

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

T/ CVDA

团体标准

T/ CVDA XXXXX—XXXX

兽用蛋白质纳米颗粒（如 VLPs）疫苗的质 控检测技术

Quality control testing technology of protein-based nanoparticles (such as VLPs) for
animal vaccines

（征求意见稿）

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽药协会 发布

目 录

目 录.....	I
前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
3.1 兽用蛋白质纳米颗粒（如 VLPs）疫苗 protein-based nanoparticles for animal vaccines (such as VLPs).....	1
3.2 病毒样颗粒 virus-like particles (VLPs)	1
3.3 佐剂 adjuvant.....	2
4 符号和缩略语.....	2
5 技术要求.....	2
5.1 基本要求.....	2
5.2 兽用蛋白质纳米颗粒抗原来源控制.....	2
5.3 佐剂来源控制.....	2
5.4 关键质量属性要求.....	3
6 检测方法.....	4
6.1 纯净检测.....	4
6.2 浓度检测.....	4
6.3 纯度检测.....	4
6.4 分子量大小检测.....	4
6.5 形态结构检测.....	4
6.6 粒径检测.....	5
6.7 组装效率检测.....	5
6.8 安全性评价.....	5
6.9 抗体反应评价.....	5
7 检测规则和结果判定.....	5
7.1 检验规则.....	6
7.2 结果判定.....	6
参 考 文 献.....	6

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国兽药协会提出并归口。

本文件起草单位：湖南派智生物科技有限公司、中国科学院过程工程研究所、北京大学未来技术学院、青岛易邦生物工程有限公司、江苏南农高科技股份有限公司、湖南农业大学、湖南新一代动物疫苗研究院。

本文件主要起草人：杨毅、张松平、孙育杰、易邦一人、缪芬芳、黄小铭、王乃东、王东亮、湛洋、邹亚文、周文锋、徐凯文、雷磊、罗施乐、麦金辉。

兽用蛋白质纳米颗粒（如 VLPs）疫苗的质控检测技术

1 范围

本文件规定了兽用蛋白质纳米颗粒（如VLPs）疫苗的技术要求、检测方法、检测规则和结果判定等标准。

本文件适用于兽用蛋白质纳米颗粒（如VLPs）疫苗的质量评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

《中华人民共和国兽药典》（2020年版）

《中华人民共和国药典》（2020年版）

《兽药质量监督抽查检验管理办法》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 兽用蛋白质纳米颗粒(如 VLPs)疫苗 protein-based nanoparticles for animal vaccines (such as VLPs)

兽用蛋白质纳米颗粒疫苗的核心组分是抗原蛋白质和佐剂，其中抗原蛋白质须经组装形成蛋白质纳米颗粒（如VLPs）。

兽用蛋白质纳米颗粒疫苗应用于猪牛羊马、禽类、水产和宠物等动物疫病防治。

3.2 病毒样颗粒 virus-like particles (VLPs)

病毒样颗粒是由病毒结构蛋白质组成，模拟真实的天然病毒结构，但不含病毒遗传物质，具有安全性高、免疫效果好、成本低廉等优势，可应用于候选疫苗的研制^{[1][2]}。

3.3 佐剂 adjuvant

按照《中华人民共和国药典（2020年版）》（三部）生物制品通则“生物制品生产用原材料及辅料质量控制规程”定义：“佐剂是与一种疫苗抗原结合以增强【如加强、加快、延长和（或）可能的定向】其特异性免疫反应和疫苗临床效果的一种或多种成分混合的物质。”

4 符号和缩略语

下列缩略语适用于本文件。

VLPs: 病毒样颗粒（virus-like particles）

SDS-PAGE: 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）

ELISA: 酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）

nm: 纳米

mg: 毫克

μL: 微升

mL: 毫升

mg/mL: 毫克每毫升

min: 分钟

°C: 摄氏度

5 技术要求

5.1 基本要求

检测用材料试剂、器械及设备应符合《中华人民共和国兽药典（2020年版）》的有关要求。

5.2 兽用蛋白质纳米颗粒抗原来源控制

兽用蛋白质纳米颗粒抗原（如 VLPs）主要成分是蛋白质，可以利用多种蛋白质表达系统【包括大肠杆菌表达系统、酵母表达系统、昆虫杆状病毒表达系统、HEK293（人胚胎肾细胞系）表达系统、CHO 细胞（中国仓鼠卵巢细胞）、Vero 细胞表达系统等】进行制备。

