

用于基因治疗的微生物载体的建议

行业指导原则草案

该指导原则文件仅限于提供意见

在*联邦注册*公告中提供的日期之前提交一份该指导原则草案的电子或书面说明，宣布该指导原则草案的出台。将电子版说明提交至 <http://www.regulations.gov>。将书面说明提交至食品和药品管理局文档管理部（HFA-305），地址为 5630 Fishers Lane, Rm. 1061, Rockville, MD 20852。您应为所有评论注明*联邦注册通告*中发表的出台声明所列举的文档编号。

这份指导原则的复印件可从对外交流、宣传和发展办公室（OCOD）获取，地址为 10903 New Hampshire Ave., Bldg. 71, Rm. 3128, Silver Spring, MD 20993-0002，或通过拨打 1-800-835-4709 或 240-402-8010 或发送邮件至 ocod@fda.hhs.gov，或通过浏览下述网址 <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> 来获取。

与该指导原则的内容相关的问题，请拨打电话或按上述地址发送电子邮件，与 OCOD 联系。

美国卫生与人力资源服务部

美国食品和药品管理局

生物制品评价和研究中心

2015 年 10 月

不具有约束效力的建议
草案——并非用于实施

目录表

I.	前言	4
II.	背景	4
III.	产品生产和表征	5
A.	产品生产——成分	5
1.	MVGT 留种储备	5
2.	MVGT 细胞库系统	7
3.	试剂	10
B.	产品生产——流程	11
1.	MVGT 生产/纯化	11
2.	失活/被杀死的细胞	12
3.	最终收集	12
4.	最终制剂	12
C.	产品检查	13
1.	MVGT 产品的微生物纯度和无菌性试验	14
2.	特性	14
3.	纯度	15
4.	效价	16
5.	其他	16
D.	原料药	17
E.	药物制剂	17
F.	稳定性试验	17
1.	生产中的稳定性试验	18
2.	最终药物制剂的稳定性试验	18
G.	附加试验	18
1.	抗生素敏感性试验	18
2.	容器/密封	18
3.	残留水分检查	19
IV.	临床前研究	19
A.	动物物种和模型	20
B.	安全性评价	20
C.	衰减评价	20
D.	生物分布/脱落	21
E.	抗生素使用	21
V.	临床研究	21
A.	一般性考量因素	21
B.	既往人类经验	22
C.	患者人群	23
D.	起始剂量、剂量递增和给药方案	23
E.	治疗变更	24
F.	监测	24

含不具有约束效力的建议
草案——并非用于实施

VI. 参考文献	25
附录 1	27

不具有约束力的建议
草案——并非用于实施

用于基因治疗的微生物载体的建议

行业指导原则草案

这份指导原则草案在最终确立后，代表了美国食品和药品管理局（FDA 或当局）目前对该课题的看法。该指导原则既不赋予任何人权力，对 FDA 或公众也不具有约束性。您可以采用替代方法，前提是该法符合适用法律和法规的要求。如果您想探讨替代方法，请与标题页中列举的负责拟定本指导原则的 FDA 人员联系。

I. 前言

我方 FDA 为您方新药临床研究申请（IND）申办方提供早期临床试验中基因治疗（MVGT）所用微生物载体的 IND 申报相关建议。MVGT 符合公共卫生服务（PHS）法案（42 U.S.C. 262）第 315（i）章节中的“生物制品”定义，如果此类产品适用于预防、治疗或治愈某种人类疾病或病症。这份指导原则草案着重于您在 MVGT IND 中提交的化学、生产和控制（CMC）信息，并且提供一份这些产品的临床前和临床考量因素之综述。

最终确立后的这份指导原则草案补充了 2008 年 4 月出台的、名为“FDA 评审员和申办方指导原则：人类基因治疗新药研究申请（IND）的内容以及化学、生产和控制（CMC）信息评审”的指导原则（参考文献 1）。

包含这份指导原则在内的 FDA 指导原则文件并不具有法律效力。相反，这份指导原则描述了 FDA 目前对于该课题的看法，应仅被视作建议，除非引用了特定法规或法律规定。FDA 指导原则中使用的措辞应当指的是建议这样做，而非要求这样做。

II. 背景

MVGT 包括细菌载体，例如经过基因改造可表达人类肿瘤抗原、细胞因子、生长因子、酶、治疗性蛋白质或核苷酸的沙门氏菌、李斯特菌或大肠杆菌。例如，细菌载体经过改造可表达人类肿瘤抗原、细胞因子、生长因子、酶、治疗性蛋白质或核苷酸。MVGT 可通过下述方式生成：染色体或游离基因改造（删失、截断或点突变）以及将外源遗传物质插入染色体或插入天然存在的游离基因中；或导入一个或多个质粒。除可能改变 MVGT 治疗谱的基因改造外，MVGT 经过改造还可以改变其生长特征。例如，MVGT 可能是存活的、死的或因特定生物化学要求或经基因改造而复制受限。

不具有约束效力的建议
草案——并非用于实施

在 2006 年 11 月出台的、名为“基因治疗临床试验——观察受试者的迟发不良反应”的 FDA 指导原则文件将基因治疗定义为“通过转录和/或翻译转移的遗传物质或合并入宿主基因组中来发挥作用以及作为核酸、病毒或基因工程微生物给药的产品”。这些产品可用于改造体内细胞或在给予接受者之前转移至离体细胞中（参考文献 2）。

III. 产品生产和表征

在 § 312.23 (a) (7) (i) (21 CFR 312.23 (a) (7) (i)) 中，如果 IND 所覆盖的特定研究适用，您必须在您的 IND 中提交一篇描述原料药和制剂化学、生产和控制的章节。依照 § 312.23 (a) (7) (iv) (b)，您必须在您的申报材料中附上一份您方产品生产所用全部成分的列表。另外，如果 FDA 要求，您应依照 § 312.23 (a) (11) 的规定提交申请审查所需的其他相关信息。

