

结合疫苗质量控制和临床研究技术指导原则

二 00 五年十月

结合疫苗质量控制和临床研究技术指导原则

前 言

结合（以蛋白为载体的细菌多糖类）疫苗是指采用化学方法将多糖共价结合在蛋白载体上所制备成的多糖-蛋白结合疫苗，用于提高细菌疫苗多糖抗原的免疫原性，如 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗、脑膜炎球菌结合疫苗和肺炎球菌结合疫苗等。结合疫苗的生产及质量控制应符合国家有关规定和中国药品 GMP 要求。其制造及检定方法的标准操作规范、验证和修订应获得国家食品药品监督管理局的批准或认可。

本原则适用于多糖-蛋白结合疫苗生产的质量控制和临床研究。

应根据疫苗生产用菌种的生物安全防护等级分类，在相应的生物安全防护条件下进行各项生产用菌种的操作。生产操作和质量检验人员必须经过严格的职业培训，并应采取适宜的防护措施，例如免疫接种相应的疫苗。必须制订详细的和切实可行的紧急处理措施，确保一旦发生细菌溢出、渗漏等其它细菌播散事故时，可最大限度地控制和避免危害人身和环境的安全。

一、结合疫苗生产的质量控制原则

（一）多糖抗原生产的质量控制

1. 生产用菌种和培养基：生产用菌种须经国家食品药品管理当局批准方可用于制备多糖抗原。应采用种子批系统。从原始种子批传代、扩增后冻干保存为主种子批。从主种子批制备工作种子批。主种子批和工作种子批菌种的各种特性应与原始种子批一致。工作种子批用于生产。应验明各级菌种库菌种的记录、来源、历史和生物学特性，并进行各项必需的生物学特性鉴定。如：形态、培养特性、生化反应和血清学试验等。必要时可采用核磁共振（ ^1H 或 ^{13}C ）、核苷酸序列分析等特殊鉴定方法。

培养基成分应尽可能避免使用动物源性材料，禁止使用来自疯牛病疫区的牛源性材料。

应通过监测细菌的生长速度、pH 值和多糖的产量，保证不同批或不同培养罐中细菌生长的均一性。

应在培养过程中及杀菌前取样进行纯菌试验，可采用革兰氏染色镜检和平皿划线接种培养等。若发现染有杂菌应废弃。

2. 精制纯化多糖：精制纯化多糖应逐批进行鉴别试验、纯度和分子大小测定。应制定多糖纯度的合格标准。通常应在-20℃以下储存精制纯化后的多糖，以维持其稳定性。为控制精制纯化多糖的质量所进行的测定包括：

(1) 鉴别试验：通常应用血清学反应进行多糖鉴别试验；

(2) 分子大小分布：应采用凝胶过滤或高效液相色谱（HPLC）等适宜方法测定纯化多糖的分子大小分布，并建立相应的 KD 值合格标准，不同批纯化多糖的 KD 值应保持一致；

(3) 采用冻干保存的纯化多糖，其水分含量应合格；

(4) 多糖含量：应采用特定的方法测定糖含量，如磷含量测定、唾液酸含量测定和核糖含量测定等方法；

(5) 杂蛋白含量：应采用 Lowry 法、BCA 等方法测定纯化多糖中蛋白杂质的含量，应同时采用相应的国家标准品作蛋白测定对照；

(6) 核酸杂质含量：应采用紫外 260nm 测定等方法测定纯化多糖中核酸杂质含量；

(7) 应采用家兔热原试验或鲎试验定量测定方法测定纯化多糖中的热原质及内毒素含量；

3. 修饰处理后的多糖：多糖与载体蛋白结合前通常需先经化学修饰，即活化（例如可采用溴化氰活化多糖）。应采用适宜的方法检测化学修饰的效果，即活化度测定；另外，可采用凝胶过滤或高效液相色谱等适宜方法测定活化后多糖的分子大小分布，以确保多糖-蛋白结合反应的批间一致性。

