

国际人用药品注册技术要求协调会

ICH 三方协调指导原则

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

Q5A (R1)

第四阶段

1999年9月23日通过

该指导原则由相应的 ICH 专家小组制定,按照 ICH 进程,已递交管理部门讨论。在 ICH 进程第四阶段,最终草案被推荐给欧盟、日本和美国的管理机构采纳。

Q5A (R1) 文件历史

第一次 汇编	历史	日期	新汇编 2005 年 11 月
Q5A	在第 2 步基础上由指 导委员会批准，并向 公众征求意见	1995 年 12 月 1 日	Q5A
Q5A	在第 4 步基础上由指 导委员会批准，并推 荐给三方 ICH 监管机 构采纳	1997 年 3 月 5 日	Q5A

现行第四版

Q5A	第 4 版校正后由由指 导委员会批准	1999 年 9 月 23 日	Q5A (R1)
-----	-----------------------	--------------------	----------

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

ICH 三方协调指导原则

1997年3月5日在ICH指导委员会会议上完成第4步并推荐给三方ICH监管机构采纳。(该指导原则包括表A-1中3型呼肠孤病毒基因组为RNA的印刷错误校正,1999年9月23日指导委员会同意)

目 录

I.前言.....	1
II.潜在的病毒污染源.....	3
A 主细胞库 (MCB) 可能存在的病毒.....	3
B 生产过程中可能带入的外源病毒.....	4
III.细胞系检定: 病毒测试.....	4
A 对主细胞库 (MCB), 工作细胞库 (WCB) 及达到体外胞龄细胞进行病毒检测的建议.....	4
1.主细胞库.....	4
2.工作细胞库.....	5
3.达到体外胞龄限度的细胞.....	5
B 推荐的病毒检测和鉴定的分析方法.....	6
1.逆转录病毒测试.....	6
2.体外检测法.....	7
3.体内检测法.....	7
4.抗体产生试验.....	7

C 细胞系的可接受性.....	8
IV.未加工品的病毒测试.....	8
V.对纯化后产品进行病毒清除研究和病毒检测的基本原理 和操作方案.....	9
VI.病毒清除工艺的评价和鉴定.....	12
A 用于评价和鉴定病毒清除率的病毒选择.....	14
1.“相关”病毒和“模型”病毒.....	14
2.其他问题.....	16
B 病毒清除评价和鉴定研究的设计和内涵.....	16
1.设施和人员.....	16
2.缩小规模的生产体系.....	16
3.对病毒逐步消除的分析.....	17
4.确定病毒去除还是灭活.....	17
5.灭活评估.....	18
6.分离柱的功能和再生.....	19
7.特别注意事项.....	19
C.病毒清除研究的说明.....	20
D.病毒清除研究的局限性.....	22
E.统计.....	24
F.病毒清除的再评价.....	24
VII.小结.....	24
VIII.术语.....	25

表 1: 不同级别细胞进行的病毒测试方法	27
表 2: 用于病毒检测的测定方法的应用与局限性举例	28
表 3: 可通过抗体产生试验检测的病毒	29
表 4: 纯化原液的病毒清除过程评估和病毒检测方案	30
附录 1 已表征细胞库经体内培养表达的产品	31
附录 2 病毒清除研究中病毒的选择	32
表 A-1: 用于病毒清除研究的病毒举例	33
附录 3 评定病毒检测结果的统计学考虑	34
附录 4 确定病毒清除率研究中下降因子的计算	37
附录 5 每剂量颗粒估算方法	38

来源于人或动物细胞系生物技术产品的病毒安全性评价

I. 前言

本文件旨在为从人或动物(即哺乳动物、鸟类、昆虫等)的特定细胞系制备的生物技术产品提供病毒安全性的测试和评价方法,并提出了上市注册时应提交的研究资料。本文件所述病毒不包括非常规性传播因子,如与疯牛病(BSE)和瘙痒病(scrapie)有关的传播因子。有关疯牛病的问题,申请人应与管理部门进行讨论。

本文件的范围涉及从特定细胞库开始的细胞培养物中所提取的产品,既包括从体外细胞培养物所提取的产品,如干扰素、单克隆抗体和重组 DNA 产品(包括重组亚单位疫苗),也包括从体内如腹水内培养的杂交瘤(hybridoma)细胞中提取的产品。对于后一种情况,需要考虑特殊因素,有关测试体内增殖细胞的其他信息见附录 1。灭活疫苗,含有自我复制因子的所有活疫苗以及用基因工程方法生产的活性载体都不属于本文件范围。

来源于细胞系的生物技术产品的一个共同特点是存在病毒污染的风险,污染可来自原细胞系(细胞基质)本身,也可来自生产过程中偶然带入的外源病毒,这种污染可能产生严重的临床后果。然而,到目前为止从细胞系来源的生物技术产品还没有发生传播病毒的问题。尽管如此,有关这些

产品病毒污染的安全性，只有通过实行如下的病毒测试计划并在生产过程中对病毒的去活或灭活作用进行评估，才可能得到确实的保证。

控制生物技术产品的潜在病毒污染，可归纳为以下三条相互补充的原则：

a) 选择并对选定的细胞系和其他原料进行检定，确保其不含可能对人体有感染和/或致病作用的病毒。

b) 评估生产工艺清除感染性病毒的能力。

c) 检测生产适当步骤的产品，确保产品未受感染性病毒的污染。

所有测试都不可避免地受到病毒定量分析本身的限制，即根据统计原则，能否测到低浓度病毒取决于样本大小。因此，单靠一种方法并不一定能够确定一个产品的安全性。在许多情况下，要确定最终产品没有污染病毒，不能单凭是否能够直接测到病毒而定，还需证明该纯化方法是否能有效的去除或灭活病毒。

在不同生产步骤中应采取的病毒测试方法和病毒清除研究，其类型和程度取决于多种因素，应逐一地进行分析。应考虑的因素包括：细胞库鉴定和检定、所测定病毒的性质、培养基组成、培养方法、设施和设备设计、细胞培养的病毒测试结果、生产工艺清除病毒的能力及产品类型和临床用途。

本文件的目的是为病毒测试、评估病毒清除率的试验和

用于设计病毒测试和病毒清除研究的推荐方法提供一个总的框架。有关资料在各附录中加以说明，所用定义参见所附专用词汇表。

制造商应根据其特定产品及其生产过程调整本文推荐的方案。生产商应对其确保病毒安全的总体方针作出解释并说明其依据。除了提供详细资料外，还应提供一份病毒安全性评估的总结，以帮助和利于管理部门审查。该总结应对病毒安全性研究的各个方面，以及与本文件有关的用于预防病毒污染的方针作一简单陈述。

II.潜在的病毒污染源

生物技术产品的病毒污染可来自细胞系的原始来源或来自生产过程中偶然带入的外源病毒。

A 主细胞库（MCB）可能存在的病毒

细胞的病毒感染可以是隐性的或持久的（如疱疹病毒），或是以内源性逆转录病毒的形式存在。这些病毒的基因组一直存在于细胞内，可从一代细胞直接传给下一代细胞。它们或是以组成型表达，或偶然表达成一种感染性病毒。

