

关于嵌合抗原受体修饰 T 细胞产品药学评价的思考

刘伯宁, 曹越, 卢加琪, 罗建辉*

(国家食品药品监督管理总局药品审评中心, 北京 100038)

摘要: CAR-T 细胞作为一种活的个体化治疗药物, 其药学研究与评价显著区别于小分子化学药和大分子重组蛋白。CAR-T 产品的药学研究表现出原材料的“多样性”、制备工艺的“差异化”和质控策略的“互补性”等特点。申报临床阶段的药学评价重在识别重大风险点, 在保证临床用药安全性的前提下, 兼顾细胞制品的产品特殊性。本文结合近期国内 CAR-T 产品药学审评实践, 提出此类产品药学评价的一般考虑与评价要点, 并就行业共性问题与发补原因展开讨论, 以期促进此类产品尽快进入临床, 在临床实践中不断改进完善, 最终转化成可实际应用的药品。

关键词: 嵌合抗原受体修饰 T 细胞; 基因修饰 T 细胞; 逆转录病毒载体; 慢病毒载体; 生产工艺; 质量控制
中图分类号: R951 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2018) 10-1637-08

Regulatory perspective for chemistry manufacturing and controls considerations in chimeric antigen receptor-modified T cell therapy

LIU Bo-ning, CAO Yue, LU Jia-qi, LUO Jian-hui*

(Center for Drug Evaluation, China Food and Drug Administration, Beijing 100038, China)

Abstract: As a living cell product, chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy displays multiple characteristics including the diversity of raw materials, the complexity of manufacturing process and the complementarity of quality control set. Pharmaceutical research and evaluation of CAR-T cell therapy are fundamentally different from small molecule and macromolecular recombinant proteins. Chemistry manufacturing and controls (CMC) review of investigational new drug (IND) submission for CAR-T therapy should especially pay attention to above unique characteristics and focus on potential risks to ensure clinical safety. Based on questions and concerns from recent CMC review practice and workshop on CAR-T cell therapy IND application, the critical points to consider for CMC study is proposed, and questions related to supplementation are also discussed in this review to accelerate the clinic translation of CAR-T therapy.

Key words: chimeric antigen receptor-modified T cell; gene modified T cell; lentiviral vector; retrovirus vector; manufacturing process; quality control

近年来, 以嵌合抗原受体修饰 T 细胞 (chimeric antigen receptor-modified T cell, CAR-T) 为代表的肿瘤免疫细胞疗法在临床上不断取得突破性进展。

2017 年, 美国 FDA 先后批准诺华公司 Kymriah (tisagenlecleucel) 用于治疗复发或难治性急性淋巴细胞白血病, 凯特公司的 Yescarta (axicabtagene-celileucel) 用于治疗非霍奇金淋巴瘤等^[1]。2017 年 12 月, 国家食品药品监督管理总局正式颁布了《细胞治疗用产品的研究与评价技术指导原则》(试行版), 明确了 CAR-T 细胞产品按照“药品”注册申报的管理路径和一般技术要求。仅半年时间, 已有 10 余家

收稿日期: 2018-05-29; 修回日期: 2018-06-07.

基金项目: 国家科技重大专项“重大新药创制”课题资助项目 (2015ZX09501008).

*通讯作者 Tel: 86-10-68586655, E-mail: Luojh@cde.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0505

国内企业申报 CAR-T 产品注册临床试验。

虽然, 此前国内免疫细胞疗法按照“第三类医疗技术”管理, 已有一定临床应用的基础。但是, 按照药品注册申报的技术要求, 现阶段申报资料中普遍存在“药学研究不充分、申报资料不完整”等问题, 造成了此类产品申报临床 (investigational new drug, IND) 阶段发补率较高的情况^[2, 3]。为此, 本文结合 CAR-T 产品的技术特点与审评实践, 重点探讨此类产品药学研究的一般规律与评价要点, 以期促进此类产品快速进入临床, 在临床实践中不断改进完善, 最终转化成可实际应用的药品。

