

にブタトリプシンが汎用されている。このためにブタに検出されるウイルスの対する安全性確保が重要となる。EMAはバイオ医薬品に利用されるブタトリプシンについてガイドラインを発出している。このガイドラインは再生医療／細胞治療のみを目的としたものではないが、汎用されているブタトリプシンのウイルス安全性が重要と考えられていることに他ならない。ガイドラインではブタトリプシンの原材料であるブタ臓腑についてのウイルス試験から製造工程を通じてのウイルスクリアランスの考え方、特にブタに蔓延しているPPVやPCVの検査、不活化工程に対する感受性、除去工程の適用など様々な観点から見解が述べられている。さらに不活化工程としてガンマ線照射、電子線照射、UV-C照射、低pH処理などについて取り上げ、ウイルスの物理的、化学的抵抗性の強さばかりでなくゲノム修復との関連も考慮する必要があると指摘されている。特に2本鎖DNAウイルスはゲノム修復が効きやすいという点を注意する必要があるとされている。このガイドラインは再生医療製品のブタトリプシンに関する有用な情報を提供しているが、さらにガイドラインに示されている事項は再生医療／細胞治療製品の原材料の安全性確保のための考え方にも通じるものがある。

ブタトリプシンなどブタ由来原材料のウイルス安全性に関してはブタサーコウイルス（PCV）の考慮する必要があることから、PCVの検査のための陽性コントロールとしてCCL33細胞の評価を行った。CCL33細胞はPCV抗原を発現している細胞であり、PCVゲノムが細胞染色体に組込まれていると想定されている。CCL33細胞をPCVのNAT検出の陽性コントロールとするために2つのプライマーセ

ットの検出能を検討したところ、PCVD1/D3のプライマーセットが有用であることが示された。

## E. 結論

Vero (JCRB NIHS0111 株) をクローニングしウイルス感受性の高い細胞を分離した。クローン化されたVero細胞は、HSV-1、Sindbis virus、Poiovirusに高い感受性を示した。次に *in vitro* ウイルス試験条件の検討を行い、ピルビン酸やInsulin/Transferrin/selenium (ITS) を添加することにより TCID50 試験の感度が上昇することが分かった。ただ全てのウイルスに共通する条件は設定できず、ピルビン酸ないしはピルビン酸／ITSを含む2つの条件に培養した細胞を用いることにより感度よくウイルスを検出できると考えられる。

ウイルス検出のための陽性ランコントロールとしてPoiovirusの検討を行った。ブタトリプシンのウイルス安全性評価のためにブタサーコウイルス（PCV）検出のためのプライマーセットの選択とPCV標準品としてPCV抗原発現株としてCCL33の評価を行った。

## G. 研究発表

1. 山口照英、内田恵理子：遺伝子治療の開発に関する我が国の規制と海外動向、Pharma Medica（印刷中）
2. 内田恵理子、古田美玲、菊池裕、窪崎敦隆、遊佐精一、宮原美知子、佐々木裕子、小原有弘、大谷梓、松山晃文、大倉華雪、山口照英：日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験のPCR法改正のた

- めの共同研究、マイコプラズマ学会雑誌  
(印刷中)
3. 内田恵理子、五十嵐友香、佐藤陽治：遺伝性難病に対する遺伝子治療薬の臨床開発促進のためのレギュラトリーサイエンス共同研究、衛研報告 132, 10-12 (2014)
  4. 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英：細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験のPCR法の見直しに関する研究、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 45 (5), 442-451 (2014)
  5. Teruhide Yamaguchi and Eriko Uchida: Oncolytic Virus: Regulatory Aspects from Quality Control to Clinical Studies, *Current Cancer Drug Targets* ( in press)
- G-2 学会発表**
1. 内田恵理子、豊田淑江、古田美玲、山口照英、佐藤陽治：パルボウイルス B19 感染系の改良とジェノタイプの違いによる増殖能の比較、日本薬学会第 135 年会 (2015.3) 神戸
  2. 古田美玲、内田恵理子、山口照英：再生医療製品のマイコプラズマ否定試験としての NAT の適用に関する研究、第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3) 横浜
  3. 内田恵理子：新しいマイコプラズマ否定試験法、第 15 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム (2015.2)
  4. 内田恵理子：遺伝子治療用製品指針改定の取り組みー品質及び安全性の確保と遺伝子治療製品の開発促進のために、第 5 回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム (2015.1)
  5. 山口照英、内田恵理子、小野寺雅史：遺伝子治療製品の品質/安全性確保のための指針改定と国際調和、IMSUT-CGCT キックオフシンポジウム 2014, 2014.11.21、東京
  6. 内田恵理子：マイコプラズマ否定試験の改正による NAT 法の積極的活用、第 13 回日本薬局方に関する研修会 2014 年 10 月 9 日 (大阪), 15 日 (東京)
  7. Eriko Uchida: Current situation of advanced therapy regulation in the world, 第 20 回日本遺伝子治療学会学術集会 (2014.8) (東京)
  8. Eriko Uchida, Yuka Igarashi, Yoji Sato, Masafumi Onodera, Teruhide Yamaguchi: Study on the biosafety of ex vivo transduced cells with retroviral vectors and Cartagena protocol domestic law, 第 20 回日本遺伝子治療学会学術集会 (2014.8) (東京)
  9. Yuka Igarashi, Eriko Uchida, Masafumi Onodera: Quality control for the supernatants of retroviral vectors using a next-generation DNA sequencer, 第 20 回日本遺伝子治療学会学術集会 (2014.8) (東京)
  10. 内田恵理子、古田美玲、菊池裕、窪崎敦隆、遊佐精一、宮原美知子、佐々木裕子、小原有弘、大谷梓、松山晃文、大倉華雪、山口照英：日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験の PCR 法改正のための共同研究、日本マイコプラズマ学会第 41 回学術集会、2014 年 5 月 22 日～23 日 (東京)
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- H-1 特許取得 なし
- H-2 実用新案登録 なし

