

• 新药论坛 •

关于重组腺相关病毒基因治疗制品药学评价的思考

刘伯宁, 徐隆昌, 韩冬梅, 罗建辉*

(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022)

摘要: 重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV) 载体与其他病毒载体相比, 具备感染能力强、可持续表达目的基因、无致病性和非基因组整合等优点, 已成为体内基因治疗的主要病毒载体。目前, 国际上已有 3 个 rAAV 相关的基因治疗产品获批上市, 另有两百余个候选药物正在开展临床试验。但是, 国内工业界在开发临床应用级 rAAV 产品时面临诸多挑战, 监管方对于此类产品的药学评价也缺乏实际审评经验。为此, 本文总结了 rAAV 基因治疗产品的最新研究进展, 从原材料、生产工艺及质量控制等方面对此类产品的药学评价考虑要点展开讨论, 以期促进此类产品的临床转化与应用。

关键词: 重组腺相关病毒; 基因治疗; 药学评价; 生产工艺; 质量控制

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)08-1965-06

Chemistry, manufacturing and control considerations of rAAV-based gene therapy products

LIU Bo-ning, XU Long-chang, HAN Dong-mei, LUO Jian-hui*

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

Abstract: Recombinant adeno-associated virus (rAAV)-based vector has shown great promise for human gene therapy, due to its advantage in eliciting long-term transgene expression, absence of adverse effect, infection ability to both dividing and non-dividing cells, non-genomic integration, and low immunotoxicity. To date, three AAV-based products have been authorized to enter European and American markets, and more than 200 rAAV-based candidates are in the process of clinic trails. Nevertheless, domestic industry is facing the challenge of manufacturing clinical grade rAAV vector, and regulatory agencies are lack of practical experience in assessing such products. Herein, this paper summarizes the latest research progress of rAAV-based gene therapy products, and discusses some quality assessment concerns in raw materials, manufacturing process and quality control, expecting to promote its clinical transformation and application.

Key words: recombinant adeno-associated virus; gene therapy; chemistry manufacturing controls review; manufacturing process; quality control

基因治疗制品通过将外源基因导入靶细胞或组织, 替代、补偿、阻断或修正特定基因, 以达到治疗疾病的目的^[1]。根据目的基因的导入方式, 可分为以嵌合抗原修饰 T 细胞产品^[2]代表的体外疗法 (*ex vivo*) 和以

病毒载体为代表的体内疗法 (*in vivo*)。与其他病毒载体 (逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、单纯疱疹病毒等) 相比, 重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV) 载体具有结构简单、无致病性、可同时感染分裂期/非分裂期细胞等显著优点。目前国际上已经批准上市的病毒类体内基因治疗产品, 如 glybera、luxturna 和 zolgensma 等均采用了 rAAV 载体, 同时尚有超过 200 个 rAAV 候选药物处于临床研究阶段^[3]。

收稿日期: 2019-09-29; 修回日期: 2019-11-20.

基金项目: 中国药品监管科学行动计划重点项目“细胞和基因治疗产品技术评价与监管体系研究”。

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0789

最近一年, 已有多家国内企业按照“药品”申请开展 rAAV 基因治疗产品的临床试验或注册申请前的沟通交流。但是, 相对于以细胞为载体的体外基因治疗产品而言^[2,4], 国内病毒载体基因治疗产品相关的技术指导原则的制定和发布相对滞后^[1,5], 监管部门缺乏实际产品的审评经验。本文结合国外 rAAV 基因治疗产品的最新研发进展和已上市 rAAV 产品的审评实例, 探讨此类产品药学研究内容与评价要点, 以期促进国内同类产品的注册申报与临床转化。

