

预防用疫苗临床前研究技术指导原则

前 言

由病毒、细菌或其他病原微生物为起始材料，经培养增殖等制成的减毒、灭活的病原体，或再经分离、提取等方法制备的富含免疫原性组份（亚单位），免疫机体后可诱导产生特异性免疫应答而达到预防某种疾病的产品，为预防用疫苗。

本指导原则仅适用于采用传统方法（灭活、减毒、分离提取）制备的预防用疫苗，目的是为该类制品的临床前研究提供应遵循的原则。

一、基本原则

- （一）应符合国家《药品管理法》等相关法律法规的要求；
- （二）应对所预防的疾病的流行情况进行分析，包括疾病的危害程度，所涉及的人群特点，病原体的分型及流行趋势等；
- （三）应对疫苗的有效性、安全性及必要性进行分析；
- （四）评估疫苗接种的风险与效益，并提出拟采取避免或减少其危害性或不良反应的措施。

二、用于疫苗生产的菌毒种

疫苗生产用菌毒种必须证明为引起相应疾病的细菌、病毒或其他病原体，如该菌毒株分离自人体，应明确提供以下信息：

（一）菌毒株名称及来源

- 1. 菌毒株名称。
- 2. 菌毒株来源：
 - （1）菌毒株来源的宿主一般情况。
 - （2）发病地点、发病日期；临床确诊疾病名称及日期、实验室确诊的主要依据、检测项目、结果及日期；病人病程及转归。
- 3. 菌毒株分离样本来源：咽拭子、漱口液、痰液、血液、粪便、尿液、组织标本。取样日期；取样时病人的病期。应提供病人治疗期间使用的主要药物包括抗生素、抗病毒药物的剂量和疗程等资料。鉴于人类的血液、脑脊液等在同一时间内相对较少感染多种病毒或细菌，因此用病人血液等分离的菌、毒株较适宜用于疫苗的研发和生产。

其他来源分离的菌、毒株的自然样本参照上述要求提供相应资料。

（二）菌、毒株分离过程

- 1. 病毒分离用细胞名称、代次、来源应清楚，应进行无菌、支原体和外源因子等检测；病毒分离不得使用肿瘤原性的细胞系，应使用非肿瘤原性细胞，如原代细胞、人二倍体细胞或 Vero 细胞等。
- 2. 病毒分离用动物名称、品系、级别、年龄、接种途径、饲养条件和制备毒种的动物脏器名称等需详细记载；如再适应到细胞，应参照上述对病毒分离用细胞的要求。
- 3. 菌毒株分离用培养基名称、种类，以及分离培养的温度和条件需确定。

（三）菌、毒株分离传代特性

应包括样品处理方法、确证菌毒株首次阳性的代次、菌毒株检定方法、每代培养条件、滴度、滴定方法、动物是否发病或死亡等资料。

（四）菌毒种库的建立和保存

原始种子批是指已适应到可生产疫苗的细胞或培养基，可稳定传代、具有良好的免疫原性、并经过检定可用于疫苗生产的菌毒种。应提供原始菌毒种代次、滴度，添加的保护剂的名称和浓度、存储条件等资料。种子批的建立应符合现行版《中国药典》“生物制品制品生产检定用菌毒种管理规程”的要求，应对种子批进行菌毒种的传代和限定代次的研究，以证明主种子和工作种子批在规定代次内的生物学特性与原始菌毒种的一致性。

1. 应提供候选菌毒种研究资料

在建立原始菌毒种库前应考虑候选菌毒种的研究：包括收集不同地区的（不同地域、发病率和民族）、不同时期的（近年与往年）、不同年龄和性别、疾病不同症状或严重程度、不同样本采集方式或来源（如血液、脑脊液、咽拭子、漱口液、痰液、尿液、粪便等）的至少 10 个以上菌毒株进行生物学等研究和比较，分析其异同点，为建立菌毒种库提供依据。

