

## 组分百日咳疫苗药学评价的一般考虑

郭胜楠 李 敏

(国家药品监督管理局药品审评中心,北京 100022)

**[摘要]** 组分百日咳疫苗与共纯化百日咳疫苗相比,成分更明确、纯度更高、更易于工艺控制,已成为目前百日咳疫苗开发的主要趋势。本文从生产工艺、质量研究等方面,对组分百日咳疫苗在早期研发及临床申报阶段的药学研究常见问题进行探讨。

**[关键词]** 百日咳; 组分; 工艺控制

**[中图分类号]** R95 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2022)21-2165-04

## General considerations on CMC evaluation for component pertussis vaccines

GUO Sheng-nan, LI Min

(Center for Drug Evaluation, Nation Medical Products Administration, Beijing 100022, China)

**[Abstract]** Compared with co-purified pertussis vaccine, component pertussis vaccine has clearer composition, higher purity and easier process control, which has become the main trend of pertussis vaccine development. However, due to the diversity of pertussis antigen components, the complexity of production process, especially the purification and detoxification, these poses great challenges for vaccine development and evaluation of chemical manufacture and controls (CMC). This paper discusses the common CMC problems of component pertussis vaccine in the early stage of development and the clinical application, including production technology and quality research.

**[Key words]** pertussis; components; process control

百日咳是由百日咳鲍特杆菌(*Bordetella pertussis*, BP)感染引起的一种急性呼吸道传染病,是导致儿童死亡的重要感染性疾病之一<sup>[1]</sup>。百日咳传染性强、感染率高,人类是其唯一宿主,主要感染对象为6岁以下儿童,其中1岁以内婴幼儿的发病率占一半以上。近些年青少年和成年的发病率有所上升,被称为“百日咳重现”(pertussis re-emerge)<sup>[2]</sup>,引起WHO的高度关注。疫苗接种是预防和控制百日咳发病的有效手段,最早在20世纪30年代被成功开发,目前已在世界范围内被广泛应用。百日咳疫苗包括全细胞百日咳疫苗(whole-cell pertussis vaccine, wP)和无细胞百日咳疫苗(acellular pertussis vaccine, aP)<sup>[3]</sup>,无细胞百日咳疫苗根据纯化工艺不同

又可以分为共纯化百日咳疫苗和组分百日咳疫苗。

国外企业(如赛诺菲巴斯德公司和葛兰素史克公司)已上市的联合疫苗中通常含有组分百日咳疫苗,国内生产企业的已上市产品主要为共纯化百日咳疫苗。近年来已有多家国内企业申报吸附无细胞组分百日咳联合疫苗并获批临床试验。目前一般将百日咳疫苗的各个单组分原液与佐剂混合制备成吸附原液,再与白喉、破伤风类毒素等联合使用,制备成联合疫苗。组分百日咳疫苗纯化、脱毒、制剂工艺等方面的研究是此类产品开发的关键。因此本文对组分百日咳疫苗的生产工艺、质量研究等方面的常见药学问题进行梳理与探讨。

## 1 百日咳疫苗简介

**1.1 百日咳疫苗的发展** 20世纪30年代,全细胞百日咳疫苗研制成功并广泛使用<sup>[4]</sup>,显著降低了百日咳发病率。但由于其为全菌体制剂,接种后常出现局部反应或少见但严重的全身反应。在20世纪

**[作者简介]** 郭胜楠,女,助理研究员,主要从事生物制品技术审评工作。联系电话:(010)85243058, E-mail: guoshn@cde.org.cn。

**[通讯作者]** 李敏,女,主任药师,主要从事生物制品技术审评工作。联系电话:(010)85242981, E-mail: lim@cde.org.cn。

70年代英国、瑞典和日本等部分国家出现了抵制疫苗接种的情况,且随后这些国家的百日咳发病率急剧上升<sup>[3]</sup>。

从20世纪70年代起,研究者对百日咳杆菌进行了更加深入的研究和工艺改进。1981年,日本率先研制成功了共纯化无细胞百日咳疫苗<sup>[4]</sup>,即以百日咳毒素(pertussis toxin,PT)和丝状血凝素(filamentous hemagglutinin,FHA)为主要有效成分,以盐析、超速离心等工艺获得的混合抗原溶液。与全细胞百日咳疫苗相比,其不良反应发生率和严重程度明显下降,具有良好的安全性和免疫原性。由于无细胞百日咳疫苗的有效成分是混合抗原,不同批次的疫苗原液中各种抗原比例可控性较差<sup>[5]</sup>。后续欧美国家采用柱层析单独提取不同抗原组分,脱毒后再按一定比例混合,制备无细胞组分百日咳疫苗,其抗原组分还增加了百日咳杆菌黏附素(pertactin,PRN)、百日咳菌毛血清型2和血清型3(fimbriae serotype 2&serotype 3,Fim2&3)<sup>[5]</sup>,此类疫苗抗原组分比例固定、纯度较高、批间一致性较好。

现阶段,利用其他抗原成分进行百日咳疫苗的研发也在进行中,如腺苷酸环化酶素(adenylate cyclase toxin,ACT)和外膜囊泡(outer membrane vesicles,OMV)可作为候选抗原。研究表明,小鼠血清抗体可以结合于ACT的C-末端RTX域(751~1706氨基酸)。将RTX751(751~1706)添加至适当剂量的无细胞百日咳疫苗中,能增强小鼠抗感染的能<sup>[6]</sup>提示可以将RTX751作为一种保护性抗原。此外,OMV是一种来自百日咳杆菌膜表面的非复制性球形脂质体囊泡,包含外膜蛋白、脂多糖及核酸等物质,经适宜的方式脱毒处理后仍具有良好的免疫原性。小鼠体内实验表明,口服百日咳OMV疫苗后可诱导细胞免疫反应和体液免疫反应<sup>[7]</sup>。

**1.2 百日咳杆菌的抗原组分** 百日咳杆菌的有效抗原成分主要包括PT,FHA,PRN,Fim2&3以及腺苷酸环化酶毒素(ACT)、气管细胞毒素(tracheal cytotoxin,TCT)和不耐热毒素(heat-labile toxin,HLT)等活性成分。其中,PT由S1~S5这5种亚基组成,分子质量约为117 kDa,具有典型的AB型细菌外毒素结构,是百日咳杆菌的主要致病因子;FHA是百日咳杆菌的主要黏附因子,存在于百日咳杆菌膜表面;PRN能够介导对宿主细胞的黏附,可以通过加热或酸处理从外膜脱落,分子量约为69 kDa;百日咳菌毛为存在于细菌表面的黏附因子,通常分为血清

型2和血清型3。

尽管百日咳疫苗是作为联合疫苗的一个部分使用,但目前已上市产品中所含的百日咳抗原组分和配比不尽相同,包括:①PT单一组分。②PT和FHA二组分。③PT,FHA,PRN三组分。④PT,FHA,PRN,Fim2&3五组分<sup>[1]</sup>。

## 2 生产工艺

组分百日咳疫苗的生产工艺复杂,包括细菌发酵、杀菌、各组分抗原纯化、脱毒、抗原吸附与配比混合等多个工艺步骤。由于不同纯化方式提取组分百日咳抗原时回收效率和抗原纯度及活性易受脱毒及纯化方式、工艺条件等因素的影响,因此工艺开发过程中应明确工艺步骤对产品关键质量属性的影响因素,尤其是纯化工艺和脱毒工艺,以确保工艺和质量的一致性。

**2.1 纯化工艺** 通常在细菌发酵培养结束后,分别收集培养上清液和菌体沉淀,百日咳疫苗的抗原组分可以通过不同的纯化工艺获得单一组分。研究者应在工艺开发过程中确定关键工艺参数和过程控制指标,并开展全面的生产工艺验证。应对各阶段中间产物(如粗提液、纯化液)进行鉴别、蛋白质含量测定、抗原含量测定、细菌内毒素检查以及各纯化步骤抗原回收率检测。对于纯化液还应进行纯度检测,如SDS-PAGE法或其他检测方法。对PT纯化液还应进行百日咳毒素毒性检查(CHO细胞簇集试验)确保脱毒前PT抗原仍保持其生物学功能的完整性,但脱毒后不应有残余毒性。杂质残留方面,除对细菌内毒素等常见杂质进行控制,还建议对纯化液中ACT,TCT及β-环糊精等产品相关杂质残留进行控制。

**2.2 脱毒工艺** PT是百日咳杆菌的主要毒性来源,也是最重要的抗原成分<sup>[8]</sup>。在脱毒完全的前提下又要保留其免疫原性,是脱毒工艺的重点与难点。脱毒方式一般分为化学脱毒(chemical detoxification)和基因脱毒(genetically detoxification)。目前应用较为广泛的是化学脱毒,即选择一定浓度的戊二醛、甲醛或两者联合使用对PT进行处理,也有将过氧化氢作为脱毒剂使用。由于纯化工艺和纯化效果的差异,且FHA和PRN的毒性来自少量残留的PT,研发者可根据不同的纯化策略以及PT残留毒性的检测结果,制定合适的脱毒工艺。此外,采用基因脱毒的方式也可以对PT进行脱毒,即通过基因工程技术使PT的S1亚基点突变,获得PT-9K/

129G 突变体,显著降低 S1 的酶活性,从而大幅度减少 PT 毒性但保留其免疫原性<sup>[9]</sup>。

根据 WHO 在 2014 年发布的《Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines》相关要求<sup>[10]</sup>,在不过度影响免疫原性的前提下应尽可能降低 PT 残留毒性,确保在疫苗有效期内不会发生毒性逆转。在工艺开发过程中研究者应首先确定各组分的脱毒剂类别,并对脱毒剂使用浓度、脱毒时间、温度等工艺参数进行充分研究。同时,脱毒前还应考察蛋白浓度及抗原含量对脱毒效果的影响。建议对各组分的多批次脱毒液进行百日咳毒素毒性检查(CHO 细胞簇集试验)以验证脱毒效果,并在成品阶段进行特异性毒性检查,避免 PT 仍具有残留毒性;进行百日咳效价检测以保证免疫原性符合要求。此外,还应开展脱毒剂(如甲醛、戊二醛)以及其他工艺相关杂质的去除效果研究。在进行脱毒验证时,每批脱毒的规模应与实际生产规模相匹配。

### 3 制剂工艺

**3.1 抗原配比** 目前已上市的组分百日咳疫苗的组分和配比存在一定差异。以我国的上市品种为例:葛兰素史克公司生产的 b 型流感嗜血杆菌(结合)和吸附无细胞百白破联合疫苗(Infanrix+Hib)曾于 2009 年在我国获批上市,组分百日咳含量为 25 μg PT 25 μg FHA 8 μg PRN;赛诺菲巴斯德公司生产的吸附无细胞百白破灭活脊髓灰质炎和 b 型流感嗜血杆菌(结合)联合疫苗(Pentaxim)于 2010 年 7 月获批进口,其组分百日咳含量分别为 25 μg PT 和 25 μg FHA。

《Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines》中明确<sup>[10]</sup>在吸附无细胞百白破疫苗临床试验研究阶段进行对照疫苗的选择时,对照苗通常应选择与正在研发中的无细胞百日咳疫苗含量和组成最相似的产品。现有已进入临床试验阶段的多个含组分百日咳的疫苗品种中,研究者从降低疫苗研发风险的角度考虑<sup>[11]</sup>,3 种抗原组分及配比均参照葛兰素史克公司的已上市同类产品制定,即每 0.5 mL 含 25 μg PT, 25 μg FHA 8 μg PRN。国内申报品种与国外同类品种的抗原组分设计一致,有利于研发阶段的对比研究和临床使用的便利性。建议后续申报的三组分疫苗参考该组成剂量进行配比。

**3.2 与其他疫苗联合使用** 组分百日咳疫苗各个

组分的原液制备完成后,与佐剂分别进行吸附、混合,制成含有 3 个组分的吸附原液。吸附原液可作为联合疫苗的一部分,与白喉类毒素、破伤风类毒素、灭活脊髓灰质炎疫苗、流感嗜血杆菌结合疫苗联合使用。在进行制剂工艺研究时,除了按照相关指导原则开展制剂工艺研究外<sup>[12]</sup>,还应重点关注各组分间的相互作用。可开展相互作用研究包括各组分疫苗的相容性、非活性成分的影响以及抗原-佐剂相互作用<sup>[13]</sup>。相容性方面应重点关注不同工艺流程和工艺参数对各组分疫苗免疫原性的影响,尽量保证各组分免疫原性较单组分不应有显著下降;非活性成分则应考察不同辅料。抗原-佐剂相互作用方面,建议参考相关指导原则对吸附机制、结合状态、吸附前后理化特性和生物学特性变化等方面进行研究。

### 4 质量研究和质量控制

**4.1 结构确证** 一般应在脱毒前对纯化液进行纯度检测和抗原含量检测,验证各组分的完整性,并对纯化液和脱毒液进行蛋白质总量检测。目前常用 SDS-PAGE 电泳法进行百日咳疫苗各组分的纯度检测。应明确各目的条带位置和含量,并设置标准品或参考品、空白对照进行比较。每种抗原的总纯度一般均可达到 95% 以上。完整的 PT 抗原在电泳图谱中应显示 5 个亚基条带,分别对应 S1, S2, S3, S4 和 S5 亚基。由于 S1 亚基是 PT 的主要免疫原性成分以及毒性作用部分,因此需重点检测 S1 亚基含量,但由于其特异性抗体难以获得,目前尚无针对 S1 的检测标准,但可采用质谱技术进行各个亚基完整性的确证。若 PT 脱毒后产生多聚体,应采用适宜的方法进行分析,必要时进行相应质控。FHA 抗原不稳定且易降解,应结合多批次检测结果,确定主带含量标准,并设置降解条带的限度标准。PRN 抗原较稳定,电泳条带在 69 kDa 附近。也可以采用灵敏度较高的快速蛋白液相色谱(fast protein liquid chromatography, FPLC)和 HPLC 进行纯度检测,但该方法设备昂贵,检测成本较高。

由于脱毒剂会使蛋白发生交联,鼓励研发者对百日咳各组分进行结构确证研究,深入探究蛋白结构与功能的关系;分析脱毒前后的蛋白结构变化以及免疫原性变化;完善各组分单聚体/多聚体检测方法学研究,采用质谱法分析各个色谱峰的归属。对各组分的蛋白理化性质进行深入探究,如采用质谱法检测氨基酸分布及肽段覆盖等。

**4.2 效价检测** 《中华人民共和国药典》2020 年

版收载了吸附无细胞百日破联合疫苗,其组成成分中含有共纯化百日咳疫苗。成品检定中要求,采用改良小鼠脑腔攻击法(mouse intracerebral challenge assay, MICA)进行百日咳疫苗效价检测,应不低于 $4.0 \text{ IU} \cdot \text{剂}^{-1}$ ,且95%可信限应不低于 $2.0 \text{ IU} \cdot \text{剂}^{-1}$ [14]。MICA法可直接反映疫苗对感染的保护力,我国一直沿用至今。

