

技术和学术引领型**CARO**公司



公众号



视频号

天津凯诺医药科技发展有限公司
Tianjin Clin-nov Medical Technology Co., Ltd.

天津经济技术开发区第一大街 61 号周大福金融中心 17 层, 300000
17th Floor, CTF Finance Center, 61 First Avenue, TEDA Tianjin, 300000, P.R. China

商务拓展: 18121042058

邮箱: BDchina@clin-nov.com/BDUS@clin-nov.com



细胞治疗法律法规指南汇总文集

(2008.9-2022.6)

细胞治疗
法律法规指南
汇总文集
(2008.9-2022.6)

CLIN-NOV

contents

目录

药学--细胞治疗类药物

01	《人源性干细胞产品药学研究与评价技术指导原则》（征求意见稿）
10	人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则
21	CAR-T细胞治疗产品 复制型病毒的风险分析及控制
26	干细胞制剂制备质量管理检查指导原则
36	免疫细胞制剂制备质量管理自律规范
41	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
48	关于印发干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）的通知
59	基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（征求意见稿）
69	免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则（征求意见稿）
96	细胞培养基生产企业质量达标检查管理指导原则
129	人源性干细胞产品药学研究与评价技术指导原则（征求意见稿）

非临床--细胞治疗类药物

151	细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（试行）
176	SD大鼠神经干细胞评价药物神经毒性模型研究
185	CAR-T细胞治疗产品非临床研究动物模型的发展和应用概述
194	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
216	基因治疗产品非临床研究与评价技术指导原则（试行）
219	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）
240	基因修饰细胞治疗产品非临床研究技术指导原则（试行）
253	基因治疗产品非临床研究与评价技术指导原则

注册--细胞治疗类药物

289	细胞治疗产品申请临床试验药学研究和申报资料的考虑要点
293	嵌合抗原受体T细胞（CAR-T）治疗产品申报上市临床风险管理计划技术指导原则

临床--细胞治疗类药物

304	脐带血造血干细胞治疗技术管理规范（试行）
310	关于开展干细胞临床研究和应用自查自纠工作的通知
314	干细胞临床研究管理办法（试行）的通知
324	造血干细胞移植技术管理规范
331	造血干细胞移植技术临床应用质量控制指标
336	体细胞治疗临床研究和转化应用管理办法（征求意见稿）
344	体细胞治疗临床研究和转化应用管理办法（解读）
352	人源性干细胞及其衍生细胞治疗产品临床试验技术指导原则（征求意见稿）
373	医疗卫生机构开展研究者发起的临床研究管理办法（征求意见稿）
387	免疫细胞治疗产品临床试验技术指导原则（试行）
414	涉及人的生命科学和医学研究伦理审查办法（征求意见稿）
434	基因治疗产品长期随访临床研究技术指导原则
448	长效粒细胞集落刺激因子预防化疗后感染临床试验设计技术指导原则（征求意见稿）
462	慢性髓细胞白血病药物临床试验中检测微小残留病的技术指导原则
476	长效重组人粒细胞集落刺激因子预防化疗后中性粒细胞减少性发热临床试验设计指导原则（试行）

人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则

一、序言

体细胞治疗是指应用人的自体、同种异体或异种（非人体）的体细胞，经体外操作后回输（或植入）人体的治疗方法。这种体外操作包括细胞在体外的传代、扩增、筛选以及药物或其他能改变细胞生物学行为的处理。经过体外操作后的体细胞可用于疾病的治疗，也可用于疾病的诊断或预防。体细胞治疗具有多种不同的类型，包括体内回输体外激活的单个核白细胞如淋巴因子激活的杀伤细胞（LAK）、肿瘤浸润性淋巴细胞（TIL）、单核细胞、巨噬细胞或体外致敏的杀伤细胞（IVS）等等；体内移植体外加工过的骨髓细胞或造血干细胞；体内接种体外处理过的肿瘤细胞（瘤苗）；体内植入经体外操作过的细胞群如肝细胞、肌细胞、胰岛细胞、软骨细胞等等。

由于体细胞治疗的最终制品不是某一种单一物质而是一类具有生物学效应的细胞，其制备技术和应用方案具有多样性、复杂性和特殊性，因此不能象一般生物制品那样制订出适合于每一种方案的具体标准，本指导原则只提出一个共同的原则，具体的申报资料和应用方案应根据本技术指导原则加以准备、申请和实施。对每个方案的整个操作过程和最终制品必须制定并严格执行（实施）标准操作程序，以确保体细胞治疗的安全、有效。

二、申报资料

（一）体细胞治疗制剂的名称、选题目的与依据、国内外研究现状或生产使用情况

1. 申请表
2. 体细胞治疗制剂的名称及命名依据
3. 选题的目的和立题依据
4. 国内外有关该制剂的研究现状、生产及临床应用情况（包括专利查询情况）
5. 临床应用的风险性评估

（二）体细胞的采集、分离和检定

1. 体细胞类型和供体的情况

（1）体细胞类型

须指出细胞来源是属于自体、同种异体、异种还是细胞系。必须提供细胞的组织来源及细胞类别的确证资料，其中包括形态生化或表面标志等。

(2) 供体

若体细胞来源于同种异体，需说明供体的年龄、性别，供体必须符合国家对献血员的要求，并提供测试的方法及符合条件的依据。供体必须经过检验证明 HBV 抗原、抗 HCV、抗 HIV-1/2、梅毒抗体、细菌、霉菌均为阴性，必要时需说明供体的既往病史、家族史等临床资料。对于那些需通过激活体内免疫功能发挥作用或需体细胞在体内长期存活的体细胞治疗项目，除 ABO 血型外，还必须对供体做 HLA-I 类和 II 类分型检查，并证明与受体（病人）相匹配，同时提供检测方法和依据。

若体细胞来源于动物，必须提供动物的来源，遗传背景，健康证明（如重要病原体，包括人畜共患疾病的病原体），饲养条件，应用此类体细胞的必要性和安全性。

(3) 细胞系

若采用细胞系进行体细胞治疗，应按国家相关规定进行主细胞库、种子细胞库及生产细胞库三级细胞库的建立及管理。应详细记述细胞的来源、鉴别标志、保存、预计使用寿命，在保存和复苏条件下稳定性的依据。生产细胞库不应含有可能的致癌因子，不应含有感染性外源因子，如细菌、霉菌、支原体及病毒。

2. 体细胞的采集

应对采集体细胞的技术方法的安全性、可行性、稳定性进行充分论证，应提供体细胞采集技术的标准操作程序，应说明采集体细胞的地址/环境，所用的设备和设施、保存和运输的环节和条件，预防微生物及病毒等有害因子污染的方法，预防共用设备和设施可能带来的交叉污染等措施。

3. 体细胞的分离

应详细规定分离体细胞用的方法、材料及设备，应提供在此过程中所用的各种材料的资料，如果是购买的原材料，应有供应商/制造商提供的产品说明及分析合格证明。

当应用单克隆抗体进行有关操作时，应参照国家药品管理局有关规定进行。

4. 体细胞的检定

在体细胞采集及分离过程中的适当阶段，应对体细胞进行质控检定，包

括采集与分离体细胞的收率、存活率、纯度、均一性等。应详细说明检定体细胞所用的方法、材料及设备，并制定合格标准。

（三）体细胞的体外操作

1. 培养基

（1）所有成分应有足够纯度（例如水应符合注射用水标准），残留的培养基或受者不应有明显影响。每个培养细胞的部门应保证所用的各种成分的质量都经过鉴定，并制定标准规格。若用商业来源的培养基，应由厂商提供全部培养基成分资料。

（2）血清的使用

除能证明体细胞培养或激活需要血清外，应避免使用任何血清。不得使用同种异体人血清或血浆。如必须使用动物血清，应考虑每批血清都应应对潜在的外源因子（包括人的病原体）进行检查、筛选。例如，牛血清应进行病毒和支原体污染的检查筛选等。

（3）人血液成份的应用

若培养基中含有人的血液成份，如白蛋白及转铁蛋白，应说明其来源、批号、质量检定合格报告，应尽可能用已批准上市的产品。

（4）条件培养基的应用

在体细胞培养中使用细胞培养来源的条件培养基时，有可能增加了制剂的危险性及降低产品的一致性。因此，尽可能确定条件培养基的必要成份，以及尝试用确定的试剂取代条件培养基。在应用条件培养基时应考虑以下几点：

①应详细提供条件培养基的来源、加工及使用说明。

②当用供者（人）细胞制备条件培养基时，应对供者按献血员标准进行传染因子的检查。

③当用自体细胞制备条件培养基时，应减少传播病毒性疾病的危险，病毒在体外扩增的能力亦应考虑。

（5）抗生素的应用

培养基中尽量避免使用内酰胺类抗生素。若采用青霉素类抗生素，应做青霉素皮试，该细胞制剂应标明加用的抗生素，并不得用于已知对该药过敏的患。另外，应做不加抗生素的培养对照，以证明能够保持无菌。

(6) 其他成份

应充分说明体细胞培养和激活时所采用的有丝分裂原、抗体、细胞因子、化学物质，以及培养物。应尽可能采用国家批准临床应用的产品。如上述成份的生产厂家已获国家批准临床应用，可以引用该批件。如上述成份的生产厂家未获国家批准临床应用，应参照国家对相应产品的质控要点，提供质量标准，并对每批产品提供详尽的质量检定报告。

(7) 培养基的检定

对每批制成的培养基（例如已加入血清及生长添加物等）应进行无菌试验，以及对拟给病人用的体外培养细胞的激活及/或支持生长试验。

2. 生产过程

生产部门对制备工艺流程应有详细的标准操作程序和适时修订的程序。收获时应保留细胞及培养基样品，供检定用。若细胞培养技术有改进，则应评估对细胞得率、生物学效应、均一性及纯度的影响。

应叙述保证细胞批同一性和防止交叉污染的质量控制系统，以及适用于长期培养时定期进行的和在体外培养后输注前对所有培养物进行的质量控制系统。

3. 质量控制

应对所有成份分离、培养及最后处理细胞所用的器具进行质量控制。各种成份都应进行同一性及污染物检查。有生物活性的成份还应进行功能检定。批记录应予保存，该记录应反映制备每批体细胞的所有步骤，记载每一成份的批号及所有检定结果。

(四) 体细胞制剂的检定与质量控制

各批体细胞的检定包括为验证操作过程对最初数批体细胞所进行的检定及在操作过程做任何改变后进行的检定，以及确定安全性和生物学效应等对每批体细胞所进行的检定，应依据实施方案制定合格标准。

1. 每批体细胞的检定

(1) 得率及存活率：于回输前应进行体细胞得率及存活率检定。

(2) 每批细胞来源的确认：应注明供者的来源并加以标记或确定批号。

(3) 无菌试验：每批培养的体细胞在患者输注前均应进行无菌试验。建议在培养开始后 3~4 天起每间隔一定时间取培养液样品，包括患者回输前 24

小时取样，按现行版《中国药典》生物制品无菌试验规程进行。在患者使用前，取培养液及/或沉淀物用丫啶橙染色或革兰染色，追加一次污染检测。

进行长期培养的体细胞，应进行支原体检查。对大多数自体体细胞产品而言，有效期很短，因此有些试验（如支原体检测）可能对制品的应用来说耗时太长，但每批制品的留样检测是必需的，其结果可以为制品的质量控制提供完整资料。虽然单个病人应用的体细胞不会等到检测完成后再回输，但是如果留样发现阳性结果或发现几次阳性结果后，应及时对生产过程进行检查。如果在体细胞制备的早期发现有污染的情况，应终止该批体细胞制品的继续制备。如果某些检测结果在制品应用时还无结果，应说明可获得结果的时间。

（4）体细胞的纯度与均一性

在体细胞回输前，应证明其纯度和均一性已达到可应用水平。

对于经过数代培养的体细胞应进行细胞的鉴定及无污染检查，以保证未被其他类型细胞污染或取代。

对于体细胞体外操作中所用的非人用成份应测定其成品中的含量，并制定相应的限量指标。

（5）生物学效应

如有可能，应尽量检测每批体细胞的生物学效应，例如体细胞具有的某种生物学功能，分泌某种产物的能力，表达某种标志的水平等。

2. 体细胞制剂的检定（申报临床前完成）

检定项目：

- （1）体细胞制品的得率和存活率；
- （2）体细胞制品的纯度和均一性或特征性表面标志；
- （3）体细胞制品的生物学效应；
- （4）体细胞制品外源因子的检测包括：

- 细菌
- 真菌
- 支原体
- 病毒
- 内毒素

(5) 体细胞制品其他添加成份残余量的检测（如牛血清蛋白、抗体、血清、抗生素、固相微粒等）。

3. 体细胞制剂的制造及检定过程，及原始记录和中国药品生物制品检定所的复核检定报告。

4. 体细胞制剂的稳定性

根据稳定性的实验结果确定有效期，说明体细胞制剂的保存条件、保存液的成份与配方。如果体细胞在处理之前、处理当中或处理之后需由一地运到另一地，应说明运输条件对保存体细胞存活率和功能的影响，应确保运输过程中体细胞制品达至上述检定标准。应提供运输容器能适用运输材料的合格证明。若体细胞制品经冻存后继续用于病人。应在冻融或再扩增后进行上述检定，达到检定标准。

(五) 体细胞治疗的临床前试验

1. 安全性评价

(1) 生长因子依赖性细胞，对其生长行为必须予以监测，若某细胞株在传代过程中失去对该生长因子的依赖，不能再予使用。

(2) 对同种异体细胞的移植，必须从免疫学方面提供其安全性依据。

(3) 对异种细胞，必须提供该异种细胞在体内存活的时间及安全性的依据。

(4) 毒性试验

尽可能模拟临床回输方式，高于临床用量的相同组织类型的动物体细胞制品回输入动物体内，观察其毒性反应、过敏反应、局部刺激反应。对特殊来源的体细胞，按具体情况制定毒性反应的评价方法。

(5) 致癌试验

对于某些长期培养的体细胞，应进行致癌性试验。

① 体外试验：软琼脂克隆形成试验

② 体内试验：采用裸鼠试验，按国家药品管理当局有关细胞株检定和质量控制要求进行，应证明经体外处理后已失去生长和增殖能力。

(6) 对于体细胞终制品所用的附加物，应视为体细胞制品的一部分，应做动物毒性试验。

2. 有效性评价

(1) 体细胞的表型

应提供该类体细胞的形态学、表面标志等,该体细胞应具有预期的功能如分泌某种产物(或因子),可通过体外试验加以检测。

(2) 体外试验

检测体细胞制品的生物学效应如细胞毒效应、免疫诱导/增强或抑制效应、造血细胞增殖能力等。

(3) 体内试验

如果有可能以动物模型来进行,临床前试验应测定体细胞制品在体内生物学功能及其治疗效果。

若某种体细胞治疗方法,因种属特异性等原因无法用动物模型体内试验来证实其有效性,应做特别说明,并提供和引证有效性的其它依据。

(六) 体细胞治疗临床试验方案

1. 临床试验方案除参照国家有关临床研究的规定外,必须包括所选用的病种、病人的年龄范围、性别、疾病的发展阶段(临床分期)、试用的病例数、事前制定病例选择与淘汰的标准。

2. 给药的方式、剂量、时间及疗程。如果通过特殊的手术条件导入治疗制品,必须提供详细的操作过程。

3. 评估疗效的客观标准,包括临床指和实验室检测项目。

4. 评估毒副作用及其程度的标准及终止治疗的标准、以及监控毒副作用必须的临床与实验室检测的项目。

(七) 研制及试用单位及负责人资格认证

提供研究与临床单位的全部主要研究人员和临床工作人员(包括负责医师、护士和实验室操作人员)的工作简历及从事与实施该项体细胞治疗方案有关的经验。提供研究单位从事符合 GMP 生产临床制品的条件和证明以及临床单位实施该方案的医疗条件。

(八) 体细胞治疗伦理学考虑

详细要求参见国家药品监督管理局颁发的 GCP 有关规定。

细胞培养用牛血清生产和质量控制技术指导原则

《中国生物制品生产用主要原辅材料质控标准》已由国家药品监督管理局颁布实施，为规范细胞培养用牛血清的生产、质量控制，促进我国牛血清质量的提高，特制定本技术指导原则。

一、总则

由于牛血清为疫苗等有关生物制品生产中一种重要的原辅材料，某些用于疾病预防的疫苗中还含有一定量的残余牛血清，因此，牛血清的生产质量管理应参照国家现行《药品生产质量管理规范》执行。

二、牛血清的生产

（一）牛血清生产单位必须经工商登记注册、具有独立法人资格，必须具有与牛血清规模化生产相适应的生产车间、设备。

（二）生产负责人及生产者必须具有相适应的专业知识，并经培训考核合格方可上岗。

（三）应有相对稳定的牛源材料来源；并与相应的供牛单位签定有法律效应的协议；协议内容应包括详细的牛群免疫接种情况、流行病的监测内容。不得使用疫区或近期有传染病流行地区来源的牛材料（如口蹄疫、结核、布氏、疯牛病疫区等）。

（四）生产用水及其他材料应符合《中国药典》及《中国生物制品生产用主要原辅材料质控标准》或相应标准的要求。

（五）应具有稳定的批量生产工艺；工艺流程中至少应有一次 0.1um 的过滤。灌装工艺应在百级净化区进行。

（六）直接接触血清的器具应进行灭菌及去热原处理。

（七）应建立系统的生产质量管理体系，包括批生产记录及生产工艺的操作细则。

（八）不得混用非牛源血清材料用于生产；产品中不得添加防腐剂或抗生素等。

三、质量管理

（一）应具有牛血清质量控制相适应的实验室及仪器设备。

（二）生产单位应具有独立于生产的质量控制部门，负责包括牛源、初制原料、生产过程及终产品的质量控制在。

（三）质控人员应具有相适应的专业知识，并经培训考核合格后方可上岗。

（四）建立完整的质量控制体系，按《中国生物制品生产用主要原辅材料质控标准》要求进行检测。

（五）企业应建立严格的批合格签发制度。

四、企业管理

（一）应建立系统的生产、质检管理制度，岗位责任制度及标准操作细则。

（二）应建立完善的销售管理制度。

（三）应建立留样制度。

人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则

一、引言

基因治疗是指改变细胞遗传物质为基础的医学治疗。目前仅限于体细胞。

基因治疗的技术和方式日趋多样性。按基因导入的形式，分为体外基因导入（ex vivo）及体内基因导入（in vivo）两种形式。前者是在体外将基因导入人细胞，然后将该细胞注入人体。其制品形式是外源基因转化的细胞，适合在具有专门技术人才和 GMP 条件的医疗单位进行。后者则是将基因通过适当的导入系统直接导入人体，包括病毒的与非病毒的方法。其制品形式是基因工程技术改造的病毒或者是重组 DNA、或者是 DNA 复（混）合物。基因治疗制剂种类较多，因此，本指导原则不可能用一个模式来概括，只能提出一个共同的原则，具体的方案应根据这些原则，确定研究技术路线。其基本原则：一是必须确保安全与有效，要充分估计可能遇到的风险，并提出相应的质控要求；二是要促进基因治疗的研究，并加强创新。对一些新的治疗技术路线的相应质控要求，可有一定的灵活性，应注意到基因治疗本身的特点以及它与经典的化学合成药物或基因工程药物的差别。目前，一些基因治疗研究相对比较成熟，而一些则不够完善，更加要求研究者在使用该技术指导原则时不可生搬硬套。为此，研究者应加强咨询和论证，提出一个科学可行的研究方案，最终获得确保安全有效的基因治疗制品。

在向国家药品监督管理局申报临床试验时，除须按本指导原则中“研究内容和制品质量控制”准备材料外，同时需提供下述材料：

（1）国内外研究现状和进展（综述）。包括：

1. 所用基因的研究现状和进展；
2. 所用载体的研究现状和进展；
3. 所用基因导入系统和方法的研究现状和进展；
4. 该研究或制品相关的体外有效性实验资料；
5. 该研究或制品相关的动物试验安全性和有效性资料；
6. 该研究或制品相关的临床试验安全性和有效性资料；
7. 该研究或制品的生产工艺现状；
8. 该研究或制品的质量控制现状；

9. 本研究或制品的先进性和创新点；

10. 本研究或制品产业化的可行性。综述内容须科学客观。

(二) 本研究或制品的知识产权情况。包括：1) 本研究或制品的知识产权情况阐述；2) 本研究或制品的知识产权检索报告和检索结果。知识产权情况的阐述和检索应包括所用基因、载体、重组体、终产品的其它成分、生产用细胞和生产工艺等。

二、研究内容和制品质量控制

(一) DNA 重组体或基因导入系统的构建

1. 治疗用的目的基因

详细说明基因治疗所用的目的基因及其来源（尤其是有否涉及国内外专利问题，应有专利查询资料），获得目的基因的材料方法和基因鉴定结果。

2. 载体

包括载体 DNA 的限制性内切酶图谱或基因库资料。若有特殊的元件，如启动子、增强子及 PolyA 位点等，应提供详细资料。若有改变结构（如丢失片段、点突变或插入片段），须提供 DNA 测序结果。若属新的或改变结构的病毒载体，须提供组建的材料、方法、组建步骤及鉴定结果的全部资料。

非病毒型基因导入系统，均需一个能在人体细胞表达目的基因的质粒。除裸露 DNA 外，还须附加其它的组分进行加工，如脂质体、多肽、金属颗粒等。本指导原则不包括寡聚核苷酸（如 AntisenseRNA, Ribozyme, RNAi 等）类基因治疗制品。

3. DNA 重组体

详细说明克隆步骤，材料方法；DNA 序列分析图谱和结果，注明启动子、增强子、插入顺序、目的基因及 polyA 顺序等；重组体的限制性酶切图谱和鉴定结果；重组体中基因表达水平和时程。

4. 基因导入系统构建包括病毒载体与非病毒载体基因导入系统。

(1) 病毒载体基因导入系统包括腺病毒载体、逆转录病毒载体和腺相关病毒载体基因导入系统等。需详细描述形成单克隆原始病毒颗粒的方法、材料、技术路线和全部的鉴定方法、标准和结果。这些鉴定一般包括：结构鉴定（限制性酶切图谱和 PCR 分析）、整个病毒的序列分析（ $\leq 40\text{kb}$ ），基因体外表达和生

物活性，SDS-PAGE、表达盒 DNA 序列分析、Westernblot 分析、转染效率、透射电镜负染法观察、复制型病毒的检测和其它污染因子的检测。

(2) 非病毒基因导入系统除裸 DNA 外，一般包括两个部分：一是哺乳动物细胞表达载体；二是其它载体物质，如脂质体、多肽或金属粒子等。为此，需说明目的基因导入系统的性质与内容。由于部分病人对青霉素的过敏反应，最好不用耐氨苄青霉素基因作耐药基因，而建议用卡那霉素或新霉素基因作耐药基因。若用物理方法导入，须提供其详细方法、步骤，基因导入效率及其表达的生物活性以及导入细胞后基因的稳定性，无重排或突变的证据。每一操作步骤必须鉴定其结果，通常的鉴定内容和方法有：限制性酶切图谱，基因的 PCR 扩增，表达盒 DNA 序列分析，SDS-PAGE，Westernblot 分析等。

(二) 细胞库及工程菌库的建立和检定

包括包装和繁殖重组病毒的细胞库和扩增重组质粒的工程菌库。必须建立三级库，即原始细胞库 (PrimarySeedBank)、种子细胞库 (MasterCellBank) 和工作细胞库 (WorkingCellbank)；或原始工程菌库、种子工程菌库和工作工程菌库。

1. 细胞库

(1) 原始细胞库

需说明来源、代数、细胞特性及有关档案资料。对主细胞库和工作细胞库需详细说明建库过程，包括材料、方法、步骤、细胞库存的数量和登记档案等。

(2) 主细胞库

主细胞库由原始细胞库直接传代建立或通过亚克隆方法筛选后建立。应明确使用代次。

(3) 工作细胞库

工作细胞库由主细胞库传代建立。应明确工作细胞库的使用代次。

(4) 细胞库检定

①主细胞库或工作细胞库检定应依据《生物制品生产用细胞的制备及检定规程》的要求进行。

②病毒转导效率和病毒的产量等的检定

③导入基因的存在状态，稳定性及其表达水平的检测

④复制型病毒的检测

若需用其它辅助病毒，须说明其来源、分离的方法步骤和传代次数等。

2. 工程菌库

工程菌主种子库和工作种子库的建立和检测应按现行《中国药典》相关要求建立。

(1) 工程菌主种子库的检定

①菌种同一性鉴定：菌种/株的来源、基因型及表型。基因型通过 RAPD 方法鉴定，通过测定重组质粒的特殊标记和抗药性标记确定表型。

②菌种培养纯度检定：外源因子（如杂菌、真菌、噬菌体等）的检测。

③菌种稳定性检定：转化菌的比例，扩增条件、质粒拷贝数，基因表达量、允许的传代次数。

④基因表达盒序列分析：插入的目的片段以及调控序列进行测序分析。

(2) 工程菌工作种子库的检定

除基因表达盒序列分析，其它检定内容按上述工程菌主种子细胞库的检定。

(三) 基因治疗制品制备和生产工艺

1. 一般要求

(1) 制备和生产条件及环境说明。强调基因治疗制品的制备和生产须按 GMP 要求进行，特别是对 ex vivo 方式的细胞制品和重组病毒制品。临床前研究和临床研究用的重组病毒制品应该在经验证的 (validatable) 生产工艺途径下制备。

(2) 详细的制备和生产工艺方法、材料和技术路线。

(3) 制备和生产过程控制。在生产过程中，一些步骤必须进行监测，并要求有监测记录。

(4) 一批制品生产的原始制造及检定记录。

(5) 中国药品生物制品检定所或由国家药品监督管理局指定的单位对一批制品的检定报告。

2. 以重组病毒作为基因治疗制品者，要求必须建立种子病毒库和工作病毒库。工作病毒库直接从种子病毒库病毒接种细胞传代制备。需详细描述病毒库

的来源、建立、克隆性，传代和保存条件和方法。其质量控制方法和标准见本指导原则有关部分。须从工作细胞库细胞复苏，传代成生产细胞开始工艺过程，不得用非细胞库来源的细胞直接进行生产。做重组病毒制品时，须使用工作病毒库的病毒去感染生产细胞，不得用非病毒库来源的病毒直接进行生产。可以使用贴壁细胞或悬浮细胞大规模培养技术。病毒库可以不经纯化而直接从细胞裂解液来制备。制剂配方也十分重要，不合适的制剂配方会影响制品活性和保存期限。

3. 非病毒型重组质粒 DNA 复（混）合物作为最终制品者，要求需详述。

- (1) 重组质粒 DNA 的生产制备和质控
- (2) 脂质体的来源和性质，或者制备方法
- (3) 多肽的来源和性质，或者合成方法
- (4) 其它成分的来源和性质，或者制备方法
- (5) 重组质粒 DNA 复（混）合物终制品的生产制备和质控

通过基因枪等物理和化学方法将基因导入人体者，需说明目的基因的制备、表达、裸 DNA 大量扩增、分离、纯化，仪器设备的性能和详细的导入方法。

4. 以基因工程化的细胞为最终制品者，包括 ex vivo 及其它形式的基因治疗。该类制品应参照《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》进行。详细说明细胞扩增的全部制备工艺，包括生产流程、所用培养液及其配制方法、细胞收集、细胞的 ex vivo 转染方法及筛选。洗涤最终制品中所用的保存液配方。

(四) 制品的质量控制

根据基因治疗类制品的生产工艺特点，其质量控制的原则主要是：检定项目尽可能在成品中进行；如成品中的添加成份影响检定结果，则需在原液中进行。

1. 重组病毒作为基因治疗制品的质量控制

根据目前国内外的进展和完善程度，这里以重组腺病毒（rAd）制品来描述重组病毒基因治疗制品的质量控制，其它的重组病毒制品可参考这些质控要点。

(1) 重组腺病毒（rAd）作为基因治疗制品的质量控制

①原液检定：

a. 无菌试验

按 2000 年版《中国生物制品规程》附录《生物制品无菌试验规程》进行。

b. 病毒颗粒数测定

c. 具有感染能力病毒颗粒的测定（病毒活性）

②半成品检定

- a. 无菌试验
- b. 病毒颗粒数测定
- c. 内毒素测定

③成品检定

- a. 物理检查
- b. 外观
- c. 装量
- d. 化学检定: pH 值
- e. 鉴别试验

限制性酶切图谱鉴别

插入基因检测

f. 纯度: 可采用 A260nm/A280nm 值法或 HPLC 法

g. 病毒滴度测定

病毒颗粒数测定, 采用 A260 紫外吸收法测定。

具有感染能力病毒颗粒的测定, 采用 TCID₅₀ 法。〔ZK〕

病毒比滴度 (比活性 IU), 病毒感染滴度/病毒颗粒数 (IU / VP) 应高于

3. 3%。

h. 效力试验

插入基因表达活性测定

插入基因的生物学活性测定

i. 复制型病毒 (RCA) 检测

A549 细胞检测法, 每 3.0×10^{10} VP 中应不高于 1 RCA (即 $\leq 1 \text{ RCA} / 3.0 \times 10^{10} \text{ VP}$)

j. 腺相关病毒的检测

采用 PCR 法, 应无腺相关病毒 (AAV) 的污染。

k. 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。

1. 无菌试验

m. 异常毒性试验

n. 内毒素检测

重组病毒制品的稳定性试验：需对保存条件、保存液配方及至少对三批样品进行稳定性考察。应进行不同温度及反复冻融对活性影响的研究。

(2) 以 *ex vivo* 形式用逆转录病毒转化的细胞（同体或异体）制品的质量控制

该类制品应参照《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》进行。应特别注意复制型病毒的检测。检测的范围，包括前述种子细胞库、工作细胞库，生产后细胞及最后病毒制品。细胞上清液的取样应相当于培养上清液的5%。生产病毒后细胞取样量须达每批中1%或108细胞（取少的）。检测方法应包括至少5代的细胞共培养扩增（如用Musdummi细胞），随后须用PG4S+/L-法、标记挽救法或RT/PCR中的两种方法来检测。必须用阳性对照（COS4070A上清液）及阴性对照作严格定量标化，证明其敏感性及其可靠性。PCR应利用放射性同位素杂交或同样敏感的系统。

若为释放病毒的细胞，须测定：

①细胞形态、表面标志、染色体组型及其同一性。

②活细胞比例和细胞浓度。

③目的基因存在状态、表达及其稳定性。尤其要说明对基因及其载体导入后是否出现基因“插入性突变”及其观察方法及结果。

④细胞冻融后的质控

冻融后细胞存活数、基因表达或转导基因的活性。

冻融后细胞上清液中的下列检测结果：

a. 无菌试验

b. 热原质实验

c. 冻融后细胞的异常毒性试验。

d. 病毒转导基因活性。

e. 支原体检查。

若为逆转录病毒上清液，须测定：

①病毒滴度

②病毒结构检定

③病毒转导基因的活性

④复制型病毒（RCR）的检测。由于逆转录病毒或 RCR 具有

整合入人细胞染色体的特性，有遗传性毒性，因此对制品中 RCR 的检测要严格进行和严格要求。

⑤上清液中的细菌、热原质及其它外源因子等。

⑥上清液中牛血清蛋白残留量。

鉴于某些细胞产品，有效期较短，而有些项目的检查须较长的时间（如支原体），这些试验项目可对每批最终产品作留样检查，而该检测结果将为产品的质控提供完整的资料。若留样检查发现阳性结果，应及时对生产过程作检查，对已发放的产品立即采取措施停止使用。

2. 非病毒型重组 DNA 基因治疗制品

（1）纯度：超螺旋型的含量，细菌基因组 DNA、RNA 和蛋白残留量。

（2）DNA 结构检测

（3）脂质体、多肽或金属粒子等的来源和性质。由于脂质体的形成及多肽类合成过程的随机性，不可能达到一般化学合成物的均一性及纯度，为此应提供不同批号间保证安全有效的可以达到的最大均一性的程度。

（4）无菌试验

（5）热原质试验

（6）过敏试验

（7）异常毒性试验

（8）介导目的基因的活性检测

（9）有害物质残余量的测定

（五）基因治疗的有效性试验

有效性试验包括：

1. 体外试验

须证明该外源基因导入细胞后，能表达并能达到治疗效果的依据。若属 ex vivo，须提供该细胞中目的基因的表达量及细胞导入体内后预期的效果。

2. 体内试验

提供动物实验结果证明在体内靶组织中基因导入的效率、表达状态及可达到治疗的目的。证明在非靶组织器官中基因表达的分布。动物种类根据实验模

型的需要而定。导入的途径应尽可能接近于临床试验的途径或条件。由于小动物对某些途径（如动脉插管）有一定困难，若改变导入途径须说明原因及依据。

若有些方案在动物中难以观察其疗效（如种族差异），应充分提供有效性的间接或旁证资料或依据。

（六）基因治疗的安全试验

对质控合格的基因治疗制剂，须提供以下安全性试验的资料：

1. 总体安全性评估

除了在质控中已规定的各项要求外，对于 ex vivo 用基因工程化的自体或异体细胞导入人体，应提供以下资料：

（1）生长因子的依赖性细胞，对其生长行为必须予以监检。若某细胞株在传代过程中失去对该生长因子的依赖性，不能再予以使用。

（2）对同种异体细胞的移植，必须从免疫学方面提供其安全性依据。

（3）对异种细胞，必须提供该异种细胞在体内存活的时间及其安全性的依据。

（4）致癌试验。无论是自体或异体细胞，经基因操作后，均须作致癌试验。对于瘤苗类制品，必须提供该瘤细胞经过何种处理能有效地阻止继续增殖的证据。致癌试验包括软琼脂细胞生长及裸鼠内致癌试验。

（5）细胞种类均一性的监控。对瘤苗类制品，应提供如何去除非肿瘤细胞的方法、步骤及其可靠性的依据。若从肿瘤组织中分离非肿瘤细胞（如淋巴细胞），则必须提供消除肿瘤细胞的方法、步骤及其可靠性（包括致癌试验在内）的依据。

（6）复制型病毒的检测，若应用病毒型导入系统必须严格检查复制型病毒。

（7）添加物：除细胞培养及保存所用的试剂外，某些 ex vivo 或 in vivo 导入基因或细胞时，需要加用其它添加物，对此类物质必须有动物实验证明其安全性。

2. 分子遗传学的评估

对 in vivo 的治疗方案，必须提供动物体内重组病毒或重组 DNA 制品导入靶组织与非靶组织的分布情况、基因的表达情况。对于 ex vivo 的方案。须提供导入基因的细胞进入体内后的活性和目的基因的表达情况和分布。

3. 毒性反应的评估

这是安全性试验的重要组成部分。in vivo 的方案必须提供毒性反应的详细资料。除目的基因可能导致的毒性外，导入系统的安全性评价至为重要，其安全性评估应包括急性毒性（最大耐受量）及长期毒性试验。毒性试验所用的剂量，除包括相当于临床使用剂量（按体重或表面积计算）外，尚需有一个较大的剂量范围。剂量范围应包括大于临床使用剂量以确定最大耐受量。给药途径应尽可能模拟临床给药或导入的形式。若改变途径须说明其原因及依据。毒性反应的观察，除常规检测项目外。应包括与基因治疗相关的检测指标。

对于 ex vivo 方案，对瘤苗类或淋巴细胞、巨噬细胞类等自体细胞的导入，一般可免做动物急性和长期毒性试验。但若加入特殊的添加物（如明胶、缝线、特殊的导管等），以及对于某些重要人体脏器内导入（如心、脑、肝等），必须作动物体内毒性作用的试验，并提供详细资料。若 ex vivo 方案添加细胞因子，亦必须提供其安全性的资料。对采用皮肤、皮下、肌肉给药途径的方案，无论是 ex vivo 或 in vivo 均需提供局部刺激性的资料。

4. 免疫学的评估

无论病毒型与非病毒型载体系统，均需注意进入体内后的免疫反应有关的问题，包括过敏反应、排斥反应以及机体的自身免疫反应（如对裸 DNA）等，并对可能发生的免疫反应提出相应的监控及处理措施。

对用于改变机体免疫状态的目的基因及其导入系统（如瘤苗、导入细胞因子基因或输入基因工程化的免疫细胞），更需提供它所引起的机体免疫改变以及可能的副作用的资料（参照《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》）。

5. 致癌试验：见本指导原则相关部分。

（七）基因治疗临床试验方案

基因治疗不同于一般生物技术制品的临床应用，首先是它的复杂性，例如对于 ex vivo 方式，需有经验的临床单位和专家将制品输入或埋入人体的特定组织，甚至通过手术进行操作；二是它的风险性，尚存在许多未知的因素，须对临床研究的全过程进行严密监控，并在申请临床研究时须提供下列资料：

1. 提供申报单位符合 GMP 生产条件的证明。
2. 提供临床研究单位和直接参与研究人员的名单和简历。

3. 明确给药的方式、剂量、时间及疗程。如需通过特殊的手术导入治疗制剂，须提供详细的操作过程。

4. 一般临床指标和实验室检测。

5. 病人及家属的同意书

6. 靶组织和非靶组织的分子生物学检测。

靶组织和非靶组织的分子免疫学检测。若导入重组病毒或可能改变机体免疫状态的制剂，须针对性地提供观察人体免疫学方面的相关检测指标及对可能发生的免疫学反应的必要处理措施。

7. 可能产生的副作用或不良反应的记录，建立实施治疗方案中的事故报告制度。

8. 随访的计划及实施办法。

（八）伦理学考虑

必须充分重视伦理学的原则，并具体按国家药品监督管理局 GCP 规定的要求严格实施。包括在实施本方案前，须向病人说明该治疗方案属试验阶段，它可能的有效性及可能发生的风险，同时保证病人有权选择该方案治疗或中止该方案治疗，以及保证一旦中止治疗能得到其它治疗的权利。严格保护病人的隐私。在病人及家属充分理解并签字后才能开始治疗。

中国医药生物技术协会
细胞培养基生产企业质量达标检查管理指导原则

2011 年 10 月 10 日制定

第一章 总 则

第一条 为了规范细胞培养基的生产，提高细胞培养基产品质量，实现细胞培养基生产领域的行业自律，制定本指导原则。

第二条 细胞培养基质量达标检查由中国医药生物技术协会医药生物技术产品质量控制专业委员会发起，是协会会员为保证细胞培养基质量的一种自发、自愿、自律行动。

第三条 本指导原则适用于本会对会员单位进行细胞培养基质量达标检查的全过程。

第四条 细胞培养基质量达标检查在中国医药生物技术协会监督指导下，由协会会员部组织专家检查组具体实施。

第五条 本指导原则中的“细胞培养基”是指：人工模拟动物细胞在体内生长的营养环境，维持动物细胞生长增殖的营养物质。

第二章 申 请

第六条 凡中国医药生物技术协会会员均可自愿申请细胞培养基质量达标检查。

第七条 申请细胞培养基质量达标检查的会员单位应向协会提供下列材料一式两份：

(一) 细胞培养基质量达标检查申请表（原件）；

- (二) 由企业法人或总经理签署的自愿接受达标检查的声明；
- (三) 企业营业执照和组织机构代码证书（复印件）；
- (四) 企业生产管理和质量管理自查报告（原件）；
- (五) 企业负责人、生产及质量管理人员文化程度登记表、技术人员比例情况表、
组织机构图；
- (六) 企业通过权威认证机构进行质量认证的审计报告和认证证书（复印件）；
- (七) 企业生产的品种及其产量统计表；
- (八) 企业生产车间平面布局图（包括：更衣室、盥洗室、人流和物流通道等，并
标明生产区域洁净度等级）；
- (九) 生产工艺流程图，并标明主要生产过程质量控制要点；
- (十) 主要设备、仪器、空调净化、工艺用水验证情况；
- (十一) 企业生产管理和质量管理文件目录；
- (十二) 至少提供一批产品的完整批记录（复印件）。

第八条 申请细胞培养基质量达标检查的会员单位应向协会交纳申请受理审核费叁仟元人民币。

第九条 协会在收到申请后 30 个工作日内进行相关材料审核，发出受理或不予受理通知。

第十条 申请单位收到受理通知后，需向协会预交检查所需的检查组差旅、食宿、专家劳务费以及抽检样品的检验费。差旅和劳务费按实际发生的费用结算后，由协会开具正式发票（含税）；样品检测费按国家发改委定价收取，由检测机构开具正式发票。

第三章 检 查

第十一条 细胞培养基质量达标检查包括现场检查和样品抽检。

第十二条 协会在收到申请单位预交的检查费用后 30 个工作日内安排现场检查。

第十三条 细胞培养基质量达标检查专家组由质量控制及检定部门、细胞培养基产品使用单位专家等 3—5 人组成。

第十四条 现场检查按《全国细胞培养基生产企业达标检查手册》进行。《全国细胞培养基生产企业达标检查手册》由中国医药生物技术协会医药生物技术产品质量控制专业委员会制定和修订。

第十五条 现场检查同时抽检三批样品。样品检验由中国医药生物技术协会委托中国食品药品检定研究院或其他相关机构按照《细胞培养基质量标准及检验方法》的标准进行全面检定。《细胞培养基质量标准及检验方法》由中国医药生物技术协会医药生物技术产品质量控制专业委员会制定和修订。

第十六条 按照《全国细胞培养基生产企业达标检查手册》评分，需达到以下条件方可视为本次检查通过：1、否决项全部通过；2、重点项目通过率达到或超过 90%；3、一般项目通过率达到或超过 80%；4、抽检样品全部合格。

如以上任一条件未达到，视为本次检查未通过，需一年以后方可重新申请。

第十七条 医药生物技术产品质量控制专业委员会根据现场检查和样品检验的结果得出通过或不通过的结论，由专家组签字后上报协会。

第四章 公告和复审

第十八条 在达标检查通过后，协会在 7 个工作日内，将检查结果上报协会理事长办公会通过。

第十九条 协会理事长办公会通过，于 3 个工作日内向申请单位下发最终检查结果通知和达标证书。并送医药生物技术产品质量控制专业委员会备案。达标证书有效期五年。

第二十条 所有达标单位名单将在协会网站和会刊上公布，同时上报国家食品药品监督管理局。

第二十一条 达标证书有效期满如需更换者，需在有效期满前 6 个月内，向协会提出复审申请。复审合格后，换发新的证书。复审的程序同第二、三章。

第五章 监 督

第二十二条 所有通过检查获得达标证书的企业，必须保证细胞培养基生产质量达到标准的要求，并保证质量的稳定性。

第二十三条 所有通过检查获得达标证书的企业在领取证书时需预交核查费伍万元整，用于本企业样品的抽检或现场检查，有效期满后按实际发生的费用结算。

第二十四条 协会根据用户反馈情况和既往情况对达标企业进行不定期核查。核查包括现场检查和样品抽检。每家企业在达标证书有效期内核查次数不少于 2 次。核查时可以通知也可不通知生产企业，抽检样品可以来自用户或生产现场。

第二十五条 所有已达标企业，需在生产销售的合格细胞培养基产品标签上明显位置印制达标证书号，以便于抽检。

第二十六条 在例行核查过程中，如遇以下情况之一，将收回达标证书：1、现场飞行检查不合格者；2、市场样品抽检不合格，协会将立即安排现场检查，但现场检查仍不合格者；3、连续两次生产企业样品抽检不合格者。

第二十七条 每次核查结果将在协会网站及会刊上公告。

第二十八条 各达标企业应积极配合核查，如无正当理由不得拒绝；否则，视为自动放弃达标证书。

第六章 申 诉

第二十九条 企业如对检查程序或结果存在异议，在收到有关通知后 7 个工作日内，有权向中国医药生物技术协会理事长办公会提出申诉。

第三十条 申诉时须递交书面申诉书，说明理由，并提供相关证明材料。

第三十一条 理事长办公会在收到书面申诉后，于 20 个工作日内进行核实，必要时组织有关专家进行讨论和复审，作出相应处理。

第七章 附 则

第三十二条 本指导原则由中国医药生物技术协会会员部及医药生物技术产品质量控制专业委员会制定并报协会通过。自 2012 年 1 月 1 日起执行。

第三十三条 本指导原则由中国医药生物技术协会负责解释。

免疫细胞制剂制备质量管理自律规范

中国医药生物技术协会

第一章 总 则

第一条 为协助免疫细胞制剂制备机构(以下简称机构)在制备过程中避免污染、交叉污染、混淆及差错,且保证免疫细胞制剂的安全性、生物学效应,参照《药品生产质量管理规范》等相关规定和指导原则,制定本规范。

第二条 本规范所称的免疫细胞是指人体组织来源(骨髓、外周血、胸腹水、脐带血、淋巴结、肿瘤组织等)中获得的用于以治疗为目的免疫细胞。

第三条 本规范适用于免疫细胞制剂制备的所有阶段。

第二章 质量管理体系

第四条 机构应建立与免疫细胞制剂相符的质量管理体系,并配备保证质量管理体系正常运行的对应条件。

第五条 质量管理体系应涵盖影响免疫细胞制剂质量的所有因素,包括物料、免疫细胞制剂的制备、控制、放行、储存和运输的全过程,确保制备的免疫细胞制剂符合预定用途。

第六条 质量管理体系应建立完整的文件体系,包括质量手册、管理文件、标准操作规程、记录,确保系统的有效运行。如采用电子信息系统进行管理,制备机构应建立电子信息系统的设计、运行、使用、升级、变更等管理程序,并对其运行的准确性和完整性进行定期验证。

第七条 质量管理体系应当包括对错误、意外事件、可疑不良事件、偏差、变更和投诉等进行调查、评估、文档记录及报告的程序和措施。

第三章 人 员

第八条 机构应配备与免疫细胞制剂制备相适应的人员,关键人员至少应包括机构负责人、制剂制备负责人、质量管理负责人和质量授权人。制剂制备负责人、质量管理负责人和质量授权人应具有与职责相关的专业知识(细胞生物学、微生物学、生物化学或医药等),同时应具有三年以上的相关工作经验或接受过相应的专业培训。制剂制备负责人与质量管理负责人、质量授权人

不得相互兼任。

第九条 机构应配备专职质量管理负责人，且不得与制剂制备负责人相互兼任。

质量管理负责人应当参与所有与质量有关的活动，负责审核和批准所有与本规范有关的文件。质量管理负责人不得将职责委托给质量受权人以外的人员。

第十条 机构应配备与其规模相适应的、经过培训并获得相应岗位资质的工作人员，仅执行其资质授权的职责，其学历、经历、资格证书、继续教育与健康记录，应予建档保存。

第十一条 机构应当建立人员卫生操作规程，最大限度地降低人员对细胞制备造成污染的风险。人员卫生操作规程应当包括与健康、卫生习惯及人员着装相关的内容。参观人员和未经培训的人员不得进入制备区和质控区。

第十二条 机构应当对工作人员健康进行管理，并建立健康档案。人员上岗前应当接受健康检查，合格者方可从事细胞制剂制备工作，以后每年至少进行一次健康检查。

第十三条 机构应当采取适当措施，避免体表有伤口、患有传染病或其他可能污染制剂疾病的人员从事细胞制备工作。员工患病康复后要求上岗，须到指定医院体检，合格后方可上岗。

第四章 场所及设施

第十四条 免疫细胞制剂制备场所的设计与建设应遵循物理隔离的建筑设计原则，以细胞制剂安全为核心，应能够最大限度地避免污染、交叉污染、混淆和差错，同时确保人员工作环境的安全无害。制备场所的面积应能满足机构开展细胞制剂制备各项功能的需要。

第十五条 免疫细胞制剂制备场所分为洁净区及非洁净区。洁净区各功能区包括细胞制备区、细胞储存区、质控区等，质控区应独立于制备区。非洁净区包括办公室、资料档案室、物料储存室、气体储存室等，不应与洁净区交叉过往。

第十六条 洁净区应当根据制备流程及相应的洁净度级别要求合理设计、布局和使用。洁净区应以温湿度、微粒、微生物、压差为主要控制参数。静态洁净度达到不低于 C 级背景下的 A 级。质控区及其空调系统应单独设立，洁净度级别应与制备区要求一致。

第十七条 医疗废弃物应有独立的放置场所，其处理应按照《医疗废物管理条例》的要求执行。

第十八条 感染性样本与非感染性样本的处理及制备场所应在独立的物理空间。

感染性样本制备间建议采用正压送风过滤后外排，不再回流循环，或采用负压制剂室。污物传递直接通向污物活室。

第十九条 非临床研究目的的工作不得与免疫细胞制剂制备间及设备共用。

第二十条 制备场所应设置门禁，以避免未经授权人员进入。

第五章 设 备

第二十一条 设备的选型、安装、改造和维护必须符合预定用途，且不应不致对细胞制剂、环境及人员安全产生不良影响，应当尽可能降低产生污染、交叉污染、混淆和差错的风险，并置于适当地点以便操作、清洁、维护，以及必要时进行的消毒或灭菌。

第二十二条 应当建立设备采购、安装、使用、清洁、维护维修、校准等操作流程并保存相关记录。经改造或重大维修的设备应当进行再确认，符合要求后方可用于制备。最近期间的使用记录应置于各相关设备附近供查阅。

第二十三条 应当按照操作规程和校准计划定期对制备和检验用衡器、量具、仪表、记录和控制设备以及仪器进行校准和检查，并保存相关记录。校准的量程范围应当涵盖实际制备和检验的使用范围。

第二十四条 感染性样本与非感染性样本的处理及制备所使用的设备不应交叉使用。

第六章 样本及物料

第二十五条 免疫细胞制剂制备所用的物料是指制备及检测过程中所使用的试剂耗材与细胞制剂直接接触的包装材料及外包装材料。

第二十六条 免疫细胞制剂制备所用的样本及物料应当符合相应的质量标准。进口物料应当符合国家相关的进口管理规定。

第二十七条 应当建立样本及物料的操作规程，确保样本及物料的正确标识、接收、检验、储存、发放、使用和发运，防止污染、交叉污染、混淆和差错。

第二十八条 样本及物料接收应准确记录，记录应包括交货单和包装容器上所注样本及物料的名称，机构内部所用样本及物料名称和（或）代码，接收日期，供应商和生产商（如不同）的名称，供应商和生产商（如不同）标识的批号，质量报告，接收总量和包装容器数量，接收后机构指定的批号或流水号，有关说明（如包装状况）。

第二十九条 样本及物料的外包装应当有标签，并注明规定的信息，必要时还应当进行清洁，发现外包装损坏或其他可能影响样本及物料质量的情况应当向质量管理部门报告，并进行调查和记录。

第三十条 样本及物料应当根据其性质有序分批贮存和周转，发放及发运应当符合先进先出和近效期先出的原则。

第三十一条 使用计算机化仓储管理的，应当有相应操作规程，防止因系统故障、停机等特殊情况下而造成样本、物料和产品的混淆和差错。使用完全计算机化仓储管理系统进行的，物料等相关信息可不以书面可读的方式标出。

第三十二条 机构应建立物料的质量标准，并检验和放行。对生物活性的试剂，机构应有相应的措施确定效期和保存条件，并在有效期内使用，并建立相应的程序验证试剂的有效性。

第三十三条 物料供应商和样本采集机构的确定及变更应当对其提供的物料和样品进行检测和质量评估，并经质量管理部门批准后方可采购和接收。

第三十四条 机构自制的试剂（如血浆、抗原等），应建立质量标准、编号及批号编制操作规程、制备记录，并经检验合格后使用，每种物料均应当编制唯一的编号。

第三十五条 样本的要求：

样本包括人体组织来源的骨髓、外周血、胸腹水、脐带血、淋巴结、肿瘤组织等，应按照如下要求进行接收：

（一）样本的信息：来源、体积/重量、采集方式、采集时间、采集机构与人员，运输方式、运输时间；

（二）样本的接收要求包括包装完整、标签完整清晰、样本运输方式和时间符合要求；

（三）样本送达时应附细胞制备申请单，内容包括：

1. 供者基本信息：姓名、性别、年龄、身份证号等必要信息；
2. 供者的临床医学信息：既往史、现病史、临床诊断、病理诊断；
3. 实验室检测的结果：血常规及分类、病毒四项检查（HIV、HCV、HBV、梅毒）、肝肾功能；
4. 治疗方案：细胞的种类、治疗次数、回输方式等；
5. 知情同意书。

第三十六条 培养基的要求：

（一）免疫细胞体外扩增培养应避免使用异种、异体血清或血浆。所有成分应明确并符合无菌、低内毒素的质量标准。

（二）若培养基中含有人的血液成分，如白蛋白等，应明确其来源、批号、

质量检定合格报告，并尽量采用国家已批准的可临床应用产品。如上述成分未获国家批准临床应用，应参照国家对相应产品质控要点，提供质量标准，并对每批产品提供详尽的质量检定报告。

(三) 培养基禁用 β -内酰胺类抗生素，应尽量避免使用其他类型抗生素。

第七章 工 艺

第三十七条 免疫细胞制剂的制备包括样本的接收、细胞操作、包装的全过程。

免疫细胞制剂的制备应当按照经过验证后批准的工艺规程和操作规程的要求进行，并有相关记录，以确保细胞制剂达到规定的质量标准。

第三十八条 进行细胞制剂制备前，应再次确认细胞样本符合接收的要求。在制备中使用的物料进行再次确认和核对，符合要求方可使用，并作相应记录。

第三十九条 制备开始前应按照清场操作规程进行检查，确保设备和制备场所没有上批遗留的产品、文件或与本批产品制备无关的物料，设备处于已清洁及待用状态。检查结果应当有记录。

第四十条 在感染性样本的制备区内，操作人员应当穿戴该区域专用的防护服。

第四十一条 应当建立细胞制剂批号编制规程和确定收获日期的操作规程。收获日期应明确日期及时间。每批细胞制剂均应当编制唯一的批号。

第四十二条 每次制备结束后应当进行清场，确保设备和制备场所没有遗留与本次制备有关的物料、产品和文件。

第四十三条 应当尽可能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，应当按照偏差处理操作规程执行。

第四十四条 采用经过验证或已知有效的清洁和去污染操作规程对环境、设备和器械进行清洁灭菌；必要时，应当对与物料直接接触的设备表面的残留物进行检测。

第四十五条 细胞制剂制备过程所用试剂应按照产品说明进行使用。对未使用完毕的试剂，机构应有相应的措施确定效期和保存条件，并在有效期内使用，并建立相应的程序验证试剂的有效性。

第四十六条 包装操作规程应当规定降低污染和交叉污染、混淆或差错风险的措施。

第四十七条 包装操作前，还应当检查所领用的包装材料正确无误，核对待包装产品和所用包装材料的名称、规格、数量、质量状态，且与工艺规程相符。

第四十八条 细胞制剂分装、封口后应当及时贴签。同一操作空间不能同时有其他批次细胞存在，避免发生混淆或贴错标签等差错。

第四十九条 因包装过程产生异常情况而需要重新包装细胞制剂的,必须经专门检查、调查并由指定人员批准。重新包装应当有详细记录。

第五十条 机构应留取每批细胞制剂样本至少到疗程治疗结束后三个月。

第八章 检测与放行

第五十一条 机构应具有免疫细胞制剂的检测能力,并配备相关专业技术人员和设备,建立制剂质量控制检测标准和操作规程,确立制剂质量检验和放行的操作规程。

第五十二条 质控标准检测应参照现行版《中国药典》生物制品相关规程,检测项目至少包括内毒素检测、无菌检测、支原体检测、细胞数量、效应细胞比率、细胞存活率、细胞表型等。

第五十三条 机构内部应在免疫细胞制剂制备过程中开展质量检测,制剂的检验应当由机构负责人指定有资质的人员进行。机构可以委托有资质的第三方开展制剂的质量检测。检测结果应当有质量负责人或质量授权人审核。

第五十四条 对于机构用于质量检验的仪器设备的可靠性、准确性、精确性和运行状态的监控应当有明确规定。

第五十五条 符合放行标准的免疫细胞制剂由质量管理负责人或质量授权人批准后方可放行。放行标准应包括:细胞免疫治疗申请单、免疫细胞制剂制备记录、免疫细胞制剂质量检验报告、免疫细胞制剂标签、免疫细胞制剂包装、免疫细胞制剂放行单等。

第五十六条 受到污染和(或)违反本规范所制造的免疫细胞制剂不得放行,并记录;同时向质量管理负责人汇报。

第五十七条 仅细胞数量不符合放行标准的免疫细胞制剂在对细胞制剂的紧急医疗需求下,经主治医师申请,机构质量负责人签字同意后放行。

第九章 储存与运输

第五十八条 应建立储存与运输管理制度和标准操作规程,以防止细胞制剂与物料的混杂、混淆、变质、污染、交叉污染及任何对细胞制剂效用与完整性的不良影响,并防止不当的放行。

第五十九条 免疫细胞制剂应在特定的温度下储存,以保证细胞的活性及完整性。

(一)以液体状态储存的细胞制剂应当在特定的温度范围内储存以维护存活

率和功能，时间不应超过操作规程中规定的时限。

（二）冻存的细胞制剂应当在操作规程中规定的温度范围内储存，此温度范围适用于细胞制剂和使用的冷冻保护液。

第六十条 细胞制剂与物料应分别储存，感染性与非感染性应分别储存。应当建立避免交叉污染和混淆的操作规程。

第六十一条 应有机制确保液氮冻存柜中的液氮水平得到持续的维护以保证细胞制剂保持在特定的温度范围内。

第六十二条 用于存放细胞制剂或试剂的储存设备应有持续工作的报警系统。警报应当设置预警温度和液氮水平，以保障有充分的时间处理细胞制剂。

第六十三条 如果工作人员不是一直在储存设备的附近区域，在办公区域合适的位置应建立能在异常情况向多个负责人和工作人员发出警告的报警系统。报警系统应当有声音信号或者其他有效的通知方法。

第六十四条 机构应根据免疫细胞制剂的种类、制备程序、贮存条件、稳定性及包装来制定其有效期。因故无法符合贮存条件时，应采取纠正措施并作记录。

第六十五条 免疫细胞制剂运输前，机构应检验并记录其是否符合放行标准。运输的条件应由质控负责人员核准并作记录。

第六十六条 免疫细胞制剂在运输过程中应建立相应的管理制度和操作规程，经确效后执行，并应做到以下要求：

（一）运输过渡时间应当缩到最短；

（二）直接接触细胞制剂的容器应放在另一个密封无泄漏的次级容器里；

（三）细胞样本和制剂运输至非毗邻的机构应当放在由能抵御内容物泄漏、碰撞压力、压力改变、温度改变、戳刺的材料制成的外部容器里进行运输；

（四）要求温度控制的细胞制剂和长时间转移或运输的细胞制剂应当在经验证能维持在规定温度范围内的容器中进行转移或运输；

（五）运输容器应当根据相关法律和管理规范中关于使用低温材料和生物物质运输的规定进行标注；

（六）细胞样本和制剂的转移和（或）运输应当有随同记录，细胞样本的随同记录包括供者、采集者的姓名、采集方式、时间及注意事项；细胞制剂的随同信息应包括制备者、运输者、检测报告，未完成检测项目应注明及接受者的名称、地址、联系方式等；

（七）感染性和非感染性细胞样本或细胞制剂应分别置于独立的容器中运输。

第六十七条 免疫细胞制剂不应通过用于检测金属物体的 X 射线装置。如果检查是必须的，容器内容物应当人工检查。

第六十八条 转移和运输记录应当能追溯免疫细胞制剂从一个机构到另一个机构的流转过程。转移和运输记录应当包括：免疫细胞制剂发放和接受的日期和时间、运输过程中的任何延误或其他的突发状况引起的问题及相应的处置记录。

第十章 标识与追溯

第六十九条 机构应建立一套完整的标识标签系统和免疫细胞制剂编码系统，以确保细胞制剂的辨识并防止制剂混杂，确保细胞制剂的唯一性和可追溯性。标注应当遵循相关法律和规范的要求。

第七十条 免疫细胞制剂的标识标签系统包括对细胞制剂制备全过程样本接收、制备、储存、检验、发放、运输和使用进行标注管理。在有追溯要求的情况下，实现细胞制剂的可追溯性。

第七十一条 免疫细胞制剂标签的内容应包括供者姓名、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（精确时间）等。

第七十二条 免疫细胞制剂制备区标识包括但不限于功能区/区标识、状态标识、警示标识等，避免发生混淆和差错。免疫细胞制剂制备过程中使用的容器、设备或设施所用标识应当清晰明了。除在标识上使用文字说明外，还可采用不同的颜色区分被标识物的状态（如感染性和非感染性等）。

第七十三条 标签宜在细胞制剂制备负责人或指定人员审核并确认与已批准的标准模板保持一致性后，方可使用。用于不同细胞制剂的未使用的标签库存应当以受到控制管理的方式存放以避免错误。废弃标签必须销毁。

第七十四条 标签程序必须建立检查体系，以防止将信息转移到标签时发生错误。标注程序中应逐项核对，以避免转移信息到标签上时出错。输入到容器标签上的信息应当双人复核。

第七十五条 标签附在容器上时，应当确保容器上留有足够的区域能够检查其中的内容物。从原容器分离之前，细胞制剂必须贴上新标签，随后重新包装进新的容器。标签在各个阶段都应当呈现在细胞制剂包装上。

第七十六条 每份免疫细胞制剂必须编制唯一的编码，通过它能追溯到供者来源以及该细胞制剂操作和最终处理的所有记录，并建立相关程序能够关联新旧编码。

（一）同一供者提供的样本、血浆、组织等采集时必须使用相同的编码及识别码进行标识区分；

（二）如果同一供者来源的不同免疫细胞被合并，合并后的标识应能够追踪

到原样本和制剂。

第七十七条 细胞制剂容器只能贴加部分标签的，容器上须至少贴上制剂的独特数字或字母识别符，并附详细产品信息说明单，其内容应包括完整产品信息，并以恰当的方式与该制剂一同保存。

第七十八条 机构将免疫细胞制剂运输至临床应用的医疗机构时或之前，应以书面方式告知其相关追溯的规定要求，将经植入、移植、输入、转移至接受者的细胞制剂，都记载于接受者的病历或相关联的记录。

第十一章 附 则

第七十九条 本规范为机构开展免疫细胞制剂制备质量管理的基本要求。机构应当根据各自的实际情况（如经基因修饰的免疫细胞制剂的制备）确定是否还需要遵照其他的规范。

第八十条 出于标准的使用，本规范条款称“应”时，指的是应当在任何时候都遵循这条标准。本规范条款称“宜”时，指的是这是项推荐和建议的活动，同时也可能有其他有效的处理方案。本规范条款称“可”时，是允许的意思，主要用来明细事宜。

第八十一条 本规范下列术语含义是：

静态：是指所有细胞制备设备均已安装就绪，但没有制备活动且无操作人员在场的状态。

供者：细胞制剂的细胞或组织所来源的个体。

标注：用于标识原始细胞制剂制备和其他任何制备细胞制剂的步骤，包括完成相关审查的步骤和贴附相应标签的步骤。

放行：当符合特定标准时，将产品从隔离状态或处理状态中取出。

放行标准：细胞制剂离开制备机构的监控必须满足的要求。

采集时间：细胞治疗产品采集程序结束时的当天时间。

收获日期：细胞培养过程中，当细胞数量、细胞表型或某种产物等达到一定的指标后，将细胞从培养容器中移出，去除培养基后加入适宜的保护液用于特定的目的，这个时间段称为细胞收获日期。

紧急医疗需求：在没有细胞制剂治疗的情况下，接受者有可能死亡或者有严重病情。

验证：用检查和客观证据来确认能够始终如一的达到特定的要求。一个流程可以通过客观事实来验证，即这个流程生产出的细胞制剂能够满足起初定义的规范。

感染性样本：从感染性疾病患者采集的组织或细胞。

非感染性样本：从健康个体或无感染性疾病患者采集的组织或细胞。

第八十二条 本规范自发布之日起实施。

（2016 年 10 月 10 日）

中国医药生物技术协会

干细胞制剂制备质量管理检查指导原则

2018年4月24日修订

第一章 总则

第一条 为规范干细胞制剂的制备，提高干细胞制剂制备的质量管理，实现干细胞制剂制备领域的行业自律，根据《中国医药生物技术协会章程》、《中国医药生物技术协会行业自律工作制度》、《干细胞制剂制备质量管理自律规范》等文件规定制定本指导原则。

第二条 干细胞制剂制备质量管理检查由中国医药生物技术协会再生医学分会和骨组织库分会发起，是协会会员单位为保证干细胞制剂制备质量管理的一种自发、自愿、自律行为。

第三条 本指导原则适用于本会对会员单位进行干细胞制剂制备质量管理检查的全过程。

第四条 干细胞制剂制备质量管理检查在中国医药生物技术协会监督指导下，由协会秘书处组织实施。

第五条 本指导原则中的“干细胞制剂”应符合《干细胞制剂制备质量管理自律规范》中的规定。

第二章 申请

第六条 凡中国医药生物技术协会会员单位均可自愿申请干细胞制剂制备质量管理检查，初次申请单位应至少运行六个月以上。

第七条 申请干细胞制剂制备质量管理检查的会员单位应向协会秘书处提供下列材料一式两份：

(一) 干细胞制剂制备质量管理检查申请表（原件）；

(二) 由机构法人签署的自愿接受检查的声明；

- (三) 机构营业执照和组织机构代码证书（复印件）；
- (四) 干细胞制剂制备质量管理自查报告（原件）；
- (五) 机构负责人、制备负责人、质量负责人及其他质量管理人员情况表、技术人员比例情况表、组织机构图；
- (六) 制备的干细胞制剂品种及其产量统计表；
- (七) 制备机构车间概况及各功能区平面图（包括：细胞制备区、质量检测区、细胞贮存区、物料库区、医疗废物存放区、辅助区、人流和物流通道等，并标明所有洁净区的洁净度等级）；
- (八) 制备工艺流程图，并标明主要制备过程质量控制要点；
- (九) 主要设备、仪器、空气净化、工艺用水（如适用）等的验证情况；
- (十) 干细胞制剂制备质量管理文件目录；
- (十一) 每种干细胞制剂至少提供一批制剂的完整批记录。
- (十二) 具备资质的第三方检验机构出具的干细胞制剂质量复核报告。

第八条 协会在收到申请后 5 个工作日内进行相关材料的形式审核。

第九条 在形式审查合格后，申请单位与协会签订技术服务合同，并按照合同提供资料专家审查、现场检查等相关费用。

第十条 在申请单位经费到账后 30 日内，协会组织专家对申报材料进行评审，根据专家评审意见，给出受理或退回申请的通知。退回申请的，按照合同约定，退回除资料专家审查以外的其他费用。

第三章 检查

第十一条 干细胞制剂制备机构质量检查为现场检查。

第十二条 协会在发出受理通知后，制定检查方案，与申请单位确定现场检查日期。

第十三条 干细胞制剂制备质量管理达标现场检查组由质量控制及检定部门专家 3-5 人和协会领队 1-2 人组成。

第十四条 现场检查按照《干细胞制剂制备质量管理自律规范检查手册》进行。《干细胞制剂制备质量管理自律规范检查手册》由中国医药生物技术协会制定和修订。

第十五条 申请单位有权对现场检查人员提出回避的要求，需提出切实可信的理由，协会采纳后，可对专家组相关人员进行调整。

第十六条 专家组对照《干细胞制剂制备质量管理自律规范检查手册》打分，得出现场检查通过或不通过的结论，签字后上报协会。

第十七条 需达到以下条件方可视为检查通过：1、按照《干细胞制剂制备质量管理自律规范检查手册》评分，未发现严重缺陷项目；2、主要缺陷项目通过率不低于 90%；3、一般缺陷项目通过率不低于 80%。

如以上任一条件未达到，视为检查未通过，需整改后，运行六个月以上后，方可重新申请。

第四章 公告和复审

第十八条 在检查通过后，协会将检查结果上报协会理事长办公会审议。

第十九条 协会理事长办公会通过后，协会秘书处于 7 个工作日内向申请单位下发最终检查结果通知和质量合格证书。合格证书有效期五年。

第二十条 质量管理合格的单位名单将在协会网站和会刊上公布。同时向国家相关管理部门通报。

第二十一条 质量管理合格证书有效期满需更换，可向协会再次提出申请。

第五章 监督

第二十二条 通过检查获得合格证书的单位，在证书有效期内应按照《干细胞制剂制备质量管理自律规范》的要求，保证质量管理的稳定性。

第二十三条 在证书有效期内，协会不定期对获得证书的单位进行核查，并对干细胞制剂进行质量跟踪，对出现产品质量问题的单位进行有因核查。

第二十四条 核查为现场检查，可以事先通知检查对象，也可事先不通知（即飞行检查）。

第二十五条 在证书有效期内，如遇以下情况之一，将收回达标证书：1、协会核查不合格或国家有关部门现场检查后通报不合格；

2、产品质量不合格或有严重不良反应报告后，协会将立即安排现场检查，但现场检查不合格。

第二十六条 核查结果将在协会网站和会刊上公告。

第二十七条 各合格单位应积极配合核查，如无正当理由不得拒绝；否则，视为自动放弃合格证书。

第六章 申诉

第二十八条 单位如对检查程序或结果存在异议，可在收到有关通知后7个工作日内向中国医药生物技术协会提出申诉。

第二十九条 申诉时须递交书面申诉书，说明理由，并提供相关证明材料。

第三十条 协会在收到书面申诉后，于20个工作日内进行核实，必要时组织有关专家进行讨论和复审，做出相应处理。

第七章 附则

第三十一条 本指导原则由中国医药生物技术协会制定。自 2018 年 5 月 21 日起执行。

第三十二条 本指导原则由中国医药生物技术协会负责解释。

· 细胞治疗 · 研究评价 ·

CAR-T 细胞治疗产品中复制型病毒的风险分析及控制

吴雪伶, 赵翔, 孟淑芳* (中国食品药品检定研究院, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 100050)

摘要: 嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T细胞) 因其在血液肿瘤中的显著疗效已成为肿瘤免疫治疗领域中的国际研究新热点, 成为肿瘤治愈新的希望。目前, 在CAR-T细胞产品的生产中, 通常是利用逆转录病毒载体或慢病毒载体将CAR基因高效地导入T细胞中, 但在使用这些病毒载体的同时也带来了CAR-T产品污染复制型逆转录病毒 (RCR) 或复制型慢病毒 (RCL) 的潜在风险。虽然随着病毒载体设计及生产体系的不断改进, 这种风险已大大降低, 但仍不能完全排除。因此, 监管机构要求对于临床使用的慢病毒或逆转录病毒载体、转导的CAR-T细胞产品以及患者均要进行复制型病毒的检测。本文主要通过分析复制型病毒污染检测的必要性、降低复制型病毒污染风险的措施、复制型病毒检测的阶段以及检测方法等方面, 提出在CAR-T细胞生产过程中控制RCR/RCL的策略, 以供CAR-T细胞产品研发者参考。

关键词: 嵌合抗原修饰T细胞 (CAR-T细胞); 逆转录病毒载体; 慢病毒载体; 复制型病毒

中图分类号: R392-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7777(2018)07-0879-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.07.006

Risk Analysis and Control of Replication Competent Virus in CAR-T Cell Therapy Products

Wu Xueling, Zhao Xiang, Meng Shufang* (National Institutes for Food and Drug Control, The Key Laboratory of Biotechnology Product Test Method and Its Standardization, National Health Commission, Beijing 100050, China)

Abstract: Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) has become a new research focus in the field of tumor immunotherapy due to its remarkable therapeutic effects in hematological tumors, and has become a new hope for the cure of cancer. At present, retroviral vectors or lentiviral vectors are commonly used to efficiently introduce CAR gene into T cells in the production of CAR-T cell products. However, the use of these vectors may cause the risk of contamination of CAR-T cell products with replication competent retroviruses (RCR) or replication competent lentiviruses (RCL). Although this risk has been greatly reduced with the continuous improvement of virus vector design and production systems, it cannot be completely eliminated. Therefore, Regulatory agencies require the detection of replicative viruses for the clinically used lentivirus or retroviral vectors, transduced CAR-T cell products and patients. This article mainly focuses on the necessity of the replication competent virus contamination detection, the measures to reduce the risk of replication competent virus pollution, the stage

基金项目: 国家科技重大专项“创新生物药评价及标准化关键技术研究”(编号2018ZX09101001)

作者简介: 吴雪伶, 博士, 副研究员; 研究方向: 病原生物学; Tel: (010) 67095414; E-mail: wuxueling46@sina.com

通信作者: 孟淑芳, 博士, 研究员; 研究方向: 病原生物学; Tel: (010) 67095414; E-mail: mengsf@263.net

of replication competent virus detection and the detection methods, and putting forward the consideration for controlling RCR/RCL in the process of CAR-T cell production for reference by CAR-T cell product developers.

