

[S] GPH3-1

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

药品审评中心
二〇〇五年十二月

目 录

一、概述.....	3
(一) 病毒安全性控制的迫切性.....	3
(二) 病毒安全性技术审评基本内容和适用范围.....	3
二、病毒污染的来源和控制	4
(一) 病毒污染的可能来源.....	4
1 细胞种子/动物组织原材料携带的病毒.....	4
2 细胞培养增殖过程中引入的病毒	4
(二) 病毒污染的控制和检测	5
1 组织原材料和种子库细胞来源动物病毒感染方 面的研究资料	5
2 严格控制生产用生物组织原材料的来源动物.	5
3 严格生产用种子库细胞的病毒检测	6
4 细胞培养结束时混悬液的病毒检测	6
5 动物组织原材料匀浆的病毒检测	7
三、病毒检测方法.....	8
(一) 体外法.....	8
(二) 体内法.....	8
(三) 动物抗体产生试验.....	8
(四) 其他方法.....	8
四、病毒去除/灭活验证研究及有效工艺步骤评价... ..	8
(一) 病毒去除/灭活验证研究.....	8

1 目的和基本原则.....	9
2 方法和要点.....	9
3 指示病毒的选择.....	10
4 人员、设施.....	11
(二) 病毒去除/灭活有效工艺步骤评价.....	11
1 评价基本要点.....	11
2 影响因素及综合分析.....	12
(三) 统计处理分析.....	14
五、病毒安全性追踪观查.....	15
六、小结.....	15
七、名词解释.....	17
八、参考文献.....	17
九、附录.....	18

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

一、概述

(一) 病毒安全性控制的迫切性

随着动物源性组织、细胞、体液及重组真核细胞表达制备的生物制品逐渐增多，使用的人群不断扩大，加之动物源性产品原材料质量控制未引起足够重视，生产工艺又基本没有经过严格的病毒去除/灭活效果验证。因此，目前动物源性病毒感染人类的风险性极高，潜在医源性感染问题变的日益突出。其中动物组织来源制品由于动物本身健康检疫状况差，不同动物携带的病毒外源因子复杂多变，可控性因素尚不确定，对人体的潜在危害性较之经过系统鉴定和严格控制的真核细胞表达制品的风险性更高。

根据《药品注册管理办法》的要求，由人的、动物的组织或者体液提取的制品、动物源性单克隆抗体及真核细胞表达的重组制品，尚需增加病毒灭活工艺验证资料。

(二) 病毒安全性技术审评基本内容和适用范围

为了加强动物组织/细胞来源制品病毒安全性的质量控制，结合国家食品药品监督管理局已发布的《血液制品病毒去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则》，参考其它相关的技术要求，我们制定了本技术审评一般原则，试用于重组或者杂交的动物真核细胞（例如重组 CHO 细胞、人/动物杂交瘤细胞等，但不包括酵母细胞）经培养后表达或者分泌，以及直接采用动物组织原材料（例如动物细胞、组织及体液等）经提取、纯化制备的治疗用生物制品。

基本内容包括：

1、生物组织来源动物的病毒控制，生物组织原材料及细胞种子库病毒筛查。

2、细胞培养悬液及生物组织原材料匀浆中污染病毒的检测。

3、病毒去除/灭活工艺验证研究及综合评价。

4、病毒安全性追踪观察

本技术审评一般原则仅重点考虑研究、生产和检定中的一般共性问题，不可能包纳和适用于各种复杂的实际情况。因此，在论证动物源性生物制品的病毒安全性方面应结合具体产品性质、特点，充分考虑特定品种的个性问题，突出和强调科学性。

二、病毒污染的来源及控制

（一）病毒污染的可能来源

主要有二个途径：

1、细胞种子/动物组织原材料携带的病毒

通常细胞种子/动物组织原材料是病毒污染的源头。由于细胞和组织来源的动物种类不同，动物自然携带或者感染的病毒种类一般有所不同。另外，动物组织原材料在取材、运输及保存过程中如果不执行严格的操作规范，则有可能与其它动物组织感染的病毒形成交叉污染。鉴于动物病毒的来源、感染性质和风险性十分复杂，因此需要全面分析、综合考虑病毒污染的可能性，重点关注检测出的病毒对于人的致病性、感染性和复制活性。