病毒可通过多种途径进入 MCB，例如：

- 1) 从受感染动物制备的细胞系；
- 2) 使用病毒建立细胞系；
- 3) 使用受污染的生物试剂如动物血清组分；
- 4) 细胞操作过程中受到的污染。

B 生产过程中可能带入的外源病毒

外源病毒可通过多种途径带入最终产品，其中包括，但不限于以下几点：

- 1) 使用受污染的生物试剂如动物血清组分；
- 2) 用病毒诱导表达编码目的蛋白的特定基因
- 3) 使用受污染的试剂，如单克隆抗体亲和柱 (affinitycolumn)；
- 4) 组方中使用了受污染的赋形剂；
- 5) 细胞和培养基操作过程中的污染。

对细胞培养的参数进行监控有助于早期测出可能污染的外源病毒。

III.细胞系检定：病毒测试

有效的病毒测试方法是确定细胞系是否适用于生物技术产品生产的重要部分。

A 对主细胞库 (MCB)，工作细胞库 (WCB) 及达到体外胞龄细胞进行病毒检测的建议

不同级别细胞 (包括 MCB、WCB 和达到体外胞龄限次细胞) 的病毒测试方法举例 (见表 1)。

1.主细胞库

应对 MCB 进行内源性和非内源性病毒污染的全面筛查。对于含一种或一种以上人或非人灵长目动物配体的异种杂交细胞系，由于这些细胞引起的病毒污染是极其有害的，因

此，应进行人或非人灵长目病毒的测定。

非内源性病毒的测定应包括体内和体外接种试验，并根据该细胞系的传代史进行其他特异性试验，包括相应的物种特异性试验如小鼠抗体产生试验(MAP)，用以测定可能污染的病毒。

2.工作细胞库

作为药物生产起始细胞基质的工作细胞库，必须进行外源病毒检测，既可对 WCB 进行直接测定，也可对从 WCB 来源的体外传代限度内的细胞进行分析。当对 MCB 已进行过相应的非内源性病毒测试，并且对已达到或超过细胞传代限度的 WCB 来源的细胞进行过外源病毒的测试，则不必再对原有的 WCB 作类似的试验。WCB 一般不须作抗体产生试验。另外，不检测 MCB，而对 WCB 进行全面检测来作为替代手段也是可以的。

3.达到体外胞龄限度的细胞

用于生产的体外细胞传代限度应根据在试生产或商业化生产条件下达到或超过设定的体外胞龄限度的生产细胞的数据而定。

一般说来，生产细胞是通过扩增 WCB 获得的，MCB 也可直接用于制备生产细胞。有些内源性病毒可能在 MCB 和 WCB 阶段没有被检测出，应对达到体外胞龄限次的细胞的内源性病毒作出评价。对达到体外胞龄限次细胞至少应进行

一次适当的试验(如体内和体外试验),以进一步确保生产过程未受外源病毒的污染。如果此时测出有外源病毒污染,应对工艺流程作仔细检查以查明污染原因。若有必要,应对工艺全部重新设计。

B 推荐的病毒检测和鉴定的分析方法

对内源病毒和外源病毒的检测方法很多。表 2 列举了一些检测方法。这些方法可作为目前推荐的基本方法,但不包含全部现有方法,也不是固定不变的。由于大部分适用的方法会随科学的发展而变化,因此只要有充分的资料支持,采用其他方法也是可接受的。欢迎生产商与管理部门讨论这些可替代性方法。对个别特殊情况,可能需要作其他试验。应设相应的对照试验,以确保试验具有充分的敏感性和特异性。当细胞的种系提示有较大可能存在某种病毒时,需进行专门试验和/或处理。如供生产用的细胞为人或非人灵长目细胞系,除有可接受理由外,还应进行如引起免疫缺陷性疾病和肝炎的人源病毒测试。聚合酶链式反应(PCR)可用于检测这些人源病毒和其他特殊病毒的核酸序列。生产商应按以下提出的一般框架和理论背景证明其所做工作的合理性。

1. 逆转录病毒测试

对于 MCB 和培养达到或超过胞龄限度的体外细胞,应进行逆转录病毒测试,包括对敏感细胞培养的感染性测定和电镜(EM)检查。如果没有检测到病毒感染,EM 没有发现

逆转录病毒或逆转录病毒样颗粒，应测定逆转录酶 (RT)，或采用其他适当的方法，测定有无非感染性的逆转录病毒。至于转导研究 (induction study)，目前尚未发现对此有何应用价值。

2. 体外检测法

进行体外检测时，应将被测试样品 (见表 2) 接种到多种敏感的细胞培养物中，以确保能较为广泛的检测到人和有关动物的病毒。测试中所用指示细胞需根据待试细胞库的物种来源而定，但必须包括一种对人病毒敏感的人和/或非人灵长目动物细胞系。测试的种类和待测的样本应根据细胞的来源或细胞操作情况中可能存在的病毒类型而定。细胞致病病毒和红细胞吸附病毒应予以检测。

3. 体内检测法

将被测试样品 (见表 2) 接种到哺乳期小鼠和成年小鼠以及鸡胚中，以检测细胞培养物中不能生长的病毒。除以上试验动物物种外，根据细胞系性质和来源，还可使用其他动物物种进行测试。应对受试动物的健康情况进行监测，如有异常应进行调查以确定病因。

4. 抗体产生试验

对于啮齿类动物细胞系中的物种特异性病毒的检测，可将被测试样品 (见表 2) 接种到无病毒动物中去，经一段特定时间后测定其血清抗体水平或酶活性。这种试验包括：

小鼠抗体产生试验 (MAP)、大鼠抗体产生试验 (RAP) 和仓鼠抗体产生试验 (HAP)。目前, 有关用抗体产生试验筛查出的病毒见表 3。

C 细胞系的可接受性

人们认识到, 用于生产的某些细胞系含有内源性逆转录病毒及其他病毒或病毒基因序列。为此, 本文件第 V 节介绍了生产行动计划。对于含有内源性逆转录病毒以外的病毒的细胞系能否用于生产的问题, 应由管理部门根据产品的收益、产品的临床使用用途、污染病毒的性质、感染或致病的潜在可能性、产品的纯化工艺 (如对病毒清除的评价资料) 及对纯品进行病毒测试的程度, 进行利弊分析后综合考虑。

IV. 未加工品的病毒测试

未加工品包括集中回收的一批或多批细胞和培养基。当细胞不易获取 (如使用中空纤维或类似装置) 时, 未加工品是发酵罐中收获的液体。在深加工前, 从生产反应罐中获取的一份代表性未加工品样本最适合于检查病毒污染, 若有污染, 也最有可能被检测出来。因此, 除非部分初加工后的样品对病毒测试更敏感 (如未加工品在细胞培养物中可能有毒性, 而经部分加工后可能就没有毒性了), 否则均应在未加工品阶段进行病毒测试。

