

生物技术产品病毒安全控制技术要求发展趋势研究 以 ICH Q5A (R2) 为例

赛文博, 于鹏丽, 韦 薇*

(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100076)

[摘要] ICH Q5A (R1)《来源于人或动物细胞系生物技术产品的病毒安全性评价》是针对特定生物技术产品病毒安全控制的专项指导原则, 对于重组蛋白、基因工程病毒载体等多种药品的研发和生产具有重要的指导意义。该指导原则自 1999 年开始正式实施, 历经生物技术产品迅速发展的 25 年, 已不再适应产业发展的新需求。修订稿 ICH Q5A (R2) 已于 2023 年底正式签署实施, 为新产品、新技术不断涌现的生物技术产品病毒安全控制提供了更多的方法、更大的灵活性和更明晰的决策树。本文将依托 ICH Q5A (R2), 从适用产品范围、潜在病毒污染源和生产用原材料的预处理、病毒性外源因子的检测等六方面, 重点分析下一代测序技术、先验知识、连续制造等先进技术和概念的应用对生物技术产品病毒安全控制技术要求的影响, 以期为用户提供参考。

[关键词] 病毒安全控制; 生物技术产品; 下一代测序; 先验知识; 病毒清除工艺; 连续制造

[中图分类号] R95 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2025)06-0566-05

Research on the development trend of viral safety control technology and requirements for biotechnology products: taking ICH Q5A (R2) as an example

SAI Wen-bo, YU Peng-li, WEI Wei*

(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100076, China)

[Abstract] ICH Q5A (R1), Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin, is a special guideline for the control of viral safety of specific biotechnology products, which is of great significance for the research and development and manufacture of recombinant proteins, genetically engineered viral vectors and other pharmaceutical products. The guideline has been formally implemented since 1999, and after 25 years of rapid development of biotechnology products, it is no longer adapted to the new needs of industrial development. The revised version, ICH Q5A (R2), was officially signed and implemented at the end of 2023, which provides more methods, more flexibility and a clearer decision tree for virus safety control of biotechnology products under the continuous emergence of new products and technologies. Relying on ICH Q5A (R2), this paper will make discussion from six aspects, including the scope of applicable products, potential sources of viral contamination and pre-treatment of raw materials for production, detection of viral exogenous factors, etc., and focus on analyzing the impacts of the application of advanced technologies and concepts, such as the next generation sequencing, prior knowledge, and continuous manufacturing on the technical requirements of viral safety and control of biotechnology products, with a view to providing references for readers.

[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)80996158, 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)80996186, E-mail: weiw@cde.org.cn。

[DOI] 10.20251/j.cnki.1003-3734.2025.06.002

[Key words] viral safety control; biotechnology products; next generation sequencing; prior knowledge; virus clearance processes; continuous manufacturing

病毒污染风险是多种生物制品药学研究的重点,其不仅可能给患者带来直接的安全威胁,即使受污染产品未流入市场,生产场地的污染也可能给广大患者的药品供给带来巨大风险。ICH Q5A《来源于人或动物细胞系生物技术产品的病毒安全性评价》议题作为针对特定生物技术产品病毒安全控制的专项指导原则,既是相关产品开发研究的重要指导性文件,也是监管机构进行评价的重要依据。因此,广受业界和监管机构关注。