依照这些法规，根据后续章节中的描述，我们建议您在 IND 申报材料中提供一份详细的完整 MVGT 生产工艺描述。您还应描述在 MVGT 产品生产过程中使用的所有成分，例如微生物载体、微生物细胞库系统、微生物细胞中寄宿的质粒/噬菌体、生产中使用的试剂和任何辅料。另外，您应描述生产工艺中采用的所有规程。该信息可允许 FDA 评估您方产品的特性、质量、纯度和效价¹。

A. 产品生产——成分

您应在 IND 中提供下述与您方微生物制品有关的信息：

1. MVGT 留种储备

MVGT 历史和详细衍生方法的描述，包括：

¹ 一般来讲，细胞、组织和基因治疗办公室（OCTGT）负责审查 MVGT 和相关产品（例如溶瘤细菌）的临床研究。按照 2012 年出台的 FDA 指导原则“活体生物治疗用品的早期临床试验：化学、生产和控制信息”中的描述，由 FDA 生物制品评价和研究中心（CBER）的疫苗研究和评审办公室（OVRR）对活体生物治疗用品（LBP）的临床研究进行评审。

不具有约束效力的建议

草案——并非用于实施

a. MVGT 克隆的选择

您应附上一份 MVGT 历史、来源和衍生的描述。MVGT 留种储备应从单一、完全隔离的菌落中衍生。出于传播 MVGT 的目的，您应确保不会将抗生素选择性标志物——例如 β -内酰胺酶引入 MVGT 中。MVGT 的衰减应通过使其多余和强健的方式来实现，例如使 MVGT 基因组中多个位点发生突变以及发生多处点突变。

b. 物理特性和生长特征

IND 申报材料应描述微生物的物理特性，例如在显微镜下的形状、菌落形态以及染色特征，包括其摄取革兰氏染色剂或抗酸性染色的能力（染色应针对对数生长期的细菌培养物）。生长特征包括在最优生长条件下的分裂时间以及用于评价其生长状况（例如评价细菌运动性）的微生物特定特征。

c. 定义 MVGT 的基因构成

您应提供与 MVGT 染色体遗传标志物相关的以及可用于区分基因组限制模式的信息。如果 MVGT 包含一个天然存在的质粒，您应附上一份质粒描述以及检测微生物细胞库系统（MCB）和最终成品中是否存在质粒的方法。您应描述 MVGT 的选择性标志物/选择方法。

d. 生长条件

IND 应包含一份生长培养基和生长条件的描述，例如培养基组成、生长补充剂、抗生素、生长温度要求以及增氧/生物反应器/厌氧要求。

e. 基于游离基因/质粒的外源基因插入

如果 MVGT 包含质粒载体，您应描述将质粒载体导入亲代细胞中以建立 MVGT 的方法（例如使用中间细菌转移菌株和/或采用下述技术，如电穿孔、转化、结合等）。另外，您还应在 IND 申报文件包中提供下述与 MVGT 克隆衍生有关的信息：

含不具有约束效力的建议

草案——并非用于实施

- 可鉴别出基因插入的质粒/噬菌体、调控序列，例如启动子、核糖体结合位点/Shine-Dalgarno 序列、转录终止子、和相关限制性核酸内切酶位点，例如多克隆位点（MCS）的图表；
- 任何密码子优化的相关信息；以及
- 导入质粒/细菌载体中的特征序列/连接序列的详细信息。

f. 插入染色体的外源基因

您应提供将外源基因插入染色体所采用的方法的详细描述。我们建议您应提供含染色体融合基因插入物的最终克隆体的衍生流程图，并且在正文中描述最终克隆体衍生工艺中生成的中间克隆体。

2. MVGT 细胞库系统

如下文所述，IND 应包含微生物细胞库系统信息（即主细胞库、工作细胞库）。

a. 主细胞库（MCB）

您的 IND 应包含与 MCB 表征有关的信息，包括足以确立细胞安全性、特性、纯度和稳定性的测试。信息应阐明下述事宜：

- **菌株的纯度：**我们建议从单一孤立菌落中衍生微生物 MCB（在至少经过 2 轮菌落筛选后顺序隔离出）。细菌产品的所有进一步扩增均应从这种 MCB 中衍生，而不再需要进一步的单个菌落选择。

不具有约束效力的建议

草案——并非用于实施

- **微生物纯度²**：对于作为存活细菌制品的 MVGT，如果 § 610.12 (21 CFR 610.12) 中概括的无菌性测试的常规应用并不可行，例如因为存活载体菌株表现出生长，则通过单一培养来检测微生物纯度是适用的（见第 III.C.1 节微生物纯度检查）。该检查方法应能检测出缓慢生长的微生物污染物。
- **细菌细胞的特性（以及质粒/噬菌体，如果适用）**：您的开发方案应包括可通过物理或化学特征（即表现型、基因型、脱氧核糖核酸（DNA）序列或其他标志物）、选择性标志物和抗生素耐药性来区分规定细胞的检查。
- **经基因改造的质粒 50kb 或更小质粒的测序**：您应提供完整序列，以及被导入微生物中以衍生 MVGT MCB 的所有经基因改造质粒的测序方法描述。
- **注释序列信息**：您应总结带有适当注释的质粒序列信息，鉴别出所有开放阅读框（ORF），无论是预期的或是非预期的，以及编码的基因及其调控元件。您应当指明 MVGT 衍生的质粒/噬菌体序列以及通过检索相关数据库识别出的序列是否存在序列一致性。
- **插入染色体中的外源基因的测序**：我们建议您开展和提供插入基因以及至少 0.5kb 侧翼区的序列分析，并且提供基因插入及其调控元件以及经改造的基因组其他区域的图表。
- **活性**：您应检测产品特异性特征，例如引入的基因的表达、基因表达的持续时间、表达的基因产物的定位（例如分泌的/与膜结合的或细胞内的基因产物所占百分率）和生长速率/分裂时间（体内和体外）。
- **抗生素敏感性**：抗生素敏感性试验应包括一组抗生素，包括该类别抗菌剂的至少 2 种一线抗生素和 2 种二线抗生素。

