

# 细胞治疗指南

# 细胞治疗工艺开发和生产的注意事项

无论您是刚接触细胞治疗生产, 还是希望扩大现有工艺和知识库, 本指南都将为您提供成功生产细胞治疗产品的主要注意事项。细胞治疗指南综述了最新的方法、惯例、资源、应用等, 以支持细胞治疗生产工作流程的每一步。





# 目录

1. 细胞治疗所需生产原材料的注意事项
2. 供应商资格认定过程概述
3. 细胞分离、改造和扩增概述
4. 细胞分离
5. 细胞改造
6. 细胞扩增
7. 用于细胞治疗的自动化封闭系统
8. 细胞治疗的特性研究和分析
9. 影响细胞治疗产品低温保存的因素
10. 细胞治疗供应链物流

# 第1节： 细胞治疗所需生产原材料的注意事项

## 简介

在细胞治疗产品转化至临床的过程中，决定成功的因素在于影响生产的早期工艺和材料选择上的决策。不仅是最终获批药品中的材料（即辅料）需要满足一定的质量标准，而且生产工艺中使用的原材料（或辅助材料）也必须符合严格的质量标准。如果产品开发初期选择的原材料在临床试验和商业化阶段不能满足必要的监管标准，就需要用符合标准的材料来替代。这些替代品可能会导致成本和时间的大幅增加。

要想取得细胞治疗临床试验和商业化的成功，最佳做法是：制定一个以最终目标为导向的原材料策略。这种考量更长远，侧重于在细胞治疗产品开发早期就使用更高等级的原材料，以满足临床试验的必要监管条件，并最终实现获批产品的商业化生产。该策略能够增加成功概率，避免突发的代价高昂的意外，导致错过有前景的细胞治疗候选方案。

本节高度概述了原材料选择的注意事项，以降低风险并符合当前的监管指南。有关这一主题的更深入讨论，请参见本节末尾“其他资源”部分。

## 什么是原材料

原材料，在美国法规中也被称为辅助材料\*，是指在生产过程中与细胞治疗产品接触，但不保留在最终治疗产品中的成分。例如，细胞培养基和生长因子是生产细胞治疗产品时采用的原材料。虽然最终产品中并没有原材料，但原材料仍然很重要，因为它们可能对最终细胞治疗产品的安全性、纯度和效价有影响。

按中国《药品生产质量管理规范（2010年修订）》中第三百一十二条第三十五条对物料的定义，生物制品的原料是指原材料。同时，在中国药典2020版第三部《生物制品通则-生物制品生产用原材料及辅料质量控制》中规定，对于生物制品

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。按照来源可将生物制品生产用原材料分为两大类：一类为生物原材料，主要包括来源于微生物，人和动物细胞、组织、体液成分，以及采用重组技术或生物合成技术生产的生物原材料等；另一类为化学原材料，包括无机和有机化学材料。



监管指南建议开发者尽可能使用治疗级原材料，因为它们对最终细胞治疗产品的特性和安全性有潜在影响。不幸的是，并不是每种使用到的原材料都有治疗级版本。因此，最好选择根据适当的现行生产质量管理规范（cGMP）生产的原材料。虽然有针对仅供研究使用（RUO）和体外诊断（IVD）使用开发的相同材料，但特别是当治疗产品进入到临床试验并有望实现商业化时，这类材料往往缺乏一些必要的溯源记录和测试。在长期细胞治疗产品生产过程中，应避免使用为RUO或IVD用途设计的原材料。

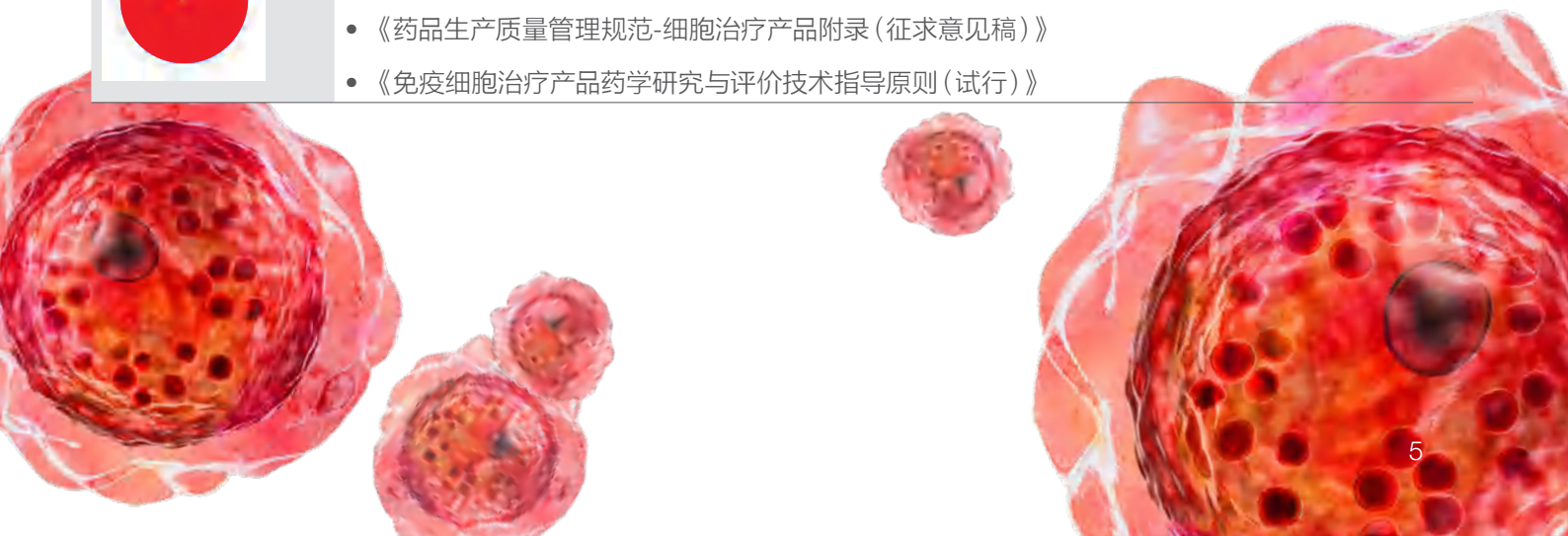
与药品和医疗器械不同的是，没有针对原材料生产的特定cGMP指南。监管指南（如USP<1043>和ISO276）仅仅建议选择根据适当质量管理体系生产的原材料，这是一个相当模糊的术语。供应商可能声称他们的产品是在cGMP条件下生产的，此类声明包括：基于遵循特定cGMP指南的cGMP声明；独立的质量管理体系认证（如ISO9001）；或者如果该工厂生产的是受监管的产品，甚至可能声称经过监管机构的检查。然而，根本没有所谓的“GMP级”材料。

要了解按照cGMP生产原材料的含义，首先要从已发布的监管指南开始。表1列出了不同地区的一些主要指南。

\*不同地区对“原材料”和“辅助材料”这两个术语可能存在一些混淆——欧洲使用“原材料”一词，而美国使用“辅助材料”一词。辅助材料与美国联邦法规第21篇第1271部分中定义的“加工材料”和美国现行药品生产质量管理规范第211部分中定义的“成分”同义。

表1.主要管辖区的原材料监管指南。

地区	原材料监管指南
国际 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• WHO生物制品GMP</li> <li>• 各种ISO标准 (ISO 9001、13485和TC276)</li> <li>• 各种ICH指南 (ICH Q5A、ICH Q5D、ICH Q3、ICH Q2)。</li> </ul>
澳大利亚 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 澳大利亚生物制剂监管指南 (ARGB) —用于生产的关键原材料</li> </ul>
日本 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PMDA MHLW第210号公告—生物成分标准</li> <li>• 可用的原材料认证流程</li> </ul>
欧洲 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (EC) 第1394/2007号ATMP法规</li> <li>• 欧洲药典5.2.12用于生产细胞和基因治疗药物的生物源性原材料</li> <li>• 欧盟药事法规第4卷GMP指南 (2018年5月)</li> </ul>
美国 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• USP &lt;1043&gt;—用于细胞、基因和组织工程产品的辅助材料</li> <li>• USP &lt;92&gt;—用于细胞治疗生产的生长因子和细胞因子 (限于rh-IL4)</li> <li>• FDA化学、制造和控制 (CMC) 指南</li> <li>• 美国联邦法规第21卷第1271部分第1271.210节—GTPs</li> <li>• 美国联邦法规第21卷第211部分E子部分—GMPs</li> <li>• 可用的主文件流程</li> </ul>
中国 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 中国药典第三部《生物制品生产用原材料及辅料质量控制规程》</li> <li>• 《药品生产质量管理规范 (2010年修订)》</li> <li>• 《人用基因治疗制品总论 (公示稿)》</li> <li>• 《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》</li> <li>• 《药品生产质量管理规范-细胞治疗产品附录 (征求意见稿)》</li> <li>• 《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则 (试行)》</li> </ul>



一般而言，cGMP是指“在生产、加工和包装制剂时所使用的、方法和控制的最低要求”，以确保该产品是安全的，并具有正确的效价和成分<sup>(1)</sup>。这些通用的cGMP要求包括：人员规范；质量控制计划和功能；设施和设备；组件、容器和封闭系统的控制；生产和记录；实验室控制；包装、标签和分销；以及记录保存。要求示例见表2。

表2.cGMP生产基本组成示例<sup>(1)</sup>。

系统	示例
材料控制	仓库中来料的检阅和放行过程
GMP分析	有质量保证监督的质量控制实验室
标准操作规程	具有偏差及纠正和预防措施(CAPA)过程的批记录文件
合格操作者	必要的着装、安全和操作培训
有环境控制的受控访问	键控访问ISO 7级环境, 并有ISO 5级空间用于无菌处理
环境监测和清洁周期	滴板、拭子测试、颗粒监测以及定期消毒和清洁

USP<1043>是全球最受认可的原材料指导文件之一。USP <1043>提出了一个基于4个风险类别的风险模型, 用于评估每种原材料(表3)。这些风险类别由生产商要求的具体活动来定义<sup>(2)</sup>。每个风险等级所需的活动是分阶段进行的, 所有产品都需要一个子集(例如, 分析证书和批间测试)。随着与原材料相关风险的增加, 还需要进行不同的活动(例如, 对含有动物产品的残留材料进行安全测试)。产品进入临床试验后期时, 风险也会随之增加。产品开发者应着眼于获取1级和2级原材料; 3级原材料不太有利; 临床工作应避免使用4级原材料。鉴于做不到零风险, 开发者在选择原材料时要力图保持尽可能低的风险, 同时还要保持性能。

表3.USP <1043>原材料风险类别。

层级	风险等级	说明	示例
1	最低	高质量并适合CGT*的生产	用作细胞培养基添加剂的注射用重组人胰岛素
2	低	特性鉴定良好, 预期用作原材料, 在符合GMP的质量管理体系下生产	Gibco CTS培养基和试剂产品
3	中	预期不作为原材料使用	RUO或IVD材料, 如一些细胞培养基
4	高	未在公认的质量管理体系下生产, 预期不作为原材料使用; 可能来自动物, 有毒, 生物活性不稳定	动物细胞或动物血清, 用于细胞培养的霍乱毒素, 或用于转基因表达的选择剂

\*CGT=细胞和基因治疗

在中国药典2020版第三部《生物制品通则-生物制品生产用原材料及辅料质量控制》中, 对生物制品原材料, 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四级, 不同风险等级生物制品生产用原材料至少应进行的质量控制要求见详见下表4。

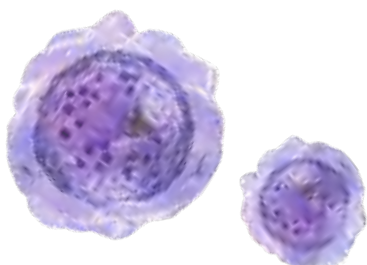


表4.中国药典表4中国药典2020版对不同风险等级生物制品生产用原材料的质量控制要求。

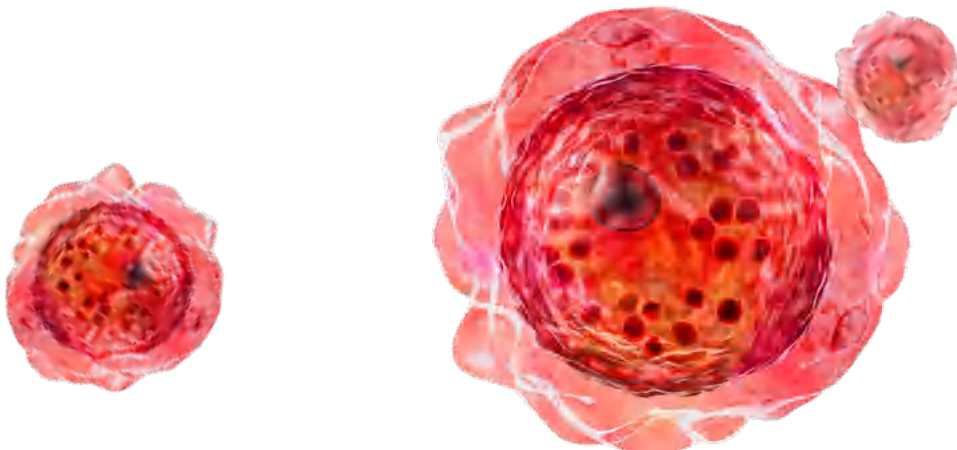
原材料等级	上市许可证明(如药品注册批件、生产许可证)	供应商药品生产GMP证书	供应商出厂检验报告	国家批签发合格证	按照国家药品标准或生物制品生产企业内控质量标准全检	关键项目检测(如鉴别、微生物限度、细菌内毒素、异常毒性检查等)	外源因子检查	进一步加工、纯化	来源证明	符合原厂家和中国相关动物源性疾病的安全性要求,包括TSE	供应商审计
第1级	✓	✓	✓	如有应供应	—	✓	—	—	—	—	✓
第2级	✓	✓	✓	—	抽检(批)	✓	—	—	—	—	✓
第3级	—	—	✓	—	✓	—	—	如需要	—	—	✓
第4级	—	—	✓	—	✓	—	动物原材料应检测	如需要	动物原材料应提供	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

注：“✓”为对每批原材料使用前的质控要求；“—”为不要求项目。

在中国药典中规定,对于不同风险级别原材料的质量控制,应充分考虑来源于动物(或人)的生物原材料可能带来的外源因子污染的安全性风险。生产过程中应避免使用毒性较大的化学原材料,有机溶剂的使用应符合药典通则“残留溶剂测定法”的相关要求。

中国国家药品监督管理局在2022年1月发布的《药品生产质量管理规范-细胞治疗产品附录(征求意见稿)》中对细胞治疗的物料进行了规定,如第二十六条【原材料控制】细胞产品生产用的生物材料,如细胞株、工程菌、载体、动物来源的试剂和血清等,企业应当保证其来源合法、安全并符合质量标

准,防止引入或传播传染病病原体。同时,在第二十七条【关键物料】中规定,企业应当对物料进行风险评估,以确定关键物料(如直接用于细胞产品生产的基因修饰载体或其他起始生物材料、细胞因子、生长因子、酶、血清等),关键物料的确应当有记录。对关键物料应开展入厂检验,并考虑特定风险及降低风险的其他措施(如加强质量控制)。对于在细胞治疗生产与检测过程中使用的体外诊断试剂,在此意见稿的第二十八条进行了相关规定,即用于特定传染病病原体(HIV、HBV、HCV及梅毒螺旋体)标记检查的体外诊断试剂及其管理,应采用经国家药品监督管理部门批准的体外诊断试剂。



### 细胞治疗生产中原材料的关键质量属性

选择生产细胞治疗产品的原材料时, 开发者通常关注四个关键的产品特性:

- 材料身份鉴别
- 纯度, 以及是否有杂质
- 批间一致性
- 储存和稳定性

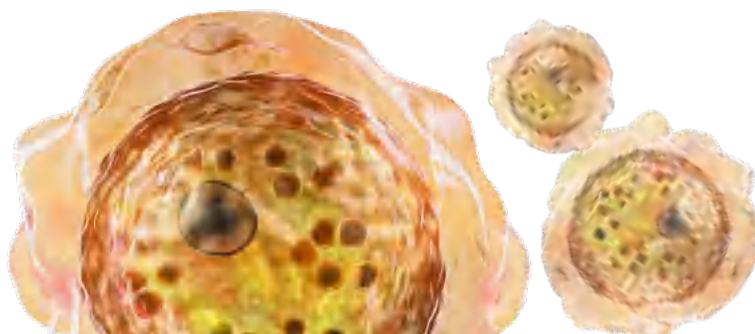
表5总结了针对每个特征要考虑的一些重要细节。由于关键质量属性缺乏全球标准, 细胞治疗产品生产厂商应选择符合该地区最严格要求的标准的原材料。

就材料身份鉴别来看, 细胞治疗产品生产厂商应密切注意生物安全特性, 以确定材料可能给设施、操作者和最终细胞治疗产品带来的任何风险。最好尽可能避免动物源成分。如果无法做到这一点, 那对这些原材料采取基于风险的管理方法进行分析就非常重要。在这个过程中需要考虑到以下因素:

- 可能的替代品 (例如, 重组蛋白)
- 病毒灭活过程
- 上游与下游使用 (越往下游使用原料产品, 风险越大)
- 材料等级 (例如, 符合cGMP vs RUO)
- 经证实的产品可追溯性和相关文件 (来自供应商)
- 原产国 (对CJD、BSE和TSE风险很重要)

表5. 四种关键原材料特性的考虑因素。

特性	考虑因素
身份鉴别和无微生物或病毒污染	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 关于分子组成或配方的所有信息</li> <li>• 对于专有材料, 关于活性组分活性的文件</li> <li>• 动物源材料的COO、健康声明和病原体检测</li> <li>• 所需的病毒检测、供体资格和筛选、人源材料的文件</li> </ul>
纯度和杂质	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 关于纯度的文件</li> <li>• 对于多组分产品, 活性成分的纯度</li> <li>• 杂质的鉴定应记录在案</li> <li>• 检测残留物的方法</li> </ul>
一致性	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 供应商努力在分析证书上体现批间一致性</li> <li>• 按照GMP生产的材料更容易证明一致性</li> </ul>
储存和稳定性	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 供应商建议的储存条件 (如温度、光线、湿度), 证明原材料保持稳定性能</li> <li>• 由稳定性测试支持的产品有效期, 反映产品作为原材料的使用情况</li> </ul>





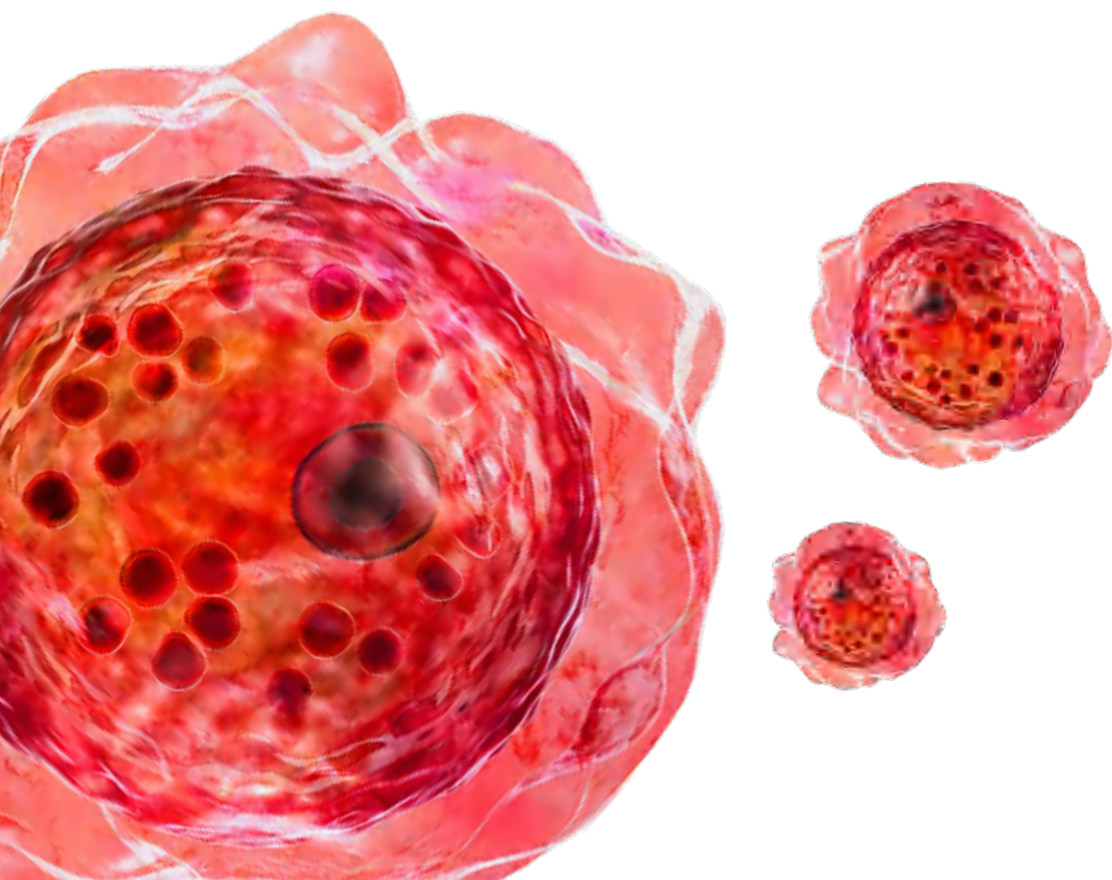
在生物安全领域内,有一些术语在使用上可能会产生混淆。在选择所涉原材料时,细胞治疗产品生产商应明确了解供应商对“无动物源成分”、“无血清”和“无异源成分”等术语的定义,以充分了解与原材料有关的潜在风险。

细胞治疗产品生产商在做出最终材料决策时,还需要考虑原材料的性能测试。供应商应提供性能数据,以反映产品作为原材料的预期用途。例如,使用CHO细胞系对培养基进行性能测试时,如果培养基的预期用途是生长T细胞,那么这种测试就没有什么用处。数据还应能够使开发者确定原材料的性能一致性,定量数据优于通过/未通过结果。为了准确评估数据并确定其与预期用途的相关性,供应商应提供所使用的测定方法,最好是使用参考测试方法(如美国药典或USP)。

开发者应尽可能选择有各论的USP级或EP级等药品级原材料。各论确保原材料符合由特定测试、操作步骤和接受标准确定的特定质量标准,包括身份鉴别、强度、质量和纯度。如

果没有各论,则应在供应商的材料文件(见下文,关键原材料文件)中找到一些(如果不是全部的话)上文讨论的重要属性信息。但是,开发者可能需要进行额外的测试,以便最终做出稳妥决策,并降低与原材料相关的风险。即使不存在全球质量标准,生产商最好选择经过充分特性鉴定的原材料,以确定与之相关的风险,包括:

- 分析证书上测试方法的数值规范,以证明批间一致性
- 侧重于生产工艺中预期用途的性能测试,并将稳定性测试与性能挂钩
- 原产地证书上提供的生物衍生原材料在一级、二级和三级水平上的可追溯性
- 在分析证书上记录所使用的USP测试方法或经过确认的内部方法



## 关键原材料文件

上述关于原材料质量属性的大部分信息都可以在各种供应商文件中找到(表6, 图1)。这些不同文件中的信息除了用于确定原材料是否适合细胞治疗生产外, 其中一些信息也是各种监管备案文件所需信息。在原材料含有专利组分或配方的情况下, 开发者应寻找能够通过法规支持文件提供此类信息

的供应商, 这些文件根据签署的保密协议提供。一些地区(如美国)支持由供应商提供的主文件, 以便与相应的监管机构共享专有材料。主文件不需要签署保密协议, 可以更快获得监管备案的必要信息。

- GMP生产(美国联邦法规第21篇第820部分, 经ISO 13485认证)
- 详细的分析证书(COA)和原产地证书(COO)
- 药物主文件(DMF)或法规支持文件(RSF)
- 无菌产品(经确认的SAL 10-3)
- 内毒素和支原体检测
- 性能测试(T细胞功能检测)
- 人源蛋白的外源病毒检测和病毒灭活数据的获取
- 在细胞治疗产品生产中长期经验证



**图1.细胞治疗产品生产商在各种产品文件中应查找的重要产品特性示例。**例如, Gibco™ CTS™免疫细胞血清替代品是专门设计用于细胞治疗产品生产的试剂, 符合文件要求。它符合美国、欧洲和日本的原材料指南。进行人类淋巴细胞体外培养时, 该试剂旨在替代人源血清。

**表6.原材料供应商文件类型。**

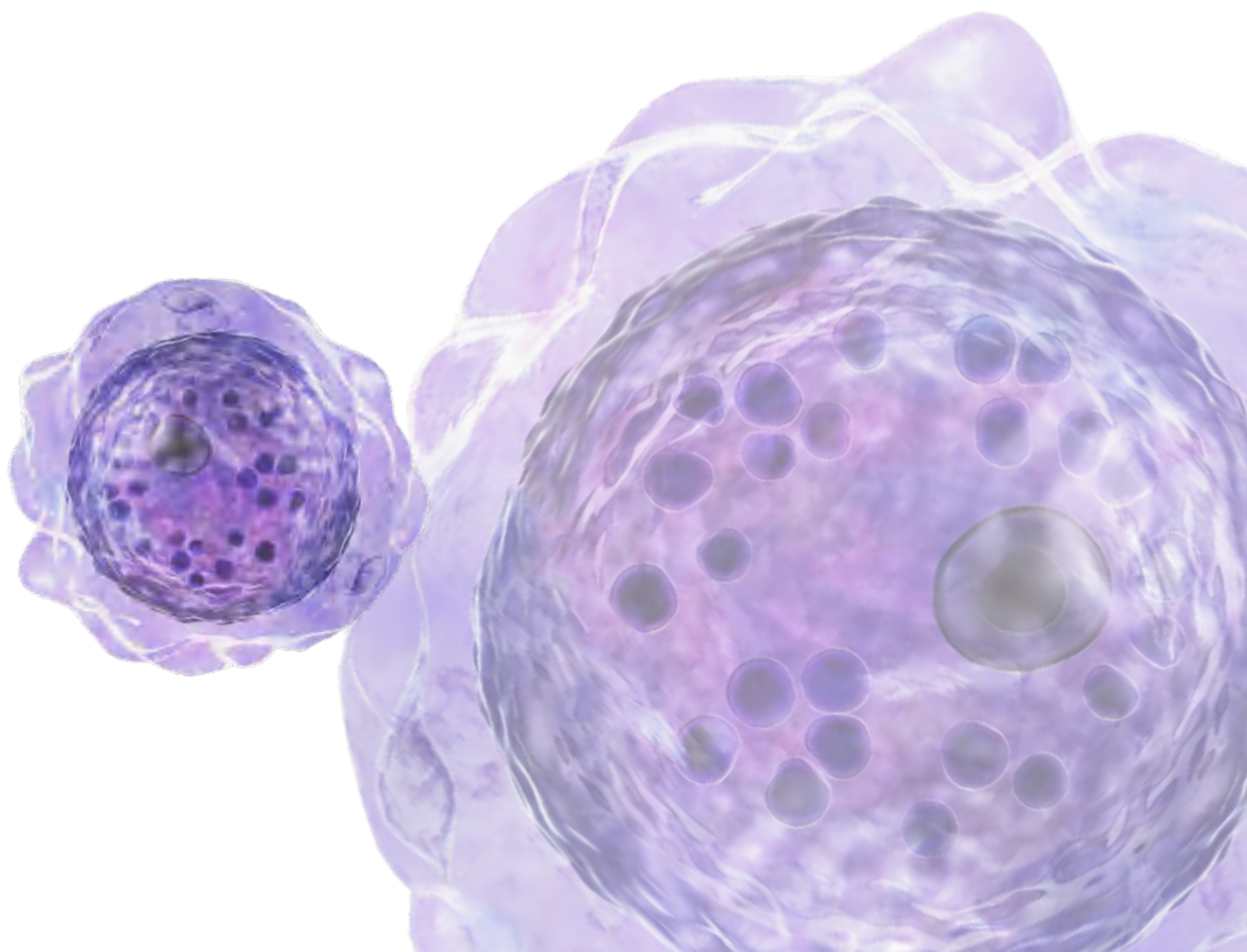
文件类型	说明
分析证书(COA)	COA包含产品批次; 产品有效期和失效期; 身份鉴别; 数量; 纯度和杂质; 安全性和生物活性等信息。
原产地证书(COO)	COO证明了供应链控制(可追溯性), 这对人来源和动物来源产品尤为重要。
安全资料表(SDS)	SDS(如适用)包含了每种材料的特性及其物理、健康和环境危害等信息, 以及与之相关的后续防护措施。它还包括处理、储存和运输该材料的必要安全预防措施。
合规性证书(COC)	COC可用于支持质量体系或标准的合规性声明。
法规支持文件(RSF)	根据保密协议, 该文件提供产品性能、稳定性、质量控制和分析测试方法, 专门用于满足细胞治疗产品原材料监管要求。当药物主文件不可用时使用。
药物主文件(DMF)	向监管机构提交的一份详细的文件, 提供有关生产、测试、加工、包装和储存所用的设施、工艺和原材料的机密信息。DMF仅在美国、加拿大和日本可用。

## 供应商和开发者的责任

最终, 药物生产商有责任评估与所选原材料相关的风险和适用性, 其中大部分评估是在供应商资格认定过程中进行的(关于供应商资格认定的更多内容, 请阅读下文)。表7提供了在此过程中需要解决的一些重要事项, 以减少与细胞治疗产品相关的风险。

表7.原材料风险评定的一些关键考虑因素。

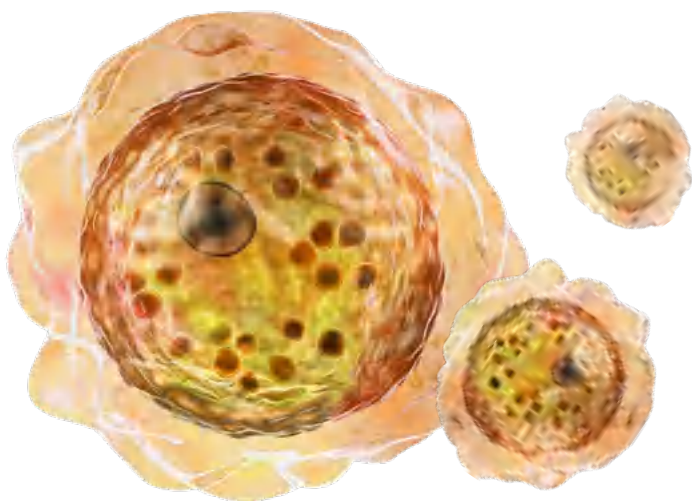
原材料:	考虑因素
来源	<ul style="list-style-type: none"><li>• 这种材料是人源、动物源还是重组材料?</li><li>• 来源涉及病毒吗?</li><li>• 该材料可以用低风险的替代品来替代吗?</li></ul>
生产	<ul style="list-style-type: none"><li>• 非专用设施中的cGMP、无菌和交叉污染问题是什么?</li><li>• 在生产过程中, 材料是否有可能接触到其他人类和动物产品?</li><li>• 供应商的生产场地是否经过了我司团队的审计?</li></ul>
测试	<ul style="list-style-type: none"><li>• 有哪些测试可以证明该材料的特性、纯度、安全性和性能?</li><li>• 是否进行过任何病毒灭活处理? 是否经过确认?</li></ul>
可追溯性	<ul style="list-style-type: none"><li>• 供应商能否证明所有风险组分及其供应链的材料可追溯性?</li></ul>



原材料供应商在生产商进行原材料选择过程中以及选择完成后都需负相关义务。细胞治疗产品生产商和原材料供应商了解各自在整个临床试验和商业化过程中的责任,并共同努力,及时履行这些责任,这一点很重要(表8)。

表8.细胞治疗产品生产商及其供应商的责任。

活动	生产商	供应商
针对预期用途鉴定原材料的性能	✓	
提供原材料的COA、COO和SDS		✓
确保原材料在人类和动物疾病方面是安全的		✓
对用于细胞治疗产品生产的原材料进行风险评定	✓	
确认对最终细胞治疗产品至关重要的COA测试	✓	
对原材料进行特性鉴定并制定规范		✓
评估最终细胞治疗产品原材料的批间差异	✓	
确定生物相容性、细胞毒性和其他安全性测试(如果供应商没有提供)	✓	
评估最终细胞治疗产品中残留的原材料	✓	
评估原材料的稳定性		✓
准备法规支持文件(DMF或RSF)		✓
执行质量和供应协议		✓



对于细胞治疗而言，除一般性的生物原材料与化学原材料外，还涉及较为特殊的供者材料：依据《药品生产质量管理规范-细胞治疗产品附录（征求意见稿）》第十五条【供者筛查标准和供者材料质量标准】，企业应当根据细胞产品注册批准的要求建立供者筛查标准和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。在采集供者材料前，应依据第二十一条【采集操作规程】，制订供者材料采集、运输、接收的书面要求，并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。对负责供者材料采集的医疗机构，企业应根据第十六条~第二十条，选择具有合法资质的医疗机构作为供者材料采集的机构，对其进行质量评估与审计，同时确定经认可的合格医疗机构名单，建立对应的质量档案，签订对应的质量协议，并定期对医疗机构采集供者材料的情况进行回顾与评估。

对于每批供者材料，企业应按第二十四条【质量评价】，在投产前，对其进行质量评价，内容至少应包括：

(一)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，并按照第二十一条【采集操作规程】内容核对相关信息；

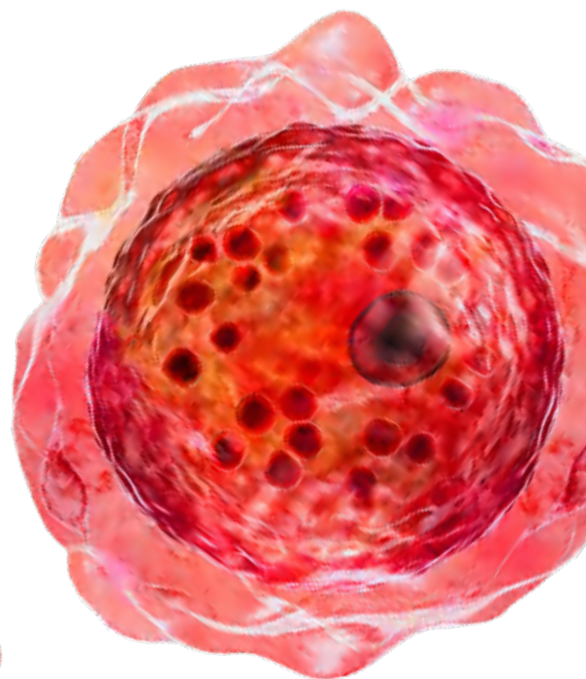
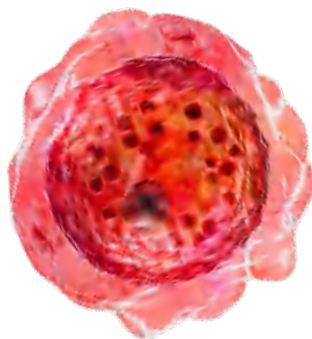
(二)运输过程中的温度监控记录完整，温度符合规定要求；如对供者材料采集后的储存温度有特殊要求，还应有完整的温度监控记录，且符合标准要求；

(三)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；

(四)供者材料包装完整，无破损；

(五)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。

对于细胞治疗中涉及的传染病阳性的供者材料，企业应参照第二十三条【阳性供者材料】进行隔离存放，且每个包装都有明显标识。意见稿中同时规定，企业不得接受不符合注册标准的异体供者材料。



## 总结

选择用于细胞治疗产品生产的优质原材料时, 存在许多监管方面的挑战。目前还没有一个全球标准可以囊括细胞治疗产品中所用原材料的所有关键属性, 因此难以覆盖可能使用该药物的所有区域。同时, 也没有特定cGMP指南可用于生产细胞治疗产品中使用的原材料, 并且所用术语存在混淆, 这使得确定合适的供应商的过程更加繁重。这些挑战给开发者带来了更大的压力, 他们需要确定一种策略, 在降低风险的同时, 能够平衡原材料的成本和性能。这种策略的制定应着眼于长远, 避免在临床开发和试验后期需要替换原材料。例如开发一种满足其目标地区最严格监管要求的产品。

细胞治疗产品的成分对开发一个可重复且稳健的生产工艺至关重要。在细胞治疗产品开发早期, 从专门生产细胞治疗用产品的可靠供应商处适当采购材料, 可以缩短开发时间, 大大降低成本, 并提高获得监管当局批准的可能性。

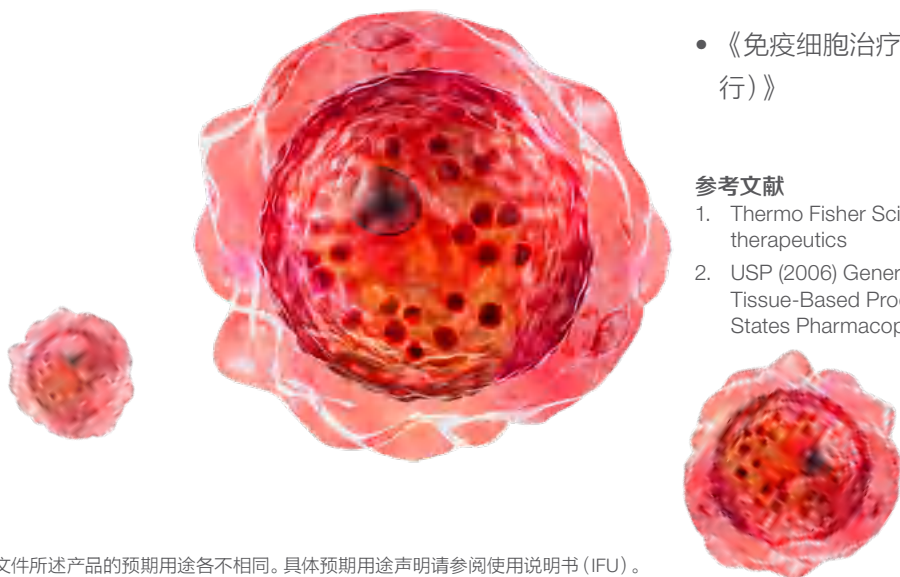
## 其他资源

本文概述了细胞治疗产品生产商在选择适当的原材料时必须应对的众多挑战和考虑因素。要对这些主题进行更深入的讨论, 我们推荐阅读和观看以下材料: [多能细胞治疗产品生产<sup>10</sup>](#), [关于细胞和基因疗法生产用GMP辅助材料](#)的网络研讨会点播视频, 以及来自各种监管机构的大量出版物, 包括:

- 欧洲药典5.2.12用于生产细胞和基因疗法医药产品的生物源性原材料
- USP <1046>基于细胞和组织的产品
- USP <1047>基因疗法产品
- USP <1043>辅助材料
- USP <1024>牛血清
- USP <90>胎牛血清
- USP <89>用作辅助材料的酶
- USP <92>生长因子和细胞因子
- 日本的生物成分标准+
- ISO工作草案—细胞治疗产品生产过程中的辅助材料
- 中国药典第三部《生物制品生产用原材料及辅料质量控制规程》
- 《药品生产质量管理规范-细胞治疗产品附录(征求意见稿)
- 《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》

## 参考文献

1. Thermo Fisher Scientific (2020) Manufacturing pluripotent cell therapeutics
2. USP (2006) General Chapter <1043>: Ancillary Materials for Cell- and Tissue-Based Products. In: USP-NF English Edition. Rockville: United States Pharmacopeial Convention.



