



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

# 2019

## 病毒去除/灭活的方法及工艺的选择

### 病毒去除/灭活验证研究

徐明明  
北京义翘神州科技股份有限公司



# 100%自主研发生产

**1** 国际一流的团队和蛋白、  
抗体研制技术

**2** 全球蛋白、抗体试剂的  
新兴领军企业

**3** 为全球生命科学研究提供高品质、  
低价格的科研工具试剂

6000 +  
重组蛋白



10000 +  
抗体

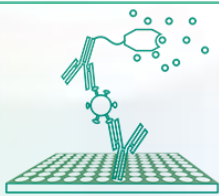


40万 +  
基因产品



**“一站式·低风险·高  
质量” 技术服务**

ELISA 试剂盒、培养基、转染试剂、IP Kit 等



- 重组蛋白/抗体生产
- 抗体开发生产
- 生物药开发
- 免疫检测





Sino Biological  
Biological Solution Specialist

# 目录:

病毒去除/灭活验证的概述

病毒去除/灭活的方法

国内外申报的差异



# PART1

## 病毒去除/灭活验证的概述

- 迫切性
- 定义
- 目的
- 适用范围
- 阶段
- 名词解释

# 迫切性



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

- 目前动物源性病毒感染人类的风险性极高，潜在的医源性感染性问题变得日益突出。因此**由人的、动物的组织或者体液提取的制品、动物源性单克隆抗体及真核表达的重组制品**，生产工艺中一定要包含能有效地去除/灭活这些潜在病毒的工艺步骤，以确保制品的生物安全性。

# 定义



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

- 病毒去除/灭活验证研究有时会简称为病毒清除验证，采用指示病毒以评价生产工艺过程去除/灭活病毒效能的试验研究。

# 目的

- 评价病毒去除/灭活的各个工艺是有效的，并对该工艺降低的病毒的总体水平进行定量的评估。

# 适用范围



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

## 适用

- 重组或者杂交的动物真核细胞，经培养后表达或者分泌的生物制品（例如重组CHO细胞、人或动物杂交瘤细胞等表达或分泌的干扰素、单抗、重组蛋白、疫苗等制品）
- 直接采用动物组织原材料经提取、纯化制备的治疗用生物制品（例如动物细胞、组织及体液提取的生物制品）

## 不适用

- 酵母细胞表达或分泌的生物制品
- 灭活疫苗、活疫苗、基因工程活载等产品

# 需要病毒去除/灭活验证的阶段



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

工艺研发阶段，提供数据支持：可选

新药临床申报（IND）：必选

生物制品许可申请（BLA）：必选

上市后产品补充验证：可选



# 名词解释



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

- 病毒：是指含有单一类型的核酸（RNA 或者 DNA），能够在细胞内复制的感染性因子。
- 指示病毒：是指在病毒去除/灭活工艺验证研究中使用的用于显示工艺处理效果的感染性活病毒。
- 病毒灭活：意在“杀死”病毒以强化病毒安全性的工艺过程。
- 病毒去除：将病毒从目的产物中去除或者分离出去以强化病毒安全性的工艺过程。

# 名词解释



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

- 有效工艺步骤：是指在验证研究中，能够使指示病毒数量被去除/灭活达  $4\log_{10}$  以上的工艺步骤。
- 去除/灭活指数：是指经过生产工艺步骤处理后，指示病毒数量被去除/灭活的程度，通常以对数值表示。



# PART2

## 病毒去除/灭活的方法

- 方法概述
- 病毒去除方法
- 病毒灭活方法
- 工艺的选择

# 病毒去除/灭活验证研究方法概述



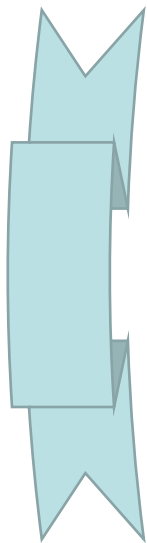
Sino Biological  
Biological Solution Specialist

