

兽用蛋白质纳米颗粒(如 VLPs)质控技术

Quality control technology of protein-based nanoparticles (such as VLPs) for
veterinary use

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
兽用蛋白质纳米颗粒（如 VLPs）质控技术.....	1
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） protein-based nanoparticles (such as VLPs) for veterinary use..	1
3.2 病毒样颗粒 virus-like particles（VLPs）	1
4 符号和缩略语.....	1
5 技术要求.....	2
5.1 基本要求.....	2
5.2 兽用蛋白质纳米颗粒来源控制	2
5.3 关键质量属性要求.....	2
6 检测方法.....	3
6.1 纯净检测.....	3
6.2 浓度检测.....	3
6.3 纯度检测.....	3
6.4 分子量大小检测.....	3
6.5 形态结构检测.....	4
6.6 粒径检测.....	4
6.7 组装效率检测.....	4
6.8 安全性评价.....	4
7 检测规则和结果判定.....	5
7.1 检验规则.....	5
7.2 结果判定.....	5
参 考 文 献.....	5

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管理。

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、韩建文、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）质控技术

1 范围

本文件规定了兽用蛋白质纳米颗粒（如VLPs）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）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）

《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） protein-based nanoparticles (such as VLPs) for veterinary use

兽用蛋白质纳米颗粒系经人工组装形成的蛋白质纳米颗粒（如VLPs）。

兽用蛋白质纳米颗粒应用于猪牛羊马、禽类、水产和宠物等动物疫苗研制和疫病防治。

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]}。

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)

nm: 纳米

mg: 毫克

μL: 微升

mL: 毫升

mg/mL: 毫克每毫升

min: 分钟

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来源控制

兽用蛋白质纳米颗粒 (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 关键质量属性要求

5.3.1 纯净

应无菌生长。

5.3.2 浓度

病毒样颗粒浓度应符合产品说明书和内装标签【主要成分与含量】的规定, 总蛋白浓度一般应不高于 0.5 mg/ml。

5.3.3 纯度

病毒样颗粒纯度应占总蛋白含量不低于 50%。

5.3.4 分子量大小

病毒样颗粒单体分子量大小需要基本符合理论大小，纳米颗粒分子量需基本符合理论大小。

5.3.5 形态结构

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

5.3.6 粒径

病毒样纳米颗粒粒径一般为10 nm~200 nm^{[3][4]}。

5.3.7 病毒样纳米颗粒组装效率

病毒样纳米颗粒应占比总蛋白质含量应不低于50%。

5.3.8 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。

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。

6.2 浓度检测

可按照BCA商品化试剂盒说明书方法，测定蛋白浓度。根据“6.3：纯度检测”结果，计算得到目的蛋白质浓度。

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，检测目的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，根据病毒样颗粒分子量标准，判断抗原蛋白质单体分子量大小。

病毒样纳米颗粒分子量，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，对病毒样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

取病毒样颗粒样品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，评价病毒样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病毒样纳米颗粒的稳定性^[6]。

6.6 粒径检测

取适量病毒样颗粒样品，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（MALLS）对病毒样纳米颗粒分子量大小和分布做补充分析^[7]，得到的病毒样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。

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6.1~6.8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、组装效率和安全性评价共八个项目。

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病毒样纳米颗粒。

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病毒样纳米颗粒。

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] 徐媛, 杨廷丽, 邹兴启, 李翠, 朱元源, 秦义娴, 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.