Keywords: chimeric antigen receptor T cell (CAR-T); retroviral vectors; lentiviral vectors; replication competent virus

目前,嵌合抗原受体T细胞(Chimeric Antigen Receptor T Cell, CAR-T)治疗产品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,已经成为肿瘤免疫治疗领域中新的国际研究热点。2017年8月及10月美国FDA分别批准了2个针对血液肿瘤的CD19-CAR-T细胞治疗产品上市,我国也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。但总体来看,我国CAR-T细胞治疗产品的研发还处于起步阶段,因此,为推进我国CAR-T细胞治疗产品的产业化发展,由中国食品药品检定研究院牵头起草并在CAR-T细胞基础研究与产品研发单位的大力支持下,于近期共同完成并发布了《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》^[1](简称《要点》),为CAR-T研发提供更具有操作性的参考。

在CAR-T细胞治疗产品的制备过程中,通常利用逆转录病毒载体或慢病毒载体将CAR基因高效地导入T细胞中^[2-4],这也同时带来了产品安全性方面一个备受关注的问题,即复制型逆转录病毒(Replication Competent Retroviruses, RCR)或复制型慢病毒(Replication Competent Lentivirus, RCL)污染的潜在风险。针对该风险,FDA及欧盟先后出台了相关文件^[5-8],要求建立灵敏、可靠的RCR/RCL检测方法,对于使用 γ -逆转录病毒载体及慢病毒载体生产的基因治疗产品,需要在生产及应用的不同阶段进行RCR/RCL的控制,包括生产病毒的细胞库、终末细胞、病毒载体及CAR-T细胞,并对CAR-T细胞回输后的患者个体进行监测^[5-7],以保证患者不受RCL的感染。笔者在前述《要点》中同样提出了该风险控制的要求,本文即在此《要点》的基础上,进一步分析讨论复制型病毒污染检测的必要性、降低复制型病毒污染风险的措施、复制型病毒检测的阶段以及检测方法等方面,并提出在CAR-T细胞生产过程中控制RCR/RCL的策略,以进一步提高CAR-T细胞治疗产品的安全性。

1 关注RCR/RCL污染风险的必要性

目前,制备CAR-T细胞所用的 γ -逆转录病毒载体和慢病毒载体均为复制缺陷型载体,理论上已经极大地降低了产生复制型病毒的风险,但病毒载体的制备方法以及制备过程中仍存在产生RCR或RCL的潜在风险,如病毒载体生产过程中因穿梭载体、包装载体及包装细胞中的内源性逆转录元件之间,或病毒载体与T细胞的内源性逆转录元件之间发生同源或非同源重组,从而导致RCR或RCL产生^[9-11]。

RCR/RCL对患者的风险表现在两个方面:一方面,它们同逆转录病毒载体一样可以整合在细胞基因组中,从而产生因整合出现的激活原癌基因、破坏抑癌基因或使促细胞生长的因子表达增高而造成二次肿瘤的风险;另一方面,因其具有复制性,即可产生具有复制能力的病毒,加之采用了可感染多种细胞的膜蛋白,大大增加了整合而造成二次肿瘤的风险。比如,尽管早期的研究显示,鼠 γ -逆转录病毒MLV在非人灵长类动物中并不能造成严重的安全性问题^[12-13],但研究者在一项对严重免疫缺陷恒河猴进行体外输注骨髓祖细胞的试验中发现,在输注 γ -逆转录病毒载体转导的骨髓祖细胞的10只动物中,有3只动物发生了淋巴瘤,并在200天内死亡^[14],原因分析结果显示,动物的淋巴瘤组织中可检测到RCR,并且在感染的动物中可检测到RCR引起的 γ -逆转录病毒血症^[15],因而证实引起动物发生淋巴瘤的真凶正是RCR,是由于转导骨髓祖细胞的 γ -逆转录病毒载体污染RCR所致。再如,自然界中的慢病毒,因受其病毒结合受体及宿主的限制性因子的制约,感染通常具有种属特异性,如HIV-1/2在人类可引起艾滋病,马传染性贫血病毒(Equine Infectious Anemia Virus, EIAV)会引起马的复发性发热伴病毒血症、血小板减少和消耗症状,猫免疫缺陷病毒(Feline Immunodeficiency Virus, FIV)会引起猫免疫缺陷综合症等。但是,为了扩大感染细胞的类型,慢病毒载体的包膜通

常采用其它病毒的膜蛋白进行替换,如常用的VSV-G膜蛋白,即可能形成的RCL是假型病毒,这样就能特异地感染人源细胞,因此,可能会增加RCL污染而带来的潜在风险。因此,使用逆转录病毒载体生产的基因治疗产品中RCR/RCL的污染风险始终是药品监管机构的一个重要的关注点。

2 降低产生RCR/RCL风险的措施

在逆转录病毒载体发展的过程中,研究者一直在采取多种措施以降低RCR/RCL的风险,包括载体的设计、病毒载体包装方法等。

早期的 γ -逆转录病毒生产系统仅去除了病毒的包装序列^[16],具有包装功能的病毒结构基因与转导载体之间比较容易发生重组而产生RCR。于是,人们在病毒载体生产体系上做了多次改进,如PA317包装细胞体系,该系统首先删除了病毒基因组的包装信号,同时将3' LTR替换为SV40病毒上的多聚腺苷酸位点,并将5' LTR删除^[17],这样可以去除多个逆转录和整合所必需的信号,从而降低了RCR产生的风险,这也是第一个被用于人体基因转移试验的病毒载体系统^[18-19]。但PA317包装体系仍然具有可产生RCR的倾向性^[14],因此,该系统又被鼠GP+envAml2系统所取代^[20],该系统通过将Gag-Pol表达基因和Env表达基因分开置于不同的质粒上,并且通过降低载体和包装序列间的同源性,进一步降低了RCR产生的风险^[20-22]。而在PG13包装体系中^[23],人们利用长臂猿白血病病毒(Gibbon Ape Leukemia Virus, GALV)的包膜来代替 γ -逆转录病毒载体的包膜,形成假型 γ -逆转录病毒载体颗粒,而这种GALV包膜假型病毒可能能够通过抑制病毒载体的再次感染,而降低重组的发生。另外,越来越多的人源细胞被用于 γ -逆转录病毒载体的生产^[24-27],由于人类基因组中不含有与 γ -逆转录病毒序列同源的DNA序列,因此,可大大降低RCR产生的几率。

此外,Yu等人还建立了 γ -逆转录病毒自我失活(Self Inactivating, SIN)病毒载体^[28],即将 γ -逆转录病毒载体3'端LTR的U3区删除,该区域包含病毒的强启动子和增强子,在病毒逆转录过程中,3' LTR的U3区会被复制并被转移至5'端,将此U3区删除后,使载体自我失活,导致病毒不能利用自身的启动子进行基因的表达,而只能利用细胞类型特异的启动子进行基因的表达,这样

可进一步降低病毒载体与内源性逆转录病毒发生重组的风险。

与 γ -逆转录病毒相比,慢病毒具有更为复杂的基因组结构,除结构基因gag-pol和env外,还含有调节功能基因tat、rev及辅助调节基因vif、vpr、vpu和nef。第一代慢病毒载体包含了HIV的大部分基因组元件,但将这些元件置于不同的质粒上,如采用三质粒系统,其中穿梭质粒仅含有目的基因、LTR区及与反转录和包装相关的基因,一个包装质粒含有除HIV Env基因外的所有病毒基因元件,另一个包装质粒表达其它病毒来源的膜蛋白,如通常使用的VSV-G膜蛋白^[29-30],从而降低重组和RCL的产生风险。其后,研究者发现,在体外培养系统中,HIV基因组上的4种辅助调节基因vif、vpr、vpu和nef对于病毒复制并不是必需的,且还与病毒的病变效应有关,因此,在第二代慢病毒载体系统中,将这4种辅助调节基因剔除^[31-32],使RCL的产生风险进一步降低。在目前常用的第三代慢病毒载体系统中,三质粒系统在剔除4种辅助调节基因的基础上,再次将tat基因剔除^[31],而且为了进一步降低重组的发生和复制型病毒的产生,将gag/pol和rev基因分别置于不同的质粒上,即形成四质粒包装系统,这种设计不仅可使RCL产生的风险再次降低,同时,即使在慢病毒载体生产中产生了RCL,也会使RCL的致病性降低。另外,与 γ -逆转录病毒载体相同,在慢病毒基因组的3' LTR U3区引入缺失突变,破坏LTR中的启动子/增强子活性,形成SIN病毒载体,进一步提高了载体的安全性^[31]。

从第一代到第三代,慢病毒载体系统得到了不断改进,安全性不断提高,到目前为止,使用第一代到第三代慢病毒载体系统所生产的病毒载体的临床试验均未发现RCL污染的案例。近期,Cornetta K和Maruccia KT等人分别发表了较大样本量的RCL污染调查研究的论文,一篇论文的研究对象包括460份CAR-T细胞及296份CAR-T细胞输注病人样本^[33]。另一篇论文的研究对象包括17份病毒载体、375份CAR-T细胞产品及308份CAR-T细胞输注病人样本^[34]。两项研究均显示,在所有被检测的样本中,不论是病毒载体,还是CAR-T细胞样本及接受治疗的患者样本,均未发现RCL污染^[33-34],进一步证实了目前使用的慢病毒载体具有较高的安

全性。另外,基于研究数据^[3],研究者认为,对病毒载体进行充分的RCL检测对确保CAR-T细胞成品无RCL污染具有关键作用。

3 RCR/RCL检测的阶段

虽然通过以上病毒制备系统的改进,已大大降低RCR/RCL产生的风险,但仍不能完全排除,因此,美国FDA要求对于 γ -逆转录病毒载体和慢病毒载体,需要在生产的整个过程及不同阶段进行RCR/RCL检测,以确保无RCR/RCL的污染^[6-7]。对于RCR的控制,需对载体生产用主细胞库、工作细胞库、生产终末细胞、载体上清液及在体外培养超过4天的载体转导细胞进行检测。对于RCL的控制,由于慢病毒载体生产目前尚不能使用稳转细胞株,因此,RCL检测点主要包括生产病毒载体的终末细胞、载体上清液和载体转导的细胞。另外,在临床研究中,对于接受载体转导细胞输注的患者,应对病人样本进行RCR/RCL的检测。同样,在发布的《要点》中,也分别在逆转录病毒生产的稳转细胞的细胞库、生产终末细胞、病毒载体及CAR-T细胞治疗产品这几个质控阶段设置了相应的检测要求。

与FDA检测载体上清液的观点稍有不同,欧洲药典中则要求,对纯化后的病毒载体进行RCR/RCL的检测。从理论上来说,在病毒载体的制备过程中,因复制型病毒的产生与病毒载体特点及载体设计有关,是病毒载体生产体系自身存在的风险,而非外源引入。因此,在对病毒载体进行RCR或RCL检测时,用病毒载体收获液或纯化后的病毒载体进行检测均具有一定的合理性,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,但为达到有效的检出,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或RCL同样也会得到浓缩,检测时可能需要相对小的样本量,同时,也可直接反映出转导的病毒载体中是否含有RCR或RCL,但也存在纯化工艺可能会对原本含量可能很低的RCR或RCL造成破坏从而影响检出的风险。基于病毒载体中RCL污染的检测在整个生产工艺及临床应用的重要性^[3],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成品中RCR/RCL污染的风险。

4 RCR/RCL检测的方法

建立高敏感的RCR/RCL检测方法是提高CAR-T产品安全性的另一个重要措施。目前,RCR/RCL的检测方法主要包括针对特定基因(如VSV-G基因、psi-gag基因或GALV基因)的PCR法或QPCR法以及敏感细胞感染试验法。为了提高试验的灵敏度,FDA推荐利用以细胞培养为基础的感染性试验进行RCR/RCL的检测,该方法首先将可能存在的RCR/RCL在敏感细胞上扩增,并在培养终点利用敏感、快速的检测方法进行检测。有效的感染试验法首先要求RCR/RCL可以感染敏感细胞,其次要求在敏感细胞中可产生感染性病毒颗粒并释放出来,且感染试验要具有足够的灵敏度,可以检出低MOI的阳性对照病毒。

4.1 RCR检测方法

目前应用较多的检测RCR的方法包括2种类型的细胞感染性试验,即S+/L-试验和标记拯救试验^[3]。在这些试验中需先有一个扩增阶段,即将待检样本与敏感细胞共培养至少3周,将可能存在的RCR进行扩增,再将扩增后的样本接种到检测的指示细胞上,通过病变或特定产物表达显示是否存在RCR。

在S+/L-试验中,用于扩增RCR的最常用的细胞为Musdunni细胞,该细胞可用于鼠双嗜性 γ -逆转录病毒的扩增,但不适用于具有GALV包膜的 γ -逆转录病毒的扩增,对于GALV病毒,可使用293细胞进行扩增。在检测阶段使用指示细胞,如猫星型胶质细胞系PG-4^[30],该细胞系是一个S+/L-细胞系,它含有鼠肉瘤病毒基因组(S+),但缺少鼠白血病毒基因组(L-),只有在细胞中同时表达鼠肉瘤病毒和鼠白血病毒时,细胞才会出现病变。基于该原理,当将扩增阶段的细胞培养上清液接种到PG-4细胞上时,如果细胞发生病变,则表明样品污染了RCR。

标记拯救试验的原理是用于RCR扩增的敏感细胞系中含有一个带标记基因的 γ -逆转录病毒载体^[21],在检测阶段,将扩增阶段收集的上清液接种到初始培养的扩增细胞上,如果存在RCR污染,RCR的基因组和带标记基因的 γ -逆转录病毒载体将会被RCR包装,感染细胞后,RCR将会使标记基因表达。

4.2 RCL检测方法

目前已经建立的RCL检测方法还并不多。最初

建立的RCL PCR检测方法是通过检测牛Jembrana病毒载体感染上清液中的tat序列来检测RCL^[37]。但是目前通常使用的第三代以HIV-1为基础的慢病毒载体中，tat基因已从载体中被删除，因此，该方法已不适用。合胞体形成试验也被用于RCL的检测^[38]，即将病毒载体或转导细胞在HIV敏感细胞系进行培养，检测合胞体的形成，但该试验适用于具有完全复制能力的且含有HIV包膜的慢病毒的检测，不一定适用于HIV-1载体中RCL的检测。而基于逆转录酶活性检测的方法，虽然该方法灵敏度较高且可用于筛选广谱的逆转录病毒，但该方法可能会受到细胞状态或培养基的影响造成试验背景高和假阳性的结果^[39-40]。

FDA推荐的RCL检测方法是利用敏感细胞对病毒载体中可能存在的RCL进行培养扩增，并在培养终点进行检测^[7]。由于人T细胞系C8166对HIV及以VSV-G为包膜的慢病毒载体均具有高度的敏感性，因此多被用于RCL的扩增培养与检测^[41-43]。该方法是将病毒载体与C8166共孵育培养21天，用于扩增潜在污染的RCL，然后，收集扩增的培养上清液，再接种于C8166细胞上，继续培养7天，培养结束时，检测病毒蛋白或核酸。常用的检测方法包括针对Gag区P24抗原的ELISA检测^[44]、针对逆转录酶的产物增强型逆转录酶活性检测（PERT）试验^[39-40]、针对载体质粒和包装质粒间重组产生的Psi-PG序列的PCR方法以及针对VSV-G包膜基因的PCR方法^[42]。

C8166感染试验除了病毒扩增阶段外，同样需要设置检测指示阶段，其目的在于降低2种情况可能造成的假阳性结果：首先，如待检测的样本为浓缩后的病毒载体，其P24抗原含量可能较高，对于这种样本即使经过3周的传代仍然可能有较低水平的P24抗原被检出，造成假阳性结果；其次，病毒载体和包装质粒间可能会发生重组^[42]，尽管该重组并不一定形成RCL，但会造成PCR法的假阳性结果，而通过指示阶段的再培养可大大降低假阳性结果的发生，从而确保检测到真正的RCL。

在细胞扩增及指示阶段检测中，需设置病毒阳性对照，若以HIV弱毒株为阳性对照病毒，即辅助蛋白编码调节基因缺失的HIV-1病毒^[41]，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的实验室开展试验；若以其它非HIV骨架的慢病毒载体作为阳性对照，可以在P2生物安全实验室进行病毒培养并开展方法学研究和样本检测。

5 结语

综上所述，对CAR-T细胞治疗产品进行RCR/RCL的控制，需要从病毒载体设计、病毒载体生产体系的不断改进完善、建立高灵敏及高效的检测方法以及在生产的不同阶段进行检测等多种措施来共同降低RCR/RCL产生的风险。在检测方法上，虽然RCR/RCL细胞感染试验具有较高的灵敏度，但该试验耗时长、工作量大，且形成系统的风险评估方法尚需一定的时间，因此，在CAR-T细胞产品临床试验早期，可考虑以灵敏且假阳性低的PCR快速检测方法作为RCR/RCL的检测方法^[45-46]，同时，基于现有的RCR/RCL监测的报道^[33-34]以及数据的不断积累，在确证性临床阶段以及上市前，对生产用细胞及病毒载体样本进行充分的RCR/RCL检测，而对CAR-T细胞产品采用快速检测方法放行，同时保留样本备查的策略可能会更好地控制RCR/RCL的风险。

参考文献：

- [1] 中国食品药品检定研究院. 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 [J]. 中国药事, 2018, 32 (6): 829-852.
- [2] Fraietta JA, Beckwith KA, Patel PR, et al. Ibrutinib Enhances Chimeric Antigen Receptor T-cell Engraftment and Efficacy in Leukemia [J]. Blood, 2016, 127 (9): 1117-1127.
- [3] Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2016, 13 (6): 370-383.
- [4] Wang X, Popplewell LL, Wagner JR, et al. Phase I Studies of Central Memory-derived CD19 CAR T-cell Therapy Following Autologous HSCT in Patients with B-cell NHL [J]. Blood, 2016, 127 (24): 2980-2990.
- [5] Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 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 [J]. Hum Gene Ther, 2001, 12 (3): 315-320.
- [6] U.S. Food and Drug Administration. 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[EB/OL].[2018-06-18]. <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm072961.htm>.2006.
- [7] U.S. Food and Drug Administration. Testing for Replication Competent Retrovirus (RCR)/Lentivirus (RCL) in Retroviral and Lentiviral Vector Based Gene Therapy Products — Revisiting Current FDA Recommendations[EB/OL].[2018-06-18].<https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:MteHO12KSXcJ:https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/CellularTissueandGeneTherapiesAdvisoryCommittee/UCM250027.ppt&cd=2&hl=en&et=clnk&gl=us>, 2010.
- [8] European Medicines Agency. Guideline on Development and Manufacture of Lentiviral Vectors[EB/OL].[2018-06-18]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003984.pdf, 2005.
- [9] Chong H, Starkey W, Vile RC. A Replication-competent Retrovirus Arising from a Split-function Packaging Cell Line was Generated by Recombination Events Between the Vector, one of the Packaging Constructs, and Endogenous Retroviral Sequences [J]. J Virol, 1998, 72 (4): 2663-2670.
- [10] Garrett E, Miller AR, Goldman JM, et al. Characterization of Recombination Events Leading to the Production of an Ecotropic Replication-competent Retrovirus in a GP+envAM12-derived Producer Cell Line [J]. Virology, 2000, 266 (1): 170-179.
- [11] Urnovitz HB, Murphy WH. Human Endogenous Retroviruses: Nature, Occurrence, and Clinical Implications in Human Disease [J]. Clin Microbiol Rev, 1996, 9 (1): 72-99.
- [12] Cornetta K, Moen RC, Culver K, et al. Amphotropic Murine Leukemia Retrovirus is Not an Acute Pathogen for Primates [J]. Hum Gene Ther, 1990, 1 (1): 15-30.
- [13] Cornetta K, Morgan RA, Gillio A, et al. No Retroviremia or Pathology in Long-term Follow-up of Monkeys Exposed to a Murine Amphotropic Retrovirus [J]. Hum Gene Ther, 1991, 2 (3): 215-219.
- [14] Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, et al. Helper Virus Induced T Cell Lymphoma in Nonhuman Primates After Retroviral Mediated Gene Transfer [J]. J Exp Med, 1992, 176 (4): 1125-1135.
- [15] Vanin EF, Kaloss M, Broscius C, et al. Characterization of Replication-competent Retroviruses from Nonhuman Primates with Virus-induced T-cell Lymphomas and Observations Regarding the Mechanism of Oncogenesis [J]. J Virol, 1994, 68 (7): 4241-4250.
- [16] Mann R, Mulligan RC, Baltimore D. Construction of a Retrovirus Packaging Mutant and Its Use to Produce Helper-free Defective Retrovirus [J]. Cell, 1983, 33 (1): 153-159.
- [17] Miller AD, Buttimore C. Redesign of Retrovirus Packaging Cell Lines to Avoid Recombination Leading to Helper Virus Production [J]. Mol Cell Biol, 1986, 6 (8): 2895-2902.
- [18] Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, et al. Gene Transfer into Humans-immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction [J]. N Engl J Med, 1990, 323 (9): 570-578.
- [19] Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T Lymphocyte-directed Gene Therapy for ADA-SCID: Initial Trial Results After 4 Years [J]. Science, 1995, 270 (5235): 475-480.
- [20] Markowitz D, Goff S, Bank A. Construction and Use of a Safe and Efficient Amphotropic Packaging Cell Line [J]. Virology, 1988, 167 (2): 400-406.
- [21] Danos O, Mulligan RC. Safe and Efficient Generation of Recombinant Retroviruses with Amphotropic and Ecotropic Host Ranges [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85 (17): 6460-6464.
- [22] Markowitz D, Goff S, Bank A. A Safe Packaging Line for Gene Transfer: Separating Viral Genes on Two Different Plasmids [J]. J Virol, 1988, 62 (4): 1120-1124.
- [23] Miller AD, Garcia JV, von Suhr N, et al. Construction and Properties of Retrovirus Packaging Cells Based on Gibbon Ape Leukemia Virus [J]. J Virol, 1991, 6 (5): 2220-2224.
- [24] Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, et al. High-titer

- Packaging Cells Producing Recombinant Retroviruses Resistant to Human Serum [J]. *J Virol*, 1995, 69 (12): 7430-7436.
- [25] Forestell SP, Dando JS, Chen J, et al. Novel Retroviral Packaging Cell Lines: Complementary Tropisms and Improved Vector Production for Efficient Gene Transfer [J]. *Gene Ther*, 1997, 4 (6): 600-610.
- [26] Sheridan PL, Bodner M, Lynn A, et al. Generation of Retroviral Packaging and Producer Cell Lines for Large-scale Vector Production and Clinical Application: Improved Safety and High Titer [J]. *Mol Ther*, 2000, 2 (3): 262-275.
- [27] Ghani K, Cottin S, Kamen A, et al. Generation of a High-titer Packaging Cell Line for the Production of Retroviral Vectors in Suspension and Serum-free Media [J]. *Gene Ther*, 2007, 14 (24): 1705-1711.
- [28] Yu SF, von Ruden T, Kantoff PW, et al. Self-inactivating Retroviral Vectors Designed for Transfer of Whole Genes into Mammalian Cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83 (10): 3194-3198.
- [29] Cronin J, Zhang XY, Reiser J. Altering the Tropism of Lentiviral Vectors Through Pseudotyping [J]. *Curr Gene Ther*, 2005, 5 (4): 387-398.
- [30] Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector [J]. *Science*, 1996, 272 (5259): 263-267.
- [31] Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A Third-generation Lentivirus Vector With a Conditional Packaging System [J]. *J Virol*, 1998, 72 (11): 8463-8471.
- [32] Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, et al. Self-inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient in vivo Gene Delivery [J]. *J Virol*, 1998, 72 (12): 9873-9880.
- [33] Cornetta K, Duffy L, Turtle CJ, et al. Absence of Replication-Competent Lentivirus in the Clinic: Analysis of Infused T Cell Products [J]. *Mol Ther*, 2018, 26 (1): 80-288.
- [34] Marucci KT, Jadowsky JK, Hwang WT, et al. Retroviral and Lentiviral Safety Analysis of Gene-Modified T Cell Products and Infused HIV and Oncology Patients [J]. *Mol Ther*, 2018, 26 (1): 269-279.
- [35] Sastry L, Cornetta K. Detection of Replication Competent Retrovirus and Lentivirus [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 506: 243-263.
- [36] Haapala DK, Robey WG, Oroszlan SD, et al. Isolation from Cats of an Endogenous Type C Virus with a Novel Envelope Glycoprotein [J]. *J Virol*, 1985, 53 (3): 827-833.
- [37] Metharom P, Takyar S, Xia HH, et al. Novel Bovine Lentiviral Vectors Based on Jembrana Disease Virus [J]. *J Gene Med*, 2000, 2 (3): 176-185.
- [38] Chang LJ, Urlacher V, Iwakuma T, et al. Efficacy and Safety Analyses of a Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Derived Vector System [J]. *Gene Ther*, 1999, 6 (5): 715-728.
- [39] Sastry L, Xu Y, Duffy L, et al. Product-enhanced Reverse Transcriptase Assay for Replication-competent Retrovirus and Lentivirus Detection [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16 (10): 1227-1236.
- [40] Miskin J, Chipchase D, Rohll J, et al. A Replication Competent Lentivirus (RCL) Assay for Equine Infectious Anaemia Virus (EIAV)-based Lentiviral Vectors [J]. *Gene Ther*, 2006, 13 (3): 196-205.
- [41] Escarpe P, Zayek N, Chin P, et al. Development of a Sensitive Assay for Detection of Replication-competent Recombinant Lentivirus in Large-scale HIV-based Vector Preparations [J]. *Mol Ther*, 2003, 8 (2): 332-341.
- [42] Sastry L, Xu Y, Johnson T, et al. Certification Assays for HIV-1-based Vectors: Frequent Passage of Gag Sequences Without Evidence of Replication-competent Viruses [J]. *Mol Ther*, 2003, 8 (5): 830-839.
- [43] Manilla P, Rebello T, Afable C, et al. Regulatory Considerations for Novel Gene Therapy Products: a Review of the Process Leading to the First Clinical Lentiviral Vector [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16 (1): 17-25.
- [44] Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, et al. High-titer Human Immunodeficiency Virus Type 1-based Vector Systems for Gene Delivery into Nondividing Cells [J]. *J Virol*, 1998, 72 (11): 8873-8883.
- [45] Martineau D, Klump WM, McCormack JE, et al. Evaluation of PCR and ELISA Assays for Screening Clinical Trial Subjects for Replication-competent Retrovirus [J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8 (10): 1231-1241.
- [46] Skrdlant LM, Armstrong RJ, Keidaisch BM, et al. Detection of Replication Competent Lentivirus Using a qPCR Assay for VSV-G [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018, 8: 1-7.

(收稿日期 2018年6月21日 编辑 王雅雯)



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	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 基本原则	2
4.1 总体要求	2
4.2 人员	2
4.3 物料	2
4.4 设施和设备	3
5 载体制备	3
5.1 质粒制备	3
5.2 非病毒载体制备	3
5.3 病毒载体制备	3
6 CAR-T 细胞制备及质量控制	4
6.1 T 细胞的采集和分离	4
6.2 CAR-T 细胞制备	4
6.3 CAR-T 细胞制剂的质量控制	5
6.4 CAR-T 细胞冻存、运输与复苏	5
6.5 CAR-T 细胞制剂的放行	6
7 追溯	6
8 保密	6
参考文献	7

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废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：

- 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:

- 鉴别试验;
- 复制型病毒(RCR/RCL)检测(生产时的批次和冻存复苏时的批次);
- 无菌试验;
- 内毒素检测;
- 支原体检测;
- 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;
- 病毒滴度测定;
- 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:

- 患者姓名缩写、筛选号或入组编号或其他唯一识别码;
- 患者临床诊断,肿瘤特异性靶点信息;
- 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授权人签字审核。
- 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 细胞制剂制剂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 CAR-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.
-

关于印发干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）的通知

发布时间：2015-07-31

各省、自治区、直辖市卫生计生委、食品药品监管局，新疆生产建设兵团卫生局、食品药品监管局，国家卫生计生委直属有关单位，食品药品监管总局直属有关单位：

为加强我国干细胞制剂和临床研究质量管理，国家卫生计生委与食品药品监管总局根据《干细胞临床研究管理办法（试行）》，共同组织制定了《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》（可从国家卫生计生委或食品药品监管总局网站下载）。现印发给你们，请遵照执行。

国家卫生计生委办公厅 食品药品监管总局办公厅
2015年7月31日

干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）

一. 前言

二. 干细胞制剂的质量控制

- （一）干细胞的采集、分离及干细胞（系）的建立
- （二）干细胞制剂的制备
- （三）干细胞制剂的检验
- （四）干细胞制剂的质量研究

三. 干细胞制剂的临床前研究

- （一）安全性评价
- （二）有效性评价

名词解释

参考文献

一. 前言

干细胞是一类具有不同分化潜能，并在非分化状态下自我更新的细胞。干细胞治疗是指应用人自体或异体来源的干细胞经体外操作后输入（或植入）人体，用于疾病治疗的过程。这种体外操作包括干细胞的分离、纯化、扩增、修饰、干细胞（系）的建立、诱导分化、冻存和冻存后的复苏等过程。用于细胞治疗的干细胞主要包括成体干细胞、胚胎干细胞及诱导的多能性干细胞（iPSC）。成体干细胞包括自体或异体、胎儿或成人不同分化组织，以及发育相伴随的组织（如脐带、羊膜、胎盘等）来源的造血干细胞、间充质干细胞、各种类型的祖细胞或前体细胞等。

目前国内外已开展了多项干细胞（指非造血干细胞）临床应用研究，涉及多种干细胞类型及多种疾病类型。主要疾病类型包括骨关节疾病、肝硬化、移植物宿主排斥反应（GVHD）、脊髓损伤及退行性神经系统疾病和糖尿病等。其中许多干细胞类型，是从骨髓、脂肪组织、脐带血、脐带或胎盘组织来源的间充质干细胞，它们具有一定的多向分化潜能及抗炎和免疫调控能力等。

用于干细胞治疗的细胞制备技术和治疗方案，具有多样性、复杂性和特殊性。但作为一种新型的生物治疗产品，所有干细胞制剂都可遵循一个共同的研究过程，即从干细胞制剂的制备、体外试验、体内动物试验，到植入人体的临床研究及临床治疗的过程。整个过程的每一阶段，都须对所使用的干细胞制剂在细胞质量、安全性和生物学效应方面进行相关的研究和质量控制。

本指导原则提出了适用于各类可能应用到临床的干细胞（除已有规定的造血干细胞移植外）在制备和临床前研究阶段的基本原则。每个具体干细胞制剂的制备和使用过程，必须有严格的标准操作程序并按其执行，以确保干细胞制剂的质量可控性以及治疗的安全性和有效性。每一研究项目所涉及的具体干细胞制剂，应根据本指导原则对不同阶段的基本要求，结合各自干细胞制剂及适应证的特殊性，准备并实施相关的干细胞临床前研究。

二. 干细胞制剂的质量控制

（一）干细胞的采集、分离及干细胞（系）的建立

1. 对干细胞供者的要求

每一干细胞制剂都须具有包括供者信息在内的、明确的细胞制备及生物学性状信息。作为细胞制备信息中的重要内容之一，需提供干细胞的获取方式和途径以及相关的临床资料，包括供者的一般信息、既往病史、家族史等。既往史和家族史要对遗传病（单基因和多基因疾病，包括心血管疾病和肿瘤等）相关信息进行详细采集。对于异体干细胞临床研究的供者，必须经过检验筛选证明无人源特定病毒（包括 HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、CMV 等）的感染，无梅毒螺旋体感染。必要时需要收集供者的 ABO 血型、HLA-I 类和 II 类分型资料，以备追溯性查询。如使用体外授精术产生的多余胚胎作为建立人类胚胎干细胞系的主要来源，须能追溯配子的供体，并接受筛选和检测。不得使用既往史中患有严重的传染性疾病和家族史中有明确遗传性疾病的供者作为异体干细胞来源。

自体来源的干细胞供者，根据干细胞制剂的特性、来源的组织或器官，以及临床适应证，可对供体的质量要求和筛查标准及项目进行调整。

2. 干细胞采集、分离及干细胞（系）建立阶段质量控制的基本要求

应制定干细胞采集、分离和干细胞（系）建立的标准操作及管理程序，并在符合《药品生产质量管理规范》（GMP）要求基础上严格执行。标准操作程序应包括操作人员培训；材料、仪器、设备的使用和管理；干细胞的采集、分离、纯化、扩增和细胞（系）的建立；细胞保存、运输及相关保障措施，以及清洁环境的标准及常规维护和检测等。

为尽量减少不同批次细胞在研究过程中的变异性，研究者在干细胞制剂的制备阶段应对来源丰富的同一批特定代次的细胞建立多级的细胞库，如主细胞库（Master Cell Bank）和工作细胞库（Working Cell Bank）。细胞库中细胞

基本的质量要求，是需有明确的细胞鉴别特征，无外源微生物污染。

在干细胞的采集、分离及干细胞（系）建立阶段，应当对自体来源的、未经体外复杂操作的干细胞，进行细胞鉴别、成活率及生长活性、外源致病微生物，以及基本的干细胞特性检测。而对异体来源的干细胞，或经过复杂的体外培养和操作后的自体来源的干细胞，以及直接用于临床前及临床研究的细胞库（如工作库）中的细胞，除进行上述检测外，还应当进行全面的内外源致病微生物、详细的干细胞特性检测，以及细胞纯度分析。干细胞特性包括特定细胞表面标志物群、表达产物和分化潜能等。

（二）干细胞制剂的制备

1. 培养基

干细胞制剂制备所用的培养基成分应有足够的纯度并符合无菌、无致病微生物及内毒素的质量标准，残留的培养基对受者应无不良影响；在满足干细胞正常生长的情况下，不影响干细胞的生物学活性，即干细胞的“干性”及分化能力。在干细胞制剂制备过程中，应尽量避免使用抗生素。

若使用商业来源培养基，应当选择有资质的生产商并由其提供培养基的组成成分及相关质量合格证明。必要时，应对每批培养基进行质量检验。

除特殊情况外，应尽可能避免在干细胞培养过程中使用人或动物源性血清，不得使用同种异体人血清或血浆。如必须使用动物血清，应确保其无特定动物源性病毒污染。严禁使用海绵体状脑病流行区来源的牛血清。

若培养基中含有人的血液成份，如白蛋白、转铁蛋白和各种细胞因子等，应明确其来源、批号、质量检定合格报告，并尽量采用国家已批准的可临床应用的产品。

2. 滋养层细胞

用于体外培养和建立胚胎干细胞及 iPS 细胞的人源或动物源的滋养层细胞，需根据外源性细胞在人体中使用所存在的相关风险因素，对细胞来源的供体、细胞建立过程引入外源致病微生物的风险等进行相关的检验和质量控制。建议建立滋养层细胞的细胞库，并按细胞库检验要求进行全面检验，特别是对人源或动物源特异病毒的检验。

3. 干细胞制剂的制备工艺

应制定干细胞制剂制备工艺的标准操作流程及每一过程的标准操作程序（SOP）并定期审核和修订；干细胞制剂的制备工艺包括干细胞的采集、分离、纯化、扩增和传代，干细胞（系）的建立、向功能性细胞定向分化，培养基、辅料和包材的选择标准及使用，细胞冻存、复苏、分装和标记，以及残余物去除等。从整个制剂的制备过程到输入（或植入）到受试者体内全过程，需要追踪观察并详细记录。对不合格并需要丢弃的干细胞制剂，需对丢弃过程进行规范管理并记录。对于剩余的干细胞制剂必须进行合法和符合伦理要求的处理，包括制定相关的 SOP 并严格执行。干细胞制剂的相关资料需建档并长期保存。

应对制剂制备的全过程，包括细胞收获、传代、操作、分装等，进行全面的工艺研究和验证，制定合适的工艺参数和质量标准，确保对每一过程的有效控制。

（三）干细胞制剂的检验

1. 干细胞制剂质量检验的基本要求

为确保干细胞治疗的安全性和有效性，每批干细胞制剂均须符合现有干细胞知识和技术条件下全面的质量要求。制剂的检验内容，须在本指导原则的基础上，参考国内外有关细胞基质和干细胞制剂的质量控制指导原则，进行全面的细胞质量、安全性和有效性的检验。同时，根据细胞来源及特点、体外处理程度和临床适应证等不同情况，对所需的检验内容做必要调整。另外，随着对干细胞知识和技术认识的不断增加，细胞检验内容也应随之不断更新。

针对不同类型的干细胞制剂，根据对输入或植入人体前诱导分化的需求，须对未分化细胞和终末分化细胞分别进行必要的检验。对胚胎干细胞和 iPS 细胞制剂制备过程中所使用的滋养细胞，根据其细胞来源，也需进行针对相关风险因素的质量控制和检验。

为确保制剂的质量及其可控性，干细胞制剂的检验可分为质量检验和放行检验。质量检验是为保证干细胞经特定体外处理后的安全性、有效性和质量可控性而进行的较全面质量检验。放行检验是在完成质量检验的基础上，对每一类型的每一批次干细胞制剂，在临床应用前所应进行的相对快速和简化的细胞检验。

为确保制剂工艺和质量稳定性，须对多批次干细胞制剂进行质量检验；在制备工艺、场地或规模等发生变化时，需重新对多批次干细胞制剂进行质量检验。制剂的批次是指由同一供体、同一组织来源、同一时间、使用同一工艺采集和分离或建立的干细胞。对胚胎干细胞或 iPS 细胞制剂，应当视一次诱导分化所获得的可供移植的细胞为同一批次制剂。对需要由多个供体混合使用的干细胞制剂，混合前应视每一独立供体或组织来源在相同时间采集的细胞为同一批次细胞。

对于由不同供体或组织来源的、需要混合使用的干细胞制剂，需对所有独立来源的细胞质量进行检验，以尽可能避免混合细胞制剂可能具有的危险因素。

2. 细胞检验

2.1 质量检验

（1）细胞鉴别

应当通过细胞形态、遗传学、代谢酶亚型谱分析、表面标志物及特定基因表达产物等检测，对不同供体及不同类型的干细胞进行综合的细胞鉴别。

（2）存活率及生长活性

采用不同的细胞生物学活性检测方法，如活细胞计数、细胞倍增时间、细胞周期、克隆形成率、端粒酶活性等，判断细胞活性及生长状况。

（3）纯度和均一性

通过检测细胞表面标志物、遗传多态性及特定生物学活性等，对制剂进行细胞纯度或均一性的检测。对胚胎干细胞及 iPS 细胞植入人体前的终末诱导分化产物，必须进行细胞纯度和/或分化均一性的检测。

对于需要混合使用的干细胞制剂，需对各独立细胞来源之间细胞表面标志物、细胞活性、纯度和生物学活性均一性进行检验和控制。

(4) 无菌试验和支原体检测

应依据现行版《中华人民共和国药典》中的生物制品无菌试验和支原体检测规程，对细菌、真菌及支原体污染进行检测。

(5) 细胞内外源致病因子的检测

应结合体内和体外方法，根据每一细胞制剂的特性进行人源及动物源性特定致病因子的检测。如使用过牛血清，须进行牛源特定病毒的检测；如使用胰酶等猪源材料，应至少检测猪源细小病毒；如胚胎干细胞和 iPS 细胞在制备过程中使用动物源性滋养细胞，需进行细胞来源相关特定动物源性病毒的全面检测。另外还应检测逆转录病毒。

(6) 内毒素检测

应依据现行版《中华人民共和国药典》中的内毒素检测规程，对内毒素进行检测。

(7) 异常免疫学反应

检测异体来源干细胞制剂对人总淋巴细胞增殖和对不同淋巴细胞亚群增殖能力的影响，或对相关细胞因子分泌的影响，以检测干细胞制剂可能引起的异常免疫反应。

(8) 致瘤性

对于异体来源的干细胞制剂或经体外复杂操作的自体干细胞制剂，须通过免疫缺陷动物体内致瘤试验，检验细胞的致瘤性。

(9) 生物学效力试验

可通过检测干细胞分化潜能、诱导分化细胞的结构和生理功能、对免疫细胞的调节能力、分泌特定细胞因子、表达特定基因和蛋白等功能，判断干细胞制剂与治疗相关的生物学有效性。

对间充质干细胞，无论何种来源，应进行体外多种类型细胞（如成脂肪细胞、成软骨细胞、成骨细胞等）分化能力的检测，以判断其细胞分化的多能性（Multipotency）。对未分化的胚胎干细胞和 iPS 细胞，须通过体外拟胚胎体形成能力，或在 SCID 鼠体内形成畸胎瘤的能力，检测其细胞分化的多能性（Pluripotency）。除此以外，作为特定生物学效应试验，应进行与其治疗适应症相关的生物学效应检验。

(10) 培养基及其他添加成分残余量的检测

应对制剂制备过程中残余的、影响干细胞制剂质量和安全性的成分，如牛血清蛋白、抗生素、细胞因子等进行检测。

2.2 放行检验

项目申请者应根据上述质量检验各项中所明确的检验内容及标准，针对每一类型干细胞制剂的特性，制定放行检验项目及标准。放行检验项目应能在相对短的时间内，反映细胞制剂的质量及安全信息。

3. 干细胞制剂的质量复核

由专业细胞检验机构/实验室进行干细胞制剂的质量复核检验，并出具检验报告。

（四）干细胞制剂的质量研究

在满足上述干细胞制剂质量检验要求的基础上，建议在临床前和临床研究各阶段，利用不同的体外实验方法对干细胞制剂进行全面的安全性、有效性及稳定性研究。

1. 干细胞制剂的质量及特性研究

1.1 生长活性和状态

生长因子依赖性的检测：在培养生长因子依赖性的干细胞时，需对细胞生长行为进行连续检测，以判断不同代次的细胞对生长因子的依赖性。若细胞在传代过程中，特别是在接近高代次时，失去对生长因子的依赖，则不能再继续将其视为合格的干细胞而继续培养和使用。

1.2 致瘤性和促瘤性

由于大多数间充质干细胞制剂具有相对的弱致瘤性，建议在动物致瘤性试验中，针对不同类型的干细胞，选择必要数量的细胞和必要长的观察期。

在动物致瘤性试验不能有效判断致瘤性时，建议检测与致瘤性相关的生物学性状的变化，如细胞对生长因子依赖性的改变、基因组稳定性的改变、与致瘤性密切相关的蛋白（如癌变信号通路中的关键调控蛋白）表达水平或活性的改变、对凋亡诱导敏感性的改变等，以此来间接判断干细胞恶性转化的可能性。

目前，普遍认为间充质干细胞“不致瘤”或具有“弱致瘤性”，但不排除其对已存在肿瘤的“促瘤性”作用。因此，建议根据各自间充质干细胞制剂的组织来源和临床适应证的不同，设计相应的试验方法，以判断其制剂的“促瘤性”。

1.3 生物学效应

随着研究的进展，建议针对临床治疗的适应证，不断研究更新生物学效应检测方法。如研究介导临床治疗效应的关键基因或蛋白的表达，并以此为基础提出与预期的生物学效应相关的替代性生物标志物（Surrogate Biomarker）。

2. 干细胞制剂稳定性研究及有效期的确定

应进行干细胞制剂在储存（液氮冻存和细胞植入前的临时存放）和运输过程中的稳定性研究。检测项目应包括细胞活性、密度、纯度、无菌性等。

根据干细胞制剂稳定性试验结果，确定其制剂的保存液成份与配方、保存及运输条件、有效期，同时确定与有效期相适应的运输容器和工具，以及合格的细胞冻存设施和条件。

3. 快速检验方法的研究

应根据新的干细胞基础及实验技术研究成果，针对各自干细胞制剂的特性、特定的临床适应证，研发新的快速检验方法，用于干细胞制备过程各阶段的质量控制和制剂的放行检验。

三. 干细胞制剂的临床前研究

应进行干细胞制剂的临床前研究，为治疗方案的安全性和有效性提供支持和依据。

在临床前研究方案中，应设计和提出与适应证相关的疾病动物模型，用于预测干细胞在人体内可能的治疗效果、作用机制、不良反应、适宜的输入或植入途径和剂量等临床研究所需的信息。

应在合适的动物模型基础上，研究和建立干细胞有效标记技术和动物体内干细胞示踪技术，以便于研究上述内容，特别是干细胞的体内存活、分布、归巢、分化和组织整合等功能的研究。在综合动物模型研究基础上，应对干细胞制剂的安全性和生物学效应进行合理评价。

鉴于干细胞治疗的特殊性，其临床前的安全有效性评价具有较大难度和局限性，以下只提出一些基本的原则，具体的研究方案可根据这些原则制定。如进行的相关研究工作与下述原则不符，应提供相应的依据和支持性资料。

（一）安全性评价

1. 毒性试验

可通过合适的动物试验模型观察干细胞制剂各种可能的毒性反应，如细胞植入时和植入后的局部和整体的毒性反应。

如难以采用相关动物评价人干细胞的毒性，可考虑尽可能模拟临床应用方式，采用动物来源相应的干细胞制剂，以高于临床应用剂量回输动物体内，观察其毒性反应。

2. 异常免疫反应

对干细胞制剂特别是异体来源、经体外传代培养和特殊处理的自体或异体来源的制剂，应当通过体外及动物试验评价其异常免疫反应，包括对不同免疫细胞亚型及相关细胞因子的影响。对胚胎干细胞及 iPS 细胞，在体外诱导分化后重新表达供体的 HLA 抗原分子，植入体内后可能形成的免疫排斥反应，需进行有效评价。

3. 致瘤性

对高代次的或经过体外复杂处理和修饰的自体来源以及各种异体来源的干细胞制剂，应当进行临床前研究阶段动物致瘤性评估。建议选择合适的动物模型，使用合适数量的干细胞、合理的植入途径和足够长的观察期，以有效评价制剂的致瘤性。

4. 非预期分化

非预期分化包括非靶细胞分化或非靶部位分化。建议利用特定的检测技术，在体内动物试验中研究、评估和监控干细胞非预期分化的可能性。

（二）有效性评价

1. 细胞模型（见前述—干细胞制剂的质量研究）

2. 动物模型

用于观察植入的干细胞或其分化产物改变模型中疾病的病理进程；研究干细胞的归巢能力和免疫调节功能；通过分析干细胞植入后，特定细胞因子和/或

特定基因表达情况，提出替代性生物学效应标志物。

若所申请的研究方案，因目前国际上干细胞生物学知识和技术方面的局限性，无法提出有效的体内动物模型研究内容，则应在临床前研究报告中进行全面细致的说明。

名词解释：

干细胞制剂 (Stem cell-based medicinal products)：是指用于治疗疾病或改善健康状况的、以不同类型干细胞为主要成分、符合相应质量及安全标准，且具有明确生物学效应的细胞制剂。

胚胎干细胞 (Embryonic stem cell)：源自第 5-7 天的胚胎中内细胞团的初始（未分化）细胞，可在体外非分化状态下“无限制地”自我更新，并且具有向三个胚层所有细胞分化的潜力，但不具有形成胚外组织（如胎盘）的能力。

成体干细胞 (Somatic stem cell)：位于各种分化组织中未分化的干细胞，这类干细胞具有有限的自我更新和分化潜力。

间充质干细胞 (Mesenchymal stromal/stem cell, MSC)：一类存在于多种组织(如骨髓、脐带血和脐带组织、胎盘组织、脂肪组织等)，具有多向分化潜力，非造血干细胞的成体干细胞。这类干细胞具有向多种间充质系列细胞（如成骨、成软骨及成脂肪细胞等）或非间充质系列细胞分化的潜能，并具有独特的细胞因子分泌功能。

祖细胞 (Progenitors)：一类只能向特定细胞系列分化，并且只具备有限的分裂增殖能力的成体细胞。

前体细胞 (Precursors)：一类只能向特定终末分化细胞分化的，较祖细胞更有限的增殖能力的成体细胞。

造血干细胞 (Hematopoietic stem cell)：具有高度自我更新能力和多向分化潜能的造血前体细胞，可分化成红细胞、白细胞、血小板和淋巴细胞。

诱导的多能性干细胞 (Induced pluripotent stem cell, iPS)：一类通过基因转染等细胞重编程技术人工诱导获得的，具有类似于胚胎干细胞多能性分化潜力的干细胞。

胚胎干细胞系 (Embryonic stem cell line)：在体外培养的条件下，可保持未分化状态连续增殖的胚胎干细胞。

全能性 (Totipotent)：是早期数天胚胎中，具有分化成机体所有类型细胞和形成完全胚胎能力的干细胞。

亚全能性(Pluripotent)：是具有形成机体各种类型细胞，即所有三胚层来源细胞的能力，但不具有形成胚外胎组织细胞的能力。

多能性(Multipotent)：是指具有形成机体内超过一种类型细胞的能力，但往往是针对特定细胞系列的。

滋养层细胞(Feeder layer)：是指通过细胞-细胞相互作用，或分泌蛋白或其他物质，位于胚胎干细胞和 iPS 细胞的培养底层，以支持这些干细胞生长的动物源性或人源性细胞。

畸胎瘤(Teratoma)：一种含有三个胚层组织细胞和分化的组织的良性肿瘤。

参考文献：

1. 《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》(2003)
2. 《中华人民共和国药典》2010 版，第三部。
3. 王军志等。《生物技术药物研究开发和质量控制》(第二版)，科学出版社，2007。
4. European Pharmacopeia-Method 5.2.3-Cell substrates for the production of vaccines for human use.
5. WHO - Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks (2010).
6. FDA Guidance for Industry-Characterization and Qualification of Cell Substrates and other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications (2010)
7. ICH Guidelines-Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell lines of Human or Animal Origin-Q5A(R1)-1999.
8. ICH Guidelines-Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products-Q5D-1997.
9. Dominici M., et al. Minimum criteria for defining multipotent stem cells-The ISCT position statement.2006;8 (4) : 315-317(2006).
10. ISSCR Guidelines for clinical translation of stem cells (2008)
11. FDA Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy (1998)
12. FDAGuidance-Content and review of CMC information for human somatic cell therapy IND application (2008)
13. FDA Guidance-Potency Tests for Cellular and Gene Therapy (2011).
14. FDA Guidance for Industry-Current Good Tissue Practice (CGTP) and Additional Requirements for Manufactures of Human Cells, Tissues,

and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps).

15. EMA Guideline on human cell-based medicinal products (2007)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则
（征求意见稿）

国家药品监督管理局药品审评中心
生物制品药学部

2020 年 9 月

20	目录	
21	一、前言	4
22	二、定义和范围	5
23	三、一般原则和风险考虑	5
24	四、生产用材料	7
25	1. 载体的选择和构建	7
26	1.1 目的基因	7
27	1.2 病毒载体系统	8
28	1.3 核酸类载体	10
29	1.4 微生物载体	11
30	2. 起始原材料	11
31	3. 其他生产用原材料和辅料	15
32	3.1 原材料	15
33	3.2 辅料	16
34	五、制备工艺与过程控制	17
35	六、质量研究与质量控制	20
36	1. 质量研究	20
37	1.1 结构和特性分析	20
38	1.2 生物学活性	21

39	1.3 纯度、杂质和污染物分析	22
40	1.4 含量	23
41	1.5 其他特性分析	24
42	2. 质量控制	24
43	七、稳定性研究	25
44	八、容器和密闭系统	26
45	九、环境和生物安全性	27
46		
47		
48		
49		
50		
51		
52		
53		
54		
55		
56		
57		
58		
59		
60		
61		
62		
63		
64		
65		
66		
67		
68		
69		
70		
71		

72 一、前言

73 近年来，随着基因递送系统和编辑技术的不断进步，基因治疗领
74 域发展迅速，为一些难治性疾病，尤其是罕见遗传疾病的治疗提供了
75 新的治疗思路和方法。为了规范和指导基因治疗产品按照药品管理规
76 范进行研究、开发和评价，制定本指导原则。由于生物技术发展迅速，
77 基因治疗产品类型日新月异，各类产品技术特点存在较大差异，本指
78 导原则仅基于当前的技术发展和科学认知，针对基因治疗产品药学研
79 究的特殊性提出一般性技术要求，以确保研究和治疗用药品的质量、
80 安全性和有效性。后续随着技术的发展、认知的深入和经验的积累，
81 将逐步补充和完善本技术指导原则，同时结合产业发展趋势，将针对
82 具体品种类型制定相应的技术指导原则。

83 本指导原则仅作为基因治疗产品的一般性技术要求，为基因治疗
84 产品相关企业的研发、申报提供指导意见，同时，也作为监管机构监
85 管和评价基因治疗产品的重要参考。基因治疗产品的研发应在符合
86 《中华人民共和国药品管理法》、《中华人民共和国药品注册管理办
87 法》、《中华人民共和国药典》等相关法律法规的前提下，遵循本指导
88 原则的相关技术要求，必要时可综合借鉴参考其他相关指导原则。由
89 于基因治疗产品发展迅速、类别多样，覆盖的临床适应症广泛，不同
90 研发阶段、不同临床适应症产品的药学研究不尽相同，本指导原则的
91 技术要求对具体品种或研究的适用性，应采用具体问题具体分析的原
92 则。

93 二、定义和范围

94 基因治疗产品通常由含有工程化基因构建体的载体或递送系统
95 组成，其活性成分可为 DNA、RNA、基因改造的病毒、细菌或细胞
96 等。根据基因载体类型的特性差异，基因治疗产品主要可分为以病毒
97 为载体的基因治疗产品、以质粒 DNA 为载体的基因治疗产品、RNA
98 类基因治疗产品，以及以细菌微生物为载体的基因治疗产品，其中以
99 病毒和质粒 DNA 为载体的基因治疗产品较为常见。

100 本指导原则所涉及的基因治疗产品是指导入人体后，在体内通过
101 对体细胞的遗传物质进行修饰、改变基因表达方式或调节细胞生物特
102 性以达到疾病治疗目的的药品。本指导原则不包括溶瘤病毒类产品和
103 CAR-T 细胞等离体基因修饰细胞治疗类产品，但此类产品的部分相
104 关研究，如病毒载体的制备等，适当条件下可以综合借鉴参考。

105 三、一般原则和风险考虑

106 基因治疗产品是在人体细胞内，利用“细胞工厂”进一步表达产
107 物或编辑细胞基因发挥功能的“活”的产品，因此，其药学研究和设
108 计应综合考虑产品的生产和体内生物学过程。基因治疗产品的研制总
109 体应符合《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）“人用基
110 因治疗制品”总论的要求，临床用样品的生产应满足《药品生产质量
111 管理规范》的基本原则和相关要求，重点关注生产过程中外源因子的
112 污染和交叉污染、生产人员的健康和安全防护、生产环境的生物等级

113 和安全隔离，以及生产产物或废弃物对环境的生物安全性影响。产品
114 的药学研究和质量控制应充分考虑各类产品的特殊性，基于“质量源
115 于设计”的理念，进行充分的工艺开发和全面的质量研究，总结生产
116 用材料和生产工艺对产品质量的影响，分析产品质量与临床安全性、
117 有效性的相关性，建立全过程的质控系统和全生命周期的管理理念。
118 建立完整的产品溯源体系，确保产品从生产到使用全过程的可追溯性。

119 基因治疗产品生产所选用的载体类型、细胞基质种类、生产工艺、
120 作用机制不同，产品风险存在较大差异，应根据产品风险等级制订相
121 应的风险控制方案。在评估产品的整体风险时，应综合考虑各种因素
122 对产品风险的影响。一般认为，缺少临床应用和/或动物安全性数据支
123 持，致病性和作用机制不明确的产品风险较高，开展人体研究之前应
124 进行更充分的立题讨论和机制研究，全面评估安全性风险并制定相应
125 的控制策略；对于积累了一定人体或动物安全性数据的产品，如进行
126 了新的结构改造或遗传修饰，经合理性评估后可定义为中等风险载体，
127 可针对改构部分重点制定风险控制策略；对于有充分的人体应用数据，
128 或有一定数量同类上市产品的安全性数据支持，结构和作用机制较为
129 清晰的载体，相对安全性风险较低，可根据前期的研究基础，在临床
130 研究过程中逐步完善风险控制方案。产品的风险识别贯穿于产品全生
131 命周期，应在产品生产和应用过程中不断收集数据，逐步识别潜在风
132 险，完善风险控制方案。

133 四、生产用材料

134 生产用材料是指生产基因治疗产品过程中所使用的所有物质或
135 材料，包括生产用原材料和辅料（如培养基及其添加成分、纯化物料
136 等所有生产过程中使用的物料）、起始物料（如生产用细胞、菌毒种
137 等）等。生产用材料直接关系到产品的质量，因此，研究应规范建立
138 生产用材料的质量管理体系，包括风险评估、供应商审计、质控体系
139 等。

140 1. 载体的选择和构建

141 1.1 目的基因

142 目的基因是指基因治疗产品中主要发挥治疗或调节作用的基因
143 序列及其相关调控元件，常见如功能蛋白的编码序列、靶向结合的核
144 酸转录序列等。目的基因的选择应基于充分的病因学研究，同时考虑
145 人种间的序列差异，以及对应基因产物在人体中的免疫原性、功能活
146 性、安全性。根据适应症和预期作用机制合理设计目的基因序列。由
147 野生型序列经密码子优化、基因突变、缺失和重排等修饰改造而来的
148 目的基因，应具有合理的改造依据；通过平台算法和序列规则设计的
149 靶向结合核酸序列，如 sgRNA、RNAi 序列，应充分评估算法和规则
150 的科学性，对序列的靶向特异性进行充分的验证。

151 目的基因表达调控元件的选择应重点考虑元件或其序列的体内
152 安全性，权衡元件对产品生产效率和体内表达疗效的影响。目的基因

153 序列若含有以瞬时或组织特异性的方式控制基因表达的转录调控元
154 件，应提供研究数据证明目的基因表达的特异性。

155 1.2 病毒载体系统

156 基因治疗常见病毒载体类型包括腺病毒载体、逆转录病毒载体、
157 慢病毒载体、腺相关病毒载体、痘病毒载体等，根据病毒载体是否整
158 合至靶细胞基因组可分为整合类和非整合类，根据载体的复制特性可
159 分为复制缺陷型、条件复制型和可复制型病毒载体。具体载体类型的
160 选择应根据病毒载体特性、临床适应症、作用机制、给药途径和给药
161 频率（即再治疗的潜在需要）等全面分析确定。载体的选择和设计应
162 考虑以下方面：

163 （1）亲本野生型毒株和相应病毒载体对人和其他动物的致病性
164 和毒力，必要时载体设计应考虑尽量删除毒力相关的基因或组分。

165 （2）亲本毒株在人群中的感染几率和基础中和抗体滴度水平，
166 人体免疫反应对病毒载体的体内分布、转导效率和治疗效果的影响。

167 （3）必要时，应最少化病毒载体的非必需元件，或对病毒包装
168 蛋白进行工程改造，使病毒载体具有复制缺陷性。

169 （4）最少化病毒载体与人类病原体或内源性病毒的同源序列，
170 降低重组产生新型感染性因子或复制型病毒的风险。

171 （5）载体对组织或细胞的亲嗜性，对靶组织或细胞的转导特异
172 性和转导效率。

173 （6）病毒载体基因序列的稳定性，突变序列的潜在安全性风险。

174 （7）毒株或载体的改造对其免疫原性、致病性的影响，对现有
175 抗病毒疗法的敏感性是否发生改变。

176 （8）病毒载体是否具有生殖毒性。

177 整合型载体应重点分析载体在基因组中的整合方式和整合位点
178 的分布趋势，评估其插入致细胞基因突变和细胞癌变的风险，制定相
179 应的临床监测方案。

180 对于复制缺陷型病毒载体，应对病毒载体的复制缺陷性进行验证。
181 载体设计、包装系统的选择应充分考虑生产系统通过同源或非同源重
182 组产生可复制型病毒的可能，在生产过程中对出现可复制型病毒的风
183 险建立全过程的控制策略，如，对适当的生产过程中的样品、原液，
184 以及终产品进行可复制型病毒的检测。

185 对于复制型病毒或条件复制型病毒载体，应结合病毒载体的安全
186 性和预期作用机制说明病毒结构和复制调控元件设计的合理性。载体
187 选择和结构设计时应重点考虑以下方面：（1）病毒载体的复制能力对
188 适应症和作用机制的必要性；（2）载体不应含有任何已知具有人体致
189 癌性/致瘤性的元件；（3）评估改构之后病毒载体的致病性、感染活性
190 和毒力，应证明其人体使用的安全性；（4）病毒载体的感染和/或复制
191 通常应具有相应的组织或细胞的特异性。

192 病毒载体系统的选择和设计应具有充分的合理性依据。由原始毒
193 株或保藏毒株改造而来的病毒载体，应提供病毒载体设计的科学性和
194 合理性依据，并根据毒株的既往培养历史和改造过程进行相应的鉴定
195 和安全性检验。病毒载体的构建过程信息应完整，避免改造过程中引

196 入外源因子，确保病毒基因组的单一性，对病毒载体的序列、结构的
197 正确性进行全面确认。载体的构建和检定过程应遵循逐步确认、互相
198 印证、补充完善的策略。

199 病毒载体的疗效和安全性取决于病毒对靶细胞的感染特异性和/
200 或目的基因在靶细胞中的特异性表达。产品开发过程中，应通过载体
201 的选择和设计、体外生物学活性验证、非临床研究、临床试验等多个
202 方面对载体的靶向特异性、目的基因的表达活性和表达时限进行验证。

203 1.3 核酸类载体

204 核酸类转导系统包括 RNA、DNA 质粒等核酸结构，经电转导或
205 化学介质转导进入细胞后，直接或转录、翻译、剪辑后在细胞内发挥
206 治疗作用。RNA、DNA 质粒等核酸载体结构、目的基因和相关调控
207 元件的设计应符合拟定适应症和预期作用机制，提供序列设计合理性
208 依据并充分考虑载体的序列稳定性、表达活性和免疫原性。核酸类载
209 体的起始原材料可能涉及质粒的构建、细菌种子库的制备，或化学合
210 成原料等，相应研究或质量控制应符合《中国药典》的相关要求，并
211 参考本指导原则相应要求。载体的质控一般包括鉴别、序列完整性、
212 特征序列、外源因子、无菌、内毒素等。质粒载体或 RNA 转录模板
213 应进行全基因序列测序，结果应与预期一致。载体的最终产物中应避
214 免存在抗生素抗性基因和致癌性基因。化学合成用原材料的选用应遵
215 循质量级别高、杂质引入少、残留安全性风险低的原则。

216

1.4 微生物载体

217 微生物载体指经基因修饰用于表达目的基因、改变微生物遗传特
218 性或生物活性的沙门氏菌、李斯特菌、大肠杆菌等微生物。研究应结
219 合微生物的理化和生物学特性，说明微生物的改造依据和具体遗传改
220 造过程，说明质粒或附加体 (episome) 的来源、质粒结构、构建过程、
221 转导方法等，对微生物载体的基因组、生物学特性、改造基因、质粒
222 或附加体的基因序列进行确认。微生物的改造应以降低或去除微生物
223 的致病性，增强载体的治疗活性为目标，关注改造后微生物的致病性、
224 目的基因表达活性和体内分布的改变。避免使用 β 内酰胺类抗生素抗
225 性基因。

226 微生物载体建议建库管理，确保载体的单克隆性和稳定性。细菌
227 种子库和内含质粒应符合《中国药典》的相关要求，并参考本指导原
228 则相应要求。种子库的检定一般包括微生物的鉴别、理化特性、生长
229 特性、纯度、无菌、支原体、噬菌体、基因组或质粒的遗传标记、限
230 制性酶切、质粒或基因组插入序列、活性、抗生素抗性、基因拷贝数
231 等。种子库的保存和传代稳定性，尤其是遗传稳定性应能满足生产和
232 治疗要求，质粒的丢失率应符合预期。

233

2. 起始原材料

234 基因治疗载体系统的选择应基于产品的安全性和临床有效性考
235 虑。不同载体类型可能包括质粒 DNA、细胞基质、工程菌库、病毒种
236 子库、产毒细胞株/库等部分或全部起始原材料。起始原材料应有清晰

237 的来源和完整的溯源性信息，根据载体类型、适应症、预期作用机制
238 等，综合考虑各起始原材料对产品质量、安全性和有效性的影响。所
239 有相关起始原材料均应进行充分的鉴定并建立明确的质量控制要求。

240 **包装/生产细胞：**病毒包装/生产细胞应符合来源和培养历史清楚，
241 安全性风险可控，满足生产技术和建库管理的基本原则。生产/包
242 装细胞的选择，除考虑细胞生物属性（如生长特性、包装效率等）对
243 病毒产量的影响外，应全面评估细胞对最终产品质量和安全性的潜在
244 影响，如细胞是否含有致癌基因、细胞成瘤性和致瘤性、内源性病毒
245 的污染、病毒载体在细胞内的重组风险等。原则上，生产应选用无病
246 毒污染的细胞基质用于病毒包装和生产，若细胞基质含有内源性病毒，
247 应全面评估其安全性风险，必要时在工艺中增加经验证的病毒去除/
248 灭活单元，并在终产品阶段对内源性病毒的残留进行控制。充分评估
249 病毒生产细胞的成瘤性和致瘤性风险，尽量避免肿瘤细胞系的选用，
250 如使用，应提供相关的研究资料说明使用的合理性和必要性，对细胞
251 中是否存在病毒整合基因或致癌风险基因进行分析，必要时对其残留
252 进行控制。在生产过程和产品放行等多个阶段对完整细胞的残留进行
253 控制。腺病毒等复制缺陷型病毒载体的生产，应使用不含同源序列或
254 最小量同源序列的细胞系用于病毒包装或生产，降低病毒载体在生产
255 细胞内的重组几率。

256 病毒载体的包装/生产细胞应建库管理，细胞库应符合《中国药典》
257 通则“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及检定规程”的相关要
258 求，一般包括：鉴别、纯度、细胞数量、活率、基因型和表型、理化

259 特性、外源因子等，关注细胞种属相关病毒和培养过程可能引入的潜
260 在外源因子的污染风险。细胞基质若进行了遗传修饰（如组成性表达
261 病毒包装蛋白或复制辅助因子等），应具体说明改造的依据和具体改
262 造过程，并对修饰结果，如基因序列、拷贝数等进行确认。细胞传代
263 稳定性应能支持病毒的生产稳定性和遗传稳定性，关注传代过程中细
264 胞成瘤性变化。

265 **质粒 DNA：**病毒包装系统的质粒来源、结构和序列应明确，优
266 先选用安全等级最高的系统用于病毒包装，否则，需要提供更多的安
267 全性研究数据支持。质粒设计应尽量去除非必需基因和致癌性元件，
268 避免同源序列引起重组的安全风险。结合病毒载体的选择和作用机制，
269 具体说明筛选基因、表达调控元件、编码序列等组成元件的来源和功
270 能，提供质粒和病毒载体中毒力基因、病毒插入或复制调控相关元件
271 序列的改造依据，具体说明质粒构建过程，并对相应结果进行确认。
272 质粒序列中应尽量避免选用 β -内酰胺类抗性基因作为质粒筛选标记。
273 用于瞬时共转染生产病毒的质粒，其生产应基于细菌种子批系统，采
274 用稳定的细菌发酵和纯化工艺生产，每批质粒应通过放行检测方能用
275 于载体生产。

276 质粒的质控常包括鉴别、含量、质粒完整性、重要基因序列的确
277 认、纯度、宿主细胞 DNA 残留、宿主细胞蛋白质残留、无菌、内毒
278 素、热原等。对核酸类载体或微生物载体转导的质粒，应对目的基因
279 的表达活性进行确认，如有必要，应对基因表达量和表达产物的生物
280 学活性进行控制。

281 **细菌种子批：**细菌种子批的制备和检定应符合《中国药典》通则
282 “生物制品生产检定用菌种毒种管理规程”的要求，菌种的来源应清晰，
283 制备过程完整。细菌种子批的质控一般包括菌落形态、染色镜检、生
284 化特性、抗生素抗性检查、纯度、电镜检查、细菌、真菌、噬菌体等。
285 对于质粒生产用的细菌种子批或含有质粒、附加体微生物种子批，应
286 对含有的质粒序列进行确认，检测质粒拷贝数和有/无质粒细菌的比
287 例，小于 50kb 的质粒载体建议进行全质粒序列测定。微生物载体的
288 种子批应进行表型和基因型鉴定，经基因修饰的微生物，应对基因组
289 重要区域（如引入的治疗基因或调控元件，以及目的基因侧翼至少
290 0.5kb 内的区域）进行测序确认，对改造基因的插入位点、基因拷贝
291 数等进行分析，必要时检测目的基因的表达水平和功能活性。对于
292 减毒细菌载体，应鉴定其减毒的特性和稳定性，并检测其抗生素敏感
293 性。种子批的遗传和表型稳定性应能满足生产和治疗需求。

294 **病毒种子批：**病毒包装辅助病毒、可复制性、条件复制性病毒等
295 可建库病毒载体应尽量建库管理，以确保批间的一致性和生产稳定性。
296 研究中关注病毒种子批的建立过程，并在申报资料中体现，必要时应
297 提供病毒基因组的示意图。建库过程应避免人源或动物源性原材料，
298 如动物血清的使用，如必须使用，应提供合理性依据并控制用量，对
299 引入外源因子的安全性风险进行控制。对于培养历史不清晰的毒株，
300 建库过程中可采用多轮噬斑或有限稀释纯化，或通过 DNA/RNA 进行
301 拯救，确保毒株的纯度和单克隆性。

302 病毒种子批的质控应符合《中国药典》“人用基因治疗制品”总

论的要求，一般包括鉴别（基因组和免疫特性）、病毒滴度、表型特征、基因序列一致性、治疗序列的转录/表达、治疗序列或表达产物的生物活性、无菌检查（细菌和真菌）、支原体检查、螺原体（昆虫细胞）、外源病毒因子、复制型病毒（制品本身为复制缺陷型或条件复制型）等。同时，还应对种子批历史传代和构建过程中可能引入的特定外源病毒因子进行检测。除另有规定外，应对病毒基因组序列的完整性和正确性进行分析，或至少应对重要区域（如目的基因和调控元件，以及被人为修改的任何区域及其侧翼至少 0.5kb 内的区域）的序列进行确认。

辅助病毒或病毒包装用病毒载体的制备，以及病毒种子库的检定可综合参考起始原材料相关部分。

病毒种子批的传代稳定性研究条件应能代表或模拟临床样本土生产条件，结合病毒包装/生产细胞的传代稳定性研究，证明生产用病毒种子批的遗传稳定性、目的基因表达稳定性和生产稳定性。根据传代稳定性研究结果合理拟定病毒种子批和生产细胞库的限传代次。

3. 其他生产用原材料和辅料

3.1 原材料

生产原材料（或辅助材料）是指生产中所使用但不作为最终产品成分的物料，如消化酶、抗生素、培养基、去污剂、纯化试剂等。生产过程中所使用的原材料应符合《中国药典》通则“生物制品生产用原材料及辅料的质量控制规程”的相关要求，原材料的质量应符合其

324 预期用途。

325 生产原材料的选用应经过充分的工艺开发，其来源、组成、用途、
326 用量和质量等情况应明确并合理，不必要的使用有可能增加残留的安全
327 性风险和引入外源因子的风险。具体说明原材料的来源、组分、功
328 能、使用阶段、质量标准等。生产过程中应避免使用牛血清、猪胰蛋
329 白酶等动物或人来源的原材料，尽量采用血清替代物或重组制品替代。
330 若必须使用，应提供相关的研究资料说明使用的必要性和合理性，并
331 针对原材料的物种来源、生产地区、生产工艺等建立完整的质控体系，
332 评估 TSE/BSE 安全性风险。严禁使用疫病流行区来源的动物血清，
333 不得使用未经过安全性检验的血清。生产过程中应避免使用青霉素等
334 β -内酰胺类抗生素、链霉素，以及溴乙锭等有毒有害试剂。生产过程
335 中使用的耗材和容器应符合生物安全性标准，避免产品发生物理或化
336 学反应导致活性物质失活、活性下降或引入其他风险。

337 3.2 辅料

338 产品中辅料的选择、用量和质量标准应基于充分的制剂处方开发
339 研究，证明其使用的必要性、安全性和合理性。制剂辅料应符合《中
340 国药典》通则“生物制品生产用原材料及辅料的质量控制规程”的相关
341 要求，优先选用符合药用标准的辅料，质量应满足其预期功能作用。

342 对于新型递送系统或复杂转导系统，如纳米粒子、脂质体等，若
343 含有在人体首次使用或在给药途径中首次使用的新型辅料，应根据全
344 面的辅料药学信息评价辅料的质量控制和安全性，必要时应开展适当

345 的非临床或临床安全性评估。应对系统组分分别进行质量控制和安全
346 性评估，同时对辅料之间的相互作用和转导系统的稳定性进行验证研
347 究，提供其符合预期使用目的的支持性依据。如使用多种来源（如动物、
348 植物与合成来源）的或多个供应商的系统组分，应按照来源或供应商
349 分别提供信息，并进行特性鉴定与可比性研究，以证明采用不同来源
350 或供应商的原材料所生产的产品（理化特性和纯度特征以及复合性能）
351 具有等效性。

352 **五、制备工艺与过程控制**

353 基因治疗产品类型不同，制备工艺存在较大差异，一般是指从细
354 胞或微生物培养发酵到终产品密封保存的过程，但也可能是无细胞的
355 体外合成或转录体系，如 RNA 载体类产品。研究者应根据目标产品
356 的质量属性，通过充分的工艺开发，逐步建立从实验室规模到生产规
357 模的生产工艺。研究确定的生产工艺应具有合理的工艺步骤、明确的
358 工艺参数，以及全面的过程控制信息。工艺经过充分的验证应证明具
359 有可控性、可放大性和稳健性。建议尽量采用连续的、密闭式生产工
360 艺，减少生产过程中的环境暴露环节，如生产过程中存在不连续的情
361 况，应对生产过程中间品的保存条件和保存时限进行研究和验证。根
362 据生产过程的风险分析和对产品质量影响，建立全过程的质量监测和
363 控制策略，在适当的阶段对细菌、真菌、支原体、外源病毒等污染进
364 行检查。研究者应随着工艺技术的进步和产品理解的深入不断优化工
365 艺，提高产品一致性、安全性和有效性。

366 根据载体类型的不同,基因治疗产品的生产可能起始于工程菌库、
367 包装细胞库或产毒细胞库等。上游工艺往往决定了产品的质量,研究
368 应根据充分的工艺开发确定发酵工艺条件,如培养基及添加成分、发
369 酵规模和模式、培养时间、接种条件、收获时间,以及培养过程中 pH
370 值、渗透压、搅拌速度、pCO₂ 等培养条件。在提高产率的同时,研
371 究应优化工艺条件,提高载体的包装效率、包装准确性,以及产物的
372 生物学活性,减少空载体、错误包装载体、无活性载体、游离核酸等
373 产品相关杂质的产生,同时减少不必要的工艺相关杂质的引入。病毒
374 载体类基因治疗产品下游纯化过程往往缺少病毒去除/灭活工艺单元,
375 无法对病毒污染的潜在风险进行控制,因此在病毒种子或产品的外源
376 因子检查受限的情况下,建议在相同的生产条件下进行对照细胞的培
377 养和检定。RNA 类制品的体外转录制备工艺,应通过转录模板制备
378 和转录条件的控制,保证转录过程的稳定性和忠实性。

379 纯化工艺应根据产品类型、上游工艺和潜在的杂质合理设定,在
380 保证产品收率并稳定去除或降低生产过程中产生的产品相关杂质和
381 引入的工艺相关杂质的同时,应能维持产品的生物学活性。纯化工艺
382 性能经验证,如回收率、杂质清除效果等,应能保证工艺的稳定性。
383 发酵阶段若使用了辅助病毒、包装用病毒,或具有潜在的病毒污染风
384 险,应根据目标载体与病毒杂质之间的理化特性差异,在纯化过程中
385 增加必要的病毒去除/灭活工艺步骤,如采用去污剂灭活包膜病毒等,
386 并对病毒去除/灭活效果进行验证,控制非目标病毒的残留安全性风
387 险。工艺应对细菌、真菌的污染进行控制。

388 制剂处方、处方工艺和剂型应根据产品类型、产品稳定性和临床
389 用药需求确定。制剂处方应能有效维持产品的稳定性和功能活性，满
390 足临床用药需求；制剂剂型的选择应综合考虑产品的稳定性、保存和
391 运输需求、临床用药的便利性和安全性等多方面因素。新型辅料的应
392 用可能需要更多的动物或人体的安全性数据支持。

393 研究者应具体描述完整的生产工艺，并提供工艺流程图，注明各
394 步的工艺参数和生产过程中控制。明确生产规模和批次的定义，注意
395 上下游规模的匹配性，合理确定原液和制剂阶段。提供工艺开发研究
396 信息，说明工艺参数的拟定依据和合理性。根据工艺步骤对产品质量
397 的影响，明确关键工艺步骤和关键工艺参数，合理设定生产过程中控
398 制，对关键中间体进行检定，确定标准限度，尤其是生产过程中的微
399 生物、病毒内外源因子的污染控制和产品中间体的质量。病毒类载体
400 应对生产终末细胞和上清收获液的外源因子污染进行控制。对于复制
401 缺陷性或条件复制型病毒载体，应该在多个工艺阶段采用敏感的方法
402 对可复制性病毒产生进行检测。非临床研究和临床研究样品应采用代
403 表性生产工艺制备。

404 开发过程中若存在多个阶段的生产工艺，如非临床研究样品制备
405 工艺、临床试验用样品制备工艺、商业化生产工艺，应具体说明各阶
406 段工艺之间的差异，并对变更前后的工艺开展可比性研究，分析工艺
407 变更对产品质量的影响，如有必要应进一步提供非临床或人体研究数
408 据。

409 六、质量研究与质量控制

410 1. 质量研究

411 随着对产品认识的深入和检测技术的发展,产品的质量研究应不
412 断补充和完善并贯穿于整个生命周期。研究应采用先进、成熟的分析
413 方法,全面了解产品质量属性,评估质量属性与产品安全性、有效性
414 的相关性。质量特性的研究应选用代表性工艺批次和适当生产阶段的
415 样品作为研究对象,代表性批次如非临床研究批次、中试批次、关键
416 性临床批次或商业化工艺批次等,生产阶段样品如原材料、中间体、
417 原液和成品。原液和制剂之间若存在质量特性的差异,应分别取样进
418 行分析。对于复合核酸载体,应对核酸载体、复合组分和最终复合物
419 分别进行研究。

420 质量研究内容应覆盖所有可能与产品安全性、有效性相关的特性,
421 一般包括结构、鉴别、一般理化特性、纯度、生物学活性、基因转导
422 效率、杂质、基因型、表型等,具体研究项目应根据产品类型、作用
423 机制、原材料和生产工艺决定。

424 1.1 结构和特性分析

425 结构的研究包括一级结构和高级结构。采用多种方法,如测序、
426 限制性酶切谱图等,对载体完整的基因序列进行确认,尤其是目的基
427 因以及相关的选择/调节/控制元件,基因中应不含有致癌或促瘤基因。

428 病毒类载体应对基因序列的完整性、正确性和均一性进行鉴定,

对病毒载体结构蛋白的正确表达和颗粒的正确组装进行鉴定，如衣壳蛋白的分离鉴定、病毒血清型、病毒颗粒的镜下结构、颗粒大小及分布、聚集体、折光度等。可结合表型和活性研究综合分析结构的正确性。

核酸类载体应对载体序列的正确性和完整性进行测序确认，对线性、环状、超螺旋等结构和比例进行分析确认，对功能活性相关的二级结构，如回文序列等进行鉴定。确认质粒复制起点的位置以及是否存在 CpG 序列（如果与制品的设计相关）。对于 RNA 类载体，如存在其他特殊修饰结构，如核苷修饰、加帽率、PolyA 尾的长度和分布等，应一并进行鉴别和确认。

复合核酸类基因治疗制品，应对载体复合物的结构，以及核酸和递送复合物之间的相互作用进行检定，如结构形式、粒径分布、表面电荷、复合物组分比例、核酸包被效率、颗粒聚集度、在特定情况和生物环境中的稳定性等。

微生物载体应通过菌株的染色特性、镜下形态、菌落形态、培养特性等对菌株进行形态学和生长特性进行鉴定，通过测序、PCR、限制性酶切等分析对基因组和负载质粒的序列，尤其是特征序列或工程改造序列，以及质粒大小、拷贝数、质粒丢失率等进行分析鉴定。

1.2 生物学活性

生物学活性的研究和方法学建立应依据产品适应症、给药途径和作用机制进行开发，尽可能建立与作用机制相同或相似的体内、外分

析方法用于活性研究和质量控制。研究应能反映产品的转导活性，以及替代、补偿、阻断、修正特定基因的预期作用。含有多种活性成分的制品，需要分别建立方法对各个成分的活性进行测定，同时还应考虑活性成分之间可能存在的干扰或协同等作用。分析方法应尽量模拟载体的体内过程，选择相关的细胞类型分析载体的转导效率、基因表达水平、表达产物的生物学活性，以及其他与载体或递送系统作用机制相关的因素。对于病毒载体等选择性递送系统，应证明载体对靶组织或细胞的亲嗜性、转导特异性，以及基因表达的选择性。

1.3 纯度、杂质和污染物分析

杂质主要包括产品相关杂质和工艺相关杂质。

产品相关杂质包括所有非目标或非功能形式的生产产物。病毒类载体一般应分析产物中的空壳病毒、错误包装病毒、杂合病毒、无活性病毒颗粒、病毒聚集等杂质在产品中的残留水平，并对其安全性进行评估；核酸类载体一般应分析错误序列、不完整序列、降解片段、差异结构、错误修饰、或复杂递送系统错误组装组分等的残留水平；微生物载体一般应对菌株的单克隆性、质粒或改造基因丢失率等情况进行检定。对于复制缺陷型或条件型复制病毒载体，应分析是否存在可复制型或野生型病毒。

工艺相关杂质主要由生产工艺引入，一般包括起始原材料(如宿主细胞蛋白、宿主细胞 DNA、包装质粒等)、生产原材料（如培养试剂、纯化试剂等），以及设备来源杂质（如生产管线和包装容器的浸

物、色谱填料脱落物等)。研究应对所有工艺相关杂质的残留水平进行检测或分析,并评估其安全性。生产过程中如使用了包装病毒、辅助病毒等原材料,应对病毒的残留水平,感染、表达活性进行分析,并评估其安全性。一般建议将宿主细胞的 DNA 残留控制在 10ng/剂以内,将 DNA 片段大小限制在 200bp 以内。生产若使用了肿瘤细胞,或携带致癌表型、病毒序列的细胞,可能需要采用更严格的核酸残留限度,并对完整细胞的残留进行控制。对产品中已知具有安全性风险的特定转化序列的残留,如 E1A、SV40 大 T 抗原等应分别进行控制。另外,新型或复杂递送系统中,脂质等复杂辅料制备工艺存在一定的杂质,且脂质存在降解可能,如有必要,相关杂质也应纳入考虑范围。如有可能,应关注生产设施、设备中潜在渗出物质的残留水平。

产品污染物一般包括细菌、微生物、支原体、外源病毒,或部分细胞内源性病毒等,应严格控制污染物的引入和残留。

1.4 含量

建立基因治疗产品物理数量和生物数量的检测指标,如:颗粒数、感染性滴度或感染性颗粒数、基因组 DNA/RNA 或质粒 DNA 浓度、细菌数等。病毒载体应对总颗粒数与感染性滴度或感染性颗粒数的比例进行控制,病毒载体类制剂建议以物理滴度计算临床计量。活的微生物载体应对活率,以及活菌与死菌的比例进行控制。分析应尽可能使用标准品或对照品来校准含量测定结果。

1.5 其他特性分析

一般理化特性分析，如外观、澄清度、可见异物、不溶性微粒、PH 值、渗透压等。此外，还可能要对病毒载体的复制能力、插入位点、质粒载体的转导效率等。

对于 **crisp-cas9** 等编辑工具相关的基因治疗的产品，由于当前的认知和检测手段较为有限，研究应对此类产品进行更全面的安全性评估信息，包括编辑系统的选择，序列设计等上游构建的安全考虑，潜在脱靶位点的评估和检测数据的确认，编辑技术对细胞促瘤/成瘤的筛选风险、编辑系统组分的免疫原性等，应对潜在的风险建立相应的安全控制策略和检测方法。

2. 质量控制

质量标准的制定以控制最终产品的质量和批间一致性为目的，具体应根据工艺和控制需要对不同阶段的样品制定质量标准，一般包括原液、半成品（如有）和制剂的质量标准。质量标准的确定应基于质量研究，根据产品质量属性与安全性、有效性的相关性确定质量标准的具体内容，一般包括检验项目、分析方法和可接受标准。标准限度一般应基于目标产品质量的设定、代表性工艺批次分析数据的统计、稳定性研究结果，以及人体或动物安全性研究数据等多个方面设定。

原液的质量标准一般包括外观、鉴别、理化特性、纯度、含量、活性、外源因子、内毒素、杂质（产品相关和工艺相关杂质），以及其他药典规定检测项目。对于非复制型或条件复制型病毒载体，应对可

复制型病毒进行检测和控制。除上述原液检测项目外，制剂质量标准，还应关注受制剂处方、制剂生产工艺和包装容器影响的其他质量属性，一般还包括（但不限于）：转导效率、感染活性、制剂外观、装量、可抽取体积、水分残留、制剂理化特性（如 PH 值、折光率、渗透压、不容性微粒、可见异物等）、关键辅料含量（铝、复合辅料等）、制剂工艺杂质、可复制型病毒（如适宜），以及药典要求的制剂检项等。制剂若采用特殊容器或药械组合装置，还需要根据装置的功能增加特定的放行检测。对于部分未纳入质量标准的检测项目，应说明其合理性，并提供验证依据。

质量控制应选用先进、成熟的检测方法，如有必要，可选用多种互补的分析方法用于检测项目的质量控制。放行检验用方法应经过研究与验证，特别是新建立的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。对于有效期短或样本量小的产品，可采用快速、微量的新型检测方法，若采用非药典的替代方法，应证明该方法相比药典方法的等效性或优越性，必要时，在产品放行检验时可以同时采用两种检验方法进行相互验证。根据检测需要，应建立相应的标准品或参比品，标准品/参比品的建立和制备应符合《中国药典》“生物制品国家标准物质制备和标定规程”的相关要求。

七、稳定性研究

基因治疗产品稳定性研究可参照《生物制品稳定性研究技术指导原则（试行）》和 ICH Q5C 的一般原则和相关要求进行，同时根据产

品自身特点、临床用药情况等合理设计研究方案。研究项目一般包括长期稳定性、加速稳定性、影响因素研究、运输稳定性、使用稳定性等，研究条件应根据具体保存、运输和使用情况，以及相应研究条件下研究结果的指示意义具体确定。研究应选用代表性工艺样品，装于代表性包装容器或使用器材进行。稳定性研究监测项目应全面，尤其是对产品安全性、有效性、稳定性有重要指示意义的检测项目。研究期限应覆盖实际保存或使用时限。

八、容器和密闭系统

容器和密闭系统一般包括原液、半成品（如有）、制剂的包装容器，生产过程中原材料、中间品的保存容器，以及生产过程中与产品直接接触的生产管线，如生物反应袋、一次性管线等。为避免储存容器或密闭系统对产品的质量产生非预期影响，应对容器和密闭系统进行相容性研究、密闭性研究和安全性评估，特定条件下的密闭保存容器还应进行相应条件下的适用性研究，如冷冻适应性等。对于具有特殊功能的次级包装材料，应将次级包装材料纳入容器和密闭系统的研究中，对其相应功能进行研究和验证。如涉及特殊给药装置，如电穿孔装置、鼻喷装置、无针注射器等，需提交相关研究资料或其他适用的支持资料。

551 九、环境和生物安全性

552 全面分析基因治疗产品生产和使用过程中可能对环境 and 环境
553 生物安全性具有潜在影响的因素，如质粒和种子批的特定抗性基因、
554 病毒生产过程中含病毒的废液及稀释液、临床使用时逃逸至环境的病
555 毒、医疗差错导致病人误用错用的病毒、近效期或过期的基因治疗产
556 品，以及生产相关容器和设施、设备的交叉污染等，评估基因治疗产
557 品对环境和环境中生物的安全性的影响。从开发研究、商业化生产到
558 临床使用全过程进行生物和环境安全性管理，制定严格的风险控制措
559 施，降低产品对生物和环境的安全性威胁。对错用和误用的特殊人群
560 制定相应的解救措施。

**免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则
(征求意见稿)**

国家药品监督管理局药品审评中心

生物制品药学部

2020 年 9 月

106

一、前言

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

二、范围与定义

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

近年来,免疫细胞治疗理论和技术发展迅速,多种相关产品相继进入临床试验,为一些严重及难治性疾病提供了新的治疗手段。2017年,原国家食品药品监督管理总局发布《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》,对细胞治疗产品按照药品管理相关法规进行研发时的技术要求进行了总体阐述。由于免疫细胞治疗产品的细胞来源、类型、体外操作等方面异质性较大,质量研究和质量控制相较传统药物更加复杂。为规范和指导免疫细胞治疗产品按照药品管理规范进行研发、申报和评价,制定本指导原则。本指导原则仅基于当前的科学认知,对免疫细胞治疗产品的药学研究提出一般性技术要求,为药品研究、开发、生产和申报提供技术指导意见,同时,也作为监管机构监管和评价免疫细胞治疗产品的重要参考。随着技术的发展、认知的深入和经验的积累,后续将逐步修订和完善相关产品的技术要求。

本指导原则适用于按照药品管理相关法规进行研发和注册申报的免疫细胞治疗产品。

本指导原则所涉及免疫细胞治疗产品是指采用人体自身或供体来源的免疫细胞,经过体外操作,包括但不限于分离、纯化、培养、扩增、诱导分化、活化、遗传操作、细胞(系)的建立、冻存复苏等,再输入(或植入)到患者体内,通过诱导、增强或抑制机体的免疫功能而治疗疾病的产品。包括过继性细胞治疗(Adoptive Cell Therapy, ACT)产品、治疗性疫苗等。免疫细胞治疗产品类型主要包括但不限于细胞因子诱导的杀伤细胞(Cytokine-Induced Killer, CIK)、肿瘤浸润性淋巴细胞(Tumor Infiltrating Lymphocyte, TIL)、嵌合抗原受体T细胞(Chimeric Antigen Receptor T-Cell, CAR-T)、T细胞受体修饰T细胞(T Cell Receptor-engineered T-cell, TCR-T)、自然杀伤(Natural Killer, NK)细胞、树突状细胞(Dendritic Cell, DC)、巨噬细胞等。肝细胞、肌细胞、胰岛细胞、软骨细胞等体细胞,以及与非细胞成分的组合也可以参考本指导原则。本指导原则对来源于人类细胞的非活细胞和细胞碎片可能适用。对于经基因修饰的CAR-T和TCR-T类产品等,其细胞部分可以参考本指导原则;基因修饰部分可以参考

其他相关技术指南。本指导原则不适用于输血用的血液细胞、干细胞、生殖相关细胞，以及由细胞组成的组织、器官类产品等。

三、风险分析和控制

免疫细胞产品具有多样性、异质性、复杂性、发展性等特点，不同类型产品可能存在不同程度的风险。因此，需要根据多方面因素、针对不同类型产品的特性进行风险评估和控制。在产品开发的初期，可以根据现有产品知识及其预期用途进行初始风险分析，制订相应的风险控制方案。应使用综合风险分析来论证产品开发的合理性和科学性，将综合风险分析结果用于：（1）识别、确定与产品质量和安全性相关的风险因素；（2）确定非临床和临床研究期间所需进行风险评估的数据范围和重点；（3）制定风险防控和处理措施。建议研究者在整个产品生命周期内对其进行跟踪分析和更新，收集数据以进一步确定其风险特征并制定控制策略。

