

单克隆抗体下游工艺病毒清除能力的研究

来源于细胞系的生物技术产品可能存在被病毒污染的风险——其程度取决于多种因素，包括制备的来源、使用的原材料、生产系统、纯化试剂和赋形剂等。研究生产过程对病毒的去除或灭活作用，是降低病原性病毒医源性传播的潜力，进而降低风险的关键步骤，这对于产品的安全性至关重要。在生物制品进入临床试验和上市之前，必须证明其生产过程具有清除已知和假定病毒的能力。本文将单克隆抗体（mono-clonal antibody，简称 mAb）下游纯化工艺病毒清除能力研究的方案、影响因素和创新及挑战等方面进行论述。

文 / 王湛清

PROCESS-Tip

* 更多信息请登录：
pharm.vogel.com.cn
* 反馈编码：201234

1 单抗产品病毒安全性评估

关于病毒清除能力的研究，通常是通过将已知滴度的指示病毒加入到不同生产工艺阶段的中间品中，再测定经特定工艺处理后的样品中残留病毒的滴度，最后通过计算出病毒滴度对数下降值（log reduction value，简称 LRV）

进行评价。对于 $LRV \geq 4\log_{10}$ 的工艺步骤一般可认为是有效的病毒清除步骤。 $LRV < 4\log_{10}$ 的工艺可认为有助于提高生产过程总病毒清除率。但是由于病毒验证的局限性， $LRV \leq 1\log_{10}$ 的工艺对于病毒清除的意义不大，其 LRV 值不计入生产过程的总量中^[1]。

采用模拟生产工艺（缩小的工艺）的方法时，应尽量设计与实际生产工艺相关及合理的病毒

去除 / 灭活研究试验方案，尤其是有效的生产工艺步骤，模拟的工艺在试验参数及控制条件方面应与实际工艺严格地保持一致。

2 常用指示病毒和验证方案

常用的指示病毒见表 1。在新药研究申请（investigational new drug，简称 IND）阶段，生物技术产品需要对至少 2 种模型病毒进行病毒清除研究，通常选择一种

表 1 常用指示病毒

中文全称	英文全称	英文缩写	科	基因组	包膜	大小 /nm	pI	耐受性
鼠白血病病毒	Murine Leukemia Virus	MuLV	逆转录病毒	ssRNA	有	80 ~ 110	6.0 ~ 6.7	低
假狂犬病毒	Pseudorabies Virus	PRV	疱疹病毒	dsDNA	有	120 ~ 200	7.4 ~ 7.8	中
3 型呼肠孤病毒	Reovirus 3	Reo-3	呼肠病毒	dsRNA	无	60 ~ 80	3.9	中
鼠细小病毒	Minute Virus of Mice	MVM	细小病毒	ssDNA	无	18 ~ 24	5.0	很高

注：耐受性是指生产工艺中，对物理化学处理具有的耐受性。

逆转录病毒 (X-MuLV) 和一种细小病毒 (MMV)。在生物制品许可申请 (biologics license application, 简称 BLA) 阶段, 通常使用 3 ~ 5 种特异性 / 非特异性病毒进行病毒清除研究, 并评估 3 ~ 5 个工艺步骤, 以从病毒安全性的角度证明产品具有足够的安全系数。由于国内外指导原则不同, 用于申报的病毒清除验证步骤存在差异。mAb 生产工艺中常用的病毒清除验证方案见表 2。

3 下游工艺的病毒清除能力

3.1 下游工艺对不同病毒的清除能力

截至 2009 年, 向 FDA 提交

的 IND 和 BLA 的单克隆抗体产品中^[2], Protein A 亲和层析、Low pH、阴离子交换层析 AEX (流穿模式)、阳离子交换层析 CEX (结合-洗脱模式) 和除病毒过滤的病毒清除验证最常用的指示病毒科及其清除作用的平均值和范围如图 1 所示。

对于逆转录病毒, 除 CEX 的 LRV 约 $3\log_{10}$ 外 (如图 1 中 a 柱形图所示), 其他工艺均能够稳健地清除 ($LRV \geq 4\log_{10}$)。疱疹病毒与逆转录病毒的清除效果相似且 $LRV > 4\log_{10}$ (如图 1 中 b 柱形图所示)。小型无包膜病毒 (如细小病毒) 则较难有效地清除, 它们对化学处理具有耐受性, 且不易