H-3 その他 なし

Virus	Primer	Probe
Poliovirus RT-PCR	F: 5' -CCCGAGAAATGGGACGACTA-3' R: 5' -TGGAGCTGTTCCGTAGGTGTA-3'	5' -FAM-ACATGGCAAACCTCATCAAATC CATCAATC- MGB-3'
HSV-1 PCR	HSV-1001F: 5' -GCGTCATGGTACTGGCAAG-3' HSV-1002R: 5' -TTGACTCTACGGAGCTGGCC-3'	HSV-FAM-TAMRA: 5' -FAM-TGGAGCTGATGCCGTAGTCGG- TAMRA-3'
Sindbis RT-PCR	SINV-QF : 5' -CAACTGGGCCGATGAGAAA-3' SINV-QR : 5' -TCCTGCCTTCACTAAGCCTTGTA-3'	SINV-FAM-TAMRA : 5' -FAM-TCCTGGAAGCCCCTAATATAGG ACTG-TAMRA-3'
huCMV PCR	Forward primer: 5' -AACTCAGCCTTC CCTAAGACCA-3' Reverse primer: 5' -GGGAGCACTGAGGCAAGTTC-3'	5' (FAM)-CAATGGCTGCAGTCAGGCCAT GG-(TAMRA) 3'
huCMV PCR	Forward primer: 5' -GACTAGTGTGATGCTGGCCAAG-3' Reverse primer: 5' -GCTACAATAGCCTCTTCTCATCTG-3'	5' (JOE)-AGCCTGAGGTTATCAGTGTA TGAAGCGCC-(BHQ1a) 3'

<参考資料 1 に記載された EMA のブタトリプシンのウイルス安全性に関する記載>

## 6. 感染性因子の試験

ブタに関しては食品安全対策を目指した管理や対策が取られているが、医薬品製造など食品以外に使用する場合には動物由来原料としての感染因子の伝播リスクが存在する。

生物薬品の安全性確保では、原料物質にウイルス等の感染因子がないことを試験で確認することが重要である。しかし、ブタトリプシンの製造工程でウイルス試験を適用するには現実的にはいろいろと傷害がある。これは主として経済的なあるいはブタの処理を行う施設要件によるところが大きく、大量の原料バッチを造る前に個々のブタごとにウイルス試験を実施することは困難であり、プールされたあとでは、1頭のブタがウイルスに汚染されていても、採取したブタ膵臓腺は検査されることはなく大きなプールバッチとされることになる。このために 1 つの汚染臓器が存在してもウイルスは希釈され汚染が拡散してしまい十分な感度での試験が困難になる。一般的なルールとしては、原料プールでの試験は、ウイルスの不活化や除去工程に入る前に実施するべきで最終トリプシン製品で外来性ウイルス試験を実施するのは適切ではない。しかしこのような原則は、凍結した膵臓組織をアルコールを含む溶液で直接ブタトリプシンを抽出する操作を行う製法で適用するのは簡単ではない。加熱や低 pH 処理がこの抽出操作で行われる場合には、エンベロープウイルスのみならずエンベロープを持たないウイルスも一定の不活化が行われることになる。さらに、ブタパルボウイルスやブタサーコウイルスはトリプシンの酵素活性に影響を受けないが、膵臓に含まれるいくつかの酵素類は加熱や低 pH といった抽出条件でいくつかのウイルスの感染性に影響を与える。

ウイルス試験を実施際には試験法を明確にし、その妥当性を示さなければならない。ウイルス試験を実施する中間製品のバッチサイズと同様に、サンプルサイズについてもウイルス試験の有用性を評価する際に考慮しなければならない。

ブタトリプシン製品の安全性に関して、混入する可能性のあるブタ由来ウイルスリスク評価を行っておく必要がある。このようなブタウイルスのヒトに対するリスクについてはすでに公表されている (Marcus-Sekura et al 2011)。この論文の結論として、これまでのヒトへの感染性に関する情報やヒトがウイルスに対する抗体を保有していたり、ヒト細胞への感染性の有無などの情報を元に、ヒトへの感染性がある 17 属、55 種のブタ由来ウイルスが同定されている。この中の 60% のウイルスは Vero 細胞で増幅し、多くのウイルスがブタ細胞で検出可能である。そのために通常のインビトロウイルス試験では 2 つの異なる細胞サインを用いるべきである。すなわち一つの細胞はヒトないしは霊長類由来の細胞 (例えば Vero 細胞) を用い、他の細胞としてはブタ由来の細胞を用いるべきである。用いる細

胞は血球凝集性のあるウイルスないしは細胞変性作用のあるウイルスを検出できるものでなければならない。細胞培養に際してはウイルス増幅を最も効率的に行えるような条件で実施する必要がある。

細胞培養で検出できないブタ由来ウイルスに関しては製品ごとのリスク評価を行った上で、ケースバイケースの判断をするべきである。この評価では2010年に出されたWHOの細胞基材に関するペーパーやヨーロッパ薬局方を参考にするべきである。混入する危険性のある全てのブタ由来ウイルスを考慮すべきである。疫学的に広く蔓延しているウイルスや不活化が困難なウイルス（例えばPPVやブタサーコウイルス）、さらにはE型肝炎ウイルス（HEV）などの人獣共通感染症ウイルスなどを考慮すべきである。リスク評価では全ての製造工程、試験によってどのようなウイルスが検出できるか、さらには医薬品としての使用目的などを考慮すること。例えば、原材料を採取する地域の疫学的な感染症発症状況、製造工程での高いウイルスクリアランス能を示すことなどにより特定のウイルスの検査を不要とすることの妥当性を説明すること。一般的に、感染性ウイルスが混入していることが明らかになった場合には、製造工程で十分にウイルスを除去・不活化できない限りそのトリプシンバッチはヒトバイオ医薬品の製造に用いるべきではない。このようなウイルス汚染があった場合に同様な対処をすべきかに関しては本ガイドラインのスコープから外れる。ガイドラインのスコープからは外れるが、もしウイルス汚染が明らかな原料を製造に用いる場合には製造工程にウイルス汚染を広げたり、他の製品への汚染を引き起こす可能性があることを十分に考慮する必要がある。

ウイルステストがブタトリプシンの製造業者、医薬品製造業者、外部委託機関、あるいは複数の機関によって実施されるかもしれない。しかし、基準に従ったウイルス試験の実施を担保するのは医薬品製造業者の責務となる。

ト細胞培養の試薬として使用されたり、ワクチンのウイルス活性化に用いられるトリプシンはEU局方の無菌試験やマイコプラズマ試験に適合していなければならない（EU局方2.6.7や同等のバリデーションがなされた試験、例えばUSP、JP、連邦法など）。他の目的に用いられるトリプシンはEU局方の0694トリプシン（あるいは同等の試験）に適合した微生物試験に適合していなければならない。

## 7. 製造

トリプシンは凍結された膵臓腺の原料プールから抽出され、沈殿工程やクロマトグラフィー工程を経て製造される。製造では長期に渡る低pH処理が実施される。Yang等(2013)やLackner等(2014)の論文データによれば、pH1.7の長期に渡るインキュベーションによりPPVやPCVは不活化されるというデータが出されている。しかし、pH1.0での長期に放置（18-24時間、4℃）された市販のトリプシンは活性をもっており、そのまま接着細胞の剥

