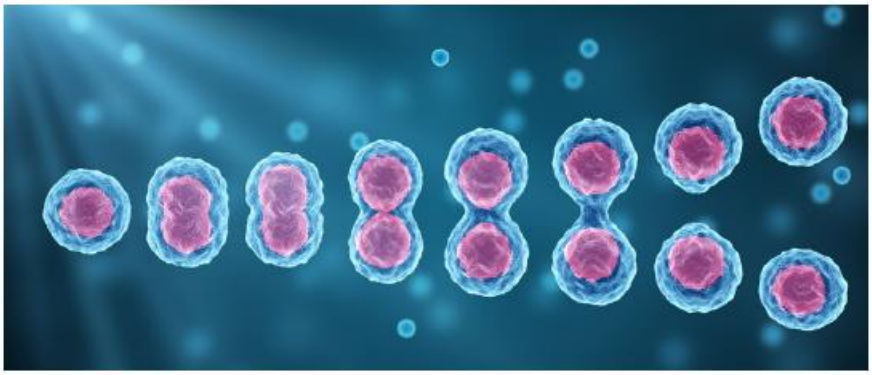
撰文：岑祥技術部

保證克隆性：生物治療藥物的關鍵監管要求

生產細胞株之主細胞庫 (Master Cell Banks, MCBs) 的克隆性 (Clonality) 是生物製藥生產的關鍵要求。新設備有助於克隆過程優化。

自 FDA 於1986年批准第一個重組蛋白以來，多年來獲批的生物藥物數量不斷增長，反映出它們與現代醫學的相關性越來越高。[1]到2021年，FDA 批准了第100個單克隆抗體產品[2]以及其他九個新的生物製劑，佔當年批准藥物總數的16%。[3]生物製藥市場35年來的穩定增長模式反映了這些藥物如何成為治療多種疾病最有效的臨床治療方式之一；因此，它們越來越多地用於幾乎所有醫學分支。[4]

生物治療藥物 (Biotherapeutics) 是針對人體內特定分子的尖端藥物，這些分子參與廣泛傳播的疾病 (包括癌症、免疫和代謝障礙) 的發展。[5]哺乳動物細胞株，例如中國倉鼠卵巢細胞 CHO和人類胚胎腎臟上皮細胞 HEK293，是用於製造重組 DNA (recombinant DNA, rDNA) 衍生之人類治療性蛋白質的最常用平台。這些細胞株被設計成攜帶編碼所需蛋白質的基因，是生物技術公司可以擁有的最重要的資產。因此，公司需要確保這些細胞株或細胞衍生物質的安全性 (Safety) 、純度 (Purity) 和效力 (Potency) ，並限制生產過程中的可變性 (Variability) ，以確保最終產品的一致性。



可能影響過程一致性和產品質量的一個主要因素是細胞株的克隆衍生 (Clonal derivation) 或克隆性 (Clonality) 。[6]「簡而言之，克隆性基本上是從單顆細胞開始的細胞株」， Advanced Instruments市場開發高級經理 Andrea Gough 解釋道，「無論您是想製造重組抗體、病毒載體、疫苗還是誘導性多能幹細胞 (iPSC) ，建議從均質的、克隆衍生的生產細胞株開始，以減少過程可變性和患者的潛在風險。」

克隆性：監管提交的關鍵要求

充分表徵的克隆衍生細胞株不僅是生物製藥生產過程的基本組成部分，而且監管提交的要求，最典型的是在研究新藥 (IND) 申請階段。事實上，克隆衍生會影響產品的關鍵質量屬性 (Critical quality attributes) 。[7]因此，生產細胞株中克隆性的保證至關重要，應在細胞株開發過程中及早確認。「多個監管機構變得越來越嚴格，需要更詳細的MCB克隆性證據，」

Gough繼續說道，「因此，公司的目標是在開發過程的早期開始使用克隆細胞株，並儘快獲取所需的證據。」事實上，作為整體控制策略的一部分，監管機構要求所有生物製造細胞株“從單個前驅細胞中克隆出來 (cloned from a single cell progenitor)” 以確保安全和一致的產品質量。[8]美國 (FDA) 和歐盟 (EMA) 在生產細胞株的克隆衍生方面有不同但重疊的生物治療藥物生產指南 (見表1) 。

