

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<sup>1</sup>, 卢加琪<sup>2</sup>, 张景辰<sup>1</sup>, 韦薇<sup>2</sup> (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 $\gamma$ -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 Huifang<sup>1</sup>, LU Jiaqi<sup>2</sup>, ZHANG Jingchen<sup>1</sup>, WEI Wei<sup>2</sup> (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  $\gamma$ -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.

**[Key words]** 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常用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 $\gamma$ -逆转录病毒载体

慢病毒载体和 $\gamma$ -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 $\gamma$ -逆转录病毒载体进行CAR基因的递送。慢病毒和 $\gamma$ -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<sup>[1]</sup>。两者的不同之处在于, $\gamma$ -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, $\gamma$ -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<sup>[2]</sup>。此外,两者也表现了不同的整合偏好, $\gamma$ -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<sup>[3]</sup>。尽管 $\gamma$ -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<sup>[4]</sup>。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这四个不影响慢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<sup>[4-5]</sup>。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<sup>[6]</sup>。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 $\alpha$ (human elongation factor 1 $\alpha$ , EF1 $\alpha$ )等启动子以驱动转基因的表达<sup>[7]</sup>。

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<sup>[8]</sup>,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)<sup>[9]</sup>,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<sup>[9]</sup>;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<sup>[8]</sup>。此外,RCL还需纳入患者监测中,对临床受试者进行不少于15年的长期回访,定期检测回输患者血样中的RCL标志物<sup>[8,10-11]</sup>。

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<sup>[12-13]</sup>。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<sup>[10-12]</sup>,并纳入临床风险管理计划<sup>[14]</sup>。

综上,慢病毒载体和 $\gamma$ -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年的受试者回访,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

Cas9)是原核生物防御病毒或噬菌体的一种适应性免疫机制<sup>[15]</sup>。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, gRNA)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<sup>[15-16]</sup>。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<sup>[17]</sup>。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<sup>[18]</sup>。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<sup>[15]</sup>。研究<sup>[19]</sup>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是非常重要的步骤,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异体等<sup>[17]</sup>。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<sup>[15]</sup>。研究<sup>[20]</sup>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<sup>[20]</sup>。

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<sup>[15]</sup>。已有研究<sup>[21]</sup>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<sup>[13]</sup>。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<sup>[11]</sup>。

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)是从基因组上的一个位置移动到另一个位置的一段DNA短序列,转座子作为一种基因递送工具,可以将外源DNA片段插入基因组中<sup>[22]</sup>。转座子根据其位移机制可分为两类:I类转座子和II类转座子。I类转座子又称为逆转录转座子,遵循“复制-粘贴”机制,将自身DNA基因组转录为RNA后,进一步逆转录为DNA并重新整合至基因组<sup>[23-24]</sup>。II类转座子又称为DNA转座子,它们在换位过程中仅依赖于DNA中间体,它们可以进一步被分成两个子类:第一个子类遵循“剪切-粘贴”机制,转座子从基因组的一个位置被切除并重新整合至其他位置<sup>[23-24]</sup>;第二个子类遵循“复制-粘贴”机制,元件产生自身拷贝并整合至基因组中,但此过程不涉及RNA中间体<sup>[23]</sup>。转座子系统的元件包括转座子,即两端含有反向重复序列(inverted terminal repeat, ITR)的目的基因,以及转座酶(transposase),该酶表达后可结合于转座子的ITR序列,切割转座DNA序列后形成发卡样结构,与待修饰细胞基因组的特定序列匹配后整合在基因组中<sup>[4]</sup>。

目前,应用最广泛的转座子系统包括睡美人(sleeping beauty, SB)转座子、PB(piggyBac)转座子和Tol2转座子系统,均属于“剪切-粘贴”机制的DNA转座子,三者既有相同之处又具备各自特点。三者携带基因的能力均可达>100 kb,但整合位点偏向不同,SB转座子系统偏向整合于TA位点,PB转座子系统偏向整合于TTAA位点,而Tol2转座子系统则无明显的位点整合偏好<sup>[25-26]</sup>。三者均属于非定点整合,但整合特性有所不同:SB转座子系统几乎是随机整合,而PB转座子系统和Tol2转座子系统则偏向整合在转录起始位点<sup>[27]</sup>。在整合效率上,SB转座子系统和PB转座子系统在人体细胞的整合效率与逆转录病毒相当,而Tol2转座子系统整合效率则偏低<sup>[27]</sup>。转座酶本身在超过一定阈值浓度时可作为转座抑制剂抑制转座子活性,这一现象称为过度生产抑制(overproduction inhibition, OPI)。SB转座子系统具有OPI现象,而PB转座子和Tol2转座子系统仅表现出有限的OPI现象<sup>[28]</sup>。