離に用いることができるとされている (Melnick & Wallis, 1977)。さらに、ガンマ線照射や電子線照射、UV 照射なども適用できる。ウイルスろ過などの手法やそれ以外の最新のウイルス不活化法も適用可能である。原料の管理には限界があり全てのウイルスを試験することは困難であることから、2 つのウイルス不活化・除去工程を製法の中に組み込むことが推奨される。あるいは十分な説明が必要である。いずれの場合にも、製造工程では、ウイルスクリアランスに影響を与えるクリティカルパラメーターを管理する必要がある。

バッチごとの交差汚染や動物由来原料からの汚染リスクを最小限にするために適切かつバリデーションされたクリーニング対策を実施することが求められる。製造されたトリプシン製品ごとに、そのバッチを特定できるような解析結果を添付すること。トリプシン製品は GMP、ISO あるいは HACCP に適合した品質管理システムにより製造される必要がある。

#### 8. トリプシンの製造工程がウイルスを不活化・除去できることのバリデーション

微生物の不活化や除去はトリプシンの外来性汚染物質に対する安全性確保の重要な要素である。したがって、特定の工程を選択し、その工程がウイルスを不活化／除去できる能力を有していることを慎重にバリデーションすることが求められる。CPMP のウイルスバリデーション試験に関する CPMP の通知を参考にすること；ウイルスの不活化や除去工程をデザインし、試験結果の解釈などについての通知。

トリプシンの酵素活性や他のブタ膵臓由来酵素の活性は、いくつかのウイルスの不活化に貢献すると考えられるが、PPV や PCV などの非エンベロープウイルスのようなこれらの酵素に抵抗性の高いウイルスに関してはほとんど期待できない。したがって、このような抵抗性の高いウイルスに関しては複数の不活化や除去工程の評価が必要であり、あるいはウイルス否定試験のような他のウイルス安全対策が求められる。それ以外のウイルス不活化対策としてガンマ線照射や UV-C 照射、あるいはウイルスろ過などを考慮する必要がある。

ガンマ線や電子線などの照射、ウイルスろ過、低 pH 工程でのバリデーションに関しては、物理的、化学的な処理に対して抵抗性の高い小型の DNA 非エンベロープウイルスとして動物パルボウイルス (PPV) を含めるようにすること。

ガンマ線照射は一般的に凍結したトリプシンに対して実施される。凍結乾燥された検体に対して照射を行う場合にウイルス不活化の検討は慎重に実施する必要がある。ウイルス不活化のバリデーションにおいては、スパイクしたウイルスが均一な分布をとらず、溶液の中に不均一に分布する可能性があることやトリプシン粒の脂溶性部分にのみ分布する可能性がある。したがって、凍結前の溶液にウイルス溶液を添加して凍結し、凍結乾燥後にウイルスタイターを測定することが推奨される；このことにより照射工程にどれだけのウ

ウイルスをロードしたかを知ることができる。

UV-Cの照射に関しては、ウイルス不活化は主としてUVが直接ゲノムと相互作用する機作に依存しており、主な光化学反応生産物はピリミジンである。しかし、これまでの試験データからは、ウイルスの不活化は遺伝子の構成やゲノム(DNA/RNA)の種類によって単純に不活化の程度を予測することができない。すなわち、ウイルスの感染性を評価するための細胞を用いた *in vitro* 感染試験において細胞のゲノム修復機構によりウイルスのゲノムが修復される可能性も考慮すべきであり、特に2本鎖DNAを持つウイルスの場合には不活化作用を過小評価する可能性がある。一般的にアデノウイルスはHSV-1と同様にUV-Cに比較的抵抗性が高いためにUV-Cの評価に用いることが推奨される。

トリプシンがタンパク質分解作用を持つことから、トリプシンを含む被検液にスパイクしたウイルスの安定性を考慮する必要がある。また細胞試験において細胞傷害性を持つためにアッセイの実施を妨害する可能性があることも念頭に置くこと。