在某些情况下, 可对同时含有完整细胞和破碎细胞以及深加工前从反应器中取出的培养上清液的混合物进行测定。

在进行上市注册申请时，至少应上报三批试生产或规模化生产的未加工品的研究资料。

生产商应制定出对各批产品进行外源病毒现场考核的计划。对于未加工品病毒测试的范围、程度和频度应结合以下几点综合考虑后作出决定：用于生产产品的细胞系性质、细胞系检定过程中病毒检测的结果和广泛性、培养方法、原料来源和病毒清除研究结果等。对未加工品，一般使用一种或几种细胞系进行体外筛查试验。如适用，可使用 PCR 试验或其他适当的方法。

一般来说，已测出有外源病毒的未加工品不能再用于生产产品，并应对工艺流程作认真检查，以确定污染原因，以便采取适当措施。

V.对纯化后产品进行病毒清除研究和病毒检测的基本原理和操作方案

病毒测试方案应覆盖 MCB、药品生产的各个阶段直到最终产品产生的整个过程，设计的方案应具有相关性和合理性。其中包括对未加工品病毒清除的评价和鉴定。病毒清除研究和评价的目标是确保产品没有病毒污染。

在选择清除研究用病毒时，首先要明确对已知病毒清除的工艺评价和对用非特异模型病毒（后文叙述）进行的工艺病毒去除验证的评估之间的区别。关于相关模型病毒、特异模型病毒和非特异模型病毒的定义，见术语解释。工艺评估

时需要了解在该工艺过程(如未加工品)有多少病毒量存在,以及清除多少量才能确保产品的安全性。灭活有时效性,了解这一点将有助于确保灭活效果。在对已知污染物的清除能力进行评价时,需对灭活的时效关系进行深入研究,对灭活/清除方法的重现性加以证实,同时还要对工艺参数作出评价。当用非特异模型病毒来考核生产工艺清除病毒的耐用性时,研究设计中应对非包膜病毒予以特别的关注。病毒清除特性研究的限度可能受对细胞系和未加工品的检验结果的影响。这些研究应按以下所述方法进行(第VI节)。

表 4 是举例说明对于细胞和/或未加工品病毒检测结果而采取的行动方案,包括工艺评价、病毒清除鉴定和纯品的病毒试验。行动方案中要考虑到各种情况,其中必须用非特异模型病毒对病毒清除情况进行鉴定。A、B 两种情况是最常见的。被病毒污染的生产系统通常不能用于生产,啮齿类动物逆转录病毒污染除外。如果要将 C、D、E 三种情况的细胞系用于药物生产,要有充分说服力和正当理由,并须与管理机构协商。当使用 C、D、E 情况中细胞系时,须有已经过验证的有效步骤,确保可疑病毒从生产流程中灭活/去除。

情况 A: 细胞或未加工品中未发现病毒、病毒样颗粒或逆转录病毒样颗粒时,应使用上述非特异模型病毒进行病毒消除和病毒灭活研究。

情况 B: 只有啮齿类动物逆转录病毒(或非致病性逆转

录病毒样颗粒，如啮齿 A 型和 R 型颗粒)，应使用特异模型病毒，如鼠白血病病毒，对工艺进行论证。对于纯化后产品，应使用高特异性和高敏感性的方法对所疑病毒进行测定。上市审批时，应提供至少三批试生产规模或生产规模的纯化后产品的检定数据。常用于药物生产的 CHO、C127、BHK 等细胞系和鼠杂交瘤细胞系，尚未有关于产品病毒污染安全问题的报道。对于这些细胞系，由于其内源性颗粒的性质已经全面鉴定，病毒清除问题也已证实，一般无须再检测纯化后产品的非感染性颗粒。使用如情况 A 中所述的非特异模型病毒即可。

情况 C: 已知细胞或未加工品中含有除啮齿类动物逆转录病毒以外的病毒，而这些病毒又无证据证明其对人有感染性[如表 3 脚注 2 中所标明的，除啮齿类动物逆转录病毒（情况 B）以外的病毒]，则病毒消除和灭活的评价研究应使用已鉴定的病毒。如果不能使用已鉴定的病毒，应使用相关模型病毒或特异模型病毒来评估其工艺清除效果是否可被接受。在灭活的关键步骤，应对已鉴定的病毒（或相关模型病毒或特异模型病毒）进行时效性灭活，作为对这些病毒工艺评价的一部分。对于纯化后产品，应用高特异性、高敏感性的方法对所疑病毒进行检测。申请上市时，应提供至少三批试生产规模或生产规模纯化后产品的检定数据。

情况 D: 当检测出已知的人致病原（如表 3 脚注 1 所指

的)时,除特殊情况外,该产品是不能被接受的。在这种情况下,建议用已鉴定的病毒用作病毒去除和灭活评价研究,并使用高特异性、高敏感性的特殊方法对所疑病毒进行检测。如无法使用该病毒,应使用“相关”和/或特异模型病毒(后文叙述)。应证明在工艺纯化和病毒灭活过程中,确已达到去除和灭活所设病毒的目的。应建立病毒灭活效果与灭活时间的关系,并将其作为关键工艺评价的一部分。应使用高特异性、高敏感性的方法对纯化后产品中的所疑病毒进行检测。申请上市时,应提供至少三批试生产规模或生产规模的纯化后产品的检定数据。

情况 E: 在细胞或未加工品中检测到用现有方法无法分类的病毒时,由于这种病毒有可能是致病性的,因此该产品一般不予接受。在极个别的情况下,并有充分说服力和正当理由说明该细胞能用于药物生产时,在进入下一步之前,须与管理机构协商。

VI.病毒清除工艺的评价和鉴定

病毒去除和/或灭活方法的评价和鉴定对生物技术产品的安全性起着重要的作用。在过去,发生的多起污染事例是由于使用了那些未被认为或是从未被怀疑的污染过的原料。尽管这种情况并不发生在从性质完全确定的细胞系提取的生物技术产品,而是发生在从其他原料提取的生物制品中,但是病毒清除评价可使我们确信那些未知的、预想不到和有

害的病毒都有可能被去除。研究必须被详细记录并在受控条件下进行。

病毒清除研究的目的是评价那些被认为可有效灭活/去除病毒的工艺步骤，并定量评估病毒的整体下降水平。具体做法是有目的地将一定量的病毒加入到原料和/或各工艺步骤的抽样样本中去，通过研究在后续工艺步骤样本中的病毒量来确定该工艺步骤对病毒去除/灭活的效果。如果较少几步工艺步骤就能证明其对病毒的清除是充分的，则不必对生产的每一步都作评估和鉴定。应注意的是，生产的其他工艺步骤可能会对已取得的病毒灭活/去除结果产生间接影响。生产商应对病毒清除评价的研究方法的合理性和有效性作出解释和证明。

