

計畫編號： DOH101-DC-2004

行政院衛生署疾病管制局 101 年度科技研究發展計畫

抗蛇毒血清凍晶注射劑安定性試驗

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局血清疫苗研製中心

計畫主持人：李政道

研究人員：陳蓓諭、吳慧娟、曾雅鈴、溫振谷、黃秀懿、陳雅惠

執行期間：101 年 1 月 1 日至 101 年 12 月 31 日

目 錄

頁 碼

封面	(1)
目錄	(2)
中文摘要	(3)
前言	(4)
材料與方法	(6)
結果	(10)
討論	(13)
參考文獻	(14)

中文摘要

近來衛生署為提昇國內藥廠品質，對 GMP 推展至 PIC/S GMP，而本局生產之抗蛇毒血清製劑共有四種：1. 抗龜殼花及赤尾鮫蛇毒血清凍晶注射劑；2. 抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清凍晶注射劑；3. 抗百步蛇毒血清凍晶注射劑；4. 抗鎖鏈蛇毒血清凍晶注射劑。以上四種產品皆必須執行上市後之安定性監控，以確保產品品質，而監控純化製程中的消化步驟是否消化完全可幫助製程穩定性也符合 cGMP 品質控管精神。本計畫為監控抗蛇毒血清製劑存放於 4°C 的安定性與其效價的關聯，結果顯示產品在架儲期內皆符合規格要求。而利用 35°C 加速試驗評估運銷抗蛇毒血清製劑時可能遭到短暫脫離標示之儲存條件，結果疫苗仍維持其有效性。此外也利用蛋白質電泳法及西方墨點分析方法結果顯示純化製程中大部分 IgG 經 pepsin 消化成 F(ab')₂ 且無 Fc 片段殘留，此試驗可管控馬血清中抗蛇毒蛋白純化完全與否以維持產品穩定性，最終能達到品質最佳與保證的效益。

關鍵字：抗蛇毒血清凍晶注射劑、效價、安定性、加速試驗

前言

臺灣氣候溫暖潮濕適合蛇類繁殖，早期生態未破壞前處處可見蛇類出沒，其中毒蛇約23種，臨床上較常見的六大毒蛇分別是出血毒性的龜殼花、赤尾鮫及百步蛇；神經毒性的兩傘節及飯匙倩(眼鏡蛇)；混合毒性之鎖鏈蛇。除了鎖蛇分佈較偏重南部及東部山區之外，其它五種毒蛇在全台各地都可見，其中以被赤尾鮫咬傷比率最高，而百步蛇雖然在六大毒蛇中毒性較弱，但是每次釋放大量的毒液，所以致死率高居第一。咬傷之後臨床上的症狀，神經毒性蛇毒會造成肌肉麻痺、呼吸衰竭；出血性蛇毒則會使局部腫脹、瘀血、傷口流血，劇痛，全身性的症狀則是血小板降低與各器官出血。治療蛇毒咬傷使用正確種類的抗毒蛇血清是最決定性的治療[1, 2]。本局血清疫苗研製中心為目前國內唯一產製抗蛇毒血清的cGMP疫苗廠，目前供應4種抗蛇毒血清，其中2種為雙價型（抗龜殼花及赤尾鮫蛇毒血清、抗飯匙倩及兩傘節蛇毒血清），另2種則為單價型（抗百步蛇毒血清、抗鎖鏈蛇毒血清），有效期皆為5年。目前國外之文獻大多先以胃蛋白酵素消化法(pepsin digestion)，直接處理抗體切取F(ab')₂，再經過不同方式精製純化的血清[3]，本中心產製之抗蛇毒血清亦是以此方法純化的血清。

近來衛生署為提昇國內藥廠品質與國際間對於GMP的要求與日俱增，對GMP之推行由原有GMP到cGMP藥品優良製造確效作業（current Good Manufacturing Practice，簡稱cGMP），再發展至最近之PIC/S GMP，國際醫藥品稽查協約組織（The Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme, PIC/S）是由世界各國衛生機關所組成的跨國性國際組織，PIC/S GMP Guide勢必為未來GMP國際標準。依衛生署規定，104年1月1日起，所有西藥製劑製造工廠必須全面完成實施國際GMP標準(PIC/S GMP)。