目前,多采用二质粒系统将转座子和转座酶序列分散于2个质粒中进行表达,2个质粒同时进入细胞才能成功进行基因修饰。在应用方面,应综合考虑转座子系统的整合特性、整合效率、DNA浓度和目标细胞类型等进行选择。上游设计方面,应考虑对转座酶、转座子、末端重复序列进行优化,尽量删除



质粒中不必要的序列,以及在转座子质粒中加入隔离元件(insulator element)以增强目的基因的表达<sup>[4,27]</sup>。在对人体细胞进行转导时,建议针对特定的细胞类型,对转座子序列和转座酶基因的比例进行研究,该比例对质粒骨架DNA的整合效率和基因漂移概率均有影响<sup>[4]</sup>。若质粒DNA中存在抗生素耐药基因则可能会触发免疫应答,且存在传播到致病菌株的风险,因此,建议对质粒DNA进行合理优化,以降低风险<sup>[27]</sup>。

与 $\gamma$ -逆转录病毒载体和慢病毒载体类似,转座子系统可能存在插入突变和致癌的风险,因此,需要开展相应的研究并控制相关风险。如研究中结合转座子系统的整合特性、系统设计、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。采用具有代表性的基因转导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,含有关键位点的细胞有无优先异常增殖<sup>[12-13]</sup>。另外,建议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<sup>[10-12]</sup>。

#### 4 分选磁珠

分选磁珠一般为单克隆抗体偶联超顺磁珠形成的复合物,目前已被广泛应用于细胞治疗领域,用于细胞的分选纯化。磁珠分选是一种抗体介导的细胞分离方法,能选择性结合特定的细胞表面标志物,因此具有高靶点特异性优势<sup>[29]</sup>。分选磁珠的概念最早由MOLDAY等<sup>[30]</sup>在1977年提出,用于红细胞和淋巴细胞的分选。经过几十年的发展,市场上已经有大量不同品牌的商品化磁珠可供选择,本文以细胞治疗领域最常用的两种分选磁珠——赛默飞公司的Dynabeads®和美天旎公司的MACS® Microbeads为例,对磁珠的构成、分选原理、分选方式、检测和控制要求等进行介绍。

Dynabeads®由UGELSTAD教授发明,是均匀的包被铁氧化物的聚苯乙烯球形珠,其表面连接特异性抗体,用于细胞分选的磁珠直径约为 $4.5\ \mu\text{m}$ <sup>[31]</sup>。MACS® Microbeads由美天旎公司发明,是由铁氧化物、右旋糖酐组成的磁珠,表面连接特异性抗体,直径约 $50\ \text{nm}$ <sup>[32-33]</sup>。两种磁珠均具有超顺磁性,即只有在磁场存在的情况下才有磁性,一旦外部磁场被移除,它们就不会保留任何剩余磁性<sup>[29]</sup>。磁珠大小和组成的不同使得二者具有不同的性质:Dynabeads®可以避免细胞接触铁氧化物和右旋糖酐,从而避免可能引起的细胞活化和细胞损伤,但因其大小与细胞相近,阳性分选后一般需要进行磁珠解离方可进行

