

基因修饰细胞治疗产品的生物分析策略与方法学介绍

张贺峰^{1,2}, 梁宇^{1,2}, 刘颖^{3*}, 邹灵龙^{1,2*}

(1. 苏州康维讯生物技术有限公司, 江苏 苏州 215100;

2. 中国科学院大学温州研究院, 浙江 温州 325024;

3. 中国食品药品检定研究院, 北京 100176)

[摘要] 基因修饰细胞治疗产品是指经基因修饰、并按照药品监管相关法规进行研发和注册申报的活细胞产品, 主要包括基因修饰的免疫细胞、干细胞以及其他类型细胞的治疗产品。此类治疗产品既有细胞产品自身特点, 也有基因治疗产品的潜在风险, 生物分析策略要考虑这两方面的特点。恰当设计并执行临床生物分析的检测方法, 开展充分的生物分析研究将有助于明确基因修饰细胞治疗产品的有效性与安全性、并最终确立所开发产品的获益风险比, 其重要性是不言而喻的。本文从药代(细胞)动力学、药效学与免疫原性的研究上综述了细胞治疗产品的生物分析的策略和实操。

[关键词] 生物分析; 细胞治疗; 药代(细胞)动力学; 免疫原性

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-3593(2023)05-0369-08

Introduction of Bioanalytical Strategies and Methodologies for Genetically Modified Cell Therapy Products

ZHANG He-feng^{1,2}, LIANG Yu^{1,2}, LIU Ying^{3*}, ZOU Ling-long^{1,2*}

(1. Suzhou Kanwhish Biotech Co., Ltd., Jiangsu Suzhou 215100, China;

2. Wenzhou Institute of the University of Chinese Academy of Sciences, Zhejiang Wenzhou 325024, China;

3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China)

[Abstract] Genetically modified cell therapy products refer to living cell products that have been genetically-modified and are developed for marketing in accordance with relevant regulations. They mainly include genetically modified immune cells, stem cells, and other cell-derived products. While genetically modified cell therapy products have characteristics of the cell product, they carry potential risks of gene therapy because of their gene modification nature. Bioanalytical strategies should take these elements into consideration. This requires properly designed and implemented bioanalytical methods for clinical studies. Adequate bioanalysis is therefore critical to collect data and information for the evaluation of efficacy, safety, and finally the benefit-risk ratio of the gene-modified cell products, and to provide evidence to support clinical trial design and risk control strategies. This review summarizes bioanalytical strategies and practices of cell therapy products from pharmacokinetic (cellular kinetics), pharmacodynamic, and immunogenicity evaluation perspectives.

[Key Words] Bioanalysis; Cell therapy; Pharmacokinetics (Cellular kinetics); Immunogenicity

细胞与基因治疗(Cell and Gene Therapy, CGT)按产品形式可主要分为体外基因治疗和体内基因治疗。通常, 体外基因治疗主要涉及基因修饰的细胞治疗, 指获取患者的目的细胞后, 在体外经过基因修饰

技术(如调节、替换、添加或删除基因等)以改造其细胞生物学特性, 再回输至患者体内用于治疗人类疾病的活细胞治疗产品。基因修饰细胞治疗产品在临床治疗中以基因修饰的免疫细胞、干细胞和它们衍生的细胞为主; 而体内基因治疗主要包括病毒载体介导的基因治疗、脂质载体介导的基因治疗和核酸基因治疗(表1)。本文将围绕基因修饰细胞治疗产品的生物分析展开讨论, 结合当前国际和国内通行的相关生物分析指南、法规以及相关文献, 提出这类产品的临床生物分析策略和建议^[1,2]。

[作者简介] 张贺峰, 男, 研究实习员, 研究方向: 生物分析、生物标志物研究。E-mail: hefengzhang@ucas.ac.cn

***[通讯作者]** 刘颖, 女, 研究员, 研究方向: 药物分析与药物质量控制。E-mail: liuying@nifdc.org.cn

邹灵龙, 男, 研究员, 研究方向: 转化医学与精准治疗。E-mail: Michael_zou@ucas.ac.cn

表 1 基因修饰细胞治疗产品的分类

产品分类	主要的细胞类型	获批的治疗产品*
基因修饰免疫细胞产品	CAR-T	Kymriah®
	CAR-NK	Yescarta® (奕凯达®)
	TCR-T	Tecartus®
		Breyanzi®
		Abecma®
基因修饰干细胞产品	HSPC	Strimvelis®
	HSC	Zynteglo®
	iPSC	Skysona®
		Libmeldy®
基因修饰其它衍生细胞产品	Chondrocytes	Invoossa-K® #

注: * 包含全球主要监管机构(中国 NMPA, 美国 FDA, 欧盟 EMA) 批准的基因修饰细胞治疗产品; #Invoossa-K® 在韩国药监部门获批上市, 于 2019 年退市

1 基因修饰细胞治疗产品

1.1 基因修饰免疫细胞治疗产品

基因修饰免疫细胞治疗产品主要指采用受试者自体或同种异体来源的免疫细胞, 经体外培养并进行基因修饰和改造, 使其具有靶向杀伤能力, 再回输至人体内, 通过直接靶向杀伤目标细胞、调节免疫系统、减弱免疫耐受、激活免疫响应等方式进行干预和治疗的细胞产品。根据采用的免疫细胞种类、基因工程的改造特点, 基因修饰免疫细胞治疗产品的主要分为嵌合性 T 细胞疗法 (Chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)、嵌合性 NK 细胞疗法 (CAR-NK)、T 细胞受体基因工程改造的 T 细胞 (T cell receptor-engineered T-cell, TCR-T) 等。而对于未经基因修饰的细胞疗法诸如肿瘤浸润淋巴细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞等则不属于讨论的范畴^[3]。

