

# 多肽疫苗生产及质控技术指导原则

二 00 五年十月

# 多肽疫苗生产及质控技术指导原则

## 前 言

多肽疫苗是按照病原体抗原基因中已知或预测的某段抗原表位的氨基酸序列，通过化学合成技术制备的疫苗。传统疫苗一般由两种方式制备，一种为能诱发免疫力却不致病的减毒疫苗，例如黄热病、脊髓灰质炎和麻疹疫苗或卡介苗；另一种为灭活疫苗（例如百日咳杆菌、狂犬病毒、伤寒杆菌）。多肽疫苗由于完全是合成的，不存在毒力回升或灭活不全的问题。特别是一些还不能通过体外培养方式获得足够量的抗原的微生物病原体。有些虽能进行体外培养，但这些病原体有潜在致病性和免疫病理作用等涉及安全性与有效性的问题。多肽作为体内引起效应细胞免疫应答形成的免疫原，将成为一种新型的疫苗，但还有很多理论和技术问题要继续研究，目前尚无多肽疫苗获准上市。因此，应采取适当可行的途径对这种潜能疫苗进行生产及质控，并在其生产过程中积累经验，为此，应加强咨询和论证，以便提出一个确保安全有效而又适合实际的申报资料。同时，对每个方案中各个阶段的操作过程、中间及最终产品的制备，务必制定标准操作规程和质控标准，并予严格实施。

### 一、多肽疫苗的化学合成

首先应该确定天然抗原的氨基酸序列，选择和确定寻找有效肽段的方法，并寻找该肽段所针对的抗原决定簇。

其次应选择合适的合成方法。合成中等大小的多肽也会涉及众多反应，每加入一个氨基酸需多次反应，在一个氨基酸的  $\alpha$  氨基与另一个氨基酸的羧基缩合形成肽链之前，必须使其中一个形成高反应的活化状态，这个选择自然落到羧基上，合成因而从 C 到 N 端。如果 A 氨基酸的 C 端与 B 氨基酸的 N 端缩合产生 2 肽 A—B，则 A 的 N 端及 B 的 C 端必须保护起来，才能转化成在 A—B 之间形成特异性肽的形式。此外，氨基肽的侧链基团也能与活化羧基反应，因此也必须保护起来。这些侧链保护基团必须能耐受除去  $\alpha$  氨基保护基团的条件，这样才能生成新的氨基基团使肽链得以继续延长。合成结束后必须除去所有的保护性基团以得到所需的多肽。多肽的合成循环包括了一系列的反应，每一循环生成一个新肽键。

主要有两个合成策略：片段浓缩法和固相合成法（merrifield法）。片段浓缩法是经典的合成技术。首先合成数条小肽，经纯化和去保护后结合成较长的肽，直到最后所需的序列。

在固相合成法是将肽链一端结合于固相载体上的方法。通过在N-末端逐步加上氨基酸的方法合成肽段。

另外也引入一些新进展包括改良的保护基因、新的固相载体、脱保护及侧链功基保护等新方法。在疫苗合成领域中，由于肽链联接或装配到需要的结构（TADPs）及免疫原性构架（MAPs）所用技术的引进，加上肽链经脂质或碳水化合物的修饰作用，使得合成问题变得更加复杂。目前多应用固相法，特别是在选择和确定有效抗原表位研究方面，是合成多肽疫苗的一条可供选择的途径。

## 二、多肽疫苗的生产工艺及质控

（一）应提供研制某一疫苗的详细资料，包括选择特定抗原决定簇的理由、对抗原决定簇的检定，以及对载体、表位连接、结合剂、肽的呈递方式及佐剂等的选择理由及其相应证据。

（二）应说明每条肽段所针对的抗原表位。内容包括对每个表位来源的说明，当不止一个表位时，应说明把不同表位相互结合到一个已知序列内的理由，此外还应对表位的类型（B、Th、Tc等）及特殊组合方式进行说明。

（三）应当提供肽链合成的详细资料。内容包括：原料的来源和特性、使用的方法学、氨基酸的连接和脱保护，进入下一步连接的判断标准，任何加入的修饰基团（例如糖基化，脂质化）的详细情况。如果采用了液体合成法，应当提供包括对中间体有特殊说明的流程图。

