

13 价肺炎球菌多糖结合疫苗（破伤风类毒素/白喉类毒素）

13 Jia Feiyanqiujun Duotang Jiehe Yimiao

(Poshangfeng Leidusu/ Baihou Leidusu)

13-valent Pneumococcal Polysaccharide Conjugate Vaccine (TT/DT)

本品系采用纯化的 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型肺炎链球菌荚膜多糖抗原，分别经活化后与载体蛋白共价结合为多糖蛋白结合物，加入磷酸铝佐剂及辅料后制成。其中部分型别荚膜多糖抗原分别经活化后与破伤风类毒素共价结合为多糖蛋白结合物，部分型别荚膜多糖抗原分别经活化后与白喉类毒素共价结合为多糖蛋白结合物。用于预防由上述 13 种血清型肺炎链球菌引起的肺炎、脑膜炎、中耳炎和菌血症等疾病。

1 基本要求

生产和检定用设施、原材料及辅料、水、器具、动物等应符合“凡例”的有关要求。

2 制造

2.1 菌种

生产用菌种为 13 种血清型肺炎链球菌菌种（1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型），来源应明确。

2.2 原液

2.2.1 精制多糖

1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型肺炎球菌精制多糖应符合“23 价肺炎球菌多糖疫苗”中 2.1-2.2 项的规定。

2.2.2 精制多糖检定

按 3.1 项进行。

2.2.3 保存与保存时间

粗制多糖、精制多糖于-30℃或以下保存，保存时间应符合批准的要求。

2.2.4 裂解多糖

2.2.4.1 多糖裂解

各型别肺炎球菌精制多糖分别溶解至适宜浓度，过滤后用均质机处理，经超滤浓缩、洗滤、冻干即得各型肺炎球菌裂解多糖。或按另行批准的工艺制备。

2.2.4.2 裂解多糖检定

按 3.2 项进行。

2.2.4.3 保存与保存时间

于-30℃或以下保存，保存时间应符合批准的要求。

2.2.5 载体蛋白

2.2.5.1 白喉类毒素

白喉类毒素原液的制造及检定应符合“吸附白喉疫苗”2.1~2.2 项规定。可采用分子排阻色谱法或其他经批准的方式对白喉类毒素原液进一步纯化，经除菌过滤后，即为白喉类毒素载体。

2.2.5.2 破伤风类毒素

破伤风类毒素原液的制造及检定应符合“吸附破伤风疫苗”2.1~2.2 项规定或经批准的其他方法。可采用分子排阻色谱法或其他经批准的方式对破伤风类毒素原液进一步纯化，经除菌过滤后，即为破伤风类毒素载体。

2.2.5.3 载体蛋白的检定

按 3.3 项进行。

2.2.5.4 保存与保存时间

于-30℃或以下温度保存，保存时间应符合批准的要求。

2.2.6 肺炎球菌多糖蛋白结合物的制备

2.2.6.1 结合

将各相应血清型的肺炎球菌裂解多糖用注射用水溶解，加入适宜 pH 值的缓冲液至合适浓度并搅拌混匀。搅拌状态下，加入适量活化剂进行活化反应后，按比例加入稀释后的白喉类毒素载体或破伤风类毒素载体，搅拌反应一定时间，加入适宜终止溶液终止反应。

2.2.6.2 纯化

将上述反应结束后的各血清型肺炎球菌多糖蛋白结合物按批准的方法经澄清过滤、超滤浓缩后，采用分子排阻色谱法进一步纯化，收集的结合物纯化液经除菌过滤后，即为肺炎球菌多糖蛋白结合物原液。