后续应用或功能研究;MACS® Microbeads因尺寸较小,不会引起细胞活化,且磁珠可被细胞生物降解,因此使用后一般不需要进行磁珠解离即可进行下游应用。

微球表面连接的特异性抗体使得磁珠可以从复杂的悬浊液(如血液)中直接捕获和分离完整的细胞。一般将细胞和磁珠温育后置于磁场中,未结合磁珠的细胞被洗脱,而结合磁珠的细胞被保留在磁场中,移除磁场后即可得到结合磁珠的细胞。可根据起始样本的性质、细胞表面标志物和下游应用要求等确定分选策略,目前主要有三种分选策略:阳性分选、阴性分选和组合分选<sup>[31]</sup>。(1)阳性分选是指直接用磁珠从复杂的细胞混合物中根据独特的细胞表面抗原分离出特定的细胞亚群,使用磁场对抗体包被磁珠和靶细胞形成的复合物进行收集,为目前细胞治疗产品中最常用的分选方式。(2)阴性分选则是用磁珠从样本中去除所有不需要的细胞类型,一般用于稀有细胞的预富集及高纯度细胞群的分离,阴性分选得到的细胞表面不结合磁珠。(3)组合分选通常用于稀有细胞的分选,或者从一个样本中分离出不同的细胞亚群。通常先通过阴性分选去除不需要的细胞类型,再通过阳性分选对目的细胞进行富集和分离,组合分选能极大地提高稀有细胞的纯度<sup>[31-34]</sup>。除分选功能外,CD3/CD28磁珠还能模拟抗原提呈细胞对T细胞进行体外激活,促进T细胞的增殖。

Dynabeads®为微米级别磁珠,虽然本身不具有毒性,但因组成材料聚苯乙烯不易降解、偶联抗体(特别是鼠源抗体)可能引起的免疫反应及回输后磁珠可能堵塞毛细血管,一般会在培养数天后用磁场进行磁珠解离和去除,并在放行检测中用光学显微镜检测磁珠残留量。虽然国内对磁珠残留限度尚无明确规定,但行业内通用标准为每 $3 \times 10^6$ 个细胞中磁珠含量应小于100个。

MACS® Microbeads为纳米级别磁珠,生产商声明为可生物降解材料,这意味着随着细胞的增殖,细胞表面磁珠会逐渐消失。研究<sup>[33]</sup>表明,将阳性分选得到的CD45RO<sup>+</sup>记忆T细胞培养2周,未增殖细胞组磁珠残留比例为47.3%,部分增殖细胞组磁珠残留比例为8.36%,快速增殖细胞组磁珠残留比例为2.87%。这说明细胞分裂可快速稀释子代细胞表面的纳米磁珠<sup>[33]</sup>。另外,溶酶体可以通过胞吐作用消除或降解右旋糖酐铁纳米颗粒<sup>[35]</sup>。纳米级别磁珠尺寸较小,如MACS® Microbeads约为细胞体积的1/200,在光学显微镜下不易被观察到,一般通过标记磁珠表面抗体或者标记右旋糖酐后进行流式检测,报告数值意义

为表面带有磁珠的细胞比例,而非残留磁珠的个数。细胞类型的差异、培养时间的不同、增殖潜力的差异等均会导致纳米磁珠的降解比例不同,考虑工艺对磁珠的去除能力及纳米磁珠相应的组分如右旋糖酐、抗体(尤其是鼠源抗体)等可能引起的免疫反应,建议对纳米磁珠残留进行研究。同时,建议申请人对供应商的磁珠质量进行定期审计,关注其生产原材料及关键质量属性(如抗体:铁比例等)的变化,必要时开展磁珠和细胞产品层面的变更可比性研究。

磁珠的组成成分之一为单克隆抗体,建议参考抗体的生产要求,生产过程中尽量不使用生物来源的原材料,使用检定合格的细胞库进行生产,且生产过程应包含能有效去除/灭活病毒的步骤。磁珠的级别应与细胞治疗产品的研发阶段相适应,临床试验用的细胞治疗产品应尽可能采用符合药品生产质量管理规范(good manufacturing practice, GMP)标准的磁珠。质量控制方面,应尽可能保持批次间的一致性,避免因批次间的差异而导致磁珠在分选能力上的差异。

## 5 滋养细胞

滋养细胞通常为经过适当处理后,自身不能分裂和增殖,但通过细胞和细胞间的相互作用或分泌一定的营养物质,用以支持其他细胞生长、扩增的一类细胞<sup>[36]</sup>。目前主要应用于NK细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、诱导多能干细胞(iPS细胞)-NK细胞等细胞的体外扩增,取得了良好的扩增效果。滋养细胞来源广泛,目前使用的滋养细胞主要包括外周血单个核细胞(PBMC)及一些肿瘤来源的细胞,经过或不经过基因修饰。

