

关于重组药物生产用细胞库单克隆性的审评思考

齐连权, 赵 靖, 韦 薇, 白 玉, 罗建辉*

(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022)

摘要: 用于重组蛋白药物生产的细胞库应来源于单个克隆, 以保持重组蛋白药物在整个生命周期中质量的一致性。多种技术可用于转染后细胞群的单克隆化分离及确认。本文以CHO细胞为例, 综述了工业界和监管机构对于生产用细胞库单克隆性的认知和了解, 提出了基于目前技术水平对申报临床及申报上市阶段单克隆性的一般要求, 并对非单克隆性来源细胞库的质量控制策略及审评要求提出建议, 希望能够为研发机构成功建立重组蛋白药物生产用细胞库提供参考。

关键词: 重组蛋白药物; 细胞库; 单克隆性; 有限稀释法

中图分类号: Q816 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)07-1325-05

Assessment of monoclonality of cell bank for recombinant biologics production

QI Lian-quan, ZHAO Jing, WEI Wei, BAI Yu, LUO Jian-hui*

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

Abstract: To ensure the consistency of quality in recombinant protein production, the cell bank for biologics should be derived from a single clone. A number of techniques have been used for cloning and assurance from the cellular pool after transfection with a target gene. Here, using CHO cell as an example, we summarize the knowledge and understanding of monoclonality of production cell bank from both industries and regulatory authorities, and propose general considerations on the requirements of monoclonality for clinical trial application and new drug application based on current techniques. Furthermore, we suggest quality control strategies and assessment methods for those cell banks from non-single clones.

Key words: recombinant biologics; cell bank; monoclonality; limiting dilution

近年来, 快速发展的生物技术药物已经逐渐成为多种疾病——尤其是肿瘤和免疫性疾病的有效治疗手段。大多数重组蛋白类药物由哺乳动物细胞表达生产, 其中中国仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞的使用最为广泛^[1]。CHO细胞可以高密度悬浮培养于化学成分限定的培养基中, 其高水平表达的重组蛋白结构与生物活性和人类蛋白高度相似, 多年来已被成功用于重组药物生产^[2]。

宿主细胞的驯化改造、高效的表达载体设计、高表

达细胞株的筛选策略、化学成分限定培养基的选择和生产设备改进、生产工艺的持续优化和验证等关键模块, 构成完整的工艺和产品质量控制策略。作为生物制品原液生产最关键的原材料之一, 药物研发机构应从包括安全性在内的多角度对生产用细胞基质进行适当的质量控制。

为保持重组药物在整个生命周期中质量的一致性, 监管当局通常要求药物研发机构对生产用细胞基质建立经检定符合要求的二级或三级细胞库, 可采用多种克隆化手段筛选最佳克隆用于建立主细胞库 (master cell bank, MCB) 和工作细胞库 (working cell bank, WCB)。用主细胞库传代产生的工作细胞库生产

收稿日期: 2019-01-03; 修回日期: 2019-01-26。

*通讯作者 Tel: 86-10-85243072, E-mail: luojh@cde.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0016

生物技术药物可保证每批产品都有一个经检定符合限定要求的共同起源细胞。细胞库来源的单克隆性与否对产品生命周期的质量管理非常重要。来源于一个稳定、可持续供应生产用的单克隆细胞系的细胞库能够更好地保持产品批次之间的质量一致性。

传统单克隆化的方法是有限稀释法, 随着技术的发展, 有限稀释法与成像法等其他技术联合使用可更高效地确认单克隆性^[3]。通常可使用泊松分布来推算有限稀释法得到的单克隆性概率^[4]。本文以 CHO 细胞为例, 综述了工业界和监管机构对于生产用细胞库单克隆性的认知和了解, 提出了基于目前技术水平对相关研究及申报资料的建议, 希望能够为研发机构成功建立重组药物生产用细胞库提供参考。

