

· 论著 ·

人凝血因子Ⅷ血液制品中的病毒灭活与验证

闫晨¹, 熊可强¹, 王文姬¹, 李玲² (1. 上海新兴医药股份有限公司, 上海 200135; 2. 上海卡乐康包衣技术有限公司, 上海 201206)

[摘要] 目的 研究人凝血因子Ⅷ制备过程中S/D病毒灭活法和80℃、72 h干热灭活法的病毒灭活工艺的灭活效果。方法 经过S/D法及80℃、72 h干热法双重处理灭活病毒,并通过加入指示病毒(PRV、Sindbis、HIV、EMCV、PPV)验证病毒灭活效果。结果 上述工艺可有效灭活脂包膜和非脂包膜病毒。最终制品中TNBP残余量小于1/10万(10 ppm)、吐温-80(Tween-80)残余量小于1/万(100 ppm),符合安全标准,人凝血因子Ⅷ的生物活性及其他各项指标未发现明显变化。结论 可以作为人凝血因子Ⅷ实验过程中的病毒灭活方法。

[关键词] 人凝血因子Ⅷ;病毒灭活;S/D处理;干热处理

[中图分类号] R973.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)03-0199-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.03.009

Inactivation and validation of virus in blood products of human coagulation factor VIII

YAN Chen¹, XIONG Keqiang¹, WANG Wenji¹, LI Ling² (1. Shanghai Xinxing Medical Company Limited, Shanghai 200135, China; 2. Shanghai Colorcon Coating Technology Limited, Shanghai 201206, China)

[Abstract] **Objective** To study effect of virus inactivation/removal treated by solvent/detergent method and dry heating at 80℃, 72 h for inactivation in human coagulation factor VIII. **Methods** Human coagulation factor VIII extracted from healthy human plasma were treated by solvent/detergent method and dry heating at 80℃, 72 h for inactivation. The virus inactivation effect was validated by adding the indicator virus (PRV, Sindbis, HIV, EMCV, PPV). **Results** The methods could effectively inactivate lipid-enveloped and non lipid-enveloped viruses which could be used for virus inactivation/removal during human coagulation factor VIII experiments, the residual amount of TNBP in production was less than one percent ten thousand (10 ppm), the residual Tween-80 concentration was less than one percent hundred thousand (100 ppm), which all met the safety standards. **Conclusion** and no significant change was observed in the activation and other indicators of human coagulation factor VIII.

[Key words] human coagulation factor VIII; virus inactivation; solvent/detergent treatment; dry heating

人凝血因子Ⅷ又称抗血友病球蛋白,是体内内源性凝血系统的重要成分之一。因子Ⅷ主要在肝脏中生成,但在其他一些组织,如血管内皮细胞中也能合成。它是单糖蛋白,相对分子质量(M_r)为320 000,含2 332个氨基酸残基,因子Ⅷ基因位于Xq28,基因长度185 kb,有26个外显子。

人凝血因子Ⅷ是一种经过纯化、冻干的人凝血因子制剂,系从健康人的新鲜冰冻血浆混合中获得因子Ⅷ冷沉淀,并经过分离、提纯和病毒灭活处理步骤精制而成¹。人凝血因子Ⅷ是防治甲型血友病人出血的特效血液制剂。

甲型血友病是一种伴性遗传疾病,患者由于凝

血机制缺陷,偶遇内外伤往往血流不止,也会因关节等处微血管破裂造成出血不止,关节肿痛等,需要足量输用含因子Ⅷ制剂。由于因子Ⅷ在机体内的半衰期不长(仅8~12 h),故止血效果虽然显著,但不能持久,再次出血须再输注。且由于该病目前还未有根治的方法,故患者在一生中都需要使用因子Ⅷ制剂,所以这类患者对该制剂的需求量非常大^[1]。

过去经验中血液制品大规模传播人类获得性免疫缺陷病毒(HIV)的案例使人们对血液制品的病毒安全性仍有担心。最近,血浆分离的凝血因子Ⅷ浓缩液在给美国、欧洲、南非的血友病患者使用后有造成非脂包膜的甲型肝炎病毒(HAV)感染^[2-5]的情况。凝血因子Ⅷ浓缩液也有类似报道传播非脂包膜的细小病毒B19^[6-9]。因此,对于血液制品增加病毒灭活工艺步骤及其验证至关重要。笔者在此介绍人凝

[作者简介] 闫晨,男,本科,工程师。Tel:13611639069, E-mail: sxx_yy@hotmail.com.

