

重组生物技术产品连续制造中病毒安全控制的一般考量

赛文博,胡莹莹,韦 薇

(国家药品监督管理局药品审评中心,北京 100022)

[摘要] 连续制造是重组生物技术产品生产工艺未来的发展方向之一,ICH Q13 等重要技术文件的出台也为其应用实践提供了指导意见。但在病毒安全控制领域,连续制造与既往常见的批制造模式在控制理念和措施上都存在较大差异。本文将从连续制造的工艺特性入手,对生产用原材料控制、生产过程中的检定和病毒去除/灭活工艺验证三方面内容进行初步探讨。同时,由于重组生物技术产品连续制造的案例仍然有限,更为全面、细致的控制策略和措施仍有待于研发和生产经验的进一步积累和完善。建议该类产品在申报前与监管机构进行充分沟通交流,以科学、严谨的试验设计确保受试者或患者的用药安全。

[关键词] 重组生物技术产品;连续制造;生产用原材料;过程检测;病毒去除/灭活工艺验证

[中图分类号] R965.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)02-0134-04

General considerations for viral safety control in continuous manufacturing of recombinant biotechnology products

SAI Wen-bo, HU Ying-ying, WEI Wei

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

[Abstract] Continuous manufacturing is one of the development directions of the production process of recombinant biotechnology products in the future. The promulgation of important technical documents such as ICH Q13 also provides guidance for its application practice. However, in the field of viral safety control, there are great differences in control concepts and measures between continuous manufacturing and previous batch manufacturing mode. Starting with the process characteristics of continuous manufacturing, this paper makes a preliminary discussion on three aspects, which are the control of raw materials, in-process test, and virus removal/inactivation process validation. At the same time, as the cases of continuous manufacturing of recombinant biotechnology products are still limited, more comprehensive and meticulous control strategies and measures still need further accumulated and improved based on R&D and production experience. It is suggested that the applicants of this kind of products should fully communicate with the regulatory authorities before the application, so as to ensure the safety of the subjects or patients through scientific and rigorous trial design.

[Key words] recombinant biotechnology products; continuous manufacturing; raw materials; in-process test; virus removal/inactivation process validation

连续制造由于其降低生产成本、加快生产速度等方面的显著优势,被认为是生物制品制造工艺发展的新趋势。2021年公开征求意见的国际人用

药品注册技术协调会(The International Council for Harmonisation, ICH) Q13 “Continuous Manufacturing of Drug Substance and Drug Products”(第三阶段)也为生物制品的连续制造提供了新的指导性文件^[1]。连续制造与目前常见的批制造模式在药学研究的很多方面存在较为显著的差异,而作为重组生物技术产品药学研究重点之一的病毒安全控制可能是其中

[作者简介] 赛文博,男,副主任药师,主要从事生物制品药学审评工作。联系电话:(010)85243042,E-mail:saiwb@cde.org.cn。

[通讯作者] 韦薇,女,主任药师,主要从事生物制品药学审评工作。联系电话:(010)85243075,E-mail:weiw@cde.org.cn。

具有代表性的一方面。ICH Q13 在附件 3 治疗性蛋白原液的连续制造中也多次提到,已实施的 ICH Q5A(R1)可能存在不适用于连续制造的情形^[2],此时可以采用其他经科学验证的研究方法。而目前正在修订的 ICH Q5A(R2)也将增加关于连续制造中病毒安全控制的独立章节^[3],为相关研究提供指导。

相较于传统的批制造模式,重组生物技术产品的连续制造在病毒安全控制方面既有劣势,也有优势。例如,灌流培养等技术的应用可能导致前期未被发现的病毒污染更快地扩散至下游工艺,进而引发后续风险;但另一方面,连续制造减少了人员的操作和干预,降低了意外引入病毒污染的风险。因此,连续制造对于重组生物技术产品的病毒安全控制而言,机遇与挑战并存,需要科学、严谨、针对性地制定其病毒安全控制策略。

本文将从生产用原材料控制、生产过程中检定和病毒去除/灭活工艺验证研究三方面,对重组生物技术产品连续制造过程中的病毒安全控制策略进行归纳和总结,以引发对于该问题的进一步思考。

1 生产用原材料控制

无论采用何种生产模式,生产用原材料的内、外源病毒因子筛查都是避免污染的重要措施,但从生产的速度和过程控制的难易度来说,源头控制的理念和实践对于连续制造具有更为重要的意义和更好的保障效果。