降低病毒感染性可以通过清除病毒颗粒或灭活病毒的感染性的方法达到。在评定每一生产工艺步骤时，都应说明使病毒失去感染性的可能的机制，即究竟是被去除还是被灭活。对于灭活步骤，应在不同的时间取样并作出灭活曲线（见 VIB5 节）。

病毒清除评价研究的目的是要证实，MCB 中已知存在的病毒被清除了，同时提供一定程度的保证，即那些没有被测到的或能进入生产流程的外源病毒也可被清除。下降因子一般用 \log 表示，其含义是：虽然病毒的残留感染性永远也不可能降至 0，但可以对数级大幅度下降。

除了对已知存在的病毒进行清除研究外，还应对其他病毒的去除了和/或灭活能力进行研究。对于那些目前还不清楚或可能会存在的生化和生物物理特性十分广泛的病毒，研究的目的并不是要达到某一特定的去除或灭活目标，而是要确定生产工艺对病毒去除或灭活的可靠性。应对生产工艺步骤中的病毒去除或灭活能力加以证实（见VIC节）。这种研究并不是要对某一特定安全性风险作出评价，因此，无须求出特定的清除值。

A 用于评价和鉴定病毒清除率的病毒选择

为了测试生产工艺消除病毒的总体能力，供清除评价和工艺鉴定研究用的病毒应与可能污染产品的病毒相似，而且要有广泛的理化特性。生产商应根据评价和鉴定病毒清除率的目的及本指南提及的准则对病毒的选择作出合理解释。

1.“相关”病毒和“模型”病毒

病毒清除研究中的一个主要问题是确定使用何种病毒。这些病毒可分为三类：“相关”病毒、特异“模型”病毒和非特异“模型”病毒。

用于生产过程中评价病毒清除情况的“相关病毒”，可以是已被鉴定的病毒，或是与已知病毒种类相同的病毒，或是可能会污染细胞培养物或污染生产过程中使用的其他试剂或材料的病毒。应确定纯化和/或灭活工艺能消除和/或灭活此种病毒的能力。如果得不到“相关”病毒，或它不太适用于

病毒清除的工艺评价研究（如不能离体培养到足够的滴度），应使用特异“模型”病毒代替。适用的特异“模型”病毒是与已知病毒或可疑病毒密切相关（同种或同属），并与所观察到的或可疑的病毒具有类似理化特性的病毒。

啮齿动物细胞系一般都含内源性逆转录病毒颗粒或逆转录病毒样颗粒，可能具有感染性（C型颗粒），也可能没有感染性（细胞浆A型和R型颗粒）。应确定所用生产工艺具有去除和/或灭活啮齿类动物逆转录病毒的能力，此项工作可使用鼠白血病病毒作为鼠源细胞的特异“模型”病毒。由于已有EB病毒（EBV）永生化的B淋巴细胞用于生产单克隆抗体，因此此时应确定生产工艺能否去除和/或灭活疱疹病毒。伪狂犬病毒也可用作特异“模型”病毒。

当研究目的是确定生产工艺去除和/或灭活病毒的总体能力时，如需要确证病毒清除工艺的稳健性时，应使用具有不同特性的非特异“模型”病毒进行病毒清除特性研究。从“相关”病毒和/或特异“模型”病毒研究中所获取的研究数据也有助于这种评估。一般不需要对所有病毒进行测试，应对那些对理化方法处理具有耐受性的病毒加以关注，因为从这些病毒所获取的结果可为评价生产工艺去除和/或灭活病毒的总体能力提供有用的信息。选用病毒的种类和数量与细胞系质量和特性及生产工艺有关。

附录2和表A-1例举了代表不同物理化学结构的“模型”

病毒以及已用于病毒清除研究的一些病毒。

2.其他问题

其他要考虑的问题如下：

a) 尽管有时不可能，能培养出高滴度的病毒是最理想的。

b) 在每个生产工艺步骤中病毒均应被检测，应该有一种有效和可靠的检测方法，用来检测每种被使用的病毒。

c) 有些病毒可能会对从事清除研究的人员造成健康损害，对此应加以重视。

B 病毒清除评价和鉴定研究的设计和内涵

1.设施和人员

根据 GMP 规定，不能将任何病毒引入生产设施。因此病毒清除研究应在隔离的实验室进行，该实验室应专用于病毒学研究，纯化工艺的缩小模型应由病毒学专家会同生产人员一起设计、制备。

2.缩小规模的生产体系

应对缩小的生产规模的有效性加以证实。缩小的生产规模应尽量接近实际生产水平。色谱设备、柱床高度、线性流速、流速/柱床体积比（即过柱时间）、缓冲液、凝胶型号、pH、温度、蛋白浓度、盐及产品都应代表生产规模水平。应有一个类似的洗脱方案。对于其他生产工艺步骤，亦应有类似考虑。有些偏差是不可避免的，但应重视其对结果的影响。

3.对病毒逐步消除的分析

在进行病毒清除研究时，需要综合评估工艺过程中多个生产工艺步骤消除病毒的总体能力，还要对每个可能参与病毒清除的生产工艺步骤的去除和/或灭活病毒的能力进行分别评估，并认真考虑各个工艺步骤的确切作用。每一工艺步骤的测试样本中应含足够量的病毒，以便对每一工艺步骤阶段的有效性作出适当的评价。一般来说，应将病毒加入到每一步生产工艺中的待测样本中。在有的情况下，只要将高滴度病毒加到未提纯的产品中去，并测定随后各步骤的病毒浓度就可以了。当病毒去除是由纯化分离步骤完成时，如有可能，建议对纯化分离步骤中不同分离部分的病毒量的分布进行调查。当在生产过程中有多个生产工艺步骤使用灭活病毒缓冲液时，也可用替代的方法，如用较弱的灭活病毒缓冲液进行平行试验，作为对生产工艺总体评价的研究组成部分。另外应对每一被测工艺步骤之前和之后的病毒滴度进行测定。感染性定量测定方法应有足够的敏感性和重现性，还要有足够的重复实验以确保结果具有充分的统计学可信度。如有正当理由，也可使用与感染性无关的定量分析。在进行感染性测定时，要有相应的病毒对照组以确保方法的敏感性。如抽样病毒的浓度较低，其统计结果也应该考虑（附录 3）。

4.确定病毒去除还是灭活

降低病毒感染性，可通过去除病毒或灭活病毒的方法实

现。对评定的每一道生产工艺步骤，都应说明其使病毒感染性丧失的机制是灭活还是去除。如生产工艺只清除了很少一部分病毒感染性，由于病毒的清除是保证产品安全性的重要因素，则必须进行专门的或附加的灭活/去除步骤。对某一特定步骤，区别其是去除还是灭活作用是必要的，例如，在逐步清除病毒的工艺步骤中均使用的某种缓冲液可能具有灭活病毒的作用，则此时应分别评价层析工艺步骤的病毒去除能力和层析工艺所用缓冲液灭活病毒的能力。

