

新形势下生物制品病毒清除的挑战和思考

张乐, 温凤鲜, 周沙沙, 官艳东, 徐明明

【摘要】 生物制药行业飞速发展, 出现了很多新技术和新产品, 其对病毒安全性评价提出了挑战。为探讨新形势下生物制品病毒安全性控制策略与病毒清除验证实施方式, 本文根据生物制品病毒安全性指导原则的变化, 从病毒载体类产品、连续制造工艺、先验知识和(或)平台验证三方面, 比较了病毒载体类产品和传统重组产品、连续制造工艺和传统批生产的病毒安全性控制策略以及先验知识和(或)平台验证的应用策略和传统病毒清除工艺验证策略的异同, 对新形势下生物制品病毒安全性控制策略与病毒清除验证实施方式给出建议, 可为研究者、生产企业和监管机构提供一定借鉴。

【关键词】 生物制品; 病毒安全性; 病毒清除; 病毒载体; 连续制造; 先验知识

中图分类号: R95 文献标识码: A

文章编号: 1673-713X (2025) 02-0174-07

Challenges and reflections on viral clearance of biological products in the new situation

【Abstract】 The rapid development of the biopharmaceutical industry has led to the introduction of numerous new technologies and products, posing challenges to the assessment of their viral safety. To address the viral safety control strategy and validation of viral clearance for biologics in this new situation, this paper reviews studies on viral vector-based products, continuous manufacturing process and the utilization of prior knowledge and platform validation in accordance with the updated viral safety guideline for biologics. It compares the viral safety control strategies of viral vector-based products with traditional recombinant products, as well as the differences between continuous manufacturing processes and traditional batch production. Furthermore, it discusses the application of prior knowledge and platform validation strategy versus the traditional viral clearance validation strategy. Recommendations are made for viral safety control strategies and the implementation of virus clearance validation in the new environment, offering guidance for researchers, manufacturing companies, and regulatory bodies.

【Key words】 biological product; viral safety; viral clearance; viral vector; continuous manufacturing; prior knowledge

生物制品存在潜在病毒污染风险。国外曾报道人免疫球蛋白产品因筛选试剂改变和缺乏有效的病毒灭活步骤导致患者静脉注射后丙肝病毒传播^[1]; 已经通过监管机构许可的轮状病毒疫苗发现存在猪圆环病毒 1 型; 常用于生产杆状病毒表达产物的昆虫细胞 SF9 发现存在弹状病毒^[2]。病毒污染事件的预期影响可能包括导致相应生物制品以及厂区其他产品的质量和安全、临床上的严重后果和公众对生物制药产业的信心不足^[3]。因此生物制品的病毒安全性控制尤为重要。

生物制药行业近几十年飞速发展, 出现了很多新的技术和产品。以重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)载体的基因治疗制品为例, 全球已有 6 款 rAAV 载体产品获批上市, 国内也有多达 22 款 rAAV 载体制品获得临床许可^[4]。10 个采用连续制造技术的药物已获得美国 FDA 批准, 国内已完成 2 个连续制造进口药物的上市申请和多个临床试验的审批^[5]。新兴治疗产品与传统重组蛋白质或抗体类产品存在差异, 病毒安全性的侧重点有

所不同, 病毒去除(灭活)工艺的应用可能受限, 外源因子污染风险可能需要多个环节联合控制^[6]。病毒安全性控制应以风险评估为基础, 从三个方面进行考虑, 首先是来源控制, 选择合适的起始材料和原材料, 其次是生产过程控制及检测, 确保过程中无病毒检出, 最后是病毒清除工艺验证, 通过病毒去除(灭活)工艺确保产品无潜在的病毒^[3]。

随着技术和时代的发展, 生物制品病毒安全性控制策略随之发展, 人用药品技术要求国际协调理事会(ICH)《Q5A(R2): 来源于人或动物细胞系生物技术产品的病毒安全性评价》作为生物制品病毒安全性最重要的国际性指南, 为来源于人或动物细胞系的生物技术产品的病毒安全性评价工作提供了重要的指导和参考。2022 年 9 月 29 日 ICH 开始对 ICH Q5A 的修订内容征求意见, 2023 年 12 月 12 日, 国家药品监督管理局发布了 ICH Q5A(R2) 的实施

作者单位: 100023 北京义翘神州科技股份有限公司

通信作者: 徐明明, Email: mingming_xu@sinobiological.cn

收稿日期: 2024-04-18

建议。其修订内容囊括了新产品类型病毒载体类、新制造工艺连续制造工艺和新策略先验知识或平台验证等^[7]。本文根据生物制品病毒安全性指导原则的变化,综述了病毒载体类产品、连续制造工艺、先验知识或平台验证等方面的研究,比较了病毒载体类产品和传统重组产品、连续制造工艺和传统批生产的病毒安全性控制策略以及先验知识或平台验证策略和传统病毒清除工艺验证策略的异同,对新形势下生物制品病毒安全性控制策略与病毒清除验证实施方式给出了建议。