1 rAAV 基因治疗产品的研发进展与评价难点

1.1 rAAV 用于体内基因治疗的显著优势

AAV 是一类无包被膜, 具有二十面体结构, 大小为 20~26 nm 的细小病毒。AAV 最初作为腺病毒的污染成分被发现, 系天然的复制缺陷型病毒, 只有在辅助病毒(腺病毒、疱疹病毒)存在的条件下才具有复制能力, 同时对人类无致病性, 具有良好的生物安全性。AAV 含有大小 4.7 kb 单链 DNA 基因组, 其中包括可编码病毒复制和整合相关蛋白的 *rep* 基因、编码衣壳蛋白的 *cap* 基因和编码辅助激活蛋白的 *app* 基因等。根据衣壳蛋白的不同, AAV 可分为 12 种血清型和 100 多种变体。不同血清型对人体不同组织的靶向性和感染效率存在差异, 如: AAV8 对肝脏组织细胞感染效率较高, AAV1 和 AAV9 则分别对心脏细胞和骨骼肌细胞更为敏感。与其他病毒载体相比, 由 AAV 改造而来的 rAAV 载体具有结构简单、无致病性, 可感染分裂期/非分裂期细胞, 不整合至基因组等优势, 是目前基因治疗中应用较多的病毒载体之一。目前在临床试验中应用最多的是 rAAV2, 而 rAAV9 可穿过血脑屏障, 可应用于治疗中枢系统疾病^[3]。

1.2 rAAV 基因治疗产业发展现状

据不完全统计 (<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>), 目前至少有 238 个 rAAV 基因治疗产品正在开展临床试验, 3 个 rAAV 基因治疗制品已在欧美注册上市(表 1)^[6,7]。rAAV 基因治疗制品的适应症主要集中在单基因遗传病领域, 包括血友病、杜氏肌营养不良症、先天性黑蒙症、脂蛋白脂酶缺乏症和阿尔茨海默症

等。与传统的替代疗法相比^[8], rAAV 制品在基因层面进行修复, 单次给药即有可能达到长期疗效。近年, 国际上多家传统制药公司通过并购等方式进入此领域, 如 Novartis 公司并购 AveXis Inc, Pfizer 并购 Bamboo Therapeutics。在我国, 2003 年首个基因治疗产品“重组人 p53 腺病毒注射液”上市后^[9], 很长一段时间内基因疗法行业发展陷入低谷。但近年, 药审中心陆续收到了多家国内企业申请开展 rAAV 制品临床试验的沟通交流申请。

1.3 rAAV 基因治疗产品药学评价的内容与难点

相对于工艺研究成熟、质量表征充分的重组蛋白产品^[10-12], rAAV 制品的药学开发与评价存在着诸多挑战。如: 原材料方面, 病毒包装细胞、培养基中动物源成分均存在内外源因子污染可能; 永生化细胞或肿瘤细胞系作为生产细胞基质时, 存在着癌基因转移的风险。生产工艺方面, 目前应用较多的多质粒瞬转工艺批间一致性差、产能放大受限。若使用辅助病毒生产, 终产品存在病毒污染/残留的可能。质量研究方面, 病毒颗粒存在多种复杂的产品相关杂质(空病毒、错误 DNA 包装病毒、不具感染力病毒等), 较难在质控中通过单一项目控制产品纯度。效力分析方法需体现目的基因转移、表达与功能, 分析方法开发具有难度, 且自制标准品稳定性差。上述问题均为 rAAV 基因治疗产品的药学研究与加速审评提出了挑战^[13]。

目前, 国内外尚无针对 rAAV 基因治疗产品专门的技术指导原则。审评实践中主要依据的技术指导原则仍然是 2003 年 3 月发布的《人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》^[5]。此外, 2020 版《中国药典》中拟增加的《人用基因治疗制品总论》将对病毒类基因治疗制品的生产和质量控制提出通用性技术要求^[1]。国际上, 欧盟 EMEA 于 2018 年发布了《关于基因治疗产品质量、非临床和临床指导原则》^[14], 美国 FDA 也在同年发布了《人类基因疗法申请临床试验药学信息》^[15]等 6 项基因治疗指导原则。上述指导原则和技术文件, 将是未来此类产品药学评价的主要技术依据。

