

转移因子溶液生产工艺病毒灭活/去除效果验证



薛美玲, 郭维真, 王红新, 王川吏, 陈美红, 魏小亮

金花企业(集团)股份有限公司西安金花制药厂(西安 710304)

【摘要】目的 对转移因子溶液生产工艺中的病毒灭活/去除方法进行验证。**方法** 选择伪狂犬病毒 (PRV)、水疱性口炎病毒 (VSV)、脑心肌炎病毒 (EMCV)、猪细小病毒 (PPV) 作为指示病毒, 在缩小生产规模的工艺条件下考察巴氏消毒法 (80 °C 灭活 30 min) 和超滤膜过滤法 (5KD 超滤膜过滤) 对 4 种病毒的灭活/去除能力。**结果** 3 批样品分别采用 2 种病毒灭活/去除方法, PRV、VSV、EMCV 和 PPV 的病毒滴度降低值均达到 4 logs 以上。**结论** 建立的巴氏消毒法和超滤膜过滤法均可有效去除指示病毒 PRV、VSV、EMCV、PPV 及其所代表的相关病毒。

【关键词】 转移因子溶液; 病毒灭活; 病毒去除; 巴氏消毒法; 超滤膜过滤法

【中图分类号】 TQ464.7

【文献标识码】

Validation of virus inactivation/removal efficacy in production process of transfer factor solution

XUE Meiling, GUO Weizhen, WANG Hongxin, WANG Chuanli, CHEN Meihong, WEI Xiaoliang

Xi'an Jinhua Pharmaceutical Factory, Jinhua Enterprise (Group) Co., Ltd., Xi'an 710304, China

Corresponding author: WEI Xiaoliang, Email: weixiaoliang_198@163.com

【Abstract】Objective To verify the virus inactivation/removal effect of the production process of transfer factor solution. **Methods** Pseudorabies virus (PRV), vesicular stomatitis virus (VSV), encephalomyocarditis virus (EMCV) and porcine parvovirus (PPV) were selected as indicator viruses. The virus inactivation and removal efficiencies of pasteurization method (80 °C for 30 min) and ultrafiltration membrane filtration method (5KD ultrafiltration membrane filtration) against the four viruses were evaluated under process conditions with scaled-down production batches. **Results** Three batches of samples were processed using two different virus inactivation/removal methods, the log reduction values of PRV, VSV, EMCV and PPV all exceeded 4 logs. **Conclusion** The established pasteurization and the ultrafiltration membrane filtration methods can effectively remove the indicator viruses PRV, VSV, EMCV, and PPV and the related viruses they represent.

【Keywords】 Transfer factor solution; Virus inactivation; Virus removal; Pasteurization; Ultrafiltration membrane filtration method

转移因子 (transfer factor, TF) 是由多肽与低聚核苷酸构成的可溶性、可透析、可超滤小分子混合物, 分子量约 2 000~5 000 Da, 能够自由透过半透膜。TF 耐受

胰蛋白酶、糜蛋白酶、胃蛋白酶、DNA 酶、RNA 酶等酶解作用,具备紫外吸收特征,但热稳定性较差^[1],因其分子量小、无毒性、无抗原性、不会诱发过敏反应、机体不产生中和抗体,且可跨物种使用,是应用前景广阔的免疫增强剂^[2]。TF 溶液(TF solution, TFS)以健康猪脾脏为起始原料,经拣选、组织匀浆、保温处理、离心、超滤工艺制备得到,是 TF 口服溶液、胶囊的中间原料。

TF 的制备原料为动物脾脏组织,存在引入动物源性病毒的潜在风险。为保障产品病毒安全性,本研究参照《多组分生化药注射剂基本技术要求》^[3]、《动物病毒学》^[4]、《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》^[5]、*Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human and Animal Origin*^[6]、*Guideline on Virus Safety Evaluation of Biotechnological Investigational Medicinal Products*^[7]、《血液制品去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则》^[8]、《药品生产质量管理规范(2010 年修订)生化药品附录》^[9]及《生物制品病毒安全性控制》^[10]等国内外相关技术指导原则与专著标准,结合 TFS 实际生产工艺特点,选取巴氏消毒法与超滤膜过滤法,系统考察 TFS 制备工艺的病毒灭活/去除能力。

