药 品GM P 指 南

uidance of Good Manufacturing Practices for Drug

第2版

质量管理体系

质量控制实验室与物料系统

厂房设施与设备

无菌制剂

口服固体制剂与非无菌吸入制剂

原料药





上架建议 药学

ISBN 978-7-5214-3822-2

9 787521 438222 >

定价：598.00元（上、下册）

药品GMP指南

第2版

无菌制剂下册

国家药品监督管理局食品药品审核查验中心组织编写

中国健康传媒集团

中国医药科技出版社

药 品GMP 指 南

Guidance of Good Manufacturing Practices for Drug

第 2 版

无菌制剂

Sterile Medicinal Product

下册生物制品（单抗）细胞治疗产品

国家药品监督管理局食品药品审核查验中心组织编写



中国健康传媒集团

中国医药科技出版社

药品GMP 指南 第2版

无菌制剂

下册生物制品（单抗）细胞治疗产品

国家药品监督管理局食品药品审核查验中心◎组织编写



中国健康传媒集团
中国医药科技出版社

内 容 提 要

“药品GMP指南”(第2版)由国家药品监督管理局食品药品审核查验中心组织编写。《无菌制剂》分册内容紧扣《药品生产质量管理规范(2010年修订)》及其附录的要求，结合国内外制药行业的具体实践，吸收参考了国际组织和监管机构有关指南的关键变化。本书以上版内容为基础，新增生物制品(单抗)和细胞治疗产品两个部分，以及脂质体和预灌封注射剂产品、 一次性使用技术和免洗物料等内容。

本书可供药品生产企业、药品上市许可持有人、工程设计、设备制造、药品监管机构等相关人员和检查员参考使用。

图书在版编目（CIP） 数据

无菌制剂/国家药品监督管理局食品药品审核查验中心组织编写；高天兵，郑强主编. ═北京：中国医药科技出版社，2023.4

（药品GMP指 南 ）

ISBN 978-7-5214-3822-2

Ⅰ.① 无 … Ⅱ. ①国…②高…③郑…Ⅲ. ①制剂一药品管理一质量管理一中国一指南 Ⅳ.①R943-62

中国国家版本馆CIP 数据核字(2023)第042756号

责任编辑 吴思思 张 睿

美术编辑 陈君杞

版式设计 也 在

出版 **中国健康传媒集团|中国医药科技出版社**

地址北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话发行：010-62227427 邮购：010-62236938

网址 www.cmstp.com

规格787×1092mm /₁6

印 张 7 1 %

字数1396千字

版次2023年4月第1版

印次2023年4月第1次印刷

印刷三河市万龙印装有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5214-3822-2

定价598.00元(上、下册)

版权所有盗版必究

举报电话：010-62228771

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换



编 委 会

主　　编 高 天 兵 郑 强

副 主 编 曹　轶　韩　亮

编　　委 (以姓氏汉语拼音为序)

毕 军 陈 建 新 陈 中 怡 程 玥 葛 均 友 蓝 科 蔚 李 建 科
任　民　陶　铜　静　王　丰　王　刚　王　亮　王　飙　王　董　明
王静怡肖志坚　姚　艳　平　尹　放　东　张　华　张凤珊郑金旺

撰稿人员 (以姓氏汉语拼音为序)

安 文 强 柴 庶 泽 陈 瑞 陈 茂 伟 陈 青 连 陈 苏 玲 程　尹
崔 雨 婕 邓 艳 邓 春 来 东 寰 睿 段 雪 建 顿 昕 多 佳
方 小 聪 付 阳 郭 建 海 郭 燕 红 何 畅 何 明 霞 何 燕 娜
侯 军 胡 继 猛 胡 仲 新 黄 洁 黄 俊 黄 清 竹 黄 晓 刚
Ivan Lin 江 满 秀 蒋 靖 欣 阚 静 康 健 柯 桂 盛 李 进
李 鹏 李 泉 李 锐 李 珩 李 贺 平 李 佳 懿 李 凌 梅
李 明 刚 李 森 武 李 彦 辉 凌 磊 刘 秋 琳 刘 苏 建 刘 勋 涛
南 东 坡 牛 君 潘 友 文 丘 崇 辉 饶 岳 俊 宋 洪 杰 苏 虹
苏 纪 兰 孙 健 孙 磊 孙 智 明 Tatiana Golovina 王　丹
王 德 毅 王 金 成 王 启 明 王 胜 怿 王 潇 寒 王 月 明 王 朝 艳
魏 才 学 魏 洪 超 文 剑 丹 吴 岚 琛 吴 文 蕾 武 福 军 夏 杰
夏 禄 华 肖　辉　肖　婧　肖 勇 生 谢 贵 兵 谢 胜 华 徐 晶 晶
徐 兰 兰 薛 骏 杨 慧 杨 昀 杨 秋 艳 杨 兴 伟 易 赛 花
应 伟 娜 袁 野 袁 冶 张 兰 张 沁 张 爱 波 张 小 燕
张 永 华 赵 天 贵 赵 振 坤 郑 琪 钟 楠 钟 亚 玲 周 进 红
周 进 莉 朱 甜 朱 慧 君

审稿人员 (以姓氏汉语拼音为序)

敖 卓 列 曹 辉 曹 渊 曹 艳 华 成 殷 崔 强 刁 旺 喜
丁 勇 丁 满 生 方 笑 语 甘 一 迪 高 杨 高存强葛渊源
龚 丽 萍 韩 强 郝 旭 梅 贺 铮 怡 黄 维 黄 锦 航 黄 雪 月
孔 妍 李 晶 李 静 李 达 龙 李 红 秀 李 建 平 李 香 玉
梁 颖 刘 芬 刘 俊 云 娄 再 飞 楼 双 凤 马 敏 华 马 岩 松
潘 志 成 庞 海 河 裴 艳 茹 朴 晋 华 齐 菲 菲 沈 沁 盛 娉
施 瑞 娜 史 晶 孙 朗 孙 程 洁 孙 素 梅 汤 平 汤 正 坤
唐 文 燕 王 芳 王 元 王 立 杰 王 诗 琳 王 守 斌 温 艳 华
肖 洁 琼 徐 赜 许 丹 许 青 青 许 文 铂 宣 培 军 闫 桐
闫兆光颜若曦杨红艳 杨 敬 鹏 杨 晓 林 杨 永 胜 姚 泳
姚 树 元 叶 非 尹 逊 辽 俞 佳 宁 张 闯 张 新 张 燕
张长军张凤梅张华敏张灵敏张楠楠 张晓刚 张越琳
赵 飞 赵 俭 赵 小 军 赵 孝 斌 郑 起 平 周 亮 周 艳
周晓丽周有治周志彩 颛孙燕卓亚红

编写说明

“药品GMP 指南”丛书自2011年8月出版以来，对帮助我国制药行业更好学习、理解、实施药品生产质量管理规范(GMP) 发挥了重要作用，同时也为药品GMP检查员提供了学习教材。十年来，我国制药工业质量管理体系建设不断完善，质量管理水平不断提升，《药品管理法》《疫苗管理法》《药品注册管理办法》《药品生产监督管理办法》等法律、部门规章陆续修制定，以及多个GMP附录颁布实施，不断加强与完善了药品GMP实施的要求。随着国家药监局成为ICH 管委会成员，疫苗国家监管体系通过世界卫生组织NRA评估，积极筹备申请加入药品检查合作计划(PIC/S), 我国药品监管国际化程度日益深化。特别是近十年来国际药品GMP指南不断更新，涉及数据可靠性、无菌产品、连续制造等新理念、新标准、新技术，产业界对于“药品GMP 指南”丛书内容更新修订的需求日益迫切。

2021年8月，在国家药品监督管理局以及相关业务司局的支持和指导下，国家药品监督管理局食品药品审核查验中心会同北京大学知识工程与监管科学实验室和中国健康传媒集团中国医药科技出版社组织开展“药品GMP 指南”修订工作。

“药品GMP指南”第2版以上版内容为基础，结合过去十几年国内外制药行业的具体实践，吸收ICH、WHO、PIC/S、 美国FDA、EMA 有关指南，以及借鉴ISPE、ISO、PDA、APIC等有关指南的关键变化，旨在服务于知识和创新驱动的产业发展和以患者为中心、基于风险的科学监管。

来自130多家国内外药品监督管理机构、生产企业和研究机构的500余位专家积极参与再版修订工作，完成了500多万字的稿件，内容较上版增加近1倍。

“药品GMP指南”第2版《质量管理体系》分册新增研发质量体系、数

据可靠性策略章节和药品上市许可持有人管理要求等；《厂房设施与设备》分册新增工艺气体系统、信息化和计算机化系统、先进制造三个部分；《口服固体制剂与非无菌吸入制剂》分册新增吸入制剂、缓控释制剂和中药颗粒剂附录，技术转移、工艺验证、共线生产等内容；《无菌制剂》分册新增生物制品(单抗)和细胞治疗产品两个部分，以及脂质体和预灌封注射剂产品、 一次性使用技术和免洗物料等；《质量控制实验室与物料系统》《原料药》分册对接国内外产业法规指南全面升级，并就实验室调查、微生物实验室、供应商管理、委托储存、临床用原料药、溶媒回收等热点内容进行专题讨论。

本次修订得到了国家药品监督管理局以及相关业务司局的支持和指导，北京大学知识工程与监管科学实验室和有关企业给予了全力配合。在此，谨对关心和支持本次修订的各级领导和专家表示衷心的感谢!特别感谢北京市药品审评检查中心、辽宁省药品审评查验中心、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、山东省食品药品审评查验中心、广东省药品监督管理局审评认证中心对本丛书审核工作给予的大力支持。

“药品GMP 指南”第2版涉及的内容广泛，虽经努力，但因时间仓促、水平有限，错漏之处恳请广大读者批评指正。

国家药品监督管理局食品药品审核查验中心

2023年1月

总 目 录

无菌制剂/1
生物制品(单抗)/765
细胞治疗产品/971

生物制品(单抗)

目录

前言

1.1 指南说明 770
1.2 法规背景 770
1.3 技术背景 771

生产质量控制策略

2.1 制定原则 773
2.2 物料控制 774
2.3 工艺控制 777
2.4 分析控制 785
2.5 稳定性研究与应用 787
2.6 污染控制 788
2.7 工艺验证 794
2.8 清洁验证 797
2.9 单抗制品生产质量控制要素 800

生产用细胞库的制备、检定和维护

3.1 细胞库管理概述 803
3.2 主细胞库和工作细胞库的制备 808
3.3 检定 815

3.4 管理和维护 822
3.5 上市后变更 825



上游工艺的生产质量控制

4.1 上游物料的质量管理 830
4.2 细胞基质稳定性研究 835
4.3 上游生产工艺控制 837
4.4 上游工艺验证 842
4.5 上游清洁验证 845
4.6 上游污染控制 847

下游工艺的生产质量控制

5.1 下游物料的质量管理 866
5.2 下游生产工艺控制 870
5.3 下游中间产品稳定性 887
5.4 下游病毒安全控制 888
5.5 下游工艺的微生物控制 893
5.6 层析介质与膜包的管理 898
5.7 下游工艺验证 901
5.8 下游清洁验证 904
5.9 下游工艺低内毒素回收 911



技术转移和可比性研究

6.1 技术转移 914
6.1.1 技术转移的阶段 916
6.1.2 技术转移中的关注要点 923
6.2 可比性研究 928

6.2.1 可比性研究方案 930
6.2.2 可比性研究结果的解释与评估 936
6.2.3 可比性与生物相似性的异同 937

符合生物制品（单抗）工艺控制要求的检测方法

7.1 关键质量属性和分析控制策略 938
7.1.1 关键质量属性风险评估 938
7.1.2 原液、制剂和中间产品的分析控制策略 941
7.2 分析方法 943
7.3 分析方法生命周期管理 948

参比品标定与管理

8.1 批次选择 958
8.2 制备与贮存 959
8.3 确证、标定与放行 961
8.4 稳定性考察/监测 965
8.5 使用管理 966
8.6 变 更 968

1 前言

1.1指南说明

本章节通过介绍国内外人用重组单克隆抗体(简称单抗)制品生产和质量控制的先进思路和理念，以及与生产质量控制相关的单抗制品药学研究内容，结合国内企业近年来的探索实践，旨在为单抗制品生产和质量控制的具体实施方法和检查提供参考，希望能够帮助企业在符合《药品生产质量管理规范(2010年修订)》及其生物制品附录的基础上，提高单抗制品生产和质量控制的实施水平。

本章节适用于单抗制品原液的生产和质量控制，主要突出单抗制品原液生产和质量控制的特点。制剂生产参见本分册无菌制剂部分，生产及质量管理的其他相关内容，请参见本丛书配套的其他分册(如《质量管理体系》《厂房设施与设备》《质量控制实验室与物料系统》等)。

1.2法规背景

本部分在GMP及其生物制品附录的基础上，参考了国家药品监督管理局(以下简称NMPA)、ICH、WHO、PIC/S、美 国FDA、EMA、ISPE、ISO、PDA、BPOG等监管机构或国际组织颁布的，与单抗制品生产相关的规范、指南、技术文件，以及单抗制品研究的最新进展，同时结合企业的需求及具体实践，使指南更具指导性、实用性。

1.3技术背景

本章节中“人用重组单抗制品”,系指采用单克隆抗体筛选技术、重组 DNA 技术及细胞培养技术制备的人用单克隆抗体药物，包括完整免疫球蛋白、具有特异性靶点的免疫球蛋白片段、基于抗体结构的融合蛋白等。其作用机制是通过与相应抗原的特异性结合，从而直接发挥中和或阻断作用，或者间接通过Fc效应发挥包括抗体依赖 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,ADCC)和补体依赖细胞毒作用 (complement-dependent cytotoxicity,CDC)等生物学功能。

典型的单抗制品制造工艺主要包括以下几个阶段：细胞库制备(主细胞库和工作细胞库)、细胞培养、纯化、制剂生产。

单抗制品生产细胞培养工艺有流加补料培养(fed-batch) 、灌流培养(perfusion)以及浓缩流加补料培养(concentrated fed batch) 等方式，纯化生产工艺有批生产和连续生产等模式。上游细胞培养反应器主要存在不锈钢生物反应器和一次性使用生物反应器两种形式，下游的纯化工艺主要采用可重复使用的柱层析生产工艺。

典型的单抗制品生产工艺步骤包括：工作细胞库制备、细胞复苏、摇瓶扩增、反应器扩增、反应器培养、收获、亲和层析、低pH值病毒灭活/去污剂 (S/D) 灭活、离子交换层析、除病毒过滤、超滤浓缩/换液、原液配制、过滤、分装、原液解冻(如有)、配制、混合、除菌过滤、制剂灌装、冻干(如有)、轧盖、灯检、贴签包装。单抗制品生产典型工艺流程示意图见图1-1。

本章节以商业化生产阶段的流加补料培养和柱层析生产工艺为代表工艺，概述单抗原液的生产质量控制，其他类型/阶段的单抗制品工艺开发/生产可参考本章节执行。



图 1－1 单抗制品生产典型工艺流程示意图

2 生产质量控制策略

本章主要内容：

T 单抗制品制定控制策略的原则

单抗制品在物料控制、工艺控制、分析控制、稳定性研究与应用、污染控制等方面的注意事项

T 单抗制品开展工艺验证、清洁验证的原则

2.1制定原则

控制策略是指根据当前对产品和工艺的了解，为确保工艺性能和产品质量而进行的一系列有计划的控制(ICH Q8)。控制策略可包括生产工艺参数、与原液和制剂生产相关的原材料、辅料及包装材料的属性、设施、设备运行条件、过程控制、产品质量标准，以及监测和控制的分析方法及频率等。

控制策略的形成是一个从产品理解到工艺理解的持续改进过程，需要依据质量源于设计(quality by design,QbD)的原则，在对产品及其工艺全面理解基础上，采用风险控制工具识别影响产品关键质量属性(critical quality attributes,CQAs)、关键物料属性(critical material atributes,CMAs) 和关键工艺参数(critical process parameters,CPPs)、 其他变异来源等，并依据风险评估结果建立并维持产品的受控状态，以及促进产品质量持续改进。在产品开发初期应根据目标产品质量概况(quality target product profle,QTPP)确定期望的产品质量属性，并基于现有知识、药学研究、非临床评价、临床研究的数据，评估质量属性对产品安全性和有效性的影响，以确定质量属性的关键性。质量属性关键性的评估可遵循ICH Q9的相关原则，并应随着产品知识和工艺知识的积累，在产品生命周期中持续进行更新。

为实现产品质量的持续稳定受控，需在工艺开发及工艺表征的过程中确定关键工艺参数，充分理解其与关键质量属性间的关系，并形成初步的控制策略，后续在

工艺性能确认(process performance qualification,PPQ)阶段对其有效性和适用性进行确认。根据对工艺的认知程度，可选择建立/设定目标值、操作范围、可接受范围、设计空间以及工艺性能监测方式等，并随着工艺理解的深入，持续改进。

质量风险管理的原则应贯穿产品整个生命周期，控制策略也应随着对工艺和产品理解的加深，以及工艺和技术的改进而进行持续优化。

图2-1说明了制定产品控制策略的流程。

单抗制品为细胞培养表达的蛋白质产物，其质量属性具有特殊性，例如：具有复杂的多级结构，结构直接影响产品功能活性及有效性；存在多种翻译后修饰、产品异质性强、产品相关物质多样、产品相关杂质复杂、工艺相关杂质来源众多；生产和贮存条件对产品质量影响大等。基于单抗制品的产品特性，通常将其质量属性分为产品相关质量属性、工艺相关质量属性、活性、常规质量属性及污染物。详细的分类示例见表2-1。

本章节以单抗制品质量属性的评估和分类为基础，对其控制策略制定进行介绍，包括物料控制、工艺控制、分析控制、稳定性研究与应用、污染控制、工艺验证和清洁验证。

2.2物料控制

A. 原材料、辅料及耗材控制

物料是单抗制品工艺及质量实现的关键要素之一，GMP“第六章 物料与产品”和“第十章第七节供应商的评估和批准”对物料以及物料供应商的管理提出了基本要求；《中国药典》三部生物制品生产用原材料及辅料质量控制中，对生产过程中使用的原材料和辅料质量控制提出了通用性要求。此外，本分册无菌制剂部分在“3.2.1物料”章节对于无菌制剂生产中所用物料应重点关注的内容也提出了指导意见。

单抗制品生产所用物料按功能分类，主要为原材料、辅料和生产用耗材。其中原材料指生物制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。上游生产原材料主要包括配制培养基和相关溶液所需的培养基和添加物等；下游原材料主要包括生产过程中配制缓冲液所需的无机化合物及有机溶剂。根据《中国药典》三部生物制品术语，辅料指生物制品在配制过程中所使用的辅助材料，如佐剂、稳定剂、赋形剂等。生产用耗材主要为用于上下游以及制剂生产中使用的生物反应袋、配/储液袋、无菌连接器、滤器等一次性使用耗材，以及超滤膜包、层析介质等重复使用耗材。

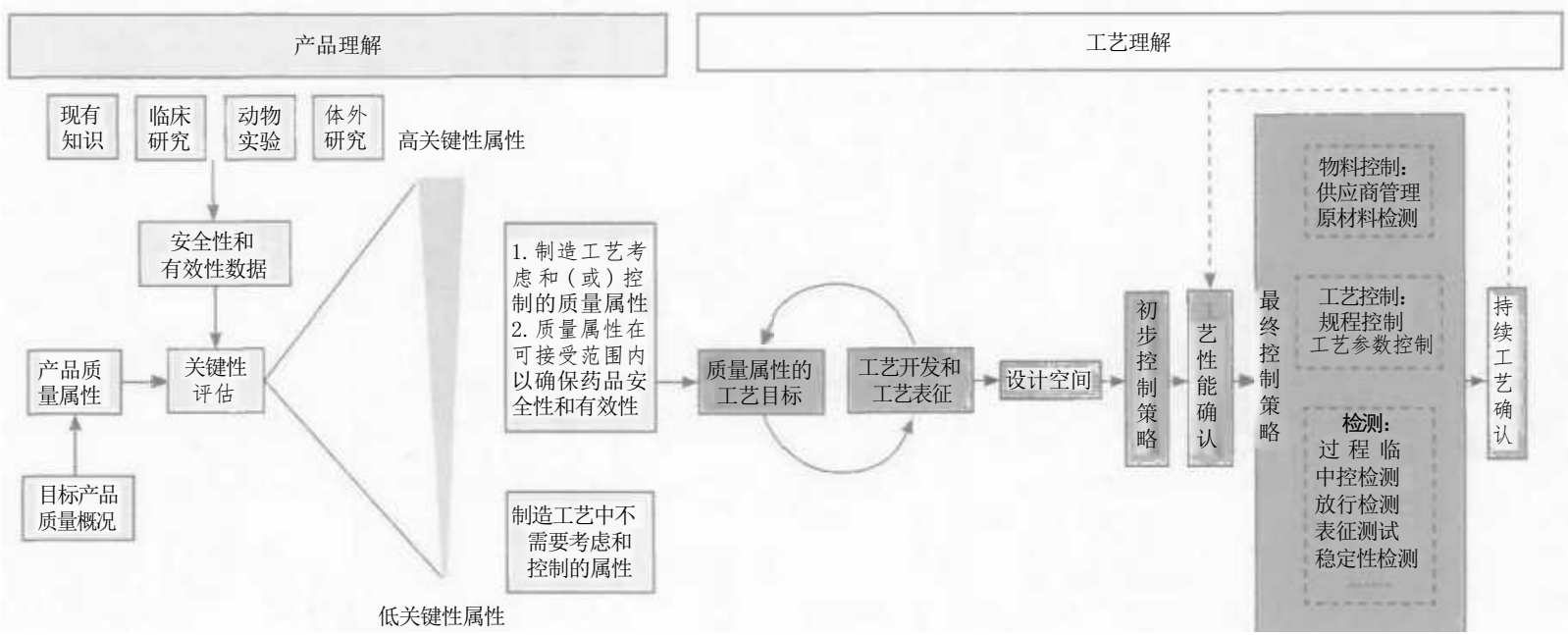


图 2－1 产品控制策略实现流程

注：参考CMC Biotech Working Group,A-Mab:ACase Study in Bioprocess Development.2009.

表2-1 单抗制品质量属性示例

类别	质量属性示例
产品相关质量属性	等电点、氨基酸序列、高级结构、糖基化、二硫键/聚合体、低分子量物质、酸性变体、碱性变体、氧化、脱酰胺、C端赖氨酸
工艺相关质量属性	宿主细胞DNA(HCD)、宿主细胞蛋白(HCP)、Protein A残留、细胞培养物和添加剂(如消泡剂、甲氨蝶呤、残留溶剂)等
活性	结合活性、生物学活性、ADCC效应、CDC效应
常规质量属性	外观、蛋白质含量、pH值、渗透压摩尔浓度、辅料含量、颜色、澄清度、装量、微粒、黏度”、装量差异、水分
污染物	支原体、病毒、微生物、细菌内毒素、浸出物

注：*对高浓度制剂还应关注黏度。

参考CMC Biotech Working Group,A-Mab:ACase Study in Bioprocess Development.2009

一次性使用技术已广泛应用在单抗制品生产领域。目前，国际上已经有一系列相关的法规、指导原则及技术报告用于帮助供应商、制药企业和药品监管部门更加合理、有效地制造、应用和监管一次性使用技术，如USP、欧盟GMP附录1、PDA第66号报告、BPOG 的相关技术指南等，同时国内也开始建立针对一次性使用技术的团体标准及技术指南，为国内一次性使用技术的应用提供参考及指导。无菌制剂中使用一次性使用技术的注意事项也可参考本分册无菌制剂部分“18.1一次性使用技术”。

物料质量控制活动主要在以下环节展开：基于产品关键质量属性以及工艺评估确定物料关键质量属性、筛选确定物料供应商、建立物料的企业内控质量标准、入厂验收/检验与放行、贮存管理、发放与使用管理、退库管理、物料销毁管理、物料变更管理等。本丛书《质量控制实验室与物料系统》分册对物料的管理进行了系统的阐述，本节重点针对单抗物料管理的特殊关注点展开描述。

单抗制品原材料及辅料特殊关注点主要包括：动物源性物料风险、细胞培养基适用性、工艺特殊添加物去除能力、微生物(细菌、真菌)/支原体/病毒及细菌内毒素污染风险等。单抗生产用耗材特殊关注点主要包括：工艺匹配性、相容性、外来污染控制、完整性控制等。同时，应注意关注不锈钢系统阀体隔膜或密封材料(如垫片)材质、匹配性、相容性以及更换周期等。

单抗制品物料的质量管理要求以及控制实施指导，详见本分册生物制品(单抗)部分“4上游工艺的生产质量控制”和“5下游工艺的生产质量控制”。

B. 耗材相容性评估

单抗制品生产过程中， 一次性使用耗材在与培养基、缓冲液、中间产品、原液、制剂等工艺流体直接接触的过程中，可能存在相互作用，导致耗材中部分可迁移的物质进入产品，进而影响产品的安全性和有效性。需关注一次性使用耗材对接触流体，特别是产品相关流体的安全性影响，即可提取物和浸出物

一次性使用技术的相容性研究可参考本分册无菌制剂部分“18.1 一次性使用技术”。

可提取物的安全性风险高低与耗材在工艺流中的使用环节、耗材和流体接触的时间、温度、流体性质、接触面积-体积比、后续是否有杂质去除步骤等相关。首先需识别工艺过程中所使用的与工艺流体直接接触的聚合物材质是否为一次性使用耗材，然后通过风险评估(图2-2),识别出工艺中各耗材的可迁移物安全风险等级，根据不同的风险等级，制定相应的控制措施。

评估过程可参考BPOG 发布的Best Practices Guide For Evaluating Leachables Risk From Polymeric Single-Use Systems Used In Biopharmaceutical Manufacturing(《生物制药生产过程中一次性使用聚合物系统浸出物风险评估的最佳应用指南》)或其他相关的法规指南，评估流程示意如下：

按照上述流程评估的过程中，对中等及以上风险的耗材进行安全性评价时，需要注意，由于不同供应商、不同耗材的可提取物研究条件存在差异，最终得出的安全性风险可能存在差异。在实际评价工作中，应考虑耗材在工艺中的使用步骤，以便更全面地评估。例如，因超滤浓缩/换液(UF/DF) 工序可有效去除低分子量的物质，在超滤浓缩/换液前的工序中使用的耗材的可提取物和浸出物的风险通常相对较低。

2.3工艺控制

单抗制品本身的性质复杂，需从产品质量属性出发，基于风险建立健全的工艺控制要求，以稳定、 一致地生产出符合安全性、有效性要求的产品。应对每一质量属性进行风险分类或排序，以识别关键质量属性并建立初步的控制要求，通常常规质量属性及污染相关属性在不同项目中均可直接判定为关键质量属性。

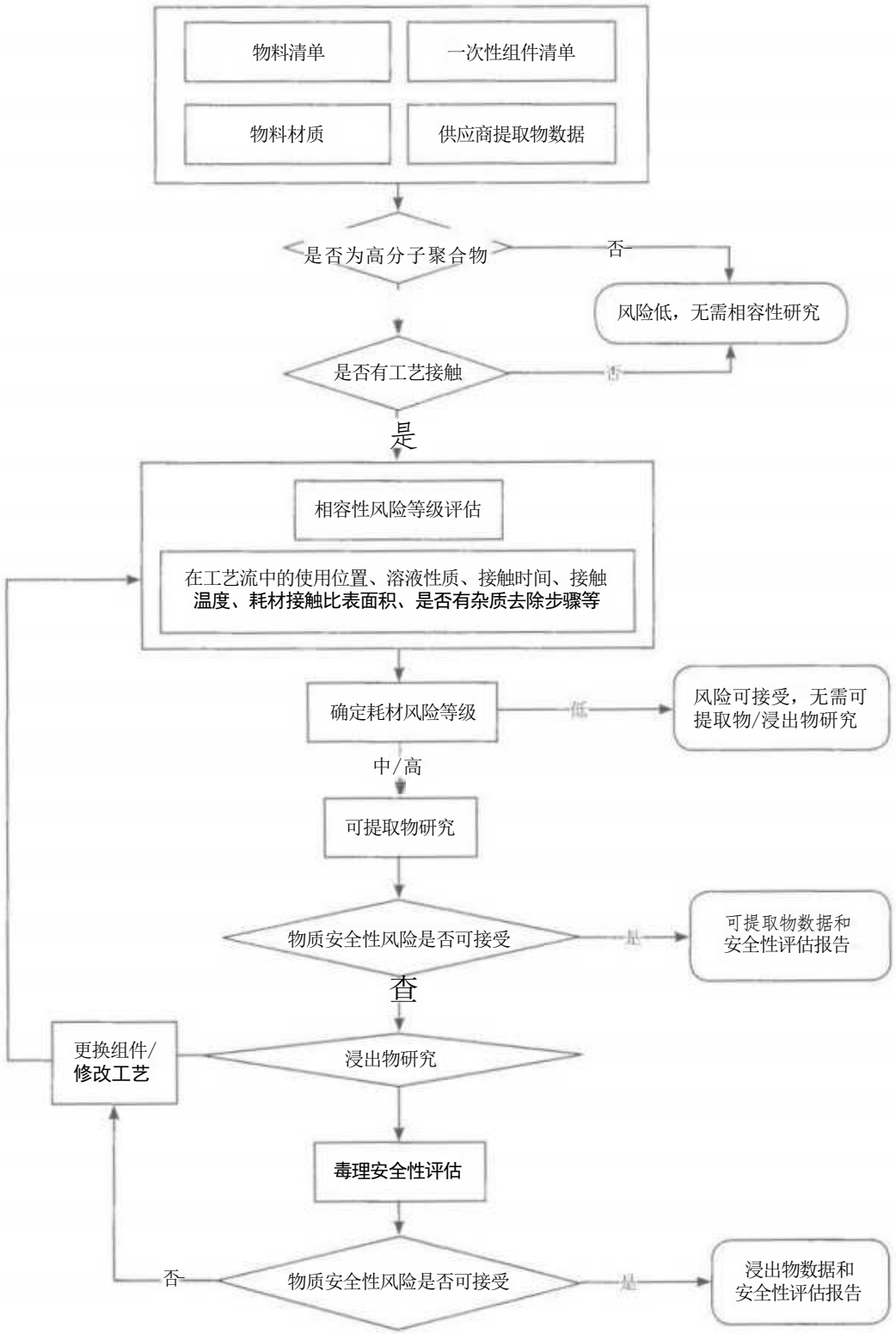


图 2－2　耗材风险评估流程示意图

产品相关质量属性及工艺相关质量属性总体评估思路可参见图2-3。首先将评估属性分为产品相关质量属性和工艺相关质量属性，对工艺相关质量属性可进一步分为宿主细胞衍生物、生物活性工艺组分和无生物活性工艺组分。针对产品相关质量属性、宿主细胞衍生物及生物活性工艺组分可采用风险排序、预先危害分析等风险评估工具评估其关键性。针对无生物学活性的工艺组分(如甲氨蝶呤)对产品的安全性的影响，一般采用杂质日暴露剂量(permitted daily exposure,PDE)或杂质安全因子(impurity safety factor,ISF)对其进行评估。对于活性，一般生物学活性和结合活性直接影响产品有效性，直接判为关键质量属性；对ADCC效应及CDC 效应等Fc 功能，需结合产品的作用机制评价其关键性。根据评估的结果将质量属性分为关键质量属性和非关键质量属性

单抗制品典型的关键质量属性示例见表2-2

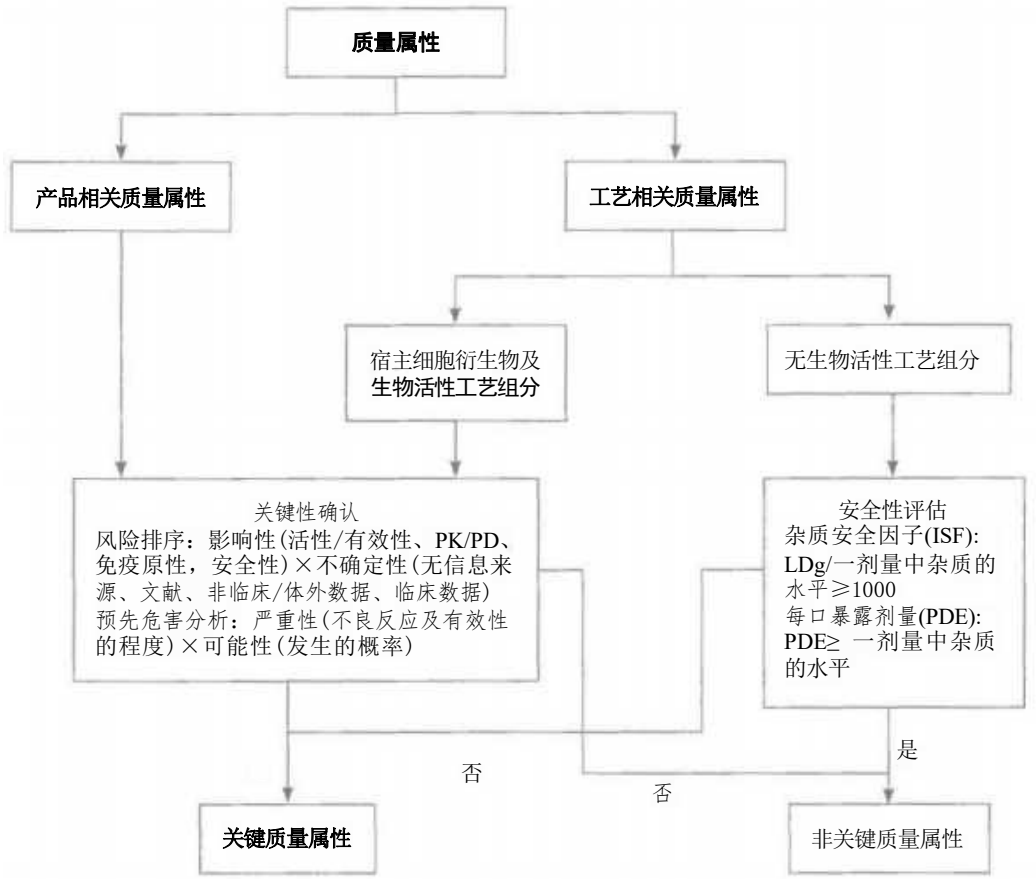


图 2-3　关键质量属性总体评估原则

表2-2 单抗制品典型的关键质量属性示例

类别	关键质量属性
产品相关质量属性	氨基酸序列、高级结构、酸性变体、聚合体、低分子量物质
工艺相关质量属性	宿主细胞DNA(HCD)、宿主细胞蛋白(HCP)、ProteinA残留
活性	相对结合活性、生物学活性
常规质量属性	蛋白质含量、pH值、渗透压摩尔浓度、辅料含量、颜色、澄清度、装量、微粒、水分*、容器密封完整性
污染物	支原体、病毒、微生物、细菌内毒素、浸出物

注：*对冻干产品，还应关注水分。

当形成初步的关键质量属性后，结合行业、平台经验以及早期工艺研究的结果，进行初步工艺开发，建立初步工艺流程及参数控制目标或范围，在工艺性能确认前，基于已识别的工艺输入(可控的工艺参数),使用风险评估工具并结合当前对工艺的理解，分析此类工艺参数对于产品质量的影响程度，识别出潜在的关键工艺参数(potential critical process parameter,pCPP)和非关键工艺参数(non-CPP), 随后建立可比的缩小模型，并以此为基础针对潜在关键工艺参数进行深入的工艺表征研究，以深刻理解工艺过程与产品质量间的关系，进一步明确潜在关键工艺参数属于关键工艺参数或者非关键工艺参数。针对非关键工艺参数，基于其对工艺性能影响的评估识别其为重要工艺参数(key process parameter,KPP)或非重要工艺参数。

工艺参数控制原则制定一般包括设定/目标值、可接受范围(proven acceptable range,PAR) 以及常规操作范围(normal operating range,NOR)。可接受范围可以是基于多参数研究所得的设计空间(design space,DSp)或单因素研究所得的可接受范围；常规操作范围可基于表征研究或实际工艺需求等制定操作目标值，同时根据平台经验、正常工艺波动、设备控制能力以及人员操作等一系列系统误差进行目标值正常波动范围的制定。工艺参数关键性评估流程见图2-4。

针对图2-4说明如下：

●参数或属性：工艺变量可以是单元操作的输出和对另一单元的输入，对一个指定的单元操作，根据每个变量的直接可控性初步设定为参数或属性(是：直接可控制的工艺输人决定了工艺的可变性；否：不能直接控制的工艺输出是被监测的属性，可能表示工艺性能或产品质量属性)。

• 工艺参数：对关键质量属性的潜在影响[是：如果怀疑参数的变化对关键质量属性(CQA) 有影响，或如果数据显示可能会有影响，则指定这个参数为关键工艺参数(CPP)； 否：参数为非关键工艺参数并进一步评价]

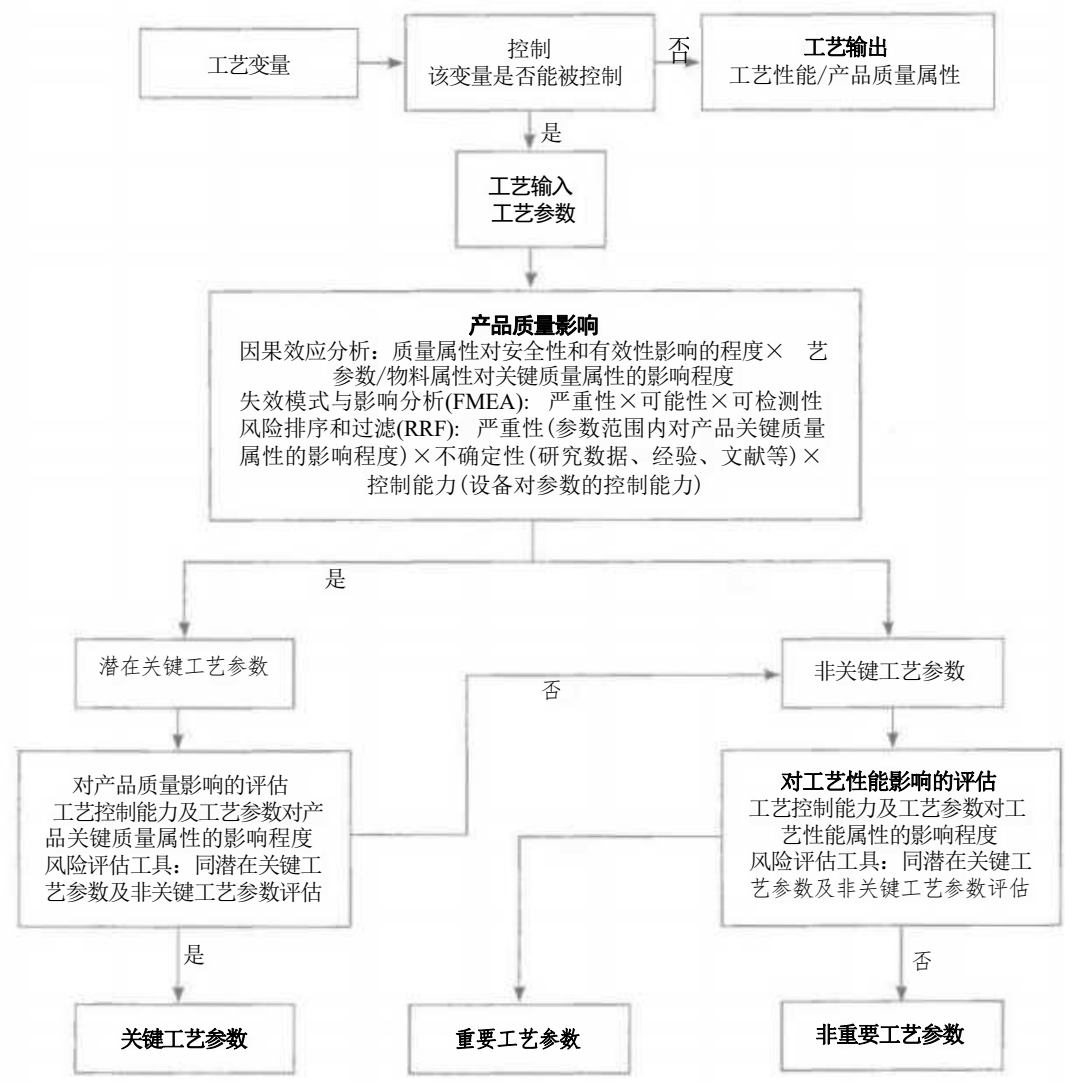


图 2－4　关键工艺参数评估流程

注：参考PDATR　No.60Process　Validation:A　Lifecycle　Approach(《工艺验证：生命周期方法》)。

o非关键工艺参数：如果超定义范围运行，潜在影响工艺性能或稳定性[是：参数指定为重要工艺参数(KPP)；否：在较宽的范围，参数对工艺无影响，参数被指定为非重要工艺参数(non-KPP)]。

除工艺表征外，还需结合其他研究内容及商业化生产工艺实现的过程，建立中间过程的质量及性能指标的测试要求，从而制定整体的工艺控制策略。其他研究内容包括但不限于：细胞库检定、细胞库/细胞系稳定性、培养基稳定性、中间产品稳定性研究、除病毒验证、溶液稳定性研究、杂质清除研究、重复使用耗材寿命研究、搅拌均一性研究、相容性研究等。典型的单抗制品原液工艺控制原则示例如表2－3。

表2-3 单抗制品原液工艺控制原则举例

阶段	工序步骤	关键工艺参数	重要工艺参数	关键性能属性	工艺过程测试
细胞培养阶段	细胞复苏	/	温度、培养时间	细胞活率、细胞密度	/
	摇瓶扩增	/	温度、培养时间、接种密度	细胞活率、细胞密度	/
	反应器扩增	/	温度、pH值、溶氧、培养时间、接种密度	细胞活率、细胞密度	/
	反应器培养	温度、pH值、培养时间	补料时间/体积、溶氧、接种密度	细胞活率、表达量	培养过程的细胞密度、活率、代谢过程指标、培养终点的表达量、微生物限度、细菌内毒素、支原体、病毒
	收获	/	压力、流速	收率、浊度	蛋白含量、宿主细胞蛋白(HCP)、宿主细胞DNA(HCD)微生物限度、细菌内毒素
纯化阶段	亲和层析	载量、洗脱液pH值	收峰范围	收率	蛋白含量、宿主细胞蛋白(HCP)、宿主细胞DNA(HCD)Protein A残留、SEC、IEC、微生物限度、细菌内毒素
	低pH值病毒灭活	pH值、时间、温度	/	/	SEC、IEC、微生物限度、细菌内毒素
	阴离子交换层析	载量、上样样品pH值和电导率	收峰范围	收率	蛋白含量、宿主细胞蛋白(HCP)、宿主细胞DNA(HCD)、Protein A残留、SEC、IEC、微生物限度、细菌内毒素
	阳离子交换层析	载量、洗脱液pH值和电导率	收峰范围	收率	蛋白含量、宿主细胞蛋白(HCP)、宿主细胞DNA(HCD)、Protein A残留、SEC、IEC、微生物限度、细菌内毒素
	除病毒过滤	压力、载量	/	收率	蛋白含量、微生物限度、细菌内毒素、膜包完整性
	超滤浓缩/换液	换液倍数	跨膜压力	收率	蛋白含量、SEC、IEC、微生物限度、细菌内毒素
	过滤、分装	/	1	收率	过滤完整性
	原液	/	/	/	原液质量标准检项

注：工艺过程测试包括中控检测和过程监测：中控检测主要目的是对影响中间体和原液质量重大变异的工艺步骤设置相关控制指标，从而保证整体的工艺性能实现；过程监测主要目的是对中间体和原液相关属性进行检测，以追踪产品质量或工艺性能的变化趋势。

以上内容均为常规的工艺控制策略的举例，根据各企业产品的开发阶段以及对工艺和产品的认识程度不同，控制策略也不尽相同，表2-3中的工艺过程测试项目，仅为典型的测试类别，但其中与工艺实现及安全性相关的测试项目一般或推荐作为常规检项，如细胞培养终点的表达量、细菌内毒素、微生物限度、病毒及纯化过程各步骤蛋白质含量等。各企业需结合自身的工艺能力及产品特点建立科学合理的工艺过程控制、监测项目及监测频率等，并随着对工艺和产品的理解深入，更新优化上述控制策略。

以下将以质量属性聚合体及残留宿主细胞蛋白(HCP) 为例进行工艺控制要求制定的说明。

实例分析

实例1：产品相关质量属性控制要求制定（聚合体）

单抗制品聚合体含量通常与临床免疫原性强弱相关，基于行业知识、实验室研究、非临床研究及临床研究数据或知识，以及对产品质量属性的理解，运用风险评估工具，如风险排序(risk ranking),将聚合体评为关键质量属性，同时基于聚合体对产品的安全性及有效性的影响，根据研究数据及行业知识，初步制定该质量属性的可接受范围为聚合体含量≤5.0%(SEC-HPLC 纯度)。

通常上游工艺及下游工艺(极端的温度，如细胞培养过程；酸碱度，如低 pH 值病毒灭活；盐浓度、蛋白浓度，如层析过程；机械剪切力，如搅拌、传输过程；贮存过程等)均对此质量属性有潜在影响，应根据建立的关键质量属性及其范围，结合平台经验、行业经验及早期研究等进行早期的工艺开发，建立初步的工艺流程、参数控制范围及测试要求。在工艺性能确认前通过严重性、不确定性和参数控制能力等风险评估方式，筛选出对聚合体有影响的潜在关键工艺参数，通过工艺表征研究，建立潜在关键工艺参数与聚合体含量间的关系，并依据聚合体的控制目标建立各工艺参数的控制范围，最终通过参数范围内参数波动对聚合体含量的影响程度、参数的可控程度确定关键工艺参数。

利用风险优先系数(risk priority number,RPN)工具，从关键质量属性失效的严重性、失效的概率、该质量属性的可检测性三个维度，对聚合体的工艺控制风险进行评估，并结合聚合体在产品生命周期中的来源，建立工艺控制策略和测试策略，如物料控制、参数控制、中控检测、过程监测、放行测试、稳定性测试、表征测试等。

基于工艺表征研究，生物反应器培养工艺、亲和层析工艺、低pH值病毒灭活工艺、离子交换层析及超滤工艺对聚合体含量有显著影响，对上述工艺参数进行控制并建立过程监控点。结合聚合体对安全性及有效性的影响，基于工艺一致性控制需求，用SEC-HPLC 纯度方法进行放行检测。考虑到产品贮存过程中可能形成聚合体导致聚合体含量升高，在稳定性考察中对聚合体含量进行检测。此外，因SEC-HPLC纯度放行方法无法直接反映聚合体的聚合度，故用SEC-MALS 或 AUC 对聚合体进行表征检测。

综合以上分析，基于对产品及工艺的认识，对聚合体建立的控制策略见表2-4。

表2-4 单抗制品聚合体质量控制策略举例

单元操作	物料控制	参数控制	中控检测	过程监测*	放行测试	稳定性测试	表征测试
种子复苏和接种							
传代扩增							
生物反应器培养		X					
收获							
亲和层析		X		X			
低pH值病毒灭活		X		X			
澄清过滤		X		X			
离子交换层析		X		X			
除病毒过滤							
超滤		X		X			
原液					X	X	X

注：*过程监测的频率可根据周期性回顾及趋势分析的结果进行调整。

实例2:工艺相关质量属性控制策略制定(残留宿主细胞蛋白)

宿主细胞蛋白(HCP) 为一类由宿主细胞产生的蛋白，单抗制品HCP 残留量通常与临床免疫原性强弱相关，其从关键质量属性到关键工艺参数的识别、研究以及最终控制策略制定的过程均与实例1聚合体部分的思路一致。但不同HCP 具有不同的性质，且其相对丰度在不同批次的细胞培养过程中可能具有差异，并可能与生产规模相关，故下游纯化工艺中一般不进行此类杂质的挑战研究，建议使用来自商业

化规模或具有代表性的发酵液，通过工艺表征研究，建立关键工艺参数与HCP 残留量间的关系。

基于工艺表征研究，生物反应器培养工艺、澄清过滤工艺、亲和层析工艺、离子交换层析工艺对HCP 残留量有显著影响，故对上述工艺参数进行控制并建立过程监控点。结合HCP 残留量对安全性及有效性的影响，基于工艺一致性控制需求，在原液中对HCP 残留量进行放行检测。考虑到产品贮存过程中不会引入 HCP，故稳定性考察中不进行检测

综合以上分析，基于对产品及工艺的认识，对残留 HCP建立的控制策略见表2-5。

表2-5 单抗产品HCP残留质量控制策略示例

单元操作	物料控制	参数控制	中控检测	过程监测*	放行测试	稳定性测试	表征测试
种子复苏和接种							
传代扩增							
生物反应器培养		X					
收获		×		X			
亲和层析		X		X			
低pH病毒灭活							
澄清过滤		X		×			
离子交换层析		×		X			
除病毒过滤							
超滤							
原液					×		

注：*过程监测的频率可根据周期性回顾及趋势分析的结果进行调整。

2.4分析控制

单抗制品具有分子量大、结构复杂、产品非单一组分、生物学活性、杂质种类复杂等质量特点，以及生产工艺复杂、质量控制点分布广、对环境控制要求高等工艺特点，需要建立稳健且完善的分析控制原则。

单抗制品分析检验控制应贯彻质量源于设计(QbD) 的策略理念，基于对产品

关键质量属性、关键工艺参数和关键物料属性的风险评估，结合工艺的特点和需求，以及工艺对风险的控制能力，来制定产品全生命周期的分析控制原则，以期达到单抗制品使用的安全、有效以及质量可控的目标。相关分析控制应包含工艺关键步骤和中间产品控制、原液和成品质量控制、基于产品特点的表征分析、可比性研究测试、稳定性研究试验、分析方法的验证及其生命周期管理等(单抗制品典型分析项目示例见表2-6)。

应注意在产品生命周期的不同阶段以及在生产的不同环节中，对分析控制的要求不同，例如，在产品开发不同阶段对分析方法验证的全面性有不同的要求，根据工艺对杂质的去除效果不同，不同阶段或生产环节的中间产品纯度指标的控制要求也不同。同时，分析控制原则应按照申报国家的药典、法规及指南要求进行设计和实施。由于单抗制品具有生物学活性，整个生产过程均需要保证产品的活性与功能，应特别注意生物学活性的分析控制。关于分析控制原则的内容，详见本分册生物制品(单抗)部分“7.1 关键质量属性和分析控制”。

单抗制品分析控制中所使用的参比品对其检测结果的可靠性至关重要，其制备、标定、表征、稳定性等都应有相关的控制要求，详见本分册生物制品(单抗)部分“8参比品标定与管理”。

表2-6 单抗制品典型分析项目示例

类别	项 目
一级结构	完整分子量、还原完整分子量、切糖完整分子量、切糖还原完整分子量、非还原肽图、翻译后修饰、糖型分析、糖基化位点分析、唾液酸含量、游离巯基、等电点
高级结构	圆二色谱(CD)、差式扫描量热(DSC)、二硫键、荧光光谱
.常规检验	蛋白质含量、装量、渗透压摩尔浓度、pH值、颜色、澄清度、可见异物、不溶性微粒、辅料含量
鉴别	肽图、cIEF或IEC
产品纯度和杂质	SEC纯度、IEC纯度、还原CE纯度、非还原CE纯度
产品异质性	糖型、电荷异质性
工艺相关杂质	残留宿主细胞蛋白(HCP)、残留宿主细胞DNA(HCD)、残留Protein A、甲氨蝶呤等
活性相关	相对结合活性、生物学活性
微生物相关	无菌、细菌内毒素、密封完整性

2.5稳定性研究与应用

单抗制品对环境非常敏感，特别是温度、光照、剪切力等因素的影响，例如，受到生产工艺、包装容器、贮存条件、运输方式及过程、使用环节等因素的影响，抗体蛋白在较长时间、较高温度以及暴露于较强光线的情况下，容易产生聚合体、电荷变异体等产品相关杂质/物质，在剪切力的作用下，可能发生肽键的断裂或分子构象的变化，产生片段杂质或影响活性，为保证其在最终使用时的安全性与有效性，避免失活或降解，在贯彻质量源于设计策略理念时，应根据产品的工艺特点、关键质量属性，以及质量属性与稳定性的相关性，建立单抗制品全生命周期的稳定性控制策略。相关稳定性研究包括中间产品的稳定性研究、原液和成品的稳定性研究、容器相容性对产品的稳定性影响、运输中的稳定性研究、配伍输注稳定性研究等。

稳定性研究能够检测出随环境因素变化而变化的质量属性，同时也是产品贮存条件和有效期设定的基础。通过稳定性研究，可以明确产品的敏感条件、降解途径与速率等相关信息。稳定性研究的具体要求参考《中国药典》指导原则9402生物制品稳定性试验指导原则、CDE 发布的《生物制品稳定性研究技术指导原则(试行)》、ICH Q5C Stability Testing of Biotechnological/Biological Products(《生物技术/生物制品稳定性试验》)和*ICH Q1E Evaluation of Stability Data(《稳定性数据的评价》)*等其中需要重点关注的内容包括：稳定性考察样品的选择、对容器的要求、稳定性指示检测方法的选择、稳定性考察试验的设计、数据及结果的分析等

开展稳定性研究的样品应能够代表相应的工艺条件、规模、批次和产品规格，用于稳定性试验的原液和成品的质量应能代表临床研究及商业化生产产品质量。用于成品稳定性试验的各批次应来自不同批号的原液。

用于稳定性试验的原液应贮存在能充分代表其实际规模化生产所使用的容器中，也可将用于稳定性考察的原液置于缩小的容器中，但缩小的容器应与规模化生产所用容器的材质及密封系统相同(包括但不限于缩小容器的形状、密封方式等，如果使用缩小的不锈钢容器系统，还应注意其取样装置和取样方式应与规模化生产相同),成品应采用与规模化生产时相同的包装容器与密封系统。

由于单抗制品结构和组成复杂，采用单一的稳定性检测方法或参数并不能完全反映单抗制品稳定性特征的全貌，应根据产品的实际情况，设计一系列合理的稳定性试验项目，对生产过程的中间产品、原液、成品、运输及输注使用过程的不同产品进行稳定性试验，以尽可能全面地反映产品的稳定性特征。对于原液和成品应设

计一系列稳定性试验条件，如长期、加速、影响因素(如冻融条件、振动、光照)等，以保证合适的稳定性研究条件能检测出其成分、纯度及效价的变化。长期稳定性的试验时间点应根据预定有效期的长短合理制定，如果产品在某个时间变化剧烈，可有针对性地进行更密集的检测。原则上，加速和影响因素试验应尽可能开展到产品不合格为止。对于生产过程的中间产品、运输产品及配伍输注的产品，应根据实际条件进行稳定性研究的设计以反映其稳定性。

对于稳定性研究所用的分析方法，应综合评估其是否全面监测了产品的关键质量属性，根据需要可增加一些表征方法检测其质量属性的变化。

稳定性结果的评估应综合考虑所有质量属性的变化，必要时应采用统计学工具或方法，分析数据批间一致性和稳定性趋势，若稳定性试验的数据表明产品质量变化非常小，从数据上可以明显看出有效期制定的合理性，则不必进行正式的统计分析，只要提供简略的理由即可。

应综合考虑产品从原液到成品以及运输分发过程等不同阶段的稳定性情况，分段评价其稳定性变化趋势，识别对稳定性影响最大的环节或风险，并评价从原液到成品以及运输使用过程中稳定性下降的累计效应，以评价产品在整个生命周期内的稳定性风险。例如，可通过考察采用近效期原液灌装的成品的稳定性或脱冷链样品的稳定性，来评估稳定性累计效应对产品质量的影响。

根据评估结果，明确产品的敏感条件、降解途径、降解速率等信息，制定产品的贮存条件和有效期(保存期),并根据产品特性，结合分析方法的变异性，制定产品合理的放行质量标准，以确保产品在有效期内符合货架期标准。

2.6污染控制

在生产、取样、包装或重新包装、贮存或运输等操作过程中，原辅料、中间产品、待包装产品、成品受到的具有化学或微生物特性的杂质或异物的不利影响，即为污染。单抗制品采用细胞作为起始原材料，且在生产中需引入较多物料，其污染物主要有微生物(细菌、真菌)、支原体、病毒、细菌内毒素、微粒等。

污染控制策略 (contamination control strategy,CCS) 指为确保工艺性能和产品质量，在现有产品和工艺的理解上计划的一套对污染的控制措施。下文将根据单抗制品原液生产工艺及过程控制的特点，阐述微生物(细菌、真菌)、支原体、细菌内毒素和病毒的污染控制策略。其中细菌内毒素除物料、器具等引入外，更大的风险来自微生物污染导致的细菌内毒素污染，本小节将微生物和细菌内毒素合并为微生

物污染进行描述。无菌制剂制定污染控制策略的一般性原则详见本分册无菌制剂部分“2.1.2污染控制策略”。

A. 微生物污染控制

微生物污染将导致抗体蛋白降解、活性降低、产生免疫原性、蛋白异质性、改变产品杂质谱、生产工艺无法去除的杂质等风险，从而影响单抗制品的有效性和安全性。应基于现有知识和系统性的风险评估，开发单抗制品微生物污染控制策略，从人员、厂房设施设备、物料、环境、生产工艺设计的方面进行控制，并结合实际的生产过程在生产不同阶段设置相应的监测点及控制标准，有效控制微生物污染的风险。单抗制品微生物污染控制策略(示例)见图2-5。

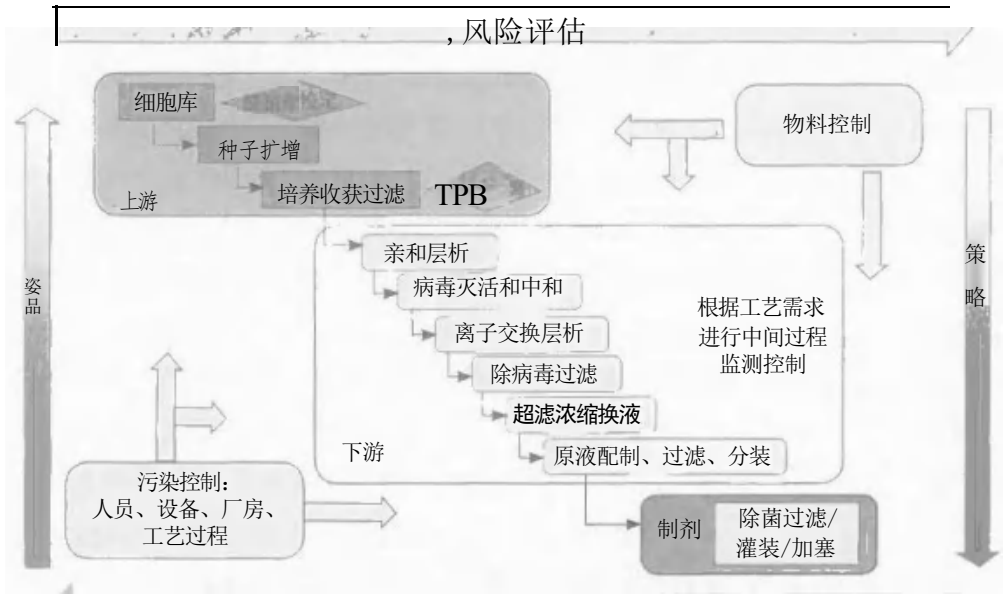


图 2－5　单抗制品微生物污染控制策略图(示例)

●来源及其控制：单抗制品的生产过程中微生物污染的主要来源包括人员、设备、厂房设施、物料、工艺过程等。

人是洁净区环境的最大污染源，人员的数量和活动量将直接影响整个洁净区的环境质量。人员因健康问题，如患有传染病、皮肤病、创伤等可能引入微生物污染风险。应当精心设计并建立洁净区人员卫生、行为规范和人员资质确认程序，对人员进行微生物知识、无菌更衣、无菌操作、取样等有关培训。尽可能采用物理屏障手段，减少人员手工操作步骤，最大限度地降低人员对药品生产造成污染的风险。

设备表面也是可能的污染源，应明确设备的清洁和消毒方式(手工或在线)并制定书面的清洁消毒规程，规定每一台设备的清洁消毒程序，明确清洁和消毒使用的清洁剂和消毒剂以及清洁消毒周期。生产设备或系统应尽可能采用密闭系统，其结构设计、组装、清洁消毒和存放均应考虑降低生物膜形成的风险。

厂房密封性不够、车间布局不合理、厂房清洁消毒不彻底都可能引起微生物对环境的污染，进而造成污染产品的风险。应从设计上考虑对微生物污染的防控，例如：人物流的合理划分，车间功能间的合理布局，洁净区空调系统、压差、水系统、气体等公用介质系统的设计，建立厂房设施的清洁消毒要求，对消毒剂效力进行验证等。应制定合理的监测方案，并对监测数据进行定期回顾，确保厂房设施微生物控制的有效性。

细胞建库和单抗制品生产中使用到的物料和耗材种类多且复杂，比如细胞培养过程，使用到大量的培养基和葡萄糖等利于微生物生长的物料以及一次性使用的无菌耗材，如未对来料和生产过程的微生物进行控制，则可能会导致微生物的大量繁殖。应建立相应的风险评估流程，根据其对产品质量的影响以及生产工艺的关键性确定相应的风险等级，筛选质量可控的供应商，经评估后制定微生物负荷有关的进厂验收标准，并按标准进行检测。物料贮存中还应防范污染风险，如环境温湿度控制、防虫防鼠等。应根据用途对一次性使用的无菌材料进行评估或无菌检查。对于直接接触产品的工艺气体，应基于风险评估制定相应的标准，并进行监测。

工艺过程也存在引入微生物的风险。单抗制品的生产过程中存在开放性操作(如细胞复苏、摇瓶操作、纯化过程等),可能会在操作的过程中带入微生物从而污染产品。单抗制品一般为非最终灭菌产品，因此在整个生产过程中应最大限度降低微生物的污染。单抗制品原液生产阶段一般为非无菌工艺过程，应通过无菌操作、密闭系统、无菌连接手段等降低微生物负荷并严格控制微生物的污染风险。主细胞库(master cell bank,MCB) 和工作细胞库(working cell bank,WCB)建库应符合GMP要求，细胞库的检定项目应包括细菌、真菌和支原体，对于未处理的细胞培养收获液(un-processed bulk,UPB) 和生产终末细胞(end of production cells, EOPC), 应进行微生物和支原体检测。生产前应做好反应器密封性检查，避免泄漏。对接种、转种等操作，应当有控制措施避免开放性操作中的微生物污染，应防范生产过程中的取样引入微生物污染。

●工艺能力控制：应关注培养基、缓冲溶液等的贮存条件和时限，以及层析介质、膜包等的清洁消毒、贮存条件和时限。应基于风险评估和研究结果制定中间产品贮存条件(如贮存前过滤、低温贮存)和时限。建议对纯化各工序收集液开展微

生物限度监测。根据工艺过程评估建立中间产品微生物负荷降低的措施，控制微生物污染。

o 监测控制：应根据产品质量属性及临床需求等，结合风险评估工具，系统性识别微生物引入、生长及快速繁殖的风险点(考虑点包括不限于：物料的接收、贮存、转运、厂房设施设备的设计和使用、人员健康及操作、工艺实现过程、清洁程序等)，并建立相应的控制措施、监测计划和限度(接受标准、警戒限及行动限)，超出限度应开展相应的调查和评估。

0回顾与更新：应对建立的控制措施进行回顾和分析，通过持续监测的结果和趋势进行持续改进，以不断提升污染控制水平，确保产品安全性和有效性：

B. 病毒污染风险控制

单抗制品的工程细胞来源于动物的组织或器官，这些组织或器官原材料在取材、运输及保存过程中有可能导致病毒污染。工程细胞构建过程也可能导致病毒污染。使用工程细胞建立细胞种子 (cell seed,CS)、主细胞库和工作细胞库的过程有可能导致病毒污染。这些细胞一旦感染病毒，可能会在细胞培养过程大量复制病毒，导致超出纯化工艺的病毒清除能力。纯化过程也同样可能受到来自人员、设施设备、物料、环境等方面的病毒污染。病毒污染会影响最终产品的安全性，因此需开展系统性的风险评估，并根据评估结果制定控制策略。

总体来说，病毒污染风险控制概括为病毒污染来源控制、病毒灭活/去除工艺能力控制以及病毒检测能力控制。下面将以单抗制品工艺为主线，从人、机、料、法、环、测等不同环节简要描述病毒污染风险控制原则。病毒污染风险控制需要系统性的风险评估输出实施要求，在实施过程后定期回顾实施效果，并进行优化，持续提升风险控制的有效性和及时性。单抗制品的病毒控制策略(示例)见图2-6。

●来源及其控制：细胞构建和建库过程可能存在病毒污染风险，如细胞种子引入的污染，使用动物源性成分的培养基、耗材引入的污染。应尽可能避免使用动物源性成分的物料。对于建库过程细胞自身是否感染携带病毒，目前主要通过过程控制结合检测来识别。《中国药典》三部对主细胞库和工作细胞库的内、外源病毒因子检定有详细规定。检验方法应基于细胞系的来源和历史，以及在细胞系生成和扩增过程中与人类或动物来源材料的潜在接触进行评估制定。这些检测内容对于生产终末细胞(EOPC) 也适用。当生产工艺发生改变时，应重新对生产终末细胞(EOPC)进行检测。每次从主细胞库建立一个新的工作细胞库，均应按规定项目进行检定。有些内源性病毒可能在主细胞库和工作细胞库阶段没有被检测出，应对达到体外细

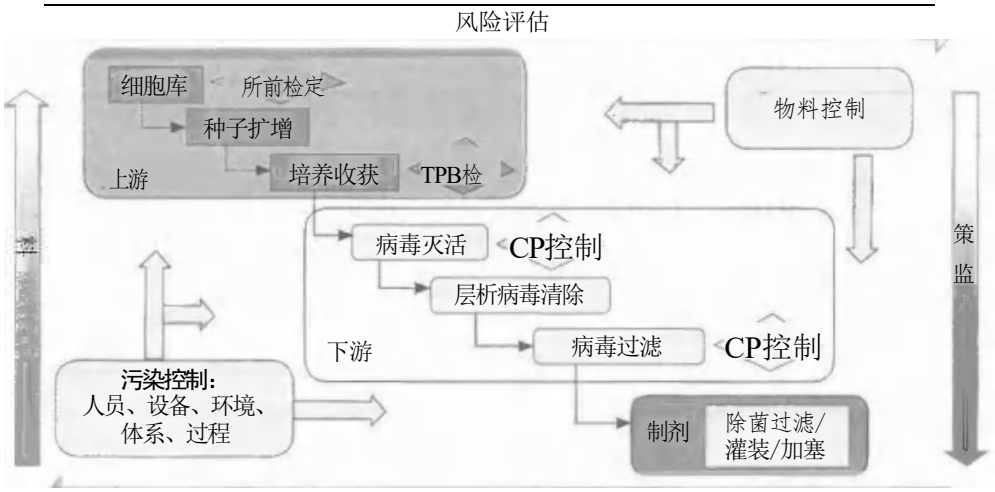


图2-6 单抗制品病毒控制策略图(示例)

胞传代限次的细胞(limit of invitro cell age,LIVCA)的内源性病毒做出评价。对达到体外细胞传代限次细胞至少应进行一次适当的试验(如体内和体外试验),以进一步确保生产过程未受外源病毒的污染。如果此时测出有外源病毒污染，应对工艺流程作仔细检查以查明污染原因。若有必要，应重新设计全部工艺。

细胞培养过程也应尽可能避免使用动物源性成分的物料。对于细胞培养过程是否感染携带病毒，目前主要通过对未处理的细胞培养收获液(UPB) 进行检测来识别。ICH Q5A明确要求，应对未处理的细胞培养收获液进行病毒测试，除非部分初加工后的样品对病毒测试更敏感，如未处理的细胞培养收获液对检测细胞可能有毒性，而经部分加工后可能就不具有毒性。建议企业基于风险评估制定计划以持续评估生产批次中的外源病毒。对UPB进行病毒检测的范围和程度应通过考虑几个方面来确定，包括用于生产所需产品的细胞系的性质，细胞系确认过程中进行的病毒检测的结果和范围、培养方法、原料和试剂的来源以及病毒清除率研究的结果。对于连续生产工艺长时间细胞培养带来的内源病毒水平波动风险，建议企业通过评估确定适宜的取样时间节点开展病毒检测。

人员因健康问题，如患有传染病、皮肤病、创伤、病毒性感冒等可能引入病毒污染风险。患有传染病、皮肤病、创伤、病毒性感冒等对产品质量和安全性有潜在不利影响的岗位操作人员应调离操作岗位，治愈后方可继续上岗。还应关注人员因培训不足导致引入病毒污染的风险。应加强人员的培训，避免因操作不当引入病毒污染风险。

在物料引入病毒风险方面，应特别关注原材料如培养基，辅料如吐温等，耗材

如硅胶管、耐压管、密封圈、垫片等，包装材料(胶塞等)等是否含有动物源成分；贮存条件是否有被虫鼠污染的风险；运输过程是否有造成破损导致污染的风险。具体要求可参考《中国药典》三部生物制品生产用原材料及辅料质量控制中对原材料和辅料的质量控制要求。如果生产过程使用到含有动物源性成分，应有充分资料证明其不会引入外源性病毒污染风险。

厂房位置不合理、密封性不够、车间布局不合理都可能产生病毒污染风险：厂房所处的位置应远离风险源(如动物培养房、病毒培养区),厂房应有良好的密封性，应有防虫防鼠设施，防止病毒污染。除病毒过滤前后区域应尽可能物理隔离，尽可能采用独立的人流物流，防止潜在病毒风险区域的人员进入无病毒风险区域。空调的布局应合理，除病毒过滤前后区域的空调系统应严格分开。

●工艺能力控制：如纯化工艺过程工艺能力不足，可能导致病毒无法有效灭活/去除。纯化工序应至少含有两个机制互补的病毒灭活/去除步骤，并经过有效性验证。病毒灭活/去除应参考ICH Q5A,通过能代表生产规模的缩小模型进行验证，并在大规模生产过程中，重点关注影响病毒灭活/去除的关键工艺参数，如低pH 灭活工序的 pH、温度、时间、病毒过滤去除工序的跨膜压、纳滤膜完整性等。当工艺规模放大或工艺发生重大变化时，应评估其对病毒灭活/去除的影响，并根据评估结果决定是否需要开展补充病毒清除验证。对于连续生产工艺，评估应包括：如果发生病毒污染，可能出现短时间内的高病毒量的情况，在此条件下艺是否具有足够的病毒清除能力

0检测能力控制：在病毒检测方面，传统病毒检测方法可能在灵敏度和时效性上存在不足，也可能导致病毒扩散和污染。病毒检测方法中，应关注更灵敏的病毒检测方法，如基于核酸的检测方法可以更好地弥补传统检测方法的不足，相关内容可以参考PDA第71号报告Depyrogenation(《除热原》)、ICH Q5A

污染处理：对发生病毒污染的情况，企业应建立流程，对不同工序阶段的污染采取不同的措施进行处理。例如：在细胞收获液中检测到外源性病毒，则不得用于后续生产或使用，应立即进行全面调查，评估料液可能污染的工序、厂房设施、设备、物品、物料等，以及因时效性原因可能被污染的批次，根据调查结果和评估采取措施，如对被污染培养液、中间产品、半成品、成品等调查后进行灭活废弃。对污染厂房设施设备调查后进行全面消杀。对被污染厂房内的物品也应进行全面消杀。对被污染物料调查后进行灭活废弃。

●回顾与更新：应密切跟踪和定期回顾产品病毒安全情况，确保产品病毒安全风险受控，并通过对病毒灭活/去除工艺和病毒检测手段的优化改进，不断更新控制要求，持续提升病毒污染控制能力。

2.7工艺验证

工艺验证应当证明一个生产工艺按照规定的工艺参数能够持续生产出符合预定用途和注册要求的产品。参考ICH指导原则(Q8 和 Q9)、美 国FDA工艺验证工业指南、EMA工艺验证指导原则、PDA 第60-3号报告(工艺验证：生命周期方法，附件2:生物制药原液的生产),工艺验证应采用生命周期验证方法，主要分为工艺设计、工艺性能确认、持续工艺确认三个阶段。

工艺验证的一般性要求详见本丛书《质量管理体系》分册“3.6确认与验证”。

图2-7简述了生物制品生命周期工艺验证方法的主要活动。



图2-7 生物制品生命周期工艺验证活动示例

A．阶段1:工艺设计

工艺设计(process design)阶段的主要目的是开发出可以实现稳健生产的工艺方法，根据产品知识的理解及工艺研究结果建立初步控制策略，达到可以开展工艺性能确认所需的条件。

工艺设计阶段主要活动包括不限于以目标产品概况(target product profile,TPP)出发建立目标产品质量概况，经风险评估识别出关键质量属性、并以此为基础，进行工艺开发，经风险评估识别出潜在关键工艺参数，基于潜在关键工艺参数开展工艺表征，建立初步工艺控制策略

工艺设计阶段确定的工艺参数、性能指标及工艺控制策略，将在下一阶段中进行确认。

B．阶段2:工艺性能确认

工艺性能确认是为了证明工艺变量的可控以及生产出符合预定质量属性的产品的能力，它的完成标志着工艺将从产品开发和临床生产阶段过渡到常规商业化生产T 艺性能确认证明了在商业化生产规模下工艺设计的有效性和工艺控制策略的适用性。

o 工艺性能确认的准备：在执行工艺性能确认之前，应进行准备状态评估，以确定所需信息的可用性或完成时间，并确保有适当的设施、设备与训练有素的人员。

●工艺性能确认的批次数：通常工艺性能确认至少要使用三个连续的批次来证明一致的制造工艺，所需的批次数量应基于风险评估确定。

●工艺性能确认的执行策略：为了便于工艺性能确认执行，可以采用分组策略来简化测试和最大程度的提高适用性。选择的策略必须经过科学判断和风险评估，并在工艺验证主计划和工艺性能确认方案中做出规定。

矩阵法(括号法):在工艺或设备参数(例如，批量大小、温度、pH 值、密度、流量、容器大小)的整个范围或极限范围内，可采用矩阵法(或括号法)进行验证，通过对最大范围或极限条件测试，代表测试变量的整个范围。

5分组法：适用于具有物理结构与功能相同或相似的设备，比如设备完全相同或类似(如生物反应器、储存容器等),相似程度应有充分说明。使用任何一个设备进行测试都能用于支持组内其他设备的确认或验证，可以对组内其他设备进行减少的操作与测试，例如，仅进行确认。如多个设计与尺寸相似/

相同的生物反应器用于反应器生产工序，采用分组验证策略执行工艺性能确认的实践方法可参考本分册生物制品(单抗)部分“4.4上游工艺验证”。

0最差条件(worst-case)：　最坏情况下的策略包括测试一个条件或一组条件，这些条件包括较高和(或)较低的工艺限度，以及与常规操作条件相比，构成产品或工艺失败的最大潜在风险的情况。

●工艺性能确认的接受标准建立：应基于工艺设计阶段获得的数据、历史知识和设备能力建立工艺性能确认接受标准。应确定批间和批内一致性的标准，同时第三阶段持续工艺确认中用于跟踪和趋势分析的参数和属性应包含在工艺性能确认接受标准中。通常接受标准包括以下几个方面。

0中间产品符合设定标准；

0所有工艺参数应保持在正常的操作范围，特别是关键工艺参数和重要工艺参数；

o 所有的产品质量属性和工艺性能属性应符合预期的接受标准。

●单抗制品工艺性能确认考虑要点：结合单抗制品生产工艺的特点，在进行工艺性能确认中通常应关注以下要点。

o 细胞培养工艺研究；

0病毒灭活或去除；

6产品相关杂质/物质(包括聚合体、降解产物、电荷异构体等)和工艺相关杂质(包括残留DNA、残留HCP、残留Protein A、消泡剂以及其他工艺添加物等)的去除；

0中间产品微生物和细菌内毒素控制；

0中间产品的保存时限；

o 混合均匀性；

0重复使用的层析介质和膜包的寿命研究；

原液冻融研究；

0工艺性能的一致性；

0产品质量属性批间一致性。

C．阶段3:持续工艺确认

工艺经过验证后，产品生命周期内将继续对工艺进行持续监测与评价，以确保工艺和产品质量始终处于受控状态。对前阶段建立的工艺输入和相应输出关系的理解，是持续工艺确认(continued process verification,CPV)成功的基础。

可以根据对工艺的理解程度分为两个阶段：第一阶段仍然需要一定程度的加强检测与监控，直到收集到的足够数据能有效地评估工艺波动。第二阶段在建立相应的控制限后，主要为常规的监控，同时根据工艺相关的变更或偏差回顾，适当地阶段性调整部分参数的监控或检测的强度或频率。

持续工艺确认实施主要包括以下方面：

(1)制定持续工艺确认方案，或建立产品专属的监控计划包含取样计划，取样频率等。下游各工序监测项目包括但不限于：关键工艺参数(CPP)，重要工艺参数 (KPP)，中控检测结果(如中间产品质量属性或产品相关杂质含量)、工艺性能属性或性能评价的辅助指标(如工序回收率等)。产品关键质量属性，或其他有需要的但未在首次工艺验证中关注到的因素。

(2)数据收集与审评持续工艺确认的数据可以来自于生产批记录内记录的相关工艺参数，日常的中控及放行检测，以及根据监控方案设定的加强取样检测。相关部门人员需要对收集的数据进行周期性审评，审评周期或频率取决于风险的水平及对工艺的理解。

(3)数据的统计学分析及控制限的制定按照不同的控制参数性质，选择不同的统计学工具进行分析，常用的统计学工具包括3 Sigma控制图和工艺控制能力(Cpk/Ppk) 分析图等。对于某些工艺参数或属性，可在积累一定批次数据(建议30批以上)后，通过3 Sigma 控制图输入工艺参数的内部控制限。而工艺控制能力(Ppk) 通常作为审核工艺能力的指标。如当Ppk≥1.33，表明工艺控制能力良好；当Ppk<1.0， 表明工艺控制能力差，必须提升。生产企业可根据具体情况，制定相应工艺能力评价及持续改进机制。

2.8清洁验证

对于共线生产，应基于质量风险管理的理念理解药品共线生产的危害、暴露和风险的关系，科学确定残留的可接受限度，分析产生污染和交叉污染的途径，采取降低污染和交叉污染措施，持续监控污染和交叉污染控制水平。

为降低或消除产品生产过程中的污染和交叉污染的风险，确保与产品和工艺用溶液接触的工艺设备、工器具及重复使用的耗材得到有效的清洁，企业应对清洁工艺进行验证。

企业应在产品研发阶段收集积累产品药理毒理学数据，并开发清洁方法；在技术转移阶段应基于产品特性、工艺及设备等进行共线生产可行性风险评估，设计清

洁验证方案并着手开展清洁验证；在产品上市前完成清洁验证工作，并在上市后持续开展共线生产风险控制措施的监督，积累清洁过程数据，持续改进污染和交叉污染控制措施。

清洁验证的一般性要求详见本丛书《质量管理体系》分册“3.6确认与验证”。

单抗制品的清洁工艺应结合上下游生产工艺特点和生产线模式进行开发，清洁验证通常分成三个阶段开展(表2-7),包括清洁工艺设计与开发(包括分析和取样方法的开发及确认)、清洁工艺验证、清洁验证状态维护。

表2-7 清洁验证的不同阶段

阶段1	阶段2	阶段3
清洁工艺设计与开发	清洁工艺验证	清洁验证状态维护
·残留目标物的识别 ●清洁剂的选择 ·建立限度 。分析测试 o残留计算 ·组合策略 ·建立污染与设备的关联分析 ·建立清洁参数 ·清洁方案策略/流程 ●测试位置/取样位置	·执行清洁验证(生产规模) ·使用工艺产品残留挑战清洁有效性 ●如清洁不彻底，改进清洁工艺 ●完成并输出有效流程	●周期性监控和确认 ·使用统计方法来观察清洁工艺的稳定性

A. 清洁工艺设计与开发

良好的设计和开发可以减少清洁工艺的风险和清洁验证的难度。对于单抗制品的清洁方法开发一般需要考虑以下内容：

●单抗制品生产过程接触工艺设备表面的物质繁多，包括：活性蛋白、培养基、细胞及其代谢产物、工艺添加剂、缓冲液、清洁剂等，清洁程序的设计需考虑上述潜在污染物的去除。如果存在任何与活性蛋白或者其他工艺组分相关的特别毒性物质，则可能需要考虑使用专用的设备。

●单抗制品清洁工艺的残留限度一般需要考虑活性蛋白残留(或者其他的主要物质成分)、清洁剂残留、微生物负荷、细菌内毒素水平，以及设备目检清洁要求。由于蛋白类产品在清洗过程中可能会发生降解或变性，可能会变成非活性物质，因此采用活性蛋白的基于健康的暴露限(health-based exposure limits,HBEL)计算可能是不合适的，可以参考ISPE 推荐可比质量(comparable quality,CQ)方法进行

残留限度计算[参考ISPE Cleaning Validation Lifecycle-Applications,Methods,and Controls(《清洁验证生命周期-应用，方法和控制》)]。如预期原液下游工艺纯化步骤可以去除前端清洁过程中留下的残留物，可以适当放宽前端生产步骤生产清洁后的残留限度标准。

●应考虑清洁验证中分析方法的适用性，确保能充分检测到相关残留物，需考虑残留目标物在清洗过程中发生的变化，如蛋白的降解。通常单抗制品清洁验证中的分析方法会选择非特异性分析方法，如总有机碳法(TOC)。

●取样方法的选择取决于设备、待检测残留物的性质、残留物限度以及所需的分析方法。通常包括：直接取样(目检、仪器法)、淋洗取样、擦拭取样。企业应考虑单抗制品生产设备的特点选取适当的取样方法，并进行取样回收率研究/评估，确保取样方法的适用性和稳定性。

B. 清洁工艺验证

确定清洁工艺后，应使用真实物料或者经评估的有代表性的模拟物料进行清洁工艺验证，证明设计的清洁程序能够适用于大规模生产后的设备清洁。

执行清洁验证时，通常考虑在最差工艺条件下连续完成三次验证。最差工艺条件可包括最长的生产后保持时间、阶段性生产中最大批量或者最长运行时间、最短的清洗时间、最低的清洗温度和最差的CIP 模块循环回路等。清洁验证的执行可以基于科学的评估，采用分组法进行，通常包括设备分组和产品分组。

上游使用不锈钢反应系统时，应额外关注公用系统、不锈钢系统的清洁验证。下游纯化阶段的清洁验证应关注非一次性使用耗材的使用连续性、使用周期，以及冲洗液可能带来的影响。

单抗制品清洁验证在上下游不同的关注点和实施要点可以参考本分册生物制品(单抗)部分“4.5上游清洁验证”和“5.8下游清洁验证”。

C. 持续的清洁验证状态维护

验证状态的维护应包括清洁工艺和设备，包括对被清洁设备和用于清洁的设备的预防性维护和校准。通常包括：关键参数监控、过程报警、变更控制、周期监控、数据趋势分析和回顾。

在持续的验证状态监控的基础上，企业也可以开展定期的再验证，以证明清洁工艺的稳定性。

2.9单抗制品生产质量控制要素

对单抗制品从细胞库、细胞培养、纯化及原液制备、制剂生产过程中的物料、工艺、分析方法等控制关注要素进行梳理，具体内容见表2-8单抗制品生产质量整体控制要素表。与无菌产品其他共性的关注要素，可参考本分册无菌制剂部分其他章节相关内容。

表2-8 单抗制品生产质量整体控制要素

要素 \ 工序		细胞库	细胞培养	纯化及原液制备	制剂生产
原材料、辅料及耗材控制		●关注细胞冻存管对低温耐受能力、密闭性、完整性、无菌及无热原性 ·关注耗材相容性风险	·关注外源因子(如病毒、支原体)引入的风险 ·关注培养基对细胞生长及抗体表达带来的风险，例如，对抗体糖基化的影响 ●关注一次性使用耗材的无菌保证能力	·关注耗材相容性的风险 ·关注微生物、病毒、细菌内毒素引入的风险	·关注生产及贮存用耗材的可迁移物促使蛋白聚集或断裂风险
工艺控制	生产	·关注细胞传代稳定性 ·关注细胞低温贮存中的交叉污染风险 关注建库过程无菌保证能力 ·关注细胞库的均一性	·关注细胞生长代次是否在限传代次内 ·关注工艺条件对细胞生长性能和收获液质量属性的影响，例如，对聚合体的影响 ·关注细胞培养过程中工艺参数的连续监测	·关注病毒、产品及工艺相关杂质去除能力及验证 ●关注填料膜包寿命和使用 ·关注工艺过程对外源性污染的控制能力 ·关注重复使用的层析介质和膜包的处理及重复使用对产品引入污染的风险	·关注原液反复冻融导致的产品稳定性风险 ·关注pH条件、蛋白浓度、辅料浓度，设备剪切力等因素对蛋白聚合体、微粒等质量属性影响的风险
	清洁	●关注重复使用容器、器具的清洁和灭菌	·关注目标蛋白、培养基，细胞及代谢产物等特殊污染物 ●关注因清洁方法及产品特定性质带来的清洁过程中清洁目标物的变化及其对分析方法的影响，例如，采用碱液作为清洁剂导致目标蛋白的降解，分析方法通常采用非特异性的TOC ·关注重复使用的层析介质和膜包的清洁消毒及清洁后保存方式带来的微生物污染风险		●关注因清洁方法及产品特定性质带来的清洁过程中清洁日标物的变化及其对分析方法的影响，例如，采用碱液作为清洁剂导致目标蛋白的降解，分析方法通常采用非特异性的TOC

续表

要素 \ 工序		细胞库	细胞培养	纯化及原液制备	制剂生产
工艺控制	技术转移和可比性	关注因细胞库变更，以及由于不同的变更类别带来细胞库检定、传代稳定性、生产工艺可比性研究、质量可比性研究、稳定性可比性研究、非临床/临床桥接(如有)	·关注技术转移过程工艺变化带来的可比性研究 ·关注分析方法转移过程中因方法变更带来的前后方法的桥接(如有) ·关注缓冲液组分、储存条件、接触材料等条件变化带来的风险		·关注因生产设备、包装材料、规模等变化带来的可比性研究
分析检验		·关注细胞库检定	·关注未处理细胞培养收获液及生产终末期细胞的检测(根据法规对批次的要求执行) ●关注针对同一质量属性需建立多种分析方法进行测试，产品组分复杂，对结果分析难度比小分子产品高，生物学活性、工艺相关杂质如宿主蛋白残留方法试剂盒覆盖率及方法变异性高等风险点 ·关注中间产品、原液及产品的低内毒素回收(low endotoxin recovery,LER)影响 ·关注参比品的制备、标定、表征和稳定性管理		
稳定性研究	贮存、运输、使用	·关注细胞库低温贮存稳定性及细胞贮存过程中的备份贮存及安全性 ·关注细胞库的遗传稳定性和表达稳定性(如需)	●关注中间产品储存稳定性(储存条件及时限) ●关注原液贮存、运输、反复冻融稳定性		·关注产品脱冷链的时限 ·关注产品运输稳定性(温度、振动、光照等影响) ·关注产品使用稳定性如输液时配伍输注稳定性 ·关注产品稳定性下降的累计效应
污染控制	支原体	·关注细胞本身及使用动物源性材料引入支原体污染的风险	·关注培养基等引入支原体污染的风险	●关注人员等引入支原体污染的风险	·关注人员等引入支原体污染的风险
	微生物/细菌内毒素	关注建库过程开放性操作引入污染的风险	·关注开放性操作引入污染的风险	·关注环境、公用介质、溶液、耗材等引入风险	·关注因单抗制品更易促进微生物生长、繁殖带来的无菌控制要求

续表

要素 \ 工序		细胞库	细胞培养	纯化及原液制备	制剂生产
污染控制	微粒	N/A	N/A	●关注原液分装工序的环境控制	●关注单抗制品生产中引入外源性微粒的风险 • 关注单抗制品产品产生的内源性微粒对产品质量的影响
	病毒	• 关注细胞本身及使用动物源性材料引入病毒污染的风险	• 关注动物源性材料引入病毒污染的风险	• 关注除病毒后产品再次污染的风险	• 关注厂房设施车间布局设计方面控制污染的能力

3 生产用细胞库的制备、检定和维护

本章主要内容：

单细胞建库的通用流程和考虑要点

T 细胞库的检定的要求

细胞库的管理和维护的注意事项

细胞库上市后变更的要求

3.1细胞库管理概述

法规要求…　…

药品生产质量管理规范(2010年修订)生物制品附录

第三十五条 生产和检定用细胞需建立完善的细胞库系统(细胞种子、主细胞库和工作细胞库)。细胞库系统的建立、维护和检定应当符合《中华人民共和国药典》的要求。

第三十七条 应当通过连续批次产品的一致性确认种子批、细胞库的适用性。种子批和细胞库建立、保存和使用的方式，应当能够避免污染或变异的风险。

第三十八条 种子批或细胞库和成品之间的传代数目(倍增次数、传代次数)应当与已批准注册资料中的规定一致，不应随生产规模变化而改变。

第三十九条 应当在适当受控环境下建立种子批和细胞库，以保护种子批、细胞库以及操作人员。在建立种子批和细胞库的过程中，操作人员不得在同一区域同时处理不同活性或具有传染性的物料(如病毒、细胞系

或细胞株)。

第四十条 在指定人员的监督下，经批准的人员才能进行种子批和细胞库操作。未经批准不得接触种子批和细胞库。

第四十一条 种子批与细胞库的来源、领用、制备、贮存及其稳定性和复苏、使用情况应当有记录。储藏容器应当在适当温度下保存，并有明确的标签。冷藏库的温度应当有连续记录，液氮贮存条件应当有适当的监测。任何偏离贮存条件的情况及纠正措施都应记录。库存台账应当长期保存。

第四十二条 不同种子批或细胞库的贮存方式应当能够防止差错、混淆或交叉污染。生产用种子批、细胞库应当在规定的贮存条件下在不同地点分别保存，避免丢失。

第四十三条 在贮存期间，主种子批和工作种子批储存条件应当一致；主细胞库和工作细胞库的储存条件应当一致；另有批准或规定的按照批准或规定的条件储存。 一旦取出使用，不得再返回库内贮存。

背景介绍

现有单抗制品多通过重组技术由哺乳动物细胞表达生产，每批产品都有一个经检定过的共同起源，即保存的细胞库。细胞库是生产单抗制品的起始原材料，因此直接影响到生物制品的特性、质量和安全性。建立细胞库的目的就是为了保证生产的可持续性和产品质量的稳定。重组单抗制品的生产必须建立在良好的细胞库管理基础上。

细胞库(cell bank):是指活细胞被定量均一且体积适宜地独立分装后保存于规定条件下的一个细胞的保存库。这个保存库里面的每一个独立包装均可以代表未被分装前的细胞系。

单抗生产用细胞库的管理应符合《中国药典》三部生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制、人用重组DNA蛋白制品总论和人用重组单克隆抗体制品总论的相关要求。

技术要求

表3-1是国际上针对细胞库管理的主要参考文件。

表3-1 细胞库管理的参考文件

机构或组织	文件名称
ICH	Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derivedl fiom Cell Lines of Human or Animal Origin(《来源于人或动物细胞系生物技术产品的病毒安全性评价》)
	Q5B Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production ofr-DN4 Derived Protein Products(《对用于生产rDNA来源蛋白质产品的细胞的表达构建体分析》)
	Q5D Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products(《用于生物技术/生物制品生产的细胞基质的来源和鉴定》)
	Q7 Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients(《原料药的药品生产质量管理规范指南》)
WHO	WHO TRS 957 Annex 2 WHO Good Manufacturing Practices for Active Pharmaceutical Ingredients(《附录2 WHO活性药物成分生产质量管理规范》)
PIC/S	Aide Memoire Inspection of Biotechnology Manufactures(《生物技术制品检查备忘录》)
美 国 F D A	21 CFR 610 General Biological Products Standards-610.18 Cultures.(《21 CFR 610一般生物制品标准-610.18培养》)
	Points toConsider in the Characterization ofCell Lines Used to Produce Biologicals(《用于生产生物制品的细胞系的特性分析中需要考虑的要点》)
	Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use(《人用单克隆抗体产品的生产和检验应考虑的要点》)
	Chemistry,Manufacturing,and Controls Changes to an Approved Application: Certain Biological Products(《已获批生物制品申请的CMC变更》)
	CPGM 7356.002M Surveillance Inspections of Profein Drug Substance Manufacturers(《CPGM 7356.002M蛋白原液生产企业监督检查》)
EMA	EU EudraLex V4 Annex 2 Manufacture of Biological active substances and Medicinal Products for Human Use(《欧盟GMP附录2人用生物原料药与药品的生产》)
USP	<1043>Ancillary Materials for Cell,Gene,and Tissue-Engineered Products(<1043>《细胞、基因和组织工程产品的辅助材料》)
	<1044>Cryopreservation ofCells(<1044>《细胞冷冻保存》)
	<1048>Quality ofBioteclnological Products;Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production ofr-DNA DerivedProtein Products(<1048>《生物技术产品的质量：分析用于生产r-DNA衍生蛋白质产品的细胞中的表达构建体》)
	<1050>Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines ofHuman orAnimal Origin(<1050>《源白人类或动物细胞系的生物技术产品的病毒安全性评估》)

指　导

细胞库的建立是为了保证重组单抗药物生产的稳定性和批间一致性。单克隆抗体的细胞库系统通常包括细胞种子、主细胞库、工作细胞库。单克隆抗体通常建立主细胞库、工作细胞库的两级生产用细胞库(参照《中国药典》三部人用重组单克隆抗体制品总论)。 一般情况下主细胞库来自于细胞种子，工作细胞库来自主细胞库。在某些特殊情况下(如每年生产的产品仅需有限的几支细胞时),仅建有主细胞库而没有工作细胞库的单级细胞库，原则上是可行的，但需要得到国家药品监管部门的批准。

A. 细胞种子

对于单克隆抗体产品，是指经过克隆培养而形成的均一细胞群体，通过检定证明适用于生物制品生产或检定。在特定条件下，将一定数量、成分均一的细胞悬液，定量均匀分装于一定数量的安瓿或适宜的细胞冻存管，于液氮或-130℃以下冻存，即为细胞种子，供建立主细胞库用。