- 将一定量的病毒加入到原料和/或各个工艺的中间样品中，验证该工艺对此病毒的去除或灭活的效果。首先建立待验证工艺的缩小模型，再在待验证样品中人为地加入一定种类和数量的病毒，使用缩小模型进行病毒去除/灭活工艺步骤，对样品进行病毒去除/灭活处理，最后对处理前后的样品进行病毒检测，判断生产工艺中病毒去除/灭活效果。去除/灭活指数 $\geq 4\log_{10}$ ，才被认为是有效处理步骤。

# 病毒去除方法



Sino Biological  
Biological Solution Specialist



除病毒过滤

层析

分级沉淀法

# 除病毒过滤

- 又称纳米膜过滤
- 原理：使用20nm左右的滤膜对生物制品溶液进行过滤，利用筛分原理，在纳米膜过滤中，大于滤膜孔径的病毒或其他病原体被截留在薄膜上，尺寸较小的生物制品则能通过滤膜继续存留在溶液中。
- 去除病毒效果：去除指数一般在 $4\log_{10}$ 以上。

常用的纳米膜品牌：PLANOVA™



sartorius

# 除病毒过滤



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

## 材质介绍:

- 商品化纳滤膜：再生纤维素、聚偏二氟乙烯（PVDF）、醋酸纤维素（CA），磺化聚砜（SPS），磺化聚醚砜（SPES），聚酰胺（PA），聚乙烯醇（PVA）等。
- 荷电纳滤膜：荷电纳滤膜根据所带基团电荷不同可分为：荷负电膜、荷正电膜和双极膜。
- 复合纳滤膜：磺化聚苯醚复合纳滤膜、醋酸纤维素硫酸酯纳滤膜、羧基化聚砜膜的纳滤膜等。

# 除病毒过滤



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

如何选择除病毒过滤膜？

产品过滤通量 ✓

加入病毒后过滤通量 ✓

成本 ✓



# 除病毒过滤



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

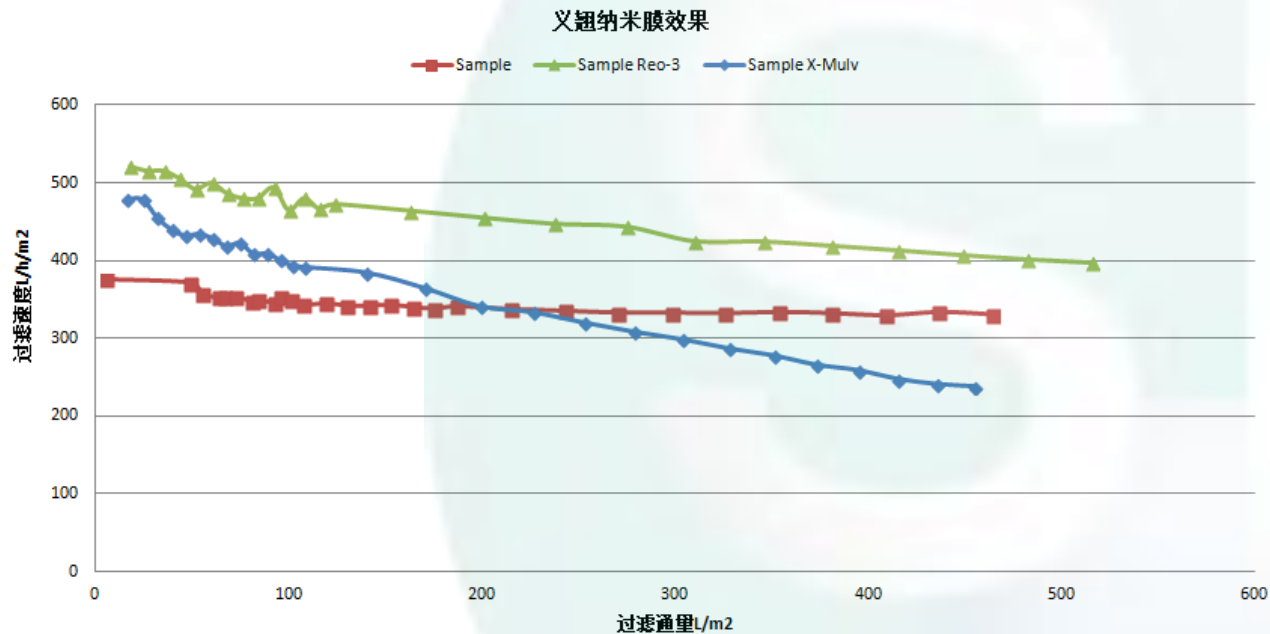
## 影响过滤通量因素：

1. 样品浓度：浓度越高过滤通量越低
2. 样品稳定性：样品中有多聚体影响过滤通量
3. 缓冲体系：中性缓冲液过滤通量高
4. 过滤膜材质：材质形状不同，过滤通量和除病毒效果不同