本文件所述产品的预期用途各不相同。具体预期用途声明请参阅使用说明书 (IFU)。

## 第2节： 供应商资格认定过程概述

### 简介

供应商资格认定 (VQ) 是确定供应商是否有能力满足必要产品或服务的特定要求的过程。对于细胞治疗产品的生产，必要的产品和服务涵盖范围广泛，包括原材料选择、无菌灌装、生产、制剂和低温保存服务、分析检测、配套服务和冷链配送。VQ过程告知所有参与方，产品和服务符合身份鉴别、质量和纯度的接受标准，并保证产品和服务始终符合指定的GMP要求。

细胞治疗行业正处于初期阶段，目前关于VQ的标准化监管政策或指南还很少。不过，大多数生产实体（申办方、合同开发和生产组织）遵守FDA、人用药品注册技术要求国际协调会 (ICH E6 R2和ICH Q10) 以及国际标准化组织 (ISO) 制定的标准。遗憾的是，这些机构专门为细胞治疗产品生产商提供的VQ计划细节极少，作为监测、识别和降低供应商相关风险的第一步，这些生产商必须建立一个稳健的VQ计划。

### 一个典型的VQ过程可以分为4个步骤：

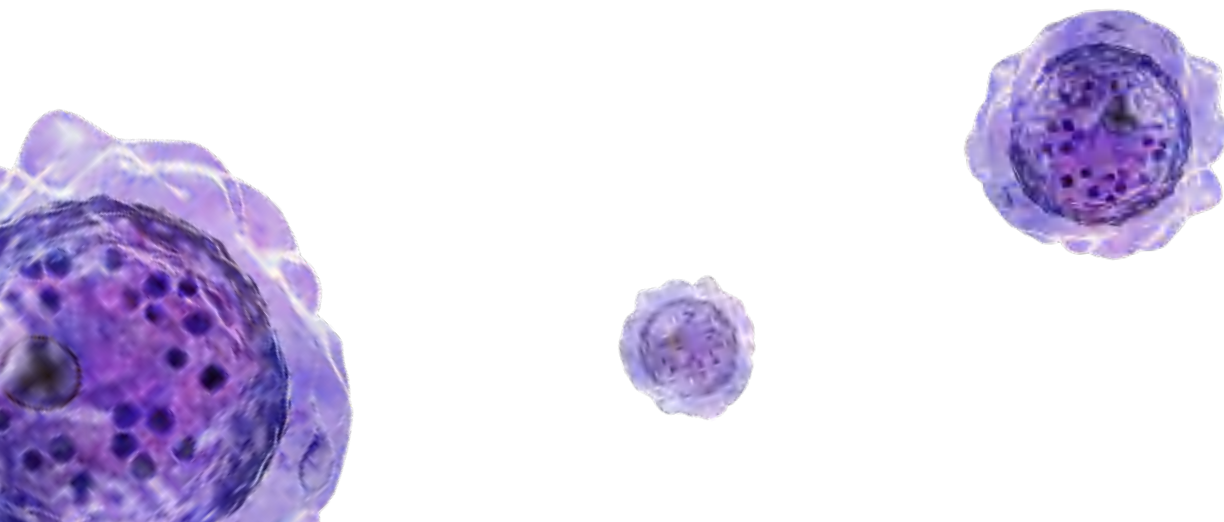
1. 定义供应商要求并制定供应商问卷
2. 编制一份潜在供应商的名单，并评估能力，以确定最佳人选。
3. 进行全面审计并选择合适的供应商
4. 制定并实施供应商资格再认定计划

### 定义供应商要求

供应商评估的第一步是定义供应商要求和设计综合问卷。供应商要求应涉及几个不同的属性（见表1的一些主题）。问卷还应该涉及其他重要的供应商政策，如变更控制管理（例如，内部供应商和生产地点的变更；变更通知政策的时间和例外情况）。最后，供应商对问题的回答应有助于为几个关键领域分配风险等级，包括供应商的工艺性能和质量管理体系、纠正和预防措施 (CAPA) 系统以及变更管理系统 (CMS)。（见下文，编制一份潜在供应商的名单并评估其能力）。

表1. 供应商选择调查问卷中涉及的常见话题。

- 供应商提供材料和服务的能力
- 供应商对沟通内容坦诚、及时和透明，并有明确的计划来管理紧急事件
- 供应商对其政策和程序的控制，以确保性能稳定
- 供应商对保持质量和性能的承诺
- 供应商以文件形式提供保证，证明其能够及时交付一致的产品和服务
- 供应商的可持续发展政策
- 与要求的产品和服务相关的成本
- 及时交付所需产品的能力
- 制定政策和策略以预测和缓解与内部供应链、仓库、原材料和人力相关的变化
- 财务状况（现金储备）和资源，以满足任何未来增加的商业生产需求
- 供应商和客户企业文化及核心价值观的一致性



## 编制一份潜在供应商的名单并评估其能力

接下来的步骤包括制定一份相关原材料供应商的名单，并根据他们对问卷的回答确定每个供应商的能力和其他属性。在潜在供应商填写问卷的同时，内部团队进行进一步的内部评估，重点关注文献综述、供应商的技术能力、供应商的监管历史（如FDA 483文件、召回、警告等）、供应商的年度报告以及任何以前或现在的客户参考资料。

在收到完成的供应商问卷后，生产实体的质量保证（QA）团队会在收到后的指定时间段内审查问卷的完整性和可接受性。一旦通过内部研究或调查问卷发现有任何问题，生产商会要求供应商的QA团队给出书面回应，回应中应作出所需的具体阐释，以便作出最终选择。待所有问题都得到满意答复后，初步评估过程就完成了，同时也缩小了供应商名单的范围。评估还强调了需要在审计阶段进行仔细审查的具体项目。

表2.风险等级（改编自参考文献1）。

风险等级	相关因素
高	<ul style="list-style-type: none"><li>没有替代品或很难鉴定替代品的定制产品</li><li>用于关键步骤的产品（例如，直接和/或患者接触）</li><li>许可证中指定的来源，其中替代品需要进行额外的测试（如稳定性测试）。</li></ul>
中	<ul style="list-style-type: none"><li>有替代产品</li><li>工艺上游使用的产品；一般用途；在经确认步骤中使用的产品</li><li>有替代产品，需要机构预先批准或只需进行适度的额外测试</li></ul>
低	<ul style="list-style-type: none"><li>有多种合格的替代产品；可能有安全库存</li><li>产品用于行业中常见的经确认步骤中</li><li>有具有轻微监管问题的替代产品，只需通知或进行最低限度的额外测试</li></ul>

这项工作的一个重要步骤包括对供应商自身的供应链战略进行评估。包括了解供应商原材料的质量和来源，业务连续性，以及不间断供应的应急计划。细胞治疗产品生产商面临的一个最糟糕情况是在临床试验期间需要更换或替换原材料。同样，一旦产品进入商业化，生产商需要密切监测原材料供应，以避免生产延误。生产特定细胞治疗产品的供应链可能相当复杂，需要监督大量供应商。基于风险的监督方法可以简化这一任务<sup>11</sup>。

基于风险的策略将评估单个原材料对生产工艺的关键性，从而形成一个框架，使生产商能够为供应商的能力分配风险等级。这种方法也使生产商能够更好地分配时间和资源来监控商业化后的材料。表2提供了一些一般风险因素的示例，个别生产商可能会有额外的问题要添加到每个级别中。



## 进行审计并选择最终供应商

这组缩小了范围的供应商将进入到下一个评估步骤。此过程称为审计，最好由跨职能团队执行，该团队包括来自QA、工艺开发、生产和分析开发部门的成员以及其他技术专家。生产实体的最佳做法是制定标准操作规程 (SOP)，以评估供应商在不同审计级别下的能力和属性。

进行的审计类型基于许多标准，包括过去与供应商的关系、批准状态的持续时间、供应商是否提供关键或非关键产品或服务，以及生产实体的风险评定策略。有几种类型的审计过程，按严格程度进行分类：

1. 无需审计或检查清单-影响最小的材料
2. 回顾性审计-根据过去的表现进行资格审查
3. 书面审计-通过审计检查清单进行资格审查
4. 现场审计

必须在特定的VQSOP中定义所需的审计类型和审计频率。在资格再认定计划中定义持续审计频率也是一种常见的做法（见下文，制定供应商资格再认定计划）。

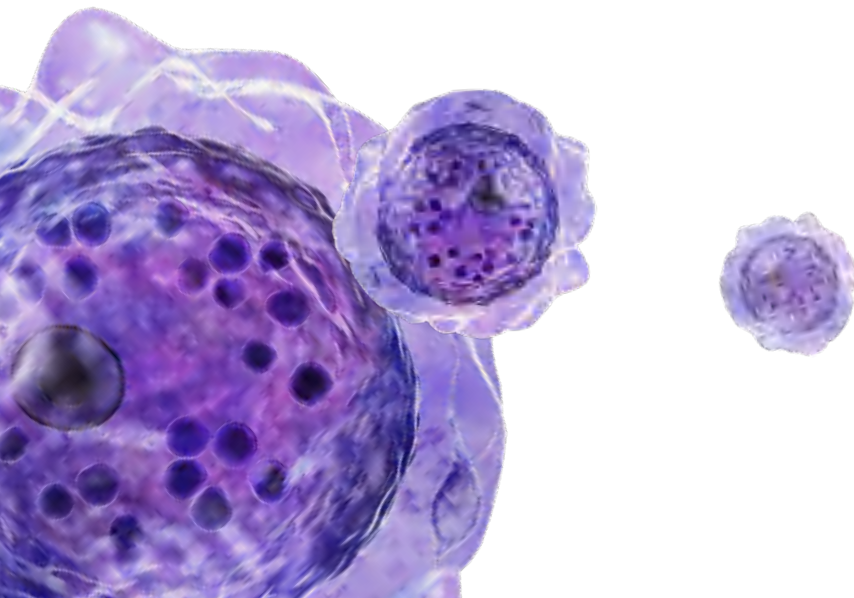
审计完成后，审计团队会生成一份评估，涵盖供应商设施及其质量管理体系的适用性、供应商员工和部门组织（包括员工等级和技能组合）、对供应商文档程序的审查（例如，相关的SOP），以及对供应商供应链的审查。某些情况下，在做出最终选择之前，要求供应商生产一批用于测试的原材料可能比较合适。

评估完成后，QA团队与指定人员一起对供应商做出最终选择。当供应商被“批准”时，QA会更新批准的供应商名单，并向供应商发出批准函。如果供应商被视为“未批准”，QA团队将与相关部门合作，以确定需要哪些额外的信息和步骤来使该供应商获得资格。如果未获批准的供应商提供了额外信息或将纠正和预防措施 (CAPA) 落实到位，则可重新考虑其资格。如果此类供应商的答复令人满意，则该供应商可能会被“批准”。如果答复不令人满意或供应商不愿意做出适当的改变，则他们将保持“未批准”状态。

在某些例外情况下（例如，无法获得额外的信息或没有即时替代品），将制定风险评定计划，以确定是否可以使用该供应商，直到采取进一步的必要措施以避免生产停工。然后为所有批准的供应商制定一个质量协议。

## 制定供应商资格再认定计划

在VQ流程和最终供应商选择之后，使用定义好和预先确定的时间间隔为供应商资格再认定制定计划和SOP。虽然最初的VQ过程包括了对供应商属性和能力的详细评估，但临床和商业生产计划的成功依赖于持续的VQ，定期举行供应商会议和审计，以保持产品和服务的最高质量。资格再认定计划定义了审计的类型和频率，并与供应商共享。资格再认定计划还确定了会引发额外审计的情况，如生产地点的改变、增加新工厂或仓库、将业务转移到另一个国家，以及因现有原材料的全球短缺而改变原材料。



## 与VQ过程相关的成本

供应商资格认定对财务影响很大,可能会增加新商业细胞治疗产品的成本。据估计,每年用于现场和远程新供应商资格认定的费用为1.30-1.50亿美元<sup>[2]</sup>。表3分享了各种实体的一些典型成本。这些成本不包括定期重新认定现有供应商的成本或分发和评估信息请求的间接成本。

表3.与VQ审计(VQA)相关的典型成本(美元)<sup>[2]</sup>。

	每个VQA的平均成本	年均VQA成本
总计	\$13,259	\$270,033
申办方	\$12,432	\$197,940
CRO	\$18,704	\$666,883
小型公司	\$12,607	\$150,570
中型公司	\$17,072	\$475,445
大型公司	\$21,839	\$1,886,308

## 总结

FDA、ICH和ISO制定的高级监管要求很有用,但在实施细胞治疗产品生产的VQ计划方面缺乏标准化和具体性。这导致了VQ计划和流程的高度可变性和劳动密集型,这可能导致细胞治疗产品的延误和成本负担的增加。在细胞治疗行业建立标准以简化VQ流程之前,目前的最佳实践要求建立一种基于开放和及时对话的合作关系,明确界定资格认定过程中的期望,以及管理风险和实现双方成功的计划。

## 参考文献

1. Shimoni, Y et al. (2015). A Risk-Based Approach to Supplier and Raw Materials Management. *BioProc Intl* 13(10): 10–15.
2. Jay A. Turpen, Senior Consultant, The Avoca Group 03.04.20 as seen in Contract Pharma.
3. BioProcess Systems Alliance (2019) The Role of Single-Use Polymeric Solutions in Enabling Cell and Gene Therapy Production Part 3: Best Practices for Supplier Selection, Qualification, and Validation to Ensure Supply Chain Security Bio-Process Systems Alliance Cell and Gene Therapy Committee. *BioProc Intl* 17(6).
4. ASTM E3051–16: Standard Guide for Specification, Design, Verification, and Application of Single-Use Systems in Pharmaceutical and Biopharmaceutical Manufacturing. ASTM International: West Conshohocken, PA, 2016; doi:10.1520/E3051-16.

# 第3节： 细胞分离、改造和扩增概述

## 简介

嵌合抗原受体 (CAR) 技术的使用极大推动了某些类型癌症的治疗。这项技术利用免疫防御系统 (如T细胞), 通过携带CAR “有效载荷” 修饰的免疫细胞, 靶向治疗患者的癌细胞。与许多新技术一样, 这项技术正在取得快速进展, 克服了早期CAR-T技术所遇到的障碍和困难。

接下来的章节将讨论开发和生产CAR-T细胞治疗产品方面的一些最新进展, 包括T细胞分离的方法, 生产CAR-T细胞的工程改造步骤, 以及扩增经过工程改造的细胞的策略, 以方便后续患者治疗 (图1)。本节还将介绍一些利用自然杀伤细胞 (NK) 作为免疫武器治疗癌症的新方法。作为讨论生产工艺的一个平台, 本节简要介绍了CAR-T疗法背后的生物学原理。那什么是CAR?

嵌合抗原受体 (CAR) 是一种人工改造的受体, 经过细胞改造可以在T细胞和NK细胞等免疫细胞上表达。对于CAR-T细胞治疗产品, T细胞被改造为能够表达CAR蛋白, 可以识别独特肿瘤抗原的细胞。CAR蛋白由胞外域和胞内域组成, 胞外域由单克隆抗体衍生, 而胞内域源自于T细胞。这些组分的设计和构建使得CAR-T疗法成为最先进的过继细胞治疗产品之一。CAR蛋白由三部分组成 (图2):

1. **胞外域** — 一个单链可变区片段 (scFv), 它源自独特肿瘤抗原的特异性单克隆抗体分子 (例如白血病细胞上的CD19)
2. **跨膜结构域** — 起固定作用
3. **胞内域** — 源自T细胞的 “功能性” 组分

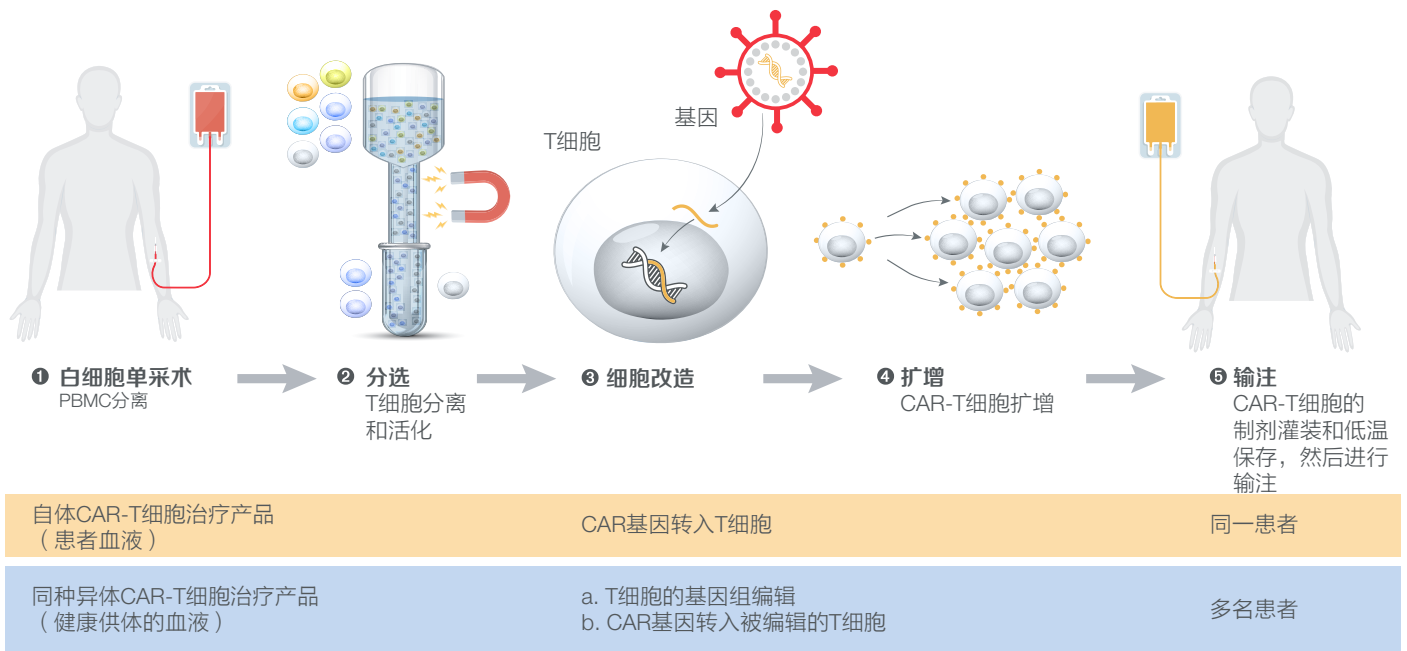


图1. CAR-T细胞治疗产品工作流程中自体与同种异体方法的异同点。

### 胞外域 (scFv)

scFv或胞外域是肿瘤抗原结合结构域，它指定了CAR-T靶标。它位于T细胞膜上，是源自单克隆抗体的单链抗体片段。scFv由轻链和重链 (VL和VH) 的可变区组成，并通过短接头与跨膜结构域融合。与其他抗体一样，这些单链抗体可以与蛋白质、碳水化合物和糖脂结合<sup>[1]</sup>。

### 跨膜结构域

跨膜结构域的功能仅仅是将CAR的scFv部分稳定在T细胞表面。跨膜结构域通常来自于CD8 $\alpha$ ，但也可基于CD4或CD28<sup>[2]</sup>。

### 胞内域

胞内域源自CD3  $\zeta$  链，是CAR的功能 (或信号转导) 末端。CAR scFv与肿瘤抗原结合后，CAR胞浆内 (CD3  $\zeta$ 链) 形成一个聚集簇，该簇形成后将启动激活信号转导，最终导致肿瘤细胞的细胞毒性。

CAR的各个部分的设计对于抗肿瘤反应的成功是至关重要的。正如预期的那样，已经有一些改进可以使CAR-T细胞杀伤效率更高、在体内持续时间更长而且毒性更小。例如，第二代CAR在胞内域添加了免疫调节模块 (例如 CD28或CD137[4-1BB]) 并改进了杀伤机制。当同时加入免疫调节模块CD28和CD137时 (第三代CAR)，持续性有所提高<sup>[3,4]</sup>。

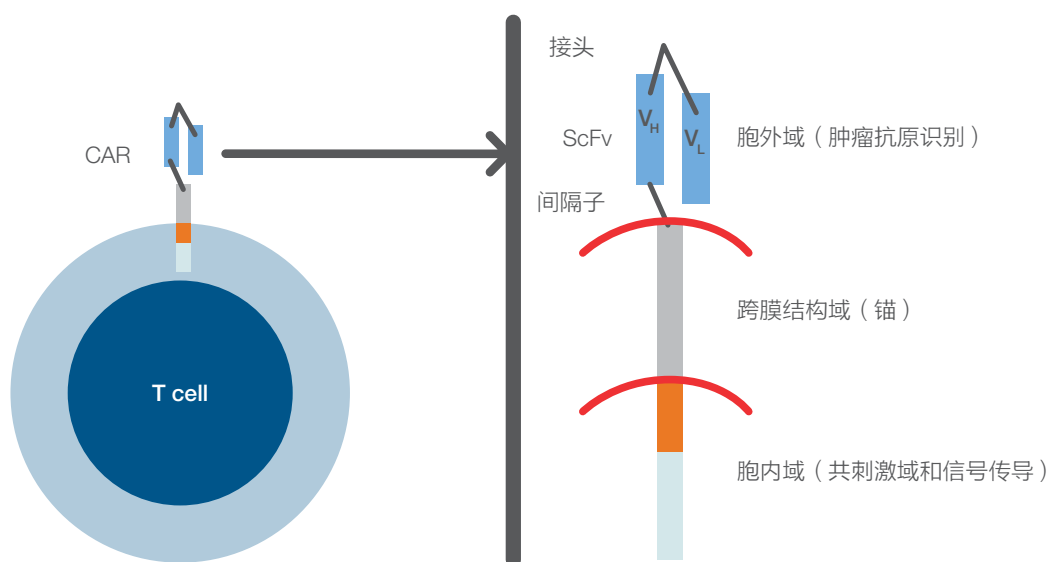


图2.嵌合抗原受体的组成结构。

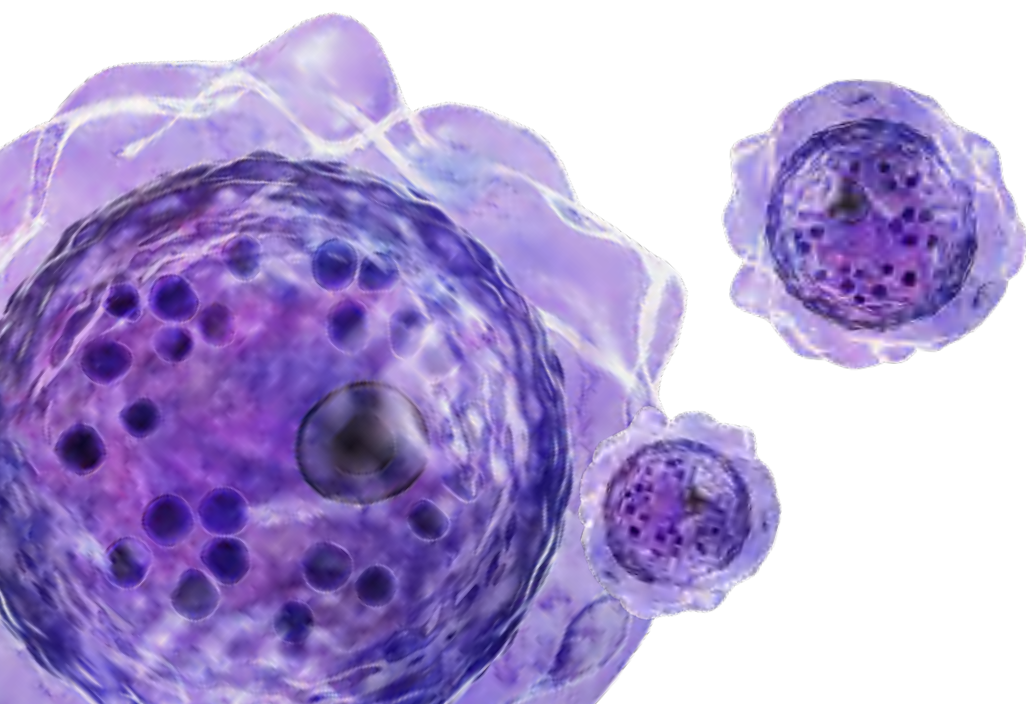
## 自体与同种异体CAR-T疗法

早期的CAR-T细胞治疗产品依赖于从癌症患者身上分离T细胞。然后对患者的T细胞进行修饰以靶向癌细胞并重新回输到患者体内。这个过程称为自体CAR-T疗法，通常需要3-4周去生产，失败率大约为7-10%<sup>[6]</sup>。虽然这种方法取得了巨大的成功，但自体CAR-T疗法的生产是一个漫长的过程，延长了治疗时间，而且无法扩展。

自体CAR-T疗法的局限性可以通过细胞改造来自健康供体的第三方T细胞来克服。这些所谓的“现货”或同种异体CAR-T细胞可以提前生产，并能够在患者需要时立即使用。与直接治疗一名患者的自体疗法不同，同种异体疗法可以治疗多名患者。表1总结了使用同种异体方法与自体方法相比的诸多好处。此外，同种异体方法提供了由供体来源生产的标准药品，显示出富含干细胞记忆样T细胞（TSCM）的最佳免疫学特征。这能使同种异体CAR-T细胞产品成为B细胞恶性肿瘤的一线疗法。

表1.自体 and 同种异体CAR-T疗法之间的差异。

自体CAR-T产品	同种异体CAR-T产品
一种产品用于一个患者	一种产品用于多个患者
患者供体-质量和数量上的高度变异性（TSCM数量少）	来自TSCM数量多的选定健康供体，在数量和质量上表现出稳定性。
无法选择所需的T细胞表型和功能	可以优化T细胞表型和功能（例如，编辑归巢和生长基因）
为满足个别患者的需求，产品生产时间紧迫	在需要时为患者做好准备
可扩展性有限	易于扩展
单一癌症靶点	多个癌症靶点（多基因编辑）
增加治疗成本（针对单个患者的质量测试和监管成本）	减少治疗成本（质量测试和监管成本分摊到多个患者身上）



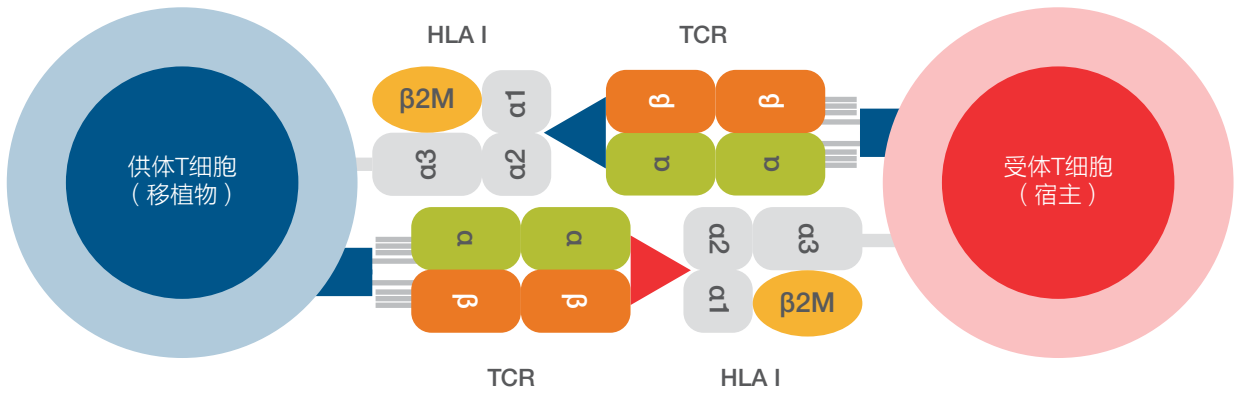
## 同种异体CAR-T疗法的问题: 克服患者的排斥反应

虽然异体CAR-T疗法有助于解决自体方法所遇到的一些问题,但它仍然面临着诸多严峻挑战。最重要的是,异体CAR-T疗法可能会因患者排斥(患者自身的免疫系统将供体细胞识别为外来细胞)导致危及生命的严重反应<sup>[6,7]</sup>。图3说明了患者排斥同种异体T细胞背后的基本生物学原理。这种排斥是由人类白细胞抗原(HLA)I类和T细胞受体(TCR)的相互作用驱动的,这些受体在供体和患者的T细胞上都有表达,可能导致三种排斥情况:

- 移植物抗宿主病(GvHD)
- 宿主抗移植物病(HvGD)
- 患者的NK细胞攻击带有掩蔽HLA(一种用于避免前两种情况的修饰策略)的异体CAR+T细胞

TCR是一种由 $\alpha$ 和 $\beta$ 链组成的膜结合蛋白,作为CD3复合体分子的一部分表达在所有T细胞的表面(图3)。表面显示的HLA I类分子普遍存在于全身细胞上,由 $\alpha$ 链组成,由 $\beta$ 2-微球蛋白( $\beta$ 2M,图3)稳定。

一个HLA I类分子由一组6个基因组成,分别命名为A、B、C、E、F和G,这些基因根据其多态性进一步划分。基因A、B和C具有高度多态性,每个基因中都有超过6,000个等位基因。非多态性的基因是E、F和G,其等位基因变体少于300个<sup>[8,9]</sup>。



**图3.HLA I和TCR相互作用及患者排斥的生物学原理。**供体和患者T细胞上的TCR和HLA I之间的相互作用驱动了两种排斥途径。在移植物抗宿主病中,供体TCR识别宿主T细胞的异体肽/HLA I,导致宿主细胞的排斥(如杀伤)。在宿主抗移植物病中,情况正好相反-宿主TCR将供体HLA I识别为外来物并将其作为目标杀死。

排斥机制是由T细胞的TCR $\alpha$   $\beta$ 链与HLA I类分子的识别和相互作用引发的(图4)。在移植物抗宿主病中,当供体T细胞上的TCR将受体细胞(组织)上的HLA I类复合物视为外来物并对其进行攻击时,就会出现同种异体排斥反应<sup>[6]</sup>。同样,在宿主抗移植物病中,受体T细胞的TCR将供体T细胞上的HLA I类复合物识别为外源物并对其进行攻击。

为了消除这些排斥障碍,科学家可以利用TCR和HLA I类复合物的基本生物学特性。更具体地说,通过基因编辑破坏 $\beta$ 2M可用于阻止成熟的供体HLA I类分子到达细胞表面,从根本上保护供体T细胞免受受体T细胞识别和消除。同样,通过基因编辑破坏供体细胞TCR $\alpha$ 或 $\beta$ 链可以防止受体T细胞识别和攻击供体T细胞。