1 CAR-T 细胞产品的药学研发特点与评价

1.1 CAR-T 细胞产品药学研发的特点

CAR-T 产品属于“活”细胞疗法, 作为“药品”开发面临着诸多挑战, 如: ① 生产原材料方面, 供者细胞质量的个体间差异较大, 其他原材料 (质粒、病毒、细胞激活试剂和培养基等) 也会对终产品质量造成影响; ② 生产工艺方面, 制备工艺复杂 (分选、激活、转导、扩增和洗涤等)、工艺性能稳健性较差, 存在着工艺失败的可能 (10% 左右), 工艺变更前后可比性研究较难评价; 细胞本身不耐受终端除菌和病毒灭活, 终产品具有较高的外源因子污染和病毒安全性风险; ③ 产品质量方面, 终产品属多种细胞的混合物, 同时存在着“分化”与“表型”的“异质性”; 传统检测方法 (培养法) 的实验周期难以满足临床用药需求; 生物测活方法缺少标准物质, 较难设定统一的标准限度等^[2, 4]。

此外, CAR-T 产品作为正在探索的先进技术疗法, 研发者在其原材料来源、制备工艺和质控策略等可存在多种选择。通过对已受理申报资料的梳理 (>10 个品种), 药学研究中存在着生产原材料“多样性”、生产工艺“差异化”、质控策略的“互补性”等技术特点^[2]。上述 CAR-T 细胞药学研究的挑战与特点, 也决定了药学评价的一般考虑与关注要点应区别于传统小分子化学药或大分子重组蛋白。

1.2 CAR-T 细胞产品药学评价

目前, 国内已颁布适用于 CAR-T 产品的药学评价的技术指南, 包括: 《细胞产品研究与评价技术指导原则》(2017 年)、《人基因治疗和制剂质量控制技术指导原则》(2003 年)、《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》(2003 年) 等。随着我国监管要求与国际的接轨, 美国 FDA 和欧盟 EMEA 关于“体细胞治疗”^[5]、“基因治疗”^[6]、“生物测活方法”^[7]、“逆转录病毒载体”^[8]、慢病毒载体^[9]等相关指导原则在审评实践

中也具有较强的指导意义。

此外, 关于 CAR-T 细胞生产过程中涉及血液采集与运输、病毒载体制备、自体细胞体外培养等具体问题, 其他品种较为成熟的相关技术要求也具备一定参考价值, 如: 供者细胞筛查 (参考血液制品的供浆者及原料血浆筛查)、CAR 基因构建 (参考重组蛋白药物目的基因及表达载体构建与克隆化筛选)、包装细胞检定 (参考疫苗用细胞基质检定)、病毒载体生产 (参考 DNA 疫苗、基因疗法的过控控制) 等。由于 IND 阶段药学研究评价重在识别和控制药物潜在的安全性风险^[10], 笔者认为, 此类产品 IND 阶段的药学评价的一般考虑与技术要求, 应围绕“识别和控制用药安全性风险, 兼顾细胞产品特殊性”的原则展开。

2 CAR-T 的药学研究内容与评价要点

下文将根据现行药品法规要求下药学资料的整理顺序 (8~15 号资料), 就 CAR-T 产品上游构建与原材料、原液与制剂生产工艺、质量研究、稳定性研究等方面涉及的药学研究内容与评价要求展开讨论。

2.1 CAR-T 产品的分子设计

CAR-T 产品的分子结构, 一般包括单链抗体、铰链区、跨膜区和胞内区。CAR-T 药物的作用机制是模拟体内 T 细胞表面受体 (T cell receptor, TCR) 与靶细胞表面的组织相容复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 递呈的肿瘤抗原结合后, 诱导 T 细胞活化对肿瘤细胞进行杀伤。CAR-T 分子的单链抗体 (single-chain variable fragment, scFv) 可与肿瘤抗原高亲和力、特异性结合, 使其抗肿瘤效果不依赖于肿瘤细胞的 MHC 表达。CAR-T 分子的胞内区中整合了促进 T 细胞活化和增殖的序列, 保证了 CAR-T 细胞可在体内长期存活和发挥疗效。

CAR-T 细胞分子设计可直接影响着其体内的存续、归巢和杀伤效力。研究表明, ScFv 的结合表位与亲和力影响 CAR-T 细胞体内的杀伤效果与不良反应^[11], 铰链区的长度和柔性^[12]以及胞内区共刺激分子^[13, 14] (CD28 和 4-1BB 等) 的选择会影响 CAR-T 细胞在体内存续和杀伤效力。为了进一步提高 CAR-T 分子的靶向性、杀伤效力和安全性, 多种改构策略开始应用于 CAR-T 的分子设计 (表 1)^[15-18]。最近为了降低 CAR-T 生产成本, 缩短制造周期, 采用基因编辑技术 (TALENs、Mega-TALS、ZFNS、CRISPR/CAS9) 敲除部分基因 (TCR α/β 、HLA-A 和 B2M)^[19-22], 可制备现货供应的通用性 CAR-T 细胞产品已经成为此领域研发热点。

