

新兴治疗产品外源因子安全性研究与评价的一般考虑

徐隆昌 崔 靖 韦 薇

(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022)

[摘要] 随着科学研究成果的不断转化应用, 新兴治疗产品的种类越来越多。由于新兴治疗产品在生产工艺方面与传统重组蛋白质或抗体类产品存在较大差异, 因此外源因子风险控制的侧重点也往往有所不同。部分新兴治疗产品在工艺步骤中缺乏除菌过滤和/或病毒灭活/去除工艺步骤, 因而采用在生产工艺中的多个环节联合控制外源因子污染的风险尤为重要。外源因子的风险控制与产品质量和安全性密切相关, 在产品研发和技术审评中应得到足够的重视。本文结合实际审评过程中的经验, 对当前新兴治疗产品研发过程中, 尤其是临床试验申请阶段, 外源因子控制方面存在的缺陷进行总结和分析, 希望能对后续新兴治疗产品的研发和审评提供参考, 加快推进我国新兴治疗产品的临床转化应用。

[关键词] 新兴治疗产品; 外源因子; 审评; 风险控制

[中图分类号] R95 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2022)11-1052-05

General considerations on the risk assessment of adventitious agents of advanced therapeutic products

XU Long-chang, CUI Jing, WEI Wei

(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China)

[Abstract] With the continuous transformation and application of scientific research results, there are increasing types of advanced therapeutic products. As the production process of advanced therapeutic products is quite different from traditional recombinant protein or antibody products, the focus of risk control of adventitious agents are often not the same. Some advanced therapeutic products lack sterilization filtration and/or virus clearance/removal process steps in the process, thus the control of contamination risk for adventitious agents of raw materials is particularly important. The risk control of adventitious agents is closely related to product quality and safety, which should be given sufficient attention in product development and technical assessment. Based on the experience in the actual review process, this article summarizes and analyzes the deficiencies in the control of adventitious agents in the development of the advanced therapeutic product, especially at the IND stage, hoping to provide reference for the subsequent development and assessment of advanced therapeutic products, and accelerate the clinical transformation and application of advanced therapeutic products in our country.

[Key words] advanced therapeutic products; adventitious agents; assessment; risk control

新兴治疗产品(advanced therapy medical products, ATMP)一般是指区别于传统或相对成熟的生物技术产品, 根据新的科学发现或原理而研发的治疗产品。目前, 各国对于新兴治疗产品尚未有统一的定

义或范围界定, 但不同国家申报的新兴治疗产品类型基本相似, 主要包括体细胞治疗产品、基因治疗产品、溶瘤病毒产品、组织工程产品以及各种组合形式的新兴治疗产品等。

近些年, 随着基因编辑技术、免疫学、病毒载体等多个学科领域的快速发展, 全球已有多款新兴治疗产品相继获批上市, 免疫细胞治疗产品如

[作者简介] 徐隆昌, 男, 博士, 助理研究员, 主要从事生物制品药理学审评研究。联系电话: (010) 85243067, E-mail: xulch@cde.org.cn。



“Yescarta(Kite Pharma 公司)”, “Tecartus(Kite Pharma 公司)”, “Provenge(Dendreon Corporation)”, “Kymriah(Novartis Pharmaceuticals Corporation)”等; 基因治疗类产品如“Zolgensma (AveXis , Inc)”, “Luxturna (Spark Therapeutics , Inc.)”等; 干细胞类产品如“Clevecord(Cleveland Cord Blood Center)”等; 溶瘤病毒类产品如“Imlygic(Amgen Inc.)”等。我国自2017年发布《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》以来, 国家药品监督管理局药品审评中心受理的新兴治疗产品相关的沟通交流和临床试验申请数量大幅增加, 并有逐年增多的趋势。据粗略统计, 目前临床试验申请阶段(investigational new drug, IND) 各类新兴治疗产品获批比例约为60%~70%。IND阶段为确保临床受试者安全, 审评重点关注与产品安全性相关的问题。经对既往各类未批准的新型治疗产品存在的问题进行调研, 笔者发现, 除产品工艺不合理、质量研究不全面外, 外源因子控制不全面引入的安全性风险占较重比例。

