

# WHO病毒灭活/去除验证指南

中国药品生物制品检定所

沈琦

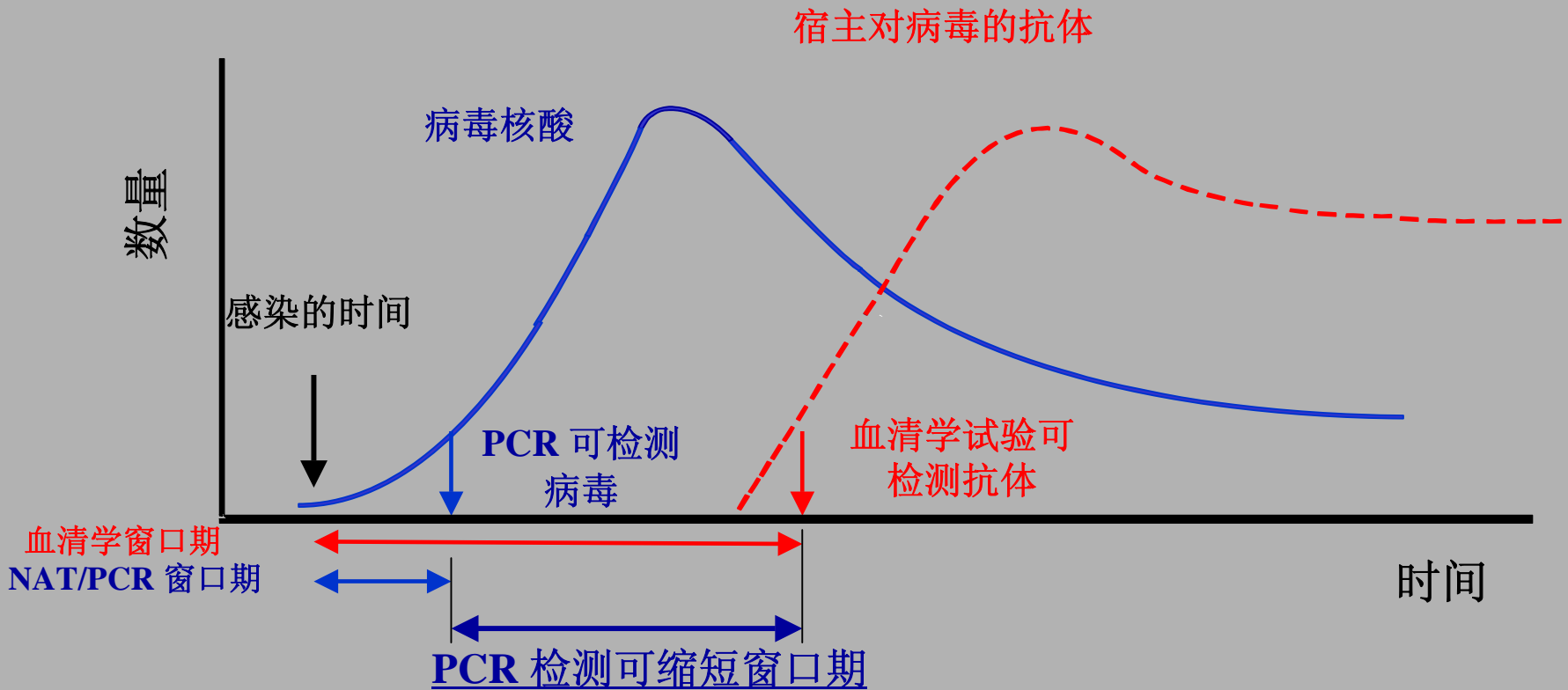
# 临床用血浆的病毒安全性

- 血浆检疫/献血员血浆复检
- **S/D**处理血浆
- 亚甲基兰处理血浆