2023 年 11 月的布拉格会议中, Q5A (R2) 议题^[1]完成了正式签署,并获得管委会通过,标志历时 4 年修订工作的结束。本次议题的修订起始于 2019 年的 ICH 新加坡会议,国家药品监督管理局 (National Medical Products Administration, NMPA) 药品审评中心 (Center for Drug Evaluation, CDE) 派员全程、深度参与了该议题的修订工作。2022 年 11 月, CDE 于官网发布了《关于公开征求 ICH 指导原则〈Q5A (R2): 来源于人或动物细胞系生物技术产品的病毒安全性评价〉意见的通知》,并于次年 2 月将讨论、整合后的意见和建议反馈至议题专家工作组 (expert working group, EWG)。2023 年 12 月,在 ICH 布拉格会议结束后的 1 个月内, CDE 于官网发布了该议题的实施建议和中文版征求意见通知。2024 年 5 月, NMPA 于官网发布了《国家药监局关于适用〈Q5A (R2): 来源于人或动物细胞系生物技术产品的病毒安全性评价〉国际人用药品注册技术协调会指导原则的公告》(2024 年第 63 号),明确自 2025 年 5 月 21 日开始的相关研究 (以试验记录时间点为准),均适用 Q5A (R2) 指导原则 (以下简称“R2”)。

相较于已实施了 25 年的现行版 Q5A (R1) 指导原则 (以下简称“R1”)^[2],修订版在下一代测序技术 (next generation sequencing, NGS) 的应用、先验知识的管理和应用等方面有了长足进步,同时也在体外指示细胞法检定培养时长、有效病毒清除工艺步骤的判定等方面进行了进一步的明确,更利于全球范围内技术要求的协调统一。新议题的实施给监管方和业界既带来了便利,也带来了挑战。本文将依托 R2 更新框架,对目前生物技术产品病毒安全控制相关技术要求的发展趋势进行讨论,以为读者提供参考。

1 主要修订内容

1.1 适用产品范围的扩大

伴随以草地贪夜蛾细胞 (spodoptera frugiperda cell 9, Sf9) 为代表的新生产用细胞基质的应用和以腺相关病毒 (adeno associated virus, AAV) 为代表的创新性产品的问世,生物技术产品中病毒安全控制的要求势必进行适应性调整。为充分指导新技术、新产品的应用, R1 中的“体外细胞培养物所提取的产品”被进一步明确为“利用重组 DNA 技术并通过体外细胞培养生产的产品”;同时基于动物保护和生产工艺淘汰等因素,明确不再鼓励使用在腹水内培养的杂交瘤细胞来进行生产;而细胞治疗产品由于其生产工艺的特殊性,仍不包括在本指导原则的适用范围内。

此外, R2 中适用范围的重大变化是适用于能够开展病毒清除但不会对产品产生负面影响的特定基因工程病毒载体和病毒载体衍生产品,代表性产品包括使用杆状病毒/昆虫细胞生产的病毒样颗粒 (virus-like particles, VLPs) 等重组蛋白产品、使用腺病毒或疱疹病毒作为辅助病毒生产的 AAV 产品等。为进一步说明新增适用产品的类型及其相关的特殊考量,本次修订中专门增加附件 6 基因工程病毒载体和病毒载体衍生产品章节。相较于常见的采用已知有内源性逆转录 (reverse transcription, RT) 酶活性和病毒样颗粒的中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary, CHO) 表达体系生产的重组蛋白产品,该类产品还需要额外考虑由表达系统引入的复制型病毒 (replication competent virus, RCV) 等其他类型病毒的污染风险。但总体上,通过采用生产用原材料控制、有效的过程中检测和病毒清除工艺步骤的整体控制策略仍能确保该产品免受病毒污染的威胁。

1.2 潜在的病毒污染源和生产用原材料的预处理

R2 列举了在主细胞库 (master cell bank, MCB) 制备过程中可能引入病毒性外源因子的情形,并列举了部分控制措施,例如:对细胞培养参数进行早期监测和生产用原材料的病毒安全控制等。R2 明确当必须使用人或动物来源的生产用原材料时,除了提供资质证明外,还应关注其生产过程中的病毒清除步骤和检测结果,并尽可能对引入病毒污染风险