5.灭活评估

为了对病毒灭活作出评估，应在未加工的粗品或中间品中加入感染性病毒，并计算下降因子。要知道病毒灭活不是一个简单的一级反应，通常比较复杂，包含有快的“一期”反应和慢的“二期”反应。因此，要在不同的时间点取样研究并建立灭活曲线。建议灭活研究除最低作用时间外至少还应设一个大于零和小于最低作用时间的时间点。如果该病毒是一种已知人致病性“相关”病毒，研究工作必须取得更多的数据，并设计出一种有效的灭活工艺。但是，如使用非特异“模型”病毒进行灭活研究，或使用特异“模型”病毒作为病毒颗粒的替代物，如 CHO 细胞浆内逆转录病毒样颗粒，必须至少分别作两次独立的研究来证实清除工艺的可重复性。如可能，应从加入病毒的起始材料中能检测出的病毒量确定病毒的起始量。如果不可行，可根据加入病毒的滴度计算起始病毒

量。如果由于灭活太快，来不及根据工艺条件建立灭活曲线，应进行相应的对照试验以证实病毒经灭活处理已失去感染性。

6.分离柱的功能和再生

纯化系统中的色谱分离柱和其他设备经一段时间反复使用后，其清除病毒的能力会发生变化，因此在使用若干次后，必须估测其清除病毒能力的稳定性后才能再用。在设备再次使用前，必须保证生产设备可能残留的任何病毒都被充分消灭或去除。例如，可通过提供证据证实色谱柱经过清洗和再生过程确实将病毒灭活或清除了。

7.特别注意事项

a) 制备高滴度病毒时应注意避免凝集反应。凝集的病毒更容易被物理方式去除，但同时更难被灭活，因此，与生产实际不相符。

b) 须注意有效分析方法的最低检出病毒量。

c) 应进行平行对照分析研究，以评估样品是否在检测病毒滴度前因稀释、浓缩、过滤或贮存等原因使病毒失去感染性。

d) 加入产品中的病毒量体积要小，从而不会使产品稀释或改变产品的性质。因为，经稀释后，试验蛋白样品已不再与生产规模的产品相同。

e) 诸如缓冲液、培养基或试剂等的微小不同都会影响

病毒的清除效果。

f) 病毒灭活是时间依赖性的。因此，加入病毒的产品在某一缓冲剂中或特定色谱分离柱中停留的时间长短应能反映生产规模的工艺条件。

g) 应分别对缓冲剂和产品评估其毒性或对病毒滴度检测方法的干扰，因为这些因素会对指示细胞产生不良影响。如果溶液对指示细胞有毒性，可能需要进行稀释、调整 pH 值或者将含有加入病毒的缓冲液进行透析。如果产品本身具有抗病毒活性，进行病毒清除研究时，应采用无产品的空白对照试验，即使不加入产品或用无抗病毒活性的相似蛋白替代品进行研究会影响某些生产工序的病毒行为。应包括充分的控制，以论证仅用于准备样品的试验步骤（如，透析、结晶）对去除/灭活病毒的影响。

h) 许多纯化方案中都反复使用相同或相似的缓冲液或分离柱。分析数据时，应考虑这种方法带来的影响。某一特定工艺的消除病毒效果会随所在的生产阶段而有所不同。

i) 当生产条件或缓冲剂具有很强细胞毒性或灭活病毒的作用时，可能会低估总体下降因子，因此需逐例讨论。由于病毒清除研究本身的局限性或因设计不够完善，也会高估总体下降因子。

C.病毒清除研究的说明

可接受性

评估病毒灭活/去除的目的是对各工艺步骤作出评价和鉴定，了解其对灭活/去除病毒是否有效，并对生产过程中病毒下降的总体水平进行定量分析。就 B-E 所述的病毒污染而言，不仅要证明病毒已被消除或灭活，而且还要证明纯化工工艺具有足够能力将病毒清除，从而确保终产品具有相当的安全性。生产过程中所消除或灭活的病毒量应与收获液中可能存在的病毒量相比较。

为了进行这种比较，必须对收获液中的病毒总量作出估计。方法可采用检测感染性或其他诸如电透镜（TEM）的方法。整个纯化工工艺消除病毒的能力应比收获液的同等单剂量中的估计量更多。病毒下降因子计算见附录 4；每个剂量颗粒的估算见附录 5。

生产商应认识到，不同种类的病毒，其清除机制有可能不同。当判断病毒灭活/去除过程的效果时，应综合考虑以下各种因素：

- 1) 所用测试病毒是否合适；
- 2) 清除研究的设计；
- 3) 所获得的 log 下降值；
- 4) 灭活的时效问题；
- 5) 工艺参数变化对病毒灭活/去除的潜在影响；
- 6) 测定方法灵敏度范围；
- 7) 灭活/去除方法对某些种类病毒可能具有的选择性。

以下任何一种方法都能实现有效清除：多步灭活法，多步互补分离法，或灭活与分离结合法。由于分离法对病毒的物理化学特性具有很强的依赖性，它会影响病毒与凝胶基质的相互作用和病毒的沉淀特性，因此"模型"病毒可用与靶病毒不同的方法进行分离。应充分确定影响分离的生产参数并加以控制。表面特性的变化，如糖基化，也是差异的来源。但是尽管存在这些潜在的可变因素，仍可采用将几种互补分离过程结合的步骤或将灭活与分离相结合的步骤达到有效去除病毒目的。因此，像色谱层析分离、过滤步骤和提取，只要控制条件并完善设计，都是有效去除病毒的步骤。一种去除病毒的步骤其降低病毒量的能力，应至少分别由两次独立的研究加以重复才能证明是有效的。

总体下降因子一般以各因子之和来表示。除另有合理解释，病毒滴度下降在 $1 \log_{10}$ 或以下可忽略不计。

如所用生产工艺去除病毒感染性的能力较低，而病毒去除对于产品安全又是一个重要因素，则应另外增加一次或多次有针对性的灭活/去除步骤。生产商应对所有病毒下降因子的合理性作出说明，并将根据以上所列因子对结果作出评价。

D.病毒清除研究的局限性

病毒清除研究有助于保证最终产品达到可接受的安全水平，但其本身并不能完全安全可靠。这是由于病毒清除研究设计和执行过程中的许多因素会使对生产工艺清除病毒

感染的能力作出不正确的估计，其中包括如下因素：

1.用于某一生产工艺病毒清除研究的病毒制品可能是在组织培养中生产的。组织培养的病毒在某一生产工艺步骤中表现的特性可能与天然病毒的特性有所不同。例如，天然病毒与培养病毒的纯度和凝集度是不同的。

2.病毒感染性的灭活常是一条双相曲线：先有一个快速起始阶段，接着是一个较慢的阶段。这就可能使最初灭活阶段逃逸的病毒对以后各阶段具有更强的耐受性。如具有耐受性的那一部分病毒以病毒凝集物的形式出现，则其感染性可能对许多不同的化学处理及热处理都产生耐受性。