ウイルスの不活化・除去工程がトリプシンの品質に悪影響を及ぼすことも評価する必要がある。



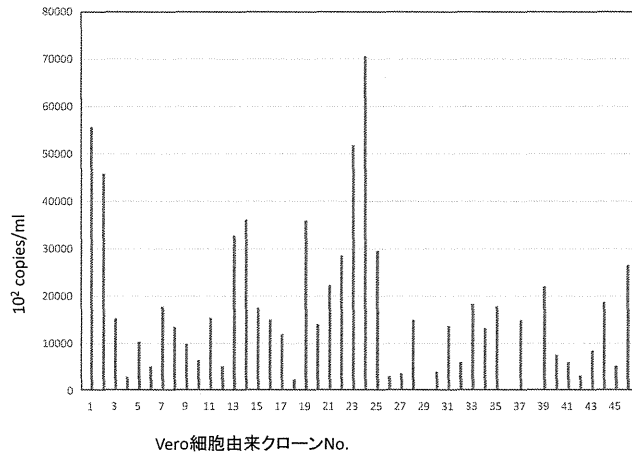


図1. 長期に培養を行っているVero細胞(ATCC由来)をクローニングしてHSV-1の増幅能の違いを解析

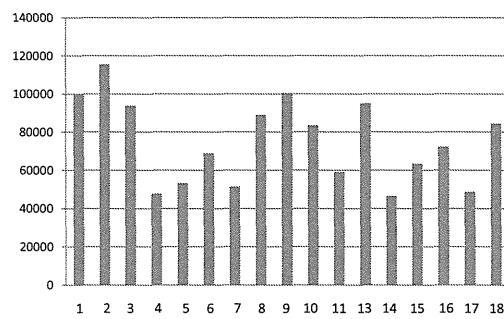
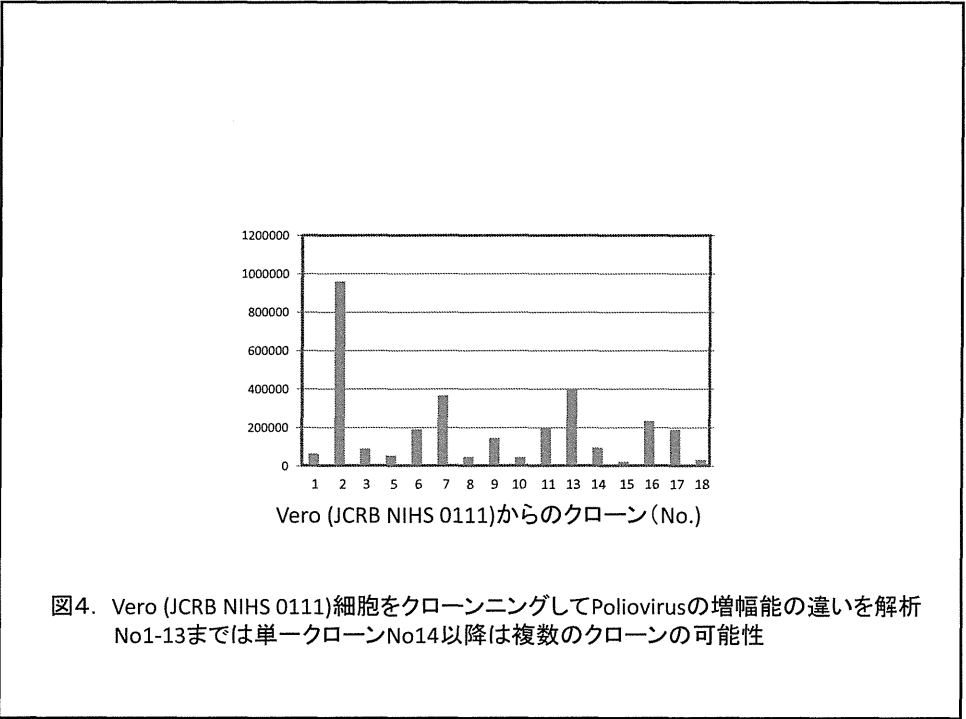
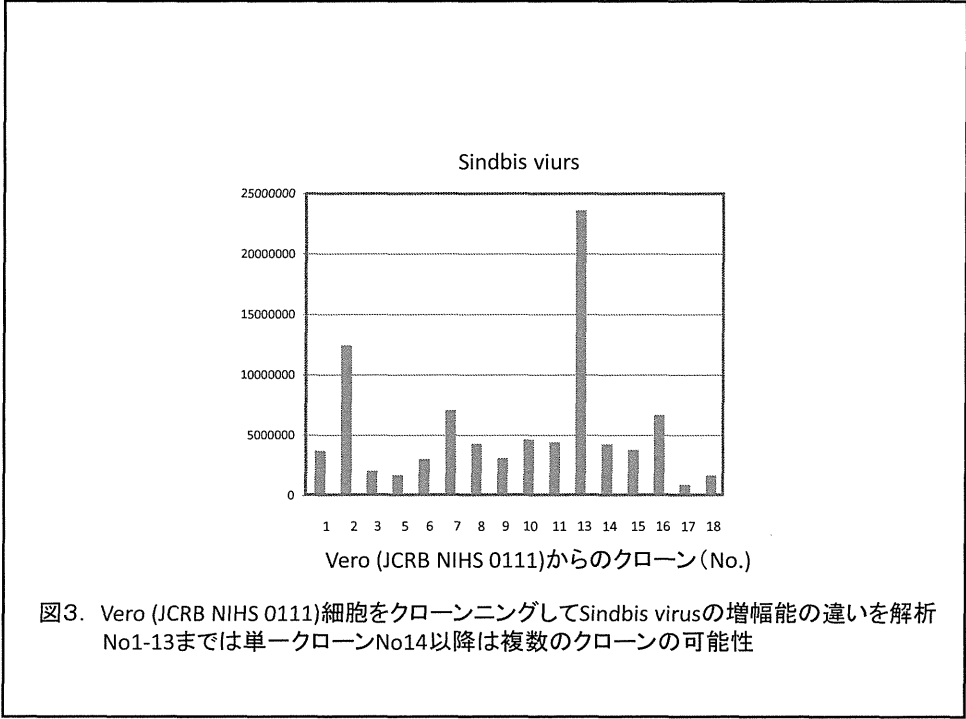


図2. Vero (JCRB NIHS 0111)細胞をクローニングしてHSV-1の増幅能の違いを解析  
No1-13までは単一クローンNo14以降は複数のクローンの可能性