较高的原材料,如血清或猪胰蛋白酶等,采用电离辐照、短时高温处理或紫外 C 辐照等方式进行病毒灭活预处理。

1.3 病毒性外源因子的检测

1.3.1 检测目标 细胞库的检测目标仍包括 MCB、工作细胞库 (working cell bank, WCB)、达到体外限传代次的细胞 (limit of *in vitro* cell age, LIVCA) 和未加工收获液 (unprocessed bulk, UPB)。但在具体实施过程中,更强调基于细胞来源、传代历史、制备操作等方面,依据病毒污染的风险针对性地制定检测和控制策略。对于具有明确传代历史、已经充分表征,且具有充分先验知识的常用细胞系 (如 CHO, NS0, SP2/0 和 Sf9 等细胞系),基于其实际操作中潜在的污染风险,或可免于开展 WCB 和 LIVCA 中的部分检定项目,如 RT 酶活性和体内检测等。在病毒性外源因子的体内或体外检测中,当由于缺少特异性中和抗体或其他原因导致的生产终末期样品无法开展有效检测时,可以采用未编辑的宿主细胞作为对照细胞进行 LIVCA 检测或采用 NGS 进行检测,以确保生产过程中未引入外源病毒污染。

UPB 的检定要求也发生了显著变化,由 R1 中上市申报需至少提供 3 批次中试或商业化规模的检定结果,更新为需将其纳入生产批次的常规检测,即对每批次产品进行 UPB 检定。如果在 UPB 中检出任何外源病毒,除非有合理解释,否则不得将其用于产品生产。这一变化极大地提高了商业化生产中对病毒污染风险的发现和控制能力,特别是主培养阶段后期发生的 RT 病毒污染也能得到有效控制。另一方面,该要求也充分反映了目前的监管实践,例如:我国从 2020 年开始,已逐步要求对每批次临床试验样品和商业化生产批次产品的 UPB 进行外源因子检定。

1.3.2 检测方法 落实到各个具体检测项目,R2 版本的要求整体更为详细,先验知识的应用也为检测策略提供了新的选择。

在 RT 病毒检测中,明确指出对于已获得广泛认知的、可能会产生 RT 病毒颗粒的细胞基质,其 RT 酶活性预期即为阳性,此时无需再开展基于聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的 RT 活性检测,而直接开展电镜检测以确定所含 RT 病毒样颗粒的类型即可。关于诱导试验,R2 指出其可能有助于评价新的细胞基质中未知的内源性 RT 病毒,以及潜伏的脱氧核糖核酸或核糖核酸病毒等。

在体外细胞培养的感染性试验中,明确了指示细胞的种类包括来源物种的细胞系、人类二倍体细胞系 (如 MRC-5 细胞)、猴肾细胞系 (如 Vero 细胞) 以及其他基于细胞基质来源风险可能需要的指示细胞。检测的项目包括细胞病变、红细胞吸附或红细胞凝集试验。检测时培养时长应达到 28 d,且每 2 周至少进行 1 次亚传代。

体内检测中明确基于先验知识,在满足特定前提条件的情况下,对已经广泛使用且经充分表征的生产用细胞基质,如 CHO 细胞、NS0 细胞、SP2/0 细胞,可能无须再开展基于动物的体内检测。对于仍有未知风险的,可接种至哺乳期小鼠、成年小鼠和鸡胚中进行检测或采用 NGS 检测替代动物实验。

基于核酸扩增技术 (nucleic acid amplification techniques, NAT) 检测方法的应用是本次修订的重点之一,其中包括 PCR 检测、靶向或非靶向的 NGS 检测或其他分子生物学方法,特别是当采用 NGS 替代其他检测方法时,无须开展头对头的对比研究,而仅对其本身开展充分的方法学研究即可,此时应关注用于方法验证病毒的理化性质是否全面,以及分析数据库的完善性等。当 NAT 检测出现阳性结果时,应开展包括体外和/或体内检测在内的进一步研究以确认是否具有感染性的病毒。虽然本次修订中,NGS 被多次提及并赋予了重要意义,但在具体实施细节上仍不明确,如其方法学研究等。客观上,我国在 NGS 技术的发展和应用方面相较于国外监管机构和合同研究机构仍有一定差距。例如:我国目前尚未建立通用型 NGS 方法学验证方案,难以保证各机构研究结果的准确性;更大的差距来源于生物信息学分析数据库的建立和生物信息分析的人才储备。目前,世界主要研究和监管机构所采用的数据库均为境外数据库,其数据库的覆盖面和冗余程度直接决定了 NGS 检测结果的可靠性,特别是当数据库不够完整以至于国内的流行毒株无法有效检出,继而导致检测结果获得假阴性的结论时具有极大的危害性。此外,数据库安全性也是未来不得不纳入考量的重要因素。