2010版《中国药典》三部曾称为原始细胞库(primary cell bank,PCB),在USP中称为research cell bank(RCB)及 premaster research cell bank(pmRCB),通常也称为Pre-MCB。

B. 主细胞库

取细胞种子通过规定的方式进行传代、增殖后，在特定倍增水平或传代水平同次均匀地混合成一批，定量分装于一定数量的安瓿或适宜的细胞冻存管，保存于液氮或-130℃以下，经全面检定合格后，即可作为主细胞库，用于工作细胞库的制备。

C. 工作细胞库

工作细胞库的细胞由MCB 细胞传代扩增制成。由MCB的细胞经传代增殖，达到一定代次水平的细胞，合并后制成一批均质细胞悬液，定量分装于一定数量的安瓿或适宜的细胞冻存管中，保存于液氮或-130℃以下，经全面检定合格后，即为工作细胞库。

单抗生产用细胞株构建主要包括表达宿主细胞选择、表达载体构建、目标基因导入宿主细胞、细胞加压筛选、单克隆细胞株筛选、细胞种子、主细胞库和工作细胞库建立等工艺环节。细胞建库的通用流程和考虑要点见图3-1。

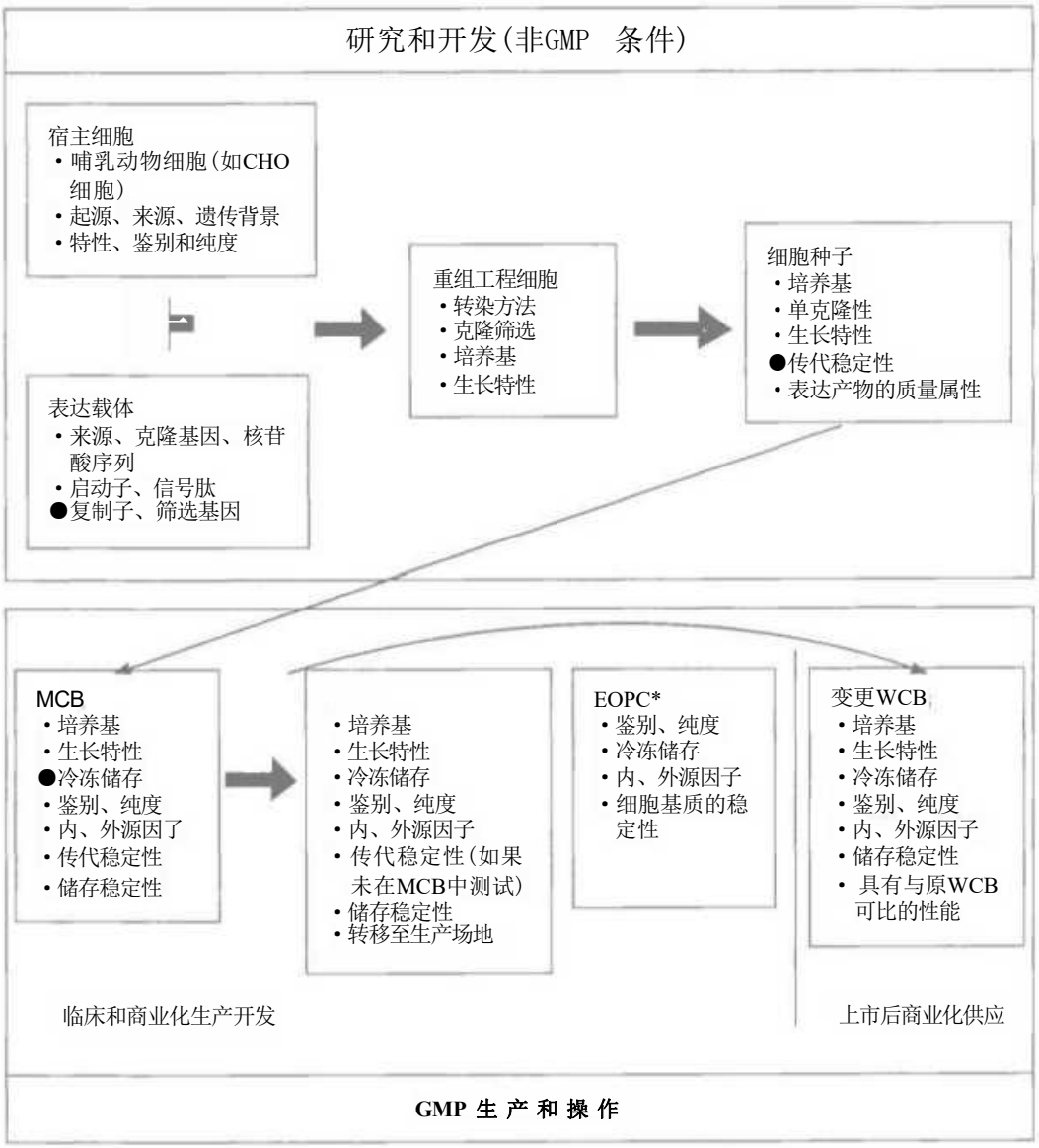


图 3－1　细胞建库通用流程和考虑要点

注：*EOPC: 生产终末细胞，在生产条件下或与生产中使用的条件相当的条件下，从 MCB 或 WCB 培养到生产末期或超过生产末期时收获的细胞。

细胞种子通常来源于研究或者开发实验室，往往是在非GMP条件下制备。而MCB和WCB则必须在符合GMP条件下生产。细胞种子可用于临床前样品的制备，但临床试验用药品通常需要由MCB或者WCB制备。MCB通常被认为是单抗原液GMP生产的起始原材料，并作为WCB的来源。早期临床研究的单抗原液，可由MCB直接生产，也可由MCB制备WCB后由WCB生产。用于后期开发和商业化生产的单抗原液通常由WCB生产。细胞库建立后，生产终末细胞(EOPC) 至少应进

行一次全面的检测，当生产工艺发生改变时，应重新对EOPC进行检测。通常为了确保产品的稳定供应，应根据商业化生产需求，前瞻性考虑是否需要从MCB建立新的 WCB。

3.2主细胞库和工作细胞库的制备

实施导

主细胞库和工作细胞库的制备流程基本一致，均包括细胞复苏、传代、扩增培养、分装、冷冻保存等步骤。应明确各级细胞库的传代方法、制备过程、建库规模和限传代次。细胞库制备流程见图3-2。

MCB和 WCB应在符合我国现行GMP的条件下制备。建库及制备全过程应具有可溯源性及操作的一致性，并对各个环节的风险进行充分的评估。应充分考虑建库特定的工艺流程，并最大限度地避免污染和交叉污染。没有哪一种细胞库检测方案能检测出所有可能潜在的污染，因此，只有在细胞建库期间采取有效的污染控制措施，才能确保细胞不被污染，为生产提供可靠的细胞基质。以下列出MCB 和WCB 制备工作需要考虑的关键要素。

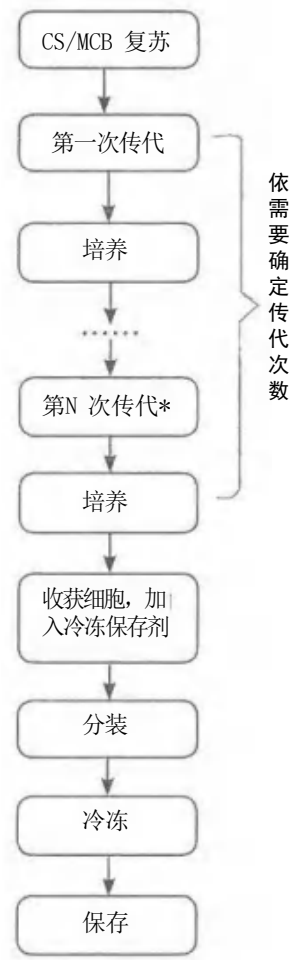


图3-2 生产用细胞库制备流程图

注：*传代次数应有传代稳定性数据支持。

A. 人 员

●应尽量避免人员带来的污染和交叉污染。细胞建库工作涉及活细胞的操作，应在质量风险管理的基础上，对建库工作人员的行为进行限制，或者采取污染控制措施，并对工作人员进出控制区域进行记录，以尽量减少污染和交叉污染的机会，并进行追溯。如制定程序避免同一工作人员处理其他活细胞或活的微生物后进行建库的操作。

●经批准的人员才能进行建库操作，必要时可指定人员进行监督。未经批准的人员不得接触细胞库。细胞建库应设立专职工作人员。人员应有微生

物学、生物学等相关的背景和知识，应经过专业知识和无菌操作的培训，并考核合格后批准上岗，并应进行定期的再培训和考核。

o 工作人员应定期进行健康检查。患有传染病、皮肤病以及皮肤有伤口者、对产品质量和安全性有潜在不利影响的人员，均不得进入生产区进行建库的操作。

●建库工作人员应有良好的卫生和健康习惯。建库通常在B 或 C 级背景的生物安全柜进行无菌操作，为了降低污染和交叉污染的风险，工作人员应穿着灭菌的连体洁净服，可加戴无菌的长手套。

B. 厂房和设备

●细胞建库一般应设立专用的生产操作车间/区域，或者与单抗上游生产细胞复苏和摇瓶培养工序共用生产操作车间/区域，应充分评估该区域的共线风险，并采取相应措施。该区域应为受控区域，只有经过授权的人员才能进入。企业应对细胞库建库设立相对固定的场所和区域，如有变化，应根据相关法规，按照风险评估原则分类进行变更管理。

o 操作环境的级别应当与建库的操作要求相适应。如采用生物安全柜，背景环境的级别一般为B 级或C 级；如采用隔离器，则背景环境级别不低于D 级。

o 建库主操作间布局须合理，仅放置建库必须的设备，以便于操作，并最大限度地避免污染和交叉污染。

●考虑建库操作的特殊性，建库车间/区域宜采用独立的人流通道，必要时，可将进入和退出该洁净区的更衣间分开设置。清洗后的工作服应灭菌后再供建库使用，使用后的洁净服应考虑采取消毒或灭菌的方式灭活后再进行清洗。

●建库操作使用的物料、耗材体积较小， 一般可使用传递窗作为物流通道。建库通常在B 级 或C 级背景下的生物安全柜中进行无菌操作，建库主操作间面积较小，传递窗应避免直接连通C 级和CNC 区域。

●建库车问/区域应设置独立的空调系统，如与其他区域共用空调系统，可考虑将该车间/区域的排风设置为全排。

C. 生产方式

细胞建库一般采用阶段性生产的方式，不得在同一时间内在同一区域处理不同的细胞系或细胞株。

应建立建库车间/区域清洁和清场的标准操作程序。清洁和消毒的程序应经过验证，并在日常生产中进行监测。

D. 容器和用具

细胞建库常用容器和器具包括细胞冻存管、摇瓶、枪头、移液管和离心管等，为了避免污染和交叉污染，建议尽量使用无菌无热原的一次性耗材。

如果容器和器具需重复使用，应建立清洁、灭菌及去除热原(内毒素)的程序，并进行验证或确认。

使用无菌无热原的一次性耗材时，应建立相应的验收程序。

通常选择无菌无热原的一次性聚丙烯螺旋盖细胞冻存管用于细胞库的冷冻保存。应仔细审查相应耗材的规格，确保选择的材料能承受极端的液氮温度，与内容物在化学上相容，并确保容器的密闭性和完整性。通常不会对冻存管进行额外的完整性测试，但应在使用前检查容器的外观是否破损、垫圈是否密封，并在使用时仔细确认冻存管是否已被拧紧，以确保容器的密闭性、完整性满足要求。

E. 物料要求

细胞库制备使用的原材料应按照要求从质量部门批准的合格供应商处购买，且应符合批准的质量标准。应尽可能避免使用人和动物来源的物料(例如，人血清、牛血清、猪胰蛋白酶)。

培养基是细胞建库的主要原材料，对细胞的质量有直接的影响，也是细胞污染的可能来源之一。应明确培养基的组成和来源，并建立培养基配制、灭菌、取样和检测的标准程序。

应尽量使用化学成分确定的非动物源性培养基，对于动物源性添加成分，应尽可能控制并减少其使用。如果无法避免使用，应有与使用风险相称的相关文件或者确认材料的支持。应提供诸如原产国、原产组织、物料生产过程中应用的病毒灭活或者去除步骤，以及对物料进行的病毒检测类型等信息。所有动物源性材料均应无细菌、真菌、分枝杆菌、支原体及病毒等外源因子污染。应尽量采用无血清培养基，并尽可能减少用于处理细胞的动物来源的蛋白酶。细胞培养过程中所用的牛血清及蛋白酶应符合《中国药典》的相关要求。培养基中不得含有人血清，如果使用人血白蛋白，应使用获得国家药品监督管理部门批准的人用药品。

在可能的情况下，可以对培养基进行补充处理，例如，伽马射线照射、除病毒过滤、高温短时处理或者紫外线C照射，作为额外的病毒风险缓解措施。

细胞库建库制备过程不得使用青霉素或者β-内酰胺类抗生素。

F. 建库细胞种子

通常细胞种子是在非GMP 条件下制备，因此在引入GMP 设施之前应对该细胞系进行评估。评估可以参照《中国药典》三部、CDE《重组制品生产用哺乳动物细胞质量控制技术评价一般原则》、ICH Q5A《来源于人或动物细胞系生物技术产品的病毒安全性评价》、ICH Q5D《用于生物技术/生物制品生产的细胞基质的来源和鉴定》等要求，需考虑以下方面。

●细胞系的来源清晰。应具有宿主细胞和表达载体的起源、来源、遗传背景，包括克隆基因的来源和特性、构建和鉴别情况，以及表达载体遗传特性和结构等详细资料。这些资料最好从细胞来源实验室或机构获得，也可引用正式发表的文献。

●应具有细胞来源的证明资料。应从能够提供初始细胞历史及其溯源性书面证明材料的机构获得，且应提供该细胞在该机构的详细传代记录，包括培养过程中所使用的所有原材料的详细信息，如种类、来源、批号、生产日期及有效期、制备或使用方法、质量标准及检测结果等。

●细胞系质量评估：生产、代谢、表达量、产品质量等特性，是否有初步传代稳定性研究数据，是否有单克隆证明性数据。

0已经完成必要的分析和检验。在进入 GMP 生产设施之前，细胞系至少已完成并通过无细菌、真菌、支原体和外源性病毒检测，并确认细胞基质没有被污染。必要时，质量保证部门应对检测机构进行评估和认可。

G. 监 测

●应对建库车间/区域的温度、湿度、压差等进行监测。

●企业应根据实际情况，进行风险评估，建立完整的建库车间/区域环境监测策略， 一般应包括：静态环境的确认；在进行接种等关键操作时，生物安全柜的气流模型确认；每次进行建库操作时，主要功能间和生物安全柜的动态微生物的监测等。对于建库环境的监测，应进行风险评估，并将此作为CCS 的一部分。

●建库使用的主要设备，例如，CO_2 恒温震荡培养箱，应经过确认，主要培养参数如CO_2浓度、温度、转速等在细胞培养过程中应进行连续监测。

H. 中间过程控制

应建立MCB 和WCB 制备的工艺文件，按照工艺文件进行细胞传代扩增，并记录在批记录中。

细胞种子通常冻存在液氮罐中。将细胞冻存管从液氮罐中取出后应迅速解冻，缓慢的升温速率会导致重结晶损伤或细胞暴露于高浓度的细胞冻存液中，这两种情况都可能导致细胞死亡。对于每种细胞系都要制定最合适的解冻程序(温度、速度和时间)，哺乳动物细胞通常的解冻温度一般约为37℃，解冻速度应尽可能快(大多数哺乳动物细胞应>1℃/s)。通常细胞会在温水浴或自动细胞解冻仪中进行解冻。如采用水浴，应使用灭菌水或注射用水，每次使用后应将水排空，避免微生物的滋生，以降低产品污染的风险。

细胞冻存液通常是高渗的，因此解冻后需立即进行处理，洗涤或者稀释细胞是常用的方法。量化细胞解冻后的活力很重要，通常进行细胞计数并检测细胞的活力。按照《中国药典》要求，如果解冻后细胞活力低于80%，该细胞种子应废弃。

根据细胞计数的结果，计算扩增的体积和所需的摇瓶数量，并进行传代操作，将摇瓶放入CO_2恒温震荡培养箱中扩增培养。细胞扩增培养的关键中控参数包括以下四点。

●活细胞密度，细胞的最佳密度取决于细胞类型、目的和最佳回收率，通常介于10^6~10^7个细胞/ml。

●细胞活率，　一般>90%。

●微生物控制，应无微生物污染。

●收获细胞的标准，应在大多数细胞处于指数生长期时收获细胞。在此阶段收获细胞，可以确保细胞最有活力。

I. 分 装

一般应在种子库建立之前完成单克隆筛选，以确保细胞种子库及后续主细胞库和工作细胞库的均一性。为了保证细胞库中每个容器中的内容物完全一致，如培养细胞采用多个器皿的，应将所有培养皿中的细胞混合均一后再分装。

细胞库的分装体积应结合其用途进行设计，既确保工艺使用的需求和便利，又避免浪费。

MCB应尽量在产品的生命周期中保持不变。除非是某些特殊情况下(如每年生产的产品仅需有限的几支细胞时)。应尽早制备WCB，尽量避免直接用MCB进行生产，消耗过多的MCB。MCB　的分装数量应考虑放行检验、稳定性检验、产品生命周期中的使用量，并基于贮存安全及备份需求，进行制备。

WCB相较于MCB，使用频繁，需求量相对更大，其分装数量建议根据其放行检验、稳定性考察、日常生产的使用量，结合细胞库的制备和检验放行周期，以及

细胞库制备的产能(传代代次和规模)等综合考虑。

为了在后续的冷冻保存中保持细胞的稳定性，在分装前需要加入冷冻保存剂，通常是细胞培养级的二甲基亚砜(DMSO)， 溶液的混合过程产生热量会导致培养基升温，因此通常应在混合前预冷培养基。混合过程中局部冷冻保存剂浓度会较高，应关注分装过程所使用容器与冷冻保存剂的化学相容性。

在分装前，应确认每个细胞冻存管外观是否有破损，垫圈(如有)是否完整，并在每个冻存管上进行标识。应确认标识的方式能够耐受极端的液氮温度。标签上的标记应清晰易读，如有可能可以带有条形码。标识的信息应包括细胞库的名称、批号、代次、冻存日期以及细胞冻存管的序列号。大多数的冷冻标签都非常小，所以附加的信息可以保存在相关的文档中(如果使用条形码)

可以使用手持式移液装置或小型自动灌装装置来分装细胞悬液，分装后应仔细拧紧冻存管，以确保容器的密闭性。分装过程中应严格控制分装时限，分装时间应尽量短并可控，以尽量减少 DMSO 在较高温度下潜在的细胞毒性影响，确保细胞活力。在建库的工艺文件中应规定分装的时限，并将时限记录在批记录中。 一种良好的实践方法是：建库的细胞量较大时，将所有培养器皿中的细胞收集于同一容器，调整至合适的细胞浓度并混合均匀，将细胞悬液(不含DMSO) 分装至几份，每份细胞在分装前加入冷冻保存剂(含DMSO)， 混合均匀后开始分装。已经分装的细胞冻存管可以先放在2~8℃冰箱冷藏。尽量快速操作，控制分装时限，待全部分装完成后，所有的细胞冻存管一起降温冷冻。

J. 冷冻和贮存

冷冻保存是在极低的温度下冷却和贮存细胞以保持其活力的过程。应采用适合细胞培养物的最佳冻存方法，同种细胞库每次冻存的降温过程应相同。冻存过程需在确定并可控的条件下进行，以确保细胞库的质量稳定。

通常用于哺乳动物细胞的冷冻方式有两种：

●控制速率的可编程程序降温仪。程序降温仪连接到液氮，根据编程的步骤，通过增加或减少进入腔室的冷氮气流量来控制腔室的温度。受控速率冷冻方案通常涉及几个步骤，每个步骤都应针对特定的细胞类型进行评估和鉴定。对于同一种细胞库可以设定固定的编程程序。

●被动冷冻。是将细胞库冻存管放入冻存盒，经过预冷后，再放入超低温冰箱(约-80℃或-150℃)的方式进行冷却。这种方式应评估大部分过程所达到的平均冷却速度和冷冻曲线的一致性，并对此进行确认。

应限制细胞在冷冻前暴露于冷冻保护剂的时间，在建库的工艺文件中应规定允许的最长时间并在建库批记录中记录。

冷冻过程完成后，将细胞库转移至液氮罐中贮存，细胞库转移的过程中，应尽量减少样品升温，如使用移动的小型液氮罐。

K. 冷冻前后的确认

为保证细胞冻存后仍具有良好的活力，冻存前的细胞活力应不低于90%,冻存后应取一定量的可代表冻存全过程的冻存管复苏细胞，复苏后细胞的活力应不低于80%(细胞库复苏后的活力可以直接采用生产批次的数据，无需额外的试验)。细胞冻存后，应至少做一次复苏培养并连续传代至衰老期，检查不同传代水平的细胞生长情况。细胞冻存后，可通过定期复苏细胞及复苏后细胞的活力数据验证细胞在冻存及贮存条件下的稳定性。

L. 隔离和放行

细胞完成建库后，应转入待验液氮罐储存。待验细胞库与放行细胞库应严格区分，以避免污染和交叉污染。

应建立生产用细胞库的放行程序。生产用细胞库只有放行后才可用于临床或者商业批次的生产。生产用细胞库按照质量标准完成检验[见本分册生物制品(单抗)部分“3.3检定”],完成生产和检验记录审核，并符合相关规定后，由质量部门放行。放行后的生产用细胞库由待验液氮罐转入放行液氮罐中贮存。

由于细胞库完成全项检验的时间较长，可以基于风险评估，建立条件放行的程序。通常在早期临床阶段，刚刚完成细胞库建库，尚来不及完成全项检验就要启动临床批次的生产。基于早期临床一般生产规模较小，使用一次性的系统等考虑，可以进行风险评估，在部分项目未完成检验的情况下，先条件放行细胞库用于临床试验用药品的生产。细胞库条件放行之前必须完成的检测通常至少需要包括：活细胞密度、细胞活率、无菌(细菌、真菌检查)、支原体检测。条件放行的细胞库在生产的产品放行之前必须完成细胞库的完全放行。

在商业化生产阶段，尤其是采用不锈钢系统进行生产的单抗，应优先考虑进行前瞻性规划，在细胞库完全放行后再进行后续生产，以控制污染的风险，确保业务的可持续性。

3.3检定

背景介绍

对建库细胞基质的鉴定和检测是生物技术产品及生物制品质量控制的重要组成部分。通过对生产用细胞库的检定，可评估是否存在来自其他细胞系的细胞、外源和内源病毒因子以及其他污染物(如来自于宿主的毒素或抗生素)。检测的目的是为了证实用于生产的细胞基质的特性、纯度和适用性。

技术要求

《中国药典》2020年版三部生物制品通则

生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制

一、对生产用细胞基质总的要求

(四)细胞检定

细胞检定主要包括以下几个方面：细胞鉴别、外源因子和内源因子的检查、成瘤性/致瘤性检查等。必要时还须进行细胞生长特性、细胞染色体检查，细胞均一性及稳定性检查。这些检测内容对于MCB 细胞和WCB细胞及生产限定代次细胞均适用。

细胞检定项目的基本要求见表1。细胞库建立后应至少对MCB 细胞及生产终末细胞 (EOPC) 进行一次全面检定。当生产工艺发生改变时，应重新对EOPC 进行检测。每次从MCB 建立一个新的WCB, 均应按规定项目进行检定。

表1 细胞检定项目的基本要求

检测项目	MCB	WCB	生产终末细胞(EOPC)
细胞鉴别	十	十	(+)
细菌、真菌检查	十	十	十
分枝杆菌检查	(+)	(+)	(+)
支原体检查	十	十	十

续表

检测项目		MCB	WCB	生产终末细胞(EOPC)①
细胞内、外源病毒因子检查	细胞形态观察及血吸附试验	十	十	十
	体外不同细胞接种培养法	十	十	十
	动物和鸡胚体内接种法	十	—	+
	逆转录病毒检查	十	—	十
	种属特异性病毒检查	(+)	—	
	牛源性病毒检查	(+)	(+)	(+)
	猪源性病毒检查	(+)	(+)	(+)
	其他特定病毒检查	(+)	(+)	(+)
染色体检查		(+)	(+)	(+)
成瘤性检查		(+)	(+)	—
致瘤性检查		(+)	(+)	

注：①表示生产终末细胞，是指在或超过生产末期时收获的细胞，尽可能取按生产规模制备的生产末期细胞。

“+”为必检项目，“-”为非强制检定项目。

(+)表示需要根据细胞特性、传代历史、培养过程等情况要求的检定项目。

*表示MCB 或 WCB。

四、重组细胞的特殊要求

重组细胞系通过DNA 重组技术获得的含有特定基因序列的细胞系，因此重组细胞系的建立应具有细胞基质构建方法的相关资料，如细胞融合、转染、筛选、集落分离、克隆、基因扩增及培养条件或培养液的适应性等方面的资料。细胞库细胞的检查除应按本通则“一、(四)细胞检定”的规定进行，还应进行下述检查。

1. 细胞基质的稳定性

生产者须具有该细胞用于生产的目的基因的稳定性资料，稳定性检测的项目及方法依据产品的特性确定，对于细胞基质来说，稳定性的分析是保证MCB/WCB与EOPC之间的一致性，包括重组细胞的遗传稳定性(如插入基因拷贝数、插入染色体的位点、插入基因的序列等)、目的基因表达稳定性、目的产品持续生产的稳定性，以及一定条件下保存时细胞生产目的产品能力的稳定性等资料。

2.细胞鉴别试验

除按本通则“一、(四)1.细胞鉴别试验”进行外，还应通过检测目的蛋白基因或目的蛋白进行鉴别试验。

实施指导

单克隆抗体的生产用细胞库一般来源于哺乳动物细胞系，应根据宿主细胞的来源、种属特性、重组细胞系的构建、传代历史、培养方法和使用的原材料等制定每个细胞库的质量标准。细胞库的质量标准应由国家药品监管部门批准。

单克隆抗体的生产用细胞库检定，会涉及内、外源病毒因子等特定项目的检测，有效的病毒测试方法是确定细胞库是否适用于单抗制品生产的重要部分。许多的分析方法可以检测内、外源病毒因子，适用的方法会随科学的发展而变化，如果有充分的资料支持，可以和监管部门讨论替代性的方法。

2022年9月发布的ICHQ5A(R2)《 来源于人或动物细胞系生物技术产品的病毒安全性评价》(征求意见稿)推荐在适用的情况下，采用分子病毒检测方法补充或者替代体内动物试验和体外细胞培养法。分子病毒检测方法包括核酸扩增技术(nucleic acid amplification techniques,NATs)和下一代测序(next generation sequencing,NGS),分别适用于特异性病毒检测和广泛的病毒检测。

细胞库的检验项目通常会委托第三方实验室进行。应建立委托检验管理的程序，质量管理部门应按照委托检验的管理程序对第三方实验室进行质量审计，审计结果符合要求，方能批准第三方实验室为合格的服务供应商。应和第三方实验室签订质量协议，在质量协议中应约定双方在取样、检验及检验报告的审核和签批等方面的职责，并规定出现实验室异常或偏差后的调查和处理流程。

实例分析

实例1:某单克隆抗体生产用细胞库质量标准制定的考虑要点

表3-2是某单克隆抗体的生产用细胞库质量标准。现以该单克隆抗体生产用细胞库质量标准为例，举例说明单克隆抗体生产用细胞库质量标准制定的考虑要点。

表3-2 某单克隆抗体生产用细胞库质量标准

检测项目			检测依据	质量标准	MCB	WCB	EOPC
细胞鉴别			《中国药典》三部生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制	我国仓鼠细胞来源，且无其他细胞交叉污染	+	+	+
细菌、真菌检查			《中国药典》通则1101无菌检查法	应无菌生长	+	+	+
分枝杆菌检查				应无分枝杆菌生长	+	+	+
支原体检查			《中国药典》通则3301支原体检查法	应为阴性	+	+	+
细胞内、外源病因子检查	细胞形态观察		《中国药典》三部生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制	细胞形态正常	+	+	+
	体外不同细胞接种培养法			无细胞病变，血吸附试验及红细胞凝集试验为阴性	+	+	+
	动物和鸡胚体内接种法			至少接种乳鼠、成年小鼠、鸡胚（两组不同日龄）和豚鼠后24小时内动物死亡率＜20%；观察期末动物存活率≥80%	+	—	+
	逆转录病毒检查	逆转录酶活性测定		报告结果	+		+
		透射电镜检测		报告结果	+	—	+
		感染性试验		应为阴性	+	—	+
	种属特异性病毒检查（HAP、MAP）			应为阴性	+		—
	牛源性病毒检查			应为阴性	+		—
	猪源性病毒检查			应为阴性	+	—	—
	鼠细小病毒污染检查			应为阴性	+		+

续表

检测项目		检测依据	质量标准	MCB	WCB	EOPC
细胞活力	细胞活率	自建方法	应不低于80%	+	十	
	活细胞密度		应符合批准要求	+	+	
目的蛋白表达量*			应符合批准要求	+	十	

注：“+”表示需要检定项目，“-”表示无需检定项目，“*”表示该项目无需在放行时完成检定

该单克隆抗体的工程细胞是由编码某单克隆抗体基因的质粒构成的表达载体转染我国仓鼠卵巢细胞(CHO) 构建。

细胞系的来源清晰，宿主细胞和表达载体的起源、来源、遗传背景，包括克隆基因的来源和特性、构建和鉴别情况，以及表达载体遗传特性和结构等详细资料齐全。

工程细胞构建过程、细胞种子、主细胞库和工作细胞库的制备过程均有详细可溯源的记录，制备过程所用培养基、冻存液不含任何动物来源成分和抗生素。

细胞种子在转入GMP 生产车间以前已经完成并通过无细菌、真菌、支原体和外源性病毒检测，并确认细胞基质没有被污染。

根据《中国药典》三部生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制的规定，结合ICH Q5A《来源于人或动物细胞系生物技术产品的病毒安全性评价》、ICH Q5B《对用于生产rDNA来源蛋白质产品的细胞的表达构建体分析》、ICH Q5D《用于生物技术/生物制品生产的细胞基质的来源和鉴定》等要求，制定该单克隆抗体的细胞库质量标准。生产用细胞库的质量标准应经国家药品监管部门的批准。

此质量标准主要适用于某单克隆抗体在中国的申报，如果考虑在其他法规市场提交上市申请，则需结合相应法规市场的具体要求进行调整。例如，申报美国需要参考美国FDA 的相关指南，并按照现行版USP相关章节进行检验。

细胞库建立后应至少对MCB细胞及生产终末细胞(EOPC) 进行一次全面检定。当生产工艺发生改变时，应考虑重新对 EOPC进行检测。每次从MCB 建立一个新的WCB, 均应按规定项目进行检定。

(1) 细胞鉴别试验生产用细胞库(MCB 和 WCB) 和生产终末细胞(EOPC) 应进行鉴别试验，以确认为本细胞，且无其他细胞的交叉污染。细胞鉴别试验方法有多种，包括细胞形态、生物化学法、免疫学检测、细胞遗传学检测、遗传标志检测以及其他方法(如杂交法、PCR 法、报告基因法等)。

对于该单克隆抗体的MCB, 同工酶分析和染色体核型分析已足以鉴别至中国仓

鼠卵巢细胞的种属来源，也可采用其他替代的方法。对于WCB 和 EOPC采用一种鉴别试验即可。

(2)细菌、真菌至少取细胞库冻存细胞总支数的1%或至少2支冻存细胞管(取量大者),依法检查(《中国药典》通则1101无菌检查法),应符合规定。可采用直接接种法检测。

(3)分枝杆菌检查将细胞库解冻后，取至少1×10^7个活细胞用培养上清液制备细胞裂解物，按照无菌检查法(《中国药典》通则1101无菌检查法)进行分枝杆菌检查，也可采用经过验证的分枝杆菌核酸检测法替代培养法。

(4)支原体检查取细胞培养上清液样品，依法检查(《中国药典》通则3301支原体检查法),应符合规定。细胞库的检定应同时进行培养法和指示细胞培养法(DNA 染色法),也可以采用经国家药品检定机构认可的其他方法。

(5)细胞外源病毒因子检查应注意检查细胞系/株中是否有来源物种中潜在的可传染的病毒，以及由于使用的原材料或操作带入的外源性病毒。细胞进行病毒检查的种类及方法，须根据细胞的种属来源、组织来源、细胞特性、传代历史、培养方法及过程等确定。如MCB进行了全面检定，WCB 需检测的外源病毒种类可主要考虑从MCB到 WCB 传代过程中可能引入的病毒，对于仅存在于MCB建库前的病毒可不再重复检测。根据该细胞系的特性，制定外源病毒因子检查项目如下。

●细胞形态和体外培养法在MCB、WCB 及 EOPC 中均进行了检测。

●该细胞系建库过程采用未使用任何动物来源的组分，动物体内接种法检测外源病毒仅需对MCB 、EOPC进行检测，WCB 无需检测。

●该细胞系来源于我国仓鼠，采用小鼠和仓鼠抗体产生试验(MAP 和 HAP)检测其种属特异性病毒，此项病毒不可能从传代过程中引入，仅在MCB中检测即可。

●该宿主细胞传代历史中使用了牛血清，但在后续生产和建库过程中不再使用牛血清，按要求所建立的MCB或 WCB 和 (或)EOPC至少应检测一次牛源性病毒，经过评估，仅在MCB中进行检测。

●该细胞系在初始的建立过程中使用了来源于猪的胰酶，但在后续生产和建库过程中不再使用胰酶，按要求所建立的MCB或 WCB 和 (或)EOPC 至少应检测一次猪源性病毒，经过评估，仅在MCB中进行检测。

●鼠细小病毒作为种属特异性病毒，按照《中国药典》要求，在MCB 中应进行检测。考虑到CHO 细胞对于鼠细小病毒易感，在EOPC 中也进行了鼠细小病

毒的检测。

(6)逆转录病毒检查 应采用多种方法进行逆转录病毒的检测。不同的方法具有不同的检测特性，逆转录酶活性提示可能有逆转录病毒存在，透射电镜检查可证明是否有病毒性颗粒存在并进行定量，感染性试验可证明是否有感染性的逆转录病毒颗粒存在，应采用不同的方法联合检测。

●逆转录酶活性测定：采用敏感的方法，如产物增强的逆转录酶活性测定法(PERT 或PBRT法)进行检测，但由于细胞中某些成分也具有逆转录酶活性，因此，逆转录酶阳性的细胞应进一步确认是否存在感染性逆转录病毒。

●透射电镜检查法：取至少1×10^7个活细胞采用超薄切片法进行透射电镜观察。

●感染性试验：将待检细胞感染逆转录病毒敏感细胞，培养后检测。

CHO细胞含有逆转录病毒基因序列，可能会表达内源性逆转录病毒颗粒，若细胞逆转录酶活性检测为阳性，则需进行透射电镜检查，以确证是否存在逆转录病毒颗粒。应进行感染性试验，以确定所表达的逆转录病毒是否具有感染性。MCB 和EOPC均应进行逆转录病毒的检测。

(7)成瘤性检查 成瘤性(tumorigenicity): 是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。

CHO细胞是已证明具有成瘤性的传代细胞，按《中国药典》规定用于生产治疗性生物制品时可不再做成瘤性检查。本生产用细胞库无需进行成瘤性检查。

(8)致瘤性检查 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。

细胞基质致瘤性可能与细胞 DNA(或其他细胞成分)或细胞基质中含有致瘤性因子相关。来源于肿瘤的细胞或因未知机制形成肿瘤表型的细胞，含有致瘤性物质的理论风险性相对较高。

单抗制品是高度纯化和不含细胞的生物制品，只要通过生产工艺验证或通过每批产品的放行检验，表明残留的宿主细胞 DNA符合限度要求，通常不必进行致瘤性试验。本单抗制品在每批次原液的放行时进行残留宿主细胞DNA检验，生产用细胞库无需进行致瘤性检查。

(9)细胞活力生产用细胞库长期在<-130℃的条件下保存，冷冻保存细胞复苏后的高水平活力对于高效可靠的生产非常重要。活细胞密度和细胞活率可以直接采用WCB 建库数据或者生产批次的数据。

(10)目的蛋白表达量检测该项指标可不作为细胞库放行的指标，直接收集该MCB/WCB生产批次的数据，无需进行额外检测。

3.4管理和维护

应制定生产用细胞库接收、贮存、维护和管理的规程，以避免污染、交叉污染、混淆和差错，确保细胞库的质量符合预定的用途和要求。

A. 细胞库受控管理

仅有经过授权的人员才能进入细胞库。细胞库一般需进行双人双锁管理，未经授权的人员不得接触细胞库。

B. 贮存和贮存条件

细胞库在-130℃以下的条件可以长期贮存。 一般可贮存在液氮罐中，生产用细胞库应尽量贮存在液氮罐的气相中。

同一细胞系的不同细胞库应当在相同的温度下贮存。

细胞库的贮存条件应进行24小时连续温度监控和记录，并制定警戒限度和纠偏限度，由报警系统在超出设定条件时及时通知，以采取措施，保证细胞库贮存环境的稳定性。

C. 防止混淆和污染的措施

细胞库管理应制定防止混淆和污染的控制措施，例如：

●非生产用细胞应与生产用细胞库严格分开贮存。

●主细胞库和工作细胞库应分别贮存。

●已放行的细胞库和未放行的细胞库应分别贮存。

●商业化产品和非商业化阶段产品的细胞库风险点不同，建议分开贮存(非商业化阶段产品通常会由于项目推进进度，细胞库未完成全项检测，尤其是内外源病毒的检测，进行条件放行，因此有潜在交叉污染风险)。

●商业化产品建议每个品种使用单独的液氮罐贮存细胞库，以避免混淆和差错；

非商业化产品可考虑不同的细胞库贮存在同一个液氮罐中，但每个专用容器(如冻存盒)只能存放同种细胞库，并有明显的标识区分。

●细胞库冻存盒应放在液氮罐中的气相层(如细胞库存放在细胞库的液相中，需有额外的交叉污染控制措施，例如，只存放一种细胞、检查冻存管的密闭性)。

0每个液氮罐均应考虑记录细胞冻存位置图，并根据入库和出库情况及时更新。

D. 灾难性事件的预防

细胞库管理应制定灾难性事件的预防措施，例如：

●每一个生产用细胞库应在生产设施内至少两个不同的地点或区域存放。如果具备条件，生产用细胞库应建立异地存放的备用库。

●贮存生产用细胞库的系统应配备备用电源，如双回路供电、UPS 等，以控制停电风险。

●贮存生产用细胞库的液氮罐建议配备自动液氮补加系统，并连接报警系统。

●应有应对突发断电或设备故障等突发情况的应急措施，如液氮的手动补充、备用的液氮罐等。

E. 细胞使用记录

每种细胞库均应分别建立台账，详细记录放置位置、容器编号、分装及冻存数量、取用情况等。细胞库中的每支细胞均应具有细胞系/株名、代次、批号、编号、冻存日期、贮存容器的编号等信息。

贮存期间，主细胞库和工作细胞库中的细胞一旦取出，不得再返回库内贮存。

F. 定期监测

生产用细胞库在贮存期间应定期进行贮存稳定性监测，以确保能够满足预定的用途。

细胞库的稳定性研究包括传代稳定性研究[详见本分册生物制品(单抗)部分“4.2细胞基质稳定性研究”]和贮存稳定性研究。

应制定贮存条件下稳定性监测的方案，对每个细胞库(包括MCB 和 WCB) 进行贮存稳定性研究，以证实复苏细胞表达能力的稳定性。贮存条件下细胞库的稳定性监测内容包含解冻后细胞活率、细胞生长密度和(或)收获液蛋白产量等。贮存条件下的稳定性研究一般在生产过程中定期进行监测，细胞库的稳定性监测应在一

支或多支冷冻保藏的WCB复苏后制备生产用细胞时进行，或当一支或多支冷冻保藏的MCB 复苏并用于制备新WCB时进行。可根据生产数据，回顾稳定性考察内容，确认细胞库的稳定状态。如果长时间未进行生产，应按上市申请时所述的间隔时间对生产用细胞库进行活力测试，考察其在贮存条件下的稳定性状态。如果细胞的活力没有明显的减退， 一般不需要对MCB 和WCB 做进一步的测试。

G. 细胞库的转移

冷冻保存的细胞库通常会在制备、贮存和使用地点之间运输。大多数用于单克隆抗体生产的细胞库通常在带有持续温度监测系统的液氮气相(杜瓦罐)中运输，以确保在运输过程中，细胞库的温度低于-130℃。运输容器在运输过程中会受到明显的振动和机械应力，因此应定期评估其功能是否正常。需要对运输方法进行风险评估，必要时进行确认，以确定最佳选择，运输确认研究应涵盖最坏的情况或最差条件，确认的范围应包括温度监控设备。

冷冻保存的细胞，无论是国内还是国际，都应按照当地邮政和国际航空运输协会的指导方针进行运输。包裹还应满足检验检疫和生物安全的监管要求。应以不影响细胞完整性的方式包装和运输冷冻保存的细胞。发货时，托运人应附上在收到细胞库时正确存放的说明。

接收方应建立细胞库的验收程序，按照程序对转移的细胞进行验收。接收方应在接收时核对运输过程的温度是否符合要求、细胞库的包装是否完整无破损，核对细胞库数量和信息(名称/编号/批号/代次等)是否和转移单据一致。确认无误后，转移到指定的液氮罐或液氮箱中。

H. 细胞库的销毁

细胞库是生产单克隆抗体药物的起始原材料， 一般会长期保存。无保存价值(如产品退市)、污染或检验不合格的细胞库需要销毁。应建立细胞库销毁的管理程序。

细胞库销毁应按照《中华人民共和国生物安全法》及当地卫生健康主管部门的要求，经细胞库管理部门、质量管理部门及环境健康安全部门批准，按照批准的处理方式进行销毁，销毁的过程应由质量管理部门监督。销毁后应在台账上注销，记录销毁原因、方式和日期等。

3.5上市后变更

背景介绍

2021年6月CDE 发布《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则(试行)》，用于指导生物制品上市许可持有人(以下简称持有人)开展生物制品上市后药学变更的研究。指导原则按药学变更可能对生物制品安全性、有效性和质量可控性的风险和产生影响的程度，实行变更分类。从注册的角度，依据风险和产生影响的程度由高到低分为：重大变更、中等变更、微小变更。指导原则列举了常见的生物制品药学变更事项，在基于科学和风险的基础上，界定了具体变更事项的类别、需满足的前提条件和基本的技术要求。

WHO 丁2018年发布《批准的生物治疗产品变更程序和数据要求指南》,旨在为国家监管机构(NRA) 和企业提供有关对已获得许可的生物治疗产品进行监管变更的指导，以确保其持续的质量、安全性和有效性。指南基于变更对生物治疗产品质量属性的潜在影响，以及这对产品安全性或有效性的潜在影响，将变更分为：重大 (major) 变更、中等(moderate) 变更、微小(minor) 变更和对产品质量没有影响的变更。

美国FDA 于2021年6月更新了《已获批生物制品申请的CMC 变更指南》,指南包含关于报告变更的类型、术语表以及关于批准后生产变更和建议报告类别的示例，帮助企业确定其产品哪些类型的变更应在年报中提交，哪些需要提交需事先批准的补充申请(post-approval supplements,PAS)。变更被归类为：需要提交需事先批准的补充申请(PAS) 的变更、需要提交30天生效变更补充申请(changes being effected after 30 days,CBE30)或无需等待即可生效的变更补充申请(changes being effected immediately,CBE0)的变更、在年报(annual report,AR)中提交的变更。美国FDA 在指南中列举出了关于细胞库变更的分类示例。

欧盟没有专门针对生物制品上市后变更的指南，细胞库的变更可参考《人用药和兽用药上市许可变更审查》[Commission Regulation(EC)No 1234/2008],及其《变更分类详情指南》(2013/C 223/01)。

表3-3比较了我国、WHO 及美国FDA 指南中细胞库变更的分类情况：

表3-3生物制品变更指南细胞库变更分类对比

CDE	变更分类	WHO	变更分类	美国FDA	变更分类
表达载体变更：目的基因和宿主细胞均未改变	重大	与已许可的主细胞库（MCB）或原始细胞库无关的新细胞基质可能需要新的上市许可申请或许可申请	新的许可申请	使用相同表达载体从源物料或细胞系中生成新的主细胞库或主毒种 注：使用不同表达载体可能需要以新的生物制品许可申请(BLA)	PAS
新主细胞库	重大	变更主细胞库的培养基	重大		
新主细胞库：新主种子批/新主细胞库由之前批准的原始种子批/细胞库或已批准的主种子批/主细胞库中制得；制备方法不变，种子批/细胞库质量标准缩紧或未发生改变；新主种子批/新细胞库代次未超出已批准的代次	中等	制备新的主细胞库：新的主细胞库由原始克隆或之前批准的主细胞库制得，并且生长在同一种培养基中	中等		
				新工作细胞库或新工作毒种由之前批准的主细胞库或主毒种制得，但没有已批准的规程	PAS
新工作细胞库：新工作种子批/新工作细胞库由之前批准的主种子批/主细胞库制得；新工作种子批/新工作细胞库代次不超过之前批准的代次	中等				
新工作细胞库：新工作种子批/新工作细胞库由之前批准的主种子批/主细胞库制得；新工作种子批/新工作细胞库代次不超过之前批准的代次；制备方法不变，种子批/细胞库质量标准缩紧或未发生改变	微小	制备新的工作细胞库：新的细胞库是由预先批准的MCB制备；新的细胞库不超过预先批准的传代水平；新的细胞库根据许可中预先批准的协议/流程放行	微小	新工作细胞库或新工作毒种由之前批准的主细胞库或主毒种根据已批准的规程制得	AR
菌(毒)种/细胞库冻存保护剂改变：仅限去除工作细胞库所含的动物源成分，如新生牛血清	微小				

续表

CDE	变更分类	WHO	变更分类	美国FDA	变更分类
种子批/细胞库质量检验标准变更：增加新检定项目或缩紧验收标准，符合药典及其他国内外相关规范和指导原则	微小	细胞库的确认规程变更	中等	变更已批准的主/工作细胞库或主/工作种子确认规程	PAS
		细胞库的确认规程变更：规程被认为是更加严格的(增加新检定项目或缩紧验收标准)	微小		
		细胞库变更生产场地	中等		
		细胞库变更检测和贮存场地，用于放行的细胞库测试/验收标准未作任何更改。细胞库使用的贮存条件没有改变，细胞库的运输条件已经验证	微小		

细胞库上市后的变更工作应按照相关法规的规定，参照变更指南，根据单抗产品自身特点，以及细胞库变更的具体内容，进行风险识别、风险评估和风险管控，做好以风险为依据的变更分类管理。

A. 前瞻性考虑

细胞库是单抗生产的起始原材料，细胞库的变更往往影响范围广泛，需要进行充分的研究和必要的验证，考虑到上市后产品的商业化供应可持续性，应提前进行前瞻性的规划。

例如，在进入商业化生产中通常会发生的工作细胞库的变更，如果按照既定的方法从批准的主细胞库制备新的工作细胞库，虽然从变更分类来看是微小变更，但考虑到细胞库的制备和检定所需的时间，尤其是内外源病毒检测的时间，必须提前规划，通常在正式变更一年以前提前进行规划。

B. 变更分级

在科学和风险的基础上，根据对生物制品安全性、有效性和质量可控性的风险和产生影响的程度，实行变更分类。依据风险和产生影响的程度由高到低分为：重大变更、中等变更、微小变更。对于重大变更需要通过系列的研究证明，该变更不对产品的安全性、有效性和质量可控性产生不良影响；对于中等变更需要通过相应的研究证明，该变更不影响产品的安全性、有效性，并且不降低产品的质量可控性。

C. 技术要点

根据变更的实际内容，结合产品的特点，按照CDE《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则(试行)》开展相应的变更研究。变更研究需要考虑的技术要点包括：

- 细胞库的建立及检定。
- 细胞库的传代稳定性。
- 生产工艺可比性研究。
- 质量可比性研究。
- 稳定性可比性研究。
- 非临床/临床桥接的考量。

D. 沟通与申报

按照法律法规对变更提出补充申请申报、备案或在年度报告中报告。

实例分析

实例2:某单克隆抗体上市后变更WCB 考虑要点

现以某单克隆抗体上市后变更WCB为例，举例说明对于单克隆抗体上市后细胞库变更的考虑要点。

1.前瞻性考虑

该单克隆抗体是已上市单抗制品，在申报上市前已建立MCB 和WCB 两级细胞库，并获得药品监督管理部门批准。现WCB仅剩100支，仅能支持一年多的商业化

生产，需制备新的WCB 以确保商业化生产的持续性。

2. 变更分级

按照CDE《 已上市生物制品药学变更研究技术指导原则(试行)》的变更分类，基于以下五点考量，该变更为微小变更。

●新的WCB 和 现WCB 都来源于同一MCB, 该 MCB 已获国家药品监管部门批准。

■新的WCB 传代次数和现WCB保持一致。

●新的WCB 制备规模和现WCB 保持一致。

●新的WCB 制备方法不变。主要制备设备基本一致，主要工艺参数基本一致。除了细胞解冻化冻由水浴改为白动细胞解冻仪。

●新的WCB 检验方法质量标准不变。

3. 技术要点

●新的WCB 应按质量标准进行全项检定后，方可放行用于商业化生产。

●该单克隆抗体的WCB 制备方法不变，培养基和冷冻保存剂不变，细胞解冻设备的变化主要是为了降低微生物污染的风险，不同解冻设备解冻后的细胞活力基本一致，评估设备变化对细胞解冻的影响较小。

o 采用缩小模型评估新的WCB 和现WCB工艺表现和单克隆抗体产品质量具有可比性，无需进行商业化生产规模的可比性研究。

●该单克隆抗体的MCB 已完成传代稳定性研究，WCB 制备方法不变，新的WCB无需再进行传代稳定性研究。

●新的WCB 应定期进行贮存稳定性研究。

●新的WCB 和现WCB 的制备工艺一致，可以进行评估，考虑是否将用于商业化生产规模的首批，取样进行EOPC检测。

●新的WCB 生产的原液和制剂，无需进行额外的稳定性研究。可以考虑将新WCB生产的首批原液和制剂作为持续稳定性考察批次。

4. 沟通与申报

该变更为微小变更，应在年度报告中报告药品监管机构。

4 上游工艺的生产质量控制

本章主要内容：

E. 上游工艺中物料管理的注意事项

F 细胞基质稳定性研究的内容

F 上游生产工艺的典型流程和各工序的控制要点

E 上游工艺验证的注意事项

E 上游清洁验证的注意事项

F 上游污染控制的要素

4.1上游物料的质量管理

法规要求 ……

药品生产质量管理规范(2010年修订)生物制品附录

第四条 生物制品具有以下特殊性，应当对生物制品的生产过程和中间产品的检验进行特殊控制：

(一)生物制品的生产涉及生物过程和生物材料，如细胞培养、活生物体材料提取等。这些生产过程存在固有的可变性，因而其副产物的范围和特性也存在可变性，甚至培养过程中所用的物料也是污染微生物生长的良好培养基。

第三十四条 当原辅料的检验周期较长时，允许检验完成前投入使用，但只有全部检验结果符合标准时，成品才能放行。

第四十七条 用于生产的培养基/培养液应与批准的一致；培养基应进行适用性检查；禁止使用来自牛海绵状脑病疫区的牛源性材料，并应符合

《中华人民共和国药典》的相关要求。

第五十五条 应当按照《中华人民共和国药典》、国家药品监督管理部门核准的质量标准、相关质控要求对生物制品原辅料、中间产品、原液及成品进行检验。

背景介绍

单抗上游生产所用物料按照功能分类，主要为原材料和生产用耗材。原材料主要包括生产过程中配制培养基和相关溶液所需的基础培养基、补料培养基、细胞营养物(谷氨酰胺、葡萄糖等)、消泡剂、抗结团剂和无机化合物等。生产用耗材多由高分子材料制成，包括但不限于：用于细胞培养的一次性无菌细胞培养瓶、 一次性生物反应器袋；用于培养基和溶液配制、过滤、贮存的混匀袋、过滤器和储液袋；用于液体传送的硅胶管、跨接管、缓冲容器以及管路连接组件；用于取样的取样袋、取样管、移液管；以及用于收获的深层过滤膜包以及用于微生物(含支原体等)控制的液体/空气过滤器等产品。此外单抗上游生产还使用到一些工艺气体，如空气、O_2、CO_2和N_2, 企业应制定相应的验收标准、监测频率，并做好趋势分析，进行年度回顾。对于直接接触产品的工艺气体使用点的空气过滤器，应定期进行完整性检测，详见本分册无菌制剂部分“10.6.3.4气体过滤器的使用”。

本分册生物制品(单抗)部分“2.2物料控制”详细介绍了通用的物料控制策略。本节将对单抗上游物料中的原材料和生产用耗材相关的内容予以阐述。

A. 原材料供应商的选择与管理

生产用原材料直接关系产品的质量，因此其来源、组成、用途、用量和质量控制等情况应十分明确。原材料的选择应考虑其使用的合理性和安全性，企业应根据原材料在企业内使用特点，建立对供应商的选择标准和流程，并对其供应商进行相应的质量审计及管理，确保原材料的生产与质量管理过程符合企业内部要求。

●应确保所选原材料满足工艺需求，且无TSE/BSE风险。质量标准制定应符合工艺需要并参考药典的相关要求。

●应根据原材料在工艺中的应用和对产品质量的影响程度确定供应商风险类别以及资格认定所需的评估要求。对于中高风险物料供应商应规定进一步的审计要求，并定期进行再评审。

●供应商应根据质量协议的要求将变更通知使用方。

●在工艺开发和技术转移的过程中，应尽量保持所使用原材料的一致性，尤其是尽量减少在商业化规模更换关键原材料。如需更换，应选择符合工艺要求并优先采用同等或更高质量级别的原材料。更换关键原材料建议参考《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则(试行)》评估变更等级，应根据对产品质量的影响进行风险评估，并开展必要的研究。必要时应向监管机构及时沟通汇报。

B. 原材料的使用及其对应关注点

上游原材料主要用于上游生产各个阶段培养基和相关溶液的配制，包括种子扩增、生产细胞培养和目标产物的表达，以及收获。主要原材料包含基础培养基、补料培养基、葡萄糖、pH 值调节剂、消泡剂、抗结团剂等物料。其质量控制的关注点一般包括：性状、鉴别、含量、微生物限度、细菌内毒素和促生长(培养基，如需)。培养基及其添加物应考虑是否是化学成分限定的物料，是否包含动物源成分及引入外源污染的风险。细胞培养如添加一定的筛选压力(如甲氨蝶呤),应综合评估上游培养过程的添加量及其下游纯化工艺去除效率，确保添加剂的残留浓度低于安全限度，确保产品的安全性。原材料一般关注其是否满足工艺需求，《中国药典》收录的原材料应参考《中国药典》标准对原材料进行检测放行。对于非药典收录的物料，企业应建立内控标准以保证物料的质量符合要求。

C. 原材料的使用风险评估和质量控制

上游生产过程中原材料的使用对生产工艺和产品带来的风险包括： TSE/BSE、微生物引入、内毒素引入、外源因子杂质引入、细胞生长影响、蛋白表达与修饰影响等。企业需根据药典和工艺要求对生物制品生产用原材料进行风险评估。对于风险等级较高的原材料，应采取必要的措施在接收/验收→贮存→请验/取样/检验→放行/发放→领用→销毁(如有)的整个生命周期中对其进行严格的质量控制。

培养基是维持细胞生长的营养物质，在代谢中起调节及控制作用，根据《中国药典》要求其质量控制按照表4-1中第3级原材料进行管理。培养基应优先选择化学成分限定的培养基，尽量避免使用动物来源物料，以支持生产工艺和产品质量的一致性。培养基含碳水化合物、无机盐、缓冲系统、氨基酸和其他成分。在培养基

出厂放行时，供应商一般考察性状、pH 值、渗透压、微生物指标(微生物限度和内毒素)等。入厂管理应根据风险评估，参考供应商的控制标准，建立企业的内控标准，包括但不限于： 一般理化项目检查、微生物限度或无菌、细菌内毒素等安全性检查项目。基于风险评估，入厂后需对培养基按照内控标准进行检测或控制，合格后放行用于生产(当原辅料的检验周期较长时，允许检验完成前投入使用，但只有全部检验结果符合标准时，成品才能放行)。培养基有商业化培养基和定制化培养基，应基于不同培养基的特性制定不同的风险控制策略。应建立适当的培养基使用标准，包括适用性检查项目。

表4-1 不同风险等级生物制品生产用原材料的质量控制要求*

原材料等级	第 1 级	第2级	第 3 级	第4级
上市许可证明(如药瓶注册批件、生产许可证)	√	√		
供应商通过药品GMP符合性检查2	V			
供应商出厂检验报告		V	V	
国家批签发合格证	如有应提供			
按照国家药品标准或生物质品生产企业内控质量标准全检		抽检（批）	V	√
关键项目检测(如鉴别，微生物限度，细菌内毒素，异常毒性检查等)	V	V		
外源因子检查				动物原材料应检测
进一步加工纯化			如需要	如需要
来源证明				动物原材料应检测
符合原产国和我国相关动物源性疾病的安全性要求，包括TSE				动物原材料应检测
供应商审计	y	√	√	√

注：“ √ ”为每批原材料使用前的质控要求，“-”为不要求项目。

*: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。

**:也可提供符合GMP要求的相关证明材料。

针对细胞培养过程中的特殊添加物，如类胰岛素生长因子(IGF1)、 甲氨蝶呤、消泡剂等，应考虑工艺的去除能力，同时在下游分析控制策略中应考虑是否需要进行相关杂质残留检测。

此外需要关注培养基的贮存和运输的条件，有些特殊培养基开封后需建立使用与保护策略，如规定避光保护、开封后使用时间或次数限制，或进行使用前的分装。可参考GMP 原料药附录第二十八条生产操作的要求。

D. 原材料供应商的变更管理

对于上市后的产品，变更生产所用原材料应慎重。如因工艺需求或供应风险需要变更原材料，则应基于风险评估的原则，对变更后的物料进行质量评估（如变更前后供应商物料的质量属性对比）。变更主要物料供应商时，需要进行相关的验证，必要时还应对供应商提供的样品进行实验研究和试生产，以及对试生产药品进行稳定性考察，在得到质量管理部门和监管机构（如需要）批准后方能使用。

与培养基和生产用原材料相关的变更内容在不同前提条件下的分类等级以及所需满足的技术要求可参考《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则（试行）》中相关章节。

E. 上游生产用耗材的应用和关注点

单抗上游生产用耗材多由高分子材料制成，也叫做一次性使用技术的耗材，本分册无菌制剂部分“18.1 一次性使用技术”章节详细介绍了一次性使用技术的应用和考虑、相容性研究、完整性检查、测试和验证研究、供应商管理和进厂验收等内容。

直接接触产品的关键耗材供应商应纳入供应商管理，应具有供应商质量保证/质量体系和核心验证文件（生物相容性、物理化学相容性、可提取物和浸出物分析）等，企业应结合生产工艺的要求，在风险评估的基础上建立入厂检验质量标准。生产商发生相关质量变更时，应及时获取信息并评价物料质量变更对产品质量的影响。

针对上游工艺，需重点关注一次性耗材对细胞生长的影响。与培养基、细胞培养液接触的一次性耗材要严格保证无菌。对一次性无菌材料应逐批进行评估或无菌检查，根据使用用途进行项目监测。管道无菌连接和无菌断开采用接封管和切管机或一次性无菌连接器或断开器进行时，应对无菌连接和无菌断开的无菌保证效果进行验证。培养基过滤的过滤器应进行完整性检测。对于一次性生物反应器袋，在使用前应进行完整性检查（如保压测试、使用培养基预平衡等），以降低泄漏污染的风险。 一次性耗材的可提取物和浸出物的评估可参考本分册无菌制剂部分“18.1 一次性使用技术”描述的可提取物和浸出物评估流程和案例。对于上游工艺一般需先识别出需要评估一次性系统，然后根据一次性系统的工艺流位置、温度、接触时间、工艺流体类型和润湿表面积体积比等方面将一次性系统进行分类。因上游处于单抗

生产工艺的前端，上游工艺使用的一次性耗材带来的可提取物和浸出物通常可以在收获时随着细胞碎片被部分去除，以及在下游工艺的层析工序以及超滤浓缩/换液(UF/DF) 等步骤被进一步去除。因此上游工艺使用的一次性耗材的可提取物和浸出物风险一般相对较低。

4.2细胞基质稳定性研究

背景介绍

单克隆抗体生产的起始原材料为冻存均匀且稳定的细胞基质，即MCB 或 WCB。重组细胞源性的特征使得这一原材料在一定程度上影响最终产品的质量、安全性和生产的稳定性，例如：细胞源性可能带来的内外源污染(如内外源病毒因子、微生物、支原体等);细胞基质传代培养过程中可能带来的重组基因拷贝数丢失、整合位点变化和目标序列的突变等；细胞库贮存过程中控制不当造成细胞库不能稳定持续地生产出稳定产量和质量的产品。对细胞基质进行适宜的控制，能够有效保证产品的质量和安全性。

对细胞基质的控制包含：细胞库的制备、检定和管理；细胞基质的稳定性研究和控制。细胞库的制备、检定和管理见本分册生物制品(单抗)部分“3生产用细胞库的制备、检定和维护”,本节将重点说明细胞基质的稳定性研究和控制部分。

技术要求

细胞基质的稳定性研究包含：传代培养过程中细胞基质的稳定性研究和贮存条件下的细胞库稳定性研究。前者指考察传代培养期间，细胞基质的稳定性和生产预期产品的一致性，后者考察细胞库在指定的贮存条件下，长期保存的一致性。

传代培养过程中的稳定性研究包含表型稳定性研究和基因型稳定性研究。具体考察项目见表4-2所示。表型稳定性研究主要考察细胞基质传代过程中细胞倍增时间和产品质量的稳定性，基因型稳定性考察细胞基质在传代培养过程中重组DNA 整合位点、拷贝数和目标序列等基因水平上的稳定性因素。

建立主细胞库时，应同步考察其表型稳定性和基因型稳定性，以确定细胞库的传代次数限度，支持生产工艺的需求。建立工作细胞库后，应考察工作细胞库的表型稳定性和基因型稳定性特征，确定工作细胞库的传代次数要求。

表4-2 细胞基质稳定性考察项目

稳定性研究	考察项目
表型稳定性研究	●细胞生长特性 ●细胞倍增时间 ·目的蛋白表达的稳定性” ●产品纯度、异质性和其他产品关键质量属性*
基因型稳定性研究	·目标序列整合位点 ·目标序列基因拷贝数 ·目标基因的侧翼序列 ·目标序列完整性

注：#小规模条件下的目的基因表达稳定性研究；

*检测项目依据产品的特性决定。

在产品临床开发阶段，细胞库基质的稳定性研究可采用小规模条件下模拟生产传代的方式考察其表型和基因型稳定性，细胞库的稳定性研究应至少覆盖传代次数至生产终末细胞。对上市产品，细胞基质的稳定性应有更充分的研究，考察其体外传代限度，即有研究数据表明，传代至更长的代次，仍可保持其遗传稳定性特征，以支持上市后持续稳定供应的需要(如因培养工艺变更等需要更长代次稳定性的研究支持)。限度研究应考察中试或者实际生产规模，且覆盖至一定代次(超出工艺需要代次),评估其对细胞基质基因稳定性、产品质量和病毒安全性的影响。用于研究此限度的生产细胞通常由工作细胞库扩增而得，如有适当理由，主细胞库也可用于此项研究。

典型的上市产品细胞库的体外传代限度研究方法如下：

●根据中试生产规模或实际生产规模，培养至生产终末细胞，转至小规模条件下，将细胞培养至目标代次或超出目标代次，研究不同代次工艺表现、产品质量和基因稳定性。

●在细胞培养的前期，根据风险选择合适的工艺步骤，传代至一定目标代次或超出目标代次，再放大至生产规模，收获生产终末细胞，研究工艺表现、产品质量和基因稳定性。

有些内源性病毒可能在MCB 和WCB 阶段没有被检测出，在体外传代限度研究中，应对达到体外传代限次的细胞内源性病毒做出评价。对体外达到传代限次的细胞至少进行一次合适的测试(参考ICH Q5A),将进一步保证生产过程不会导致内源性病毒的活化或外源病毒(包括生长缓慢的病毒)的扩增，如果此时检测到外源病毒污染，应仔细检查工艺流程，以查明原因。如有必要，应对工艺进行重新设计。

上游工艺控制中，应确保生产工艺不超出允许的传代限度，保证细胞基质的稳定性和安全性，进而保证产品的质量和安全性。如细胞培养工艺、规模和培养基等

发生变化，应评估其对细胞传代限度的影响。

贮存条件下细胞库的稳定性研究指主细胞库和工作细胞库在长期贮存条件(液氮罐)下的稳定性考察，长期贮存条件下的稳定性研究应重点关注不同监管机构和注册批准的要求，应按承诺的期限完成稳定性评估。当贮存的细胞复苏用于临床试验或商业化供应时，细胞解冻后活力可证明这些复苏细胞在贮存过程中仍然保持活力。通过制备临床试验或商业化样品，可证实复苏后的细胞能用于生产所需产品。贮存条件下的稳定性研究应在生产过程中定期进行监测(如活细胞密度、细胞活率等),这种监测可在一支或者多支WCB 被解冻后制备生产用细胞时进行，或当一支或者多支MCB 被解冻用于制备WCB时进行(MCB 的贮存稳定性)。如长时间未进行生产活动，应考虑定期对生产用细胞库进行活力测试。

4.3上游生产工艺控制

背景介绍

单克隆抗体上游生产工艺通常包括细胞复苏、摇瓶扩增、反应器扩增、反应器培养和收获几个部分，图4-1简述了常见的细胞培养和收获的各个步骤。首先，对WCB冻存管进行解冻，然后通过一系列摇瓶培养步骤对细胞进行扩增。合并摇瓶培养扩增的细胞，通过生物反应器(通常包括波浪式生物反应器和搅拌式生物反应器)继续扩增，最终接种至生产生物反应器中培养进行产品表达。细胞培养结束后通过离心机或(和)深层过滤进行收获。

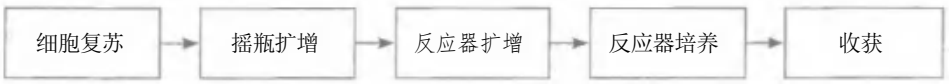


图4-1 上游细胞培养的工艺流程图示例

注：细胞复苏和摇瓶扩增步骤为敞口操作，需在生物安全柜中进行

生物制品的生产工艺较为复杂，周期较长，因此需要对每一个生产环节都制定稳健的控制策略，确保最终产品能够符合质量要求。通常控制策略应包含每个步骤对输入端操作参数的控制和输出端性能属性的检测。这些参数的重要性分类以及可接受范围通常是在工艺开发过程中，通过风险评估和工艺表征确定，主要依据其对生产工艺和CQA的潜在影响程度。应基于参数重要性等级开展偏离参数范围或限度的质量评价和制定需要采取的行动。

细胞复苏与扩增培养的目的，是将冻存管中的细胞进行复苏并经一系列传代扩增以达到生产反应器的接种要求，当种子扩增细胞培养结束后，接种至生产反应器中，并在一定工艺条件下(如温度、pH 值、溶氧、转速等)培养用于表达“目的蛋白”,培养结束后通过收获步骤去除细胞及其碎片等得到收获液。从细胞复苏开始，到生物反应器的接种、转移、培养和收获等过程应尽量使用无菌操作技术降低微生物污染的风险。复苏后细胞的传代水平应不超过批准用于生产的最高限定代次。以下总结了上游工艺各个步骤通常需要关注的操作参数和检测的性能属性。

A. 细胞复苏及摇瓶扩增

将主细胞库/工作细胞库的冻存管细胞解冻(通常为1支),将适当体积的细胞悬液转移至含有适当体积扩增培养基的摇瓶中，使接种细胞达到所需密度(通常该密度有设定范围)。在一定工艺条件下(温度、CO_2 浓度、转速等)培养一定时间得到种子细胞悬液。解冻温度和解冻时间通常为复苏步骤的关键控制点，冻存管细胞解冻过程需控制解冻温度并应尽量缩短解冻时间。

扩增培养过程中的中间产物常见的测定项目有活细胞密度、细胞活率等(表4-3)。依此传代扩增，将上述细胞作为后一步扩增的种子，每次扩增前计算接种密度。

表4-3 复苏和摇瓶扩增阶段常见的工艺参数示例

种子扩增步骤	工艺参数	工艺性能属性	备注
细胞复苏和摇瓶扩增	·复苏温度和时间 ●培养温度 · CO_2浓度 · 转速 ●培养时间 ·培养体积 ·目标细胞接种密度	·活细胞密度 ●细胞活率 ●检查污染(如显微镜镜检) ●代谢监测项目，如pH值、pCO_2、葡萄糖、乳酸、铵、谷氨酰胺、谷氨酸等(如需)	·重点关注细胞生长状态(细胞密度、细胞活率) ●取样及检测应有代表性(如注意混匀后执行取样),对于重复测样需有明确的操作规程指引

B. 波浪式生物反应器扩增

将适当体积的细胞悬液转移至含有适当体积培养基的细胞波浪式生物反应器中。使接种细胞达到所需密度(通常该密度有设定范围)。在一定工艺条件下(温度、CO_2浓度、角度、振荡速率等)培养一定时间得到种子细胞悬液。扩增培养过程中

的中间产物测定项目有活细胞密度、细胞活率等(表4-4)。依此传代扩增，将上述细胞作为后一步扩增的种子，每次扩增前计算接种密度。应对重要的工艺控制参数进行在线连续监控(如培养温度、角度、振荡速率等),对细胞生长(如活细胞密度、活率)进行监测，将以上监测数据纳入批生产记录并对数据进行复核以及做必要的校准。

表4-4 波浪式生物反应器扩增阶段常见的工艺参数示例

种子扩增步骤	工艺参数	工艺性能属性	备注
波浪式生物反应器扩增	●培养温度 • 总通气量 • CO_2浓度 ●振荡速率 • 角度 • 培养时间 • 培养体积 ●细胞接种密度	• 活细胞密度 • 细胞活率 • 检查污染(如显微镜镜检) • 代谢监测项目，如pH值、pCO_2、葡萄糖、乳酸、铵、谷氨酰胺、谷氨酸等(如需)	• 重点关注细胞生长状态(细胞密度、细胞活率) • 取样及检测应有代表性(如注意混匀后执行取样),对于重复测样需有明确的操作规程指引

C. 搅拌式种子生物反应器扩增

将适当体积的细胞悬液转移至含有适当体积培养基的种子生物反应器中。使接种细胞达到所需密度(通常该密度有设定范围)在一定工艺条件下(温度、pH 值 、溶氧、转速等)培养一定时间得到种子细胞悬液。扩增培养过程中的中间产物测定项目有活细胞密度、细胞活率等(表4-5)。依此传代扩增，将上述细胞作为后一步扩增的种子，每次扩增前计算接种密度。应对反应器培养的重要的工艺控制参数进行在线连续监控(如培养温度、pH 值、溶氧、转速、培养时长等),对细胞生长(如活细胞密度、活率)进行监测，将以上监测数据纳入批生产记录并对数据进行复核以及做必要的校准。

表4-5 搅拌式种子生物反应器扩增阶段常见的工艺参数示例

种子扩增步骤	工艺参数	工艺性能属性	备注
搅拌式种子生物反应器扩增	• 培养温度 • pH值 • 溶氧(DO) 转速 • 培养时间 • 培养体积 • 细胞接种密度 • 消泡剂添加(根据需要) • 顶通空气(根据需要)	• 活细胞密度 ●细胞活率 • 显微镜检查污染 ●代谢监测项目，如pH值、pCO_2、葡萄糖、乳酸、铵、谷氨酰胺、谷氨酸等	• 重点关注细胞生长状态(细胞密度、细胞活率) ●取样及检测应有代表性(如注意混匀后执行取样),对于重复测样需有明确的操作规程指引

D. 生物反应器培养

种子扩增细胞培养结束后，计算接种密度并将适当体积的细胞悬液转移至含基础培养基的生产反应器中，使接种细胞密度达到所需密度(通常该密度有设定范围),在一定工艺条件下(温度、pH 值、溶氧、转速等)进行培养(表4-6)。应对反应器培养的重要工艺控制参数进行在线连续监控(如培养温度、pH 值、溶氧、转速、培养时长等),对细胞生长(如活细胞密度、活率)、代谢(如葡萄糖、乳酸等)进行监测，将以上监测数据纳入批生产记录并对数据进行复核以及做必要的校准。

表4-6 生物反应器培养阶段常见的工艺参数示例

生产步骤	工艺参数	工艺性能属性	备注
生物反应器培养	• 培养温度 • pH值 ●溶氧(DO) • 转速 ●培养时间 • 培养体积 • 细胞接种密度 ●补料 • 补糖 • 补碱(根据需要) ●消泡剂添加(根据需要) ●顶通空气(根据需要)	• 活细胞密度 • 细胞活率 • 显微镜检查污染 ●代谢监测项目，如pH值、pCO_2、葡萄糖、乳酸、铵、谷氨酰胺、谷氨酸等 • 表达量 • 产品质量(如需)	• 重点关注细胞生长(细胞密度、细胞活率)、表达量及关键产品质量(根据需要) ●取样及检测应有代表性(如注意混匀后执行取样),对于重复测样需有明确的操作规程指引

针对批次补料培养工艺，接种培养一定时间后，依照工艺需求，加入一定比例的补料培养基进行补料培养，同时需监控培养液中的葡萄糖浓度，当细胞悬液中葡萄糖浓度小于葡萄糖限度时，需添加葡萄糖至所需浓度。按照需求少量添加消泡剂以减少泡沫。在整个细胞培养的过程中，监测细胞代谢的状态，同时监测细胞密度和细胞活率。在生产生物反应器中的细胞培养持续至培养结束，培养结束标准参照培养时间或细胞活率不低于限度而设定。从细胞库复苏至细胞培养结束细胞总倍增次数(PDL) 应不超过细胞传代稳定性的研究限度。在细胞培养结束时，需对未处理的UPB进行污染物(包括病毒、支原体等)检测(表4-7,参考ICH Q5A及美国FDA《人用单克隆抗体产品的生产和检验应考虑的要点》)。

表4-7 未处理的UPB的检查参数示例

参数	接受标准
支原体	不得检出
无菌或微生物限度	无生长或内控标准
细菌内毒素	内控标准
外源病毒检查(体外法)	不得检出
逆转录病毒检查(定量法，如电镜法)	报告结果
种属特异性病毒	不得检出

注：①如检测微生物限度，应设立合适的内控标准；②应对每批未处理的细胞培养收获液进行外源病毒检测；③申报 IND批次以及PPQ和工艺发生变化的前三批；④上游工艺发生变更，考虑检测种属特异性病毒，如采用鼠源细胞库生产需检测鼠细小病毒(MVM)， 可同EOPC 检测同步考虑

E. 收 获

在当生产生物反应器触发收获条件或达到规定的培养时间，将未经处理的细胞培养悬液经离心和(或)转移至含深层过滤器、减菌过滤器的串联过滤系统中经过滤得到无细胞培养液。此无细胞培养液(收获液)的保存时间依据存储研究制定，详见表4-8。

表4-8 收获阶段常见的工艺参数示例

生产步骤	工艺参数	工艺性能属性	备注
收获[离心机(如使用)及深层过滤]	• 收获时生物反应器温度 • 离心机控制参数(如适用) • 收获液温度 • 处理流量 • 背压(如适用) • 离心力(如适用) • 排渣时间(如适用) • 深层滤器控制参数 • 载量 • 过滤流速 ●压差 • 冲洗体积	• 收获液目标蛋白浓度 • 收获液体积 • 离心后料液浊度(如适用) ●步骤产率 ●微生物负荷 ●细菌内毒素 • 杂质残留*	需重点关注产率、产品贮存条件(如温度)、贮存时间及关注是否有产品特殊属性，举例：某些单抗产品具有特殊属性如容易还原，此时需要考虑缩短收获液贮存时间及在贮存过程中考虑通空气操作

注：*用于研究工艺杂质去除能力需进行残留检测(如宿主细胞DNA残留、宿主细胞蛋白残留等)。

实例分析

实例1:常见的细胞培养关键和重要工艺参数

表4-9列举了常见的细胞培养关键和重要工艺参数(根据工艺表征结果及参数分类定义确定)。

表4-9 常见的细胞培养关键和重要工艺参数

工艺步骤	操作参数	分类	设定点(操作范围)
细胞复苏和摇瓶扩增	培养温度	重要工艺参数	37(36~38)℃
反应器扩增	pH值	重要工艺参数	7.00(6.80~7.20)
	温度	重要工艺参数	37(36~38)℃
	种子细胞密度	重要工艺参数	0.3(0.2~0.4)×10^6cells/ml
反应器培养	pH值	关键工艺参数	7.00(6.80~7.20)
	溶氧(DO)	关键工艺参数	50(20~80)%
	温度	关键工艺参数	37(36~38)℃
	种子细胞密度	重要工艺参数	0.25(0.20~0.30)×10^6cells/ml
	培养时长	关键工艺参数	14(13~15)天
收获	离心力(如使用离心机)	重要工艺参数	10000(9000~11000)g
	产品深层过滤流速	重要工艺参数	100(≤120)L/(m^2·h)
	产品深层过滤压力	重要工艺参数	<1bar

注:*同一参数在不同阶段分类可能不同。以pH值为例:在反应器扩增阶段主要进行细胞增殖,仅有微量的蛋白表达,该阶段pH 值主要影响工艺性能;在反应器培养阶段,目标蛋白会被大量合成,pH 值除影响工艺性能外还可能影响产品质量。

4.4上游工艺验证

背景介绍

工艺验证应当证明一个生产工艺按照规定的工艺参数能够持续生产出符合预定

用途和注册要求的产品。验证活动贯穿于从产品工艺开发直至产品退市的全生命周期。工艺验证策略及分析详见本分册生物制品(单抗)部分“2.7工艺验证”。其中PPQ 是工艺验证过程的重要环节，是为了证明在商业化生产规模下工艺设计的有效性和工艺控制策略的适用性。上游生产过程中通常会使用多个等同的设备，因此验证过程中，需要基于验证的合理性、验证成本及验证时间等方面综合评估确定验证批次数。

实例分析

实例2:常见上游工艺验证策略

以下对如何应用分组法确定PPQ 运行批次展开了讨论，对PPQ 及在此之前通常需要完成的研究进行了总结归纳，以及总结了工艺验证第3阶段持续工艺确认中通常所需关注的参数。

(1) 分组法-批次选择

上游工艺的细胞培养通常会使用多个等同的设备，因此在验证过程中需依据风险评估制定合理的验证批次数，避免每个生物反应器的多次重复运行。

以生物反应器为例，设备等同性可考虑从如下方面进行评估。

- ●评估所用生物反应器的机械设计
  - o 设备是否采用相同的材料和具有相同的功能。
  - o 设备是否具有相同的物理属性(工作体积，几何形状，表面光洁度，控制设计等)。
  - o 设备是否符合相同的安装确认和运行确认接受标准。
  - o 设备软件控制是否相同。
- ●评估所用生物反应器的确认状态
  - o 工厂验收测试(FAT)。
  - o 现场验收测试(SAT)。
  - o 安装、运行、性能确认。
  - o 评估所用生物反应器的氧传质系数是否可比。
  - o 最终通过评估项目在所用生物反应器的实际运行表现(如工艺性能)进行确认。

表4-10列举了使用分组法进行细胞培养的PPQ。

表4-10 分组法进行多个生产生物反应器PPQ 示例

设备分组-生物反应器	评估	PPQ运行次数	支持数据
生产生物反应器1 生产生物反应器2 生产生物反应器3	反应器对比 结构设计 材质 验收标准 操作原理 工艺控制仪器和软件	反应器1:3批 反应器2:1批 反应器3:1批	例如：小规模工艺表征数据支持参数设定范围

注：①工艺验证可采用同一个反应器连续3批，其他反应器各1批的验证策略，如需减少验证批次数应进行充分风险评估，例如对于完全相同的生物反应器且已进行过多批次商业化生产的生产线，可以基于设备的等同性评估、已掌握的工艺知识、积累的平台经验、相关设施设备设计(公用工程、反应器的结构设计、工艺控制仪器及软件等)及已完成的相关确认(如IQ、OQ等)等方面综合评估合理制定验证批次数，但多个相同反应器一起验证的总批次应不少于3批。②表4-10示例中“批次”指全工艺步骤进行的验证活动，并非针对某一反应器或某一步骤单独展开验证。

(2)上游工艺验证阶段1和阶段2进行的研究

对工艺和产品知识的理解是在药物研发过程中逐步建立的，在此过程中需进行一系列相关工艺研究来更深入的理解工艺以建立稳健生产的工艺，上游需重点关注的研究详见表4-11。

表4-11 上游工艺验证阶段1、2开展的研究示例

细胞培养工艺相关研究/评估	
1	工艺开发研究
2	工艺表征研究
3	培养基、缓冲液混匀研究
4	培养基、缓冲液贮存研究(过滤前及过滤后)
5	澄清细胞收获液贮存时间稳定性研究
6	EOPC检测[检测项目见本分册生物制品(单抗)部分“3生产用细胞库的制备、检定和维护”]
7	一次性耗材相容性评估/研究

(3)上游工艺验证阶段3持续工艺确认

PPQ 成功后，需进行持续工艺确认(CPV)， 在商业化生产活动中按照已建立的确认方案对相关项目进行监控及进行趋势分析，以确保工艺保持受控状态。持续确认活动中的监控项目通常包括相关工艺趋势、中间产品及成品的质量等，分析结果

用于衡量和评估工艺稳定性及工艺控制能力。同时该报告也可作为年度产品回顾的补充。CPV中的监控参数基于前期掌握的工艺知识、已完成相关研究及验证结果综合评估确定。表4-12列举了某项目在上游细胞培养工艺CPV 中监测的参数。

表4-12 上游CPV 监测参数示例

工艺步骤		参数	限度/可接受标准
细胞培养	细胞复苏	复苏后细胞活率	≥85%
	反应器扩增	N-1阶段培养结束时活细胞密度	4.0~6.0×10° cells/ml
	反应器培养	接种后活细胞密度	0.3~0.5×10° cells/ml
		接种后细胞活率	≥95%
		收获时活细胞密度	10~20×10cells/ml
		收获时细胞活率	≥80%
		表达量	3.0~4.0g/L
		无菌	阴性
		支原体	不得检出
		外源病毒体外检测	不得检出
收获		收率	≥85%
		细菌内毒素	≤4EU/ml
		生物负荷	≤50cfu/10ml

4.5上游清洁验证

背景介绍

清洁验证是单克隆抗体生产过程中重要的一环，主要是针对与产品直接接触的非一次性使用(重复使用)的设备系统。对这些设备进行清洁，并对清洁流程做验证的目的是避免污染和交叉污染。清洁验证策略及分析见本分册生物制品(单抗)部分“2.8清洁验证”。结合上游生产工艺特点，本章节选择典型的不锈钢反应系统模式就清洁验证的三个阶段应用展开讨论。

实例分析

实例3:不锈钢反应器系统清洁验证示例

某单抗生产车间拥有6个6000L的不锈钢反应器(图4-2),已知在种子扩增线是使用一次性反应器，在细胞培养阶段是使用6000L的不锈钢生物反应器。

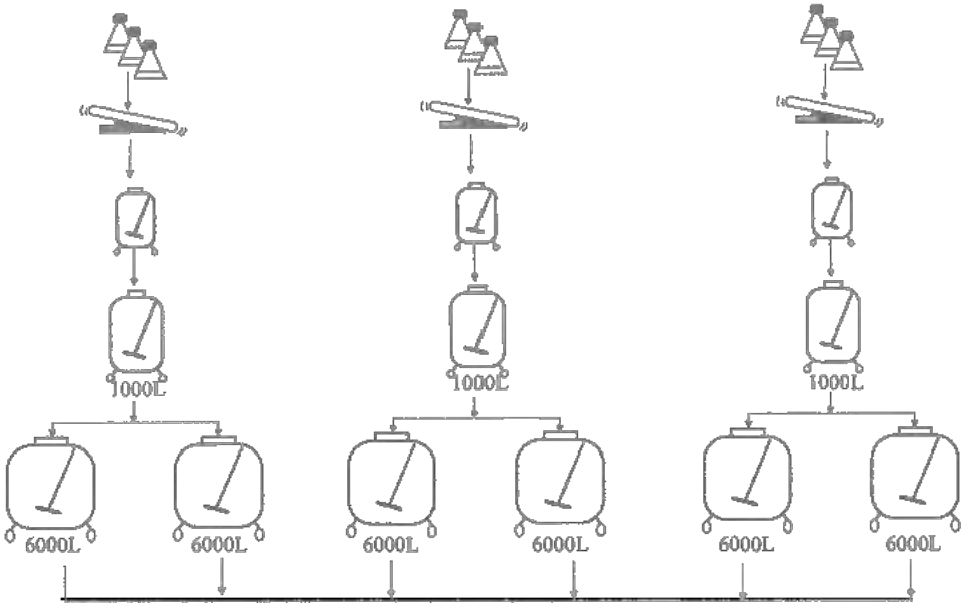


图4-2 某单抗生产设备示意

结合单抗的细胞培养工艺进行风险评估，针对一次性系统和不锈钢做相应的区分，本例着重陈述不锈钢系统。

●阶段1:清洁工艺设计与开发——细胞培养阶段的工艺步骤主要是复苏/扩增/培养/收获，目标残留物来源于过程的培养基或者培养基添加物、细胞碎片、蛋白残留、代谢产物、消泡剂、清洁剂等。选择有代表性的残留目标物类型，综合考虑黏度、溶解度、细胞数量规模以及表达量等。对于细胞培养阶段代表性污染物的物料，应选择活细胞密度最高和产品浓度最高的介质，因此对涉及细胞产物的系统一般会选择细胞收获前培养液作为研究开发的代表性目标残留。对于培养基配制系统应综合考虑培养基黏度、配比浓度、配制体积等，选择最难清洗的培养基作为残留目标。

根据蛋白特性以及培养基/配制缓冲液，选择合适浓度的氢氧化钠进行清洁。如涉及特殊蛋白残留需使用其他清洁剂，需同时考虑清洁剂残留的研究。根据生产工艺，选定某种最难清洗的缓冲液以及细胞培养收获液中间品作为最差条件，结合清

洁参数进行小规模实验；结合不锈钢反应器的材质，针对不同材质/粗糙度进行分类并考虑做TOC擦拭和淋洗水回收率的研究。需要注意研究物料的来源应该具有代表性。

特别地，在做清洁方法开发时，需要考虑系统完整的边界，如重复使用的不锈钢系统范围，以及涉及的连接部件处、密封处均应覆盖，以确保清洁方法的有效性。建议在做系统设计时就考虑适合的材质以及可更换性和易操作的更换方式，避免清洁死角。

o 阶段2:清洁方法验证——方法开发完毕后，结合不锈钢系统的实际系统设计及施工进行充分的风险评估，需考量系统中多个生物反应器的安装差异(如管路长度/阀门安装角度等)等因素，综合考虑生物反应器的机械结构/物理特性构造的一致性后，可采用分组方法进行清洁验证。应依据分组中的生物反应器系统情况选择最差条件，执行三轮清洁验证，组内的其余反应器作为子反应器各执行一轮清洁确认。此处的最差条件应综合考虑输送管路距离、物料特性、介质在系统停留时长及清洁剂的溶解度等多种因素。对于主反应器需执行的清洁验证轮次，企业可结合自身的工艺认知、平台经验以及生物反应器等同性研究数据等综合考虑，进行充分科学的风险评估，同时保证总清洁轮次不少于三次以体现清洁工艺的有效重现性。由于清洁验证是需要在生产条件下进行，需要考虑结合实际生产轮次执行。

一般情况下，清洁验证是伴随着商业化生产规模执行，通常应不晚于工艺验证结束。如配合工艺验证批次执行，需要考虑两种验证的策略配合度。当清洁验证未完成时，伴随每次的生产应进行相应的清洁确认以保证下一次生产的安全使用，直到清洁验证完成。

●阶段3:清洁验证状态维护——当初始清洁验证完成后，企业应根据验证结果进行风险评估以确定再验证的频率，可通过周期性监控确认清洁工艺的稳定性。企业可依据评估选择关键清洁效果的指标并使用统计方法来考察清洁工艺的稳定性。

4.6上游污染控制

背景介绍

污染控制是单克隆抗体生产过程中重要的质量控制内容，主要指对药品生产中的微生物、热原/细菌内毒素和粒子的污染控制。关于污染控制策略的通用要求参见本分册生物制品(单抗)部分“2.6污染控制”,本节不再赘述污染控制策略的目的、

基本流程、要求及其生命周期的管理等。

上游生产工艺中的污染控制主要关注细胞培养物的外源污染控制，包括非目标细胞对生产细胞的污染控制、微生物的污染控制(细菌、真菌)、支原体及病毒、细菌内毒素和其他生物污染物的控制(如传染性海绵样脑病朊病毒)。污染控制中应关注的另一主要污染物“粒子”通常不是影响细胞培养性能的关键因素，在本节中不做详细描述。

号

A. 上游污染控制概述

企业通常会通过各类风险评估将上游污染控制的要求定义在日常的管理流程中，但是由于生物制品污染和交叉污染预防的复杂性，出现因污染导致的失败时，企业往往很难找到根本原因和制定有效措施。这些单一和分散的措施难以帮助企业形成污染控制的系统性管理，也无法让企业的管理人员对污染控制的情况进行整体把控。企业应汇总可能的“污染源”“风险评估”“污染控制措施”及“监测方法”,从而制定与污染风险相适应的所有控制措施和监测措施的整体策略，以掌握和评估上游污染控制的整体情况。

●上游污染源：在典型的上游工艺中，常见的污染物主要来源于以下三个方面(表4-13)。

- o厂房、公用系统、设备设施、人员及物料引入的细菌、霉菌、酵母菌、细菌内毒素及粒子等。
- o由细胞株引入的支原体、病毒及非目标细胞等。
- o由动物来源的物料引入的海绵状脑病朊病毒等。

细菌、霉菌、酵母菌、支原体及病毒可以利用细胞及其培养基的营养进行大量繁殖，与细胞生长形成竞争机制，其产生的大量代谢产物(如酶、抗原及毒素)将破坏细胞的生长环境，抑制细胞生长，促使细胞变异，是上游工序中最关键的污染控制对象。

非活性粒子通常对细胞培养的性能不产生关键的影响，并非该阶段主要关注的污染源。

由于朊病毒也属于蛋白质，不易在后续工序中进行去除，且工艺中通常没有相应的检测手段，属于必须完全控制的污染源。

另外，如果后续工序中没有设计针对热原/细菌内毒素去除的工艺步骤，应更为严格地控制热原/内毒素的污染源。

表4-13 上游污染源的关键性

污染源	非常关键	关键	非关键
细菌、霉菌、酵母菌			
支原体	√		
分枝杆菌	√		
病毒	√		
朊病毒	√		
细菌内毒素		√	
非活性粒子			√

0上游污染风险评估及策略制定：风险评估及其输出的控制措施往往是独立和单一的，污染控制策略可以将这些独立的措施相互关联来实现整体把控。企业可以考虑从厂房及环境、设备设施、物料、工艺及生产过程、人员五方面进行污染及交叉污染的风险评估和控制策略的制定。表4-14是一个将独立的风险评估和控制措施信息进行汇总的举例，为梳理企业已有的风险评估和控制措施进行污染控制策略制定提供参考。

表4-14 污染控制策略制定信息汇总表

工艺步骤(例如：细胞复苏、摇瓶培养、生物反应器培养、收获)				
关键因素	说明	可能的污染	风险评估	措施及监测方法
厂房及环境	该步骤的生产环境，例如：C级。A级送风	生产环境中的污染源，如细菌、霉菌	厂房布局风险评估 空调系统风险评估 环境监测风险评估 共线生产风险评估 霉菌污染风险评估	功能区域的隔离 洁净级别的设定 人流、物流的设定 环境监测 清洁消毒的方式及频率 再验证的周期
设备设施	主要考虑直接接触培养液的设备/器具，如摇瓶、不锈钢生物反应器、取样器具等	结合设备/器具的清洁和无菌化处理方法进行考虑	设备设施风险评估 共线生产风险评估	CIP/SIP的方法及周期 清场及清洁要求 密闭系统不同批次同时生产的污染控制要求 非一次性器具的清洗及灭菌

续表

工艺步骤(例如：细胞复苏、摇瓶培养、生物反应器培养、收获)				
关键因素	说明	可能的污染	风险评估	措施及监测方法
物料	应考虑该步工艺的起始物料及过程添加物料，对于使用一次性耗材的，应对直接接触料液的一次性物料进行评估	考虑细胞株、原材料、培养基及直接接触料液的一次性耗材(如适用)可能引入的污染，如TSE/BSE,病毒、细菌、真菌、内毒素等	物料风险评估 共线生产风险评估	细胞株的传代、接收、微生物的检验及储存 动物来源物料TSE/BSE申明 培养基开封后的管理 培养基微生物及内毒素检验 一次性耗材辐照灭菌的管理 一次性耗材完整性的管理 过滤器完整性测试 水系统微生物/内毒素监测
工艺及生产过程	如培养过程中的通气、添加培养基、酸、碱及消泡剂等操作	主要考虑操作过程中引入的来自人员和环境的污染，以及直接接触细胞液的人员洁净服可能受到的污染	工艺风险评估 生产过程微生物及内毒素风险评估	更衣流程及日常监控 细胞接种敞口操作人员操作资质确认 无菌对接操作 洁净区人员行为规范 直接接触细胞液人员洁净服的灭活处理
人员	应考虑上游如有敞口操作时，人员是否得到了合适的培训和考核，具备相关资质			

污染控制策略不是一蹴而就的，随着技术的提升、人员知识的增加、变更，以及在日常管理中发现的问题的积累，污染控制策略应该得到持续改进，以适应新的认知和需求。应定期回顾并分析检测/监测数据，以及因异常事件采取的纠正预防措施，将其转化为日常的污染控制策略，才能有效改进企业的控制手段，避免污染的发生。

