

# 应用组合的技术提高工艺安全性

中国食品药品检定研究院

付瑞

2016年9月

NATIONAL INSTITUTE FOR FOOD AND DRUG CONTROL

N  
I  
F  
D  
C



中国食品药品检定研究院

# 应用组合的技术提高工艺安全性

- ❖ 国内生物制品病毒安全评价相关法规简介
- ❖ 病毒安全评价具体要求
- ❖ 相关病毒灭活/去除工艺技术方法

# 国内生物制品病毒安全评价相关法规简介

1. 血液制品去除灭活病毒技术方法及验证指导原则
2. 生物组织提取制品和真核细胞表达制品的病毒安全性评价技术审评一般原则
3. 多组分生化药注射剂基本技术要求
4. 动物源性医疗器械产品注册申报资料指导原则(修订版)

# 国内生物制品病毒安全评价相关法规简介



## 目的与意义

随着动物源性组织、细胞、体液及重组真核细胞表达制备的生物制品逐渐增多，使用的人群不断扩大，加之动物源性产品原材料质量控制未引起足够重视，生产工艺又基本没有经过严格的病毒去除/灭活效果验证。因此，目前动物源性病毒感染人类的风险性极高，潜在医源性感染问题变的日益突出。其中动物组织来源制品由于动物本身健康检疫状况差，不同动物携带的病毒外源因子复杂多变，可控性因素尚不确定，对人体的潜在危害性较之经过系统鉴定和严格控制的真核细胞表达制品的风险性更高。

# 国内生物制品病毒安全评价相关法规简介

## ❖ 适用范围

- 试用于重组或者杂交的动物真核细胞（例如重组CHO细胞、人/动物杂交瘤细胞等，但不包括酵母细胞）经培养后表达或者分泌，以及直接采用动物组织原材料（例如动物细胞、组织及体液等）经提取、纯化制备的治疗用生物制品。

# 国内生物制品病毒安全评价相关法规简介

- ❖ 细胞种子/动物组织原材料携带的病毒
  - 使用了感染动物或动物细胞
  - 使用了被污染的原材料
  - 采用病毒建立细胞库
  - 细胞传代过程中病毒污染

# 国内生物制品病毒安全评价相关法规简介

- ❖ 细胞培养增殖过程中引入的病毒
  - 使用了污染的动物血清等生物试剂
  - 使用的层析填料等试剂被病毒污染
  - 使用了污染的赋型剂
  - 在细胞和培养基操作中的污染

# 国内生物制品病毒安全评价相关法规简介

## ❖ 避免病毒污染的方法

- 选择合适的原材料及细胞系，并进行相关检测
- 对生产工艺清除病毒的能力进行评价
- 在生产的不同阶段对产品进行病毒检测



# 国内生物制品病毒安全评价相关法规简介

## 检测范围

- 主细胞库（MCB）
- 工作细胞库（WCB）
- 生产终末细胞

## 检测方法

- 逆转录病毒：电镜、RT-PCR或其它方法
- 体外试验：细胞法
- 体内试验：鸡胚
- 抗体生成试验：小鼠、大鼠、地鼠等

# 国内生物制品病毒安全评价相关法规简介

- ❖ 病毒灭活/去除工艺验证
  - 根据不同情况选择合适的指示病毒
  - 设计合理的验证方案
  - 对验证结果进行恰当的评价

# 国内生物制品病毒安全评价相关法规简介

## ❖ 指示病毒的选择

一个典型的验证研究所选择的病毒，至少应包括单链和双链的RNA及DNA、脂包膜和非脂包膜、强和弱抵抗力、大和小颗粒等病毒；去除/灭活技术方面可根据采用的具体方法选择恰当的适宜病毒

# 国内生物制品病毒安全评价相关法规简介

Virus	Family	Genus	Natural Host	Genome	Env	Size (nm)	Shape	Resistance <sup>1</sup>
Vesicular Stomatitis Virus	Rhabdo	Vesiculo-virus	Equine Bovine	RNA	yes	70 x 150	Bullet	Low
Parainfluenza Virus	Para-myxo	Paramyxo-virus	Various	RNA	yes	100-200+	Pleo/ Spher	Low
MuLV	Retro	Type C oncovirus	Mouse	RNA	yes	80-110	Spherical	Low
Sindbis Virus	Toga	Alphavirus	Human	RNA	yes	60-70	Spherical	Low
BVDV	Flavi	Pestivirus	Bovine	RNA	yes	50-70	Pleo/ Spher	Low
Pseudo-rabies Virus	Herpes		Swine	DNA	yes	120-200	Spherical	Med
Poliovirus Sabin Type 1	Picorna	Enterovirus	Human	RNA	no	25-30	Icosa-hedral	Med
Encephalomyo-carditis Virus (EMC)	Picorna	Cardio-virus	Mouse	RNA	no	25-30	Icosa-hedral	Med
Reovirus 3	Roe	Orthoreo-virus	Various	RNA	no	60-80	Spherical	Med
SV40	Papova	Polyoma-virus	Monkey	DNA	no	40-50	Icosa-hedral	Very high
Parvoviruses (canine, porcine)	Parvo	Parvovirus	Canine Porcine	DNA	no	18-24	Icosa-hedral	Very high