1.3.3 检测结果分类 R2 在检测结果的分类上纳入了针对新型产品的考量。例如:在情况 A 中强调了要区别药物活性成分 (如 AAV) 和非预期的病毒、VLPs 或 RT 病毒样颗粒污染。在情况 F 中针对性地列举了需要采用辅助病毒进行生产的情形,明确了此时应使用辅助病毒或特异模型病毒 (如杆状病

毒、腺病毒或疱疹病毒)证明病毒清除情况。在尚未证明工艺对辅助病毒具有稳健的过量清除效率前,应对每批纯化后的产品进行检测,确保无生产病毒残留。此外,上市申报时还应提供至少3批次纯化后产品的检测结果以证明无辅助病毒残留。对于情况B(仅含有啮齿类动物RT病毒的啮齿动物细胞系)、情况C(含有啮齿类动物RT病毒以外的病毒,但其对于人体无感染性)、情况D(含有对人类具有感染性的病毒)、情况E(含有现有方法无法分类的病毒)的技术要求与R1基本保持一致。

1.4 病毒清除工艺

病毒清除工艺的特征和研究中,R2重点强调了先验知识的应用,具体内容主要涉及层析填料使用寿命末病毒清除性能的验证和病毒清除平台验证的应用。

层析填料方面,已有大量文献和实践经验证明对于蛋白A亲和和捕获层析,经重复使用的填料不会导致其病毒去除效率的下降。因此,无须再使用达到拟定寿命的蛋白A层析填料开展特定产品的病毒清除性能验证。对于其他层析填料,在具有充分先验知识,特别是内部应用经验的基础上,也可适用该原则。

病毒清除平台验证为具有充分先验知识,特别是内部应用实践经验的研发者提供了更为灵活和高效的选择。在建立和应用平台验证时,应充分了解平台验证中特定工艺步骤的病毒清除机制及影响病毒清除效果的关键因素;明确产品(或工艺中间品)的组成,并基于风险评估其与指示病毒间潜在的相互作用以及其对病毒清除效果产生的潜在影响;还要充分考虑病毒清除验证研究的一般局限性。R2新增了附件5作为应用平台验证的示例,提供了溶剂/去污剂灭活、低pH灭活和除病毒截留过滤缩小模型中关键工艺参数的最差条件以用于评估平台模型的合理性。总体上,平台验证应从指示病毒选择的合理性、工艺中间体的一致性和缩小模型的代表性三方面进行充分的对比分析,同时在实际应用时,至少需要使用细小病毒在最差条件下进行一次特定产品的除病毒截留过滤确认验证。此外,在病毒清除工艺的再评价工作中,也可引入先验知识和平台验证经验。在申报实践中,由于各研发者对于病毒清除工艺平台验证的理解有所不同,CDE制定了《治疗用重组蛋白产品临床试验申请病毒清除工艺平台验证技术指导原则(试行)》^[3],并于2024年1

月12日正式挂网实施。该指导原则明确了病毒清除工艺平台验证中所需关注的关键工艺参数项目、建议的工艺参数范围及建立平台所需的案例数。

在病毒清除能力评估方面,R2明确有效的病毒清除步骤通常至少在2个独立研究中会使病毒量可重复地减少达到至少 $4 \log_{10}$,而稳定降低 $1 \sim 3 \log_{10}$ 的步骤有助于确保病毒安全性并可纳入总体病毒下降的评估。