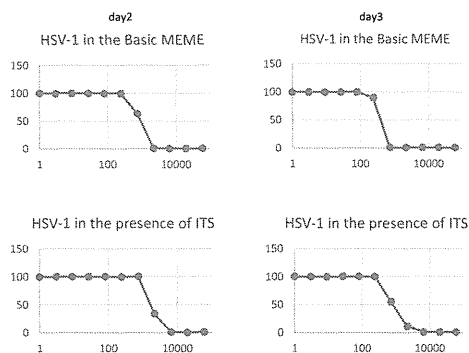


図5. HSV-1のTCID50測定条件の検討

Vero (JCRB NIH8 0111)細胞を96ウェルマイクロプレートに播種し、コンフルエントになって時点でHSV-1を感染させ、CPEの変化を測定した。

ウイルス感染後、ITS(Insulin/Transferrin/Selenium)やピルビン酸を添加。

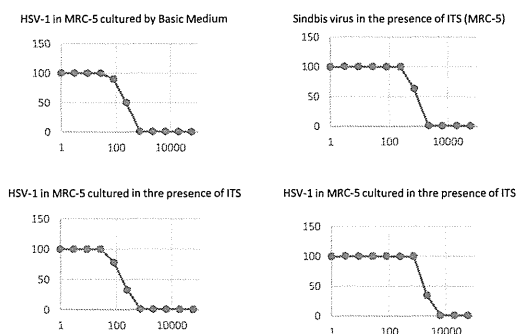


図6. MRC-5細胞を用いたTCID50測定条件の検討

ウイルス感染後、ITS(Insulin/Transferrin/Selenium)やピルビン酸を添加して培養した

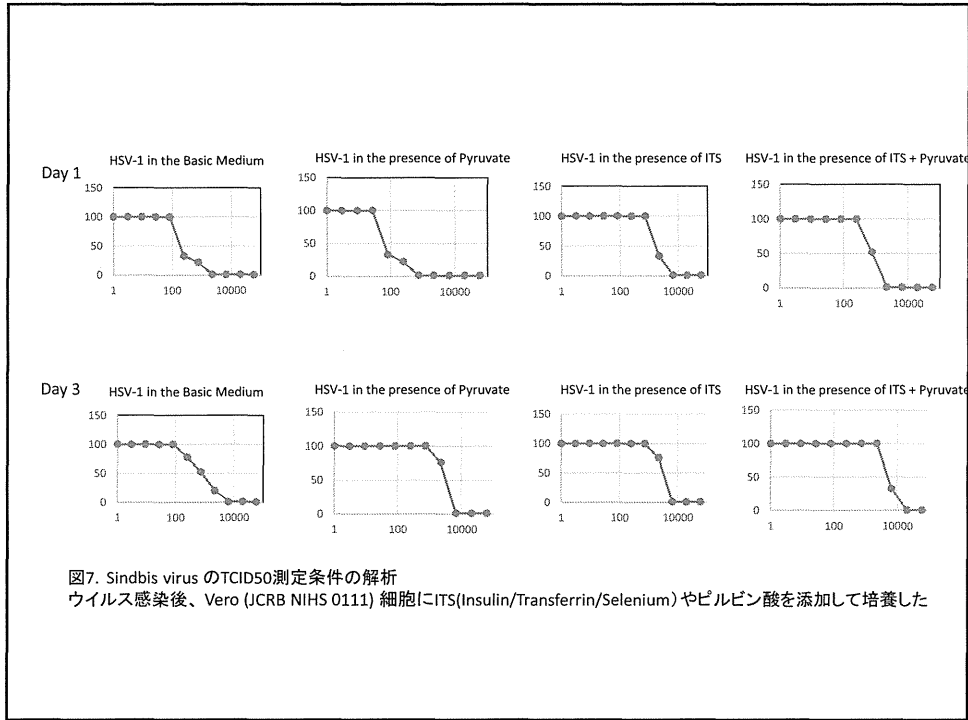


図7. Sindbis virus のTCID50測定条件の解析  
ウイルス感染後、Vero (JCRB NIHS 0111) 細胞にITS(Insulin/Transferrin/Selenium) やピルビン酸を添加して培養した

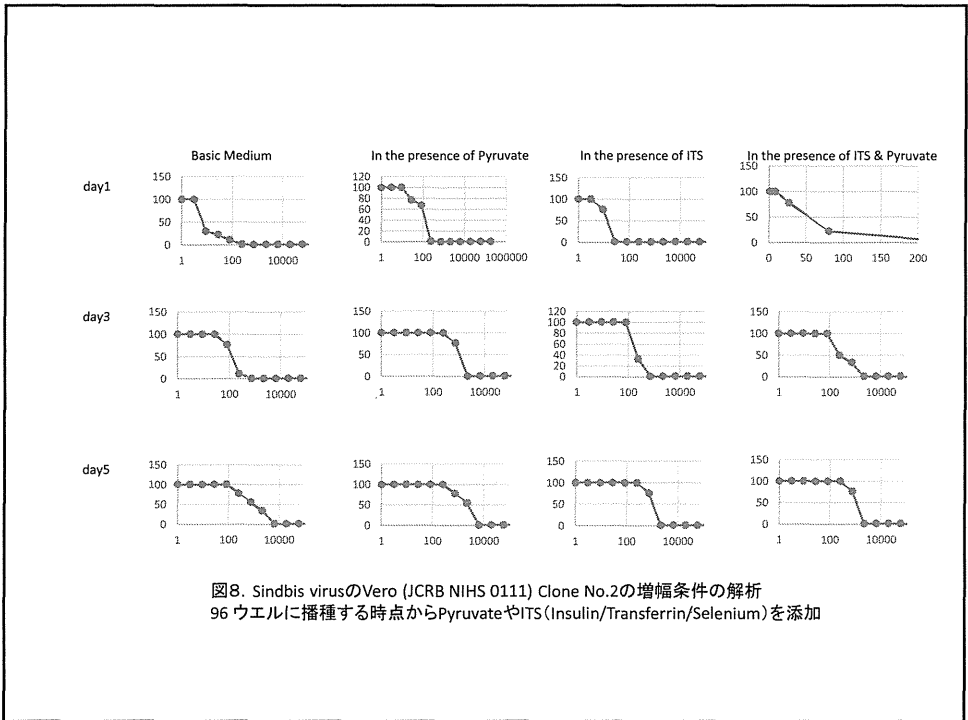


図8. Sindbis virusのVero (JCRB NIHS 0111) Clone No.2の増幅条件の解析  
96 ウェルに播種する時点からPyruvateやITS(Insulin/Transferrin/Selenium)を添加

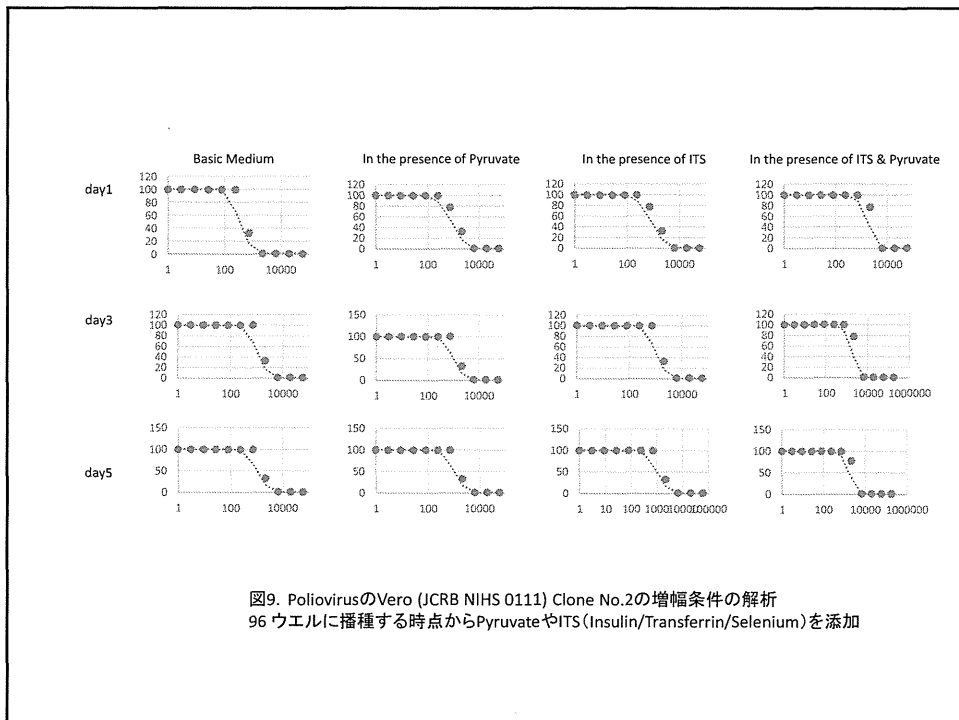


図9. PoliovirusのVero (JCRB NIHS 0111) Clone No.2の増幅条件の解析  
96 ウェルに播種する時点からPyruvateやITS (Insulin/Transferrin/Selenium)を添加

