

降纤酶制备中层析工艺对病毒去除能力研究

赵成跟, 张洪波 (昆明龙津药业股份有限公司, 昆明 650503)

摘要 目的: 研究降纤酶制备中层析工艺对脂包膜指示病毒伪狂犬病毒 (PRV) 和水疱性口腔炎病毒 (VSV) 的去除能力, 为该产品的病毒安全性评价提供依据。方法: 用微量滴定法测定层析工艺处理前后各批次样品中PRV和VSV的滴度, 按Karber法计算病毒滴度, 并计算层析处理前后各批次样品中各指示病毒的滴度下降值。结果: 层析填料 (使用 ≥ 108 次) 对PRV的去除效果为4.28 logs, 层析填料 (使用 ≥ 102 次) 对VSV的去除效果为4.72 logs; 未处理对照中, PRV滴度平均下降0.14 logs、VSV滴度平均下降0.32 logs。结论: 降纤酶制备工艺中的层析工艺能有效去除脂包膜指示病毒。

关键词: 降纤酶; 层析工艺; 伪狂犬病毒; 水疱性口腔炎病毒

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)03-0306-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.03.011

Study on the Virus Removal Ability of Chromatographic Process in the Preparation of Defibrase

Zhao Chenggen, Zhang Hongbo (Kunming Longjin Pharmaceutical Co., Ltd., Kunming 650503, China)

Abstract Objective: To study the capabilities of removing lipid-envelope indicator viruses (PRV and VSV) by the chromatography process in the preparation of defibrase in order to lay a basis for the virus safety evaluation of the products. **Methods:** The titers of PRV and VSV in each batch of samples before and after the chromatographic process were measured by microtitration method. The virus titers were calculated with the Karber method, and the titer drop values of each indicator virus (PRV and VSV) in each batch of samples before and after the chromatographic treatment were calculated. **Results:** The removal effect of chromatography packing (used ≥ 108 times) on PRV was 4.28 logs, and the removal effect of chromatography packing (used ≥ 102 times) on VSV was 4.72 logs. The PRV titer in the untreated control has decreased by 0.14 logs and VSV titer has decreased by 0.32 logs on average. **Conclusion:** The chromatographic in the preparation of defibrase can effectively remove the lipid-envelope indicator virus.

Keywords: defibrase; chromatography process; PRV; VSV

降纤酶是由尖吻蝮蛇蛇毒分离纯化得到的一种类凝血酶, 具有抗凝血、溶血栓、抗癌、止血、止痛等功效^[1], 临床上被广泛应用于治疗短暂性脑缺血发作、脑梗死、脑栓塞、不稳定型心绞痛、下肢深静脉栓塞等心脑血管血栓性疾病^[2-3]。

然而蛇毒粗毒成分非常复杂, 除类凝血酶外还

含有神经毒素、细胞毒素、肌肉毒素等多种活性成分^[4], 是该类产品引起出血事件、过敏反应、动脉栓塞等不良事件的主要原因^[5-6]。现行降纤酶质量标准要求降纤酶产品纯度达到SDS-PAGE电泳纯, HPLC测定纯度需大于90%^[7], 而天然蛇毒中的类凝血酶绝大多数为酸性蛋白质, 经典的蛋白质提纯方

法如盐析、热变性、酸碱变性、有机溶剂沉淀、超速离心等,由于专一性差和分辨率不高,不能有效去除病毒类杂质,已很少用于降纤酶的制备。

在降纤酶的实际生产工艺中,采用溶解、离心、多次柱层析、多次浓缩、纳滤的生产工艺制备降纤酶,其中的层析工艺旨在去除蛇毒中的病毒类物质。层析技术,即利用各种组分与固定相亲和力或相互作用的差别,实现各组分的分离。从去除病毒机理上讲,阴离子交换层析是以分析电荷为分离基础,病毒比目的蛋白更紧密地与介质结合,从而去除病毒^[8]。本研究旨在验证降纤酶制备中层析工艺对脂包膜指示病毒伪狂犬病毒(Pseudorabies Virus, PRV)和水疱性口腔炎病毒(Vesicular Stomatitis Virus, VSV)的去除能力,为该产品的病毒安全性评价提供依据。