B. 污染控制策略关键因素

• 上游厂房及洁净区的污染控制：厂房和洁净区是外来污染引入的重要途径之一，并且作为日常污染管理的基础，通常具有重大的影响。良好的设计能确保后续的日常管理更加简捷有效，而设计不足可能导致日常管理事倍功半，且厂房进入正式运营后难以进行大规模的改造，增加企业成本和产品污染的风险。

企业应按照生产工艺流程和洁净区分区原则，以及工艺的特性和风险设定来划

分上游生产区域，包括但不限于培养基/缓冲液配制区域、细胞接种及摇瓶培养、生物反应器培养和收获的生产区域，以及根据工艺流程设定的辅助区域，如清洗间、灭菌间、固体废弃物处理间等。供参考的上游洁净区划分思路见表4-15。

表4-15 上游厂房及洁净区划分思路

分类	区域/房间	功能	洁净级别	说明
功能区	细胞接种间	细胞复苏、接种及摇瓶培养	C级 接种在生物安全柜中进行	接种过程由于存在敞口操作，应在C+A洁净环境下进行，以保护被接种的细胞免丁污染
	细胞培养间	细胞在生物反应器中的培养	D级	细胞培养在密闭环境中进行，暴露部分应采用无菌转接头或其他适当的能防止污染的方法，如使用局部移动层流等
	收获间	上游收获	D级	如采用离心的工艺，应考虑收获间设置独立的房间，或如与生物反应器间在同一区域，能有相应的隔离措施，防止操作过程中产生的悬浮微粒导致的活性微生物扩散 如采用深层过滤工艺，建议收获间尽可能设置独立房间。如车间设计深层过滤与细胞培养间在同一房间的，应当通过一定手段控制生物活性物质暴露，如密闭系统、灭活试剂原位灭活等措施
	培养基配制间	培养基的配制	C 级 或D 级	企业应根据操作风险来考虑洁净级别的设置，使培养基的配制过程能尽量减少敞口操作带来的污染以及培养基粉尘的扩散
辅助区	清洗间	器具清洗	D级或C NC	
	灭菌间	器具、物料灭菌	D级	
	废弃物处理间	废弃物清洁灭活处理	D 级 或C NC	应能确保生产过程中产生的废弃物经过合理的无害化处理后再离开生产区域，并应能防止废弃物回流到生产区

空调系统的设置应能有效防止不同区域/房间的交叉污染，企业应通过充分的验证和数据来证明空调系统的设计满足该要求。房间的送排风以及房间内工序的洁净度设计等应符合洁净室设计的基本原则。

应明确区分人物流。通常情况下，废弃物与生产使用的物料应使用不同的通道进行转运，并考虑在细胞液暴露和其他可能存在潜在污染物的区域，为人员设置独立的洁净更衣通道和退更通道，或应有充分的措施来保证使用同一通道时能有效防止交叉污染。废弃物的运输路径通常不得返回相对洁净的区域或与洁净物流在同一时间发生交叉，并应尽可能从最简洁的路线运送出生产区域。

●上游设备设施：目前，单抗上游的生产通常分为以一次性系统为主的生产线、以不锈钢为主的生产线或一次性技术结合不锈钢的生产线三种类型。在污染控制方面，无论是一次性系统或不锈钢系统，均有其优势及不足。对于新建生产线的企业，应从系统设计和选择开始考虑污染的控制，已经具备生产线的企业，同样可以通过系统类型角度对现有生产线设备进行评估，对高风险的系统加强管理，持续改进污染控制策略。

一次性使用技术由于具备灵活性高的特点，便于不同产品和不同批次之间的转化，大大降低了交叉污染的可能，也避免了因不当的清洁方法引入或残留污染。企业应当对一次性使用技术进行系统性的管理：

o 应尤其关注供应商的生产环境。

0确保供应商进行了合理且完整的辐射灭菌验证，并在日常生产中按要求进行环境的微生物监控和分析，定期对辐射灭菌剂量的有效性进行评估(包括上限及下限)。

o 建立一次性使用技术接收、检查、放行及使用的管理流程，包括但不限于确认一次性使用技术的型号、辐射灭菌报告、包装完整性、各连接端连接无异常、应装配的所有部件均完整，系统无目视可见的非密封点，人工操作准确无差错，从而保证一次性使用技术的密闭性，确保生产过程不会因一次性使用技术的破损引入污染甚至导致失败。

由于不锈钢系统属于重复利用的设备，防止批次和产品间的交叉污染是其重点关注的问题。企业应确保不锈钢系统的设计不存在清洁及灭菌的死角，并对其CIP和SIP 进行全面的验证和再验证。不锈钢系统具有更成熟的自控平台建设基础，可以大幅减少人工操作对生产及洁净环境的影响。

企业可以选择单一的生产线模式，也可以根据风险进行两者结合的生产线设计。下面从污染控制的角度出发，提供具有代表性的“结合型上游生产线”设计的思路供企业参考。

企业可以从系统的关键性(如是否与产品直接接触)以及清洁的难易程度考虑选择怎样的系统。 一般情况下，直接接触产品的系统被认为是关键系统，且由于产

品成分较培养基/缓冲液更为复杂，其清洁难度相对较高，首先考虑选择一次性系统来控制污染及交叉污染的可能。对于非产品直接接触的系统，考虑定义为非关键系统，且其清洁相对容易，可考虑选择不锈钢系统。但这并不是绝对的，无论采取怎样的生产系统设计，均应进行充分的评估、研究及验证来确保有效的污染和交叉污染控制：表4-16概述了系统选择的一种思路供企业参考。

表4-16 基于污染控制原则的上游系统选择参考思路

典型工艺步骤	系统与产品接触情况	清洁难度	代表性系统选择
培养基配制	间接接触	较简单	不锈钢系统
细胞接种及摇瓶扩增	直接接触	较难	一次性系统
反应器培养	直接接触	较难	一次性系统
收获	直接接触	较难	一次性系统

上游设备设施的日常管理应符合GMP 管理的要求，包括一次性系统完整性的检查、非一次性系统的清洁消毒等

0上游物料与污染控制

基本控制要求：企业应考虑物料在发放、退库及传递的管理要求。原则上，进入上游有潜在病毒污染区域的物料不应再传递至下游除病毒后使用，以防止交叉污染，除非企业能证明其能采取有效的措施防止污染的发生。上游工艺中的物料主要指细胞库、原材料及直接接触料液的一次性耗材，是上游生产工艺中引入污染物的重要途径(表4-17)。

表4-17 上游物料污染控制要求

物料	可能引入的污染	控制要求
细胞库	细菌、真菌、分枝杆菌、支原体、病毒、非目标细胞	详细的细胞库管理参见细胞库相关章节，在污染控制方面应重点关注以下要求： a.待检、检验不合格及检验合格的细胞株应被贮存在不同的液氮罐中 b.细胞应按《中国药典》的要求进行全检后方可用于生产，即使不是正式的生产，未完成安全性项目检查的细胞也不应引入GMP厂房中，避免对GMP生产区域或其他产品造成污染 c.生产用细胞和非生产用细胞(如检测用细胞、产品研发用细胞等)的贮存应严格分开，非生产用细胞不应进入GMP生产区域

续表

物料	可能引入的污染	控制要求
原材料(培养基、细胞营养物等)	细菌、真菌、细菌内毒素、朊病毒	a.朊病毒：应从供应商处获得培养基及其组成成分是非动物来源的证明，或无TSE/BSE声明 b.微生物及内毒素：应在供应商审计时了解供应商的培养基生产环境和工艺是否能有效控制或消除微生物及细菌内毒素的污染，并对入厂的培养基进行微生物限度、无菌(针对RTU的培养基)及细菌内毒素检查。是否需要对所有原材料进行上述检测，可以根据该物料的特性和在工艺中的用量评估决定(图4-3)
一次性耗材	细菌、真菌、细菌内毒素	直接接触产品的一次性耗材，如用于生产过程或微生物相关的样品取样，应根据待检测项目选择相应的无菌、无热原器具。企业应检查器具的辐射灭菌证书及厂家COA中关于微生物和细菌内毒素的检查结果，如用于关键步骤，还应进行适当的抽样检查

0物料入厂微生物质量控制评估：上游生产用原材料，在入厂时通常应经过微生物及细菌内毒素的检查后放行用于生产。在满足法规要求的基础上，企业也可以通过评估，确认物料是否可以免于检验，或降低检验频率等。

对于一种原材料是否存在被微生物污染，并且将该污染传递到产品中的风险，是基于物料本身的特性、工艺及物料用量决定的。为了确保放行物料的微生物污染风险低，可以通过物料本身的特性进行评估，包括：物料自身的抑菌性、物料的状态(固体或液体)、物料的潮解性(是否易被潮解)、物料的酸碱度、物料来源(是否生物来源)和物料是否含有防腐剂。

企业应根据物料污染风险的程度制定物料的检验放行要求，并根据监控数据及时进行调整。通常情况下，对于高污染风险(污染可能性高)的物料，应按来货批次每批进行微生物负荷及内毒素的检测；对于中污染风险(污染可能性中)的物料，可适当降低检测频次；对于低风险(污染可能性低)的物料，可免除物料放行时的微生物负荷和内毒素的检测。当供应商发生可能影响物料微生物相关的变更时，企业应重新评估物料的微生物污染风险。图4-3提供了简单的物料污染风险的评估树。

o废弃物料的处理：由于细胞培养液中的生物活性物质可能对外部环境产生污染，并可能返回到洁净区污染洁净环境和产品，企业应使用生物废弃物专用的容器对生物废弃物进行包装和标识，并在制定污染控制策略时充分考虑生物废弃物的处理要求。表4-18列举了单抗上游常见的废弃物及其处理要求(参照《国家危险废物名录》,按照企业的环境评估报告执行)。

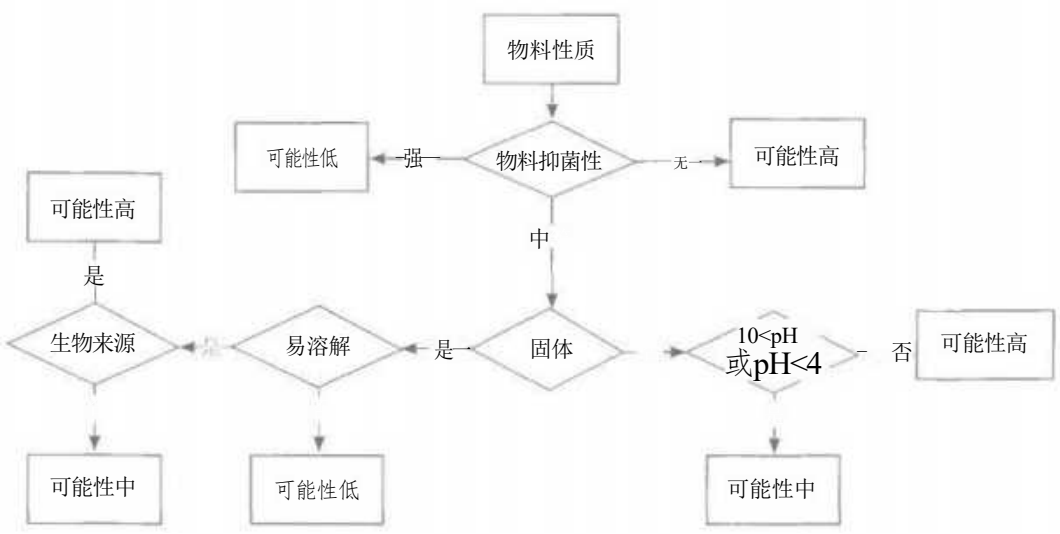


图4－3　物料入厂微生物质量控制评估

表4－18　单抗上游废弃物污染控制

工序	废弃物来源	主要废弃物	废弃物类别及处理方式
培养基配制	培养基/缓冲液配制与过滤	一次性混匀袋与储液袋/一次性连接管路/注射器/离心管/一次性过滤器	生物废液，冲洗废液并交有资质单位处理
种子扩增与细胞培养	细胞代谢	细胞培养废气(如O_2/CO_2/水蒸气)	无害废气，直排
	接种剩余细胞液	接种后剩余细胞液	危险废弃物，灭活后交有资质单位处理
	取样检测剩余细胞液/培养或取样相关耗材	一次性摇瓶/一次性培养袋/一次性软管/取样袋/注射器/离心管等	固体生物危废，冲洗废液并灭活后交有资质单位处理
收获	与细胞培养液或深层过滤液接触的一次性耗材	深层过滤液收集混匀袋/一次性软管/取样袋/注射器/离心管等	固体生物危废，灭活后交有资质单位处理
	深层过滤膜包	深层过滤膜包	NaOH浸泡后，冲洗液按照生物废弃物灭活处理 浸泡/湿热灭菌后膜包按照危险废弃物交有资质单位处理
	深层过滤系统CIP	CIP废液	生物废液，灭活处理

●上游工艺与污染控制：单抗的上游生产应参考无菌药品生产的污染控制要求，并特别关注表4－19特定的关键污染控制要求。

表4-19 上游工艺污染控制要点

操作	上游工艺污染控制要点
培养基/溶液配制	如使用的不是预配制培养基，基于培养基及培养基补充物易受污染并能促进微生物生长的特性，企业应关注培养基称量后的贮存环境，并控制培养基配制后至完成过滤的工艺时间，以及培养基除菌过滤后的有效期。即使企业有信心培养基的除菌过程可以有效去除污染的微生物，但是仍然要考虑大量微生物代谢产生和滞留在培养基中的有害物质(如代谢产物、细菌内毒素)可去除支原体的过滤工艺也应得到充分的考虑，例如，使用0.1μm的过滤器等
细胞接种	全过程应遵守无菌操作的要求，敞口操作应在C+A环境下进行。操作中尽量减少培养基反复开启的次数，应避免溢出和溅出，如有发生，应采取有效措施防止污染扩散
细胞传代及培养	操作过程中尽量减少培养基反复开启的次数，考虑定期对污染情况进行检查，对任何疑似微生物污染的现象均应提高警惕，保存污染图像并封存本批次使用过的设备及器具，便于后续调查，并避免污染扩散
取样操作	如为一次性使用技术，应在系统定制时设计足够的可防止污染的取样器具；如为不锈钢系统，应采用可以防止细胞培养液暴露的形式，如采用无菌对接取样或针刺式取样阀。操作应该遵守无菌操作的要求
收获前及收获	应对收获前料液(未处理的细胞培养收获液)及澄清收获液设置可能污染源的检测项及接收限度。收获前料液通常应按要求检测支原体、微生物、细菌内毒素及外源病毒等

0上游工艺中委托服务的管理：在上游工序中，企业可能会委托第三方进行涉及污染控制的部分活动，例如终末细胞/收获液的内外源病毒和微生物检测、异物调查等，应纳入污染控制策略中进行考虑。

●上游人员管理与污染控制：从事单抗上游生产、质量管理及其他相关工作的人员，应遵守GMP 的要求定期进行微生物基础知识和生物安全的培训，其资质管理及培训要求本节不再赘述。木节将仅针对上游工艺中特定的人员要求进行讨论。

生产人员应定期检查身体，已知患有传染性疾病的人员不得进行细胞培养的工作。负责细胞培养工作的人员在生产区内不得进行非生产制品用细胞或微生物的操作；在同一工作日进行细胞培养前，不得接触动物或操作有感染性的微生物；在生产期间，在上游工作的人员，如果未采取经证实有效和规定的去污染措施，不得从上游区域穿越至其他生产区域；负责细胞接种的人员，应对其无菌操作进行考核，考核可以考虑使用无菌工艺模拟试验的形式，确保操作人员掌握细胞接种的无菌操作要求。

●上游清洁消毒与环境控制：应对生产现场、设施设备及器具选择合适的清洁方法及清洁后的保存方式，清洁状态及有效期应进行标识。应能避免已清洁区域/房间和未清洁的区域/房间之间造成交叉污染，如果采用同一区域内的不同房间独立清洁

的形式，应考虑有效的措施来避免人员在已清沽的房间/区域和未清洁的房间/区域之间穿梭。

如使用水浴锅进行细胞复苏，应使用注射用水或灭菌水作为媒介，并在每次使用后排空，使用前后均应进行相应的清洁；用于细胞接种和传代操作的生物安全柜在每次使用后均应进行全面的清洁及表面消毒，由于使用后生物安全柜的层流关闭.其内部的环境级别和背景一致，在使用前也需要进行消毒，如果超过清洁效期，还需要额外的清洁； CO_2 培养箱应定期进行清洁消毒

细胞扩增及培养阶段，应有流程对细胞培养液或培养基泄漏的处理进行管理当细胞培养物发生泄漏时，应立即采取封漏措施并进行现场清洁消毒，确保有效控制污染并彻底清除现场污染。建议考虑的要点包括：

封堵泄漏容器；

对泄漏液体进行围堵来减小受污染的区域；

将泄漏的料液收集到可密封的容器中，密封容器并清洁容器表面(也可使用袋子密封收集料液的容器)后，将容器转移至灭活区域进行无害化处理；

对受污染区域进行清洁消毒，通常情况下，采用的清洁消毒方法应强于常规洁净区清洁消毒的方法，例如，增加消毒剂用量和增加清洁次数，或采用具有杀灭支原体、病毒等外源因子能力的消毒剂；

对污染区域进行环境采样等 如果在同-区域有同时进行的其他产品/批次的发酵活动，应该评估这些产品批次受到的影响，并根据评估结果加强后续步骤的监控

C. 共线生产的污染控制

0上游共线生产的基本原则及流程：《药品共线生产质量管理指南》已对药品研发、技术转移及生产阶段中生物制品的共线生产要求进行了详细的阐述。对于单抗上游的生产，企业在考虑共线生产时还应特别关注以下风险点。

原则上，单克隆抗体不应与激素类生物制品、细胞毒类及高活性的药品共线生产，对于其他考虑共线生产的产品，在经过充分的共线生产风险评估后，可进行共线生产。典型的共线评估流程如图4-4所示：

上游共线生产的污染控制要求：在单抗的共线生产过程中，相对于传统的不锈钢系统， 一次性使用技术能更好地防止交义污染，在充分确认系统密闭性的条件下，单抗多产品的共线应首先考虑使用一次性系统。不锈钢系统用于单抗多产品共线生产时，需要更详细的风险评估和系统性的清洁验证来避免产品的交叉污染。

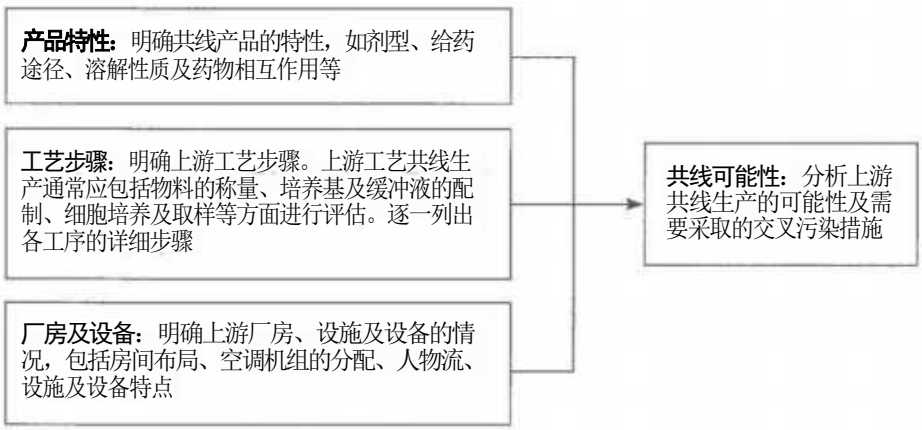


图4-4　上游共线评估流程

另外，GMP中明确规定企业不得在同一生产操作间同时进行不同品种和规格药品的生产操作，除非没有发生混淆或交叉污染的可能。因此，单抗上游的共线生产中应考虑采用时间隔离（错时生产）的形式，或采取可靠的措施来支持同时生产（如同一区域的独立密闭系统）。

- 对于在生产过程中可能出现活性物质暴露的工艺步骤，在共线生产中考虑采用时间隔离（错时生产）的形式，如培养基配制、细胞接种等。错时生产的形式应建立生产线换产品管理的流程，确保在下一产品入场前完成清场及清洁，其操作应符合GMP的相关要求。
- 作为密闭发酵阶段，可以同时进行产品的共线生产，但是仍然应该制定明确的管理流程来明确异常事件（如泄漏）的处理要求。

D. 污染的消除

如生产环境出现了超出标准的污染，或发现了有害微生物，应对环境进行全面的清洁消毒处理，采取的消毒方法应能对发生的污染具有明确的作用，例如，出现霉菌污染时，使用的消毒剂应是经过效力验证可以杀灭霉菌的消毒剂。如必要，生产区域清洁消毒后，应进行悬浮粒子、沉降菌及表面微生物的监测，合格后再使用。应调查环境污染的来源，并充分评估环境污染可能对产品质量造成的影响，包括但不限于分析产品在环境中暴露的可能性、增加产品的取样监测点及监测项目等。

一旦上游细胞培养液出现了微生物或病毒的污染，应立即对被污染的料液及其设备进行隔离，检查是否存在泄漏点，并对泄漏点进行封闭处理，对现场进行清洁消毒（如使用杀孢子剂或其他强效消毒剂），防止污染扩大。被污染的细胞培养液应

按经验证的程序进行灭活，可考虑采取措施降低料液在转移至灭活罐过程中造成更多污染的可能，例如，在料液中加入氢氧化钠达到一定的 pH 值进行料液的预处理等。对接触料液的器具、耗材等进行灭活处理。上述操作完成后，还应对设备设施及生产环境进行全面的清洁消毒及环境监测。对于处理污染的操作人员，其洁净服应先进行灭活处理，再丢弃或进行常规的清洗、消毒(如适用),防止洁净服对外部环境或其他区域、洁净服等造成污染。

实例分析

实例4:常见上游污染控制策略

采 用HACCP风险分析工具对上游生产工艺及其他方面因素进行风险分析，风险等级及风险定义见表4-20。

表4-20 上游污染风险登记表

风险等级	风险定义
高风险	直接导致单抗上游生产中断或失败，如果该问题发生，没有一定可以检测到该问题的步骤，必须采取有效的控制措施防止该问题的发生
中风险	可能/间接导致单抗上游工序中断或失败，如果该问题发生了， 一定可以在工艺被中断前被检测和纠正
低风险	对单抗上游工序影响甚微，可以不需要额外的控制措施

应识别上游工艺中各工序各污染影响因素的潜在问题，以及这些问题可能导致的风险，对风险等级进行判定，并根据风险等级确认污染控制措施，并设定监控措施以监控污染控制的有效性。将这些风险及措施汇总在污染控制策略中，供管理层及技术人员掌握现状及定期更新，及时发现和预防问题。

本节以常规上游工艺和设备设施为例，列举上游工艺中主要风险及污染控制策略(表4-21),限于篇幅，这不是一个完整的评估及污染控制要求，不会对常规的污染控制要求进行赘述(例如，人员在洁净区的更衣要求、洁净区清洁、环境监测、非直接接触产品料液的设备清洁等),企业应根据自身情况进行详细分析。

表4-21　上游污染控制汇总表

工序	潜在的问题	潜在的风险	风险等级	有代表性的CCS	有代表性的CCS有效性评估
上游物料准备	人员有传染病或暴露创口	从人员引入微生物污染	中	进入生产区域前进行自查并填写记录，对有疑虑的情况，应由微生物师做出判断和决策	环境监测数据及趋势分析 微生物鉴定结果 中间产品、产品污染偏差
	人员当天负责其他品种细胞的暴露操作，或有关动物的操作	从人员引入交叉污染，如杂细胞、病毒、支原体等	中	在文件中明确人员工作内容的要求，操作人员在执行当天的活动前应确认是否进行过其他品种细胞的操作 动物房设置在独立建筑中，与原液生产区域保持适当的距离，从事动物操作/实验的人员与上游工序人员不应兼任	
	物料称量罩失效，不具有负压和层流保护功能	操作人员和环境受到污染，导致其他物料被交义污染	中	制定设备维护的计划，定期检测其气流状态和风量 使用前提前开启，检查设备运行状态正常后方可使用，过程中出现报警，应立即停止操作，保护物料。在必要时，人员应重新更衣，环境应重新清洁后方可重新开始物料称量	
	动物来源的物料或其衍生物	引入朊病毒	高	选择物料时尽可能避免动物来源的衍生物，或应获得相应的BSE/TSE申明	供应商档案 物料BSE/TSE申明 异常毒性数据
	物料本身能促进污染物的生长(如高营养物质),如培养基，尤其是可直接使用的无菌培养基或其添加物	物料白身被污染，在产品料液中增加产品污染概率	中	密封保存，　一次性使用，该类物料通常不允许开封后的重新密封，如果必须这样做，应评估开启包装和重新密封的环境是能确保无新的污染引入	物料微生物检验数据 中间产品、产品污染偏差
	物料的微生物、内毒素等达不到控制要求	引入微生物、内毒素污染	中	制定物料的微生物和内毒素控制标准，根据其风险确认人厂检验的频率	物料微生物检测报告 中间产品、产品污染偏差

续表

工序	潜在的问题	潜在的风险	风险等级	有代表性的CCS	有代表性的CCS有效性评估
上游物料准备	暴露的物料操作活动不符合无菌操作要求	人员、环境的污染物进入物料	中	制定无菌操作规范，进行相关人员的培训及考核；将无菌操作作为QA现场监督的检查项之一	环境监测数据及趋势分析 QA巡检记录统计 中间产品、产品污染偏差
	不同批次或产品的物料同时进行准备	批次/产品间交叉污染	中	物料应按产品进行阶段性称量/准备： (1)每种物料称量/准备后对区域进行适当清洁后再进行下一物料的称量准备 (2)每种产品的物料完成称量/准备后，对区域进行清场和清沾、然后进行下一产品的物料称量/准备	交叉污染偏差
	物料贮存风域未设置合适的虫害控制措施	虫害引入外来因子(如病毒)	中	由专业的虫害控制专家进行虫害控制的布防，一几发现虫害，对区域内的物料外观和包装进行检查，对现场进行适当的清洁	虫害控制报告及趋势分析 虫害偏差 中间产品，产品污染偏差
	在物料传递时不充分的物料包装清洁	污染引入沾净区，尤其是霉菌	中	选择多重包装的物料，在进入仓库时应除去运输外包装，进入洁净区前除去第二层包装 对于包装层数少的情况，进行表面清洁和消毒，如出现过物料传递引起的霉菌污染，物料包装的清洁消毒应考虑更高效但是残留低的消毒剂，如过氧化氢 传递窗或物流气闸需要满足对应洁净区管理及白净的要求	环境监测报告及趋势分析 中间产品、产品污染偏差
	缺少可以保护物料的适当的洁净环境	从环境引入污染	中	物料敞口的操作区域，其洁净级别等于或高于物料用于生产时的环境级别。对于不能一次性使用完，需要重新封口贮存的物料，采用A级送风保护后进行敞口操作	物料定期复检报告及趋势 中间产品、产品污染偏差

续表

工序	潜在的问题	潜在的风险	风险等级	有代表性的CCS	有代表性的CCS有效性评估
培养基/溶液配制	配制到除菌过滤/灭菌放置过长时间	微生物负荷过高，无法通过过滤/灭菌去除污染物	高	进行配制到除菌过滤/灭菌放置时间的研究 在日常操作中进行时限规定和微生物负荷限度设定	中间产品微生物检验数据及趋势分析
	过滤未选择合适的过滤器(灭菌未选择合适的灭菌条件)	不能有效去除培养基/溶液中的污染物	高	(1)过滤使用0.1μm的过滤器进行培养基的过滤，以确保可以去除支原体 对于过滤体积较大的培养基(如超过500L)，增加0.2μm的预过滤器，降低杂质及微生物负荷，确保0.1μm滤器的有效性 (2)灭菌非温度敏感的溶液可采用高温灭菌，对灭菌参数和装载进行验证，确保灭菌有效性	中间产品(如收获前)支原体检验结果 中间产品微生物负荷检验结果
	过滤器完整性被破坏	不能有效去除培养基/溶液中的污染物	中	过滤后进行过滤器完整性测试，完整性测试失败的，培养基/溶液不得用于后续工序	过滤器完整性测试报告 中间产品微生物测试结果
	贮存容器泄漏	培养基/溶液被污染	高	贮存容器在使用前后均需检查其完整性 容器放置在特定的独立区域，运输和贮存过程均不得接触尖锐物品 培养基/溶液在使用前应目视检查容器完整性，以及培养基/溶液是否出现异常变化	容器泄漏/污染偏差
	贮存条件不适合或时间过长	培养基/溶液被污染	高	对贮存温度和时间进行研究和验证，并在日常操作中进行贮存条件和时限的规定	贮存环境温湿度监控数据 因培养基/溶液被污染导致的偏差
	不同阶段、批次、产品的培养基/溶液在同一区域配制	交叉污染	高	不同批次、产品的培养基/溶液工序需采取分阶段进行，完成全面清场及清洁后方可进行其他批次或产品的培养基/溶液配制	交叉污染偏差 环境监测数据

续表

工序	潜在的问题	潜在的风险	风险等级	有代表性的CCS	有代表性的CCS有效性评估
细胞复苏及种子培养	人员在细胞敞口操作中不能严格进行无菌操作	因不良操作向细胞中引入污染	高	对人员进行无菌操作培训及考核 在文件中详细定义细胞复苏的操作注意事项	细胞培养污染数据
	细胞冻存管在解冻过程中有水浴中的水进入或残留在冻存管管口	水浴中的水进人细胞液，引入微生物污染	高	采用干式恒温器进行细胞解冻，如采用水浴进行细胞解冻，水浴高度应低于冻存管管口，或采用其他有效防止污染的措施(如使用洁净的外袋保护冻存管),水浴锅内使用注射用水或灭菌水，每次使用后排空，使用前后均进行清洁 解冻后使用挥发性消毒剂对冻存管外部进行擦拭消毒	细胞培养污染数据
	同一区域内同时进行不同产品的细胞复苏	交叉污染，包括非日标细胞及其他污染	高	在流程中规定不同产品细胞复苏的要求，不得在同一区域同时进行，在进行另一产品的细胞复苏操作前，该区域应进行清场及清洁 操作人员同一工作H在进行一个产品的细胞敞口操作后，不得再进行其他细胞的操作，除非有经过确认的可靠的去除污染的方法	环境监测数据及趋势分析 交叉污染偏差
	摇瓶不是无菌、无热原的，或缺少隔菌呼吸膜	细胞被摇瓶污染，或在摇瓶培养阶段被环境污染	高	选择无菌、无热原且带疏水呼吸膜的摇瓶，摇瓶入厂需进行放行检查，确认其辐射结果及无热原声明 使用前确认摇瓶包装的完整性	物料COA检查及放行报告 摇瓶引起污染的偏差
	接种过程细胞液暴露在非无菌的环境中	细胞液受到环境污染	高	在A级层流保护下通过无菌操作进行细胞的接种，操作过程进行环境监测	细胞培养污染偏差
反应器培养	一次性使用技术完整性失效或存在异物	细胞液受到生物反应器或环境的污染	高	使用前确认一次性使用技术的包装完整性、辐射灭菌标识、生物反应器的完整性，包括各链接处的完整性；确认无目视可发现的异物 每日进行显微镜检，确认细胞液污染情况	一次性使用技术COA及放行报告 细胞培养污染情况

续表

工序	潜在的问题	潜在的风险	风险等级	有代表性的CCS	有代表性的CCS有效性评估
反应器培养	细胞扩增的接种过程中，细胞液暴露在非无菌环境中	细胞液受到环境污染	高	采用无菌转接头进行细胞扩增过程中的细胞液接种，或使用可移动的A级层流保护接种过程中的暴露操作 每日进行显微镜检，确认细胞液污染情况	细胞培养污染情况
	过程中使用的工艺气体不是无菌的	细胞液受到工艺气体的污染	高	用于细胞培养的工艺气体需进行定期的微生物及粒子检测，进入生物反应器前需要经过除菌过滤器的过滤，滤器需通过完整性测试；一次性设备滤器企业需提供滤器的完整性测试合格证明；定期检查确认细胞液污染情况	细胞培养污染情况
	取样时培养的细胞液被暴露在环境中	细胞液受到环境污染	高	对于一次性使用技术，取样袋与培养袋进行一体化设计，并采用无菌断口技术；对于非一次性使用技术，可以使用针刺式取样阀进行取样操作；取样在密闭的管路和容器中进行	细胞培养污染情况
	补料/添加物添加时培养的细胞液被暴露	细胞液受到环境污染	高	补料容器与生物反应器采用无菌对接，物料传输使用密闭管路	细胞培养污染情况
收获	细胞液在收获前被污染	细胞液受到环境、设备或人员污染	高	在收获前进行微生物和内毒素的检测	收获液微生物/内毒素检测结果
	一次性使用技术完整性失效或存在异物	细胞液受到生物反应器或环境的污染	中	使用前确认一次性使用技术的包装完整性、辐射灭菌标识、袋子和软管等的完整性，包括各连接处的完整性；确认无目视可发现的异物	一次性使用技术泄漏偏差 异物偏差
	收获过程细胞液暴露在环境中	细胞液受到环境、设备或人员污染	中	进行减菌过滤后的收获液应收集到无菌密闭的容器中	收获液微生物/内毒素检测结果

续表

工序	浩在的问题	潜在的风险	风险等级	有代表性的CCs	有代表性的CCS有效性评估
收 获	收获液贮存条件不合适或时间过长	生物负荷或内毒素超出控制标准	中	验证贮存条件和时间限度，并在文件中进行规定；在最后一个循环上样前进行收获液的微生物负荷和内毒素进行检测	收获液微生物/内毒素检测结果
废弃物处理	废弃物在排出/转移出生产区时仍然其有生物活性	废弃物污染外部环境	中	制定废弃物排出前的灭活处理流程	排废指标
	废弃物的转移路径与干净的生产区域有交叉，或可能返回至洁净区域	废弃物对洁净的生产区域/产品造成污染	中	在人物流设计时应确保废弃物的运输路径不得返回相对洁净的区域或与洁净物流发生交叉，并应尽可能从最简洁的路线运送出生产区域	交叉污染偏差环境监测数据

5 下游工艺的生产质量控制

本章主要内容：

E 下游工艺中物料管理的注意事项

E 下游生产工艺的典型流程，各工序的控制要点
下游开展中间产品稳定性研究的目的、开展方式
有效病毒灭活/去除工艺的建立

F 下游工艺控制微生物污染的方式

F 重复使用的层析介质与膜包的管理
下游工艺验证的注意事项

E 下游清洁验证的注意事项

F 低内毒素回收与缓解措施

5.1下游物料的质量管理

背景介绍

单抗下游生产所用物料按功能分类，主要为原材料、辅料和生产用耗材。原材料主要包括生产过程中配制缓冲液所需的酸、碱、盐等无机化合物及部分有机溶剂；辅料主要包括在原液配制过程中所使用的辅助材料，如稳定剂、赋形剂、缓冲体系等；与产品接触的生产用耗材多由高分子类有机聚合物或硅质岩类无机材料制成，包括可重复使用的层析介质和超滤浓缩/换液膜包、 一次性使用的各种缓冲液配制及储存袋、中间产品混匀及储存袋、原液长期贮存容器、中间产品深层过滤膜包、减菌/除菌过滤器、除病毒过滤器、液体传输管路、各种取样管及取样袋等。

一次性使用技术在单抗下游生产中有广泛应用，很大程度上可替代传统的不锈钢设备。本分册无菌制剂部分“18.1 一次性使用技术”全面介绍了一次性使用技术

的定义，在制药领域的应用和考虑，相容性研究，完整性检查，测试和验证研究，供应商管理和进厂验收等内容。但针对单抗蛋白分子高级结构的不稳定性、工艺过程中微生物控制要求、聚合物表面对蛋白的吸附性及可提取物与可浸出物安全性要求等特点，需对单抗药物下游生产过程中使用耗材的质量管控有特殊的要求。下游使用一次性技术需要考虑的风险主要包括以下几方面：

●产品与产品接触表面之间的相互作用(吸附、浸出物和溶出物)。

●相比于不锈钢设备， 一次性使用技术较为脆弱，存在穿孔及泄漏的风险。

●工艺适用性，对其容纳体积、载量的要求(高温、高压、有溶出风险的高浓度有机溶剂不适用)。

●人工操作数量与复杂度增加，需要使用前进行检查与相应处理。

• 一次性使用技术的灭菌工艺及对其质量的影响。

• 一次性使用技术引入的污染控制，如微生物、内毒素、颗粒和异物(如要求)。

本分册生物制品(单抗)部分“2.2物料控制”详细介绍了通用的物料控制策略及耗材相容性评估策略。本节将重点阐述在单抗下游生产中所使用耗材的技术与安全性关注点、风险评估策略及变更管理。可重复使用的耗材在本分册生物制品(单抗)部分“5.6层析介质与膜包的管理及持续寿命研究”中介绍。

实施指导

A. 一次性使用技术的应用及其对应关注点

一次性使用技术应用于下游生产的多个工序，包括缓冲液配制及贮存、中间产品混匀及贮存、液体转运及过滤、原液贮存及各工序的取样，根据用途的不同，其关注侧重点也不同。

一次性搅拌袋、储液袋的技术与安全性关注点如下：

●完整性要求，破损和漏液问题，对于微生物控制的下游工艺，需尽量避免，应建立使用前检查及使用过程中发生漏液后的相关处理程序。

●功能性要求，组件的稳固性、搅拌性能、参数测量与调节功能，与支撑容器的适配性/贴合度等。

●微生物与内毒素控制。

●化学兼容性与生物相容性。

●颗粒的脱落。

●动物源成分。

●内表面材质，对蛋白的吸附性及稳定性影响。

●可提取物和浸出物。

●材料性质，如防冻性(对于原液低温贮存)。

●特定贮存条件(温度、光照、气体阻隔性等)对于材料的要求。

一次性过滤器、深层滤器、除病毒滤器(膜包)的技术与安全性关注点如下：

●过滤性能要求，如孔径、截留分子量等。

●过滤器使用条件(压力、流速等)。

●过滤器完整性测试方法及标准(如涉及)。

●灭菌方式，重复灭菌的性能(如涉及)。

●微生物与内毒素控制。

●化学兼容性与生物相容性。

●颗粒脱落与纤维释放。

●动物源成分。

●接触材质对特定检测项目无显著影响(如对残留DNA 的吸附等)。

●可提取物和浸出物。

B. 一次性使用技术的使用风险评估及质量控制

下游工艺比较接近单抗药物的最终产品，使用一次性使用技术对产品带来的风险包括微生物引入、内毒素引入、颗粒引入、可提取物与浸出物杂质引入、中间产品稳定性(降解、聚合及吸附)等。对生产工艺带来的风险包括工艺性能(如预定的搅拌效果、过滤效果)、系统完整性(泄漏、破损)等。

企业需要着重评估一次性使用技术对工艺控制及产品质量的潜在风险，推荐参考ICH Q9、ICH Q10等，建立适合企业自身特点的耗材质量管控体系，常用的风险评估工具有： FMEA、故障树分析(FTA)、鱼骨图、危害分析与关键控制点(HACCP) 等。任何对药品质量(进而导致对患者安全)可能产生的不良影响，都必须作为主要关注点来考虑。对于评估级别较高的风险项，企业应采取必要的措施对风险进行控制，或通过对耗材制造商/供应商的加强管理进行间接控制。

C. 一次性使用技术的可提取物和浸出物风险评估及研究

一次性使用技术产生的可提取物和浸出物可能会影响产品的有效性和安全性，并因其在后续工序不涉及相关检测，因此需要在使用一次性技术前进行关注，国际

上已有相关指导文件可参考，如USP<665>、USP<1665>、BPOG 发布的《生物制药生产过程中一次性使用聚合物系统浸出物风险评估的最佳应用指南》等，目前国内也有关于药品包装材料相容性研究的指导原则可参考，如《化学药品注射剂与塑料包装材料相容性研究技术指导原则(试行)》及《化学药品注射剂生产所用的塑料组件系统相容性研究技术指南(试行)》等。

可提取物和浸出物的风险评估需基于实际工艺参数进行，制药企业可参考各技术指南及法规要求，制定自身的风险评估模型。风险评估的一般步骤及模型可参考本分册无菌制剂部分“18.1 一次性使用技术”描述的可提取物和浸出物评估流程和案例。

除上述常用的评估流程外， 一次性使用技术风险评估过程中还有另一考虑点：下游超滤浓缩/换液(UF/DF) 作为纯化步骤，具有降低和去除小分子浸出物杂质的作用，另外超滤前的吸附-洗脱层析工序，也具有降低和清除小分子杂质的功能，ICH Q3D明确指出UF/DF 可有效去除元素杂质，USP<1665>征求意见稿将UF/DF等清除可提取物的步骤作为风险评估中降低风险的要素。因此，通常可认为超滤前的纯化工艺步骤中可提取物和浸出物的风险相对较低。

一次性使用技术的可提取物试验一般由供应商进行，可提取物和浸出物的试验样品、提取溶剂、提取时间、提取温度及后续的分析方法选择等，可参考相关的指导原则。

浸出物试验通常由制药企业根据实际使用条件进行，可使用同材质小体积的一次性使用技术进行，试验条件(包括装量、温度及时间等)均参考实际或可覆盖实际使用条件。

D. 一次性使用技术供应商的变更管理

产品上市后，变更生产所用一次性耗材应谨慎。应按照法规市场注册要求评估变更等级，并通过补充申请、备案或年报方式通知监管部门。 一次性使用技术的变更，需基于科学与风险的原则，进行充分的评估与研究。同时，使用条件发生变更(如升高温度、调整pH 值、延长接触时间等)也可能引起浸出物的变化和一次性使用组件风险评级的变化，因此需对一次性使用技术重新进行风险评估，必要时进行相关的试验并出具研究报告。

新增备选耗材时，对于第二供应商，应按照选择第一供应商的技术要求进行，并按照上市后变更相关技术要求进行研究，关注变更前后的差异。目前行业中尚无标准化的一次性使用技术检测方法，各供应商采取的控制方法可能是不同的，需确

保其均符合各自的质量系统要求。例如，对于某项检测，两个供应商的检测频率或检测方法不同，但均可证明此项检测可控，也是可以接受的。

结合一次性使用技术的用途，对其进行风险评估，以确认备选物料的可替代性。评估可参考表5-1进行。

表5-1 一次性使用技术变更风险评估示例

变更类型	描述	风险评估关注点*	性能确认工作
对等替换	相同组件、尺寸和结构材料，由不同的供应商采用相同的工艺条件制造	1,2	通过变更控制，监测设计和用户技术规范
功能等效	材料性能相同，但材料供应商不同(如袋子、过滤器、管路)或工艺条件不同	1,2,3,4,6	监测性能属性，浸出物和产品关键质量属性
工艺、功能改变或改进	功能或性能相似，设计和结构材质不同，在使用时可能需要同时调整工艺或设备	1,2,3,4,5,6	利用缩小模型研究监测性能属性、浸出物和产品关键质量属性，必要时进行工艺验证

*风险评估关注点：

1. 说明拟替代物料的设计、尺寸、性能和材质要求(形状、适配性和功能)。
2. 组件材料和工艺流体的相容性，接触面积和接触时间。
3. 提供生物安全性说明和可提取物实验数据。
4. 供应商提供的可提取物数据与实际工艺条件的适配性。
5. 后续步骤是否有可去除或稀释浸出物的能力。
6. 产品质量影响评估。

5.2下游生产工艺控制

法规要求……

药品生产质量管理规范(2010年修订)

第三百一十二条

(十三)返工

将某一生产工序生产的不符合质量标准的一批中间产品或待包装产品、成品的一部分或全部返回到之前的工序，采用相同的生产工艺进行再加工，以符合预定的质量标准。

药品生产质量管理规范(2010年修订)生物制品附录

第五十一条　应当采用经过验证的工艺进行病毒去除或灭活处理，操作过程中应当采取措施防止已处理的产品被再次污染。

第五十三条　应当明确规定层析分离柱的合格标准、清洁或消毒方法。不同产品的纯化应当分别使用专用的层析介质。不同批次之间，应当对层析分离柱进行清洁或消毒。不得将同一层析分离介质用于生产的不同阶段。层析介质的保存、再生及使用寿命应当经过验证。

第六十条　应当对生产过程中关键工艺(如发酵、纯化等工艺)的相关参数进行连续监控，连续监控数据应当纳入批记录。

背景介绍

单克隆抗体下游生产各工序主要目的是去除产品相关杂质(如聚合体、降解产物)，去除工艺相关杂质(如培养基成分、宿主细胞蛋白、宿主细胞 DNA、脱落蛋白A配基、抗生素、消泡剂、有机溶剂等)，调节电荷异构体比例，灭活及去除潜在病毒，同时将单抗分子置换到稳定的缓冲体系内，加入适量稳定剂以利于单抗分子的长期贮存。图5-1简述了平台化的单抗下游纯化的各个工序。

下游工序从收集上游澄清收获液开始，首先经过亲和层析捕获目标抗体分子，然后通过低 pH 值（或其他化学灭活剂）灭活病毒，再通过阴/阳离子交换层析进行精细纯化、除病毒过滤，及切向流超滤浓缩换液，最后添加辅料，配制过滤，分装成原液并进行冷藏或冷冻贮存。

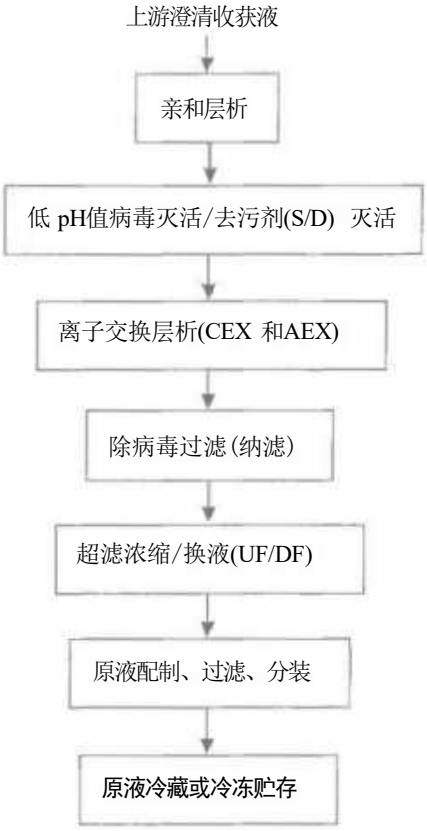


图 5－1　平台化下游纯化工序

实施指导

以下总结了下游工艺各个环节通常进行控制的操作参数和监测的性能参数，其中微生物部分的监控在本分册生物制品(单抗)部分“5.5下游工艺的微生物控制”中进行阐述。

A. 层析纯化操作实施的通用要求

层析是单抗下游生产中最为常用的工序，利用蛋白质的电荷性、特异性吸附、疏水作用、分子大小等原理实现单抗纯化的目的。层析系统通常由液体泵、层析柱、附属的管路及阀门、传感器(流量、压力、pH 值、温度),以及紫外和电导率等检测单元组成。在单抗的生产过程中，应建立层析相关的操作及管理规程，并关注以下要点：

●层析系统应建立预防性维护保养程序，定期检查各阀门、管路及泵的运行情况，检查校准各测量单元与传感器，关注紫外检测单元光源使用情况，进行预防性更换。长期使用时，应关注管路的钝化和老化情况。

●层析介质(填料)应建立入厂验收程序，如鉴别试验、微生物负荷及内毒素含量等。必要时考虑其工艺要求，如动态载量测试等。

●层析柱装填前应检查层析柱的清洁状态和密封性等，如筛网、密封圈、柱管等组件。

●层析柱装填前应目视检查填料性状，装填完毕后，应根据平台化的操作经验及填料的特性，测定柱效并符合设定的标准，如理论塔板数、对称因子等。

●层析柱装填后持续使用期间，应根据性能监测情况及生产批次的安排，制定定期拆装柱计划(如需)。

●层析系统与层析柱的清洗与在线消毒应建立相关规程。

●层析介质在位或离线保存时，需选择合适的保存液，周期性检查保存液情况，定期更换保存液，避免液位下降与微生物滋生。

●层析系统管道需要有标识，使用前应检查管路连接情况，避免接错，运行时应关注系统压力。

●层析过程应连续监控关键工艺参数，自动层析程序运行前需确认程序配方，电子记录保存需符合数据可靠性要求。

●层析工序要有明确的样品收集标准，生产过程中应关注层析图谱情况，如电导率 、pH 值、紫外吸收值等。为考察工艺的稳健性，建议定期对商业化生产阶段批次间图谱的一致性做分析。

B. 亲和层析

亲和层析工序的目的是从上游澄清收获液中捕获目标抗体，并承担部分工艺相关杂质与潜在病毒的清除功能。亲和层析介质(也称填料)通常连接有蛋白A(Protein A)或蛋白G(Protein G)配基，可与抗休分子(通常为IgG) 中 的Fc 片段特异性结合，达到捕获和浓缩目标抗体的目的

在亲和层析柱完成装填、清洗及平衡后，将上游澄清收获液上样至亲和层析柱，抗体分子将与填料结合，上样结束后，进行后平衡及冲洗(如需要),然后进行洗脱，根据出峰的紫外吸收值(如UV280) 收集口标组分在收集完毕后，儒进行层析介质的再生与清洁。

亲和层析工序的常见的工艺参数、性能属性及中控参数见表5-2

表5-2 亲和层析工序的常见的工艺参数、性能属性及中控参数

生产步骤	操作参数	性能属性或中控参数率	备注
装柱	• 柱高 • 介质使用循环数	• 理论塔板数 • 对称因子	
1样	• 前平衡体积 • 载量 • 保留时间 • 后平衡体积	• 柱压	需根据蛋白总量、载量计算每批需要的循环数
冲洗	• 冲洗液pH值及体积		
等梯度洗脱	• 洗脱液pH值 • 样品收集UV280吸收值 • 保留时间	• 柱压 • 工序回收率 • 中间产品质量，如CE-SDS、CEX-HPLC等	

注：*中控检测可根据产品专属的分析控制策略选择进行日常监控，工艺验证或阶段性批次中加强监测，微生物相关控制见本分册生物制品(单抗)部分“5.5 下游工艺的微生物控制”

亲和层析图谱示意图见图5-2

亲和层析洗脱得到的收集液pH 值较低，可直接进入低 pH 值病毒灭活工序，或根据中间产品贮存稳定性情况进行短暂贮存(或回调pH 值后贮存)后合并多个循环收集样品进入低pH 值病毒灭活工序。如需暂存，需考虑贮存条件及贮存时限对产品理化性质及微生物负荷的影响。贮存条件、贮存时限应有明确规定。

亲和层析介质允许同产品不同批次间重复使用，考虑到基质的基架碎裂、配基脱落、杂质的吸附等会影响分辨率及可清洁性，层析介质的最大使用次数需根据小

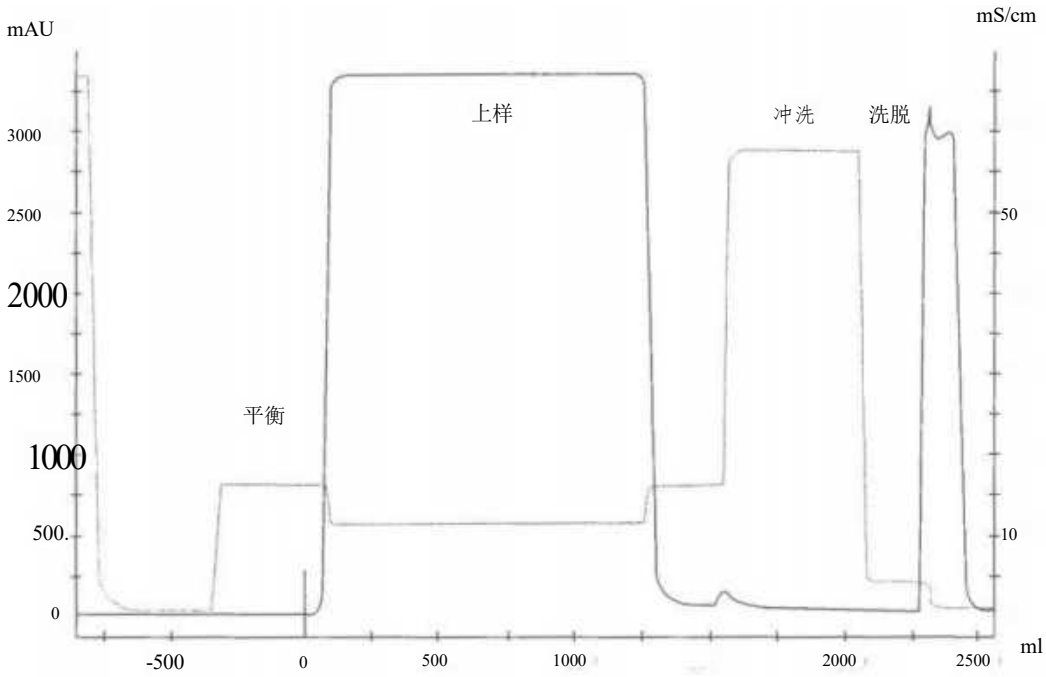


图5-2　亲和层析图谱示意图

试研究数据及除病毒验证结果评估，并在生产规模进行同步确认，层析柱每次使用后需进行清洁与消毒，清洁与消毒程序应固定，清洗前后的保存时间(如适用)应当进行规定。层析介质的在线与离线保存，应规定保存条件(如温度等)、保存液种类和浓度，并定期进行更换。

C.低 pH 值病毒灭活

该工序利用低 pH 值环境下，脂包膜类病毒的囊膜和病毒衣壳蛋白会逐渐变性而使病毒颗粒丧失感染能力，从而达到病毒灭活效果。通常亲和层析的收集液pH 值通常在3~4之间，如不在病毒灭活预定的pH 值范围内，可通过添加亲和层析洗脱液或酸溶液，将收集液pH 值调节至目标范围，并保持一定时间(操作时注意加酸速度控制，以防pH 值过低)。静置灭活的pH 值、时间、温度应通过病毒灭活验证进行确定。病毒灭活完成后的中间产品需回调pH 值至目标范围，进行深层过滤去除沉淀后(如需要)后得到蛋白收集液。

低pH 值病毒灭活工序的常见的工艺参数、性能属性及中控参数见表5-3。

pH 值回调后的中间产品在放置过程中，需考虑贮存条件及贮存时限对产品理化性质及微生物负荷影响。企业应根据中间产品稳定性研究结果结合实际生产情况，制定和明确贮存条件和时限。

表5-3 低pH值病毒灭活工序常见的工艺参数、性能属性及中控参数

生产步骤	操作参数	性能属性或中控参数*	备注
低pH值病毒灭活	• 蛋白质含量(如需) • pH值 • 温度 • 灭活时间	• 工序回收率 • 单体纯度(SEC-HPLC) • 电荷异质性(CEX-HPLC、CZE或cIEF) • 杂质含量，如宿主细胞蛋白(HCP)，脱落的亲和层析介质配基，宿主细胞DNA(HCD)等	影响病毒灭活效果的参数一般为关键工艺参数(CPP) 灭活静置起止时间的pH值应被记录确认
pH值回调及深层过滤	• 回调pH值范围 • 深层过滤载量、过滤通量及压力(如需)		

注：*中控检测项可根据产品专属的分析控制策略选择进行日常监控。工艺验证或阶段性批次中加强监测，微生物相关控制见本分册生物制品(单抗)部分“5.5 下游工艺的微生物控制”

D. 阳离子交换层析

阳离子交换层析工序是根据抗体蛋白分子带电荷的特性，与层析介质带电荷的基团，在不同的pH 值和离子强度下，进行结合与解离，实现抗体的精细纯化。该工序主要目的是调节酸性及碱性异构性比例、去除产品相关的杂质(如高分子聚合体或低分子片段)及工艺相关的杂质(如宿主细胞蛋白、宿主细胞DNA、亲和层析介质脱落的Protein A或 Protein G配基等)。

在阳离子层析柱完成装填、清洗、平衡后，将上一工序的收集液(或按需要调节 pH 值及电导之后)上样至层析柱，抗体分子将与层析介质结合，上样结束后，进行阳离子层析柱的后平衡、冲洗(如需要)，然后通过改变电导率和(或)pH 值进行洗脱，根据洗脱峰的紫外吸收值(UV280) 或洗脱的柱体积(CV) 收集目标组分。固定方式收集或分段收集后根据检测结果进行合样。在收集完毕后、需进行层析介质的再生与清洁。

阳离子层析工序常见的工艺参数、性能属性及中控参数见表5-4。

表5-4 阳离子层析工序常见的工艺参数、性能属性及中控参数

生产步骤	操作参数	性能属性或中控参数*	备注
装柱	• 柱高 • 介质使用循环数	●理论塔板数 ●对称因子	
上样	• 前平衡体积 • 载量 • 平衡液及上样样品pH值，电导率 保留时间 • 后平衡体积	• 柱压	需根据蛋白总量计算每批循环数

续表

生产步骤	操作参数	性能属性或中控参数*	备注
洗脱	• 平衡液及洗脱液pH值，电导率 • 洗脱梯度(如适用) • 保留时间 ●样品收集条件(UV280吸收值或CV值) • 洗脱组分的合样方式(如需要)	• 柱压 工序回收率 • 单体纯度(SEC-HPLC) 电荷异质性(CEX-HPLC、cZE或cIEF) • 杂质含量(宿主细胞蛋白，脱落的亲和层析介质配基，宿主细胞DNA等)	

注：*中控检测项可根据产品专属的分析控制策略选择进行日常监控，工艺验证或阶段性批次中加强监测，微生物相关控制见本分册生物制品(单抗)部分“5.5下游工艺的微生物控制”。

阳离子交换层析图谱示意图见图5-3。

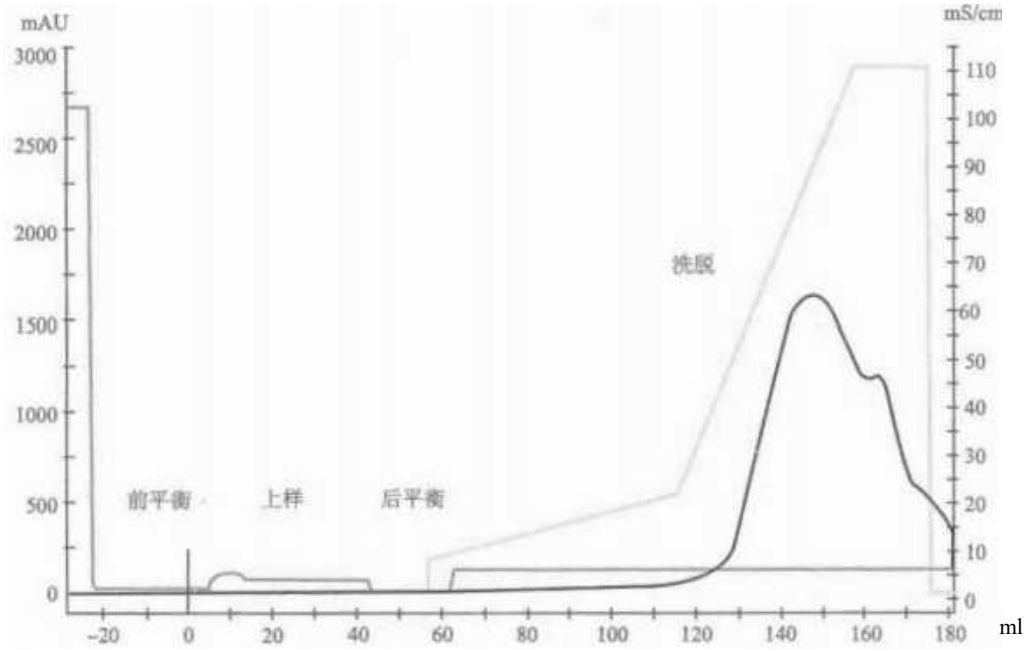


图5-3 阳离子交换层析图谱示意图

阳离子层析收集液(或经合样后收集液)在放置过程中需考虑贮存条件及贮存时限对产品理化性质及微生物负荷影响。企业应根据中间产品稳定性研究结果，结合实际生产情况制定和明确贮存条件和时限。

阳离子交换层析介质在同产品不同批次间重复使用时，需考虑介质的分辨率及可清洁性能的变化，填料的最大使用循环数需根据小试研究数据评估，并在生产规模进行同步确认，每次使用后需进行层析介质的清洁和(或)消毒，清洁与消毒程

序应固定，清洗前后的保存时间应当进行规定。层析介质的在线与离线保存，应规定保存条件(如温度等)、保存液种类和浓度，并定期进行更换。

E. 阴离子交换层析

阴离子交换层析主要是通过介质配基对宿主细胞蛋白(HCP) 及宿主细胞DNA等杂质的吸附作用，实现抗体工艺相关杂质的去除，同时阴离子层析也具有较强的病毒清除功能。常用的平台单抗纯化工艺中，该步骤通常为流穿模式(杂质与病毒分子在上样时与层析介质结合，产品不与介质结合)。根据工艺的开发策略及产品的性质，阴离子交换层析与阳离子交换层析工序顺序并不是固定的，阴离子层析可先于阳离子，同时对于复合型阴离子层析介质，也可用于弱结合模式的梯度洗脱，本节阐述的阴离子层析以流穿模式为例：

在阴离子层析柱完成装填、清洗、平衡后，将上一工序的收集液(或按需要调节pH值和电导之后)上样至阴离子层析柱，抗体分子经流穿模式经过阴离子层析柱，根据洗脱峰的紫外吸收值(UV 280)或洗脱柱体积收集目标组分 在收集完毕后，需进行层析介质的再生与清洁

阴离子层析工序常见的工艺参数、性能属性及中控参数见表5-5。

表5-5 阴离子层析工序常见的工艺参数、性能属性及中控参数

生产步骤	操作参数	性能属性或中控参数申	备注
装柱	• 柱高 • 介质使用循环数	• 理论塔板数 • 对称因子	
上样/洗脱	• 平衡体积 • 载量 • 平衡液及上样样品pH值、电导率 • 洗脱液pH值，电导率 • 保留时间 • 后平衡体积 • 样品收集条件，开始及结束的UV 280吸收值(或CV值)	• 柱压 • 工序回收率 • 单体纯度(SEC-HPLC) • 电荷异质性(CEX-HPLC、CZE或cIEF) • 杂质含量(宿主细胞蛋白，脱落的亲和层析介质配基，宿主细胞DNA等)	需根据蛋白总量计算每批所需循环数

注：单中控检测项可根据产品专属的分析控制策略选择进行日常监控，工艺验证或阶段性批次中加强监测，微生物相关控制见本分册生物制品(单抗)部分“5.5下游工艺的微生物控制”。

阴离子交换层析图谱示意图见图5-4。

阴离子层析收集液在放置过程中需考虑贮存条件及贮存时限对产品理化性质及微生物负荷影响，企业应根据中间产品稳定性研究结果，结合实际生产情况制定贮存条件及贮存时限。

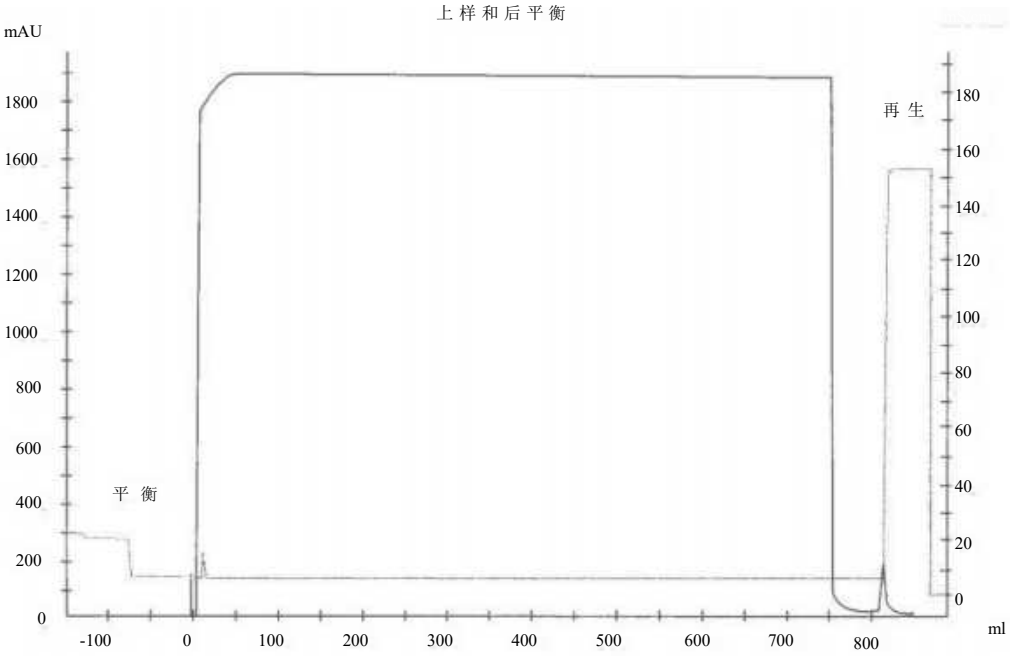


图5-4 阴离子交换层析图谱示意图

阴离子交换层析介质在同产品不同批次间重复使用时，需考虑介质的分辨率及可清洁性能的变化，填料的最大使用次数需根据实验室研究数据及除病毒验证结果评估，并在生产规模进行同步确认，每次使用后需进行层析介质的清洗与消毒，清洗与消毒程序应固定，清洗前后的保存时间应当进行规定。层析介质的在线与离线保存，应规定保存条件(如温度等)、保存液，并定期进行更换。

F. 除病毒过滤

除病毒过滤也称为纳滤，主要通过分子大小拦截作用，采用纳米级的膜对病毒颗粒进行物理截留从而实现病毒去除，即小粒径的蛋白流穿，大颗粒的病毒被截留，与低 pH 值病毒灭活及层析工序去除病毒的原理有所不同。实际生产过程中，几种病毒清除/灭活原理可结合运用，以达到工艺特定的病毒清除目的。

在除病毒过滤系统完成清洁消毒后，将除病毒滤器(膜包)及预过滤器以及相关组件正确安装，根据蛋白溶液体积或蛋白载量计算膜包的最少有效过滤面积，以确定膜包的数量。

除病毒过滤是整个单抗生产工序病毒控制的最后一步，过滤后的收集液应在封闭系统内传输至另一单独区域，通常称为病毒后区域，该区域物理上应与病毒前区域隔开，应采用独立空调系统及人物流。应避免人员从病毒前区域进入病毒后区域，

病毒后区域的设备建议区域专用，或做好清洁与消毒措施，防止产品被再次污染。如病毒过滤后区域无法与过滤前区域完全物理隔离，企业必须采取足够的措施控制病毒污染的风险，如封闭系统、全新风供应、压差梯度、单向人流物流等。

除病毒滤器或膜包在安装后一般使用纯化水或注射用水(或特定冲洗溶剂)进行预冲洗，预冲洗的主要目的是润湿过滤器内的过滤孔道，去除滤器本身的可提取物等相关杂质。

除病毒过滤的效果主要取决于过滤压力及载量，压力太大可能会造成病毒分子的穿透，因此大多数企业在除病毒过滤中采用恒压过滤法，通过膜前后的压差，使产品透过滤膜，而病毒则被截留达到去除病毒的目的。过滤载量需通过可滤性研究获得，并通过病毒过滤验证进行确认。过滤前可用缓冲液进行平衡操作，过滤结束后可使用平衡液将残留在系统及滤器中的料液进行顶洗，以提高工序回收率。

除病毒过滤工序常见的工艺参数、性能属性及中控参数见表5-6。

表5-6 除病毒过滤工序常见的工艺参数、性能属性及中控参数

生产步骤	操作参数	性能属性或中控参数	备注
膜包冲洗与平衡	• 预冲洗压力或流速 • 预冲洗体积 ●前平衡体积		供应商提供指导值，排气、检查密封性、冲洗可提取物杂质
除病毒过滤	• 过滤载量 • 恒压过滤压力 • 后平衡液顶洗体积	• 过滤过程中的压力波动或流速衰减 ●完整性测试 • 工序回收率 • 单体纯度(SEC-HPLC) • 电荷异质性(CEX-HPLC、CZE或cIEF)	过滤载量与压力应通过病毒清除验证确定，影响病毒去除效果的参数一般为关键工艺参数(CPP)

注：*中控检测项可根据产品专属的分析控制策略选择进行日常监控，工艺验证或阶段性批次中加强监测、微生物相关控制见本分册生物制品(单抗)部分“5.5下游工艺的微生物控制”

除病毒过滤结束后，必须采用适当的方法对过滤器(或膜包)进行完整性检查并记录，推荐采用扩散流试验法。完整性测试通过后，中间产品方可进入下一工序生产。

完整性测试应关注以下要点：

●除病毒滤器(膜包)完整性测试的润湿液体一般为纯化水或注射用水。冲洗时间/流速应明确规定，并经过确认。如涉及一些特殊试剂，如胶体金试剂，需要遵守供应商的指导手册。

●应当建立滤器(膜包)完整性测试规程，应明确规定测试标准、最大可重复

测试的次数，如果排除测试操作原因后最终表明滤器完整性失败，应有相应的措施，如评估过滤后料液进入病毒后区域的污染处置情况等。

除病毒过滤工序本身对产品及工艺相关杂质去除无明显作用，但需要考虑过滤工序对蛋白分子结构与性质的影响及外部污染物的引入，如细菌内毒素、过滤器的析出物等。

企业应根据中间产品稳定性研究结果，结合生产实际情况制定除病毒工序后的中间产品贮存条件（贮存温度、贮存时限）。

G. 超滤

超滤浓缩/换液(UF/DF)，是利用切向流过滤 (TFF) 的方式，在一定的压力或流速下，小分子溶质和溶剂可透过一定孔径的膜材，而大分子溶质被截留，利用此原理对除病毒过滤后的中间产品进行纯化，去除分子量较小的物质，同时更换缓冲体系，浓缩目的单抗分子。超滤工艺首先要选择合适截留分子量的膜包，通常30~100kDa, 通过超滤浓缩及换液过程达到工艺设定的目标蛋白浓度及预期的缓冲液体系。根据工艺需要，超滤工序也可以设计在除病毒过滤工序或离子交换工序前，将中间产品的缓冲体系及蛋白浓度调节至适合下一工序需求的范围，超滤工序的工作原理不变。

超滤系统一般包括加压泵、用于固定超滤膜包的夹具、回流罐、液体传输管路、压力表、流量计及用于控制流量与压力的阀门。在超滤膜包安装完毕并对系统及超滤膜包执行清洁消毒后，需要对膜包进行完整性测试。企业应当建立超滤膜包完整性测试规程，根据膜包厂家提供的使用手册进行完整性测试。

生产开始前需平衡超滤系统，然后开始超滤工序，通常包含三个阶段：浓缩、换液及产品回收。

最先进行的是样品的浓缩，常规的控制方式有：流速+跨膜压(TMP)、压力增量 (Delta P)+跨膜压(TMP)。通过调节超滤膜进口流速（或控制透过端、回流端流速）、回流端阀门开度来控制相关的参数。样品的浓缩过程中应关注压力、温度及回流罐内液位等变化，循环罐工作体积需要满足料液的最小可循环体积工作要求。

换液是以满足料液的溶剂属性与最终原液或添加保护剂前的原液溶剂属性保持一致，换液后的溶剂会带入最终产品中，因此配制超滤置换液所需物料需满足辅料的质量标准。换液是通过透出液在滤出端去除，在料液罐中加入另外一种缓冲液（置换液）循环置换完成的。常规的控制方式有：流速+跨膜压(TMP)、压力增量 (Delta P)+跨膜压 (TMP)。

产品回收是通过驱动泵将回流罐、超滤管路及膜包内的产品转移至贮存容器中。企业可根据自身产品的工艺特性适当增加冲洗步骤，提高工序回收率。

超滤工序常见的工艺参数、性能属性及中控参数见表5-7。

表5-7 超滤工序常见的工艺参数、性能属性及中控参数

生产步骤	操作参数	性能属性或中控参数*	备注
超滤膜包平衡	• 平衡体积 • 跨膜压(TMP) • 压力增量(DeltaP) • 膜包面积(或载量)	●完整性测试	根据蛋白总量和载量确定工艺所需的膜包面积(数量)
浓缩	• 浓缩终点浓度或体积 • TMP • Delta P • 流速	• 回流液蛋白含量	超滤过程中的剪切力及高浓度环境可能会导致蛋白聚合体产生 电荷异质性如无明显变化，可考虑不用监测
换液	• 目标换液倍数 • TMP • Delta P • 流速	• 回流液蛋白含量 • 透过液pH值或电导率值	
产品回收	• 超滤后顶洗体积	• 工序回收率 • 电荷异质性(CEX-HPLC或CZE、iclEF) • 单体纯度(SEC-HPLC)	

注：*中控检测项可根据产品专属的分析控制策略选择进行日常监控，工艺验证或阶段性批次中加强监测，微生物相关控制见本分册生物制品(单抗)部分“5.5 下游工艺的微生物控制”。

超滤工序生产结束后，超滤系统及膜包需要进行清洗。超滤膜包在同产品批次间重复使用时，需考虑膜包的通量及可清洁性能的变化。膜包的最大使用次数或更换标准需基于实验室研究数据评估，并进行生产规模的同步确认。超滤膜包每次安装后，使用前需进行清洗操作，清洗液在一段时间内接触整个系统的所有部件，包括膜的内表面，实现膜与系统的清洁、消毒和冲洗。膜包使用后应先使用平衡液或注射用水预冲洗，避免膜包内的残留蛋白直接接触碱液变性，降低膜包的清洗效果。对于重复使用的超滤膜包，需在生产结束清洗消毒后向膜组件内泵入保存介质。使用后的超滤膜的保存条件、保存液种类以及保存液更换频率需有效抑制微生物的滋生，应避免超滤膜包长时间干燥状态下贮存。当超滤系统因为生产周期切换、产品切换、预防性保养/维修等操作，其内部管路、接口等被打开暴露在环境后，应考虑进行增强的清洁/消毒程序，然后再用保存液保存。

企业应根据中间产品稳定性研究结果，结合实际生产情况制定超滤浓缩液中间产品贮存条件(贮存温度、贮存时限)。

H. 原液配制、过滤、分装及贮存

超滤浓缩液蛋白含量较高，需要添加一定量的蛋白保护剂，并将蛋白浓度稀释至目标范围(或与最终制剂浓度相同)。搅拌均匀后，进行0.2μm 减菌过滤，并分装至合适的容器中，即成为原液，原液通常需冷藏或冷冻贮存。

原液配制、过滤及分装工序常见的工艺参数、性能属性及中控参数见表5-8。

表5-8 原液配制、过滤及分装工序常见的工艺参数、性能属性及中控参数

生产步骤	操作参数	性能属性或中控参数*	备注
配制	●辅料的添加量，如聚山梨酯，海藻糖等 ●搅拌转速，时间 ●温度控制(如需要)	·滤器完整性测试 ·蛋白含量 ●摩尔渗透压、pH值 ●聚山梨酯含量(如适用) ●微生物负荷 ●细菌内毒素 ·电荷异质性(CEX-HPLC, CZE或cIEF等) ●单体纯度(SEC-HPLC)	配制完成后中间产品的质量属性的检测可在原液放行项中体现
0.2μm 减菌过滤	·过滤流速(或压力)过滤载量 ·工艺时长		
分装、贮存	·分装体积 ·冷冻温度(如需要) ●分装操作时长		

注：*中控检测项可根据产品专属的分析控制策略选择进行日常监控，工艺验证或阶段性批次中加强监测，微生物相关控制见本分册生物制品(单抗)部分“5.5下游工艺的微生物控制”。

原液配制过程除中间产品质量属性，同时需考虑所添加辅料的质量控制，如辅料的含量及化学稳定性、细菌内毒素、微生物限度等。对聚山梨酯类辅料应考虑其易氧化及水解的特性，需制定相应的使用策略，如限定单包装重复使用的次数等。同时，原液配制完成后过滤前蛋白含量、渗透压、细菌内毒素及微生物负荷等性质可通过风险评估后确定监控措施，同时应关注过滤器的吸附作用。

单抗原液通常会直接(或经稀释后)进行除菌过滤及无菌灌装成制剂成品，因此在原液的过滤、分装及贮存过程中需关注以下要点：

●分装过程的环境控制，过滤后端的敞口操作推荐在C 级背景下A 级送风环境中进行，或采用密闭系统进行分装。

●配制、过滤及分装的总时长，需关注过滤器材质的相容性及尽可能避免或缓解辅料添加后原液的低内毒素回收(low endotoxin recovery,LER)现象。

●原液的贮存应考虑原液与容器的相容性、原液的长期稳定性及保存时间；贮存条件和有效期需足够的数据支持。

●需冷冻贮存的原液应考虑冻融温度及升/降温速率对蛋白的影响，冻融次数、

贮存条件和有效期需足够的数据支持。

e 原液在转运过程中要考虑温度、振荡剪切力、光照(如适用)等对蛋白的影响，以及原液贮存包装的完整性。

如制剂灌装工艺涉及多批原液合并生产半成品，需明确规定每批原液应在有效期内，每批原液应按规定的工艺生产、单独检验，并符合相应质量标准。企业应制定原液并批和使用的原则，如半成品投料最多不超过几批、遵循先进先出的原则等。不得将不合格批次与其他合格批次原液进行混合制备半成品。混合的各批原液应可有效追溯，应对混合工艺进行验证。

I. 返 工

返工是指将某一生产工序生产的不符合质量标准的一批中间产品或待包装产品、成品的一部分或全部返回到之前的工序，采用相同的生产工艺进行再次加工，以符合预定的质量标准。

参考PDA 第74号报告Reprocessing ofBiopharmaceuticals(《生物制药返工》),

返工(或重复执行已存在的某个生产工序)需要精心设计的程序和支持性的数据，以补充已完成的生产工艺验证。最重要的是，支持性研究数据必须高度保证产品的质量，即返工生产的原液具有与未返工批次同等的质量(comparable　quality)

原则上，只要能提供足够的数据支持，证明返工操作能够持续生产出与标准工艺相同的，且符合预定质量标准的原液，几乎任何操作工序都可以考虑进行潜在的返工。单抗原液的生产过程中，对于一些简单的操作工序，如因完整性测试失败引起的除菌或除病毒过滤工序的返工，容易被监管机构或行业界理解和接受。

基于产品的生产工艺特点、使用目的和风险、涉及市场的法规许可要求，商业化和临床试验阶段生产的返工操作要求可能会不同。临床试验产品的生产仍属于生产工艺的设计阶段，有返工操作的可能。如果发生偏差，在确认偏差发生原因，进行必要的风险评估并制定返工方案、取样以及检测策略后，可进行返工。同时应评估产品的质量和安全性，为后续的工艺性能确认及商业化生产收集必要的数据支持。任何的临床阶段生产的返工过程应有详细记录。

确定商业化生产工艺时，应根据工艺表征研究结果，回顾相关的生产或工艺开发历史，主动考虑可能的返工情况。定义为返工的情况必须是偶发事件，由特殊的原因造成，例如：设备机械故障、泄漏，过滤器(膜包)完整性测试失败，或因偶发的特殊原因导致过滤操作未完全按照预定工艺进行，原液过滤后暂存容器破损等情况等。准备充足的支持性数据，证明对产品质量的影响较低。需强调的是，频繁需要进行

返工的生产工艺通常会被认为是工艺控制能力不足，工艺无法维持在验证状态内。

返工需有明确的适用范围，以下情况一般不允许返工：

●产品没有通过无菌/微生物限度/内毒素限度要求。

●返工范围和(或)次数超过最大允许的次数。

●待分装原液不符合既定的质量标准要求，判定为不合格。

对于已经完成过滤的培养基、缓冲液(统称溶液)及中间产品，由于一次性袋子渗漏，为防止环境微生物侵入并滋生，经试验研究或评估对工艺影响较低的情况下，可进行再过滤，并建立相应的操作规程。

对于关键工序的返工，基于监管部门要求，可将需要的返工工序，以及相应的研究数据及必要的确认方案包含在注册文件中，以获得该工序的注册许可。

设计与执行返工操作时，推荐按以下程序及关注点进行：

●对操作工序执行前瞻性技术风险评估(如 FMEA)， 结合工序的设计目的，与产品关键质量属性的关联度，识别可能需要返工的工序，建立返工的触发条件或中控检测，如滤器完整性测试等。

●设计生产规模返工的程序，包含所有的设备，工艺参数、与相邻操作工序的衔接、返工前/后的相关程序(平衡、清洁消毒等)及工艺控制。应特别关注如何将待返工的中间产品与所需设备恢复到适合进行返工工序的起始条件。如调节中间产品的体积、pH 值、蛋白浓度、电导率等。

●设计评估以考察更广范围的影响，如车间布局设计、除病毒前后区域的隔离、公用系统的消耗、生产计划等。

●评估识别可能会因返工受影响的产品质量属性，关注产品的降解或聚集机理、与耗材表面的吸附、化学析出物、中间产品放置时间、冻融(如有)等对最终产品稳定性的影响。

●识别或开发额外的分析方法，以监控返工工序前后产品关键质量的变化，如比较受影响的返工批次和未进行返工批次的纯度差异，建立可比性接受标准。

●设计并确认缩小规模的返工模型，用代表性料液进行相应的返工研究。分析评估研究结果，确认是否满足所有预先确定的可比性接受标准；是否符合工艺参数操作范围；中间产品、原液及制剂成品的稳定性是否受影响。注册申报资料里包含足够的缩小模型的研究数据可减少监管部门对额外的生产规模数据的需求。

●建立生产规模的工艺验证方案，可比性研究方案及稳定性研究方案(如需要)。包含返工的触发条件，允许的最长返工时间，返工的最大次数，附加的中控检测及可接受标准以证明产品是可比的，稳定性研究策略等。在首次市场许可的注册申报

中包含以上方案。如未在首次上市许可注册申报中包含，建议通过补充申请方式与监管部门沟通。

●当生产过程中触发返工后，按预先提交的方案执行返工，总结分析相关数据，形成验证报告及可比性研究报告(如需),向监管机构报告或备案。

实例分析

实例1:某单抗产品下游纯化主要工序及参数分级控制

表5-9列举了单抗产品下游常见的关键和重要工艺参数(根据工艺表征结果及参数分类定义确定):

表5-9 某单抗产品下游纯化主要工序及参数分级控制

工艺步骤	工艺参数	分级*	参数范围	考量点
亲和层析	载量	KPP	≤45g/L	工艺一致性、杂质去除效率
	上样保留时间	KPP	5.0~7.0min	工艺一致性、杂质去除效率
	洗脱液pH值	CPP	2.8~3.2	产品质量、目的产品洗脱效率
低pH值病毒灭活	灭活pH值	CPP	3.0~4.0	病毒灭活效果、产品质量
	灭活时间	CPP	≥60min	病毒灭活效果
	灭活温度	CPP	18~25℃	病毒灭活效果
阳离子层析	柱高	KPP	15~25cm	工艺一致性，杂质去除效率
	载量	CPP	32~46g/L	产品质量，工序回收率
	洗脱液ApH值	CPP	6.5~7.0	产品质量，杂质去除效率
	洗脱液B pH值	CPP	6.5~7.0	产品质量
	洗脱液A电导率	CPP	1.8~2.2mS/cm	产品质量，杂质去除效率
	洗脱液B电导率	CPP	8.0~9.0mS/cm	产品质量
	洗脱梯度	KPP	20.0%~80.0%B 25.0CV	工艺一致性
阴离子层析	载量	CPP	≤300g/L	病毒去除效果
	上样样品pH值	KPP	6.5~7.0	工艺一致性
	上样样品电导率	KPP	7.0~9.0mS/cm	工艺一致性
	上样/平衡保留时间	CPP	4.0~6.0min	病毒去除效果，杂质去除效率

续表

工艺步骤	工艺参数	分级*	参数范围	考量点
除病毒过滤	过滤载量	CPP	≤900L/㎡	病毒去除效果
	过滤压力	CPP	≤0.20MPa	病毒去除效果
	滤器完整性	CPP	通过	病毒去除效果
超滤浓缩换液	TMP	KPP	≤0.10MPa	工艺一致性
	Delta P	KPP	≤0.10MPa	工艺一致性
	置换液pH	KPP	5.70~6.30	工艺一致性
	换液体积倍数	KPP	8~12	工艺一致性
原液配制、过滤及分装	搅拌转速	KPP	150~200r/min	工艺一致性
	搅拌时间	KPP	15~30min	工艺一致性
	0.2μm过滤流速	KPP	≤4L/min	微生物负荷控制
	滤器完整性	KPP	通过	微生物负荷控制
	冷冻温度	CPP	≤-35℃	产品质量

注：*参数的分类级别取决于工艺风险评估及表征的研究结果。

实例2:除病毒过滤工序返工

(1)事件在除病毒过滤工序完成后，除病毒膜包的使用后完整性测试失败，此结果将会影响产品放行。可通过一个新的除病毒膜包重新过滤，以确保有效地清除病毒。然而，此返工程序由于增加工艺时间，中间产品再次通过除病毒膜包，可能会对产品质量产生影响。

(2)考虑点 工艺开发阶段，使用具有代表性的缩小模型及代表性料液进行实验室规模的研究，以评估病毒过滤后中间产品再次通过膜包对产品质量的潜在影响。研究从生产规模的不同批次中取病毒过滤后的中间产品料液。每批料液均在实验室规模上依次通过两套新的、完整的除病毒过滤器进行重新过滤，以代表更差情况。研究数据证实，再过滤对产品收率及产品质量无明显影响，与未经重复过滤的中间产品纯度无明显差异，符合预定的可比性接受标准。

(3)解决方案

①将实验室规模重复过滤研究的结果作为支持性数据体现在首次上市许可的注册申报资料中，同时提交一份生产规模重复过滤的验证方案。用于监管部门审核评估并预先批准，以便后续在商业化生产批次中按该方案执行。

验证方案包含要点：

o 执行重复除病毒过滤工序的适用条件，如滤器完整性测试失败、过滤器后端的密封性破坏，或未进行正确的单元操作，

●重复过滤确认的可接受标准，例如：该工序的CPP 、KPP均控制在可接受范围内；加强检测重复过滤前后中间产品的质量属性，如分子排阻高效液相色谱(SEC-HPLC)、 阳离子交换高效液相色谱(CEX-HPLC) 等，并设定可接受标准；返工后的原液放行检测符合要求。

0确定返工批次原液稳定性研究策略。

②调查膜包完整性测试失败的原因，并对需要执行的返工操作进行全面的质量风险评估，包括对中间产品质量的影响，除病毒过滤失败的中间产品在进入病毒后区域的容器密封性，中间产品转运至病毒前区域的方式，中间产品再次过滤前的样品预处理方式等。结合重复过滤的小规模研究数据，评估确认对产品质量风险较低的情况下，经质量部门批准后，方可执行返工。

③严格按监管部门预先批准的方案执行除病毒过滤的返工操作，在收集相应的工艺及质量数据后，确认所有关键工艺参数，关键质量属性均符合相应的接受标准，形成工艺验证总结报告及可比性研究报告。

④按监管部门的要求进行上市后报告(备案或年报),放行该批次产品

5.3下游中间产品稳定性

下游各生产工序之间通常是不连续的，工序之间有一定的时间间隔，同时，部分工序会设计成多个循环，如层析、超滤等。因此，含有单抗的中间产品不可避免地需要在室温(或2~8℃冷藏)环境中放置，基于中间产品理化性质与微生物负荷控制的考虑，需要结合企业实际情况制定中间产品放置条件与时限。

中间产品稳定性考察应根据实际工艺特点，基于科学与风险的评估后确定，通常需要考虑的中间产品包括：上游澄清收获液、低pH 值病毒灭活收集液、离子交换层析收集液、除病毒过滤收集液、超滤工序收集液等。如原液生产过程中使用的是一次性储存系统，则需要考虑储存容器的接触层材质、比表面积、光照条件(如适用)、环境温度、容器密封状况等，原液生产阶段的中间产品理化稳定性可采用缩小模型进行研究。

应根据中间产品的理化稳定性数据来确认各工序之间的最长间隔时间。如工序或工序间隔时长超过24小时， 一般会结合中间产品微生物负荷控制要求，具体见本

分册生物制品(单抗)部分“5.5下游工艺的微生物控制”。

中间产品稳定性确认所涉及的产品相关检测项目含单体纯度[SEC-HPLC、十二烷基硫酸钠毛细管电泳(CE-SDS)]、 电荷异质性(CEX-HPLC 或CZE、iCIEF)、游离巯基(如适用)及生物学活性[酶联免疫吸附(ELISA) 测定结合活性]等。通常稳定性确认的标准是放置期间内无明显变化或变化趋势控制在一定范围内，并符合下一工序的控制要求。

5.4下游病毒安全控制

下游生产过程中病毒安全需从控制病毒污染源的意外引入以及建立有效病毒灭活/去除工艺两方面进行。其中病毒污染源引入控制可从人员、设备设施、起始原材料、辅料、耗材、细胞培养过程及中控检测等方面进行控制，详见本分册生物制品(单抗)部分“2.6污染控制”。本节主要讨论建立有效的病毒灭活/去除工艺。

实施指导

单抗药物下游纯化工艺中的病毒灭活/清除步骤的效果需要通过缩小规模的生产体系，选择有代表性的模型病毒进行病毒灭活/清除的验证，根据测试结果评价生产工艺消除病毒的总体能力。

A. 模型病毒选择

模型病毒的选择应遵循与可能污染产品的相关病毒尽可能相似且要有广泛理化特性的原则。根据ICH Q5A,可供选择的指示病毒分为三类：“相关”病毒、“特异性”模型病毒、“非特异性”模型病毒。

● “相关”病毒是指已被鉴定的病毒或其同类型病毒，或是可能会污染细胞或生产过程中使用的其他材料或试剂的病毒。

● “特异性”模型病毒与“相关”病毒密切相关，是与已知病毒或可疑病毒相关，并与其具有类似理化特性的病毒。

● “非特异性”模型病毒是用来为生产工艺去除病毒能力定性的病毒，其目的是对生产过程去除/灭活病毒的总体能力进行定性，即确定纯化工艺的能力。

应优先选择与潜在污染病毒密切相关的病毒，如相关病毒不能获取或不适于体

外培养(如不能离体培养到足够高的滴度),可采用“特异性”模型病毒代替；评价病毒清除的总能力时，应选择具有不同特性的“非特异性”模型病毒，包括DNA/RNA、有/无包膜、颗粒大小，尤其对物理/化学处理明显耐受的病毒等。此外，还应考虑指示病毒的实验毒株与自然毒株及其他毒株之间可能存在的差异，在其他特性相同的前提下应优先选择抵抗力强的毒株。当研究目的是为了确定生产工艺灭活/去除病毒的总体能力，如需要确证病毒去除工艺的稳健性时，应使用具有不同特性的“非特异性”模型病毒进行病毒清除验证研究。(表5-10)

表5-10 四种常见指示病毒的特征

病毒	科属	基因组	脂包膜	大小(nm)	物理化学抗性
小鼠白血病病毒(x-MuLV)	C类逆转录病毒	RNA	有	80~110	低
伪狂犬病毒(PRV)	疱疹病毒	DNA	有	120~200	中
呼肠孤病毒3型(Reo-3)	呼肠孤病毒	RNA	无	60~80	中
鼠细小病毒(MVM)	细小病毒	DNA	无	18~24	很高

B. 病毒清除验证最差条件

病毒清除验证采用可代表生产规模的缩小模型进行，缩小版的纯化水平应尽可能代表生产工艺，如层析设备、层析介质、层析柱高、线性流速、过柱时间、缓冲液 、pH 值、温度、蛋白浓度、盐及产品均应代表生产规模水平，应有一个类似的洗脱方案。同时缩小模型设计需考虑采用病毒灭活/清除的最差条件，用于证明最差条件下病毒的灭活/清除能力。

通常采用的最差条件示例见表5-11。

表5-11 病毒清除验证各工序最差条件

工序	最差条件	备注
低pH值病毒灭活	• pH值上限 • 灭活时间下限 • 灭活温度下限	对于不确定是否为最差条件的参数，建议采用与实际生产工艺一致的参数进行验证 对于除病毒工序，暂停点需结合生产实际情况进行设计
有机溶剂/去污剂(S/D)灭活	• S/D浓度下限 • 灭活时间下限 • 灭活温度下限	

续表

工序	最差条件	备注
亲和层析	●扩展收集	对于不确定是否为最差条件的参数，建议采用与实际生产工艺一致的参数进行验证 对于除病毒工序，暂停点需结合生产实际情况进行设计
阳离子层析	• 扩展收集	
阴离子层析 (以流穿模式为例)	• 上样载量上限 • 扩展收集	
疏水层析	• 扩展收集	
除病毒过滤	• 过滤载量上限 • 泄压暂停情况(如适用) • 过滤压力上限	

C. 病毒清除验证阶段性的要求

病毒清除验证在不同阶段的要求也不同，如临床试验申请阶段、临床阶段、上市申请阶段。表5-12列出了国内外在不同阶段对于病毒清除验证的技术要求。

表5-12 临床及上市申报阶段病毒清除验证的要求

工艺步骤	NMPA/EMA/美国FDA早期临床生产(IND)申报工艺	NMPA/EMA/美国FDA后期商业化生产(NDA)申报工艺
低pH值病毒灭活或去污剂(S/D)灭活	重复两次试验 一种病毒(指示病毒MuLV)	重复两次试验 两种病毒(指示病毒MuLV、PRV)
层析工序	重复两次试验 两种病毒(指示病毒MuLV、MVM) 通常只考察一步病毒去除能力最强的阴离子层析	重复两次试验 四种病毒(指示病毒MuLV、PRV、Reo-3、MVM) 需评估旧填料的病毒清除能力以及病毒残留
除病毒过滤	重复两次试验 两种病毒(指示病毒MuLV、MVM)	重复两次试验 四种病毒(指示病毒MuLV、PRV、Reo-3、MVM)

D. 整体病毒灭活/清除能力评估

建议设计一种清除多种潜在病毒污染物的下游工艺。在这种情况下，在可行且不对产品产生不利影响的情况下，实施两个不同的有效步骤，这些步骤在作用方式上相互补充。其中一个生产步骤应能有效清除无包膜病毒。

