

# 冻干制剂灌装车间培养基模拟工艺验证

成 魁 魏国宏 杨灵通 巩喜军 徐永浩 刘晓宇 韩祥东 刘 晓

兰州兰生血液制品有限公司 甘肃兰州 730046

**【摘要】目的** 通过无菌灌装胰酪大豆胨液体培养基来评价新车间血液制品生产过程的无菌保障水平。**方法** 按分装操作程序进行灌装,过程中加入最快灌装速度、最多工作人员数量、最大灌装数量、最长工作时间、常规干扰实验及非常规干扰实验等干扰实验和干扰因素。**结果** 通过模拟灌装过程中的最快灌装速度、最多工作人员数量、最大灌装数量、最长工作时间、常规干扰实验和非常规干扰实验,灌装后的培养基经接种培养无微生物生长。**结论** 胰酪大豆胨液体培养基模拟灌装验证结果证明无菌工艺能保证血液制品生产的无菌和安全性。

**【关键词】**模拟灌装;血液制品;挑战实验;干扰因素

**【中图分类号】**R927

**【文献标识码】**A

**【文章编号】**1671-4083 (2021) 02-097-02

无菌工艺模拟试验是采用适当的培养基或其他介质,模拟制剂生产中无菌操作的全过程,评价该工艺无菌保障水平的一系列活。GMP 规定无菌生产工艺的验证应当包括培养基模拟灌装试验。培养基模拟灌装试验的首次验证,每班次应当连续进行 3 次合格试验。无菌工艺模拟试验指南规定新建无菌生产线,在正式投产之前,每班次应当连续进行 3 次合格的模拟试验<sup>[1]</sup>。经至少连续三批培养基灌装试验合格后方可证明被验证工艺的一致性和可靠性。初次验证后,为了评估无菌工艺的受控情况,每条生产线的培养基灌装每半年验证一次,每次试验至少灌装一批。要求所用培养基能够支持微生物生长的菌谱范围要宽,应能促进微生物的生长<sup>[2]</sup>。胰酪大豆胨液体培养基(TSB)是一种广谱性培养基,特别对无菌工艺环境中源自人体的微生物有良好的促生长效果,是无菌工艺模拟试验常用的培养基。目前,血液制品生产企业多采用 TSB 作为灌装试验的培养基<sup>[3]</sup>。因此,本试验通过模拟灌装试验来证明新车间工艺无菌保障的可靠性、有效性和可及性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

TSB;金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉、生孢梭菌、大肠埃希菌;注射用水。

### 1.2 试剂与仪器

立式超声波清洗机;脉动真空灭菌器;隧道式灭菌干燥机;真空冷冻干燥系统。

### 1.3 风险评估

无菌生产工艺的设计基于对产品特性、工艺技术和无菌保证措施的认知和经验的累积。对无菌生产过程开展系统性风险评估,以充分识别无菌生产过程中潜在风险点。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 验证预确认

验证开始前对验证实施过程中所涉及的所有人、机、料、法、环、测等相关项目逐一进行检查确认。

#### 1.4.2 培养基的配制

培养基的配制:按照灌装瓶数 2500 瓶,装量为 20ml,配制 3% TSB。

#### 1.4.3 培养基除菌、分装、模拟冻干入柜过程、轧盖

将脱外包的注射剂瓶、铝塑组合盖外箱消毒后经物流通道进入洁净间,将溴化丁基橡胶塞铝塑组合盖、分装用具和除菌滤器经 121℃、30 分钟湿热灭菌待用。

培养基溶液除菌过滤,待分装瓶数>2500 瓶,将除菌过滤后的培养基装入大立瓶中,密封保存,用于轧盖效果验证。

分装:分装过程持续 3h 左右,分装 2400 瓶培养基,每瓶培养基装量为 20ml。

最大速度约 1080 瓶/h 灌装,分装约 1600 瓶;最小速度约 900 瓶/h 灌装,分装约 800 瓶。制品自动灌装于注射剂瓶内,半加塞后立即入冻干柜。

分装过程加入挑战试验,安排生产过程中最大、最少人数操作。增加固有性干预的次数,如转移加塞、加胶塞、转移铝塑盖、加铝塑盖、更换沉降菌皿、浮游菌检测次数。增加纠正性干预,模拟最差条件下的故障排除,包括:灌装装量调试、调整瓶盘探头、调整灌装机进瓶探头、调整灌装机压塞检测探头、更换灌装泵管路、调整胶塞锅、调整胶塞定位块、调整胶塞吸塞盘、清理瓶盘倒瓶、清理胶塞、轧盖星轮复位、调整铝塑盖轨道、清理铝塑盖、操作人员减少、灌装人员进出洁净室和离线尘埃粒子检测等因素。