2、细胞培养增殖过程中引入的病毒

动物组织原材料经常被制作成细胞培养需要的培养基、添加成分及辅料，如果这些原材料本身污染有病毒，在生产工艺过程中又未能进行有效控制，这些病毒将随细胞的连续培养得到复制扩增，

特别是生产人员在对培养细胞进行接触性操作中，如果没有严格执行 GMP，则随时可能引入污染的病毒。

(二) 病毒污染的控制和检测

病毒作为感染性因子，通常需要伴随细胞生存，其基本生物学特征表现为对活细胞的严格依赖性。动物作为活生命体，必然易成为病毒的自然宿主。因此无论是动物组织原材料匀浆、细胞培养结束时的混悬液，如果已知污染了对人致病或者感染性的野生外源病毒，则不能用于生产制品；如果检出了内源性逆转录病毒、具有种属特异性的其它感染性活病毒，在没有充分证据表明对于人体安全性和充分的灭活验证保证的前提下，须废弃该原材料并妥善处理。

对于真核细胞的病毒检测应特别关注人/动物杂交瘤细胞。可选用人源、猴源细胞和生产用细胞系等适宜的盲传细胞，进行体外传代培养，使潜在病毒能够充分扩增显现。特殊情况下，还需要通过浓缩样本的方式进行动物传代试验及其它适宜的检测试验提高对轻微污染病毒的检出几率。具体内容包括如下五个方面：

1、组织原材料和种子库细胞来源动物病毒感染方面的研究资料。

应特别关注已确认对于人类具有感染和致病能力的病毒以及已有试验提示与人类疾病具有密切关联性的病毒。应明确生产用组织原材料和种子库细胞中可能存在的动物源性病毒的种类，包括种特异性病毒、逆转录病毒等。阐明风险性病毒对人的多种敏感细胞的亲嗜性、对不同动物宿主的感染适应性和选择特异性，提供有关生物学特性以及对理化因素敏感性等方面的研究报道资料。

2、严格控制生产用生物组织原材料的来源动物

建立动物种群，采取封闭、隔离的饲养管理方式既是从生产源头严格控制生物组织原材料质量的重要组成部分，也是重要保证措施之一。动物必须经过符合兽医检验要求的健康状态监测并建立档案资料。应根据不同的动物种类和不同的病毒选取适用的病毒筛查方法例如 PCR、ELISA 等。充分考虑检测结果能够反映的动物病毒实际感染状态。根据相关研究资料确定检测的病毒种类，并提供选择的依据和理由。每批原材料投产前应进行相关病毒的复核检定。

3、严格生产用种子库细胞的病毒检测

对于直接引用已建立的传代细胞系（例如 CHO 细胞），应提供引进时的合法来源、传代历史及外源因子鉴定方面的证明性文件，在病毒的检测控制方面可参照《中华人民共和国药典》三部 2005 年版生物制品生产用动物细胞基质制备及检定规程中关于细胞内外源病毒因子检查的相关要求复核验证种子库细胞。

对于新建立的细胞系，应按照建库细胞的要求严格筛查内源性病毒。根据来源的始祖细胞或者亲本细胞特点，充分考虑动物病毒方面已有的研究报道及其它适宜资料，设计病毒检测的项目和要求，完成系统全面的鉴定。因为一旦漏检，细胞内源性病毒将在实际生产中大量扩增，导致病毒的严重污染。

4、细胞培养结束时混悬液的病毒检测

如果种子细胞携带有未筛查出的病毒或者在培养过程中意外引入了污染的病毒，则随着细胞的扩增，潜在的病毒将会得到大量复制。因此，在确定了细胞培养的基本生产条件和工艺后，应将多批收获物（特指细胞培养结束时的混悬液），在未经任何处理前，对代表性样本进行适宜的病毒污染检测。得到的结果最能够反映培养细胞及其产物在生产过程中有无病毒污染及污染程度。如果混悬液

