

# 血液制品去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则

二 00 八年九月

# 血液制品去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则

目前已知经血液制品传染的病毒主要有 HBV、HCV、HIV-1、HIV-2、HTLV 和细小病毒 B19。尚未发现经血液制品传染 CJD。但有少数研究报告发现有实验性传染现象，因此要密切关注 CJD，特别是 vCJD 的发展动向。

为了提高血液制品安全性，生产工艺要具有一定的去除/灭活部分病毒能力，生产过程中应有特定的去除/灭活病毒方法。本技术指导原则是对血液制品（指以人血浆为原料制备的制品）生产过程以及特定的去除/灭活病毒方法验证的指导原则，包括指示病毒和病毒去除/灭活方法的选择、验证方案的设计、结果判定以及附录所列技术验证申报的程序。

## 一、去除/灭活病毒方法的选择

由于不同类血液制品潜在的污染病毒的可能性不同，为此选择病毒去除/灭活方法的侧重点也应有所不同：

### （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。

### （二）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。

### （三）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。

## 二、常用的去除/灭活病毒方法评价

### （一）巴斯德消毒法（巴氏消毒法）

#### 1. 人血白蛋白制品

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）。

## 2. 其它血液制品（液体制剂）

由于制品的组成、稳定剂（如：氨基酸、糖、枸橼酸盐等）及其浓度的不同，均会对灭活病毒效果有一定的影响。因此在采用巴氏消毒灭活病毒方法时必须进行病毒灭活效果验证。

### （二）干热法（冻干制品）

80℃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）。

### （三）有机溶剂/去污剂（S/D）处理法

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。S/D 处理前应先用 1 μm 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。

### （四）膜过滤法

膜过滤技术只有在滤膜的孔径比病毒有效直径小时才能有效除去病毒。该方法不能单独使用，应与其它方法联合使用。

验证研究时应考虑蛋白溶液的浓度、滤速、压力和过滤量等重要参数。在过滤前及过滤后应测试滤膜的完整性。

### （五）低 pH 孵放法

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。

### 三、特定的去除/灭活病毒方法验证

#### (一) 指示病毒的选择

首先,应该选择经血液传播的相关病毒(如:HIV),不能用相关病毒的,要选择与其理化性质尽可能相似的指示病毒;第二,所选择的病毒理化性质应有代表性(病毒大小、核酸类型以及有无包膜),其中至少应包括一种对物理和/或化学处理有明显抗性的病毒。在进行去除/灭活病毒验证时,应根据制品的特性及所采用的病毒去除/灭活工艺,参照下表列举的病毒选择适宜的指示病毒。所选择的指示病毒至少应包括 HIV-1、HBV 和 HCV 模拟病毒以及非脂包膜病毒。水疱性口炎病毒(VSV)耐受的 pH 范围比较广,验证低 pH 孵放法灭活病毒效果时可选用此指示病毒。

经血液传播疾病的相关病毒及验证可选用的指示病毒

(举例)

病毒	基因组	脂包膜	大小 (nm)	指示病毒举例
HIV	RNA	有	80-100	HIV
HBV	DNA	有	45	鸭乙型肝炎病毒、伪狂犬病毒
HCV	RNA	有	40-60	牛腹泻病毒、Sindbis 病毒
HAV	RNA	无	27	HAV、脊髓灰质炎病毒、脑心肌炎(EMC)病毒
B19	DNA	无	20	犬细小病毒、猪细小病毒

#### (二) 方案设计

1. 去除/灭活病毒验证研究应符合 GLP 的要求。
2. 研究影响去除/灭活病毒效果的参数(包括机械参数和理化参数)允许变化的幅度。
3. 研究病毒灭活动力学,包括病毒灭活速率和灭活曲线。
4. 指示病毒滴度应该尽可能高(病毒滴度应 $\geq 10^6$ /ml)。
5. 加入的病毒与待验证样品体积比不能高于 1:9。

6. 如可能，验证过程中每步取出的样品应尽快直接进行病毒滴定，不做进一步处理（如超离心、透析或保存、除去抑制剂或毒性物质等）。如果样品必须做进一步处理，或不同时间取出的样品要在同一时间进行测定，应考虑这些处理方法对病毒检测结果的影响。

7. 检测方法可包括蚀斑形成、细胞病变（如合胞体或病灶形成）、终点滴定或其他方法。这些方法应该有适宜的灵敏度和可重复性，每一个取样点应取双份样品并设有对照以保证结果的准确性。