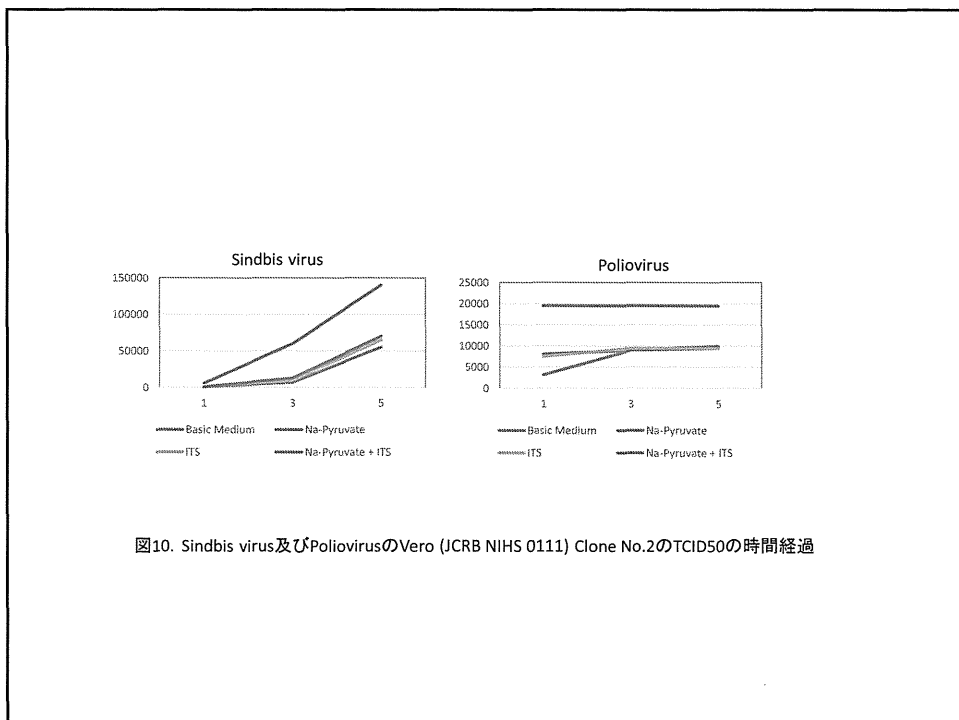


図10. Sindbis virus及びPoliovirusのVero (JCRB NIHS 0111) Clone No.2のTCID50の時間経過

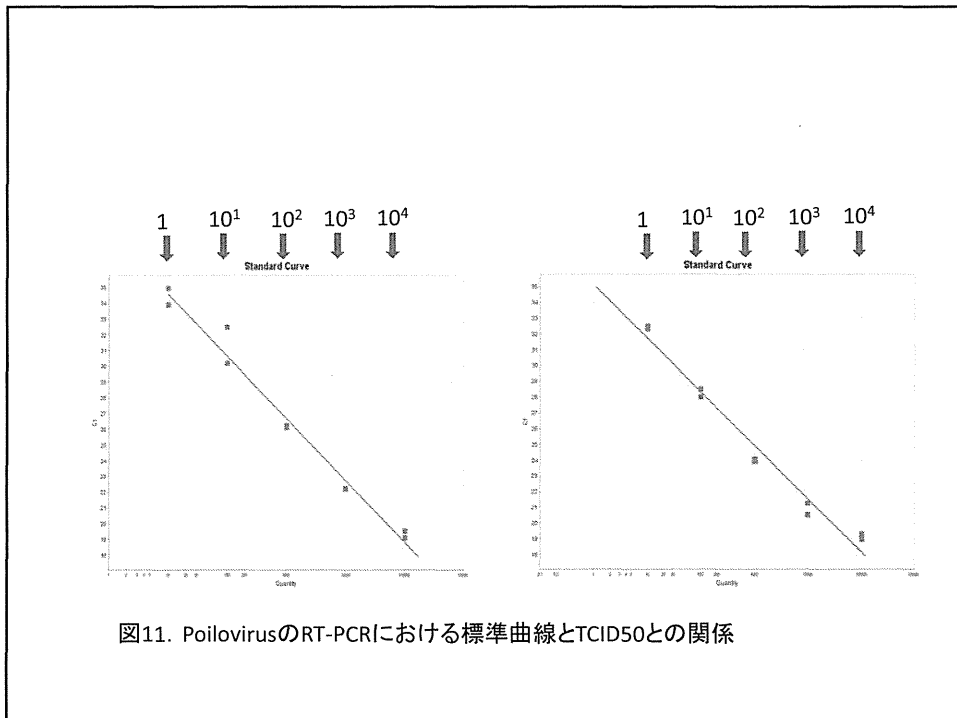


図11. PoilovirusのRT-PCRにおける標準曲線とTCID50との関係

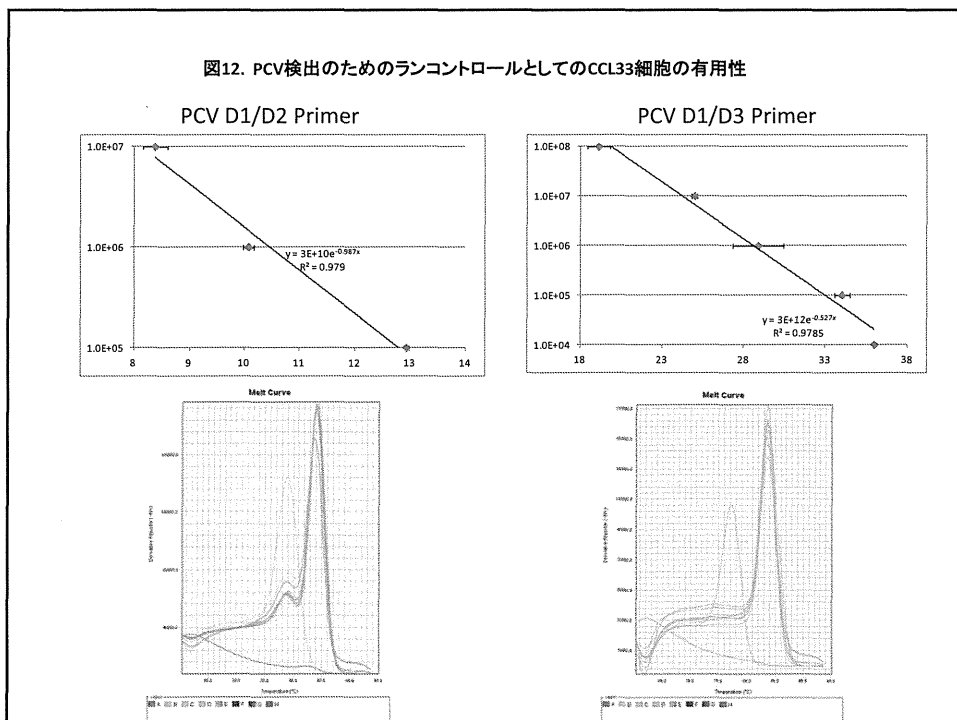
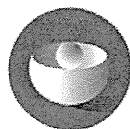