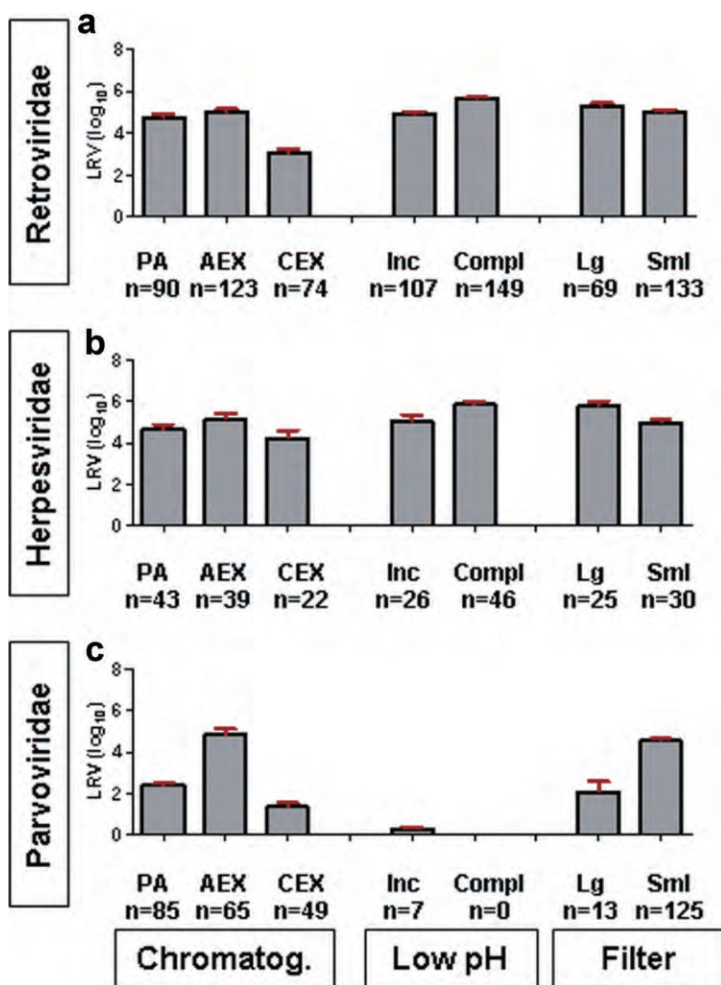


图 1 下游工艺对逆转录病毒 (a)、疱疹病毒 (b) 和细小病毒 (c) 清除作用的平均值



Sievers 在线 TOC 分析仪

——制药水系统在线 TOC 监控的灵活解决方案

自中国 2010 年版 GMP 法规实施以来, 越来越多的制药企业从传统的离线 TOC 分析, 转到在线 TOC 实时监测, 以保证注射用水和纯化水的质量。

在线 TOC 监测, 自动从水系统直接取样, 避免了离线检测时人工取样可能发生的失误、样品污染; 降低了等待时间与实验室成本; 同时能够预警水质问题, 避免停产造成的损失。

Sievers 分析仪为您提供多种在线 TOC 监测解决方案, 满足不同需求!



哪款 Sievers TOC 分析仪才是您的理想选择?

M9 在线 / 便携型 TOC 分析仪
 • 旗舰产品, 从实时检测到清洁验证的 TOC 应用都能轻松实现

500 RL 在线型 TOC 分析仪
 • 专为制药行业设计, 使用方便, 是 PAT (过程分析技术) 的良好工具

CheckPoint 在线 / 便携 TOC 传感器
 • 经济型在线 TOC 选择, 设计小巧、灵活, 用于实时故障诊断与水质趋势分析



扫二维码
 关注 Sievers 分析仪
 免费下载
 TOC 分析的标准操作规程 SOP 文件

热线电话: 400 887 8280
 邮箱: sievers.china@suez.com
 网站: cn.sieversinstruments.com

表 2 mAb 生产工艺中病毒清除验证方案

工艺	IND		BLA
	NMPA	EMPA, TGA, FDA	EMPA, TGA, FDA
Low pH 灭活或去垢剂灭活	2 种病毒 (MuLV, PRV), 3 批 GMP, 动态曲线	1 种病毒 (MuLV), 1 批 GMP, 重复 2 次	2 种病毒 (MuLV, PRV), 1 批 GMP, 重复 2 次
纳滤	2 种病毒 (MVM, MuLV 或 Reo-3), 3 批 GMP, 中间取样	2 种病毒 (MVM, MuLV), 1 批 GMP, 重复 2 次	4 种病毒 (MuLV, MVM, Reo-3, PRV), 1 批 GMP, 重复 2 次
Protein A 和阴离子交换层析	NA	2 种病毒 (MuLV, MVM), 1 批 GMP, 重复 2 次	4 种病毒 (MuLV, MVM, Reo-3, PRV), 1 批 GMP, 重复 2 次, 评估达最大使用次数的填料
层析 2	NA	可选	4 种病毒 (MuLV, MVM, Reo-3, PRV), 1 批 GMP, 重复 2 次, 评估达最大使用次数的填料