（二）载体蛋白的质量控制

载体蛋白生产用菌种和培养基的质控原则与多糖抗原生产用菌种和培养基的质控原则相同。

结合疫苗常用的载体蛋白包括有：破伤风类毒素、白喉毒素无毒变异蛋白（CRM197）和 B 群脑膜炎球菌外膜蛋白等。

如果采用已有国家标准的破伤风类毒素和白喉类毒素等作为载体，其各项质量指标应符合现行版《中国药典》的要求，尤其要注意确保载体蛋白的纯度。

采用国外已通过临床试验验证的安全有效的 CRM197 蛋白、B 群脑膜炎球菌

外膜蛋白等作为载体，应参照国外相应的质量标准，对其特性和纯度进行质量复核：（1）可采用 HPLC 法等适宜方法测定 CRM197 蛋白的纯度，其纯度应在 90% 以上；应确保 CRM197 蛋白的氨基酸序列正确无误。如果与白喉类毒素在同一车间生产，应建立能区分 CRM197 蛋白和白喉毒素的方法，并应符合中国药品 GMP 要求。（2）可采用 SDS-PAGE 图谱分析测定纯化后 B 群脑膜炎球菌外膜蛋白复合物的组成；其脂多糖的含量不应超过 8%；家兔热原试验应合格。

采用上述以外的其它蛋白作为载体，应参照上述蛋白载体质量标准要求，结合其自身特点建立相应的质量标准，并进行严格的质量检测和复核。

可采用血清学方法进行载体蛋白的鉴别试验。用于检测载体蛋白理化特性的常用方法包括：SDS-PAGE 图谱分析、等电聚焦分析、HPLC 测定、氨基酸分析、氨基酸序列分析、旋光度测定、荧光分光光谱分析、肽图谱分析和质谱分析等。

如果载体蛋白与多糖结合前需进行活化处理，应建立测定蛋白活化程度的方法，以确保批与批之间的一致性。

（三）多糖-蛋白结合物原液的质量控制

不同的结合疫苗可能采用不同的多糖-蛋白结合工艺，但均需要进行多步反应。为了确保多糖-蛋白结合物的稳定性、安全性和批间一致性，应建立相应的质量控制方法。由于结合反应可能影响多糖的结构，多糖-蛋白结合后（单价结合物未混合前）应进行多糖的鉴别试验。此外，还应对纯化后的多糖-蛋白结合物进行以下检测：

1. 应采用适宜的检测方法，确证多糖-蛋白结合物原液经过纯化后，多糖-蛋白结合反应中所使用的试剂（如溴化氰、ADH 和 EDAC 等化学试剂）已被清除；

2. 如果化学结合反应产生了独特的结合标志（例如某一独特的氨基酸），可通过测定该标志物定量分析多糖-蛋白结合反应的程度，也可将结合物中多糖/蛋白比作为判断结合反应的一个间接标志；

3. 残留的活化功能基团：结合物中多糖或载体蛋白均应不再残留有活化后未结合的功能基团；

4. 结合及未被结合的多糖含量：结合多糖为结合疫苗中的免疫保护抗原。未被结合的游离多糖不得超过一定比例。可直接测定游离多糖的含量，或先将结合多糖和未结合多糖分离后测定结合多糖的含量。将结合多糖和游离多糖分离的方法包括沉淀、凝胶过滤、超滤或超离等方法；

5. 蛋白含量：可采用 HPLC 等适宜方法测定多糖-蛋白结合物中结合蛋白和未结合蛋白的含量；

6. 多糖/蛋白比：分别测定结合物中结合多糖和结合蛋白的含量；

7. 分子大小分布：结合物原液应逐批进行相对分子大小的测定，可采用凝胶过滤或液相色谱等方法进行测定，所建立的方法应能将多糖-蛋白结合物与未结合的多糖、蛋白区分开；

8. 无菌试验应合格；

9. 结合物中载体蛋白的毒性试验：如果采用破伤风类毒素和白喉类毒素作为载体蛋白，应按现行版《中国药典》的要求，对多糖-蛋白结合物进行破伤风类毒素和白喉类毒素的毒性试验；

10. 可对结合物进行热原试验及内毒素含量测定。

疫苗原液在稀释、分装前可加入适宜和适量的佐剂、防腐剂及保护剂。多价结合疫苗既可在各单价结合物原液混合后加入佐剂、防腐剂及保护剂，也可在各单价结合物原液中加入佐剂、防腐剂及保护剂后再混合。稀释分装前无菌试验应合格。