本研究选取伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)、水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)、脑心肌炎病毒(encephalomyocarditis virus, EMCV)及猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV) 4 种典型病毒作为模型指示病毒,采用缩小化生产工艺条件,系统探究巴氏消毒法与超滤膜过滤法对 4 种病毒的灭活/去除效果,明确产品生产过程的病毒安全性保障水平,为 TFS 系列产品的质量安全与临床用药有效性提供实验依据。

1 仪器与试药

1.1 主要仪器

1812 型 5 KD 卷式超滤膜(江苏久吾高科技股份有限公司);H-MB001-L-N 型超滤装置(杭州科伯特过滤器材有限公司);DSZ2000X 型倒置生物显微镜(重庆澳浦光电技术有限公司);BSC-1800IIA2 型二级生物安全柜(北京亚泰科隆仪器技术有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

TFS(批号:251022、251023、251024)由金花企业(集团)股份有限公司西安金花制药厂提供;PRV、VSV、EMCV、PPV 均购自美国典型菌种保藏中心(ATCC);胎牛血清(批号:11011-8611)采购于浙江天杭生物科技股份有限公司;胰蛋白酶(批号:SH30042.02)购自瑞典 Hyclone 公司;DMEM 培养基(批号:GUMD-B301)购自苏州海星生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 巴氏消毒法灭活病毒

分别取 3 批次 TFS 样品各 90 mL,按照样品与指示病毒液体积比 9:1 的比例加入对应的指示病毒液,充分混匀制备得到病毒加标样品。精准吸取 5 mL 混匀后的加标样品作为零点对照,用于检测加毒初始病毒载量。将剩余加标样品置于恒温循环器中升温,待料液温度稳定升至 80 °C 后,持续恒温 30 min;过程中每间隔 10 min 同步记录料液温度并取样,所得样品均妥善留存待测。

2.2 超滤过滤法去除病毒

分别取各批次 TFS 样品 500 mL,按照样品与指示病毒液体积比 9:1 的比例加入对应的指示病毒液,充分混匀后制备得到病毒加标样品。精准吸取 5 mL 混匀后的加标样品,作为测定初始病毒载量的零点对照。超滤过程中通过调节回流端阀门开度与泵体转速,控制进液端压力与回流端压力均 ≤ 0.1 MPa,持续至料液无明显循环流动为止,分别收集超滤透过液与回流液,密封留存检测。

2.3 对照设置

本实验同步设置多种对照体系以保证检测结果的准确性与可靠性。

2.3.1 样品对照

分别取 3 批 TFS 样品各 10 mL,调节体系至中性后进行离心处理,取上清检测,用以考察样品本身对宿主细胞生长状态的影响。

2.3.2 病毒阳性对照

以原始指示病毒液作为阳性对照,用于验证指示病毒滴度是否符合相关技术指导原则要求,确保病毒模型有效。

2.3.3 零点对照

以混匀后的初始加标样品作为零点对照,用

于评价样品初始染毒水平及样品基质对病毒活性的潜在影响。

2.3.4 阴性对照

选取检测96孔板的第1列与第12列孔，仅常规加入培养基进行培养，用于监测试验体系中细胞的正常生长状态，排除培养环境、操作污染等干扰因素。

2.4 病毒滴度检测方法

将检测用细胞调整至 1×10^5 个/mL的细胞密度，接种于96孔细胞培养板中，每孔接种体积为100 μ L；将培养板置于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱中预培养12~24 h，待细胞贴壁生长稳定后备用。

将各组对照样品及工艺处理后的待测样品分别进行10倍梯度连续稀释，稀释梯度范围为 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 。

在细胞培养板第2~11列孔中，分别加入 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 梯度稀释的各样品溶液，每孔加入100 μ L；其中培养板第1列与第12列设置为空白细胞阴性对照孔。

加样完成后，将培养板置于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养条件下持续培养，动态观察细胞病变情况，及时记录各孔细胞病变数量，直至细胞病变不再发生变化，完成检测观察。

根据细胞病变的孔数，运用Karber法计算半

数细胞培养物感染量（50% tissue culture infective dose, TCID_{50} ），检测下限为0.5 logs。计算公式如下：

$$\lg \text{TCID}_{50} = xk - d \left[\left(\frac{1}{n} \right) (r) - 0.5 \right]$$