3.生产工艺对病毒感染性的总体去除能力是以每一工艺步骤病毒下降 \log 值之和表示的。将各步骤的下降因子相加，尤其是将下降较少（如低于 $1 \log_{10}$ ）阶段的因子相加，可能会对去除病毒的实际能力估计过高。此外，除非有合理的理由，否则亦不能将重复相同或几乎相同的方法所获得的下降值包含在其中。

4.下降因子用 \log 滴度来表示，说明尽管残留的病毒感染性可能已大大降低，但是决不会降至 0。例如，当每毫升含 $8 \log_{10}$ 感染单位的试样 \log 滴度下降至每毫升 $0 \log_{10}$ 或是每毫升一个感染单位，下降因子为 $8 \log_{10}$ ，但此时应考虑测定方法的检测范围是否符合要求。

5.尽管缩小生产规模设计时慎之又慎，但试生产工艺总

是与商业化生产工艺有所不同。

6.生产工艺中具有相似灭活机制步骤的病毒下降因子的相加会对工艺整体清除病毒能力产生过高估计。

E.统计

病毒清除研究结果评估时应引入统计学分析。研究结果应具有统计学意义才能支持所得出的结论（见附录3）。

F.病毒清除的再评价

当生产或纯化工艺发生重大变化时，要考虑这种变化对病毒清除直接和间接的影响，必要时应对该工艺进行再评价。例如，生产工艺的变化会使细胞系产生的病毒数量发生明显变化；生产步骤的变化也可能会改变病毒清除的程度。

VII.小结

本文件就病毒污染风险的评价方法及产品的病毒去除方法提出建议，从而有助于从动物或人细胞系生产出安全的生物技术产品，同时强调了以下一些措施的价值：

A.要对细胞基质原材料进行全面定性和筛查研究，以明确存在哪些病毒污染物。

B.通过确定污染物对人组织细胞的易感性，对风险程度作出评价。

C.制定一项测试未加工品中外源病毒的计划。

D.为获得最佳病毒清除效果，对病毒清除研究应进行仔细设计，在同一生产过程中使用不同的病毒灭活或去除方法。

E.病毒灭活和去除评价研究的性能。

VIII.术语

外源病毒：见病毒。

细胞基质：用于制造产品的细胞。

内源病毒：见病毒。

灭活：用化学或物理的方法使病毒感染性降低。

体外胞龄（细胞年龄）：指细胞在体外培养过程中，从 MCB 复苏开始到生产反应器收获时所经历的时间。可以采用细胞群体倍增水平或细胞传代水平表示。若以细胞传代水平表示，其传代培养程序应已预先预定。

主细胞库（MCB）：一般是在规定条件下从经选择的细胞克隆中制备的细胞单批合并物，等量分置于多个容器中并在特定条件下存放。MCB 是用作制备工作细胞库（WCB）的。检测一个新 MCB（来自原细胞克隆、MCB 或 WCB）时，除非有正当理由，一般其检测方法应与检测该 MCB 的方法相同。

最低作用时间：一个处理步骤所保持的最短时间。

非内源病毒：见病毒。

病毒清除工艺鉴定：用非特异“模型”病毒评价生产过程去除和/或灭活病毒可靠性的研究。

病毒清除方法评价研究：用“相关”和/或特异“模型”病毒确定生产工艺去除和/或灭活病毒效果的研究。

生产用细胞：用于制造产品的细胞基质。

未加工品：一次或多次回收后集中起来的细胞和培养基。当细胞不能直接获得时，未加工品是从发酵罐中回收的液体。

病毒：在细胞内复制的可致病的感染性因子，只有一种核酸（RNA 或 DNA），不能以其遗传物质形式生长、双数分裂和繁殖。

外源病毒：非故意引入的污染病毒。

内源病毒：其基因组是宿主细胞起源物种的一部分，并整合到动物基因组中的一类病毒体。在本文件中，为无限繁殖细胞基质而故意引入的非整合病毒如 EBV 及牛乳头瘤病毒（BPV）属于这一类病毒。

非内源病毒：MCB 中存在的外源病毒。

非特异模型病毒：用来为生产工艺清除病毒能力定性的病毒，其目的是对生产过程去除和/或灭活病毒的总体能力进行定性，即确定纯化工艺的效能。

相关病毒：用于工艺评价研究用的病毒，可以是已经鉴定的病毒或是已知病毒的同一种类，或是生产过程中使用的任何易污染细胞培养物或其他生产用材料、试剂的病毒。

特异模型病毒：与已知或可疑病毒密切相关（同种或同属）的病毒，与所见或所疑病毒具有类似的物理化学特性。

病毒清除：通过将病毒颗粒去除或将病毒感染性灭活的方法消除靶病毒。

病毒样颗粒：在电镜下可见、形态与已知病毒相似的某种结构。

病毒去除：用物理方法将病毒颗粒从产品中分离。

工作细胞库（WCB）：在规定培养条件下扩增 MCB 获得匀质的细胞悬液，并经分装成多个等份制备而成。

表 1：不同级别细胞进行的病毒测试方法

	MCB	WCB ^a	代次限制细胞 ^b
逆转录病毒和其他内源病毒的检测			
感染力	+	-	+
电镜 ^c	+ ^c	-	+ ^c
逆转录酶 ^d	+ ^d	-	+ ^d
其他特异病毒试验 ^e	如使用 ^e	-	如使用 ^e
非内源性或外源病毒测试			
体外测定	+	- ^f	+
体内测定	+	- ^f	+
抗体产生检测 ^g	+ ^g	-	-
其他特异病毒试验 ^h	+ ^h	-	-

a. 见正文-III.A.2。

b. 达到限传代次的细胞：在体外达到传代限度的生产细胞（见正文-III.A.3）。

c. 也可测定其他因子。

d. 若逆转录病毒感染试验为阳性，则无须检测。

e. 指使用于已受此因子感染的细胞系。

f. 对第一个 WCB，此测试应在该 WCB 产生的达到体外限传代次细胞上进行；以后的 WCB，可直接在 WCB 上进行单项体外和体内测试，或在达到体外限传代次的细胞上测试。

