

生物制品检测 符合 GMP 的 NGS 解决方案

Biologics
Solutions

Next Generation Sequencing

NGS可补充或替代传统方法

法规趋势或建议：

ICH Q5A R2草稿已于2022年10月对公众发布：建议将基于核酸检测的方法（PCR, NGS）应用于外源因子检测

欧洲药典 EP 5.2.4 也提及对于疫苗产品的质控可用体外方法替代体内方法细胞治疗产品

...

稳健高效的质量控制检测对于生物制品的开发至关重要，旨在缩短上市时间并改善患者治疗效果，Charles River 与我们合作伙伴——PathoQuest合作，提供下一代测序（NGS）/高通量测序（HTS）与基因组学解决方案，以更好地为制药和生物技术公司提供服务。

优势：

- ✓ 丰富的监管知识和符合法规要求的实验室，GLP&GMP认证实验室
- ✓ 有效进行生物制品安全性检测和QC检测
- ✓ 高度一体化且灵活的NGS解决方案，可检测原材料，MCB，WCB，病毒种子库，DS，DP等，加速药品上市进程
- ✓ 专有病毒数据库及资深病毒学和生物信息学专家

Fast time to
release



Safety



Cost-effective
offer



Expertise



3R compliance



NGS 在生物制品检测中的应用

Biologics Solutions



GLP认证实验室

GMP认证实验室

已知/未知病毒检测

一次检测识别多种病毒

新细胞系表征

全基因组测序

NGS检测可应用产品:

- 基因治疗产品
- 疫苗
- 抗体药和治疗性蛋白
- 其他生物制品
- 原材料

NGS在生物制品检测中的应用

病毒安全 Viral Safety

外源病毒可能会污染生物制药的生产系统，如不被发现，会对终产品造成风险。NGS检测是一种不需要靶向引物来寻找病毒污染的技术，它能够同时“扫描”数百万个RNA/DNA序列，在识别出感兴趣的序列后，利用生物信息学分析，确定与已知病毒的匹配，并有可能识别出新的未知病毒。我们利用宏基因组学的方法，为病原体的鉴定提供了一种更为灵敏和全面的方法，该方法允许从生产样品中鉴定病原体，如：

- 疫苗和病毒原液
- 真核细胞库
- 原核细胞库
- API和原材料
- 研究用材料

遗传稳定性测试/细胞系表征 Genetic Stability Testing/Cell Line Characterization

PathoQuest在微生物学和病毒学方面的专业知识与Illumina先进的NGS测序平台相结合，使我们成为研究细胞系和病毒库的独特解决方案供应商，NGS可用于细胞系/株鉴别和/或纯度（单克隆性）评估。

我们提供 Nanopore MinIon, MiSeq或 NextSeq的测序服务，包括STR（短串联重复序列）分析（DNA指纹图谱）、插入或靶向序列比较。对于全基因组测序，我们提供MiSeq或NextSeq系统服务，并在快速周转时间内实现从头组装或与参考序列比对。

NGS让您不必进行多个实验，一次运行即可获得多重结果。

NGS细胞系/株检定服务包括：

- 用于生产工艺（如疫苗）的新细胞系的表征
- 全基因组测序
- 细胞鉴别（STR分析）
- 克隆性测试
- 遗传漂变研究
- 细胞重组

降低药物开发管线的风险 De-Risking the Drug Development Pipeline

NGS宏基因组方法可以检测生物制品从R&D阶段到上市产品批次放行过程中使用的所有生物培养基和其他成分，包括污染情况下的调查。通过将原材料检测包含在病毒安全检测方案中，您可以降低以后在生产工艺中发现污染物的风险。

ICHQ5A (R2) 草稿有关NGS应用的部分描述摘引：

下一代测序（NGS）和核酸扩增技术（NAT）（如聚合酶链反应（PCR））可分别适用于广泛和特异性病毒检测。这些试验的引入可以在不与当前推荐的体外和体内试验进行系统的头对头比较的情况下进行。特别是，不建议在体内试验中进行头对头比较，以满足替代、移除和改进(replace, remove, refine)动物使用3R原则的全球目标。

3.2.5.2 Next Generation Sequencing

新的先进分子方法如NGS可用于广泛的病毒检测。NGS可以提供确定的病毒检测灵敏度和广度，并可以减少动物使用和测试时间。基于潜在的安全问题，生物信息学分析可以针对特定病毒，也可以针对未知病毒检测。