Table 1 Design concept and development of chimeric antigen receptor-modified T cell (CAR-T) therapy^[15-18]

Component	Approach	Case
Target	Haematological malignancies Solid malignancies	CD20, ROR1, CD30, CD123, CD33, CD22, LeY, BCMA, CD138 PSMA, mesothelin, FAP, EGFRvIII, EGFR, CEA, CD171, GD2, HER2, IL-13, glypican-3
CAR	scFv Dual car system Universal CAR	anti-CD19 scFv (FMC63) CAR1-CD3 ζ (signal 1), CAR2-costimulation (signal 2) Ligand (IL13R)-based CAR
Hinger region	Immuglobulin-derived hinge CD8-derived spacers	CH ₂ CH ₃ hinge derived from IgG1
Transmembrane domain	CD3, CD4, CD8, or CD28 transmembrane domain	
Intracellular domain	CD3 ζ -CD28/4-BB/OX40/ICOS	
Joint expression	Cytokines Safety switches	IL-12, IL-15 iCasp9, huEGFRt
Gene disrupt	Checkpoint protein Cytokines	PD-1, CTLA-4 IL-6

目前, CAR-T 产品研发呈不断增加趋势, 既有跟踪同类已上市产品, 也有在此基础上进行改良优化。对于前者, 建议申请人关注相关功能组件的知识产权问题。对于新型改构 CAR-T 产品, 应结合立题依据说明 CAR 的分子改构 (敲减组件、自杀标记等) 的科学性和合理性, 并结合体内、体外实验结果验证改构后生物活性是否符合设计预期。

2.2 原材料 (供者细胞、相关试剂与耗材) 供者细胞是 CAR-T 产品制备的起始物料, 应参照医疗管理的相关规定对供者进行病原微生物感染标志物 (HIV-1/2、HBV、HCV 和梅毒等) 筛查, 同时建议采用单采机分离单核淋巴细胞。供者细胞质量 (细胞群/亚群和功能状态等) 可直接影响后续扩增和转染等工序的效率, 报道称不同 T 细胞亚型 (CD4⁺/CD8⁺、初始 T 细胞、中央记忆 T 细胞等) 在体内增殖与杀伤效果差异显著^[23], 因此应建立细胞中间体验收标准。

细胞培养建议选择商品化无血清培养基, 不建议使用动物源血清。若使用人自体血清或 AB 血清, 应开展充分的研究以支持血清的适用性、必要性和不可替代性。其他试剂 (抗体、细胞因子和人血清白蛋白等) 应优先使用药用级或临床级别产品; 细胞分选或激活建议使用商业化免疫磁珠, 若采用传统抗体包被技术, 应详述操作规程与工艺条件; 细胞扩增建议使用封闭化和规模化的生物反应器。

2.3 生产工艺 (质粒、病毒载体和 CAR-T 细胞) 目前 CAR-T 细胞转导过程中多使用逆转录病毒和慢病毒载体。质粒与病毒载体的生产环境应符合 GMP 规范, 产品的规模、质量应与临床试验用药的需求及探索性研究性质相适应。

质粒的生产工艺应建立重组工程菌表达。生产工

程菌应按照现行版药典要求建库并检定。质粒纯化工艺一般包括碱裂解、阴离子 (疏水) 层析和除菌过滤等, 应按预设的放行标准检定合格后, 视需要可进行冷冻长期保存^[24,25]。质粒的抗性标记不建议使用氨苄青霉素, 若生产环节必需使用抗生素保持工程菌的质粒保有率, 应对纯化工艺和终产品中的抗生素残留进行验证。

考虑到病毒的安全性问题, 慢病毒载体建议使用第三代、四质粒系统。包装细胞 (293 和 293T) 应参照疫苗生产用细胞基质相关要求建库和检定。慢病毒载体的纯化一般采用澄清过滤、阴离子交换 (或亲和层析)、核酸酶酶切和除菌过滤等, 其中核酸酶切是保证去除质粒残留的必需工序^[26]; 逆转录病毒一般采用稳转细胞系 (PG13 等) 进行表达。病毒载体生产用工程细胞应参照现行药典要求建立细胞库并检定。由于包膜蛋白 (GAL-V) 的敏感性, 逆转录病毒纯化往往不能使用层析等工艺, 因此其质量研究中应对相关杂质进行充分的研究与控制。

