

团 体 标 准

T/FDSA XXXXX—XXXX

基于全癌标志物检测评价细胞治疗产品 制备质量安全及临床应用效果标准

Quality, Safety, and Clinical Performance Assessment Standards for Cell Therapy Products
Utilizing Pan-Cancer Biomarker Testing

(送审稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国食品药品企业质量安全促进会 发 布

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。

细胞治疗产品作为新兴医疗手段，在多种疾病治疗上潜力巨大，其监管法规也在不断发展完善。不同监管机构对细胞治疗产品风险评估，都发布了相关法规和指南来规范细胞疗法药物的开发。

本行业标准的制定旨在通过全癌 DNA 甲基化标志物 TAGMe[®]，建立遵循 GMP 规范的细胞及其衍生产品质量及其成/致瘤性风险的检测评价体系。

请注意本文件中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。

本文件由中国食品药品企业质量安全促进会提出并归口。

本文件起草单位：中国食品药品企业质量安全促进会干细胞与再生医学委员会、上海奕谱生物技术有限公司、陕西中港万海生命科学研究院有限公司

本文件主要起草人：姚雄、于文强、李哲、杜炜明

目录

- 1 范围 1
- 2 规范性引用文件1
- 3 术语和定义1
- 4 原理 2
- 5 试剂和材料2
- 6 仪器设备 3
- 7 分析步骤 3
- 8 结果计算和表达4
- 9 质量控制与验证5
- 10 安全措施 6
- 11 方法性能指标 7
- 附录8

基于全癌标志物检测评价细胞治疗产品 制备质量安全及临床应用效果标准

1 范围

本标准规定了基于全癌标志物检测评价细胞治疗产品制备质量安全及临床应用效果的方法。

本标准适用于干细胞治疗产品、免疫细胞治疗产品、细胞衍生治疗产品等的质量安全评估及临床应用效果评价。

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对本文件必不可少的条款。其中，标注日期的引用文件，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。

人干细胞产品非临床研究技术指导原则（2024 年版）

细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（2023 年修订版）

ICH S6(R1)：生物技术药物的临床前安全性评价

ICH Q5D：基因治疗产品的质量要求

ISO 20387:2018，生物技术—生物样本库通用要求

细胞治疗产品质量控制检测指导原则（2025 年版）

中华人民共和国药典（2025 年版第四部）

药品生产质量管理规范（2010 年修订）

GB/T6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 DNA 甲基化

DNA 甲基化是表观遗传学中的一种重要机制，指的是在 DNA 分子中的胞嘧啶（C）碱

基上加上甲基（CH₃）基团，形成 5 甲基胞嘧啶（5mC）。这种化学修饰会影响基因的表达，而不改变基因的编码序列。

3.2 全癌 DNA 甲基化标志物 TAGMe®

TAGMe® (Tumor Aligned General Methylated Epiprobe) 是一种基于全癌标志物 DNA 甲基化技术，能够通过识别和分析特定的 DNA 甲基化位点，来评估细胞产品的安全性与有效性。

3.3 致瘤性 (Oncogenicity)

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。

3.4 成瘤性 (Tumorigenicity)

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。

3.5 促瘤性 (Tumor-Promoting Activity)

指细胞治疗产品通过旁分泌、免疫抑制或物理接触等方式间接促进宿主已有肿瘤生长或转移的风险。

4 原理

TAGMe®技术可识别出肿瘤细胞中普遍存在的 DNA 甲基化标志物，全癌标志物的甲基化通常出现在癌症细胞的基因区域，在正常细胞中，这些区域通常处于未甲基化状态。通过对细胞产品中 DNA 甲基化水平的检测，TAGMe®技术能够揭示出细胞是否已经经历过潜在的癌变或成瘤性转变。

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 DNA 提取试剂盒：市售，符合相关标准。

5.1.2 Me-qPCR 试剂：包括反应缓冲液、酶等。

5.1.3 阳性对照：已知高甲基化的细胞系或样本，如 HeLa 细胞系。

5.1.4 阴性对照：正常非癌细胞系，如 HEK293 细胞系或其他已知无甲基化的细胞系。

5.1.5 其他：包括但不限于 Taq 酶、dNTPs、引物等。

5.2 材料

5.2.1 离心管：多种规格，如 2 mL、10 mL、15 mL 等。

5.2.2 移液器及移液吸头：不同量程，如 100 μ L、1000 μ L、5000 μ L 等。

5.2.3 其他：如样本采集相关材料等。

6 仪器设备

6.1 PCR 仪器：如 ABI7500、宏石 SLAN96S 等。

6.2 DNA 提取仪：如有需要可配备。

6.3 离心机：转速 ≥ 10000 r/min。

6.4 电子天平：感量为 0.01 g 和感量为 0.0001 g。

6.5 生物安全柜：用于样本处理等操作。

6.6 其他：如恒温设备等。

7 分析步骤

7.1 样本准备

7.1.1 干细胞产品采集：从干细胞制剂或治疗性细胞产品中，采用无菌技术收集细胞样本。推荐使用第 3 代（P3）至第 7 代（P7）细胞样本。

7.1.2 免疫细胞产品采集：对于免疫细胞，如 CAR-T、CAR-NK 等，可以通过静脉采集患者或供者的外周血、骨髓或组织样本。

7.1.3 临床患者样本采集：从接受细胞治疗的患者体内（如外周血、肿瘤组织或其他相关组织）采集全血样本，需在患者治疗前或治疗后的特定时间点（如半个月、1 个月、3 个月、6 个月等）进行采集。

7.2 样本处理

7.2.1 细胞样本处理：收集的细胞样本应立即进行处理。若细胞样本需要保存，必须按照适宜条件（2 - 8℃）及合适保存液中短期存放，避免细胞活性丧失。对于长期存储，推荐采用低温冻存技术，存储温度为 -80℃或更低，避免反复冻融。

7.2.2 核酸提取：细胞样本必须确保高质量的 DNA 提取，避免样本中的 RNA 或其他污染物干扰后续的甲基化分析。

7.3 检测

7.3.1 在上述准备好反应体系中分别加入处理好的待测样本、阴性对照、阳性对照各 8 μL，终体积为 30 μL/ 管，盖紧管盖，混匀，瞬时低速离心。

7.3.2 使用 PCR 仪器进行检测，设置如下程序：

步骤	温度（℃）	时间	循环数（次）
1	95	5 min	1
2	94	20 sec	35
3	60	30 sec	35
4	72	20 sec	35

靶标 T1 检测通道：FAM；G1 检测通道：CY5；G2 检测通道：ROX。

8 结果计算和表达

8.1 定性

使用基因甲基化检测分析软件进行数据处理与分析，输出甲基化状态的判定结果。根据检测结果分析样本的 DNA 甲基化水平，并与标准值进行比较，评估样本的致癌性/成瘤性风险。当样本 PM 值大于等于 60.00 时，判定为甲基化阳性；当样本 PM 值小于 60.00 时，判定为甲基化阴性。

8.2 风险等级划分

8.2.1 低风险：PM 值小于 60.00（甲基化阴性），即未发现 TAGMe 出现高甲基化。该批次产品的甲基化水平稳定，未见显著异常变化，通常表示细胞产品安全性较高。

8.2.2 中等风险：PM 值在 60.00 至 80.00 之间，TAGMe 出现轻微的高甲基化。该批次产品存在一定的成瘤性/致瘤性风险，需进行更加严格的质控，并可能需要进一步的临床验证或修正生产工序。

8.2.3 高风险：PM 值大于或等于 80.00，TAGMe 显示高甲基化，提示细胞可能具有较高的致瘤性或成瘤性。该批次产品的甲基化水平明显异常，提示可能存在严重的癌变风险，建议暂停临床应用或进一步进行工艺优化。

9 质量控制与验证

9.1 阳性对照

阳性对照的 PM 值应大于等于 60.00,表明目标甲基化位点在阳性对照中正确被检测到,验证了实验系统的有效性和灵敏度。

9.2 阴性对照

阴性对照的 PM 值应小于 60.00,说明在无 DNA 甲基化的情况下,实验没有产生任何非特异性信号。

9.3 重复性测试

所有样本应进行至少三次独立实验（即三个技术重复），特别是在临床试验或细胞产品放行测试中。分析重复实验的 PM 值，计算每个样本的平均值和标准偏差。标准偏差较小的样本结果表明该实验具有较高的一致性和可重复性。

9.4 实验过程中的质量控制

9.4.1 样本质量控制：在每次实验前，需确保提取的 DNA 质量符合要求。DNA 的纯度（如 OD₂₆₀ / 280 比值）应达到 1.8 - 2.0 之间，且浓度适合 PCR 反应（50 ng-100 ng）。

9.4.2 质控数据记录与评估：实验结果应详细记录，包括样本信息、阳性/阴性对照、重复性测试结果等。

9.4.3 空白对照：每个实验中都应设置空白对照（仅加入缓冲液和试剂，不加入 DNA），以排除试剂污染和操作误差带来的影响。

9.5 标准操作程序（SOP）

制定详细的 SOP，包括样本处理、DNA 提取、PCR 扩增、数据分析等所有步骤。每个操作步骤都应严格按照 SOP 执行，以减少人为误差，确保结果的可靠性。

10 安全措施

10.1 实验室个人防护

穿戴适当的个人防护装备：所有实验人员应佩戴实验室标准的个人防护装备（PPE），包括实验服、一次性手套、护目镜和面罩，避免直接接触化学品、试剂和可能感染性材料。在处理可能含有生物危害的样本时，应佩戴适当的口罩，以防止样本中的微粒或病原体传播。

10.2 样本与试剂处理

10.2.1 生物样本处理：所有的细胞样本、血液样本、体液样本等可能含有病原的物质都应视为潜在感染源。处理时应使用专用的生物安全柜进行操作，确保空气流通。

10.2.2 化学品和试剂处理：在操作 DNA 提取试剂、PCR 试剂盒等化学品时，严格按照化学品的安全数据表（SDS）规定使用。特别是有机溶剂、酸、碱、苯类化学品等，在使用过程中应佩戴防护手套，并操作于通风柜内。

10.3 操作环境安全

10.3.1 实验室通风：确保实验室配备有效的通风系统，避免因化学试剂或生物样本操作所产生的有害气体或微粒对实验人员造成危害。特别是在使用溶剂或处理可能存在生物危害的样本时，必须在通风柜内进行操作。

10.3.2 生物安全柜使用：处理任何可能含有致病微生物或人源性细胞时，必须在认证的生物安全柜内进行操作。

10.4 废物处置

实验废弃物的分类与处理：所有实验废弃物都应根据危险性进行分类，并放入相应的生物废物容器中。使用过的细胞样本、培养皿、试剂等，必须按照生物危险废物进行处理，交由专业机构进行灭菌、消毒或丢弃。

10.5 紧急处理与事故应对

10.5.1 化学品泄漏处理：遇到化学试剂泄漏，应立即穿戴防护设备进行处理。使用适当的吸收材料（如吸油纸、活性炭）吸收泄漏的化学物质，避免其扩散。

10.5.2 生物样本泄漏处理：在处理生物样本泄漏时，应立即清理现场，并使用适当的消毒剂（如 75%乙醇、漂白水等）进行彻底消毒。

10.6 实验记录与人员培训

10.6.1 记录管理：实验过程中的所有操作步骤、实验数据和异常情况应详细记录，并确保所有记录符合实验室管理要求。

10.6.2 人员培训：实验室所有人员在操作前必须经过培训，熟悉 TAGMc®技术的使用流程和安全操作规程。

11 方法性能指标

11.1 检出限

本方法可根据相关实验确定其对细胞产品致瘤性/成瘤性风险的检出限。

11.2 灵敏度

灵敏度应 $\geq 95\%$ 。

11.3 特异性

特异性应 $\geq 95\%$ 。

11.4 假阴性率

假阴性率应 $\leq 5\%$ 。

11.5 假阳性率

假阳性率应 $\leq 5\%$ 。

附录

(资料性)
TAGMe® DNA 甲基化检测报告

样本信息

样本 ID: _____

样本类型: _____ (如干细胞、免疫细胞等)

来源/供者信息: _____

样本收集日期: _____

检测日期: _____

检测人员: _____

实验条件

PCR 仪器型号: _____

DNA 提取方法: _____

质控结果: 合格/不合格

阳性对照: 合格/不合格

阴性对照: 合格/不合格

主要发现

目标基因甲基化水平:

目标基因: _____

甲基化 PM 值: _____

结果: 阳性/阴性

检测结论

总体评估: 细胞产品的 DNA 甲基化状态提示其致瘤性/成瘤性风险较低/较高 (根据甲基化检测结果)。

阳性结果: 提示细胞产品可能存在潜在的致瘤性或成瘤性风险。建议进一步评估细胞产品的生产工艺和质量控制过程。

阴性结果: 细胞产品在所检测的甲基化标志物位点中未显示出异常, 成瘤性风险较低, 符合安全性要求。

建议:

对于检测为阳性的样本, 建议进一步评估细胞的增殖活性、遗传稳定性和其他潜在的致瘤性标志物。

对于检测为阴性的样本, 继续按照标准质量控制流程进行生产和临床应用。

备注:

样本检测结果为临床参考, 仅供实验室评估使用, 最终结论应结合其他实验数据和临床表现。本报告仅针对指定样本的 DNA 甲基化检测结果进行评估, 其他相关信息请参考附加检测报告。