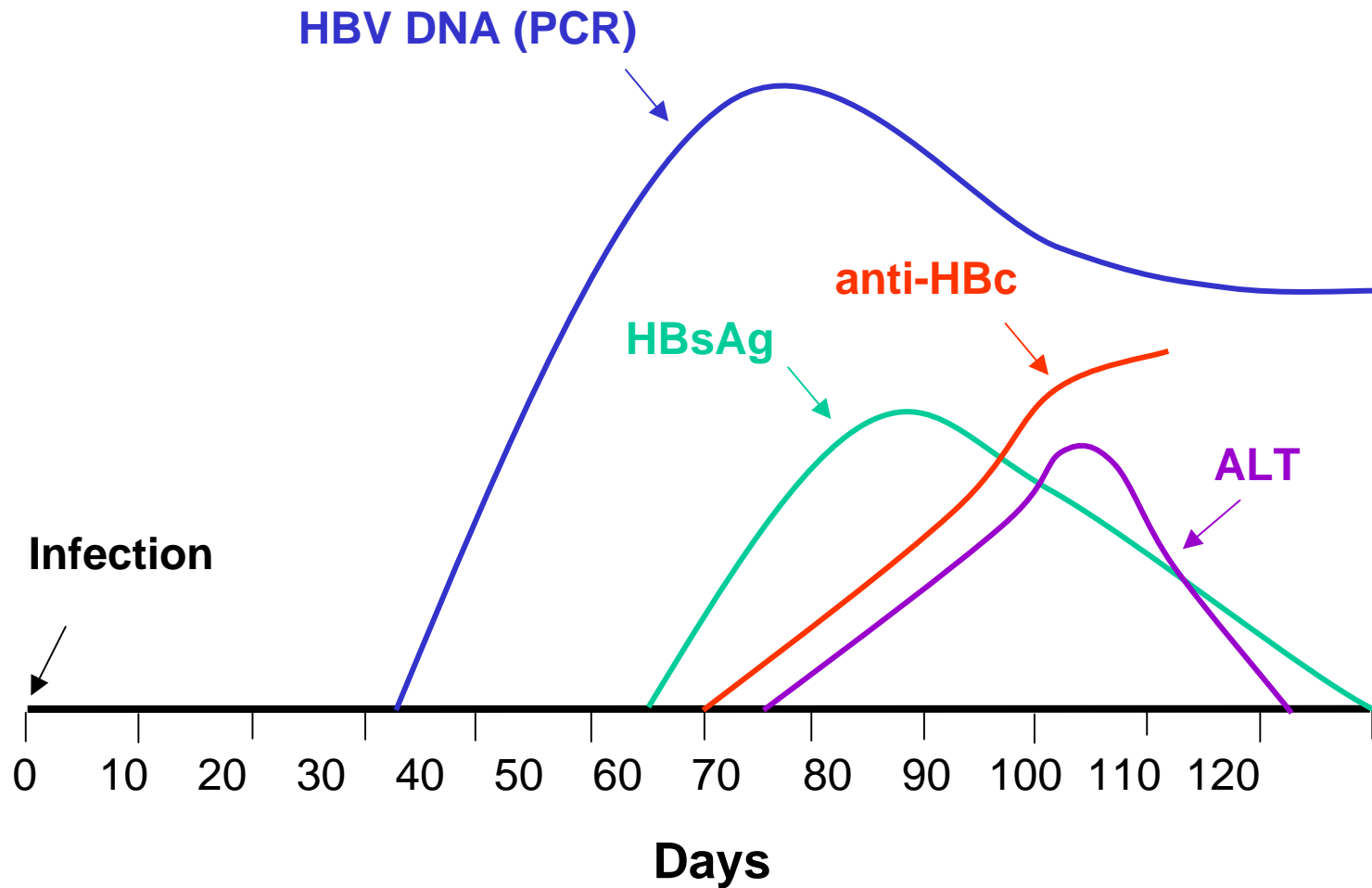
# 1.血浆检疫/献血员血浆复检

- 血浆放置一段时间，3-4月
- 等献血员第二次献浆
- 检查病毒非常有用
- 减少窗口期传染

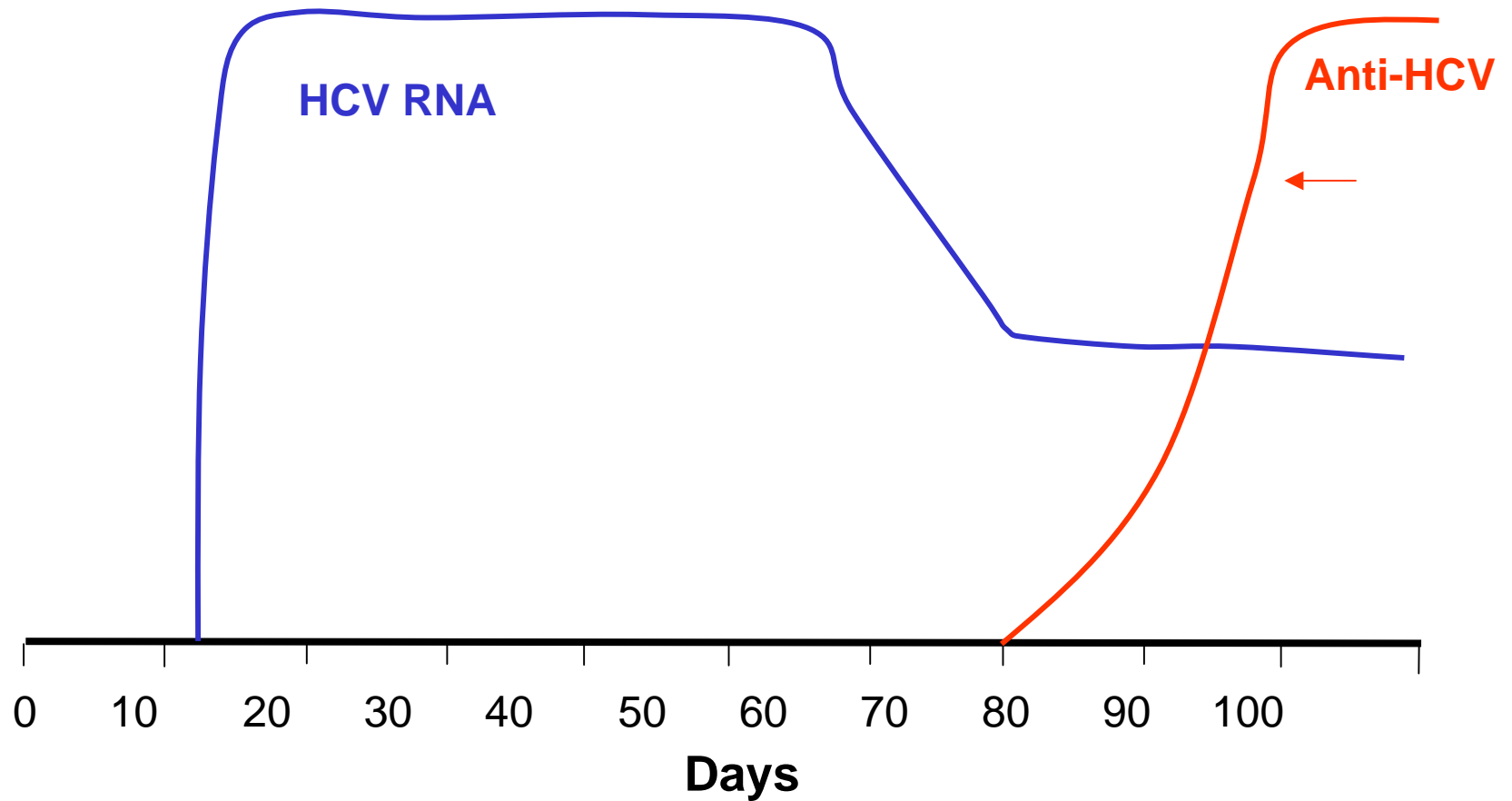
# NAT/PCR 缩短“窗口期”



