中华人民共和国
The People's Republic of China

细胞治疗相关法规

《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（试行）》
《CAR-T细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要点》
《嵌合抗原受体修饰T细胞(CAR-T细胞)制剂制备质量管理规范》

金斯瑞生物科技
Make Research Easy

业务

GMP质粒

GMP 病毒

加速医药转化 · 共建健康未来

助力2025医药行业“中国制造”

红宝书目录

细胞治疗产品研究与评价技术指导原则
（试行）

一、前言

近年来，随着干细胞治疗、免疫细胞治疗和基因编辑等基础理论、技术手段和临床医疗探索研究的不断发展，细胞治疗产品为一些严重及难治性疾病提供了新的治疗思路与方法。为规范和指导这类产品按照药品管理规范进行研究、开发与评价，制定本指导原则。由于细胞治疗类产品技术发展迅速且产品差异性较大，本原则主要是基于目前的认知，提出涉及细胞治疗产品安全、有效、质量可控的一般技术要求。随着技术的发展、认知的提升和经验的积累，将逐步完善、细化与修订不同细胞类别产品的具体技术要求。由于本指导原则涵盖多种细胞类型的产品，技术要求的适用性还应当采用具体问题具体分析的原则。

二、范围

本指导原则所述的细胞治疗产品是指用于治疗人的疾病，来源、操作和临床试验过程符合伦理要求，按照药品管理相关法规进行研发和注册申报的人体来源的活细胞产品。本指导原则不适用于输血用的血液成分，已有规定的、未经体外处理的造血干细胞移植，生殖相关细胞，以及由细胞组成的组织、器官类产品等。

三、风险控制

由于细胞治疗产品种类多、差异大、性质复杂多

变、研究进展快、技术更新迅速、风险程度不同，因此，对于不同类型产品，可基于风险特征和专项控制措施，采用适合其产品的特有技术。

细胞治疗产品的风险很大程度上取决于细胞的来源、类型、性质、功能、生产工艺、非细胞成分、非目的细胞群体、全生产过程中的污染和/或交叉污染的防控，以及具体治疗途径及用途等。不同细胞治疗产品的制备及使用过程可能会给患者带来不同程度的风险。细胞治疗产品应根据不同的风险制订相应的风险控制方案。从细胞治疗产品研发初始，应根据已有认识及其预期用途进行全面分析，并应在整个产品生命周期内不断地收集和更新数据，明确和防范风险。

在评估产品的整体风险时，应考虑各种因素对产品风险的影响，比如细胞的来源，细胞的操作程度，细胞的增殖、分化、迁移能力，细胞体外暴露于特定培养物质时间、细胞培养时间、细胞存活情况和细胞代次，非细胞成分的毒性作用，物理性及化学性处理或基因修饰/改造对细胞特性的改变程度，细胞和生物活性分子或结构材料组成的组合产品，激活免疫应答的能力，免疫识别的交叉反应，使用方式以及对受者的预处理，类似产品的经验或相关临床数据的可用性等多方面因素。

在细胞治疗产品的研发中，应不断综合各种风险因素进行分析评估，特别是应将综合风险分析结果用于：确定与产品的质量和安全性相关的风险因素；确

定在非临床和临床应用中所需数据的范围和重点；确定风险最小化措施的过程等。

细胞治疗产品中的细胞来源、获取和操作过程应当符合伦理。生产者应建立“知情与保密”管理体系，一方面让供者充分了解细胞的用途和使用情况，另一方面让供者的个人信息得到充分的保护。对于制备过程中不合格及临床试验剩余的细胞治疗产品或供体细胞，必须采用妥善、合法并符合伦理和生物环境安全性相关要求的处理方式。

细胞治疗产品的生产者应建立产品可追溯的管理体系，以确保产品从供者到受者全过程的可追溯性。需列出供者—产品—受者链，或自体产品—受者链，需规范和监控生产操作过程，严格防控不同供者样品（或不同批次样品）的混淆。

四、药学研究

（一）一般原则

由于细胞本身具备体内生存、自主增殖或/和分化的能力，其药学研究和质量控制应充分考虑以上基本特征，同时细胞治疗产品应符合药品质量管理的一般要求，临床用样品的生产全过程应当符合《药品生产质量管理规范》的基本原则和相关要求。生产过程中应特别关注人员、环境、设备等要求。细胞治疗产品的生产应建立全过程控制体系，生产工艺应经过严格的工艺验证并建立清晰的关键控制点；应严格控制生产用材料的质量并建立生产线清场的操作规范，避免生

产用原材料和生产操作过程中可能引入的外源性污染或交叉污染；应制订有效的隔离措施，防止不同供者来源制品或不同批次产品的混淆。

研究者需根据产品自身的特点综合评估供者细胞应用的合理性。一般情况下，采集前应对供者进行筛查，包括健康状况的全面检查（如一般信息、既往病史和家族性遗传病等）、病原微生物的感染筛查和在危险疫区停留情况的调查等。

（二）生产用材料

生产用材料是指用于制备细胞治疗产品的物质或材料，包括细胞、培养基、细胞因子、各种添加成分、冻存液、基因修饰/改造用物质和辅料等。生产用材料直接关系到产品的质量，因此研究者应建立良好、规范的生产用材料的质量管理体系，包括使用风险的评估、对关键生产用材料的供应商的审计和制订质量放行检测机制等工作程序。

1. 细胞

1.1 供者细胞

供者细胞来源应符合国家相关的法律法规和伦理的要求，供者细胞的获取、运输、分选、检验或保存等操作步骤应经过研究和验证，并在此基础上制订明确的规范和要求，比如供者细胞的特征、培养情况、代次、生长特性、保存状态、保存条件以及检验情况等。原则上，对于适合于建立细胞库的供者细胞应建立细胞库进行保存和生产。细胞库的层级可根据细胞自身

特性、生产情况和临床应用情况综合考虑；并应建立细胞库的检验标准，检验应满足安全性、质量可控性和/或有效性的基本要求。

1.2 生产过程细胞

生产过程细胞，如生产病毒用细胞，原则上应该符合来源和历史培养情况清楚、安全性风险可控、符合生产技术的需要和建立细胞库管理的基本原则。

2.其他生产用材料

2.1 原材料

生产用原材料的来源、组成、用途、用量和质量控制等情况应明确并合理。选择原材料时应考虑其使用的必要性、合理性和安全性，比如可能导致细胞突变或存在致敏可能性的非预期影响等，并应开展工艺去除效果验证和安全性风险评估，必要时对其残留量进行放行检测。应尽量采用已经获得批准用于人体的或符合药典标准的原材料。生物来源的原材料，应进行全面的外源因子检测，并应考虑到技术发展对新型外源因子的认知。自体使用产品应严格防止可能存在的外源因子传播的风险。

细胞治疗产品生产过程中使用的筛查试剂盒、分选试剂或材料、细胞分离或活化用抗体或磁珠、培养基、培养过程的添加物和与产品或中间样品接触的生产设备或材料等应经过严格的筛选和适用性的评估，应关注感染性病原微生物和免疫原性等安全性风险，建议尽量使用经监管当局批准的产品，否则建议使用

适合产品的高质量级别的产品。细胞培养过程中，应尽量避免使用动物或人来源的物质，比如应尽量避免血清的使用，若必须使用血清，需要提供相关的研究资料说明使用的必要性和合理性；严禁使用疫病流行区来源的动物血清；不得使用未经过安全性验证的血清。

对于需要经过基因修饰/改造的产品，应明确基因修饰/改造过程中采用的基因物质材料的来源、组成和质量控制情况，具体要求可参考相关的技术指导原则和/或文件。由于基因修饰/改造用物质可作为终产品的物质组成，因此应符合药品的生产质量管理规范。

2.2 辅料

细胞治疗产品中辅料的使用、用量和质量情况应加以研究和验证，证明其使用的必要性、安全性和合理性。宜优选经批准可用于人体的辅料，否则需要开展全面的研究与评估。对于新型的辅料应开展适当的非临床安全性研究。

（三）制备工艺与过程控制

细胞治疗产品的制备工艺指从供者获得供者细胞到细胞成品输入到受者体内的一系列体外操作的过程。研究者应进行工艺的研究与验证，证明工艺的可行性和稳健性。生产工艺的设计应避免细胞发生非预期的或异常的变化，并满足去除相关杂质的要求；需建立规范的工艺操作步骤、工艺控制参数、内控指标和废弃标准，对生产的全过程进行监控。研究者应不

断优化制备工艺，减少物理、化学或生物学作用对细胞的特性产生非预期的影响，以及减少杂质的引入，比如蛋白酶、核酸酶、选择性的抑制剂的使用等。建议尽量采用连续的制备工艺，如果生产过程中有不连续生产的情况时，应对细胞的保存条件和时长进行研究与验证。建议尽量采用封闭的或半封闭的制备工艺，以减少污染和交叉污染的风险。

生产工艺全过程的监控包括生产工艺参数的监测和过程控制指标的达成等。研究者应在对整体工艺的理解和对生产产品的累积经验的基础上，明确过程控制中关键的生产步骤、制订敏感参数的限定范围，以避免工艺发生偏移。必要时，还可以对制备过程中的细胞进行质量监控，过程中的质量监控与细胞放行检测相互结合与互补，以达到对整体工艺和产品质量的控制。例如，细胞在体外需要进行基因修饰/改造时，需要关注基因物质的转导效率、基因进入细胞后的整合情况、细胞的表型和基因型、目的基因的遗传稳定性、转导用基因物质的残留量，以及病毒复制能力回复突变等；细胞在体外进行诱导分化时，需要关注细胞的分化情况、细胞生长特性（如恶性转化等）、细胞的表型和/或基因型、诱导物质的残留情况等。

产品的剂型、制剂处方和处方工艺，应根据临床用药要求和产品自身的稳定性情况而定。有些细胞治疗产品在给药前需经过产品成分物理状态的转变、容器的转换、过滤与清洗、与其他结构材料的联合，以及调

整给药剂量等操作步骤，这些工艺步骤的确定也应该经过研究与验证，并在实际应用中严格执行。

（四）质量研究与质量控制

1.质量研究

细胞治疗产品的质量研究应选择有代表性的生产批次和合适的生产阶段样品（如初始分离的细胞、制备过程中细胞或成品等）进行研究。质量研究应涵盖细胞特性分析、功能性分析、纯度分析和安全性分析等方面，并且根据产品的自身特性可再增加其他相关的研究项目。

细胞特性研究应根据不同类型细胞的特征进行研究，如细胞鉴定（基因型、表型等）、分化潜能研究、表面标志物的表达、生物学活性、对外源性刺激的应答和表达产物的定性与定量的研究等方面。对于预期产品为多种不同类型或不同基因型/表型细胞所组成的混合物时，建议对细胞的混合特性进行鉴定研究和定量质控。

功能性分析方面，应针对细胞的性质、特点和预期用途等，建立功能性研究的方法，并用于研究与分析。研究中应考虑到产品的作用机制（比如细胞直接作用、细胞分泌因子作用或是其他），结合临床应用的适应症或其他可替代的指标建立合理、有效的生物学效力检测的方法。

细胞纯度方面，建议检测活细胞百分含量、亚细胞类别百分含量等；如果细胞进行了基因修饰/改造或分

化诱导，建议检测功能性细胞的比率。建议根据临床应用的风险情况考虑对其他非目的细胞群体进行定性和定量的研究与/或质量控制。

安全性相关的研究应根据细胞来源和制备工艺过程的特点考虑，可选择针对外源性因子、细胞恶性转化的可能性、成瘤性和致瘤性、相关杂质、病毒载体回复突变等方面开展研究。相关杂质研究中应包括工艺中引入的杂质（如蛋白酶、分化诱导试剂、病毒载体、微珠等）和产品相关的杂质（如细胞非预期表达的产物、死细胞残余和其他可能的生物降解产物等）。

2.质量控制

研究者需建立细胞治疗产品的质量控制策略。建议采用中间样品的质量检验和终产品放行检验相结合的机制。检定项目应当建立在产品质量研究以及对生产工艺和生产过程充分理解的基础之上，同时兼顾产品的特性和当下的科学认知与共识。随着研究的不断深入（如从临床前阶段进行至临床阶段），工艺相关信息应逐渐获得累积，检验方法应逐步完善，以适应各阶段的质量控制要求，建议确证性临床试验用样品的质量控制与商业化生产时的质控要求保持一致。质量控制一般应考虑鉴别、生物学效力、纯度、杂质、细胞数量（活细胞数、功能细胞数等）和一般检测（如无菌、支原体、内毒素、外观、除细胞之外的其他外源性异物等）等。验收标准的制订应以临床前研究批次、临床研究批次和验证批次中检测获得的数据，以及其他相关

数据（如经验、文献报道和稳定性研究等）确定。

当放行检验受到时间限制时，可考虑加强工艺过程中的样品质量监控，将过程控制与放行检验相结合，通过过程控制简化放行检验。以上操作应经过研究与验证，并附有相应的操作规范。建议尽量在产品临床应用前完成全部放行检验，当有些放行检验结果可能后置时，应对可能出现的非预期检验结果制订处置方案。为对产品进行回顾性分析或进一步分析，建议研究者根据产品自身特点，并参照《药品生产管理规范》中的要求进行留样备查。

一些细胞治疗产品在给药前还需经过一系列操作步骤，研究开发时应开展模拟给药过程的相关研究。如果该操作在医疗机构开展，产品生产者应明确操作步骤和注意事项，以指导临床医护工作者正确操作使用。建议在给药前完成操作后对最终产品进行质量核准，如细胞形态、活细胞数及比率、颜色、除细胞之外的其他外源性异物等，以及操作步骤的复核和标签核对等。

放行检验用方法应经过研究与验证，特别是对于建立的新方法应进行全面的验证，对于药典中收录的方法应进行适用性的验证。对于有效期短和样本量小的产品，可采用快速、微量的新型检测方法。研究者应对新型检验方法与传统检测方法进行比较和评估，必要时，在产品放行检验时可以采用两种检验方法进行相互验证。

（五）稳定性研究

细胞治疗产品的生产建议采用连续的工艺，对于生产过程中需要临时保存的样品应进行稳定性研究，以支持其保存条件与存放期。细胞治疗产品稳定性研究的基本原则可参照一般生物制品稳定性研究的要求，并根据产品自身的特点、临床用药的需求，以及保存、包装和运输的情况设计合理的研究方案。应采用具有代表性的细胞样本和存储条件开展研究。其中，需要特别关注细胞治疗产品的运输稳定性研究和使用过程中的稳定性研究等，应开展研究证明在拟定的存储条件下，细胞治疗产品的质量不会受到运输、使用中或其他外界条件的影响。应根据产品自身的特点和存储条件等方面，合理地设计稳定性考察的项目和检测指标，例如，冷冻储存的样品或产品一般应模拟使用情形（如细胞复苏过程）开展必要的冻融研究。考察项目建议涵盖生物学效力、细胞纯度、细胞特性、活细胞数及比率、功能细胞数和安全性相关的内容等。

（六）容器和密闭系统

为避免由于存储而导致的产品质量发生非预期变化，研究者应对细胞治疗产品生产过程中的样品和/或成品保存用的包装容器和密闭系统进行安全性评估和相容性研究，以说明其使用的合理性，例如密封性研究、冷冻储存适应性研究等。

细胞治疗产品生产过程中可能涉及样品与容器短暂直接接触的步骤，如采集的组织或细胞、制备过程

中的细胞、成品回输等步骤，研究者应对使用的容器进行安全性评估或接触的相容性研究等。

对于运输用的次级包装容器(非直接接触细胞)或材料也应经过验证，如对其遮光性、密封性和抗击机械压力等方面进行研究和验证。

五、非临床研究

（一）一般原则

1.研究评价内容

由于细胞治疗产品的物质组成及作用机制与小分子药物、大分子生物药物不同，所以传统、标准的非临床研究评价方法可能不完全适用于细胞治疗产品。细胞治疗产品的非临床研究评价内容取决于细胞类型及临床用途，与细胞来源、种类、生产过程、基因修饰/改造、处方中非细胞成分等因素密切相关，还与研发计划及相应的临床试验方案有关。由于细胞治疗产品种类繁多，不同产品其治疗原理、体内生物学行为、临床应用存在差别和不确定性，因此，对不同产品的研究评价应遵循“具体情况具体分析”的原则；同时，人用药品注册技术要求国际协调会（ICH）颁布的《生物技术药品的非临床安全性评价指南》(S6)可为细胞治疗产品的非临床研究评价提供参考。

2.受试物要求

非临床研究评价试验应尽可能使用拟用于临床试验的细胞治疗产品；用于进行非临床试验的受试物，其生产工艺及质量控制应与拟用于临床试验的受试物

一致（如果不一致应给予说明，并评估其对预测人体反应的影响）。

（1）人源的细胞治疗受试物参考本指导原则的药学要求；

（2）如果由于相关动物选择的限制，可考虑使用动物源替代品进行非临床研究评价；动物源替代品应与人源的细胞治疗受试物的生产工艺及质量标准尽可能相似，并提供必要的比较数据以确认替代品的质量属性。可考虑如下对比：

①组织或样本获取的程序；

②细胞识别、分离、扩增以及体外培养程序；

③细胞生长动力学参数（例如细胞倍增时间、细胞生长曲线、细胞增殖高峰时间）；

④表型和功能特性（比如生长因子和细胞因子的分泌，细胞群体特异性表型/基因型标志）；

⑤终产品配方/细胞支架种植方式（如果有）；

⑥终产品的储存条件及细胞活力；

⑦动物替代细胞作用方式与终产品细胞作用方式的异同。

非临床试验受试物和临床用样品的异同均应在新药申报时予以说明。

3.动物种属选择

非临床研究评价应选择合适种属的动物进行试验，所选动物对细胞治疗产品的生物反应与预期人体反应接近或相似。动物模型选择需考虑以下几个方面：

（1）生理学和解剖学与人类具有可比性；

（2）对人体细胞产品或携带人类转基因的细胞产品的免疫耐受性；

（3）临床给药系统/流程的可行性，转运特定剂量的细胞到治疗靶点的可行性；

（4）免疫缺陷动物的适用性，对产品进行长期安全性评估的可行性。

免疫功能正常的动物给予人源细胞时可能出现免疫应答反应，此种情况下，可考虑采用以下模型开展非临床研究：

①给予免疫抑制剂于具有免疫能力的动物；

②遗传性免疫缺陷动物；

③人源化动物；

④在免疫豁免部位给药；

⑤或者以上形式的组合。

某些情况下，也可采用动物源替代品进行评价。

鉴于细胞治疗产品的特性，如产品效应持续时间长、在体内持续存在、在细胞治疗产品与疾病环境间复杂的作用机制、侵入性的给药途径等，也可考虑采用疾病动物模型进行非临床研究。

