

# 联合疫苗临床前和临床研究技术指导原则

二 00 五年十月

# 联合疫苗临床前和临床研究技术指导原则

## 前 言

联合疫苗是指含有二个或多个活的、灭活的生物体或者提纯的抗原，由生产者联合配制而成，用于预防多种疾病或由同一生物体的不同种或不同血清型引起的疾病。如果将载体疫苗和偶联疫苗的载体菌或偶联的载体成分所引起的疾病也作为其适应症时，则载体疫苗和偶联疫苗也属于联合疫苗。

在本指导原则中根据联合疫苗的研究经验和结果，提出了有关临床前研究和临床研究中应注意的问题和要求。论及的内容不可能面面俱到，在实际应用中可能会遇到许多技术问题，对于特定问题和特定的制品，应视具体问题具体研究决定。本指导原则亦将随科学技术发展和经验积累而逐步完善。

### 一、联合疫苗研究开发中应考虑的问题

联合疫苗的研发过程中，应对联合后疫苗各组份间的相互作用，以及防腐剂、佐剂和非活性成分等对联合后活性成分的影响等进行研究。应证明联合后的疫苗在安全性和有效性方面至少与单价疫苗是相等的。

#### （一）组份间的相容性

以往的经验表明，单价疫苗在联合后会使疫苗的安全和效力发生改变。有时联合疫苗中的某种成分会对其他的一种或多种活性组份起到抑制或增强的作用，例如：当全细胞百日咳疫苗与灭活脊髓灰质炎疫苗（IPV）联合后会使百日咳的效力下降；另外，当用活疫苗配制联合疫苗时，可产生病毒间或病毒亚型间的免疫干扰，其免疫应答比单病毒组份疫苗的免疫应答要低；由活疫苗配制的联合疫苗，也可能发生组份间的重组反应，可能使减毒活疫苗毒力回复。因此，在开展临床试验前，应对联合疫苗中各组份间的相容性进行验证。应采用适宜的理化、生化和生物学检测方法，对制品的特性和组份的完整性进行测定。为了进一步证明组份间的相容性，在临床前的研究中，应采用适当的动物模型，确定联合后对各组份的效力和免疫原性是否有影响。还应当考虑到联合疫苗中的每一组份都有可能通过联合使毒力回复。因此，应当测定组份在单价时和联合时是否有恢复变异的趋势。同时，还应评价制品的再悬浮的影响，以及容器和瓶塞与联合疫苗是否相匹配。

## （二）防腐剂对联合疫苗的影响

防腐剂或稳定剂有可能改变疫苗的效力，如 DTP-IPV 中的硫柳汞可抑制 IPV 的效力；应考虑防腐剂对组分毒性逆转的影响，还应考虑定量测定各成分或抗微生物物质的残余量，以及进行防腐剂对成品抗污染能力的研究。

## （三）佐剂对联合疫苗的影响

应研究佐剂与其他组分间的相容性及对每一成分的吸附度，同时还应考虑多个组分若同时吸附时的吸附效率和动力学。对于未被吸附（游离）的组分在配制后吸附情况，例如未被吸附的组分是否会被吸附；已吸附的组分是否会被解离下来，即研究存放时间对佐剂吸附抗原的影响等。对于以前未被吸附过的组分，应研究吸附后对检测方法和检测结果是否会产生影响，应了解对鉴别试验或热原试验方面的影响。

## （四）非活性成分对联合疫苗的影响

在配方的开发阶段，应当测定不同的缓冲液、盐类、稳定剂（比如乳糖、明胶、山梨醇等）以及其他化学因素是否对疫苗的安全性、纯度或效力产生有害的相互作用。

## （五）稳定性和有效期

在稳定性和有效期的研究时，应使用三批成品考核实际贮存时间内制品的稳定性，以制定该制品的有效期。由于疫苗的有效期是从成品的效力试验开始计算的，所以还应考虑以下三个方面对疫苗有效期的影响，即生产过程中和配制前每一组分的保存时间、效力试验开始前后的联合疫苗的保存时间。联合疫苗的有效期的开始时间应当是从测定联合疫苗中的第一个组分的最后一次有效的效力试验开始（或合格）之日。按有效期最短的组分确定联合疫苗的有效期限，即应综合考虑各组分的有效期。所制定的成品有效期应当确保制品在其总有效期内（即有效期开始前的贮存期加上成品的有效期）各组分都是稳定和合格的。