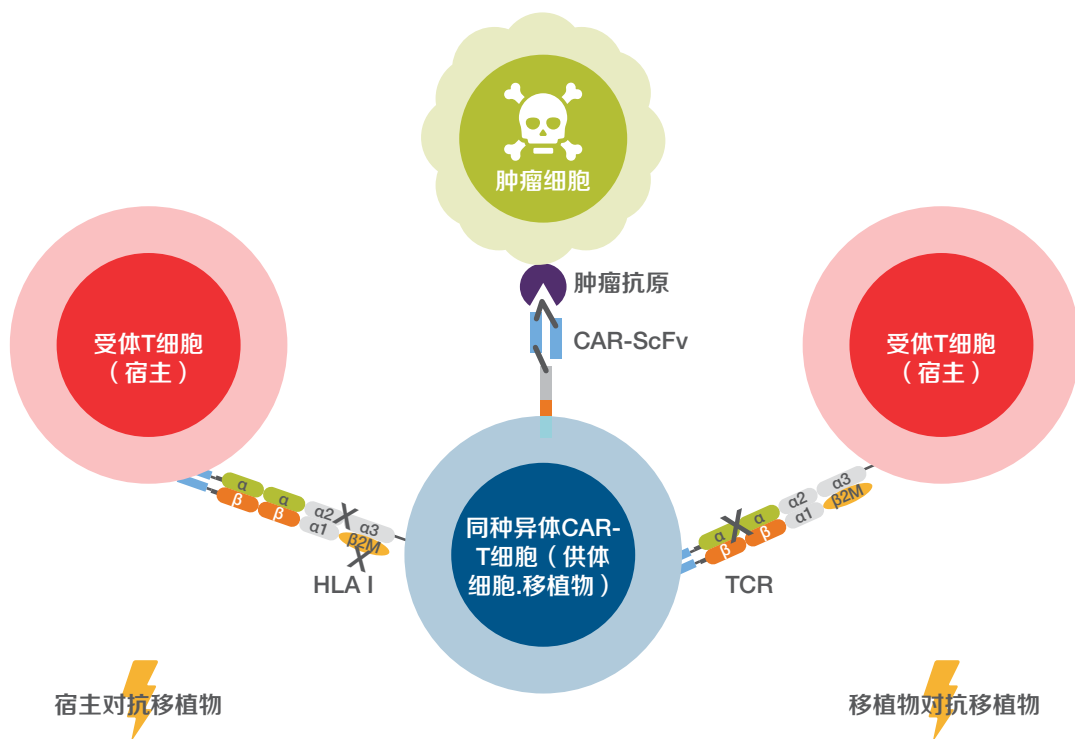
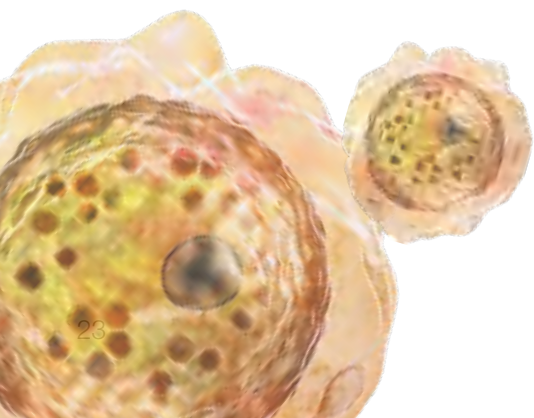


图4.防止同种异体排斥反应的现货型策略。右侧:消除移植的异体CAR-T细胞上的TCR $\alpha$ 链可以防止移植物抗宿主病(GvHD)。左侧:通过破坏移植的异体CAR-T细胞上的 $\beta$ 2M来消除HLA I,可以防止宿主抗移植物病(HvGD)。



然而, 这些方法会导致第三个排斥障碍, 其原因是供体细胞上HLA I类的消失, 使供体细胞容易受到受体自身NK细胞的靶向(图5), 也被称为“缺失自我信号”<sup>[10,11]</sup>。为了克服受体NK细胞介导的HLA或TCR供体细胞消除, 研究人员可以对供体细胞进行基因修饰, 使其表达一种抑制性分子, 如非多

态HLA-E(图5)<sup>[12,13]</sup>。这种修饰可以通过将序列插入或“敲入”HLA-E的序列与 $\beta 2M$ 融合。这样做能够在供体细胞上稳定表达一种HLA I类分子, 并阻止对这些细胞产生受体NK介导的杀伤(图5)。

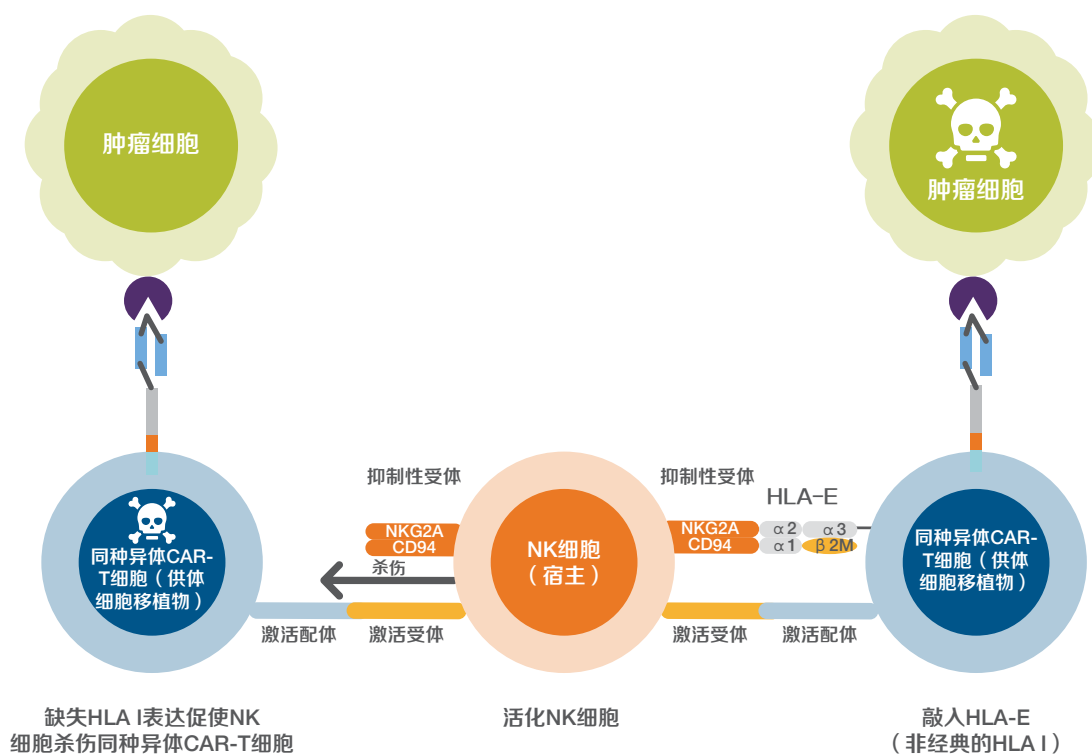
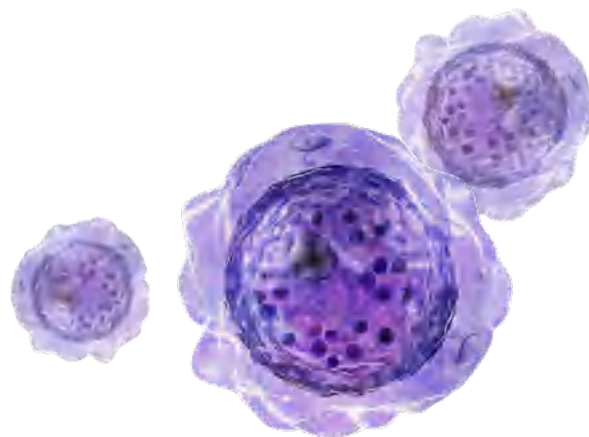


图5.在供体T细胞上添加HLA-E将阻止宿主NK的杀伤。缺乏HLA I蛋白的同种异体CAR-T细胞将成为NK细胞的目标(也被称为“缺失自我信号”)。这是一种对不表达HLA I的细胞的正常免疫反应。带有敲入HLA-E基因的经过工程改造细胞将防止宿主NK细胞杀伤同种异体CAR-T细胞。





## 总结

同种异体T细胞来源的选择能使所用材料具有更高质量起始血液(来自健康第三方供体)、改善免疫细胞组成,从而提高最终产品的可扩展性。与自体方法不同,同种异体方法可治疗多个患者。使用同种异体T细胞来源可导致患者排斥(如GvHD和HvGD),正在利用技术进步来缓解其中的一些问

题,例如通过使用HLA I类或TCR等基因的基因编辑来克服在宿主系统中识别“异物”。临床上的成功表明,采用其中一些掩蔽技术的同种异体CAR-T细胞治疗产品能够将这种方法用于更多的患者,并且随着多家专注于同种异体CAR的公司已经在临床测试同种异体CAR-T疗法,正在加速这一领域的发展(表2)。

表2.部分具有临床试验的同种异体CAR-T公司及其代表性产品。

公司	产品	CAR靶标	同种异体细胞来源
Allogene and Pfizer	UCART19	CD19	T细胞
Kuur Therapeutics	KUR-502	CD19	NK细胞和T细胞
Cellectis and Pfizer	UCART19、UCART123	CD19、CD123	T细胞
Celyad	CYAD-211	BCMA	T细胞
CRISPR Therapeutics	CTX110	CD19	T细胞
Fate Therapeutics	FT819	CD19	iPSC衍生的T细胞
Poseida Therapeutics	P-BCMA-ALL01、P-MUC1-ALLO1	BCMA、MUC1	T细胞
Precision Biosciences	PBCAR269A	CD19	T细胞
Tessa Therapeutics	CD30.CAR-EBVST	CD30	EBV T细胞
北恒生物	CTA101	CD19、CD22	T细胞

## 参考文献

1. Irving M, et al. (2017) Engineering Chimeric Antigen Receptor T-Cells for Racing in Solid Tumors: Don't Forget the Fuel. *Front Immunol* 8:267.
2. Fujiwara K, et al. (2020) Hinge and Transmembrane Domains of Chimeric Antigen Receptor Regulate Receptor Expression and Signaling Threshold. *Cells* 9(5):1182.
3. June C, et al. (2020) CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* 359 (6382):1361–1365.
4. Skorka K, et al. (2020) The Application of CAR-T Cells in Haematological Malignancies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 68(6):34.
5. <https://www.us.kymriah.com/>.
6. Depil S, et al. (2020) “Off-the-shelf” allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 19:185–199.
7. W. Qasim (2019) Allogeneic CAR T cell therapies for leukemia. *Am J Hematol* 94:S50–S54.
8. E. Ingulli (2010) Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr Nephrol* 25:61–74, 2010.
9. EMBL Immuno Polymorphism Database.
10. Ljunggren H and Kärre K. (1990) In search of ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11(7):237–244.
11. Sun J and Lanier L (2008) Cutting edge: viral infection breaks NK cell tolerance to “missing self”. *J Immunol* 181(11):7453–7457.
12. Pallmer K and Oxenius A (2016) Recognition and regulation of T cells by NK cells. *Front Immunol* 7:251.
13. Gornalusse GG, et al. (2017) HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat Biotechnol* 35:765–772.

这些文件所述产品的预期用途各不相同。具体预期用途声明请参阅使用说明书(IFU)。

## 第4节： 细胞分离

### 简介

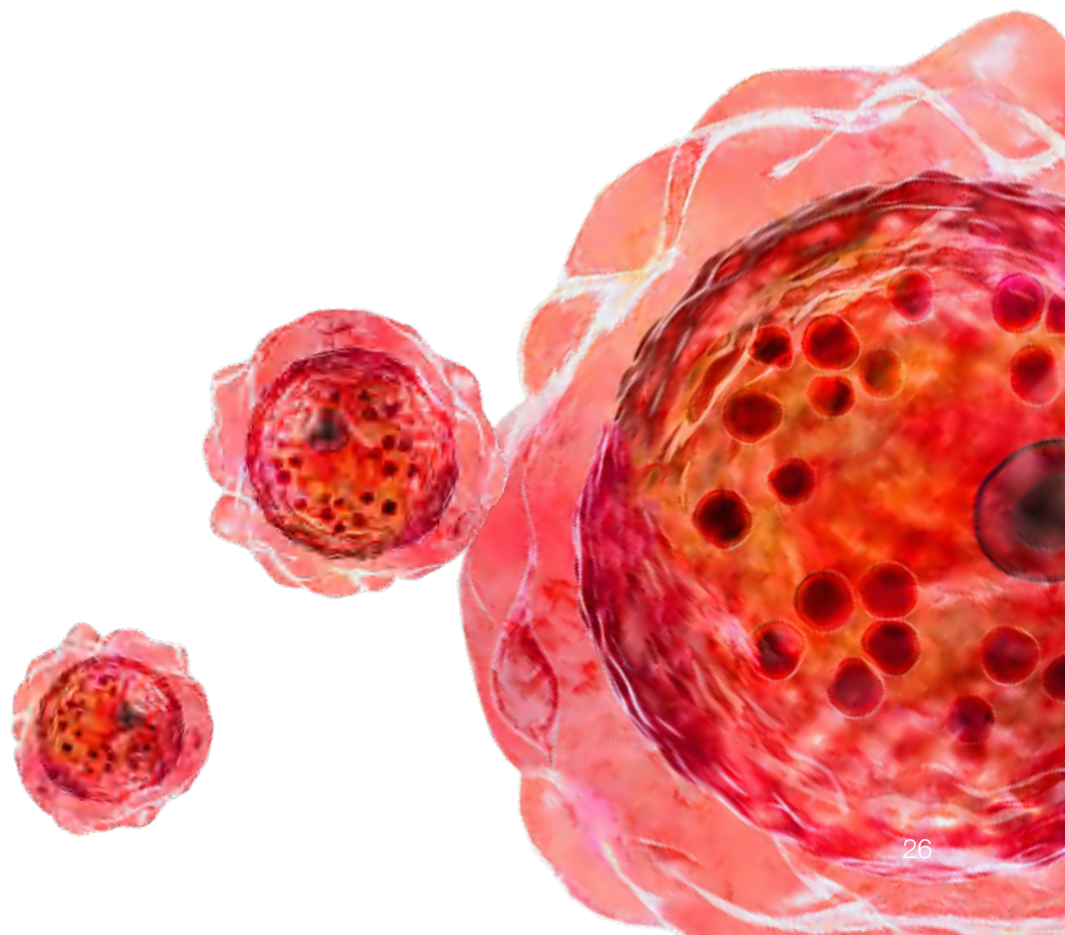
在任意一款细胞治疗产品开发和生产工作流程的基础上，起始细胞材料的质量直接影响最终产品的活率和患者治疗的功效。大多数细胞分离方法，特别是外周血单核细胞（PBMC）的分离，目前是使用开放式系统进行的，这可能导致差错和污染，进而导致无法产出可行的细胞治疗产品。此外，在生产工艺的扩增阶段，供体产品的变异性会导致细胞组成、细胞活率和敏感性的差异。由于多种原因，并非所有患者（包括健康供体）都能以适合该过程的理想数量有效地动员功能性T细胞。因此，T细胞分离工作流程必须灵活，以便能够进行各种调整，同时无论从患者或供体那里获得何种输入材料，仍能产生标准化的CAR-T细胞产品。理想的细胞分离工作流程应是自动化的、封闭的且一致的。

本节将讨论PBMC的分离以及要工程改造的T细胞群（CD3+）的分离和激活。本节还将讨论使用诱导多能干细胞（iPSC）衍生的细胞和NK细胞的替代细胞方法，这是克服更传统方法问题的潜在解决方案。

### 健康供体特征

同种异体细胞治疗产品的开发始于从捐献的血液中分离出T细胞的过程，这一过程被称为白细胞单采术。要进入临床试验，需要有足够数量的捐献血液，并具有正确的细胞组分和表型。对于同种异体疗法，理想的供体血液最好来自年轻个体。捐献的血液成分中，单核细胞和中性粒细胞（特别是粒细胞）的比例应该很低，并且细胞应具有有效的倍增时间。供体血液应具有免疫学特征，包括正常的CD3+细胞数量，平衡的CD4/CD8比率，足够数量的干细胞样记忆细胞，以及CD62L+CCR7+T细胞的表达。

正如预期的那样，细胞治疗产品开发商和生产商希望T细胞群的纯度尽可能高，有时还会寻找特定的T细胞亚群。劣质起始材料可能导致无法将其用于细胞治疗产品处理，并最终导致供体产品无法进入临床。然而，具有高产量和高纯度的高效细胞分离方法是可靠的，可以减轻在供体血液质量方面的压力。

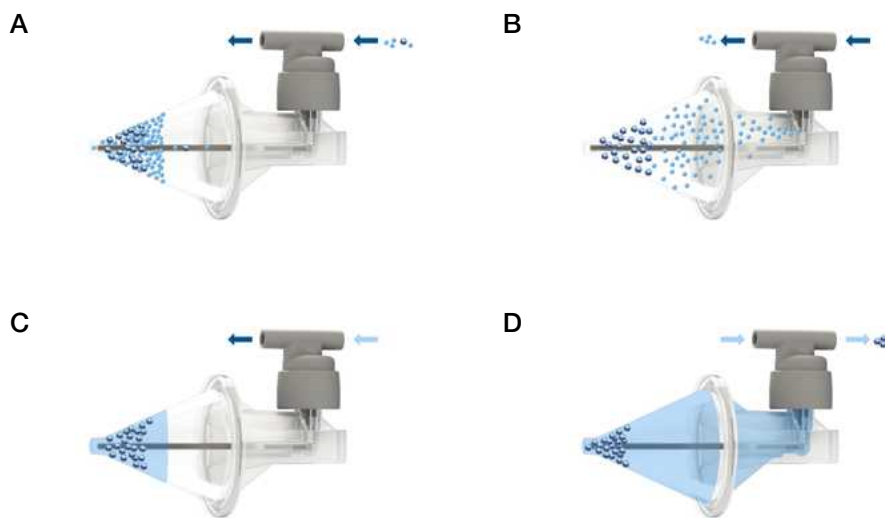


## PBMC分离

一旦获得并对捐献血液进行了特性鉴定, 下一步就是分离PBMC。通常情况下, 分离方法开放或封闭的特点取决于所需的直接用户交互量。封闭式方法是首选方法, 这样做能降低污染和用户错误的风险, 而且对于一些临床应用来说, 可能需要这样做。

最著名的分离PBMC的做法是使用Ficoll培养基的密度梯度离心法<sup>[1]</sup>。虽然这种方法能够成功地将PBMC从红细胞中分离出来, 但分离出的PBMC会保留污染物, 如粒细胞、单核细胞, 甚至一些残留的红细胞。大多数密度梯度离心分离是使用开放式系统进行的, 这使得该过程容易出现错误、污染和人与人的差异性。虽然存在自动化的封闭式密度梯度离心系统, 但这些系统往往会丢失细胞, 因缺乏系统灵活性而降低产量, 而且价格也会大大增加。

最近的一种封闭系统方法依赖于逆流离心, 它根据细胞的大小和密度来分离细胞。使用这种技术的系统(如Gibco™ CTS™ Rotea™系统)通过在流化床中施加一个与离心力相反的恒定流动力来悬浮细胞(图1)。悬浮的细胞被轻轻浓缩而不形成沉淀, 然后以非常高的回收率进行洗涤。使用淘析, 可以去除死细胞以优化细胞群的活率。调整离心速度和流速可以使细胞根据大小和密度进行分开, 而剪切力最小。



**图1.逆流离心(CFC)的原理。**封闭系统CTS Rotea仪器依靠逆流技术, 根据大小和密度分离细胞。(A)细胞上样: 使用“平衡的”g力和逆流参数, 将由培养基和细胞组成的起始物料通过中心管引入CFC腔室。(B)淘析: 较大或密度较大的细胞会在流化床中被捕获, 而较小或密度较低的细胞和碎片则会通过流化床并在CFC腔室顶部被“洗脱”。(C)培养基交换和洗涤: 将洗涤缓冲液泵送至流化床, 替代起始产品中的原始培养基。注: 流化床可实现十分快速高效的洗涤。(D)细胞浓缩: 洗涤和浓缩的细胞现可从CFC腔室中回收, 只需简单地反转泵并通过内部管路提取浓缩物。关于逆流离心技术的更多细节和视频可以在这里找到。

密度梯度离心和逆流离心产生的结果相当 (图2)。然而, 逆流离心的明显优势在于其执行时间更短; 而且最重要的是, 其可以在更理想的封闭系统设置中执行。表1总结了PBMC分离方法。

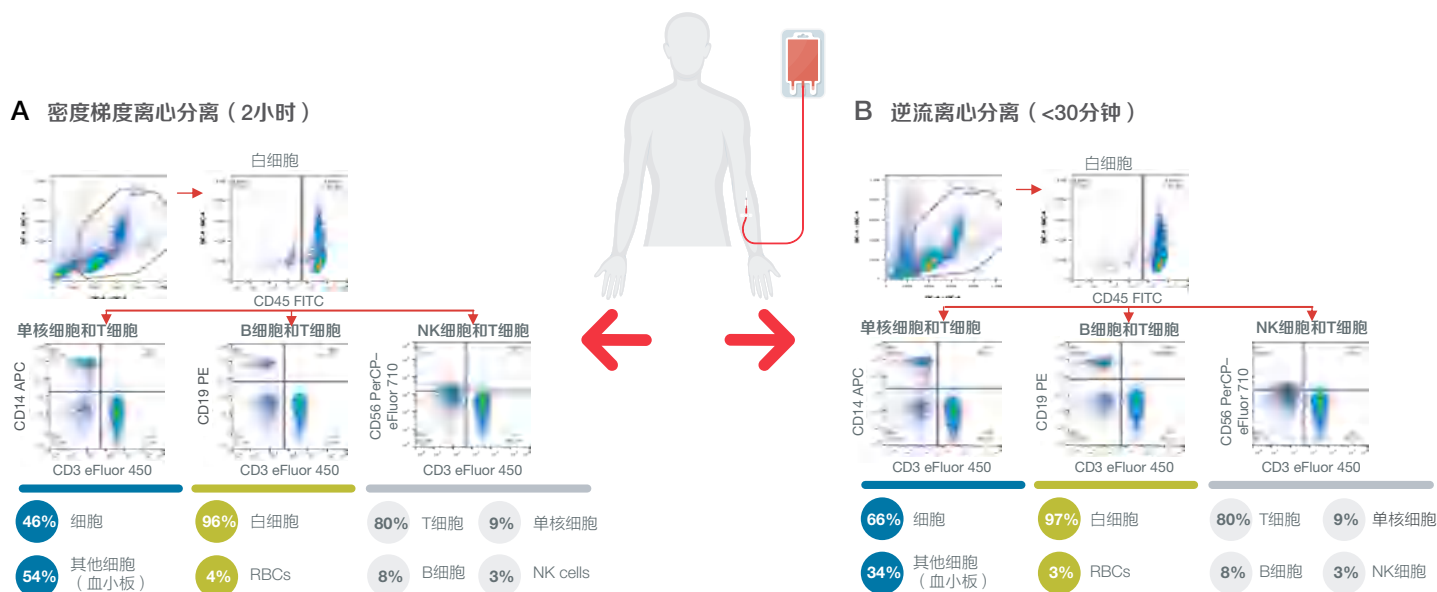


图2.使用封闭式逆流离心系统和开放式密度梯度系统从红细胞中分离PBMC。将单一供体白细胞单采样本的液体分为两份, 并(A)使用Ficoll聚合物通过密度梯度离心或(B)使用CTS Rotea系统通过逆流离心分离PBMC。CTS Rotea系统可在30分钟内从白细胞单采样本中分离出PBMC, 且分离性能几乎与密度梯度系统相当, 并具有封闭式处理的附加优点。

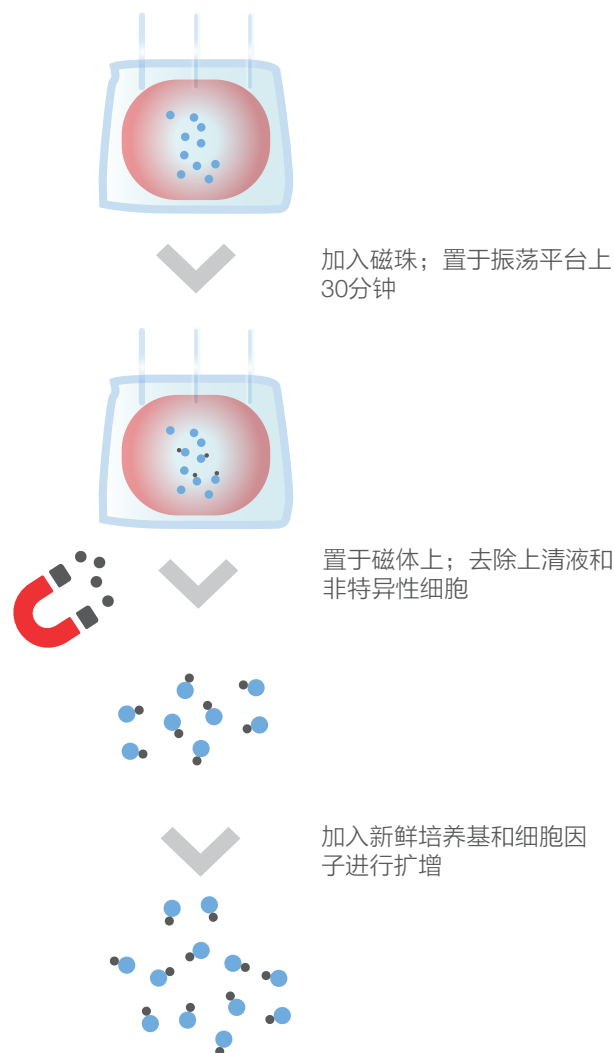
表1.PBMC分离方法的比较。

	密度梯度离心	逆流离心
<b>优点</b>	广受认可 广泛应用 平价 (仅限开放式系统)	缩短处理时间 方案灵活性 减少用户错误和差异性 减少污染 可实现自动化
<b>缺点</b>	过程冗长 昂贵 (封闭式系统)	昂贵 (封闭式系统)

## T细胞分离和激活

PBMC分离后的下一步是T细胞分离, 以去除其他细胞类型的任何残留污染, 并提高产物特异性。然后再进行激活。同种异体供体血液的固有可变性导致无法区分细胞类型。为了克服这个问题, 已经开发出基于磁珠的T细胞群筛选方法。这些方法使用与抗体结合的磁珠, 而抗体可识别T细胞表面标志物并与之结合。当放置在磁体附近时, 磁珠-T细胞复合物结合并被保留, 而不需要的细胞类型则会被冲走。一旦分离, T细胞便可以从磁珠中释放出来 (见图3)。

目前市面上有多种磁珠产品。其中一些平台可用于极具特异性的细胞群 (例如CD4/CD8+或CD62L+), 这些细胞群后续可通过其他方式激活。另一种Gibco™ CTS™ Dynabeads™ CD3/CD28系统可提供T细胞激活和扩增所需的原始和共刺激信号, 无需单独的激活步骤, 从而减少引入污染的可能性。



**图3.使用CTS Dynabeads CD3/CD28分离和激活T细胞以进行后续工程改造。**收集PBMC, 并在细胞培养袋中使用CTS Dynabeads CD3/CD28 (磁珠与细胞比为3:1) 激活。将培养基中的细胞和磁珠置于振荡平台上孵育30分钟。30分钟后, 将培养袋置于Gibco™ CTS™ DynaMag™磁力架上, 并收集附着在磁珠上的CD3/CD28+细胞。丢弃上清液和非特异性细胞。加入含有细胞因子的新鲜培养基, 以便同时进行T细胞激活和扩增。用该方法分离出的CD3+CD28+ T细胞回收率超过90%, 受到均匀刺激 (>95% 的CD25+细胞), CD3+T细胞纯度超过95%, 整个过程无需抗原呈递细胞 (APC)。用有关此过程的更多详细信息, 请参阅[使用CTS Dynabeads CD3/CD28一步分离和激活初始和早期记忆T细胞](#)。

## iPSC衍生的CAR NK细胞

同种异体工作流程的一个主要问题是细胞数量或起始材料不足以创建用于患者输注的产品。为了克服这一限制，已经开发出一种用于从iPSC中获得NK细胞或T细胞的革命性方法。NK细胞的使用减少了排斥障碍（例如，人移植物抗宿主病），并且NK细胞可从多种不同来源产生，例如脐带血、骨髓、人类胚胎干细胞和iPSC。

NK细胞的一个显著优势是，与T细胞不同，在杀死多个靶细胞后，NK细胞的存活率有所提高。此外，NK细胞可产生与T细胞不同的细胞因子谱。T细胞产生的细胞因子导致细胞因子释放综合征（CRS），已观察到一些使用过继细胞治疗产品的患者中出现这种危及生命的疾病，而使用NK细胞有可能避免这种情况。

同种异体疗法排斥反应最常见的原因是由于iPSC衍生产物的HLA I类基因存在差异，导致供体和受体之间的不匹配。T细胞定期与HLA复合物相互作用，因此表面HLA复合物的任何变化都表明该物质是外来物质。相反，NK细胞可以以HLA非依赖的方式对不同的肿瘤靶标表现出细胞毒性，这可以减轻供体和受体之间的不匹配问题。原代NK细胞的分离困难且复杂，并且可能导致产量低下，使得iPSC衍生的CAR NK细胞成为同种异体工作流程中更具吸引力的选择。为此，主要目标是确定iPSC细胞系，以避免同种异体排斥反应，并加快将细胞治疗产品推广到临床。

## 总结

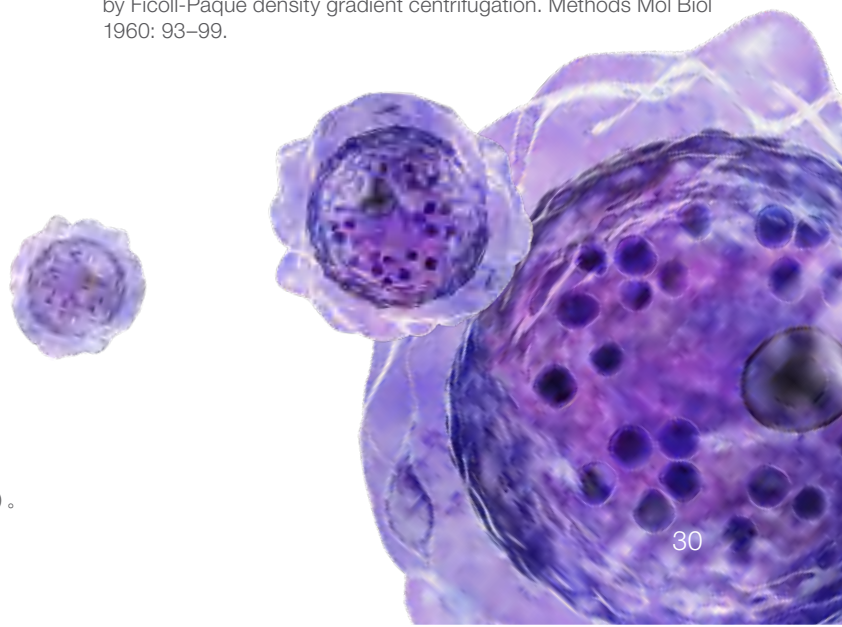
同种异体CAR-T细胞的制备需要鉴定健康的第三方供体，并分离足够数量的T细胞，以用于后续的工程改造步骤。理想情况下应在封闭的系统环境中进行分离，该环境可提供修饰灵活性，以便轻松解释来源材料的差异。最新进展中研究了其他来源或细胞类型（即iPSC衍生的NK细胞）的使用，以进一步扩展和改进CAR技术的应用。

## 其他资源

- Grievink HW, et al. (2016) Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreserv Biobank* 14(5):410–415.
- One-step isolation and activation of naive and early memory T cells with CTS Dynabeads CD3/CD28.
- Habib S, Tariq SM, Tariq M. (2019) Chimeric Antigen Receptor-Natural Killer Cells: The Future of Cancer Immunotherapy. *Ochsner J* 19(3):186–187.
- Gornalusse GG, et al. (2017) HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat Biotechnol* 35(8):765–772.
- hu H, et al. (2020) Metabolic Reprogramming via Deletion of CISH in Human iPSC-Derived NK Cells Promotes In Vivo Persistence and Enhances Anti-tumor Activity. *Cell Stem Cell* 27(2):224–237.
- Wu Y, et al. (2017) Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines. *Front Immunol* 8:930.

## 参考文献

1. Tan YS and Lei YL. (2019) Isolation of tumor-infiltrating lymphocytes by Ficoll-Paque density gradient centrifugation. *Methods Mol Biol* 1960: 93–99.