整体病毒灭活/清除能力评估需先分析或评估单个工序的病毒灭活/清除能力，

判断其是否为有效的病毒清除步骤或有部分清除病毒能力的步骤或没有清除能力的步骤。 一般病毒清除值大于4log被认为是有效的病毒去除步骤，1~3log 被认为有部分病毒清除能力的步骤，小于1log被认为没有病毒清除能力，且不计入整体清除能力的计算。

其次，层析工序需结合不同阶段收集液的检测结果，分析被清除病毒的分布以及分析残留实验(carryover) 结果用于判断清除效果。另外，由于层析介质的寿命可能会影响病毒清除效果，因此需要考察旧介质的病毒清除能力，且需要对比分析新旧介质病毒清除能力的差异

最后需要整体计算每个成品剂量里潜在的病毒颗粒数量，该计算仅适用于起始数目可以估算的病毒，如内源性逆转录病毒。细胞收获液中的逆转录病毒数量可以通过透射电镜进行检测，然后根据每个剂量的成品所需要的细胞收获液体积计算出每剂量终产品中的引入的病毒总量， 一般需低于百万分之一，即一百万剂量中出现一颗病毒。详细计算见以下示例

0每成品剂量含病毒颗粒估算方法 (ICHQ5A 附 录 5 ）

适用于起始数目可以估算的病毒，如内源性逆转录病毒。举例：

假设细胞培养收获液中，病毒测得或估计的浓度=10° %ml

计算得病毒消除因子≥10^{15}

一个剂量的产品所需的培养收获液体积=IL(10^3ml)

每剂量颗粒的估算

$$\frac{(10^6\text{病毒颗粒/ml})\times(10^3\text{ml/剂量})}{\text{消除因子}>10^{15}}\quad\frac{10^9\text{病毒颗粒/剂量}}{\text{消除因子}>10^{15}}=<10^{-6}\text{病毒颗粒/剂量}$$

因此，可以预计每一百万剂量中的病毒颗粒数少于一个。

E. 应用先验知识评价病毒清除率

作为一般原则，当将病毒添加到待研究的每个步骤的产品特定中间体物料中时，可通过实验评价病毒清除率。当生产企业通过已建立且经过充分表征的工艺(如使用相同的平台技术)开发类似产品时，为其他产品得到的病毒清除数据可能适用于同一工艺步骤的新产品。但是，为了使用这一数据，必须充分理解工艺步骤。特定工艺步骤的先验知识的代表性应得到明确的证明。由外部和内部经验组成的先验知识应涵盖以下方面：

●应了解病毒清除的潜在机制。

●应了解所有可能影响病毒清除的工艺参数。

●应明确病毒和产品之间的相互作用不影响病毒清除。

●特定工艺中间体的组成可能会影响病毒清除率。对于某些工艺步骤，即使是缓冲液、培养基、试剂、杂质水平组合的微小差异，也可能显著影响病毒清除率。因此，应证明其他产品的工艺中间体组合的代表性。此外，除非先验知识表明工艺中间体组合的病毒清除稳健性，否则在新产品和既有产品在特定步骤之前的处理应遵循类似的策略。

●当将先验知识应用于特定产品时，应考虑病毒清除研究的一般局限性。

外部先验知识(包括已发表的数据)也可以支持指示灭活/去除病毒步骤的潜力，并可以提供对所涉及机制的深入了解。这些数据还可用于定义关键工艺参数，以及为特定病毒清除步骤中的检测设定最差情况限度。

F. 生产过程的控制

生产过程中应该严格按GMP要求执行，根据产品的特性、工艺、预定用途和设备等因素，使用风险评估的手段，采取相应的措施以预防差错及交叉污染，如使用专用厂房和设备、阶段性生产方式、使用密闭系统等。尽量避免同一设备用于不同阶段的纯化操作。应对共用的设备采取适当的清洁和消毒措施，并对清洁和消毒的效果进行验证，应特别关注病毒后区域是否被污染，防止病毒通过设备或环境由病毒前区域带入病毒后的产品中。

企业应该按照经核准的标准对相关原辅料、中间产品、缓冲液等实施质量管理和控制，并采取必要的措施，防止病毒灭活/去除后的产品被污染。

G. 病毒安全保障的持续改进

生产企业应密切跟踪药品的病毒安全情况，确保病毒安全风险受控。应持续关注新的病毒去除/灭活技术，通过病毒清除技术和检测手段的优化改进，不断提升病毒安全性保障。

由于科学技术的进步、法规制度的完善、市场的变化以及企业自身生产条件的改变等，单抗生物制品上市后进行持续改进，工艺变更不可避免。当生产或纯化工艺发生重大变化时，要考虑这种变化对病毒清除直接和间接的影响，必要时应对该工艺进行再评价。可以使用内部经验和平台知识评价可能影响病毒清除功效的生产工艺变更。如果其他产品的内部知识(内部经验)不能外推到具体产品和(或)不能再适用平台知识，则必须进行具体产品的病毒清除率研究。

5.5下游工艺的微生物控制

背景介绍

单抗下游生产过程为控制微生物负荷的非无菌生产工艺，常规的层析、病毒清除/灭活、超滤换液、原液配制、过滤、分装及贮存等工序无法具有与化学或蒸汽灭菌相同的灭菌能力，而且单抗药物最终的给药方式以注射方式为主，如中间产品微生物负荷过高，会对产品的质量与患者的安全构成风险。例如：某些微生物产生的酶会降解产品有效组分，影响效价；微生物产生的异源蛋白在体内会产生免疫原性，产生的内毒素、外毒素、外源DNA 等会对人体产生不良反应；微生物负荷过高会对最终产品的无菌性产生影响等。因此对下游生产过程的微生物负荷和细菌内毒素的控制要求相对较高。

《中国药典》三部人用重组单克隆抗体制品总论明确要求应对工艺过程中微生物污染进行监控(如微生物限度、细菌内毒素检查等)。

单抗的下游生产过程中存在液体中间产品贮存、中性的缓冲体系、营养物质丰富、常温的生产过程、重复使用的设备、层析介质与膜包、复杂的操作工序、部分操作非封闭等特点，而这些因素都为微生物的引入及增殖提供了有利条件。所以，在下游生产过程中对微生物负荷的监控尤为关键。

实施指导

A. 风险评估

基于科学的风险评估是建立微生物控制措施的基础，风险评估应由相关职能部门共同参与，并需要在生产开始之前完成(如工艺设计阶段)。风险评估有多种工具，如FMEA、流程图、鱼骨图等，所选择的风险评估方式应适用于工艺和产品。通过风险评估来识别、评估下游生产过程中潜在的污染风险，并针对性的实施控制措施以降低风险。

全面的微生物控制涉及厂房、设施、设备、人员、物料及工艺等，企业应建立完整的质量管理体系，应有相应的控制规程，以保证生产环境具有良好的微生物控制水平。

从下游工艺设计开始，即应考虑工艺过程中微生物的控制风险点。在进行风险评估时，需关注以下要点：

●缓冲液的配制：缓冲液是污染引入产品的可能性途径之一，配制缓冲液的原材料入厂检验需考虑微生物及细菌内毒素限度，缓冲液配制用水一般为纯化水或注射用水。同时，基于缓冲液组成中的营养成分、使用工序，应分析评估决定缓冲液配制后的过滤及过滤时限要求、缓冲液贮存容器、环境条件、贮存时限、是否需要使用前的放行检测等。

●设备及贮存容器：不锈钢贮存及传输系统需关注清洁消毒及消毒后保持时间对微生物增殖的影响、中间产品贮存过程中的容器密封性等。相对于不锈钢系统，使用经预先辐射灭菌的一次性搅拌及储液袋、过滤器、液体传输管路，可有效降低过程中微生物引入的途径与几率。

●生产环境及工艺设计：生产流程设计应考虑工艺的实际情况，如操作环境、营养成分、是否封闭操作等，如澄清过滤后的中间产品富含培养基成分，需要尽快处理，同时开放操作应当最大可能避免，以减少微生物的侵入。因生物制品的中间产品无法通过化学、高温灭菌等直接灭菌方式控制微生物，下游生产各操作工序结束后，应根据实际工艺的风险情况进行评估，可采用低温暂存或0.2μm过滤中间产品的方式进行微生物负荷控制。

●中间产品暂存时长及暂存条件：暂存时长在生产过程中是一个重要考虑因素，因残留的微生物会随时长而进行增殖，暂存时长应成为生产风险评估的一部分。影响暂存时长内中间产品或缓冲液中微生物繁殖的因素有：基础微生物负荷、营养成分以及暂存条件(如温度、容器密封性、暂存环境)等。

企业应基于科学与风险，评估确定缓冲液、中间产品的暂存条件及暂存时限，必要时，进行生产环境和规模下的最大暂存时长确认，或采用有利于微生物生长的模拟物代替中间产品进行确认。同时，企业应建立对中间产品进行日常微生物和细菌内毒素监测的计划。

B. 中间产品微生物的监控计划

为考察生产过程中微生物分布情况，企业应制定全面的微生物监控计划。基于工艺特点，设备使用情况、已有的历史生产数据，综合进行风险评估，确定生产过程的代表性的监控取样点和取样频率。取样点的设计推荐从以下方面考虑：

●缓冲液配制：除特殊原因(如抑制微生物生长)外，推荐缓冲液经过滤后使用。对于过滤后的缓冲液，如有必要，应选择具有代表性的缓冲液进行适当批次的

微生物和细菌内毒素的监测，以评估缓冲液的微生物水平及放置过程中的变化情况。建议对层析之后的工序，如除病毒过滤、超滤浓缩换液、原液配制等工序所用的关键溶液增加细菌内毒素的控制或作为日常监测，在配制后或使用前监测细菌内毒素水平。

对于不经过滤的缓冲液原则上现配现用，并评估缓冲液的用途和关键程度，进行适当批次的微生物负荷和细菌内毒素监控，以评估现有生产过程的微生物控制能力。

e 层析纯化、除病毒过滤、超滤浓缩换液：下游各生产工序开始前或结束后，相关设备、层析介质和超滤膜包应执行清洁消毒操作。为了监测设备/系统、层析介质或膜包在清洁消毒后微生物负荷和细菌内毒素水平，推荐企业结合工艺的实际情况，在生产过程中持续进行，监测取样点的代表性及取样频率经风险评估后确定。

下游生产的每个操作工序结束后可根据评估决定是否需对中间产品进行0.2μm过滤以降低微生物负荷，中间产品在与重复使用的设备、层析介质和膜包等物品接触后，微生物及细菌内毒素可能会从介质、膜包或设备中引入，而下游生产工序间通常是非连续性的，过滤后的中间产品需要暂存等待下一工序，为更好地考察重复使用物品的消毒效果，暂存容器及环境对微生物负荷的影响，可选择在中间产品过滤前及过滤后暂存的最长时间点作为最差条件进行取样，进行微生物监测：

●原液配制、分装工序：原液配制工序涉及的辅料添加方式、配制操作方式、配制环境与操作时间均有可能引起微生物负荷变化，可选取过滤前的原液进行微生物加强检测，或作为日常监测。原液过滤完成后，应对过滤器的完整性进行测试，以保证原液过滤的有效性。根据不同项目的工艺需求，原液的分装与贮存有多种操作方式，原液的微生物与细菌内毒素的监测取样应经过充分评估，取样位点和取样时间的设定应考虑取样的代表性、取样过程的风险以及分装操作的特点(如密闭系统分装或层流环境下敞口分装，分装至一个容器或分装到多个容器等)。

●取样和检测

取样方法：为保证取样不会受到微生物污染造成假阳性结果，应尽量避免开放的取样方式，推荐使用无菌的取样器或热塑管焊接进行取样，细菌内毒素样品的取样，应使用合适的低内毒素吸附的除热原容器，以防止假阳性或假阴性的结果。

考虑微生物在溶液环境中的不均匀性，微生物负荷检验取样体积应经过合理评估确定，以确保具有代表性。

应考虑微生物负荷检测样品的时效性。样品通常需放置在低温环境下

(2~8℃)暂存，企业需经过风险评估，明确规定检测样品允许的放置时间。在检测前应记录追踪样品的取样时间、转移方式及保存条件。

o 微生物检查方法：微生物限度检查可参照《中国药典》通则1105非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法，也可使用替代的快速检测方法，方法建立需要进行确认，参照《中国药典》指导原则9201药品微生物检验替代方法验证指导原则，现有快速检测方法列举见表5-13。

表5-13 快速微生物检测方法列表

检测类型	检查方法
定性方法	生物发光技术 电化学技术 比浊法等
定量方法	固相细胞计数法 流式细胞计数法 直接荧光技术等
基于微生物细胞所含特定组成成分的分析技术	脂肪酸测定技术 核酸扩增技术 基因组鉴定技术 质谱技术 基因指纹分析技术等

●推荐的控制限度：生产过程中的微生物相关可接受标准(微生物限度、细菌内毒素)应根据目标产品概况、过程能力以及临床使用要求综合考虑制定，该标准可反映工序对微生物的去除能力，如层析可以一定程度上去除细菌内毒素，过滤可降低微生物负荷。通过持续监控，在达到一定批次后，应周期性对数据进行回顾以对生物负荷及细菌内毒素的内控范围进行再评价，控制限度应根据回顾结果进行更新。当结果超过限度时，应进行调查并评估对产品质量的潜在影响。推荐的下游工序的微生物控制限度见表5-14。

表5-14 下游工序的微生物控制限度示例

工序	推荐的控制范围
层析、超滤换液、除病毒等工序	滤前：≤1~100cfu/10ml
	滤后：≤1~10cfu/10ml
原液	≤1~10cfu/100ml

●警戒限及行动限：当积累到一定批次的数据，建议企业整理分析已有的监测数据，并制定警戒限和行动限以监测工艺性能，确保微生物负荷超过既定的标准时，

有相对应的调查，并执行纠正预防措施。

设置警戒限的目的是为了监测工艺性能，并对不利趋势或行动限级别的偏离提供早期预警。因此，建议采取以下措施：

需要说明，必要时发起调查；

• 回顾并分析历史数据；

鉴定所发现微生物的菌种属性；

通知相关部门

设置行动限的日的是在偏离发生时，有既定的行动用于调查纠正，因此除执行警戒级别的行动外，还建议采取以下措施：

发起调查，或启动偏差程序；

开展跨部门调查(生产、质量或工程等部门),鉴定菌种属性；

确定根本原因；

“评估对产品质量潜在的影响；

执行纠正和预防措施(CAPA)，并进行有效性检查。

0调查与影响评估：微生物限度达到或超过设置的行动限并不表明产品质量一定受到了影响，但需要详细的调查和科学的评估。

初步调查结果的确认：应首先进行实验室调查，通常在结果出现的24小时内。实验室调查的目的是确认检测结果的有效性，排查实验室检测或取样流程。 一旦确认结果有效，调查应扩大至生产范围的全面调查，并初步确定根本原因和影响评估，以及必要的纠正预防措施。

再检测、再取样以及额外取样：如果样品还在贮存时间内，则可进行再检测。如果异常是一个偶发事件，原取样位置再取样可能无法提供有用信息，若问题依旧存在，则再取样则可得到有效信息，同时可以额外对其他位置取样，这些取样可以为微生物负荷水平提供有价值的信息。

微生物的鉴定：应对超限的微生物进行鉴定，以确定污染源并帮助制定适当的处理措施。污染菌的鉴定可以提供一些调查方向，污染源往往与已知的微生物类别相关。如革兰阴性假单胞菌通常来自与水相关的液体系统的生物膜。这些污染源包括液体原料(包括水溶液、溶解成分或中间产品)和在设备内留下残余冲洗水的清洗过程。酵母菌、霉菌和革兰阳性孢子形成体(如芽孢杆菌)通常与空气中的灰尘和土壤污染有关。革兰阳性球菌(如葡萄球菌和微球菌)、多形性革兰阳性杆菌(如丙酸杆菌)及酵母菌可能表明与皮肤和身体微生物群有关。人员可能将这些污染物转移到工艺中。

微生物调查需关注所使用物料、环境监测及所用制药用水中检出微生物及是否有超标情况、微生物是否为同类型等情况，并结合以往生产批次中的微生物负荷情况进行综合评估。

确定根本原因：应使用风险评估的方式排好调查和纠正措施的优先级，对于调查，可使用分析工具(如鱼骨图、6M分析法、失效树分析法等)确定根本原因。

影响评估： 一旦发生微生物负荷达到或超过行动限事件，需对产品质量、安全性以及生产进程进行分析评估，评估应从考虑以下因素：

o 污染微生物的菌种属性，是否为致病菌或条件致病菌，根据相关文献评估是否对人体有害；

〇确定细菌内毒素检测结果是否符合标准；

0超限发生所处的工序，后续是否有工艺能力降低微生物负荷或清除毒素/代谢产物；

o 超限发生时，产品的放置时间、产品的pH 值和温度；

o 是否对产品本身有潜在影响；

0中控检测值是否和历史趋势一致，原液是否符合放行标准；

0是否需要因此改变生产工艺或生产设备。

纠正和预防措施：依据根本原因，制定相应的纠正预防措施，如调整清洁消毒工艺、对生物膜进行彻底清除、更换清洁剂、设备维护或设计改进等。纠正预防措施应进行效果追踪，有助于确定真正原因。

●不可接受微生物(objectionable microorganism): 不可接受微生物是一类非药典允许的可能具有潜在危害的微生物，可在药品溶液中繁殖，对药品的物理、化学性质产生不利影响，破坏药品的功能和疗效，并可通过用药途径可能对患者的健康产生不可接受的风险。

这一概念不适用于无菌药品的生物制剂生产，因为最终产品中不允许有微生物。而原液生产是微生物负荷控制的过程，推荐企业建立有害微生物的控制措施和程序、检验方法、放行标准，应有能力判断药品中的微生物是否为有害微生物。同时企业应关注中间产品、半成品以及水系统的微生物检测情况。对于检出的微生物应尽可能分离、鉴定，并评估风险。

5.6层析介质与膜包的管理

层析介质及超滤膜包可以在同产品不同批次间重复使用，如何管理重复使用的

介质与膜包，设定适当的使用循环次数或评价标准以指导替换全新的层析介质与膜包，对于制药企业至关重要。

企业应建立层析介质和膜包的使用管理程序，包括在线(层析介质或膜包贮存于设备上)及离线保存的条件、保存液种类及置换周期，保存过程需要建立相应管理程序以防止不同产品所使用层析介质或膜包发生混淆或交叉污染。

如何确保产品的安全性和有效性，建立持续有效的层析介质和超滤膜包的生命周期是一个复杂的问题。基于这些介质表面材质的化学性质，不同料液与其复杂的相互作用，如宿主细胞、核酸、脂质物质、病毒和工艺添加剂等。杂质成分一旦停留在介质表面，可能变性并稳定结合，难以去除。在接触过细胞料液后，使用缓冲液或清洗液对介质进行清洁和消毒。当完成一个层析循环或过滤单元操作，部分的杂质依然会结合在这些介质表面，并且随着这些介质长期保存甚至带入下一个批次的生产。

GMP生物制品附录明确要求层析介质的保存、再生及使用寿命应当经过验证。层析介质的使用次数通常由实验室缩小模型进行相关研究，确保重复使用不会影响产品质量及介质的可清洁性能。同时，通过实验室研究确定的寿命标准需要在商业化规模持续生产中同步确认或评价。

A. 设定寿命标准

影响层析介质性能的因素包括：

●层析工序在纯化工艺中的顺序。

●料液的性质。

●层析的模式。

●层析介质的种类。

●层析介质的再生与清洁程序。

●层析柱的介质装填。

●层析介质的保存，保存液种类、保存温度及时间，保存液更换频率。

影响超滤膜包寿命的因素包括：

●膜包的材质与孔径(截留分子量)。

●浓缩和换液过程中产品的特性。

●工艺参数的设置，如超滤工艺的进口通量，跨膜压差。

●膜包的清洁工艺，清洁剂，清洁频率。通常，使用标准水通量(normalized water permeability,NWP) 和总有机碳(total organic carbon,TOC)来评价清洁的有效性。

●膜包的保存，保存液种类、保存条件、保存液更换频率。

B. 层析介质和超滤膜包持续寿命研究

应通过对影响层析介质和超滤膜包寿命因素的分析，结合缩小模型(scale-down model) 的研究数据支持，并根据生产规模的实际情况，对层析介质和超滤膜包制定生产规模持续寿命研究的基本策略。推荐执行连续三个轮次的同步寿命研究以获得更加客观真实的数据。由于持续寿命研究与商业化生产同步进行，所以研究的策略与监测计划应基于对产品质量及患者的安全性风险综合性考虑，在持续监测数据发现不良趋势时，可考虑提前更换新的批次，商业化生产规模的填料使用循环数一般不允许超过实验室规模规定的循环数，尤其对病毒清除有作用的层析工序。

实施指导

A. 层析介质

考虑缩小规模的研究与生产规模在装柱方式、装柱规模、装柱频率，料液的可变性，离线保存时长等无法完全一致，基于企业实际生产情况，制定生产规模研究方案。推荐的层析介质持续监控项目见表5-15。

表5-15 层析介质持续监控项目

类别	监控项目	频率	寿命评价考量点
层析介质装柱的工艺表现	目测介质的形状、测试装柱后的理论塔板数和对称因子	每N个循环，每次装柱后	符合预设定的标准，或出现明显下降趋势
清洁工艺有效性	执行空白运行(mock run)	每N个循环	残留洗脱峰出现明显增加趋势，检测残留量(carryover)明显增加
产品质量稳定性	产品质量属性、杂质去除效果及配基脱落情况	每批或每N个循环，或介质长期保存后重新使用	符合预设的中控标准，或出现明显不良趋势
工艺表现一致性	工序回收率，层析图谱一致性对比	每批	图谱一致，无不明洗脱峰出现，工序回收率符合预设定标准

续表

类别	监控项目	频率	寿命评价考量点
保存有效性	阶段性生产间隔期间对层析介质保存有效性验证(离线或在线),微生物负荷及内毒素	保存期间定期	微生物负荷及细菌内毒素符合预设定标准

B. 超滤膜包

与层析介质具有相似的策略，以缩小模型实验研究为依据，或基于平台生产经验进行评估，制定生产规模的研究方案。推荐的膜包持续监控项目见表5-16。

表5-16 膜包持续监控项目

类别	监控项目	频率	寿命评价考量点
超滤膜包工艺表现	操作时长，水通量测试和完整性测试	每批	符合预设定标准
清洁工艺有效性	清洁后测淋洗水样(残留IgG、TOC及电导率)	每批或每N个循环	符合预设定标准
产品质量稳定性	产品质量属性(如SEC-HPLC)	每批或每N个循环	符合预设的中控标准，或出现明显不良趋势
工艺表现一致性	工序回收率，TMP-Flux曲线对比	每N个循环	图谱一致
保存有效性	生产间隔期间保存有效性确认(离线或在线),微生物负荷及内毒素	保存期间定期	微生物负荷及内毒素符合预设定标准

注：监控频率(N)可根据对工艺的理解和实际情况做适应性的调整。

5.7下游工艺验证

工艺验证策略及分析详见本分册生物制品(单抗)部分“2.7工艺验证”,本章节主要讨论下游工艺的验证要求。

施

对于单抗类生物制品，在首次获得上市许可批准前，或已获批产品在发生重大工艺变更后，通常采用前瞻性工艺验证。

A. 工艺验证的策略及执行批数

下游许多操作工序都涉及相似的或相同的工艺操作，如暂存、过滤、消毒等，同时也会涉及相同的设备，比如混匀搅拌系统、贮存设备，可以考虑在工艺验证设计时使用分组法； 一些多变量的工艺可以通过分组和矩阵的方式进行确认。

矩阵法适用于相同工艺和产品的组合有多个变量时的工艺验证，该方法基于选定的确认批次的组合可以代表所有组合下的工艺。选择组合和每种组合的代表性批数的理由，应经过科学判断，风险评估，并记录在验证总计划或验证方案中。

分组法适用于有多个相关但不同的实体能被分组，以便单个的实体能代表每个组的共同性质或最差情况，分组和选择代表性情况的判定理由应包括在验证总计划验证方案中。

下游工艺验证的批次数需根据风险评估予以确定，包括对产品及工艺的理解程度、下游操作工序的复杂性、工艺的可变性等。如上游细胞培养单抗的表达量、电荷异质性、聚合体含量、细胞活力的波动对下游工艺的影响；潜在的设备操作参数的可变性等情况。通常，对于首次工艺验证，下游工艺验证应执行不少于连续三批。

B. 下游工艺验证的相关的研究

●病毒清除研究：采用有代表性的商业化生产工艺的样品，利用确定的下游病毒清除工艺的缩小模型，可在后期临床生产或工艺验证期间同步实施，具体内容见本分册生物制品(单抗)部分“5.4下游病毒安全及控制”。

●杂质清除能力研究：工艺及产品相关杂质的去除能力需要在工艺表征中进行评估与研究，同时在工艺验证批次中加强取样以确认各纯化工序的杂质去除能力，具体的加强取样点及检测项可根据杂质的产生及纯化工序的功能进行设计。例如，常见的杂质类型见表5-17。

表5-17 下游常见杂质的种类及产生的工序

杂质分类	杂质名称/种类	杂质来源
工艺相关杂质	宿主蛋白HCP	细胞基质引入
	残 留 DNA	
	逆转录病毒颗粒	

续表

杂质分类	杂质名称/种类	杂质来源
工艺相关杂质	消泡剂	细胞培养引入
	诱导剂	
	生长因子	
	抗生素或其他化学抑制剂	
	血清成分(如有)	
	培养基成分	
	耗材析出物	
	脱落配基，如Protein A	下游纯化工艺引入
	有机溶剂、抑菌剂	
	耗材析出物	
产品相关杂质	聚合体，抗体片段	细胞培养或下游纯化中产生
	结构修饰体	

初步的风险评估用于确定哪些杂质需要进行清除研究，基于潜在的安全性考虑或杂质的类型，选择具有代表性的杂质，风险评估需要考虑杂质的生物活性，杂质毒性，杂质数量，杂质的引入或产生的工序，还需要考虑每个工序对杂质的去除能力。

对于单抗类生物制品，在原液生产阶段元素杂质的风险被认为是很低的。这很大程度是因为：元素在单抗生产中不是典型的催化剂或试剂；在细胞培养过程中培养基或补料时加入的元素为痕量水平，不会累积，在进一步加工时会被显著稀释/清除；单抗生产中使用的典型的纯化过程，如层析和UF/DF 工序，具备将细胞培养工序或与生产设备接触过程中引入的元素清除至可忽略的水平的能力。在这种情况下，通常不需要对生物技术药物原液生产中的元素杂质进行特别控制。

杂质清除能力的评估应包括杂质水平和目标值的比较以及清除趋势的一致性。

对于部分外源添加引入的杂质，如消泡剂、苯甲醇、抗生素等，首先需评估添加物的安全性，可利用杂质安全因子(ISF) 进行评估，ISF 为剂量中可能存在的某种杂质的LDso与其最大含量的比值；通常情况下，若ISF≥1000, 说明该杂质的安全风险较低，如ISF<1000, 需要设定中控检测项，或通过下游工艺的缩小模型考察清除能力，评估清除工序后的杂质残留水平。也可采用每剂量中杂质残留量与PDE进行对比的杂质安全评估方法。当工艺发生变化时，需要进行再评估。其他工艺和产品相关杂质的可接受水平将遵循常规中间产品的控制标准。

●中间产品/下游缓冲液稳定性研究：工艺中间产品和缓冲液稳定性，应结合理化稳定性、生物学活性(如需要)和生产规模微生物监测数据，为生产过程中间产品和缓冲液最长贮存时限需求提供数据支持。

工艺中间品和溶液的化学稳定性研究对商业化生产至关重要，该研究可以在生产规模直接进行，也可以用代表性的实验室规模进行，如等比例的贮存容器接触面积及装量、代表性批次的中间产品料液、相同容器的结构和接触材质。建议研究的贮存时间范围超过预期提供的安全边界。对于中间产品，建议进行三批稳定性研究。对于一些稳定的无机盐溶液，如磷酸盐缓冲液(PBS)、氯化钠等，其理化稳定性可利用生产的平台经验及相关文献报道的稳定性来支持。贮存过程的微生物负荷变化建议在生产规模进行监测。

●混合均匀性研究：混合均匀性需要在生产规模进行确认，可根据容器特点、大小、缓冲液或中间产品的特性及工艺要求，通过风险评估，结合设备分组和缓冲液分组方法，选出代表性的需要进行混匀研究的缓冲液，考虑搅拌速度、搅拌时间、容器搅拌方式及结构等影响，通常以pH值、电导率、渗透压或一些辅料浓度(如吐温)作为考察指标。中间产品混匀研究时还需要考察蛋白浓度。

混合均匀性可通过混合过程中的不同时间从容器中不同位置进行取样确认。

原液配制需要基于工艺表征研究的结果，结合生产规模的容器特点和操作特点，进行均匀性确认。

●层析介质及膜包持续寿命研究：层析介质与膜包的持续寿命研究是长期的监控计划，建议在工艺验证开始之前确定研究的策略与方案，具体内容见本分册生物制品(单抗)部分“5.6层析介质与膜包的管理及持续寿命研究”。

●微生物监控方案：下游生产过程中的关键的缓冲溶液及中间产品的微生物监测数据通常需要在上市申报资料内提交，以证明生产过程中的微生物负荷得到良好控制，因此，需要在工艺验证中按确定的微生物监控方案执行，具体内容见本分册生物制品(单抗)部分“5.5下游工艺的微生物控制”。同时日常的微生物监测计划也非常重要。

5.8下游清洁验证

背景介绍

清洁验证是单克隆抗体下游生产过程中重要的一环，尽管一次性使用技术得到

越来越多的应用，但下游工序中仍然不可避免有部分设备表面与产品直接接触，因此需要对与产品直接接触的相关设备系统进行清洁，并对清洁方法(流程)进行验证，目的是避免污染和交叉污染，这也是目前各国监管机构关注的重要质量管理要求之一。各地区在法规及指南中均有对生物制品的清洁验证相关要求。清洁验证策略及分析见本分册生物制品(单抗)部分“2.8清洁验证”,本章节内容主要介绍下游清洁验证相关的关注点。

实施指导

A. 清洁程序(方法)开发

对于单抗类药物的清洁工艺，基于产品特性，在早期可以进行以下两方面的实验室研究以支持清洁程序的设计与开发。

●清洗能力研究：清洗能力研究的目的是为了考察污染物的可清洁性，包括不同污染物，不同材质，不同的清洁条件等因素的组合。通过实验室模拟研究的结果，分析建立一个清洁工艺的“设计空间”。

对于污染物，下游生产过程包括培养基成分，辅料、中间产物、单抗蛋白、降解产物、缓冲溶液成分、清洁剂等。在清洁工艺设计和开发过程中，可以采用分组法，选择有代表性的污染物进行实验。

对于材质，可选择生产设备中与产品接触的代表性材质进行实验，如不锈钢、亚克力等。

对于清洁剂，单抗下游生产业内普遍以碱液作为清洁剂，也有部分企业基于其他因素考虑使用配方清洁剂(如CIP100 或CIP200)。清洁剂的选择应有充分的科学依据，如去除产品残留的能力、与设备的兼容性、清洁剂本身是否容易去除、低毒性以及任何与环境或安全有关的因素。

对于清洁参数，可以基于历史经验和供应商推荐设计合理的因素组合。

●降解实验：单抗本质上为蛋白质， 一般活性蛋白在高温或极端pH 条件下容易降解，需证明活性蛋白的具体降解情况。

降解实验的一般方法是将活性物质暴露在选择的清洁剂中，通过模拟清洁条件(建议模拟最差条件进行设计，包括温度、清洁剂浓度、活性成分与清洁剂的比例等)进行处理。

处理后的样品滴定至中性pH 值，然后对生成的混合物进行分析和(或)生

物化学的测试。同时，可以考虑制备相同条件下未经清洁剂处理的对照样品进行测试。

可以使用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 对暴露前后的样品进行检测，主条带消失，可认为活性蛋白已经完全降解。或者其他相适应的分析方法如酶联免疫分析法等，确认蛋白的生物学活性变化情况。

B. 清洁验证的风险评估

企业在进行清洁验证前应进行全面的风险评估，将清洁验证活动与风险管理原则联系起来。以把清洁验证中的风险降低到最小化，可选择常见的风险评估的工具，如FMEA、FTA、HACCP、鱼骨图等。

C. 清洁验证的可接受标准制定

下游生产的清洁验证中建立的接受标准应该是务实的、可确认的、可达到的、科学合理的。推荐从以下几方面考虑：

●产品残留：对于下游生产中产品专用的层析柱、层析介质、超滤膜包等，批次间的产品残留风险较低，但需要考虑层析介质与膜包多次重复使用后的可清洁性，企业可以根据产品特性和实际工艺情况，结合层析介质与膜包的寿命研究，制定合理的残留限度。

对于下游生产中产品共用的纯化收集罐、层析系统、超滤系统等，在制定产品残留限度时可以从下述几种方式上考虑产品间交叉污染风险。

应重点关注对产品质量有较大污染风险的工艺步骤，在前端生产工序的一些残留可以在相应的下游工序中去除。因此，在有足够研究数据支持的情况下，企业可选择使用最后一步纯化工序后的生产设备的总表面积(如超滤工序之后)，结合最大允许残留量，进行单位面积的可允许残留限度计算，以避免使用整个生产线的设备表面积，导致极低的限度要求。

蛋白类产品在清洗过程中暴露于pH极值和(或)加热时会降解或变性，可能会变成非活性物质。因此，采用活性蛋白的基于健康的暴露限(HBEL) 计算可能是不合适的。可参考PDA第49号报告Points to Consider for Biotechnology Cleaning Validation(《生物技术清洁验证考虑要点》)，以残留的总有机碳(TOC) 限度值作为生物制品生产过程清洁效果的可接受标准。对于非活性物质的残留可以参考国际制药工程协会(ISPE) 推荐可比质量(comparable quality,CQ) 方法进行残留限度计算。

●清洁剂残留：使用配方清洁剂时，需要了解配方的具体成分及相关信息以充分评估残留。如基于毒理学相关信息制定残留限度。

单抗下游生产中常用碱液作为清洁剂，该类常见清洁剂通常可用电导率值设定其间接限度，可以使用注射用水(1.3μs/cm) 或稍高的纯化水(5.1μs/cm) 标准。这种做法的原因是它要比科学(基于毒性数据残留或对工艺的影响)计算的限度值更加严格。通常碱液(如氢氧化钠)并不会以氢氧化钠的形式污染到最终的产品中，因此使用毒性计算是比较极端的。(参考PDA 第49号报告《生物技术清洁验证考虑要点》)

●微生物负荷：考虑到清洁后的微生物负荷，清洁过程本身不会导致设备的无菌。通常的做法是评估微生物负荷，确保随后的生产工艺不会过度挑战。通常只需达到一般的非无菌生产微生物限度标准(1~2cfu/cm²表面取样方法)。

采用注射用水(WFI) 冲洗取样时， 一种方法是使用通常的WFI 的 标 准(10cfu/100ml)， 另一方法是使用100cfu/100ml或1000cfu/100ml其中的一个。使用更高限度值的合理理由是该设备清洗后将进行在线通蒸汽或灭菌处理。

●细菌内毒素：通常测量最终冲洗水中的细菌内毒素，限度通常和注射用水(WFI) 标准(0.25EU/ml) 相同。如果后续工艺能够降低设备上的热原，可以基于合理的评估适当制定细菌内毒素限度。

D. 取样方法

为了评估清洁效果，有必要对与产品接触的设备表面进行取样，并确定存在的残留量。适当的取样方法是一个清洁验证计划的基本要素。 一般最好至少同时采用两种取样方法，取样方法包括目视检查、擦拭取样、淋洗取样及其他科学合理的替代方法。

●目视检查法：设备在目检前通常是需要干燥的。如果设备不进行干燥，需要说明理由。即使设备在日常使用中不需要干燥，但是为了更好的评估潜在的目检残留，验证批次检查时设备应该是干燥状态。

对于层析系统或一些其他管道等设备，在清洗程序后可能不是干燥的。可以考虑使用无纺布或拭子辅助进行目视检查。

●擦拭取样：擦拭取样能够直接反应取样位置的残留量。擦拭取样位置的选择需要考虑设备的材质、形状、尺寸及最难清洁的区域。例如：罐体可以选取气液交界面、搅拌浆、探头、取样口、壁面、视镜(不同材质)及滤壳等位置。

擦拭取样的方法需经过确认并且回收率符合要求，执行擦拭取样的人员需要经

过适当的培训或回收率测试考核。

●淋洗取样：对于某些区域不容易进行擦拭取样(如管道系统)可以采用淋洗水取样。

淋洗取样的方法需要充分考虑残留物的溶解性，对于极易溶解的物质，回收率研究不是必需的，执行取样的人员需要经过适当的培训。

●标识法取样：取一个圆片作为标识物，置于设备中适当的取样点上，进行上一产品的生产及清洁。在清洁后，对标识物上的污染物进行检测，采用外推法计算整个设备的全部污染。如果是要进行定量分析，则对标识物进行擦拭取样，然后对样品进行进一步分析。

E. 分析方法

在清洁验证中需要选择一个合适的分析方法，该分析方法必须经过验证，包括专属性分析方法和非专属性方法。

专属性分析方法是指，在有预期干扰物存在的情况下，仍可以检测特定残留物的方法。如果在验证方案中的目标分析物是活性成分，那些干扰物可能包括降解物和有关物质、辅料、清洁剂和清洁工艺副产物。专属性方法包括色谱法(如 HPLC、UPLC和 TLC)、光谱法(包括紫外、可见和红外)以及免疫分析法。

非专属性方法测量的是一种大致的性质，如电导率和总有机碳(TOC)， 它可能源于多种分析物和不同来源。生物类药物分子易在清洗过程中发生降解，在大多数情况下企业在清洁验证流程中并不直接设置活性限度，或者直接检测活性，而是使用总有机碳(TOC) 的分析方法。

F. 清洁验证实施要点

清洁验证是用书面证据证明一个已批准的清洁程序能在所使用设备上重复清除前次生产产品或所使用的清洁剂低于经科学评估设定的可接受标准。

●分组方法：下游生产的常见设备有中间产品储罐、转移管道、层析系统、层析柱、除病毒过滤/超滤系统以及部分小部件。通常可以从设备的构造复杂程度、材质、尺寸及工艺关键性等方面进行设备分组。对于下游生产中涉及的不同中间产物1缓冲液转移的管道，也可以考虑使用等效性评估和计算的方式综合分析选择代表性管道。

下游生产涉及的中间产物可以通过对不同组分种类、浓度等进行适当风险分析方法进行计算和评估以确定代表性的污染物。

0设备使用后待清洗保持时间(dirty hold time,DHT)及清洁后保持时间(clean hold time,CHT):设备使用后应该在一定的时间内进行清洗以避免故障、污染或对影响产品质量的残留。对于层析系统，超滤系统等在日常生产结束后会及时进行CIP, 验证时不需要过度挑战清洗前间隔时间。

清洁后，设备再次使用前应该以合适的方式放置以保证不被污染。尤其是对于清洗后不经过干燥的设备更要考虑设备放置期间的微生物滋生。

对于层析系统，超滤系统等在CIP 后贮存在抑菌性溶液中，应确定溶液可以抑制微生物生长(如稀碱溶液)或者持续监控获得数据以证明其抑菌性。应建立程序在设备使用之前充分去除抑菌性溶液：

0清洗方法：中间储罐等一般采用在线清洗站的自动清洗方式。当使用自动化的清洁工艺时，需要验证设备的正常操作范围。

对于部分小部件可能采用离线的部件清洗机或手工清洗方式。当选择手工清洗时，需要考虑人员的波动及规程的详细程度，并考虑选择最差清洗条件进行验证。

不同的设备/部件可能会有不同的清洗程序。在进行分组时需要适当的考虑，只有同样清洗程序的才能被分为一组

G. 清洁验证状态维持

要证明清洁工艺在整个产品生命周期持续受控。通常有表5-18七种方式维持验证状态。

表5-18 清洁验证状态维持相关措施

监测类型	策略	监测项日
日常监测	每次清洗时执行	目视检查，电导率，pH值或TOC
周期性监测	周期性计划	监测项及频率基于风险评估
定期审核	季度或年度	清洁工艺变化的历史，关键参数监控及趋势，事件报警，日常监测，偏差，变更及累计影响，分析方法，清洁规程，风险评估、影响清洁过程的法规变更等
新产品引入	与最初确定最难清洁产品时相同的科学风险评估	新增较容易清洁品种时，进行一个批次清洗确认，引入更难清洁品种则需要对新最差条件品种进行清洁验证或重新开发清洁工艺
新设备引入	基于风险评估	新增等同设备，或确认新旧设备等效，需要额外进行一个批次清洗确认，新增不等同设备，需按原先最差条件的验证要求重新完成清洁验证

续表

监测类型	策略	监测项目
变更回顾/偏差回顾	季度或年度	回顾所有的变更以及变更对一个系统累积影响，审核清洁工艺相关偏差和CAPA,包括目视检查失败和趋势等
再验证	N/A	影响清洁参数、分析方法、新技术或执行过程能力的重大变化或者发现不良趋势时可能需要再验证

H. 其他清洁验证相关考量点

●特殊物料或设备：单抗生产中层析介质和超滤膜包均为产品专用，特定的清洁工艺取决于所使用层析介质或膜包的类型，清洁方法需考虑对工艺或其使用寿命的影响，清洁效果一般在层析介质或膜包持续寿命研究中考察，并在商业化规模下持续确认。

层析柱、超滤系统可以不同产品共用，推荐的做法是拆除层析介质后，柱体有单独清洗程序，并进行清洁验证。层析柱筛板是清洁验证的重要关注点，有条件的企业可以考虑筛板产品专用。

●其他污染：用于清洗其他设备的清洗设备必须选用和维护以确保本身不是污染源(如部件清洗机、在线清洗站)。

对于用于层析介质准备的匀浆罐或其他设备，虽然设备本身不接触产品，但是接触用于产品的不同填料。应充分考虑其交叉污染风险，并制定合理的清洗程序。

●过程分析技术(process analytical technology,PAT)技术的应用：清洁程序中和PAT 最相关的应用是利用即时测量以确定清洁程序的完成。单抗生产的清洁程序最常见的PAT应用是电导率、TOC 及快速微生物检测法。比如可以将电导率与淋洗程序的结束建立关联，电导率就可能应用于PAT方法，但是需要考虑到在线TOC 并不具备在线传感器，而是通过管路将液体从工艺管路转移至在线仪器。这种方式需要考虑取样和实际测试之间的延迟。

快速和(或)在线检测技术本身并不是PAT，只要测定不能控制工艺步骤，它们就仅仅是快速检测工具，而不能称之为PAT工具。理想情况下，PAT可用于清洁设备实时放行从而取代清洁验证。但现况是目前使用PAT技术以确认设备表面的清洁效果(在单抗生产中测量活性物质、清洁剂、微生物及内毒素)还不足以支持单抗生产过程中设备清洁的实时放行。

5.9下游工艺低内毒素回收

背景介绍

低内毒素回收，也称为内毒素掩蔽，是近年来被逐渐关注、但已长期存在的现象 。LER 是指在使用国际统一的鲎试剂(LAL) 药典方法检测细菌内毒素时，无法检测到无菌生物制剂中的加标内毒素的现象。美国FDA已经开始强制要求提供研究数据证明鲎试剂法(即LALBET 方法，USP<85>) 在一段时间内从加标样品中回收内毒素的能力，并且希望这些研究结果包含在生物制品上市许可申请中，以供审查。

参考PDA 第82号报告Low Endotoxin Recovery(《低内毒素回收》),将已知浓度的标准内毒素添加到未稀释样品中，随着时间的推移，标准内毒素的回收率无法达到≥50%活性，即为LER 现象。LER 现象无法通过稀释来避免。样品的贮存和处理方式可能会影响其内毒素含量的可检测性和稳定性。由于内毒素检测能力低，样品中的内毒素污染水平可能被低估或未被检测出。因此，需要对样品进行内毒素加标回收率测试，研究样品从取样至检测的最大允许存放时间。

A. 生产过程控制中的相关考量

LER可能是由某配方成分单独引起，也可能是因与蛋白样品混合引起。例如，螯合剂和表面活性剂的组合已被证明通常会导致LER。然而，仅存在一种成分(即螯合剂或表面活性剂)时，不太可能会诱导LER。

LER 研究应该在与工艺相关的温度和时间下进行。工艺相关是指最有可能对LER 产生影响的工艺步骤，例如，添加聚山梨酯、螯合剂、保持时间、开放或密闭系统的工艺步骤。当工艺相关步骤在不同的温度和时间下进行时，为了测试之间的可比行和便于开展研究，可以分为以下几组：

●如果工艺相关步骤是在冷藏(2~8℃)条件下进行的，则研究应在2~8℃下进行7天。

●如果工艺相关步骤是在室温下进行的，则应在20~25℃下进行研究，研究时间基于风险评估确定。

●如果有一个与工艺相关的步骤在2~8℃下进行， 一个或多个工艺相关的步骤在室温下进行，则应在20~25℃下进行研究，研究时间基于风险评估确定。

B. 低内毒素回收缓解措施

最直接的缓解措施是确保纳入足够数量的样本，这样就可以通过一个额外的时间点对研究结束时回收率小于50%的单个时间点进行评估，以确定是否发生了LER。另外一种直接缓解的方法是增加在生产过程相关工序中取样，并测定细菌内毒素含量。 一些广泛报道的克服抑制与螯合作用的途径也证明可能会对缓解LER现象有用。

LER现象的一个可能原因是细菌内毒素超分子状态的改变，导致不容易被检测到，特别对于那些以二价阳离子作为稳定剂的。因此，逆转或缓解LER的措施可分为：调整样品处理或检测方法，以恢复对细菌内毒素的探测能力；采用额外的更复杂的检测程序，以弥补经过实验室的努力后，仍然未克服的LER 现象。

●通过样品预处理的缓解措施：应首先检查LAL BET中用于消除抑制的传统处理方法(在干扰因素测试中阳性对照品回收率<50%),例如，样品pH值、避免已知的抑制剂、塑料制品的吸附、混合不充分等。许多LER问题可以通过遵循现有的相关研究指南，对样品处理的细节关注上来解决。此外，了解产品本身、配方缓冲液和温度对细菌内毒素的主要成分脂多糖的回收率的潜在影响，也是至关重要的。建议按顺序执行以下方法：产品本身评估，在样品中添加分散剂、添加过量的二价金属离子，采用有机溶剂增加样品的疏水性，评估其他LAL试剂或采用非 LAL内毒素测试方法等。

●通过生物体内法评估：通过样品预处理缓解措施失败，接下来可以确认在生物体内是否检测到添加的细菌内毒素。样品在加入细菌内毒素并在放置处理后按《中国药典》通则1142热原检查法进行测试，产生两种可能的结果：产生热原反应或不产生热原反应。

如果加入细菌内毒素放置后通过体内检查法产生热原反应，制药企业应将热原检查法纳入内部产品放行检项，直至开发出合适的体外检查法。

如果加入细菌内毒素放置后通过体内检查法未产生热原反应，热原检查法可以不需要，但企业应该在添加引起LER 的配方成分前的工序中增加额外的中控细菌内毒素测试。或者通过控制已知可能会带入细菌内毒素的关键原料，并在后序的工序中严格控制微生物负荷，以确保最终制剂成品的低内毒素含量。

实例分析

实例3:生产过程中工艺相关低内毒素回收现象

表5-19 生产过程中工艺相关低内毒素回收现象识别示例

序号	操作步骤	工艺相关的LER	评估
1	中间产品(药物+含枸橼酸盐)储存于2~8℃	否	LER风险低，聚山梨酯尚未添加
2	添加聚山梨酯(PS)(工艺时长在室温下5小时)	是	LER风险高，同时含有聚山梨酯与枸橼酸盐
3	添加组分至产品中：药物+聚山梨酯+枸橼酸盐(在敞口容器中操作，然后转移至密闭系统中，2~8℃下暂存5天)	是	LER风险高，因环境内毒素在开放工艺步骤污染产品
4	除菌过滤和灌装(在室温条件下进行，验证的最长时间为30小时)	是	LER风险高，因为在室温下保持时间较长
5	制剂取样及放行检测(经验证的QC样品存放时间为2~8℃下暂存5天)	不适用	QC样品暂存时间的验证与LER工艺无关，应单独进行

在表5-19中，步骤2、3、4确定为与工艺相关的LER。如果一个工艺相关的步骤在2~8℃下进行，另一个工艺相关步骤在室温下进行，则应在20~25℃下进行 LER研究。在这个例子中，LER 保持时间研究应该进行最长的保持时间，即步骤2和步骤4共同操作时间：5+30=35小时。并没有考虑步骤3,因为在步骤4的保持温度与时长研究可以覆盖步骤3的情况。

6 技术转移和可比性研究

本章主要内容：

生物制品(单抗)的技术转移流程和关注点

生物制品(单抗)开展可比性研究的注意事项

6.1技术转移

背景介绍

技术转移(technology transfer,TT)通常不视作“工艺”,而是视作项目来进行考虑。技术转移通常采用项目管理，并以逐步实施的方式进行。生物制品(单抗)的技术转移应设计为一系列的计划性受控工作，设定相关预设标准，从而实现从技术转移的转出方成功地转移：①生产工艺；②分析方法；③生物基质材料、生产原辅料、最终包装材料及其质量属性指标、可接受标准等；④其他任何与产品生命周期有关的知识和技能，至技术转移的接收方。

技术转移双方要认真考虑技术转移的时间点和工艺技术的成熟度，无论发生在产品生命周期的任一阶段，都需要充分考虑转移过程的任何一步对注册申报造成的潜在影响。

通常研究用新药申请(investigational new drug application,IND)申报前发生的技术转移不发生在GMP 体系下，相关实施可参考GMP体系下的技术转移活动。对于IND申报阶段将研发转移到GMP 生产的技术转移活动，特别是技术转移活动中涉及IND申报的GMP 批次，需满足对应国家/区域的GMP 要求。

依据产品及其生产工艺的生命周期，技术转移可以发生其不同阶段，包括但不局限于：

A.IND 到关键临床阶段前的技术转移

包括IND生产到临床生产的技术转移，以及临床阶段发生的技术转移。通常这类转移伴随着工艺放大、生产场地变化以及工艺的持续优化，技术转移双方涵盖了不同车间、场地以至质量体系与申报主体。此阶段的技术转移活动应采用法规规定的适当方式向监管机构报告，如药物安全性更新报告等。若涉及可能影响产品安全性和有效性保障的工艺变更(如生产规模放大、关键原辅料变化、涉及产品安全性保障的关键工艺步骤变化、处方变化等)的技术转移活动，通常会进行相应的可比性研究。通常此阶段的可比性研究要求不同于上市后变更阶段全面的可比性研究，应依据该阶段对产品工艺知识的理解，基于质量风险管理要求，建立合理的标准和实施方案。如有需要，此阶段发生的技术转移活动可依据相关法规等要求采用合适的形式(如补充申请)告知监管机构。

B. 关键临床阶段到商业化阶段以及商业化阶段发生的技术转移

产品关键临床阶段(pivotal clinical phase)工艺通常应与商业化阶段的工艺保持一致，如果发生技术转移，其技术和质量要求应与商业化阶段发生的技术转移一致。此时的技术转移基于已积累的产品和工艺知识，在转移活动和风险评估上往往更加全面。上市后发生的技术转移一般按照其涉及的工艺变更大小[参见《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则(试行)》,2021]采取适用形式向监管机构报告。在此阶段，通常会关联更加全面的可比性和稳定性研究要求。此部分要求详见本分册生物制品(单抗)部分“6.2可比性研究”。

生物制品(单抗)技术转移通常包括复杂的过程和需要众多部门合作的各项活动，尤其是涉及不同地区转厂的项目，会涉及不同的质量管理体系，以及人员对新的工艺的系统培训，被转移的产品和相关技术需要结合研发成果和生产信息， 一般也同时涉及相应的分析方法的建立和转移。通常推荐技术转移活动以项目的方式管理，采用对所涉及工作统筹计划、行动内容整合分类、逐步实施以及最终总结报告的形式完成。

□ 技术要求

技术转移的一般性要求可参考本丛书《质量管理体系》分册“3.4.1 技术转移”。本章节描述的生物制品(单抗)的技术转移还参考了以下法规与权威指南：

●ICHQ10 Pharmaceutical QualitySystem(《药品质量体系》)

WHO ECSPP TRS 1044 Annex 4 WHO Guidelines on Transfer of Technology in Pharmaceutical Manufacturing(《药品生产技术转移指南》)

●ISPE Technology Transfer(Third edition)[《技术转移(第三版)》]
PDA TR.65 Technical Transfer(《技术转移》)

6.1.1 技术转移的阶段

无论是发生在公司内部(对内技术转移)还是公司之间的技术转移(对外技术转移),推荐采用分阶段实施的项目管理计划。生物制品技术转移通常可以分为5个阶段，包括计划、准备、执行、验收和收尾。图6-1提供了一个技术转移项目各阶段的示例(以临床阶段的技术转移活动为例)。依据技术转移项目目标和内容，不同项目各阶段的定义和要求不尽相同，转出方和接收方应对主要工作进行划分和阐述。通常认为没有相同的技术转移项目计划，每个技术转移都应该在启动前对其进行充分的分析和评估。

A. 计划阶段

在技术转移开始前，转出方和接收方要进行充分的沟通，拟定技术转移计划，确定技术转移的目的和范围、申报主体及通用流程等，该计划将指导整个项目。

考虑到对内和对外技术转移的区别，其技术转移计划阶段的复杂度不尽相同。对于对内技术转移的计划阶段，由于公司内部组织的职责和联系更加紧密，在技术转移实际开始前的早期交流更加全面和及时，在特定项目中，对内技术转移项目的计划阶段可能不是必需的。但是如果一个公司的对内技术转移发生在不同生产运营场地(特别是在不同质量系统或市场法规的监管下),仍推荐在技术转移计划阶段进行充分的技术交流和可行性分析等活动。

对于对外技术转移项目，转出方在与接收方(或其候选者)进行技术交流之前，通常应就质量管理的供应商审计和基于知识产权管理的保密协议达成一致。转出方应对接收方开展尽职调查和质量审计，对其场地、厂房、公用系统、检测、设备、技术能力以及质量系统进行综合考查，接收方对转移项目所需的工艺和生产要求进行回应。双方签署合同和质量协议，确认技术转移项目范围、费用、时间、资源、权利和义务等。双方联合制定和签署技术转移计划，进一步明确工作分解结构、责任分配矩阵，以及项目管理方式，确保项目的合理性和关联性，为后续工作提供指导。表6-1提供了一个示例，列举了该阶段的双方主要工作和交付物(包括文件和物料)。

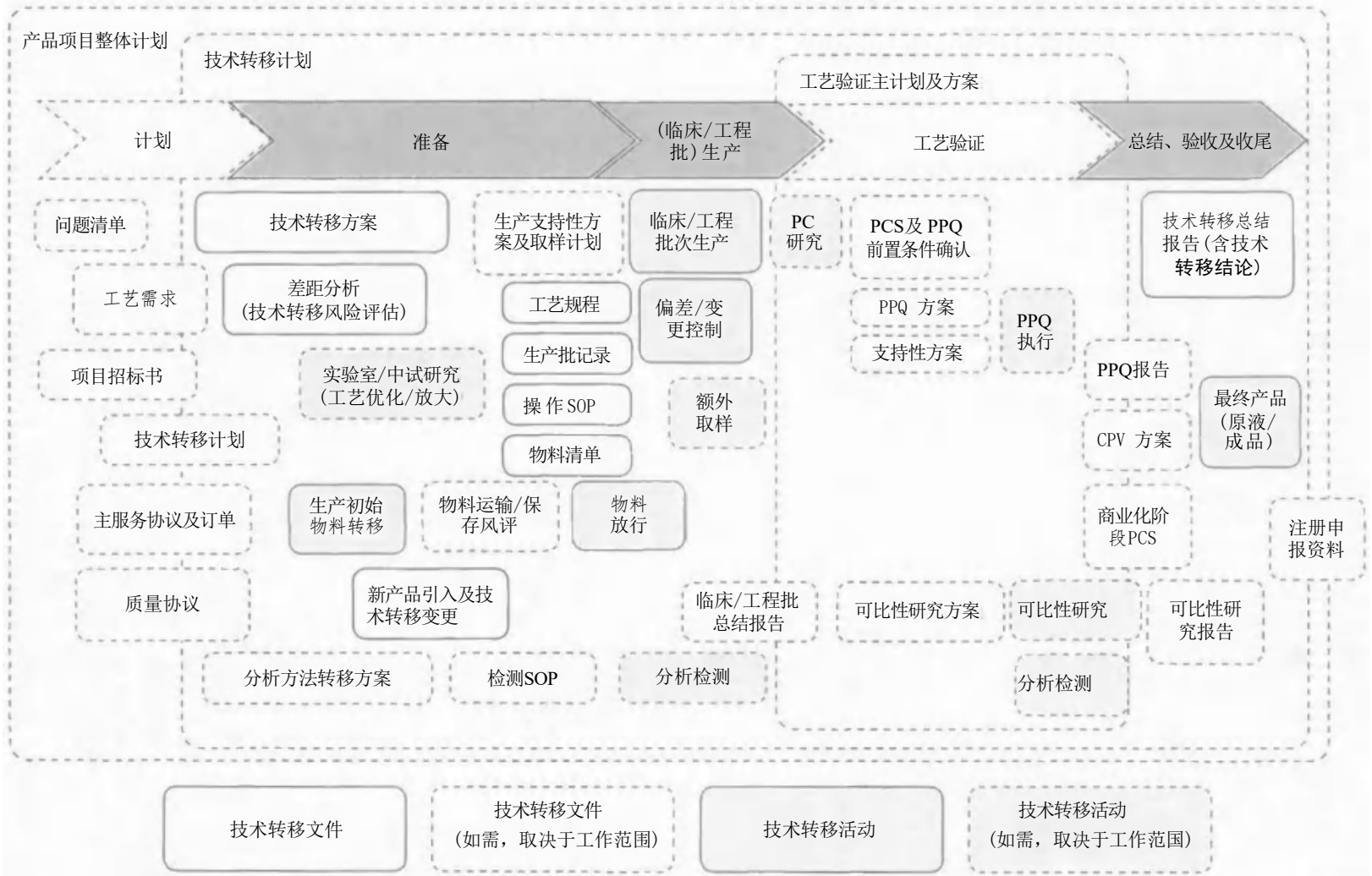


图 6－1 技术转移阶段示例(以临床阶段的技术转移活动为例)

注：其中黑色加粗字体描述的内容为GMP 规范和监管机构重点关注的技术转移相关文件/活动。PC:process characterization,工艺表征；PPQ:processperformance qualifcation,工艺性能确认；CPV:continued process erfication, 持续工艺确认；PCS:process control tategy,工艺控制策略。

表6-1 技术转移计划阶段的主要工作示例

工作	职责		交付物[文件和(或)物料]
	转出方	接收方	
技术交流①	●提供问题清单，询问信息 ●确认监管部门审计历史情况	·提供场地、检测、设备、技术能力信息 ●提供监管部门审计历史情况	问题清单
可行性分析①	·起草初稿，审阅并批准	●提供信息以支持项目时间，场地，成本等的可行性分析	可行性分析报告②
工艺需求或技术招标书	·起草工艺需求或技术招标书③，描述并提供(但不局限于)本次技术转移中的工艺、产品信息、法规申报市场、生产规模、设备、人员、环境、批次、GMP或non-GMP、检测、取样等要求，工艺放大研究，总体时间表和关键里程碑时间点等 ·根据接收方提供的对工艺需求反馈，调整技术转移活动的需求和范围，并最终批准工艺需求和接收方提供的反馈	·起草工艺需求或技术招标书反馈，描述接收方对转出方提出的需求的响应，包括可行性分析、差距分析、生产线、设备、人员、检测、取样能力、工艺放大研究设计、总体时间表反馈、关键里程碑时间点、生产批次窗口、产能等承诺、质量管理等	工艺需求或技术招标书(来自转出方) 工艺需求或技术招标书反馈(来自接收方)
技术转移计划	·起草技术转移计划，包括活动细节、资源、日程表、里程碑节点、阶段交付物(含验收标准)和风险点评估，并最终批准	·补充和响应技术转移计划，并最终批准	技术转移计划
主服务合同及附属订单	·确定服务合同中技术转移工作的范围，确认报价，权利和义务以及其他法务要求，审阅并最终批准	·起草合同，确认工作范围，最终报价，权利与义务，审阅并最终批准	主服务合同及附属订单
质量保证协议（QAA）	●审核并最终批准质量协议	●起草，审核并最终批准质量协议	质量保证协议

注：①技术交流和可行性分析不仅适用于对外技术转移，对于发生在不同生产运营场地(特别是在不同质量系统或市场法规的监管下)的对内技术转移情形同样推荐进行。

②可行性分析也可以由接收方起草，转出方审阅并批准。可以作为工艺需求或技术招标书反馈的一部分，不单独提供。

③工艺需求或技术招标书可以由接收方根据技术交流获得的信息整体出初稿，转出方审阅并批准。

④技术转移计划可以由接收方根据技术交流获得的信息整体出初稿，转出方审阅并批准。

B. 准备阶段

此阶段的目的是确认流程已经准备就绪，项目的所有关键步骤都已经得到深入的分析，潜在风险也已经制定适当的解决方案。技术转移启动会标志着技术转移工作正式开始的起点，会议中明确转出方和接收方双方参与转移的部门、团队成员及其职责、沟通方式、会议频率、信息和文件分享途径，以及汇报、追踪和反馈机制等。在此阶段，双方应从风险管理的角度，对准备的状态和潜在的风险进行把关，同时在涉及人员、设备设施、物料、方法、环境、检测、安全等方面进行全面的技术转移准备，应注意，完成接收方相关人员的培训也是一个关键日标。该阶段转出方应转移所有相关的文件和知识(技术),接收方根据转移需要起草接收方文件，关键文件包括工艺和验证文件、清洁方法及其验证文件、新产品引入和共线生产风险评估(如适用)、物料、仪器设备、分析方法和程序、技术转移方案、差距分析和风险评估报告等。除了相关物料和文件的技术转移，双方技术转移团队应注重产品和工艺知识转移的完整性。对于单抗产品， 一般地对于单抗分子及其生产工艺中的特别(风险)关注点(如分子活性、特性、产品/中间产品稳定性、关键物料及其控制等),应在技术转移风险评估中重点体现，如有必要，应制定合理的风险降低措施。

表6-2提供了该阶段的双方主要工作和交付物(包括文件和物料)。基于GMP基本要求以及风险管理理念，监管机构在此阶段通常关注技术转移方案以及差距分析(风险评估报告)的质量，包括但不局限于文件的GMP 符合性、数据可靠性、科学性和质量风险评估。

如转移项目涉及分析方法转移，涉及的方法应该在生产前完成转移，以确保产品的适当检测。基于分析方法开发生命周期和风险管理理念，对于处于产品/工艺临床早期或之前阶段的方法转移，可根据风险评估和需要逐步完成，确保可用于产品放行。分析方法转移可以有不同的方式，但都需要开展相应的评估工作，例如，决定是否可以转移豁免、是否对需要转移的方法做对比测试、两个(或多个)实验室联合验证或再验证。

表6-2 技术转移准备阶段的主要工作示例

工作	职责		交付物[文件和(或)物料]
	转出方	接收方	
技术转移启动会	●锁定参与转移的团队成员、沟通方式、频率 ●建立汇报、追踪和反馈机制 ·建立技术转移数据传递、审阅、确认流程	·锁定参与转移的团队成员、沟通方式、频率 ●确认并同意汇报、追踪和反馈机制 ●确认并同意技术转移数据传递、审阅、确认流程	会议纪要 技术转移例会日程表(如适用) 技术转移团队成员名单
技术转移资料①(从转出方到接收方)	·准备，整合，批准并传递技术转移资料至接收方，包括但不局限于： o CQA o CMA(如有) o质量标准[原液、制剂、中间产品(如适用)、原料等] o工艺参数及其分级和可接受范围(如适用) 0过程控制及工艺监控 工艺操作说明及生产流程包含物料平衡(收率)说明的工艺流程图 0稳定性数据，包括产品，中间产品等 o历史批次规模，生产数据(如有) o分析方法验证(如适用) o工艺验证，清洁验证等数据(如适用) o EHS注意事项	●接收并确认技术资料包，并依据接收得到结果开始起草风险评估(包括新产品引入及技术放大/转移风险评估)、技术转移方案、工艺放大研究方案(如适用)以及其他生产文件准备，并对以下事项进行评估/确认： 0转移后的目标生产规模 o设备设施IQ/OQ/PQ是否完成，关键工艺设备控制范围是否满足工艺参数范围要求 设备与产品接触材质与产品的相容性评估 0工艺参数的放大原则，参数在技术转移过程中修改的依据和理由 差距分析，并在生产前对风险进行纠正或评估 o识别过程中样品取样点和检测方法 ·基于以上差距分析，完成差距风险评估报告(如适用)	技术转移资料(从转出方到接收方) 差距风险评估报告(如适用，也可包含在最终的技术转移风险评估报告中)
物料清单及初始物料转移	·整合，批准并传递物料清单至接收方；批准转移过程中接收方变更的替代物料(如适用) ●审阅并批准转移流程，转移初始物料(如细胞库等)至接收方；提供物料放行数据和安全性数据或声明(如需)	·接收并确认物料清单，评估并提供可能的替代物料供转出方审阅和批准 ●评估转出方和接收方的环境差异(温度、湿度、压差等),可能会影响物料的贮存和运输 ·提供并批准转移流程，接受初始物料(如细胞库);审阅并批准物料放行数据和安全性数据或申明(如需) 对于转移涉及的关键物料，对其关键属性(CMA)完成必要的风险评估报告(如适用)	物料清单BOM 初始物料(如细胞库等) 初始物料放行报告和(或)安全性数据或申明(如需) CMA风险评估报告(如适用)

续表

工作	职责		交付物[文件和(或)物料]
	转出方	接收方	
技术转移文件(如技术转移方案)	●审核并批准技术转移文件	·完成技术转移文件，并交付转出方审核和批准、技术转移方案应包括(但不局限于) 产品和项目简介 团队人员职责 T艺流程图 生产场地设施 场地、设备(含材质相容性)、艺、检测、等差距分析 风险评估[新产品引入、共线生产(如适用)及工艺放大/转移]结论 控制策略(已完成风险降低计划，如适用) 批次的执行日程表 可能的备选计划 技术转移结束的交付物 技术转移成功标准	技术转移文件(如技术转移方案)
新产品引入和T艺放大/转移风险评估	·审核并批准新产品引入风险评估 ●审核并批准工艺放大/转移风险评估 ·市核并批准风险降低计划(如有) ·审核并批准风险降低完成后的再评估(如有)	●采用相关风险评估工具(如FMEA)完成新产品引人生产线风险评估;如有必要，根据评估结果，建立风险降低计划(如清洁验证/确认) ·采用相关风险评估工具(如FMEA),完成工艺放大/转移风险评估；如有必要，根据评估结果，建立风险降低计划(如工公放大研究，工程批等) 。若在生产执行前完成风险降低计划，应进行风险再评估，并交付转出方(SU)审阅并批准	新产品引入风险评估 「艺放大/转移风险评估 风险降低计划(如适用) 风险降低完成后的再评估(如适用)
生产文件准备	●审阅并批准生产文件(批次生产方案，T艺规程，批记录，操作SOP等)	●依据转移的工艺和质量体系要求，建立相关生产文件(批次生产方案。工艺规程，批记录，操作SOP等),并交付转出方审阅和批准 ●针对自动化控制的程序，生产前需要建立符合生产工艺需求的白动化程序	批次生产方案 工艺规程 批记录 操作SOP
技术转移变更	●审阅并批准接收方建立的技术转移变更	●根据质量管理系统要求，发起技术转移变更(技术转移启动会后应尽快发起)	变更记录

续表

工作	职责		交付物[文件和(或)物料]
	转出方	接收方	
生产执行前审核	·在进入下一个阶段(执行和生产)前，应基于风险管理的角度，进行一个全面的技术转移准备审核(人员、设施设备、物料、方法、检测、环境)	●在进入下一个阶段(执行和生产)前，应基于风险管理的角度，进行一个全面的技术转移准备审核(人员、设施设备、物料、方法、检测、环境)	审核结论(如适用)

注：①技术转移资料包(转出方至接收方的内容、文件形式和范围取决于技术转移项目的范围以及待转移工艺开发所处的阶段)。

C. 执行阶段

在此阶段，接收方按照批准的方案和流程进行生产，转出方根据需要提供远程和现场技术支持。双方对日常生产、过程监控、取样情况等进行定期沟通。依据双方批准的质量保证协议(quality assurance agreement,QAA),对于过程中发生的偏差和变更，开展调查和影响评估，如需要时由双方审阅和批准。表6-3提供了该阶段的双方主要工作和交付物(包括文件和物料)。

表6-3 技术转移执行阶段的主要工作示例

工作	职责		交付物[文件和(或)物料]
	转出方	接收方	
生产执行	●提供技术和现场操作支持	·依据相关方案，完成生产和其他工作，包括(但不局限于) 。分析方法技术转移(如适用) 0物料属性/相容性研究(如适用) o工艺放大研究(如需) o中试生产和工程批(如需) 0生产规模支持性研究 原液/制剂GMP批次生产中间取样 0过程控制，中间额外检测及放行检测(如适用) ·工艺监控和分析	生产日常汇报(如适用) 阶段性总结报告 中间取样(如适用)
偏差和变更	●审核和批准执行阶段发生的相关偏差和变更，协助影响评估，并确保产品放行前偏差已关闭，变更已执行	●依据双方批准的QAA,报告执行阶段发生的相关偏差和变更，并开展调查和影响评估，如需时传递至转出方审阅并批准	变更控制记录 偏差调查报告

执行期间，双方应基于产品的生命周期阶段以及约定的质量管理要求，决定技术转移执行阶段的生产批次遵从不同阶段的GMP 要求。例如，对于早期临床阶段，总体上可以依据GMP的相关基本原则，最大限度降低制备环节污染、交叉污染、混淆和差错的风险。但对于关键临床批次，应采取和商业化生产一致的GMP 要求，对生产过程微生物控制和全面分析、中间产品质量属性、工艺参数、工艺性能指标以及清洁有效性等进行监控，以获得足够的知识和数据，更好地理解产品工艺控制和生产控制。在这个阶段，工厂对变更的管理也随着GMP 要求而加强。生产的产品批次(部分或全部)也可能依据法规申报和质量管理要求用于稳定性和可比性研究。

D. 总结、验收和项目收尾阶段

技术转移活动完成后，转移双方应对项目进行整体评估，判定转移是否成功。技术转移的方案实施结果和结论总结体现在技术转移总结报告中。报告应对过程中的主要行动、里程碑、与原计划的变动，以及后续生产中可以提高的方向进行总结，应对主要事件和偏差进行解释说明。同时，剩余物料的处置应有明确文件记录和规定，包括销毁、转移或移用等。

技术转移总结报告应依据预设的技术转移成功标准，对技术转移活动结果进行整体全面的评估，做出技术转移成功/不成功的结论。此文件的正式签批代表转移项目的结束。需要注意的是，即使结论表明技术转移整体是成功的，但仍需列出每个未完成/不成功的活动及其对应风险，提供风险再评估和风险降低计划。如果技术转移结束后工艺将进入商业化阶段，双方应共同准备工艺验证方案(草稿)和(或)持续工艺确认方案(草稿)。对于商业化产品，技术转移结束后双方仍然需要一个持续的确认计划，便于对产品进行持续监测。

6.1.2技术转移中的关注要点

实施指导

A. 技术转移团队的组织构架

对于转出方和接收方， 一个良好的技术转移项目中，应至少包括项目委员会、技术转移项目经理、技术转移小组以及质量保证代表。转出方和接收方应在项目计划期间成立专门的委员会，实时跟踪项目进展，当项目关键路径受阻时及时采取有力行动推动项目进展，保证及时有效地汇报程序。技术转移项目经理应用专业的项

目管理工具对项目从始至终进行计划、追踪协调和沟通。技术转移小组应由不同功能部门、不同学科的成员组成。

对于对内技术转移，质量管理系统是其转移活动的重要基础。技术转移团队的质量保证代表应确保所有涉及GMP 生产/检测的技术转移活动均遵从公司内部质量管理系统(如偏差、变更、供应商审计、内审、质量文件等系统)以及法规的要求。

对于对外技术转移，QAA 始终是技术转移启动的重要基础。应由QA 主导QAA 的审阅、签订和批准，并在整个技术转移过程中进行质量风险管理(QRM)， 负责偏差/变更控制、供应商审计、产品放行、培训、操作、验证等工作的合规性符合等。

图6-2提供了一个技术转移团队组织架构示例作为参考。

B. 技术转移过程中的知识管理和风险评估

技术转移往往是个长期的项目，包括众多的行动项和多学科的信息评估和阐述。为了确保转移后产品的质量和工艺性能，知识的管理和传递是关键要求，应当有一个系统的方法和(或)平台获取、分析、保存、归档、受控发放及分享这些知识。

在技术转移阶段，风险评估除了作为风险管理工具，通常还可以作为一种有效的知识管理工具/文件，将技术转移过程涉及各种工艺、产品、生产、设备等知识采取合理的思维分类方式，用文本化的方式记录下来。更重要的，风险评估不但可以记录技术转移过程中我们已经理解或研究过的产品/工艺知识，还可以从风险的角度记录和明确尚未理解或研究的产品/工艺知识，从而帮助团队从生命周期角度更加全面地理解产品及其工艺。

风险评估应该贯穿整个技术转移过程，包括项目早期的差距分析和结束期间的风险管理决策。转移双方应对潜在的风险进行详细充分的分析，避免差距和变化对产品质量和性能的影响。ICH Q9质量风险管理提供了必要的工具和模板。

C. 工艺验证要求

如果技术转移涉及后期产品大规模生产转移至新厂房、新公司或新合同生产商 (CMO) 等，工艺验证便是技术转移的一部分。工艺验证需要按照相关法规指导进行，对工艺从设计阶段到商业化生产的数据进行收集和评价。转移双方应充分考虑工艺验证的策略以及对申报的影响，制定合理准确的工艺验证主计划、验证研究方案、批次生产计划、产品批次放行方法和用途。验证结束后质量部门批准验证总结报告，描述在验证期间发生的偏差和事件，得出工艺验证的结论，以及CPV的方法。

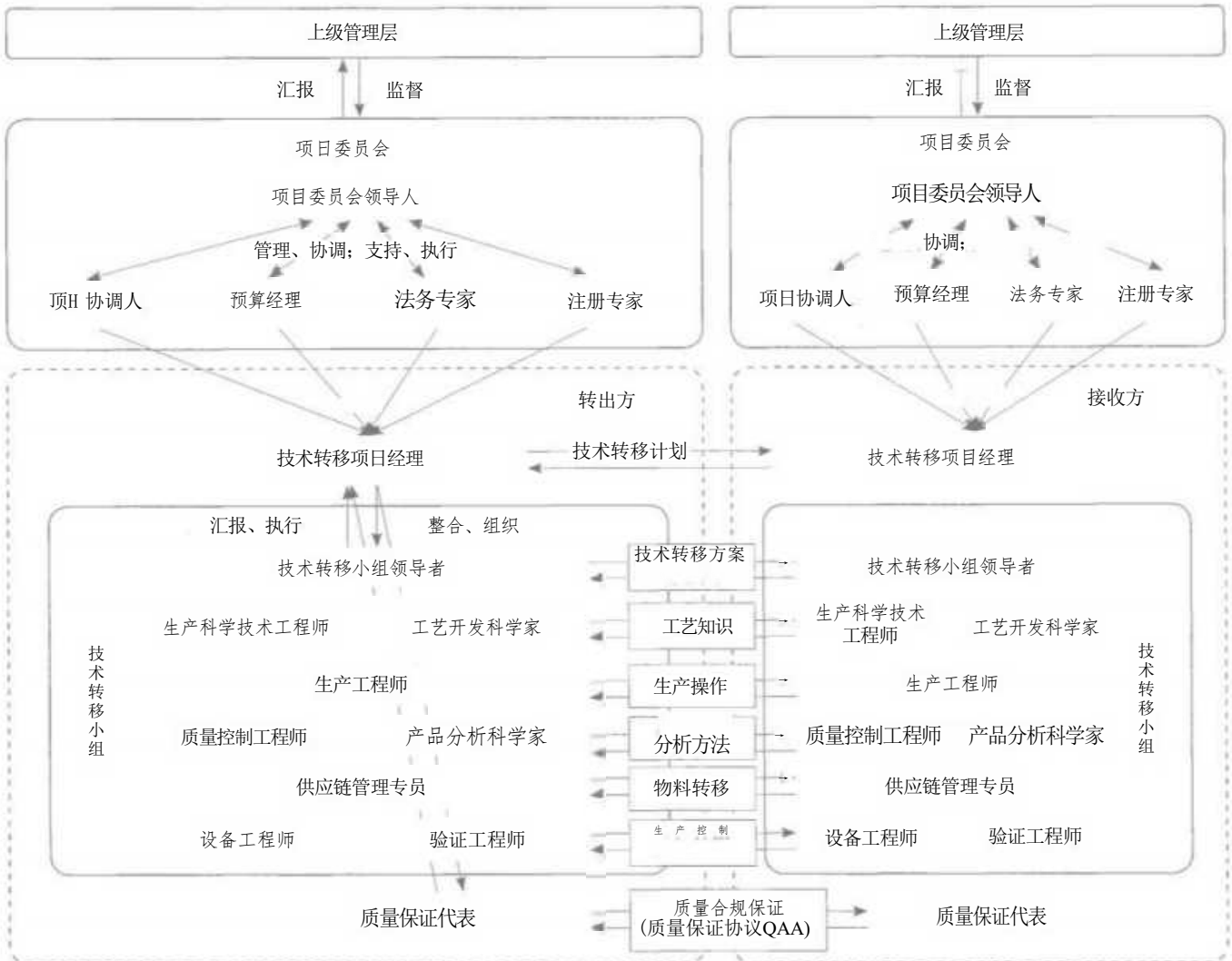


图6-2 一种技术转移团队组织架构示例

注：对于对内技术转移，转出方和接收方之上支持的上级管理层和项目委员会通常为同一组织

D. 对外技术转移的特别关注点

●定制化研发生产服务商(customized development and manufacturing organization, CDMO) 的选择：对外部公司委托生产的项目， CDMO 的选择是一个重大的决定，需要统筹考虑公司内部发展计划和寻求外部长期合作伙伴的利弊(如成本和资源分配)。除了对CDMO 公司的规模大小、财务保障、仪器设备、产能、相似项目的经验、技术能力以及法规的考虑外，转出方需要对CDMO 的产品、方法、变更以及各项转移活动进行监控，并确保其生产满足GMP 和法规的要求。转出方可以通过采用现场管理的方式保证准确快速地和接收方沟通信息，同时能主动对潜在风险获得客观深刻的认识。

●法律合同和协议：转出方和接收方之间的合同是双方合作的基础。通常技术转移项目会细化为一个或若干个合同规定下的项目包，规定涉及的责任、资源、预算和时间进度表。双方为满足项目要求会提供一些解决方案，但要同时考虑给团队带来的压力以及长期合作关系的维护。此外，转移双方应尽早签订质量协议。技术转移中出现的变化和变更的类型和程度决定了其复杂性，需要双方从质量、监管和技术角度仔细管理，并明确制定解决这些问题的联合对策。

●团队管理和技术转移交流的挑战：公司内部的技术转移相对比较容易管理，但对公司之间的技术转移，转出方应该充分考虑接收方的成熟度，包括衡量其类似产品转移的经验、质量体系的成熟度、管理系统以及支持功能的能力(如开发、生产支持、分析表征、项目管理和验证)。基于技术转移团队的组织架构，应建立不同层级、不同讨论内容和范围的交流机制，以确保技术转移交流的及时性、专业性和效率，包括但不局限于：基于双方项目委员会层面的联合项目委员会会议机制，由双方技术转移项目经理主导的技术转移项目管理联合例会机制，由双方工艺1分析技术转移专家主导的定期或不定期的联合工艺1分析转移技术讨论会机制，以及双方专门的商务/法务讨论会(如需要)。对于跨地区和国家的技术转移，转出方和接收方应该充分考虑到两地的文化差异可能会增加转移的复杂性和难度，如地理或语言带来的困难，以及对组织和交流带来的挑战。企业文化和社会文化也可能有所不同，包括不同的程序、习惯、行为、期望和规范，甚至思维方式。在技术转移过程中，必须将不同的文化和思维方式融合在一起，进行调整和沟通。团队的互动和管理、日常工作的监管和指导，以及组织之间的关系梳理也是成功技术转移管理的一个先决条件和主要考虑。

E. 技术转移计划及技术转移成功的可接受标准

技术转移双方应从项目开始明确目标以及实现目标的途径，以确保全面合理的项目管理。技术转移计划是转出方和接收方联合起草的，是指导整个技术转移项目的关键文件，为工艺和产品知识从转出方到接收方的充分理解和恰当传递提供了保证。技术转移计划应详细记录关键行动任务、人员、时间，同时明确申报策略和差距分析，例如，工艺、设备和厂房设施的比较，相关变更的风险评估和计划降低风险的行动项等。技术转移计划的内容要有可行性，针对生物制品(单抗),考虑技术转移的复杂性，以下的要素通常是不可或缺的，包括但不限于：

●转出方和接收方的职责，团队问的沟通机制。

●需要转移的生产工艺，取样和检测的步骤。

●项目阶段的划分，前后任务的关联性。

o 涉及的设备和设施，以及关键差距的分析。

●关键物料(如细胞库、测试用关键试剂、参比品等)的要求。

●关键文件的要求。

o 项目时间计划。

0技术转移所涉及的工艺放大模型/工具(如适用)

o 关键任务以及应急计划。

●分析检测方法。

应在技术转移计划中明确转移成功的衡量标准，以指导用于具体活动的技术转移(实施)方案，同时应在相应的技术转移报告中做出结论。保证产品的质量和工艺性能是方案和计划的关键内容。报告应对项目中未按计划完成的、有问题的或不成功的步骤进行分析和风险评估。在方案实施过程中，转出方和接收方应对指定的行动计划进行监控和追踪，确保接收方能够按照预期的标准生产产品和继续项目计划。可接受标准由转出方和接收方联合制定，通常包括但不限于：

0工艺性能确认以证明生产的可重复性。

0技术转移后的产品通过产品质量标准放行测试。

●接收方生产的产品与转出方原产品的可比性。

●产品稳定性数据要求。

●生产过程满足中间品及工艺步骤的控制限度(如适用)、期望收率、法规和质量要求。

在技术转移结束阶段，接收方应以技术转移报告形式对整个项目完成情况进行

总结和做出结论，包括工艺概述、中间品、原液和成品的放行情况(如适用)、设备清单、行动项完成情况、文件、后续工艺持续监测的安排等。工艺技术转移报告需要转出方和接收方的共同签名，双方应对已达成的改进措施进行监督。双方也应对前期识别的风险再次进行评估，同时应用实施的经验推动后续的改进。

针对生物制品(单抗),临床后期和上市生物制品技术转移需要考虑产品的可比性。技术转移项目组应该在项目计划中充分考虑相应的批次和时间要求。

6.2可比性研究

背景介绍

生物制品(单抗)的生产是一个复杂的过程，涉及许多步骤。变更可能发生在产品生命周期的各个阶段。变更的原因包括改进生产工艺、增加规模、提高产品稳定性、根据法规要求进行变更等。变更应有详细的记录、分析和批准，根据变更对药品的质量、安全性、有效性的影响程度和风险高低，与监管部门进行合理及时的沟通。

针对变更发生的阶段，可比性研究的关注点会有所不同。生物制品临床期间变更是以不增加临床受试者安全性风险为前提，该阶段的可比性研究结果应用于确认前期研发数据是否能够支持后期临床试验的开展，并为生物制品最终上市提供充分的支持性数据。对于已上市生物制品，则要确保变更不会对产品质量、安全性和有效性产生负面影响。通常，早期临床阶段受限于种种原因，如生产批次数量较少、对于产品和工艺的经验知识有限、分析方法尚未开发完全或经过验证等，且变更后产品仍会被应用到临床研究中，这一阶段的变更可比性研究可能比上市后变更可比性研究简化。随着经验和知识的积累，以及分析方法的不断完善，可比性研究应更全面，特别是对关键临床期间(或工艺锁定之后)发生的变更，由于没有更多临床数据的支持，应同上市后变更一样开展全面深入的可比性研究。本章节主要针对已上市产品变更开展的可比性研究。

由于工艺变更的原因、类型及内容各不相同，工艺变更对产品质量造成影响的潜在风险也有所不同。企业应结合变更的具体内容及其对产品可能造成的影响，对变更进行分类管理，并通过风险评估的方式来决定可比性研究开展的内容与形式。对于高风险变更，需要通过系列的研究(如产品的深度表征、稳定性数据甚至非临床和临床数据等)证明，该变更不对产品的安全性、有效性和质量可控性产生不良影响；对于中低风险变更，可通过相应的研究(如变更前后工艺和质量数据的对比

或书面评估等方式)证明，该变更不影响产品的安全性、有效性，并且不降低产品的质量可控性。

企业应本着逐步降低变更风险的原则设计并开展可比性研究。通常，可比性研究起始于药学/质量比对研究(包括理化分析与功能研究)，并根据其结果决定是否有必要开展进一步的非临床和(或)临床比对研究。在可比性研究开展前后以及过程中，企业应与监管部门保持良好的沟通，确保信息(如变更内容、变更类别定义、可比性研究方案、可比性研究结论等)交流的准确与透明。

□ 技术要求

本章节描述的生物制品(单抗)的可比性研究参考以下法规与权威指南：

● CDE《临床试验期间生物制品药学研究和变更技术指导原则》，2020

CDE《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则(试行)》，2021

●CDE《 生物类似药研发与评价技术指导原则》，2015

o CDE《生物类似药相似性评价和适应证外推技术指导原则》，2021

0 ICH Q5E Comparability ofbiotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process(《生物制品工艺变更前后可比性》)，2004

ICH Q12 Technical and regulatory considerations for pharmaceutical product lifecycle management(《产品生命周期管理的技术和法规考虑》)，2017

WHO Guidance:Guidelines on the Procedures and Data Requirementsfor Changes to Approved Biotherapeutic Products(《已批准生物制品变更流程与数据要求指南》)，2017

●*美国FDA Guidance:Comparability Protocols for Human Drugs and Biologics:* Chemistry,Manufacturing,andControls Information Guidance forIndustry(《生物制品可比性方案CMC 工业界指南》)，2016

o 美国FDA Guidance:Development of Therapeutic Protein Biosimilars: Comparative Analytical Assessment and Other Quality-RelatedConsiderations(《生物类似药开发过程中可比性分析评价与质量相关考量》)，2019

●*美国FDA Guidance:Chemistry, Manufacturing, and Controls Changes (CMCs)* to an Approved Application:Certain Biological Products(《已上市生物制品的CMC 变更指南》)，2021

●*EMA Guidance:Guideline on SimilarBiological Medicinal Products Containing*

Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance:Quality Issues(《生物类似药质量研究指南》),2014

●*EMA Guidance:Reflection Paper on Statistical Methodology for the Comparative* Assessment of Quality Attributes in Drug Development(《药物开发过程中质量属性可比性评估的统计学分析方法》),2021

6.2.1 可比性研究方案

可比性研究是通过收集充足的数据和建立恰当的标准，确定生产工艺的变更是否对产品的质量、安全性和有效性产生任何不良影响。需要的数据可能包括批次放行数据、生产控制数据、工艺验证数据、中间产品质量数据、分子结构表征和功能数据、稳定性数据，以及其他必要的产品质量研究数据等。在必要的情况下也要考虑到临床和非临床可比性研究。企业应根据相关要求制定合理的研究方案，根据方案展开各项研究活动。方案中同时应说明变更原因、内容和可能引起的差异，明确试验或分析的工作，并制定可比性的接受标准。此外，如果涉及分析方法的转移，则必须证明它们能产生等效的分析结果。

A. 变更描述及变更理由

变更存在多种形式和内容，可以包括工艺、物料、配方、厂房、生产设备设施、检测方法、质量标准、清洁策略、计算机软硬件等。这些变更可能直接或间接影响产品质量、法规注册或验证情况。企业可以根据变更对产品和工艺的影响程度，将变更分为重大变更、中等变更和微小变更。对于重大变更需要通过系列的研究证明，该变更不对产品的安全性、有效性和质量可控性产生不良影响；对于中等变更需要通过相应的研究证明，该变更不影响产品的安全性、有效性，并且不降低产品的质量可控性。在实施变更前应与监管部门进行充分沟通，并遵照相应法规要求进行申报与变更的执行。企业应依据相关法规制定变更管理流程，合理地对变更进行风险评估、执行监管和保持良好记录。

B. 变更风险评估

企业需要充分识别变更对工艺或产品的影响，尤其是合规性和注册申报带来的风险。企业可以依据ICH Q9质量风险管理的指导方法和企业风险管理政策，对风险项进行系统的识别、控制、沟通和审核。风险评估过程中可以通过不同方法来识别风险并对风险进行筛选排序，例如，考虑改变项与产品关键质量属性(CQA) 及

其目标范围之间的联系，考量各个工艺参数和物料性质对产品质量的影响，或者由潜在的失败模式推导等。常用风险评估工具包括流程图、检查表、FMEA 、FTA、HACCP、危害与可操作性分析(HAZOP) 等。确定高风险项后，必须确定这些风险是否可以接受。如果风险不可接受，需要提出风险降低计划，并在采取相应措施后对其风险等级进行再评估，直至风险等级降低到可接受水平。

C. 可比性研究策略

变更可比性研究是生物制品药学变更评价的基础和成功的关键。应根据变更风险评估结果确定可比性研究的策略和范围。通过一系列对变更前后相关产品的生产工艺、质量及稳定性数据的对比研究，综合评估，判定变更前后是否可比。变更可比性研究是一个递进的过程，除了开展药学可比性研究外，在某些情况下还应包括非临床和(或)临床桥接研究。

用于可比性研究的批次要具有代表性，例如，工艺验证批次、关键临床批次、稳定性研究批次、用于制备工作参比品的批次等。批次的数量要基于产品开发阶段和生产情况，同时考虑统计学分析的数据量要求。

D. 可比性研究内容

可比性研究的目的在于确证工艺变更前后产品质量、安全性与有效性的一致性。基于工艺变更的具体内容，该一致性评估可在原液与成品上分别或同步开展。可比性研究应遵照可比性方案开展，综合考虑变更对产品质量、安全性与有效性的潜在影响、产品开发阶段，以及产品与工艺的经验知识等因素。可比性研究应采用层级递进的方式开展，以药学(分析与工艺)比对为基础，若变更后产品质量属性超出预设的可比性接受标准，应对该质量属性差异的原因，以及对产品安全性和有效性的潜在影响开展深入调查和研究，包括与历史非临床研究批次和临床研究批次数据深入比对，以及结合进一步的质量特性研究更好地评估分析差异的影响，进而决定是否有必要开展进一步的非临床和(或)临床桥接研究。同时应注意，若原液的变更会影响制剂，应同时收集原液和制剂的数据，以支持可比性结论。

(1)工艺性能的比对工艺可比性研究主要对变更前后的工艺步骤、工艺参数、过程控制结果和历史数据进行比较。除比较生产中的工艺过程控制参数外，还应对必要的工艺过程控制检测结果进行比较，关注变更前后生产工艺对产品相关物质、杂质和外源因子的去除能力的可比性。对关键临床样品或已上市产品的工艺变更，应对适宜批次进行变更后产品的分析或开展变更后生产工艺验证，以证实工艺的稳

健性和批间一致性。应慎重考虑拟变更事项对后续工艺步骤和其他相关工艺过程控制参数的潜在影响。如必要，应对变更后工艺加强相应的中间控制。应论证变更前后工艺和中间产物具有可比性，变更后的工艺控制能力不低于变更前。

(2)批放行数据的比对工艺变更前后产品批放行数据的比对是质量可比性研究的重要组成部分。但需要注意的是，尽管批放行数据有助于揭示变更对产品质量的影响，但往往并不能全面评估影响，必要时应以扩展的表征分析研究作为辅助。同时，工艺变更后，应根据可比性研究结果评估质量标准的适用性。对于变更后的产品放行需求，应评估现有方法的适用性，必要时考虑增加、删除或变更现有放行检测方法。应关注满足可比性接受标准但超出历史数据变化趋势的结果，这可能揭示了产品质量的变化，必要时应进行进一步研究与分析。除非有充足的理由支持，通常情况下不应放宽放行质量标准。

(3)扩展的表征分析　由于生物制品自身结构的复杂性，工艺变更前后的产品质量，如一级结构、翻译后修饰、分子变异体等方面的细微差异往往不能仅通过批放行数据的比对得到体现。必要时，扩展的表征分析应纳入到工艺变更对产品质量可比性影响的评估之中。所选用的方法应能最大限度地检测到工艺变更对相关质量属性可能造成的影响。为了能够对产品的理化与生物学特性进行全面表征，应尽量采用正交、互补方法对同一质量属性(如分子量、杂质、高级结构等)进行表征研究，并结合方法与产品特性制定相应的可比性接受标准。

在扩展的表征分析研究中，通常采用对变更前后产品进行直接比对研究的方式，揭示工艺变更对产品质量可能造成的影响。

(4)稳定性比对研究　由于单抗产品通常对缓冲液组分、贮存条件、接触材料等条件比较敏感，生产工艺变更可能造成产品分子结构与纯度的变化，需评估其对稳定性的影响。可比性研究中应包含对变更前后产品的稳定性直接比对研究，并作为对表征分析的补充研究，用以揭示表征分析中不能被立即观察到的微小差异。例如，残留在产品中的痕量蛋白酶往往仅能通过长期贮存条件下观察到的产品降解加以揭示。长期贮存条件下的稳定性研究有助于揭示变更前后产品稳定性可能的差异，应针对变更后原液和(或)成品开展。

加速与强制条件下的稳定性研究有助于揭示变更前后产品降解途径，应包含在可比性研究中。ICH Q5E中提到，“对于任何有可能影响蛋白质结构、纯度以及杂质谱的变更，都应评估其对产品稳定性的影响，因为蛋白质通常对这些变敏感”。 一般而言，强降解条件下观察到的产品降解途径未必能代表加速或真实贮存条件下的降解途径，但仍然有助于揭示变更前后产品之间存在的可能差异。因此，强降解研究

