·重大新药创制专项巡礼·

关于基因治疗药物生物分布研究检测方法的探讨

王　欣,耿兴超,许明哲
(中国食品药品检定研究院,北京 100176)

[摘要]　生物分布研究是考察药物自给药部位进入人体以后到达靶器官的情况,和伴随时间延长的代谢消除趋势,是基因治疗药物特有的实验内容。人体暴露于外源基因片段时易于发生严重危害,需要采用适宜方法考察药物基因进入体内情况以预测其潜在安全风险。当前,多个监管机构均要求在非临床阶段开展此项研究,并且在申报临床试验之前提供相关数据。本文主要概括了生物分布研究实验内容、样本种类及特点、分析方法及原理和样本检测策略,以期望指导这项研究更加合理有效地开展,和更好地服务于我国新药安全性评价领域的监管科学工作。

[关键词]　基因治疗;基因治疗药物;生物分布;实时定量 PCR;qPCR 技术
[中图分类号] R969.1　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2021)11-0997-04

Discussions on the detection strategy and method for bio-distribution of gene therapy medicine

WANG Xin, GENG Xing-chao, XU Ming-zhe
(*National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 100176, *China*)

[**Abstract**]　The aim of bio-distribution study is to investigate the performance of medicine reaching the target organs after it was administrated to the human body, as well as its metabolism and clearance process with the time extending. Bio-distribution is a particular and feature research area specific for gene therapy medicines. It could lead severe hazards when human body exposing exogenous gene segments, thus it's necessary to adopt appropriate methods to monitor the state of gene segments of medicines inside the human body to predict potential safety risks. Currently, many regulatory authorities request to carry out bio-distribution research in preclinical study and provide relevant data and information before application in clinical trials. This article mainly generalizes the testing items, types and features of samples, analytical methods and detective strategy of bio-distribution study to provide the industry and regulatory agency with detailed and practical guidance for these kinds of researches and consequently prompt the regulation science in China in the field of preclinical evaluation and assessment.

[**Key words**]　gene therapy; gene therapy medicines; bio-distribution; real-time quantitative PCR; qPCR technology

生物分布(bio-distribution)是对药物在体内吸收、分布、代谢和排泄过程研究的重要内容,反映了药物进入人体后向各组织器官转运、代谢及蓄积的情况,对考察药物的药效作用和评估不良反应风险具有重要意义。基因治疗(gene therapy)是将人体基因片段通过特定方法导入靶细胞,纠正或补偿基因缺陷,或者体内表达插入基因产物,以达到治疗疾病目的的技术手段。2003 年中国批准了世界首个溶瘤腺病毒衍生基因治疗药物 Gendicine 上市,截止

[基金项目]　国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(2018ZX09201017-001)
[作者简介]　王欣,女,副研究员,研究方向:新药临床前安全性评价。E-mail:wangxin-26@nifdc.org.cn。
[通讯作者]　耿兴超,男,研究员,研究方向:新药临床前安全性评价。E-mail:gengxch@nifdc.org.cn。许明哲,男,主任药师,研究方向:药物分析与质量控制。E-mail:xumzhe@nifdc.org.cn。

目前包括中国、美国、欧洲等国家已陆续批准十余种基因治疗药物上市销售[1]。随着科技创新和临床研究发展,基因治疗药物已经逐渐成为治疗遗传疾病、恶性肿瘤、自身免疫病和感染性疾病的重要备选药物。

相较于化学药与其他生物技术药,基因治疗药物具有独特的体内作用机制,对适应证可以发挥更加有效地治疗治愈和显著改善临床症状作用。同时,这类药物也具有特殊的安全有效性风险,其成药性风险包括可能发生的随机整合或激活原癌基因导致异常细胞增殖,病毒载体的免疫原性产生中和抗体进而影响和降低药效作用。基因治疗药物的脱靶效应也会为非靶组织器官带来潜在的安全性风险。开展生物分布研究是为了充分预测和评估此类药物暴露产生的潜在安全性风险,通过考察药物自给药部位进入人体内以后到达靶器官的情况和伴随时间延长的代谢消除趋势[2],结合作用机制和治疗目的,预测药物的安全性和辅助推荐临床应用方案。人体暴露于外源活性基因片段时易于发生严重危害,例如基因序列与内源性配体结合激活连续的生理反应,沉积于组织器官导致脏器损伤,序列本身和/或其表达产物引起免疫反应,以及基因的复制性、存续性、整合能力等。这些都可以造成非治疗目的严重不良反应,评价药物在非靶组织器官的蓄积和表达潜力,是评估这类药物安全性的关键特征属性。研究期间,实验人员需要根据药物的序列结构特征设计适宜的方法策略与评价体系。当前,多个监管机构发布的基因治疗产品技术指导原则[2-5]中均要求在非临床阶段开展生物分布研究,以提供足够的药物毒性信息并为后续开展临床试验提供参考。