Table 1 The recombinant adeno-associated virus (rAAV) - based gene therapy in clinic^[6,7]

rAAV-based drug or candidate	Approved date /Stature	Vector-gene	Sponsor	Indication
Glybera	2012/EMEA	AAV1-LPL	UniQure	Lipoprotein lipase deficiency
Luxturna	2017/FDA	AAV2-RPE65	Spark	Inherited retinal dystrophy
Zolgensma	2019/FDA	AAV9-SMN1	AveXis	Spinal muscular atrophy
	III	AAV2-REP1	Nightstar	Choroideraemia
	III	AAV2-RPE65	Spark	LCA
	III	AAV2-ND4	GenSight	LHON
	III	AAV5-FVIII	BioMarin	Haemophilia A

2 AAV 基因治疗产品的药理学研究内容与评价考虑

下文将结合 rAAV 基因治疗产品研发进展, 重点讨论其原材料、生产工艺与质量研究等部分的药理学研究内容与评价考虑。

2.1 原材料相关研究内容与评价

2.1.1 病毒分子设计

rAAV 的载体设计应基于临床有效性和安全性, 一般为靶向特定组织或细胞, 删除与毒力、致病性或复制能力相关的基因, 以确保制品的安全性。同时, 设计应考虑载体基因组的大小、包装效率和表达效率, 并尽可能减少与体内相关病毒的同源性, 以避免形成复制型病毒。构建病毒的质粒应考虑抗生素抗性基因引入的风险, 一般不得使用氨苄青霉素抗性基因。

2.1.2 生产细胞基质

目前产业界用于 rAAV 生产的细胞基质既有哺乳动物细胞 (HEK293、BHK)、人肿瘤细胞系 (HeLa、A549), 也包括昆虫细胞系 (SF9) 等。包装细胞应进行充分的鉴定并建库。鉴定项目一般包括鉴别、纯度、基因型/表型、成瘤性/致瘤性、遗传稳定性和引入序列等。除常规无菌、真菌和支原体外, 尤其要关注细胞基质的种属特异性病毒。如: HEK293 细胞应检定 CMV、HIV-1/2、HILV-1/2、HH-V6/8、JV virus、BK virus、EBV、parvovirus B19、HBV、HPV 和 HCV 等病毒^[16]; SF9 细胞应检定螺旋原体、弹状病毒等昆虫病毒^[15]。用人肿瘤细胞系作为包装细胞, 还应充分评估其致瘤性和成瘤性的风险, 以及致瘤病毒的感染情况等, 如: HeLa 细胞为来自人子宫颈癌组织的肿瘤细胞, 已知含有 50 个拷贝数的 HPV-18 基因组和病毒 E6/7 基因序列。因此, 质量控制项目中建议检定转移基因残留^[17,18]。

2.2 生产工艺相关研究与评价

2.2.1 AAV 制品上游工艺

2.2.1.1 多质粒瞬转法 最早的 rAAV 生产工艺采用质粒、辅助病毒感染包装细胞生产。目前采用较多的是三质粒共转染 HEK 293 生产工艺, HEK293 细胞中含有腺病毒 (adenovirus, AdV) 的 *E1a* 和 *E1b* 基因, 共转染转移质粒 (含目的基因和 ITR 序列)、结构质粒 (含 *rep/cap* 基因) 和辅助质粒 (复制病毒基因 *E2A*, *E4*, *VARNA* 等), 48~72 h 后即可重组包装 rAAV。该方法适用于多种血清型 rAAV, 发酵产率一般可达每毫升 10^{14} V.G. (vector genome), 一般可满足早期临床试验 rAAV 用量 ($<10^{15}$ V.G.)。但是, 受贴壁培养方式所限, 多质粒瞬转工艺较难满足商业化生产需求 ($>10^{16}$ V.G.)。

2.2.1.2 稳转生产细胞法 构建含有辅助基因 *rep/cap* 和目的基因的稳转 HeLa 细胞系, 经腺病毒感染后也可包装出 rAAV 病毒^[17]。尤其是采用可悬浮培养的