1 新产品: 基因工程病毒载体及衍生产品

1.1 背景

病毒载体是指经改造用于介导外源基因转移和(或)表达的病毒颗粒^[8]。最常见的病毒载体有逆转录病毒(retrovirus, RV)、腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)、腺病毒(adenovirus, ADV)和慢病毒(lentivirus, LV)等^[9]。基因工程病毒载体及衍生产品主要包括使用辅助病毒和蛋白表达病毒载体、稳定转化或瞬时转染的细胞系生产的基因工程病毒载体以及病毒载体衍生产品,例如杆状病毒-昆虫细胞生产的蛋白质亚基和病毒样颗粒(virus like particles, VLPs)、基于纳米颗粒的蛋白疫苗以及 AAV 病毒载体产品^[7]。亦有人腺病毒 5 型作为基因递送载体广泛用于基因治疗产品及疫苗^[10]。病毒载体类产品因其活性成分和作用机制特殊,病毒载体复制特性的变化可能会引起病毒的非特异性感染和扩散,部分产品的基因修饰活性可使细胞的遗传物质或生物学特性发生不可逆的改变^[8]。出于生物安全性考虑,对于病毒载体类产品的检验需全面严谨,方法验证需科学完整^[4]。

1.2 病毒安全性控制策略

对于病毒载体类产品的病毒安全性控制策略,应对起始原材料如细胞库、病毒种子批进行病毒检测,对生产工艺过程进行病毒检测、考虑病毒去除(灭活)验证研究以及质量控制^[11]。与传统重组蛋白产品不同,病毒载体类产品在生产过程中或终产品中包含病毒,其生物安全风险增加。若可能应增加病毒清除工艺并进行验证。若病毒清除工艺应用受限,则通过选择来源清晰起始原材料、开展原材料和工艺过程中的检测、条件允许的情况下封闭式生产等方式来确保产品的病毒安全性。

1.2.1 原材料和辅料 对于起始原材料来说,应优先选择来源明确、培养历史清晰且无病毒污染的细胞基质用于病毒包装和生产。若使用含有内源性病毒的细胞基质,应评估其使用的必要性和安全性。生产用的病毒可能包括病毒载体种子和(或)包装用病毒,其来源、培养历史、构建过程应清晰、完整,病毒特性需满足生产的需求,且经评估其安全风险应可控^[8]。若使用了辅助病毒,其作为相关病毒污染物应充分去除^[7]。若使用了包装用病毒,应对其残留水平、感染活性、复制能力和(或)表达活性进行分析,并评估其残留安全性和制订相应的控制策略^[8]。对于其他原材料和辅

料,如血清、胰酶、激活用抗体、血液成分等,应结合供应商风险控制措施、检测报告以及产品中残留的风险进行全面分析,评估制订相应的控制策略,优先选择外源因子引入风险较低、非生物源性的原材料^[6]。另外,病毒载体类产品应重点关注病毒主种子批的质量控制,包括但不限于:鉴别、滴度、活性、无菌检查、支原体检查、外源病毒因子、伴生型病毒或复制型病毒检查等^[4]。非复制型病毒载体应关注复制型病毒载体出现的风险和控制^[6]。非复制型病毒载体理论上在体内引起病毒扩散或感染失控的风险相对较小,但仍需要通过合理、可靠的方法进行检测,选择和设计病毒载体时应充分考虑生产和使用过程中通过同源或非同源重组产生复制型病毒的可能^[8]。复制型载体应关注野生型病毒污染的风险和控制,同时考虑易发生伴随污染的病毒载体的检测^[6]。因其复制特性可能引起非特异性感染、免疫应答、细胞溶解等效应,需结合载体特性、结构设计、安全性和预期作用机制等谨慎选用^[8]。例如早期的腺病毒载体较易发生同源性重组,有可能产生野生型或有复制力的毒株^[12]。选择和设计病毒载体时,应使病毒载体与人体易感病毒或内源性病毒的同源序列最少化,来降低重组产生新型感染性病毒或复制型病毒的风险^[8]。

1.2.2 生产过程中的病毒检测 生产过程中的病毒检测可采用不同细胞培养法或基于核酸的方法进行外源病毒的筛查,依据风险评估也可考虑特定病毒或病毒家族进行检测。在进行病毒类外源因子检查时,由于制品本身为病毒,需减少病毒载体自身对实验的干扰,因此在使用细胞培养法检查前,应制备合适的中和抗体或抗血清对制品病毒进行中和。若无法制备合适滴度的中和抗体,需要在病毒种子生产时,设置生产用对照细胞并进行外源因子检测。对于不易培养或风险性较高的外源病毒,可开发特异性检测方法,如 PCR 等分子检测技术^[4]。对于非复制型或条件复制型病毒载体,应在适当的工艺阶段采用敏感的方法对其进行监测^[8]。可复制型病毒的产生是慢病毒和逆转录病毒载体生产和应用过程中最严重的风险因素,一般不应检出。应通过主细胞库的细胞和上清、生产终末细胞、收获液上清和病毒终产品,以及后期细胞制品等多个环节对可复制型病毒进行监测和控制^[13]。可复制型病毒残留标准限度的设定应根据可复制型病毒的种类、残留风险、工艺可控性、临床给药剂量等确定,例如可复制型腺相关病毒常作为腺相关病毒载体类产品原液和成品质量标准中的重要项目进行限度控制^[11]。

1.2.3 病毒清除工艺验证 病毒去除(灭活)工艺单元的设立应基于病毒载体类产品工艺特点和风险分析研究确定^[11]。病毒载体类基因治疗产品,由于上游载体包装过程中可能采用了包装用病毒、辅助病毒,或病毒包装用细胞含有潜在内源性病毒,此时工艺中应通过增加病毒清除工艺单元,清除发酵收获液中的非目标病毒^[6]。指示病毒应根据产品特点 and 验证目的选择,若可能应选择辅助病毒、包装用病毒、细胞内源性病毒等相关病毒作为指示病毒,或选择密切相关和理化性质相近的模型病毒作为指示病毒。