外源因子一般是指生产活动中引入的细菌、真菌、支原体、分枝杆菌、内/外源病毒等污染微生物。国内外发布了一系列重组蛋白和血液制品的病毒安全性相关指导原则, 各种产品类型相关的指导原则一般也涉及外源因子的控制理念。由于新兴治疗产品的新颖性、多样性和特殊性, 目前尚无成熟、统一的针对新兴治疗产品外源因子控制和评价的指导原则。本文基于当前的认知, 结合审评中的经验和体会, 以免疫细胞治疗产品、干细胞治疗产品、溶瘤病毒产品和基因治疗产品的工艺特点为例, 从药学的角度对新兴治疗产品IND阶段外源因子的安全性风险控制提出一般考虑, 以期能为新兴治疗产品外源因子风险的控制和策略的制定提供一定的参考。

根据外源因子的主要来源和控制的特点, 下文将从原材料和辅料、生产工艺和过程控制、病毒清除验证、产品放行、容器密闭系统等几个方面对外源因子的引入风险和控制考虑进行简要介绍。

1 原材料和辅料的外源因子控制

不同于重组蛋白质或抗体类产品, 新兴治疗产品生产工艺中往往缺少或不适宜增加除病毒和/或除菌过滤相关工艺操作单元, 因此在原材料和辅料阶段需加强对外源因子的控制。产品开发过程中, 应对原材料和辅料的筛选进行充分安全性评估, 选择风险小的原材料和辅料用于生产。

1.1 起始原材料 不同新兴治疗产品的生产起始原材料种类各有差异, 一般包括质粒、工程菌、细胞基质、病毒载体等。工程菌、细胞基质和病毒载体等起始原材料可能存在多种来源, 如实验室来源、间接赠送、国内外菌种/典型培养物保藏机构[如中国典型培养物保藏中心(China center for type culture collection, CCTCC)、美国典型培养物保藏中心(American type culture collection, ATCC)]等不同来源的起始原材料早期培养过程中, 通过培养环境和培养介质直接或间接引入外源因子的风险存在一定差异。一般认为, 非药品生产质量管理规范(GMP)条件、同一空间存在多种微生物或细胞和微生物交叉培养、使用了含有人源或动物来源组分的培养基、以病毒为载体进行基因改造等培养环境或操作引入外源因子的风险相对较高。因此, 为了避免或减少外源因子引入的潜在风险, 通常选择来源明确且培养历史清晰的工程菌、细胞基质或病毒载体用于产品开发。一般不推荐使用个人研究实验室进行分离、改造或使用培养历史不清晰的菌毒种或细胞基质用于商业化生产。

作为新兴治疗产品的起始原材料, 为了保证质量的均一性, 工程菌、细胞基质、病毒载体等起始原材料通常应建库管理。其中, 原材料质粒常基于工程菌库的发酵和纯化生产, 风险控制与核酸类基因治疗产品基本相似。另外, 部分体外基因修饰用病毒载体外源因子的风险控制与病毒载体类体内基因治疗产品相似。工程菌库、细胞库和病毒种子批的检定和管理应符合《中华人民共和国药典》^[1](以下简称《中国药典》) 通则“生物制品生产检定用菌毒种管理及质量控制”、“生物制品生产用检定用动物细胞基质制品及质量控制”以及“人用基因治疗制品总论”的要求。检定中, 除细菌、真菌、支原体、分枝杆菌、噬菌体(工程菌)、内/外源病毒因子、逆转录病毒等常规检测项外, 应重点关注: ① 种属特异性病毒, 如人源性病毒、鼠源性病毒等。② 培养过程中引入的潜在病毒, 如牛血清相关的牛源性病毒、猪胰酶相关的猪源性病毒等。③ 历史溯源提示的潜在外源因子, 如历史培养的微生物、细胞改造用病毒载体相关病毒等。④ 病毒载体历史包装细胞相关的潜在病毒等。

对于CAR-T等自体细胞治疗产品, 由于起始细胞采集自患者自体, 需制定适当的患者筛查标准。部分异体细胞治疗产品, 如干细胞和通用型免疫细

胞治疗产品,可能需要进行多批次的细胞采集和建库操作,因此需要有更全面的供者筛查和细胞检测标准。另外,对于干细胞等特定组织来源的细胞,除对供体进行常规健康检查和供血项目筛查外,还应对组织细胞来源部位常见的病原体进行检查,如脐带来源的间充质干细胞应考虑血液和生殖系统常见的易感病原体[如梅毒螺旋体、疱疹病毒、人乳头瘤病毒(human papilloma virus,HPV)等]的检查。

