

# 疫苗长期稳定性数据的统计评估策略

李娜<sup>1</sup>, 杜颖<sup>2</sup>, 聂晓齐<sup>1</sup>, 谭德讲<sup>2\*</sup> (1.北京民海生物科技有限公司, 北京 102609; 2.国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室, 中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

**摘要:** 疫苗产品的长期稳定性数据分析是评价产品稳定性的重要依据, 是准确制定有效期的基础, 也是保障疫苗质量安全的考察要素之一。针对目前疫苗行业稳定性数据评价的科学性问题, 本研究基于 ICH Q5C 和 ICH Q1E 这 2 个稳定性试验考察和数据分析的指导原则, 从实际出发, 以冻干人用狂犬病疫苗(人二倍体细胞)36 个月的长期稳定性数据分析为例, 阐述了疫苗长期稳定性数据的统计分析方法, 并初步探讨稳定性内控线和警戒线制定方法。为规范稳定性和有效期的评估方式提供思路和示例, 同时为疫苗质量的安全可靠提供保障。

**关键词:** 疫苗稳定性; 长期稳定性; 有效期; 统计分析; 模型拟合; 警戒限

中图分类号: R967 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2025)01-0097-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20232090

引用本文: 李娜, 杜颖, 聂晓齐, 等. 疫苗长期稳定性数据的统计评估策略[J]. 中国现代应用药学, 2025, 42(1): 97-101.

## Statistical Evaluation Strategy for the Long-term Stability Data of Vaccine

LI Na<sup>1</sup>, DU Ying<sup>2</sup>, NIE Xiaoqi<sup>1</sup>, TAN Dejiang<sup>2\*</sup> (1.Beijing Minhai Biotechnology Co., Ltd., Beijing 102609, China; 2.NMPA Key Lab for Quality Research and Evaluation of Chemical Drug, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

**ABSTRACT:** The analysis of the long-term stability data of vaccine products is an important basis for the evaluation of product stability, the basis for the accurate formulation of the shelf-life, and also one of the factors to ensure the quality and safety of vaccines. Aiming at the scientific problems of stability data evaluation in vaccine industry, based on the guiding principles of stability test investigation and data analysis of ICH Q5C and ICH Q1E, this paper took the 36 months long-term stability data analysis of rabies vaccine(human diploid cell) for human use as an example, expounded the statistical analysis method of long-term stability data, and preliminarily discussed the formulation method of stability internal control line and alert line. The purpose of this study is to provide ideas and examples for standardizing the evaluation of stability and validity, and to ensure the safety and reliability of vaccine quality.

**KEYWORDS:** vaccine stability; long-term stability; shelf-life; statistical analysis; model fit; alert limit

疫苗稳定性评价是疫苗质量和安全性监管的重要部分。自世界卫生组织 (WHO) 于 1989 年首次颁布“疫苗稳定性”文件 (WHO/EPI/GEN/89.08)<sup>[1]</sup>, 到 1995 年 ICH Q1 系列和 Q5C<sup>[2]</sup> 文件对稳定性研究内容的全面深入探讨, 特别是 ICH Q1 E<sup>[3]</sup> 和 VICH GL51<sup>[4]</sup> 专门针对稳定性数据的统计分析指导原则, 将稳定性结果统计分析作为稳定性评估工作的关键步骤之一。通过稳定性结果的统计分析能够发现产品的稳定性波动趋势, 科学有效地预测有效期 (货架期) 长短, 为有效期的科学制定提供依据。

中国监管部门也非常重视对生物制品稳定性的研究。2015 年原国家食品药品监督管理总局公布的《生物制品稳定性研究技术指导原则》<sup>[5]</sup> 和

中国药典 2020 年版“<9402>生物制品稳定性试验指导原则”均是专门针对生物制品稳定性试验和评价所出台的指导原则<sup>[6]</sup><sup>535-536</sup>。它们对疫苗产品的稳定性做了进一步规范, 强调稳定性试验贯穿于疫苗产品的整个生命周期, 是进一步确保疫苗安全有效的实施途径。其中, 稳定性数据的统计分析可以为产品质量提供有力的技术支撑, 是生产企业和监管部门对疫苗质量评价的重要依据<sup>[2,5-6]</sup>。但是目前有关于稳定性数据的统计分析主要存在以下问题: ①已提供的统计方法缺乏可操作性; ②未提供示例分析以供学习参考; ③缺乏对应的数据分析工具。以上问题给非统计专业的药品领域从业人员进行稳定性数据分析带来较大困难。