目前发展最为成熟、最迅速的基因修饰免疫细胞治疗产品是针对淋巴瘤的表面蛋白 CD19 和 BCMA 的 CAR-T 细胞疗法, 已有多款 CAR-T 产品获得我国药品监督管理局 (NMPA)、美国药监局 (US FDA)、或欧盟药监审评机构 (EMA) 等监管机构批准上市。此外, 一款同种异体 T 淋巴细胞自杀基因免疫疗法的产物是 Zalmoxis® (已退市), 用于辅助治疗造血干细胞移植后的移植物抗宿主病^[4,5]。

1.2 基因修饰干细胞治疗产品

干细胞具有自我更新、多向分化潜能、良好的组织相容性等特性, 可作为基因修饰细胞治疗产品理想的细胞载体, 在再生医学领域和 CGT 领域具有广阔

的应用前景。人源干细胞及其衍生的干细胞治疗产品同样需要经过体外操作 (包括提取、分离、纯化、培养、扩增、基因编辑/基因修饰、诱导分化、冻存及复苏、运输等过程) 形成临床的治疗产品, 对干细胞有缺陷的基因进行编辑和修正后再回输 (植入) 至患者体内, 可用于遗传性疾病的干预和治疗^[6]。基因修饰干细胞治疗产品对临床试验设计要求更高, 但现阶段的临床数据多源自单中心、小样本、对罕见疾病开展的临床试验, 数据局限性对该类治疗产品的开发以及其相关的安全性、有效性评估带来诸多挑战。开展科学、充分的生物分析能够保障基因修饰干细胞治疗产品在临床试验阶段顺利进行, 生物分析是临床试验不可或缺的组成部分^[7]。基因修饰干细胞治疗的适应证主要集中在罕见病和神经退行性疾病, 在欧美地区获批上市的基因修饰干细胞治疗产品包括用于治疗腺苷脱氨酶严重联合免疫缺陷症的 Strimvelis®、治疗输血依赖性 β-地中海贫血的 Zynteglo®、治疗早期脑型肾上腺脑白质营养不良的 Skysona® 以及治疗早发性异染性脑白质营养不良的 Libmeldy® 等^[8]。

2 基因修饰细胞治疗产品的生物分析

在临床研究中, 基因修饰细胞治疗产品进入人体内后, 由循环系统将细胞产品递送并分布到各个组织部位, 需要监测不同给药阶段细胞产品在循环系统中的“药物”含量以及持续周期, 若细胞产品发生广泛的迁移和分布, 还需对细胞治疗产品的生物分布、归巢和追踪监测进行研究^[3,9]。经基因修饰的免疫细胞和干细胞治疗产品在人体内均可能发生细胞表型分化、细胞类型转换 (尤其来源于多细胞亚群的产品), 可能发展出非预期的作用机制, 进而影响其短期药效和长期疗效。基因修饰细胞治疗产品即使来源于受试者本身, 其外源表达产物蛋白和细胞产品本身均可能引发免疫原性反应和免疫毒性, 这将影响治疗的有效性和安全性。基因修饰细胞治疗产品既有细胞治疗的特点, 也有基因治疗的潜在风险, 临床研究的生物分析是细胞治疗产品研发的重要内容和环节之一, 需兼顾两方面的特点进行设计和开展^[10]。

对于基因修饰细胞治疗产品, 重要的生物分析内容包括药代 (细胞) 动力学分析、药效学分析、免疫原性分析和生物标志物分析等^[10]。其中, 阐明药代 (细胞) 动力学特征, 有助于理解细胞治疗产品在进入人体内后的动态变化规律以及伴随的生物学行为, 为给药剂量的选择提供支持。评估产品是否达到预期的治疗效果以及确认作用机制需要进行药效学研究, 应采用可靠的检测方法验证治疗产品的基本治疗机理,

确定药效学标志物。药效学研究的试验设计需要考量基因修饰细胞治疗产品的预期作用机制、给药途径和方式、疾病周期等因素,并结合药代(细胞)动力学特征,以明确基因修饰的目的,产品功能、产品药效导致的影响等^[3]。另一方面,免疫原性的生物分析是评估安全性的重要内容,应根据免疫原性相关的技术研究指导原则建立方法,准确监测并分析治疗后的一系列免疫反应特征(包括固有免疫、体液免疫和细胞免疫),确认不良免疫反应的临床检测指标,为制定临床风险控制措施提供参考性依据^[11,12]。在临床前以及临床研究中,开展充分的生物分析研究可以收集用于评估的数据和信息,以确立所开发的基因修饰细胞治疗产品具有合理的、可接受的获益风险比,为产品的风险控制策略提供证据支持。

3 药代(细胞)动力学分析

基因修饰细胞治疗产品是活的细胞药物,其药代动力学研究也常被称为细胞动力学研究,其特征与小分子药物或传统大分子生物药(例如重组蛋白、抗体药)有着明显的区别。临床药代(细胞)动力学分析关注的核心内容是细胞产品进入人体内后“药物”数量的动态变化、持续时间和周期(例如暴露量、达峰浓度、达峰时间、半衰期等特征常数);此外,也可以进一步评估细胞活力/表型分化、预期存活期内的功能(或替代性标志物)、体内生物分布、产物蛋白的分泌或游离形式的含量等特征^[12]。基因修饰细胞治疗产品的药代(细胞)动力学研究应能够阐明细胞产品在体内的生物学过程以及伴随的生物学行为,根据细胞治疗产品类型和特点、研究目的及检测指标的临床价值,建立合理的生物分析方法并对方法进行必要的