[通讯作者] 李玲。Tel:13917513869, E-mail: eli@colorcon.com.

血因子Ⅷ的两步病毒灭活工艺(S/D法及80℃、72h干热灭活法)及其验证。

1 材料和方法

1.1 主要材料 冷沉淀(由上海新兴医药股份有限公司制造部提供);磷酸三丁酯(TNBP,美国Fluka公司,AR级);吐温-80(Tween-80,美国Sigma公司,AR级)。

1.2 人凝血因子Ⅷ制备工艺 将冷沉淀溶解于抽提液后用磷酸二氢钠进行酸沉淀,然后加入氢氧化铝并降温过滤。所得上清液经超滤浓缩和除菌过滤后加S/D试剂使最终混合液中含TNBP为0.3%,吐温-80为1%,在24~26℃条件下进行S/D处理搅拌6h来灭活脂包膜病毒,再用离子层析柱分离制品,并超滤浓缩透析至目标浓度进行配制,然后用直径0.22 μm膜过滤除菌并分装,冻干后进行80℃、72h干热处理灭活非脂包膜病毒。

1.3 病毒灭活验证

1.3.1 指示病毒 采用国家食品药品监督管理局推荐用于验证血液制品病毒灭活工艺的指示病毒,见表1。

表1 受验证病毒的详细信息

灭活工艺	指示病毒	模拟病毒	是否有脂薄膜	培养细胞	检测方法
S/D	PRV	HBV	是	PK-15	细胞病变
S/D	Sindbis	HCV	是	BHK-21	细胞病变
S/D	HIV	HIV	是	MT4	细胞病变
干热法	PRV	HBV	是	PK-15	细胞病变
干热法	EMCV	HAV	否	VERO	细胞病变
干热法	Sindbis	HCV	是	BHK-21	细胞病变
干热法	PPV	B19	否	PK-15	细胞病变

1.3.2 验证方法 S/D法工艺:分别取PRV病毒和Sindbis病毒,按1:9的比例加入制品中,并加入吐温-80和TNBP使终浓度分别为1%和0.3%(S/D)。在25℃条件下摇晃孵育6h,分别于不同时间点取样检测病毒滴度,同时取未加S/D试剂的样品作对照,将未检测出病毒的制品盲传3代,若仍无病变出现,则判定该指示病毒已被灭活。

80℃、72h干热灭活工艺:将病毒按1:9比例加入制品并分装为10ml/瓶,冻干后真空密封,并在79.5~81.5℃干烤箱中进行恒温处理72h,并于0、1、2、4、24、72h分别取样检测病毒滴度。所有样本取样后立即于-70℃冻存备测。每批样本至少重复测定2次。

2 结果

2.1 S/D法处理人凝血因子Ⅷ,灭活伪狂犬病毒

(PRV)的结果 经过对病毒灭活验证,20030201、20030202、20030203连续3批人凝血因子Ⅷ经S/D处理(TNBP、吐温-80终浓度分别为0.3%和1.0%,在24~26℃条件下处理6h),病毒灭活后,残余PRV滴度均低于本实验最低检测限-0.50lgTCID₅₀/0.1ml。结果表明,可灭活所加入指示病毒PRV分别为:20030201批≥4.25lgTCID₅₀/0.1ml,20030202批≥4.00lgTCID₅₀/0.1ml,20030203批≥4.00lgTCID₅₀/0.1ml(表2),表明该灭活方法是理想的。

表2 经S/D处理相应时间后残余PRV病毒滴度值(lgTCID₅₀/0.1ml)

