

**ICH Q5A (R2)：人類或動物來源細胞株衍
生之生物技術產品病毒安全性評估**
**Viral Safety Evaluation of Biotechnology
Products Derived from Cell Lines of Human
or Animal Origin**

衛生福利部食品藥物管理署
中華民國115年9月

前言

國際生物藥品相關法規因應科學技術進展與產品多樣化之需求持續演進，其目的在於強化生物製劑之品質、安全性與有效性之管理，以確保病人用藥安全與產品品質之穩定性。國際醫藥法規協和會（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH）所制訂之「ICH Q5A：Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin」係針對以人類或動物來源細胞株所製造之生物製劑，提供病毒安全性評估之國際標準，涵蓋病毒檢測、去除及滅活策略之設計與驗證，並為各國法規機關與產業界廣泛採用之依據。

為因應病毒安全性評估技術之進步及風險管理概念之精進，ICH於2023年11月1日完成ICH Q5A之修訂版（R2），以整合最新科學知識與實務經驗，強化病毒安全性評估之科學性與一致性。本指引爰參考ICH Q5A（R2）之內容訂定，作為我國生物技術產品病毒安全性評估之重要參考文件，並作為現行相關法規之補充說明。遵循本指引有助於建立系統性之病毒風險評估與控制策略，確保產品於開發與製造過程中具備充分之病毒安全保障，同時提升整體品質管理水準。本指引未來將持續參酌ICH最新發展進行滾動式修訂，以提供相關業者實務運作之依循。

- 本指引為中文翻譯本，供我國指引推行參考之用，最終仍以ICH公告之英文文本為準

目錄

第一章、簡介.....	5
第二章、病毒汙染之可能來源.....	6
2.1 可能存在於主細胞庫內之病毒.....	6
2.2 生產過程中可能引入的外來病毒.....	6
第三章、細胞株驗證：病毒檢驗.....	7
3.1 主細胞庫、工作細胞庫及達生產用體外細胞年齡上限的細胞之病毒檢測.....	7
3.1.1 主細胞庫.....	7
3.1.2 工作細胞庫.....	7
3.1.3 達生產用體外細胞年齡上限的細胞.....	8
3.2 建議之病毒檢測和鑑定試驗.....	8
3.2.1 反轉錄病毒檢測.....	8
3.2.2 體外細胞培養感染性試驗 (In Vitro Cell Culture Infectivity Assays).....	9
3.2.3 體內試驗 (In Vivo Assays).....	9
3.2.4 特定病毒檢測.....	10
3.2.5 分子方法.....	10
3.3 細胞株之可接受性.....	12
第四章、未加工原液之病毒檢測.....	12
第五章、病毒清除研究與純化原液之病毒檢測的基本原理和執行計畫.....	13
第六章、病毒清除製程評估及製程特性鑑定.....	15
6.1 用於病毒清除評估與特性鑑定之病毒選擇.....	15
6.1.1 相關病毒與模式病毒.....	16
6.1.2 其他考量因素其他應考慮之重點：.....	16
6.2 病毒清除製程評估與製程特性鑑定之設計及其考量.....	17
6.2.1 設施與人員.....	17
6.2.2 生產製程縮小規模模型.....	17
6.2.3 逐步評估病毒清除率.....	17
6.2.3 判定物理移除與去活化.....	17

6.2.5 去活化評估	18
6.2.6 層析管柱之功能與再生	18
6.2.7 特別注意事項	18
6.3 病毒清除研究的解讀	19
6.4 病毒清除研究的限制	20
6.5 統計	21
6.6 應用既有知識以評估病毒清除率	21
6.7 病毒清除之再評估	22
第七章、連續製程的考量重點	22
7.1 連續製程中的病毒安全性	23
7.2 連續製程中病毒清除的一般考量	23
7.3 連續製程中病毒清除的特殊考量	23
7.3.1 延長生產培養期相關的潛在風險	24
7.3.2 病毒清除研究之方法	24
第八章、總結	24
第九章、專有詞彙	25
第十章、參考文獻	29
附錄 1: 病毒清除研究之病毒選擇	37
1.1 實用「模式」病毒範例	37
1.2 曾用於病毒清除研究之病毒範例	37
附錄 2: 評估病毒和病毒減量係數之統計學考量	40
附錄 3: 病毒清除研究中減量係數的計算方法	42
附錄 4: 每劑產品中預估病毒顆粒數的計算方法	43
附錄 5: 利用既有知識（含內部經驗）以減少產品專屬確效工作的範例	44
5.1 簡介	44
5.2 以溶劑／清潔劑去活化或單獨以清潔劑去活化	44
5.3 於低 pH 下處理	46

5.4 病毒過濾	47
附錄 6: 基因工程病毒載體和病毒載體衍生產品	50
6.1 簡介	50
6.2 病毒測試	50
6.3 病毒清除	52

ICHQ5A(R2)：人類或動物來源細胞株衍生之生物技術產品病毒安全性評估

2023年11月1日

第一章、簡介

本指引說明生物技術產品之病毒安全性評估，包括病毒清除和檢測，並概述這些產品於上市申請時應提交之資料。生物技術產品包括生物治療藥品和衍生自人類或動物細胞株(例如，哺乳動物、鳥類或昆蟲)之特定生物製劑。在本文件中，「病毒」一詞不包括非常規傳播之病原體，像是哺乳動物普利昂蛋白 (Prion)(例如：牛海綿狀腦病、羊搔癢症)。鼓勵申請者與適當之主管機關討論傳播性海綿狀腦病相關議題，因為該議題超出本指引之範圍。

本指引涵蓋的產品包括使用重組 DNA 技術，透過體外細胞培養製備的細胞激素、單株抗體 (mAbs) 以及蛋白次單位疫苗。本指引亦涵蓋某些基因工程病毒載體及病毒載體衍生的產品(例如，病毒疫苗和基因治療產品)，前提是這些產品可進行病毒清除，且不會對產品產生不良影響。此類產品可能包括病毒載體，例如腺相關病毒 (Adeno-associated viruses, AAV)，可透過暫時性或穩定轉染的細胞株生產。此外，也涵蓋病毒載體衍生產品，例如利用桿狀病毒表達的類病毒顆粒 (Virus-like particle, VLP)、蛋白次單位以及基於納米顆粒的蛋白疫苗和治療產品。AAV 基因治療載體包括那些在生產過程中依賴輔助病毒 (如單純疱疹病毒或腺病毒) 的載體。關於基因工程病毒載體和病毒載體衍生產品的具體指引，請參閱附錄 6。

去活化病毒疫苗及含有自我複製因子的活性減毒病毒疫苗不在本指引適用範圍內。細胞治療製劑亦不在本指引之範圍內；然而，相關原則可視情況予以適用(例如，生物來源的起始物或是原物料)。

由於存在汙染風險且全球正持續倡議取代、減量和改進動物使用，因此已經不鼓勵使用活體內(以腹水形式)培養融合瘤細胞來製備物料。若仍存在此類製造情況，則應遵循本指引之原則，包括使用次世代定序(next generation sequencing, NGS)來取代體內試驗。

病毒汙染風險是所有細胞株衍生的生物技術產品須關注的問題，因為此類汙染可能導致嚴重的臨床後果，因此必須降低。此風險可能來自於來源細胞株(細胞受質)本身的汙染，或在生產過程中從外部引入外來病毒。然而，迄今為止，尚未有細胞株衍生的生物技術產品導致被病毒感染的案例。這些產品之病毒安全性可透過以下所述的適當措施獲得合理保障，包括實施全面性的病毒檢測計畫，以及評估製程中病毒去活化與移除的效果。為了防範此類生物技術藥品可能發生的病毒汙染，有以下三個主要且互補的方法：

- 選擇並檢測細胞株及其他原物料，包括培養基成分，以確保不含有害之傳染性病毒。
- 評估製程清除外來和內源性病毒的能力。
- 於適當之生產步驟中對產品進行檢測，以證實不含污染性傳染病毒。

在基因工程病毒載體和病毒載體衍生產品之生產過程中所採用之某些病毒清除步驟，可能不如重組蛋白所採用之步驟有效。因此，應考慮採取進一步的風險降低措施(例如，原物料處理、廣泛病毒檢測之全面測試)(請參閱附錄 6)。

病毒檢測有其固有之限制。例如，偵測低病毒濃度之能力，在統計學上而言是取決於樣本(量)的大小。因此，單一方法不一定能確立產品的病毒安全性。在許多案例中，對最終產品中不含傳染性病毒的信心程度，不僅單靠直接檢測產品(其是否有病毒存在)，亦必須證明純化過程能夠移除／或去活化(清除)病毒。

在生產之不同步驟中所執行之病毒檢測及病毒清除研究(確效)之類型和程度，將取決於多種因素，且應按個案及步驟逐一考慮。應考慮之因素，包括細胞株的來源、細胞庫的特性鑑定和檢測之程度、任何偵測到之病毒的性質、培養基成分、培養方法、設施(廠房)和設備之設計；細胞培養後之病毒測試結果、生產製程清除病毒的能力以及產品的類型和其預期的臨床使用目的。

本文所提出的建議應依據特定產品及其生產製程進行調整。此外，用於確保病毒安全性的方法應予以說明並提供合理性論證。除詳細數據外，亦應提供病毒安全性評估之總體摘要。此摘要應包含病毒安全性研究所有面向的簡要說明，以及用於預防病毒污染之策略。

第二章、病毒污染之可能來源

生物技術產品的病毒污染，可能來自於細胞株之初始來源，亦可能在建立生產細胞株及／或細胞庫的建庫過程中以及生產過程中意外引入之外源病毒。使用經充分特性鑑定的細胞庫和病毒種批可以降低病毒感染的風險。主病毒種批 (master virus seed, MVS) 或工作病毒種批 (working virus seed, WVS) 可能引入的潛在外源病毒之導入與管制，將於附錄 6 中討論。附錄 6 中所述用於產品生產的病毒(生產用病毒)，被視為是製程相關的不純物。

2.1 可能存在於主細胞庫內之病毒

外來病毒污染物可能透過多種途徑被引入主細胞庫 (master cell bank, MCB)，例如：(1) 細胞株源自受感染的動物；(2) 使用病毒來建立細胞株；(3) 使用受污染的生物性試劑(例如，用於篩選之抗體)或原物料(例如，動物或人類血清，以及豬胰蛋白酶)進行細胞培養；或 (4) 在細胞操作及細胞庫製備過程中發生污染。

細胞具有內源性反轉錄病毒，這些病毒會從一個細胞世代傳遞至下一個世代。內源性病毒(核酸)序列可能會持續性的表現，或者被活化而產生具感染性或是有缺陷的病毒顆粒。細胞中亦可能包含潛伏性或持續感染性(persistent)之病毒(例如，疱疹病毒)。

2.2 生產過程中可能引入的外來病毒

外來病毒可能透過多種途徑污染製程，包括但不限於：(1) 細胞培養過程中使用受污染之生物性原物料或試劑，例如，動物血清成分；(2) 使用受污染之病毒種批進行生產(請參閱附錄

6)；(3) 於下游純化過程中使用受污染之原物料或試劑，例如，用於產品篩選或純化之哺乳動物來源之抗體偶和親和性樹脂(antibody-coupled affinity resin)；(4) 在配方過程中使用受污染之賦形劑；以及 (5) 源自於環境的污染，包括非生物性原物料之儲存或是在細胞培養及培養基處理過程中受到人員污染。

監測細胞培養參數(例如，細胞生長和細胞存活率)亦可能有助於早期偵測可能之外來病毒污染。製造商應盡可能避免在製程中使用人類和動物衍生的原物料(例如，人類血清、牛血清、豬胰蛋白酶)。如果無法避免，應以與其風險相稱之相關文件或原物料適用性證明來支持人類和動物衍生之原物料的使用。應提供原產國、組織(tissue)來源、在製程中所採用的病毒去活化或清除處理步驟，以及對該原物料執行過的病毒檢測類型等資訊。若依據風險評估有必要時，則應盡可能於去活化步驟前執行該測試。

對動物或人類血清，或豬胰蛋白酶等具有較高引進外來病毒風險之生物原物料，應盡可能進行病毒去活化處理，例如，游離輻射照射(ionizing irradiation)。額外的病毒風險降低策略可包括細胞培養基或培養基補充物處理，例如，病毒過濾、高溫短時間處理或以紫外線 C 照射(若適當者)。

第三章、細胞株驗證：病毒檢驗

對用於生產生物技術產品的細胞株進行驗證，適當的病毒檢測是重要的一環。

3.1 主細胞庫、工作細胞庫及達生產用體外細胞年齡上限的細胞之病毒檢測

表 1 列出針對用於生產之主細胞庫、工作細胞庫及達生產用體外細胞年齡上限的細胞 (cells at the Limit of In Vitro Cell Age, LIVCA)，建議執行一次病毒檢測項目。

3.1.1 主細胞庫

應對 MCB 進行內源性病毒及外來病毒污染之廣泛檢測。針對異源雜交細胞株，例如，其中一個或多個親代來源於人類或非人類靈長類動物，應進行檢測以偵測人類或非人類靈長類動物來源之病毒，因為源自這些細胞的病毒污染可能構成特定風險。

外來病毒之檢測應同時包括表 1 所述的廣泛性及特異性病毒檢測方法。鼓勵導入如次世代定序等新的分析方法，以檢測廣泛範圍的外來性病毒。為確保能檢測出污染之病毒，檢測方案應依據風險評估，考量親代細胞株之來源及歷史，以及在建立生產細胞和 MCB 建庫過程中可能接觸到之人類或動物來源之原物料。對工作細胞庫(working cell bank, WCB)而非 MCB 進行完整測試，是另一種可接受的替代策略。

3.1.2 工作細胞庫

應依照表 1 之所述，對每個 WCB 進行外來病毒檢測。在適當情況下，若已對 MCB 執行過外來病毒檢測，且對於源自該 WCB 的細胞已經培養至 LIVCA 或超過 LIVCA，並且對其進行

過外來病毒檢測，則該 WCB 可免於進行相同的檢測。

3.1.3 達生產用體外細胞年齡上限的細胞

所訂定的生產時之 LIVCA 應基於生產細胞在具有代表性的縮小規模模型(scale-down model)中進行小規模擴增，以及/或是在先導工廠規模 (pilot plant scale)或商業規模(commercial scale)條件下擴增，直至達到或超過所設定之體外細胞年齡(*in vitro* cell age)所獲得的數據。LIVCA 細胞是經由擴增 WCB 或 MCB 而得的。在 LIVCA 細胞必須進行一次病毒評估，以偵測可能在 MCB 和/或 WCB 中但未被檢測出的病毒。對於 LIVCA 生產細胞進行一次適當的測試(如表 1 所述)，將進一步保證生產過程不會導致內源性病毒的誘導表達、潛伏性病毒的再活化，或低濃度或緩慢增殖病毒的擴增。如果在該階段偵測到任何外源性病毒，則應仔細檢查包括 MCB 和 WCB 在內的整個生產流程，以確定污染源。LIVCA 細胞也可被稱為最終生產細胞(End of Production Cells, EOPC)。