4.给药方式（途径）

非临床研究评价中，细胞治疗产品的给药方式应能最大程度模拟临床拟用给药方式。如果在动物试验中无法模拟临床给药方式，临床前研究中需明确替代的给药方式/方法，并阐明其科学性和合理性。

当使用特殊的给药装置给药时，非临床试验采用的给药装置系统应与临床一致。

5.受试物分析

应提供受试物分析数据。

细胞治疗产品在给药前可能还需经过一系列操作步骤，在完成操作后需对受试物进行质量检测，检测指标包括细胞形态、总活细胞数、细胞存活率、颜色、除细胞之外的其他外源性异物等。

（二）药效学研究

药效学研究应采用可靠的方法验证细胞治疗产品的基本治疗机理，确定生物学效应标志物。试验设计应考虑细胞治疗产品的作用机制、疾病周期长短以及给药方式等因素，结合细胞治疗产品的特性和存活时间。建议采用相关的体外和体内模型完成细胞治疗产品的药效学研究。

（三）药代动力学研究

药代动力学研究应能阐明细胞的体内过程以及伴随的生物学行为，应根据细胞治疗产品类型和特点选择合适的动物模型，一般考虑雌雄各半。根据研究目的及检测指标的临床价值，建立合适的生物分析方法并对方法进行必要的验证。药代动力学研究要关注目标细胞在体内的增殖、生物分子的表达和/或分泌，以及与宿主组织的相互作用；相互作用还包括细胞治疗产品的非细胞成分（辅料成分）及分泌的生物活性分子引起的相关组织反应。药代动力学研究内容包括但

不仅限于以下方面：

1.细胞的分布、迁移、归巢

应采用一种或多种合适的细胞追踪方法评价细胞产品的分布、迁移、归巢及其存续和消亡特性，并阐述方法的科学性。细胞治疗产品的分布及存续时间是影响细胞治疗产品有效性和安全性的最重要因素，应进行动态观察，必要时观察直至这些细胞的消失或功能丧失。可选择的技术方法有影像技术、PCR 技术、免疫组化技术等，试验设计需要考虑技术方法的适用性和优缺点。

2.细胞分化

细胞在分布、迁移和归巢后进一步分化为功能细胞发挥其治疗作用或功能衰退；对于细胞产品分化的程度及其后果（功能化或去功能化、安全参数），可应用体外方法和动物体内方法进行定量或定性评价研究。

3.对于经基因修饰/改造操作的人源细胞的特殊考虑

对于基因修饰/改造的细胞，除上述要求外，还需对目的基因的存在、表达、以及表达产物的生物学作用进行必要的研究，以体现基因修饰/改造的体内生物学效应。

（四）安全性研究评价

1.GLP 遵从性要求

细胞治疗产品的安全性研究评价应遵从《药物非

临床试验质量管理规范》（GLP）。对于某些在非 GLP 状况下开展的研究或检测，应予说明并评估非 GLP 对试验结果可靠性、完整性及对细胞治疗产品总体安全性评价的影响。

2.安全药理学试验

细胞在体内分泌的活性物质可能会对中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统的功能等产生影响；细胞本身分布或植入于重要器官，细胞治疗产品的处方成分等也可能影响器官功能。因此，对于细胞治疗产品应考虑进行安全药理试验。如果在毒性试验中发现有潜在风险，应补充开展有关安全药理试验。

3.单次给药毒性试验

单次给药毒性试验可获得剂量与全身和/或局部毒性之间的剂量-反应关系，有助于了解其毒性靶器官，也可为重复给药毒性试验的剂量设计提供一定的参考。由于细胞治疗产品能够长时间地发挥功能或诱导长期效应，因此单次给药的观察时间应考虑细胞或者细胞效应的存续时间，一般应长于单次给药毒性试验常规的观察时间。

4.重复给药毒性试验

试验设计应包含常规毒理学试验研究的基本要素，并结合细胞治疗产品的特殊性来设计，以期获得尽可能多的安全性信息。

动物种属选择：根据产品的不同特性，采用能够对细胞治疗产品产生生物学活性的动物种属进行重复给

药毒性研究。一般情况下应采用雌雄动物进行试验。如无相关种属可开展非临床研究时，非相关种属的动物试验对评价生产工艺过程、全处方的安全性及非靶效应也可能具有价值。

剂量组设计：参考“《药物重复给药毒性研究技术指导原则》”，需设计多个剂量水平、包含临床拟用剂量范围和最大可行剂量，并结合处方组成及生产工艺，设置合适的对照组。

观察指标：除常规观察指标外，需结合产品特点，选择合适的观察指标，尽可能包括形态学与功能学的评价指标，如行为学检测、神经功能测试、心功能评价、眼科检查、异常/异位增生性病变（如增生、肿瘤）、生物标志物、生物活性分子的分泌、免疫反应以及与宿主组织的相互作用等。

5.免疫原性和免疫毒性试验

细胞治疗产品或细胞分泌产物需要研究其潜在的免疫原性，免疫原性研究可参考最新版技术研究指导原则；此外，还需关注细胞治疗产品诱导产生的免疫毒性。

6.致瘤性/致癌性试验

细胞治疗产品的致瘤性/致癌性风险取决于产品中不同细胞的分化状态、生产过程中采用的细胞培养方式引起的生长动力学改变、基因修饰/改造细胞的转基因表达（例如多种生长因子）、诱导或增强宿主体内形成肿瘤的可能性以及目标患者人群等，需要根据以

上特点进行综合考虑。

目前，如何选择致瘤性/致癌性研究的动物模型尚未达成科学共识。致瘤性/致癌性试验应采用临床拟用产品进行试验。致瘤性/致癌性试验需确保细胞可在体内长期存活以考察是否有潜在肿瘤形成。试验设计需注意以下方面：（1）合适的对照组（例如阳性对照、空白对照）；（2）每组需有足够的动物数量，使肿瘤发生率的分析满足统计学要求；（3）需包含最大可行剂量；（4）受试物应到达拟定的临床治疗部位；（5）足够长的试验周期。

由于免疫排斥反应，人源细胞治疗产品的致瘤性/致癌性试验可考虑使用免疫缺陷的啮齿类动物模型进行。

7.生殖毒性试验

细胞治疗产品的生殖和发育毒性评价主要是取决于产品的特性、临床适应症以及临床拟用人群，应根据具体情况具体分析。

8.遗传毒性试验

对于人源的细胞治疗产品，如果该产品与 DNA 或其他遗传物质存在直接的相互作用，需进行遗传毒性试验。

9.特殊安全性试验

根据细胞治疗产品的特点与临床应用情况，应考虑对局部耐受性、组织兼容性及对所分泌物质的耐受性进行评估。

10.其他毒性试验

对于采用基因修饰/改造的细胞治疗产品，需关注有复制能力的病毒的产生和插入突变，特别是致癌基因的活化等特性带来的安全性风险。具体要求可参见相关的技术指导文件。

六、临床研究

当细胞治疗产品进入临床试验阶段时，应遵循《药物临床试验质量管理规范》(GCP)的要求。临床试验的研究内容原则上应包括临床安全性评价、药代动力学研究、药效学研究、剂量探索研究和确证性临床试验等。根据不同细胞治疗产品的产品性质，可酌情调整具体的试验设计。

鉴于细胞治疗产品特殊的生物学特性，在临床试验研究中，需要采取不同于其他药物的临床试验整体策略。为了获得预期治疗效果，细胞治疗产品可能需要通过特定的手术措施、给药方法或联合治疗策略来进行给药。因此，在临床试验方案设计中应一并考虑。

细胞治疗产品很多特有的性质也会影响其临床试验的设计，包括产品特性、生产特点以及临床前研究的结果等。

（一）受试者的保护

受试者的选择需要考虑多方面的因素，选择宗旨是能使研究受试者的预期风险与潜在获益经过慎重评估，同时能实现研究的科学目的。

在早期临床试验阶段，所预期的获益或风险存在

很大的不确定性。对于预期作用持久或永久以及侵入性给药等高风险特点的细胞治疗产品，在试验中应选择预期治疗可能获益的患者。

选择患者作为受试者时，应充分考虑患者疾病的严重程度和疾病的不同阶段以及现有治疗手段，如果不能获得有效的治疗，特别是不可治愈性疾病重度致残和危及生命时，患者接受细胞治疗临床研究是合理的。同时应确定并减小受试者可能承担的风险。

在受试者的选择中，还应关注，如果患者将来需要通过细胞、组织或器官移植治疗该或其他疾病，异体细胞治疗产品诱导产生的抗体可能会影响到移植的成功率。

受试者选择可能会影响临床试验的风险和获益，应尽可能减少风险、提高分析结果的能力，并增加对个体受试者和社会的获益。

对受试者可能带来的风险和获益应在知情同意书中给予充分表述。

（二）药效学

即使受试的细胞治疗产品的作用机制尚不清晰，但对其主要的作用应有所了解。

在早期临床试验中，通常其主要目的是评价产品的安全性，常见的次要目的则是初步评估产品有效性，即药效学评价。评估指标为可能提示潜在有效性的短期效应或长期结局。这些概念验证数据可以对后续的临床开发提供支持。在细胞治疗产品的活性评估中，

可以包括基因表达、细胞植入、形态学变化和其他生物标志物等特殊指标，也可以包括免疫功能变化、肿瘤体积改变或各种类型的生理应答等更常见的指标以及因技术发展可以检测的指标。

如果使用细胞治疗产品的目的是纠正功能缺陷或受损的细胞或组织的生物学功能，则应进行细胞治疗产品功能学检测。如果细胞治疗产品的预期用途是修复/免疫调节/替换细胞/组织，并有望能够终生发挥功能，则相关的结构/组织学检测指标可作为潜在的药效学标志物而进行检测，包括镜检、组织学检测、成像技术或酶活性指标检测等。

当细胞治疗产品包含非细胞成分时，应对该产品进行生物相容性、体内降解速率和生物学功能等进行综合评估。

（三）药代动力学

传统的药代动力学研究方法并不适合人的细胞治疗产品的药代动力学研究。应尽可能开展细胞治疗产品的体内过程研究。临床试验中应对研究要求、可能采取的方法及可行性进行讨论，并注意在细胞治疗产品预期的活性过程中，重点检测细胞的活力、增殖与分化能力、体内的分布/迁移和相关的生物学功能。

如果需对细胞治疗产品进行多次（重复）给药，临床方案设计时应考虑细胞治疗产品在体内的预期存活时间及相应的功能。

（四）剂量探索

早期临床试验的目的之一是探索细胞治疗产品的有效剂量范围。如可能，还应确定最大耐受剂量。

应基于在产品的质量控制研究和临床前研究中所获得的结果来确定细胞治疗产品给药剂量，并充分考虑产品的生物学效力。

与小分子药物不同，细胞治疗产品的首次人体试验起始剂量一般难以从传统的非临床药代动力学和药效学中评估确定，但其既往临床使用经验（如有）可能有助于合理地确定临床起始剂量。很多细胞治疗产品会长期存在于受试者体内或作用时间持久，所以首次人体试验应采用单次给药方案，只有在初步了解产品的毒性和作用持续时间之后，才可考虑重复给药。

细胞治疗产品通常采用半对数递增（$10^{0.5}$倍）的方法来制定剂量递增方案。给药剂量增幅的设定应该考虑到临床前数据中与剂量变化有关的风险和活性以及现有的任何临床数据。同时应充分考虑细胞治疗产品特有的安全性风险，设定足够的给药间隔和随访时间，以观察急性和亚急性不良事件。

尽管细胞治疗产品的给药剂量可能取决于患者的个体情况，然而早期临床试验所提供的剂量探索研究的证据仍然是确证性临床试验中给药剂量确定的重要依据。

（五）临床有效性

通常，临床有效性的确证性试验应在目标适应症人群中开展，应有足够样本量、合理的对照并选择具

有临床意义的终点指标。同时，该临床试验应能够提供可产生预期治疗效果的临床给药方案、治疗效果的持续时间以及在目标人群中的获益与风险。

针对特定适应症的确证性研究应符合现有的相关技术指导原则。在研究过程中，如果与上述原则有偏离应提供合理的解释。

可以使用以往经过验证或普遍认可的指标作为替代终点，该替代终点应具有临床意义并与治疗有效性相关。如果产品的有效性依赖于该产品需要长期维持输入细胞的生物学活性，临床试验观察时间应按照该产品的预期生物学活性设计，并应提供长期的患者随访计划。

（六）临床安全性

细胞治疗产品的安全性监测应贯穿于产品研发全过程。

应对非临床研究中出现的所有安全性问题进行分析并提出解决措施，尤其是在缺乏相应的动物模型进行安全性评估或缺乏同源动物模型来预测人与动物在生理学存在差异的情况下的安全性评估。

在确定临床研究方案和患者目标人群时，应该将细胞治疗作为一个整体进行风险评估，如在实施细胞治疗产品所需的手术或免疫抑制治疗等过程中。

早期试验中，其主要目的是评价安全性。基于风险考虑，应在首例受试者安全性尽可能充分暴露后再逐例入组其他受试者。安全性评价的一般性监测通常包

括症状记录和常规的临床检查，具体的监测项目取决于多种因素，如产品的性质和作用机制、研究人群、动物研究的结果和任何相关的临床经验。除了针对预期和非预期安全性问题的一般性项目检查和监测外，还可以针对细胞治疗产品的特定预期安全性问题进行评估。如急性或迟发性输注反应、细胞因子释放综合征、自身免疫反应、移植物失功或细胞治疗产品失活、移植物抗宿主反应、伴发恶性疾病、供体传染性疾病的传播、病毒重新激活等。申请者应该收集临床试验中的所有不良事件。

在细胞治疗产品的确证性临床试验及上市后阶段，除一般的症状记录和常规的临床检查外，还应注意一些重要生物学过程的改变，包括免疫应答、免疫原性、感染以及恶性转化等。

由于细胞治疗产品的药理学活性可能起效缓慢或者延迟，因此，无论受试者是否接受了整个治疗方案，都应该持续监测安全性和药理学活性。对于预期具有长期活性的产品，应对患者进行随访以确定治疗产品的长期有效性及充分暴露产品相关的安全性问题。随访持续时间应能提供初步的有效性证据和该产品的活性持续时间，并应考虑该产品是否引起迟发型安全性问题等因素。

基于风险考虑，建议开展重复给药产品的临床安全性研究。确定最大安全剂量时应该考虑到重复给药的可能性。

在细胞治疗产品临床试验中，不良反应的频率或严重程度存在相当大的不确定性，因此，临床试验方案应该包括停止标准，风险评估方案，并成立独立的数据和安全监察委员会。

（七）风险管理方案

在制订风险管理方案时，应阐述常规药物警戒及产品的可追溯性。同时应考虑细胞治疗产品在给药、个体化制备、特殊处理（如有效期短暂）或辅助治疗中可能带来的疗效和安全性差异。作为风险管理的一部分，应制定规范可行的标准操作规程。

细胞治疗产品可能需要特定的长期研究来监测特定的安全性问题，包括失效。应对长期安全性问题，如感染、免疫原性/免疫抑制和恶性转化进行评估。需要有足够的随访时间以评价其安全性。

在现阶段，对高风险的细胞治疗产品，患者的随访时间应足够长，甚至终身随访。随着对细胞治疗产品认识的增加，可延长或缩短随访间隔时间。

根据细胞治疗产品的生物学特性，可能需要开展特定的流行病学研究。

七、名词解释

原材料（Raw materials）：指生产过程中使用的所有生物材料和化学材料，不包括辅料。

生产过程细胞（Ancillary cells）：系指用于制备病毒载体等，起到包装辅助作用而不回输给受者的细胞。

细胞批次（Cell batch）：系指取自个体的一次采集的细胞，经生产全过程制成的终末细胞培养物或收获物。

成瘤性（Tumorigenicity）：系指细胞接种动物后在注射部分和（或）转移部位由接种细胞本身形成肿瘤的能力。即接种的细胞自身形成肿瘤的能力。

致瘤性（Oncogenicity）：系指细胞裂解物中的化学物质、病毒、病毒核酸或基因以及细胞成分接种动物后，导致被接种动物的正常细胞形成肿瘤的能力。即接种物（细胞和/或裂解物）促使正常细胞转变为肿瘤细胞的能力。

CAR-T 细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要点

中国食品药品检定研究院

2018 年 6 月 5 日

目录

CAR-T 细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床评价考虑要点

一、引言

嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T，Chimeric antigen receptor T cell）是指通过基因修饰技术，将带有特异性抗原识别结构域及 T 细胞激活信号的遗传物质转入 T 细胞，使 T 细胞通过直接与肿瘤细胞表面的特异性抗原相结合而激活，通过释放穿孔素、颗粒酶素 B 等直接杀伤肿瘤细胞，同时还通过释放细胞因子募集人体内源性免疫细胞杀伤肿瘤细胞，从而达到治疗肿瘤的目的，而且还可形成免疫记忆 T 细胞从而获得特异性的抗肿瘤长效机制。目前，CAR-T 细胞对多种血液肿瘤显示了非常好的临床效果，对实体瘤治疗也表现出了非常大的潜力。2017 年美国批准了两个分别针对急性 B 淋巴细胞白血病和 B 淋巴细胞瘤的 CD19-CAR-T 细胞治疗产品上市，CAR-T 细胞治疗已经成为肿瘤免疫治疗领域中新的国际研究热点。我国 CAR-T 研究也呈现蓬勃发展的态势，已有众多研究机构及制药公司投入

到了 CAR-T 细胞产品的研发中，已有多家机构递交了 CAR-T 细胞治疗产品的临床试验申请，CAR-T 细胞治疗领域的产业化开始在千差万别中起步。

同时，在 CAR-T 细胞治疗研究热潮的背后，我们必须要看到，尽管 CAR-T 细胞治疗不断取得令人鼓舞的进展，但它还是一个新兴领域，一方面人们对 CAR-T 细胞治疗的科学认识尚有许多需要解决的问题，另一方面又有许多新的技术不断进入该领域，且人们尚未有足够的数据评估其潜在风险。此外细胞治疗产品又具有与其它非体内扩增药物完全不同的特点，不仅体现在个体化、产量小及批次有限等方面，而且存在起始材料差异大、制备工艺不成熟、生物学效力以及安全性评价复杂等问题，限制了 CAR-T 细胞治疗产品的快速发展，因此，如何提高 CAR-T 细胞治疗产品的安全性、有效性、质量可控性以及产品工艺一致性是每一个研发者需要面临的问题。