疫苗品質最新觀念為生產之一致性（Consistency），所有製程（In-Process control），均須控管而非僅檢驗最終產品[4]。安定性測試應被視為從產品開發至取得許可執照到上市後追蹤之連續過程，雖然每個階段測試項目或環境因子不同，但安定性是一個持續之追蹤流程，須監測至疫苗整個生命週期。依據PIC/S GMP的規範，藥品上市後，應依產品設計適當的持續性安定性計畫並進行疫苗安定性之持續監控（Ongoing monitoring），此監控之

主要目的為支持產品之效期規格[5]。所有影響安定性之環境因子中，對疫苗均有影響的是溫度，濕度則因包裝方式，故對大多數疫苗並無影響。

目前由本局疫苗中心所產製上市販售的抗蛇毒血清凍晶注射劑，上市前均依照中華藥典規範必須通過包括pH值、無菌、異常毒性、效價等品管檢驗相關測試項目[6]，品質有一定保障。疫苗安定性測試是用來測定疫苗品質的改變，此品質改變包括免疫性及安全性二方面，評估疫苗安定性最大的問題為許多疫苗具有特殊之生物活性，生物分析對疫苗之品管扮演很重要的角色，而小鼠模式的中和效價試驗通常用來作為抗蛇毒血清疫苗安定性試驗之指標變數。由於生物分析之變異性較大，且蛇毒依區域性及種類毒性也會有所差異，無法使用統一標準品進行試驗，故試驗所使用的蛇毒在每次試驗時也應同時進行控制組並應建立其檢定用蛇毒之安定性資料。

為監控疫苗及維護良好之疫苗品質，以期達到最好的接種效果，執行疫苗上市後的安定性與確保疫苗之有效性實為必要[4, 7]。而執行短時間暴露於標示溫度外之疫苗安定性試驗更可提供疫苗運輸及使用時實質之參考價值。

目前本疫苗中心所使用之抗蛇毒血清均來自於以蛇毒免疫馬匹所得到的抗蛇毒血清，其製造過程中以胃蛋白酶消化法精製純化的血清，抗體以F(ab')₂形式使用。本計畫將利用西方墨點法(western blotting)分析抗蛇毒血清是否為F(ab')₂及是否有無Fc片段殘留，確保製程中消化步驟是否完全。建立製程中之品管方法可幫助提升產品品質並確保產品之穩定性與一致性。

材料與方法

(一) 抗蛇毒血清凍晶注射劑分別儲放於 4°C 不同時間點效價改變情形

本計畫將抽樣留存的抗蛇毒血清凍晶注射劑作為本研究之疫苗樣本，將檢驗合格後之抗蛇毒血清凍晶注射劑成品分別儲存 0、12、24、36、48、60 個月，儲存條件為 2~10°C 遮光保存[8]。安定性試驗以產品外觀性狀及效價試驗二項試驗來進行，依據本中心訂定之持續安定性試驗計畫書 P8.11.5，外觀性狀合格指標為本品需為白色至灰褐色之固體，溶解後則為無色、淡黃褐色或淡綠色透明或微現乳光之液體，無臭或微帶保藏劑之特臭；效價試驗合格指標為每瓶含 1,000 抗毒單位以上，證明在架儲期間產品品質仍能保持有效性及安全性。

(1) 抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清效價試驗方法如下：

(試驗所用檢定用毒素由製造部門自行凍乾製造)

1 毒力之測定：

- 1-1 蛇毒以磷酸緩衝溶液(pH: 7.0)或生理食鹽水或其他適當溶液，稀釋成三種等差稀釋液。
- 1-2 蛇毒之稀釋液，由腹腔注射11~14 g健康小白鼠3隻，每隻0.2 mL。
- 1-3 觀察48小時，記錄死亡隻數，以3隻全死的最低致死劑量作為MLD (minimal lethal dose，最低致死量)。