3.2 建議之病毒檢測和鑑定試驗

多種檢測方法被用於偵測內源性和外來病毒。表 2 列出此類檢測方法的範例。這些方法為建議(採用)的，但此表並非涵蓋所有的試驗方法，也並非完全不可改動。最適合之技術可能會隨科學進步而改變。若提出替代的技術方案，應同時檢附適當的佐證數據(資料)。應在進行完整病毒風險評估後制定全面的檢測策略，該策略應納入考量的因素包括細胞株來源、繼代史以及細胞株建立、細胞庫備製和生產(例如，去活化或去除病毒之步驟)使用的原物料與試劑等。此策略應根據風險評估結果，必要時納入額外的分析方法。例如，若存在某種特定病毒的可能性相對較高，除非另有合理說明，否則應包含針對該病毒的專一性檢測或其他偵測方法。應設置適當的對照，以確認檢測方法具適當的檢測靈敏度和專一性。另，若適用時，應考慮可能的基質干擾。

下文的概述為製造商在制定專屬(或適當)於產品及其製程的全面病毒檢測實施計畫時，可採用的一般框架。檢測策略應同時檢附合理說明佐證其適當性。

3.2.1 反轉錄病毒檢測

細胞株應檢測是否存在反轉錄病毒。反轉錄病毒的檢測應在 MCB 以及培養至 LIVCA 或超過 LIVCA 的細胞實施。這些檢測可能包括：感染性試驗(包含直接接種細胞上清液或細胞混合培養)、使用無細胞上清液進行反轉錄酶 (reverse transcriptase, RT) 活性試驗；以及透過穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM) 評估細胞中是否存在(病毒)顆粒。TEM 也能夠偵測其他病原體，因此通常建議用於細胞庫的特性鑑定。

若細胞株會產生反轉錄病毒顆粒(例如一些源自齧齒類、昆蟲和禽類物種的細胞株會出現此情況)，則預期會有 RT 活性，因此可能不需要進行基於 PCR 的 RT 活性檢測(例如，product-enhanced Reverse Transcriptase (PERT) assay)。應以 TEM 確認存在的反轉錄病毒顆粒的類型(例如，A 型和 C 型)。為確定這些內源性反轉錄病毒顆粒是否具傳染性，應使用相關之易受感染細胞(permissive cells，例如，用於檢測一般鼠類反轉錄病毒之 *Mus dunni* 細胞、用於檢測親趨性(ecotropic)鼠類反轉錄病毒之 SC-1 細胞) 進行感染性試驗。並搭配靈敏的反轉錄病毒

檢測讀數分析(sensitive readout assay)，例如 PERT 試驗、S⁺L⁻ 病灶試驗，或 XC 病毒斑試驗。

若不確定細胞株是否會產生反轉錄病毒顆粒，則應對細胞進行 TEM，並對澄清後的上清液進行 RT 測定(例如，PERT 檢測)。基於 PCR 的反轉錄檢測特別有用，因為它能以高靈敏度偵測反轉錄病毒的 RT 活性；然而，RT 活性可能源自於具傳染性或非傳染性反轉錄病毒。由於某些細胞 DNA 聚合酶可導致 RT 結果呈陽性，因此在確認具 RT 活性(因反轉錄病毒污染所致)或是 TEM 呈現陽性結果，後續都應利用易受感染性細胞(包括人類細胞株)搭配靈敏的反轉錄病毒偵測讀數分析，進行傳染性反轉錄病毒的檢測。

應綜合考量所有可取得的數據來解讀反轉錄病毒的檢測結果。依據第 3.3 節與第 5 節內討論之風險評估，即使細胞株會表現內源性反轉錄病毒顆粒也並未被禁止用於生產。

對於內源性反轉錄病毒已被充分分析之細胞株(例如，中國倉鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO)、NS0、Sp2/0 和 Vero 或其他基於既有知識之細胞株)，無須進行化學誘發研究。然而，這類的(化學誘導)研究可能有助於評估新的細胞受質是否存在未知、可被誘導的內源性反轉錄病毒。此外，依據風險評估結果，針對潛伏之 DNA 病毒(例如，人類細胞中之疱疹病毒 herpesvirus)和潛伏之 RNA 病毒(例如，昆蟲細胞中之野田病毒 nodavirus)進行誘發研究，亦可能為適當之舉。這些研究可能有助於衍生自新細胞受質之產品，提供病毒檢測和清除策略之相關資訊。

3.2.2 體外細胞培養感染性試驗 (In Vitro Cell Culture Infectivity Assays)

體外試驗是透過將測試樣本(請參閱表 2)接種至多種指示細胞培養中，這些細胞能偵測廣泛範圍的人類病毒及相關的動物病毒。指示細胞株的組合應包括來源物種之細胞株、人類二倍體細胞(例如，MRC-5)和猴腎細胞株(例如，Vero)。可納入額外之細胞株。測試中使用的細胞的選擇應基於風險評估，並考慮待測試細胞受質的來源物種。

感染性試驗的方法與待測樣品的選擇，應依據細胞受質的來源或細胞操作時可能混入的病毒種類而定。應符合目前之區域法規和指引，監測指示細胞培養中的造成細胞病變病毒、血球吸附及血球凝集病毒。為驗證 MCB、WCB 和 LIVCA 之合適性，應使用易受感染的細胞進行 28 天之測試，且於兩週時至少進行一次繼代培養。

可使用 NGS 或其他分子方法作為體外試驗的補充或替代檢測。這些方法可克服體外細胞培養感染性試驗的一般限制(例如，細胞株對感染的易受感染性)和生產系統特有的限制(例如，檢測樣本本身的干擾或毒性)。

3.2.3 體內試驗 (In Vivo Assays)

體內試驗可依據風險評估來實施，風險評估須考量細胞庫的歷史以及製備過程與檢測策略。然而，對於廣泛使用且已充分特性鑑定的細胞株(例如，CHO、NS0 和 SP2/0)，依據既有知識(prior knowledge)，可無需進行體內試驗。風險考量因素包括先前對未經轉染的親代細胞株所

執行的體內病毒試驗或 NGS 檢測，以及從親代細胞庫所衍生的 MCB 之管控措施。此外，也應該考量同一親代細胞庫所衍生的其他 MCB 之病毒安全性檢測的既有知識，包括建立該 MCB 所使用的方法。若 WCB 是在經核准之受控條件下製備，則通常無須進行體內試驗。對於達到 LIVCA 之細胞，可根據既有知識及其他風險評估，免除進行體內試驗。

若仍有殘餘風險存在，可考慮保留體內試驗，或以非標靶 NGS 來取代，以檢測在 MCB 建立期間或在細胞培養至 LIVCA 階段所可能引進之病毒。

體內試驗之使用可能包括將待測樣本接種至乳鼠、成鼠和雞胚胎蛋(請參閱表 2)。應監測動物之健康狀況，並對任何異常情況進行調查以確定其原因。

由於非標靶 NGS 在病毒檢測方面具有廣泛性及高敏感度，同時考量到體內試驗之侷限性，因此，鼓勵以非標靶 NGS 取代體內試驗。此外，這也推動了全球取代、減量和改進動物實驗使用的倡議。

3.2.4 特定病毒檢測

須檢測之特定病毒清單應基於病毒污染風險評估來建立，並考量(但不限於)細胞來源以及可能的病毒污染源(例如，生物來源之原物料，特別是人類或動物來源)。對於曾暴露於人類或動物來源材料(例如，牛血清和豬胰蛋白酶)的細胞株，應針對人類、牛和豬之病毒實施檢測。對於齧齒類動物來源之細胞株或曾暴露於齧齒類動物來源之原物料之細胞株，應使用核酸擴增技術 (nucleic acid amplification techniques, NAT) 或在小鼠、大鼠或倉鼠中進行抗體產生試驗，以檢測特定物種之病毒。若有暴露於特定動物物種病毒之可能性，就應進行特定病毒之檢測。例如，對於齧齒類動物來源的細胞株、或曾在齧齒類動物繼代培養而建立的細胞株，以及可能使用了齧齒類動物來源試劑的細胞株，若存在齧齒類病毒，可藉由將測試樣本(請參閱表 2)接種至無特定病原(specific pathogen free)動物(例如，小鼠、大鼠和倉鼠)體內，然後測定動物對特定病原體的抗體來進行檢測。

特定病毒檢測之例子，包括小鼠抗體產生 (Mouse Antibody Production, MAP) 試驗、大鼠抗體產生 (Rat Antibody Production, RAP) 試驗及倉鼠抗體產生 (Hamster Antibody Production, HAP) 試驗。目前藉由這些抗體產生試驗所篩檢的病毒，詳見表 3。

NAT 技術，例如 PCR 檢測、標靶或非標靶 NGS，或其他分子方法，可用於替代表 3 中所述之動物檢測，且無須進行分析方法之間的直接比較。

3.2.5 分子方法

NAT 和 NGS 等分子方法可用於病毒檢測。NGS 或可適用於已知及新型的病毒之廣泛(非標靶)檢測。NGS 也可透過定序策略或生物資訊學分析，用於特定病毒的標的檢測。非標靶之 NGS 在證實其分析方法符合預期目的後，可用於取代體內試驗，以及補充或替代體外試驗，而無須進行直接比較。不建議進行直接比較，原因在於檢測系統的終點指標不同，且相較於 NGS 在廣泛檢測已知和未知病毒方面的優異能力，體外和體內試驗在病毒檢測廣度上具有侷

限性。體外和體內試驗的結果依賴病毒在特定標靶系統中的複製能力和生物學特性來進行檢測，這限制了檢測的廣度。以 NGS 取代體內試驗，亦符合以取代、減量和改進使用動物進行試驗的全球目標。

NAT，例如基於 PCR 的方法，可用於病毒專一性檢測。可用標靶或非標靶 NGS 來取代眾多用於特定病毒檢測的 PCR 項目，而無須進行直接比較。這也有助於克服偵測病毒變異株之限制。若結果為陽性，則有必要調查偵測到的核酸是否與感染性病毒相關。

3.2.5.1 核酸擴增技術

NAT，例如基於 PCR 之方法，通常以單獨或多重(檢測)形式使用，以偵測已知病毒或已知親緣相近之病毒家族的病毒序列。當細胞培養試驗因干擾而存在侷限性時，這些分子方法可用於補充。此外，在細胞培養中不易生長而難以進行感染性試驗的病毒，分子方法是此類特定病毒偵測的有效工具。NAT 亦可調整以適用於更廣泛範圍病毒的檢測(例如，degenerate PCR)，但專一性可能會降減。由於檢測方法之專一性高，因此可複合式實施多個病毒專一性 PCR 檢測，以偵測比單一的一般生物學檢測所能涵蓋的更廣泛範圍的病毒。NAT 分析法應針對其預期用途進行適當的確效。此確效應適當包含分析方法確效以及基質特異性驗證(若適用)。

3.2.5.2 次世代定序

NGS(亦稱為高通量定序)已被證實具有廣泛之病毒檢測能力。NGS 可提供確定之靈敏度和病毒檢測廣度，且可減少動物使用和檢測時間。非標靶 NGS 可取代體內試驗，用於偵測未知或非預期病毒種類，無須進行方法直接比較。

非標靶 NGS 亦可在無須進行方法直接比較之情況下，補充或替代體外細胞培養試驗，以檢測已知和未知或非預期之病毒。此可解決體外細胞培養感染性試驗之一般限制(例如，細胞株對感染之敏感性)和生產系統之具體限制(例如，檢測樣品引起之干擾或毒性)。

NGS 可根據已知病毒之序列訊息之可及性，進行標靶檢測。或者，以 NGS 生物資訊分析檢測特定病毒。

NGS(標靶或非標靶)可替代病毒特定 PCR 檢測和齧齒動物抗體產生試驗(第 3.2.4 節)，無須進行方法直接比較。以 NGS 替代體內試驗亦符合全球倡議之意旨，即取代、減量和改進用於檢測之動物使用。

可以考慮使用 NGS 為細胞株之特性或檢測細胞庫、病毒種批或未加工原收穫液。若在因缺乏有效中和病毒載體(請參閱附錄 6)或產品或培養基成分所造成之毒性而導致檢測干擾之情況下，此舉特別有用。於該應用中，NGS 可應用於分析所有基因體病毒核酸(基因體學)、病毒 mRNA(轉錄體學)或衣殼化病毒基因體(病毒體學)。分析細胞培養衍生之材料，基因體學和轉錄體學分析之核酸應自細胞製備，而病毒體學分析則應使用細胞培養上清液或無細胞之病毒製備物。應提供選擇不同分析策略之理由。

於應用 NGS 對已知和新型病毒進行敏感性和廣泛之檢測時，必須考量 NGS 工作流程內之數個關鍵步驟：(1) 樣品預處理(若有進行者)和病毒富集步驟，該步驟可能必須依據樣品材料類型儘量擴大病毒檢測；(2) 病毒核酸提取(自套膜和非套膜顆粒中提取)和資料庫建構(DNA 和 RNA 病毒)之效率；(3) 選擇適合之定序平台進行敏感性病毒檢測；(4) 使用廣泛病毒檢測策略，針對具備不同病毒家族之病毒序列多元化說明之資料庫，進行生物資訊分析。可能必須制定後續策略確認檢測之病毒特定訊號，以區分資料庫中可能存在之非病毒序列。

應使用適合之參考材料進行方法鑑定及驗證，以評估工作流程中涉及之不同步驟之效能，且證實病毒檢測之敏感度、特異性和廣度。此可包括使用目前可利用之參考病毒試劑／套組，以評估全部 NGS 工作流程或特定步驟之效能。該試劑／套組包含不同物理(尺寸、有套膜和無套膜)、化學(低、中、高抗性)和基因組(DNA、RNA、雙股和單股、線性和環狀)特性之病毒。全面病毒資料庫應與多元病毒序列一併使用，以進行廣泛之病毒檢測。可使用其他參考材料類型，以評估特定之技術和生物資訊學步驟。

就任何使用之 NGS 方法，均應提供確效 (validation)／驗證 (qualification)，以證實其預定用途。當被視為替代方法時，此包括方法確效和特定基質確認 (matrix-specific verification)。當被視為補充方法時，此包括方法驗證和特定基質確認。方法確效需要事先定義效能標準，但方法驗證僅評估方法之效能特性。NGS 被視為一種限度測試，因此，方法確效／驗證之效能特性(特異性／檢測廣度和敏感度)應考慮 ICH Q2 之原則。

3.3 細胞株之可接受性

用於製造產品之某些細胞株，可能包含內源性反轉錄病毒、其他病毒或可能被重新活化為傳染性病毒之病毒序列。於此情況下，建議之執行計畫如第 5 節所說明。基於依據產品效益及其預期臨床用途、汙染病毒性質、其感染人類或導致人類患病之可能性、產品之純化過程(例如，病毒清除評估資料)以及對純化原液進行之病毒測試範圍所進行之風險-效益分析，包含內源性反轉錄病毒以外之病毒的細胞株的可接受性，將由適當之主管機關依個案考慮。