CAR-T 细胞的生产工艺一般包括细胞分选、激活、转染、扩增和洗涤等工序 (表 2)^[17,27,28]。如有必要, 也可根据供者细胞质量对工艺流程或参数进行“弹性”设置。如: 诺华公司 KYMRIAH 生产工艺中, 可根据患者细胞质量决定是否启用“细胞分选”工序^[29]。避免对工艺失败的患者无限制延长培养时间进行细胞扩增或多批次混合输注, 可通过原材料质控和加强工艺开发等提高工艺的稳健性。最近业内已经出现用于 CAR-T 细胞制备的全自动机器 (CliniMACS Prodigy), 从工艺控制的角度应鼓励采用先进设备实现操作步骤的“标准化”、“封闭化”和“自动化”^[28,30]。此外, 自体来源的 CAR-T 细胞

Table 2 The manufacturing process of CAR-T therapy^[17, 27, 28]

Manufacturing step	Optional process or equipment
Leukapheresis	Manual Ficoll density gradient centrifugation Blood cell separator
T cell activation	Monoclonal antibody (CD3/CD28 antibody) and interleukins (IL-12/15) plate, StrepTactin Immunomagnetic beads (Dynabeads, TransAct) Artificial antigen-presenting cells (K562)
Genetic modification	γ -Retroviral vector Lentiviral vector Transposon/transposase (sleeping beauty, PiggyBac)
Expansion	T flask Bioreactor (G-Rex, wave) Automation device (CliniMACS Prodigy)
T cell formulation	Frozen formulation Fresh formulation

应建立从细胞采集到回输全过程的产品标示系统 (chain of identify), 生产过程中不同患者的细胞应保证在时间/空间隔离, 防止产品混淆和交叉污染等的发生。

2.4 质量控制 (质粒、病毒载体及 CAR-T 细胞) 临床试验用药制备用级别的质粒^[31, 32]、慢病毒载体^[33]、CAR-T 细胞^[34]应参照基因疗法建立包括鉴定、纯度、安全项目和效力等项目的放行质量标准 (表 3)^[31-34]。如: 质粒的鉴别项应采用测序法确定目的基因序列, 纯度项对产品相关杂质 (非超螺旋状态 DNA) 和工艺相关杂质 (宿主蛋白、基因组 DNA 和 RNA) 进行限

度控制, 安全项目 (无菌和内毒素) 项应按照药典方法进行检验; 病毒载体应重点关注具有致癌风险的 DNA 残留 (SV40 和 E1A 等), 体现纯化工艺中酶切效率的 DNA 分布 (<500 bp), 病毒生产上清液和生产终末期细胞应同时检定可复制慢病毒 (replication-competent lentivirus, RCL)。由于物理滴度不能区分不具有感染活性的空病毒颗粒, 还应同时采用敏感细胞 (如 T 细胞) 法测定病毒的生物滴度。

CAR-T 细胞作为活的药物, 具有高度的个体差异性和产品异质性, 其生物测活方法的建立与限度制定具有很大的挑战性。目前, 有限的披露数据提示 CAR-T 细胞的生物测活 (CAR-T 阳性率和 IFN- γ) 与体内疗效未见明显相关关系。实际上, 目前申报临床阶段的 CAR-T 阳性率的实测值较宽 (20%~80%)^[2]。但是, 建议结合工艺开发合理设定生物活性限度以保证产品质量一致性。

2.5 稳定性与包材等 (质粒、病毒和 CAR-T 细胞)

规模化制备的质粒、病毒载体可冷冻长期保存, 有利于临床试验期间一致供应, 减少批件差异。通常质粒在冷冻条件下具有较好的稳定性。病毒的冻融操作会造成感染滴度的下降, 尽量避免病毒载体的反复冻融。应基于稳定性研究确定适宜的保存条件及有效期。若供者细胞涉及转移运输和冷冻保存, 也应开展相应的中间体稳定性研究。CAR-T 细胞可根据临床试验选择新鲜制品处方 (氯化钠和人血白蛋白等) 和冻存制剂处方 (人血白蛋白、DMSO 和电解质溶液等), 应模拟实际贮存、运输与临床应用条件开展稳

Table 3 The release test of plasmid^[31, 32], lentiviral vector^[33], CAR-T cell^[34]