5.3 佐剂来源控制

兽用疫苗佐剂品类众多,针对不同兽用蛋白质纳米颗粒疫苗可以选择不同类型佐剂进行适当配比混合,使用原料应符合《中华人民共和国兽药典(2020年版)》(三部)附录“3009 兽用生物制品生产用原材料及辅料的一般要求”。

5.4 关键质量属性要求

5.4.1 纯净

应无菌生长,应无支原体生长,应无外源病毒污染。

5.4.2 浓度

抗原蛋白质浓度应符合产品说明书和内装标签【主要成分与含量】对每头份疫苗中抗原含量的规定,总蛋白浓度(包括抗原蛋白和非抗原蛋白)一般应不高于0.5 mg/ml。

5.4.3 纯度

抗原蛋白质纯度应占总蛋白(包括抗原蛋白和非抗原蛋白)含量不低于50%。

5.4.4 分子量大小

抗原蛋白质单体分子量大小需要基本符合理论大小,蛋白质纳米颗粒分子量需基本符合理论大小。

5.4.5 形态结构

在透射电子显微镜观察下,蛋白质纳米颗粒一般为形态规整、边界清晰、结构完整稳定的颗粒。

5.4.6 粒径

蛋白质纳米颗粒粒径一般为10 nm~200 nm^{[3][4]}。

5.4.7 蛋白质纳米颗粒组装效率

蛋白质纳米颗粒应占比总抗原蛋白质含量(包括纳米颗粒蛋白质抗原和非纳米颗粒蛋白质抗原)不低于50%。

5.4.8 安全性评价

免疫动物一般无局部或全身不良反应。个别动物接种疫苗后,局部可能出现轻度肿胀,体温轻度升高,1~3日后恢复正常。

5.4.9 血清学抗体反应

单剂量免疫接种一般不低于14天产生特异性抗体。

6 检测方法

6.1 纯净检测

无菌检测：按照《中华人民共和国兽药典（2020年版）》（三部）附录“3306 无菌检测或纯粹检测法”进行检测。

支原体：按照《中华人民共和国兽药典（2020年版）》（三部）附录“3308 支原体检测法”进行检测。

外源病毒检测：按照《中华人民共和国兽药典（2020年版）》（三部）附录“3305 外源病毒检测法”进行检测。

6.2 浓度检测

按照BCA商品化试剂盒说明书方法，测定蛋白（包括抗原蛋白质和非抗原蛋白质）浓度。根据“6.3：纯度检测”结果，计算得到抗原蛋白质浓度。

6.3 纯度检测

按照《中华人民共和国兽药典（2020年版）》（一部）附录“0541 电泳法”的第五法—SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法，检测抗原蛋白质占比总蛋白的纯度。

6.4 分子量大小检测

按照《中华人民共和国兽药典（2020年版）》（一部）附录“0541 电泳法”的第五法——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法，根据蛋白分子量标准，判断抗原蛋白质单体分子量大小。

蛋白质纳米颗粒分子量，可利用多角度激光散射技术（Multi-Angle Laser Light Scattering, MALLS）进行检测。MALLS是一种基于激光散射原理的分析仪器，能够直接、精确地测量溶液中生物大分子的分子量，MALLS通常与高效液相尺寸排阻色谱联用，对蛋白质纳米颗粒的分子量大小及分子量分布进行检测^[5]。

6.5 形态结构检测

取蛋白质样品10~20 μL，滴加于铜网膜上，静置3~10 min后，用1%~2%磷钨酸负染3~10 min，干燥后通过透射电镜下观察，评价蛋白质纳米颗粒微观形态结构和稳定性，可使用差示扫描量热法补充评价蛋白质纳米颗粒疫苗的稳定性的^[6]。