2 效價之測定：

- 2-1 每瓶抗蛇毒血清凍晶注射劑以20ml回溶，再將蛇毒血清以磷酸緩衝溶液(pH: 7.0)或生理食鹽水水稀釋成適當三種等差稀釋液。
- 2-2 每一種稀釋液取0.6 mL與每0.2 mL含4 MLD之蛇毒溶液0.6 mL混合，於37 °C分別放置1時，以進行中和作用。
- 2-3 中和後的混合液由腹腔注射11-14 g健康小白鼠3隻，每隻0.2 mL。
- 2-4 觀察48小時，記錄死亡隻數及存活隻數，並計算其效價。

3 毒力對照:

- 3-1 測定抗蛇毒血清中和效價之同時，另以0.5、1.0及1.5 MLD之蛇毒溶液，由腹腔注射相同體重之健康小白鼠3隻。
- 3-2 注射1.0及1.5 MLD之小白鼠應全部死亡，注射0.5 MLD之小白鼠不應全死。

4 效價計算方式: 效價 (MLD / mL) = 4 MLD / 0.2 mL X血清稀釋倍數

4-1 每瓶血清效價= 效價 (MLD / mL) X 20 mL

(2) 抗鎖鏈蛇毒血清效價試驗方法如下：

1 毒力之測定：

1-1 鎖鏈蛇檢定毒以磷酸緩衝溶液 (pH: 7.0)、生理食鹽水或其他適當溶液，稀釋成五種以上等比 (2倍) 稀釋液，稀釋方法如下：

鎖鏈蛇毒濃度：1mg/mL

1mL 鎖鏈蛇毒+ 4mL saline ----- 甲 (0.2mg/mL)

3mL 甲 + 3mL saline ----- 乙 (20 μ g/0.2mL)

3mL 乙 + 3mL saline ----- 丙 (10 μ g/0.2mL)

3mL 丙 + 3mL saline ----- 丁 (5 μ g/0.2mL)

3mL 丁 + 3mL saline ----- 戊 (2.5 μ g/0.2mL)

3mL 戊 + 3mL saline ----- 己 (1.25 μ g/0.2mL)

3mL 己 + 3mL saline ----- 庚 (0.625 μ g/0.2mL)

3mL 庚 + 3mL saline ----- 辛 (0.3125 μ g/0.2mL)

1-2 將每組鎖鏈蛇毒之稀釋液，分別由腹腔注射11~14 g健康小白鼠10隻，每隻注射0.2mL。

1-3 觀察48小時，記錄其死亡隻數，並求出LD₅₀ (50% lethal dose)。

1-4 毒力計算方式：

$$LD_{50} = \frac{\text{低於 50\% 死亡率\% 之濃度} \times \text{Antilog} (50\% \text{ 死亡率} - \text{低於 50\% 之死亡率\%})}{(\text{高於 50\% 之死亡率\%} - \text{低於 50\% 之死亡率\%}) \log 2}$$

2 效價之測定：

2-1 將抗鎖鏈蛇毒血清，以磷酸緩衝溶液 (pH: 7.0)、生理食鹽水或其他適當溶液稀釋成適當五種以上等比 (1.5倍) 稀釋液。若為抗鎖鏈蛇毒血清凍晶注射劑，則須先以10 mL磷酸緩衝溶液 (pH: 7.0)、生理食鹽水或其他適當溶液回溶製成原液後，再進行稀釋。稀釋方法如下：

原液 3mL + saline 1.5 mL-----A

A 液 3mL + saline 1.5 mL-----B

B 液 3mL + saline 1.5 mL-----C

C 液 3mL + saline 1.5 mL-----D

D 液 3mL + saline 1.5 mL-----E

E 液 3mL + saline 1.5 mL-----F

F 液 3mL + saline 1.5 mL-----G

2-2 取每一種稀釋液與每0.2 mL含8 LD₅₀之蛇毒溶液等量混合，於37 °C分別放置1小時，以進行中和作用。

2-3 中和後，分別由腹腔注射11-14 g健康小白鼠10隻，每隻注射0.2 mL。

2-4 觀察48小時，記錄死亡隻數及存活隻數，並計算其效價。

3 效價計算方式：

$ED_{50} = \text{Anti} \left[\left(\log \text{存活率大於 } 50\% \text{之稀釋倍數} \right) + \left(\text{存活率大於 } 50\% - 50\% \text{存活率} \right) / \left(\text{存活率大於 } 50\% - \text{小於 } 50\% \right) \log 1.5 \right]$