2.2.7 肺炎球菌多糖蛋白结合物原液检定

按 3.4 项进行。

2.2.8 保存及保存时间

于 2~8℃保存，保存时间应符合批准的要求。

2.3 半成品

2.3.1 半成品配制

按批准的处方将 13 种单型肺炎球菌多糖蛋白结合物原液混合，除菌过滤后，加入适量稀释剂、辅料搅拌均匀，加入磷酸铝佐剂吸附，可补加适量稀释剂、辅料等。

2.3.2 半成品检定

按 3.5 项进行。

2.4 成品

2.4.1 分批

应符合“生物制品分包装及贮运管理”规定。

2.4.2 分装

应符合“生物制品分包装及贮运管理”规定。

2.4.3 规格

每支 0.5ml。每 1 次人用剂量 0.5ml，各型肺炎球菌多糖含量为 1 型 1.8 μg 、3 型 2.1 μg 、4 型 2.1 μg 、5 型 1.75 μg 、6A 型 1.85 μg 、6B 型 4.4 μg 、7F 型 1.75 μg 、9V 型 2.3 μg 、14 型 1.35 μg 、18C 型 3.65 μg 、19A 型 1.6 μg 、19F 型 1.25 μg 、23F 型 2.35 μg 。

2.4.4 包装

应符合“生物制品分包装及贮运管理”规定。

3 检定

3.1 精制多糖检定

3.1.1 鉴别

采用免疫双扩散法（通则 3403），各型多糖应与其相应的特异性抗血清产生明显沉淀线；或采用速率比浊法（23 价肺炎球菌多糖疫苗 3.3.2），应可测出各单型多糖含量。

3.1.2 检查

3.1.2.1 固体总量

依法（通则 3101）测定，各型精制多糖干燥至恒重。

3.1.2.2 蛋白质含量

依法测定（通则 0731 第二法 方法 1），各型蛋白质含量限度见附表。

3.1.2.3 核酸含量

依法测定（通则 0401），核酸在 260nm 波长处的吸收系数 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) 为 200，各型核酸含量限度见附表。

3.1.2.4 *O*-乙酰基含量

依法测定（通则 3117）1 型肺炎球菌多糖的 O-乙酰基含量，含量限度见附表。

3.1.2.5 磷含量

依法测定（通则 3103），或采用经批准的其他方法，各型磷含量限度见附表。

3.1.2.6 糖醛酸含量

照“23 价肺炎球菌多糖疫苗”3.1.2.6 项测定。1、3、5、9V 型精制多糖的糖醛酸含量限度见附表。

3.1.2.7 甲基戊糖含量

照“23 价肺炎球菌多糖疫苗”3.1.2.7 项测定。6A、6B、7F、18C、19A、19F、23F 型精制多糖的甲基戊糖含量限度见附表。

3.1.2.8 氨基己糖含量

照“23 价肺炎球菌多糖疫苗”3.1.2.8 项测定。4、5、9V、14、19A、19F 型精制多糖的氨基己糖含量限度见附表。

3.1.2.9 总氮含量

依法测定（通则 0704 第三法）或采用经批准的其他方法，各型总氮含量限度见附表。

3.1.2.10 多糖分子大小分布测定

按“23 价肺炎球菌多糖疫苗”3.1.2.10 项进行。各型多糖 K_0 值及小于等于 K_0 值标准的多糖回收率见附表。

3.1.2.11 有机溶剂残留量

依法测定（通则 0521），或采用经批准的其他方法，应符合批准的要求。

3.1.3 细菌内毒素检查

依法检查（通则 1143），各型细菌内毒素检查含量应小于 0.5EU/μg。

附表 各型精制多糖检定各相关项目限度要求

	蛋白质 (%)	核酸 (%)	总氮 (%)	磷 (%)	分子大小分布			糖醛酸 (%)	氨基己 糖 (%)	甲基戊糖 (%)	O-乙酰 基 (%)
					K _d		小于等于 K _d 值标准的多 糖回收率 (%)				
					CL-4B	CL-2B					
1	≤2	≤2	3.5~6.0	0~1.5	≤0.15		≥30	≥0.45			≥1.8
3	≤5	≤2	0~1.0	0~1.0	≤0.15		≥35	≥0.540			
4	≤3	≤2	4.0~6.0	0~1.5	≤0.15		≥30		≥0.40		