《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》<sup>[37]</sup>和《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》<sup>[38]</sup>中均将滋养细胞定义为生产辅助细胞,需充分说明其使用的必要性与合理性,应符合来源和培养传代历史清楚、安全性风险可控、进行细胞库分级管理(如适用)、检验结果合格的基本原则。滋养细胞如需扩大培养,建议尽可能一次性完成最终细胞的扩大培养,或确保每次扩大培养工艺和质量的一致性,且应评估扩大培养过程中是否引入了新的风险。建议建立不同生产步骤/阶段的检测程序,如检测时间、检验项目、检测方法和验收标准等。需要关注种属特异性病毒检测和可能引入的安全性风险。涉及滋养细胞失活处理的工艺,如辐照等,应经过研究与验证<sup>[39]</sup>。滋养细胞的添加量和残留量,应经过研究和验证,需证明不会对产品的安全性和有效性造成影响。

此外,对于经过基因修饰的滋养细胞,建议在构建细胞株之前评估其可能对细胞终产品产生的影响。为了保证滋养细胞的均一性和后续残留检测的便利性,建议经过基因修饰后进行单克隆筛选和建库,采用相关检测技术结合单克隆筛选和细胞库建库对细胞的单克隆性、基因插入位点、转基因原件拷贝数、转基因表达等进行确认,同时关注基因修饰系统残留及基因修饰系统所引入的风险。

滋养细胞的使用和控制方面,需对添加量进行研究,尽量使用最少的添加量生产出符合预期产量和质量的细胞产品。建议在生产过程的适当步骤对滋养细胞的残留进行定量研究,以了解滋养细胞被去除或将降解的趋势。应尽可能开发高灵敏度的检测方法对滋养细胞残留进行检测,确保细胞终产品中尽可能没有残留的滋养细胞<sup>[39]</sup>。由于肿瘤来源的细胞,其可能携带致癌基因或其他高风险因素,因此建议谨慎选用;对明确具有致癌性的基因进行残留检测,并对终产品的成瘤性进行研究,根据研究结果决定是否纳入质量标准进行控制。

## 6 结 语

随着产业发展和科学技术进步,细胞治疗产品的关键原材料势必会不断迭代,向着更安全和高效的方向发展。例如,慢病毒系统中加入绝缘子进一步降低目的基因与插入位点附近基因的相互作用、碱基编辑器和先导编辑器取代Cas9进行更为精确的基因编辑,以及可从细胞表面解离的分选磁珠系统等。这些变化可能会改变关键原材料本身的物质基础和作用机制,因此在应用时可根据研发情况具体问题具体分析,根据原材料本身的组成和性质、作用机制及可能产生的影响等综合考虑制定控制策略。另一方面,随着人们对细胞治疗产品和关键原材料研究的日益深入和完善,可能会识别更多潜在的风险从而制定更为完善的风险控制策略。因此,将来原材料的安全性势必会不断提高,与此同时,对于风险的识别能力和控制手段也会不断更新和完善。相信通过细胞治疗产品申请人/持有人、生产方和政府监管机构等各方的共同努力,关键原材料的安全性和风险控制策略将不断完善,进而促进中国细胞治疗相关产业的发展,造福患者。

## [参 考 文 献]

- [1] MILONE M C, O' DOHERTY U. Clinical use of lentiviral vectors [J]. *Leukemia*, 2018, 32(7): 1529-1541. DOI: 10.1038/s41375-018-0106-0.
- [2] POLETTI V, MAVILIO F. Designing lentiviral vectors for gene therapy of genetic diseases[J/OL]. *Viruses*, 2021, 13(8): 1526[2024-