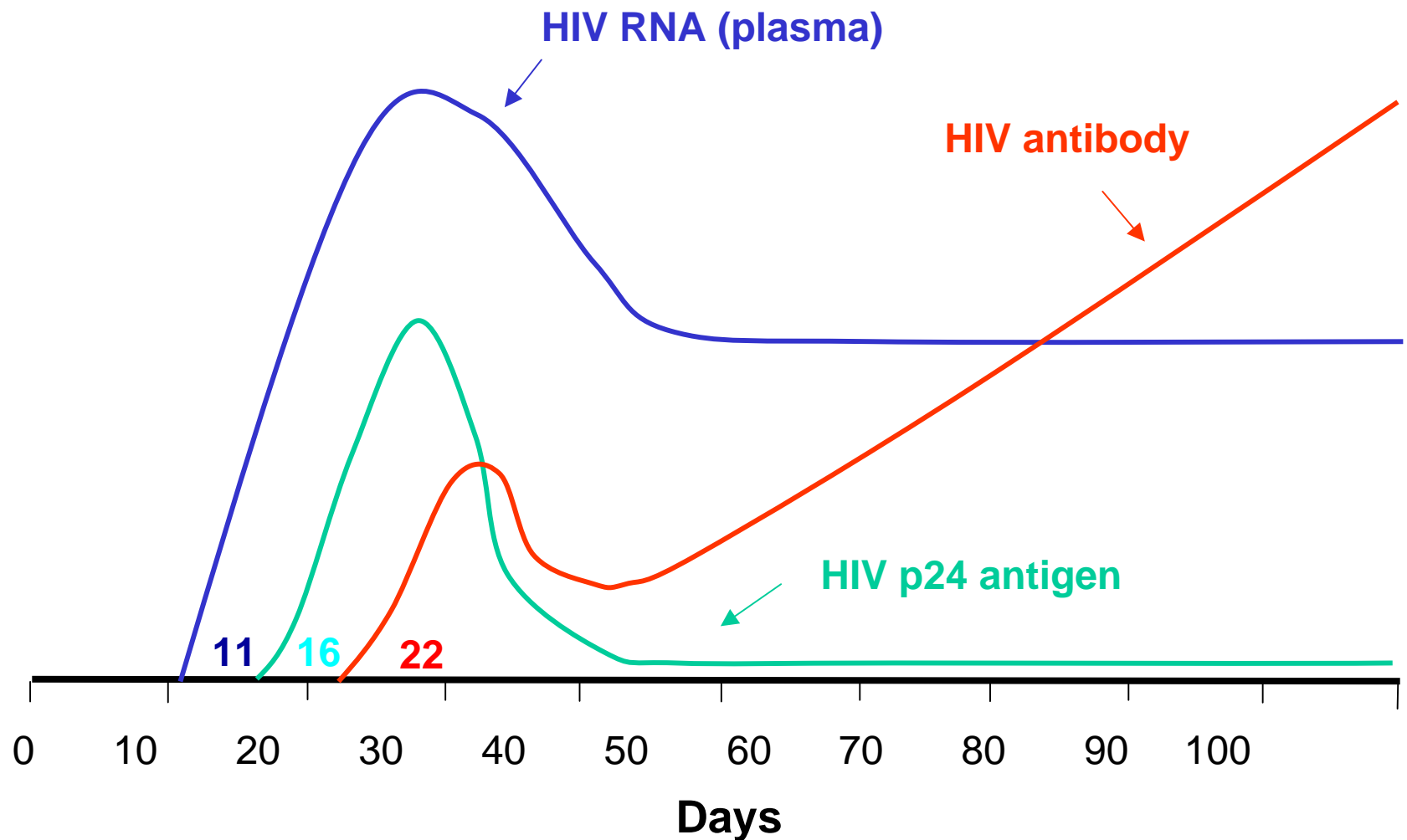
# HBV markers



# HCV markers



# HIV markers



# 优、缺点

优点：

- 保持新鲜冰冻血浆特性和适应症
- 不需精密设备

缺点

- 使用之前需对大量献血员再检查
- 损失许多血浆



## 2. S/D处理血浆

- 血浆混合，用**1.0%TNBP**和**1%TritonX-100**，在**30℃**孵育**4小时**，灭活脂包膜病毒。
- **TNBP $\leq$ 10 ug/ml**
- **TritonX-100 $\leq$ 10 ug/ml**
- 剂型：冻干和冰冻
- 血浆混合**100-2500人份**

**1%TNBP和1%TritonX-100，  
30℃孵育4小时处理血浆灭活病毒情况**

病毒种类	灭活病毒（log 10）	灭活病毒时间（小时）
VSV	$\geq 7.5$	0.25
Sindbis virus	$\geq 6.9$	0.25
Duck hepatitis B virus	$\geq 7.3$	2.5
BVDV	$\geq 6.1$	0.25
HIV	$\geq 7.2$	0.25
HBV	$\geq 6.0$	4*
HCV	$\geq 5.0$	4*