# 第5节： 细胞改造

## 简介

同种异体CAR-T细胞治疗产品开发的下一步是对分离后的T细胞的基因组成进行工程改造或改变。这些改变最终产生的T细胞可避免危及生命的排斥反应问题(更多背景信息, 请参阅第3节, [细胞分离、改造和扩增概述](#))。此外, 这些改变可引入靶向肿瘤细胞表面抗原的嵌合抗原受体(CAR)。目前已存在多种细胞改造方法, 本节将介绍目前使用的三种基因编辑工具: 锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)和规律间隔成簇短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白9(CRISPR-Cas9)。本节还将讨论向T细胞递送上述工具的几种方法, 以及工程改造工作流程的总体概述。

## 敲入与敲除

使用基因编辑工具设计来自第三方同种异体健康供体的现货型或通用CAR-T细胞, 是通过靶向供体细胞DNA的变化使特异性基因发生突变。这些工具以两种方式促进同种异体T细胞的基因编辑(图1):

1. **敲入**—添加目的基因以在细胞中实现预期功能(例如, 添加HLA-E以防止宿主NK细胞杀死同种异体CAR-T细胞)。
2. **敲除**—破坏供体T细胞不需要的基因功能, 通常是通过删除基因序列(例如, 消除TCR的TCR  $\alpha\beta$ 链)。

科学家们通常依靠DNA特异性内切酶进行基因敲入或敲除, 该内切酶使用“向导”蛋白或核酸序列定向到特定的切割位点。在双链DNA被切割后, 细胞修复机制修补基因的切割区域。这些双链DNA修复可以通过两种机制完成: 非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR)。不精确的NHEJ容易出错, 并可能导致在靶标位点发生小的插入或缺失(indels)。如果在靶向基因的编码区精确进行NHEJ修复, 将产生该基因的indel或敲除(图1)。在HDR中, 将两侧序列与切割位点周围序列同源的供体模板序列(例如HLA-E T细胞改造)添加到反应中, 以便通过重组插入。这种所需的序列插入导致精确的基因添加, 称为敲入突变(图1)。

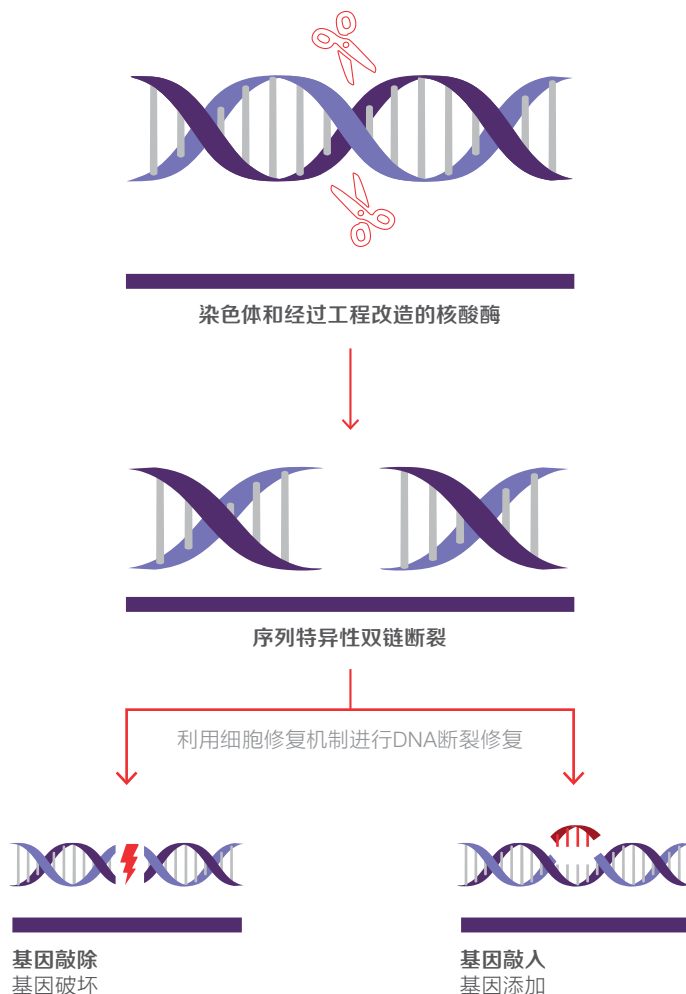
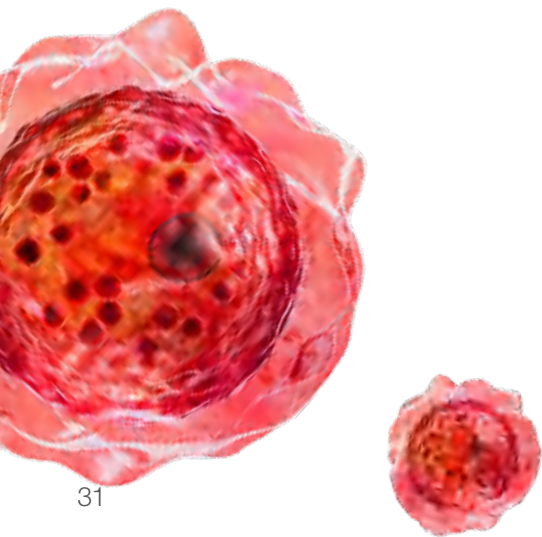


图1. 突变类型由特定的细胞修复机制决定。



## 用于创建同种异体T细胞的基因编辑技术

许多靶向基因组修饰的方法都可以产生这些永久性突变，但有三种基因编辑工具已经过充分研究，用于创建具有敲除TCR复合体或敲入HLA-E基因的同种异体CAR-T细胞：ZFN、TALEN和规律间隔成簇短回文重复序列（CRISPR）-CRISPR相关蛋白9（CRISPR-Cas9）（图2）<sup>[1-4]</sup>。

### ZFN

ZFN是一种转录因子，可以被特别设计成为一种人工核酸内切酶，用于切割双链DNA的特定序列。ZFN由两部分组成：第一部分是由多个锌指模块组成的含锌DNA结合蛋白，其通过DNA-蛋白质相互作用作为向导结合至所需的DNA序列。第二部分是FokI核酸酶，其通过柔性肽接头连接到DNA结合蛋白，并切割DNA形成双链断裂（图2A）<sup>[6]</sup>。每个锌指模块与三个连续的核苷酸相互作用，因此两个锌指模块将与6个连续的核苷酸相互作用，依此类推。一个功能完备的锌指DNA结合结构域由3-6个独立的锌指模块组成，这些模块与9-18个碱基对的高度特异性靶结合位点杂交，这样就决定了DNA序列切割区域的特异性。在实践中，ZFN以右侧和左侧ZFN配对使用，且每个FokI必须二聚化以作为核酸酶切割所需的双链DNA区域。可对锌指DNA结合蛋白进行设计使之

与基因组中感兴趣的部分配对，并将这些DNA结合蛋白和核酸酶放置在特定区域，从而产生所需的突变或改变。ZFN设计工作非常耗时，因为DNA结合蛋白（一种三级结构）需要与3个连续核苷酸精确“匹配”（表1）。由于存在左侧和右侧ZFN要求，该过程需要花费两倍的时间。这一严格要求也使ZFN成为一种具有高度特异性的工程改造工具，几乎没有脱靶效应。

### TALEN

TALEN是另一种专门设计的DNA核酸酶，与ZFN类似。TALEN同样具有一个源自Xanthomonas的DNA结合蛋白（TALE）和一个作为切割域的FokI核酸酶。与ZFN一样，TALEN同样以模块对的形式工作（即右侧TALEN和左侧TALEN），且两个FokI核酸酶必须二聚化以形成可切割目标双链DNA的功能性核酸酶（图2B）。DNA结合向导组分是12-20个成链排列的单个TALE重复序列，其中与单个DNA碱基对的结合基于每个TALE单元第12位和13位的重复可变双残基（RVD）<sup>[6]</sup>。TALEN具有高靶标特异性，因为DNA切割需要两种TALEN复合物，但最终的TALEN合成通常需要4周时间（表1）。

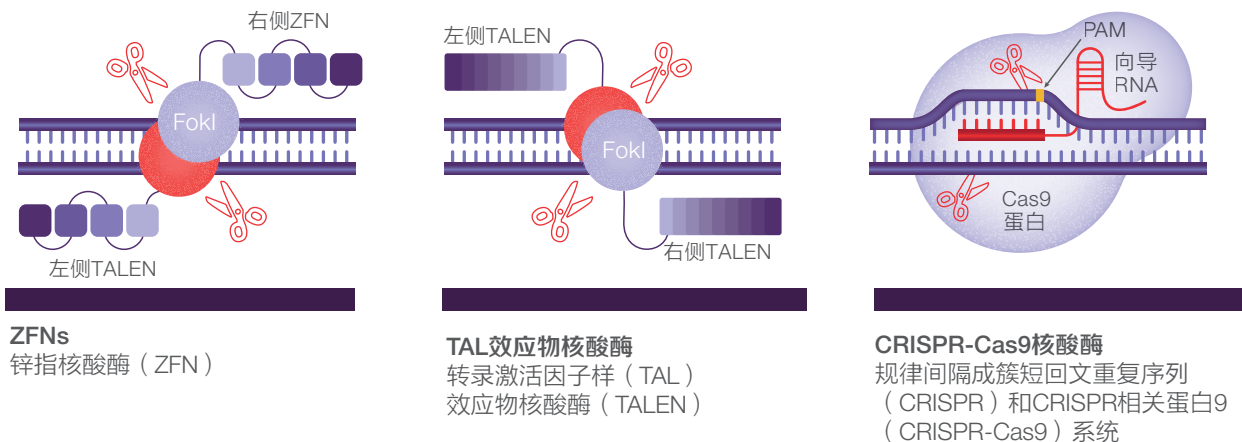


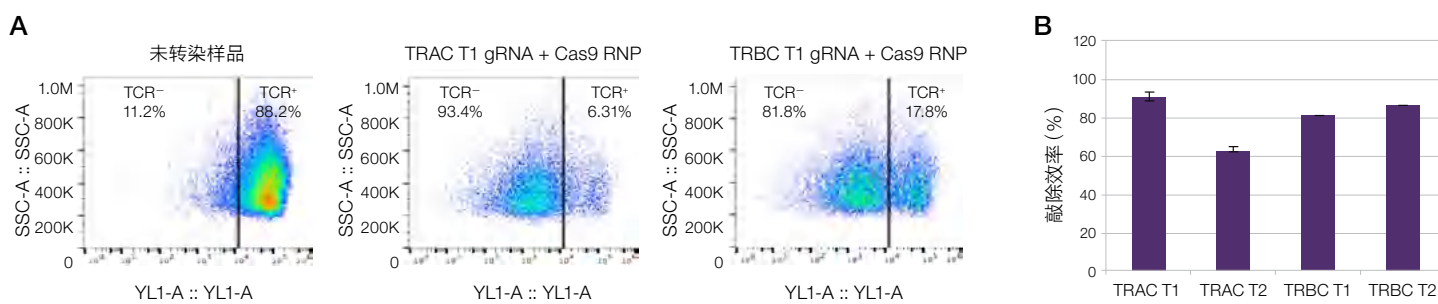
图2.用于同种异体T细胞的基因编辑工具。



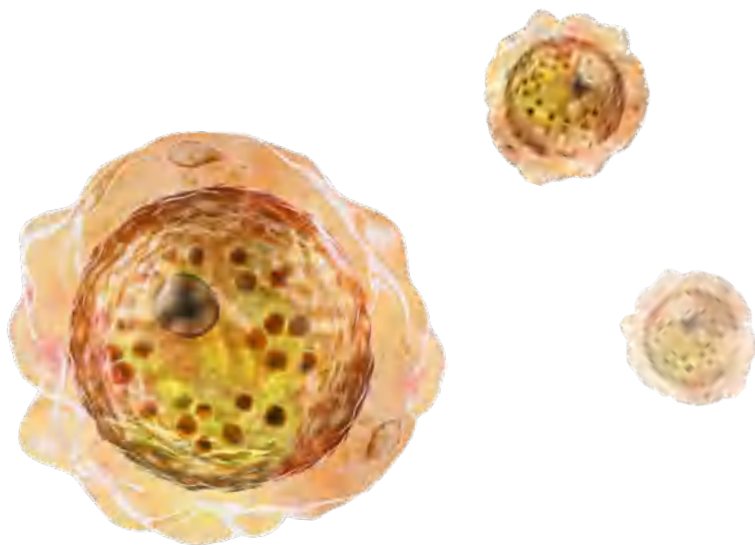
## CRISPR-Cas9

最近, 来源于化脓性链球菌的CRISPR-Cas9基因编辑技术已经问世, 该技术与ZFN和TALEN基因编辑技术迥然相异<sup>[7]</sup> (另请参阅[CRISPR基因组编辑资源指南, 第3版](#))。与ZFN和TALEN类似, 靶序列需要大约20个碱基对。CRISPR-Cas9技术由核酸酶组分 (Cas9) 和作为向导的RNA组分 (gRNA) 组成。与ZFN和TALEN不同, CRISPR-Cas9系统依赖于RNA-DNA杂交实现靶标特异性, 而ZFN和TALEN利用蛋白质-DNA相互作用和FokI核酸酶的二聚化实现特

异性切割。另一差异在于可接受的靶位点。用于基因编辑的CRISPR-Cas9靶位点必须具有前间区序列邻近基序 (NGG; 也称为PAM位点), 以便gRNA“定位”特异性DNA序列, 这在一定程度上限制了该系统的灵活性 (图2C)。尽管CRISPR-Cas9存在设计缺陷, 但与其TALEN和ZFN相比效率更高, 开发时间更短。图3显示了使用CRISPR-Cas9创建基因敲除的高效率数据。



**图3. T细胞的高效功能性敲除。**使用Invitrogen™ Dynabeads™磁珠从PBMC (来自健康供体) 中分离T细胞, 然后使用Invitrogen™ Neon™转染系统及Invitrogen™ TrueCut™ Cas9 Protein v2和靶向T细胞受体 $\alpha$  (TRAC) 或 $\beta$  (TRBC) 区的Invitrogen™ TrueGuide™ Modified Synthetic sgRNA进行转染。(A) 与TCR的特异性抗体结合后, 通过流式细胞仪进行分析, 结果显示该受体的功能性敲除>90%。对于TRAC和TRBC, 测试了两种不同基因组DNA靶标 (T1和T2) 的特异性gRNA; 仅显示了每种情况下T1靶标的结果。(B) 新一代测序 (NGS) 分析TRAC和TRBC基因座的两个不同基因组靶标 (T1和T2) 的切割效率概况。有关此实验的更多详细信息, 请参见下文, 在高达90%的人原代T细胞中实现功能性敲除。



## 基因编辑核酸酶系统的总结

两种基因组编辑技术，即ZFN和TALEN（图2A和2B），是极具特异性的基因编辑工具，必须为每个编辑实验设计两种与核酸酶相连的DNA结合蛋白（左侧和右侧复合物）。这些工具的基因序列被转移到细胞中，以表达为功能性核酸酶。基因组编辑技术，即CRISPR-Cas9系统（图2C），只需将设计的gRNA和Cas9蛋白在体外结合，以产生单个CRISPR-Cas9核糖核蛋白（RNP）复合物，该复合物递送到细胞后可诱导双链DNA断裂。表1总结了三种基因编辑技术，并提供了现货型CAR-T细胞生成的应用示例。

## 用于基因编辑工具的递送系统

这些基因编辑工具是大分子，因此其递送很具有挑战性。小分子试剂易溶于水溶液，并通过扩散进入细胞，而大分子试剂需要通过主动递送系统进入细胞。目前，体内和体外基因编辑应用可使用多种递送系统，包括电穿孔（EP）或核转染、脂质或聚合物纳米粒子、细胞穿透肽和病毒载体（如慢病毒、腺病毒或腺相关病毒（AAV））。这些方法基于可促进基因编辑工具递送至细胞的三个基本原则之一：

1. **带电表面相互作用**—带正电荷的粒子与带负电荷的细胞膜结合，然后细胞吸收粒子
2. **电流作用于细胞**—电流使细胞膜不稳，从而产生允许粒子通过的孔隙
3. **病毒载体系统**—对人类无害的修饰后病毒用于感染细胞和递送目标递送物

本部分将讨论每种方法中最常用的递送系统，即基于脂质的转染、基于电脉冲的转染和病毒转导（表2）。

## 基于阳离子脂质的递送系统

这种方法无需使用特殊设备或实验室容器，是基因编辑工具最经济和最简单的递送方法。该方法依赖脂质分子形成脂质体来包裹基因编辑工具递送物，从而帮助细胞转染（例如，[Invitrogen™ Lipofectamine™试剂](#)）。在该方法中，带正电荷的脂质纳米粒子复合物与带负电荷的细胞膜融合，通过称为内吞作用的过程促进构建体进入细胞。然后，基因编辑工具被释放到细胞质中，最终进入细胞核开始基因编辑。

表1.三种常用的同种异体T细胞基因编辑工具总结。

编辑工具	靶标识别	核酸酶	核苷酸靶标长度	核酸酶设计时间	靶基因	递送方式	参考文献
ZFN	与3个碱基对结合的锌指	FokI	18-36	大约10周	TRAC/TRBC TRAC/TRBC HLA-A	EP Lentivirus EP	Torikai H, et al. [8] Provasi E, et al. [9] Torikai H, et al. [10]
TALEN	与1个碱基对结合的TALE蛋白	FokI	30-35	大约4周	TRAC/TRBC TRAC/TRBC TRAC TRAC β2M	EP EP EP EP AAV	Poirot L, et al. [11] Knipping F, et al. [12] Osborn M, et al. [13] Qasim W, et al. [14] Eyquem J, et al. [15]
CRISPR-Cas9	gRNA与DNA杂交	Cas9	20-24	大约1周	TCR/β2M TRAC and β2M TRAC β2M TCR TRAC/TRBC TRAC	EP AAV EP EP EP EP	Ren J, et al. [16] Eyquem J, et al. [15] Georgiadis C, et al. [17] Ren J, et al. [18] Knipping F, et al. [12] Osborn M, et al. [13]

## 基于电脉冲的递送系统

由于需要使用特殊设备和电转杯, 这种方法的成本可能较为高昂。基于电脉冲的方法包括将细胞置于电转杯中, 在导电缓冲液中悬浮细胞, 并短暂施加高压电脉冲。电流在细胞和核膜上产生临时孔隙, 以便递送大分子。

目前市面上不同的电转染设备搭配有不同的电转技术、参数控制、和电转染试剂, 最终可实现大分子进入亚细胞空间的不同位置。由于细胞治疗工艺路线相较于传统生物药开发更加复杂, 选用搭配GMP级别一次性耗材的封闭式系统可以更有利于生产过程的质量控制。同时, 随着细胞疗法的多元化发展, 在选择电转染设备时生产人员更趋向于参数可灵活设置的设备, 以便针对当前开发的产品进行定制化优化, 从而实现疗法开发的成功。

## 基于病毒的递送系统

身为单链RNA病毒的慢病毒是一种强大的载体, 也是基因编辑最常用的病毒载体之一。慢病毒是免疫疗法和基因疗法的理想载体。研究表明, 慢病毒载体可将各种CAR构建体递送至免疫细胞, 将CRISPR-Cas 9等基因编辑工具递送至靶细胞, 或者递送健康基因以纠正镰状细胞病、重症联合免疫缺陷病和18 $\beta$ -地中海贫血等疾病<sup>[19,20]</sup>。最值得注意的是, 慢病毒载体已被批准用于将CAR构建体递送至T细胞进行CAR-T疗法的临床应用。慢病毒载体的最大优点在于, 其在分裂和非分裂细胞中均可实现高感染(或转导)效率。该载体具有良好的安全性、相当高的承载能力, 并能够维持长期转基因表达<sup>[21]</sup>。单个慢病毒载体的高承载能力可将Cas9、sgRNA和嘌呤霉素选择性标志物递送至靶细胞<sup>[22]</sup>。

表2.用于基因编辑的递送方法。

方法	描述	优点	缺点
慢病毒载体	将DNA或RNA包装到传染性病毒颗粒中并导入细胞	<ul style="list-style-type: none"><li>• 转导效率高</li><li>• 适用于原代免疫细胞</li><li>• CAR-T临床应用的先例</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 需要特殊的实验室环境</li><li>• 需要安全措施</li><li>• 费力</li></ul>
电穿孔	电脉冲在细胞膜上产生孔隙, 允许DNA、RNA和RNP进入细胞质和细胞核	<ul style="list-style-type: none"><li>• 快速简单</li><li>• 可在数分钟内转染大量细胞</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 需要特殊设备</li><li>• 在此过程中可形成细胞毒性阴离子, 导致细胞死亡</li></ul>
阳离子脂质	带正电荷的脂质体包裹蛋白质和RNP, 并与带负电荷的细胞膜相互作用, 促进脂质体通过内吞途径进入细胞质	<ul style="list-style-type: none"><li>• 简单通用(无需特殊设备), 毒性较低, 可作为高通量系统</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 转染效率较低</li><li>• 不可直接递送至细胞核</li><li>• 不适用于所有细胞类型</li></ul>

## 基因编辑工作流程概述

为CAR - T治疗生成工程同种异体T细胞非常复杂。基因编辑可帮助克服许多免疫学障碍，从而产生可被受体患者接受的同种异体T细胞，而不会造成危及生命的后果。工作流程总结如下：

- 设计和创建选定的基因编辑核酸酶
- 将基因编辑工具转染到T细胞
- 监测切割效率
- 分析和确认敲入和敲除情况

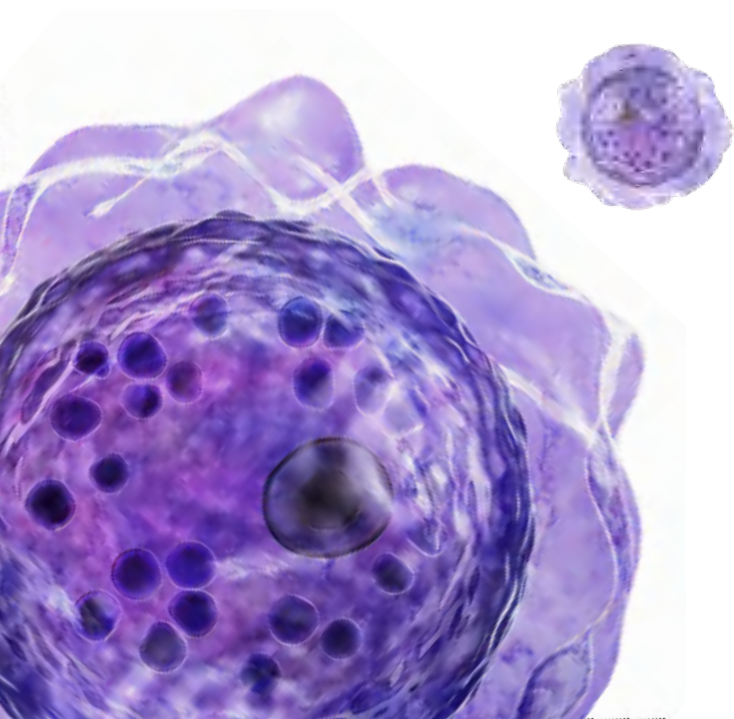
对T细胞进行实际工程改造之前需要大量的准备步骤，首先是核酸酶组分的选择和设计。每种基因编辑工具都有自己的DNA结合域设计规则和标准；然而，每种工具的最终设计在很大程度上依赖于序列分析软件工具的使用，以确定目标切割位点周围的最佳序列，从而限制非预期的“脱靶”结合位点。可使用专门为基因编辑开发的免费在线软件工具（例如，Invitrogen™ TruDesign™基因组编辑软件），许多基因编辑核酸酶供应商也可以提供设计帮助。设计完成后，可能需要1-10周生产基因编辑核酸酶组分（表1）。

从供体中分离并激活T细胞后，可使用选定的基因编辑核酸酶转染细胞并立即进行工程改造；或者，如果细胞数量较少，可先对细胞进行扩增，在达到足够的细胞数量时再进行工程改造。也可以将细胞低温保存，后期再进行工程改造。

在进入下一步之前，需对基因编辑过程中的每个步骤进行确认。这些步骤通常包括：测定所需位点的切割效率、检查PCR产物序列、监测基因和蛋白质表达，以及检查对模型细胞系统的影响（例如，毒性和活率）。许多试剂和流式细胞术系统可用于量化TCR敲除效率。

## 用于同种异体CAR细胞治疗产品的其他细胞来源

一些其他细胞来源也适合产生现货型CAR-T细胞，如胚胎干细胞（ESC）和iPSC。ESC和iPSC均具有自我更新能力，可进行无限体外扩增。人ESC来源于胚胎，因此，由于监管问题和来源有限，在临床开发方面可能存在问题<sup>[23]</sup>。相较之下，来源于成体细胞的人iPSC更合适<sup>[24]</sup>。例如，成纤维细胞可在体外重新编程、可转化为iPSC细胞，且行为类似于能够以无限增殖能力分化为红细胞、T细胞、B细胞和NK细胞的胚胎多能干细胞<sup>[25]</sup>（有关更多信息，请参阅[多能干细胞资源手册和制造多能干细胞](#)）。



另一种具有潜力的iPSC衍生免疫细胞亚群是NK细胞,它是先天性免疫反应的重要组成部分。NK细胞负责免疫监视,其这一功能主要通过靶向下调HLA I呈递和上调应激配体的病毒感染细胞和肿瘤细胞来实现。NK细胞对CAR疗法而言具有吸引力,因为它们不具有T细胞受体,且无法与HLA-I复合物相互作用,而HLA-I复合物是移植物抗宿主病的关键促成因素。iPSC衍生的CAR-T细胞仅杀死表达CAR识别的特异性抗原的肿瘤细胞,而与iPSC衍生的CAR-T细胞不同,iPSC衍生的CAR-NK细胞既可以杀死表达CAR抗原的肿瘤细胞,也可以杀死不表达CAR抗原的肿瘤细胞(图4)

使用iPSC衍生CAR-NK细胞的另一个具有吸引力的特点在于其细胞因子谱:其在激活后可分泌有限水平的IFN- $\gamma$ 、IL-12和GM-CSF。CAR-T细胞在激活后持续分泌IL-1和

IL-6,而IL-1和IL-6的存在可导致细胞因子释放综合征(CRS),即部分CAR-T疗法患者发生的严重不良事件<sup>[26]</sup>。到目前为止,过继转移iPSC衍生NK细胞的耐受性良好,且未在患者中诱发GvHD或细胞因子毒性<sup>[27,28]</sup>。

### 总结

有多种基因编辑工具和递送系统可用于促进T细胞用于CAR-T疗法所需的基因改变。每种系统都有其自身的优缺点,应针对每种CAR-T细胞治疗产品仔细权衡。需进行权衡的方面包括靶标特异性与易用性、成本与速度。与许多尖端技术一样,迅速改进的现有工具和正在问世的新方法将解决该领域当前的局限性。

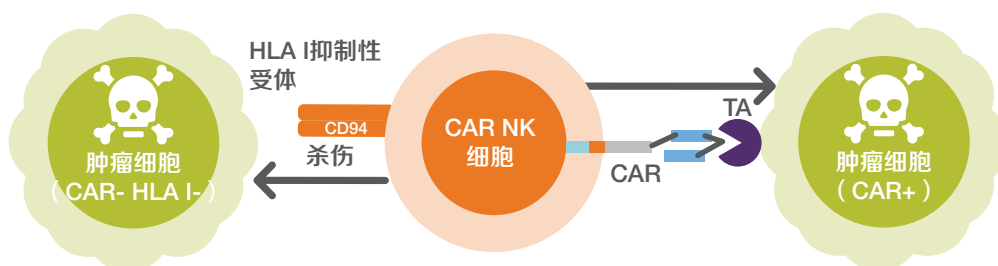
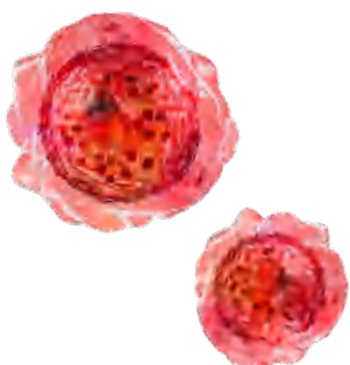
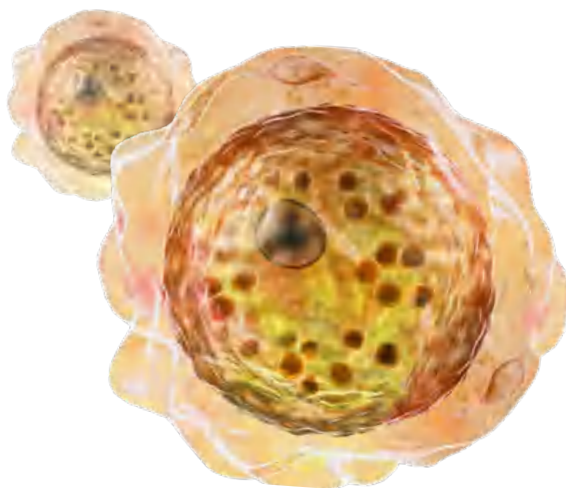


图4. CAR NK细胞可以杀死更广泛的肿瘤靶标。左侧显示CAR-NK细胞在无CAR参与的情况下杀死HLA I表达缺失的肿瘤细胞。右侧显示CAR-NK细胞介导的杀伤取决于CAR的参与和肿瘤细胞上的肿瘤抗原(TA)表达。



## 参考文献

1. Depil S, et al. (2020) “Off-the-shelf” allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 19:185–199.
2. Townsend MH, et al. (2020) Paving the way towards universal treatment with allogeneic T cells. *Immunol Res* 68: 63–70.
3. Zhao J, et al. (2018) Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. *J Hematol Oncol* 11:1–9.
4. M. Ruella and S. S. Kenderian (2017) Next-generation chimeric antigen receptor T-cell therapy: going off the shelf. *BioDrugs* 31:473–481.
5. D. Carroll (2011) Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* 188:773–782.
6. Richter A, et al (2016) TAL effector DNA-binding principles and specificity. *Methods Mol Biol* 1338: 9–25.
7. Jinek M, et al. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816–821.
8. Torikai H, et al. (2012) A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood* 119(24):5697–5705.
9. Provasi E, et al. (2012) Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nat Med* 18(5):807–815.
10. Torikai H, et al. (2013) Toward eliminating HLA class I expression to generate universal cells from allogeneic donors. *Blood* 122(8):1341-1349.
11. Poirot L, et al. (2015) Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for “Off-the-Shelf” Adoptive T-cell Immunotherapies. *Cancer Res* 75:3853–3864.
12. Knipping F, et al. (2017) Genome-wide Specificity of Highly Efficient TALENs and CRISPR/Cas9 for T Cell Receptor Modification. *Mol Ther Methods Clin Dev* 4:213–224.
13. Osborn M, et al. (2016) Evaluation of TCR Gene Editing Achieved by TALENs, CRISPR/Cas9, and megaTAL Nucleases. *Mol Ther* 24(3):570–581.
14. Qasim W, et al. (2017) Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med* 9(374):eaaj2013.
15. Eyquem J, et al. (2017) Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* 543(7643):113–117.
16. Ren J, et al. (2017) Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clin Cancer Res* 23(9):2255-2266.
17. Georgiadis C, et al. (2018) Long Terminal Repeat CRISPR-CAR-Coupled “Universal” T Cells Mediate Potent Anti-leukemic Effects. *Mol Ther* 26(5):1215–1227.
18. Ren J, et al. (2017) A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget* 8(10):17002–17011.
19. Ghaleh HEG, et al. (2020) Concise review on optimized methods in production and transduction of lentiviral vectors in order to facilitate immunotherapy and gene therapy. *Biomed Pharmacother* 128:110276.
20. Bulcha J, et al (2021) Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther* 6(1):53.
21. Cockrell AS and T Kafri T (2007) Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol* 36(3):184–204.
22. Shalem O. (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343(6166):84–87.
23. Cogle CR, et al. (2003) An overview of stem cell research and regulatory issues. *Mayo Clin Proc* 78(8):993–1003.
24. Shi Y, et al. (2017) Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* 16:115–130.
25. Angelos MG and Kaufman DS (2015) Pluripotent stem cell applications for regenerative medicine. *Curr Opin Organ Transplant* 20(6):663–70.
26. Liu E, et al. (2020) Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med* 382(6):545–553.
27. Dolstra H, et al. (2017) Successful Transfer of Umbilical Cord Blood CD34 + Hematopoietic Stem and Progenitor-derived NK Cells in Older Acute Myeloid Leukemia Patients. *Clin Cancer Res* 23(15):4107–4118.
28. Miller JS and Lanier LL (2019) Natural Killer Cells in Cancer Immunotherapy. *Annu Rev Cancer Biol* 3:77–103.



# 第6节： 细胞扩增

## 简介

CAR-T细胞治疗已发展成为商业化治疗方法，促使大量公司涌入免疫疗法领域。在标准工作流程中，患者（自体）或供体（同种异体）的经过基因工程改造的T细胞必须进行体外扩增，以供临床使用。通常，T细胞扩增是CAR-T工作流程中最长也是最关键的阶段之一。

经过工程改造的T细胞对其微环境和生长条件敏感。这些反应可能导致潜在的不良细胞变化，从而对生产和质量控制造成挑战，最终可能延误患者治疗。

扩增阶段的主要目标之一是保持“年轻化”、分化程度较低的记忆细胞表型。图1显示了T细胞分化谱，左侧为分化程度较低、治疗效果最佳的中央记忆T细胞（TCM），右侧为效果较不理想、较为成熟的效应记忆T细胞（TEM）和效应T细胞（TEFF）。当T细胞分化并向TEFF细胞群过渡，且有效性降低时，CD62L、CCR7和CD28等表面标志物将不存在。

扩增后的T细胞活率和质量对治疗效果有重大影响。幸运的是，相关因素（如培养基和添加剂的使用、细胞密度和培养平台）已得到识别和改进，以优化成功和稳健工作流程所需的条件。扩增过程中需要对CAR-T细胞进行取样和分析，以评估细胞质量，并确保产品的安全性和有效性。

## 同种异体与自体扩增

早期细胞治疗产品的重点在于自体工作流程，即分离、激活、基因修饰、扩增患者自身的T细胞并最终回输患者体内。自体工作流程的主要优点在于其允许进行个体化治疗，并将免疫排斥和其他疾病或病毒感染转移的风险降至最低。自体细胞治疗产品亦存在一些挑战，即患者的细胞通常表现出缓慢的生长曲线和更成熟的T细胞表型，这很可能是由于患者疾病的性质和体内细胞环境造成的<sup>[1]</sup>。2019年的一篇综述文章指出，研究已经证明这些固有的患者T细胞缺陷与自体疗法中观察到的缓慢CAR-T细胞扩增、持久性问题和较低的细胞毒性有关<sup>[2]</sup>。这些细胞缺陷与自体细胞扩增和质量问题直接相关，而最重要的是其与治疗效果丧失和患者治疗的周转时间较慢有关。

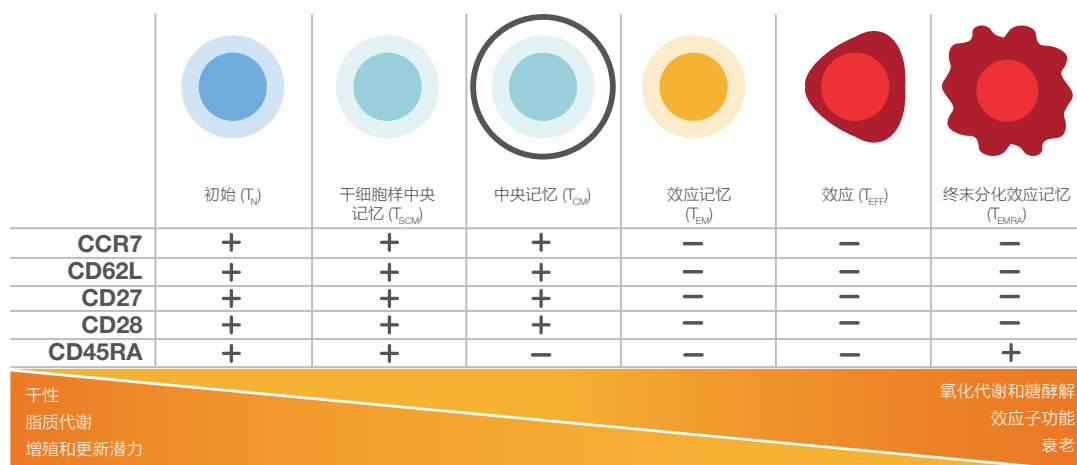


图1. 年轻为佳。早期TCM细胞（左）的维持在体外扩增过程中至关重要，该表型因其增殖和更新潜力而与患者的更有效治疗相关。

同种异体CAR-T疗法已显示出改变和改善治疗前景的巨大潜力。同种异体工作流程使用来自健康供体细胞的起始材料,可提供更有效、更及时的“现货型”治疗方案,为多例患者提供标准化治疗产品。使用健康的供体细胞有助于克服患者T细胞引起的诸多扩增和质量问题<sup>[9,4]</sup>。它还提供了重复给药或递送靶向不同治疗靶点的CAR-T细胞组合的潜力。虽然存在如此优点,但同种异体细胞治疗产品可能会导致危及生命的移植物抗宿主病或被宿主免疫系统清除,从而对患者造成重大风险。目前 these 问题是重中之重,并且正在进行研究以开发可减轻宿主排斥风险的基因 CAR修饰<sup>[5]</sup>。