本身有细胞毒性，则应尽量抽取最初分离工艺处理后的样本，以降低细胞毒性。也可以根据具体情况，检测由培养过程中及终点时的完整或破碎细胞及其上清液组成的代表性样本。

上述代表性样本是指：

- 1) 在模拟生产条件下，从至少三批培养细胞及其上清液制备的混悬液中抽取的样本。
- 2) 生产过程中不同阶段或者不同时间点采取的样本。
- 3) 抽取的样本量应能够反映培养物整体的情况。

应有在模拟或者中试条件下至少三批上述样本的检测结果。如果在此阶段检出了外源污染的感染性活病毒，则必须废弃培养的细胞混悬液，认真查找原因并采取相应对策。

在建立了生产规范，能够严格控制生产工艺过程后可以定期抽查培养终末时未处理的细胞培养物混悬液。

5、动物组织原材料匀浆的病毒检测

组织原材料经适宜的方法破碎处理后，细胞内的病毒将会释放到匀浆中，通过检测匀浆中的病毒，可以定量了解原材料中病毒的污染程度和负载量，为采取相应处理工艺提供基础研究数据。

应在适宜的时间点（根据细胞破碎的程度）采集组织原材料匀浆样本，了解病毒释放的程度，防止未破碎细胞内或者黏附在破碎细胞残片上的病毒得不到充分的去除/灭活处理。

综上，对于生物组织来源的病毒控制应充分考虑各种不确定隐匿病毒带来的风险性，重点结合第 1、2、5 条要求进行分析研究；对于真核细胞主要应考虑细胞培养对病毒的扩增作用和培养过程中的意外污染，重点结合第 1、3、4 条要求进行分析研究。但无论是

生物组织还是真核细胞的病毒控制均需要结合实际，在处理特殊情况时应应对个例问题具体分析。

三、病毒检测方法

可以采用各种适宜的方法检测污染的病毒。下列方法仅供参考，应结合品种的特点和具体生产情况，综合分析后进行设计和选择，但应有合理的依据和支持性资料。

（一）、体外法

可采用不同种属的多种敏感细胞系进行共培养检测，在适宜的培养时间点取样检测感染性病毒。至少应盲传 3 代。

（二）、体内法

在没有可靠的体外试验方法时，可采用适宜动物进行接种盲传试验，采用敏感方法检测有无感染性病毒。

（三）、动物抗体产生试验

对于尚没有合适的体内和体外病毒检测方法时，可采用不同的动物，观察种特异病毒的抗体产生情况。抗体产生试验特别有助于检出啮齿类动物病毒。

（四）、其他方法

根据传代中可能发生的污染病毒进行选择检测，例如电镜、ELISA、PCR 方法、RT 检测等。

四、病毒去除/灭活验证研究及有效工艺步骤评价

（一）病毒去除/灭活验证研究

在进行验证研究时，应当采用高度敏感和特异的检测方法对纯化后的原液进行针对性检测，在临床研究之前应提供在合理的模拟生产工艺或者接近实际生产条件下对至少三批纯化原液的病毒检测

结果，以此排除可能污染的感染性活病毒，有效控制制品的病毒安全性。

1、目的和基本原则

验证研究的目的是为了获取充足的试验研究数据证明生产工艺是否包含有效的病毒去除/灭活工艺步骤。基本原则要求生产工艺必须包含病毒去除/灭活的有效工艺步骤。若无，应根据不同品种特点增加相应处理方法，并不得改变制品原有的质量。对于生物组织提取制品应包含两种从机制上能够互补的有效工艺步骤，至少一个处理步骤应具有针对非脂包膜病毒的去除和/或灭活效应；对于真核细胞表达制品应至少包含一个有效工艺步骤，并能够有效去除和/或灭活非脂包膜病毒。关于有效的病毒去除/灭活技术方法，参见《血液制品病毒去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则》。