\*仅指测定时间

# 优、缺点

- 优点：
- 灭活脂包膜病毒
- 混合血浆，每袋血浆质量一致
- 缺点：
- 不灭活非脂包膜病毒

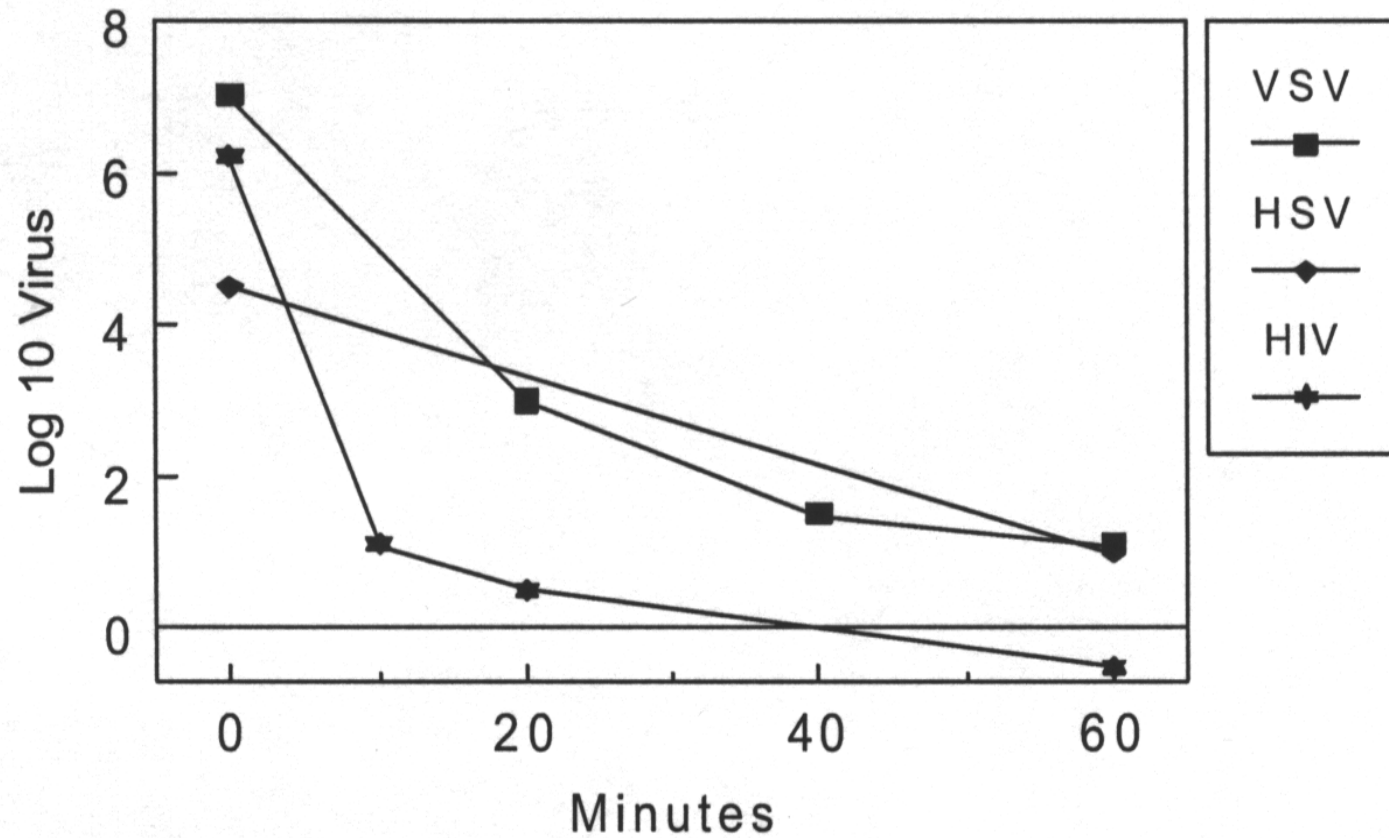
### 3.亚甲基兰和可见光处理血浆

- 一种光敏感剂，与光结合能灭活生物体系
- 1uM亚甲基兰和**45, 000lux**白色荧光照射**1小时**
- 或低压钠灯**200焦耳/cm<sup>2</sup>**照射**20分钟**
- 照射后血浆重新冰冻以备使用

## 1uM 亚甲基兰和1小时白光照射处理血浆灭活病毒情况

病毒种类	灭活 (log 10)	灭活时间 (分钟)
VSV	5.0	60
SIV	$\geq 6.3$	
Semliki forest virus	$\geq 7.0$	10
HSV	$\geq 5.5$	60
West Nile virus	$\geq 6.5$	
Sindbis virus	$\geq 9.7$	
BVDV	$\geq 5.0$	2
HIV (细胞外)	$\geq 6.3$	10-30
HIV(细胞内)	0	
Dock HBV	3.9	60
HAV	0	60

## Methylene Blue Treatment of Plasma



# 优、缺点

优点：

- 除纤维蛋白原和FVIII活性降低外，其它凝血因子活性未损失
- 单个献血员血浆

缺点

- 亚甲基兰和它的反应产物是细菌的诱变剂
- 去除亚甲基兰

# 对几种新的病毒灭活方法的评价

- 补骨脂处理新鲜冰冻血浆
- UVC光照射
- $\gamma$  照射
- 碘
- 巴氏消毒新鲜冰冻血浆
- 辛酸盐



# 1.补骨脂处理新鲜冰冻血浆

- 补骨脂：豆科补骨脂属植物补骨脂的成熟果实。2000版中国药典收载
- 化学成分：香豆精类补骨脂素，也叫补骨脂内酯
- 光敏感剂
- 补骨脂S-59：补骨脂素盐酸衍生物

# 补骨脂S-59作用原理

- 补骨脂S-59在长波紫外线的光化学处理下，在**DNA**嘧啶基中形成链中交联，从而抑制**DNA**的合成

# 浓缩血小板处理

- 方法:

高浓度的需氧致病菌和革兰氏阳性菌  
(10种)、革兰氏阴性菌(7种)、螺旋  
菌(2种)加到浓缩血小板中 ( $3.0 \times 10^{11}$

-  $6.0 \times 10^{11}$  ) , 150umol/L补骨脂和  
3J/cm<sup>2</sup> UVA的照射

# 150umol/L补骨脂和 3J/cm<sup>2</sup> UVA的照射 (血小板)

细菌	灭活量 (Log 10)
表皮葡萄球菌	>6.6
金黄色葡萄球菌	>6.6
沙雷氏菌	>6.7
大肠埃希菌	>6.4
密螺旋体	>6.8
包柔氏螺旋体菌	>6.9

# 150umol/L补骨脂和 3J/cm<sup>2</sup> UVA的照射 (血浆)

病毒	灭活量 (Log 10)
<b>DHBV</b>	<b>5.4</b>
<b>HBV</b>	<b>≥4.5</b>
<b>HCV</b>	<b>≥4.5</b>
<b>BVDV</b>	<b>≥6.7</b>
<b>HIV</b>	<b>≥5.9</b>
<b>HIV (细胞内)</b>	<b>6.4</b>

## 2.UVC光照射

- UVC光照射直接作用核酸
- 含单股核酸的病毒更敏感
- HAV和细小病毒更敏感
- 有效灭活非脂包膜病毒和耐热、耐酸病毒（脊髓灰质炎病毒II型、T4噬菌体和牛痘）

**0.1 或 0.2J/cm<sup>2</sup> UVC的照射-白蛋白  
(0.8 或1.6mM芸香苷)**

**0.05 或 0.1J/cm<sup>2</sup> UVC的照射-IVIG  
(0.5 或1.0mM芸香苷)**

病毒	灭活量 (Log 10)
EMCV	>4.3
PPV	>5.0

# 优、缺点

- 不加芸香苷，白蛋白和**IVIG**均产生**2-3**倍量的多聚体
- **Sephacryl S-200**去除多聚体
- 加芸香苷，不影响病毒灭活效果，对凝血因子、白蛋白和**IVIG**起保护作用



### 3. $\gamma$ 照射

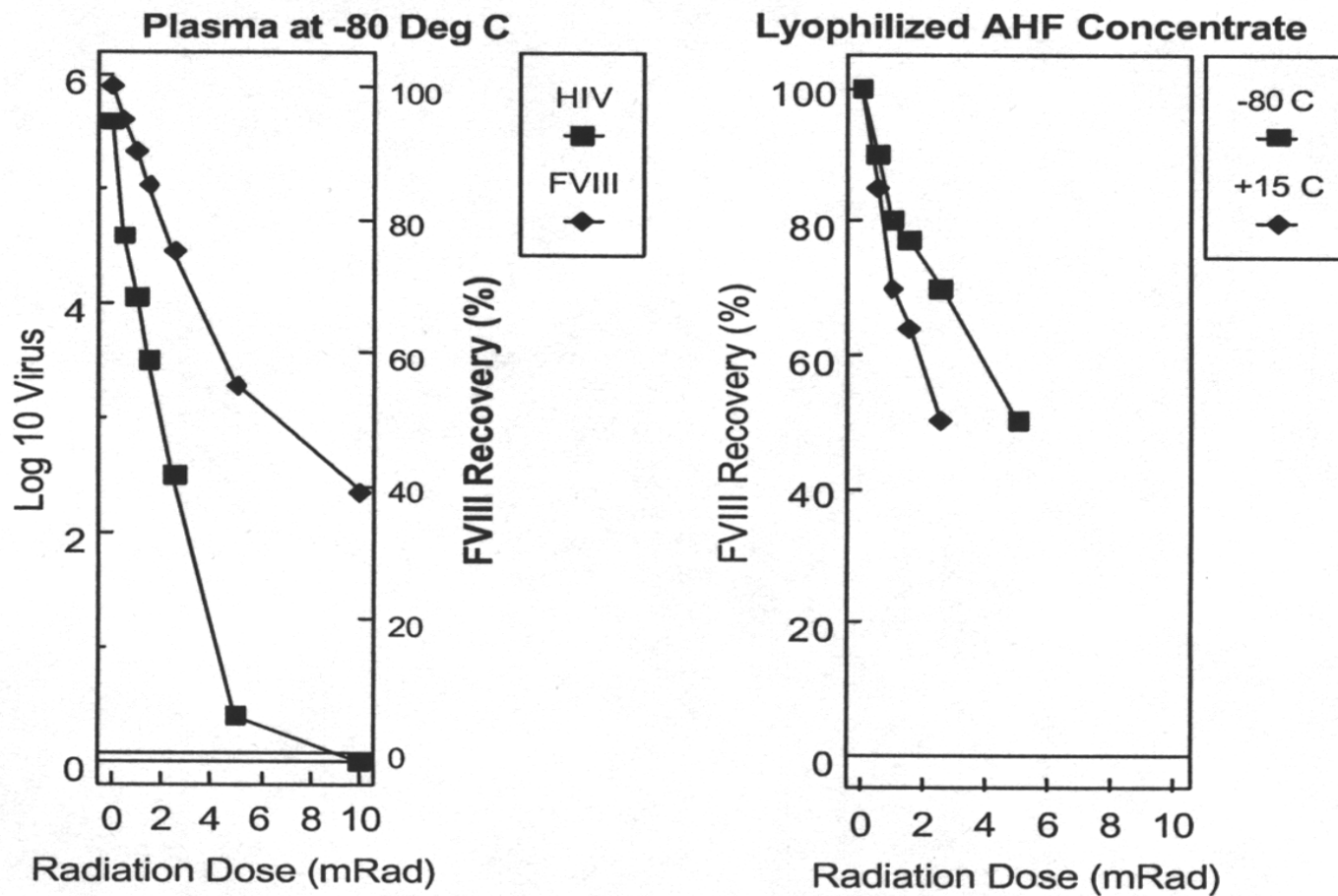
- 第一种机理

直接断裂靶分子的共价键（蛋白质和核酸）

- 第二种机理

间接作用，生产自由基和其它活性物质，作用蛋白质和核酸

**Figure VIC-1. Gamma radiation of plasma and of AHF**



## 2.3、2.8、3.0mRad分别处理冻干产品

品种	保留活性%
人纤维蛋白原	93
FVIII	67
$\alpha$ 1-API	80

## 4.碘

- 是强氧化剂
- 游离碘
- 结合到聚合物（聚乙烯咯烷酮、淀粉、葡聚糖），结合碘逐渐释放，灭活需几小时
- 碘/葡聚糖处理**IVIG**，灭活**PPV**  $> 4\text{Log}$ ,
- **IVIG**结构和功能未变，蛋白质未发生碘化

