

团 体 标 准

T/SHPPA 019—2023

免疫细胞治疗产品生产用质粒生产质量管理指南

Guidance for the manufacturing quality management of plasmids used in
the production of Immune cell therapy products

2023-05-10 发布

2023-06-01 实施

上海医药行业协会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 基本要求	2
5 技术要求	2
5.1 机构与人员	2
5.2 厂房与设备	2
5.3 生产管理	3
5.4 物料管理	5
5.5 细菌种子批	5
5.6 工艺控制	6
5.7 质量控制	6
5.8 包装与贮存	7
5.9 运输	7
参考文献	8

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由上海药品审评核查中心提出。

本文件由上海医药行业协会归口。

本文件起草单位：上海药品审评核查中心、江苏省药品监督管理局审核查验中心、上海市生物医药科技发展中心、上海药明生基医药科技有限公司、上海医药行业协会。

本文件主要起草人：李香玉、王立新、俞佳宁、王金伟、成殷、孙程洁、宋丹、党可纯、孙祎敏、卜修民、李积宗、史彤、梁银杏、高杨、谭建新、梁海兰、汪伟、夷征宇、吴耀卫、朱蓓芬。

本文件首批执行单位：无锡生基医药科技有限公司、上海药明巨诺生物科技有限公司、上海科济制药有限公司、上海优卡迪生物医药科技有限公司、上海邦耀生物科技有限公司、上海赛比曼生物科技有限公司、上海微知卓生物科技有限公司、南京驯鹿生物医药有限公司、南京传奇生物科技有限公司、南京北恒生物科技有限公司、合源生物科技(天津)有限公司、北京艺妙神州医药科技有限公司。

免疫细胞治疗产品生产用质粒生产质量管理指南

1 范围

本文件适用于生产免疫细胞治疗产品体外基因修饰系统用的质粒的生产质量管理。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

药品生产质量管理规范（2010年修订）及其附录
中华人民共和国药典（2020年版）
药品记录与数据管理要求（试行）
无菌工艺模拟试验指南（无菌制剂）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

免疫细胞治疗产品 immune cell therapy products

指源自人体（自体/异体）细胞或人源细胞系的细胞，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、遗传修饰、细胞库（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免疫细胞治疗产品。

3.2

质粒 plasmid

系细菌等生物中染色体以外的环状DNA元件，具有自主复制能力，使其在子代细胞中能保持恒定的拷贝数，并表达所携带的遗传信息。

3.3

细菌种子批 bacterial bank

指通过将质粒转化宿主菌，经单克隆筛选及培养传代后建立的种子库。

3.4

体外基因修饰系统 ex vivo genetic manipulation system

指在人体外，将外源基因等导入细胞，通过添加、替代、补偿、阻断、修正特定基因从而为获得细胞治疗产品或细胞治疗产品生产用种子细胞而使用的修饰系统。

3.5

生产区域 production area

指建筑物内一组特定的用于生产操作的房间，通常配备相对独立的空调系统（包括通风、温度和必要的湿度调节，以及必要的空气过滤净化）和人、物流通道。

3.6

密闭系统 closed system

指为了避免产品或物料暴露于室内环境而设计和操作使用，且可经验证的系统。

4 基本要求

4.1 质粒作为体外基因修饰系统的生产用起始关键物料，被用于将目的基因转染到基因修饰载体中（如慢病毒载体），进一步生产免疫细胞治疗产品。此类质粒通常不直接作用于免疫细胞治疗产品，其生产、检验和放行管理应参考《药品生产质量管理规范》及其相关附录的要求，应根据其使用于不同的研发阶段、不同的基因修饰载体及免疫细胞治疗产品及其不同的生产工艺需求，企业可以根据风险评估的结果确定生产过程中适用GMP要求的符合程度。

4.2 早期研发阶段中应重点关注质粒的设计和构建，考虑元件的功能性和安全性，一般应避免使用β-内酰胺类抗生素抗性基因，在采用土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件等有风险的调控元件时，应经过充分风险评估，在必要时进行相应安全性改造。

4.3 质粒的生产应重点关注生产用原材料的质量控制、批间差异、杂质水平、工艺中间控制、污染控制等可能影响免疫细胞治疗产品安全性、有效性的因素；质粒的质量控制方面应重点关注安全性和转染有效性相关项目，如超螺旋比例、宿主DNA残留、宿主RNA残留、宿主蛋白残留等。如果质粒生产或质量控制发生变更，应进行充分研究和评估，关注变更对质粒质量的影响，也应将对体外基因修饰系统及免疫细胞治疗产品的影响纳入考虑范围。

