

嵌合抗原受体修饰T细胞产品无菌快速检查法 常见问题的审评思考

崔靖,王靖宇,韦薇

国家药品监督管理局药品审评中心,北京 100022

关键词: 嵌合抗原受体T细胞;微生物污染;无菌检查

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2023)10-1276-05

近年来嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)产品在肿瘤治疗领域呈现较突出的优势,且已经成为细胞和基因治疗领域商业化进展较为快速的一类新产品。截至2023年7月,全球共有9个CAR-T产品获批上市,其中国外批准上市的6个CAR-T产品包括:Novartis Pharmaceuticals Corporation的Kymriah^[1]、Kite Pharma的Yescarta^[1]、Kite Pharma的Tecartus^[1]、Bristol-Myers Squibb Company的Breyanzi^[1]、Celgene Corporation/Bristol-Myers Squibb Company的Abecma^[1]、传奇生物的Carvykti^[2]。国内批准上市的3个CAR-T产品包括:复星凯特生物科技有限公司的阿基仑赛注射液(奕凯达)^[3]、药明巨诺生物科技有限公司的瑞基奥仑赛注射液(倍诺达)^[4]、南京驯鹿生物医药有限公司的伊基奥仑赛注射液(福可苏)。另外,国内目前还有多个CAR-T产品在上市审评中。

CAR-T是不同于传统小分子和成熟生物制品的

产品作为新鲜制剂供人体使用,采用传统的药典方法可能存在一定局限性。因此越来越多的产品采用无菌快速放行检测方法用于工艺中间体和/或终产品检测,但采用快速检查法是否能与药典方法具有相同的灵敏度是监管机构非常关注的问题。

本文简述了中国、美国、欧洲监管机构对无菌快速检查法的要求,并基于个人理解分析了不同监管机构对于无菌快速检查法相关要求的差异。同时结合个人审评实践总结了无菌快速检查法用于CAR-T产品工艺中间体和/或终产品检测的常见问题,结合审评思考提出一般性技术要求,以供研发者借鉴及参考。

1 国内外监管技术要求

《中国药典》三部(2020版)“1101 无菌检查法”、《美国药典》“71 sterility tests”和《欧洲药典》“2.6.1 无菌检查法”均对基于培养基法(培养基检测)法提出了相

严格按照《生产质量管理规范》相关要求以及对工艺中间体和/或终产品进行微生物检测予以保证。无菌检查作为微生物安全的一个质量项目,对于确保产品安全性至关重要,因此有必要开展全面研究和检测。目前《中国药典》三部(2020版)“1101 无菌检查法”规定的无菌检测方法有薄膜过滤法和直接接种法两种,检测周期通常需14 d,且对检验取样量有一定要求,但由于CAR-T产品批量较小,且大部分产

针对不同监管机构目前在征求意见或已试行的指南情况和具体技术要求进行阐述^[8-14]。不同监管机构的技术指南情况见表1。

2021年10月国家药典委员会公示了《中国细胞类制品微生物检查法草案》,2022年12月国家药典委员会再次针对《细胞类制品微生物检查指导原则草案》(以下简称草案)对外公开征求意见。经对比发现,两轮意见针对基于呼吸信号法的技术要求基本一致,内容方面增加了关于细胞类制品定义、无菌

概述,另外将原公示稿中细胞类制品微生物检查风险评估内容进行调整,并纳入到一般原则中,并且还增加了检验环境的要求以及制品出现污染菌、结果争议时的处理原则等^[8-9]。另外,原公示稿与草案在供试品检验量的要求上略有差异,原公示稿要求取样量为接入每种培养基的最少量应按照总体积的1%取样,按照要求应至少有2种适宜培养基用于检测真菌、需氧菌和厌氧菌,但草案关于供试品检测量要求进行了修改,要求按照总体积的1%取样,分别接种至需氧培养基和厌氧培养基。

虽然目前草案尚未正式实施,但其技术要求为CAR-T产品的无菌快速放行提供了一定依据。首先,从供试品选择和检验量上提出要求,供试品应能代表细胞产品的所有组分,并从成品中取样,如果成品取样不适用情况下可采用替代取样,如选择在处理细胞最后接触的液体中取样,并且采用本法进行生产过程的中间质控时需从相应质控点取样。该草案明确提出供试品的检验量应不低于表2,不同于传统的无菌检测方法取样量的要求,该取样量降低了终产品的消耗。其次,该草案对培养基选择、方法适用性试验(样品批次、重复试验数量、菌种及菌液制备)、接种培养、结果判断等均进行了详细的要求。第三,该草案明确指出,采用快速微生物检查法应按照《9201 药品微生物检验替代方法验证指导》(以下简称<9201>)^[10]进行方法学验证,并在应用于具体品种前进行方法适用性试验,用以考察方法是否适用于该制品的检查。而且,该草案明确指出,采用本指导原则所述的呼吸信号法时,可直接进行方法适用性试验。根据<9201>要求,目前将微生物检验替代方法分成2类,包括定性和定量试验,并明确了定性和定量试验的验证项目和验证要求。