本技术考虑要点针对于国内 CAR-T 细胞产品的研发现状，以 CAR-T 细胞产品的生产工艺及产品特性为主线，以《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（试

行)》为基本要求，从如何开展 CAR-T 细胞产品的质量控制检测研究和非临床评价两个方面提出指导性意见，为 CAR-T 细胞产品研发者提供技术参考，使我国 CAR-T 细胞产品领域从起步即能够按照一定的规范开展研究，为未来的产业化打好基础。同时，本技术考虑要点也会随着 CAR-T 细胞产品各方面研究的不断成熟而不断进行修订，从而逐步建立更为科学合理的 CAR-T 细胞产品的质量控制检测及非临床评价的要求及标准。

二、适用范围

1、本技术要点适用于哪类 CAR-T 细胞产品？

目前有多种方法用于 T 细胞修饰及 CAR-T 细胞产品制备，包括病毒载体转导（如γ-逆转录病毒载体或慢病毒载体）及非病毒载体转染（如 mRNA 转染、Transposons 转染等）等，虽然已开展的临床试验中以病毒载体转导的方式为主， 但以非病毒载体转染的方式也在不断得到青睐，因此，本考虑要点主要以病毒载体和非病毒质粒载体的基因修饰方式制备的 CAR-T 细胞治疗产品为主要对象，但共性的部分也可为其它类基因修饰方式制备的 CAR-T 细胞参考。

2、本技术要点包括哪些内容？

本技术考虑要点按照 CAR-T 细胞产品的制备工艺顺序，提出了各阶段工艺研究及质量控制的关注点及检测要求的考虑，并提出了产品非临床评价研究需要开展的内容及所用方法，主要包括原辅料选择、转导基因载体或转染基因载体的制备及质量控制、细胞供体筛选及检测、CAR-T 细胞制备工艺研究、工艺过程控制、细胞产品质量控制要求以及非临床评价研究的动物模型、有效性及安全性评价方法等，不仅提出一般要求，也对重点环节提出有针对性的考虑。

3、本技术考虑要点的基本原则是什么？

CAR-T 细胞产品是基因治疗与细胞治疗技术的结合，一方面，它具有基因治疗可能潜在的风险，如因存在基因整合或细胞复制的可能而带来二次肿瘤的风险，另一方面，由于 CAR-T 细胞的制备是以人作为供体采集初始细胞材料才能进入工艺过程，由于每个个体，特别是肿瘤患者，因其初始细胞会因为肿瘤类别及所处分期、所接受过的治疗、采集样本时的身体状况或与上一次治疗的间隔时间、以及每个患者的 T 细胞的

亚群的比例等有明显的差异，即使采用已经进行过充分验证的工艺，仍然难以保证每个个体所制备的目的细胞都是一致的。因此，本技术考虑要点一方面要考虑产品的安全性及有效性，另一方面更从各个工艺阶段突出一致性的要求，以最大限度的降低产品的可变性。

三、原材料和辅料及其质量控制：

1、在 CAR-T 细胞产品的原材料和辅料通常都要考虑哪些因素？

生产 CAR-T 细胞产品的原材料是指其生产过程中所用的所有生物原材料和化学原材料，它们不是 CAR-T 细胞产品的目标组成成份，如培养基、PBMC 分离试剂、T 细胞分选试剂、激活剂、细胞因子（如 IL-2、IL-7 及 IL-15）、血清或血清替代物等。而 CAR-T 细胞产品的辅料是指其产品配方中所使用的辅助材料，是其细胞产品中的成份，如人血白蛋白、人血小板提取物、冻存液（如 DMSO）等。

一个完整 CAR-T 细胞产品的制备过程包括基因载体物质的制备及 CAR-T 细胞终产品的制备两个大的生

产环节，同时，载体物质的制备又包括了质粒载体制备和/或病毒载体制备工艺过程，因此，在考虑选择原材料时，不仅要考虑 CAR-T 细胞产品制备过程中所用的原材料，也要考虑基因载体物质制备过程中所用的原材料（不包括生产的起始原材料，如细胞基质和菌毒种），如细菌及细胞培养基、牛血清、添加因子、转染试剂（如钙转试剂、PEI、Lipo2000 等）以及核酸酶等等。如果在 CAR-T 细胞生产过程中还使用了自制的试剂和材料，还要考虑制备这些自制试剂中所用的原材料。

在早期的基础研究时，研究者对原材料及辅料的关注可能不足，但由于原材料和辅料对产品的质量及安全性均有重要影响，因此，一旦准备进入产品开发阶段，研发人员就要尽早开展原材料及辅料的评估及筛选，而且在临床过程中要进一步开展相关的研究，在确证性临床前应完成充分的质量评估工作。

2、转导/转染 T 细胞的病毒载体/质粒载体是否可按照原材料管理？

CAR-T 细胞是基因治疗的 ex vivo 方式，通过病毒

载体转导或质粒载体转染，将 CAR 基因转入 T 细胞中从而获得 CAR-T 细胞，虽然它们未转染的部分在后续的 T 细胞扩增及洗涤过程中经验证可被去除，但其所携带的遗传物质则是 CAR-T 细胞的重要组成部分且是使 T 细胞具有肿瘤杀伤活性的重要基础，这一点与生产中所用的原材料的特性完全不同，其质量对 CAR-T 细胞具有重要影响，因此，转导/转染 T 细胞的病毒载体/或质粒载体按照产品的理念进行管理更为合理。

但同时也还需要考虑到，也正是因其不直接进入患者体内，在后续的细胞扩增及 CAR-T 制剂工艺中会有稀释或洗涤步骤，因此，通过验证可证明后续工艺可以降低其残留的风险，则可以结合工艺验证的结果制定更为合理的质量控制标准。

3、如何进行原材料和辅料的选择和风险控制？

在 CAR-T 细胞制备过程中使用的原材料有药用级别的（如 IL-2），也有非药用级别的（如 IL-7）；有的原材料在国外被批准用于药品生产但尚未在国内获得注册，如某种 CD3/CD28 磁珠；有的同一种试剂分别存在药用级别和非药用级别，非药用级又分为 GMP 级别

及研究用级别；有的试剂是生物源性材料，如病毒制备中会用到的牛血清和胰酶；有的试剂甚至要自行制备等，面对如此复杂的情况，CAR-T 细胞产品的研究者就需要考虑采用何种方法选择以及控制原材料。

原材料的选择是基于风险评估的原则，通过风险评估从而建立与之相应的风险控制策略，通常会有以下几种考虑：

（1）在产品研发早期就开始设计所用原材料的类别并分析其可能的风险，可根据我国现行版《中国药典》三部中“生物制品生产用原材料及辅料质量控制规程”及国外相关技术要求对原材料的风险等级进行评估并分类，同一种试剂或材料，优先选择低风险级别的，如药用无菌制剂优于药用制剂，药用级优先于非药用级、GMP 级优先于非 GMP 级、非动物源性优先于动物源性材料等；

（2）根据对每一种原材料风险评估的结果建立相应的质量检测项目、检测方法及放行标准，并在产品研发过程中不断分析关键原材料质量对产品质量的影响，并不断改进关键原材料的质量要求；

（3）对于研究级别的生物源性的原材料，不仅要设置它们的安全性质控项目，如无菌、内毒素、支原体、分枝杆菌及外源病毒污染的检测等，还要考虑它们的纯度、效价或对细胞活化、增殖的生物学效力的质控项目。动物源性材料的质量控制，如牛血清，需至少按照已有的国家标准或要求进行原材料质控及放行；

（4）对于自行研制的原材料，如某种特殊要求的细胞因子，不仅需要建立质量标准，还需要有制备工艺及其工艺验证等数据支持，有的高风险的原材料甚至可能还会要求开展动物体内的安全性评估。此类原材料的检测要求需要根据其使用方式、下游工艺的清除验证数据以及潜在风险来确定。

辅料的选择及控制要求同样是基于风险评估的原则，因辅料是与 CAR-T 产品一同进入患者体内，因此，选择低风险的辅料以及严格控制辅料风险是基本原则，如一种辅料同时存在几种风险等级来源时，应选用风险等级低的辅料；对于高风险等级的辅料，应在产品研发的早期评价使用这些辅料的必要性，并寻找其他替代物或替代来源。

4、在载体物质或 CAR-T 细胞终产品中是否需要进行原材料残留的质量检测？

在载体物质或 CAR-T 细胞终产品中是否进行原材料的残留控制，主要考虑两个方面，一个是根据原材料的风险级别，评估载体纯化工艺或 CAR-T 细胞制备工艺对其去除的能力，二是对于风险高的原材料除了评估去除能力外，还需要在载体或 CAR-T 细胞产品制备的最适工艺阶段或终产品中进行残留量检测的控制并建立控制标准，如慢病毒工艺中使用的降解 DNA 的核酸酶 Benzonase 的残留控制，牛血清白蛋白残留量的检测等。

四、病毒转导载体及质粒转染载体制备及质量控制：

1、转导/或转染载体制备的起始原材料包括哪些或如何定义转染载体的起始原材料？

对于γ-逆转录病毒载体（如 GALV）来说，通过多质粒瞬时共转染一包装细胞获得具有感染性的病毒颗粒，再将此病毒感染另一包装细胞，该包装细胞已稳定转染了可产生逆转录病毒颗粒的病毒必需基因，因此，通过克隆筛选后，可获得稳定生产高滴度逆转录

病毒载体的细胞株，如可生产 GALV 病毒载体 PG13 细胞，这一稳定转染的细胞即是生产病毒的起始原材料。

对于慢病毒载体来说，多采用三质粒或四质粒瞬时转染包装细胞（如 293T/17 或 293T 细胞）的方法制备病毒载体，在这个体系中，含有 CAR 基因的穿梭载体、慢病毒包装辅助元件的二个或三个辅助质粒载体以及包装细胞均是制备慢病毒载体的起始原材料。但同时，对于这些含有不同目的基因的质粒来说，菌种又是质粒生产的起始原材料，所以对于慢病毒载体，其起始原材料的定义要延伸到制备质粒的菌种，质粒在此系统中为慢病毒制备的中间产物。未来如果研究者可以开发出生产慢病毒的稳定转染的细胞株，此时，就可以将慢病毒的起始原材料仅定义为细胞。

对于使用质粒转染系统（如 Piggybac）的非病毒载体，其起始原材料是指生产含 CAR 基因质粒的菌种。

2、起始原材料要建立种子库系统吗？

是的。对于能够建立库系统的起始原材料，均应采用二级或三级种子库系统（种子、主库和工作库），因每一支冻存样品均具有群体代表性，故种子库具有良

好的均质性，而且可以进行充分的质量检定，从而最大程度地控制污染风险； 同时，由于种子库系统具有足够的数量，可为长期生产提供稳定的来源，因此，采用种子库系统是质粒载体及病毒载体生产一致性的重要保证之一。

用于生产病毒载体的稳定转染细胞（如含 CAR 基因的 PG13 细胞）及瞬时转染的细胞（如 HEK293、293T 或 293T/17）均需建立细胞库系统，即细胞种子，MCB 和/或 WCB；用于制备非病毒转染方式的质粒、慢病毒载体所需的穿梭质粒及辅助质粒的细菌，均需建立菌种库体系，即主种子库和/或工作种子库。因不同穿梭载体可使用相同的辅助质粒载体共转染获得慢病毒载体，因此，辅助质粒载体菌种种子批的保存数量可相应增大。

如对原亲本细胞进行了克隆筛选、无血清驯化、基因改造等改变细胞特性的操作，应通过在原细胞名称后增加后缀等方式重新命名细胞，以区别于原细胞，并重新建立细胞库用于病毒载体的生产。

此外，在构建病毒载体稳转细胞过程中使用的瞬

时转染细胞或包装细胞亦建议采用细胞库体系，并至少进行细胞鉴别、细菌、真菌、支原体污染检查及一般外源病毒污染的检查。

3、如何建立种子库系统？如何确定各级种子库的代次及数量？

通常情况下，种子库系统按照原始种子/细胞种子、主库及工作库进行管理，原始种子库/细胞种子用于制备主库、主库用于制备工作库。当每年的细胞的使用量不多时，可以采用种子和主库两级管理。用于生产的种子库系统必须符合种子库的质量要求。

无论是建立菌种库还是细胞库，其重要的一点是保证均质性，即从种子或主库中取 1 支或几支细菌或细胞复苏，按照规定的培养条件扩增到一定数量后，在同一次操作中，将处于相同倍增水平的细菌或细胞收集后重悬于保存液或冻存液中，合并于同一个容器，然后无菌分装到菌种保存管/或细胞冻存管中，并在适当的条件下保存。菌种库/或细胞库应选择最稳定的保存方法，如菌种尽可能以冻干的方式保存，细胞通常在液氮（如气相）中保存，或超低温保存（-180 度及

以下)。以包装慢病毒的 293T/17 细胞为例，将细胞种子复苏后，按照固定的比例传代至处于相同倍增水平的足够建库的细胞量（如均处于第 N 代)，挑选出状态良好的细胞，在同一次操作中，将这些细胞消化、离心收集，将细胞用冻存液重悬后合并在同一容器中，混合均匀，按照规定的量分装到冻存管中，按照经过验证的程序冻存后保存于液氮或其它超低温设备中，这样获得的任何一支冻存管中的细胞均可代表这一批细胞。在建库过程中，将虽然处于相同的倍增水平，但是在不同次操作中制备的冻存细胞不能作为同一个库管理，如将处于同一倍增水平的细胞分别在两个不同的时间点冻存，或在同一时间收集但分别在不同的容器中混匀后分装、均不能作为同一个库管理。

主库和工作库的代次、每一支的装量以及保存的数量需要根据种子的特性、生产能力和生产稳定性、预期的规模和预期的产品生命周期等因素综合考虑，如在产品开发早期，可建立相对小的工作库，以满足产品药学、临床前及临床研究的需要，而到了上市阶段，甚至是从确证性临床开始，则需要考虑产品的预

期生命周期，生产规模以及每年的产能等，选择建立一个相对大的工作库更为合理。

种子库的更换属于生产变更的范围，更换主库通常会被认定为较大的变更，特别是对于那些经过基因修饰操作的细菌或细胞，如从原有的种子库或主库中重新挑选克隆建立新的主库的操作即属于风险较高的变更，需要进行全面的评估。但工作库可以根据年度使用情况，从主库中重新制备新批次的工作库，并按照规定的要求检定合格后使用。

4、种子库的质量要求是什么？如何管理种子库？

（1）菌种库的质量要求：菌种库的质量检测主要包括：菌种鉴别及纯度、活菌数、质粒基因序列、质粒保有率及稳定性等。菌种的鉴别及纯度需采用不同的方法联合检测，包括通过培养，检测其菌落的形态以及是否有杂菌生长；将细菌染色，通过镜检法检测其菌的形态及染色特性；通过生化反应可检测菌种的生化特性，这些方法可证明所用菌种是本菌，无其它菌的污染。通过检测质粒序列、拷贝数及限制性酶切图谱证明菌种中的质粒含有目的元件及相应的拷贝数，

通过检测质粒的保有率验证菌种的稳定性并限定菌种使用的传代水平。因辅助质粒在真核中表达，因此，在菌种检定时不必要检查其插入基因表达的水平。除此，还应对菌种进行杂菌及噬菌体的污染检查，以保证菌种的安全性。

近年来，随着技术的发展及对药品质量要求的提高，为监测菌种的稳定性，开始增加生产用菌种全序列背景资料的要求，因此，研究者可根据研究的进度逐步开展相关的研究工作。

（2）细胞库的质量要求：《中国药典》三部生物制品通则《生产用动物细胞基质制备及检定规程》中规定了细胞基质的质量要求，包括细胞鉴别（种属、株及专属特性）、外源因子污染检查（包括非病毒性及病毒性内外源因子）、成瘤性及致瘤性检测、染色体核型、均一性以及稳定性等，但对于每种特定细胞来说，需设置更具体的检测项目。由于生产 CAR-T 细胞病毒载体的细胞主要有稳转的 PG13-CAR 细胞、HEK293、293T 或 293T/17，它们是已知体内具有成瘤性的细胞，293T 细胞已有多种重组产品的研发经验，且 CAR-T 细胞产

品主要用于目前尚无有效手段治疗的肿瘤患者，而且病毒载体不直接进入患者体内，所以在细胞库检定中主要进行细胞鉴别、外源因子污染检查，可以不进行其成瘤性及致瘤性检测，但在转染载体中要考虑细胞残留成分的检测，如宿主 DNA 及细胞蛋白的检测。但如果使用新的细胞时，作为细胞特性鉴别的特征之一，还是要考虑进行成瘤性检测。

对于稳转的 PG13-CAR 细胞，除种属鉴别外，其鉴别试验中要包括特定插入基因的鉴别（如插入基因序列、拷贝数等），同时，由于其为鼠源细胞，所以在进行细胞库的充分评估时，特定外源病毒检测项还要进行鼠源病毒的检测，而逆转录病毒的检查则可以直接采用电镜检查其逆转录病毒颗粒以及感染试验进行复制型逆病毒病毒 RCR 污染的检测。另外，由于生产病毒载体的 PG13-CAR 是稳转细胞，还需要评估其传代稳定性，通过插入基因、病毒包装及包装病毒滴度等参数进行细胞的稳定性分析，以限定其包装病毒所用的最高生产用代次。

对于慢病毒载体的包装细胞，如 HEK293、293T 或

293T/17，可通过种属、细胞株 STR 图谱以及 SV40 大 T 抗原等进行鉴别。如对细胞进行了新的基因修饰，则需增加修饰特征的鉴别。但需要注意的一点是，由于 293 类细胞属于遗传不稳定细胞，对细胞进行克隆筛选、无血清驯化、遗传操作、甚至长时间传代时易造成 STR 图谱的变化，如原有等位基因位点的重复数发生变化、在原 STR 图谱数据上可能会有一个或两个 STR 位点出现新的三等位基因峰等，因此，需通过系统分析细胞特性变化过程中的 STR 图谱从而重新建立其特征性图谱。但如果多个位点出现三等位基因峰时，则表明该细胞与其它人源细胞发生了交叉污染，不得用于病毒包装。