# 除病毒过滤



Sino Biological  
Biological Solution Specialist



# 层析

- 原理：利用各种组分与固定相亲和力或相互作用方面的差别，实现各种组分的分离。
- 举例：亲和层析、阴或阳离子交换、复合层析、反向层析等
- 应考虑新层析柱与反复使用的旧柱（填充料接近使用期限）对于去除病毒效果的差别。
- 去除病毒效果：去除指数不一定大于 $4\log_{10}$ 。

# 层析



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

影响去除指数的因素：

1. 样品性质：不同产品去除效果不同
2. 工艺性质：阴离子交换层析比阳离子交换层析、亲和层析等效果好
3. 层析柱使用次数

# 层析



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

缩小模型的要求：

- 缩小的生产工艺应当尽可能代表实际生产工艺的情况。
- 例如对于柱层析设备，柱床的高度、线性流速、流速与柱体积的比率（比如接触时间）、使用的缓冲液和凝胶类型、pH、温度、蛋白浓度、无机盐类及产品均应能够代表实际生产工艺的规模和条件，并获得类似的洗脱图谱。
- 如果产生了意外的偏差，应对实验结果可能产生的影响给予合理的解释。

# 分级沉淀法

包含乙醇分离法、辛酸沉淀法等。

- 乙醇沉淀法：低温环境下可分级沉淀，达到去除病毒的目的，同时具备灭活病毒的作用。
- 辛酸沉淀法：酸性条件下辛酸能够结合大部分蛋白质并发生沉淀，达到病毒去除的目的。
- 去除效果：决定于工艺条件。
- 重组生物制品不常用此方法。

# 病毒灭活方法



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

## 物理灭活

- 巴氏消毒法
- 干热灭活法

## 化学灭活

- 低pH孵育
- 有机溶剂/去污剂(S/D)
- 辛酸法
- 光化学法

# 巴氏消毒法



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

巴氏消毒法是在 60 °C 条件下对蛋白质溶液进行连续加热至少 10 h。

- 原理：长时间高温使病毒蛋白变性从而抑制病毒遗传物质的复制，最终使病毒失去传染性。
- 作为一种传统成熟的病毒灭活方法，巴氏消毒法可以用于白蛋白、凝血因子、免疫球蛋白、蛋白酶抑制剂等血液制品的脂包膜和非包膜病毒的灭活。
- 几十年临床应用结果表明，白蛋白的巴氏消毒法对HIV和肝炎病毒是安全的。其病毒灭活条件已很完善，**可不要求**进行病毒灭活验证。但是必须对巴氏消毒法所用设施进行验证，使巴氏消毒各参数符合要求（包括制品内温度分布的均一性和灭活时间）



# 巴氏消毒法



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

## 优点:

- 有研究结果表明巴氏消毒法只需要控制很少的过程参数，灭毒过程容易被监测，对脂包膜病毒和非包膜病毒均有灭活作用，灭毒范围广。

## 局限性:

- 蛋白质稳定剂的加入降低了病毒灭活的能力
- 在热条件处理下会导致蛋白质产品的变性，使产品的活性降低，因此不能用于稳定性不好的血浆蛋白的病毒灭活。

# 干热灭活



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

干热法最早于 20 世纪 80 年代初被用于凝血因子制品中肝炎病毒的灭活，1984 年干热法被批准用于 HIV 的灭活。

- 原理: 制剂冻干后加热处理，使病毒复制所需要的分子和结构改变，从而抑制其复制过程。
- 80°C 加热 72 小时，可以灭活 HBV、HCV、HIV 和 HAV 等病毒。但应考虑制品的水分含量、制品组成（如：蛋白质、糖、盐和氨基酸）对病毒灭活效果的影响。应确定允许的制品瓶间各参数的差异。病毒灭活用的干热箱至少每半年验证一次。验证时干燥箱内应设多个测温点（包括制品内、箱内最高和最低温度点）。