式中， xk 表示最大稀释度的对数， r 表示所有感染的孔数， d 表示稀释度对数的差， n 表示每稀释度下复孔数。

2.5 巴氏消毒法灭活病毒效果验证

2.5.1 样品中残余指示病毒PRV

3批染毒样品经80 $^{\circ}$ C热处理后，PRV病毒滴度下降值分别为 ≥ 5.167 logs、 ≥ 5.300 logs和 ≥ 5.000 logs，平均下降滴度 ≥ 5.156 logs。见表1。

2.5.2 样品中残余指示病毒VSV

3批染毒样品经80 $^{\circ}$ C热处理后，VSV病毒滴度下降值分别为 ≥ 5.500 logs、 ≥ 5.167 logs和 ≥ 5.167 logs，平均下降滴度 ≥ 5.278 logs。见表2。

2.5.3 样品中残余指示病毒EMCV

3批染毒样品经80 $^{\circ}$ C热处理后，EMCV病毒滴度下降值分别为 ≥ 5.500 logs、 ≥ 5.500 logs和 ≥ 5.700 logs，平均下降滴度 ≥ 5.567 logs。见表3。

2.5.4 样品中残余指示病毒PPV

3批染毒样品经80 $^{\circ}$ C热处理后，PPV病毒滴度下降值分别为 ≥ 5.167 logs、 ≥ 5.071 logs和 ≥ 5.167 logs，均下降滴度 ≥ 5.135 logs。见表4。

表1 80 $^{\circ}$ C加热处理后样品中PRV检测结果（ $-\lg \text{TCID}_{50}/0.1$ mL）

Table 1. Detection results of PRV in samples after heating at 80 $^{\circ}$ C ($-\lg \text{TCID}_{50}/0.1$ mL)

组别	病毒滴度	病毒降低量	病毒降低量平均值 ($\bar{x} \pm s$)
PRV病毒阳性对照	6.800	/	/
样品对照	细胞形态及生长状态正常，未见细胞形态学改变及生长抑制现象	/	/
251022批零点对照	5.667	/	/
251023批零点对照	5.800	/	/
251024批零点对照	5.500	/	/
251022批处理10 min后样品	≤ 0.500	≥ 5.167	$\geq 5.156 \pm 0.150$
251023批处理10 min后样品	≤ 0.500	≥ 5.300	
251024批处理10 min后样品	≤ 0.500	≥ 5.000	
251022批处理20 min后样品	≤ 0.500	≥ 5.167	$\geq 5.156 \pm 0.150$
251023批处理20 min后样品	≤ 0.500	≥ 5.300	
251024批处理20 min后样品	≤ 0.500	≥ 5.000	
251022批处理30 min后样品	≤ 0.500	≥ 5.167	$\geq 5.156 \pm 0.150$
251023批处理30 min后样品	≤ 0.500	≥ 5.300	
251024批处理30 min后样品	≤ 0.500	≥ 5.000	

注：“/”表示不涉及。

表2 80 °C加热处理后样品中VSV检测结果 (-lgTCID₅₀/0.1 mL)
Table 2. Detection results of VSV in samples after heating at 80 °C(-lgTCID₅₀/0.1 mL)

组别	病毒滴度	病毒降低量	病毒降低量平均值 ($\bar{x} \pm s$)
VSV 病毒阳性对照	6.800	/	/
样品对照	细胞形态及生长状态正常，未见细胞形态学改变及生长抑制现象	/	/
251022批零点对照	6.000	/	/
251023批零点对照	5.667	/	/
251024批零点对照	5.667	/	/
251022批处理 10 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.500	≥ 5.278 ± 0.192
251023批处理 10 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.167	
251024批处理 10 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.167	
251022批处理 20 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.500	≥ 5.278 ± 0.192
251023批处理 20 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.167	
251024批处理 20 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.167	
251022批处理 30 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.500	≥ 5.278 ± 0.192
251023批处理 30 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.167	
251024批处理 30 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.167	

注：“/”表示不涉及。

表3 80 °C加热处理后样品中EMCV检测结果 (-lgTCID₅₀/0.1 mL)
Table 3. Detection results of EMCV in samples after heating at 80 °C(-lgTCID₅₀/0.1 mL)