8. 如果制品的生产工艺中包含了两步或两步以上病毒去除/灭活方法，应该分别进行病毒灭活效果验证。

### （三）观察指标

#### 1. 病毒方面

（1）去除/灭活病毒滴度；

（2）灭活病毒速率、灭活曲线。以列表和做图形式报告验证结果。

#### 2. 病毒去除/灭活各参数允许变化范围

#### 3. 蛋白质方面

（1）制品质量应符合《中国生物制品规程》或有关规定；

（2）采用适当方法测定蛋白质结构和功能活性的变化。如：制品比活性、IVIg 的 Fc 功能分析可了解蛋白质结构是否发生了变化；凝胶色谱法可检测蛋白质分子大小和形状的变化；蛋白质形状变化可导致扩散系数、沉降常数和粘度的改变；SDS-PAGE，特别是等电聚焦和 PAGE 结合（双向电泳）也是检测蛋白质结构变化的很好方法。

（3）如果采用新的去除/灭活方法（包括更换使用已认可的病毒灭活方法或国内外未曾采用过的病毒去除/灭活方法），需对蛋白质半衰期和新免疫原性进行研究。要求如下：

**半衰期：**用适宜动物（如大鼠或家兔）和未经病毒去除/灭活的相同制品进行半衰期比较；

**新免疫原性：**新免疫原性用来检查蛋白质较高级别结构上的变化。这些变化不一定损害蛋白质功能，但是会引起受体免疫反应。实验室检测新免疫原性是非常困难的。可用经和未经病毒灭活的蛋白分别免疫动物（如家兔），所产生的抗体交叉用未经和经病毒灭活的蛋白结合。如果经病毒灭活的蛋白抗

体被未经病毒灭活的蛋白完全结合，说明不含新抗原。由于不能保证人类免疫系统识别的表位与实验动物相同，因此推荐在IV期临床（获得生产文号后）开展是否有新抗原产生的研究。

#### （四）效果的判定

判断病毒去除/灭活的有效性须综合考虑，不能仅以病毒去除/灭活的量来确定。在确定有效之前，必须考虑如下因素，审慎评价每次验证结果。

1. 验证试验所选择的病毒是否适宜，病毒验证的设计是否合理。

2. 病毒降低量 ( $\log_{10}$ )  $\geq 4$  logs，表示该步骤去除/灭活病毒有效。如因检测方法造成病毒降低量  $< 4$  logs 时，应盲传三代，如无病毒检出，可认定是有效的灭活病毒方法。

3. 病毒灭活动力学可更好的显示病毒灭活的效果。病毒灭活通常不是简单的一级反应。往往是起始反应速率快，其后变慢。如果病毒灭活速率随时间明显降低，表示该方法可能无效，或者残留的指示病毒对该灭活方法有抵抗力，说明该步病毒灭活方法无效。

4. 病毒实际滴度为基础病毒，指示病毒与样品 1:9 的比例混匀后零点取样的病毒滴度，通过与经去除/灭活病毒后的测定的实际病毒残留量的比较，作为该病毒去除/灭活方法（步骤）实际的灭活病毒的量。

5. 病毒检测敏感度的限值。

举例说明：

（1）加入 6 logs 病毒，剩余 4 logs 病毒，可将去除/灭活病毒的 log 数计算在生产全过程中去除/灭活病毒总量之中，但是就此步（方法）去除/灭活病毒能力而言是无效的。

（2）加入 6 logs 病毒，但由于制品本身的细胞毒作用使得检测灵敏度限值为 4 logs，仅证明除去 2 logs 的病毒。在此种情况下需改变试验设计重新进行验证。

（3）加入 6 logs 病毒，但仍可测定 2 logs 的剩余病毒，且清除病毒的量可重复出，并不受工艺的影响，应认为是有效的去除/灭活病毒的方法。

（4）加入 6 logs 病毒，之后未检测出病毒。但是由于检测灵敏度限值为 2 logs，仅能认为大约清除或灭活了 4 logs 病毒。事实上可能等于或大

于 4 logs，因此应判定此方法清除的病毒量 $\geq 4$  logs。

(5) 病毒灭活动力学是非常重要的观察指标。如巴氏消毒法（60℃，10 小时），如果病毒残留量很快降到最低检出限度值，说明此方法灭活病毒效果很好。如果病毒灭活速率缓慢，在灭活结束时才达到最低检出限度值，不能认为是一个有效的病毒灭活方法。这就是说，评价验证结果不能仅考虑病毒降低量，同时也要考虑病毒灭活动力学。

#### 四、生产工艺去除/灭活病毒能力的验证

生产工艺去除/灭活病毒能力验证参照特定的去除/灭活病毒方法验证的要求进行。需要特殊考虑的问题有以下几方面：

(一) 只对可能有去除/灭活病毒作用的生产步骤进行验证。

(二) 模拟的生产工艺各种参数应尽可能与实际的生产工艺相一致，如 pH、温度、蛋白质和其他组成成分的浓度、反应时间、层析柱的柱床高度及流速与床高的比例、洗脱图谱及该步骤的生产效果（如产量、比活性、组成成分）。应分析生产工艺中各种参数的偏差对病毒去除/灭活效果的影响。