病毒载体生产常用的纯化方法包括超速离心、离子交换层析、分子排阻层析、亲和层析、过滤等^[13]。考虑在工艺步骤中增加必要的病毒去除(灭活)单元,可根据辅助病毒、包装用病毒或内源性病毒与目标病毒载体在理化性质方面的差异确定,其中分子筛、离子层析等步骤或有一定的分离纯化效果^[6]。选取与产品兼容的病毒去除(灭活)工艺,如有机溶剂(去污剂)(solvent/detergent, S/D)孵育适用于无包膜病毒载体产品,如使用杆状病毒-昆虫细胞生产的 rAAV 产品。除病毒过滤适用于尺寸较小的病毒载体产品,如 AAV 或纳米颗粒疫苗^[7]。验证结果应能证明工艺可有效去除(灭活)生产过程中引入的非目标病毒,同时还要确保目标病毒的质量不受影响^[11],如 AAV 载体对剪切力、pH、温度、离子强度等条件较敏感易失活。另外结合上游收获液中潜在的外源病毒因子的载量,可以评估外源病毒因子残留的安全性风险^[6]。

与重组表达产品相比,病毒载体类产品因其自身特点,与可能污染的病毒理化性质相似,生产中部分病毒清除工艺的应用存在局限,即难以在不影响产品质量的前提下应用病毒清除工艺。病毒清除应用受限的情况下,病毒安全性应加强在原材料、辅料以及生产工艺的检测和质量控制^[7],如选用无内源病毒因子污染的宿主细胞、避免使用无法去除(灭活)的辅助病毒(包装病毒)、合理控制辅助病毒和包装病毒用量及包装时间等^[6]。以腺相关病毒类产品为例,鼠细小病毒(minute virus of mice, MVM)作为常用指示病毒,与 AAV 均属于细小病毒,形态和理化性质相似,在进行病毒灭活和过滤步骤的同时不影响 AAV 产物存在难度,层析工艺更有希望作为病毒清除工艺。Winkler 等^[14]进行腺相关病毒产品亲和层析工艺的病毒清除研究,该工艺能特异性结合 AAV 病毒,同时对多种病毒具有很好的病毒清除效果。其中异嗜性鼠白血病毒(xenotropic murine leukemia virus, X-MuLv)、MVM、甲型肝炎病毒和伪狂犬病毒四种病毒的清除效果 $> 4 \log$,对肠孤病毒 3 型(reoviruses type 3, Reo-3)和单纯疱疹病毒 1 型也表现出 $\geq 2.5 \log$ 的清除效果。从监管层面的考虑来说,存在风险的病毒载体类产品病毒清除工艺效果占有重要的比重。AAV 病毒基因治疗产品 Glybera 因其上游发酵液中存在大量感染性杆状病毒,而病毒清除工艺难以提供足够的清除效果,申请期间欧洲药品管理局多次给予否定评价。通过增加对包膜病毒的灭活工艺和验证,以及杆状病毒残留控制等策略,最终才通过上市申请^[6]。

病毒载体类产品仍处于发展阶段,其病毒清除工艺研究还在不断完善之中。不同于传统重组蛋白产品,病毒载体类产品的病毒清除工艺研究需根据产品的生产工艺进行更加个性化的设计,如指示病毒的选择和病毒清除工艺的评估,对检测机构的病毒检测能力提出了更高的要求。随着企业、检测机构和监管部门的研究加深,病毒清除工艺将会愈发科学完善,确保产品的安全性。

2 新工艺:连续制造工艺

2.1 背景

连续制造技术已在多个行业成功应用多年,批生产仍是生物制药行业生产的主流模式,连续制造在生物制药领域则处于起步阶段,目前尚无从原液至终产品这种端到端全连续制造的生物制品上市。全连续制造的生物制品数量较少,处于不同的研究阶段,进展较快的如 BiosanaPharma 公司的奥马珠单抗,目前处于临床试验阶段,大多连续制造的产品采用部分工艺连续的模式^[15-17]。传统批生产包含多个不连续的步骤,涉及中间产品的保存,着重于生产结束后进行产品检验,而连续制造是部分或全部单元连续,连续工艺中无停顿,着重于在线或旁线检测^[16]。连续制造技术的进步是生物制品生产工艺的未来发展方向,是现有生产工艺的革新,可以更大程度地实现降本增效。连续制造的优势在于减少了中间品转运和步骤中的暂停,设备使用效率更高,人员需求更低,制造时间更短,缺点是初始投资成本较高,批生产切换为连续制造后需要重新提交注册^[18]。美国 FDA 对 5 个连续制造药品进行审计回顾发现,连续制造药品相较于批生产药品上市时间平均要快 12 个月,生产初始投资可节省 20%~75%,日常的运营成本可以节省 6%~40%,更快地上市产生了 1.7 亿~5.37 亿美元的早期收益^[5]。但在实施层面仍面临诸多技术难点,例如国内过程分析技术的实施基础薄弱、连续进样的实时性和连续混合的均匀性问题、动态采样的策略和代表性、连续制造的清洁验证、工艺模型的建立与验证等^[19]。

