

预防用 DNA 疫苗临床前研究技术指导原则

二 00 三年三月

预防用 DNA 疫苗临床前研究技术指导原则

一、前言

DNA 疫苗是将外源目的基因片段构建在 DNA 质粒中，重组后的 DNA 导入机体后可表达目的蛋白，目的蛋白刺激机体产生特异性免疫学反应而达到预防某种疾病的生物制剂。该指导原则适用于以 DNA 质粒为载体的预防用制品。其目的是为该类制剂提供一个共同的原则，具体的方案应根据这些原则，确定具体的申报内容。其基本原则是：安全有效，质量可控，同时应鼓励创新，促进 DNA 疫苗的研究。对一些新的技术路线要建立相应的质控要求，可有一定的灵活性，应注意到 DNA 疫苗只是处于研究的初级阶段，而且与常规生物制品相比有其本身的特点，需要不断的积累经验。为此，申请者应加强咨询和论证，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，务必制订标准操作规程及质控标准，并予严格实施。

二、DNA 疫苗构建的基本要求

（一）国内外研究现状、立题依据和目的及预期效果：

1. 应了解所预防疾病的流行情况、疾病的危害程度等；包括国内及国外对该类疾病的预防和治疗手段。

2. 应了解国内外同类产品研究和开发等情况，其中包括所用的 DNA 载体、目的基因片段、简单的生产工艺、临床前试验和临床试验的结果及进展，以及该产品所面临的主要问题。

3. 对研制该类 DNA 制品用于预防疾病的有效性、安全性及必要性进行分析。

4. 应对该方案与国内外已批准的或正在进行的方案的不同之处、特点及其优越性等进行分析。凡属新的方案，应提供其优越性及安全性的依据。

5. 利益风险比。根据该预防方案可能达到的效果及可能出现的副作用或危害，对总体的利弊权衡进行评价，并提出拟采取避免或减少其危害性或副作用的措施。这种评价将是该方案能否获得批准的重要依据之一。

（二）DNA 载体及宿主菌

1. 测定 DNA 载体的全长核苷酸序列，以及与已知人类基因的同源性比较和分析。

2. 对 DNA 载体的控制元件和选择标记的序列与来源，如：真核启动子、增强子、终止序列、抗生素抗性标记等进行分析。建议避免使用抗青霉素或其它耐药基因，最好使用无抗性标记的 DNA 载体，若需要抗性标记，则可使用抗卡那霉素或新霉素的抗性标记。

3. 对 DNA 载体的安全性进行研究和分析，尤其对病毒性启动子、哺乳动物细胞或病毒终止子的安全性进行研究分析。若使用非常用性或特殊的控制元件，应提供其安全性、对基因产物表达的影响以及其利弊权衡等进行分析。

4. 明确宿主菌的基因型、原型、细菌的来源以及制备克隆菌群的方法步骤和所用实验材料。

（三）目的基因

1. 明确目的基因来源的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、基因型和亚型，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。

2. 对目的基因的序列、大小、来源以及表达产物的预计大小进行分析；明确目的基因选择的依据以及其表达蛋白在预防中的作用。

3. 若对目的基因进行了修饰，应对其修饰后的基因序列以及修饰后基因与人类已知基因序列的同源性进行分析。若在表达的目的重组蛋白以外有其它氨基酸寡肽同时表达时，应对寡肽的作用和选择的依据进行分析。并对基因修饰或重组的利弊权衡进行分析。

（四）重组质粒的构建过程

1. 提供重组体质粒构建的详细步骤及每一步的鉴定及确证方法。

2. 重组质粒库：构建完成后应建立重组质粒库，对重组质粒应进行全基因序列分析，尤其对 DNA 载体的控制元件和选择标记基因有无变异进行分析。对插入的目的基因序列进行分析，检查有无变异。

3. 应当对重组质粒的转化、扩增及纯化条件进行优化。对重组质粒库中质粒的浓度、含量等进行分析。对重组质粒的保存条件以及稳定性进行研究。

（五）表达产物的鉴定

1. 将重组质粒转化合适的哺乳动物细胞，对转化条件进行优化。
2. 建立对表达产物的分析方法，包括表达产物的大小、特征等。
3. 建立对表达产物的免疫学反应的特征进行分析的方法。

三、DNA 疫苗的生产工艺

（一）建立菌种库：对转化大肠杆菌的条件进行优化。建立原始种子库。对种子库的遗传稳定性进行分析，要明确该种子库可以传代的次数。在此基础上建立主细胞库和工作细胞库，并应保证该类细胞库无噬菌体和其它外源因子的污染；并对细菌的遗传背景进行分析和检测，保证细胞库中细菌的遗传背景包括染色体组型、表型未发生改变；应检测细菌的形态学，保证细菌的均一性；应检测导入基因的存在状态。并对工作细胞库的规模、保存条件、扩增条件、传代过程中质粒的稳定性（拷贝数及表达量）、允许的传代次数等进行研究。

