

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.10.001

· 专家论坛 ·

细胞治疗产品中关键原材料风险控制策略的审评考虑

尹慧芳¹, 卢加琪², 张景辰¹, 韦薇² (1. 国家药品监督管理局 药品审评检查长三角分中心, 上海 201210; 2. 国家药品监督管理局 药品审评中心, 北京 100076)



张景辰 博士, 高级工程师, 现任国家药品监督管理局药品审评检查长三角分中心副主任, 国家药典委员会委员, 国家组长级药品检查员。长期从事药品审评检查工作, 在药品监管科学领域研究多年, 主要从事先进治疗产品、数据评价科学、药械组合产品等的监管科学研究。主持/参与国家科技部、国家药监局、国家药典委、上海市科委等 20 余项研究课题, 包括肿瘤细胞核酸分子精准调控核酸纳米药物高效发挥免疫/化疗协同效应治疗食管癌等。在国内外学术期刊上发表论文 30 多篇, 获授权专利 2 项。参与《中国药典 2020 年版》《中国药典 2025 年版》《细胞治疗产品生产现场检查指南》等的撰写。个人与所主持项目获评上海市 2015 年“食品药品监管标兵”、2021 年“上海标准”和 2023 年上海产学研合作优秀项目奖。



韦薇 博士, 主任药师, 国家药品审评中心生物制品药学部副部长, 国家药典委员会委员, 国际人用药品注册技术协调会 (ICH) Q5C 指导原则国内组负责人。主要从事生物制品药学专业的审评工作, 负责组织相关课题参与了第三批中国药品监管科学行动计划重点项目和药品监管科学全国重点实验室课题。主导了多项涉及先进治疗产品、治疗性重组技术产品、生物类似药物等领域的技术指南和审评要点的撰写工作。作为世界卫生组织 (WHO) 生物制品技术专家组成员参与了多项 WHO 技术指南的撰写讨论工作。主笔撰写了《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则》《体外基因载体系统药学研究与评价技术指导原则》《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则》《溶瘤病毒产品研究与评价技术指导原则》和《生物制品稳定性研究技术指导原则》等。

[摘要] 以嵌合抗原受体基因修饰 T 淋巴细胞 (CAR-T 细胞) 为代表的免疫细胞治疗产品已经在白血病等血液瘤中取得了重大进步。细胞治疗产品的生产原材料种类多样, 成分复杂, 其中基因修饰载体和其他一些赋予细胞特定功能或影响其质量的原材料通常为关键原材料。这些关键原材料往往会对细胞治疗产品的质量属性和体内疗效产生重要的影响, 因此是细胞治疗产品审评的重要关注点。本文论述了细胞治疗产品中常用的几种关键原材料 (包括慢病毒载体和 γ -逆转录病毒载体、CRISPR/Cas 编辑系统、转座子系统、分选磁珠和滋养细胞), 提出了目前的审评考虑和风险控制策略, 以期促进此类产品的临床转化和应用。

[关键词] 细胞治疗产品; 关键原材料; 基因修饰载体; 风险控制

[中图分类号] R730.51; R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024) 10-0943-08

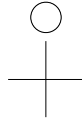
Evaluation consideration for risk control strategies of crucial raw materials used in cell therapy products

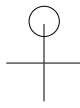
YIN Huifang¹, LU Jiaqi², ZHANG Jingchen¹, WEI Wei² (1. Yangtze River Delta Center for Drug Evaluation and Inspection, National Medical Products Administration, Shanghai 201210, China; 2. Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100076, China)

[Abstract] Immunotherapy products, represented by chimeric antigen receptor-modified T lymphocytes (CAR-T cells), have achieved significant progress in hematologic malignancies such as leukemia. The raw materials used in the production of cell therapy products are diverse and complex, with gene modification vectors and other raw materials that endow cells with specific functionalities or influence their qualities usually classified as crucial raw materials. These crucial raw materials often have significant impacts on the quality attributes and *in vivo* efficacy of cell therapy products, making them important concerns in the evaluation of cell therapy

