·新药注册与审评技术·

重组表达生物制品生产中病毒清除验证策略研究进展

赛文博,于鹏丽,李小静,韦　薇
(国家药品监督管理局药品审评中心,北京 100022)

[摘要]　采用真核表达系统生产的重组生物制品,由于其生产基质的特殊性而具有潜在的病毒污染风险,且风险引入方式多样。当前,世界各主要监管机构均发布了关于此类产品生产过程中病毒安全保障的指导原则,其中由人用药品注册技术要求国际协调会议(ICH)发布的 Q5A(R1)适用国家广泛、认可度较高。本文将从指导原则的适用范围、新型检测和分析手段、现行工艺验证方法发展、新增工艺验证途径、先进制造技术条件下的工艺验证和风险消除策略 5 个方面,对目前重组表达生物制品生产中病毒清除工艺的研究方向进行讨论,旨在探索技术要求的科学性,引起业界和监管机构的共同思考。

[关键词]　重组表达生物制品;病毒清除验证;指导原则
[中图分类号] R95　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2021)10-0876-04

Research progress in viral clearance validation strategy of recombinant biological products

SAI Wen-bo, YU Peng-li, LI Xiao-jing, WEI Wei
(*Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing* 100022, *China*)

[**Abstract**]　Because of the particularity of the production cell substrates, the potential risk of virus contamination in recombinant biological products produced by eukaryotic expression system could be introduced in various ways. Major regulatory agencies in the world-wide have issued guidelines about the viral safety in the production of such products, among which Q5A (R1), issued by the International Council for Harmonization (ICH), is widely accepted and highly recognized by different countries. In order to explore the scientific nature of the technical requirements and arouse the common thinking of the industry and regulatory authorities, this article discussed the current research progress in virus removal and inactivation process in the production of recombinant biological products from five aspects, which are the applicable scope of the guideline, new virus assays and analytical methods, the progress of validation approaches, new validation method that have emerged or evolved, and virus clearance validation and risk mitigation strategies for advanced manufacturing.

[**Key words**]　recombinant biological products; viral clearance validation; guideline

重组生物技术产品中,以真核表达系统生产的单克隆抗体、融合蛋白和活性酶等产品大多采用静脉注射或静脉滴注的临床给药方式,这对产品本身的质量属性提出了极高要求。然而无论是已广泛应用的中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell, CHO),还是刚刚开始崭露头角的草地贪夜蛾细胞(spodoptera frugiperda cell, SF9)等,均无可避免地存在受到各类病毒污染的风险。这些风险引入途径多样,可能来自宿主细胞库、生产用原辅料、产品生产工艺过程及环境等。

世界各主要监管机构均已陆续针对性地制定、发布关于重组生物技术产品中病毒安全性研究相关指导原则,如美国 FDA 于 1997 年发布的“Points to Consider in the Characterization of Cell Lines used to

[作者简介]　赛文博,男,助理研究员,主要从事生物制品药学技术审评工作。联系电话:(010)85243042,E-mail:saiwb@cde.org.cn。
[通讯作者]　韦薇,女,主任药师,主要从事生物制品评价工作。联系电话:(010)85243075,E-mail:weiw@cde.org.cn。

Produce Biologicals”,欧洲 EMA 于 1996 年发布的“The Design,Contribution and Interpretation of Studies Validating the Inactivation and Removal of Viruses”,原国家药品监督管理局于2005 年发布的《生物物质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》等,以上指导原则均适用于重组生物技术产品的上市申请阶段。目前,明确适用于临床前研究阶段的指导原则仅有 EMA 于 2008 年发布的“Guideline on Virus Safety Evaluation of Biotechnological Investigational Medicinal Products”。同时,由于全球主要监管机构和行业协会均已加入人用药品注册技术要求国际协调会议(ICH),其于 1999 年发布的 Q5A(R1):“Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin”已成为重组生物技术产品上市申请阶段病毒安全控制评价的最主要指导原则之一。但是,经过近 20 年的发展,重组生物技术产品从表达体系、产品类型、检测技术和生产经验等方面均已有巨大的进步,该指导原则已在一定程度上落后于产业的发展。2019 年 11 月,ICH 已正式启动 Q5A(R1)的修订工作。本文将结合这一议题,对目前重组生物技术产品生产工艺中的病毒清除工艺研究方向进行梳理。