（二）对工作细胞库扩增的条件进行优化，并制定相应的质控指标。

（三）应对 DNA 制备与纯化工艺中各种条件进行优化，建立稳定的纯化工艺，并制定相应的质控指标，而且为进行临床试验，应建立符合 GMP 要求的生产的环境。

（四）对佐剂或呈递物质的要求

如果在重组 DNA 终制品中使用佐剂或呈递物质，则对以下问题进行研究或提供相关材料：

1. 对于已经明确有佐剂效应或者已经商品化的佐剂和呈递物质，只需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，无需再进行毒理和安全性研究。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。

2. 对该类制剂的制备工艺进行优化，若使用脂质体或多肽类物质时，由于脂质体的形成及多肽类合成过程的随机性，不可能达到一般化学合成物的

均一性及纯度，为此应对不同批号间保证安全有效的可以达到的最大均一性的程度进行研究，并制定可以接受的质量标准。

3. 若该类制剂需与重组 DNA 制品结合，则应对结合工艺进行优化，建立检测结合率、结合均一性的方法，并制定结合标准。

（五）若与调节免疫反应的因子等同时表达，则应对这类分子进行详细的分析，包括因子的大小、表达量及免疫学反应等。若这种因子未批准上市，则应对这类分子进行单独的药理和毒理学研究。

四、药理、毒理和生物分布

该类制品不同于一般的化学药品，药理、毒理和药代动力学的实验要求具有特殊性，因此，该制品的药理学实验主要包括发生作用的原理、生物效价与剂量的关系、免疫程序和接种途径与效果的关系等；在毒理学方面主要考虑接种部位的病理反应、机体产生的抗核酸抗体反应、基因整合和必要时的致瘤性分析等；药代动力学主要包括重组 DNA 的分布、持续时间等。申报时应完成药理、毒理和药代动力学的研究，并提供实验资料。由于以上各方面是互相关联的，因此，将药理、毒理和药代动力学有关内容联系在一起进行描述。

（一）免疫原性或生物效价的评价

应建立适当的实验及检测方法来评价该类制品的免疫原性或生物效价，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该类制剂的生物效价，如：对一些有动物模型的感染性疾病，可以采用病毒的攻击实验来评价该类制剂的保护效果。而且要建立剂量与生物效价的关系，通过实验优化免疫程序和接种途径。

（二）持久性、耐受性以及生物分布的评价

由于抗原在机体内长期表达可能诱发机体的免疫耐受或产生自身免疫反应，应对抗原在机体中的表达持续时间进行动力学分析。

由于重组 DNA 接种到人体以后，机体可能诱发产生抗核酸的抗体，应建立检测抗核酸抗体的检测方法，并对机体产生该类抗体的情况进行分析。

如果整合到人体基因，可能造成人体基因的断列或重排而诱发染色体的不稳定性，从而可能产生遗传毒性或致瘤反应，因此，在临床前研究中应对基因整合的可能性进行分析，最好在猴体内进行实验，建立检测基因整合的方法，对重组 DNA 在接种部位组织及其它组织、器官的分布进行检测分析；对重

组 DNA 在分布的组织 and 器官中持续时间进行追踪检测分析；在分布的组织及器官中是否发生整合进行检测；在该类研究中尤其注意重组 DNA 制品在生殖腺中是否有分布和整合。

如果实验证明重组 DNA 分布于大部分组织或器官，而且有足够的证据证明是否发生整合作用，或者该类制品将长期用于控制或预防非致命性疾病时，应对该类制品的致瘤性进行研究。尤其在重组 DNA 中有与人基因同源性很高的序列或有已知的潜在的致瘤性基因序列时，更应进行致瘤性分析，应建立检测方法，可以采用细胞或裸鼠的方法。

五、质量控制及检定的要求

（一）生产过程中质量监控标准的建立及要求

在生产工艺的各个环节和步骤中对其产品均应建立相应的监控标准，以便后续工艺的进行。由于各申报者所选择的工艺不同，所制定的监控标准和在何步骤进行监控可能不同，但其原则是保证产品的质量、工艺的连续性和稳定性。

（二）产品的质量检定与要求

1. 外观检查，根据样品的特征建立外观的质量标准。
2. pH 值检测，可根据一般生物制品的要求建立标准，一般为 7.2 ± 0.5 。
3. DNA 含量的检测，应建立检测含量的方法，其实测值应与制品的标示量相符。
4. 纯度，主要是评价纯化的重组 DNA 制品中是否含有宿主 RNA、DNA 和蛋白的污染。

一般采用琼脂糖凝胶电泳的方法检测制品中是否有 RNA，要求无明显的 RNA 带型；一般采用 Northernblot 的方法检测制品中残留的宿主 DNA 的含量，在该方法的研究时应建立宿主 DNA 的标准品，并对该类试剂的敏感性和特异性进行验证。要求 DNA 制品中残余的宿主 DNA 含量不超过 $0.002\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ，每个人用剂量不超过 5mg。