验证^[12]。基因修饰免疫细胞治疗产品的药代(细胞)动力学分析较为成熟,而大多数在欧盟 EMA 获批上市的基因修饰干细胞治疗产品则尚未描述其产品的药代(细胞)动力学特征。建议在早期的临床研究时,尽可能开展对基因修饰细胞治疗产品的药代(细胞)动力学研究,为新药上市申请提供完备的生物分析证据支持。用于这类产品药代(细胞)动力学研究的方法主要有 PCR 分析法和流式细胞分析法。

3.1 PCR 分析法

基因修饰细胞治疗产品由于经基因编辑技术将外源基因导入治疗产品,其药代(细胞)动力学评估常用 PCR 法进行外源基因的拷贝数评估,采用的技术包括定量 PCR (qPCR) 和数字 PCR。在建立 PCR 分析方法时,首先根据转导的外源基因序列设计高度特异性的引物和探针(例如 CAR-T 细胞治疗产品,通常设计的区域可位于特异性较高的 scFv 域或者 2 段基因交界处等位置,如图 1)、制备基因组 DNA (gDNA) 标准品、选择适宜的内参基因(如 ACTIN、CDKN1A),以及根据 qPCR 的反应效率和 gDNA 量进行因子修正,最终在受试者血液样本中确定单位 gDNA 的 CAR 转基因拷贝数,用于监测体内转基因的拷贝数^[13]。为了评估 qPCR 法在 CAR-T 细胞中的分析灵敏度和重复性,可应用数字 PCR 技术对 CAR 基因拷贝数进行绝对定量,并将结果作为 qPCR 检测方法的参考拷贝数。由于数字 PCR 技术的检测灵敏度更高,对超低丰度和浓度的待测分析物的检测更具优势。当治疗周期或长期随访过长(目标分析物的丰度变得很低)时,可优先考虑基于数字 PCR 的分析方法^[14]。

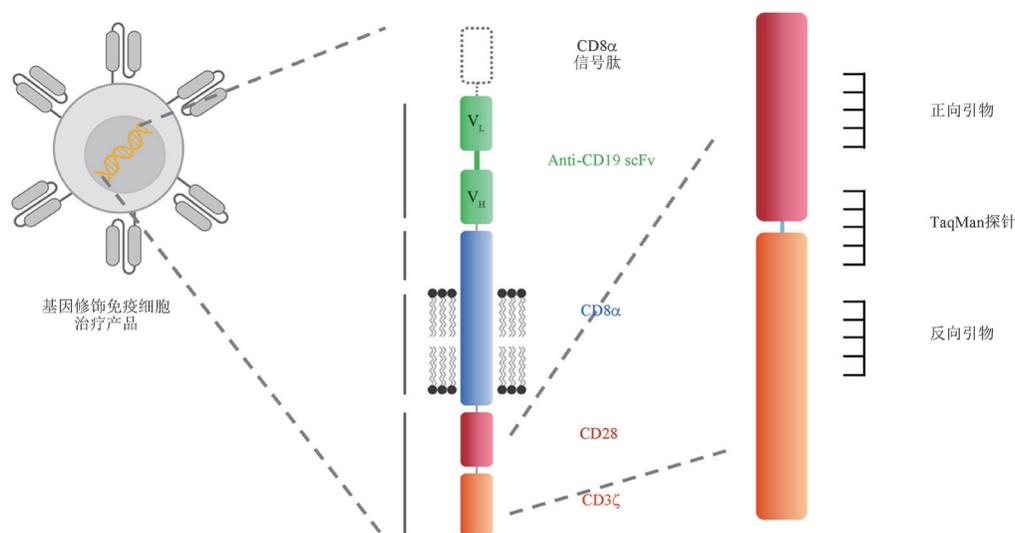


图 1 qPCR 引物与探针的设计

3.2 流式细胞分析法

对于细胞治疗产品,如果细胞产品表达特异性的膜表面标志物(如 CAR-T 细胞的 CAR 蛋白),可以使用流式细胞术的药代(细胞)动力学分析方法;如果无法通过基因修饰的外源蛋白来区分细胞产品和内源细胞,则建议评估目标细胞整体的细胞数量和动态规律^[15]。

对于流式细胞术的方法开发和验证,首先需要考虑的是构建阳性细胞标准品。理想的阳性细胞标准品是临床治疗时来源于受试者制备的基因修饰细胞治疗产品本身(即预期用途样品),但实际情况下限于药品材料的稀缺性大多难以实现。因此需要采用替代性的材料另外构建阳性细胞标准品,构建目标是最大程度接近预期用途样品,材料可考虑稳定表达目的基因的均质细胞系,以及将目的基因转导至正常供体来源的目的细胞(如 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞、CD34⁺ 细胞等)。由这些材料构建的阳性标准品各具优势和局限性,研究者可在不同开发阶段选择最适的阳性细胞标准品^[12,16]。