2. 三级种子库建立的研究资料

选择由多个候选菌毒种筛选获得的有代表性的 2-3 株菌毒种，用适宜的方法进行毒株的纯化，如空斑形成试验，挑取遗传稳定性与原始种子一致的，至少在主要保护区域核苷酸及氨基酸序列一致的毒株。同时进行三级种子批建立和工艺适应性、免疫原性和免疫效果比较研究。分析在种子批建立传代过程中不同菌毒种的遗传稳定性、病毒滴度及免疫原性资料；比对不同菌毒种对发酵、培养、收获、纯化等生产工艺和灭活工艺的适应性；考核不同菌毒种的免疫原性和免疫效果；对不同菌毒种的交叉保护水平和能力进行比较研究，确定交叉保护范围广、诱导免疫应答能力强的毒株。通过以上研究结合疫苗配方探讨，综合判断、确定应用于疫苗生产的最佳菌毒株。

原始种子、主种子、工作种子及疫苗代次的毒株遗传稳定性应保持一致。

（五）菌毒种的检定

1. 鉴别试验：可采用血清学、生物学、核酸序列分析等方法证明为该菌毒种。明确该病原体及其它相关生物分子的基因序列及结构，并与我国主要流行株的核苷酸和氨基酸同源性进行分析以及明确其血清型、亚型和/或基因型，对该种基因型或血清型的流行情况进行分析，若存在不同的血清型或基因型，应对所选择的血清型或基因型与其它血清型或基因型交叉反应或交叉保护性进行分析和研究。对某些病原体，即使菌毒株为同一基因型或同一血清型，也应对不同菌毒株的抗原性、免疫原性以及交叉保护能力进行比较。

2. 纯菌检查：按照现行版《中国药典》的要求进行，应符合规定。

3. 外源因子检查：按照现行版《中国药典》的相关要求进行，应符合规定。

4. 感染性滴度：应能达到按生产工艺要求顺利生产合格疫苗的要求。应建立测定菌毒种感染性滴度的方法和标准，并提供这些感染性滴度与疫苗有效性之间的相关性数据。

5. 免疫原性检查：菌毒种的免疫原性是衡量该疫苗是否有效的重要指标，应制定和建立测定菌毒种免疫原性的有效方法和标准，以评估该候选菌毒种能否进行疫苗生产。

6. 减毒特性

(1) 如研制减毒活疫苗应对原始菌毒株的生物学、血清型、基因型和免疫原性进行研究；应提供减毒方法、减毒过程、减毒程度和减毒后的生物学、血清型、基因型和免疫原性及减毒稳定性资料，并进行减毒前后的特性对比，尤其要对减毒后的安全性和免疫原性做出确切的结论。

(2) 应建立减毒特性指标的验证方法、动物模型和减毒后安全性的标准以及检测方法和警戒毒力回复的依据等。

(3) 注射剂的减毒活疫苗，除一般的外源因子检测外，还应验证无逆转录病毒的污染。该验证方法可采用 PERT 法等。

(4) 如已知该病毒具有嗜神经毒性，其验证要求可参考《IABSScientificworkshoponneurovirulencetestforlivevirusvaccines, WHO, 31January2005》。

三、疫苗的生产工艺研究

(一) 生产用菌毒种批的遗传稳定性分析

确定工作种子批和疫苗代次的菌毒株主要保护区域核苷酸及氨基酸序列在传代过程中发生改变的频率。生产用菌毒种、细胞和涉及生产的工艺技术应注意专利，应进行相关专利查询。

(二) 生产用细胞和/或培养基

1. 生产用细胞应符合现行版《中国药典》中“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及检定规程”的要求，除原代细胞外，采用其他细胞系应建立细胞库。

2. 生产用培养基尽可能避免使用动物来源和可能引起人体不良反应的原材料，禁止使用来自疯牛病疫区的牛源性原材料。

(三) 疫苗生产工艺的研究

生产工艺需进行验证。对疫苗生产中菌毒种代次、菌毒种接种量、收获次数、灭活工艺及验证、半成品配制、分批等要求，应按现行版《中国药典》执行。

1. 原液生产的主要技术参数的确定

(1) 病毒与细胞的接种比例或者 MOI 的最佳参数、细胞培养和病毒培养的最佳温度、培养时间和收获时间等条件。菌毒种的接种量、培养和发酵条件等技术参数。

(2) 灭活剂的选择和依据。

(3) 灭活、裂解、减毒或脱毒效果的验证。效果验证的依据、方法，应采用尽可能敏感的细胞或培养基和方法进行。

(4) 原液的浓缩和/或活性抗原的提取纯化等工艺研究：应对纯化和提取工艺中各种条件进行优化，确定纯化和提取工艺对抗原活性成分是否影响；应建立稳定的纯化工艺，包括纯化时的回收率、抗原活性和纯度等的稳定性，并制定相应的质控指标和检测方法。