1 生物分布研究内容

根据待测药物的作用机制与药效特征选择相关动物种属和/或疾病动物模型开展生物分布实验研究。根据药物的载体类型、给药途径、治疗疾病类型等因素选择检测样本,通常用于生物分布研究的组织器官样本包括:血液、注射部位、生殖腺、大脑、肝脏、肾脏、肺脏、心脏和脾脏,还可以采集其他组织或生物体液,如局部淋巴结、骨髓、眼球、视神经、坐骨神经、脊髓、(给药部位)对侧部位、脑脊液等。根据药物的药动学/药效学(pharmacokinetics/pharmacodynamics,PK/PD)特征设计样本采集原则,通常收集样本的时间范围应覆盖自药物进入体内的起始阶段至药物浓度达到峰值的稳态期,再逐渐降低的消除期的完全过程,在其中选择适宜时间点收集组织器官样本[6-7]。因此,生物分布实验内容存在样本种类多、不同组织样本间差异性强、样本数量巨大的突出问题,后期检测工作非常繁重,需要建立一套简便易行、快速准确且高通量的样本测定方法。根据基因治疗药物的结构特征,适宜采用实时定量核酸扩增检测(real-time quantitative PCR,qPCR)技术进行测定[8-9]。组织样本经过适当处理以后,提取样本基因组 DNA,测定其中药物基因的拷贝数。

2 qPCR 技术原理和 Taqman 绝对定量方法

qPCR 技术原理是在扩增反应过程中,通过荧光信号累积对 PCR 进程进行实时监测。当 PCR 反应进入指数扩增期时,模板的循环阈值(cycle threshold,Ct)与起始拷贝数的对数存在线性关系,以此为定量依据。生物分布研究中需要针对基因治疗药物一段特定序列建立 qPCR 检测方法,并且要求检测方法有较高的灵敏度,建议采用 Taqman 绝对定量法[10]。实验方法建立包括几项关键内容:① 选择合成特异性强和灵敏度高的引物探针序列。可以采用 SYBR Green 溶解曲线法确认合成引物的特异性,产物经琼脂糖凝胶电泳分析呈现为单一清晰条带,证明 PCR 反应中无非特异性扩增和引物二聚体形成。② 构建已知拷贝数的标准品。研究用标准品可以是质粒、扩增产物或者一段无关的 DNA 或 RNA 序列,只要浓度拷贝数已知即可。仅要求标准品的扩增效率与待测物的扩增效率一致,不要求序列完全一致。我们通常是在商品化通用质粒中插入扩增产物序列合成质粒标准品,经测序分析证明序列无误以后,再准确定量合成质粒的浓度拷贝数。③ 建立标准曲线。反复优化实验条件有助于提高扩增效率,并确定最终的实验条件。制备标准品系列浓度梯度稀释液进行 qPCR 反应,以 Ct 值对模板浓度负对数进行线性回归得到一条直线,此为标准曲线。直线斜率可以反映扩增效率(amplification efficiency,E),良好的扩增效率应在 90% ~110% 之间,认为此时可以确保定量的准确性。R^2 要求 >0.99,说明各浓度点标准品 qPCR 反应的一致性。根据所建立的标准曲线,确定定量范围和定量下限(lower limit of quantitation,LLOQ)[7]。每次实验都需要建立定量用标准曲线,为了提高实验效率,可以使用 384 孔板 qPCR 仪。并且,每次实验均需要设置无模板对照复孔以确认实验系统无污染。

进行生物分布测定的核酸样本中至少包括组织基因组 DNA,会对 PCR 反应产生影响或者抑制作用,所以上述建立的标准曲线不能直接应用于生物分布样本测定,需要进行改造,建立反应体系中含有背景基因组的标准曲线。改造后的标准曲线参数,要求 E 值介于 90% ~110% 之间和 R^2 >0.99,确定定量范围和最低定量限。对改造后的标准曲线,进行重复性验证,考察各浓度点 Ct 值的变异性。