结果应结合长期稳定性研究结果，用来支持和指导变更后产品长期贮存条件下货架期的制定。此外，由于强降解条件通常对产品质量属性的影响较大，为避免不同检测时间带来的差异，在有条件的情况下，应尽量开展变更前后产品在强制条件下的稳定性直接比对研究。强制稳定性研究中采用的条件应能在合理的时间范围内对产品产生可测量的降解，并用以评估产品的降解速率与降解产物。

(5)非临床与临床研究 如果已完成的分析比对研究表明变更前后产品质量高度可比，可比性研究可终止于质量比对研究。否则，应开展进一步的非临床或临床比对研究。是否开展非临床或临床比对研究应基于如下考量：

●质量评估需求：有必要对变更前后产品差异程度，以及是否有新杂质或产品相关变异体产生进行毒理、动物药代动力学(PK) 或临床生物等效性评估，或受限于分析方法能力，或在质量可比性研究中观察到的差异需进一步在非临床和(或)临床研究中加以确证。

o 产品知识

由于分子复杂性原因，如异质性和高级结构复杂性，理化与体外生物学活性方法无法检测到产品结构与功能的差异

尚未建立起明确的质量属性与安全性/有效性的关系(结构-活性关系)

治疗性蛋白与内源性蛋白关联以及由此引发的免疫原性后果。

分子作用机制(已知与未知、单一与多重活性位点)。

0已有的非临床与临床数据

适应证与患者人群：产品间的差异需在不同的患者人群(如免疫原性)和适应证中进行风险评估。

用药(如给药剂量、方式与途径):通常，长期给药和皮下注射与短期给药和静脉注射相比会有更高的免疫原性风险。

治疗窗与剂量效应曲线：变更对有不同治疗窗大小的产品的影响会有所不同。具有陡峭或钟形剂量效应曲线产品的安全性与有效性会受到PK 或受体结合的微小变化的影响。

先验经验(如免疫原性、安全性等):从本产品或同类产品中获得的经验可被用来评估不良反应风险(如免疫原性风险)。

0药代动力学/药效学(PK/PD) 关系、药物分布与清除。

非临床与临床研究可被用来评估变更前后产品差异，包括PK 研究、PD 研究、PK/PD研究、临床有效性研究、安全性研究、免疫原性评估和药物警戒研究。这些研究应尽可能进行变更前后产品之间的直接比对研究。

E. 可比性接受标准的制定及其制定依据

可比性研究应预设可比性接受标准。在早期临床研究阶段，由于产品批次与工艺知识相对有限，可比性验收项目可能相对较少，在确保安全性前提下，往往关注对产品有效性有关键性影响的检项，其可接受范围可能较为宽泛。随着产品与工艺经验的不断积累，可比性验收项目将会增加，相应的可比性接受标准也将收紧。通常，可接受标准的制定应基于历史批放行与表征数据，同时兼顾工艺与方法的变异性。

可比性接受标准的制定应基于对质量属性与安全性和有效性关系的理解基础之上。比如，对于已知不影响分子有效性的质量属性，其标准的制定通常可以宽于那些与有效性关系比较密切，或变更对有效性影响尚不清楚的质量属性。质量属性与分子有效性或安全性关系的了解可以来源于在研分子，或其他具有类似结构的分子。对于特定质量属性可比性接受标准的制定，还应考虑产品开发阶段、对受试者安全性的影响、给药方式与剂量、治疗适应证、用药人群，以及该属性已有的临床暴露量信息等。需要注意的是，可比性接受标准的制定应结合产品已获得的非临床或临床信息，以及分析方法与工艺能力，而不能仅依赖于历史批放行数据的统计分析。

对于变更后产品与变更前存在微小差异但仍满足可比性接受标准的情况，仍需对该差异对产品质量的影响进行评估，相应的可比性结论应建立在对该质量属性与产品安全性和有效性之间关联的充分理解的基础之上。应特别关注未在可比性方案中预设或预期到的差异项，这些差异项可能预示着某些由于变更而造成的对产品安全性与有效性的潜在影响。同时，应明确超出可比性接受标准，或确认变更前后某项质量属性的数据不可比，不一定会直接构成可比性研究失败的结论。如有充分证据表明该差异并不会对产品安全性与有效性造成负面影响，仍可认为变更是成功的。当然，变更前后产品不可比同样包括变更后产品在某属性上质量提升的情形。

可比性接受标准的制定依据通常可基于以下几种方式：

●基于产品质量标准来制定可比性接受标准：在产品早期开发阶段，通常可以采用变更前产品质量标准作为可比性接受标准，评估变更前后产品的质量可比性。在晚期或上市后变更阶段，对于明确不会受变更影响的质量属性，仍可采用质量标准作为可比性接受标准。通常，可采用风险评估的方式衡量工艺变更可能影响的产品质量属性。采用产品质量标准作为可比性接受标准的方式同样可应用于药典或监管部门要求的必要质量属性上，如外观、颜色、浊度、pH 值、渗透压、内毒素、微生物限度等。

0基于对历史数据的统计分析制定可比性接受标准(如容忍区间法或等效性分析法等):采用容忍区间(tolerance interval,TI)方法设立可比性接受标准时，需对变更后每一个数据进行评估，以确定其是否落在预设的容忍区间内。比如，95/99TI方式通常用于工艺变更可比性评估，表示采用95%置信区间与99%的覆盖率进行可比性评价。采用该方法制定的可比性接受标准范围应基于变更前生产工艺下历史数据均值为中心的容许区间。等效性检验评估方式是基于变更前后产品检测均值的比对，进而评估均值之间的差异是否会对产品质量造成实质性影响。可比性评估中统计分析方法应用的考量可以参考 EMA《药物开发过程中质量属性可比性评估的统计学分析方法》, 2021。

●基于检测方法能力的图表趋势分析进行可比性评估(通常包括谱图的目视可比、稳定性图表的趋势分析、杂质谱比对等):对变更前后产品谱图的目视比对或图表的趋势分析，也可评估变更前后产品的质量可比性。如果检测出变更后产品在纯度和杂质谱上与变更前产品有差异，应评估这些差异对安全性和有效性的潜在影响。变更产生新杂质时，如果可能，应对新杂质进行鉴定。应特别关注变更后产品中出现或丢失的杂质峰，并根据杂质的种类和数量，开展进一步确证研究，以确认对产品安全性或有效性没有产生不利影响。

o 或基于上述任何一种或几种方式的组合来进行可比性评估：

F. 可比性研究中的方法及其适用性考量

可比性研究开展之前，应根据变更的具体类型和范围评估现行检测方法的适用性，以及是否需要对现行方法进行优化或开发新的检测方法，并进行必要的分析方法确认和验证。比如，生产工艺的变更可能导致宿主细胞蛋白杂质谱的变化，需评估该类杂质检测方法对变更后样品检测的适用性，并确认是否有必要对检测方法进行优化或调整。 一般情况下，监管部门和各类指导原则并不要求对可比性研究中用到的表征方法进行全面的方法学验证，但企业仍需确保所用方法具有良好的科学性，并能提供一致、可信的检测结果。用于产品放行和稳定性监控的方法应参照ICH 相关指导原则 [Q2(R1),Q5C,Q6B] 进行全面的方法学验证。

分析方法在产品开发过程中通常会经过持续的优化、变更，甚至替换。需要注意的是，如果可比性接受标准是基于变更前方法产生的历史检测数据的统计分析，应在可比性方案中明确方法变更可能对检测数据造成的偏倚，以及对可比性评估结果可能造成的影响。必要时，应使用变更后的方法对工艺变更前后代表性样品进行直接对比检测。

6.2.2可比性研究结果的解释与评估

A. 可比性研究报告

可比性研究报告是对可比性研究方案的执行情况和结果进行总结分析，依据设定的可比性接受标准，对变更前后产品是否可比作出最终结论。可比性结论并不意味着变更前后产品在质量属性上是完全等同的，但应确保差异不会对产品质量、安全性和有效性产生不良影响。如果有比较项存在不一致，需要有充分的依据判断产品可比性，判断的依据与合理性需与可比性结论一同在报告中描述。可比性研究报告也应对方案中未完成的行动项、主要事件和对可比性方案相关联的偏差进行记录，并对相应的风险和后续行动进行分析。

B. 可比性结果的递进与完整性评估原则

可比性研究由多个研究方案、报告组成，通常涉及多个部门不同时间段的研究工作。尤其是稳定性研究和扩展的质量对比研究，需要较长时间收集最终数据。各项工作以阶段递进的方法管理，直到完成所有指定的行动项和数据收集，相关的报告应经审批签署。可以通过主计划和主报告形式对涉及的所有研究和数据结果进行统一整理，在总报告中得出是否可比的最终结论。可比性研究方案和报告结构示例见图6-3。

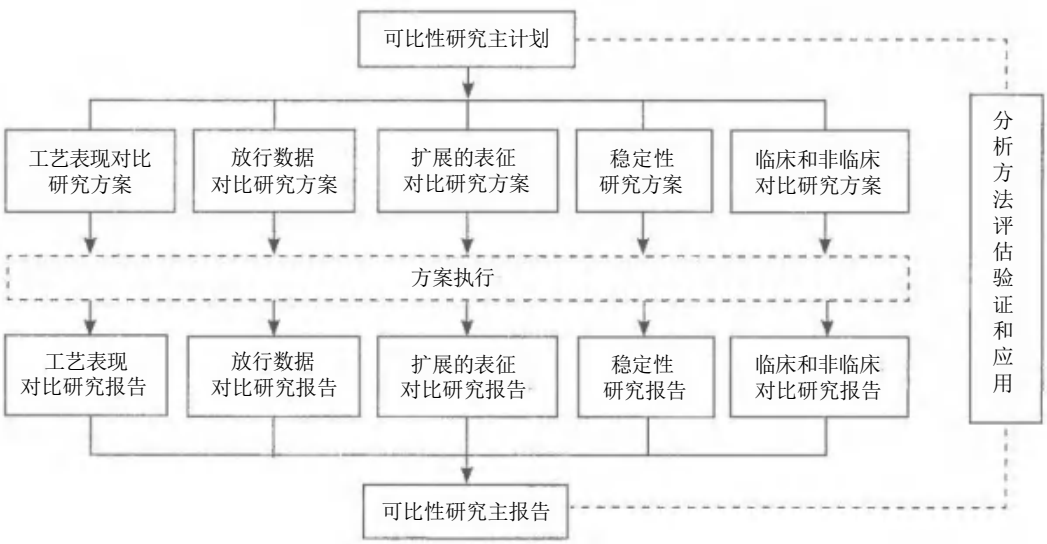


图6-3 可比性研究方案和报告结构示例

6.2.3可比性与生物相似性的异同

生物相似性评估不同于可比性评估，它是以已经批准的起始产品(原研生物药、参考品)为基础，在质量、安全性和有效性方面对生物类似药进行的广泛评估。依据CDE《生物类似药研发与评价技术指导原则》和《生物类似药相似性评价和适应症外推技术指导原则》,参考美国FDA 在2019年发布的Development of Therapeutic *Protein Biosimilars:Comparative Analytical Assessment and Other Quality-Related* Considerations(《治疗性蛋白生物类似药的研发：比对分析评估和其他质量相关考量》),以及EMA 在2014年发布的Guideline on Similar Biological Medicinal Products *Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance:Quality Issues(《含*有生物技术衍生蛋白质作为活性物质的生物类似药指南：质量问题》),相似性研究应按照与参照药比对试验、逐步递进、 一致性原则和相似性评价原则进行。研发过程可分阶段比对证明候选药与参照药的相似性，研究中采用相同产地来源的候选药产品(为工艺确定后的产品或其活性成分),考虑与参照药一致的方法和技术(如不同则应评估适用性和可靠性),在药学、非临床以及临床阶段证明与参照物的相似性。

●药学研究和评价：包括工艺、分析方法、特性分析(如理化、生物活性、纯度和杂质、免疫学特性)、质量指标、稳定性研究以及其他研究(如宿主细胞、制剂处方、规格、内包装材料等)

●非临床研究和评价：包括在药学比对研究的基础上开展药效动力学、药代动力学、免疫原性、重复给药毒性试验，以及其他试验。

●临床研究和评价：在药学和非临床比对研究的基础上进一步对临床药理学[药代动力学和(或)药效学]、有效性、安全性、免疫原性展开研究，证实与参照药的相似性。

与可比性研究相比，相似性的研究是用于候选药和参照药之间比对，但其涉及范围更为广泛。在有些情况下，可比性研究会成为相似性研究的一部分，例如，用于相似性研究的候选药对工艺、分析方法、规模或产地进行改变时，应评估变更后产品的可比性。

符合生物制品(单抗)工艺控制要求的检测方法

本章主要内容：

了生物制品(单抗)的关键质量属性风险评估

T 生物制品(单抗)的分析控制策略的制定

了生物制品(单抗)的典型分析方法

T 生物制品(单抗)分析方法的生命周期管理

7.1 关键质量属性和分析控制策略

背景介绍

分析控制策略的设计需要依据关键质量属性(CQA) 风险评估以及总体工艺控制策略。分析控制策略包括对中间样品、原液、制剂以及稳定性样品的检测策略。在这些检测中，除与CQA 关联的检测项目外，还需设计一系列相关检测，用于确保单抗原液、制剂生产工艺控制的稳健性、工艺表现的一致性以及产品质量的可控性。分析控制策略与工艺控制策略一起保证了单抗原液制剂在临床和商业化生产中的安全性和有效性。

7.1.1关键质量属性风险评估

CQA的确定通常涉及CMC多个功能板块的共同努力，单抗类药物CQA的确定方式通常分为三种：

⑴药典中要求的必检项，如外观、微粒、pH、渗透压、病毒、微生物、细菌内毒素等。

(2)质量属性，如原材料引入的杂质以及生产过程中的浸出物等，通常需通过毒理风险评估的方式来衡量其是否应作为产品CQA 加以监控。

(3)对于产品和工艺相关杂质，通常采用风险评估的方式，即对每一项产品和工艺相关杂质根据其对产品安全性与有效性的影响及影响发生的可能性进行综合评估打分，根据得分进行排名，确定其是否为该产品的CQA。评估流程可参考本分册生物制品(单抗)部分“2.3工艺控制”。

CQA的确定将进一步指导工艺开发研究过程，并通过对CQA与工艺参数之间关联的定量分析来确定产品开发的关键工艺参数。CQA 风险评估应伴随产品生命周期，并随着新的工艺与产品经验的积累进行再评估。

实例分析

实例1：贝伐珠单抗CQA 评估示例

以贝伐珠单抗为例，采用风险等级过滤(risk ranking and fltering,RRF)法 评估该产品的每个质量属性对安全性和有效性的可能影响。评估结果由两个因素决定：影响(impact) 和影响的不确定性(uncertainty) 。对影响的评估将考虑产品每个属性已知或潜在对生物学活性、药代动力学和药效学(PK/PD)、 免疫原性和安全性四方面的影响，影响越大则排名越高。每个方面的影响单独排名，排名最高的单个影响类别结果决定了该属性的总体影响(表7-1)。影响的不确定性是指用于评估影响的信息来源的确信程度，确信程度越高则排名越低(表7-2)。对“影响”和“影响的不确定性”采用不同的分值系统来反映两个因素的相对重要性，影响大于不确定性，将这两个值相乘，得到风险评分，以确定属性的整体相关性：关键性(criticality)=“影响”×“不确定性”。所有的质量属性都根据各自的风险评分分配一个关键程度，得分范围在2~140分，分数越高则风险越大(表7-3)。2~12分的产品质量属性为低风险质量属性，得分为12~112分的为高风险质量属性，即产品的关键质量属性。风险评估不需要考虑工艺、生产能力或可检测性。

表7-1 影响的评估

影响(分值)	生物学活性	PK/PD	免疫原性	安全性
非常高(20)	非常关键的变化	PK有显著变化	检测到抗药抗体，需针对安全性考虑限度	不可逆的副作用

续表

影响(分值)	生物学活性	PK/PD	免疫原性	安全性
高(16)	关键变化	PK中等变化，PD受到影响	检测到抗药抗体，需针对有效性考虑限度	可逆的副作用
中等(12)	中等变化	PK中等变化，PD未受影响	检测到可控的抗药抗体反应	可控的副作用
低（4）	变化在可接受范围	PK变化在可接受范围，PD未受影响	检测到微小的抗药抗体反应	短时间微小的副作用
无影响(2)	没有变化	PK和PD均未受影响	未检测到抗药抗体或检测到的抗药抗体无相关体内效应	没有副作用

表7-2 不确定性评估

不确定性(分值)	评估依据
非常高(7)	无任何相关信息
高（5）	有相关分子的相关文献报道
中等(3)	有待评估分子非临床或体外研究数据；相似分子临床、非临床、体外研究数据
低（2）	已在该产品临床研究中曾被使用
非常低(1)	已在待评估分子的临床中被针对性研究

表7-3 关键性评估分数表

不确定性 / 影响	1(非常低)	2(低)	3(中等)	5(高)	7(非常高)
20(非常高)	20	40	60	100	
16(高)	16	32	48	80	112
12(中等)	12	24	36	60	
4(低)	4	8	12	20	
2(无影响)	2	4	6	10	

注：浅深灰处得分表示低风险质量属性(非CQAs)，深灰处得分表示高风险质量属性(CQAs)， 黑色处表示不确定性为“非常高”时默认以影响为16分计算关键性评估分数。评分相同情况下，优先考虑影响评分。影响为中等(12分)和不确定性非常低(1分)时，质量属性被评估为高风险。影响为低(4分)和不确定性为中等(3分)时，质量属性被评估为低风险。

通过以上风险评估的方式确定贝伐珠单抗的关键质量属性，每一类列举一项属性评估见表7-4。

表7-4 贝伐珠单抗CQA评估示例

CQA类别	属性	检测方法	影响	影响评分依据	不确定性	不确定性评分依据	得分	等级
产品相关杂质	聚合体	SEC-HPLC法	20	可能增加免疫原性和影响有效性	5	有文献报道，聚合体的主要影响为免疫原性	100	高
工艺相关杂质	蛋白A(Protein A)残留	ELISA法	20	蛋白A(Protein A)可能引起免疫反应和炎症，可能影响与FcRn结合，对PK产生影响	5	有文献报道，Protein A残留的主要影响为免疫原性、炎症和半衰期	100	高
分子结构的变异体	电荷变异体中的酸性组分	CEX-HPLC法	12	抗体酸性组分可能由脱酰胺、氧化、糖化、唾液酸化等修饰组成，可能降低有效性	5	对酸性组分进行收集和活性鉴定，尚未鉴定出酸性组分的确切结构，未观察到对生物学活性有影响	60	高
	糖基化异质性中的半乳糖含量	HILIC-UHPLC法	2	贝伐珠主要结合体内游离的VEGF，作用机制与CDC效应无关	5	据文献报道，半乳糖型与IgG1的CDC效应显著相关，半乳糖型存在于内源性抗体	10	低

7．1．2原液、制剂和中间产品的分析控制策略

实施指导

分析控制策略主要包括以下五点：

●原液的放行和稳定性测试：进行原液放行和稳定性测试，以确保最终产品符合既定标准和临床用途。

●制剂的放行和稳定性测试：进行制剂放行和稳定性测试，以确保最终产品符合既定标准和临床用途。

●中间产品过程测试/原材料测试。

●特性研究：包括结构表征、纯度与杂质、生物学活性及免疫学特性等特性研究。

●额外检测控制：如工艺性能确认/可比性研究测试、用于工艺性能确认/可比性中的测试等。

针对药品一般属性(含一般属性和辅料等制剂处方相关特性)、工艺相关杂质、产品相关变异体和杂质、外源性污染物四类主要的生物制品关键质量属性，需要制定相应的分析控制策略。对每类CQA 的分析控制策略示例见表7-5。

表7-5 单抗生物药制剂的分析控制策略示例

原液/制剂质量属性		CQA分类	影响	来源	分析方法	控制策略
纯度	单体	产品相关变异体和杂质	有效性	来源于生产工艺	SEC-HPLC	过程检测 原液与制剂放行检测 稳定性检测
	聚合体	产品相关变异体和杂质	有效性 免疫原性 安全性	来源于生产工艺，中间产品/原液/制剂贮存		
电荷异质性	酸性组分	产品相关变异体和杂质	有效性	来源于生产工艺，中间产品/原液/制剂贮存	CEX-HPLC	过程检测 原液与制剂放行检测 稳定性检测
	主峰	产品相关变异体和杂质	有效性	来源于生产工艺		
	碱性组分	产品相关变异体和杂质	对有效性影响低	来源于生产工艺，中间产品/原液/制剂贮存		
宿主细胞蛋白(HCP)残留		工艺相关杂质	免疫原性 稳定性	由生产工艺引入	HCP ELISA	过程检测 原液放行检测
宿主细胞DNA(HCD)残留		工艺相关杂质	安全性	由生产工艺引入	qPCR	过程检测 原液放行检测
蛋白A(Protein A)残留		工艺相关杂质	安全性与免疫原性	由生产工艺引入	ProteinA ELISA	过程检测 原液放行检测
蛋白含量		药品一般属性	有效性	来源于生产工艺，中间产品/原液/制剂贮存	UV	过程检测 原液与制剂放行检测 稳定性检测
颗粒物		药品一般属性	免疫原性 安全性	由生产工艺引入，中间体/原液/制剂贮存	ChP<0903> USP<787> EP<2.9.19>	制剂放行检测 稳定性检测
聚山梨酯80		药品一般属性	安全性 有效性	由生产工艺引入，中间产品/原液/制剂贮存	FLD-HPLC	制剂放行检测 稳定性检测
无菌		外源性污染物	安全性	由生产工艺引入，中间产品/原液/制剂贮存	ChP<1101> USP<71> EP<2.6.1>	过程检测(微生物限度) 制剂放行检测 稳定性检测
细菌内毒素		外源性污染物	安全性	由生产工艺引入，中间产品/原液/制剂贮存	ChP<1143> USP<85> EP<2.6.14>	过程检测 原液与制剂放行检测 稳定性检测

在可能的情况下，尽量使用过程控制和(或)原材料测试来降低产品的风险。当过程控制不能充分控制时，需要通过放行分析控制将剩余风险降低到可接受的水平。在正常操作下，如果风险水平被认为非常低，可以不进行放行或过程控制测试。这些CQA 控制将作为工艺确认研究的一部分进行测试，并根据特性分析和可比性的需要进行评估(例如，评估制造工艺和生产变更的影响)。分析控制策略应根据新出现的知识、临床经验、生产性能和工艺的任何潜在变更定期重新评估。

分析控制策略同时还有以下特点：

●在各个阶段都适用。例如，与“安全”相关的CQA 的分析控制，如无菌和细菌内毒素基于药典测定， 一般在各个阶段均需控制。

●在不同阶段中会发生变化，控制策略加强。 一些分析开发会随着开发阶段变化而发生变化和改进。典型例子包括从平台宿主细胞蛋白(HCP)ELISA 过渡到产品特异性宿主细胞蛋白 (HCP)ELISA 检测，或从基于生化原理的活性测定(如结合测定、酶特异性测定)过渡到更能反映药物体内作用机制的活性检测方法(例如，以细胞为基础的试验、酶活性试验或与生理有关试验等)。

●随着对产品理解的提高，测试项可能会减少。提高对产品CQA 和分析方法的理解，可以使一些分析方法从放行变为中间产品过程控制。结构/功能研究表明，单一CQA 如果被多种检测方法考察，随着对产品理解的加深，在整体风险可控的原则下，考察同一CQA 的其他检测可能会保留在表征或可比性测试中。

7.2分析方法

背景介绍

根据检测用途不同，分析方法一般分为特性研究方法、中控产品检测方法、放行检测方法、稳定性检测方法和其他检测方法(如支持工艺验证检测方法)。

根据方法目的不同，分析方法一般分为鉴别方法、含量与效价方法、产品相关物质与纯度、工艺相关杂质、安全性检测等。本节主要介绍重要的分析方法，并解释其检测的重要质量属性。需要强调的是，随着分析技术的不断进步，本节未提及的其他方法，如质谱等，同样对大分子相关质量分析起着关键作用。

实施指导

A. 鉴 别

●肽图[反相高效/超高效液相色谱(RP-HPLC/UHPLC) 法]:肽图是《中国药典》三部人用重组单克隆抗体制品总论中所推荐的鉴别方法。《中国药典》通则3405肽图检查法中介绍了肽图法的应用、肽图检查法建立的常规步骤、重要参数和验证的基本要求。蛋白质氨基酸序列结构是决定蛋白质功能的重要性质之一。根据供试品蛋白质的结构特性选择特定的裂解方法(如化学法或酶裂解)。鉴别法常用的酶有胰蛋白酶(tripsin), 或赖氨酸蛋白酶(lys-C) 等可使蛋白质产生特异性断裂，将蛋白质降解为一系列分子量和组成不同的氨基酸片段，即肽段。通过反相液相色谱进行分离，这些肽段在色谱图上表现为多个峰，即肽图。同一蛋白质在相同条件下得到的肽图基本相同，不同的蛋白质由于氨基酸序列不同，裂解得到的肽段也不同，即肽图谱不同。通过比对样品与参比品的肽图，从而鉴别蛋白质一级结构的一致性。

抗体药物一般采用RP-HPLC/UHPLC法进行肽图测定，比较供试品谱图和参比品谱图， 一般以供试品与工作参比品肽图谱图相比，供试品特征峰与工作参比品特征峰相对保留时间一致作为接受标准。

●等电点(cIEF/iCIEF法):等电点是蛋白质自身的特殊属性，该方法同样可以作为鉴别方法。此外，抗体蛋白在生产和贮存过程中，由于脱酰胺、氧化、C- 末端赖氨酸剪切及N- 末端环化形成焦谷氨酸程度不同等原因，会产生电荷异质体，表现为等电点有酸碱差异的多种组成成分，这些等电点不同的组分也构成了产品的特征之一。可采用毛细管等电聚焦电泳法 (cIEF/iCIEF 法),将等电点不同的组分进行分离，根据各组分峰的特征及分布，确定产品电荷异质性的特征。

B. 产品相关物质与纯度

●纯度(CE-SDS 法):十二烷基硫酸钠毛细管电泳(CE-SDS) 为《中国药典》三部推荐用于单克隆抗体制品分子大小变异体检测的方法。非还原型CE-SDS 能对片段进行定量分析，还原型CE-SDS 能对非糖基化重链(NGHC) 进行定量分析。利用毛细管内填充凝胶的分子筛效应，借助SDS (十二烷基硫酸钠)消除不同蛋白质间空间结构以及电荷的差异，在电场下，使蛋白质根据分子量大小进行分离，从而达到检测样品纯度的目的。CE-SDS 法与 SDS-PAGE 法原理相同，但SDS-PAGE 法在操作过程中，由于凝胶配制、考马斯亮蓝染色及脱色等条件的变化对检测结果

的影响较大，方法的分辨率及稳定性较差； CE-SDS 由于采用了高压电场和毛细管的分离，配合相应检测器(如二极管阵列，PDA), 因此在现代大分子分析中一般选择灵敏度和分辨率更高的毛细管凝胶电泳法，即CE-SDS 法来检测蛋白的纯度。

o 纯度(SEC-HPLC 法):生产和贮存过程中蛋白分子可能产生聚合物和片段，影响产品的纯度和安全性。体积排阻色谱法(SEC-HPLC 法)可将不同分子大小的蛋白进行分离，在色谱图上采用峰面积归一化法计算主成分峰面积占总峰面积的百分比，从而得到日的蛋白的 SEC 纯度。多聚体和碎片的含量也可以同时计算得到。

●电荷异质性(CEX-HPLC,cIEF/icIEF 等):抗体蛋白在生产、工艺和贮存过程中，由于糖基化程度不同、脱酰胺、氧化、N 末端谷氨酰胺环化、C 末端赖氨酸缺失等，容易产生等电点有微弱差异的多种电荷变异体。离子交换色谱是基于电荷差异进行分离的一种分析方法，以离子交换树脂作为固定相，树脂末端修饰可交换的离子基团。当流动相携带着可电离组分通过固定相时，组分离子与树脂末端离子基团进行可逆交换，根据组分离子对树脂表面亲和力不同而得以分离。根据与之交换离子基团性质的不同分为阳离子交换色谱(CEX) 和阴离子交换色谱(AEX)。 基于抗体蛋白表面电荷分布的不同，离子交换色谱可用于抗体蛋白酸碱电荷变异体的分离与分析，根据酸性峰、主峰和碱性峰各组分所占的比例可鉴定各生产批次的电荷异质性，控制产品质量，考察批次之间一致性。cIEF/icIEF法同样可以作为电荷异质体的检测手段。

o N-糖基化分析(FLD-HPLC 等): N- 糖基化是一种最为常见的翻译后修饰，糖链的结构在补体激活和受体亲和性上发挥着至关重要的作用，可影响治疗性单抗的有效性。关于N- 糖链分析多数方法均基于通过PNGase F对蛋白质N- 糖链的酶促释放。由于缺乏内在发色团，分析前通常还会使用荧光标记物对糖链进行衍生化。每个N- 糖链包含一个可以与过量荧光标记物反应的还原端位点，因此每条N- 糖链将与一个荧光基团连接。处理后的样品即适用于通过分离和荧光检测的相对定量分析，无需任何定量标样或校准步骤。2-AB 是一种稳定的中性标记物，常用于N- 糖链的分析。另外，目前商业化的试剂盒如RapidFluor-MS、InstantPC等也用于N- 糖链的快速分析。

C. 工艺相关杂质

●外源性DNA 残留(qPCR 法):外源性 DNA 残留为《中国药典》法定要求检测的工艺相关杂质。大分子药物原液采用实时荧光定量PCR(qPCR) 检测外源性DNA残留。利用细胞基因组内的重复序列，设计正向和反向引物。在PCR 反应体系

中，扩增靶序列，加入专属或者通用的荧光染料，该染料可特异性地掺入DNA双链后发射荧光信号，游离的染料分子不发射任何荧光，从而荧光信号的增强与PCR产物的增加保持完全同步。荧光信号的累计情况与样品中的初始DNA量成正比，可通过标准曲线计算出待测样品残留DNA的含量。

对于大剂量的生物制品(如单克隆抗体)，WHO 允许限度为≤10ng/剂量，根据药物最大使用剂量[单位mg/kg按体重75kg换算成单位毫克/(人·次)]，可以将外源性 DNA 残留量标准换算成pg/mg。

●宿主细胞蛋白残留(HCP ELISA法)：残留在生物制品中的宿主蛋白属异源蛋白，有研究报道，残留宿主蛋白不仅可能引起机体的过敏反应，还可能引起机体对蛋白质药物产生抗体。HCP ELISA方法运用ELISA法，将捕获抗体与固相载体结合，形成固相抗体(试剂盒已包被好)，将辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的酶标抗体、受检物(抗原)加入，形成固相载体-HCP- 酶标抗体夹心复合物，经洗涤洗去其他未结合的物质，此时固相抗体的酶量与标本中受检抗原量 HCP 有关。

●蛋白A 残留(ELISA 法)：在采用固定了Protein A的亲和层析柱纯化抗体过程中，极微量的 Protein A可能从层析柱上脱落。被Protein A污染的生物制品极有可能对患者产生不良反应。可通过ELISA方法检测供试品中残留的Protein A。将特异性抗体与固相结合，形成固相抗体，将标本(标本中的受检物即抗原)加入，形成固相载体复合物，经洗涤洗去其他未结合的物质，再加HRP 标记的酶标抗体，与复合物上抗原相结合，此时固相抗体的酶量就与标本中受检抗原(ProteinA) 的量有关。

D. 效价(活性方法)

生物学活性方法是重要的单抗药物结构/功能的检测方法。活性主要包括结合活性和生物活性，结合活性一般采用ELISA法或细胞 ELISA法，生物活性一般采用细胞增殖抑制法、细胞毒性法、ADCC、CDC、荧光素酶报告基因细胞测定法等。常用方法举例如下：

●细胞ELISA 法：本方法运用ELISA 原理，将细胞包被于细胞培养板上，与蛋白(抗体或抗原)进行结合，再结合HRP, 通过TMB 显色，得到OD 值，通过拟合出曲线，计算供试品和参比品ECso值的比例反应生物学活性。

●荧光素酶报告基因法：该方法是基于分子的作用机制及其信号通路设计并建立检测方法中的靶细胞、效应细胞，最终通过加入底物检测荧光信号的强弱判断荧光素酶报告基因的表达，进而获取药物剂量效应曲线。

E. 含量

通过测定蛋白含量，可以有效控制产品的有效性和安全性。因蛋白质中酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键结构以及胱氨酸的吸收，使蛋白质溶液在280nm有最大紫外吸收峰。在一定吸收范围内，蛋白质在最大吸收波长处的吸光度与浓度成正比(比值即吸收系数),因此可以通过测定蛋白质在280nm的紫外吸光度，由已知的消光系数，计算出样品中蛋白质的含量。

F. 辅 料

聚山梨酯80含量(FLD-HPLC 法):可以按照《中国药典》通则0512高效液相色谱法，使用荧光检测方法进行测定。取聚山梨酯80标准品，用不含聚山梨酯80的制剂缓冲液分别稀释作为聚山梨酯80标准品溶液，用于制作标准曲线。将供试品的峰面积带入标准曲线公式中计算得出供试品中的聚山梨酯80含量。

G. 药品一般属性检定

0外观及性状(观察法):在贮存过程中由于蛋白质变性、降解等原因，可能出现变色、沉淀，是注射剂的质量风险，须严格加以控制。

o pH值 (pH 值测定法):按照《中国药典》通则0631pH值测定法测定。

●渗透压摩尔浓度(渗透压摩尔浓度测定法):按照《中国药典》通则0632渗透压摩尔浓度测定法测定。

●装量(容量法):按照《中国药典》通则0942最低装量检查法(容量法)测定。取供试品5支，得出相应的装量。

o 不溶性微粒检查(光阻法):按照《中国药典》通则0903不溶性微粒检查法(光阻法)检查。

例如：按药典规定成品该项检定的质量注册标准为标示装量100ml以下的静脉用注射液：每支≥10μm的微粒数应≤6000粒；每支≥25μm的微粒数应≤600粒。眼用制剂还有更严格要求。

o 可见异物检查(可见异物检查法):按照《中国药典》通则0904可见异物检查法(灯检法)检查。

H. 安全性检测

0无菌检查(无菌检查法):按照《中国药典》通则1101无菌检查法(薄膜过滤

法)检查。

●细菌内毒素检查(细菌内毒素检查法):按照《中国药典》通则1143细菌内毒素检查法(凝胶法)检查，采用适宜灵敏度的鲎试剂。

依据《中国药典》,注射剂人每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量为5EU。

●微生物限度(微生物限度检查法):按照《中国药典》通则1105非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法(薄膜过滤法)检查。

●异常毒性检查(异常毒性检查法):按照《中国药典》通则1141异常毒性检查法检查。即观察期内，动物全部健存，且无异常反应，到期时每只动物体重均增加。

I. 高级结构表征

蛋白质高级结构决定其生物学活性。对单抗特性需要进行研究以确认其高级结构。例如，利用质谱分析以确定蛋白质正确的二硫键连接，圆二色谱(CD) 在远、近紫外区的扫描图谱，反映蛋白质肽键的排布信息，通过对比远近紫外圆二色谱的谱图，可得知样品的二级结构和三级结构信息。或者利用差示扫描量热(DSC) 技术来检测蛋白分子的热稳定性。

7.3分析方法生命周期管理

背景介绍

分析方法生命周期管理包括但不限于分析方法的开发与确认、分析方法转移、分析方法验证、分析方法持续监控、分析方法的变更与桥接以及分析方法的退役，从识别分析方法需求开始，止于分析方法的退役。

分析方法的验证、确认和转移的一般性要求也可参考本丛书《质量控制实验室与物料系统》分册“8分析方法的验证、确认和转移”。本节主要描述大分子生物制品的分析方法生命周期管理。

自 技术要求

本章节内容参考以下法规与权威指南：

●《中国药典》指导原则9101分析方法验证指导原则

●《中国药典》指导原则9099分析方法确认指导原则

●《中国药典》指导原则9100分析方法转移指导原则

●《中国药典》指导原则9102药品杂质分析指导原则

●《中国药典》指导原则9401生物制品生物活性/效价测定方法验证指导原则

● CDE《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则(试行)》

●ICH Q2(R1):Validation of Analytical Procedures(《分析方法验证》)

●ICHQ14:Analytical Procedure Development(《分析方法开发》)

• USP<1220>:The Analytical Procedure Lifecycle(《分析方法生命周期》)

• USP<1224>:Transfer of Analytical Procedures(《分析方法转移》)

·USP<1225>:Validation of Compendial Procedures(《药典方法验证》)

●USP<1226>:Verifcation ofCompendial Procedures(《药典方法确认》)

●*PDA TR.57:Analytical Method Validation and Transfer for Biotechnology Products*(《生物技术产品分析方法的验证和转移》)

●*PDA TR.57-2:Analytical Method Development and Qualification for Biotechnology* Products(《 生物技术产品分析方法开发和确认》)

实施指导

分析方法生命周期与产品生命周期紧密相关，在不同产品阶段均应对分析方法进行评估，确保其可以满足产品下个阶段的需求，详见图7-1。



图7－1 方法生命周期、工艺生命周期与产品生命周期

●临床前，开发部门对于自建质量控制方法应完成分析方法的开发与确认(qualification), 并使用确认后的方法对中试生产的产品进行放行检测；应对药典方法(如微生物限度、无菌、细菌内毒素等)进行确认(verification)。

●临床GMP 批次放行前，自建的分析方法由开发部门确认并转移至使用部门，已确认的方法用于I 期、II 期临床产品的放行检测与稳定性检测，产品进入临床III期后工艺性能确认(PPQ) 前应完成全面的方法验证；工艺变更时，应评估变更对方法的影响，确定方法是否需要再次确认或验证。

●分析方法验证完成后应对方法进行持续监控和周期性回顾，确保方法保持验证/确认状态。

分析方法开发前需要基于产品潜在的CQA评估明确方法的目的与使用范围，如分析方法是否用于支持放行检测、稳定性检测、中控产品检测、工艺验证检测或特性研究。分析方法开发时也应明确其方法支持的产品阶段，临床前、临床阶段或商业化阶段。

分析方法开发前应根据方法的目的、使用范围、产品的潜在CQA以及法规与监管部门的要求明确对方法性能(如专属性、精密度、准确度等)的需求。分析方法开发也需要基于工艺输出的潜在QTPP、CPP,并结合当前技术平台和发展制定出分析方法目标(analytical target profile,ATP),用于支持方法开发。

分析方法选择时应根据现有平台的技术、药典通用方法(如外观、pH 值、渗透压等)以及行业的先进水平等，开发的方法应易于操作、简单、快速；试剂、耗材质量稳定，且易于获取，满足 EHS要求。

A. 方法开发

质量控制类方法中，大小变异体等纯度类和残留类等通用性较强的分析方法可以基于表达体系开发平台方法。单克隆抗体新项目开发时应结合产品特性，如靶点、结构等，评估平台方法适用性，在平台方法基础上进行优化与确认，评估方法对于杂质的鉴别能力及其定量能力。

项目专属方法(如效价方法、电荷变异体等)需要进行全面的方法开发，必要时应使用实验设计(design of experiment,DOE)的方法。对于双特异性抗体项目开发时应评估生物学活性方法的双臂识别能力。同时有些表征方法，如抗体的ADCC活性和CDC活性方法，关联到抗体的一些专属特性(如专一性靶点等),这类项目专属方法也需要进行较全面的方法开发。分析方法开发也可以借鉴分析质量源于设计 (analytical quality by design,AQbD)。应 用AQbD时，需首先定义分析方法目

标，并根据目标对关键方法属性(critical method attributes,CMAs)和关键方法参数(critical method parameters,CMPs)进行全面评估，结合实验设计(DOE) 和统计分析制定方法控制策略(control strategy),通过系统化、结构化、层层递进的方式建立分析方法，提高分析结果的准确性和可靠性。

方法开发时应选用有代表性工艺的样品，杂质类方法选用该阶段下能代表最终工艺的样品。根据对已选方法的理解、平台方法的知识与经验、分子结构的理解，应用风险评估的方式选出方法的关键参数，并对其进行摸索优化。方法关键参数初步确认完成后，对方法的耐用性进行评价，必要时应使用实验设计(DOE) 的方法，确认各关键参数的设计空间。

分析方法开发完成后应制定初步的分析方法控制策略，如系统适用性接受标准与样品检测接受标准，并在整个方法生命周期中持续收集数据，在产品的不同阶段根据方法确认、方法验证与周期性回顾结果审核或修订方法控制策略。

分析方法开发时，计划用于稳定性检测的方法应考察其稳定性指示能力。应制备强制降解样品，确认方法对于稳定性样品中的降解产物可以不受干扰地定量检测，具有良好的灵敏度与专属性。

对于分析方法中需要使用的各类标准品、参比品，方法开发时应选择能够满足法规与申报需求的材料，并对其进行确认或标定，明确其来源或供应商，根据供应商提供的信息及已有的数据确认其使用方法、贮存条件、有效期和复验需求。

分析方法应明确方法的关键试剂与耗材，必要时对关键试剂、耗材的批间一致性进行考察。对于实验中需要使用的关键试剂、系统适应性样品、控制样品，应根据实际使用需求规定贮存条件、使用方式，根据已有的数据与供应商提供的信息制定有效期。方法开发时，应考虑关键试剂与耗材的备选供应商。

当工艺变更时，应根据对现有工艺、产品、方法的理解评估现有质量控制类分析方法是否持续满足预期的需求。对于杂质类方法，工艺性能确认(PPQ) 前负责产品开发的部门应使用当下工艺代表性样品对现有方法进行评估，确认其持续满足方法预期需求。若不适用，则由负责产品开发的部门进行方法开发与确认，并将新方法转移至使用部门。

B. 方法确认

分析方法开发完成后应完成方法确认，确定现有方法适用于其预期的目的。确认完成后的分析方法可用于产品(中试样品与临床样品)的放行检测和特性(表征)研究。定量分析方法确认包括但不限于：专属性、精密度、准确度、定量限/检测

限、耐用性等；鉴别等定性分析方法确认包括但不限于：专属性、耐用性等；特性(表征)研究方法应根据其方法的预期目的来确定是否进行确认及确认项，确认项包括但不限于：专属性、重复性等。

方法开发与确认报告中应提供方法设计/方法开发的策略、方法关键参数的评估、各关键参数的设计空间、样品检测时重复样品个数评估、系统适用性/可接受标准及其制定理由、标准品/参比品/控制样品使用方法与限度制定理由等。此外，产品开发部门应提供方法转移文件，其要求可以参考本分册生物制品(单抗)部分“6.1 技术转移”中的相关要求。

C. 方法转移

分析方法转移前，方法转移方与方法接收方应进行初步的评估，方法接收方应确认分析方法满足产品相应阶段下(即临床阶段或商业化阶段)对方法的要求，并且接收方具有足够的资源与能力接收该分析方法。方法转移方与接收方应根据方法特性、项目需求制定合理的转移计划。

分析方法转移方应在分析方法转移启动时立即将方法SOP 转移至接收方，通知接收方分析方法需要使用的试剂、耗材、仪器设备、软件、样品、工作参比品、标准品以及分析方法操作环境需求(如温湿度、洁净级别等)，双方进行初步的分析方法转移差距分析，确认接收方实验室具有接收分析方法的相应资源。

分析方法的转移应同时考虑质量标准在转移中可能的变化。接收方应确认各质量控制方法性能(如精密度、耐用性等)可以用于产品放行检测，与产品的工艺能力、质量标准匹配。

分析方法转移前，转移方应提供方法开发与确认报告、方法SOP、方法的历史数据、方法关键步骤、关键参数及其设计空间、方法的注意事项等，接收方应对上述内容进行复核，确认该分析方法能够满足临床阶段或商业化阶段需求，可以进入转移实施阶段。

分析方法转移应根据方法的目的与复杂程度、接收方实验室能力、实验员技术与经验、项目的阶段，应用评估的方式设计实验。对于已用于其他项目的平台方法、药典方法(如外观、pH 值、渗透压等)，可以通过评估对方法转移的对比实验进行豁免。对于技术复杂、接收实验室缺乏平台经验的方法转移过程，必要时应增加对方法精密度、准确度与耐用性的考察。

分析方法的转移应包含分析方法知识的转移和转移文件的培训，转移方应分享新技术新平台的使用方式与技巧、方法开发/使用过程中工艺研发过程中积累的对

项目分子的知识、方法的知识、关键设备/关键试剂/关键步骤的使用指南和注意事项。

D. 方法验证

分析方法验证前需有方法SOP, 且 此SOP 能够用于指导实验操作，可以真实、全面地反映各实验操作步骤。方法验证前需回顾SOP 的所有变更或修订历史，明确在方法开发与确认后的各变更或修订对分析方法的影响。

方法验证前需确认方法对应产品中的质量标准，理化类方法质量标准中可接受标准的有效数字应与方法的性能(即精密度)匹配。方法验证设计需要满足法规要求，如遵从《中国药典》指导原则9101分析方法验证指导原则、ICH Q2《分析方法验证》。方法验证前应回顾整理现有产品的知识、工艺的知识，分析所有申报批次的批放行数据、稳定性考察数据，确认工艺的能力。

方法验证前应对方法的性能进行全面的回顾。该回顾包括但不限丁：历史检测数据、方法开发报告中的耐用性数据、方法相应偏差、异常数据调查、产品稳定性数据回顾、关键试剂和耗材批次信息回顾和设备确认状态回顾等内容。

分析方法验证前应进行风险评估，该风险评估可以体现在方法验证方案中。应根据待验证方法的类型(新方法、优化后方法、平台方法、药典方法)、项目阶段与需求、工艺对产品质量的潜在影响等综合评估需要验证的项日(完整验证或部分验证)以及各项目的可接受标准。

方法验证中可接受标准的设定应满足方法开发时对方法性能的预期需求。 一般而言，可接受标准要考虑产品质量标准、法规需求、工艺能力、批放行数据、平台方法的经验以及该分析方法的历史数据回顾等综合制定。

当产品工艺变更、关键试剂/原辅料供应商变更、方法变更时，应根据风险评估结果进行方法再验证。分析方法验证应根据方法检测中实际情况与检测的需求进行实验规划，验证中的各项实验操作应能够真实代表实际检测条件。

方法验证完成后应撰写方法验证报告，报告内容包括但不限于：验证总结、验证相关偏差与变更、试剂/耗材/设备、参比品/样品信息、溶液配制信息、各验证项的结果、数据分析与讨论、结论等。方法验证报告中还应根据方法验证结果确认现有方法的控制策略，如有更新应将更新的内容以及理由体现在方法验证报告中并更新方法SOP。

药典分析方法(如微生物限度、无菌、细菌内毒素等)的确认(verification) 参照最新版药典。药典升级后应根据风险评估或者差距分析结果决定方法是否需要再确认。

E. 方法的持续监控

分析方法应进行定期回顾，在产品生命周期的关键阶段，如工艺验证、产品申报等阶段分析方法均应进行回顾，确认其在可控状态，持续满足使用需求，维持其验证状态。如回顾中确认方法检测结果存在异常趋势，应展开调查，找到根本原因，必要时发起方法变更，修订分析方法。

商业化阶段，产品各质量控制方法应周期性回顾，确认方法持续保持验证状态。方法性能应与方法验证结果一致，如不一致或发现方法性能的不良趋势，应立即启动调查。

F. 方法变更

从变更的种类看，分析方法变更分为方法的优化与替代。方法优化分为：①样品前处理条件的优化；②方法关键参数的优化；③系统适应性可接受标准的优化；④样品重复检测策略的优化等。方法的替代分为：①不同检测原理的方法替代；②相同检测原理，由于关键试剂/耗材或技术平台变更引起的方法替代；③根据项目需求开发并转移新的方法或扩大原有方法的目的与范围，如方法由检测中间产品的方法或特性研究方法变更为质量控制方法。

从分析方法类型看，变更分为药典方法变更与非药典方法变更。非药典方法变更应提供方法变更的理由，必要时应有数据支持。方法变更启动前应由变更启动方完成方法可比性评估，确认变更后的方法精密度、准确度应不低于原方法，代表性工艺样品、稳定性样品检测结果可比。

方法变更应根据项目所在阶段评估对产品工艺的影响、稳定性考察的影响、质量标准的影响、批放行检测的影响、方法验证、其他部门的影响(研发部门可比性研究等)、工作参比品的影响等。如替代的方法涉及新设备/耗材，还应评估对设备的影响等。应根据项目阶段评估方法变更对产品及工艺的影响，应对变更前后的两方法设计并进行桥接实验。

产品上市后如果分析方法需要进行变更，应先启动变更流程，参照《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则(试行)》对变更进行评级划分，根据不同的变更等级(如重大、中度或者微小变更等)进行评估，包括：评估分析方法变更的理由和依据；提供与已批准分析方法具有等效性的支持性资料；如采用新分析方法需提供分析方法和方法学验证结果；经法规部门评估以确定该方法变更是否需要提前告知监管部门。

分析方法桥接应证明新的或候选检测方法与已批准或正在使用的方法具有相等或改进的方法性能。　一般检测方法可以分为定量和定性两类，定性检测方法提供了定性结果，而定量检测方法以与质量标准相同的单位报告结果。

一般定性检测方法无需准确度或精密度的对比，但应对检测的分析物专属性及检出限进行对比。可使用概率统计的方式在极低的分析物浓度下比较两种命中/漏检比，比较方法的检出限或灵敏度。

对于所有定量方法，应比较方法性能特征、准确度和精密度(中间精密度)。定量检测的中间精密度比较可能有三个可接受的结果(非劣效性、等效性或优效性)。根据预先规定的允许差异，结果的显著变化可能需要变更放行质量标准或其他可能的调整，然后才能使用新方法进行放行检测。证明方法在准确度方面是否可比时，必要时可能需使用等效性模型。

除了采用方法学验证比较分析方法性能之外，还需从科学性方面揭示两种方法的原理，变更后的方法原则上应更具优越性。此外，需对多批次样品采用两种方法进行对比检测，并尽可能采用统计学的方式分析检测结果的一致性，如为稳定性指示方法，应对比两种方法的稳定性指示能力。

分析方法变更的对比研究需形成分析方法的桥接报告，以支持临床阶段及上市后的方法变更。如有需求，需发起体系变更流程进行追踪，同时需要分析方法转移方进行评估。

G. 方法退役

分析方法退役时应对分析方法进行回顾，确认分析方法持续保持验证状态，分析方法生命周期内所有产生的纸质数据、电子数据均已归档、备份。

8 参比品标定与管理

本章主要内容：

参比品的种类和关系

E 参比品在制备和贮存方面的注意事项

T 参比品的确证、标定与放行

参比品的稳定性考察和监测

T 使用过程中的注意事项

变更参比品的要求

背景介绍

单抗的生物学活性或效价反映其作用机制和功效。单抗作为复杂的生物分子，其效力不能采用化学和物理性质进行定量，因此必须通过与参比品进行比较来确定，通常使用基于细胞或免疫学的生物测定。由于缺乏确定效价的绝对方法，以及实验方法的可变性和潜在的误差，使得参比品效价的标定和监测在单抗药物的开发和制造过程中成为一个重大挑战。因参比品可以把患者用药剂量的效力与临床研究的效力关联起来，单抗参比品的效价标定对于确保患者使用药物的质量至关重要。

本章节内容重点对单抗鉴别、效价及含量测定参比品的制备、标定与管理进行阐述。对用于产品其他物理化学检测使用的标准品/参比品，以及产品相关物质、产品相关杂质和工艺相关杂质检测使用的标准品/参比品，本章节不展开阐述，其管理可参考本丛书《质量控制实验室与物料系统》分册“6标准物质的管理”。

参比品根据其来源分为外部参比品与内部参比品。

外部参比品：指官方参比品，主要指法定的或来源于监管方认可机构的参比品(如药典参比品、中检院参比品或国际公认的参比品)，可用于内部参比品的标定，以及临床样品与商业化产品的生物学检测和物理化学试验。生物类似药可能获得官

方参比品，如生物类似药产品的拟上市区域或上市区域有官方参比品，应采用该参比品，无法获得官方参比品时，应制备内部参比品。

内部参比品：按照其制备阶段及用途主要分为过渡期参比品(interim reference standard)、一级参比品(primary reference standard)、工作参比品(working reference standard)。本章节内容中内部参比品均简称为参比品。

过渡期参比品：企业用代表临床前研究及探索性临床(指I、II期临床)批次工艺制备的经质量特性分析的物质，用于临床前研究及临床批次产品的生物学检测和物理化学试验。

一级参比品：企业用代表确证性临床及商业化生产批次工艺制备的，经质量特性分析的物质，主要用于工作参比品的生物学检测、物理化学试验以及标定。也可用于各批产品的生物学检测和物理化学试验。

工作参比品：制备方法与一级参比品相似，工作参比品一般用一级参比品标定而得，作为日常实验室分析的参比品之用。

自技术要求

本章节描述的参比品的标定与管理参考以下法规指南：

●《中国药典》三部人用重组单克隆抗体制品总论

·*ICH Q6B Specifications:Test Procedures and Acceptance Criteria for* Biotechnological/Biological Products(《质量标准：生物技术产品及生物制品的检测方法和验收标准》)

●*ICH Q7 Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients*(《原料药生产的GMP指南》)

●USP<1032>Design and Development of Biological Assays(《生物检定的设计和开发》)

实施指导

在单抗等重组治疗产品中，参比品在结构确证、批放行、可比性及稳定性研究中都发挥着不可替代的作用。在产品研发过程中，应充分应用参比品作为临床数据的桥梁作用，在商业化生产过程中，参比品同样起保持产品质量相对稳定的重要作用。

一般情况下，在临床前及探索性临床阶段，需建立过渡期参比品；而在确证性

临床阶段可考虑建立一级参比品与工作参比品；上市申报期间应建立两级参比品。一级参比品一般情况下应尽量保持不变，除非重大的工艺变更显著影响了产品的关键质量属性，或者一级参比品稳定性不能满足要求需更换批次。所建立的工作参比品均应采用一级参比品进行标定，以避免因参比品质量属性的变化造成生物学活性的漂移。临床前研究、临床研究到商业化阶段单抗参比品的类型与关系见图8-1。

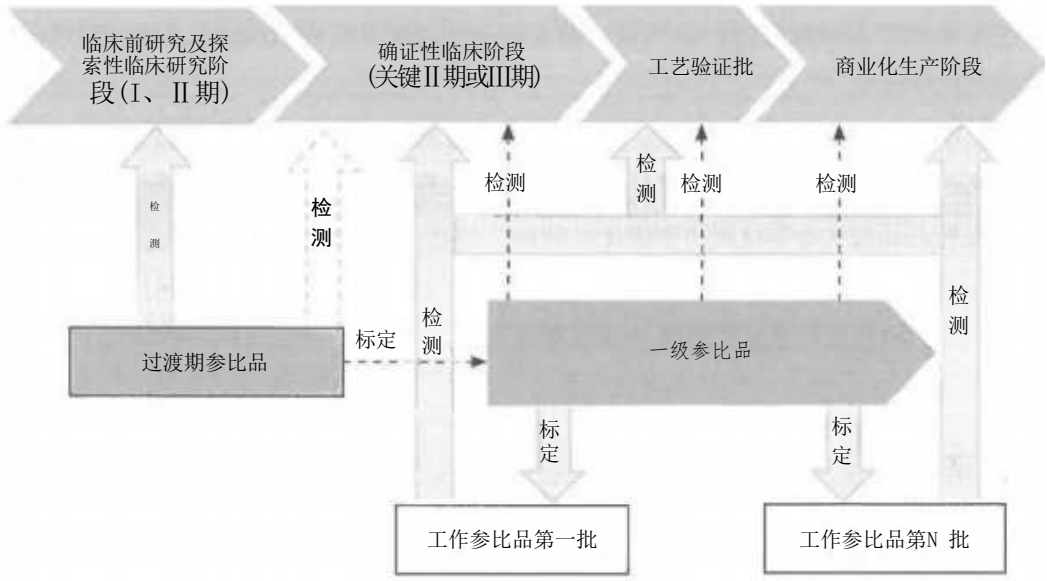


图8-1 临床前研究、临床研究到商业化阶段单抗参比品的类型与关系

注：确证性临床阶段，在尚未建立一级参比品及工作参比品前，可使用过渡期参比品进行产品放行检验。如已建立一级参比品，但未建立工作参比品前，可使用一级参比品进行产品放行检验，但应密切关注一级参比品数量，避免消耗过快导致频繁更换一级参比品的风险。

参比品的科学管理和使用显得尤为重要，此章节将结合法规要求，说明确证性临床研究及商业化生产阶段一级参比品及工作参比品的制备、确证、标定、稳定性考察或监测、使用、变更等管理要求。

8.1批次选择

自 技术要求

《中国药典》三部人用重组单克隆抗体制品总论中规定：“选择已证明足够稳定且适合临床试验的一个(多个)批次，或用一个代表批次作为标准物质，用于鉴别、

理化和生物学活性等各种分析，并应按特性分析要求进行全面分析鉴定。”ICH Q6B指出，“对于新分子实体的药品注册申请， 一般不可能获得国际标准品或国家标准品作对比。申报时，生产商应建立经过质量特性分析的内部一级参比品，该参比品应采用能够代表生产和临床研究用样品的代表性批次制备。用于产品批检验的内部工作参比品应用一级参比品标化。如能获得适宜的国际标准品或国家标准品，则应尽可能用其标化参比品”。

A. 一级参比品

一级参比品的工艺和临床批次的代表性十分重要，建立一级参比品时应进行充分评估。为了确保参比品对于临床试验的代表性，首次建立一级参比品，应选择能代表商业化生产工艺的批次制备一级参比品，如使用确证性临床研究批次或者采用工艺验证的批次进行制备。 一级参比品是效价测定的“金标准”,用于单抗产品在整个商业化生命周期内工作参比品的标定和稳定性测试。 一级参比品可能会使用很长时间，因此必须采取措施，以可靠的方式包装和贮存，其制备数量应能避免在产品生命周期中频繁更换批次。

B. 工作参比品

工作参比品应选择能代表商业化生产工艺的批次进行制备，工作参比品一般情况下建议使用与一级参比品不同批次产品进行制备(首次建立工作参比品可使用与一级参比品相同批次产品进行制备)。

8.2制备与贮存

《中国药典》三部生物制品国家标准物质制备和标定中规定：“生物制品国家标准物质制备用实验室、洁净室应符合我国现行《药品生产质量管理规范》或相关实验室操作规范要求。”

参比品制备与贮存的关注点包括以下十个方面。

●制备与分装方案：参比品的制备应有经审批的方案或规程，并有完整记录，确保制备全过程可追溯。

●缓冲体系选择：参比品需长期保存，通常情况下产品的配方足够稳定，则无需考虑缓冲体系的替换，可直接使用原液或成品进行参比品的分装。但在特殊情况下，为了提高参比品的稳定性，延长其有效期，可替换为更稳定的缓冲体系，如添加稳定剂等(注意：更换缓冲体系需考虑对分析方法的影响，需开展相应的验证，如分析方法专属性)或采用冻干形式保存。早期处方研究与稳定性考察数据可为参比品缓冲体系的选择提供依据。

●制备过程污染控制：参比品灌装/分装应采用与成品生产相同或类似的工艺及环境，以控制微生物污染及其他可能存在的污染。如参比品需置换为与产品不同的缓冲体系时，还应考虑用于换液设备的交叉污染风险。如参比品配制或换液过程存在微生物引入的风险，在灌装/分装参比品前，建议执行过滤，同时需要评估过滤可能产生的影响。

●参比品制备均一性控制：参比品制备过程应尤其注意控制其均一性，例如，在配制过程中确保其充分混匀，在过滤、灌装/分装过程中注意容器(如过滤后储罐)及管道CIP/SIP后残留水的影响，关注灌装不同时段浓度是否维持稳定等风险。在控制这些风险的同时，应根据制备过程可能对均一性造成影响的风险点，基于统计学设计取样检验方案，以证明其均一性，例如，在配液罐不同位置取样检验，灌装前中后分别取样检验(灌装前段取样应包含初始数瓶)等。

●参比品容器选择：应根据参比品的制备工艺及贮存条件，选择适宜的容器，容器的选择主要考虑以下因素：

0密封性：对容器进行密封性评估或研究，确认容器密封性满足要求。

0无菌、无热原：应选择无菌、无热原的容器，或通过处理使其达到无菌、无热原的状态。

0材质及贮存温度：原则上，参比品容器材质不得影响参比品的质量，参比品容器材质(甚至生产厂家)的选择需进行材质相容性评估或研究，确认其相容性(主要指容器材质溶出或发生吸附等影响参比品质量的情况)是否符合要求，确保容器材质不影响参比品质量属性，根据评估或研究结论选择材质及生产厂家。大多数情况下，参比品为低温或超低温冻存，如-20℃、-40℃、 -70℃、液氮冻存等，因此，参比品容器应具备相应贮存条件的耐冷冻性。

常见的单抗参比品容器为冻存管及西林瓶(与产品包装容器一致或类似)。

●分装体积：参比品分装体积应结合其用途和检验用量进行设计，既满足检验需求及使用方便，同时减少损耗。

0分装数量： 一级参比品通常应尽量保持不变，应结合其放行检验、标定工作参比品及工作参比品稳定性检验、 一级参比品稳定性考察等用途的用量，计算规划适宜的制备数量，尽量确保数量满足产品生命周期的使用需求。同时基于贮存安全及备份考虑，充分考虑冗余量，如制备三倍需求量。

工作参比品相较于一级参比品，其使用频繁，需求量相对更大，其分装数量建议考虑根据其放行检验、稳定性考察/监测、日常检验的使用量，结合预期的使用时间以及一批工作参比品制备的产能(如根据制备方式， 一个班次能完成分装的合理的产量)、贮存空间等综合考虑。

0贮存条件：为使参比品有更长的有效期， 一般采用低温贮存，如-20℃、-40℃、 -70℃、液氮冻存等。通常情况下单抗在更低的温度下会更加稳定，但这不是绝对的，何种温度更有利于保持参比品的稳定性，应根据前期不同温度下参比品的稳定性研究数据进行选择。

a 参比品标签：标签应能在相应的低温冻存环境下稳固不脱落，并使标签信息保持清晰可辨，参比品最小包装容器标签信息可相对简化，但应至少包括参比品名称、批号(建议增加瓶号信息)。在参比品包装盒/袋上应张贴完整标签，信息内容应至少包括名称、批号、制备日期(如有)、含量或效价、贮存条件等。

0参比品制备流程及控制要点示例：如图8-2所示

8.3确证、标定与放行

A. 质量标准

一级参比品质量标准： 一级参比品的主要用途为工作参比品的检验、标定及稳定性考察，应按特性分析要求进行全面分析鉴定， 一般情况下，其质量标准应至少包含鉴别、纯度、含量、活性指标。同时需要对一级参比品进行结构确证，如一级结构、高级结构、糖基化、Fc 效应功能。

0工作参比品质量标准：工作参比品主要用途为产品放行检验，其质量标准与一级参比品基本一致，首次制备工作参比品可与一级参比品采用相同批次产品，且同批制备，如一级参比品已执行结构确证及其他分析鉴定，工作参比品的确证可引用数据。后续批次工作参比品均应按质量标准及确证方案执行确证，结构确证项目可根据评估确定。

参比品质量标准及分析方法示例见表8-1,结构确证项目及分析方法示例见表8-2。

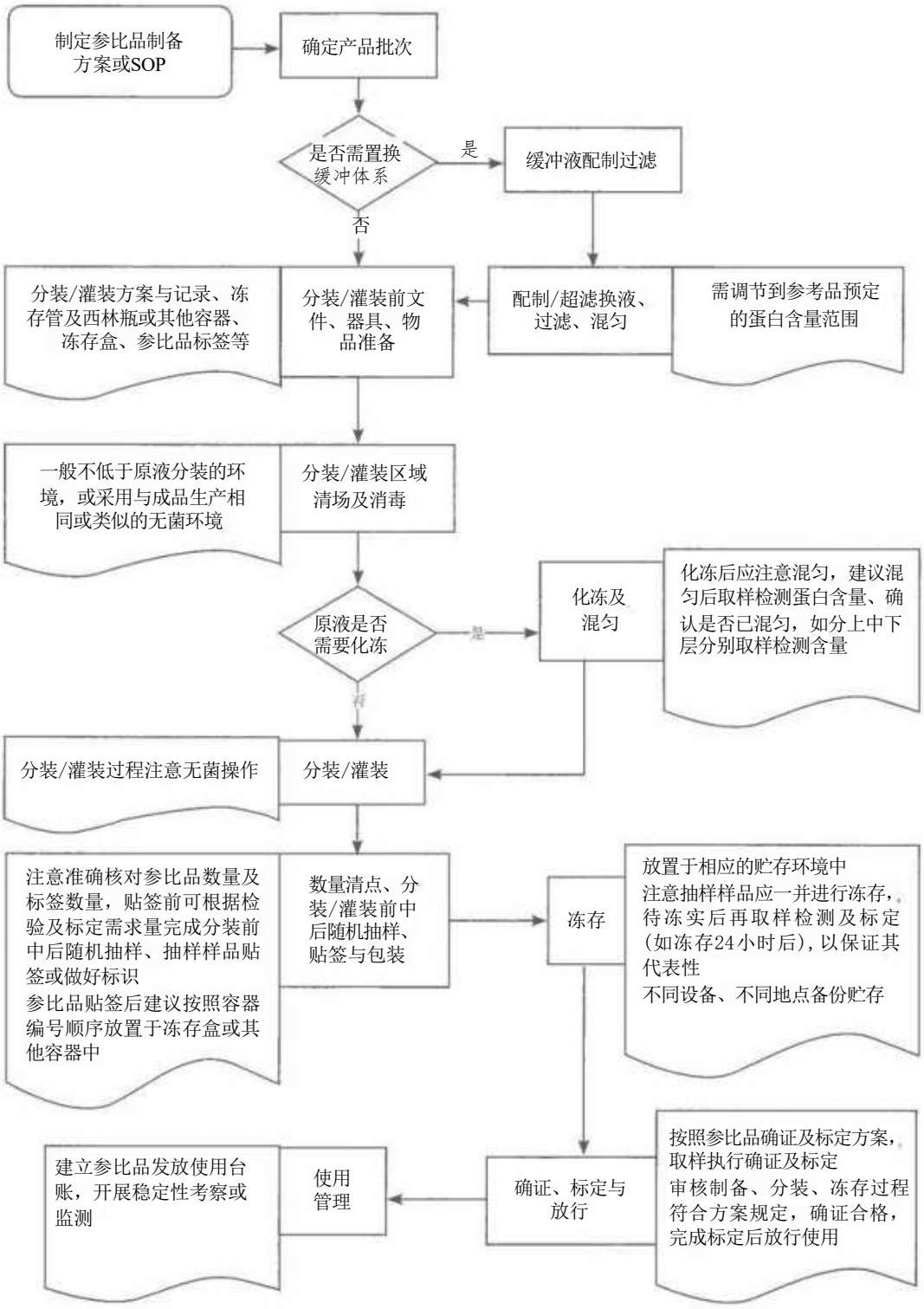


图8－2　参比品制备、分装流程及控制要点示例

表8-1 参比品质量标准及分析方法示例

类别	项 目	分析方法
鉴别	等电点	毛细管等点聚焦法等
	肽图	反相色谱法等
含量	蛋白含量	紫外-可见分光光度法等
一般理化	pH	pH值测定法
	渗透压	渗透压摩尔浓度测定法
纯度	分子大小变异体	分子排阻色谱法、CE-SDS电泳法、分析超速离心等
	电荷变异体	毛细管等点聚焦法、离子交换色谱法等
效价	生物学活性	细胞活性检测法
	结合活性	酶联免疫法等

注：此表内容仅供参考，需结合单抗品种特点制定对应的参比品质量标准。

表8-2 结构确证项目及分析方法示例

类别	项 目	分析方法
结构确证-一级结构	分子量	LC-MS及LC-MS/MS
	末端氨基酸序列	
	二硫键确认	
	序列覆盖率	
	翻译后修饰	
结构确证-高级结构	高级结构	FTIR、CD、荧光光谱等
	热力稳定性	DSF、DSC等
	游离巯基总量	Ellman’s试剂法
结构确证-糖基化	糖基化位点	LC-MS/MS
	糖型分析	高效液相-荧光(HILIC-FLD)
Fc效应功能	Fc效应功能	Fortebio、SPR、ELISA、细胞活性检测法等

注：此表内容仅供参考，需结合单抗品种特点设计结构确证项目。

B. 确 证

参比品应按照批准的质量标准、确证方案完成确证，确证结果符合标准规定，完成标定后，方可放行使用。工作参比品应采用一级参比品作为基准进行确证(如

活性项目),第一批一级参比品可采用过渡期参比品进行确证，后续批次一级参比品采用前一批一级参比品为基准进行确证。

部分企业将检验确定单抗参比品蛋白含量的活动，称为参比品蛋白含量标定。由于单抗蛋白含量通常采用紫外-可见分光光度法测定，无需采用参比/标准品进行含量“标定”,因此检验确定单抗参比品蛋白含量的活动称为参比品蛋白含量测定更为准确。在参比品蛋白含量测定时，除采用常规紫外-可见分光光度法进行测定外，还可考虑改变样品稀释方式，如采用称重稀释法，或采用无需进行样品稀释的检测仪器(如可变光程紫外-可见分光光度计、微流控光谱分析仪)来消除人为稀释误差，以提升测定结果的可靠性。无论采用何种方法，蛋白含量的测定方案需要根据方法的性能，基于统计学进行设计。

C. 标 定

单抗参比品标定通常指效价的标定，本部分主要以效价标定为例，说明标定的策略及方法。

·一级参比品标定要求： 一级参比品作为活性参比的基准，因其采用能代表商业工艺批次的产品制备，通常具备确证性临床批次代表性，并进行了充分结构确证，所以第一批一级参比品活性无需进行效价标定，直接赋值为100%,采用此方式进行第一批一级参比品活性赋值时，应注意使用该参比品与阶段性参比品进行对比桥接，必要时(如对比数据存在显著差异),需要对历史检验数据进行回顾评估。推荐采用过渡期参比品标定第一批一级参比品，标定方法与采用一级参比品标定新批次一级参比品或标定工作参比品的方法相同。在已经有一级参比品的情况下，新制备批次的一级参比品，可采用旧批次一级参比品进行标定。

●工作参比品标定要求： 一般情况下，工作参比品需使用一级参比品对其效价进行标定。

●标定检验方法：效价标定检验方法应经过验证，该方法通常与产品放行检验方法一致。

●标定实验设计：为了确保标定结果的准确可靠，在标定实验设计时，应重点考虑以下因素：

0样品代表性：关注标定样品的代表性，如在分装/灌装前中后段随机取样，对不同瓶号的样品分别进行标定。

0标定实验室：参比品可能会在不同的实验室使用，为了识别、评估不同实验室之间的数据波动，建议在设计标定实验时，考虑由不同的实验室参与标

定，如由企业内部不同工厂的实验室参与标定、研发分析实验室和QC 实验室共同标定，或者由其他可靠的第三方实验室参与标定。如已有数据证明，用于标定的分析方法在不同实验室之间的检验数据波动较小(方法重现性良好),不同实验室之间检验人员的分析数据不存在相对偏高或偏低(如A 实验室数据显著高于B 实验室)的情况，或者参比品仅在一个实验室使用的情况，由不同实验室参与标定不一定是必须的。

0标定实验次数：根据检验方法精密度等因素，按照统计学的思路，设计合理的标定次数，变异越小的分析方法需要的标定次数越少，反之方法变异越大，需要标定的次数越多。

检验人员：建议由不同的实验人员参与标定，以控制人为因素造成标定结果漂移的风险。

o 标定时间(日期):建议在不同日期开展标定实验。

0标定结果统计方法：制定科学的标定结果统计计算方法，如离群值判异，采用平均或加权平均计算标定结果等。

●参比品标定结果最终赋值：在对工作参比品的生物学活性进行赋值时，通常情况下若多次测定相对效价的95%置信区间位于原批次参比品90%~110%时，可以将新批次参比品相对活性赋值为100%。也有企业做多次标定后取均值或加权平均值进行赋值，无论采取何种方法进行赋值，应说明其合理性。

D. 放 行

参比品应由质量部门审核批准放行后，方可用于产品检验。放行审核的内容通常包括但不限于：制备过程应符合规程或方案的要求；已按质量标准及确证方案完成确证，且结果符合规定；已完成标定；制备、检验、结构确证、标定活动均有完整的记录。

8.4稳定性考察/监测

应对参比品进行稳定性考察或质量监测，以评估其稳定情况。参比品的稳定性考察包含两种类型， 一种是在其正常贮存温度下的长期稳定性考察(如-70℃)，另一种是支持其使用过程稳定性评价的加速稳定性考察(如冻融、高温)。如果已有产品的稳定性数据，足以支持对其化冻后使用过程的稳定性评价，则开展加速稳定性考察不是必须的；如果已有数据无法支持，则需开展不同温度(如

一般放置于-20℃、4℃、25℃、37℃)的加速稳定性考察，以评估参比品的稳定性。

A. 考察项目

●一级参比品稳定性考察项目：应根据前期已获得稳定性数据设计参比品的稳定性考察项目，通常对一级参比品纯度及含量项目进行考察，如SEC纯度、IEC纯度、CE-SDS还原/非还原纯度、蛋白质含量项目，以判定其是否稳定。由于一级参比品是产品效价赋值的基准，直接反映了产品的“效力”,但通常没有对应的参比品对一级参比品进行活性检验来判定其效价的稳定性。因此应尽可能收集关注参比品使用过程相关数据，多维度综合评判一级参比品的稳定性，例如：

0一级参比品理化性质的变化；

0一级参比品标定工作参比品活性以及检验工作参比品活性稳定性数据的变化趋势；

0用一级参比品进行原液/成品放行或者稳定性检验时的数据趋势；

0用一级参比品和工作参比品进行检测或者标定时，质控品活性数据变化的趋势(质控品采用能代表商业化工艺生产批次产品制备而成，通常与参比品来源于不同批次，用以监测分析方法的性能)；

〇制备参比品对应批次原液稳定性考察数据等。

●工作参比品稳定性考察项目：通常对工作参比品纯度、含量、活性项目进行稳定性考察，如SEC纯度、IEC纯度、CE-SDS还原/非还原纯度、蛋白质含量、生物学活性、相对结合活性等。采用一级参比品对其活性进行检验。

B. 考察周期间隔

应根据前期已获得的稳定性数据，设计参比品的稳定性考察周期间隔，定期开展稳定性考察或监测。

参比品稳定性考察的要求与产品稳定性考察类似，可参考本丛书《质量控制实验室与物料系统》分册“9稳定性研究”,本节不再展开讨论。

8.5使用管理

在本丛书《质量控制实验室与物料系统》分册中，对标准品的管理有详细的阐述，参比品的使用管理与其相似，因此本节不再重复论述，仅对单抗参比品特殊管

理要求进行描述。

A. 贮存管理

参比品应由专人负责保管，因单抗参比品的重要性以及低温贮存的特性，在备份贮存及贮存温度维持两个方面需要特殊考虑。

参比品对于企业非常关键，需要特别考虑其贮存的安全性，建议参照细胞库备份贮存管理的思路，将参比品(尤其是一级参比品)分不同设备、不同地点进行贮存。

参比品贮存的设备建议设置UPS 及温度持续监测报警装置，以确保其贮存的安全性及温度的稳定性。

B. 领用管理

参比品领用应建立台账，明确记录领用时间、用途、领用瓶号、领用人等信息。

C. 转 移

部分企业在不同工厂生产同种单抗产品的情况较为常见。这种情况下，对于不同工厂使用的同产品的参比品，采用统一制备、分发使用的管理方式，可降低不同批次参比品质量漂移的风险。

参比品在不同工厂间进行转移，应尤其关注转移过程中运输条件对参比品质量可能造成的影响，以及转移过程混淆的风险。因此，转移过程应确保参比品标识完整，转移运输前以及接收过程进行严格的信息确认，经过评估必要时进行抽样鉴别，以控制混淆的风险。参比品贮存条件通常为冻存状态，转移运输过程可能影响参比品质量的因素一般包括温度、振动等，应结合转移运输过程可能影响参比品质量的因素进行评估，必要时，在接收后应对可能发生变化的指标进行必要抽样检验，以确定转移运输过程参比品质量是否发生变化。同时，应注意采用能连续记录温度的设备或装置持续记录转移运输过程温度数据。

D. 使用过程注意事项

●因参比品冻融后可能出现局部不均一现象，因此在使用前应特别注意混匀操作，确保混合均匀，同时应注意混合的方式不能过于剧烈，避免剪切力等因素对蛋白质量造成影响。

●一般情况下，参比品化冻开瓶后应立即使用，不得再进行冷藏或冻存，如需重

复使用，需有相应的稳定性研究数据支持。

E. 废弃管理

未使用完或过期的参比品丢弃前应按生物活性废弃物进行灭活处理，通常采用煮沸、高压灭菌、高浓度碱液浸泡等方式进行灭活处理。

8.6变更

CDE 2021年6月发布的《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则(试行)》中，对标准品/参比品的变更分类及管理要求进行了如表8-3所示规定。

表8-3 标准品/参比品的变更分类及管理

变更事项	主要内容	前提条件	参考类别	技术要求
标准品/参比品(3.2.P.6)	利用国际(或国家)标准品标定企业内部参比品		中等	1
	从企业内部参比品变更为国家或国际标准品		中等	1
		①	微小	1
	利用已批准的参比品确证新批次参比品		中等	1
		②	微小	1
	变更标准品确证方案		中等	2
	延长标准品有效期	③	微小	3
前提条件				
①用于理化检查 ②根据批准的方案，对新参比品进行确证，包括通过与批准的一级参比品确证新批次二级参比品 ③根据批准的研究方案				
技术要求				
1.明确标准品/参比品的来源、制备、检定结果、标定过程及稳定性研究等信息。标准品/参比品检定包括鉴别、外观、纯度等，并进行新旧标准品/参比品等效性评估。等效性评估应基于统计学分析结果。拟定标准品/参比品，应与供试品同质，不应含有干扰性杂质，应有足够的稳定性和高度的特异性 2.更新参比品确证方案。详述变更参比品确证方案的依据 3.根据批准的稳定方案完成稳定性研究				

应按其规定的变更分类及技术要求开展相应的变更管理及注册活动，同时应按照企业变更管理制度对参比品的变更进行管理。其中“利用已批准的参比品确证新批次参比品”是较为常见的变更项，需要重点关注的是“根据批准的方案，对新参比品进行确证，包括通过与批准的一级参比品确证新批次二级参比品”属于微小变更，因此在上市注册申报时，建议在申报资料中提交参比品的确证方案。

一级参比品一般应尽量保持不变，除非通过可比性研究证明如重大的工艺变更显著影响产品的关键质量属性。另一方面，因一级参比品的稳定性问题，可能需要重新制备。如果在用一级参比品批次即将用完或失效，则需重新选择能代表商业化工艺生产的原液重新制备。这种失效往往是可预期的，其数据来源于过渡期参比品、一级参比品的稳定性研究或监测，建议尽可能在一级参比品失效前完成新批次参比品的制备，以确保可使用旧批次一级参比品对新批次进行桥接。

工作参比品变更批次的情况较为常见，其流程与首次制备工作参比品类似，应采用一级参比品对新批次参比品进行确证、标定，并根据参比品确证数据与结果、效价标定数据与赋值统计分析等信息评估新旧参比品的等效性，确认符合注册管理要求并经批准放行后方可投入使用。

细胞治疗产品

目 录

1 前 言

1.1 适用范围 977

1.2 技术与法规背景 977

1.2.1 技术背景 977

1.2.2 研究现状 978

1.2.3 国内外GMP 法规背景 979

1.3 框架 981

2 生产质量控制策略

2.1 基于风险的质量控制策略 985

2.2 生产质量控制要素 988

2.2.1 供者及供者材料的管理 988

2.2.2 医疗机构的质量管理 994

2.2.3 供应链(流通渠道)的质量管理 997

2.2.4 基因修饰载体系统的质量控制 999

2.2.5 污染控制策略 999

2.2.6 生物安全管理 1002

2.2.7 产品追溯系统 1003

2.2.8 批记录管理 1003

2.2.9 产品召回及其他降低风险的措施 1004

生产管理

3.1 总体原则 1011

3.1.1 生产准备 1012

3.1.2 清场管理 1013

3.1.3 灌装、分装、目检、冻存 1014

3.1.4 包装 1014

3.1.5 产品放行 1014

3.1.6 批次管理 1015

3.1.7 贮存和发运 1015

3.1.8 单采管理 1015

3.2 污染和交叉污染的控制 1018

3.2.1 交叉污染的控制 1019

3.2.2 处理含有传染病病原体的供者材料的注意事项 1020

3.3 无菌生产的工艺设计 1021

3.4 工艺验证 1023

3.5 无菌工艺模拟试验 1026

3.6 质粒的生产控制 1027

3.7 病毒载体的生产工艺控制 1028

3.8 细胞治疗产品的制备 1030

3.9 种子库和细胞库管理 1031

人员管理

4.1 人员资质 1034

4.2 人员培训 1035

4.3 人员卫生 1039

4.4 人员行为规范 1041



5.1 生产区 1047
5.1.1 非密闭工艺条件下细胞治疗产品生产区厂房设计 1047
5.1.2 密闭工艺条件下细胞治疗产品生产区厂房设计 1049
5.1.3 病毒载体生产区厂房设计 1050
5.1.4 质粒生产区的要求 1053
5.1.5 生产区的其他要求 1053
5.2 质量控制区 1054
5.3 细胞贮存库区 1055
5.4 废弃物暂存区 1056
5.5 公用设施 1056
5.6 设 备 1057
5.6.1 隔离器 1057
5.6.2 自动化密闭设备 1059
5.6.3 生物安全柜 1063
5.6.4 细胞培养设备 1063



6.1 物料风险等级评估 1066
6.2 物料管理方面的风险 1070
6.3 降低风险的措施 1071
6.3.1 基因转导与修饰系统 1071
6.3.2 物料取样、放行管理 1078

质 量 控 制

7.1 取样管理 1079

7.2 产品检验 1082
7.3 产品放行 1087
7.4 留样管理 1089
7.5 稳定性考察管理 1091
7.6 环境控制 1094

技术转移

8.1 可比性研究 1100
8.1.1 可比性研究的基本策略 1102
8.1.2 可比性研究的执行 1104
8.2 病毒载体变更的可比性研究 1107
8.2.1 病毒载体的可比性研究 1108
8.2.2 病毒载体变更的细胞治疗产品可比性研究 1110

生物安全防护

9.1 产品防护 1114
9.2 人员防护 1115
9.3 环境防护 1115

10 产品追溯系统

10.1 用户需求 1123
10.2 电子化系统开发和功能设计 1125
10.3 电子化系统功能实现和确认 1125
10.4 纸质追溯系统 1125

1 前言

细胞治疗产品的种类与技术迭代发展迅速，本章节是基于现有法规、指南、技术背景条件下编写，结合目前细胞治疗产品生产实践经验，存在一定的局限性，企业应根据自身情况与产品特点，在风险评估的基础上选择应用。

尽管本部分远不能完全解决我国细胞治疗产业化面临的监管和技术挑战，但为政府部门、企业、研究机构和科研院校提供了深入探讨这些问题的契机和起点。

1.1适用范围

本章节所述的细胞治疗产品是指按药品批准上市的经过适当的体外操作(如分离、培养、扩增、基因修饰等)而制备的人源活细胞产品，包括经过或未经过基因修饰的细胞，如自体或异体的免疫细胞、干细胞、组织细胞或细胞系等产品。本章以免疫细胞治疗产品为重点进行介绍。

本章节适用于细胞治疗产品从供者材料的运输、接收、产品生产和检验到成品放行、储存和运输的全过程。

本章节重点突出了细胞治疗产品生产与质量控制的特点，细胞治疗产品同时应遵循无菌制剂的一般要求，可参见本分册无菌制剂部分的相关内容。

本章节内容是推荐性、非强制性的，生产企业可以有其他合理选择。

1.2技术与法规背景

1.2.1技术背景

作为一种新兴的医学干预形式，细胞治疗产品面临着生产制造相关的诸多挑战，这些挑战既来自于人类细胞其本身的个体多样性或病毒载体的使用、生产过程中的可变性，也来自该领域相关科学和技术的快速更新迭代，许多生产设备、加工组件

和供应链解决方案不能从现有的制药生产工业体系直接获取，需要针对产品做适应性的调整。

细胞治疗产品生产企业一方面要建立完善的药品质量管理体系和风险管理策略，以保证产品质量，另一方面要考虑到本领域科学和技术的快速发展情况，保持创新性与灵活性，不断提高产品质量保证水平。

1.2.2研究现状

免疫细胞治疗产品主要利用人体免疫细胞，如T 细胞、DC 细胞、NK 细胞等进行工艺处理后回输人体，主要应用于肿瘤细胞杀伤、病毒清除、免疫调节等方向。

免疫细胞治疗产品研究类型主要包括：非基因修饰的T 细胞(来源于肿瘤组织或者血液等)、嵌合抗原受体基因修饰的T 细胞(CAR-T)、T 细胞受体基因修饰的T 细胞(TCR-T), 以及基于自然杀伤细胞(NK) 或树突状细胞(DC) 等其他免疫细胞的免疫细胞治疗产品，如细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK) 和嵌合抗原受体基因修饰的NK 细胞(CAR-NK) 等。此外，还包括由诱导多能干细胞(iPSC) 诱导分化为各类免疫细胞的产品。

●非基因修饰的T 细胞是自患者体内分离出的T 淋巴细胞[肿瘤浸润T 淋巴细胞 (TIL) 等],在体外大量扩增，再回输到患者体内，从而扩大肿瘤特异性免疫应答，治疗原发或继发肿瘤的方法。

●嵌合抗原受体T 细胞(CAR-T) 以 及T 细胞受体基因修饰的T 细胞(TCR-T)是利用基因修饰技术，使得T 细胞表达人工设计的具备靶向识别肿瘤，并可强化、调节T 细胞功能的蛋白受体，增强了T 细胞的靶向能力与杀伤能力，是目前免疫细胞产品研究的热点，值得注意的是，随着研究深入，各类新型受体蛋白的结构设计与功能快速迭代，在其他类型免疫细胞的扩展应用，使其定义进一步拓展。

●NK 细胞与T 细胞的杀伤作用机制不同，NK 细胞的杀伤活性受细胞表面的抑制性受体和激活性受体的共同调控，当激活与抑制的平衡被打破，NK 细胞便会行使相应的功能，在人体中同样可起到靶向杀伤目的细胞的作用。

●树突状细胞是倍受关注的专职抗原呈递细胞，能摄取、加工及呈递抗原，可在体外或体内进行诱导，启动T 细胞介导的免疫反应。

在制备工艺方面，由于细胞种类的多样性与所采取的工艺差异，目前尚无较为通行的、统一的制造工艺，免疫细胞产品可能包括以下主要工艺步骤：

●细胞起始原材料的获取。

●目的细胞的分离与纯化。

●细胞库的建立。

●细胞的诱导、活化、基因修饰。

●细胞的扩增培养。

●细胞的收获与灌装、冻存及运输。

值得注意的是，在不同的细胞治疗产品中可能存在更多的工艺步骤或没有上述工艺步骤的情况。总体来说，细胞治疗产品生产工艺目前仍处于快速迭代的时期，仍然存在较大的可变性。

1.2.3国内外GMP 法规背景

细胞治疗产品总体仍处于商业化的早期阶段，生产实践经验积累较少，各领域科学和技术的快速更新迭代进一步增加了监管难度，国内外对此类产品的GMP 监管思路也有所不同。需要注意的是，国外相应法规与指南的适用范围和我国发布的相关文件，如《细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)》,可能存在不一致。

A. 国 内GMP 法规背景

我国于2019年11月首次发布了《药品生产质量管理规范-细胞治疗产品附录(征求意见稿)》,在2022年1月再次更新征求意见稿，并于2022年10月发布了《细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)》。细胞治疗产品在满足GMP 要求的同时，还应满足无菌药品附录、生物制品附录等相关附录的要求，并参考诸如血液制品附录等相关内容。临床试验用药品(包括试验药物、安慰剂)的制备还应遵循临床试验用药品(试行)附录的要求。

B.WHO GMP法规背景

WHO GMP和 生 物 制 品GMP(WHO Good Manufacturing Practices for Biological Products) 可供细胞治疗领域参考，但具体针对此领域的技术指南与监管文件较少。值得注意的是，WHO 于2021年底发布了WHO considerations on Regulatory Convergence of Cell and Gene Therapy Products(Draft)(《WHO关于细胞和基因治疗产品监管趋同的考量文件(草案)》,该文件对细胞治疗产品领域中的名词、监管架构、风险评估体系作出了建议，可作为行业人员对自身产品的初步评估与认知使用。2022年7月发布了WHO Approach Towards the Development of A Global Regulatory Framework for Cell and Gene Therapy Products(Draft)(《WHO制定细胞和基因治疗产品全球监管框架方法(草案)》),该文件概述了细胞治疗产品的监管基本原则，这

些原则对于不同类型的细胞治疗产品的监管和审查非常重要。此外，结合细胞治疗产品的特点，WHO 发布的Laboratory Biosafety Manual,4th Edition(《实验室生物安全手册》),可作为生物安全管理的重要参考。

C.PIC/SGMP法规背景

在PIC/S的 GMP 文件体系中，细胞治疗产品属于先进治疗产品(advanced therapy medicinal products,ATMP),并有单独ATMP GMP附 录(PICS GMP Guide *Annex 2A:Manufacture ofAdvanced Therapy Medicinal Productsfor Human Use),* 指南中指出，该附录不是一个独立的文件，应与PIC/S GMP指南和其他附录一起使用，如Annex I:Manufacture of Sterile Products(《附录1:无菌药品生产》),同时，如果由于产品的性质或技术必要性，附录中提供了具体的指导，则应遵守，并优先于PIC/S GMP指南中的其他章节，除非有充分的理由不这样做，并有书面的合理、科学的依据。

D. 美 国GMP 法规背景

美国FDA 考虑到细胞治疗涉及的再生医学领域的特殊性，制定了21 CFR 1271法规，对人体细胞、组织及其来源的产品进行监管。但对于细胞治疗产品或基因/细胞治疗技术联合应用的产品，并未设置单独的GMP 要求。

对于细胞治疗产品，应符合药品CGMP 法规(21 CFR 210和211)和生物制品条例(21 CFR 600S)规定。特别地，如果是应用于I 期临床试验，则应符合美国FDA CGMP for Phase I Investigational Drugs(《I期研究用药品的现行生产质量管理规范》)的相关要求。

E. 欧 盟GMP 法规背景

在欧盟，细胞治疗产品属于先进治疗产品(ATMP), 需 遵 守ATMP GMP指南*(Guidelines on GoodManufacturing Practice Specifc to Advanced Therapy Medicinal* Products), 指南对临床研究用ATMP和已上市ATMP均做出了相应规定。需要注意的是，指南中明确指出，除非特别提及，其他药品GMP 指南(EudraLex-Volume 4)不适用于ATMP。

细胞治疗产品的生产过程中，除GMP 法规之外，还要遵循人类细胞使用领域的相关要求。在制造过程的上游，按照GMP生产之前，欧盟要求人体细胞的捐赠、采购和检测要遵循欧盟组织和细胞指令(The European Union Tissue Cells Directives,

EUTCD)(2004/23/EC)。 一旦进行生产，这些细胞的后续生产、贮存和运输分发就属于GMP的管辖范围，需执行欧盟 ATMP GMP指南。

细胞治疗产品的生产可能包括转基因操作，在这种情况下生产商还必须遵循欧盟各成员国的相关健康和安全的法规。这些健康和安全法规更偏重于对生产操作人员和环境的风险管控，往往要求采取相关管控策略，尽可能防止转基因生物进入环境。

F. 日本的法规背景

日本对细胞治疗产品的监管特点在于其再生医学产品的监管模式。日本在2014年底实施了《药品和医疗器械法案》(PMDAct) 和《再生医学安全法案》(ASRM), 形成了两种细胞与基因产品临床应用路径。PMDAct 主要监管以上市为口的的产品，但将有效性评价从上市前转移到了上市后，并可通过“有条件限时上市许可”获得事实上的商业化上市，甚至纳入口本医疗保险支付范围。按PMDAct 路径申报的产品，其生产过程受到GMP 法规的监管，同时日本药品与医疗器械管理局 (PMDA) 也推出了若干针对细胞治疗产品的GMP 指南。按ASRM路径进行的细胞治疗产品临床应用，同样可以达到规模化商业应用的目的，其在生产条件、质量控制等方面相与GMP法规有较大差异，相关要求降低很多

G. 其他监管机构

其他监管机构也有针对细胞治疗产品的GMP 指南，可供参考，如澳大利亚 *TGA 发布的Australian Code of Good Manufacturing Practicefor Human Blood and Blood* Components,Human Tissues and Human Cellular Therapy Products(《澳大利亚人体血液和血液成分、人体组织和人细胞治疗产品GMP》),新加坡HSA发布的Guidelines on Good Manufacturing Practice for CTGTP(《细胞、组织和基因治疗产品(CTGTP) GMP》):

由于细胞治疗产品体系较为复杂，产品种类与技术不断发展，各监管机构、协会用于指导规范CMC、 早期开发、临床等阶段的指南、法规，其中部分内容可能同时对GMP 管理起到指导作用，生产企业应给予充分关注并借鉴。

1.3框架

本部分首先在“2生产质量控制策略”中阐述了细胞治疗产品基于风险的质量控

制策略，并对控制要素，如供者及供者材料的管理、医疗机构的质量管理、供应链(流通渠道)的质量管理、基因修饰载体系统的质量控制等，进行了详细介绍。

本部分主要对细胞治疗产品区别于常规无菌制剂的生产、质量要点进行系统阐述。在“3生产管理”中，对细胞治疗产品生产的工艺流程和产品生产的特殊关注点进行了介绍，针对质量控制与实验室管理及产品放行、环境控制等考量点，撰写了“7质量控制”。对人员、厂房设施和设备、物料、技术转移的管理要点也进行了详细介绍，包括“4人员管理”“5厂房、设施与设备”“6物料”“8技术转移”。同时，针对细胞治疗产品特殊的关注要点，如生物安全、产品追溯，分别在“9生物安全防护”和“10产品追溯系统”进行了介绍。