図12. PCV検出のためのランコントロールとしてのCCL33細胞の有用性



EUROPEAN MEDICINES AGENCY  
SCIENCE MEDICINES HEALTH

20 February 2014  
EMA/CHMP/BWP/814397/2011  
Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP)

## Guideline on the use of porcine trypsin used in the manufacture of human biological medicinal products

Draft Agreed by Biologicals Working Party	December 2012
Adoption by CHMP for release for consultation	21 February 2013
Start of public consultation	1 March 2013
End of consultation (deadline for comments)	31 August 2013
Agreed by Biologicals Working Party	15 January 2014
Adoption by CHMP	20 February 2014
Date for coming into effect	1 September 2014

<b>Keywords</b>	<b><i>Porcine trypsin, adventitious agents, virus</i></b>
-----------------	---



# Guideline on the use of porcine trypsin used in the manufacture of human biological medicinal products

## Table of contents

<b>Executive summary .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Introduction (background).....</b>	<b>3</b>
<b>2. Scope.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Legal basis .....</b>	<b>3</b>
<b>4. Types and source of porcine trypsin .....</b>	<b>4</b>
<b>5. Starting Material.....</b>	<b>4</b>
<b>6. Testing for adventitious agents .....</b>	<b>4</b>
<b>7. Manufacture .....</b>	<b>5</b>
<b>8. Validation of the virus-reducing capacity of the manufacturing process .</b>	<b>6</b>
<b>9. Quality Controls.....</b>	<b>6</b>
<b>10. Use of alternative reagents at cell culture .....</b>	<b>7</b>
<b>11. Risk Assessment.....</b>	<b>7</b>
<b>12. Regulatory Aspects.....</b>	<b>7</b>
<b>References .....</b>	<b>8</b>



## Executive summary

This guideline describes the information to be considered by the manufacturer of human biological medicinal products using porcine trypsin. Although specific guidance and specification has been given for bovine sera used as cell culture reagent in manufacture of human medicinal products (CPMP/BWP/1793/02, Ph. Eur 2262 Bovine Serum), no guidance has been given so far for porcine trypsin.

### 1. Introduction (background)

Porcine trypsin is a reagent widely used during the manufacture of biological medicinal products. The main application is the detachment of cells from culture vessels for passaging. During manufacture of some vaccines, trypsin is added to the final culture stage of virus production for activation of a vaccine virus such as influenza virus and rotavirus. In addition, for the manufacture of specific recombinant proteins, e.g. insulin, trypsin is used as a protein-cleaving reagent during the downstream process.

Porcine trypsin, an animal derived material extracted from the pancreas of pigs, carries the risk of contamination with adventitious agents. This may especially be the case for certain viruses that are widespread among pigs and which are difficult to eliminate due to their high resistance to physicochemical treatment.

Animal-derived materials in general can be contaminated with a wide range of biological agents and therefore it is strongly recommended that all these materials are appropriately selected, tested and treated for the inactivation and/or removal of such agents before they are used for the manufacture of medicinal products. Contamination of pharmaceutical facilities with adventitious viruses may lead to a shutdown of production and to supply shortfall. Contamination can also alter growth properties of cultured cells and, theoretically, this could lead to altered properties of a biological product. For medicinal products where no virus inactivation is possible during down-stream processing steps, e.g. live vaccines, or where, in addition, testing for contaminants at the end of production is difficult, e.g. some cell based medicinal products, well-controlled reagents are essential to avoid exposure of patients to adventitious viruses or other non-viral adventitious agents.

Early in 2010 Victoria *et al.* reported the finding of DNA sequences of porcine circovirus (PCV) in a live attenuated rotavirus vaccine. Further investigation confirmed contamination of the vaccine with PCV and revealed that the PCV contamination most likely originated from porcine trypsin that was used in the development of rotavirus vaccines.

### 2. Scope

This guideline applies to trypsin purified from porcine pancreatic glands for use as a reagent in the manufacture of human biological medicinal products. This includes e.g. (1) trypsin used as a reagent for cell culture during manufacture of vaccines, advanced therapy medicinal products or other medicinal products produced from cell culture, (2) trypsin used to activate virus particles, and (3) trypsin used as a protein processing reagent.

### 3. Legal basis

This guideline has to be read in conjunction with the introduction and general principles (4) and part I of the Annex I to Directive 2001/83 as amended.

## 4. Types and source of porcine trypsin

Trypsin is a proteolytic enzyme obtained by activation of trypsinogen. Porcine trypsin is extracted from pancreatic glands usually obtained as a by-product of the food industry. It is prepared as a powder or liquid solution for use as a reagent in cell culture and as a protein processing reagent. Trypsin preparations used for cell cultures may contain impurities from the starting material including other pancreatic enzymes such as chymotrypsin but which do not adversely affect the performance of cell cultures. Highly purified trypsin preparations are available for certain applications in protein chemistry, e.g. as a protein processing reagent.

## 5. Starting Material

Selection of healthy pigs is the first step in minimizing the risk of pathogen contamination of the starting material. The pancreatic glands shall be derived from pigs fit for human consumption following ante- and post mortem inspection in accordance with European Community or equivalent (third country) conditions. Batches of raw pancreatic glands should be clearly labelled or accompanied by appropriate documentation (e.g. certificate of origin) allowing identification of the nature of the animal tissue, their origin and date of collection. Batches of raw material should be accompanied with appropriate official health certificates or equivalent appropriate documentation.

## 6. Testing for adventitious agents

Despite the application of control measures intended for food safety, there is a risk that an animal-derived starting material may be contaminated with transmissible agents.

Testing of starting materials or appropriate intermediates for virus contamination is an important safety measure for biological medicinal products. However, there are several limitations when considering virus testing during production of porcine trypsin. Mainly for economic and organizational reasons, it does not seem possible to test individual pancreatic glands prior to them being pooled into batches; consequently, material from a single infected animal could enter a large production batch and the sensitivity of subsequent tests may not be able to detect a diluted contaminant in the pooled material. As a general rule, testing of the pooled starting material should be performed at a stage before any virus inactivation/removal step whilst testing of the final trypsin preparation for adventitious viruses is not considered appropriate. However, this is not feasible in cases where batches of frozen pancreatic tissue are directly extracted with alcohol containing fluids. If heat or low pH is applied during extraction/precipitation steps, this might additionally inactivate a variety of enveloped and non-enveloped viruses. In addition, the pancreatic enzymes and their activity under exact conditions (pH, temperature) might have an influence on infectivity of some viruses while other viruses (e.g. porcine parvovirus (PPV) and PCV) are not affected by the enzymatic activity of trypsin.

The stage where testing is performed should be clearly defined and justified. The batch size of the tested product intermediate as well as the size of samples subjected to virus testing should be defined and needs to be considered when assessing the benefit of virus testing.