[作者简介] 尹慧芳 (1987—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事生物制品药学审评工作。E-mail: yinhf@ydcdei.org.cn

[通信作者] 韦薇, E-mail: weiw@cde.org.cn; 张景辰, E-mail: zhangjc@ydcdei.org.cn





products. This article summarizes several crucial raw materials that are commonly used in cell therapy products (including lentiviral vectors and γ -retroviral vectors, CRISPR/Cas gene editing system, transposon system, immunomagnetic separation beads, and feeder layer cells) and proposes the current evaluation considerations and risk control strategies with the aim of advancing the clinical transformation and application of such products.

[Keywords] cell therapy products; crucial raw materials; gene modification vectors; risk control

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(10): 943-950. DOI : 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.10.001]

近年来,以嵌合抗原受体基因修饰T淋巴细胞(chimeric antigen receptor gene modified-T lymphocyte, CAR-T细胞)为代表的细胞治疗产品已经在白血病等血液瘤的治疗中取得了重大进步。中国细胞治疗产品产业蓬勃发展,细胞治疗产品的类型也推陈出新,不断拓展新适应证,按照药品进行研发并申报临床试验的细胞治疗产品逐年增多。国家药品监督管理局药品审评中心也发布了多个与细胞治疗产品相关的指导原则,对行业的发展起到了良好的促进和指导作用。结合细胞治疗产品临床试验申报资料审评和沟通交流中的常见问题,基于当前认知,参考国内外相关技术指导原则或规范,本文对细胞治疗产品生产中的关注度较高的几种关键原材料的风险控制提出现阶段的审评考虑要点,供研发者和监管方讨论交流。

1 慢病毒载体和 γ -逆转录病毒载体

慢病毒载体和 γ -逆转录病毒载体因其能将外源基因稳定地整合到宿主细胞基因组的特点而被广泛应用于细胞治疗产品。在全球已获批上市的11款CAR-T细胞产品中,均采用了慢病毒载体或者 γ -逆转录病毒载体进行CAR基因的递送。慢病毒和 γ -逆转录病毒属于逆转录病毒科的不同属,两者都包含RNA基因组,在细胞中,该RNA基因组被一种称为逆转录酶的病毒编码酶逆转录为DNA^[1]。两者的不同之处在于, γ -逆转录病毒只能在有丝分裂期间核膜被破坏时才能进入细胞核,但慢病毒可以穿过核膜上的核孔进入细胞核,因此, γ -逆转录病毒只能感染分裂旺盛的细胞,而慢病毒能同时感染分裂期和非分裂期的细胞^[2]。此外,两者也表现了不同的整合偏好, γ -逆转录病毒优先插入转录起始位点和调控基因区域附近,而慢病毒则优先插入转录单位内^[3]。尽管 γ -逆转录病毒和慢病毒进入细胞核的方式和整合偏好各不相同,但两者在结构设计、风险控制和安全性评价方面比较类似,以下以慢病毒载体为例进行阐述。

慢病毒载体上游设计的基本考量包括删除非必要的病毒毒性基因/辅助基因、将关键病毒基

因分散于不同质粒进行表达、减少质粒与质粒之间以及质粒和宿主细胞之间的同源序列、自失活(self-inactive, SIN)改造等措施,借此使慢病毒载

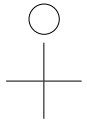
体的临床使用安全性逐渐提高
[4]
。慢病毒载体经历

了三代发展：第一代和第二代转导系统均包含三个质粒，包装质粒、衣壳质粒和携带目的基因的穿梭质粒，包装质粒包含 gag、pol、rev 基因，穿梭质粒保留了 3' 端和 5' 端的野生型长末端重复 (long terminal repeat, LTR)。第一代转导系统几乎保留了所有的病毒基因，第二代转导系统在第一代转导系统的基础上删除了 vif、vpr、vpu、nef 这四个不影响病毒载

