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，经培养增殖制成的减毒、灭活的病原体，或再经纯化、裂解、亚单位（包括细菌类毒素）等方法处理制备的富含免疫原性，刺激机体产生特异性免疫学反应而达到预防某种疾病的产品，为预防用疫苗。

本指导原则适用于用病毒、细菌或其他病原微生物制备的预防用疫苗，其目的是为该类制剂提供一个共同的原则，指导制定临床前研究的方案，和确定具体的研究内容。

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）对所预防的疾病的流行情况进行研究,包括疾病的危害程度 所涉及的人群及病原的型和亚型等；

（三）对研制该类制品用于预防疾病的有效性、安全性及必要性进行分析；

（四）应对该制品用于预防该疾病的利益风险比进行研究。根据该制品的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、用于疫苗研究用的菌毒种

研究疫苗所用的菌毒种必须证明为引起本病的细菌、病毒或其他病原体，如该菌毒株分离自人体，下述内容必须清楚。

（一）菌毒株名称及来源：

1．菌毒株名称

2．菌毒株来源

（1）分离菌毒株的宿主一般情况；

（2）发病地点、发病日期；临床确诊日期、实验室确诊日期；病人病程及病人转归。

3．菌毒株分离原样本： 咽试子、漱口液、痰液、血液、粪便、尿液、尸解标本的组织名称；取样日期；取样时病人的病期。

4．鉴于人类的血液在同一时间内较少感染多种病毒或细菌，而咽试子、漱口液、痰液、尿液、粪便等样品难免污染其他外源因子，因此用病人血液分离的菌、毒株较适宜用于研究疫苗。

5．分离菌、毒株的其他自然样本名称、来源、数量、取样方法等。

（二）菌、毒株分离过程

1．用细胞分离病毒，所用细胞名称、代次、来源应清楚，应进行细胞无菌检测、支原体和外原因子等检测；病毒分离不宜使用肿瘤原性的细胞系。尽可能使用非肿瘤原性细胞，如人二倍体细胞或Vero细胞等。

2．用动物分离病毒，对所用动物名称、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须详细记载；如再适应到细胞，则还应参照上述对分离用细胞的要求。

3．确定分离菌株所用培养基名称、种类，以及分离培养的温度和条件。

（三）菌、毒株分离传代特性

应包括样品处理方法、首次盲传确证菌毒株阳性代次、菌毒株确证检定方法、每代培养天数、病毒滴度、滴定方法、动物是否发病或死亡等资料。

（四）菌毒种建立和保存

应包括原始菌毒种代次、滴度，添加的保护剂的名称和浓度、存储条件等资料；原代菌毒种是指已适应到可生产疫苗的细胞或培养基，可稳定传代、保留抗原性、并经过检定可用于疫苗生产的菌毒种。种子批的建立应符合现行版《中国药典》“生物制品制品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。

（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。

2．无菌检查：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，取样量应足够检测试验的需要。

4．扩增能力和感染性滴度：应能达到按生产工艺要求顺利生产合格疫苗的要求。应建立测定菌毒种扩增能力和感染性滴度的方法和标准，并提供这些扩增能力和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；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，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作出确切的结论；

（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和警戒毒力回复的依据等；

（3）对制备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；

（4）如已知该病毒具有嗜神经毒性，其验证要求可参考《IABS Scientific workshop on neurovirulence test for live virus vaccines, WHO,31 January 2005》。

三、疫苗的生产工艺研究

（一）建立菌毒种库

应建立三级种子库。对种子库的遗传稳定性进行分析，明确该种子库可以传代的次数。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“生物制品生产用动物细胞基质制备及检定规程”的要求，如用传代细胞系应建立三级细胞库；

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）疫苗原液生产工艺的研究

1．生产工艺的主要技术参数的确定

（1）病毒与细胞的接种比例、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。菌毒种的接种量，培养和发酵条件等技术参数的研究确定；

