除菌过滤在轮状病毒疫苗生产工艺中的初步应用

童彦军，陈　同，伏署光，贺　倩，马　超，李佳林*
（兰州生物制品研究所有限责任公司疫苗一室，甘肃省疫苗工程技术研究中心，甘肃兰州 730046）

摘要：为了考察除菌过滤工序对三价轮状病毒疫苗质量属性的影响、评估在生产工艺中增加除菌过滤操作的可行性，分2个阶段进行了22批的半成品过滤试验。试验滤膜孔径为0.22 μm，材质为聚偏二氟乙烯（PVDF），考察除菌过滤对试验产品病毒滴度及外观、pH值、渗透压和澄清度的影响，并对拟选定的滤膜材质进行细菌截留试验。结果显示，采用PVDF材质、孔径为0.22 μm的除菌滤器进行三价轮状病毒疫苗半成品的除菌过滤，对试验产品的病毒滴度、外观、pH值和渗透压的影响不显著（P>0.05），但能显著提高试验产品的澄清度（P<0.05）。该研究为在三价轮状病毒疫苗半成品的配制工艺中增加除菌过滤工序积累了关键数据和经验。

关键词：三价轮状病毒疫苗；半成品；除菌过滤；细菌截留试验
中图分类号：R392　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)01-0120-05
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.01.016

Preliminary Application of Sterilizing Filtration in the Produce Process of Rotavirus Vaccines

TONG Yanjun, CHEN Tong, FU Shuguang, HE Qian, MA Chao, LI Jialin*
(*Center for Gansu Provincial Vaccine Engineering Research*, *The First Dept. of Vaccine in Lanzhou Institute of Biological Products Co*., *Ltd*., *Lanzhou 730046*)

ABSTRACT: In order to explore the impact of sterilizing filtration in the produce process of semi-finished products on the quality attributes of trivalent rotavirus vaccines, and to evaluate the feasibility of implementing sterilizing filtration in this produce process, sterilizing filtration experiments of 22 batches of semi-finished product were conducted in two stages. The test filter membrane had a pore size of 0.22 μm and was made from polyvinylidene fluoride(PVDF). The effect of sterilizing filtration on virus titer, appearance, pH value, osmotic pressure, and clarity of the test products was investigated, and a bacterial interception test on the proposed selected filter membrane material was performed. The results indicated that the PVDF sterilizing filter with a pore size of 0.22 μm for the sterilizing filtration of the semi-finished trivalent rotavirus vaccines did not significantly affect the virus titer, appearance, pH value, and osmotic pressure of the test products(P>0.05), but notably enhanced the clarity of the test products(P<0.05). This research provides valuable data and insights for applying sterile filtration to the formulation process of the semi-finished trivalent rotavirus vaccines.

Key Words: trivalent rotavirus vaccine; semi-finished product; sterilizing filtration; bacterial interception experiment

无菌药品按生产工艺可分为采用最终灭菌工艺生产的最终灭菌产品和部分或全部工序采用无菌生产工艺的非最终灭菌产品。无菌产品应当尽可能采用加热方式进行最终灭菌[1]。对于热不稳定的产品，可采用无菌生产操作或过滤除菌的替代方法[2]。

三价轮状病毒疫苗为非最终灭菌的减毒活疫苗，为了保障产品有效性，全工序采用无菌生产的方式进行，操作难度较大，对技术人员的要求较高[3]。半成品配制作为疫苗制剂生产阶段的关键一环，其工艺无菌性直接关系着终产品的安全性及生产成本[4]。因此，在半成品配制阶段增加除菌过滤

收稿日期：2023-04-06
作者简介：童彦军(1988—)，男，医学生物学工程师，从事病毒性疫苗工艺研发及疫苗生产工作。
通信作者：李佳林(1979—)，男，高级医学生物学工程师，从事病毒性疫苗工艺研发及疫苗生产管理工作。
E-mail：jlli@vacmic.com