第四章、未加工原液之病毒檢測

建議製造商制定計畫，以例行性地檢測生產批次中的外來病毒。未加工原液的病毒檢測的範圍，應考慮下列多個因素，包括用於生產目標產品的細胞株特性、細胞株驗證中所執行的病毒檢測結果與範圍、培養方法、原物料和試劑來源，以及病毒清除研究之結果。有關基因工程病毒載體和其衍生產品之未加工原液檢測，請參閱附錄 6。

對於批次製程，未加工原液是由一個或數個細胞及培養基收穫物合併而成。對於涉及從細胞培養中連續收穫的製程，可能會從流出的產物流中合併中間體或未加工原液樣品。於進一步處理之前，從生物反應器(培養槽)中取出的未加工原液之樣本，代表了最適合檢測外源性病毒汙染的階段之一，能以高檢出概率判斷病毒存在的可能性。因此，應對未加工原液進行適當的病毒檢測。應考慮細胞分離技術對檢測生物反應器中之細胞相關病毒的潛在影響。若未加工原液具在細胞培養試驗中呈現毒性或導致干擾，則可考慮採用最小限度的樣本稀釋或替代檢測方法，例如，NGS(請參閱第 3.2 節)。為檢測細胞相關病毒，應檢測從生產反應器中取出

的完整細胞及細胞裂解物(破碎細胞與細胞培養上清液)的混合物。對於灌流或連續製程，可能無法輕易取得細胞(例如，因為使用了中空纖維或類似之微濾系統)。於此情況下，可使用來自細胞培養之無細胞產品收穫液。對於從細胞培養中連續收穫產物的製程，應說明取樣策略的合理性(包括取樣的週期性及樣品組成)，因為外來病毒和內源性病毒顆粒的含量可能隨細胞培養時間而變化(請參閱第 7 節)。

應對每一批未加工原液進行例行性的外來病毒檢測。此類檢測可能包括使用數種指示細胞株的體外試驗或使用非標靶 NGS (請參閱第 3.2 節)。指示細胞培養應予以觀察 28 天，包括在第 2 週時進行至少一次繼代培養。細胞株在經風險評估後(考量細胞受質、生產培養週期、使用動物衍生原物料或試劑以及製程之病毒清除水準)若是具有合理性，檢測時間或可縮短為 14 天。此外，依據引進潛在污染物的風險評估，NAT 或標靶 NGS 等方法亦可能適用於檢測特定病毒(例如，鼠细小病毒，minute virus of mice)或特定病毒家族。此類快速檢測方法有助於即時做出決策。

若於未加工原液階段檢測出任何外來病毒，除非有合理依據，否則不應使用該細胞培養收穫液進行產品製造。(有關於收穫物料中檢測到外來病毒時的使用指引，請參閱第 5 節)。應仔細檢查製程，以確認污染的根本原因及污染程度，並應採取適當的行動。對於連續製造的製程，批次的最終放行應包括書面文件，證明收穫培養液用於製造該批次產品的期間內，沒有發生病毒污染。若檢測到外來病毒，應建立程序將可能受污染的物料隔離，以減少對更大生產範圍的影響。

第五章、病毒清除研究與純化原液之病毒檢測的基本原理和執行計畫

從 MCB 階段開始、經藥品生產的各個步驟直至最終產品，應制定一套最相關且合理的病毒檢測方案是至關重要的，包括從未加工原液起進行病毒清除之評估與特性鑑定。病毒清除評估與特性鑑定在此方案中扮演關鍵角色。最終目標應是取得產品不含病毒污染之保證。

在選擇用於清除研究的病毒時，區分成以下情況將會有幫助：評估製程清除已知存在的病毒的能力；透過清除非特定「模式(model)」病毒(詳見後述)之特性鑑定，來評估製程之清除穩健性(robustness)。關於「相關(relevant)」特定和非特定的「模式」病毒的定義，請參閱詞彙解說(glossary)。病毒風險評估應包括了解製程中可能存在多少之病毒(例如，在未加工原液中)，以及可清除多少病毒，以評估產品安全性。了解去活化製程的時間相關性對於確保去活化製程的有效性是必要的。在評估病毒清除時，應視情況進行深入的時間相關性去活化研究、去活化或移除再現性之驗證，以及製程參數評估。當使用非特定「模式」病毒描述製程以確認清除穩健性時，應特別注意研究設計中之無包膜病毒(有關「模式」病毒之解釋，請參閱第 6.1.1 節)。病毒清除研究之程度，可能會受到細胞株和未加工原液測試結果之影響。該研究應按下列說明進行(請參閱第 6 節)。

表 4 提供了一個執行計畫的範例，針對細胞或未加工原液的病毒檢測結果所採取的應對措施。該計畫涵蓋了製程評估、病毒清除的特性鑑定以及純化原液的病毒檢測執行計畫。表中列出了各種案例，並在下方進行描述。在所有案例中，均應使用非特定「模式」病毒進行清除(能力)之特性分析。最常見的情況是案例 A、B 和 F。生產系統若被齧齒類反轉錄病毒以外的病毒

所污染，則通常不應使用(於生產)。若有充分理由使用案例 C、D 或 E 中之細胞株來生產藥品，應與相關主管機關進行討論。在案例 C、D 和 E 中，製程中須有經確效且能有效去活化及／或移除該相關(有疑慮)病毒的製程步驟，是至關重要。

案例 A：當在細胞或未加工原液中，除了原料藥(例如病毒載體顆粒)以外並未檢出病毒、類病毒顆粒 或類反轉錄病毒顆粒 (retrovirus-like particle, RVLP) 時，則應如前所述，使用非特定

「模式」病毒進行病毒移除和去活化研究。若未檢測到反轉錄病毒顆粒，且 PERT 檢測結果為陰性者，則無須估計每劑反轉錄病毒顆粒之含量。

案例 B：於齧齒動物細胞株內，若僅存在齧齒類反轉錄病毒(例如，齧齒動物 A 型、C 型和 R 型顆粒)，則除了案例 A 中之非特定病毒清除評估外，亦應使用特定之「模式」病毒(例如，鼠白血病病毒 (murine leukaemia virus, MLV))進行製程評估。當申請上市許可，通常需要提供先導工廠規模或商業規模的 3 批次或以上純化原液中 RVLP 的定量數據。像 CHO、C127、BHK 和鼠融合瘤細胞株(例如，NS0 或 SP2/0 細胞)這類已充分特性鑑定之細胞株，由於常被用作藥品生產之細胞基質，且未報告與產品病毒污染相關的安全問題。因此，對於這些內源性反轉錄病毒樣顆粒已充分解析且清除能力已被證明的細胞株，通常不建議在純化原液或原料藥中檢測非感染性(病毒)顆粒。此方法論也可能適用於其他已充分特性鑑定的細胞株(例如 Sf9 昆蟲細胞株)。

案例 C：當細胞或未加工原液中已知含有某種病毒(齧齒類反轉錄病毒除外)，且無證據表明該病毒對人類具有感染性時(例如，Sf9 rhabdovirus)，病毒去除和去活化評估研究應使用已鑑別之病毒。若無法使用已鑑別之病毒，則應使用「相關」或特定之「模式」病毒，來證實其清除

效果是可接受的。在關鍵去活化步驟中應要取得已鑑別(或「相關」或特定之「模式」)病毒與時間相關性之去活化數據，作為製程評估之一部分。純化原液採用高專一性和高靈敏度之適當方法進行檢測，以檢測該已知病毒。對於上市許可而言，通常應提供先導工廠規模或商業規模的 3 個批次或以上之純化原液之檢測數據。

案例 D：若鑑別出一種可感染人類之病毒(例如，表 3 註腳 a 中所指之病毒)，則該產品僅在特殊情況下才會被視為可接受。於此類情況下，應使用已鑑別之病毒進行病毒移除和去活化

評估研究，且應使用高專一性和高靈敏度之特定方法來檢測該病毒。若無法使用已鑑別之病毒，則應使用「相關」和／或特定之「模式」病毒(稍後說明)。應證明該製程能夠於下游處理時可移除並去活化所選定之病毒。在關鍵去活化步驟中應要取得已鑑別(或「相關」或特定之「模式」)病毒與時間相關性之去活化數據，作為製程評估之一部分。純化原液應採用高專一性和高靈敏度之適當方法進行檢測，以檢測該病毒。對於上市許可而言，通常應提供先導工廠規模或商業規模的 3 個批次或以上之純化原液之檢測數據。

案例 E：當在細胞或未加工原液內檢測出無法以現有方法分類之病毒，由於此病毒可能具致

病性，因此該類產品通常被視為不可接受。在特殊少有情況下，若有充分理由來解釋須使用此類細胞株進行藥品生產時，則在進行後續工作前應與合適的主管機關進行討論。

案例 F：若產品製造時使用了生產用病毒(用於表達基因重組蛋白質或類病毒顆粒而使用的輔助病毒或是病毒載體等)，則應針對該生產用病毒或特定的「模式」病毒(例如，baculovirus、adenovirus、herpesvirus)進行病毒清除的實證。除非已藉由足夠且穩定的超額清除能力證明其合理性，否則應對每一批純化原液檢測殘留的生產用病毒(第 6.3 節)。在此情況下，應至少檢測 3 批次純化原液，以確認無殘留之生產用病毒。

第六章、病毒清除製程評估及製程特性鑑定

病毒移除或去活化程序之評估與特性鑑定，對於建立生物技術產品之安全性而言很重要。在以往的污染案例，曾發生被未知或甚至未曾預料的病原體所污染。儘管該情況的發生是各種來源的原物料所造成，而非來源於經完整特性鑑定之細胞株，但也再次強化了病毒清除評估可提供一定程度之信心，確保任何未知、未被懷疑且有害之病毒均能被移除。研究應有詳細書面紀錄且在受管制的方式進行。

執行病毒清除步驟(程序)之特性鑑定與評估，目的在於證明製程能清除細胞受質中已知內源性存在的病毒，或因使用生產用病毒後而引入的病毒，同時確保那些無法檢出或可能進入製程之外來病毒能被清除。病毒清除研究之目的為：(1) 評估(哪些)製程步驟能有效去活化或移除病毒；(2) 定量評估這些製程在病毒減少之總體水準。為達成此目標，應刻意加入(即「添加」)足夠量的病毒到未加工原液或是各製程步驟中所取得之製程中間體，並證明所添加的病毒在後續的各個步驟中被移除或去活化的程度。若能夠以較少之步驟證實達到適當之清除率，則無須對製程之每個步驟進行評估或特性鑑定。應考慮到製程中的其他步驟可能對病毒去活化或移除有間接影響。製造商應解釋且證明其用於病毒清除評估的方法是合理的。在適當狀況下，應對 3 個批次的細胞培養液進行定量以確認進入純化過程之病毒顆粒數量，這些數據應作為上市申請資料之一部分。

病毒傳染性之降低，可透過移除病毒顆粒或去活化病毒傳染性之方式來達成。針對每個評估地生產步驟，應描述使病毒失去傳染性之可能機制是來源於去活化或移除。就去活化步驟，應規劃研究以於不同時間點取樣並繪製去活化曲線圖(請參閱第 6.2.5 節)。

除了對已知存在之病毒進行清除研究外，亦應執行其他研究以評估移除或去活化病毒的能力。使用具有多元生物化學和生物物理特性之病毒進行研究之目的，在為了特性鑑定該清除未知或預期不存在之病毒之程序的穩健性(耐變性)，而非為達到特定之去活化或移除目標。最好能證實製程具有去活化或移除病毒之能力(請參閱第 6.3 節)。進行此類研究並非用於評估特定的安全風險，因此無須達成特定之清除率。

6.1 用於病毒清除評估與特性鑑定之病毒選擇

用於清除評估和製程特性鑑定研究的病毒，應選擇那些與可能污染產品的病毒相似之病毒，以及能代表廣泛之物理化學特性，以測試系統對一般病毒的去除能力。製造商應依據本指引

中規定之評估和特性鑑定研究之目標，說明病毒選擇之合理性。

6.1.1 相關病毒與模式病毒

於執行病毒清除研究中，一個主要的重點是決定應使用哪些病毒。這些病毒可分為三類：(1) 「相關」病毒，(2) 特定「模式」病毒，以及 (3) 非特定「模式」病毒。「相關」病毒是被用於病毒清除研究中。「相關」病毒是指已鑑別的病毒，或是與已鑑別或可能污染細胞受質、污染製程中使用之任何試劑/原物料之病毒同一物種的病毒。下游製程應證實其能夠移除和／或去活化此類病毒。當「相關」病毒無法取得或不適合用於病毒清除研究之製程評估(例如，無法於體外培養至足夠高的力價)時，則應以特定之「模式」病毒作為替代。適當的特定「模式」病毒可以是與已知或懷疑的病毒高度相關(同屬或同科)之病毒，且與觀察到或懷疑的病毒有相似的物理和化學特性。源自齧齒類動物之細胞株，通常含有內源性反轉錄病毒或類反轉錄病毒顆粒，其可能具有感染能力(C 型顆粒)或不具感染能力(細胞質中的 A 型和 R 型顆粒)。對於源自齧齒類細胞株之產品，應測定其製程對於移除及／或去活化齧齒類反轉錄病毒的能力，這可以透過使用 MLV 來達成，對於齧齒類來源的細胞，這種病毒屬特定「模式」病毒。

對於 CHO 細胞衍生之產品，CHO 細胞來源之內源性病毒顆粒也可用於病毒清除試驗。針對這些(病毒)顆粒目前尚無感染性試驗方法，因此對於檢測方法(例如，分子或生化方法)應對其使用目的進行適用性確認。當使用 Epstein-Barr virus (EBV) 讓 B 淋巴細胞永生代進而獲得人類細胞株時，應測定製程移除和／或去活化疱疹病毒之能力。偽狂犬病毒(Pseudorabies virus)也許可用作特定之「模式」病毒。

當研究目的是在於特性分析製程對一般病毒之移除及／或去活化的能力(即特性鑑定清除製程之穩健性(耐變性))時，應使用具有不同特性之非特定「模式」病毒進行病毒清除特性鑑定。從「相關」及／或特定「模式」病毒研究中獲得之數據，也可用於此類評估。無須對所有類型的病毒進行測試。應優先考慮那些對物理和／或化學處理具顯著抗性之病毒。針對此類病毒所獲取之結果，可提供關於製程對一般病毒之移除和／或去活化的有用數據。所使用病毒之選擇和數量，應考量細胞株與製程之品質和與特性鑑定(結果)。一般而言，應評估製程對至少三種具不同特性病毒之清除能力。