3-1 每mL血清效價 = $40 \text{ LD}_{50}/\text{mL} \times ED_{50}$

3-2 每瓶血清效價 = $40 \text{ LD}_{50}/\text{mL} \times ED_{50} \times 10 \text{ mL/dose}$

(二) 抗蛇毒血清凍晶注射劑加速試驗

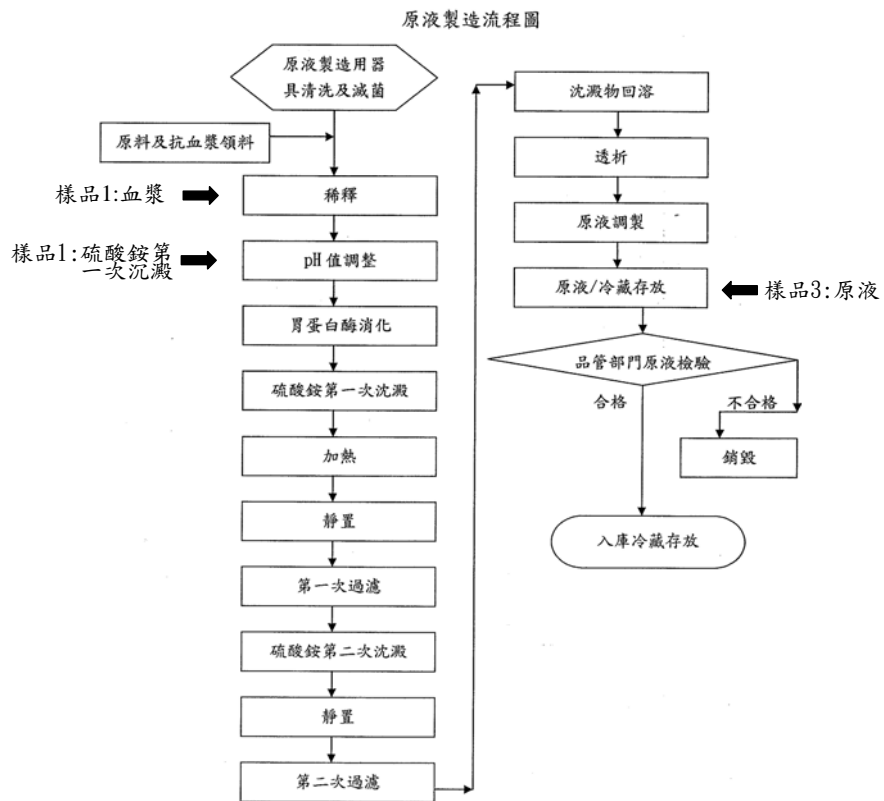
依據國際協調會議(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use, ICH)之指引[8]，由於本研究之疫苗樣本標示儲存於 2-8°C，且考慮到台灣夏季氣候溼熱，故加速試驗溫度採取 35°C±2°C 儲放。樣品存放一定時間後測其效價是否發生改變，以研究運銷抗蛇毒血清凍晶注射劑時可能遭到短暫脫離標示之儲存條件，在該情況下是否影響其效力。

因考量醫療院所對於抗蛇毒血清短暫脫離標示之儲存條件使用之虞慮，本試驗設計將過去上市之抗龜殼花及赤尾鮫蛇毒血清凍晶注射劑、抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清凍晶注射劑及抗百步蛇毒血清凍晶注射劑擺放於 10°C、15°C、25°C 及 35°C 培養箱 24 小時後移至 4°C 冷藏庫各 1、3、6、9 個月，在這些時間點分別進行效價試驗以測試儲放溫度是否會影響到疫苗效價之改變。