病毒去除工艺研究中,指示病毒应选择制品可能污染的病毒或理化性质相似的病毒,至少应包括单链和双链的核糖核酸(Ribonucleic Acid, RNA)及脱氧核糖核酸(DeoxyriboNucleic Acid, DNA)、脂包膜和非脂包膜、强和弱抵抗力、大和小颗粒等病毒;至少应包括一种对物理和/或化学有明显抗性的病毒^[9]。参照《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评审一般原则》^[9]和《血液制品去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则》^[10]选择PRV和VSV作为本研究的指示病毒。其中,PRV属脂包膜型双链DNA病毒,直径150~200 nm,中等理化抗性^[11-12];VSV属脂包膜型单链RNA病毒,175 nm×70 nm,低理化抗性^[13]。

1 材料和方法

1.1 缓冲液与样品

缓冲液A(8.20 g无水乙酸钠+11.70 g氯化钠+8.00 g PEG6000,用注射用水定容至4.00 L, pH 5.00±0.05);缓冲液B(8.20 g无水乙酸钠+58.50 g氯化钠+8.00 g PEG6000,用注射用水定容至4.00 L, pH 5.00±0.05),由昆明龙津药业股份有限公司提供。

样品1(批号M1320200529-3、M1320200529-4、M1320200529-6),由昆明龙津药业股份有限公司提供,用于层析工艺步骤PRV病毒去除试验;样品2(批号M1320200529-1、M1320200529-5、M1320200529-7),由昆明龙津药业股份有限公司提供,用于层析工艺步骤VSV病毒去除试验。

1.2 指示病毒及细胞

PRV病毒由苏州良辰生物医药科技有限公司购自国家兽医微生物菌种保藏中心中国兽医药品监察所,并进一步扩增为工作病毒(批号PRV-2019-07);VSV病毒由苏州良辰生物医药科技有限公司购自中国典型培养物保藏中心,并进一步扩增为工作病毒(批号VSV-2020-01)。

ST细胞由苏州良辰生物医药科技有限公司购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,并进一步扩增为工作细胞(批号ST-20190313);Vero细胞由苏州良辰生物医药科技有限公司购自北京中原合聚经贸有限公司,并进一步扩增为工作细胞(批号Vero-20190308)。

1.3 主要仪器

层析柱:GCC50-200阴离子交换柱,填充材料为单分散聚苯乙烯-二乙烯基苯(PS/DVB),柱管内径50 mm、长度20 cm,筛网孔径10 μm、最大耐压 7×10^6 pa,购自利穗科技(苏州)有限公司,层析原理为根据生物分子表面电荷(种类、数目和分布)差异实现对不同生物分子的分离;倒置显微镜(型号CKX53),购自奥林巴斯(中国)有限公司;二氧化碳培养箱(型号IL-185VI),购自施都凯仪器设备(上海)有限公司。

1.4 培养基和血清

MEM培养基(批号AD15805276),购自通用电气医疗系统贸易发展(上海)公司Hyclone细胞培养部;胎牛血清(FBS)(批号20150804),购自兰州民海生物工程有限公司。

1.5 方法

在验证层析工艺步骤去除病毒能力时,选择最大上样量150 mL和较大上样速度 $4 \sim 5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 进行挑战试验。根据样品起始滴度和洗脱产物中病毒的差值来判定层析工艺病毒去除的能力,据此设计了一系列试验组和对照组。

1.5.1 工艺步骤对指示病毒的去除能力

试验组层析柱以 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速运行缓冲液A至系统电导率、UV280 nm基线平衡后,将样品-病毒(50:1, V:V)的染毒样品150 mL以 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速上样至层析柱,设置上样后流穿:将染毒样品150 mL以 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速上样至层析柱。