附件 1 及表 A-1 提供了有用的「模式」病毒範例，這些模式病毒代表一系列不同的物理化學結構，以及已應用於病毒清除研究之病毒的範例。

6.1.2 其他考量因素其他應考慮之重點：

- 理想的病毒應為可生長至高力價，儘管這並非總是可行。
- 對於被評估的製程各步驟，應使用高效且可靠之檢測方法，來偵測所使用的各種病毒。
- 應考慮特定病毒可能對執行清除研究之人員所造成之健康危害。

6.2 病毒清除製程評估與製程特性鑑定之設計及其考量

6.2.1 設施與人員

由於優良製造規範之限制，不適合將任何非預期病毒引入生產設施。因此，病毒清除研究應於配備病毒學作業設備之獨立實驗室中進行，並由具備病毒專業知識之工作人員執行，並與熟悉特定製程、參與設計及準備純化製程的縮小規模模型的生產人員合作。

6.2.2 生產製程縮小規模模型

應實證縮小規模模型的代表性，並且該模型應盡可能與生產製程相似。縮小規模模型亦應考慮病毒清除之耐變性(即，在製程或製程步驟、原物料變異和製程變動狀況下，耐受這些變化且不產生負面影響的能力)。在這種情況下，建議可在相關參數的最不利(糟)條件下進行病毒清除研究。為證實病毒清除之耐變性並為可能之製程變更做好準備，有時亦可接受將條件設定在操作範圍之外。應證實縮小規模模型之效能能夠代表實際的生產製程(例如，可比較之產率和純度)。例如，對於層析步驟，應證明管柱床高、線性流速、流速與管柱床體積比(即，接觸時間)、緩衝液和樹脂類型、pH、溫度、電導度和產品濃度能夠代表商業規模之製程。應得到相似之層析圖譜。就其他程序，也應考量類似的因素。應就不可避免之偏差討論其對結果之影響。

6.2.3 逐步評估病毒清除率

當執行病毒清除研究時，應評估一個以上之生產步驟對病毒清除之貢獻度。對於可能具有病毒清除能力的各步驟，應個別評估其移除或去活化病毒之能力，並明確定義各個步驟(是清除及/或去活化)。為適當評估各步驟的有效性，在每個受測步驟的待測物中應確保含有足夠的病毒量。通常，應將病毒添加到每個受測步驟的製程中間體。在某些情況下，如果能提供合理證明，也可在較早期的製程中間體中加入高力價病毒，並於後續各步驟中測定其濃度變化。若病毒移除是藉由分離方式所達成，建議在適當且可行的情況下，研究各個分液(fraction)中病毒負荷量的分布情形。當製程中使用的緩衝液具有病毒去活化作用時，可採用替代策略，例如，在去活化效果較弱之緩衝液(例如，調節 pH 的緩衝液)中平行添加病毒，作為整體製程評估之一部分。緩衝液本身之去活化效果，可藉由單獨添加的試驗來測試。若為測定病毒顆粒之分離效果，或可採用與非感染性之定量檢測方法。應測定所評估的每個受測步驟前後之病毒力價。用於定量之感染性試驗方法，應具備足夠之靈敏度和再現性，並且應進行足夠之重複試驗，以確保結果具有適當統計效力。若可提供合理性佐證，也可使用非感染性之定量檢測方法。所有感染性試驗方法，均應設置適當之病毒對照組，以確保方法之靈敏度。此外，低病毒濃度對於取樣的統計影響，也應納入考量(請參閱附錄 2)。

原則上，應至少以兩次獨立試驗來確認病毒清除的再現性，除非能根據既有知識提供合理佐證，證明減少試驗次數是合理的(請參閱第 6.6 節)。試驗可於相同地點進行、使用相同之實驗設定和同一批製程中間體進行，但不要求兩個獨立進行之試驗結果會完全相同。

6.2.3 判定物理移除與去活化

感染性病毒的降低，可藉由移除或去活化病毒來達成。對於每一個受評估的製程步驟，應描述病毒喪失感染能力的可能機制，指出是涉及去活化及/或移除。對於特定的步驟，可能有

必要釐清移除和去活化的貢獻。例如，若同一種緩衝液可能在多個清除步驟中發揮去活化作用時（即：多個層析步驟都使用同一種具有去活化作用的緩衝液），則應將這些層析步驟各自實現的清除效果區分開來。

6.2.5 去活化評估

為評估病毒去活化效果，應在製程中間體內添加具感染性之病毒，並計算減量係數(reduction factor)。需注意，病毒去活化並非簡單之一級反應，通常是由快速的初期階段及後續的緩慢階段所構成的複雜反應。因此，試驗應規劃在不同的時間點採樣，以便繪製去活化曲線。建議在去活化試驗中，除了最短曝露時間外，還應至少包含一個短於最短曝露時間但大於零之時間點(採樣)。若病毒為已知人類致病源的「相關」病毒，且正在設計有效的去活化製程，則應特別重視取得更多的數據。然而，對於使用非特定「模式」病毒或使用特定「模式」病毒來替代病毒顆粒(例如，CHO RVLP)之去活化試驗，通常要進行兩次獨立試驗來證實清除結果具有再現性。若可行，初始病毒量應依據在被接種的起始物料中可檢測出之病毒量來認定。若無法做到，則初始病毒量可從用來接種之病毒製備物的力價來計算。若去活化速度過快，以致無法利用製程條件繪製去活化曲線圖，則應進行適當之對照試驗(例如，去活化劑濃度較低之樣本)，以證實失去感染性確實是通過去活化機制。

6.2.6 層析管柱之功能與再生

純化製程中使用的層析樹脂和膜在經過一段時間及反複使用後，其病毒清除能力可能會發生變化。故，應說明層析填料／樹脂的使用壽命，且應定義出可能影響病毒清除的參數。應執行病毒清除研究，以支持填料／樹脂之重複使用。

對於 Protein A 親和補獲層析，既有知識顯示使用過的(例如，使用壽命上限)層析填料／樹脂其病毒清除效果不會受到影響，或是有略微提升。因此，預期將無須針對使用過之樹脂進行個別產品(專屬)的研究。既有知識亦可能適用於其他涉及病毒清除之層析類型(例如，陰離子交換或陽離子交換)。因此，針對其他層析類型樹脂的重複使用，若認為無須以使用壽命上限的樹脂研究來進行個別產品的研究，則應提供相對應之既有知識，包括內部經驗以及詳細的科學性論證(第 6.6 節)。

應提供確切的保證，確保生產系統中任何可能殘留之病毒，於系統再次使用之前，均已被充分去活化或移除。例如，可在病毒清除評估中提供證據，證實清潔和再生程序可去活化或移除病毒(例如，於病毒清除評估期間)，也可藉由(提供)既有知識來加以支持。

6.2.7 特別注意事項

應考慮下列特定預防措施：

- 使用高純度、濃縮之病毒原液來進行添加，有助於減少產品中間體之稀釋，同時也減少引入可能會影響製程效能之非代表性不純物（non-representative impurities）。然而，製備高力價病毒時，應注意避免(病毒)凝集，(病毒)凝集可能會增強物理性的移除且降低去活化效果，導致無法反映實際生產情況。
- 須評估可確實測得的最低病毒數量

- 為了評估病毒感染性是否會因測量前的樣品稀釋、濃縮、過濾或儲存等原因而減少，試驗中應當包含平行的對照控制組。
- 病毒「添加液」以少量添加至產品中，以免稀釋或改變產品特性。
- (例如)緩衝液、培養基或試劑之微小差異，都可能會影響病毒清除效果。
- 病毒去活化具有時間相關性；因此，添加病毒後的產品在特定緩衝溶液中或在特定層析管柱上的停留時間，應反映商業規模製程之條件。
- 應獨立評估緩衝液與產品對於病毒力價檢測方法之毒性及干擾程度，因為這些成分可能會不當影響指示細胞。若緩衝液對指示細胞具有毒性，則可能必須對含有(添加)病毒之緩衝液進行稀釋、調整 pH 值或透析。若產品本身具抗病毒活性，則清除研究可能需要在不含產品的情況下進行「模擬」(空白)試驗 (mock run)，或者如第 6.6 節所述，可以應用既有知識(來評估)。然而，不含該產品或替換為不具抗病毒活性之類似蛋白質，可能會影響病毒在某些生產步驟中之行為。應包含足夠的對照組，以證實專門用於備製檢測樣品之程序(例如，透析、儲存)對添加病毒的移除／去活化所產生的影響。
- 若使用分子生物學檢測方法來定量病毒基因體，則應注意考慮未封裝之病毒核酸影響，因為該核酸可能無法代表特定製程步驟中完整之病毒顆粒移除率。
- 許多純化製程於一個以上之純化步驟中，使用相同或類似之緩衝液或(層析)管柱。當整個製程之整體病毒減量係數，是基於這些純化過程減量係數之總和時，應對這種方法進行合理性論證，例如，特定製程步驟之病毒清除效果，可能會隨其在製造階段的使用位置而變化，並且伴隨蛋白質和其他不純物的存在顯然會影響病毒清除能力。
- 當生產條件或緩衝液具有過高的細胞毒性或殺病毒時，整體減量係數可能會被高估或低估，因此應按個案(實際情形)討論之。整體減量係數也可能因病毒清除研究本身之固有限制或設計不當而被高估。

6.3 病毒清除研究的解讀

評估病毒去活化／移除之目的，在於評估和特性鑑定被認為可有效去活化／移除病毒之製程步驟，並定量估計製程所能達到的整體病毒清除水準。對於病毒(例如案例 B 至 F)，重要的是應證明，病毒不僅被移除或去活化，且下游製程亦具有超額之病毒清除能力，以確保最終產品具有適當水準的病毒安全。應將製程所移除或去活化之病毒量與可能進入下游製程之病毒量進行比較。

為進行此項比較，重要的是要估計未加工原液中的病毒量。此估算值應使用感染性試驗或其他方法，例如，TEM 或同等的定量 NAT 等方法來獲得。整個純化過程所能消除之病毒量，應要遠超過相當於單劑量之未加工原液中估計的病毒量。關於病毒減量係數之計算方法，請參考附錄 3。關於每劑產品中估計病毒顆粒數之計算方法，請參考附錄 4。製造商應認知清除機制可能因病毒種類而異。於判斷證明病毒去活化／移除程序之資料有效性時，應考慮結合各因素組合。這些(因素)包括：

- 評估用於試驗之病毒的適當性
- 清除研究的設計

- 達成之病毒減量係數
- 病毒去活化之時間相關性
- 製程參數變化對病毒去活化／移除之潛在影響
- 檢測方法敏感度
- 去活化／移除程序對特定類別病毒之可能選擇性

建議設計一個下游製程能清除廣泛之潛在病毒(潛在之外來病毒污染物、內源性(病毒)和／或生產用病毒)。在此背景下，建議實施兩個不同之病毒清除步驟，且該兩個步驟之作用方式應可互補，其中一個步驟應能有效清除無包膜病毒，前提是可行且不會對產品產生不利影響時。一個有效的病毒清除步驟，通常會經至少兩次獨立試驗證明，提供 4 log10 或以上的可再現的病毒載量減少。然而，人們認可提供 1 至 3 log10 可重現(病毒)減少量之步驟，同樣對病毒安全性有貢獻，並且可以納入整體病毒減少量的評估中。專用於病毒去活化／移除之製程步驟，例如，溶劑／清潔劑處理、單獨以清潔劑處理或在低 pH 值反應，在清除各種包膜病毒方面非常成功，而病毒過濾則是依據病毒尺寸來移除病毒。使用被設計用於去除小型病毒之病毒過濾膜，對於較小病毒，例如細小病毒(parvovirus)或多瘤病毒 (polyomaviruses)，也是一個有效病毒清除步驟。最後，在單株抗體純化過程中，已有經驗證明於在 Protein A 捕捉後，在低 pH 值反應，能有效去活化 MLV 和假性狂犬病毒。

可透過下列任一步驟:多個互補之去活化步驟、多個互補之移除(分離)步驟，或是去活化及移除步驟地組合，來達成可接受的整體清除率。病毒移除方法很大程度上取決於病毒特定物理化學性質的影響，這些性質會影響病毒與層析固定相(例如，樹脂或層析膜)間的交互作用以及其沉澱特性。因此，「模式」病毒的分離方式可能與「相關」病毒有所不同。影響病毒移除之製程參數應被適當定義和控制。儘管存在這些潛在變數，透過互補性移除步驟或去活化和移除步驟的組合，仍可獲得有效的清除效果。因此，精心設計之移除步驟，例如層析分離步驟、過濾步驟和萃取步驟，只要在適當控制之條件下進行，即可成為有效之病毒移除步驟。

整體減量係數通常被表示為各個單獨減量係數之總合。然而，病毒量減少量小於 1 log10 者，則可以忽略不計，除非有充分理由證明，否則應被排除。

儘管病毒清除被認為是確保產品安全性的重要因素，但若製程對感染性的清除程度不充分時，則應當額外引入一個或以上之特定、額外之去活化／移除步驟。就所有病毒，製造商必須將所有相關病毒納入考量，評估所獲得的清除指數是否可接受，並證明其合理性。在評估結果時，應考慮上述的所有因子。

6.4 病毒清除研究的限制

病毒清除研究有助於確保最終產品達到可接受之安全水準，但不能僅憑這些研究就確立產品的絕對安全。病毒清除研究之設計和執行時，許多因子可能導致對製程移除病毒感染性能力不正確的預估。這些因子包括：

- 用於製程清除研究之病毒製備(品)，通常是從特定之細胞培養來製造。這種人工添加

的病毒在製程步驟中之行為，可能與來自生物原料、在細胞培養基中或在製造細胞中複製的天然病毒污染物的行為有所不同。例如，這種差異可能包括用於添加的病毒顆粒和來自個製程中間體之天然病毒，在純度或凝集程度上有所差異。

- 病毒感染性之去活化，通常遵循雙相曲線，即快速初始階段與隨後的較慢階段。逃脫第一次去活化步驟之病毒，可能會對後續步驟具有更強之抵抗力。例如，若這種抵抗性的部分以病毒凝集體的形式存在，那麼該感染性可能對一系列不同的化學處理和熱處理都具有抵抗性。
- 整體製程對於病毒的移除或去活能力，是以各步驟清除率的對數總和來表示。然而將非顯著減少(例如，低於 $1 \log_{10}$)步驟的減量係數進行加總，可能會高估實際的病毒清除潛能，因此不應執採用這種做法。此外，對於機制相似的去活化步驟，若將其病毒清除指數進行相加，也可能會造成整體清除力被高估。再者，將重複執行的相同或近似步驟納入清除數值之計算，也應提供合理的理由。
- 減量係數以病毒力價之對數下降值來表示，意味著儘管殘留的病毒感染性可能會大幅降低，但永遠不會減至零。例如，將每毫升 (mL) 含有 $8 \log_{10}$ 個感染單位之製劑的感染性降低 $8 \log_{10}$ ，則在將試驗的檢測極限納入考量後，殘留量仍為每毫升 $0 \log_{10}$ 個感染單位，即每毫升為 1 個感染單位。
- 儘管在設計規模縮小製程時已採取謹慎措施，但在用於病毒清除確效研究的小規模處理仍可能與商業規模的處理有所不同。