1 单克隆性的科学基础和技术要求现状

所谓单克隆性, 一般指用于建立细胞库的始祖细胞为单个细胞。宿主细胞转染目的基因后经筛选/加压/驯化等处理形成细胞群, 经克隆化筛选操作选择其中最优的细胞株用于建立细胞库, 进行药物生产。由于无法 100% 确保细胞库来源于单个细胞, 通常以概率的形式表示单克隆性, 并采用技术手段记录和分析来加以确认。概率是指研发机构根据实验结果计算的统计学可能性, 确认是指采用支持性的数据对单克隆性进行分析和评价。

宿主细胞和转染后的重组细胞基因组通常不稳定, 在培养过程中其基因型、核型和表型处于不断变化中, 在选择压力存在条件下变化会进一步加剧。因此即使采用来源于单个始祖细胞建立的细胞库在微观上仍然是异质的。单克隆化筛选可以将主细胞库的异质性降低到最小, 以保证产品生产工艺和质量的稳定可控; 同时模拟生产工艺对细胞株的稳定性进行评估能进一步加强工艺控制能力。若细胞库非单克隆来源, 当上游工艺发生变化时, 可能会造成细胞亚群或亚克隆的选择性生长, 从而引起生产工艺或最终产品质量属性的改变。

CHO 细胞之所以被广泛用于重组药物生产, 在于其高度的基因可塑性, 可以将目的基因高效整合进基因组中, 并在筛选压力下实现基因扩增^[5]。同时其基因组在筛选压力之下很脆弱, 在外界条件发生变化时可能对生产工艺及产品造成一定风险^[6]。这也意味着很难通过对主细胞库和/或工作细胞库的检测或后续的亚克隆手段来确认其来源于单个克隆^[7]。同样, 虽然通过传代稳定性研究可以初步判断细胞株在相应代次范围内基因型和表型的相对稳定程度, 从而为保证产品质量提供基础条件, 却也无法通过细胞库稳定性研究确认单克隆性。但是可通过多种检测方法为细胞

的单克隆性提供支持性证据, 如对来源于单个细胞 MCB 的多个亚克隆研究结果表明, 虽然亚克隆之间在表型和目的基因拷贝数上发生较大变化, 但 DNA 印迹分析结果显示整合位点在亚克隆之间仍较相似, 这提示可采用 DNA 印迹作为单克隆性的支持性数据。染色体计数和染色体涂染 (chromosome painting) 可用于观察核型异质性^[8]; 荧光原位杂交技术 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 能识别目标基因的整合位点, 结合靶标位点扩增和新一代测序技术, 也可以分析细胞库是否为单细胞来源^[9]。

国际人用药品注册技术协调会 (International Council for Harmonization, ICH) 药品质量指导原则 Q5B 和 Q5D 对于细胞库的单克隆性都有相关要求内容^[10]。其中 Q5B《对用于生产 rDNA 来源蛋白质产品的细胞的表达构建体分析》中说明了主细胞库通常来自选定的含有表达构建体的细胞克隆; Q5D《用于生物技术产品及生物制品生产的细胞基质的来源和鉴定》中要求“对于重组产品, 细胞系是指克隆自一个祖细胞且含有所需序列的转染细胞”^[11]。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 的技术报告系列 TRS978 附录 3 中也明确要求“克隆过程应被完整记录, 包括成像细节和/或适当统计资料”以及“对于用重组质粒 DNA 技术转染来源的蛋白, 若能够在定义的传代代次内, 生产工艺可证实均一和一致的产品质量, 则单次完整记录的克隆是足够的”^[12]。美国 FDA 的审评专家也对单克隆性的审评考虑给出了诸多建议^[13-15]。我国发布的《人用单克隆抗体质量控制技术指导原则》中对杂交瘤细胞要求应“采用适宜的方法进行融合、筛选及克隆化”; 《人用重组 DNA 制品质量控制技术指导原则》中生产的控制部分, 要求含表达载体的宿主细胞应经过克隆而建立主细胞库。从以上的法规和指导原则的要求来看, 重组药物细胞库应来源于克隆化的细胞, 但目前尚无对单克隆性概率和确认方面的具体技术要求或共识。