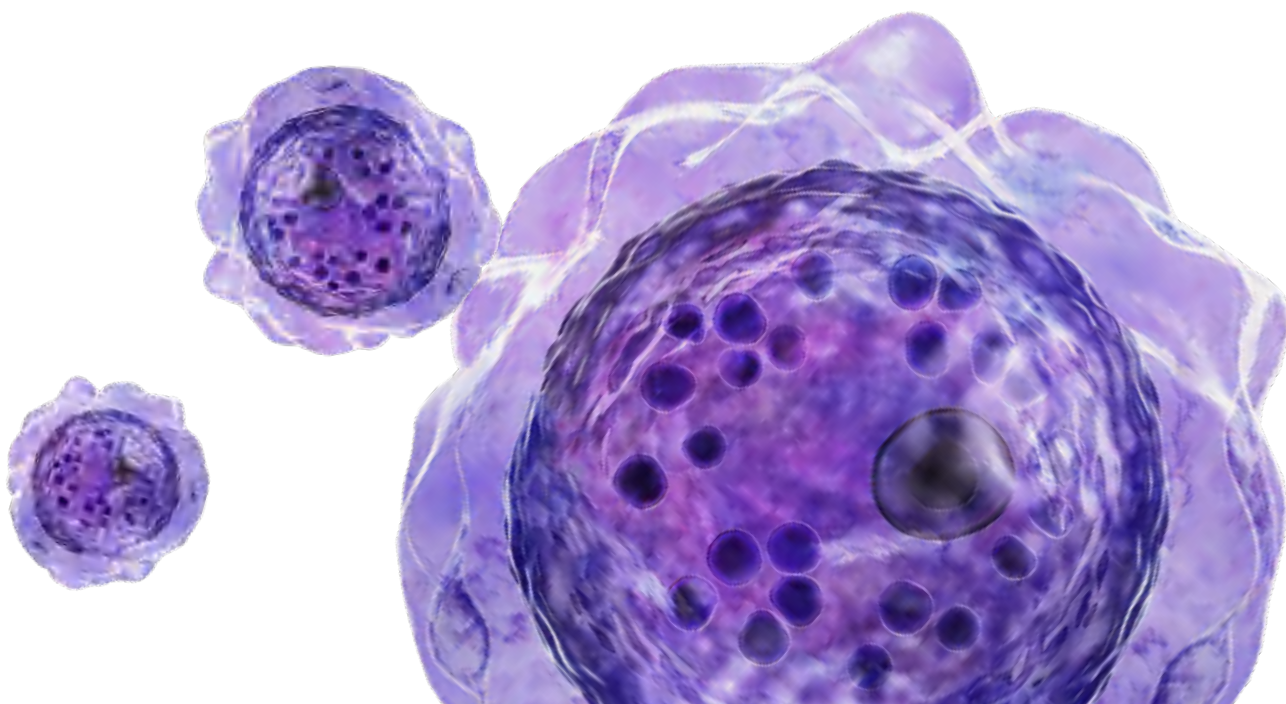
由于同种异体疗法需要更多细胞以生产多剂量,同种异体工作流程往往比自体工作流程规模更大、时间更长,其扩增阶段通常持续12-18天。额外的培养时间会对细胞分化和治疗产品的功能产生负面影响。如前所述,不必要的T细胞分化会导致年轻TCM细胞群损失,这可能导致患者治疗反应和治疗效果降低。

然而,解决这一问题的成功补救策略包括控制TCM细胞的分离和激活,以及在整个扩增过程中考虑细胞密度和补料。最终,通过成功的补救策略,潜在可扩展的同种异体工作流程可降低T细胞治疗产品的总成本,并提供更佳的治疗可及性<sup>[6]</sup>。

## 激活以扩增

在细胞治疗产品工作流程中,通过白细胞单采术从供体处收集白细胞。筛选自白细胞的T细胞表型经过分离和激活,以及基因编辑和T细胞重编程,从而表达CAR。在同种异体工作流程中,从健康供体中获取T细胞可显著增加分离出更理想的早期记忆T细胞群的可能性,从而提高细胞产量和整体治疗效果。

CD3和第二信号通路受体(如CD28)的共刺激提供了激活初始细胞的“唤醒”信号。CD3信号转导对于T细胞生长是必不可少的,而CD28激动性连接有助于T细胞存活,并在细胞骨架重塑、细胞因子产生、分化以及扩增过程中的转录和翻译后改变中发挥作用<sup>[7]</sup>。



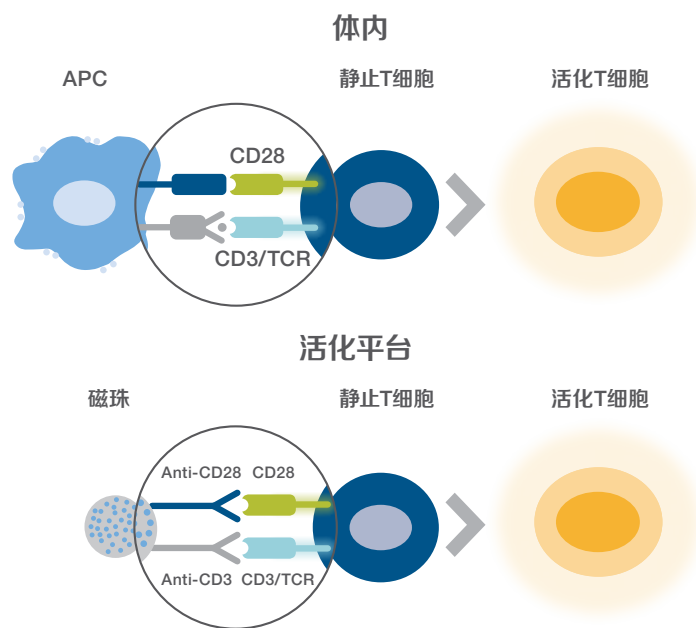


目前, T细胞激活主要通过抗体包被的磁珠(图2)或纳米微粒技术实现, 该技术通过抗CD3和抗CD28抗体模拟抗原依赖性信号。这些技术取代了使用抗原呈递细胞(APC)、丝裂原、可溶或孔板包被的抗体或化学激活剂的传统自制通用激活方法。此外, 白细胞介素2(IL-2)和白细胞介素7(IL-7)等特异性细胞因子已被证明可支持所需TCM表型的激活和维持, 并具有更高的扩增能力<sup>[6]</sup>。

CTS Dynabeads CD3/C28可以通过一步法进行分离和激活, 以便扩增所需T细胞表型<sup>[6]</sup>(图2)。这种共价结合的抗体磁珠技术无需额外添加饲养细胞、抗原或APC。这些磁珠

可在激活后或在基因修饰和扩增前去除。需要注意的是, 选择用于激活T细胞的产品和方案应符合应用、工艺和监管要求, 即仅供研究使用(RUO)或临床应用。

在激活和工程改造完成后进行缓冲液交换, 以将所需的T细胞转移到扩增培养基中。该步骤可使用封闭式自动逆流离心系统完成。在扩增过程中, 以所需水平释放的免疫刺激性细胞因子(如IL-2和IFN- $\gamma$ )可使CD8+细胞在扩增过程中作为记忆T细胞存活。



**图2.通过磁珠法分离和激活T细胞。**磁珠技术产品(例如CTS Dynabeads CD3/CD28)提供了一种分离、激活和扩增T细胞的体外方法。均匀、惰性、超顺磁珠的大小与抗原呈递细胞相似, 并与抗CD3和抗CD28抗体共价偶联。这两种抗体提供原始和共刺激信号, 针对有效的T细胞激活和扩增进行了优化。

# 影响T细胞扩增的条件和因素

## 扩增平台

T细胞扩增平台的选择取决于最终用户的应用、工作体积、工作流程和监管要求。表1总结了可用的不同平台选项及其优缺点。体外扩增可以在静态或动态培养系统中进行。静态培养系统的过程可以在培养瓶或透气静态培养袋中进行。为了维持系统封闭性，许多静态细胞培养袋带有用于取样的密封无菌管路和接头。温度和CO<sub>2</sub>水平的控制可通过将静态培养物放置在通常设置为37°C、5% CO<sub>2</sub>浓度的受控培养箱来实现。使用这种方法时，仅在培养基交换时发生气体交换。使用底部透气膜的透气性细胞培养瓶可作为封闭式静态培养系统的替代选择，其通过底部的渗透膜实现气体输送；与传统培养瓶相比，透气性细胞培养瓶可提供较大的接触表面的培养基工作体积。

由于体积、营养物质和气体交换的限制，静态培养系统可能不是同种异体工作流程的理想平台。在扩展T细胞工作流程时，小规模下的成功并不能确保大型系统的成功。扩大规模时应选择合适的生物反应器，并开发一套质量源于设计的战略。

封闭式和自动化摇摆式生物反应器平台系统适用于自体 and 同种异体工作流程和规模扩展。利用生物工艺一次性细胞培养容器技术以及自动化摇摆式生物反应器系统，可以监测和控制溶解氧(DO)、pH值、葡萄糖和代谢物，如乳酸和铵盐。摇摆式生物反应器的运动和角度可实现均匀混合和温和

搅拌。

兼容的预灭菌一次性培养袋配备多个传感器，可实现自动控制 and 报告。对于分批补料处理，这些系统可通过连续重量测量监控培养体积。扩增期间的典型条件包括6.6-7.0的pH值、6.6-7.5%的CO<sub>2</sub>范围和30-50%的DO范围，这些条件可确保细胞活率。理想的搅拌速度和角度取决于工作体积和培养袋的规格。对于[Thermo Scientific™ HyPerforma™ 摇摆式生物反应器](#)之类的摇摆式系统，当10 L生物反应器(袋)中包含1.5 L体积时，通常按照8rpm的速度摆动和6°的摆动角度。随着T细胞扩增体积的增加，摆动速度和摆动角度预计也会增加<sup>[1]</sup>。

最近，有人提出具有分批补料或灌注过程的低剪切力台式搅拌生物反应器可作为T细胞扩增平台。如果证明成功，这可能会产生重大影响，特别是对需要高T细胞产量的同种异体疗法。由于自动化程度高和所需手动操作较少，模块化搅拌台式生物反应器系统可能有助于降低成本。此外，该系统可满足从研究到商业化规模过渡期间的各种体积需求(表1)，这样可以减少或消除重新设计和过渡到其他扩展过程的必要性，从而避免成本增加和过渡错误的风险。对于工艺无法变更的2期或3期临床试验来讲，这一点尤为重要。此外，搅拌台式生物反应器可达到更高的体积传质系数(KLa)，从而支持生物反应器内有效且均匀的氧气输送。

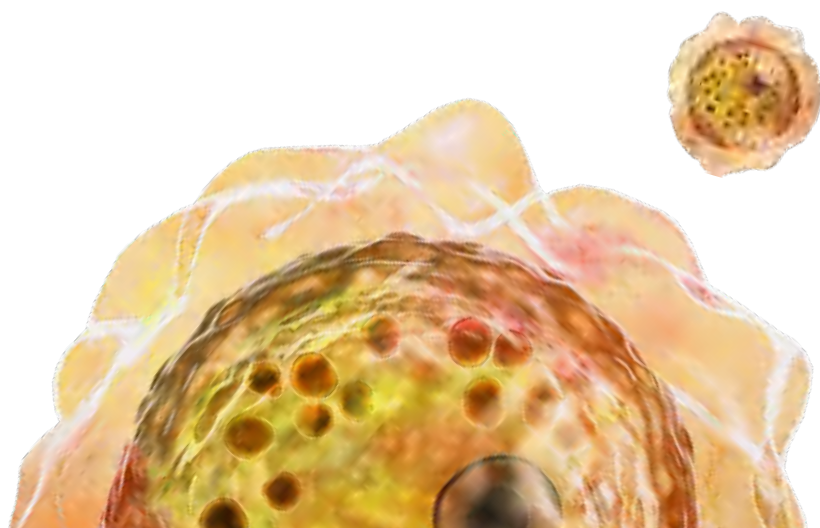


表1.T细胞扩增平台的比较。

选项	典型工作体积	临床或RUO	优点	缺点
静态培养袋	5 mL-3 L	RUO或临床	<ul style="list-style-type: none"> <li>封闭式系统</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>气体输送和工作体积有限</li> <li>难以实现高密度培养和放大</li> </ul>
T-培养瓶和静态孔板	100 μL-370 mL	RUO	<ul style="list-style-type: none"> <li>经济实惠, 适用于多种条件的筛选</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>开放式系统</li> <li>小规模</li> </ul>
摇摆式生物反应器	300 mL-25 L	临床	<ul style="list-style-type: none"> <li>封闭式、自动化、可扩展</li> <li>气体、液体、DO和pH值控制和传感</li> <li>可支持灌注培养, 实现高密度扩增</li> <li>数字集成</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>占地面积大</li> <li>成本高</li> </ul>
使用底部透气膜的透气性细胞培养瓶	8 mL-5 L	RUO或临床	<ul style="list-style-type: none"> <li>可实现封闭</li> <li>自动化</li> <li>与静态培养相比, 支持KLa值</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>难以实现高密度培养和放大</li> <li>成本高</li> </ul>
搅拌式生物反应器	250 mL-2,000 L	临床	<ul style="list-style-type: none"> <li>封闭式、自动化、可扩展</li> <li>气体、液体、DO和pH值控制和传感</li> <li>可支持灌注培养, 实现高密度扩增</li> <li>数字集成</li> <li>支持更高的KLa值</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>占地面积大</li> <li>成本高</li> </ul>

本表中产品的预期用途各不相同。具体预期用途声明请参阅使用说明书 (IFU)。

## 培养基

培养基和添加剂的选择可以显著影响扩增过程中T细胞群的生长、分化、活率和CD8:CD4比值。选择一款灵活的可用于扩增阶段的培养基, 且能够与其他工艺步骤 (如T细胞分离和激活) 都兼容是很重要的, 同时可适应从静态细胞培养系统到大规模动态生物反应器等各种平台。

随着工作流程和方案可变性的增加, 生产人员已经研发出优化的培养基和条件, 以支持灵活、无缝和可扩展的工作流程。培养基来源可能成为T细胞扩增的瓶颈, 它带来的挑战包括批次间差异性, 这可能会对产品输出的一致性和质量产生负面影响。利用可靠供应商提供的化学成分明确的无血清培养基, 并采用强有力的质量控制流程, 有助于减少这种差异性。这些产品属性还将最大限度地降低下游纯化和监管风险, 并节约总体生产成本。

最近的一项研究证明了培养基对T细胞扩增的显著影响, 该研究使用了一种专门用于在同种异体细胞治疗工作流程中扩增人T细胞的新型培养基<sup>[12]</sup>。CAR-T工作流程中的一项主要

挑战是需要更多具有首选年轻中央记忆T细胞表型的细胞, 从而产生更多功能和有效的治疗结果。在扩增阶段早期, 适度增加中央记忆细胞可提高收集阶段的细胞产量。该研究在18天同种异体类型工作流程中对健康供体T细胞进行了测试, 结果表明, 与对照培养基相比, 新配方培养基在第10天时的细胞扩增约提高20%, 而第17天时的细胞增殖率提高近100% (图3)。当用对照培养基的数据进行归一化计算时, 所需中央记忆T细胞亚群的比例也增加了10-20% (图4)<sup>[12]</sup>。此外, 当使用健康供体细胞时, 具有早期记忆表型的细胞的此类增强与较高水平的干扰素 $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) 释放一致。当归一化为对照培养基时, 6例患者的IFN $\gamma$ 产量平均增加了187% (图5)。观察到的IFN $\gamma$ 产量增加可能起到催化剂的作用, 可通过刺激巨噬细胞、中性粒细胞和自然杀伤细胞增强整体免疫反应, 并为患者提供更有有效的治疗<sup>[12]</sup>。

培养基不仅会影响细胞扩增, 而且其优势取决于并特定于扩增阶段使用的初始细胞来源。在这些研究中, T细胞的代谢转变使得工作流程更长<sup>[12]</sup>。

## 添加剂

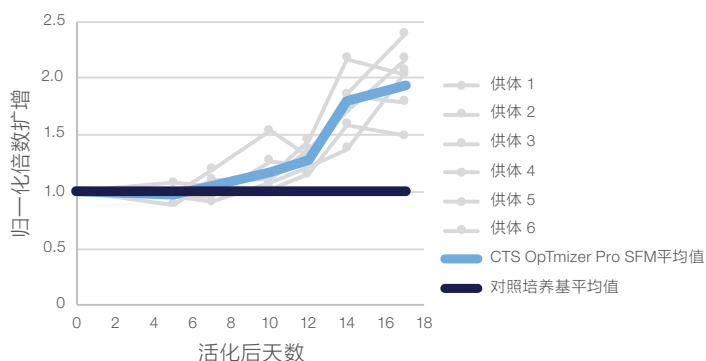
除培养基外，添加剂在T细胞扩增中也发挥着重要作用。L-谷氨酰胺是代谢和分化的必需碳源，需要在整个细胞治疗产品制造过程中加以补充。

血清在研究中应用广泛，可帮助支持基础T细胞激活和细胞生长。虽然研究中可以接受使用血清，但它在临床应用中会带来监管和供应方面的问题，并且会表现出批次间差异性，从而影响T细胞分化和整体产品输出。血清替代物的出现解决了这些问题，这些确定的添加剂已被证实可支持类似的T细胞CD8+/CD4+比值，同时保持高细胞扩增和活率<sup>[13,14]</sup>。

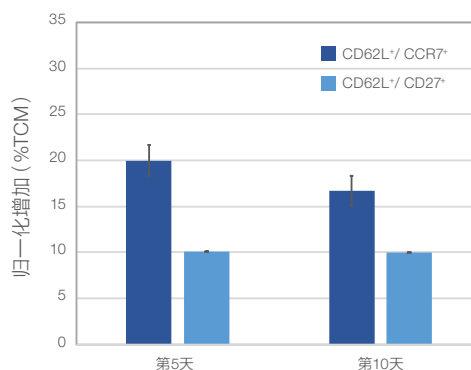
## 灌注

灌注是一种生物工艺技术，其使用新鲜培养基连续替换用过的培养基，同时将细胞保留在培养容器内。该方法可添加新的营养物质，同时防止对培养性能产生负面影响并影响产品质量的有毒代谢废物的积累。这种占用更小空间的技术可使培养物达到更高的细胞密度和更高的扩增倍数，与传统的批量或分批补料工艺相比可提高生产率。灌注技术在自体 and 同种异体T细胞扩增中均有应用，但对大多数需要更多细胞数量的同种异体工作流程来讲，灌注技术更加至关重要。在更短时间内实现更高细胞密度和扩增，可减少耗竭细胞的数量，并增加年轻TCM细胞数，从而支持更有效的治疗。

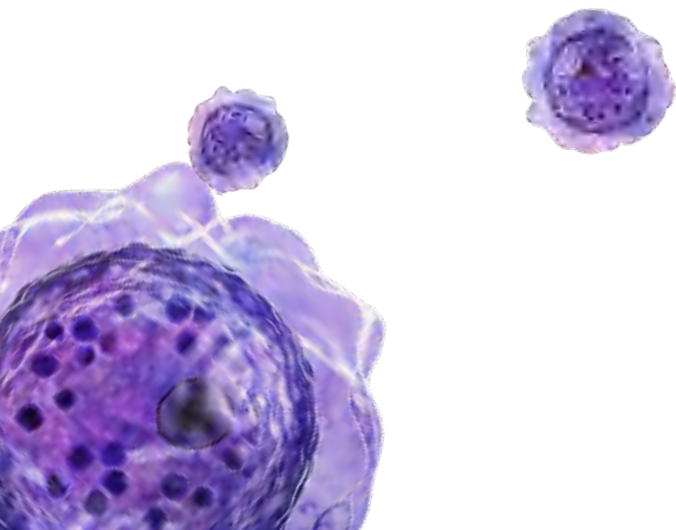
一项T细胞扩增对比实验比较了摇摆式生物反应器中的分批补料和灌注工作流程，以评价灌注对细胞生长、细胞活率、关键代谢物和生长因子的影响<sup>[15]</sup>。灌注技术可通过减少扩增期间乳酸和氨的积累支持更高密度的活T细胞。与其他细胞类型一样，这些代谢物对T细胞具有毒性，可诱导细胞生长停滞或凋亡，继而直接影响细胞活率和扩增。



**图3.专用培养基中的T细胞扩增。**与对照培养基相比，在6名健康供体的18天工作流程中，CTS OpTmizer Pro SFM的归一化增殖显示第10天时的倍数扩增约增加20%，而第17天时的倍数扩增增加近100%。



**图4.专用培养基中生长的细胞的TCM标志物表达。**在同种异体工作流程中，根据对中央记忆标志物CD62L、CCR7和CD27的分析，用Gibco™ CTS™ OpTmizer™ Pro SFM培养的6种健康供体细胞显示所需TCM细胞群的大小增加了10-20%。



同种异体工作流程的另一个关键要素是足以支持T细胞生存和增殖的IL-2浓度。通过灌注，在扩增期间可维持足够的IL-2水平。相反，非灌注培养显示IL-2浓度在第12天时降至无法检出的水平，这使得细胞无法达到可比的细胞活率<sup>[65]</sup>。为充分了解灌注和IL-2的作用，研究者设计了另外一项实验，以分析和比较灌注和非灌注设置下的细胞生长和活率。注入测试非灌注生物反应器中的IL-2量与输送到灌注控制生物反应器中的IL-2量相当。尽管每日IL-2注射量相当，但在T细胞扩增阶段结束时（第14天），非灌注培养扩增仅为灌注对照的63%<sup>[15]</sup>。

虽然灌注具有优势，但所需的大量灌注培养基可能增加成本，生产人员必须优化其工艺和灌注率以避免培养基浪费。即便如此，灌注技术在T细胞扩增方面具有不可否认的优势；它是一种易于扩展的解决方案，有助于维持有利的培养环境，以实现更长、更高效的工作流程，这对同种异体细胞治疗产品尤为重要。

### 在扩增期间维持细胞密度

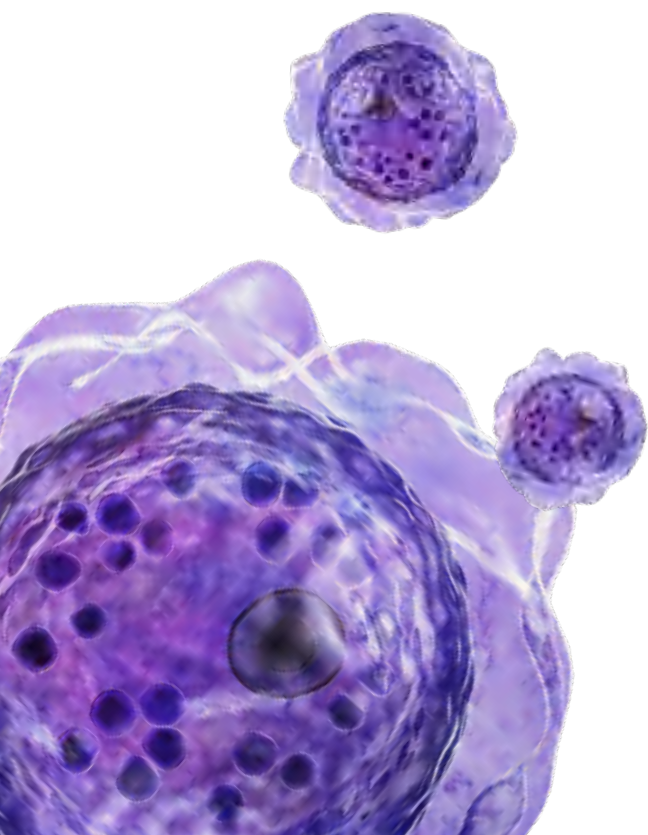
其他细胞培养参数（如维持细胞密度）已被证明会影响T细胞的扩增。最近一项关于维持不同T细胞密度影响的评价结果表明，有几种因素直接影响细胞产品数量和质量。许多经典的T细胞扩增方案要求将细胞维持在 $0.5 \times 10^6$ 个细胞/mL；然而，该研究结果表明，较低的细胞密度（ $0.25 \times 10^6$ 个细胞/

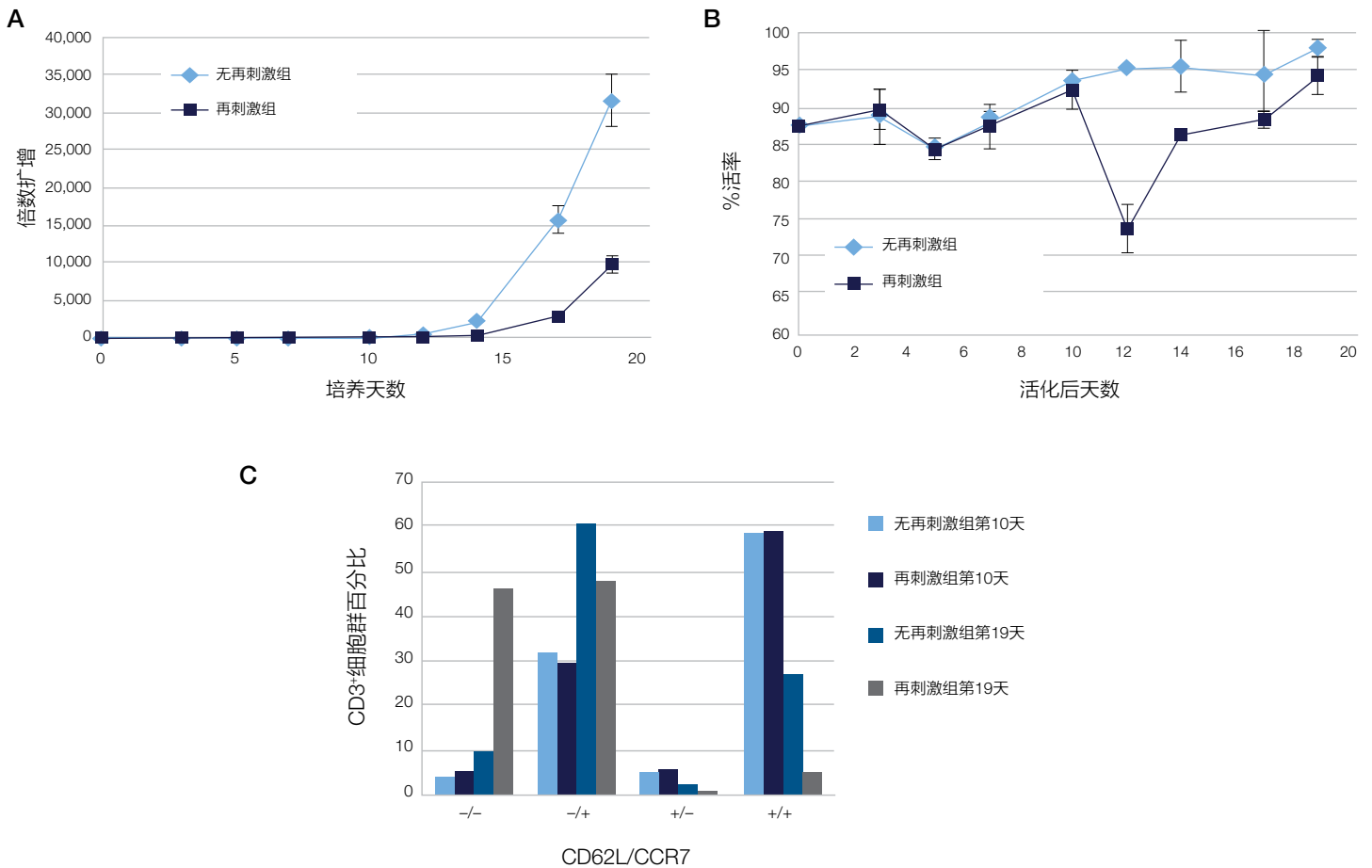
mL）与较高倍数的细胞扩增和细胞活率提高相关。相反，将维持细胞密度增加到 $0.75 \times 10^6$ 个细胞/mL显示出较低倍数的扩增和略低的细胞活率。这些结果表明，维持较低的T细胞密度可通过使T细胞暴露于更多营养物质而对细胞输出的数量和质量产生积极影响，并有助于维持更大比例的中央记忆表型<sup>[6]</sup>。

### 再刺激

转化为更多活的所需的T细胞表型促使人们去理解在扩增阶段的激活和再激活的应答持续性。在最近的一项研究中，使用CTS Dynabeads CD3/CD28对扩增阶段的二次“再刺激”进行了评价<sup>[6]</sup>。该研究旨在更好地理解T细胞再刺激的效果、T细胞再刺激影响治疗细胞输出的方式，以及T细胞再刺激是否对T细胞生产工艺有任何影响。

该研究表明，使用磁珠进行单轮激活足以在整个20天的工作流程中诱导稳健的细胞增殖和高细胞活率，另外还提供证据表明，再刺激可在随后几天内导致暂时生长滞后和细胞活率下降（图6A和6B）。此外，二次激活的细胞显示出较低的CD8:CD4比值和中心记忆细胞生物标志物的急剧下调。在这两种情况下，中心记忆细胞群（CD62L<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>）在有和无再刺激条件下均明显减少，而双阴性效应细胞群（CD62L<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup>）在扩增后期增加，这一点在再刺激组中更为明显（图6C）<sup>[6]</sup>。





**图6.再刺激对T细胞生长和表型的影响。**在较长的工作流程中使用CTS Dynabeads CD3/CD28进行第二轮刺激会对以下方面产生负面影响：**(A)** 细胞扩增、**(B)** 细胞活率和**(C)** 细胞分化。(误差直方图代表一式三份进行的三个供体的标准差)。

这些结果表明，再刺激可催化早期记忆T细胞向效应T细胞的转变。减缓这一转变对于开发和微调T细胞生产工艺至关重要。

总体研究结果表明，选择最佳培养基、添加剂、平台和工艺参数至关重要，这将支持稳健的T细胞扩增，同时维持对T细胞治疗产品的有效性具有关键作用的所需的早期中央记忆T细胞表型。

### 监管和分析测试

了解监管要求对于保持每个阶段的临床批准至关重要，以避免进展到后期临床阶段的关键问题和延期。此外，监管要求影响细胞治疗产品产品的许多分析质量测试要求。

在扩增阶段，需要稳健可靠的分析工具来准确测量和监测各种细胞特征，如增殖、活率、分化状态和其他细胞表型属性。在扩增期间和扩增后，通过监管机构批准或内部确认的检测对一系列所需质量属性进行测试。这些测试将评价与细胞产品的安全性、纯度和效价相关的质量属性。

在生产工艺中使用病毒载体时，通常需要进行微生物和真菌无菌性以及支原体存在性的安全性测试，以及可复制型病毒和载体拷贝数的测试。纯度测试通常使用流式细胞术来评估相应T细胞和CAR相关表面标志物的阳性细胞比例，而安全性测试旨在确保不存在非预期的细胞类型。效价测试通过流式细胞术或PCR方法评估CAR-T细胞含量，而细胞毒性和细胞因子分泌则通过各种体外检测进行评估<sup>[16]</sup>。

有多种方法可用于对任何给定的细胞特性进行分析测试，因此，测试中的可变性是生产工艺中已知的差异来源<sup>[16]</sup>。

### 愿景和结语

在过去的十年中，细胞治疗产品领域取得了许多进展，且未来可期。由于时间对于患者治疗解决方案至关重要，努力缩短生产和产品质量放行时间是研发工作的重中之重。T细胞生产工艺较为复杂，目前每个步骤均存在许多可改变的潜质。目前正在进一步研究，以确定和解决可能影响最终产品质量属性的制造变量<sup>[16]</sup>。未来发展的重点可能在于实现更高的自动化水平、封闭式系统制造和实时特性研究<sup>[17]</sup>。

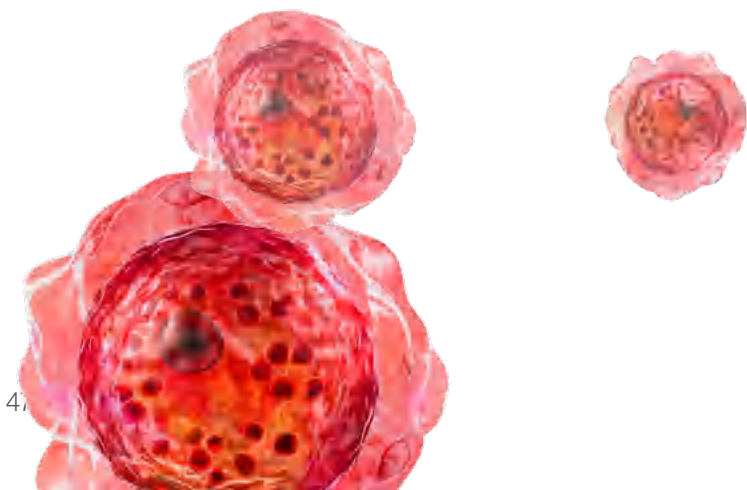
实现“现货型”同种异体治疗解决方案并改进自体治疗解决方案需要产品和过程开发方面的大量投资。目前和未来的T细胞扩增工作包括降低风险和开发更加标准化和可转移的稳健过程。要实现从初期研发到商业化生产轻松无缝过渡，关键在于详细了解产品和过程开发，以实现成功的规模扩展<sup>[17]</sup>。此外，该领域内的创新同样重要，以便探索新方法并扩展同样重要技术。

### 关于CAR-NK细胞治疗产品的说明

尽管CAR-T疗法在治疗血液循环相关癌症方面取得了成功，但利用经过工程改造的T细胞治疗其他癌症（例如实体瘤）仍具有挑战性。一种正在广泛开发的方法涉及NK细胞的使用，NK细胞是先天免疫系统的细胞亚群，经大量临床试验证实对各种癌症治疗有效。同种异体NK细胞以非抗原和HLA依赖性方式发挥其细胞毒性作用。

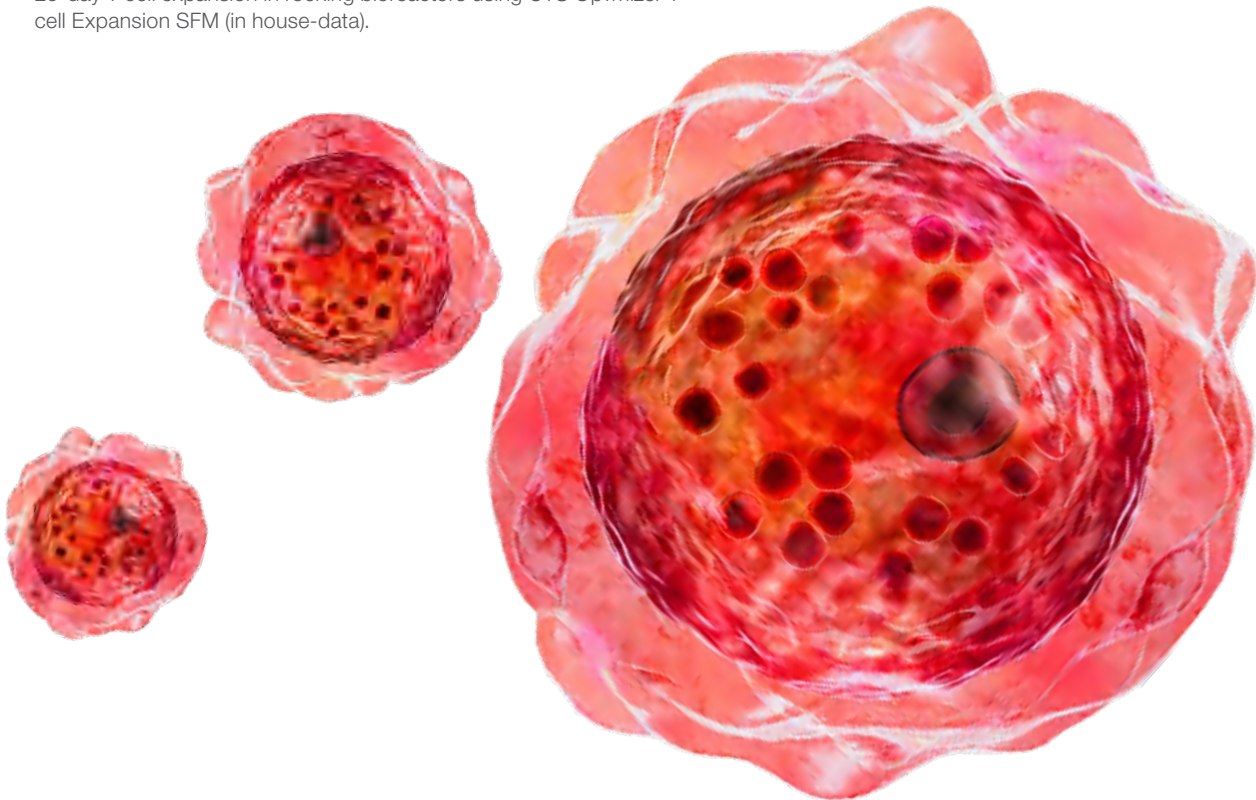
CAR-NK细胞的工程改造可促进对肿瘤特异性抗原的特异性靶向性，使其能够在实体肿瘤微环境中发挥作用。这一方面与iPSC衍生的CAR-NK技术相结合，可使细胞作为现货型解决方案实现无限供应，从而使患者免于等待漫长的交付周期。使用CAR-NK-19治疗淋巴瘤（CD19）<sup>[18,19]</sup>和使用CAR-NK-GPC3治疗肝细胞癌（HCC）和卵巢癌实体瘤<sup>[20]</sup>的最新研究证明了这种方法的前景。