洗涤1过程:以 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速运行缓冲液

A 150 mL。

洗涤2过程：以 $5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速按缓冲液A-缓冲液B以4:1的体积比运行缓冲液A和缓冲液B共200 mL。

洗脱产物：以 $5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速同时运行缓冲液A和20%~100%梯度的缓冲液B（设置缓冲液B梯度为20%，待仪器切换为20%缓冲液B后，再设置缓冲液B梯度为100%），洗脱至 $A_{280\text{nm}}\leq 40\text{ mAU}$ 。

碱洗过程：以 $5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速运行 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH溶液250 mL。

收集以上各工艺过程全部药液，取样1 mL用MEM培养基10倍稀释过滤后进行病毒滴度测定，用以考察层析不同阶段对指示病毒的去除能力。

1.5.2 对照试验

细胞毒性对照：样品用MEM培养基10倍稀释过滤后接种于指示细胞（指示病毒PRV用ST细胞培养，VSV用Vero细胞培养），观察指示细胞生长状况，用于测定层析前样品对指示细胞的影响。

病毒对照：指示病毒用MEM培养基500倍稀释后过滤，于2~8℃冰箱中静置至层析结束，用MEM培养基10倍稀释后过滤，用于测定稀释后病毒本身的变化情况。

干扰对照：指示病毒用MEM培养基连续10倍梯度稀释，选择 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-4} 3个不同稀释度病毒按病毒-培养基（1:9， $V:V$ ）加入MEM培养基，测定病毒滴度；样品用MEM培养基10倍稀释后，按样品-培养基（9:1， $V:V$ ）分别加入上述3个不同稀释度的病毒溶液，测定病毒滴度，用于测定样品对病毒滴度的影响。

起始滴度对照：B柱浓缩液按样品-病毒（50:1， $V:V$ ）加入指示病毒后用MEM培养基10倍稀释并过滤，用于测定层析前样品的病毒滴度。

未处理对照：B柱浓缩液按样品-病毒（50:1， $V:V$ ）加入指示病毒后用MEM培养基10倍稀释并过滤，于2~8℃冰箱中静置至层析结束，

取样测定病毒滴度，用于测定层析工艺时间内样品本身对指示病毒的影响。

缓冲液对照：缓冲液A、缓冲液B按缓冲液-病毒（50:1， $V:V$ ）加入指示病毒，于2~8℃冰箱中静置，待层析结束后，用MEM培养基10倍稀释后过滤，用于测定层析工艺时间内缓冲液对指示病毒的影响。

细胞阴性对照：指示病毒用相应指示细胞培养后用MEM培养基10倍稀释，观察指示细胞生长状态，用于测定病毒滴度时排除细胞自身的影响。

1.5.3 病毒滴度测定

用微量滴定法^[14]测定层析前后各批次样品、对照中的PRV和VSV的滴度，即以ST细胞作为PRV的指示细胞，以Vero作为VSV的指示细胞，将各取样点试样进行10倍梯度稀释后，取0.1 mL分别接种至上述指示细胞中，并将接种试样后的指示细胞接种于96孔细胞板中，每个稀释度接种8孔，置于37℃、5% CO₂培养箱中培养，倒置显微镜下观察细胞病变；按Karber法^[15-16]计算病毒滴度，以半数细胞感染剂量TCID₅₀的对数值表示，即病毒滴度 $T=\log_{10}\text{TCID}_{50}=L-d(S-0.5)$ ，其中 L =最高稀释度的对数， d =稀释对数之间的差， S =阳性孔比率总和。

根据上样液体积（ V_1 ）、滴度（ T_1 ），工艺处理后体积（ V_2 ）、滴度（ T_2 ），计算工艺处理后病毒滴度下降值： $\text{LRF}=\log_{10}(V_1\times T_1)/(V_2\times T_2)$ 。

2 结果

2.1 试验组

2.1.1 病毒滴度下降值

样品病毒滴度平均下降值：层析填料（使用次数 ≥ 108 次）对PRV的去除效果为4.28 logs，层析填料（使用次数 ≥ 102 次）对VSV的去除效果为4.72 logs，见表1、表2。