² 对于这份指导原则草案，术语“微生物纯度”被定义为除 MVGT 外不存在其他微生物。通过单一培养含量测定（这种含量测定法旨在证明供试样本中仅存在一种微生物），对微生物纯度进行评价。

不具有约束效力的建议

草案——并非用于实施

- **衰减突变的表征：**您应描述衰减规模和稳定性。应对衰减位点以及自衰减位点起每侧至少 0.5kb 的序列进行测序。
- **细菌生长：**您应描述细菌生长条件，包括在生产中使用的所有培养基以及试剂/成分的文件记录连同相关分析证书（COA）的副本。您还应附上用于驱动基因表达的诱导条件的计时和持续时间，例如温度、pH 或其他生长条件的变化或加入诱导剂。
- **冷冻保藏、储存和回收：**IND 应包括 MCB 冷冻保藏、储存和回收详细信息，包括与细胞密度、冷冻试管数、储存温度和细胞库所在地有关的信息。
- **基因型和表现型的稳定性：**多次传代后 MCB 基因型和表现型的稳定性以及冷冻保藏后细胞存活率的描述应纳入 IND 中。
- **噬菌体检测：**在有利于产生噬菌体裂解周期的条件下，通过基于培养物的检测法，对 MCB 进行鉴定以检测细菌产品是否存在噬菌体。这项检测应包括用于评价检测灵敏度的阳性和阴性对照。如果条件满足，噬菌体检测所用的阳性对照应包括 MVGT 特异性的、经过充分表征的噬菌体。

b. 工作细胞库（WCB）

记录 WCB 表征所需的信息量通常不及记录 MCB 表征所需的信息量广泛。如果已有双层细胞库系统，我们建议您对 WCB 进行下述试验：

- 纯度
- 有限的鉴定试验（例如靶向特异性聚合酶链式反应（PCR），用于检测是否存在删失或插入）
- 质粒检测（如果 MVGT 产品含天然或导入的质粒）
- 抗生素敏感性谱

含不具有约束效力的建议
草案——并非用于实施

- 存活率
- 细胞数
- 稳定性

3. 试剂

您必须在 IND 中列举生产产品使用的试剂（§ 312.23 (a) (7) (iv) (b)）。就该指导原则而言，试剂是细菌生长、选择、纯化或其他关键生产步骤所必需的、但是并非作为最终产品的一部分而存在的这些成分。试剂可能影响最终产品的安全性、效价和纯度，尤其是在引入外源因子时。试剂的实例包括培养基和培养基成分、抗生素以及基因表达诱导剂。除试剂列表外，应在 IND 中提交下述信息：

a. 生产中使用的试剂列表

对于 MVGT 生产中使用的每种试剂，应提交下述信息：

- 试剂的浓度
- 采用的生产步骤
- 供应商信息，包括产品识别编号和批号。
- 试剂来源信息（即试剂是否是合成的、重组的、植物、动物或人类来源）（参考文献 1）。
- *试剂质量*：无论何时，只要可行，我们建议使用经 FDA 批准的产品或临床级试剂。

b. 生产中使用的试剂的鉴定

应审查由试剂供应商提供的每批次的分析证书。需要附加试验来协助确保您方 MVGT 生产过程中使用的试剂的安全性和质量。我们建议您制定一个评定计划，该计划包括安全性检查（纯度、内毒素、支原体和外源物质）、功能分析以及用于证明不存在潜在有害物质的检测（例如残余溶剂检测）。我们相信检查范围应取决于如何在生产工艺中使用特定试剂。

含不具有约束效力的建议

草案——并非用于实施

c. 确定试剂从药品中清除

您应检测药品中存在的已知或可能具有毒性的残留生产试剂。IND 应描述用于检测最终产品中这些试剂残留水平的测定程序。我们建议您首先确定“一项鉴定研究是否足以证明溶剂被清除或在临床试验启动前的批次放行检查是否适用”。

d. 其他担忧

我们建议您切勿使用抗生素进行细菌选择。特别是，诸如盘尼西林之类的 β -内酰胺类抗生素不应使用在人用治疗药品生产过程中。如果使用抗生素，我们建议您定量测定最终产品中的残留抗生素量，并且描述预防超敏反应的防范措施。

B. 产品生产——流程

您应在 IND 中附上一份 MVGT 产品衍生、生产和纯化中采用的所有流程的详细描述。我们相信将生产和纯化工艺简图以及流程中和最终产品测试纳入其中能够有助于更明确地提供此类信息。

1. MVGT 生产/纯化

您应描述在 MVGT 生产过程中采用的流程，包括：

- 在 MVGT 传播中采用的培养流程、培养基成分（包括动物来源成分和使用的抗生素）。
- 细胞生长条件、细胞密度、细胞生长检测方法、pH 调节、生物反应器质量标准等。包括一份培养系统描述（摇瓶、生物反应器等）以及阐明系统是密闭的或是开放的。描述在培养过程中使用的任何去沫剂、细胞采集条件（例如膜过滤、离心等）。
- 采集条件，包括体积、计时（培养持续时间）以及采集时培养物的光密度。
- 所有纯化步骤按操作顺序列举，例如离心、柱纯化和密度梯度。

不具有约束效力的建议

草案——并非用于实施

- 工艺计时和中间储藏：我们建议您报告从细胞生长结束至过滤/漂洗步骤和最终采集期间每个步骤大致消耗的时间。重要的是了解生产过程中每步的时间限度以确定开展哪些生产过程中试验。