# 国内生物制品病毒安全评价相关法规简介

- ❖ 设计合理的实验方案
  - 人员和设施：单独的实验设施、人员要有病毒操作经验
  - 采用模拟生产工艺（缩小的工艺）的方法，能代表实际生产工艺的情况
  - 每一个有效步骤分别验证

# 国内生物制品病毒安全评价相关法规简介

- ❖ 对验证结果进行恰当的分析
  - 灭活效果的评价：病毒的去除/灭活过程不是简单的一级动力学反应过程
  - 层析介质的再生与重复使用
  - 病毒感染量的降低可以从病毒颗粒去除或者被灭活的情况两方面来评价

# 国内生物制品病毒安全评价相关法规简介

## ❖ 病毒清除效果的再评价

当生产与纯化过程发生重大变更时，需要对病毒清除效果进行再评价。重大变更包括细胞产生的病毒数量显著变化，或者病毒清除效率变化

# 病毒安全评价具体要求

	MCB	WCB	生产终末细胞
细胞形态观察及血吸附试验	+	+	+
体外不同细胞接种培养法	+	+	+
动物和鸡胚体内接种法	+		+
逆转录病毒检查	+	—	+
种属特异性病毒检查	( + )	—	—
牛源性病毒检查	( + )	( + )	( + )
猪源性病毒检查	( + )	( + )	( + )
其他特定病毒检查	( + )	( + )	( + )



# 病毒安全评价具体要求

## ❖ 病毒灭活/去除工艺验证的要求

- 验证时间：临床研究前应完成初次验证，报产前应完成全工艺的验证
- 需验证的工艺：初次验证可仅对低pH处理和纳米膜过滤方法进行验证，报产前应增加对层析纯化步骤的验证
- 采用的指示病毒：低pH处理一般采用Mu1v和PRV，纳米膜过滤一般采用MVM和Reo3，层析纯化一般采用MVM和Mu1v
- 需要的样品：能代表生产工艺的三批样品

# 相关病毒灭活/去除工艺技术方法

## ❖ 低pH处理

- 常用pH范围：3.5~4.0，一般pH3.8以下可较快的灭活病毒
- 常用温度范围：18~25℃
- 常用缓冲液：柠檬酸缓冲液或醋酸缓冲液
- 蛋白浓度：一般在50mg/mL以下
- 常用处理时间：30min~120min
- 处理条件温和，对蛋白活性影响小，但仅可有效灭活有囊膜病毒。

# 相关病毒灭活/去除工艺技术方法

## ❖ 有机溶剂/洗涤剂（S/D）处理

- 常用试剂：Triton X-100，TNBP
- 常用温度范围：18～25℃
- 蛋白浓度：一般在50mg/mL以下
- 常用处理时间：30min～240min
- 处理条件温和，可有效灭活有囊膜病毒
- 后序工艺中应充分考虑有机溶剂残留的清除

# 相关病毒灭活/去除工艺技术方法

## ❖ 层析纯化步骤

- ProteinA亲和层析和阴离子交换层析去除病毒效果较好
- 需要对新填料和寿命终点填料同时进行验证
- 缩小规模的工艺要能代表生产工艺：柱高、线性流速、滞留时间等关键参数要一致
- 实验方案中需考虑填料再生和清洗的效果
- 纯化工艺必须与其它灭活/去除工艺联合使用

# 相关病毒灭活/去除工艺技术方法

## ❖ 纳米膜过滤

- 蛋白浓度：一般在20mg/mL以下
- 缓冲体系：中性缓冲液过滤效果较好
- 样品稳定性：多聚体的形成对过滤效果影响很大

# 相关病毒灭活/去除工艺技术方法

## ❖ 其它常用方法

- 干热法：冻干曲线、干热箱
- 有机试剂：戊二醛、乙醇、丙酮等
- 氧化剂：过氧化氢
- 切向流层析
- 高温、高压



谢谢