2.2 病毒安全性控制策略

相较于传统的批生产模式,生物制品的连续制造在病毒安全控制方面既有劣势,也有优势。如灌流培养技术的应用可能导致前期未被发现的病毒污染更快地扩散至下游工艺,进而引发后续风险;但另一方面,连续制造减少了人员的操作和干预,降低了意外引入病毒污染的风险。因其成本方面的优势,可以预见采用连续制造的相关产品将越来越多。因此,连续制造对于生物制品的病毒安全控制而言,机遇与挑战并存,需要科学、严谨、针对性地制订病毒安全控制策略^[20]。可从潜在污染源(如起始原材料和物料)、工艺过程中的病毒检测和工艺清除病毒能力的验证分别考虑^[7]。

2.2.1 原材料和辅料 连续制造的原材料控制同批生产一样,应选择外源因子污染风险小的材料,如非疫区或无动物源成分,或对具有高外源因子污染风险的材料进行病毒去除(灭活)处理。连续制造的细胞培养具有高密度和长时间的特点,内源性病毒的水平可能随时间发生波动,这对过程中的病毒检测和病毒清除工艺的能力提出了更高的要求。同时如金属盐、维生素等成分,较大波动可能会对细胞培养性能产生不利影响,运行时间延长可能需要不同批次的培养基、缓冲液或其他用于下游连续制造工艺的起始物料,可能会给工艺带来更多的可变性^[21]。

2.2.2 生产过程中病毒检测 连续制造生产过程的病毒检测,应考虑延长的细胞培养持续时间可能带来内源性逆转录

病毒水平的升高、单元间的连接和单元操作可能引起物料中病毒水平的波动、基于固定的生产时间或生产数量确定连续制造批次对检测策略的影响等。因此应当合理设置采样点,确保待测样品病毒污染检测结果的准确性。建议在整个收获阶段进行多次取样和检测,确保灌流培养中连续收集的未加工收获液中不存在病毒污染,同时帮助后续溯源和调查。若检测出现阳性结果,则应补充感染性实验和(或)动物实验,以帮助进一步决策的制订。对病毒污染的时间点、来源及传播途径进行详细调查并加以解决^[20]。另外,使用快速检测外源因子的方法有助于尽早决策,以减轻连续制造期间污染事件的影响^[21]。

2.2.3 病毒清除工艺验证 连续制造的病毒清除工艺验证应基于传统批生产的病毒清除工艺验证经验,同时结合连续工艺的特点进行考虑。一般应在延长细胞培养持续时间带来的病毒水平升高风险、输入物料属性的波动、操作单元的负载能力、流速以及时间干扰或暂停的影响、纯化中多柱循环等方面进行考虑^[7]。

生物制品生产工艺流程主要包括上游培养、下游纯化、病毒灭活等步骤,连续灌流生物反应器是连续制造上游工艺的典型代表,技术较为成熟,而生物制品下游纯化、病毒灭活等工艺的连续制造还处于发展阶段,应用较多的是用在线配液代替传统配液以及使用多柱层析系统代替单柱层析^[19]。已有一些连续制造工艺的研究。Budde 等^[22]公开了将单克隆抗体的分批纯化工艺转化为连续纯化工艺的方法,通过具有 5 根色谱柱的多柱 Protein A 亲和层析系统实现连续的进料流和连续的洗脱液流,但纳滤等其他步骤仍采用批生产模式。瑞泽恩制药公司^[23]公开了抗体产品的连续除病毒过滤系统,其与层析系统相连接,使用并行的至少两个过滤器进行过滤,每个过滤器可以基于过滤量或压力进行联通或断开,可被安排不同时间间隔操作,从而实现连续的除病毒过滤,避免中断。有专利公开了一种较为完整的连续制造系统,包含层析主单元、病毒灭活主单元、浓缩(换液)主单元等,可以实现目标蛋白的连续自动纯化,污染风险小、纯化效率高^[24]。

连续制造工艺的变化对缩小模型的建立提出了更新的要求。缩小模型应具有代表性,策略主要分为两种,一种是建立具有连续制造特征的缩小模型,另一种是考虑连续制造中相关动态参数变化后使用最差条件的批生产的传统模型。分别对低 pH 或 S/D 孵育灭活工艺、除病毒过滤工艺和层析去除工艺三种典型的病毒清除工艺的缩小模型建立进行考虑。

对于连续制造的低 pH 或 S/D 孵育灭活工艺来说,相比批生产,灭活处理的过程由静态变为动态,可能会导致停留时间分布和混合均匀度等参数的变化^[20]。应采用灭活剂浓度、温度和时间等工艺参数范围中的最差条件,同时考虑连续流灭活影响的特有参数,以达到科学准确评估连续制造灭活工艺效果的目的。Gillespie 等^[25]建立了连续制造的低

pH 孵育缩小模型,可以模拟连续流动系统中缩小停留时间分布,评估不同 pH 水平、缓冲液组成、单抗浓度和温度的影响,并与传统批生产的灭活方式进行了比较,均达到了很好的灭活效果。浙江大学^[26]公开了一种用于连续病毒灭活的装置,特殊设计的弯曲管路内物料流动具有较窄的停留时间分布,避免灭活孵育时间差异过大,确保连续病毒灭活的效果。