2. 失活/被杀死的细胞

如果最终产品是失活/被杀死的 MVGT，您应描述细胞失活/被杀死的方法和条件。IND 还应包括一些数据以便证明细菌已经无法复制，但是在失活后仍能保持理想特征。您应通过包括 MVGT 产品生产过程中的培养基和生长条件的无菌性测试以及 § 610.12 章节中描述的无菌性检查，对细胞杀死状况进行评价。

3. 最终收集

您应提供一份详细的最终收集描述。您应描述在最终处方前是否将最终 MVGT 收集物进行浓缩，请描述漂洗条件以及使用的缓冲液/培养基。如果 MVGT 在储存前冻干，请描述冻干条件以及冻干所使用的稳定剂。如果 MVGT 原料药 (DS) 或药物制剂 (DP) 冷冻保藏，您应附上此信息以及所启动的任何稳定性研究（见本指导原则的 III.B.4 节）。您还应描述细胞生长至最终收集以及最终收集至冻干期间的保存时间和保存条件。如果生产工艺包括最终收集至最终制成制剂期间的中间储存步骤，应描述储存条件和储存时间长度。

4. 最终制剂

您必须描述依照 § 312.23 (a) (7) (iv) (a) 处方的最终产品制剂。另外，IND 应描述诸如生长因子、缓冲液和盐稳定剂之类的辅料是否包含在最终制剂中，并且声明其来源（见本指导原则 III.A.3 节）。您还应确认这些辅料的供应商和最终浓度。

应描述成品制剂中使用的 MVGT 细胞密度或浓度（存活细胞相对于死亡细胞）。如果将最终成品转移至临床中心冷冻，您应描述如何运输这些产品，还应附上数据来证明解冻产品可得出一致结果。如果对药物制剂进行复溶，您应描述复溶培养基或缓冲液体积和组成，并且提供数据来证明复溶时的细菌存活率。存活率数据应取自一式三份独立进行试验的至少 2 个不同产品批次。

C. 产品检查

MVGT 产品检查包括有助于确保安全性的微生物试验，以及产品特征评价，例如特性、纯度（包括内毒素）、存活率和效价。

您在生产工艺中（包括 MCB/WCB 的生产）应开展试验以评价生产工艺本身，并且确保产品的质量 and 一致性。您应描述中间验收标准和最终制剂放行标准所依据的质量标准。质量标准是可证明产品以及该产品生产过程中使用的其他材料之质量的品质标准（即试验、分析流程和验收标准）。验收标准指的是所描述的试验的数值限度、范围或其他标准。质量标准应与产品研发阶段相适应，因为随着产品研发不断迈向获得许可证，其放行标准总体上会不断提炼和收紧（参考文献 1）。本指导原则附录 1 中的表-1 提供了建议开展的 MVGT 产品试验的举例。

依照 § 312.33 (b) (7)，您必须向您的 IND 中追加年度报告，该报告包含在过去 1 年内发生的重大生产或微生物变更总结中。您的年度报告应包含生产更新，这包括与 MCB/WCB 稳定性试验有关的结果以及在报告期内生产的批次的表征试验和批次放行试验结果。这些结果可通过表形式提交，应包含批号或识别代码、生产日期、所采用的试验、试验方法、试验方法的灵敏度和特异性（如果适用）、放行标准和试验结果。为达到指定目的，所有试验方法均应充分灵敏、具有特异性和重现性。

依照 § 312.23 (a) (7) (i)，您必须提供描述原料药和制剂组成、生产和控制的章节。尽管在每个研究阶段，一直要求您提交充分的信息以确保研究药物的鉴别、质量、纯度和规格均准确，但是质量保证所需的信息量会随研究阶段、研究的拟定持续时间、剂型和他处获得的信息量而变化。因此，您必须在您的 MVGT 产品 IND 中提供信息以确保：（1）不存在其他污染性微生物（微生物纯度和无菌性）；（2）特性；（3）纯度（不存在外源性工艺相关物料）；（4）效价。根据这些规定，我们建议开展下述试验：

1. MVGT 产品的微生物纯度和无菌性试验

- 应检测活体 MVGT 产品是否还有其他疾病或病症的病原体。应描述和论证细菌生长培养基、生长条件以及用于评价纯度的 DP 量。³应对微生物纯度和供试成分（促生长培养基、条件）试验进行验证以证明该试验能够可靠地和一致地检测出存活的污染性微生物。对于检测法应能够检测出的常见细菌的范例，请参考疾病预防控制中心（CDC）侵袭性细菌病原体列表（参考文献 3）以及美国药典（USP）第 62 章节中描述的特定病原体。⁴我们还建议对从生产设施中分离出的环境病原体进行评价。对于早期临床试验，当不具备专用的活体微生物生产设施时，微生物纯度检查应包括在相同生产设施中生产的其他微生物制品的检查。
- 对于被杀死的 MVGT 产品或离开宿主无法生长的 MVGT 产品，例如噬菌体或空的细菌被膜（小细胞），您应开展 DP 无菌性检查。无菌性检查应包括好氧菌和厌氧菌污染物以及真菌污染物检测。对于这些产品，还应对 MCB、DS 和生产过程中样本进行检查以证明微生物纯度。

2. 特性

您应通过每种产品专属的检测法，通过可充分识别 MVGT（§ 312.23（a）（7）（i））以及将其与相同生产设施中处理的其他产品区分开的方式，检查与 MCB 和 DP 有关的特性。对于最终产品，特性检查对于确保药瓶中成分正确贴标至关重要。