体包装和转导的基因。第三代转导系统有较大变化，将 rev 基因在单独的质粒表达、删除 tat 基因，并通过密码子优化进一步减少序列重叠^[4-5]。因此，第三代慢病毒转导系统包括四个质粒：包含目的基因的穿梭质粒、包含 gal、pol 基因的包装质粒、包含 rev 基因的调控质粒和包含 env 基因的衣壳质粒。通常，会将穿梭质粒 5' 端和 3' 端 LTR (或者仅 3' 端 LTR) 包含启动子和增强子的 U3 区域删除形成 SIN 慢病毒载体，以减少对整合位点附近宿主基因的插入激活，进而降低基因突变或者癌变的几率，提高安全性^[6]。然而，U3 区域的删除会极大地降低转基因的表达。为解决此问题，通常会在目的基因前面引入巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 或者人真核细胞翻译延长因子 1 α (human elongation factor 1 α , EF1 α) 等启动子以驱动转基因的表达^[7]。

虽然目前慢病毒载体的上游设计理论上极大地降低了生产过程中可复制性慢病毒 (replicative lentivirus, RCL) 的产生，且不必要病毒毒性基因的删除进一步削弱了可能产生的 RCL 的功能^[8]，但是考虑到 RCL 的形成机制和结构较为复杂，并未完全排除 RCL 产生的可能性，因此，各国监管机构仍把 RCL 作为重要的安全性风险关注点。美国和欧盟分别发布了相关指导原则，中国发布了《慢病毒载体 RCL 检测问题与解答》(征求意见稿)^[9]，针对慢病毒载体系统 RCL 检测和风险控制提出了一般性建议，以供申请者和检测机构参考：(1) 检测样品方面，建议每个临床试验用批次的病毒载体上清液和生产终末细胞 (end of production cell, EOPC) 均需要采用细胞培养法进行 RCL 检测；选择最易检出 RCL 的样品进行检测并充分考虑检测样品对检测方法的可能干扰。(2) 检测量方面，推荐测试足够的病毒载体上清液，以确保取样量满足检测到 1 RCL/剂量的可能性为 95%，也可以结合实际生产情况，考虑采用





5%的未处理病毒载体上清液或300 mL进行取样检测。

(3) 检测方法方面, 建议将病毒载体上清液和EOPC与允许细胞系共培养至少连续5次传代, 并增加指示期培养后进行检测; 建议采用不同原理的终点检测方法进行相互验证; 建议选用HIV弱毒株或重组的条件复制型慢病毒载体作为阳性对照; 每个批次实际样品检测时需设立阳性对照、阴性对照、抑制对照组和样品组; 选择病毒易感和易复制的细胞系作为共培养细胞并按照现行版《中国药典》检定用细胞相关要求提供全面的研究资料。(4) 方法学验证方面, 需考虑共培养和终点检测两个阶段的验证, 根据国际人用药品注册技术协调会(ICH)协调指导原则Q2(R2) [ICH HARMONISED GUIDELINE, Q2(R2)]和现行版《中国药典》中相关指导原则开展验证^[9]; 对于经病毒载体转导的细胞终产品, 需要对每个批次产品进行RCL检测, 可采用经验证的检测方法替代细胞培养法^[8]。此外, RCL还需纳入患者监测中, 对临床受试者进行不少于15年的长期随访, 定期检测回输患者血样中的RCL标志物^[8, 10-11]。

除RCL外, 慢病毒的整合特性所导致的肿瘤形成风险也是需要考虑的方面。虽然SIN慢病毒载体能够降低对整合位点附近宿主基因的插入激活, 从而降低基因突变或者癌变的几率, 但安全性风险并未完全消除。研究中还需结合载体的整合特性、载体设计和改造、细胞平均插入拷贝数、基因修饰细胞总数、目的细胞类型、目的细胞的增殖潜能等综合评估潜在的插入突变、致瘤/致癌风险, 并采用具有代表性的基因修饰细胞进行基因整合位点分析, 关注肿瘤相关调控基因附近有无优先整合迹象, 含有关注位点的细胞有无优先异常增殖^[12-13]。另外, 在临床研究中需对治疗后患者细胞的插入位点和克隆性进行分析和监测, 进行不少于15年的受试者观察^[10-12], 并纳入临床风险管理计划^[14]。