2 细胞单克隆化常用方法和技术考量

线性化的重组质粒 DNA 转染宿主细胞后可筛选得到细胞群, 将细胞群以一定的密度铺板至微孔板中, 可以实现单克隆化^[16]。这个单克隆化过程可采用有限稀释法 (limiting dilution) 完成, 其结果符合泊松分布, 可以采用 excel 等常用数据处理软件计算单克隆的概率。例如, 经过 1 轮以 0.5 个细胞/孔铺板, 可以得到单克隆的概率是 77%; 经过 2 轮以 0.5 个细胞/孔铺板, 可以得到单克隆的概率是 95%。

药物研发机构可以根据实际铺板密度推算单克隆概率, 同时应关注以下情况以确认此概率: ① 细胞聚团

情况,在接种前应通过镜检等方法确认细胞群的细胞是良好分离的,细胞聚团会降低单克隆的概率;②按0.5个细胞/孔铺板,按泊松分布可计算细胞数为0的孔比例应该是61%,但事实上经多天培养后可发现未长出细胞的孔比例会高于此数值,这主要是因为很多孔中虽铺有细胞但无法长成克隆。不同项目之间克隆的长出率变动很大,其比例可从10%到98%,这主要和细胞活率、筛选压力及培养条件等因素有关。③若需检查细胞数目,可在铺板第0天1~2 h细胞自然沉降(也可通过离心微孔板加速此过程)后镜检微孔板,手工或采用自动成像设备记录孔内的细胞数目,可采用卡方检验分析其泊松分布的适合度。④可连续多天检查孔中细胞的生长和倍增情况,并进行比对分析;必要时应检查铺板前的空板,以排除假信号。成像检查对于确认单克隆性有很大帮助,但应避免长时间观察损伤细胞。

除了经典的有限稀释法,近年来基于流式细胞术的单细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)^[17]、克隆筛选单细胞打印系统^[18]、ClonePix高通量细胞克隆筛选系统^[19]、新一代测序(next-generation sequencing, NGS)^[20]、细胞成像技术等新技术也逐渐应用于细胞克隆化或者用于确认单克隆性,为研究者提供了更高效稳健的筛选手段和文档记录。

对于采用自动高通量成像技术辅助有限稀释法确认单克隆性,研发机构需关注第0天时成像系统的检测敏感度、边缘效应以及是否可对整个孔成像。申报资料时应提供整个孔和单细胞位置放大的图片作为支持数据;同时应关注成像系统发生假阴性的概率,即成像系统判断孔中为0或1个细胞,实际有1个或多个细胞,其中第二种情形导致单克隆性判断错误。可采用克隆化分离分别表达两种不同的荧光蛋白的混合细胞群来确认克隆过程和成像系统的灵敏度^[21]。

采用FACS和ClonePix等仪器设备开展单细胞筛选前应对相应仪器设备进行能力确认,并详细记录筛选过程和数据,进行统计学分析和计算。受篇幅所限,本文不对这些技术要求和优缺点展开详细讨论,可参阅供应商的操作手册和文献了解。

3 申报临床阶段对单克隆性的一般考虑

一般研发机构提交临床试验申请时已经完成了MCB的建立(可能尚未完全检定)。在临床试验申请阶段递交的资料应包括但不限于细胞库外源物质(ICH Q5D)、宿主细胞的历史资料、无血清培养基适应性培养情况(若适用)、克隆化过程(有限稀释法克隆、FACS、ClonePix和克隆筛选等)以及最终克隆的扩增、评价和筛选等。无血清适应性培养应在克隆筛选之前