此外,在病毒清除工艺验证研究中,产品特性也对验证的方案具有显著影响,例如:在采用杆状病毒作为辅助病毒生产的VLPs产品中,不但需要在指示病毒中增加相应的模型病毒,而且由于VLPs本身结构大小可能导致常用的20 nm病毒截留过滤无法使用,也给相应产品生产工艺中病毒的安全控制能力带来了新的挑战。

1.5 连续制造

伴随ICH Q13的落地,连续制造逐渐成为生产方式革新的方向之一。对于生物技术产品,虽然连续制造下的病毒安全控制的整体思路 and 风险评估方向与既往批生产模式基本一致,但在生产用原材料的管理和预处理、生产过程中的取样与检测策略及方法、病毒清除工艺验证、病毒安全控制决策树等技术细节仍存在显著差异。对此,R2除了在第七章中针对性地提出了潜在的风险点和整体控制策略外,还在各章节中插入了相应的特殊考量。例如:对于灌流培养,考虑到使用了微滤系统,细胞样品的获取可能存在困难,可以使用不含细胞的未加工收获液进行检定。同时,在连续收获过程中,由于外源病毒和内源病毒水平有可能随着细胞培养持续时间而发生变化,应证明取样策略(包括样本的周期性和组成)的合理性。

1.6 其他

除上述进行了较大规模修订的内容外,本次R2还更新或明确了部分技术细节。例如:在CHO细胞的情况B中,内源性RT病毒已被广泛定性为非感染性病毒,因此,在未检出感染性RT病毒的前提下,其安全限度可由“ $<10^{-6}$ 颗粒·剂 $^{-1}$ ”变更为“ $<10^{-4}$ 颗粒·剂 $^{-1}$ ”。

专业术语也进行了增补和修订,例如:首次明确EOPC和LIVCA相互等同,新增了关于NGS、平台验证等概念。其中,备受关注的先验知识被定义为:现有知识,包括内部知识(如开发和生产经验)、外部知识(如科学和技术出版物,包括供应商数据、文献

和同行评审的出版物)或既定科学原理(如化学、物理和工程原理),该定义强调了当应用先验知识时,内部实践获得的经验是首要且必需的。

2 展望与挑战

ICH Q5A(R2)的成功修订,为新产品、新技术加持下的生物技术产品病毒安全控制提供了更多的方法、更大的灵活性和更明晰的决策树。特别是病毒清除平台验证,基于工业界和监管方近20年来的实践经验,对于满足前提条件的产品和研发者,在保证产品安全性的前提下节省了大量的时间和资金。工艺变更后的病毒安全性评估也越来越多地应用于取代重新开展试验性研究。但同时其作为一个高等级指导原则,在NGS的方法学验证、平台验证模型的建立等方面仅提出了有限的建议,缺乏更为充分的技术细节。在给未来技术发展留有接口的同时,也给全球协调统一监管尺度的速度和程度上引入了

未知数。总之,如何基于ICH Q5A(R2)和科学实践,强化全球工业界和监管方共识,加速具有临床价值生物技术产品的研发和生产,仍是一个需要努力的课题。

[参 考 文 献]

- [1] ICH. ICH Q5A (R2). Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin[EB/OL]. (2023). https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q5A_%28R2%29_Guideline_2023_1101.pdf.
- [2] ICH. ICH Q5A (R1). Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin[EB/OL]. (1998). https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5A_R1/Step4/Q5A_R1_Guideline.pdf.
- [3] 国家药品监督管理局药品审评中心.《治疗用重组蛋白产品临床试验申请病毒清除工艺平台验证技术指导原则(试行)》[EB/OL]. (2024). https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/52daa6be5e529f9e3b1f5c89_fc5607ce.

编辑:刘卓越/接受日期:2025-02-11