（四）如果肽单体为中间产物，应当对其分离鉴定并提供下述确证依据。

1. 主要肽顺序与预期的结构相同，例如，目标氨基酸按需要的顺序排列；修饰（脂化及糖基化）情况；

2. 对肽单体中的主要杂质（可能情况下对次要杂质）应分离鉴定。验证纯度时应采用多种技术对其理化特性尽可能多地检查，特别要注意检测生产或纯化过程中可能加入的物质；

3. 连续多批产品的肽质量应保持一致。

(五) 对肽单体或肽衍生物应建立适当的标准。对肽的纯度、总杂质、每种主要及次要杂质都应规定限度要求。

(六) 如果不能对肽单体进行全面鉴定，应提供相应说明。

(七) 应对肽的稳定性进行评价，并制定适当的贮存期。

(八) 偶联物

偶联物中多肽及其它成分除了达到适当的要求外，还应符合下列规定：

1. 对偶联物进行验证，其含量应能重复并保持一致，当不止一种肽结合到同一载体上时，应对每一种肽所占比例进行控制并能重复制备；

2. 最大限度降低副反应并控制到能重复的水平，这些副反应包括载体之间的交联，载体表面浓缩的未结合的偶联剂，以及对未参与结合的偶联剂的灭活等；

3. 有证据表明偶联物未改变抗原序列；

4. 应当考虑机体对载体蛋白或其诱导免疫反应的潜在临床影响；

5. 当同一载体用于几种疫苗或一种疫苗的几种不同表位时，应考虑特异性表位抑制的可能性，并进行调查；

6. 应当最大限度地降低残余溶剂或副产品的含量，并设定相应限定要求；

7. 应当设定适宜的可接受的标准，合适的参考制品可能是必要的。

(九) 载体

肽可以联接或结合到载体上，选择载体时应谨慎，因为对载体的免疫应答可能会掩蔽对肽的免疫应答。目标人群中的一部分可能对某一载体存在过敏反应或某些载体有刺激自身免疫的危险，应避免选择这些载体。载体应有自己的档案材料及相应标准，它包括：载体的鉴定，生产一致性的证据，蛋白质的安全性以及与蛋白质、脂多糖、多聚体、脂质体等相关的一些特征试验。例如，聚合体和脂多糖应当具有可重复的分子量范围，脂多糖具有一致的单糖组分，脂质体具有一致的结构、组分。对不同成分及杂质应鉴别定性并加以定量测定，对于生物来源的载体应当采取措施，确保检测不出感染因子。

(十) 聚合、烷化或载体合成肽

无论是与聚合肽构架（例如 MAP）结合的肽，或肽单体合成后再进一步形成的聚合肽或烷化肽（例如，通过末端半胱氨酸的氧化作用），也无论是单一

肽链或与其它肽链的聚合，都应有相应的证据，表明反应过程达到了最后可重复的阶段。

（十一）佐剂、防腐剂及其他添加成分为方便操作、增强稳定性、延长保存期以及修饰免疫原的类型和免疫原性，原则上可在免疫原中选择添加许多成分。这些成分其特性变化较大，从小分子物质到大分子菌体成分及合成聚合物等各不相同，有作为非特异免疫增强剂的成分，特异性免疫激活作用的成分及直接作用于不同免疫细胞的成分。其中许多会产生自身的毒性，而且可能因与抗原联合使用而显著改变免疫反应，从而引起安全性方面的其它顾虑。传统佐剂是在矿物胶基础上制成-氢氧化铝、磷酸铝或磷酸钙，到目前为止批准使用的佐剂鲜为他类。对已获批准的以铝盐及钙盐为基础的佐剂，其标准应达到药用等级（不含重金属离子，质量恒定，具有恒定的结合特征）。由于灭菌可能会改变佐剂的结合特征，对不同批次佐剂应以可重复、持续的方式处理。对于添加剂，应提供所有成分的明确说明，阐述使用的理由。每种成分应具有适当的分析标准要求，终配方中应限定不同成分混合物的含量。此外，应全面评价配方的抗原及毒性特征，特别注意不同成分的混合可能会导致抗原发生不良的修饰作用。