(5) 初步确定起始投料、原液、半成品和成品的产出比的数据。

2. 对佐剂的要求

新型疫苗应用的佐剂包括 3 类：分别为目前常用的铝佐剂；批准用于某些疫苗的佐剂如 MF59 等；新开发研制尚未用于疫苗特别是预防性疫苗的佐剂如 CpG 等。一般情况下，抗原量及免疫原性能满足免疫保护的需要，则不使用佐剂为宜。

(1) 是否选择铝佐剂, 应根据疫苗抗原的免疫原性、抗原与佐剂最优配比等综合考虑。应注意不同种类抗原与铝佐剂制备疫苗后, 铝佐剂对抗原的免疫增强作用可能有所差异, 甚至不同制备批的铝佐剂之间也有不同。

(2) 对其他已经批准用于上市疫苗的佐剂, 只须提供该类制剂的组分或化学组成, 国内外使用该类制剂的情况, 无需对该佐剂再单独进行毒理和安全性研究, 但应对疫苗成品进行严格的安全性研究, 获得新型疫苗中佐剂的安全性资料。

(3) 若国内外均未使用过该类佐剂, 则必须对其作用原理、安全性及佐剂效应进行详细的研究并建立切实可行的评价方法。

(四) 疫苗的配方研究

应对疫苗的配方进行研究, 如疫苗中添加的稳定剂、缓冲液、以及赋形剂等是否对疫苗的免疫原性和安全性造成影响。

四、药理、毒理和生物分布

疫苗不同于一般的化学药品, 药理、毒理的试验要求具有特殊性。由于各项药理、毒理试验是互相关联的, 因此在试验和评价时应综合考虑相关的因素。

药理学试验主要包括疫苗的作用机理和免疫原性。应建立适当的试验方法评价疫苗的免疫原性。如果有动物模型或可建立动物模型, 可以采用动物模型直接评价疫苗的免疫原性。对一些有动物模型的感染性疾病, 可以采用病原体的攻击试验评价该疫苗的保护效果。若无法建立动物模型, 应建立能验证该疫苗有效性的体外试验进行评价。应考察接种的剂量与免疫原性的关系, 通过试验优化免疫程序和接种途径。

疫苗的动物长期毒性试验及毒理学试验应选用相关种属或品系的动物进行, 至少选择一种相关动物进行毒性试验。试验内容主要包括重复给药毒性试验、急性毒性试验、局部刺激性试验等, 必要时还应包括生殖毒性试验。接种剂量原则上应使疫苗在动物体内达到最佳的免疫应答。疫苗的动物长期毒性试验不需要每日给药, 接种次数建议至少比临床拟定的接种次数多 1 次, 一般采取 2~3 周的暴露间隔。试验应考察接种部位和全身的病理反应, 应尽可能进行疫苗的免疫原性试验, 包括血清中和抗体效价或其它与免疫应答有关的研究, 重点考察疫苗诱导的免疫毒性作用, 需关注对疫苗诱导的保护性细胞因子和与毒性有关的炎症因子的检测和分析。

疫苗通常不需要进行药代动力学研究。必要时, 应建立敏感的动物模型考察减毒活疫苗的生物分布, 测定接种疫苗后的病毒血症(或菌血症)以及持续时间、排毒(菌)方式和途径, 对是否呈现体内复制及器官组织的感染应进行研究。

五、质量控制要求

在生产工艺的各个环节和步骤中的产品均应建立相应的监控标准, 以便后续工艺的顺利进行, 保证产品的质量、工艺的稳定性。应在研发阶段建立疫苗的质控标准和参考品, 应建立并验证纯度、杂质残留、抗原、抗体、生物效力的定量检测方法; 单剂疫苗不应添加含汞防腐剂。疫苗生产在培养阶段不得添加抗生素。对种子培养阶段添加抗生素的应按现行版《中国药典》的标准执行。

