



## 疫苗類藥品—品質方面之審查重點

陳美方\*

### 壹、前言<sup>1</sup>

疫苗類藥品的研究與發展一直是重大議題，各國政府與世界衛生組織(WHO)投資相當的經費研發各種疫苗並提高疫苗的品質，盡力降低因品質管控不良而導致副作用的問題。疫苗早期的研發，是藉著將病原大量培養，經過去活化或減毒的過程，再將其抗原蛋白質萃取純化，這種方法費時，有時又有安全的疑慮，例如其他病毒的汙染；故近年來藉由化學合成或基因工程技術製成疫苗，使微生物汙染的風險降低，如阿茲海默症疫苗與子宮頸癌疫苗等。抗原與不純物的安全與品質管控在疫苗類的藥品一直是審查的重點，但是以目前多元化的疫苗成分與製備過程，本篇文章不易涵蓋所有的疫苗種類，僅提供原則性的探討，並且衛生署(已升格為衛生福利部)曾針對疫苗類藥品查驗登記技術性資料的審查，於民國 91 年公告了「藥品查驗登記審查準則-疫苗類藥品之查驗登記」<sup>2</sup>，此項公告涵蓋之疫苗種類包括「經減毒處理的活菌、病毒或寄生蟲；去活化的生物有機體；經處理的活細胞；或天然/純化的免疫原（包括於宿主細胞中製造之基因重組成份、共價結合物、合成抗原、聚核苷酸（如質體、去氧核糖核酸疫苗）；表現特定異種免疫原之載體細胞、或帶有免疫原之細胞。亦可包括上述多種疫苗的組合。」其中對於化學、製造和管制部分，所應檢附的資料皆有詳細的列舉及說明。

### 貳、化學、製造與管制部分（以下簡稱 CMC）

由於生物分析方法的限制（例如專一性、靈敏度、測試時間），單單依賴最終產品（final product）的品質測試，難以完整認定藥品的品質及一致性，尤其是生物藥品，而疫苗類藥品的異質性又較高，因此，需要從原料來源（例如細胞或病毒）、製造過程（例如細胞培養、純化步驟）、製程管控、製程確效、特性分析以及安定性試驗等項目，加以管控和確認，才能確保疫苗類藥品具有合理的品質及一致性。

#### ■ 活性主成分(抗原)

##### 一. 來源的安全性

##### 病毒來源

對於用在疫苗製造的病毒種源應做詳細的說明，須提供的資料應包括(但不限於)下列資料：(1)病毒的起源，(2)病毒株的建立過程，(3)種批系統的詳細資料，(4)維持病毒種源的培養技術。一般常見的疫苗，如 A 型肝炎、白喉、沙賓疫苗、狂犬病疫苗、黃熱

\* 醫藥品查驗中心 藥劑科技組



病疫苗、流感疫苗、麻疹疫苗等二~三十種疫苗的標準病毒株，可以從 NIBSC (The National Institute for Biological Standards and Control)或 ATCC (American Type Culture Collection)中取得。

### 細胞來源<sup>3,4,5</sup>

活性主成分(抗原)的來源安全性是審查的重點，若抗原的生產是來自細胞種批系統，其細胞應證明其安全性是可接受的。審查內容包含種細胞(seed cell)的起源、分離、特性、及培養過程、細胞庫(cell bank)合理的品質測試結果。其中，安全性相關的測試項目，一般包括(但不限於)細菌、真菌、黴漿菌、分枝桿菌(mycobacteria)、一般病毒、細胞或病毒來源生物的相關病毒、反轉錄病毒、致瘤性(tumorigenicity)等。