4.4 对于采用多个质粒瞬时共转染工艺生产体外基因修饰载体（如三质粒或者四质粒系统），质粒分为含有目的基因的转移质粒和在转染过程中发挥辅助作用的通用型辅助质粒两种类别，两类质粒的生产技术要求和质量控制原则应保持一致。

4.5 药品上市许可持有人（MAH）对质粒的质量负有责任。

5 技术要求

5.1 机构与人员

5.1.1 企业应设置与质粒生产相适应的生产管理、质量管理、供应链管理等部门，参考药品生产要求的质量管理体系，各部门应有明确的职责。

5.1.2 企业应当配备与产品生产、检验与质量管理相适应的技术人员，具有适当资质和丰富实践经验的操作人员和管理人员。参与质粒生产和检验的人员应当具备产品相关知识，有书面文件明确其相关职责。

5.1.3 参与质粒生产和检验的人员应接受相关的卫生、病原微生物处理、无菌操作（如适用）等相关专业培训。

5.2 厂房与设备

5.2.1 生产用厂房设施应根据质粒产品特性，生产工艺流程和工艺控制要求设计，充分考虑人流、物流的合理性，尽可能减少人流和物流交叉污染的风险，宜采用废弃物单向流设计，确保不对质粒产品造成污染。

5.2.2 质粒发酵区域作为有菌操作区应与纯化区域物理分开，宜配备独立的空调净化系统，并关注预

防交叉污染的措施。

5.2.3 生产区内应提供生产用压缩空气、纯蒸汽、制药用水等公用介质，并进行定期监测。关注工艺用水的流向设计，应避免倒流，防止污染及交叉污染。

5.2.4 生产的关键设备应进行计量、确认与验证，与产品直接接触的设备或者耗材宜使用一次性系统，以有效地防止污染和交叉污染；使用非一次性系统，应采取适当措施降低污染的风险，使用后的房间和设备需进行适当清洁，设备清洁方法应经过验证。

5.2.5 对于发酵、纯化等生产关键步骤，宜采用电子化系统控制设备，可参考《药品生产质量管理规范》计算机化系统附录、《药品记录与数据管理要求（试行）》的要求，对电子化系统进行多级账号管理，并纳入计算机化系统，以确保数据的可靠性、真实性和可追溯性。

5.2.6 质粒生产应在受控环境中进行，环境需采取有效控制措施并进行日常监测，以尽可能降低环境微生物及颗粒等对产品可能造成的污染，操作环境的洁净度级别宜按照表1中的示例进行选择。

表 1 生产操作环境的洁净度级别

洁净度级别	以无菌质粒产品生产操作为例
B级背景下的A级	质粒除菌过滤后的分装（如采用密闭系统进行该操作，可根据风险评估降低背景级别）。
C级背景下的局部A级	1. 生产过程中菌种的接种、传代、取样等操作； 2. 采用非密闭系统进行生产用无菌溶液的除菌过滤、无菌生产操作等； 3. 质粒的除菌过滤。
C级	质粒纯化操作。
D级	1. 发酵培养基配制及灭菌； 2. 采用密闭系统进行微生物培养及发酵； 3. 采用密闭系统进行生产用无菌溶液的除菌过滤、无菌生产操作等。

5.3 生产管理

5.3.1 一般要求

质粒生产应依照已批准的工艺规程和操作规程进行操作并有相关记录，确保生产过程的有效控制，持续、稳定地生产出符合质量要求的产品。

5.3.2 分批原则

企业应当建立划分质粒产品生产批次的规则，生产批次的划分应当能够确保同一批次产品质量和特性的均一性。原则上来源于同一工作菌种发酵获得菌体经同一生产周期裂解、纯化后的获得质量和特性均一的产品为一批。若不同批次工作菌种发酵获得的菌体经裂解纯化步骤后合并进行分装成最终成品的，应评估可能存在的风险并经相应的验证。质粒生产日期不得迟于产品分装前经最后混合的操作开始日期。

5.3.3 工艺验证

5.3.3.1 应基于产品研发阶段、质粒特点、质粒工艺是否相同等因素结合质量风险管理原则进行风险

评估，确定各质粒工艺确认或验证的批次和方案，如工艺过程控制确认、中间产物贮存稳定性研究、多批次质量分析以及杂质清除研究等。

5.3.3.2 通常转移质粒（含有目的基因）工艺验证一般应包含三个连续成功的工艺生产批次，如需减少辅助质粒验证批次，首次验证应根据风险评估结果，选择其中一种有代表性的质粒进行三批次工艺验证，其他质粒工艺验证可根据风险评估结果制定验证方案。商业化生产中应进行持续的工艺确认，如因变更需要进行再次验证时，可根据风险评估结果确定合理的工艺验证批次。