本部分结构图如下(图1-1)：

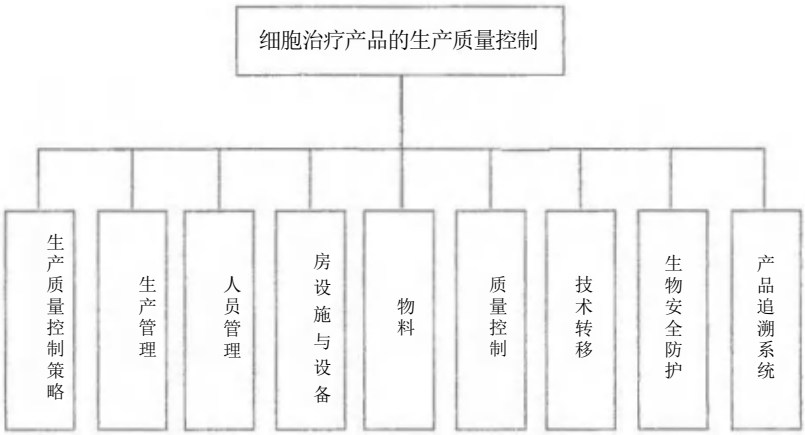


图1-1 细胞治疗产品部分框架示意图

2 生产质量控制策略

本章主要内容：

写细胞治疗产品生产的特殊性

如何制定质量控制策略

T 细胞治疗产品生产质量控制策略的要素

背景介绍

细胞治疗产品作为一类“活细胞”产品，相比其他化学及生物药品，其具有一定特殊性。细胞治疗产品的供者材料一般来源于人体，具有天然的个体差异性，其来源、类型、用途、性质、功能、生物学活性、可能携带的传染性病原体等特征，对产品质量与生产工艺均造成影响，导致多样化，细胞治疗产品生产具有以下特殊性：

●供者材料来源于人体，可能含有传染病病原体。

●供者材料的质量受其来源、类型、特性等因素影响，具有差异性。自体细胞产品生产工艺需要充分考虑供者材料个体化差异的影响，制定合理的工艺步骤和参数并在经批准的范围内实施生产。

●受供者材料来源和产品类型影响，产品生产批量差异可能较大，生产组织模式相对灵活，生产与临床需求结合更为紧密。

●温度和时限对供者材料和产品的质量具有更为显著的影响。

●由于细胞治疗产品为活细胞，包含维持细胞生存的营养物质，供者材料采集后的生产过程受到污染后更利于微生物的繁殖和扩散，且无法进行最终灭菌，污染不易去除。

●自体细胞产品或采用异体供者材料生产的需与患者配型使用的产品， 一旦发生混淆或差错，造成供者材料或细胞治疗产品与患者之间的不匹配，可能会对患者产

生危及生命的严重后果。

针对细胞治疗产品这类“活细胞产品”,应从不同细胞治疗产品各自产品及工艺特点出发，围绕从生产起始物料开始的供者材料采集及运输、GMP 生产及质量控制、产品放行及发运流通的闭环全流程中的各个环节，识别产品和生产工艺中的具体风险，评估对产品质量、安全性及有效性潜在影响，设计出符合GMP 要求的措施，才能实现细胞治疗产品质量可控，保护患者用药安全，实现以患者为中心的质量管理目标。

细胞治疗产品的质量管理体系建立应包含自起始原材料(供者材料)开始、体外经过运输及加工生产、再返回至患者的全过程，包含医疗机构(治疗中心)、供应链(冷链运输及产品流通渠道)、产品制备工厂(生产中心)的三个端的闭环范围。应在充分的工艺开发和全面的质量研究的基础上，逐渐增加对细胞治疗产品的科学认识和经验积累，及时分析评估对产品质量有影响的风险因素、产品质量与临床安全性、有效性的相关性，建立与细胞治疗产品相适应的全生命周期质量控制策略，实现产品从生产到使用的全程质量受控。自体CAR-T 细胞治疗产品生命周期质量管理闭环示意图见图2-1。

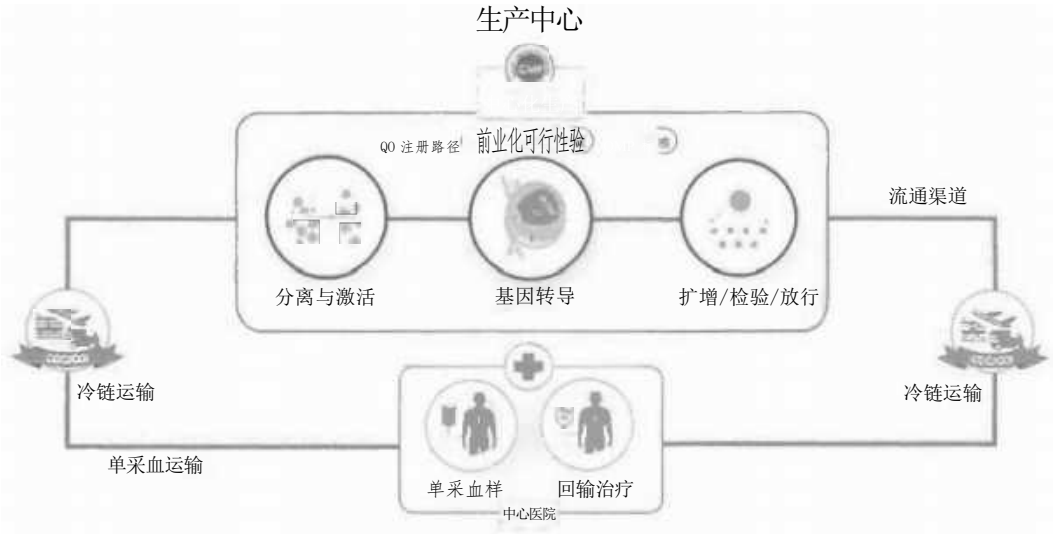


图2-1 自体CAR-T 细胞治疗产品生命周期质量管理闭环示意图

2.1基于风险的质量控制策略

背景介绍

基于细胞治疗产品的特点，对所有与产品生产工艺相关的风险进行考量时，应基于当前的科学知识、积累的经验、所有可取得的信息、对产品质量、安全性及有效性潜在影响的评估，以及其他与人的健康和环境相关的风险，制定最合适的控制/规避措施。

在临床研究期间，确保临床试验受试者的安全是临床试验的重要环节，确保临床试验结果的可靠性也同等重要，尤其是确保产品的一致性，保证在非GMP 车间生产的产品不会影响临床试验结果。因此，从开发阶段起，就应启动保证产品质量的控制策略。另外，对产品的认知是一个循序渐进的过程，相应的生产工艺和控制方法会随临床试验的不同阶段逐渐精细和完善。

对于获得上市许可的细胞治疗产品，制定的质量控制策略应符合注册批准要求，如对原材料和供者材料、生产设施及设备的控制、检验及验收标准、工艺验证、放行标准以及稳定性研究等。

细胞治疗产品目前尚处于新兴和快速发展阶段，对细胞类产品的科学认识和GMP规模化生产的经验尚在不断积累，因此，基于现有的科学知识及有限的经验开展风险评估的策略，也应随着行业的进步不断更新调整，最终应将基于科学知识的质量风险评估与保护患者联系起来，质量风险管理的资源投入、形式和文件应与风险的水平相适应。当然，运用基于风险的方法的管理策略不等于可以经过风险评估，降低 GMP明确规定的要求和监管当局规定的要求。

对质量源于设计(QbD) 的药品研发方法与控制策略的详细介绍，可参考本分册无菌制剂部分“2无菌制剂生产和质量管理概要”。针对细胞治疗产品，注射剂协会PDA 于2018年发布的81号技术报告Cell-Based Therapy Control Strategy(《细胞治疗产品控制策略》)中，对如何将质量源于设计(QbD) 的理念运用在细胞治疗产品中和如何制订质量控制策略进行了阐述(图2-2)。此处不再展开描述。

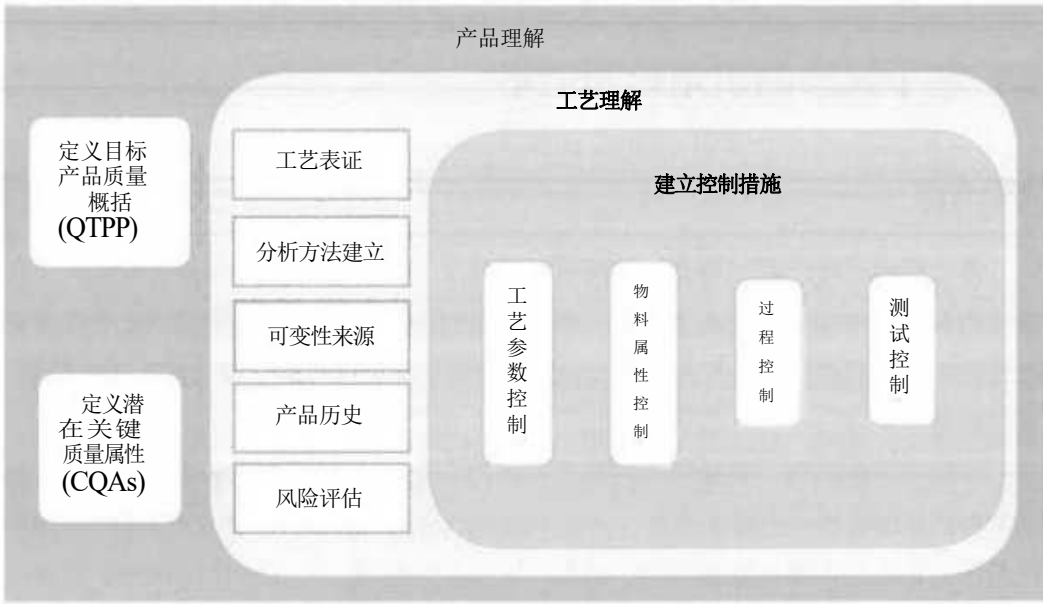


图2-2 质量控制策略开发概览图

注：本图来自于PDATR81《细胞治疗产品控制策略》

实例分析

本案例以CAR-T 细胞治疗产品为例，描述了制定质量控制策略的过程，仅供参考。

A. 目标产品概况(TPP)

●适应证。

●治疗人群。

●产品分类。

●细胞获得/细胞源。

●剂型。

●作用方式机制。

●含量。

●给药方式。

●给药方案。

●规模。

●贮存条件。

●有效期。

B. 目标产品质量概况(QTPP)

0药品属性：包括适应证、剂型、给药方案、给药总量、容器包装系统、稳定性及贮存条件等:

6安全性

0 鉴 别

含量

0纯度。

0杂质。

活性。

e 通用要求。

C. 关键质量属性(CQA)、 关键工艺参数(CPP) 和关键物料属性(CMA)

从 QTPP中识别影响产品质量的质量属性，风险程度高的定义为CQA

整理所有生产工艺参数，将直接影响CQA的工艺参数定义为CPP

按照工艺流程图识别出细胞治疗产品生产使用的所有原材料及辅料，评估出物料的关键性程度，将关键性程度高的物料属性定义为CMA。

D. 控制措施

0工艺参数控制措施举例

供者材料采集细胞参数控制：如CAR-T 细胞治疗产品单采血的采集参数将直接影响供者材料的质量(如淋巴细胞总量、采集总体积等)。

产品生产过程工艺控制：如细胞扩增培养条件中温度及CO_2 浓度会直接影响细胞生长和扩增。

物料属性控制措施举例

关键起始物料控制： CAR-T 细胞治疗产品中常用的基因修饰载体是病毒载体，在细胞转导步骤对细胞进行基因修饰，作为关键性物料的病毒载体质量(如不得携带外源性污染因子)是GMP 生产成功的关键：

一次性无菌耗材控制：基于细胞治疗产品全过程无菌生产的特点，生产中使用的一次性耗材必须是无菌的， 一次性耗材需要满足细胞治疗产品对无菌、细菌内毒素、外来异物等的控制要求。

●过程控制措施举例

o 环境监测：基于细胞治疗产品不能进行灭菌/除菌工艺，生产中敞口工序的无菌保证对操作环境依赖度极高，因而在细胞治疗产品的批生产时，应对直接操作细胞的生产人员进行表面微生物监测，对在B 级背景下A 级进行的关键操作全过程进行悬浮粒子监测，对关键工艺操作过程的背景进行微生物监测。

0无菌操作管理：定期对生产操作的全程无菌操作步骤进行无菌工艺模拟试验，对生产用无菌培养基配制工艺进行验证及周期性再验证。

●测试控制措施举例

0细胞生长情况监测：在细胞扩增培养阶段，取样测定细胞密度和细胞活率，判断细胞生长情况是否满足工艺预期。

0放行检测：依据工艺产品的特点，对生产过程及成品设置取样点，制订取样方案和实施取样，评价细胞治疗产品的质量状况。

CAR-T 细胞治疗药物的CQA、CPP、CMA和控制措施策略示例见表2-1。

2.2生产质量控制要素

细胞治疗产品和传统药物相比存在的特殊性，使得细胞治疗产品质量体系管理边界和范围略有不同。从细胞治疗产品的质量风险控制出发，建立包含医疗机构(治疗中心)、供应链(冷链运输及产品流通渠道)、产品制备工厂(生产中心)的三端连接的闭环管理质量体系尤为重要。

本部分从细胞治疗产品的全生命周期闭环流程出发，基于风险程度，列举了细胞治疗产品可能共有的质量风险点(不同细胞治疗产品的工艺不同，可能有的风险点不适用),建议企业制定相应的控制措施。

2.2.1 供者及供者材料的管理

背景介绍 ——————————

供者材料作为细胞治疗产品的起始物料，来源于人体， 一方面会影响细胞治疗产品的质量，另一方面其中可能含有传染病病原体，存在对生产操作人员健康产生影响的风险。因此供者材料的质量要求应作为关键物料属性进行管理，避免污染和混淆，确保采集样本符合生产工艺要求，减少不同批次供者材料间的质量差异。应

表2-1 CAR-T 细胞治疗药物的CQA、CPP、CMA 和控制措施策略示例

CAR-T细胞治疗产品生产质量控制策略					
序号	工艺步骤	关键质量属性(COA)	关键工艺参数(CPP)	关键物料属性(CMA)	控制措施举例
1	单采血	淋巴细胞总数；采集总体积	单采循环血量循环时长	采血套件完整无菌性	采集参数设置；单采血套件的使用前完整性检查
2	T细胞分选	细胞活率；细胞数	分选磁珠添加量	CD4/CD8分选磁珠性能	CD4/CD8磁珠的入厂测试；过程取样细胞计数
3	T细胞激活	细胞活率；细胞数	激活磁珠添加量：激活时长	激活磁珠性能	激活磁珠的入厂测试；培养过程取样细胞计数
4	T细胞转导	细胞活率；细胞密度	病毒载体添加量(总滴度)；转导时长	病毒载体滴度	病毒载体入厂测试滴度；病毒载体MOI及转导时长控制；培养过程取样细胞计数
5	细胞扩增	细胞活率：细胞密度	培养温度/CO_2浓度	细胞扩增培养基性能(促生长能力、培养基无菌性)	配制后培养基取样测试促生长能力；除菌滤器完整性测试；培养温度及CO,浓度连续监测；培养过程取样细胞计数
6	细胞收获	细胞活率；细胞密度；CAR阳性转导率	培养温度/CO_2浓度	细胞扩增培养基性能(促生长能力、培养基无菌性)	配制后培养基取样测试促生长能力；除菌滤器完整性测试；培养温度及CO_2浓度连续监测；取样细胞计数/测试CAR-T阳性率
7	原液	细胞活率；CAR-T细胞数；工艺杂质残留	清洗/收获参数	一次性收集袋的完整性	设置相应的细胞分离参数；取样测试细胞活率/CAR阳性率；清洗后取样测试工艺杂质(BSA/RCL HCP/Mycoplasma)；一次性收集袋供应商审计/入厂检验无菌、细菌内毒素
8	半成品配制及分装	细胞活率；CAR-T细胞数	CAR-T细胞总数；冻存液添加量	辅料质量匹配工艺要求	取样细胞计数；控制投入CAR-T细胞总量；辅料供应商审计/入厂检测鉴别、无菌、细菌内毒素、不溶性微粒
9	产品冻存	细胞活率；CAR-T细胞数	程序降温参数	产品冻存袋性能（耐低温产品相容性、无菌性）	程序降温参数控制；产品冻存袋供应商审计/入厂检测无菌、细菌内毒素

续表

CAR-T细胞治疗产品生产质量控制策略					
序号	工艺步骤	关键质量属性(COA)	关键工艺参数(CPP)	关键物料属性(CMA)	控制措施举例
10	成品	成品放行标准(鉴别、含量、纯度、杂质、活性、无菌、支原体、细菌内毒素等)	贮存温度	—	成品存储罐实时温度监控及报警系统；成品按放行标准进行全检

在生产工艺规程中明确规定投入生产的细胞材料的质量标准(例如：单采血的起始细胞总数、外源因子污染情况等)。不符合标准的供者材料可能导致生产失败。例如：用于CAR-T 产品的起始生产用的单采血，应关注淋巴细胞总数是否符合工艺标准，采集的单采血是否有病原微生物污染等。

自 技术要求

细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)

七、供者筛查与供者材料

(一)企业应当建立供者筛查和检测标准及供者材料的质量标准，并综合考虑微生物的生物安全等级、传染病类别和细胞产品的预定用途等因素进行风险评估，定期回顾其适用性。

企业不得接收不符合质量标准的供者材料。

(二)企业应当选择具有合法资质的医疗机构作为供者材料采集和细胞产品使用的机构，并明确双方职责。质量管理部门应当定期对医疗机构进行质量评估，并根据评估情况会同企业有关部门对医疗机构进行现场质量审计，以确保医疗机构供者筛查和检测、供者材料采集以及产品的使用符合相关要求。

(三)企业应当建立对医疗机构进行质量评估和认可的操作规程，明确医疗机构的资质、选择的原则、质量评估方式、评估标准及合格医疗机构认可的程序，并明确现场质量审计的内容、周期、审计人员组成及资质。

(四)企业质量管理部门应当指定专人负责医疗机构的现场质量审计，确定经认可的合格医疗机构名单，并建立每家医疗机构的质量档案。

(五)企业应当与经认可的合格医疗机构签订质量协议。质量协议的内容应当至少包括医疗机构和企业双方的职责，供者材料的采集方法、保存条件、质量标准、接收规程和/或细胞产品的使用。

(六)企业应当定期对医疗机构采集供者材料和使用细胞产品的情况进行回顾和评估， 一旦发现医疗机构出现不符合操作规程，可能会对患者造成不利影响的情况，应当及时要求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。

(七)企业应当制定供者材料采集、保存、运输、接收的书面要求，详细说明供者材料的采集方法、保存和运输条件以及接收的标准。

(八)企业对每批接收的供者材料，至少应当检查以下各项内容：

1.来源于合法且经企业评估认可的合格医疗机构。

2.运输过程中的温度和时限监控记录完整，温度和时限符合规定要求；如对供者材料采集后的储存温度和时限有特殊要求，还应有完整的温度和时间监控记录，且符合标准要求。

3.包装完整无破损。

4.包装标签内容完整，至少含有能够追溯到供者的个体识别码、采集日期和时间、采集量及实施采集的医疗机构名称等信息；如采用计算机化系统的，包装标签应当能追溯到上述信息。

5.供者材料采集记录。

6.供者筛查和临床检验结果，至少应当有检查特定传染病病原体标志物的结果。

(九)已知含有传染病病原体的自体供者材料在运输、接收、贮存、发放或转运过程中应当与其他供者材料彼此隔离，每个包装都应有明显标识。

(十)投产使用前，企业应当对每批供者材料进行质量评价，内容至少应当包括：

1.确认供者材料来自于合法的且经过企业评估认可的医疗机构及符合筛查标准的供者，并按照上述第(八)中第4条内容核对相关信息。

2.供者材料从医疗机构采集结束至企业放行用于生产前的储存温度和时限符合规定要求。

3.供者材料包装完整，无破损。

4.运输、储存过程中出现的偏差已按相关规程进行调查和处理。

指　导

A. 供者传染病病原体筛查

细胞治疗产品生产过程中通常不包括病毒去除工艺或步骤，来源于供者材料中的传染病病原体，无法在现有细胞治疗产品的生产工艺中去除，因此，对供者材料的提供人员，应建立传染病病原体筛查机制，在医疗机构使用经监管当局批准的试剂盒进行病原微生物检测，筛查结果应满足生产企业对供者材料的质量要求。

对 于CAR-T 等自体细胞治疗产品，应根据产品治疗适应人群，制定筛查标准。如细胞治疗产品生产用的单采血，在采集前应要求捐献者至少进行 HIV、HBV、HCV和梅毒螺旋体等特定传染病病原体的检测，符合要求的才可开展后续单采血采集。

部分异体细胞治疗产品，如干细胞和通用型免疫细胞治疗产品，可能需要进行多批次的细胞采集和筛查，因此还需要有更全面的供者筛查和细胞检测标准。

B. 供者单采血采集

根据不同细胞治疗产品工艺开发要求，明确采集细胞数量(例如：CAR-T 细胞治疗产品建议采集淋巴细胞总数达5×109个)、采集体积(采集的最小体积应满足工艺规定)等技术标准，制定相应的采集标准并对院端采集人员进行培训，确保采集细胞符合生产要求。

C. 供者材料的运输

●含有传染病病原体的供者材料在运输过程中应当与其他供者材料彼此隔离。

●供者材料运输过程需要经过确认，运输过程需要有温度监控记录。

●供者材料应当始终存放于具有冷链运输条件的设施设备中。

●应确保供者材料在运输过程中不经过X 线辐射，不可倾倒、重摔、混淆，全程不应打开冷链包装。

●若采用第三方物流，运输供应商应经过细胞治疗产品生产商确认后成为合格供应商，并签订质量协议。

D. 供者材料的接收

应设有专门的供者材料接收地点，含有传染病病原体的供者材料应在单独隔离

的空间接收及存放。供者材料接收的包含文件应有明确规定并建立接收及存放标准。供者材料接收的注意事项包括：

3供者材料来源于合法且经企业评估认可的医疗机构。

运输过程中的温度和时限监控记录完整，温度和时限符合规定要求；如对供者材料采集后的贮存温度有特殊要求，还应有完整的温度监控记录，且符合标准要求。

c 包装完整无破损。

0包装标签内容完整，至少含有能够追溯到供者的个体识别码、采集日期和时间、采集量及实施采集的医疗机构名称、细胞总数、患者体重等信息；如采用计算机化系统，供者材料从医院发运到生产场地后，对供者材料包装上的标签进行扫码，通过与电脑系统中预先录入的患者ID 号核对，确认是否正确；同时，在电脑系统中获取患者的体重、所在医院科室和病床号、医师、采集时间、细胞数量等信息。

●供者材料采集记录完整。

o 供者筛查的临床检验结果，至少应当有检查特定传染病病原体标记的结果。对于已知含有传染病病原体的供者材料，企业应当隔离存放，每个包装都有明显标识。

c 供者材料应在规定的温度条件下暂存，直至用于生产。

E. 供者材料的放行

应建立供者材料的放行管理流程，只有经过质量保证部门质量评价，合格后才可放行进入后续生产使用。质量评价内容包括但不限于：

●确认供者材料来自于合法的且经过企业评估批准的医疗机构及符合筛查标准的供者。

0运输过程中的温度监控记录完整，温度符合规定要求；如对供者材料采集后的贮存温度有特殊要求，还应有完整的温度监控记录，且符合标准要求。

供者材料从医疗机构采集结束至企业放行用于生产前的贮存温度和时限符合规定要求。

o 供者材料包装完整，无破损。

●运输、贮存过程中出现的偏差已按相关规程进行调查和处理。

●异体供者材料不得含有经细胞、组织或体液传播疾病的病原体。

对供者材料进行入厂检测，确认检测结果符合质量标准之后放行使用。如果由于特殊的细胞治疗产品特点(如生产周期短等),企业无法在使用之前完成所有供者

材料的检测项目，企业可以在风险可控的情况下对供者材料进行限制性放行，但需要在细胞治疗产品放行时完成供者材料的检测并符合质量标准。

实例分析

对于供者材料筛查，需基于产品风险和供者使用要求，明确供者的任何相关特征，包括但不限于年龄、性别、既往辐射暴露、疫区停留情况、既往病史、家族史、病原微生物筛查信息、人白细胞抗原(human leukocyte antigen,HLA)分型信息、血型、血常规检测等。筛查项目一方面可参考《中国药典》三部血液制品生产用人血浆中的描述，检测项目包括：

●外观。

●蛋白质含量。

●谷丙酸氨基转移酶(ALT)。

●乙型肝炎病毒(HBsAg)。

●梅毒螺旋体。

●人类免疫缺陷病毒(HIV-1 和HIV-2)。

●丙型肝炎病毒(HCV)。

企业可根据供体健康/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筛查项目。

另一方面，对于供者材料的入厂检验标准，可结合产品特点进行部分工艺相关指标的检测，以下检测项目供参考：

●总细胞数。

●细胞活性。

●细胞抗体标志物检测。

●支原体检测。

2.2.2医疗机构的质量管理

背景介绍 一

供者材料无论来自于患者自体细胞还是捐献者的组织细胞，均需由有医师资格人员在医疗机构内实施采集操作。现已上市的CAR-T 细胞治疗产品，均需要在回输前由有经验的医护人员实施细胞制剂成品的复融操作。同时，在院端开展细胞治疗

前，还需要专业医师指导，完成患者用药前的桥接治疗、淋巴细胞清淋等细胞治疗前处理。因此，具备细胞治疗经验和能力的医疗机构是保证患者治疗效果和用药安全的关键。

企业建立的质量管理体系应将供者材料采集端和治疗端的医疗机构包含进去，筛选具备条件的医疗机构，对医疗机构相关医护人员进行采集和复融等操作的培训，对采集场地和治疗场地进行现场审计，经过质量评估并确认符合要求的，纳入合格医疗机构和合格医护人员清单，双方签订质量协议。质量协议的内容应至少包括：医疗机构和企业双方的职责、供者材料的采集方法和贮存条件、质量标准接收规程和产品的使用等。对合格医疗机构还应实施动态维护，定期开展审计及再审计，及时补充经审计合格的医疗机构名单，并从清单中剔除存在风险的医疗机构。

实施指导

A. 医疗机构的筛选

根据细胞治疗产品对供者材料采集和治疗的医疗机构的要求，从医疗机构的医疗水平出发，评估医疗机构既往治疗患者数、治疗水平、已建有的细胞治疗全流程多学科诊疗管理或院际合作团队情况(如对于CAR-T 产品，团队可不限于本院治疗科室、ICU 科、神经内科、感染科等)等，评估医疗机构的硬件配备、住院治疗的床位数等情况，和医疗机构进行沟通和共建意愿度评估，确立目标合作医疗机构。

B. 医疗机构的培训

对经过初步筛选的合作医疗机构的相关业务科室及人员，企业应负责开展相关产品医学及使用的知识培训，使医疗机构人员熟悉产品的使用环节，了解产品使用过程中的重要注意事项，包括用药后可能发生的不良事件的处置流程等。培训内容应包括：

●细胞治疗产品相关医学基础知识：由企业专门负责医学管理的医学专业人员作为讲师，对产品知识及相关的医学数据进行培训，如病例分享、不良反应处理等。

●产品使用相关操作流程培训及练习性预演：由企业的专业人员作为培训讲师，和医疗机构相关科室现场进行的讲解和培训。培训内容主要包含：

o 供者材料采集标准流程及关键操作要点说明。

- 供者材料从医疗机构交接至运输商的交接流程及确认的关键点。
- 供者材料运输过程中的质量管理介绍。
- 产品运输至医疗机构的交接流程及确认关键点。
- 产品在使用前的复融操作流程及关键操作点。
- 使用后剩余产品的处置。
- 练习性预演实操：配合真实运输设备的运输及交接进行模拟性操作练习。

C. 医疗机构的质量审计/认证

企业应建立医疗机构质量审计/认证的标准操作流程，由质量管理部门对目标合作医疗机构进行现场质量审计，评估医疗机构硬件和软件是否支持产品在该医疗机构开展治疗。可将卫健委对采血机构的相关管理法规作为评估参考依据：

- 《单采血浆站质量管理规范》。
- 《单采血浆站实验室质量管理规范》。
- 《静脉血液标本采集指南》。

D. 合格医疗机构的定期评审及退出机制

●经过质量审核合格且成功完成实战操作演练后，企业应和医疗机构签订质量协议，明确双方质量责任。将审计合格的医疗机构纳入《合格医疗机构清单》。并按照产品注册批准上市时监管要求，定期将合格医疗机构名单上报当地药品监管部门进行备案。

●发生偏差、质量投诉，应及时启动偏差及投诉调查，必要时启动有因审计，若审计活动中发现无法满足要求时，应暂停相关治疗活动，确认医疗机构的整改符合要求后才可重启治疗活动，必要时，应将该医疗机构从合格清单中剔除。

实例分析

以自体CAR-T 细胞治疗产品为例，对医疗机构采血现场审计要求如下：

●确认细胞单采室现场硬件条件，具体如下：

- 单采室场地情况：具有适当的规模和管理，以便接收、准备、采集、运输包装单采血材料。
- 现场设备情况：采血机的品牌/型号、校准状态和校准周期、使用和维护记录。

0采血机配套使用耗材及试剂的储存管理情况。

o 单采人员情况：单采人员具备相应资质、符合培训要求证明。
确认医疗机构的质量管理体系，具体如下：

2医疗机构对单采人员培训和资质管理流程。

医疗机构的文件管理流程。

0单采设备操作、校准和维护等管理流程。

物料耗材管理流程。

单采流程管理情况(包括单采准备、单采过程数据记录、保证患者身份准确、信息可追溯等)。

0单采室的清洁和环境管理流程。

2.2.3供应链(流通渠道)的质量管理

背景介绍

细胞治疗产品的供应链包含了从起始供者材料的运输、最终制剂产品运送至患者所在医疗机构开展用药治疗的整个流通环节，供应链是连接生产中心和治疗中心的质量管理闭环中重要纽带。例如：对于已上市的自体CAR-T 细胞治疗产品这类“患者订制”单人单批次的个人用药，其供应链由药品经营企业(例如：已上市CAR-T 药品采用的DTP 药房负责“最后1公里配送”)和药品物流企业构成了向医疗机构端配送的闭环式结构。

采用的运输方式应能维持产品质量稳定，运输过程中能够防止差错及混淆等规范运作，是确保产品质量安全可靠的重要环节，供应链质量控制内容应是细胞治疗产品质量管理体系中的重要部分。企业可通过与供应链服务商的质量约定，共同对产品运输包装的温控能力进行确认，对运输过程中可能的外界干扰(例如：撞击、辐射)是否会对产品质量产生风险进行研究和确认，运输过程中产品温度波动是否符合产品允许的范围进行确认，对运输过程中防止差错及污染的措施进行质量评价，确保细胞治疗产品在流通渠道过程中产品质量受控，降低细胞治疗产品在流通领域中可能的质量风险，最终确保患者用药安全。

企业应与供应链服务商(药品经营企业，如DTP 药房)和药品物流企业(承运商)共同建立多方联动的供应链协同管理团队，负责供者材料和最终成品的营运流程、信息交换、物流运输的全程监控，确保执行经设计并经验证的运输方案，结合订单信息提供个体化的运输服务，实现产品配送全程质量管控。

企业还应与供应链服务商共同建立多方联动的应急管理团队，对细胞治疗产品在供应链流程中出现的异常情形做出快速决策和响应。

A. 供应链服务商的筛选及质量审计

企业应结合自身产品特点，选择相适应的供应链服务商，初步评估物流运输商的运营能力、业务响应能力、合作意愿度及其内部质量管控体系等，筛选出可能的物流运输商，并由技术团队和物流运输商团队合作，联合开发，或在物流运输商已有包装中筛选，初步确认满足产品运输要求的可能包装样式。完成供应商的初步筛选和评估后，由质量管理部门启动对服务商质量体系的全面质量审计。

B. 运输确认

企业应与服务商协同，完成供者材料和细胞制剂成品的运输验证。确保运输全过程满足生产工艺及产品贮存的需要。应明确符合运输要求的运输包装形式、确认包装保温的最大时长，作为实际运输时限管理的依据。

C. 供应链服务商的定期评估和退出机制

经质量审核合格的供应商，企业应与其签订质量协议，并纳入《合格供应链服务商清单》进行管理。

若发生偏差、质量投诉等，应执行相应的偏差调查及投诉调查流程，必要时启动现场审计，若发现无法满足要求时，应暂停相关运输活动，确认整改符合要求后才可重启使用该服务商，否则，应采取退出机制，从合格清单中剔除。

实例分析

以冷链运输的自体CAR-T 细胞产品为例，对供应链服务商的审计要点包括：

●冷链运输设施设备应配置温度自动监测设备，可实时采集、显示、记录、传送配送过程中的温度数据，具有远程及就地实时报警功能；应配置定位系统，可实现配送轨迹的监控；应采取安全保障措施，防止药品在配送过程中丢失或替换。

●应确保供者材料、药品在运输过程中避免X 线辐射，不可倾倒、重摔、混淆，

全程应尽可能避免打开冷链包装，并确保随行文件和患者信息的安全。

●有药品专用的固定贮存区域，并通过监控设备实施贮存期全程监控。药品贮存时，应保持存放在经验证的适用于冷链运输的设施设备中。固定贮存区域温度应保持在冷链设备验证的环境温度范围中，并有专人管理，建立记录。

●物流运输商应有相应的异常情况处置机制。如发生温度异常、冷链运输设施设备破损、倒置、跌落、封签非正常开启等任何异常情形，应及时反馈至企业，执行企业要求采取的相应应急措施。

●物流运输商建有的质量管理体系应包含对冷链药品的验收、在库维护、发运及应急处置等相关管理流程，应符合《药品经营质量管理规范》及其附录《冷藏、冷冻药品的储存与运输管理》中的相关规定。

2.2.4基因修饰载体系统的质量控制

背景介绍

基因修饰载体系统是关键的起始原材料，在细胞治疗产品的生产中，对最终产品的质量保证至关重要，载体基因结构设计、制备过程以及质量控制等方面的差异将直接影响产品的安全性和有效性。基因修饰载体系统的生产过程应在GMP条件下进行。

目前，细胞治疗产品的上市许可持有人(MAH)，其基因修饰载体系统(如CAR-T细胞转导用的病毒载体)采用委托研发生产外包组织(CDMO)公司生产为主，外部生产企业的质量管理体系差异各有不同，因此MAH应建立相应管理CDMO公司的流程，和其签订质量协议，对CDMO公司进行质量审计和定期再审计。对入厂的基因修饰载体系统建立到货验收标准(涵盖入厂检验质量标准)，取样检测合格后才可放行用于生产。

管理要求的进一步阐述，详见本分册细胞治疗产品部分“6物料”。

2.2.5污染控制策略

法规要求 . . . .

药品生产质量管理规范(2010年修订)

第一百八十八条 不得在同一生产操作间同时进行不同品种和规格药品的生产操作，除非没有发生混淆或交叉污染的可能。

第一百八十九条 在生产的每一阶段，应当保护产品和物料免受微生物和其他污染…..

第一百九十七条 生产过程中应当尽可能采取措施，防止污染和交叉污染……

第一百九十八条 应当定期检查防止污染和交叉污染的措施并评估其适用性和有效性。

药品生产质量管理规范(2010年修订)无菌药品附录

第三条 无菌药品的生产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、各种微粒和热原的污染。

第四十六条 生产的每个阶段(包括灭菌前的各阶段)应当采取措施降低污染。

背景介绍 ------

欧盟2022年8月发布的GMP 附录1“无菌药品生产”中给出了污染控制策略(contamination control strategy,CCS)的定义：源于现有产品和工艺的理解，以确保工艺性能和产品质量为目标而设计的针对微生物、细菌内毒素/热原和微粒的一系列控制措施，这类措施包括对原液、辅料及成品的组成及成分、生产设施和设备操作状况、过程控制、终产品质量标准、相关方法及监控频次设立相应的控制参数和质量标准。

基于细胞治疗产品“活的细胞”的特性，常用的灭菌/除菌工艺不能用于细胞治疗产品的生产，因此，现已批准上市的细胞治疗产品，其工艺培养体系均按照全程无菌生产要求来管理， 一旦发生微生物污染，会直接导致最终产品不合格或不得不终止生产。因此，遵循无菌药品的生产管理要求是防止微生物污染，确保产品成功的重要手段。例如：对于工艺步骤中涉及的敞口操作，应在B 级背景下的A 级进行；生产车间为了避免污染，应有良好的人物流设计，使得进入洁净区的人员和物品携带微生物负荷降低到相应洁净度级别规定；直接从事无菌操作的人员，应经过微生物控制培训和无菌操作规范的培训，成功通过无菌工艺模拟试验(aseptic process simulations,APS) 后才能上岗从事细胞治疗产品生产操作。

A. 细胞治疗产品的厂房设计

细胞治疗产品的生产从起始供者材料采集开始，至最终成品制剂的生产工艺全过程所有的敞口操作，均为在B 级背景下的A 级进行的无菌操作，因此需要对进入生产制备操作间的人员更衣流和物料传递流进行良好的设计，以有效避免污染及交叉污染和防止微生物污染；需要对生产洁净区建立确认及日常环境监测策略，制订批生产时环境悬浮粒子、微生物监测频率；对检出的环境微生物进行鉴定和调查。

具体管理内容，详见本分册细胞治疗产品部分“3生产管理”“5厂房、设施与设备”。

B. 无菌操作人员培训

现有上市自体CAR-T 细胞治疗产品由于其生产规模小，依赖操作人员在生物安全柜内完成关键的工艺步骤操作，例如从细胞培养袋中取样细胞计数、添加培养基及换液、半成品的配制等，因此，直接从事细胞治疗产品无菌操作人员的无菌操作能力是生产制备成功的重要保证。

企业应建立一套无菌操作培训的流程，经过严格的无菌培训和操作考核后的合格人员才能从事细胞治疗产品的生产操作。无菌操作培训内容至少包括：

●无菌更衣培训。

●无菌操作培训。

●无菌工艺模拟试验。

具体管理内容，详见本分册细胞治疗产品部分“4人员管理”。

C. 生产用物料无菌控制

细胞治疗产品为全过程无菌生产，因此直接和细胞治疗产品接触的设备、原材料和一次性耗材等必须满足无外源性病毒因子污染、无菌/无热原的要求。因此，对生产用关键物料的质量控制至关重要，质量管理内容至少包括：

●供应商筛选：在生产工艺开发和生产用物料筛选时，就应特别关注物料可能引入外源性病毒因子的风险，尽可能选择非人、动物组织来源或其生产加工工艺中不含生物源性材料的原材料，若必须使用(如胎牛血清),应进行充分评估和确认，其

产品工艺中必须包含病毒去除工艺和进行最终检测，确保其提供的产品没有外源性病毒因子引入的风险。

●供应商质量审计：重点关注物料的生产工艺，提供无菌产品的无菌保证情况，放行标准等；审计合格后应和供应商签订质量协议。

●物料入厂检验：对关键物料进行质量风险评估，制订入厂检验标准(包含无菌、细菌内毒素限度等),执行入厂检验和放行管理。

具体管理内容，详见本分册细胞治疗产品部分“6物料”。

D. 过程污染监测

在细胞治疗产品的生产过程中，应建立产品的过程取样监测策略，及时发现生产过程中微生物污染情况，监测项目至少包含：

●支原体污染监测。

●微生物污染监测。

具体管理内容，详见本分册细胞治疗产品部分“7质量控制”。

2.2.6生物安全管理

背景介绍

细胞治疗产品的供者材料来源于人体血液或组织，属于生物源性材料，存在引入、传染及传播传染性病毒因子的风险，在细胞治疗产品的生产过程中，必须严格执行防止差错及混淆的措施，控制外源因子引入导致的产品安全性风险。

在细胞治疗产品的生产端，应建立生物废弃物处置及灭活、含有传染病病原体的生物材料泄露应急处置等管理措施。例如：在接收及生产操作/检验操作过程中，应严格遵循相应的生物安全操作，过程废弃物应及时进行灭活处置，灭活工艺参照GMP要求进行验证或确认。

针对含有传染病病原体的样本，应在指定的专门的操作间进行处置，并保持与相邻房间的负压，相应的操作过程应在生物安全柜内进行，以确保操作人员的安全，涉及操作的实验室场地还应符合卫健委对生物安全实验室级别的要求。

具体管理内容，详见本分册细胞治疗产品部分“9生物安全防护”。

2.2.7产品追溯系统

背景介绍

基于细胞治疗产品的特点，要实现细胞治疗产品全流程的防混淆/防差错，不仅在生产过程中需要进行防差错/防混淆的管理，还应从起始供者材料开始，对采集的细胞及组织的体外运输进行全流程的防差错/防混淆的质量管理，建立产品的全程追溯系统，确保细胞治疗产品的质量及用药安全。

产品追溯的进一步阐述，详见本分册细胞治疗产品部分“10产品追溯系统”。

2.2.8批记录管理

背景介绍

细胞治疗产品的批记录的保存时限与其他传统药物不同。GMP 第一百六十二条规定：批记录至少保存至药品有效期后一年。在《细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)》中规定：细胞产品的批记录应当至少保存至产品有效期后5年。供者材料、关键物料的追溯以及供者与患者关联识别等关键追踪记录或资料，至少保存30年。而欧盟规定，ATMP产品追溯系统数据要求至少保存至产品有效期后30年(ATMP生产质量管理指南6.37)。

建议企业根据相应产品的具体情况，制订合适的批记录保存效期。

实例分析

CAR-T 细胞治疗产品批记录由产品全周期内生产及质量控制活动产生的相关记录组成，可以按照供者识别码编号整理所有的批记录进行归档，归档的批记录包含但不限于：

●起始供者材料的采集记录、运输过程温控记录、生产中心接收及检验记录和供者材料的质量评价放行记录。

●批生产及过程控制记录、中间产品及成品的检验记录和最终成品质量评价放行记录。

●成品运输至治疗中心过程的温度记录和产品复苏回输操作记录等。

2.2.9产品召回及其他降低风险的措施

背景介绍

细胞治疗产品质量管理体系涵盖了由医疗机构(治疗中心)、供应链(运输流通端)和细胞制备(生产中心)链接起来的闭环，闭环内一旦发生任何与产品相关的质量问题(投诉)时，应触发质量体系中的产品投诉调查流程，展开应急处理和原因调查，若经过调查确认有产品质量风险存在时，应立即做出停止流入下一环节的纠正措施，必要时从院端(治疗中心)或流通端召回产品。

自 技术要求

细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)

十、质量管理

(四)企业应当建立应急处理规程，当获知细胞产品在运输和使用过程中发现有质量风险，如包装袋破损、标签信息错误和脱落，或者产品温度在运输过程中超标，应当立即启动应急处理并展开调查，相关应急处理和调查应当有记录和报告。必要时还应当启动产品召回。

A. 产品召回

●应建立有效系统确保对质量相关的投诉进行记录并充分调查，无论投诉是口头的还是书面的。除另有规定外，负责处理投诉及质量缺陷调查的人员应该独立于市场及销售部门。

●应建立收到投诉后应采取相关行动的操作流程，流程中应包含对产品召回行动对患者获得医疗产品可及性影响的评估。

●对于召回的产品，应制定书面处理流程，内容包括：如何发起产品召回、召回应告知方(包括主管部门及医疗机构)，以及召回材料如何处理；应确保产品召回流程能在任何时候都能被快速实施；应从保护公众健康的角度，在找出问题根源并充

分描述产品缺陷之前就进行产品召回。

●对于已批准上市的细胞治疗产品，应考虑实施产品模拟召回演练。

B. 其他风险最小化措施

患者在用药后均伴有不同程度的不良反应是一般细胞治疗产品的临床治疗特点，例如：临床上观察到的细胞因子释放综合征和免疫效应细胞相关神经毒性综合征是细胞治疗后的常见不良反应，因此， 一般患者需要住院用药，用药后的一段时间内需要在院端由医护人员进行密切监护。各国药监机构在批准细胞治疗产品上市的同时，均规定药品上市许可持有人(MAH) 的产品上市后的风险管理计划中，应根据细胞治疗产品所开展的动物研究以及人体临床研究中获得的有效性及安全性数据，结合适应证人群的特点，明确药品的已确认风险和潜在风险，提出与风险相匹配的药物警戒活动计划和风险最小化措施，以确保药品上市后在适用人群的临床用药过程中保持获益大于风险。

●药物警戒活动

常规药物警戒活动包含但不限于：

0不良事件的收集、处理、随访、分析评估。

0不良事件和定期安全性更新报告的提交。

0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。

0对产品安全性特征的持续监测。

o 必要时与监管机构及时沟通。

特殊药物警戒活动包括但不限于：

对治疗中心进行评估认证和定期再认证。

持续开展针对接受产品治疗患者的长期安全性随访，并通过非干预性研究收集和评估治疗产品在更广泛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。

●其他风险最小化措施

常规风险最小化措施包含但不限于：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〕和〔警告〕等部分，传递细胞治疗药品可能存在的风险，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。

额外风险最小化措施包含但不限于：开展医生、患者和物流人员的教育培训、发放患者提示卡等，如出现教育材料中某环节相关的大量不良反应，可考虑对教育材料进行评估和适时更新。

3 生产管理

本章主要内容：

T 细胞治疗产品生产的典型流程

生产管理的关注要点

T 如何开展工艺验证和无菌工艺模拟试验

T 对质粒、病毒载体的控制需要关注的内容

了种子库和细胞库管理的要点

背景介绍

本章节主要对免疫细胞治疗产品(以下简称细胞治疗产品)生产过程控制的相关要求进行阐述。

直接用于细胞治疗产品生产的基因修饰载体或其他赋予其特定功能的材料(如病毒、质粒、RNA、抗原肽、抗原蛋白、蛋白质-RNA 复合物等)的生产、检验和放行等过程，应当参照GMP的相关基本原则以及数据可靠性要求，最大限度地降低制备环节污染、交叉污染、混淆和差错的风险，确保细胞治疗产品的安全和质量。

以自体CAR-T 细胞治疗产品为例，典型的生产流程如下(图3-1)。

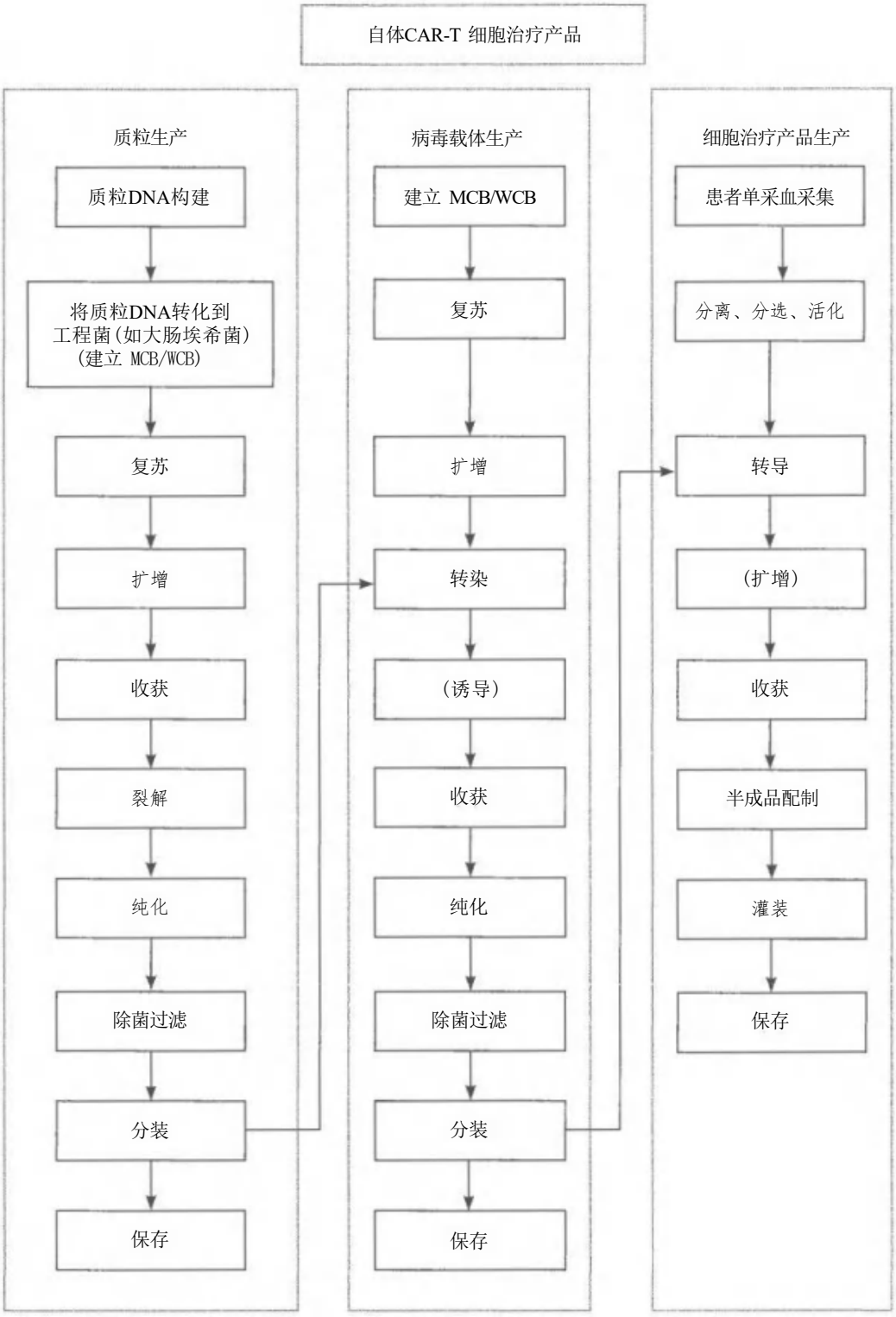


图 3－1　自 体CAR-T　细胞治疗产品生产

技术要求

细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)

九、生产管理

(一)细胞产品根据其工艺特点，产品批次可考虑定义为：在同一生产周期中，采用相同生产工艺、在同一生产条件下生产的一定数量的质量均一的产品为一批。单一批次所生产出来的所有细胞的总量为此次生产的批量。

(二)细胞产品、直接用于细胞产品生产的基因修饰载体或其他赋予其特定功能的材料的无菌工艺模拟试验至少应当符合以下要求：

1.采用非密闭系统进行无菌生产操作的，无菌工艺模拟试验应当包括所有人工操作的暴露工序。

2.采用密闭系统进行无菌生产操作的，无菌工艺模拟试验应当侧重于与密闭系统连接有关的步骤；如有未模拟的无菌生产操作，应当进行风险评估，并书面说明不开展无菌工艺模拟的合理性。

3.需要较长时间完成的无菌生产操作，应当结合风险评估，说明缩短模拟某些操作(如离心、培养)时长的合理性。

4.对微生物生长有抑制作用从而可能影响无菌工艺模拟试验结果的无菌生产操作(如冻存),经风险评估后可不包含在无菌工艺模拟试验中。

5.同一生产区域有多条相同生产线的，每条生产线在成功通过无菌工艺模拟试验的首次验证后，可采用极值法或矩阵法，或两者联用的方法，至少每班次半年进行1次无菌工艺模拟试验，每次至少一批。

使用相同设备和工艺步骤生产不同的产品，如采用极值法进行无菌工艺模拟试验，应当模拟某些生产操作的最差条件；如采用矩阵法进行无菌工艺模拟试验，应当模拟相似工艺步骤的最差条件；如采用两者联用方法的，应当书面说明理由及其合理性，模拟应当包括所有的无菌生产操作及最差条件、所有生产用的设备类型。

(三)细胞产品生产工艺应该经过验证，其工艺验证应当符合以下要求：

1)采用自体供者材料生产细胞产品的生产工艺有一定的特殊性，其验证所用的供者材料可来源于健康志愿者；如果来源于患者的，可采用同步验证的方式。

2)对于用自体供者材料生产细胞产品，应当根据风险评估考虑实际生产中的最差条件。如同一生产区域有多条相同生产线的，或者同一生产操作间内有多个隔离器的，最多可同时进行生产操作的生产线数量，或隔离器的数量，同时还应将

生产环境、操作人员及实验室检验能力等影响因素作为最差条件予以考虑，并经过验证。

(四)直接用于细胞产品生产的基因修饰载体或其他赋予其特定功能的材料生产工艺应当经过验证，工艺验证至少应包含三个连续的、完整生产工艺的批次。

(五)细胞产品生产过程中应当采取措施尽可能防止污染和交叉污染，控制质量风险，如：

1.含有传染病病原体的自体供者材料，在生产、转运过程中应与其它不含有传染病病原体的供者材料或细胞产品相互隔离。

2.采用非密闭系统或设备进行生产时，同一生产区域内不得同时生产不同品种的细胞产品，同一生产操作间内不得同时生产相同品种的不同批次细胞产品。

3.同一生产区域的不同生产操作间内同时进行同一品种不同批次细胞产品生产时，宜采用密闭系统，如无法保证全部生产过程的密闭控制，则应充分进行风险评估，并采取有效的控制措施，如密封转移、房间压差控制、不得跨越房间操作、直接操作人员不得交叉走动、灭菌与消毒以及单向流传递等。

4.同一生产区域内采用密闭系统进行同一品种不同批次细胞产品生产时，除细胞培养步骤外应避免在同一生产操作间内同时进行多个相同或不同步骤的生产操作，在完成一个步骤生产操作后应及时进行清场。还应采取有效的控制措施，如房间压差控制、人员管控、交替操作、定置管理、灭菌与消毒以及单向流传递等。

5.同一生产操作间内有多个隔离器时，应当定期对其进行完整性检查，隔离器不应直接向操作间内排风，且排风不可循环利用。还应采取有效的控制措施，如密封转移、交替操作、定置管理、灭菌与消毒以及单向流传递等。

6.采用密闭系统进行细胞培养，同一生产操作间或同一培养箱内可同时培养和保存不同批次产品，但应当采取有效措施避免混淆；采用非密闭系统进行细胞培养，应对培养箱内不同批次产品进行物理隔离(如采用蜂巢式培养箱)或采用不同生产操作间的独立培养箱，培养箱内应保持一定的洁净程度且可以进行消毒或灭菌。还应进行充分的风险评估，采取有效措施以避免交叉污染和混淆。

7.密闭系统或设备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。

(六)应当制定监测各生产工序环境微生物污染的操作规程，并规定所采取的措施。处理被污染的产品或物料时，应当对生产过程中检出的微生物进行鉴定并评估其对产品质量的影响。

应当保存生产中所有微生物污染和处理的记录。

(七)细胞产品生产过程中应当采取措施尽可能防止混淆和差错，如：

1.生产过程中的供者材料和产品都应当有正确的标识，低温保存的产品也应当有标识。

2.自体细胞产品供者材料和产品的标识信息中应当有可识别供者的具有唯一性的编号(或代码)。

3.生产前应当仔细核对供者材料和产品的标识信息，尤其是用于识别供者的具有唯一性的编号(或代码),核对应有记录。

4.生产过程中需对产品进行标识的，应当确认所标识信息的正确性，自体细胞产品应当与自体供者材料上用于识别供者的具有唯一性的编号(或代码)一致，确认应有记录。

(八)细胞产品生产用包装容器及其连接容器(如有)应当在使用前和灌装后立即进行外观检查，以确定是否有损坏或污染迹象，外观检查应有记录。

(九)直接接触细胞产品的无菌耗材应当尽可能使用一次性耗材。

(十)生产过程中的中间产品和物料的转运有特殊要求的，如温度、时限等，应当对转运条件有明确的规定，并在转运过程中进行相应的监控，且有相应记录。

(十一)生产过程中含有传染病病原体的污物、废弃物或可疑污染物品应当原位消毒，完全灭活后方可移出工作区域。处理过程应符合国家医疗废物处理的相关规定。

3.1总体原则

细胞治疗产品具有多样性、异质性、复杂性、迭代快等特点，随着对产品特性及工艺了解的加深，可以优化生产工艺及控制。但应注意，对于已上市的细胞治疗产品，任何变更都应以保证产品的安全性和有效性、质量可控性为基本出发点，在考虑终产品质量可比性的前提下，充分评估变更风险，结合产品特点以及变更的实际情况开展变更研究，并按照有关规定进行补充申请、备案或报告，保留完整记录，确保可追溯性。

细胞治疗产品的生产过程中应当采取措施以防止污染和交叉污染、混淆和差错。如果发生偏差，无论偏差大小，都应重视。应对偏差进行调查，以查明原因或合理推测可能的原因，并且采取适当的纠正和预防措施。

细胞治疗产品相关的质量风险与细胞/组织的来源及生物学特性(如是否含传染病病原体)、载体(如是否具备复制能力或逆转录能力)的生物特性、非细胞组分

(原料、基质)的特性以及生产工艺相关，企业应使用基于风险的方法，确保产品质量。

细胞治疗产品涉及生物活性物质(如病毒载体),其生产环境和生产过程控制应在满足GMP的同时考虑有关生物安全的规定，以防止有毒有害物质的泄露和散播。应建立生物安全管理体系并保留相应的记录，配备适宜的设备和设施，制定生物安全防护措施以及应急预案。

3.1.1 生产准备

A. 物料的接收和处理

入厂物料和原材料接收后，应立即进行物理隔离、待检，直到放行以供使用或分发，同时应设立必要的不合格品存放区，用以存放检测不合格的物料和原材料。

在确认满足质量标准要求后，采购的物料、中间产品和生物活性物质(如病毒载体)在生产使用前，需要经放行审批。

生产过程中，所有的物料、原液的容器、主要设备都应贴上标签或标识，在适当的情况下，还应标记操作房间，或者标明加工产品或物料的信息，如浓度或效价(如适用)和批号。如条件允许，应该注明生产阶段。

容器、设备、设施上的标签应该清晰且明确。除了标签上的文字外，可使用不同的颜色来标明所处状态(如：待验、接收、不合格、清洁)。需要确认标签性能(如黏附性)与贮存或生产条件(如：极低的贮存温度、恒温水槽)是否匹配。

试剂与溶液应有明确的标签，包括配制日期、配制人员、试剂/溶液名称或代码、有效期、贮存条件、批次号、规格等。

用于生产质粒或病毒载体的菌种和(或)细胞株，应按照《中国药典》三部生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制相关规定以及ICH 等相关指南进行制备和检验，检验合格并放行的菌种库/细胞库才能用于生产。

对于人体组织或细胞，无论是从医院采集或是从第三方获取，都应建立完整的从医院或第三方到实验室或车间的完整的接收管控措施，有关追溯的要求可参考本分册细胞治疗产品部分“10产品追溯系统”。

应确认病毒载体、非病毒载体、人体组织或血液细胞等材料投产前符合质量要求，相关要求可参考本分册细胞治疗产品部分“6物料”。

B. 厂房和设备确认

可参考本丛书《厂房设施与设备》分册和本分册细胞治疗产品部分“5厂房、设施与设备”。

C. 生产人员

详见本分册细胞治疗产品部分“4人员管理”。

3.1.2 清场管理

药品生产必须保持清洁卫生环境，不同洁净区对生产环境、设备和人员等有不同的清洁卫生要求。

为了保证整个生产过程严格执行卫生标准，防止对药品产生污染，必须建立卫生制度和清洁规程，明确生产环境、设备和人员的清沾消毒要求，并对清洁、消毒方法进行验证，建立有效的清洁消毒体系。

为了防止药品生产中不同品种、规格、批次之间的污染和交叉污染，各生产工序在生产结束、更换品种及规格或换批号前，应彻底清理及检查作业场所，密闭性一次性使用技术可根据风险评估确定清场管理规则。

生产人员应接受定期培训，形成按规程操作、按规定填写记录、发生偏差应及时汇报上级的良好习惯，从而最大限度地预防人为的污染因素。

清洁

同一品种连续生产时，批次间应进行清洁，连续生产结束后，产品转换前需采取额外的措施，如将批次间已验证过的清洁方法重复运行一次。

厂房应建立相应的清洁清场操作规程，操作规程内容应至少包含：频次、方法、效期及标准。

对重复使用的工具和与产品直接接触的设备部件，其清洁程序应进行验证。如色谱树脂(填料)和超滤膜包(柱),在连续生产结束后应采用已验证的方法进行清洁。不同产品的纯化应当分别使用专用的层析介质。

高度相似的细胞治疗产品的清洁程序无需逐个验证，可使用最差条件选择一个产品作为代表进行验证。如：相同骨架带有不同目标基因(gene of interest,GOI)序列的质粒载体，带有不同GOI 的同一类病毒载体，以及带有不同靶向功能的T 细胞。

3.1.3灌装、分装、目检、冻存

细胞治疗产品多数是带有活性且黏稠度较高的产品，灌装精度受制剂洗涤液残留、细胞总量不一等影响，需参考药典通则，并制定相应标准，对灌装量、灌装精度进行确认和检验。

细胞治疗产品具有生物活性，无法实施最终灭菌，需要采用无菌生产工艺进行生产，生产的产品为非最终灭菌的产品，其无菌保证水平需严格控制。

细胞治疗产品应建立适当的生产过程目检程序及标准，并确认包装的完整性。

有些产品(如个体化的细胞治疗产品)批次生产规模小，分装的总数量少，无法直接按成品取样进行相关质量检验或样品量不足，如注册申报时已经过充分的风险评估、对比研究、验证且获得许可，可对细胞培养物合并洗涤后、制剂灌装前的离心洗涤液样品进行部分样品需求量大的项目的检测。在生产时也可以考虑大体积分装和小体积分装并存的情况，以小体积分装的产品的检验数据代替大体积分装的结果，但分装需要在同一次操作中完成。不同规格的包材材质应当相同。

细胞治疗产品的冻存工艺应经过验证。

3.1.4包装

应建立包装和贴签的标准操作规程，相关要求应参考《中国药典》三部生物制品分包装及贮运管理。

对产品标签的一般要求包括：

●产品标签(包括内标签和外标签)的内容应经过批准，并进行版本控制。

●产品标签中应至少包含如下信息：生产日期和时间、产品名称、规格、批号、贮存条件、剂量、个体识别码(如适用)。相关要求应参考NMPA发布的《药品说明书和标签管理规定》

●产品标签应受控，打印、发放/领用、破损及销毁应有记录，标签和包材均纳入物料平衡管理。

内包装标签的粘贴需要在受控环境中进行，其要求一般包括：完全密闭的产品(如已轧盖的西林瓶、已密封的储存袋、已密闭的样品管)，贴标可以在受控但未分级 (CNC) 区域进行。

3.1.5产品放行

参考本分册细胞治疗产品部分“7质量控制”。

3.1.6批次管理

细胞治疗产品根据其工艺特点，批次可定义为在同一生产周期中，采用相同生产工艺、在同一生产条件下生产的一定数量的质量均一的产品为一批。单一批次所生产出来的所有细胞的总量为该批次生产的批量。

细胞治疗产品批次管理的注意事项包括：

●应建立有关批次和批号管理的规程文件。

●产品批号的设计规则应符合《中国药典》三部生物制品分包装及贮运管理中的规定。

●产品批号应唯一，产品批号应按批号管理规程生成。

●原液和制剂之间的批次关系应能追溯(如适用)。

●从原液到中间品，中间过程取样应与批次对应且能追溯。

3.1.7贮存和发运

细胞治疗产品的贮存应满足以下要求：

●半成品、中间品、成品(合格品、不合格品)应有明确存储分区。

●质粒、病毒、细胞等产品应有不同的储存环境，应有物理隔离的措施。

●含有传染病病原体的供者材料应独立存储。

o 各存储区域应有明确的标识和详细的出入库记录。

细胞治疗产品的发运应满足以下要求：

●产品的发运或转移应可以追溯，并能监控和保留详细的记录，包括运输的时间、运输过程、温度监控等。

●产品的发运应遵守生物安全的相关规定。

●病原微生物菌(毒)种或生物样本运输的外包装应有生物危险标签、标识、警告用语以及送出和接收单位的名称、地址、联系人和联系电话等。

●产品发运的承运商应能满足产品的运输要求，并具备特殊物品承运的相应资质并经质量部门认定批准，签署承运质量协议。

3.1.8单采管理

背景介绍

细胞治疗产品的单采血操作属医疗操作，但关系着细胞治疗产品生产用初始原

材料的质量，需综合考虑卫健委血细胞单采相关技术要求，血细胞的采集、保存、运输管理还应符合产品生产要求。

对于单采流程，建议参考卫健委颁布的《单采血浆站质量管理规范》《单采血浆站实验室质量管理规范》《静脉血液标本采集指南》等相关要求。

对于细胞治疗产品，供者材料是工艺的关键起始原材料，其中自体细胞产品每个患者一个批次，供者材料采自每个独立的患者，经过生产后回输给同一个患者，其供者材料通常都是生产工艺的最大变量，因此需确保单采得到的供者材料符合生产工艺的需求，且能始终生产出符合预设质量标准的产品，企业作为责任主体，需依据对产品关键质量属性以及工艺的理解，制定供者筛查标准，制订供者材料采集、运输、接收标准操作规程，详细说明供者材料的采集方法、保存和运输条件以及接收的标准。

对于供者材料的采集方法，应至少明确以下要点：

●筛选标准：如适应证、血常规、全血处理量或采集产物体积、传染性疾病的病原体筛查等。

●设备及耗材：如采集设备的型号以及对应的耗材、管路预冲以及使用的溶液等。

●患者的预处理：如补预先充血钙、是否需要深静脉置管等。

●单采程序的设置：如设备所采用的单采程序等。

●单采运行：如抗凝剂比例、采集流速等。

●包装及运输：如包装要求、运输温度、运输时限、标签信息(含追溯信息)、运输验证等。

●异常情况处理：因患者个体化差异，单采期间可能发生的技术性问题需提供建议的解决方案。

实例分析

本实例以自体CAR-T 细胞治疗产品为例，对单采流程进行介绍。

自体CAR-T 产品的起始原料多为外周血单核细胞(PBMCs)，如采用其他来源，可参考基本要求。

自体单采产物是从患者体内通过血液成分分离系统(血细胞分离机、单采机)，利用离心原理将血液成分分离，采集白膜层而得到。自体单采产物是CAR-T 的主要起始原材料，因此对于单采需进行相应的管理以确保单采产物符合工艺需求。

企业应重点关注采集过程以下环节：

0血常规收集以及传染病筛查

医疗机构需在患者单采血采集前一定时限内给患者进行血常规检查并收集相关信息，可能包括但不限于：血红蛋白、血细胞比容、红细胞压积、血小板计数、白细胞计数、单核细胞计数、淋巴细胞绝对计数、中性粒细胞绝对计数等，以取得设置单采运行的基本患者信息。

对于传染病病原体筛查，需依据产品相关要求，以及公司相关生产线的设计，来决定是否接收传染病阳性样本用于生产。传染病筛查主要包括但不限于艾滋病病毒(检测方法及诊断标准可参考WS 293—2019《艾滋病和艾滋病毒感染诊断》、乙型肝炎病毒(检测方法及诊断标准可参考WS 299—2008《乙型病毒肝炎诊断标准》、丙型肝炎病毒(检测方法及诊断标准可参考 WS 213—2001《丙型病毒肝炎诊断标准》、梅毒螺旋体筛查(检测方法及诊断标准可参考WS 273—2007《梅毒诊断标准》。对于血源性传染病病原体筛查，应明确需要使用血源性筛查试剂盒进行筛查检测，不宜使用诊断试剂进行检测。

●设置单采参数

单采设备都有其指定的单采程序，单采操作者应遵守企业制定的单采操作参数，方可采集到符合工艺要求的细胞。

对于白细胞单采，为得到符合生产工艺需求的细胞数量，需考虑对于全血处理量的设定。企业需根据对工艺的理解制定全血循环量体积。如处理全血量可依据血常规结果而制定。如果绝对淋巴细胞计数大于或等于特定数值时，可采用较低的全血量的目标值。如果绝对淋巴细胞计数小于特定数值时，可在范围内增加处理全血量的目标值。

白细胞单采产物一般为细胞和血浆的混合物，血浆可增加运输过程中的细胞稳定性，因此企业需考虑研究和制定对于白细胞单采产物的体积要求。

白细胞单采产物的储存袋一般为单采耗材配套的储存袋。单采产物应避免阳光直射及高温。

c 运行单采

开始单采程序，细胞采集参数、白细胞采集频率和全血/抗凝剂比例在采集过程中可能会因为患者情况进行相应调整。单采操作者应结合患者情况，临床经验及设备制造商操作指南进行调整。

单采过程中可能发生突发情况或不良反应，企业应依据医院机构临床经验进行对症处理或依据企业既往累积的经验制定突发情况的应急处理预案。

●包装及运输

完成单采后立即进行单个核细胞采集袋的管道进行热合密封和包装，单采产物采集袋进行标识后，将包装后的单采血样放入冷链运输箱中的血样包装盒内封箱并加封签。 一般采用适宜温度的冷链运输箱进行运输，冷链运输箱需经过运输验证，也可依据企业产品及工艺需求进行冻存和运输。冻存工艺需考虑个体化差异进行研究及验证。

需进行单采产物的运输稳定性研究以确定运输温度和时限。

运输过程中可能遇到安检和X 线照射的情况，企业需考虑研究X 线照射对于单采产物及最终成品的影响。如采用航运，还需考虑其他因素的潜在影响，如气压对单采产物的潜在影响。

3.2污染和交叉污染的控制

对于细胞治疗产品及直接用于细胞产品生产的基因修饰载体或其他起始生物材料(包括：病毒、质粒、RNA、抗原肽、抗原蛋白、蛋白-RNA 复合体等)，应遵循质量风险管理的原则评估控制生产过程中可能出现的污染和交叉污染风险。

直接用于细胞产品生产的基因修饰病毒载体(如 Lentivirus、AAV、HSV等) 应与细胞产品及其他载体(如质粒DNA 、mRNA 、gRNA等)或生物材料分别在各自独立的生产区域进行生产，并配备独立的空调净化系统。可复制型病毒载体/基于可复制型病毒载体的产品，或感染性材料/基于感染性材料的产品不可与其他材料/产品的同时培养/贮存。病毒载体生产区域的送排风口应采取有效的措施防止出现泄露和污染风险。

不同品种间的设备、器具需要共用的，应进行充分的清洁确认和验证，证明清洁效果和产品残留的安全性，与最终产品直接接触的组件应尽可能使用一次性使用技术。

自体细胞治疗产品相对异体细胞治疗产品在对于传染病和病毒的检查和控制方面有可能存在区别，建议尽可能避免两者共线生产。

考虑到病毒和质粒修饰的时候有可能会存在交叉污染的风险，对于需要体外进行病毒、质粒或基因编辑等修饰的细胞治疗产品，建议尽可能避免与没有修饰过的细胞治疗产品(如干细胞、DC 细胞等)共线生产。

向洁净区传入物料、设备、器材时，应避免引入污染，传入与传出行为应是明确规定或标示的。传入的物品推荐采用(双扉)灭菌柜(干热或湿热)、过氧化氢气锁、紫外、表面消毒、双层脱外层密封包装等方式，避免引入污染。物料传入方式

应经过风险评估，选取合适方法，更多内容可参考本分册无菌制剂部分“5.8物料向洁净区的转移”。

在任何生产操作开始前，应先确保工作区域和设备干净，环境符合生产洁净度要求并且没有任何与本次生产不相关的物料、产品、产品残留物、文件等。在生产过程中应尽可能采取防止差错、混淆、污染和交叉污染的措施，包括：

●在分隔的区域内生产不同品种的产品。

●采用阶段性生产方式。

●设置必要的气锁间和排风。

●空气洁净度级别不同的区域应有压差控制。

●未经处理或未经充分处理的空气不得进入生产区。

●在易产生交叉污染的生产区内，操作人员应穿戴该区域专用的防护服。

●采用经过验证或已知有效的清洁/灭活和去污染规程进行清洁，至少应该在每个批次之间进行适当的清洁/灭活流程；必要时，应对残留量进行确认。

●采用密闭系统生产。

●生产和清洁过程中应避免使用易碎、易脱屑、易发霉器具。

●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引入外源性污染或交叉污染。

●尽量采用单元化的生产工艺，尽可能使用专用的、产品特定的或一次性使用的装置。

●必须快速且安全地处理意外泄露物，尤其是活生物体。考虑到生产中所使用的生物材料，以及与生物材料有关的风险，应采取经确认的灭活措施。

●不同批次生产记录同时出现时可采取不同颜色或款式封皮进行区分。

●对于无法实施有效灭菌的生物材料，应进行风险评估制定处理措施(如辐射)并进行验证，以尽量减少污染物的引入。

生产环境的洁净度级别，可以参考本分册细胞治疗产品部分“5厂房、设施与设备”。

3.2.1 交叉污染的控制

基于质量风险管理原则，在整个生产步骤中应尽可能使用密闭系统进行生产。在有充分的操作和(或)技术控制下，可以允许在同一区域同时生产两个或多个不同的细胞治疗产品批次，例如：

●同一生产操作间内有多个隔离器，应当定期对其进行完整性检查，隔离器不应

直接向操作间内排风，且排风不可循环利用。还应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、灭菌与消毒以及单向流传递等。

●同一生产区域内的多个生物安全柜，分布于不同生产操作间，宜采用密闭系统同时进行同一品种不同批次细胞产品的生产；如无法保证全部生产过程的密闭控制，则应充分进行风险评估，并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、房间压差控制、不得跨越房间操作、人员不得交叉走动、灭菌与消毒以及单向流传递等。

●采用非密闭系统或设备进行生产时，同一生产区域内不得同时生产不同品种的细胞产品，同一生产操作间内不得同时操作相同品种的不同批次细胞产品；不建议洁净室内同一培养箱存放不同批次产品，如需同时培养同一品种不同批次的产品，应对培养箱内不同批次产品进行物理隔离(如采用蜂巢式培养箱)或采用不同生产操作间的独立培养箱，培养箱内应保持一定的洁净度且可以进行消毒或灭菌。还应进行充分的风险评估，采取有效措施以避免交叉污染和混淆。可复制病毒产品，或感染性材料/产品与其他非复制性/非感染性材料/产品不建议同时进行培养。

●采用密闭系统进行细胞培养，同一生产操作间或同一培养箱内可同时培养和保存不同批次产品，但应当采取有效措施避免混淆。

●如果使用封闭系统生产，应确保所有设备以正确的方式连接，并处于密闭状态。使用自动化系统时，应特别注意完整性测试的完成。对一次性系统，应确认其完整性，并基于质量风险管理原则制定适当的周期、程序和方法。完整性测试可自行完成，也可引用供应商的数据(如培养瓶上的呼吸器完整性测试)。使用后的完整性可以根据完整性检测的可行性和适宜性确定。重复使用设备的完整性应在设备使用前后的清洁和消毒后进行确认。

●在非无菌的条件下添加或取出材料时，应严格执行无菌操作。如未使用无菌连接器或未采用无菌连接的过滤器，则认为系统的密闭性已经被破坏。

●如果风险不能通过操作和(或)技术手段进行控制，需在独立区域进行生产。在同一区域的任何后续生产之前，应用经过验证有效的方式进行彻底清洁和去污染。

3.2.2处理含有传染病病原体的供者材料的注意事项

使用含有传染病病原体的供者材料生产细胞治疗产品时，其生产操作应当在独立的专用生产区域进行，并采用独立的空调净化系统经过带有防泄漏保护的过滤系统处理后排放，保持产品暴露于环境的生产区域相对负压。当在同一生产区域内需

要生产含有不同传染病病原体的供者材料时，须进行充分的评估，包括但不仅限于传染病的种类、是否有药物治疗，并应同时参考《中华人民共和国传染病防治法》和GMP 血液制品附录的相关要求。

含有传染病病原体的供者材料在运输、接收、贮存、发放或发运过程中应当与其他供者材料彼此隔离，在生产、转运过程中不得接触其他不含有传染病病原体的供者材料或细胞产品。对于检测实验室，应参考有关生物安全实验室的国标、原卫生部的人间传染的病原微生物目录中对检测实验室的特殊要求。

对于已知含有传染病病原体的自体供者材料，企业应当隔离存放，每个包装都有明显标识：

生产过程中含有传染病病原体的污物、废弃物或可疑污染物品应当原位消毒，完全灭活后方可移出工作区域。处理过程应符合国家危险废物处理的相关规定。

处理含有传染病病原体须同时满足《中华人民共和国传染病防治法》和《中华人民共和国生物安全法》的相关要求。

3.3无菌生产的工艺设计

细胞治疗产品的生产应参考GMP 无菌药品附录的相关规定，进行全生产过程控制。

细胞治疗产品所使用的原材料，如质粒和病毒载体，由于分子量大，部分产品无法采用除菌过滤的方式控制微生物的水平，且不能采用最终灭菌的工艺。因此，部分或全部过程应采取无菌生产工艺。

细胞治疗产品为活细胞制剂且为非最终灭菌产品，为降低污染和交叉污染风险，保障无菌生产，应尽量考虑使用密闭系统进行生产。密闭系统是为了避免产品或材料暴露于室内环境中而设计的生产或操作系统。产品或物料转入密闭系统时，必须以非暴露的方式(如通过无菌连接器或密闭的转移系统)进行，避免产品或物料暴露于室内环境。如果打开密闭的系统(如安装过滤器或进行连接),再回到密闭状态或者使用前需要进行消毒或灭菌。

密闭系统既可以避免产品或材料暴露于室内环境，达到空间隔离的效果，可大大降低污染和交叉污染的风险，同时相较于非密闭系统，其更易于以横向扩展的方式 (scale out)放大细胞治疗产品的生产规模。但其缺点是在连接或融合交叉处有污染的风险，须评估其对于密闭系统的污染风险，并制定相应的防止污染的预防控制措施(如消毒或灭菌)。

细胞治疗产品无菌生产的工艺设计应尽量考虑密闭化、自动化设备、 一次性无菌密闭管路耗材/试剂等。

A. 设 备

●宜采用密闭、自动化设备进行细胞治疗产品的生产操作。

●同一生产区域有多条相同的生产线，且采用隔离器的，应当定期对其进行完整性检查，隔离器不应直接向操作间内排风，且排风不可循环利用。

B. 物 料

●采用一次性使用无菌物料。

●物料应尽量实现生产所需最小独立无菌包装。

●密闭、自动化设备，宜采用密闭、管路耗材/试剂，通过无菌对接的方式进行生产操作。

C. 厂房

●对于含有传染病病原体的供者材料，其生产操作应当在独立的专用生产区域进行，并采用独立的空调净化系统，保持产品暴露于环境的生产区域相对负压。

●密闭设备、管路安置环境的洁净度级别可适当降低。

实例分析

使用密闭设备生产细胞治疗产品(图3-2)



图3－2 使用密闭设备生产细胞治疗产品示意图

Day0 使用细胞分选仪从单采血中分离T 细胞，该细胞分选仪采用的是全密封一次性耗材，与单采血袋子的连接通过无菌焊管机；分离得到的T 细胞，再用密闭式

细胞处理仪进行清洗，该密闭式细胞处理仪同样是采用一次性密封耗材。

Day2 前两天的细胞培养是在密封的透气袋中进行，病毒转导也是在透气袋中进行。

Day3 通过无菌管路焊接将透气袋中的细胞转移至细胞培养系统中，该细胞培养系统是全密闭的培养容器，用于细胞扩增。

Day7~9细胞到达收获量的时候，采用密闭式细胞处理仪进行清洗浓缩以及制剂，该密闭式细胞处理仪采用的是全密闭一次性耗材；细胞装在密闭的冻存袋中，程序降温仪降温，后续放入液氮罐中长期贮存。

3.4工艺验证

细胞治疗产品生产工艺应根据相应阶段的法规要求和风险评估进行适当的验证。基于组织/细胞数量有限的潜在限制，工艺验证应根据风险评估考虑实际生产中的最差条件。

验证应按照规定的流程执行，验证数据和结论应被记录。

当起始材料短缺时，在工艺验证期间使用代表性的替代材料是可接受的(如自体治疗、匹配供体情况下的异体治疗、未扩增到MCB的异体治疗)。应评估替代材料的代表性，例如：供者年龄、健康供者材料的使用、解剖来源(如股骨与髂嵴)或其他不同特征(如使用代表性细胞类型或使用代次高于产品规格中设定的细胞)。

在可能的情况下，对于生产过程的关键点，应考虑使用来自实际起始物料的样品来验证。例如：在基于自体细胞修饰治疗遗传疾病的情况下，在适宜的条件下，使用自体细胞(受疾病影响)来进行关键的工艺过程验证，其他方面可以使用具有代表性的替代细胞(如健康人群来源的细胞样品)进行验证。

对于采用自体供者材料的细胞治疗产品，特别需要考虑实际同时生产的最大产能。

产能研究需基于对产品、产品工艺、设备、厂房设计、清场清洁流程等进行综合评估。不同工艺路线产能增加的风险程度可能不同，产能扩增的方式也可能存在不同，如增加新的生产线，同一个操作间增加相同的工艺设备数量或者增加生产班次等。这些情况均可能增加混淆、污染和交叉污染风险，或无法稳定地生产出符合预设质量标准的产品，或无法及时完成产品检测和放行，延误患者治疗时机。因此产能扩增需基于产品特性、工艺特点和生产模式等对每个案例进行风险评估以识别

潜在的风险。对于自体细胞治疗产品，风险评估的因素可能包括但不限于：

·厂房设计、生产工艺设计和生产班次安排。

●同一个生产区域/生产操作间同时仅一个批次还是可能存在多个批次。

●工艺操作主要采用封闭体系操作还是非封闭系统，以及操作的洁净区背景。

●生产操作大多采用自动化的、标准化的设备还是大多采用经培训的人员手工操作。

●生产管理是否采用了信息化系统，如MES 系统等还是无信息化系统，仅使用纸质记录。

●生产均采用了一次性无菌组件还是存在与产品直接接触的重复使用组件或设备。

●清场清洁流程是否能支持产能扩增。

●已培训的人员数量是否与生产要求匹配。

·QC 的设备数量、检验能力等是否与生产能力匹配。

需基于风险评估的结果判断产能扩增的风险。如果同一区域在非密闭系统情况下仅同时存在一批，或现场存在多个批次的情况下均采用了密闭系统、采用了自动化、标准化设备、使用一次性无菌耗材、生产管理采用了信息化系统管理，通常而言风险相对较低。

如果同一区域内有多个生物安全柜，分布于不同生产操作间，且无法保证全部生产过程的密闭控制，更多依靠手工操作，生产无信息系统管理，通常而言风险相对较高。

参考《细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)》,细胞产品生产工艺应该经过验证，其工艺验证应当符合以下要求：

A.采用自体供者材料生产细胞产品的生产工艺有一定的特殊性，其验证所用的供者材料可来源于健康志愿者；如果来源于患者的，可采用同步验证的方式。

B.对于用自体供者材料生产细胞产品，应当根据风险评估考虑实际生产中的最差条件。如同一生产区域有多条相同生产线的，或者同一生产操作间内有多个隔离器的，最多可同时进行生产操作的生产线数量，或隔离器的数量，同时还应将生产环境、操作人员及实验室检验能力等影响因素作为最差条件予以考虑，并经过验证。

依据该要求，需要在工艺验证中考虑产能的相关模拟研究，基于生产场地、生产工艺以及生产排班情况的综合评估，模拟出产能挑战的情况。以下列举了一个最大产能的研究案例。

实例分析

如一个主要的生产区域包括4个独立的生产操作间，这些操作间共享相同的生产辅助区域(如配液区域等，未在图上显示),每个生产操作间在同一个时间存在一个批次在生产，但4个操作间可能存在同时生产的情况。每个独立操作间的洁净区背景均为B 级，每个操作间包含一台生物安全柜(图3-3)。

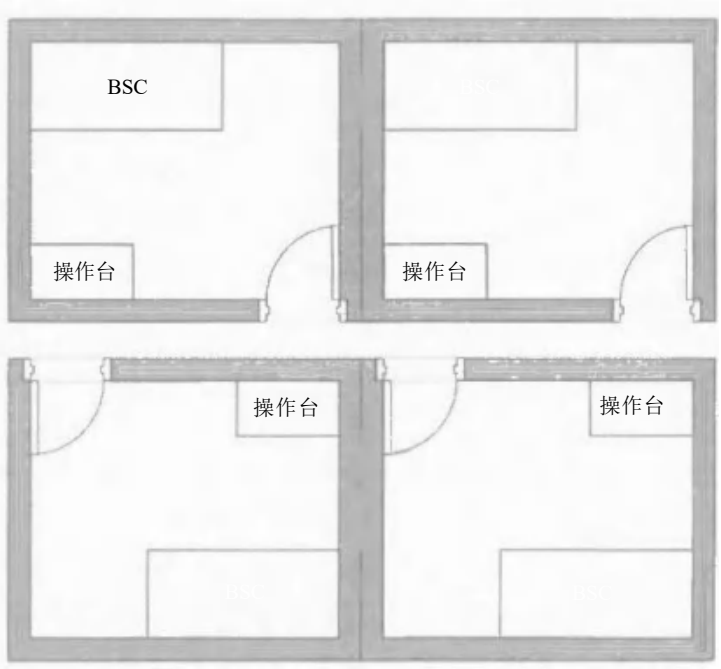


图3-3 产能扩增研究背景信息

该产品基本工艺包括细胞分选、细胞激活、细胞转导、细胞扩增、细胞收获和制剂，所有生产操作均在每个独立的生产操作间进行，其中非密闭系统操作均在生物安全柜操作，部分密闭系统操作在操作间操作台上进行。每个批次生产周期约为10天，检测时间约为7天。

基于对产品、产品工艺、设备、厂房设计、清场清洁流程等综合评估，认为其产能最差的条件是4个操作间均安排生产时，根据该评估，安排相关产能研究批次，同时应列明支持该产能研究的生产工艺设备数量、检测设备数量、已获得资质的各个生产操作单元的人员数量、已获得资质的各个检测项目的人员数量、环境监测的设备数量及已获得资质的环境监测人员的数量、洁净介质(如注射用水、洁净气体等)的使用情况等。某产品的产能研究计划见表3-1。

表3-1 某产品的产能研究计划

	操作间1	操作间2	操作间3	操作间4
第 1 天	细胞分选	细胞分选	细胞分选	细胞分选
第2天	细胞激活	细胞激活	细胞激活	细胞激活
第 3 天	细胞转导	细胞转导	细胞转导	细胞转导
第 4 天	细胞扩增	细胞扩增	细胞扩增	细胞扩增
第 5 天	细胞扩增	细胞扩增	细胞扩增	细胞扩增
第6天	细胞扩增	细胞扩增	细胞扩增	细胞扩增
第 7 天	细胞扩增	细胞扩增	细胞扩增	细胞扩增
第8天	细胞扩增	细胞扩增	细胞扩增	细胞扩增
第 9 天	细胞扩增	细胞扩增	细胞扩增	细胞扩增
第10天	细胞扩增	细胞收获和制剂	细胞收获和制剂	细胞扩增
第11天	细胞收获和制剂	N/A	N/A	细胞扩增
第12天	N/A	N/A	N/A	细胞收获和制剂

自体细胞治疗产品的生产周期可能每个批次情况不太一致，如果在风险评估时认为细胞收获和制剂过程风险最高，是最挑战的工艺步骤，则最差条件应考虑模拟4个批次同时收获和制剂。生产应依据最差条件的判断做出相应的模拟情况。

生产完成后的QC 检测也需模拟最差条件，但建议避免刻意拖延检测开启的时间或持续时间。

产能研究的可接受标准应至少包括但不限于：

●所有产能研究的批次均顺利完成生产，无混淆、差错、污染和交叉污染情况。

●所有产能研究批次的成品均符合产品质量标准。

●产能研究期间，生产过程的环境监测数据无明显变差的趋势。

●产能研究期间，洁净介质系统(水系统、气体系统等)的监测数据无明显变差的趋势。

3.5无菌工艺模拟试验

对于所有无菌工艺，无菌工艺模拟试验应作为初始验证的一部分进行，此后应该按照 GMP无菌药品附录的规定每六个月重复一次。在生产频次较低的情况下(即

如果两批生产之间的间隔时间大于六个月小于一年),在下一批生产前进行无菌工艺模拟试验是可以接受的，需在下一批次产品生产之前提供无菌工艺模拟试验的结果。

对于需要很长时间的步骤，也可开发其他替代的方法。结合风险，说明缩短模拟某些活动(如离心、培养)时间的合理性。在一些情况下，可将流程拆分为几个关键阶段，分别进行模拟，前提是每个阶段之间的转换也要进行评估。当采用密闭系统来生产时，工艺模拟应该侧重于与密闭系统连接有关的步骤上。

如生产不同类型的细胞治疗产品，可以考虑矩阵法和(或)分组法。在分组法中，可仅对某些设计因子在极端值下的样品进行完整的工艺模拟，这种方法适用于生产工艺相似的不同产品(相同的设备和工艺步骤)。在矩阵法中，当不同的细胞治疗产品采用相似的工艺步骤时可合并无菌工艺模拟试验，但须确保矩阵法已覆盖最具挑战的生产条件。有正当理由时可联合使用矩阵法和(或)括号法。

如果长时间不生产(即超过一年),则应按初始验证处理，在生产开始前至少进行3次无菌工艺模拟试验，需涉及所有相关操作人员。考虑到产品性质、产品质量和患者安全的各个方面，任何偏离此方法的行为都需要根据质量风险管理进行充分论证。

无菌工艺模拟试验的通用要求应参考本分册无菌制剂部分“12无菌工艺模拟试验”。

3.6质粒的生产控制

质粒DNA是最常用的非病毒基因载体。其制造过程包括种子制备、发酵培养和下游工序。

●上游工序——种子制备

种子制备通常包括一次种子和二次种子的制备。制备过程的控制点可能包括温度、转速、接种比例等。在种子扩增和发酵前，需要进行中间过程控制测试，以确定其满足发酵要求。

●上游工序———发酵培养

种子液达到发酵培养要求后，即可接种到发酵培养基中。发酵培养过程中的控制点可能包括接种比例、培养温度、酸碱度、通气量、转速、补料方案等。应明确发酵结束终点。

●下游工序

下游纯化工艺通常包括菌体裂解、澄清、超滤浓缩洗滤、层析纯化、再浓缩洗

滤、除菌过滤、灌装等步骤。

应明确规定层析分离柱的合格标准、清洁或消毒方法。不同产品的纯化应分别使用专用的层析介质。不同批次间应当对层析柱进行清洁或消毒。不建议将同一层析分离介质用于生产的不同阶段。层析介质的保存、再生及使用寿命应当经过验证。

3.7病毒载体的生产工艺控制

用于瞬时转染生产病毒载体最常见的细胞系是HEK293,其他生产方式中也会使用单纯疱疹病毒、Sf 9昆虫细胞和HeLa人肿瘤细胞系等。上游周期可达35天。细胞培养开始时，使用较高的接种细胞量可以减少上游工艺的生产周期。特别是对于贴壁细胞，上游工艺长时间的细胞培养和大量的手动操作造成污染或细胞死亡的可能性很高。因此，使用密闭系统和适当的细胞处理是上游工艺成功的关键。

如果使用了复制缺陷型病毒载体，需要评估在载体的生产过程中是否有可能产生复制型病毒。如果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。应根据产品特点，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。

病毒载体的下游通常是2~3天，根据纯化步骤的数量可以更长。纯化后经浓缩得到期望的病毒滴度。然而，病毒滴度可能与病毒载体的转导活性(如空衣壳数量)不直接相关。因此，控制关键参数以获得稳定的生产工艺是获得质量稳定的病毒载体的关键因素。

对于涉及病毒载体的生产区域，贮存区域应具有足够的容量，以便有序存放各类物料和产品，包括起始物料和原材料、包装材料、散装物料和成品等。例如：贴壁细胞的消耗物料数量明显高于悬浮细胞，需要足够的空间存放来料，以及大量的培养箱进行培养。

对于直接用于细胞产品生产的病毒载体的制造过程，其生产操作环境的洁净度级别可参照表3-2中的示例进行选择。

慢病毒载体生产工艺

典型的慢病毒载体生产工艺如下(图3-4)：

表3-2　生产操作环境的洁净度级别示例

洁净度级别	细胞治疗产品生产操作示例
B级背景下的A级	1.处于未完全密闭状态下的生产操作和转移 2.无法除菌过滤的溶液和培养基的配制 3.载体除菌过滤后的分装
C级背景下的局部A级	1.生产过程中采用无菌注射器对处于密闭状态下的产品和生产用溶液进行穿刺取样等操作 2.病毒载体生产用细胞的传代操作 3.可除菌过滤的溶液和培养基的除菌过滤 4.载体的除菌过滤
C级	1.可除菌过滤的载体的纯化操作 2.可除菌过滤的溶液和培养基的配制
D级	1.采用密闭管路转移产品、溶液或培养基 2.采用密闭系统或设备进行细胞产品、载体的生产操作(如在隔离器中进行产品的无菌分装)、取样 3.质粒生产用工程菌或病毒载体生产用细胞在密闭罐中的发酵或培养

注：表中除D级以外的生产操作示例，均指在非密闭系统下的操作。成品应在适当条件下贮存，以保持产品质量并防止混淆。

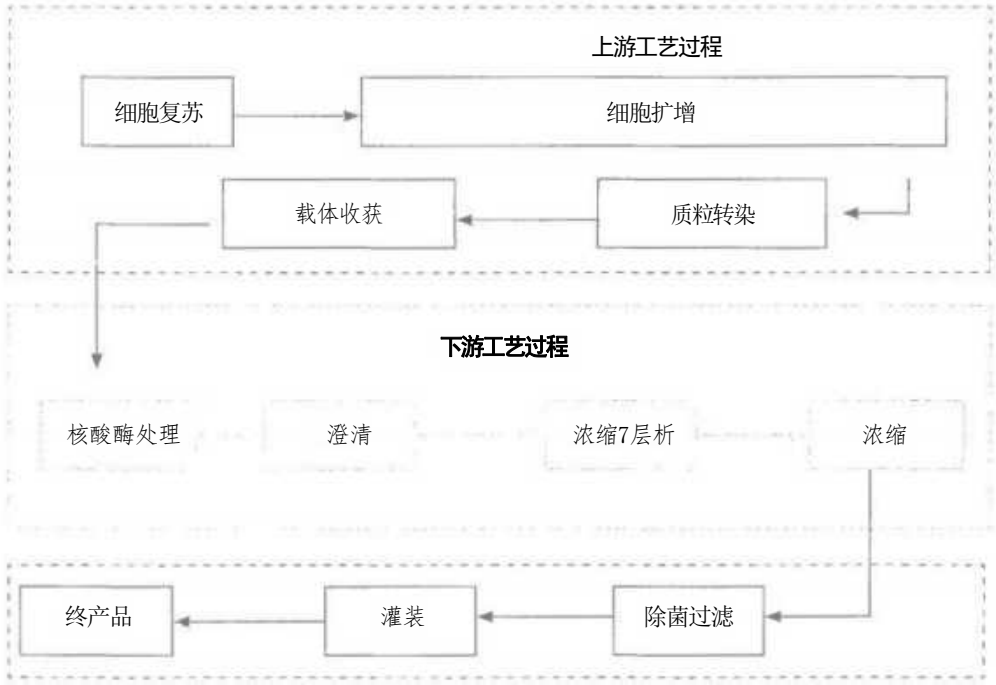


图3-4　典型的慢病毒载体生产工艺

注：应根据厂房设施、环境控制、物料、工艺等评估是否需要除菌过滤以及除菌工艺所处的阶段，保障产品的无菌性

●细胞在培养基中被扩增和传代，以制备足够数量的细胞用于生产慢病毒载体。

●利用质粒通过瞬时转染生产慢病毒载体。

●生产时将质粒合并，并添加到转染试剂中混合，以产生转染所需的混合物。

●将复合物添加到含有细胞的培养基中，并将培养物培养特定的时间。

●培养后，收集含有载体的上清液，并通过封闭的下游纯化过程进一步处理。

●上清液通过核酸酶处理，澄清后，随后进行切向流过滤，通过层析步骤以去除相关杂质，并将病毒载体浓缩到制剂缓冲液中。

3.8细胞治疗产品的制备

细胞治疗产品的工艺流程一般包括：供者材料处理、细胞表型分类、基因修饰(如适用)、细胞扩增和细胞清洗/配制。

实例分析

自 体CAR-T 细胞生产工艺

CAR-T 细胞生产平台过程包括以下单元操作(图3-5):分离/分选、激活/转导、扩增、浓缩、洗涤、制剂工艺、灌装和冻存。



图3-5 自体CAR-T 细胞生产工艺

该过程包括：

●分离分选出目标细胞。

●将分离分选的细胞接种在培养基中，进行激活。

●在转导工序，以批次恒定的感染复数(MOI) 将慢病毒载体接种至培养瓶或培养袋中进行基因转导。

●在工艺的后续指定日期，使用密闭系统扩增细胞至目标数量后，收集、浓缩和洗涤细胞。

●制剂工艺。

●通过无菌转移将所需体积灌装至冻存袋中进行冻存。

●经检测放行后按照运输条件1贮存条件运输至治疗中心。

3.9种子库和细胞库管理

对于异源性的，对供者和患者匹配性无要求的细胞治疗产品，推荐建立主库及工作种子库/细胞库。对于直接用于细胞产品生产的基因修饰载体或其他起始生物材料，如适用，也推荐建立主库及工作种子库/细胞库。细胞库体系可以防止不必要的性能漂移，这种漂移往往发生在重复的亚批或多代培养中。

种子库或细胞库，与活性物质和成品之间扩增或传代的次数应与注册临床申请或上市申请的质量标准保持一致。

作为产品生命周期管理的一部分，种子库和细胞库的建立，包括主代次和工作代次，以及他们的维护和贮存，应在适当的GMP 条件下进行，包括：

●应有适当受控的环境，以保护种子批、细胞库以及处理它的人员。

●在建立种子批和细胞库期间，不得在同一区域或由同一个人同时处理其他活的或感染性物质(如病毒、细胞株)。

●在主细胞库建立前，所有文档都应被保存以支持可追溯性。

●所有与最初采购和基因开发过程中使用的对产品安全有潜在影响的组件相关的问题(如生物源试剂)都应记录在案。

●建立的主细胞库/工作细胞库应分别存放，细胞检定包含细胞鉴别、细胞内外源病毒因子、无菌检查等，相关要求可参考《中国药典》三部生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制。

●应通过连续批次产品的特性和质量的一致性来进一步证明其持续可靠性。种子和种子库的稳定性和复苏能力的证据应加以记录，并应以允许进行趋势评价的方式保存记录。

●种子批和细胞库的贮存和使用应尽量减少污染的风险(例如：分装在密封容器中并贮存在气相液氮中或其他替代方法)。不同种子和(或)细胞在同一区域或同一设备上贮存的控制措施应能防止混淆，同时应考虑物料的传染性，以防止交叉污染。

●贮存容器应密封，清楚标识，并保存在适当的温度下。必须保存库存台账。贮存温度和使用点的液氮水平应被持续监测。应记录与设定限度相关的偏差及采取的纠正和预防措施。

●最好将库存分开，并存放在不同的地点，以减少全部损毁的风险。这些地点的管控应满足以上几段的描述。

●库存的贮存和处理应按照相同的程序和参数进行。 一旦从种子批/细胞库管理系统中拿出，不得再返回库存。

4 人员管理

本章主要内容：

LT 细胞治疗产品对关键操作人员的特殊要求

T 人员培训，包括医疗机构人员培训的内容

T 人员健康管理和生物安全防护的注意事项

T 接触含有传染病病原体供者材料的人员行为有哪些注意事项

背景介绍

相比于无菌制剂，细胞治疗产品的特殊性决定了其额外的人员管理特点：

●产品无法进行最终灭菌，因此生产全过程均应进行严格的无菌控制，对于参与生产的人员管理要求更高、更为细致。

●该类产品现阶段仍存在大量依赖生产人员直接或近距离接触产品的手工操作步骤，形成人员与产品的双向生物安全性风险，需关注生物安全防护的要求。

●供者材料来源于人体血液或器官，通常由医疗机构采集，产品使用过程也涉及临床操作人员，人员管理链条应延伸至临床场景。

基于以上特点，本章节着重阐述了生产人员、检验人员、物流人员、临床人员在此类产品生产中额外的培训要求、卫生管理要求、生物安全防护等要点。无菌制剂对人员的一般要求请参考本章节。

4.1人员资质

法规要求……

药品生产质量管理规范(2010年修订)

第二十条 关键人员应当为企业的全职人员，至少应当包括企业负责人、生产管理负责人、质量管理负责人和质量受权人。

质量管理负责人和生产管理负责人不得互相兼任。质量管理负责人和质量受权人可以兼任。应当制定操作规程确保质量受权人独立履行职责，不受企业负责人和其他人员的干扰。

自 技术要求

细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)

五、人员

(一)生产管理负责人、质量管理负责人和质量受权人应当具有相应的专业知识(微生物学、生物学、免疫学、生物化学、生物制品学等),并能够在生产、质量管理中履行职责。

企业负责人、质量管理负责人、生产管理负责人的职责管理的一般性要求可参见本丛书的《质量管理体系》分册“3.2机构与人员”。非冻存细胞制剂具有有效期短等特点，质量受权人需及时对产品进行批质量评价并执行放行工作，质量受权人可以进行转授权工作委托，但只是职能委托，责任不可以委托。

转授权工作委托需满足的条件包括：

●质量受权人转授权工作只能委托给质量部门人员，不得将职能委托给其他部门的人员。

●受托人资质应当满足受权任职资格。

●受托人应经过与产品放行有关的培训。

●质量受权人应对转授权受托人批准放行的产品进行质量评价，职能委托应以书面形式进行确认，形成正式文件。

对于从事关键工序的操作人员及特定项目的检验人员，也应关注其资质要求，如具备生物学、生物工程、免疫学、药学等相关知识，上岗前应经过微生物学相关培训及生物安全培训，尤其是经过如何预防经供者材料传播疾病方面的知识的培训。关键工序操作人员应参与成功的无菌工艺模拟试验(APS)， 且 在APS 过程中执行的操作与实际生产中负责的工作相一致。

关键工序操作/检验人员应满足的要求包括：

●具备细胞生物学、免疫学、生物化学和微生物学等相关的知识。

●理解偏离经验证的程序可能对产品和患者带来的风险。

●熟练掌握相应载体生产和(或)细胞培养技术。

对于手工操作，应保证人员操作的一致性，最大程度地减少人员对产品的影响，如将核心工序进行详细分解，规范每个工艺操作。

对于自动化操作，关键工作操作/检验人员应熟悉相关设备的使用、维护与验证，能对设备故障进行适当的处理。

4.2人员培训

法规要求…. …… … …

药品生产质量管理规范(2010年修订)

第二十七条 与药品生产、质量有关的所有人员都应当经过培训，培训的内容应当与岗位的要求相适应。除进行本规范理论和实践的培训外，还应当有相关法规、相应岗位的职责、技能的培训，并定期评估培训的实际效果。

第二十九条 所有人员都应当接受卫生要求的培训，企业应当建立人员卫生操作规程，最大限度地降低人员对药品生产造成污染的风险。

药品生产质量管理规范(2010年修订)无菌药品附录

第二十条 凡在洁净区工作的人员(包括清洁工和设备维修工)应当定期培训，使无菌药品的操作符合要求。培训的内容应当包括卫生和微生物方面的基础知识。未受培训的外部人员(如外部施工人员或维修人员)在生产期间需进入洁净区时，应当对他们进行特别详细的指导和监督。

药品生产质量管理规范(2010年修订)生物制品附录

第六条 应当加强对关键人员的培训和考核，培训内容至少包括相关法律法规、安全防护、技术标准等，并应当每年对相关人员进行专业考核。

从事生物制品生产、质量保证、质量控制及其他相关人员(包括清洁、维修人员)均应根据其生产的制品和所从事的生产操作进行专业知识和安全防护要求的培训。

技术要求

细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)

五、人员

(二)从事细胞产品生产、质量保证、质量控制及其他相关工作(包括清洁、维修人员等)的人员应当经过生物安全防护的培训并获得授权，所有培训内容应符合国家关于生物安全的相关规定，尤其是预防传染病病原体传播的相关知识培训。

从事细胞治疗产品的生产人员应经过培训，熟练掌握相应载体生产和(或)细胞培养技术，接触供者材料的人员应经过如何预防经供者材料传播疾病方面的知识培训，如应培训预防经血液、暴露伤口、气溶胶传播疾病的相关知识及操作注意事项等。从事细胞治疗产品生产、检验、维修和清洁等人员应经过相关生物安全事故应急处理措施的培训及演练。

应将生物安全实验室的特殊危害告知生产、实验室人员，并遵循相应的标准

操作规程，通常由对工作和相关要求最为了解的人员来确定生物安全培训规划的内容。

企业应确保医疗机构中参与供者材料采集、细胞产品回输的医生、护士、管理人员经过相应培训，熟悉供者材料采集流程及细胞治疗产品的使用和风险处置方法。

培训应有文件记录，进行必要的确认，并形成培训档案。

企业内部培训内容应包括但不限于：

●《药品生产质量管理规范》及相关附录。

●无菌操作技术及污染控制策略。

●岗位操作规范。

●洁净区行为规范。

●无菌更衣规范。

●生物安全防护及应急处置方法。

●细胞生物学、微生物学等相关知识。

●物流运输规范等。

医疗机构人员培训内容应包括但不限于：

●细胞治疗产品适应证及供者筛查标准。

●供者材料采集、保存方法。

●产品使用说明书。

●产品使用风险处置等。

实施指导

A. 生产人员培训

●手工操作人员培训

细胞治疗产品手工操作较为复杂的，可将工序进行分解，分模块组织培训，培训形式包括但不限于理论知识讲解、视频观摩、工艺实操等，同时应侧重各工序无菌控制、防混淆等要点，同时无菌操作人员应通过无菌工艺模拟试验。可将操作视频保留，制作为培训教材，培训视频文件的使用和保存应符合GMP文件管理的要求。

细胞治疗产品的供者材料来源于人体血液或者器官组织，生产过程中存在部分

敞口操作，且批量小、批次多，生产操作结束后的清场、清洁和消毒尤为重要，应对生产人员进行严格的清场、清洁和消毒培训，培训方式应注重实操培训。

●自动化设备操作人员培训

使用自动化设备进行生产时，人工干预相对较少，但耗材与耗材、耗材与试剂、耗材与设备、设备与设备之间的无菌连接尤为重要，应作为自动化设备操作人员培训的重点。

●信息化人员培训

细胞治疗产品多使用信息化手段对供者材料和产品进行全程跟踪和追溯，应重点培训信息化人员对各个生产和质量控制环节的理解，关注数据的及时性、准确性以及数据的安全性，使其熟悉信息化系统需要重点监控的风险点。

B. 医疗机构人员培训

对于涉及供者材料采集，以及产品接收、转运、使用及其管理的医疗机构人员(临床医生、护士、药事管理人员等),应在企业进行备案，企业应当对其开展培训，培训方式可采取现场讲解、模拟实操、线上培训等，培训效果评估可采用知识竞赛、试卷考核、问答、实际操作、回顾等方式。

●首次培训

根据合格医疗机构在企业进行备案的人员清单，对备案人员进行首次培训。培训合格后方可执行供者材料采集及产品回输等操作。

●定期培训

根据医疗机构医护人员执行供者材料采集及产品回输情况，如执行次数、操作过程中异常情况等开展定期培训。

●临时培训

新申请备案人员加入、现场出现偏差、供者材料采集或产品回输发生变更时，应及时开展临时培训。

●培训评估

应定期对培训进行评估，评估内容可包括：

- o 培训计划执行情况。
- o 培训效果统计分析。
- o 培训调查问卷分析。
- o 培训资源匹配情况，如培训师、培训设备、场地、培训经费等。
- o 培训过程不足及改进建议等。

C. 物流人员培训

对于供者材料和终产品的物流运输人员，应重点对运输过程进行培训，包括供者材料/产品的运输流程、运输环境及装载方式、电子监测系统的使用、可能出现的异常情况的处理、生物安全防护等。

D. 其 他

工艺变更或生产流程发生变化时，应对所有涉及的人员进行培训，完成培训并考核通过后方能实施变更。

4.3人员卫生

法规要求. .