（3）种子库的管理：在《中国药典》三部中明确规定了菌种库及细胞库的管理要求，包括细菌或细胞一旦从库中移出，不得再回冻至库内；研究用菌种或细胞与生产用的菌种或细胞要严格分开存放；需建立台账、冻存容器的监测及维护等。

5、如何考虑质粒载体的生产工艺及规模？质粒载体的质量控制包括哪些？

制备质粒载体时，从工作种子批取一支或几支菌种复苏，逐级扩大培养后（培养过程中不应再使用抗生素等具有筛选压力的试剂）进行质粒提取，经纯化及除菌过滤后成为质粒批。质粒的纯化工艺会随着产品研发的进展而不断提高，如在研发早期或早期临床时可能采用质粒提取试剂等进行质粒载体的纯化，但随着临床研究的进展，制备慢病毒载体的质粒或转染 T 细胞的质粒载体则需要考虑工业化的质粒生产方式，包括连续发酵工艺、柱纯化工艺等，并开展质粒生产工艺验证研究，包括对杂质清除能力的验证研究。对于用非病毒系统的质粒转染载体来说，因直接用于 T 细胞转染，还需要考虑质粒的制剂配方工艺，如制剂缓冲液配方既要保持质粒的稳定性，又要减少对 T 细胞的风险，同时还需要尽可能符合产品制剂的要求。

生产质粒菌种的传代次数应有菌种传代稳定性数据的支持，应采用能保证从菌种库工作种子批代次复苏后传代至质粒载体生产所用的细菌代次尽可能少的生产工艺，且在 CAR-T 上市后，用于制备慢病毒载体的质粒的菌种传代次数应不高于工艺验证的最大传代

次数；同时需要考虑每个质粒的生产规模应与慢病毒载体及 CAR-T 细胞预期规模相匹配，为了提高生产的一致性，单批次质粒应有足够的量可以满足制备多批次的慢病毒载体及 CAR-T 细胞。

质粒的质量控制通常需要考虑质粒鉴别、含量、纯度（包括 DNA 形式及杂质）、无菌、内毒素等，对于直接用于转染 T 细胞的质粒载体，还需要考虑质粒的细胞转染效率。其中，质粒鉴别检查时，尽管在菌种库质量控制中进行了质粒的基因序列测定且进行了菌种稳定性的研究，但在质粒质控时仍需进行质粒序列测定或限制性酶切法对质粒进行鉴别，确认质粒结构及序列的正确性。质粒的纯度控制包括两个方面，一方面控制质粒本身的质量，如可采用 OD260/OD280 的比值、电泳法或液相法等，不仅可以控制质粒所占的百分比，还可分析及监测质粒的不同形式，如超螺旋、解螺旋及线性的比例，不同质粒状态比例的控制主要是考虑对慢病毒包装效率以及 T 细胞转染效率的影响，并可作为质粒批间一致性的控制；另一方面，纯度的检测还应包括对工艺杂质的控制，如宿主菌蛋白残留、宿

主菌 DNA 残留以及工艺中添加的其它需要控制的成份。为控制质量检测的有效性，研究者应在产品研发过程中建立质粒参比品，用于质粒鉴别、纯度及细胞转染效率检测的控制。

质粒保存的稳定性研究也是质粒质量控制的一个重要参数，通过分析不同保存时间及不同保存温度下质粒的不同形式比例的变化、对 T 细胞转染效率的影响确定质粒使用的有效期。

6、病毒载体的生产规模要设计多大？是否可以采用细胞培养皿进行病毒载体的培养？关键工艺研究包括哪些？病毒载体制备过程中如何降低牛血清的风险？

病毒载体规模的设计需要根据单次感染 T 细胞所需要的病毒量、质量检测所需要的量、留样量、病毒载体的稳定性以及预期的年度病毒用量等因素综合考虑。在临床试验过程中，一方面因在评估 CAR-T 细胞产品的同时也要评估病毒载体工艺及其稳健性，需要使用不止一个批次的病毒载体制备 CAR-T 细胞，另一方面，由于 T 细胞供体的个体差异大，为减少病毒批次一致性不足造成的影响，又不应使用过多批次的病毒载体，

因此病毒生产规模的设计要同时兼顾这两方面的需要。而对于上市后 CAR-T 细胞的制备，在病毒载体保存稳定性数据的支持下，采用大规模制备的病毒载体更有利于产品的安全性、有效性及一致性。产品早期研究时，研究者可能会采用培养皿进行病毒载体的制备，但对于生产临床用病毒载体来说，这种培养方式引入污染的风险相对较大，因此，制备临床用的病毒载体应采用尽可能封闭的系统，如细胞工厂或生物反应器。

对于γ-逆转录病毒载体，因可建立稳转细胞系，如 PG13 细胞生产 GALV 病毒载体，在生产病毒载体时，从工作细胞库中取出 1 支或多支冻存细胞复苏，合并后接种于适当的培养瓶，逐级扩大培养，收获培养上清即可获得γ-逆转录病毒载体悬液。而制备慢病毒载体时，目前主要是采用三质粒或四质粒共转染的方法，从 WCB 取一支或多支包装细胞，扩增至所需数量后，加入适当比例的辅助质粒载体及穿梭质粒载体共转染细胞，培养一定时间后收获上清，即获得慢病毒载体悬液。

为获得高滴度的病毒，应开展病毒培养工艺的研

究，包括不同阶段细胞培养用液、辅助质粒与穿梭质粒的比例、质粒转染方法及所用试剂（如磷酸钙、PEI或其它转染试剂如 lipofect2000 等）、转染时间及效率、病毒收获时间及收获次数，病毒悬液保存条件等关键工艺参数，并进行验证。因逆转录病毒载体的稳定性相对较差,在 4-8℃保存及反复冻融均会明显降低病毒的感染滴度，所以，在工艺设计时应考虑采用培养及纯化的连续工艺，以减少中间品保存的时间，同时还应考虑增大收获病毒培养液的规模同时降低收获次数的工艺，以提高病毒产量的同时保证病毒的滴度。

目前病毒载体制备中仍多采用含血清工艺，但为了降低牛血清的风险，一方面，在使用前按照药典中新生牛血清的质量要求进行牛血清的检测，在病毒载体的质量控制中进行牛血清白蛋白残留量的检测，另一方面，鼓励开展病毒载体的低血清以及无血清生产工艺的研究，如在病毒包装阶段采用低血清培养或无动物源性培养液替代牛血清的工艺研究。

7、是否要进行病毒载体生产终末细胞的检定？

是的，进行病毒载体生产终末细胞的检定，其目

的在于评价病毒载体的生产工艺是否会引入外源病毒因子或激活内源性病毒因子而增加产品的风险。因目前用于 T 细胞转染的病毒载体主要分泌到培养上清中，包装细胞病变相对较弱，因此，其生产终末细胞即是指病毒液收获后的细胞。一般来说，在生产工艺稳定的情况下，至少要进行一次生产终末细胞的全面检定，检测项目至少包括细胞鉴别、无菌检查、支原体检查及病毒污染检查，其中病毒污染检查中应包括复制型病毒（RCR/RCL）的检测，而细胞种属特定病毒可不再重复检测。但如果生产工艺发生了变化，则需要重新进行生产终末细胞的检测。

8. 如何开展病毒载体中的外源因子污染的检测？

对于转染 T 细胞的病毒载体来说，外源因子污染是影响其安全性的一个重要风险因素，因此，应对每批的病毒载体进行外源因子污染的检测，其检测项目主要包括细菌、真菌污染、支原体污染及外源病毒因子污染，被测样本应不得检出外源因子。

根据最适样本的原则，取病毒载体的收获液进行外源因子污染的检测能最大程度地反映污染的风险，

如进行多次病毒载体收获，则每次收获时均应取收获液检测。外源因子污染的检查方法可见《中国药典》三部的无菌检查法、支原体检查法及外源病毒因子污染检查法的通则。但考虑到病毒载体的不稳定性及下游工艺的连续性，在此阶段也可考虑采用快速检测方法放行而进入下游纯化工艺，但应同时采用药典方法进行检查，如果药典方法检测结果显示有外源因子污染，则使用了该收获液制备的任何批次的病毒载体均不得用于 T 细胞转染。

除药典方法外，同时鼓励研究者开发更敏感、更快速的外源因子检测方法，如高通量测序法，经验证后可考虑作为外源病毒因子污染检查的替代方法。

9、病毒载体是否要纯化？纯化及浓缩工艺应考虑哪些因素？纯化的病毒载体如何保存？

因 CAR-T 细胞产品的有效成份为活细胞，其产品为无菌制剂但不能采用终端灭菌工艺及除菌过滤工艺，在细胞培养、收获及制剂阶段虽然有换液以及离心洗涤过程，但纯化工艺仍显不足，且不能采用有效的病毒清除及灭活工艺，因此，为降低病毒载体对 CAR-T 细

胞产品的安全性风险，应考虑对病毒载体收获液进行纯化、浓缩并制成无菌病毒载体。

因γ-逆转录病毒载体及慢病毒载体病毒颗粒相对较大，属中等大小病毒，且有包膜，在培养、纯化及浓缩过程中对剪切力相对敏感，易破坏对细胞的感染性，因此，在进行纯化及浓缩工艺设计时，不仅要考虑尽可能采用减小这些破坏因素的纯化工艺，如控制流速、减小切向流压力，而且还必须要考虑纯化工艺对杂质的去除效果以及纯化规模放大的能力，如采用柱层析法进行病毒载体的纯化。

为避免反复冻融，纯化后的病毒载体应保存在适宜的制剂配方缓冲液中，按照单次使用量分装后在最适条件下进行保存，病毒载体的最适保存条件应进行验证。

逆转录/慢病毒病毒载体的稳定性是影响该领域发展的一个重要因素，如果逆转录病毒载体可以长期稳定保存，则给病毒载体大规模化生产提供了发展空间，同时也会提高 CAR-T 细胞产品的一致性以及大大降低 CAR-T 细胞产品的成本，提高患者的可及性。病

毒载体的制剂配方缓冲液、病毒载体的保存状态（如冻干）及保存条件均是保持病毒载体稳定的重要因素，因此，在临床试验过程中，鼓励研究者继续开展病毒载体制剂及保存工艺的研究，以提高病毒载体的稳定性。

10、纯化后的病毒载体的质量控制检测需要考虑哪些参数？

纯化后的病毒载体质量控制通常会参照以病毒载体为终产品的基因治疗产品的要求，主要质控项目包括外观、可见异物、CAR 鉴别、pH、纯度、病毒物理滴度和/或转导滴度、无菌检查、复制型病毒（RCR/RCL）、工艺相关杂质（如宿主细胞蛋白及 DNA 残留、质粒 DNA 残留、总 DNA 残留、牛血清白蛋白残留、核酸酶残留等）及细菌内毒素等。针对一个特定的病毒载体，需根据病毒载体及其生产工艺的特点建立特定的质量控制检测项目及要求。

同质粒参比品一样，在病毒载体的纯度、CAR 鉴别、物理及细胞转导滴度的检测中需要建立相应的病毒载体参比品，但是由于病毒载体稳定性及制备规模的限

制可能会制约病毒参比品的研制，特别是慢病毒载体，因此，鼓励研究者在临床试验期间在病毒稳定性数据积累的基础上尽可能开展病毒载体参比品的研究工作以满足产品上市时的需要。

11、采用何种方法进行病毒载体的滴度测定？是否需要规定病毒载体的比活性？

不论是γ-逆转录病毒载体还是慢病毒载体，因其均不具有复制能力，因此，不能通过常规的细胞病变法（如 PFU 或 CCID50 法）进行病毒滴度的测定，而通常采用对细胞转导的能力做为病毒载体的滴度，即将病毒载体转导敏感细胞系（如 293T 细胞、HT-1080 细胞等）或原代细胞（如 PBMC）后，检测细胞 CAR 表达阳性率或 CAR 基因拷贝数，计算其转导滴度（TU/ml）。但由于不同的细胞对病毒载体的敏感性不同，不同的检测参数对病毒载体转导滴度结果也不同，因此，选择何种细胞、检测何种指标进行病毒载体的转导滴度的测定需要进行充分的验证，同时，鼓励研究者在临床试验过程，探索病毒载体转导滴度测定结果与转导 T 细胞所用的病毒量、CAR-T 细胞阳性率以及临床有效

性之间的关系，以建立最适病毒滴度测定方法及病毒载体转导剂量。

除病毒转导滴度外，还可通过检测病毒载体特定抗原或病毒基因拷贝数来检测病毒载体的物理滴度，如慢病毒载体 p24 抗原含量的检测。但由于病毒载体包装过程中可能会形成无转导效力的病毒，而这些无效力的病毒载体不能将 CAR 基因整合到 T 细胞基因组中，因而也不能产生 CAR-T 细胞，因此，为限制无转导效力的病毒载体的水平以监测病毒载体工艺的一致性，建议限定转导滴度与物理滴度的比例，即比活性。

12、采用何种方法进行 RCR/RCL 检测？

复制型病毒(RCR/RCL)是γ-逆转录病毒载体与慢病毒载体的一个安全性质量控制项目，因病毒载体设计的不同，产生复制型病毒的风险也会有不同，如采用四质粒共转体系以及含有末端自我失活(Self Inactivating,SIN)结构的病毒载体，其病毒载体生产过程中产生 RCL 的风险会明显降低，但尽管如此，产生 RCR/RCL 的风险仍不能完全排除，因此仍需要对病毒载体进行 RCR/RCL 的检测，且病毒载体不得检出

RCR/RCL。

复制型病毒的产生与病毒载体特点及载体设计有关，是逆转录病毒载体生产体系中可能存在的风险，不是因外源而引入的风险，因此，取病毒载体收获液或纯化后的病毒载体用于 RCR/RCL 检测均具有一定的合理性，但这两个点检测各有利弊。如以病毒载体收获液作为样本，可以直接地反映病毒载体在包装过程中出现 RCR/RCL 的风险，为达到有效的检出，可能需要取较大的样本量进行检测；如以纯化后的病毒载体为检测样本，因病毒载体在经过纯化及浓缩工艺后，RCR/RCL 同样也会得到浓缩,检测时可能需要取相对小的样本量即可进行有效的控制，也可直接反映出转导的病毒载体中是否含有 RCR/RLC,但也存在纯化工艺可能会对原本含量可能很低的 RCR/RCL 造成破坏从而影响检出的风险。不论选择何种样本，均需要对病毒载体进行充分的复制型病毒的检测，以降低在 CAR-T 阶段产生 RCR/RCL 的风险。

目前 RCR/RCL 的检测方法主要包括针对特定基因（如 VSVG 基因）的 PCR 法或 QPCR 法和敏感细胞感染

试验法，即将待测样本接种于敏感细胞上，进行多次传代，如样本中有复制型病毒，在培养末期的时候通过观察病变、p24 抗原表达、RCR/RCL 特定基因表达或逆转录酶活性等可能反应出病毒复制的情况，如用 C8166 细胞或其他敏感细胞检测慢病毒载体的 RCL。

RCR/RCL 检测方法要求具有较高的灵敏度，建立及验证 RCR/RCL 检测方法时，可以考虑以复制型病毒或复制型病毒载体作为样本验证方法的最低检出水平。对于 γ-逆转录病毒载体 GALV 来说，因 GALV 为生物安全 II 级，检测实验室可以在 P2 生物安全实验室开展 RCR 检测方法的建立及验证以及样本的检测。对于复制型慢病毒（RCL）的检测来说，可以采用 HIV 弱毒株或重组的条件复制型慢病毒载体作为阳性对照病毒。若以 HIV 弱毒株为阳性对照病毒，其感染试验所涉及的培养应在 P3 级生物安全实验室条件下进行；但若采用条件复制型的慢病毒载体作为阳性对照，则可以在生物安全级别至少为 P2 的实验室开展实验。其他非 HIV 骨架的慢病毒载体，可以在 P2 生物安全实验室进行阳性对照病毒培养并开展方法学研究和样本检测。通常

来讲，应对每批制备的病毒载体进行充分的 RCR/RCL 检测，包括高灵敏的 PCR 法及敏感细胞感染试验法，但结合现有慢病毒载体临床试验的安全性数据、P3 实验室做为常规检测的低操作可行性和复制型慢病毒载体制备的困难，在 CAR-T 细胞产品临床试验早期，可考虑用灵敏的 PCR 法进行 RCR/RCL 的控制检测，但在确证性临床阶段以及上市前则必须采用敏感细胞感染试验监测病毒载体中的 RCR/RCL 的潜在风险。

13、如何考虑病毒载体工艺杂质质量控制的要求？

病毒载体工艺杂质残留量的限定标准可以参考 in-vivo 方式的病毒基因治疗制剂的要求，但同时也需要考虑，因用于 T 细胞转导的病毒载体并不直接进入人体，且在细胞转导后，CAR-T 细胞扩增培养的过程中会经过多次培养液的更换以及细胞收获后洗涤过程，这些操作均会不同程度的降低工艺杂质的含量，因此，对于那些工艺杂质残留量质量标准的制定还应结合下游工艺验证的数据综合评估后再确定标准。但是对于牛血清白蛋白残留量来说，因其是一个明显的过敏原，且会吸附在细胞表面不易去除，因此，仍应建立严格

的标准，可考虑以单次转导所用的病毒量为一个剂量，应不高于 50ng/剂。

14、是否要开展病毒载体的稳定性研究以及如何设定稳定性评价参数？

是的，病毒载体的稳定性研究数据是制定病毒载体保存条件及有效期的重要依据，因病毒载体的生产成本较高，在研究早期，可重点开展保存温度及转导条件的病毒载体稳定性研究，保存温度应开展实时稳定性研究，而转导条件的稳定性可根据转导 T 细胞的最长时间设置稳定性研究的时间点，稳定性研究主要考查病毒载体对保存条件敏感的质量参数，如可见异物、转导滴度、无菌及细菌内毒素等，如是冻干保存的病毒载体，还需进行水分的检测。

15、转导载体是否允许外包加工？如何控制外包加工的转导载体的质量？

由于病毒载体制备，特别是临床级的慢病毒载体制备，是一个复杂及专业化程度很高的过程，对生产设施、设备、工艺验证等等都需要高额的投入，因此，国际上一些开展 CAR-T 细胞治疗产品开发的公司会选