HeLa S3 细胞系, 稳转细胞生产法可直接放大至 2 000 L 规模。与之类似, 构建含有 *ICP27* 基因的 BHK 细胞, 经转染含有辅助基因和目的基因的复制缺陷型 d27.1 HSV 后, 也可高效表达 rAAV^[19]。但是, 稳转细胞法的主要缺点在于, 细胞构建和遗传稳定性研究较为耗时, 且生产过程中使用辅助病毒存在病毒安全性风险。

2.2.1.3 杆状病毒感染昆虫细胞法 杆状病毒具有高度的种属特异性, 不感染脊椎动物, 能将 rAAV 基因和辅助功能的反式作用元件转移至 SF9 昆虫细胞中。因此, 近年也开始应用于 rAAV 的大规模生产。该方法的优点在于杆状病毒生物安全性好, 感染效率高, 生产工艺便于放大。但质量控制项目中也应考虑杆状病毒及 DNA 相关物质残留^[20]。

对于 rAAV 上游生产工艺, 药理学评价建议关注关键工艺的工艺开发与验证, 如采用多质粒瞬时转染或加入辅助病毒等工序中, 应通过工艺开发与验证说明关键工艺参数的控制范围及中间体验收标准, 如不同载体配比、转染试剂用量、辅助病毒与生产细胞的感染复数等^[1,14,21]。

2.2.2 AAV 制品下游工艺

2.2.2.1 纯化工艺 rAAV 纯化工艺一般包括细胞培养液收获、化学法/物理法裂解细胞、benzonase 酶消化去除核酸物质、多步层析和密度梯度离心、置换制剂处方缓冲液等工序, 其中, 亲和层析模拟细胞受体的结合作用捕获 rAAV。如: 硫酸肝素填料可特异性结合 rAAV2, AVB 琼脂糖填料可结合 1、2、3、5 和 8 等多种血清型 rAAV^[22]。对于空载体的去除, 目前多采用碘克沙醇和氯化铯超速离心法。值得关注的是, 中国药典相关总论^[1]中明确指出, “除另有证明其合理性外, 不得使用氯化铯-溴化乙锭密度离心法进行基因治疗产品的纯化”。

2.2.2.2 病毒清除验证 如上所述, 采用杆状病毒-昆虫细胞或稳转细胞系 (HeLa) 生产工艺时会使用杆状病毒或辅助病毒 (HSV、Ad5 等)。因此, 下游工艺应增加特定病毒去除/灭活工序。如: 采用表面活性剂 Triton X-100 (0.5%, v/v) 和增加病毒过滤工序去除收获液中残留杆状病毒; 采用加入表面活性剂、低 pH 值灭活等工序去除 HSV 病毒; 采用离子交换法、短时间加热 (52 °C、10 min) 和纳滤等工序去除腺病毒等^[23]。

2.2.2.3 制剂处方 由于 rAAV 衣壳蛋白对温度和 pH 值变化并不敏感, rAAV 制品的制剂处方开发相对简单。通常惯用在盐溶液中加入 200 mmol·L⁻¹ 硫酸镁或 0.001% 泊洛沙姆 F68 避免产生聚体, 基本可支持长期保存 (-65 °C) 和运输稳定性。

对于 rAAV 下游生产工艺, 药理学评价建议结合产

品相关杂质、过程相关杂质的去除效率评估纯化工艺合理性与稳健性。对于使用辅助病毒的生产工艺应结合收获液中病毒含量,进行病毒去除/灭活工艺验证,综合评估病毒的残留安全性。

2.3 质量控制相关研究与评价

2.3.1 相关杂质研究

2.3.1.1 工艺相关杂质 rAAV 制品的工艺相关杂质包括病毒包装与纯化工艺中引入的宿主蛋白、宿主 DNA、辅助病毒、质粒、血清和氯化铯等组分。由于病毒包装细胞通常含有致癌基因,如 HEK293 细胞内含有 *E1A* 的腺病毒基因, HeLa 细胞内的 *E6*、*E7* 致癌基因。因此,一般对于宿主细胞残留 DNA 含量应小于 10 ng/Dose,且残留 DNA 片段应小于 200 bp^[24];