除了关键试剂的选择和制备,方法的选择也是方法开发阶段值得考虑的重点。用流式细胞术来评估药代(细胞)动力学特征,尽管在分析灵敏度上可能稍逊色于 PCR 分析法,但其表征了细胞水平的含量,更加契合“细胞动力学”的生物学含义,也能同时分析各细胞亚群的动态变化^[12,16]。另外,基于流式细胞术的方法开发无需申办方提供 CAR 基因完整的核苷酸序列信息,因此,在产品序列信息保密的情况下,仅提供 CAR 阳性细胞标准品即可进行方法开发,是支持临床生物分析开发流式细胞术检测方法的重要因素之一。尽管如此,基于流式细胞术的检测方法对临床样本和专业操作要求较高,样本的稳定时间较为有限,需要在样本采集后的短时间内完成检测,对样本的采集、转运、分析都具有极大的挑战。

3.3 两种分析方法的结合

对于基因修饰细胞治疗产品的药代(细胞)动力学研究,通常在临床开发的早期阶段建议采用多种检测方式评估并监测细胞产品在体内的动态变化过程。基因修饰细胞治疗产品可以同时采用上述两种检测方法进行分析,这两种技术手段分别测定外源基因拷贝数和目标表型阳性(如 CAR 蛋白、外源基因表达产物)的细胞数量,能够更为全面的分析细胞产品在体内的细胞增殖和存续情况^[15]。在 FDA 披露的 6 款 CAR-T 细胞治疗上市产品的药品说明书中,其中 3 款(即 Breyanzi[®]、Kymriah[®]、Abecma[®])采用了

PCR 分析法进行相关研究和数据呈递,另外 2 款(即 Tecartus[®] 和 Yescarta[®])则是以流式细胞术研究了药代(细胞)动力学,而 Carvykti[®] 的药代(细胞)动力学分析则同时应用 PCR 和流式细胞术两种分析方法。在设计药代(细胞)动力学检测方法和相互验证时,可以将 PCR 分析法的检测结果理解为细胞产品在机体内的“总数”,而流式细胞术分析法的检测结果则更偏向于“有效数”,二者在动力学上可能存在一定差异,但是也有一定的相关性^[17]。现在的观点是,早期临床研究可能同时采用两种分析方法,当相关性已经建立,后期临床研究可以只用更便于操作的 PCR 方法来评估药代(细胞)动力学。

4 药效学分析

药效学研究应采用可靠的检测方法来验证细胞治疗产品的基本治疗机理,临床试验设计应考虑细胞治疗产品的 MOA、疾病周期以及给药方式等因素,结合细胞治疗产品自身特性和细胞在机体的存活时间来考虑。

4.1 基因修饰免疫细胞治疗产品的药效学分析物

对于大多数基因修饰免疫细胞治疗产品,可以通过基因表达产物的检测或功能分析来评估药效学活性。当基因修饰免疫细胞治疗产品具有单个或多个特异性的识别靶点时,应分析其对每个靶点的作用活性。如果产品具有分泌特定蛋白、多肽或其他活性成分、亦或是敲除基因的,也需要进行针对性药效学分析,如检测特定蛋白的活性、持续时间和变化情况等。基因修饰免疫细胞治疗产品可能在体内存活较长时间,并产生长期疗效,确证性试验的临床考察点还应关注疗效的持续时间^[18]。由于临床试验的持续时间和受试者数量受限,以及基因修饰免疫细胞治疗产品尚缺乏大规模临床应用经验,上市后通过收集真实世界数据,有助于进一步考察产品的长期疗效。美国 FDA 发布的 CAR-T 细胞产品开发指导原则建议:药效学评估指标包括效应细胞因子的变化水平、免疫分型和肿瘤细胞杀伤等指标^[19]。药效学方案的设计要能反映标志物的效应特点和预期反应持续时间,且探索性的相关分析涉及 CAR-T 细胞产品的效应与药代(细胞)动力学特征间的关系,并结合 CAR-T 细胞暴露量与药物效应进行分析(如图 2)^[20]。在完整的 CAR-T 细胞临床治疗期间,可考察的药效学标志物包括:(1)稳态免疫细胞因子和促炎细胞因子(包括 IL-15、CRP、GM-CSF 等);(2)炎症相关细胞因子/标志物(包括 IL-6、IFN- γ 、IL-10 等);(3)趋化因子(包括 IP-10、IL-8、MIP-1 α 等);(4)免疫效应因子(包括 Granzyme B 等)^[20]。