1. NGS可以用广谱病毒检测来替代体内实验，以检测未知或未曾预见的病毒种类。
2. NGS还可以补充或替代体外细胞培养试验，以检测已知和未知或未曾预见的病毒种类。
3. 可用于检测已知病毒，并且它可替代HAP、MAP和RAP试验以及其他病毒特异性PCR测定。

NGS的使用可在以下情形下被特别考虑：

1. 检测或表征细胞基质或细胞库中已知和未知病毒
2. 病毒种子或者病毒收获液中由于没有有效的中和载体病毒措施而对检测产生干扰时
3. 产品本身毒性或培养基因组存在毒性时

NGS可用于检测细胞DNA中存在的病毒序列（基因组学）或细胞中的RNA（转录组学），或可用于检测病毒颗粒中存在的病毒基因组（病毒组学），并应提供选择这些不同策略的理由。

指南中除了上述针对于细胞株病毒检测的描述，针对于上清收获液（UPB），也提到应对每一批UPB进行定期病毒检测。这可能包括使用几种细胞系体外筛选实验或广谱病毒检测分子方法（如NGS）。

由于NGS具有复杂的工作流程，鼓励制造商与适当的监管机构就方法验证和数据提交的期望进行讨论。

友情提示：详细描述请参考ICH官网的英文原文，具体应用请与监管机构保持沟通

头对头比较：NGS vs In Vivo

Biologics Solutions

实验背景及方法：

我们进行比较分析的出发点有两个：

- 《欧洲药典》第5.214章：Substitution of in vivo method(s) by in vitro method(s) for the quality control of vaccines
- Gombold *et al* (2014)：Systematic evaluation of in vitro and in vivo adventitious virus assays for the detection of viral contamination of cell banks and biological products

我们为这项比较研究选择的病毒与Gombold等人详细介绍的病毒一致，包括以下三类病毒：

A类：水泡性口炎病毒和甲型流感都被视为NGS检测最具挑战性的模型【↑体内法灵敏度，↓体外法灵敏度】

B类：单纯疱疹病毒1型，柯萨奇病毒A和B，以及腮腺炎病毒【↓（中等至低）体内法灵敏度，↑体外法灵敏度】

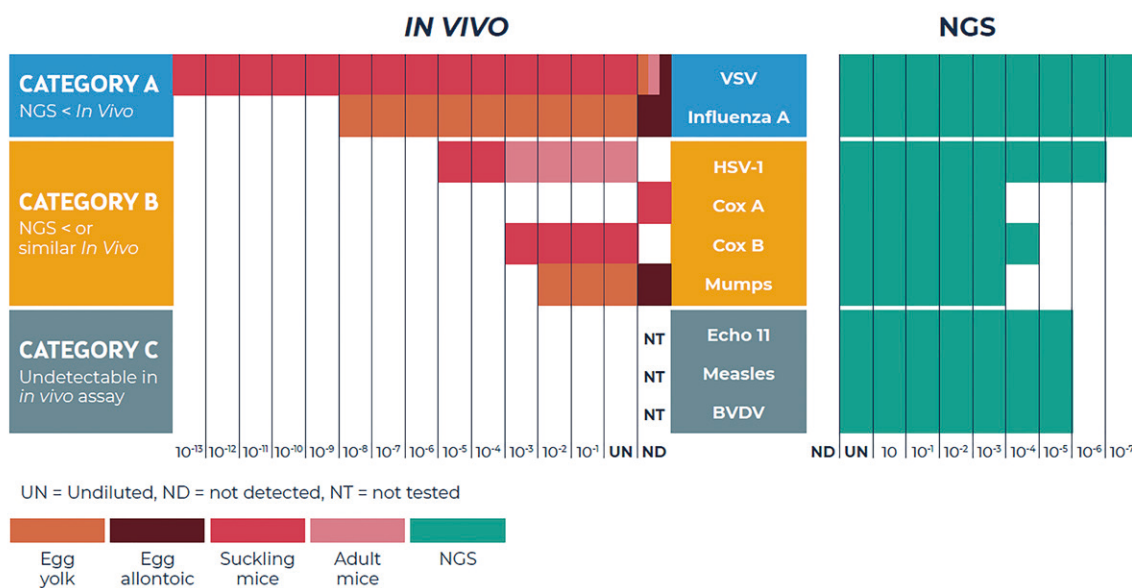
C类：埃可病毒11型、麻疹和牛病毒性腹泻病毒【通过目前的体内法无法检测到，表明分子方法具有明显优势】

我们使用了感染细胞模型（感染相应病毒的宿主细胞）来更好地反映行业的典型测试矩阵。这不同于常见的加标病毒策略，即将病毒直接添加到测试基质（如细胞裂解物）中。虽然后者在实验室中更易操作、更简单，但活性感染的影响和动力学可能会丢失，从而导致检测中的潜在偏差。