对于病毒种子,一般情况下,应在建立病毒种子批前采用多种技术手段和方法进行单克隆病毒筛选,如在构建过程中采用多轮噬斑纯化、有限稀释纯化或通过DNA/RNA进行拯救,以确保毒株的纯度。作为细胞治疗产品基因修饰用的原材料,非复制型病毒载体应关注复制型病毒载体出现的风险和控制,复制型载体应关注野生型病毒污染的风险和控制。另外,生产中使用的辅助病毒、滋养层细胞,其外源因子的风险考虑与病毒载体、细胞基质相似。

1.2 其他原材料和辅料 原材料是指生物制品生产过程中使用的所有生物原材料和化学原材料。除起始原材料外,新兴治疗产品生产中所使用的其他原材料包括培养基及添加组分、缓冲液、层析填料、消泡剂、消化酶、抗体等;辅料是指制剂处方中的添加成分,包括缓存盐、稳定剂、冻存液、脂质体等。由于动物源或人源性原材料相比其他原材料具有更高的引入外源因子的风险,所以新兴治疗产品生产过程中应尽量避免使用此类原材料,如有可能,应采用化学成分限定或重组来源的原材料进行替代。如必须使用,应从原材料的来源、质量、用量和安全性评估等多方面进行研究和控制。

原材料和辅料的质量控制应符合《中国药典》通则“生物制品生产用原材料及辅料质量控制的要求”。实际申报过程中,部分品种因缺少原材料、辅料,尤其是生物源性原材料和辅料生产相关的内/外源因子的风险和生产商对相应风险的控制信息,或未针对原材料、辅料制定相应的内控策略,以至于无法充分支持其产品的安全性。建议原材料和辅料筛选过程中,尤其是人源或动物源性原材料、辅料(如血清、猪胰酶、细胞筛选或激活用抗体、血液成分等)应结合供应商风险控制措施、检测报告以及产品中残留的风险进行全面分析,根据分析结果评估使用风险并制定相应的控制策略。原则上,应优先选择外源因子引入风险较低、非生物源性的原材料。

2 生产工艺和过程中控制

生产工艺和过程中外源因子的污染控制是产品质量和安全性风险控制的重要环节。生产环境和操作过程中,外源因子污染的控制应以《药品生产质量管理规范》为基础,如与工艺操作相适应的环境洁净等级、稳定的设备状态、规范的生产操作、严格的物料验收标准、避免在同一空间对不同样品同时进行操作处理等。对于CAR-T等部分自体细胞治疗产品,同一生产区如同时存在健康和具有潜在病原体污染的细胞培养操作,应对两者进行物理空间的隔离,并分别采用独立的空气循环系统,避免外源因子的交叉污染。

新兴治疗产品的工艺步骤设计应以产品特征和目标产品质量为基础。工艺应尽量减少开放式的操作环节或单元,减少生产过程中不必要的补料添加或取样操作,以免补料或取样过程中增加外源因子的污染风险。如有补料或取样的必要,应严格按照无菌操作规范进行。适用情况下,如质粒、病毒载体等,应在生产工艺中增加除菌过滤步骤,为产品的无菌性提供保障。病毒载体的生产中,如使用了辅助病毒、包装用病毒或细胞基质含有内源性病毒污染风险时,根据辅助病毒、包装用病毒或内源性病毒与目标病毒载体在理化性质方面的差异,应考虑在工艺步骤中增加必要的病毒去除/灭活单元。

生产过程中,可通过过程中样品的检测对外源因子的污染情况进行监测。一般在关键的步骤或污染检出概率较大的步骤进行取样检测,如在细胞培养终末阶段取样检测微生物负荷/无菌、内毒素、支原体、外源病毒因子等。对于病毒载体的包装生产,收获液中的目标病毒载体可能会对外源病毒因子的检测造成干扰,因此可能需要制备相应的中和抗体排除目标病毒载体对检测结果的影响。另外,实际生产中,可以在相同的生产条件下培养对照细胞(不接种病毒种子),或在接种病毒种子前取样进行外源病毒因子检测,以排除细胞等起始原材料和培养过程中外源因子污染的风险。