2、方法和要点

采用模拟生产工艺（缩小的工艺）的方法，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保持一致。缩小的生产工艺应当尽可能代表实际生产工艺的情况。例如对于柱层析设备，柱床的高度、线性流速、流速与柱体积的比率（比如接触时间）、使用的缓冲液和凝胶类型、pH、温度、蛋白浓度、无机盐类及产品均应能够代表实际生产工艺的规模和条件，并获得类似的洗脱图谱。如果产生了意外的偏差，应对实验结果可能产生的影响给予合理的解释。应考虑新层析柱与反复使用的旧柱（填充料接近使用期限）对于去除病毒效果的差别，并预留适宜的缓冲储备。

通常是将已知量的指示用活病毒，加入到模拟的原液或者不同生产工艺阶段的中间产品中，然后定量测定经特定工艺步骤或者技术方法处理后病毒滴度下降的幅度，由此评价工艺的去除/灭活病毒效果。如果采用了非感染性病毒检测方法，则应提供充分的论证依据和理由。

要获得对每个有效步骤的准确评价，必须保证每个步骤在起始时加入了足够多的病毒负载量。一般应将病毒加入到每个待验证步骤的中间品内，有些情况下则将高滴度的病毒直接加入到未处理的原液中，然后检测两个步骤之间病毒滴度的下降情况。对于采用分离法去除病毒的效果进行评价时，应当了解病毒在不同分离层中的负载量分布状况；如果在工艺的多个步骤中都采用了具有杀病毒作用的同样缓冲液，则可同时使用没有较强杀病毒作用的缓冲液进行平行对照试验，检测每个工艺步骤处理前后病毒的滴度，

一般只对病毒去除/灭活的有效工艺步骤进行验证，不必对每个工艺步骤都进行验证。

应采用适宜的病毒检测方法，结果应进行统计分析处理。所有的感染性检测试验，均应设立适宜的对照试验，确保试验方法的敏感性，当样本中的病毒量较低时还应考虑统计学分析的误差。

3、指示病毒的选择

可以从以下方面考虑：

1) 一个典型的验证研究所选择的病毒，至少应包括单链和双链的 RNA 及 DNA、脂包膜和非脂包膜、强和弱抵抗力、大和小颗粒等病毒；去除/灭活技术方面可根据采用的具体方法选择恰当的适宜病毒，例如 SD 法可选用脂包膜病毒，膜过滤法可选用粒径小的

病毒，加热法可选用脂包膜和非脂包膜病毒，低 pH 孵放法可选用对理化因素比较耐受的指示病毒等。

2) 应尽可能选择可培养至高滴度的病毒，对每一种指示病毒，都应提供可靠的检测方法。

3) 应注意选择的指示病毒可能对验证操作人员形成的健康危害，并采取必要的防护措施，遵守国家有关的管理规定，属于烈性传染病毒不能使用。

总之，应以生物组织原材料、种子细胞或者组织原材料匀浆、培养细胞结束时的混悬液中可能出现的污染病毒为核心，结合能够用于评价验证效果的指示病毒的可获得性与相关培养试验条件进行合理选择。

4、人员、设施

应参照 GMP 的相关要求。验证研究应当在单独的实验室进行，应当配备适于开展病毒研究工作的相应试验条件和设备，试验人员应当具有必要的病毒学试验专长和技能，在实验病毒学专家的指导下设计和准备模拟的生产工艺。

(二)、病毒去除/灭活有效工艺步骤评价

生产工艺过程对不同种类的病毒的去除/灭活机制可能有所不同，因此在对去除/灭活资料分析总结时应当综合考虑各种因素，确定对病毒的去除/灭活效果。

1、评价基本要点

主要考虑病毒载量下降的程度和动态过程两个方面。

1.1 病毒载量下降的程度

一般将病毒感染性滴度减少 $\geq 4\log$ 的处理步骤认可为有效的病毒去除/灭活工艺步骤。病毒感染量的降低可以从病毒颗粒去除或

者被灭活的情况两方面来评价。对于有效的具体工艺步骤，应注意区别灭活作用与去除作用。当在多个层析步骤中均使用了相同的缓冲液时，由于该缓冲液在洗脱过程中很可能对病毒发挥了直接的灭活作用，显然不能将这一作用归结于每个层析步骤起到了各自的去除作用。