## 二、联合疫苗生产中应考虑的问题

生产过程中应考虑的主要问题是生产的一致性，即生产的稳定性，应证明在已确定的生产条件下生产出的产品是稳定和一致的。

### （一）连续批的数量和规模

用于稳定性研究的成品最好是用连续三批原液配制的，应在规模化的生产设施中进行，至少有一批是在大规模生产状态下生产的，以表明该生产工艺在其生产规模改变时是否会对产品的安全、纯度和效力产生影响，尤其对于吸附类产品和不易再悬浮的产品，其成品的质量有可能受到吸附效率或者联合步骤的影响。

### （二）单价组分混合时应考虑的问题

在配制联合疫苗时每一种抗原应至少使用三批，但对已获生产文号的抗原（单价疫苗）可少于三批，没有必要对联合疫苗中所有组分的连续批进行联合配比的测定，但应当证明疫苗中每一抗原组分的生产一致性。可采用下述联合配比方法的矩阵表或采用随机采样法，例如：X、Y、Z 等组分配制的联合疫苗可采用每一组分的第一批联合后得到成品为第一批，即  $X_1+Y_1+Z_1+\dots N_1$  配制得到最终成品为批号 1， $X_2+Y_2+Z_2+\dots N_2$  配制得到最终成品为批号 2， $X_3+Y_3+Z_3+\dots N_3$  配制得到最终成品为批号 3。采用这种方式配制可减少成品的批数。

## 三、联合疫苗检定中应考虑的问题

### （一）一般要求

对生产的每一批制品都要进行检测，证明其质量达到了相应的质量标准，以保证制品在安全、纯度和效力方面的质量。如果目前尚无令人满意的联合疫苗检测方法，应尽快开发新的检测方法，以测定每一种组分的含量或效价。

### （二）效力试验

应当测定联合疫苗中各有效组分的效力，其效价应当达到单价制品的规程要求。如果不能达到规程要求时，应证明其效价降低是由于联合疫苗中组分间的相互作用所致，并证明降低的效价不会导致人群免疫后低的免疫应答。如果已经证明后序的生产工艺对原液的效价没有影响时，可以用对原液的效价测定代替对成品的效价测定，但冻干制品必需对成品进行效价测定。对含有佐剂的疫苗，抗原的吸附度对制品的效价会产生较大的影响，因此应测定成品的效力。效力试验应能证实组分间的相互作用使某一种组分对其他组分产生增强或减弱作用。效力试验可以用动物免疫原性试验，对每一种抗原的免疫应答以及

应答的质量都应进行研究，这些研究应当包括测定抗体的分类、亲和力、亲和性、抗体动态变化或功能，例如测定中和靶抗原或毒素的能力。最好是用动物试验比较联合疫苗与单个抗原的免疫应答情况，以确定是否发生了免疫应答的增强或抑制现象。同样，也应在动物免疫原性研究中测定活疫苗株之间的免疫干扰现象。

对于一个新的疫苗或者联合疫苗中含有人体未曾使用过的新抗原，只要有动物模型，就应当首先用动物模型对其保护力进行研究。保护力试验应当采用拟预防疾病的有毒株来攻击。应当按照经统计学和经科学验证的试验步骤对试验结果进行确认，并应详细描述。此项试验应在产品的开发早期进行。

### （三）鉴别试验

应对联合疫苗中每一活性组分进行检定，目的是证明制品的内容物与其标签的标示相一致。

### （四）无菌检查

联合疫苗中的各组份以及成品疫苗均应符合无菌试验的要求。对含有残余抗生素、含有未曾使用过的防腐剂或含有颗粒状佐剂的制品，对其半成品和成品的无菌试验应进行研究，并建立适宜于这些制品的无菌试验方法。

### （五）纯度试验

联合疫苗中每一种组分均应达到该组分的纯度要求，如 Hib-DTP 偶联疫苗中的 Hib 组分，即使与已知含有内毒素的 DTP 配制成联合疫苗，也应当符合 Hib 制品热原试验的要求。在此种情况下则不要求对成品进行热原检查。此外，对组分进行纯度测定用的 SDS-PAGE 检测，也不适用于成品。