择与病毒载体制备机构合作的方式，为其提供病毒载体，这种方式也有可能成为未来我国 CAR-T 细胞产品的生产模式，因此，如果拟采用外包的方式制备病毒载体，那么 CAR-T 细胞产品生产单位应对自己所用的质粒载体及病毒载体进行充分的验证，建立基础的生产及纯化工艺，并制定病毒载体的质量标准后，再选用有 GMP 资质的病毒载体公司进行生产。CAR-T 细胞生产单位既应保证生产病毒载体的公司其质量体系符合 GMP 的要求，又要保证病毒载体生产全过程符合该 CAR-T 细胞产品生产单位所制定的该病毒载体特定的质量要求，包括对原材料、菌种库及细胞库、质粒生产及病毒生产的要求，并与病毒载体公司间建立严格的供应商审计制度、产品质控及年度报告等质量协议要求，以保证可获得质量稳定的病毒载体。同时，CAR-T 细胞生产单位必须根据所制定的病毒载体质量标准，对每批病毒载体的关键质量控制参数进行检验，合格后方能放行使用。

五、建立可提供 T 细胞的供体资质标准：

1、选择 T 细胞供体的基本考虑是什么？

同其他免疫细胞产品一样,CAR-T 细胞产品的生产也是从供体细胞采集开始进入制备流程的，这是免疫细胞治疗产品一个非常典型的特征，也是造成最终细胞产品一致性较差的一个重要原因，因此，需建立准确、合理的供体标准。而且，对于 CAR-T 细胞产品来说，尽管研究者在不断地开展提高其安全性的研究，但到目前为止，其临床使用的风险尚不能充分评估，因此，使用人群仍限制在无有效治疗手段的肿瘤晚期患者，而这种患者因其前期的治疗过程更为复杂，个体状况的差异性更大，因此，更需要建立供体与 CAR-T 细胞产品之间的相关性，提高 CAR-T 细胞制备的成功率及质量可控性。

建立供体标准至少要考虑：（1）对供体身体状况的基本要求，如血常规指标、外周血淋巴细胞数或某种特定表型细胞的数量等;（2）临床适应症：如肿瘤类别及分期、肿瘤负荷、采集初始样本前与现在治疗方案的间隔、血液肿瘤患者外周血中肿瘤细胞表型及数量等;（3）传染性疾病因子的筛查和检测：对传染性疾病因子的检测标准需结合 CAR-T 细胞的临床治疗目的

来建立，如用于治疗 HBV 引起的肝癌的或治疗 HIV 患者的自体 CAR-T 细胞，其供体的 HBV 或 HIV-1/2 的标准则可以其病毒载量值作为限定标准；（4）遗传性疾病及肿瘤史筛查：主要用于异体供体的筛查。

2、细胞供体(者)应进行哪些传染性疾病因子的检测？应采用何种方法检测？

制备 CAR-T 细胞治疗产品所用的采集物为白细胞富集样本，病原体筛查和检测的种类至少应包括 HIV-1/2、HBV(表面抗原及核心抗原)、HCV、梅毒、CMV、EBV 及 HTLV-1/2。因 CMV 抗体阳性率较高，研究者需要建立 CMV 抗体阳性样本是否使用或如何放行的操作细则。在细胞采集前，可取供体外周血样本进行抗体或抗原的检测，检测方法应采用最灵敏的方法，如血源筛查试剂。病原体检测时间与细胞采集时间间隔应尽可能短。

对于异体细胞供体，必须进行上述病原体的筛查及检测，包括使用核酸检测方法进行病原体检测，病原体阴性的才可作为细胞供体。

3、自体细胞供体是否必须要进行传染性疾病因子筛

查和检测？

对于自体细胞供者来说，因其仅限于自体使用，其病原体传播的风险相对较小，且肿瘤患者入院时已经进行了一定程度的病原体检测，因此，对于自体供体的病原体筛查和检测是建议性而非强制性的，其目的是了解供者病原体感染状况，如果供体某种病原体检测为阳性，或未进行筛查，在后期细胞操作时需要考虑细胞培养方法是否会造成病毒或其它外源因子的增殖或传播，从而危及到操作者或对其它供者样本造成交叉感染，并采取相应的防护或隔离操作措施。

4、如使用可建系的细胞制备 CAR-T 细胞，如何评估其供体及细胞的风险？

对细胞供体应进行遗传性疾病及肿瘤基因的筛查和检测，细胞系则需要按照《中国药典》三部生物制品通则《生物制品生产及检定用细胞的制备及检定规程》的要求建立细胞库，并进行全面的质量评价，包括细胞鉴别、外源因子污染（包括非病毒性及病毒性内外源因子）、细胞核型、成瘤性、稳定性、免疫反应性等。

5、在临床试验过程中如何进一步开展供体资质的研究？

对于自体细胞供者来说，因 CAR-T 的治疗效果与安全性与自体患者密切相关，在临床试验过程中应更进一步开展自体患者前期治疗手段及治疗阶段、肿瘤的异质性（如外周血中不同表型的血液肿瘤细胞）、特定肿瘤标记、外周血单核细胞采集时间、细胞中各表型细胞组成的比例或某种特定成份与 CAR-T 细胞扩增的成功率、体外生物学效力、治疗效果及不良反应间的关系，以便获得更精准的数据用以严格限定自体或异体供者的入选条件，使最合适的患者最大获益。

对于异体供者来说，在临床试验中还应更多地开展供体与患者 HLA 表型相合度以及治疗方案与免疫排斥之间的相关性研究。

六、CAR-T 细胞产品的生产、质量控制研究及检测：

1、CAR-T 细胞产品的生产工艺研究应考虑哪些因素？

CAR-T 细胞制备可大致划分为以下几个工艺步骤：外周血细胞采集及单核细胞的分离（或冻存）、T 细胞分选、T 细胞活化、T 细胞转导（或转染）、CAR-T 细胞扩增和收集洗涤及制剂。每一个步骤均应开展工艺研究，包括外周血细胞的采集量、单核细胞分离试剂的

选择及分离方法，PBMC 的冻存条件及冻存时间、T 细胞分选试剂和活化试剂的选择及用量优化、培养液的选择及优化、添加因子及使用浓度的优化、培养方式的选择及优化、细胞转导方法及载体用量的选择和优化、转导/转染条件及转导/转染时间的优化、CAR-T 细胞扩增条件的优化、细胞收获方法及洗涤条件、CAR-T 细胞制剂配方的优化、细胞冻存方法的优化、CAR-T 细胞运输条件及复苏条件的优化等，并进行部分工艺及完整工艺的充分验证，确定最终的工艺参数，如 PBMC 有分离后使用和冻存后再使用两种工艺，验证时则需要对这两种工艺均进行工艺验证。

对于已知病原体阳性的自体 CAR-T 细胞产品工艺或用异体 T 细胞制备 CAR-T 的工艺还要验证 T 细胞培养扩增体系不会造成传染性疾病因子的培养及扩增。另外，与自体 CAR-T 细胞相比，异体 CAR-T 细胞产品因其可用于多个患者，其传染性疾病传播的风险较高，因此，对于异体 CAR-T 细胞产品不鼓励使用新鲜制备的细胞剂型。

因多种因素的限制，自体 CAR-T 细胞治疗产品可

能在应用于患者前未必能够进行全部项目的检定，所以工艺验证尤为重要。但工艺研究及验证必须结合工艺的实际情况设定相应的验证参数，如人工操作、模块式制备系统、全封闭自动制备系统等，可能需要研究以及验证的工艺步骤不同，因此，也需要设置不同的工艺验证参数。

由于 CAR-T 细胞产品工艺研究在不断进展，到目前为止，业界对何种工艺最好并未达成共识，因此，可以在产品研发过程及早期临床试验阶段开展不同程度的工艺验证研究，但在确证性临床试验过程中应完成充分的工艺验证。

工艺验证完成后，应在关键工艺步骤设置关键过程控制参数及标准，以提高 CAR-T 细胞产品的生产一致性。

2、如何定义 CAR-T 细胞的批次及批量？

从单一个体的 PBMC 细胞进入分选开始至制备出可供临床用 CAR-T 细胞为止，经过这一单次工艺过程中所制备的 CAR-T 细胞称为一个批次，此单一批次所制备出来的所有分装的规格为此次生产的批量。如从

自体供体中采集并分离 PBMC 后冻存保存，将冻存的一支或几支 PBMC 复苏，然后经过分选、活化、转导、扩增、收集及制剂过程后获得 3-4 个包装的 CAR-T 细胞，这些细胞即称为一个批次。如果再次从 PBMC 复苏制备 CAR-T 细胞，则为另一个批次。对于自体供体来说，每一个批次的量一般较少，如每批可能有几个包装规格；而对于异体供者来说,CAR-T 细胞的批次可能会有 50~100 个包装规格。

3、CAR-T 细胞产品的质量控制研究及检测至少应包括哪些项目？应如何设置这些质控项目更符合 CAR-T 细胞产品的特点？

CAR-T 细胞治疗产品的质量控制研究及检测项目一般应包括：细胞数量及细胞活率、细胞表型、CAR 阳性率检测、生物学效力检测，无菌检查、支原体、热原/内毒素的检测、CAR-T 细胞基因组中病毒载体拷贝数及整合的检测、RCR/RCL 检测、工艺残留物检测（如具有潜在风险的磁珠残留、细胞因子残留、Retronectin 残留等）及肿瘤细胞残留检测。对于异体 CAR-T 细胞，还应进行组织相容性抗原检测及采用核酸法进行特定

人源病毒的检测。

对于异体供体（非直系亲属或移植配型个体）的 CAR-T 细胞，因可成为货架期产品，批量相对较大，因此，除取收获的细胞悬液为最适检测样本用于支原体的检测外，所有其它的检测项目均可在最终的 CAR-T 细胞产品中检测，所有检测结果均合格后方可放行。

而对于自体 CAR-T 细胞，原则上应尽可能用最终细胞产品进行检测，但考虑到因单次制备的批量有限，即使冻存剂型的 CAR-T 细胞为配合患者的治疗时间，有的可能难以完成所有的检测，因此，需要在用最小的样本量达到最大程度地控制产品质量控制之间进行风险评估，即采用在制备过程中不同的点取样以及 CAR-T 细胞最终制剂取样进行上述的项目检测的策略，取样点的设定需要根据工艺特点及工艺验证的结果确定。如：无菌检查、细菌内毒素则应取最终包装的 CAR-T 细胞产品进行检测；无菌检查也可取 CAR-T 细胞收获前的样本进行快速方法的补充检测。再如 CAR-T 细胞产品的剂量通常是以活的 CAR 阳性的 T 细胞数来标示，在分装前需要根据细胞计数结果、细胞活率、T 细

胞阳性率以及 CAR 阳性率来计算分装量，并需要在分装时将标签贴在存袋上，因此，细胞表型及 CAR 阳性率检测可能需要在细胞收获前进行，而细胞数量及细胞存活率则需要在分装前检测，如为冻存细胞，还需要通过冻存工艺验证研究证明冻存后的 CAR-T 细胞产品仍可以符合患者剂量的要求，并结合冻存工艺验证的结果制定终产品相应项目的质量标准。其它检测项，如 CAR-T 细胞基因组病毒载体拷贝数及整合位点的检测可在收获前取 CAR-T 细胞悬液进行检测；RCR/RCL 和工艺残留物检测则可在冻存前取样检测；而生物学效力在分装前取样还是取最终包装的细胞悬液进行检测，可能需要根据方法学验证结果确定，如果方法学验证结果显示，分装前取样检测与最终包装取样检测的结果具有一致性，可将此项检测前置。

针对一个特定的 CAR-T 细胞治疗产品，应根据 CAR-T 的设计、基因修饰方法、所用的关键原材料、生产工艺及工艺验证数据、保存条件及预期用途等具体特点综合考虑，设置个性化的质量控制要求，包括过程控制及最终产品放行检测的项目及标准，并在质量

标准中明确特定项目的取样点及取样要求。

4、选择或建立质量控制检测方法时应考虑哪些因素？如何制定其每一检测项目的质量标准？

（1）细胞数量及细胞存活率：对于 CAR-T 细胞来说，患者输入的细胞数及活率不仅与临床有效性及临床副反应密切相关，而且是设置 CAR-T 细胞产品包装规格及临床剂量的重要参数，因此，需要建立准确的细胞计数及活率检测方法，并建立产品的放行标准。

目前有多种方法用于 CAR-T 细胞治疗产品的细胞计数，包括传统血球计数板计数法及细胞自动计数仪计数法，其中自动计数仪又包括不同的计数原理，如利用台盼蓝染色计数、荧光染色法计数及非染色法计数等。与人工计数法相比，自动计数仪节省人工，且明显减少不同操作者之间的误差，对于产品质控检测来说，自动计数仪检测结果的可重复性更好。不同自动计数仪因每种方法计数原理不同，同一样本在不同的计数仪上的结果会有明显的差异，这些差异可能来自于染料的特性及其标记特性、区分细胞不同活力状态（如活细胞、死亡、凋亡细胞）的能力及计数软件的设

计等，因此，应在计数方法验证的基础上建立细胞数及活率标准，且细胞数应设立上限及下限标准，细胞使用前活率应不低于 70%,但同时鼓励研究者开发符合临床使用要求的、可提高或维持冻存细胞复苏后高活率的细胞冻存液。

（2）鉴别、均一性及纯度检测：因 CAR-T 细胞为以 T 细胞为主的异质性细胞群，因此应开展目的 T 细胞和非 T 细胞表型及含量质量控制研究，并建立相应的质量标准。鉴别及纯度检测目前主要采用流式细胞法，对不同的细胞表面标志物进行检测。所采用的细胞表面标记至少要包括两类，一类表面标记应用于检测 CAR-T 细胞中的非目标细胞成份并限定其比例，包括 NK 细胞、单核细胞等。另一类表面标记用于鉴别 CAR-T 细胞中目标 T 细胞的比例及不同 T 细胞表型的组成，在前期研究中可能主要以 CD3 表型为主，但由于 CAR-T 细胞在体内的持久性及有效性机制尚未完全阐明，因此，在临床试验过程中研究者需要进一步分析不同 T 细胞表型的比例与临床有效性之间的相关性，如包括 CD4 与 CD8 的比例、中央记忆 T 细胞、效应记

忆 T 细胞、效应 T 细胞以及耗竭 T 细胞等对体内效力及持久性的影响，为最终建立 T 细胞表型标准提供数据，同时也为采用表型作为生物学效力替代检测提供依据。

除细胞表型鉴别外，还应关注细胞培养过程中出现交叉污染的风险，因此，在制备过程中不仅要通过标识系统确保不同个体细胞的可溯源性，还应通过工艺设计及有效的隔离措施防止出现交叉污染的风险，同时建议留取采集细胞样本及 CAR-T 细胞产品，如果出现意外情况时可用于个体来源检测的原因分析。

（3）CAR 转导/或转染阳性率检测：对于 CAR-T 细胞来说，发挥肿瘤杀伤作用的有效成份是 CAR 阳性的 T 细胞，CAR-T 细胞产品的包装规格及临床使用剂量是以 CAR-T 阳性细胞数标示的，因此，必须检测 CAR 转染阳性率。应采用流式细胞法检测 CAR 转染阳性率，目前有针对 CAR 不同结构区域的检测方法，包括针对 CAR 抗原结合位点的，如 CD19 抗原或抗 ScFv 抗体，或针对轻链或铰链区的抗 Fab 或 Protein L，与其它两种方法相比，针对抗原结合部位的 CAR 阳性率检测方

法具有更好的专属性。因现有数据显示不同程度的CAR 阳性率（20%~80%）在临床上均表现出了一定的有效性，建立统一的 CAR 阳性率的最低标准尚需更多的数据支持，但作为 CAR-T 细胞有效成份质量控制的指标，研发者需在申请临床试验前建立特定产品的 CAR 阳性率最低标准，在临床过程中进一步开展生产工艺及检测方法的研究及验证，结合早期的临床数据，在确证性临床前建立更合理的CAR 阳性率标准。

（4）CAR-T 细胞的生物学效力检测：同其他生物制品相似,CAR-T 细胞的生物学效力检测方法最好可以模拟产品的作用机制（MOA），可以是体外法也可以是体内法，并且鼓励研究者开发定量的效力检测方法。目前 CAR-T 的效力检测有多种方法，如将 CAR-T 细胞与肿瘤靶细胞体外共同孵育后通过检测肿瘤杀伤率或增殖抑制率、IFN-γ的表达量、CAR-T 细胞上某种与杀伤相关的细胞表型的变化等体外效力检测方法，或采用动物活体成像技术，检测标记的靶细胞肿瘤模型在体内的减少或动物生存期延长等体内效力检测方法。在研发早期，研究者可能会采用体外细胞因子表达的

替代指标进行效力检测。但不论采用何种方法，在早期的方法学验证时，至少要分析方法的专属性，证明其生物学效力与 CAR-T 细胞具有一定的量效关系，并考虑采用体内法验证体外法的有效性。随着研究及临床试验的不断深入，需要逐步建立起体外效力的有效评价方法及质量标准并开展效力参比品的研究。

（5）无菌检查：在可行的情况下，首选药典方法用于无菌检查，但考虑到 CAR-T 细胞产品的特殊性，也鼓励研究者开发快速的无菌检查法作为中间过程监测或放行检测方法，且在临床试验过程中须按照中国药典要求以及其它国际要求对快速无菌法进行充分验证，且在早期使用时，快速方法应与药典方法平行进行，在获得充分的比对数据后，结合无菌生产全过程的风险评估设计放行策略，才有可能替代药典方法。

（6）支原体检查：应在细胞培养物合并后洗涤前取细胞悬液进行支原体检查，同无菌检查相同，在可行的情况下，首选药典方法，但由于药典支原体检查时间较长，因此也鼓励研究者开发快速的支原体检查法用于中间过程监测或放行检测，但在临床试验过程

中必须对快速方法进行充分的验证，验证方法可参考中国药典的相关规定及国际要求，证明所用快速方法的最低检出限至少不能低于药典方法。即使选用商品化的检测试剂，在使用前也需确认其最低检出限不低药典方法。在早期使用时，应与药典方法平行进行，在获得充分的比对数据后才有可能替代药典方法。