1 修订背景及计划

本次指导原则修订计划起始于 2019 年 6 月的 ICH 阿姆斯特丹会议,由非正式质量讨论组(Informal Quality Discussion Group,IQDG)发起本次议题修订。2019 年 9 月全球主要 ICH 成员机构指派专家成立非正式工作组(Informal Working Group,IWG),其中包括我国监管机构和行业协会代表各 1 名。2019 年 11 月 ICH 新加坡会议上经 IWG 讨论认为 Q5A(R1)目前主要存在问题包括:① 由于适用范围不涉及新型细胞基质,以及利用其生产的新型生物技术产品,导致各监管机构审评尺度和技术要求的一致性面临挑战。② 缺乏对于新兴分析技术的明确要求,如下一代测序技术(next generation sequencing,NGS)在内、外源病毒检测中的应用指南等。③ 病毒清除工艺验证策略要求已落后于生产经验的积累,各监管机构对先验知识等新概念接受程度不一。④ 缺乏对连续制造等先进生产技术的支持等。因此 IWG 一致同意正式启动修订,并正式成立专家工作组(Experts Working Group,EWG)。会议同时拟定了本次修订工作的概念文件和工作计划,并在 ICH 官方网站对外公布,确定分别由 FDA 和 EMA 派出的专家作为汇报人和监管机构主席。按照原定工作计划本次修订应在 2020 年 11 月完成技术文件初稿,2021 年 6 月进入第二阶段,并最终在 3 年内完成本次修订。ICH Q5A(R2)计划于 2022 年 11 月联合签署生效。但目前由于新型冠状病毒肺炎疫情的影响,自新加坡会议后的面对面会议均已取消并改为线上讨论,给协调修订工作带来一定难度,实际的修订进度可能略慢于计划。

2 主要研究方向

2.1 指导原则适用范围 ICH Q5A(R1)明确其适用范围包括从特定细胞开始的细胞培养物中所提取的产品[1]。因此,除干扰素、单克隆抗体、重组 DNA 制品以及腹水内培养的杂交瘤细胞中的提取产品外,逐步广泛应用的新型活性物质也满足这一定义的要求。例如,葛兰素史克公司利用 SF9 细胞生产的人乳头瘤病毒(human papilloma virus,HPV)疫苗 Cervarix® 为病毒样颗粒(virus like particle,VLP)产品;诺华公司生产用于治疗 2 岁以下脊髓性肌萎缩症儿童患者的 Zolgensma® 则是以腺相关病毒 9(adeno associated viruses 9,AAV9)作为载体。目前,新活性物质的病毒清除工艺经验积累仍较为薄弱,且新细胞基质的使用可能引入各类已知或未知的新型病毒。因此指导原则中风险识别和检定策略的更新、现有病毒灭活清除工艺对新型病毒的适用性、产品的再组装风险等均应重新考量。

原则上,本次修订将基于细胞基质本身的特性,将已经充分表征的表达体系与新基质、新产品做出一定区分,并针对后者制定更为严格的病毒安全控制措施。此外,本次修订将不包括使用新型产品进一步制造的生物技术产品,如嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法(CAR-T)产品等。减毒活疫苗及灭活疫苗由于其特殊性,将依旧排除在本次修订范围之外。

2.2 新型检测和分析手段 针对生产用原辅料和易污染工艺步骤中间体的病毒检测,是保证产品安全的重要手段之一。Q5A(R1)已对目前通用的病毒检测方法及其局限性进行了汇总分析,主要包括电镜实验、体外细胞培养实验、相关物种体内感染性实验及聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)检测等。其中,体外培养法检测病毒依赖于指示细胞中病毒复制后诱导的可见效应,如细胞病变效应、血吸附或血凝作用,因此当病毒处于潜伏期、病毒复制不产生明显的效应或该病毒为宿主细胞的