3 组织样本检测策略

应用已建立的标准曲线对样本进行生物分布测定。首先,对收集的不同类型组织样本采用适宜的方法提取 DNA。提取过程中会使用多种化学试剂和经过多个实验步骤,容易引入和产生 PCR 抑制物,如盐离子、有机溶剂酚-氯仿、多糖、血红素等。提取效率不同会导致各样本间收获 DNA 的产物量不同,需要进行均一化处理,才能比较其中药物基因分布数量的差异。由此可见,每个 DNA 样本在组织来源、组成成份、浓度数量等方面都存在些许不同,这些因素都会对扩增反应产生影响,需要建立一种适用于所有样本测定的通用型方法[11]。基于对样本复杂性的充分认识与考虑,目前形成了几种不同的检测策略及方法:① 组织特异性校正法,即针对不同组织脏器建立检测标准曲线[12]。称取等量的脏器组织掺入不同浓度标准品中,共同提取 DNA 以后进行 qPCR 反应,拟合生成标准曲线,利用该曲线对相同脏器来源的 DNA 样本进行测定。对不同脏器来源的 DNA 样本进行测定时,需要建立脏器专属的标准曲线。使用该方法时,需要将各种组织先修剪至相同重量再提取 DNA 和测定。一些研究者提出若可以得知组织基因组拷贝数,建议使用组织基因组 DNA 作为标准品构建标准曲线,不必须再单独制备标准品以节省时间和人力[13]。② 样本浓度校正法,即将提取的各种 DNA 样本浓度都调整至相同[14]。将等量的空白背景基因组 DNA 掺入不同浓度标准品中,进行 qPCR 反应,拟合生成标准曲线,利用该曲线对所有 DNA 样本进行测定。应用该方法时,需要在研究早期开展充分的方法学验证以说明方法的通用性。分别在标准品中掺入尽可能多的不同组织来源的空白基因组以充分模拟样本实际情况,比如心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑、性腺等脏器组织,每次都生成一条标准曲线,并且曲线参数满足 qPCR 实验要求,说明反应中存在不同脏器来源的基因组 DNA 对 PCR 扩增无影响。样本提取 DNA 以后经紫外法测定浓度,将各样本浓度调整至相同水平以后再进行测定。③ 内参基因校正法,即使用管家基因定量样本中背景基因组拷贝数[15-16]。使用该方法,除去构建定量药物基因的标准曲线之外,还需要构建定量背景基因组的标准曲线,并且进行充分的方法学验证。在药物标准品中掺入不同量的背景基因组,和在基因组标准品中掺入不同量的药物基因,来模拟实际情况。生成的多条标准曲线及其参数均满足实验要求,说明 2 套 PCR 反应体系中分别存在其他干扰基因时对各自的反应效率无影响。常用的参比基因有 *GAPDH*, *β-actin*, *18S rRNA*[17-18]。可以采用外标测定方法,在 2 个 PCR 反应管中分别测定相同样本中药物基因和背景基因的拷贝数。实际研究中,实验人员可以结合具体的基因治疗药物序列特点,选择合适的方法进行研究。总结上述方法有一个共同特点,都在最大程度上尽量模拟真实样本情况,确保实验结果准确可靠。

4 其他有关研究内容

开展生物分布研究可以发现基因治疗药物在体内分布到达组织器官,当药物分布于性腺组织时,需要考虑测定药物与组织细胞染色体的潜在可整合性,以确认其是否有生殖和遗传毒性风险。当药物分布于重要生命器官或者周边组织时,如大脑、脑脊液,需要连续检测多个时间点的样本,并且设置较长的样本收集时间阶段,确保实验结束时药物在这些组织中完全消除掉。基因治疗药物分布阳性的组织器官,其所携带的插入片段也会相应地分布于这些组织器官,并且表达生成活性产物。如表达的活性蛋白质分子、细胞因子、调控蛋白、代谢酶、免疫抗体等。他们可以进入外周血并随之运输至机体靶位,也可以与分布器官中相应受体结合产生生物学效应。调控蛋白可以使脏器中受体蛋白表达含量升高或下降,并随之引起级联放大的生理反应。免疫抗体可能与脏器中某些受体结合,必要时可以采用免疫组化方法测定产物与组织器官的结合情况,以辅助分析药物对组织器官的潜在损伤作用[6]。当表达产物是非内源性蛋白分子时,产物本身还具有免疫原性,需要进行免疫原性检测研究[19]。