生成CAR-NK细胞的工作流程与CAR-T细胞的工作流程相似，但需要对NK细胞培养物进行充分的体外扩增，以满足同种异体疗法的剂量和批量要求。通常，每次剂量需要大约 $5 \times 10^6$ 个细胞/kg体重，或接近 $500 \times 10^6$ 个细胞/患者。用于CAR-NK细胞体外扩增的细胞培养平台包括T-培养瓶、透气性细胞培养瓶、生物反应器或培养袋，具体取决于最终临床产品的规模。推荐的培养条件包括使用添加有IL-2、IL-15和IL-21的无异源培养基。与CAR-T细胞相同，在临床环境中使用CAR-NK细胞之前需满足广泛的质量控制要求，通常包括在体内动物肿瘤模型中测试细胞产品对各种肿瘤细胞系的细胞毒性杀伤能力。



## 参考文献

1. Staff (2021) CAR-T Cell Therapies: Allogeneic Workflows - Bioprocess Insider. BioProc Int.
2. Cheng J, et al. (2019) Understanding the Mechanisms of Resistance to CAR T-Cell Therapy in Malignancies. *Front Oncol* 9:1237.
3. Li T, et al. (2019) A Good Response of Refractory Mantel Cell Lymphoma to Haploidentical CAR T Cell Therapy after Failure of Autologous CAR T Cell Therapy. *J ImmunoTher Cancer* 7(1):52.
4. Cho JH, Collins JJ. & Wong WW. (2018) Universal chimeric antigen receptors for multiplexed and logical control of T cell responses. *Cell* 173(6): 1426–1438.
5. Depil S, et al. (2020). “Off-the-shelf” allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 19(3):185–199.
6. Thermo Fisher Scientific (2021) Successful support of longer T cell expansion workflows with CTS Dynabeads CD3/CD28 and CTS OpTmizer T Cell Expansion SFM.
7. Esensten J, et al. (2016). CD28 costimulation: From mechanism to therapy. *Immunity* 44 (5):973–988.
8. Kalia V & Sarkar S. (2018) Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2-A Balancing Act. *Front Immunol* 9:2987.
9. Thermo Fisher Scientific (2019) One-step isolation and activation of naive and early memory T cells with CTS Dynabeads CD3/CD28.
10. Ludwig J and Hirschel M (2019) Methods and process optimization for large-scale car t expansion using the G-rex cell culture platform. *Methods in Mol Biol* 2086:165–177.
11. Thermo Fisher Scientific (2020) Optimizing parameters for 10-day and 20-day T cell expansion in rocking bioreactors using CTS OpTmizer T cell Expansion SFM (in house-data).
12. Thermo Fisher Scientific (2021) Improving Allogeneic Workflow and Cell Proliferation Using CTS OpTmizer Pro SFM.
13. Thermo Fisher Scientific (2019) CTS OpTmizer T Cell Expansion SFM, No Phenol Red, Displays T Cell Manufacturing Workflow Flexibility.
14. Thermo Fisher Scientific (2019) The Benefits of Supplementing CTS OpTmizer T Cell Expansion SFM, No Phenol Red.
15. Janas M, et al. (2015) Perfusion’s Role in Maintenance of High-Density T-Cell Cultures.” *BioProc Int* 13(1):18–26.
16. Reddy OL, Stroncek DF & Panch SR (2020) Improving CAR T cell therapy by optimizing critical quality attributes. *Semin Hematol* 57(2):33–38.
17. Eyles JE, et al. (2018) Cell therapy products: focus on issues with manufacturing and quality control of chimeric antigen receptor T-cell therapies. *J Chem Technol Biotechnol* 94(4): 1008–1016.
18. Liu E, et al. (2020) Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors. *N Engl J Med* 382:545–553.
19. Ueda T, et al. (2020) Non-clinical efficacy, safety and stable clinical cell processing of induced pluripotent stem cell-derived anti-glypican-3 chimeric antigen receptor-expressing natural killer/innate lymphoid cells. *Cancer Sci* 111:1478–1490.
20. Li Y, et al. (2018) Human iPSC-derived natural killer cells engineering with chimeric antigen receptors enhance anti-tumor activity. *Cell Stem Cell* 23(2):181–192.e5.



本文件所述产品的预期用途各不相同。具体预期用途声明请参阅使用说明书 (IFU)。



# 第7节： 用于细胞治疗的自动化封闭系统

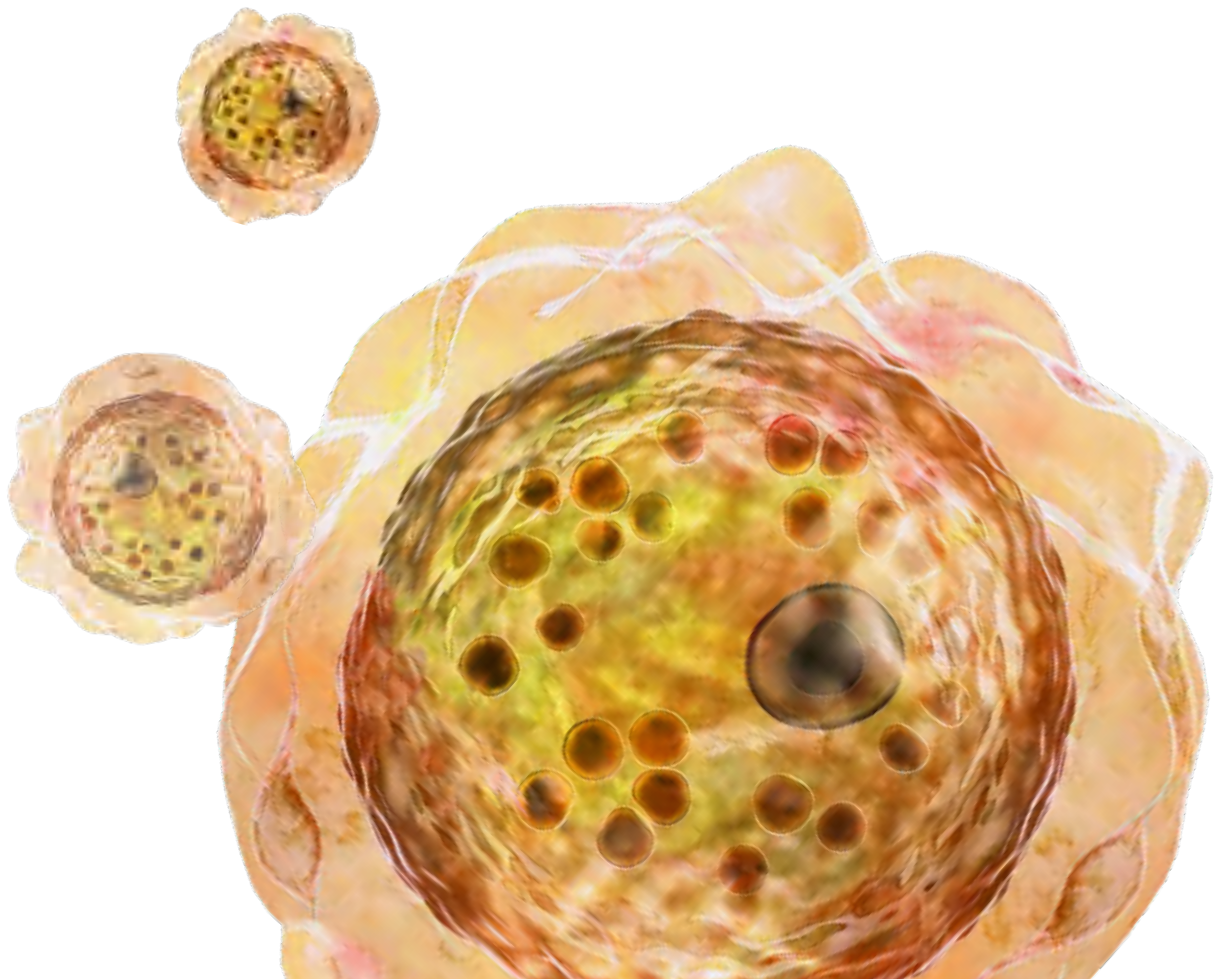
## 简介

CAR-T技术的初步研究依赖于手动、开放式的开发系统。随着技术的成熟，CAR-T细胞制造商不断寻求能够降低总体成本的过程改进。制造商们还致力于减少污染、提高批次间一致性并实现关键信息的监测和采集，这将有助于应对不断变化的监管环境。为此，CAR-T细胞治疗产品制造商正在转向带有集成软件控制的自动化封闭系统，以降低制造成本、保持产品一致性并满足监管要求。

## 用于生产CAR-T细胞治疗产品的封闭式与开放式系统

在CAR-T细胞治疗产品的分离和扩增方法中，许多步骤可选择使用开放式或封闭式系统进行。例如，用于分离PBMC的密度梯度离心通常在开放式系统中进行，且常用于研究规模细胞生长的T培养瓶也属于开放式系统。然而，开放式系统

会使细胞治疗产品暴露于室内环境，且所需的用户交互更多，例如在层流超净工作台操作<sup>[1]</sup>。这些开放式过程往往更加费力，且占用空间可能更大，尤其是在试图扩大生产规模时。使用开放式系统时的另一个考虑因素是需要使用A级或B级洁净生产车间，而封闭式系统可在C级洁净生产车间中进行生产。封闭式系统所需制造条件的差异可显著降低成本、劳动力和空间要求。在研究环境中，可以选择手动开放式过程。然而，由于污染风险和批次间产品差异性增加，在临床应用和最终细胞治疗产品制造中应避免使用这些方法，否则可能无法得到监管部门的批准，并可能导致产品故障。



根据欧洲药品管理局(EMA),封闭式系统是“为了避免产品或材料暴露于室内环境而设计和运行的工艺系统。可以将材料添加至封闭式系统,但添加方式必须避免使产品暴露于室内环境(例如,通过无菌连接器或融合系统)”(补充部分为斜体)<sup>[2]</sup>。系统可以使用各种器械和技术(例如无菌屏障过滤器、一次性无菌对接连接器)进行封闭。使用一次性技术(SUT)可以在洁净室或生物安全柜外提供增强保护,从而进一步帮助封闭系统。SUT包括一次性袋、生物反应器、管路、囊式过滤器和连接器,与封闭式系统技术兼容<sup>[9]</sup>。使用SUT时必须考虑所有部件的兼容性,尤其是袋和管路之间的连接。如果管路尺寸和袋不匹配,仍可在层流超净工作台内进行无菌连接。

依据《药品生产质量管理规范-细胞治疗产品附录(征求意见稿)》对密闭系统的定义,细胞治疗中的密闭系统是指为了避免产品或物料暴露于室内环境而设计和操作使用的系统。产品或物料被转入该密闭的系统时,必须以非暴露的方式(例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。如需打开密闭的系统(例如安装过滤器或进行连接),在回到密闭状态或者使用前需要进行消毒或灭菌。在此意见稿第十一条【密闭系统】中规定,在细胞治疗产品生产时,宜采用密闭系统或设备进行细胞产品的生产操作。对于生产操作环境的洁净度级别,第十二条中明确了对应细胞产品生产操作示例的生产环境洁净度级别要求,详见下表1。

**表1.生产环境洁净度级别要求。**

洁净度级别	细胞产品生产操作示例
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、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.生产过程中采用注射器对处于密闭状态下的产品和生产用溶液进行取样; 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配制; 4.载体的除菌过滤。
C级	1.采用非密闭系统(如使用透气盖的细胞培养瓶等)在培养箱中培养; 2.载体的纯化操作。
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。

按此意见稿,若使用非封闭式细胞治疗产品制备工艺,除培养环节外,其余生产环节的环境要求基本均为B级+A级。

同时,依据《药品生产质量管理规范-细胞治疗产品附录(征求意见稿)》第四十条【一次性耗材】直接接触细胞产品的无菌耗材应当尽可能使用一次性材料。

### 封闭式过程和SUT的重要性

生物工艺中的污染代价相当高昂。这不仅会导致产品损失,还可能导致设施停工以进行清洁和确认。根据FDA,对于细胞治疗产品的无菌处理,“细胞治疗产品……代表无法进行过滤灭菌的产品子集……在制造过程中应尽可能使用封闭式系统”<sup>[2]</sup>。封闭系统可显著降低病毒、细菌或其他外源因子污染的风险。此外,封闭式系统可置于受控但未分类的环境中<sup>[4]</sup>,这可提高制造灵活性(例如,减少设施占用空间或减轻设施中的隔离压力)。此外,设备和人员可以更方便地走动,以满足生产需要。这些简化设计使得制造设施可在多个中心轻松复制。将封闭式系统与SUT结合使用可显著缩短处理时间,包括清洁、设置和批量周转时间。此外,商品成本将随着操作成本的降低而显著降低,其中可能包括人工成本、环境监测和空气处理的能源成本、材料培养成本以及设施成本<sup>[9]</sup>。

### 自动化在GMP生产中的重要性

为了进一步控制制造成本,细胞治疗产品制造商将致力于实现过程中大部分手动步骤的自动化。自动化并不局限于生产阶段;它可以扩展到离线或在线过程分析技术(PAT)等分析步骤。

自动化的实施对于大规模cGMP制造至关重要<sup>[6]</sup>。EMA建议,“使用自动化设备可以更轻松地满足某些GMP要求,也可以在产品质量方面带来一定优势”<sup>[2]</sup>。自动化将提高操作者安全性,减少人为错误,并实现处理的稳健性和重现性。自动化系统可以简化整体操作。可将包括多个步骤或需要多名操作者的手动程序整合到单个仪器内,并由单名操作者进行操作,从而减少产品周转时间和操作空间所需的人员数量。因此,设施生产能力将提高,而类似数量的细胞治疗产品的总商品成本将显著降低。

### 细胞治疗产品制造中现有的封闭式自动化系统

患者特异性细胞治疗产品开发(例如CAR-T)的多个步骤可使用自动化封闭式系统实现:细胞分离、扩增、处理和制剂。

系统可根据自动化程度分为两类<sup>[7]</sup>:

### 1.集成式封闭系统

### 2.模块化封闭系统

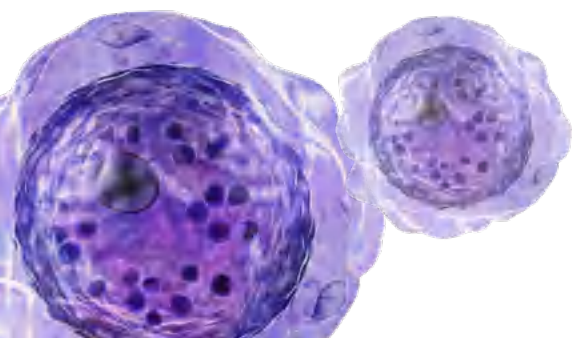
集成式封闭系统可实现完全自动化。这类一体化系统易于使用,是一种端到端的、每次仅供单名患者使用的解决方案。投入使用后,集成的封闭式仪器将在一定时间内(通常为1-2周)专门用于生产特定患者的细胞产品。这种方法是指针对特定患者或目的而设计的自动化封闭式单个仪器,并将多个步骤集成到一个完整的工作流程中。

模块化封闭系统的用途更广,每个仪器主要针对单个步骤进行优化。这种方法不会将生物工艺局限于单一供应商,而是可以选择最适合过程中各个步骤的仪器。更重要的是,制造商可以根据需要灵活地使用现有仪器开发新的工艺过程。例如,可以使用Rotea™(Thermo Fisher Scientific提供的封闭式逆流淘析系统)分离PBMC/CD3<sup>+</sup>T细胞,并使用透气性细胞培养瓶扩增T/CAR-T细胞(请参阅此主题白皮书)。

## CAR-T细胞治疗产品生产工作流程的数字集成

软件驱动的数字集成在支持整个细胞治疗产品生产工作流程的全自动化方面发挥着至关重要的作用。数字集成可以通过监控从原材料采购到临床产品交付的整个工作流程来提高生产效率和过程控制。这种跟踪可以确保数据完整性、可追溯性和法规符合性,并有助于扩大工艺规模。理想情况下,成熟的制造环境将连接生产(硬件和控制器)、控制层(例如,监督控制)和制造执行系统(下图1)。软件工具可以提供跨批次挖掘和分析来自上下游批次记录数据的能力,以便进行实时优化和故障排除。

当前用于细胞治疗产品生产的数字解决方案通过将仪器连接至分布式控制系统(DCS)进行工作流程管理。DCS层可在整个工作流程中进行可扩展的过程优化、工作流程管理和数据传输。一些软件系统可以更方便地配置到DCS和制造执行系统(MES)。



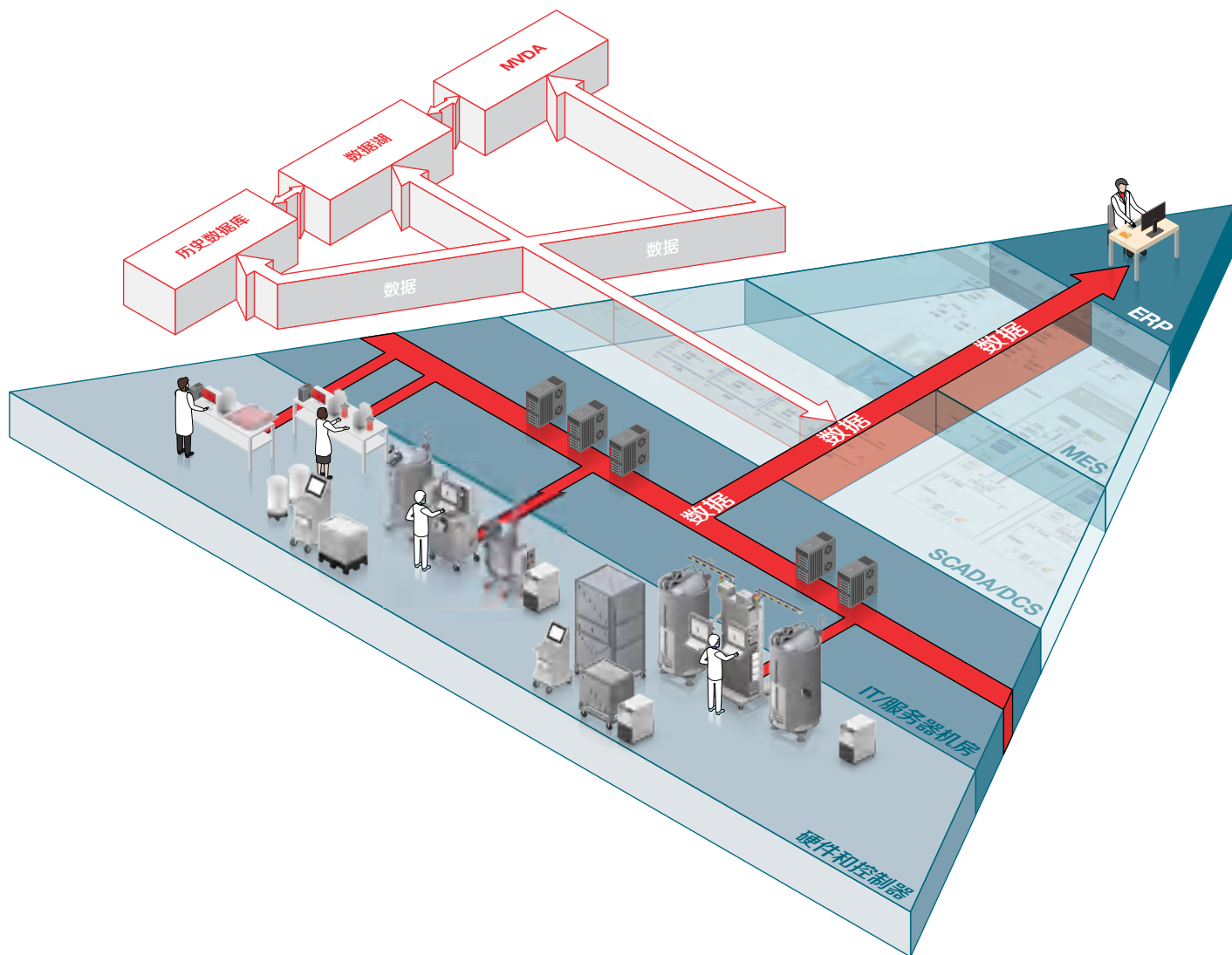


图1.成熟制造商为商业化产品提供的全面过程控制、数字连接和数据流。为轻松扩大过程规模并加快上市时间，必须通过分布式控制系统（DCS）管理工作流程以进行过程控制，并通过可进一步整合到企业资源规划（ERP）系统中的制造执行系统（MES）确保可追溯、可重现和安全的数据连接。

## 总结

科学家们始终致力于使CAR-T细胞治疗产品在治疗患者时更有效、更安全和更持久。然而，CAR-T细胞的制造容易出现错误、批次间差异和污染。这些错误通常是由使用带有手动处理的开放式过程造成。封闭式自动化系统整合了复杂的多步骤CAR-T工作流程，可以轻松克服这些挑战。使用封闭集成系统可提高一致性、纯度和安全性，同时有助于降低总体制造成本。这些优势有助于使细胞治疗产品在未来变得更经济、更普及。

## 参考文献

1. Challenging the Cleanroom Paradigm for Biopharmaceutical Manufacturing of Bulk Drug Substances Challenging the Cleanroom Paradigm for Biopharmaceutical Manufacturing of Bulk Drug Substances (biopharminternational.com)
2. Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products Volume 4
3. Jayaraman, P. et al. Accelerate translational mesenchymal stromal cell therapy through consistent quality GMP manufacturing. 2021. Front Cell Dev Biol 2021 Apr 13;9:648472. doi: 10.3389/fcell.2021.648472. eCollection 2021.
4. Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing —Current Good Manufacturing Practice FDA
5. James, D. How short-term gain can lead to long-term pain. Cell Gene Therapy Insights, 2017. 3(4), 271-284.
6. Automation in Cell Therapy Manufacturing by Ian R. Harris, Francis Meacle and Donald Powers
7. Automation in cell and gene therapy manufacturing: from past to future Automation in cell and gene therapy manufacturing: from past to future | SpringerLink

本文件所述产品的预期用途各不相同。具体预期用途声明请参阅使用说明书（IFU）。

# 第8节： 细胞治疗的特性研究和分析

## 简介

细胞治疗产品开发者的目标是生产安全、有效且一致的产品，以帮助通常患有难治性疾病的患者。分析方法对于实现这一目标和整个开发过程至关重要。这些方法构成了所有关键开发决策的基础，包括应使用何种工艺设备、何种基因工程改造方法能够产生最佳性能和活率组合、何种培养基系统和饲养时间方案具有最佳性能，以及针对哪类患者人群。

在开发用于分析和准确鉴定生物产品的适当测试方面，细胞治疗产品制造商面临着若干挑战。本节将讨论这些挑战、制造商目前使用的特性研究策略和工具，以及一些克服现有障碍的未来趋势。

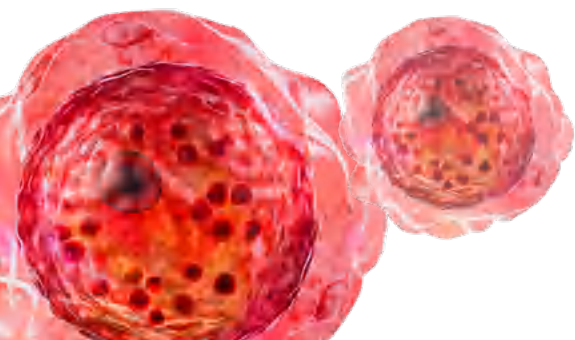
## 定义产品质量标准

根据ICH Q6B《质量标准指南：生物技术产品和生物制品的检验方法和接受标准》的定义，生物制品的特性研究“包括物理化学性质、生物活性、免疫化学性质、纯度和杂质的测定”<sup>[1]</sup>。对生物制品的全面了解有助于制定适当的质量标准。在较高层次上，每个质量标准都有助于建立一套“新原料药或新制剂都必需遵循的、与其用途相适应的认可标准”<sup>[1]</sup>。根据定义，质量标准包括检测或测试、执行方案以及定义产品接受标准的数值限值、范围或其他观察结果。这些接受标准可分为不同类别：鉴别、纯度、效价、安全性和其他（定义见表1）。

尽管完整产品特性研究和放行质量标准的概念较通俗易懂，但其实际实施极具挑战性。

表1.新细胞治疗产品的接受标准分类。

分类	定义
鉴别	<ul style="list-style-type: none"><li>• 鉴别产品以进行适当标记，并将产品与同一设施制造的其他产品区分开来的检测 (21CFR610.14)</li><li>• 例如细胞表面或细胞内标志物、基因表达、分泌信号分子和肽序列</li></ul>
纯度	<ul style="list-style-type: none"><li>• 涵盖生产工艺中所用材料（例如，分离或激活磁珠、消化酶或基因工程改造试剂）的残留测试的检测</li><li>• 可参考可能对最终产品的安全性和有效性产生不利影响的污染细胞类型</li></ul>
效价	<ul style="list-style-type: none"><li>• 证明细胞治疗产品能够影响给定结果的生物活性衡量指标 (21CFR600.3)</li><li>• 由于在预测临床疗效时难以选择评估产品质量和一致性的单项检测，建议使用检测矩阵</li></ul>
安全性	<ul style="list-style-type: none"><li>• 主要测试外源因子（例如，无菌性、支原体或内毒素水平）的检测</li><li>• 还可包括其他关注的领域（例如，免疫原性或致癌性）</li></ul>
其他	<ul style="list-style-type: none"><li>• 包括外观、剂量、活率和细胞计数测试</li></ul>



## 细胞治疗产品特性研究的挑战

1982年,首个生物制剂——重组胰岛素获得批准,开启了制药的新纪元。此后,科学家们开发了更复杂的重组蛋白和单克隆抗体疗法,其中许多已成为畅销药物。虽然与小分子药物相比,这些治疗方法在开发、制造和分销方面更具挑战性,但与复杂的“活”细胞治疗产品(例如CAR-T细胞治疗产品)开发相比,上述挑战性便不足为提。

首先,人类细胞较大,每个细胞均由数百万个蛋白质分子组成。人类细胞的结构也较复杂,包括细胞膜、细胞骨架和执行特定功能的细胞器。除了体积大、生化组成多样外,细胞治疗产品还具有异质性和动态性,会不断与环境相互作用并对其做出反应。由于这种动态性的存在,对于可能因制造、储存和管理方式的不同而发生变化的细胞类型,无法对其异质混合物的所有性质和功能进行充分特性研究。每种特性检测在某个时间点仅显示单个或有限数量的属性。由于需要选择最合适的细胞属性进行测试,且每种检测方法均存在固有局限性,这对充分发挥细胞治疗产品领域潜力提出了亟待行业解决的重大挑战。

几乎所有细胞治疗产品都来自供体组织的初始细胞来源开始。一致且可预测的制造输出面临着供体间差异性的严峻挑战。对于自体疗法,由于患者病情严重程度不同,或在提供组织之前接受过多次治疗,会出现额外的差异性。这些因素使得制定有效的质量标准以确保高质量治疗产品的持续生产具有挑战性。

## 质量源于设计的方法

最近,细胞治疗产品开发一直在其产品开发过程中实施质量源于设计(QbD)原则,目标是为患者提供最高质量的产品。该概念最初由工程师Joseph M. Juran提出<sup>[2]</sup>,后来FDA在2007年报告“21世纪药品质量基于风险的方法”中强调了QbD在药品开发中的实用性<sup>[3]</sup>。QbD的首要原则是应通过“对产品和工艺的全面了解”<sup>[3]</sup>和过程控制“将质量注入到产品中”。QbD系统方法始于预先定义的目标,以可靠的科学为基础。此外,该方法旨在了解“制造产品所涉及的风险以及如何最好地缓解这些风险”<sup>[4]</sup>

例如,FDA提出了一个通用QbD方案<sup>[4]</sup>(见图1)。通常,QbD过程从定义最终目标或产品开始,由开发者对产品的作用机制(MoA)进行假设。MoA描述了细胞产品为达到预期治疗效果而产生的特定作用。然后,MoA为目标产品概况(TPP)提供信息,TPP描述了产品的预期属性,包括安全性和有效性相关特征。接下来,开发者应确定哪些关键特性或关键质量属性(CQA),以实现预期的临床结果。CQA定义为“一种物理、化学、生物或微生物性质或特征,应在适当的限度、范围或分布之内,以确保预期的产品质量”<sup>[5]</sup>。如果不符合CQA,则通过对患者造成伤害的风险确定CQA。细胞治疗产品中经常会提到“产品即工艺”的概念;QbD中的直接推论是关键工艺参数(CPP),它是制造控制策略的关键部分。根据ICHQ8(R2),CPP是“其变异性会影响到关键质量属性而应进行监测或控制的工艺参数,以确保工艺能够产生预期的产品质量”<sup>[6]</sup>。

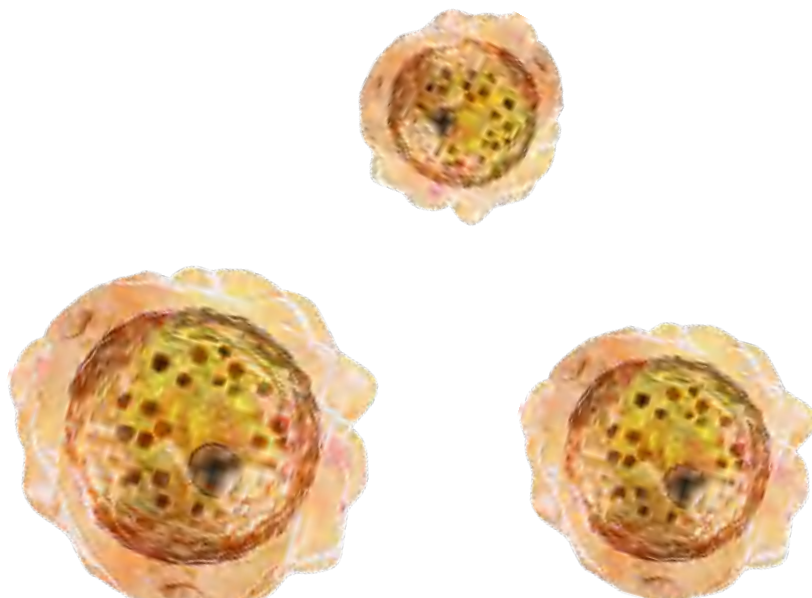




图1.质量源于设计 (QbD) 原则。该通用方案提供了一个决策框架, 细胞治疗产品开发者必须制定该框架以定义和控制细胞治疗产品的质量。基于FDA的Finn博士提出的方案<sup>6</sup>。

根据FDA的介绍，“CQA应与CPP结合使用，以确保<产品>质量和制造一致性”<sup>[4]</sup>。  
 具体示例见表2。

表2.新细胞治疗产品的接受标准分类。

关键质量属性	关键工艺参数
来源材料的接受标准	特定步骤的行动限
中间体的标准	设备性能
过程中和放行标准	过程限值

CQA随后成为产品的过程中和放行质量标准，后者决定了产品是否适合其预期用途（即治疗患者）。然而，这些标准并不是固定的，而是会通过迭代过程不断进行评价。随着时间的推移，开发者将收集更多的产品特性研究数据，在临床试验中积累更多对产品的了解，并获得更多的产品制造经验。此类新数据及其发现可证明修订、添加或删除质量标准的合理性（图2）。

总之，QbD方法是一种通过监测临床结果（安全性和有效性）、CQA和CPP将患者、治疗产品和生产工艺联系在一起的方法。为确保该方法能够发挥作用，开发者必须选择适合目的的检测，用于评估可通过适当性能预测产品质量的基本属性。

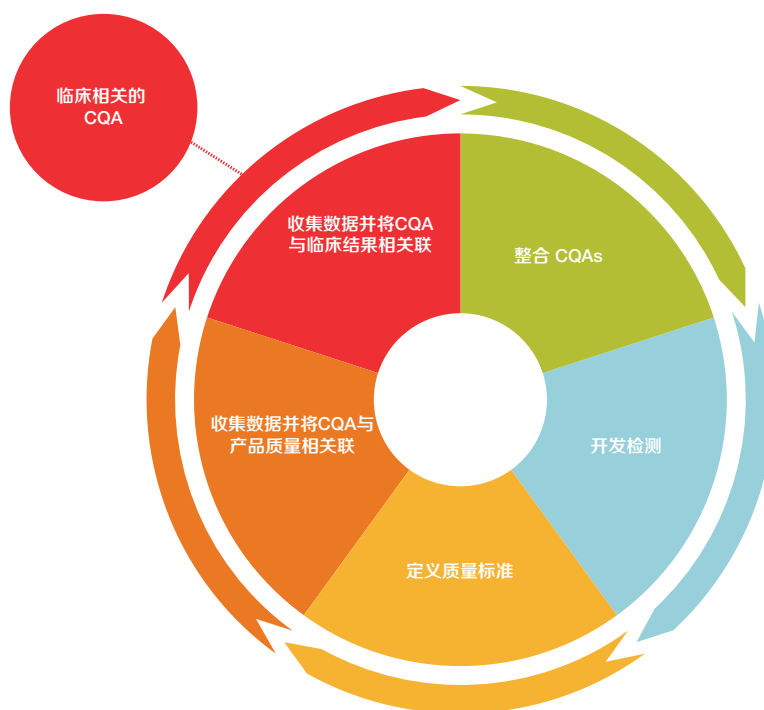


图2.确定临床相关CQA的系统和迭代方法。随着细胞治疗产品制造商从各种来源获得更多关于其产品的信息，他们将修订或补充质量规范。



## 监管角度和开发阶段

虽然细胞治疗产品开发的投资近年来呈指数级增长，但它仍然是一个年轻的行业。因此，随着行业和监管机构更多地了解各类活细胞产品的制造方式，以及产品用于患者时的表现，监管环境也在不断变化。鉴于这些产品的复杂性及其治