组别	病毒滴度	病毒降低量	病毒降低量平均值 ($\bar{x} \pm s$)
EMCV 病毒阳性对照	7.000	/	/
样品对照	细胞形态及生长状态正常，未见细胞形态学改变及生长抑制现象	/	/
251022批零点对照	6.000	/	/
251023批零点对照	6.000	/	/
251024批零点对照	6.200	/	/
251022批处理 10 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.500	≥ 5.567 ± 0.115
251023批处理 10 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.500	
251024批处理 10 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.700	
251022批处理 20 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.500	≥ 5.567 ± 0.115
251023批处理 20 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.500	
251024批处理 20 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.700	
251022批处理 30 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.500	≥ 5.567 ± 0.115
251023批处理 30 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.500	
251024批处理 30 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.700	

注：“/”表示不涉及。

2.6 超滤过滤法去除病毒效果验证

2.6.1 样品中残余指示病毒PRV

3批染毒样品超滤后，PRV的病毒滴度下降值分别为 ≥ 5.300 logs、≥ 5.167 logs 和 ≥ 5.167 logs，平均下降滴度 ≥ 5.211 logs。见表5。

2.6.2 样品中残余指示病毒VSV

3批染毒样品经超滤处理后，VSV病毒滴度下降值分别为 ≥ 5.500 logs、≥ 5.500 logs 和 ≥ 5.071 logs，平均下降滴度 ≥ 5.357 logs。见表6。

2.6.3 样品中残余指示病毒EMCV

3批染毒样品超滤后，EMCV病毒滴度下降值分别为 ≥ 5.833 logs、≥ 5.500 logs 和 ≥ 5.700 logs，平均下降滴度 ≥ 5.678 logs。见表7。

2.6.4 样品中残余指示病毒PPV

3批染毒样品超滤处理后，PPV病毒滴度下降值分别为 ≥ 5.071 logs、≥ 5.167 logs 和 ≥ 5.090 logs，平均下降滴度 ≥ 5.109 logs。见表8。

表4 80 °C加热处理后样品中PPV检测结果 (-lgTCID₅₀/0.1 mL)Table 4. Detection results of PPV in samples after heating at 80 °C(-lgTCID₅₀/0.1 mL)

组别	病毒滴度	病毒降低量	病毒降低量平均值 ($\bar{x} \pm s$)
PPV 病毒阳性对照	6.667	/	/
样品对照	细胞形态及生长状态正常，未见细胞形态学改变及生长抑制现象	/	/
251022批零点对照	5.667	/	/
251023批零点对照	5.571	/	/
251024批零点对照	5.667	/	/
251022批处理 10 min 后样品	2.333	3.334	3.524 ± 0.171
251023批处理 10 min 后样品	2.000	3.571	
251024批处理 10 min 后样品	2.000	3.667	
251022批处理 20 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.167	≥ 5.135 ± 0.055
251023批处理 20 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.071	
251024批处理 20 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.167	
251022批处理 30 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.167	≥ 5.135 ± 0.055
251023批处理 30 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.071	
251024批处理 30 min 后样品	≤ 0.500	≥ 5.167	

注：“/”表示不涉及。

表5 超滤处理后样品中PRV检测结果 (-lgTCID₅₀/0.1mL)Table 5. Detection results of PRV in samples after ultrafiltration treatment(-lgTCID₅₀/0.1mL)

组别	病毒滴度	病毒降低量	病毒降低量平均值 ($\bar{x} \pm s$)
PRV 病毒阳性对照	6.800	/	/
样品对照	细胞形态及生长状态正常，未见细胞形态学改变及生长抑制现象	/	/
251022批零点对照	5.800	/	/
251023批零点对照	5.667	/	/
251024批零点对照	5.667	/	/
251022批回流液	5.500	/	/
251023批回流液	5.667	/	/
251024批回流液	5.500	/	/
251022批透过液	≤ 0.500	≥ 5.300	≥ 5.211 ± 0.077
251023批透过液	≤ 0.500	≥ 5.167	
251024批透过液	≤ 0.500	≥ 5.167	

注：“/”表示不涉及。

表6 超滤处理后样品中VSV检测结果 (-lgTCID₅₀/0.1 mL)Table 6. Detection results of VSV in samples after ultrafiltration treatment(-lgTCID₅₀/0.1 mL)