本研究针对目前存的问题, 就疫苗长期稳定

基金项目: 中国医学科学院“创新疫苗质量评价和标准化研究”(2021-I2M-5-005)

作者简介: 李娜, 女, 硕士 E-mail: lln0809@163.com \*通信作者: 谭德讲, 男, 主任技师 E-mail: tandj@nifdc.org.cn

性数据统计分析的重难点进行详细阐述,结合风险评估对稳定性数据的结果分析做科学严谨的判定。希望本研究能够为疫苗企业加强稳定性数据分析提供参考,为监管机构对稳定性的科学评价提供有效途径,为疫苗领域监管科学发展提供新的统计学思路。

## 1 疫苗类产品稳定性数据分析的难点

### 1.1 疫苗的稳定性研究较为复杂

疫苗稳定性研究的复杂性一方面体现在各类疫苗的生物特性差别大,自身不稳定且对环境条件要求较高(例如,mRNA疫苗不同厂家所报告的储存温度和相应的“有效期”差异很大,从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 到 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,从几天到几个月);另一方面,疫苗类产品部分检项因检测方法的变异大而导致报告值区分能力弱,无法区分检测结果间的差异是方法还是产品本身不稳定所致。值得注意的是,并非所有用于产品放行的方法都适合进行稳定性考察,一般用于稳定性评估的方法应该具有更高的精密性,以便保证较小的产品降解程度即可被有效发现。以上难点均会为稳定性数据分析带来挑战。

### 1.2 稳定性数据的分析缺乏科学统计依据

稳定性数据统计分析应依据疫苗类产品的特性进行。2015年原国家食品药品监督管理总局公布的《生物制品稳定性研究技术指导原则》和中国药典2020年版“<9402>生物制品稳定性试验指导原则”指出:“若稳定性试验的数据表明产品质量变化非常小,从数据上可以明显看出有效期制定的合理性,则不必进行正式的统计分析,只要提供简略的理由即可”<sup>[5]</sup>。这一论述对于自身不稳定,变异性大的疫苗类产品而言,不符合其特性<sup>[7-8]</sup>。其次,目前,很多对产品质量变化大小是一种主观经验的判断,缺乏科学性,且未考虑对产品质量造成的风险。最后,在申报过程中易受到相关的质疑和挑战。因此,建议疫苗生产企业采用合适的统计方法评价稳定性数据。

### 1.3 稳定性数据统计分析方法不清晰

中国药典2020年版“<9402>生物制品稳定性试验指导原则”强调:“稳定性结果与0个月(初始)比较以确定药品的有效期。由于实验数据的分散性,一般应按95%可信限进行统计分析,得出合理的有效期”<sup>[3,6]</sup>。以上法规和指导原则提及稳定性相关的统计分析基本原理略有不同,且与之

配套的统计学分析方法和不同实验设计下的统计工具并没有详细说明。

## 2 稳定性结果统计分析方法

包括WHO、中国以及欧美的有关稳定性试验的指导原则和法规中几乎都会提及稳定性结果的统计分析<sup>[2-6,9-12]</sup>。其中,对稳定性结果统计分析阐述得最早且最详细的是ICH QIE<sup>[3]</sup>,它提出分析定量指标(例如含量、降解产物)随时间的回归分析以及不同批次之间是否可以合并以进行有效期预测的一般框架。即有效期是通过确定均值的95%置信限与建议的可接受标准相交的最早时间预测。当提供双侧可接受标准时,最早的交叉时间基于95%的双侧置信区间;当仅提供一侧可接受标准时,最早的交叉时间基于95%的单侧置信区间。

ICH QIE还提出批次之间能否合并的统计方法,即对每批样品回归曲线的斜率和截距进行统计检验(通常至少3批数据),考察斜率和截距的 $P$ 值与显著水平 $\alpha=0.25$ 之间的比较。具体的合并方式分为3种:①模型1为完全模型,此时斜率和截距统计检验 $P$ 值均 $<0.25$ ,即每批次拟合不同的截距和不同的斜率(没有跨批次合并)。完全模型是使用单独的均方根误差(root mean square error, RMSE)计算每一批次的预测区间,最先超出(稳定性)质量标准的预测区间所对应的时间设定为产品效期。②模型2,斜率的 $P>0.25$ ,截距的 $P<0.25$ ,即每个批次的截距不同,但斜率相同。此时可以认为每个批次的变化趋势是一致的,截距大小会对效期产生直接的影响。③模型3,斜率和截距的 $P$ 值均 $>0.25$ ,即所有批次截距和斜率均相同。当稳定性数据适用于该模型时,将会预测出最长的有效期。流程图见图1。