（7）细菌内毒素的检测：细菌内毒素检测应作为 CAR-T 细胞的放行标准，可采用 LAL 法或其他新的敏感稳定的方法，但新方法需要与家兔法进行比较验证。

（8）CAR-T 细胞基因组中病毒载体拷贝数的检测：载体基因整合在 T 细胞基因组中，一方面显示有 T 细胞进行了 CAR 基因修饰，一方面又是一个安全性指标，可能会因整合而带来原癌基因的激活或抑癌基因的失活等造成二次肿瘤的风险，尽管现在载体的设计已经大大降低了整合的风险，但这种风险仍未完全消除，因此需要对整合到细胞基因组中的病毒拷贝数进行检测，在收获时取 CAR-T 细胞悬液进行检测，目前认为不高于 5 拷贝/细胞是可以接受的。但需注意的是，这一检测项目反映的是群体的平均值，不是每个细胞的

实际情况，因此，在临床试验过程中还需要继续密切关注因 CAR 基因整合带来的潜在风险。

（9）CAR-T 细胞基因组中载体整合位点的检测：此项检测主要是评价载体在 T 细胞中不会产生热点整合而造成二次肿瘤的风险，如在肿瘤基因或抑癌基因发生整合，但由于此项研究与载体设计等相关，因此，可作为产品质量控制研究的内容，可暂时不做为过程控制或产品放行的标准。在临床试验期间进行多个体数据的分析，获得载体整合的特点并进行风险评估后，再确定是否有必要作为每批产品的质量检测项目。

（10）RCR/RCL 检测：因该项检测在病毒载体的阶段做了充分的检测，在 CAR-T 细胞质控时可考虑主要采用 PCR 法或其它快速法检测放行，但在早期研究时，建议积累足够的数据来支持这种质控策略。

（11）工艺残留物检测：应建立细胞治疗产品在生产过程中添加的肽、蛋白及试剂残留量的检测方法，如细胞因子、生长因子、抗体、磁珠、血清的残留量检测以及细胞碎片等的检测。根据工艺验证的结果以及添加成份的风险，确定是否作为质量检验项目及

CAR-T 细胞产品放行标准。

（12）CAR-T 细胞中肿瘤细胞残留的检测：对于 CAR-T 来说，在临床试验过程中还应开展 CAR-T 细胞产品中肿瘤细胞残留特别是被转导的肿瘤细胞的检测方法研究，建立敏感的检测方法并限定肿瘤细胞的残留水平。

（13）人源病毒因子检测：主要适用于异体 CAR-T 细胞，如工艺验证时证明培养过程不会造成传染性疾病因子的扩增，可不作为产品放行要求。

5、CAR-T 细胞产品如何留样更为合理？为便于质量检测及留样，是否可以将需在最终包装中检测的项目分装在非最终包装容器中？

对于异体 CAR-T 细胞产品来说，因其具有货架期产品的特性，其批量可以满足质量检测的要求，因此，留样要求与其他生物制品的要求相同。

对于自体 CAR-T 细胞产品来说，其单批次数量有限，因此可根据前述检测项目设置的考虑，有些项目可采用过程样品替代最终细胞产品留样。但需要在最终包装中检测的项目，因为包装材料同样会影响产品

的质量，除非能证明非最终包装容器与最终包装容器对 CAR-T 细胞的影响完全一致，否则不能替代。

6、是否要开展 CAR-T 细胞稳定性研究？

是的，同其他生物制品一样，CAR-T 细胞产品的稳定性研究是其产品效期、运输条件规定的依据，需要开展稳定性研究，包括保存条件稳定性研究及运输稳条件的稳定性研究。

但因 CAR-T 细胞的批量有限，即使是异体 CAR-T 细胞，其最终包装规格的批量也不能满足现有生物制品稳定性研究指导原则的要求，包括长期稳定性研究，而且对于冻存条件下保存细胞来说，已有科学数据并不支持加速稳定性及强制条件稳定性的研究，因此，尚需另行建立 CAR-T 细胞产品稳定性研究的要求。

七、CAR-T 细胞的非临床研究

本部分主要基于药品审评中心《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》非临床研究部分和《当前对 CAR-T 类产品非临床研究与评价的一些考虑》的一般原则，参考国外已上市产品相关信息，对 CAR-T 类产品非临床研究实施过程中的具体技术问题进行讨论。

作为一种可特异性识别并杀伤肿瘤细胞的人源 T 淋巴细胞产品，现有的非临床研究方法及标准在 CAR-T 细胞产品的评价上存在一定的局限性，需要进行多种新的非临床研究评价策略和方法的探索。CAR-T 细胞产品的非临床研究可能包括如下研究内容：1）体外药效学研究（见六.4.（4）质量研究部分）；2）动物体内药效学研究；3）药代动力学研究，关注目标细胞在体内增殖、分布和存续时间；4）非临床安全性研究，主要包括一般毒性研究（以常规毒理学检测终点为主要观察指标的单次给药和/或多次给药毒性研究）、以神经系统为主的安全药理研究、局部耐受性和体外溶血研究等制剂安全性研究以及免疫毒性研究等。受 CAR-T 细胞免疫学特性和相关动物模型可获得性的限制，参考国内外关于 CAR-T 细胞产品研发的实例和监管文件，如已有临床数据经过评估后可保证临床受试者安全性，CAR-T 产品的非临床研究可能获得部分免除。因此，进行哪些非临床研究需要根据每个品种的具体研发程度决定。

1、非临床研究的一般原则

（1）CAR-T 细胞产品非临床研究的受试物来源包括哪些？

用于非临床研究的 CAR-T 细胞产品一般不必要使用患者的血液进行制备。研究使用的细胞样本可采用健康志愿者捐赠的血液制备。当无法使用临床拟用产品时，采用动物来源替代产品进行一些概念验证性研究（Proof-of-Concept）也具有重要意义。

（2）目前常用的 CAR-T 细胞产品的非临床研究动物模型有哪些？

CAR-T 细胞作为人源细胞产品，给予免疫功能正常的动物时会发生免疫应答，导致人源细胞被清除或者出现免疫排斥反应，从而无法获得对临床有充分预测意义的有效性和安全性信息。因此，需要根据研究目的选择适当的实验动物种属。目前，已用于 CAR-T 产品研究和正处于探索阶段的动物模型有如下几种：

1）同源小鼠模型（Syngeneic Mouse）

同源小鼠模型具有完整的免疫系统，可以负荷鼠源肿瘤。鼠源 CAR-T 细胞可以靶向性地与其体内鼠肿瘤相关抗原（Tumor Associated Antigen，TAA）结合，

其组织也可能表达低水平的靶抗原，因此可以更好的用于检测靶向和脱靶毒性。但是仅限用于研究鼠源细胞制备的 CAR-T 产品。

2）转基因小鼠（Transgenic Mouse）

转基因小鼠为免疫系统正常鼠，表达人 TAA。在研究针对不同 TAA 的 CAR-T 的同时可以保留宿主免疫系统，但研究对象细胞需要为鼠源细胞。该模型适合用于 CAR-T 细胞的概念验证性研究，但是无法提供人源 CAR-T 细胞的药效和安全性的直接证据。

3）移植瘤小鼠模型（Human Xenograft Mouse）

在免疫缺陷小鼠中移植人源肿瘤，可用来研究人源 CAR-T 细胞对人源肿瘤的作用，是一种更加直接的概念验证性研究，也可以在研发早期阶段用于测试不同的设计类型的 CAR（例如，引入不同的信号分子或者细胞因子）的药效研究。

4）免疫系统重建人源化小鼠（HIS 小鼠，Humanized Immune System mice, HISmice）

该模型通过向免疫缺陷鼠移植人免疫细胞制备得来。通常是在对免疫缺陷鼠进行 CAR-T 细胞治疗前移

植人 CD34+造血干细胞/祖细胞（Human CD34+ Hematopoietic Stem / Progenitor Cells, CD34+ HSPCs）。HSPCs 可以再生少量髓系和部分淋巴系细胞。向免疫缺陷鼠移植人的骨髓、肝脏和胸腺的人源化 BLT（fetal bone marrow，liver， thymus）小鼠模型，其构建更加复杂，是目前最接近人免疫系统的动物模型，曾被用于治疗 HIV 的 CAR-T 细胞的研究，然而，该模型具有髓系细胞发育不全和 T 细胞欠缺的缺点，且目前很难实现大批量生产和标准化。

5）灵长类模型（Primate）

猴免疫系统和生理学功能与人接近，理论上可交叉识别人和猴特异性抗原的 CAR-T 产品，可以模拟细胞因子风暴（Cytokine Release Syndrome，CRS）和神经毒性等临床上发现的毒性反应。但是在猴体内移植人源肿瘤较为困难，当猴 TAA 无法被 CAR 识别时，CAR-T 细胞无法活化，在体内存续时间短；同时，人源细胞在猴体内可能会被免疫排斥，无法充分评价其药效或者无法充分评价其药效或者毒性反应。

上述动物模型各有优缺点，采用不同的模型进行

不同目的和不同类型的非临床研究，可以获得更多的有效性和安全性信息。

2、CAR-T 细胞产品的药效学研究

（1）如何选择药效学评价研究的动物模型？

目前常用移植瘤小鼠模型研究 CAR-T 细胞对肿瘤的抑制作用。同源小鼠模型和转基因小鼠模型具有完整的免疫系统，在已建立与人源肿瘤相匹配的鼠源肿瘤模型的基础上，可在一定程度上反映宿主对 CAR-T 细胞的免疫反应。这两种模型适合开展概念验证性研究，且受试物需要是鼠源 CAR-T 产品。对于治疗淋巴细胞白血病或淋巴瘤的 CAR-T 细胞产品，可使用人源细胞，如 Raji、Daudi、Nalm-6、Jeko-1 等细胞株，或者使用通过基因工程导入特异靶标的特殊稳转细胞株，如 CD19-K562，CD20-K562 等在免疫缺陷啮齿类动物建立移植淋巴瘤模型。鼠源 CAR-T 细胞产品也可使用鼠源细胞如 A20 等建立鼠源模型来评价。通过不同给药途径给予动物肿瘤细胞可形成不同的肿瘤模型，如，尾静脉注射可形成系统的（全身性）的淋巴瘤模型，皮下注射或者腹腔注射可形成局部的淋巴瘤模型。有一

些研究在 HIS 小鼠中移植人血液系统肿瘤，对 CAR-T 细胞的药效及毒性进行评价。

（2）如何选择药效学检测方法和评价指标？

生物发光成像（Bioluminescent Imaging，BLI）技术是最直观且常用的 CAR-T 细胞药效研究方法，该方法检测表达荧光素酶的肿瘤细胞，并以荧光强度表示肿瘤的荷载量，是目前评价 CAR-T 细胞产品体内药效作用的主要技术之一。BLI 是一种微创的成像方式，广泛应用于分子和细胞体内动态检测领域，例如基因表达、蛋白质相互作用、细胞的增殖、迁移、分化以及细胞在动物体内的分布等。采用 BLI 方法可以长时间检测体内研究中癌细胞的迁移和扩增，也可用于评价细胞治疗产品毒性相关的反应。BLI 所使用的荧光素酶具有高灵敏度和低背景荧光的特性，也被广泛应用于非侵入性疾病的监测中。

其它常用检测方法包括：1）流式细胞术检测动物体内肿瘤细胞的数量；2）流式细胞术、ELISA、MSD 等免疫学方法检测血清中与肿瘤相关的细胞因子的变化，从而间接反映药效学结果；3）常规药理学或病理学方

法检测肿瘤相关参数（如瘤体积、瘤重、动物体内肿瘤细胞的定植部位）和动物中位存活期等。动物中位生存期（(Median Survival Time）可反映 CAR-T 细胞的总体活性，但无法准确反映 CAR-T 的靶向活性。进行 CAR-T 细胞产品药效研究时，推荐采用不同方法来体现其药效，例如：对于表达 CD19+的淋巴瘤模型，可使用流式细胞计数法检测血液、脾脏或淋巴结中 CD19+细胞的表达量指示肿瘤荷载程度，然而流式细胞计数法不能直观地体现肿瘤发生后期其它各个脏器的累及情况，因此，最好也同时采用活体成像或者组织学方法进行研究。

（3）药效学研究如何进行试验设计？

CAR-T 细胞药效学研究不应局限于常规药物药效学研究的设计方案，而应根据细胞的来源、产量等特点进行科学合理的试验设计。例如，用于非临床研究的 CAR-T 细胞通常来源于健康志愿者的捐赠，而源于同一捐赠者的一次捐赠很难制备出同时满足药效学和安全性评价研究的受试物的需求量。此外，使用从单一捐赠者中获得的 T 细胞生产的 CAR-T 细胞是否能够

充分代表该产品的药效学结果也需审慎考虑。如果受试物来自不同的捐赠者或者不同的采血时间，每次获得的受试物的细胞特性等也可能存在某些未知的差异。CAR-T 细胞药效学研究要包含不同的剂量水平以体现量效关系。因未转染 CAR-T 细胞也可能存在非特异性的肿瘤细胞杀伤作用，故除了溶媒对照外，需设置 T 细胞对照组（未转导 CAR 的 T 细胞、模拟转导的 T 细胞或者半抗原特异性 CAR-T 细胞）。作为对照的 T 细胞应尽量与研究用 CAR-T 细胞是同一来源且使用统一的生产流程和质量控制标准。此外，建议设置不接种肿瘤的溶媒对照组以便于结果分析。条件允许时，体内药效试验建议使用来自不同捐赠者的细胞生产的 CAR-T 细胞进行动物药效学研究，以评估 CAR-T 细胞治疗效果的稳定性。研究中可增加或者设置卫星组用于细胞药代动力学（分布、迁移、归巢及其存续和消亡特性）、细胞因子的检测以及其它一些毒性指标的监测。

3、CAR-T 细胞产品的药代动力学（药代）研究

当前肿瘤细胞专属的靶抗原较少，而 CAR-T 细胞产品又具有较强靶向细胞杀伤活性。CAR-T 细胞如果与

人体内的非肿瘤细胞结合，可引起严重的脱靶副反应，甚至导致死亡。另一方面，CAR-T 细胞的体内效力又依赖于细胞的有效增殖及免疫记忆的形成。因此，在非临床研究中阐明 CAR-T 细胞的体内过程对其有效性和安全性的研究至关重要。

（1）药代研究动物模型如何选择？

因人源细胞在动物体内会导致免疫排斥反应，人源 CAR-T 细胞最好使用免疫缺陷动物进行研究。一般而言，在肿瘤细胞存在的情况下 CAR-T 细胞会大量增殖并发挥生物学作用，因此目前 CAR-T 细胞最常用的药代研究模型为移植瘤模型。在条件允许的情况下也可增加非荷瘤模型的分布研究，以便对两者间组织分布差异性进行比较。

（2）CAR-T 细胞的药代（生物分布）检测技术如何选择？

CAR-T 细胞的药代研究主要关注目标细胞在体内增殖水平、分布情况和存续时间，可选择的检测技术包括成像技术、流式细胞术、免疫组化技术、定量 PCR 技术等，不同的方法适用于不同的检测样本和检测目

的。成像法可以直观地检测 CAR-T 细胞的体内分布，活体成像的细胞标记可通过多种方法实现，如对细胞进行放射性同位素标记、遗传修饰（如，表达绿色荧光蛋白或荧光素酶）标记，纳米粒子标记（如，铁-葡聚糖纳米粒子）等；流式细胞术可以检测动物血液、骨髓和脾脏中的 CAR-T 细胞；免疫组化的方法可以检测脾脏或其它脏器中 CD3+细胞或 CAR+细胞的表达，以提示人 T 细胞在动物脏器中的分布和累积；定量 PCR 方法可检测所有类型样本中代表人源 CAR-T 细胞的 DNA 或者 RNA 水平，PCR 方法推荐以 CAR 而不是 T 细胞作为特异性检测目标。目前，一些新的技术方法，如，原位杂交等，也开发用于检测 CAR-T 细胞的组织分布。使用上述方法对 CAR-T 细胞进行标记后，是否对细胞的质量属性和生物学特性产生影响，以及是否对细胞的分布情况及其研究结果产生影响也值得关注。标记细胞的生产工艺、质量控制、生物学活性鉴定过程应与非标记细胞一致，并应对其检验结果进行对比，证明是否在差异以及差异的程度，同时评价对细胞属性可能的影响。总之，在非临床研究中，最好用一种或多种

适宜的细胞追踪方法评价细胞产品的分布、迁移、归巢及其存续和消亡特性，并阐述方法的科学性。

4、CAR-T 细胞产品的非临床安全性研究

已获得的临床研究结果显示,CAR-T 细胞产品的安全性风险主要包括：CRS、可逆的神经毒性、B 细胞减少和靶向与脱靶（On-target, Off-tumor）毒性效应等。因此,非临床安全性的主要关注点为如何评价 CRS，神经毒性、靶向和脱靶毒性等。另外，产品制备过程中细胞在体外经过了复杂的转基因修饰，因此 CAR-T 细胞的成瘤性/致瘤性问题也是考虑重点之一。在非临床动物研究中，国内外就上述关注点可进行何种程度的预测尚无统一标准。同时，动物毒理学研究也存在着动物模型、种属特异性等具有挑战性的难题。

（1）CAR-T 细胞的非临床安全性研究是否需要在 GLP 条件下进行？

与其它治疗性药物产品一致,CAR-T 细胞治疗产品的非临床安全性评价研究也应遵从《药物非临床研究质量管理规范》(GLP)。对于伴随在药效学研究中的某些特殊指标的检测也可以在非 GLP 条件下开展，但应

保证试验结果的可靠性、完整性及对产品总体安全性评价的影响。

（2）CAR-T 细胞的非临床安全性研究中受试物分析如何进行？

鉴于 CAR-T 产品制备过程的特殊性，委托方应提供受试物完整的质量分析数据报告，并应提供覆盖所有给药浓度以及模拟所有运输过程、处理操作、直至动物给药前过程的受试物稳定性研究数据。受试物在到达研究机构后，如果在给药前需要经过复苏、重悬等处理操作，研究机构至少要对细胞形态、活细胞总数、细胞活率、颜色、除细胞之外的其它外源性异物等进行观察或检测。如果受试物到达研究机构后可以不经处理直接给药（在稳定性允许的时间范围内），则上述检测可以由委托方进行。

（3）如何选择安全性研究的动物模型？

为提高非临床安全性研究的预测准确性，受试物在动物体内过程和/或所处环境应最大程度上模拟人体中的过程和/或环境。同源小鼠模型和表达人 TAA 的转基因小鼠是免疫系统正常鼠，具有完整的免疫系统，