药品生产质量管理规范(2010年修订)

第三十条 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。生产区和质量控制区的人员应当正确理解相关的人员卫生操作规程。企业应当采取措施确保人员卫生操作规程的执行。

第三十二条 企业应当采取适当措施，避免体表有伤口、患有传染病或其他可能污染药品疾病的人员从事直接接触药品的生产。

第三十三条 参观人员和未经培训的人员不得进入生产区和质量控制区，特殊情况确需进入的，应当事先对个人卫生、更衣等事项进行指导。

第三十五条 进入洁净生产区的人员不得化妆和佩带饰物。

第三十六条 生产区、仓储区应当禁止吸烟和饮食，禁止存放食品、饮料、香烟和个人用药品等非生产用物品。

药品生产质量管理规范(2010年修订)无菌药品附录

第二十二条 从事无菌药品生产的员工应当随时报告任何可能导致污染的异常情况，包括污染的类型和程度。当员工由于健康状况可能导致微生物污染风险增大时，应当由指定的人员采取适当的措施。

药品生产质量管理规范(2010年修订)生物制品附录

第八条 根据生物安全评估结果，对生产、维修、检定、动物饲养的操作人员、管理人员接种相应的疫苗，需经体检合格，并纳入个人健康档案。

第九条 患有传染病、皮肤病以及皮肤有伤口者、对产品质量和安全性有潜在不利影响的人员，均不得进入生产区进行操作或质量检验。

应对细胞治疗产品的人员交叉污染风险进行有效控制，尤其是源自供者材料与操作人员间的交叉污染。应制定人员卫生管理规程，以防止传染性疾病的病原体在物料、产品和人员之间传播，并控制对环境的潜在影响。

人员卫生管理一般包括两方面：人员健康管理及针对操作含传染病病原体体细胞的人员生物安全防护控制。

A. 人员健康管理

直接从事产品生产和检验的人员、供者材料采集人员的卫生状况与药品质量相关，应制定规程对上述人员进行健康管理和监控，包括入职体检、在职定期体检、离职体检等。对于从事生产、检验、维修、内控等与产品/供者材料接触的操作人员，其任职资格中应包含人员健康要求，如不应患有乙型肝炎、梅毒、艾滋病、传染性皮肤病等，并作为健康体检项目依据。供者材料/产品的运输人员应根据接触风险制定健康管理要求；应建立人员健康档案，用以追溯人员健康情况。

应制定健康异常情况上报制度，当生产操作人员健康异常时(如发热、流感、腹泻、患有传染病、体表有创伤等),应主动报备，经评估可能影响产品质量时，这类人员不得执行与产品接触的操作。

应当根据产品和生产过程中使用材料的已知风险采取相应措施来保护操作人员，对高风险的员工(如直接接触供者材料或产品的员工等)开展职业健康监护，人员不能为细胞易感病毒携带者，如乙型肝炎病毒携带者。

B. 人员生物安全防护控制

针对操作含传染病病原体体细胞的人员生物安全防护控制，除建立人员安全防护措施及生物外溢应急处理措施外，还应评估体细胞可能携带的病原体种类及风险，根据风险等级制定相应预防措施，如从事生产、检验等与产品接触的人员接种相应疫苗；体表有创伤者应暂时调岗，治愈后方可继续操作；加强人员培训避免因操作不当引入病毒污染风险等。

更多人员生物安全防护的内容请参考本分册细胞治疗产品部分“9 生物安全防护”。

4.4人员行为规范

法规要求

药品生产质量管理规范(2010年修订)

第三十七条 操作人员应当避免裸手直接接触药品、与药品直接接触的包装材料和设备表面、

药品生产质量管理规范(2010年修订)无菌药品附录

第二十三条 应当按照操作规程更衣和洗手，尽可能减少对洁净区的污染或将污染物带入洁净区。

药品生产质量管理规范(2010年修订)生物制品附录

第十一条 生产期间，未采用规定的去污染措施，不得从接触活有机体或动物体的区域穿越到生产其它产品或处理不同有机体的区域中去。

自 **技术要求**

细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)

五、人员

(三)生产期间，从事载体生产的人员如未按规定采取有效的去污染措施不得进入细胞产品的生产区域，直接接触含有传染病病原体供者材料的人员不得进入其他生产区域。

细胞治疗产品生产人员的行为除满足无菌生产洁净区的良好行为规范要求外，还应满足：

●人员不应从接触活微生物、转基因生物、毒素或动物的区域直接进入处理其他产品、灭活产品或不同生物体的区域。如果这种通过是不可避免的，应采取适当的风险控制措施。

●为防混淆和差错，每次操作前应严格进行身份鉴别可追溯链(code for chain of identity,cCOI) 等信息识别与核对，核对无误后方可进行下一步操作。

●手工操作较为复杂，工艺用时较长，为减少人员长时间操作对环境和产品的影响，除对人员进行洁净区行为规范要求外，还应明确各工艺时限要求，以保证在规定的时间内完成各工序操作。

●供者材料采集操作前、产品回输前应严格核对供者/患者信息，防止混淆。

对于接触含有传染病病原体供者材料的人员，其行为规范包括但不限于以下要求：

●在进行含有传染病病原体供者材料操作时，任何时候都必须穿着防护工作服(如连体衣、隔离服等),并且戴口罩、眼罩。

●在进行可能直接或意外接触到血液、体液以及其他具有潜在感染性的材料的操作时，应戴上合适的手套， 一次性手套需要佩戴双层。佩戴前，应检查手套是否有褪色、穿孔(漏损)、裂缝等现象。 一次性手套不可重复使用。手套用完后，应先消毒再摘除，随后洗手。

●在处理完感染性生产、实验材料后，以及在离开生产、实验室工作区域前，都

必须洗手消毒。

●对于可能产生潜在眼睛损伤(生物、物理等)生物安全的生产、实验操作，应选择适当的眼镜防护装备类型和尺寸。

●生产区、实验室内部如发生生物危害液体或腐蚀性液体等喷溅到工作人员的眼睛时，应立即(或者在同事的帮助下)利用就近的洗眼装置，用大量缓冲清水冲洗眼睛表面，时间至少15分钟。

●严禁穿着生产区、实验室防护服离开生产区、实验室，不能携带生产、实验材料离开操作区域。

●在生产区、实验室内用过的防护服不得和日常服装放在同一柜子内，需经过灭活处理后方可移出生产区、实验室。

●需要带出生产区、实验室的手写文件必须保证在生产区、实验室内未受到污染。生产检验过程中的记录不得在生物安全柜内填写。

●对于可能包含、接触人体组织、血液、病毒、致病细菌的耗材、液体废物、用具等，应进行基于验证的物理(如湿热灭活)、化学方法(如 VHP) 原位灭活处理后方可进行暂存、处置。

5 厂房、设施与设备

本章主要内容：

细胞治疗产品的生产区应满足的要求

质量控制区应满足的要求

细胞贮存库区应满足的要求

废弃物暂存区应满足的要求

生产中使用的设备应满足的要求

法规要求……

药品生产质量管理规范(2010年修订)生物制品附录

第二十二条 无菌制剂生产加工区域应当符合洁净度级别要求，并保持相对正压；操作有致病作用的微生物应当在专门的区域内进行，并保持相对负压；采用无菌工艺处理病原体的负压区或生物安全柜，其周围环境应当是相对正压的洁净区。

第二十三条 有菌(毒)操作区应当有独立的空气净化系统。来自病原体操作区的空气不得循环使用；来自危险度为二类以上病原体操作区的空气应当通过除菌过滤器排放，滤器的性能应当定期检查。

背景介绍

细胞治疗产品厂房设施的布局必须进行整体设计，在满足生产、设备和工艺布局要求的前提下，同时考虑房间特定功能，设计合适的气流方向、人流方向、物流

方向，便于生产操作、清洁和维护。细胞生产区应设立洁净区，洁净区的设计、建设、管理、进出、使用、清洁、消毒、环境监测等应参照GMP无菌药品附录的相关要求。同时，洁净区应当根据制备流程及相应的洁净度级别和生物安全要求合理设计、布局和使用。厂房、设施、设备的一般要求请参考本丛书《厂房设施与设备》分册和本分册的相关内容。

“可能含有传染病病原体”是细胞治疗产品最突出的一个特殊性。因此，在厂房、设施和设备设计、选型与实施中，要及早对产品可能涉及的病原体风险进行评估，并制定相应的风险控制策略，有效防止引入、传播病原体。

技术要求

细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)

六、厂房、设施与设备

(一)直接用于细胞产品生产的基因修饰病毒载体应与细胞产品、其他载体或生物材料相隔离，分别在各自独立的生产区域进行生产，并配备独立的空调净化系统。

(二)使用含有传染病病原体的供者材料生产细胞产品时，其生产操作应当在独立的专用生产区域进行，并采用独立的空调净化系统，产品暴露于环境的生产区域应保持相对负压。

(三)宜采用密闭系统或设备进行细胞产品的生产操作；密闭系统或设备放置环境的洁净度级别可适当降低，应当定期检查密闭系统或设备的完整性。

(四)细胞产品、直接用于细胞产品生产的基因修饰载体或其他赋予其特定功能的材料，其生产操作环境的洁净度级别可参照表格中的示例进行选择。

洁净度级别	生产操作示例
B级背景下的A级	1.处于未完全密闭状态下的生产操作和转移； 2.无法除菌过滤的溶液和培养基的配制； 3.载体除菌过滤后的分装。
C级背景下的局部A级	1.生产过程中采用无菌注射器对处于密闭状态下的产品和生产用溶液进行穿刺取样等操作； 2.病毒载体生产用细胞的传代操作； 3.可除菌过滤的溶液和培养基的除菌过滤； 4.载体的除菌过滤。
C级	1.可除菌过滤的载体的纯化操作； 2.可除菌过滤的溶液和培养基的配制。

续表

洁净度级别	生产操作示例
D级	1.采用密闭管路转移产品、溶液或培养基； 2.采用密闭系统或设备进行细胞产品、载体的生产操作(如在隔离器中进行产品的无菌分装)、取样； 3.质粒生产用工程菌或病毒载体生产用细胞在密闭罐中的发酵或培养。

备注：表格中除D级以外的生产操作示例，均指在非密闭系统下的操作。

(五)含有传染病病原体的供者材料和相应细胞产品应有单独的隔离区域或设备予以贮存，与其它供者材料和相应细胞产品的储存区域分开，且采用独立的储存设备，隔离区域和储存设备都应当有明显标识。

(六)用于供者材料和细胞产品的传染病病原体标志物检查，或对含有传染病病原体样品进行检测的实验室，应符合国家关于实验室生物安全的相关规定，应当有原位灭活或消毒的设备。

细胞治疗产品厂房设施根据生产工艺的不同可遵循以下布局的基本原则：

●细胞治疗产品厂房宜建立在自然环境良好的区域，应远离严重空气污染、水质污染、病原微生物(含未知或无检测手段的病原微生物)丰富的场所，由于细胞治疗产品的成品制剂及原材料通常对温度敏感，运输时限要求很强，因此，在保证不受振动或噪声干扰的前提下，适于选择相对交通便捷的区域。

●厂房的设计与建设应遵循物理隔离的建筑设计原则，以细胞治疗产品的质量为核心，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。细胞治疗产品厂房应根据工艺特点，具有满足工艺要求的面积。

●企业需根据工艺的设计，基于风险评估确定厂房的洁净度级别，处于非密闭状态下产品的生产操作和转移，需考虑在B 级背景下的A 级环境下操作；处于密闭状态下的产品生产操作，可考虑在D 级或C 级环境下操作，密闭系统需经过验证。密闭系统或设备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。

●细胞治疗产品厂房应设置相应的功能区，根据工艺的不同，功能区包括但不限于细胞生产区、病毒载体和质粒的生产区、质量控制区、贮存区、医疗废物存放区和其他辅助区等。各功能区应有明确的功能要求和独立的空间、设施和设备。直接用于细胞产品生产的基因修饰病毒载体或生物材料等应与细胞治疗产品及其他载体或生物材料分别在各自独立的生产区域进行，并配备独立的空调净化系统。建议经过基因修饰的细胞治疗产品和没有经过基因修饰的细胞治疗产品不进行共线生产。

含有传染病病原体的供者材料的处理及生产场所应根据企业产品的生产方式进行充分的风险评估，如采用非密闭系统生产，宜考虑在独立的物理空间中进行。含有传染病病原体的供者材料制备问应保持产品暴露于环境的生产区域相对负压。含有传染病病原体的供者材料的污物建议原位灭活，经完全灭活后方可移出工作区。

细胞治疗产品厂房应定期进行环境风险评估。

3细胞治疗产品厂房应建立并实施防虫、防鼠、防花粉等措施，防止无关动(植)物进入关键区域

0功能区的设计、建造、运行和维护应满足细胞治疗产品的质量要求，应便于清洁、操作和维护

c细胞治疗产品厂房应采用持续供电系统、集中供气系统，必要时可考虑供氧系统，确保连续和稳定地提供电力、液氮、气体(二氧化碳、氮气、氧气等),满足细胞治疗产品贮存条件长期稳定的要求。

5.1 生产区

本小节分别介绍了非密闭和密闭工艺条件下细胞治疗产品的厂房设计、病毒载体生产区的厂房设计、质粒生产区的要求和生产区的其他要求

5.1.1 非密闭工艺条件下细胞治疗产品生产区厂房设计

A. 基本要求

●高风险区的嵌入式设计

针对细胞治疗产品，设计时应考虑以下方面：核心操作区(如细胞培养和制剂灌装)应采取嵌入式的设计，在其外部设置保护区域，人员经过更衣控制，物料和部件则需要经过必要的清洁灭菌后方可进入无菌操作区域，使外界对无菌环境的影响降到最低。

o气锁设计

人员、设备和物料应通过气锁间进入洁净区。

气锁的作用主要是维持压差以防止空气污染，有正压与负压两种类型，可用于人员进出及物料传递。气锁是两个不同洁净区间的连接通道，气锁应保持逐级压差梯度。气锁可采用连锁系统或光学和(或)声学的报警系统防止两侧的门同时打开。

●洁净级别确认

洁净级别确认是厂房设施确认的一部分，并需要定期进行再确认。洁净级别确认和洁净区监测是两个环节，应该明确予以区分并分别管理。洁净区的设计必须符合相应的洁净度要求，包括达到“静态”和“动态”的标准。

●压差控制

GMP 规定“洁净区与非洁净区之间、不同等级洁净区之间的压差应不低于10Pa。必要时，相同洁净度级别的不同功能区域(操作间)之间应保持适当的压差梯度”。涉及含有传染病病原体的供者材料的制备房间，应保持相对负压。

●气流方向

一般来说，建议单向流动所有工艺元素，如人员、物料、中间体、产品、设备和废物。气流应按照预先要求的方向进行流动。适当的气流组织有助于较快地满足环境的温湿度和分级要求，有利于防止有害环境污染物对产品产生不利影响。首先可通过烟雾试验观察单向流系统保护下的气流与设备的相互作用，如果空气因为湍流而产生回流，系统必须重新平衡或调整。人员进入操作时，继续考察气流流向，若操作时烟雾回流，必须建立操作规程以避免人员进入上述区域，防止污染、交叉污染。在任何运行状态下，洁净区通过适当的送风应当能够确保对周围低级别区域的正压，维持良好的气流方向，保证有效的净化能力。

●人员进出控制

洁净区可考虑设计门禁系统，限制非必要的人员出入。此外，厂房设计时可考虑设计录像监控系统或观察窗，方便管理人员或其他人员从外部观察指导洁净区内部的操作行为。

B. 特殊要求

由于生产过程中存在产品暴露，细胞治疗产品厂房设计还应考虑以下方面：

●对于处于非密闭状态下产品的生产操作和转移，应在B 级背景下的A 级 中进行。

●根据产品特性需考虑批次间交叉污染及混淆的风险，采取措施预防交叉污染，如使用阶段性生产方式或专用的厂房和设备等。对于含有传染性疾病病原体的供者材料，其生产操作应当在独立的专用生产区域进行，并采用独立的空调净化系统。

●生产用物料的转移方式(向B 级转移)需要结合工艺流程考虑灭菌设施设备的选型，需要注意灭菌方式对物料失活的影响。

●核心洁净区无菌功能保证的设备选型要求，用于培养的设备应当能够防止产品

受到外源性污染；应定期确认产品直接暴露的隔离与封闭系统无泄露风险；设备表面应易于清洁消毒，操作简单，易于布置在生物安全柜内，设备不能污染核心生产区，能采取措施保证满足核心区的无菌要求。

实例分析

图5-1为某非密闭工艺条件下的厂房示意图实例，按图中所示，工艺主操作间人、物单向流动，准备间人、物非单向流动，各主操作间共用进入、退出走廊。进入和退出走廊均为洁净区。

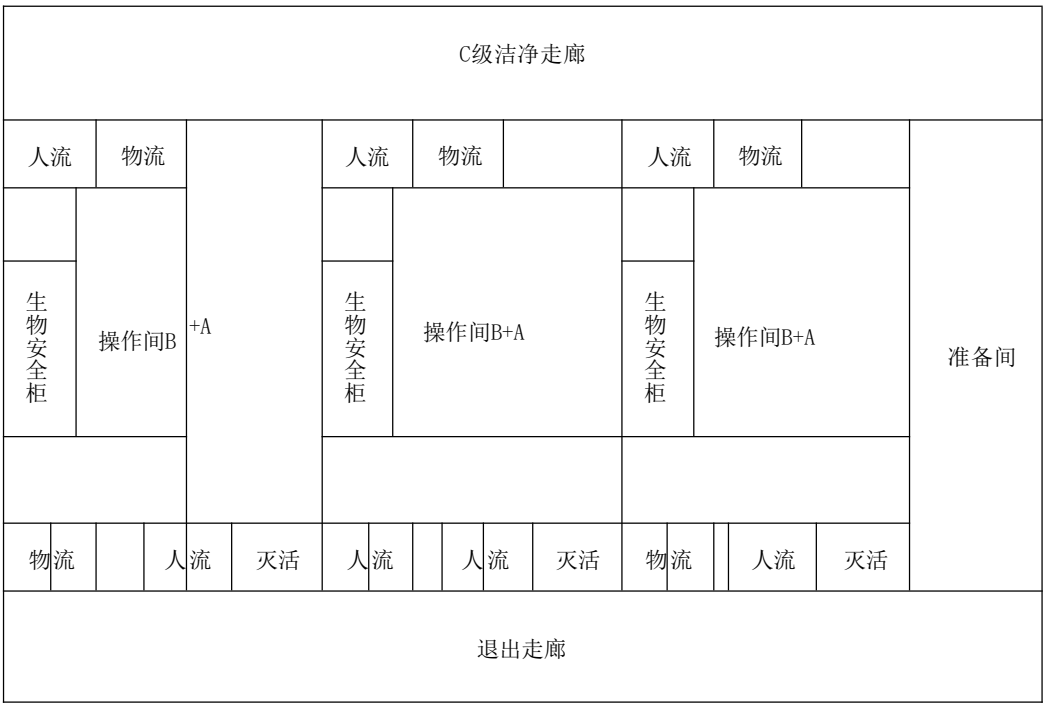


图5-1 某非密闭工艺条件下的厂房示意图

5.1.2密闭工艺条件下细胞治疗产品生产区厂房设计

生产过程为密闭工艺或隔离器背景下的厂房设计的注意事项包括：

●按照GMP 要求划分一般生产区和洁净生产区。

●工艺区主操作间人流单向。

●工艺区主操作间物流传递单向。

●工艺区主操作间废弃物灭活退出单向。

●可以考虑同一房间内使用多个密闭系统或隔离器，但需具备有效的措施防止交叉污染。

●含有传染性疾病病原体的供者材料，其生产操作应当在独立的专用的生产区域，采用独立的空调净化系统。

●采用密闭设备和管路，其环境的洁净度级别可适当降低，可以考虑C 级或D级。

●密闭设备和管路意外发生泄漏时，应基于风险评估制定并采取有效的应急措施。

实例分析

使用隔离器或密闭管路工艺条件下的厂房示意图如图5-2所示，其功能区主要有公共进入区域和退出区域、C/D 级的工序操作间，C/D 级的工序操作间内可设多个操作台或隔离器。可以同时在一个操作间内使用多个密闭系统(如WAVE培养系统),但需具备有效措施防止交叉污染。

5．1．3病毒载体生产区厂房设计

病毒载体厂房设计时应按照细胞治疗产品特点及国内外相关的法律法规规划设计工艺平面和相关配套设施。病毒载体生产车间一般包括：细胞培养、转染、病毒载体纯化和产品灌装以及辅助房间等区域。每个房间的大小及人、物流要求、房间内设施的布局是影响工艺布置的重要因素。

A. 平面设计

病毒载体产品单批次产量相对较少，生产车间面积小，房间设置较为灵活。在设计工艺平面时，除了工艺流程外，各生产步骤所需要的时间也是非常重要的影响因素。在满足生产工艺要求的前提下，建议根据各工艺步骤所需要的生产时间合理地划分生产区域，便于对已完成生产步骤的区域进行单独灭活，使其提前进行下一批产品的生产，从而提高车间的使用率和生产效率。同时需注意病毒生产区有毒区和无毒区要严格区分。

B. 空调设计

不同类病毒载体其生产操作应当在独立专用的生产区域进行，并采用独立的空

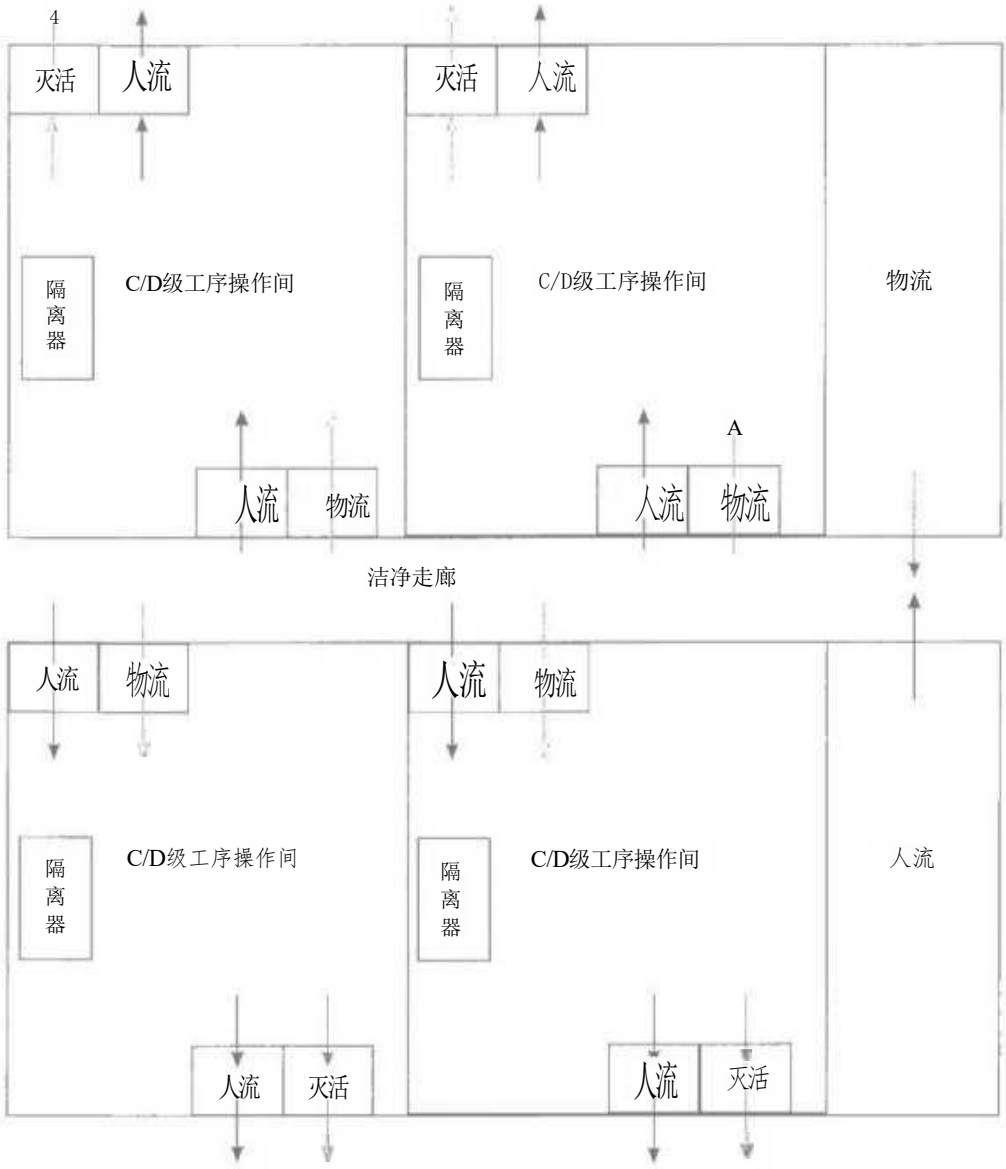


图 5－2 使用隔离器或密闭管路工艺条件下的厂房示意图

调净化系统，空调系统建议直排。洁净区内在污染较大的房间与相邻房间或过道应保持相对负压，防止交叉污染。病毒生产区有毒区和无毒区的空调系统需要完全独立和区分。

C. 其他辅助设计

对于病毒载体的制造，应基于风险评估考虑进行额外的分离和控制，避免在同一时间同一设施中生产多个产品，以防止污染/交叉污染，例如：

●制造区域内的物理隔离/时间隔离。

●独立空气处理装置(air handling units,AHU)。

●废气通过HEPA 过滤。

●适当的套件/气锁压差(dP) 设计。

●不同风险等级(复制/非复制)的病毒的分线生产。

●采用密闭系统进行生产。

●使用隔离器或生物安全柜进行生产。

此外，由于病毒载体产品的附加值高，生产过程因断电所造成的损失十分巨大。在关键生产步骤和贮存时，设备都需要不间断电源，此类设备数量也较多，且不间断电源通常为集中设置。因此，关键设备需要设置UPS电源，在厂房设计时应提前考虑。

实例分析

某慢病毒载体生产工艺流程主要分为上游(细胞复苏、细胞扩增、细胞转染、收获),下游主要为纯化、浓缩等环节，最后为灌装环节。根据慢病毒载体的生产工艺流程，将车间按无毒区(细胞复苏、细胞扩增)和有毒区(细胞转染、纯化、浓缩等)进行严格区分，分为2个独立的洁净空调系统。

某慢病毒生产车间无毒区布局示意如图5-3所示：

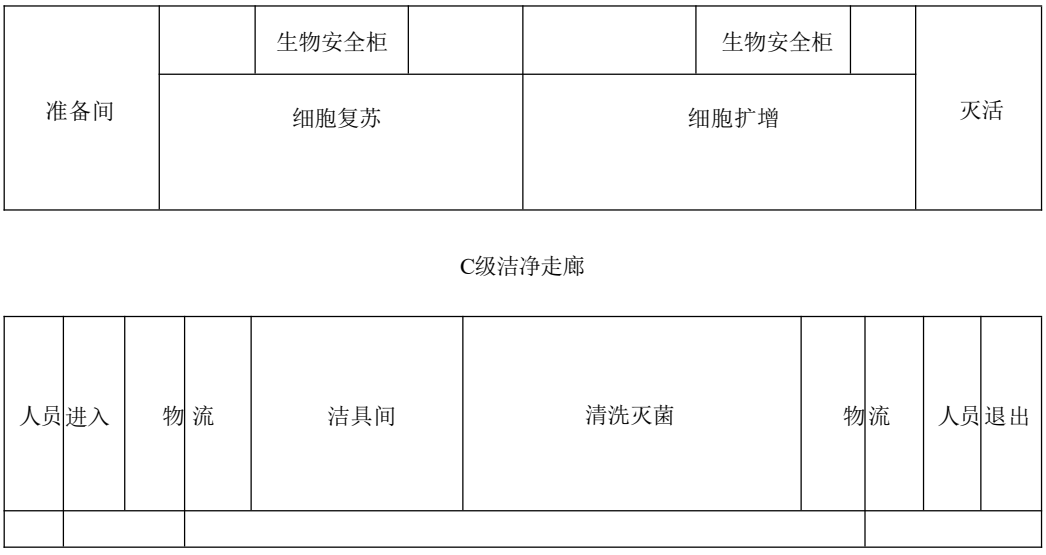


图5-3 某慢病毒生产车间无毒区布局示意图

某慢病毒生产车间有毒区布局示意如图5-4所示：

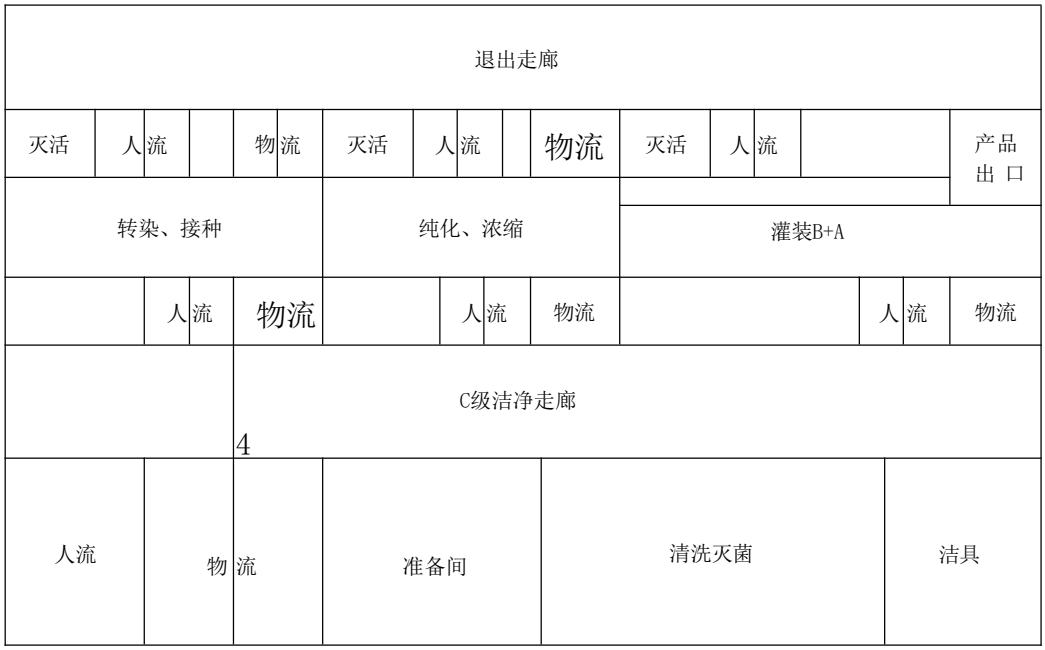


图5-4 某慢病毒生产车间有毒区布局示意图

5.1.4质粒生产区的要求

质粒制备区域包括了细菌菌种接种、发酵、收获、质粒提取纯化和产品灌装以及辅助间、人流更衣、物流缓冲、废物灭活等区域。应依据工艺要求设置房间的洁净级别。质粒制备区域的工艺布局与病毒载体制备区域类似。需注意的是质粒可以扩散到空气中，不容易降解，空间熏蒸不能破坏质粒，可能会带入到产品中扩增。在质粒的生产过程中建议尽可能使用密闭系统，避免质粒的暴露和泄漏，在不可避免的敞口操作中，应使用生物安全柜进行保护。

5.1.5生产区的其他要求

生产区还应满足的其他要求包括：

0细胞治疗产品不能进行最终灭菌或除菌过滤，在整个制造过程中都需要无菌技术。如考虑采用密闭系统，设施的设计和布局应适合于预期的操作，并应考虑到每个制备过程的工艺流程。

●细胞治疗产品需要灵活的平面和房间配置，以支持不同的工艺流程，使细胞治疗产品和载体制造可以标准化和规模化。细胞治疗产品所需的一般设备有生物安

全柜、培养箱、离心机、细胞计数仪、培养瓶或生物反应器系统及特定工艺的设备(如细胞分离和转导系统)。

●在公共区域进行多产品分离时，应执行风险评估和控制策略，如果发生空气处理机组(AHU) 故障，应在设计前考虑控制措施(如备用AHU、关键管道分支点的隔离阀、不间断电源)。

●由于原材料数量多、 一次性耗材数量大、操作过程中人员数量多，物料和人员气锁间以及每个制备车间内要根据工艺、设备留有一定的空间，以适应适当的物料消毒和转移，并确保不会由于操作人员的存在而对加工区域产生不利影响。

●对于采用自体供者材料生产的细胞治疗产品，在进行工艺验证时需要符合实际同时生产的最大产能要求，生产区设计时，也要相应从空间上满足实际同时生产的最大产能要求。

●包装操作与灌装操作的功能间建议分开设置。

5.2质量控制区

质量控制区应与细胞生产区和细胞贮存区物理隔离，设有醒目的标识。质量控制区的平面布局应遵循防止污染和交叉污染以及生物安全的风险要素，进行合理设计规划。对于无菌操作与微生物限度及阳性对照等区域，建议独立设置或采用独立空调系统。处理潜在阳性样本的实验室，需根据潜在的不同的阳性样本的生物安全等级，设置不同级别的生物安全实验室，并遵循相应的生物安全实验室管理规定，具体设施要求可参照WHO 实验室生物安全手册(表5-1)中的相关规定。同时建议设置检验废弃物灭活能力的相应功能间。

表5-1 WHO实验室生物安全手册中不同生物安全水平对设施的要求

	生物安全水平			
	一级	二级	三级	四级
实验室隔离	不需要	不需要	需要	需要
房间能够密闭消毒	不需要	不需要	需要	需要
通风				
——向内的气流	不需要	最好有	需要	需要
——一通过建筑系统的通风设备	不需要	最好有	需要	需要
——HEPA过滤排风	不需要	不需要	需要/不需要	需要

续表

	生物安全水平			
	一级	二级	三级	四级
双门入口	不需要	不需要	需要	需要
气锁	不需要	不需要	不需要	需要
带淋浴设施的气锁	不需要	不需要	不需要	需要
通过间	不需要	不需要	需要	
带淋浴设施的通过间	不需要	不需要	需要/不需要	不需要
污水处理	不需要	不需要	需要/不需要	需要
高压灭菌器				
——现场	不需要	最好有	需要	需要
——实验室内	不需要	不需要	最好有	需要
----双门	不需要	不需要	最好有	需要
生物安全柜	不需要	最好有	需要	需要
人员安全监控条件	不需要	不需要	最好有	需要

注：a.在环境与功能上与普通流动环境隔离；b.取决于排风的位置；c.取决于实验室中所使用的微生物因子；d例如：观察窗、闭路电视、双向通讯设备

一些检测中可能用到复制型病毒，其实验室的设计和管控须进行风险评估，并进行适当的控制。

细胞治疗产品特别是干细胞治疗产品，比常规药物质检项日多出很多，质控区设计时，应从质检空间上满足实际同时生产的最大产能要求。

5.3细胞贮存库区

应以各级库为单位设置独立区域，应有醒日的标识用于区分各级库区。库区的环境、通风、照明和空气指标(包括氧分压)应符合液氮安全存放要求和安全操作要求；库区地面应耐压、耐冻、防滑；库区应装备空气成分自动监测和报警系统，并可以进行远程监控。适宜装备液氮深低温保藏设备：

●实时监测装置，监测液氮保藏设备内温度和(或)液氮水平的装置。

●远程自动报警装置，当贮存条件发生异常或特殊情况，可能超出设定值时应能自动远程报警。

对于未完成检测的细胞治疗产品，特别是自体产品，建议采用追溯系统进行定置定位管理。

含有传染病病原体的供者材料和相应细胞治疗产品应有单独的隔离区域或设备予以贮存，与其他供者材料和相应细胞治疗产品的储存区域分开，且采用独立的储存设备，隔离区域和储存设备都应当有明显标识。若使用液相液氮罐保存样品，冻存管或冻存袋便会长期浸泡在液氮中， 一旦冻存管或冻存袋密封不严，可能造成交叉污染，因此建议使用气相液氮罐，同时应注意避免在同一个气相液氮罐内存放含有传染病病原体的供者材料或细胞和不含传染病病原体的供者材料或细胞。

5.4废弃物暂存区

细胞治疗产品的废弃物在转移出洁净车间之前应先进行灭活处理，未灭活的废弃物应提前进行密封处理，贴好标签，根据废弃物的类型和危险度应设计一个专用的废弃物处理区。应设在远离其他功能区、可封闭、能耐受清洗和消毒的独立设施中；应在医疗废物存放区配备必要的防护措施；应对医疗废物实行集中存放，专人专管，确保不扩散，定期转运。不同类型的废弃物处理应按照《医疗废物管理条例》的要求执行。需要特别注意废弃物如果处理不当有可能导致质粒、病毒对环境的污染。

5.5 公用设施

工艺公用设施包括注射用水、纯化水、纯蒸汽、洁净气体系统和净化空调系统等。公用设施的一般性要求可参考本丛书《厂房设施与设备》分册。

各系统的注意事项包括：

●因为细胞治疗产品不能最终灭菌和过滤除菌，生产用水和试剂应为无菌。如每日用量不大，可直接使用外购的无菌水和试剂，如每日所需无菌水较多，则可考虑设计注射用水储存和分配系统，注射用水应经过灭菌之后使用。

●需要纯化水站及储存和分配系统，以用于洁净区工作服的清洗、生产用的工器具的清洗和洁净区的清洁。

●需要CO_2 气瓶间，通过汇流排调压除菌后输送到CO_2 培养箱，并监测CO_2 浓度。

●洁净区的净化空调系统，需要按照区域进行设置，以便于管理和减少交叉污

染。传染性病毒阳性血的细胞操作间，应设计为全排风。洁净区的温湿度， 一般为18~26℃和45%~65%相对湿度。

5.6设备

细胞治疗产品使用的常规设备请参考本丛书《厂房设施与设备》分册和本分册的相关内容。本节将着重介绍适用于细胞治疗产品的隔离器、自动化密闭系统、生物安全柜等工艺设备，以及工艺公用系统及辅助设施。

5.6.1 隔离器

背景介绍

隔离器在细胞治疗产品生产中已经开始广泛应用，并逐步代替传统的无菌洁净室，成为一种发展趋势。本节将介绍隔离器在细胞治疗产品中的使用要求和应用。在计划使用隔离器前需进行充分的风险评估，尤其应考虑过氧化氢对原材料储存袋的穿透性，以避免过氧化氢穿透及残留对原材料，尤其是细胞治疗产品产生影响。隔离器的一般要求请参考本分册无菌制剂部分“17屏障技术”。

自技术要求

隔离器应当合理设计，以有效防止与周围环境发生交叉污染。

细胞治疗产品所使用的隔离器的设计及应用取决于隔离器使用的性质，应根据细胞治疗产品的特性，设计隔离器的气流、压差、构造材料、环境、类型等。

在工艺中使用隔离器时，需根据使用特性和需求制定用户需求标准(URS)，目的是可靠地生产明确的产品，所有的URS都应在项目进程中被清晰地定义和及时归档。

实施指导

细胞治疗产品无菌用途隔离器的设备通常在正压下运行，在使用前需按规程有效进行去污染。 一般用于处理无菌物料的隔离器需遵循以下原则：

●隔离器内所有工作和物料的处理应经无菌手套控制操作完成，运行时不能有人

员或身体部位直接进入隔离器进行操作。

●所有进入隔离器的物料必须经去污染或灭菌，并且必须直接经过去污染或灭菌系统进入，或经过快速转移舱进入。

●去污染方式应经过验证。

A. 用于细胞治疗产品的隔离器组成

隔离器的总体分区应根据产品的工艺需要设置，建议包括但不限于传递舱、操作舱、观察舱、培养舱等功能舱体。如舱体可自由组合，各舱体间可采用快速转移接口(rapid transfer port,RTP)对接方式或双层气密封对接方式进行舱体对接。但需强调的是，密封圈是公认的隔离系统的潜在污染源。当两个RTP法兰连接形成一个密封的传递通道时，密封圈上仍可能存在微生物污染，对于在RTP 连接后外露出来的密封圈，应在RTP 连接后，物品通过传递前，及时用杀孢子剂处理，传递物品时仍需遵循无菌操作要求，传递的物品及操作手套均不能触碰到RTP的密封圈。

●传递舱

建议包含快速传递仓和瞬时灭菌通道。

- o 快速传递舱：主要用于细胞制备的物料及试剂(如一次性培养容器、移液管等)的传递。
- o 瞬时灭菌通道：主要用于冻存样品等小型样品(如细胞、细胞因子等对常温暴露时间有要求的样品)的灭菌通道。

●操作舱

建议根据工作需要，包括但不限于恒温制冷存储空间、恒温制冷操作平台、内置离心机、复温器等。

- o 恒温制冷存储平台：通常设置2~8℃和-20℃两个暂存区，用于存放缓冲液、消化液、培养基、细胞因子、质粒等。
- o 恒温制冷操作平台：通常为2~8℃的制冷平台，用于一些对温度敏感的试剂和细胞，如消化酶液和小批量细胞的分装等。
- o 内置离心机：通常设置低速水平离心机，通常用于细胞及试剂的离心。
- o 复温器：可设置恒温可调，用于培养基等试剂的预热复温工作。
- o 固废通道和吸液器。

●观察舱

内置倒置显微镜(装置)，用于观察细胞在接种后于培养容器中的分布、生长

情况，生产过程中观察细胞的生长密度用于判断是否收获或传代以及细胞计数观察等。

o 培养舱

内置细胞培养箱，宜内腔全密闭式设计，具备在线汽化过氧化氢去污染。

B. 在线环境监控和数据系统

隔离器应包含在线的悬浮粒子监测和在线浮游菌监测，可实时检测操作舱的操作环境，同时，应保证有足够气压、能源供应以及温湿度，并有相应的报警装置。应内置设备运行管理系统，具备电子签名、电子管理、视频操作记录等追溯功能。

C. 隔离器的维护和清洁

隔离器的清洁及维护可参考本分册无菌制剂部分“17屏障技术”。

5.6.2 自动化密闭设备

背景介绍

自动密闭化设备具有以下优点：

●减少了产品暴露风险和人员干预导致污染风险。

●白动化过程容易操作，全封闭，无需生物安全柜，避免了操作者与培养体系的直接接触，工艺转移和生产地址变更所需进行的可比性研究相对容易。

●自动化有助于改进检测过程和工艺验证，确保安全有效，质量可控。如贴壁细胞脱离培养瓶壁需要震荡摇晃，如果人工处理，很难保证操作的均一性。对于较大规模、商业化的生产而言，自动化的封闭式细胞处理系统是细胞洗涤和浓缩的更优选择。

技术要求

细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)

六、厂房、设施与设备

(三)宜采用密闭系统或设备进行细胞产品的生产操作；密闭系统或设备放置环境的洁净度级别可适当降低，应当定期检查密闭系统或设备的完整性。

在选择使用自动化封闭式处理系统时，应考虑以下因素：

●应着重考虑处理的产品类型，应根据自体细胞、异体细胞类型加以区分。

●在工艺要求方面，需重点考虑设备的最大、最小处理体积、活细胞百分比及最大、最小处理速率等。

●在设备整合方面，需重点考虑软、硬件的集成，尤其是管路耗材的兼容性等。

●工艺开发过程中，需重点评估人员的可操作性、工艺参数的稳定性、试剂耗材的成本及保持产品质量并满足监管要求等。

实流槽导

设备选择的考虑要点具体如下：

A. 细胞来源

细胞的来源可分为自体细胞和异体细胞，这两者对生产加工的核心需求是不同的，如细胞数量、活性和细胞浓度等，因此对设备的选择也不同。洗涤和浓缩的步骤可发生在细胞富集过程的初始步骤，也可应用于中间过程来改变介质或在制备结束时来浓缩细胞悬液，最后用于产品配方和灌装。

对自体细胞产品而言，设备的最小处理量和活细胞回收率的能力是重点考虑的因素。较低的活细胞回收比例会导致细胞治疗产品生产失败。而当制备浓缩的细胞悬浮液时，最小输出量也是制备能否顺利进行的关键。例如：当通过电穿孔法制备CAR-T 细胞产品时，细胞浓度需要保持在每毫升(40~300)×10^6个细胞。通常情况下，对于单采来说， 一个细胞洗涤装置需要能够将收集的产物浓缩至体积小于10ml，才能适用于电穿孔。

对异体细胞产品而言，最大处理量才是更重要的因素。主要考虑的是起始材料的输入体积范围。异体产品起始材料的体积最小可到50ml(如脐带血来源)，进行细胞扩大培养后体积最大可至1000L。所以对设备的体积处理量要求较高。

影响洗涤和浓缩设备选择的另一个关键因素是处理速度和时间。任何对细胞质量的负面影响(如剪切力)都可能会在下游设备处理中被放大。另外，转染、转导、酶消化或细胞分选等过程都会给细胞施加压力，使其对洗涤和浓缩的操作更加敏感，不易控制。

B. 可整合性

可整合性是自动化封闭式细胞治疗处理系统的核心价值。自动洗涤和浓缩设备作为加工链的一部分，是以模块化的方式与其他设备进行物理连接，这其中如何规划和评估设备的互相连接方式十分重要。

如果试剂是包装在袋子中的，则洗涤和浓缩装置的设置方式相对容易。因为包装袋可以和大多数设备兼容，在管道尺寸合适的情况下，通过尖刺的端口或者无菌焊接连接即可。但如果是采用了其他形式的包装，需要增加一个先将材料转移到袋子中的步骤，再进行无菌连接和洗涤浓缩。因此，如果转移不能实现无菌连接，自动化设备消除污染风险的价值将大大降低。理想状态下，浓缩后的产品也应该通过封闭设备转移到下游的流程中(如制剂和分装)。

C. 材 质

设备的材质选择也需要重点考虑，宜尽量选择耐清洁消毒的设备。

D. 软件集成

软件集成也是封闭式细胞处理系统的重要组成。集中的电子记录使操作可以自动化，能够取代批次间生产和质量控制的手动记录。此外，匹配的控制软件还可以扩展到应用同一集中式系统的多个设备上，这样可以控制所有连接的设备并提供实时反馈。

E. 工艺流程设计

工艺流程设计的目标是开发一种稳健的、可重复的工艺，同时保持产品质量，并满足监管要求。 一种稳定、合适的洗涤和浓缩工艺应该做到不因材料的变化改变其生产的稳定性。

要开发这样一种工艺，需要控制过程的关键工艺参数，重复的多变量分析有时是必不可少的。例如：基于离心过程的关键过程参数可能包括流量速度、离心速度和沉降时间。优化这些参数时，应考虑工艺参数与产品质量之间的关系，以确保制造工艺适合规模化生产。

实例分析

实例1:细胞分离系统示例

某细胞分离系统，是一种全封闭、高度自动化的细胞分离设备，可通过预设的工艺程序，实现单核细胞的分离、骨髓干细胞的分离、脐带血干细胞的分离、脂肪干细胞的分离、细胞复苏、细胞浓缩洗涤、细胞分装等，密闭系统减少了交叉污染，全自动操作可降低批次间差异，使人工干预最小化。该细胞分离系统处理过程中，将活塞式离心桶放入机器的离心单元中，与封闭的无菌管路连接，通过气动装置、称重传感器等，将样品导入活塞式离心桶中，在离心的作用下实现不同组分的梯度分离，然后通过推动活塞，在旋转三通阀的配合下，将桶内的液体导出到不同的储液袋及细胞收集袋中。

以单核细胞分离为例，离心桶中血液在细胞分离液及梯度离心的作用下，由内至外依次被分为血浆层、单核细胞层、淋巴分离液层和红细胞层，通过活塞的上下移动，改变离心桶内的体积，控制液体进出。

实例2:封闭式细胞处理系统示例

某系统由一台小巧的多功能主机、 一次性使用无菌套件，以及直观、可视化、可定制程序的软件组成。共同构成了一个封闭式细胞处理系统，可以高效、灵活地进行细胞的分离、浓缩、洗涤、缓冲液置换和冻存。

●该系统使用逆流离心技术，细胞输入口设置在离心室内。

●可连续处理范围广泛的输入体积，输出体积可低至5ml,高浓度的输出产物中仅包含极少量缓冲液或溶液残留，适用于电转以及自体细胞产品的商业化生产。

●能够清洗和浓缩小于50ml的细胞样品，处理时间小于15分钟，且能够维持细胞活率最高可达100%。

●在细胞的处理过程中还可以同步去除红细胞等干扰，减少操作步骤。

●温和的流化床可实现低剪切力处理，能够在保持细胞活性和高速度的同时实现超过95%的细胞回收率。

●系统还配有摄像头，提供实时的可视化信息，便于随时观察和调整，便于工艺流程优化。

●通过可定制的自动化程序软件，该系统可以进行模块化的改装，按照需求定制生产的流程。

5.6.3生物安全柜

细胞治疗产品生产过程中会使用到很多的生物安全柜，特别是在无菌生产工艺中使用生物安全柜提供无菌生产环境，需要注意以下事项：

●生物安全柜的选型需要考虑到排风的设计，对于一个房间有多个生物安全柜的，不建议直接排风到洁净室内部。

●需要掌握生物安全柜的原理、功能、操作、清洁和维护，以及生物安全柜的降风速和面风速的区别。

0生物安全柜内部的单向流系统在其工作区域必须均匀送风，应当有数据证明单向流的状态并经过验证。

●生物安全柜由于其特殊的设计，其风速有可能无法满足A 级环境风速为0.36~0.54m/s(指导值),此时可以考虑采取必要的措施证明无菌操作的可靠性，如气流模型等。

5.6.4细胞培养设备

A. 静置培养设备

传统方法使用透气培养袋或透气培养瓶在二氧化碳培养箱中培养，形成稳定的温度、湿度和二氧化碳浓度，在细胞治疗领域，常见的培养箱具有多种不同的腔体体积、灭菌方式等可供选择。

B. 生物反应器

近年来，波浪生物反应器以其低剪切力，可高密度灌流培养等特点被广泛应用于细胞治疗产品的培养，其主要特点如下：

o 摇动培养平台，可扩展、灌流培养，实现更高的细胞密度数量级。

0密闭体系，通过无菌结合方式链接上、下游细胞处理系统。

●自动化操作效率高，降低因患者细胞个体差异导致的操作可变性。

o 软件实时监控记录生产过程，便于数据追溯。

6 物料

本章主要内容：

ET 细胞治疗产品如何进行物料风险等级评估

物料管理方面存在哪些风险

T 有哪些降低物料风险的措施

背景介绍

对于物料的定义以及类型，在国内以及国际所颁布的规范、指导原则、指南中有不同的描述，以下部分摘录供参考：

●GMP: 物料指原料、辅料和包装材料。

●2020年版《中国药典》三部生物制品生产用原材料及辅料质量控制生物制品生产用原材料系指生物制品生产过程中使用的所有生物原材料和化学原材料。生产用辅料系指生物制品配方中所使用的辅助材料，如佐剂、稳定剂、赋形剂等。

·2020年版《中国药典》三部人用基因治疗制品总论用于基因治疗制品生产的起始原材料主要包括生产用细胞、细菌或病毒种子。

●《细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)》:供者材料指从符合筛查标准的供者获得的用于细胞产品生产的细胞或组织等。

●《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》:生产用物料系指免疫细胞治疗产品生产过程中使用的所有原材料、辅料和耗材等。原材料包括起始原材料(如生产用细胞、生产辅助细胞、体外基因修饰系统)和其他原材料(如培养基、添加因子、其他生化试剂等)。生产用细胞来源包括人体供者来源(自体细胞、同种异体细胞)和人源细胞系来源，生产辅助细胞根据用途或功能，可能为病毒包装细胞、滋养细胞等。

·*EMA 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(《关 于ATMP 生产用基因递送物料所用生物来源起始物料生产的GMP 原则问答》):对于基因修饰细胞，起始物料应为获得基因修饰后细胞所用的成分，如生产载体的起始物料、载体和人体或动物细胞。

图6-1中包括了细胞治疗产品可能会使用到的一些物料，如细胞、基因转导与修饰系统、辅料、内包装材料、其他生产用材料，其中涉及的细胞库、菌库、辅料、内包装材料、其他生产用材料(如培养基、 一次性使用技术、酶、生物源性材料)等物料的管理，与其他生物制品相关物料的管理类似，因此本章节不再对这些物料的管理进行描述，而重点描述细胞治疗产品中供者材料、基因转导与修饰系统(如质粒、病毒载体)的相关风险、控制措施，以及细胞治疗产品物料管理中一些特殊的策略。

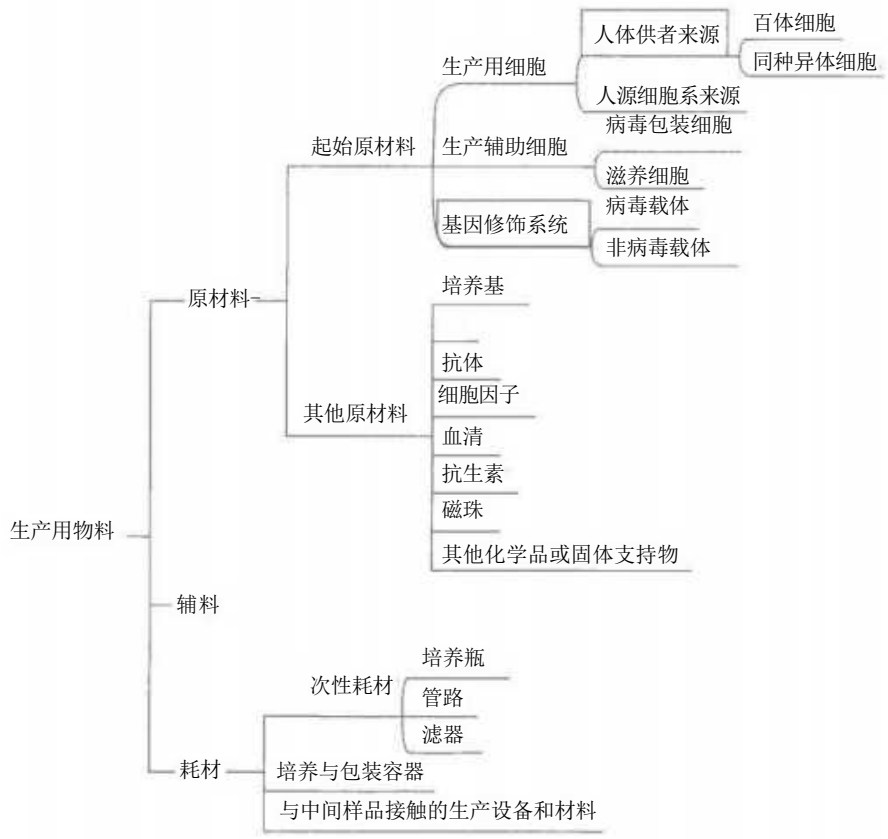


图6-1 细胞治疗产品物料类型树状图

注：以上树状图根据《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》绘制，方框内为本章节重点描述的内容。

此外，本章节所描述的内容仅包括生产过程中所使用的物料，对于生产过程非直接相关物料以及检测相关物料、试剂，不包括在本章节内。

本章节将重点介绍物料风险等级评估、物料风险识别和降低风险的措施。

6.1物料风险等级评估

对物料风险等级进行合理的评估是做好物料管理的前提。《中国药典》三部生物制品生产用原材料及辅料质量控制中，根据原材料的来源、生产以及对生物制品潜在的毒性和外源因子污染风险等，将生物制品生产用原材料按风险级别从低到高分为四级，不同风险等级生物制品生产用原材料应进行适宜的质量控制。细胞治疗产品相关的物料可以参考这一分级进行控制，但是需要根据细胞治疗产品特点，通过物料对产品质量属性的影响程度，对其进行适宜的分级并采取相应的控制措施。

A. 关键物料属性(CMA)　评 估

在进行关键物料属性评估时，需要确定哪些物料对产品关键质量属性有影响，并对影响程度进行分级，其分级通常可分为三级，也可以根据实际情况将影响程度分成不同的等级(表6-1)。

表6-1　物料对产品关键质量属性的影响程度分级示例

影响	标准	物料等级
高	物料属性的微小或中等变化对CQA造成显著影响	关键物料
中	物料属性大的变化或小的变化累加其他因素会对CQA造成显著影响	潜在关键物料
低	物料属性对CQA没有影响	非关键物料

〔实例分析〕提供了以胎牛血清 (FBS) 为例进行影响程度分级的示例。

B. 物料风险等级评估

除了上述的CMA 评估方法，通过对CQA的影响程度来确定物料的级别之外，亦可通过以下因素来考虑或确定物料的风险级别：

●是否为主要营养物质来源(如培养基)或冻存保护剂。

●是否与产品杂质去除、活性处理有关(如层析填料、线性化酶等)。

●是否与除菌过滤后产品直接接触(如盛装除菌过滤后料液的容器或是内包材)。

o 是否为终产品的主要组成部分(如辅料)。

o 是否会影响A 级洁净环境(如擦拭A 级洁净区的无菌布)。

o 是否是动物来源。

此外，在进行细胞治疗产品生产过程中，需要根据产品特点选择适宜级别的物料，根据中国食品药品检定研究院于2018年发布的《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》,在进行原材料和辅料的选择时，可采用以下原则：

●药用无菌制剂优于药用制剂，尤其是对于那些不经过除菌过滤而又参与到关键生产步骤的成分(如人血白蛋白),需要考虑采用无菌制剂。

●药用级原辅料优于非药用级原辅料。

●GMP 级优于非GMP 级原辅料。

●非动物源性优于动物源性原辅料。

上述提到的GMP 级物料，业界目前尚无明确的定义或是标准。为了使得细胞治疗产品生产商能够选择适宜级别的物料，以下列举出一些GMP 级别物料所需要具备的基本要素供参考：

●遵循GMP 的原则，最大限度降低制备环节污染、交叉污染、混淆和差错的风险。

●人员

人员经过适宜的培训并记录。

0人员健康状态能够满足生产需要。

●设备

0设备处于良好状态并能满足预期需求(经过计量或是确认)。

仪器仪表经过计量或是适宜的方式能够确保显示数值的准确性：

对设备进行了良好的维护保养。

●质量体系

建立了偏差或是异常事件处理流程。

3建立了变更控制流程，对变更进行分级管理，并且明确对于影响产品质量的变更将会通知客户。

建立了客户投诉流程。

0建立了超标(out-of-specification,00S) 或是不合格数据调查流程。

0建立了文件管理流程。

a建立了培训管理流程。

●物料

o 建立了原材料供应商管理流程。

o建立了原材料取样、检测及放行流程。

o 对必要的生产原材料进行留样。

o 对物料或是产品相关TSE/BSE进行了适宜的管控(若适用)。

●厂房设施设备

o产品在适宜的环境条件下进行生产，并对环境进行相应的控制。

o 对生产区域进行清洁或消毒，满足产品生产需求。

o生产区域有适宜的人员、物料流向控制措施。

o设置了足够的生产、检测、仓储区域。

●检测

o 建立了相应的流程进行产品检测。

o 对检验过程进行了记录。

o建立了产品留样管理制度。

o 对产品有效期或是复测期进行了研究。

●*生产*

o有适宜的微生物、细菌内毒素控制措施(若适用)。

o有适宜的无菌保证措施(若适用)。

o有适宜的杂质控制措施(若适用)。

o若是共用生产线，采取了足够的措施避免交叉污染。

o 对生产过程进行了记录。

o 建立了批号管理流程。

实例分析

实例1：以胎牛血清(FBS)　为例进行影响程度分级的示例

以下使用FBS 为例介绍如何进行影响程度分级(表6-2)。

上述评估表显示，FBS 对产品多项CQA 产生影响，因此被定义为高风险物料。

表6-2 FBS 对产品CQA 的影响程度示例

物料	CQAs									理由
	安全		鉴别		效力	纯度			效价	
	源因子	支原体	CD44	CD151	细胞浓度	残留FBS	成纤维细胞污染	死亡细胞		
FBS	关键物料	关键物料	关键物料	关键物料	关键物料	非关键物料	关键物料	关键物料	关键物料	FBS是动物来源物料，存在引入外源因子的可能，培养基中存在FBS对细胞的表型有直接的影响，对它们的增殖能力和活力，高浓度的FBS能促进成纤维细胞的增殖

注：关键物料——对CQA有严重影响；潜在关键物料——对CQA有中等程度影响；非关键物料——对CQA无影响

实例2:以甘油为例说明物料风险评级过程

以质粒载体建库过程中使用到的甘油举例说明物料风险评级过程(表6-3)

表6-3 甘油风险级别评估示例

物料名称	甘油	物料代码	××××
申请部门	生产部	物料用途	大肠埃希菌工作种子库保护剂
序号	项 目	风险等级	
1	是否是辅料	□是→高风险 ☑否→转2	
2	是否是内包材	□是→高风险 ☑否→转3	
3	是否是动物来源	□是→高风险 ☑否→转4	
4	是否会影响A级环境	□是→高风险 ☑否→转5	
5	是否与除菌过滤后产品直接接触	□是→高风险 ☑否→转6	

续表

物料名称	甘油	物料代码	xxxx
申请部门	生产部	物料用途	大肠埃希菌工作种子库保护剂
序号	项 目	风险等级	
6	是否为主要营养物质来源或是产品冻存保护剂	口是→中风险 ☑否→转7	
7	是否与产品杂质去除、活性处理有关	口是→中风险 ☑否→转8	
8	是否为终产品的主要组成成分	☑是→中风险 口否→低风险	
物料风险等级	口高风险 ☑中风险 口低风险		

6.2物料管理方面的风险

A. 基因转导与修饰系统(如质粒、病毒载体)

直接或间接用于细胞治疗产品生产的基因转导与修饰系统，如质粒、病毒载体，亦会对细胞治疗产品质量产生影响。此外，这些载体在细胞治疗产品中定位多样性，如质粒既可以作为载体用于病毒载体CAR-T 产品的生产中，也可以做为载体用于非病毒载体CAR-T 产品生产中。对于不同定位的载体，若是未能执行适宜的质量管理，则会给载体质量带来风险。

B. 物料取样、放行

细胞治疗产品是一个新兴的产品，发展时间较短，生产所需的物料存在供应商少、规格少、可选择级别少、价格昂贵、检验方法特殊等特点，为此，在物料取样、放行方面存在一些有别于其他药品物料的特点，细胞治疗产品物料在取样、放行方面的风险包括：

●患者需要尽快使用产品，细胞治疗产品需要尽快生产，但是在产品生产之前物料未能完成所有检测及放行，不能确定物料质量属性是否满足产品生产需要。

●物料供应商少，部分物料只有研究级别可以使用。

●物料价格昂贵且包装形式不能满足个性化细胞治疗产品生产的需要，难以确定物料取样、留样量。

6.3降低风险的措施

6.3.1 基因转导与修饰系统

本小节描述的基因转导与修饰系统指质粒、病毒载体等，以下简称载体。

实施指导

A. 载体的定义、定位

载体是细胞治疗产品中关键的物料，其工艺稳定性、质量可控性可影响细胞产品的安全性和有效性。以下为不同的国家的法规、指南对载体的定义、定位，企业应根据产品特点对载体进行适当的定位，采取适宜的质量管理。

●《细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)》

直接用于细胞产品生产的基因修饰载体或其他赋予其特定功能的材料(如病毒、质粒、RNA、抗原肽、抗原蛋白、蛋白质-RNA 复合物等)的生产、检验和放行等过程应符合《药品生产质量管理规范》及其相关附录的要求。

●*PIC/S GMP Guide Annex 2A: Manufacture of Advanced Therapy Medicinal* Products for Human Use(《附录2A: 人用先进治疗产品生产》)

该附录给出了附录适用范围的示例，并指出，在ATMP活性物质生产的早期到后期中，GMP 要求水平是增加的(表6-4)。

表6-4 PIC/S对ATMP 生产的要求

示例产品	本附录的应用			
基因治疗：mRNA	线性DNA模板制备	体外无细胞转录	mRNA纯化	配制、灌装
基因治疗：体内病毒载体	质粒生产	建立MCB和WCB²	载体生产和纯化	配制、灌装
基因治疗：体内非病毒载体(裸DNA、脂质体、多聚体等)	质粒生产	建立细菌库	发酵和纯化	配制、灌装

续表

示例产品	本附录的应用			
基因治疗：离体基因修饰细胞	起始组织/细胞的捐赠、采购和检验	质粒生产 载体生产	细胞离体遗传修饰	配制、灌装
体细胞治疗	起始组织/细胞的捐赠、采购和检验	MCB、WCB或原代细胞批或细胞库的建立	细胞分离、培养纯化、与非细胞成分的组合	配制、组合、灌装
组织工程产品	起始组织/细胞的捐赠、采购和检验	初步加工、分离和纯化、建立MCB、WCB、原代细胞批次或细胞库	细胞分离、培养、纯化、与非细胞成分的组合	配制、组合灌装

注：1.附录适用于深灰色部分的生产步骤。附录或附录的原则是否适用于浅灰色的步骤取决于相应成员国的立法要求。

2.对于基因治疗离体基因修饰细胞，附录适用于载体生产，除非成员国法律另有授权，否则应适用GMP原则。

●*EMA 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(《关于ATMP生产用基因递送物料所用生物来源起始物料生产的GMP原则问答》)

在ATMP生产中用于转移基因物料的一些生物来源的起始物料，如体外转录至mRNA时用作模板的线性DNA，生成病毒载体和(或)mRNA的质粒以及载体仍然必须符合GMP原则。

在该问答中，EMA使用表6-5展示了质粒、病毒的定位以及所需符合的GMP要求。

表6-5 EMA对ATMP生产中GMP原则及GMP应用的示例

示例产品	起始物料-活性成分-成品			
体内基因治疗：mRNA	质粒生产及线性化	体外转录	mRNA生产及纯化	配制、灌装
体内基因治疗：非病毒载体(如裸质粒)	质粒生产	细菌库的建立(MCB,WCB)	DNA生产发酵及纯化	配制、灌装
体内基因治疗：病毒载体	质粒生产	细胞库(MCB，WCB)以及病毒种子的建立(若适用)	载体生产及纯化	配制、灌装

续表

示例产品	起始物料-活性成分-成品				
离体：基因修饰细胞	组织/细胞的捐赠，采购及测试	质粒、病毒载体以及毒种扩增所需要的细胞库(MCB、WCB)的建立	质粒生产，载体生产	基因修饰细胞生产	配制、灌装

注：加下划线的是AMTP起始物料，粗体字的是ATMP活性成分；通过电子和分子生物学方法构建质粒发生在质粒生产之前，被认为是研究和开发，因此不在本次问答范围内。

深灰色显示的生产步骤采用GMP，浅灰色显示的生产步骤采用GMP原则

●*FDA Considerations for the Development of Chimeric Antigen Receptor(CAR)T* Cell Products(《CAR-T细胞产品开发过程的考虑点》)

III.CAR-T 细胞设计及开发的通用考虑

B.载体

载体是由生物材料组成或起源的运送工具，旨在传递遗传物质。载体包括质粒、病毒和细菌，它们已经被改造以传递遗传物质。对于CAR-T 细胞来说，载体是提供治疗疾病的药理活性的关键组成成分。

IV.CMC 推荐

我们建议申办者以通用技术文件(CTD) 的格式组织信息，将载体CMC 信息描述在一个完整的原液(DS) 部分，将CAR-T 细胞信息组织在一个单独的DS部分和一个单独的制剂(DP) 部分，如GT-CMC 指南第IV.B 节中所讨论的。

CAR-T 细胞和载体应在与开发阶段相适宜的GMP 条件下制造。

B. 载体的质量管理

对于细胞治疗产品生产使用的基因修饰载体，企业可以向供应商采购或是委托供应商进行生产，也可以自行生产，无论采取何种方式获得载体，企业都应该采取足够的质量管理措施，以保证载体质量。以下分别对外购/委托生产载体以及自行生产载体需要关注的要点进行介绍。

a.外购/委托生产载体

企业应通过供应商资质确认(如问卷调查、入厂测试等)定期评估载体生产商是否应用了GMP原则。

以下对供应商管理中现场审计、问卷调查、质量协议(QAA) 签署方面的关键

点进行介绍。

●现场审计

除遵循常规的GMP 审计要点之外，以下内容需要重点关注：

0传染性海绵状脑病 (transmissible spongiform encephalopathy,TSE)控制。

0病毒污染和与其他载体或其他基因物质交叉污染的可能性。

o 复制能力强的病毒(在复制缺陷病毒载体的情况下)应证明在所使用的病毒生产系统水平上没有形成具有复制能力的病毒。

0微生物(如支原体)或细菌内毒素/热原污染的可能性。

o 源于原材料的任何潜在杂质，或作为工艺的一部分而产生并残留的任何潜在杂质。

0若为无菌产品，则无菌保证的能力是否足够。

0在没有专用设备和(或)设施的情况下，其他过程中携带的任何杂质的可能性，如残余DNA(抗生素抗性基因、潜在致瘤细胞系的残余DNA等)、动物源性物质、抗生素等。

o 环境控制和贮存/运输条件，包括冷链管理(如适用)。

o 若为共线生产，是否进行过相应的风险评估以及相应的检测，以证明交叉污染的风险水平可接受。

o 对于特殊病毒产品，需要考虑相关的生产、质量人员是否需要接种疫苗，避免所生产的产品对生产、质量人员身体造成影响。

●质量保证协议

企业需要与生产过程中的物料供应商签订质量协议，而质粒、病毒作为其中的关键原材料，质量协议显得更加重要，企业需要根据质粒、病毒对成品质量、安全性和有效性的潜在影响的程度来确定要求的范围，其中应包括质量管理体系、文件、原材料、细胞库、生产、质量标准、检测和控制、贮存以及处理和运输等其他方面。如果质粒、病毒是作为直接用于细胞产品生产的基因修饰载体或其他起始生物材料，企业还需要根据协议的要求介入到供应商的质量管理活动中，如偏差、变更、00S等方面的管理。

如果载体是从不同的供应商处采购的，则企业需和不同的供应商签订好质量协议，明确相应的责任及义务。此外，企业需要在质量协议中与载体供应商明确，需要供应商配合接受药监部门的延伸检查。

以下为QAA 中需重点关注的双方的责任。

质粒、病毒载体供应商的责任包括但不限于：

配置足够的生产、质量人员，按照既定的制造、检定规程进行生产、检测。

当重大、主要变更/偏差发生时通知企业。

当确定的00S发生时以及样品复测前通知企业。

对共线生产风险进行评估。

物料放行。

产品出厂放行。

履行技术转移转出方的职责(人员、厂房设施设备、物料等方面差距分析)(涉及技术转移时)。

配合接受客户审计以及药监部门延伸检查。

企业的责任包括但不限于：

批准工艺规程、质量标准、稳定性考察方案等文件。

o 批准变更、偏差、0OS。

3产品最终放行。

0履行技术转移接收方的职责(分析方法、工艺、知识转出)(涉及技术转移时)。

以上仅描述协议双方一部分的责任及义务，双方其他的责任及义务可以结合质粒、病毒在细胞治疗产品的定位并参考《药品委托生产质量协议指南(2020年版)》中的《药品委托生产质量协议模板(2020年版)》进行制定。

b. 白行生产载体

若是细胞治疗产品拥有者白行生产载体，则同样需要执行适宜的GMP 原则(与上述载体供应商执行的GMP 原则相同)。此外，对于质粒、病毒生产过程中所使用到的物料，应根据质粒、病毒产品定位以及物料所处产品生产阶段等因素，选择合适的级别。物料级别选择需考虑：

●若质粒是作为细胞治疗产品的原材料(质粒是病毒生产的原材料，而病毒是直接用于细胞产品生产的基因修饰载体，那么质粒可视为细胞产品的原材料)，则建议在纯化之后所使用的物料为药用级或GMP 级别(若有)；若质粒是直接用于细胞产品生产的基因修饰载体，则发酵、纯化及后续工序过程所使用的物料需为药用级或GMP 级别(若有)，若是没有药用级或是GMP级别，则需选择适宜级别的物料，同时进行风险评估，尤其是安全性方面的风险，参照GMP 对物料进行管理。

●病毒载体是直接用于细胞治疗产品生产的基因修饰载体，生产过程用到的物料需为药用级或GMP 级别(若有)，若是没有药用级或是GMP级别，则需选择适宜级

别的物料，同时进行风险评估，尤其是安全性方面的风险，并参照GMP 对物料进行管理。

c.临床生产阶段与商业化生产阶段的差异点

质粒和病毒载体可应用于产品生命周期中的不同阶段，企业可根据阶段不同而采用相适应的质量管理策略。总体来说，临床阶段重点关注产品安全性，上市后生产阶段，除了关注产品安全性、有效性以及质量可控性之外，还需要保证工艺、方法的一致性、稳健性。

以下对应用于不同阶段的载体，其质量管理要素执行的差异点进行举例，企业根据产品特点进行风险评估，确定在不同阶段所需进行适宜的质量管控(表6-6)。

表6-6 不同应用阶段的质粒、病毒载体质量管控差异点

阶段 / 质量管理要素	临床生产阶段	商业化生产阶段
生产环境	洁净区，独立生产区域	洁净区，独立生产区域
环境监测	按照指南或法规要求定期执行	按照指南或法规要求定期执行
人员培训	良好的数据和记录管理规范培训(GDRP)+临床GMP培训	良好的数据和记录管理规范培训(GDRP)+GMP培训
物料放行(包括生产过程中使用的原材料及耗材)	中、低风险物料：COA放行 高风险物料：COA放行+人厂检测放行	低风险物料：COA放行 中风险物料：COA+入厂检测放行 高风险物料：按照企业内控质量标准全检
产品放行	●批生产记录审核 偏差、变更、OOS审核 ●环境监测数据审核 ·物料放行审核 ●批检验记录审核 ●审计追踪记录抽查 ·公用系统监测数据抽查	·批生产记录审核 ·偏差、变更、OOS审核 ·环境监测数据审核 ·物料放行审核 ·审计追踪记录审核 ·公用系统监测数据审核 ·稳定性考察数据审核
生产记录	QA批准发放、管理	QA批准发放、管理
过程监控	对批生产过程关键步骤进行检查	对批生产过程全过程进行检查
偏差、变更、OOS等质量事件	按照书面的偏差、变更、OOS等质量事件处理流程进行处理	按照书面的偏差、变更、OOS等质量事件处理流程进行处理，调查的深度、范围强于临床生产阶段

续表

阶段 质量管理要素	临床生产阶段	商业化生产阶段
厂房设施/设备确认	设备至少进行IQ、OQ,公用系统进行IQ、OQ、PQ	按照GMP要求进行DQ、IQ、OQ、PQ
工艺确认/验证	●进行灭菌工艺验证 ●进行无菌工艺模拟试验	·进行灭菌工艺验证 ·进行无菌工艺模拟试验 ●进行产品工艺验证 ●进行产品持续工艺确认
分析方法确认/验证	分析方法确认	分析方法验证
清洁确认/验证	清洁确认(对淋洗水进行取样，检测TOC、微生物限度、电导率等)	清洁验证(对清洁验证相关的分析方法进行验证，执行取样回收率试验)
运输	·运输过程中温度监控探头，并保存运输记录 ·静态运输确认(模拟试验)	·运输过程中温度监控探头，并保存运输记录 ·动态运输验证(根据实际运输路线进行运输验证)

实例分析

TSE/BSE 控制是载体生产过程中需要重点关注的风险，企业应尽可能采用无动物源的物料进行生产从而避免这一风险。如果细胞治疗产品生产企业外购或是委托生产获得载体，则需要供应商提供载体的TSE/BSE声明。表6~7中的TSE/BSE 声明示例供参考。

表6-7 TSE/BSE 声明示例

TSE/BSE声明

敬启者：

产品名称：

生产批号：

我们 在此保证，我们生产的上述产品符合以下几点：

无动物源成分。

没有源自或暴露于受检疫的动物的物质，用于传播动物海绵状脑病/牛海绵状脑病。

我们的制造工厂所使用的设备没有动物(或)动物产品(或)动物副产品(或)兽医疫苗(或)动物病原体。

QA审核人/日期：

QA负责人/日期：

6.3.2物料取样、放行管理

鉴于细胞治疗产品特点，其生产过程中使用到的物料在取样、放行方面存在一些有别于其他药品物料相关的风险。以下描述了对于这些风险所建议采取的控制措施或控制风险的思路。

A. 取样管理和检测项目

●取样操作的具体要求详见本丛书《质量控制实验室与物料系统》分册相关内容。

●完成取样后，至少需要等到鉴别检测完成后才可以用于生产。

●细胞治疗产品所用物料需要按照《中国药典》三部生物制品生产用原材料及辅料质量控制要求，确定适宜的检测项目，对于检测项目中缺少鉴别项的物料，可以使用如核对配方号或是物料号等方式对物料进行确认，防止物料的混淆。

B. 放行策略

·供者材料以及其他物料的限制性放行(终产品放行前完成完全放行):对于一些个性化治疗的细胞治疗产品，患者对产品的需求迫切，因此存在产品在生产之前物料尚未完成全部检验的情况。在这样的情况下，企业可以经过充分的风险评估，采取适当的控制措施后，对供者材料或是其他物料进行限制性放行，用于产品的生产，并在产品放行前完成这些物料的检测及放行。若后期发现物料检验不合格，应评估对产品的影响，只有确认对产品质量无影响时方可放行产品。限制性放行应有书面的控制程序。

●对于研究级别的物料，企业应充分了解使用研究级原料的风险，通过检测的方法，如功能测试、安全性实验，确认这些原材料的适用性，只有满足生产需求的研发级别物料才能放行，以用于产品的生产。

7 质量控制

本章主要内容：

细胞治疗产品如何进行产品的取样

产品检验的注意事项

了产品放行的注意事项

E 如何进行留样

E产品进行稳定性考察的要点

E 环境控制的要求

细胞治疗产品从供者材料采集、运输、接收、生产、检验、放行、成品运输和使用均应进行全过程控制，考虑到细胞产品的特殊性，本章节侧重指导细胞治疗产品特殊的质量控制要求。

主要内容包括：取样管理、产品检验、产品放行、留样管理、稳定性考察管理和环境控制。

7.1取样管理

背景介绍

细胞治疗产品的生产工艺和产品存在较多特殊性，应结合产品及工艺流程的风险点设计细胞治疗产品的取样方案，确保能够使用合适的、具有代表性的样品对产品的关键质量属性进行控制，以确保产品质量。本节主要讨论因细胞治疗产品的基本特征和特殊性、相关取样操作的技术要求及考虑点。

导

A. 技术特点

●细胞治疗产品的主要成分为细胞，属于“活的药物”,无法进行最终灭菌、除菌过滤、微生物去除/灭活等操作，发生污染和交叉污染的风险较高。

●细胞治疗产品的生产工艺涉及细胞分选、转导、清洗等多种工序，不同工序的细胞组分及特性存在明显的差别，非单一细胞库的直接增殖。

●细胞治疗产品的个性化程度较高，且细胞对温度环境较为敏感，对于取样操作及取样后的样品处理及保存要求较高。

●对于自体细胞治疗产品，对取样及检验的时效性要求较高， 一方面由于其为定制生产，患者情况决定了制备及检验过程的时限要求；另一方面细胞样品本身的常温保存时限较短，也对检验时效性有较高要求。

●自体细胞治疗产品生产批量较小，以满足自体回输剂量为目的进行生产及制剂，难以获得大批量的产品/样品用于检验及留样。

●对于自体细胞治疗产品，存在多批次同步同阶段生产的情况，发生混淆及差错的风险较高，且发生混淆的后果严重。

B. 取样策略

细胞治疗产品的取样策略需要根据取样目的、法规要求，结合产品及生产工艺特点(如采用连续生产工艺、单元化生产工艺等)制定详细、完整的取样计划：

●细胞治疗产品的取样策略应满足产品质量标准检测项目及检验方法的要求，以确保使用合适的取样样品用于检验。如无菌检查、细菌内毒素检查等，原则上应尽可能在最终产品制剂后进行取样检测，以满足法规要求。

●原则上细胞治疗产品应尽可能使用最终细胞产品进行放行检测，但对于自体细胞治疗产品，考虑到生产批量较小，细胞产量有限，且检验时效性要求较高，可考虑结合生产工艺过程设计取样点，并经过充分的风险评估及必要的质量研究，证实在合适的工序下进行取样的样品，能够反映终产品的特点，以达到产品质量控制的目的。

●应结合检验方法及产品/工艺特点制定适宜的取样量，并需满足法规要求。考虑到细胞治疗产品的特点，无菌检查取样量应结合产品批量、规格及检查方法等制定取样策略，必要时可参考国内外法规，如 EP 2.6.27 Microbiological Examination of