工序，对保障产品质量，降低产品的无菌风险具有重要作用[5]。

目前，高效的下游处理是快速发展的医药行业面临的一个重大挑战。病毒类或病毒样颗粒疫苗的大粒径范围（100 ～ 400 nm）增加了除菌过滤的复杂性[6—7]。本研究分 2 个阶段进行了三价轮状病毒疫苗小试规模的半成品过滤试验，初步评估了在半成品配制阶段增加除菌过滤工序对产品质量属性的影响[8]。其中，第一阶段根据拟选定的滤膜孔径和材质，对过滤前后产品的病毒滴度进行考察；第二阶段是基于第一阶段获得的积极结果，选用相同滤膜材质和孔径的除菌滤器，初步放大试验规模和试验批次，对半成品过滤前后的病毒滴度和理化特性进行研究，并对拟选定的滤膜进行细菌截留试验，考察三价轮状病毒疫苗是否对滤膜的细菌截留性能产生影响。

1 仪器与试药

SevenExcellence 型多参数测试仪（瑞士 Mettler Toledo 公司）；OM-6060 型全自动渗透压分析仪购自［爱科来国际贸易（上海）有限公司］；HERAcell 240i 型 CO_2 培养箱和 AQ4500 型精密型浊度仪均购自美国 Thermo Fisher 公司；7500 型实时荧光定量 PCR 系统和 680 型全自动酶标仪均购自美国 Bio-Rad 公司。

新生牛血清（兰州民海生物工程有限公司）；One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂盒（日本 Takara 公司）；MEM 培养基、胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司；轮状病毒检测试剂盒由兰州生物制品研究所有限责任公司诊断室提供；0.22 和 0.45 μm 的 Durapore® 聚偏二氟乙烯（PVDF）表面滤膜、5.08 cm（2 英寸）Durapore® 筒式滤器和 Millex-GV 针头过滤器均购自美国 Millipore 公司；聚对苯二甲酸乙二醇酯（PET）瓶购自兰州百灵塑料制品有限公司。

缺陷型假单胞菌（ATCC19146）购自 ATCC；G2、G3 和 G4 型人 - 羊轮状病毒基因重配株和兰州羔羊轮状病毒（Lanzhou lamb rotavirus，LLR）株由兰州生物制品研究所有限责任公司研发和保存；原液生产用基质细胞非洲绿猴肾细胞（Vero 细胞）和总病毒滴度检定用细胞猴胚肾细胞（MA104 细胞）由兰州生物制品研究所有限责任公司疫苗一室保存；分型病毒滴度检定用细胞非洲绿猴肾细胞（Vero 细胞）由兰州生物制品研究所有限责任公司质量检定室保存。

2 方法与结果

2.1 半成品配制

依据产品半成品配制原则，分 2 个阶段进行三价轮状病毒疫苗半成品试配，试配半成品中含有 G2、G3 和 G4 型人 - 羊轮状病毒基因重配株。第一阶段配制 6 批半成品，每批 50 mL，批号为 001 ～ 006；第二阶段配制 16 批半成品，每批 500 mL，批号为 007 ～ 022。所有半成品均装在 PET 瓶中。

2.2 病毒滴度检测方法

总病毒滴度检测方法：三价轮状病毒疫苗 G2、G3 和 G4 型总病毒滴度检测方法采用细胞培养半数感染量（$CCID_{50}$）联合 ELISA 法进行。将 MA104 细胞用细胞培养液 MEM 配制成每 1 mL 约含 1.0×10^5 个细胞的悬液，接种至 96 孔细胞培养板，每孔 100 μL，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 3 ～ 4 d；将供试品和对照品（LLR 株）预处理后照 10 倍梯度稀释，接种到培养后的细胞板上，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 6 d。培养结束后冻融 1 次，按轮状病毒检测试剂盒使用说明书进行 ELISA 试验判定。在阴性、阳性对照成立的条件下，按 Spearman-Karber 法计算样品及对照品的病毒滴度值。