Category	Plasmid	Lentiviral vector	CAR-T
General	Appearance	Appearance, pH	Appearance
Identify	Restriction digestion analysis	CAR gene identify	CAR expression
	DNA sequencing		
	DNA concentration		
Purity	DNA homogeneity		Cell viability
	Host chromosomal DNA	Host DNA	CAR ⁺ T cells
	Host RNA	Size distribution of residual DNA Transfer of residual DNA (SV40, E1A)	CD3 ⁺ T cells CD19 ⁺ cells
	Host protein	Host protein, BSA	
	Residual antibiotics	Residual benzonase	Residual beads
Safety	Sterility	Sterility	Sterility, gram stain
	Endotoxins	Endotoxins Mycoplasma Adventitious agents	Endotoxins Mycoplasma Copies of transgene insertion
		Replication competent lentivirus (EOP and supernatant)	Replication competent lentivirus
	Potency	Transformation efficiency	<i>In vitro</i> IFN- γ secretion
		<i>In vitro</i> viral titer Physical viral titer	

定性研究。如: 诺华公司 KYMRIAH 冻存制剂可在液氮冷冻条件下保存 9 个月, 复苏后应在 3 h 内完成输注^[29]。此外, 对于冻存制剂选用的内包材 (冻存管和冻存袋) 应关注其防冻性与密封性。

3 CAR-T 产品 IND 申报资料中常见问题与发补原因分析

目前在我国从事 CAR-T 产品研发的公司多为小微企业, 研发者对细胞治疗产品的药学研究内容与评价要点认识不足, 导致申报资料的完整性、规范性、溯源性存在较多缺陷。目前已受理品种中, 生产工艺开发欠缺、质量研究与控制不足以及存在病毒安全性风险等, 是此类品种 IND 申报资料中的常见问题及需要补充研究的主要原因。

3.1 生产工艺开发欠缺 此前, 国内进行临床试验的 CAR-T 疗法多在医院实验室内小规模制备, 普遍存在着不符合临床试验用药基本要求的情况, 如: 质粒经外购后未建库, 每次生产仍需转染宿主菌、克隆筛选; 使用商业化大提试剂盒提取质粒, 未建立质粒纯化工艺和中间控制; 病毒包装细胞来源不明 (或未经鉴定), 存在较高的外源因子污染风险; 病毒载体缺乏必要的纯化工序 (如无核酸酶切工序), 导致相关杂质 (质粒、宿主 DNA 和宿主蛋白等) 含量超标; 生产环境不符合 GMP 规范, 存在质粒/病毒污染、患者样品混淆的风险; 制检记录与拟定规程不符, 原始数据不具溯源性; 存在重大工艺变更且未提供可比性研究等。

生产环境是保证 CAR-T 细胞产品质量、防止外源因子污染的基本保障, 建议申请人严格按照现行《药品生产管理规范》、参照美国 FDA 关于 I 期临床试验 GMP 要求^[35]和欧盟 EMEA 对于“先进技术疗法”产品的 GMP 要求^[36], 对 CAR-T 生产的质量系统、厂房、设施、设备、质量控制系统、公用系统和仓储系统等方面进行规范管理。

IND 阶段 CAR-T 细胞生产工艺应完成初步的工艺开发与验证, 以保证工艺的可控性、适用性和产品质量的一致性^[3, 37]。工艺设计应体现“质量源于设计”的理念, 基于临床作用机制研究识别产品的“关键质量属性”和工艺过程的“关键工艺参数”^[38]。早期的 CAR-T 细胞生产工艺开发可采用健康志愿者细胞进行, 但应充分考虑到患者细胞质量差异性。建议对关键工序中的关键工艺参数进行探索性研究, 如: 质粒转染包装细胞工序中多质粒的比例与用量, 转染时间、激活工序中磁珠与细胞比例、激活时间等, 病毒转导工序中 MOI 值、感染时间等, 扩