被过滤器截留 (如图 1 中 c 柱形图所示)。只有 AEX 和小型病毒过滤器能够有效地清除细小病毒科 (平均 LRV > 4log₁₀)。

图 1 中所示工艺依次为 Protein A、AEX (流穿模式)、CEX (结合-洗脱模式)、Low pH 灭活 (“不完全”与 “完全”清除) 以及大孔径与小

孔径的除病毒过滤。

3.2 下游工艺对病毒清除能力的影响因素

各工艺的 LRV 值的分布情况如图 2 所示。将 0 ~ 2log₁₀ 的研究归为低 LRV 组, 将大于 6log₁₀ 的研究归为高 LRV 组进行对比分析。

3.2.1 Protein A 亲和层析

Protein A 工艺的 LRV 值与平衡 / 洗涤缓冲液、填料、洗脱液组成及洗脱 pH 值均无明显相关性。低 LRV 组的共同点是原料相当复杂, 可能是原料与填料复杂的相互作用对层析柱去除病毒的能力产生了负面影响。

3.2.2 AEX (流穿模式)

Strauss 等人的研究表明 AEX (流穿模式) 上样的 pH 值和电导率可以影响 LRV^[3]。而 Miesegaes 等人的统计结果显示, 与 Protein A 类似, AEX (流穿模式) 的 LRV 与不同缓冲液、填料、pH 和电导率等变量无明显相关性, 可能原因是申报的案例工艺条件中优化了 pH 和电导率。

3.2.3 CEX (结合-洗脱模式)

CEX 工艺的病毒清除作用不够稳健。高 LRV 组的 LRV 与缓冲液、经验水平或任何层析柱性质 (如柱高和树脂类型) 无明显相关性。然而, 高 LRV 研究中使用的平衡 / 上样及洗脱 pH 值均较低, 为 5.3±0.2; 而低 LRV 组中 pH 为 6.0±0.2。另一个因素是缓冲液中盐浓度也会引起 LRV 值差异。低 LRV 研究使用的缓冲液中盐浓度较高, 上样 / 平衡液中 NaCl 的平均浓度为 290±120 mM, 洗脱液

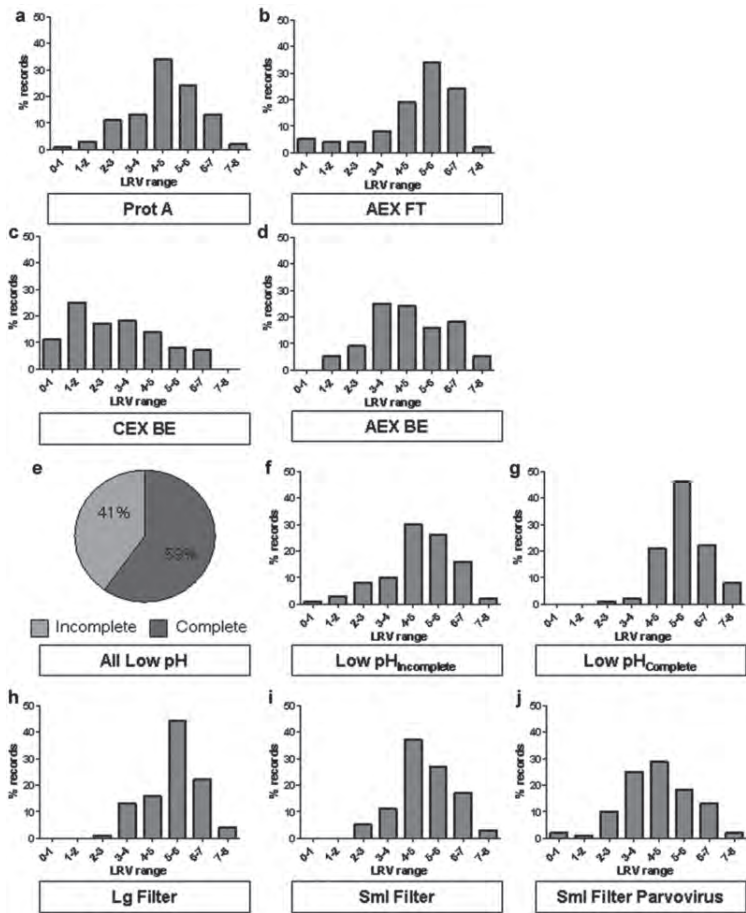


图 2 下游工艺在不同 LRV 范围的分布情况

中 NaCl 的浓度为 340 ± 70 mM, 而高 LRV 的研究中 NaCl 的浓度分别为 58 ± 27 mM 和 183 ± 31 mM。

3.2.4 Low pH 灭活

Low pH 工艺中, pH 值是一个关键过程参数, pH 为 3.8 时足以灭活逆转录病毒^[4]。其中, 低 LRV 研究组的 pH 值为 3.9, 而高 LRV 研究中 pH 值为 3.4。