5 结语

相较于化学药和一般生物技术药,基因治疗药物不仅可以用于治疗前者难以有效治疗的遗传性疾病,还可以用于治疗包括恶性肿瘤、心血管疾病、感染性疾病等在内的获得性疾病,临床应用前景非常

广泛。生物分布研究通过直接检测药物在各组织器官分布数量,可以明确表征药物在脏器中的分布、代谢、蓄积以及排泄消除过程的药学特征,为评估药物的给药方案、考察有效性与安全性的关键质量属性(critical quality attribute,CQA)参数提供了可靠的科学依据。生物分布研究内容聚焦于药物拷贝数测定和阳性靶器官确认,但不仅限于此,对表达产物的生成量和可能的体内作用及效应有重要的提示作用,这些对辅助毒性实验设计和解释毒性实验发现具有重要意义。生物分布研究为非临床药物安全性评价实验设计与方案选择提供了数据支持;对于监管部门制定更为合理且有针对性的质量控制与药品评价体系,构建药学监管与生物有效性、治疗有效性的可靠关联提供了重要参考。

[参 考 文 献]

[1] WANG DW, WANG K, CAI YJ. An overview of development in gene therapeutics in China[J]. *Gene Ther*, 2020, 27(7-8): 338-348.

[2] FDA US. Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products[EB/OL]. [2020-12-04]. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/preclinical-assessment-investigational-cellular-and-gene-therapy-products.

[3] FDA US. Guidance for Industry: Long Term Follow-up After Administration of Human Gene Therapy Products[EB/OL]. [2020-12-04]. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/long-term-follow-after-administration-human-gene-therapy-products.

[4] EMA/CAT. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products[EB/OL]. [2020-12-04]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf.

[5] ICH. S12 Non-clinical Biodistribution Studies for Gene Therapy Products[EB/OL]. [2020-12-08]. https://database.ich.org/sites/default/files/S12_FinalConceptPaper_2019_1118.pdf.

[6] SILVA LIMA B, VIDEIRA MA. Toxicology and biodistribution: the clinical value of animal biodistribution studies[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018, 8: 183-197.

[7] 张旻, 宫新江, 叶旋, 等. IPRP关于基因治疗产品生物分布研究的相关考虑[J]. 中南药学, 2019,17(7): 993-996.

[8] JOHNSON G, NOUR AA, NOLAN T, *et al*. Minimum information necessary for quantitative real-time PCR experiments[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1160: 5-17.

[9] HAWORTH R, PILLING AM. The PCR assay in the preclinical safety evaluation of nucleic acid medicines[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2000, 19(5): 267-276.

[10] CIKOS S, KOPPEL J. Transformation of real-time PCR fluorescence data to target gene quantity[J]. *Anal Biochem*, 2009, 384(1): 1-10.

[11] SEITZER J, ZHANG HC, KOSER M, *et al*. Effect of biological matrix and sample preparation on qPCR quantitation of siRNA drugs in animal tissues[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2011, 63(2): 168-173.

[12] HO JK, WHITE PJ, POUTON CW. Tissue-specific calibration of real-time PCR facilitates absolute quantification of plasmid DNA in biodistribution studies[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, 5: e371.

[13] YUN JJ, HEISLER LE, HWANG II, *et al*. Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(12): e85.

[14] FU J, LI D, XIA SY, *et al*. Absolute quantification of plasmid DNA by real-time PCR with genomic DNA as external standard and its application to a biodistribution study of an HIV DNA vaccine[J]. *Anal Sci*, 2009, 25(5): 675-680.

[15] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

[16] KREUZER KA, BOHN A, LUPBERGER J, *et al*. Simultaneous absolute quantification of target and control templates by real-time fluorescence reverse transcription-PCR using 4-(4'-dimethylaminophenylazo) benzoic acid as a dark quencher dye[J]. *Clin Chem*, 2001, 47(3): 486-490.

[17] AKIYAMA H, UEDA Y, NOBUMASA H, *et al*. A set of external reference controls/probes that enable quality assurance between different microarray platforms[J]. *Anal Biochem*, 2015, 472: 75-83.

[18] ZHONG SL, ZHOU SY, YANG SJ, *et al*. Identification of internal control genes for circular RNAs[J]. *Biotechnol Lett*, 2019, 41(10): 1111-1119.

[19] COUSIN S, SENESCHAL J, ITALIANO A. Toxicity profiles of immunotherapy[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 181: 91-100.

编辑:刘卓越/接受日期:2021-03-01