综上, 慢病毒载体和 γ -逆转录病毒载体的安全性风险控制需从载体设计开始考虑其形成可复制性逆转录病毒(replication competent retrovirus, RCR)的风险、整合风险和其他可能存在的风险, 载体制备过程中需对每个批次的病毒载体上清液和EOPC进行RCR检测, 并用经验证的检测方法检测每个批次细胞终产品中的RCR。另外, 还需采用代表性样品对基因在细胞中的整合位点和克隆性进行分析, 并且建议进行不少于15年的受试者随访, 对RCR和整合位点进行监测, 并纳入临床风险管理计划。

2 CRISPR/Cas 编辑系统

CRISPR最初在原核生物基因组中发现, 是短的、部分重复的独特DNA序列, CRISPR及其相关蛋白(如

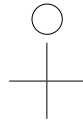
C
a
s
9
)是原核生物防御病毒或噬菌体的一种适应性免疫机制
[15]。
经过几十年的发展, 以

CRISPR/Cas9 系统为代表 的基因编辑技术已被广泛应用于医药、农业、生物技术等各个方面。在治疗领域，CRISPR/Cas9 基因编辑系统既可以 直接应用于体内基因治疗，又可以在体外对细胞进行编辑后回输至人体起到治疗作用。以 CRISPR/Cas9 系统为例，其包括 向导 RNA (guide RNA,

sgRNA) 和 CRISPR-相关蛋白 (如 Cas9) 两个关键部分。CRISPR/Cas9 系统基因组编辑机制通常包括识别、切割和修复三个步骤，单链向导 RNA (single-guide RNA, sgRNA) 通过碱基互补配对识别 目标基因中的目的序列，Cas9 核酸内切酶在原间隔 相邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 上游的第 3 个碱基对处切断双链 DNA，双链断裂区域通过非同源末端连接 (non-homologous end joining) 或者同源重组修复 (homology-directed repair) 的 DNA 修复机制进行修复^[15-16]。CRISPR/Cas9 系统可通过质粒、病毒载体 (慢病毒载体、腺相关病毒载体 等)、Cas9 核糖蛋白复合物、脂质纳米颗粒等多种形式进入细胞^[17]。在此，对以 Cas9 核糖蛋白复合物形式进入细胞进行体外基因编辑的情况进行讨论和分析。通常情况下，Cas9 核糖蛋白复合物通过电转或其他形式进入细胞进行基因编辑，相关情况可能包括直接切断双链 DNA，利用胞内非同源末端连接的方式进行修复从而改变目的基因的序列，进而改变其功能；切断双链 DNA 的同时提供同源修复模板，从而进行定点基因插入或敲除；同时使用两条或多条 sgRNA 对大片段基因进行敲除等。

上游设计方面，sgRNA 是决定 CRISPR 基因编辑是否成功的关键，因为 sgRNA 负责引导基因编辑系统到达目标位点^[18]。sgRNA 可能会与非靶标 DNA 错配，从而导致非特异性、非预期的基因修饰，这被称为脱靶效应。CRISPR/Cas9 系统的靶向效率由 sgRNA 的 20 个核苷酸序列和临近目标基因的 PAM 序列所决定^[15]。研究^[19]表明，目标序列与 20 个核苷酸的 sgRNA 序列之间若有 3 个以上的错配则可导致脱靶效应。脱靶效应导致的风险可能包括序列突变、缺失、重排、免疫反应和癌基因激活等，极大地限制了 CRISPR/Cas9 系统在治疗领域的应用。脱靶作为 CRISPR/Cas9 系统的主要风险，需要通过多方面的优化以降低脱靶风险，为目的 DNA 序列选择和设计合适的 sgRNA 是非常重要的 一步，需要考虑的方面通常包括鸟嘌呤和胞嘧啶 (guanine and cytosine, GC) 含量、sgRNA 长度、sgRNA 的化学修饰和潜在序列变体等^[17]。另外，对 Cas9 蛋白进行修饰以优化其核酸酶特异性也是减少脱靶的一种方式^[15]。研究^[20]表明，Cas9 蛋白