增工序中细胞因子浓度、培养时间, 洗涤工序中的洗涤体积与次数等。

在 CAR-T 工艺开发的过程中, 通常伴随着生产原材料供应商的改变、生产工艺的改进、生产规模的放大等形式的工艺变更。由于 CAR-T 细胞制备工艺的复杂性和终产品的异质性, 其工艺变更的可比性研究与评价存在较大挑战。如: KYMRIAH 在从宾夕法尼亚大学向诺华公司工艺转移和优化过程中, 上述工艺变更被判定为不具可比性后, 又开展了相应临床研究进行支持^[29]。因此, 建议工艺变更尽可能与临床试验的开展相结合, 重大工艺变更的时间节点应选择在临床试验前或关键性验证临床开展前。重要原材料的工艺变更后除了关注产品自身质量外, 还应考虑对下游工艺的潜在影响, 如: 病毒载体的工艺变更除了要进行产品质量、稳定性研究等外, 还应结合变更后 CAR-T 细胞工艺性能参数进一步说明可比性。

3.2 质量研究与控制不足 目前 KYMRIAH^[29]和 YESCARTA^[39]的相关药学研究资料已有部分公开披露, 多数申请人能够参照上市 CAR-T 细胞产品制定批次放行质量标准。但是, 考虑到 CAR-T 生产工艺的“复杂性”及产品质量的“异质性”, 此类产品的质量策略应体现生物制品全程控制的理念。若单纯的依赖于终产品放行检验, 而忽视原材料、工艺过程 and 产品质量的控制, 则难以保证终产品的质量一致性。以下关于质量研究的缺陷也是发补内容中较常出现的问题: 关键原材料产品质量未达到临床用药级别, 质粒质量标准缺乏纯度控制 (超螺旋比例)、病毒质量标准缺乏安全性项目 (RCL) 和效力 (生物滴度) 项目控制; 照搬同类产品质量标准, 放行检验项目与限度缺乏工艺开发与质量研究数据的支持; 仅采用快速检测方法对终产品进行放行检测, 且缺乏必要的方法学验证资料支持, 存在明显临床用药安全性风险。

CAR-T 细胞生产所用原材料中, 培养基、辅料等成分重点关注动物源性成分的安全性风险; 质粒、病毒应建立全面的放行质量标准及相关参比品; CAR-T 细胞的质量研究应结合工艺开发与验证, 对产品/工艺相关杂质进行研究与控制。如: 通过对非目标细胞成分 (红细胞、粒细胞、死细胞和 B 细胞等) 含量研究, 应将影响临床安全性的死细胞和 B 细胞通过细胞活率和表型分析等项目进行限度控制, 对不影响临床安全性相关成分 (自体 NK 细胞等) 可不纳入放行质量标准^[29]; 工艺过程中引入抗生素、抗体偶联磁

珠等不仅要作为工艺相关杂质进行限度控制,还应结合工艺开发对纯化工序(洗涤等)的去除能力进行验证。

由于采用传统培养法对 CAR-T 细胞安全性项目(无菌、支原体、可复制慢病毒)检测,批次放行检验周期可能影响临床实际应用。建议采用多种检测方法(快速法与培养法)、多个检测时间点(前置或后置)的互补策略进行质量控制。如:诺华 KYMRIAH 将支原体、CAR 基因鉴定与拷贝数的取样时间前置在细胞培养收液阶段,这样样品既能最大可能检测到支原体污染,也避免了冻存液对检测方法的干扰^[29]。也可以在批次放行质量标准的基础上,进一步建立输注前放行标准和临床应急预案,以满足培养法检测周期较长的实际需要。

3.3 存在病毒安全性风险 用于 CAR-T 细胞转染的病毒载体,主要是基于 HIV-1 改构的慢病毒载体和基于 MLV 病毒改构的逆转录病毒。理论上,病毒载体在体外包装生产、转染扩增的过程中均可发生同源重组形成复制型病毒。因此目前应用最为广泛的第三代、四质粒系统慢病毒载体,通过将病毒表达组件分散到多个质粒、去除不必要的辅助基因、构建 SIN 序列等方式降低 RCL 风险^[9]。申报资料在上游构建中应结合病毒载体的设计依据、功能组件进行说明。

虽然,目前应用于临床的第三代慢病毒载体(>460 批)尚未发现复制性慢病毒阳性^[40],长期的临床患者监控也未发现逆转录病毒导致的基因毒性^[41]。但是,欧美监管机构出于安全风险考虑,仍普遍要求在病毒生产(细胞库或病毒液上清、生产终末期细胞)、细胞转染(CAR-T 细胞)、临床输注后(患者体内等)等阶段进行 RCL/RCR 监测。并且,对于检测方法中采用的敏感细胞、阳性对照和取样量有着严格的要求^[8,9,42]。传统培养法检测 CAR-T 细胞 RCL/RCR 的实验周期(6 周)不能满足临床用药放行检测的需求,工业界目前普遍采用 qPCR 法进行快速放行试验,但应对该方法的敏感性、特异性和重复性进行方法学验证^[43],同时建议留样采用传统培养法进行检定。部分申请人未采用公认的敏感细胞(Mus dunni 和 C8166 等)进行扩增,应进一步说明方法学建立的合理性。此外,病毒载体插入位点突变也有可能致细胞癌变,CAR-T 细胞的放行检测需要对基因拷贝数进行控制,输注患者体内也需要检测基因的整合位点^[8,9]。