2.3.1.2 产品相关杂质 rAAV 制品的相关杂质包括未包装基因的空病毒、包装错误基因(宿主 DNA、不完整目的基因、辅助病毒基因等)的病毒、无感染活性的病毒颗粒、聚体或氧化形式的病毒颗粒等。这些产品相关杂质不仅不能实现目的基因在靶细胞的表达,还可在临床上引起免疫原性或基因毒性。如:多质粒顺转体系中,一般空病毒占比可以达到 50%~98%^[25]。空病毒不具感染能力,且容易形成病毒聚体和降解,引起体内免疫反应。因此,质量研究中应采用 A260/A280、透射电镜、分析性离心和质谱等技术检测空病毒含量^[24]。

复制型腺相关病毒(replication-competent AAV, rcAAV)是由于同源/非同源重组发生后,rAAV 病毒同时包装 *rep* 和 *cap/AAP* 等基因所产生的产品相关杂质。rcAAV 在辅助病毒存在的条件下可以进行复制扩增。rcAAV 的检测一般采用在辅助病毒存在下使用敏感细胞进行扩增,细胞裂解液经过多次扩增传代后,采用 Southern blot 和 qPCR 法测定 *rep* 或 *cap* 基因^[25]。如:已进入临床试验的 rAAV 制品 scAAV2/8-LP1-hFIXco 采用 qPCR 法控制 rcAAV 含量限度低于 $1/2.25 \times 10^6$ ^[26]。目前也有报道称采用优化后的多质粒瞬转工艺,rcAAV 含量限度可低于 $1/10^8$ V.G.^[16]。

2.3.2 一般质量控制项目

rAAV 病毒生产质量控制包括过程控制与终产品放行检测(表 2)^[16,23,24,27]。如:病毒包装用质粒应进行鉴别、含量、纯度、宿主细胞 DNA 残留、转染效率、细菌内毒素、无菌等质量控制;病毒收获液应控制外源因子(无菌、支原体等)、外源病毒、目的病毒等检测;rAAV 原液与制剂放行项目一般包括外观、理化性质(pH 值、渗透压)、病毒滴度(物理滴度、感染滴度)、纯度(蛋白纯度、吸光度比值、宿主 DNA 残留、质粒 DNA 残留、核酸酶残留)、效力(目的基因表达、体外活性、体内活性)、安全性(内毒素、无菌、rcAAV)^[27]。此外,对于眼部用药的

Table 2 Release test of clinical AAV-based product^[16,23,24,27]

	Test	Method
Physiochemical	Appearance	Visual inspection
	pH	Potentiometry
	Osmolality	Osmometry
Purity	Protein	SDS-PAGE/silver staining
	Aggregation	Dynamic light scattering
	Empty/intermediate particles	Ratio vg(qPCR)/vp(ELISA) or electron microscopy
	OD260/OD280	Spectrophotometry
	Host cell DNA	q-PCR
	Plasmid DNA	q-PCR
Potency	HKE293/BSA/Benzonase	ELISA
	Vector genome titler	q-PCR
	Infectivity	Infectious assay
	Gene expression <i>in vitro</i>	ELISA
Safety	Endotoxin	LAL assay or rabbit pyrogen assay
	Sterility	Sterility test
	Replication-competent AAV	Serial infection on permissive cell/rep or cap qRCR

rAAV 制剂,内毒素含量应不高于 2.0 EU/dose/eye 或 0.5 EU/mL,应按照眼用制剂控制不溶性微粒(USP<789>)、产品的放行检测应包括配置后产品等^[28]。