对于连续制造的纳滤去除工艺来说,纳滤的持续输入受前置层析单元的影响,没有缓冲罐辅助的情况下,输入物料的浓度、pH、电导率等方面可能会产生周期性的变化,从而可能导致滤膜超载或过滤压力变化,进而可能引起细小病毒的泄漏^[20]。同时应考虑潜在中断(如更换过滤器)和延长时间的的影响。Lute 等^[27]建立了连续制造的除病毒过滤工艺的缩小模型,考虑了动态产品流中组分波动、低流量和(或)低压参数下运行较长时间对病毒安全性的影响,模拟蛋白质、盐和病毒浓度增加的情况,但仅在蛋白质浓度较高的峰值期间观察到过滤压力增加,使用 Planova 20N 和 Planova BioEX 连续过滤长达 4 d,未发现延长过滤时间和动态产品流对噬菌体去除有效性的明显影响。

对于连续制造的层析去除工艺来说,相比批生产,常使用多柱层析的方式来实现持续的纯化,具有不同的多柱联合模式。建立层析缩小模型时应根据不同模式的特点以及对病毒清除的潜在影响进行考虑,必要时联合验证。多柱层析常用模式为过载的初级纯化流出物被分流到二级层析填料中,持续过载的工作模式可能导致层析填料对病毒的去除能力发生变化;另一种模式为相同的色谱柱,在加载和非加载步骤之间切换,就单柱而言仍与批生产模式相似,可以根据目标过程条件,如流速、载量、重复使用等情况,建立缩小模型^[20]。值得注意的是,多柱层析可能造成病毒量在不同柱的差异,次级柱可能增加非特异性病毒结合的机会。Chiang 等^[28]建立了连续制造工艺的多柱蛋白 A 亲和层析的缩小模型来评估病毒去除效果。一种模式是 1+1,即主次两个色谱柱串联,另一种模式是 1+2,即一个一级色谱柱和两个二级平行色谱柱串联,通过阀门等柱间连接进行控制,可实现色谱柱的主次切换和饱和后的间歇运行,考察了停留时间和缓冲液组分的影响,发现停留时间对病毒清除下降因子的影响很小,更高电导率和盐浓度有益于噬菌体的去除。

连续制造产品的病毒清除验证研究对缩小模型的建立提出了更高的要求。一方面有赖于检测机构开展相应的连续制造病毒清除验证工艺的相关研究,另一方面有赖于连续制造设备供应商对于实验室级别连续制造设备的支持。只有通过连续制造工艺的充分理解、相关连续制造设备供应商技术的广泛应用以及企业、检测机构和监管机构的良好沟通,多方共同发展才能建立合理的连续制造的工艺缩小模型和更科学地进行病毒清除验证,最终助力连续制造产品的注册申报。

3 新策略：先验知识和（或）平台验证

3.1 背景

对于病毒清除验证来说，传统验证策略是先对具有代表性批次的产品或中间品进行病毒加标，再结合生产工艺建立的实验室级别的缩小模型进行工艺模拟，最后检测残留的病毒含量从而验证对应生产工艺的病毒清除效果。从单个产品来看，这样的策略并无问题，但若是从一家公司同一病毒清除工艺平台生产多个产品来看，或者从某一种病毒清除工艺有大量产品的生产工艺中使用来看，以往的策略可能是偏保守的。新验证策略是结合已有病毒清除工艺数据或规律以及相同平台不同产品病毒清除数据的对比研究进行验证，或可减少或代替传统的病毒清除验证策略，达到加快验证进程，节省企业成本的目的。但已有病毒清除数据应充分，病毒清除工艺的表征应明确，否则不足以支持新策略，仍需使用传统的验证策略。

已有病毒清除工艺数据或规律被定义为先验知识，包括内部知识（如开发和生产经验）、外部知识（如科学和技术出版物，包括供应商数据、文献和同行评审的出版物）或既定科学原理（如化学、物理和工程原理）的应用^[7]。而通过先验知识进行病毒清除验证的方法被定义为平台验证，即采用已获得的特定产品病毒清除工艺验证研究内部经验，适当结合外部知识，对内部其他类似产品生产工艺中特定工艺步骤的病毒清除性能进行评估的研究方法^[29]。

3.2 先验知识和（或）平台验证的应用

内部知识基于企业自身病毒清除数据的积累，而平台验证最重要的应为内部数据。生产用细胞基质、生产工艺参数、验证用指示病毒等关键因素一致或类似，不同的产品或中间品具有可比性，则其他产品的病毒清除数据对于目标产品的平台验证更为充分和可信。外部知识的选择较多，关于病毒清除外部知识最典型的是产品注册申报的病毒清除验证数据或病毒清除研究的文献数据。可根据外部数据结合自身平台，确定病毒清除工艺的参数和工艺组合的策略。Miesegaes 等^[30]基于 2009 年前的申报资料建立了单克隆抗体及相关蛋白的病毒清除数据库，包含 553 份化学灭活记录、521 份纳滤记录和 1324 份层析记录；Ajayi 等^[31]基于 1995 – 2021 年的申报资料建立了来源于动物细胞生物技术产品的病毒清除数据库，包含 420 份化学失活记录、505 份纳滤记录和 1729 份层析记录；Stanley 等^[32]基于 20 多年合作单位药明生基和查理士河的纳滤数据建立了除病毒过滤的数据库，包括 2311 份纳滤记录。使用可信度高、数据量充分、相关性高的数据集更适合作为外部先验知识支撑病毒清除工艺的验证。结合上述病毒清除数据库，下面按工艺介绍其阐明的先验知识。