5.3.4 污染和交叉污染

质粒产品生产过程中应当基于产品特性以及工艺流程，采取有效措施防止污染和交叉污染，控制质量风险，如：

- a) 宜采用密闭系统进行生产，如发酵采用密闭式发酵罐系统。生产过程中有产品暴露的操作时，宜采取合理措施降低操作带来的污染风险，如在生物安全柜中操作等。密闭系统发生意外开启或泄漏的，应当进行风险评估并采取有效的应急措施；
- b) 不同品种的质粒应采用阶段性生产方式进行生产，生产品种轮换时应按照批准的清场操作规程进行清洁和清场，清洁程序应经过验证；
- c) 采用密闭系统生产的，同一生产操作区域或同一培养箱内可同时进行同一品种的不同批次产品生产，但应当采取有效措施避免批间污染及混淆；
- d) 宜采用一次性使用系统进行生产，尤其是与产品直接接触的耗材，如菌种培养摇瓶、管道、除菌过滤器等等。如采用重复使用的设备及物料，应在使用后按照批准的清洁程序进行清洁及适当的监测，清洁程序应当经过验证；
- e) 不同品种质粒纯化生产时与产品介质接触的过滤器、中空纤维柱、膜包、层析介质等应按照品种专用，不得共用。过滤器、中空纤维柱、膜包等一次性耗材的材质应经过溶出析出评估或测试。重复装填层析柱应对层析柱保存、清洗、安装工艺进行研究。层析介质及膜包等寿命应经过评估或验证；
- f) 含有工程菌的料液、检测剩余的样品及废弃物等，应采取适当措施灭活后方可移出生产区域，防止其污染厂房、设施及产品；
- g) 采用密闭系统生产的，产品或物料被转入密闭系统时，必须以非暴露的方式（例如通过无菌连接器或密闭转移系统）进行，避免产品或物料暴露于室内环境。如需打开密闭系统（例如进行暴露的无菌操作、安装过滤器或进行组件连接等），在回到密闭状态或者使用前需要进行消毒或灭菌（非无菌环境下暴露），且应对其“回到密闭状态”的能力进行必要的确认或验证；
- h) 质粒最终成品为无菌产品的，无菌生产工艺的验证可参考《药品生产质量管理规范》无菌药品附录、《无菌工艺模拟试验指南（无菌制剂）》的要求，确保其无菌保证水平满足要求。如采用无菌工艺模拟试验等方式确认质粒无菌生产操作的无菌保障的有效性。

5.3.5 混淆和差错

质粒生产过程中宜采取有效的措施避免物料、产品和废弃物的差错和混淆，如密封转移、交替操作、定置管理、灭菌与消毒以及传递等过程中应做好标识管理。

5.3.6 其他

质粒的生产过程中，应重点关注裂解等特殊工序的工艺时限，避免产生额外的残留物或工艺杂质、产品相关杂质。中间产物如需储存，应视情况开展必要的中间产物贮存稳定性研究。

5.4 物料管理

5.4.1 质粒生产用物料的管理应遵循质量风险管理的原则，结合物料的预期用途、物料的质量属性、供应商的资质等制定物料风险等级分级及控制策略。对于物料的分级，可参考《中国药典》三部生物制品生产用原材料及辅料质量控制通则中对生物制品原材料及辅料的分级原则，根据原材料的来源、生产以及对最终细胞治疗产品潜在的毒性和外源因子污染风险等，结合质粒本身在细胞治疗产品中的作用，确定生产用关键原材料的范围及入厂检验和放行的要求。

5.4.2 应避免使用人源或动物源性材料。如需使用，应开展外源因子等安全性相关的风险评估与研究。

5.4.3 生产过程中应避免使用 β -内酰胺类抗生素，如需使用其他种类的抗生素，应对抗生素的残留量进行控制和安全性评估。

5.4.4 质粒发酵应尽可能选择分析纯或更高级别的物料，质粒纯化及后续生产工序使用的物料宜选择药用级，对于无药用级别的，应参照《药品生产质量管理规范》对物料管理的要求，经风险评估后，选择适宜级别的物料。

5.4.5 下游生产过程中使用的与产品直接接触的关键一次性耗材，应进行适用性和生物安全性风险评估，根据风险评估结果来决定是否需要开展进一步研究或验证。质粒使用的内包装材料，应对其密封性、无菌性和相容性进行评估，并考虑其可能存在的核酸酶对质粒的影响。