处理时间(h)	批号 20030201	批号 20030202	批号 20030203
对照样品			
0	4.25	4.00	4.00
6	3.25	3.38	3.62
处理样品			
0.25	<-0.38	<-0.38	<-0.50
0.5	<-0.50	<-0.50	<-0.50
0	<-0.50	<-0.50	<-0.50
1	<-0.50	<-0.50	<-0.50
2	<-0.50	<-0.50	<-0.50
4	<-0.50	<-0.50	<-0.50
6	<-0.50	<-0.50	<-0.50
终止对照	4.25	4.12	4.38

2.2 S/D法处理人凝血因子Ⅷ灭活Sindbis病毒的结果 经过病毒灭活验证,20030201、20030202、20030203连续3批人凝血因子Ⅷ经S/D处理(TNBP、吐温-80终浓度分别为0.3%和1.0%,在24~26℃条件下处理6h)后,3批样品Sindbis病毒灭活量均大于4lgPFU/ml(表3),表明该灭活方法是理想的。

表3 经S/D处理相应时间(h)后残余Sindbis病毒滴度值(lgPFU/ml)

处理时间(h)	批号 20030201	批号 20030202	批号 20030203
对照样品			
0	4.43	4.46	4.56
6	4.4	3.7	4.15
处理样品			
0.25	<0.00	<0.00	<0.00
0.5	<0.00	<0.00	<0.00
0	<0.00	<0.00	<0.00
1	<0.00	<0.00	<0.00
2	<0.00	<0.00	<0.00
4	<0.00	<0.00	<0.00
6	<0.00	<0.00	<0.00
终止对照	4.38	4.32	4.32

2.3 S/D法对人凝血因子Ⅷ内免疫缺陷病毒(HIV)进行灭活的结果 经过中国人民解放军艾滋病检测确认实验室验证,20030201、20030202、

20030203 连续 3 批人凝血因子Ⅷ经 S/D 处理(TN-BP、吐温-80 终浓度分别为 0.3% 和 1.0%, 在 24 ~ 26℃ 条件下处理 6 h), 滴度下降 log 5.5 (表 4), 经细胞培养盲传 3 代, 1/4 h 第三代出现细胞病变, 其余均未出现细胞病变(表 5), 表明 S/D 处理 6 h 即可有效灭活样品中的 HIV 病毒。

表 4 经 S/D 处理相应时间后残余 HIV 病毒滴度值(TCID₅₀)

验证批号	测定时间(h)				
	0	1/4	1	3	6
阳性对照组	7.50				
20030201					
第一次	4.50	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
第二次	4.50	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
第三次	4.23	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
20030202					
第一次	4.50	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
20030203					
第一次	4.50	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00

表 5 经 S/D 处理后不出现病变的样品连续盲传 3 代继续观察细胞病变(7 d)的结果

验证批号	取样时间(h)	第一代		第二代		第三代	
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³
20030201							
第一次	1/4	-	-	-	-	+	-
	1	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-
第二次	1/4	-	-	-	-	+	-
	1	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-
第三次	1/4	-	-	-	-	+	-
	1	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-
20030202							
第一次	1/4	-	-	-	-	+	-
	1	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-
20030203							
第一次	1/4	-	-	-	-	+	-
	1	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-

2.4 80℃、72 h 干热处理人凝血因子Ⅷ灭活 PRV 病毒的结果 经病毒灭活验证, 20030201、20030202、20030203 连续 3 批人凝血因子Ⅷ经干热法[(80 ± 2)℃, 72 h]处理后, 可灭活所加入指示病毒 PRV 分别为: 20030201 批 ≥ 4.75 lgTCID₅₀/0.1 ml, 20030202 批 ≥ 5.12 lgTCID₅₀/0.1 ml, 20030203 批 ≥ 4.88 lgTCID₅₀/0.1 ml(表 6), 表明该灭活方法是理想的。

表 6 经干热处理相应时间后残余 PRV 病毒滴度值(lgTCID₅₀/0.1 ml)

处理时间(h)	批号 20030201	批号 20030202	批号 20030203
冻干前	5.25	5.62	5.38
冻干后	4.75	4.5	4.88
1	2.88	3.12	3.12
2	2.38	2.25	2.38
4	1.38	1.62	1.5
24	≤0.50	≤0.50	≤0.50
72	≤0.50	≤0.50	≤0.50

2.5 80℃、72 h 干热处理人凝血因子Ⅷ灭活脑心肌炎病毒(EMCV)的结果 经病毒灭活验证, 20030201、20030202、20030203 连续 3 批人凝血因子Ⅷ经干热法[(80 ± 2)℃, 72 h]处理后, 可灭活所加入指示病毒 EMCV 分别为: 20030201 批 ≥ 5.00 lgTCID₅₀/0.1 ml, 20030202 批 ≥ 5.13 lgTCID₅₀/0.1 ml, 20030203 批 ≥ 4.75 lgTCID₅₀/0.1 ml(表 7), 表明该灭活方法是理想的。

表 7 经干热处理相应时间后残余 EMCV 病毒滴度值(lgTCID₅₀/0.1 ml)

处理时间(h)	批号 20030201	批号 20030202	批号 20030203
冻干前	5.00	5.13	4.75
冻干后	4.13	4.13	4.63
1	0.5	0.63	0.75
2	0.13	-0.13	-0.25
4	-0.5	-0.5	-0.5
24	-0.5	-0.5	-0.5
72	-0.5	-0.5	-0.5

2.6 80℃、72 h 干热处理人凝血因子Ⅷ灭活 Sindbis 经病毒灭活验证, 20030201、20030202、20030203 连续 3 批人凝血因子Ⅷ经干热法[(80 ± 2)℃, 72 h]处理后, 可灭活所加入指示病毒 Sindbis 分别为: 20030201 批 ≥ 6.53 lgTCID₅₀/0.1 ml, 20030202 批 ≥ 6.43 lgTCID₅₀/0.1 ml, 20030203 批 ≥ 6.40 lgTCID₅₀/0.1 ml(表 8), 表明该灭活方法是理想的。

表 8 经干热处理相应时间后残余 EMCV 病毒滴度值(lgTCID₅₀/0.1 ml)

处理时间(h)	批号 20030201	批号 20030202	批号 20030203
冻干前	6.53	6.43	6.40
冻干后	5.70	5.72	5.64
1	3.03	2.98	3.10
2	2.07	2.05	2.05
4	0.90	0.48	0.78
24	<0.00	<0.01	<0.02
72	<0.01	<0.02	<0.03

2.7 80℃、72 h 干热处理人凝血因子Ⅷ灭活猪细小病毒(PPV) 经病毒灭活验证, 20070101、

20070102、20070103 连续 3 批人凝血因子Ⅷ经干热法 $(80 \pm 2)^\circ\text{C}$, 72 h]处理后,可灭活所加入指示病毒 PPV 分别为 20070101 批 $\geq 4.25 \lg\text{TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$, 20070102 批 $\geq 4.00 \lg\text{TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$, 20070103 批 $\geq 4.13 \lg\text{TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$ (表 9),表明该灭活方法是理想的。

表 9 经干热处理相应时间后残余 PPV 病毒滴度值($\lg\text{TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$)

处理时间(h)	批号 20070101	批号 20070102	批号 20070103
冻干前	4.75	4.50	4.63
冻干后	4.13	4.13	4.00
2	3.75	3.88	3.63
4	2.25	2.25	2.13
24	1.25	1.50	1.38
48	0.88	0.75	0.75
72	≤ 0.50	≤ 0.50	≤ 0.50

2.8 80°C 、72 h 干热处理对人凝血因子Ⅷ质量的影响 对 2003 年的 3 批人凝血因子Ⅷ制品进行 80°C 、72 h 干热处理,对加热前后的样品进行质量检定(表 10)。结果显示制品能耐受 80°C 、72 h 干热