冻干入柜,使培养基在冻干柜内半加塞状态存放 4h 以上,存放结束后全压塞,轧盖,培育间培养。

分装全过程中动态沉降菌、在线尘埃粒子监测和浮游菌监测。结束后对工作人员进行压指、工作衣和洁净区表面微生物监测。

#### 1.4.4 培养基模拟灌装过程的物料平衡确认

确认 TSB 培养基配制量、灌装用量和损耗量的物料平衡。

#### 1.4.5 培养基的培养

培养基先在 20~25℃ 孵室中倒置静放 7 天,培养三日后进行抽样灯检,确认生长情况,再转入 30~35℃ 孵室中倒置静放 7 天。

#### 1.4.6 培养基促生长试验

随机抽取 30 瓶无污染的 TSB。接种枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌,在 30℃~35℃ 孵箱培养不超过 3 天;接种黑曲霉及白色念珠菌,在 20℃~25℃ 孵箱培养不超过 5 天。

#### 1.4.7 轧盖密封效果验证

每批随机抽样,接种大肠埃希菌,30~35℃ 培养 24~48h,菌液浓度 10<sup>6</sup>CFU 以上时倒入大桶。将挑战瓶完全浸入 4h。另取 2 瓶正置 2 瓶倒置做阳性对照。挑战瓶与阳性对照瓶 30~35℃ 培养 7 天。目检,判定是否混浊长菌。

#### 1.5 合格标准

不应检出污染品。

## 2 结果

### 2.1 风险评估

通过风险评估,识别了灌装过程中的风险点,输出了挑战试验和干扰因素。无菌工艺模拟试验指南(无菌制剂)要

求生产批量小于 5000 支, 模拟灌装批量至少与生产批量相同, 生产批量为 2300 瓶, 故模拟灌装批量为 2400 瓶。容器装量: 因容器规格为 50ml, 装量需为容器体积的  $\frac{1}{3} \sim \frac{1}{2}$  的要求, 因此, 模拟灌装验证的装量为每瓶 20ml。

## 2.2 培养基的配制结果

配制的 TSB 数量为 60000ml 计算 TSB 干粉用量, 其中 50000ml 用于培养基灌装试验, 10000ml 用于轧盖密封性试验。

## 2.3 培养基除菌、分装、模拟冻干入柜过程、轧盖结果

灌装装量为 20mL, 最快灌装速度为 30 瓶 / 分钟, 最慢灌装速度为 15 瓶 / 分钟, 最多工作人员数量 8 人, 最长工作时间 3h。调整灌装机进瓶探头 2 次共 1 分钟。调整灌装机压塞检测探头 1 次共 1 分钟, 更换灌装泵管路共 1 次共 8 分钟。调整胶塞锅次 1 共 1 分钟。调整胶塞定位块 2 次共 6 分钟, 调整胶塞吸塞盘 2 次共 7 分钟, 清理瓶盘倒瓶 3 次共 1 分钟。转移胶塞 1 次共 1 分钟。加胶塞 3 次共 1 分钟。清理胶塞 5 次共 1 分钟。停机 1 次共 30 分钟。加铝塑盖 2 次共 1 分钟。轧盖星轮复位 3 次共 1 分钟。调整铝塑盖轨道 3 次共 1 分钟。清理铝塑盖 3 次共 2 分钟。更换沉降菌平皿 2 次共 1 分钟。浮游菌检测 2 次共 10 分钟。操作人员减少支 1 人共 30 分钟。离线尘埃粒子检测 1 次共 10 分钟。

每批次分装量分别为 2437、2426、2419 瓶。环境监测均合格。培养基污染数为零。

## 2.3 培养基模拟灌装过程的物料平衡确认结果

三批培养基模拟灌装实际用量与剩余物料的总和等于领用的数量, 物料平衡处于合格范围, 结果合格。

## 2.4 培养基促生长试验结果

促生长的三批培养基均出现了明显的微生物生长。

## 2.5 轧盖密封效果验证结果

挑战试验的培养基无混浊长菌, 阳性对照混浊长菌。

## 3 讨论

本试验涵盖了最大产量, 三批次分别灌装 2437、2426、2419 瓶。容器中培养基灌装体积应考虑适宜微生物生长的需要和容器内表面覆盖的要求, 灌装体积不必与产品相同, 但科学的灌装量既能保证产品通过倒置和旋转接触到所有内表面并有足够的氧气支持微生物的生长, 又有利于对培养基的观察。要求每只容器的培养基灌装体积为容积  $\frac{1}{3} \sim \frac{1}{2}$ <sup>[4]</sup>, 所以 50mL 的模制瓶模拟灌装体积选择 20mL。模拟试验应涵盖产品实际灌装速度范围, 采用最慢的灌装速度、最快的灌装速度, 用以模拟最大操作强度 / 难度。但最快灌装速度不能超过灌装线的最大设计速度, 灌装对象为高浓度蛋白产品时, 易出现气溶胶, 这将对悬浮粒子浓度造成影响<sup>[5]</sup>, 日常生产的分装速度应介于验证的最快速度 30 瓶 / 分钟与最慢速度 15 瓶 / 分钟之间。在培养基灌装时分装操作人员、环境监测人员、维修人员和其他相关人员必须参与培养基的灌装验证, 验证时应确认灌装间最多工作人员数量。其中参与到本试验中的