表 1 3 批次层析后各组分中 PRV 滴度测定结果 (log₁₀TCID₅₀/0.1 mL)

取样点	3 批次取样点试样滴度平均下降值			PRV 滴度平均下降值	标准差
	M ₁₃ 20200529-3	M ₁₃ 20200529-4	M ₁₃ 20200529-6		
流穿液	≥ 5.33	≥ 5.27	≥ 5.52	≥ 5.37	N/A
洗涤 1 过程	≥ 5.31	≥ 5.27	≥ 5.52	≥ 5.37	N/A
洗涤 2 过程	≥ 5.21	≥ 5.15	≥ 5.40	≥ 5.25	N/A
洗脱产物	4.28	4.38	4.50	4.39	0.11
碱洗过程	4.59	4.82	4.90	4.77	0.16

注: N/A 表示不适用。

表 2 层析工艺去除样品中 VSV 滴度测定结果 (log₁₀TCID₅₀/0.1 mL)

取样点	3 批次各取样点试样滴度平均下降值			VSV 滴度平均下降值	标准差
	M ₁₃ 20200529-1	M ₁₃ 20200529-5	M ₁₃ 20200529-7		
流穿液	≥ 5.83	≥ 5.71	≥ 5.71	≥ 5.75	N/A
洗涤 1 过程	≥ 5.83	≥ 5.71	≥ 5.71	≥ 5.75	N/A
洗涤 2 过程	≥ 5.71	≥ 5.59	≥ 5.59	≥ 5.63	N/A
洗脱产物	4.85	4.72	4.92	4.83	0.11
碱洗过程	4.81	4.86	4.58	4.75	0.15

注: N/A 表示不适用。

2.1.2 病毒去除动力学

经层析工艺处理后, 3 批次样品中 PRV、VSV

滴度均呈下降趋势, 试验数据接近, 重现性良好, 见图 1、图 2。

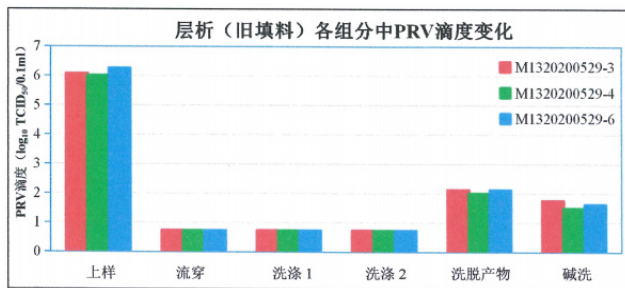


图 1 层析各组分中 PRV 分布情况

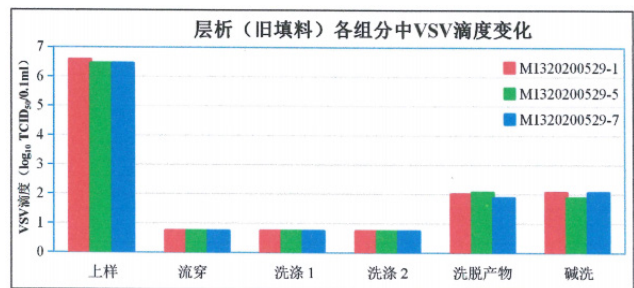


图 2 层析各组分中 VSV 分布情况

2.2 对照组

2.2.1 细胞毒性试验

ST 细胞和 Vero 细胞生长状态无异常, 即层析

前样品 10 倍 MEM 培养基稀释度对指示细胞生长均无影响, 见表 3 及图 3、图 4。

表 3 不同稀释度样品对指示病毒的影响 ($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/0.1\text{ mL}$)