6.5 統計

病毒清除研究應納入對數據的統計分析，以評估結果。為使所得出的結論得到支持，試驗結果必須經過統計學上的驗證(請參閱附錄 2)。

6.6 應用既有知識以評估病毒清除率

作為一般原則，病毒清除的評估是通過實驗來進行的，即將病毒人工添加至欲評估的各階段產品特有製程的中間體。當製造商以經過證實且充分描述之製程(即使用相同之平台技術)開發類似產品時，其他產品產生之病毒清除資料可能適用於相同製程步驟之新產品。惟，為利用該步驟之資料，必須充分了解該製程步驟。應明確證明特定製程步驟相關既有知識之代表性。既有知識(包括外部和內部經驗)應涵蓋下列概述之方面：

- 應理解基本的病毒清除之機制。
- 應全面理解可能影響病毒清除之製程參數。
- 應確定病毒與產品之間之互動不會影響病毒清除率。若存在病毒與產品互動可能影響病毒清除之潛在風險，則應證明應用來自其他產品製程之既有知識的合理性。若特定步驟有一個以上之產品的資料，則於各情況下之病毒清除效果，應具可比較性。
- 特定製程中間體之成分，可能影響病毒清除率。對於某些製程步驟，即使(例如)緩衝液、培養基、試劑和不純物譜僅有微小差異，亦可能影響病毒清除率。因此，應證明來自其他產品之製程中間體之組成成分的代表性。除非既有知識指明有關製程中間體之組成成分之穩健病毒清除率，否則新產品和已證實產品在特定步驟之前之處理，應遵循類似之策略。

- 當應用既有知識於特定產品時，應考慮第 6.4 節概述之病毒清除率研究之一般限制。

外部既有知識(包括已發表之資料)可證明某個步驟去活化／清除病毒之潛力，並可提供其中涉及機制之洞察力。該資料亦可用於定義對病毒清除關鍵之製程參數，且設定特定病毒清除步驟中測試的最不利情況上限。於最不利情況條件下進行病毒清除研究，有助於減少特定產品實驗之數量。惟，應藉由證實所涉不同產品製造期間之製程相似性、產品中間體之相似性及確保產品特定屬性不會影響病毒清除等方式，證明已發表之病毒減少因子適用於特定產品。因此，應仔細評估已發表之資料，且運用特定平台之內部經驗(內部既有知識)進行補充該資料。

關於未經特定產品實驗之病毒清除資料之接受性，係依據具體情況依個案決定，同時考慮藥品之整體病毒安全策略，包括細胞受質和原料之性質和描述，以及整體病毒清除策略。若資料不足以證明既有知識之使用，則應進行針對特定產品之病毒清除研究。

於使用既有知識得出減量係數主張時，應考慮相關平台資料中之所有減量係數，以證明該主張之合理性。建議採用保守減量係數主張，以避免高估製程步驟之減量能力。

附錄 5 提供案例，即當依據目前之理解，包括來自其他產品之病毒減量資料的內部經驗之既有知識，可用於主張來自相同製造平台之新產品的減量係數。

6.7 病毒清除之再評估

當上游或下游製程發生重大變更時，應考慮該變更對病毒清除的直接和間接影響，並於需要時對系統進行再評估。例如，上游製程之變化可能導致細胞株產生之病毒量發生顯著變化。製程步驟之變更可能會改變病毒清除之程度。

在生命週期管理中，對可能影響病毒清除有效性的製造製程變更，可利用內部知識與平台概念進行評估。若其他產品的內部知識無法外推至特定產品，及／或平台概念不再適用，則應當執行產品專屬的病毒清除研究。

第七章、連續製程的考量重點

連續製程 (Continuous Manufacturing, CM) 可能涉及持續地將進料送入製程中，該製程是由一系列相互連接的單元操作組成，這些單元操作會轉化進料且持續輸出物料(即產品)。連續製造可應用於製程之部分或全部單元操作中。除了理解各個單元操作外，對於整合製程及其動態的理解，也是識別和降低病毒安全風險的關鍵。關於治療性蛋白之連續製造程序運作模式的說明，請參閱 ICH Q13(附錄 III)。

就病毒安全而言，連續製造的技術層面可能與批次生產中所遭遇之情況有所不同，這包括病毒的檢測和移除方法、原物料可追溯性、製程動態，以及啟動／停機時的監測頻率。

然而，基本原則與期望（例如基於科學與風險之方法，以及其在控制病毒污染風險上的實施方式），在本質上與批次生產相同。這也包括污染預防策略(請參閱第 2.2 節)。例如，源自於

批次生產經驗或從既有知識中所獲得的病毒去活化或清除之物理與化學條件，也可能適用於連續製程(請參閱第 6.6 節)。

7.1 連續製程中的病毒安全性

連續製程中的病毒安全性策略，應以潛在汙染源(例如，起始物與原物料及延長的細胞培養時間)、製程移除病毒的能力、以及確保無病毒存在的檢測能力等風險評估為基礎。第 3 節和第 4 節中所提供的檢測指引，也被視為可適用於連續製造。基於此評估，應制定一套策略，內容應包含進行外源性病毒檢測的類型與頻率，以證明製程在生產期間維持無汙染狀態。

7.2 連續製程中病毒清除的一般考量

在設計製程和病毒清除研究時，應考量下列事項：

- 製程可能採部份整合(連接)運作或連續操作模式，若是合適，可利用基於批次生產製程之病毒清除效能的科學理解來評估單元操作(請參閱第 7.3.2 節)。
- 應評估各單元操作及設備間連接的潛在風險(例如，於單元操作之間使用緩衝槽(surge tank)或混合槽以緩解質量流速差異或輸入物料不均勻的問題)，以評估對病毒清除能力可能產生的任何影響。
- 應建立適當之製程監控，以檢測 a) 製程擾動(例如，影響病毒清除的壓力／流速中斷)和 b) 外來病毒汙染。製程擾動的最終影響，可能因事件類型而異，應當按個案評估。

若進行即時決策 (real time decision making)，則應包含相應程序來確定 a) 製程擾動對病毒清除的影響，或 b) 汙染對輸出物料品質和產品的影響。基於這些考量，應當考慮將潛在之不合格物料從產品流中分流，或對已生產的物料進行處置(第 4 節)。

- 病毒清除研究的設計應考慮下列因素的潛在影響(如適用)：
 - 進料特性的變異(例如，蛋白質或不純物之濃度和均一性，以及凝集程度)
 - 滯留時間(Residence time)
 - 預期事件(例如，製程啟動、關機和暫停)和非預期的短暫事件(例如，製程擾動)
 - 操作負載能力
 - 替代性上樣策略，例如，多柱循環和串聯上樣
 - 病毒控制策略

7.3 連續製程中病毒清除的特殊考量

連續製造在病毒安全性方面也具有一些特殊的考量，如下所述。

7.3.1 延長生產培養期相關的潛在風險

於生產培養過程中，內源性病毒量可能會隨時間產生波動，應評估並採取合適的抽樣策略，以避免影響藥品劑量風險因子之計算(請參閱第 4 節和第 3 節中有關細胞株鑑定的考量)。

7.3.2 病毒清除研究之方法

儘管連續製造預期可維持在一個受控狀態，但製程仍可能在啟動、終止及製程擾動等期間，產出可能出現變異(例如，在發生病毒污染的情況下，可能在短時間內出現高病毒負荷)。這類時期的風險在本指引之其他部分(第 6.2 節)有另行說明。

此外，根據設備設計和系統整合情況，也可考慮同時確效兩個或更多的連接單元操作。連續製造之特定考量因素，包括：

- 層析
 - 在重複循環使用狀況下(例如，多管柱層析)，批次製程可作為縮小規模模型來使用，前提是可合理證明批次製程具備了目標製程條件(例如流速、樹脂負載量與管柱超載、樹脂清潔能力)。關於規模縮小的指引，請參閱第 6.2.2 節。
 - 可考量對兩個或更多連接的層析步驟進行確效；例如，陽離子交換層析之結合/洗脫模式(bind and elute mode)與陰離子交換層析之流通模式(flow through mode)。對於連接的單元操作，只要製造過程中的操作條件(例如上樣物料相關條件)能充分反映在模型中，也可選擇使用傳統的批次縮小規模模型來評估病毒清除效果。
- 病毒去活化
 - 以批次方式進行驗證是可行的，前提是可合理證明批次製程具備了目標製程條件。
 - 對於病毒去活化(例如，pH 及溶劑／清潔劑)，應確保相關的動態製程參數的控制(例如，pH 值、溶劑／清潔劑濃度、均勻性和混合性、溫度、以及滯留時間分佈)。
 - 應用縮小規模模型來評估動態製程中去活化效果時，應謹慎評估／證明規模對製程動態(例如，滯留時間分佈)和控制策略的影響。
- 病毒過濾
 - 若影響病毒清除的參數，其設定未超出病毒清除研究中測試的範圍(例如：最不利情況設定點)，則以批次製程進行確效也是適合的。
 - 應定義製程管控措施，以便在更換濾膜及使用後進行完整性測試時，仍能維持病毒清除能力。

第八章、總結

本指引建議了評估產品病毒污染風險、控制可能病毒來源以及確認製造製程病毒清除能力的方法，從而有助於生產源自動物或人類細胞株的安全生物技術產品。這些管控和清除方法包括：

- 對起始物料(細胞受質)進行徹底之特性鑑定與測試，以特性鑑定是否存在病毒污染物；

- 透過判定對人體細胞向性(tropism)或了解在人類中的感染情況，來評估病毒污染物的潛在風險；
- 對未加工原液制定適當之外來病毒之檢測計畫；
- 制定適當之病毒清除計畫；
- 針對同一製造製程中使用的各種病毒去活化或移除方法，妥善設計且進行病毒清除研究。

第九章、專有詞彙

外來病毒 (Adventitious Virus)

非刻意引入之病毒污染。請參閱病毒。

細胞受質 (Cell substrate)

用於生產產品之細胞。

對照細胞 (Control Cells)

與病毒或病毒載體的生產平行培養之細胞，但未接種病毒／病毒載體種批(virus/viral vector seed)。對照細胞之培養(維持)條件必須與生產細胞的培養條件實質一致，包括使用相同批次的培養基和相同的培養基更換程序。

最終生產細胞 (End of Production Cells, EOPC)

從 MCB 或 WCB 培養 (在與生產條件相當的條件下)，直至達到或超過生產結束時的最高細胞繼代數或細胞群體倍增數(population doubling level)的細胞。在某些情況下，也會總培養時間來衡量。EOPC 也可稱為擴展細胞庫(ECB)，這兩個術語可以與 LIVCA 細胞互換使用。

內源病毒 (Endogenous Virus)

原意是指反轉錄病毒，其基因組為細胞株的來源物種之生殖細胞(germ line)的一部分，並且穩定地嵌入到親代細胞株的基因組裡。於本指引中，亦包括故意引進之非嵌入式病毒，例如，為了使細胞受質永生化而刻意引入之 Epstein-Barr 病毒，或牛乳頭狀瘤病毒(Bovine Papillomavirus)。

擴展細胞庫 (Extended Cell Banks, ECB)

從 MCB 或 WCB 培養並擴增而來之細胞，其培養代數達到或超過所規劃的生產用細胞體外年齡 (in vitro cell age)，亦可稱為 EOPC。

體外細胞年齡 (In Vitro Cell Age)

從 MCB 小管解凍開始，直到從生產容器中收穫為止的一段時間尺度，這段時間尺度可用總

培養時間、細胞群體倍增數或者以既定稀釋方法進行繼代培養時的細胞繼代數來表示。

體外細胞年齡上限 (Limit of *In Vitro* Cell Age, LIVCA) 細胞

LIVCA 細胞是透過擴增 MCB 或 WCB，使其達到或超過生產細胞之體外細胞年齡。LIVCA 細胞亦可稱為 EOPC 或擴展細胞庫 (ECB)，且這些名稱可交替使用。

去活化

透過化學或物理方式處理而降低病毒之傳染性。

主細胞庫 (Master Cell Bank, MCB)

從單一個細胞池之分裝，通常在既定條件下從細胞受質或經選定的細胞株備製，然後分裝至多個容器中並於特定條件下儲存。

主病毒種批 (Master Virus Seed, MVS)

MVS(種原、批次 或庫)指載體病毒、病毒載體或生產用病毒(例如輔助病毒或病毒蛋白表現載體)之製備物，所有未來的生產都將直接由此或是透過 WVS 來衍生。MVS 是一種由單一培養過程衍生出之成分均一(但不一定具有完全相同基因)之活病毒製備物，分裝至適當之儲存容器中並於適當之條件下儲存。

最短曝露時間 (Minimum Exposure Time)

處理步驟所維持的最短時間。

次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS)

亦稱為高通量定序、大規模平行定序或深度定序，係一種基於核酸之多步驟技術，具廣泛的能力可對已知和未知外來病毒之非標靶(無預設標的)檢測。於某些情形下，NGS 亦可用於透過定序策略或生物資訊分析，用於已知病毒的標靶檢測。

平台製造 (Platform Manufacturing)(ICH Q11)

針對開發新藥生產策略之方法，自與同一申請者先前用於製造其他同類型藥品之相似製程開始(例如，使用事先既定之宿主細胞、細胞培養生產單株抗體，以及已存在豐富經驗之純化製程)。

平台確效(Platform Validation)

於本指引內，該名詞專指對製程平台進行病毒清除相關之確效。在本指引中，平台確效被定義為依據目前理解，利用既有知識，包括其他產品病毒清除數據之內部經驗，以主張類似新產品之減量係數。

既有知識 (Prior Knowledge)

既有知識指目前知識，包括內部知識(例如，開發和生產經驗)、外部知識(例如，科技刊物，包括供應商資料、文獻和同儕評審刊物)或既定科學原理之應用(例如，化學、物理和工程原理)。

病毒清除之製程特性鑑定 (Process Characterisation of Viral Clearance)

其中使用非特定「模式」病毒以評估製程移除和／或去活化病毒穩健性之病毒清除研究。

病毒清除之製程評估研究 (Process Evaluation Studies of Viral Clearance)

其中使用「相關」和／或特定「模式」病毒以認定製程移除和／或去活化該病毒之能力之病毒清除研究。

病毒清除之製程穩健性 (Process Robustness of Viral Clearance)

穩健性一詞用於描述以下兩種不同特性中的一項或兩項。一項特性指製程或製程步驟能耐受原物料變異和製程變更的能力，但不會對病毒清除產生負面影響。另一個特性是能夠清除廣泛特定和非特定「模式」病毒的能力。

生產細胞 (Production Cells)

用於製造產品之細胞受質。

純化原液 (Purified Bulk)