多數已上市的病毒疫苗，其生產使用的細胞基質並無致瘤性，例如 Vero(繼代 ~150代), WI38、MRC-5、Chicken embryo cell 等。為了提高抗原產量，近年來，具潛在致瘤性的細胞如 MDCK 或 CHO 細胞也逐漸用來生產疫苗，但是仍限於去活化病毒疫苗或高度純化的基因重組疫苗。一方面因為對預防性疫苗的安全性要求較高，並且疫苗的純化過程相較基因重組蛋白質簡略，並無一系列的分離技術以進行高度純化，因此，美國食品藥物管理局<sup>4</sup>建議對於具有致瘤性的細胞受質執行致癌性試驗(oncogenicity)。細胞的致癌性試驗是對於細胞的生物安全性更高一層的考量，其必要性因個案不同而有不同的考量，因此目前是以個案來研究其必要性。細胞的致癌性試驗的設計(例如動物年齡與隻數、試驗參數、試驗期間、投予方式與劑量)與一般藥品的致癌性試驗(carcinogenicity)不同。

### 胚胎蛋來源

若抗原的生產是經由傳統的胚胎蛋作為基質，依據歐洲藥典<sup>6</sup>的規範，關於培養病毒種株(working seed)的「無特定病原胚胎蛋」(specific pathogen free eggs)，須提供來源雞隻的健康狀況(如:連續三代皆無特定的病原菌感染)、外來物質的篩選、雞隻飼養的控管(如適當動物隔離的過程)與沒有施打抗生素和疫苗的證明，「無特定病原胚胎蛋」本身則提供蛋表面和內部生物負荷量(bioburden)。至於生產疫苗用的胚胎蛋(production embryo eggs)，則須提供來源雞隻的疫苗接種計畫和紀錄，以及使用抗生素的狀況、產蛋率、測試相關的病毒感染；至於生產用的胚胎蛋本身則須提供蛋表面和內部生物負荷量(bioburden)、胚胎蛋的存活率(如檢查胚胎血管)、胚胎的生長階段(age of embryo)等。

## 二. 製程和製程中管控<sup>2</sup>

雖然疫苗的研發方法有許多種，可以是經細胞培養所取得的病毒或是基因重組技術所取得的蛋白質，在製程中都應有一份完整的製造流程表，並表列其製程管制與試驗項目。以下僅就一些製程和製程中管控的審查重點加以陳述：



- 原物料管控

關於抗原製備時所使用的原物料種類(例如培養基、緩衝液、血清、抗生素、多肽合成用的樹脂、化學物質和分析用的管柱等)及來源皆需進行管控，尤其是動物來源的物料。如具有可能引發病毒感染或海綿樣腦病變的風險，例如常加在培養基的小牛血清蛋白，即需提供製備的產地來源和海綿樣腦病變的風險評估，或是培養過程中使用豬之 trypsin，則須提供豬相關的病毒檢測。此類產品，都應檢附正式的檢驗成績書說明其規格和測試結果。

- 細胞的培養及採收(若適用)

關於細胞的培養須對培養過程，生長曲線和生長特性作說明，並提供純度，效價，和抗原含量等管制和測試時間點，並說明防範污染的措施。另一面，關於細胞的採收，須提供抗原細胞分離的方法(例如沉澱，離心和過濾等)，若抗原在過濾前後需儲存時，亦須說明儲存的條件及時間。

- 純化與後續處理

若為細胞培養或胚胎蛋培養的不活化病毒或減毒病毒，一般在純化過程前，會進行不活化步驟或減毒的步驟。

(1) 病毒不活化

若所使用的疫苗為不活化病毒，應執行適當的不活化步驟，並且應註明不活化反應的條件、病毒不活化過程的確效，並且須對不活化試劑的殘餘量進行安全性評估。以流行性感冒不活化病毒疫苗為例，常用的不活化試劑為甲醛，廠商須提供其不活化的步驟和其確效評估，確效的對象除了流感病毒本身之外，尚須選擇數種潛在風險的病毒 (cell-based 病毒疫苗)或黴漿菌等 (egg-based 病毒疫苗)，成品的甲醛殘餘量亦不得超過 0.02% w/v(中華藥典第七版)。