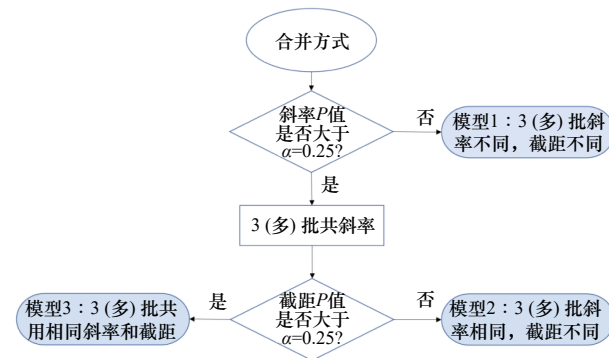


图1 多批次模型选取方式流程图

Fig. 1 Multi-batch model selection flow chart

除此之外，对于不同时间点的检测项目可以进行趋势分析来初步判断产品的稳定性。

### 3 疫苗稳定性数据示例分析

疫苗稳定性考察试验中发现，不稳定的类型基本可以分为3类，即物理不稳定性、化学不稳定性及生物不稳定性。经验表明，生物不稳定性对疫苗效期起着决定性作用<sup>[2,11-13]</sup>。本研究结合3批冻干人用狂犬病疫苗(人二倍体细胞)长期稳定试验中的部分关键物理、化学及生物特性指标的稳定性结果(表1)进行统计学分析，为冻干人用狂犬病疫苗有效期的预测和制定提供科学依据。

用统计软件 JMP 17(SAS Institute, Inc.)<sup>R</sup><sup>[14]</sup>对以上结果进行稳定性分析，以效力试验(%)的数据为例，结果见图2和表2。其中表2模型比较可以判断3(多)批数据的合并方式，通过分析源C(斜率)和源B(截距)的P值与置信水平( $\alpha=0.25$ )相比较。例如表2中源C的P值为 $0.0132 < 0.25$ ，说明各批次拟合方程的斜率不能合并；同理，源B的P值为 $0.117 < 0.25$ ，说明各批次拟合方程的截距也不能合并。此时，3批数据拟合了3条回归方程，见图2。

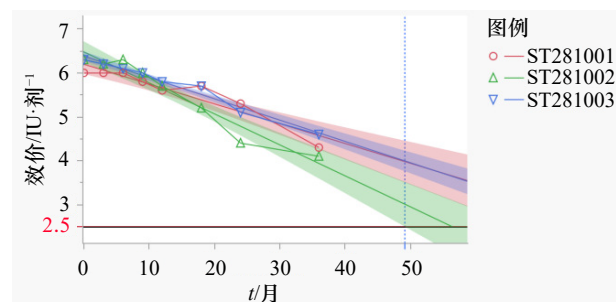


图2 效价的稳定性回归拟合图

Fig. 2 Regression fitting plot for stability of potency results

图2稳定性检验显示了采用不同截距和不同斜率的模型拟合方式，对3批狂犬疫苗效价数据

表1 冻干人用狂犬病疫苗的长期稳定性数据

Tab. 1 Long-term stability data of rabies vaccine(human diploid cell) for human use, freeze-dried

检项	批号	t/月								
		0	3	6	9	12	18	24	36	
装量/mL·剂 <sup>-1</sup> (应 $\geq 0.50$ mL·剂 <sup>-1</sup> )	ST281001	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.51	0.52	0.52
	ST281002	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.51	0.52	0.52	0.52
	ST281003	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.51	0.52	0.52
pH值 5.5~7.5	ST281001	5.7	5.7	5.7	5.8	5.8	5.8	5.9	5.8	5.8
	ST281002	5.7	5.7	5.7	5.6	5.9	5.8	5.9	5.7	5.7
	ST281003	5.6	5.7	5.7	5.7	5.8	5.7	5.8	5.7	5.7
效价/IU·剂 <sup>-1</sup> (应 $\geq 0.25$ IU·剂 <sup>-1</sup> )	ST281001	6	6	6	5.8	5.6	5.7	5.3	4.3	4.3
	ST281002	6.3	6.2	6.3	6	5.7	5.2	4.4	4.1	4.1
	ST281003	6.3	6.2	6.1	6	5.8	5.7	5.1	4.6	4.6

