·新药注册与审评技术·

重组治疗用生物技术产品临床试验申报阶段病毒安全控制的一般考量

赛文博,郭胜楠,魏开坤
(国家药品监督管理局药品审评中心,北京 100022)

[摘要] 病毒污染风险控制一直是重组生物技术产品安全性控制的重要组成部分。目前我国尚未针对重组治疗用生物技术产品出台临床试验申报阶段病毒安全控制技术指南,而上市阶段的技术指南来源较为繁复,在一定程度上给研究人员带来了困扰,延缓了新药的研发进程。因此,本文将从现行指导原则的技术要求、现行版《中华人民共和国药典》技术要求和审评实践3个方面,对重组治疗用生物技术产品在临床试验申报阶段病毒安全控制的基本技术要求进行讨论,以期能提高相关产品的研发质量,加速申报进程。

[关键词] 重组治疗性生物技术产品;病毒安全控制;病毒去除/灭活
[中图分类号] R95 [文献标志码] A [文章编号] 1003-3734(2021)21-1956-05

General considerations for viral safety control of recombinant therapeutic biotechnological products during the CTA phase

SAI Wen-bo, GUO Sheng-nan, WEI Kai-kun
(*Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing* 100022, *China*)

[**Abstract**] The risk control of viral contamination has always been an important part of the safety control of recombinant biotechnology products. At present, China has not issued technical guidelines for viral safety control in the clinical trial application stage for recombinant therapeutic biotech products, while the sources of technical guidelines in the marketing stage are complicated, which to some extent brings troubles to researchers and delays the development process of new drugs. Therefore, in order to improve the R&D quality of related products and accelerate the application process, this article will discuss the basic technical requirements for viral safety control of recombinant therapeutic biotechnology products in the clinical trial application phase from three aspects: the technical requirements of the current technical guidelines, the technical requirements of the Chinese Pharmacopoeia, and the review practice.

[**Key words**] recombinant therapeutic biotechnological products; viral safety control; virus removal/inactivation

以中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary,CHO)细胞为代表的一系列经过较为全面表征研究的细胞基质已经广泛应用于各类重组生物技术产品的生产,但是由于其来源和生产工艺的特殊性,病毒污染的风险一直如影随形。1993—2013年,全球范围内至少发生了16起生产场地的病毒污染事件,引发污染的病毒包括鼠细小病毒、呼长孤病毒、囊泡病毒2117、猪圆环病毒、卡奇谷病毒等,涉及多家知名国际药企,由此带来的风险和可能引发的严重后果无法估量。高度的危害性决定了病毒安全控制一直是重组生物技术产品技术评价中重要的安全指标

[作者简介] 赛文博,男,助理研究员,研究方向:治疗用生物制品药学技术审评。联系电话:(010)85243042,E-mail:saiwb@cde.org.cn。
[通讯作者] 魏开坤,男,助理研究员,研究方向:治疗性生物制品药学技术审评。联系电话:(010)85242990,E-mail:weikk@cde.org.cn。

之一。

在目前的审评实践中,由于国内外相关指导原则和《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)的技术要求已较为明确,重组治疗用生物技术产品上市申请的申报资料质量整体较高,极少出现由于病毒安全控制研究未达到相关技术标准而导致产品延期甚至无法上市的情况。但反观临床试验申请,情况却有所不同,例如,生产用原材料的外源因子控制、病毒去除/灭活验证所使用缩小模型的代表性等问题层出不穷。反思其中的缘由,部分可能是由于基础研究尚待推进,如以核酸检测为基础的分析技术在区分病毒(样)颗粒的感染性尚存在一定困难等;另一部分,可能是由于对生产工艺的理解不够充分而导致忽略了潜在的风险点,如病毒去除/灭活工艺验证中所采用的工艺参数达不到拟定生产工艺的最差条件等。因此,本文将从现行指导原则技术要求、《中国药典》2020 年版技术要求及技术审评实践 3 个角度展开讨论,以引发对于重组治疗性生物技术产品临床试验申请(clinical trial application,CTA)阶段病毒安全控制一般要求的思考。

1 现行指导原则技术要求

1.1 国内指导原则 由原国家食品药品监督管理总局药品审评中心于 2005 年 12 月发布的《生物组织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》[1] 系国内已发布的唯一的关于重组生物技术产品病毒安全控制指导原则。该指导原则较为详细地从病毒污染的来源和控制、病毒检测方法、病毒去除/灭活验证研究及有效工艺步骤的评价和病毒安全性追踪观察等方面阐述了国内监管机构的病毒安全控制理念。其中,主要的技术要求包括:① 细胞库检定方面,应明确细胞系来源信息及相关证明性文件并参照现行版《中国药典》要求对各级细胞库进行检定。② 生产用原材料方面,应严格控制动物来源的生产用原材料质量,对必须使用的原材料需提供选用的依据和理由,并在每批原材料投产前进行相应的病毒检测。③ 病毒去除/灭活验证研究方面,除明确了指示病毒的选择原则外,还要求生产工艺中应联合使用灭活与去除或其他从机制上能够互补的步骤,验证研究需要采用具有代表性的工艺参数和至少 3 批次样品开展验证研究,而病毒感染性滴度减少 ≥4 logs 的处理步骤方可被认可是有效的病毒去除/灭活工艺步骤。