3.2.1 低 pH 或 S/D 孵育工艺 低 pH 或 S/D 孵育主要是通过使病毒的包膜蛋白变性实现病毒的灭活作用，因此主要对包膜病毒有较好的灭活效果。数据显示 S/D 灭活逆转录病毒和疱疹病毒的效果变异较大。吐温-80 与磷酸三丁酯是使用较多的灭活剂组合。2015 年后，Triton X-100 因

其更强的灭活效果使用增多，但因其降解产物存在环境污染问题，在欧洲经济区使用该物质都受到限制^[31]。使用 0.5% Triton X-100 处理 1 h 或使用 1% 吐温-80 和 0.3% 磷酸三丁酯处理 6 h 认为可有效灭活逆转录病毒^[7]。数据显示低 pH 孵育可以有效地灭活逆转录病毒和疱疹病毒，大多数记录的 pH 值范围在 3.5 ~ 3.8，且孵育时间至少 30 min，超过 60 min 可以达到较好的灭活效果^[31]。低 pH 孵育工艺 pH 条件在 3.6 以下的病毒清除效果更加一致，部分灭活效果偏低的原因主要是受毒性影响^[30]。

3.2.2 纳米膜过滤工艺 纳滤是基于筛分原理将大于滤膜孔径病毒进行截留实现病毒的去除。纳滤膜孔径一般 1 ~ 2 nm，而病毒尺寸为 8 ~ 400 nm，尺寸越小的病毒，纳滤相对截留的能力则越弱。Stanley 等^[32]证明了纳滤对于较大的病毒来说是稳健的病毒去除工艺，约有 99% 的数据显示对 X-MuLv、PRV 和 Reo-3 大于 4 log 的去除效果。但是纳滤对于细小病毒来说结果仍存在不确定性，病毒大小与膜孔径接近，有穿透的可能。另外病毒清除效果显示与过滤器类型和代次有关。大型病毒过滤器对较大尺寸病毒如逆转录病毒、疱疹病毒和呼肠病毒，均有很好的去除效果。第一代小型病毒过滤器有两例检测到 Reo-3 的记录，第二代小型病毒过滤器相比第一代小型病毒过滤器有更少的细小病毒突破记录（16% vs 40%），即选用合适类型的较新代次的过滤器具有更高的概率获得高病毒清除下降因子，同时病毒的超载、样品的杂质等都影响病毒去除的效果^[30-31]。纳滤先验知识的应用策略应分两方面考虑。对于逆转录病毒、疱疹病毒和呼肠病毒等较大尺寸病毒在已有纳滤数据的支持下或可免除病毒清除验证。而对于细小病毒应审慎对待已有纳滤数据，应充分证明其去除能力和考虑其他因素，如中断影响，基于风险和受益考虑病毒清除验证的策略。

3.2.3 层析工艺 层析主要目的是纯化，并非专门的病毒去除步骤，主要通过层析柱和样品或病毒的结合等机制实现病毒的去除。数据表明蛋白 A 亲和层析主要通过流穿的机制实现病毒的去除，缓冲液对病毒去除的影响较小，主要受样品的复杂程度影响较大^[30]。不同样品亲和层析病毒清除效果具有高变异性，主要分布在 1 - 4 log^[31]。离子交换层析主要通过目标蛋白和杂质的等电点差异进行分离。一般阴离子交换层析流穿模式有较好的去除效果，而阴离子交换层析洗脱模式相比有较高的变异，70% 的阴离子交换层析记录使用流穿模式^[31]。阴离子交换层析流穿模式数据中缓冲液、pH 和电导未发现与病毒清除下降因子有明显相关性，阴离子交换层析洗脱模式数据中，平衡与洗脱缓冲液的 pH 差异与病毒清除下降因子正相关，而较低的病毒清除下降因子更多为盐洗脱^[30]。90% 的阳离子交换层析记录使用洗脱模式，相比阴离子交换层析变异性大且一般去除效果 < 4 log^[31]。阳离子洗脱模式数据中较高的病毒清除下降因子一般有着较低的平衡或洗脱缓冲液 pH，较低的病毒清除下降因子同样依赖于盐洗脱^[30]。盐洗脱和低 pH 洗脱的病毒清除效果差异可能是在病毒去除叠加了病毒灭活，清除效

果被高估。疏水层析同样去除效果变异性大且一般去除效果 $< 4 \log$, 申报记录中占比较少, 而混合层析记录中主要为阴离子交换和疏水混合层析的流穿模式, 具有很好的去除效果^[31]。

确定性较高的病毒清除工艺或可在先验知识的支持下减少或替代验证试验。如专门的病毒清除工艺, 如纳滤和低 pH 孵育, 其占总病毒清除贡献平均约 56%^[31]。效果变异较大的病毒清除工艺可结合先验知识为验证试验提供参考。如层析工艺, 阴离子交换对总病毒清除的贡献平均约 20%, 而其他层析贡献仅约 10%^[31]。

从实践来看, 传统生物制品的病毒清除工艺类型较为固定。同一类型产品或同一技术平台的产品的病毒清除验证工作存在一定冗余。考虑先验知识和(或)平台验证, 对以往数据规律的分析和总结, 通过可比性研究减少冗余的验证工作, 同时对未充分阐明的工艺进行完整验证, 从而实现不损害产品病毒安全性的前提下减少验证, 这同时对企业和检测机构的内部数据积累和数据分析提出了更高的要求。国内目前开展病毒清除平台验证仍处于起步阶段, 相关的法规和指导原则仍在不断完善中, 同时企业内部、检测机构和监管部门的历史验证数据也在不断积累, 未来基于积累的验证经验或成熟的平台验证案例, 平台验证或将部分代替传统验证方式, 推动病毒清除验证方式的革新。