（五）成品的质量检定

1. 鉴别试验：通常采用多糖的特异性抗体进行免疫学测定；

2. 无菌试验：成品中不得检出细菌或真菌等微生物；

3. 多糖含量：可采用化学显色、色谱分析（包括 HPLC）或符合国家规定的免疫学方法（例如速率比浊法或 ELISA）进行测定；

4. 残留水分：如果结合疫苗为冻干制品，应采用适宜方法测定水分，残余水分应不超

5. 毒素含量：可采用家兔热原试验或鲎试验定量测定内毒素含量；

6. 佐剂含量：如果疫苗使用了佐剂，应采用适宜的方法检测成品中佐剂的含量，所使用的佐剂及其用量应符合国家有关规定。如果所使用的佐剂为铝佐剂，每人用剂量中的佐剂含量应不超过 1.25mg；

7. 防腐剂含量：选择防腐剂时应该考虑防腐剂的稳定性，应避免选择可能与疫苗成分产生相互作用的防腐剂。如果疫苗中加入了防腐剂，应采用符合国家规定的方法测定成品中防腐剂的含量。所加入的防腐剂及其含量应符合国家有关规定，即应不破坏疫苗的免疫效果，也不会损害人体健康；

8. 异常毒性试验，应符合现行版《中国药典》的要求；

9. pH 值测定：pH 值对结合疫苗的稳定性和安全性及免疫保护效果影响很大，应根据临床研究和稳定性试验的结果确定最适 pH 值范围。成品应逐批进行 pH 值测定，冻干制品应采用批准的稀释剂复溶后进行 pH 值测定；

10. 外观检查应符合规定要求；

11. 稀释剂：应对复溶疫苗用稀释剂进行检定。必须采用疫苗生产厂家提供的、符合国家规定的稀释剂。

（六）其他

结合疫苗的包装、标签、配送、运输和储存均应符合中国药品 GMP 要求及国家有关规定。

结合疫苗的标签上应标明：每一人用剂量中所含多糖抗原（血清群、型别）和载体蛋白；每一人用剂量中每一结合物的含量；储存和运输的适宜温度（2-8℃）；如果疫苗为冻干疫苗，应标明疫苗复溶后应迅速接种；冻干疫苗应标明疫苗复溶所采用的稀释剂名称及体积。稳定性试验应考虑的因素包括：结合疫苗逐渐解聚的特性，导致多糖分子量变小、与蛋白载体结合的多糖含量减少、结合物分子变小以及游离多糖含量增加。加速稳定性试验的结果不能替代实时稳定性试验。如果生产工艺的改变可能影响产品的稳定性，应进行稳定性试验对新方法进行验证。

二、结合疫苗的临床研究

为评价结合疫苗的安全性和免疫原性，应按国家规定的要求进行结合疫苗的临床研究。由于结合疫苗（尤其是多价结合疫苗）生产工艺相对复杂，影响

因素较多，出现批间差异的可能性相对较大。因此，多价结合疫苗宜采用多批疫苗进行临床研究。如果生产工艺发生重大改变，或是将多价疫苗作为一种新联合疫苗的组分时，应考虑重新进行临床研究。

如果结合疫苗的生产工艺或剂量、剂型发生了变化，应及时向国家食品药品监督管理局报告，由国家食品药品监督管理局根据具体情况组织专家进行再评估，评估的内容包括：发生的变化是否会影响结合疫苗的质量、批间一致性、结构完整性和免疫原性。应考虑到多个细微改变可能产生的累积效应。

必要时，结合疫苗的临床研究中可设置多糖疫苗对照组。如果偶联疫苗的适应证包括载体蛋白来源细菌所导致的疾病，可设置载体菌疫苗对照组。

应采用适宜的血清学标准评估结合疫苗的免疫保护效果，应对测定 IgG 抗体所采用的方法进行标准化，从而验证其功能抗体与 IgG 抗体的相关性，此外，还可通过临床研究，证明结合疫苗能诱导多糖疫苗无法诱导的免疫记忆反应。