1.2 病毒去除/灭活动态分析

病毒的去除/灭活过程不是简单的一级动力学反应过程，病毒感染活性一般先经过快速下降期，然后转入缓慢下降期的双时相特征。如果病毒逃逸了第一个灭活步骤，则在随后的步骤中可能会增加抵抗力。如果病毒逃逸的原因是由于形成了聚集颗粒，则在后续步骤中，很可能对许多理化处理因素或者加热过程不再敏感。病毒的灭活具有时间依赖性，因此加入了指示病毒的中间产品，应在特定的缓冲液或层析柱中保留足够的时间，以充分模拟将来的实际工艺过程及条件。在去除/灭活研究中应设立合理的取样时间，通过在不同的适宜时间多次取样，绘制出病毒去除/灭活过程的动态变化图。选择的取样点应包括能够完全去除/灭活病毒的最小处理时间点以及在最小处理时间点以外的其它代表性时间点。

2、影响因素及综合分析

在设计和执行试验研究的过程中，应充分重视和考虑干扰病毒去除/灭活效果的实际影响因素，增加安全性评价的客观性和准确性。

2.1 指示病毒和加入方式

经组织培养方法制备的指示病毒，其性质、特点及行为可能发生了适应性改变，与工艺过程中实际遇到的自然状态下的病毒有所不同，例如培养的病毒与自然增殖的病毒在均一性和积聚特性方面

不完全相同。在制备高滴度的感染性病毒时，应避免病毒颗粒的聚集，以防止高估物理去除/灭活方法对降低病毒感染量的实际作用；应尽可能将指示病毒以较小的体积加入待测产品中，以免加入病毒引起稀释效应或者改变产品的性质；由稀释样本获得的检测结果，可能与将来实际生产中产品的结果并非完全相同。应注意任何微小的改变例如缓冲液、培养基或试剂等可能对去除/灭活效果产生的影响。

2.2 工艺总体去除/灭活效果

一个有效的工艺步骤实际上应当在两个独立的验证研究中都能够重复出相同的病毒去除/灭活量。生产工艺对病毒的总去除/灭活效果应为各步骤去除/灭活效果之和。在适宜的控制条件下，经恰当设计的工艺过程例如柱层析、膜过滤及纯化步骤等，均有可能成为有效的病毒去除步骤。如果去除效果仅够一个对数级甚至低于一个对数级，通常可忽略其效果，不记入工艺总的去除指数内。如果各工艺步骤几乎没有降低感染量的作用，则必须引进有效的去除和/或灭活步骤。病毒去除/灭活的效果应超过病毒潜在的污染负荷。

在分析试验结果时，对于重复使用同样或类似的缓冲液及层析柱，一般不应累加其指数，除非能提供充足的依据和理由，如果将多步骤的去除/灭活指数相加（特别是将灭活效果不明显的步骤相加）或者将工艺过程中重复采用的同样或者类似灭活机制形成的灭活效果累加，可能会高估工艺实际能达到的效能。应注意有效步骤对病毒的去除/灭活效果可能与实际生产工艺中使用的效果有一定偏差。