4 结语

目前,国际上 CAR-T 细胞疗法已经在血液肿瘤

治疗上取得突破,针对实体瘤适应症的 CAR-T 细胞产品和通用性 CAR-T 细胞产品也进入临床研究阶段。在我国,按照医疗技术开展的 CAR-T 临床试验将近 200 个^[44],免疫细胞疗法显示出蓬勃的行业发展前景。随着工业界研发热情持续高涨,以及药品审评中鼓励创新相关政策的落地,相信后续将有更多的 CAR-T 产品按照药品注册申报临床试验。本文希望结合近期 CAR-T 产品的审评实践,与业界同仁探讨此类产品药学研究的基本内容与评价要点,以期共同促进临床研究阶段行业的健康发展,最终满足国内病患的临床用药需求。

References

- [1] June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer [J]. *Science*, 2018, 359: 1361-1365.
- [2] Liu BN: CMC considerations of CAR-T therapy for IND application [C] // Workshop on CMC regulation perspective of CAR-T therapy for IND application (CAR-T 细胞产品申报临床药学研究研讨会). Beijing: China, 2018.
- [3] Center for Drug Evaluation, China Food and Drug Administration. Chemistry, manufacturing, and control (CMC) considerations for cell therapy investigational new drug applications (INDs) [EB/OL]. Beijing: Center for Drug Evaluation, 2018.
- [4] Lu XV. Regulatory considerations for manufacturing and testing of investigational chimeric antigen receptor (CAR) T-cell products [C] // Measurement Challenges for CAR-T Biomanufacturing. Gaithersburg: USA, 2016.
- [5] FDA. Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy [EB/OL]. 1998 [2018-06-02]. <https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/cellularandgenetherapy/ucm081670.pdf>.
- [6] FDA. 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) [EB/OL]. 2008 [2018-06-02]. <https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/cellularandgenetherapy/ucm078694.pdf>.
- [7] FDA. Guidance for industry potency tests for cellular and gene therapy products [EB/OL]. 2011 [2018-06-02]. <https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/cellularandgenetherapy/ucm078694.pdf>.