在与人高度同源的小鼠肿瘤抗原或转入的人肿瘤相关抗原的存在下，较适于评价产品的靶向与脱靶作用以及产品对宿主免疫系统的影响。但其局限性在于受试的 CAR-T 细胞应为鼠源细胞。此外，鼠的生物学特性和免疫系统有别于人，不能最大程度的反映产品的 CRS 等风险，且鼠源 CAR-T 细胞在此模型小鼠易发生活化诱导的细胞死亡，存活时间短。

移植瘤小鼠模型在免疫缺陷小鼠中移植人源肿瘤，可以作为疾病动物模型对毒性指标进行观察。其缺点是没有宿主免疫系统，不能完全模拟人体中出现的 CRS 带来的级联反应，无法检测脱靶作用。非荷瘤的免疫缺陷鼠由于缺乏免疫细胞，不会产生免疫排斥反应，可使 CAR-T 细胞在其体内存活较长时间，更适合对 CAR-T 细胞制剂的非靶点安全性风险以及成瘤性/致瘤性进行研究。

HIS 小鼠模型可以在动物体内较好地模拟人免疫系统，在评价 CAR-T 细胞安全性方面颇具前景。但该模型尚处于初期研究阶段，模型的统一和标准化尚存在难点。比如，CD34+ HSPCs 细胞的来源包括多种途

径，如成人骨髓、外周血、脐带血和胎儿肝脏，而不同来源细胞产生的动物模型可能对 CAR-T 细胞评价的结果产生影响；由于安全性研究需要的动物数较多，往往同一实验需要使用多个供体来源的 CD34+ HSPCs 细胞，重建后的小鼠个体嵌合程度也可能不同，上述因素都可导致实验系统个体差异程度增加；另外，人 CD34+ HSPCs 细胞在小鼠体内分化的骨髓和淋巴细胞与在人体内分化的同类细胞比较存在很大区别，由其建立的人免疫系统还很不完善，随时间推移，其自发病的发生率也比免疫缺陷小鼠更高。总之，目前人源化小鼠模型的应用仍以探索性为主，尚不能全面应用到非临床研究中。

猴免疫系统和生理功能与人接近，但多数情况下因为免疫原性的问题，无法在猴体内对人源 CAR-T 进行长期毒性的研究。目前使用猴开展 CAR-T 研究应用的例子很少。为降低免疫排斥，可同时给予动物免疫抑制剂，但可对 CAR-T 的安全性研究结果产生干扰。

（4）常规毒理学试验设计的考虑要点？

一般可使用免疫缺陷动物或者荷瘤鼠模型单独进

行较全面的毒理学研究，也可在药效学研究的同时，设计卫星组进行毒性指标的检测（包括常规毒理学指标，如临床症状、体重、摄食量、血液学、血清生化、病理学检查、细胞因子检测等）。因免疫缺陷动物或者荷瘤鼠模型不是毒理学研究常规使用动物，在研究过程中应密切关注各项背景数据以及荷瘤可能带来的病理、生理指标变化。

剂量组别和给药方案：低剂量应不低于临床等效剂量。因为不同 CAR-T 细胞转染率不一致，静脉给药时高剂量应以输入动物体内的总细胞数不引起动物输液反应（总细胞数不能过大）和肺栓塞为标准进行设计。应至少包含两个或两个以上剂量，给药应等于或大于临床给药次数。毒性研究设计包括至少两个剂量组，不同的剂量可以是来源于同一捐赠者的不同剂量的细胞，也可以是分别来源于不同受试者的同一剂量（较高剂量）的细胞。与药效学研究相同，除了设置溶媒对照组，也可以设置 T 细胞对照组方便结果分析。如使用荷瘤鼠模型进行毒性研究，可根据研究机构的背景数据考虑设置非荷瘤对照组。

给药次数：CAR-T 细胞产品毒性研究不能遵循常规的设计思路。可以在单次或多次给药后，在不同的检测时间点进行全面的毒性指标的检测。如果 CAR-T 细胞产品在临床上为单次给药，动物试验时可在不产生免疫原性或者免疫耐受的时间点内进行第二次甚至更多次的给药，然而是否可以进行多次给药，以及给药次数的确定需根据不同 CAR-T 细胞产品的作用特点充分论证后决定。

试验周期和检测时间：在 CAR-T 的安全性研究中，可能不适合使用“给药结束”和“恢复期结束”等毒理学常规的检测时间点的概念。如在采用荷瘤鼠的毒性研究中，第一次剖检时间（一般意义上的“给药结束”时间点）可以选择未经治疗荷瘤鼠的生存期限（2-3 周）、临床出现 CRS 等严重毒性反应的时间或者 CAR-T 细胞发挥最强生物学活性作用的时间点，检测受试物潜在的短期毒性反应和靶器官。以药代研究所显示的细胞存续时间或者荷瘤动物在受试物作用后的最长存活时间，作为第二次剖检时间点（一般意义上的“恢复期结束”时间点），考察 CAR-T 细胞长期、延迟毒性和

致瘤性风险。

检测指标：因为免疫缺陷鼠的机体状态可能较差，荷瘤鼠模型处于严重疾病状态，各种检测样本（例如血液量）的量通常不能满足等常规检测指标的需要，可以减少一些不必要的指标或者设计更多的动物数来满足对样本量的需求。

（5）CAR-T 细胞的非临床安全性研究中是否需要进行伴随毒代动力学研究？

CAR-T 细胞产品的非临床安全性研究通常使用免疫缺陷小动物模型，进行伴随毒代动力学研究时需要设置卫星组动物，对动物数目的需求较大。单一捐赠者来源的或者单次制备的 CAR-T 细胞产品的量往往不能满足伴随毒代研究的需求。同时，有些 CAR-T 产品毒性研究可能伴随药效学研究开展。因此，认为在个体化的 CAR-T 产品研发中，不强制性要求一定要在毒性研究的同时伴随进行毒代研究，可以将药代和毒代研究结合进行，有时单独的药代研究能很好反应细胞体内过程的情况下，可以兼用于毒代研究。毒（药）代研究可以在毒性或药效研究同时进行，采用同一批细

胞产品，也可以采用不同批次的细胞产品分开进行。

（6）免疫毒性评价研究如何进行？

已有的临床研究结果和 CAR-T 治疗的原理显示 CAR-T 细胞产品必然具有免疫毒性，目前研究结果也显示免疫毒性，如 CRS 等，与细胞治疗的效果显著相关。然而，因非临床研究中尚无可以直接预测人 CAR-T 细胞的临床免疫毒性风险的理想的动物模型，因此需要对不同动物模型中获得的免疫毒性检测结果进行客观的分析，以评价其预测能力。CAR-T 细胞在非临床免疫毒性检测指标大致包括：采用流式细胞方法、Luminex、MSD 电化学发光检测等方法检测血清细胞因子水平（如 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、INF-γ、TNF-α 等），以期待反映 CAR-T 细胞的 CRS 风险；根据使用动物模型的不同，检测动物外周血中淋巴细胞计数及表型分析（如 CD3+、CD4+、CD8+等）；异种细胞移植物抗宿主反应（Graft-versus-Host Reaction，GvHR）的观察和与临床研究可能相关性的科学评价；免疫器官检查（重量、大体和组织病理检查）。免疫毒性的检测时间点需要根据 CAR-T 作用机制和不同的动物模型以及预试验

结果进行合理的设计。

（7）神经毒性如何考察？

可以在适当模型上进行神经毒性考察。常规的安全药理学功能观察试验组合（Functional Observation Battery，FOB）研究设计（给药次数，给药周期，检测频率等）不一定适合 CAR-T 细胞的作用特点，根据采用动物种属或模型的不同，可以设计多次给药或者延长观察期以考察神经毒性。此外，应尽可能与其它毒性研究相结合，重点观察神经毒性。CAR-T 细胞治疗产生的神经毒性可能与 CRS 具有相关性，认为是 CRS 损伤血脑屏障，血管内皮受损，细胞因子进入脑内导致的。因此，可以考虑在临床研究中出现 CRS 的时间点进行一次 FOB 的观察。另外，对于在不能很好模拟 CRS 的动物模型中进行的神经毒性考察的意义有待审慎考虑。

（8）致瘤性研究如何进行？

作为一种终末分化的体细胞治疗产品，理论上 CAR-T 细胞成瘤性/致瘤性风险较低。体外评价方法软琼脂克隆试验可通常表现为阴性结果。在基因组插入

位点分析中，因插入是随机的，每例患者的插入位点可能不尽相同；即使插入位点为可能致瘤的位点，随着 CAR-T 细胞死亡或体内对 CAR-T 细胞的免疫应答，也无法确定其致瘤性。但对于导入了外源基因的 CAR-T 细胞产品，需通过病毒载体插入人基因组的插入位点分析、体外细胞永生化增殖、体内研究中异常/异位增生性病变（如增生、肿瘤）等研究初步评估其致瘤性风险。体内致瘤性研究可与较长周期的动物毒理学研究伴随开展，可以在临床试验期间完成。

结束语

由于 CAR-T 领域正处于飞速发展阶段，不断有新的思路及新的技术进入该领域，人们对它的科学认识也在不断深入，同时，对它的风险的认识也在临床试验及临床应用过程中不断积累，因此，对 CAR-T 的制备工艺的提高、质量控制的考虑及检测要求，以及非临床研究的要求都会不断改进，本技术考虑要点也会随着这些发展进行定期的修订，以更好地促进我国 CAR-T 领域的产业化发展。

参考文献

1.《中国药典》三部

2.国家食品药品监督管理局药品审评中心，2017，12，《细胞制品研究与评价技术指导原则(试行)》。

3. FDA，CBER, 2008, Guidance for FDA Reviewers and Sponsors，Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)。

4. FDA, CBER, 2006, Guidance for Industry, Supplemental Guidance on Testing for Replication Competent Retrovirus in Retroviral Vector Based Gene Therapy Products and During Follow-up of Patients in Clinical Trials Using Retroviral Vectors.

5. FDA, CBER, 2010, Briefing Document — Testing for Replication Competent Retrovirus (RCR)/Lentivirus (RCL) in Retroviral and Lentiviral Vector Based Gene Therapy Products — Revisiting Current FDA Recommendations.

6. FDA, CBER, 2011, Guidance for Industry, Potency Tests

for Cellular and Gene Therapy Products.
7. FDA, CBER, 2013, Guidance for Industry, Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products.
8. FDA, CBER, 2015, Guidance for Industry, Considerations for the Design of Early-Phase Clinical Trials of Cellular and Gene Therapy Products.
9. FDA, CBER, 2011, Guidance for Industry, Validation of Growth-Based Rapid Microbiological Methods for Sterility Testing of Cellular and Gene Therapy Products.
10. FDA, CBER, 2015, Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics.
11. EMA, CPMP, 2008, Guideline on Human Cell-based Medicinal Products.
12. EMA, 2008, Guideline on the Non-clinical Studies Required Before First Clinical Use of Gene Therapy Medicinal Products.
13. EMA, 2012, Guideline on quality, non-clinical and

clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells.
14. EMA, 2013, Guideline on the risk-based approach according to annex I, part IV of Directive 2001/83/EC applied to advanced therapy medicinal products.
15. EMA, 2015, Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (Draft).
16. EMA, 2016, Guideline on potency testing of cell based immunotherapy medicinal products for the treatment of cancer.
17. EMA, 2011, Reflection paper on stem cell-based medicinal products.2011
18. 国家食品药品监督管理局，2003, 《人基因治疗研究和制剂质量控制指导原则》。
19. EP9.4, 01/2010:51400, Gene Transfer Medicinal Products for Human use.
20. USP40, 2017, General Information <1046> Cellular and Tissued-based Products.

21. USP 40, 2017, General information <1047> Gene Therapy Products.
22. Fesnak AD., June CH., Levine BL., Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. Nature Reviews Cancer, 2016, 16(9): 566-581.
23. Jackson HJ., Rafiq S., Brentjens RJ., Driving CAR T-cells forward, Nature Reviews Clinical Oncology, 2016, 13(6) : 370-383.
24. Reeves L., Smucker P., Cornetta K., Packaging cell line characteristics and optimizing retroviral vector titer: the national gene vector laboratory experience. Human Gene Therapy, 2000, 11:2093–2103.
25. Wang XY., Olszewska WM., Qu JR., et al. Large-scale Clinical-grade Retroviral Vector Production in a Fixed-Bed Bioreactor. J Immunother, 2015, 8(3):127-135.
26. Ausubel LJ., Hall C., Sharma A., et al. Production of CGMP-Grade Lentiviral Vectors. Bioprocess Int. , 2012 ,10(2): 32–43.
27. Merten OW, Matthias Hebben M., Bovolenta C.,

Production of lentiviral vectors. Molecular Therapy — Methods & Clinical Development, 2016, 16017:1-14.
28. Vormittag P., Gunn R., Ghorashian S., et al. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 53:164–181.
29. PettittD., Arshad Z., Smith J., et al., CAR-T Cells: A Systematic Review and Mixed Methods Analysis of the Clinical Trial Landscape, Molecular Therapy. 2017, https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.10.019
30. 国家食品药品监督管理总局审评中心, 2018.3.15, 当前对 CAR-T 类产品非临床研究与评价的一些考虑。
31. Novartis, <Primary Discipline Memo - KYMRIAH.pdf>. 2017. https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/App rovedProducts/ucm573706.html
32. Kite, < Summary Basis for Regulatory Action >.2017 https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines

/cellulargenetherapyproducts/approvedproducts/ucm584335.pdf
33. Siegler EL., Wang P, Preclinical models in chimeric antigen receptor-engineered T cell therapy, Human gene therapy. 2018, 29(5):534-546.
34. Kalaitsidou M,,Kueberuwa G., Schutt A., et al. CAR T-cell therapy: toxicity and the relevance of preclinical models, Immunotherapy, 2015,7(5) : 487-97.
35. Qian L., Li D., Ma L., et al. The novel anti-CD19 chimeric antigen receptors with humanized scFv (single-chain variable fragment) trigger leukemia cell killing. Cellular immunology, 2016, 304-305: 49-54.
36. Themeli M., Kloss CC., Ciriello G., et al. Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy. Nature Biotechnology, 2013, 31(10) :928-33.
37. Long AH., Haso WM., Shern JF, Wanhainen KM., et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors,

Nat Med., 2015, 21(6) : 581-590.
38. Wegner A., Chimeric antigen receptor T cells for the treatment of cancer and the future of preclinical models for predicting their toxicities. Immunotherapy, 2017, 9(8): 669-680.

起草单位及起草人

中国食品药品检定研究院生物制品检定所：孟淑芳、王佑春、吴雪伶、赵翔、黄维金、王斌、王萌、宋雪、贾芳英

中国食品药品检定研究院安全评价研究所：霍艳、侯田田、黄瑛、文海若、李芊芊、屈哲

中国人民解放军总医院及北京永泰免疫生物制品有限公司：王歆

华东师范大学生物医学工程与技术研究所及上海优卡迪生物技术有限公司：俞磊

参与提出意见及建议的单位

中国人民解放军空军军医大学陈志南院士；中国食品药品检定研究院李波、王军志；中国人民解放军海军军医大学万涛；中国人民解放军海军军医大学钱其军；上海市肿瘤研究所李宗海；国家药典委员会郭中平；中国食品药品检定研究院安全评价研究所王雪、张河战；第二军医大学袁伯俊；军事医学科学院廖明阳；上海市食品药品检验所林梅、陈钢、邵泓；上海交通大学医学院附属瑞金医院王文博；北京永泰生物制品有限公司孙磊；艾森生物（杭州）有限公司叶佩芳、陈业、燕宇；重庆精准生物技术有限公司钱程、张茜真、杨智、沈俊杰；华道（上海） 生物医药有限公司余学军、陈鑫；南京驯鹿医疗技术有限公司邹勇、胡广、赵弘烨；普瑞金深圳生物技术有限公司张继帅、陈泽建；英普乐孚生物技术（上海） 有限公司梅卫玲；上海细胞治

疗集团孙艳；复星凯特生物科技有限公司孙敏敏、沈青山；上海尚珞生物医药科技有限公司答亮；西比曼生物科技（上海）有限公司任加强、郑茂发、陆吉顺、吕晓腾、吴军峰；南京传奇生物科技有限公司蒋忻坡；上海恒润达生生物科技有限公司何风；科济生物医药（上海）有限公司夏春秀、刘超；上海明聚生物科技有限公司姚树元；中山大学刘炳峰；博生吉安科细胞技术有限公司汪敏、游凤涛；中国人民解放军空军军医大学李玲、汪世婕；康龙化成（北京）新药技术研发公司汪巨峰；山东欣博药物研究有限公司沈连忠；成都华西海圻医药科技有限公司岑晓波、王莉；北京昭衍新药研究中心股份有限公司孙云霞；上海益诺思生物技术有限公司马璟；北京协和建昊医药技术开发有限责任公司魏金锋；江苏鼎泰药物研究股份有限公司张雪峰；苏州赛泰医疗技术有限公司；北京艺妙医疗科技有限公司鲁新安。

声明：中国食品药品检定研究院合法拥有《CAR-T 细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要

点》版权，如需网络转载的应注明 “来源：中国食品检定研究院官网：（http://www.nifdc.org.cn/CL0001/）”。违反上述声明者，中国食品药品检定研究院将依法追究其相关法律责任。《考虑要点》全文亦将于《中国药事》杂志 2018 年第 6 期刊发。

ICS 11.120.01
C 00

团　体　标　准

CMBA/T 004.1—2018

嵌合抗原受体修饰 T 细胞（CAR-T 细胞）制剂制备质量管理规范

Code of manufacturing quality management for Chimeric Antigen Receptor T Cells（CAR-T cells）based-medicinal product

2018 - 09 - 06 发布　　2018 - 09 - 06 实施
中国医药生物技术协会 发布

目 次

前言

本标准按照 GB/T 1.1—2009《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中国医药生物技术协会制定，由中国医药生物技术协会实施。

本标准起草单位：中国医药生物技术协会医药生物技术临床应用专业委员会、天津医科大学肿瘤医院、北京博仁医院、安徽未名细胞治疗有限公司。

本标准主要起草人：任秀宝、孙倩、童春容、刘振云、孙艳、王伟、郝希山。

本标准为首次发布。

引 言

近年来，免疫治疗经历了一系列突飞猛进的发展，以特异性过继免疫细胞疗法及免疫检查点抗体疗法为代表的新型免疫治疗技术因其在临床研究中取得的显著疗效而成为学术界和产业界共同关注的焦点。其中，嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法（Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy，CAR-T 疗法）因其在白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤等病种的治疗中展现出显著的治疗效果而成为国内外研究的热点。随着我国对 CAR-T 技术的研究不断深入，国内企业的积极布局和产业链的延伸，我国的 CAR-T 细胞治疗技术也在紧随国际趋势的发展。