2.3 检测方法评价

如果生产条件或者缓冲液的细胞毒性或者杀病毒作用过强，则验证研究有可能从整体上低估工艺对病毒的灭活作用，当然也可能由于病毒去除/灭活验证研究本身的局限性和试验设计不充分等方面的原因而过高估计了去除/灭活效果。应分别单独评价缓冲液和制品在病毒滴度检测方法中的毒性和干扰作用。如果样本溶液对细胞有毒性，应对含有负载病毒的缓冲液进行适宜的稀释、调整pH或者透析，如果样本本身含有抗病毒的活性成分，则应采用不含该活性成分的模拟溶液进行验证研究。但应考虑不含有抗病毒成分的溶液（比如以其它类似成分代替的溶液）可能会改变某些工艺步骤中病毒的行为。应设立充分的平行对照试验，说明试验本身及样本制备过程，提供相关的试验资料，以排除由于样本的透析、稀释、浓缩、过滤及贮藏可能对去除/灭活验证效果的影响。可使用感染性滴度测定方法或者透射电镜的方法确定样本中的病毒量，考虑检测方法的定量分析灵敏度、最低检测限。如果检测方法的最低检测限为 10^3TCID_{50} ，即使病毒起始滴度为 10^6TCID_{50} ，经处理后未检出病毒，也不宜算作特定的有效工艺步骤，因为经处理后病毒的残留量有可能大于 10^2TCID_{50} ，因此只能根据检测方法的灵敏度表示为未检出。

2.4 互补的去除/灭活步骤

模拟工艺过程的研究结果与实际生产工艺总会有所区别。即使充分考虑各种影响因素，也只是模拟实际中可能发生的结果，两者之间难以进行完全替代。为达到有效的去除/灭活效果，通常须联合使用灭活与去除步骤，甚至多个从机制上能够互补的去除和/或灭活步骤。

（三）、统计处理分析

病毒去除/灭活验证研究中，应进行适宜的统计处理分析，特别是有关病毒量的正确估算，以支持得出的结论。

五、病毒安全性的追踪观察

药品临床研究和上市后追踪观察，对于确认其病毒安全性具有直接的证明作用。因此对动物组织细胞来源的生物制品，在临床研究及上市后应进行必要的病毒安全性追踪观察。针对可能污染的病毒，注意观察并设立病毒感染的评价指标，包括已知对原材料来源动物有致病性的病毒，在体内、体外试验中能够感染人类组织细胞的病毒，特别是隐性感染的病毒。通过血清学或者培养分离等临床检测，发现和验证在生产过程中未能检出的新病毒及感染特征。采用的检测方法应当能够鉴别出人与动物病毒的区别，并经过验证确保敏感性和特异性。

六、小结

必须高度重视动物组织细胞来源生物制品病毒安全性，其控制应从源头抓起，防范意识应贯穿于整个生产过程中。

对于生物组织提取物，应严格控制生物组织原材料的来源动物，建立动物种群，采取封闭、隔离的饲养管理方式。动物必须经过符合兽医检验要求的健康状态监测并建立档案资料。

对于重组真核细胞表达制品，应使用来源明确、经系统鉴定符合建库要求的种子细胞。生产细胞必须严格控制在许可的传代限度内。应严格筛查细胞种子/动物组织原材料携带的病毒，严防细胞培养增殖过程中引入的病毒，例如细胞培养中使用的培养基、添加成分及动物组织来源辅料中污染的病毒。每批生物组织原材料投产前应进行相关病毒的复核检定。

应采用各种适宜的方法检测起始原材料中、培养结束时的细胞混悬液及破碎后的生物组织匀浆中可能存在的污染病毒。

应进行规范的病毒去除/灭活验证研究，试验设计、试验数据和结果分析等方面应具有科学性。研究方案应与实际生产工艺相关及合理，模拟的生产工艺，尤其是特定的步骤在试验参数及控制条件方面应与实际工艺基本一致；应采用将指示用活病毒加入到原液或者不同生产工艺阶段的中间产品中，然后定量测定经特定工艺步骤或者技术方法处理后病毒滴度下降幅度的评价方法；在选择指示病毒时，应至少包括了双链和单链的 RNA 及 DNA 病毒、脂包膜和非脂包膜病毒，并综合考虑了生产工艺、污染病毒及去除/灭活技术方法本身等各方面的特点；有效处理步骤应对病毒感染性滴度去除/灭活的效果达 $\geq 4\log$ ；应对有关去除/灭活病毒量的估算采用适宜的统计处理分析；应采用高度敏感和特异的适宜检测方法对纯化后的原液进行针对性检测，至少应包括在合理的模拟生产工艺或者接近实际生产条件下对三批纯化原液的病毒检测结果。