样品类型及稀释度	病毒滴度		病毒滴度差
	PRV	VSV	
MEM 培养基 +10 ⁻¹ 病毒	5.90 ± 0.12	6.31 ± 0.13	N/A
样品 10 倍 MEM 培养基稀释后 +10 ⁻¹ 病毒	5.89 ± 0.21	6.44 ± 0.13	< 0.5
MEM 培养基 +10 ⁻² 病毒	4.79 ± 0.20	5.10 ± 0.17	N/A
样品 10 倍 MEM 培养基稀释后 +10 ⁻² 病毒	4.65 ± 0.18	5.23 ± 0.19	< 0.5
MEM 培养基 +10 ⁻⁴ 病毒	3.00 ± 0.11	3.50 ± 0.14	N/A
样品 10 倍 MEM 培养基稀释后 +10 ⁻⁴ 病毒	2.81 ± 0.19	3.31 ± 0.19	< 0.5



a. 正常 ST 细胞 (100×) ; b. 层析前接种样品后正常 ST 细胞 (10×) ;
c. 层析步骤 PRV 感染后病变 ST 细胞 (100×) 。

图 3 ST 细胞



a. 正常 Vero 细胞 (100×) ; b. 层析前接种样品后正常 Vero 细胞 (10×) ;
c. 层析步骤 VSV 感染后病变 Vero 细胞 (100×) 。

图 4 Vero 细胞

2.2.2 病毒试验

PRV 病毒滴度平均下降值为 0.19 logs, VSV 病毒滴度平均下降值为 0.27 logs, 表明相同工艺时间内指示病毒的滴度不会发生改变。

2.2.3 干扰试验

病毒在样品中的滴度与在 MEM 培养基中的滴

度差均 < 0.5 logs, 即培养基 10 倍稀释的层析前样品对指示病毒均无影响。

2.2.4 未处理试验

3 批样品中的 PRV 滴度平均下降 0.14 logs、VSV 滴度平均下降 0.32 logs, 表明相同工艺时间内样品本身对指示病毒 PRV 和病毒 VSV 均没有灭活

作用。

2.2.5 缓冲液试验

3 批缓冲液 A 的 PRV 滴度平均下降 0.44 logs, 3 批缓冲液中的 VSV 滴度平均下降 0.25 logs; 3 批缓冲液 B 的 PRV 滴度平均下降 0.06 logs, VSV 滴度平均下降 0.12 logs, 表明相同工艺时间内缓冲液 A 液和 B 液对指示病毒 PRV 和病毒 VSV 均没有灭活作用。

2.2.6 细胞阴性试验

PRV 病毒用 ST 细胞培养后用 MEM 培养基 10 倍稀释, VSV 病毒用 Vero 细胞培养后用 MEM 培养基 10 倍稀释, 指示细胞生长良好, 即培养基对指示细胞无毒性。

3 讨论

阴离子交换层析是根据病毒与降纤酶物理、化学性质差异, 分子结构和大小不同, 病毒和降纤酶与固定相以离子键相结合, 离子键的数量决定病毒和降纤酶与固定相结合的能力, 离子键越多结合力越强, 在不同离子强度的洗脱液洗脱下, 病毒和降纤酶先后被洗脱出来, 从而去除降纤酶中的病毒^[17-18]。

本研究所用的层析柱、工艺流程与实际生产工艺保持一致, 最大上样量 150 mL (实际工艺上样量为 50~150 mL) 和较大上样速度 4~5 mL·min⁻¹ (实际工艺上样速度为 3~5 mL·min⁻¹) 进行挑战试验, 即验证试验工艺流程和工艺参数包含所有实际生产工艺流程和工艺参数; 若在该挑战试验参数下层析工艺能去除降纤酶中的指示病毒, 则说明在实际生产工艺参数下该层析工艺能有效去除病毒。

细胞毒性试验显示, 降纤酶 10 倍稀释度对 Vero 细胞和 ST 细胞生长均无影响, 因此, 柱层析步骤指示病毒 PRV 和 VSV 的滴度最低检测限度为 1.0 logs; 未处理对照组结果表明, 降纤酶本身对指示病毒 PRV 和 VSV 没有灭活作用; 柱层析结束后的降纤酶总洗脱液取样稀释后, 层析填料 (使用次数 ≥ 108 次) 对 PRV 的去除效果为 4.28 logs, 层析填料 (使用次数 ≥ 102 次) 对 VSV 的去除效果为 4.72 logs。《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评审一般原则》^[10] 中规定“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;” “一般将病毒感染性滴度减