在评估产品的总体风险时，应综合考虑各种因素对产品风险的影响，免疫细胞治疗产品在药学方面的主要风险评估包括但不限于：（1）细胞的来源（自体/同种异体）、类型和生物学特点（增殖、分化、迁移能力、细胞自身功能/分泌活性物质、启动/增强免疫应答的能力等）；（2）细胞的生产过程、操作程度（体外培养/扩增/活化/诱导/遗传操作/冷冻保存等）及操作对细胞特性的改变程度，如基因修饰对细胞功能的影响、生产过程中可能的污染等；（3）纯度（非细胞成分、非目的细胞群体等的毒性作用或其他非预期作用）；（4）给药方式（例如系统性输注、局部应用或经手术应用），是否需要对接受者的预处理，是否和非细胞产品（生物活性分子或结构材料）形成组合等；（5）既往类似产品的经验或相关临床数据的可用性。

基于风险，将免疫细胞产品大致分为：

1、中低风险产品：具备以下几个特点：自体来源细胞；经过较小程度的体外处理（如培养、扩增、诱导等）；发挥与内源功能相似的作用；未与其它药品或药材成分并用。

2、高风险产品：异体来源的细胞；经过遗传操作的细胞；具有恶性转化风险的细胞；与其他非细胞成分组合的产品；需经手术等植入人体关键组织器官。

产品风险分类的意义在于申请人可以更清晰设计产品研发的风险控制策略，

163 监管部门可以依据产品的风险情况建立具体的评估方案。

164 四、一般原则

165 免疫细胞治疗产品存在个性化程度较高、产品的批量有限、温度环境敏感、
166 非冻存状态下有效期较短，稳定性和批间一致性低等特点。同时由于细胞本身具
167 备体内生存、自主增殖或/和分化、细胞间相互作用等能力，在基于风险评估的前
168 提下，其药学研究应充分考虑以上产品的基本特征和特殊性，同时应符合药品质
169 量管理的一般要求。

170 免疫细胞治疗产品中的细胞来源、获取、操作以及废弃过程应当符合伦理、
171 相关法律法规及产品质量要求。研究者应建立完善的“知情与保密”管理体系。

172 免疫细胞治疗产品生产全过程应当符合《药品生产质量管理规范》的基本原
173 则和相关要求。生产过程中应特别关注人员、厂房与设备、原材料控制、环境与
174 设施等。生产厂房的总体布局应合理，各区应根据细胞特性、工艺流程及相应的
175 洁净度级别合理设计及布局，如质量控制区应与生产区分开等。严格防控不同供
176 者样品或不同批次样品的混淆。生产设施设备的设计、建造、改造和运行维护等
177 应符合细胞产品生产的质量管理要求，应满足无菌生产要求并经过验证，能有效
178 防止污染、交叉污染、混淆和差错，以及便于清洁、操作和维护。产品的生产环
179 境须满足其质量和预定用途的要求，应当最大限度降低微生物、各种微粒和热原
180 的污染风险。生产工艺应经过严格的工艺验证并建立清晰的关键过程控制点；应
181 严格控制生产用材料的质量，并建立生产线的操作规范；建立严格的开场和清场
182 制度，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。

183 产品生产工艺应建立在充分的开发与研究基础之上，研究内容包括：确定目
184 标产品质量概况、确定产品的关键质量属性、通过风险评估以联接关键质量属性
185 和物料特性/工艺参数、设计空间（design space）、通过质量风险管理确定控制策
186 略、产品生命周期的管理和持续改进。研究者应对整体工艺充分理解，积累经验，
187 在此基础上明确过程控制中关键的生产步骤、关键参数、关键质控点、制定敏感
188 参数的限定范围，以保持工艺的相对稳定。必要时，还可以对生产过程中的细胞
189 进行质量监测，过程中的质量监测与细胞放行检测相互结合，以互相补充，达到
190 对整体工艺和产品质量的控制的要求。研发阶段这些要素的完备程度，将会直接
191 影响产品生产阶段的稳定性和可靠性。生产过程中研究者还应建立产品可追溯的

192 管理体系，以确保产品从供者到受者全过程的可追溯性。

193 五、生产用材料

194 基于免疫细胞产品自身的特点及其生产工艺的特点，生产用材料直接关系到
195 该类产品的最终质量，因此，研究者应建立良好、规范的生产用材料的质量管理
196 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定质量放行
197 检测机制等工作程序。

198 为保证临床应用的安全性，最大程度的降低安全性风险，生产用材料应尽可能
199 能选择药用级产品，否则建议选择质量标准级别高的材料。所有生产用材料来源
200 应当清晰、合法；质量应保证安全、有效，特别应关注防止外源因子的引入或传
201 播的风险。

202 （一）细胞

203 1、生产用细胞

204 1.1 供者的筛选

205 基于研究，研究者应建立合理的供者筛选程序和标准。基于产品风险和供者
206 使用需求，应明确供体的任何相关特征，包括但不限于年龄、性别、既往辐射暴
207 露、在危险疫区停留情况、既往病史、家族史、病原微生物筛查信息、HLA (human
208 leukocyte antigen) 等。病原微生物筛查方面，同种异体供者至少应符合献血者的
209 标准，筛查供者是否存在 HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、梅毒螺旋体等感染，
210 也可根据供体健康/疾病史或区域流行病区生活逗留的具体情况适时增加相应的
211 筛查项目，并建立验收的标准和程序。供者筛查过程中，建议采用监管当局批准
212 的试剂盒检测病原体，检测方法应经过验证。对于高风险产品，建议在适当时评
213 估包括多态性（例如血型）的分型、供者和受体之间组织相容性抗原（I 类和/或
214 II 类 HLA，在某些情况下可能为次要抗原）的匹配，明确并建立分型程序和标
215 准，并根据生产要求，增加对供者细胞质量的筛查项目。建议研究者记录和保存
216 供者的血清学、临床诊断和病史等数据，必要时应对供者进行随访。

217 1.2 供者细胞的来源

218 供者细胞根据来源可分为自体细胞、同种异体细胞。供体细胞的来源应符合
219 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
220 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

221 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。
222 供者细胞的采集、运输、接收、体外操作等一系列过程应当建立溯源系统和质控
223 体系并定期回顾其适用性，及时优化相应的控制。

224 1.3 供者细胞的获取

225 免疫细胞产品的供者材料采集和产品的使用常常涉及医疗机构的参与。研究
226 者应当选择具有合法资质的医疗机构作为供者材料采集和产品使用的机构，对医
227 疗机构进行评估和审计，建立合格医疗机构名单及其质量档案，并与经批准的合
228 格医疗机构签订质量协议、制定相应的产品操作规范。定期对医疗机构采集供体
229 材料和使用产品的情况进行回顾和评估。相关的主要工作包括：明确医疗机构的
230 资质、选择的原则、质量评估方式、评估标准及合格医疗机构批准的程序，并明
231 确现场质量审计的内容、周期、审计人员组成及资质。质量协议的内容应当包括
232 供者材料的采集方法、保存条件和质量标准。定期回顾与评估中，一旦发现医疗
233 机构出现不符合操作规程，且可能会对患者造成不利影响的情况，应当及时要求
234 医疗机构采取纠正措施和预防措施，必要时不再纳入合格医疗机构名单。

235 医疗机构的操作规范考虑要点：

236 ● 严格按照生产者制定的供者筛查标准进行筛查，严格遵守生产者制
237 订的供者材料采集、运输、接收标准操作规程。操作规程应详细说明供者材
238 料的采集方法、保存和运输条件以及接收的标准。

239 ● 严格遵守生产者制定的详细的产品使用操作规程。产品在医疗机构
240 使用前需要现场配制的，生产者应当详细描述复苏方法、稀释清洗方法、配
241 制的环境、无菌要求、暂存时间和温度、转运方式等，必要时可以图片或视
242 频形式说明。

243 ● 所有进行免疫细胞产品操作的医务人员必须经过相应的严格培训，
244 并获得相应的操作资质和授权方可上岗操作。培训应当有记录。

245 ● 所有操作进行前，至少进行以下的检查和核对，包括操作前查、操作
246 中查、操作后查；查对床号、查对姓名、查对药名、查对剂量、查对时间、
247 查对浓度、查对用法。

248 ● 在细胞采集或使用过程中，必须建立定时和不定时的观察制度，严密
249 观察，及时发现和处理不良反应，并做好观察记录。

免疫细胞的获取操作过程应经过研究与验证。在符合伦理和知情同意的情况下，工艺研究中建议纳入患者来源的细胞开展相应的研究，并尽量采用与临床应用情景类似的患者细胞。由于不同供者来源的细胞可能存在质量差异，应考虑采用具有代表性的、不同供者来源的细胞对生产工艺进行研究。根据产品特点并基于研究，确定细胞收集方法、组织来源和其他相关识别信息，包括但不限于收集场所、使用的设备和/或程序等。免疫细胞获取存在单采血采集、外周血采集、淋巴结组织分离、脐带血采集、肿瘤组织分离等多种组织取材方式。应当提供细胞收集方法、组织来源和其他相关识别信息，包括但不限于收集场所、使用的设备和/或程序等。建议综合考虑免疫细胞类型及供者健康状况等，优先选用血液成分单采技术等方式规范进行免疫细胞的采集。建议对获得细胞的方法进行研究和论证，包括但不限于有关酶的类型、抗凝剂、血分仪器和程序（循环血量、流速等）、手术方式等。尽量减少产品中的细胞衍生杂质，如细胞碎片、其他非目标细胞的残留等，并考虑降低对供者器官、组织施加的破坏程度。避免不必要的和不适当的加工和处理步骤，以避免损坏细胞的完整性和/或功能，进而导致治疗失败甚至不良反应。细胞收集过程中应对微生物污染和样品交叉混淆风险进行控制。

1.4 供者收集细胞的处理和质量控制

收集到的细胞在应用于生产前，如果需要进一步处理，如混合、分批、包装、冻存、运输等，应开展相应的研究、验证，并根据研究情况制定相应操作规范。

收集到的细胞在应用于生产前，建议进行细胞类型、数量、表型、活力、微生物等方面的检定。细胞类型鉴别可通过相关的基因型和/或表型标志物进行鉴定和确认，标志物阳性的细胞比例可以作为预期细胞群指标评估的依据。对于收集细胞的质量研究与控制，可以更大程度的保证最终生产的成功率。鼓励研究与终产品质量相关的收集细胞质量指标，并纳入收集细胞质量放行标准中。

1.5 细胞系来源免疫细胞

对于生产用细胞来自于免疫细胞系的产品，原则上，应对细胞系建立细胞库用于生产。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、质量可控性和有效性的基本要求。免疫细胞系应满足来源清楚、合法，培养过程无明显质量风险，细胞质

279 量与特性满足产品质量需要等要求。对于细胞系来源的免疫细胞高风险产品，须
280 对细胞系建立细胞库并进行分级管理。

281 **1.6 生产用细胞的储存**

282 建议建立或采用稳定可控的细胞存储体系和平台，研究确定供者细胞或细胞
283 系合适的保存条件和包装材料，保证在不改变细胞特性的情况下，对细胞进行妥
284 善的保存，确保细胞的活力、密度、纯度、无菌性和生物学功能的稳定。

285 **2、生产过程细胞**

286 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
287 楚、安全性风险可控、符合生产技术的需要和建立细胞库分级管理的基本原则。
288 应当采用历史培养情况清晰明确、来源合规、质量能够满足与研发阶段相适应、
289 且可确保产品的质量安全的菌株或细胞，建议根据所购买细胞的具体途径提供其
290 溯源信息，包括但不限于证明性文件、培养过程、传代及检定信息等。建议尽可
291 能一次性完成最终生产细胞的扩大培养，或确保每次扩大培养工艺和质量的一致
292 性，并评估扩大培养过程中是否引入了新的风险，例如引入污染和/或载体完整
293 性受到破坏。还应建立不同生产步骤的检测程序，如检测时间表、检测方法、获
294 取信息和验收标准等。对于滋养层细胞，还需要额外关注特定病毒检测和可能引
295 入的安全性风险；滋养层细胞失活处理的工艺，如辐照或添加药物等，应经过研
296 究与验证。。

297 对于细胞库的分级管理，分级可包括初级细胞库、主细胞库和工作细胞库，
298 建议在满足中国药典、ICH 及相关指导原则的前提下，结合产品的实际情况建立
299 进行分级和全面的检定。

300 **（二）基因转导与修饰系统**

301 高风险产品涉及到对供者细胞的体外基因编辑，用于基因编辑的基因转导系
302 统包括病毒载体、核酸物质等，相关的药学专业技术要求请参照《基因转导与修
303 饰系统药学研究与评价技术指导原则》。

304 **（三）辅料**

305 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
306 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
307 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，具体可以
308 参考《新药用辅料非临床安全性评价指导原则》。

309 (四) 其他生产用材料

310 细胞的收集、选择、培养甚至基因或表型修饰需要多种材料，如培养基、其
311 他细胞、酶、抗体、细胞因子、血清和抗生素、其他化学品或固体支持物（例如
312 磁珠、凝胶基质）等，这些材料的使用可能会影响免疫细胞产品的质量、安全性
313 和有效性。原材料的使用应参考《中国药典》“生物制品生产用原材料及辅料的
314 质量控制规程”，具体说明原材料的来源、组分、功能、使用阶段、质量标准等，
315 提供相关的文件（如来源证明、检验报告书（COA）、包装说明书、无 TSE/BSE
316 声明等）证明其符合拟定标准，适用于其预期用途。尽量采用已经获得批准用于
317 人体或符合药典标准的原材料。若需要使用非临床级材料作为关键材料，应尽量
318 使用质量标准级别高的产品，并确保其安全性和适用性，其中与细胞直接接触的
319 材料的生产过程原则上应符合 GMP 的相关要求。

320 产品生产过程中如需使用抗原，需充分评估其可能引起的免疫学风险，包括
321 引起自身免疫性疾病、细胞因子风暴以及导致的超敏反应等。在满足生产需求的
322 同时，尽量采用来源清楚、风险低、质量均一稳定的抗原产品。申请时提供抗原
323 选择依据、序列信息、生产工艺及质量控制等资料。

324 尽量避免使用具有潜在致敏性的材料，如某些动物血清、特定蛋白质、血型
325 物质、 β -内酰胺类抗生素（如青霉素）等。尽量避免使用动物源性材料，尽可能
326 用规定组成成分的非动物源性试剂替代。如果必须使用动物来源原材料，需要提
327 供相关的研究资料说明使用的必要性和合理性，并针对原材料的物种来源、生产
328 地区、生产工艺建立完整的质控体系，评估 TSE/BSE 安全性风险，并对终产品
329 中的动物源材料残留量进行检测及开展安全性风险评估。严禁使用疫病流行区来
330 源的动物血清，不得使用未经过安全性验证的血清。如生产过程使用自体血清或
331 自体血浆，应说明血清/血浆的生产工艺，并对包装、存放条件和时间等进行研
332 究。如果使用同种异体血清，其使用的原则与安全性风险控制要求参考上述动物
333 来源原材料的要求，使用中重点关注人源外源因子的风险监控和不同来源、不同
334 批次血清质量差异可能对产品生产过程产生的影响。人源性材料（如白蛋白、免
335 疫球蛋白等）可以参考血液制品的质量要求和检测方法。

336 生产过程中使用的培养瓶、管路、滤器等一次性耗材、培养与包装容器，及
337 与中间样品接触的生产设备和材料等应经过严格的筛选，开展适用性和生物安全

性的评估。建议尽量使用监管机构批准的产品，否则建议使用适合产品的高质量级别的产品。

根据生产用材料本身的安全性风险等级以及在终产品中可能残留的情况，基于风险建立工艺中去除步骤和/或产品中定量残留检测方法，并设定浓度阈值。如果添加成分不能有效去除，则应当在动物或其他有效系统中进行安全性和毒性评估。

免疫细胞治疗产品可能与其他独立医疗器械、活性植入性医疗器械、基质、微囊、包涵体等材料形成组合产品。医疗器械可参考器审中心的相关技术要求。组合产品应当考察和评估细胞与器械等材料的互相作用及风险。细胞终产品的所有结构成分均应进行详细描述和论证，并评价其安全性和预期用途的适用性。

六、生产工艺

免疫细胞治疗产品的生产工艺包括从细胞采集到最终细胞收获及保存和临床使用前的全过程。研究者应对整个产品的生产工艺进行研究和验证，包括但不限于细胞采集、运输、体外操作、与产品其他成分的组合、包装、冻存复苏、制剂等，以证明生产工艺的可行性和稳健性。组合产品生产工艺的研究和验证应包括单独成分到最终组合产品的所有工艺步骤，以保证生产的一致性。

工艺研究中建议尽量采用与生产实际来源、质量一致的细胞，如果样品量有限（如自体细胞产品），建议采用具有相似特征、但有足够数量的细胞产品进行更充分更广泛的工艺研究及验证。研究者应不断优化生产工艺，减少不必要的工艺步骤，尽量采用连续的生产工艺，尽量采用封闭的或半封闭的生产工艺，尽可能使用专用的、产品特定的或一次性使用的装置，以减少污染和交叉污染的风险。

（一）生产工艺

生产工艺的设计应建立在对整体工艺的充分理解和对产品的累积经验基础上，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；需建立从供体材料收集开始的整个工艺流程，建立规范的工艺操作步骤、工艺控制参数和废弃标准，并标明关键步骤和半成品（如中间细胞产物等）。应对生产的全过程进行监控，包括工艺参数和过程控制指标的监测等。

生产工艺要求的考虑要点通常包括但不限于：

1、生产规模和批次定义

367 免疫细胞产品的生产规模由细胞特性、生产工艺和临床用途等多方面的因素
368 共同决定。合适的生产规模应满足产品质量的要求，以及临床前研究和临床试验
369 对每批免疫细胞产品数量的要求。生产规模的大小直接影响到后续患者接受细胞
370 产品的次数、产品的一致性和稳定性等。

371 自体细胞的生产规模应结合细胞特点和治疗方案，合理确定，通常应保证患
372 者接受至少一次的治疗剂量。同种异体的生产规模可适当扩大，保证患者接受多
373 次或多名患者的治疗剂量。建议在保证细胞产品质量的基础上适当扩大生产规模，
374 以满足药物评价和临床试验的需求，并有利于减少产品的批次间差异。

375 在免疫细胞治疗产品从实验室制备向工业生产转化的阶段，应关注生产规模
376 扩大的方式，开展研究保证产品质量。如果在生产规模扩大研究中，始终保持生
377 产工艺不变和每批产品规模不变，而是通过增加批次的方式成比例地扩大生产规
378 模时，应重点关注工艺稳健性和批次间的质量差异，以及防止混淆和交叉污染的
379 发生。如果在生产规模扩大研究中，引入了新的生产工艺，如采用了多层细胞工
380 厂或者细胞反应器等设备，应重点关注工艺变更对质量的可能影响，以及防止新
381 工艺导致的污染的发生。

382 批次定义的目的是保证细胞产品的一致性和可追溯性。一般情况下，在单一
383 容器中充分混合的一定数量的细胞为一批。该单一批次所生产出来的所有细胞的
384 总量为此次生产的批量。研究者应提供从供者材料收集到给药前终产品的生产批
385 次的明确定义，包括但不限于生产规模、细胞传代次数、编号规则、目的细胞比
386 例和数量、细胞合并规则等。

387 2、生产工艺开发

388 免疫细胞治疗产品工艺开发应根据目标产品质量概况，结合理化特性和生物
389 学特征，合理设计试验，逐步建立从实验室规模到商业规模的生产工艺。应明确
390 生产工艺的选择、控制和优化过程。在生产工艺研究和优化过程中，逐步确定关
391 键工艺参数。

392 对于目标产品质量概况研究，应从多个研究方面对细胞产品的特征如表面标
393 志物、细胞活率、纯度、生物学活性、目的基因转导效率等进行分析，并从中确
394 定可能影响产品安全性和有效性的关键质量属性。对于中低风险产品，早期工艺
395 研发内容包括但不限于：起始细胞分离培养，原材料使用，细胞扩增工艺及细胞

396 扩增时间等。对于高风险产品，早期研发内容包括但不限于：异体细胞的培养，
397 基因转导与修饰，细胞诱导分化操作等。应定义关键工艺参数，并建立相匹配的
398 参数范围来限制可能影响质量属性的过程参数发生变异。确定了关键质量属性和
399 关键工艺参数后，应当进行风险评估和研究论证。随着产品研发的不断深入和经
400 验数据的不断积累，工艺关键参数和关键质量属性应当不断优化。

401 在细胞体外培养过程中，应当考虑细胞体外生长的可行性和任何操作对细胞
402 的影响，保持细胞的完整性和功能特性。对操作的步骤（换液、传代、激活、基
403 因修饰、诱导等）、添加的成分（基础培养基组成，重组蛋白及相关生长因子的
404 添加）、培养容器、培养条件（如温度/溶氧/pH）、杂质去除、培养时间、最大
405 传代次数、培养规模和参数设置等都应当进行研究和验证，并根据工艺设计和控
406 制进行密切监测和优化。对于供体细胞/细胞系来源的细胞等，应明确其相关基
407 因型和表型，并确定其培养寿命和稳定性。应当建立检测方法和标准，持续监测
408 细胞培养扩增后细胞的基因型和/或表型以及功能的变化。

409 如果细胞的培养介质不是液态培养基，而是直接在非液态基质/器械/支架内
410 （上）培养细胞，需考虑非液态基质/器械/支架等培养介质对细胞生长、功能和
411 完整性的影响，如可降解生物材料可能引起的细胞环境变化（如 pH 值、离子浓
412 度、气-液界面等改变），同时还应考虑细胞可能对非液态基质/器械/支架产生的
413 影响（如降解速率、介质形态、介质组成成分等）。

414 若对细胞进行体外诱导，应对诱导的方法和条件、细胞生长特性的变化、细
415 胞的表型和/或基因型的变化、细胞功能的变化、诱导物质的残留、目的细胞群和
416 非目的细胞群的比例变化进行研究和验证，并不断优化。

417 若对细胞进行遗传操作，应对转导试剂的选择及合理性、病毒感染复数
418 （MOI）、遗传操作的方法和条件、目的基因的转导/转染效率、目的基因在染色
419 体中的整合情况、目的基因遗传稳定性、细胞基因型和/或表型、功能的变化、风
420 险基因的残留和去除、病毒复制能力回复突变、插入突变等进行研究和验证，并
421 持续优化。

422 3、关键工艺步骤和参数

423 质量概况和关键质量属性的确定应根据免疫细胞治疗产品的类型、特点并基
424 于对产品的现有认知。关键工艺参数应依据产品的关键质量属性确定，并应随着

425 工艺过程知识的发展而不断改良，可能的关键工艺参数包括但不限于：起始细胞
426 数量，基础培养基组成，重组蛋白及相关生长因子的添加，细胞扩增相关工艺参
427 数等。

428 研究者对操作方法和条件参数应进行反复论证，不断优化，结合多批次工艺
429 参数和质量属性的统计分析结果设置合理的可接受标准，制定详细完整的关键工
430 艺步骤、工艺参数、过程控制参数和可接受标准，并在工艺验证研究中进行研究，
431 确定关键工艺步骤和参数设置的可行性和工艺生产的稳健性。随着产品研发的不
432 断深入和经验数据的不断积累，工艺关键参数和属性应当不断优化。

433 4、制剂处方和工艺

434 制剂研发的目的是确保产品的安全性、有效性、稳定性和便利性。制剂的类
435 型可能影响产品的质量、安全和疗效。制剂研究的总体目标是确保剂型选择的合
436 理性，处方合理，工艺稳定，有效控制生产过程，适合工业化生产。研究者应当
437 根据产品自身的特性(如作用机理、稳定性等)和临床应用情况决定产品的剂型、
438 制剂处方和处方工艺。制剂研究一般包括：

439 (1) 剂型的选择

440 根据免疫细胞产品的特性和临床应用的需求，选择合适的剂型。免疫细胞治
441 疗产品一般为注射剂。如果使用其他剂型，应当说明其合理性。

442 (2) 处方研究

443 根据免疫细胞产品的特性、稳定性研究结果等，结合剂型特点、用法和给药
444 途径，合理设计试验，进行处方筛选和优化，最终确定处方。处方研究主要关注
445 规格、辅料成分和用量、用法，以及产品在储存、运输、使用等过程中的稳定性
446 表现等。

447 制剂处方应与储存条件相适应，免疫细胞产品常见涉及冷藏和/或冷冻。研
448 究中，应验证细胞冷藏和/或冷冻条件和时间等对细胞特性和活力状态的影响，
449 以确定制剂处方和保存条件。

450 细胞冷冻保护剂主要分为穿透性冷冻保护剂（如二甲基亚砜（DMSO）、甘
451 油、乙二醇等）和非穿透性冷冻保护剂（如聚乙二醇吡咯烷酮、白蛋白、蔗糖、海
452 藻糖等）。研究中应当验证细胞冻存保护剂（如 DMSO 等）的成分、用量和合理
453 性。如果细胞产品在给受者使用前需要经过物理状态改变、过滤、清洗、容器转

454 换、调整剂量、与其它材料联用等操作，应当进行充分的研究和验证。

455 考虑因素如下：

- 456 ● 细胞冷冻保护剂本身的毒性及免疫原性（如 DMSO、白蛋白等）；
- 457 ● 对细胞特性、功能及稳定性的影响；
- 458 ● 去除方法或残留量的可接受标准；
- 459 ● 冷冻的设备和程序方法；
- 460 ● 细胞冷冻保护剂的来源、生产批次、用量、用法等；

461 （3）制剂工艺研究

462 根据细胞产品的特性、稳定性研究结果、临床前安全性评价等情况，结合生
463 产条件和设备，进行工艺研究和验证，确定制剂生产工艺并建立适当的过程控制
464 标准。如适用，应当进行工艺放大研究，必要时对处方、生产工艺等进行调整。
465 制剂工艺研究可以单独进行，也可以结合处方研究同时进行。制剂工艺还应考虑
466 防止混淆和引入污染，细胞浓度和数量，包装对细胞的吸附，灌装产生的剪切力
467 对细胞的影响等。鼓励采用自动化灌装工艺进行制剂灌装，如早期研究时采用手
468 动灌装工艺，应关注细胞污染风险、装量一致性、含量均匀度等，并开展充分的
469 验证研究。

470 （4）包装材料（容器）的选择

471 根据细胞产品的特性、稳定性研究结果、制剂与包材相容性研究结果及容器
472 和密闭系统安全性评估结果等，确定内包装材料（容器），并通过稳定性试验继
473 续考察包材的防冻性、密封性及与细胞产品的相容性等。建议优选监管部门批准
474 的、有临床使用安全性经验的包装材料（容器）。

475 （二）过程控制

476 免疫细胞产品本身无法耐受微生物去除/灭活工艺的操作处置，也无法进行
477 终端灭菌或除菌过滤，设计、测量、监测和控制关键工艺参数的过程控制是保证
478 细胞产品质量的关键。建议合理设立生产过程控制的取样时间点、检测项目和验
479 收标准，并依据相关的过程控制要点，适时调整改进工艺参数，以确保产品生产
480 工艺的稳健性和不同批次间质量的一致性。

481 过程控制应特别关注：（1）防止样品混淆和交叉污染，包括生产过程中的
482 供体材料、中间样品和产品，尤其注意不同患者的细胞操作应进行严格的时间/

483 空间隔离；一批次样品的生产操作前和生产操作后，设施和环境必须进行彻底的
484 清场、清洁和消毒确认；（2）防止微生物和病毒外源因子污染，应在关键时间
485 点对适合的中间样品开展无菌、支原体等安全性相关检测；（3）生产全过程
486 （包括从组织/细胞采集过程、生产、运输到临床应用整个过程）的可追溯性；（4）
487 细胞产品的生产过程中应对细胞进行细胞活率、增殖能力、细胞表型、杂质含量、
488 生物学活性等方面的质量监控，过程中的质量监控与细胞放行检测可相互结合与
489 互补。半成品或中间细胞产物是指在生产工艺过程中可分离可获取的产物；应建
490 立这些中间细胞产物的检测项目和质量标准，以确保生产工艺的可重复性和终产
491 品的一致性。对于封闭式细胞培养体系，可依据封闭系统结构、取样流程等特点
492 酌情减少过程控制的取样操作，防止污染。

493 （三）工艺验证

494 工艺验证的实施应当在生产工艺的开发设计和对产品的充分认知的基础上
495 开展。免疫细胞治疗产品工艺验证遵循生物制品工艺验证的一般原则，工艺验证
496 中需考虑：应尽量采用与临床应用情景类似的供者细胞进行工艺研究；验证中关
497 注同时生产最大产能的验证与研究。完成商业化生产工艺验证后，应进行持续工
498 艺确认，保证工艺处于受控状态。

499 与传统的药物相比，免疫细胞产品具有特殊性，也决定了其生产工艺的特殊
500 性。建议验证的内容包括但不限于：

- 501 ● 关于生产环境及设备设施的验证
- 502 ● 关于生产用原材料的验证
- 503 ● 关于细胞体外操作步骤的验证
- 504 ● 关于样本代表性的验证
- 505 ● 关于细胞放行检测和质量控制的验证
- 506 ● 关于细胞容器包材的验证
- 507 ● 关于细胞制剂的验证
- 508 ● 关于细胞运输与储存的验证

509 工艺验证研究中，通过批间分析可研究生产工艺一致性和质量的稳定性。研
510 究者应当开展批间测试，建立合理可靠的检测方法和检测时间点，并制定适当的
511 规格，以确保免疫细胞产品在使用过程中的一致性和稳定性，保障患者的安全。

如适用，应当对原料和产品进行批间分析，尽可能评估所有原料和产品的规格以及可能潜在的杂质，以全面评估产品的一致性。批次间一致性建议通过多个连续生产批次的产品进行验证，纳入多种、多批次的生产材料进行验证。

七、质量研究与质量控制

（一）质量研究

1、质量研究及其要求

免疫细胞产品研发中起始细胞、生产过程中细胞和终产品的质量研究是保证产品质量及其在临床应用的有效性和安全性的前提，也是建立细胞产品质量相关的生产环节，如产品的特征分析、工艺设计、风险控制、质量检测、持续改进等环节的基础。因此，质量研究贯穿在免疫细胞产品的全生命周期过程中。

质量研究的样品应是来自有代表性的生产批次或合适生产阶段的细胞，如初始分离的细胞、生产过程中细胞、培养结束收获的细胞或成品等，应全面研究各项细胞特性，并确定关键质量属性。

当预期的免疫细胞产品在生产过程中需进行添加成分刺激（如诱导、抗原负荷等），或者进行遗传操作（如基因编辑、外源基因表达等）时，除了对刺激或操作后的终产品进行质量研究外，还应应对刺激或操作前的细胞开展质量研究，并分别确定各自的关键质量属性。

某些情况下，免疫细胞产品的生产过程和/或使用过程可能涉及多种细胞类型或基因型/表型，其质量研究的样品选择可按以下思路开展：在生产过程中需要由多种不同类型或不同基因型/表型细胞混合制备成免疫细胞产品时，可对产品的混合特性进行质量研究，并确定混合产品的关键质量属性。当在使用过程中需要先混合多种不同类型或不同基因型/表型的免疫细胞产品时，应对各独立的免疫细胞产品分别开展相关质量研究，分别确定各自的关键质量属性。

2、质量概况

通过质量研究，应能确定免疫细胞产品的质量概况和关键质量属性。免疫细胞的质量概况一般可分为：安全性研究、功能性研究、细胞纯度研究、其他项目的研究等，也可根据产品的自身特性增加其他相关的研究。

（1）安全性研究

540 免疫细胞产品的安全性研究可以分为微生物学安全性研究和产品本身的安全
541 性研究两个方面。前者是指细胞产品都应满足无微生物污染和无微生物代谢产
542 物污染的质量要求，如真菌、细菌、支原体、病毒、内毒素等；后者是指细胞产
543 品应排除由生物学特性决定的风险因素导致安全性问题的质量要求，如细胞恶性
544 转化、不良反应等问题。应根据细胞产品的细胞种类和来源、生产工艺和相关物
545 料特点进行上述两方面的安全性研究，并选择合适的检验项目作为关键质量属性。

546 建议安全性研究应至少包括以下几个方面：

547 **外源因子：**外源因子污染可能来源于起始细胞；也可能来源于培养和生产过
548 程中使用的生物材料，比如人源和/或动物源性成分，或者生物材料在其自身的
549 生产过程中引入外源因子。因此，在产品的质量研究中应根据可能引入的外源因
550 子，结合体内和体外方法开展特定外源因子（含逆转录病毒）的检测。例如，细
551 胞生产若使用牛源材料，须进行牛源特定病毒的检测；若使用胰酶等猪源材料，
552 须进行猪源特定病毒的检测；细胞在生产过程中若使用动物源性滋养层细胞，需
553 进行滋养层细胞相关特定动物源性病毒的全面检测。在开展涉及人源传染病的外
554 源因子检测时，应关注细胞及其起始细胞可能处于感染过程中的窗口期的可能，
555 必要时应开展二次取样和检测。另外，外源因子还可能由生产操作过程中引入，
556 因此，外源因子检测除特异性来源外源因子检测外，如可行，还建议采用非特异
557 性的外源因子检测方法进行风险控制。

558 **病毒载体回复突变（复制型病毒 RCV）：**对于使用病毒载体进行遗传操作
559 的免疫细胞治疗产品，如 CAR-T，其病毒载体的回复突变是产品安全性的主要
560 风险之一，因此在产品设计和质量研究时应充分考虑，且需要在后期的研究中长
561 期监测。当选择慢病毒包装系统时，在设计层面建议使用安全性更高的质粒系统
562 包装慢病毒，以及选择含有末端自我失活（Self Inactivating, SIN）结构的病毒载
563 体；在质量研究层面，应对慢病毒载体的潜在风险进行全面评估后开展安全性研
564 究，并以研究结果作为依据说明所选择病毒载体的合理性。当采用慢病毒载体进
565 行遗传操作时，RCL（replication-competent lentivirus）作为一个重要安全性风险
566 关注点，申请人除了在生产过程中对病毒（上清液、病毒生产终末期细胞）采用
567 敏感的指示细胞培养法检测 RCL，还应在放行检验中对细胞终产品采用经方法
568 学验证的快速方法进行 RCL 的检测放行，同时还应进行留样，必要时用指示细

569 胞培养法进行回溯检测分析。每批检测时都设置合理的阳性、阴性对照，检测方
570 法的灵敏度和检测样本量需达到临床研究使用剂量的安全性要求，以及考虑病毒
571 颗粒对 RCL 检测的抑制效果等。当选用的质粒系统风险较高（如存在病毒包装
572 非必要元件、多个包装元件存在于同一质粒等情况）时，还应进一步提高慢病毒
573 复制回复突变的检测要求。如果采用其他的病毒系统，如逆转录病毒系统，也应
574 遵循以上的安全性风险控制原则。

575 **细胞恶性转化：**某些高风险情况下，细胞产品有发生恶性转化（包括但不限
576 于成瘤性、致癌性等）的可能性，如具有转化潜力的异体来源的免疫细胞产品，
577 或经过体外诱导转化操作的自体细胞产品等。在这类情况下应结合体内和体外实
578 验对细胞发生恶性转化的可能性进行安全性研究和评估。

579 **不良反应：**因其细胞特征和治疗机制的特殊性，免疫细胞治疗产品在临床应
580 用时可能发生某些特定的不良反应，如 CAR-T 细胞产品在临床应用时可能发生
581 脱靶效应、细胞因子风暴、过敏等。应结合体内和体外实验针对细胞产品导致不
582 良反应的可能性开展安全性研究和评估。

583 **杂质：**包括工艺中引入的杂质，如残余的蛋白酶、分化诱导试剂、血清、病
584 毒载体、以及残留的磁珠、纤维和塑料微体等；和产品相关的杂质，如非目的细
585 胞、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。对于终
586 产品中所有可能存在的添加材料，应当建立和明确去除方法和残留定量检测方法，
587 并根据人体暴露最大剂量设定浓度阈值。如果添加成分不能有效去除，则应当在
588 动物模型或其他系统中进行安全性和毒性评估。

589 **（2）功能性研究**

590 功能性研究是通过体外功能分析实验来评价免疫细胞治疗产品（或其相关样
591 品）是否具备合格的临床治疗功能的相关研究。开展功能性研究时，应针对细胞
592 产品的性质、特点和预期用途（适应证），尤其是实现临床治疗效果的具体机制
593 和指标，选择正确的作用机制相关质量属性作为关键质量属性，建立和验证合适
594 的体内/外功能性分析方法，用于产品的研究与分析。

595 免疫细胞治疗产品实现临床治疗效果的机制可包括：

596 **通过细胞直接作用：**是指产品细胞和靶细胞结合，进一步启动靶细胞发生反
597 应（如启动细胞溶解反应、诱导细胞凋亡或增殖）的作用机制。这类机制的体外

598 功能性研究一般可通过将细胞产品与不同靶细胞共培养并检测相关指标变化来
599 开展。

600 **通过释放活性物质作用：**是指细胞产品通过释放各种活性物质来发挥治疗作
601 用的一种机制，包括直接作用如阻断靶细胞表面受体活化或诱导靶细胞再生等；
602 间接作用如增强人体免疫能力或抑制周边血管生成等发挥作用。这类机制的功能
603 性研究一般可通过检测对相关因子的释放或表达来开展。

604 **以上两者兼具：**可通过对以上两种机制的分别检测来开展功能性研究。

605 可能包括但不限于以下研究方面：

606 **分化/发育潜能：**研究的范围应涵盖该产品所含各类细胞的各种可能的分化/
607 发育方向。其中与适应证和临床应用安全性和有效性相关的分化功能应作为代表
608 性评价内容纳入质量控制。

609 **对外源性刺激的应答：**外源性刺激可以来自培养基中添加的各种活性物质如
610 诱导因子、单抗、小分子化合物等，或来自其他细胞如基底细胞、靶细胞的作用，
611 或来自外界培养条件的刺激如低氧环境、机械剪切力等。对外源性刺激的应答一
612 般可通过研究外界相关因素作用于细胞后产生的细胞学反应，如细胞形态的改变、
613 细胞增殖能力的改变、细胞因子的分泌、表型的变化、信号通路的改变、代谢的
614 改变等。

615 **表达产物的定性与定量研究：**当细胞产品及其功能涉及内源或外源基因产物
616 的表达时，应开展对表达产物的研究，如表达产物的种类、特性、表达水平、修
617 饰程度（如糖基化、磷酸化等）、聚合性（如同源或异源聚合物等）、转运（如
618 胞内转运、分泌等）、代谢产物等定性及定量研究。

619 **（3）细胞纯度研究**

620 免疫细胞产品的质量和效力往往和产品中功能性细胞的纯度相关。实际情况
621 可能比较复杂：一方面，应关注不同类型产品对免疫细胞产品中的功能细胞纯度
622 的阈值要求各不相同；另一方面，也应注意同一产品中不同的功能亚群细胞对细
623 胞产品整体治疗效力的影响能力也各不相同，需要单独研究不同亚群的细胞纯度，
624 比如 CAR-T 细胞治疗中记忆性 T 细胞亚群及其纯度对最终疗效的影响可能较大；
625 在某些情况下，产品中非功能性细胞的纯度也可能直接影响产品治疗效果，甚至
626 是安全性，例如 CAR T 细胞产品中残留的患者 B 细胞具有较高的安全性风险。

627 所以在开展免疫细胞产品的细胞纯度研究时，应结合产品的性质、特点、治疗机
628 制和治疗效果，选择正确的细胞组分作为关键质量属性开展纯度研究，并在之后
629 的其他研究中进一步验证细胞纯度研究的方法设计和结果是否适用。

630 细胞纯度研究的分析对象可包括：

631 **活细胞比率：**当细胞产品为单一细胞种类并具有均一性时，一般可以通过直
632 接检测产品中活细胞的比率来研究产品的纯度。

633 **细胞亚群比率：**当细胞产品为多种不同类型或不同基因型/表型细胞所组成
634 的混合物时，建议通过检测与治疗效果相关的各个不同细胞亚群的比率来研究产
635 品的纯度，并进一步综合评估产品的质量和有效性。某些情况下，也可以对产品
636 细胞按代谢类别、成熟阶段（幼稚、衰老、耗竭等）进行分类。

637 **功能性细胞的比率：**当细胞产品中同时存在功能性和非功能性细胞时，如进
638 行了基因修饰/改造或体外诱导等操作后的细胞产品，建议通过检测功能性细胞
639 比率来研究产品的纯度。比如在 CAR-T 产品中，在进行了嵌合抗原受体基因转
640 入的操作后，纯度分析的目标细胞群应选择能同时正确表达嵌合抗原受体(CAR)
641 和 T 细胞标记的功能性细胞，不能包括未表达 CAR 的 T 细胞和虽表达 CAR 但
642 T 细胞标记不正确的细胞。

643 **非目的细胞群体的比率（如适用）：**当细胞产品中某些非目的细胞群体可能
644 对产品的临床用途带来影响和/或风险时，建议细胞纯度研究还应包括非目的细
645 胞群体的定性研究和/或定量研究，并根据研究数据进一步开展质量控制。同时，对非
646 目的细胞开展安全性研究和功能性研究，必要时进行针对性的工艺设计去除非目
647 的细胞，并进行质量控制。

648 **（二）质量控制**

649 申请人应建立免疫细胞治疗产品的质量控制策略。建议采用中间样品质量检
650 验、终产品放行检验并结合留样检验的机制进行质量控制。

651 **1、质量标准**

652 随着研究的不断深入（如从临床前阶段进行至临床阶段及上市阶段），工艺
653 相关信息应逐渐累积，检验方法应逐步完善，以适应各阶段的质量控制要求。免
654 疫细胞治疗产品的质量控制一般应考虑鉴别、生物学效力、纯度、杂质、转基因

655 拷贝数（如适用）、细胞数量（活细胞数、功能细胞数等）和一般检测（如 pH、
656 渗透压、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。

657 结合质量研究，质量标准的制定应有充分的依据。制定依据应基于风险控制
658 分析、可靠的科学知识和统计方法，并有研究数据支持，数据可包括产品研发阶
659 段的可用性数据、非临床和/或临床研究中使用批次的检测数据、工艺验证数据
660 以及稳定性研究的数据等，同时兼顾产品的特性和当下的科学认知与共识。

661 免疫细胞质量标准应包括检定项目、检验方法与标准限度。

662 （1）质量标准的检测项目和检验方法

663 质量控制一般应考虑检验项目和方法包括但不限于：

664 **细胞鉴别：**细胞鉴别的方法可包括细胞形态、HLA 分析、遗传多态性分析、
665 核型分析、STR 分析、代谢酶亚型谱分析、表面标志物及特定基因表达产物分析
666 等多种检测方法。建议采用特异性强的检测方法对不同类型及不同来源（供者）
667 的细胞产品进行综合的细胞鉴别。

668 **存活率及增殖能力：**建议采用不同原理的检测方法，如活细胞计数、细胞倍
669 增时间分析、细胞周期分析、克隆形成率分析等，检测细胞的活率和增殖能力。

670 **纯度和均一性：**建议通过检测细胞标志物、遗传多态性及特定生物学活性等
671 分析方法，对产品进行细胞纯度或均一性的检测。

672 **无菌试验和支原体检测：**应依据现行版《中华人民共和国药典》中的生物制
673 品无菌检查法和支原体检查法，对细菌、真菌及支原体进行检测。如药典传统方
674 法无法满足免疫细胞治疗产品检验样品量有限、快速放行等的要求，申请人可以
675 开发新型的无菌和支原体的检测方法进行放行检测，但是检测方法应经过充分验
676 证。在未能充分验证新型方法可以完全替代药典传统方法时，建议在使用新型检
677 测方法进行放行检测的同时，留样采用药典传统方法进行平行检测。

678 **内毒素检测：**应依据现行版《中华人民共和国药典》中的细菌内毒素检查法，
679 对内毒素进行检测或采用其他经过验证研究的适用方法。

680 **细胞内、外源因子的检测：**建议根据质量研究的结果确定细胞产品及其生产
681 过程中可能引入并影响产品质量和安全性的关键内、外源因子，在此基础上选择合
682 适的方法如细胞培养法、核酸或蛋白检测法、荧光抗体检测法等对内、外源因
683 子检测。对于使用逆转录/慢病毒载体转导的基因修饰的细胞产品，RCV 作为一

684 一个重要安全性风险关注点，申请人除了在生产过程中对病毒（上清液、病毒生产
685 终末期细胞）采用经验证的指示细胞培养法完成 RCV 标准检测以外，还应在放
686 行检验中对细胞终产品采用经方法学验证的快速方法进行 RCV 的检测放行，同
687 时还应进行留样，必要时用指示细胞培养法进行回溯检测分析。

688 **异常免疫反应：**建议对异体来源的细胞产品选择合适的方法进行免疫学反应
689 检测。

690 **成瘤性：**对于高风险产品，应通过合适的体内或体外方法如裸鼠成瘤性试验、
691 软琼脂克隆形成试验、端粒酶活性检测、核型分析等直接或间接的方法对细胞产
692 品的成瘤性进行检测。对于中低风险产品，建议根据风险程度的不同酌情开展成
693 瘤性分析。

694 **生物学效力试验：**根据产品特点和作用机制，采取合适的检测方法，如对靶
695 细胞的效应、分泌特定因子等，进行生物学效力检测。当直接的检测试验受到所
696 需细胞数量限制时，可研发和实施替代性的检测方法。

697 **培养体系中其他添加成分残余量和非功能杂细胞群的检测：**根据质量研究的
698 结果，明确对产品生产过程中残余的、可能影响细胞产品质量和安全性的工艺相
699 关杂质（如牛血清蛋白、抗生素、消化酶、细胞因子、磁珠等）和产品相关杂质
700 （如非功能杂细胞群、细胞碎片等）的控制，并选择适用的方法进行检测。对于
701 一般工艺相关杂质，如经充分验证证明工艺可对其有效、稳定地清除，可结合工
702 艺进行控制。

703 **（2）质量标准的标准限度**

704 质量标准的标准限度的类型（如定性或定量标准限度等）、用途（如控制限、
705 放行限、监管限等）和范围应可保证免疫细胞治疗产品的安全性、有效性和质量
706 可控性。标准限度应通过临床前研究、临床研究和验证研究，以及其他相关研究
707 （如经验、文献报道和稳定性研究等）的数据确定。

708 免疫细胞产品的质量控制内容应涵盖整个生产过程，对于生产过程中的重要
709 的生产用原材料，如质粒和病毒载体等，也应建立质量标准进行风险控制。

710 **2、检验方法的验证**

711 放行检验用方法应经过研究与验证，特别是对于建立的产品特异性方法应进
712 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。药典方法经过修订

713 或替代时，应验证其合理性。方法学验证研究应关注阳性对照、阴性对照、抑制
714 对照、供试品取样代表性和取样量、检测指标、判定标准等方面的合理性。

715 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
716 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
717 时可以采用两种检验方法进行相互验证。

718 产品研发过程中如出现检测方法的变更，应开展方法学桥接对比研究。

719 3、参考品

720 在条件许可的情况下，检验项目与检测方法可与适当的参考品做比较。选择
721 适当的检测对照品，以实现不同批次产品间的可比性，或者实现不同批次检测结
722 果间的可比性，并有助于确定设备和试剂在规定的范围内工作。参考品在建立时
723 应当说明其预期用途和计量学溯源，在使用时应遵照规定的检测方法进行标定。
724 在产品开发的各个阶段使用的参考品应开展稳定性研究。申报时，应明确参考品
725 的来源、制备信息和用途，提供参考品质量研究、标定研究和稳定性研究数据。

726 4、放行检验

727 部分免疫细胞治疗产品因时效较短，在完成全部的质量检验之前，生产者可
728 对这类产品进行放行检验作为临床应用的依据。

729 放行检验应考虑以下基本原则：

730 （1）在放行检测时间受限时，可考虑过程中的质量监控，将过程控制、放
731 行检验与留样检验相结合，可通过过程控制简化放行检验。

732 （2）在检验方法的设计上，可根据方法的时效性和便捷性研究并验证替代
733 方法进行放行检测。在完成充分验证前，应开展药典传统方法和替代检测方法的
734 平行检测，积累数据并在后续研究中不断优化。

735 （3）在放行检验的同时，应留样开展全面的质量检验。放行检验与留样检
736 验结果不一致时，应充分考虑相关风险。

737 5、使用前的质量核准

738 一些免疫细胞产品在给药前还需经过一系列操作步骤如稀释、混匀、复苏等，
739 在研发时应开展模拟使用前操作的相关研究，根据研究结果明确使用前的操作步
740 骤和注意事项，并指导临床医护人员正确操作使用。由于免疫细胞产品的批次
741 间差异，在临床使用前仍可能出现非预期的质量变化，因此临床使用前应实施质

742 量核准步骤，核准的内容可包括但不限于：

743 • 细胞形态观察；

744 • 活细胞数及比率测定；

745 • 颜色、外源性异物的观察；

746 • 如适用，快速无菌检测（如取培养液及/或沉淀物用丫啶橙染色或革

747 兰染色等）；

748 • 标签核对和操作步骤复核。

749 **八、稳定性研究**

750 免疫细胞治疗产品的稳定性研究是基于对产品及其生产工艺的系统研究和

751 理解，通过设计试验获得其质量特性在各种环境因素（如温度、冻融等）的影响

752 下随时间变化的规律，以认识和预测细胞产品的稳定趋势，并以此作为产品有效

753 期（或中间产品保存期）设定的依据，产品质量标准制订的基础，以及工艺参数、

754 制剂处方、包装材料等各项选择是否合理的判定标准。

755 **（一）稳定性研究基本原则**

756 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，以及包装、保存和运输的情况设计合理的研究方案。

759 研究用样品：应依据特定细胞的可获及性，选择代表性样本开展研究，包括

760 采集的起始细胞、生产过程中间样品、细胞成品、临床使用过程中样品等，研究

761 用样品的细胞密度和体积范围应可代表实际生产和使用条件。样品的包装容器与

762 密闭系统应选择与实际储存相同或同材质的小规格包装容器与密闭系统。对于自

763 体用途的细胞产品，出于使用患者材料的伦理考虑，采用自体细胞样品开展稳定性研究可能会面临挑战。在这种情况下，可以先使用健康供者的细胞进行早期稳定性评估，并在后续研究过程中就健康供者样品对患者材料的代表性进行论证和研究。

767 考察条件：对于细胞产品的保存、运输，应根据产品特点和保存、运输条件

768 开展保存、运输稳定性来支持产品在生产中和生产后的保存期间和运输有效期内的

769 细胞完整性和产品稳定性。对于需冷冻保存的细胞成品、起始细胞或中间产品，

770 应验证其在冻存和复苏条件下细胞质量（如细胞数量、完整性、活率等）的变化

情况；如适用，还应验证多次反复冻融的影响。对于在使用过程中需要暂存、复苏、稀释或混合的产品，应开展使用过程稳定性研究来支持和论证产品在有效期中的细胞完整性和产品稳定性。

检测指标和检测方法：长期稳定性研究方法通常采用产品放行检测用方法。结合产品特性，设定合理、全面的检测指标，包括但不限于理化特性、细胞活率、功能细胞比例、生物学活性、纯度、杂质、微生物安全性指标等。应合理设置各项指标的考察频次，如至少在拟定有效期的初期和末期进行无菌试验或替代试验（如容器/密封系统的完整性试验）。若稳定性数据提示辅料在有效期内氧化、降解等对产品质量有不良影响，有必要在稳定性试验中对辅料含量加以监测。中间产物或原液及成品加速、强制条件试验检测方法应根据研究目的和样品的特点采用合理、敏感的方法。

申报临床试验阶段的稳定性研究数据，应可以初步说明产品的稳定性并可以支持临床试验使用。申报生产上市时，稳定性研究数据应为有效期（保存期）的制定提供有效依据。

（二）运输稳定性研究

细胞产品通常要求冷链运输，对产品的运输过程应进行相应的稳定性模拟验证研究。稳定性研究中需充分考虑运输路线、交通工具、距离、时间、条件（如温度、反复冻融、辐射、振动情况等）、产品包装情况（如外包装、内包装等）、产品放置情况和监控器情况（如温度监控器的数量、位置等）等各方面因素。对于悬浮在液体中保存的细胞成品、起始细胞或中间产品，需要在研究中关注振荡对细胞的影响，并考虑到产品的放置方向，如正立、倒立或水平放置等。设计稳定性研究时，应模拟运输时的最差条件，如高温季节、运输距离、振动频率和幅度及脱冷链等。通过验证研究，应确认产品在运输过程中处于拟定的保存条件下可以保持产品的稳定性，并评估产品在短暂的脱离拟定保存条件下对产品质量的影响。对于需要冷链运输的产品，建议对产品脱离冷链的温度、次数、总时间等进行研究。

（三）使用稳定性研究

使用稳定性研究设计时应考虑临床实际使用的场景对产品稳定性的影响，如注射器及针头种类、抽吸与推注的速率、使用前的配制或稀释的影响等，如适用，

800 还应包括静脉滴注的输液管道种类，以及给药条件（如温度、光照等）和时间的
801 影响。应根据使用稳定性研究数据合理拟定产品解冻或临床配伍后的放置条件和
802 时间，防止放置过程中出现微生物污染。

803 **（四）保存条件标示**

804 根据稳定性研究结果，需在产品说明书或标签中明确产品的保存条件和有效期
805 期。不能冷冻的产品需另行说明。若产品要求防辐射或避免冻融等，建议在各类
806 容器包装的标签中和说明书中注明。对于使用前需冻融、稀释或混合的产品，应
807 明确产品在操作后的稳定性，其中应包括冻融、稀释或混合后的保存条件和最长
808 保存期。

809 **九、容器和密闭系统**

810 为避免由于存储而导致的产品质量发生非预期变化，研究者应对免疫细胞产
811 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
812 相容性研究，以说明其使用的合理性。

813 **（一）研究要求**

814 免疫细胞治疗产品与包装容器和密闭系统相容性研究的基本原则可参照一
815 般生物制品包材相容性研究的要求，并根据产品自身的特点以及包装、保存、运
816 输和使用的情况设计合理的研究方案。

817 在开展临床试验之前，在保证临床试验用样品安全性的前提下，包材相容性
818 研究可采用供应商对包装材料进行的基本性能测试和生物安全性评估结果作为
819 参考依据，也可采用符合临床试验需要的初步稳定性研究结果作为依据。在临床
820 试验期间，应根据细胞制剂组分和保存条件，按照相关指导原则规范开展完整的
821 相容性研究，并在上市申报中提供全面的包材相容性和功能性研究数据。

822 **（二）研究样品**

823 容器或包装系统的相容性安全性评估和功能性研究的对象应包括细胞产品
824 直接接触的包装容器，以及在生产过程中与细胞直接接触的容器（如培养瓶、各
825 类移液管/枪头、针筒、细胞冻存管、冻存袋等）。

826 1、当研究对象是与细胞产品直接接触的包装容器时，建议采用多批细胞产
827 品包装于拟选用的材料或容器后进行相容性试验；当研究对象是在细胞产品生产
828 过程中与细胞直接接触的容器时，包括培养瓶、各类移液管/枪头、针筒和细胞冻

829 存管等，应在充分考虑相容性的前提下开展生产过程中的适用性验证。

830 2、在经过评估，具有代表性的前提下，可采用小规格同材质的包装容器或
831 直接接触材料作为样品。

832 (三) 研究内容

833 容器和密闭系统的安全性评估的基本内容应包括容器和包材的来源、质量标准、生物安全性研究数据等信息。容器和密闭系统的相容性研究的基本内容应根据产品特点、包材特点、保存条件和运输条件合理设置，对特定条件下的密闭保存容器还应进行相应条件下的功能适用性研究，如容器密闭性、冷冻适用性等，以及容器与特殊辅料成分（如 DMSO）的相容性等。

838 相容性研究试验项目：可根据细胞产品在保存、运输和生产过程中使用的容器材料的种类划分需重点考察的项目，包括但不限于：

840 (1) 聚合材料（如塑料、聚合纤维素等）：建议重点考察水蒸气、氧气的渗入；水分、挥发性药物的透出；高分子材料对药物的吸附；细胞与高分子材料的作用；高分子材料中添加剂、加工时分解产物对细胞的影响；以及微粒、密封性研究等。

844 (2) 玻璃：建议重点考察玻璃中碱性离子的释放对细胞产品 pH 的影响；有害金属元素的释放；不同温度（尤其冷冻时）、不同酸碱条件下玻璃的脱片；含有着色剂的避光玻璃被某些波长的光线透过，影响细胞活性；玻璃对细胞的吸附；玻璃容器的针孔、瓶口歪斜等问题。

848 (3) 金属：建议重点考察细胞产品对金属的腐蚀；金属离子对细胞稳定性的影响；金属上保护膜在试验前后的完整性等。

850 (4) 橡胶：加以重点考察其中各种添加物的溶出对细胞的作用；橡胶对细胞的吸附以及填充材料在溶液中的脱落。

852 申请人除了细胞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外，对于运输用的次级包装容器（非直接接触细胞）或材料也应开展验证，验证的项目包括但不限于保温性、密封性、抗机械压力和遮光性（如需要）等方面。

856 十、工艺变更

857 如果发生工艺变更，应根据生产工艺变更的具体情况进行变更类别的评估

858 (微小变更、中等变更、重大变更),参考国内外有关变更相关技术指导原则开
859 展充分研究,分析变更前后产品安全性、有效性和质量可控性等方面的可比性,
860 以确保生产工艺变更前后的产品质量一致。工艺变更对产品安全性、有效性和质
861 量可控性的影响,通常可包括对细胞理化特性、微生物安全性、表型、生物学活
862 性、稳定性等方面。申报时,应详细描述具体变更内容、变更原因和针对变更开
863 展的研究。

864 生产工艺研究过程中,应关注非临床研究样品制备工艺、临床试验用样品制
865 备工艺以及商业化生产工艺(广义的包括生产工艺、场地、原材料、规模等)等
866 几个重要生产阶段的生产工艺情况,如果存在变更,应评估变更可能对产品质量
867 产生的影响。一般不建议在关键性临床试验开始后发生影响产品安全性和质量的
868 关键性变更;若确需变更,应进行充分的工艺变更前后可比性研究和评估,必要
869 时,还需开展动物或人体临床桥接试验。鼓励申请人针对变更研究方案和药审中
870 心开展沟通交流。

871 变更前后产品质量和稳定性比较,可以根据免疫细胞治疗产品的生产规模、
872 工艺、质量特点,采用变更前、后多个批次的样品进行可比性研究。如适用,生
873 产工艺变更后产品可与产品参考品进行比较。如条件许可,应对各研发阶段的细
874 胞产品进行留样,留样的数量和保存条件应能满足后续工艺、质量对比研究的需
875 要。

876 十一、环境和生物安全性

877 作为以临床治疗为主要用途的细胞产品,其生产和使用过程中应遵守药品的
878 相关基本要求,包括细胞产品对其生产和使用环境的要求,以及细胞产品在生产
879 和使用过程中对环境潜在风险的防控要求等。对于细胞产品在生产和使用过程中
880 对环境的潜在风险,应通过环境风险评估进行研究并采取对应措施和替代方案。

881 (一)免疫细胞产品环境风险评估的特点

882 当免疫细胞产品的细胞不属于自然存在的细胞种类,或者在生产过程中发生
883 了显著改变如遗传操作时,则该细胞产品在研发、生产和使用过程中建议开展环
884 境风险评估,以明确其对环境的潜在风险。

885 与通过化学方式产生的药品不同,免疫细胞产品的环境风险评估往往没有可
886 界定的环境风险阈值,因此对免疫细胞治疗药物的环境风险评估应着重于其对

887 直接暴露的非患者人员的不良影响，以及对环境的不良影响。一旦在环境风险评
888 估过程中发现不可接受的风险，应进一步确定降低风险的措施。

889 鉴于免疫细胞产品的异质性，环境风险评估的要求应根据具体情况制定，并
890 以该细胞产品的数量和实验数据作为评估的基础。

891 **（二）环境风险评估的主要内容**

892 环境风险评估的主要内容包括：

893 **1、鉴别可能造成环境风险的特征**

894 可能造成环境风险的特征可以是细胞产品本身的生物安全性特征如毒性、致
895 病性、感染性、潜伏性、传播机制等，也可以是该产品在研发或生产过程中的某
896 些操作如基因编辑、病毒转导、细胞融合等，以及免疫细胞产品在使用或释放后
897 与环境发生的不可预见的变化如缺陷性病毒重组变异等。应通过科学假设和实验
898 来分析和鉴定可能对人类健康或环境造成不良影响的各项特征及其后果。

899 对于含有病毒载体的免疫细胞产品，还应考虑其病毒载体的种类、稳定性、
900 致病性等相关特征。当病毒载体是经过修饰失去复制能力和致病性的载体类型时，
901 应在环境风险评估中测定其回复为可复制型或毒性病毒的安全性特征。

902 **2、评估可能造成的潜在环境风险**

903 环境风险评估应评估各项潜在环境风险的种类及其影响程度和发生几率，并
904 给出总体环境风险的结论。

905 **（1）评估潜在环境风险的影响方面**

906 在评估潜在环境风险时应研究其产生影响的方面，包括免疫细胞产品和/或
907 载体的特征，可能受影响的环境特征和可能发生的变异的特征等。

908 **（2）评估潜在环境风险的影响程度**

909 潜在环境影响的程度可以分成不同的层次，如可忽略、有自限性、有严重效
910 应、以及导致长期永久有害后果等。评估影响程度的大小时应以已知会发生的事
911 件和可合理预期的事件为依据。

912 **（3）评估发生潜在环境风险的可能性**

913 发生潜在环境影响可能性的评估依据是已知会发生的事件和可合理预见的
914 事件。如当免疫细胞产品和/或载体获得复制能力和传染能力时，应合理预见并
915 评估发生潜在环境风险。

916 (4) 评估总体环境风险

917 在完成每一项潜在环境影响的鉴别、程度与可能性后, 应将所有潜在环境影
918 响汇总成总体环境风险评估。

919 3、降低总体环境风险的措施

920 环境风险评估的内容应包括为避免或缓解总体环境风险而计划采取的措施, 如灭
921 活、清除、限制暴露、集中处理废物和监测产品在环境中的释放等。这些措施应
922 在总体环境风险评估的基础上设计和实施, 包括但不限于:

- 923 ● 设计和实施卫生措施如废物处理的要求等。
- 924 ● 设计和采用适当的生物防护条件生产、使用和处理免疫细胞产品和/
925 或其载体。尽可能减少受者与易感人群或物种的接触。
- 926 ● 设计和采取尽可能减少气雾形成的控制措施。

927 4、拟定生产操作的替代方案

928 当免疫细胞产品在生产过程中的某项操作(或某组相关操作)有潜在的不良
929 环境影响时, 应在环境风险评估中讨论与该项操作相比环境风险更小的合理替代
930 行动方案。通过拟定措施来替代或缓解相关生产操作的影响以降低总体风险水平。

931 (三) 外源因子的安全性评价

932 免疫细胞产品的生物安全性还包括对外源因子的安全性评价。根据细胞产品
933 的类型和工艺的不同, 潜在外源因子污染的种类包括病毒外源因子、非病毒外源
934 因子和非常规外源因子等, 潜在外源因子污染的来源可以是人或者除人以外的动
935 植物和微生物。应通过起始细胞控制、生产用原材料及辅料控制、设施控制、生
936 产过程控制结合对产品的检测策略等措施尽可能降低外源因子污染的风险。

937 1、非病毒外源因子

938 除细菌载体以外的免疫细胞产品要求微生物无菌。

939 由于可能无法采用加热或辐照等直接灭菌方法, 因此应通过以下多种措施确
940 保免疫细胞产品的微生物无菌性:

- 941 ● 选择和控制免疫细胞产品的起始细胞(包括种子和细胞库)、试剂、
942 辅料及设备。
- 943 ● 在生产过程中防止外源因子污染。
- 944 ● 采用可降低生物负荷的工艺步骤如过滤除菌。

- 进行生产过程检查和控制，重点限制生物负荷水平和/或内毒素水平。

2、病毒外源因子和非常规外源因子

尽可能地排除生产过程中使用的外源性病毒和其他非常规外源因子及其残留物（如生产和辅助病毒）的污染，比如在细菌底物上产生的与载体相关的噬菌体污染，或者因生产工艺相关生物材料引入可传播海绵状脑病（Transmissible spongiform encephalopathy, TSE）等。

- 为此，可通过病毒清除/灭活研究来确定生产工艺中的相关步骤，以及对起始细胞和其他生物来源的生产材料进行全面检测，或采用已验证的工艺进行操作确保这些物料的病毒安全性，包括：选择和控制起始原料（包括种子和细胞库）、原材料和设备。

- 采取措施防止外来物质进入生产过程。

- 防止外源因子进入生产过程。

在可行的情况下采用载体纯化工艺步骤对相关病毒进行清除/灭活。

十一、名词解释

细胞治疗（Cell Therapy）：是指应用人自体或异体来源的细胞经体外操作后输入（或植入）人体，用于疾病治疗的过程。体外操作包括但不限于分离、纯化、培养、扩增、活化、细胞（系）的建立、诱导、遗传操作、冻存复苏等。

过继性细胞治疗（Adoptive Cell Therapy, ACT）：是指从肿瘤患者体内分离免疫活性细胞，在体外进行活化和扩增后回输患者，从而达到直接杀伤肿瘤或激发机体的免疫应答杀伤肿瘤细胞的目的。

原材料（Raw materials）：指细胞治疗产品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）：起到生产病毒载体、支持细胞生长等辅助作用而不回输给受者的细胞，包括病毒包装细胞、滋养层细胞等。

设计空间（Design Space）：已被证明能保证细胞治疗产品质量的输入变量（如物料属性）和工艺参数的多维组合和交互作用的范围。在设计空间内的变动，在监管上不被视为变更。

细胞批次（Cell batch）：一般情况下，在单一容器中充分混合的一定数量的细胞为一批。

974 **目标产品质量概况 (Quality Target Product Profiles, QTPP)：**是指理论
975 上可以达到的细胞产品及其生产过程中各阶段细胞样品所含有的,预期可能改变
976 产品临床效果(安全性和有效性)的所有质量方面的综合描述。

977 **关键质量属性 (Critical Quality Attribute, CQA)：**指细胞治疗产品的物理、
978 化学、生物或微生物性质或特征,应在适当的限度、范围或分布之内,以确保预
979 期的产品质量。

980 **成瘤性 (Tumorigenicity)：**系指细胞接种动物后在注射部分和(或)转移
981 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。

982 **致瘤性 (Oncogenicity)：**系指细胞裂解物中的化学物质、病毒、病毒核酸
983 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。
984 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。

985

986 **十二、参考文献**

- 987 1. Guidance for Industry Guidance for Human Somatic Cell, FDA, 1998.
- 988 2. Eligibility Determination for Donors of Human Cells, Tissues, and Cellular and
989 Tissue-Based Products (HCTPs), FDA, 2007.
- 990 3. Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC)
991 Information for Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug
992 Applications (INDs)—Guidance for FDA Reviewers and Sponsors, FDA,
993 2008.
- 994 4. Human cell-based medicinal products, EMA, 2008.
- 995 5. Risk-based approach according to Annex I, part IV of Directive 200183EC
996 applied to advanced therapy medicinal products, EMA, 2001.
- 997 6. Xenogeneic cell-based medicinal products, EMA, 2009.
- 998 7. GUIDANCE DOCUMENT: Preparation of Clinical Trial Applications for use of
999 Cell Therapy Products in Humans, Health Products and Food Branch,
1000 Canada, 2015.
- 1001 8. guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational
1002 advanced therapy medicinal products in clinical trials, EMA, 2019.

- 1003 9. guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products
1004 containing genetically modified cells, EMA, 2019.
- 1005 10. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene
1006 Therapy Investigational New Drug Applications (INDs); Draft Guidance for
1007 Industry, FDA, 2018.
- 1008 11. Scientific requirements for the environmental risk assessment of gene-therapy
1009 medicinal products, EMA, 2008.
- 1010 12. Quality, preclinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products,
1011 EMA, 2018.
- 1012 13. Considerations for the Design of Early-Phase Clinical Trials of Cellular and Gene
1013 Therapy Products; Guidance for Industry, FDA, 2015.
- 1014 14. Guidance for Industry; Potency Tests for Cellular and Gene Therapy
1015 Products, FDA, 2011.
- 1016 15. Guidance for Industry ; Preparation of IDEs and INDs for Products Intended to
1017 Repair or Replace Knee Cartilage, FDA, 2011.
- 1018 16. Determining the Need for and Content of Environmental Assessments for Gene
1019 Therapies, Vectored Vaccines, and Related Recombinant Viral, FDA, 2015.
- 1020 17. Lipsitz Y., Timmins N. Zandstra P. Quality cell therapy manufacturing by design,
1021 [J] Nature Biotechnology 2016, Vol 34, No. 4, 393-397.
- 1022 18. French A, Bravery C, Smith J, Chandra A, Archibald P, Gold JD, et al. Enabling
1023 Consistency in Pluripotent Stem Cell-Derived Products for Research and
1024 Development and Clinical Applications Through Material Standards. [J] Stem
1025 Cells Transl Med 2015; 4(3) : 217-23.
- 1026 19. P Mazur. Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications. [J] Am J
1027 Physiol. 1984 Sep;247(3 Pt 1):C125-42.