實驗設計另將抗蛇毒血清凍晶注射劑放置於 35°C 培養箱 1 個月後移至 4°C 冷藏庫 6 個月，進行效價試驗觀察抗蛇毒血清是否仍維持品質。

(三) 抗蛇毒血清製程中以胃蛋白酶消化步驟品管分析

收集101年抗蛇毒血清製程中胃蛋白酶消化步驟前後之血清樣本(圖一)，先以BCA蛋白質分析套組測量蛋白質濃度均一化樣品蛋白質量，再以Tris-Glycine預鑄膠片蛋白質電泳法及快速西方墨點法比較pepsin消化前後血清樣本，實驗結果以蛋白質電泳濃度及分子量位置分析IgG 及 IgG F(ab')₂ 精製純化程度；而西方墨點法則以Rabbit anti-horse IgG進行免疫染色，其抗體會與 Horse total IgG雜交而呈色，用以分析pepsin切割horse Ig後之抗蛇毒血清抗體是否為F(ab')₂及是否有無Fc片段殘留[9]。



圖一、收集製程中抗蛇毒血漿、硫酸銨第一次沉澱及抗蛇毒血清蛇毒原液樣品

結果

- (一) 將已上市的抗鎖鏈蛇毒血清凍晶注射劑儲放於冷藏庫 4°C 各 1、2、3、4、5 及 6 年，執行效價試驗結果可得知儲放 6 年之抗鎖鏈蛇毒血清仍維持其每瓶力價大於 1000U 之品質規格(表一)。

表一、抗鎖鏈蛇毒血清儲存於 4°C 各 1、2、3、4、5 及 6 年力價的結果

[抗鎖鏈蛇毒血清]儲存於 4°C 各 1、2、3、4、5 及 6 年力價的結果(U/瓶)							
批號	0 年	1 年	2 年	3 年	4 年	5 年	6 年
FR9301	1252	1588	1769	1747	1742	1606	1626
FR9701	1464	1840	1784	1653	-	-	-

- (二) 建立抗蛇毒血清凍晶注射劑放置於 10°C、15°C、25°C 及 35°C 培養箱 24 小時後移至 4°C 冷藏庫各 1、3、6、9 個月的安定性資料(表二)，結果皆符合檢驗規格。

表二、抗蛇毒血清於 10°C、15°C、25°C 及 37°C 24 小時後儲存於 4°C 各一、三、六及九個月力價的結果

[抗蛇毒血清]儲存在不同溫度 24 小時放置於 4°C 一個月力價結果(U/瓶)					
批號		10°C	15°C	25°C	35°C
FH10001	抗龜殼花	1600	1600	1600	1600
	抗赤尾鮫	>2000	>2000	>2000	>2000
FN9901	抗雨傘節	1200	1200	1200	1200
	抗飯匙倩	1200	1200	1200	1200
FA9801	抗百步蛇	1200	1200	1200	1200
[抗蛇毒血清]儲存在不同溫度 24 小時放置於 4°C 三個月力價結果					
批號		10°C	15°C	25°C	35°C
FH10001	抗龜殼花	1600	1600	1200	1200
	抗赤尾鮫	>2000	>2000	>2000	>2000
FN9901	抗雨傘節	1600	1200	1600	1600
	抗飯匙倩	1600	1200	1200	1200
FA9801	抗百步蛇	1200	1600	1200	1200

[抗蛇毒血清]儲存在不同溫度 24 小時放置於 4°C 六個月力價結果					
批號		10°C	15°C	25°C	35°C
FH10001	抗龜殼花	1600	1200	1200	1200
	抗赤尾鮫	>2000	>2000	>2000	>2000
FN9901	抗雨傘節	1600	1600	1600	1600
	抗飯匙倩	1200	1200	1200	1200
FA9801	抗百步蛇	1200	1600	1600	1200