预测出的有效期约49个月。同理，分别预测出装量和pH的预测效期大小约为113个月和308个月。依据效价大小是狂犬疫苗的关键质量属性和稳定性考察的重要指标，同时考虑选取更保守(更短)的预测时间等因素，认为以上3批稳定性结果冻干人用狂犬疫苗的有效期约49个月。

除此之外，通过对稳定性数据分析可以获知更多产品信息，例如表3是每个批次的均方误差(mean square error, MSE)，用于描述在时间跨度下，每个批次的变异度量大小的指标<sup>[15]</sup>。表3显示ST281002批各项检测结果的MSE大小均明显大于其他2批产品，提示应重点关注并检查ST281002批生产检验过程，以确保使用的数据没有错误。

还可以对多批次稳定性数据在不同时间点的试验结果做趋势分析，直观地判断产品的稳定性，选取表1中的效价作趋势分析，见图3。

从图3中可以直观地看出每批狂犬疫苗效价大小随时间的波动趋势，基本上所有稳定性结果均在控制限范围内，表明狂犬疫苗在目前36个月的考察过程中产品是稳定可靠的。

### 4 以稳定性数据制定产品稳定性放行(内控)限和警戒限

生产企业进行稳定性分析的另一个目的是制定产品稳定性放行(内控)限和警戒限，即初始结果达到多少时能确保有效期内(如36个月)产品仍符合其预期用途所对应的放行(内控)限和警戒限。从图2可以得知ST281002批是最先与稳定性可接受标准相交的批次，所以可以选择该批次数据更为保守的制定产品的放行(内控)限和警戒限。首先计算ST281002批稳定性数据回归拟合方程的斜率(-0.07054)和斜率标准误(0.0055859)

表 2 模型比较及结论

Tab. 2 Model comparison and conclusion

源	自由度	平方和	均方	F 统计量	P 值
A	4	0.551 979	0.137 995	3.992 645	0.017 2
B	2	0.167 500	0.083 750	2.423 164	0.117 0
C	2	0.384 479	0.192 240	5.562 126	0.013 2

结论 在显著性水平 0.25 处接受的最佳模型具有不同的截距和不同的斜率, 建议最早交叉时间约为 49.1 月

表 3 MSE 汇总表

Tab. 3 MSE summary sheet

批号	自由度	效价[MSE]	pH [MSE]	装量[MSE]
ST281001	6	0.043 240	0.002 917	1.276×10 <sup>-5</sup>
ST281002	6	0.049 985	0.012 128	1.425×10 <sup>-5</sup>
ST281003	6	0.010 461	0.003 955	1.276×10 <sup>-5</sup>

的估计值。此时最大的降解速率估计值为 $-0.070\ 54 \pm 0.005\ 859 = 0.076\ 399$ 。通过 36 个月的稳定性实验, 认为放行(内控)限大小为效价接受标准(2.5)+36 个月的最大的降解速率预估值, 即  $2.5 + 36 \times 0.076\ 399 \approx 5.3$ , 此时, 初始效力检验结果应  $\geq 5.3$  这一放行(内控)限, 产品才可以正常放行。

另外, 制定警戒限可更大程度上降低产品的不稳定性带来的风险。比较保守的制定警戒限的方式是在放行限的基础上增加截距的标准误差<sup>[15]</sup>。由于不同批次计算出的截距的标准误差大小不一致, 所以需要将不同批次的稳定性数据进行截距的合并估计。经计算, 合并后截距的标准误差大小约为 0.073 757, 因此警戒限为  $5.3 + 0.073\ 757 \approx 5.4$ 。以上计算放行限和警戒线的方法仅是基于统计指标的运算, 在实际应用过程中, 还需要结合产品自身的风险综合考量。

## 5 讨论

### 5.1 为何采用 0.25 显著性水平对稳定性数据进行回归分析

ICH/FDA 建议对多批次稳定性结果分析时,

显著性判定 P 值不是传统的与  $\alpha=0.05$  进行比较判定, 而是使用  $\alpha=0.25$  的显著性水平, 主要基于以下几个方面考量。