少 ≥ 4 logs 的处理步骤认可为有效的病毒去除 / 灭活工艺步骤”。《血液制品去除 / 灭活病毒技术方法及验证指导原则》^[9] 中规定“病毒降低量 (log₁₀) ≥ 4 logs, 表示该步骤去除 / 灭活病毒有效”, 表明柱层析工艺能有效去除样品中的指示病毒 PRV 和 VSV。

本次研究的层析工艺步骤重复性好, 试验数据和结果稳定, 表明该层析工艺是一个有效的去除脂包膜指示病毒 (PRV 和 VSV) 的工艺步骤。

参考文献:

- [1] 安慧艳, 岳梅林, 赵小龙. 降纤酶的药理作用及其研究进展 [J]. 中国药房, 2005, 16 (19): 1504-1505.
- [2] 陈艳坤, 刘诗翔. 蛇毒降纤酶的研究进展 [J]. 西南国防医药, 2012, 22 (2): 223-225.
- [3] 李炎, 林涛, 王叔桥, 等. 降纤酶质量研究 [J]. 中国药师, 2015, 18 (10): 1695-1700.
- [4] 罗晓清, 杨化新, 金少鸿. 降纤酶研究进展 [J]. 中国药事, 2008, 22 (11): 1008-1013.
- [5] 肖纲, 刘俊琦, 夏雨, 等. 湖南永州尖吻蝾蛇毒的蛋白组分及毒性分析 [J]. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 2019, 45 (5): 541-547.
- [6] 蕾茹, 严楠, 江小青, 等. 降纤酶不良反应文献分析 [J]. 长江大学学报 (自然版), 2013, 10 (3): 81-83.
- [7] 国家药品监督管理局. WS1-XG-031-2000 国家药品标准 [S]. 2000.
- [8] 王淑箐, 付瑞, 巩薇, 等. 重组融合蛋白柱层析病毒去除工艺的验证 [J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27 (2): 241-244.
- [9] 国家食品药品监督管理局. 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评审一般原则 [EB/OL]. (2005-07-18) [2021-06-22]. <http://www.cde.org.cn/dzkw.do?method=largePage&id=285>.
- [10] 国家食品药品监督管理局. 国药监 [2002]160 号 血液制品去除 / 灭活病毒技术方法及验证指导原则 [EB/OL]. (2002-05-09) [2021-06-22]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0058/9330.html>.
- [11] 向敏, 夏瑜, 王定发, 等. 猪伪狂犬病最新研究进展 [J]. 湖北农业科学, 2020, 59 (23): 20-23.
- [12] 梁祺英, 王世坤, 司红彬. 猪伪狂犬病病毒的研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学, 2017, 38 (9): 106-109.
- [13] 孙洪正, 徐自忠, 周晓黎, 等. 水疱性口腔炎研究

- 进展[J]. 动物医学进展, 2007, 28(10): 72-76.
- [14] 张航, 吴强, 黄琰, 等. 静注巨细胞病毒免疫球蛋白生产工艺中人巨细胞病毒灭活/去除效果研究[J]. 中国输血杂志, 2020, 33(10): 1043-1046.
- [15] 王聪, 李秀, 牛苗, 等. 基于TCID₅₀检测AAV9载体制品感染性滴度的方法[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(10): 28-32.
- [16] 杨倩, 宋战昀, 张旭光, 等. 羧甲基壳聚糖病毒灭活/去除工艺验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(5): 533-537.
- [17] 张辉, 冯亚莉. 重组乙肝疫苗柱层析去除病毒能力验证[J]. 河北企业, 2016, 3(1): 122-123.
- [18] 杨春晖, 容新宗. 病毒灭活技术即产业发展报告[J]. 中国医药生物技术, 2020, 15(4): 440-448.

(收稿日期 2021年10月11日 编辑 郑丽娥)