<1071>对于有效期短或需要立即使用的产品的无菌快速方法提出了一般性技术要求^[11],其适用产

品范围包括疫苗、血液制品、生物制品、细胞类制品以及细胞和基因治疗产品等。该指南主要是针对无菌快速放行检测方法基于风险控制的理念进行阐述,同时概述了目前不同原理的无菌快速检查法,如ATP生物发光、流式细胞术、核酸扩增技术、呼吸、固相细胞术等方法原理、检测灵敏度、检测时间等。该指南未对采用无菌快速检查法时的取样量、方法验证提出具体要求,但对于取样量的要求引用了<2.6.27>的相关要求。<1223>是针对替代微生物检测方法验证要求的技术指南^[12],其从微生物检测仪器设备要求、替代方法的验证要求以及方法适用性均提出了较为广泛和充分的建议。

<2.6.27>是针对有效期短、批量小,采用传统的无菌检测方法无法满足放行检测要求的细胞类产品无菌检测制定的技术指南^[13],但不适用于人血或人血液制品的微生物检查。该指南对检测样品的选择、检验量、检测方法验证等提出了相应建议。检测样品选择应来自终产品且必须能代表制品的所有成分,当不能实现时,需进行替代品测试,如与被处理细胞持续接触的液体,但应证明替代物的代表性。检验量的要求见表2。另外,指南中对于基于微生物生长的自动化检查方法的验证内容提出了较为详细的建议,如促生长试验的要求,方法适用性要求,供试品检验量要求,结果判定等。<2.6.27>同时也对于基于非生长的替代方法进行了简单列举,并指出替代方法验证的要求可参考<5.1.6>。<5.1.6>详细阐述了不同的替代检测方法的原理、方法优缺点以及验证的要求^[14],常见方法分为3类,基于微生物生长的测定方法(如电化学法、气体消耗和产生的测量、生物发光法、比浊法、选择性和/或指示性培养基法)、直接测定法(如固相细胞术、流式细胞仪法、直接荧光过滤技术、自身荧光法)、细胞成分分析(如根据微生物表型和基因型特点开发的方法)。方法验证方面针对定性和定量方法的验证项目提出了要求。

表 1 不同监管机构技术指南

机构	技术指南
国家药典委员会	中国细胞类制品微生物检查法草案(国家药典委员会) 细胞类制品微生物检查指导原则草案(国家药典委员会) 9201 药品微生物检验替代方法验证指导原则
《美国药典》	<1071>短效期产品的无菌快速放行检测方法:一种基于风险的方法(以下简称<1071>) <1223>微生物检验替代方法验证(以下简称<1223>)
《欧洲药典》	2.6.27 细胞制品的微生物检查(以下简称<2.6.27>) 5.1.6 微生物控制的替代方法(以下简称<5.1.6>)

表 2 供试品的最少检测量

细胞类制品总体积(V, mL)	总接种体积(分别接种至
	需氧培养基和厌氧培养基)
$10 \leq V \leq 1\ 000$	总体积的 1%
$1 \leq V \leq 10$	100 μL
$V < 1$	不适用

综合以上指南情况,各国监管机构对无菌快速检查法适用的范围要求基本一致,均是针对有效期短、批量小,采用传统药典方法无法在使用前满足放行检测要求的产品。供试品的检验量方面,草案和<2.6.27>均予以明确,但<1071>未提出具体要求,该指南中引用了<2.6.27>取样量的要求。综合以上情况认为,目前各国监管机构关于无菌快速检查法要求的检测量基本保持一致。检测方法方面,草案和<2.6.27>均提出了较为详细的要求,如检测样品、重复试验次数、阳性菌选择、接种量、结果判定标准,但<1071>仅列举了几种方法的原理和优缺点等,未提出具体的检测要求。另外,草案相比<2.6.27>在培养基的适用性确认方面选择的阳性菌种类不完全一致,草案中针对需氧菌种类相比<2.6.27>增加了大肠埃希菌,其他阳性菌要求基本一致。微生物检测替代方法验证方面,各国监管机构均是针对定性和定量方法的验证项目提出了相应的要求,虽然在验证项目的要求上略有不同,内容详略程度略有不同,但整体理念未见较大差异。