## 5.巴氏消毒新鲜冰冻血浆

- 稳定剂：1300g/L山梨醇、514g/L蔗糖、4mM葡萄糖酸钙、15mM枸橼酸钠、5g/L精氨酸
- 60℃、10小时
- 保存80-90%凝血因子活性
- 透析去除稳定剂

# 病毒灭活剂-辛酸盐

- 原理：非离子化的辛酸分子能进入病毒包膜，并破坏包膜脂质层或破坏嵌入在包膜脂质层的蛋白质，从而影响病毒脂包膜的完整性。在低pH条件下，辛酸盐呈最大的非离子化形式，从而能达到最佳的灭活病毒的效果。

# 最终选定条件

- **10%蛋白浓度**
- **16mM辛酸盐**
- **pH4.5**
- **30℃以上放孵10小时**

# 验证结果

- **$\text{HIV} > 5.5 \log$**
- **$\text{BV DV} > 4.7 \log$**
- **$\text{Sindbis} > 7.1 \log$**
- **$\text{PRV} > 4.9 \log$**



# 优点

- 稳定剂，安全可靠
- 与S/D 法比较，对某些病毒灭活速度快  
20-60倍
- 不影响蛋白质的生物学活性
- 得率提高

## 二.我国对血液制品病毒去除/灭活验证的管理

# 病毒灭活/去除(Viral inactivation and removal)-1

- 为了做好血液制品病毒去除/灭活工作，卫生部下发了〔卫药政发（1994）第264号〕文。此文对去除/灭活病毒方法及检测效果作了相应规定。
- 为了使病毒去除/灭活方法验证及申报工作规范化，加快血液制品病毒去除/灭活工作，卫生部又下发了〔卫药生发（1997）第443号〕文，关于“血液制品病毒去除或灭活病毒方法及其验证和论证程序”。

# 病毒灭活/去除(**Viral inactivation and removal**)-2

- 为了使我国血液制品病毒去除/灭活工作与**WHO**血液制品病毒去除/灭活指南接轨，国家食品药品监督管理局组织有关专家对〔卫药生发（1997）第443号〕做了进一步修该和完善。
- **2002年5月9日**国家食品药品监督管理局以国药监注〔**2002**〕第**160**号文发布了关于印发《血液制品去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则》。

# **病毒灭活/去除(Viral inactivation and removal)-3**

- **2001年底WHO生物制品专家委员会通过了《Guidelines on Viral Inactivation and Removal Procedures Intended to Assure the Viral Safety of Human Blood Plasma Products》。**

# 指导原则内容包括

- 去除/灭活病毒方法的选择
- 常用的去除/灭活病毒方法的评价
- 特定的去除/灭活病毒方法的选择
- 特定的去除/灭活病毒方法的验证
- 生产工艺去除/灭活病毒能力的验证
- 附录：技术验证申报程序

# 血浆制品相关病毒传播

乙型肝炎病毒	HBV	DNA	有
丙型肝炎病毒	HCV	RNA	有
人类免疫缺陷病毒 1 和 2	HIV 1 HIV 2	RNA	有
甲型肝炎病毒	HAV	RNA	无
微小病毒 B19	B19	DNA	无

新出现的病毒	缩写	核酸类型	包膜
西尼罗河病毒	WNV	RNA	有
冠状病毒 (SARS)	SARS-CoV	RNA	有
猴痘病毒	MPXV	DNA	有

# 病毒的选择

病毒	包膜	指示病毒
<b>HIV</b>	有	<b>HIV</b>
<b>HBV</b>	有	鸭乙肝病毒( <b>Duck HBV</b> )、伪狂犬病毒( <b>Pseudorabies virus</b> )
<b>HCV</b>	有	<b>BVDV</b> 、 <b>Sindbis</b> 病毒
<b>HAV</b>	无	<b>HAV</b> 、脊髓灰质炎病毒( <b>Polio virus</b> )、脑心肌炎病毒( <b>Encephalomyocarditis virus</b> )
<b>B19</b>	无	犬细小病毒( <b>Canine parvovirus</b> )、猪细小病毒( <b>Porcine parvovirus</b> )



# 病毒灭活与去除的方法

## 1、化学方法

- 溶剂/去污剂
  - 有机溶剂磷酸三丁酯（**TNBP**）
  - 去污剂**Tween-80, Triton X-100**
  - 对脂包膜病毒有效，对非脂包膜病毒无效
- $\beta$ -丙内酯法

## 2、光化学方法

- 甲基蓝
  - 加上甲基蓝
  - 然后进行光照，导致灭活
  - 临床用血浆“**MB-血浆**”

# 病毒灭活与去除的方法

## 3、物理方法

- 去除
  - 纳米膜过滤
  - 层析法（免疫亲和层析）
  - 沉淀法（酒精、硫酸铵）
- 加热灭活
  - 干热法（冻干终产品）
  - 蒸汽处理（热的水蒸汽）
  - 巴氏消毒法（**60℃、10小时**）