克隆性的重要性與產品的穩定表達和藥物批准後，如果出現任何供應問題對患者的潛在風險有關。因此，它在監管要求中受到強調。” Gough 說。

生物治療藥物生產指南
國際人用藥品技術要求協調委員會 (ICH) 於1998年發布的“ICHQ5D指南”指出，“對於重組產品，細胞物質 (Cell substrate) 是含有所需序列的轉染細胞，該細胞已被從單顆前驅細胞克隆而來 (For recombinant products, the cell substrate is the transfected cell containing the desired sequences, which has been cloned from a single cell progenitor) 。” [9]
1997年發布的FDA指南“製造和測試人用單克隆抗體產品時應考慮的要點”指出，“主細胞庫 (MCB) 被定義為來自單一細胞的具有均勻組成的集合組織或細胞。(The master cell bank (MCB) is defined as a collection of cells of uniform composition derived from a single tissue or cell) ” [10]
EMA在2016年發布的《單克隆抗體及相關產品的開發、生產、表徵和規範指南》中指出，“用於生產單克隆抗體的細胞基質應是穩定且連續的單克隆細胞株，通過重組DNA和/或其他合適的技術開發出來的 (The cell substrate to be used for the production of the monoclonal antibodies should be a stable and continuous monoclonal cell line that has been developed by means of recombinant DNA and/or other suitable technologies) 。” [11]

WHO在2013年發布的“技術報告 (TRS) 978”指出，“對於通過重組質粒DNA技術轉染獲得的蛋白質，只要在整個生產過程中證明產品的同質性和一致的特性，單次完整記錄的克隆就足夠了過程並在生產過程之外的規定細胞年齡內。 (For proteins derived from transfection with recombinant plasmid DNA technology, a single fully documented round of cloning is sufficient, provided that product homogeneity and consistent characteristics are demonstrated throughout the production process and within a defined cell age beyond the production process)”[12]

表一。

“儘管 CHO 細胞株被認為是一種非常強大的細胞系，並且已被用於自1980年代以來生物治療藥物的製造，它的基因組非常‘可塑 (Plastic)’，可以隨時間變化，因此從單個CHO細胞開始可以幫助降低風險。”事實上，這種不穩定性和染色體異質性會影響細胞生長、生產力和產品質量。[13]

克隆保證 (Clonal assurance) 降低了這些異質種群變化的可能性，從而降低了供應問題的風險，並最終降低了患者健康的風險。“對於生物技術/製藥公司來說，最糟糕的情況是在藥物發布後出現生產問題，”Gough 解釋說。“如果公司不能提供藥物，這會對等待治療的患者產生重大影響。將這種對患者健康的風險降至最低也是監管機構的一個重要考慮因素。”

有限稀釋：亞克隆的經典方法

為了產生克隆衍生的細胞株，需要分離、培養和擴增單個前體細胞 (Single precursor cell) 。執行此亞克隆步驟的傳統方法是有限稀釋 (Limiting dilution, LD) ，它是在1980年代初開發的，用於在生產單克隆抗體時克隆雜交瘤 (Hybridoma) 細胞株。[14] “LD 是指在一個獲取細胞並稀釋的過程中，使細胞在培養基中顯著降低至0.5個細胞的理論濃度。” Gough 解釋道。“這種方法是基於概率的：你希望每個孔的細胞濃度如此之低的原因，是為了避免許多孔中有兩個細胞或沒有細胞。如果您從更高的目標濃度開始，例如，每孔一個細胞。” 事實上，LD 依賴於一種概率方法，該方法提供相對較高的“克隆”衍生細胞株統計概率，尤其是在進行第二輪克隆時 (見表2) 。此外，顯微鏡評估可用於目視確認孔中是否存在單個細胞。

Limiting dilution, example at 0.5 cells per well

Assumption 1 - **Cells are distributed according to a Poissoin distribution.**

Cells per well	0	1	2	3	4	5
% of wells	61%	30%	8%	1%	0%	0%

At a seeding density of 0.5 cells per well, 39% of wells contain cells, the rest will be empty.

Assumption 2 - **All cells have an equal chance of survival and growth.**

% of colonies derived from 1 cell	77%
% of colonies derived from more than 1 cell	23%

Of the 39% of wells containing cells, 77% will contain 1 cell and 23% will contain more than 1 cell.