³ 附加信息见美国药典第 61 章节<USP61>：无菌产品的微生物检查。

⁴ 美国药典第 62 章节描述的特定病原和检测方法不一定适用于所有 MVGT 产品。我们建议您在 IND 前会议中与 FDA 商讨试验方法和供试微生物的适用性。

不具有约束效力的建议

草案——并非用于实施

对于细菌菌株鉴别，我们建议至少采用 2 种互为补充的鉴别方法⁵，例如下述试验：

- 革兰氏染色
- 菌落形态/细胞培养营养素依赖性菌落鉴别
- 基于 DNA 的 PCR 检测/染色体 DNA 的限制性片段连接多态性 (RFLP) /基于 16s 核糖核酸 (RNA) 的分析/通过测序开展的管家基因分析
- 采用基于 DNA 的检测法和表型检测法，测定宿主基因型和表现型特征以检测是否存在基因标志物或缺失。
- 采用 PCR 或相似的灵敏方法来鉴别天然和导入的质粒的数量、大小和序列。

3. 纯度

产品纯度被定义为不含外源性物质，除非是经批准的生物制品许可申请 § 600.3 (r) (21 CFR 600.3 (r)) 中描述的生产工艺所无法避免的。产品纯度必须在 IND 中描述 (§ 312.23 (a) (7) (i))。MVGT 产品的纯度检查应包括致热原性/内毒素检测以及为证明产品不含非预期的细菌和真菌微生物而开展的单一培养物检查。纯度检查应作为留种储备、MCB 和 WCB 鉴定试验的一部分以及作为最终 DP 放行试验纳入其中。

MVGT 产品特异性建议纯度检查包括下述：

- 残留的宿主细胞蛋白质/DNA 含量 (对于噬菌体/小细胞)。
- 菌株纯度：存在单一细菌菌株菌落，这些菌落的生化特征可鉴别，彼此间相似。如果最终产品是多种 MVGT 的混合物，应检查每种 MVGT 成分的纯度。应对至少 10 个随机菌落 (数量基于每板 100 个孤立菌落的估算值) 进行评价以确认最终产品的纯度。
- 所有非肠道给药的 MVGT 产品均要求内毒素含量测定标准 <5 EU/kg/剂量。

⁵ 是否需要附加特性检查取决于 MVGT 产品本身。我们建议您在 IND 前会议中与 FDA 探讨您方的特定产品以及您申请开展的特性检查类型。

4. 效价

您应描述和论证您用来测定效价的含量测定法。我们建议您采用定量测定法来测定效价。可以考虑将由多种含量测定法构成的矩阵用作替代方法，包括效价的定量和定性指标（参考文献 4）。效价测定应作为 MCB、鉴定和 DP 放行试验的一部分纳入其中。对于 I 期/II 期研究，可定量测定转基因表达的含量测定法连同定量测定存活和死亡微生物所采用的含量测定法均可作为一种替代效价测定。对于 III 期研究，您应将可测定 MVGT 的相应生物学活性的体内或体外测定法纳入其中。注意：效价测定必须在获得许可前进行验证（21 CFR 211.165 (e)）。

5. 其他

a. 存活率

对于活体细菌产品，我们建议您确立存活率的最低放行标准。我们建议将 DP 标准设定为存活细胞>60%⁶（参考文献 5）。应在 MCB、WCB、DS 和 DP 阶段检查存活率。

b. 细胞数/剂量

如果最终 MVGT 产品是非肠道给药的，考虑到死亡细菌对抗原特异性和载体特异性免疫应答也有贡献，我们建议您基于最终产品中的存活和死亡细菌数确立剂量水平。

c. 聚集物检查

微生物聚集物的存在和大小是非肠道给药的 MVGT 产品的一个潜在安全性问题。作为稳定性方案的一部分，应在生产时以及定期检查最终产品中是否存在聚集物。应为 DP 中存在的颗粒物质的大小拟定批次放行标准和验收限度。

⁶ 如果您的特定 MVGT 产品无法满足该标准，鼓励您在 IND 前讨论会议中与 FDA 商讨该问题。

D. 原料药

原料药是旨在提供药理学活性的一种活性成分。对于经进一步处理（例如热杀死、冻干、装入胶囊、制成片剂等）以获得最终 DP 的 MVGT，应评价其纯度、质粒是否存在（如果适用）、存活率、细胞数等，将该信息连同试验标准、验收限度和试验方法描述一同纳入 IND 中。考虑纳入 IND 中的一些其他试验参数在本指导原则的 III.F.2 节中描述。该信息可通过对 DS 进行试验来获取，或如果最终产品生产时除分装外不需要额外的操作，则通过对 DP 进行试验获取该信息（DS 和 DP 的建议试验参数列表，参见本指导原则附录 1 的表 1）。

E. 药物制剂

药物制剂是患者给药所使用的最终处方产品。如果是 MVGT 产品，最终处方产品还包括瓶装微生物载体。应针对生产的每批产品开展药物制剂放行标准检验。我们建议您采用表形式提供您拟定的所有标准（本指导原则 III.C 节中描述的安全性、纯度、效价和特性检查）。

F. 稳定性试验

如 § 312.23 (a) (7) (ii) 中所提供的，您必须在 IND 的所有阶段开展稳定性试验以证明在拟定临床研究的计划持续时间内，产品在可接受的化学和物理限度内。在临床试验的早期阶段开展稳定性试验以确立产品在研究所规定的时间段内是充分稳定的。支持最终制剂和标注时间段的数据是取得许可证所必需的。

您应提供工艺中原材料和最终 MVGT 产品的稳定性方案和数据。拟定的稳定性方案应包括产品特性、纯度、质量和效价的测定。对于开展的每项试验，您应描述试验方法、抽样时间点（应有零时间点）、试验温度和其他适当信息，包括您用来证明产品稳定性的检测法的论证，以及在临床方案要求的保存时间内测定这些参数。进一步的信息，请参考国际协调会议（ICH）Q5C 行业指南：生物技术制品的质量：生物技术/生物制品的稳定性试验（参考文献 6）。