1. 工作种子批毒种制备阶段应重点关注其遗传稳定性, 建立鉴别试验、病毒滴度检查、毒株免疫原性试验的方法和标准。

2. 对纯化工艺应重点关注其纯化产物、原液的抗原纯度，建立用于评价纯化产物所含有有效成分的最低限量和杂质的最高限量方法，通常可测定有效抗原在疫苗中的绝对值或测定主要杂质的量推算有效抗原在疫苗中的相对值。采用人二倍体细胞以外的细胞生产的，应建立用于评价纯化产物、原液中宿主细胞 DNA 和蛋白残留量的方法。对生产过程中使用灭活剂的疫苗，应建立有效的灭活方法，对灭活效果进行验证；建立用于评价纯化产物、原液、成品中灭活剂残留量检测的方法。建立上述检测方法时应建立相应的标准品，并按药典中有关方法学验证指南对方法、试剂、标准品的敏感性和特异性等进行验证，并制定相应的限量范围，以达到控制生产批间的一致性和产品质量稳定性的目的。

3. 申报疫苗的质量标准不得低于现行版《中国药典》和 WHO 相关指南的要求。对于能够定量检测的安全性、有效性的指标，其质量标准应根据多批（有统计学意义的）产品，多次测定的试验数据，经统计学分析后拟定，计算均值和标准差，应综合考虑方法学的变异情况，确定合理的上下限要求，一般均值加减不得高于 2.58 个标准差作为上下限。

4. 在半成品和成品阶段的质量控制至少包括：

（1）鉴别试验、装量。

（2）化学指标：pH 值，佐剂、灭活剂以及其他残留有机溶剂。

（3）无菌检查、异常毒性、热原或细菌内毒素检查。

（4）生物效价：应建立体内或体外检测方法和标准。体内效力试验一般采用小鼠 ED₅₀ 的方法。由于用于预防的疫苗是通过机体的免疫应答反应发生作用的，因此应评价其体液免疫和细胞免疫水平。在评价体液免疫效价时，应选择实验动物的品系，建立检测动物血清抗体的检测方法，并对该类方法进行验证，可以计算小鼠 ED₅₀ 以及抗体滴度，如有必要和可行，还应当建立评价抗体质量的方法，对抗体的性质进行评价，如亚型测定及抗原中和位点分析等；在评价细胞免疫效价时，可建立检测评价细胞免疫的方法（如 Elispot 方法等），也可通过对细胞因子的定量检测评价其细胞免疫情况，如属于常规检定项目，方法应稳定、重复性好、可操作性强，并制定相应的质量标准。若有动物模型，可进行动物保护性试验。

（5）抗生素：按现行版《中国药典》的相关要求执行。

5. 疫苗标准品或参考品的研究：应在疫苗研发阶段考虑研究、建立稳定工艺后的疫苗抗原参考品，以及疫苗效力、免疫原性检测的标准品或参考品。疫苗抗原参考品与其后生产多批次疫苗的质量控制指标的比对，可了解在上市后生产的疫苗抗原较研发阶段的抗原在质量上有无改变。疫苗效力、免疫原性检测的标准品或参考品可用于疫苗效力指标的质量控制。

六、稳定性试验

稳定性试验是指疫苗在规定保存温度下的稳定性试验。由于稳定性试验的结果直接与制品的效期有关，且试验观察时间较长，因此应在生产工艺确定后尽早留样进行，定期取样测定制品效力和其他相关的质量指标。对稳定性试验结果与加速稳定性试验数据进行分析对比，可为正式产品的有效期确定提供依据。

七、疫苗剂量和免疫程序的研究

应依据动物试验中不同接种剂量、不同剂次的抗体阳性率、应答水平等免

疫原性指标，结合疫苗目标人群感染前后、一般健康人群的抗体阳性率和水平等流行病学资料，综合拟定疫苗申报临床的剂量和程序。

八、临床研究用样品要求

（一）申请临床试验用的疫苗和对照品，按照国家 GMP 的要求, 在符合现行中国药品 GMP 的条件下生产；

（二）临床试验用疫苗样品应与临床前研究用质量相同, 其批量一般不少于 1000 人份，并能满足临床试验对疫苗数量的要求；

（三）进行临床试验的疫苗和对照品必须由中国药品生物制品检定所进行质量复核；

（四）I 期和 II 期临床试验后，可以根据结果对生产工艺、质量指标等进行调整；III 期临床试验用样品的生产工艺、质量指标及生产规模和场地，原则上应与疫苗批准上市后的一致。