[抗蛇毒血清]儲存在不同溫度 24 小時放置於 4°C 九個月力價結果(U/瓶)					
批號		10°C	15°C	25°C	35°C
FH10001	抗龜殼花	1200	1200	1200	1200
	抗赤尾鮫	>2000	>2000	>2000	>2000
FN9901	抗雨傘節	1600	1600	1600	1200
	抗飯匙倩	1200	1200	1200	1200
FA9801	抗百步蛇	1200	1200	1200	1200

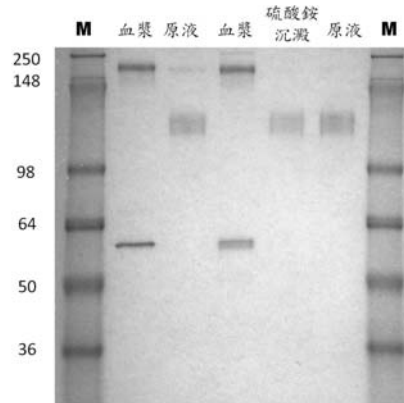
(三) 實驗設計另將抗蛇毒血清凍晶注射劑放置於 35°C 培養箱一個月後移至 4°C 冷藏庫六個月，進行效價試驗結果如表三，結果皆符合檢驗規格。

表三、抗蛇毒血清於 37°C 1 個月後儲存於 4°C 六個月力價的結果

[抗蛇毒血清]儲存於 35°C 一個月後放置於 4°C 六個月力價結果(U/瓶)			
批號		原始力價	力價
FH10101	抗龜殼花	1200	1200
	抗赤尾鮫	>2000	>2000
FN10101	抗雨傘節	1200	1200
	抗飯匙倩	1200	1200
FA9801	抗百步蛇	1200	1200

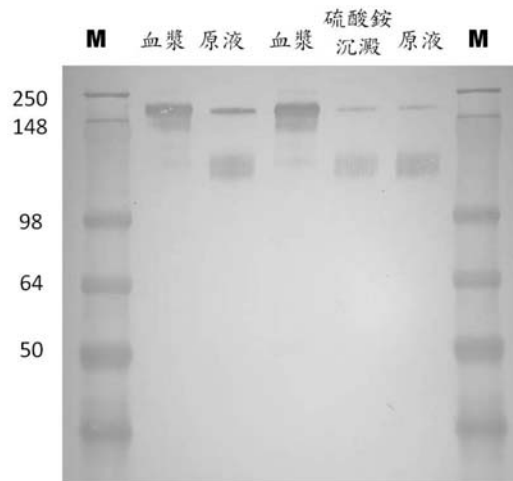
(四) 本計畫將收集製程中胃蛋白酶消化步驟前後之血清樣本，以 Tris-Glycine 蛋白質電泳法及西方墨點法分析比較消化前後血清樣本，可了解所得到的抗蛇毒血清抗體是否為 F(ab')₂ 及是否有無 Fc 片段殘留。蛋白質電泳實驗結果如圖一所示 (Lane2~3:HC100-60B 製程; Lane2~3:HC101-61B 製程)，在 PAGE 上可以很清楚看到血漿樣本呈現 150kDa IgG 及 67kDa Albumin, 經過 pepsin 消化後會產生 F(ab')₂

fragment 及很多 Fc subfragment,這些小片段的 Fc 可經由透析膜來移除。由電泳結果所示，抗蛇毒血清製程中 pepsin 消化後硫酸銨第一次沉澱樣品及原液樣品，在 110kDa 位置 $F(ab')_2$ 清楚呈現，且大部份 IgG 已被切除乾淨並無 Fc 片段殘留。



圖一、由蛋白質電泳圖可以清楚呈現血漿經由 pepsin 消化後，大部分 IgG 被切成 $F(ab')_2$ 且無 Fc 片段殘留

西方墨點法則以 Rabbit anti-horse IgG 進行免疫染色，其抗體會與 Horse total IgG 的 Heavy chain 和 Light chain 雜交而呈色，用以分析 pepsin 切割 horse IgG 後之抗蛇毒血清抗體是否為 $F(ab')_2$ ，和電泳圖比對確定呈現的 band 是欲分析的抗體(圖二)。