- py/ucm243392.pdf.
- [8] FDA. Supplemental guidance on testing for replication competent retrovirus in retroviral vector based gene therapy products and during follow-up of patients in clinical trials using retroviral vectors [EB/OL]. 2006 [2018-06-02]. <https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/cellularandgenetherapy/ucm078723.pdf>.
- [9] EMA. Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors [EB/OL]. 2005 [2018-06-02]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003984.pdf.
- [10] Liu BN, Luo JH. Research and development of innovative antibody-based drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 1811–1819.
- [11] Hudecek M, Lupo-Stanghellini MT, Kosasih PL, et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 3153–3164.
- [12] Alabanza L, Pegues M, Geldres C, et al. Function of novel anti-CD19 chimeric antigen receptors with human variable regions is affected by hinge and transmembrane domains [J]. *Mol Ther*, 2017, 25: 2452–2465.
- [13] Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJC, et al. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells [J]. *Cancer Cell*, 2015, 28: 415–428.
- [14] Kawalekar OU, RS OC, Fraietta JA, et al. Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T cells [J]. *Immunity*, 2016, 44: 712.
- [15] Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13: 370–383.
- [16] Srivastava S, Riddell SR. Engineering CAR-T cells: design concepts [J]. *Trends Immunol*, 2015, 36: 494–502.
- [17] Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, et al. A guide to manufacturing CAR T cell therapies [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 53: 164–181.
- [18] Jaspers JE, Brentjens RJ. Development of CAR T cells designed to improve antitumor efficacy and safety [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 178: 83–91.
- [19] Torikai H, Reik A, Liu PQ, et al. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR [J]. *Blood*, 2012, 119: 5697–5705.
- [20] Ren J, Zhang X, Liu X, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 17002–17011.
- [21] Poirot L, Philip B, Schiffer-Mannioui C, et al. Multiplex genome edited T-cell manufacturing platform for “off-the-shelf” adoptive T-cell immunotherapies [J]. *Cancer Res*, 2015, 75: 3853–3864.
- [22] Torikai H, Reik A, Soldner F, et al. Toward eliminating HLA class I expression to generate universal cells from allogeneic donors [J]. *Blood*, 2013, 122: 1341–1349.
- [23] Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8⁺ and CD4⁺ subsets confer superior antitumor reactivity *in vivo* [J]. *Leukemia*, 2016, 30: 492–500.
- [24] Carnes AE, Williams JA. Plasmid DNA manufacturing technology [J]. *Recent Pat Biotechnol*, 2007, 1: 151–166.
- [25] Schmeer M, Buchholz T, Schleef M. Plasmid DNA manufacturing for indirect and direct clinical applications [J]. *Hum Gene Ther*, 2017, 28: 856–861.
- [26] Segura MM, Mangion M, Gaillet B, et al. New developments in lentiviral vector design, production and purification [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2013, 13: 987–1011.
- [27] Levine BL, Miskin J, Wonnacott K, et al. Global manufacturing of CAR T cell therapy [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2017, 4: 92–101.
- [28] Kaiser AD, Assenmacher M, Schroder B, et al. Towards a commercial process for the manufacture of genetically modified T cells for therapy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22: 72–78.
- [29] FDA. CMC review of original submission, BLA125646, KYMRIA H [EB/OL]. 2017 [2018-06-02]. <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM577221.pdf>.
- [30] Lock D, Mockel-Tenbrinck N, Drechsel K, et al. Automated manufacturing of potent CD20-directed chimeric antigen receptor T cells for clinical use [J]. *Hum Gene Ther*, 2017, 28: 914–925.
- [31] Przybylowski M, Bartido S, Borquez-Ojeda O, et al. Production of clinical-grade plasmid DNA for human Phase I clinical trials and large animal clinical studies [J]. *Vaccine*, 2007, 25: 5013–5024.
- [32] Schmeer M, Schleef M. Pharmaceutical Grade Large-Scale Plasmid DNA Manufacturing Process, DNA Vaccines: Methods and Protocols [M]. New York: Springer New York, 2014: 219–240.
- [33] Ausubel LJ, Hall C, Sharma A, et al. Production of CGMP-grade lentiviral vectors [J]. *Bioprocess Int*, 2012, 10: 32–43.

- [34] Gee AP. Manufacturing genetically modified T cells for clinical trials [J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22: 67–71.
- [35] FDA. Guidance for industry CGMP for phase 1 investigational drug [EB/OL]. 2008 [2018-06-02]. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070273.pdf>.
- [36] EMEA. Guidelines on good manufacturing practice specific to advanced therapy medicinal products [EB/OL]. 2017 [2018-06-02]. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol4/2017_11_22_guidelines_gmp_for_atmps.pdf.
- [37] Li M, Guo XX, Liu BN. Discussion on general principle and key points of process validation for biologics [J]. *Chin J Biol (中国生物制品学杂志)*, 2017, 30: 664–668, 672.
- [38] Lipsitz YY, Timmins NE, Zandstra PW. Quality cell therapy manufacturing by design [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 393–400.
- [39] FDA. CMC review of original submission, BLA125643, Yescarta® [EB/OL]. 2017 [2018-06-02]. <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherap> Products/ApprovedProducts/UCM584335.pdf.
- [40] Cornetta K, Duffy L, Turtle CJ, et al. Absence of replication-competent lentivirus in the clinic: analysis of infused T cell products [J]. *Mol Ther*, 2018, 1: 280–288.
- [41] Scholler J, Brady TL, Binder-Scholl G, et al. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4: 132ra53.
- [42] FDA. Briefing document — testing for replication competent retrovirus (RCR)/lentivirus (RCL) in retroviral and lentiviral vector based gene therapy products — revisiting current FDA recommendations [EB/OL]. 2016 [2018-06-02]. <https://sites.duke.edu/dvvc/files/2016/05/FDA-recommendation-for-RCR-testing.pdf>.
- [43] Skrdlant LM, Armstrong RJ, Keidaisch BM, et al. Detection of replication competent lentivirus using a qPCR assay for VSV-G [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018, 8: 1–7.
- [44] Liu B, Song Y, Liu D. Clinical trials of CAR-T cells in China [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10: 166.