对于我们评估的体内部分，使用行业标准方法为测试系统（成年小鼠、乳鼠和鸡胚）接种受感染的细胞裂解物。随后对这些系统进行了感染和/或死亡迹象监测。



对于我们测试的NGS部分，从冷冻[感染]细胞颗粒中提取RNA，并用于制备标准RNA-Seq（转录组）文库，用于使用illumina系统进行测序。



结论：

通过头对头实验比较，证明RNAseq转录组测序可以取代应用于细胞库的体内测试，同时提供了更好的安全保证。

- NGS转录组分析在10³至10⁷个无病毒细胞的背景中检测到1个感染细胞
- 对于体内法高灵敏度（A类）检测到的病毒，NGS的检测效率很高，可确保高检测灵敏度
- 对于体内法检测到的中低灵敏度（B类）或未检测到的（C类）病毒，NGS显示出比体内更好的分析灵敏度和检测范围，因此确保了更好的检测灵敏度

病毒载体和质粒鉴别

Biologics Solutions

符合GMP的NGS服务-病毒载体和质粒鉴别

要点

- 根据监管规定，企业应提供制剂鉴别结果。对于含有遗传物质的病毒载体的鉴别测试，应对其进行核酸测序。
- 下一代测序（NGS）技术的处理量更多、规模更大、速度更快，相比传统的Sanger测序法有非常大的进步。具体而言，NGS技术能进一步提供有关产品中遗传变异的信息，尤其是罕见或极罕见的突变。
- 质粒原材料应与成品一样，采用NGS技术进行鉴别，以保证生产质量。

用Sanger技术对1000个碱基片段完全测序需要2到3次单独的引物设计和反应，那么对于AAV（5 kb）或慢病毒基因组（10 kb）完整测序可能需要10至30次反应才能完成。此外，对于DNA二级结构和复杂的核苷酸序列，引物延伸会受到阻碍，比如AAV基因组中的末端反向重复（ITR）序列。因为突变会经常发生，并且基序与载体和相关质粒的结构和功能有关，所以要特别注意，使用Sanger测序来破解这些基序难度很大。

NGS技术相较于Sanger测序的优点

历史上，Sanger测序一直都为监管部门所认可，而如今NGS技术受到青睐，因为该技术具有提供病毒载体以及质粒的完整全面的序列信息的优势：

成本低 对AAV或慢病毒基因组（分别为5 kb或10 kb）进行完整测序可能需要10至30次Sanger测序反应。虽然单次Sanger测序通常比NGS成本更低，但并行多次Sanger反应的成本高昂，尤其是在设计和检测需要多对引物的情况下。

省时 对于单次测序或优化某一特定样本时，Sanger测序速度更快（GMP检测服务通常为1-2周）。但是，如果样本没有提前进行测序验证，那么将花费大量的时间。

复杂结构测序 对于DNA二级结构和高度重复区域如富含GC碱基对的序列和poly-A，特殊病毒序列如AAV ITR区或慢病毒LTR区，以及一些启动子和调控区域，采用NGS测序更加方便。而在Sanger测序中，这些区域将严重阻碍引物延伸。

高精度突变检测 突变检测非常重要，不仅关系到成品的质量，并且还关系到质粒原材料的质量。Sanger测序本质上是一种获得共有序列的方法，虽然可以识别序列中的变异或亚群，但只有在变异存在20%以上时，其识别结果才可靠。即便在此水平上，电泳图谱的解读也带有很强的主观性。相比之下，理论上，NGS技术可以检测出单个变异，而在实践中，确认变异需要经过多次读数。因此，即使变异存在于1%以下的群体中，采用NGS进行突变检测也是可行的。值得注意的是，在某一样本中估算遗传变异相对丰度时，NGS应被视为一种半定量而非完全定量的方法，因为量化取决于序列覆盖度以及被测序列的质量。因此，在设置NGS测序结果标准时应考虑这一点。

	Sanger Sequencing	NGS
Speed	★☆☆☆☆	★★★★★
Cost	★★★★☆	★★★★★
Variant detection	★★★★☆	★★★★★
Challenging sequences	★★☆☆☆	★★★★★

Sanger测序和NGS技术优势对比

病毒载体鉴别检测

质粒鉴别检测

charles river



关注Charles River生物制品服务

www.criver.com

查士利华实验室|生物制品检测解决方案

上海市青浦区华隆路1777号G幢一层