2 存在问题和基本考虑

CAR-T 产品的微生物控制主要通过对生产用原材料的检测和控制、生产过程检测和 / 或终产品放行检测,以及按照《生产质量管理规范》相关要求要求进行生产等一系列控制措施予以保障。我们在这类产品审评中发现,生产过程检测和 / 或终产品放行检测的无菌检查存在诸多问题,以下针对目前存在的一些共性问题及基本考虑进行阐述。

2.1 检测样品选择 CAR-T 生产过程比较复杂,通常包括单采血采集、T 细胞分选和激活、病毒转导、细胞培养和扩增、细胞收获及制剂制备等一系列操作,且 CAR-T 细胞产品的有效成份为活细胞,产品为无菌制剂但不能采用终端灭菌工艺及除菌过滤工艺,因此采用过程控制和终产品放行检测相结合的控制策略对确保这类产品的微生物安全性至关重要。

目前普遍存在的问题是仅在最终 CAR-T 产品阶段进行无菌检测,生产工艺过程中缺少必要的无菌

检测和控制。考虑到 CAR-T 产品的特殊性,仅采用终产品进行无菌检测可能存在一定风险,一方面, CAR-T 产品生产可能使用动物 / 人源性材料,且产品本身属于活细胞,其生产过程微生物污染的风险相对较高,因此单纯的采用终点无菌检测放行的控制策略可能存在一定风险;另一方面,由于 CAR-T 终产品难以采用传统药典方法获得检测结果后再用于临床受试者,通常需采用经过验证的无菌快速检查法,但由于无菌快速检查法的成熟程度比较有限,因此为了确保临床使用样品的安全性,建议除了对原材料进行严格的审核和基于风险制定合理的企业内控标准外,还需在 CAR-T 产品生产工艺过程中进行取样和检测,取样点的设定需要根据工艺特点及工艺验证的结果确定。通常情况下,应结合起始物料的来源和微生物控制情况、生产工艺的自动化水平和密闭操作情况、细胞培养工艺复杂程度和培养时间、其他与生产或物料相关的因素进行风险评估,选择适宜的工艺中间体进行无菌检测,基于常规的 CAR-T 产品生产工艺建议在如下阶段考虑进行无菌检测,如单采血阶段、外周血单个核细胞复苏阶段、细胞收获液阶段(如适用)和 / 或终产品阶段进行无菌检测。

2.2 无菌快速检测方法验证 目前大部分的 CAR-T 产品的无菌快速检测方法主要是基于微生物生长原理的方法,其中检测微生物呼吸信号的方法较为常见,如 BacT / ALERT 30 全自动微生物检测系统,该方法通常作为微生物检测的定性方法,在使用该方法前需进行验证,以确保无菌快速检查法的效果优于或等同于药典方法。验证项目的选择可参照<9201>关于定性和定量方法的一般验证要求,通常情况下定性方法验证项目包括专属性、检测限、重现性和耐用性等。

目前在无菌快速验证方法中存在的问题包括以下几个方面:①方法验证项目不全面;②方法检测限验证中阳性菌种类不全,或加入阳性菌的浓度未进行充分研究和验证,直接采用某一特定浓度阳性菌进行试验并作为方法的检测限;③方法中未设置合理的阴性对照;④无菌快速方法验证时未与药典方法进行等效性对比等。针对以上问题,方法学验证项目的不完善可能无法证明替代方法的可行性,从而导致检测结果的可信性受影响,建议参照<9201>对定性和定量试验方法验证项目和验证目的的要求开展规范的验证,同时也可参考<1223>和<5.1.6>相关要求。如针对定性方法的专属性验证一方面需要开展培养基的促生长试验以确保培养瓶中加入的培