WHO相关指导原则提供了2种方法评价百日咳疫苗免疫原性<sup>[10]</sup>,即小鼠免疫原性检测(mouse immunogenicity test, MIT)和MICA法。MICA法以无细胞百日咳疫苗国际标准品为对照,检测方法和判定标准与《中华人民共和国药典》相同。同时鼓励开发MIT法和MICA法的替代方法,如小鼠鼻腔攻击实验。而《欧洲药典》(10.8版)中无细胞百日咳疫苗效价检测的方法为血清学效价检测法(小鼠或豚鼠法)<sup>[15]</sup>。该方法为体外检测法,易于操作,重复性好,也减少了实验动物的用量。此外,还开发了CHO细胞抗体中和法,但目前检测耗时长且只能滴度定量<sup>[16]</sup>,其方法学完善尚在进行中。

## 5 稳定性研究

百日咳疫苗在不同的生产阶段会产生多个中间产物,如各组分的纯化液、脱毒液、原液以及吸附原液。在不同的生产阶段,百日咳疫苗各中间产物的储存条件和有效期各不相同,应对各组分的中间品开展全面的稳定性考察,应在拟定的有效期内观察各个百日咳组分的有效性和安全性指标变化情况,如抗原含量、蛋白含量、特异性毒性等,科学合理地制定储存条件和有效期。建议尽可能以连续生产为原则进行中间产物的投料,避免不稳定中间产物的长期贮存(如吸附前的纯化液等),完成半成品配制后立即进行成品灌装。

## 6 展望

目前国内企业生产的组分百日咳疫苗研发尚在

临床研究阶段,生产工艺和质量控制仍在不断完善中,在上市阶段会伴随着工艺变更、规模放大、质量提升等变化。因此本文仅根据当前对组分百日咳疫苗研究的认知对部分问题进行探讨,以期对组分百日咳疫苗研发提供借鉴,推进国产组分百日咳疫苗的发展。

## [参考文献]

- [1] 王真行,邹力,陈敏. WHO关于百日咳疫苗的意见书[J]. 国际生物制品学杂志, 2016, 39(2): 97-103.
- [2] CROWCROFT NS, BOOY R, HARRISON T, et al. Severe and unrecognised: pertussis in UK infants[J]. *Arch Dis Child*, 2003, 88(9): 802-806.
- [3] 杨晓明. 百日咳疫苗现状和发展方向[J]. 中国生物制品学杂志, 2003, 16(2): 128-130.
- [4] 王军志. 疫苗的质量控制与评价[M]. 人民卫生出版社, 2013.
- [5] 胡业勤,段凯,李新国,等. 组分无细胞百日咳疫苗纯化新工艺的建立[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(21): 2498-2504.
- [6] BOEHM DT, HALL JM, WONG TY, et al. Evaluation of adenylate cyclase toxoid antigen in acellular pertussis vaccines by using a bordetella pertussis challenge model in mice[J]. *Infect Immun*, 2018, 86(10): e817-e857.
- [7] 王丽婵,马霄. 新型百日咳疫苗研发及发展方向的探讨[J]. 微生物学免疫学进展, 2022, 50(3): 82-90.
- [8] 张霖阳,潘殊男,李世慧,等. 检测百日咳毒素活性的中国仓鼠卵巢细胞簇集法的建立和初步应用[J]. 国际生物制品学杂志, 2013, 36(4): 177-181.
- [9] 骆鹏,马霄. 新型百日咳疫苗研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2018, 46(5): 91-97.
- [10] WHO. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines, Annex 4, TRS No 979[S]. 2014.
- [11] 邵杰,高晨燕,杨焕. 基础免疫用组分百日咳联合疫苗临床评价的考虑[J]. 中国疫苗和免疫, 2019, 25(5): 593-597.
- [12] 国家药品监督管理局药品审评中心. 联合疫苗临床前和临床研究技术指导原则[S]. 2008.
- [13] 国家药品监督管理局药品审评中心. 预防用含铝佐剂疫苗技术指导原则[S]. 2019.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020年版.三部.北京:中国医药科技出版社, 2020.
- [15] EP. European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia[S]. Strasbourg: 2019.
- [16] 骆鹏,马霄,侯启明. 建立我国百日咳组分纯化疫苗质量标准的探讨[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(9): 1351-1354.

编辑:杨青/接受日期:2022-09-19