人员有 5 名工作人员、2 名监测人员、4 名环境检测人员和 1 名维修人员, 其中最多人员时为 8 人。模拟试验挑战了生产设备设施等灭菌后最长的放置时间。规定了放置时间不超过 36h, 灌装试验的运行持续时间涵盖了实际分装过程的操作时间和中断操作的时间, 最长分装时间为 3h。灌装过程中加入了装载胶塞、环境监控、设备安装等常规和计划性的干预动作, 同时加入了对无菌生产过程的纠正或调整, 如生产过程中清除破碎的瓶子, 排除卡住的胶塞, 更换部件、设备故障排除等纠正性干预。此类干预动作作为正常生产中允许的干预活动, 与实际的生产活动一致。但不可在模拟试验中挑战违反 GMP 的干预动作, 以证明其的合理性。科学的干预动作主要来源于日常工作出现的事件, 综合考虑有代表性的活动及干扰, 将其列入方案中。干扰的次数应体现最差原则<sup>[6]</sup>, 即模拟的次数不得少于实际生产可能发生的最多次数。无菌工艺验证的环境应与实际生产操作一致, 特别的生产控制和预防措施将影响试验结果的可靠性<sup>[7]</sup>。与实际生产工艺相比, 模拟试验中的环境监控增加额外的监测环节, 对工作人员的更衣进行了确认, 监测工作人员的表面微生物。促生长试验的菌种选择了药典的标准菌株, 促生长试验接种量 > 100CFU, 按照中国药典要求培养, 结果证明培养基能够支持微生物的生长。通过微生物挑战试验验证自动灌装机的轧盖密封效果, 采用微生物浸入试验的方法。挑战试验的培养基均零污染, 阳性对照瓶浑浊长菌, 证明了轧盖密封的良好效果。

成功的无菌工艺模拟试验是允许正式生产的必要条件, 但仍需正视试验的局限性。GMP 是评价无菌生产过程法规符合性的准绳和底线, 血液制品企业的无菌工艺过程需高于 GMP 的要求, 无法满足 GMP 的工艺不能通过无菌工艺模拟试验的成功证明工艺的合理性。虽然培养基模拟灌装试验是评估无菌生产工艺可靠性的常用方法, 但制品检测出现污染时, 不能通过成功的模拟灌装结果, 排除生产过程所带来的污染可能性。

## 参考文献

- [1] 谢晓颖. 无菌原料药的无菌工艺模拟试验要点 [J]. 科学与财富, 2020, 000(002):181.
- [2] 胡敬峰, 韩莹. 无菌工艺模拟试验中存在的问题与对策 [J]. 中国药事, 2019, 33(12):1395-1399.
- [3] 李惠. 粉针剂无菌工艺验证培养基模拟分装 [J]. 科技资讯, 2018, 16(2):235-235.
- [4] 苏静. 冻干制剂模拟灌装验证 [J]. 医药, 2016(11):00017-00018.
- [5] 张红蕾, 贾丽辉, 李萌. 浅议培养基模拟灌装之最差条件选择 [J]. 饮食保健, 2017, 4(011):212.
- [6] 刘燕, 申志峰, 陈成. 基于风险评估的吹灌封无菌工艺的验证 [J]. 化工与医药工程, 2018, 039(002):P.31-37.
- [7] 陈旭. 无菌工艺模拟试验最差条件的选择及干预实施 [J]. 中文科技期刊数据库 (文摘版) 医药卫生 :00219-00219.

(上接第 96 页)

过多种方式了解到生物宏观组织与微观形态的一种技术<sup>[3]</sup>。该方式检测中, 能够了解到细胞中的细胞核周长、面积等相关参数, 以及 DNA 含量等指标, 进而能够对病症进行较为准确的分析以预后评估, 正确判断患者是否出现癌细胞转移情况。

综上所述, 定量病理技术在乳腺癌诊断中具有积极意义, 检出率较高, 而且能够观察到细胞形态, 具有重要临床价值, 可以作为预后判断的一种主要方式。

## 参考文献

- [1] 张清鹏. 新辅助化疗对乳腺癌根治术后病理诊断的影响效果观察 [J]. 中国实用医药, 2019, 14(06):96-97.
- [2] 刘晓威. 乳腺癌合并细微钙化采用钼靶 X 线与彩超影像诊断的对比研究 [J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(02):50-51.
- [3] 徐小艳, 王建君, 王慧, 等. JMJD3 和 Ki-67 定量检测与乳腺浸润性导管癌分子分型及临床病理学特征的关系 [J]. 中国癌症杂志, 2020, 243(01):63-69.