圖二、Western Blotting 可以清楚呈現與 Rabbit anti-horse IgG 雜交呈色的 IgG 及 $F(ab')_2$

討論

安定性測試應被視為從產品開發至取得許可執照到上市後追蹤之連續過程，是一個持續 (ongoing) 之追蹤流程，須監測至疫苗整個生命週期。本計畫將已上市的抗鎖鏈蛇毒血清凍晶注射劑儲放於冰箱4°C各1、2、3、4、5及6年，執行效價試驗可觀察儲放5年之抗鎖鏈蛇毒血清仍維持其每瓶1000U之品質規格，此計畫執行能監控疫苗上市後的持續安定性以符合PIC/S GMP法規，並確保疫苗在架儲期之有效性。

加速試驗則考量醫療院所常遇到短暫脫離標示溫度，分別選擇10°C、15°C、25°C及35°C進行24小時培養後分別於4°C儲存1、3、6、9個月進行效價試驗，結果顯示本局產製之抗蛇毒血清效價皆符合規格要求，這對各醫療院所使用上提供實質證據顯示抗蛇毒血清的有效性，加速安定性資料可用於支持最小放行規格。過去曾接過醫療院所來電詢問放置室溫時間與抗毒血清效價關聯性，此次試驗另將抗蛇毒血清凍晶注射劑放置於35°C培養箱一個月後移至4°C六個月再進行效價試驗，結果得知抗蛇毒血清效價仍符合每瓶1000U以上規格，未來將延續完成35°C加速培養一個月後移至4°C分別1、2、3、4年之效價試驗，提供疫苗運輸及使用時之實質參考價值。

評估疫苗安定性最大的問題為多數具有特殊之生物活性，不能經由單一生物或化學方法來分析其特性。小鼠模式生物分析效價試驗通常用來作為抗蛇毒血清安定性試驗之指標變數，而蛇毒沒有標準品，故每次效價分析皆會因毒素不同及實驗動物個體差異而有所差異，另效價試驗中血清的稀釋倍數選擇也會影響效價的判別，而本局抗蛇毒血清安定性結果皆能符合每瓶1000U以上規格以證明產品有效性。凍結乾燥疫苗之安定性資料建議包括稀釋液復原後之最大儲存時間及疫苗殘留水分含量應被規範，往後品管部門也將陸續建立相關的實驗分析方法。

目前本疫苗中心所使用之抗蛇毒血清均來自於以蛇毒免疫馬匹所得到的抗蛇毒血清，其製造過程中以胃蛋白酵素消化法精製純化的血清，抗體以F(ab')₂形式使用。由此次蛋白質電泳法及西方墨點法(western blotting)結果確認製程中抗蛇毒血清大部分IgG皆消化精製為純化之F(ab')₂並無Fc片段殘留，往後將建立濃度分析軟體系統以提供更精確之數據佐證，而建立製程中之品管方法可幫助提升品質並確保產品之穩定性與一致性。

六、重要參考文獻：

依一般科學論文之參考文獻撰寫方式，列出所引用之參考文獻，並於計畫內容引用處標註之。

1. Gutierrez, J.M., G. Leon, and T. Burnouf, *Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead*. *Biologicals*, 2011. **39**(3): p. 129-42.
2. Calvete, J.J., et al., *Venoms, venomics, antivenomics*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(11): p. 1736-43.
3. G. LeoÂn, M.M., E. Rojas, B. Lomonte, J.M. GutieÂrez, *Comparison between IgG and F(ab0)2 polyvalent antivenoms:neutralization of systemic effects induced by Bothrops asper venom in mice, extravasation to muscle tissue, and potential for induction of adverse reactions*. *Toxicon*, 2001. **39**: p. 793-801.
4. *WHO Guideline on Stability Evaluation of Vaccines* 2006.
5. *PIC/S GMP GUIDE* 2010.
6. *中華藥典第六版*.
7. *WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunogloblins*, 2010, World Health Organization: Geneva.
8. ICH, *Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products*. 2003.
9. Gutierrez, J.M., et al., *Snake venomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming*. *J Proteomics*, 2009. **72**(2): p. 165-82.