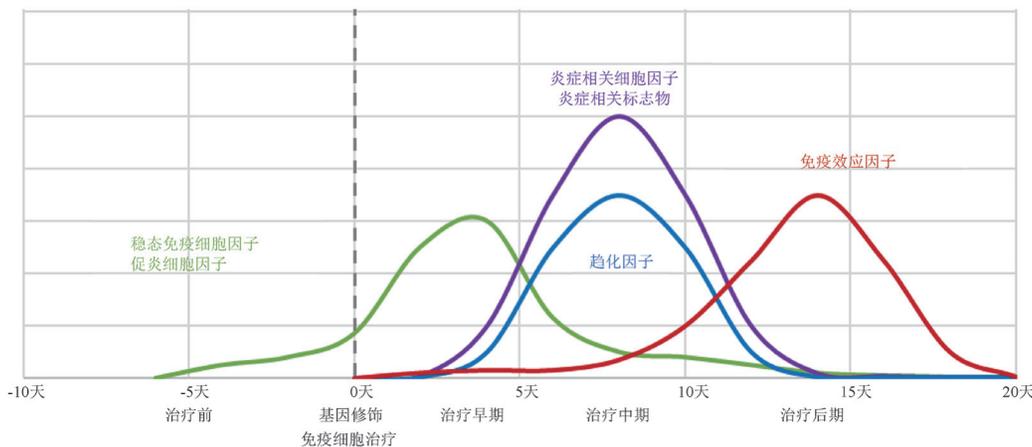


图2 基因修饰免疫细胞治疗产品的药效学标志物动态变化

4.2 基因修饰干细胞治疗产品的药效学分析物

基因修饰干细胞治疗产品具有自我复制和多向分化潜能,其在体内的存续和疗效持续周期相较于基因修饰免疫细胞治疗产品更长。接受基因修饰干细胞治疗产品的受试者可能终身伴随该类细胞产品,如果干细胞产品因非预期的分布、存续和过度增殖,将可能导致基因表达产物的毒性蓄积,影响产品疗效和安全性。应根据外源基因的表达情况和功能活性设计药效学生物分析策略,可考虑检测的药效学指标包括:(1)基因表达产物的暴露量和生物分布;(2)基因表达产物的功能活性/酶活性水平;(3)细胞表面标志物的分型和特定细胞群体的比例等^[21]。鉴于基因修饰干细胞治疗产品种类繁多、治疗原理和机制各异,具体选择哪类药效学指标应当结合产品本身特点以及主要研究者的决策来决定,以便更好地表征药效关系,提供关键的药效学临床数据并充分地解释预期或非预期的临床试验结果。

5 免疫原性分析

对于基因修饰细胞治疗产品,诱导机体产生免疫反应的主要因素包括:(1)转基因的外源产物蛋白(例如CAR基因表达的蛋白、缺陷修正的转基因表达蛋白等);(2)载体上病毒基因表达的蛋白;(3)同种异体细胞(通用型CAR-T细胞、通用型干细胞)上的抗原蛋白。免疫反应主要包括固有免疫反应、适应性体液免疫和细胞免疫反应。

体液免疫反应由B淋巴细胞驱动产生针对外源蛋白或同种异体细胞的抗体,即抗药抗体(Anti-drug-antibody, ADA)和中和抗体(Neutralizing antibody, NAb)^[22]。基因修饰细胞治疗产品的外源蛋白是基因工程化的非天然产物、或经基因修正的同源蛋白,

例如:CAR结构中的scFv和胞内胞外蛋白拼接结构是诱导机体产生体液免疫反应的主要因素,部分CAR-T细胞产品的scFv甚至是鼠源序列,其免疫原性风险可能更高;而基因修正的同源蛋白与受试者自身表达蛋白存在部分氨基酸位点差异,导致同源蛋白的表位存在差异。这些由体液免疫反应产生的ADA可能减弱或阻碍细胞产品的生物学功能,进而降低细胞产品的有效性,甚至引发非预期的不良反应、增加治疗安全性风险^[22,23],因此需要检测和评估。

细胞免疫主要表现为细胞毒性T细胞的活化以及随后的细胞毒性反应。在接受CAR-T细胞治疗时,CAR-T细胞自身可能诱发细胞免疫应答而产生针对CAR-T细胞的细胞毒性攻击。CAR-T细胞能够通过MHC I型分子递呈外源重组的CAR结构,并被细胞毒性CD8+T细胞识别,活化的CD8+T细胞针对CAR-T细胞进行靶向攻击并裂解,导致CAR-T细胞数量减少,进而导致疗效下降^[23]。

5.1 体液免疫分析方法

配体结合测定法(Ligand binding assay, LBA)和基于细胞活性分析的检测方法(Cell-Based Assay, CBA)常用于CAR-T细胞的体液免疫原性测定^[11,24]。若CAR-T产品是自体产品,传统的LBA(如ELISA)可用于评估CAR胞外结构域的ADA,但是,重组表达的游离CAR蛋白是无法完全表征CAR-T细胞在生理状态下的胞外结构,该方法可能导致ADA检出率降低。但其优势在于方法学开发和验证过程相对简单,整体开发时间往往较短,更适合早期的探索性临床研究。

流式细胞术是ADA检测的可选方案,不仅可以评估ADA的水平,也可以用于评估预存抗体的存在,而且对于同种异体(通用型)CAR-T细胞产品,流式

细胞术也能够评估因同种异体发生的体液免疫反应^[25]。流式细胞术方法开发的难点在于:(1)预期用途的阳性细胞标准品数量非常有限,很难建立受试者特异性的检测方法,因此基于稳转细胞系(CHO、Jurkat 等)或转导 CAR-T 的健康供体 T 细胞通常作为阳性细胞标准品使用(与药代(细胞)动力学基于流式细胞术的标准品建立相似);(2)ADA 阳性对照抗体的制备开发与优化验证也是挑战之一,需要制备并应用人源的 ADA 阳性对照抗体,以避免 ADA 样本与阳性对照抗体的物种差异;(3)CAR-T 预存抗体是确定 Cut point 时的干扰因素,应谨慎处理,以避免检测临床样本时发生假阴性误判^[24,25]。

5.2 细胞免疫分析方法

在临床试验阶段,监测细胞免疫反应是安全性评估的另一项重要生物分析。细胞免疫原性也可以通过多种检测方法进行评估和监测,最常用、最成熟的方法之一是 ELISpot (Enzyme-linked ImmunoSpot Assay)。采用此方法时,完整的 CAR-T 氨基酸序列用于构建重叠短肽的肽库,这些多肽将被添加至受试者外周血单个核细胞(PBMCs)中,如果受试者的 PBMCs 样品存在能够识别某个多肽段并产生反应性的 T 细胞,T 细胞将分泌一系列的炎症细胞因子,如 IFN- γ ,会在 ELISpot 上读出一个单细胞阳性斑点。此外,流式细胞术也能够用于检测细胞免疫原性,使用 CAR-T 衍生的系列多肽刺激 PBMCs,通过胞内炎症细胞因子染色技术评估细胞毒性 T 细胞的活化^[25]。