「純化原液」指純化過程結束時之材料。儘管於大多數情況下，此代表原料藥，但為避免干擾檢測分析，亦可使用不含賦形劑之純化材料。

生產用病毒 (Production Virus)

生產用病毒指一種製程相關病毒，且可能包括輔助病毒或用於蛋白質表達之病毒載體。

輔助病毒 (Helper Virus)

一種提供輔助功能之病毒，使有複製缺陷之共同感染病毒能夠進行複製。

用於蛋白質表達之病毒載體 (Viral Vector for Protein Expression)

一種重組病毒，例如桿狀病毒，可用於表達重組蛋白或類病毒顆粒，或用於產生病毒載體。

補充測試方法 (Supplementary Test Method)

一種用於提供額外數據以佐證常規檢測的測試方法。

未加工原液 (Unprocessed Bulk)

一個或多次合併收穫的細胞和培養基。當不易取得細胞時，未加工原液是由生物反應器中採集之液體所構成。

病毒清除 (Viral Clearance)

移除病毒顆粒或去活化病毒之感染能力。

病毒載體 (Viral Vector)

一種重組病毒，可作為藥品應用於體內，或用於體外之其他進階治療應用。

病毒載體衍生產品 (Viral Vector Derived Product)

一種由病毒載體編碼並表達之產品，其中重組病毒被稱為用於生產之病毒載體，例如桿狀病毒。

病毒 (Virus)

於細胞內複製之感染病原體，具潛在致病性，僅接有單一核酸類型(RNA 或 DNA)，無法成長或進行二分裂，且以其遺傳物質之形式進行增殖。

非特定模式病毒 (Non-Specific Model Virus)

是指用於製造製程病毒清除特性鑑定的病毒。其目的是分析製造製程總體上移除和／或去活化病毒的能力（即鑑定下游製程的穩健性）

相關病毒 (Relevant Virus)

在製程評估研究中使用的病毒，應為已鑑別的病毒，或與已知或可能污染細胞受質或污染用於生產製程中任何其他試劑或原物料的病毒屬於相同物種。

具複製能力病毒 (Replication Competent Virus, RCV)

病毒載體與反式互補病毒序列(trans-complementing viral sequences)發生基因重組，從而產生具有複製能力的病毒。

特定模式病毒 (Specific Model Virus)

與已知或懷疑之病毒密切相關(同屬或同科)之病毒，其物理和化學特性與觀察到或懷疑之病毒相似。

類病毒顆粒 (Virus-Like Particles)

在形態上看似與已知病毒相關的結構。可能包含或不包含病毒基因體。

工作細胞庫 (Working Cell Bank, WCB)

WCB（工作細胞庫）是由在特定培養條件下培養 MCB（主細胞庫）所獲得的均質細胞懸浮液分裝後製備而成。

工作病毒種批 (Working Virus Seed, WVS)

WVS(庫存、批次或庫)是由 MVS 產生。

第十章、參考文獻

ICH Q2(R2)/Q14: Analytical Procedure Development and Revision of Q2(R1) Analytical Validation

ICH Q11: Development and Manufacture of Drug Substances

ICH Q13: Continuous Manufacturing of Drug Substances and Drug Products

表 1：細胞受質特性鑑定所建議的病毒測試

	MCB	WCB	位於LIVCA之細胞
反轉錄病毒和其他內源性病毒之試			
反轉錄病毒測試 ^a	+	-	+
其他內源性病毒測試 ^b	於適當時 ^b	-	於適當時 ^b
外來病毒測試			
體外試驗或 NGS ^e	+	+C	+C
體內試驗或 NGS ^e	+d	-	+d
特定病毒測試 ^f	於適當時 ^f	-	-

a. 詳情請參閱第 3.2.1 節。

b. 適合已知含有該病原體之細胞株。

c. 體外病毒試驗直接在 WCB 或直接在自該 WCB 衍生之 LIVCA 細胞上進行。

d. 體內試驗可依據風險評估來執行。若仍存在殘餘風險，可考慮執行該測試或以非標靶 NGS 代替，以檢測在建立 MCB 期間或於細胞培養至 LIVCA 階段可能引入之病毒。詳情請參閱第 3.2.3 節。

e. 非標靶 NGS 可替代體內試驗(第 3.2.3 節)，且補充或替代體外試驗(第 3.2.2 節)。

f. 檢測是基於風險評估，包括細胞受質之來源與歷史，以及可能接觸人類或動物來源之原物料。可使用基於細胞培養的感染性分析檢測、抗體產生試驗(MAP，HAP 和 RAP)、病毒特定 NAT 或其他分子方法(例如 NGS)等方法。詳情請參閱第 3.2.4 節。檢測項目可能包括測試特定物種之病毒，例如，昆蟲細胞中的節肢動物媒介病毒 (arboviruses)，以及使用血清或胰蛋白酶，則需檢測牛源或豬源病毒。對於用於生產之細胞受質中檢出的病毒，應採取之對應措施請參閱表 4(案例 B、C 和 E)。

表 2：病毒檢測方法之用途和限制的範例

測試	測試物品	檢測能力	檢測限制
抗體產生試驗	細胞裂解液及其培養基	特定病毒抗原	無法於動物體內複製和／或生產抗體之病毒。並非所有病毒感染都會產生可測量的抗體反應
體內病毒試驗	細胞裂解液及其培養基	病毒範圍有限	無法於檢測系統中複製或產生疾病之病毒。檢測干擾。
體外病毒試驗		病毒範圍廣泛	無法於檢測系統中複製或產生感染跡象之病毒。檢測干擾。
1. 細胞庫測試	1. 細胞裂解液及其培養基(對於共同培養，待測品中應包含完整的細胞)		
2. 生產測試	2. 來自生產反應器之未加工原液或細胞裂解物及其細胞培養基		
TEM：			低敏感度。無法確認病毒是否具傳染性。
1. 細胞庫測試	1. 活細胞	病毒和類病毒顆粒，包括內源性反轉錄病毒	病毒顆粒之定性評估
2. 生產測試	2. 無細胞材料		定量檢測(用於病毒清除評估)
反轉錄酶 (RT) 檢測 (例如，PERT 檢測)	無細胞培養上清液	反轉錄病毒顆粒和反轉錄酶活性	可能必須區分反轉錄病毒反轉錄酶和細胞聚合酶
1. 細胞庫測試			
2. 生產測試			
反轉錄病毒 (RV) 感染性	無細胞培養上清液	感染性反轉錄病毒	於所選定檢測系統內無法複製或形成離散病灶或斑塊之 RV

共同培養	活細胞	感染性反轉錄病毒	無法複製之 RV
1. 感染性終點指標			1. 請參閱上述之 RV 感染性
2. TEM 終點指標			2. 請參閱上述之 TEM ^a
3. RT 終點指標			3. 請參閱上述之 RT
PCR(聚合酶鍊式反應)	細胞、培養液和其他材料	特定病毒序列	存在引子序列。無法確認病毒是否具傳染性。
1. 細胞庫測試			
2. 生產測試			
NGS	細胞、培養液和其他材料	廣泛之病毒序列範圍	陽性結果不代表病毒是否具感染性，應進行研究。

a. 另，可能難以區分測試樣本和指示細胞。

表 3：於抗體產生測試檢測出之病毒^d

MAP	HAP	RAP
鼠痘病毒(Ectromelia Virus) ^{b,c}	淋巴球性脈絡叢腦膜炎病毒 (LCM) ^{a,c}	漢它病毒 ^{a,c}
漢它病毒(Hantaan Virus) ^{a,c}	小鼠肺炎病毒(PVM) ^{b,c}	克氏大鼠病毒(Kilham Rat Virus, KRV) ^{b,c}
K 病毒 ^b	呼腸孤病毒第三型 (Reo3) ^{a,c}	小鼠腦脊髓炎病毒 (Theilers', GDVII) ^b
乳酸脫氫酶病毒(Lactic Dehydrogenase Virus, LDM) ^{a,c}	仙臺病毒(SV) ^{a,c}	小鼠肺炎病毒(PVM) ^{b,c}
淋巴球性脈絡叢腦膜炎病毒 (Lymphocytic Choriomeningitis Virus, LCM) ^{a,c}	猿病毒第五型(Simian Virus 5, SV5) ^{a,c}	大鼠冠狀病毒(Rat Coronavirus) ^b
小鼠微病毒(Minute Virus of Mice) ^{b,c}		呼腸孤病毒第三型(Reo3) ^{a,c}
小鼠腺病毒(Mouse Adenovirus MAV) ^{b,c}		仙臺病毒 ^{a,c}
小鼠巨細胞病毒(Mouse Cytomegalovirus, MCMV) ^{b,c}		唾液腺腺炎病 (Sialodacryoadenitis Virus, SDAV) ^b
小鼠腦脊髓炎病毒(Mouse Encephalomyelitis Virus, Theiler's GDVII) ^b		大鼠細小病毒(Toolan's H-1 virus) ^{b,c}
小鼠肝炎病毒(Mouse Hepatitis Virus, MHV) ^b		
小鼠輪狀病毒(Mouse Rotavirus, EDIM) ^{b,c}		
小鼠肺炎病毒(Pneumonia Virus of Mice, PVM) ^{b,c}		
多瘤病毒(Polyoma Virus) ^b		
呼腸孤病毒第三型(Reovirus Type 3, Reo3) ^{a,c}		
仙臺病毒(Sendai Virus) ^{a,c}		

胸腺病毒(Thymic Virus)^{b,e}

- a. 有證據顯示能夠感染人類或靈長類動物之病毒。
- b. 無證據顯示能夠感染人類之病毒。
- c. 能夠於人類或靈長類動物來源之細胞中進行體外複製之病毒。
- d. 可使用 NAT 替代，例如，PCR 檢測、標靶或非標靶 NGS 或其他分子檢測方法。
- e. 亦稱為鼠疱疹病毒 3 型。

表 4： 配合細胞或未加工原液病毒測試結果之建議執行計畫

	案例 A	案例 B	案例 C ^b	案例 D ^b	案例 E ^b	案例 F
狀態						
存在外來病毒 ^a	-	-	+	+	+C	-
類病毒顆粒 ^a	-	-	-	-	+C	-
類反轉錄病毒顆粒 ^a	-	+	-	-	+C	-
已鑑定之病毒	不適用	+	+	+	-	+
病毒對人類具感染性	不適用	- ^d	- ^d	+	不詳	+ ⁱ
存在生產用病毒	-	-	-	-	-	+
行動						
使用非特定模式病毒之病毒清除之製程特性鑑定	是 ^e	是 ^e	是 ^e	是 ^e	是 ^e	是 ^e
使用「相關」或特定「模式」病毒之病毒清除之製程評估	否	是 ^f	是 ^f	是 ^f	是 ^g	是 ⁱ
純化原液之病毒檢測	不適用	否 ^j	是 ^h	是 ^h	是 ^h	是 ⁱ

- a. 細胞受質和／或未加工原液階段之病毒檢測結果。用於生產之細胞培養物若被病毒污染，除非經過特定的病毒清除和風險評估證明其合理性，否則一般不應採用。若遵循適當之病毒清除評估程序，則內源性病毒（例如反轉錄病毒）或 MCB 中嵌合之病毒，或許可接受。
- b. 若已知被病毒污染之來源材料對人類具有傳染性和／或致病性，則僅得於經證實有特定病毒清除和風險評估之特殊情形下使用之。
- c. 已透過直接或間接方法觀察到之病毒。
- d. 被認為無致病性。
- e. 均應使用非特定「模式」病毒進行清除之特性鑑定。
- f. 應進行有關「相關」病毒或特定「模式」病毒之製程評估。

- g. 請參閱案例 E 之主文。
- h. 應藉由對疑慮病毒檢測具有高特異性和敏感度之合適方法，確認純化原液中未檢測到病毒。就上市許可，應提供至少三個批次之先導工廠規模或商業規模製造之純化原液的檢測數據。
- i. 病毒可能或不可能對人類具有傳染性。應對生產用病毒進行製程評估。若無法進行製程評估，則應使用特定之模式病毒。當用於生產時，應於未加工原液階段使用至少三個細胞培養批次來對生產用病毒進行定量，以認定病毒清除之目標。於純化原液中，使用「相關」易受感染細胞株進行感染性試驗，以認定不存在可檢出之生產用病毒，以達成具敏感之病毒檢測。或者，亦可使用分子方法。除非經穩健之清除證明，否則應對每批純化液進行無殘留生產用病毒之檢測(第 6.3 節)。
- j. 請參閱第 5 節案例 B 之說明。

附錄 1: 病毒清除研究之病毒選擇

1.1 實用「模式」病毒範例

1. 代表廣泛物理化學結構之非特定「模式」病毒：

- 多瘤病毒(如 SV40)、動物細小病毒或其他某些小型且具有物理化學抗藥性之無具套膜病毒。
- 副流感病毒(parainfluenza virus) 或流感病毒(influenza virus)、辛德畢斯病毒(Sindbis virus)或其他一些中型至大型之有套膜 RNA 病毒。或者，為擴大無具套膜病毒之譜系，可使用其他無具套膜病毒，例如，呼腸孤病毒、SV40 或微小核糖核酸病毒(picornavirus)。
- 疱疹病毒(例如，單純疱疹病毒 1 型或偽狂犬病毒)或其他一些中型至大型之 DNA 病毒。

該病毒僅作為範例，且未強制使用該病毒。

2. 就產生類反轉錄病毒顆粒之細胞受質，鼠反轉錄病毒通常被用作特定之「模式」病毒。亦可能使用內源性鼠或其他齧齒動物反轉錄病毒顆粒。

1.2 曾用於病毒清除研究之病毒範例

表 A-1 列出已用於病毒清除研究之數種病毒。惟，因為其僅為範例，未強制使用表中之任何病毒，且建議製造商考慮其他病毒，尤其是可能更適合其個別製程之病毒。一般而言，應評估該製程清除三種或以上不同特性病毒之能力。