5	≤7.5	≤2	2.5~6.0	≤2.0		≤0.60	≥40	≥012	≥020		
6A	≤2.0	≤2.0	0~2.0	2.5~5.0		≤0.50	≥30			≥15.0	
6B	≤2	≤2	0~2.0	2.5~5.0		≤0.50	≥30			≥015	
7F	≤5	≤2	1.5~4.0	0~1.0	≤0.20		≥25			≥513	
9V	≤2	≤2	0.5~3.0	0~1.0		≤0.45	≥35	≥515	≥513		
14	≤5	≤2	1.5~4.0	0~1.0	≤0.30		≥35		≥520		
18C	≤3	≤2	0~1.0	2.4~4.9	≤0.15		≥30			≥014	
19A	≤2	≤2	0.6~3.5	3.0~7.0	≤0.45		≥40		≥012	≥020	
19F	≤3	≤2	1.4~3.5	3.0~5.5	≤0.20		≥40		≥12.5	≥120	
23F	≤2	≤2	0~1.0	3.0~4.5	≤0.15		≥30			≥037	

3.2 裂解多糖检定

3.2.1 分子大小分布测定

照“23 价肺炎球菌多糖疫苗” 3.1.2.10 项方法测定。1、3、4、7F、14、18C、19A、19F 和 23F 型多糖采用琼脂糖 CL-4B 凝胶柱， K_{av} 值应在 0.20~0.50， K_{av} 值在 0.20~0.50 之间的回收率应为：1 型≥77%、3 型≥66%、4 型≥77%、7F 型≥64%、14 型≥53%、18C 型≥67%、19A 型≥64%、19F 型≥63%、23F 型≥73%；5、6A、6B 和 9V 型多糖采用琼脂糖 CL-2B 凝胶柱， K_{av} 值应在 0.45~0.75， K_{av} 值在 0.45~0.75 之间的回收率应为：5 型≥73%、6A 型≥78%、6B 型≥69%、9V 型≥69%。

3.2.2 细菌内毒素检查

依法检查（通则 1143），应不高于 0.5EU/μg。

3.3 载体蛋白检定

3.3.1 蛋白质含量

依法测定（通则 0731 第二法 方法 1），应不低于 50mg/ml。

3.3.2 单体含量

照分子排阻色谱法（通则 0514）测定或采用经批准的其他方法，按面积归一化法计算。

色谱条件 用葡聚糖-琼脂糖复合基质为填充剂；以 0.15mol/L 氯化钠或其他适宜溶液为流动相；检测波长为 280nm；进样体积为 0.5ml；

测定法 分别取破伤风类毒素与白喉类毒素，注入液相色谱仪，记录色谱图。

限度 破伤风类毒素载体单体含量应不低于 85%，白喉类毒素载体单体含量应不低于 90%。

3.3.3 细菌内毒素检查

依法检查（通则 1143），应不高于 10EU/mg。

3.3.4 无菌检查

依法检查（通则 1101），应符合规定。

3.4 肺炎球菌多糖蛋白结合物原液检定

3.4.1 鉴别

采用免疫双扩散法（通则 3403），各型别肺炎球菌多糖蛋白结合物原液应分别与对应型肺炎球菌特异性抗血清（或抗血清因子）及相应的破伤风抗毒素或白喉抗毒素产生明显沉淀线。或采用经批准的其他方法。

3.4.2 多糖含量

3.4.2.1 3、4、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F 和 23F 型多糖含量

依法测定（通则 0401）或采用经批准的其他方法测定。

多糖参考品贮备液 精密称定各型别多糖参考品 125mg，加 25ml 水充分溶解，制成每 1ml 中约含 5mg 的溶液，照固体总量测定法（通则 3101）测定其固体总量。取该溶液适量，用水稀释制成每 1ml 中约含固体总量 1mg 的溶液，即得多糖参考品贮备液。

多糖参考品溶液 精密量取多糖参考品贮备液，用适宜溶剂稀释制成每 1ml 中约含 100 μ g 的溶液，得多糖参考品工作液。精密量取多糖参考品工作液 0ml、0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml，分别置于试管中，加适宜溶剂至 1.0ml，摇匀，作为多糖参考品溶液。各浓度平行配制两份。