A comprehensive literature-based risk analysis of potential porcine viruses that may contaminate porcine trypsin and could pose a risk to humans has been published (Marcus-Sekura et al., 2011). In summary, 55 porcine virus species from 17 different families have been identified with a documented or potential human host range as indicated by reports of natural human infections, detection of antibodies in humans and/or ability to infect human cells in culture. Sixty percent of these viruses can replicate in Vero cells and a variety can be detected in porcine cells. Therefore a general *in vitro* test is recommended using two distinct cell lines, one of which should be of human or primate origin (e.g.

Vero) and the other of porcine origin. The cell lines should be capable of detecting haemadsorbing viruses and cytopathic viruses. Cells should be cultivated in a manner that allows detection of viral replication.

Specific tests for porcine viruses that are not detected by a general cell culture test should be considered on a case-by-case basis following a product-specific risk analysis (see Chapter Risk assessment) considering more product specific documents where relevant (e.g. WHO 2010, Ph.Eur 5.2.3). All potentially-contaminating porcine viruses should be considered. Specific consideration should be given to widely distributed viruses which are difficult to inactivate (e.g. PCV and PPV) and with zoonotic potential (e.g. HEV). The risk analysis takes into consideration the whole manufacturing process, the testing capability and the use of the medicinal product. For example, consideration of a specific geographic origin or demonstration of highly effective virus inactivating/removing manufacturing steps can justify why testing for certain viruses might be omitted. Generally, if an infectious virus contaminant is detected, the trypsin batch should not be used for the manufacture of human biological medicinal products unless a careful risk assessment demonstrates that the infectious virus will be reliably inactivated or removed by virus reduction steps. Although this is not in the scope of this Guideline, care should be taken to prevent spread of the virus in the facility or to other medicinal products when using virus positive materials.

Virus testing may be performed by the trypsin supplier, by the manufacturer of the medicinal product, by a contract laboratory or by more than one of these. It is the responsibility of the marketing authorisation holder of the medicinal product to ensure that testing is carried out to the required standard.

Trypsin used as reagents for cell culture or activation of virus particles should comply with the Ph. Eur. test for sterility and be free of mycoplasmas (Ph. Eur 2.6.7 or validated equivalent test, e.g. USP, JP, CFR, etc.). Trypsin used for other applications should comply with microbiological tests required in Ph. Eur. 0694 Trypsin (or equivalent tests).

## 7. Manufacture

Trypsin is usually obtained by extraction of pools of frozen pancreatic glands with additional optional purification steps such as precipitation or chromatography. Production frequently includes a prolonged incubation at low pH. Data presented at conferences (Yang et al., 2013 and Lackner et al., 2014) indicate that both PCV and PPV might be significantly inactivated during prolonged incubation at pH 1.7, room temperature. It has been reported that commercially available trypsin retains its activity after prolonged treatment (18-24h) at a pH of 1.0 at 4°C (Melnick and Wallis, 1977) and can be used for cell culture after such treatment. In addition, a final pathogen inactivation step such as gamma irradiation (minimum dose 30 kGy), e-beam irradiation, or UV irradiation can be applied. Other methods (e.g. virus filtration) or novel methods for virus inactivation/removal can be used alternatively or in addition to the methods described above. Given the limitations on the control of raw materials and limitations on testing for viruses, it is advisable to incorporate two complementary virus reduction steps, unless otherwise justified. In any case, the manufacturing process should be appropriately controlled with respect to critical parameters that affect virus reduction, or the purity and activity of the enzyme preparation.

Appropriate and validated cleaning measures should be implemented in order to minimize the risk of batch-to-batch cross contamination and cross contamination with other materials of animal origin. Each batch of manufactured trypsin product should be uniquely identified and a certificate of analysis should be generated for each batch. Trypsin should be manufactured under a quality system such as GMP, ISO, or an HACCP-compatible system.

## 8. Validation of the virus-inactivation/removal capacity of the manufacturing process

Inactivation/removal of microbiological agents is considered as a major factor contributing to adventitious agent safety of trypsin. Therefore, selected process steps should be carefully validated with respect to their virus inactivation/removal capacity. Reference is made to the CPMP Note for Guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (CPMP/BWP/268/95).

Although the enzymatic activity of trypsin and possibly other porcine pancreatic enzymes may contribute to the inactivation of some viruses, this does not apply to resistant viruses such as the non-enveloped porcine parvovirus and porcine circovirus. Therefore, special consideration should be given to assure adequate clearance for this type of contaminant and the inclusion of more than one virus inactivation or removal step is warranted unless such viruses are controlled by other safety measures (e.g. testing). As an option for an additional, dedicated virus inactivation step, gamma or UV-C irradiation, or virus filtration should be considered.

For the validation of irradiation steps, virus filtration and for low pH steps, an animal parvovirus (e.g. porcine parvovirus) should be included as these viruses are small DNA non enveloped viruses considered to be resistant to physico- and chemical treatments.

Gamma irradiation is generally performed on frozen liquid trypsin. Applying irradiation to lyophilised powder requires careful investigation of virus inactivation. During validation of virus inactivation, it should be considered that it is difficult to achieve a homogeneous distribution of viruses when spiking liquid virus preparations directly into the hydrophobic trypsin powder. Therefore it is recommended to spike the pre-lyophilised intermediate with a liquid virus preparation and to determine the virus titre after lyophilisation; this can then be used as the load titre for the irradiation step.

As regards UV-C irradiation, virus inactivation is mainly attributed to direct interaction with nucleic acids, and most of the photoproducts are generated on pyrimidines. However, study data show that virus inactivation is not simply predictable by the genetic composition or type of nucleic acid genome (RNA/DNA, ss/ds). It should also be considered that repair mechanisms mediated by cell based infectivity assays, which are used for measuring virus inactivation, may reduce the observed lethal effects, especially for viruses possessing double-stranded nucleic acids. Generally, Adenovirus is considered to be rather resistant to UV-C irradiation as well as herpes virus (PRV) and should be considered for evaluation of virus inactivation.

Due to the proteolytic nature of trypsin, controls assessing the stability of a spiked virus in trypsin-containing test material and controls for cytotoxicity and interference of the test matrix in a virus assay are important for this product.

Adverse effects on trypsin quality or performance should be assessed when considering implementing a viral inactivation or viral removal step in an existing trypsin manufacturing process.

## 9. Quality Controls

It is recommended that identity and activity testing for porcine trypsin follow the Ph Eur requirements in the Trypsin monograph (Ph. Eur. 0694 Trypsin) or equivalent test. The pancreatic starting material contains a variety of proteases but no general recommendation for purity of trypsin used as a cell culture reagent can be given as the presence/absence of other enzymes is variable between lots of trypsin and this may be tolerated in its use in cell culture. On the other hand, purity can be important for other applications such as protein processing steps where specific cleavage of proteins is required.