2.3.3 效力测定方法

对于 rAAV 制品的效力测定方法,应体现其病毒物理滴度、感染活性及生物活性。一般在临床试验早期可采用 qPCR 法测定病毒基因组,敏感细胞或靶向细胞测定其感染能力和目标产物表达能力表征产品效力。关键性临床试验开展后应进一步开发反映产品作用机制的体外酶活法或体内功能实验法。如:SPK-RP65 在进入 III 期临床后,通过转染指示细胞(HEK293-LRAT)后测定 RPE65 蛋白酶促反应产物视黄醇含量来计算产品效力^[29]。值得指出的是,对于 qPCR 法测定病毒基因组应采用线性 DNA 绘制标准曲线,若采用超螺旋 DNA 作为参照品,载体基因组含量测定值显著高于真实值^[16]。

3 rAAV 基因治疗产品药学评价实例分析

目前,国际上仅有 3 个 rAAV 基因治疗产品(glybera、luxturna 和 zolgensma)获批上市,国内此类产品多处于研发早期阶段,工业界与监管方对于 rAAV 基因治疗产品的药学研究与评价均缺乏实践经验。下文拟结合国外已上市产品审评报告中披露信息,对此类产品的药学评价考虑要点及常见问题进行讨论。

3.1 Glybera

Glybera(alipogene tiparvovec, AAV1-LPLS447X)是 Amsterdam Molecular Therapeutics 公司开发的携带

人 *LPLS447X* 基因的 rAAV2 型基因治疗产品, 临床上肌肉注射用于治疗成人脂蛋白脂肪酶缺陷症。本品工艺开发过程中存在重大工艺变更: 第一代生产工艺 (AMT-010) 采用 HEK293 表达系统, 商业化生产工艺 (ATM-011) 则采用杆状病毒-昆虫细胞系统表达, 因此开展了药学和非临床可比性研究。下游工艺中采用工艺规模缩小模型对包膜病毒、非包膜病毒去除能力进行了工艺验证。质量研究对 3 批连续生产批次制品进行了充分的表征研究, 其中包括: 组分 (基因组完整性/大小、蛋白质分析、分子质量、衣壳蛋白); 物理性质 (颗粒大小、病毒颗粒糖基化修饰); 一级结构 (序列确证、蛋白鉴定); 高级结构 (透视镜、分析超速离心); 生物活性 (感染性颗粒、比活、效力) 等。EMA 审评认为, 由于细胞收获液中含有大量感染性杆状病毒, 且下游工艺不能提供足够的病毒去除效果, 要求申请人补充提供临床注射杆状病毒残留 DNA 的风险分析报告, 并建议产品放行检测项目中增加感染性杆状病毒残留和 rcAVV 等检查项目。并且, EMA 审评建议产品上市后生产工艺应进一步增加杆状病毒去除工序 (如病毒过滤), 后期应提高杂质 (包装细胞 DNA、残留 Rep/Cap 基因、rcAAV、感染性杆状病毒等残留) 检测方法灵敏度^[30,31]。

3.2 Luxturna

Luxturna (voretigene neparvovec-rzyl, SPK-RPE65) 系美国 Spark Therapeutics 公司研发的携带人 RPE65 基因 rAAV-2 型基因治疗制品, 临床上视网膜下注射用于治疗先天性黑朦症。产品采用三质粒共转染贴壁 HEK293 细胞, 滚瓶生产工艺。生产工序包括: 细胞扩增、转染、培养基置换、收获培养液、切向流过滤、均质、离子交换色谱、密度梯度离心、制剂缓冲液置换和过滤等; 本品 III 期临床试验前曾发生场地、包装容器等工艺变更, 采用“Side-by-side”法比对产品的方法进行产品可比性研究。产品放行检测项目包括: 理化 (外观、pH 值、浓度、可抽取体积)、鉴定 (目的基因)、含量 (基因组浓度)、效力 (目的基因表达、体外活性)、纯度和安全性项目 (内毒素、颗粒物、无菌) 等, 质量研究中对宿主 DNA、质粒 DNA、EIA 基因和牛血清蛋白等工艺相关杂质残留进行控制。FDA 审评认为, 本品上市后应继续完成包装细胞 HKE293 稳定性及产品实时稳定性等研究^[24,32]。