疗适应症多样性，并不存在用于管理疗法评价方式的单一框架。相反，必须针对特定产品定制每个特性研究方案。目前有可用的特性研究和分析方法相关指南，但它们仅提供了帮助开发者的总体原则和建议（表3）。

表3.监管要求和相应方法的示例。

属性	要求和参数	方法	MCB*	载体	细胞
鉴别 21CFR610.14	表型	流式细胞术、PCR、甲基化-PCR、微阵列	●		●
	鉴定	短串联重复序列 (STR)、HLA-PCR或NGS	●		●
纯度 21CFR600.3	杂质谱 (Cas9、宿主细胞DNA、宿主细胞蛋白、残留载体DNA)	qPCR、ELISA	●	●	●
	原材料残留 (例如, Benzonase、BSA、抗生素抗性基因、转染试剂、柱沥滤物等)	qPCR、ELISA、HPLC、质谱分析		●	
	残留磁珠	流式细胞术、细胞计数			●
	空壳: 全病毒比例	qPCR/ELISA、HPLC、电子显微镜、超速离心		●	
	污染细胞	流式细胞术、qPCR、测序	●		●
效价 21CFR600.3	功能检测	细胞检测	●	●	●
	替代物检测	特定于细胞类型	●	●	●
安全性	RCR/RCL	细胞检测、qPCR		●	
	VCN	PCR、ddPCR	●		●
	基因组稳定性	细胞检测、微阵列、NGS	●		
	致瘤性	畸胎瘤	●		
	载体聚集体	动态光散射 (DLS)		●	
无菌性和外源因子 21CFR610.12 USP<71>	无菌性、内毒素、支原体、病毒	促生长测试/抑菌性和抑真菌性测试、LAL、PCR	●	●	●
剂量 USP<1046>	活率	活细胞/死细胞	●		●
	细胞计数	细胞计数	●		●
	载体基因组滴度 (VG)	PCR、ddPCR		●	
	感染性基因组滴度 (IG)	TCID <sub>50</sub>		●	
其他	特定于产品和工艺		●	●	●

\*Master Cell Bank

特定产品检测的评价通常基于其目的适用性和性能。开发者通常采取增量式方法(图3)。对于早期试验,监管机构似乎对开发者的选择依据更感兴趣,特别是方法的适用性证明、所选测量属性(CQA)的合理性,以及产品整个开发历史中的证据和结果解释。在这些早期阶段,可接受限值的范围可

能较为广泛。在后期阶段,检测和接受标准变得更加明确,重点转向方法验证和方法性能的统计方法。表4描述了方法验证的八个基本步骤,即ICH Q2/R1《分析方法验证》<sup>④</sup>中所述的准确度、精密度、特异性、检测限、定量限、线性、范围和稳健性。

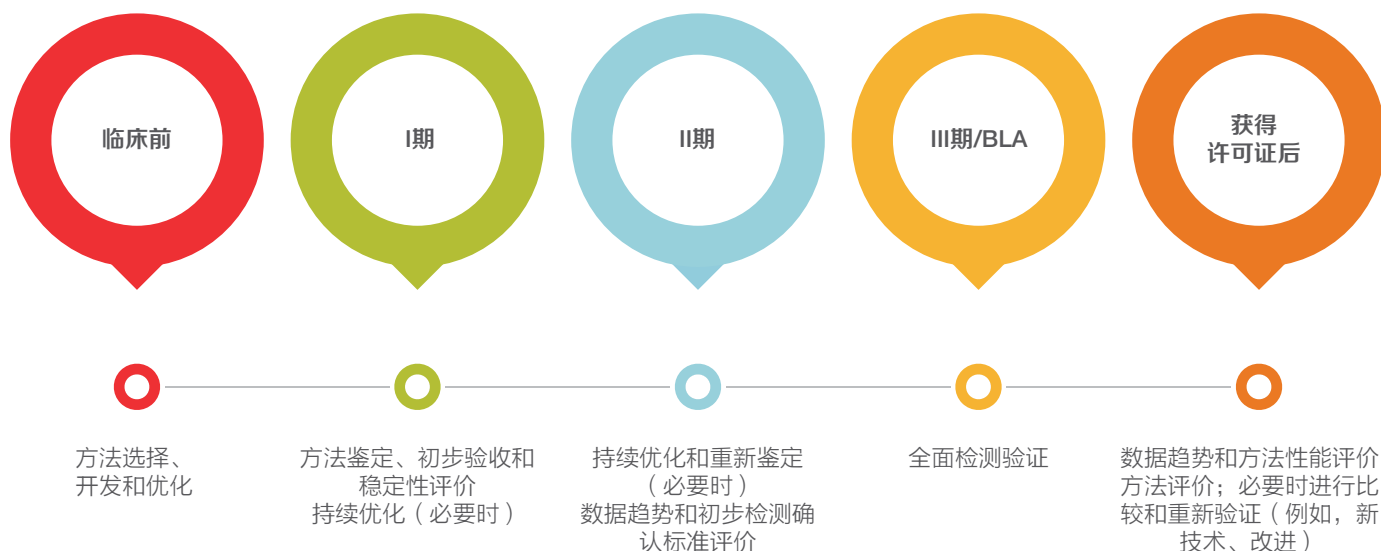


图3.用于细胞治疗产品特性研究的阶段特异性检测开发。

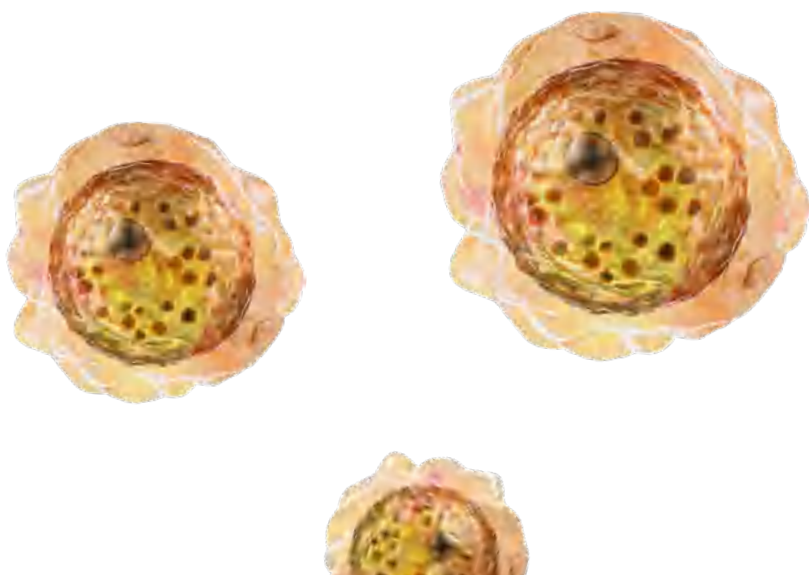


表4. ICH Q2/R1《分析方法验证》<sup>[6]</sup>中定义的分析方法验证步骤。

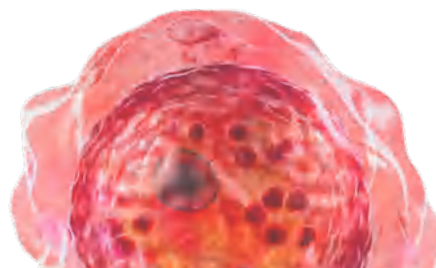
准确度	“分析方法的准确度表达了可接受值, 包括常规真值或可接受的参考值, 与测得值之间的一致性的接近程度。”
精密度	“分析方法的精密度表达了, 在给定条件下, 获得的一系列的同一均匀样品的多次取样的测量值之间的一致性的接近程度(分散度) ”
特异性	“特异性是指清晰地评价组分中认为可能存在的分析物的能力。”
检测限	“一个分析方法的检测限是样品中分析物能被检测到但是没必要作为精确值定量的最小量。”
定量限	“一个分析方法的定量限是样品中分析物能够定量测定, 具有合适的精密度和准确度的最低量。”
线性	“分析方法的线性是获得的测试结果与样品中分析物的浓度(量)成直接比例的能力(在给定范围内)。”
范围	“分析方法的范围是样品中分析物的最高浓度和最低浓度之间的间隔(包括最高和最低浓度), 在此区间内, 已经证明分析方法有合适的精密度、准确度和线性。”
稳健性	“分析方法的稳健性是, 在故意对分析方法的参数进行细微变化后, 方法仍然能保持不受影响的能力的一种测试, 并且提供在正常范围内使用的可靠性说明。”

### 趋势和未来

大多数细胞治疗产品开发者认可产品特性研究和分析是该行业面临的一些最大挑战。在这些方面取得进展之前, 细胞治疗产品将沦为末等疗法, 永远无法发挥其全部潜力。那么, 改进的趋势和机会在何处? 该领域的发展方向又是如何?

流式细胞术的多功能性使其成为细胞生物学、免疫学和细胞治疗产品中不可或缺的工具。开发者可以利用单一平台执行多种任务, 包括细胞计数、细胞活率测试、基因组编辑转导效率测定, 以及表型分析。此外, 流式细胞术可以量化具有特定属性的细胞亚群, 这在CAR-T疗法中尤为重要。尽管流式细胞术在细胞治疗产品研究中用途广泛, 但由于该方法固有的变异性, 不便将其转移到GMP制造环境中。这种变异性由多种来源促成, 包括操作者、试剂、仪器设置、样品制备以及数据采集和分析。然而, 流式细胞术永远不会被完全取代, 这便促使供应商引入解决方案以提高其与GMP环境的兼容性(例如, 利用自动流式细胞术设门策略进行分析)。

由于人类细胞的变异性使得基于细胞的方法难以实施, 细胞治疗产品领域正尽可能地从细胞方法转向分子方法。与基于细胞的方法相比, 分子方法具有众多优势。首先, 分子方法往往更加灵敏。这种灵敏度对于识别潜在有害的污染细胞类型非常重要, 例如分化细胞产品中的未分化诱导多能干细胞, 或用于B细胞恶性肿瘤的CAR-T产品中的污染B细胞。其次, 分子检测更容易标准化, 从而确保由不同操作者在不同地点和日期使用不同仪器进行的检测产生一致的结果。最后, 分子分析所需的测试材料通常较少。一些自体细胞治疗产品开发者使用50%的剂量进行质量控制测试。在这些条件下, 如果患者的起始物料有限, 则开发者可能无法获得足够的细胞用于完整的治疗剂量。未来, 开发者将转向需要更少起始材料的检测平台, 而其中大部分将以分子为基础。



单细胞分析在细胞治疗产品中的普及性和重要性日益凸显，尤其是在最近关于临床试验中慢病毒转导干细胞产品的研究之后<sup>[7,8]</sup>。该研究强调了准确了解转基因在基因组中的整合位置的必要性，如果可能的话，还应确定是否有任何内源基因受到破坏。总体而言，该行业正转向基因修饰的细胞治疗产品（例如，CAR-T），因此，FDA要求开发者在单细胞水平上确定转基因的位置。随着基因组编辑技术的出现和工程改造步骤的愈加复杂化，必须对效率进行量化并证明编辑的特异性和安全性。

许多临床和商业阶段的开发者致力于开发新一代生产工艺，以缩短制造时间、降低总体劳动力和设施成本并提高生产能力。一些研究表明，过程中和放行测试占生产成本的25-30%。这些高昂成本在自体细胞治疗产品中尤其沉重，因为总体制造成本将分摊至单例患者的单一药物。多重兼容性检测能力可帮助降低这些测试成本。同样，更快速的测试方法将是缩短周转时间的关键。例如，可使用市售的快速qPCR支原体检测代替USP<63>中所述的28天培养法。另一个机会领域是快速无菌检测，包括标准协调机构在内的多个团体目前正在进行这项工作。

在过去十年中，多家公司开展合作，共同将数字技术解决方案应用于医疗保健制造<sup>[9,10]</sup>。来自美国国立卫生研究院和美国国家标准与技术研究院的科学家发表了一篇开创性论文，阐述了基于人工智能（AI）的质量控制在其用于治疗老年性黄斑变性的干细胞衍生产品中的应用。他们开发的算法可以分析通过定量明视野吸光度显微镜获得的图像，并能够确定视网膜色素上皮细胞的成熟水平。这种基于AI和图像的质量控制方法允许对细胞产品进行非破坏性监测，并可实现自适应制造和实时放行。借助此类数字化方法，有可能彻底改变细胞治疗产品的测试和放行方式，从而提高生产能力并缩短向患者交付产品的时间。

随着该领域开始开发商业化生产工艺，封闭式自动化生产系统也将逐渐部署。实施这些系统的关键在于过程分析技术（PAT）。FDA将PAT定义为“通过在处理过程中及时测量原材料与过程中材料以及工艺的关键质量与性能特性来设计、分析与控制制造的系统。”<sup>[11]</sup>。对关键工艺参数（例如代谢物产生或营养物质消耗）进行基于传感器的实时测量能力可促进开发者的理解，并允许对制造过程进行更精细的控制。虽然PAT已成功应用于大分子生物制剂生产，但它在细胞治疗产品领域的应用尚处于早期阶段。专为细胞治疗产品设计的PAT将是开发稳健的制造过程的关键，以便为有需要的患者提供稳定、改变生活的药物。

#### 参考文献

1. ICH Q6B-Guidance on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. European Medical Agency
2. Juran JM (1992) *Juran on quality by design: the new steps for planning quality into goods and services*. Free Press
3. Pharmaceutical Quality for the 21st Century: A Risk-Based Approach. (2007) FDA
4. Finn, F. (2018) Early-Stage Manufacturing Considerations for Cell Therapy Products. Presentation at CASSS Cell & Gene Therapy Products.
5. ICH Q8(R2) Pharmaceutical Development. European Medical Agency
6. ICH Q2/R1 Validation of Analytical Procedures. International Conference on Harmonization
7. bluebird bio (2021) bluebird bio Provides Updated Findings from Reported Case of Acute Myeloid Leukemia (AML) in LentiGlobin for Sickle Cell Disease (SCD) Gene Therapy Program. Press release.
8. bluebird bio (2021) bluebird bio Provides Update on Severe Genetic Disease Programs and Business Operations Press release.
9. Oxford Biomedica (2019) Oxford Biomedica announces R&D collaboration with Microsoft to improve gene and cell therapy manufacturing using the intelligent cloud and machine learning. Press release.
10. BusinessWire (2019) AWS Announces Strategic Collaboration with Novartis to Accelerate Digital Transformation of Its Business Operations. Press release
11. Guidance for Industry PAT—A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. (2004) FDA

## 第9节:

# 影响细胞治疗产品低温保存的因素

### 简介

当传统药物治疗无效时，细胞治疗产品可以为疾病的治疗提供希望和解决方案，从而可能彻底改变医学和人类健康。细胞治疗产品被称为“活着的药物”，因为它们使用活细胞作为最终药物产品。然而，与传统药物制造相比，这些细胞治疗产品的生产工艺较为复杂，且面临着独特的挑战。特别是，细胞治疗产品通常需要使用低温保存步骤，以确保细胞治疗产品在不受影响无菌性和有效性的情况下得到保存。然而，这种低温保存步骤增加了后期临床或商业化产品冷链管理的复杂性。低温保存使最终产品可以在对患者和临床人员来说最方便快捷的时间运出。它还避免了用更多时间维持细胞培养，从而最大限度地减少那些可能改变细胞有益特性的衰老、遗传漂变和表观遗传变化的可能性。最终产品的低温保存可确保细胞治疗产品在全球范围内的获取和使用。

### 低温保存

低温保存是通过降低生物系统（例如细胞）的温度以保持其结构和功能完整性的过程。最佳低温保存策略的目标是将温度降低到-130°C以下，而不会在从水相到冰相的转变过程中形成胞内冰晶。成功的低温保存将确保细胞达到玻璃态转变温度（即液体开始变为固体时），抑制分子活动，并在不影响细胞数量和质量的情况下保持“假死”状态<sup>[1]</sup>。低温保存之前的生产步骤包括细胞洗涤、细胞收集和制剂。制剂步骤包括在细胞悬液中添加低温保护剂和辅助材料或辅料，该步骤对时间和温度敏感，即使轻微的执行错误也会对最终产品产生负面影响<sup>[2]</sup>。

成功的低温保存策略受细胞大小、形态、细胞膜通透性和细胞器组成等多种因素的影响。细胞培养基的组成和密度、低温保护剂的选择和冷却速度等外部因素也会显著影响成功率（图1）<sup>[3]</sup>。更复杂的是，这些因素需要专门针对每种最终的细胞产品进行调整。不理想的低温保存可能导致活率丧失、每剂量细胞数量不足以及剂量间差异，这可能会影响疗法的整体治疗效果。

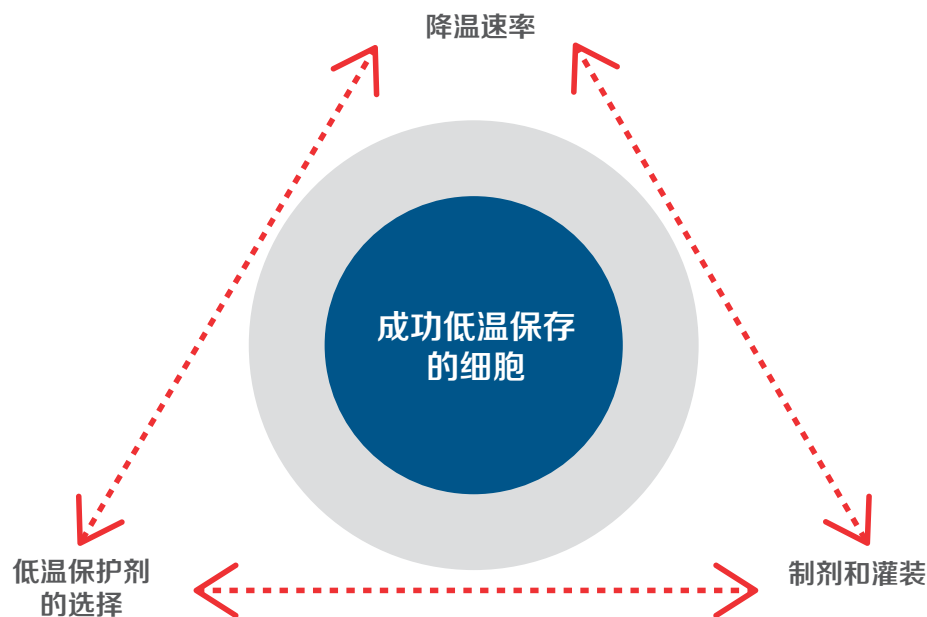


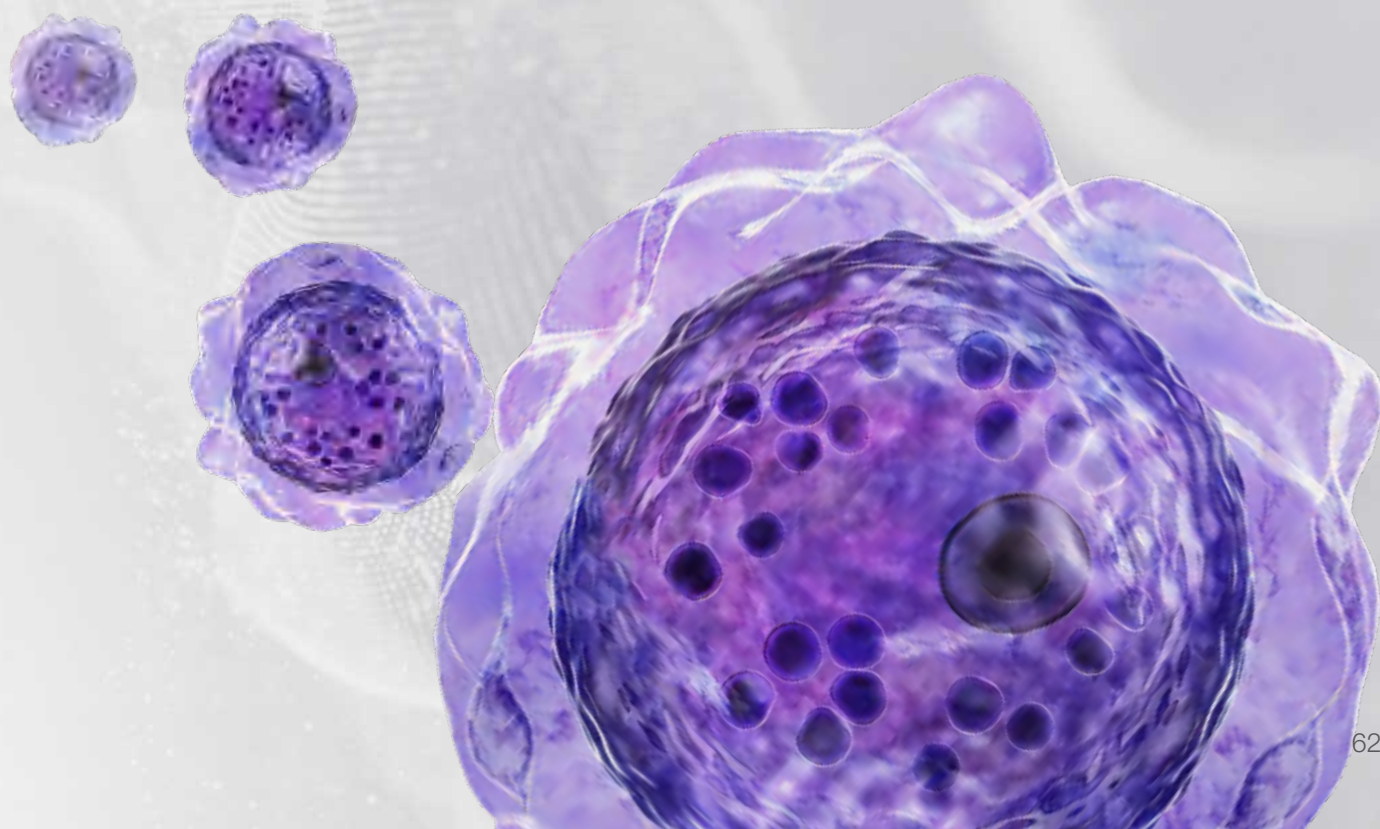
图1.细胞治疗产品的最佳低温保存受到若干外部因素的影响，必须针对单个细胞产品进行优化。

低温保存中的一项主要挑战是，不仅要确保细胞在降温过程中存活，而且要保持复苏后的安全性、有效性和效价。为了避免可能导致复苏后细胞死亡的渗透压休克和细胞膜损伤，必须对过程进行优化。不适当的降温参数及其不一致使用可能会导致人工筛选出表型特征不同于所需细胞群的亚群。由各种因素（包括低温保护剂毒性、细胞内和细胞外冰晶、细胞内pH值改变、渗透压失衡以及降温 and 复苏后加热的次优速率）引起的低温保存诱导应激也是一个主要障碍，会导致细胞活率和细胞功能的显著丧失。低温保存诱导的应激可导致两种类型的细胞死亡：细胞凋亡和细胞坏死。低温保存后，通常在复苏后培养6至24小时内观察到细胞凋亡和细胞坏死<sup>[4,5]</sup>。细胞坏死由外来刺激物引起，其发生快速，表现为细胞器肿胀和解体，可导致大量细胞损失。相反，细胞凋亡通常称为程序性细胞死亡，表现为细胞皱缩和凋亡小泡的形成，可影响单细胞或少量细胞<sup>[4,5]</sup>。

复苏后的细胞活率检测具有挑战性。通过膜完整性测试（如台盼蓝染色排除法或荧光细胞成像法）测得的复苏后即刻存活率并不能准确衡量低温保存过程质量<sup>[6]</sup>，因此需要通过其

他检测获得真实的活率曲线。最好在24小时后对细胞活率和细胞数量进行复苏后评估<sup>[6]</sup>。在长期测试（例如，超过3-5年）过程中，进行多次冻融测试，两次测试中间设定一定的时间间隔，将非常有利于评价低温保存过程的稳健性和稳定性。

低温保存诱导的迟发性细胞死亡（DOCD）是另一种已观察到的复苏后细胞死亡形式，似乎是由细胞坏死和细胞凋亡应激共同引起。然而，与细胞坏死和细胞凋亡事件不同，通过对活细胞的单时间点分析，低温保存诱导的DOCD在复苏后的最初几小时内可能并不明显<sup>[7]</sup>。相反，低温诱导的DOCD通常表现为复苏后12-24小时活率显著降低。当氧化应激水平超出细胞的维持或修复能力时，细胞的永久性损伤便会导致DOCD<sup>[7]</sup>。低温保护剂和冻存液的选择对于最大限度地减少DOCD和提高低温保存后的细胞存活率至关重要。



## 低温保护剂的选择

低温保护剂通过最大限度地减少低温保存过程中的物理和化学损伤并改善细胞存活率和细胞结构完整性来保护细胞和组织。有效的低温保护剂具有低分子量, 无毒性, 且不会影响复苏后细胞的行为。低温保护剂可分为两大类: 细胞内低温保护剂和细胞外低温保护剂 (表1)。细胞内低温保护剂

通过渗透细胞膜和阻止冰晶形成发挥作用。细胞外低温保护剂的工作原理是改善降温过程中可能出现的渗透压失衡。虽然细胞治疗产品通常使用细胞内低温保护剂, 但可以同时减少毒性和保持结构及功能完整性的低温保护剂组合越来越受到关注。

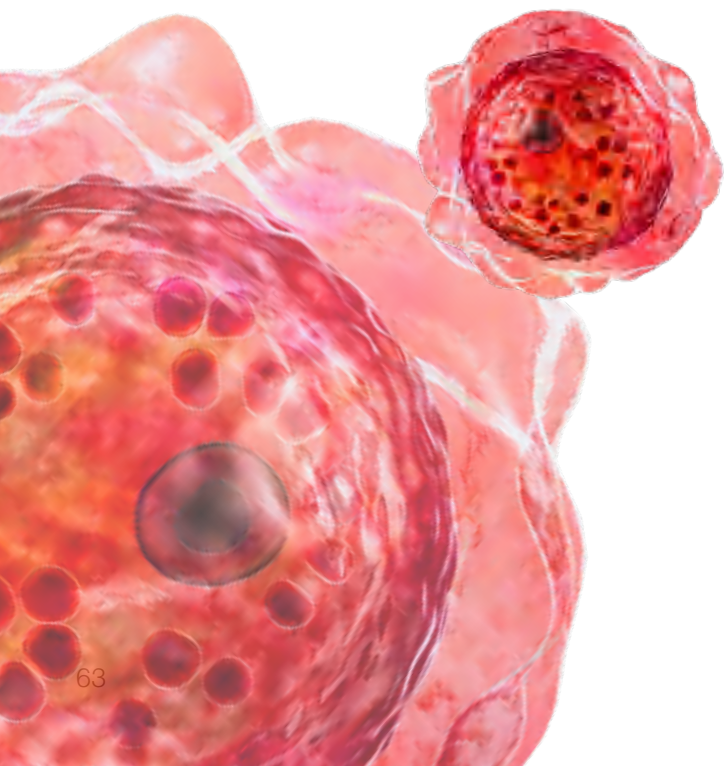
表1.低温保护剂的类型。

类型	特征	示例
细胞内低温保护剂 (细胞膜渗透性)	渗透细胞膜, 并防止可能导致破裂的冰晶形成	DMSO、甘油、乙二醇和丙二醇
细胞外低温保护剂 (非细胞膜渗透性)	改善降温过程中发生的渗透压失衡	蔗糖、海藻糖、葡萄糖、甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)

## 细胞内低温保护剂

药品制造中最常用的低温保护剂为细胞内低温保护剂二甲亚砜 (DMSO,  $\text{Me}_2\text{SO}$ ) (表1), DMSO可提供增强渗透性和长期稳定性, 并在最终制剂中保持细胞的安全性和有效性 [8]。DMSO已被用作助剂和最终制剂中的辅料。

虽然DMSO是最常用的低温保护剂, 但它也具有缺点。DMSO可对细胞的基因组和蛋白质组学分析产生不利影响, 并对包括线粒体、细胞核和细胞膜在内的细胞结构造成损害。DMSO还可引起患者的各种不良反应。当用作辅料时, 由于DMSO的毒性, 只能使用极低浓度。ICH认为, 对于DMSO“每日摄入 50 mg 或更少量时无须论证即可接受。如符合生产能力和 GMP 的实际情况, 也可接受更大的残留量”<sup>[9]</sup>。FDA认为在移植治疗中, 每日摄入不超过1 g/kg 可以避免严重的DMSO毒性<sup>[10]</sup>。如果将DMSO用作辅助材料, 并且超过ICH和FDA指南的要求, 则需要通过传统离心方法或新方法 (例如 [Gibco CTS Rotea 逆流离心系统](#)) 进行细胞洗涤, 以将其去除。



## 细胞外低温保护剂

最新的进展显示使用非DMSO溶剂和等渗压剂组合（例如，糖、糖醇、氨基酸和蛋白质）在改善复苏后回收率方面具有良好前景<sup>[13,14]</sup>。不含DMSO的低温保护剂是优先的选择，因为它们风险较低、患者耐受性更好、与袋和可焊接管路的兼容性更佳，并且可能不需要输注前的洗涤步骤。

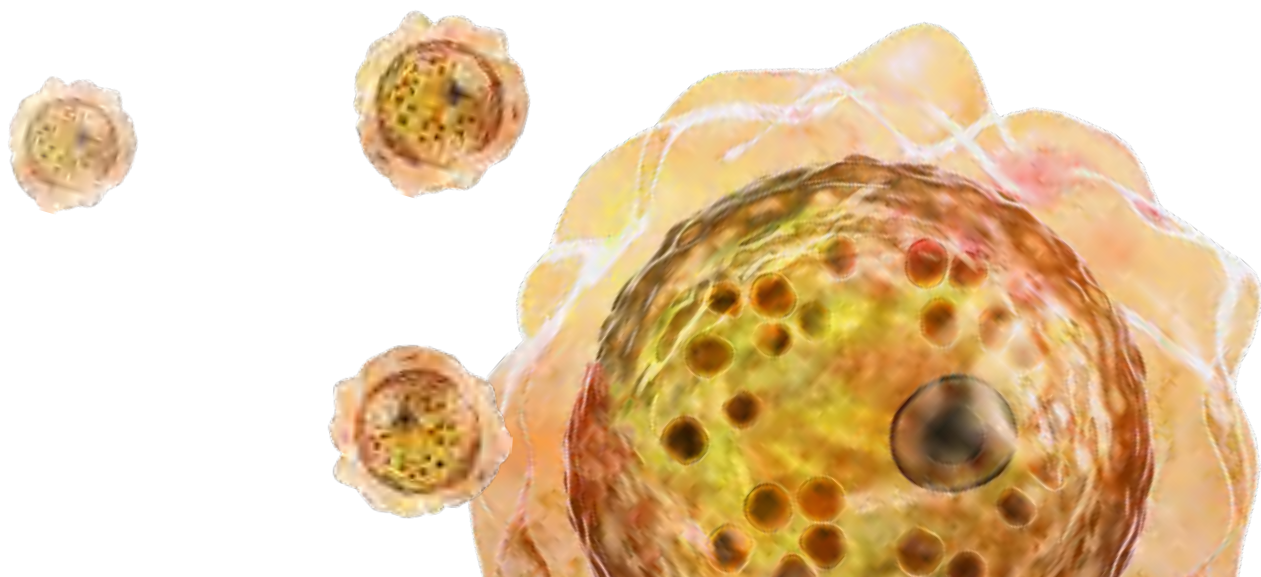
目前，由于细胞外低温保护剂的添加通常会导致低温保存性能欠佳，且复苏后细胞活率较差，因此其在细胞治疗产品中的应用有限。然而，最近的研究表明海藻糖（一种葡萄糖的非还原型双糖）具有一定的应用前景。海藻糖在降温过程中显示出优异的保存细胞和细胞结构的能力。研究还表明，添加P2X7（一种打开细胞跨膜孔的ATP激活受体）可以克服海藻糖的低渗透问题<sup>[14]</sup>。其他一些初步研究表明，将聚乙烯吡咯烷酮（PVP）用于人类脂肪组织来源的成体干细胞的低温保存，可使细胞复苏率达到与含动物血清的DMSO相当的水平<sup>[15]</sup>。甲基纤维素的单独使用或与低浓度DMSO和人血清白蛋白（HSA）的结合使用也显示出一些前景<sup>[16]</sup>。虽然这些研究令人鼓舞，但仍需进一步研究以评价细胞外低温保护剂在细胞治疗产品中的应用。

## 制剂和灌装

### 制剂

制剂是将细胞、缓冲液、蛋白质、辅料和低温保护剂组合在一起的过程。完成细胞扩增步骤后，将在洗涤和收集细胞后立即进行制剂。因为收集的细胞将在缺乏营养物质的次优条件下保存，所以制剂步骤具有温度依赖性和时间敏感性。需要适当的配方来稳定细胞，使其能够承受应激因素，如温度偏移、pH值变化以及搬运、储存、装运和临床操作引起的机械应力。由于制剂先于实际低温保存步骤，优化的制剂方案对于生产稳定、安全、有效且符合监管要求的最终低温保存细胞产品至关重要。

制剂和最终灌装策略包括选择适当的低温保护剂和其他辅料以及最终容器（见下文）。辅料的选择在维持最终产品的关键质量属性（CQA）方面发挥关键作用。人血清白蛋白是细胞治疗产品中最受欢迎的辅料之一，因为它是血液中最普遍的蛋白质，并且已知能为维持细胞活率创造最佳微环境。它可以清除毒素和其他活性氧类物质，维持pH值，提供隔离环境，并在低温保存期间维持细胞活率<sup>[17]</sup>。最终制剂的其他组分包括葡聚糖（用作渗透性中性扩充剂和肠外营养物质）、氯化钠（用作生理盐水稀释剂）和稳定剂（如辛酸钠和N-乙酰色氨酸），可保护蛋白质（如HSA）免受氧化应激<sup>[18]</sup>。





## 容器选择

容器的选择对总体疗法成功有重大影响。容器提供物理保护，并负责最终产品在整个生命周期内的稳定性。容器的设计和制造必须符合储存和装运重现性的特定标准。容器还必须具有以下特征：易用性、零度以下稳定性、无可提取物和浸出物、低温保护剂（如DMSO）耐受性以及最佳标记表面<sup>[9]</sup>。最常用于细胞治疗产品的最终容器类型为螺旋盖冻存管、袋和塑料或玻璃小瓶（表2）。

螺旋盖冻存管已广泛用于储存许多基于细胞的产品，特别是用于GMP级主细胞库的储存。螺旋盖小瓶方便且经济实惠；具有长期低温保存记录；并且在分析和稳定性测试中具有良好性能。然而，它们带来了一些监管方面的挑战。螺旋盖冻存管需要在生物安全柜（BSC）中进行产品灌装的开放步骤，导致该过程较为费力、易受人为错误影响，且更容易受到污染。此外，它们具有有限的每剂量体积和标签表面，并且在交付给患者之前需要在接收地点进行大量操作。