处理,其质量指标无明显改变。

3 讨论

经血液制品传染的病毒主要有 HAV、HBV、HCV、HIV、细小病毒 B19 等,其中 HAV 和 B19 为非脂包膜病毒,其他为脂包膜病毒。从上文结果可以看出其相应指示病毒 EMCV、PRV、Sindbis、HIV、PPV 均可被 S/D、干热两步灭活法所灭活。S/D 法主要针对脂包膜病毒,而干热法则对脂包膜与非脂包膜病毒都有良好效果。所有以上病毒在经过灭活后其病毒滴度都降低至少 4 logs。其中 EMCV、PRV、Sindbis 和 PPV 在灭活后其病毒的滴度都低于可检测最小值。HIV 滴度降低虽然达到 $\log 5.5$,但其最终滴度略高于其他指示病毒。虽然已符合国家标准,但出于谨慎考虑仍对其盲传 3 代进行细胞病变观察,结果显示在经过 1 h S/D 灭活后细胞病变即已不再出现。本方法共 S/D 灭活 6 h,可以保证灭活效果。此外,经过 80°C 、72 h 干热处理后,人凝血因子Ⅷ制品的主要质量指标与处理前相比无明显变化,可以保证制品的质量。

表 10 3 批样品经干热处理前后反应制品质量水平的主要参数对比

项目	20030201		20030202		20030203	
	干热前	干热后	干热前	干热后	干热前	干热后
真空外观	合格	合格	合格	合格	合格	合格
热原实验	合格	合格	合格	合格	合格	合格
溶解时间(min)	<3	<3	<3	<3	<3	<3
水份(%)	1.85	1.56	2.01	2.06	1.94	1.7
效价(IU/ml)	24.9	23.5	27.2	26	24.3	22.6

综上所述,S/D 和 80°C 、72 h 干热双重灭活病毒工艺无论对脂包膜病毒还是非脂包膜病毒都具有良好的灭活效果且对制品质量指标影响不显著,可在实验室中采用。

【参考文献】

- [1] 刘隽湘. 输血疗法与血液制剂[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 214-215.
- [2] Brackmann HH, Oldenburg J, Eis-Hubinger AM, et al. Hepatitis A virus infection among the hemophiliapopulation at the Bonn Hemophilia Center[J]. Vox Sang, 1994, 67(S1): 3-8.
- [3] Mannucci PM, Gdovin S, Gringeri A, et al. Transmission of hepatitis A to patients with hemophilia by factor Ⅷ concentrates treated with organic solvent and detergent to inactivate viruses. The Italian Collaborative Group[J]. Ann Intern Med, 1994, 120(1): 1-7.
- [4] Lawlor E, Johnson Z, Thornton L, et al. Investigation of an outbreak of hepatitis A in Irish haemophilia A patients[J]. Vox Sang 1994, 67(S1): 18-20.

- [5] Soucie JM, Robertson BH, Bell BP, et al. Hepatitis A virus infections associated with clotting factor concentrate in the United States[J]. Transfusion, 1998, 38(6): 573-579.
- [6] Aguilar FC, Lucia CJF, Ferrer TJ, et al. Parvovirus B19 infection in patients with congenital blood coagulation disorders[J]. Med Clin, 1997, 108(17): 641-646.
- [7] Santagostino E, Mannucci PM, Gringeri A, et al. Transmission of parvovirus B19 by coagulation factor concentrates exposed to 100 degrees C heat after lyophilization[J]. Transfusion, 1997, 37(5): 517-522.
- [8] Lefrere JJ, Mariotti M, Thauvin M. B19 parvovirus DNA in solvent/detergent-treated anti-haemophilia concentrates[J]. Lancet, 1994, 343(8891): 211-212.
- [9] Azzi A, Ciappi S, Zakrzewska K, et al. Human parvovirus B19 infection in hemophiliacs first infused with two high-purity, virally attenuated factor Ⅷ concentrates[J]. Am J Hematol, 1992, 39: 228-230.

[收稿日期] 2013-03-05 [修回日期] 2013-06-19

[本文编辑] 陈静