1.1 生产用细胞基质 生产用细胞基质污染是常见的生物制品病毒污染引入途径之一,中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞中的逆转录病毒样颗粒、草地贪夜蛾细胞(*spodoptera frugiperda*, SF)-9 细胞中的弹状病毒片段均有可能给产品引入未知的风险^[4-5]。《中华人民共和国药典》2020 年版和 ICH Q5A 对于主细胞库(master cell bank, MCB)和工作细胞库(working cell bank, WCB)的检定要求在连续制造的病毒安全控制中依然具有重要的指导意义^[6]。

1.2 其他生产用原材料 动物/人体来源的生产用原材料是重组生物技术产品病毒污染的主要潜途径之一,如来源于猪的胰蛋白酶或来源于牛的血清等。众所周知的 Rotarix[®] 污染事件经追溯调查证明,在轮状病毒培养所使用的主细胞库、工作细胞库和后续工艺中间体中所发现的近乎全长的猪圆环病毒-1 来自采用了受污染的猪源胰蛋白酶制备的主细胞

库,此类事件也说明病毒污染风险并非遥不可及^[7]。因此,生产用原材料的控制是极为必要的。从生产实践上,采用非疫区来源的牛血清制品,推动以重组蛋白酶作为生产工具酶,以及对培养基、接触性组件、纯化用树脂等其他生产用原材料进行高温短时处理或辐照处理等方式,都已被证明能有效降低病毒污染风险。

2 生产过程中检定

连续制造过程中检定是保障产品病毒安全性的重要措施。与批生产模式相同,针对商业化规模下生产或进一步制备获得的生产终末细胞库(end of production cells, EOPC)、达到体外限传代次细胞(limit of *in vitro* cell age, LIVCA)或未加工收获液(unprocessed bulk, UPB)中内、外源病毒因子的充分检定能有效暴露整个复苏、扩培、主培养阶段过程中潜在的各类病毒污染风险。

连续制造过程中检定特殊之处主要在于两方面:一是上游阶段长时间、高密度的细胞培养,以及培养过程中的各类取样操作对可能存在的病毒负荷或检测结果产生影响。因此应当合理设置采样点,制定规范的取样操作,确保待测样品病毒污染检测结果的准确性。二是批次的定义对过程中检测的监测点设置和后续决策树具有较大影响。根据 ICH Q13 的定义,批是指在一个工艺或一系列工艺中,所生产的一定量的在规定限度内具有均一性的物料。批量的大小既可以由一个固定的量确定,也可以由一个固定时间区间内的产量确定。因此,检验点也可以依据生产量或生产时间而制定。此时,为了确保灌流培养中连续收集的未加工收获液中不存在病毒污染,建议在整个收获阶段进行多次取样和检测,以帮助后续溯源和调查。

从检定方法来说,针对 EOPC 和 LIVCA 的检定应参照《中华人民共和国药典》2020 年版或 ICH Q5A(R1)要求的项目和方法进行检定。针对不断收集的 UPB 样品,细胞感染试验、动物实验和基于核酸的检定方法均可用于样品的检定。考虑到检定速度方面的优势,基于核酸的检定方法,如实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative polymerase chain reaction, QPCR)技术或下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术可能被用于样品的快速放行检测,而将细胞感染试验或动物实验作为补充。其中,NGS 技术凭借其在检定速度和深度方面的优势,获得了迅速的发展,目前已在细胞库、生产用

原材料和未加工收获液的检定中积累了一定的使用经验^[8-9]。

检定结果的判定方面,对于基于核酸的检定技术而言,其无法判断是否已经形成具有感染性的病毒颗粒,因此一旦发现阳性结果,应立即补充开展感染性试验和/或动物实验,以帮助进一步决策的制定。如若在进一步试验中依然获得阳性结果,则应立即对于病毒污染的时间点、来源及传播途径进行详细调查,如果污染来自主反应器或更为上游的扩增阶段,那么应当立即终止生产,并停止所有已生产批次未加工收获液的使用。如果污染来自特定批次的特定诱因,应根据病毒污染的来源和风险等级,如生产或储存场所小鼠入侵等原因,确定不得用于后续生产的未加工收获液的批次范围,充分防范风险。