测定法 向多糖参考品溶液各管中缓慢加入 0.2%蒽酮-硫酸溶液（称取 0.6g 蒽酮，加 10 ml 无水乙醇使溶解，然后加入冷却的 75%硫酸-生理盐水 300ml，充分溶解，混匀；室温贮存，临用配制）4ml，混匀，于沸水浴 20 分钟，冷却至室温。于 620nm 波长处读取各管的吸光度值，同时以空白管作为对照。精密量取供试品溶液 1.0ml 置于试管中，自“缓慢加入 0.2%蒽酮-硫酸溶液”起同法操作。以多糖参考品溶液系列浓度（ μ g/ml）对其相应的吸光度值作直线回归，求得直线回归方程。将供试品溶液的吸光度值带入直线回归方程中，根据稀释倍数计算出供试品的多糖含量。

限度 各型多糖含量应不低于 112 μ g/ml，或应符合批准的要求。

3.4.2.2 1 型和 5 型多糖含量

照“23 价肺炎球菌多糖疫苗”3.1.2.6 项测定或采用经批准的其他方法测定。

多糖参考品贮备液 精密称定相应型别多糖参考品约 50mg，加水 10ml 使溶解，制成每 1ml 中约含 5mg 的溶液，照固体总量测定法（通则 3101）测定其固体总量。取该溶液适量，用水定量稀释制成每 1ml 中约含固体总量 1mg 的溶液，即得多糖参考品贮备液。

多糖参考品溶液 精密量取多糖参考品贮备液适量，用适宜溶剂定量稀释制成每 1ml 中约含 100 μ g 的溶液，得多糖参考品工作液。精密量取 0ml、0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml，分别置于试管中，加适宜溶剂至 1.0ml，摇匀，作为多糖参考品溶液。各浓度平行配制两份。

测定法 照“23 价肺炎球菌多糖疫苗”3.1.2.6 项方法测定 1 型和 5 型肺炎球菌多糖蛋白结合物中多糖含量。

限度 各型多糖含量应不低于 112 μ g/ml，或应符合批准的要求。

3.4.3 游离多糖含量

采用脱氧胆酸钠沉淀法或其他适宜方法将结合物原液中与蛋白质结合的多糖沉淀，分别照 3.4.2 项测定沉淀前结合物原液和沉淀后上清液中的多糖含量。3、7F 型应不高于 10%，1、4、5、6B、9V、14、18C 型应不高于 15%，6A、19A、19F 型应不高于 20%，23F 型应不高于 25%。或应符合批准的要求。

同法检测相应型别多糖对照溶液或衍生物（如有）沉淀前后的多糖含量，分别计算多糖回收率，应为 90%–110%。

3.4.4 蛋白质含量

依法测定（通则 0731 第二法 方法 1），蛋白质含量应符合批准的要求。

3.4.5 多糖与蛋白质比值

照 3.4.2 和 3.4.4 项试验结果计算，多糖与蛋白质比值应符合批准的要求。

3.4.6 分子大小分布测定

采用琼脂糖 CL-4B 凝胶柱（1.6cm $\times$ 100cm），依法测定（通则 3419 第二法）。1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 型肺炎球菌多糖蛋白结合物原液 K_{av} 值小于等于 0.30 的回收率应不低于 80%；23F 型肺炎球菌多糖蛋白结合物原液 K_{av} 值小于等于 0.30 的回收率应不低于 70%；6A、19A 型肺炎球菌多糖蛋白结合物原液 K_{av} 值小于等于 0.30 的回收率应不低于 60%。