1028
1029
1030
1031
1032
1033

1

2

3 **人源性干细胞产品药学研究与评价技术指导原则**
4 **（征求意见稿）**

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14 **国家药品监督管理局药品审评中心**

15 **生物制品药学部**

16

17 **2021 年 8 月**

目 录

1		
2	一、前言	3
3	二、适用范围	3
4	三、一般原则	3
5	四、风险评估与控制	4
6	五、生产用材料	5
7	(一) 原材料	5
8	1. 起始原材料	5
9	1.1 生产用细胞	5
10	1.2 辅助细胞	8
11	1.3 体外基因递送与修饰系统	9
12	2. 其它原材料	9
13	(二) 辅料	10
14	六、生产工艺	11
15	(一) 工艺开发	11
16	1. 细胞培养工艺	11
17	2. 制剂工艺	12
18	3. 工艺过程控制	12
19	4. 工艺变更	13
20	(二) 工艺验证	13
21	七、质量研究与质量控制	14
22	(一) 质量研究	14
23	1. 细胞特性分析	14
24	2. 理化特性分析	15
25	3. 细胞纯度分析	15
26	4. 生物学活性分析	17
27	(二) 质量标准	18
28	八、稳定性研究	20
29	九、包装及密闭容器系统	20

1	十、名词解释.....	21
2	十一、参考文献.....	21

3 一、前言

4 2017 年，原国家食品药品监督管理总局发布《细胞治疗产品研究与评价
5 技术指导原则（试行）》，对细胞治疗产品按照药品管理相关法律法规进行研发
6 时的技术要求进行了总体阐述。为进一步规范和指导干细胞产品的药学研发和
7 申报，促进干细胞产业发展，特制定本技术指导原则。

8 本指导原则的目的是基于现有认识，对按药品进行开发的干细胞产品从研
9 发到上市阶段药学研究技术问题提供建议，药物研发者亦可根据干细胞产品研
10 发的实际情况，采用其他更有效的方法和手段进行干细胞产品开发，但是必须
11 符合药物研发的规律，并提供科学合理的依据。

12 按照药品进行研发和注册申报的干细胞产品需接受国家药品监督管理局
13 （NMPA）的监管，符合《中华人民共和国药品管理法》、《药品注册管理办法》、
14 《中华人民共和国药典》等相关法律法规的要求。供人体使用的干细胞产品的生
15 产全过程应当符合《药品生产质量管理规范》（GMP）的基本原则和相关要求。

16 二、适用范围

17 本指导原则中“干细胞产品”包括由人源性的成体干细胞(adult or somatic
18 stem cells, ASCs/SSCs)、人胚干细胞(human embryonic stem cell, hESCs)
19 和诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)扩增、诱导
20 分化，或成熟体细胞转(分)化获得的干细胞及其衍生细胞，与辅料相混合，分
21 装至特定容器，符合特定药品放行标准，可直接应用患者，也可与组织工程材料
22 一起用于患者的治疗产品。

23 三、一般原则

24 干细胞产品具备来源和组成复杂、细胞类型多样、细胞本身具备体内生存、
25 自主增殖或/和分化的能力、产品生产规模和生产工艺差异大、产品作用机制复

1 杂等特点，因此，对于干细胞产品的生产工艺设计与验证、质量研究和控制等应充分
2 考虑以上基本特征，如应有明确合理的供者细胞来源和筛选标准，选择可有效
3 保持细胞活力和活性的包装系统及储存运输条件。

4 干细胞产品应遵循循序深入、逐步递进的药物开发规律，在申报临床阶段原
5 则上应满足开展临床试验安全性的要求，临床试验期间继续完善生产工艺和产品
6 质量等相关研究，在上市申请时应提供支持产品安全、有效、质量可控的完整的
7 研究数据。

8 干细胞产品的研发生产流程包括从供体材料的获取、运输、接收、产品生产
9 和检验到成品放行、储存和运输的全过程，符合细胞治疗产品的一般规律，在适用
10 本指导原则的同时，还适用其它有关的生物制品一般指导原则⁽¹⁷⁾。

11 四、风险评估与控制

12 除了一般生物制品的常见风险外，干细胞产品的风险还包括污染和交叉污染
13 的风险（供者、原材料、操作过程）、高风险起始原材料（ESCs/iPSCs、基因递
14 送与修饰系统）残留的风险、加工过程中非目的细胞、非预期变化等杂质的风险、
15 生产工艺变更的风险和干细胞产品的其他质量风险因素。影响干细胞产品质量的
16 风险因素具体包括但不限于：（1）供体年龄、健康情况等⁽⁸⁾；（2）细胞的来源
17 （自体、同种异体、iPSC 来源等）、生物学特性（增殖、分化、迁移能力、与目
18 标治疗组织的谱系接近程度）以及基因突变等；（3）细胞的生产过程操作（体
19 外培养/扩增/诱导/分化/遗传操作/冷冻保存/复苏等）及操作复杂程度对细胞特
20 性的影响，如基因修饰对细胞基因组的影响；（4）细胞体外暴露于特定培养物
21 质时间、细胞培养时间、细胞存活情况和细胞代数等；（5）诱导材料及剂量、
22 诱导时间、添加处理顺序等；（6）给药方式（皮肤外用、静脉输注或经手术应
23 用），是否需要对接受者进行预处理，是否和非细胞产品（生物活性分子或结构材
24 料）形成组合等。

25 研发者应在综合考虑各种因素的基础上，针对不同类型产品特性和全生命周
26 期过程评估产品的总体风险，并制定相应的风险控制策略。干细胞产品风险控制
27 策略可能至少应该考虑以下方面：

1 (1) 建立清场和隔离操作规范, 关注对动物或人性原材料的严格质控、
2 对细胞库和收获液的分析检验、对生产关键节点无菌、支原体、内外源病毒的检
3 测与控制等。

4 (2) 做好上下游材料批号和标识管理, 建立完善的可追溯系统, 同时关注
5 生产过程中的细胞鉴别检测, 确保干细胞产品质量属性合格。

6 (3) 尽量采用连续、密闭式生产工艺, 减少生产过程中的环境暴露环节,
7 避免污染风险。

8 (4) 设立过程控制指标和废弃指标, 对中间体进行检定或质量监测, 如对
9 基因修饰的细胞或细胞因子诱导分化的细胞进行外源基因的转导效率或细胞分
10 化情况、细胞表型和基因型的检定等。

11 (5) 进行全面的生产工艺开发与验证, 开展系统的变更可比性研究, 结合
12 产品特性和工艺开发持续进行质量特性研究, 充分表征细胞形态、活力、遗传稳
13 定性、成瘤性/致瘤性、细胞表型特征(包括预期和非预期细胞群)和功能等, 尤
14 其关注影响产品质量的杂质水平及安全性影响。

15 五、生产用材料

16 生产用材料包括干细胞产品生产过程中使用的所有原材料和辅料。原材料包
17 括起始原材料(生产用细胞、辅助细胞、体外基因递送与修饰系统)和其它原材
18 料(如培养基和细胞因子等生化试剂、细胞分离和组合装置等耗材)。辅料的使用
19 应符合药典要求和关联审评审批的有关要求。生产用材料直接关系到产品质量,
20 需参考《中国药典》的相关要求^(9, 10)进行风险评估和质量控制。

21 (一) 原材料

22 1. 起始原材料

23 1.1 生产用细胞

24 按照药品开发的干细胞产品, 一般来源于供者(自体或异体), 也可能来源
25 于细胞库。干细胞的来源和相关操作应符合国家相关法律法规和伦理⁽¹¹⁾⁽¹³⁾的要

- 1 求，其使用应取得所有人知情同意和授权。生产干细胞产品应建立稳定的生产用
- 2 细胞来源，并确保质量的一致性。需根据产品特点建立合理的供者筛查程序和标
- 3 准，综合评估生产细胞应用的安全性与合理性。

4 1.1.1 供者筛查

5 供者筛查是干细胞产品控制风险的重要手段。合理的供者筛查程序和标准对

6 防范病毒污染、组织排异、遗传疾病等风险十分必要。对于细胞库来源的干细胞

7 产品，生产用细胞供者应为体细胞/配子的供体。供者的病原微生物筛查方面，

8 尤其对用于同种异体干细胞临床研究的供者，可参考采供血的相关要求⁽¹⁴⁾，如

9 筛查供者是否存在 HBV、HCV、HIV、梅毒螺旋体等感染。实际开发应用中，还应

10 根据供体健康/疾病史或区域流行病区生活逗留、组织细胞特异性的易感病原体

11 等具体情况适时增加相应的筛查项目，并列入验收标准。对于自体来源的干细胞

12 供者，可根据来源的组织或器官、干细胞制剂的特性以及临床适应证等对供体的

13 质量要求和筛查项目和标准进行适当调整，应确定生产程序等是否会增加供体中

14 可能存在的病原体传播风险，并说明采取的预防措施（为防止病毒或其他外源性

15 因子传播给自体受者以外的其他人）。为了保证病原体筛查结果的可靠性，对供

16 者进行筛查的机构应具备相关资质，供者筛查过程中尽量采用监管机构批准的血

17 源筛查试剂盒检测病原体，检测方法应经过适用性确认，关注检测方法灵敏度对

18 病原微生物的检出能力。通用型干细胞产品制备时必须考虑窗口期对病原微生物

19 筛查的影响。组织排异方面风险，可参考输血供体的相关要求考虑，比如收

20 集供者的 ABO 血型、HLA-I 类和 II 类分型资料等，需证明供体与受体（病人）的

21 组织分型相匹配，同时需提供检测方法和依据⁽⁸⁾。对于使用干细胞产品的患者，

22 应结合先进的分析检测技术充分评估引入遗传性疾病的风险。

23 1.1.2 供者细胞

24 供者细胞获取、保存、运输和入厂检验等步骤应经过充分研究，明确标准操

25 作规程和关键质量控制参数，制定完善规范的同一性追溯系统和干细胞供应质量

26 保证体系，应完成必要的验证。

27 用于获取供者细胞的程序（例如手术，若可能应指明使用的器械）、收集场

28 所的名称和位置、以及运输条件（如运输到加工场所进行进一步生产）等信息应

1 予明确。操作步骤应进行设计、研究与必要的验证,确保供者细胞获取的工艺稳
2 定和质量一致。供者细胞分离工艺,可能对干细胞产品质量有影响,对变化分离
3 工艺研究中建议采用具有代表性的供者来源的细胞,处理过程中关注进行细胞鉴
4 别、成活率及生长活性、外源致病微生物和基本的干细胞特性检测(如适用)。
5 对供者细胞储存和运输稳定性进行研究,对运输容器的性能进行验证和定期确认。
6 采集到的细胞入厂时,根据工艺要求、产品特点,应进行细胞类型、数量、表型、
7 活力、微生物等方面相应的检测,如细胞类型鉴别可通过相关的基因型和/或表
8 型标志物进行鉴定和确认,标志物阳性的细胞比例可以作为预期细胞群指标评估
9 的依据。应选择合理的成品质量相关的指标,可适当纳入收集细胞质量放行标准
10 中。

11 1.1.3 细胞种子和细胞库

12 细胞种子的技术要求如药典通则所述,应来源清楚、合法合规、检定全面。
13 人胚干细胞和诱导多能干细胞均应建立细胞系/株(cell line)后作为细胞种子
14 使用,可参照ICH Q5D和《生物制品生产检定用动物细胞基质制备及检定规程》
15 对适合的供者细胞和生产用细胞种子进行建系、建库和检定等,商业化生产规模
16 的建库频率依据产品自身特性和批产量等确定。

17 每个细胞库(MCB和WCB)的历史、来源、派生、特征,以及进行检测的频
18 率均应说明。MCB检测一般涉及产品的微生物学特征,包括无菌性、支原体、外
19 源性病毒因子的体内和体外检测,包括对人体细胞进行CMV、HIV-1和2、HTLV-
20 1和2、EBV、B19、HBV和HCV检测(若适用),或其他特定病原体。对于暴露
21 于牛或猪来源的组分(例如血清、血清组分、胰蛋白酶)的细胞系,建议包括对
22 牛和/或猪来源的外源性因子的检测。细胞鉴别包括通过细胞系的物理或化学特
23 征(即表型、基因型或其他标志物)区分特定细胞的检测。细胞库的纯度应包括
24 对任何污染细胞的鉴别和定量、生长活性(包括冻存后的复苏活性)、增殖能力
25 等,还应检测与产品治疗性质相关的细胞活性(例如iPSC的多能性)和细胞分化
26 情况。经基因编辑的干细胞产品,需重点关注基因物质的转导效率、基因进入细
27 胞后的整合情况、调控元件、细胞的表型和基因型、目的基因的遗传稳定性、转
28 导用基因物质的残留量,以及病毒复制能力回复突变等。还有其他的一些信息,

1 对判断产品安全性也有帮助，比如：使用的培养条件，包括在生产期间使用的所
2 有培养基和试剂/组分的记录，以及相关检验报告单（COA）的副本；MCB的冷
3 冻保存、储存和恢复，包括有关细胞密度、冷冻小瓶数量、储存温度和细胞库位
4 置的信息；多次传代后MCB的遗传和表型稳定性，以及冷冻保存后细胞的活力。
5 若有两级细胞库系统（MCB和WCB），建议对WCB进行以下检测：体外外源性
6 病毒因子检测；细菌和真菌灭菌；支原体；和代表性的鉴别试验（例如Southern
7 印迹、流式细胞仪）。对于正在临床试验中使用的干细胞样品，制备完成时，应
8 从细胞分化角度应对样品进行表观和遗传的稳定性评估。

9 在细胞基质鉴定和检测中使用更先进方法和技术改进时，应开展新旧方法的
10 全面对比验证和检测桥接研究，证明新方法的专属性、灵敏度和精密度至少与现
11 有方法相当。

12 1.1.4 传代稳定性

13 干细胞在传代过程中可能存在不稳定性，产生细胞异质性，因此无论是建库
14 干细胞还是非建库干细胞，均需对传代稳定性进行充分规范的研究。传代稳定性
15 研究时的传代条件应能代表实际临床/商业化生产工艺，重点关注内外源因子污
16 染、细胞干性、多能性、成瘤/致癌性等的变化，明确体外生产限传代次和临床
17 使用代次。传代稳定性的研究项目常包括细胞 STR 鉴别、数量、形态、活率、群
18 体倍增时间、纯度、端粒酶活性等生长特性稳定性，也包括染色体核型和全基因
19 测序遗传稳定性，还包括碱性磷酸酶染色/鼠畸胎瘤试验、免疫荧光法或 PCR 法
20 检测多能性基因表达等干性稳定性等。

21 1.2 辅助细胞

22 在生产过程中若使用其它辅助细胞，也应符合来源清晰可追溯、安全性风险
23 可控、建立细胞库分级管理的基本原则，这些辅助细胞可能残留于干细胞终产品，
24 应作为杂质，对其风险进行研究控制。如对于体外培养建立人胚干细胞及诱导
25 多能细胞的人源或动物源的饲养层细胞、诱导分化用内胚层样细胞等，应需明确
26 其选择依据与合理性。根据外源性细胞在人体使用可能的相关风险因素，对细胞
27 来源的供体、细胞分离、培养和建系过程应能清楚溯源，对引入外源致病微生物
28 的风险等进行分析评估和检测控制，对可能涉及细胞失活处理的工艺，如辐照或

1 添加药物等，以及辅助细胞的添加量和残留量，应经过研究与验证，证明其不会
2 对产品造成安全性和功能方面的影响。辅助细胞可进行建库管理，并按药典细胞
3 库检验要求进行全面检验，特别是对人源或动物源特异病毒的检验。应结合辅助
4 细胞的性能等考察不同代次的辅助细胞库细胞的稳定性。

5 1.3 体外基因递送与修饰系统

6 经基因修饰和重编程技术获得的干细胞产品，其上游生产均涉及体外基因递
7 送与修饰系统的参与，基因递送与修饰系统的材料选择（含病毒包装细胞）、载
8 体设计、工艺过程和质量控制等药学专业技术要求建议参照相关技术指南。

9 体外基因递送与修饰系统常采用整合型和非整合型的载体。整合型载体应用
10 较为广泛，如慢病毒和逆转录病毒，但其随机整合现象可能导致插入突变，干扰
11 内源基因的表达调控，这些病毒可能在终末分化的细胞中被异常再激活，成瘤风
12 险可能更高。非基因整合型重编程方法，如腺病毒、腺相关病毒和仙台病毒可
13 介导转录因子基因在宿主中瞬时表达，通过影响细胞形态诱导细胞产生多潜能性，
14 基因组整合风险较低，但仍需关注应用此类重编程技术生产干细胞产品的成瘤性、
15 非预期免疫反应、介导转录因子的病毒残留相关毒性等。另外，相对终末分化的
16 免疫细胞，干细胞成瘤风险可能更高，需充分评估体外基因递送与修饰系统在干
17 细胞产品中的应用对干细胞终产品和临床安全性等的影响。

18 2. 其它原材料

19 干细胞产品的原材料可以参照《中国药典》相关要求⁽⁷⁾进行原材料选择和供
20 应商审核。应充分考虑原材料使用的必要性、安全性和合理性，以及大规模产品
21 生产时的供应连续性，部分原材料处在不断更新优化过程中，优先选择风险等级
22 低，如采用药用级的原材料，明确原材料来源、组成、用途、用量和质量控制等
23 情况，具备原材料来源证明、检验报告书、包装说明书、TSE/BSE分析声明等文
24 件。若生产工艺中使用研究级试剂（如培养基、转录因子、化学小分子等），应
25 明确试剂的来源、生产工艺和性能的信息，并建立质量鉴别程序，其中包括安全
26 性检测（无菌性、内毒素、支原体和外源性因子）、功能分析、纯度检测和含量
27 分析（例如残留溶剂检测），以证明试剂中无潜在有害物质，并且生产使用时应
28 满足无菌、无支原体、低内毒素的相关要求。检测的范围将取决于特定试剂在生

1 产工艺中的使用方式，还需考虑到技术发展对新外源因子的认知。对于可能影响
2 产品质量和安全性（如致细胞突变）的所有原材料，需在最终产品或工艺的合理
3 阶段对残留进行评估和控制，并结合临床使用剂量确定需要控制的残留限度。有
4 些高风险原材料可能需要开展动物体内的安全性评估。生产中应避免使用 β -内
5 酰胺类抗生素，若其他环节不可避免使用抗生素，应明确抗生素选择依据、残留
6 控制和安全性评估等信息。

7 干细胞产品生产中应量避免使用人源或动物源性材料，尽可能采用组成成分
8 明确的非动物源性试剂，在早期研发筛选无人源或动物源性物料生产工艺。若必
9 须人源或动物源性物料（如自体血清或自体血浆），应充分说明其来源生物、销
10 售商/供应商、原产国、生产工艺和质量标准等信息，并设定合理的内控检测项
11 目和可接受标准，严格控制外源因子污染（如外源病毒和朊病毒）和免疫原性等
12 风险。对于由于使用人源或动物源性材料，导致最终制剂被引入TSE/BSE的潜在
13 风险，应始终保持警觉。

14 有些干细胞产品可能与其他医疗器械、活性植入性医疗器械、基质、微囊等
15 材料形成组合产品，应符合药械组合产品的相关要求，需对组分进行详细描述和
16 论证，说明每种成分的批准状况，并评价其安全性和预期用途的适用性，同时需
17 进行适当类型的生物相容性研究，并评估对其他器械检测是否充分，对控制器械
18 组件的任何硬件和软件的检测是否充分。

19 生产过程中与中间样品直接接触的容器和密闭系统（培养瓶、一次性管路、
20 生物反应袋、滤器等）应经过严格的筛选，关注防止微生物污染和批次间交叉污
21 染，开展耗材适用性和生物安全性评估，并基于风险评估开展充分的耗材相容性
22 和密封性的研究。

23 （二）辅料

24 按照药品开发的干细胞产品所用辅料的来源、用量和质量控制应基于风险评
25 估的原则，经处方筛选等进行充分研究和验证，证明其使用的必要性、安全性和
26 合理性，应符合现行版《中国药典》通则“生物制品生产用原材料及辅料质量控
27 制”的相关要求，尽量选择低风险的辅料，优先选用药用级辅料。对于高风险等

1 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
2 或替代来源，必要时，新型辅料应开展适当的非临床安全性研究。

3 六、生产工艺

4 干细胞产品工艺复杂，批间差别可能和一般药物不同。对于按药品开发的干
5 细胞产品，其生产工艺的研究应尽量遵循药品生产工艺的一般规律，关注对生产
6 工艺与产品质量关系的研究，加强对工艺残留去除的影响研究与验证，建立稳健
7 可靠的生产工艺。

8 （一）工艺开发

9 自研发早期需要逐步地明确生产工艺步骤和操作参数限定范围，以及生产过
10 程控制、可接受标准和废弃标准等，保持工艺相对稳定可靠，逐步确定产品目标
11 产品质量概况（QTPP）和关键质量属性（CQA）。干细胞产品生产工艺一般包括上游
12 的细胞培养工艺和下游的制剂工艺，工艺流程可能包括细胞的复苏、扩增、诱导分
13 化、基因递送与修饰、收获、罐装、冷冻、存储、运输等中的几项工艺步骤。应
14 明确生产规模和批次、批量的定义，关注上下游工艺规模的匹配性。如工艺过程
15 中存在合批或分批的情况，需要开展充分的研究并制定相应的原则。

16 1. 细胞培养工艺

17 干细胞产品的质量特性主要在细胞培养阶段形成，此外，细胞培养体系和各
18 步骤工艺参数均可能对来源不同的细胞的生长分化特性、生物学功能和表现遗传
19 特性产生影响，因此应进行全面的工艺研究。细胞培养工艺风险变量因素包括种
20 子细胞库、细胞分离（机械法、酶法）、培养容器（贴壁单层培养工艺的细胞汇
21 合度与传代/收获时机，生物反应器培养工艺的微载体选择、反应器参数）、培养
22 体系、接种/传代密度及生长动力条件等，还包括起始细胞、感染复数、诱导体
23 系和分化体系等，每个工艺阶段中关键生产用材料/组分添加量、添加条件（时间、
24 温度）、离心洗涤条件和次数等。细胞培养工艺的质量考察因素包括细胞活力（活
25 细胞率、传代代数、倍增时间），细胞特性（形态、表型和基因型、分化情况、
26 生物学功能）、纯度、转导效率、重编程效率、病毒载体回复突变、多能性、成

- 1 瘤/致癌性、非预期细胞/影响、遗传学和表观遗传学监控等。干细胞产品的基因
- 2 组积累的癌症及遗传病有关的基因突变风险可通过测序方法辅助分析。

3 2. 制剂工艺

4 制剂处方和工艺应根据临床用药要求,并结合产品自身的特性等进行充分研
5 究后确定。目的细胞成分是决定产品有效性的重要组分。制剂研究应说明处方组
6 成,明确细胞密度或细胞浓度等 CQA,明确最终制剂是新鲜细胞还是冻存细胞,
7 制剂游离细胞形式还是与基质结合,或是冻存细胞复苏后经洗涤等工艺处理再给
8 予患者等。若最终产品以冷冻状态运输到临床研究中心,则应在包括对产品运输
9 方式的说明,并提供表明产品可被解冻的一致结果的数据,鼓励采用先进的带有
10 在线监测的程序降温设备开展不同降温程序研究。

11 可根据生产批量、罐装过程对细胞活力的影响选择合理的制剂灌装工艺。如
12 制剂需要冻存,应开展制剂的复苏工艺研究,如冻存细胞复苏后经洗涤等工艺处
13 理再给予患者,还应开展洗涤工艺研究,并关注操作过程的安全性风险和刚复苏
14 细胞对洗涤工艺的耐受性。对于新型给药装置和给药方式,需保证给药准确度。
15 在输入人体前,细胞制剂在医院的处理时间和存放的条件也应该明确规定。若自
16 体或同种异体细胞产品在注射前进行辐照以消灭复制能力以降低致癌风险,则应
17 提供数据以证明细胞在辐照后丧失复制能力,但仍保持其所需的特性。在干细胞
18 产品回输的临床操作规程中,重点关注防范不同类型细胞自身的风险性和临床使
19 用过程中污染、感染和病原传播的风险。

20 3. 工艺过程控制

21 干细胞产品的生产的全过程应通过合理可行的工艺控制参数和中间体控制
22 限度进行监控。这些工艺控制参数和中间体控制限度包括了明确工艺步骤的培养
23 时长、生产周期和细胞限传代次、生产中每个步骤的时间控制范围等等。由于干
24 细胞产品一般无法进行终端除菌和除病毒工艺,外源因子污染风险高,生产过程
25 中应在适当环节控制微生物安全性指标(包括无菌、支原体、内毒素等)。另外,
26 有效的隔离措施对防止不同供者来源制品或不同批次产品的混淆、差错等有重要
27 意义。考虑到细胞在生产工艺过程中存在动态可变性,对于可以表征细胞形态、
28 活力、成瘤/致癌性、表型特征(包括预期和非预期细胞群)、功能、遗传稳定,

1 以及产品稳定性的质量参数,建议在关键生产环节或中间产物进行中间过程控制,
2 设置可接受标准,为纠偏限度提供依据。

3 采用基因转导与修饰操作的风险较高,应予重点关注,制定严格的风险控制
4 点。应明确转导方式、遗传操作方法和条件、目的基因转导效率、在染色体的整
5 合情况,并论述合理性。采用病毒载体的,还应就病毒复制回复突变、插入突变
6 等情况进行研究和验证。对体外基因转导与修饰前、后的细胞表型、基因型、功
7 能、特性,以及工艺相关杂质和非目标细胞群的变化趋势等,应重点进行研究、
8 表征和/或验证,以确定工艺的稳健性。

9 4. 工艺变更

10 和其他药品一样,干细胞产品的制备工艺也会在生命周期中发生变更,这些
11 变更的目的是对产品的工艺进行优化或提高质量。需全面研究这些变更对干细胞
12 产品的安全性、特性、纯度和生物学活性等方面的影响,进行工艺变更前后的
13 可比性研究。对于干细胞产品,可比性研究的内容应该覆盖到变更前后的原材料
14 比对、工艺过程比对以及中间品/终产品的质量属性变化等,重点关注变更内容、
15 分析方法检测应能分辨产品质量属性变更以及产品的开发阶段等,可以参考 ICH
16 Q5E⁽¹⁸⁾ 设置合理的可比性研究检测指标及可接受标准,将各阶段代表性批次纳入
17 进行研究,关注检测项目的全面性、预设对比研究标准设置的合理性、检测方法
18 的有效性和检测结果分析的客观性等。对于开发过程中可能存在多个阶段的生产
19 工艺,如非注册临床样品制备工艺、非临床样品制备工艺、临床试验用样品制备
20 工艺、商业化生产工艺,应具体说明各阶段工艺之间的差异,并对变更前后的工
21 艺开展可比性研究,分析工艺变更对产品质量的影响,如有必要应进一步提供非
22 临床或人体比对研究数据。一般情况下在确证性临床试验开展前完成所有预期变
23 更。

24 (二) 工艺验证

25 与一般药品相比,干细胞产品的批间差异可能较大,工艺验证较为困难,但
26 仍需保证产品一致性和质量可控性。上市阶段应采用商业化生产规模下的生产工
27 艺进行连续多个批次干细胞产品的生产,并对各批次工艺和产品质量进行全面表

征，确认各工艺的稳健性和产品质量的一致性，工艺验证过程中建议关注关键生产阶段对产品的基因型不稳定性、成瘤/致瘤性和表型特征(包括预期和非预期细胞群)的体外评估，确保产品的安全性。另外，应完成关键原材料生产工艺验证、中间体存储条件和时间验证、培养基/缓冲液制备和放置条件验证、过滤器验证、运输验证、无菌模拟灌装验证、清洁验证和容器密封完整性验证等。

和一般药品一样，干细胞产品在早期临床试验时一般尚未进行生产工艺验证，但应在临床试验前明确生产用原辅料的质控标准，同时采取适当的工艺过程监测和控制措施，以确保工艺符合临床试验样品的安全性要求。用于支持上市许可申请的确证性临床试验样品，应能代表上市产品，其生产工艺必须进行工艺验证以证明生产工艺可确保生产的一致性。商业化规模工艺验证应关注实际同时生产最大产能的挑战研究，考虑人员、设备、物料、环境、检测等整体运行能力对最大产能的支持能力。不同批次工艺性能和产品质量的变化趋势数据应详细记录，开展全生命周期中的持续工艺确认。

七、质量研究与质量控制

(一) 质量研究

干细胞产品具备多样性、变异性、复杂性等特性，质量研究应选择代表性的生产批次和合适的生产阶段样品(包括初始分离的细胞或细胞种子、细胞库、中间产品、原液和制剂成品等)进行研究，质量研究内容应尽量覆盖细胞特性分析、理化特性分析、纯度分析、安全性分析和有效性分析等方面，尽可能采用一系列先进、正交的分析技术，且分析方法应经过研究确认，确保方法适用可靠。

1. 细胞特性分析

细胞形态：细胞的形态学分析对于处在不同生长发育阶段的细胞具有一定的指示作用，光学显微镜(可结合特异性染色)是常见的观察细胞形态方法。

细胞活性：干细胞产品通常是活的细胞治疗产品，可通过细胞活率、活细胞数、群体倍增时间、细胞周期等对细胞活性进行综合评价。

1 **细胞鉴别**：对细胞群体进行鉴别是确保干细胞产品纯度的重要方式，一般通
2 过短串联重复序列（short tandem repeats, STR）图谱、中期染色体核型分析
3 及同工酶谱分析或种属遗传多态性基因分析等方法对不同细胞交叉污染进行评
4 价，也可通过表面标志物及特定基因进行分析鉴别。

5 **细胞标志物检测**：细胞表达特定的标志物是细胞特性的一部分，常通过选择
6 多种表面标志物对细胞类型、多能性、谱系、终末分化和/或功能测定进行干细
7 胞产品的表征，相关分析检测方法应经过规范验证。mRNA 标记物与蛋白质标记
8 物表达的有效相关性如果经验证，可使用基于 mRNA 的标记物辅助进行细胞表征。

9 **2. 理化特性分析**

10 一般理化特性分析需结合产品类型和制剂特征开展研究，可包括外观、颜色、
11 澄清度、pH、可见异物、渗透压摩尔浓度、装量等项目。

12 **3. 细胞纯度分析**

13 干细胞产品在生产过程中可能会引入非细胞杂质（如理化杂质）、细胞碎
14 片或非功能所需细胞，影响产品生物学特性方面的纯度和均一性，可能带来安
15 全性风险。对于这些非目的细胞成分，在工艺中应予以去除，在质量研究中予
16 以检测，并进行定性/定量控制。

17 通常纯度分析的研究项目可能包括：活细胞比率、细胞亚群比率、功能性细
18 胞比率、非目的细胞群体比率等。对于一些细胞与非细胞成分的制剂组合型产品，
19 除细胞外还包含非细胞成分（如基质、支架等），需重点评估非预期细胞及非细
20 胞成分等杂质。

21 **3.1 生物学安全性**：是指细胞内在的、由其生物学特性所决定的，和外在的、
22 诱发其生物学特性发生改变相关的安全性问题。在对干细胞生物学安全性进行评
23 价时，应尽可能考虑相关细胞的临床适应症、给药途径、剂量等与临床治疗直接
24 相关的因素，并利用合适的体内、体外试验模型对相关的生物学安全性进行有效
25 评估。干细胞生物学安全性包括成瘤性和致瘤性、异常免疫反应和异常分化等。

26 **成瘤性（Tumorigenicity）、致瘤性（Oncogenicity）**：应考虑干细胞产品
27 的成瘤和致瘤风险，特别是高代次的，或经过体外复杂处理和修饰的自体来源以

1 及各种异体来源的干细胞产品。对于人胚干细胞和诱导多能干细胞来源的干细胞
2 衍生产品，应特别关注终产品成瘤性和致瘤性检测，分析与未分化多潜能细胞的
3 去除和终产品 ESCs/ iPSCs 残留水平的关系。

4 **异常免疫反应：**对于一些细胞制剂，特别是异体来源、经体外传代培养和特
5 殊处理的自体或异体来源制剂，应当结合产品特性通过体外及动物试验评价其异
6 常免疫反应。比如对细胞自身免疫相容抗原 HLAs 分子（ES 及 iPSC 分化后重新
7 表达供体 HLA）、免疫共刺激分子、促炎因子（IFN, TNF）等的表达进行检测，
8 对间充质增殖/活化异体免疫细胞（如总淋巴细胞增殖）的检测。

9 **非预期分化：**包括非靶细胞分化或非靶部位分化。建议开发特定的检测技术
10 （比如 SPR 法检测标志物），研究、评估和监控干细胞产品非预期分化的可能性
11 和影响，可结合目的细胞分化纯度进行具体分析。

12 **3.2 微生物学安全性：**是指干细胞产品需满足无细菌、真菌、支原体和病毒
13 等微生物污染，以及无微生物代谢产物（以革兰氏阴性菌所产生的内毒素为代表）
14 污染的质量要求。内、外源因子污染的监测可通过相关病原物（如核酸、蛋白、
15 多糖）或微生物代谢物的直接检测，或体外细胞模型、敏感动物接种及鸡胚接种
16 等方法对相关微生物存在和效应的间接分析来实现。

17 **无菌检测-细菌、真菌：**鼓励采用现行版药典培养法进行无菌检测，可依据
18 工艺阶段、管理需要、临床应用需要等，采用不同时间针对不同工艺阶段的细胞，
19 选择不同检测方法，如采用全自动细菌/分枝杆菌检测系统或革兰氏染色法镜检，
20 或基于核酸或特定代谢物的快速检测方法。选用快速检测方法应进行适用性评估，
21 并逐步完成全面的方法学验证和与药典法的比对，以证明检测能力相当。

22 **支原体检测：**鼓励依据药典中规定的培养法和指示细胞感染法（或称 DNA 染
23 色法）相结合进行确证性支原体检测。需要时也可应用支原体核酸扩增方法作为
24 快速检测方法，或针对不同工艺阶段的检测需求采取确证方法和快速方法相结合
25 的方式进行支原体检测。常见的人源支原体通常由实验人员带入，如口腔支原体、
26 人支原体、唾液支原体；动物来源的支原体通常经牛血清带入，如发酵支原体、

1 精氨酸支原体、莱氏支原体；在分离、消化细胞时使用胰蛋白酶可能带入猪鼻
2 支原体。方法选择和验证时应予以考虑可能的污染来源。

3 **特定病毒和非特定病毒检测：**病毒污染是指来源于起始细胞等原材料或是生
4 产过程中所引入的种属特异病毒（如人源病毒和动物源性病毒）、内外源性逆转
5 录病毒，以及所有非特定病毒因子。根据产品特性于合适阶段进行相关检测，利
6 用体内和体外方法，结合生产全过程综合评价产品的病毒污染风险。人源特定病
7 毒可能包括 HIV、HBV、HCV、HTLV、TB、B19 等，相关检测以病原体核酸/抗体检
8 测为主，尽量使用经批准的体外诊断试剂盒进行检测，相关检测方法应经过验证。
9 如使用过牛血清，须进行牛源特定病毒的检测，可能包括牛副流感病毒、牛腺病
10 毒、牛细小病毒、牛腹泻病毒和弧肠孤病毒等；如使用胰酶等猪源材料，可能需
11 检测猪细小病毒、猪圆环病毒以及猪圆环病毒等；如胚胎干细胞和 iPS 细胞在制
12 备过程中使用动物源性饲养层细胞（Feeder layer），须进行细胞来源相关特定
13 动物源性病毒的全面检测。对于逆转录病毒和非特定病毒因子检测，可参照《中
14 国药典》三部通则“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”的相关
15 要求进行。

16 **病毒载体回复突变（具有复制能力的病毒，replication competent virus,**
17 **RCV）：**对于使用复制缺陷型病毒进行体外转导获得的干细胞产品，存在病毒载
18 体回复突变的可能。RCV 是影响产品安全性的主要风险之一，在产品设计和质量
19 研究时应充分考虑。一般情况下，除在生产过程中对病毒（上清液、病毒生产终
20 末期细胞）采用经验证的指示细胞培养法完成 RCV 标准检测以外，还应在放行检
21 验中对细胞终产品采用经验证的快速方法进行 RCV 的检测放行，同时还应进行留
22 样，必要时用指示细胞培养法进行终产品回溯检测分析，后期研究中也应持续监
23 测 RCV。

24 **细菌内毒素检测：**建议采用现行版药典所建议的凝胶法和光度测定法，如有
25 更好的方法经验证后可采用，比如改良的凝胶法（也称重组 C 因子法）。

26 4. 生物学活性分析

27 干细胞是活细胞药物，其生物学作用是多靶点、多通路的，各类干细胞的生
28 物学有效性可基本归类为诱导分化能力、免疫调控能力和组织再生能力。干细胞

- 1 生物学效力检测包括：相关生物活性物质的分泌（如重组蛋白、糖蛋白或脂蛋白、
- 2 生长因子、酶及细胞因子等）、细胞及细胞外基质/结构的形成、细胞相互作用
- 3 （如免疫激活或抑制）、细胞的迁移分化或自我更新潜能。

4 研发者应明确产品与临床治疗相关的生物学效应和作用机制，开发能够代表
5 产品作用机制的定量/半定量生物学活性测定方法⁽¹⁶⁾，尽可能采取多种互补的分
6 析检测方法进行研究并完成方法学验证，比如，在可能需要具有功能和表型可塑
7 性的混合细胞群情况下，效力测试应补充不同细胞群表型谱的数据。特殊情况下，
8 还可开发生物学活性的替代指标，如在活体系统之外进行的非生物分析测定法
9 （analytical assay），通过评估产品的免疫化学、生物化学和/或分子属性来
10 提供广泛的产品表征数据。采用的分析测定法应开展替代方法与效力相关性研究，
11 还应证明该测定法可以区分活性细胞与非活性物质或死亡细胞等形式产品，并进
12 行充分的对照研究和方法学验证。有些干细胞及其衍生制品具有复杂的和/或不
13 完全清晰的作用机理或具有多种生物学活性，细胞生物学功能表征须结合体外生
14 物学效应和体内动物模型综合评价。

15 （二）质量标准

16 人源性干细胞产品的质量标准的制订应根据产品特点、生产工艺、质量研究
17 和风险评估等进行确定，一般包括原液（如有）质量标准、半成品（如有）质量
18 标准和制剂质量标准。考虑到部分干细胞产品批量有限、有效期短的特殊性，在
19 经过充分研究的基础上，可通过加强过程控制和中间体的检测来简化放行检测
20 （简化的放行检查必须至少包含鉴别和生物学效力检测），同时采用新型的放行
21 检测方法辅助传统检测方法，但是检测方法应经过充分验证。

22 干细胞产品的质量标准检测项目应当建立在产品质量研究以及对生产工艺
23 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
24 识。除了一般检测外观、装量、pH、无菌性、内毒素、支原体外，放行检查还
25 应包括细胞数量/剂量（细胞数、功能细胞数等）、细胞活力、鉴别、纯度、生
26 物学效力（定量/半定量功能测定、分子标志物等）、产品和工艺相关杂质、异
27 常免疫反应等。基因修饰的情况下，应针对每批最终产品基因修饰细胞的百分

比、每个细胞的载体/质粒拷贝数进行检测。如果从最终产品中去除了外源遗传物质，可在放行时通过相关灵敏检测进行证明。对于使用复制缺陷型病毒转导的细胞，应证明不存在复制型载体（RCV）。产品和工艺相关杂质可结合稳定合理的工艺清除验证进行分析控制，对于终产品中有一定残留，且可能影响干细胞产品质量和安全有效性的工艺相关杂质（如 BSA、消化酶、磁珠、微载体等相关杂质（如有害细胞残留），应选择适用的方法进行质量放行控制。原则上应依据现行版药典中的生物制品无菌和支原体检查法进行终产品放行检测，必要时采用快速方法放行应进行方法学确认，在未能充分验证新型方法可以完全替代药典传统方法时，建议在使用新型检测方法进行放行检测的同时，留样采用药典传统方法进行平行检测，同时对检测结果后置可能出现的非预期结果制定处置方案。对于运输到医院后需要进行给药前再操作（比如容器的转换、物理状态的转变、与其他结构材料的联合、过滤与清洗等）的干细胞产品，建议再次设定质量标准项目，如细胞形态、颜色、活细胞数及比率、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。可接受标准需根据临床前和/或临床研究时各批样品的数据、用于证明生产一致性批次的数据、稳定性研究数据和研发相关的数据等进行制定。经质量特性分析后建立的参考品应具备代表性和可溯源性，应采用经验证的分析检测方法进行参考品标定（含量标定和活性标定），并对产品开发各个阶段使用的参考品应开展稳定性研究，确定复验期和有效期。

分析检测方法的开发和验证应遵循药品开发的一般方法学规律，包括放行检测方法和过程控制检测方法。分析方法应随着研究的不断深入逐步完善并验证，以适应各阶段的质量控制要求。对基于自身产品建立的新方法应进行全面的验证，对采用药典的方法应进行适用性确认，如果药典方法经过修订或替代时，应进行对比研究以确认其合理性。比如采用快速、微量的新型检测方法对有效期短、样本量小的产品进行检测时，应对方法进行比较和评估，并在产品放行时采用两种检验方法进行相互验证。

八、稳定性研究

可参照中国药典《生物制品稳定性试验指导原则》⁽¹⁷⁾和ICH Q5C⁽¹⁸⁾的一般要求开展稳定性考察。

稳定性研究的目的是为了支持干细胞产品的储存、运输、使用，稳定性研究一般包括影响因素试验（温度、光照、机械力等）、加速试验、长期试验、运输试验和临床使用中稳定性试验。试验条件应充分考虑新鲜细胞和冻存细胞的区别，考虑干细胞产品保存、包装、运输、临床配伍和实际给药的特殊要求，考虑各个环节样品贮存的累积保存时间对最终产品稳定性的影响等。

试验样品：一般包括代表性原液（如有）、成品和需要临时或阶段性冷冻的中间细胞产品。

试验项目：一般包括生物学效力、细胞纯度、细胞特性、活细胞数、细胞活率、功能细胞数、微生物安全性指标以及辅料含量等，试验时间应能支持有效期拟定，考虑到干细胞产品的复杂性和变异性，一般不支持有效期外推。

申报临床阶段的稳定性数据能够支持临床试验开展即可。

申报上市时需提供拟定的多个代表性批次的稳定性数据以支持确定贮藏条件、使用条件和有效期，同时应明确产品的敏感条件、失活途径和失活速率等。

九、包装及密闭容器系统

包装及密闭容器系统的适用性评估对象是指直接接触制品的包装容器和密闭系统。应结合产品给药途径（静脉给药、局部给药、眼用制剂）、制剂性质（新鲜细胞、冷冻制剂）等选择合适的内包材（西林瓶、软袋等），参考相关指导原则⁽¹⁹⁾开展干细胞产品生产过程中的样品（采集的组织或细胞、制备过程中的细胞）和成品与直接接触包装材料的相容性研究，可选取小规格同材质的包装容器进行，但应涵盖拟包装制品的密度和体积范围；应开展可提取物/浸出物研究，并进行安全性评估。提取物的毒理学评估，应以良好的科学原则为基础，并考虑

- 1 具体的容器密封系统、药品处方、剂型、给药途径和给药方案（慢性或短期给药）
2 等。

3 十、名词解释

4 **成体干细胞**：已经发育的胚胎组织或成人组织及出生伴随的附件组织（如脐
5 带、胎盘）中，具有多向分化潜能的间充质干细胞（mesenchymal stem cell，
6 MSC）、造血干细胞和各类前体细胞（progenitor cell），如神经干细胞（neural
7 stem cell，NSC）等。

8 **人胚干细胞**：体外发育早期的囊胚（blastocyst）内细胞团中分离和建立的
9 具有向三胚层分化潜能的干细胞，可在体外无限的自我更新，具有多能性。

10 **诱导多能干细胞（iPSC）**：是指利用病毒或非病毒载体技术对已分化的成体
11 细胞进行重编程所获得的具有多向分化潜能的干细胞，具有类似于人胚干细胞的
12 多能性。

13 **畸胎瘤（Teratoma）**：指多能干细胞注射到免疫功能障碍的小鼠体内，产生
14 的一种多层良性肿瘤。科学界通过注射干细胞到小鼠体内验证所产生的畸胎瘤包
15 含三个胚层细胞，进而测试是否建立了人胚干细胞系（hESC）。

16 **饲养层细胞（Feeder layer）**：是指自身不具有增殖能力，但通过细胞-细
17 胞相互作用或分泌一定营养物质，用于支持其他细胞生长、扩增的细胞。

18 **批**：指在同一生产周期中，用同一来源、同一工艺过程制备出来的一定数量
19 的一批制品，在规定限度内，批具有数量和质量均一性。

20 十一、参考文献

-
- 21 **【1】** NMPA. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（试行）. 2017.
22 **【2】** FDA. Guidance for FDA Reviewers and Sponsors. Content and
23 Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC)
24 Information for Human Somatic Cell Therapy Investigational New
25 Drug Applications (INDs). 2008.

- 1 **【3】** FDA. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information
2 for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications
3 (INDs). 2020.
- 4 **【4】** EMA. Reflection paper on stem cell-based medicinal products.
5 2011.
- 6 **【5】** ICH Guidance on Quality of Biotechnological/Biological Products:
7 Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for
8 Production of Biotechnological/Biological Products, (63 FR
9 50244, September 21, 1998).
- 10 **【6】** FDA. Deviation Reporting for Human Cells, Tissues, and Cellular
11 and Tissue-based Products Regulated Solely Under Section 361
12 of the Public Health Service Act and 21CFR Part 1271. 2017.
- 13 **【7】** 国家卫计委和国家食品药品监督管理局. 干细胞制剂质量控制及临
14 床前研究指导原则（试行）. 2015.
- 15 **【8】** 卫生部. 人的体细胞治疗及基因治疗临床研究质控要点. 1993.
- 16 **【9】** 《中国药典》通则“生物制品生产用原材料及辅料质量控制”.
- 17 **【10】** 《中国药典》通则“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控
18 制”.
- 19 **【11】** 科技部和卫生部. 人胚胎干细胞研究伦理指导原则. 2003.
- 20 **【12】** 卫生部. 涉及人的生物医学研究伦理审查办法. 2016.
- 21 **【13】** 国家食品药品监督管理局. 药物临床试验伦理审查工作指导原则.
22 2010.
- 23 **【14】** 《中国药典》通则“血液制品生产用人血浆”.
- 24 **【15】** ICH. Q5E Comparability of Biotechnological/Biological
25 Products Subject to Changes in Their Manufacturing Process. 2004.
- 26 **【16】** FDA《Guidance for Industry: Potency Tests for Cellular and
27 Gene Therapy Products》
- 28 **【17】** 《中国药典》通用技术要求“生物制品稳定性试验指导原则”.
- 29 **【18】** ICH. Q5C Stability Testing of Biotechnological and Biological
30 Products. 1995.
- 31 **【19】** 药品包装材料与药物相容性试验指导原则 YBB00142002.

附件

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 and 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、选择性的抑制剤的使用等。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，也可作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研究控制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。如急性或迟发性输血反应、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

或缩短随访问隔时间。

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。

SD 大鼠神经干细胞评价药物神经毒性模型研究

屈哲^{1,2}, 吕建军², 张硕², 耿兴超², 李波³, 赵德明^{1*} (1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193; 2. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心、药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176; 3. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的:应用 SD 大鼠神经干细胞评价药物的神经毒性, 为新药早期筛选和临床前安全性评价提供体外替代方法。**方法:**体外培养 SD 大鼠神经干细胞, 传代后得到稳定的第二代神经球。以已知具有神经毒性的长春新碱、顺铂、瑞芬太尼、丙泊酚注射液、丙戊酸钠、苯妥英钠、丙烯酰胺、乙醇、氧化铁纳米粒子作为神经毒性阳性物质, 以培养基作为神经毒性空白对照品; 以没有神经毒性且具有促进神经细胞生长的神经生长因子作为检测模型的敏感性; 以验证 SD 大鼠神经干细胞模型对神经毒性药物的检出能力。**结果:**长春新碱、顺铂、丙泊酚注射液、苯妥英钠、丙烯酰胺、氧化铁纳米粒子可引起全部或部分神经球解离破碎, 神经干细胞坏死。顺铂、丙戊酸钠和苯妥英钠可见显著性的抑制神经球聚集。长春新碱、顺铂、瑞芬太尼、氧化铁纳米粒子、丙泊酚注射液、丙戊酸钠、苯妥英钠、丙烯酰胺、乙醇均表现剂量相关性的神经干细胞增殖毒性作用。神经生长因子可见促进神经球聚集及神经干细胞增殖。**结论:**本文以 SD 大鼠神经干细胞模型, 以神经干细胞体外生长发育指标, 验证了已知神经毒性抗肿瘤药物、麻醉剂、抗癫痫药物等的神经毒性特征。评价结果与这些药物已知的神经毒性作用特点一致, 该评价方法可作为药物神经毒性临床前安全性评价研究的体外替代试验。

关键词:神经毒性; 神经干细胞; 神经球聚集; 增殖毒性; 体外替代方法

中图分类号: R95 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7777(2018)08-1079-09
doi:10.16153/j.1002-7777.2018.08.012

On Evaluation of Drug Neurotoxicity by Using SD Rat Neural Stem Cells

Qū Zhē^{1,2}, Lǚ Jiānjūn², Zhāng Shuò², Gēng Xīngchāo², Lǐ Bō³, Zhào Dēngmíng^{1*} (1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Beijing Key Laboratory for Safety Evaluation of Drugs, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China; 3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, 100050, China)

Abstract Objective: To evaluate drug neurotoxicity by using SD rat neural stem cell and to provide an *in vitro* alternative method for the early screening and preclinical safety evaluation of new drugs. **Methods:** SD rat neural stem cells were cultured *in vitro* and the stable second generation of neurospheres was obtained by subculture of cells. Vincristine, cisplatin, remifentanyl, propofol, sodium valproate, phenytoin, acrylamide, ethanol, and iron-oxide nanoparticles with known neurotoxicity were used as positive substances. Cell medium was used as a neurotoxicity negative control. Nerve growth factor (NGF) that is non-neurotoxic but can promote the growth of neural stem cell was used to detect the sensitivity of the model and to verify the capacity of the SD rat neural stem

基金项目: 十三五重大新药创制专项课题“创新药物非临床安全性评价研究关键技术”(编号 2018ZX09201017)

作者简介: 屈哲, 副研究员, 从事临床前药物安全性评价毒性病理学诊断工作; Tel: (010) 67872233-8210, E-mail: quzhe@nifdc.org.cn

通信作者: 赵德明, 教授, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

cell model to detect the neurotoxicity in the drug. **Results:** Vincristine, cisplatin, propofol, phenytoin, acrylamide and iron-oxide nanoparticles could cause disintegration of all or part of neurospheres, indicating necrosis of neural stem cells. Cisplatin, sodium valproate and phenytoin had a significant inhibitory effect on the neurosphere aggregation. Vincristine, cisplatin, remifentanyl, iron-oxide nanoparticles, propofol, sodium valproate, phenytoin, acrylamide and ethanol showed dose-related proliferation and cell toxicity effect of neural stem cells. NGF is found to promote neurosphere aggregation and the proliferation of neural stem cells. **Conclusion:** In this study, the neurotoxicity of several antitumor drugs, anesthetics, and antiepileptic drugs with neurotoxicity was verified with SD rat neural stem cells as model and growth and development of neural stem cells *in vitro* as indicators. The results were consistent with the neurotoxicity characteristics of these drugs, indicating the method can be used as an alternative method *in vitro* for preclinical safety evaluation of drug neurotoxicity.

Keywords: neurotoxicity; neural stem cells; neurosphere aggregation; proliferation toxicity; *in vitro* alternative method

神经毒性是新药及先导化合物早期筛选和临床前安全性评价的重要组成部分。传统的神经毒性评价试验主要采用大鼠功能观察组合试验以及组织病理学检查方法^[12], 缺点是需要使用大量的实验动物, 周期长, 费用高, 结果判断主观性强^[13]。近年来, 随着国际上动物试验的“3R”原则要求以及各种体外细胞培养技术的发展^[14], 可以实现从细胞结构和功能改变的多指标筛选和评价药物引起的神经毒性, 其优势在于可实现高通量高内涵筛选^[15], 并从作用机制上解释和评价药物的神经毒性作用。

神经系统体外研究的细胞模型包括细胞系^[6]、原代培养细胞^[7]以及干细胞模型^[8]。神经干细胞可分化为中枢神经系统的三种主要细胞, 包括神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞; 其增殖性和多能性为预测药物毒性和体内代谢作用提供了丰富的资源^[9]。然而单一的体外细胞模型并不能完全评价所有神经毒物的毒性靶点, 因此, 选择相应的细胞模型和评价指标评价特定类型神经毒物的神经毒性。

在神经毒性评价方面, OECD提出了综合测试和评估方法^[10], 试图从各种神经细胞模型获得数据、通过验证和综合评估后用于药品监管^[11]。本研究利用体外培养SD大鼠神经干细胞。选用已知具有神经毒性的抗肿瘤药长春新碱、顺铂; 选用具有发育神经毒性作用的抗癫痫药丙戊酸钠、苯妥英钠; 选用具有神经毒性和发育神经毒性的化合物乙醇、丙烯酰胺; 选用具有神经毒性的麻醉剂丙泊酚、瑞芬太尼; 选用具有神经毒性的纳米制剂氧化

铁纳米粒子^[12]; 检测SD大鼠神经干细胞对神经毒性的检出能力。选用可促进神经干细胞生长的神经生长因子^[13]以检测该模型的敏感性。通过检测对神经干细胞球聚集的抑制作用以及对神经干细胞的增殖毒性作用; 评价药物的神经毒性和发育神经毒性, 以期为新药早期筛选和神经毒性的临床前安全性评价提供有效的体外替代方法。

1 实验材料

1.1 实验动物

怀孕14~14.5 d SD大鼠, 1只。购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 主要试剂和试剂盒

OriCellTM SD大鼠神经干细胞完全培养基 (100 mL每瓶, RASNF-01001, 赛业生物科技); Anti-Nestin Antibody (100 µg, Lot. No.2780475, Millipore); Goat pAb to Ms IgG (Cy3) (0.5 mg·mL⁻¹, Lot. No.GR251063-6, Abcam); 胎牛血清 (500 mL每瓶, Lot. No.1565565, Gibco); D-Hanks液 (500 mL每瓶, Lot. No.8115074, Invitrogen); 胰酶-EDTA (100 mL每瓶, Lot. No.20141211, 北京北科慧宇实验器材有限公司); Collagen I Rat Tail (100 mL每瓶, Lot. No.1834231, Gibco); Click-iT® Edu Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry Assay Kit (50 assays) (Lot. No. 1711804, Thermo Fisher)。

1.3 受试物

1.3.1 检测组

注射用硫酸长春新碱 (简称, 长春新碱)

(1 mg, Lot. No.1405V1, 深圳万乐药业有限公司); 注射用顺铂冻干型(每瓶10 mg, Lot. No. H20023460, 齐鲁制药有限公司); 瑞芬太尼(每瓶20 mg, 171260-200601, 中检院标准物质); 氧化铁纳米粒子(10 mL, 直径5 nm的磁性纳米颗粒溶液, 胺官能化的, 1 mg · mL⁻¹ Fe, 在H₂O中的分散体, MKBR2641V, Sigma); 丙泊酚注射液(10 mL, 0.1g, Lot. No.H20040079, 四川国瑞药业有限公司); 丙戊酸钠(50 mg, Lot. No.100963-201302, 中检院标准物质); 苯妥英钠(50 mg, Lot. No.100210-201303, 中检院标准物质); 丙烯酰胺(1 mg · mL⁻¹, Lot. No.20150427, 国药集团化学试剂有限公司); 乙醇(纯度100%, Lot. No.20150917, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.3.2 对照组

空白对照组(SD大鼠神经干细胞完全培养基); 神经生长因子组(20 μg, Lot. No.GF028, Millipore)。

1.4 主要仪器设备

实体显微镜(型号: MZ APO, 厂家LEICA; 灯型号: LG-PS2; 厂家OLYMPUS); 倒置显微镜(型号: CKX31; 厂家: 日本OLYMPUS); 倒置荧光显微镜(型号: IX71; 厂家: 日本OLYMPUS); 光学显微镜(型号: BX-51; 厂家: OLYMPUS); 超净工作台(型号: BCN1360B, 厂家: 北京东联哈仪仪器制造有限公司); CO₂培养箱(型号: 10-0221; 厂家: 日本R.K.J.); 高速冷冻离心机(型号: H-500FRS, 厂家: 日本KOKUSAN); CCD显微成像系统(型号: DP73-ST-SET; 厂家: OLYMPUS); Cell Sens standard分析软件(厂家: OLYMPUS); 流式细胞仪(型号: FACS Calibur; 厂家: BD公司)。

2 试验方法

2.1 SD大鼠神经干细胞培养

怀孕14~14.5 d; SD大鼠经异氟烷麻醉后, 剖开腹腔, 完全放血, 连同胎盘和胎膜摘取双侧胚胎组织, 置于75%乙醇溶液中浸泡消毒10 min。置于无菌操作台中, 剥离胎膜和胎盘, 将完整的胚胎移入D-Hanks液中, 清洗2~3遍, 在体视显微镜下剥离胚胎脑部皮肤、颅骨、脑膜肉眼清楚可见的大血管后取出全脑, 置于冰板上的D-Hanks

液中。脑组织剪碎后, 加入0.25%胰酶-EDTA, 置37℃ 5% CO₂温箱中消化15 min, 用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基终止消化。将消化好的脑组织吹打成单细胞悬液, 于200目筛网过滤, 1000 rpm · min⁻¹离心5 min, 弃上清液, 用1 mL SD大鼠神经干细胞完全培养基洗细胞2次, 加入适量SD大鼠神经干细胞完全培养基后吹打成单细胞悬液, 细胞计数并调整密度为5 × 10⁵ · mL⁻¹, 接种于细胞培养瓶中。将神经干细胞置于37℃ 5% CO₂温箱中培养3~4 d, 神经干细胞开始聚集成神经球, 采取半数换液法继续培养3~4 d。神经干细胞传代: 将形成一定大小的神经球培养液离心, 1000 rpm · min⁻¹离心5 min, 沉淀物重悬后, 反复吹打成单细胞悬液, 再继续于新的SD大鼠神经干细胞完全培养基中培养1代。此时, 形成的第2代神经干细胞球生长稳定, 可应用于神经毒理学研究。

2.2 神经干细胞鉴定

将悬浮生长的神经球接种于包被有多聚赖氨酸的多孔培养板中, 使细胞贴壁生长。贴壁细胞用预温的PBS洗3次; 应用4%多聚甲醛在室温固定细胞20 min; PBS洗3次; 0.2% Triton X-100透化15 min; PBS洗3次; 5%羊血清封闭37℃孵育30 min; 加入1:100稀释的一抗anti-Nestin antibody, 4℃过夜; PBS洗3次; 加入1:1000稀释的二抗Goat pAb to Ms IgG (Cy3), 避光、室温孵育30 min; PBS洗3次; Hoechst染核、室温避光5 min, 丙三醇封片后, 倒置荧光显微镜下观察。

2.3 神经球聚集毒性试验

将第二代神经球培养3~4 d时, 按照神经球密度1 × 10⁴ · mL⁻¹每孔移至96孔板中。给药分组及神经球聚集毒性试验给药分组设计如表1所示。每孔的培养基与药物体积之和为100 μL。同时, 接种3个相同的培养板, 每个试验组设置4个复孔, 分别于给药后24 h、48 h和72 h时收集50 μL神经球培养液, 倒置显微镜下观察神经球聚集情况, 采用CCD显微成像系统和Cell Sens standard分析软件, 观察和测量每个复孔中5个视野的神经球大小。各给药组数据均以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 给药各组均值均与空白对照组比较, $P < 0.05$ 表示两组比较差异显著, $P < 0.01$ 表示两组比较差异非常显著。

表1 神经球聚集毒性试验给药分组设计

受试物	空白对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
长春新碱	0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
顺铂	0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	1600 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
瑞芬太尼	0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	1600 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
氧化铁纳米粒子	0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
丙泊酚注射液	0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
丙戊酸钠	0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
苯妥英钠	0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
丙烯酸胺	0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
乙醇	0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
神经生长因子	0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$		

2.4 神经干细胞EdU (5'-乙炔基-2'-脱氧尿苷) 增殖毒性试验

第二代神经干细胞培养4~6 d左右再次形成神经球,将神经球和培养基的混合液按照每孔750 μL 体积接种到12孔培养板中,培养次日进行给药。给药分组情况与神经球聚集毒性试验给药分组设计相同。给药后的每孔溶液终体积为1 mL。

按照Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry Assay Kit的操作规程进行试验:(1)应用EdU标记神经干细胞:在超净台内进行操作,神经干细胞在给药24 h后,每孔加入1 μL 的10 mM EdU溶液、混匀,使得10 mM EdU溶液与培养基的稀释比例为1:1000 (10 μM)。将加入EdU的培养板再次放入37℃培养箱中孵育2 h。取出后采用机械分离法将神经球打散成单细胞悬液,移入流式管,1000 $\text{rpm} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心3 min,弃上清液。(2)固定和渗透:用3 mL含1%胎牛血清的PBS洗涤细胞一次,1000 $\text{rpm} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心3 min,弃上清液。向沉淀中加入100 μL Click-iT固定剂,并充分混匀。室温下,避光孵育细胞15 min。用3 mL含1%胎牛血清的PBS洗涤细胞,1000 $\text{rpm} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心3 min,弃上清液。将沉淀细胞重悬于100 μL Click-iT渗透洗涤剂中,并充分混匀,孵育15 min。(3)Click-iT反应:每个样本中加入0.5 mL的Click-iT反应试剂,充分混匀。反应混合物在室温

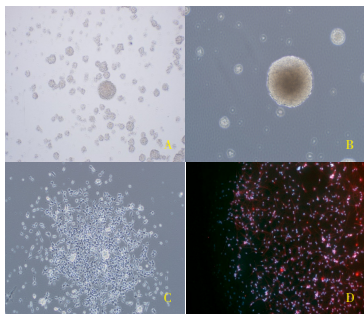
下避光孵育30 min。用3 mL Click-iT渗透洗涤剂洗涤一次,1000 $\text{rpm} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心3 min,弃上清液。加入400~500 μL 的Click-iT渗透洗涤剂重悬细胞,流式细胞仪上进行分析。上机前,将较大的、没有充分分离的神经干细胞球过滤。每份样品收集5000个左右的细胞,用紫外发射滤光片(450/400 nm)405 nm激发荧光检测EdU的表达。

数据均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据的比较采用单因素方差分析法,设定 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异非常显著。

3 结果

3.1 SD大鼠神经干细胞培养

第一代分离培养的神经干细胞,在培养7 d时聚集成折光性较好的神经干细胞球(见图1-A)。如果培养时间过长,神经球聚集过大,中心部分的神经干细胞会因为缺乏营养而发生坏死,呈深色(见图1-B),外周神经干细胞会交错成神经网络不易在传代时将神经球吹打为单细胞悬液。本研究中,调整神经球的培养密度为 $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$,神经球大小均值为1500 μm^2 ,此时的神经球在毒理学试验中能维持较好的神经干细胞活力。当神经球贴壁后,神经干细胞不断由中心向外生长延伸,胞体呈多边形、较小,突触短而不明显。抗Nestin抗体鉴定神经干细胞为阳性。如图1-C及图1-D所示。



注：A：悬浮生长的神经球（100×）；B：聚集过大的神经球中心位置细胞呈深色（100×）；C：神经球/神经干细胞贴壁生长（100×）；D：抗Nestin抗体标记神经干细胞呈阳性（200×）

图 1 神经球和神经干细胞形态学观察及鉴定

3.2 神经球聚集毒性实验结果

神经球聚集毒性实验结果如表2和图2所示。A长春新碱从给药24 h起即可引起神经球解离、破碎、神经干细胞坏死；B顺铂具有显著的抑制神经球生长作用；C瑞芬太尼未见明显神经球聚集毒性作用；D氧化铁纳米粒子、E丙泊酚和H丙硫酰胺可引起神经球解离、破碎、神经干细胞坏死；F丙

戊酸钠、G苯妥英钠具有显著的抑制神经球生长作用。神经生长因子促进神经球聚集；I乙醇未见明显神经球毒性作用。试验结果表明神经球聚集毒性指标适用于评价顺铂、丙戊酸钠和苯妥英钠药物的抑制神经球生长毒性作用；而长春新碱、氧化铁纳米粒子、丙泊酚和丙硫酰胺的细胞毒性作用较强，可选用检测细胞毒性的指标进行评价。

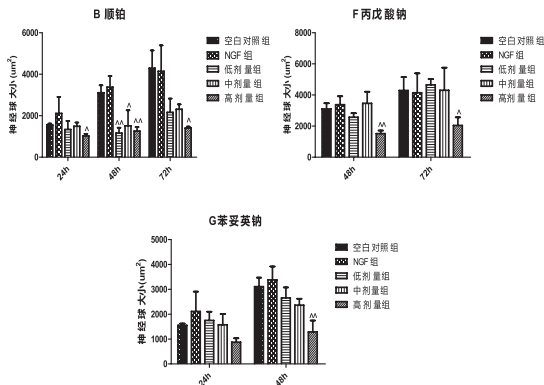
表 2 神经球聚集 / 毒性作用观察结果

标识 受试物名称	给药 24 h	给药 48 h	给药 72 h
A 长春新碱	部分解离破碎 (1、m、h)	全部解离破碎 (1、m、h)	全部解离破碎 (1、m、h)
B 顺铂	球体正常 (1、m)； 少数解离破碎 (h)	部分解离破碎 (1、m、h) 球体减小 (1、m、h)	部分解离破碎 (1、m、h) 球体减小 (1、m、h)
C 瑞芬太尼	球体正常 (1、m、h)	球体正常 (1、m、h)	部分贴壁 (1、m、h)
D 氧化铁纳米粒子	球体正常部分贴壁 (1、m、h)	球体正常部分贴壁 (1、m) 全部解离破碎 (h)	部分解离破碎 (1、m)； 全部解离破碎 (h)
E 丙泊酚	球体正常部分贴壁 (1、m)； 部分解离破碎 (h)	部分解离破碎 (1、m)； 全部解离破碎 (h)	球体正常部分贴壁 (1、m)； 全部解离破碎 (h)
F 丙戊酸钠	球体正常部分贴壁 (1、m、h)	球体正常部分贴壁 (1、m、h) 高剂量组球体减小	球体正常部分贴壁 (1、m、h)， 高剂量组球体减小

续表 2

标识 受试物名称	给药 24 h	给药 48 h	给药 72 h
G 苯妥英钠	球体正常部分贴壁 (1、m) 部分解离破碎 (h)	球体正常部分贴壁 (1、m) ; 部分解离破碎, 球体减小 (h)	球体正常部分贴壁 (1、m) ; 部分解离破碎, 球体减小 (h)
H 丙烯酸胺	球体正常部分贴壁 (1、m) ; 部分解离破碎 (h)	球体正常部分贴壁 (1、m) 部分解离破碎 (h)	球体正常部分贴壁 (1、m) ; 全部解离破碎 (h)
I 乙醇	球体正常 (1、m、h)	球体正常 (1、m、h)	球体正常 (1、m、h)
K 神经生长因子	球体增大 (1、m、h)	球体增大 (1、m、h)	球体增大 (1、m、h)

注: 1 表示低剂量组, m 表示中剂量组, h 表示高剂量组。



注: 数据为均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$), $n=4$; * 表示与空白对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$);

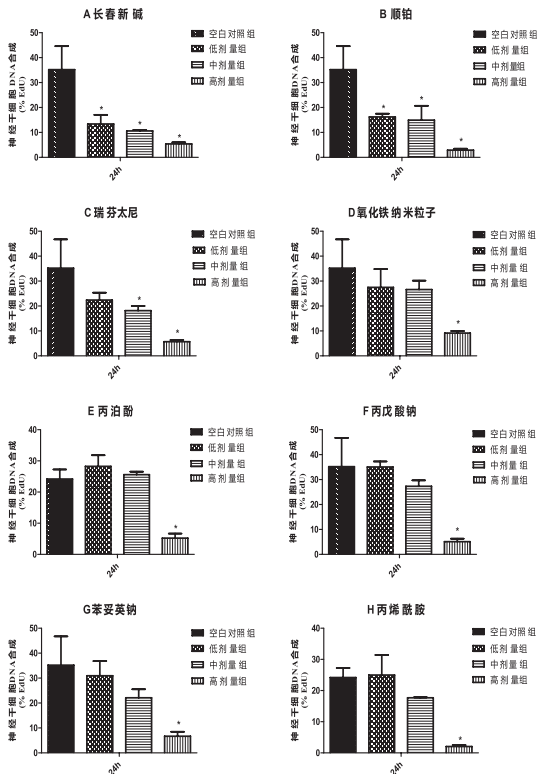
~ 表示与空白对照组相比有极显著性差异 ($P < 0.01$)

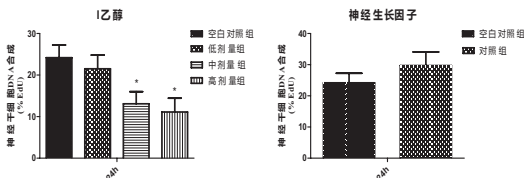
图 2 神经球聚集/毒性试验结果显著性差异分析

3.3 神经干细胞EdU增殖毒性试验结果

神经干细胞EdU增殖毒性试验结果如图3所示。在给药24h, A长春新碱、B顺铂、C瑞芬太尼、D氧化铁纳米粒子、E丙泊酚、F丙戊酸钠、G

苯妥英钠、H丙烯酸胺、I乙醇均具有抑制神经干细胞增殖作用, 且呈剂量相关性。J神经生长因子可见促进神经干细胞增殖趋势。





注: 数据为均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$), $n=4$; * 与空白对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$);

** 与空白对照组相比有极显著性差异 ($P < 0.01$); NGF: 神经生长因子。

图3 给药24 h神经干细胞增殖毒性作用统计结果

4 讨论

为了在药物研发早期筛选神经毒物, 国内外药物研发企业和监管机构都试图建立一种新的检测策略和方法, 目的是能够快速、可靠、减少使用实验动物数来评价药物的神经毒性。随着各种神经干细胞及细胞模型的开发, 可实现体外神经毒性和发育神经毒性研究, 甚至还能模拟慢性神经毒性研究^[14]。本研究中, 选用几类已知具有神经毒性和发育神经毒性的药物和化合物, 利用SD大鼠神经干细胞模型评价药物对神经球聚集、神经干细胞增殖的毒性作用, 以探讨该评价体系的适用性, 以及验证评价结果的准确性和敏感性。

神经球聚集毒性试验中, 丙戊酸钠和苯妥英钠表现为抑制神经球聚集, 该检测终点可有效地评价这两种抗癫痫药物的发育神经毒性作用, 但其对神经干细胞的存活并无影响。长春新碱、顺铂、氧化铁纳米粒子、丙泊酚注射液、丙烯酸酯可直接引起神经干细胞凋亡坏死, 证明了其较强的神经毒性作用。

本研究应用更加快速、灵敏和准确的Edu细胞增殖毒性检测法评价药物对神经干细胞的增殖毒性作用, 能有效地检测处于S期的细胞百分数^[15]。在试验设定的3个时间点中给药6 h, 各药物剂量组未见明显干细胞增殖毒性。给药48 h, 各种药物的中、高剂量组增殖毒性作用较强几乎未检测出细胞增殖率。给药24 h, 则表现显著的增殖毒性剂量效应关系, 说明给药24 h即为检测药物影响神经干细胞增殖毒性的最佳时间点。试验结果表明长春新

碱、顺铂、瑞芬太尼、氧化铁纳米粒子、丙泊酚注射液、丙戊酸钠、苯妥英钠、丙烯酸酯、乙醇均具有剂量相关性的增殖毒性作用。

本研究利用SD大鼠神经干细胞模型验证了10种已知药物的神经毒性作用, 结果证明这些药物影响神经球聚集和具有神经干细胞增殖毒性; 提示该SD大鼠神经干细胞模型可作为药物神经毒性早期筛选和临床前安全性评价。

参考文献:

- [1] Fonck C, Easter A, Pietras MR, et al. CNS Adverse Effects: From Functional Observation Battery/Irwin Tests to Electrophysiology[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 229: 83-113.
- [2] Kaufmann W, Bolon B, Bradley A, et al. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Central and Peripheral Nervous Systems[J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40 (4): 87-157.
- [3] Tsuji R, Crofton KM. Developmental Neurotoxicity Guideline Study: Issues with Methodology, Evaluation and Regulation[J]. *Congenit Anom (Kyoto)*, 2012, 52 (3): 122-28.
- [4] Schultz L, Zurich MG, Culot M, et al. Evaluation of Drug-Induced Neurotoxicity Based on Metabolomics, Proteomics and Electrical Activity Measurements in Complementary CNS in Vitro Models. *Toxicology in Vitro*, 2015, 30 (1): 138-165.
- [5] Wilson MS, Graham JR, Ball AJ. Multiparametric High

- Content Analysis for Assessment of Neurotoxicity in Differentiated Neuronal Cell Lines and Human Embryonic Stem Cell-Derived Neurons. [J]. Neurotoxicology, 2014, 42 (5) : 33-48.
- [6] Esmaeelpanah E, Razavi BM, Vahdati Hasani F, et al. Evaluation of Epigallocatechin Gallate and Epicatechin Gallate Effects on Acrylamide-Induced Neurotoxicity in Rats and Cytotoxicity in PC 12 Cells[J]. Drug Chem Toxicol, 2017, 26 (10) : 1-8.
- [7] Radio N, Frank S. Neuronal Cell Morphology in Primary Cerebellar Granule Cells Using High-Content Analysis[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1727: 227-237.
- [8] Schultz L, Zurich MG, Culot M, et al. Evaluation of Drug-Induced Neurotoxicity Based on Metabolomics, Proteomics and Electrical Activity Measurements in Complementary CNS in Vitro Models[J]. Toxicology in Vitro, 2015, 30 (1) : 138-165.
- [9] Gorba T, Conti L. Neural Stem Cells as Tools for Drug Discovery: Novel Platforms and Approaches[J]. Expert Opin Drug Discovery, 2013, 8 (9) : 1083 - 1094.
- [10] Bal-Price A, Lein PJ, Keil KP, et al. Developing and Applying the Adverse Outcome Pathway Concept for Understanding and Predicting Neurotoxicity[J]. Neurotoxicology, 2017, 59 (5) : 240-255.
- [11] OECD. [ENV/JM/MONO(2017)4]Report of the OECD/EFSA Workshop on Developmental Neurotoxicity (DNT): The Use of Non-Animal Test Methods for Regulatory Purpose[S]. 2017.
- [12] Valdiglesias V, Kilic G, Costa C, et al. Effects of Iron Oxide Nanoparticles: Cytotoxicity, Genotoxicity, Developmental Toxicity, and Neurotoxicity[J]. Environ Mol Mutagen, 2015, 56 (2) : 125-48.
- [13] Wang Q, Song YH, Tang Z, et al. Effects of Ganglioside GM1 and Neural Growth Factor on Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation[J]. Genet Mol Res, 2016, 15 (3) : 1-8.
- [14] Schmidt BZ, Lehmann M, Gutbier S, et al. In Vitro Acute and Developmental Neurotoxicity Screening: An Overview of Cellular Platforms and High-Throughput Technical Possibilities[J]. Arch Toxicol, 2017, 91 (1) : 1-33.
- [15] 罗涛, 王彤敏, 李力燕. EdU与BrdU在检测细胞增殖中的特点及应用进展[J]. 重庆医学, 2015, 32 (44) : 4581-4583.

(收稿日期 2018年5月30日 编辑 范玉明)

CAR-T 细胞治疗产品非临床研究动物模型的发展和应用概述

黄瑛, 侯田田, 霍艳* (中国食品药品检定研究院, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176)

摘要:嵌合抗原受体T细胞(CAR-T, Chimeric Antigen Receptor T Cell)已成为近年来癌症免疫治疗领域的研究热点, 由于其具有特异性高、选择性强等优点, 在肿瘤治疗领域中具有巨大的潜力。同时, CAR-T疗法可能带来特殊毒性风险, 包括细胞因子释放综合征、神经毒性、B细胞减少和靶向与脱靶毒性等。尽量在研发早期、在人体使用前获得CAR-T产品的有效性和安全性等非临床信息至关重要, 选择合适的动物模型进行上述相关研究可以大大提高对临床结果的预测性。目前, 已用于CAR-T产品研究和正处于探索阶段的动物模型主要包括同源小鼠模型、转基因小鼠、移植瘤小鼠模型、免疫系统重建人源化小鼠以及灵长类动物模型。但是, 由于CAR-T细胞产品的个性化程度高, 人和动物免疫系统特性存在差异, 人源细胞在动物体内易受到免疫排斥等原因, 人源产品在动物模型上的研究结果尚不能完全反映其在人体内的作用情况。因此, 需要根据产品特点和研究目的, 构建或者选择适当的动物模型, 为CAR-T细胞治疗产品非临床研究提供有效的研究工具。

关键词: 嵌合抗原受体T细胞; 动物模型; 非临床研究; 有效性; 安全性评价; 毒性

中图分类号: R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7777(2018)07-0886-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.07.007

Overview of the Development and Application of Animal Models in Non-clinical Studies of CAR-T Cell Therapy Products

Huang Ying, Hou Tiantian, Huo Yan* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing Key Laboratory, National Center for Safety Evaluation of Drugs, Beijing 100176, China)

Abstract: Chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) has become a research focus in the field of cancer immunotherapy in recent years. Because of its high specificity and strong selectivity, CAR-T has great potential in the field of cancer therapy. However, CAR-T therapy can have specific toxic risks, including cytokine release syndrome, neurotoxicity, B-cell reduction, as well as targeted and off-target toxicity. It is crucial to obtain non-clinical information such as the effectiveness and safety of CAR-T products in the early stages of R&D prior to human use. Selecting appropriate animal models for these above-mentioned studies can greatly improve the predictability of clinical outcomes. At present, the animal models that have been used for CAR-T product research and still are in the exploratory stage mainly include including homologous mouse models, transgenic mice,

基金项目: 十二五国家科技重大专项“生物大分子药物特殊评价关键技术研究”(编号 2015ZX09501007-004)

作者简介: 黄瑛, 博士; 研究方向: 药物临床前安全性评价研究; Tel: (010) 67876252; E-mail: huangycn@163.com

通信作者: 霍艳, 博士; 研究方向: 药物临床前安全性评价研究; Tel: (010) 67876252; E-mail: yanhuo@nifde.org.cn

mouse models of transplanted tumors, humanized mouse with reconstructed immune system, and primate models. However, due to the high degree of personalization of CAR-T cell products, human-derived cells are susceptible to immune rejection in animals, and differences of biological characteristics and immune system between humans and animals, etc., human-derived product studied in animal models could not fully reflect its role in the human body. Therefore, it is necessary to construct or select appropriate animal models based on product characteristics and research purposes, and to provide powerful tools for non-clinical study of CAR-T cell therapy products.

Keywords: CAR-T; animal models; non-clinical study; effectiveness; safety evaluation; toxicity

当今肿瘤治疗手段与日俱增,除常规手术、放疗和化疗之外,肿瘤免疫疗法作为癌症治疗的“第四支柱”引起广泛关注,它将过去重复的症状控制转为一次性的治疗甚至治愈,给生物学带来新的希望。其中,嵌合抗原受体工程T(CAR-T)细胞治疗是近年来发展非常迅速的一种细胞治疗手段,即通过体外对T细胞修饰使其能靶向肿瘤抗原并产生相应免疫反应,在多项临床研究中取得了巨大的成功^[1]。目前全球已有两款药物相继获得FDA的批准上市,分别是Novartis的Kymriah和Kite的Yescarta,极大地促进了CAR-T产品的研发和应用热潮。

虽然CAR-T疗法取得了一些不错的成果,但仍有不少问题亟待解决。从临床试验反馈得到的诸如疗效、安全性的问题,需要通过临床前的基础研究以及动物试验等进行改进和优化,再反馈回临床以制定优化的治疗方案^[2-3]。但是,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模型。目前,已用于CAR-T产品研究和正处于探索阶段的动物模型主要包括同源小鼠模型、转基因小鼠、移植瘤小鼠模型、免疫系统重建人源化小鼠以及灵长类动物模型^[6-8]。

1 同源小鼠模型(Syngeneic Mouse)

同源小鼠模型具有完整的免疫系统,可负荷载瘤肿瘤,并用以考察CAR-T产品对机体的活性作用。以靶向CD19的CAR-T细胞为例,早期使用同源小鼠模型进行的药效学研究表明,CAR-T细胞回输后导致淋巴瘤消除的效果比使用抗CD19单克隆抗体更为显著,且未出现明显的细胞毒性。同时,同源小鼠模型的组织也可能表达低水平的靶抗原,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。因此,可以更好地用于检测靶向和脱靶毒性^[9],但是仅限于用于研究鼠源细胞制备的CAR-T产品。小鼠品系不同也可能影响毒性反应的考察,使用BALB/c小鼠进行研究发现,第一代CAR-T细胞(T细胞受体胞内信号结构域无共刺激分子表达)通过特异性抗原识别肿瘤细胞并对肿瘤细胞进行杀伤,但未见明显的副作用^[10]。与之相比,第二代CAR-T细胞(T细胞受体胞内信号结构域含共刺激分子CD28表达)则会导致B细胞增生以及慢性毒性,并伴随骨髓来源的抑制性细胞(Myeloid-derived Suppressor Cells, MDSCs)增多,从而诱发免疫抑制作用,且用CAR-T细胞治疗后血清IFN- γ 和TNF- α 水平升高,提示治疗后可能诱发细胞因子释放综合征(Cytokine Release Syndrome, CRS)。在C3H或C7BL/6同源小鼠模型上进行同样的研究并未观察到这些毒性^[11]。因此,使用同源小鼠模型开展非临床研究时,各种小鼠品系出现的毒性反应可能各不相同。同时,同源小鼠模型的免疫系统与人类的免疫系统不同,在很大程度上仍无法模拟CAR-T诱发的CRS,且与人源CAR-T细胞相比,鼠源CAR-T细胞在体内存活时间较短,易发生活化诱导的细胞死亡,难以很好地揭示人源CAR-T细胞体内生物学效应以及毒性反应^[12]。

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^[13]。该模型适合用于CAR-T细胞的概念验证性研究,由于大多数TAA不仅在肿瘤上表达,在健康组织中也有较低水平的表达,因此,转基因小鼠是观察CAR-T毒性作用的重要模型。在一项临床试验中发现,CAR-T回输前,以环磷酰胺进行预处理,能明显增强CAR-T的抗肿瘤效果,上述情况在异

种移植瘤小鼠模型中并未发现,但在该转基因小鼠模型中获得了证实^[14]。然而,该转基因小鼠模型对临床的毒副作用仍无法实现充分预测,也无法提供人源CAR-T细胞的药效和安全性的直接证据。有临床研究发现,以癌胚抗原CEA (Carcino-embryonic Antigen) 为靶点的CAR-T会诱导病人出现严重自身免疫,但在3项CEA转基因小鼠研究中,至少有2项没有观察到动物出现明显自身免疫反应^[15],原因可能在于胰腺癌患者的结肠黏膜皱褶减少,使得肠道内的CAR-T细胞以及细菌菌落增多,进而导致免疫细胞功能亢进,而小鼠虽表达了高水平的人类CEA,病理条件下的免疫功能亢进却无法在转基因小鼠中复制,因此无法获得全面的对临床有预测价值的信息。此外,临床试验发现,给予高剂量抗HER2的CAR-T细胞后,患者发生死亡,而在HER2的4个转基因小鼠模型中,有3个并未观察到致死性反应^[9]。由此可见,通过转基因方式移植人TAA并不能再现许多天然肿瘤的性质,而能够产生自发肿瘤的转基因模型小鼠可能会更好地模拟人类癌症的临床进展并进行肿瘤靶向以及脱靶毒性的预测。

3 移植瘤小鼠模型 (Human Xenograft Mouse)

当前肿瘤学研究主要依赖免疫缺陷小鼠的荷瘤模型,即在免疫缺陷小鼠中移植人源肿瘤,用来研究人源CAR-T细胞对人源肿瘤的作用,属于一种更加直接的概念验证性研究。

早在1966年,科学家们就构建了T淋巴细胞发育不全的裸鼠模型。随后,通过SCID缺陷小鼠与非肥胖糖尿病NOD小鼠回交,产生了NOD/SCID小鼠,该小鼠既有先天免疫缺陷,又有T和B淋巴细胞缺乏。各种肿瘤细胞可以植入,且较少发生排斥反应及移植瘤抗宿主病 (GVHD),因此, NOD/SCID小鼠一度被认为是用于血液学肿瘤研究最理想的模型动物^[16-17]。但人们逐渐发现,由于SCID小鼠的NK细胞对外源细胞的排斥作用,制约了人源肿瘤细胞的植入能力,使得该模型的使用受到限制。21世纪初,随着IL-2受体伽玛链 (IL-2R γ) 缺陷小鼠的引入,使移植瘤小鼠模型的构建水平获得较大提升^[18]。作为细胞因子IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21等信号传递所共同需要的受体成分,IL-2R γ 的缺陷将直接导致T、B细胞发育

受损,NK细胞缺失,由此构建出的NSG等几种重度联合免疫缺陷小鼠均克服了残存NK细胞对外源性细胞的限制性问题,使得它们成为当前肿瘤移植最为理想的模型小鼠。通过对荷载淋巴瘤的小鼠注射CAR-T细胞,可观察人源CAR-T细胞的抗肿瘤作用,对其有效性评估具有重要意义^[19-20]。

移植瘤小鼠模型负荷肿瘤细胞后,还可在研发早期阶段用于测试和验证不同类型CAR (例如引入不同的信号分子或者细胞因子) 的药效以及靶向或脱靶效应。例如,有研究使用NSG小鼠来测试嵌合组合抗原的CAR细胞的靶向性,以减少其脱靶毒性,该CAR-T细胞需同时靶向前列腺特异膜抗原以及前列腺干细胞抗原,即T细胞只有在两者都被识别时才被激活,而只表达其中1种抗原的靶细胞则不会被CAR-T细胞清除^[21]。另一项研究使用了针对CD19和CD20的双特异性CAR-T来减少CD19呈阴性的白血病中的抗原逃逸。与只针对CD19的CAR-T细胞相比,双特异性CAR-T细胞能够有效清除NSG中混合表达CD19和/或CD20的白血病细胞群^[22]。此外,应用移植瘤小鼠模型可测试引入不同人源细胞因子的CAR-T的抗肿瘤效果,有研究发现包括IL-2、IL-7、IL-15和IL-21在内的多个细胞因子均能改善CAR-T细胞治疗产品的肿瘤杀伤能力,但诱导的机制以及肿瘤清除程度有所不同^[23]。

移植瘤小鼠模型在免疫缺陷小鼠中移植人源肿瘤,也可以作为疾病动物模型对毒性指标进行观察,但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,也无法观察CAR-T细胞与体内其他免疫细胞或组织的相互作用,无法检测脱靶作用。非荷瘤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。

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

免疫系统重建人源化小鼠模型是通过向免疫缺陷鼠移植人源免疫细胞制备得来,在一定程度上具有人类天然或适应性免疫系统,在此基础上植人人源肿瘤细胞或肿瘤组织,可用于研究人类免疫系统环境下肿瘤的生长情况,评估CAR-T细胞抗

肿瘤治疗效果及相关毒性作用机制^[24-26]。它们对来源CAR-T细胞具有较好的耐受性,并弥补了同源小鼠模型以及移植瘤小鼠模型的缺陷。人源化小鼠模型的构建通常是在免疫缺陷鼠如NSG小鼠等进行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^[16, 27]。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^[12]。

免疫人源化小鼠模型由于同时具有人的免疫系统并可以移植人源肿瘤组织,能够真实模拟人免疫系统与肿瘤相互作用的过程,在临床前CAR-T细胞产品抗肿瘤评价体系中具有其独特优势。在临床前药效学评价方面,有研究已经证明该小鼠模型能够反映出肿瘤的异质性,在做临床预测时,更接近真实的临床结果。患者中的肿瘤组织异质性强,通过该评价系统可以较好地观察靶点被消除后肿瘤是否复发,从而反映临床疗效。其次,在临床前安全性评价方面,人源化小鼠为CAR-T治疗的安全性评估提供了机会。CAR-T常见的副作用有细胞因子风暴、神经系统毒性和B细胞发育不全等。T细胞会攻击带有相同肿瘤抗原的正常细胞,诱发细胞因子风暴。尽管CAR-T采取了多种改进策略,但由于患者个体的差异等原因有副作用仍无法避免。通过将肿瘤组织移植到小鼠模型体内,注射患者特异性的CAR-T细胞,监测CAR-T细胞的组织分布,研究CAR-T细胞在体内存活时间以及肿瘤生长情况、小鼠体重变化、细胞因子浓度等,评估CAR-T的治疗靶标是否特异,是否存在脱靶毒性,预测CAR-T实际临床应用时产生细胞因子风暴的可能性以及严重性,从而进行临床治疗方案的风险评估。

尽管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。例如,人源化免疫系统在小鼠中并没有对宿主实现完全耐受,具有髓系细胞发育不全、T细胞欠缺等缺点^[28]; 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,而一份脐带血干细胞所能用于重建的小鼠非常有限,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尚不完善,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在CAR-T细胞上的研究应用仍以探索性为主,尚不能全面应用到非临床研究中。

5 灵长类模型 (Primate)

一直以来,几乎所有的CAR-T临床前研究都是在啮齿类动物身上进行。然而,小鼠TAA序列、免疫系统以及生理学功能与人类生理存在显著差异。灵长类动物的免疫系统与人类更相似,理论上可交叉识别人和猴特异性抗原的CAR-T细胞,可以模拟CRS和神经毒性等临床上发现的毒性反应。

灵长类动物最早曾被应用在以肿瘤相关抗原ROR1 (Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 1) 为靶点的CAR-T研究中, ROR1在人类和灵长类动物之间高度保守,且有相似的组织表达模式,因此,灵长类动物模型能为CAR-T产品的安全性提供较有价值的信息。研究者将经过改造过的猕猴自体T细胞移植到2只猕猴体内,这些CAR-T细胞迅速靶向含有大量ROR1⁺ B细胞的区域,比如淋巴结和骨髓,使ROR1⁺ 前体B细胞得以清除,即使在高剂量下,也仅观察到IFN- γ 和IL-6的一过性升高,且给药3天后血清细胞因子水平恢复正常^[29]。另一项有关L1细胞粘附分子的CAR-T产品也使用了灵长类动物模型,该TAA在人类和猕猴之间高度保守,研究使用的剂量为临床剂量的100倍,试验发现2只猕猴的耐受性良好,只有短暂的IFN- γ 和IL-6血清细胞因子水平增加,此外也没有观察到毒性,这可能与CAR-T细胞在动物体内持续时间短,受体内免疫清除相关^[30]。只有在另一项以CD20为靶点的CAR-T细胞临床前研究中,注射后CAR-T灵长类动物出现B细胞发育不良、神经毒性和CRS症状,血清IL-6和IL-8显著升高。上述毒性反应与临床中观察到的不良反应较为吻合,即患者在注射1周后出现肢体震颤和行为异

常等在内的神经毒性,在服用抗癫痫药物后不良反应得到控制,这些临床中呈现的不良反应在灵长类动物模型中得以预测,可能与环磷酸腺苷预处理或不同CAR-T靶点的构造及特性相关^[6]。

尽管灵长类动物模型显示的毒副作用可能与临床试验较为相似,可在小鼠模型验证后进一步提供有用的安全信息,并可做为临床前应用的最后一步检测,但当前的模型仍存在很多亟待解决的问题,其中一个重要局限性是在灵长类体内移植人源肿瘤较为困难,当灵长类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长期评价其药效或者毒性反应;为降低免疫排斥,可预先或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;此外,该模型价格高、研究样本小,在临床前应用中仍存在诸多挑战。

6 结语

CAR-T细胞治疗作为近年来被认为癌症治疗领域最成功的方法之一,为肿瘤治疗带来巨大希望的同时,也给临床前评价研究带来前所未有的挑战。动物模型是生命科学研究中建立的能够模拟人体内反应的动物材料,在CAR-T细胞产品的有效性和安全性等研究中具有重要意义。由于生物体的复杂性和种属特异性,目前尚未有任何一种动物模型能完全模拟人类的免疫系统以及肿瘤微环境^[31]。在对CAR-T细胞产品进行临床前研究时,需根据产品特性以及动物模型的优缺点,采用不同的模型进行不同目的和不同类型的研究。表1总结了CAR-T细胞产品临床前研究中不同动物模型的特点和应用^[6]。随着研究的不断深入以及各种新技术的应用,人们将建立更为完善的动物模型,从而为CAR-T细胞肿瘤免疫治疗提供更多更有价值的有效性和安全性信息。

表 1 CAR-T 细胞临床前研究中不同动物模型的特点和应用

模型	构成	优点	缺点	应用
同源小鼠模型 (Syngeneic Mouse)	鼠源肿瘤、鼠源CAR-T和鼠源免疫系统	完整免疫系统;可以研究靶向和脱靶毒性(小鼠组织表达低水平的靶抗原)	所有细胞必须是鼠源的;小鼠生物学特性和免疫系统有别于人、不能最大程度地反映CRS、鼠源CAR-T细胞存活时间短、易发生活化诱导的细胞死亡	检测宿主免疫反应;无法获得转基因鼠的情况下评价CAR的安全性
移植小鼠模型 (Human Xenograft Mouse)	人源肿瘤和CAR-T	可以研究人源细胞CAR-T细胞对人源肿瘤的作用;更加直接的概念验证性研究	没有宿主免疫系统;不能进行脱靶作用的研究	测试复杂CAR的设计或药效验证性研究;人源细胞因子的应用性探索研究
转基因鼠 (Transgenic Mouse)	鼠源肿瘤、CAR-T和带有肿瘤相关抗原TAA的免疫系统	可以研究人TAA,同时保留宿主免疫系统;特别适合观察脱靶毒性作用	不能获得所有类型的TAA;细胞来源必须是鼠源	评价靶向和脱靶毒性作用以及对宿主免疫系统的影响
人源化转基因小鼠 (Humanized Mouse)	人肿瘤、CAR-T和部分人免疫系统	可以研究人源细胞,含有部分免疫细胞,可以模拟肿瘤微环境或者脱靶作用	免疫系统人源化程度低;目前研究很少	研究特定免疫细胞对CAR-T作用的影响
灵长类模型 (Primate)	猕猴CAR-T和免疫系统	免疫系统和生理学与人接近;可以模拟临床毒性(如CRS和神经毒性)	价格高;研究样本小;缺少移植瘤模型检测药效(体内无肿瘤细胞,无法活化CAR-T细胞,细胞存活时间短)	在小鼠模型进行充分验证后可进行安全性研究;可做临床前应用的最后一步检测

参考文献：

- [1] Maude S L, Frey N, Shaw P A, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371 (16) : 1507-1517.
- [2] Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, et al. Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia with Genetically Targeted Autologous T Cells: Case Report of an Unforeseen Adverse Event in a Phase I Clinical Trial[J]. *Mol Ther*, 2010, 18 (4) : 666-668.
- [3] Morgan R A, Yang J C, Kitano M, et al. Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced with a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2[J]. *Mol Ther*, 2010, 18 (4) : 843-851.
- [4] Wegner A. Chimeric Antigen Receptor T Cells for the Treatment of Cancer and the Future of Preclinical Models for Predicting Their Toxicities[J]. *Immunotherapy*, 2017, 9 (8) : 669-680.
- [5] Barrett D M, Grupp S A, June C H. Chimeric Antigen Receptor- and TCR-Modified T Cells Enter Main Street and Wall Street[J]. *J Immunol*, 2015, 195 (3) : 755-761.
- [6] Siegler E L, Wang P. Preclinical Models in Chimeric Antigen Receptor-Engineered T-Cell Therapy[J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29 (5) : 534-546.
- [7] Wegner A. Chimeric Antigen Receptor T Cells for the Treatment of Cancer and the Future of Preclinical Models for Predicting Their Toxicities[J]. *Immunotherapy*, 2017, 9 (8) : 669-680.
- [8] Wu Y, Xu R, Jia K, et al. The Efficacy of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Immunotherapy in Animal Models for Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2017, 12 (11) : e187902.
- [9] Sanmamed M F, Chester C, Melero I, et al. Defining the Optimal Murine Models to Investigate Immune Checkpoint Blockers and Their Combination with Other Immunotherapies[J]. *Ann Oncol*, 2016, 27 (7) : 1190-1198.
- [10] Cheadle E J, Hawkins R E, Batha H, et al. Natural Expression of the CD19 Antigen Impacts the Long-term Engraftment But Not Antitumor Activity of CD19-specific Engineered T Cells[J]. *J Immunol*, 2010, 184 (4) : 1885-1896.
- [11] Cheadle E J, Sheard V, Rothwell D G, et al. Differential Role of Th1 and Th2 Cytokines in Autotoxicity Driven by CD19-specific Second-generation Chimeric Antigen Receptor T Cells in a Mouse Model[J]. *J Immunol*, 2014, 192 (8) : 3654-3665.
- [12] Holzapfel B M, Wagner F, Thibaudau L, et al. Concise Review: Humanized Models of Tumor Immunology in the 21st Century: Convergence of Cancer Research and Tissue Engineering[J]. *Stem Cells*, 2015, 33 (6) : 1696-1704.
- [13] Bhattacharya-Chatterjee M, Saha A, Foon K A, et al. Carcinoembryonic Antigen Transgenic mouse Models for Immunotherapy and Development of Cancer Vaccines [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2008, 20 : 20-28.
- [14] Brentjens R J, Riviere I, Park J H, et al. Safety and Persistence of Adoptively Transferred Autologous CD19-targeted T Cells in Patients with Relapsed or Chemotherapy Refractory B-cell Leukemias[J]. *Blood*, 2011, 118 (18) : 4817-4828.
- [15] Parkhurst M R, Yang J C, Langan R C, et al. T Cells Targeting Carcinoembryonic Antigen Can Mediate Regression of Metastatic Colorectal Cancer But Induce Severe Transient Colitis[J]. *Mol Ther*, 2011, 19 (3) : 620-626.
- [16] Hogan C J, Shpall E J, McNulty O, et al. Engraftment and Development of Human CD34(+)-enriched Cells from Umbilical Cord Blood in NOD/LtSz-scid/scid Mice[J]. *Blood*, 1997, 90 (1) : 85-96.
- [17] Wang X, Qi Z, Wei H, et al. Characterization of Human B Cells in Umbilical Cord Blood-transplanted NOD/SCID Mice[J]. *Transpl Immunol*, 2012, 26 (2-3) : 156-162.
- [18] Walsh N C, Kenney L L, Jangalwe S, et al. Humanized Mouse Models of Clinical Disease[J]. *Annu Rev Pathol*, 2017, 12 : 187-215.
- [19] 王岩石, 田志刚. 免疫系统人源化小鼠的构建及其应用进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2016, (3) : 289-298.
- [20] Tasian S K, Kenderian S S, Shen F, et al. Optimized Depletion of Chimeric Antigen Receptor T Cells in Murine Xenograft Models of Human Acute Myeloid Leukemia[J]. *Blood*, 2017, 129 (17) : 2395-2407.
- [21] Kloss C C, Condomines M, Cartellieri M, et al.