5.4.6 供应商提供的研究数据可作为评估支持材料，如引用供应商数据，须对数据的适用性进行评估。

5.4.7 应建立质粒生产用原材料、内包装材料、关键一次性耗材的质量管理流程，如供应商质量评估、验收标准、入库验收、储存、有效期/复验期管理等。

5.5 细菌种子批

5.5.1 细菌种子批是生产质粒的起始原材料，应充分考虑宿主菌的来源、基因型、表型、既往使用经验和生产需求等因素，如使用新型菌株，需关注其可能引入的额外风险。

5.5.2 按照《中国药典》三部生物制品生产检定用菌毒种管理及质量控制通则的要求完成二级或三级细菌种子批的建库和检定，主种子批和工作种子批建库环境应参照《药品生产质量管理规范》的要求。对于生产不同质粒使用的主种子批和工作种子管理，应通过区分物料编号、标签管理、储存管理等多种方式，避免不同细菌种子批在储存或使用过程中发生混淆或交叉混淆。建库过程中应避免使用 β -内酰胺类抗生素，如需使用其他种类的抗生素，应对抗生素的残留量进行安全性评估或控制，应尽量避免使用人源或动物源的材料。

5.5.3 基于细菌主种子批和细菌工作种子批的制备方法，合理设定细菌种子批的检定项目。细菌种子批检定项目一般包括细菌形态学鉴别、染色镜检、生化特性分析、菌种基因型鉴定、菌种纯度、抗性检查、活菌数、质粒限制性内切酶图谱分析、质粒全序列鉴定、噬菌体检查等。检测方法需经过研究、确认或验证。通过质量控制应确保不存在其它细菌、真菌和噬菌体的污染，以及确保目的基因序列和其他元件序列的准确性。

5.5.4 开展全面的传代稳定性研究，宜根据质粒序列准确性、质粒限制性内切酶图谱、质粒保有率、质粒拷贝数等研究结果明确细菌种子批的限定传代代次。

5.5.5 根据细菌种子批在贮存条件下和时长内种子批的活菌数、质粒保有率等研究结果制定合理的贮存条件和有效期。

5.6 工艺控制

5.6.1 应当制定质粒生产工艺规程并经过批准,工艺规程中应明确质粒产品的关键质量属性(如适用)、生产工艺流程、关键工艺参数和控制范围、中间控制项目及控制标准。应制定生产操作规程,对生产操作步骤等进行详细说明,以确保生产过程的有效运行和有效控制。

5.6.2 质粒的生产通常以细菌种子批为起始原材料,其工艺分为上游工艺和下游工艺。上游工艺包括种子扩增及发酵、菌体收获、菌体裂解等步骤;下游工艺包括层析、超滤/渗滤、除菌过滤及灌装等步骤,最终制备成质粒成品。典型质粒生产关键工艺步骤和工艺控制点如下:

- a) 种子扩增:取工作种子批,复苏,使用摇床或生物反应器进行逐级扩增培养,培养至细菌满足发酵生产接种要求。培养过程中应对培养基组成、培养温度、转速、培养时间及细菌悬液光密度(Optical Density, OD)值等工艺参数进行监控;
- b) 发酵生产:通常使用适当生产规模的生物反应器进行高密度细菌发酵培养,收获菌体悬液。发酵过程中应对接种量、发酵培养基组成、发酵培养温度、pH、溶氧量、搅拌转速、补料培养基组成、补料时间和速率、收获时间、菌体悬液OD值等工艺参数进行监控;
- c) 菌体收获及裂解:发酵菌体悬液通过高速离心或切向流过滤等方式去除培养上清液和菌体外杂质,收集菌体,在一定条件下使细胞部分或者全部破碎进行菌体裂解,将质粒、宿主DNA、宿主蛋白、细菌内毒素等细胞内物质释放到胞外。菌体处理通常采用碱裂解方式,应对裂解过程中菌体浓度、裂解液(配方、浓度或pH值)、裂解时间、搅拌转速(如适用)等相关参数进行关注,裂解后进行中和、沉淀(如适用)及澄清处理,去除宿主DNA、宿主蛋白、宿主RNA、细菌内毒素等,此过程中还应关注中和缓冲液的组成、加入时间、加入量以及中和完全程度;
- d) 超滤/渗滤1:对收获的澄清液进行浓缩洗滤,进一步去除宿主DNA、宿主蛋白、宿主RNA、细菌内毒素等。过程中应对浓缩倍数、洗滤倍数及跨膜压等参数进行监控;
- e) 层析纯化:采用多步层析步骤提纯质粒,提升超螺旋比例,去除宿主DNA、宿主蛋白、宿主RNA、细菌内毒素等,通常选用凝胶层析、亲和层析、疏水层析和离子层析等填料介质,利用分子量、特异性结合、疏水性、电荷等方法进行杂质去除。层析过程中应对层析柱载样量、线性流速、洗杂和洗脱条件(pH、盐浓度等)、收集峰起止点进行监控;
- f) 超滤/渗滤2:对层析收获液进行超滤浓缩和换液,通过该步骤将质粒DNA置换到质粒保存液中,经浓缩并调节至符合目标产品浓度后,进行下一步除菌过滤和无菌灌装。应对置换倍数、跨膜压、产品浓度等参数进行监控;
- g) 除菌过滤和灌装:采用除菌过滤器进行除菌过滤,除菌过滤后在A级环境下进行分装。质粒最终成品为无菌产品的,质粒产品灌装的全过程应当保证无菌和避免污染和交叉污染,并进行相关监控,应基于风险评估的结果确定灌装的生产形式和方式,其生产形式和方式应经过无菌工艺验证。