该指导原则虽然未明确适用的产品申报阶段,但在病毒去除/灭活验证研究章节和病毒安全性的追踪观察章节中分别对临床前研究和临床研究期间的追踪观察提出了明确要求,因此该指导原则适用于 CTA 和上市申请 2 个阶段。

1.2 国外指导原则 国际上,与重组生物技术产品病毒安全控制相关的指导原则较多,包括美国 FDA 于 1997 年发布的“Points to Consider in the Characterization of Cell Lines used to Produce Biologicals”,欧洲 EMA 分别于 1996 年和 1998 年发布的“The Design,Contribution and Interpretation of Studies Validating the Inactivation and Removal of Viruses”和“Guideline on Virus Safety Evaluation of Biotechnological Investigational Medicinal Products”,以及由人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)于 1999 年发布的 Q5A(R1)(以下简称 ICH Q5A):“Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin”[2]。本文将选取应用较为广泛的 2 个指导原则进行介绍。

ICH Q5A 指导原则自 1999 年正式推广实施以来,已广泛获得国际主要监管机构和跨国企业的认可,快速地推进了全球认可标准的统一。2020 年 1 月,国家药品监督管理局发布 2020 年第 7 号公告,宣布从 2020 年 7 月 21 日起正式在我国全面实施 ICH Q5A 指导原则。总体上,该指导原则偏重于通过风险评估的手段,以高等级的原则性意见指导研究者和监管机构根据产品和工艺的特性展开研究和评价,强调个案的特殊性。同时,由于其系上市申报阶段的技术要求,涉及内容较为全面,主要包括:① 细胞库检定方面,应按照表 1 要求对主细胞库(master cell bank,MCB)、工作细胞库(working cell bank,WCB)和达到体外限传代次细胞(limit of *in vitro* cell age,LIVCA)进行检定。② 未加工收获液方面,应提供 3 批次商业化规模未加工收获液(unprocessed bulk,UPB)的外源因子研究结果。③ 病毒去除/灭活工艺验证研究方面,应根据潜在的病毒来源和研究目的的不同,选择相关病毒、特异模型病毒和/或非特异模型病毒作为指示病毒,涵盖蛋白 A 亲和层析、阴离子层析、低 pH 病毒灭活和纳滤等多个工艺步骤,工艺验证应在缩小模型中采用最差工艺条件对 1 批次样品进行 2 次的独立研究,并对新的和达到使用寿命末的层析填料的病毒清除效果分别开展验证。④ 安全因子计算方面,明确了累积去除能力的计算方法,但对具体的清除限

度未进行明确要求,仅在附录 5 中以举例的形式建议应 $<10^{-6}$ 颗粒·剂$^{-1}$。由于该指导原则的科学性和认可度,其对于 CTA 阶段的重组治疗用生物技术产品研发和生产具有较强的指导意义。

表 1 ICH Q5A(R1)细胞库检定要求

项目	MCB	WCB	LIVCA
感染力	+	−	+
电镜	+	−	+
逆转录酶	+	−	+
其他特异性病毒测试	如使用	−	如使用
体外测定	+	−	+
体内测定	+	−	+
抗体产生检测	+	−	
其他特异性病毒试验	+	−	

2008 年由 EMA 发布的“Guideline on Virus Safety Evaluation of Biotechnological Investigational Medicinal Products”[3]系目前唯一针对生物技术产品 CTA 阶段的病毒安全控制进行要求的指导原则,其安全控制理念与 ICH Q5A 相似,可以理解为后者在 CTA 阶段的延伸解读,亦更强调病毒安全控制的理念。汇总其主要的技术要求包括:① 细胞库检定方面,无论是仅建立了 MCB 或已完成了 MCB 和 WCB 的建立,均应按照 Q5A 的要求进行检定,而 LIVCA 或 UPB 二者检定其一即可。② 生产用原材料方面,应关注动物或人体来源的生产用原材料的类型、生产工艺以及安全检定等因素,确保其具有适当的病毒安全性。③ 未加工收获液的检定方面,应在临床试验期间要求申请人对每一批涉及临床试验样品制备的 UPB 进行外源因子的检定。④ 病毒去除/灭活验证研究方面,研究应在临床研究开始前完成,具体的技术要求基本参照 ICH Q5A 完成。