Cell-Based Preparations(《细胞制剂的微生物检验》)等。同时，对于取样量有限的场景，在条件许可的情况下，可考虑采用小样本量的检测方法进行检验，如开发使用荧光定量PCR 等高灵敏、低样本量的检验方法等。

●对于细胞治疗产品的注册检验样本的取样，考虑到工艺及其质量放行检验的特殊性，应依照《药品注册检验工作程序和技术要求规范(试行)》中的规定，结合工艺特点，以最适样本为原则，选择来源于过程控制样本或终产品样本等制定取样策略。

C. 取样要求

可参考无菌药品通用的取样流程进行取样，对于细胞治疗产品，重点的取样要求如下：

●为了避免发生污染，生产过程中取样需在满足生产操作环境的洁净度级别的要求下，以最大限度地降低污染及交叉污染的风险。

●对于取样样品，应具有清晰、明确的标识并可追溯，以避免发生混淆，包括同一生产批次不同取样样品间的混淆、批次间样品的混淆等。

●取样操作过程中，需要结合产品及工艺特点，选择适宜的取样器具及样品容器进行取样，且取样操作及取样后的样品处理、保存及检验应符合相应样品的保存条件的要求。建议考虑密闭体系的取样方式，同时取样方式需评估样品代表性，合理排除死体积等因素的干扰。

实例分析

对于某自体CAR-T 细胞治疗产品，其生产工艺包括细胞分选、细胞转导、细胞扩增、细胞收获及制剂等步骤，其最终产品装量(剂量)为按CAR-T/kg 患者体重计算。该产品生产过程中，结合生产工艺特点，在生产收获日的多个步骤分别取样及检验，用于产品放行。

在收获日细胞扩增结束阶段，取细胞混悬液样本进行支原体检查。该取样步骤为支原体检查的最适样本，可以确保最大限度地检测到潜在的支原体污染。

在收获日扩增阶段后，产品经过清洗步骤，在清洗后进行工艺相关杂质残留情况的取样检验。

在收获日制剂后、冻存前，取样进行细菌内毒素、无菌检查等项目的检验，以确保产品制剂后的成品符合无菌药品的要求。

7.2产品检验

导

A. 检验项目

参考《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》,免疫细胞治疗产品的检验项目一般包括鉴别、生物学活性、纯度、杂质、转基因拷贝数(如适用)、细胞数量(活细胞数、功能细胞数/比例等)和一般检测(如pH、渗透压、无菌、支原体、细菌内毒素、外观、明显可见异物等)等。

B. 检验方法

应充分结合细胞治疗产品的特点选择检验方法，并参考《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》《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)》《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》等适用的法规、指导原则及技术考虑要点等，并完成方法学验证或确认，用于产品检验。

对于自体细胞治疗产品，其生产工艺及产品特点存在较高的特殊性，在检验方法的选择上需考虑：

●自体细胞治疗产品为单人单批次定制生产，由于其临床使用场景极具特殊性，对产品检验放行的时效性要求极高。

●自体细胞治疗产品的生产批量较小，为了满足生产工艺、产品取样及留样的需求，检验方法可考虑选择样品检验量较小、灵敏度较高的方法，并进行充分的方法学验证，用于产品检验。

●细胞治疗产品的个性化程度较高，患者间差异大，检验结果的波动性可能较大。因此应充分考虑到产品特点选择检验方法并完成方法学验证，以确保检验结果的可靠性及对产品质量的代表性。

·自体细胞治疗产品存在多批次同步生产或检验的情况，检验方法及检验流程中应重点关注样品及结果的可追溯性，避免发生混淆，包括同一生产批次不同阶段取样检验的混淆、不同批次间取样检验的混淆等。

C. 产品安全性检查

对于无菌检查、支原体检查等方法，依据《中国药典》中相应检查法的规定，使用传统方法难以满足免疫细胞治疗产品的检验样品量有限、快速放行等的检验需求。对于免疫细胞治疗产品，尤其是自体细胞治疗产品，可考虑开发快速检测方法，并进行充分的方法学验证及与药典传统方法的比对验证，证明快速方法的应用优于或等同于药典传统方法，可替代传统方法。

●快速无菌检查

细胞治疗产品有别于传统的无菌药品，存在工艺差异性大、产量少、效期短、临床需求紧迫等特殊性，需要对成品进行快速检测放行，而现有的药典无菌检查法难以适用。可采用快速无菌检查方法来替代药典的无菌检查法，并验证其适用性，以基于风险的方法，确认产品微生物质量可接受度，以确保成品不会对患者构成微生物风险。

目前细胞治疗产品主要应用的替代快速方法主要采用基于细菌、真菌生长的原理，其中检测微生物呼吸信号的方法为目前最常见的类型，包括但不限于基于二氧化碳底物显色的检测技术、基于荧光增强显示的检测技术、基于气压感应的检测技术等，相关方法利用微生物在生长过程中所累积的产物(如CO_2 等)或引起气压的变化(如代谢产生或消耗气体等),仪器通过对感应器的持续监测绘制信号曲线，并通过相应算法分析样品是否发生微生物污染。

快速无菌检查方法的开发和验证可参考以下文件：

02020年版《中国药典》指导原则9201药品微生物检验替代方法验证指导原则。

《中国药典》《细胞类制品微生物检查指导原则》(2022年第二次公示稿)。

0 EP5.1.6 Alternative Methods for Control of Microbiological Quality(《微生物质量控制的替代方法》)。

EP 2.6.27 Microbiological Examination of Cell-Based Preparations(《细胞制剂的微生物检验》)。

USP<1223>Validation of Alternateive Microbiological Methods(《替代微生物方法的验证》)。

0 USP<1071>Rapid Microbial Testsfor Release ofSterile Short-Life Products:A Risk-Based Approach(《短效期无菌产品放行的快速微生物检测：基于风险的方法》)。

PDA 技术报告TR33 Evaluation,Validation and Implementation ofAlternative and Rapid Microbiological Methods(《替代快速微生物方法的评估、验证和实施》)。

对于使用快速无菌检查方法的方法学验证，可结合标准菌株、环境优势菌株等，从方法专属性、检测限、重现性、耐用性等方面分别进行验证。方法验证的具体实施过程，可以按法规要求并参考相关技术指导原则和团体标准[如《细胞和基因治疗产品快速无菌检查法的验证技术要求》(公示稿)]等的验证策略，充分验证快速检验方法符合微生物定性检验的要求。

同时，新型无菌快检法在完成方法学验证后，可在企业内部采用该快速方法进行产品检验，并同步实施药典无菌检查方法检测，累计一定数量批次数据，以评估新型无菌快检法和药典无菌检查方法的一致性。

●支原体

与无菌检查方法类似，由于药典传统支原体检查法难以满足细胞治疗产品快速检测放行等的要求，需要考虑开发快速检查方法用于中间过程监测或产品放行，如采用基于核酸扩增技术(nucleic acid amplification techniques,NAT)进行快速检验，通过扩增并检测特定支原体基因组保守序列来进行支原体污染的检测，已成为实验室检测支原体污染的常用方法。

目前USP<63> 已允许使用经过验证的NAT 法或依赖酶活性的方法检测支原体污染，同时要求快速方法应与药典方法具有可比性；EP<2.6.7> 中将支原体NAT 法作为支原体检查的可选方法，同时应按照验证指南进行验证并证实与药典方法的可比性。如采用基于NAT的方法用于支原体快速方法的开发及验证，应参考《中国药典》的相关规定及国际要求，如EP 2.6.7 Mycoplasmas,(《支原体》)、EP 2.6.21 Nucleic Acid Amplifcation Techniques(《核酸扩增技术》)、USP<1071>《短效期无菌产品放行的快速微生物检测：基于风险的方法》等进行方法开发及验证，并证明所用快速方法的最低检出限应不低于药典方法。

对于使用快速方法进行的支原体方法学验证，可结合多种支原体菌株等，进行专属性、灵敏度、耐用性等方面分别进行验证，并就代替药典法进行比对研究，证实快速方法与药典方法检测能力可比。

D. 仪器管理

a.细胞计数仪

细胞治疗产品生产过程及检验过程中会使用到细胞计数仪器，需要注意以

下事项：

0需要具备完善的电子记录和审计追踪，符合数据记录完整性的要求。

0可以满足GMP要求的IQ/0Q 验证程序。

0建议选取便于擦拭清洁的一体机设计。

建议选取自动化高的设备，减少手动操作。

b.流式细胞仪

流式细胞仪是对细胞进行白动分析和分选的装置。它可以快速测量、存贮、显示悬浮在液体中的分散细胞的一系列重要的生物物理、生物化学方面的特征参量，并可以根据预选的参量范围把指定的细胞亚群从中分选出来。

流式细胞仪在细胞治疗产品中多用于细胞产品的检验工作，此处重点介绍分析型流式细胞仪在检验过程中保障检验数据可靠性的注意事项。

●流式细胞仪的质量控制

光路与流路校正：主要目的是确保激光光路与样品流处于正交状态，使仪器检测时的变异减少到最小，从而控制仪器的变异系数(CV 值)

PMT校准：采用质控品进行PMT校准，必要时进行电压补偿，使仪器检测灵敏度不会因PMT的放大功率降低而改变。

绝对计数的校准：采用绝对计数标准品建立绝对计数标准。

0标本的制备

标本制备非常重要，常常由于标本制备过程中出现人为非特异性荧光干扰(尤其在间接免疫荧光染色中)或细胞浓度低等影响检测结果，为了保障检验数据的可靠性，建议采取以下措施：

根据机器自身特点，调整标本上机检测前的浓度，细胞浓度过高过低都会影响检测结果。

使用蛋白封闭剂封闭非特异结合位点，尤其在间接免疫荧光标记时必不可少。

荧光抗体染色后充分洗涤，注意混匀和离心速度，减少重叠细胞和细胞碎片。

9设置对照样品，采用与抗体来源同型匹配的无关对照和荧光抗体的本底对照。

判定结果时，应注意减去本底荧光，为使免疫荧光的定量分析更精确，应用计算机程序软件，用拟合曲线方法从实验组的曲线峰值中减去对照组的曲线峰值，可以得到更准确的免疫荧光定量结果。

o注意染色后避光，避免荧光衰减。

●其他注意事项：电子档案管理模块应符合GMP 计算机化系统附录中关于电子记录及电子签名的要求。

c.荧光定量PCR

荧光定量PCR(qPCR) 主要通过荧光信号的变化实时监测PCR扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化，通过Ct值和标准曲线的关系对起始模板进行定量分析，具有操作简便、快速高效、高通量、高敏感性等特点，在细胞治疗产品的检验中应用广泛，多用于病原体的定量检测、CAR-T 细胞治疗产品载体拷贝数和复制型慢病毒的检测等。

荧光定量PCR仪有单通道、双通道和多通道之分。当只用一种荧光探针标记的时候，选用单通道；有多种荧光标记的时候使用多通道。单通道也可以检测多荧光的标记和目的基因表达产物，因为一次只能检测一种目的基因的扩增量，需多次扩增才能检测完不同目的基因片段的量。多通道利于做多重PCR, 实现一次检测多种目的基因的功能。建议在选择qPCR仪时需注意以下方面：

●硬件

o功能涵盖广泛：基因表达分析，病原体绝对定量分析，SNP 基因型分析以及以阳性内对照为基础的阳性/阴性结果判定。

o尽可能支持更多的荧光标记检测，包括但不限于：FAMTM/SYBR Green I、VIC%JOE、NEDTM/TAMRATM/Cy3°、ROXTM/Texas Red和 Cy5 等 。

●软件

o实验设计尽量简化。

o扩增反应曲线的实时监测。

o尽可能自动设定荧光基线，自动计算荧光阈值。

o基因表达相对定量软件可以多块孔板基因表达实验的数据。

o 自动SNP分型软件以直观的图表输出分型结果并自动进行分型质量评分。

o分析软件经过验证。

实例分析

某自体CAR-T 细胞治疗产品放行检验项目示例如下：

某自体CAR-T 细胞治疗产品，基于对于产品的风险评估、生产和临床研究的统计分析，并结合质量研究、稳定性研究的结果，制定了产品的质量标准，用于产品放行。对于其中的检验项目示例如表7-1:

表7-1 某自体CAR-T 细胞治疗产品放行检验项目示例

质量属性	检验项目
鉴别	细胞鉴别
物理检查	外观
	明显可见异物检查
	pH
	渗透压摩尔浓度
	装量/剂量
纯度	细胞活率
	CAR转导效率
杂质	产品相关杂质
	工艺相关杂质
效能	生物学活性
安全性	转基因拷贝数
	可复制性病毒检查
	细菌内毒素含量
	支原体检查
	无菌检查

7.3产品放行

技术要求

《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》

(二)质量控制

4. 其他情况

产品放行检测是确保产品质量满足临床应用的重要保障，但是部分免疫细胞治疗产品因时效较短，可能无法在临床使用前完成全部放行检测。在这种情况下，如果风险被充分研究评估，并经过验证证明可控的情况下，可以考虑在完整放行检测

结果获得前先行使用(使用放行);当风险未被充分研究评估或评估认为可能造成严重的无法挽回的后果时，则不建议考虑使用放行。

为加强质量控制，降低风险，建议考虑以下一些措施：

(1)在放行检测时间受限时，可考虑加强原材料的质量控制和过程控制，将其与放行检测相结合，控制风险。

(2)检测方法方面，可采用快速替代检测方法进行检测，以最大程度控制风险。在充分完成替代检测方法验证前，需开展药典方法和替代检测方法的平行检测，积累数据并在研究中不断优化。

(3)在使用放行的同时，应继续完成完整的放行检测。需充分考虑相关风险，提前制定措施，当后置的放行检测结果出现异常或不合格时，需启动相关风险适用的紧急预案。

企业应当建立产品批准放行的操作规程，明确批准放行的标准、职责，并有相应的记录。产品放行的主要流程包括质量评价和批准放行。质量评价是对产品所有相关的原始数据进行评估和批准的过程，判断物料、工艺和过程是否符合质量标准、注册标准，包括对批生产记录和批检验记录的回顾，还需考虑环境检测和中间过程控制的数据，确认每批产品的信息完整、正确且可追溯。产品的质量评价应当有明确的结论，如批准放行、不合格或其他决定，每批产品应由质量受权人签名批准放行。

对于自体细胞治疗产品，由于受到效期短、临床需求紧迫等特殊性的限制，可以考虑在基于充分的风险研究及评估、并经过验证证明可控的情况下，制定快速检验放行的策略，并依照注册标准要求开展检验和实施产品放行，如依据批准的流程在完整放行检测结果获得前进行使用放行，以满足临床需求。同时，采用使用放行时，应充分考虑相关风险，提前制定措施或紧急预案，以应对当后置的放行检测(如采用传统药典方法进行的无菌、支原体检查等)结果出现异常或不合格时，控制风险。

自体细胞产品或采用异体供者材料生产的需与患者配型使用的细胞产品，放行前应当核实供者材料或细胞的来源信息，并确认其与患者之间的匹配性。使用检验完成前投入使用的供者材料生产细胞产品的，放行前的质量评价应当评估供者材料对最终产品质量的影响。

当产品符合质量标准，质量受权人可能对在产品或质量控制过程中发生偏差的相关批产品予以放行，前提是：对偏差影响进行的深入评估支持该偏差对产品的质

量、安全性和有效性都不产生负面影响的结论，且评估将受影响的批次纳入稳定性研究项目中的必要性。

7.4留样管理

背景介绍

企业按规定保存的、用于药品质量追溯或调查的物料、产品样品为留样。用于产品稳定性考察的样品不属于留样。

用于留样的样品要能代表整批物料或产品的质量，也可以抽取其他样品来监控生产过程中最重要的环节(如生产的开始和结束环节)。本章节主要讨论因细胞治疗产品的基本特征及特殊性，产品留样的一些技术要求及考虑点。

技术要求

细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)

十、质量管理

(一)细胞产品的供者材料、关键物料和成品应该按规定留样。特殊情况下，如因供者材料或物料稀缺，产品批量小、有效期短和满足临床必需等，供者材料、物料和细胞产品的留样量、留样包装、保存条件和留样时间可进行如下适当的调整：

1.供者材料的留样

自体和异体供者材料一般应当保存留样，稀缺的供者材料如需调整留样要求或不保存留样的，应书面说明其合理性。

2.物料的留样

关键物料(如直接用于细胞产品生产的基因修饰载体或其他赋予其特定功能的材料、细胞因子、生长因子、酶、血清、饲养细胞等)对调查产品可能出现的质量问题至关重要，企业应当对有效期或货架期内的关键物料保存留样。

3.成品的留样

①成品留样量可以根据不同细胞产品的批量适当减少。

②因满足临床必需，确实无法留样的，应当在留样记录中附有成品的照片，能够清晰体现成品标签的完整信息。

③需要缩短留样保存时间的，企业应当进行评价并有相应报告。

④因产品有效期较短，而需要延长其留样保存时间的，应当采取适当的方法(如低温冻存)以满足留样的预定目的。如新鲜细胞低温冻存后不能作为表征质量的样品，但可作为病毒检测的样品。如成品留样经冷冻保存不能满足预定目的，企业应考虑采用替代方法(如采用中间产品的留样替代成品留样)。

⑤无法使用成品留样的，可选择与成品相同成分的中间产品留样，留样的包装、保存条件及期限应当满足留样的目的和要求。留样的包装方式和包装材质应当与上市产品相同或相仿。

A. 技术特点

●细胞治疗产品生产批量相对较小，如自体细胞治疗产品以满足自体回输剂量为目的进行生产及制剂，难以获得大批量的产品/样品用于留样。

●细胞治疗产品的放行检验多采用过程控制样本检验与终产品样本检验相结合的形式进行质量控制，留样策略的制定需要参考产品检验的关键节点进行设计。

●细胞治疗产品的个性化程度较高，且细胞对温度环境较为敏感，对于留样样品的处理及贮存要求较高。

B. 留样策略

细胞治疗产品的留样策略应参考法规要求、产品批量及生产工艺路线制定。

●细胞产品的供者材料(包括自体和异体供者)一般应当保存留样，同时可考虑在生产过程中的关键环节进行留样，以实现对生产过程的质量管理及追溯。

●如条件允许，应考虑使用成品留样。如无法使用成品留样的，可选择与成品相同成分的中间产品留样，如在制剂后阶段取样作为留样，以最大程度反映产品的质量。

●制定留样策略时，应充分评估样品稳定性及代表性，以确保相应留样可以反映产品或关键工艺样品的质量。同时，结合留样目的、工艺特点及法规要求制定合理的留样量，并选择合适的包装规格、贮存条件、留样期限等。

●特殊情况下，如受限于产品批量等因素，无法按照法规要求进行留样的，应充分结合质量风险进行评估，对于留样的策略(如留样量、留样包装等)等进行适

当的调整。如选择使用与成品包装同材质的小规格包装容器与密闭系统用于留样；或基于相应的风险评估及研究数据，评估使用替代包装方式用于稳定性考察及留样的科学性及代表性，并可参照注册申报中与稳定性考察中一致的包装方式进行留样等。

C. 留样的使用

公司应建立规程规定留样的使用。 一般情况下，留样样品不得随意取用，仅在有特殊情况时，如调查、投诉、成品因异常无法回输且有成品留样时才能使用，使用前需要得到质量管理负责人的批准。

7.5稳定性考察管理

背景介绍

稳定性试验的目的是考察原料药、中间产品或制剂的性质在温度、湿度、光线、振动等条件的影响下随时间变化的规律，为药品的生产、包装、贮存、运输条件和有效期的确定提供科学依据，以保障临床用药的安全有效。并且通过持续稳定性考察可以监测在有效期内药品的质量，并确定药品可以或预期可以在标示的贮存和贮存条件下，符合质量标准的各项要求。

对于细胞治疗产品，由于其个性化程度较高、产品批量有限、温度环境敏感、非冻存状态下有效期较短、稳定性和批间一致性低等特点，需要充分结合产品特点及申报阶段要求设计稳定性试验方案，如上市前稳定性研究、上市后稳定性考察、持续稳定性考察等，贯穿上市前研发至上市后的质量研究的全过程，为产品的生产、贮存及使用提供依据。

稳定性试验方案的设计应参考ICH Q5C Stability Testing of Biotechnological/Biological Products(《生物技术生物制品：生物技术/生物制品稳定性试验》)、《中国药典》指导原则9402生物制品稳定性试验指导原则、《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》和其他国内外相关指导法规等。同时，如涉及药学变更，还应遵循《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则(试行)》等要求进行稳定性研究，为相应的药学变更提供支持。

实施指导

A. 产品特点

●细胞治疗产品的主要成分为细胞，对温度环境非常敏感，稳定性受生产工艺、贮存温度等影响较大。

●细胞治疗产品对贮存及运输要求较高，非冻存状态下有效期较短，如为冻存工艺，冻存后需在低温环境下(如液氮罐、 -80℃等)保存。

●细胞治疗产品的个性化程度较高，批间一致性低，细胞产品的稳定趋势的预测难度偏大。

●细胞治疗产品生产批量小，如自体细胞治疗产品以满足自体回输剂量为目的进行生产及制剂，难以获得大批量的产品用于稳定性试验。

●不同细胞治疗产品的生产工艺差别较大，如涉及中间产品的保存，需对中间产品的稳定性进行试验，为中间产品的保存期的制定提供有效依据。

B. 稳定性试验策略

细胞治疗产品的稳定性试验策略，可参考一般生物制品稳定性试研究的要求，并充分结合产品特点、贮存及使用需求设计并制定考察策略。

●稳定性试验目的

需要结合工艺及产品特点、贮存及使用需求制定稳定性试验方案。如在产品上市前阶段展开的稳定性研究，包括针对产品贮存条件及有效期进行的长期稳定性研究、加速稳定性研究；针对临床使用场景的稳定性研究(in-use stability);针对成品的冷链运输的稳定性研究；针对供者材料的保存及运输的稳定性研究；针对非连续生产工艺中间品的稳定性研究等；以及在产品上市后，在有效期内监控已上市药品的质量，以发现药品与生产相关的稳定性问题而进行的持续稳定性考察等，对供者材料及产品的贮存、运输、使用的各环节进行全面的研究。

●稳定性试验样品

稳定性试验应结合其考察目的及产品特点，选择相应的代表性样品进行研究。如对于稳定性样品，其细胞密度、制备及冻存工艺(如有)等应能反映产品的特点，并可选择产品规格的包装容器与密闭系统进行稳定性考察，或者采用同材质的小规格包装容器与密闭系统作为代表性样品进行研究。特殊情况下，如受限于产品批量等因素，无法按照法规要求进行稳定性试验的，应充分结合质量风险，对于考察策

略(如样本量、样本包装等)等进行适当的调整，并对其科学性及代表性等进行评估：如评估使用小规格的替代包装方式(以获得更多的样本量)进行连续时间点的稳定性试验，或使用不同批次成品规格的样品在多个时间点分别进行稳定性试验等，并充分考虑样品选择策略对于稳定性试验的影响。

同时，对于自体细胞治疗产品，基于伦理及产品批量方面的因素，使用患者来源的样品用于稳定性试验具有一定的难度，可选择相同工艺及条件下的来源于健康供体的代表性样品进行稳定性的试验，并对患者材料的代表性进行论证和研究。

●稳定性试验项目

稳定性试验项目应结合其研究目的及产品特点进行选择，并可参考《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》进行稳定性研究的相关策略的制定。

对于长期稳定性研究可基于产品放行检验项目进行设置，并重点考察受稳定性影响较大的项目，并结合检验方法设置合理的稳定性考察标准，以全面、有效地评估产品稳定性随时间的规律。

对于临床使用稳定性(in-use stability)的考察，可结合临床使用场景的特点，如复融后保存时长、给药条件等设计稳定性考察方案，并结合风险点选择合适的考察项目进行研究。

对于运输稳定性，可基于产品运输过程相关特点(如运输路线、交通工具、距离、季节、时间、运输条件等)及产品的风险点，设计稳定性考察方案及考察项目，如重点关注运输场景下对产品包装、效能等的影响。

对于非连续生产工艺的中间产品的稳定性，可结合中间产品及工艺的特点及稳定性考察目的(如中间品的保存时长、保存条件等),进行稳定性考察的设计，如关注中间产品储存后的质量变化、使用中间产品制备成品的关键质量属性等。

实例分析

某自体CAR-T细胞治疗产品需进行长期稳定性研究，基于使用患者材料的伦理考虑，评估使用相同工艺及条件下的来源于健康供者的细胞作为代表性样品用于稳定性考察。同时，由于产品批量较小，难以获得同一个批次的多份产品(成品规格)用于稳定性研究，经评估选择了与产品相同材质的小规格包装容器(以获得同一批次的多份样品用于连续时间点的稳定性考察),并按相同制剂细胞密度进行稳定性样

品的制备，以用于长期稳定性研究。

该产品的长期储存条件为液氮条件，该条件下细胞的稳定性相对较高，设计产品预定的有效期可达到1年以上，参考《中国药典》指导原则9402生物制品稳定性试验指导原则，设计在冻存后到3、6、9、12、18个月进行长期稳定性考察，考察产品质量与时间变化的规律。

长期稳定性研究考察项目基于产品放行检测项目进行设计，并结合稳定性风险点、稳定性样本量等情况进行评估，制定稳定性考察项目及可接受标准。

7.6环境控制

A. 生产过程的环境控制

细胞治疗产品属于无菌药品，其主要成分为细胞，无法进行最终灭菌、除菌过滤、微生物去除/灭活等操作，发生污染和交叉污染的风险较高，因此需要遵循无菌药品的生产管理策略进行环境控制，以确保满足无菌生产要求。

由于生产工艺差异性较高，应充分结合生产工艺路线及厂房设施的特点制定系统的环境监测方案，以确保洁净区环境在良好的受控状态下运行。

细胞治疗产品根据其工艺路线(如自体细胞治疗产品、异体细胞治疗产品等)不同，生产规模差异较大(单批次针对单一患者或多位患者),其生产区布局、工艺设备需依据相应工艺(采用密闭系统/非密闭系统等)及需求配置，需以此为基础评估环境控制需求。

根据细胞治疗产品生产操作过程中使用密闭系统或非密闭系统的工艺特点，可参考《细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)》的生产操作示例，在相应的洁净度级别下进行生产操作，并进行环境监测，以确保生产过程的操作环境可控。

对于自体细胞治疗产品，由于其为单人单批次定制生产，存在多个批次同时生产的场景，在厂房设计及生产管理过程中应采取相应的措施防止微生物污染及交叉污染。当同一生产区域有多条相同生产线同时生产时，可基于风险评估对背景区域、单条生产线制定相应的环境监控策略。

使用含有传染病病原体的供者材料生产细胞产品时，其生产操作应当在独立的专用生产区域进行，并采用独立的空调净化系统，保持产品暴露于环境的生产区域相对负压。

B. 检验过程的环境控制

对于细胞治疗产品，因供者材料来源于人体，可能含有传染病病原体；同时检验过程可能涉及基因修饰载体(如病毒载体)等生物材料，存在生物安全的风险，实验室的设计及管理也应关注相应的生物安全控制。

同时，对于供者筛查、供者材料和细胞产品检验实验室，用于传染病病原体标记检查，或对含有传染病病原体样品进行检测的，应符合国家关于实验室生物安全的相关规定，必要时应当有原位灭活或消毒的设备。

8 技术转移

本章主要内容：

细胞治疗产品进行技术转移的主要关注点

开展可比性研究的注意事项

T 针对病毒载体变更，开展可比性研究的注意事项

背景介绍

不同的工厂或实验室之间对于生产工艺或分析方法的技术转移是药物研发和商业化生产的必要部分，细胞治疗产品也不例外。

对于细胞治疗产品，由于生产规模较小，早期研发和临床阶段的生产批次可能均在研发和临床样品生产场地进行，在关键临床或者商业化生产前可能转移至符合商业化规模要求，且GMP 符合性更高的生产场地。此时需要通过技术转移来完成研发和生产部门之间或不同生产场地之间产品知识和工艺技术的转移，以实现临床样品或商业化产品的生产。技术转移的策略应当建立在风险管理及法规要求的基础上，结合细胞治疗产品及其工艺特点，全面考虑双方的人、机、料、法、环等GMP 基本要素。

成功的技术转移取决于良好的项目管理流程、风险管理体系以及对产品和工艺的深刻理解，同时也要求转移方和接收方的密切配合，以确保技术转移的高效和成功。

技术转移过程中，需要转移的内容包括但不限于以下方面：

●产品的相关科学信息。

●产品的质量属性(包括产品关键质量属性和物料关键质量属性)。

●工艺描述，包括各个单元操作(如工艺流程图、关键工艺参数等描述)。

●产品控制策略。

●持续优化项目。

●以往的经验和发生的问题总结。

●对产品质量潜在风险的理解。

●环境保护/健康/安全相关要求。

一个技术转移项目完成时，常用的成功标准为：接收方能够通过确定的工艺持续生产出符合预设质量标准的产品，包括但不限于以下方面：

●关键工艺参数(CPP) 均在预先设置的可接受范围内。

●中间控制检测项目(IPC) 结果均符合预设标准。

●产品放行检测结果均符合预设的产品质量标准。

●其他预设的工艺表现均符合预期(如有),如主要工艺步骤的杂质清除水平，主要工艺步骤的收率等。

●可比性研究的可接受标准(如适用)。

当产品处于不同阶段时，技术转移的评价方法和标准可能存在差异，对于不同阶段的技术转移，以下考虑可供参考：

●在IND 申报之前，产品还未投入到临床试验，此时，可能以完成IND 申报批次作为技术转移的成功标准。

●在IND 申报后，关键临床前，如果发生了技术转移，则应参考《临床试验期间生物制品药学研究和变更技术指导原则》开展相应可比性研究，并评价对已进行的非临床和临床研究的影响。

●在关键临床后，如果发生了技术转移，则应参考《临床试验期间生物制品药学研究和变更技术指导原则》开展相应可比性研究(药学)和(或)工艺性能确认，并评价对已进行的非临床和临床研究的影响。

●在产品上市后如果发生了技术转移，则应依据上市后变更的指导原则，进行相应的可比性研究(药学)和(或)工艺性能确认来证明产品质量的可比性，并评价对已进行的非临床和临床研究的影响。

企业可按照各自项目的阶段以及产品情况制定相应的技术转移成功标准。

实施指导

在讨论细胞治疗产品的技术转移前，需首先了解该品种的特殊性。

细胞治疗产品为比较新颖的药品，与一般生物制品(如单抗等)相比较，在产品的使用方式、生产批量、无菌控制、起始物料、工艺控制、放行策略、产品稳定

性、产品认知及给药方式等方面均存在较明显的差异。细胞治疗产品可能存在自体细胞治疗产品、异体非通用型细胞治疗产品、通用型细胞治疗产品等不同形式，甚至自体细胞治疗产品也存在不同的工艺路线，风险评估的因素可能存在较大差异，如：自体细胞治疗产品在发生场地变更的技术转移中可能更多采用工艺扩展(scale out)，混淆、污染和交叉污染风险可能更高，而通用型细胞治疗产品可能会发生工艺放大(scale up),工艺放大的成功与否对产品质量可能影响更大。同时技术转移的过程中也可能叠加了大量的变更，如生产场地变更、病毒载体变更、关键工艺设备变更、关键物料变更等因素。为了更好地确保转移前后的产品工艺稳健可控、质量一致，在技术转移策略上，还需要结合风险管理原则的应用。以下列举了一些风险评估中需要考虑的关键因素，包括但不限于：

●新产品引入；需确认转入场地是否已经有产品在该场地生产；需同时考虑已有产品的生产对新产品的影响，以及新产品引入对已有产品的影响；特别是需对厂房生物安全性的评估；不仅限于细胞生产的部分，作为关键原材料的质粒和病毒载体，引入新产品时也需要进行相应的评估。

·厂房设计；如新的生产场地与原生产场地相比有无变化，原有的非封闭式生产操作是否还适用；生产区与中控和QC 区域的样品传递路线是否更长，是否符合中间品或样品的时限；细胞生产区、质粒生产区和病毒载体生产区等是否独立，有无交叉污染风险等。

●关键原材料和耗材是否有变化；关键原材料可能包括起始原材料，如血样、质粒/病毒载体、辅料、内包材、培养基、细胞因子等；是否发生了供应商或者产地变化；原有的物料包装形式是否符合新场地的使用要求；物料运输至生产操作区的流程是否需要更新等。

●关键工艺设备是否有变化；如关键工艺设备发生变化，设备性能能否符合工艺要求，设备程序是否发生变化等。

●关键工艺参数是否有变化；原有的关键工艺参数及范围是否有变化，有无新增的关键工艺参数等。

●生产规模、生产班次和生产频率等是否有变化；批量是否有变化，是否有工艺放大还是工艺扩展；是否符合已验证的最大产能；清场清洁流程是否能支持新的生产模式等。

●关键的分析方法(包括检验仪器)是否有变化；如发生变化，如何确认与验证新方法，并与旧方法做好桥接；如何评估原有数据等。

●人员和人员培训；已培训并获取资质的生产人员和QC 检验人员数量是否与产

能匹配；培训是否有效等。

在完成风险评估后，需基于风险评估的结果，针对每个被识别的风险，制定具体的措施，包括但不限于优化流程、增加研究等，这些具体措施均应被记录在技术转移的计划文件中。

特别需要关注以下方面：

A. 无菌生产工艺的建立和确认

由于细胞治疗产品无法通过除菌过滤或最终灭菌的方式获得无菌保障，需结合接收方的设施设备，以及工艺过程中所有物料、 一次性耗材的实际情况，建立相应的全程无菌生产工艺和评价体系，包括但不限于：

●物料及耗材传递过程的包装形式和清沾消毒方式。

●起始物料、过程控制及终产品的无菌取样/留样数量和具有代表性的节点。

B. 建立合适的技术转移可接受标准

细胞治疗产品技术转移的方案和可接受标准应考虑不同患者之间异质性的特点，建议使用同一健康志愿者的供者材料进行工艺转移研究批次的生产，以加强转移双方数据的可比性。同时，可接受标准的制定也应充分考虑双方厂房设计和工艺流程等的异同，及由此可能带来的影响。

C. 建立合适的过程控制及放行策略

细胞治疗产品具有批量小、对环境因素(如光、温度、湿度等)较敏感的特点，在建立生产过程控制及放行策略时，应考虑以下因素：

●起始物料、中间产物及终产品批量较小，可检测样本量小，需要制定合适的取样数量、取样节点和检测项目。

●需结合接收方设施设备的实际情况，以及起始物料、中间产物和终产品的稳定性，确定各工艺步骤工艺时长。

D. 产品稳定性研究

技术转移应考虑进行长期稳定性研究，如果起始物料、关键原材料、包材、关键一次性耗材或设备等发生变化，应通过风险评估，考虑是否需要增加运输稳定性及使用稳定性等研究。

E. 产品和工艺的知识传递及持续监控计划

由于细胞治疗产品的新颖性，工艺技术开发及规模化生产尚处于起步阶段，和其他药品或生物制品相比，实操经验和技术人员都比较缺乏，在技术转移时，建议充分考虑全面的知识转移计划，包括细胞治疗产品的基本知识以及被转移产品的工艺知识，建立并执行完成首次转移后的工艺过程数据持续收集、分析、沟通及持续学习的方案。

在完成技术转移后需要持续监测生产情况和关键数据，确保措施的有效性，并进行持续改进。

技术转移的一般性流程可参考本丛书《质量管理体系》分册“3.4.1技术转移”，本章节重点阐述细胞治疗产品的特殊性。

8.1可比性研究

可比性研究是细胞治疗产品技术转移中发生可能性较高且非常关键的研究。本章节仅探讨药学可比性相关要求及研究，不包含非临床和临床可比性研究内容的讨论。

背景介绍 一

细胞治疗产品的变更可比性研究具有其复杂性和独特性。可参考的一般原则包括：

●逐步递进的原则。

●适当的对比样品。

●适当的分析方法。

●对比研究范围和特性。

●基于风险的对比研究策略。

对于可比性研究的风险评估，应考虑以下方面：

●研究阶段：工艺开发早期/工艺开发晚期。

●变更的工艺单元：上游工艺、下游工艺、制剂工艺(注：此处上、下游工艺的划分主要针对质粒和病毒载体等生产，如细胞制品生产部分可能不存在上、下游工艺等划分)。

●变更的范围：细胞批次更新、工艺调整、规模放大(如适用)、工艺扩展、供

应商变更、增加或变更生产场地。

对于这些识别的风险，基于风险高低，应体现在可比性研究方案中，包括但不限于：

●研究范围：工艺、过程控制、放行检测、拓展研究、临床/非临床。

v研究批次：变更类型、质量变异度、质量控制策略、方法学、研究阶段。

可比性标准：合理、严谨的可比性标准

方法学：方法学开发和桥接、统计工具的应用

技术要求

已上市生物制品药学变更研究技术指导原则(试行)

二、基本考量

(三)变更可比性研究

开展变更可比性研究是生物制品上市后药学变更评价的基础和成功的关键。应根据变更事项和类别，预期变更对产品造成的影响，以及变更对产品安全性和有效性潜在影响的评估，确定可比性研究的策略和范围、通过一系列对变更前后相关产品的生产工艺、质量及稳定性数据进行对比的、综合的评估，判定变更前后是否可比。变更可比性研究是一个递进的过程，除了开展药学可比性研究外，在某些情况下还应包括非临床或/和临床桥接研究。

生物制品工艺变更前后可比性(ICH Q5E)

1.2 背景

生物技术/生物制品在开发和获得批准后，其生产商经常会变更产品的生产工艺，变更的原因包括改进生产工艺、增加规模、提高产品稳定性，以及根据法规要求进行变更。变更生产工艺时，生产商应总体评估产品的有关质量特性，从而证明该改变没有对制剂的安全性和有效性产生不利影响。这样一份评估应该说明：是否还需要进行非临床和临床研究。

1.4基本原则

可比性研究并不意味着变更前后的产品在质量特性上是一致的，但它们应高度相似并且现有知识应能充分预测，以确保质量特性上的任何差别对药物制剂的安全

性或有效性不会产生不利影响。

可比性结论应以分析检测、生物学测定以及某些情况下的非临床和临床数据为基础。如果生产商仅通过单独的分析研究就可以保证比较试验的可靠性，那么变更后产品的非临床或临床研究就不必进行了。但是，如果还没有建立特异的质量特性和安全性及有效性之间的关系，并且，观察到变更前后产品在质量特性上有差别时，可比性试验中就应包括质量、非临床和/或临床的对比研究。

其他可供参考的指导文件包括：

●*EMA Comparability Considerations for Advanced Therapy Medicinal Products* (ATMP)Questions and Answers(《先进疗法产品可比性考虑问答》)(EMA/CAT/499821/2019)。

·*EMA Reflection Paper on Statistical Methodology for the Comparative Assessment* of Quality Attributes in Drug Development(《药物研发中关于质量属性可比性评估的统计方法学的思考性文件》)(EMA/CHMP/138502/2017)。

8.1.1 可比性研究的基本策略

细胞治疗产品的可比性研究需针对变更内容进行风险评估，对风险进行分级，一般以是否影响关键质量属性作为风险评估与分级的依据。除此以外，对于自体细胞疗法，因其特殊性，起始物料来源于每个患者，需评估物料来源的可替代性，并以评估结论决定可比性研究所使用的起始物料。

可比性研究的决策过程可参考图8-1:

A. 可比性研究的方案设计

可比性研究设计应基于风险评估的原则：

●应根据产品质量属性和工艺特点合理的、有针对性的、规范的进行可比性研究设计。

●应提供详细的变更前后差异的比较，并说明依据及变更目的。

●应使用风险评估工具选择合适的可比性研究，选择变更可能与产品质量属性的关联性及可能影响产品的质量属性，以确定可比性研究的策略和具体研究内容。

除产品质量及表征研究外，可比性研究也应关注对工艺过程及杂质等的潜在影响，选择适合检测变更影响的工艺过程步骤，如上游工艺的变更也需要对变更下游工艺的关键步骤、过程控制、工艺表现、产品稳定性等进行评估。

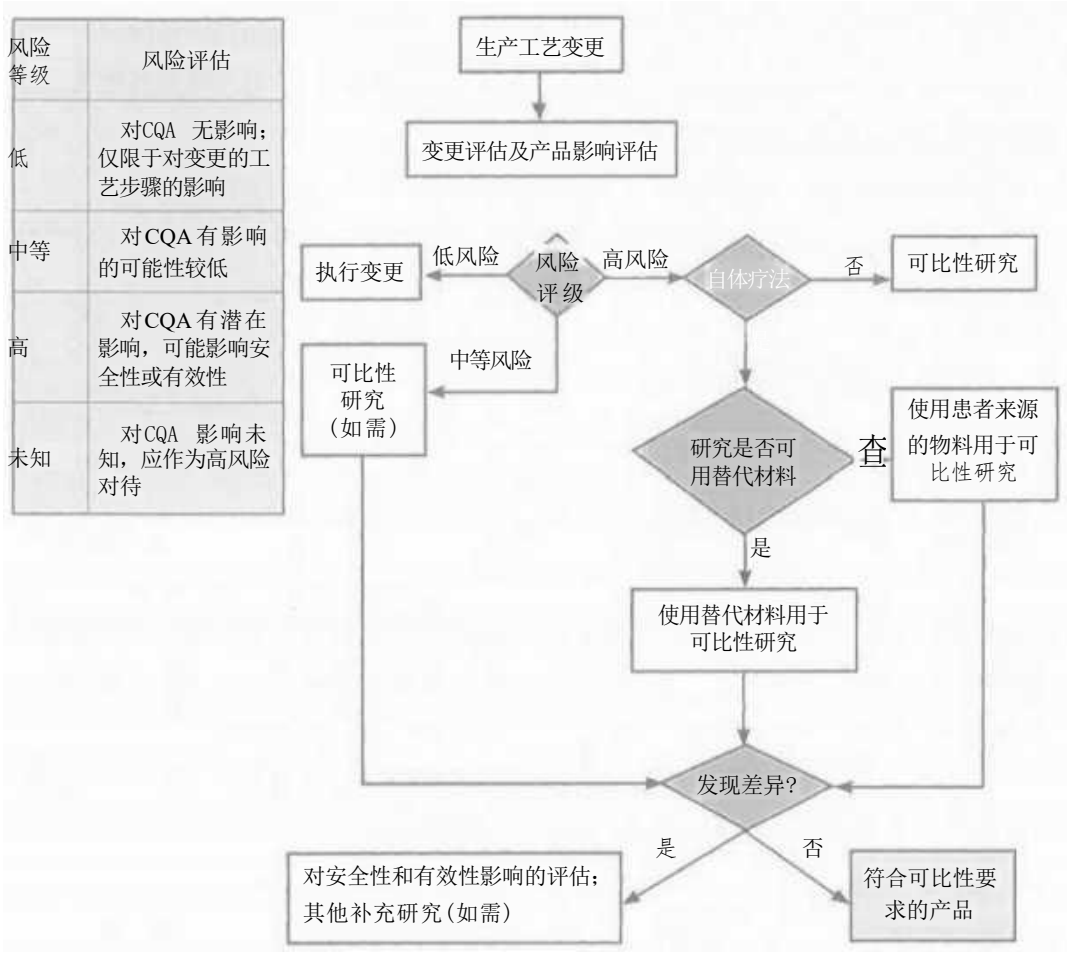


图 8－1　细胞治疗产品可比性研究决策树

B. 可比性研究及可接受标准的设计

采用的比较方式可包括与历史数据的比较和平行试验比较。

对于定量标准，应基于足够的、具有代表性的历史批次数据统计分析，预设验收标准，可采取历史数据的最大值、最小值，也可通过统计学方式计算可接受范围，如计算获得的范围均低于该品种质量标准的要求，则应使用质量标准规定的范围，即使用更为严格的标准。除符合预设的可接受标准外，也应对变更前后的批次进行趋势分析。

对于定性标准，可比较变更前后的图谱的重叠性（如适用）。

C. 供者细胞（如适用）

细胞治疗产品的起始原料个体差异较大，在平行试验中，使用来自同一供体来

源的细胞可有效降低来自起始物料(供体细胞)的变异性，选择供体细胞时应关注样品的代表性，考虑到患者样品的稀缺性及潜在的伦理问题，可选择具有代表性的健康供者细胞进行可比性研究。

任何观察到的分析差异都应评估其对产品质量、安全性和有效性的影响。

对于同时或不同时引入多个变更的情况，应关注变更是否可能存在交叉或叠加的效应，持续关注与安全性和有效性相关的质量属性的趋势变化。

8.1.2可比性研究的执行

A. 可比性研究执行的阶段

执行可比性研究时，应注意：

●产品全生命周期的变更都应被记录且充分评估。

●在产品开发早期，应广泛开展工艺及产品表征研究，以尽早建立、积累未来可比性研究中使用的分析方法及历史经验；随着工艺知识和生产经验的积累、分析方法的进一步开发，可比性研究应当全面使用可获得的各种信息和数据。

●对于临床前研究或临床早期阶段，可比性研究通常用于证明变更前后产品之间的代表性，及变更前的非临床和临床数据适用于变更后的产品。

●如果工艺变更是在开发后期引入的，此时应该评估相应的风险等级，并进行全面的可比性研究。

B. 用于可比性研究的分析方法

针对可比性研究中使用的分析方法，应注意：

●用于放行检测的方法及产品表征研究方法均可被用于可比性研究。

●分析方法应该适合目的并且足够稳定、灵敏以确保可检测到变更带来的差异，对于检测方法变异大的项目，可增加平行试验进行比较。

●鼓励采用多种方法对同一属性进行多维度的评估。

●应预留足够的留样用于后续的可比性研究，考虑到病毒载体及细胞产品样品的稀缺性及效期较短，变更前的样品可能无法获得。在这种情况下，应充分利用分析方法进行可比性的评估，如在分析方法足够稳定且未发生变更的情况下，可使用历史数据作为变更前的依据；在分析方法发生变更时，可采用分析方法的桥接，以支持变更前后的质量异同的评估。

●建立参比品可更好地支持变更可比性的评估。

对于平行试验，在同一场地/同一次试验中进行样品检测可有效降低分析方法相关变异性的引入。

C. 结果解读

针对可比性研究的结果，有以下结果：

0基于有关质量特性的适宜比较，变更前后的产品高度相似，具有可比性，可以预期对产品安全性或有效性没有产生不利影响

●变更前后的产品可观察到质量特性比较中的一些差别，但根据积累的经验、相关资料和数据，可以证明对安全性和有效性没有不利影响。这些情况下，可以认为变更前后的产品具有可比性。

●变更前后的产品的质量特性中存在一些差别，但并不排除可能对产品安全性和有效性产生不利影响。且更多有关质量属性的数据以及对此进行的分析将不能有助于确认生产工艺改变前后的产品是否具有可比性。应考虑进行非临床和(或)临床研究。

C质量特性的差别非常显著,可以确定产品不是高度相似，并且不具有可比较性。应考虑进行非临床和(或)临床研究

D. 稳定性研究

稳定性研究的相关性应基于变更进行评估。稳定性研究可发现理化特性、功能试验不能发现的细微差别，尤其是加速和(或)强制降解稳定性研究，可用于建立产品的降解模式、降解趋势，从而对变更前后的产品质量可比性评估提供进一步的支持。

可根据加速和(或)强制降解稳定性和长期稳定性的初步结果，延用变更前的贮存条件和有效期。

E. 生产场地可比性研究的特殊考量

对于生产场地的可比性研究，首先需通过技术转移流程明确两个场地之间的差距，以及这些差距的影响，包括“人、机、料、法、环、测”等各个方面，以明确对于产品质量的潜在影响。

自体细胞治疗产品生产场地变化一般可能存在工艺扩展(而非工艺放大),场地可能存在多台同一型号的设备，可比性研究中通常不会使用到所有的设备，需评估设备的代表性问题。从临床生产场地转移至商业化生产场地时，其最大产能可能发

生变化，对于自体细胞治疗产品，防混淆、差错、污染和交叉污染尤其重要，需在可比性研究中对产能变化的影响进行评估，或通过产能研究的方式进行。另外，需收集转移方的工厂所有的相关批次数据用于可比性可接受标准的制定。

实例分析

CAR-T　自体细胞治疗产品的场地变更研究

假定有A 工厂与B 工厂两个生产场地，A 工厂为临床样品的生产场地，B 工厂为商业化产品的生产场地，A 工厂已经完成了较多批次临床样品的生产，积累了较多的批次数据。产品从A 工厂转移给B 工厂，其中：

●生产工艺和控制策略均未发生变化。

●关键原辅料和内包材均未发生变化，部分原料由同一供应商的不符合GMP 要求的物料变更为符合GMP 要求的物料。

●病毒载体未发生变化。

●关键工艺设备均未发生变化，部分辅助设备的品牌有所变化，设备数量有所增加。

●部分开放式的操作变更为密闭体系的操作。

●生产批量未发生变化，每个患者一个批次，细胞扩增的规模未发生变化。

●B工厂每周生产批次数量有所提升。

●产品质量标准均未发生变化。

基于对生产工艺的理解和结合两个工厂生产车间的差异分析，进行相应的风险评估。“人、机、料、法、环、测”方面均未发生显著变化，风险较低。但是根据对自体CAR-T 细胞治疗产品的理解，供者材料(白细胞单采产物)可能是最大的输入变量，对于场地可比性研究需考虑消除供者材料带来的影响。

该品种的基本工艺包括细胞分选、细胞激活、细胞转导、细胞扩增、细胞收获以及制剂。

在方案设计时，可考虑将单采获得的白细胞单采产物均分为两袋，或者如存在细胞分选工艺，可在完成细胞分选后，将纯化后的T 细胞平均分为两袋，分别用于A 工厂和B 工厂后续的平行生产活动。同时由于A 工厂和B 工厂每个单元操作使用的设备同时存在多台同一型号的设备，因此每批使用同一型号的不同设备。

依据该方案设计(图8-2),完成生产后，总计有3个A 工厂批次以及3个B 工

厂批次用于可比性研究。首先需要分析B 工厂3个批次的中控及成品放行检测数据。连续3个批次终产品质量属性需符合预设的可接受标准：

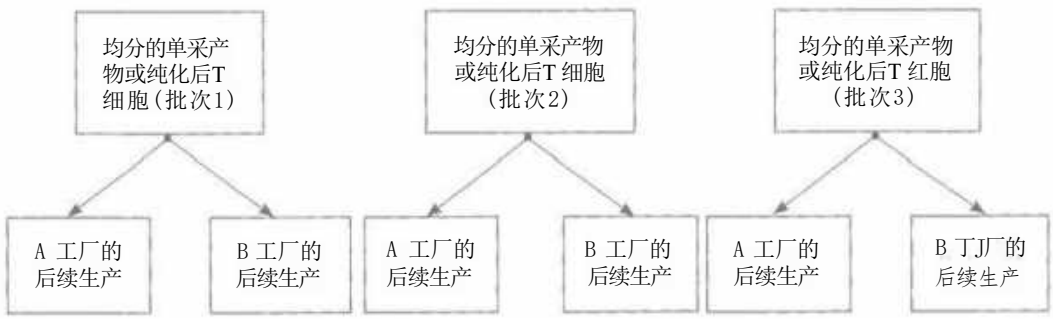


图 8－2　可比性研究方案示意1

●通过关键质量属性评估得出所有现行工艺中的CQA。

●对于数值型属性的可接受标准，可根据产品放行标准和历史批次数据的最大值、最小值，或者通过统计学方法制定；应选取其中比较严格的标。

0所有批次均来自A 工厂临床研究符合产品放行标准批次的数据。

●定性属性的可接受标准与产品放行标准相同。

如B 工厂符合以上要求，则认为可比性研究符合要求。

在此基础上建议进一步对3批A 工厂的批次与B 工厂的批次数据进行对比分析，结合A 工厂生产的数据，经由技术专家进行判断和总结，如发现平行运行批次的数据有明显差异的，需分析原因，确定是否影响工艺稳健性及产品质量，如有影响，则认为可比性研究的结果不符合要求，需制定纠偏措施后重新研究；如无影响，则认为可比性研究符合要求。

8.2病毒载体变更的可比性研究

本章节主要针对病毒载体的相关变更进行的可比性研究。对于细胞治疗产品，如发生病毒载体变更，应包括病毒载体的质量可比性和功能可比性，即除针对病毒载体自身需进行可比性研究外，还需将病毒载体应用于细胞治疗产品进行相应的可比性研究。

可比性研究的一般要求可参考本分册生物制品(单抗)部分“6技术转移和可比性研究”和本分册细胞治疗产品部分“8．1可比性研究”。

8.2.1 病毒载体的可比性研究

背景介绍

基因载体系统可在人体外将外源基因导入靶细胞或组织，通过添加或敲除、替代、补偿、阻断、修正特定基因，以达到治疗疾病的目的。由于细胞治疗产品的细胞来源、类型、体外操作等方面差异较大，质量研究和质量控制相较传统药物更加复杂。

对于病毒载体产品，变更通常是必要的且无法避免的，包括增加新的生产用细胞库、优化生产工艺、更改过程规模、更改原材料供应商、增加新的生产场地等。在所有此类情况下，可比性成为支持产品现有安全性和有效性数据同样适用于变更后的有效工具。

病毒载体产品质量标准只是确定产品的常规质量，而不是对产品进行全面的鉴定，因此可能不足以评价病毒变更对病毒载体产品和细胞治疗产品的所有影响。可比性研究的质量对比分析需在放行检测项目的基础上进行扩展，通常应包括结构特征、纯度、效价、杂质等，必要时也应包含病毒载体生产工艺过程表现的对比分析，以及使用该病毒载体进行生产的细胞治疗产品的工艺过程表现和质量属性的对比分析。

用于体外编辑的病毒载体产品的质量风险有别于体内基因治疗产品，经在体外进行基因修饰后的细胞还可能经过一段时间的体外培养、换液清洗的步骤，在应用于人体之前还要经过细胞终产品放行检测。因此，其可比性研究也应结合该特点进行设计、执行和评估。

细胞治疗产品有其固有的变异性，如起始原料的变异性、复杂的生物学特征和制造工艺。因此，基于质量属性的“高度相似(因此具有可比性)产品”的ICH Q5E指南概念对细胞治疗产品尤其具有挑战性。但ICH Q5E的一般原则可以应用于病毒载体产品的变更，对于病毒载体的上市后变更，也可参考《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则(试行)》开展研究。

实例分析

CAR-T 细胞治疗产品病毒载体变更

假定有病毒载体A 和病毒载体B，为同一种病毒载体，由不同的供应商进行生

产，A 病毒载体已生产了多个批次，并用于较多批次的细胞治疗产品生产，积累了较多的批次数据，病毒载体B 为变更后的病毒载体。针对病毒载体A 和B 的变更差距分析和风险评估，包括：

●病毒载体工艺的简述。

●详细的变更前后差异的比较，并说明依据及变更目的。

●变更的影响评估，可借助风险评估工具、质量风险管理工具对变更病毒载体及细胞治疗产品潜在的影响进行评估、梳理及汇总。对于复杂的变更， 一般应有单独的文件对变更前后进行差距分析，并对风险等级及风险项进行评估，以指导可比性研究方案的制定。

依据病毒载体A 批次的历史数据，可考虑通过统计学方式制定可比性研究的可接受标准，包括质量标准、表征属性、工艺参数控制、工艺过程表现、杂质残留及杂质清除能力等质量属性方面，检验项目应考虑以下项目：

●残留宿主细胞蛋白。

o 载体滴度。

●无菌、细菌内毒素。

o 干扰素γ分泌。

o 残留宿主细胞DNA。

●残留质粒DNA。

●渗透压。

●其他工艺相关杂质和产品相关杂质等。

如生产过程中还使用了核酸酶等，其残留也应体现在质量检测中。

对杂质清除能力的研究，应在声称具有相关杂质清除能力的工艺完成后，进行取样并检测杂质残留，并与变更前的病毒载体生产或研究数据做比对，判断是否有显著差异，如在生产过程中使用了抗生素，需检测和评估其工艺的去除能力。

通过至少3个批次以上的病毒载体B 可比性研究批次的生产，将这些批次数据与预设的可接受标准进行对比。符合以下标准则认为研究结果符合要求：

●所有关键工艺参数均符合预设范围。

●所有中控检测项目均符合预设范围。

●所有产品检测结果均符合可比性研究范围。

●杂质清除能力无显著差异。

●生产过程的收率等其他工艺过程表现符合预期，无显著异常。

8.2.2病毒载体变更的细胞治疗产品可比性研究

除病毒载体自身的可比性研究外，还应考虑该变更对细胞治疗产品的影响，因此需基于变更前后的病毒载体进行细胞治疗产品的可比性研究。病毒载体变更的细胞治疗产品可比性研究的法规要求及技术要求均可参考本章节的“8.1可比性研究”，本小节主要提供案例参考。

实例分析

CAR-T 细胞治疗产品病毒载体变更的细胞治疗产品可比性研究

假定有病毒载体 A 和病毒载体B，为同一种病毒载体，由不同的供应商进行生产，A 病毒载体已生产了多个批次，并用于较多批次的细胞治疗产品生产，积累了较多的批次数据，病毒载体B为变更后的病毒载体。对于病毒载体变更应用于细胞治疗产品的可比性研究，除病毒载体变更以外，供者材料(白细胞单采产物)可能是最大的输入变量，对于病毒载体可比性研究需考虑消除供者材料带来的影响。该品种的基本工艺包括细胞分选、细胞激活、细胞转导、细胞扩增、细胞收获以及制剂。

在方案设计时，可考虑将单采获得的白细胞单采产物均分为两袋，或者如存在细胞分选工艺，可在完成细胞分选后，将纯化后的T细胞平均分为两袋，分别使用病毒载体A和病毒载体B进行平行生产。

依据该方案设计(图8-3),完成生产后，总计有3个使用病毒载体A 的细胞产品批次以及3个使用病毒载体B的细胞产品批次用于对可比性研究。

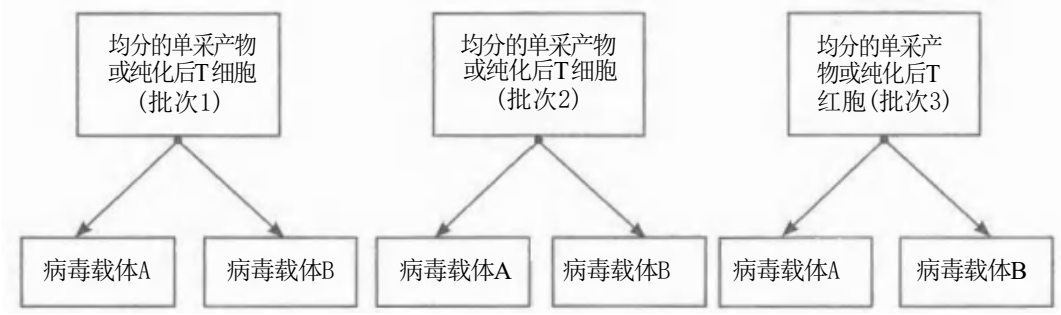


图8-3 可比性研究方案示意2

首先需要分析使用病毒载体B的3个批次的中控及成品放行检测数据，包括杂质研究样品(如有)。连续3批次终产品质量属性需符合预设的可接受标准：

0通过关键质量属性评估得出所有现行工艺中的CQA。

●数值型属性的可接受标准根据产品放行标准和历史批次数据的最大值、最小值，或通过统计学方法计算，选取合理的可接受标准。

●用于可比性研究可接受范围制定的所有批次，均来自使用病毒载体A 生产出的，符合产品放行标准的批次。

●定性属性的可接受标准与产品放行标准相同。

通过可比性研究批次的生产，将使用病毒载体B 生产出的批次数据与这些预设的可接受标准进行对比。符合以下标准则认为研究结果初步符合要求：

●所有关键工艺参数均符合预设范围。

●所有中控检测项目均符合预设范围。

●所有产品检测结果均符合可比性研究范围。

●杂质清除能力无显著差异。

●生产过程的收率等其他工艺过程表现符合预期，无显著异常。

在此基础上建议进一步对3批病毒载体A的批次与病毒载体B 的批次数据进行对比分析，经由技术专家进行判断和总结，如发现平行运行批次的数据与病毒载体功能相关的指标有明显差异的，如转导效率等，需分析原因，确定是否影响工艺稳健性及产品质量，如有影响，则认为可比性研究的结果不符合要求，需制定纠偏措施后重新研究。如无影响，则认为可比性研究最终符合要求。

9 生物安全防护

本章主要内容：

细胞治疗产品生物安全防护的总体原则

产防护需要考虑什么

人员防护需要考虑什么

环境防护需要考虑什么

法规要求…　　…….

药品生产质量管理规范(2010年修订)生物制品附录

第五条　生物制品生产企业在生产质量管理过程中，应当按照国家有关生物安全管理法律法规、生物制品生产检定用菌毒种管理规程等建立完善生物安全管理制度体系，应当对包括生物原材料、辅料、生产制造过程及检定等整个生物制品生产活动的生物安全进行评估，并采取有效的控制措施。

第六条　应当加强对关键人员的培训和考核，培训内容至少包括相关法律法规、安全防护、技术标准等，并应当每年对相关人员进行专业考核。

从事生物制品生产、质量保证、质量控制及其他相关人员(包括清洁、维修人员)均应根据其生产的制品和所从事的生产操作进行专业知识和安全防护要求的培训。

背景介绍

广义的生物安全是指与生物有关的各种因素对社会、经济、人类健康及生态环境所产生的危害或潜在风险。狭义的生物安全是由动物、植物、微生物等生物给人类健康和白然环境可能造成不安全的防范：本章节主要关注细胞治疗产品的生物安全，其风险主要来源于以下方面：

供者材料来源于人体，可能含有传染病病原体，且生产过程中难以去除。

●产品本身为活细胞，容易受到微生物污染或交叉污染。

●供者材料或产品本身属于患者的遗传样本，应满足《生物安全法》的相关要求。

●基因修饰细胞使用的转基因手段，需要采取防护手段避免对操作人员和环境的影响。

□技术要求

细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)

四、原则

(二)鉴于细胞产品的以上特殊性，企业应当对从供者材料采集到患者使用的全过程采取特殊控制措施，至少包括：

2.建立生物安全管理制度和记录，具有保证生物安全的设施、设备，预防和控制产品生产过程中的生物安全风险，防止引入、传播病原体。

五、人员

(二)从事细胞产品生产、质量保证、质量控制及其他相关工作(包括清洁、维修人员等)的人员应当经过生物安全防护的培训并获得授权，所有培训内容应符合国家关于生物安全的相关规定，尤其是预防传染病病原体传播的相关知识培训。

六、厂房、设施与设备

(六)用于供者材料和细胞产品的传染病病原体标志物检查，或对含有传染病病原体样品进行检测的实验室，应符合国家关于实验室生物安全的相关规定，应当有原位灭活或消毒的设备。

七、供者筛查与供者材料

(一)企业应当建立供者筛查和检测标准及供者材料的质量标准，并综合考虑微生物的生物安全等级、传染病类别和细胞产品的预定用途等因素进行风险评估，定

期回顾其适用性。

企业不得接收不符合质量标准的供者材料。

生物安全管理体系通用要素应纳入EHS体系，遵照持续改进的原则进行管理，体系要素主要包括：

●组织与人员方面：建立生物安全专家委员会，进行指导和咨询，可聘任外部专家。人员符合相应资质，实验室符合相关要求，开展生物安全培训等。

●风险与设施方面：开展生物安全风险评估，应满足不同等级生物安全区域的通用要求、不同等级实验动物设施的生物安全要求、典型生物安全设备要求(生物安全柜、安全设施等)、空调系统与公用工程系统、生物安全安保要求等。

●流程与制度：包括微生物学操作规范、消毒、去污染与灭活、重组 DNA/ 基因修饰技术要求、废弃物管理(含废水、废气)、健康监护与免疫接种、生物安全事故与应急、个人防护、感染性物质的运输(厂内、厂外)、菌毒种管理、生物安全信息告知与维护等。

●其他要求：化学品操作危害防控、火灾和电气风险防控等。

对于新引入的产品，企业应开展生物安全风险评估，根据企业生产产品特性，结合《病原微生物实验室生物安全管理条例》《人间传染的病原微生物名录》《WHO实验室生物安全手册》以及其他相关规范，进行分级分类管理。

本节主要围绕产品防护、人员防护、环境防护三个方面综合阐述本领域应额外注意的要点。为确保生物风险可控，涉及感染性材料时，企业应参照《生物安全法》《实验室生物安全通用要求》《WHO实验室生物安全手册》《疫苗生产车间生物安全通用要求》等，建立生物安全管理体系，必要时也可参照美国、欧盟、加拿大等国家或地区最新公布的研究成果进行补充完善。

9.1 产品防护

细胞治疗产品应建立从供者材料采集开始，至产品生产使用全过程的生物安全防护体系：

●供者材料采集和运输过程中应建立样本保存容器的密封与防混淆策略。

●产品生产过程中应建立完善的防混淆追溯体系，尽可能应用信息化、自动化、密闭生产系统，以防止产品污染。

●进行手工操作及开口操作时，应确保操作环境符合无菌制剂生产环境要求，操

作人员应符合健康要求，并接受培训和考核以降低风险：

应建立适宜的防止交叉污染的硬件与规程策略，避免不同供者、不同产品之间的交叉污染。

对于基因修饰载体，应设置独立的操作区域与隔离策略。

0产品运输过程中，应设计符合产品特性的包装形式，避免环境病原体的侵入，应尽可能采用专用的运输载具，避免使用可能存在风险的载具：

具体防止交叉污染的措施可参考本分册细胞治疗产品部分“3.2污染和交叉污染的控制”

9.2人员防护

细胞治疗产品的人员防护应符合以下要求：

0从事细胞治疗产品生产、质量保证、质量控制及其他相关工作(包括清洁、维修等)的人员必须经过生物安全防护相关知识的培训并经考核合格后上岗。

职业健康管理部门及时发放劳动防护用品

0从事细胞治疗产品生产、质量保证、质量控制及其他相关工作(包括清洁、维修等)的人员应正确佩戴相适应的防护用品

从事暴露操作的人员需经体检合格，必要时应接种相应的疫苗

0应针对病原微生物泄露、人员感染等事件，建立相应的应急管理规程，对从事细胞治疗产品生产、质量保证、质量控制及其他相关工作(包括清洁、维修等)的人员进行定期培训以及定期应急演练，提高人员面对突发事件的应急处置能力。

●对医院端人员和运输人员进行培训并考核，通过考核后方可开展相关工作。

9.3环境防护

细胞治疗产品需满足相关的环境防护要求，包括：

0生产必须符合环境法规关于保护空气、地表水、地下水等的要求，应制定废气排放、废水排放、危险废弃物处置等制度和措施，获得相应监管部门的批准。

●细胞治疗产品可能涉及来源于人体的材料，因此需对可能接触、包含、分离后所产生的废物、废耗材、废液、废气，依照其可能存在的病原体、生物污染特性进行收集与灭活处理。所产生的医疗废弃物，如含有残留血液的采集容器等，应妥善收集隔离后，委托具备资质的医疗废物处理机构进行处理。对生产过程中的可能存

在环境危害的检验样品，同样应进行集中收集与灭活处理。

●对基因载体，包含人为构建引入的基因片段，如耐药基因等，泄露至自然环境中存在重组引入天然菌株、生物导致突变的风险。因此应首先评估此类物质的生存与复制特性，对存在仅依赖自然环境自我复制或整合的风险物质，应考虑通过特定生产步骤灭活，消除基因片段的复制和传播能力。

实例分析

生物安全防控需要在企业生物安全管理部门的组织下，根据生物危害等级进行分级分类管理，对可能的风险点进行识别，进而采取必要的措施进行防范。

以某生产细胞治疗产品操作涉及某病毒(生物等级为二级)为例，进行生物安全防护整体策略的说明，风险点包括但不限列举项，仅供参考，详见表9-1:

表9-1 细胞治疗产品生物安全风险及防护措施

序号	项 目	风险点	防护措施
1	供者材料包装	1.供者材料容器不坚固、密合不严，有可能导致样品溅洒、溢出、渗漏 2.供者材料运输包装不符合生物安全要求，可能导致样品的侧翻、渗漏，造成环境扩散	供者材料采用采血容器、样本包装袋和采血盒三层包装。第一层包装采血容器，密封，具备一定的抗压能力，能够防止泄漏，并被包在第二层包装内；第二层包装样品包装袋，密封，能够防止泄漏，对于阳性供者材料采用有生物安全标识的样品包装袋；第三层包装采血盒，采用硬质材料，保护内容物，避免内容物振动和泄漏。包装完成至实验室接收前，禁止开启包装；运输过程的冷链包装采用保温箱的形式，均使用经过验证的保温箱，能够满足供者材料的运输要求
2	供者材料暂存	1.现场存在多份供者材料时，供者材料存在混淆的可能 2.阴性和阳性供者材料存在交叉污染的可能	供者材料间采用物理隔离；每份供者材料多层包装；包装上有标签可以进行标识；阴性和阳性供者材料分别有独立容器或设备暂存
3	供者材料运输	1.使用不合格车辆运输，可能会对环境造成污染或人员造成伤害 2.运输过程中监管不力，造成供者材料的丢失，可能会对环境造成污染或人员造成伤害 3.运输人员培训不到位，操作不当	1.选择经质量部门审计合格并签署质量协议的物流公司进行运输，运输车辆为密闭式运输工具且都在企业备案，避免社会物流运输带来的安全风险 2.所有运输途中的供者材料均可通过系统进行线上监控，能够获取供者材料所处位置及温度等信息，当出现了与运输路线偏离的情况，第一时间沟通了解情况，如出现供者材料丢失，立即上报部门领导，并向相关管理部门报告，必要时报 警 3.对运输人员定期进行培训

续表

序号	项 目	风险点	防护措施
4	供者材料接收	接收过程容器溢漏可能会对供者材料接收人员造成伤害或对供者材料接收区域造成环境污染	1.人员接收供者材料前，穿戴好防护服、帽子、口罩、手套等个人防护用品 2.供者材料接收环境备有消毒剂，需对接收的供者材料进行表面消毒后接收 3.如容器出现溢漏，尽快对接触的部位进行清洗和消毒，降低感染的危险，尽快就医 4.溢漏的容器、按照废弃物的处理流程，进行相应灭活处理后，转交到危废间
5	供者材料（样品）送检	容器如有溢漏，感染性样本可能会对供者材料接收人员造成伤害或供者材料接收区域造成环境污染	1.人员接触供者材料前，穿戴好防护服、帽子、口罩、手套等个人防护用品后进行检测 2.容器如出现溢漏，尽快对接触的部位进行清洗和消毒，降低感染的危险，尽快就医 3.溢漏的容器，按照废弃物的处理流程，进行相应灭活处理后，转交到危废间
6	供者材料操作	供者材料操作过程中出现溅洒，造成人员伤害或台面、地面等环境污染	1.使用生物防护二级的设备(如生物安全柜)，防止血液分离过程意外洒溅到操作人员身上 2.在SOP中规范人员的操作，动作标准、轻缓，避免溅出 3.若有意外溅出污染，污染到的操作台面、地面及其他物品立即用经验证的方法进行灭活处理，废弃物按医疗废物进行处理
7	产品运输	1.使用不合格车辆运输，可能会对环境造成污染或对人员造成伤害 2.运输过程中监管不力，造成供者材料的丢失，可能会对环境造成污染或对人员造成伤害	1.运输供者材料的车辆均要求为封闭式运输T具，且负责供者材料运输的均为自有物流人员或是经过审计合格备案后的第三方物流公司，避免社会物流运输带来的安全风险 2.所有运输途中的供者材料均可通过系统进行线上监控，能够获取供者材料所处位置及温度等信息，出现与运输路线偏离的情况时，第一时间沟通了解情况，如出现供者材料丢失，立即上报部门领导，并向相关管理部门报告，必要时报警
8	产品暂存	可能会出现产品溅洒、溢出、渗漏的情况，会对环境或人员造成伤害	出现溅洒、溢出、渗漏的情况，及时对所存放区域消毒处理，产生的垃圾按照医疗废弃物处理
9	清洁消毒	操作完毕后，若不及时对工作台面、生物安全柜等现场或使用后的设备进行消毒，则有可能会造成操作间环境污染或人员感染	1.操作完毕后，及时对操作所涉及的场地及设备表面用经过验证的清洁消毒方式进行处理 2.消毒完毕后，人员由退更问先脱去手套，将手套外表面翻转入内，再脱去防护服，将防护服外面卷向里面，装到专用容器内。阳性室内使用的防护服或碰到感染性废弃物的防护服灭活后进行清洗，其他的防护服放置待清洗区

续表

序号	项 目	风险点	防护措施
10	危险废弃物处置	1.废弃物分为感染性废弃物和损伤性废弃物 感染性废弃物有废培养袋、废离心管、废弃的样本、废外周血、废手套等，若处理不当，可导致感染或者致病因子外泄而伤害人员和污染环境 损伤性废弃物，如一次性使用的注射器等，未按照要求处理，存在意外刺伤或划伤人员的隐患 2.废弃物随意扔放在危废间，导致感染因子外泄而伤害人员和污染环境或者损伤性废弃物存在意外刺伤、划伤人员的隐患 3.废弃物大量堆积在危废间，造成环境污染 4.危险废弃物的处置单位不符合资质要求，导致环境污染或者人员感染 5.废弃物存放的建筑物不符合法律法规要求，造成环境污染或者人员感染	1.废弃物处理遵循《危险废物管理制度》等制度要求，分类收集，规范处置 所有损伤性废弃物放置于有警示标识的硬质、防漏、防锐器刺破的专用利器盒中，所有感染性废弃物放置于有警示标识的医疗废弃物专用包装袋中，进行灭活后转移到危废间 2.按照《危险废物管理制度》,安全环保部负责核实接收危废的种类和重量，并现场填写危废暂存记录表，做到危废物按照种类定置存放 3.按照《危险废物管理制度》,应确认危废间的危废储量和处置公司的实际情况，及时联系有资质的处置公司进行转运处置，并现场填写危废转移记录表 4.按照《危险废物管理制度》对危废处置单位的资质进行审核 5.危废间地面及裙脚具有防渗措施，如防渗层为2mm厚高密度聚乙烯，渗透系数≤10-1° cm/s
11	电力供应	若实验室没有布置双路供电，或电力供应不稳定，存在实验活动突然中断、实验设备停止工作等所带来的相关安全风险	1.布置双路供电 2.主要设备配备备用电源 3.配备报警系统
12	电气操作	操作间活动涉及的电气操作，包括实验室工作区电气设备的启动、关闭、安装、空调机组等电气设备的启动、关闭等，这些电气操作的过程中可能产生触电、电击、电气故障等风险	1.电气设备的设计制造符合相关安全标准的要求，并由取得电工资格证的人员进行操作 2.新的、改装过的，或修理过的电气设备，在未经电工完成电气安全测试和设备符合安全使用要求之前，不允许使用 3.电气设备使用人员接受正确操作的培训，定期检查设备中可能引起电气故障的破损，只有电工才能从事电气设备和电路工作，禁止从事未经授权的工作
13	维修维护	阳性区域生物安全柜、隔离器、传递窗、排风过滤器等维护及更换高效时，可能对维护人员带来感染风险	1.维护人员进行生物安全专业培训 2.配备隔离防护服、防护毒面罩、防护手套等防护装备 3.作业前对设备进行消毒

续表

序号	项 目		风险点	防护措施
14	人员结构		新进人员无处理意外事件经验，风险会增加	根据岗位要求进行培训；新上岗操作人员均有老员工带领操作
15	人员资质		未执行相关的专业知识培训并未获得上岗证，无法保证工作质量和安全	建立员工培训制度，职前职后进行培训，合格后方可上岗操作
16	人员健康		操作人员患有传染病、皮肤病以及皮肤有伤口者、对产品质量和安全性有潜在不利影响的人员	1.操作人员应定期体检，患有传染病、皮肤病以及皮肤有伤口者、对产品质量和安全性有潜在不利影响的人员，均不得进入操作区 2.操作人员应当接种相关疫苗
17	生物安全培训		工作人员上岗前没有接受严格的生物安全以及相关生物安全设备操作的技术培训，易造成生物安全事故的发生	建立完善的生物安全培训制度，规定上岗前培训、定期培训的工作流程。操作人员须经上岗前培训并考核合格方能上岗；公司每年定期组织培训以及应急演练，确保人员能够熟练操作生物安全设备、设施
18	生物安全设备设施	个人防护用品	个人防护用品如若穿戴不规范、大小不合适或使用过期的防护用品等，将会导致效果降低、甚至失效，均可能存在人员感染或环境污染的风险	1.操作人员上岗前进行防护用品穿戴培训并经考试合格 2.操作人员选择大小合适、有效的防护用品 3.公司定期对防护用品的有效期进行检查，及时更换到效期的防护用品
		应急救治设施和用品	实验室若没有配备洗眼器、应急药箱等必要的应急设施和物品，或配备的急救用品种类不全、不合适或过期，则导致应急时无法发挥作用	实验室内配备洗眼器、功能正常，配备的75%医用酒精、过氧乙酸(PAA)或其他消毒剂、创可贴等急救物品与实验活动相适应，并在有效期内使用，由专人负责管理，进行定期维护、清理和更新
		消毒灭菌剂	消毒产品过期、配制方法或浓度不正确、种类选择不合理，都将会导致消毒效果降低、生物灭活能力降低，或对物品腐蚀性增加、对皮肤造成刺激等问题	所使用的消毒灭菌剂为75%医用酒精、PAA，分别从有资质的正规生产企业购买且按照说明书正确操作使用，消毒过程中人员全程穿戴防护服、手套、口罩等个人防护用品
19	非常规活动		1.进入操作间可能会引起操作间感染特别是不慎打翻、打破血管或损坏仪器部件情况 2.实验室运行过程中其他人员需要进入实验室参观时，存在影响实验正常运行的风险	1.进入人员绝对不能私自动用操作间内有标志的危险品(除非经过授权) 2.实行人员准入、登记制度。任何外来人员进入实验室应由实验人员全程陪同 3.禁止未穿防护服的人员随意进出实验室的防护区域、同时，也禁止穿防护服的人员走出实验室的防护区域

续表

序号	项 目	风险点	防护措施
20	被误用	操作间活动结束后不及时对操作场所进行清洁、消毒，其他操作人员在不知情的情况下可能误用标本、实验材料和设备设施等，导致人员感染和操作间环境污染等	1.操作过程中正确使用实验材料和设备设施，材料、试剂等有明确的标识，便于使用 2.操作结束后，立即对工作场所进行消毒处理，且整理好操作用到的仪器设备等材料 3.实验室实行准入制度，非实验人员禁止入内(除非授权)
21	管理体系	如果组织结构不健全、设置不合理，体系文件与实际不匹配，以及部门职责不清或者衔接不当等就可能带来风险	定期对生物安全管理制度的适用性进行回顾和评估，必要时进行修改、完善，以确保生物安全管理体系持续有效地运行

生物安全防控是持续改进的，随着技术的提升、人员意识的提升、工艺的变更，以及在日常活动中发现的问题，防控措施应不断更新，另外需要将异常事件采取的纠正预防措施转化为日常的防控，才能有效且持续改进控制手段，避免生物安全事件的发生。

10产品追溯系统

本章主要内容：

T 细胞治疗产品搭建产品追溯系统的一般性要求

如何建立产品追溯系统的用户需求文件

纸质系统和电子化系统的关系是什么

背景介绍

细胞治疗产品应建立产品可双向追溯的管理体系，以确保产品从供者到受者全过程“端到端”的可追溯性闭环管理，严格防控不同供者样品(或不同批次样品)间的混淆。要实现细胞治疗产品“端到端”全流程的防混淆/防差错，不仅在生产过程中需要进行防差错/防混淆的管理，还应从起始供者材料的采集、运输、生产、检验、放行及产品贮存、运输直至医疗机构端的使用进行全流程的防差错/防混淆的质量管理，建立产品的全程追溯系统确保细胞治疗产品的质量及用药安全。同时，细胞治疗产品的全程追溯系统还应考虑和政府监管系统的有效对接。

自技术要求

细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)

十一、产品追溯系统

(一)企业应当建立产品标识和追溯系统，确保在供者材料运输、接收以及产品生产和使用全过程中，来源于不同供者的产品不会发生混淆、差错，确保供者材料或细胞与患者之间的匹配性，且可以追溯。

该系统宜采用经验证的计算机化系统，应当可以实现对产品从供者到患者或从

患者到供者的双向追溯，包括从供者材料接收、运输、生产、检验和放行，直至成品运输和使用的全过程。

(二)企业应当对每一个供者编制具有唯一性的编号(或代码),用于标识供者材料和产品。

(三)企业应当建立书面操作规程，规定供者材料和产品在接收、运输、生产、检验、放行、储存、发放过程中正确标识与核对标识信息的操作和记录，确保可识别供者且具有唯一性的编号(或代码)不会发生标识错误或遗漏，确保供者材料或细胞产品与患者之间的匹配性，且具有可追溯性。

(四)企业应当与医疗机构建立信息交流机制，及时交流供者材料采集、产品使用以及与产品质量相关的关键信息等。

A. 合规性管理

对于电子化的追溯系统，应符合国家药监局发布的《药品记录与数据管理要求》(2020年第74号)及GMP计算机化系统附录的要求，确保数据在建立、修改、保存、获取以及恢复、备份等环节的可靠性和安全性。

B. 追溯流程管理

追溯系统需要通过唯一识别码联接“端到端”全流程中每一个利益相关者，包括：医疗机构、物流公司、上市许可持有人、委托加工厂、经销商、DTP药房等，实现“端到端”全流程的追溯和监控(图10-1)。

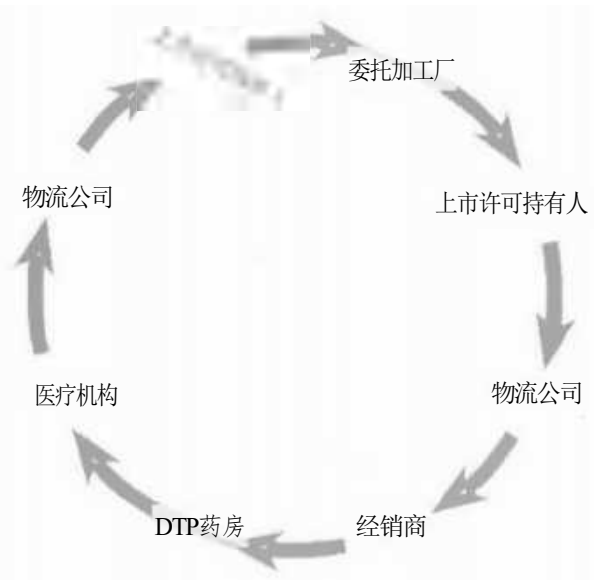


图10-1“端到端”全流程管理

指

细胞治疗产品的追溯体系在临床应用的不同阶段可以通过不同形式实施。例如：在早期临床试验阶段，采集和使用点比较集中，供应链简单，批次少的情况下，可

以采用纸质追溯体系；而随着商业化生产的实现，生产批次增多，终端医疗机构不断扩展，物流供应链变得复杂后，引入电子化的追溯体系是非常有必要的，当然，也可以考虑电子和纸质系统的结合应用。

企业在建立产品全流程双向追溯系统时，除了应满足一般药品GMP生产的追溯要求外，还应考虑具备以下功能：

0产品追溯系统应为全流程双向追溯系统，系统对患者供者材料伪名化，每个患者的一次单采对应一个唯一追溯码，并与相应的供者材料识别号、药品批号进行关联，确保在供者材料接收、GMP 制备过程关键操作过程、产品检验、产品流通、交付、使用过程中，不会发生混淆、差错，系统应覆盖细胞/组织体外运行全程。

●追溯系统中应确保能获取包括运输管理过程应记录完整的运输信息，将运输人员、紧急联系人等信息关联唯一追溯码，同时具备温度、定位的电子记录，具备报警功能，当产品温度、时效或位置等发生异常时，系统自动触发报警，并立即推送报警信息。

0应在单采血交接、工艺生产、产品流通交接关键节点设置操作人员进行电子签名，追溯系统应具备审计追踪功能。

o 追溯系统的数据可单独保存(若易于获取且明确可关联至相关药品，也可在批记录之外保存),但是应能确保一旦需要时，可以快速获取相关追溯性数据。

10.1 用户需求

企业确定需要建立追溯体系时，应当首先明确“用户需求”,并通过初步的风险评估，确定关键性和非关键性需求，建立用户需求文件，基本需求可以考虑以下功能：

A. 基础信息库建立和维护

0应建立“端到端”整个追溯闭环中每一个相关利益方的基础信息，包括：

医疗机构(医院)、科室、医护人员的具体信息，如名称、姓名、地址、联系方式等。

物流公司名称、地址及物流人员姓名、身份证号、联系方式等。

上市持有人及生产工厂信息，如工厂代码、联系人姓名、联系方式等。

经销商、DPT药房名称、地址、联系人姓名、联系方式等。

0产品名称、产品代码、运输要求、包装规格、使用剂量等。

0采集或输注所需的一次性套装名称、型号、编号等。

●应考虑基础信息的使用和维护过程中的安全性和可靠性

0系统使用和管理人员的权限级别设置。

o基础数据及执行记录的修改权限和审计追踪。

0各终端间数据共享和限制管理。

0应具备可靠的数据恢复和备份功能。

B. 追溯流程管理

在建立追溯管理系统时，需要相关业务部门共同分析讨论整个业务流程中每一个环节的步骤和具体操作要求，并通过患者唯一识别码和追溯系统衔接。

●工厂企业端

0采血申请及订单确认(血样标签打印等)。

o 血袋接收信息确认。

o 血袋质量放行。

o产品生产(一次性耗材管理、过程及产品、样品标签打印等)。

o放行待包装。

o 确定并出具回输订单(包装材料管理)。

c 包装并执行出厂放行。

o产品出库、物流交接(物流人员信息)。

o订单终止。

9产品销毁。

如果生产端使用了其他电子化生产管理系统，如制造执行系统(MES)、 实验室信息管理系统(LIMS)、 质量管理系统(QMS) 等，应确保和计算机化的产品追溯系统的有效联接，例如：物料/一次性耗材发放、标签打印、CoA出具、留样管理等。

●医院端

0采血准备及信息确认。

o 血袋交付，物流交接。

o产品接收，信息确认。

o产品使用。

o产品销毁。

●经销商/DTP 药房

o订单信息确认。

o 交付确认。

●监管机构端(必要时):获取产品追溯信息。

C. 电子签名

由于追溯系统涉及的相关利益机构多，细胞治疗产品从供者材料的采集到产品回输周期长，计算机化的追溯系统应能实现电子签名功能。

10.2电子化系统开发和功能设计

对于电子化追溯系统，在企业明确了用户需求后，应当和系统开发供应商充分沟通，共同开发系统，根据用户需求设计相应功能，形成功能要求文件。

10.3电子化系统功能实现和确认

电子化追溯系统一旦确定了用户需求和功能要求后，可以根据GMP 计算机化系统附录和确认与验证附录进行验证、确认后投入使用。

10.4纸质追溯系统

在临床早期阶段没有建立电子化追溯系统的情况下，也可以通过全程或部分纸质表单记录和传递方式来实现全程追溯，在数据管理和流程管理的基本要求上，纸质系统和电子化系统没有本质区别，可以作为电子化系统的应急备选预案，以确保业务的可持续性。

实例分析

自体CAR-T 细胞治疗产品在GMP生产追溯体系基础上建立全流程双向计算机化追溯系统

某自体CAR-T 细胞治疗产品生产企业为了满足商业化生产的需求，组建项目团队，开始搭建全流程双向计算机化追溯系统。项目包括项目建立、项目实施和项目交付阶段。本实例仅就项目计划和用户需求进行分析，项目的其他管理可以参考有关项目管理和验证管理指南予以实施。

A. 项目计划

在项目建立阶段，非常重要的内容是明确项目目标、范围、利益相关方和项目成员，以及其他项目管理的基本元素，如经费预算、时限、风险等，形成项目计划文件。

项目目标：建立“端到端”(医疗机构—企业—物流—医疗机构)全程双向计算机化追溯系统。

项目范围如下：

●数据库：医疗机构、患者、工厂、产品、物流、经销商、DTP 药房。

●流程

0主数据库的建立和维护。

0采血需求和需求确认(包括生成患者唯一识别码)。

0采血过程及血袋贴签、运输。

0工厂接收及放行血袋至生产。

o 产品收获。

o 产品检验并放行至包装。

o 输注需求及需求确认。

o产品包装及放行出厂。

o 产品运输物流交接。

0经销商和DTP 药房交接。

o 产品使用。

o 和公司现有的计算机化管理系统制造执行系统(MES)、 企业资源管理系统(ERP) 及实验室信息管理系统(LIMS) 的有效联接。

●项目组成员组成：供应链、生产、质量、仓库、商务、验证、IT 部门成员。

B. 用户需求

项目组成员对既定项目范围内全流程的每一环节进行拆解，通过调研、讨论的方式，分析具体用户需求，包括关键和非关键项，形成用户需求标准(URS)。

需求关键性判定依据如下：

●是否为GMP 法规具体条款要求。

●是否直接涉及批次混淆风险控制。

●是否影响关键质量控制参数。

:是否影响数据完整性。

0是否直接用于产品质量处置。

主数据库建立和维护要求如下：

0医疗机构(医院及科室)名称、编号、地址、联系方式应能被执行输入、查看、修改、生效、废止等操作。

医护人员姓名及其所在医院、科室，联系方式、单采资质期限等信息应能被执行输入、查看、修改、生效、废止等操作。

0物流公司名称、编号、地址、联系方式、资质期限应能被执行输入、查看、修改、生效、废止等操作。

C物流人员姓名、身份证号、资质期限、联系方式应能被执行输入、查看、修改、生效、废止等操作。

●生产工厂名称、代码、联系方式应能被执行输入、查看、修改、生效、废止等操作

0产品信息(包括产品名称、产品规格、产品代码、包装规格等)应能被执行输入、查看、修改、生效、废止等操作。

输注及单采所需一次性套装名称、型号、品牌等信息应能被执行输入、查看、修改、生效、废止等操作。

0经销商名称、地址、编号、联系方式应能被执行输入、查看、修改、生效、废止等操作。

o DTP药房名称、地址、编号、联系方式应能被执行输入、查看、修改、生效、废止等操作。

●数据库中数据变更应有审计追踪，能追溯到变更执行人、执行时间及执行原因。

o 数据库应根据使用者需求设立不同级别的使用权限，包括建立、维护、输入、编辑、查看等权限。

o 数据库应具有单位、编码、地点、时间等搜索功能，并根据需求形成可查阅或打印的报表。

0数据库应能支持数据建立、修改或废止的线上审批流程。

数据库应能支持附件上传及查看等功能。

追溯管理流程如下：

o 采血需求和采血确认

业务端提交采血需求申请，包括医疗机构信息、患者基础信息(姓名、身份

证号、年龄、诊断、传染病检查结果等)、计划采血时间、产品信息等。

o 系统应能自动生成患者唯一性编号及对应的追溯码，编号和追溯码一旦生成，应能被查阅或废止，但不得替换或删除。

0采血需求应能被自动通过邮件或其他方式通知到相关人员，确保及时响应。

o 供应链端应能根据实际生产计划，确定或修改采血日期，并自动通知相关人员。

0系统应能支持采血申请和采血确认的线上审批流程。

o 系统应能支持血袋及运输标签打印，并包含必要的信息，如药品名称、批号、生产日期、患者唯一性编号和追溯码等，标签打印应具备审计追踪功能。

●采血及物流交接

o 采血端应能进入系统核对确定了的采血订单，包括患者信息、产品信息及标签信息。

0应能输入采血当日患者基本情况、采血设备、采血起始及结束时间、采集物体积、抗凝剂使用情况、运输温度计信息、冷链封箱时间、采集一次性套装型号，以及异常情况记录、运单号等信息记录和相关附件。

0采血及物流及交接完成，并确认后，系统应能通过邮件或短信自动通知相关人员。

o 应能通过物流条码扫码操作，将血袋的患者追溯码和物流条码关联，以便运输过程追踪。

●血袋接收和放行

0工厂应能通过扫描血袋追溯码核对订单的患者信息、采集信息、标签信息等。

o 应能输入接收信息，如接收时间、随箱文件核对、外观检查结果、随箱温度记录等，并完成物流交接确认，系统自动通知相关人员。

o 检查核对完成后，系统应能执行QA 放行/拒绝/隔离等操作。

o 应能记录接收过程中的异常情况。

●生产和标签打印

o 应能通过追溯码扫描，将追溯码和制造执行系统的生产批号关联，确定生产批号、生产日期和有效期至信息，并打印标签，标签应有唯一性追溯码。

〇标签打印应具备审计追踪功能。

●检验和放行至包装

系统应能执行QA 在线放行/拒绝/隔离等操作，并具备在线审批和异常事件备注功能。

系统应能支持上传相关附件，以及异常情况记录。

o 产品输注需求及需求确认

业务端提交产品输注需求申请，包括医疗机构信息、患者信息(姓名、唯一性编号、身份证号等)、计划输注时间、产品信息等。

需求经在线审核确认后，系统应能自动生成运输标签并执行打印，并自动通过邮件或短信通知相关人员

0产品包装及放行出厂

系统应能通过追溯码扫码核对患者信息和标签信息。

系统应能执行QA 在线放行/拒绝/隔离等操作，并具备在线审批和异常事件备注功能。

●物流交接及产品运输

应能输入运输信息，如运输单号、随箱温度计信息、冷链箱信息，包括封签号和封箱时间等。

• 应能通过扫码将运单号和患者追溯码关联，核查患者信息。

经销商、DTP 药房端应能通过扫描追溯码确认产品信息及运输时限。

物流人员一旦在线确认接收后，系统应能白动通知相关人员。

0医疗机构端接收和使用

应能在系统中核对冷链箱信息、封签号、温度记录等，并备注异常情况，在线确认接收。

2产品一旦确认接收，系统应能通过邮件或短信立即自动通知相关人员。

应能通过扫描患者唯一追溯码，核对患者信息、产品信息、随箱文件、标签信息等，并在线确认。

应能记录产品离开冷链箱开始复融时间、结束复融时间、开始回输时间、回输结束时间等信息，并备注输注过程中的异常情况。

应能在系统中确认输注完成，并自动通过短信或邮件通知相关人员。

●订单终止和产品销毁

系统应能执行订单终止和产品销毁操作，并能上传相关附件，执行在线审核流程。