5.6.3 应规定生产过程中各步骤的工艺时限及过程中物料、中间产品和最终产品的储存条件,并采取有效的管理控制措施确保符合储存要求。物料、中间产品和最终产品如需转运,应当对转运条件有明确的规定,如温度、时限等,对于有特殊温度要求的物料、中间产品和最终产品的转运,在转运过程中应进行相应的监测并有记录。

5.6.4 生产工艺过程中任何偏离生产工艺规程的情况均应当有记录,应对偏差进行评估、调查并制定纠正和/或预防措施,有效防止类似偏差的再次发生。

5.7 质量控制

5.7.1 企业应当对质粒逐批进行检验。一般包括以下项目：理化（外观、pH）、质粒浓度或含量、鉴别（限制性内切酶分析、序列鉴定）、纯度与杂质（ A_{260}/A_{280} 、超螺旋比例、宿主菌 DNA 残留、宿主菌 RNA 残留、宿主蛋白残留、抗生素残留（如适用）等）、无菌及细菌内毒素等。

5.7.2 应根据质粒在最终的免疫细胞治疗产品生产中的功能及安全性等相关因素，经风险评估建立合理的质粒质量标准；可参照《中国药典》的相关要求，进行检测方法的验证或确认。

5.7.3 应对质粒的稳定性进行长期监测，选择合理、敏感的考察项目（如外观、pH、浓度/含量、纯度（ A_{260}/A_{280} ）、超螺旋比例等），并根据相关数据制定或调整质粒的贮存条件和有效期。

5.8 包装与贮存

5.8.1 企业应有详细的规程规定质粒产品的包装、贴签和贮存（如适用）等操作过程，所有操作过程应有详细、完整的记录。

5.8.2 质粒产品包装容器和包装形式应当基于风险评估的结果确定，其安全性和密封性均应经过适当的评估或验证，避免产品遭受污染。

5.8.3 企业应配备专用的设备用于质粒成品的贮存，并按照《药品生产质量管理规范》的要求划分区域，按品种、批号分区存放。每个最小包装上应有标签标识其名称、批号、数量/体积、生产日期、有效期/复验期、贮存条件等必要信息。应当按照有效期或复验期贮存。贮存期内，如发现对质量有不良影响的特殊情况，应当进行复验。对于贮存过程中发生的超温、包装破损等异常情况，应按偏差程序进行处理和评估。

5.8.4 贮存区应当有足够的空间，待验品和合格品可进行分区或用状态标识进行管理，放行前应按待验贮存，不合格和退回（如适用）品应专区存放并有明显的标识。

5.8.5 贮存设备应进行温度监控，可配备相应的温度监控系统。应建立出入库记录，记录应真实、完整、准确、可追溯。

5.9 运输

质粒产品的运输和转运的方式应有明确的操作规程进行规定，运输的方式应进行验证和确认（如适用），整个运输过程应有完整的记录。

参 考 文 献

- [1] 细胞治疗产品生产质量管理指南（试行）（2022年10月31日）
- [2] 体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则（试行）（2022年5月30日）
- [3] Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs), US Food and Drug Administration Chemistry (Jan., 2020)
- [4] Questions and answers on the principles of GMP for the manufacturing of starting materials of biological origin used to transfer genetic material for the manufacturing of ATMPs, EMA/246400/2021
- [5] Connect Collaborate Accelerate, A discussion to help establish release specifications for plasmids and the bacterial master cell banks used to produce them [J]. BioPhorum Operations Group Ltd, 2020
- [6] BioPhorum Further discussion on plasmid to establish release specifications using a risk-based approach manager supply [J]. BioPhorum Operations Group Ltd, 2022
-