Assumption 3 - **A 2nd round of limiting dilution delivers a high probability of monoclonality.**

Probability of clonality after 1 round	77%
Probability of clonality after 2 rounds	95%

The probability of clonality is derived from statistical analysis based upon work by Coller & Coller (ref. Hybridoma, 1983 2: 91-96) and is based on 3 assumptions.

表二。

雖然 LD 是一個相對便宜的過程，但非常勞動密集、耗時、緩慢且產量低；它在科學家之間也有很大差異，並且無法從手動使用顯微鏡觀察的過程中進行記錄。此外，潛在的統計考慮是基於用 Beads 而不是細胞，然而事實上，細胞不像珠子，因為細胞傾向於黏在一起。因此，即使進行雙輪克隆，也可能無法完全保證基因同質性。

替代克隆技術：優化單細胞分離

最近的技術進步顯著改進了克隆選擇系統。在現代克隆方法中，使用專門的儀器來確保將單個細胞接種到微孔盤的每個孔中。

流式細胞術 (FACS) 最初是作為一種研究工具開發的，可以根據細胞表面標記物的表達來偵測或挑選細胞。[15] “FACS 是一項眾所周知的技術，” Gough 說。 “這是一種高效、高通量的方法，因為它可以在短時間內一次篩選數百萬個細胞。但是，FACS 需要很高的技術專長；並且當細胞以極高的速度和壓力被推過分揀機構中的一個非常小的孔時，會產生機械應力。” 事實上，由於這種剪切應力，許多選定的克隆無法在選擇過程中存活下來，因此生長率很低。此外，為了被檢測，細胞需要用熒光染料標記，這可能會對所選細胞克隆的生長和擴增產生負面影響，並且還可能具有額外的副作用。

對更溫和的流體學需求以及與 LD 方法相關的挑戰推動了新的低壓自動播種方法開發。Advanced Instruments VIPS™ 設備使用基於圖像的細胞偵測方法，檢測每個孔中沉積的單個細胞，並通過在孔中原位成像來立即進行確認。此類設備的播種效率為70-85%，隨細胞類型而異，遠高於 LD 效率 (30%) (見表3) 。

	Limiting Dilution	FACS	VIPS™
Seeding efficiency	30%	99%	70-85%
96-well plates necessary to screen 1000 cells	50	10	10
Efficiency	Low	High	High
Outgrowth probability	High	Low	Low

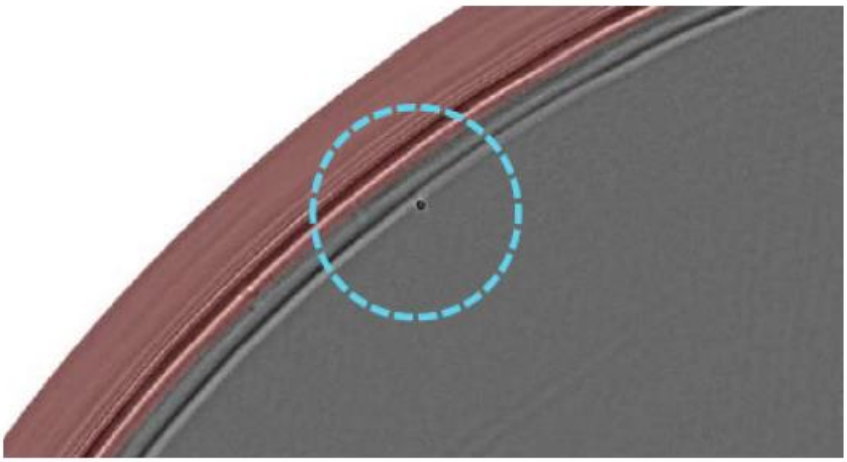
表三。

VIPS™ 為LD和流式細胞儀的有效替代方案，” Gough 評論道。 “這種具有整合成像功能的沉積設備使科學家能夠拍攝沉積在孔中的單細胞照片。它比 FACS 更溫和，不會傷害目標細胞，這些細胞隨後可以生長和擴展。”