内源性病毒时,体外培养法无法有效检测这些病毒。而对于动物体内的感染性实验,Gombold 等[2]通过对 16 种病毒体内、外筛选结果的广泛性和敏感性进行对比,指出了体内感染实验的局限性。此外,考虑到实验动物福利的不断发展,活体感染性实验的减少已成为趋势。

由此,PCR 和 NGS 等基于核酸技术基础的检测手段脱颖而出。PCR 技术目前已广泛应用于起始和收获材料中内、外源病毒的快速检定,如未加工收获液中 MVM 的检测,其缺点在于对于特定病毒引物序列的需求,致使其难以检测出未知的病毒风险。NGS 则由于其实验所需样本量小、对样品单一程度要求低、检测周期短等优势已在生物技术产品的病毒风险控制中逐渐引起重视。各国监管机构也积极参与到 NGS 的研究和应用中,例如,FDA 已经成立了病毒检测兴趣小组(ACDTIG);《欧洲药典》已接受 NGS 用于疫苗,来代替体内感染性实验(Ph. Eur. 9.3 第 5.2.3 章节、9.4 第 2.6.16 章节)。但客观上,广泛推广 NGS 仍存在一定障碍:检测结果的可靠性极度依赖于标准化的试剂和检测方法、完整度极高的数据库、性能优异的分析软件、富有经验的人员以及大数据的储存、传输和处理能力。同时,作为以核酸技术为基础的检测手段,其中难以避免地存在无法区分鉴别病毒序列是否具有感染性的问题。尽管部分跨国公司和监管机构已经在 NGS 的应用上有所积累,但是将其纳入 ICH 指导原则是一项全球性的挑战。因此,将 NGS 作为现有病毒检测分析方法的有力补充或替代,而非必须项目不失为一个更为妥当的选择。

2.3 现行工艺验证方法发展 大量的工业生产经验积累表明,在具有相似生产工艺的成熟平台技术上,结构、性质相似的重组生物技术产品在生产过程中,部分病毒清除步骤的工艺参数虽然不完全一致,但波动范围较小,且灭活、去除效率基本保持稳定,如纳滤清除等。因此,工业界已初步获得一定共识,即在特定前提条件下,该类产品生产工艺中病毒清除验证的部分内容可以参考企业在既往生产中所获得的知识或积累的经验。这些知识或经验通常作为药品开发、商业化规模生产及上市后变更中的决策工具,被称为“先验知识”,并已广泛应用于 ICH Q8,Q10,Q11 及 EMA 的各类指导原则中。

病毒清除工艺验证方法的灵活多样能够极大促进新产品开发速度的加快和研发成本的降低,但机遇与挑战并存。“先验知识”的使用尚需要确定其来源可靠性、生产工艺和产品之间的相似性、病毒灭活清除步骤的适用性、最差工艺条件的合理性、平台条件及既往运行次数等先决条件。依据现有数据,监管机构普遍认为在去污剂灭活、低 pH 灭活和纳滤去除步骤中,基于先验知识的“模块验证”具有较好的一致性,而在阴离子或阳离子色谱层析步骤中,考虑到不同产品的特性及各级纯化工艺中间体杂质的种类与含量的区别,存在较大的不确定性风险,先验知识不能完全准确地预测其他产品的病毒清除效果。