表 A-1：已用於病毒清除研究之病毒範例

病毒	科	屬	天然宿主	基因體	套膜	尺寸 (nm)	形狀	抗性 ^a
水泡性口炎病毒 (VSV) ^b	彈狀病毒	水泡病毒	馬牛	RNA	是	70x150	子彈	低
副流感病毒	副黏液 病毒	呼吸道病毒或 正紅斑病毒	多種	RNA	是	100-200+	多形／球體	低
鼠白血病毒 (MLV)	反轉錄 病毒	γ 反轉錄病毒	鼠	RNA	是	80-110	球形	低
辛德畢斯病毒	披膜病毒	甲病毒	人	RNA	是	60-70	球形	低
牛病毒性腹瀉病毒 (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV)	黃病毒	瘟病病毒	牛	RNA	是	50-70	多形／球體	低
偽狂犬病病毒 ^c	疱疹病毒	水痘病毒	豬	DNA	是	120-200	球形	中
加州豆夜蛾多核多 角體病毒 (Autographa Californica Multiple Nucleopolyhedrovir us) ^c	桿狀病毒	甲桿病毒	昆蟲	DNA	是	250-300	多角體形	中
腺病毒第 2 型或第 5 型 ^c	腺病毒	乳腺病毒	人	DNA	否	70-90	二十面體形	中
水泡病毒 2117 株 (Vesivirus 2117)	杯狀病毒	水泡病毒	不詳	RNA	否	27-40	二十面體形	中
腦心肌炎病毒 (Encephalomyocarditis Virus, EMCV)	小核糖 核酸病 毒	心肌病毒	鼠	RNA	否	25-30	二十面體形	中
牛腸病毒 (Bovine Enterovirus, BEV)	小核糖 核酸病 毒	腸病毒	牛	RNA	否	25-30	二十面體形	中
呼腸孤病毒第三型	呼腸病毒	正呼腸病毒	多種	RNA	否	60-80	球形	中
猴病毒四十 (SV40)	多瘤病毒	β 多瘤病毒	猴	DNA	否	40-50	二十面體形	非常高
細小病毒 (犬、 鼠、豬) ^d	細小病毒	原小病毒	犬、鼠、豬	DNA	否	18-24	二十面體形	非常高

- a. 依據製程研究之物理化學處理抗性。抗性與具體之處理方法有關，且其應於病毒生物學特性的理解和製程性質之背景下使用之。實際結果將依處理方法而異。
- b. 在昆蟲細胞中發現之 rhabdovirus 之特定「模式」病毒。
- c. 用於病毒載體生產之輔助病毒或病毒蛋白質表達載體相關之特定「模式」病毒或「相關」病毒。
- d. 可作為較大球形／二十面體形病毒和具套膜病毒之單一最不利情況「模式」病毒，以驗證病毒過濾器。這些病毒僅為範例，且未強制使用該病毒。

附錄 2: 評估病毒和病毒減量係數之統計學考量

病毒力價測定與所有生物測定系統一樣，存在固有的變異性問題。為確定研究的可靠性，必須對病毒力價和由此衍生出的減量係數的準確性以及檢測方法的有效性進行評估，統計評估的目標是確定該研究已在具備可接受之病毒學專業能力的水準下完成。

1. 檢測方法可為計數法(quantal)或定量方法。計數法方法包括動物感染性試驗或組織培養感染劑量檢測，其中動物或細胞培養物被記錄為感染或未感染。之後，透過感染之動物或培養物之比例來測量感染性力價。於定量方法中，測得之感染性隨病毒輸入量呈連續變化。定量方法包括基於分子之方法或病毒斑檢測 (plaque assays)，其中每個計入之病毒斑對應一個感染單位。計數法和定量方法均適合統計學評估。
2. 檢測中的變異可能產生於稀釋誤差、統計效應以及檢測系統內之未知或難以控制之差異。此等影響在比較不同次檢測之結果 (檢測間變異) 時，通常較在單一檢測內比較結果 (檢測內變異) 更為顯著。
3. 檢測內變異結果之 95% 信賴區間通常應約為平均值之 $\pm 0.5 \log_{10}$ 左右。可利用標準教科書方法來評估檢測內之變異。檢測間變異可透過納入參考標準品來予以監測，為使檢測可被接受，對該標準品效價的估計應在實驗室建立的平均估計值的約 $0.5 \log_{10}$ 範圍內。精準度較低的檢測方法，在提供適當理由的情況下，也可能被接受。
4. 在對「相關」和特定「模式」病毒清除研究中，應在可能的情況下計算觀察到之減量係數的 95% 信賴區間。若起始原料之病毒檢測之 95% 信賴區間為 $+s$ ，步驟後材料之病毒檢測的 95% 信賴區間為 $+a$ ，則減少因子之 95% 信賴區間為

$$\pm \sqrt{s^2 + a^2}$$

低濃度病毒檢出機率

於低病毒濃度下(例如，每公升 (L) 含 10 至 1,000 個感染性顆粒)，很明顯，數毫升之樣本可能含有或不含感染性顆粒。該樣本不含感染性病毒之機率為 p ，即：

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

當 $V(L)$ 為待測材料之總體積時， $v(L)$ 為樣本體積， n 為 V 中統計上分佈之感染性顆粒的絕對數量。

若 $V \gg v$ ，則本方程式可用卜瓦松分佈(Poisson distribution)近似：

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

當 c 指每公升液體中之感染性顆粒的濃度時。

或， $c = \ln p / -v$

例如，若測試之樣本體積為 1 毫升，則病毒濃度在每公升含有 10 至 1,000 個感染性顆粒時，機率為 p ，即：

c	10	100	1000
p	0.99	0.90	0.37

此指明就每公升 1,000 個病毒之濃度，於 37% 之採樣內，1 毫升樣本中將不會含有病毒顆粒。

若僅對部分樣本進行病毒檢測且測試結果為陰性，則應當計算在總樣本中能夠產生陽性結果的病毒數量，並在計算減量係數時將此值納入考量。95%的信賴區間是理想的，然而在某些情況下，由於材料限制，這可能不切實際。

附錄 3: 病毒清除研究中減量係數的計算方法

個別移除或去活化步驟之病毒減量係數，被定義為處理前物料中的病毒負載量與經過該步驟處理後供下一步使用之物料中的病毒負載量，兩者比值的對數($\log_{10}$)。若使用下列縮寫：

起始原料：

體積 v' ；病毒力價 $10^{a'}$ ；

病毒負載量： $(v')(10^{a'})$ ，

最終材料：

體積 v'' ；病毒力價 $10^{a''}$ ；

病毒負載量： $(v'')(10^{a''})$ ，

依下列公式計算各減量係數 R_i ：

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

本公式同時考慮製程步驟前後材料之病毒力價和體積。

由於某些病毒力價測定法固有的不精確性，用於計算總減量係數之個別減量係數應大於 1。

完整製程之總減量係數是各步驟減量係數之對數總和。它代表了第一個製程清除步驟開始時的病毒負載量對最後一個製程清除步驟結束時之病毒負載量之比率的對數。減量係數通常以對數尺度表示，這意味儘管殘留病毒之感染性永遠不會降至零，但在數學上可能會大幅減少。

附錄 4： 每劑產品中預估病毒顆粒數的計算方法

本附錄適用於可預估起始數量之病毒，例如，內源性反轉錄病毒。

範例：

1. 假設

測量或估計進入純化製程的病毒濃度(例如，細胞培養收穫中的病毒濃度)= $10^6/\text{mL}$

計算之病毒清除係數 = $>10^{15}$

用於製備一劑產品之培養收穫液體積 = 1 公升 (10^3 mL)

2. 預估顆粒／劑量之計算方法

$(10^6 \text{ 病毒單位/mL}) \times (10^3 \text{ mL/劑})$

清除係數 $>10^{15}$

$= 10^9 \text{ 顆粒/劑}$

清除係數 $>10^{15}$

$= <10^{-6} \text{ 顆粒/劑}$

因此，預計每百萬劑中不到一個顆粒。

上述情形是使用齧齒類細胞生產單株抗體或其他重組蛋白時，內源性反轉錄病毒減量的典型案例(案例 B)。在針對特定病毒進行全面風險評估時，應考慮額外因素，例如，病毒的宿主範圍、病毒的感染能力及致病性、避免污染之措施、測試、給藥途徑和人類感染劑量。

在 CHO 細胞之案例 B 情境中，由於內源性反轉錄病毒已被廣泛鑑定為不具感染性，若檢測未能確定感染性反轉錄病毒存在，對於單株抗體或其他重組蛋白之類反轉錄病毒樣顆粒， $<10^{-6}$

⁴ 顆粒/劑之數值，被認為是可接受之數值。

附錄 5:利用既有知識（含內部經驗）以減少產品專屬確效工作的範例

5.1 簡介

根據平台確效方法的一般原則，應在來自同一平台的不同產品間證實其具有穩健之病毒清除能力，且病毒清除程序應遵循既定且充分特性鑑定之條件。此外，除非既有知識指明病毒清除對於製程中間體之組成具有穩健性，否則應證明製程中間體之組成與病毒清除研究中使用之中間體具有可比性。

於此背景下，與特定產品製程確效相對，平台確效被定義為利用既有知識，包括從其他產品獲得的病毒清除內部經驗（即申請者擁有的數據），來主張對新的類似產品之病毒減量係數。一般而言，當基於包括內部經驗之既有知識來主張新產品病毒清除能力時，應包含對所有可用之相關平台數據進行討論，並提供支持平台確效方法適用性的理論依據（請參閱第 6.6 節）。為減少針對產品進行個別確效的需求，可提供部分既有知識與內部資料作為支援，例如比較新產品及其製程與其他內部產品、相關製程條件或製程中間體。

專用於病毒清除之製程步驟（例如，以清潔劑去活化、低 pH 值和透過病毒過濾移除），適用於平台確效方法。

因此，下文將提供應用既有知識的範例，包含藉由清潔劑與低 pH 反應來進行去活化異嗜性鼠白血病毒 (XMLV)，以及透過病毒過濾方式移除病毒。

這些範例僅為說明目的而提供，僅建議平台確效方法如何被應用，不應將其作為範本或作為查驗登記提交資料之惟一依據。

表 A-2 至 A-4 彙整了製藥業界目前對各種製程條件的理解，說明各製程步驟之製程參數及其潛在關鍵性。製程參數與中間體對病毒清除的實際影響，應依據既有知識與內部經驗加以評估。

隨著對製程理解的持續深化，未來可考慮將更多製程步驟納入平台確效的範圍。

5.2 以溶劑／清潔劑去活化或單獨以清潔劑去活化

依據作用機制，在使用溶劑／清潔劑 (solvent/detergent, SD) 或單獨以清潔劑進行去活化時，清潔劑濃度是重要的製程參數。

此外，疏水性不純物（例如，脂質、細胞碎片）或細胞培養基成分（如消泡劑）可能會與界面活性劑或 SD 混合物產生競爭作用，干擾其溶解病毒脂質外套膜的能力，從而影響病毒去活化的效果，因此應進行評估。

迄今為止，無任何跡象顯示病毒與特定治療性蛋白之間的交互作用會影響清潔劑的去活化效

果。凝集體(例如，細胞碎片或凝集之病毒顆粒)可能會包覆病毒顆粒並阻礙其與清潔劑接觸。因此在製造時，產品中間體(例如，細胞培養收穫液 (harvested cell culture fluid, HCCF))在進行去活化前，應使用包括標稱孔徑 $\leq 0.2\mu\text{m}$ 的過濾步驟除細胞／細胞碎片。

以下段落描述如何將平台確效方法應用於 XMLV 去活化，並以 SD 或 Triton X-100 為例子。此方法也可能適用於其他替代清潔劑，若這些清潔劑已證實能提供穩健且高效之 XMLV 去活化能力。

Triton X-100 是一種非離子清潔劑，常用於膜研究中來溶解脂質雙層。此清潔劑透過溶解病毒脂質外套膜來去活化具套膜病毒，因而使病毒不具有感染能力。Triton X-100 已被廣泛用於病毒去活化，包含多年來在血漿衍生產品的製程中，以及在單株抗體純化製程平台中常被添加至 HCCF 中。

歐洲化學品管理局 (European Chemical Agency) 已將 Triton X-100 列入授權清單(Authorisation List, Annex XIV)，理由是其降解產物在環境中具有類荷爾蒙的活性，因此，儘管 Triton X-100 仍被廣泛使用，製藥產業正在尋找替代之清潔劑。市面上有其他相似物理化學特性的清潔劑，並且能有效達成 XMLV 去活化。由於 Triton X-100 的去活化特性已被充分鑑定，且關於其效力之知識相當豐富，因此本指引將其納入作為範例。

由於 Triton X-100 之非離子性質，其效能應不會受到 HCCF 中的 pH 值、離子強度或抗衡離子(counter ions)影響。過去的經驗表明，來自製程平台之多項產品在 0.2% Triton X-100 濃度、15°C 和 60 分鐘之反應條件下，均可有效去活化涵蓋一系列典型脂質和總蛋白之 HCCF 中的 XMLV。然而，如下文所示，在省略特定產品實驗的情況下，建議採用 0.5% Triton X-100 濃度以確保有效和可靠的去活化作用。

利用 Triton-X100 或 SD 試劑和 MLV 作為範例，表 A-2 彙總基於清潔劑之脂質套膜病毒去活化的製程參數，以及其潛在之關鍵性。

表 A-2：清潔去活化或 SD 處理的製程參數或製程因子及其潛在影響之摘要

製程參數或因子	潛在影響	理由
SD 或 Triton X-100 濃度	高	去活化劑
反應時間	高	去活化機制具時間相關性
溫度	高	影響去活化動力學
$\leq 0.2\mu\text{m}$ 過濾之前處理	高	自起始中間體中移除凝集體；凝集體可能會包覆病毒顆粒並防止清潔劑與其接觸
HCCF 中之總脂質含量或替代參數	低	在最不利 HCCF 條件下，觀察到之影響低

產品類型	低	對 mAbs、半抗體、融合蛋白或重組蛋白，未觀察到會對去活化造成影響
總蛋白含量	低	觀察到的影響低
pH	低	Triton X-100 為非離子清潔劑
離子強度	低	Triton X-100 為非離子清潔劑
HCCF 中的緩衝鹽	低	Triton X-100 為非離子清潔劑
病毒顆粒與產品之間的潛在交互作用	低	未觀察到會對去活化造成影響，且破壞脂質套膜可降低與產品交互作用之機率。

因此，根據目前對製程的理解，於澄清後 HCCF 中使用 Triton X-100，在 $\geq 0.5\%$ 濃度、 $\geq 15^{\circ}\text{C}$ 條件下反應 ≥ 60 分鐘，在多個細胞培養衍生產品中皆可有效去活化 XMLV。當使用 SD 試劑時，利用 1% 之 Triton X-100 和 0.3% 之磷酸三丁酯(Tri-N-Butylphosphate)處理 ≥ 30 分鐘，或於 $\geq 23^{\circ}\text{C}$ 條件下，以 1% 之聚山梨酯 80 (polysorbate 80) 和 0.3% 之磷酸三丁酯處理 ≥ 6 小時，可有效去活化反轉錄病毒。依據目前之製程理解，平台確效方法可以適用於以 SD 處理或單獨使用 Triton X-100 對 XMLV 進行去活化。

5.3 於低 pH 下處理

低 pH 處理是透過將病毒套膜上的蛋白質變性，而去活化具套膜病毒，因此防止病毒吸附到細胞上並感染細胞。在細胞培養衍生產品(例如，mAbs)的製程中，對捕獲層析的產品匯集液進行低 pH 之處理，已經廣泛應用於反轉錄病毒之去活化。