# 病毒灭活工艺

灭活工艺	产品类型
巴氏消毒法(60 °C、10hr) ( <b>Pasteurization</b> )	白蛋白、 <b>IgG</b> 、凝血因子
<b>S/D法(Solvent/Deterdent)</b>	<b>IgG</b> 、凝血因子、血浆
低pH孵放法(pH4 <b>incubation</b> )	<b>IgG</b>
干热( <b>Dry-heat treatment</b> )	凝血因子
纳米膜过滤法 ( <b>Nanofiltration</b> )	凝血因子、 <b>IgG</b>

# 制造过程

## 病原体（病毒）灭活和去除

- 血浆蛋白纯化
  - 去除不需要的蛋白质
  - 去除潜在的病毒污染
  - 纯化步骤
    - 乙醇沉淀
    - 乙醇/**PEG**沉淀
    - 层析/免疫亲和层析
    - 纳米膜过滤

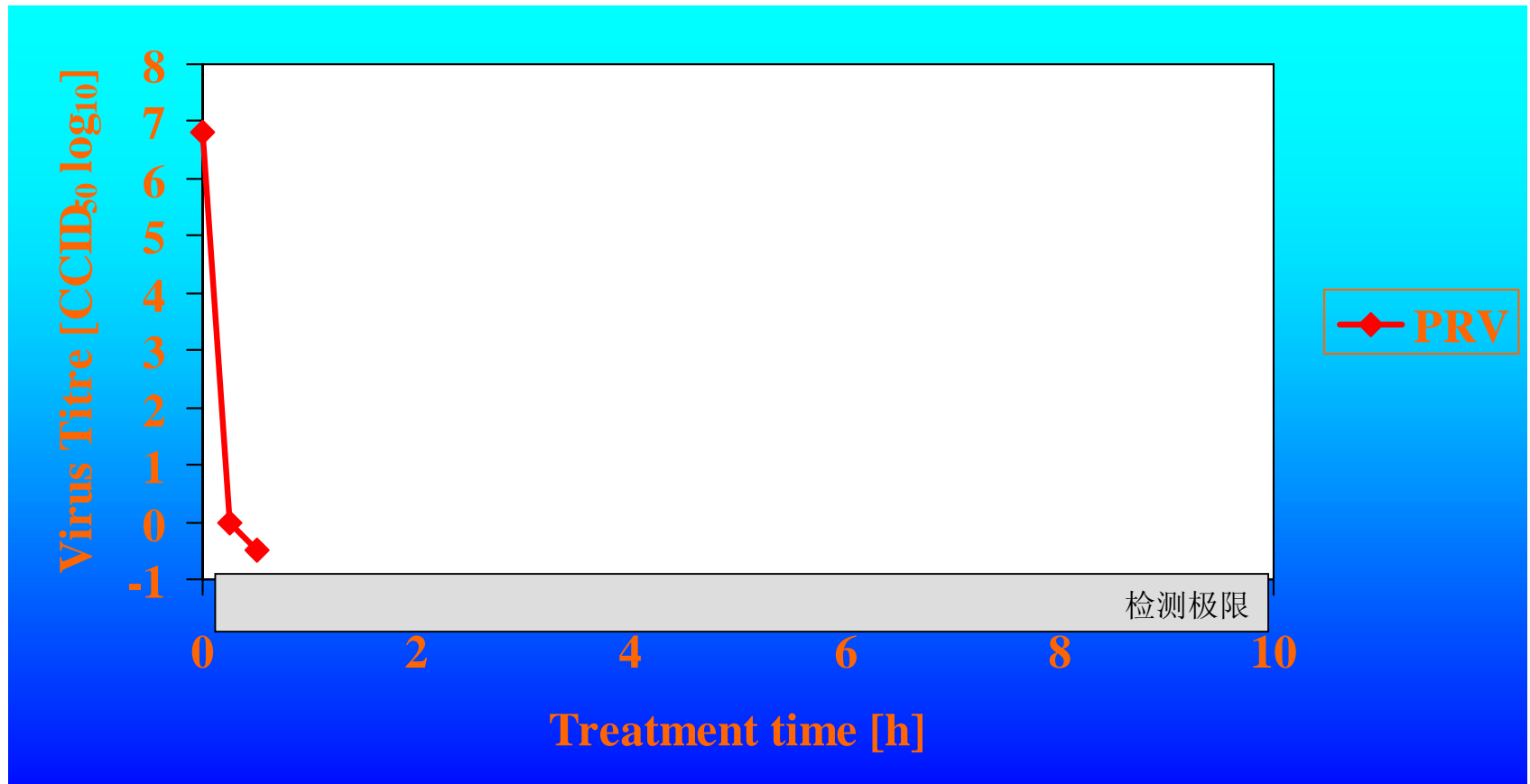
# 制造过程



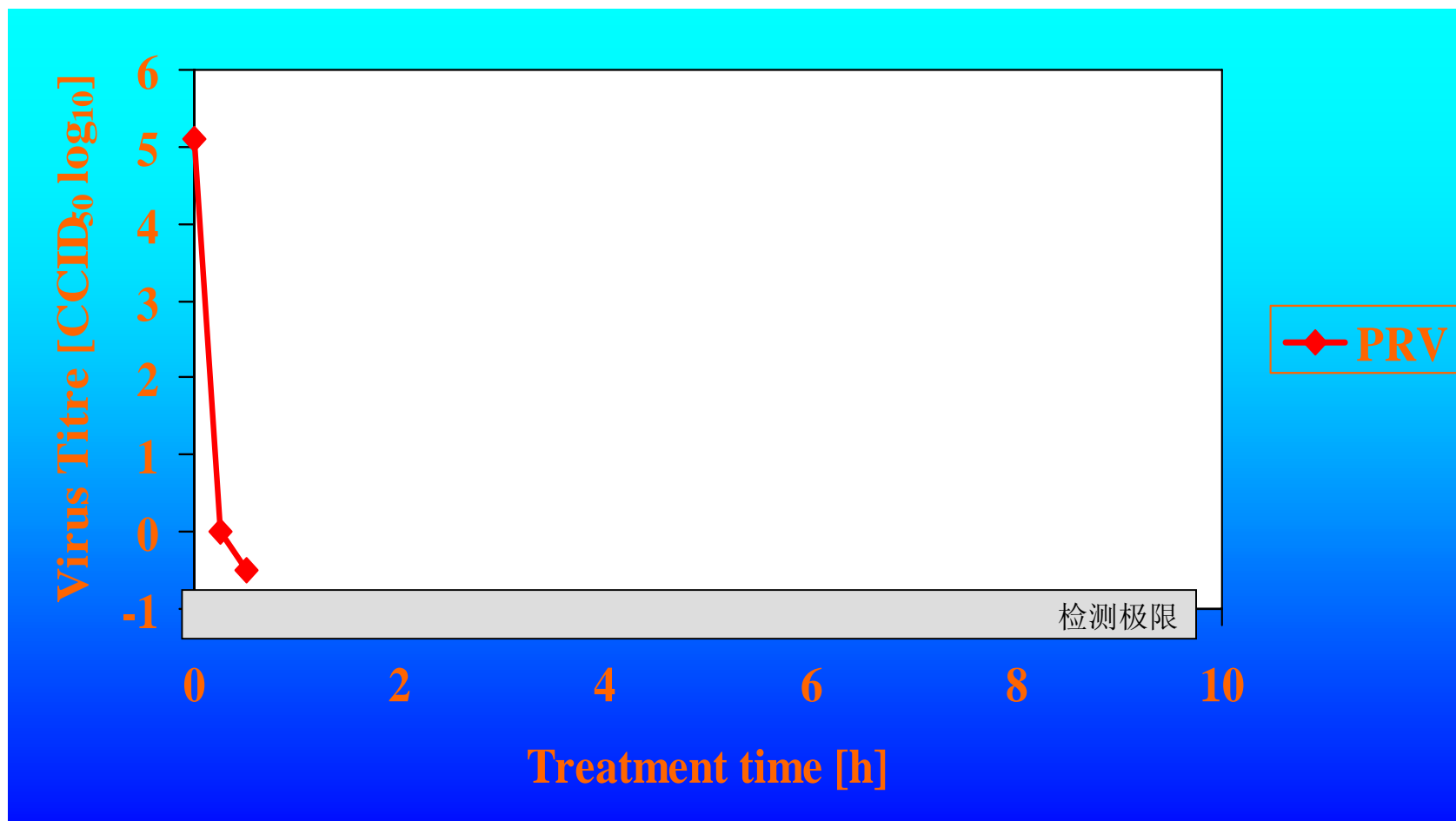
# 20%人白蛋白

病毒平均减少因数 ( $\log_{10}$ )					
生产步骤	HIV 1	BVDV	PRV	HAV	CPV
血浆					
冷沉淀					
1. 乙醇沉淀法					
2. 乙醇沉淀法 (38% and 40% 乙醇)	$\geq 5.1$	$\geq 5.3$	$\geq 6.6$	4.1	3.5
透析/ 填充					
巴氏消毒法	$\geq 6.7$	$\geq 8.8$	$\geq 7.5$	$\geq 6.8$	1.2
20%人白蛋白					
总减少因数	$\geq 11.8$	$\geq 14.1$	$\geq 14.1$	$\geq 10.9$	4.7