(2) 病毒減毒

比起去活化病毒 (inactivated virus) 或表面抗原 (surface antigen) 疫苗，減毒的病毒 (live attenuated virus) 疫苗除了體液性免疫 (humoral immunity) 之外，比較容易產生細胞性免疫 (cellular immunity)，因此，整體的免疫原性 (immunogenicity) 較強，也就是其臨床預防效果可能較佳。但是，減毒疫苗的減毒步驟是否除去了野生型病毒的污染及致病性，則需要確實的評估其減毒處理方式(條件)及過程，並以動物試驗來證實減毒後的病毒沒有致病性。

(3) 純化步驟



在純化過程中應說明抗原成分純化的目的及原理，例如色層分析管柱，超高速離心機，過濾器及單株抗體等試劑或設備。在純化過程中，需監控無菌狀態或生物負荷量，及純化後的產量。另外，對於不純物的管控應採用公認的標準(請參看不純物分析部分)。

### 三. 特性分析<sup>2</sup>

依據疫苗的種類和來源的不同，所需提供的特性分析項目亦不同。若為化學合成或基因工程所製備的蛋白質，須提供胺基酸序列和蛋白質的高級結構分析，並利用一些光譜學例如紫外線/可見光，質譜或電泳加以檢測去胺基，氧化，及凝集等形式的蛋白質。若是疫苗為類病毒顆粒(virus like protein)，則亦須提供自我重組(self-assembly)成聚合物的比例。若疫苗的成分為醣類，須提供醣類的種類測定，必要時需再加上醣類序列分析；若為 DNA 疫苗<sup>7</sup>，則須在臨床試驗第一期即提供質體 plasmid 完整的 DNA 序列分析，並且需指出序列中，哪些部份不是預期下的蛋白質轉譯之開放閱讀框(open reading frames)。若是從病毒或細菌等有機體取得，主要是檢測誘發免疫反應的物質：以流行性感冒病毒為例，一般而言是檢測病毒表面的醣蛋白，例如凝血素(hemagglutinin)，神經胺酸酶(neuraminidase)與其相關的蛋白質。另外，特性分析除了包括抗原結構上的分析外，也包括生物活性分析。生物活性分析包括抗原的效價和活性的分析結果(敘述與結果)，一般而言可提供下列資料(但不限於)例如，蛋白質西方墨點分析(western blot analysis)或酵素連結免疫吸附分析(ELISA)、細胞計量分析、適當的神經毒測試、血清分型、電泳分型、不活化試驗、中和抗體分析、以及效價等。所提供的生物活性分析資料，應說明所使用的對照標準品，活性測試的接受基準、分析方法以及容許的誤差範圍。對於沒有列在藥典中的活性方法，應詳細提供分析方法，確效和試驗結果。

### 四. 活性主成分的規格與管控

廠商須提供活性主成分在規格中的分析方法，與制定規格接受基準(acceptance criteria)的科學性理由，以及活性主成分的檢驗成績書。另外，亦須檢送活性主成分的批次分析(至少三批)，用以支持疫苗產品製備時品質的一致性。

### 五. 不純物分析

不純物的資料應包含主成分中不純物的鑑別與含量分析的數據(如凝膠電泳、管柱沖提、西方墨點法等)，不純物包括：

- (一) 與產品相關的不純物：例如抗原於製程或儲存時產生的變異或改變
- (二) 與製程相關的不純物：主要可以分為三種
  - (1) 培養基相關的成分，如 Trypsin 的殘餘量。
  - (2) 細胞基質的蛋白質或核酸：疫苗的生產方式若經由哺乳類細胞株培養，須在不純物部分加以描述宿主核酸的殘餘量，以確認其核酸的大小和殘餘量不至於誘發致癌基因(oncogene)，世界衛生組織(WHO)<sup>8</sup>所訂的核酸殘餘量為