去活化效率取決於作為去活化劑之氫離子濃度，以 pH 值量測、保持時間和溫度以及緩衝液基質。極高之離子強度，亦可能影響去活化效率。

表 A-3 XMLV 以低 pH 進行去活化處理時之製程參數及其潛在影響之摘要。

表 A-3：XMLV 以低 pH 進行去活化處理時之製程參數及其潛在影響之摘要

製程參數或因子	潛在影響	理由
pH	高	去活化劑
反應時間	高	去活化機制具時間相關性
溫度	高	對去活化動力學之影響
緩衝液基質	高	現有資料顯示去活化之穩健性 取決於緩衝液基質
產品濃度	低	於下列所述條件下未觀察到影響
蛋白凝集體之形成	低	於下列所述條件下未觀察到影響
產品類型	低	對於單株抗體、半抗體、雙特異性抗體、融合蛋白或重組蛋白而言，未觀察到對去活化產生影響
NaCl 濃度 ^a	低	若氯化鈉 ≤500 mmol/L，則無影響。
病毒顆粒與產品間之潛在交互作用	低	未觀察到對去活化之影響

a. 迄今為止，關於其他緩衝液離子強度的影響的資料有限。

符合目前之理解，於 ≤pH 3.6、≥15°C 持續 ≥30 分鐘、在 ≤500 mmol/L 氯化鈉濃度下，進行低 pH 處理可有效去活化 XMLV。醋酸鹽和檸檬酸鹽緩衝液是最常見之緩衝液，並可穩定的去活化 XMLV。

跟據目前對製程理解，以低 pH 處理而去活化 XMLV，可以適用平台確效的方法。

5.4 病毒過濾

病毒過濾之主要作用機制是依據之尺寸大小而進行顆粒移除。一般而言，產品中間體之過濾體積(volumetric throughput)以及沖洗濾膜所用緩衝液的體積及壓力(包括壓力／流速中斷)，都被視為病毒過濾製程中可能的關鍵參數。

當病毒顆粒尺寸遠大於過濾孔徑分布時，病毒顆粒與產品間的潛在交互作用並非關鍵因素。然而，當病毒顆粒尺寸與過濾膜孔徑相似時，這種潛在的交互作用對病毒截留的影響尚未完全釐清。

本節其餘部分著重在利用其他產品在病毒過濾方面的既有知識與內部經驗，來證明使用小型及大型病毒截留濾膜(virus-retentive filter)來移除大型病毒的合理性。既有知識可用於小型及大型病毒截留濾膜，但本章節聚著重於小型病毒截留濾膜，因為它們的使用更為普遍。

小型病毒截留濾膜移除反轉錄病毒效率的影響因素已被充分了解，這些因素包括製程參數的變化，如：濾膜類型(型號與特性)、以流速或壓力來控制的過濾模式、切向流或垂直流(dead-end flow)過濾方式，以及壓力中斷等。基於病毒移除之可預測性和穩健性，該製程步驟被認

為適用於平台確效方法。

使用小型病毒截留濾膜進行之病毒移除，一種做法是將細小病毒所得的減量係數套用至較大的球形／二十面體病毒 (icosahedral viruses) 及具套膜病毒，從而避免使用較大的病毒進行確效研究。然而，由於細小病毒可能會通過濾膜，可能會導致病毒清除能力(例如，大型病毒清除能力)被低估。鑑於移除機制是基於尺寸大小，以及業界經驗在使用小型病毒截留濾膜可以穩健且完全的去除移除反轉錄病毒，因此公司可利用其內部針對細小病毒和大型病毒移除之數據，建立一個針對常用小型病毒截留濾膜的平台式大型病毒清除聲明。

考量到病毒移除是基於尺寸的機制，因此小型病毒通過小型病毒截留濾膜之理論風險將高於大型病毒。

應充分瞭解解壓力／流速中斷的影響，以及反映實際製造條件之過濾體積和過濾後沖洗體積 (post-filtration flush volume) 等因素。須考量低壓力／低流速或中斷壓力／流速，對特定類型的病毒過濾膜可能造成有限的負面影響。

若利用來自其他產品之既有知識和內部經驗作為主張細小病毒清除能力的依據，則至少應執行一次該產品個別的確證性確效試驗，該確效需使用細小病毒並考慮最不利情況條件(請參閱表 A-4)。病毒截留濾膜的品牌／型號在病毒去除效能及其對製程參數影響之穩健性方面均具關鍵性，應在建立平台數據時納入考量。

表 A-4 彙整了以小型病毒截留濾膜進行細小病毒截留時，各製程參數及其可能影響。

表 A-4：小型病毒截留濾膜之製程參數及其對細小病毒截留效果潛在影響之摘要。

製程參數或因子	潛在影響	理由
載入到病毒濾膜上之產品中間體的過濾體積	高	高過濾體積或高蛋白通量被視為最不利狀況，其影響會因濾膜的種類而異。
用於沖洗濾膜之緩衝液的體積	高	高沖洗體積被視為最不利狀況，其影響會因濾膜的種類型而異。
壓力／流速	高	壓力／流速不應超過濾膜操作之上限。對某些特定類型的濾膜，低壓／低流速可能構成最不利的情況。應考慮到壓力／流速中斷(若在過過濾程中或由產品中間體過濾切換至濾膜沖洗時發生)之情況。
產品類型	低	對於單株抗體、半抗體、雙特異性抗體、融合蛋白或重組蛋白的病毒清除，未觀察到影響。
產品濃度	低	對病毒清除未觀察到負面影響
pH	低	對基於尺寸大小之病毒移除方式，未造成負面影響。在pH 值較低(<pH 5)之條件下，可能對某些特定類型的濾膜會產生有限的負面影響，且影響程度各有差異。
離子強度	低	對病毒清除之影響有限
緩衝液基質	低	對病毒清除之影響有限
病毒顆粒與產品間之潛在交互作用	低	病毒與抗體間之特定交互作用可加強病毒截留

附錄 6: 基因工程病毒載體和病毒載體衍生產品

6.1 簡介

生物技術的進步促成了新型且先進的生產平台出現，這些平台使用來源於人或動物(即禽類、哺乳動物或昆蟲)並經過特性鑑定的細胞庫來表達新類型產品。附錄 6 的範圍包括基因工程病毒載體及病毒載體衍生的產品，這些產品可透過輔助病毒與病毒載體(統稱為生產用病毒)進行蛋白表達，或是利用穩定或暫時轉染的細胞株生產。本附錄所涵蓋的產品為可基於產品的物理化學特性而進行病毒清除的產品。這些產品包括使用桿狀病毒／昆蟲細胞生產的蛋白質次單元和類病毒顆粒、基於納米顆粒的蛋白疫苗，以及病毒載體產品等(例如，AAV)。這些載體可在體內(*in vivo*)或離體(*ex vivo*)使用。

不依賴輔助病毒的產品，可透穩定轉染或暫時性轉染的細胞株來進行生產，或是透過病毒載體感染來表達重組蛋白或類病毒顆粒(例如重組桿狀病毒)。依賴輔助病毒的產品，則需要使用輔助病毒以利產品表達或是讓病毒載體能複製(例如，AAV 需要依賴如單純疱疹病毒或腺病毒等輔助病毒)。

生物製劑病毒污染的可能來源，已於主要指引第 2 節中說明。應考量額外的病毒污染風險，例如，由表現系統引入的風險，以及可能存在具複製能力病毒的污染風險。在評估產品製程中潛在的外部污染風險時，應仔細考量細胞受質對外來病毒之易感性(susceptibility)。使用經過充分特性鑑定的細胞庫和病毒種批，可降低病毒污染風險。生產用病毒被視為是製程相關之不純物。

新型產品的病毒安全性與污染控制，應藉由實施全面性的管理計畫來確保，包括原物料的來源管理，在適當的製程步驟進行病毒檢測，以及透過製程移除及／或去活化外來病毒和生產用病毒。若病毒清除能力有限，則病毒安全性應著重在原物料與試劑以及製程的檢測和管控。

因此，應採用基於風險的方法來證明產品的病毒安全性。

6.2 病毒測試

應於適當的製造階段對內源性病毒和外來病毒進行廣泛的檢測和特性鑑定，以支持產品整體安全性。應根據產品類型及其相關風險因素來實施檢測，並且檢測應覆蓋產品整個生命週期。下表 A-5 概述了在生產過程中各階段應執行的檢測。表中描述了對病毒種批、未加工原液(收穫液)以及純化原液／原料藥所應執行的檢測。用於病毒載體生產的細胞受質，其測試和特性鑑定計畫請參閱主要指引的表 1；對這些類型產品可能適用的額外考量亦列於表 A-5。若生產細胞在製程中無法存活，LIVCA 的檢測則適用於未轉染的細胞。

檢測的類型及範圍應視風險評估而定，須評估細胞受質及製程之相關特定風險因素。應考慮之因素包括細胞受質與病毒種批／載體的來源、繼代史及特性、原物料和試劑的來源與生產方式、所用的細胞培養製程、生產用病毒的使用、以及製程去活化及／或移除病毒的能力。

表 A-5：於適當之階段應進行之病毒測試

試驗方法	MCB、WCB、 達到 LIVCA 之 細胞	病毒種批	未加工原液 (收穫液)	原料藥 (純化原液)
外來病毒檢測				
體外試驗或 NGS ^{a,b}	請參閱主要 指引表 1	+ ^g	+ ^g	-
體內試驗或 NGS ^b		+ ^g	- ^{g,j}	-
特定病毒測試 ^c		+ ⁿ	+	-
反轉錄病毒和內源性病毒、生產用病毒和具複製能力病毒(若適用)的檢測				
反轉錄病毒及 內源性病毒	請參閱主要 指引表 1	+	- ^{d,j}	-
生產用病毒	-	-	+ ^e	+ ^e
具複製能力病毒	-	+ ⁱ	+ ⁱ	+ ⁱ

- MCB、WCB、LIVCA、MVS 和 WVS 應以易受感染細胞進行 28 天的測試，並在第 2 周時至少進行一次繼代培養。對於未加工原液，可根據風險評估(考量細胞受質、生產培養週期、使用動物性來源之原物料或試劑，以及製程之病毒清除水準)及證明合理的情況下，或可將檢測縮短至 14 天。指示細胞培養應監測細胞病變病毒、血球吸附病毒和血液凝集病毒，並符合現行地區性法規與指引。對於在昆蟲細胞株中生產的產品，檢測應包括使用節肢動物病毒的易受感染細胞株(例如，BHK 細胞)。若無法中和病毒載體或病毒載體衍生產品，NGS 可作為替代檢測方法且特別有效。應對病毒種批和未加工原收穫液進行檢測。於某些情形下，未加工原收穫液可能與原料藥相同。
- 非標靶 NGS 可替代體內試驗(第 3.2.3 節)，並可補充或替代體外試驗(第 3.2.2 節)。
- 檢測應基於風險評估，包括細胞受質之來源和歷史、病毒種批的來源，以及可能接觸的人類或動物來源的原物料。可使用的方法，例如基於細胞培養之感染性試驗、抗體產生試驗(MAP，HAP 和 RAP)、病毒特定 NAT 或其他分子方法(例如 NGS)。詳情請參閱第 3.2.4 節。檢測可能包括特定物種之病毒，例如，昆蟲細胞中之節肢動物病毒，或若使用血清或胰蛋白酶，則應分別檢測牛或豬的病毒。。
- 若 MCB 或病毒種批檢測出反轉錄病毒陽性，則後續應包括對至少 3 批次未加工原收穫液中對可能的反轉錄病毒顆粒進行定量檢測，以確定病毒清除之目標含量。對於 MVS，若仍存在殘餘風險，則可考慮對未加工原收穫液進行檢測。
- 生產用病毒應在未加工原液階段進行定量，並至少使用 3 個細胞培養批次，以確認病毒清除之目標數值。應使用易受感染細胞進行感染性試驗來靈敏地檢測病毒，以證明原料藥(純化原液)中不含生產用病毒。或可使用分子方法進行檢測。除非能以穩健的超額清除能力來佐證，否則應對每批純化原液進行檢測，確認沒有殘留的生產用病毒(案例 F，表 4)。
- 具複製能力病毒(replication competent virus, RCV)可能在製造中的任何階段產生。建議於製造的多個階段檢測 RCV。為使病毒檢測最大化，RCV 檢測應在病毒種批／細胞庫、各批次未加工收穫原液或原藥或製劑上進行。
- 當體外或體內試驗可能受到干擾時，應在病毒種批及／或未加工原收穫液階段，對平行培養的對照細胞進行檢測。若對病毒種株與未加工原液使用 NGS 進行檢測，則無須對照細胞培養物進行檢測。
- 若細胞庫尚未檢測，則應對病毒種批進行檢測。
- 應對病毒種批進行檢測。視產品類型，病毒種批可能用於製造疫苗病毒、病毒載體或輔助病毒。病毒種批是由已建立的細胞株來生產的。依循基於風險方法，病毒檢測應考量細胞株以及製備病毒種批所使用的原物料和試劑的來源，以確保無外來病毒及不存在具複製能力病毒。因為 WVS 直接衍生自 MVS，因此可基於風險評估，於 WVS 執行部分外來病毒檢測。另一種可接受的替代方法，是在每批 WVS，而非在 MVS 上執行完整的檢測。
- 基於風險評估的檢測

6.3 病毒清除

應盡可能依照本指引之一般原則，降低外來病毒、內源性病毒和殘留生產用病毒的汙染風險。某些病毒載體產品，例如 AAVs，適合執行病毒清除步驟，可確保外來病毒及生產用病毒之清除(去活化或移除)。

病毒清除應使用具代表性且合格之縮小規模模型來進行評估。病毒載體及其衍生產品之物理化學特性將決定病毒清除如何來套用在下游製程中。病毒清除研究應包括生產用病毒本身或特定「模式」病毒(例如，桿狀病毒、腺病毒、疱疹病毒)，以及代表外源和內源病毒的「模式」病毒(請參閱表 A-1)。關於表 4 中所述特定和非特定「模式」病毒選擇的實施方案，請參閱第 5 節和第 6 節。製程應對用於蛋白表達的病毒載體或是輔助病毒具有穩健之清除能力。若產品可以耐受(例如無套膜的病毒載體)，則一般常用之病毒去活化步驟，例如，利用清潔劑或以溶劑／清潔劑處理，可能是適用的。此外，對於 AAV 等小型病毒載體或奈米粒子型疫苗等產品，病毒過濾可能是更合適的方式，因其可依尺寸排除進行病毒去除。層析步驟可以針對與病毒載體表面性質不同的病毒提供清除效果。在當適狀況下，應執行病毒清除研究，以確定製程相關步驟的病毒減量係數。例如使用桿狀病毒／昆蟲細胞系統所生產之次單元蛋白和 VLP 能夠被純化，且可透過製程達成病毒清除。

這些產品的病毒安全性也可藉助於在封閉系統中操作、測試和其他預防性管控措施(請參閱第 2.2 節、第 3 節和第 4 節)。這些產品製程之病毒清除步驟，可能無法與重組蛋白質製程達到相同穩健性。因此，必須透過風險評估來支持產品的病毒安全性。