各分型病毒滴度检测方法：对轮状病毒在 Vero 细胞中复制产生的 mRNA 进行 qRT-PCR 法检测，确定三价轮状病毒疫苗 G2、G3、G4 型病毒滴度。将 37 ℃、5% CO_2 条件下培养的 Vero 细胞制备成每 1 mL 含 5×10^4 个细胞的悬液，按每孔 200 μL 接种于 96 孔细胞培养板，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 70 ～ 74 h；将供试品和参考品稀释消化后，接种到培养后的细胞培养板上，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 18 ～ 24 h；培养结束后裂解病毒，利用 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂盒进行检测并读出 C_t 值，通过对参考品和供试品的 C_t 值数据进行平行线分析，在双平行线均成立的情况下，根据参考品的滴度值推算出供试品的病毒滴度。

2.3 除菌过滤

半成品过滤试验第一阶段，对配制好的 6 批半成品用直径为 33 mm、孔径为 0.22 μm 的针头式滤

器进行过滤，并在过滤前后取样进行病毒滴度检测；半成品过滤试验第二阶段，对配制好的16批半成品用直径为5.08 cm(2英寸)、孔径为0.22 μm的筒式滤器进行过滤。2种滤器滤膜材质均为亲水性PVDF。

2.4 第一阶段过滤试验的病毒滴度结果

取“**2.1**”项下半成品，按“**2.3**”项下方法进行第一阶段过滤，按“**2.2**”项下方法测定病毒滴度，采用Minitab 20.0软件对试验数据进行统计学分析。6批半成品（每批50 mL）除菌过滤前后的病毒滴度为1 mL 4.50～7.80 $lgCCID_{50}$。配对*t*检验结果（表1）显示，在不同的病毒滴度范围内，除菌过滤对6批半成品的G2、G3、G4型病毒滴度和G2、G3、G4型总病毒滴度均没有显著影响（$P>0.05$）。

2.5 第二阶段过滤后的相关表征

取“**2.1**”项下半成品，按“**2.3**”项下方法进行第二阶段过滤，按“**2.2**”项下方法测定病毒滴度。结果显示，16批半成品（每批500 mL）除菌过滤前后的病毒滴度为1 mL 4.70～8.10 $lgCCID_{50}$。配对*t*检验结果（表2）表明，在不同的病毒滴度范围内，除菌过滤对16批半成品的G2、G3、G4型病毒滴度和G2、G3、G4型总病毒滴度均没有显著影响（$P>0.05$）。

依据ChP 2020年版三部收载方法检测过滤前后半成品的外观、pH值、渗透压和澄清度。结果显示，未观察到16批半成品（每批500 mL）除菌过滤前后的外观发生变化，均为淡粉红色液体；过滤前后试验样品的pH值范围为7.251～7.316和7.241～7.311，渗透压范围为642～665和647～670 mOsmol/kg，但澄清度则分别为0.928～1.312和0.517～0.857 NTU。由此可见，除菌过滤对16批半成品的外观、pH值和渗透压没有显著影响（$P>0.05$）；但对试验产品的澄清度有显著影响（$P<0.05$），说明除菌过滤有益于提高产品的澄清度。

2.6 细菌截留试验

细菌截留试验：选取3批次等比例缩小的0.22 μm亲水性Durapore® PVDF试验膜（表面积为13.8 cm^2），1批次相同膜材质的0.45 μm测试膜（同时为阳性对照膜），在实验室模拟实际生产工艺的最差条件，进行细菌截留验证研究。本试验挑战的菌株为缺陷型假单胞菌（ATCC19146），挑战试验的菌浓度应至少达到每1 cm^2有效过滤面积10^7个菌的挑战水平。