4 结语

对于病毒载体类产品来说, 其病毒清除工艺验证的设计需要从多方面考虑, 如生产用细胞、病毒种子、辅助病毒和工艺选择等。病毒载体类产品应根据产品的病毒安全性风险设计病毒清除方案, 并考虑是否使用病毒载体类产品生产相关的病毒或指示病毒。工艺在实现清除效果的同时避免产品受影响, 这依赖于企业和检测机构对产品的充分沟通和对方方案的合理设计, 最终实现科学严谨的验证。连续制造是生物制药生产方式的未来发展方向, 是自动化在传统行业的又一场革命。而对病毒清除工艺验证来说, 因实验室规模和条件限制, 需要寻求科学合理的工艺缩小和模拟方式。一方面是考虑最差条件等同于批生产的验证思路, 另一方面是模拟连续制造的工艺, 可能需要依赖相应硬件实现, 如通过泵控制样品浓度的波动, 也可能采用对传统验证模型的改进的方式, 如考虑停留时间分布和延长过滤时间等。先验知识和(或)平台验证是对以往经验和数据的应用, 其应用的基础是病毒清除工艺存在规律。但目前未完全认识其规律, 如样品成分对病毒清除的具体影响, 需要通过已知的规律, 结合以往经验进行分析、对比和例证, 从而论证以往的经验和数据适用于新的产品, 其应是科学严谨的。错误的论证可能导致风险被低估进而引起严重的产品病毒安全性事件, 但同时合理的论证可以有效节省企业的成本, 加快申报的进程。

新形势下面对新的产品、新的工艺技术和新的验证策略, 检测机构应迎接挑战和积极开展病毒载体类、连续制造工艺、先验知识和(或)平台验证的相应研究, 并与生产

企业和监管部门多方通力合作, 助力新产品申报, 推动行业共同发展。

参考文献

- [1] Yu W, Zhao H, Liu WF. Virus inactivation/removal processes and viral safety of blood products[J]. Chin J Blood Transfus, 2009, 22(7):606-610. (in Chinese)
余伟, 赵辉, 刘文芳. 病毒灭活/去除工艺与血液制品病毒安全性[J]. 中国输血杂志, 2009, 22(7):606-610.
- [2] Yuan XH, Meng SF. The techniques and progress of adventitious virus detection by next generation sequencing[J]. Chin Pharm Aff, 2021, 6(35):673-680. (in Chinese)
袁翔鹤, 孟淑芳. 二代测序技术检测生物制品中外源病毒的技术方法和应用进展[J]. 中国药事, 2021, 6(35):673-680.
- [3] Guo HZ, Yang MH, Yang HC, et al. Viral safety control of biologics[J]. Drug Stand China, 2022, 23(2):108-114. (in Chinese)
郭怀祖, 杨美花, 杨汇川, 等. 生物制品病毒安全性控制[J]. 中国药品标准, 2022, 23(2):108-114.
- [4] Overview of quality control of gene therapy products[J]. Chin Pharm Aff, 2023, 37(6):611-644. (in Chinese)
基因治疗制品质量控制概述[J]. 中国药事, 2023, 37(6):611-644.
- [5] Liang ZC, Tang XF, Yang P, et al. Research progress and maturity assessment of continuous manufacturing of traditional Chinese medicine[J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(12):3162-3168. (in Chinese)
梁宇辰, 唐雪芳, 杨平, 等. 中药连续制造研究进展和成熟度评估[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(12):3162-3168.
- [6] Xu LC, Cui J, Wei W. General considerations on the risk assessment of adventitious agents of advanced therapeutic products[J]. Chin J New Drugs, 2022, 31(11):1052-1056. (in Chinese)
徐隆昌, 崔靖, 韦薇. 新兴治疗产品外源因子安全性研究与评价的一般考虑[J]. 中国新药杂志, 2022, 31(11):1052-1056.
- [7] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Q5A(R2): Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin[S]. 2023-11-01.
- [8] Center for Drug Evaluation, Nation Medical Products Administration. Technical guidelines for pharmaceutical research and evaluation of in vivo gene therapy products (trial)[S]. 2022-05-31. (in Chinese)
国家药品监督管理局药品审评中心. 体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行) [S]. 2022-05-31.
- [9] Zhou Y, Wang SQ, Sun T, et al. Non-clinical analysis of marketed gene therapy products[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(2):300-304. (in Chinese)
周宇, 王士奇, 孙涛, 等. 已上市基因治疗产品的非临床研究分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(2):300-304.
- [10] Xu L, Li M. Reflections on the pharmacologic evaluation of adenoviral vector vaccines[J]. Chin J Biol, 2022, 35(6):763-768. (in Chinese)
徐莉, 李敏. 腺病毒载体疫苗药学评价的思考[J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35(6):763-768.
- [11] Xu LC, Cui J, He W. Interpretation of guidance on CMC study of in vivo gene therapy products[J]. Chin J New Drugs, 2023, 32(2):113-117. (in Chinese)
徐隆昌, 崔靖, 何伍. 《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》解读[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(2):113-117.
- [12] Jiang DC, Yin HZ, Li DF. Quality control of adenoviral vectors and