g. 例如，MAP、RAP、HAP-通常适用于啮齿细胞系。

h. 例如，适用于人、非人灵长目或其他细胞的测试方法。

表 2：用于病毒检测的测定方法的应用与局限性举例

检测项目	检测对象	检测能力	检测局限性
抗体生产	细胞裂解物和其培养基	特异病毒抗原	对动物测试系统抗原没有感染性
体内病毒筛查	细胞裂解物和其培养基	对人有致病作用的各种病毒	在测试系统中不复制或不致病的病毒
体外病毒筛查: 1. 细胞库鉴定 2. 生产筛查	1. 细胞裂解物和其培养基 (共培养时, 测试样品中的细胞应是完整的细胞) 2. 从生物反应器中回收的收获液或细胞裂解物和其培养基	对人有致病作用的各种病毒	在测试系统中不复制或不致病的病毒
TEM 检测: 1. 细胞培养物 2. 细胞培养上清	1. 活细胞 2. 无细胞培养上清	病毒或病毒样颗粒	通过鉴别进行定性分析
逆转录酶 (RT)	无细胞培养上清	逆转录病毒和已表达的逆转录病毒 RT	只能测定在理想条件下具有最佳活性的酶。由于有细胞中酶的存在, 或浓缩样品的本底干扰, 很难得出结论。
逆转录病毒 (RV) 感染力	无细胞培养上清	感染性逆转录病毒	RV 在所选测试系统中不能复制或形成分散疫源或菌斑
共培养 1. 感染终点 2. TEM 终点 3. RT 终点	活细胞	感染性逆转录病毒	RV 不能复制 1. 见 RV 感染栏 2. 见 TEM ^a 栏 3. 见 RT 栏
PCR (聚合酶链反应)	细胞、培养液和其他材料	特异病毒序列	必须有引物序列。不能说明病毒是否有感染性。

a 此外, 很难将测试样品与指示细胞区分。

表 3：可通过抗体产生试验检测的病毒

小鼠	大鼠	仓鼠
脱脚病病毒 ^{2,3}	淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 ^{1,3}	汉坦（Hantaan）病毒 ^{1,3}
汉坦病毒 ^{1,3}	小鼠肺炎病毒（PVM） ^{2,3}	基尔汉姆（Kilham）大鼠病毒（KRV） ^{2,3}
K 病毒 ²	呼肠病毒 3 型（Reo3） ^{1,3}	小鼠脑脊髓炎病毒（泰累尔，GDV II） ²
乳酸脱氢酶病毒（LDM） ^{1,3}	仙台（Sendai）病毒 ^{1,3}	小鼠肺炎病毒（PVM） ^{2,3}
淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒（ICM） ^{1,3}	SV5	大鼠冠状病毒（RCV） ²
小鼠细小病毒 ^{2,3}		呼肠病毒 3 型（Reo3） ^{1,3}
小鼠腺病毒（MAV） ^{2,3}		仙台（Sendai）病毒 ^{1,3}
小鼠巨细胞病毒（MCMV） ^{2,3}		巨唾液腺炎病毒（SDAV） ²
小鼠脑脊髓炎病毒（泰累尔，GDV II） ²		图兰（Toolm）病毒 ^{2,3}
小鼠肝炎病毒（MHV） ²		
小鼠小轮状病毒（EDIM） ^{2,3}		
小鼠肺炎病毒（PVM） ^{2,3}		
多瘤病毒 ²		
呼肠病毒 3 型（Reo3） ^{1,3}		
仙台（Sendai）病毒 ^{1,3}		
胸腺病毒 ²		

1. 有证据表明能感染人和灵长目动物的病毒
2. 无证据表明能感染人的病毒
3. 能在体外细胞中进行复制的来源于人或灵长目动物的病毒

表 4：纯化原液的病毒清除过程评估和病毒检测方案

	情况 A	情况 B	情况 C ²	情况 D ²	情况 E ²
状态					
有病毒 ¹	-	-	+	+	(+) ³
病毒样颗粒	-	-	-	-	(+) ³
逆转录病毒样颗粒 ¹	-	+	-	-	(+) ³
已鉴定病毒	不适用	+	+	+	-
对人致病病毒	不适用	- ⁴	- ⁴	+	未知
行动					
用非特异“模型”病毒对病毒清除进行工艺鉴定	是 ⁵	是 ⁵	是 ⁵	是 ⁵	是 ⁷
用“相关”或特异模型病毒对清除病毒工艺进行评价	不	是 ⁶	是 ⁶	是 ⁶	是 ⁷
测试纯品中的病毒	不适用	是 ⁸	是 ⁸	是 ⁸	是 ⁸

1. 细胞基质和/或未加工原液水平的病毒检测结果。通常情况下，不允许用于生产的细胞培养体系受到病毒污染。若存在内源性病毒（如逆转录病毒）或作为 MCB 组成部分的病毒，在进行充分的病毒清除能力评估后是可能被接受的。
2. 当起始原材料受到病毒污染时，无论其是否属于已知能够在人体中传染和/或致病的病毒，将只能在极个别情况下才能被允许使用。
3. 已通过直接或间接方法观察到过的病毒。
4. 确认对人体不具有致病性。
5. 应使用非特异性的模式病毒完成典型条件下的病毒清除。
6. 应使用相关病毒或特异性病毒完成工艺步骤评估。
7. 见正文中情况 E。
8. 应对可能存在的病毒使用具有高特异性和高敏感性的方法进行检测，并确证纯化后产品中无可检测的病毒。当进行上市申请时，应至少提供三批次中试生产或商业化生产规模的原液纯化制造数据。对于像 CHO 这类内源性颗粒已充分鉴定且已经证明能够被有效清除的细胞系，通常不需要再对纯化后产品进行非感染性颗粒的检测。

附录 1 已表征细胞库经体内培养表达的产品

对于经由接种了特定细胞库的动物身上所提取的液体制成的产品，应提供关于该动物的所需信息。

用于制造生物技术产品及生物制品的动物应尽可能地从种类明确而又无物种特异病原体的动物群中选择。此外，应对表 3 所列的有关病毒进行充分地检测。应提供对于新进动物和已患病动物的检疫隔离程序说明，并确保相应设备能够有效的通过抑制、清洁和去污染的方法控制外源因子的传播。这可能需要相应的警戒程序辅助完成，其中应包括一份待检测外源因子清单。兽医应能于现场或就近提供支持服务。应说明动物饲养场与其他生产设备隔离的情况。操作人员应经过充分的训练以保证其安全。

应充分说明动物饲养的程序，其中应包括饮食、清洁、喂养计划、兽医的定期检查条例（若适用）、动物接种后可能需要的特殊处理的细节，同时要对动物的接种方案、接种物的准备、接种部位及接种途径加以说明。

从动物体中获得的原始收集材料可以被视为一般生产步骤中从生物反应器中所获得的未加工品。因此，应完成在第四章所列出的所有检测项目。此外，生产商应对未加工收获液的生物负荷作出评价，确定该材料是否有支原体，同时对成年和哺乳期小鼠进行物种特异性检测及体内测试。

附录 2 病毒清除研究中病毒的选择

A. 有效的模式病毒举例

1.代表一定物理化学结构的非特异模式病毒

-SV40 (多瘤病毒 1)、人脊髓灰质炎病毒 1 (赛宾株)、动物细小病毒或其他一些小的非包膜病毒

-副流感病毒或流感病毒、辛德比斯 (Sindbis) 病毒或其他一些中到大型包膜 RNA 病毒

-疱疹病毒 (如单纯疱疹病毒或伪狂犬病毒) 或其他一些中到大型 DNA 病毒

以上病毒均为示例, 不强制使用上述病毒完成病毒清除研究。

2.对于啮齿动物细胞培养物, 小鼠逆转录病毒常用作特异模式病毒。

B. 已应用于病毒清除研究的病毒举例

表 A-1 列举了已用于病毒清除研究的病毒。但是, 由于其仅仅是示例, 其中任何病毒的使用均无强制性规定, 鼓励生产商考虑其他病毒种类, 特别是是对他们自身生产工艺更适合的病毒。一般说来, 应至少使用三种不同特性的病毒对工艺的清除病毒能力进行评价。