第一, 从统计分析, 稳定性预测是通过构造时间-响应拟合模型及其置信区间来完成的, 置信区间与稳定性可接受标准相交所对应的时间点即为产品的有效期。而置信区间的计算公式中所包含的置信系数  $(1-\alpha)$  大小直接反映了区间的宽窄。 $\alpha$  越大, 置信系数越小, 对应的置信区间越窄, 说明估计得更精确。其次,  $\alpha$  越大, 可以补偿由于稳定性试验时样本量不足导致的把握度(效能)低。

第二, 从风险角度分析,  $\alpha$  对应的是假设检验中的 I 型错误。在质量控制领域, I 型错误又称为生产商风险, 与之对应的 II 型错误被称为消费者风险, 生产商风险和消费者风险之间是此消彼长的对立关系。当取远大于常规 ( $\alpha=0.05$ )5 倍的 0.25, 对应的 I 型错误(生产商风险)增大(即生产商的产品使用有效期缩短), II 型错误(消费者风险)降低(更能保证消费者的使用安全性和有效性), 有效保障消费者的用药安全。

第三, 从实际过程出发, 稳定性分析至少考察 3 批次合并的实验结果, 而更高的显著性水平 ( $\alpha$ ) 意味着更难以实现批次合并, 从而有效期不会被高估, 无法实现 3 批(多批)次合并后预测出更长有效期的现象, 确保更保守的估计有效期。

### 5.2 效期预测需要全面考量

对稳定性数据的统计分析, 主要目的是通过合理科学的方式预测有效期。需要注意的是, 产品有效期的确定应根据长期试验条件下持续稳定性数据最终确定。但在注册申报时, 经合理证明也可依据长期试验条件下获得的实测数据, 有限外推得到超出实际观测时间范围外的较长有效

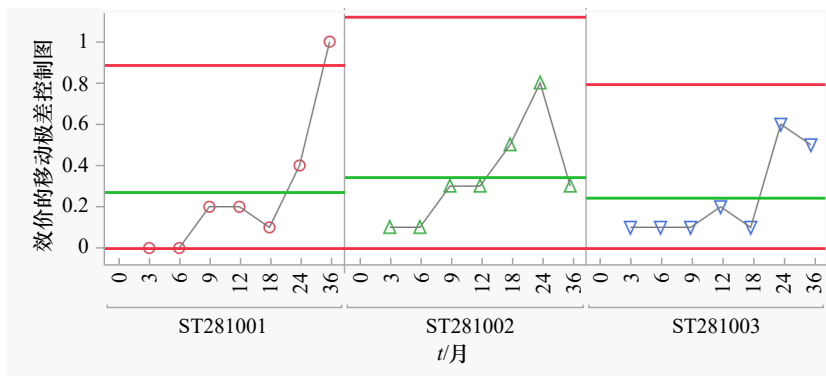


图 3 效价结果的单值移动极差控制图

Fig. 3 Individual moving range control chart of potency results

期,从而实现更大的获益。合理的外推其根本是对稳定性数据的良好统计分析,包括有效地拟合模型、严谨的试验方案、多批次的支持性数据;同时,对降解机制全面剖析,对加速试验和强制降解结果综合考量,这些均是有效期预测过程中需要注意的方面<sup>[16-17]</sup>。

### 5.3 稳定性评估需要借助统计分析

目前相关法规和指导原则对稳定性数据的统计分析未作强制性要求,认为给出充分合理的理由后可以不开展稳定性数据分析。笔者认为以上要求和观点仅针对部分理化和生物学特性极其稳定的产品,这类产品的稳定性实验结果之间差异波动较小,可以适当放宽稳定性评估工作的要求;但针对于绝大多数产品(特别是生物制品),易受外界环境影响,有必要对稳定性数据进行统计评估。

解决稳定性数据评估的瓶颈,需要借助相应的统计原理和软件来解决。部分企业由于缺乏稳定性数据统计分析的基础知识和分析工具,使得稳定性数据评估工作受阻,导致相关企业尽量去避免甚至省略稳定性数据处理工作。为有效解决以上统计问题,可使用专门的统计分析软件解决,如 JMP 统计软件的“稳定性检验”平台<sup>[14]</sup>、Minitab 的稳定性分析模块<sup>[18]</sup>和专用于药品稳定性和有效期计算的软件 SLASA 等<sup>[19]</sup>。