3.3 Zolgensma

Zolgensma (onasemnogene abeparvovec, AVXS-101) 系 AveXis 公司开发的携带运动神经元蛋白 1 (survival motor neuron, SMN) 基因的 rAAV9 型基因治疗产品, 临床上静脉注射治疗儿童脊髓肌肉萎缩症。本品在工艺开发过程中, 结合目标质量属性采用风险评估方法

确定本品关键质量属性, 采用工艺规模缩小模型确定工艺设计空间并进行工艺验证; 本品在关键性临床试验开展前、注册上市前, 先后发生场地、工艺和制剂处方等变更。FDA 审评判定工艺变更前后产品纯度和 VG 单位效力保持一致; 本品的“效力”检测项中既包括定量检测靶细胞 SMN 蛋白表达水平, 也包括体内半定量法检测小鼠“生存率”。值得关注的是, 由于本品在 I 期临床试验开展过程中“含量”分析方法缺乏精确度与准确度, 44 个月后采用更新的方法重新修正临床给药剂量。此外, 在本品稳定性实验中, 观测到“含量”和“效力”有所下降^[33]。

4 结语

目前, 国际上以 rAAV 作为外源基因导入的平台技术日益成熟, 通过病毒外壳蛋白化学修饰或定向进化等技术, 提高载体靶向性与感染效率, 降低体内免疫原性^[3]。由于 rAAV 制品在单基因遗传疾病治疗领域具有不可比拟的临床优势, 科学界普遍认为基因疗法真正进入临床实践的时代已经到来^[6,34]。与此同时, 国际上对于基因治疗的监管趋势正在发生变化, FDA 和 NIH 联名在《新英格兰医学杂志》上发表文章表示, 并没有充分的数据证明基因疗法存在特殊的、不可预测的安全风险, 未来美国将逐步简化监管程序, 鼓励基因疗法的开发^[35]。在我国, 长期以来基因与细胞制品的监管科学研究相对滞后^[36]。2019 年, 国家药品监督管理局启动“细胞和基因治疗产品技术评价与监管体系研究”课题, 开展包括 rAAV 在内的基因治疗制品技术评价考虑要点的相关研究。本文结合 rAAV 制品最新研究进展及审评案例, 探讨此类产品的药学研究内容与评价要点, 以期为国内此类产品按照“药品”进行注册申报提供参考。

作者贡献: 刘伯宁执笔; 徐隆昌、韩冬梅补充校对; 罗建辉审核。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. General theories of human gene therapy products (draft) [人用基因治疗制品总论 (草案)] [EB/OL]. 2019. <http://www.chp.org.cn/view/ff8080816a583947016b400a6458575e?a=BZSWZP.pdf>.
- [2] Liu BN, Cao Y, Lu JQ, et al. Regulatory perspective for chemistry manufacturing and controls considerations in chimeric antigen receptor-modified T cell therapy [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1637-1644.
- [3] Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery [J]. Nat Rev Drug Discov,