3.4.7 游离蛋白含量

照高效液相色谱法（通则 0512）或其他适宜方法测定。

色谱条件 用亲水性球形聚甲基丙烯酸酯颗粒为填充剂；以 10mmol/L PBS 溶液为流动相；检测波长为 214nm；进样体积 100 μ l。

限度 应不高于 5.0%。

3.4.8 残留试剂含量

如适用，应采用适宜的方法测定活化、结合或纯化等工艺过程中使用的试剂残留量，并制定适宜的可接受标准。或应符合批准的要求。

3.4.9 无菌检查

依法检查（通则 1101），应符合规定。

3.4.10 细菌内毒素检查

依法检查（通则 1143），应不高于 0.5EU/ μ g。

3.5 半成品检定

无菌检查 依法检查（通则 1101），应符合规定。

3.6 成品检定

3.6.1 外观

应为白色或乳白色混悬液，无异物。

3.6.2 检查

3.6.2.1 pH 值

依法测定（通则 0631），应为 5.0~7.0。

3.6.3.2 装量

依法检查（通则 0102），应不低于标示量。

3.6.3.3 渗透压摩尔浓度

依法测定（通则 0632），应为 200~400mOsmol/kg。

3.6.3.4 氯化钠含量

依法测定（通则 3107），应为 7.5~9.5g/L。

3.6.3.5 铝含量

依法测定（通则 3106），应为 0.075~0.125mg/剂。

3.6.3.6 聚山梨酯 80 含量

如添加聚山梨酯 80，依法测定（通则 3203）或采用经批准的其他方法测定，应符合批准的要求。

3.6.3.7 各型多糖含量

精密量取 3ml 供试品，加入适宜的解吸附液进行解吸附后，必要时采用适宜稀释液进行进一步稀释，使得供试品溶液中各型别多糖含量在标准曲线的浓度范围内。照“23 价肺炎球菌多糖疫苗”3.3.2 项方法测定，各型多糖含量应为标示量的 70%~130%。

3.6.3.8 各型抗原吸附率

精密量取 3ml 供试品至离心管中，称取重量 W_1 ，8000g 离心 5 分钟，去除上清液，向沉淀中补加稀释液至 3ml 或向沉淀中补加稀释液至重量为 W_1 ($W_1 \pm 0.03g$)，混匀，如有必要，8000g 再次离心 5 分钟，去除上清液，向沉淀中补加稀释液至 3ml 或向沉淀中补加稀释液重量为 W_1 (W_1 为沉淀中补加稀)，混匀备用。向上述溶液中加入适宜解吸附液进行解吸附处理，得供试品溶液。必要时采用适宜稀释液进行进一步稀释，使得供试品溶液中各型别多糖含量在标准曲线的浓度范围内。或采用经批准的其他方法制备供试品溶液。

照“23 价肺炎球菌多糖疫苗”3.3.2 项方法测定。计算各型抗原吸附率，1 型 $\geq 40\%$ 、3 型 $\geq 40\%$ 、4 型 $\geq 20\%$ 、5 型 $\geq 20\%$ 、6A 型 $\geq 20\%$ 、6B 型 $\geq 40\%$ 、7F 型 $\geq 25\%$ 、9V 型 $\geq 20\%$ 、14 型 $\geq 40\%$ 、18C 型 $\geq 40\%$ 、19A 型 $\geq 40\%$ 、19F 型 $\geq 38\%$ 、23F 型 $\geq 38\%$ ，或应符合批准的要求。

3.6.3.9 总蛋白质含量

依法测定（通则 0731 第二法 方法 1），应符合批准的要求。

3.6.3.10 结合蛋白质含量

精密量取供试品 3ml 于离心管中，8000g 离心 10 分钟，收集上清液，或弃去上清后，向沉淀中加入氯化钠注射液至 3ml，即得供试品溶液。依法测定供试品溶液中结合蛋白质浓度（通则 0731 第二法 方法 1），并计算供试品中的结合蛋白质的含量，应不低 70%。

3.6.3.11 无菌检查

依法检查（通则 1101），应符合规定。

3.6.3.12 异常毒性检查

依法检查（通则 1141），应符合规定。注射剂量为每只小鼠 0.5ml，含 1 次人用剂量；每只豚鼠 5ml，含 10 次人用剂量。

3.6.3.13 细菌内毒素检查

依法检查（通则 1143），应小于 10EU/剂。

4 保存、运输及有效期

于 2~8℃ 保存和运输。自生产之日起，有效期不超过 24 个月或符合批准的要求。

5 使用说明

应符合“生物制品分包装和贮运管理”规定和批准的内容。

上网公示稿