此外,采用新的在线加标法进行病毒清除验证也是目前讨论的方向之一,但是加标模型的确定及其对潜在病毒的代表性、对数减少值的评估等技术细节尚需逐步明确。

2.4 新增工艺验证途径 在单克隆抗体品种的经典下游纯化工艺中,蛋白 A 层析、阴离子层析、阳离子层析等色谱纯化步骤对于病毒的清除具有重要意义。Q5A(R1)中指出:纯化系统中的色谱分离柱和其他设备经一段时间反复使用后,其清除病毒的能力会发生变化,因此在使用若干次后,必须估测其清除病毒能力的稳定性后才能再用。但是近年来,工业界不断积累的经验引起了新的讨论。安进公司曾汇总其 8 个单克隆抗体产品,分别使用全新和使用寿命末的蛋白 A 层析和阳离子交换层析填料,对 MVM,PRV,Reo-3 和 X-MuLV 这 4 种病毒的清除效率进行了对比研究,结果显示各组新旧填料对病毒的去除效率未见显著差异,罗氏、礼来等公司也在独立研究中发现类似的结果[3-5]。在这种前提下,是否可以减免部分重复研究、减免实验的判定标准等都是值得深入思考的问题。

此外,更新新型细胞基质可能引入的病毒谱、明确已充分表征细胞系纯化工艺中总体清除率要求、增加对生产用起始原材料的控制策略以及对特定的病毒灭活清除步骤所使用的模式病毒提出建议等问题都将在本次修订中予以讨论。

2.5 先进制造技术条件下的病毒清除验证和风险消除策略 2019 年 2 月,BiosanaPharma 公司生产的奥马珠单抗生物类似药已获得 EMA 批准进入临床研究阶段,这是全球第一个完整意义上的由连续制造工艺生产的生物技术产品。集约化生产所带来的占地减少、耗时缩短甚至产品质量提高,在不断吸引业界关注的同时,也引起监管机构的思考。同月,

FDA 正式发布了《Quality Considerations for Continuous Manufacturing》,其中连续制造被定义为:由 2 个或多个操作单元组成的系统中,不间断加入的生产用原材料持续进入生产工艺,加工制造的产物则不断被移除,这样的流程构成了连续制造[6]。

连续制造的风险控制策略可能与传统的批生产模式截然不同,生产工艺中内、外源因子检测取样点的设置、原材料及产品信息的溯源、发现污染后的决策树等问题充满了成本与风险的博弈。生物来源生产用起始原材料的内、外源因子检测标准,使用一次性系统、不锈钢系统或混合系统进行生产工艺的病毒安全控制策略,病毒清除步骤的关键工艺参数,缩小模型对于连续生产模型的适用性和代表性,连续使用的层析柱和滤器在病毒清除效果上的验证,各工艺步骤最差条件的确定等问题都需要进一步的思考和明确。

3 结语

尽管到目前为止,从未有受病毒污染的重组生物技术产品进入消费者市场的案例,但这不代表现有的病毒清除工艺已足够充分。不断增加的新型细胞基质、产品类型和生产工艺技术演进仍在不断挑战各个利益相关方对于风险的识别和控制能力。在保证产品安全性的同时,兼顾患者对新药研发的临床需求、企业对提高研发生产效率的考量和全球监管的一致协调将是我们未来长期的研究课题。

[参 考 文 献]

[1] ICH Q5A. Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin [EB/OL]. [1998]. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5A_R1/Step4/Q5A_R1__Guideline.pdf.

[2] GOMBOLD J, KARAKASIDIS S, NIKSA P, *et al*. Systematic evaluation of *in vitro* and *in vivo* adventitious virus assays for the detection of viral contamination of cell banks and biological products [J]. *Vaccine*, 2014, 32(24): 2916 - 2926.

[3] BLÜMEL J, MA JF. Proceedings of the 2017 viral clearance symposium, session 3: resin lifetime[J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2018, 72(5): 488 - 497.

[4] MATTILA J, CURTIS S, WEBB-VARGAS Y, *et al*. Retrospective evaluation of cycled resin in viral clearance studies-A multiple company collaboration[J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2019, 73(5): 470 - 486.

[5] 韦薇, 徐隆昌, 白玉,等. 重组表达生物制品病毒安全性研究与评价的考虑[J]. 中国新药杂志, 2019,28(16): 1964 - 1968.

[6] FDA. Quality Considerations for Continuous Manufacturing[EB/OL]. [2019]. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/quality-considerations-continuous-manufacturing.

编辑:杨青/接受日期:2020 - 08 - 05