## 四、联合疫苗临床研究中应注意的问题

联合疫苗的临床研究与其他疫苗一样首先应遵循《药品临床试验管理规范》（GCP）的要求。由于联合疫苗是多组分的，在临床研究中对于安全性和有效性的研究与单一成分的疫苗有所不同，应注意以下几方面的问题。

### （一）安全性研究

一般来讲，联合疫苗的安全性研究是与同时在不同部位接种联合疫苗中的每一种单价组分疫苗进行比较，例如，接种 DTP-HB 疫苗与分别接种 DTP 和 HB 疫苗进行比较。临床试验应是随机的，且应设对照组，如分别在不同部位同时

注射联合疫苗中所含有的单价组份疫苗的对照。

临床试验中应观察接种后的不良反应，还应进行跟踪研究，应在临床研究开始前确定不良反应的判定标准和跟踪研究方案。一般灭活疫苗应进行 7 天的主动监测，活疫苗应进行 14 天以上的主动监测，还应进行 30 天电话随访或采用调查表的方式。观察的不良反应包括全身反应如：发热、不适、头疼、呕吐、哭闹，及红斑、硬结、疼痛、触痛等局部反应；以及不常见或罕见的不良反应。

## （二）免疫原性研究

应当对联合疫苗中所有组分的免疫原性进行研究。应当将联合疫苗的免疫原性与分别同时接种在不同部位的各单价组分疫苗的免疫原性进行比较，如果联合疫苗中的某些组分是已获生产文号的，那么，该已获得文号的单组份疫苗可以用于免疫原性研究的对照组。联合疫苗中的每一种血清型或组分在联合疫苗中均应有相应的免疫原性要求。在临床试验方案中应包含各组分免疫原性与其保护性之间关系研究的要求。

评价每一组分的免疫原性的参数是非常关键的，应广泛征求有关专家的意见，确定评价疫苗免疫原性的参数以及各参数的合格标准。一般来讲，抗体水平和血清阳转对于临床保护性只起一定的参考作用。应当注重抗体的质量而不是仅仅是抗体的量，例如，抗体的亲和性、功能、抗原决定簇的识别位点以及其他规定的参数对确定应答抗体的质量是非常重要的。

免疫原性比较研究的目的在于证明联合疫苗接种后各组份疫苗的免疫应答与同时分别接种联合疫苗中的各单组份疫苗后的免疫应答之间是否有显著区别。研究的设计应能证明联合疫苗与原单价疫苗的免疫原性相一致，应能证明和排除在临床上抗体几何平均滴度（GMTs）和/或者血清阳转率方面的显著性差别，同时应考虑测定方法和受试者的内在变化的影响。临床试验方案中应对联合疫苗接种后各单组份疫苗的免疫应答与直接接种单组份疫苗的免疫应答可能存在的显著差别作出明确的定义，在试验假设中应清楚地表明哪些差别是将被排除的，并且以此来计算出受试人群的大小。应当对任何观测到的差别评价其临床相关性，对每一个组分在免疫剂量或免疫程序上的改变，均应有临床数据作为其改变的依据。

用于临床验证的制品批数可以比用于生产一致性研究的批数少。但是，在某些情况下，例如制品中含有未获生产文号的组分时，临床验证时应使用更多的批数，应至少有一批是用于生产一致性研究的制品，并且，应采用制备联合疫苗的同批单价疫苗进行接种的对照组试验，以避免由于批间的不同而引起免疫原性的不同。对所使用的疫苗批间的差异要进行分析。因此，临床试验也应考虑以上因素对临床研究结果的影响。

### （三）有效性研究

每一组分的有效性均应经过临床试验得到证明。比较理想的临床试验是前瞻性的、随机的和有对照的。评价有效性所使用的判定终点，一般是疾病的发病率，但也可以是已经确定了的“保护性相关指标”。疫苗有效性试验中所使用的保护性相关指标，应为经过充分验证的和临床试验证明的可以保护该疾病的实验室参数。如果一个免疫学的保护性相关指标在能够确定质和量的相互关系时，就可以代替流行病学指标。具有一定滴度的某些类别的抗体与保护性具有相关性，例如免疫后破伤风抗毒素的中和抗体单位大于 0.01IU/ml 时，则认为可保护受试者免于破伤风的发生。