- 06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8402868/>. DOI: 10.3390/v13081526.
- [3] MODLICH U, NAVARRO S, ZYCHLINSKI D, *et al.* Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors[J/OL]. *Mol Ther*, 2009, 17(11): 1919-1928[2024-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835038/>. DOI: 10.1038/mt.2009.179.
- [4] 卢加琪, 韦薇, 白玉, 等. 细胞治疗产品的基因转导系统及审评要点[J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(1): 27-32. DOI: 10.3969/j.issn.1003-3734.2020.01.005.
- [5] VANNUCCI L, LAI M, CHIUPPESI F, *et al.* Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology[J]. *New Microbiol*, 2013, 36(1): 1-22.
- [6] MAETZIG T, GALLA M, BAUM C, *et al.* Gammaretroviral vectors: biology, technology and application[J/OL]. *Viruses*, 2011, 3(6): 677-713[2024-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185771/>. DOI: 10.3390/v3060677.
- [7] RINTZ E, HIGUCHI T, KOBAYASHI H, *et al.* Promoter considerations in the design of lentiviral vectors for use in treating lysosomal storage diseases[J/OL]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2022, 24: 71-87[2024-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8688940/>. DOI: 10.1016/j.omtm.2021.11.007.
- [8] FDA. Testing of retroviral vector-based human gene therapy products for replication competent retrovirus during product manufacture and patient follow-up; guidance for industry[EB/OL]. (2020-01)[2024-06-02]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/testing-retroviral-vector-based-human-gene-therapy-products-replication-competent-retrovirus-during>.
- [9] 国家药品监督管理局药品审评中心. 慢病毒载体RCL检测问题与解答(征求意见稿)[EB/OL]. (2023-10-13)[2024-06-02] <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/3216c2903507d7fcdd2c83abbccdc404>.
- [10] 国家药品监督管理局药品审评中心. 免疫细胞治疗产品临床试验技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2021-02-09)[2024-06-02]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1936d1c9006ccce2251702221f063b1c>.
- [11] 国家药品监督管理局药品审评中心. 基因治疗产品长期随访临床研究技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2021-12-01)[2024-06-02]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/c9de887410ddcc291ce5a1c039a241c6>.
- [12] EMA. Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells [EB/OL]. (2021-04-28)[2024-06-02]. <https://www.ema.europa.eu/en/quality-non-clinical-clinical-aspects-medicinal-products-containing-genetically-modified-cells-scientific-guideline#revision-1effective-from-1062021-8966>.
- [13] 国家药品监督管理局药品审评中心. 基因修饰细胞治疗产品非临床研究技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2021-11-30)[2024-06-02]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/41bc557bec23a6ebfb0e148cc989f041>.
- [14] 国家药品监督管理局药品审评中心. 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)治疗产品申报上市临床风险管理计划技术指导原则[EB/OL]. (2022-01-26)[2024-06-02]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/574e71202540d2b38cf34dfcb5673a86>.
- [15] ASMAMAW M, ZAWDIE B. Mechanism and applications of CRISPR/cas-9-mediated genome editing[J]. *Biologics*, 2021, 15: 353-361. DOI: 10.2147/BTT.S326422.
- [16] REDMAN M, KING A, WATSON C, *et al.* What is CRISPR/Cas9? [J]. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 2016, 101(4): 213-215. DOI: 10.1136/archdischild-2016-310459.
- [17] 徐隆昌. 外周血来源的通用型CAR-T细胞产品研究进展和审评考虑[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(21): 2159-2164. DOI: 10.3969/j.issn.1003-3734.2022.21.012.
- [18] LI T X, YANG Y Y, QI H Z, *et al.* CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 36[2024-06-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36646687/>. DOI: 10.1038/s41392-023-01309-7.
- [19] ZHANG X H, TEE L Y, WANG X G, *et al.* Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering[J/OL]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2015, 4(11): e264[2024-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4877446/>. DOI: 10.1038/mtna.2015.37.
- [20] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.010.
- [21] CHARLESWORTH C T, DESHPANDE P S, DEVER D P, *et al.* Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans[J/OL]. *Nat Med*, 2019, 25(2): 249-254[2024-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7199589/>. DOI: 10.1038/s41591-018-0326-x.
- [22] PERWEEN S, KUMAR D, KUMAR A. A review on transposons and its utilization as genetic tool[J]. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 2020, 9(2): 1874-1884. DOI: 10.20546/ijcmas.2020.902.214.
- [23] OCHMANN M T, IVICS Z. Jumping ahead with Sleeping beauty: mechanistic insights into cut-and-paste transposition[J/OL]. *Viruses*, 2021, 13(1): 76[2024-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7827188/>. DOI: 10.3390/v13010076.
- [24] HICKMAN A B, DYDA F. Mechanisms of DNA transposition[J/OL]. *Microbiol Spectr*, 2015, 3(2): MDNA3-MDNA0034-2014[2024-06-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26104718/>. DOI: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0034-2014.
- [25] KAWAKAMI K. Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates [J/OL]. *Genome Biol*, 2007, 8(Suppl 1): S7[2024-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2106836/>. DOI: 10.1186/gb-2007-8-s1-s7.
- [26] 姜淇耀, 史甲儒, 罗志强, 等. 基于PiggyBac转座系统的CD19-CAR载体的构建及功能鉴定[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(2): 156-160. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2023.02.009.
- [27] SANDOVAL-VILLEGAS N, NURIEVA W, AMBERGER M, *et al.* Contemporary transposon tools: a review and guide through mechanisms and applications of Sleeping beauty, piggyBac and Tol2 for genome engineering[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10): 5084[2024-06-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34064900/>. DOI: 10.3390/ijms22105084.
- [28] TSUKAHARA T, IWASE N, KAWAKAMI K, *et al.* The Tol2 transposon system mediates the genetic engineering of T-cells with CD19-specific chimeric antigen receptors for B-cell malignancies [J/OL]. *Gene Ther*, 2015, 22(2): 209-215[2024-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5548386/>. DOI: 10.1038/gt.2014.104.
- [29] FRENEA-ROBIN M, MARCHALOT J. Basic principles and recent