3.2.5 除病毒过滤

不论是小孔径还是大孔径的滤器, 清除 MuLV 的 LRV 值均不低于 $2\log_{10}$, 只有 1% 的研究低于 $3\log_{10}$ (图 2 中 h 柱形图和 i 柱形图所示)。大孔径病毒过滤器对逆转录病毒的总体清除率低于小孔径病毒过滤器 (如图 1 中 c 柱形图所示)。影响细小病毒清除结果的主要原因是过滤器类型不同。总的来说, 除病毒过滤能够可靠地清除病毒。

图中工艺依次为 Protein A (a)、AEX 流穿模式(b)、CEX 结合-洗脱模式 (c)、AEX 结合/洗脱模式 (d)、Low pH 灭活 (“不完全”与 “完全”清除) (e ~ g), 以及大孔径 (h) 与小孔径 (i ~ j) 的除病毒过滤 (其中, a ~ i: 逆转录病毒; j: 细小病毒)。

4 病毒安全性评估的创新与挑战

生物制药下游工艺领域在不断地发展与创新, 势必会带来病毒清除评估的创新^[5]。以上游和下游工艺领域的进展——以连续流生物工艺为例, 评估和建立有效且稳健的病毒清除过程十分必要。在连续流过程中, 诸如病毒灭活和病毒过滤等步骤预计仍将以批处理方式进行。虽然在连续流模式下, 色谱过程的病毒清除能力不应与分批处理过程有本质区别, 但必须有数据进行支持。

5 展望

从病毒学安全性的角度来看, 生物制药行业具有出色的安全性, 很大程度上可以归功于行业严格遵守病毒安全的 3 个关键策略: 充分寻找材料和细胞库来源并检测, 记录病毒清除评估 (病毒验证研究) 和进行过程中病毒测试。新型细胞底物生产的生物药物特性可能会发生变化并伴有不同的风险, 确保生物药物的安全性需要良好的风险管理策略。

白帆生物拥有经验丰富的专业技术团队, 覆盖从研发、小试、

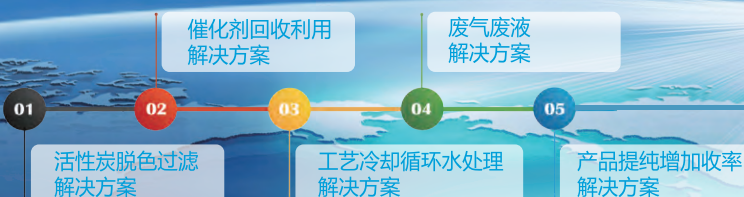
中试到规模化生产的完整产业链, 建立了针对各类肿瘤和自身免疫性疾病的单克隆抗体药物产业化基地, 拥有独特的 NONCROS? 多产品共线生产技术、智能信息化管理系统、高表达量的宿主细胞平台等, 可有效缩短新药上市时间, 提高有效产能, 降低药物成本。

【参考文献】

- [1] ICH Q5A(R1). Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. 1998.
- [2] Miesegaes G, Lute S, Brorson K. Analysis of viral clearance unit operations for monoclonal antibodies. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 106(2):238-246.
- [3] Strauss, D. M., Lute, S., Tebaykina, Z. et al. Understanding the mechanism of virus removal by Q sepharose fast flow chromatography during the purification of CHO-Cell derived biotherapeutics. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 104(2):371-380.
- [4] Brorson K, Krejci S, Lee K. et al. Bracketed generic inactivation of rodent retroviruses by low pH treatment for monoclonal antibodies and recombinant proteins. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 32(3):321-329.
- [5] Shukla A A, Aranha H. Viral clearance for biopharmaceutical downstream processes. Pharmaceutical Bioprocessing. 2015, 3(2):127-138.

飞潮 -- 工艺流程优化解决方案

- ✓ 提高生产效率, 提升产品品质
- ✓ 降低运营成本, 实现节能减排



☎ 400 820 6150

🌐 www.feature-tec.com

广告