遵循《药品生产质量管理规范》（GMP）是 CAR-T 细胞制剂制备的原则要求。此前，中国医药生物技术协会已经制定了《免疫细胞制剂制备质量管理自律规范》，帮助机构在免疫细胞制剂制备过程中避免污染、交叉污染、混淆及差错，最大限度地保证免疫细胞制剂的安全性、生物学效应。但 CAR-T 细胞作为一类特

殊的免疫细胞，其制备和质量控制具有特殊性。为了适应我国 CAR-T 细胞治疗产业的需要，加强 CAR-T 细胞治疗的质量管理，规范细胞制备过程，保证 CAR-T 细胞制剂在临床研究和应用时的质量，促进国内外同行间的交流，中国医药生物技术协会在已有《免疫细胞制剂制备质量管理自律规范》的基础上，根据 CAR-T 细胞的特殊性，制定《CAR-T 细胞制剂制备质量管理规范》。CAR-T 细胞制剂制备过程中涉及到的人员、设备、样品储存与运输、标识与追溯系统等其他要求，应参照中国医药生物技术协会制定的《免疫细胞制剂制备质量管理自律规范》执行。

嵌合抗原受体修饰T细胞（CAR-T细胞）制剂制备质量管理规范

1 范围

1.1 本标准规定了CAR-T细胞制剂制备机构在制备过程中包括从载体制备、细胞采集以及细胞转导/转染、扩增、收集、冻存等过程中须遵循的基本要求和原则，保证CAR-T细胞制剂的安全性和生物学效应。

1.2 本标准适用于CAR-T细胞制剂制备的所有阶段。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

《中华人民共和国药典》（三部）

《免疫细胞制剂制备质量管理自律规范》（中生协字〔2016〕035 号）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T 细胞） chimeric antigen receptor T cell，CAR-T cell

经过基因工程修饰的，可表达被导入的含有抗原识别片段、T 细胞受体活化分子、共刺激信号等信号分子的 CAR 基因的 T 细胞。

3.2

外周血单个核细胞 peripheral blood mononuclear cell，PBMC

血液中具有单个核的细胞，主要包括淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞和少量其他细胞类型。

3.3

质粒 plasmid

一类存在于细菌和真菌细胞中独立于染色体 DNA 而自主复制的共价、闭合、环状 DNA 分子，通常携带一定数量的基因，是基因工程最常见的运载体。

3.4

目的基因 target gene

人工构建的具有明确功能的基因或基因片段。

3.5

载体 vector

在基因工程重组 DNA 技术中将 DNA 片段（目的基因）转移至受体细胞中进行复制和表达的工具。

注：常用的载体包括质粒、病毒等。

3.6

转导 transduction

借助病毒等方法将外源性遗传物质（DNA 或 RNA）导入细胞进行表达的过程。

3.7

转染 transfection

通过非病毒载体（如质粒）将外源遗传物质（DNA 或 RNA）植入细胞的过程。

3.8

冻存液 cryoprotectant

能保护细胞在冷冻和复苏过程不受损害的溶液或试剂。

3.9

标识 label

粘贴或附着在对象上的用于区分不同对象的标记、注释或条码。

3.10

细胞批次 cell batch

取自个体的细胞经单次细胞制备工艺过程制成的一批细胞制剂。

4 基本原则

4.1 总体要求

CAR-T 细胞制剂的制备包括质粒的制备、病毒的制备、样本的采集、接收、处理、细胞刺激、转导/转染、扩增、收获、质量检测、冻存和运输等全过程。制备机

构应建立健全 CAR-T 细胞制剂制备的质量管理体系，结合 CAR-T 细胞制剂制备的特殊工艺，对各个操作环节以及环境和人员等严格要求并实施，最终产品应符合质量标准。

4.2 人员

4.2.1 制备机构应配备与其规模相适应的 CAR-T 细胞制剂制备人员和质量检测人员，操作人员应具备基本的专业知识，并接受特定的专业技术培训后方可上岗。病毒和细胞制备技术人员身体健康无传染性疾病，能熟练掌握无菌操作技能，并具备病毒制备或人免疫细胞培养经验，其职称、学历、经历、资格证书、继续教育与健康记录，应建档保存。

4.2.2 建立人员卫生操作规程和自我防护规程，最大限度地降低人员对细胞制备造成污染以及操作人员自我感染的风险。操作规程应包括与健康、卫生习惯及人员着装相关的内容，以及操作过程中避免交叉污染和污物正确处理方法等内容。

4.2.3 维修人员或其他非专业人员进入制备区和质控区应经过培训和批准。

4.3 物料

4.3.1 CAR-T 细胞制剂制备所用的物料是指制备中所使用的试剂耗材、生物活性因子以及与细胞制剂直接接触的包装材料及外包装材料等。

4.3.2 CAR-T 细胞制剂制备所用的样本及物料应符合相应的质量标准。进口物料应符合国家相关的进口管理规定。细胞制剂制备中使用的物料管理应参照《中华人民共和国药典》中的《生物制品生产用原材料及辅料质量控制规程》实行管理。物料供应商应有相应的资质，并提供证明文件。

4.3.3 培养过程中对培养基、活性因子等外源蛋白的要求如下：

a) 所有使用的培养基、活性因子等外源蛋白应有明确的来源及批号，应有质量检定合格报告；

b) CAR-T 细胞体外扩增培养应尽量避免动物或人源物质如血清等制品的使用，若必须使用，需要开展相关研究，证明使用的必要性和合理性；严禁使用疫病流行区来源和未经过安全性验证的动物血清等制品。

4.3.4 转导/转染过程中所使用的培养皿或培养袋等

耗材和细胞因子等均需符合相应的质量标准。

4.3.5 制备机构应建立物料检验和放行质量标准，对生物活性试剂，制备机构应有相应措施确定有效期和保存条件，并在有效期内使用。

4.3.6 制备机构自制的试剂（如血浆、抗原等），应建立质量标准、编号及批号的编制操作规程，并经检验合格后使用，每种物料均应编制唯一的编号，并有制备记录。

4.4 设施和设备

4.4.1 CAR-T 细胞制剂制备场所按照不同工艺应至少包括质粒制备区、病毒制备区、细胞制备区，质控区（支原体测定、内毒素测定、流式细胞仪检测和分子生物学等相关检测）和储存区（病毒储存区、细胞储存区），各个区域应相对独立。病毒制备区、病毒储存区应具有独立的空调系统。制备机构可根据实际情况合理分配和增加所需区域（留样室、办公室、资料档案室、物料储存室、气体储存室等）。

4.4.2 制备机构应根据工艺要求，对各功能区合理设计、布局和使用，应设立洁净区，洁净区的设计、建设、

管理、进出、使用、清洁、消毒、环境检测等参见药品 GMP 规范无菌药品附录。

4.4.3 载体的制备应在 C 级背景下 A 级洁净度级别的环境中进行，载体在非密闭条件下的除菌过滤和灌装应在 B 级背景下 A 级洁净度级别的环境中进行； CAR-T 细胞制剂制备过程中与细胞有关的操作，如细胞分离、转导/转染、扩增、收获等应在非密闭条件下的操作应在 B 级背景下 A 级洁净度级别的环境中进行。

4.4.4 制备机构应设置用于制备感染性样本的独立物理空间，设立独立的空调系统。使用后的器具和相关物品应经过灭活处理后再移出该区域。感染性样本与非感染性样本的处理及制备不得使用同一设备。

5 载体制备

5.1 质粒制备

5.1.1 质粒应序列信息明确，并经过鉴定和确认。质粒菌种应采取种子库系统，并按照《中国药典》相关要求完成菌种库的检定。菌种建库过程应符合药品 GMP

规范，同时应有明确来源和批次信息，并有详细记录。

5.1.2 质粒的质量应经过检测，包括但不限于：

a) 纯度：超螺旋型的含量，细菌基因组 DNA、RNA 和蛋白残留量；

b) 无菌试验；

c) 内毒素试验；

d) 酶切鉴定；

e) 基因测序；

f) 如工艺中使用有潜在危险性的物质，则需做物质残余量的测定。

5.2 非病毒载体制备

非病毒载体(包括但不限于 DNA、RNA，蛋白质)应有明确的来源、结构和遗传特性，制备过程应符合药品 GMP 标准，达到相应质量标准的要求。不得含有支原体、细菌及病毒等其他任何外源因子，内毒素应控制在限定范围内；根据所选择载体类型不同，参见《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》(试行)、《人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》、《人用重组 DNA 制品质量控制技术指导原则》、《人用单克隆抗

体质量控制技术指导原则》等。

5.3 病毒载体制备

5.3.1 病毒包装细胞系应采取种子库系统，建立主细胞库和工作细胞库，并按照《中国药典》相关要求完成细胞库的检定。细胞建库过程应符合药品 GMP 规范，有明确来源和批次信息，并有详细记录。

5.3.2 病毒包装所用细胞系的细胞培养液应成分明确并具有溯源性，使用人或动物源性成分，如血清、胰蛋白酶或其他生物学活性物质，应具有这些成分的来源、批号、质量控制、检测结果和质量保证的相关信息，应不得含有任何病毒等外源因子。

5.3.3 每一批用于转导/转染的病毒应经过检测，包括但不限于：

a) 鉴别试验；

b) 复制型病毒（RCR/RCL）检测（生产时的批次和冻存复苏时的批次）；

c) 无菌试验；

d) 内毒素检测；

e) 支原体检测；

f）残留量测定：应根据生产工艺及成品的添加成份，对有潜在危险性的成份进行残留量检测；

g）病毒滴度测定；

h）效力试验：插入基因的表达水平测定及生物学活性测定。

5.3.4 应避免病毒载体反复冻融，病毒应储存于合适的环境中并进行稳定性研究，确定使用期限并在有效期限内使用。每批病毒应编制唯一的批号，并建立病毒的出入登记记录制度。

6 CAR-T 细胞制备及质量控制

6.1 T 细胞的采集和分离

6.1.1 制备机构应建立供者采集标准，进行细胞采集应具备相应的资质，应使用全自动血细胞分离机，按单核细胞分离程序，采集外周单个核细胞富集血，在技术上无法实现采集外周血单个核细胞富集血的情况下，可考虑静脉血采集方案。根据制备要求对采集的外周血进行单个核细胞的分离及 T 细胞的分选，并对

所分选出的 T 细胞进行活化。

6.1.2 采集管路应使用一次性消耗品，血细胞分离机应定期进行清洁和检测。

6.1.3 在符合洁净级别要求的操作间分离 PBMC，根据工艺要求再进一步确定是否分选特定细胞亚群进行转导/转染，转导/转染前进行细胞计数及细胞存活率测定。

6.1.4 传染性病毒检测阳性患者的 T 细胞应在感染性样本制备区进行细胞分离、培养、收集，完成制备过程。操作完毕应彻底清场、并应验证确认无该次操作残留感染风险物后方可进行后续供者的样品制备。

6.2 CAR-T 细胞制备

6.2.1 样本送达时应附细胞制备申请单，内容包括但不限于：

a) 患者姓名缩写、筛选号或入组编号或其他唯一识别码；

b) 患者临床诊断，肿瘤特异性靶点信息；

c) 实验室检测的结果：血常规及分类、HIV、HCV、HBV、EBV、CMV，HTLV，梅毒、肝肾功能、凝血检测；

如果是异体治疗回输，应做 ABO 血型、Rh 血型配型以及 HLA 配型检测；

d)治疗方案：细胞的种类、治疗次数、回输方式等；

e) 知情同意书。

6.2.2 CAR-T 细胞制剂制备应按照经过验证后批准的操作规程的要求进行，并有相关记录。

6.2.3 在感染性样本操作区内，操作人员应穿戴该区域专用的防护服。

6.2.4 在细胞培养耗材及培养箱上进行标识，并采取措施避免交叉污染。

6.2.5 操作前应检查所领用的包装材料正确无误，核对包装产品和所用包装材料的名称、规格、数量、质量状态，且与操作规程相符。

6.2.6 活化 T 细胞所采用的包被抗体或磁珠抗体应符合相关质量要求。

6.2.7 细胞转导/转染主要包括非病毒转染和病毒转导两种方式，应确认基因导入系统并对其进行验证，建立关键步骤控制点。

6.2.8 细胞扩增过程中每更换一次培养体系应准确计

数，应根据质量要求对细胞浓度及培养时间进行调整。

6.2.9 CAR-T 制剂的收获分为新鲜剂型和冻存剂型，冻存宜采用全封闭冻存袋的方式，在气相液氮储存环境下储存。

6.2.10 每批次细胞培养结束后，应进行清场，制备场所和设备应没有与本次制备有关的物料、产品、记录等遗留。

6.2.11 应建立 CAR-T 细胞制剂批号编制规程。每批细胞制剂应编制唯一的批号，并建立出入登记记录制度。

6.2.12 应避免出现任何偏离工艺规程或操作规程的偏差，如出现偏差，应按照偏差处理操作规程执行。

6.2.13 制备机构应建立 CAR-T 细胞制剂留样操作规程，留样应至少保存至使用结束后三个月。

6.3 CAR-T 细胞制剂的质量控制

6.3.1 制备机构应具有 CAR-T 细胞制剂的检测能力，并配备相关专业技术人员和设备，建立制剂质量标准，确立制剂质量检验操作规程，所有检测方法应经过验证。

6.3.2 CAR-T 细胞制剂的质量要求：

a）应进行无菌试验和支原体检测；

b）应进行内毒素检测；

c）应对细胞存活率和回输数量进行检测；

d） 应对终产品中 CAR-T 细胞转导/转染率、免疫表型进行检测；

e） 应检测 CAR-T 细胞制剂对特异性肿瘤细胞的杀伤作用；

f） 病毒转导/转染后的细胞应进行 RCR/RCL 检测；

g） 应进行 CAR-T 细胞的基因拷贝数检查（VCN）；

h）对于培养后不经冻存，直接回输的 CAR-T 制剂，应加强培养的全过程质量控制，设置合理的取样点，并采用合理的快速检测方法进行质量控制；

i） 如果细胞培养基内添加成分可能会对细胞制剂质量或安全性产生影响，应对培养基及其他添加成分残余量进行检测，如细胞因子等；

j）使用磁珠抗体刺激 T 细胞的，应检测制剂中的残余磁珠量。

6.3.3 制备机构应在 CAR-T 细胞制剂制备过程中开展质量检测，制剂的检验应由制备机构负责人指定有资

质的人员进行。制备机构可以委托有资质的第三方开展相关质量检测。检测结果应有质量负责人或质量受权人签字审核。

6.4 CAR-T 细胞冻存、运输与复苏

6.4.1 制备机构应建立 CAR-T 细胞的冻存和复苏操作规程，在规定的温度范围内储存细胞。应对冻存工艺（包括冻存液和冻存容器等）和复苏工艺进行验证，验证项目宜包括生物学效力、细胞纯度、细胞特性、活细胞数及比率、功能细胞数和安全性相关的内容等。

6.4.2 应建立 CAR-T 细胞制剂运输的标准操作规程，运输方式等应经过验证。

6.5 CAR-T 细胞制剂的放行

6.5.1 制备机构应建立 CAR-T 细胞制剂放行的操作规程，符合质量标准的 CAR-T 细胞制剂由质量管理负责人或质量受权人批准后方可放行。

6.5.2 CAR-T 细胞制剂经放行后方可进行回输。

6.5.3 每批次的 CAR-T 细胞制剂放行检测项目应至少包括：无菌检测、支原体检测、内毒素检测、细胞存活率、细胞数量、非 T 细胞表型、效应细胞比率、CAR 转

导/转染效率、CAR 基因拷贝数、复制型病毒以及可能的毒性物质残留等。

6.5.4 如 CAR-T 细胞制剂质制备后需立即进行回输，可采用经过验证的快速检测方法。但应建立规程，规定采用快速检测方法放行后，使用现行通用检测方法检验出现不合格结果时采取的措施。

7 追溯

7.1 应建立完整的细胞制备记录系统、标识标签系统和免疫细胞制剂编码系统，以便于 CAR-T 细胞制剂的辨识并防止制剂混杂。记录和标识应遵循相关法律和规范的要求。

7.2 细胞制备记录包括每天的细胞状况，细胞数量，转导/转染条件，细胞因子浓度等具体信息。标识系统应记录患者信息、细胞制剂名称、批号、收获日期及时间、规格（细胞数量/体积）、储存条件、效期等。

7.3 每个患者的信息和操作全过程应双人复核。

7.4 每份 CAR-T 细胞制剂应编制唯一的编码。编码应

能追溯到患者信息以及该细胞制剂操作和最终处理的所有记录。应建立相关程序保证新旧编码能够关联。

7.5 转移和运输记录应能追溯 CAR-T 细胞制剂从一个机构到另一个机构的流转过程。转移和运输记录应包括：CAR-T 细胞制剂发放和接收的日期和时间、运输过程中的任何延误或其他突发状况引起的问题及相应的处置记录。

7.6 制备机构应建立不良反应报告和收集制度，在对不良反应进行分析时，应能追溯到所使用 CAT-T 细胞制剂制备的相关记录。

8 保密

应采取措施，防止病人的隐私信息被泄露。

参 考 文 献

[1] 《药品生产质量管理规范》(卫生部令第 79 号)

[2] 食品药品监管总局,细胞治疗产品研究与评价技术指导原则,2017.

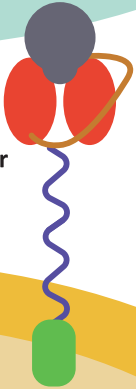
[3] CAR-T 细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要点，中国药事，2018， 32（6）：829-852.

细胞治疗整体解决方案

From DNA to Virus，From IND to Commercial

Car Plasmid in Viral Vector

- GMP Plasmid
- GMP Virus



T Cell

金斯瑞生物科技

Make Research Easy

南京金斯瑞生物科技有限公司

江苏省南京市江宁区高新科学园雍熙路28号

服务电话：400-025-8686分机号5820/5828
服务邮箱：gene@genscript.com.cn
网页链接：www.genscript.com.cn