进行,若在克隆筛选之后进行,应增加克隆筛选步骤。

在临床试验申请阶段,申请人应提供单克隆性的概率和确认资料,技术审评根据提供的资料对MCB的单克隆性进行最初的评估。若发现可能的重要缺陷会与申请人进行沟通,但原则上,单纯缺乏单克隆性确认不应阻碍临床进程。克隆化确认可结合临床进程深入研究,但研发机构应结合细胞的特性、克隆异化的倾向性、产品特性可能发生的异质性或质量特性改变等进行风险性分析和控制。

目前对单克隆性概率尚没有明确限值要求,但申请人应该在克隆化之前预设单克隆概率,并按照该目标开展研究。通常在合适稀释水平(如每孔0.5个细胞)进行两轮有限稀释可以达到95%的单克隆概率。其他方法和技术,如FACS、ClonePix和成像技术等,在适当的操作步骤和参数情况下,也可提供较高概率的单克隆性。

如果单克隆性满足可接受的概率,那么通常不需额外进行确认。单纯为了确认而提供的证据不具备决定性的证明作用,只是提供了支持性的证据,此类支持单克隆性的数据类型基于细胞克隆方法不同而有所差异。对于单克隆性概率较低且确认不充分的(如处于早期研发阶段的创新重组药物),由于种子细胞起始阶段存在非单克隆性的隐患和风险,应当加强工艺过程控制以保证产品质量的一致性。

保证单克隆性仅仅是全部控制策略的一部分,培养工艺对细胞生长的影响巨大。在递交临床试验申请时进行的细胞培养研究和初始工艺验证仅反映当时工艺过程中细胞生长的稳定性,并不能预测未来工艺放大和变更可能导致克隆生长的失衡或变异。考虑到在产品开发过程中逐渐增大的巨额投入,若能够早期采取必要的严格筛选、检定、传代研究等控制措施,则能更有效保证所建立细胞库的单克隆性,预防种子细胞变异的风险,同时减少随之而来的很多上游工艺开发和产品质量不可控的风险。

4 申报上市阶段对单克隆性的一般考虑

在申请药品上市注册时,应基于临床期间及工艺验证等更多批次的生产和质量研究数据,以及对种子细胞模拟生产传代及稳定性研究监测积累的数据,进一步提供充分的单克隆性确认资料,应用多种手段提供单克隆性的支持性证据,并持续到产品的上市后研究中。根据临床亟需的程度和治疗价值,对不能充分确认MCB单克隆性的情形,研发机构应考虑加强对潜在非单克隆MCB有效的控制策略。

对于已经完成临床前研究的建库细胞,在开展单克隆性研究时发现存在非单克隆问题,例如某已获批

上市的、采用CHO细胞表达制备的治疗性单克隆抗体品种在采用FISH方法检定生产终末细胞时发现,其并非由单一细胞克隆构成。进一步的研究发现,主细胞库、多个工作细胞库及多个生产终末细胞库的核型一致,都包含有两个细胞亚群(两个亚克隆群并存),但不同细胞库之间两个亚群的比例不同。技术审评要求申请人对主细胞库、多个工作细胞库及多批次生产终末细胞库的两个亚群中目标基因的DNA水平、RNA水平、表达抗体产品的质量分析进行比较后认为,数据未提示该非单克隆来源问题对抗体质量构成影响,因此暂未调整生产工艺参数。但作为批准后承诺,拟重新单克隆化该主细胞库,用于质量可比性评估;或重新开发一个替代重组CHO细胞系,开展包括临床生物可比性研究在内的相似性评估。

5 对非单克隆细胞系的一般考虑

对于潜在非单克隆MCB,在建立新的WCB时,需关注WCB建立用培养基及培养条件是否发生了变更,因该变更可能会带来新旧WCB中各亚群比例上的差异进而影响产品质量。同样需要引起关注的是,此类品种在上游培养基等原材料和培养条件改变以及其他工艺变更时,应进行额外的风险和质量评估,包括增加过程控制参数,并在评估中间品、原液及成品的质量标准符合性的基础上,开展结构解析甚至是稳定性研究来分析降解途径、降解趋势和降解速率等多方面的可比性;并特别关注变更前后是否存在由非单克隆性产生的相关杂质方面的差异。