生产过程中,若存在中间产物的暂存操作,一般应对中间产物的暂存稳定性进行研究。研究除关注中间产物的理化特性以外,应同时对无菌(或微生物负荷)、内毒素等安全性指标进行考察,研究中同时关注保存容器的密闭性和保存条件的合理性。

3 病毒清除验证

重组蛋白质产品、抗体或血液制品等产品工艺

相对成熟,国内外发布了一系列与其工艺相关的病毒灭活/验证指导原则,国内如《生物组织提取制品和真核细胞表达制品的病毒安全性评价技术审评一般原则》^[2]和《血液制品病毒去除/灭活病毒技术及验证指导原则》^[3],国际协调指南如 ICH Q5A (Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived From Cell Lines of Human or Animal Origin)^[4]。不同指南之间侧重略有差异,但基本理念并无明显冲突。新兴治疗产品由于工艺不同于常规重组蛋白质类产品,工艺流程中常常缺少灭活或过滤等病毒清除步骤。但部分新兴治疗产品,尤其是病毒载体类基因治疗产品,由于上游载体包装过程中可能采用了包装用病毒、辅助病毒,或病毒包装用细胞含有潜在内源性病毒,此时工艺中应通过增加病毒清除工艺单元,清除发酵收获液中的非目标病毒(包装用病毒、辅助病毒或内源性病毒等)。

新兴治疗产品的病毒去除/灭活验证研究可参考 ICH Q5A 或《生物组织提取制品和真核细胞表达制品的病毒安全性评价技术审评一般原则》中关于病毒清除验证研究的一般原则进行。根据产品特点和验证目的选择相应的指示病毒,如以辅助病毒、包装用病毒、细胞内源性病毒等相关病毒或特异模型病毒为指示病毒。具体验证单元和验证研究计划应根据工艺步骤对病毒清除效果的潜在作用设计,如根据有包膜和无包膜之间的差异可考虑增加低 pH 值或有机溶剂/去污剂(S/D)法灭活步骤;根据电荷、病毒颗粒大小、病毒比重等理化特性差异,分子筛、离子层析等步骤或有一定的分离纯化效果。根据验证研究的结果,结合上游收获液中潜在的外源病毒因子的载量,评估清除步骤的有效性和外源病毒因子残留的安全性风险。有效病毒清除步骤的验证研究结果应能证明培养收获液中相应载量的病毒(辅助病毒、包装用病毒或内源性病毒)通过灭活/去除工艺能达到相应的安全系数。

由于病毒之间理化特性的差异有限,因此病毒去除/灭活的工艺步骤在设计和设置方面往往比较受限。新兴治疗产品往往无法像重组表达制品在生产工艺中采用多步、不同原理的病毒去除/灭活步骤,而单一步骤的病毒去除/灭活能力或许存在一定局限性,因此还需结合上游起始原材料的质量控制策略进行外源因子的风险控制,如选用无内源病毒因子污染的宿主细胞、避免使用无法去除/灭活的辅助病毒/包装病毒、合理控制辅助病毒和包装病毒用

量及包装时间等。例如,2012年在欧盟上市的腺相关病毒基因治疗产品 Glybera,由于其上游采用了杆状病毒-昆虫细胞表达系统,因此在下游工艺中增加了对包膜病毒的灭活工艺,并对工艺的病毒清除能力进行了验证。由于上游病毒包装时,发酵液中产生了大量感染性杆状病毒,而病毒清除工艺又不足以提供足够的清除效果,以至于申请期间欧洲 EMA 多次给出了否定评价。最终,通过要求申请人提供病毒残留 DNA 的风险分析、对感染活性的杆状病毒残留进行控制、加强杆状病毒工序研究等策略完成了上市申请。国内部分杆状病毒包装系统也采用了类似的策略,在对病毒进行清除验证的同时对灭活病毒颗粒或残留病毒颗粒的感染活性进行控制,同时,对病毒残留 DNA 进行感染活性和表达活性研究,进一步排除杆状病毒基因组残留风险。

4 质量控制

产品的质量控制涉及原材料、生产过程、原液和制剂等多个阶段。由于原材料和生产过程已在前述部分进行了介绍,本章节所指的质量控制仅针对原液和/或制剂质量标准中外源因子相关的风险控制。