如果在疫苗中加入防腐剂，应确定其含量，该用量应既不对疫苗中的各个成分产生不良作用，也不应引起人体副反应。单剂量制剂不应添加防腐剂。

#### （十二）稳定性

进行充分的稳定性研究是研制疫苗的一项重要内容。因此应确定配方的稳定性，并以此建立合适贮存条件下的最大货架期。为确保每种成分的有效性，应对到期产品的免疫原性及安全性进行实时稳定性研究。

### 三、产品的质量与检定要求

保证多肽制品的一致性极其重要，应广泛使用分析技术。应对疫苗生产工艺的各个环节和步骤的各种成分（无论以单独或偶联方式）均应建立相应的监控标准，包括原材料质控，加工过程的质控和终产品的质控，以保证终产品安全有效。

除应符合常规的安全试验（如无菌、热原试验及异常毒性试验），针对合成多肽的特点应考虑：

(一) 纯度：高效液相色谱 (HPLC)、毛细管电泳 (CE)、阳离子或阴离子色谱、等电聚焦，依据分子大小的鉴别技术 (分子筛层析，还原、非还原 SDS-PAGE 电泳)，根据疏水性的鉴别技术 (反相或疏水作用层析) 等相应分析的技术。

(二) 理化性质均一性的确定：氨基酸序列分析 (N/C 末端)、肽图、MS 以及氨基酸组成 (AAA) 分析。

(三) 产品相关的杂质

(四) 与生产过程相关的杂质

(五) 人为修饰的检测

(六) 效力试验

效力试验并非一定反映出在人体内的作用机制或功能活动。但是在合适情况下应包括有关疫苗功能的适宜试验。效力试验的主要目的是通过测定生物活性的方法，确认各批之间的一致性。因此应考虑活体外及活体内免疫性和抗原性测定试验。这种试验应将制品同时与参考品做比较，而且试验结果经过统计学检验。由于疫苗的作用模式会改变，有关这类试验的细节应区别对待，不能一概而论。但是应确定试验结果的可信限，以便确定方法本身固有的变异，为每批制品的平均值提供一个可信限幅度，并由此确定接受的标准及限值，为此应建立适宜的参考制剂。

(七) 生物效价测定

(八) 建立内部参考品：建立适当的参考品对实现这些标准也是必要的。此外，选取合适的一批中间产品及终产品 (最好是选择经过临床评价的制品)，就其化学成分、纯度及生物学活性进行全面检定，而后保存下来作为化学或生物参考品，可依此制定每批产品的标准要求。

(九) 佐剂、保护剂及其他添加成分：如果使用铝或钙的化合物作为佐剂，其用量不应超过常规用量范围 (每人用剂量的铝佐剂含量应不超过 1.25mg，钙佐剂含量应不超过 1.3mg)。对保护剂及其他添加剂应确定相应的质量控制标准。

#### 四、临床前安全评价

临床前安全评价的主要目的是确定新药制品是否引起意外或不良的效应。

但推荐供化学药使用的临床安全及毒性试验对于合成肽疫苗不甚相关。动物毒性试验会产生种属特异性方面的问题，因此，多肽疫苗的安全评价应考虑诸多因素。有必要采取灵活的方法评价合成肽疫苗的临床前安全性，应当充分考虑使用合成肽疫苗所产生不良免疫病理反应的各种可能性。

必须确保使用的肽序列不具有明显的不良药理活性。因此，应筛查单体肽固有的毒性或药理作用。也应考虑由聚合或偶合而产生的作用的可能性。一种多肽可能有意想不到的次要活性，而这一活性可能会由于上述反应而得到放大并产生危害。因此，应全面检查多肽及其偶合物的药理活性。

抗肽抗体可能与人体组织产生意想不到的交叉反应，也可引发自身免疫反应。因此，应使用人体组织测定疫苗的最后配方及佐剂是否产生意外的交叉抗体。偶合或聚合反应能产生新的表位，而仅仅评价肽单体不能解决该问题。毫无疑问安全试验是必要的，但选择何种试验则应依靠实际情况而定，并应咨询有关质控当局。对于临床前安全性试验，应广泛使用生物学、生物化学、免疫学、毒理学及组织病理学等适当的研究技术，在适当的情况下，可采用多个相关剂量并包括急性及慢性试验。