

邵顺儒, 杨冬芝, 侯 盛, 等. 注射用重组抗肿瘤坏死因子- α 人鼠嵌合单克隆抗体病毒去除/灭活工艺的建立及效果验证[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(15): 77-83.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.15.013

注射用重组抗肿瘤坏死因子- α 人鼠嵌合单克隆抗体病毒去除/灭活工艺的建立及效果验证

邵顺儒¹, 杨冬芝¹, 侯 盛², 陶 静², 袁秀珍², 张慧勇², 张 蕙²

(1. 徐州医科大学, 江苏徐州 221004; 2. 泰州迈博太科药业有限公司, 江苏泰州 225300)

摘要:旨在建立注射用重组抗肿瘤坏死因子- α 人鼠嵌合单克隆抗体病毒去除/灭活工艺, 并进行效果验证。膜过滤工艺去除病毒验证结果表明, 膜过滤后的蛋白质回收率在 98% 以上, 分子排阻色谱纯度在膜过滤前后没有明显变化; 经测试, 膜过滤后小鼠白血病病毒、小鼠微小病毒、呼肠孤病毒滴度的降幅均大于 4 lg TCID₅₀/0.1 mL。低 pH 值释放灭活病毒验证工艺结果表明, 低 pH 值释放前后蛋白质含量、分子排阻色谱纯度没有明显变化; 测试结果表明, 室温处理时间 ≥ 0.5 h, 小鼠白血病病毒、伪狂犬病毒的滴度降幅均大于 4 lg TCID₅₀/0.1 mL。该去除/灭活效果均符合《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》的要求, 建立的工艺有效保证了产品的质量及安全性。

关键词:注射用重组抗肿瘤坏死因子- α 人鼠嵌合单克隆抗体; 膜过滤病毒去除; 低 pH 值释放病毒灭活; 分子排阻色谱纯度; 蛋白质回收率; 半数组织培养感染剂量

中图分类号: R915 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)15-0077-06

根据《药品注册管理办法》要求, 对于动物源性单克隆抗体重组生物制品, 在工艺上要进行病毒去除/灭活验证。按病毒去除/灭活^[1-2]方式的不同, 清除病毒的方法可分为膜过滤法^[3]、色谱法^[4-5]、超短时微波加热法、巴氏消毒法、干热法、有机溶剂/去污剂(S/D)法和低 pH 值释放法^[6]。《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》(下文简称《一般原则》)中要求, 验证研究的目的是为了获取充足的试验研究数据以证明生产工艺中是否包含有效的病毒去除/灭活工艺步骤。《一般原则》要求生产工艺中必须包含病毒去除/灭活的有效工艺步骤, 若不包含, 则应根据不同品种的特点增加相应的处理方法, 并不得改变制品原有的质量。对于从生物组织中提取制成的生物制品, 在工艺上应有 2 个有效工艺步骤从机制上进行互补, 对于非脂包膜病毒, 应不少于 1 个

工艺有效步骤有效去除和/或灭活作用; 对于通过真核细胞表达的生物制品, 要求至少有一个工艺有效步骤, 能够有效去除和/或灭活非脂包膜病毒^[7]。对于低 pH 值病毒灭活工艺, 非特异模型病毒建议选择有包膜的、对理化条件耐受能力强且耐受范围广泛的病毒种类, 如伪狂犬病病毒; 对于纳米膜的过滤工艺, 建议选择粒径小的病毒种类, 如鼠细小病毒。另外, 对病毒去除/灭活的验证要注意工艺过程对样品质量的影响。应考察在工艺处理前后, 纯度、蛋白质含量、蛋白质回收率等的差异或变化能否确保产品符合质量标准规定。只有在确保工艺处理前后上述质量指标的差异或变化不明显, 才能认为设定的病毒去除/灭活工艺条件是有效的。在工艺验证中, 应采用大生产工艺参数中的最差条件在小试生产规模下进行。如在开展低 pH 值法灭活病毒验证时, 采用实际生产 pH 值、蛋白含量标准规定的最高限与温度范围最低限。在进行膜过滤去除病毒的效果验证时, 采用实际生产压力和上样量范围的上限^[8]。按照《一般原则》规定, 本试验建立了注射用重组抗肿瘤坏死因子- α 人鼠嵌合单克隆抗体(简称“注射用坏死因子抗体”)膜过滤病毒去除工艺和低 pH 值释放病毒灭活工艺, 前者选取小

收稿日期: 2020-03-31

作者简介: 邵顺儒(1971—), 男, 江苏淮安人, 主管药师、执业药师, 主要从事药品生产质量管理、质量控制及研究工作。E-mail: shaoshunru@163.com。

通信作者: 杨冬芝, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事药物分析研究工作。E-mail: dongzhijie@xzhmu.edu.cn。

鼠白血病毒、小鼠微小病毒、呼肠孤病毒作为指示病毒,后者选取小鼠白血病毒、伪狂犬病毒作为指示病毒,分别进行去除/灭活工艺验证,本试验结果可为该单抗制品的病毒安全性研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 病毒及细胞

小鼠白血病毒起始滴度为 $6.750 \lg \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ mL}$ (其中 TCID_{50} 表示半数组织培养感染剂量),用猫星形胶质细胞进行培养;小鼠微小病毒的起始滴度为 $6.875 \lg \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ mL}$,用小鼠皮下结缔组织细胞进行培养;呼肠孤病毒的起始滴度为 $7.250 \lg \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ mL}$,用幼仓鼠肾细胞进行培养;伪狂犬病毒的起始滴度为 $6.875 \lg \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ mL}$,用猪肾细胞进行培养。上述病毒及细胞均由中国食品药品检定研究院保存。

1.2 注射用坏死因子抗体

该注射用坏死因子抗体样品由泰州迈博太科药业有限公司制备,其中纳米膜过滤病毒去除工艺所用注射用坏死因子抗体样品为纯化工艺中通过疏水层析收集的样品,批号分别为 008-201702、008-201703、008-201704。pH 值法灭活病毒工艺所用样品为亲和层析收集的样品,批号分别为 cCC-20170311、cCC-20170321、008-201704。

1.3 膜过滤病毒去除工艺的建立及验证

1.3.1 膜过滤病毒去除工艺的建立 预过滤膜(型号为 Viresolve Prefilter)和除病毒过滤膜(型号为 Viresolve Pro)均购自美国 Millipore 公司。取纯化工艺中疏水层析收集批号分别为 008-201702、008-201703、008-201704 的样品,每批分别经过 Viresolve Prefilter 预过滤和 Viresolve Pro 除病毒过滤膜(除病毒过滤膜面积为 3.1 cm^2 ,过滤压力为 220 kPa)过滤,每个病毒、每批样品的体积均在 280 mL 以上。

1.3.2 分子排阻色谱纯度、蛋白质回收率的检测 考察膜过滤去除病毒工艺对过滤前后样品分子排阻色谱纯度、蛋白质总量的影响。取膜过滤前后的样品,用高效液相色谱(HPLC)方法检测分子排阻色谱纯度,根据膜过滤前后的总蛋白质量计算蛋白质的回收率。

1.3.3 膜过滤病毒去除工艺的效果验证

1.3.3.1 病毒的滴定 (1)选用小鼠白血病毒为指示病毒。将猫星形胶质细胞以 6×10^4 个/mL

的密度加入 96 孔细胞培养板中,每孔 0.1 mL ;在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h ,设二氧化碳含量为 5% ,待细胞铺满后,将各对照及处理后的样品进行连续稀释,稀释倍数为 $10^{-1} \sim 10^{-11}$;在细胞培养板的第 1 列至第 11 列加入稀释 $10^{-1} \sim 10^{-11}$ 倍的病毒 0.1 mL/孔 ;在第 12 列加入细胞培养基,作为细胞对照;将上述培养板放进温度为 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含 $5\% \text{ CO}_2$ 的培养箱内,每天观察、记录病变细胞数(孔),直至细胞对照孔内的细胞无法维持正常形态,采用 96 孔细胞病变法进行病毒滴定,按 Karber 法计算小鼠白血病毒滴度。(2)选用小鼠微小病毒作为指示病毒。培养用细胞为小鼠皮下结缔组织细胞,采用与小鼠白血病毒同样的方法计算小鼠微小病毒滴度。(3)选用呼肠孤病毒作为指示病毒。培养用细胞为幼仓鼠肾细胞,采用与小鼠白血病毒相同的方法计算呼肠孤病毒滴度。

1.3.3.2 病毒去除效果的验证 取批号为 008-201702、008-201703、008-201704 的纯化工艺中疏水层析收集的样品各 280 mL 以上,分别进行预过滤,取预过滤后的样品按照 2% 的比例加入指示病毒,混匀,采用设置的膜去除病毒工艺过滤上样液,分别在膜过滤体积为 200 、 240 mL 及过滤终点取样,进行残余病毒滴度的检测,检测方法同小鼠白血病毒。每种指示病毒均用每批上样液测试 2 次。

1.4 低 pH 值解放法病毒灭活工艺的建立及验证

1.4.1 病毒灭活工艺的建立 采用亲和层析收集样品,批号分别为 cCC-20170311、cCC-20170321、008-201704,每批样品分别用 25 mmol/L 柠檬酸盐(pH 值为 $2.8 \sim 3.2$)或 1 mol/L Tris-base 调节 pH 值至 3.8 ,于 $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 4 h 后分别于 0.5 、 1.0 、 2.0 、 4.0 h 取样,用 1 mol/L Tris-base 调节 pH 值至中性。

1.4.2 灭活病毒的工艺对分子排阻色谱纯度、蛋白质含量影响的检测 取低 pH 值解放前后的样品,用 HPLC 方法检测分子排阻色谱纯度,再通过紫外分光光度法检测蛋白质含量。

1.4.3 灭活病毒的工艺效果验证

1.4.3.1 病毒的滴定 选用小鼠白血病毒、伪狂犬病毒作为指示病毒,小鼠白血病毒用猫星形胶质细胞培养,伪狂犬病毒用猪肾细胞培养,具体方法同“1.3.3”节,分别滴定并计算小鼠白血病毒及伪狂犬病毒的滴度。

1.4.3.2 病毒灭活效果的验证 各取 5 mL cCC-

20170311、cCC - 20170321、008 - 201704 亲和层析收集的样品,用 1 mol/L Tris - base 调节 pH 值至中性,制备对照样品。取 1.96 mL 细胞培养基,加入 0.04 mL 病毒,使病毒的最终占比为 2%,制备病毒对照样品。各取 5 mL cCC - 20170311、cCC - 20170321、008 - 201704 亲和层析收集的样品,用 1 mol/L Tris - base 调节 pH 值至中性,按照 2% 的比例分别加入 0.102 mL 指示病毒(小鼠白血病病毒、伪狂犬病毒),混匀后除菌过滤,取出 2 mL 并冻存于 -70 ℃ 环境下,作为零点对照样品;再取出 2 mL 并于 18 ℃ 放置 4 h,冻存于 -70 ℃ 环境下,作为终点对照样品。

各取 20 mL cCC - 20170311、cCC - 20170321、008 - 201704 亲和层析收集的样品,每批分别用 25 mmol/L 柠檬酸盐 (pH 值为 2.8 ~ 3.2) 或 1 mol/L Tris - base 调节 pH 值至 3.8,按照 2% 的比例分别加入 0.408 mL 指示病毒(小鼠白血病病毒、

伪狂犬病毒)混匀,于 18 ℃ 放置 4 h,分别于 0.5、1.0、2.0、4.0 h 取样,用 1 mol/L Tris - base 调节 pH 值至中性,除菌过滤后作为处理后样品。样品对照、病毒对照、零点对照、终点对照及处理后样品在处理结束后立即冻存于 -70 ℃ 下,样品滴定时于室温复溶。具体方法同“1.3.3”节,分别滴定并计算小鼠白血病病毒及伪狂犬病毒的滴度,每种指示病毒均用每批的上样液测试 2 次。

2 结果与分析

2.1 病毒去除工艺的建立及验证

2.1.1 膜过滤对蛋白质回收率及分子排阻色谱纯度的影响 由表 1 可以看出,膜过滤去除病毒工艺处理的蛋白质回收率均在 98% 以上,膜过滤前后分子排阻色谱纯度均在 98% 以上,表明膜过滤后回收率较高,膜过滤对纯度基本无影响,采用膜过滤法去除病毒的工艺是可行的。

表 1 膜过滤后的蛋白质收率及膜过滤前后的分子排阻色谱纯度

| 样品批号 | 膜过滤后的蛋白质回收率 (%) | 分子排阻色谱纯度 (%) | |
|--------------|-----------------|--------------|-------|
| | | 膜过滤前 | 膜过滤后 |
| 008 - 201702 | 100.69 | 99.91 | 99.92 |
| 008 - 201703 | 98.69 | 98.86 | 99.50 |
| 008 - 201704 | 98.08 | 99.64 | 99.70 |

由表 2 可以看出,当滤出液体积达 280 mL (008 - 201702)、282.5 mL (008 - 201703)、272.5 mL (008 - 201704) 时,样品的小鼠微小病毒下降滴度分别为 4.750、4.688、4.750 lg TCID₅₀/0.1 mL,均 > 4 lg TCID₅₀/0.1 mL。由表 3 可以看出,当滤出液体积达 280 mL (008 - 201702)、290 mL (008 - 201703)、271 mL (008 - 201704) 时,样品的呼肠孤病毒下降滴度分别为 4.875、4.938、4.813 lg TCID₅₀/0.1 mL,均 > 4 lg TCID₅₀/0.1 mL。由表 4 可以看出,当滤出液体积达 281.6 mL (008 - 201702)、272 mL (008 - 201703)、282.8 mL (008 - 201704) 时,样品的小鼠白血病病毒下降滴度分别为 4.375、4.563、4.563 lg TCID₅₀/0.1 mL,均 > 4 lg TCID₅₀/0.1 mL,过滤后的样品符合《一般原则》的要求,表明该工艺可有效去除病毒。

2.2 病毒灭活工艺的建立及验证

2.2.1 低 pH 值孵放对蛋白质含量及分子排阻色谱纯度的影响 从表 5 可看出,低 pH 值孵放在病毒灭活前后对样品蛋白质含量及纯度均无明显

影响。

2.2.2 低 pH 值孵放病毒灭活工艺效果的验证结果 从表 6 可以看出,指示病毒小鼠白血病病毒经低 pH 值孵放灭活 0.5 h 后,cCC - 20170311、cCC - 20170321、008 - 201704 的小鼠白血病病毒下降滴度分别达 4.438、4.563、4.375 lg TCID₅₀/0.1 mL,均 > 4 lg TCID₅₀/0.1 mL。由表 7 可以看出,指示病毒伪狂犬病毒经低 pH 值孵放灭活 0.5 h 后,cCC - 20170311、cCC - 20170321、008 - 201704 的伪狂犬病毒下降滴度分别达 4.875、4.938、4.750 lg TCID₅₀/0.1 mL,均 ≥ 4 lg TCID₅₀/0.1 mL,随着处理时间的延长,指示病毒小鼠白血病病毒、伪狂犬病毒的下降滴度不再改变,均 ≥ 4 lg TCID₅₀/0.1 mL,符合《一般原则》的要求,表明该工艺可有效灭活病毒。

3 讨论与结论

在建立去除病毒的工艺中,应考察预过滤膜(型号为 Viresolve Prefilter)和除病毒过滤膜(型号

表 2 膜过滤对小鼠微小病毒的去除效果

| 组别 | 试验条件 | 类别 | 残余小鼠微小病毒滴度(lg TCID ₅₀ /0.1 mL) | | |
|-----|---|-------|---|--------------|--------------|
| | | | 008 – 201702 | 008 – 201703 | 008 – 201704 |
| 对照组 | 病毒对照样 | 病毒对照 | | 5.250 | |
| | 样品对照样 | 样品对照 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | 零点对照样 | 零点对照 | 5.250 | 5.188 | 5.250 |
| | 终点对照样 | 终点对照 | 5.125 | 5.250 | 5.188 |
| 样品组 | 过滤后 200 mL | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.750 | ≥4.688 | ≥4.750 |
| | | 平均降低量 | ≥4.729 | ≥4.729 | ≥4.729 |
| | 过滤后 240 mL | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.750 | ≥4.688 | ≥4.750 |
| | | 平均降低量 | ≥4.729 | | |
| | 008 – 201702 过滤后 280 mL、008 – 201703 过滤后 282.5 mL、008 – 201704 过滤后 272.5 mL | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.750 | ≥4.688 | ≥4.750 |
| | | 平均降低量 | ≥4.729 | ≥4.729 | ≥4.729 |
| | 缓冲液冲洗 | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.750 | ≥4.688 | ≥4.750 |
| | | 平均降低量 | ≥4.729 | ≥4.729 | ≥4.729 |

注:病毒去除数值(降低量)为零点对照样本检测值与去除工艺处理后样本检测值的差。表 3、表 4 同。

表 3 膜过滤对呼肠孤病毒的去除效果

| 组别 | 试验条件 | 类别 | 残余呼肠孤病毒滴度(lg TCID ₅₀ /0.1 mL) | | |
|-----|---|-------|--|--------------|--------------|
| | | | 008 – 201702 | 008 – 201703 | 008 – 201704 |
| 对照组 | 病毒对照样 | 病毒对照 | | 5.438 | |
| | 样品对照样 | 样品对照 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | 零点对照样 | 零点对照 | 5.375 | 5.438 | 5.313 |
| | 终点对照样 | 终点对照 | 5.125 | 5.250 | 5.250 |
| 样品组 | 过滤后 200 mL | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.875 | ≥4.938 | ≥4.813 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.875 | |
| | 过滤后 240 mL | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.875 | ≥4.938 | ≥4.813 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.875 | |
| | 008 – 201702 过滤后 280 mL、008 – 201703 过滤后 290 mL、008 – 201704 过滤后 271 mL | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.875 | ≥4.938 | ≥4.813 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.875 | |
| | 缓冲液冲洗 | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.875 | ≥4.938 | ≥4.813 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.875 | |

为 Viresolve Pro)对上样液中病毒的去除效果、过滤时的压力、恒压载量试验,分析该过滤膜在完全堵塞前所能过滤的最大上样体积。本试验初步设定了如下除病毒的工艺参数:预过滤膜型号为

Viresolve Prefilter,除病毒过滤膜型号为 Viresolve Pro,压力为 220 kPa。试验结果表明,采用膜过滤工艺去除病毒符合工艺需求,该去除病毒工艺的方法可行。膜过滤去除病毒的效果验证试验结果表明,

表 4 膜过滤对小鼠白血病病毒的去除效果

| 组别 | 试验条件 | 类别 | 残余小鼠白血病病毒滴度 (lg TCID ₅₀ /0.1 mL) | | |
|-----|--|-------|---|--------------|--------------|
| | | | 008 – 201702 | 008 – 201703 | 008 – 201704 |
| 对照组 | 病毒对照样 | 病毒对照 | | 5.063 | |
| | 样品对照样 | 样品对照 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | 零点对照样 | 零点对照 | 4.875 | 5.063 | 5.063 |
| | 终点对照样 | 终点对照 | 4.813 | 4.813 | 5.000 |
| 样品组 | 过滤后 200 mL | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.375 | ≥4.563 | ≥4.563 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.500 | |
| | 过滤后 240 mL | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.375 | ≥4.563 | ≥4.563 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.500 | |
| | 008 – 201702 过滤后 281.6 mL、008 – 201703 | | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | 过滤后 272 mL、008 – 201704 过滤后 282.8 mL | | 病毒降低量 | ≥4.375 | ≥4.563 |
| | | | 平均降低量 | ≥4.500 | |
| | | | | | |
| | 缓冲液冲洗 | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.375 | ≥4.563 | ≥4.563 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.500 | |

表 5 低 pH 值孵放灭活对样品蛋白质含量及纯度的影响

| 样品批号 | 蛋白含量 (mg/mL) | | 分子排阻色谱纯度 (%) | |
|----------------|--------------|------|--------------|-------|
| | 灭活前 | 灭活后 | 灭活前 | 灭活后 |
| cCC – 20170311 | 8.19 | 8.35 | 99.91 | 99.92 |
| cCC – 20170321 | 8.35 | 8.31 | 98.86 | 99.50 |
| 008 – 201704 | 7.22 | 7.12 | 99.64 | 99.70 |

除病毒过滤膜 (Viresolve Pro) 的孔径为 20 nm,选择的指示病毒小鼠微小病毒粒径为 20 ~ 26 nm,可见小鼠微小病毒对去除病毒效果具有有效的指示作用。用 3 批注射用坏死因子抗体样品进行病毒去除工艺验证,结果表明,至滤出终点时,小鼠微小病毒的滴度下降值均 >4 lg TCID₅₀/0.1 mL,符合《一般

表 6 低 pH 值孵放对小鼠白血病病毒的灭活效果

| 组别 | 试验条件 | 类别 | 残余小鼠白血病病毒滴度 (lg TCID ₅₀ /0.1 mL) | | |
|-----|----------------|-------|---|----------------|--------------|
| | | | cCC – 20170311 | cCC – 20170321 | 008 – 201704 |
| 对照组 | 病毒对照样 | 病毒对照 | | 5.000 | |
| | 样品对照样 | 样品对照 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | 零点对照样 | 零点对照 | 4.938 | 5.063 | 4.875 |
| | 终点对照样 | 终点对照 | 4.875 | 4.875 | 4.750 |
| 样品组 | 低 pH 值处理 0.5 h | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.438 | ≥4.563 | ≥4.375 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.459 | |
| | 低 pH 值处理 1.0 h | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.438 | ≥4.563 | ≥4.375 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.459 | |
| | 低 pH 值处理 2.0 h | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.438 | ≥4.563 | ≥4.375 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.459 | |
| | 低 pH 值处理 4.0 h | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.438 | ≥4.563 | ≥4.375 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.459 | |

注:病毒降低量为零点对照样本检测值与灭活工艺后样本检测值的差。表 7 同。

表 7 低 pH 值孵放对伪狂犬病毒的灭活效果

| 组别 | 试验条件 | 类别 | 残余伪狂犬病毒滴度 (lg TCID ₅₀ /0.1 mL) | | |
|-----|----------------|-------|---|----------------|--------------|
| | | | cCC - 20170311 | cCC - 20170321 | 008 - 201704 |
| 对照组 | 病毒对照样 | 病毒对照 | | 5.438 | |
| | 样品对照样 | 样品对照 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | 零点对照样 | 零点对照 | 5.375 | 5.438 | 5.250 |
| | 终点对照样 | 终点对照 | 5.250 | 5.188 | 5.125 |
| 样品组 | 低 pH 值处理 0.5 h | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.875 | ≥4.938 | ≥4.750 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.854 | |
| | 低 pH 值处理 1.0 h | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.875 | ≥4.938 | ≥4.750 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.854 | |
| | 低 pH 值处理 2.0 h | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.875 | ≥4.938 | ≥4.750 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.854 | |
| | 低 pH 值处理 4.0 h | 处理后样品 | ≤0.500 | ≤0.500 | ≤0.500 |
| | | 病毒降低量 | ≥4.875 | ≥4.938 | ≥4.750 |
| | | 平均降低量 | | ≥4.854 | |

原则》的要求,证明膜过滤工艺可有效去除小鼠微小病毒,此外,注射用坏死因子抗体最大上样液过滤体积可以达到 270 mL,能够满足实际生产需要。

本试验结果还表明,用低 pH 值(3.8)处理亲和层析收集样品生产工艺对产品的蛋白质含量及分子排阻色谱纯度均不会产生影响。将 3 批亲和层析收集的样品用于灭活病毒的工艺验证,结果显示,在 pH 值为 3.8、室温为 18 ℃的条件下处理 0.5 h,指示病毒小鼠白血病毒、伪狂犬病毒滴度下降值均 >4 lg TCID₅₀/0.1 mL,符合《一般原则》的要求,表明该 pH 值法在生产过程中可有效灭活病毒。

在单克隆抗体的生产工艺中,可依据蛋白质产物与病毒颗粒大小的不同,利用膜过滤工艺有效去除病毒,在生产中使用一次性除病毒膜包,每次使用后进行完整性测试。该方法已经在国内外多种生物制品的生产中得到了广泛运用^[9]。只有病毒的有效直径大于滤膜的孔径,膜过滤法才能有效截留病毒,达到去除病毒的目的,这种方法须要与前文所述方法^[1]联合使用才能起到有效去除/灭活病毒的作用。低 pH 值孵放法是破坏病毒包膜的完整性、阻断病毒与宿主受体结合的途径,使病毒无法感染宿主细胞^[10-11],起到灭活病毒的作用。低 pH 值孵放法具有方法简单、经济实惠、容易操作等特点,已被用于伪狂犬病毒^[10]、猪细小病毒^[12]、流感病毒^[13]等病毒的灭活。

去除/灭活病毒的理想方法有 2 个特性:可以部分去除病毒或者破坏病毒的活性和结构,维持生物制品的生物活性、理化性质。病毒去除/灭活工艺的验证研究是为了取得充分的试验数据,确认去除/灭活病毒的工艺步骤是否有效。验证的单克隆抗体应至少包含 1 个有效的病毒去除/灭活工艺步骤,并能有效去除和/或灭活非脂包膜病毒。对本试验样品进行病毒去除/灭活工艺验证结果表明,经过膜过滤,蛋白质回收率符合规定,分子排阻色谱纯度没有明显变化;用低 pH 值处理后,蛋白质含量、分子排阻色谱纯度无明显变化。在去除/灭活病毒的验证工艺中,选用的小鼠白血病毒、小鼠微小病毒、呼肠孤病毒、伪狂犬病毒这 4 个病毒的理化性质(病毒的大小、核酸类型、有无包膜)有代表性,本试验结果显示,经去除或灭活后,小鼠白血病毒、小鼠微小病毒、呼肠孤病毒、伪狂犬病毒这 4 种病毒的滴度下降值均达到了规定的标准(>4 lg TCID₅₀/0.1 mL),证明本试验建立的注射用坏死因子抗体病毒去除/灭活工艺所用方法是有效的。

参考文献:

[1]王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制[M]. 2 版. 北京: 科学出版社,2007:237-258.
[2]Roush D J. Integrated viral clearance strategies - reflecting on the present, projecting to the future [J]. Current Opinion in Biotechnology,2018,53:137-143.

柳燕杰,田旭平,李 倩. 美国红栲叶绿体基因组密码子偏好性分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(15):83-88.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.15.014

美国红栲叶绿体基因组密码子偏好性分析

柳燕杰,田旭平,李 倩

(山西农业大学林学院,山西太谷 030801)

摘要:为了提高基因的表达效率,利用叶绿体基因工程提高美国红栲的重要特性,利用 Codon W 1.4.2 和在线软件 CUSP 分析了美国红栲叶绿体基因组中的 52 条基因编码序列密码子偏好性。结果表明,美国红栲叶绿体基因组密码子的 GC 含量依次为 $GC_1(45.23\%) > GC_2(39.23\%) > GC_3(26.19\%)$;有效密码子数(ENC)范围为 37.55~55.28,其中 ENC 值 >45 的有 34 个;RSCU >1 的密码子有 29 个,其中 14 个以 U 结尾、12 个以 A 结尾,表明其偏好以 A、U 结尾,且偏倚很弱。中性点图分析表明, GC_{12} 与 GC_3 的相关系数为 0.321 7,回归系数为 -0.538 5,相关性不显著;美国红栲叶绿体基因组的 GC 含量是高度保守的,密码子偏好主要受环境选择的影响;17 个密码子被确定最优密码子。本研究为美国红栲叶绿体遗传工程和遗传多样性分析提供了科学依据。

关键词:美国红栲;叶绿体基因组;密码子偏好性;选择

中图分类号:S718.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)15-0083-06

美国红栲 (*Fraxinus pennsylvanica*) 是木犀科 (Oleaceae) 栲属 (*Fraxinus*) 乔木,原产美国,雌雄异株,花先叶开放,喜光、抗寒、抗盐碱、抗水湿,是我国重要的行道树或庭园绿化树种^[1]。

在生物体传递遗传信息的过程中,作为联结核酸和蛋白质的密码子扮演着重要的角色^[2],密码子被称为第二套遗传密码^[3];密码子使用的选择方式不仅影响基因的表达^[4],也影响基因相应的功能^[5]。构成基因组的 4 种核苷酸可形成 64 种密码子,各密码子与氨基酸相对应,除甲硫氨酸和色氨酸外,其余 18 种氨基酸均有 2~6 个密码子,这些编码同一氨基酸的不同密码子被称为同义密码子 (synonymous codon)^[6];在翻译过程中,每个氨基酸相对应同义密码子的使用频率存在差异,即有的同

收稿日期:2020-02-17

基金项目:山西农业大学动植物育种基金(编号:2019yz004)。

作者简介:柳燕杰(1995—),男,山西吕梁人,硕士研究生,主要从事园林植物与观赏园艺。

通信作者:田旭平,副教授,研究生导师,主要从事园林植物与景观设计。E-mail:txp8638@sina.com。

[3] Singh N, Arunkumar A, Peck M, et al. Development of adsorptive hybrid filters to enable two-step purification of biologics [J]. Mabs - Austin, 2017, 9(2): 350-363.

[4] Chiang M J, Pagkaliwangan M, Lute S, et al. Validation and optimization of viral clearance in a downstream continuous chromatography setting [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(9): 2292-2302.

[5] Angelo J, Chollangi S, Müller - Späth T, et al. Virus clearance validation across continuous capture chromatography [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(9): 2275-2284.

[6] David L, Bayer M P, Lobedann M, et al. Simulation of continuous low pH viral inactivation inside a coiled flow inverter [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(4): 1048-1062.

[7] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 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 [S]. 2005

[8] 韦 薇,徐隆昌,白玉,等. 重组表达生物制品病毒安全性研究与评价的考虑 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(16): 1964-

1968.

[9] 郑丰平,王 炳,郑 琪,等. DV50 纳米过滤去除静注人免疫球蛋白中的病毒时流速的影响因素 [J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(12): 1712-1713, 1718.

[10] Johnston A, Uren E, Johnston D, et al. Low pH, caprylate incubation as a second viral inactivation step in the manufacture of albumin parametric and validation studies [J]. Biologicals, 2003, 31(3): 213-221.

[11] Buchacher A, Iberer G. Purification of intravenous immunoglobulin G from human plasma - aspects of yield and virus safety [J]. Biotechnology Journal, 2006, 1(2): 148-163.

[12] Lebing W, Remington K M, Schreiner C, et al. Properties of a new intravenous immuneoglobulin (IGIV - C, 10%) produced by virus inactivation with caprylate and column chromatography [J]. Vox Sanguinis, 2003, 84(3): 193-201.

[13] Jeong E K, Sung H M, Kim I S. Inactivation and removal of influenza A virus H1N1 during the manufacture of plasma derivatives [J]. Biologicals, 2010, 38(6): 652-657.