(三) 生产各步骤对不同类型病毒去除/灭活的选择性。

(四) 核酸扩增技术（如 PCR）检测病毒核酸的灵敏度比较高，但是该检测技术最大的局限性是不能区别被灭活了还是未被灭活的病毒。因此该技术不能用于灭活病毒量的验证，只能用于生产过程中病毒去除量的验证。

(五) 通常在生产过程中去除/灭活病毒量是可以计算在清除病毒总量中，但不能认定是有效病毒去除步骤。因为生产过程通常有一些变化，很难控制及验证，而且，病毒分配完全取决于病毒特异的理化性质，这些理化性质影响了病毒与凝胶介质相互作用和沉淀的性质。因此由于病毒表面特性的微小差异（如：糖基化），指示病毒与靶病毒分配形式可能完全不同。在实验室增殖的相关病毒可能在分配上与野生株不同。然而，如果病毒降低量可重复，如果影响病毒分配的各生产参数可以适当地确定和控制，所要的组份能可靠的与一般公认的含病毒组份分开，就可以符合有效步骤的标准（即，认为是有效去除/灭活病毒步骤）。

(六) 验证的目的是为了确定生产工艺去除/灭活病毒的能力，获得生产全过程中估计去除/灭活病毒的总量。一般降低的总量是各步降低病毒量的总

和。但是由于病毒验证的局限性，如分步骤中病毒降低量 $\leq 1 \log$  则不应将其计算在总量中。

#### 五、去除/灭活病毒方法的再验证

以下几种情况需进行病毒去除/灭活方法的再验证：

(一) 首次生产者，需对生产工艺中特定的去除/灭活病毒方法进行再验证；

(二) 采用新工艺或对原有生产工艺进行了重大改革时，需对生产工艺进行清除病毒

能力验证；对特定的去除/灭活病毒方法进行去除/灭活病毒效果验证；

(三) 工艺改变但不属重大工艺改革时，需对特定的去除/灭活病毒方法进行再验证；

(四) 被灭活的中间品组成成分或 pH 值发生改变时，需对特定的去除/灭活病毒方法进行再验证。

附录：

#### 血液制品病毒去除/灭活验证申报程序

1、国家药品监督管理局授权中国药品生物制品检定所及其它认定的检测实验室进行病毒去除/灭活效果的验证工作。

2、血液制品生产企业应按本技术指导原则的要求对其生产工艺和特定的病毒去除/灭活方法进行验证。如无条件，可委托其它单位进行去除/灭活病毒效果的验证。

3、血液制品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，并附制品生产工艺、质量标准、病毒灭活方法及其标准操作细则（SOP）、至少中试规模连续生产的三批病毒灭活前中间品（去除/灭活病毒前的样品）及其制造记录等相关资料。

4、中国药品生物制品检定所对生产单位提交的验证申请及相关的技术资料进行审核；对其提供的三批病毒灭活前的中间品进行与病毒去除/灭活方法相关的参数（如：pH、蛋白质浓度、水分及稳定剂含量、纯度等）的检测。

5、中国药品生物制品检定所及授权认定的检测实验室对生产单位提交的连续生产的三批病毒灭活前的中间品进行病毒灭活方法效果验证。授权认定的检测实验室在验证完成后将验证结果函告中国药品生物制品检定所。

6、在病毒去除/灭活验证的同时或验证后，中国药品生物制品检定所对申报单位提供的连续生产的三批制品（批号可与病毒验证时报送的制品的批号不同，但必须是采用相同的生产工艺和病毒去除/灭活方法生产的制品）进行全面质量复核（按《中国生物制品规程》及有关的法定标准进行全检，出具检验报告）。

7、采用新的病毒去除/灭活方法时，在资料审查及病毒灭活效果验证结束后，由中国药品生物制品检定所负责组织血液制品和病毒学等方面专家以及包括药品审评中心在内的相关部门的人员参加的技术论证会，对申报的病毒灭活方法进行论证。

8、验证结束后，中国药品生物制品检定所将去除/灭活病毒验证结果、综合评价意见及三批制品检定报告回复申报单位；

9、申报单位将申报血液制品拟采用的病毒去除/灭活方法研究资料（包括相关文献）、企业自检报告和中国药品生物制品检定所及授权认定的检测实验室向生产单位提交的病毒去除/灭活方法验证结果、综合评价或论证意见、加入病毒去除/灭活工艺后的制品稳定性考核结果、中国药品生物制品检定所出具的三批制品检定报告等一并上报国家药品监督管理局予以审批。