- their gene therapy products[J]. *Prog Microbiol Immunol*, 1998, (3):89-92. (in Chinese)
姜典才, 尹红章, 李德富. 腺病毒载体及其基因治疗制品的质量控制[J]. *微生物学免疫学进展*, 1998, (3):89-92.
- [13] Xu LC, Wei W, Luo JH. Development and evaluation considerations of viral vector production for CAR-T cell products[J]. *Chin J Cancer Biother*, 2018, 25(12):1218-1222. (in Chinese)
徐隆昌, 韦薇, 罗建辉. CAR-T 细胞产品中病毒载体生产的研发进展和审评考虑[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(12):1218-1222.
- [14] Winkler M, Goldfarb M, Weng S. Viral clearance in a downstream AAV process: case study using a model virus panel and a noninfectious surrogate[J]. *BioProc Int*, 2021, 19(4):38-45.
- [15] Vanhoorne V, Vervaeke C. Recent progress in continuous manufacturing of oral solid dosage forms[J]. *Int J Pharm*, 2020, 579:119194.
- [16] Zhao X, Wei W. Reflections related to quality control in the application of continuous manufacturing technology for biological products[J]. *Chin J Biol*, 2023, 36(7):892-896. (in Chinese)
赵欣, 韦薇. 生物制品连续制造技术应用质量控制的相关思考[J]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36(7):892-896.
- [17] Alpan S, Can O, Baycin D, et al. Demonstrating a powerful scale-up strategy for Biosimilar mAb in single use systems via physicochemical and functional characterization[C]//Cell culture engineering XVI: 16th cell culture engineering (CCE) conference, Tampa, Florida, USA, 2018. Tampa, Florida, USA: Engineering Conference International, 2018:156-161.
- [18] Cao M, Ding LC, Hu YC, et al. Current situation and considerations on global regulations for continuous pharmaceutical manufacturing[J]. *Chin Pharm Aff*, 2022, 36(4):363-376. (in Chinese)
曹萌, 丁力承, 胡延臣, 等. 药品连续制造全球监管发展现状与思考[J]. *中国药事*, 2022, 36(4):363-376.
- [19] Ge YY, Cao H, Hu YC, et al. Regulatory strategies and challenges for continuous manufacturing technology[J]. *Chin J Pharm*, 2022, 53(6):904-911. (in Chinese)
葛渊源, 曹辉, 胡彦臣, 等. 连续制造技术的监管策略及挑战[J]. *中国医药工业杂志*, 2022, 53(6):904-911.
- [20] Sai WB, Hu YY, Wei W. General considerations for viral safety control in continuous manufacturing of recombinant biotechnology products[J]. *Chin J New Drugs*, 2023, 32(2):134-137. (in Chinese)
赛文博, 胡莹莹, 韦薇. 重组生物技术产品连续制造中病毒安全控制的一般考量[J]. *中国新药杂志*, 2023, 32(2):134-137.
- [21] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Q13: Continuous manufacturing of drug substances and drug products[S]. 2022-11-15.
- [22] Budde B, Schwan P, Borchert SO, et al. Method for transferring a batch production process to a continuous production process: US202017309991[P]. 2022-03-10.
- [23] Regeneron Pharmaceuticals, Inc.. Continuous virus retention filtration: CN202180067555.6[P]. 2023-08-01. (in Chinese)
瑞泽恩制药公司. 连续病毒截留式过滤: CN202180067555.6[P]. 2023-08-01.
- [24] Shanghai Henlius Biotech, Inc.. A system and method for continuous purification of target molecules: CN202011404668.4[P]. 2022-06-03. (in Chinese)
上海复宏汉霖生物技术股份有限公司. 一种用于靶分子连续纯化的系统和方法: CN202011404668.4[P]. 2022-06-03.
- [25] Gillespie C, Holstein M, Mullin L, et al. Continuous in-line virus inactivation for next generation bioprocessing[J]. *Biotech J*, 2019, 14(2):e1700718.
- [26] Zhejiang University. A device for continuous virus inactivation and a design method thereof: CN202311201880.4[P]. 2023-12-29. (in Chinese)
浙江大学. 一种用于连续病毒灭活的装置及其设计方法: CN202311201880.4[P]. 2023-12-29.
- [27] Lute S, Kozaili J, Johnson S, et al. Development of small-scale models to understand the impact of continuous downstream bioprocessing on integrated virus filtration[J]. *Biotechnol Prog*, 2020, 36(3):e2962.
- [28] Chiang MJ, Pagkiliwangan M, Lute S, et al. Validation and optimization of viral clearance in a downstream continuous chromatography setting[J]. *Biotech Bioeng*, 2019, 116(9):2292-2302.
- [29] Center for Drug Evaluation, Nation Medical Products Administration. Technical guidelines for validation of viral clearance process platforms for clinical trial applications of recombinant protein products for therapeutic use (trial)[S]. 2024-01-13. (in Chinese)
国家药品监督管理局药品审评中心. 治疗用重组蛋白产品临床试验申请病毒清除工艺平台验证技术指导原则(试行)[S]. 2024-01-13.
- [30] Miesegaes G, Lute S, Brorson K. Analysis of viral clearance unit operations for monoclonal antibodies[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106(2):238-246.
- [31] Ajayi OO, Johnson SA, Faison T, et al. An updated analysis of viral clearance unit operations for biotechnology manufacturing[J]. *Curr Res Biotechnol*, 2022, 4:190-202.
- [32] Stanley B, Holmes V, Manzari R, et al. Twenty plus years of data demonstrating virus filtration as an effective and robust step for large virus removal[J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2022, 76(1):1-8.