组别	病毒滴度	病毒降低量	病毒降低量平均值 ($\bar{x} \pm s$)
VSV 病毒阳性对照	7.000	/	/
样品对照	细胞形态及生长状态正常，未见细胞形态学改变及生长抑制现象。	/	/
251022批零点对照	6.000	/	/
251023批零点对照	6.000	/	/
251024批零点对照	5.571	/	/
251022批回流液	6.200	/	/
251023批回流液	6.000	/	/
251024批回流液	6.333	/	/
251022批透过液	≤ 0.500	≥ 5.500	≥ 5.357 ± 0.248
251023批透过液	≤ 0.500	≥ 5.500	
251024批透过液	≤ 0.500	≥ 5.071	

注：“/”表示不涉及。

表 7 超滤处理后样品中 EMCV 检测结果 (−lgTCID₅₀/0.1 mL)
Table 7. Detection results of EMCV in samples after ultrafiltration treatment(−lgTCID₅₀/0.1 mL)

组别	病毒滴度	病毒降低量	病毒降低量平均值 ($\bar{x} \pm s$)
EMCV 病毒阳性对照	7.000	/	/
样品对照	细胞形态及生长状态正常，未见细胞形态学改变及生长抑制现象	/	/
251022 批零点对照	6.333	/	/
251023 批零点对照	6.000	/	/
251024 批零点对照	6.200	/	/
251022 批回流液	6.500	/	/
251023 批回流液	6.000	/	/
251024 批回流液	6.000	/	/
251022 批透过液	≤ 0.500	≥ 5.833	≥ 5.678 ± 0.168
251023 批透过液	≤ 0.500	≥ 5.500	
251024 批透过液	≤ 0.500	≥ 5.700	

注：“/”表示不涉及。

表 8 超滤处理后样品中 PPV 检测结果 (−lgTCID₅₀/0.1 mL)
Table 8. Detection results of PPV in samples after ultrafiltration treatment(−lgTCID₅₀/0.1 mL)

组别	病毒滴度	病毒降低量	病毒降低量平均值 ($\bar{x} \pm s$)
PPV 病毒阳性对照	6.667	/	/
样品对照	细胞形态及生长状态正常，未见细胞形态学改变及生长抑制现象	/	/
251022 批零点对照	5.571	/	/
251023 批零点对照	5.667	/	/
251024 批零点对照	5.590	/	/
251022 批回流液	5.667	/	/
251023 批回流液	5.800	/	/
251024 批回流液	5.429	/	/
251022 批透过液	≤ 0.500	≥ 5.071	≥ 5.109 ± 0.051
251023 批透过液	≤ 0.500	≥ 5.167	
251024 批透过液	≤ 0.500	≥ 5.090	

注：“/”表示不涉及。

3 讨论

动物源性原料携带的病毒种类复杂多样，依据相关技术指导原则要求、产品原料的动物种属特征及生产工艺作用机制，筛选具有代表性的指示病毒，是病毒安全性验证的核心前提。本研究选取 PRV、VSV、EMCV、PPV 4 种病毒作为指示病毒，所选毒株涵盖 DNA 病毒与 RNA 病毒、有脂包膜病毒与无脂包膜病毒、高理化抗性病毒与低理化抗性病毒，同时覆盖猪脾脏原料易感的优势病毒类型，可全面表征样品的病毒污染风险情况。超滤工艺主要依据病毒与蛋白分子的粒径差异及膜吸附作用实现病毒去除，其中 PPV 颗粒直径极小、穿透能力较强。孙妙因等^[11]采用 PPV 开展超滤工艺验证，通过 PPV 的清除效果类推对

大粒径病毒的去除能力，但该推断仅存在理论可行性，缺乏充分的实验数据支撑。基于此，本研究在超滤工艺验证中同步采用 4 种指示病毒进行系统考察，有效弥补单一病毒验证的局限性，使实验结论更具严谨性与可靠性。综上，通过评价 4 种不同特性指示病毒的清除效果，既符合相关技术审评原则^[5]的规范要求，也可客观、全面地反映 TFS 生产工艺对病毒的防控与去除能力。