# 干热灭活



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

- 干热法常用的处理条件有60 °C、96 h, 80 °C、72 h 以及 100 °C、30min。
- 有相关专家研究发现, 在100 °C、30 min 的处理条件下, 此病毒灭活方法除了对猪细小病毒的灭活不理想外, 对其他病毒均有良好的灭活效果, 而且经过此方法后凝血因子的失活仅在5% 左右, 没有发现蛋白制品的物理或生物学性质发生变化, 证明了干热法作为最终病毒灭活的关键步骤, 能够保证凝血因子产品的病毒安全性。
- 由于对病毒灭活能力的限制, 此方法常用于凝血因子制品的辅助病毒灭活方法。

# 低pH孵育



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

低 pH 孵育在 20 世纪 80 年代初用于注射用人免疫球蛋白的制备过程中防止免疫球蛋白的聚合，随后发现其对大部分的脂包膜病毒有灭活作用，后被用于血液制品的病毒灭活。

- 原理: 持续的低pH使某些病毒成分产生变质，从而影响病毒的复制，最终使病毒失去传染性。
- 研究表明，免疫球蛋白生产工艺中的低pH（如pH4）处理（有时加胃酶）能灭活几种脂包膜病毒。灭活条件（如：pH值、孵放时间和温度、胃酶含量、蛋白质浓度、溶质含量等因素）可能影响病毒灭活效果，验证试验应该研究这些参数允许变化的幅度。

# 低pH孵育



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

- 在 pH 5、30 °C 条件下对静脉注射用免疫球蛋白持续处理 14 d 能够对脂包膜病毒和部分非包膜病毒进行有效的灭活。
- 该方法可以作为生产过程的处理，与纳米膜过滤、离子交换层析等工艺相结合的方式，保证制品的安全性。
- 该方法要求产品的活性在低 pH 条件下保持稳定。

# 低pH孵育



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

影响灭活效果因素（重组制品）：

1. pH范围：pH < 3.8灭活病毒效果较好
2. 缓冲体系：灭活效果与缓冲液成分有关
3. 孵育温度：温度越高，灭活效果越好
4. 样品浓度：浓度越低，灭活效果越好

# 有机溶剂/去污剂(S/D)



早在20世纪80年代中期S/D法开始发展应用，目前依然是血液制品中一种核心的病毒灭活方法。

- 原理：有机溶剂和非离子表面活性剂的混合物能够破坏脂包膜病毒的类脂膜，从而使类脂从病毒表面脱落，使病毒失去黏附和感染细胞的能力。
- 有机溶剂，如：磷酸三丁脂（TNBP）和非离子化的去污剂，如：Triton X-100或吐温-80结合可以灭活脂包膜病毒，但对非脂包膜病毒无效。
- 常用的灭活条件是0.3%TNBP和1%吐温-80，在24℃处理至少6小时；0.3%TNBP和1%Triton X-100，在24℃处理至少4小时。

# 有机溶剂/去污剂(S/D)



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

- S/D处理前应先用1 $\mu$ m滤器除去蛋白溶液中可能存在的颗粒（颗粒可能藏匿病毒从而影响病毒灭活效果）。加入S/D后应确保是均一的混合物。
- 在灭活病毒全过程中应将温度控制在规定的范围内。如果在加入S/D后过滤，则须检测过滤后S/D的浓度是否发生变化，如有变化应进行适当调整。吐温-80应采用植物源性，并应采用称量法量取。



# 有机溶剂/去污剂(S/D)



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

- 有研究结果显示，以0.3% 的 TNBP 和1%的 Triton-X100 为S/D试剂，在22℃条件下处理 30min 后可以对凝血因子制品中的牛痘病毒、单纯疱疹病毒、辛德毕斯病毒等模拟脂包膜病毒进行有效的灭活，证实了S/D法用于脂包膜病毒灭活的稳健性和有效性。
- S/D法主要用于凝血因子制品、蛋白酶抑制剂、人免疫球蛋白等血液制品的脂包膜病毒灭活。