- Combinatorial Antigen Recognition with Balanced Signaling Promotes Selective Tumor Eradication by Engineered T Cells[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31 (1) : 71-75.
- [22] Zah E, Lin M Y, Silva-Benedict A, et al. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells[J]. Cancer Immunol Res, 2016, 4 (6) : 498-508.
- [23] Markley J C, Sadelain M. IL-7 and IL-21 are Superior to IL-2 and IL-15 in Promoting Human T Cell-mediated Rejection of Systemic Lymphoma in Immunodeficient Mice[J]. Blood, 2010, 115 (17) : 3508-3519.
- [24] 连晶瑶, 丁苗慧, 秦国慧, 等. 免疫系统人源化小鼠模型的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27 (10) : 113-119.
- [25] 李爽, 邹建玲, 鲁智豪, 等. 免疫系统人源化小鼠模型的建立、应用及挑战[J]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2017, 9 (10) : 15-20.
- [26] 孙丽娜, 孙晨鸣, 赵勇. 免疫系统人源化小鼠模型现状及应用[J]. 实验动物科学, 2012, 29 (6) : 52-55.
- [27] 陈冰, 刘吴川, 李龙云, 等. 人源化小鼠模型构建和应用的研究进展[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2018, (3) : 667-674.
- [28] 陈冰. 造血免疫系统人源化小鼠中人红细胞重建缺陷的机制研究[D]. 吉林大学, 2017.
- [29] Berger C, Sommermeyer D, Hudecek M, et al. Safety of Targeting ROR1 in Primates with Chimeric Antigen Receptor-modified T Cells[J]. Cancer Immunol Res, 2015, 3 (2) : 206-216.
- [30] K ü nkele A, Taraseviciute A, Finn L S, et al. Preclinical Assessment of CD171-Directed CAR T-cell Adoptive Therapy for Childhood Neuroblastoma: CE7 Epitope Target Safety and Product Manufacturing Feasibility[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23 (2) : 466-477.
- [31] Kalaitzidou M, Kueberuwa G, Schutt A, et al. CAR T-cell Therapy: Toxicity and the Relevance of Preclinical Models[J]. Immunotherapy, 2015, 7 (5) : 487-497.

(投稿日期 2018年6月20日 编辑 王雅雯)

细胞治疗 · 研究评价

编者按:

嵌合抗原受体T细胞,即CAR-T(Chimeric antigen receptor T)是一种基因修饰的T细胞,通过将带有特异性肿瘤细胞抗原识别结构域及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;此外,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。由于CD19-CAR-T细胞在多种血液肿瘤临床试验中的突出表现,CAR-T细胞已经在全球范围内掀起了研究热潮,甚至有研究者认为肿瘤治愈已成为可能。

近年来,研究者在血液肿瘤及实体肿瘤细胞靶点研究、CAR分子设计、T细胞转导方法及临床治疗效果等方面均取得了巨大进展,特别是对多种血液肿瘤显示了非常好的临床效果。美国FDA于2017年8月和10月批准了诺华公司和凯特公司的分别针对急性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,未来可能会有更多的CAR-T细胞产品获得上市批准。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CAR-T细胞产品的研发中,取得了很好的研究成果,截至目前,已有十余家递交了CAR-T临床试验的申请,并有一家已获准临床试验许可,距离未来上市申请又迈进了一步。

在CAR-T细胞治疗产品全球研究热点的大背景下,我们需要清醒地认识到,作为基因治疗与细胞治疗的结合产物,CAR-T细胞领域仍处于初级阶段,一方面,在CAR-T细胞的基础研究、产品工艺和质量研究、非临床及临床研究中仍有许多问题需要探索;另一方面,CAR-T细胞个性化特征明显,制备工艺复杂,影响其产品质量的因素较多,体内作用机制复杂,具有很多与我们现在对已有产品认知不同的特点,研发者以及药品监管者都要面临很多新的挑战,需要更具有产品针对性的考虑要求。同时,我国CAR-T细胞治疗产品研究处于起步阶段,研发机构的规模大小不同,研发力量千差万别,研发人员多是从实验室研究领域开始进入产品开发,对产品研发的理念、规范性要求了解不足,对产品工艺及质量研究以及非临床研究尚缺少技术指导,临床经验尚不足,正是需要规范发展以逐步向产业化推进的好时机。本技术考虑要点针对国内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在检测研究和非临床研究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。

本刊结合CAR-T细胞产品研发推出本栏目,为今后的细胞治疗产品研究与评价构建交流的平台。

Editor's Note:

The chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) is a genetically modified T cell, which can introduce the genetic material with specific tumor cell antigen recognition domain and T cell activation signal into T cells, activate T cells by direct binding with specific antigen on the surface of tumor cells, and directly kill tumor cells by releasing perforin, granzyme-B etc. Meanwhile, CAR-T can kill tumor cells by releasing cytokines to recruit the human endogenous immune cells so as to treat tumors. Furthermore, the CAR-positive memory T cells are also maintained to sustain the specific and long-term anti-tumor effect. Due to the outstanding effect of CD19 CAR-T cells in a variety of clinical trials of blood tumors, the research of CAR-T is popular in the worldwide, and some investigators even believe that curing tumor has become possible.

In recent years, great progress has been made in the research of blood and solid tumor cell targets, CAR molecular design, T cell transduction methods and clinical treatment effects, especially for many kinds of blood tumors. The US FDA approved two kinds of CD19-CAR-T cell therapy products from Novartis and Kite in August and October 2017, for acute B-cell lymphocytic leukemia (B-ALL) and B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL) respectively. There may be more CAR-T products which will be approved in the future. The research for CAR-T in China has also shown a flourishing trend. Many research institutions and pharmaceutical companies have made effort in the research and development of CAR-T cell therapy products and have achieved very good results. So far, more than 10 applicants have submitted clinical trial application (CTA) for CAR-T and one applicant had granted the clinical trial permission (CTP), one step closer to the biological license application (BLA) in the future.

However, in the context of global research hotspots of CAR-T cell therapy products, we also need to be clearly aware that as a combination of gene therapy and cell therapy, the field of CAR-T cells is still in its primary stage. On one hand, there are still many problems that need to be explored in basic research, manufacturing process and quality research, nonclinical and clinical research of CAR-T cells. On the other hand, the individual characteristics of CAR-T cells are obvious, the preparation process is complex and there are many factors affecting the quality of products. Mechanism of action *in vivo* is complex and there are many characteristics different from the understanding of existing products. Therefore, the researchers and drug regulators will face a lot of new challenges and need more product-specific considerations. Meanwhile, the research of CAR-T cell therapy products in China is in the initial stage. The scale of the research and development (R&D) organizations is different and the capability also varies a lot. Most of the R&D people enter the product development field from laboratory research field and have insufficient understanding of the concept and standard requirements of product R&D. The technical guidance on product manufacturing process and quality research, nonclinical research and clinical research is not sufficient. Therefore, it is a very good opportunity to standardize the development and promote towards industrialization gradually. The main purpose of this technical considerations, based on the basic requirements of the "Technical guidelines for the research and evaluation of cell therapy products (Trial Implementation)", focuses on the current R&D status of CAR-T cell therapy products in China to provide suggestions on how to conduct the quality control testing and nonclinical research for CAR-T cell therapy products with the manufacturing process and product characteristics of CAR-T cell therapy products as the main line in order to provide technical references for CAR-T cell therapy product researchers, promote the standardization of research for CAR-T cell therapy products in China from the initial stage and lay a good foundation for future industrialization.

Chinese pharmaceutical affairs launch this column in conjunction with the R&D of CAR-T cell therapy products with the purpose of building a communication platform for future research and evaluation of cell therapy products.

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

目 录

一、引言	(833)
二、适用范围	(833)
1、本技术要点适用于哪类 CAR-T 细胞产品?	(833)
2、本技术要点包括哪些内容?	(833)
3、本技术考虑要点的基本原则是什么?	(833)
三、原材料和辅料及其质量控制	(834)
1、CAR-T 细胞产品的原材料和辅料通常都要考虑哪些因素?	(834)
2、转导 / 转染 T 细胞的病毒载体 / 质粒载体是否可按原材料管理?	(834)
3、如何进行原材料和辅料的选择和风险控制?	(834)
4、在载体物质或 CAR-T 细胞终产品中是否需要原材料残留的质量检测?	(835)
四、病毒转导载体及质粒转染载体制备及质量控制	(835)
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?	(835)
2、起始原材料要建立种子库系统吗?	(835)
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?	(836)
4、种子库的质量要求是什么? 如何管理种子库?	(836)
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?	(837)
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?	(838)
7、是否要进行病毒载体生产终末细胞的检定?	(838)
8、如何开展病毒载体中的外源因子污染的检测?	(838)
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? ...	(839)
10、纯化后的病毒载体的质量控制检测需要考虑哪些参数?	(839)

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？	(839)
12、采用何种方法进行 RCR/RCL 检测？	(839)
13、如何考虑病毒载体工艺杂质质量控制的要求？	(840)
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？	(840)
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？	(841)
五、建立可提供 T 细胞的供体资质标准	(841)
1、选择 T 细胞供体的基本考虑是什么？	(841)
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？	(841)
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？	(841)
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？	(841)
5、在临床试验过程中如何进一步开展供体资质的研究？	(842)
六、CAR-T 细胞产品的生产、质量控制研究及检测	(842)
1、CAR-T 细胞产品的生产工艺研究应考虑哪些因素？	(842)
2、如何定义 CAR-T 细胞的批次及批量？	(842)
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？	(842)
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？	(843)
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？	(845)
6、是否要开展 CAR-T 细胞稳定性研究？	(845)
七、CAR-T 细胞的非临床研究	(845)
1、非临床研究的一般原则	(846)
2、CAR-T 细胞产品的药效学研究	(846)
3、CAR-T 细胞产品的药代动力学（药代）研究	(847)
4、CAR-T 细胞产品的非临床安全性研究	(848)
结束语	(850)
参考文献	(850)
起草单位及起草人	(852)
提出意见及建议的单位	(852)

一 引言

嵌合抗原受体T细胞 (Chimeric antigen receptor T cell, CAR-T), 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, 而且还可能形成免疫记忆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细胞产品的质量检验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, 以最大限度地降低产品的可变性。

三 原材料和辅料及其质量控制

1 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分, 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分, 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。

但同时还需要考虑到, 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检测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检测原材料的残留控制,主要考虑两个方面:一个是根据原材料的风险等级,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,再将该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病毒载体的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/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℃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于同一容器中，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，还应定期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）、成瘤性及致癌性检测、染色体核型、均一性及稳定性等，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癌性检测，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泳检查其逆转录病毒颗粒以及感染试验进行复制型逆转录病毒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究的进展而不断提高，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，还需要考虑质粒的菌种转染效率。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分。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，又不宜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CALV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/RLC）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，被检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，则每次收获时均应收取收获液检测。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出外源因子污染，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细胞产品的有效成分为活细胞,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BMC)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/RCL,但也存在纯化工艺可能会对原本含量可能很低的RCR/RCL造成破坏从而影响到检出的风险。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SV40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、产品质量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，合格后方可放行使用。

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在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，除收获后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冻存袋上，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，对于产品质量检测来说，自动计数仪检测结果的重复性更好。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SeFv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量控制策略。

(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病原体因子的扩增,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6.4(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, HIS mice)

该模型通过向免疫缺陷鼠移植人免疫细胞制备而来。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) 灵长类动物模型(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。对于治疗淋巴瘤白血病或淋巴瘤的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)和动物中位生存期等。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谨慎考虑。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(未转染CAR的T细胞、模拟转染的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/致癌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/致癌性进行研究。

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。

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、延迟毒性和致病性风险。

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,因非临床研究尚无法直接预测人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[S]. 2015.
- [2] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 细胞制品研究与评价技术指导原则(试行)[S]. 2017.
- [3] FDA. 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) [S]. 2008.
- [4] FDA. 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[S]. 2006.
- [5] FDA. Briefing Document — Testing for Replication Competent Retrovirus (RCR) /Lentivirus (RCL) in Retroviral and Lentiviral Vector Based Gene Therapy Products — Revisiting Current FDA Recommendations[S]. 2010.
- [6] FDA. Guidance for Industry, Potency Tests for Cellular and Gene Therapy Products[S]. 2011.
- [7] FDA. Guidance for Industry, Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products[S]. 2013.
- [8] FDA. Guidance for Industry, Considerations for the Design of Early-Phase Clinical Trials of Cellular and Gene Therapy Products[S]. 2015.
- [9] FDA. Guidance for Industry, Validation of Growth-Based Rapid Microbiological Methods for Sterility Testing of Cellular and Gene Therapy Products[S]. 2011.
- [10] FDA. Guidance for Industry, Analytical Procedures and

- Methods Validation for Drugs and Biologics[S]. 2015.
- [11] EMA. Guideline on Human Cell-based Medicinal Products[S]. 2008.
 - [12] EMA. Guideline on the Non-clinical Studies Required Before First Clinical Use of Gene Therapy Medicinal Products[S]. 2008.
 - [13] EMA. Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells[S]. 2012.
 - [14] EMA. Guideline on the risk-based approach according to annex I, part IV of Directive 2001/83/EC applied to Advanced therapy medicinal products[S]. 2013.
 - [15] EMA. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (Draft) [S]. 2015.
 - [16] EMA. Guideline on potency testing of cell based immunotherapy medicinal products for the treatment of cancer[S]. 2016.
 - [17] EMA. Reflection paper on stem cell-based medicinal products[S]. 2011.
 - [18] 国家食品药品监督管理总局. 人基因治疗研究和制剂质量控制指导原则[S]. 2003.
 - [19] EP9.4. Gene Transfer Medicinal Products for Human use. [S]. 2010; 51400.
 - [20] USP40. General Information <1046> Cellular and Tissue-based Products[S]. 2017.
 - [21] USP 40. General information <1047> Gene Therapy Products[S]. 2017.
 - [22] Fesnak AD., June CH., Levine BL. Engineered T Cells: the Promise and Challenges of Cancer Immunotherapy[J]. Nature Reviews Cancer, 2016, 16 (9) : 566-581.
 - [23] Jackson HJ., Rafiq S., Brentjens RJ. Driving CAR T-cells Forward[J]. 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[J]. 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]. J Immunother, 2015, 8 (3) : 127-135.
 - [26] Ausubel LJ., Hall C., Sharma A., et al. Production of CGMP-Grade Lentiviral Vectors[J]. Bioprocess Int., 2012, 10 (2) : 32-43.
 - [27] Merten OW., Matthias Hebben M., Bovolenta C., Production of Lentiviral Vectors[J]. 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[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 53: 164-181.
 - [29] Pettitt D., Arshad Z., Smith J., et al., CAR-T Cells: A Systematic Review and Mixed Methods Analysis of the Clinical Trial Landscape, Molecular Therapy. 2017[EB/OL]. [2017-10-19]. <https://doi.org/10.1016/j.mthe.2017.10.019>.
 - [30] 国家食品药品监督管理总局审评中心. 当前对CAR-T类产品非临床研究及评价的一些考虑 [EB/OL]. (2018-03-15). <http://www.cde.org.cn/dzkw.do?method=largePage&id=314391>.
 - [31] Novartis. Primary Discipline Memo - KYMRIAH[EB/OL]. (2017). <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/ucm573706.htm>.
 - [32] Kite. Summary Basis for Regulatory Action [EB/OL]. <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[J]. Human gene therapy, 2018, 29 (5) : 534-546.
 - [34] Kalaitidou M., Kueberwa 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[J]. 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[J]. 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[J]. 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[J]. 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：王敏

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

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、赵弘辉；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；上海尚路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析坡；上海恒润达生物科技股份有限公司何凤；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；北京协和建吴医药技术开发有限责任公司魏金峰；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。

1

2

3 **基因治疗产品非临床研究与评价技术指导原则**

4 **（征求意见稿）**

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16 **2021 年 2 月**

17

目 录

18		
19	一、概述.....	4
20	(一) 背景.....	4
21	(二) 目的.....	5
22	(三) 一般原则.....	6
23	(四) 范围.....	6
24	二、非临床研究.....	7
25	(一) 相关动物种属.....	7
26	(二) 受试物.....	8
27	(三) 药理学.....	8
28	1. 动物模型.....	9
29	2. 概念验证研究.....	10
30	3. 安全药理学.....	11
31	(四) 药代动力学.....	12
32	1. 暴露量.....	12
33	2. 生物分布.....	12
34	3. 脱落.....	13
35	(五) 毒理学.....	13
36	1. 一般毒理学.....	14
37	2. 免疫原性和免疫毒性.....	17
38	3. 生殖毒性.....	19
39	4. 遗传毒性.....	19
40	5. 致癌性.....	21
41	6. 复制型病毒风险.....	21
42	7. 局部耐受性.....	22

43	三、开展临床试验的非临床考虑	22
44	（一）首次临床试验起始剂量	22
45	（二）支持临床试验的关键非临床研究	23
46	四、附录	24
47		

基因治疗产品非临床研究与评价技术指导原则

（征求意见稿）

一、概述

（一）背景

随着基因转导和修饰技术、递送载体系统、细胞培养技术等领域在基础研究和技术开发上的快速发展，基因治疗取得了突破性进展，为难治性疾病（尤其是罕见遗传性疾病）提供了全新的治疗理念和思路。自基因治疗技术出现以来，安全性始终是基因治疗研发最为关注的问题之一，关系到整个领域技术研发和产业应用的健康有序发展。基因治疗产品（Gene Therapy Products）应开展系统的非临床研究，评估安全性风险及作用机制的有效性，以支持开展相应临床试验及上市。基因治疗产品作用机制特殊且多样，起效方式复杂，非临床试验设计、实施以及研究设计中试验类型、时间安排和灵活性，可能与其它药物的非临床研究不同。

(二) 目的

本指导原则为基因治疗产品研发提供建议，以帮助设计合适的非临床研究计划，并作为非临床评价的参考，以支持开展相应的临床试验。

基因治疗产品非临床研究为临床试验提供支持性信息，研究内容一般为药理学、药代动力学、毒理学，研究目的通常包括提供作用机制有效性证据、确定药理作用特征、了解毒理学特征（确定靶器官、暴露量-反应关系和可逆性等）、确定首次人体试验的安全剂量水平、提示临床试验风险等。

本指导原则旨在促进基因治疗产品的研发，并保护受试者免受不必要的不良反应，同时应遵循“替代、减少、优化”的3R原则(Replacement, Reduction, Refinement, “3Rs”)，以避免不必要的动物及其它资源的使用。

适当情况下，基因治疗产品研发中应考虑其他非临床研究指导原则的建议。本指导原则主要描述了与其他指导原则的非临床试验建议不一致的特殊情况。

79 （三）一般原则

80 源于对基因治疗产品多样性、生物体复杂性和科学认知局限性的
81 考虑，基因治疗产品研发应遵循创新药物研发的一般原则，分阶
82 段逐步推进。

83 基因治疗非临床研究应为临床试验风险-获益分析提供充分的
84 信息。由于基因治疗产品种类、作用机制、作用特点、安全性风险
85 等方面的差异，应根据风险分析结果和临床试验受试者潜在风险/
86 获益比来设计并开展非临床研究。

87 由于基因治疗产品的生物学复杂性，基因治疗产品非临床研究
88 和评价均应采取具体问题具体分析的原则，综合考虑产品导入基因
89 特性、载体生物学特征、研究模型的可行性/可获得性、适应症/目
90 标患者群体、给药途径、给药方案等多种因素。

91 用于支持基因治疗产品研发的非临床安全性研究应遵循药物非
92 临床研究质量管理规范（GLP）。

93 （四）范围

94 基因治疗产品通过转导的遗传物质的转录或翻译而发挥作用，
95 一般包括：核酸（例如质粒、RNA）、表达特定基因的基因修饰微
96 生物（例如病毒、细菌、真菌）、离体基因修饰的人类细胞，以及

编辑宿主基因组（通过或未通过特定的转录/翻译）的产品和未通过基因修饰表达特定基因的微生物如溶瘤病毒产品。

本指导原则适用除基因修饰细胞以外的基因治疗产品，不适用于化学合成的寡核苷酸及其类似物。基因修饰细胞治疗产品参见《基因修饰细胞治疗产品非临床研究与评价技术指导原则》。

二、非临床研究

（一）相关动物种属

基因治疗产品的非临床研究应在相关动物种属中开展。一般认为，基因治疗产品应能在相关动物种属中有效导入/暴露，有效转录/翻译,发挥药理学活性作用。复制型载体的基因治疗产品应可在相关动物种属中复制。

相关动物种属选择应综合考虑生物学反应性和疾病特点，可以选择野生型、免疫缺陷型、人源化或其它基因修饰的动物。考虑基因治疗产品特殊性和临床适应症，某些情况下可能需要采用“非标准”的动物种属和品系开展非临床试验，如基因修饰啮齿类动物（如转基因或基因敲除）、其它啮齿类动物（如叙利亚仓鼠、棉鼠等）、以及非啮齿类动物（如绵羊、猪、山羊、马等）。

114 (二) 受试物

115 基因治疗产品非临床研究中所用受试物应明确其特性，应该能
116 够充分代表临床试验拟用样品，还应考虑生产过程、关键质量特征
117 (如滴度)、临床拟用制剂等因素。

118 如果基因治疗产品生物学作用具有种属特异性，应考察评估受
119 试物在非临床研究中的活性，科学论证其对临床拟用样品的代表性。
120 如果非临床研究中受试物载体采用了表达性标签(如荧光蛋白)，
121 应分析评估表达性标签对非临床试验支持性的影响。

122 当产品药学信息(载体结构、表达元件、生产工艺等)发生重
123 大变更时，需要评估开展桥接研究或新的非临床研究的必要性。

124 (三) 药理学

125 基因治疗产品药理学研究是为了在体内、体外研究产品与治疗
126 靶点相关的作用机制和效应，明确基因治疗产品的生物学作用特点，
127 应选择合适的体内或体外模型进行，并以此评估基因治疗产品在人
128 体中潜在治疗作用和效果，有助于后续非临床和临床试验的剂量选
129 择。在某些情况下，相关人用经验可能有助于加深对基因治疗产品
130 生物学作用特征的认识。在 I 期临床试验之前，基因治疗产品应当
131 完成作用机制、量效关系特点和药效活性的初步研究。

1. 动物模型

结合基因治疗产品的具体特点，动物疾病/损伤模型有可能对正常健康动物模型更加适于评价“风险-获益”关系，更有机会发现可以用于临床试验监测的活性/毒性生物标志物。

选择动物模型时应考虑以下因素：受试物在动物模型中复制能力和转导（转染、感染）特性；动物模型中与受试物相关的细胞表达和组织分布，这有可能对受试物药效、药代动力学和安全性评价造成显著影响；受试物中有生物调节活性的组分对动物模型转基因的表达水平和组织表达特异性的影响；导入基因产物引起的生物学效应；动物预存免疫学状态对受试物的影响；动物模型内在的与导入基因同源的基因及其产物对药效的影响；转基因动物用于特定受试物药效评价的适用性；结合受试物产品组分的生物学特性，可实际用于动物模型的安全剂量和体积；受试物在动物模型中的生物学分布以及与宿主内源性病毒产生重组的可能性；动物模型的遗传背景（如小鼠品系等）、肠道微生物菌群等。在选择动物疾病/损伤模型时需要了解其局限性，包括模型内在的固有变异、历史/基线数据不足、生理功能和解剖结构的技术性限制、模拟人体疾病/损伤病理过程的可靠性有限等。

如果没有合适的动物模型满足试验需要，应当依据科学原理开发相应的动物模型或者使用适当的体外系统开展试验。若目标适应

症没有合适的动物模型，应通过更完善的体外研究或替代性模型（如类器官）来验证基因治疗产品的有效性，并对体外研究或替代模型研究对临床试验设计的支持性进行科学论证。

如果单个动物试验模型不足以论证相关问题，则应采用不同的动物模型从多个角度开展相应研究。

2. 概念验证研究

由于基因治疗产品的生物学作用与试验系统、试验动物种属高度相关，在基因治疗药理学研究中应关注概念验证（Proof of Concept, POC）研究的重要性。POC 研究为临床试验提供可行性和有效性的非临床证据，并提供可能的生物学作用机制等信息。

POC 研究的目标包括：1. 基因治疗产品的有效剂量范围，包括最低起效剂量，推荐开展产品量效关系的探索性研究；2. 优化给药途径，以确保治疗产品能到达靶组织、器官或特定细胞类型；3. 优化给药方案，包括相对疾病进展的最优给药时间；4. 基因治疗产品的生物学功能及作用机制。

POC 研究包括体外研究和体内研究。体外研究主要用于评估基因治疗产品的生物学功能（如治疗基因的表达、特定细胞功能的恢复等）及对作用机制的初步验证。体外研究通常不足以预测基因治疗产品在人体内的药理及毒理学特征，因此应选择合适的动物疾病

模型进行体内研究，通过对动物表型、目标基因的体内表达、及其功能活性相关的生物标志物进行检测以说明基因治疗产品的有效性和/或安全性。

由于种属和免疫状态的差异，基因治疗产品在人体内的表达、分布和作用与在模型动物中可能有较大不同，这种情况下，可选用替代产品（如治疗基因使用来自模型动物的同源基因，或使用基因修饰的模型动物细胞等）进行POC研究。对于替代产品的设计应进行详细的说明，并对替代产品的体内研究数据对于临床试验的指导意义进行合理的评估。

3.安全药理学

安全药理学主要是研究基因治疗产品（包括载体和导入基因，以及导入基因的表达产物）在治疗剂量范围内或治疗范围以上剂量时，对生理功能潜在的非期望作用，一般包括对中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统的影响。根据产品特点，可能需要补充对其他器官系统的研究。通常应在人体试验前完成。安全药理学评价一般基于导入基因作用机制、载体类型和分布、临床给药方案等因素，采用基于风险的评估策略。安全药理学研究通常采用单剂量给药方式，如有可能的话，也可以与单次/重复给药毒性试验联合进行。

(四) 药代动力学

1. 暴露量

基因治疗产品应根据产品具体特点考虑非临床研究中的实际暴露情况。基于基因治疗产品的暴露量，对非临床（药理学、药代动力学、毒理学）研究结果进行分析评价。

2. 生物分布

基因治疗产品生物分布是基因治疗产品在体内靶组织和非靶组织的分布、存续和清除。生物分布特征是基因治疗产品非临床研究的关键部分，有助于解释药理学、毒理学的研究发现，也为临床试验设计提供支持信息。基因治疗产品生物分布研究应在临床试验开始前完成。

基因治疗产品生物分布研究应采用足够的剂量，以临床拟用的给药方式，在相关动物种属中开展，不仅包括导入基因、载体的检测，还可能包括表达产物的检测。取样时间点的安排应能体现基因治疗产品体内过程的特点，至少包括在靶组织和非靶组织的峰值和稳态阶段。具有体内复制特征的基因治疗产品，取样点至少包括两个峰值和清除阶段。生物分布研究的检测方法应经过方法学验证。

3.脱落

脱落是指基因治疗产品通过排泄物（粪便）、分泌物（尿液、唾液、汗液、鼻咽液等）或皮肤（脓疮、伤口等）排出体外。根据基因治疗产品的特点（如复制型基因治疗产品）评估开展脱落分析的必要性。脱落分析应包括对其排出体外成分感染能力的检测。根据基因治疗产品脱落的特点和感染风险，在临床试验中采取相应的风险控制措施。

（五）毒理学

在毒理学研究中，应对基因治疗产品进行全面的安全性分析评估，必要时还应评估导入基因的表达产物的安全性。

由于基因治疗产品的生物学复杂性，毒理学试验设计应充分考虑产品本身的特点（如导入基因结构和作用机理、表达产物的活性与功能、载体性质和生物学特征、相关动物种属和疾病模型的可获得性）和临床应用（如适应症、给药途径和治疗方案等）。原则上应选择可以代表临床使用的、具备合适安全窗口的剂量、给药途径和方法，应注意组别、检测指标和时间节点的合理性。必要时，可考虑增加额外的组别（如静脉给药，以评估潜在的严重毒性反应），额外的检测时间点，特殊的毒性生物标志物检测等。

开展毒理学研究应遵从 GLP 规范，对于采用特殊动物模型、药理毒理整合性研究、特殊指标检测等非常规 GLP 试验内容，可以考虑按照非 GLP 研究实施，但应保证数据的质量和完整性。

1.一般毒理学

一般毒理学试验用以评估基因治疗产品毒性特征、毒性可逆性、延迟毒性、剂量-毒性反应关系等，包括单次给药和重复给药毒性试验。一般毒理学试验设计时应关注动物种属的选择、与基因治疗产品特性相关的检测指标、毒性反应的持续时间和可逆性，考虑设计合适的卫星组动物，以评估生物分布达峰值时的潜在毒性。

动物种属选择

毒理学研究中所选动物种属应与基因治疗产品具有良好的生物学相关性，采用相关动物种属开展试验。通常情况下，毒理学试验采用正常健康动物，某些情况下亦可参考药理学试验中使用的疾病动物模型以预测临床试验风险/获益比。至少采用一种相关动物种属开展单次给药毒性试验和/或重复给药毒性试验。根据具体产品安全性风险，考虑开展更多动物种属的单次给药或重复给药毒性试验。

剂量设计

通常情况下，一般毒理学试验中的给药剂量应该包括在最合适的非临床药效模型中确定的药效剂量范围或拟推荐的临床剂量范围。最高剂量的设置可能会受到动物模型、递送组织容量/大小、给药途径、产品的生产能力和高浓度制剂稳定性等限制。最高剂量一般应获得严重毒性反应的相关信息，通常为药效学最高剂量的一定倍数或拟推荐临床最高剂量的一定倍数；如果受载体浓度或给药体积的限制，可选择最大可行剂量作为最高剂量。最大可行剂量一般考虑可配制的产品浓度和可输送至靶组织/器官的体积及其载量。同时，基于对转基因产品中载体现有的认知，考虑设计合适的对照组，例如，可能需要设计溶媒组、空载体或含有非功能转基因的载体等作为对照进行研究。当使用疾病动物模型作为试验系统时，应考虑设计模型对照组。一般毒理学试验的动物数应该满足科学评价的一般要求。

给药方案

在一般毒理学试验中，基因治疗产品的给药方案应最大程度地模拟临床拟用给药方案，给药途径、给药频率和给药期限应能适当反应临床使用情况。

对于临床上拟单次给药的基因治疗产品，需要开展单次给药毒性试验研究。考虑到基因治疗产品可能存在延迟毒性，应考虑延长合适时间进行给药后毒性指标的检测。针对具有长期表达特性的基

因治疗产品，毒性观测指标检测时间应足以评估长期或延迟毒性。此类研究需要包含重复给药毒性研究的检测指标和时间点，包括大体病理学、组织病理学、血清生化、血液学等，毒性持续时间和可逆性。如果单次给药就能引起核酸序列和/或基因治疗产品在人体中长期作用，但实际在动物模型中没有或作用时间明显短于人体，或者动物体内复制型载体的复制动力学特征无法反应其在人体中的情况，此时应考虑进行重复给药毒性试验以模拟人体情况。

对于临床上拟多次给药的基因治疗产品，应进行重复给药毒性试验研究，给药次数和给药频率应不低于临床给药次数和频率。多次给药间隔时间应根据基因治疗产品的作用特点（如载体发挥作用持续性、导入基因表达的相关信息等，这些信息可以来自概念验证试验和/或已有的相关文献资料。）进行设计，以保证能够充分暴露毒性风险。

试验期限

由于基因治疗产品作用的持续性、可能非经典的量效关系、基因组整合风险以及新作用模式的非预期风险等，一般毒理学试验的持续时间通常会长于其它生物制品的标准毒性试验持续时间。需阐述试验期限的合理性，并根据基因治疗产品的作用特点（如载体发挥作用持续性、导入基因表达的相关信息等），确定并选择恢复期观察时长。一般毒理学试验应包括多个解剖时间点（至少应包括转

入基因表达出现峰值的时间点、达到稳态表达的时间点等），以便
评估载体和导入基因发挥作用的持续性，以及剂量/暴露量与毒性
反应的关系。

检测指标

一般毒理学试验的检测指标通常包括临床症状观察、体重、摄
食量、眼科、体温、心电图、临床病理学（血液学、血清生化、血
凝、尿液、电解质）、大体病理学、脏器重量和组织病理学等常规
检查指标；除此之外，需结合基因治疗产品特性，考虑增加合适的
观察指标，如生物活性细胞因子分泌、异常/异位增生性病变，免
疫原性/免疫毒性等；必要时设置卫星组，考察基因治疗产品中载
体和导入基因在体内的转录/翻译、分布、存续情况，为毒性试验
的结果解释提供支持性数据。必要时还应考虑基因治疗产品中脱落
的可能性及生殖毒性风险。

2.免疫原性和免疫毒性

基因治疗产品可能导致的免疫反应包括先天性免疫反应（全身
系统性细胞因子升高、多器官炎症反应）和适应性免疫反应（如产
生针对载体和转基因产物的抗体、激活细胞毒性 T 淋巴细胞、T 淋
巴细胞分泌针对特异性转基因产品的细胞因子）。多种因素可显著
影响基因治疗产品的先天性和适应性免疫反应，如宿主因素（前期

接触过相关病毒血清型和/或导入基因产物、免疫系统状态）、基因递送方式（递送系统种类、递送基因的途径和靶组织）、基因递送载体（病毒载体种类、血清型、载体剂量和导入基因的启动子类型等）、导入基因的产物、异位表达基因产物（特别是针对免疫豁免器官和/或部位特异表达的基因产物）。

对于那些携带已知对免疫系统有影响的基因治疗产品，如编码生长因子、细胞因子等的产品，通常需要开展免疫原性和免疫毒性研究，应包括体液和/或细胞免疫终点评价。

基因治疗产品的免疫原性可能来源于产品中的非人源化组分、过表达的转基因产物、基因编辑产生的非预期的肽/蛋白质等，其中病毒载体类基因治疗产品相对更容易产生免疫原性。

根据基因治疗产品的质量研究，如果预计会产生异常基因产物，或基因治疗产品表达的蛋白质与天然产物相比结构发生了改变，则应进一步评估产品的免疫原性。还应考虑预存免疫和多次给药后抗载体免疫的影响。应特别关注补体激活及其后续效应，如果重复给药可导致补体激活，则应研究动物和人类血清中补体激活标志物。同时，还要考虑交叉反应或旁观者自身免疫反应风险。

对于某些特定的基因治疗产品，动物模型可能无法代表临床实际情况，因此可能无法提供可解释的免疫毒性数据。在这些特定情

况下，鼓励采用动物模型的同源基因序列开展试验，以提供支持性信息。

3. 生殖毒性

应根据基因治疗产品类型、作用机制、一般毒性、分布特征以及患者人群来评估潜在的生殖/发育毒性风险。生殖毒性试验的研究策略和风险评估可参考 ICH S5 (R3) 的建议和 ICH M3、S6 中的相关内容。

通常需要开展胚胎-胎仔发育毒性和围产期毒性研究，除非有基于具体产品类型的特殊考虑并具有科学合理性。如果基因治疗产品拟用于有生育可能或妊娠人群，应研究产品对胎儿的影响（如细胞因子局部产生后通过胎盘转运），开展胚胎-胎仔发育和围产期毒性试验。如果在一般毒理学试验中发现有潜在的生殖器官毒性反应，那么需要开展生育力和早期胚胎发育毒性试验。

生殖毒性试验可基于风险评估需要采用科学合理的试验策略，包括采用科学验证的替代试验方法。

4. 遗传毒性

考虑到基因治疗产品将遗传物质转移到宿主细胞内或整合到宿主基因组中或对宿主基因组进行编辑，存在潜在的遗传毒性风险。

目前对于判断细胞基因组插入是否会产生遗传毒性、是否最终会发生癌变依然还缺乏系统的认知，因此，需要分析载体或遗传物质整合进基因组或对基因组编辑的特征及相关潜在风险。

通常不需要进行标准的遗传毒性组合试验，但应根据基因治疗产品的特点、产品的具体适应症、载体的已有信息，评估基因治疗产品整合进基因组的可能性，判断是否需要开展另外的遗传毒性研究，如研究基因组修饰的发生情况，并检测随后可能发生的异常细胞行为；评估插入突变（插入位点、插入拷贝数等）引起的遗传毒性风险。当基因治疗产品采用基因编辑或转座子技术时，需要关注脱靶编辑、转座子转座印迹引起的遗传毒性问题；鉴定/表征基因组整合位点。遗传毒性需要考虑最终产品的形式、递送方式（全身或局部）以及靶向的具体组织、器官和靶向细胞的生物学状态等，例如目标细胞是未分化细胞，插入突变产生遗传毒性的风险相对较高。

基因修饰噬菌体、细菌和真菌相关的产品可以不进行遗传毒性研究，一般认为这些产品通常不会直接与宿主细胞基因组发生相互作用。

5.致癌性

在基因治疗产品非临床开发过程中，通常不需要开展标准的啮齿类动物全生命周期的致癌试验。采用证据权重（WoE）方法来评估致癌性风险，必要时进行致癌性研究。WoE考虑因素包括但不限于：对应药物靶点和药物活性信号通路是已知与致癌性有相关性的（如外源基因产物是生长因子）；预测与肿瘤发生发展有一定相关性的靶点和信号通路的；插入突变研究的相关结果提示有致癌性风险的；载体设计中有潜在致癌风险的；生产体系中存在引入致癌成分的；重复给药毒性研究组织病理学发现，包括细胞肥大、弥漫性和/或局灶性细胞增生、持续的组织损伤和/或慢性炎症、癌前病变和肿瘤发生；内分泌失调的证据；免疫抑制；其他技术方法研究发现的可以合理解释说明与动物和/或人体内肿瘤发生信号通路和发生机制相关。

6.复制型病毒风险

如果使用了复制缺陷的病毒载体，需要评估在载体生产的过程中是否有可能产生复制型病毒。如果基因治疗产品有可能含有翻译病毒结构或非结构蛋白的元件，应充分评估该产品在体内产生活性完整病毒颗粒的风险。应根据基因治疗产品具体特点，评估分析基因突变和内源性病毒片段重组产生复制型病毒的可能性。检测复制

型病毒的技术方法应通过方法学验证。如果基因治疗产品有可能产生复制型病毒，应该用动物模型对复制型病毒风险进行评估。

在评估复制型病毒风险时，应考虑到该病毒在不同物种之间的流行性以及传播性，针对动物试验的结果是否能够反映在人类传播的流行病学原理需要进行慎重评估。

7.局部耐受性

根据产品类型、给药途径和临床试验方案，某些基因治疗产品（如眼内给药、肌肉注射、瘤内给药等）应开展局部耐受性试验，可以结合在一般毒理学试验中进行。

三、开展临床试验的非临床考虑

（一）首次临床试验起始剂量

确保受试者安全是考虑和确定基因治疗产品首次临床试验起始剂量的出发点。首次临床试验起始剂量应根据非临床研究所提示的安全有效性特征，采用所有已有的非临床数据（药代动力学、药效学和毒理学）进行科学论证，并且基于多种方法进行选择。

如果未见经典的量效关系，那么最低起效剂量（Minimal Effective Dose）和最高耐受剂量（Maximum Tolerable Dose）可能可以为剂量/暴露量与活性/毒性的关系提供有用的信息。

应根据具体基因治疗产品生物作用特点，选择合适的方式进行动物剂量与人体等效剂量的种属间换算。体表面积标准化、体重等比放大、靶器官体积比例放大等可能是合适的方式。不同类型的基因治疗产品，可能需要采用不同的策略来拟定首次临床试验起始剂量。基因治疗产品开发实例也许可以作为同类产品拟定首次临床试验起始剂量的参考（见附录）。

（二）支持临床试验的关键非临床研究

考虑到不同基因治疗产品的差异，以及临床试验也可能采用不同的给药剂量及方案，应当选择合适的非临床研究设计。非临床研究信息应能充分支持临床剂量、方案并确定潜在的毒性。应科学论证基因治疗产品非临床对临床试验的支持性，综合评估具体临床试验方案的风险-获益。一般情况下，基因治疗产品非临床研究项目和阶段性评价策略可参考 ICH M3，但应根据基因治疗产品的具体特点、适应症、用药人群，具体问题具体分析，综合评价非临床对临床试验方案的支持性。对于拟用于晚期肿瘤患者的基因治疗产品，非临床研究项目和阶段性评价策略可参考 ICH S9。

应尽早完成生物分布研究，以了解基因治疗产品在体内分布、存续和清除的特点，选择合适的动物种属，开展合适的药效学、毒理学研究，并设计合理的临床试验方案。在临床试验开始前，应在有效剂量、量效关系、耐受剂量、毒性反应特征、给药途径/方

案、作用机制、种属差异等方面完成科学论证。考虑到基因治疗产品的特殊性，在合适的情况下，其药理学、药代动力学、毒理学试验也可考虑联合开展。

四、附录

1) 系统暴露给药的腺相关病毒(Adeno-Associated Virus, AAV) 基因治疗产品、溶瘤病毒、治疗性 RNA 疫苗产品多数采用了人体表面积标准化的方法进行种属间剂量换算。

2) 眼科局部注射给药基因治疗产品可能可以根据试验动物与人体玻璃体腔、视网膜下腔的体积比进行总给药量等比换算。此类产品临床试验还应考虑：避免因手术、给药方式导致视网膜等的额外损伤；可以承载的用药载量；病毒滴度（浓度）过高引起的病毒聚集体；目标器官外非预期表达带来的毒性风险。

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对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.

基因修饰细胞治疗产品非临床研究技术指导原则（试行）

凯诺医药

2021 年 11 月

目 录

一、前言	3
二、适用范围	3
三、总体考虑	3
四、受试物	4
五、动物种属/模型选择	5
六、非临床有效性与概念验证	6
七、非临床药代动力学	7
八、非临床安全性	8
(一) 一般考虑	8
(二) 转基因表达产物的风险评估	8
(三) 插入突变风险评估	9
九、对特定类型基因修饰细胞产品的特殊考虑	10
(一) CAR 或 TCR 修饰的免疫细胞	10
(二) 诱导多能干细胞来源的细胞产品	12
(三) 采用基因编辑技术制备的细胞产品	12

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《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》（试行）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、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，基因修饰的干细胞及其来源的细胞产品等。

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、可接受的获益风险比，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。

细胞经基因修饰后会改变其生物学特性，同时也会带来新的安全性风险，如基因编辑脱靶风险、载体插入突变风险、载体重组风险、表达的转基因产物的风险等。在制定非临床研究计划时，除参考《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》（试行）中的对细胞治疗产品的一般要求外，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研究，充分表征产品的药理学、毒理学和药代动力学特征。在进行获益风险评估时，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

非临床研究所用受试物应可代表临床拟用样品的质量和安全性，关键性非临床研究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、体内非临床研究所使用的样品均应符合相应开发阶段的质量标准要求。若后续制备工艺发生变更，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

进行非临床体内研究时，应尽可能选择相关的动物种属/模型。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）动物对基因修饰细胞及转基因表达产物的生物学反应与预期的人体反应的相似性；（2）动物对异种来源的基因修饰细胞的免疫耐受性；（3）动物病理生理学特征与拟用患者人群的相似性；（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/或转基因的种属特异性，常规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 Chimeric Antigen Receptor T-Cell, CAR-T 细胞），采用疾病模型动物可能会提供有用的信息。

每种动物种属/模型均有其优点和不足，没有一种模型可全面预测基因修饰细胞在患者人群中的有效性和安全性。在选择动物种属时，应评估所采用的动物种属/模型与人体的相关性和局限性。若有多种相关动物模型，且这些模型可提供互补的证据，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（如二维或三维组织模型、类器官和微流体模型等）为有效性和安全性的评估提供有用的补充信息。

六、非临床有效性与概念验证

对于基因修饰细胞治疗产品，应参照《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》（试行）的要求进行药效学研究。

此外，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。

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）基因修饰对细胞生物学特性和生理功能的影响。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 and 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，建议采用替代方法评估基因修饰细胞的潜在长期效应，如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、非临床药代动力学

参考《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》（试行）中的对细胞治疗产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、迁移、归巢、定植、增殖、分化和存续性）。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/或全身的暴露特征及免疫原性。

八、非临床安全性

（一）一般考虑

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，在制定非临床安全性评价策略时，除参考《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》（试行）中对细胞治疗产品的一般要求外，还应基于每个产品的特点，具体问题具体分析。在制定非临床安全性评价策略时，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）诱导免疫应答/免疫耐受；（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。

基因修饰细胞治疗产品的非临床安全性研究一般应当在经过药物非临床研究质量管理规范（GLP）认证的机构开展，并遵守药物非临床研究质量管理规范。对于某些采用特殊动物模型、药理毒理整合性研究、特殊指标检测等非常规试验内容，可以考虑在非 GLP 条件下进行，但应保证数据的质量和完整性。

（二）转基因表达产物的风险评估

通常，转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，转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表达转基因产物，应在体内试验中评估转基因表达产物的毒性风险。在设计试验时，应根据转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。

一些转基因产物（如，生长因子、生长因子受体、免疫调节物等）若长期持续表达，可能会存在长期安全性风险，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转基因表达水平的定量检测以及免疫原性检测。

（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，如插入位点的偏好性；（2）载体的设计，如增强子、启动子等构建元件的活性，影响邻近基因的潜力；产生剪接突

变体的潜在剪接位点或多聚腺苷酸信号等；（3）细胞载体拷贝数；4）转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、致瘤/致癌性风险。非临床研究，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。

九、对特定类型基因修饰细胞产品的特殊考虑

鉴于基因修饰细胞的产品种类繁多、各有特点，除上述一般技术要求外，还应基于产品的特性进行相应的特殊考虑。本指导原则列举了以下三种情形的特殊考虑。

（一）CAR或TCR修饰的免疫细胞

对于嵌合抗原受体（Chimeric antigen receptor, CAR）或T细胞受体（T cell receptor, 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。

对于靶点相关毒性，应采用体外方法深入分析靶点在在

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点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，应采用多种体外方法评估其胞外抗原识别区的脱靶风险。

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，应进行充分的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）诱导多能干细胞来源的细胞产品

诱导多能干细胞（induced pluripotent stem cell, iPS）自身具有致瘤性风险，在体内可形成畸胎瘤，整合病毒载体的使用和诱导多能性可能增加iPS细胞插入致突变性和致癌性的风险。因此，应在首次临床试验前完成致瘤性试验。若设计科学合理，能够满足评价要求，也可在持续时间足够长的毒性研究中评估致瘤性风险。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以降低致瘤风险，应在体内试验中确认/验证此类自杀机制的功能

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/或体内非临床研究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）采用基因编辑技术制备的细胞产品

对于采用基因编辑技术制备的基因修饰细胞产品，应进

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。

在评估基因编辑的脱靶风险时，应说明所选择的评价策略的合理性和敏感性。虽然采用计算机分析预测基因编辑的潜在脱靶位点，并对潜在脱靶位点进行深度测序分析，可用于评估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。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.

凯诺医药

基因治疗产品非临床研究与评价技术指导原则

（试行）

凯诺医药

2021 年 11 月

目 录

一、前言	1
(一) 背景	1
(二) 目的	1
(三) 一般原则	2
(四) 范围	3
二、非临床研究	4
(一) 药理学	4
1. 动物模型	5
2. 概念验证研究	6
3. 安全药理学	7
(二) 药代动力学	8
1. 暴露量	8
2. 生物分布	8
3. 脱落	9
(三) 毒理学	9
1. 一般毒理学	10
2. 免疫原性和免疫毒性	13
3. 生殖毒性	14
4. 遗传毒性	15

5.致癌性	16
6.复制型病毒风险	16
7.局部耐受性	17
三、支持临床试验的非临床考虑	17
(一) 首次临床试验起始剂量	17
(二) 关键非临床研究	18

凯诺医药

基因治疗产品非临床研究与评价技术指导原则

一、前言

（一）背景

随着基因转导和修饰技术、递送载体系统、细胞培养技术等领域在基础研究和技术开发上的快速发展，基因治疗取得了突破性进展，为难治性疾病（尤其是罕见遗传性疾病）提供了全新的治疗理念和思路。自基因治疗技术出现以来，安全性始终是基因治疗研发最为关注的问题之一，关系到整个领域技术研发和产业应用的健康有序发展。基因治疗产品（Gene Therapy Products）应开展系统的非临床研究，评估安全性风险，验证有效性机制，以支持开展相应临床试验及上市。基因治疗产品种类多样，作用机制和起效方式均有别于小分子、大分子药物，非临床试验设计、实施以及研究设计中试验类型、时间安排和灵活性，可能与其它药物的非临床研究不同。

（二）目的

本指导原则为基因治疗产品研发提供建议，以帮助设计合适的非临床研究计划，并作为非临床评价的参考，以支持开展相应的临床试验。

基因治疗产品非临床研究为临床试验提供支持性信息，研究内容一般为药理学、药代动力学、毒理学，用于提供作用机制有效性证据、明确生物分布特点、确定药理作用特征、了解毒理学特征（确定靶器官、暴露量-反应关系和可逆性等）、确定首次人体试验的安全剂量水平、建议临床给药途径和剂量递增计划、支持患者入组标准、确定可指导临床监测的生理参数、提示临床试验风险等。

本指导原则旨在促进基因治疗产品的研发，并保护受试者免受不必要的不良反应，同时遵循“替代、减少、优化”的3R原则(Replacement, Reduction, Refinement, “3Rs”)，以避免不必要的动物及其它资源的使用。

适当情况下，基因治疗产品研发中应考虑其他非临床研究指导原则的建议。本指导原则主要描述了与其他指导原则的非临床试验建议不一致的特殊情况。

（三）一般原则

源于对基因治疗产品多样性、生物体复杂性和科学认知局限性的考虑，基因治疗产品研发应遵循创新药物研发的一般原则，分阶段逐步推进。

基因治疗产品非临床研究应为临床试验风险-获益分析提供充分的信息。由于基因治疗产品种类、作用机制、作用特点、给药途径、安全性风险等方面的差异，应基于风险分析设计并开展非临床研究，综合评估临床试验受试者潜在风险-获益。

由于基因治疗产品的生物学复杂性，基因治疗产品非临床研究和评价均应采取具体问题具体分析的原则，综合考虑产品导入基因（Transgene）特性、载体生物学特征、研究模型的可行性/可获得性、适应症/目标患者群体、给药途径、给药方案等多种因素。

基因治疗产品非临床安全性研究一般应当在经过药物非临床研究质量管理规范（GLP）认证的机构开展，并遵守药物非临床研究质量管理规范。对于某些采用特殊动物模型、药理毒理整合性研究、特殊指标检测等非常规试验内容，可以考虑在非 GLP 条件下进行，但应保证数据的质量和完整性。

（四）范围

基因治疗产品通过转导的遗传物质的转录或翻译而发挥作用，一般包括：核酸（例如质粒、RNA）、表达特定基因的基因修饰微生物（例如病毒、细菌、真菌）、离体基因修饰的人类细胞，以及体内编辑宿主基因组（通过或未通过特定的转录/翻译）的产品和未通过基因修饰表达特定基因的微生物（例如溶瘤病毒产品）。

本指导原则适用于除基因修饰细胞以外的基因治疗产品，不适用于化学合成的寡核苷酸及其类似物、预防性疫苗。基因修饰细胞治疗产品参见《基因修饰细胞治疗产品非临床研究与评价技术指导原则》。

二、非临床研究

基因治疗产品的非临床研究应在相关动物种属中开展。一般认为，基因治疗产品应能在相关动物种属中有效导入/暴露，有效转录/翻译，发挥药理学活性作用。复制型载体的基因治疗产品应可在相关动物种属中复制。相关动物种属选择应综合考虑生物学反应性和疾病特点，可以选择野生型、免疫缺陷型、人源化或其它基因修饰的动物。考虑基因治疗产品特殊性和临床适应症，某些情况下可能需要采用非常规的动物种属和品系开展非临床试验，如基因修饰啮齿类动物（例如转基因或基因敲除）、其它啮齿类动物（例如叙利亚仓鼠、棉鼠等）、以及非啮齿类动物（例如绵羊、猪、山羊、马等）。采用非常规的动物种属和品系需提供科学依据。

基因治疗产品非临床研究中所用受试物应明确其特性，应该能够充分代表临床试验拟用样品，还应考虑生产过程、重要质量特征（例如滴度）、临床拟用剂型等因素。如果基因治疗产品生物学作用具有种属特异性，应考察评估受试物在非临床研究中的活性，科学论证其对临床拟用样品的代表性。当产品药学信息（载体结构、表达元件、生产工艺等）发生重大变更时，需要评估开展桥接研究或新的非临床研究的必要性。

（一）药理学

基因治疗产品药理学研究是为了在体内、体外研究产品与治疗靶点相关的作用机制和效应，明确基因治疗产品的生物学作用特点，

应选择合适的体内或体外模型进行，并以此评价基因治疗产品在人体中潜在治疗作用和效果，有助于后续非临床和临床试验的剂量选择。在某些情况下，相关人用经验可能有助于加深对基因治疗产品生物学作用特征的认识。在开展临床试验之前，基因治疗产品应当完成作用机制、量效关系特点和药效活性的支持性研究。

1. 动物模型

动物疾病/损伤模型可能相对正常健康动物模型更加适于评价“风险-获益”关系，更有机会发现可以用于临床试验监测的活性/毒性生物标志物。

选择动物模型时应考虑以下因素：受试物在动物模型中复制能力和转导（转染、感染）特性；动物模型中与受试物相关的细胞/受体表达和组织分布；受试物中生物调节活性的组分对动物模型转基因的表达水平和组织表达特异性的影响；受试物导入基因产物引起的生物学效应；动物预存免疫学状态对受试物的影响；动物模型内在的与导入基因同源的基因及其产物对药效的影响；转基因动物用于特定受试物药效评价的适用性；动物模型实际可行的安全剂量和体积；受试物在动物模型中的生物分布特征等。在选择动物疾病/损伤模型时需要考虑其局限性，包括模型内在的固有变异、历史/基线数据不足、生理功能和解剖结构的技术性限制、模拟人体疾病/损伤病理过程的可靠性等。

如果没有合适的动物模型满足试验需要，应当依据科学原理开发相应的动物模型或使用更完善的体外试验系统、替代性模型（例如类器官）开展试验。需要科学论证新的动物模型、体外试验系统或替代模型试验对临床试验设计的支持性。

如果单个动物试验模型不足以论证相关问题，则应采用多种动物模型开展相应研究，进行综合分析评价。

2. 概念验证研究

基因治疗产品生物学作用与实验系统、实验动物种属高度相关，在基因治疗产品药理学研究中应关注概念验证（Proof of Concept, POC）研究的重要性。POC 研究为临床试验提供可行性和有效性的非临床证据，并提供可能的生物学作用机制、潜在的安全性问题等信息。

POC 研究的目标包括：1. 确定基因治疗产品的有效剂量范围，包括最低起效剂量，推荐开展量效关系的探索性研究；2. 优化给药途径，以确保治疗产品能到达靶组织、器官或特定细胞类型；3. 优化给药方案，包括相对疾病进展的最优给药时间；4. 验证基因治疗产品的生物学功能及作用机制。

POC 研究包括体外研究和体内研究。体外研究主要用于评价基因治疗产品的生物学功能（如治疗基因的作用、表达产物的活性、特定细胞功能的恢复等）和对作用机制的初步验证。单独的体外研究通常不足以预测基因治疗产品在人体内的药理及毒理学特征，因

此需要选择合适的动物疾病模型进行体内研究，通过对动物表型、导入基因的体内表达及其功能活性相关的生物标志物等进行检测以说明基因治疗产品的有效性和/或安全性。

由于种属和免疫状态的差异，基因治疗产品在人体内的表达、分布和作用与在模型动物中可能有较大不同，可选用替代产品（如治疗基因使用来自模型动物的同源基因，或使用基因修饰的模型动物细胞、组织和类器官等）进行 POC 研究。应详细说明采用替代产品的试验设计，并科学评估替代产品体内研究数据对临床试验的支持性。

3.安全药理学

基因治疗产品（包括载体和导入基因，以及导入基因的表达产物）安全药理学主要是研究受试物在治疗剂量范围内或治疗范围以上剂量时，对生理功能潜在的非期望作用，一般包括对中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统的影响，通常应在临床试验前完成。采用基于风险的评价策略开展基因治疗产品的安全药理学试验，考虑因素一般包括：导入基因作用机制、载体类型、生物分布、给药途径和临床给药方案等。安全药理学试验通常采用单次给药方式，其研究终点也可以纳入到一般毒理学试验中。

（二）药代动力学

1. 暴露量

基因治疗产品应根据产品具体特点考虑非临床研究中的实际暴露情况，对非临床（药理学、药代动力学、毒理学）研究结果进行分析评价。

2. 生物分布

基因治疗产品生物分布是受试物在相关动物种属中给药部位、靶组织和非靶组织包括体液（例如血液、脑脊液、玻璃体液）在内的体内分布、存续和清除。生物分布特征是基因治疗产品非临床研究的关键部分，有助于解释药理学、毒理学的研究发现，也为临床试验设计提供支持信息。基因治疗产品生物分布研究应在临床试验开始前完成。

基因治疗产品生物分布研究应采用足够的剂量，以临床拟用的给药途径，在相关动物种属或动物模型中开展，不仅包括导入基因的检测，还可能包括导入基因表达产物、载体的检测。采样时间点的安排应能体现基因治疗产品体内过程的特点，至少包括在靶组织和非靶组织的峰值和稳态阶段。具有体内复制特征的基因治疗产品，采样点至少包括第一、第二两个峰值和清除阶段。生物分布研究的检测方法应经过方法学验证。

基因治疗产品在分析非临床生物分布研究结果与临床相关性时，应关注给药途径、剂量水平、给药方案和实验动物的免疫反应等因素。

3.脱落

脱落是指基因治疗产品通过排泄物（尿液、粪便）、分泌物（唾液、鼻咽液等）或皮肤（脓疱、疮、伤口）排出体外。根据基因治疗产品的特点（例如复制型基因治疗产品）评估开展脱落分析的必要性。除相关的核酸检测外，脱落分析还应根据具体产品的特点考虑排出体外成分的感染能力。根据基因治疗产品脱落的特点和感染风险，在临床试验中采取相应的风险控制措施。

（三）毒理学

在毒理学研究中，应对基因治疗产品进行全面的安全性分析评价，必要时还应评价导入基因的表达产物的安全性。

由于基因治疗产品的生物学复杂性，毒理学试验设计应综合考虑产品本身的特点（如导入基因结构和作用机理、表达产物的表达水平与活性、载体性质和生物学特征、相关动物种属和疾病模型的可获得性）和临床应用（如适应症、给药途径和给药方案等）。原则上应选择可以代表临床使用的给药途径和方法，采用具备合适的剂量范围，还应注意组别、检测指标和时间节点的合理性。必要时，可考虑增加额外的组别（例如静脉给药，以评价潜在的严重毒性反应）、额外的检测时间点、特殊的毒性生物标志物检测等。

当采用临床拟用样品的毒理学试验难以提供有价值的信息时，也可考虑采用替代产品开展毒理学试验，但需提供科学依据，并注意替代产品和临床拟用样品之间，在生产工艺、杂质/污染物水平、药代动力学以及确切的药理学机制方面都可能存在差异。使用替代物产品的试验可以用于风险识别，以及了解放大的药理作用的潜在不良影响，但是一般不用于定量风险评估。

1.一般毒理学

一般毒理学试验用以评价基因治疗产品毒性特征、毒性可逆性、剂量-毒性反应关系、生物分布-毒性反应关系等，包括单次给药和重复给药毒性试验。一般毒理学试验设计时应关注动物种属的选择、与基因治疗产品特性相关的检测指标、毒性反应的持续时间和可逆性。

(1) 动物种属选择

毒理学研究中所选动物种属应与基因治疗产品具有良好的生物学相关性，采用相关动物种属开展试验。通常情况下，毒理学试验采用正常健康动物，某些情况下亦可参考药理学试验中使用的疾病动物模型以预测临床试验风险/获益比。如果选择单一性别或特定年龄阶段的动物开展试验，需要提供科学合理依据。至少采用一种相关动物种属开展一般毒理学试验。必要时，考虑开展更多动物种属的一般毒理学试验。

(2) 剂量设计

通常情况下，一般毒理学试验中的给药剂量应该包括在最合适的非临床药效模型中确定的药效剂量范围或拟推荐的临床剂量范围。最高剂量一般期望获得明显毒性反应的相关信息，通常为药效学最高剂量的一定倍数或拟推荐临床最高剂量的一定倍数。最高剂量的设置可能会受到动物模型、递送靶组织的容量/大小、给药途径、产品的生产能力和高浓度制剂稳定性等限制。如果受载体浓度或给药体积的限制，可选择最大可行剂量作为最高剂量。最大可行剂量一般考虑可配制的产品浓度和可输送至靶组织/器官的体积及其载量。

(3) 分组

一般毒理学试验原则上应设低、中、高3个剂量组，以及合适的对照组，例如溶媒、辅料、空载体、含有非功能转基因的载体等对照组。当使用疾病动物模型作为试验系统时，应考虑设计模型对照组、假手术组等。

(4) 给药方案

在一般毒理学试验中，基因治疗产品的给药方案应最大程度地模拟临床拟用给药方案，给药途径、给药频率和给药期限应能适当反映临床使用情况。

对于临床研究拟单次给药的基因治疗产品，可开展扩展的单次给药或重复给药毒性试验。基因治疗产品应考虑延长合适时间进行给药后毒性指标的检测。针对具有长期表达特性的基因治疗产品，

毒性观测指标检测时间应延长至暴露量稳态之后，且足以评价毒性反应持续时间和可逆性。如果基因治疗产品拟在人体中长期发挥作用，但实际在动物中作用时间明显短于人体，或者复制型产品在动物体内的复制动力学特征无法反映其在人体中的情况，此时应考虑进行重复给药毒性试验以模拟人体情况。

对于临床研究拟多次给药的基因治疗产品，应进行重复给药毒性试验，给药次数和给药频率一般不应低于临床给药次数和频率。多次给药间隔时间应根据基因治疗产品的作用特点（如载体发挥作用持续性、导入基因表达的相关信息等。这些信息可以来自概念验证试验和/或已有的相关文献资料。）进行设计，以保证能够充分暴露毒性风险。

（5）试验期限

基因治疗产品一般毒理学试验的持续时间通常会长于其它生物制品的标准毒性试验持续时间。在设计一般毒理学试验时，需阐述试验期限的合理性，并根据基因治疗产品的作用特点（如载体发挥作用持续性、导入基因表达的相关信息等），确定恢复期观察时长。一般毒理学试验应包括多个解剖时间点（至少应包括导入基因峰值时间点、稳态时间点等），以便评价基因治疗产品发挥作用的持续性，以及剂量/暴露量与毒性反应、生物分布与毒性反应的关系。

（6）检测指标

除常规观察指标外，一般毒理学试验需结合基因治疗产品特性，考虑增加合适的观察指标，如生物活性细胞因子分泌、异常/异位增生性病变、免疫原性/免疫毒性等。应考察基因治疗产品中载体和导入基因在体内的转录/翻译、分布、存续情况，为毒性试验的结果解释提供支持性数据（必要时设置卫星组）。必要时还应考虑基因治疗产品中脱落的可能性及生殖毒性风险。

2. 免疫原性和免疫毒性

基因治疗产品可能导致的免疫反应包括先天性免疫反应和适应性免疫反应。多种因素可显著影响基因治疗产品的先天性和适应性免疫反应，如宿主因素（前期接触过相关病毒血清型和/或导入基因产物、免疫系统状态）、基因递送方式（递送系统种类、给药途径和靶组织）、载体（载体种类、血清型、剂量和导入基因的调控元件类型等）、导入基因的产物、异位表达基因产物（特别是针对免疫豁免器官和/或部位特异表达的基因产物）。

基因治疗产品的免疫原性可能来源于产品中的非人源化组分、导入基因的表达产物、载体、基因编辑产生的非预期的肽/蛋白质等。病毒载体类基因治疗产品相对更容易产生免疫原性。此外，还应考虑实验动物预存免疫对试验的影响。

根据基因治疗产品的质量研究，如果预计会产生异常基因产物，或基因治疗产品表达的蛋白质与天然产物相比结构发生了改

变，则应进一步评估表达产物的免疫原性。如果基因治疗产品可导致补体激活，则应考察血清中补体激活标志物。

已知对免疫系统有影响的基因治疗产品，如编码生长因子、细胞因子等的产品，通常需要开展免疫毒性研究，应包括体液和/或细胞免疫终点评价。

对于某些特定的基因治疗产品，动物模型可能无法代表临床实际情况，因此可能无法提供可解释的免疫毒性数据。在这些特定情况下，建议采用动物模型的同源基因序列开展试验，以提供相关支持性信息。

3. 生殖毒性

基因治疗产品应根据受试物的产品类型、作用机制、一般毒理发现、生物分布特征以及患者人群来评估潜在的生殖/发育毒性风险。生殖毒性试验的研究策略和风险评估可参考 ICH S5 (R3) 的建议和 ICH M3 (R2)、S6 及 S9 中的相关内容。

通常需要开展胚胎-胎仔发育毒性和围产期毒性研究，除非有基于具体产品类型的特殊考虑并具有科学合理性。如果基因治疗产品拟用于有生育可能或妊娠人群，应研究产品对胎儿的影响（例如细胞因子局部生成后通过胎盘转运），开展胚胎-胎仔发育和围产期毒性试验。如果在一般毒理学试验中发现有潜在的生殖器官毒性反应，应开展生育力和早期胚胎发育毒性试验。

当基因治疗产品在生殖器官持续存在时，需要进一步研究确定其在生殖细胞（例如卵母细胞、精子）的暴露水平。根据载体类型、复制能力、基因组整合特性、剂量水平、给药途径等因素，分析评估基因治疗产品生殖系整合风险。

4.遗传毒性

基因治疗产品将遗传物质转移到宿主细胞内或整合到宿主基因组中或对宿主基因组进行编辑，存在潜在的遗传毒性风险。目前对于判断细胞基因组插入/修饰是否会产生遗传毒性、是否最终会发生癌变依然还缺乏系统的认知，因此，需要分析基因组改变（载体或遗传物质整合进基因组、对基因组编辑等）的特征，并评估相关潜在风险。

通常不需要进行标准的遗传毒性组合试验，但应根据基因治疗产品的特点、产品的具体适应症、载体的已有信息、导入基因序列结构等，评估基因治疗产品整合进基因组的可能性，判断是否需要开展另外的遗传毒性研究，如研究基因组修饰的发生情况，并检测随后可能发生的异常细胞行为；评估插入突变（插入位点、插入拷贝数等）引起的遗传毒性风险。当基因治疗产品采用基因编辑或转座子技术时，需要关注脱靶编辑、转座子转座印迹引起的遗传毒性问题；鉴定/表征基因组整合位点。

遗传毒性需要考虑最终产品的形式、给药途径（全身或局部）以及靶向的具体组织/器官/细胞的生物学状态等。如果目标细胞是未分化细胞，插入突变产生遗传毒性的风险相对较高。

基因修饰噬菌体、细菌和真菌相关的产品可以不进行遗传毒性研究，一般认为这些产品通常不会直接与宿主细胞基因组发生相互作用。

5. 致癌性

标准的啮齿类动物致癌性试验一般不适用于评价基因治疗产品。可采用证据权重（Weight of Evident, WoE）方法来评估致癌性风险，必要时进行致癌性研究。WoE关注因素一般包括但不限于：药物靶点和药理作用通路已知与致癌性相关（例如导入基因产物是生长因子）；靶点和信号通路的药理作用特征预测与肿瘤发生发展有一定相关性；插入突变研究的相关结果提示有致癌性风险；载体设计中有潜在致癌风险；生产体系中存在引入致癌成分；一般毒理学试验组织病理学发现，包括弥漫性和/或局灶性细胞增生、持续的组织损伤和/或慢性炎症、癌前病变和肿瘤发生；激素紊乱；免疫抑制；其他技术方法研究发现与动物和/或人体内肿瘤发生相关。

6. 复制型病毒风险

采用复制缺陷病毒载体的基因治疗产品，需要评估在生产的过程中是否有可能产生复制型病毒。如果基因治疗产品可能含有翻译

病毒结构或非结构蛋白的元件，应充分评估该产品在体内产生活性完整病毒颗粒的风险。应根据基因治疗产品具体特点，评估分析因基因突变和内源性病毒片段重组产生复制型病毒的可能性。

检测复制型病毒的技术方法应通过方法学验证。如果基因治疗产品有可能产生复制型病毒，应采用动物/细胞模型对复制型病毒风险进行评估。

在评估复制型病毒风险时，应考虑到该病毒在不同物种之间的流行性以及传播性。针对动物/细胞试验的结果是否能够反映在人类传播的流行病学原理需要进行慎重评估。

7.局部耐受性

根据产品类型、给药途径和临床试验方案，某些基因治疗产品（例如眼内给药、肌肉注射、瘤内给药等）应开展局部耐受性试验，适当时可以结合在一般毒理学试验中进行。

三、支持临床试验的非临床考虑

（一）首次临床试验起始剂量

确保受试者安全是考虑和确定基因治疗产品首次临床试验起始剂量的出发点。首次临床试验起始剂量应根据非临床研究所提示的安全有效性特征，采用所有已有的非临床数据（药代动力学、药理学和毒理学）进行科学论证，并且基于多种方法进行选择。

如果未见经典的量效关系，那么最低起效剂量（Minimal Effective Dose）和最高耐受剂量（Maximum Tolerable Dose）可能可以为剂量/暴露量与活性/毒性的关系提供有用的信息。

应根据具体基因治疗产品生物学作用特点，选择合适的方式进行动物剂量与人体等效剂量的种属间换算。体表面积标准化、体重等比放大、靶器官体积或重量比例放大等可能是合适的方式。此外，还考虑基因治疗产品在不同种属靶器官的生物分布差异。不同类型的基因治疗产品，可能需要采用不同的策略来拟定首次临床试验起始剂量。

（二）关键非临床研究

非临床研究信息应能充分支持临床试验剂量、方案并确定潜在的毒性。应科学论证基因治疗产品非临床研究对临床试验的支持性，综合评价具体临床试验方案的风险-获益。一般情况下，基因治疗产品非临床研究项目和阶段性评价策略可参考 ICH M3

（R2），但应根据基因治疗产品的具体特点、适应症、用药人群，具体问题具体分析，综合评价非临床研究对临床试验方案的支持性。对于拟用于晚期肿瘤患者的基因治疗产品，非临床研究项目和阶段性评价策略可参考 ICH S9。

基因治疗产品应尽早完成生物分布研究，以了解基因治疗产品在体内分布、存续和清除的特点，选择合适的动物种属，开展合适的药理学、毒理学研究，并设计合理的临床试验方案。在临床试验

开始前，应在作用机制、有效剂量范围、量效关系、耐受剂量、毒性反应特征、种属差异、给药途径/方案等方面完成科学论证。考虑到基因治疗产品的特殊性，在合适的情况下，其药理学、药代动力学、毒理学试验也可考虑联合开展。

凯诺医药

细胞治疗产品申请临床试验药学研究和申报资料的考虑要点

近年来，肿瘤免疫治疗技术突飞猛进，以嵌合抗原受体修饰 T 细胞（CAR-T）为代表的基因修饰细胞产品陆续进入临床。细胞治疗类产品获得的突破性进展和国外 CAR-T 细胞治疗产品的批准上市，为晚期肿瘤患者的治疗带来新希望。CAR-T 细胞产品属于“活”的细胞药物，且不能耐受病毒灭活/终端灭菌处理，产品本身具有高度的“个性化”和“异质性”，生产工艺与质量控制具有较强的“复杂性”和“特殊性”。此前，按照“医疗技术”开展的非注册临床试验取得了一些研究资料，但是按照药品研发与申报，已受理申报资料的完整性、规范性、溯源性及质量体系和风险控制要求存在较多缺陷，影响审评进度。

为鼓励 CAR-T 类产品创新，满足临床用药亟需，做好申请临床试验阶段药学研究和申报资料的整理准备，提请申请人在遵循技术指导原则要求开展相关研究的基础上，特别关注以下方面药学研究和申报资料的考虑要点。

1、生产原料（供者细胞、试剂/培养基）

自体细胞筛查应参照医疗管理的相关规定，进行 HIV-1/2、HBV、HCV、梅毒等感染项筛查。供者细胞的采集需使用单采机进行。

质粒生产过程中建议避免使用 β -内酰胺类抗生素。如需使用，应对抗生素的残留量进行控制和安全性评估；包装细

胞培养过程中如使用胰酶，建议采用重组来源胰酶；应说明 CAR-T 细胞生产过程中细胞培养基来源，是否含有人源/动物源性成分并进行风险评估。如培养基中含有血清成分，应符合总局关于《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》（试行）相关规定及解读文件的要求。

2、生产工艺（质粒、病毒，CAR-T 细胞）

质粒应提供调控元件和重构序列的研究资料。重组工程菌应按照《中国药典》相关要求完成二级或三级菌种库的建立和检定，质粒应进行全基因测序并完成菌株传代稳定性研究。

病毒包装细胞（如：293T 细胞）应提供细胞来源、传代历史等资料，并按照《中国药典》相关要求完成二级或三级细胞库的建立和检定。细胞建库过程应符合 GMP 规范（可参照疫苗生产用细胞基质相关要求）。

CAR-T 细胞生产工艺方面，在申报临床阶段应提供初步的工艺可行性开发资料和关键步骤的可控性资料，拟定生产工艺应有相应的研究数据支持。CAR-T 细胞产品生产过程，应对不同患者的细胞操作进行严格的时间/空间隔离，防止混淆和交叉污染等问题的发生。CAR-T 细胞产品生产过程应严格符合 GMP 规范。

质粒、病毒载体、CAR-T 细胞的生产 and 环境要求应符合 GMP 规范。

3、质量研究（质粒、病毒，CAR-T 细胞）

质量研究应重点关注安全性相关项目并进行风险评估。

质粒的质量标准，建议包括：pH 值、外观、含量、260/280 纯度、质粒 DNA 同质性、酶切鉴定、基因测序、无菌、内毒素、宿主 RNA 残留、宿主基因组残留、宿主蛋白残留等。

病毒载体质量标准，建议包括：外观、pH 值、渗透压摩尔浓度、CAR 基因鉴定、病毒滴度（物理化学测定及生物学功能测定）、DNA 残留、残留宿主 DNA 转移（如 SV40、E1A 等）、蛋白质残留、BSA 残留、核酸酶残留、RCR/RCL、无菌、内毒素、支原体、外源性病毒检测等。

CAR-T 产品的质量标准，建议包括：pH 值、外观、渗透压、活细胞密度、细胞活率、CD3+T 细胞比例、CD3+CAR+ 细胞（比例、计数）、无关细胞比例（如 CD19+B 细胞）、细胞分型、生物学活性、载体拷贝数、RCR/RCL、无菌、内毒素、支原体、磁珠残留（如适用）等。

参比品方面，质粒和病毒建议建立参比品；CAR-T 细胞的参比品应能满足指示细胞生物活性的要求和提示检测系统中的偏移，同时应提供必要的方法学研究及验证资料。

基于 RCR/RCL 的高风险性和检测方法的复杂性，关于检测的方法学、灵敏度、样品的代表性（病毒生产的终末细胞、收获的上清液、CAR-T 细胞产品）等相关研究，可参照国内外已颁布的通用技术指导原则。

4、稳定性研究

质粒、病毒载体在保存过程中，应对其稳定性进行考察，

同时应尽量避免病毒载体反复冻融。

CAR-T 细胞应模拟实际贮存、运输与临床应用条件开展稳定性研究。

5、其他

对于以 CAR-T 为代表的基因修饰细胞产品，药学研究与评价的考虑要点应与其研发阶段相适应，关注不同类型细胞自身的风险性、体外培养操作过程中引入的风险，以及细胞生物学及遗传学改变的潜在风险，申报临床阶段重点关注临床用药（回输细胞及附带成分）的整体安全性问题，并结合临床医疗探索实践中反馈的风险提醒及其他专业意见进行综合判断。上述 CAR-T 产品的临床前药学研究申报资料的考虑要点，主要基于专家研讨会的基本共识。随着对此类产品科学认知的深入，以及审评和监管经验的丰富，申请临床阶段药学要求将做进一步调整和完善。

**嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）治疗产品
申报上市临床风险管理计划
技术指导原则**

2021 年 11 月

目 录

一、概述.....	3
二、主要内容.....	4
三、安全性说明	5
(一) 一般考虑.....	5
(二) CAR-T 细胞治疗产品可能存在的安全性风险	6
四、药物警戒活动	7
(一) 常规药物警戒活动	7
(二) 特殊药物警戒活动	8
五、风险最小化措施.....	8
(一) 常规风险最小化措施	8
(二) 额外风险最小化措施	8
六、参考文献.....	10

嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）治疗产品申报上市 临床风险管理计划技术指导原则

一、概述

嵌合抗原受体（Chimeric antigen receptor, CAR）-T 细胞（CAR-T）是指通过基因修饰技术，将病毒等载体导入自体或异体 T 细胞，从而表达由抗原识别结构域、铰链区、跨膜区、共刺激信号激活区等组成的嵌合抗原受体（CAR）而形成的一种可以识别某种特定抗原的 T 细胞。CAR-T 输注到患者体内后，可与肿瘤细胞表面特异性抗原相结合而激活，通过释放穿孔素、颗粒酶等直接杀伤肿瘤细胞达到治疗肿瘤的目的。CAR-T 对多种血液淋巴系统肿瘤显示了较好的临床效果，对实体瘤治疗也表现出了较大的治疗潜力。目前已有多个产品经美国、欧盟、中国批准上市，适应症涉及复发/难治的急性 B 淋巴细胞白血病和 B 细胞淋巴瘤及多发性骨髓瘤等。由于 CAR-T 细胞治疗产品的特点和作用机制，在开展临床试验过程中也暴露出了细胞因子释放综合征（Cytokine release syndrome, CRS）、免疫效应细胞相关神经毒性综合征（Immune Effector Cell-associated Neurotoxicity Syndrome, ICANS）等不良反应，还有淋巴细胞清除术预处理等治疗相关的其它操作引起的血细胞减少、感染等，如不及时采取妥当的救治措施可能导致严重后果。除自体来源的 CAR-T 细胞外，移植供体来源 CAR-T 细胞以及通用型 CAR-T 细胞也已进入临床试验阶段。由于它们的新颖性、复杂性和技术特异性，可能会给患者带来远期的、潜在的安全性风险。

为促进及早发现此类风险并提供有效的风险控制措施，本指导原则在借鉴 ICH E2E 药物警戒计划、《药物警戒质量管理规范》和国内外风险管理计划相关指导原则的基础上，列举了 CAR-T 细胞治疗产品可能存在的安全性风险，以及常规和本类产品特有的额外药物警戒活动和风险最小化措施。CAR-T 细胞治疗产品的风险识别应尽早开始，并在整个研发过程中持续进行，以在可能的情况下预防风险的发生或将风险最小化。随着对风险认知的变化，应及时更新风险管理计划。本指导原则包括 CAR-T 细胞治疗产品申报上市临床风险管理计划的结构和内容，重点就撰写 CAR-T 细胞治疗产品风险管理计划时的特殊考虑进行描述，CAR-T 细胞治疗产品申报上市临床风险管理计划还应参考 ICH E2E、《药物警戒质量管理规范》以及我国药品监管机构发布的有关技术指导原则。随着技术的发展和相关研究数据的积累，本指导原则也将适时进行更新。

二、主要内容

CAR-T 细胞治疗产品申报上市风险管理计划的主要内容应包括安全性说明、药物警戒活动、上市后有效性研究计划、风险最小化措施。

安全性说明是一个关于药物重要的已确认风险，重要的潜在风险，和重要的缺失信息的摘要。主要包括适应症流行病学、重要的已确认风险、重要的潜在风险、重要的缺失信息等。

药物警戒活动的目的是控制风险，包括常规药物警戒活动、特殊药物警戒活动等。与其他药品相同，CAR-T 细胞治疗产品上市后必须执行常规药物警戒活动，如不良反应的收集、分析和报

告。因 CAR-T 细胞治疗产品重要的已确认/潜在风险中可能有不
确定因素影响对风险的认知,或需要对重要缺失信息作进一步研
究,因此应当考虑特殊的药物警戒活动,如长期安全性随访。

上市后有效性研究计划包括附条件批准要求的强制性有效
性研究、监管机构要求的强制性有效性研究、申办方承诺/计划开
展的其他有效性研究等。

风险最小化措施的目的是预防或降低风险的发生,包括常规
风险最小化措施、额外风险最小化措施等。药品说明书是最重要
的常规风险最小化措施的工具。对于 CAR-T 细胞治疗产品来说,
还应采取额外的风险最小化措施如上市许可持有人对医疗机构
的评估和认证、开展医务人员和患者的教育培训、发放患者提示
卡等。

三、安全性说明

(一) 一般考虑

安全性说明包括药物重要的已确认风险,重要的潜在风险和
重要的缺失信息。CAR-T 细胞治疗产品安全性风险较高,应在产
品整个研发过程中持续进行风险识别,以预防和降低风险。根据
CAR-T 细胞治疗产品特点、作用靶点和作用机制,其安全性风险
可能包括: CRS、ICANS、治疗后感染尤其是相应的迟发性感染、
肿瘤溶解综合征、针对正常组织细胞的在靶脱瘤效应 (on-
target/off-tumor)、遗传物质整合到宿主基因组中和/或基因编辑等
原因有可能导致的染色体异常及基因突变、诱导自身免疫或免疫
原性反应、出现移植物抗宿主病或原有移植物抗宿主病加重、由
于 CAR-T 细胞用药错误/用药不当而造成伤害等。此外,接受

CAR-T 细胞治疗产品前使用化疗药物、单克隆抗体等进行淋巴细胞清除治疗（清淋预处理）引起不良反应也应给予特别关注。

（二）CAR-T细胞治疗产品可能存在的安全性风险

根据产品从生产、运输、处理、给药、随访等流程的时间顺序，将关于 CAR-T 细胞治疗产品可能存在的安全性风险列举如下。以下所列举的风险并非全部，应结合产品特性、作用靶点、作用机制、非临床研究和临床试验中暴露的安全性信息等来制定 CAR-T 细胞治疗产品的风险管理计划。

1.与产品的质量特征、储存和分配相关的对患者造成的风险

1.1 疾病传播的风险：应考虑 T 细胞的来源（自体或异体），可能存在与传染病有关的风险（如病毒）。

1.2 致瘤性的风险：应考虑产品特征，所使用整合性载体（如逆转录病毒或转座子等）将外源基因插入到基因组中可能会插入到原癌基因附近激活该基因、或所使用基因编辑技术可能会对基因组产生非目的的靶向，导致患者肿瘤风险增加。

1.3 与产品的制备、储存、运输和分配有关的风险（如保存、冷冻和解冻过程）、冷链或其他类型受控温度条件被突破的风险、与产品稳定性有关的风险，这可能会影响 CAR-T 细胞的生物学活性进而导致治疗失败，各种可能会影响 CAR-T 细胞的生物学活性进而导致不能如期治疗的风险。

2.与产品作用相关的风险

2.1 T 细胞激活引起的 CRS、ICANS、其它神经毒性等。

2.2 CAR-T 细胞攻击表达靶抗原的正常组织细胞，从而引起的正常组织损伤或免疫缺陷等。

2.3 长期安全性风险，如持续低丙种球蛋白血症或无丙种球蛋白血症导致的感染风险、恶性肿瘤和自身免疫性疾病。

2.4 因免疫原性反应引起的过敏反应、产生中和抗体等。

3.与患者基础疾病（或潜在疾病）或与合并使用其他药物的相互作用相关的风险

3.1 与患者自身情况如肿瘤负荷、合并移植抗宿主病等相关的风险。

3.2 对患者或供者细胞进行预期和非预期基因修饰有关的风险，如细胞凋亡、功能改变、恶性肿瘤。

3.3 与预处理相关的风险，如淋巴细胞清除术用化疗药物或处理并发症时使用免疫抑制剂等。

3.4 诊断或治疗之前、目前伴随或未来可能出现的各种疾病对 CAR-T 细胞治疗产品的潜在影响。

4.与给药程序和给药方式有关的对患者造成的风险

4.1 与操作或产品注射相关的风险。

4.2 与产品剂量错误和/或用药错误等有关的风险。

5.与患者不良事件处理相关的风险

出现不良事件时，急救措施或药物的可及性及其风险。

6.其他尚未排除的风险，如与患者生殖和遗传相关的风险等。

四、药物警戒活动

（一）常规药物警戒活动

CAR-T 细胞治疗产品的常规药物警戒活动应包括不良事件的收集、处理、随访、分析评估；不良反应和定期安全性更新报告的提交；附条件批准产品按要求开展的临床试验中对可疑且非

预期严重不良反应 (SUSAR) 和研发期间安全性更新报告 (DSUR) 的提交; 对产品安全性特征的持续监测。必要时与监管机构及时沟通。

(二) 特殊药物警戒活动

为识别、定性或定量描述 CAR-T 细胞治疗产品的安全风险, 补充缺失信息, 应采取特殊药物警戒活动。包括但不限于: 持续开展针对接受产品治疗患者的长期安全性随访, 并通过研究收集和评估 CAR-T 细胞治疗产品在获批适应症人群中的安全性和疗效。

建立产品从生产、运输、使用到后续随访的全链条管理体系, 在出现不良反应时可对应到特定产品, 实现可追溯。

五、风险最小化措施

风险最小化措施包括常规风险最小化措施和额外风险最小化措施, 上市许可持有人应该对风险最小化措施是否有效进行评估。

(一) 常规风险最小化措施

CAR-T 细胞治疗产品的常规风险最小化措施包括: 通过说明书和标签等载体中相关项目如【不良反应】、【注意事项】、【用法用量】等部分传递药品存在的风险, 并提供管理该风险的常规风险最小化措施的临床建议。在风险信息发生变化时, 应及时更新说明书和标签。

(二) 额外风险最小化措施

为进一步降低 CAR-T 细胞治疗产品的安全风险, 保护患者,

应采取额外风险最小化措施。主要包括上市许可持有人对医疗机构的评估和认证、开展医务人员和患者的教育培训并保证培训效果、发放患者提示卡等。在出现教育材料中某环节相关的大量不良反应或出现新的安全性信息时，需考虑对教育材料进行评估和适时更新。

1.上市许可持有人对医疗机构的评估和认证

为了最大限度地降低与 CAR-T 细胞用药相关的安全风险，上市许可持有人应对医疗机构进行评估和认证。应至少包括单采（如需）、输注前处理（如复融、稀释等）、输注、不良反应处理（如急救人员、设备、药品等）等过程的硬件、软件、人员资质等方面。

2.开展医务人员和患者的教育培训和发放患者提示卡

上市许可持有人应开展医务人员和患者的教育培训，医务人员的教育培训材料应至少包括以下方面：

- CAR-T 产品简介
- 适应症
- 细胞采集（如需）
- 淋巴细胞清除术
- 产品储存和使用过程说明（如产品的储存条件、产品配制、给药、剩余产品和包装的处理的标准操作程序）
- 产品已知的不良反应（如 CRS、ICANS 等）
- 给药后对不良反应的监测包括出院后与患者的定期联系和评估
- 对不良反应的管理及相关急救药品的配备要求（如输注

后出现 CRS，根据分级给予相应的治疗）

- 长期安全性随访方案
- 可追溯性（如将批号信息记录在患者的病历和患者的提示卡中，在报告不良反应时提供产品标识信息）
- 不良反应的报告程序
- 告知患者产品相关风险信息和提醒患者如出现相关症状或体征及时携带患者提示卡就医

患者的教育培训材料应采用通俗易懂的语言，内容包括产品相关信息，如产品简介、给药过程、产品安全风险、风险监测计划、报告不良反应的重要性和程序等。

患者提示卡包括致医务人员信息和患者提示信息，致医务人员信息中告知患者已接受 CAR-T 产品治疗，可能出现的不良反应，患者提示信息中告知风险的严重性和及时就医的必要性，如出现某些症状时即刻就医。

药品注册申请人应切实提高主体意识，在 CAR-T 细胞治疗产品研发过程中和产品上市后持续识别风险、控制风险，以最大限度地保障患者的用药安全。

六、参考文献

- [1] ICH. E2E Pharmacovigilance Planning. 2004
- [2] NMPA. 《药物警戒质量管理规范》. 2021
- [3] EMA. Guideline on safety and efficacy follow-up and risk management of Advanced Therapy Medicinal Products. 2018
- [4] NMPA. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（试行）. 2017

[5] CDE. 免疫细胞治疗产品临床试验技术指导原则（试行）.2021

[6] 中国研究型医院协会. CAR-T 细胞治疗 NHL 毒副作用临床管理路径指导原则. 2021

凯诺医药

脐带血造血干细胞治疗技术规范（试行）

为规范脐带血造血干细胞治疗技术的临床应用，保证医疗质量和医疗安全，制定本规范。本规范为技术审核机构对医疗机构申请临床应用脐带血造血干细胞治疗技术进行技术审核的依据，是医疗机构及其医师开展脐带血造血干细胞治疗技术的最低要求。

本治疗技术规范适用于脐带血造血干细胞移植技术。

一、医疗机构基本要求

（一）开展脐带血造血干细胞治疗技术的医疗机构应当与其功能、任务相适应，有合法脐带血造血干细胞来源。

（二）三级综合医院、血液病医院或儿童医院，具有卫生行政部门核准登记的血液内科或儿科专业诊疗科目。

1.三级综合医院血液内科开展成人脐带血造血干细胞治疗技术的，还应当具备以下条件：

（1）近 3 年内独立开展脐带血造血干细胞和（或）同种异基因造血干细胞移植 15 例以上。

（2）有 4 张床位以上的百级层流病房，配备病人呼叫系统、心电监护仪、电动吸引器、供氧设施。

(3) 开展儿童脐带血造血干细胞治疗技术的, 还应至少有 1 名具有副主任医师以上专业技术职务任职资格的儿科医师。

2. 三级综合医院儿科开展儿童脐带血造血干细胞治疗技术的, 还应当具备以下条件:

(1) 近 3 年内独立开展脐带血造血干细胞和 (或) 同种异基因造血干细胞移植 10 例以上。

(2) 有 2 张床位以上的百级层流病房, 配备病人呼叫系统、心电监护仪、电动吸引器、供氧设施。

3. 血液病专科医院开展脐带血造血干细胞治疗技术的, 还应当具备以下条件:

(1) 近 3 年内独立开展脐带血造血干细胞和 (或) 同种异基因造血干细胞移植 15 例以上。

(2) 有 4 张床位以上的百级层流病房, 配备病人呼叫系统、心电监护仪、电动吸引器、供氧设施。

4. 儿童专科医院开展脐带血造血干细胞治疗技术的, 还应当具备以下条件:

(1) 近 3 年内独立开展脐带血造血干细胞和 (或) 同种异基因造血干细胞移植 15 例以上。

(2) 有 4 张床位以上的百级层流病房, 配备病人呼叫系统、心电监护仪、电动吸引器、供氧设施。

(三) 其他相关科室。

1. 开展脐带血造血干细胞治疗技术的, 应有质量控制和质量评价措施的实验室或者有固定协作关系的实验室, 能够进行脐带血造血干细胞活性检测、有核细胞计数、CD34⁺细胞计数和 HLA 组织配型, 具备免疫抑制剂的血药浓度监测能力。造血干细胞治疗技术所需的相关检验项目参加卫生部指定的室间质量评价机构的室间质量评价并合格。

有微生物检测及相关诊断检验、血液学和病理学常规检测、细胞遗传学分析条件和能力, 或者与具备上述条件和能力的实验室有固定协作关系。

2. 有病理科或者有固定协作关系的病理科。

3. 需要全身放射治疗 (TBI) 做预处理时, 有放射治疗科或者有固定协作关系的放射治疗科, 能够实施分次或者单次全身放射治疗, 能够实施放射剂量测量。

4. 同时开展同种异基因造血干细胞治疗技术的, 要符合《非血缘造血干细胞移植技术管理规范》中相关要求。

二、人员要求

(一) 基本要求。

1. 小于 10 张百级层流病房床位开展脐带血造血干细胞治疗技术的科室, 应配备 3 名以上符合造血干细胞治疗技术人员要求的执业医师, 并按照护士与床位比 2:1 配备护士。

2. 大于 10 张百级层流病房床位开展脐带血造血干细胞治疗技术的科室，应配备 5 名以上符合造血干细胞治疗技术人员要求的执业医师，并按照护士与床位比 1.7:1 配备护士。

3. 从事脐带血造血干细胞治疗技术的护士须经过造血干细胞移植技术培训。

（二）脐带血造血干细胞治疗医师。

1. 取得《医师执业证书》，执业范围为内科或儿科。

2. 经卫生部或卫生部委托的机构组织的脐带血造血干细胞治疗技术系统培训并考核合格。

脐带血造血干细胞治疗工作的负责人还应当具有副主任医师以上专业技术职务任职资格，有 10 年以上血液内科或儿科工作经验、参与造血干细胞移植工作 5 年以上，有造血干细胞移植合并症的诊断和处理能力。

（三）护士。

1. 取得《护士执业证书》。

2. 经卫生部或卫生部委托的机构组织的造血干细胞移植护理工作培训并考核合格。

脐带血造血干细胞治疗护理工作负责人还应当有 3 年以上造血干细胞移植患者护理经验。

（四）其他相关卫生专业技术人员。

经过脐带血造血干细胞治疗技术专业系统培训并考核合格。

三、技术管理基本要求

(一) 严格遵守相关技术操作规范和诊疗指南，根据患者病情、可选择的治疗方案等因素综合判断、因病施治、合理治疗，科学、严格掌握脐带血造血干细胞治疗技术适应症。

脐带血造血干细胞治疗技术适应症包括：

1. 遗传性及先天性疾病：骨髓衰竭、血红蛋白病、重症免疫缺陷病、代谢性疾病。

2. 获得性疾病：

(1) 恶性疾病：急性白血病、慢性白血病、骨髓增生异常综合征、多发性骨髓瘤、恶性淋巴瘤及其他某些恶性肿瘤。

(2) 非恶性疾病：重症再生障碍性贫血、重症放射病。

脐带血造血干细胞治疗技术禁忌证包括：

①有严重的精神病。

②有严重的心、肝、肾、肺功能不全。

③有不能控制的严重感染。

④合并其他有致命危险的疾病。

⑤一般受者年龄不超过 65 岁。

(二) 实施脐带血造血干细胞治疗前应当向患者和其家属告知治疗目的、风险、注意事项及可能发生的并发症等，并签署知情同意书。

(三) 建立脐带血造血干细胞治疗术后随访制度，连续 3 年平均 1 年存活率不低于 50%。

（四）在完成每例次脐带血造血干细胞治疗后按照相关规定将移植相关信息上报卫生行政部门。

（五）医疗机构和医师按照相关规定接受省级卫生行政部门组织的脐带血造血干细胞治疗技术相关情况考核。包括脐带血造血干细胞治疗技术能力审核，如移植植入率、严重并发症、死亡病例、医疗事故发生情况、患者生存质量和随访情况等。

四、其他管理要求

（一）脐带血造血干细胞来源合法，建立脐带血造血干细胞来源登记制度，保证脐带血造血干细胞来源可追溯。不得通过脐带血造血干细胞治疗技术谋取不正当利益，不得泄露脐带血造血干细胞捐献者资料。

（二）供治疗的脐带血造血干细胞由卫生部批准设置的脐带血造血干细胞库提供。

（三）严格执行国家物价政策，按照规定收费。

关于开展干细胞临床研究和应用自查自纠工作的通知

中华人民共和国卫生部 www.moh.gov.cn

卫办科教函（2011）1177 号

各省、自治区、直辖市卫生厅局、食品药品监督管理局（药品监督管理局），新疆生产建设兵团卫生局、食品药品监督管理局，部直属各有关单位：

为促进干细胞治疗技术科学、有序地发展，规范干细胞临床研究和应用行为，整顿干细胞治疗工作，经研究，卫生部与国家食品药品监督管理局决定开展为期一年的干细胞临床研究和应用规范整顿工作。该工作将分为自查自纠、重新认证和规范管理等阶段。现将自查自纠阶段有关工作通知如下：

一、全国各级各类从事干细胞临床研究和应用的医疗机构及相关研制单位，应当按照《药物临床试验质量管理规范》和《医疗技术临床应用管理办法》要求，开展干细胞临床研究和应用项目（暂不包括未经体外处的骨髓移植）自查自纠工作，认真总结已经和正在开展的干细胞临床研究和应用活动，如实报告调查内容。

二、为加强此项工作的组织领导，卫生部和国家食品药品监督管理局已经成立了干细胞临床研究和应用规范整顿工作领导小组，各省（区、市）应当成立由省级卫生行政和食品药品监督管理部门主要负责同志组成的工作组，研究制定本地区自查自纠工作方案。

各省级卫生行政部门应当对正在开展的干细胞临床研究和应用项目进行认真清理。停止未经卫生部和国家食品药品监督管理局批准的干细胞临床研究和应用活动。在自查自纠工作中，对不如实上报干细胞临床研究和应用工作情况，继续开展未经卫生部和国家食品药品监督管理局批准的干细胞临床研究和应用项目的单位将给予重点整顿。对于已经国家食品药品监督管理局批准的干细胞制品临床试验项目，应当严格按照临床试验批件以及《药品临床试验质量管理规范》的要求进行，不得随意变更临床试验方案，更不得自行转变为医疗机构收费项目。

三、2012年7月1日前，暂不受理任何申报项目。有关部门将依据现行法律法规，抓紧研究并提出制度性文件草案和相关技术标准、规范，并结合自查自纠工作实际，探索建立适合我国的干细胞临床研究和应用监管模式和长效机制。卫生部和国家食品药品监督管理局联合成立的干细胞临床研究和应用规范整顿工作领导小组办公室负责规范整顿各

项工作的组织实施和在此期间（2012 年 7 月 1 日至规范整顿工作结束）的干细胞临床研究项目的申报受理相关工作，拟按药品申报的项目请注明。

四、各地区、各单位应当本着实事求是、认真负责的态度，认真开展自查自纠工作，如实填写《干细胞临床研究和应用自查情况调查表》（附件），并报告干细胞临床研究和应用中存在的问题，查找原因，提出改进意见。

医疗机构及相关研制单位将本单位干细胞临床研究和应用自查自纠情况报告于 2012 年 1 月 31 日前报送省级干细胞临床研究和应用规范整顿工作组。省级干细胞临床研究和应用规范整顿工作组汇总本地区医疗机构和相关研制单位自查自纠工作情况，形成总结报告，并请于 2012 年 3 月 1 日前报送卫生部、国家食品药品监督管理局干细胞临床研究和应用规范整顿工作领导小组办公室。

军队和武警部队所属医疗机构的相关工作，由总后勤部卫生部和武警部队后勤部根据本通知要求参照执行。

联系人：卫生部科教司技术处 王锦倩

电话：010-68792955

传真：010-68792234

电子邮箱: kejiaosi@163.com

地址: 北京市西城区西直门外南路 1 号

邮政编码: 100044

附件: 干细胞临床研究和应用自查情况调查
表

二〇一—
年十二月十六日

关于印发干细胞临床研究管理办法（试行）的通知

国卫科教发〔2015〕48号

发布时间：2015-07-20

各省、自治区、直辖市卫生计生委、食品药品监管局，新疆生产建设兵团卫生局、食品药品监管局，国家卫生计生委直属有关单位，食品药品监管总局直属有关单位：

为规范并促进我国干细胞临床研究，国家卫生计生委与食品药品监管总局共同组织制定了《干细胞临床研究管理办法（试行）》（可从国家卫生计生委、食品药品监管总局网站下载）。现印发给你们，请遵照执行。

国家卫生计生委 食品药品监管总局
2015年7月20日

干细胞临床研究管理办法（试行）

第一章 总则

第一条 为规范和促进干细胞临床研究，依照《中华人民共和国药品管理法》、《医疗机构管理条例》等法律法规，制定本办法。

第二条 本办法适用于在医疗机构开展的干细胞临床研究。

干细胞临床研究指应用人自体或异体来源的干细胞经体外操作后输入（或植入）人体，用于疾病预防或治疗的临床研究。体外操作包括干细胞在体外的分离、纯化、培养、扩增、诱导分化、冻存及复苏等。

第三条 干细胞临床研究必须遵循科学、规范、公开、符合伦理、充分保护受试者权益的原则。

第四条 开展干细胞临床研究的医疗机构（以下简称机构）是干细胞制剂和临床研究质量管理责任主体。机构应当对干细胞临床研究项目进行立项审查、登记备案和过程监管，并对干细胞制剂制备和临床研究全过程进行质量管理和风险管控。

第五条 国家卫生计生委与国家食品药品监管总局负责干细胞临床研究政策制定和宏观管理，组织制定和发布干细胞临床研究相关规定、技术指南和规范，协调督导、检查机构干细胞制剂和临床研究管理体制机制建设和风险管控措施，促进干细胞临床研究健康、有序发展；共同组建干细胞临床研究专家委员会和伦理专家委员会，为干细胞临床研究规范管理提供技术支撑和伦理指导。

省级卫生计生行政部门与省级食品药品监管部门负责行政区域内干细胞临床研究的日常监督管理，对机构干细胞制剂和临床研究质量以及风险管控情况

进行检查,发现问题和存在风险时及时督促机构采取有效处理措施;根据工作需要共同组建干细胞临床研究专家委员会和伦理专家委员会。

第六条 机构不得向受试者收取干细胞临床研究相关费用,不得发布或变相发布干细胞临床研究广告。

关于印发干细胞临床研究管理办法(试行)的通知

国卫科教发(2015)48号

发布时间:2015-07-20

第二章 机构的条件与职责

第七条 干细胞临床研究机构应当具备以下条件:

- (一) 三级甲等医院,具有与所开展干细胞临床研究相应的诊疗科目。
- (二) 依法获得相关专业的药物临床试验机构资格。
- (三) 具有较强的医疗、教学和科研综合能力,承担干细胞研究领域重大研究项目,且具有来源合法,相对稳定、充分的项目研究经费支持。
- (四) 具备完整的干细胞质量控制条件、全面的干细胞临床研究质量管理体系和独立的干细胞临床研究质量保证部门;建立干细胞制剂质量受权人制度;具有完整的干细胞制剂制备和临床研究全过程质量管理及风险控制程序和相关文件(含质量管理手册、临床研究工作程序、标准操作规范和试验记录等);具有干细胞临床研究审计体系,包括具备资质的内审人员和内审、外审制度。
- (五) 干细胞临床研究项目负责人和制剂质量受权人应当由机构主要负责人正式授权,具有正高级专业技术职称,具有良好的科研信誉。主要研究人员经过药物临床试验质量管理规范(GCP)培训,并获得相应资质。机构应当配置充足的具备资质的人力资源进行相应的干细胞临床研究,制定并实施干细胞临床研究研究人员培训计划,并对培训效果进行监测。
- (六) 具有与所开展干细胞临床研究相适应的、由高水平专家组成的学术委员会和伦理委员会。
- (七) 具有防范干细胞临床研究风险的管理机制和处理不良反应、不良事件的措施。

第八条 机构学术委员会应当由与开展干细胞临床研究相适应的、具有较高学术水平的机构内外知名专家组成,专业领域应当涵盖临床相关学科、干细胞基础和临床研究、干细胞制备技术、干细胞质量控制、生物医学统计、流行病学等。

机构伦理委员会应当由了解干细胞研究的医学、伦理学、法学、管理学、社会学等专业人员及至少一位非专业的社会人士组成,人员不少于7位,负责对干细胞临床研究项目进行独立伦理审查,确保干细胞临床研究符合伦理规范。

第九条 机构应当建立干细胞临床研究项目立项前学术、伦理审查制度，接受国家和省级干细胞临床研究专家委员会和伦理专家委员会的监督，促进学术、伦理审查的公开、公平、公正。

第十条 机构主要负责人应当对机构干细胞临床研究工作全面负责，建立健全机构对干细胞制剂和临床研究质量管理体系机制；保障干细胞临床研究的人力、物力条件，完善机构内各项规章制度，及时处理临床研究过程中的突发事件。

第十一条 干细胞临床研究项目负责人应当全面负责该项研究工作的运行管理；制定研究方案，并严格执行审查立项后的研究方案，分析撰写研究报告；掌握并执行标准操作规程；详细进行研究记录；及时处理研究中出现的问题，确保各环节符合要求。

第十二条 干细胞制剂质量受权人应当具备医学相关专业背景，具有至少三年从事干细胞制剂（或相关产品）制备和质量管理的实践经验，从事过相关产品过程控制和质量检验工作。质量受权人负责审核干细胞制备批记录，确保每批临床研究用干细胞制剂的生产、检验等均符合相关要求。

第十三条 机构应当建立健全受试者权益保障机制，有效管控风险。研究方案中应当包含有关风险预判和管控措施，机构学术、伦理委员会对研究风险程度进行评估。对风险较高的项目，应当采取有效措施进行重点监管，并通过购买第三方保险，对于发生与研究相关的损害或死亡的受试者承担治疗费用及相应的经济补偿。

第十四条 机构应当根据信息公开原则，按照医学研究登记备案信息系统要求，公开干细胞临床研究机构和项目有关信息，并负责审核登记内容的真实性。

第十五条 开展干细胞临床研究项目前，机构应当将备案材料（见附件1）由省级卫生计生行政部门会同食品药品监管部门审核后向国家卫生计生委与国家食品药品监管总局备案。

干细胞临床研究项目应当在已备案的机构实施。

关于印发干细胞临床研究管理办法（试行）的通知

国卫科教发〔2015〕48号

发布时间：2015-07-20

第三章 研究的立项与备案

第十六条 干细胞临床研究必须具备充分的科学依据，且预防或治疗疾病的效果优于现有的手段；或用于尚无有效干预措施的疾病，用于威胁生命和严重影响生存质量的疾病，以及重大医疗卫生需求。

第十七条 干细胞临床研究应当符合《药物临床试验质量管理规范》的要求。干细胞制剂符合《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》的要求。

干细胞制剂的制备应当符合《药品生产质量管理规范》(GMP)的基本原则和相关要求,配备具有适当资质的人员、适用的设施设备和完整的质量管理文件,原辅材料、制备过程和质量控制应符合相关要求,最大限度地降低制备过程中的污染、交叉污染,确保持续稳定地制备符合预定用途和质量要求的干细胞制剂。

第十八条 按照机构内干细胞临床研究立项审查程序和相关工作制度,项目负责人须提交有关干细胞临床研究项目备案材料(见附件2),以及干细胞临床研究项目伦理审查申请表(见附件3)。

第十九条 机构学术委员会应当对申报的干细胞临床研究项目备案材料进行科学性审查。审查重点包括:

- (一)开展干细胞临床研究的必要性;
- (二)研究方案的科学性;
- (三)研究方案的可行性;
- (四)主要研究人员资质和干细胞临床研究培训情况;
- (五)研究过程中可能存在的风险和防控措施;
- (六)干细胞制剂制备过程的质控措施。

第二十条 机构伦理委员会应当按照涉及人的生物医学研究伦理审查办法相关要求,对干细胞临床研究项目进行独立伦理审查。

第二十一条 审查时,机构学术委员会和伦理委员会成员应当签署保密协议及无利益冲突声明,须有三分之二以上法定出席成员同意方为有效。根据评审结果,机构学术委员会出具学术审查意见,机构伦理委员会出具伦理审查批件(见附件4)。

第二十二条 机构学术委员会和伦理委员会审查通过的干细胞临床研究项目,由机构主要负责人审核立项。

第二十三条 干细胞临床研究项目立项后须在我国医学研究登记备案信息系统如实登记相关信息。

第二十四条 机构将以下材料由省级卫生计生行政部门会同食品药品监管部门审核后向国家卫生计生委与国家食品药品监管总局备案:

- 机构申请备案材料诚信承诺书;
- (二)项目立项备案材料(见附件2);
- (三)机构学术委员会审查意见;
- (四)机构伦理委员会审查批件;
- (五)所需要的其他材料。

关于印发干细胞临床研究管理办法(试行)的通知

国卫科教发〔2015〕48号

发布时间：2015-07-20

第四章 临床研究过程

第二十五条 机构应当监督研究人员严格按照已经审查、备案的研究方案开展研究。

第二十六条 干细胞临床研究人员必须用通俗、清晰、准确的语言告知供者和受试者所参与的干细胞临床研究的目的、意义和内容，预期受益和潜在的风险，并在自愿原则下签署知情同意书，以确保干细胞临床研究符合伦理原则和法律规定。

第二十七条 在临床研究过程中，所有关于干细胞提供者和受试者的入选和检查，以及临床研究各个环节须由操作者及时记录。所有资料的原始记录须做到准确、清晰并有电子备份，保存至临床研究结束后30年。

第二十八条 干细胞的来源和获取过程应当符合伦理。对于制备过程中不合格及临床试验剩余的干细胞制剂或捐赠物如供者的胚胎、生殖细胞、骨髓、血液等，必须进行合法、妥善并符合伦理的处理。

第二十九条 对干细胞制剂应当从其获得、体外操作、回输或植入受试者体内，到剩余制剂处置等环节进行追踪记录。干细胞制剂的追踪资料从最后处理之日起必须保存至少30年。

第三十条 干细胞临床研究结束后，应当对受试者进行长期随访监测，评价干细胞临床研究的长期安全性和有效性。对随访中发现的问题，应当报告机构学术、伦理委员会，及时组织进行评估鉴定，给予受试者相应的医学处理，并将评估鉴定及处理情况及时报告省级卫生计生行政部门和食品药品监管部门。

第三十一条 在项目执行过程中任何人如发现受试者发生严重不良反应或不良事件、权益受到损害或其他违背伦理的情况，应当及时向机构学术、伦理委员会报告。机构应当根据学术、伦理委员会意见制订项目整改措施并认真解决存在的问题。

第三十二条 在干细胞临床研究过程中，研究人员应当按年度在我国医学研究登记备案信息系统记录研究项目进展信息。

机构自行提前终止临床研究项目，应当向备案部门说明原因和采取的善后措施。

关于印发干细胞临床研究管理办法（试行）的通知

国卫科教发〔2015〕48号

发布时间：2015-07-20

第五章 研究报告制度

第三十三条 机构应当及时将临床研究中出现的严重不良反应、差错或事故及处理措施、整改情况等报告国家和省级卫生计生行政部门和食品药品监管部门。

第三十四条 严重不良事件报告：

(一) 如果受试者在干细胞临床研究过程中出现了严重不良事件，如传染性疾病、造成人体功能或器官永久性损伤、威胁生命、死亡，或必须接受医疗抢救的情况，研究人员应当立刻停止临床研究，于 24 小时之内报告机构学术、伦理委员会，并由机构报告国家和省级卫生计生行政部门和食品药品监管部门。

(二) 发生严重不良事件后，研究人员应当及时、妥善对受试者进行相应处理，在处理结束后 15 日内将后续工作报告机构学术、伦理委员会，由机构报告国家和省级卫生计生行政部门和食品药品监管部门，以说明事件发生的原因和采取的措施。

(三) 在调查事故原因时，应当重点从以下几方面进行考察：干细胞制剂的制备和质量控制，干细胞提供者的筛查记录、测试结果，以及任何违背操作规范的事件等。

第三十五条 差错报告：

(一) 如果在操作过程中出现了违背操作规程的事件，事件可能与疾病传播或潜在性的传播有关，或可能导致干细胞制剂的污染时，研究人员必须在事件发生后立即报告机构学术、伦理委员会，并由机构报告国家和省级卫生计生行政部门和食品药品监管部门。

(二) 报告内容必须包括：对本事件的描述，与本事件相关的信息和干细胞制剂的制备流程，已经采取和将要采取的针对本事件的处理措施。

第三十六条 研究进度报告：

(一) 凡经备案的干细胞临床研究项目，应当按年度向机构学术、伦理委员会提交进展报告，经机构审核后报国家和省级卫生计生行政部门和食品药品监管部门。

(二) 报告内容应当包括阶段工作总结、已经完成的病例数、正在进行的病例数和不良反应或不良事件发生情况等。

第三十七条 研究结果报告：

(一) 各阶段干细胞临床研究结束后，研究人员须将研究结果进行统计分析、归纳总结、书写研究报告，经机构学术、伦理委员会审查，机构主要负责人审核后报告国家和省级卫生计生行政部门和食品药品监管部门。

(二) 研究结果报告应当包括以下内容：

1. 研究题目；
2. 研究人员名单；
3. 研究报告摘要；
4. 研究方法与步骤；

5. 研究成果;
6. 病例统计报告;
7. 失败病例的讨论;
8. 研究结论;
9. 下一步工作计划。

关于印发干细胞临床研究管理办法（试行）的通知

国卫科教发〔2015〕48号

发布时间：2015-07-20

第六章 专家委员会职责

第三十八条 国家干细胞临床研究专家委员会职责：按照我国卫生事业发展要求，对国内外干细胞研究及成果转化情况进行调查研究，提出干细胞临床研究的重点领域及监管的政策建议；根据我国医疗机构干细胞临床研究基础，制订相关技术指南、标准、以及干细胞临床研究质量控制规范等；在摸底调研基础上有针对性地机构评估、现场核查，对已备案的干细胞临床研究机构和项目进行检查。

国家干细胞临床研究伦理专家委员会职责：主要针对干细胞临床研究中伦理问题进行研究，提出政策法规和制度建设的意见；根据监管工作需要，对已备案的干细胞临床研究项目进行审评和检查，对机构伦理委员会审查工作进行检查，提出改进意见；接受省级伦理专家委员会和机构伦理委员会的咨询并进行工作指导；组织伦理培训等。

第三十九条 省级干细胞临床研究专家委员会职责：按照省级卫生计生行政部门和食品药品监管部门对干细胞临床研究日常监管需要，及时了解本地区干细胞临床研究发展状况和存在问题，提出政策建议，提供技术支持；根据监管工作需要，对机构已备案的干细胞临床研究项目进行审查和检查。

省级干细胞临床研究伦理专家委员会职责：主要针对行政区域内干细胞临床研究中的伦理问题进行研究；推动行政区域内干细胞临床研究伦理审查规范化；并根据监管工作需要，对行政区域内机构伦理委员会工作进行检查，提出改进意见；接受行政区域内机构伦理委员会的咨询并提供工作指导；对从事干细胞临床研究伦理审查工作的人员进行培训。

第四十条 国家和省级干细胞临床研究专家委员会和伦理专家委员会应当对机构学术、伦理审查情况进行监督检查。

学术方面的检查主要包括以下内容：

（一）机构的执业许可、概况、相应专业科室的药物临床试验机构资格及卫生技术人员和相关技术能力与设施情况。

（二）机构学术委员会组成、标准操作规范。

（三）承担国家级干细胞相关研究情况。

（四）对以下内容的审查情况：

1. 干细胞临床研究负责人、主要临床研究人员的的情况，参加干细胞临床试验技术和相关法规培训的情况等；
 2. 研究方案的科学性、可行性；
 3. 防范干细胞临床研究风险的管理机制和处理不良反应事件的措施；
 4. 干细胞临床研究管理制度和标准操作规程的制定；
 5. 按照《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》的要求对干细胞制剂的质量管理、评价标准和相应的设备设施管理情况。
- （五）学术审查程序是否合理。
 - （六）有无利益冲突。
 - （七）其他有关事宜。

伦理方面的检查主要包括以下内容：

- （一）机构伦理委员会组成、标准操作规范；
- （二）研究项目伦理审查过程和记录，包括风险/受益评估及对策等；
- （三）对知情同意书的讨论和批准的样本；
- （四）伦理审查程序的合理性；
- （五）有无利益冲突；
- （六）其他有关事宜。

第四十一条 省级干细胞临床研究专家委员会和伦理专家委员会应当对行政区域内机构开展的干细胞临床研究项目建立从立项审查、备案到过程管理、报告审议等全过程督导、检查制度。

第四十二条 省级干细胞临床研究专家委员会和伦理专家委员会应当对机构提交的严重不良事件报告、差错或事故报告和处理措施等及时分析，提供咨询意见，对机构整改情况进行审评；重大问题的整改情况可提请国家干细胞临床研究专家委员会和伦理专家委员会进行审评。

第四十三条 国家和省级干细胞临床研究专家委员会和伦理专家委员会应当对已备案的干细胞临床研究项目进行定期评估、专项评估等，并对国家和省级卫生计生行政部门和食品药品监管部门所开展的专项检查、随机抽查、有因检查等提供技术支撑。

关于印发干细胞临床研究管理办法（试行）的通知

国卫科教发〔2015〕48号

发布时间：2015-07-20

第七章 监督管理

第四十四条 省级卫生计生行政部门和食品药品监管部门应当对医疗机构所开展的干细胞临床研究项目进行定期监督检查、随机抽查、有因检查等，对监督检查中发现的问题及时提出处理意见。

第四十五条 省级卫生计生行政部门会同食品药品监管部门应当于每年 3 月 31 日前向国家卫生计生委和国家食品药品监管总局报送年度干细胞临床研究监督管理工作报告。

第四十六条 国家或省级干细胞临床研究专家委员会对已备案的机构和项目进行现场核查和评估，并将评估结果公示。

第四十七条 国家卫生计生委和国家食品药品监管总局根据需要，对已备案的干细胞临床研究机构 and 项目进行抽查、专项检查或有因检查，必要时对机构的干细胞制剂进行抽样检定。

第四十八条 机构对检查中发现的问题须进行认真整改，并形成整改报告于检查后 3 个月内报送检查部门。

第四十九条 机构中干细胞临床研究有以下情形之一的，省级卫生计生行政部门和食品药品监管部门将责令其暂停干细胞临床研究项目、限期整改，并依法给予相应处理。

- (一) 机构干细胞临床研究质量管理体系不符合要求；
- (二) 项目负责人和质量受权人不能有效履行其职责；
- (三) 未履行网络登记备案或纸质材料备案；
- (四) 不及时报告发生的严重不良反应或不良事件、差错或事故等；
- (五) 擅自更改临床研究方案；
- (六) 不及时报送研究进展及结果；
- (七) 对随访中发现的问题未及时组织评估、鉴定，并给予相应的医学处理；
- (八) 其他违反相关规定的行为。

第五十条 机构管理工作中发生下列行为之一的，国家卫生计生委和国家食品药品监管总局将责令其停止干细胞临床研究工作，给予通报批评，进行科研不端行为记录，情节严重者按照有关法律法规要求，依法处理。

- (一) 整改不合格；
- (二) 违反科研诚信和伦理原则；
- (三) 损害供者或受试者权益；
- (四) 向受试者收取研究相关费用；
- (五) 非法进行干细胞治疗的广告宣传等商业运作；
- (六) 其他严重违法违反相关规定的行为。

第五十一条 按照本办法完成的干细胞临床研究，不得直接进入临床应用。

第五十二条 未经干细胞临床研究备案擅自开展干细胞临床研究，以及违反规定直接进入临床应用的机构和人员，按《中华人民共和国药品管理法》和《医疗机构管理条例》等法律法规处理。

第八章 附则

第五十三条 本办法不适用于已有规定的、未经体外处理的造血干细胞移植，以及按药品申报的干细胞临床试验。依据本办法开展干细胞临床研究后，如申请药品注册临床试验，可将已获得的临床研究结果作为技术性申报资料提交并用于药品评价。

第五十四条 本办法由国家卫生计生委和国家食品药品监管总局负责解释。

第五十五条 本办法自发布之日起施行。同时，干细胞治疗相关技术不再按照第三类医疗技术管理。

附件 1

造血干细胞移植技术规范 (2017 年版)

为规范造血干细胞移植技术的临床应用，保证医疗质量和医疗安全，制定本规范。本规范是医疗机构及其医务人员开展造血干细胞移植技术的最低要求。

本规范适用于应用同种异基因造血干细胞移植技术治疗血液系统疾病，其造血干细胞来源包括血缘（HLA 全相合或者单倍型相合）和非血缘供者的骨髓、外周血或脐带血。

一、医疗机构基本要求

（一）医疗机构开展造血干细胞移植技术应当与其功能、任务和技术能力相适应，有合法的造血干细胞来源。

（二）有卫生计生行政部门核准登记的血液内科或儿科及相关专业诊疗科目。

（三）开展造血干细胞移植治疗技术的科室应当具备以下条件：

1. 有百级层流病房床位 4 张以上，配备患者呼叫系统、心电监护仪、外周血干细胞采集机、流式细胞仪、电动吸引器或中心负压吸引系统、供氧设施。

2. 成人血液内科开展儿童造血干细胞移植技术的，还应当至少有 1 名具有副主任医师以上专业技术职务任职资格的本医疗机构儿科医师。

3. 医疗机构应当在完成 5 例同胞全相合异基因造血干细胞移植术后，方可开展非血缘、脐带血或者配型不合造血干细胞移植。

（四）其他相关科室。

1. 开展造血干细胞移植技术的，应当具有质量控制和质量评价措施的实验室或有固定协作关系的实验室，能够进行造血干细胞活性检测、有核细胞计数、CD34⁺细胞计数和 HLA 组织配型，具备免疫抑制剂的血药浓度监测能力。造血干细胞移植技术所需的相关检验项目参加省级及以上卫生计生委指定的室间质量评价机构的室间质量评价并合格。

2. 有微生物检测及相关诊断检验、血液学和病理学常规检测、细胞遗传学分析条件和能力，或与具备上述条件和能力的实验室有固定协作关系。

3. 全身放射治疗（TBI）做预处理时，有放射治疗科或有固定协作关系的放射治疗科，能够实施分次或者单次全身放射治疗，能够实施放射剂量测量。

二、人员基本要求

（一）开展造血干细胞移植技术的医师。

1. 取得《医师执业证书》，执业范围为内科或儿科专业的本医疗机构在职医师。

2. 有 10 年以上血液内科或儿科领域临床诊疗工作经验、参与造血干细胞移植工作 5 年以上，有造血干细胞移植合并

症的诊断和处理能力。造血干细胞移植治疗工作的负责人还应当具有副主任医师以上专业技术职务任职资格。负责异基因造血干细胞移植工作的医师应当具有高级专业技术职务任职资格。

3. 经过省级卫生计生行政部门指定的培训基地关于造血干细胞移植技术相关系统培训，具备开展造血干细胞移植技术临床应用的能力。

4. 小于 10 张百级层流病房床位的科室，应当配备 3 名以上经过造血干细胞移植技术培训合格的执业医师，并按照护士与床位比 2:1 配备护士；大于等于 10 张百级层流病房床位的科室，应配备 5 名以上经过造血干细胞移植技术培训合格的执业医师，并按照护士与床位比 1.7:1 配备护士。

（二）其他相关卫生专业技术人员。

经过造血干细胞移植治疗技术专业系统培训，满足开展造血干细胞移植治疗技术临床应用所需的相关条件。

三、技术管理基本要求

（一）严格遵守造血干细胞移植技术操作规范和诊疗指南，严格掌握造血干细胞移植技术适应证和禁忌证。

1. 造血干细胞移植技术适用于治疗以下血液系统疾病：

（1）恶性疾病：急性白血病、慢性白血病、骨髓增生异常综合征、多发性骨髓瘤、淋巴瘤及其他某些恶性肿瘤等。

（2）非恶性疾病：再生障碍性贫血、重症放射病、重

型地中海贫血等。

2. 应用造血干细胞移植技术治疗部分遗传病、先天性疾病及代谢性疾病参照本规定。

(二) 实施造血干细胞移植术前应当向患者及其家属告知治疗目的、风险、注意事项及可能发生的并发症等，并签署知情同意书。

(三) 医疗机构应当建立完整的临床数据库及严格的术后随访制度，在完成每例次造血干细胞移植术后应当按照有关规定将移植相关信息上报卫生计生行政部门。

(四) 技术要求。

1. 拟行骨髓或外周血造血干细胞移植，采集供者单个核细胞数应当达到以下标准：骨髓单个核细胞数 $\geq 3 \times 10^8/\text{Kg}$ ， $\text{CD}34^+$ 细胞数 $\geq 2 \times 10^6/\text{Kg}$ ；外周血单个核细胞数 $\geq 5 \times 10^8/\text{Kg}$ ， $\text{CD}34^+$ 细胞数 $\geq 2 \times 10^6/\text{Kg}$ 。

2. 拟行脐带血造血干细胞移植可采用单份或多份脐带血，单份脐带血单个核细胞数 $> 2 \times 10^7/\text{Kg}$ ， $\text{CD}34^+$ 细胞数 $> 1 \times 10^5/\text{Kg}$ 。

3. 造血干细胞移植术后 100 天植入率 $\geq 80\%$ 。

4. III-IV度急性移植物抗宿主病发生率 $< 30\%$ 。

5. 连续 3 年移植后 1 年存活率 $\geq 50\%$ 。

6. 第一次缓解期的白血病患者移植后 1 年生存率 $> 60\%$ 。

(五) 其他管理要求。

1. 使用经国家食品药品监督管理局批准的造血干细胞移植技术相关器材，不得违规重复使用与造血干细胞移植技术相关的一次性医用器材。

2. 造血干细胞来源合法，供移植用非血缘骨髓造血干细胞应当由中华骨髓库提供，供移植用脐带血造血干细胞应当由国家卫生计生委批准设置的脐带血造血干细胞库提供。

3. 建立造血干细胞来源登记制度，保证造血干细胞来源可追溯。不得通过造血干细胞移植技术谋取不正当利益，不得泄露造血干细胞捐献者资料。

四、培训管理要求

（一）拟开展造血干细胞移植技术的医师培训要求。

1. 应当具有《医师执业证书》，具有主治医师及以上专业技术职务任职资格。

2. 接受至少 6 个月的系统培训。在指导医师指导下，参加同种异基因造血干细胞移植诊疗工作 2 例，参与 5 例以上同种异基因造血干细胞移植患者的全过程管理，包括适应证选择、供者选择、制定预处理方案、并发症处理、移植后管理和随访等，并考核合格。

3. 在境外接受同种异基因造血干细胞移植技术培训 6 个月以上，有境外培训机构的培训证明，并经省级卫生计生行政部门指定的培训基地考核合格后，可以视为达到规定的培训要求。

4. 本规范印发之日前，从事临床工作满 15 年，具有副主任医师专业技术职务任职资格，近 3 年独立开展造血干细胞移植技术临床应用不少于 50 例，未发生二级及以上责任程度为主要责任以上、与造血干细胞移植相关的医疗事故的，可免于培训。

（二）培训基地要求。

1. 培训基地条件。

省级卫生计生行政部门指定造血干细胞移植技术培训基地。培训基地应当具备以下条件：

（1）三级甲等医院，符合造血干细胞移植技术管理规范要求。

（2）百级层流病房床位数不少于 10 张。

（3）近 3 年累计完成同种异基因造血干细胞移植术不少于 150 例，每年完成各类同种异基因造血干细胞移植术不少于 50 例。

（4）本医疗机构具有开展同种异基因造血干细胞移植相关实验室及检测条件。

（5）有至少 4 名具有同种异基因造血干细胞移植能力的指导医师，其中至少 2 名为主任医师。

（6）有与开展同种异基因造血干细胞移植技术培训工作相适应的人员、技术、设备和设施等条件。

（7）近 3 年举办过全国性的与造血干细胞移植技术相

关的专业学术会议或者承担过造血干细胞移植技术国家级继续医学教育项目。

2. 培训工作基本要求。

（1）培训教材和培训大纲满足培训要求，课程设置包括理论学习、临床实践。

（2）保证接受培训的医师在规定时间内完成规定的培训。

（3）培训结束后，对接受培训的医师进行考试、考核，并出具是否合格的结论。

（4）为每位接受培训的医师建立培训及考试、考核档案。

造血干细胞移植技术临床应用 质量控制指标 (2017 年版)

一、造血干细胞移植适应证符合率

定义：造血干细胞移植术适应证选择正确的例数占同期造血干细胞移植术总例数的比例。

计算公式：

$$\text{造血干细胞移植适应证符合率} = \frac{\text{造血干细胞移植术适应证选择正确的例数}}{\text{同期造血干细胞移植术总例数}} \times 100\%$$

意义：体现医疗机构开展造血干细胞移植技术时，严格掌握适应证的程度，是反映医疗机构造血干细胞移植技术医疗质量的重要过程性指标之一。

二、异基因造血干细胞移植植入率

定义：异基因造血干细胞移植术后 100 天内，实现造血重建（患者外周血中性粒细胞 $>0.5 \times 10^9/\text{L}$ 与血小板 $>20 \times 10^9/\text{L}$ ）的患者例次数占同期异基因造血干细胞移植患者总例次数的比例。

计算公式：

$$\text{异基因造血干细胞移植植入率} = \frac{\text{异基因造血干细胞移植术后 100 天内实现造血重建的患者例次数}}{\text{同期异基因造血干细胞移植患者总例次数}} \times 100\%$$

意义：反映医疗机构造血干细胞移植技术水平的重要指标之一。

三、重度（III-IV度）急性移植物抗宿主病发生率

定义：急性移植物抗宿主病（aGVHD），是指造血干细胞移植术后 100 天内，由于移植物抗宿主反应而引起的免疫性疾病，主要表现为皮疹、腹泻和黄疸，是异基因造血干细胞移植的主要并发症和主要死亡原因。重度（III-IV度）急性移植物抗宿主病发生率，是指异基因造血干细胞移植术后发生重度（III-IV度）急性移植物抗宿主病患者例次数占同期异基因造血干细胞移植患者总例次数的比例。

计算公式：

$$\text{重度（III-IV度）急性移植物抗宿主病发生率} = \frac{\text{重度（III-IV度）异基因造血干细胞移植术后发生急性移植物抗宿主病患者例次数}}{\text{同期异基因造血干细胞移植患者总例次数}} \times 100\%$$

意义：体现医疗机构对不同移植方式造血干细胞移植术后 aGVHD 预防水平，是反映医疗机构造血干细胞移植技术医疗质量的重要过程性指标之一。

四、慢性移植物抗宿主病发生率

定义：慢性移植物抗宿主病（cGVHD），是指造血干细胞移植术 100 天后，由于移植物抗宿主反应而引起的慢性免疫性疾病。慢性移植物抗宿主病发生率，是指异基因造血干细胞移植术后发生慢性移植物抗宿主病患者例次数占同期异基因造血干细胞移植患者总例次数的比例。

计算公式：

$$\text{慢性移植物抗宿主病发生率} = \frac{\text{异基因造血干细胞移植术后发生慢性移植物抗宿主病患者例次数}}{\text{同期异基因造血干细胞移植患者总例次数}} \times 100\%$$

意义：体现医疗机构对造血干细胞移植术后 cGVHD 预防水平，是反映医疗机构造血干细胞移植技术医疗质量的重要过程性指标之一。

五、异基因造血干细胞移植相关死亡率

定义：异基因造血干细胞移植术后 100 天内非复发死亡患者数占同期异基因造血干细胞移植患者总数的比例。

计算公式：

$$\text{异基因造血干细胞移植相关死亡率} = \frac{\text{异基因造血干细胞移植术后 100 天内非复发死亡患者数}}{\text{同期异基因造血干细胞移植患者总数}} \times 100\%$$

意义：体现医疗机构对造血干细胞移植术后患者的综合管理水平，是反映医疗机构造血干细胞移植技术医疗质量的重要结果指标之一。

六、异基因造血干细胞移植总体生存率

定义：异基因造血干细胞移植后 1 年和 3 年随访（失访者按未存活患者统计）尚存活的患者数占同期异基因造血干细胞移植患者总数的比例。

计算公式：

$$\text{异基因造血干细胞移植总体生存率} = \frac{\text{异基因造血干细胞移植后 1 年和 3 年随访尚存活的患者数}}{\text{同期异基因造血干细胞移植患者总数}} \times 100\%$$

意义：体现医疗机构造血干细胞移植技术水平，是反映医疗机构造血干细胞移植技术医疗质量的重要结果指标之一。

七、异基因造血干细胞移植无病生存率

定义：异基因造血干细胞移植后 1 年和 3 年随访（失访者按未存活患者统计）无病存活的患者数占同期异基因造血干细胞移植患者总数的比例。

计算公式：

$$\text{异基因造血干细胞移植无病生存率} = \frac{\text{异基因造血干细胞移植后 1 年和 3 年随访无病存活的患者数}}{\text{同期异基因造血干细胞移植患者总数}} \times 100\%$$

意义：体现医疗机构造血干细胞移植技术水平，是反映医疗机构造血干细胞移植技术医疗质量的重要结果指标之一。

八、平均住院日

定义：实施异基因造血干细胞移植治疗的患者出院时占用总床日数与同期异基因造血干细胞移植治疗患者出院人数之比。

计算公式：

$$\text{平均住院日} = \frac{\text{出院时所有患者占用总床日数}}{\text{同期异基因造血干细胞移植治疗患者出院人数}}$$

意义：体现医疗机构造血干细胞移植技术的效率，是反映医疗机构造血干细胞移植技术医疗质量的重要结果指标之一。

九、平均住院费用

定义：实施异基因造血干细胞移植治疗的患者出院时住院总费用与同期异基因造血干细胞移植治疗患者出院人数之比。

计算公式：

$$\text{平均住院费用} = \frac{\text{出院时所有患者住院总费用}}{\text{同期异基因造血干细胞移植治疗患者出院人数}}$$

意义：体现医疗机构造血干细胞移植技术的社会经济学效益，是反映医疗机构造血干细胞移植技术医疗质量的重要结果指标之一。

十、平均住院药费

定义：实施异基因造血干细胞移植治疗的患者出院时住院药品总费用与同期异基因造血干细胞移植治疗患者出院人数之比。

计算公式：

$$\text{平均住院药费} = \frac{\text{出院时所有患者住院药品总费用}}{\text{同期异基因造血干细胞移植治疗患者出院人数}}$$

意义：体现医疗机构造血干细胞移植技术的社会经济学效益，是反映医疗机构造血干细胞移植技术医疗质量的重要结果指标之一。

附件 1

体细胞治疗临床研究和转化应用 管理办法（试行）

（征求意见稿）

第一章 总 则

第一条 为满足临床需求，规范和促进体细胞治疗临床研究及转化应用，依照《中华人民共和国药品管理法》和《医疗机构管理条例》等法律法规，制定本办法。

第二条 体细胞治疗是指来源于人自体或异体的体细胞，经体外操作后回输（或植入）人体的治疗方法。这种体外操作包括细胞在体外的激活、诱导、扩增、传代和筛选，以及经药物或其他能改变细胞生物学功能的处理。

第三条 本办法适用于由医疗机构研发、制备并在本医疗机构内开展的体细胞治疗临床研究和转化应用。

按照本办法管理的体细胞治疗转化应用项目目录由国家卫生健康委制定并进行动态管理。

第四条 开展体细胞治疗临床研究和转化应用的医疗机构及其临床研究项目和转化应用项目均应当具备相应条件，在国家卫生健康委备案，并在备案项目范围内开展体细胞治疗临床研究和转化应用。

第五条 医疗机构是体细胞治疗临床研究和转化应用的责任主体，对体细胞制备的质量负责。

第六条 国家卫生健康委负责体细胞治疗临床研究和转化应用的管理工作，参照药品生产质量管理规范的核心技术标准组织制定和发布《体细胞治疗临床研究和转化应用技术规范》，组建体细胞治疗专家委员会，为体细胞治疗临床研究和转化应用规范管理提供技术支撑和伦理指导，建立和维护体细胞治疗临床研究和转化应用登记备案信息系统（以下简称备案信息系统）。

第七条 国家卫生健康委负责对体细胞治疗临床研究和转化应用备案医疗机构进行监督检查，省级卫生健康行政部门负责行政区域内备案医疗机构的日常监督管理，发现问题和存在风险时及时督促医疗机构采取有效处理措施，并报告国家卫生健康委。

第二章 医疗机构和项目备案管理

第八条 开展体细胞治疗临床研究和转化应用的医疗机构应当具备以下条件，并提交医疗机构备案材料（附件1）。

（一）三级甲等医疗机构，具备较强的医疗、教学和科研能力，具有与所开展体细胞治疗项目相应的诊疗科目并完成药物临床试验机构备案；

（二）承担过省级及以上科技部门或卫生健康行政部门立项的体细胞治疗领域研究项目；

（三）具有与开展体细胞治疗相适应的项目负责人、临床医师、实验室技术人员、质量控制人员及其他相关人员；

（四）具有符合《体细胞治疗临床研究和转化应用技术

规范》要求，满足体细胞制备所需要的实验室以及相应的设施设备；

（五）建立体细胞治疗质量管理及风险控制制度体系，具有与所开展体细胞治疗相适应的风险管理和承担能力；

（六）成立学术委员会和伦理委员会，建立本医疗机构体细胞治疗临床研究和转化应用项目立项前审查制度。

第九条 体细胞治疗临床研究项目应当具备以下条件，并由医疗机构提交临床研究项目备案材料（附件2）。

（一）具备充分的科学依据，用于尚无有效干预措施的疾病，或用于严重威胁生命和影响生存质量的疾病，旨在提高现有治疗方法的疗效；

（二）适应证明确、临床研究设计合理，且有前期研究基础；

（三）通过本机构学术委员会的科学性审查和伦理委员会的伦理审查，并由医疗机构主要负责人审核立项；

（四）具有相应的项目研究经费支持。

第十条 体细胞治疗临床研究项目进入转化应用阶段应当具备以下条件，并由医疗机构提交转化应用项目备案材料（附件3）。

（一）在临床研究取得体细胞治疗安全性、有效性等证据的基础上，总结形成针对某种疾病（适应证）的治疗方案和技术标准（包括细胞治疗的种类/途径、治疗剂量/次数和疗程等）；

（二）通过本机构学术委员会的转化应用评估审查和伦

理委员会的伦理审查；

（三）具有完善的体细胞治疗转化应用持续评估方案。

第十一条 医疗机构应当在备案信息系统登记并上传备案材料扫描件，同时将纸质件提交省级卫生健康行政部门。省级卫生健康行政部门自收到备案材料之日起 15 日内完成形式审核，提交国家卫生健康委。

第十二条 国家卫生健康委自收到备案材料之日起 2 个月内组织体细胞治疗专家委员会进行评估，向社会公示完成备案的医疗机构及临床研究或转化应用项目清单，接受社会监督。

经查不符合备案条件的，可整改后再次提交备案材料，整改期不少于 6 个月。

第十三条 医疗机构进行首次机构备案时，须同时提供医疗机构备案材料和临床研究项目备案材料。新增临床研究项目时，只需提交临床研究项目备案材料。

第十四条 参与多中心体细胞治疗临床研究项目的医疗机构，应当符合医疗机构备案条件，由牵头单位负责汇总提交医疗机构及临床研究项目备案材料。

第三章 项目过程管理与体细胞制备质量控制

第十五条 医疗机构应当严格按照《体细胞治疗临床研究和转化应用技术规范》开展体细胞治疗临床研究和转化应用。

第十六条 体细胞治疗临床研究项目经备案转入转化应

用后，不得擅自扩大适应证范围。如果需要扩大适应证范围，医疗机构应当重新备案开展临床研究。

第十七条 医疗机构应当建立完备的体细胞治疗质量管理体系，保证体细胞制备质量的标准化和临床研究及转化应用方案实施的规范化。

第十八条 开展体细胞治疗临床研究和转化应用须遵循伦理原则和国家有关法律法规，涉及伦理问题时提交医疗机构伦理委员会讨论。

临床研究阶段不得向受试者收取任何研究相关费用。

第十九条 医疗机构应当根据信息公开原则，在备案信息系统上逐例报送体细胞治疗项目开展情况数据信息，公开项目进展和不良反应的发生及处置等有关情况，并对登记内容的真实性负责。

第二十条 医疗机构应当建立健全档案管理制度，有效管理分析体细胞治疗临床研究和转化应用有关数据信息，原始资料应当至少保存 30 年。

第二十一条 医疗机构应当建立完善的培训机制，对开展体细胞治疗临床研究和转化应用的人员进行业务和伦理学知识培训。

第二十二条 医疗机构对进入转化应用的项目，应当继续积累数据，开展系统评估，按年度进行总结，每年 1 月 20 日前向省级卫生健康行政部门提交上一年度工作报告。

第二十三条 体细胞制备应当符合《体细胞治疗临床研究和转化应用技术规范》的基本原则和相关要求。

第二十四条 体细胞制备应当优先采用已经获得批准用于人体的或符合药典标准的原材料，最大限度地降低制备过程中的污染、交叉污染，确保持续稳定地制备符合预定用途和质量要求的体细胞。

每批次制备的体细胞必须留样备查。

第二十五条 医疗机构应当授权体细胞制备质量授权人全权负责体细胞制备工艺全过程的质量，负责对制备的体细胞进行签批放行。未经体细胞制备质量授权人签批的体细胞不得应用于临床。

第四章 监督管理

第二十六条 国家卫生健康委采取飞行检查等方式对备案医疗机构和项目进行抽查、专项检查或有因检查，并将检查结果公示。

第二十七条 省级卫生健康行政部门做好本辖区医疗机构开展体细胞治疗临床研究和转化应用的日常监督管理，每年向国家卫生健康委报送监督管理工作报告。

第二十八条 医疗机构中体细胞治疗临床研究和转化应用有以下情形之一的，省级卫生健康行政部门应当责令其暂停体细胞治疗临床研究或转化应用项目，整改期不少于6个月，并将有关情况报告国家卫生健康委。

- （一）医疗机构体细胞治疗质量管理体系不符合要求；
- （二）项目负责人和质量授权人不能有效履行其职责；
- （三）不及时报告发生的严重不良反应或不良事件、差

错或事故等；

（四）擅自更改临床研究或转化应用方案；

（五）不及时报送项目进展及结果；

（六）对随访中发现的问题未及时组织评估、鉴定，并给予相应的医学处理；

（七）体细胞制备不符合《体细胞治疗临床研究和转化应用技术规范》要求；

（八）其他违反本办法规定的行为。

第二十九条 医疗机构管理工作中发生下列行为之一的，国家卫生健康委将责令其停止体细胞治疗临床研究和转化应用，予以通报批评，并按照有关法律法规的规定进行处理。

（一）未完成备案擅自开展体细胞治疗临床研究和转化应用；

（二）整改不合格；

（三）违反临床研究规范和伦理原则；

（四）损害供者或受者权益；

（五）非法进行体细胞治疗的广告宣传等商业运作；

（六）其他严重违反本办法规定的行为。

第五章 附 则

第三十条 医疗机构拟将产品申请药品注册的，参照国家药品监督管理部门发布的《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（试行）》进行自评，对符合药品注册有关技术要

求、药物非临床研究质量管理规范以及临床试验质量规范等相关规定的，可按药品管理的有关程序申请临床试验，已获得的研究数据可以提交用于药品评价。

第三十一条 有专门管理办法的体细胞治疗按照现行规定执行。

第三十二条 本办法由国家卫生健康委负责解释，自发布之日起实施。

- 附件:1. 体细胞治疗医疗机构备案材料
2. 体细胞治疗临床研究项目备案材料
3. 体细胞治疗转化应用项目备案材料

附件 1-1

体细胞治疗医疗机构备案材料

(一式两份)

一、体细胞治疗临床研究机构备案申请表及备案信息采集表。

二、医疗机构执业许可证书复印件。

三、药物临床试验机构备案证明复印件。

四、医疗机构体细胞临床研究组织管理体系（框架图）和各部门职责。

五、医疗机构体细胞临床研究管理主要责任人、质量受权人资质，以及相关人員接受培训情况。

六、医疗机构学术委员会和伦理委员会组成及其工作制度 and 标准操作规范。

七、体细胞制备标准操作规程和设施设备、人员条件。

八、体细胞临床研究质量管理及风险控制程序和相关文件（含质量管理手册、临床研究工作程序、标准操作规范和试验记录等）。

九、体细胞质量评价标准和检测设备设施情况。

十、防范体细胞临床研究风险的管理机制和处理不良反应、不良事件的措施。

十一、其他相关资料。

附件 1-2

体细胞治疗临床研究项目备案材料

(一式两份)

一、体细胞治疗临床研究项目备案申请表及备案信息采集表。

二、项目立项申报材料诚信承诺书。

三、项目伦理审查申请表及伦理审查批件。

四、临床研究经费情况。

五、研究人员的名单和简历，体细胞临床研究质量管理手册。

六、供者筛选标准和供者知情同意书样稿。

七、体细胞制备过程中主要原辅料标准。

八、体细胞制备的工艺，质量控制标准和制定依据，以及工艺稳定性数据等。

九、体细胞制备的完整记录和体细胞制备质量检验报告。

十、体细胞制备的标签、储存、运输和使用追溯方案。

十一、不合格和剩余的制备体细胞的处理措施。

十二、前期研究报告，包括体细胞治疗的临床前或临床安全性和有效性评价。

十三、临床研究方案，应当包括以下内容：

1. 研究题目；
2. 研究目的；

3. 立题依据；

4. 预期效果；

5. 研究设计（应当遵循随机、对照、前瞻的设计原则，包括受试者纳入、排除标准和分配入组方法，以及所需的病例数等）；

6. 所制备体细胞的使用方式、剂量、时间及疗程，如需通过特殊手术导入治疗制剂，应当提供详细操作过程；

7. 中止和终止临床研究的标准；

8. 疗效评定标准；

9. 不良事件的记录要求和严重不良事件的报告方法、处理措施；

10. 病例报告表样稿；

11. 研究结果的统计分析；

12. 随访的计划及实施办法。

十四、临床研究风险预判和处理措施，包括风险评估报告、控制方案及实施细则等。

十五、临床研究进度计划。

十六、资料记录与保存措施。

十七、受试者知情同意书样稿。

十八、研究者手册。

十九、相关知识产权证明文件。

二十、其他相关材料。

附件 1-3

体细胞治疗转化应用项目备案材料

(一式两份)

- 一、体细胞治疗项目转化应用备案申请书。
- 二、伦理审查申请表及医疗机构伦理审查批件。
- 三、医疗机构学术委员会审查意见。
- 四、项目临床研究报告和质控报告。
- 五、体细胞治疗转化应用方案。
- 六、体细胞治疗转化应用评估方案。
- 七、知情同意书样稿。
- 八、临床研究风险预判和处理措施，包括风险评估报告、控制方案及实施细则等。
- 九、不良事件的记录要求和严重不良事件的报告方法、处理措施。
- 十、体细胞制备的标签、储存、运输和使用追溯方案。
- 十一、不合格和剩余体细胞制备的处理措施。
- 十二、其他相关材料。

附件 2

体细胞治疗临床研究和转化应用 管理办法（试行）解读

一、制定《体细胞治疗临床研究和转化应用管理办法（试行）》的背景是什么？

近年来，随着卫生健康科技快速发展，细胞治疗为恶性肿瘤、某些传染病和遗传病等难治性疾病患者带来了新的希望，并在美欧日等发达经济体以多种方式开始进入临床应用，我国医疗机构也开展了大量临床研究，患者希望接受高质量细胞治疗的呼声日益增高。为满足临床需求，规范并加快细胞治疗科学发展，国家卫生健康委组织起草了本管理办法，对体细胞临床研究进行备案管理，并允许临床研究证明安全有效的体细胞治疗项目经过备案在相关医疗机构进入转化应用。

二、本管理办法与干细胞临床研究管理办法的关系是什么？

体细胞的科学定义包括干细胞，原国家卫生计生委同原食品药品监管总局于 2015 年出台了《干细胞临床研究管理办法（试行）》，有效地规范和推动了我国干细胞治疗临床研究工作，按照本管理办法“第三十一条，有专门管理办法的体细胞治疗按照现行规定执行”，干细胞临床研究等有关工作仍然按照《干细胞临床研究管理办法（试行）》的规定

执行。

三、管理办法的适用范围是什么？

本管理办法第三条规定“本办法适用于由医疗机构研发、制备并在本医疗机构内开展的体细胞治疗临床研究和转化应用”。国家卫生健康委对细胞治疗转化应用项目进行目录管理，与产业化前景明显的细胞治疗产品错位发展。由企业主导研发的体细胞治疗产品应当按照药品管理有关规定向国家药品监管部门申报注册上市。

四、开展体细胞治疗如何进行备案？

按照本管理办法有关规定，开展体细胞治疗临床研究和转化应用的医疗机构应当进行备案，医疗机构进行首次机构备案时，须同时提供医疗机构备案材料和临床研究项目备案材料。已备案的医疗机构新增临床研究项目时，只需提交临床研究项目备案材料。医疗机构所开展的体细胞治疗临床研究项目结束后，在取得安全性、有效性等证据的基础上，可以进行转化应用备案，在该医疗机构将体细胞临床研究项目转入转化应用。

医疗机构应当在备案信息系统登记并上传相关材料扫描件，同时将纸质件提交省级卫生健康行政部门。省级卫生健康行政部门自收到备案材料之日起15日内完成形式审核提交国家卫生健康委。国家卫生健康委自收到备案材料之日起2个月内组织体细胞治疗专家委员会进行评估，向社会公示完成备案的医疗机构及临床研究或转化应用项目清单，接受社会监督。经查不符合备案条件的，可整改后再次提交备

案材料，整改期不少于6个月。

五、正在开展的体细胞治疗临床研究项目如何备案？

适用本办法管理正在开展体细胞治疗临床研究的医疗机构，应当在本办法发布之日起30个工作日内履行备案程序。国家卫生健康委组织专家进行督导检查，对不符合条件的医疗机构及其研究项目提出暂停或终止意见，符合条件的可继续开展研究。

六、体细胞临床研究进入转化应用的总体要求是什么？

在临床研究取得体细胞治疗安全性、有效性等证据的基础上，总结形成针对某种疾病（适应症）的治疗方案和技术标准（包括细胞治疗的种类/途径、治疗剂量/次数和疗程等）。

通过该机构学术委员会的转化应用评估审查和伦理委员会的伦理审查。具备完善的体细胞治疗转化应用持续评估方案。经备案后，可以在开展临床研究的医疗机构进入转化应用。

七、如何做好体细胞治疗临床研究和转化应用的过程监管？

国家卫生健康委采取飞行检查等方式对备案医疗机构和项目进行抽查、专项检查或有因检查，并将检查结果公示。省级卫生健康行政部门做好本辖区医疗机构开展体细胞治疗临床研究和转化应用的日常监督管理，每年向国家卫生健康委报送监督管理工作报告。医疗机构开展体细胞临床研究和转化应用出现第二十八条规定情形的，省级卫生健康行政

部门应当责令其暂停体细胞治疗临床研究或转化应用项目，整改期不少于6个月，并将有关情况报告国家卫生健康委；存在第二十九条规定情形的，国家卫生健康委将责令其停止体细胞治疗临床研究和转化应用，予以通报批评，并按照有关法律法规的规定进行处理。

八、体细胞治疗临床研究和转化应用是否可以收费？

体细胞治疗临床研究不得向受试者收取任何研究相关费用。体细胞治疗转化应用项目备案后可以转入临床应用，由申请备案的医疗机构按照国家发展改革委等4部门《关于印发推进医疗服务价格改革意见的通知》（发改价格〔2016〕1431号）有关要求，向当地省级价格主管部门提出收费申请。

人源性干细胞及其衍生细胞治疗产品 临床试验技术指导原则 (征求意见稿)

国家药品监督管理局药品审评中心
生物制品临床部

2020 年 8 月

目 录

一、概述	1
(一) 前言	1
(二) 目的和适用范围	1
(三) 定义	2
二、临床试验设计	2
(一) 一般考虑	2
(二) 探索性临床试验	8
(三) 确证性临床试验	11
三、临床试验结束后研究	12
(一) 临床试验受试者的长期随访	12
(二) 上市后研究或监测	14
四、干细胞备案临床研究结果用于药品注册审评的评价要点	14
(一) 干细胞备案临床研究用于药品注册审评的必要条件	15
(二) 干细胞备案临床研究用于药品注册审评的评价结论	16
参考文献	19

一、概述

（一）前言

干细胞指一类具有自我更新、多向分化潜能的细胞，在再生医学领域有广阔的应用前景。人源性干细胞及其衍生细胞治疗产品（以下称“干细胞相关产品”）作为重要的再生医学产品，可能应用到几乎涉及人体所有重要组织器官的修复及研究人类面临的许多医学难题，在细胞替代、组织修复、疾病治疗等方面具有巨大潜力。本指导原则中“人源性干细胞”包括人胚干细胞、成体干细胞和诱导形成的干细胞。来源包括人的配子、囊胚（体外培养期限自受精开始不超过14天）、脐带、胎盘、脂肪、骨髓等细胞和组织。人源性干细胞衍生细胞治疗产品指由上述人源性干细胞诱导分化，或成熟体细胞转分化获得的细胞治疗产品。

当干细胞相关产品进入临床试验时，应遵循《药物临床试验质量管理规范》（2020年修订版）（GCP）等一般原则要求。干细胞相关产品在细胞来源、类型、制备工艺等方面差异较大，而治疗机制和体内活性等相较传统药物更加复杂。为了获得预期治疗效果，干细胞相关产品还可能需要通过特定的给药方法或联合治疗策略来进行给药，因此，在干细胞相关产品的临床研究过程中，需要针对该类产品特点设计严谨科学的试验方案，以保护受试者安全并得到可靠的临床试验数据。

（二）目的和适用范围

本指导原则适用于按照《药品管理法》、《药品注册管理办法》等药品管理相关法规进行研发和注册申报的干细胞相关产品，旨在为该类产品开展临床试验的总体规划、设计、实施和试验数据分析等方面提供必要的技术指

导，规范药物临床试验申办者(以下简称申办者)和临床试验研究者对干细胞相关产品的安全性和有效性的评价方法，并最大程度地保护受试者参加临床试验的安全和权益。

部分干细胞相关产品兼具细胞治疗产品和基因治疗产品的特性。本指导原则的目的不是对其监管属性或分类进行认定，而是基于现有认识，对干细胞相关产品开展临床试验时若干技术问题的建议和推荐，内容不具有强制性，随着研究和认识的深入，本原则内容将继续修订和完善。鼓励申办者适时与药品审评中心就具体试验方案的设计和实施细则进行沟通。

(三) 定义

干细胞相关产品临床试验指应用人自体或异体来源的干细胞经体外操作形成产品制剂后输入（或植入）人体，用于疾病防治的临床试验。体外操作包括干细胞相关产品在体外的提取、分离、纯化、培养、扩增、基因编辑或基因修饰、诱导分化、冻存及复苏、运输等。

二、临床试验设计

(一) 一般考虑

1、伦理考量

伦理审查是当今国际通行的控制研究风险的重要手段，涉及干细胞相关产品的临床试验项目必须进行充分的伦理审查。我国的《药物临床试验质量管理规范》(2020 年)、世界医学协会的《赫尔辛基宣言》(2013 版)以及国际医学科学组织委员会(CIOMS)的《涉及人类健康相关研究的国际伦理指南》(2016 年)，均制定并确立了人体生物医学研究的伦理标准和科学标准，所有干细胞相关产品临床试验均应遵循尊重原则、受益原则、公正原则、无伤原

则四个伦理审查的基本原则。干细胞相关产品临床试验的伦理审查过程应符合我国《药物临床试验质量管理规范》、ICH GCP (E6)等规范文件的要求。

干细胞相关产品的临床试验均应符合《涉及人的临床研究伦理审查委员会建设指南》(2019版, 附则六: 干细胞临床研究伦理审查)规定。

2、研究人群

临床试验的受试人群选择取决于预期获益和潜在风险, 在不同的临床研究阶段, 应利用已获得的研究证据分析受试者的获益-风险预期。在干细胞相关产品的早期临床试验中, 可依据预期的作用机制、临床前研究数据及既往相同或类似的干细胞相关产品的人体研究数据等评估受试者的潜在获益和风险。除了潜在获益和风险的评估, 试验数据的可评价性也是选择研究人群的重要考量。

(1) 健康志愿者

干细胞相关产品在体内的存活和作用持续时间较长, 并具备自我复制和多向分化潜能, 其长期安全性风险尚不明确。此外, 鉴于干细胞相关产品特性, 体内药物代谢动力学(PK)以及药物效应动力学(PD)的研究方法与传统药物相比尚不成熟, 可能给健康受试者带来不确定的安全性风险。因此, 干细胞及其衍生细胞治疗产品的临床试验通常不考虑在健康志愿者中进行。

(2) 适应症人群

为一项临床试验选择最适当的受试者时有多方面考量, 包括潜在风险和获益, 以及研究数据的可解读性等。常规治疗失败、缺乏有效治疗手段的受试者能够承受的治疗风险可能更高, 或者其病情更能支持承担风险的合理

性。此外，因重度或晚期疾病导致生理机能大幅下降的受试者，与病情较轻的受试者相比，耐受额外生理机能损失的能力更低。因此，干细胞及其衍生物治疗产品在开展临床试验时，应结合产品作用特点、潜在风险和获益、疾病严重性和病情进展等多个因素综合考虑。

研究数据的可解读性也是选择适当研究人群时的重要考量，例如，目标适应症的常规治疗（如药物、手术、物理治疗等）可能影响干细胞相关产品安全性和有效性的评估。选择常规治疗无效、且缺乏有效治疗手段的受试者，可能有助于降低常规治疗对试验药物安全性及有效性评价的影响。如果无法避免干细胞相关产品与常规治疗联合使用，则有必要在临床试验中采用稳定的常规治疗方案，如药物类型、剂量、给药频率等，以提高试验结果的可解读性。

（3）儿童受试者

对于纳入儿童受试者的临床试验，在儿童开展临床试验前，应已获得相关干细胞相关治疗产品的成人受试者的安全性和耐受性数据。如果申办者拟在无成人安全性研究数据的情况下进行儿童受试者试验，应提供成人研究不可行原因或不首先开展成人研究的依据。

3、受试者保护和风险控制

（1）受试者筛选

除研究人群的一般考虑外，在某些干细胞相关产品的临床试验中，受试者入组时可能正在接受针对目标适应症或其他疾病的治疗。如果受试者在临床试验期间需要暂停现有治疗、或改变现有治疗药物的剂量或给药频率，申

办者应谨慎评估暂停或改变现有治疗可能导致受试者病情进展的风险，以及试验产品预期产生的临床获益。只有预期临床获益显著高于暂停或改变现有治疗的疾病进展风险时，才考虑采用该试验方法，同时有必要制定详细的补救治疗方案，避免延误或加重受试者的病情。

（2）研究者培训和操作程序记录

干细胞相关产品较传统化药或大分子药物，在药物存储监测、细胞复苏、使用配制等方面有较大区别，应该给研究者以及参与临床试验相关操作的研究中心工作人员进行专门培训。对于干细胞相关产品可能产生的不良事件以及预防和处理措施也需要制定相关文件，并对研究者进行相关培训。