该指导原则的特殊之处在于规定了 2 种可以适当减免研究的情况:① 对于 ICH Q5A 第五章节:对纯品进行病毒清除研究和病毒检测的基本原理和操作方案中所明确的情况 A,细胞或未加工品中未发现有病毒、病毒样颗粒或逆转录病毒样颗粒的情况下,如果可以证明某一步骤可有效清除包括小的无包膜病毒(如细小病毒)在内的广谱病毒,则仅进行单一步骤病毒去除/灭活工艺验证即可;而对于情况 B,只有啮齿类动物逆转录病毒(或非致病性逆转录病毒样颗粒如啮齿 A 型和 R 型颗粒)的情况下,通常需要对多于一步的工艺进行评价,以证实存在充分的逆转录病毒去除能力。② 对于已有充分研究经验的研究者,在先验知识和平台技术的有效支撑下,可以减免部分验证研究工作。

2 现行版《中国药典》技术要求

根据国家药品监督管理局、国家卫生健康委员会关于发布 2020 年版《中华人民共和国药典》的公告(2020 年第 78 号公告)要求,我国从 2020 年 12 月 30 日起正式实施《中国药典》2020 年版[4],由于其特殊的法律地位,《中国药典》是对药物/药品进行技术审评的重要依据。在病毒安全控制方面,本次修订在既往已有的生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制章节的基础上,增加了专门的生物制品病毒安全控制章节,以更全面地对生物技术产品的病毒安全进行控制。

由于《中国药典》细胞基质制备和质量控制相关内容中对细胞库的检定要求不仅包括细胞内、外源因子方面,还涉及细胞鉴别、无菌检查、支原体检查等,因此其对细胞库的检定要求相较于国外的各项指导原则更为细致。该章节对细胞库检定项目、适用的检定方法及判定方法均有较为完整的要求,检定的样品包括 MCB,WCB 和生产终末细胞库(end of production cell,EOPC)。

新增的生物制品病毒安全控制章节适用产品涵盖重组治疗性生物制品、基因治疗产品、疫苗等多个类型的产品,具体技术要求涉及生产用原材料的来源控制、生产过程控制、产品病毒污染的检测、病毒清除工艺验证及上市产品的病毒安全性追踪等方面,整体风险控制理念兼顾了国内外相关指导原则。其中,病毒清除效果评估中明确指出病毒清除下降因子≥4 logs,表示该步骤去除/灭活病毒有效,如因检测方法导致病毒清除下降因子 <4 logs 时,应盲传三代,如无病毒检出,可认定是有效的病毒清除方法。

3 技术审评实践

总体上,本着鼓励创新、加速推进的原则,CTA 阶段相对更注重最终产品的安全性,而整体的内、外源因子全面控制措施可在临床试验期间进一步完善。落实到具体的技术要求上,主要包括以下几个方面。

3.1 细胞库检定及上游控制 宿主细胞应具有清晰的来源和传代历史,对于获得后进行的改造应在申报资料中进行详细的描述,特别是在改造过程中

是否使用了动物来源的原材料。对于细胞库的检定中外源因子检测,现行版《中国药典》和 ICH Q5A 指导原则要求基本一致,参照两者完成的研究在 CTA 阶段均可被接受,但考虑到前者检项中还包括鉴别、细菌污染等检定,因此建议按照前者开展研究。对于确为突破性新产品或临床急需的品种,且直接采用 MCB 进行临床试验样品生产的,在 CTA 中可以仅对 MCB,EOPC/LIVCA/UPB 进行检定。无论何种类型产品,均建议在 CTA 资料中提供具有代表性工艺生产 UPB 的外源因子检定结果,且在临床试验期间对每批 UPB 进行检定。需要指出,依据目前的研究认知,一般情况下 CHO 细胞中的逆转录酶活性检定结果为阳性,因此需要开展感染性试验和电镜检测等进一步研究。其中感染性试验结果应为阴性,而电镜检测一般能发现非感染性逆转录病毒样颗粒。

3.2 其他生产用原材料方面 研究者应注意在产品生产中是否使用了血清制品、重组蛋白酶等可能引入病毒污染的原材料。例如,血清制品应选择具有资质的供应商产品,并提供 TSE/BSE 风险评估或证明,若相关证明性文件缺失可能导致 CTA 被暂停。对于生产过程中使用真核细胞表达的重组蛋白酶,若为研究者从其他供应商处购买应提供病毒安全相关证明,若为研究者自行生产需在申报资料中提供该蛋白酶的主要生产用原材料、生产工艺信息、质量标准及病毒安全控制相关材料,对于用于生产该蛋白酶所使用原材料的病毒安全控制,由研究者自行严格把关。