3 病毒去除/灭活工艺验证

连续制造与批制造模式在病毒去除/灭活工艺验证中的研究重点基本一致,需要保证验证用工艺中间体、验证用缩小模型和指示病毒的代表性。验证研究既可以操作单元为单位展开,也可以连续或部分连续的形式展开,其取决于药物/药品的实际生产形式。在前提条件允许的情况下,亦可采用平台验证或模块化验证的数据对连续制造病毒去除/灭活工艺步骤的性能进行评估。

连续制造过程的病毒去除/灭活工艺验证可能涉及长时间的生产操作,此时应当重点考虑过程中可能发生的工艺暂停以及指示病毒的稳定性等可能对病毒去除/灭活效果产生直接或间接影响的因素。由于重组生物技术产品的生产工艺中间体多为液体,相较于固体的小分子药物,其由工艺暂停所导致的物料不均匀性可能更为明显,所引发的偏差频率可能更高。因此,应当充分评估连续过程暂停所产生的影响,并科学制定工艺恢复阶段的监控参数和物料收集/废弃策略。

3.1 层析去除工艺 与批制造模式相似,层析去除工艺由于其工作机制和模式的复杂性,除已在上文中提及的一般考量外,应特别关注验证用缩小模型中各项工艺参数对拟定生产工艺条件下最差条件的代表性。而连续制造下的特殊考虑,与所采用层析工艺的工作模式密切相关。

多柱位层析系统常依赖于层析填料的过载来提高收率,过载的初级纯化流出物被分流到二级层析填料中,以避免产品的损失。以模拟移动床(simulated moving bed, SMB)层析系统为代表,一般由 4

个或以上、以半闭环方式连接的结合/洗脱模式工作的层析步骤组成,2 个入口分别用于进料和洗脱液的流入,2 个出口分别用于废物和纯化蛋白质的流出和收集。此时,由于过长的生产周期可能引起层析填料的变质或性能下降,持续过载的工作模式也可能导致层析填料对病毒的去毒能力发生变化。因此,用于病毒去除验证研究的模型应为整体缩小的系统模型,并充分模拟长时间持续过载的工作条件。使用寿命方面,虽然在大量研究中已经证明蛋白 A 层析填料相较于另外几种常见的层析步骤,如阳离子层析、阴离子层析、复合疏水层析等具有更好的使用寿命末的病毒去除性能,但当应用到连续制造中时这种性能能否得以保持,仍有待更为充分的验证研究。

另一类常见的层析系统是膜层析系统,其与柱层析的根本区别在于前者的内部孔径约为 3~5 μm,远远小于后者 15~40 μm 的平均值。这种差别在降低生物大分子纯化过程中的排阻效应时更为显著。此外,其高流速、高动态结合载量的特性也为连续制造中的应用奠定了基础。需要注意的是,即使采用一次性的膜层析系统,但由于生产过程中可能存在的上下游规模差异,膜层析系统若涉及多个循环使用,应考察多循环条件下病毒去除能力的潜在变化。

特殊情况下,以相同模式工作的色谱柱交替运行也是作为连续制造工序的一种选项。该类系统一般采用 2 个相同的色谱柱,在加载和非加载步骤之间切换,就单柱而言仍旧与批制造模式相似,执行平衡、加载、洗涤、洗脱和原位清洗和/或再生序列等过程。此时,在验证过程中可以根据目标过程条件,如流速、载量、重复使用等情况,建立缩小模型。当多个层析工艺连续工作时,可以在科学评估的基础上,形成一个操作单元,联合进行验证。此时,由于各个层析柱仍然具有各自的再生周期,使用寿命末层析填料的病毒去除能力研究也与批制造时的研究模式基本一致。

3.2 低 pH 或有机溶剂灭活工艺 连续制造过程的低 pH 或有机溶剂处理可能采用多罐系统或连续流系统。对于多罐系统,与病毒灭活相关的工艺参数与批制造基本一致,如 pH 值/有机溶剂浓度、处理时间、处理温度、缓冲液体系、样品前处理等。因此,其病毒灭活工艺验证也应采用拟定工艺参数范围内的最差条件展开验证。

对于连续流系统来说,低 pH 或有机溶剂处理

的过程由静态变为动态。由于液体本身的特性,当液体混合物流过中空管时,管中央的液体部分较周围液体往往以更高的速度流动,会造成同时进入连续流系统的物料具有不同的相对停留时间,当相对停留时间差距越大,其分布则越宽。但对于稳定的病毒灭活工艺来说,过宽的停留时间分布可能导致部分物料没有在低 pH 环境或有机溶剂下暴露足够的时间,进而弱化该工艺步骤的病毒灭活效果。此时,相较于批制造工艺或多罐系统,在病毒灭活验证研究中应额外纳入物料混合均匀度和停留时间分布等关键工艺参数,以充分评估连续流病毒灭活的工艺性能和稳健性。