当研究者和操作人员的临床经验和技能可能影响产品使用的安全性和有效性时，申办者应该明确参与临床试验的研究者和操作人员的基本资质要求，并对研究者和操作人员进行必要培训。某些情况下（例如同一个研究中心有多个操作者），对相关人员进行统一的，特定给药及治疗操作程序的培训，可有效减少配药、给药治疗过程操作差异对于试验数据的影响，有助于研究结果的解读。详细的书面标准操作规程（SOP）也能有助于确保产品给药的安全性和一致性。仔细记录给药过程和后续观察有助于识别研究者和操作人员对方案的依从性，还有助于分析操作或治疗差异与临床结局之间的相关性，并识别可能的操作或治疗优化。

（3）研究停止规则

在国内已经开展的干细胞相关产品药物临床试验中，尚未观察到反复出现的严重安全性风险，但考虑到有限的数量以及观察时间较短，产品

安全性仍需要持续评估。此类产品的试验方案建议包括研究停止规则，以及
时控制暴露于风险的程度和受试者人数。研究停止规则通常规定事件（如同
适应症或给药方式相关的特定医学事件或死亡）的严重性或发生频率，达到
后将暂停入组和给药，直至情况得到评估。基于评估结果，可能修订临床研
究方案以降低受试者的安全风险。修订内容一般包括入组标准的修订（例如
排除出现特定不良事件风险较高的受试者人群），或者剂量降低、产品配制
或给药方式的调整、或受试者安全监测方案的改进等。在研究方案进行调整
改进以后，可能考虑恢复试验。

因此，研究停止规则不一定终止试验。合理设计的停止规则允许研究者
评估和解决在试验过程中识别的风险，确保受试者风险维持在合理水平。

（4）风险控制

干细胞相关产品的临床安全性受细胞来源、细胞类型、增殖和分化潜
能、制备工艺、作用活性等多重因素影响，不良反应的发生时间和严重性也
与细胞在体内的存活、增殖和分布等特征密切相关。在临床试验方案中需根
据产品特点和前期研究结果，针对临床试验中可能出现的安全性风险，制定
全面、可操作的风险控制方案，对具体风险的预防、识别、诊断、处理和预
后随访等进行详细描述。

4、其他考虑

（1）个体化治疗产品的考虑

对于自体来源的干细胞及其衍生细胞治疗产品，其生产过程高度个体
化，需要为每例受试者单独生产，生产过程可能需要数周时间。如果产品生

产出现问题，可能导致受试者无法参加临床试验。临床试验过程中出现生产失败时，深入分析失败原因非常重要，这些分析可能有助于改善后续试验的受试者筛选标准，降低生产失败概率，或者针对生产失败制定应急治疗方案，改进后续临床试验设计。

研究方案还应明确规定，对于生产失败无法按计划给药的受试者，是否再次尝试生产和治疗，以及是否将招募新的受试者入组，以替换未接受治疗的受试者。不能按计划治疗是临床试验可行性评估的一部分，也可能是一个重要的试验中止点（甚至终点），应制定计划统计未能治疗的受试者比例，分析未能进行产品给药的原因，并评估未能给药对受试者造成的后果。

（2）临床试验的可行性评估

很多干细胞相关产品的生产环节和给药过程需要专门的设备和操作程序，产品的保存、转运和使用过程较传统药物复杂，建议在首次人体试验正式实施前，研究评估干细胞及其衍生细胞治疗产品运输、研究中心存储、配制等各个环节操作的可行性，并制定相应的实施方案，对临床试验早期发现的产品供应、保障程序中存在的问题，需要及时处理解决。

（3）非临床研究的完整性

完整的非临床研究有助于了解干细胞相关产品的作用机制、体内增殖/分化/迁移、急性和长期毒性、致瘤性等生物学特性，是人体临床研究的重要补充，对于确定临床研究的给药方案、预测细胞在人体内的分布和安全性等有重要意义。申办者开展干细胞相关产品的临床研究前，须参考药品审评机构

及 ICH 等发布的相关指导原则开展非临床研究，并在注册申报时递交给药品
审评机构。

(二) 探索性临床试验

1、探索性试验的目的

早期探索性试验，尤其是首次人体试验（first in human, FIH）的主要目的是探索安全性和耐受性。安全性评估包括对潜在不良反应性质和发生率的评估及其与剂量之间关系的估计。干细胞相关产品的探索性试验设计，通常还会考虑不同于其他药品的临床安全性问题（例如体内异常增殖和成瘤性、宿主抗移植反应等）。探索性试验的一个常见次要目的是对产品活性进行初步评估，如临床症状改善、细胞在体内的增殖存活和生物分布、药效学活性及生物学活性相关指标等，为后续验证性临床试验确定给药剂量和给药方案，以及明确研究设计、研究终点、统计假设等提供数据基础。

2、剂量选择和递增探索

(1) 临床起始剂量

与其他传统药物相比，干细胞相关产品的非临床研究受到多种因素影响，例如动物模型的选择、免疫应答的种属差异等，对人体安全起始剂量的预测可能不如小分子药物精确。如果有可用的动物实验或体外数据，可能有助于判断初始细胞剂量的风险水平。如果有同类或相关产品的既往临床数据（即使采用不同给药途径或不同适应症），也有助于预测临床起始剂量。

(2) 剂量递增和队列规模

干细胞相关产品在 FIH 试验中选择剂量增幅时，应考虑非临床研究及类似产品的临床数据中剂量变化对受试者安全性和有效性的影响。对每一剂量水平的受试者数量的要求，应考虑不同适应症人群对风险的可接受程度，或者安全性的评价要求。相对于严重危及生命疾病的患者，在慢性病或非致命性疾病患者中开展临床试验时，可能需要通过更大的队列规模提供更高的安全保障。此外，其他研究目的，如耐受性和临床药理学活性评估等也可能影响队列规模及剂量增幅的设计。

(3) 给药方式

在 FIH 试验中，一般采用受试者之间设置一定间隔、逐例给药的方式，避免多个受试者同时暴露而增加安全性风险。对首例患者应加强不良事件监测，还要考虑迟发性不良事件。向同一剂量组内下一例受试者或下一个剂量组受试者给药前，应规定一定的随访间隔，以观察急性和亚急性不良反应。间隔期的选择一般基于非临床研究中急性或亚急性毒性的发生情况，细胞在体内的活性持续时间和/或既往类似产品在人体中的应用经验。

干细胞相关产品可能在受试者体内长期存活，在对产品毒性和活性持续时间有初步了解之前，可能较难预测重复给药的风险。因此，建议首次用于人体的干细胞相关产品采用单次给药方案。当已有研究证据提示安全性风险较低且多次给药可能增加活性时，在早期试验中有可能采用多次给药的方

(4) 最大耐受剂量

对最大耐受剂量（maximum tolerance dose, MTD）的摸索通常通过剂量递增设计实现。干细胞相关产品可接受的毒性或不良反应的严重程度，应基于疾病的严重性和获益风险预期进行判断，建议申办者在临床试验方案中明确探索方法。

对于干细胞相关产品，还可以通过剂量探索确定其生物学活性范围或最佳有效剂量，如果在较低剂量水平可以观察到稳定的生物学活性或临床获益，申办者可能不必要确定 MTD。但须认识到，早期研究往往难以准确估计产品的有效推荐剂量，申办者需仔细评估早期研究未能确定 MTD 对后续试验的影响，原则上确证性临床试验剂量不应超出探索性研究的剂量范围。

3、探索性试验对照设置

早期探索性临床试验以观察安全性为主，对照设置的重要性不如确证性试验，如果合并用药影响本品的不良反应观察，或者在早期探索性研究中初步观察产品活性或疗效，申办者可能有必要设置对照。当临床上对疾病进程的认识尚不充分，或入组受试者的疾病严重程度差异很大时，设置平行对照组对于评价试验产品的安全性或有效性就更加重要。

如果需要设置对照，对照品的选择应考虑研究目的、疾病的进展程度和严重性、治疗选择等多重因素，例如，I 期临床试验采用安慰剂对照可能有助于评价试验产品的安全性，并初步评价有效性。

4、探索性试验的其他考虑

申办者可以基于总体临床研究规划考虑早期探索性研究的设计，在早期研究中纳入有助于未来产品研发的设计要素，例如，在 I 期临床试验中设置有效性或体内药效学观察指标，以收集有效性的初步证据。申办者可能考虑

将早期研究设计为 I 期和 II 期合并进行的 I/II 期试验，在剂量递增和推荐剂量明确后，进入扩展期，以推荐的剂量水平继续入组额外的患者，进一步观察干细胞相关产品的疗效。如果采用该类设计，在试验方案中应明确从剂量递增阶段转到扩展阶段的原则和方法。

（三）确证性临床试验

与其它药物一样，干细胞相关产品的确证性研究（或关键研究）的目的是确认探索性研究中初步提示的安全性和疗效，为药品注册提供关键的获益/风险评估证据。确证性研究的目标人群、主要和次要终点的选择、研究持续时间、样本量估计和统计学设计等应符合具体治疗领域的一般指南要求。

1、对照和设盲

良好的随机对照试验（randomized controlled trial, RCT）是确证性研究中优先推荐的设计方法，该研究方法可以消除受试者的基线差异、减少偏倚，有利于客观评价试验产品的治疗效果。对于某些适应症，可能缺少合适的对照药物，或伦理上不宜采用安慰剂作为对照药，可考虑与最佳支持性治疗进行对照。

干细胞相关产品的确证性试验通常建议保持盲法，对于部分自体来源的干细胞及其衍生细胞治疗产品，研究者或医务人员参与细胞的采集并配合操作给药过程，这种情况下有必要采用其它方法降低试验的偏倚，如设立不受研究者影响的独立审评委员会（independent review committee, IRC），对临床终点进行判读并作为主要终点的判定标准，或对研究者评估的结果进行敏感性分析。

2、疗效和安全性

在确证性临床试验中，针对适应症或目标人群选择合理的临床疗效终点是临床评价的基础，支持干细胞相关产品批准的临床试验终点通常应当是直接反映临床获益的指标，疗效指标的评价标准须与适应症相关的诊疗指南或临床共识保持一致。生物学活性指标如细胞因子或生物标志物的变化、合并用药或伴随治疗的减量或停止等通常不作为确证性临床试验的主要疗效评价标准。任何未经验证的终点或替代终点应首先在探索性研究中确认与患者临床获益的相关性后，才能用于确证性临床试验。

干细胞相关产品可以在体内存活较长时间，并产生长期疗效。对于异体来源的干细胞相关产品，反复给药可能诱导机体产生免疫应答，进而降低重复给药的有效性或增加安全性风险。因此，确证性试验的临床终点还应关注疗效的持续时间，建议申办者根据目标人群的疾病特点和临床获益评价标准，设置足够的观察期以评价受试者的长期获益。

在确证性临床研究阶段应继续监测安全性风险，分析重要和潜在的风险信息，包括迟发性不良事件（如致瘤性）的发生率、严重性和危险因素等，并有必要采取措施使风险最小化。安全性分析集应足够大，以充分评价干细胞相关产品的安全性，以确保上市后的安全使用。

如果临床试验过程中出现药学重大变更，应在确证性试验开始之前实施这些变更，并从临床角度评价工艺变更对产品疗效和安全性的影响。

三、临床试验结束后研究

（一）临床试验受试者的长期随访

由于干细胞相关产品长期存活及持久性作用的不确定性，申办者应对临床试验期间接受治疗的所有受试者进行适当的长期随访。建议申办者在完成临床试验方案设定的访视后，继续关注受试者的疾病预后、长期疗效、免疫功能变化以及肿瘤形成等迟发性安全风险，并观察产品在体内的持续存在时间、免疫原性等。随访时间主要取决于干细胞相关产品的风险水平、疾病进程的认识等，应在不短于迟发不良反应事件预期发生的时间段内，尽量观察到由于产品特性、暴露性质等给受试者造成的风险。

干细胞相关产品的风险水平与多种因素有关，如细胞来源、增殖或分化潜能、体内存活和作用时间、是否有外源基因表达、是否具有转分化能力等。例如，间充质干细胞产品的增殖或分化潜能有限、免疫原性相对较低，建议对于间充质干细胞或符合间充质干细胞特征的细胞治疗产品进行不少于2年的随访，以观察成瘤性等迟发性安全风险。其他类型的干细胞相关产品，需要根据细胞特性或风险水平进行适当调整。

根据临床试验的研究计划和持续时间，长期随访可能作为临床试验的一部分，或者设计为一项单独研究，如果对长期监测有一个单独的研究方案，在受试者参加临床试验前，除获得受试者对临床试验的知情同意外，还应获得其对长期随访研究计划的知情同意。如果长期随访作为临床试验的一部分，随访时间可能超过主要终点或获益风险评估所需要的观察时间，这种情况下，通常无需在开始后续试验或提交上市申请之前完成长期随访。

儿童受试者可能因较为年幼而存在长期药物活性影响，干细胞相关产品给药后的长期随访可能需要监测对生长和发育的影响，因此，较长时间的临床随访数据对于评估安全性和发育影响可能很重要，尤其是在婴儿和年幼儿

童中进行临床试验时。与成人相比，在儿童受试者中监测长期安全性和作用持续时间可能更加困难，申办者在拟定长期随访计划时应予以妥善考虑。

（二）上市后研究或监测

干细胞相关产品的治疗方式和体内活性特征与传统小分子或生物大分子药物有较大区别，目前尚缺乏该类产品在人体中大规模研究和应用的经验。由于临床试验的持续时间和受试者数量有限，上市后通过收集真实世界数据，有助于进一步观察产品的长期疗效，或暴露罕见的不良反应等。因此，申办者取得产品的上市许可后，可能有必要通过上市后观察性研究或重点监测等方式，收集真实世界中的有效性及安全性等信息，并通过药品定期安全性更新报告（PSUR）或药品再注册等途径与监管部门进行沟通。

四、干细胞备案临床研究结果用于药品注册审评的评价要点

原国家卫生计生委和原国家食品药品监管总局于2015年7月印发的《干细胞临床研究管理办法（试行）》（以下称“管理办法”）和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》对干细胞备案临床研究提出了明确的技术要求，依据管理办法开展干细胞临床研究后，如申请药品注册临床试验，可将已获得的临床研究结果作为技术性申报资料提交并用于药品评价。

如果申办者向药品监督管理部门递交药物临床试验申请之前，已按管理办法要求开展了备案的干细胞临床研究，并拟用于药品注册申报，应按照《生物制品注册分类及申报资料要求》，提供备案临床研究中使用的干细胞相关产品的药学、非临床及临床研究相关信息，其中，临床研究报告应按照《ICH E3：临床研究报告的结构与内容》进行撰写并提交。

药品审评部门对备案临床研究结果进行技术评价的主要目的和评价标准与药物临床试验相同，即判断干细胞相关产品的安全性、有效性或体内增殖存活和代谢特性等是否达到临床研究的预期目标。如果申办者拟将备案临床研究数据用于支持药品注册，应基于取得的备案临床研究结果，制定后续研发规划或后续临床试验方案，明确研究目标、研究人群和研究方法等。

（一）干细胞备案临床研究用于药品注册审评的必要条件

1、工艺和质量一致性

稳定的生产工艺可以保证细胞治疗产品的质量稳定性，有助于确保临床试验结果的一致性。干细胞备案临床研究数据用于药品注册申报时，申办者应确保干细胞相关产品的药学研究符合药品注册申报的相关技术要求，并提供备案研究中使用的干细胞相关产品的生产工艺参数和生产检验记录等，以证明备案研究中使用的干细胞相关产品与药品注册申报产品的药学一致性或可比性。如果药品注册申办者在临床研究过程中变更了干细胞相关产品的原材料、生产或制备工艺及质量标准等，应解释变更原因，对变更后的产品进行质量可比性研究，并评估变更对产品安全性或有效性的影响，相关研究结果应在递交新药临床试验申请时提供给药品审评部门。

2、临床研究的合规性和数据完整性

当申办者拟将干细胞备案临床研究结果用于支持药品注册申报时，备案临床研究的策划准备、实施过程、改进和监查记录，以及研究者对临床研究报告真实性、完整性、准确性和可溯源性的确认过程和记录，均应按照《药物临床试验必备文件保存指导原则》的要求进行保存，供药品注册申办者稽查或药品监督管理部门检查。

如果临床研究过程中存在违反我国《药物临床试验质量管理规范》、损害受试者利益等情况，或未按照《药物临床试验必备文件保存指导原则》等指导原则保存临床研究原始资料或文件，导致临床研究结果无法溯源，或申办者递交的备案临床研究报告缺乏临床研究的关键信息，如受试者筛选入组和基线情况、给药方法、安全性及有效性评价和随访结果、合并用药等，导致难以对备案研究结果进行评价时，干细胞备案临床研究结果不能作为干细胞相关产品注册申报的支持性证据。

（二）干细胞备案临床研究用于药品注册审评的评价结论

干细胞相关产品不同临床研究阶段的主要目的、观察指标和试验方法不同，探索性临床研究的研究目的是探索干细胞相关产品的安全性、耐受性以及后续临床试验的给药方案，为确证性临床研究的研究设计、给药方法、观察终点等提供基础。确证性临床研究的研究目的是确证干细胞相关产品的疗效和安全性，为支持注册提供获益/风险评价的基础，同时确定剂量与效应的关系。

当备案临床研究数据用于药品注册申报时，申办者需要基于备案临床研究结果，制定产品研发计划及相应的临床试验方案。药品审评部门将对备案研究的科学性、研究进展程度以及积累的安全性或有效性结果等进行分析，在此基础上判断申办者拟定的临床研发计划或临床试验方案是否科学合理。鼓励申办者与药品审评中心就备案临床研究结果，以及拟实施的临床研发计划或临床试验方案等进行沟通交流。

基于备案临床研究结果，药品审评部门的评价结论可能包括：

1、备案临床研究数据提示较高安全性风险，可能无法获准开展注册临床试验

如果备案临床研究中出现损害受试者健康和安全的严重不良事件，且申办者制定的风险控制措施不能确保及时识别和处置相应安全性风险，并保障受试者安全；或者非临床安全性研究提示重要安全性风险，且已有人体研究数据无法排除相关风险时，申办者可能有必要暂停临床试验，待查明安全性风险原因，完善相关研究并排除安全性风险后，再考虑继续开展临床试验。

2、备案临床研究能够提供初步安全性信息，可能需要扩展探索性临床试验以初步探索有效性，并进一步观察安全性。

如果备案临床研究对干细胞相关产品的安全性和耐受性进行了初步探索，研究结果可以提供安全剂量范围和/或给药间隔、体内活性和/或药代动力学、剂量效应关系等信息。在这种情况下，申办者可能在备案研究探索的剂量和给药频率范围内，选择特定的剂量和给药频率，在更大规模的受试者中进一步观察安全性，并初步探索干细胞产品的治疗作用，为明确后续临床试验的试验设计、受试人群、主要终点等提供依据。

3、备案临床研究结果初步提示干细胞相关产品在目标适应症中的有效性，且预期获益显著高于风险，可能需开展确证性试验以证明干细胞相关产品的临床价值。

如果备案临床研究对干细胞相关产品的安全性、体内活性和/或药代特性、剂量效应关系等积累了较充分的研究数据，研究结果初步提示干细胞在特定剂量和/或给药频率下治疗目标适应症的有效性，且预期获益可能显著高于风险。在这种情况下，申办者可能需要开展确证性试验，利用严谨的试验

设计和统计假设，选择合理的主要终点，以证明干细胞相关产品相对于现有治疗手段的临床优势，并提供关键的获益/风险评价依据。

4、备案临床研究结果足以满足干细胞相关产品在目标适应症中的获益风险评估要求，可能不需要重复或继续开展临床试验。

如果申办者通过探索性和确证性备案临床研究，对干细胞相关产品的安全性和耐受性进行了持续随访和长期观察；明确了干细胞相关产品的作用机制、体内活性和剂量效应关系，以及体内增殖、存活、分布和/或分化等生物学特性；并对干细胞相关产品的有效性进行了科学严谨的研究，临床安全性和有效性记录完整、评价指标科学合理，研究结果足以明确干细胞相关产品在目标适应症人群中的获益和风险，备案临床研究结果可能作为关键支持性证据用于药品注册审评，不需要重复或继续开展药物临床试验，以避免延缓患者获得有效的临床治疗，或者将更多患者暴露在无效治疗中。

鼓励申办者在递交申报资料前与药品审评部门进行沟通，就备案临床研究的科学性、研究结果的可靠性及临床研发计划和临床试验方案等进行交流，以提高干细胞相关产品的研究和申报效率。

参考文献

1. 人胚胎干细胞研究伦理指导原则，2003，科学技术部和卫生部
2. 人体细胞为基础的药物产品指南，2008，欧洲药品管理局
3. 安全性和有效性随访指南-前沿治疗药物的风险管理，2008，欧洲药品管理局
4. 临床试验数据监察委员会的操作规范和实践，2013，姚晨等
5. 干细胞临床研究管理办法（试行），2015，国家卫生计生委、国家食品药品监管总局
6. 细胞和基因治疗产品早期临床试验设计的考量，2015，美国食品药品监督管理局生物制品评估和研究中心
7. 药物临床试验数据管理与统计分析的计划和报告指导原则，2016，国家食品药品监管总局
8. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)，2017，国家食品药品监管总局
9. 干细胞通用要求，2017，中国细胞生物学学会干细胞生物学分会
10. 涉及人的临床研究伦理审查委员会建设指南，2019，国家卫生健康委医学伦理专家委员会办公室、中国医院协会
11. 药物临床试验质量管理规范，2020，国家食品药品监管总局、国家卫生健康委
12. 生物制品注册分类及申报资料要求，2020，国家药品监督管理局
13. 药物临床试验必备文件保存指导原则，2020，国家药品监督管理局

附件

医疗卫生机构开展研究者发起的 临床研究管理办法

(征求意见稿)

第一章 总 则

第一条（目的） 为规范临床研究管理，提高临床研究质量，促进临床研究健康发展，提升医疗卫生机构诊断治疗、预防控制疾病的能力，根据《基本医疗卫生与健康促进法》《科学技术进步法》《执业医师法》《药品管理法》《医疗机构管理条例》《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》等有关法律法规，制定本办法。

第二条（研究定义） 本办法所称研究者发起的临床研究（以下简称临床研究）是指医疗卫生机构（以下简称机构）开展的，以人个体或群体（包括医疗健康信息）为研究对象，非以药品医疗器械注册为目的的，研究疾病的诊断、治疗、康复、预后、病因、预防及健康维护等活动。

第三条（基本原则） 机构开展临床研究是为了探索医学科学规律、积累医学知识，不得以临床研究为名开展超范围的临床诊疗或群体性疾病预防控制活动。

临床研究过程中，机构及其研究者要充分尊重研究对象的知情权与自主选择权利。

第四条（研究资质） 机构及其研究者开展临床研究应当取得法律法规规定的资质，具备相应的能力和必要的资金保障。

第五条（机构责任） 机构是临床研究实施的责任主体，开展临床研究应当遵守有关法律法规、部门规章及有关规范性文件和技术准则、伦理规范的要求，制定切实有效的临床研究管理实施细则，建立健全保障科学、规范、有序开展临床研究的组织体系、质量体系、利益冲突防范机制和研究对象权益保护机制，加强对临床研究的核查和全过程管理。积极支持和组织开展临床研究学术交流和培训。

机构应当结合自身实际，合理判断临床研究的风险，结合研究类型、干预措施等对临床研究实行分类管理。

第六条（研究者责任） 临床研究的主要研究者对临床研究的科学性、伦理合规性负责，应当加强对其他研究者的培训和管理，对研究对象履行恰当的关注义务并在必要时给予妥善处置。

临床研究的主要研究者和其他研究者应当遵守科研诚信，不得捏造篡改数据，不得剽窃他人成果。根据有关法律法规、部门规章、有关规范性文件、技术准则、伦理规范及

机构制定的规章制度要求，加强对临床研究过程的自查，及时如实报告有关事项。

第七条（专业管理） 省级及以上卫生健康行政部门应当设立专家委员会或指定有关专业机构，全面掌握并定期梳理辖区内机构开展临床研究情况，通过专业学术指导、伦理审查监督、研究资金支持等方式，加强对临床研究的监督管理和统筹协调，支持和组织开展临床研究学术交流和培训，促进临床研究的质量提升和效能提高。

第八条（紧急状态） 在突发公共卫生事件应急响应期间，国家卫生健康委员会或其指定的国家专业机构，在科学论证的基础上，可以牵头组织全国范围内的临床研究。

机构自主开展的临床研究与上述研究发生冲突时，机构应优先保障完成上述研究，同时暂停机构自主开展的临床研究受试者新入组。

第二章 基本分类及原则性要求

第九条（基本分类） 根据研究者是否施加某种研究性干预措施，临床研究可以分为观察性研究和干预性研究。

第十条（观察性研究的一般要求） 开展观察性研究，不得对研究对象施加研究性干预措施，不得对研究对象采取随机化分组，不得使研究对象承担超出常规诊疗或疾病防控需要的额外健康（疾病）风险或经济负担。

研究对象因参加观察性研究接受超出常规诊疗或疾病防控需要的额外检查、检验、诊断等措施（以下简称额外的非研究性措施），可能造成的风险超出最小风险的，参照干预性研究管理。

第十一条（干预性研究的一般要求） 开展干预性研究，研究性干预措施应当符合医学的基本理论和伦理规范、具有扎实的前期研究基础、制定科学规范的研究方案和风险预案、通过科学性审查和伦理审查。机构和研究者应当对干预性研究可能出现的风险进行评估，具备与风险相适应的处置能力，妥善保护干预性研究的研究对象（以下简称受试者）的健康权益，不得向受试者收取与研究相关的费用和因研究增加的费用。

干预性研究一般由三级医疗机构、设区的市级及以上卫生机构牵头开展，其他医疗卫生机构可以参与干预性研究。研究性干预措施为临床干预措施的，主要研究者必须具备相应的“医师执业资格”或“护士执业资格”。

第十二条（以上市后产品为干预措施研究的特殊要求）

以上市后药品、器械等产品为研究性干预措施的临床研究，一般在产品批准的适用范围内或在符合诊疗规范的前提下开展。

当同时满足下列条件时，可以超出产品已批准的适用范围开展干预性研究。

（一）在临床研究管理体系完备的三级甲等医院开展。

（二） 针对严重危害人的生命健康且目前无确切有效干预措施的疾病，或者虽有确切有效的干预措施但不可获取。

（三） 有体外实验手段或动物模型的，体外实验或者动物实验研究结果应当支持开展临床研究；或者观察性研究结果提示确有必要开展干预性研究。

（四） 使用方法不超过现有说明书的用法用量，预期人体内药物浓度（或生物效应）可以达到有效浓度（或有效水平）；或使用方法虽超过现有说明书用法用量但有充分证据证明其安全性、耐受性良好，或具有明确的风险获益评估证据且具有良好风险控制措施。

第十三条（手术和操作、物理治疗、心理治疗、行为干预、临床诊疗方案、群体性健康措施、生物医学技术等为干预措施的研究） 以手术和操作、物理治疗、心理治疗、行为干预、临床诊疗方案、群体性健康措施、生物医学技术等为干预措施的临床研究，应当使用已经批准上市的药品、器械等产品并符合适用范围，在符合现有诊疗规范的前提下开展。

第十四条（生物医学技术研究） 技术指标已经得到充分验证的生物医学技术，在生物医学技术没有发生改进的情况下，不得针对相关技术指标开展重复性的临床研究。

第三章 组织管理

第十五条（管理体系） 开展临床研究的机构应当设有临床研究管理委员会、伦理（审查）委员会，并设立或者指定专门部门（以下称临床研究管理部门）负责临床研究管理。

机构应当为临床研究管理配备必要的管理人员和条件保障。

第十六条（临床研究管理委员会） 临床研究管理委员会由医疗卫生机构相关负责人、相关职能部门负责人和临床研究专家代表组成，负责医疗机构临床研究的决策、审核、管理和监督。

第十七条（管理部门） 临床研究管理部门在临床研究管理委员会指导下，负责临床研究的立项审查、过程管理、质量管理、合同管理、结题管理和档案管理等工作，并协调科学性审查和伦理审查。

第十八条（伦理（审查）委员会） 机构应当按照《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》要求，建立机构伦理（审查）委员会，健全工作制度，提供工作条件，保障伦理（审查）委员会独立开展伦理审查。

第四章 立项管理

第十九条（机构立项） 临床研究实行机构立项制度，未经机构批准立项的临床研究不得实施。

根据法律法规、规范性文件和国际惯例等要求，临床研究涉及行政审批、备案、登记、注册等事项的，在未按要求的完成上述事项之前，机构不得批准研究者启动实施临床研究。

第二十条（研究提出） 主要研究者应当制定临床研究方案，并按照要求向机构临床研究管理部门提交临床研究方案和相关资料，接受全程管理。

第二十一条（科学性审查） 机构应当制定临床研究科学性审查管理制度、细则和工作程序，组织开展科学性审查。

科学性审查的内容应当包括研究的合理性、必要性、可行性，以及研究目的、干预措施、研究假设、研究方法、样本量、研究终点、研究安全性等。

科学性审查的专家应覆盖临床研究所属专业领域和研究方法学（统计学或流行病学）领域。干预性研究的科学性审查程序一般包括机构外专家匿名评审环节。

第二十二条（伦理审查） 机构伦理（审查）委员会按照工作制度，对临床研究独立开展伦理审查，确保临床研究符合伦理规范。

第二十三条（立项审核） 临床研究管理部门应当对提交的材料进行审核。有以下情形之一的，不予立项：

- （一）不符合法律、法规、规章及规范性文件要求的；
- （二）未通过科学性审查和伦理审查的；
- （三）违背科研诚信规范的；

- （四）研究前期准备不足，临床研究时机尚不成熟的；
- （五）临床研究经费不足以完成临床研究的；
- （六）药品、器械等产品不符合使用规范的；
- （七）临床研究的安全风险超出实施机构和研究者可控范围的；
- （八）可能存在商业贿赂或其他不当利益关系的；
- （九）依据法律法规和国家有关规定应当禁止研究的其他情形。

研究者应当签署利益冲突声明并与研究方案等一并提交机构审查，在发表研究结果时应当如实披露。

第二十四条（合作研究） 机构受其他机构委托、资助开展临床研究或者参与多中心临床研究的，应当与委托、资助机构或多中心临床研究牵头机构签订临床研究协议，明确双方权利、义务及责任分担等。

牵头机构对临床研究负主体责任，参与机构对本机构参与的临床研究内容负责。

参与机构应当根据自身情况对多中心研究中是否采用牵头机构科学性审查、伦理审查意见进行规定。

第二十五条（临床研究登记） 在正式启动实施前 30 日，临床研究的有关信息应当通过医学研究登记备案信息系统（以下简称“系统”）完成登记。观察性研究向医疗机构的

执业登记机关登记，卫生机构向同级卫生健康行政部门登记。

干预性研究向省级卫生健康行政部门登记。

研究者应当如实、准确、完整填写临床研究信息，临床研究管理部门、伦理（审查）委员会等应当分别在系统填写并上传科学性审查、伦理审查和机构立项审核意见。

机构应当对临床研究信息的真实性、准确性、完整性等进行审核，并对相关内容负责，机构审核后完成登记。

在系统填写临床研究信息，应当使用规范汉字，涉及专业术语的应当符合学术规范。

登记完成的临床研究项目由系统统一编号。

第二十六条（多中心研究信息填写） 多中心研究由牵头机构的研究者在医学研究登记备案信息系统填写，牵头机构和参与机构的临床研究管理部门、伦理（审查）委员会根据要求在系统上确认或上传有关补充材料、提交审核意见，并分别对有关信息的真实性、准确性、完整性负责。

第二十七条（信息公开） 完成登记的临床研究有关信息，通过医学研究登记备案信息系统或国家卫生健康委员会指定的平台向社会公开，接受同行和社会监督。

第五章 财务管理

第二十八条（财务制度） 机构应当根据国家法律法规规定和文件要求，建立临床研究经费管理制度，对批准立项的临床研究经费纳入单位收支进行统一管理，专款专用。

机构内设科室、部门和个人不得私自收受临床研究项目经费及物品。

第二十九条（合规使用） 研究者应当严格执行本机构规章制度，按照临床研究经费预算，合理使用研究经费，不得擅自调整或挪作他用。

第六章 实施管理

第三十条（实施原则） 研究者应当严格按照批准的方案开展临床研究，稳慎、积极推动临床研究开展，如实记录临床研究过程和结果并妥善保存。

第三十一条（变更） 在研究过程中，研究者需要对已立项的临床研究项目进行变更的，应当向机构临床研究管理部门报告。

临床研究管理部门应当按照科学性审查和伦理审查制度组织评估，对涉及研究目的、研究方法、统计方法以及研究对象等实质修改的，应当重新进行科学性和伦理审查。

对需要重新审查的，应当及时启动审查。

第三十二条（暂停或终止） 研究者可以申请暂停或终止临床研究。

申请暂停或终止临床研究的，应当向临床研究管理部门报告并说明原因。暂停或终止的干预性临床研究，已经有受试者入组的，机构及研究者应当制定方案，妥善保障已经入组受试者的权益。

第三十三条（过程监管） 机构应当对临床研究实施全过程监管，定期组织开展核查。主要研究者应当对负责的临床研究定期自查，确保临床研究的顺利进行。

第三十四条（安全性监管） 机构应当加强临床研究的安全性评价，制定并落实不良事件记录、报告和处理相关的规章制度和规范标准，根据不良事件的性质和严重程度及时作出继续、暂停或者终止已经批准的临床研究的决定。

第三十五条（争议处理） 机构应当建立受试者争议和投诉的处理机制，科学判定损害产生的原因，合理划分责任。

对研究性干预措施、额外的非研究性措施造成的非预期损害，应当对受试者或研究对象给予适当的补偿或赔偿；对研究性干预措施、额外的非研究性措施造成的预期损害，应当按照约定对受试者或者研究对象给予补偿或赔偿；对其他原因造成的损害，按照有关管理规定处理。

机构应当建立受试者和研究对象损害风险预防、控制及财务保障机制。

第三十六条（叫停机制） 临床研究过程中出现如下情形之一的，机构应当暂停或者终止研究，并及时报告临床研究登记的卫生健康行政部门。

- （一）存在违反法律法规、规章的行为；
- （二）存在违背伦理原则或科研诚信原则的行为；

(三) 研究过程中发现相关药品、器械可能存在严重质量缺陷；

(四) 发现临床研究存在严重安全风险；

(五) 存在商业贿赂或其他不当利益关系；

(六) 违规使用研究经费的行为；

(七) 其他应当停止研究的情形。

第三十七条（数据管理） 机构应当建立临床研究源数据的管理体系，实现集中统一存储，保障临床研究数据在收集、记录、修改、处理和保存过程中的真实性、完整性、规范性、保密性，确保数据可查询、可溯源。

第三十八条（档案管理） 机构应当加强临床研究档案管理，如实记录并妥善保管相关文书档案。自研究结束之日起，档案保存年限不低于 10 年。在确保安全的前提下，可以实行电子归档。

第三十九条（及时更新） 临床研究发生启动、方案调整、暂停、终止、完成等情形时，机构和研究者应当在医学研究登记备案信息系统及时更新临床研究信息。

第四十条（结项报告） 临床研究实行结项报告制度。临床研究终止或完成时，研究者应当及时分析研究结果，形成全面、客观、准确的研究报告。

临床研究管理部门应当组织对研究报告进行评审，并对该临床研究结项。

结项后的研究报告应当在医学研究登记备案信息系统上传，并向同行公开，加强学术交流。

第七章 监督管理

第四十一条（行政监督） 各级卫生健康行政部门应当依托医学研究登记备案信息系统加强对在本机关登记的临床研究的监测、评估、分析，并实施监督检查。发现机构违反本办法规定的，应当责令其立即改正，停止违规开展的研究、妥善保护受试者权益；发现机构临床研究管理体系及临床研究过程管理存在系统性、结构性问题的，应当责令机构暂停研究，进行整改；并按照相关法律法规给予行政处罚及处分。有关监督检查情况，应当定期通报。

第四十二条（技术监督） 省级及以上卫生健康行政部门设立的专家委员会或其指定的专业机构，应当依托医学研究登记备案信息系统对辖区内机构开展的临床研究进行技术核查，对科学性不强、伦理合规性不高、研究过程管理不规范以及违反本办法有关规定的，应当及时建议其所在机构停止相关研究、妥善保护有关受试者的合法权益；发现机构临床研究技术管理体系及临床研究技术管理存在系统性、结构性问题的，应当建议机构暂停研究，进行整改。

有关技术核查情况，应向有关卫生健康行政部门反馈并提出处理建议，定期向辖区医疗卫生机构通报。

第四十三条（机构监督） 机构应当加强本机构开展临床研究情况的监督检查，发现研究者擅自开展临床研究、调整已经批准的研究方案或者收受临床研究经费等的，应当按照有关规定处理。

第四十四条（违规开展） 未经机构批准，研究者擅自开展临床研究、调整已批准研究方案或者收受临床研究项目经费的，相关卫生健康行政部门和机构应当按照相关规定予以相应处理；机构未履行监督管理职责的，由相关卫生健康行政部门依法处理；构成犯罪的，移交司法机关依法处理。

第八章 附 则

第四十五条 干细胞临床研究按照《干细胞临床研究管理办法（试行）》管理，体细胞临床研究参照《干细胞临床研究管理办法（试行）》管理。

第四十六条 本办法自发布之日起施行，《医疗卫生机构开展临床研究项目管理办法》（国卫医发〔2014〕80号）同时废止。但在本办法实施前机构已经开展尚未完成的临床研究，医疗卫生机构应当自本办法实施之日起3个月内按照原要求完成立项、备案等手续。

第四十七条 中医临床研究的管理办法，由国家中医药局会同国家卫生健康委另行制定。

免疫细胞治疗产品临床试验技术指导原则

（试行）

国家药品监督管理局药品审评中心

2021 年 2 月

目 录

一、概述	1
(一) 前言	1
(二) 目的和适用范围	2
(三) 免疫细胞治疗产品的特性	3
二、临床试验设计	5
(一) 一般考虑	5
1、受试人群	5
2、受试者保护和临床安全性	8
3、个体化治疗产品的特殊考虑	11
(二) 探索性临床试验	13
1、探索性试验的目的	13
2、剂量探索和剂量递增	14
3、对照设计	16
4、给药间隔	17
5、药代动力学 (PK) 和药效学 (PD) 研究	17
(三) 确证性临床试验	19
1、对照和设盲	19
2、疗效和安全性	20
三、临床试验结束后研究	22
(一) 临床试验受试者的长期随访	22
(二) 上市后研究或监测	24
参考文献	24

一、概述

(一) 前言

2017 年，原国家食品药品监督管理总局发布《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》，对细胞治疗产品按照药品管理相关法规进行研发时的技术要求进行了总体阐述。该指导原则发布以来，我国细胞治疗产品的研发和注册申报数量明显增加，特别是免疫细胞治疗产品。

免疫细胞治疗是利用患者自身或供者来源的免疫细胞，经过体外培养扩增、活化或基因修饰、基因编辑等操作，再回输到患者体内，激发或增强机体的免疫功能，从而达到控制疾病的治疗方法，包括过继性细胞治疗 (adoptive cellular therapy, ACT)，治疗性疫苗等。根据作用机制的不同，目前的细胞免疫治疗研究类型主要包括：肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)、嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor modified T cells, CAR-T) 以及工程化 T 细胞受体修饰的 T 细胞 (T-cell receptor-engineered T cells, TCR-T) 等，此外，还存在基于自然杀伤细胞 (natural killer cells, NK) 或树突状细胞 (dendritic cells, DC) 等其它免疫细胞的治疗方法，如细胞因子诱导的杀伤细胞 (cytokine-induced killer cells, CIK)

等。

当免疫细胞治疗产品进入临床试验时，应遵循《药物临床试验质量管理规范》（GCP）、国际人用药品注册技术协调会（ICH）E6等一般性原则要求。同时，免疫细胞治疗产品的细胞来源、类型、体外操作等方面异质性较大，治疗原理和体内作用等相较传统药物更加复杂。为了获得预期治疗效果，免疫细胞治疗产品可能需要通过特定的操作措施、给药方法或联合治疗策略来进行给药。严谨科学的临床试验对保障受试者安全、产生可靠的临床试验数据至关重要，鉴于免疫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。因此，在上述指导原则的框架下，有必要进一步细化免疫细胞治疗产品开展临床试验的技术建议，以便为药品研发注册申请人（以下简称申请人）及开展药物临床试验的研究者（以下简称研究者）提供更具针对性的建议和指南。

（二）目的和适用范围

本指导原则适用于以在国内注册上市为目的，按照《药品管理法》、《药品注册管理办法》等药品管理相关法规进行研发和注册申报的免疫细胞治疗产品，旨在为该类产品开展临床试验的总体规划、试验方案设计、试验实施和数据分析等方面提供必要的技术指导，以最大程度地保障受试者参加临床试验的安全和合法权益，并规范

对免疫细胞治疗产品的安全性和有效性的评价方法。

对于经过基因修饰或编辑的免疫细胞治疗产品如 CAR-T 和 TCR-T 等，还兼具基因治疗产品的特性。本指导原则的目的不是对其监管属性或分类进行认定，而是基于现有认识，对免疫细胞治疗产品开展临床试验时若干技术问题的建议和推荐，内容不具有强制性，随着研究和认识的深入，本指导原则内容将继续修订和完善。鼓励申请人适时与药品审评中心就具体试验方案的设计、实施及结果等进行沟通。

（三）免疫细胞治疗产品的特性

免疫细胞治疗产品的特征与传统药品有显著区别，例如：

- 起始原材料来源多样（如自体来源、同种异体来源等）；采集（如血细胞单采、从肿瘤组织中分离肿瘤浸润淋巴细胞（TILs）等）和制备工艺复杂（如细胞筛选和纯化、抗原孵育、体外活化、基因修饰或编辑等）；制备失败或延迟可能导致受试者无法按计划接受治疗；运输和储存条件要求高；自体来源的产品高度个体化，制备规模有限、质量研究和质量控制难度较大；往往需要伴随用药（如淋巴细胞清除等预处理）等。

- 临床前动物实验数据外推存在局限性并受多种因素影响，如选择的动物模型、给药途径、起始剂量、生物分布、免疫应答、脱靶效应以及致瘤性等；
- 不良反应的发生率、持续时间和严重性、细胞在人体内增殖存活和免疫原性的不确定性；
- 复制型病毒（replication competent lentivirus/retrovirus, RCL/RCR）、遗传毒性、致瘤性的不确定性；
- 基于免疫细胞在体内可能长期存活和持续作用，需要长期的疗效和安全性随访；

不同类型免疫细胞治疗产品制备工艺的复杂程度、体内生物学特性存在显著差异，在临床应用中的安全性风险也有明显不同。非同源性异体使用、外源基因片段的导入、体外诱导/扩增、全身性作用等因素均可能影响细胞回输后的生物学特性。较复杂的体外操作、培养过程使用多种外源因子或试剂等均可能增加细胞质量控制的难度，进而增加临床应用的安全性风险。例如，CIK的制备工艺和外源性干预相对简单，耐受性总体良好。相比之下，CAR-T细胞体外操作的复杂性远高于DC-CIK，在明显增强T细胞体内杀伤作用的同时，细胞因子释放综合征（cytokine release syndrome, CRS）、免疫效应细胞相关神经毒性综合征（Immune Effector Cell-associated

Neurotoxicity Syndrome, ICANS) 和 / 或噬血细胞综合征 (hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH) 等严重不良反应的发生风险也相应增加。

免疫细胞治疗产品的作用方式与其他类型药品有明显差异，因此，设计临床试验时需考虑这类产品的特点，并结合既往临床经验和国内外临床研究进展，及时完善试验设计和风险控制方案。

二、临床试验设计

(一) 一般考虑

1、受试人群

选择临床试验的受试人群应充分考虑预期获益和潜在风险，在不同的临床研究阶段，应利用可获得的研究证据分析受试者的获益-风险预期。在免疫细胞治疗产品的早期临床试验中，可依据作用机制、临床前研究数据及既往人体研究和应用经验等估计潜在获益和风险，临床前研究选择的动物模型应可以向人体进行可借鉴的、可预测的外推。

(1) 健康志愿者

免疫细胞治疗产品在体内的存活和作用持续时间较长，除存在短期安全性风险外，长期安全性风险尚不明确，且细胞采集和产品给药往往需要有创操作，可能增加受试者的安全性风险，因此，免疫

细胞治疗产品的临床试验通常不考虑在健康志愿者中进行。

（2）疾病分期或严重程度

选择免疫细胞治疗产品临床试验的受试人群时，疾病分期或严重程度是最重要的考虑要素之一。考虑到疾病严重程度更重或更晚期的受试者对免疫细胞治疗风险的接受度更高，或者其病情更能支持承担风险的合理性。因此，申请人经常将早期试验的入组受试者限制在疾病严重程度更重或分期更晚的受试者中。但在某些情况下，选择疾病分期较早或严重程度更轻的受试者可能更适当。例如，当出现疗效的时间与细胞输注时间之间的间隔较长时，选择晚期或病情严重的受试者可能不利于有效性的观察，在不显著增加受试者的安全性风险的情况下，申请人可能考虑在较早期或病情更轻的受试者中进行临床试验。

对于自体来源的免疫细胞治疗产品，病情进展迅速的晚期或病情严重的受试者可能无法采集到合格的制备原材料、或无法制备出符合标准的细胞产品、或无法等待免疫细胞治疗产品的制备时间（通常需要数周），或无法耐受制备或给药所需进行的有创操作（如血细胞单采）或合并用药（如淋巴细胞清除）。因此，在决定临床试验中研究的疾病严重程度之前，必须先考虑对受试者所造成风险的预期性质和严重程度，以及这些风险在不同分期或严重程度疾病中的影响。

此外，在选择研究人群时，还应考虑试验结果的可评价性。病情

复杂的受试者可能存在干扰结果分析的不良事件，或正在接受基础疾病相关的伴随治疗，这可能导致安全性或有效性数据难以解读。如果最终目标人群是病情较轻的患者，在患有重度或晚期疾病的受试者中进行试验时，可能无法获得足以满足获益-风险评价所需的安全性及有效性信息。

因此，在免疫细胞治疗产品的临床试验中，选择纳入特定疾病研究的适当受试者时，应结合产品作用特点、疾病严重性和病情进展、未满足的临床需求和现有治疗选择等多个因素综合考虑。

（3）儿童及青少年受试者

对于纳入儿童及青少年受试者的临床试验，在开展试验前，应获得同一试验产品来自成人受试者的安全性和耐受性数据。如果申请人拟在无成人安全性或疗效研究的情况下进行儿童试验，应提供不首先开展成人研究的依据。

（4）其他考虑

对于某些特定产品类型，在选择受试者人群时还存在其他方面的考虑。例如，对于治疗性癌症疫苗，可能须识别相应靶抗原的表达。对于经过基因修饰的免疫细胞治疗产品，对载体或外源基因表达产物的既存抗体可能影响产品的安全性或有效性；因此，早期临床试验中应对存在这类抗体的受试者的安全性和有效性进行分析，为后期临床试验受试者的选择提供参考。

对于安全性风险较高的免疫细胞治疗产品，一般不考虑纳入孕

妇或准备妊娠的育龄期受试者（包括其伴侣准备妊娠的男性受试者）。受试者在临床试验期间应采取必要的避孕措施，并且有生育潜能的受试者在研究过程中需要采取高效避孕措施。此外，某些特定免疫细胞治疗产品的表面标志物可能与受试者体内的异常组织或细胞具有一定程度的相似性和交叉性（例如，正常 T 细胞与起源于胸腺或具有 T 细胞表面标志物的恶性肿瘤细胞），如果采集外周血细胞时混有异常细胞，且制备过程无法完全分离，则可能影响产品的安全性和有效性，因此，在该类临床试验中，应考虑排除外周血或骨髓高度受累的受试者。

2、受试者保护和临床安全性

（1）受试者筛查

部分免疫细胞治疗产品的临床试验存在的风险显著、且获益不确定。因此，这类产品的临床试验往往仅入组对现有治疗手段缺乏应答或没有其他治疗方法可供选择的受试者。对于这类临床试验的设计，应制定相应操作程序，确保每例受试者在筛查时经过充分评估，并符合临床试验的入组标准，试验设计中应包括这些评估措施的具体信息。如果免疫细胞治疗产品的制备及给药程序需要血细胞单采、淋巴细胞清除预处理或人组织相容性抗原（HLA）配型等程序，试验方案中还应明确受试者在单采前、预处理前和细胞治疗产品回输前的安全性标准和评估程序，以降低受试者参加临床试验的风险。

在某些免疫细胞治疗产品的临床试验中，受试者入组时可能正在接受针对适应症或其他疾病的治疗。如果受试者在临床试验期间需要暂停现有治疗、或改变现有治疗药物的剂量或给药频率，申请人应谨慎评估暂停或改变现有治疗可能导致受试者病情进展的风险，以及试验产品预期产生的临床获益。只有预期临床获益显著高于暂停或改变现有治疗的疾病进展风险时，才考虑采用该试验方法，同时有必要制定详细的补救治疗方案，避免延误或加重受试者的病情。

（2）不良反应处理

免疫细胞治疗产品的临床安全性受细胞类型、作用活性、靶抗原选择、是否经过基因修饰等多重因素影响，不良反应的发生时间和严重性也与细胞在体内的存活、增殖和分布等特征密切相关。在临床试验方案中需根据产品特点，针对临床试验中可能出现的安全性风险，制定全面、可操作的风险控制方案，对具体风险的预防、监测、识别、诊断、处理和预后随访等进行详细描述。

细胞免疫疗法正处于快速发展期，对于其安全性风险的认识和处置能力也在不断完善，建议申请人及时参考国内外最新的临床共识或重要研究，以及时更新完善其风险控制措施，提高试验方案的科学性和合理性。例如，国内外研究者对 CAR-T 细胞治疗相关的常见不良反应，如 CRS、ICANS、或 HLH 等积累了较丰富的临床经验，其分级和处置方法也在国内外研究者中达成很多共识，对于有效控

制临床试验中的安全性风险有重要的借鉴价值。

（3）研究者培训和程序记录

有些细胞免疫治疗有较高的安全性风险，研究者的临床经验和技能水平对及时发现和处理不良事件起关键作用，并可能需要重症监护等相关科室的配合支持。对于涉及复杂给药程序或需经特殊培训的递送方式，如瘤内或局部给药，操作人员的技能水平也可能影响产品的安全性和疗效。

当研究者和操作人员的临床经验和技能可能影响产品的安全性和有效性时，申请人应对研究者和操作人员培训、研究或熟练度水平规定最低要求。某些情况下（例如多中心临床试验），对操作人员进行特定给药及治疗程序的培训可能降低给药或治疗过程的变异，有助于研究结果的解读。详细的书面标准操作规程（SOP）也可能有助于确保产品给药的安全性和一致性。仔细记录给药过程和后续观察有助于识别研究者和操作人员对方案的依从性，还有助于分析操作或治疗差异与临床结局之间的相关性，并识别可能的操作或治疗优化。

（4）试验停止规则

由于免疫细胞治疗产品临床试验中的不良反应发生率或严重程度存在很大的不确定性，这些产品的试验方案应包括试验停止规则，以控制面临风险的受试者人数及单个受试者面临的风险程度。试验停止规则通常规定事件（如受试者在研究期间出现可检出的有复制

能力的慢病毒（RCL）、严重不良事件或死亡）的严重性或发生频率，达到后将暂停入组和给药，直至情况得到评估。基于评估结果，可能需要修订临床研究方案以降低受试者的安全风险。修订内容可能包括入组标准的变化（例如排除出现特定不良事件风险较高的受试者），或者剂量降低、产品制备或给药方式的调整、或监测方案的改进等。在研究方案进行调整改进以后，可能能够在确保安全性的前提下恢复试验。

因此，试验停止规则不一定终止试验。合理设计的停止规则允许申请人和研究者评估和解决在试验过程中识别的风险，确保受试者风险维持在合理水平。建议申办方建立数据监察委员会，在方案中规定数据监察委员会审核数据的时间点，并做出暂停、停止或继续研究的建议。

3、个体化治疗产品的特殊考虑

很多免疫细胞治疗产品制备过程高度个体化，需要为每例受试者单独制备，制备过程可能需要数周或更长时间。受试者在首次采集组织或细胞时符合研究入组标准，但在计划的给药时间可能不再符合这些标准。例如，受试者的病情可能在产品制备期间恶化，导致无法耐受试验程序或预计存活时间不超过研究持续时间。入组标准中应考虑这类因素，降低受试者无法按计划接受细胞回输的可能性，并制定受试者接受产品输注需满足的条件。

如果产品制备出现问题，可能导致受试者失去治疗机会。临床试验过程中出现制备失败时，深入分析失败原因及导致失败的受试者因素非常重要，这些分析可能有助于改善后续试验的受试者筛选标准，降低制备失败概率。应针对制备失败制定补救治疗方案，改进后续临床试验设计。为了降低制备问题对受试者造成的影响，在确定免疫细胞治疗产品可用之前，不对受试者进行高风险的回输前处理（例如淋巴细胞清除预处理）。

研究方案还应明确规定，对于制备失败无法按计划给药的受试者，是否再次尝试制备和治疗，以及是否将增加入组，以替换未接受治疗的受试者，以满足方案预设的接受规定剂量治疗的患者数量。不能按计划治疗是临床试验可行性评估的一部分，也可能是一个重要的试验终点，应制定计划统计未能治疗的受试者比例，分析未能进行产品给药的原因，并评估未能给药对受试者造成的后果。

很多免疫细胞治疗产品的制备环节和给药过程需要专门的设备和操作程序，产品的保存、转运和使用过程也与其他药物有显著差别，需要在临床试验过程中持续评估各制备和给药程序的可行性，发现产品供应和保障程序中存在的问题。如果临床试验过程中出现制备放行或运输等环节出现问题导致的不良事件，申请人应及时停止临床试验，完善或改进制备、质检、运输以及回输前检验等操作程序，在改进措施未得到充分验证前，不应恢复开展临床试验，以保障受试者参加临床试验的安全性。

(二) 探索性临床试验

1、探索性试验的目的

(1) 安全性和耐受性

早期探索性试验，尤其是首次人体试验，主要目的是安全性和耐受性。安全性评估包括对潜在不良反应性质和发生率的评估及其与剂量之间关系的估计。免疫细胞治疗产品的探索性试验设计，通常还会考虑不同于其他药品的临床安全性问题（短期安全性如 CRS、ICANS，长期或迟发性不良反应，外源基因随机整合到细胞基因组形成插入突变，导致成瘤性和恶性转化等）。

最大耐受剂量（maximum tolerance dose, MTD）通常通过剂量递增设计实现。细胞治疗产品可接受的毒性或不良反应的严重程度，会基于疾病的严重性和获益风险预期进行判断，申请人应在研究方案中明确探索方法。

对于免疫细胞治疗产品，可以通过剂量探索确定其生物学活性范围或最佳有效剂量，如果在较低剂量水平可以观察到稳定的生物学活性或临床获益，申请人可能不必要确定 MTD。此外，很多免疫细胞治疗产品受制备及运输等实际情况的限制，仅能达到特定的暴露量范围，临床试验中可能只能观察部分剂量水平的安全性特征，而无法确定 MTD。但须认识到，早期研究往往难以准确估计产品的有效推荐剂量，申请人需仔细评估早期研究未能确定 MTD 对后续试验的

影响。原则上确证性临床试验剂量不应超出探索性研究的剂量范围。

如果免疫细胞治疗产品拟与其他药物或治疗方法联合治疗，有必要通过探索性试验观察联合治疗的安全和耐受性，以及其他药物或治疗方法对免疫细胞治疗产品体内活性、增殖或存活、给药频率等的影响。

（2）体内活性评估

探索性试验的一个常见次要目的是对产品活性进行初步评估，例如，细胞在体内的增殖存活和生物分布（如药代动力学）、药效学活性（如产品回输后的细胞因子水平）、免疫原性、有效性如肿瘤缓解或其他类型的临床改善等，用以改善后续临床研究计划。

2、剂量探索和剂量递增

（1）起始剂量的估算

首次人体试验的起始剂量，通常基于非临床安全性研究结果。与小分子或生物大分子药物相比，免疫细胞治疗产品的非临床研究受到多种因素影响，例如动物模型的选择、免疫应答的种属差异等，对人体安全起始剂量的预测可能不如其他药物精确。如果有可用的动物实验或体外数据，可能有助于判断起始细胞剂量的风险水平。

如果有同靶点同机制的同类或相关产品的既往临床经验（即使采用不同给药途径或不同适应症），也有助于临床起始剂量的选择。

（2）免疫细胞治疗产品的剂量描述

很多免疫细胞治疗产品的细胞组成并非均一，往往包含多种类型的细胞，起主要治疗作用的可能是其中一种细胞类型，但不良反应可能受同一产品中其它类型细胞的影响。在描述免疫细胞治疗产品的剂量时，需要考虑产品的特定属性，例如细胞类型和来源（自体与同种异体来源等）、转导效率、单个细胞的载体平均拷贝数和细胞活力、效价和生物学活性等。

在尚无法明确不同细胞亚群对活性作用或不良反应的影响时，明确终产品中的细胞亚群和所占比例，并比较不同细胞亚群对临床结局的影响，可能有助于识别与产品安全性和有效性最相关的细胞亚群。当产品预期的活性成分可以明确时，申请人往往选择最能代表预期活性的特定细胞亚群来描述产品剂量，例如，很多导入外源基因的免疫细胞治疗产品中的载体阳性细胞数。在这种情况下，申请人还应描述载体阳性细胞数与其它细胞成分的比例，并分析转导效率对患者安全性及有效性的影响。

（3）剂量递增

在恶性肿瘤患者中开展早期探索性临床试验时，申请人经常选择 3+3、改良毒性概率区间（mTPI）和贝叶斯最优区间（BOIN）等设计。对于首次开展人体临床研究的免疫细胞治疗产品，在选择剂量探索试验每个剂量组的样本量以及组间剂量增幅时，还应考虑非临床研究及类似产品的临床经验中剂量变化对受试者安全性和有效性

的影响。在开展除恶性肿瘤外其他适应症的临床研究时，每一剂量水平的受试者数量还应考虑不同适应症人群对风险的可接受程度，或者安全性的评价要求，可能需要通过更大的样本量提供更充分的安全性信息。此外，其他研究目的，如耐受性、制备可行性和药理学活性评估，也可能影响样本量或剂量增幅的选择。

免疫细胞治疗产品可能在受试者体内长期存活，在对产品毒性和活性持续时间有初步了解之前，可能较难预测重复给药的风险。因此，很多首次用于人体的免疫细胞治疗产品采用单次给药方案。但是，对于某些产品如治疗性细胞疫苗，当已有研究证据提示安全性风险较低且多次给药可能增加活性时，在早期试验中有可能采用多次给药的方式。

3、对照设计

早期探索性临床试验以观察安全性为主，对照设计的重要性不如确证性试验，但如果合并用药可能影响本品的不良反应观察，或者在早期探索性研究中初步观察产品活性，申请人可能有必要设置对照。当临床上对疾病进程的认识尚不充分，或入组受试者的疾病严重程度差异很大时，设置平行对照组对于评价试验产品的安全性或活性更加重要。

如果需要设置对照，对照品的选择可能考虑研究目的、疾病的进展程度和严重性、治疗选择等多重因素，例如，早期探索性研究采

用安慰剂或标准治疗对照可能有助于评价试验产品的安全性。

4、给药间隔

对于首次在人体中开展临床试验 (first in human, FIH) 的免疫细胞治疗产品, 采用受试者间隔给药的方式, 可以避免多个受试者同时暴露而出现预期外的安全性风险。在 FIH 试验中, 对首例患者应加强不良事件监测, 还要考虑迟发性不良事件。向同一剂量组内下一例受试者或下一个剂量组受试者给药前, 应规定一定的随访间隔, 以观察急性和亚急性不良事件。间隔期的选择一般基于非临床研究中急性或亚急性毒性的发生情况, 细胞在体内的活性持续时间和/或既往类似产品在人体中的应用经验。

5、药代动力学 (PK) 和药效学 (PD) 研究

免疫细胞治疗产品的药代动力学特点与传统的小分子或生物大分子药物有明显差异, 可能无法进行吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 等传统药代动力学评估。由于检测技术的快速发展, 申请人应利用科学合理的药代动力学评估方法, 监测细胞活力、增殖/分化 (例如细胞表型和功能性标记物)、持续存在 (例如血药浓度-时间曲线下面积)、致瘤性、免疫原性、体内分布、异位灶、组织嗜性/迁移以及细胞/产品预期存活期内的功能 (或其替代指标) 等特性。如果一种方法不能完全反映细胞在体内的 PK 特性, 建议申请人采用多种方法

监测细胞在体内的增殖和存活情况，例如，对于经过基因修饰的免疫细胞治疗产品如 CAR-T, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 和流式细胞术 (Flowcytometry) 进行 PK 分析，分别通过测定外源基因拷贝和 CAR+细胞数量的变化，有助于互相验证检测方法的可靠性，可以更全面的分析产品在体内的扩增和存活情况。

对于大多数免疫细胞治疗产品，可以通过细胞和/或体液免疫应答分析药效学活性。有多个特异性靶点的治疗产品，应分析其对每个靶点的作用活性。如果细胞经体外基因修饰，在体内分泌特定蛋白、多肽或其它活性成分，或敲除了特定基因的表达，也需要进行针对性的药效学分析，如检测特定蛋白的活性、持续时间和变化情况等等。

申请人可以基于总体临床研究规划考虑早期探索性研究的设计，在早期研究中纳入有助于未来产品研发的设计要素，例如，在 I 期临床试验中设置有效性或体内药效学观察指标，以收集有效性的初步证据。申请人有时会考虑将早期研究设计为 I 期和 II 期合并进行的 I/II 期试验，在剂量递增和推荐剂量明确后，进入扩展期，以推荐的剂量水平继续入组额外的患者，进一步观察免疫细胞治疗产品的疗效。如果采用该类设计，在试验方案中应明确从剂量递增阶段转到扩展阶段的原则和方法。

(三) 确证性临床试验

与其它药物一样，免疫细胞治疗产品的确证性研究（或关键研究）的目的是确认探索性研究中初步提示的疗效和安全性，为注册提供关键的获益/风险评估证据。确证性研究的目标人群、主要和次要终点的选择、研究持续时间、样本量估计和统计学设计等应符合具体治疗领域的一般指南要求。

1、对照和设盲

良好的随机对照试验（randomized controlled trial, RCT）是确证性研究中优先推荐的设计方法，该研究方法可以消除受试者的基线差异、减少偏倚，有利于客观评价试验产品的治疗效果。对于某些适应症，可能缺少合适的对照药物，或伦理上不宜采用安慰剂作为对照药，可考虑与最佳支持性护理或治疗进行对照。

如果 RCT 设计不可行，申请人可能在确证性临床试验中采用单臂试验（single arm trial, SAT）。在这种情况下，申请人应解释无法开展 RCT 试验的理由并提供相应研究证据，并有必要利用回顾性数据、前瞻性真实世界研究、荟萃分析或流行病学调查等数据及探索性研究结果，对受试人群、主要终点和预期临床疗效等研究要素进行合理说明。

RCT 确证性试验应在可行的情况下尽量保持盲法。对于很多免疫

细胞治疗产品，由于研究者或医务人员参与细胞的采集并配合操作给药过程，可能难以对研究者设盲，这种情况下有必要采用其它方法降低试验的偏倚，例如对受试者设盲。如果盲法不可行，如 SAT，应设立不受研究者影响的独立审评委员会（independent review committee, IRC），对临床终点进行判读并作为主要终点的判定标准，或对研究者评估的结果进行敏感性分析。

2、疗效和安全性

在确证性临床试验中，针对适应症或目标人群选择合理的临床疗效终点是临床评价的基础，支持药物批准的临床试验终点通常应当是直接反映临床获益的指标，疗效指标的评价标准须与适应症相关的诊疗指南或临床共识保持一致。基于免疫细胞治疗产品的作用特点，可能考虑采用包含临床症状改善或生活质量提高的复合终点，或增加免疫相关的临床疗效评估方法，如实体肿瘤的缓解评估通常采用世界卫生组织（WHO）标准或实体瘤疗效评价标准（response evaluation criteria in solid tumors, RECIST），随着对免疫疗法作用特点的了解，免疫细胞治疗产品的临床试验中可能增加免疫治疗疗效评价标准（如实体瘤免疫疗效评价标准，immune response evaluation criteria in solid tumors, iRECIST）。任何未经验证的终点或替代终点应首先在探索性研究中获得验证，然后才能用于确证性临床试验。对于免疫细胞治疗产品，免疫反应相

关的指标可能有助于准确评估临床疗效，如特异性细胞或体液免疫应答、活性分析等，但免疫功能评价通常不作为支持上市的主要依据。

免疫细胞治疗产品可以在体内存活较长时间，并产生长期疗效。由于细胞来源和制备等因素的限制，很多产品的治疗次数有限。因此，确证性试验的临床终点还应关注疗效的持续时间。例如，在 CAR-T 治疗淋巴组织和造血系统恶性肿瘤的临床试验中，相对于最佳缓解率，在第三个月时的持续缓解率更能反应患者的长期获益。建议长期随访以获得缓解持续时间（DOR）、无进展生存时间（PFS）、总生存时间（OS）等反映该产品有效性持续时间的指标，以更好的了解产品特征和长期获益。

在确证性临床研究阶段应继续监测安全性风险，分析重要的已知和潜在的风险信息，包括迟发性不良事件（如致瘤性）的发生率、严重性和危险因素等，并有必要采取措施使风险最小化。安全性分析集应能够评价免疫细胞治疗产品的主要安全性风险。

如果临床试验过程中出现药学重大变更，应在确证性试验开始之前完成这些变更，并从临床角度评价药学变更对产品疗效和安全性的影响。

三、临床试验结束后研究

（一）临床试验受试者的长期随访

由于免疫细胞治疗产品的长期存活及持久性作用，申请人应对临床试验期间接受治疗的所有受试者进行适当的长期随访，关注受试者生存、新发或继发癌症、感染、免疫功能变化及迟发性不良反应等安全性风险，以及非临床或临床数据提示需要关注的潜在风险，并观察产品在体内的持续存在时间、转基因表达时间（如有）、是否有致瘤性、免疫原性等。随访时间主要取决于免疫细胞治疗产品的风险水平、体内的存活和作用时间、疾病进程的认识等，应足以观察到可能由于产品特性、暴露性质等导致的受试者风险，并不应短于迟发不良事件的预期发生时间。

免疫细胞治疗产品的风险水平与多种因素有关，如细胞来源和类型、体内活性和存活时间、是否有外源基因表达、基因表达使用的载体类型以及是否存在基因组整合等。针对不同风险水平的免疫细胞治疗产品，随访持续时间的建议如下：

- 对于没有外源基因表达、且体外操作不改变细胞存活时间及分化潜能的免疫细胞治疗产品，长期随访的持续时间不应短于细胞在体内的自然存活时间，建议对受试者进行1年或以上的随访。

- 对于有外源基因表达、但不存在基因整合或基因重组风险，或载体的基因整合或重组风险较低的免疫细胞治疗产品，建议对受试者进行不少于 5 年的随访。
- 对于有外源基因表达、而且表达载体存在基因整合或有基因重组风险的免疫细胞治疗产品，建议对受试者观察不少于 15 年。

上述建议是基于现有科学认识，随着临床研究和应用数据的积累，以及对免疫细胞治疗产品了解的深入，可能会对随访时间的建议进行调整。

根据临床试验的研究计划和持续时间，长期随访可能作为临床试验的一部分，或者设计为一项单独研究，如果对长期监测有一个单独的研究方案，在受试者参加临床试验前，除获得受试者对干预性临床试验的知情同意外，还应获得其对长期随访研究计划的知情同意。如果长期随访作为临床试验的一部分，随访时间可能超过主要终点或获益风险评估所需要的观察时间，这种情况下，通常无需在开始后续试验或提交上市申请之前完成长期随访。

儿童受试者可能因较为年幼而存在长期暴露，免疫细胞治疗产品给药后的长期随访可能需要监测治疗对生长和发育的影响，因此，较长期间的临床随访数据对于评估安全性和发育结局可能很关键。与成人相比，在儿童受试者中监测长期安全性和作用持续时间可能

更加困难，申请人在拟定长期随访计划时应予以妥善考虑。

（二）上市后研究或监测

免疫细胞产品的治疗方式和体内作用特征与传统小分子或生物大分子药物有较大区别，目前尚缺乏该类产品在人体中大规模应用的经验。由于临床试验的持续时间和受试者数量有限，上市后通过收集真实世界数据，有助于进一步观察产品的长期疗效，或暴露罕见的不良反应等。因此，申请人取得产品的上市许可后，可能有必要通过IV期试验、上市后观察性研究或重点监测等方式，收集真实世界中的有效性及安全性等信息，并通过药品定期安全性更新报告（PSUR）或药品再注册等途径与监管部门进行沟通。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理总局. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（试行）. 2017.
- [2] U.S. FDA, CBER. Considerations for the Design of Early-Phase Clinical Trials of Cellular and Gene Therapy Products. June 2015.
- [3] EMA/CAT. Draft guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational advanced therapy medicinal products in clinical trials. February, 2019.
- [4] Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized

- immunotherapy for human cancer. *Science* 2015;348:62-8.
- [5] Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood* 2016;127:3321-30.
 - [6] Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular therapy oncolytics* 2016;3:16011
 - [7] Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: mechanisms, manifestations and management. *Blood reviews* 2019;34:45-55.
 - [8] Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, et al. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *The Lancet Oncology* 2017;18:e143-e52.
 - [9] Park JH, Riviere I, Gonen M, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *The New England journal of medicine* 2018;378:449-59
 - [10] Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *The Lancet Oncology* 2019;20:31-42.
 - [11] Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *The New England journal of medicine* 2019;380:45-56.
 - [12] EMEA/CHMP/GTWP. Guideline on follow-up of patients administered with gene therapy medicinal products. November, 2009.
 - [13] U.S. FDA, CBER. Long term follow-up after administration of human gene therapy products. January 2020

附件

涉及人的生命科学和医学研究 伦理审查办法

（征求意见稿）

第一章 总 则

第一条 为保护人的生命和健康，维护人的尊严，尊重和保护受试者的合法权益，促进生命科学和医学研究健康发展，规范涉及人的生命科学和医学研究伦理审查工作，依据《中华人民共和国民法典》《中华人民共和国基本医疗卫生与健康促进法》《中华人民共和国科学技术进步法》等，制定本办法。

第二条 本办法适用于在中华人民共和国境内的医疗卫生机构、高等学校、科研院所等开展涉及人的生命科学和医学研究伦理审查工作。

所有涉及人的生命科学和医学研究活动均应当接受伦理审查。

第三条 本办法所称涉及人的生命科学和医学研究是指以人为受试者或使用人的生物样本、数据的以下研究活动：

（一）采用物理学、化学、生物学等方法对人的生殖、生长、发育、衰老进行研究的活动。

（二）采用物理学、化学、生物学、中医药学和心理学等方法对人的生理、心理行为、病理现象、疾病病因和发病

机制，以及疾病的预防、诊断、治疗和康复进行研究的活动。

（三）采用新技术或者新产品在人体上进行试验研究的活动。

（四）采用流行病学、社会学、心理学等方法收集、记录、使用、报告或者储存有关人的涉及生命科学和医学问题的生物样本、医疗记录、行为等科学研究资料的活动。

第四条 伦理审查应当遵守国家法律法规。涉及人的生命科学和医学研究应当尊重受试者的自主意愿，同时遵循有益、不伤害、公正和保护隐私的原则。

第二章 伦理审查委员会

第五条 开展涉及人的生命科学和医学研究的二级以上医疗机构和设区的市级以上卫生机构（包括疾病预防控制中心、妇幼保健、采供血机构等）、高等院校、科研院所等机构是伦理审查工作的管理责任主体，应当设立伦理审查委员会，开展涉及人的生命科学和医学研究伦理审查，定期对从事涉及人的生命科学和医学研究的科研人员、学生、科研管理人员等相关人员进行生命伦理教育和培训。

其他开展涉及人的生命科学和医学研究且未设立伦理审查委员会的机构可以书面方式委托区域伦理审查委员会或有能力的机构伦理审查委员会开展涉及人的生命科学和医学研究伦理审查。受委托的伦理审查委员会应当对审查的研究项目进行跟踪审查。医疗卫生机构应当委托高于其等级

的医疗卫生机构伦理审查委员会开展涉及人的生命科学和医学研究伦理审查。

各伦理审查委员会应预先制定疫情爆发等紧急情况下的审查制度。

区域伦理审查委员会设置和管理的具体办法由省级卫生健康行政部门会同有关部门制定。

第六条 机构应当采取有效措施保障伦理审查委员会独立开展伦理审查工作。

第七条 伦理审查委员会的职责是保护受试者合法权益，维护受试者尊严，避免公共利益受损，促进涉及人的生命科学和医学研究规范开展；对本机构或委托机构开展的涉及人的生命科学和医学研究项目进行伦理审查，包括初始审查、跟踪审查和复审等。

第八条 机构伦理审查委员会的委员应当从生命科学、医学、生命伦理学、法学等领域的专家和非本机构的社会人士中遴选产生，人数不得少于7人，并且应当有不同性别的委员，少数民族地区应当考虑少数民族委员。

必要时，伦理审查委员会可以聘请独立顾问，以覆盖被审查项目的专业领域。独立顾问对所审查项目的特定问题提供咨询意见，不参与表决。

第九条 机构伦理审查委员会委员任期3年，可以连任。伦理审查委员会设主任委员1人，副主任委员若干人，由伦理审查委员会委员协商推举或选举产生，并由机构任命。

伦理审查委员会委员应当具备相应的伦理审查能力，并定期接受生命科学和医学研究伦理知识及相关法律法规知识培训。

第十条 伦理审查委员会对受理的申报项目应当在 30 天内开展伦理审查，提供审查意见；情况紧急的，应当及时开展伦理审查，提供审查意见。

对已批准的研究项目进行定期跟踪审查，受理受试者的投诉并协调处理，确保项目研究不会将受试者置于不合理风险之中。

第十一条 伦理审查委员会在开展伦理审查时，应当要求申请人提供审查所需材料，并根据职责对研究项目方案、知情同意书等文件提出伦理审查意见。

第十二条 伦理审查委员会委员应当签署保密协议，承诺对所承担的伦理审查工作履行保密义务，对所受理的研究项目方案、受试者信息等保密。

第十三条 机构应当在伦理审查委员会设立之日起 3 个月内进行备案，并在国家医学研究登记备案信息系统上传信息。医疗卫生机构向本机构的执业登记机关备案。其他机构按行政隶属关系向上级主管部门备案。机构伦理审查委员会应当于每年 3 月 31 日前向备案的机关提交上一年度伦理审查委员会工作报告。

伦理审查委员会备案材料包括：

（一）人员组成名单和委员工作简历。

（二）伦理审查委员会章程。

（三）工作制度或者相关工作规程。

（四）备案的机关要求提供的其他相关材料。

以上信息发生变化时，机构应当及时向备案的机关更新信息。

第十四条 伦理审查委员会应当接受所在机构的管理和受试者的监督。

第十五条 伦理审查委员会应当建立伦理审查工作制度、标准操作规程，健全利益冲突管理机制，保证伦理审查过程独立、客观、公正。

第三章 伦理审查

第十六条 涉及人的生命科学和医学研究应当符合以下原则：

（一）合法合规原则。研究活动必须严格遵守国家和地方相关法律法规及伦理指导原则。

（二）知情同意原则。尊重和保障受试者的知情权和参加研究的自主决定权，严格履行知情同意程序，不允许使用欺骗、利诱、胁迫等手段使受试者同意参加研究，允许受试者在任何阶段无条件退出研究。

（三）控制风险原则。将受试者人身安全、健康权益放在优先地位，其次才是科学和社会利益。研究风险与受益比应当合理，尽最大努力使受试者接受风险最小化的研究，力

求避免受试者受到伤害。

（四）公平合理原则。应当公平、合理地选择受试者，入选与排除标准具有明确的生命科学和医学依据。应当公平合理分配研究受益、风险和负担。

（五）免费和补偿、赔偿原则。对受试者参加研究不得收取任何研究相关的费用，对于受试者在研究过程中支出的合理费用应当给予适当补偿。受试者受到研究相关损害时，应当得到及时、免费治疗，并依据法律法规及双方约定得到补偿或者赔偿。

（六）保护隐私原则。切实保护受试者的隐私，如实将受试者个人信息的储存、使用及保密措施情况告知受试者并得到许可，未经授权不得将受试者个人信息向第三方透露。

（七）特殊保护原则。对儿童、孕妇、老年人、智力低下者、精神障碍患者等特殊人群的受试者，以及受精卵、胚胎、胎儿或其他辅助生殖技术涉及的潜在受试者，应当予以特别保护。

（八）公共利益原则。个人利益和公共利益存在冲突时，应当经过严格论证。

第十七条 涉及人的生命科学和医学研究项目的负责人在申请伦理审查时应当向伦理审查委员会提交下列材料：

（一）项目材料诚信承诺书。

（二）伦理审查申请表。

（三）研究人员信息、研究项目所涉及的相关机构的合

法资质证明以及研究项目经费来源说明。

（四）研究项目方案、相关资料，包括文献综述、临床前研究和动物实验数据等资料。

（五）受试者知情同意书或样本、信息的来源证明等。

（六）科学性论证意见。

（七）利益冲突声明。

（八）受试者招募广告及其发布形式。

（九）科研成果的发布形式说明。

（十）伦理审查委员会认为需要提交的其他相关材料。

第十八条 伦理审查委员会收到申请材料后，应当及时组织受理项目的伦理审查，并重点审查以下内容：

（一）研究是否符合法律法规、规章及有关规定的要求。

（二）研究者的资格、经验、技术能力等是否符合研究要求。

（三）研究方案是否科学，并符合伦理原则的要求；中医药项目研究方案的审查，还应当考虑其传统实践经验。

（四）受试者可能遭受的风险程度与研究预期的受益相比是否在合理范围之内，包括社会受益与风险的权衡与审核。

（五）知情同意书提供的有关信息是否充分、完整、易懂，获得知情同意的过程是否合规、恰当。

（六）受试者个人信息及相关资料的保密措施是否充分。

（七）受试者招募方式、途径、纳入和排除标准是否恰当、公平。

（八）是否向受试者明确告知其应当享有的权益，包括在研究过程中可以随时无理由退出且不受歧视的权利，告知退出研究后的其他治疗方法等。

（九）受试者参加研究的合理支出是否得到了适当补偿；受试者参加研究受到损害时，给予的治疗、补偿或赔偿是否合理、合法。

（十）是否有具备资格或者经培训后的研究者负责获取知情同意，并随时接受有关安全问题的咨询。

（十一）对受试者在研究中可能承受的风险是否有预防和应对措施。

（十二）研究是否涉及利益冲突。

（十三）研究是否涉及社会敏感的伦理问题。

（十四）研究结果是否发布，方式、时间是否恰当。

（十五）需要审查的其他重点内容。

第十九条 伦理审查委员会委员与研究项目存在利益冲突的，应当回避。伦理审查委员会应当要求与研究项目存在利益冲突的委员回避审查。

第二十条 伦理审查委员会批准研究项目的基本标准是：

（一）研究符合法律法规要求。

（二）研究具有科学价值和社会价值。

（三）尊重受试者权利，保护受试者隐私。

（四）研究方案科学合理。

- (五) 受试者招募、选择合理、公平。
- (六) 风险与受益比合理，风险最小化。
- (七) 知情同意规范。
- (八) 不损害社会公共利益。
- (九) 与研究机构和研究人员能力相适应。
- (十) 对研究结果发布方式和时间的安排合理。
- (十一) 遵守科研规范与诚信。

第二十一条 伦理审查委员会应当对审查或跟踪审查的研究项目作出批准、不批准、修改后批准、修改后再审，继续研究、暂停或者终止研究的决定，并说明理由。

伦理审查一般以会议形式举行。情况紧急的，可采用网络会议及其审查程序。

伦理审查委员会作出决定应当得到伦理审查委员会全体委员的二分之一以上同意。委员应当对研究所涉及的伦理问题进行充分讨论后投票，否定意见必须记录在案。

第二十二条 经伦理审查委员会批准的研究项目需要修改研究方案、知情同意书、招募材料、提供给受试者的其他材料等时，研究项目负责人应当将修改后的文件再报伦理审查委员会审查；研究项目未获得伦理审查委员会审查批准的，不得开展项目研究工作。

第二十三条 研究风险不大于最小风险的研究项目、已批准研究项目的研究方案作较小修改，且不影响研究风险受益比的研究项目可以申请简易程序审查。

简易程序审查可以由伦理审查委员会主任委员或者由其指定的两个或以上委员进行审查。审查结果和理由应当在下次伦理审查会议上报告伦理审查委员会。

第二十四条 经伦理审查委员会批准的研究项目在实施前，研究项目负责人、机构伦理审查委员会和机构应当将该研究项目、该项目伦理审查意见、机构审核意见等信息按照国家医学研究登记备案信息系统要求如实、完整、准确上传，并根据研究进展及时更新信息。鼓励研究项目负责人、机构伦理审查委员会和机构在研究项目管理过程中实时上传信息。

国家卫生健康委应当不断优化国家医学研究登记备案信息系统，提升工作效率。

第二十五条 在项目研究过程中，项目研究者应当将发生的严重不良事件在获知后 24 小时内向机构伦理审查委员会报告；伦理审查委员会应当及时审查，以确定研究者采取的保护受试者的人身安全与健康权益的措施是否充分，并对研究风险与受益比进行重新评估，出具审查意见。