研发机构应根据发现非单克隆时产品所处的开发阶段,综合分析其潜在的风险和不同应对策略的必要性和合理性,以选择后续缓解措施并如实记录申报。若在批准上市后发现证据表明MCB为非单克隆时,应及时和监管机构沟通。同时研发机构应该建立规范的种子细胞筛选、扩增、传代及稳定性研究等方面的记录溯源文件,并制订能够良好控制工艺过程的计划,包括统计评价产品质量属性的漂移、建立额外的关键过程参数、对生产的每批原液进行额外的鉴定研究、甚至限制生产直至问题得以溯源确定或解决。通过额外的控制策略可以降低商业化生产时的产品质量风险,例如限制体外细胞传代次、增加对生产终末细胞(end of production cell, EOPC)的鉴定、上游工艺的额外过程监控、增加原液的检测项目等。基于申请人所采取的控制策略是否充分、完整,监管机构确定该品种是否可以开展下一步研究开发或许可上市。

对非单克隆的MCB的重新克隆可能会引入新的潜在风险,随着项目研发的深入,风险会进一步增高;在开发后期,重新进行MCB的克隆后研发机构应按照

ICH Q5E开展系统的可比性研究工作,相比之下尝试引入更稳健的控制策略可能更合适。某正在欧洲开展I/IIa期临床研究的、采用CHO细胞表达制备的单克隆抗体品种在国内申报开展多中心II期临床研究,其拟在中国使用的临床试验用药采用新的主细胞库并存在大量重大工艺变更,其中采用新的主细胞库的原因是认为原主细胞库存在非单克隆来源的问题而重新制备,由于未能充分说明变更前后质量的可比性,无法合理预测潜在的药效、安全性和免疫原性风险,该品种被监管机构暂停临床。

6 结语

成功建立单克隆化细胞株能够有效保证细胞库的单一来源,并进而实现对重组蛋白药物全生命周期的质量控制。因此,单克隆性是生物技术药物申报中需要满足的技术监管基本要求之一;建议药物研发机构在项目开发早期即建立起单克隆性,以降低项目开发和产品质量风险。使用单克隆细胞库和非克隆细胞库生产的产品在发生工艺变更时,其控制策略的监管要求应该是不同的。无论使用何种方法进行细胞的单克隆化,研发机构均应提供足够的信息以评估该方法的可信度。所用方法应经过验证以保证其可以提供有可靠保障的单克隆性。若缺少对单克隆性的确认,研发机构应进行额外的基因型和表型的分析以及产品质量分析。对于非克隆细胞库,可能即使一个很小的工艺变更,都需要一个更强的控制策略以监控上游工艺,并进行相应的可比性研究。

技术审评会持续关注单克隆性的分析技术手段、非克隆性发生的情形及确证研究进展情况,并适时根据所提供的资料进行整体评估,以明确研发机构是否对单克隆性的确认提供了足够的信息和是否需要与其进一步沟通交流。若仅提供了低概率单克隆性和/或不充分的单克隆性确认信息,或者已有证据表明细胞库为非单克隆细胞库,一般需要研发机构补充提供额外的控制策略以支持许可。

References

- [1] Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018 [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36: 1136-1145.
- [2] Datta P, Linhardt RJ, Sharfstein ST. An 'omics approach towards CHO cell engineering [J]. Biotechnol Bioeng, 2013, 110: 1255-1271.
- [3] Evans K, Albanetti T, Venkat R, et al. Assurance of monoclonality in one round of cloning through cell sorting for single cell deposition coupled with high resolution cell imaging [J]. Biotechnol Prog, 2015, 31: 1172-1178.