细胞治疗产品制造商倾向于使用一次性使用袋。根据其不同操作步骤（例如：细胞洗涤，扩增，浓缩，收集，低温保存）中的用途，可选择标准或定制化尺寸的一次性使用袋及包括接口和管路的套件。一次性使用袋的优势包括贴标容易、接口多、（袋内尾液的）临床操作少（用于最终剂量递送）。然而，使用一次性使用袋需要引入接管机和封口机等专业仪器，对操作者进行专门培训，并仔细规划排气和特殊包装过程，以确保袋子在复苏后不会出现裂缝和导致产品泄漏。虽然可以使用套件或自动化系统进行多袋灌装，但规模扩大仍具有挑战性，且单次制造运行的批量通常限制在150-200个产品袋<sup>[9]</sup>。

使用“即用型”容器（例如由环烯烃共聚物和充当无菌屏障的可穿刺隔膜组成的小瓶）可提供封闭式系统的优势和灵活性，并可根据商业化需求扩大规模<sup>[9]</sup>。然而，即用型容器价格较为昂贵，且需要专门培训。此外，除非花费大量资金购买大型且复杂的多功能自动化系统或ISO 5 GMP制造设施，否则可能需要在BSC内部进行灌装操作。

表2.细胞治疗产品常用容器类型的优缺点。

容器类型	优点	缺点
螺旋盖冻存管	<ul style="list-style-type: none"><li>• 经济实惠</li><li>• 方便</li><li>• 长期以来用于低温保存</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 开放式系统</li><li>• 污染可能性增加</li><li>• 费力</li><li>• 灌装错误率增加</li><li>• 单次加药量有限</li></ul>
袋	<ul style="list-style-type: none"><li>• 封闭式系统</li><li>• 可定制选项</li><li>• 表面贴标容易</li><li>• 临床操作少</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 专用设备的成本增加</li><li>• 需要专门的操作者培训</li><li>• 规模扩大问题限制批量</li></ul>
塑料或玻璃小瓶	<ul style="list-style-type: none"><li>• 封闭式系统</li><li>• 提高生产规模可扩大的能力</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 非常昂贵</li><li>• 需要专门培训</li></ul>



## 冷却过程和速度

将细胞温度降低到低温状态的过程需要一系列步骤，这些步骤根据细胞类型而定。首先，在连续步骤中，将冻存液以受控速度添加到细胞中，以防止渗透压应激造成的细胞损失。通常应预先降温冻存液，并使用冰袋、低温毯或低温工作台面使细胞悬液和混合液保持降温，以防止在添加DMSO时发生加热相关的细胞损伤。加入冻存液后，将细胞悬液转移到程控降温仪的预冷腔室中。在降温过程中，记录探头检测的产品温度并生成降温曲线。

低温保存期间中的降温速率对最终产品的细胞活率有显著影响。降温速率控制细胞内和细胞外冰晶的形成和大小，并在降温过程中影响溶液效应。快速降温将大大增加胞内冰晶的形成，并将溶质浓度效应降至最低，而慢速降温则产生相反的影响。目前，缓慢降温是各种细胞类型最常用的低温保存方法<sup>[5]</sup>。此外，快速降温方法需要更高浓度的低温保护剂，导致毒性诱导的细胞损失或在临床中心增加洗涤和重新配制步骤<sup>[5]</sup>。

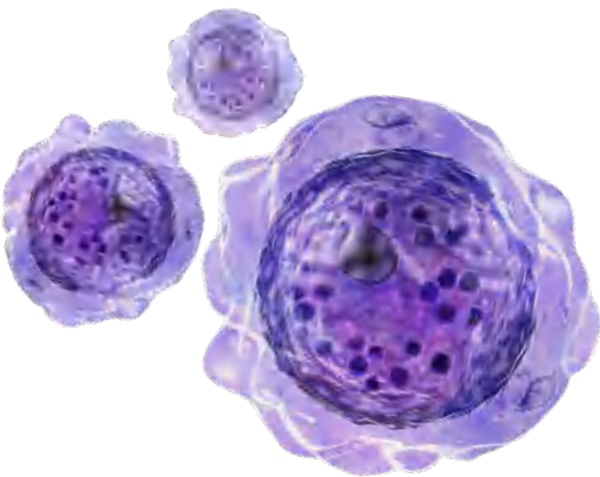


图2.程控降温仪，如Thermo Scientific™ CryoMed™程控降温仪，有助于管理低温保存过程，以确保达到最佳参数。有关使用CryoMed程控降温仪的更多详细信息，请阅读此智能说明

## 总结

细胞治疗产品的最终产品低温保存过程至关重要，因为不理想的低温保存过程可能导致成批的劣质品并最终无法治疗患者。虽然一些用于早期临床试验的即时看护设施仍在患者床旁提供非低温保存或“新鲜”的最终产品，但这并非是可持续的选项。随着细胞治疗产品领域的成熟，交付标准化、可扩展、可重复、符合全球监管机构要求并具有适合“按需配送”的最长保质期的低温保存最终产品将被证明是最佳选项。

有关低温保存过程的更多详细信息，请查看此[白皮书](#)



## 参考文献

1. Mazur P (1970) Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 168:939–949.
2. Baust J (2007) Properties of cells and tissues influencing preservation outcome: molecular basis of preservation-induced cell death. In: Baust J, Baust J (editors), *Advances in Biopreservation*. New York: CRC Press. pp 63–87.
3. Stacey G, Healy H, Mann J et al. (2016) Fundamental points to consider in the cryopreservation and shipment of cells for human application. Chapter 6. In: Connon CJ (editor), *Bioprocessing for Cell-Based Therapies*. New Jersey: Wiley-Blackwell. pp 167–186.
4. Baust JM, Van Buskirk RG, Baust JG (2002) Gene activation of the apoptotic caspase cascade following cryogenic storage. *Cell Preserv Technol* 1:63–80.5.
5. Baust JG, Gao D, Baust JM (2009) Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis* 5(3):90–96.
6. Hunt CJ (2019) Technical considerations in the freezing, low-temperature storage and thawing of stem cells for cellular therapies. *Transfus Med Hemother* 46:134–149.
7. Baust JM, Vogel MJ, Van Buskirk R et al. (2001) A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival. *Cell Transplant* 10(7):561–571.
8. Awan M, Buriak I, Fleck R et al. (2020) Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regen Med* 15(3):1463–1491.
9. International Council on Harmonisation. (2016) *Harmonised Guideline on Impurities: Guideline for Residual Solvents, ICH Q3C (R6)*.
10. FDA Briefing Document (2011) Hemacord (Hematopoietic Progenitor Cells-Cord), BLA 125397.
11. Drezet CA, Huynh C, Autret A et al. (2014) Automated washing of autologous hematopoietic stem cell grafts after thawing does not impair engraftment. *Bone Marrow Transplant* 49:1127–1128.
12. Mfarrej B, Bouchet G, Couquiaud J et al. (2017) Pre-clinical assessment of the Lovo device for dimethyl sulfoxide removal and cell concentration in thawed hematopoietic progenitor cell grafts. *Cytotherapy* 19(12):1501–1508.
13. Pi C-H, Yu G, Petersen A et al. (2018) Characterizing the “sweet spot” for the preservation of a T-cell line using osmolytes. *Sci Rep* 8(1):16223.
14. Weng L, Beauchesne PR (2020) Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation for cell therapy: A review. *Cryobiology* 94:9–17.
15. Hunt CJ (2011) Cryopreservation of human stem cells for clinical application: A review. *Transfus Med Hemother* 38(2):107–123.
16. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV (2010) Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells Dev* 19(4):513–522.
17. Mirabel C, Puente-Massaguer E, del Mazo-Barbara A et al. (2018) Stability enhancement of clinical grade multipotent mesenchymal stromal cell-based products. *J Transl Med* 16(1):291.
18. Hoogendoorn KH, Crommelin Daan JA, Jiskoot W (2020) Formulation of cell-based medicinal products: A question of life or death? *J Pharm Sci* July 6:1–10.
19. Woods EJ, Thirumalaa S (2011) Packaging considerations for biopreservation. *Transfus Med Hemother* 38(2): 149–156.
20. Jaglowski S, Hu Z-H, Zhang Y et al. (2019) Tisagenlecleucel chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy for adults with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): real world experience from the Center for International Blood & Marrow Transplant Research (CIBMTR) Cellular Therapy (CT) Registry. *Blood* 134(Supplement 1):766.

# 第10节： 细胞治疗供应链物流

## 简介

细胞或基因疗法开发、生产到患者床旁交付的过程需要复杂的物流活动，以保持产品在超低温或低温下的完整性。当涉及到细胞治疗产品时，复杂性便愈发凸显。物流策略要求可根据细胞治疗产品的具体类型而有所不同，并需要对完整的细胞治疗产品生产工作流程有深入了解。这一多步骤生产工艺大致包括：

- 1、从患者或供体处采集细胞
- 2、运输至制造工厂进行处理
- 3、加工成制剂
- 4、最终产品运回临床环境供患者使用

当患者的细胞转化为活性制剂时，它们将经历从冷藏（2°C至8°C）到低温保存（-150°C至-196°C）的一系列储存条件（图1）。本章将概述一些在制定细胞治疗产品供应链或配送策略时需考虑的普遍的议题，并强调在考虑自体细胞治疗产品与同种异体细胞治疗产品时可能不同的细微差别。

### 自体疗法物流



图 1

### 同种异体疗法物流



图1.细胞治疗产品物流概述。

## 自体与同种异体细胞治疗产品物流

自体细胞治疗产品是一个静脉到静脉的供应链过程，以直接从特定患者处采集材料为起点。该样本用作生产工艺中的原材料输入。静脉到静脉供应链起始于采集患者起始材料并将其运输至细胞制造中心，在将最终制剂从制造中心配送至医院后结束。由于生产工艺中每个步骤的临界温度要求，以及针对单个患者的个性化治疗情况，尽可能地降低供应链内的风险以确保最终产品质量和身份链至关重要。维持该供应链的关键驱动因素包括：

1. **剂量可用性**—对于特定患者，可能仅有单剂量可用。
2. **患者病情**—接受治疗的患者可能病情危重，这意味着供应链中的任何延误都可能使患者面临风险。
3. **疗法识别信息**—确保整个物流过程中的身份链和监管链对于向正确的患者交付正确的药物至关重要。

依据《药品生产质量管理规范-细胞治疗产品附录（征求意见稿）》第五条【特殊控制】鉴于细胞产品的特殊性，企业应当对供者材料采集和产品生产的全过程采取特殊控制措施，至少包括（一）对产品及其从供者材料的接收直至成品储存运输的全过程进行风险评估，制定相应的风险控制策略，以保证产品的安全、有效和质量可控；（三）在供者材料运输、接收

及产品生产、储存、运输全过程中监控产品或生产环境的温度及操作时限，确保在规定的温度和时限内完成相应的操作；（五）从供者材料采集到患者使用的全过程中，产品应当予以正确标识且可追溯，防止混淆和差错。在中国《药品生产质量管理规范》（2010版）第六章物料与产品第一百零三条中同样规定了，应当建立物料和产品的操作规程，确保物料和产品的正确接收、贮存、发放、使用和发运，防止污染、交叉污染、混淆和差错。物料和产品的处理应当按照操作规程或工艺规程执行，并有记录。这就要求企业或研究者从供者材料，原材料至产品端的物流运输，均需采取完善的措施，以确保物流运输方面的合规性。

物流策略始于白细胞单采术（患者血液采集）或其他患者特定样品。为了保持一致性并确保高细胞质量，可使用标准化的单采（或样品）采集组件以确保符合和遵守标准操作程序（SOP），并促进原材料输入的标准化采集方法。试剂盒的使用可确保制造过程的起始材料质量的一致性，并可最大限度地减少操作者对有效性的影响。协调试剂盒组装；准备装箱并运至采集中心；与此同时进行单采收集。从患者体内采集细胞后，可以新鲜状态装运细胞（室温或2-8°C）或低温保存以备日后使用。虽然低温保存在制造时间上具有更大灵活性，但大多数制造方案仍需使用新鲜细胞。

同种异体疗法的物流要求与自体疗法类似，但整体工作流程允许供应具有一定的灵活性。供应链中一个明显的区别是供体材料的来源。一旦确定了HLA类型或其他细胞特征后，必须确定供体以提供起始材料。自体疗法依赖于从个体患者体内采集细胞，且每次治疗均需重复使用供应链，而同种异体产品使用合并的健康供体细胞作为输入起始材料。细胞来源必须符合GMP指南，且必须遵守严格的监管链和身份要求。在开发出真正的同种异体产品之前，起始材料的特征将决定患者是否适合最终制剂。

对于每批次供者材料的接受，依据《药品生产质量管理规范-细胞治疗产品附录（征求意见稿）》第二十二條【供者材料接收】，至少应当检查以下各项内容：（一）来源于合法且经企业评估认可的医疗机构；（二）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有特殊要求，还应有完整的温度监控记录，且符合标准要求。（三）包装完整无破损；（四）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；（五）供者材料采集记录；（六）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。对于自体治疗中传染病阳性的供者材料，意见稿第二十三條【阳性供者材料】规定对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。同时明确，企业不得接收不符合注册标准的异体供者材料。

无论治疗类型如何，任何细胞在进入生产工艺后都将遵守严格的注意事项和指南进行包装和贴标。生产工艺完成后，将制剂低温保存，置于干燥气相运输罐内，并通过“next-flight out”的专业快递服务运送到临床中心进行患者给药。

## 储存

细胞储存条件在整个过程中至关重要，以确保药物完整性在任何阶段均不会受到影响。基因疗法要求最低储存温度为-80°C，而细胞治疗产品主要储存温度为-196°C或以下。这些超低温条件要求在选择储存设施时必须考虑一些关键因素，以确保适当的超低温储存或低温保存条件。

除了治疗用产品的储存外，细胞制品的供者材料与产品的储存也应纳入考虑范围内。在《药品生产质量管理规范-细胞治疗产品附录（征求意见稿）》第八章质量管理第四十三條【留样】中对细胞产品的供者材料、关键物料和成品的留样做出

了相关规定。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：

### （一）供者材料的留样

自体 and 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策略或不保存留样的，应书面说明其合理性。

### （二）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起始生物材料、细胞因子、生长因子、酶、血清等）对调查产品可能出现的质量问题至关重要，企业应当在其有效期或货架期内保存留样。

### （三）成品的留样

- 1、成品留样量可以适当减少；
- 2、因满足临床必需，确实无法留样的，应当在批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可能不能作为表征质量的样品，但可作为无菌检查或病毒检测的样品。如成品留样经低温保存不能满足预定目的，企业应该考虑采用替代方法（如采用中间产品、分化的细胞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。

同时，对于不合格的物料、中间产品、待包装产品和成品的储存，应当参照中国《药品生产质量管理规范》（2010版）第六章第一百三十一條的相关规定，不合格的物料、中间产品、待包装产品和成品的每个包装容器上均应当有清晰醒目的标志，并在隔离区内妥善保存。



## 超低温储存和低温保存

无论选择冷库服务提供商还是建立内部储存设施,都必须注意表1中所述的重要考虑因素。

降低风险的一个重要方法是利用分散式储存设施并将样品存储在多个站点。这对于主细胞库(MCB)和药品尤为重要。利用拥有多个站点的组织也会影响针对患者程序执行和适应准时制(JIT)交付的能力。

表1.细胞治疗产品物流中关于冷藏的考虑因素。

冗余	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 是否有多个储存系统用于保护您的特定材料?</li> <li>• 如果一条路径无法确保对您的材料进行持续保护,系统内是否存在冗余?</li> <li>• 发生储存故障时,转移材料的备用容量如何?</li> </ul>
风险减轻措施	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 是否有备用发电机用于在断电时维持储存条件?</li> <li>• 设施的安全性如何? 是否设置门禁控制? 是否有全天候监控?</li> <li>• 设施是否拥有满足地区、州和国家要求所需的适当许可证和执照?</li> </ul>
GMP合规性	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 监管机构是否定期进行审计以确保设施的合规性?</li> </ul>
规模扩大能力	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 供应商能否适应未来从临床到商业化规模材料体积的过渡? 这一特点将支持尽早建立更普遍适用的SOP,并促进未来从临床到商业化过程的无缝过渡。</li> </ul>
细胞和基因疗法经验	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 许多最终药物产品具有小体积包装的特点,因此相关经验非常重要。</li> </ul>
储存模式	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 储存考虑因素和SOP要求在将样品从储存环境中取出时应尽可能减少“超出温度范围”的时间。</li> <li>• 站点为集中式单站点模式还是分散式(多站点)模式? 在不同地理位置和不同地区设置储存设施可能具有重要意义。</li> </ul>



### 有关冻存制剂包装和贴标的考虑因素

同种异体疗法和自体疗法在产品包装和贴标方面的许多考虑因素较为相似。在这两种情况下，最终产品通常在低温保存条件下储存和转移。这需要在决定这些产品的包装和贴标时特别考虑。由于需要在从开始（患者细胞或组织采集）到结束（患者给药）的整个过程中跟踪疗法产品，自体疗法在处理方面显示出重要差别。与同种异体疗法不同，自体疗法将需要额外的身份链（COI）跟踪能力，以确保疗法与患者的正确适配，且疗法在开发过程的任何阶段均未受到影响。

首先要考虑的是使用的容器类型。冻存管或冻存袋以及储存容器体积的选择均至关重要。这些初始选择将影响标签类型的选择，进而影响主标签上可包含的信息类型。确定包装类型和尺寸后，必须解决将标签粘贴至容器的过程。选项包括手动贴标或机器贴标。这将进一步影响用于执行贴标活动的环境类型，特别是温度条件（室温、冷藏、干冰或冷冻转运车）。机器贴标的贴标结果通常更加一致，但在制造单次剂量时可能并不作为过程的一部分。重要的是，室温条件下下的贴标方式与产品本身温度之间的关系对于理解标签粘附的质量和持久性非常重要。必须选择适合最终储存温度条件的标签，以确保标签在产品的整个使用寿命期内保持粘附性。

最后，标签类型的选择也会影响一些下游决策。标签可以是单页标签或手册标签。虽然手册标签可以包含更多信息，但手册标签的制造涉及多个组件，且并非每个组件均经过优化以适应低温保存条件（例如，使用的纸张类型和用于装订页面的热熔胶）。细胞和基因疗法产品通常使用纸箱进行储存和装运，必须预测标签连接和最终标签材料是否适合放入所选的储存箱。

根据不同国家/地区的监管要求，标签上印刷的实际内容可能有所不同。虽然这些要求可能因地区而异，但所需的基本信息通常包括：

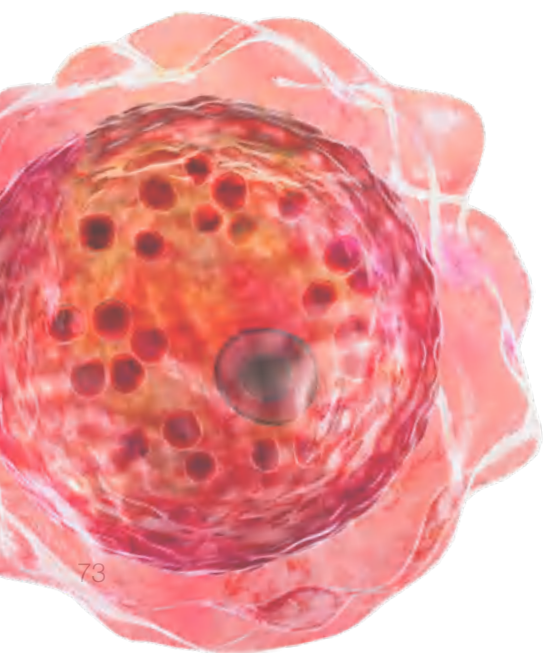
- 给药说明
- 本地化语言翻译
- 最终储存温度
- 发起方和制造商的详细信息

中国《药品生产质量管理规范》（2010版）第一百二十六条规定：每批或每次发放的与药品直接接触的包装材料或印刷包装材料，均应当有识别标志，标明所用产品的名称和批号。

由于自体疗法的高度个体化，其标签信息可能存在额外要求。这可能包括列出独特的跟踪信息（例如身份链）和使用特定条形码或识别标签，以最大限度地降低向患者提供不正确治疗的风险。

### 高价值材料的运输考虑因素

细胞和基因疗法运输的首要任务是在确保药物准时到达的同时保持药物的完整性。在自体疗法中，由于制剂本身的高度个体化性质，供应链的独立组成部分均具有较高价值。供应链中的任何环节出现故障，无论是影响最初的患者采集样品还是最终制剂，都会对最终患者结局产生重大影响。必须快速、安全地运送材料，以满足经常患有重病患者的需要。这包括确保原材料的充足供应和储存条件；采集和运输单采样品或其他患者来源起始材料；并最终配送至患者进行回输。为实现无缺陷运行，可采用合格的运输技术和数据记录器来监测和跟踪温度波动以及冷链的维护。由于大多数基因疗法的运输温度最低为-65°C，而大多数细胞治疗产品在低至-150°C的低温保存条件下运输，对于这些药物而言，速度、温度和完整性的维持变得较为复杂。在评价鉴定方案时，需注意的重要特征包括但不限于：



- 环境概况—自定义或行业标准
- 季节性—例如, 夏季和冬季
- 使用的有效载荷 (最小值和最大值)
- 重复性—一式三份测试
- 国际安全运输协会 (ISTA) 认证的包装测试实验室
- 经行业标准校准的设备
- 设计确认 (DQ)、运行确认 (OQ) 和性能确认 (PQ)

在《药品生产质量管理规范-细胞治疗产品附录(征求意见稿)》第二十九条【运输确认】规定: 供者材料和细胞产品的运输应当经过确认。依据中国《药品生产质量管理规范》(2010版)第二百九十五条之规定: 每批产品均应当有发运记录。根据发运记录, 应当能够追查每批产品的销售情况, 必要时应当能够及时全部追回, 发运记录内容应当包括: 产品名称、规格、批号、数量、收货单位和地址、联系方式、发货日期、运输方式等。对于单次运输多个批次产品的情形, 第二百九十六条规定药品发运的零头包装只限两个批号为一个合箱, 合箱外应当标明全部批号, 并建立合箱记录。并且发运记录应当至少保存至药品有效期后一年(第二百九十七条)。

在制定决策和建立SOP时, 运输路线的确认同样重要。该过程较为复杂, 需要考虑许多可能影响运输过程中产品完整性的不同属性。原产地、目的地和运输路线均会影响产品能承受的温差。此外, 季节性也可以在制定方案时增加额外的维度。在容器内放置温度监测装置对于确保准确记录实际产品温度维持情况而非外部环境波动非常重要。所有装运方案应至少通过三次运输进行确认, 并且重要的是, 应定期进行重新评价以确保供应链任何环节的任何细微变化都得到持

续监测和质量控制。物流和供应链中常被低估的一方面是供应链的最后一步, 即药品实际交付所需的法规合规性。在不断变化的监管环境中, 要保持21 CFR 第11部分的合规性, 需要在产品的保质期内不断评价产品的完整性。这通常通过选择可信赖的服务提供商来解决。这些合作伙伴通常提供一系列服务, 包括提供经过确认的SOP和不同级别的服务, 例如准时制(JIT)服务(如Patheon物流的“next-flight out”)。

选择经验丰富且值得信赖的合作伙伴至关重要, 他们能够应对来自贸易合规性、法规合规性和风险管理方面的挑战。在过程方面, 需要考虑到因海关扣留或延误而产生的可能影响产品完整性的潜在问题。当在-65°C条件下装运时, 可通过再冷却保持温度连续性。然而, 对于液氮(LN2)装运, 当前的包装技术无法进行再充装; 因此, 根据装运箱类型, 最长维持时间限制在8-14天。为了最大限度地减少这种限制, 可以采用多层风险减轻措施:

- 提前准备适当的文件, 以避免可能的延误(例如, 海关扣留)
- 与经验丰富的报关服务商合作
- 考虑自由贸易区选项
- 开发分散式供应网络以降低风险

为实现无缺陷运行, 许多客户或服务提供商发现, 利用调度塔方法可有效进行细胞和基因疗法运输和物流管理。调度塔是一个集中式枢纽, 它整合了供应链所有阶段使用的所有监控系统 and 数据收集工具。这使用户能够完全了解整个过程。调度塔可以由客户开发, 以包含其选择的工具和组成部分, 也可以由物流服务提供商开发。

使用调度塔方法的一个主要优点是能够识别供应链的故障点和优势，从而能够进行预测分析，以便最大限度地提高效率并改进过程。此外，完全可见性允许进行实时监控，以确保执行针对各个物流服务提供商的特定指令。最终，数据将反馈到事件或异常情况的有效管理中，使客户能够生成预先制定的升级计划和应急程序，并推动有效的客户服务。

### 监管链和身份链

如前所述，细胞治疗产品供应链（尤其是患者特异性自体疗法）要求严格的合规性并建立监管链。需要完整的端到端可见性和文档，包括定位监控、温度跟踪和提供商之间所有交接的文档（即，陆运空运到海关检查等）。在运输过程中，从提货点到最终交付的个人跟踪需要识别授权个人（托运人和收货人）和相关的监管链文件，包括姓名首字母、日期和时间。此外，在整个运输过程中，实时温度和GPS定位监控，以及运输过程中的位置确认能够提醒客户潜在的延误。

就细胞和基因疗法而言，信息必须保持在每剂量水平，并且该文档必须在出现温度偏移或其他问题的情况下随时可用。同种异体疗法可以使用散装存储方案，并存储在气相LN2中。由于并非所有公司都能够支持气相LN2运输，与有能力支持此类供应链的公司合作可确保最终制剂的质量。

在自体疗法中，身份链成为物流的关键驱动力，以确保正确的制剂按时交付给正确的患者。在建立身份链过程时，必须考虑以下几点：

1. 在产品初级和次级包装上列出患者唯一识别号和批次信息
2. 在风险管理周期中定期评估身份链（COI）控制能力：制定计划并明确利益相关者；起草和批准适用领域的流程图；起草失效模式及后果分析（FMEA）；制定偏离和风险评定；在文件控制中审查和批准；培训和实施
3. 确保已建立SOP并定期审查
4. 通过适当的隔离、生产线清场和工厂内转换最大限度地减少混淆风险

5. 在整个过程中实施验证步骤（手动或电子方式），以确保从细胞采集到治疗中心的制剂输注保持适当的链接
6. 平衡COI与健康保险流通与责任法案（HIPPA）和其他隐私法的关系

依据《药品生产质量管理规范-细胞治疗产品附录（征求意见稿）》【产品追溯系统】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。同时，企业应对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；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与患者之间的匹配性，且具有可追溯性（第四十八条与第四十九条）。

### 配送——提货/打包装运

下一阶段是选择合作伙伴以配送产品。在选择服务提供商时，需确认以下问题：

1. 该服务提供商是否拥有临床样品和商业产品的适当运营许可证？
2. 服务的交付周期要求是什么？您是否需要提前申请装运材料？他们能否在第二天或当天配送？确保建立服务水平协议，以便您了解物流，包括供应商需要哪些信息才能按时发货。
3. 合作伙伴是否能够满足JIT请求？（注意，JIT排序需要考虑接受治疗的患者的健康状况）。
4. 供应商是否有系列化能力，以支持我方未来的商业发布？

## 从临床到商业供应规模的过渡

最初,大多数关于供应链和物流的决策将在临床阶段做出,该阶段的样本量和体积可能较小,不太可能批量进行。然而,当前的供应链是否能够过渡并适应商业供应需求对成功至关重要。虽然临床供应链可能在地区或国内层面运作,但商业供应链通常需要跨境运输,并涉及初始提货点和最终交付点之间的多个接触点。随着生产工艺变得更加全球化,更多的合规性、运输和供应问题有待解决(参见表2的总结)。

随着商业化进展,这些高度敏感的材料可能需要运送至更远处,并根据全球范围内不同的目的地遇到更多变化情况。不同国家的法规要求各异,此国家法规的符合性可能不适用于彼国家法规。可能需要变更过程,以确保全球贸易合规

性。此外,不同的国家可能有税收要求,导致生产-配送-销售过程中不同节点缴纳的税款增加。这可能会影响到在某些国家(例如欧盟国家)开展业务或向其提供产品的能力。

在美国,当产品从临床使用过渡到商业化应用时,存在一些重要的FDA合规性考虑。《美国药物供应链安全法案》合规性可以追踪处方药在全国范围内的分销情况。特别是,电子互操作系统实施能力对于遵守《药品质量和安全法案》第II篇至关重要。

当产品从临床试验环境过渡到商业领域时,涵盖最终产品标签插图和信息的许多严格的指导原则都会产生影响。

表2.向商业规模运营过渡时需考虑的问题。

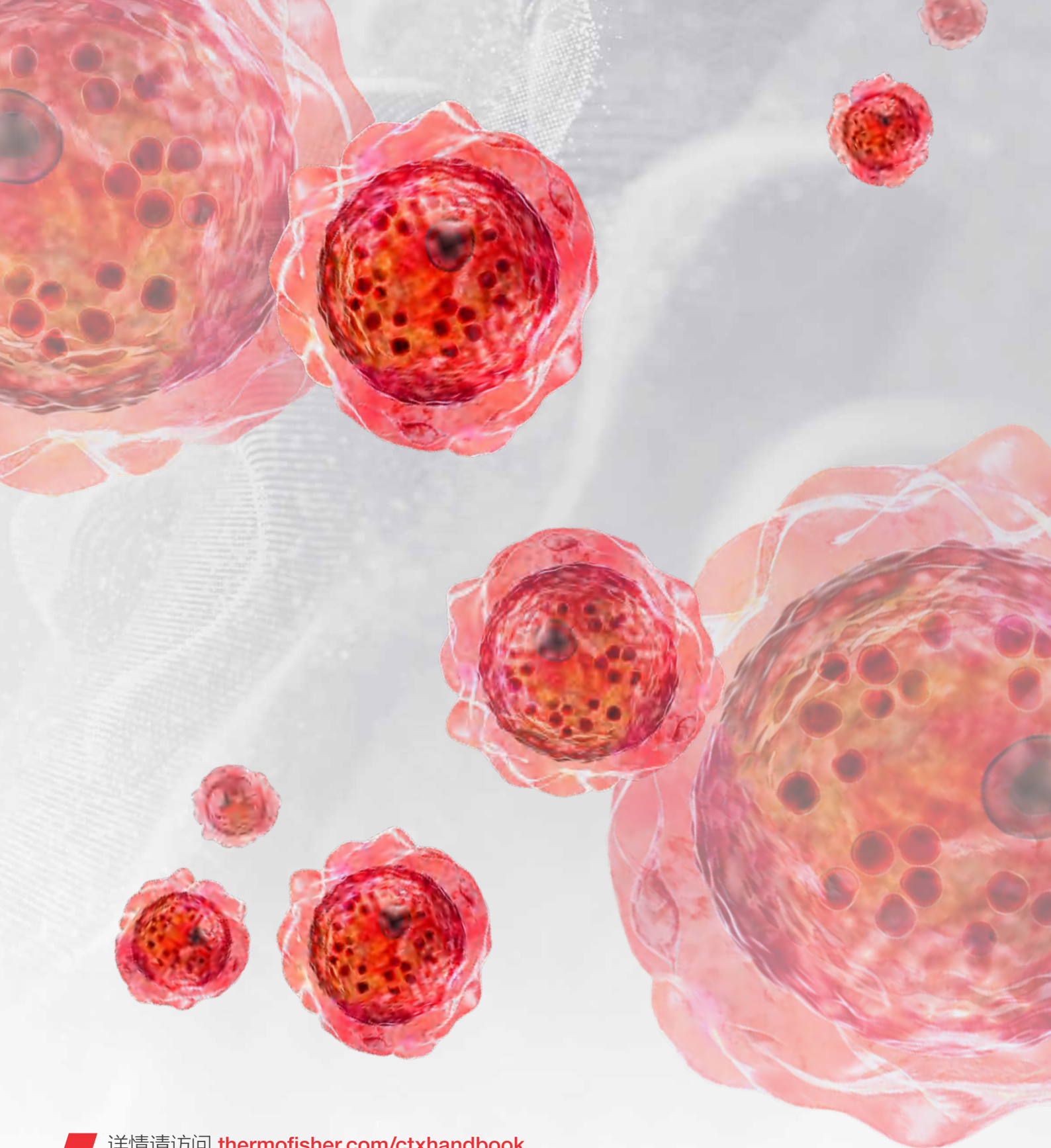
问题类别	具体问题
供应链可扩展性	<ul style="list-style-type: none"><li>• 当前的供应链能否支持纵向和横向扩展以适应商业层面的需求?</li><li>• 随着治疗需求的增加,您为储存、运输和配送的不同阶段选择的合作伙伴是否能够适应更大规模?</li></ul>
全球贸易合规性和增值稅 (VAT)	<ul style="list-style-type: none"><li>• 为确保全球贸易合规性,您是否需要调整或修改现有过程?</li><li>• 每个地区的税收要求是什么?</li></ul>
法规合规性	<ul style="list-style-type: none"><li>• 是否有配备ATMP QP (Advanced Therapy Medicinal Products Qualified Person) 的提供商可以为我方产品出具QP声明?</li><li>• QP出具QP声明需要哪些文档?</li><li>• QP批次或产品放行的交付周期是多久?</li><li>• 在申请EMA批准之前,我需要提前多久与QP接洽?</li></ul>
系列化	<ul style="list-style-type: none"><li>• 我方产品应如何符合《美国药物供应链安全法案》?</li><li>• 我方应该选择哪种EPCIS系统,以便与商业包装和分销合作伙伴进行集成?</li></ul>
标签和插图设计	<ul style="list-style-type: none"><li>• 最终商业产品标签是否符合相应地区的要求?</li><li>• 我应该选择哪种标签或组件,以便能够耐受低温保存条件下的储存和配送?</li></ul>
欧盟“蓝箱”政策	<ul style="list-style-type: none"><li>• 标签是否符合欧洲药品管理局(EMA)授权发布的指导原则?</li></ul>

这些要求由美国FDA和世界其他国家的同等机构管理。每个国家具有各自要求，因此美国或EMA的批准并不意味着标签将符合其他国家的标准，从而导致需要重新设计标签以符合每个单独的目标市场。对于欧盟，标签指导原则由EMA发布。他们针对单一药物申请的授权概述了指导原则，并在以下方面做出规定：标签上必须显示的信息；文本必须使用的语言取决于产品销售的地区；可能为成员国特定的附加文本要求；标签的颜色、标志、配色方案和其他特征；以及在标签上包含上市许可编号等细节。

## 总结

尽管每个供应链和物流计划的具体细节会根据产品的具体临床和商业需求而有所不同，但在一些关键领域，预先考虑和规划可以降低风险，并减少材料和昂贵解决方案的潜在损失。对于细胞治疗产品，这些特殊考虑因素包括储存温度、运输方式、监管链和身份链、贴标，以及影响上述因素的地区法规和差异。选择在细胞治疗产品方面经验丰富、值得信赖的材料和服务供应商可以减少其中的一些挑战，帮助细胞治疗产品制造商及时、安全地向重病患者提供宝贵的治疗药物。





详情请访问 [thermofisher.com/ctxhandbook](http://thermofisher.com/ctxhandbook)



赛默飞  
官方微信



赛默飞  
生命科学小助手

免费服务电话：800 820 8982/400 820 8982  
信息咨询邮箱：[csbj@thermofisher.com](mailto:csbj@thermofisher.com)  
[www.thermofisher.cn](http://www.thermofisher.cn)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC