

·

基因修饰细胞治疗产品非临床研究与评价

技术指导原则

(试行)

(征求意见稿)

2021年2月

目 录

一、前言	1
二、适用范围	1
三、总体考虑	1
四、受试物	2
五、动物种属/模型选择	3
六、概念验证	4
七、药代动力学	5
八、非临床安全性	6
(一) 总体安全性考虑	6
(二) 基因表达产物的风险评估	6
(三) 插入突变风险评估	7
(四) 载体动员 (Vector mobilisation) 和重组风险评估	8
九、对特定类型基因修饰细胞产品的特殊考虑	8
(一) 基因修饰的免疫细胞 (CAR 或 TCR 修饰的 T 细胞 /NK 细胞)	8
(二) 诱导多能干细胞 (iPS) 来源的细胞产品	10
(三) 基因编辑的细胞产品	10

一、前言

近年来，随着基因修饰技术的迅速发展，基因修饰细胞治疗产品已成为医药领域的研究热点。由于基因修饰细胞治疗产品物质组成和作用方式与一般的化学药品和生物制品有明显不同，传统的标准非临床研究策略和方法通常并不适用于基因修饰细胞治疗产品。为规范和指导基因修饰细胞治疗产品非临床研究和评价，在《细胞制品研究与评价技术指导原则》基础上，根据目前对基因修饰细胞治疗产品的科学认识，制定了本指导原则，提出了对基因修饰细胞治疗产品非临床研究和评价的特殊考虑和要求。随着技术的发展、认知程度的深入和相关研究数据的积累，本指导原则将不断完善和适时更新。

二、适用范围

本指导原则适用于基因修饰细胞治疗产品。基因修饰细胞治疗产品是指经过基因修饰（如调节、修复、替换、添加或删除等）以改变其生物学特性、拟用于治疗人类疾病的活细胞产品，如基因修饰的免疫细胞（如 T 细胞、NK 细胞、树突状细胞和巨噬细胞等）和基因修饰的干细胞（如造血干细胞、多能诱导干细胞等）等。

三、总体考虑

非临床研究是药物开发的重要环节之一。对于基因修饰细胞治疗产品，充分的非临床研究是为了：1) 阐明基因修饰

的目的、功能以及产品的作用机制，明确其在拟定患者人群中使用的生物学合理性；2)为临床试验的给药途径、给药程序、给药剂量的选择提供支持性依据；3)根据潜在风险因素，阐明毒性反应特征，预测人体可能出现的不良反应，确定不良反应的临床监测指标，为制定临床风险控制措施提供参考依据。因此，应充分开展非临床研究，收集用于风险获益评估的信息，以确立拟开发产品在目标患者人群中预期具有合理的、可接受的风险获益比，同时为临床试验的设计和风险控制策略的制定提供支持性依据。

由于不同基因修饰细胞治疗产品的细胞的来源、类型、生物学特性、基因修饰方式/技术、生物学功能/作用方式、生产工艺、非细胞组分等各不相同。在制定非临床研究计划时，除参考《细胞制品研究与评价技术指导原则》中的对细胞制品的一般要求外，还应具体问题具体分析，基于产品特点和目前已有的科学认知，结合拟定适应症、患者人群、给药途径和给药方案等方面的考虑，科学合理的设计和实施非临床试验，充分表征产品的药理学、毒理学和药代动力学特征。在进行风险获益评估时，还应重点关注由非临床向临床过渡时非临床研究的局限性和风险预测的不确定性。

四、受试物

非临床试验所用受试物应可充分代表临床拟用样品的质量和安全性，确证性非临床试验应尽可能采用临床拟用

基因修饰细胞治疗产品作为受试物。体外、体内非临床试验所使用的样品均应符合相应开发阶段的质量标准要求。应阐明非临床使用样品与临床拟用样品的异同及其对人体有效性和安全性的可能影响。

在某些情况下，受种属特异性的限制，可考虑采用替代产品（表达动物同源基因的人源细胞产品或动物源替代细胞产品）。替代产品应与临床拟用产品采用相似的生产工艺，并对可能影响有效性和安全性的关键质量参数进行对比研究，以评估替代产品与临床拟用产品的质量相似性及其对非临床数据预测性的影响。

五、动物种属/模型选择

进行非临床体内试验时，应选择相关的动物种属/模型。理想状态下，基因修饰细胞应能以其预期的作用方式在所选择的动物中表现出在拟用患者人群中所期望的功能活性。因此，选择相关动物时需要考虑产品的特性以及临床拟用情况，包括但不限于以下因素：1) 动物病理生理学特征与拟用患者人群的相似性；2) 动物对基因修饰细胞及导入基因表达产物（若有）的生物学反应与预期的人体反应的相似性；3) 动物对异种来源的基因修饰细胞的免疫耐受性；4) 临床拟用递送/给药方式的可行性。

由于免疫排斥反应以及细胞和/或导入基因的种属特异性，常规标准实验动物很可能并不适用，而免疫缺陷动物、

转基因动物或采用同源替代产品作为受试物可能会更合适。对于某些作用机制涉及与疾病环境相互作用的基因修饰细胞（例如 CAR-T 细胞），可能需要采用疾病模型动物。采用疾病模型动物进行的非临床研究可提供活性和毒性的剂量关系信息，可更好的评估基因修饰细胞产品的风险获益比。

每一种动物种属/模型均有其优点和不足，没有一种模型可完美预测基因修饰细胞在患者人群中的有效性和安全性，应评估并阐明非临床研究所采用的动物种属/模型与人体的相关性和局限性，建议采用多种动物/模型开展研究。当缺少相关动物模型时，可采用基于细胞和组织的模型（如 2D 和 3D 组织模型、类器官和微流体模型），这些模拟人体内环境的模型也可为有效性和安全性的评估提供有用的补充信息。

六、概念验证

对于基因修饰细胞治疗产品，除应参照《细胞制品研究与评价技术指导原则》的要求进行药效学研究外，还应进行概念验证试验，阐明对细胞进行基因修饰的理由和可行性。通常，对细胞进行基因修饰的理由可能包括但不限于：1) 引入突变基因的功能拷贝以纠正遗传性疾病；2) 改变/增强细胞的生物学功能；3) 引入一个安全开关，以在必要时能够清除细胞。应根据基因修饰的目的，进行相应的体外和体内验证试验，证明可达到基因修饰的目的。

概念验证试验评估终点可能包括：1) 对细胞基因组修饰

的特异性；2)引入的外源调控序列对内源基因表达的影响，或转基因的表达及功能活性；3)基因修饰对细胞正常行为和生理功能的影响(如对扩增、分化能力的影响，对T细胞激活和杀伤活性的影响等)。设计概念验证试验时，应考虑设置合适的平行对照(如未修饰的细胞)。

虽然体外试验可在一定程度上验证基因修饰细胞的设计理念和拟定作用方式，但对于功能复杂的活细胞，仅依靠体外试验并不足以预测基因修饰细胞的体内行为和功能。因此，除非有充分的理由，均应尽可能考虑进行体内概念验证试验。在设计体内概念验证试验时，建议采用疾病模型动物。对于预期在人体内会长期存续或长期发挥功能的基因修饰细胞，如果缺乏相关的动物模型，建议采用替代产品进行体内概念验证试验，在足够的、可行的时间窗内评估基因修饰细胞的长期效应。

七、药代动力学

参考《细胞制品研究与评价技术指导原则》中的对细胞制品药代动力学的一般要求，采用相关动物模型开展药代动力学试验以阐明基因修饰细胞在体内的命运和行为(包括生物分布、归巢、定植、增殖、分化和持续性)。这些试验可以单独开展，也可以整合到概念验证试验和/或毒理学试验中。

若基因修饰细胞表达的转基因产物可分泌到细胞外，应阐明其在局部和/或全身的暴露特征。

八、非临床安全性

(一) 总体安全性考虑

在评估产品的整体风险时，除参考《细胞制品研究与评价技术指导原则》中对细胞制品的一般要求外，还应重点关注基因修饰所可能带来的风险，如表达转基因的风险、基因编辑脱靶风险、载体插入突变风险、载体重组风险等。在制定非临床安全性评价策略时，应基于每个产品的特点，具体问题具体分析考虑因素包括但不限于：1) 临床拟用适应症、目标患者人群和临床给药方案；2) 细胞的来源、类型及其在体内的细胞命运；3) 基因修饰目的、方式及技术；4) 作用方式/机制或预期的功能活性；5) 激起免疫应答能力/免疫耐受能力；6) 产品的质量因素；7) 已有的非临床/临床数据；8) 类似产品的已知有效性和安全性信息。

(二) 基因表达产物的风险评估

通常，导入基因会随基因修饰细胞的存在而持续表达，对于有复制能力的细胞，导入基因还可能会随细胞的增殖而过度表达，导致基因表达产物的蓄积，进而导致毒性。因此，若基因修饰细胞编码导入基因，应在体内试验中评估导入基因表达产物的毒性风险。在设计试验时，应根据导入基因的表达情况和功能活性设计试验期限和必要的终点指标，考虑因素包括：1) 基因表达水平和持续时间；2) 基因表达产物的分布部位；3) 基因表达产物的功能活性。一些转基因（如

生长因子、生长因子受体、免疫调节物等)若长期持续表达,可能会导致长期安全性风险担忧,如导致细胞非受控的生长、恶性转化等不良反应。因此,对于长期持续表达或具有长期效应的转基因修饰细胞,非临床安全性研究的期限应足以评估其长期安全性风险。为确定基因表达产物的量效关系,解释预期和非预期的试验结果,建议在试验中伴随对导入基因表达水平的定量检测(如采用Q-PCR或ELISA法)以及免疫原性(ADA)检测。

(三) 插入突变风险评估

一些整合性载体(如逆转录病毒、慢病毒、转座子)可将外源基因插入整合到细胞基因组中,这可能会导致关键基因突变或激活原癌基因,从而导致恶性肿瘤风险增加。

影响插入突变的关键风险因素包括:1)载体的整合特征,即插入位点的偏好性;2)载体的设计,如增强子、启动子等构建元件的活性,反式激活邻近基因的潜力;产生剪接突变体的潜在剪接位点或多聚腺苷酸信号等;3)载体剂量;4)导入基因表达产物的功能活性(如与细胞生长调控相关)和表达水平;5)靶细胞群的转化可能性,这可能与细胞的分化状态、增殖潜力、体外培养条件和体内植入环境等有关。

基于已有科学经验和既往非临床/临床研究结果,如果认为基因修饰细胞所采用的载体系统可将外源基因整合到细胞基因组中并可在体内长期存续,需综合分析以上风险因素,

评估潜在的插入突变风险和致癌性风险。非临床方面，应采用具有代表性的基因转导细胞进行基因整合位点分析，分析细胞的克隆组成以及在关注基因（如肿瘤相关调控基因）附近有无优先整合迹象，含有关注整合位点的细胞有无优先异常增殖。此外，还应在临床试验中频繁检测转导细胞的基因插入位点和克隆性来监测和减轻与基因插入突变相关的致癌性风险。

（四）载体动员（Vector mobilisation）和重组风险评估

应基于载体的选择、载体的设计、目标转导细胞群以及目标患者人群评估载体与内源性病毒重组和动员的风险。如果有证据显示此类风险增加，应开展相应的非临床试验评估载体动员和重组的风险。

九、对特定类型基因修饰细胞产品的特殊考虑

（一）基因修饰的免疫细胞（CAR或TCR修饰的T细胞/NK细胞）

对于CAR或TCR修饰的免疫细胞，应尽可能采用多种方法评估其靶点相关毒性和脱靶毒性风险，如采用合适的动物模型或体外方法、计算机预测等。

应采用体外方法深入分析靶抗原在人体器官、组织和细胞中的表达分布情况，基因表达分析库和文献调研也可能会有助于阐明靶抗原在不同病理生理状态下的表达是否存在差异。应采用表达和不表达靶抗原的细胞作为靶细胞进行体

外试验，确认CAR或TCR修饰的免疫细胞可特异性的识别和杀伤靶细胞。

对于CAR修饰的免疫细胞，应采用体外方法（如人质膜蛋白阵列技术等）评估其胞外抗原识别区（一般为抗体的单链可变区片段）与人体膜蛋白的脱靶结合风险。

TCR修饰免疫细胞的脱靶毒性可通过评估TCR与人体自身抗原肽的交叉识别能力来评估。首先，应采用体外试验测定TCR修饰的免疫细胞与人自身抗原肽-HLA（与递呈靶抗原肽的HLA等位基因相同）复合物的亲和力，并说明抗原肽的选择依据及选择范围。此外，还应研究其他相关或不相关的蛋白中是否含有靶抗原肽序列。如果TCR与人自身抗原肽有交叉反应可能，应确定靶抗原肽的最小识别基序（motif），并采用计算机预测分析评估交叉反应性。如果计算机预测可识别出具有潜在交叉反应性的抗原肽，应在体外测定TCR修饰免疫细胞对表达相应蛋白或递呈相应抗原肽的细胞的识别能力。如果不能排除交叉反应性，应基于含有潜在交叉反应性抗原肽的蛋白的表达模式以及TCR与潜在交叉反应性抗原肽的亲和力来进行风险评估。为获得TCR与其他等位HLA潜在交叉反应性的信息，应进行足够的HLA交叉反应性筛选。

对于TCR修饰的T细胞，还应关注引入TCR链和内源性TCR之间的错配可能性，应描述和说明旨在降低错配可能性的TCR设计策略。

(二) 诱导多能干细胞 (iPS) 来源的细胞产品

iPS细胞自身具有致瘤性风险，在体内可形成畸胎瘤。因此，非临床试验中应考虑进行致瘤性试验。体内致瘤性试验建议采用掺入未分化iPS细胞的细胞产品作为阳性对照，以确认实验系统的灵敏度。如果iPS细胞设计了自杀机制，应在体内试验中确认/验证这种自杀机制的功能。

重编程可能会诱导细胞的表观遗传学改变，其后果尚不完全清楚。为评估iPS细胞衍生细胞的表观遗传学改变所引起的潜在异常特征，应采用体外和/或体内非临床试验来阐明细胞具有适当的行为和生理功能，毒理学试验还应评估细胞异常行为引起的不良反应。应结合质量表征数据、非临床安全性数据以及文献数据进行深入的风险评估，并就旨在保护患者安全的风险减轻措施进行讨论。如果发现遗传学和/或表观遗传学改变，应解决相应的安全性问题。

(三) 基因编辑的细胞产品

对于基因编辑的细胞产品，应采用相关细胞进行体外在靶和脱靶活性评估，以确认修饰酶或向导RNA对靶基因序列的特异性。虽然计算机分析可用于预测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比对，以证明潜在脱靶位点未出现脱靶。应说明所选择的评价策略的合理性和敏感性。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。

参考文献

1. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（试行），NMPA，2017年。
2. Quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells. EMA, 2020.
3. Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products. FDA, 2013.
4. Guideline on Quality, Non-clinical and Clinical Requirements for Investigational Advanced Therapy Medicinal Products in Clinical Trials. EMA, 2019.
5. Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products. FDA, 2020.
6. Guideline on the Non-Clinical Studies Required Before First Clinical Use of Gene Therapy Medical Products, EMA, 2008.