（2）灭活剂的选择和依据；

（3）灭活或裂解条件及灭活或脱毒效果的验证，灭活效果验证的依据、方法；灭活效果的验证，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：纯化和提取工艺中各种条件进行优化，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，按GMP要求在符合GMP要求的生产环境下生产；

（5）初步确定起始投料、原液、半成品和成品的产出比的理论数据。

2．疫苗对佐剂的要求

目前能用于疫苗的佐剂多为氢氧化铝，而铝佐剂通常使疫苗产生的抗体滞后，且增加注射局部的副反应机率。如疫苗的抗原能满足免疫的需要，则不加佐剂为宜。如果在终制品中使用佐剂，则对以下问题应进行研究，对于已经明确有佐剂效应或者已经商品化的佐剂，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。

（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成分，缓冲液、佐剂、以及冻干疫苗的赋形剂成分等是否对疫苗造成影响。

四、药理、毒理和生物分布

疫苗不同于一般的化学药品，药理、毒理的实验要求具有特殊性，因此，该制品的药理学试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和全身的病理反应、以及机体对该疫苗的非期望的免疫应答反应和这种反应的持续时间。由于以上各方面是互相关联的，因此，应综合考虑药理、毒理和免疫原性或生物效价的因素。

应建立适当的试验及检测方法来评价疫苗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的，可以采用动物模型直接评价疫苗的生物效价，如：对一些有动物模型的感染性疾病，可以采用病原体的攻击实验来评价该疫苗的保护效果。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。若无法建立动物模型，应建立能验证该疫苗有效性的体外实验进行评价。

灭活疫苗的生物分布较难检测和评价。减毒活疫苗的生物分布应建立敏感的动物模型，可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感染的器官组织细胞应进行详细的研究。

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的产品均应建立相应的监控标准，以便后续工艺的进行,保证产品的质量、工艺的稳定性。

（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．纯度：主要用于评价纯化制品中含有有效成分的量和杂质的最低限量，制定相应标准，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。

4．宿主细胞 DNA和蛋白残留量检测：采用传代细胞生产疫苗，应限制疫苗中的宿主细胞DNA和蛋白残留量，进行方法研究时应建立相应的标准品，并对检测试剂的敏感性和特异性进行验证。疫苗中残余宿主细胞DNA及蛋白残留量可参考现行版《中国药典》的相关要求。

5.无菌检查：应符合现行版《中国药典》的相关要求。

6．热原或细菌内毒素检查：可参照现行版《中国药典》的相关要求进行； 也可以用其它方法检测疫苗中的热原物质。

7．抗生素检测：预防用疫苗在生产过程中不得添加青霉素或其他β内酰氨类抗生素；如在生产过程中添加除上述以外的其他抗生素，应建立相应的检测方法并规定抗生素残留量的要求。

8．灭活效果的验证：由于制备疫苗的病原体一般均对人类致病，因此应建立有效的灭活方法对该制品中的病原体进行灭活，并应对灭活效果进行验证；在成品检定中应建立灭活剂残留量检测的方法和限度标准。

9．异常毒性检查：应符合现行版《中国药典》的相关要求。

10．稳定性试验：是指疫苗在常规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。

11．效力试验（生物效价）：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，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。若有动物模型，可进行动物保护性实验。

12．佐剂的质量评价：如最终制品含有佐剂，则应建立佐剂含量以及与之结合率的检测方法，并制定相应质量标准。

13．疫苗标准品或参考品的研究：对于一种新疫苗而言，建立检测疫苗的效力、免疫原性或毒性用标准品或参考品对判断验室研究阶段与批量投产后的疫苗质量是否一致以及临床试验的评价是非常重要的。

六、临床研究用样品要求

（一）申请临床试验用的疫苗，按照国家GMP的要求,在符合现行中国药品GMP的生产条件下生产的。

（二）临床试验用疫苗样品应尽量使用与临床前研究相同批的疫苗,其批量一般不少于1000人份，并能满足临床试验对疫苗量的要求。

（三）进行临床试验的疫苗必须由中国药品生物制品检定所进行质量复核。