1. 生产中的稳定性试验

如果 MVGT 是冷冻保藏或冻干的，您的稳定性方案的设计目的应是确保产品在冷冻保存/冻干期内是稳定的，并且根据情况测定上文中描述的参数。为评价 MVGT 生物学功能，我们建议在生理条件下，在丰富培养基中开展储存后复活的迟缓期持续时间评价。

活体和死亡细菌试验应成为您稳定性方案的一部分。我们预测每种细菌菌株的相应验收标准会有所不同，我们建议您基于您方 MVGT 产品生产和试验经验来制定标准。

2. 最终药物制剂的稳定性试验

您应附上任何可证明在产品处方至患者输液期间产品仍保持稳定的数据，以便协助确立失效期。我们建议您在适当的温度下以及在与预期保存时间相符的时间点开展试验。如果产品从生产地点运输到临床地点，请描述时间和运输条件（即包装、温度）。您的稳定性方案应足以证明在拟定的储存和运输条件下可维持产品完整性、纯度、可回收的样本体积、产品聚集特征和效价。我们建议您采用 III 期研究中对系统施加应力的条件，启动和完成验证研究。

G. 附加试验

1. 抗生素敏感性试验

应对留种储备、MCB 和 DP 进行抗生素敏感性试验，当获得结果后，将结果纳入 IND 中。抗生素敏感性试验应包括在正常情况下用于治疗衍生 MVGT 所用菌剂之感染的至少 2 种一线治疗和 2 种二线治疗抗生素。

2. 容器/密封

您应描述所使用的容器和密封系统的类型，并且确保容器和密封系统与产品是相容的（参考文献 7）。

3. 残留水分检查

如果使用冻干/干燥的细菌产品,请参考 FDA 先前发表的与残留水分检查有关的建议(参考文献 8)。

4. 环境评价

在 IND 所针对的 MVGT 产品的临床研发中,您必须依照 21 CFR 25.31 提交一份分类排除声明或一项依照 21 CFR 25.40 开展的环境评价(§ 312.23 (a) (7) (iv) (e))。更多信息,请参见 2015 年 3 月发布的 FDA 行业指南,名为“判定基因治疗、载体疫苗和相关重组病毒或微生物制品的环境评价需求及其内容”(参考文献 9)。

5. 生产工艺的鉴定

MVGT 产品的生产工艺需要使用复杂程度、变异性以及引入外源物质的风险程度不同的试剂和原材料。您应采用适当的方法、设施和生产控制来确保为 I 期临床研究生产的 MVGT 符合相应的安全性、特性、质量和纯度标准。为 II 期和 III 期临床研究生产的以及持 BLA 为上市而生产的 MVGT 产品必须遵守 21 CFR 第 210 和 211 部分的规定。FDA 先前已经发布与 I 期临床试验 cGMP 建议有关的附加指导原则(参考文献 10)。

IV. 临床前研究

指导原则的该章节描述了在临床前研究中评价 MVGT 产品的活性、安全性和生物分布应考量的因素。开展临床前研究以支持将特定 MVGT 产品应用于目标患者人群的科学依据。基于 MVGT 药理学和毒理学研究的充分信息,申办方得出结论“可以安全地开展拟定的临床试验,但是必须在 IND 中提交这些信息(§ 312.23 (a) (8))”。FDA 先前发表的指导原则提供了与适当动物物种和动物疾病模型选择、试验药物(包括 MVGT 产品)临床前概念验证和毒理学研究总体设计相关的综合性建议(参考文献 11)。MVGT 临床前研究设计的附加考量因素在下文中高亮度显示。

A. 动物物种和模型

生物相关动物物种和模型选择的考量因素包括物种对 MVGT 载体的包容性/敏感性；对 MVGT 和表达的转基因的药理学应答；动物物种/模型与目标临床人群的生理学/病理生理学可比性。如果可行，我们建议采用动物疾病模型来表征 MVGT 产品的剂量效应/生物学活性关系。当设计研究以评价 MVGT 产品的毒理学和生物分布特征时，应考虑这些动物模型，因为疾病状态可能影响这些研究生成的安全性数据，同时这些模型可提供更为相关的 MVGT 产品风险受益评价估算。该课题更为详细的讨论，请参见 2013 年 11 月出台的名为“研究性细胞和基因治疗产品的临床前评价”的 FDA 指导原则文件第 III.A 和 V.B 章节（临床前评价指导原则）（参考文献 11）。

B. 安全性评价

临床前安全性研究的总体目标是鉴别、表征和定量测定 MVGT 产品的潜在局部、全身、急性或慢性毒性。这些研究生成的数据有助于指导选择起始剂量水平、剂量递增方案、给药方案、监测参数和临床试验的其他要素。适用于 MVGT 产品的临床前研究设计总体考量因素在临床前评价指导原则第 III 和 V 章节中提供（参考文献 10）。该产品类别特异性的待评价参数包括：对促炎细胞因子和趋化因子的潜在诱导作用；以及由 MVGT 或表达的转基因介导的内在和适应性免疫应答。应探索免疫应答与 MVGT 产品给药所致的脱靶毒性间的潜在相关性，因为该信息会影响临床试验设计。

C. 衰减评价

接受 MVGT 的绝大多数临床人群在某种程度上免疫系统受损或免疫抑制。因此，应评价产品衰减程度以及衰减的表现型的稳定性。例如，如果 MVGT 产品复制依赖于特殊营养素需求或某种特定微生物环境，应在 IND 申请中提交可证明这种依赖性的严格性以及产品在缺少这些因素情况下无法复制的体外和/或体内数据。如果适用，应评价废除宿主细胞/组织上 MVGT 产品中的致病因子或导入新的致病因子的影响。对于可以形成孢子的 MVGT 产品，应对孢子形成或复制的条件进行充分表征，包括靶向位点。