本次挑战试验用料液为轮状病毒疫苗，测试批量（等比例缩小的体积）≥ 500 mL，温度范围为

表1　6批半成品过滤前后的病毒滴度比较

Tab.1　Comparison of Virus Titers of Six Batches of Semi-finished Product before and after Filtration

病毒分型	项目	每1 mL样品的病毒滴度($lgCCID_{50}$)均值						配对*t*检验	
		001	002	003	004	005	006		
G2	过滤前	6.63	6.88	6.97	7.36	5.84	6.45	$t=-1.60$	$P=0.170$
	过滤后	6.50	7.70	7.40	7.50	6.00	6.40		
G3	过滤前	6.57	6.03	7.02	7.13	6.44	6.46	$t=-0.14$	$P=0.896$
	过滤后	6.60	6.45	6.78	6.73	6.56	6.63		
G4	过滤前	5.77	5.28	6.19	4.84	6.77	7.24	$t=-0.31$	$P=0.772$
	过滤后	5.70	4.50	6.20	5.20	6.90	7.30		
总病毒	过滤前	7.1	7.2	6.8	7.6	7.1	7.4	$t=-0.89$	$P=0.415$
	过滤后	7.2	7.0	6.8	7.8	7.2	7.5		

表2　16批半成品过滤前后的病毒滴度统计分析

Tab.2　Statistical Analysis of Virus Titers of Sixteen Batches of Semi-finished Product before and after Filtration

统计分析	G2型		G3型		G4型		总病毒	
	过滤前	过滤后	过滤前	过滤后	过滤前	过滤后	过滤前	过滤后
每1 mL样品的病毒滴度($lgCCID_{50}$)均值	5.95	5.90	6.71	6.61	6.20	6.15	6.88	6.68
标准差	0.85	0.86	0.41	0.46	0.54	0.43	0.70	0.66
*t*值	0.54		1.44		0.93		1.75	
*P*值	0.601		0.172		0.368		0.101	

8.8 ～ 25.7 ℃。试验膜 A、B、C 的过滤压力范围为 0.152 ～ 0.269 MPa，对照膜 D 过滤压力范围为 0.062 ～ 0.076 MPa。详细数据和参数如表 3 所示。

本次缺陷型假单胞菌挑战试验中，挑战菌是能够通过 0.45 μm 的 Durapore® 测试（对照）膜的适宜菌体。结果显示，通过 3 批 0.22 μm Durapore® 试验膜的滤液均无菌，挑战微生物的菌液浓度均大于每 1 cm^2 有效过滤面积 1.0×10^7 个菌落数，表明 PVDF 滤膜能用于拟定批量的三价轮状病毒疫苗半成品的除菌过滤。详细数据如表 4 所示。

3 讨论

过滤介质、工艺条件和除菌过滤器是影响除菌过滤效果的 3 个重要因素 [9]，选择适合三价轮状病毒疫苗半成品特性和工艺条件的滤膜材质是除菌过滤的首要条件 [10]。本研究选用的滤膜材质为亲水性 PVDF，该滤膜通量大、流速高，具有低蛋白吸附、低溶出和化学兼容性良好的特点，在生物医药行业应用普遍，适用于终端除菌过滤 [11]。初步研究结果显示，该滤膜能够良好地适应三价轮状病毒疫苗半成品特性；对试验产品的病毒滴度及理化特性如外观、pH 值、渗透压的影响不显著（P>0.05），但能显著改善产品的澄清度，有益于提高疫苗产品的质量。

病毒滴度是病毒类疫苗产品有效性和质量保障的关键质量属性，是除菌过滤的关键性考察指标 [12]。本研究共计 22 批次的半成品过滤研究结果充分表明，滤膜材质为 PVDF、孔径为 0.22μm 的初步过滤工艺设计，能够完全满足产品对 G2、G3、G4 各型病毒滴度和 G2、G3、G4 型总病毒滴度的要求。另有研究 [6,13] 表明，除菌过滤是病毒滴度损失的重要原因，同时病毒浓度也是影响除菌过滤性能的因素之一。本研究采用不同病毒滴度范围的半成品进行除菌过滤试验，结果表明在病毒滴度范围为 1 mL 4.50 ～ 7.80 $lgCCID_{50}$（第一阶段）和 1 mL 4.70 ～ 8.10 $lgCCID_{50}$（第二阶段）时，除菌过滤均不会对试验产品的病毒滴度产生显著影响（P>0.05）。