- [4] Koziol JA, Ferrari C, Chisari FV. Evaluation of monoclonality of cell lines from sequential dilution assays [J]. *J Immunol Methods*, 1987, 105: 139-143.
- [5] Frye C, Deshpande R, Estes S, et al. Industry view on the relative importance of "clonality" of biopharmaceutical-producing cell lines [J]. *Biologicals*, 2016, 44: 117-122.
- [6] Wurm FM, Wurm MJ. Cloning of CHO cells, productivity and genetic stability – a discussion [J]. *Processes*, 2017, 5: 20.
- [7] Tharmalingam T, Barkhordarian H, Tejeda N, et al. Characterization of phenotypic and genotypic diversity in subclones derived from a clonal cell line [J]. *Biotechnol Prog*, 2018, 34: 613-623.
- [8] Vcelar S, Melcher M, Auer N, et al. Changes in chromosome counts and patterns in CHO cell lines upon generation of recombinant cell lines and subcloning [J]. *Biotechnol J*, 2018, 13: e1700495.
- [9] Aebischer-Gumy C, Moretti P, Little T, et al. Analytical assessment of clonal derivation of eukaryotic/CHO cell populations [J]. *J Biotechnol*, 2018, 286: 17-26.
- [10] O'Callaghan PM, Berthelot ME, Young RJ, et al. Diversity in host clone performance within a Chinese hamster ovary cell line [J]. *Biotechnol Prog*, 2015, 31: 1187-1200.
- [11] ICH Q5D. ICH harmonised tripartite guideline: derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products [EB/OL]. 1997 [2018-12-31]. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5D/Step4/Q5D_Guideline.pdf.
- [12] WHO. WHO Expert Committee on biological standardization [EB/OL]. 2013 [2018-12-31]. https://www.who.int/biologicals/expert_committee/TRS_978_61st_report.pdf.
- [13] Kennett S. Establishing clonal cell lines-a regulatory perspective black cell, cell blue, cell old, new cell [EB/OL]. WCBP2014 [2018-12-31]. https://c.ymcdn.com/sites/www.casss.org/resource/resmgr/WCBP_Speaker_Slides/2014_WCBP_Sarah_Kennett.pdf.
- [14] Novak R. Regulatory perspective on the evaluation of clonality of mammalian cell banks [EB/OL]. 2017 [2018-12-31]. https://cdn.ymaws.com/www.casss.org/resource/resmgr/cmc_no_am_jan_sprk_slds/2017_CMCJ_Novak_Rachel.pdf.
- [15] Welch J. Tilting at clones: a regulatory perspective on the importance of "clonality" of mammalian cell banks [EB/OL]. 2017 [2018-12-31]. <https://www.topbiox.com/wp-content/uploads/2017/06/Joel-Welch.pdf-Amsterdam-April-2017.pdf>.
- [16] Zhou Y, Shaw D, Lam C, et al. Beating the odds: the poisson distribution of all input cells during limiting dilution grossly underestimates whether a cell line is clonally-derived or not [J]. *Biotechnol Prog*, 2018, 34: 559-569.
- [17] Fieder J, Schulz P, Gorr I, et al. A single-step FACS sorting strategy in conjunction with fluorescent vital dye imaging efficiently assures clonality of biopharmaceutical production cell lines [J]. *Biotechnol J*, 2017. DOI: 10.1002/biot.201700002.
- [18] Yim M, Shaw D. Achieving greater efficiency and higher confidence in single-cell cloning by combining cell printing and plate imaging technologies [J]. *Biotechnol Prog*, 2018, 34: 1454-1459.
- [19] Roy G, Miro-Quesada G, Zhuang L, et al. Sequential screening by ClonePix FL and intracellular staining facilitate isolation of high producer cell lines for monoclonal antibody manufacturing [J]. *J Immunol Methods*, 2017, 451: 100-110.
- [20] Wright C, Groot J, Swahn S, et al. Genetic mutation analysis at early stages of cell line development using next generation sequencing [J]. *Biotechnol Prog*, 2016, 32: 813-817.
- [21] Shaw D, Yim M, Tsukuda J, et al. Development and characterization of an automated imaging workflow to generate clonally-derived cell lines for therapeutic proteins [J]. *Biotechnol Prog*, 2018, 34: 584-592.