D. 生物分布/脱落

在许多临床试验中，MVGT 产品给药并非经天然感染或传播途径。因此，在动物经预期临床给药途径给药后，MVGT 和表达的转基因（如果适用）的生物分布/脱落谱是一个重要的安全性终点。我们建议您在 MVGT 产品给药后的多个时间点，从靶向和非靶向组织/生物液中采集生物分布/脱落数据。采用经过充分表征的方法，选取适当的阳性和阴性对照品，对组织/样本进行分析，应测定 MVGT 产品中的存活和死亡微生物数。FDA 先前提供了与研究设计的一般性原则有关的建议（参考文献 2）。与脱落研究的设计和分析有关的更多信息，您还可以参考于 2015 年 8 月出台的 FDA 指导原则，名为“基于病毒或细菌的基因治疗和溶瘤产品脱落研究的设计和分析”（脱落研究指导原则）（参考文献 12）。

E. 抗生素使用

应评价 MVGT 产品在多种抗生素存在和不存在条件下的体内生物学活性、安全性和生物分布/持久性特征（与入选的抗生素类别有关的建议，参考该指导原则的第 III.G1 节）。从这些研究中获得的数据有助于选择有效的抗生素以及准确地计时临床试验中的抗生素给药。

V. 临床研究

本指导原则的该章节着重于 MVGT 产品研究所独有的临床研发和早期临床试验设计问题。一般性试验问题在 ICH 指导原则：“E8 临床试验的一般考量因素”（参考文献 13）中讨论。与 MVGT 产品早期临床试验尤其相关的临床考量因素在下文中描述。

A. 一般性考量因素

在临床试验中给予 MVGT 产品可能构成巨大的安全隐患。这种隐患源自产品的感染性、必需的伴随药物带来的风险和研究步骤的风险。该章节的目的是探讨风险缓解的一般性要素，以便协助设计和开展 MVGT 产品早期试验。

特定 MVGT 产品（例如活体细菌产品）和特定研究人群（例如免疫受损患者）存在具有临床意义的败血症和/或疾病风险。预防性、伴随或治疗后抗生素专门用于降低这种感染风险。抗生素敏感性检测（见第 III.G.1 章节）和抗生素临床前研究（见本指导原则的第 III.E 节）可支持临床试验的一线 and 二线抗生素选择。相关临床或临床前数据也支持这些抗生素的给药方案和给药

持续时间。

MVGT 产品的体内存活期取决于免疫抑制药伴随给药。然而，此类免疫抑制药物可能极大地增加研究受试者的严重感染风险。因此，必须对免疫抑制药物给药进行论证，并且连同适当的预防措施（例如仔细选择剂量以及监测感染不良事件）一同纳入研究中。

研究 MVGT 产品与其他药品（例如抗生素或免疫抑制药，如上文所述）联合给药、通过有创操作给药（例如手术）或全身给药。在这种情况下，用于论证起始剂量、给药方案和剂量递增合理的依据和数据应考虑到产品和研究步骤的预期风险。研究方案应包括一份对这些预期风险进行监测的计划。

在早期临床试验中，一份预先规定的风险管理计划可降低因干预措施差异而导致的变异性以及风险结局的严重程度。因此，一份预先规定的风险管理计划可提高安全性数据的可判读性。MVGT 产品临床试验的风险评价和管理将随新数据的涌现而演变。

B. 既往人类经验

特定研究性 MVGT 产品或相关产品先前已经在人类中给药。如果是这样，可获得相关临床安全性和活性数据以便预测拟定研究的设计。为评价现有数据与特定研究性 MVGT 产品间的相关性，有必要对先前给药的 MVGT 产品进行充分表征（请参见本指导原则的 III 节）。因此，对这些先前给药的 MVGT 产品进行表征可确定现有数据在多大程度上能够预示拟定 MVGT 产品试验的设计。

如果有既往人类数据，则视这些数据的相关性而定，可能并不需要开展附加临床前研究来支持起始剂量和/或剂量递增方案。FDA 建议您在开展附加临床研究之前与 CBER 联系以探讨这些给药问题。您应提供从既往人类经验中获得的综合性活性和安全性数据以支持 MVGT 产品拟定给药方式的安全性。

C. 患者人群

MVGT 产品的临床研发可能涉及在一系列宽泛的医学条件下开展初步试验。这些范围涵盖易于治疗的相对良性病症以及治疗选择极其有限的致命性或致残性晚期疾病，还包括目前尚无治疗方法的罕见遗传疾病。一般来讲，早期试验的合格标准应定义一个与探索的治疗适应症有关的适当疾病情形。您应考虑选择一个 MVGT 产品内在和致敏性风险相对降低的人群。例如：

- 基于厌氧型细菌孢子的产品产生的孢子能够在坏死组织中繁殖。为降低孢子增殖风险，考虑排除存在坏死组织或易于出现坏死组织的患者（例如脑脓肿、憩室炎或最近接受辐照的患者）。
- 具有器官特异性取向的 MVGT 产品对这些器官可能构成固有风险。考虑对受试者进行选择以便将这些潜在固有风险最小化。例如，在有肝感染取向的 MVGT 产品的试验中，排除患有潜在肝病的患者可降低肝毒性风险。

D. 起始剂量、剂量递增和给药方案

早期临床试验中的剂量选择和给药方案可能对 MVGT 产品相关风险产生实质性影响。这些潜在风险已经在 CMC 和本指导原则的临床前章节中探讨。为将对人体受试者构成的风险最小化，临床前概念验证和安全性研究的结果有助于指导选择最初临床剂量水平、剂量递增方案和给药方案。鼓励申办方在产品研发早期积极与 FDA 接洽以讨论支持 MVGT 产品早期临床试验所需的临床前数据。