- 2019, 18: 358-378.
- [4] Liu BN. CMC considerations of CAR-T therapy for IND application [C]. Beijing: 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), 2018.
- [5] NMPA. Guidance for human gene therapy and quality control of DP (人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则) [EB/OL]. 2003. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=37.doc>.
- [6] Dunbar CE, High KA, Joung JK, et al. Gene therapy comes of age [J]. *Science*, 2018, 359: eaan4672.
- [7] Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 358-378.
- [8] Jia DC, Liu BN, Luo JH. Research progress in recombinant coagulation factor VIII products and their pharmaceutical assessment [J]. *Chin J New Drug* (中国新药杂志), 2019, 28: 1681-1687.
- [9] Peng Z. Current status of gene therapy in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16: 1016-1027.
- [10] Liu BN, Bai Y, Luo JH. Biosimilarity study regarding product quality of recombinant monoclonal antibodies as biosimilars [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2017, 52: 1194-1199.
- [11] Liu BN, Luo JH. Research and development of innovative antibody-based drugs [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2017, 52: 1811-1819.
- [12] Liu BN, Xu GL, Luo JH. Chemistry, manufacturing and controls regulatory considerations for marketing authorization application of therapeutic antibody in China [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2019, 54: 2126-2134.
- [13] FDA. Facilitating expedited development of advanced therapy products [EB/OL]. 2019. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics>.
- [14] EMEA. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products [EB/OL]. 2018. <https://www.ema.europa.eu/en/enterprisemanagement.com>.
- [15] FDA. Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug application (INDs) [EB/OL]. 2018. <https://www.fda.gov/media/113760/download>.
- [16] Wright JF. Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies [J]. *Gene Ther*, 2008, 15: 840-848.
- [17] Tatalick LM, Gerard CJ, Takeya R, et al. Safety characterization of HeLa-based cell substrates used in the manufacture of a recombinant adeno-associated virus-HIV vaccine [J]. *Vaccine*, 2005, 23: 2628-2638.
- [18] FDA. FDA briefing document: cell lines derived from human tumors for vaccine manufacture [EB/OL]. 2012. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines>.
- [19] Chulay JD, Ye GJ, Thomas DL, et al. Preclinical evaluation of a recombinant adeno-associated virus vector expressing human alpha-1 antitrypsin made using a recombinant herpes simplex virus production method [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22: 155-165.
- [20] Felberbaum RS. The baculovirus expression vector system: a commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors [J]. *Biotechnol J*, 2015, 10: 702-714.
- [21] Clément N, Grieger JC. Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials [J]. *Mol Ther Methods Clin Devel*, 2016, 3: 1-7.
- [22] Wang L, Blouin V, Brument N, et al. Production and purification of recombinant adeno-associated vectors [M] // Snyder RO, Moullet P, Editors. *Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols*. Alachua: Humana Press, 2011: 361-404.
- [23] Penaud-Budloo M, Francois A, Clement N, et al. Pharmacology of recombinant adeno-associated virus production [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018, 8: 166-180.
- [24] Wright JF. Product-related impurities in clinical-grade recombinant AAV vectors: characterization and risk assessment [J]. *Bio-medicines*, 2014, 2: 80-97.
- [25] Schnodt M, Buning H. Improving the quality of adeno-associated viral vector preparations: the challenge of product-related impurities [J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2017, 28: 101-108.
- [26] Allay JA, Sleep S, Long S, et al. Good manufacturing practice production of self-complementary serotype 8 adeno-associated viral vector for a hemophilia B clinical trial [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22: 595-604.
- [27] Snyder RO, Audit M, Francis JD. rAAV vector product characterization and stability studies [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 807: 405-428.
- [28] FDA. Human gene therapy for retinal disorders: draft guidance for industry [EB/OL]. 2018. <https://www.fda.gov/media/113814/download>.
- [29] Couto LB, Buchlis G, Farjo R, et al. Potency assay for AAV vector encoding retinal pigment epithelial 65 protein [C]. Seattle: ARVO Annual Meeting, 2016.
- [30] EMA. Assessment report: glybera [EB/OL]. 2012. <https://www.nature.xileisou.com/articles/nrd3835-c1.pdf>.
- [31] Bryant LM, Christopher DM, Giles AR, et al. Lessons learned from the clinical development and market authorization of glybera [J]. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2013, 24: 55-64.
- [32] FDA. CMC review of luxturna [EB/OL]. 2017. <https://www.fda.gov/media/110141/download>.
- [33] FDA. CBER CMC BLA review memorandum: zolgensma [EB/OL]. 2019. <https://www.fda.gov/media/127961/download>.
- [34] High KA, Roncarolo MG. Gene therapy [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381: 455-464.
- [35] Collins FS, Gottlieb S. The next phase of human gene-therapy oversight [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379: 1393-1395.
- [36] Wang JZ. Overview of biopharmaceuticals regulatory science development in China [J]. *Chin J New Drug* (中国新药杂志), 2018, 27: 2465-2471.