尽管 CAR-T 细胞疗法已在临床研究中经过广泛的验证,但并不完全了解免疫原性对基因修饰免疫细胞治疗产品所带来的潜在影响;另一方面,对于基因修饰干细胞治疗产品,在免疫原性分析方面仍存在更多值得探索和研究的方面,应在临床研究阶段积极开展针对基因修饰干细胞治疗产品的免疫原性分析。

6 生物标志物分析

基因修饰细胞治疗产品的生物标志物主要包括诊断性、预测性、预后性、监测性、安全性等生物标志物。早期探索性临床试验可以通过二代测序(Next-generation sequencing, NGS)的方法评估受试者基线组织的基因表达与突变特征、利用生化分析仪检测基线的血清生物标志物、或者设计检测靶点表达情况以表征诊断性生物标志物^[26]。生物标志物的界限与分类十分广泛,可依据基因修饰细胞治疗产品的特性和生物分析经验探索性地设计研究内容。例如,通过多色流式细胞术检测血液样品中免疫细胞/干细胞分化

亚群的特征,利用免疫组化或者多重免疫荧光的方法来评估目标生物标志物在组织中的表达和分布情况,对于基因修饰免疫细胞治疗产品可以考虑免疫检查点(如 PD-L1, LAG-3, TIM-3 等)和肿瘤/免疫微环境的评估^[26]。

6.1 细胞因子的评估

基因修饰免疫细胞治疗主要的不良反应涉及细胞因子释放综合征(Cytokine release syndrome, CRS)和神经毒性综合征(Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome, ICANS),受试者体内的细胞因子水平可能由于治疗骤然升高,而严重的神经毒性可能导致受试者认知障碍。对受试者的基线和预定时间节点的细胞因子水平进行监测可以实时掌握细胞因子释放的动态变化情况。这需要定制化设计生物分析方法并检测多种细胞因子,包括炎症相关因子、生长因子等,以便更好地阐明细胞产品的作用机制和药效关系^[27]。

6.2 细胞因子的分析方法

在制定所需检测的细胞因子组合时,可参考同类上市或临床阶段竞品的设计方案、已披露的临床试验结果,结合自身产品的特性和相关临床试验需要考察的目的和意义,合理地制定生物标志物分析对象。但是细胞因子的检测是高度可变的,随着临床试验 I/II/III 期的推进以及各生物分析数据的积累,需要灵活地、准确地判断和优化生物标志物检测方案,早期临床试验的生物标志物检测结果可能直接作为后续研究方向的重要依据。方法学上有单因子分析和多因子分析,开展多因子同步分析(multiplexing analysis)的难点在于各类细胞因子的动态范围差异较大,生物分析方法要具备足够的分析灵敏度以及足够宽的检测动态范围,才能保证在检测和分析时能够涵盖所有的目标分析物。常用的单因子生物分析平台有 ELISA 和 MSD,多因子分析平台有 MSD、Luminex、Simoa,在检测细胞因子上有各自的优缺点,应谨慎选择^[28]。

7 结语

基因修饰细胞治疗产品的生物分析策略概括,见表 2。本文对基因修饰细胞治疗产品的临床生物分析方法进行了讨论,结合国际和国内相关法规和指导原则,为该类治疗产品的生物分析策略与方法学提供指导和应用。相关法规和要求的推行需要监管机构和制药企业的共同努力,通过成立专家团队,以更加规范地方式开展基因修饰细胞治疗产品的生物分析工作。

表 2 基因修饰细胞治疗产品的生物分析

研究内容	分析物	检测手段
药代(细胞)动力学	目的基因拷贝数	PCR
药效学	表达产物蛋白的细胞数	流式细胞术
	产物蛋白水平	LBA、CBA
	产物蛋白的酶活性	酶活测定
	细胞因子水平	单/多因子检测平台(ELISA, MSD等)
免疫原性	细胞分型和比例	流式细胞术
	ADA、NAb	LBA、CBA
生物标志物	细胞免疫反应	ELISpot、流式细胞术
	CRS 和/或 ICANS 相关的细胞因子	单/多因子检测平台(ELISA, MSD等)
	基因突变	NGS、PCR
	组织标志物表达	IHC、IF
	相关细胞的分型和比例	流式细胞术
	MRD	流式细胞术、数字 PCR

注:ADA, Anti-drug antibody, 抗药抗体;CBA, Cell-based Assay, 基于细胞的检测方法;CRS, Cytokine release syndrome, 细胞因子释放综合征;ELISA, Enzyme linked immunosorbent assay, 酶联免疫吸附测定;ICANS, Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome, 神经毒性综合征;IF, Immunofluorescence, 免疫荧光;IHC, Immunohistochemistry, 免疫组织化学;LBA, Ligand binding assay, 配体结合测定法;MRD, Minimal residual disease, 微小残留病灶;MSD, Meso scale discovery, 一种超敏多因子电化学发光仪;NAb, Neutralizing antibody, 中和抗体;NGS, Next-generation sequencing, 二代测序;PCR, Polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应

参考文献

- [1] Katherine AH, Maria GR. Gene therapy[J]. N Engl J Med, 2019, 381(5): 455-464.
- [2] Wang D, Wang K, Cai Y. An overview of development in gene therapeutics in China[J]. Gene Therapy, 2020, 27(7-8): 338-348.
- [3] 国家药品监督管理局. 基因修饰细胞治疗产品非临床研究技术指导原则[EB/OL]. (2021-12-03) [2023-08-10]. <https://www.cde.org.cn/zdylz/fullsearchpage>.
- [4] Pan K, Farukh H, Chittep VCSR, et al. CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy[J]. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 2022, 41(1): 119.
- [5] Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies[J]. Blood Cancer Journal, 2021, 11(4): 69.
- [6] Mousaei GM, Seok J, Park HS, et al. Stem Cell Therapy: From Idea to Clinical Practice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(5): 2850.
- [7] 国家药品监督管理局. 人源性干细胞及其衍生细胞治疗产品临床试验技术指导原则[EB/OL]. (2023-06-21) [2023-08-10]. <https://www.cde.org.cn/zdylz/domesticinfo?zdyldCODE=6917d4d20e199762471bcd31aafac182>.
- [8] Lan T, Luo M, Wei X. Mesenchymal stem/stromal cells in cancer therapy[J]. Journal of Hematology and Oncology, 2021, 14(1): 1-16.
- [9] 国家药品监督管理局. 免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则[EB/OL]. (2022-05-31) [2023-08-10]. <https://www.cde.org.cn/zdylz/domesticinfo?zdyldCODE=adac7701a40bf0ad8691c409324a004c>.
- [10] Shi J, Chen X, Diao J, et al. Bioanalysis in the Age of New Drug Modalities[J]. AAPS Journal, 2021, 23(3): 64.
- [11] Stevenson L, Richards S, Pillutla R, et al. 2018 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: Focus on flow cytometry, gene therapy, cut points and key clarifications on BAV (Part 3-LBA/cell-based assays: Immunogenicity, biomarkers and PK assays)[J]. Bioanalysis, 2018, 10(24): 1973-2001.
- [12] Sarikonda G, Mathieu M, Natalia M, et al. Best practices for the development, analytical validation and clinical implementation of flow cytometric methods for chimeric antigen receptor T cell analyses[J]. Cytometry Part B: Clinical Cytometry, 2021, 100(1): 79-91.
- [13] Yang TY, Doddareddy R. Considerations in the development and validation of real-time quantitative polymerase chain reaction and its application in regulated bioanalysis to characterize the cellular kinetics of CAR-T products in clinical studies[J]. Bioanalysis, 2021, 13(2): 115-128.
- [14] Qi T, McGrath K, Ranganathan R, et al. Cellular kinetics: A clinical and computational review of CAR-T cell pharmacology[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2022, 188: 1-32.
- [15] Hays A, Durham J, Gullick B, et al. Bioanalytical Assay Strategies and Considerations for Measuring Cellular Kinetics[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(1): 695.
- [16] Sarikonda G, Pahuja A, Kalfoglou C, et al. Monitoring CAR-T cell kinetics in clinical trials by multiparametric flow cytometry: Benefits and challenges[J]. Cytometry Part B-Clinical Cytometry, 2021, 100(1): 72-78.
- [17] Awasthi R, Pacaud L, Waldron E, et al. Tisagenlecleucel cellular kinetics, dose, and immunogenicity in relation to clinical factors in relapsed/refractory DLBCL[J]. Blood Advances, 2020, 4(3): 560-572.
- [18] Larson RC, Maus MV. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells[J]. Nature Reviews Cancer, 2021, 21(3): 145-161.
- [19] FDA. Considerations for the Development of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Products[EB/OL]. (2022-03-12) [2023-08-10]. <https://www.fda.gov/media/156896/download>.
- [20] European Medicines Agency. Assessment report YESCARTA International non-proprietary name: axicabtagene ciloleucel Procedure No. EMEA/H/C/004480/0000 [EB/OL]. (2018-06-22) [2023-08-10]. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/yescarta>.
- [21] Ferrari G, Thrasher AJ, Aiuti A. Gene therapy using haematopoietic stem and progenitor cells[J]. Nature Reviews Genetics, 2021, 22(4): 216-234.
- [22] Khan AN, Chowdhury A, Karulkar A, et al. Immunogenicity of CAR-T Cell Therapeutics: Evidence, Mechanism and Mitigation[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13(May): 1-14.
- [23] Wagner DL, Fritsche E, Pulsipher MA, et al. Immunogenicity of CAR T cells in cancer therapy[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2021, 18(6): 379-393.

- [24] Neubert H, Olah T, Lee A, et al. 2018 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: Focus on immunogenicity assays by hybrid LBA/LCMS and regulatory feedback Part 2-PK, PD & ADA assays by hybrid LBA/LCMS & regulatory agencies' inputs on bioanalysis, biomarkers and immunogenicity[J]. Bioanalysis, 2018, 10(23):1897-1917.
- [25] Corsaro B, Yang TY, Murphy R, et al. 2020 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: Vaccine Assay Validation, qPCR Assay Validation, QC for CAR-T Flow Cytometry, NAb Assay Harmonization and ELISpot Validation (Part 3-Recommendations on Immunogenicity Assay Strategies, NAb Assays, Biosim[J]. Bioanalysis, 2021, 13(6):415-463.
- [26] Amini L, Silbert SK, Maude SL, et al. Preparing for CAR T cell therapy: patient selection, bridging therapies and lymphodepletion[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2022, 19(5):342-355.
- [27] Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management[J]. Blood Reviews, 2019, 34:45-55.
- [28] Hersey S, Keller S, Mathews J, et al. 2021 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: ISR for Biomarkers, Liquid Biopsies, Spectral Cytometry, Inhalation/Oral & Multispecific Biotherapeutics, Accuracy/LLOQ for Flow Cytometry (Part 2-Recommendations on Biomarkers/CDx Assays Development & Va[J]. Bioanalysis, 2022, 14(10):627-692.
- (收稿日期:2023-08-15)