可以采用酶联免疫法（ELISA）或氨基酸分析法检测制品中宿主蛋白的残余量，在该方法的研究过程中应建立宿主蛋白的定量标准，并对检测方法的

敏感性和特异性进行验证，其性能能满足该实验的要求。宿主蛋白的含量应不超过 0.001ug/ug，每个人用剂量不超过 5ug。

可以检测样品在波长为 260nm 和 280nm 的紫外吸收值，并计算 A260/A280 的比值，评价制品的总体纯度，要求其比值在 1.75 以上。

5. 质粒大小的均一性和结构的分析：主要是分析超螺旋结构与线性和松弛性质粒的比例，一般采用琼脂糖凝胶电泳的方法对制品进行电泳分析，并用扫描仪对电泳结果进行扫描，分析各带型所占的比例，一般要求环状结构的重组质粒所占的比例在 90%以上。

6. 鉴别实验：主要是对重组质粒的特征以及是否含有正确的插入片段进行分析。至少用三对以上限制性内切酶对重组质粒进行酶切，对酶切产物分别进行电泳分析，观察是否有特征性的带型；用 PCR 方法对插入片段进行扩增或用特征性的酶切方法分析插入的基因片段的大小是否与预计的大小一致。

7. 体外效力实验：体外转染哺乳动物细胞，检测其表达量，需建立定量检测表达抗原的方法以及表达抗原的定量标准，并对该检测方法的敏感性以及定量的准确性进行验证；还应检测表达抗原的图谱，其各表达目的抗原的大小应与预计大小相同，应建立相应的方法并进行验证。制定各表达抗原的量和图谱的质量控制标准。

8. 无菌实验：应检测需氧菌、厌氧菌以及支原体等，制品中应无该类微生物的污染。

9. 热原实验：主要检测制品中是否有热原物质，可用鲎试剂检测细菌的内毒素，要求内毒素的含量不高于 0.01EU/ug；每个人用剂量不超过 20EU，也可以用其它方法检测制品的热源。

10. 抗生素及其它添加物质残余量的检测

由于 DNA 载体一般使用抗菌素的选择性标记，重组 DNA 的研制和制备过程中采用含抗菌素的选择性培养基进行培养，在纯化制品中对抗菌素的含量应进行限制，因此，应建立检测抗菌素的检测方法并制定抗生素残留量的要求。

在重组 DNA 的培养和纯化工艺中，可能需要一些其它物质或基质，如纯化工艺中可能需要乙醇，这些物质可能对人体有潜在的危害，应在纯化制品中限制其含量，因此，应建立检测方法并制定残留量的标准。

11. 安全性实验：该实验是控制该类制品质量的重要指标，由于该制品的与一般生物制品相比又有其特殊性，因此，在安全性方面除了考虑一般的安全性实验，还应考虑该制品的特异性安全性。

一般性安全实验：主要用小鼠和豚鼠进行实验，一般小鼠腹腔接种一个人用剂量，豚鼠接种 5 个人用剂量。

12. 稳定性实验：由于 DNA 超螺旋结构的不稳定性，而且超螺旋结构的比例多少可能影响重组 DNA 的转染率，因此，在该类制品的稳定性实验中应主要考虑超螺旋结构的稳定性。应建立检测超螺旋质粒稳定性的实验方法，并建立相应的质量标准。

13. 生物效价：由于用于预防的 DNA 制剂所发生作用的原理不同，评价其生物效价的方法也不同。

如果 DNA 制剂是通过免疫反应发生作用的，则应评价其体液免疫和细胞免疫的生物效价。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诊断试剂，并对该类试剂进行验证，可以计算小鼠 ED₅₀ 以及抗体产生的滴度，如有必要和可行，还应当建立评价抗体质量的方法，对抗体的质进行评价；在评价细胞免疫效价时，应当建立检测评价细胞免疫的方法（如特异性 CTL 反应的方法或 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，该类方法应稳定、重复性好、可操作性强，并制定相应的质量标准。

若已有蛋白类疫苗，其评价方法应参照有关蛋白类疫苗的评价方法。

若有动物模型，可进行动物保护性实验。

14. 佐剂或呈递物质的质量评价：如在最终重组 DNA 制品含有佐剂或呈递物质，则应建立检测该类物质的量以及与重组 DNA 结合率的方法，并制定质量标准。

六、临床研究用样品要求

（一）对申请 I 期临床试验的申报者，应在 GMP 条件下至少生产一批产品，其每批产量一般不少于 1000 人份。

（二）产品必须由中国药品生物制品检定所进行质量复核。

（三）完成每期临床研究后需及时总结材料并报国家药品监督管理局申请后续的临床试验。若效果明确，可以进行 III 期临床试验。申报者应当在 GMP 和正常规模化生产的条件下生产，并由中检所进行质量复核。