# 辛酸法

早在 20 世纪 90 年代初，有报道辛酸钠灭活 4 种脂包膜蛋白的机制，揭开了辛酸法在病毒灭活中的应用。

- 原理：在低 pH 条件下，辛酸的非离子形式具有亲脂性，能够进入病毒脂包膜从而破坏脂质双分子层和相关蛋白质的完整性，使脂包膜病毒失去传染性，达到脂包膜病毒的灭活作用。
- 有研究报道，辛酸溶液能够在极短的时间(1 min)内对人免疫缺陷病毒、牛病毒性腹泻病毒、辛德毕斯病毒、伪狂犬病病毒进行有效的灭活。
- 由于辛酸法需要在低 pH(通常 $\text{pH} < 6$ )条件下发挥作用，要求蛋白质产品在低 pH 条件下能够保持其稳定性，因此目前主要用于免疫球蛋白M和免疫球蛋白G的病毒灭活。

# 光化学法



亚甲蓝( MB) /可见光处理法、补骨脂素/UVA 处理法、核黄素 /UV 处理法等是目前常用的光化学方法， 主要用于全血浆以及血小板制品的病毒灭活。

- **MB/可见光法处理法** 原理是: MB 是一种带正电荷的感光吩噻嗪染料，可以穿过病毒的包膜与核酸结合，在一定强度的光照射下发生光化学反应，产生羟基自由基和单态氧，阻止核酸的复制从而达到病毒灭活的目的。
- 此法对脂包膜病毒有良好的灭活效果，对非包膜病毒灭活效果不理想。
- 对于不稳定的蛋白产品可能造成功能活性的损失，目前多有文献报道此病毒灭活方法对于血浆蛋白的影响变化。

# 光化学法

- **补骨脂素 /UVA 处理法** 原理是: 补骨脂素分子能够可逆的嵌入DNA、RNA螺旋中, 在长波紫外线( UVB)的照射下, 补骨脂素分子与嘧啶碱基相互作用, 阻止病毒的复制, 使其失去传染性。
- 此方法的病毒灭活效果以及缺陷与MB/可见光法相似。

# 光化学法

- **核黄素 /UV 处理法** 原理是: 核黄素是小分子物质, 能够插入核酸内部, 在 UV 的作用下, 通过可逆性氧化还原反应转移电子, 使鸟嘌呤氧化, 病毒无法复制从而使其失去传染性。
- 此法对脂包膜病毒以及一些非包膜病毒的灭活作用效果显著, 但是也容易造成不稳定蛋白的失活。

# 工艺的选择——血液制品



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

根据不同类血液制品潜在的污染病毒的可能性不同：

## （一）凝血因子类制品

生产过程中应有特定的能去除/灭活脂包膜和非脂包膜病毒的方法，可采用一种或多种方法联合去除/灭活病毒，如S/D、干热灭活、除病毒过滤等。

## （二）白蛋白

采用低温乙醇生产工艺和特定的去除/灭活病毒方法，如巴斯德消毒法等。

## （三）免疫球蛋白类制品

对于免疫球蛋白类制品（包括静脉注射用人免疫球蛋白、人免疫球蛋白和特异性人免疫球蛋白）生产过程中应有特定的灭活脂包膜病毒方法。但从进一步提高这类制品安全性考虑，提倡生产过程中加入特定的针对非脂包膜病毒的去除/灭活方法。因此可以选择如S/D、除病毒过滤等方法。

