

预防用以病毒为载体的活疫苗制剂的技术指导原则

二 00 三年三月

预防用以病毒为载体的活疫苗制剂的技术指导原则

一、前言

以病毒为载体的预防用活疫苗是指将外源目的基因片段构建在病毒载体中，重组后的病毒载体导入机体后可表达目的蛋白，目的蛋白通过刺激机体产生特异性免疫学反应而达到预防某种疾病的目的。该指导原则适用于以病毒为载体的预防用活疫苗制品。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，促进以病毒为载体疫苗的研究。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，应注意到以病毒为载体活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、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. 应了解所预防或治疗疾病的流行情况、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、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. 应对该方案与国外内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，对总体的利弊权衡的进行评价，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）病毒载体及宿主细胞的有关内容

1. 目前所用的病毒载体主要包括逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体以及痘苗病毒载体等。为此，应明确病毒载体的来源、结构，并进行必要的专利查询，其中包括载体 DNA 的限制性内切酶图谱。若有特殊的元件，如启动子、增强子以及 PolyA 位点等，应提供详细资料。若改变结构（如丢失片段或插入片段），须对相应片段进行测序分析。若属新的或改变结构的病毒载体，须对组建的材料、方法、组建步骤及鉴定进行详细的研究。

2. 生产用细胞：来源、传代历史以及质控的材料。包括细胞形态学、染色体组型、支原体、细菌、病毒等外源因子的检测结果。若需用其它辅助病毒，须明确来源、分离的方法步骤等。

（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）重组病毒的构建及种子细胞库的建立

1. 应对穿梭质粒与目的基因连接的详细步骤进行研究，并对构建以后的重组穿梭质粒进行检定和确证。对重组穿梭质粒的转化、扩增和纯化条件进行研究。

2. 对目的基因片段导入病毒的过程进行研究，建立切实可行的筛选和确证的方法。对含有目的基因片段的重组病毒的特征进行分析。

3. 对重组病毒的特性进行检定，必要时进行序列分析，研究必要的控制元件和选择标记基因有无变异以及对插入的目的基因序列进行分析，检查有无变异。

4. 应当对重组病毒感染细胞条件进行优化。对重组病毒的浓度、含量等进行分析。对重组的保存条件以及稳定性进行研究。应当建立重组病毒库。应对重组病毒库的外源因子进行分析。

5. 产病毒的种子细胞库的组建：由病毒载体转染包装细胞或非包装细胞所组建的能复制并产生病毒的细胞系称为产病毒细胞系，即原始种子细胞库。该原始种子细胞库的组建过程必须予以详细说明，包括材料、方法、步骤、细胞系的鉴定。其中应当包括细胞形态学、染色体组型、传代次数、稳定性、病毒滴度的检测、病毒介导目的基因的表达活性以及外源因子的检查等。

6. 复制型病毒的检测：包括方法、技术可靠性及结果

（五）对表达产物的分析

1. 将重组病毒感染合适的哺乳动物细胞，对感染条件进行优化。
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、生产工艺

（一）工作细胞库的建立及质控：须明确工作细胞扩增的方法、传代次数、倍增时间、可允许的传代次数（保持同样的病毒滴度及转导基因的活性）及工作细胞库的规模、保存条件。并对以下内容进行研究：