### 5.4 稳定性数据统计分析方法的替代

目前,评价产品稳定性和预测有效期的统计方法大部分是基于线性回归和差异性检验。这种方式更为简单,易于操作和理解。除上述方法外,也可以采用其他合适的替代统计方法。例如,可以对评估(回归)斜率或平均有效期进行等效性检验,以确定多批次数据是否可以合并。采用等效性检验应该事先定义评估等效差值或者通过适当的方式证明等效区间的大小,同时应该和监管部门详细阐述替代统计方法的科学性和合理性<sup>[20]</sup>。

总之,稳定性数据的科学评价贯穿于疫苗产品全生命周期,是反应产品安全有效的重要过程。对稳定性数据的考察和分析,其意义是:①有利于进一步明确产品的敏感条件、降解速率等信息,为科学地制定产品贮存条件提供依据;②根据产品的特性制定各个指标可接受的最大变化范围,为产品质量标准的建立和优化打下基础;③基于统计分析的稳定性数据处理方式来预测产品有效期是科学且必要的,能够确保在整个

效期内产品的安全有效;④利用统计模型预估有效期,可以平衡生产商风险和消费者风险,并且使双方在最大程度上获益,符合监管科学所追求的宗旨。

## REFERENCES

- [1] GALAZKA, ARTUR M, WHO Expanded Programme on Immunization. Stability of Vaccines [M]. 1989. Geneva, World Health Organization.
- [2] ICH Q5C. Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Evaluation for Stability Data[S]. 1995.
- [3] ICH Q1E. Evaluation for Stability Data[S]. 2003.
- [4] EMA/FDA VICH GL51. Quality: statistical evaluation of stability data[S]. 2013.
- [5] 国家食品药品监督管理总局. 生物制品稳定性研究技术指导原则[S]. 2015.
- [6] 中国药典. 四部[S]. 535-536, 457-460.
- [7] ZHANG C, JIANG D C, HUANG Z L, et al. Some thoughts on main technical issues arising from vaccine stability study in China[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2009, 23(4): 349-351.
- [8] GAO F, LI K L, WU X, et al. Progress in the research and development of the methods for vaccine stability[J]. Chin J Exp Clin Virol(中华实验和临床病毒学杂志), 2018, 32(4): 426-429.
- [9] World Health Organization(WHO). Guidelines on Stability Evaluation of Vaccines[S]. 2006.
- [10] ICH Q1D. Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drug Substances and Products[S]. 2002.
- [11] 中国药典. 三部[S]. 35-41.
- [12] USP43 NF38. <1049 > Quality of Biotechnological Products: Stability[S]. 2020.
- [13] LI N, DU Y, LIU C, et al. Definition and taxonomy of biological method[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2022, 42(6): 931-936.
- [14] JMP. Stability Analysis[EB/OL]. (2021-09-28) [2022-08-25].<https://www.jmp.com/support/help/en/16.0/#page/jmp/stability-analysis.shtml#>.
- [15] SAS Institute Inc. Pharmaceutical Quality by Design Using JMP: Solving Product Development and Manufacturing Problems[M]. 2018. United States, SAS Institute Inc.SAS Campus Dr. Cary, NC.
- [16] WANG H, LIU G Y, ZHANG Y P. Advances in stability testing of drug products[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2006, 15(20): 1710-1715.
- [17] DUAN L, LI N, HAN L, et al. Progress on the study of drug accelerated stability model[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2021, 30(21): 1990-1997.
- [18] 李蓓, 杨秀珍. Minitab 软件在药品稳定性研究中的运用[J]. 医学食疗与健康, 2019(6): 278-279.
- [19] 监管统计学研究者. 有效期和稳定性评估软件(SLASA)简介 [EB/OL]. (2020-04-15) [2022-08-25]. <https://mp.weixin.qq.com/s/QWz6fthBSvdRi0edxCVE9w>.
- [20] TSONG Y, CHEN W J, TSAE-YUN DAPHNE LIN, et. al. Shelf life determination based on equivalence assessment[J]. J Biopharm Stat, 2003, 13(3): 431-439.

收稿日期: 2023-07-25

(本文责编: 曹粤锋)