如果为剂量递增计划提供的理论依据和论证是充分的，则起始剂量、剂量递增方案和给药方案也得到既往临床数据的支持。正确地定义剂量限制毒性（DLT）和最高耐受剂量（MTD）也可将与剂量递增相关的风险降至最低。考虑将特定 MVGT 相关风险纳入这些定义中。例如：

- 临床症候性败血症可能是研究的剂量限制毒性的一项标准。
- 在 MVGT 产品给药后出现不需要住院治疗的发热和血液培养物呈阳性可能被定义为应向 FDA 快速报告的严重和非预期的不良反应，应被纳入剂量限制毒性和/或终止原则中（参考文献 14）。

含不具有约束效力的建议

草案——并非用于实施

- 全身给药的 MVGT 产品也存在预期风险，例如给药后立即出现的发热或血液培养物呈阳性。这些预期事件的持续时间延长或迟发可作为剂量限制毒性和/或终止标准。

E. 治疗变更

个体受试者的研究终止原则和治疗终止标准提高了早期临床试验的安全性。MVGT 相关风险降低程序的范例包括基于预期感染风险（例如在厌氧型 MVGT 产品研究中形成脓肿；败血症）的超标率或严重程度的研究终止原则。

F. 监测

安全性监测计划应考虑到基于既往临床前和临床经验确认的与特定 MVGT 产品和转基因产品有关的潜在风险。特定监测计划的范例包括下述：

- 具有繁育、再繁育或再播种能力的 MVGT 产品的长期安全性监测。
- 在非特定症状发作时开展血液培养和影像学研究的监测计划，目的是降低因厌氧微生物产物所致而形成脓肿的潜在风险。
- 考虑对预期或已知会导致迟发型不良事件或累积毒性的 MVGT 产品进行长期安全性监测。从相关 MVGT 产品的既往人类经验中获得的安全性数据，特别是不良事件性质和发作时间有助于确定长期监测的适当时长。既往临床经验与相关 MVGT 产品间的相关性评价应考虑到剂量水平、给药途径、暴露持续时间及暴露和评价的受试者数。

对于早期临床试验，建议对 MVGT 产品的脱落进行监测。应继续开展脱落监测直至充分的连续测定表明不再存在 MVGT 产品。样本选择（例如身体分泌物和/或排泄物）可能依赖于特定 MVGT 产品和拟定的给药途径。更多信息，请参见 FDA 的脱落研究指导原则（参考文献 12）。

VI. 参考文献

1. Guidance for FDA Reviewers and Sponsors: Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs), 2008.
<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm072587.htm>.
2. Guidance for Industry: Gene Therapy Clinical Trials - Observing Subjects for Delayed Adverse Events, 2006.
<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm072957.htm>
3. Centers for Disease Control and Prevention list of invasive bacterial pathogens.
<http://www.cdc.gov/abcs/overview/background.html>.
4. Guidance for Industry: Potency Tests for Cellular and Gene Therapy Products, 2011.
<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/UCM243392.pdf> .
5. G. Nebe-von-Caron., et al., "Analysis of Bacterial Function by Multi-Color Fluorescence Flow Cytometry and Single Cell Sorting." J. Microb. Methods. 2000. 42:97-114.
6. International Conference on Harmonisation Q5C: Guideline for Industry: Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products, 1996.
<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm065005.htm>.
7. Guidance for Industry: Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics, 1999.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070551.pdf>.
8. Guideline for the Determination of Residual Moisture in Dried Biological Products, 1990.
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/05d0047/05d-0047-bkg0001-Tab-11.pdf>.
9. Determining the Need for and Content of Environmental Assessments for Gene Therapies, Vected Vaccines, and Related Recombinant Viral or Microbial Products, Guidance for Industry, 2015.
<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm401869.htm>.

含不具有约束效力的建议
草案——并非用于实施

10. Guidance for Industry: CGMP for Phase 1 Investigational Drugs, 2008.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070273.pdf>
11. Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products, 2013.
<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm376136.htm#III>.
12. Guidance for Industry: Design and Analysis of Shedding Studies for Virus or Bacteria-Based Gene Therapy and Oncolytic Products, 2015.
<http://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceinformation/guidances/cellularandgenetherapy/ucm404050.htm>.
13. International Conference on Harmonisation Guidance: E8 General Considerations for Clinical Trials, 1997 (62 FR 66113).
www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM073132.pdf
14. Guidance for Industry and Investigators: Safety Reporting Requirements for INDs and BA/BE Studies, 2012.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM227351.pdf>.

含不具有约束效力的建议
草案——并非用于实施

附录 1

建议对 MVGT 产品开展的试验的举例（表-1）

	留种储备	主细胞库	工作细胞库	生产中试验	原料药	药物制剂
特性	+	+	+			+
纯度	+	+	+		(+)	+
单一培养试验	+	+	+		(+)	+ [#]
无菌性						+ ^{***}
质粒试验	+	+	(+)	(+)	+	(+)
抗生素敏感性谱	+	+	(+)		(+)	+
宿主基因构造	+	+			(+)	+
效价		+			(+)	+
基因表达		+			(+)	+
衰减确认*	(+)	+			(+)	(+)
存活率	+	+	+		+	+
细胞数		+	+		+	+
存活：死亡细胞比						+
残留水平**						+
残留抗生素					(+)	+
残留生长培养基成分					(+)	+
存在聚集物					(+)	+
稳定性试验		+	+	+		+

+建议开展试验。

(+) 可能需要，取决于生产工艺。

*IND 应包括通过对载体中的相关基因/区域进行测序来确认任何致衰减的点突变/插入/删失等信息。

**对于冻干或干燥的最终产品。

***对于被杀死的 MVGT 最终产品。

#对于存活 MVGT DP。