# 工艺的选择——重组制品



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

- 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的生物制品。

- ✓ 低pH孵育
- ✓ S/D孵育
- ✓ 层析
- ✓ 除病毒过滤

# 工艺的选择——生化药品



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

- 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。

- ✓ 强碱处理:  $\text{NaOH}$
- ✓ 低pH孵育
- ✓ 高温
- ✓ 层析
- ✓ 分级沉淀
- ✓ 超滤: 小分子多肽, 可截留病毒



# 工艺的选择——医疗器械



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

- 全部或部分采用动物组织制成的或取材于动物组织的医疗器械产品（体外诊断用医疗器械除外）。

- ✓ 辐照：钴60
- ✓ 强碱处理：NaOH
- ✓ 氧化剂：过氧化氢
- ✓ 分子交联工艺：戊二醛浸泡

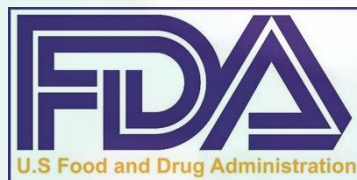


# PART3

## 国内外申报的差异

- 指导原则
- 差异
- 指示病毒的选择
- 示例

# 国内外的指导原则



# 国内外申报差异



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

## 指示病毒

- 国内：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。
- 国外：尽可能选择污染产品的病毒最相似的病毒进行验证即特异性模型病毒，同时关注非特异性病毒即理化性质较宽的病毒。

## 工艺可重复性要求

- 国内：一般验证三批
- 国外：至少分别做两次独立的研究

## 工艺的选择

- 国内：IND申报时期只选择低pH和除病毒过滤这两个工艺，BLA时期增加层析步骤。
- 国外：IND申报时期低pH和除病毒过滤这两个工艺以外，需要引入一步层析工艺。

# 指示病毒的选择

以CHO表达系统为例：

病毒名称	基因组	脂包膜	大小(nm)	形态	理化抗性
小鼠白血病病毒 (X-MuLv)	RNA	有	80-100	球型	低
伪狂犬病毒 (PRV)	DNA	有	120-200	球型	中
呼肠孤病毒3型 (Reo-3)	RNA	无	60-80	球型	中
鼠细小病毒 (MVM)	DNA	无	18-24	20面体	极高

# 差异示例——IND

工艺步骤	去除/灭活	指示病毒	
		国内	国外
低pH值孵育	灭活	X-MuLv, PRV	X-MuLv, PRV
除病毒过滤	去除	MVM, Reo-3	X-MuLv, MVM
层析1	去除	NA	X-MuLv, MVM
层析2	去除	NA	按意愿添加
批次	/	三批	一批重复两次

# 差异示例——BLA

工艺步骤	去除/灭活	指示病毒	
		国内	国外
低pH值孵育	灭活	X-MuLv, PRV	X-MuLv, PRV
除病毒过滤	去除	X-MuLv, MVM, Reo-3	X-MuLv, PRV, MVM, Reo-3
层析1	去除	X-MuLv, PRV, MVM, Reo-3	X-MuLv, PRV, MVM, Reo-3
层析2	去除	按意愿添加	按意愿添加
批次	/	三批	一批重复两次



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

# 病毒去除/灭活验证服务

1. 可在灭活/去除研究开展之前提供各种相关咨询，帮助客户了解在获得所需清除水平过程中，哪些工序或工艺参数较为理想，而哪些会存在问题。
2. 工作人员经验丰富，有10年以上病毒清除验证经验，其中包含多位留学博士、硕士，可以帮助客户建立缩小模型，对纯化工艺进行指导，或与客户共同开展研究项目。
3. 我们对中国FDA、美国FDA和ICH等的当今要求和未来趋势具有深刻的理解，我们将根据客户产品生产工艺设计最佳的病毒灭活/清除验证方案。





THANK YOU

**北京义翘神州科技股份有限公司**

Add / 北京市北京经济技术开发区科创十街18号院9号楼

Tel / +86-400-890-9989 Fax / +86-10-50953282

Email / [order@sinobiological.com](mailto:order@sinobiological.com) [www.sinobiological.com](http://www.sinobiological.com)



Sino Biological  
Biological Solution Specialist

## 北京义翘神州科技股份有限公司

地址：北京市经济技术开发区科创十街18号院9号楼

电话：+86-400-890-9989

传真：+86-10-50953282

邮箱：Order@Sinobiological.com

网址：cn.sinobiological.com



扫一扫，关注  
“北京义翘神州”

精品试剂助力您的科研事业！ *Accelerate Your Research & Discovery!*