6.6 粒径检测

取适量蛋白质样品，可按《中华人民共和国兽药典（2020年版）》（一部）附录“0982 粒度和粒度分布测定法”的第三法——光散射法等进行检测。

6.7 组装效率检测

取适量样品，按照《中华人民共和国兽药典（2020年版）》（一部）附录“0512 高效液相色谱法”或附录“0514 分子排阻色谱”方法进行分析，亦可联用多角度激光散射检测技术对蛋白质纳米颗粒分子量大小和分布做补充分析^[7]，得到蛋白质颗粒组装效率应不低于50%。

6.8 安全性评价

按照《中华人民共和国兽药典（2020年版）》（三部）附录“3010 兽用生物制品安全检测的通用要求”执行。

具体可选用方法（1）或方法（2）：

（1）用小鼠、豚鼠或其他替代动物检测，选取适量体重、日龄、数量的动物，按照疫苗使用方法进行免疫（注射、口服或喷鼻等），观察7~14日，应全部健活。

（2）用本体动物检测，按照疫苗安全检测方法进行检测，观察免疫动物的临床指标，包括但不限于体重增长、体温监测、局部或全身不良反应，接种部位不存在（包括但不限于肌肉纤维坏死、结缔组织增生等）病理学变化。不得出现因接种疫苗引起的死亡及明显的不良反应。

6.9 抗体反应评价

血清特异性抗体与抗原蛋白质的结合情况，可通过ELISA进行评价，具体操作方法可根据不同的实验室体系进行调整，可通过包被合适浓度的抗原蛋白质，再先后进行封闭、血清孵育和酶标二抗孵育，再通过显色液显色和终止液终止，根据酶标仪测得吸光值来评价血清特异性抗体与抗原蛋白质的反应活性。

7 检测规则和结果判定

7.1 检验规则

7.1.1 组批

以相同材料、相同生产工艺、连续生产或同一批次生产的产品为一组批。

7.1.2 采样

按照中华人民共和国农业农村部公告第645号文件《兽药质量监督抽查检验管理办法》执行。

7.1.3 检测项目

每批制品均按本文件6.1~6.9所列方法进行检测，包括纯净、浓度、纯度、分子量大小、形态结构、粒径、组装效率、安全性评价和效力评价共九个项目。

7.2 结果判定

所有检测项目结果均符合本标准规定指标，则判定该批产品属于兽用蛋白质纳米颗粒疫苗。

如果检测项目有任何一项不符合本标准规定，则从原批次重新随机加倍抽样，所有检测项目重新复验。若复验结果有任何一项不符合本标准规定，则判定该批产品不属于兽用蛋白质纳米颗粒疫苗。

参 考 文 献

-
- [1] Roldão A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9(10):1149-1176.
- [2] Huang X, Wang X, Zhang J, Xia N, Zhao Q. Escherichia coli-derived virus-like particles in vaccine development. *NPJ Vaccines*. 2017;2:3.
- [3] Wang D, Yuan Y, Liu B, Epstein ND, Yang Y. Protein-based nano-vaccines against SARS-CoV-2: Current design strategies and advances of candidate vaccines. *Int J Biol Macromol*. 2023;236:123979.
- [4] Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(11):787-796.
- [5] 徐嫻, 杨延丽, 邹兴启, 李翠, 朱元源, 秦义娟, 李琰, 盛亚男, 刘业兵, 彭国瑞, 徐小艾, 张松平, 赵启祖. 应用高效体积排阻色谱偶联多角度激光散射鉴定猪圆环病毒 2 型灭活疫苗及病毒样颗粒疫苗抗原[J]. *生物工程学报*. 2022;38(8):2948-2958.
- [6] Yang Y, Zhao Q, Li Z, Sun L, Ma G, Zhang S, Su Z. Stabilization study of inactivated foot and mouth

disease virus vaccine by size-exclusion HPLC and differential scanning calorimetry. *Vaccine*.

2017;35(18):2413-2419.

[7] Yang Y, Li H, Li Z, Zhang Y, Zhang S, Chen Y, Yu M, Ma G, Su Z. Size-exclusion HPLC provides a simple, rapid, and versatile alternative method for quality control of vaccines by characterizing the assembly of antigens. *Vaccine*. 2015;33(9):1143-1150.