轮状病毒疫苗对缺陷型假单胞菌 ATCC19146 没有杀菌作用，基于此进行了细菌截留试验。结果表明，轮状病毒疫苗不会改变除菌级（0.22 μm）亲水性 Durapore® 滤膜的性能，达到每 1 cm^2 有效过滤面积截留 ≥ 1.0×10^7 个缺陷型假单胞菌 ATCC19146 的标准。本试验中 0.22 μm 膜的测试结果可代表在相同的过滤工艺下，Durapore® 0.22 μm 亲水性 PVDF 过滤器具有相同的截留性能。

研究 [13] 表明，除菌过滤的性能在很大程度上取决于宿主细胞蛋白质混合物的复杂组成。因此，

表 3 细菌截留试验的参数汇总

Tab.3 Summary of Parameters of the Bacterial Interception Test

检测滤膜	滤膜批号	滤膜孔径/μm	终端过滤体积/mL	总过滤体积[1)]/mL	接触时间/h	再循环时间/min	最小流速/(mL·min^{-1})
试验膜A	R9SN69273	0.22	266	292 00	3.23	168	172
试验膜B	R1KA09257	0.22	274	325 00	3.23	168	192
试验膜C	RG042820	0.22	268	298 00	3.23	168	176
对照膜D	R3MA05763	0.45	287	292 00	3.23	168	172

注：[1)] 总过滤体积 = 最小流速 × 再循环时间 + 终端过滤体积。

表 4 细菌截留试验结果

Tab.4 Results of the Bacterial Interception Test

滤膜	挑战菌液浓度		滤膜挑战水平[1)]/(cfu·cm^{-2})	滤液无菌状态
	起始/(cfu·mL^{-1})	最终/(cfu·mL^{-1})		
试验膜A	2.38×10^6	2.40×10^6	4.63×10^7	无菌
试验膜B	2.38×10^6	2.46×10^6	4.88×10^7	无菌
试验膜C	2.38×10^6	2.10×10^6	4.08×10^7	无菌
对照膜D	2.38×10^6	2.64×10^6	5.49×10^7	TNTC[2)]

注：[1)] 滤膜挑战水平 = 最终挑战菌液浓度 × 终端过滤体积 / 过滤表面积（13.8 cm^2）；[2)] 表示菌落太多，无法计数。

应基于产品特性选择适合的过滤系统和过滤工艺参数[14]。本研究为半成品疫苗配制工艺增加除菌过滤工序积累了关键数据和经验，后续还需要结合产品特性和工艺特点，选用相同滤膜材质和孔径的除菌滤器，进行中试或生产规模的半成品除菌过滤研究。同时，应对过滤器进行可提取物测试、活性药物成分的吸附试验和滤器兼容性检查等验证工作。后续研究除要考虑病毒滴度和理化特性外，还应对产品的其他质量属性如残余牛血清蛋白、残余宿主蛋白、Vero 细胞 DNA 残留量，以及产品工艺参数如工作时长等进行考察，以进一步确认除菌过滤工序对产品特性和工艺的影响，评估半成品配制工艺增加除菌过滤工序的可行性[15—16]。除菌过滤不能对产品的质量产生不良影响[17]，后续研究也应充分认识除菌过滤工艺的局限性，尽可能采取措施降低除菌过滤本身的风险。另外，过滤系统的设计、选择、验证和使用等内容应根据《除菌过滤技术及应用指南》[18]来实施，确保生产工艺的法规符合性，使生产过程满足其质量和预定用途的要求[19—20]。

参考文献：

[1] 尚　悦. 无菌药品参数放行国际实施历程及我国现状浅析[J]. 中国医药工业杂志, 2021, **52**(9): 1248-1252.