3.3 纳滤去除工艺 与低 pH 或有机溶剂灭活工艺相同,连续制造中的纳滤工艺也可以配合多罐系统,以确保纳滤工艺步骤物料的均匀性,在恰当的时间点对滤膜进行更换并用于后续物料的过滤,形成与既往批制造工艺相同的生产模式,其病毒去除工艺验证研究要求也与批制造基本一致。

当纳滤工艺以连续流工艺生产时,物料由前置工艺的流入速度虽然是恒定的,但由于层析步骤一个或多个结合/洗脱模式应用所产生的周期性的洗脱峰,引起物料在蛋白质浓度、pH、电导率等方面的变化,在没有缓冲罐的辅助下,理化性质波动的物料可能对滤器的病毒清除能力产生负面影响。例如,当非均一物料通过滤膜时,可能导致滤膜超载或过滤压力的周期性变化,进而引起细小病毒的泄漏。此外,连续流过滤病毒去除验证研究的另一个挑战来自整个验证周期内指示病毒活性的维持。连续流生产中,纳滤工艺的生产周期可能长达数日或数十日,对于细小病毒活性的维持可能形成挑战,而病毒滴度的异常降低可能导致对拟定纳滤工艺病毒清除性能的错误估计。此外,在过滤器前安装在线气泡捕集器,以防止负载溶液中的任何微小气泡影响过滤器性能等辅助措施也需在工艺验证中给予充分模拟。

4 结语

连续制造作为未来重组生物技术产品生产工艺的主要发展趋势之一,所带来的机遇和挑战并存。在病毒安全控制方面,连续制造更强调全流程管理,

生产用原材料的内、外源病毒因子检定是源头控制的基础,对整个生产流程的病毒安全起决定性作用,因此必须慎之又慎。生产过程中的检定是重要的安全保障措施,长时间培养中取样点的设置和后续处理的决策树也需要更严谨的设计。病毒去除/灭活工艺验证作为连续制造过程中一道重要的工艺防线,应当充分考虑所执行的工艺模式,以及生产工艺在启动、暂停和终止时所产生的干扰,而科学建立的验证用缩小模型是确保验证研究代表性的决定性因素。总体上,连续制造工艺的病毒安全控制理念虽然脱胎于批制造工艺,但更为全面、细致的控制策略仍有待于研发和生产经验的进一步积累和完善。因此,建议该产品在申报前与监管机构进行充分的沟通交流,以科学、严谨的试验设计确保受试者或患者的用药安全。

[参 考 文 献]

- [1] ICH Q13. Continuous Manufacturing of Drug Substance and Drug Products [EB/OL]. [2021]. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q13_Step2_DraftGuideline_%202021_0727.pdf.
- [2] ICH Q5A (R1). Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin [EB/OL]. [1999]. https://database.ich.org/sites/default/files/Q5A%28R1%29%20Guideline_0.pdf.
- [3] ICH Q5A (R2). Final Concept Paper [EB/OL]. [2019]. https://database.ich.org/sites/default/files/Q5A-R2_FinalConceptPaper_2019_1117.pdf.
- [4] HUSSAIN M, RAYFIELD WJ, ROUSH DJ. A direct RT qPCR method for quantification of retrovirus-like particles in biopharmaceutical production with CHO cells [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 189:113472.
- [5] MA H, GALVIN TA, GLASNER DR, *et al.* Identification of a novel rhabdovirus in *Spodoptera frugiperda* cell lines [J]. *J Virol*, 2014, 88(12):6576-6585.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 2020 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [7] VICTORIA JG, WANG C, JONES MS, *et al.* Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus [J]. *J Virol*, 2010, 84(12):6033-6040.
- [8] FDA. Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications [EB/OL]. [2010]. <https://www.fda.gov/media/78428/download>.
- [9] WHO. Scientific principles for regulatory risk evaluation on finding an adventitious agent in a marketed vaccine [EB/OL]. [2015]. <https://www.who.int/publications/m/item/adventitious-agent-in-a-marketed-vaccine-annex-2-trs-no-993>.

编辑:杨青/接受日期:2022-12-28