第二十六条 对已批准实施的研究项目，研究者应当按要求及时提交研究进展、违背方案、暂停/中止、终止、研究完成等各类报告。

机构伦理审查委员会应当按照研究者提交的相关报告进行跟踪审查。跟踪审查包括以下内容：

（一）是否按照已批准的研究方案进行研究并及时报告。

(二) 研究过程中是否擅自变更项目研究内容。

(三) 是否增加受试者风险或显著影响研究实施的变化或新信息。

(四) 是否需要暂停或者提前终止研究项目。

(五) 其他需要审查的内容。

跟踪审查的委员不得少于2人，跟踪审查情况应当在下次伦理审查会议上报告伦理审查委员会，跟踪审查过程中发现严重问题的，应当立刻向伦理审查委员会报告。

第二十七条 在多个机构开展的研究可以建立伦理审查协作机制，确保各机构遵循一致性和及时性原则。

牵头机构和参与机构均应当组织伦理审查。参与机构伦理审查委员会在充分了解项目的整体情况后，可以简易审查程序认可牵头机构伦理审查结论。

参与机构的伦理审查委员会应当及时对本机构参与的研究项目伦理情况进行跟踪审查。

第二十八条 机构与企业等其他机构合作开展生命科学与医学研究或为企业等其他机构开展生命科学与医学研究提供人的生物样本、数据的，机构应当充分了解研究的整体情况，通过伦理审查、开展跟踪审查，以协议方式明确生物样本、数据的使用范围、处理方式，并在研究结束后监督其妥善处置。

第二十九条 学术期刊在刊发涉及人的生命科学和医学研究成果时，应当确认该研究项目经过伦理审查委员会的

批准。研究者应当提供相关证明。

第三十条 伦理审查委员会独立开展项目伦理审查工作，任何机构和个人不得干预伦理审查委员会的伦理审查过程及审查决定。

第四章 知情同意

第三十一条 有受试者的项目，研究者开展研究前，应当获得受试者自愿签署的知情同意书；受试者不能以书面方式表示同意时，项目研究者应当获得其口头知情同意，并提交过程记录和证明材料。

第三十二条 受试者为无民事行为能力人或者限制民事行为能力人的，应当获得其监护人（法定代理人）的书面知情同意。当监护人（法定代理人）代表受试者知情同意时，应该在受试者可理解的范围内告知相关信息，并尽量让受试者亲自签署知情同意书。

第三十三条 知情同意书应当包含充分、完整的信息，并以受试者能够理解的语言文字表达。

第三十四条 知情同意书应当包括以下内容：

（一）研究目的、基本研究内容、流程、方法及研究时限。

（二）研究者基本信息及研究机构资质。

（三）研究可能给受试者、相关人员和社会带来的益处，以及可能给受试者带来的不适和风险。

（四）对受试者的保护措施。

（五）研究数据和受试者个人资料的使用范围和方式，是否进行共享和二次利用，以及保密范围和措施。

（六）受试者的权利，包括自愿参加和随时退出、知情、同意或不同意、保密、补偿、受损害时获得免费治疗和补偿或赔偿、新信息的获取、新版本知情同意书的再次签署、获得知情同意书等。

（七）受试者在参与研究前、研究后和研究过程中的注意事项。

（八）研究者联系人和方式、伦理审查委员会联系人和方式、发生问题时的联系人和联系方式。

（九）研究的时间和受试者大致的人数。

（十）研究结果是否会反馈受试者。

（十一）告知受试者可能的替代治疗及其主要的受益和风险。

（十二）涉及人的生物样本采集的，还应当包括样本的种类、数量、用途、保藏、利用（包括是否直接用于产品开发、共享和二次利用）、隐私保护、对外提供、销毁处理等相关内容。

第三十五条 在知情同意获取过程中，项目研究者应当按照知情同意书内容向受试者逐项说明。

项目研究者应当给予受试者充分的时间理解知情同意书的内容，由受试者作出是否同意参加研究的决定并签署知

情同意书。

在心理学研究中，因知情同意可能影响受试者对问题的回答，而影响研究结果准确性的，在确保受试者不受伤害的前提下经伦理委员会审查批准，研究者可以在项目研究完成后充分告知受试者并获得书面知情同意，否则不得纳入研究数据。

第三十六条 当发生下列情形时，研究者应当再次征询获取受试者的知情同意：

（一）与受试者相关的研究方案、范围、内容发生变化的。

（二）利用过去用于诊断、治疗的有身份标识的样本进行研究的。

（三）生物样本数据库中有身份标识的人体生物样本或者相关临床病史资料进行研究，超出知情同意范围的。

（四）前期已有研究知情同意，但用于授权范围以外的研究的。

（五）受试者民事行为能力提高的。

第三十七条 除另有规定外，以下情形经伦理审查委员会审查批准后，可以免除征询知情同意的要求：

（一）利用可识别身份信息的人的生物样本或者数据进行研究，已无法找到该受试者再次征询知情同意，研究项目采取充分措施保护个人信息且不涉及个人隐私和商业利益的。

(二) 生物样本捐献者已经签署了知情同意书，同意所捐献样本及相关信息用于所涉及的研究领域。

第五章 监督管理

第三十八条 国家卫生健康委会同有关部门共同负责全国涉及人的生命科学和医学研究伦理审查监督管理。

国家卫生健康委负责全国医疗卫生机构开展的涉及人的生命科学和医学研究伦理审查监督。教育部负责全国高等学校开展的涉及人的生命科学和医学研究伦理审查监督，并管理教育部直属高等学校相关工作。其他高等学校和科研院所开展的涉及人的生命科学和医学研究伦理审查监督管理按行政隶属关系由相关部门负责。

县级以上地方人民政府卫生健康、教育等部门依据职责分工负责本辖区涉及人的生命科学和医学研究伦理审查监督管理。

主要监督检查以下内容：

(一) 机构是否按照要求设立伦理审查委员会，并进行备案。

(二) 机构是否为伦理审查委员会提供充足经费，配备的专兼职工作人员、设备、场所及采取的有关措施是否可以保证伦理审查委员会独立开展工作。

(三) 伦理审查委员会是否建立健全利益冲突管理机制。

(四) 伦理审查委员会是否建立伦理审查制度。

(五) 伦理审查内容和程序是否符合要求。

(六) 审查的研究项目是否如实、及时在国家医学研究登记备案信息系统上传、更新信息。

(七) 伦理审查结果执行情况。

(八) 伦理审查文档管理情况。

(九) 伦理审查委员会委员的伦理培训、学习情况。

(十) 其他需要监督检查的相关内容。

各级卫生健康行政部门应当与同级政府各相关部门建立有效机制，加强工作会商与信息沟通。

第三十九条 国家和省级卫生健康行政部门应当牵头设立同级医学伦理专家委员会或委托相关机构承担同级医学伦理专家委员会工作，为卫生健康、教育等部门开展伦理审查及其监督管理提供技术支持，定期对辖区内的伦理审查委员会委员进行培训，协助同级卫生健康、教育等行政部门开展监督检查。

第四十条 机构应当加强对本机构设立的伦理审查委员会开展的涉及人的生命科学和医学研究伦理审查工作的日常管理，定期评估伦理审查委员会工作质量，对发现的问题及时提出改进意见或者建议，根据需要调整伦理审查委员会委员等。

第四十一条 机构应当督促本机构的伦理审查委员会落实县级以上政府相关部门提出的整改意见；伦理审查委员会未在规定时间内完成整改或者拒绝整改，违规情节严重或

者造成严重后果的，其所在机构应当撤销伦理审查委员会主任委员资格，追究相关人员责任。

第四十二条 任何单位或者个人均有权举报涉及人的生命科学和医学研究中存在的违规或者不端行为。

第四十三条 医疗卫生机构未按照规定设立伦理审查委员会或未委托伦理审查委员会审查，擅自开展涉及人的生命科学和医学研究的，由县级以上地方卫生健康行政部门对有关机构和人员依法给予行政处罚和处分。

其他机构按照行政隶属关系，由其上级主管部门处理。没有上级主管部门的，由机构登记机关处理。涉及社会组织的，由社会组织登记管理机关依据相关登记管理法规处理。

第四十四条 医疗卫生机构及其伦理审查委员会违反本办法规定，有下列情形之一的，由县级以上地方卫生健康行政部门对有关机构和人员依法给予行政处罚和处分：

（一）伦理审查委员会组成、委员资质不符合要求的。

（二）机构没有为伦理审查委员会提供充足经费，配备的专兼职工作人员、设备、场所及采取的有关措施不足以保证伦理审查委员会独立开展工作的。

（三）伦理委员会未建立利益冲突管理机制的。

（四）未建立伦理审查工作制度或者操作规程的。

（五）未按照伦理审查原则和相关规章制度进行审查的。

（六）泄露研究项目信息、受试者个人信息的。

（七）未按照规定进行备案的。

（八）未接受正式委托为其他机构出具伦理审查意见的。

（九）未督促研究者提交相关报告并开展跟踪审查的。

（十）其他违反本办法规定的情形。

其他机构按照行政隶属关系，由其上级主管部门处理。

没有上级主管部门的，由机构登记机关处理。涉及社会组织的，由社会组织登记管理机关依据相关登记管理法规处理。

第四十五条 医疗卫生机构的项目研究者违反本办法规定，有下列情形之一的，由县级以上地方卫生健康行政部门对有关机构和人员依法给予行政处罚和处分：

（一）研究项目或者研究方案未获得伦理审查委员会审查批准擅自开展项目研究工作的。

（二）研究过程中发生严重不良反应或者严重不良事件未及时报告伦理审查委员会的。

（三）违反知情同意相关规定开展项目研究的。

（四）未及时提交相关研究报告的。

（五）其他违反本办法规定的情形。

其他机构按照行政隶属关系，由其上级主管部门处理。

没有上级主管部门的，由机构登记机关处理。涉及社会组织的，由社会组织登记管理机关依据相关登记管理法规处理。

第四十六条 机构、机构伦理审查委员会、项目研究者在开展涉及人的生命科学和医学研究工作中，违反法律法规要求的，按照相关法律法规依法进行处理。

第四十七条 县级以上人民政府有关行政部门对违反

本办法的机构和个人作出的行政处理，应当向社会公开。机构和个人严重违反本办法规定的，记入科研诚信严重失信行为数据库，按照国家有关规定纳入信用信息系统，依法依规实施联合惩戒。

第四十八条 机构和个人违反本办法规定，给他人人身、财产造成损害的，应当依法承担民事责任；构成犯罪的，依法追究刑事责任。

第六章 附则

第四十九条 本办法所称人或人的生物样本包括人体本身以及人的细胞、组织、器官、体液、菌群等和受精卵、胚胎、胎儿。

第五十条 本办法所称受试者包括人体研究的对象，以及提供个人生物样本、生物遗传信息、诊疗信息、行为记录等用于涉及人的生命科学和医学研究的个体。

第五十一条 涉及国家秘密的，在提交伦理审查和获取受试者知情同意时应当进行脱密处理。无法进行脱密处理的，应当签署保密协议并加强管理。未经脱密处理的研究项目不得在国家医学研究登记备案信息系统中上传。

第五十二条 本办法自××××年××月××日起施行。本办法施行前，从事涉及人的生命科学和医学研究的机构已设立伦理审查委员会的，应当自本办法施行之日起3个月内按规定备案，并在国家医学研究登记备案信息系统中上传

信息。

本办法施行前，已经伦理审查批准开展的涉及人的生命科学和医学研究项目，应当自本办法实施之日起6个月内在国家医学研究登记备案信息系统完成上传信息。逾期不再受理。

基因治疗产品长期随访临床研究技术指导原则

（征求意见稿）

国家药品监督管理局药品审评中心
生物制品临床部

2021 年 5 月

目 录

一、概述	3
(一) 前言	3
(二) 目的和适用范围	3
二、基因治疗长期随访临床研究设计	4
(一) 长期随访的观察目的	4
(二) 长期随访观察的考虑要素	4
1、迟发性不良反应相关的潜在风险因素	4
2、临床研究人群	7
3、长期随访的观察时间	8
4、有效性	9
(三) 长期随访的设计实施	9
1、知情同意	9
2、设计和实施	10
(四) 不同基因治疗产品的特殊考虑	11
1、关于整合性载体的特殊考虑	11
2、关于基因编辑产品的特殊考虑	12
三、上市后长期监测计划的实施建议	13

一、概述

（一）前言

基因治疗是指通过修饰或操纵基因的表达或改变活细胞的生物学特性以达到治疗目的的治疗手段，主要作用机制有正常基因替换致病基因、使不能正常工作的基因失活或者引入新的或修饰的基因等方式。具备基因治疗属性的产品类别多样，如质粒 DNA、RNA、基因改造的病毒、细菌或细胞以及基因编辑技术等。随着基因治疗技术的不断发展，临床研究的不断深入，基因治疗已为多种难治性疾病提供了新的治疗策略。目前，在全球范围内已有多个基因治疗产品批准上市，如，Luxturna®用于治疗 RPE65 基因突变造成的视网膜营养不良，CAR-T 细胞用于治疗多种恶性血液肿瘤以及 Strimvelis®用于治疗腺苷脱氨酶缺乏导致的重症联合免疫缺陷。国内也有治疗不同适应症的多种基因治疗产品进入临床研究阶段。

通常来说，基因治疗通过引起人体的永久或长期的变化达到治疗效果，这些变化在体内长期存在，可能增加不可预测的风险如迟发性不良反应等。为了评估和降低迟发性不良反应等风险，并了解治疗效果随时间延长的变化，有必要对接受基因治疗临床试验的受试者开展长期随访。长期随访的观察方法和研究设计取决于基因治疗产品的风险特性和适用人群等因素，本指导原则主要针对上述因素开展讨论，对于药物临床试验需要遵从的一般原则以及与其他指导原则的重复内容在本指导原则中不再赘述。

（二）目的和适用范围

本指导原则适用于按照《中华人民共和国药品管理法》、《药品注册管理办法》等药品管理相关法规进行研发和注册申报的具备基因治疗属性的产品，旨在为该类开展长期随访临床研究提供技术指导，确保及时收集迟发性不良反应的信号，识别并降低这类风险，同时获取这类产品长期安全性和有效性的信息。

本指导原则是对基因治疗产品开展长期随访临床研究相关技术问题的建议和推荐，不具有强制性的法律约束力。随着基因治疗技术的发展、认知深入和经验积累，本指导原则中的相关内容将不断完善与更新。申请人在研究中应始终坚持具体问题具体分析的原则，并建议及时与药审中心就长期随访研究方案的具体设计和细节进行沟通。

二、基因治疗产品长期随访临床研究设计

（一）长期随访的观察目的

基因治疗产品长期随访的主要目的是收集受试者的迟发性不良反应，了解基因治疗产品在体内的存续情况，从而识别并降低接受基因治疗产品的患者的长期风险。此外，考虑到基因治疗产品长期作用的特点，观察疗效随时间的变化情况也是长期随访的重要目的。

（二）长期随访观察的考虑要素

1、迟发性不良反应相关的潜在风险因素

在评估基因治疗产品的风险因素时，申请人应参考本品的非临床和临床数据以及类似产品的已知数据。基因治疗产品的非临床研究旨在为临床研究提供支持性信息和关键安全性特征参数，如机体中的生物分布和持久性、整合/修饰宿主基因组、潜伏再激活以及潜在免疫

原性等。对于新型基因治疗产品，可参考数据有限，申请人应尽可能在临床前研究中获得用于评估迟发性不良反应风险的数据。

基因治疗产品特有的可能会引起迟发性不良反应的风险因素包括：

（1）基因组整合活性

基因治疗产品可能会采用修饰宿主基因组的技术，并有可能在宿主细胞或组织中持续存在。很多基因治疗载体的基因整合不会指向基因组的特定位点，可能在整合位点处产生插入突变、或激活整合位点附近的原癌基因等，进而破坏重要基因功能或增加恶性肿瘤的风险，例如，国外已有多项研究报告在接受了使用 γ -逆转录病毒载体转导的基因修饰细胞治疗的受试者中发生白血病。因此，对于存在此类风险的产品，有必要进行长期随访临床研究以评估出现迟发不良反应的风险。

国内外基因治疗产品开展的非临床研究、长期随访获得的临床经验以及基因组整合位点分析方法的显著改进，都有助于更好地理解整合性基因治疗载体相关风险。通常认为，很多能够介导外源基因转入细胞核的载体（如逆转录病毒载体、转座子元件和基因编辑产品等）有基因组整合潜力，需要通过长期随访观察迟发性不良反应的风险；根据目前的认识和研究数据，质粒、痘病毒、腺病毒和腺相关病毒载体（AAV）等载体的基因治疗产品不具有整合倾向或潜伏期后再激活的倾向，国际上开展的临床试验中也表现出较低的迟发性不良反应风险。当载体或基因治疗产品原有的风险特征增加时，例如经过修饰以携带基因组编辑成分的质粒或改变给药方式以提高整合能力等，需要

提高对长期随访观察的要求；反之，也可以对目前认为存在迟发风险的基因治疗载体进行修饰，以降低这些风险。

（2）长期表达

与其他产品相比，部分基因治疗产品的显著特征是在患者靶细胞或基因修饰细胞中持续存在并编码表达作用因子（功能性蛋白或基因表达调节元件），并通过永久或长期改变靶细胞或组织的功能来达到治疗效果。同时，由于基因治疗编码的作用因子在体内的长期暴露或表达异常，可能产生与其功能相关的长期安全性风险，如细胞生长失控和恶性肿瘤形成、自身免疫反应或其他无法预测的迟发性不良反应。

（3）潜伏再激活

部分病毒类基因治疗产品如疱疹病毒，可能存在从潜伏期被再激活的可能性，存在感染相关的迟发性不良反应的风险。

（4）持续感染

有复制能力的病毒或细菌载体基因治疗产品，有可能在免疫能力低下的患者中发展为持续感染，进一步增加发生迟发但严重感染的风险。

（5）基因编辑活性

基因编辑等新型基因治疗产品有独特的基因组修饰功能，可诱导人类基因组中的位点特异性改变或修饰，同时也可能在基因组中发生脱靶效应，导致非预期的基因表达变化，进而增加未知且不可预测的迟发性不良反应风险。

(6) 非预期的生物分布

有些基因治疗产品需要在特定的细胞或组织中表达以实现治疗目的,如果基因治疗产品在非预期的细胞、组织或器官中表达或修饰,可引起非靶细胞功能、生长或/分化改变,甚至引发肿瘤。

(7) 基因重排或重组

当基因治疗产品所用载体及其携带的基因发生复制时,可能出现非治疗目的非预期的基因表达或改变,或者与相应野生型或辅助病毒互补后产生回复突变或意外复制或形成新的病毒。

(8) 免疫原性

由于基因治疗产品在体内的持续暴露或者需要多次给药等情况,机体可能产生针对基因治疗载体或编码的作用因子的免疫应答。由于基因治疗产品在靶细胞或组织中的表达时间、分布范围或表达强度等差异,机体免疫应答的后果可能从不具有临床意义的一过性的免疫反应,到针对靶细胞或组织的免疫攻击,甚至产生严重危及生命的不良事件。

(9) 其他考虑因素

除产品相关因素外,基因治疗产品的长期风险评估还应考虑靶细胞/组织/器官,患者群体(年龄、免疫状态、死亡风险等)和相关疾病的特征以及合并其他治疗的影响。

2、临床研究人群

如果一种基因治疗产品具有引起迟发性不良反应的风险,需要开展长期随访观察时,所有接受基因治疗产品的受试者在签署知情同意

书后均应入组长期随访临床研究。在设计长期随访临床研究的方案时，应考虑目标受试者人群及特征、整体健康情况以及接受治疗的患者的预期生存期等特征对迟发性不良反应的收集的影响。通常来说，当临床研究人群的某些特征（如预期寿命短、多重合并症、以及暴露于放疗或化疗等其他药物）可能干扰迟发性不良反应的观察分析时，会影响长期随访观察在评估和减轻受试者风险方面的效用；而在病情较轻或较局限，合并症以及伴随治疗有限或较稳定的受试者中，通过长期随访观察收集到的评估数据可能更容易分析。

3、长期随访的观察时间

长期随访的持续时间应确保足以观察到受试者因产品特性、暴露情况（生物分布和给药途径）等导致的风险，应不短于迟发性不良反应的预期发生时间。

一般而言，针对不同类型的基因治疗产品建议如下：

- 具有基因组整合活性的载体（例如 γ -逆转录病毒和慢病毒载体）和转座子元件建议观察不短于 15 年。
- 可以产生持续感染、或有潜伏再激活风险的细菌或病毒载体（如单纯疱疹病毒）建议观察 15 年或至数据表明不再存在任何风险（感染或再激活）。
- 基因编辑产品建议观察 15 年或至数据表明不再存在任何风险。
- 腺相关病毒载体建议观察 5 年或至数据表明不再存在任何风险。

以上长期随访时间的建议主要基于基因治疗的产品类型，具体产品的随访时间取决于产品的特性和体内存在时间、转基因表达时间、

迟发性不良反应的预期时间及发生率、受试者适应症和预期生存期、给药途径、以及长期随访的其他观察目的。随着随访数据的积累，研究者和研究申办方可能会根据产品的存在情况、转基因表达和临床表现的持续评估情况，延长或缩短长期随访的持续时间。如果研究申办方认为其基因治疗产品安全性风险较低、无需开展长期随访临床研究，或者希望变更随访时间，应合理说明依据或变更理由并与药品审评部门进行沟通。

4、有效性

尽管基因治疗产品的疗效持续时间通常较长，但随着时间的推移，基于质粒、非病毒载体或病毒载体等的基因治疗产品在体内的转基因表达水平可能逐渐下降，含有载体或病毒的靶细胞数量也可能逐渐减少，上述因素都可能导致基因治疗产品的疗效逐渐下降。长期随访观察有助于了解基因治疗产品有效性随时间推移的变化情况，以及再次接受治疗的时机和方法。

（三）长期随访的设计实施

1、知情同意

知情同意应遵循《药物临床试验质量管理规范》的相关要求，向受试者说明参加临床试验可能预见的安全性风险，内容需包含长期随访研究的目的、研究程序、持续时间、访视间隔以及申办方的联系方式等。当非临床研究或临床试验中发现基因治疗产品的风险有所改变时，应及时更新知情同意书并告知受试者。知情同意书中还应对长期随访期间的人体组织样本采集和保存、基因检测等进行说明。

2、设计和实施

在基因治疗产品长期随访临床研究中，应建立一套可行的监测计划用于记录并收集受试者与研究相关的所有数据，可以及时记录、报告不良事件并做出评估。通常，长期随访临床研究应详细说明受试者的监测计划，包括访视时间表、采样计划、监测检查方法以及长期随访临床研究中的目标临床事件等。建议申办方提供一份简明科学的随访记录模板，供研究者记录所有观察结果和与研究相关的所有数据。如果在临床试验期间或上市后获得改变基因治疗产品风险的重要信息，应及时修订随访计划并予以实施。

在受试者接受基因治疗后的5年内（或根据具体产品的风险确定的长期随访期内），临床随访应记录受试者的简要病史，使用致癌或致突变药物和其他药物的情况以及有关的不良事件信息，新出现、复发或加重的疾病（例如恶性肿瘤、神经系统疾病、免疫原性或自身免疫类疾病、感染甚至死亡等）及相关体格和实验室检查等。同时，尽可能在合适的随访时间点采集相关样本，使用经过验证的、足够敏感的方法检测基因治疗产品在体内的持续存在情况并分析相关影响，直至数据表明不再有任何风险。如随访过程中出现疑似与基因治疗产品相关的不良事件，应及时根据临床、实验室、分子生物学、细胞遗传学、组织学或HLA分析获得的证据或深度测序数据等进行因果分析，必要时提高随访频率或增加随访内容。

对于随访时间超过5年的基因治疗产品，完成前5年的随访后，应通过电话或书面调查问卷等方式，保持每年至少随访受试者一次直

至随访期结束。如前期随访提示产品在体内持续存在，建议观察至数据表明不再存在任何风险。

申办方向药品监督管理部门递交临床试验申请（IND）时应纳入长期随访的研究计划。长期随访的研究内容可以与不同阶段临床试验方案整合在一起，也可以单独设计为一个研究方案，无论采用何种形式，申办方需注意实施的连贯性和一致性，若临床试验过程中对长期随访的研究计划进行了更新，应确保各阶段临床研究的每位受试者都按照最新的计划进行随访，并及时更新知情同意文件。申办方应在研发期间定期安全性更新报告（DSUR）中总结上一个报告期内长期随访的研究结果，并按照相关法规要求及时报告临床试验期间出现的不良事件。

（四）不同基因治疗产品的特殊考虑

1、关于整合性载体的特殊考虑

如受试者接受整合性载体基因治疗产品，例如转座子元件、 γ -逆转录病毒、慢病毒及其他逆转录病毒载体，或利用整合性载体或基于转座子的载体在体外修饰的细胞，长期随访中需格外关注基因治疗产品的基因组整合风险，建议申办方分析基因治疗载体在靶细胞或相关替代细胞的基因组中整合的影响（例如是否存在克隆性生长、是否存在优势克隆、克隆性生长是否导致恶性肿瘤等）。由于该分析通常需采用有创性检测方法取得样本，实施时还需要考虑技术和伦理上的可行性，例如靶向视网膜或肝脏等组织的基因治疗产品，可能难以对靶细胞采样，这种情况下可能需要通过密切的临床随访等方式间接评

估基因整合风险；同时，选择易于采样的替代细胞也可能提供关于载体整合性的信息，例如靶向骨髓造血干细胞的基因治疗产品，可以通过采集外周血细胞或富集外周血干细胞进行观察。

如果基因组整合相关风险的分析可行，应注意以下几点：

- 在接受基因治疗产品的最初 5 年内，两次检测间的采样间隔建议不超过 6 个月。此后每年至少检测一次，直至检测不到载体序列。
- 检测方法的敏感度、特异性和可重复性应经过验证，并设计适当的阳性和阴性对照；
- 当体内靶细胞或替代细胞中载体序列阳性的比例超出预期范围时，应开展克隆性生长的评估。
- 如果存在优势克隆或单克隆生长，应在不超过 3 个月的时间内再次检测确认，并尽快开展整合位点的分析。
- 当载体的整合位点确定后，应与人类基因组数据库等进行比较，确定整合位点的基因功能，评估是否与包括癌症在内的任何疾病有关。
- 如果受试者体内出现载体阳性细胞的克隆性生长，或检测发现基因整合位点在癌基因或癌相关基因附近，应缩短检测间隔至不超过 3 个月并密切监测恶性肿瘤征兆，直至检测不到基因治疗载体。
- 对基于逆转录病毒载体的基因治疗产品，还应开展可复制性逆转录病毒（RCR）的检测。

2、关于基因编辑产品的特殊考虑

基因编辑产品除了适用基因治疗产品的一般考虑以及整合性载

体的特殊考虑外，长期随访中还应额外关注脱靶风险，量化评估脱靶活性和在靶活性之间的相关性，或利用在靶活性来预测脱靶活性的水平。如果基因治疗产品通过全身给药方式递送，长期随访中的安全性监测不仅包括靶器官或靶组织的脱靶活性，而且还应包括可能发生在其他组织和器官中的脱靶活性。

三、上市后长期监测计划的实施建议

在临床研究期间，接受基因治疗的受试者人数通常比较有限。同时，在产品获得上市批准时，临床试验中接受了基因治疗产品的受试者通常尚未完成长期随访临床研究，临床试验中的收集的安全性数据不足以评估所有可能的迟发性不良反应的风险。因此，在获得上市批准后，申办方仍可能需要继续开展长期随访临床研究，建立产品和使用者的可追溯系统。申办方应按照国家药品上市后监测相关的法规和指导原则要求，建立并完善药物警戒系统，主动收集患者的不良事件信息，鼓励患者主动报告不良事件，提高数据收集质量。

建议申办方在递交新药上市申请（NDA）之前与药品审评部门沟通是否需要开展基因治疗产品的上市后长期随访临床研究，以持续评估产品的安全性和有效性。如需要开展，建议在 NDA 申报时提供上市后研究或临床试验的方案，包括研究目的、研究人群、观察内容和持续时间等。此外，上市后风险管理计划有助于评估和控制基因治疗产品的安全性风险，建议申办方在 NDA 审评过程中与药品审评部门沟通是否需要制定上市后风险管理计划及具体内容。

参考文献

- [1]U. S. FDA. Long Term Follow-Up After Administration Of Human Gene Therapy Products. 2020
- [2]EMA. Guideline On Follow-Up Of Patients Administered With Gene Therapy Medicinal Products. 2009
- [3]EMA. Guideline On Safety And Efficacy Follow-Up-Risk Management Of Advanced Therapy Medicinal Products. 2008
- [4]国家食品药品监督管理总局, 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行), 2017.
- [5]国家药品监督管理局药品审评中心, 免疫细胞治疗产品临床试验技术指导原则(试行), 2021
- [6]国家药品监督管理局药品审评中心, 溶瘤病毒类药物临床试验设计指导原则(试行), 2021
- [7]ICH E6 (R2): Integrated Addendum to Good Clinical Practice (GCP) , 2016
- [8]ICH E2F 研发期间安全性更新报告, 2010
- [9]ICH E2E 药物警戒, 2004

1

2

3

4

5

6

长效粒细胞集落刺激因子预防化疗后感染

7

临床试验设计技术指导原则

8

(征求意见稿)

9

10

11

12

13

14

15

国家药品监督管理局

16

2021 年 10 月

17

19	一、前言	1
20	二、背景	2
21	三、探索性研究设计的考虑	4
22	(一) 首次人体临床试验	4
23	1. 受试者的选择	4
24	2. 研究设计	4
25	3. 临床药理学研究	5
26	(二) 概念验证研究	6
27	1. 研究人群及化疗方案	6
28	2. 研究设计	7
29	3. 评估指标	7
30	四、确证性研究设计的考虑	8
31	1. 确证性研究的设计	8
32	2. 研究人群及化疗方案	8
33	3. 研究终点的选择	9
34	五、安全性评价	10
35	六、小结	11
36	参考文献	11

37 一、前言

38 近年来,随着肿瘤基础、转化和临床研究的发展深入,肿瘤治疗
39 的方式及药物的选择更加个体化,新的靶向药物和免疫治疗药物不断
40 涌现,但是以细胞毒药物为基础的化疗(简称化疗)仍然是肿瘤
41 治疗的基石。中性粒细胞(Absolute neutrophil count, ANC)减少症
42 是化疗引起的骨髓抑制相关血液学毒性,其减少程度和持续时间与患
43 者感染风险甚至死亡风险密切相关。

44 重组人粒细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte-
45 colony stimulating factor, rhG-CSF)作为防治肿瘤化疗引起的 ANC
46 减少症的有效药物已经上市多年。rhG-CSF 通过刺激骨髓造血干细胞
47 向粒系细胞分化,促进粒细胞增殖、成熟和释放,恢复外周血中性粒
48 细胞数量,主要用于预防非髓源性肿瘤化疗后的 ANC 减少症,其常
49 见不良反应有骨和关节痛、肌肉酸痛、肝肾功能指标异常等。由于
50 rhG-CSF 普通制剂的半衰期较短,在一个化疗周期中患者需要多次注
51 射用药,治疗上多有不便,且可能增加感染风险。

52 如今,已经能够通过改构 G-CSF 蛋白改进其药代动力学(PK)
53 特征,达到延长半衰期、减少给药次数的目的,即为长效 rhG-CSF,
54 可由每日给药减少为每个化疗周期给药一次,大大地提高了患者用药
55 的依从性。药代动力学的变化可引起体内药效学特征的变化,进而对
56 安全性和有效性产生影响,因此,如何合理地选择长效 rhG-CSF 的
57 给药剂量和频次至关重要——既要确保长效 rhG-CSF 能有效地预防
58 放、化疗所致以发热性 ANC 减少症为表现的感染,还要避免药物引

59 起过高的中性粒细胞计数所带来的相关不良反应。目前国内已有多个
60 长效 rhG-CSF 产品获批上市，同时，还有多项同类产品正在研发之
61 中。鉴于研发此类长效 rhG-CSF 主要用于成年非髓性恶性肿瘤患者
62 在接受容易引起发热性 ANC 减少症的骨髓抑制性化疗时，降低以发
63 热性 ANC 减少症为表现的感染发生率适应症，本指导原则旨在提出
64 临床研究指导和建议。

65 本指导原则仅代表药品监管部门当前的观点和认知。随着医学科
66 学和临床试验的发展，本指导原则中的相关内容将不断完善与更新。
67 应用本指导原则设计和实施研究时，请同时参考药物临床试验质量管
68 理规范（good clinical practice, GCP）、人用药品技术要求国际协调理
69 事会（International Council for Harmonisation of Technical Requirements
70 for Pharmaceuticals for Human Use, ICH）和其他国内已发布的相关指
71 导原则。

72 二、背景

73 ANC减少症是骨髓抑制性化疗最严重的血液学毒性。ANC减少
74 的程度、持续时间与感染甚至死亡风险直接相关，严重地影响了化疗
75 药物的相对剂量强度、密度与既定周期，临床上往往因此降低化疗药
76 物剂量、延迟治疗时间或更改化疗方案，最终难以达到预期的疗效。
77 因此，预防或治疗ANC减少症是足剂量足疗程化疗或剂量密集化疗的
78 根本保证。

79 1.中性粒细胞减少性发热

80 中性粒细胞减少性发热（febrile neutropenia, FN）是ANC减少症

81 最主要的临床并发症。FN的定义为单次口腔温度 $\geq 38.3^{\circ}\text{C}$ 或 $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$
82 持续1小时以上，同时 $\text{ANC} < 0.5 \times 10^9/\text{L}$ 或 $\text{ANC} < 1.0 \times 10^9/\text{L}$ 但预计在
83 随后的48小时后将下降至 $< 0.5 \times 10^9/\text{L}$ 。

84 2.中性粒细胞减少性发热风险评估

85 根据发生FN的风险,可将化疗方案分为以下三类:

86 A.中性粒细胞减少性发热高度风险方案,定义为化疗初治患者的
87 FN发生率 $> 20\%$ 的化疗方案

88 B.中性粒细胞减少性发热中度风险方案,定义为化疗初治患者的
89 FN发生率介于 $10\text{-}20\%$ 之间的化疗方案

90 C.中性粒细胞减少性发热低度风险方案,定义为化疗初治患者的
91 FN发生率 $< 10\%$ 的化疗方案

92 3.化疗相关中性粒细胞减少症分层管理

93 对于接受FN高度风险化疗方案治疗的患者,无论其治疗目的是
94 根治肿瘤或者延长生存时间,或是减轻疾病相关症状、改善生存质量,
95 均建议宜预防性使用rhG-CSF。

96 对于接受FN中度风险化疗方案治疗的患者,除了化疗方案和所
97 治疗的特定的恶性肿瘤以外,还需要考虑患者自身的危险因素,比如
98 年龄 > 65 岁、既往接受过化疗或放疗、治疗前已经存在ANC减少或者
99 存在肿瘤骨髓浸润、存在感染/开放的伤口、近期手术史、一般体力
100 状态差、肾功能异常、肝功能异常(特别是胆红素升高)以及艾滋病
101 毒(HIV)感染等。若患者存在上述高风险因素时,建议预防性使用
102 rhG-CSF。

103 对于接受FN低度风险化疗方案治疗的患者，不建议预防性使用
104 rhG-CSF。

105 三、探索性研究设计的考虑

106 （一）首次人体临床试验

107 首次人体临床试验(first in human, FIH)的目的是对长效 rhG-CSF
108 的安全性耐受性进行探索，同时获得其 PK 和 PD 参数，并对 PK/PD
109 关系进行分析等。

110 1. 受试者的选择

111 通常而言，健康受试者的均一性较高，因此可以选择在健康受试
112 者中开展 FIH 试验。

113 由于预期新的长效 rhG-CSF 可能带来严重的不良反应（例如可
114 引发白细胞过度增多（ $>70 \times 10^9/L$ ），进而具有导致脾肿大、脾自发
115 性破裂的风险，通常选择在非髓性恶性肿瘤患者中开展 FIH 试验。一
116 般情况下可以招募符合（一线）姑息性细胞毒化疗条件的患者。

117 2. 研究设计

118 通常需要开展多个剂量的爬坡研究，对长效 rhG-CSF 耐受性进
119 行研究，以探索其安全剂量范围。

120 当选择健康受试者作为研究对象时，可以采用安慰剂对照、盲态
121 研究设计，在某一剂量水平，接受长效 rhG-CSF 的受试者数应大于
122 接受安慰剂的受试者数。通过安慰剂对照，有利于更清晰的反映长效
123 rhG-CSF 的安全性特征。

124 当选择肿瘤患者作为研究对象时，也可酌情采用单臂、开放性研

125 究设计。

126 3. 临床药理学研究

127 3.1 PK/PD 数据分析

128 在 FIH 试验时, 应注意开展临床药理学研究。应获得足够的数据
129 描绘长效 rhG-CSF 基本的 PK 参数 (例如 AUC、 C_{max} 、 T_{max} 、 C_{min} 、
130 $T_{1/2}$ 和 CL) 以及给药后的药效学 (PD) 指标随时间的变化。

131 通常采用中性粒细胞绝对值变化作为 PD 指标, 也可同时对髓系
132 (如 CD34 细胞) 和非髓系细胞 (如单核细胞、淋巴细胞、血小板和
133 红系细胞) 的变化, 进行比较研究。

134 使用 rhG-CSF 后, 中性粒细胞绝对值曲线呈双峰形, 第 1 峰是
135 rhG-CSF 促进骨髓已成熟的粒细胞向外周血释放的结果, 第 2 峰是
136 rhG-CSF 刺激骨髓粒系造血祖细胞加速增殖、分化、成熟和释放所致。
137 一般单次给药后, 中性粒细胞的第 1 峰达峰时间将决定 rhG-CSF 给
138 药时间与化疗周期的关系 (例如, 在开始化疗前, 或化疗结束后给
139 药); 而中性粒细胞在高水平的维持时间以及第 2 峰出现的时间, 决
140 定 rhG-CSF 给药频次。

141 应对 PK 与 PD 之间的相关性进行评估。强烈建议在同一项研究
142 中全面收集 PK 和 PD 数据, 以尽量减少研究间的差异性, 并且更好
143 地描述 PK/PD 关系。

144 需要关注的是, 开发长效 rhG-CSF 的主要目的, 是通过延长产
145 品的半衰期, 实现患者用药频次的降低, 提高便利性。目前已有多个
146 长效 rhG-CSF 上市, 其给药频次均为每个化疗周期给药 1 次, 因此

147 对于每个化疗周期给药频次超过 1 次的长效 rhG-CSF，需要谨慎考虑
148 其立题合理性。

149 3.2 生物活性测定方法

150 通常在开展临床药理学研究时，应当有相应的生物活性测定方法
151 进行血药浓度测定。但是对于药代动力学研究，应当建立和使用特异
152 性较高的检测方法（例如 RIA、EIA、ELISA 等）。

153 （二）概念验证研究

154 通过概念验证（proof of concept, POC）研究，将进一步对长效
155 rhG-CSF 的安全性和有效性进行考察，明确其合理的剂量及给药周
156 期，为关键研究设计提供支持。

157 通过概念验证研究应当回答剂量（剂量强度和密度）和/或给药
158 方案对 ANC 减少的发生时间、发生率、程度和持续时间有何影响的
159 问题。此部分的结果应该得出用于确证性研究的给药方案建议，包括
160 开始治疗的时间及疗程，以及是否由于化疗对骨髓抑制的强度不同，
161 量效关系会有差异等。

162 1. 研究人群及化疗方案

163 研究应当在同一瘤种（例如疾病分期相同的相同肿瘤）的患者中
164 进行。

165 建议研究中受试者接受相同的化疗方案治疗。如果研究中要纳入
166 接受不同化疗方案治疗的受试者，则应当在随机分组时按照化疗方案
167 的不同予以分层。应该具体说明化疗方案对应的 FN 风险度；不建议
168 在研究中纳入接受不同 FN 风险度化疗方案治疗的受试者。

169 2. 研究设计

170 研究的设计应当为双盲、随机、平行分组的量效关系试验，对照
171 组用药宜选择普通制剂 rhG-CSF 和标准剂量。根据 FIH 试验中对于
172 PK/PD 分析，确定概念验证研究中拟探索的长效 rhG-CSF 的剂量和
173 给药频次，通常对选定的 2-3 个剂量的安全有效性进行验证；在此阶
174 段，还可以进一步探索按公斤体重计算剂量和固定剂量的不同给药方
175 式。

176 如果需要评价 1 个以上的给药途径，应当给出首选的一个给药途
177 径或多个给药途径，并且说明理由。不同的给药途径，都需要对 ANC
178 减少终点药效学作用进行等效性或不等效数据分析。

179 3. 评估指标

180 概念验证研究中，应当测定包括但不限于以下指标：白细胞分类
181 计数、培养证实的感染发生率、FN 的发生率、血常规监测（包括血
182 红蛋白、淋巴细胞和血小板计数）、实际累积化疗用药剂量占计划累
183 积化疗剂量的百分比、累积 rhG-CSF 剂量、输血次数、CD34+细胞的
184 动员、PK 数据和免疫原性数据等。

185 ANC 减少是最重要的评估指标，包括 4 级 ANC 减少的发生率、
186 ANC 减少的持续时间（中性粒细胞 $<0.5 \times 10^9/L$ 和 $<0.1 \times 10^9/L$ 的天
187 数）、FN 的发生率、中性粒细胞绝对计数恢复的中位时间、中性粒细
188 胞绝对计数的最低点、从骨髓抑制开始到中性粒细胞最低值出现的时
189 间，以及中性粒细胞绝对计数最低值 $<0.5 \times 10^9/L$ 和 $<0.1 \times 10^9/L$ 的发
190 生率。

在此阶段，应进一步确定和验证 PK/PD 关系，特别是要明确血药浓度与中性粒细胞水平间的关系。

四、确证性研究设计的考虑

确证性研究的目的，是证明长效 rhG-CSF 在推荐的用法用量下，可以显著降低 FN 的发生率、持续时间和/或严重程度，同时提供充分的安全性数据。

原则上建议在至少两种不同的非髓系恶性肿瘤中（如乳腺癌和非小细胞肺癌）分别开展一项确证性临床试验，通过至少两项随机对照研究来确证长效 rhG-CSF 的有效性与安全性。

1. 确证性研究的设计

确证性研究通常应为双盲、随机、对照试验，应采用当前公认的标准治疗作为对照。可以采用优效设计或者非劣效设计。如果采用非劣效设计，应根据所选择的对照药，确定恰当的非劣效界值；并且在方案中应提供非劣效界值的确定依据。

应根据统计假设计算样本量。推荐接受试验药队列与对照药队列的样本量比例为 1:1，如设置 2:1 及以上的样本量分配，应当说明其理由。

在确证性研究中，有时可能需要对一个以上的给药治疗方案进行试验，例如，对按体重给药的方案和固定剂量的给药方案进行探索，此时，应分设队列，分别进行统计假设和计算样本量。

2. 研究人群及化疗方案

为了提高试验组间的可比性，减少研究中的干扰因素，原则上应

213 选择同一瘤种、处于相同肿瘤疾病分期和既往未曾接受化疗的非髓性
214 恶性肿瘤患者作为研究人群。

215 选择敏感人群有助于更好地识别药物疗效。鉴于目前临床中对接
216 受FN高风险化疗方案治疗的患者，国内外临床指南均建议其预防
217 性使用rhG-CSF，因此研究中受试者接受的化疗方案应为FN高风险
218 化疗方案。

219 对于采用非劣效设计的临床试验，在同一研究中，强烈建议受试
220 者接受相同的化疗方案。对于采用优效设计的临床试验，也建议受试
221 者接受相同的化疗方案；如果确实无法满足所有受试者接受相同的化
222 疗方案的要求，也应以化疗方案的不同作为受试者入组时的分层因
223 素。

224 3. 研究终点的选择

225 3.1 主要终点

226 主要疗效指标应为临床终点。

227 当rhG-CSF用于接受容易引起发热性ANC减少症的骨髓抑制性
228 化疗的非髓性恶性肿瘤患者时，其治疗目的主要是降低以FN为表现
229 的感染，因此临床终点应为FN发生率或感染发生率。4度ANC减少持
230 续时间与FN发生率的相关性已经得到业界广泛认同，因此目前可接
231 受的替代终点是化疗第1周期4度ANC减少持续时间。

232 如果计划采用其他替代终点作为主要研究终点，应提供充分的证
233 据证明该替代终点与FN发生率或感染发生率明确相关。

234 3.2 次要终点

降低感染是重要的次要终点，可考虑使用以下标准，来评估 ANC 减少引起的感染：ANC 减少期间病原微生物培养阳性或临床诊断的感染以及 FN。

此外，还建议对以下（包括但不限于）指标进行分析：第一周期 4 度及以上 ANC 减少的发生率，3 度及以上 ANC 减少的发生率/持续时间；后续化疗周期中 3 度/4 度及以上 ANC 减少的发生率/持续时间；接受抗生素治疗的患者比例；实际化疗剂量占计划用化疗剂量的百分比；发生化疗减量或推迟的患者比例；化疗推迟的天数等。

五、安全性评价

原则上，用于支持新药上市的安全性暴露量应至少满足 300 例受试者。安全性考察在各阶段试验研究中均应进行考察，对不良反应发生的类型、严重程度和频率等进行收集，并与对照组进行比较。骨痛是 rhG-CSF 治疗中常见的不良反应，在临床试验中应特别关注。

免疫原性研究是生物大分子药物特有且重要的研究项目，应贯穿在整个长效 rhG-CSF 的研发过程中。免疫原性主要通过检测抗药抗体（ADA）和中和抗体(Nab)的发生率来评价。

免疫原性试验结果与检测方法的敏感性、特异性及药物耐受性高度相关，在 FIH 临床试验时，即建议探索和建立良好的免疫原性的检测方法。在后续的概念验证和确证性临床试验中，均应对长效 rhG-CSF 的免疫原性进行研究。建议所有受试者均应进行免疫原性的考察，以了解长效 rhG-CSF 在抗体阳性率、抗体滴度、抗体出现时间、中和抗体发生率以及中和抗体与 PK/PD 的相关性等方面的特点，并与

257 对照药进行比较。建议对出现异常情况的患者根据需要适时增加检测
258 点。

259 六、小结

260 重组人粒细胞集落刺激因子（rhG-CSF）普通制剂已经上市多年，
261 而近年来 rhG-CSF 长效制剂应运而生，由于其药代方面的特性和优
262 势，可使给药次数明显减少，方便病人，并能获得不劣于普通制剂的
263 有效性和安全性。本指导原则介绍了 rhG-CSF 长效制剂预防化疗后
264 感染的临床研究设计的考虑要点，旨在强调研究设计在药物有效性及
265 安全性评价中的重要性，以供临床研发中参考。在成人安全性和有效
266 性临床研究的基础上，鼓励开展儿童研究项目。根据相关技术指导原
267 则，进一步探讨使用成人数据外推至儿科患者的可能性。

268 以上观点为针对研究设计时的重点内容的一般考虑，仅代表监管
269 部门当前的认识，鼓励研发企业与管理部門进行沟通，探索更加简便、
270 高效的研究设计方法。

271

272

273 参考文献

- 274 [1] 中国抗癌协会肿瘤临床化疗专业委员会,中国抗癌协会肿瘤支持
275 治疗专业委员会.肿瘤化疗导致的中性粒细胞减少诊治专家共识
276 （2019年版）.中国肿瘤临床, 2019, 46（17）:876-882.
- 277 [2] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会.肿瘤放化疗相关中性粒细胞
278 减少症规范化管理指南.中华肿瘤杂志, 2017, 39(11):868-878.
- 279 [3] NCCN. Myeloid Growth Factors, Version 4. 2021.

280 https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/growthfactors.pdf

281 [4] 国家药监局药审中心关于发布《药物临床试验非劣效设计指导原

282 则》的通告（2020 年第 17 号）.

283 <http://www.cde.org.cn/news.do?method=largeInfo&id=31c0a47beeb92f8f>.

284 [5] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会.中国临床肿瘤学会（CSCO）

285 肿瘤放化疗相关中性粒细胞减少症规范化管理指南(2021).临床肿瘤

286 学杂志, 2021, 26(7):638-648.

凯诺医药

慢性髓细胞白血病药物临床试验中检测 微小残留病的技术指导原则

国家药品监督管理局

2021 年 11 月

目录

一、概述.....	3
二、CML 的 MRD 检测	5
（一）MRD 检测的方法选择	5
（二）MRD 检测的方法学要求	5
（三）实验室要求	6
三、CML 新药研发中的 MRD 应用	7
（一）分子学反应的定义	7
（二）早期探索性临床研究中的应用	8
（三）关键性注册临床研究中的应用	9
1. 人群选择	9
2. 人群富集	10
3. 疗效终点	10
4. 检测时间点或时间窗	12
四、总结	12
参考文献	13

一、概述

染色体易位 $t(9;22)(q34;q11)$ 形成的费城染色体 (Ph) 是慢性髓细胞白血病¹ (Chronic myeloid leukemia, CML) 的标志性特征, 分子水平表现为 22 号染色体的 BCR 基因和 9 号染色体上的 ABL1 基因形成的 BCR-ABL1 融合基因。靶向 BCR-ABL1 融合基因的酪氨酸激酶抑制剂 (Tyrosine kinase inhibitor, TKI) 出现后, CML 患者体内的肿瘤细胞被深度清除, 显著改善了患者的生存预后及生活质量。接受 TKI 治疗的慢性期 (chronic phase, CP) 患者不但追求主要分子学反应 (Major molecular response, MMR), 同时还强调早期分子学反应 (Early molecular response, EMR) 和稳定的深度分子学反应 (Deep molecular response, DMR)。临床试验结果表明, 接受 TKI 治疗获得深度分子学反应持续超过 2 年的 CML 患者, 有可能实现无治疗缓解 (Treatment-free remission, TFR), 因此, CML 逐渐成为一种可长期生存的慢性疾病。由于深度而持久的分子学反应显著延长了 CML 患者的无事件生存期 (Event free survival, EFS)、无进展生存期 (Progression free survival, PFS) 和总生存期 (Overall survival, OS), 新药研发关键性注册研究中采用上述临床终点作为主要疗效终点越来越不可行, 而广泛地使用某一治疗节点上的分子学反应作为替代终点。

¹ 注: 疾病名“慢性髓细胞白血病”采用全国科学技术名词审定委员会编撰的《血液学名词》中的表述。

临床实践和新药研究中，通过对 CML 患者进行分子学水平微小残留病（Minimal residual disease, MRD）的监测实现对患者的分子学反应评价。因此，对 CML 患者进行规范的分子学水平 MRD 监测对于评价是否达到最佳治疗效果至关重要，在恰当的时间点进行 MRD 检测已经成为 CML 治疗过程中的常规手段。然而，国内尚无技术要求或行业标准对 CML 新药临床试验中进行 MRD 检测的方法、界值、数据/信息采集计划提出要求，也未明确 MRD 检测用于新药注册的实际价值。临床实践中实验室检测方法缺乏充分的标准化和规范性，导致检测结果的稳定性、可靠性不理想，给正确解读新药临床试验的有效性结果带来挑战。

本技术指导原则针对在我国研发的用于治疗 Ph+ CML 的新药，对临床研究尤其关键性注册临床研究中进行 MRD 检测提出观点和建议，供药物研发的申请人和研究者参考，不具有强制性的法律约束力。有关 CML 新药临床研究计划和具体设计、MRD 检测的方法学细节、伴随诊断研发的具体要求等内容，并非本技术指导原则的重点。

应用本技术指导原则时，还请同时参考国际人用药品注册技术协调会（The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH）和其他国内外已发布的相关技术指导原则。

二、CML 的 MRD 检测

（一）MRD 检测的方法选择

新药临床试验中，应采用实时定量逆转录聚合酶链式反应（Real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction, RQ-PCR）在分子学水平对 CML 患者进行治疗过程中的 MRD 监测，以确定患者体内 *BCR-ABL1* 融合基因信使核糖核酸（message ribonucleic acid, mRNA）的拷贝数水平。无论 CML 患者的疾病分期和治疗阶段，采用骨髓细胞遗传学核型分析或者荧光原位杂交（Fluorescence in situ hybridization, FISH）检测的细胞遗传学水平反应程度都不能代替分子学水平的 MRD 检测。

典型的 CML 患者为 *BCR-ABL1* (P210) 型；另有不到 5% 的 CML 患者，融合基因为 *BCR-ABL1* (P230) 型、*BCR-ABL1* (P190) 型或其他变异类型。应该在临床研究中根据 CML 患者的融合基因型为所有患者预先拟定 MRD 的检测方案。若计划纳入新诊断或已明确复发的患者，应该采用定性或 RQ-PCR 确定 *BCR-ABL1* 融合基因的类型；若计划纳入既往经过治疗且仍处在低肿瘤负荷状态的患者，至少应该获得初诊时 *BCR-ABL1* 融合基因类型的报告，以便治疗期间采用适宜的 MRD 监测方案。

（二）MRD 检测的方法学要求

临床试验中，应该提供详细的 RQ-PCR 操作方案和规范，

明确定量方法，指定对照、试剂、仪器、引物和探针序列，提供稳定的公共体系和标准品，并对实验室的检测能力（敏感度）和管理体系提出要求。

应采用国际标准（International scale, IS）对 *BCR-ABL1*（P210）mRNA 的拷贝数水平进行报告。通常选择 *ABL1* 作为内参基因，以 *BCR-ABL1* 拷贝数与 *ABL1* 拷贝数的比值代表 *BCR-ABL1* 融合基因的 mRNA 水平。也可以选择国际上推荐的其他内参基因，但同一研究中内参基因应该固定。IS 将标准化的基线值定为 100%，并采用对数标尺报告 *BCR-ABL1* mRNA 水平相比于基线的下降程度以反映分子学反应深度，例如 *BCR-ABL1*^{IS} 为 1% 代表相比于基线值下降了 2-log，0.0032% 则代表下降了 4.5-log。

骨髓和外周血都可用于 CML 患者诊断及治疗过程中的分子学检测，但治疗过程中 MRD 状态检测和监测的最佳样本为外周血。为保证结果的准确性，每份样品的目的基因及内参基因均应该做平行管或二次扩增；在目的基因拷贝数很低时，若平行管之间拷贝数差异 > 2 倍还应该进行第三次扩增。

（三）实验室要求

临床试验中应采用中心实验室进行 *BCR-ABL1* mRNA 拷贝数水平检测，应以中心实验室的检测结果作为相关疗效指标的计算依据。本地实验室可以采用与中心实验室不同的

RQ-PCR 操作方案和操作规范，但本地实验室和中心实验室检测结果的一致性将对有效性结果的评价产生影响。

中心实验室必须获得进行 BCR-ABL1^{IS} 转换的转换系数 (Conversion Factor, CF)，并通过定期的评估即室间质控样品比对校正来保证 CF 持续准确。所选择的临床研究中心应具备已获得 CF 值的本地实验室，或可在不影响受试者诊疗的情形下将样本送往已获得 CF 值的实验室进行检测。建议中心实验室和本地实验室的检测敏感度应达到可检测的 ABL1 拷贝数 $\geq 32,000$ 。

三、CML 新药研发中的 MRD 应用

(一) 分子学反应的定义

临床实践中常用的 CML 分子学反应定义如表 1 所示。

表 1 慢性髓细胞白血病分子学反应定义

分子学反应	定义
主要分子学反应 (MMR) / MR3.0	BCR-ABL1 ^{IS} $\leq 0.1\%$ (ABL1 拷贝数 $\geq 10,000$)，即 BCR-ABL1 拷贝数相比于基线下降 3-log
MR4.0	BCR-ABL1 ^{IS} $\leq 0.01\%$ (ABL1 拷贝数 $\geq 10,000$)，即 BCR-ABL1 拷贝数相比于基线下降 4-log
MR4.5	BCR-ABL1 ^{IS} $\leq 0.0032\%$ (ABL1 拷贝数 $\geq 32,000$)，即 BCR-ABL1 拷贝数

	相比于基线下降 4.5-log
MR5.0	BCR-ABL1 ^{IS} ≤0.001%(ABL1 拷贝数 ≥100,000) , 即 BCR-ABL1 拷贝数 相比于基线下降 5-log
早期分子学反应	治疗 3 个月时 BCR-ABL1 ^{IS} ≤10%或 治疗 6 个月时 BCR-ABL1 ^{IS} ≤1%
MR=molecular response, 分子学反应; MMR=major molecular response, 主要分子学反应。	

分子学反应 (Molecular response, MR) 的程度和发生的时间都对判断其临床价值具有意义。在治疗开始后 12 个月内任何时间点获得稳定的主要分子学反应 (MMR) 是 CML 一线 TKI 和二线 TKI 治疗的目标。MR4.0 和 MR4.5 是在 MMR 的基础上所追求的深度分子学反应 (DMR), 持久的 DMR 是实现无治疗缓解 (Treatment-free remission, TFR) 的前提。丧失 MMR 或出现耐药性 BCR-ABL1 激酶区突变被认为是当前治疗分子学反应的终止。其中丧失 MMR 定义为已经实现 MMR 的患者再次出现 2 次 BCR-ABL1^{IS}>0.1%(同一份样本应分析两次, 4~6 周内另行取样并进行检查)。若出现经过证实的 CHR 丧失或 CCyR 丧失或进展至 AP/BP 或死亡, 则可以在没有 MMR 评估的情况下同时判断为丧失 MMR。

(二) 早期探索性临床研究中的应用

考虑到 MRD 对于 CML 患者的诊疗具有非常重要的临

床价值，无论目标人群为何种疾病阶段和治疗史的患者，均应在早期探索性临床研究中受试者进行规范的 MRD 监测，并且充分收集各种水平的分子学反应数据。监测的方法和流程应该符合临床实践中形成的共识。早期探索性临床试验中获得的 MRD 相关数据可以为推荐剂量、目标人群的选择、关键性注册研究的设计提供依据，也可用于分析 MRD 状态与临床终点之间的相关性。

（三）关键性注册临床研究中的应用

治疗过程中的 MRD 状态是衡量一种 CML 新药临床价值的关键指标。对于接受一线或二线 TKI 治疗的慢性期患者而言，多数患者经过 TKI 治疗可以获得与健康人相似的预期生存期，追求更早、更深、更持久的分子学反应是新药研发的首要目标。在实现 MMR 的基础上，获得持久的 DMR 并实现 TFR 是下一个治疗目标。对于多次复发的 CP 患者，以及加速期（Accelerated phase, AP）和急变期（Blastic phase, BP）患者，分子学水平的 MRD 监测也是评价治疗获益的重要手段。

1. 人群选择

分子学反应的发生时间、深度和持续时间对判断患者的长期预后至关重要，申请人应该考虑将 MRD 作为临床试验中的随机分层因素、筛选高风险人群的指标或亚组分析的生物标志物。例如，在以往接受过 TKI 治疗的 CML 患者为

目标人群的临床试验中，可收集患者既往治疗/末次治疗是否实现 MMR 或达到的 MRD 水平，作为随机分层的因素；以新诊断患者为目标人群时，以是否在某一时间节点实现 MMR 或分子学反应程度对其他有效性指标进行亚组分析。

2. 人群富集

MRD 状态也可以成为 CML 临床研究中富集人群的指标。例如，接受 TKI 治疗的过程中，部分患者在不同治疗节点的 BCR-ABL1^{IS} 水平符合当时的“警告”标准，可将这类患者纳入同一研究以探索当前治疗药物的更优剂量，或新药是否可获得比当前药物更具优势的治疗反应；可将当前治疗过程中丧失分子学反应或未在 12 个月内获得 MMR 作为未在分子学水平实现治疗目标的人群富集依据。

3. 疗效终点

对于新诊断或一线 TKI 治疗失败的 CML-CP 患者最佳治疗反应为起始治疗后 12 个月内实现稳定持久的 MMR，临床试验的主要疗效终点应反映这一治疗目标。对作为主要疗效指标的 MMR 进行计算时，应该仅将在规定的评估节点时被评价为 MMR 的受试者判断为反应者，而不包括曾经获得过 MMR 但已经丧失 MMR 的受试者。新产品应该开展与现有一代或二代 TKI 产品相比较的随机对照研究，证明其在获得 MMR 方面更具优势，同时对缓解持续时间、EMR、DMR（MR4.0 和 MR4.5）、至反应时间、各评估节点时的分子学

反应率等指标进行全面的比较分析。申请人应该基于前期探索研究获得的数据，在开展关键性注册研究之前，与审评部门就对主要疗效指标进行主要分析的时间节点、支持注册的最短随访时间等达成一致。考虑到 CML 患者接受 TKI 治疗后，普遍可获得较长的 EFS、PFS 和/或 OS，因此要求新产品上市之前观察到上述临床终点层面的治疗获益并不现实。然而，强烈建议申请人在新产品基于分子学反应率获批上市后，继续在关键性注册研究中对试验组和对照组的长期治疗获益（例如 PFS 和 OS 等）进行随访和比较；考虑到 DMR 及其持续时间对实现 TFR 具有重要意义，应在后期随访中对相关指标持续进行评估和分析。

对于多次复发的 CML-CP 患者，以及 CML-AP 和 CML-BP 患者，当前的临床实践并不追求 MMR。但是针对这部分患者人群的临床试验，也应将分子学反应相关指标列入次要疗效指标，作为有效性评价的支持性数据。

受试者已经实现完全血液学缓解（Complete hematologic response, CHR）是对 MMR 以及 DMR 进行评价的前提。作为疗效终点时，应该基于意向性治疗（Intent-to-treat, ITT）人群计算分子学反应率，而非经试验治疗后达到 CHR 人群或分子学反应可评估人群（可作为敏感性分析人群）。因各种原因未进行 MRD 评价或检测失败的受试者不应被判断为反应者。需要注意的是，当前对于分子学反应与 CML 长期生

存的相关性研究均基于已有的 TKI 产品。不排除在新的 TKI 产品中观察到不同规律的可能性，也不排除未来出现并非以 BCR-ABL1 作为治疗靶点的新产品。审评部门对分子水平 MRD 监测在 CML 新药研发中的监管考虑可能因产品的作用机制、治疗目的有所调整，申请人在开展关键性临床研究之前应与审评专业技术机构进行充分的沟通交流。

4. 检测时间点或时间窗

应该至少每 3 个月进行一次 *BCR-ABL1* mRNA 水平检测，即使受试者已经获得了 MMR 或实现 TFR。获得 MMR 且持续缓解时间超过 24 个月的受试者，可以酌情降低检测频率至每 6 个月一次，直至当前治疗首次给药后至少 5 年或丧失分子学水平反应。接受异基因造血干细胞移植的受试者应该在移植前后均进行 *BCR-ABL1* mRNA 水平检测。未达到最佳反应，或已达到 MMR 但 *BCR-ABL1* mRNA 水平出现增高趋势的受试者，应该适当增加检测频率。未获得最佳疗效、治疗失败或出现病情进展时、AP 和 BP 患者在接受治疗前应进行 *BCR-ABL1* 激酶区突变检测。

四、总结

本技术指导原则阐述了药品审评专业技术机构当前对抗 CML 新药临床研究中 MRD 检测的观点和认识，通过明确 MRD 对于 CML 新药研发的价值，对临床试验中 MRD 的检测方法、临界值、检测计划、相关信息/数据的采集提出规

范化要求，实现提高临床试验中 MRD 检测结果可靠性和可比性的目的。本技术指导原则不能涵盖 CMLMRD 检测和评价的全部内容，鼓励研发从业者与药品审评专业技术机构及时沟通，持续完善本技术指导原则。

参考文献

- 1、FDA. Hematologic Malignancies: Regulatory Considerations for Use of Minimal Residual Disease in Development of Drug and Biological Products for Treatment[EB/OL].(2020/1/24) [2021/5/11].
<https://www.fda.gov/drugs/media/134605/download>.
- 2、FDA. Table of Surrogate Endpoints That Were the Basis of Drug Approval or Licensure[EB/OL].(2021/3/31) [2021/5/11].
<https://www.fda.gov/drugs/development-resources/table-surrogate-endpoints-were-basis-drug-approval-or-licensure>.
- 3、秦亚臻，主鸿鹄. 慢性髓性白血病分子监测手册[M]. 北京：人民卫生出版社，2013.
- 4、中华医学会血液学分会. 慢性髓性白血病中国诊断与治疗指南（2020 年版）[J]. 中华血液学杂志，2020，41(5):353-364.
- 5、中华医学会血液学分会试验诊断学组，中国慢性髓性白血病联盟专家组. 中国慢性髓性白血病诊疗监测规范（2014 年

版) [J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(8):781-784.

6、Hochhaus A, Baccarani A, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2020, 34(4):966-984.

7、Hochhaus A, Saussele S, et al. Chronic myeloid leukaemia: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology. 2017, 28(suppl 4):iv41-iv51.

8、Soverini S, De Benedittis C, et al. Best practices in chronic myeloid leukemia monitoring and management. Oncologist. 2016, 21(5):626-33.

长效重组人粒细胞集落刺激因子预防
化疗后中性粒细胞减少性发热
临床试验设计指导原则（试行）

目录

一、前言	1
二、背景	2
三、探索性研究设计的考虑	4
(一) 首次人体临床试验	4
1. 受试者的选择	4
2. 研究设计	4
3. 临床药理学研究	5
(二) 概念验证研究	6
1. 研究人群及化疗方案	7
2. 研究设计	7
3. 评估指标	8
四、确证性研究设计的考虑	8
1. 确证性研究的设计	9
2. 研究人群及化疗方案	9
3. 研究终点的选择	10
五、安全性评价	11
六、小结	12
参考文献	12

一、前言

近年来，随着肿瘤基础、转化和临床研究的发展深入，肿瘤治疗的方式及药物的选择更加个体化，新的靶向药物和免疫治疗药物不断涌现，但是以细胞毒药物为基础的化疗（简称化疗）仍然是肿瘤治疗的基石。中性粒细胞（Absolute neutrophil count, ANC）减少症是化疗引起的骨髓抑制相关血液学毒性，其减少程度和持续时间与患者感染风险甚至死亡风险密切相关。

重组人粒细胞集落刺激因子（recombinant human granulocyte- colony stimulating factor, rhG-CSF）作为防治肿瘤化疗引起的 ANC 减少症的有效药物已经上市多年。rhG-CSF 通过刺激骨髓造血干细胞向粒系细胞分化，促进粒细胞增殖、成熟和释放，恢复外周血中性粒细胞数量，主要用于预防非髓源性肿瘤化疗后的 ANC 减少症，其常见不良反应有骨和关节痛、肌肉酸痛、肝肾功能指标异常等。由于 rhG-CSF 普通制剂的半衰期较短，在一个化疗周期中患者需要多次注射用药，治疗上多有不便，且可能增加感染风险。

如今，已经能够通过改构 G-CSF 蛋白改进其药代动力学（PK）特征，达到延长半衰期、减少给药次数的目的，即为长效 rhG-CSF，可由每日给药减少为每个化疗周期给药一次，大大地提高了患者用药的依从性。药代动力学的变化可引起体内药效学特征的变化，进而对安全性和有效性产生影响，

因此，如何合理地选择长效 rhG-CSF 的给药剂量和频次至关重要——既要确保长效 rhG-CSF 能有效地预防放、化疗所致以中性粒细胞减少性发热（febrile neutropenia, FN）为表现的感染，还要避免药物引起过高的中性粒细胞计数所带来的相关不良反应。目前国内已有多个长效 rhG-CSF 产品获批上市，同时，还有多项同类产品正在研发之中。鉴于研发此类长效 rhG-CSF 主要用于成年非髓性恶性肿瘤患者在接受容易引起 FN 的骨髓抑制性化疗时，降低以 FN 为表现的感染发生率适应症，本指导原则旨在提出临床研究指导和建议。

本指导原则仅代表药品监管部门当前的观点和认知。随着医学科学和临床试验的发展，本指导原则中的相关内容将不断完善与更新。应用本指导原则设计和实施研究时，请同时参考药物临床试验质量管理规范（good clinical practice, GCP）、人用药品技术要求国际协调理事会（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH）和其他国内已发布的相关指导原则。

二、背景

ANC减少症是骨髓抑制性化疗最严重的血液学毒性。ANC减少的程度、持续时间与感染甚至死亡风险直接相关，严重地影响了化疗药物的相对剂量强度、密度与既定周期，临床上往往因此降低化疗药物剂量、延迟治疗时间或更改化

疗方案，最终难以达到预期的疗效。因此，预防或治疗ANC减少症是足剂量足疗程化疗或剂量密集化疗的根本保证。

1.中性粒细胞减少性发热

中性粒细胞减少性发热(FN)是ANC减少症最主要的临床并发症。FN的定义为单次口腔温度 $\geq 38.3^{\circ}\text{C}$ 或 $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ 持续1小时以上，同时ANC $< 0.5 \times 10^9/\text{L}$ 或ANC $< 1.0 \times 10^9/\text{L}$ 但预计在随后的48小时后将下降至 $< 0.5 \times 10^9/\text{L}$ 。

2.中性粒细胞减少性发热风险评估

根据发生FN的风险,可将化疗方案分为以下三类:

A.中性粒细胞减少性发热高度风险方案，定义为化疗初治患者的FN发生率 $> 20\%$ 的化疗方案

B.中性粒细胞减少性发热中度风险方案，定义为化疗初治患者的FN发生率介于10-20%之间的化疗方案

C.中性粒细胞减少性发热低度风险方案，定义为化疗初治患者的FN发生率 $< 10\%$ 的化疗方案

3.化疗相关中性粒细胞减少症分层管理

对于接受FN高度风险化疗方案治疗的患者，无论其治疗目的是根治肿瘤或者延长生存时间，或是减轻疾病相关症状、改善生存质量，均建议宜预防性使用rhG-CSF。

对于接受FN中度风险化疗方案治疗的患者，除了化疗方案和所治疗的特定的恶性肿瘤以外，还需要考虑患者自身的危险因素，比如年龄 > 65 岁、既往接受过化疗或放疗、治疗

前已经存在ANC减少或者存在肿瘤骨髓浸润、存在感染/开放的伤口、近期手术史、一般体力状态差、肾功能异常、肝功能异常（特别是胆红素升高）以及艾滋病毒（HIV）感染等。若患者存在任何一项上述高风险因素时，建议预防性使用rhG-CSF。

对于接受FN低度风险化疗方案治疗的患者，不建议预防性使用rhG-CSF。

三、探索性研究设计的考虑

（一）首次人体临床试验

首次人体临床试验（first in human, FIH）的目的是对长效rhG-CSF的安全性耐受性进行探索，同时获得其PK和PD参数，并对PK/PD关系进行分析等。

1.受试者的选择

通常而言，健康受试者的均一性较高，因此可以选择在健康受试者中开展FIH试验。

由于预期新的长效rhG-CSF可能带来严重的不良反应，例如可引发白细胞过度增多（ $>70 \times 10^9/L$ ），进而具有导致脾肿大、脾自发性破裂的风险，通常选择在非髓性恶性肿瘤患者中开展FIH试验。一般情况下可以招募符合（一线）姑息性细胞毒化疗条件的患者。

2.研究设计

通常需要开展多个剂量的爬坡研究，对长效rhG-CSF耐

受性进行研究，以探索其安全剂量范围。

当选择健康受试者作为研究对象时，可以采用安慰剂对照、盲态研究设计，在某一剂量水平，接受长效 rhG-CSF 的受试者数应大于接受安慰剂的受试者数。通过安慰剂对照，有利于更清晰的反映长效 rhG-CSF 的安全性特征。

当选择肿瘤患者作为研究对象时，也可酌情采用单臂、开放性研究设计。

3. 临床药理学研究

3.1 PK/PD 数据分析

在 FIH 试验时，应注意开展临床药理学研究。应获得足够的数据描绘长效 rhG-CSF 基本的 PK 参数（例如 AUC、 C_{max} 、 T_{max} 、 C_{min} 、 $T_{1/2}$ 和 CL）以及给药后的药效学（PD）指标随时间的变化。

通常采用中性粒细胞绝对值变化作为 PD 指标，也可同时对髓系（如 CD34 细胞）和非髓系细胞（如单核细胞、淋巴细胞、血小板和红系细胞）的变化，进行比较研究。

使用 rhG-CSF 后，中性粒细胞绝对值曲线呈双峰形，第 1 峰是 rhG-CSF 促进骨髓已成熟的粒细胞向外周血释放的结果，第 2 峰是 rhG-CSF 刺激骨髓粒系造血祖细胞加速增殖、分化、成熟和释放所致。一般单次给药后，中性粒细胞的第 1 峰达峰时间将决定 rhG-CSF 给药时间与化疗周期的关系（例如，在开始化疗前，或化疗结束后给药）；而中性粒细

胞在高水平的维持时间以及第 2 峰出现的时间，决定 rhG-CSF 给药频次。

应对 PK 与 PD 之间的相关性进行评估。强烈建议在下一项研究中全面收集 PK 和 PD 数据，以尽量减少研究间的差异性，并且更好地描述 PK/PD 关系。

需要关注的是，开发长效 rhG-CSF 的主要目的，是通过延长产品的半衰期，实现患者用药频次的降低，提高便利性。目前已有多个长效 rhG-CSF 上市，其给药频次均为每个化疗周期给药 1 次，因此对于每个化疗周期给药频次超过 1 次的长效 rhG-CSF，需要谨慎考虑其立题合理性。

3.2 生物活性测定方法

通常在开展临床药理学研究时，应当有相应的生物活性测定方法进行血药浓度测定。但是对于药代动力学研究，应当建立和使用特异性较高的检测方法（例如 RIA、EIA、ELISA 等）。

（二）概念验证研究

通过概念验证（proof of concept, POC）研究，将进一步对长效 rhG-CSF 的安全性和有效性进行考察，明确其合理的剂量及给药周期，为关键研究设计提供支持。

通过概念验证研究应当回答剂量（剂量强度和密度）和/或给药方案对 ANC 减少的发生时间、发生率、程度和持续时间有何影响的问题。此部分的结果应该得出用于确证性研

究的给药方案建议，包括开始治疗的时间及疗程，以及是否由于化疗对骨髓抑制的强度不同，量效关系会有差异等。

1. 研究人群及化疗方案

研究应当在同一瘤种（例如疾病分期相同的相同肿瘤）的患者中进行。

建议研究中受试者接受相同的化疗方案治疗。如果研究中要纳入接受不同化疗方案治疗的受试者，则应当在随机分组时按照化疗方案的不同予以分层。应该具体说明化疗方案对应的 FN 风险度；不建议在研究中纳入接受不同 FN 风险度化疗方案治疗的受试者。

2. 研究设计

研究的设计应当为双盲、随机、平行分组的量效关系试验，对照组用药宜选择普通制剂 rhG-CSF 和标准剂量。根据 FIH 试验中对于 PK/PD 分析，确定概念验证研究中拟探索的长效 rhG-CSF 的剂量和给药频次，通常对选定的 2-3 个剂量的安全有效性进行验证；在此阶段，还可以进一步探索按公斤体重计算剂量和固定剂量的不同给药方式。

如果需要评价 1 个以上的给药途径，应当给出首选的一个给药途径或多个给药途径，并且说明理由。不同的给药途径，都需要对 ANC 减少终点药效学作用进行等效性或不等效数据分析。

3.评估指标

概念验证研究中，应当测定包括但不限于以下指标：白细胞分类计数、培养证实的感染发生率、FN 的发生率、血常规监测（包括血红蛋白、淋巴细胞、单核细胞和血小板计数）、实际累积化疗用药剂量占计划累积化疗剂量的百分比、累积 rhG-CSF 剂量、输血次数、CD34+细胞的动员、PK 数据和免疫原性数据等。

ANC 减少是最重要的评估指标，包括 4 级 ANC 减少的发生率、ANC 减少的持续时间（中性粒细胞 $<0.5 \times 10^9/L$ 和 $<0.1 \times 10^9/L$ 的天数）、FN 的发生率、中性粒细胞绝对计数恢复的中位时间、中性粒细胞绝对计数的最低点、从骨髓抑制开始到中性粒细胞最低值出现的时间，以及中性粒细胞绝对计数最低值 $<0.5 \times 10^9/L$ 和 $<0.1 \times 10^9/L$ 的发生率。

在此阶段，应进一步确定和验证 PK/PD 关系，特别是要明确血药浓度与中性粒细胞水平间的关系。

四、确证性研究设计的考虑

确证性研究的目的，是证明长效 rhG-CSF 在推荐的用法用量下，可以显著降低 FN 的发生率、持续时间和/或严重程度，同时提供充分的安全性数据。

原则上建议在至少两种不同的非髓系恶性肿瘤中（乳腺癌和非小细胞肺癌）分别开展一项确证性临床试验，通过至少两项随机对照研究来确证长效 rhG-CSF 的有效性与安全

性。

1. 确证性研究的设计

确证性研究通常应为双盲、随机、对照试验，应采用当前公认的标准治疗作为对照。可以采用优效设计或者非劣效设计。如果采用非劣效设计，应根据所选择的对照药，确定恰当的非劣效界值；并且在方案中应提供非劣效界值的确定依据。

应根据统计假设计算样本量。推荐接受试验药队列与对照药队列的样本量比例为 1:1，如设置 2:1 及以上的样本量分配，应当说明其理由。

在确证性研究中，有时可能需要对一个以上的给药治疗方案进行试验，例如，对按体重给药的方案和固定剂量的给药方案进行探索，此时，应分设队列，分别进行统计假设和计算样本量。

2. 研究人群及化疗方案

为了提高试验组间的可比性，减少研究中的干扰因素，原则上应选择同一瘤种、处于相同肿瘤疾病分期和既往未曾接受化疗的非髓性恶性肿瘤患者作为研究人群。

选择敏感人群有助于更好地识别药物疗效。鉴于目前临床中对接受FN高度风险化疗方案治疗的患者，国内外临床指南均建议其预防性使用rhG-CSF，因此研究中受试者接受的化疗方案应为FN高度风险化疗方案。

对于采用非劣效设计的临床试验，在同一研究中，强烈建议受试者接受相同的化疗方案。对于采用优效设计的临床试验，也建议受试者接受相同的化疗方案；如果确实无法满足所有受试者接受相同的化疗方案的要求，也应化疗方案的不同作为受试者入组时的分层因素。

3.研究终点的选择

3.1 主要终点

主要疗效指标应为临床终点。

当rhG-CSF用于接受容易引起FN的骨髓抑制性化疗的非髓性恶性肿瘤患者时，其治疗目的主要是降低以FN为表现的感染，因此临床终点应为FN发生率或感染发生率。4度ANC减少持续时间与FN发生率的相关性已经得到业界广泛认同，因此目前可接受的替代终点是化疗第1周期4度ANC减少持续时间。

如果计划采用其他替代终点作为主要研究终点，应提供充分的证据证明该替代终点与FN发生率或感染发生率明确相关。

3.2 次要终点

降低感染是重要的次要终点，可考虑使用以下标准，来评估ANC减少引起的感染：ANC减少期间病原微生物培养阳性或临床诊断的感染。

此外，还建议对以下（包括但不限于）指标进行分析：

第一周期 4 度及以上 ANC 减少的发生率，3 度及以上 ANC 减少的发生率/持续时间；后续化疗周期中 3 度/4 度及以上 ANC 减少的发生率/持续时间；接受抗生素治疗的患者比例；实际化疗剂量占计划用化疗剂量的百分比；发生化疗减量或推迟的患者比例；化疗推迟的天数等。

五、安全性评价

原则上，用于支持新药上市的安全性暴露量应至少满足 300 例受试者。安全性考察在各阶段试验研究中均应进行考察，对不良反应发生的类型、严重程度和频率等进行收集，并与对照组进行比较。骨痛是 rhG-CSF 治疗中常见的不良反应，在临床试验中应特别关注。

免疫原性研究是生物大分子药物特有且重要的研究项目，应贯穿在整个长效 rhG-CSF 的研发过程中。免疫原性主要通过检测抗药抗体（ADA）和中和抗体(Nab)的发生率来评价。

免疫原性试验结果与检测方法的敏感性、特异性及药物耐受性高度相关，在 FIH 临床试验时，即建议探索和建立良好的免疫原性的检测方法。在后续的概念验证和确证性临床试验中，均应对长效 rhG-CSF 的免疫原性进行研究。建议所有受试者均应进行免疫原性的考察，以了解长效 rhG-CSF 在抗体阳性率、抗体滴度、抗体出现时间、中和抗体发生率以及中和抗体与 PK/PD 的相关性等方面的特点，并与对照药进

行比较。建议对出现异常情况的患者根据需要适时增加检测点。

六、小结

重组人粒细胞集落刺激因子（rhG-CSF）普通制剂已经上市多年，而近年来 rhG-CSF 长效制剂应运而生，由于其药代方面的特性和优势，可使给药次数明显减少，方便病人，并能获得不劣于普通制剂的有效性和安全性。本指导原则介绍了 rhG-CSF 长效制剂预防化疗后中性粒细胞减少性发热的临床研究设计的考虑要点，旨在强调研究设计在药物有效性及安全性评价中的重要性，以供临床研发中参考。在成人安全性和有效性临床研究的基础上，鼓励开展儿童研究项目。根据相关技术指导原则，进一步探讨使用成人数据外推至儿科患者的可能性。

以上观点为针对研究设计时的重点内容的一般考虑，仅代表监管部门当前的认识，鼓励研发企业与管理部門进行沟通，探索更加简便、高效的研究设计方法。

参考文献

[1] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会.中国临床肿瘤学会（CSCO）肿瘤放化疗相关中性粒细胞减少症规范化管理指南(2021).临床肿瘤学杂志, 2021, 26(7):638-648.

[2] 中国抗癌协会肿瘤临床化疗专业委员会,中国抗癌协会肿瘤支持治疗专业委员会.肿瘤化疗导致的中性粒细胞减少诊治专家共识(2019年版).中国肿瘤临床,2019,46(17):876-882.

[3] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会.肿瘤放化疗相关中性粒细胞减少症规范化管理指南.中华肿瘤杂志,2017,39(11):868-878.

[4] NCCN. Myeloid Growth Factors, Version 4, 2021.

https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/growthfactors.pdf

[5] 国家药监局药审中心关于发布《药物临床试验非劣效设计指导原则》的通告(2020年第17号).

<http://www.cde.org.cn/news.do?method=largeInfo&id=31c0a47beeb92f8f>.