新兴治疗产品外源因子质量标准项目的设定需结合产品特点和生产工艺具体考虑,一般常规包括无菌和内毒素检测项。生产过程中,如细胞治疗产品存在支原体的污染风险,应将支原体检测纳入质量控制系统;非复制型或条件复制型病毒载体类产品应考虑可复制型病毒载体的检测和控制,可复制型病毒载体应考虑野生型病毒载体的污染和控制,病毒载体应同时考虑易发生伴随污染的病毒载体的检测,如腺病毒与腺相关病毒;上游生产或包装若使用了包装病毒或辅助病毒,应考虑包装病毒或辅助病毒的残留和活性;细胞等产品培养过程中若使用了病毒载体进行基因修饰,应考虑病毒载体的残留,尤其是可复制型病毒载体的残留;大肠杆菌等工程细菌应考虑噬菌体的污染。必要时可考虑增加异常毒性检查。

外源因子检测的样品选择应具有代表性并能大概率检出污染。制剂配制工艺如无相应的污染风险,可不必在制剂中重复检测原液(如有)中相应的外源因子。部分细胞治疗产品,由于产品的有效期较短,制剂的放行检测时效无法满足产品的放行需求,可考虑选取生产过程中的样品检测外源因子,但中间产物的检测结果应能代表产品的外源因子污染风险。

外源因子检测方法的专属性、精密度、灵敏度、检测限、耐用性等方面应满足产品的检测需求。IND 阶段应参考《分析方法确认指导原则》对方法适用性进行确认。无菌、支原体等药典方法检测时限通常较长,对于部分有效期较短的细胞治疗产品,方法可能无法满足其产品的放行检测。如采用自建的无菌或支原体快速放行检测方法替代药典方法用于产品放行检测,可参考《药品微生物检验替代方法验证指导原则》对快速放行方法的可替代性进行验证。在充分验证方法可替代性之前,建议采用快速放行方法进行产品放行的同时,同步留样进行药典方法的检测,对检测结果进行进一步确认。

5 容器密闭系统

包装容器的适用性直接影响产品的质量和保存有效期。包装容器的选择除应满足相容性要求外,应对容器的密闭性能进行考察。密闭性研究可以采用微生物挑战或亚甲基蓝染料渗透等方法进行。结合稳定性研究,应同时关注不同保存期限和特定保存条件下的密闭性能,如高温或低温等特殊恶劣条件下容器密封性能的变化。

6 总结

随着科学技术的进步和研究成果的应用转化,新兴治疗产品的种类、生产工艺和质量控制技术将层出不穷、日新月异,从而对新兴治疗产品外源因子的安全性风险控制策略提出了更高的要求和挑战。相对于重组蛋白或抗体类产品相对成熟和稳定的外源因子控制方案,不同类型新兴治疗产品外源因子的质量控制策略千差万别,产品安全性研究和评价

经验相对有限,国内外对各类产品的技术要求也尚未形成统一标准,但控制策略的制定原则仍应根据各类产品的特点,基于风险分析制定相应的策略。对于一些新的生产体系,如新的生产细胞、新的包装病毒和辅助病毒等,由于对细胞的内/外源病毒污染背景不清晰,对包装病毒和/或辅助病毒对人体细胞的感染性和致病性不明,此时往往需要进行更多的探索研究和更严格的风险控制策略。总而言之,外源因子的控制和评价在新兴治疗产品的生命周期中始终占有重要的比重,在研发早期,尤其是 IND 阶段,由于产品理化特性和生物学活性仍处于不断完善和补充的阶段,外源因子的控制因与产品安全性密切相关,故在 IND 评价中显得更为重要。因此,研究者和监管机构均需对产品的外源因子安全性进行全面评估,并采用有效的控制手段和措施。

[参 考 文 献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 国家药品监督管理局药品审评中心. 《生物组织提取制品和真核细胞表达制品的病毒安全性评价技术审评一般原则》[EB/OL]. (2005 - 12). <http://www.cde.org.cn/zdylz.do?method=largePage&id=71fc578fd703429e>.
- [3] 国家药品监督管理局药品审评中心. 《血液制品病毒去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则》[EB/OL]. (2002 - 05 - 09). <http://www.cde.org.cn/zdylz.do?method=largePage&id=bd75916606234cc1>.
- [4] ICH. Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived From Cell Lines of Human or Animal Origin[EB/OL]. (1997). <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.

编辑: 王宇梅/接受日期: 2022 - 01 - 20