3.3 病毒去除/灭活工艺方面 应采用对临床试验样品生产工艺具有代表性的工艺制备的中间品和缩小工艺模型开展验证研究。以常见的单克隆抗体产品生产工艺为例,选用的病毒去除/灭活工艺验证样品应能代表临床试验样品的生产工艺,建议至少达到中试规模,突破性新产品或临床急需产品可有特殊考虑。在验证研究所使用的缩小模型中,选取的生产工艺参数应对临床试验样品生产工艺具有代表性,且为拟定工艺参数范围内的最差条件,如蛋白 A 亲和层析工艺应保证缩小模型在色谱柱高、温度、缓冲液体系等方面与临床试验样品生产工艺保持一致,收峰条件应不窄于拟定生产工艺参数中规定的收峰条件,而上样载量和流速应该设定在拟定工艺参数范围内的最大值;对于低 pH 灭活工艺步骤,则应采用拟定工艺参数中的最高 pH 值、最短灭活时间、最低温度等;对于纳滤步骤应当选择最大压强和载量等。否则,可能在临床试验通知书中建议按照已完成验证的工艺参数进行生产。

此外,需要注意的是在实际申报中,曾出现病毒去除/灭活验证所采用的层析填料与滤膜品牌与实际生产工艺使用品牌或型号不同的情况,从而导致 CTA 被暂停。因此,研究者应同时在申报资料中明确缩小模型所使用材料对实际生产工艺的代表性,一般来说,技术审评阶段仅能接受同一供应商采用统一材质生产的不同面积的纳滤滤膜,对于不同供应商提供的以上耗材均应重新开展病毒去除/灭活验证研究。

在指示病毒的选择中,参照《生物组织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》或 ICH Q5A 指导原则进行均可,应特别关注并选择具有与潜在的内源性病毒种属相同或性质相似的指示病毒。对于病毒去除/灭活验证涉及的工艺,应至少包括作用机制不同的 2 个工艺步骤,常见工艺为低 pH 病毒灭活和纳滤清除,对于具有特殊生产工艺的产品根据实际生产工艺选择即可。在验证样品批次的选择上,按照国内外指导原则采用 3 批次样品进行验证或 1 批次样品进行 2 次独立研究均能获得认可。

3.4 安全因子计算方面 应选择每一个步骤的最差结果进行累积计算,去除效果 <1 log 的,不纳入安全因子的计算,进而根据未加工收获液中逆转录病毒样颗粒总数计算产品的安全因子,原则上应 $<10^{-6}$ 颗粒·剂$^{-1}$。这一标准更强调对重组生物技术产品病毒去除/灭活工艺的全面控制。需要说明的是,无论采用多批次样品还是单一批次样品的 2 次独立研究,每次病毒去除/灭活验证所计算出的病毒滴度降低数可能存在一定差异,笔者建议在整体工艺的安全因子计算中采用最差值进行累加计算。当多个研究的病毒降低滴度存在较大差异时,需考虑验证研究设计和执行的合理性和科学性,如有必要应重新开展验证研究。

4 结语

综上所述,重组治疗用生物技术产品在生产过程中对内源性病毒颗粒或外源性病毒污染进行有效控制既是研发过程中不可回避的安全性问题,也是各国监管机构的关注重点之一。虽然我国尚未针对重组治疗用生物技术产品在 CTA 阶段的病毒安全控制出台明确的技术指南,但国内外指导原则、现行

版《中国药典》等指南或法规性文件对病毒安全控制具有相同或相似的理念,对 CTA 阶段的产品具有重要指导意义,其中细胞库和 UPB 的检测、其他生产用原材料的病毒污染风险控制、病毒去除/灭活工艺验证及整体工艺安全因子的计算是整个产品病毒污染风险的重要控制点。随着重组治疗用生物技术产品研发进度的飞速发展,越来越多的细胞工程或基因工程技术被转化为生产实践成果,一些新技术的引入,例如采用逆转录病毒载体进行工程细胞株的构建等,也给该产品的病毒安全控制带来了新的挑战。重要的是,无论是研究者还是监管方都应以科学性和规范性为出发点,进行多角度论证,以减少给受试者带来的潜在风险。

[参 考 文 献]

[1] 原国家食品药品监督管理总局. 生物组织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[EB/OL]. [2008]. http://www.cde.org.cn/zdyz.do? method=largePage&id=71fc578fd703429e.

[2] ICH Q5A. Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin[EB/OL]. [1998]. https://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/qualityguidelines.html.

[3] EMA. Virus safety evaluation of biotechnological investigational medicinal products[EB/OL]. [2008]. https://www.ema.europa.eu/en/virus-safety-evaluation-biotechnological-investigational-medicinal-products.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 版. 北京:中国医药科技出版社,2020.

编辑:王宇梅/接受日期:2021-06-24