生产工艺必须包含病毒去除/灭活的有效工艺步骤。若无，应根据不同品种特点增加相应处理方法，并不得改变制品原有的质量。对于生物组织提取制品应包含两种从机制上能够互补的有效工艺步骤，至少一个处理步骤应具有针对非脂包膜病毒的去除和/或灭活效应；对于真核细胞表达制品应至少包含一个有效工艺步骤，并能够有效去除和/或灭活非脂包膜病毒。病毒去除/灭活的效果应超过病毒潜在的污染负荷。在有效工艺步骤之后没有进行可能引入新污染的操作。

在临床研究及上市后应采取必要的病毒安全性追踪观察。在知情同意书及使用说明书中应增加病毒感染风险性的必要警示语言。

七、名词解释

病毒去除/灭活验证研究：采用指示病毒以评价生产工艺过程去除/灭活病毒效能的试验研究。

生物组织匀浆/细胞混悬液：生物组织匀浆是指经过破碎等初步操作后未进行下一步处理前的原浆液。细胞混悬液是指在培养过程中或终点时收获的一批或者多批培养物（包括培养液及细胞），如果无法获得培养的细胞，则可收集培养液。

病毒：是指含有单一类型的核酸（RNA 或者 DNA），能够在细胞内复制的感染性因子。

指示病毒：是指在病毒去除/灭活工艺验证研究中使用的用于显示工艺处理效果的感染性活病毒。

病毒灭活：意在“杀死”病毒以强化病毒安全性的工艺过程。

病毒去除：将病毒从目的产物中去除或者分离出去以强化病毒安全性的工艺过程。

有效工艺步骤：是指在验证研究中，能够使指示病毒感染量被去除/灭活达 4log 以上的特定工艺步骤。

去除/灭活指数：是指经过生产工艺步骤处理后，指示病毒感染量被去除/灭活的程度，通常以对数值表示。

生产细胞传代限度：是指实际生产过程中细胞允许的最高限定增殖代次。一般以模拟生产条件下的细胞传代稳定性试验确定的代次为限定依据。

八、参考文献

1、国家药品监督管理局.《血液制品去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则》. 2002.

2、FDA . Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. Sep. 1998.

3、EMEA/CPMP. Virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. Aug. 1996 .

4、国家药典委员会. 《中华人民共和国药典》2005 年版三部. 化学工业出版社. 2005.

九、附录

病毒去除/灭活验证研究中采用过的病毒

病毒名称	科	属	自然宿主	基因组	脂包膜	大小 (nm)	形态	理化抗性
水疱性口腔炎病毒	弹状病毒	水疱性病毒	马、牛	RNA	有	70 × 175	弹状	低
副黏病毒	副黏病毒	副黏病毒	可变	RNA	有	100-200	多形态/球型	低
人免疫缺陷病毒	逆转录病毒	慢病毒	人	RNA	有	80-100	球型	低
小鼠白血病病毒	逆转录病毒	C型原癌病毒	小鼠	RNA	有	80=110	球型	低
辛得毕氏病毒	披盖病毒	甲病毒	人?	RNA	有	60-70	球型	低
牛腹泻病毒	披盖病毒	瘟病毒	牛	RNA	有	50-70	多形态/球型	低
伪狂犬病毒	疱疹病毒	水痘病毒	猪	DNA	有	120-200	球型	中
脊髓灰质炎病毒 sabinI 型	微小RNA病毒	肠病毒	人	RNA	无	25-30	20 面体	中
脑心肌炎病毒	微小RNA病毒	心肌炎病毒	小鼠	RNA	无	25-30	20 面体	中
呼肠孤病毒 3 型	呼肠孤病毒	正呼肠孤病毒	可变	RNA	无	60-80	球型	中
甲型肝炎病毒	微小RNA病毒	肝炎病毒	人	RNA	无	25-30	20 面体	高
SV40 病毒	乳多空病毒	多瘤病毒	猴	DNA	无	40-50	20 面体	极高
细小病毒 (犬、猪)	细小病毒	细小病毒	犬、猪	DNA	无	18-24	20 面体	极高