[2] 中华人民共和国卫生部. 药品生产质量管理规范(2010年修订)[EB/OL]. (2011-01-17)[2023-03-15]. http://www.nhc.gov.cn/wjw/bmgz/201102/e1783dd3c9684f0cb875d71170a96d17.shtml.

[3] 王似锦, 王杠杠, 余　萌, 等. 国内外无菌药品生产法规指南中人员的管理[J]. 中国医药工业杂志, 2022, **53**(8): 1222-1226.

[4] 穆　琰. 无菌药品生产过程的放行评估[J]. 当代化工研究, 2022, (13): 183-185.

[5] SHOAEBARGH S, GOUGH I, MEDINA M F, *et al*. Sterile filtration of oncolytic viruses: an analysis of effects of membrane morphology on fouling and product recovery [J]. *J Memb Sci*, 2018, **548**: 239-246.

[6] TAYLOR N, MA W, KRISTOPEIT A, *et al*. Evaluation of a sterile filtration process for viral vaccines using a model nanoparticle suspension [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, **118**(1): 106-115.

[7] JANNIK D, SEBASTIAN H, BJÖRN H, *et al*. Scalability of sterilizing-grade filters in different filtration modes [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2020, **74**(6): 644-659.

[8] DU Z S, MOTEVALIAN S P, CARRILLO CONDE B, *et al*. Scale-up issues during sterile filtration of glycoconjugate vaccines [J]. *Biotechnol Prog*, 2022, **38**(4): e3260.

[9] 胡敬峰, 许　丹, 韩　莹. 除菌过滤技术在药品生产应用中存在的问题与对策[J]. 中国药事, 2020, **34**(12): 1384-1388.

[10] 王卫星. 除菌过滤器的选择与小容量注射剂的无菌质量风险[J]. 机电信息, 2010, (8): 15-17.

[11] NA J, SUH D, CHO Y H, *et al*. Comparative evaluation of the performance of sterile filters for bioburden protection and final fill in biopharmaceutical processes [J]. *Membranes* (Basel), 2022, **12**(5): 524.

[12] 周振歆, 易　力, 常亚军, 等. 冻干甲型肝炎减毒活疫苗除菌过滤前后产品质量分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, **34**(12): 1412-1417.

[13] WRIGHT E, KAWKA K, MEDINA M F C, *et al*. Evaluation of host cell impurity effects on the performance of sterile filtration processes for therapeutic viruses [J]. *Membranes* (Basel), 2022, **12**(4): 359.

[14] JOHNSON T F, JONES K, IACOVIELLO F, *et al*. Liposome sterile filtration characterization via X-ray computed tomography and confocal microscopy [J]. *Membranes* (Basel), 2021, **11**(11): 905.

[15] 颜若曦. 液体除菌过滤技术检查要点探析[J]. 中国医药导刊, 2022, **24**(6): 613-617.

[16] YANG H, LI N, CHANG S. A risk-based approach to setting sterile filtration bioburden limits [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2013, **67**(6): 601-609.

[17] ANTONSEN H R K, AWAFO V, BENDER J L, *et al*. Sterilizing filtration of liquids. Technical report No. 26 (revised 2008) [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2008, **62** (5 Suppl TR26): 2-60.

[18] 国家药品监督管理局. 除菌过滤技术及应用指南[EB/OL]. (2018-07-31)[2023-03-15]. https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqtggtg/20180911170301439.html.

[19] AKERS M J. Sterile filtration [J]. *Int J Pharm Compd*, 2015, **19**(5): 393-401.

[20] JORNITZ M W, MELTZER T H. Validation of sterilizing grade filtration [J]. *Dev Biol* (Basel), 2003, **113**: 65-69.