每劑量小於 10 ng (10 ng/dose)。至於細胞基質的蛋白質殘餘量，應根據廠內經驗來制定其接受範圍，確認其不至於誘發急性免疫反應。

- (3) 純化過程中未去除的試劑:純化過程中所用到不活化的試劑(如甲醛)或用於純化的物質(如蔗糖)和降解核酸的酵素(如 benzonase)，則需列出殘餘量的接受基準。

## 六. 參考標準品

應敘述一級對照標準品與工作對照標準品的製備、特性、規格與安定性。標準品可為公定的標準品，或是廠商自行製備所得。

## 七. 容器封裝系統

應提供如容器來源、材質及適用性。

## 八. 安定性試驗

在主成分的安定性試驗應提供純化後中間物質在每個過程中的安定性(例如:吸收、添加穩定劑、添加防腐劑、低壓冷凍乾燥儲存、乾燥)，若此疫苗類產品為多價(multivalent)的抗原混和，則在主成分的安定性應提供每個單價原液(monovalent bulk)的安定性。安定性資料應包括安定性試驗的條件、試驗項目與試驗結果數據。

## ■ 成品

一般的疫苗類藥品在抗原製備完成後，在成品部分進行抗原與賦形劑以及佐劑(並非所有疫苗類產品都有佐劑)的混合，以凍晶乾燥或無菌過濾的型式進行無菌充填。故在成品部分的審查重點為(1)賦形劑與佐劑的管控(2)製造過程與製程中管控(3)成品的安定性。

### 一. 賦形劑與佐劑的管控

若是新穎的賦形劑與佐劑，亦須提供相關的臨床前安全性試驗，關於佐劑的安全考量可以參考 WHO「Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines」<sup>9</sup>。若是動物來源的賦形劑，需檢視資料包括動物來源地區、預防外來病原的管控，及正式的檢驗報告或檢驗成績書。

### 二. 製造過程和製程中管控

在製程方面，因為大部分疫苗類產品為針劑，審查重點會特別著重無菌過濾和凍晶乾燥的製程確效。

### 三. 成品的安定性



在安定性試驗方面，至少須提供三批代表上市製程之最終產品安定性試驗報告，以訂定其儲存條件與有效期限。關於新型流感疫苗<sup>10</sup>，須提供安定性試驗的計畫書和預定的測試項目，如使用期間，發現規格測試結果異常，應通知有關單位。詳細的安定性試驗報告可參考「藥品安定性試驗基準：生物技術/生物性藥品之安定性試驗」<sup>11</sup>和「藥品查驗登記審查準則-疫苗類藥品的查驗登記」<sup>2</sup>。

### 參、參考資料

1. 王蓉君、朱夢麟、陳恆德：新疫苗法規科學現況之簡介，台灣醫界，2007;50:25-30
2. 行政院衛生署：藥品查驗登記審查準則—疫苗類藥品之查驗登記，2002。
3. Cell substrates for the production of vaccines for human use. European Pharmacopoeia, 6th edition, Council of Europe, France, 01/2008:50203
4. FDA, Center for Biologics Evaluation and Research. Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals, 1993.
5. FDA, Center for Biologics Evaluation and Research. Characterization and qualification of cell substrates and other biological starting materials used in the production of viral vaccines for infectious diseases, 2010
6. Chicken flocks free from specified pathogens for the production and quality control of vaccines. European Pharmacopoeia, 6th edition, Council of Europe, 01/2008:50202
7. FDA, Center for Biologics Evaluation and Research. Considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications, 2007.
8. WHO, WHO Study Group on Cell Substrate for Production of Biologicals, 2007
9. WHO, Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvated vaccines, draft, 2013
10. 行政院衛生署：「新型流感疫苗查驗登記審查準則指引」,2010
11. 行政院衛生署：「藥品安定性試驗基準：生物技術/生物性藥品之安定性試驗」