浓度也是决定脱靶的一个重要因素, 高浓度Cas9 蛋白更易导致脱靶, 降低Cas9 蛋白浓度显著提高了在靶和脱靶的比例, 但与此同时整体的编辑效率也有所降低。此外, Cas9 蛋白的持续表达可能是导致脱靶的另外一个因素^[20]。

Cas9 蛋白的浓度不仅关系到编辑效率, 对脱靶也有很大的影响, 所以在研发期间建议研究Cas9 蛋白浓度与编辑效率、脱靶之间的关系, 以及Cas9 蛋白与 sgRNA 的配比关系, 合理控制 sgRNA 和 Cas9 的用量。Cas9 蛋白和 sgRNA 在细胞内可能被降解, 考虑到不同类型的细胞在降解速率上存在差异, 且Cas9 蛋白和 sgRNA 在胞内可能导致的蓄积残留、持续脱靶效应, 建议在适当的工艺阶段和细胞终产品中对胞内残留的 Cas9 蛋白和sgRNA 进行检测。由于 CRISPR/Cas9 系统的组成部分来源于细菌, 宿主免疫可以引发针对这些成分的免疫反应^[15]。已有研究^[21]发现, 健康人体内存在针对 Cas9 蛋白的体液(抗 Cas9 抗体)和细胞(抗Cas9 T 细胞)免疫应答。因此, 建议研究工艺对Cas9 蛋白的去除能力和终产品中胞外Cas9 残留, 将可能导致的免疫原性降至最低。此外, 染色体易位、大片段丢失等也是CRISPR/Cas9 系统可能导致的风险, 使用 2 条及以上 sgRNA 进行编辑时应尤其注意。

对于采用基因编辑技术制备的基因修饰细胞产品, 应进行体外在靶和脱靶活性评估, 以确认Cas9 蛋白或 sgRNA 对靶基因序列的特异性。在评估脱靶风险时, 应说明所选择的评价策略的合理性和全面性。虽然采用计算机分析预测基因编辑的潜在脱靶位点并对潜在脱靶位点进行深度测序分析, 可用于评估 CRISPR/Cas9 系统基因编辑的脱靶风险, 但选择的评价策略仍应包含体外全基因组测序对比, 以证明潜在脱靶位点未出现脱靶。此外, 在评估脱靶活性时, 还应评估种属特异性的差异、细胞病理生理状态的差异或细胞类型的差异对非临床数据预测性的影响。必要时, 还应分析基因编辑对细胞表型和生理功能的潜在影响^[13]。此外, 需要通过长期随访观察迟发性不良反应的风险, 建议观察 15 年或至数据表明不再存在风险^[11]。

综上, 当采用CRISPR/Cas 编辑系统时, 应设计和选择与目标DNA 序列最匹配的 sgRNA 序列, 通过优化 Cas9 蛋白的核酸特异性来减少可能导致的脱靶效应。采用合适用量的 sgRNA 和 Cas9 进行编辑, 检测工艺过程和终产品中细胞内外的 Cas9 和 sgRNA 残留, 关注染色体易位、大片段丢失等风险。同时, 研

究中还需对在靶和脱靶活性进行评估, 采用全基因组测序进行验证。此外, 需进行 15 年的长期随访观

察迟发性不良反应的风险。

3 转座子系统

转座子 (transposon) 是能从基因组上的一个位

以上内容仅为本文档的试下载部

分，为可
阅读页数
的一半内
容。如要
下载或阅
读全文，
请访问：

[https://d
.book118.
com/88812
104712200
7004](https://d
.book118.
com/88812
104712200
7004)