1. 细胞的均一性：包括细胞形态学、染色体组型、表型、导入基因的存在状态及其表达。

2. 病毒滴度

3. 转导基因的活性

4. 外源因子的检测结果

5. 复制病毒的检测 所有以上的项目在自检的基础上，均须由中国药品生物制品检定所检定或由国家药品监督管理局指定的单位检定。

（二）种子细胞培养方法和扩增的步骤进行优化，建立培养过程中的质控指标。

(三) 对重组病毒的分离、富集及纯化的工艺进行优化，并建立相应的质控指标。

(四) 对原液的稀释分装的工艺进行优化，并建立质控指标。

(五) 添加物的质控：在细胞培养、制备过程中使用血清、生长因子、抗菌素等时，应对去除该类添加物的过程及效果进行研究。并应对保存液成份应进行安全性研究。

四、制品的药理、毒理学研究

(一) 安全性试验

1. 复制型病毒的检测，应严格检查复制型病毒并制定相应的标准。

2. 特种添加物：除细胞培养及保存所用的试剂外，如使用明胶、缝线或金属粒子等其它添加物，应对此类物质进行动物安全性研究。

3. 分子遗传学的评估：应对目的基因在体内的存在状态以及分布情况进行研究。

4. 目前用于载体的病毒有疫苗株和非疫苗株，对非疫苗株应进行严格的安全性研究。

(二) 毒理反应的评估

这也是安全性试验的重要组成部分。除目的基因可能导致的毒性外，导入系统的安全性评价至为重要，其安全性评估应包括急性毒性（最大耐受量）及长期毒性试验。毒性试验所用的剂量，除包括相当于临床使用剂量（按体重或表面积计算）外，尚需有一个较大的剂量。给药途径应尽可能模拟临床给药或导入的形式。若改变途径须说明其原因及依据。毒性反应的观察，除常规检测项目外，应包括其它相关的检测指标。还应对局部刺激进行研究。

(三) 免疫学的评估

应注意进入体内后的免疫反应有关的问题，包括过敏反应、排斥反应以及机体的自身免疫反应等。应对这些问题进行研究并提出相应的监控及处理措施。

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检查的质量标准。

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. 鉴别实验，主要包括对病毒载体的鉴别和对表达产物的鉴别试验，对病毒载体的鉴别主要通过免疫学方法检测病毒蛋白、检测病毒核酸的大小或限制性内切酶对重组病毒的核酸进行酶切分析。对表达产物的分析主要用免疫反应检测基因表达产物和用 PCR 方法检测插入基因。

4. 建立适当的方法对病毒的滴度及含量进行检测。

5. 体外效力实验：检测其体外表达量，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。

6. 建立适当的方法检测复制型病毒，并制定相应的质控标准。

7. 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。

8. 热原试验：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，并制定相应的质控标准。

9. 异常毒性实验：主要用小鼠和豚鼠进行试验，一般小鼠腹腔接种一个人用剂量，豚鼠接种 5 个人用剂量。该试验是控制该类制品质量的重要指标，由于该制品与一般生物制品相比又有其特殊性，应根据病毒的特征建立不同的病毒特异性毒性反应，如可将以痘苗病毒为载体的制剂接种在兔背皮下观察脂肪性反应。

10. 属逆转录病毒的导入系统，应特别注意复制型病毒的检测。检测范围，包括前述种子细胞库、工作细胞库及最后病毒制品。细胞上清液的取样应相当于培养上清液的 5%。细胞须用共培养法，产病毒细胞取样量须达到每批中 1%。检测方法，须用 S+/L-法、标记挽救法或 RT/PCR 中的两种方法。必须用阳性对照（COS4070A 上清液）及阴性对照作严格定量标化，证明其敏感性及其可靠性。PCR 应利用放射同位素杂交或同样敏感的系统。

11. 若最终制品为腺病毒，须补充以下资料：

(1) 腺病毒颗粒数及感染单位的测定：目前公认的腺病毒的定量，是腺病毒颗粒测定，以腺病毒基因组 DNA 定量为依据，以 1 个 OD260 单位作为 1.11012 颗粒；同时要测定感染滴度。

(2) 复制型腺病毒的检测：参考美国 FDA1996 的建议，在一个病人用的腺病毒的总量中，复制病毒不超过 1 个 PFU。在整个制备过程中，从种子细胞库、工作细胞库的建立以及以后制备用于临床的病毒制剂，均需检测复制型腺病毒。检测必须有阳性对照，感染分子比率（MOI）在 10~100 之间（过高 MOI 可抑制复制型病毒的生长）。

12. 对残余宿主细胞的蛋白进行检测并建立质控标准。

13. 生物效价：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方法，并对该方法进行验证，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。

15. 添加物的质控：添加物指细胞培养、制备过程中所用的血清、生长因子等。应建立检测添加物的方法和质控标准。

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，并由中国药品生物制品检定所或国家药品管理局确定的药品检验机构进行质量复核。