# IVIG用巴氏消毒法灭活伪狂犬病毒 (PRV)



# FVIII用S/D法灭活伪狂犬病毒 (PRV)





# 验证一种病毒所送样品量

- **S/D法：含S/D样品3瓶，40ml/瓶；不含S/D样品3瓶，20ml/瓶**
- **巴氏消毒法：3瓶，40ml/瓶**
- **低pH孵放法：12瓶（其中中性样品4瓶）30ml/瓶（我室4瓶）**

# 申报程序如下

- 1.生产企业应按《血液制品去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则》（以下简称“技术指导原则”）的要求对其生产工艺和特定的去除/灭活病毒方法进行验证。
- 2.生产企业在完成去除/灭活病毒效果验证后，向中国药品生物制品检定所提出验证申请，并附上相关资料。

# 申报程序如下

3. 中国药品生物制品检定所对生产企业提交的验证申请及相关资料进行审核，符合要求后对申报的去除/灭活病毒方法进行验证。
4. 在病毒去除/灭活验证的同时或以后，中国药品生物制品检定所还要对加入病毒去除/灭活工艺后生产的3批制品进行全面的质量复核。

# 申报程序如下

- 5.采用新的病毒去除/灭活方法时，在资料审核及病毒灭活效果验证后，由中国药品生物制品检定所组织血液制品和病毒学等方面专家以及有关部门人员，对申报的病毒灭活方法进行论证。

# 验证一个病毒送样品量

## 1. S/D法

- 含S/D试剂的样品量：3瓶，40ml/瓶
- 不含S/D试剂的样品量：3瓶，20ml/瓶

## 2. 巴氏消毒法： 3瓶，40ml/瓶

## 3. 低pH孵放法： 12瓶（其中中性样品4瓶）， 30ml/瓶（血液制品室4瓶，其他交到相关科室）

# 申报资料

- 1.申请病毒灭活函
- 2.血液制品室主任签字
- 3.送我所收审办受理
- 4.资料包括（3份）：申请进行病毒灭活或去除复核验证报告、生产工艺、质量标准、**SOP**、申报单位完成的病毒灭活或去除验证报告、中试三批制造记录等相关资料