- advances in magnetic cell separation[J/OL]. *Magnetochemistry*, 2022, 8(1): 11[2024-06-02]. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry8010011>. DOI: 10.3390/magnetochemistry8010011.
- [30] MOLDAI R S, YEN S P, REMBAUM A. Application of magnetic microspheres in labelling and separation of cells[J]. *Nature*, 1977, 268(5619): 437-438. DOI: 10.1038/268437a0.
- [31] NEURAUTER A A, BONYHADI M, LIEN E L, *et al.* Cell isolation and expansion using dynabeads®[M]//Cell Separation. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007: 41-73. DOI: 10.1007/10\_2007\_072.
- [32] MILTENYI S, MÜLLER W, WEICHEL W, *et al.* High gradient magnetic cell separation with MACS[J]. *Cytometry*, 1990, 11(2): 231-238. DOI: 10.1002/cyto.990110203.
- [33] LAGHMOUCHI A, HOOGSTRATEN C, FREDERIK FALKENBURG J H F, *et al.* Long-term *in vitro* persistence of magnetic properties after magnetic bead-based cell separation of T cells[J/OL]. *Scand J Immunol*, 2020, 92(3): e12924[2024-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7507180/>. DOI: 10.1111/sji.12924.
- [34] GRÜTZKAU A, RADBRUCH A. Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years[J]. *Cytometry A*, 2010, 77(7): 643-647. DOI: 10.1002/cyto.a.20918.
- [35] MÜLLER P, GAEBEL R, LEMCKE H, *et al.* Intramyocardial fate and effect of iron nanoparticles co-injected with MACS® purified stem cell products[J]. *Biomaterials*, 2017, 135: 74-84. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.05.002.
- [36] LLAMES S, GARCÍA-PÉREZ E, MEANA Á, *et al.* Feeder layer cell actions and applications[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2015, 21(4): 345-353. DOI: 10.1089/ten.TEB.2014.0547.
- [37] 国家药品监督管理局药品审评中心. 免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2022-05-26)[2024-06-02]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/0584963a84e01bb4d83022f559d22144>.
- [38] 国家药品监督管理局药品审评中心. 人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2023-04-25)[2024-06-02]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1dfacaa7804aca84d648edb83b10c40b>.
- [39] 尹慧芳, 徐隆昌, 邱晓, 等. 浅析细胞治疗产品中滋养细胞的使用及控制策略[J]. *中国食品药品监管*, 2024(2): 24-29. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5390.2024.02.003.

[收稿日期] 2024-06-03

[修回日期] 2024-08-19

[本文编辑] 党瑞山