培养基适宜与微生物生长;另一方面还需考虑供试品对检测结果的干扰作用(微生物的生长抑制)。检测限验证方面仅采用 1 个较高浓度的试验菌进行验证很难反映出替代方法的检测灵敏度,更无法证明替代方法与药典方法等效或优于药典方法,一般情况下,根据实验确定接种量并采用较低浓度的试验菌接种,然后分别采用药典方法和替代方法对试验菌进行检验,以证明替代方法检测限不大于药典方法检测限。虽然草案提出采用指导原则中呼吸信号法进行无菌检测时,可直接进行方法适用性试验,但由于该草案尚未正式实施,因此目前阶段仍建议进行替代方法和药典方法的等效性对比。目前<9201>和<5.1.6>中虽然提及可采用较低浓度的试验菌如每单位不超过 5 CFU 进行检测限的验证,但该数值并不是一个固定的验证限度值,还需结合方法的检测灵敏度以及微生物生长特性情况予以综合考虑。另外,检测限验证试验需考虑采用足够数量的独立试验和重复次数以证明方法的可靠性。方法验证试验中应设置合理的阳性对照、阴性对照,阳性对照的选择种类和加入量可参照《中国药典》和/或草案相关要求,阴性对照可考虑采用培养基、冻存液、稀释液等。等效性验证在<1223>和<5.1.6>均有提及,虽然<9201>中未作为 1 个验证项目单独列出,但在检测限和重现性验证项目中明确提出需采用统计学方法评价两种方法是否存在差异。因此,在开展无菌快速检测方法验证时,需特别关注药典方法和替代方法的等效性对比,确保替代方法检测能力不低于或优于药典方法;另外,还需开展多次重复试验以确保获得的试验结果满足统计学要求。

3 技术要求

无菌快速检查法的应用为 CAR-T 产品的快速放行提供了便利,但在其广泛应用的同时也带来了监管方面的担忧,一方面是由于整个工艺过程控制和/或终产品放行仅采用无菌快速检测法进行检测和控制,而缺少基于整体风险的控制策略,如未进行留样并增加药典方法的复核,未结合工艺特点和产品特点充分评估无菌检测策略的全面性和完整性;另一方面,不同原理的替代方法可能均存在一定局限性,且在未开展充分和全面的方法验证时直接作为药典方法的替代可能存在一定安全性风险。因此为确保受试者安全性,建议在可行的情况下,首选药典方法用于无菌检查,但考虑到 CAR-T 细胞产品的特殊性,也鼓励研究者开发快速无菌检查法作为中间过程监

测或放行检测方法,且在开展临床试验前按照《中国药典》要求以及参考其他监管机构要求对无菌快速检查法进行充分验证/确认。快速无菌检查法在完成替代方法学验证后,可采用该方法进行产品检验,但仍建议同步实施药典方法检测,持续积累数据。同时一旦发现药典方法和快速无菌检查法检验结果不一致时,应对检验过程予以充分的调查,分析造成无菌检查结果不一致的原因,以药典检测结果作为最终判定依据。同时针对结果不一致的情况,还需鉴定检验过程中发现的污染微生物种类,并建立相应的控制策略。而且在临床使用时做好微生物污染的临床应急处理方案,一旦出现无菌检测阳性结果,建议及时通知临床医生进行后续应急处理和治理。

4 结语

无菌检查是 CAR-T 产品质量控制项目中非常重要的安全性控制指标,越来越多的基于不同原理的替代方法在该类产品的检测中得到应用。虽然不同国家监管机构为替代方法的应用和验证要求提出了一些要求,但由于这些替代方法通常依赖于供应商提供的自动化的仪器设备,且目前没有一种国际上公认的可替代传统的无菌检测方法的无菌快速检查法。因此,采用替代方法用于无菌检测时,建议申请人按照《中国药典》和国际相关指南的要求规范开展替代方法的验证,在前期研究阶段采用药典方法和替代方法进行并行检测,持续积累两种方法检测一致性的数据。另外,希望申请人加强与监管机构的沟通,在采用新型的替代方法用于无菌检查时,需提供充分的研究数据和资料,以确保替代方法的可靠性和准确性。

参考文献

- [1] LI X, LE Y, ZHANG Z, *et al.* Viral vector-based gene therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (9): 7736.
- [2] Food and Drug Administration. Carvykti [EB/OL]. (2023-05-18) [2023-07-25]. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/carvykti>.
- [3] 国家药品监督管理局药品审评中心. 上市药品信息 [EB/OL]. (2022-05-12) [2023-07-25]. <https://www.cde.org.cn/main/xxgk/postmarketpage?acceptidCODE=52c9386efddbc71-d485aa6d71766934b>.
- [4] 国家药品监督管理局药品审评中心. 上市药品信息 [EB/OL]. (2022-04-28) [2023-07-25]. <https://www.cde.org.cn/main/xxgk/postmarketpage?acceptidCODE=ce8dfa29ce17fc19f1ba3-33414dd57f3>.

- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 520-524.
- [6] The United States Pharmacopoeia Commission. <71> sterility tests [EB/OL]. (2013-08-12) [2023-07-25]. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-481C30EA-8A49-4A77-9E81-DOCD7C533498_1_en-US?source=Search%20Results&highlight=sterility.
- [7] European Pharmacopoeia Commission. 2.6.1 sterility [EB/OL]. (2011-04-01) [2023-07-25]. <https://pheur.edqm.eu/app/10-6/content/106/20601E.htm?highlight=on&terms=2.6.1.%20sterility&terms=sterility&terms=2.6.1>.
- [8] 国家药典委员会. 中国细胞类制品微生物检查法草案 [EB/OL]. (2021-10-26) [2023-07-25]. <https://www.chp.org.cn/gjywj/swzp/16551.jhtml>.
- [9] 国家药典委员会. 细胞类制品微生物检查指导原则草案 [EB/OL]. (2022-12-01) [2023-07-25]. <https://www.chp.org.cn/gjywj/swzp/17462.jhtml>.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 494-497.
- [11] The United States Pharmacopoeia Commission. <1071> Rapid microbial tests for release of sterile short-life products: a risk-based approach [EB/OL]. (2019-11-01) [2023-02-01]. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-EEDBFFA0-A579-4F26-ACFF-53248C30BFF6_2_en-US?source=Activity.
- [12] The United States Pharmacopoeia Commission. <1223> Validation of alternative microbiological methods [EB/OL]. (2018-03-01) [2023-02-01]. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-D3D4C54C-B00B-4720-9846-F2A4F4589838_3_en-US?source=Activity.
- [13] European Pharmacopoeia Commission. 2.6.27 Microbiological examination of cell-based preparations [EB/OL]. (2021-07-18) [2023-02-01]. <https://pheur.edqm.eu/app/10-6/content/10-6/20627E.htm?highlight=on&terms=sterility&terms=2.6.1.%20sterility&terms=sterility&terms=2.6.1&terms=2.6.1>.
- [14] European Pharmacopoeia Commission. 5.1.6 Alternative methods for control of microbiological quality [EB/OL]. (2017-07-12) [2023-02-01]. <https://pheur.edqm.eu/app/10-6/content/10-6/50106E.htm?highlight=on&terms=sterility%20%282.6.1&terms=sterility&terms=sterility&terms=sterility&terms=sterility>.

收稿日期:2023-03-10 编辑:王佳凤

(上接第 1275 页)

- [49] ZHANG Z J, DONG Z P, WEI Q J, *et al.* A neonatal murine model of Coxsackievirus A6 infection for evaluation of antiviral and vaccine efficacy [J]. *J Virol*, 2017, 91 (9): e02450-16. DOI: 10.1128/JVI.02450-16.
- [50] WU X, SU Y, DONG F Y, *et al.* Establishment of bioluminescent imaging mouse model for coxsackievirus A6 vaccine using the pseudovirus system [J]. *Chin J Viral Dis*, 2018, 8 (6): 515-520. (in Chinese)
吴星, 苏瑶, 董方玉, 等. 柯萨奇病毒 A 组 6 型报告基因假病毒可视化感染模型的建立 [J]. *中国病毒病杂志*, 2018, 8 (6): 515-520.
- [51] FANG C Y, LIU C C. Recent development of enterovirus A vaccine candidates for the prevention of hand, foot, and mouth disease [J]. *Expert Rev Vaccin*, 2018, 17 (9): 819-831.
- [52] ZHANG Z J, DONG Z P, WANG Q, *et al.* Characterization of an inactivated whole-virus bivalent vaccine that induces balanced protective immunity against coxsackievirus A6 and A10 in mice [J]. *Vaccine*, 2018, 36 (46): 7095-7104.
- [53] LIM H, IN H J, LEE J A, *et al.* The immunogenicity and protection effect of an inactivated coxsackievirus A6, A10, and A16 vaccine against hand, foot, and mouth disease [J]. *Vaccine*, 2018, 36 (24): 3445-3452.
- [54] SHEN C Y, KU Z Q, ZHOU Y, *et al.* Virus-like particle-based vaccine against coxsackievirus A6 protects mice against lethal infections [J]. *Vaccine*, 2016, 34 (34): 4025-4031.
- [55] ZHANG W, DAI W L, ZHANG C, *et al.* A virus-like particle based tetravalent vaccine for hand, foot, and mouth disease elicits broad and balanced protective immunity [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2018, 7 (1): 94.
- [56] LIU H B, ZHANG M, FENG C Z, *et al.* Characterization of Coxsackievirus A6 strains isolated from children with hand, foot, and mouth disease [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 700191. DOI: 10.3389/fcimb.2021.700191.

收稿日期:2023-01-16 编辑:李靓