本研究结果显示，巴氏消毒法处理 10 min 对 PPV 的灭活效果相对有限，该现象主要由 PPV 独特的病毒结构与理化特性共同决定。首先，PPV 具备极强的热稳定性，其病毒衣壳由 60 个 VP2 结构蛋白组装形成规整的二十面体对称结构，衣壳蛋白内部富含疏水残基，可通过大面积分子内疏水作用构建稳定的疏水核心，同时辅以分子间氢

键、少量二硫键及钙离子配位键的多重交联加固作用,使病毒整体空间构象具备优异的热力学耐受能力,难以被短时高温破坏;其次,PPV属于典型的无囊膜病毒,不存在脂包膜这类热敏结构薄弱靶点,高温无法通过破坏囊膜脂质结构实现快速灭活,仅能缓慢作用于高稳定性的蛋白衣壳,大幅提升了短时热力灭活的难度;最后,PPV基因组为单链DNA,核酸结构高度紧凑,紧密包裹于坚固的衣壳内部,可有效隔绝高温与水分子的冲击,短时热处理难以造成核酸链断裂与基因组损伤,仅当高温持续作用致使衣壳结构彻底崩解后,病毒基因组才会快速丧失生物活性,这也是其初期灭活效率偏低的核心原因。在生化药品病毒安全控制领域,多种灭活、去除工艺的联合应用是提升病毒安全性的有效手段。张金岩等^[12]以小牛胸腺来源的注射用胸腺肽为研究对象,选取麻疹病毒、水痘带状疱疹病毒、甲肝病毒为指示病毒,采用低pH孵放、高温加热、超滤多级工艺联用的模式开展病毒灭活/去除验证,多工艺协同作用可有效清除不同类型指示病毒,获得了良好的病毒控制效果,为动物源性生化药品的病毒安全性验证提供了重要参考。

本研究结合TFS实际工业化生产条件,采用规模缩小化模型对巴氏消毒法与超滤膜过滤法对病毒清除的效果进行验证,能够真实、客观地反映实际生产工艺对潜在病毒的灭活/去除能力。已有研究表明,单一病毒清除手段存在作用机制局限性,难以完全规避动物源性病毒污染风险,需通过两种及以上作用机制互补的工艺组合构建多级病毒安全屏障,以保障药品的病毒安全性^[3]。TFS生产体系配套的加热处理与超滤过滤工艺,分属热灭活与物理截留两种不同作用机制,工艺互补性强,可有效清除模型指示病毒,能够为产品生产过程的病毒安全提供可靠保障。值得注意的是,仅依靠生产阶段的病毒去除工艺无法实现全链条风险管控,为进一步完善产品质量安全体系、最大限度保障临床用药安全,还需强化源头质量控制,严格落实猪脾脏原材料供应商资质审核、病毒学检测及风险管控措施,结合完善的产品质量标准构建从原料入厂、生产加工至成品放行的全流程质量管控体系,从而全方位降低产品病毒污染风险,提升药品质量安全性。

病毒去除/灭活方法种类较多,包括纳米膜过

滤技术、色谱法、超短时微波加热法、巴氏消毒法、干热法、有机溶剂/去污剂法、低pH孵放法和紫外照射病毒灭活技术^[13-18]。不同病毒去除与灭活技术的作用机制存在显著差异,因此在工艺开发过程中,需在保证病毒清除效能的基础上,兼顾产品理化性质与生物学活性的稳定性,实现安全性与产品质量的双重保障。本研究采用巴氏消毒法80℃分别处理10、20、30min,结果显示,处理30min后TFS活性和病毒下降滴度虽均满足质量标准要求,但工艺参数仍存在进一步优化潜力,后续可通过引入其他类型病毒清除技术或调整热处理温度与保温时长,综合评价不同工艺条件下样品的理化性质、生物活性及病毒去除效果,进而筛选并确立更适合TFS生产的最优病毒灭活工艺体系。