表 A-1：用于病毒清除研究的病毒举例

病毒	科	属	天然宿主	基因组	包膜	大小 (nm)	形状	耐受性*
小囊状口腔	弹状病毒	水泡性病毒	马牛	RNA	有	70×150	子弹状	低
副流感病毒	无孔属	副粘液病毒	多种	RNA	有	100~200+	多形/圆形	低
鼠白血病病毒	逆转录	C型肿瘤病毒	小鼠	RNA	有	80~110	圆形	低
辛德比斯病毒	外衣	阿尔法病毒	人	RNA	有	60~70	圆形	低
BVDV	黄热	瘟疫病毒	牛	RNA	有	50~70	多形/圆形	低
假狂犬病毒	疱疹病毒		猪	DNA	有	120~200	圆形	中
I型脊髓灰质炎病毒	微小 RNA 病毒	肠道病毒	人	RNA	无	25~30	二十面体	中
脑心肌炎病毒 (EMC)	微小 RNA 病毒	心病毒	小鼠	RNA	无	25~30	二十面体	中
3型呼肠孤病毒	呼肠	正呼肠病毒	各种	RNA	无	60~80	圆形	中
SV40	乳多孔	多瘤病毒	猴	DNA	无	40~50	二十面体	很高
细小病毒 (犬、猪)	细小	细小病毒	犬、猪	DNA	无	18~24	二十面体	很高

*指生产工艺研究中，对物理化学处理具有的耐受性。耐受性与特定的处理有关，只有在了解病毒生物学特性和生产工艺性质情况下才能使用。实际结果会随着处理情况而变化。以上只是一些病毒的举例，并不强制使用。

附录 3 评定病毒检测结果的统计学考虑

所有生物学测定方法在测定病毒滴度时都会碰到变异的问题。应对病毒滴度的准确性、从中获得的下降因子的可行性以及检测方法的有效性进行评价，从而确定研究的可靠性。统计学评估的目的是确认病毒清除研究工作是在病毒学可接受水平上进行的。

1.测定方法可以是定性的或是定量的。定性方法包括动物感染性测定或组织培养感染剂量（TCID）测定，该法是按动物或细胞培养感染与否来记分。然后根据感染动物比例或培养物感染的比例测定感染滴度。用定量测定时，所测定的感染性随病毒的不断加入而变化。定量法包括空斑测定，即计算每一感染单位的相应空斑。无论是定性还是定量法测定，都应服从统计学处理原则。

2.变异可来自稀释误差、统计效应和测定方法系统中未知的或难以控制的误差。多次检测结果间的变异（试验间变异）将大于同一次检测结果的变异（试验内变异）。

3.试验内变异的 95%可信限一般应在均值 $\pm 0.5\log_{10}$ 范围内。试验内变异可用教科书上的标准方法进行分析。试验间变异可引入参考品进行监测，其效价的估计值应在实验室平均估计值的 $0.5\log_{10}$ 左右。如有正当理由，低于次精密度的测试结果也是可行的。

4.只要可能，在进行“相关”和特异“模型”病毒清除研究

时，应计算所观察到的下降因子的 95%可信限。如果起始材料病毒测定的 95%可信限是+s，此后的材料病毒测定 95%可信限是+a，下降因子的 95%可信限为：

$$\sqrt{\pm s^2 + a^2} \cdot 1.$$

低浓度时病毒测定的概率

显然，在低病毒浓度时(如每升含 10~1000 个感染颗粒)，几毫升样本中可能含有也可能不含感染颗粒。该样本不含感染颗粒的概率 p 为：

$$p = ((V-v) / V)^n$$

其中 V (升) 是要测试材料的总体积，v (升) 是样本的体积，n 是在 V 中统计分配的感染颗粒绝对数目。

如果 $V \gg v$ ，这一公式可用泊松分布近似计算：

$$p = e^{-cv}$$

其中 c 为每升感染颗粒浓度。

$$\text{或 } c = \ln p / -v$$

举例：如测试样本为 1 毫升，病毒浓度为每升 10~1000 个感染颗粒，则 P 为：

c	10	100	1000
p	0.99	0.90	0.37

这说明，对于每升含 1000 个病毒颗粒浓度的样本，抽样的 37% 中，其 1 毫升样本中不含一个病毒颗粒。

如果只是样本的一部分进行病毒测试，而且结果是阴性，

为获取阳性结果，应对总样本中存在的病毒数量进行计算，这在计算下降因子时，此值应予以考虑。应达到 95%可信限。但是，在某些情况下，由于材料的局限性，这样做可能是不现实的。

附录 4 确定病毒清除率研究中下降因子的计算

单个纯化或灭活步骤的病毒下降因子是指纯化前样本中病毒量与用于下一步工艺纯化后样本中病毒量之比的 \log_{10} 。如使用以下缩写：

起始材料：

体积 v' ；滴度 $10a'$ ；

病毒量： $(v')(10a')$ ，

最终材料：

体积 v'' ；滴度 $10a''$ ；

病毒量： $(v'')(10a'')$ ，

单个下降因子 R_i 按如下公式计算：

$$10^{R_i} = (v')(10a') / (v'')(10a'')$$

这一公式同时考虑了纯化前后样本的滴度和体积。

由于有些病毒滴定本身不精确，用于计算整体下降因子的单个下降因子应大于 1。

整个生产过程的总下降因子是各单个阶段下降因子对数之和。它代表了第一个清除工艺开始时的病毒量与最后一步清除工艺结束时的病毒量之比的对数值。下降因子一般以对数表示，这意味着残留病毒感染力永远不可能为 0，只是对数级大幅度下降了。

附录 5 每剂量颗粒估算方法

这适用于起始数目可以估算的病毒，如内源性逆转录病毒。

举例：

1. 假设

细胞培养回收液中，病毒测得或估计的浓度= 10^6 /ml

计算得病毒清除因子 $\geq 10^{15}$

一个剂量的产品所需的培养回收液体积=1 升 (10^3 ml)

2. 每剂量颗粒的估算

$$\frac{(10^6 \text{ 病毒颗粒/ml}) \times (10^3 \text{ ml/剂量})}{\text{消除因子} > 10^{15}}$$

$$= \frac{10^9 \text{ 病毒颗粒/剂量}}{\text{消除因子} > 10^{15}}$$

$$= < 10^{-6} \text{ 病毒颗粒/剂量}^2$$

$$\text{因此，可以预计每一百万剂量中的病毒颗粒少于一个。}$$