如果联合疫苗中的单组分疫苗的保护性效力是经过证实的，这一研究结果可以作为参考资料来支持联合疫苗的研发。在临床试验时，可采用与单价组份疫苗的桥接试验来比较联合疫苗中这组份疫苗的保护性效力。

如果联合疫苗免疫后产生的抗体水平低于单价组分疫苗，但仍能达到保护性作用的，应提供相应的数据或资料证明其保护的有效性及其持久性。

在评价制品有效性时，一般不选用病例对照试验（case-control）。由于该试验在许多方面有可能产生偏差，因此，在采用该方法时，应在试验方案中详尽地阐述如何降低偏差和采取的纠正措施。

一般来说，测定多价血清型的联合疫苗中每一个血清型的效力是比较困难的。因此可采用相应的替代方案。应当根据目标人群中相应血清型疾病的发病率设计此类疫苗有效性的临床试验。如果临床试验的判定终点是以该疫苗所预防的各型疾病发病率的总和时，该试验应当具有相当的规模，即确保发病率低的血清型仍能有一定数量人群的数据，以评价其有效性。

对于多价血清型的联合疫苗，由于缺乏足够数量的病例而不能进行临床

有效性的评价时，在某些情况下，可以用免疫原性的数据推断其有效性。如果在临床上已经证明了血清学和有效性存在着相关关系时，可以使用免疫原性数据推断其有效性。

#### （四）数据统计

临床研究中很重要的一个问题是确定受试人群的大小。现在尚无计算联合疫苗临床试验受试人群大小的标准，评价主要基于统计学、临床学和基础科学的评价结果。

多数联合疫苗的临床试验均以在不同部位分别接种各组分疫苗或接种各组份混合后疫苗为试验的对照组，受试者应当随机地分配到各疫苗组。按照受试者的特性（如：年龄或者到达试验点的日期）分组的方法不符合随机分配的原则。

为了证明联合疫苗与单价疫苗等效性的临床试验，应当设计一个拒绝有区别的假设试验，而不是传统意义上的无区别的“无效”假设试验。为了证明发生率和比例相同或等价时，采用单侧检验是适宜的，因临床试验的目的在于证明注射联合疫苗与分别注射的单价组分疫苗无明显差异。

如果要证明联合疫苗优于分别注射的单价组分疫苗，应当设计一个检验差异的临床试验，而不是一个检验等价的试验。

对于免疫应答，一般分析接种后的 GMT 或 GMR（应答率的几何均值），通常是为了排除联合疫苗和分别注射的单价组分疫苗间在临床上有意义的差别。对于要排除事先规定的差别的临床试验规模，应计算考虑受试人群的大小。

如果联合疫苗的免疫应答未显示明显地低于分别注射的单价疫苗，那么，可采用双侧的生物等价检验来分析 GMT。理想的设计是联合疫苗诱导所产生的抗体滴度既不比预先规定的量太低也不会太高。

临床结果分析时，应同时进行血清的阳转率与抗体滴度的分析比较研究。在没有保护性替代指标的情况下，如果没有阳转率与 GMT 间的分析和评价是很难得出结论。如果已经建立了保护性免疫的替代指标，在评价联合疫苗和分别注射的单价组分疫苗间的差别时，就应当考虑保护性免疫替代指标。

对于评价常见的不良反应，试验组中联合疫苗为一个接种部位，而对照组为二个或多个接种部位，这种对比分析试验不是双盲的。因此，在分析时应将

单部位接种的反应（联合疫苗组）与多部位接种（对照组）当中反应最严重的一点进行比较。还应考虑到在个体内的不同组分间的相互作用。

对于不常见的不良反应的评价，临床试验中应根据疫苗目标人群的大小来确定受试人群的大小。

对于罕见的不良反应的评价，受试人群的规模应当足够大，如果未观察到不良反应，可认为在目标人群中发生的可能性也很低。

总之，联合疫苗的研发和临床试验不同于一般疫苗，除一般要求以外，还应充分考虑多种组分联合后产生的相互作用对联合后疫苗的安全性和有效性的影响，以及是否产生毒性逆转或重组。在临床试验时，应采用联合疫苗中各组分分别但同时接种作为对照组，由于对照组是多部位接种，给不良反应的评价带来了困难，同时还应充分考虑各组分在体内的相互作用而产生的影响。因此，不能简单地采用一种固定的模式研究联合疫苗的安全性和有效性。