参考文献

- 1 成杰,栾业俊,仲亚娜,等.转移因子的研究进展[J].山东畜牧兽医,2017,38(8):55-57.[Cheng J, Luan YJ, Zhong YN, et al. Research progress on transfer factor[J]. Shandong Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017, 38(8): 55-57.] DOI: 10.3969/j.issn.1007-1733.2017.08.041.
- 2 Levine PH, Pizza G, Ajmera K. Transfer factor in virus-associated malignancies: an underestimated weapon in prevention and treatment of cancer[J]. Adv Tumor Virol, 2011, 2: 7-20. DOI: 10.4137/ATV.S7852.
- 3 原国家食品药品监督管理局.多组分生化药注射剂基本技术要求(试行)[S].2008:8-10.
- 4 殷震,刘景华,主编.动物病毒学[M].北京:科学出版社,1997:204-1195.
- 5 原国家食品药品监督管理局药品审评中心.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[S].2005,12:11-17.
- 6 International Conference on Harmonisation(ICH).Quality Guideline Q5A(R1): Viral Safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin[R/OL].(1999-09-2)[2026-04-10]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-r1-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived-cell-lines-human-or-animal-origin-step-5_en.pdf.
- 7 European Medicines Agency. Guideline on virus safety evaluation of biotechnological investigational medicinal products: EMEA/CHMP/BWP/398498/2005[S/OL].(2009-02-01)[2026-04-10]. <https://www.ema.europa.eu/en/virus-safety-evaluation-biotechnological-investigational-medicinal-products-scientific-guideline>.
- 8 原国家食品药品监督管理局.血液制品去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则[S].2002:4-7.
- 9 原国家食品药品监督管理局.药品生产质量管理规范[S].2010:18-32.
- 10 中国药典2025年版.三部[S].2025:22-34.

- 11 孙妙因, 孙德军, 王智鼎. 肌氨肽苷制备工艺及其病毒去除方法的验证[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(6): 395–397. [Sun MN, Sun DJ, Wang ZD. Preparation technology of amino-peptide nucleotide and validation of viral removal method[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2008, 29(6): 395–397.] DOI: [CNKI:SUN:SHYW.0.2008-06-013](#).
- 12 张金岩, 闫素志, 李莉, 等. 注射用胸腺肽灭活/去除可能的污染病毒的工艺[J]. 微生物学免疫学进展, 2012, 40(5): 37–41. [Zhang JY, Yan SZ, Li L, et al. Processes for inactivation and removal of potential contaminating viruses in thymopeptides for injection[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2012, 40(5): 37–41.] DOI: [10.13309/j.cnki.pmi.2012.05.027](#).
- 13 Durno L, Tounekti O. Viral inactivation: low pH and detergent[J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2015, 69(1): 163–172. DOI: [10.5731/pdajpst.2015.01040](#).
- 14 Caballero S, Diez JM, Belda FJ, et al. Robustness of nanofiltration for increasing the viral safety margin of biological products[J]. Biologicals, 2014, 42(2): 79–85. DOI: [10.1016/j.biologicals.2013.10.003](#).
- 15 梁婧, 张潇文, 李策生, 等. 低pH孵放病毒灭活效果回顾性验证评价[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(9): 915–917. [Liang J, Zhang XW, Li CS, et al. Evaluation of retrospective confirmation on virus inactivation by low pH incubation[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2016, 29(9): 915–917.] DOI: [CNKI:SUN:ZGSX.0.2016-09-019](#).
- 16 陈琪, 张旻, 杨滨, 等. 细胞培养生物制品在不同研发阶段病毒清除的要求[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(8): 962–967. [Chen Q, Zhang M, Yang B, et al. Viral clearance requirement for cell-line derived biologics at different stages of development[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2014, 23(8): 962–967.] DOI: [CNKI:SUN:XNYA.0.2014-08-012](#).
- 17 扈会平, 赵淑媛, 唐正均, 等. 鼠神经生长因子病毒灭活效果的验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(5): 709–711, 715. [Hu HP, Zhao SY, Tang ZJ, et al. Verification of effectiveness of virus inactivation in mouse nerve growth factor[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2014, 27(5): 709–711, 715.] DOI: [CNKI:SUN:ZSWZ.0.2014-05-014](#).
- 18 赵峰, 张宜俊, 冉艳红, 等. 重组人IL-12病毒去除/灭活工艺的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(7): 950–953, 958. [Zhao F, Zhang YJ, Ran YH, et al. Development and verification of procedure for virus inactivation/removal in recombinant human interleukin-12[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2014, 27(7): 950–953, 958.] DOI: [10.13200/j.cnki.cjb.000467](#).

收稿日期: 2026 年 04 月 12 日 修回日期: 2026 年 07 月 15 日

本文编辑: 周璐敏 洗静怡