新水平的克隆保證：全孔成像設備

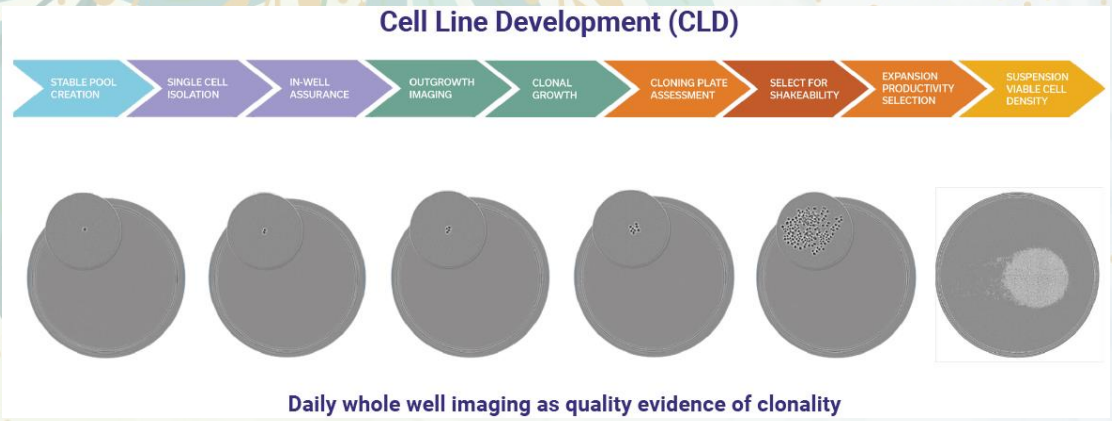
由於監管機構要求提供大量詳細信息來評估克隆過程，故生物技術和製藥公司需要提供嚴格的克隆證明。因此，他們需要有效證據 (例如圖像) 來顯示細胞庫生成過程中發生的情況。

“在沉積、沉積後24小時內，以及隨後的細胞急落擴增過程中，微孔盤的顯微成像對於確保細胞株的克隆衍生很有價值，” Gough 解釋說。“VIPS™ 設備將細胞接種過程、與液滴圖像和第0天全孔圖像結合起來。每孔中的液滴成像提供了成功分離單細胞的證據。” 這種對技術“成功”的實時視覺評估也有助於消除額外的實驗室工作，顯著提高過程效率。



Scale: 200 µm

此外，現代成像技術可以監測細胞株的生長，對於免疫球蛋白等簡單分子通常需要14到21天，而對於更複雜的分子則需要長達28天。Solentim Cell Metric® 提供充滿培養基的孔的全孔成像、高對比度成像，以確認第0天單個細胞的存在以及此後整個培養期間的每日成像。“成像設備在第0天捕獲整個孔的圖像，因此您可以看到單個細胞，” Gough 說。“然後他們會定期拍照，讓你可以監測單個細胞生長成集落的情況。該程序允許您在不干擾細胞生長的情況下收集基於圖像的克隆性證據。”



使用成像系統時，重要的是要考慮它們的準確性可能會受到以下因素的影響：校準、焦點、照明、焦深和分辨率問題等。事實上，由於這些設備的聚焦深度有限，因此細胞需要位於孔的底部，以避免在接種數天后出現假陰性集落。此外，由於製造過程中的塑料成型工具之影響，每個孔的底部在微孔盤中的高度不同。確定成像系統在孔邊緣看到細胞的概率也是有益的。

技術進步允許開發更有效的克隆過程。快速增長的生物製藥市場需要這種準確高效的分析程序。截至2019年底，全球正在進行1,000多項臨床試驗16，以了解生物製藥如何可以改善當今許多慢性病的治療。

Sources

1.https://bioplanassociates.com/wp-content/uploads/2017/02/2019-FDA-Biopharmaceutical-Approvals-WP- 22Jan2020.pdf

2.https://www.nature.com/articles/d41573-021-00079-7

3.https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/development-approval-process-cber/2021-biological-license-application-approvals

4.https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28972297/

5.https://www.ifpma.org/wp-content/uploads/2016/01/IFPMA-BiotheraputicsWeb4.pdf

6.https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33896120/

7.https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31588011/

8.https://www.ema.europa.eu/en/ich-q5d-derivation-characterisation-cell-substrates-used-production-bio¬technologicalbiological

9.https://database.ich.org/sites/default/files/Q5D%20Guideline.pdf

10.https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/points-consider-manufactu¬re-and-testing-monoclonal-antibody-products-human-use

11.https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-development-production-charac¬terisation-specification-monoclonal-antibodies-related_en.pdf

12.https://www.who.int/biologicals/expert_committee/TRS_978_61st_report.pdf

13.https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28865132/

14.https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25290326/

15.https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17261021/

16.https://www2.deloitte.com/us/en/insights/industry/health-care/future-of-pharmaceutical-industry.html