· 警戒与通报 ·

英国提示妊娠 20 周后长期使用非甾体抗炎药的潜在风险

英国药品和健康产品管理局(MHRA)提示医务人员,布洛芬、萘普生和双氯芬酸等非甾体抗炎药(NSAIDs)的全身给药(口服和注射)禁用于妊娠晚期(妊娠 28 周后)。对 2022 年一项研究数据的回顾分析表明,从怀孕 20 周起长期使用非甾体抗炎药可能会增加羊水过少和胎儿肾功能障碍的风险。在此早期阶段也发现了一些动脉导管收缩的病例。经患者和医务人员相互沟通后,认为有必要在妊娠 20 周后使用全身用 NSAIDs,则应处方最短的用药时间以及最低剂量,如果使用时间超过数天,则应考虑额外的新生儿监测。此外,建议在妊娠最后 3 个月停止使用任何 NSAIDs。

NSAIDs 可阻断前列腺素的合成和释放,以缓解疼痛和炎症。NSAIDs 包括布洛芬、萘普生和双氯芬酸。此次建议适用于 NSAIDs 口服制剂和 NSAIDs 注射制剂(处方药)。

近期的一项欧洲审查考虑了有关 NSAIDs 在妊娠期风险的进一步证据,该证据来源于自 2008—2017 年的一项观察性队列研究。该研究报告称,羊水过少可能是由胎儿肾功能障碍引起的,与妊娠第 20 周开始使用 NSAIDs 有关。在妊娠中期和/或晚期暴露于 NSAIDs 的 1092 例妊娠患者中,观察到有 41 例(3.8%)羊水过少报告。相比之下,在妊娠早期接触 NSAIDs 的 1154 例妊娠患者中,有 29 例(2.5%)羊水过少报告。在同一项研究中,在妊娠中期或晚期暴露于 NSAIDs 的妊娠患者中,观察到少量动脉导管过早闭合的报告;在妊娠早期暴露于 NSAIDs 的妊娠患者中,没有发现上述报告。这项研究还观察了妊娠期暴露于安乃近的影响,安乃近是英国没有上市的另一种止痛药物。

该项审查建议,如果在妊娠 20 周后使用 NSAIDs 超过数天,则应在产品说明书中增加额外的警告,强调羊水过少和动脉导管收缩的风险。羊水过少和动脉导管收缩可能导致很严重的潜在风险,可能使胎儿发育受限和心脏功能障碍。

MHRA 人用药品委员会(Commission on Human Medicines, CHM)下的儿科用药和妇女健康药品专家咨询小组以及 CHM 考虑了这项研究的结果,并同意欧洲审查的建议。CHM 认为,长期暴露于 NSAIDs 导致的动脉导管收缩的风险是严重风险,这支持了在产品说明书中增加警告,尽管 CHM 指出,在妊娠中晚期,短期(少于几天)暴露于 NSAIDs 会带来风险的证据有限。如果医生认为 NSAIDs 治疗是必要的,那么应从第 20 周开始对羊水过少和动脉导管收缩进行产前监测。

该项审查没有评估 NSAIDs 局部用药(含 NSAIDs 的凝胶和乳膏)。建议医务人员应遵循产品说明书中与妊娠相关的禁忌和警告;建议在妊娠期间使用含 NSAIDs 的凝胶或乳膏的患者应仔细阅读患者说明书以获得建议。此外,最新的审查没有将 COX-2 抑制剂止痛药(昔布类药物)纳入评估。然而,需要注意的是,所有昔布类药物在妊娠晚期都是禁用的,部分昔布类药物在整个妊娠期都是禁用的。与其他 NSAIDs 类似,昔布类药物抑制前列腺素合成,并与羊水过少、宫缩乏力和动脉导管过早闭合风险有关。医务人员应遵循 COX-2 抑制剂类药物的产品说明书中与妊娠相关的禁忌和警告。

对 2022 年一项研究数据的审查也表明,从妊娠 20 周起长期使用 NSAIDs 可能会增加羊水过少和胎儿肾功能障碍的风险,在此早期阶段,也发现了一些动脉导管收缩的病例。NSAIDs 在妊娠晚期禁用,这意味着从妊娠第 28 周开始就不应使用 NSAIDs。这是因为使用 NSAIDs 可导致胎儿的动脉导管收缩和肾功能障碍的风险增加,在妊娠晚期上述风险更大。NSAIDs 还可能因其抗血小板聚集作用而延长产妇出血时间,并可能抑制分娩期间子宫收缩,导致分娩延迟或分娩时间延长。

NSAIDs 的产品说明书已修订,增加了包括妊娠中期羊水过少和动脉导管过早闭合的风险。目前,说明书建议从妊娠 20 周起应避免使用 NSAIDs,除非医生认为有必要。提醒医务人员,在妊娠最后 3 个月(28 周后),由于动脉导管过早闭合和胎儿肾功能障碍的风险,以及可能导致分娩期间产妇出血时间延长和子宫收缩受到抑制,因此禁止使用全身用 NSAIDs(口服和注射)。

(来源:英国药品和健康产品管理局 MHRA 网站)