

ACRO Online 小课堂-CAR-T 质粒、慢病毒生产与质控的经验分享

非常感谢各位小伙伴对 ACRO Online 小课堂的关注和支持，第五讲直播课中及课后有很多小伙伴积极参与并提出了一些问题，我们整理后把对应的分析分享给大家。当然这只是我们的分析，如果大家有补充的话欢迎来和我们一起交流。

ACRO Online 小课堂前五讲（SPR 技术分享/ ADA&PK 技术分享/ CAR 阳性率检测技术分享/ 功能性抗体细胞水平分析案例分享/CAR-T 质粒、慢病毒生产与质控的经验分享）的直播资料（课程回放、PPT 等），可点击 <http://t.cn/EoTZxcs> 进行申请哦。

互动问题（Q）和 ACRO 分析（A）

Q1 : HIV-1 有风险吗？

A1 : HIV (Human Immunodeficiency Virus) 是人类免疫缺陷病毒，HIV-1 在世界卫生组织国际癌症研究机构公布的致癌物清单中属于 1 类致癌物，即对人类为确定致癌物。

慢病毒载体是以 HIV-1 为基础发展起来的基因治疗载体。为了避免有复制能力病毒的产生，在构建慢病毒时一般将 HIV-1 基因组分装到几个质粒载体中，再共转染细胞，然后获得只有一次感染能力但是没有复制能力的 HIV-1 载体颗粒。第三代慢病毒载体，RCL 产生需要经过至少三次重组，和获取驱动病毒全长 mRNA 转录（两个 LTR 之间序列）的启动子，所以产生的几率极其低。目前已发展到 4 质粒包装系统，使意外产生活性病毒的可能被大大降低。

但慢病毒载体的风险还是有的，所以要在多个环节多个时间点进行 RCL 的质控，以及 CAR-T 细胞回输患者后为期 15 年的安全随访。

Q2 : CAR-T 细胞经过处理，最终产品与初始样本的同源性如何确认？

A2 : 这个问题不只是医患人员担心的问题，也是企业在执行 GMP 的时候必须要确保的一项。这是整个 CAR-T 细胞制备过程的一个控制，涉及方方面面。采集血液时，考虑患者的血来自哪个医院的哪个患者，血液运输过程是否会混淆，血液交给谁，分配到哪个车间制备，在哪个地方培养，制备后在哪个地方储存，又是怎么运输到医院，对应到之前的患者。

无论是条形码形式还是二维码形式，都是要做到确保防混淆和可追溯性。唯一标识码的设计很重要。要足够区分医院和患者，考虑到血液和 CAR-T 生产批号的关系，如果工艺中用到血浆的话，也要考虑到血浆与患者和 CAR-T 生产批号的关系。

自动化生产确实可以降低混淆情况。但是目前的全自动化设备比较昂贵，如果是一体机，CAR-T 的分选、病毒感染、扩增等都在一个设备里。在扩增的时候，设备分选的功能就不能用，会造成资源的浪费。

所以目前阶段还是要注重 GMP 管理。考虑人机料法环各个方面管理和控制，做好每一步的交接工作。生产过程中要做到分区域生产，对可能混淆的步骤建立关键控制点，注意清场，双人复核。

Q3 : 慢病毒生产是做一批用一批，每批的质量怎么样保证一致？

A3 : 慢病毒生产虽是瞬转的，但生产能力足够的话，每一批可以生产出很多慢病毒，慢病毒也可以长期保存，所以不是做一批用一批。目前有研究者也在努力开发稳转的慢病毒细胞株，可

以增加批次一致性。

每批质量的一致性如何保证，这个是任何一种工艺和任何一种产品都必须考虑的问题，不单是慢病毒。至少要通过原材料的控制，生产过程的控制，质粒质量和用量的控制，工艺验证和放行检测等全过程来保证质量的稳定性和批间一致性。

Q4：悬浮的 293 是指 293f 吗？

A4：分享过程中提及的是悬浮的 293T 细胞，293T 细胞是 293 细胞中转入 SV40-antigen 基因形成的高转衍生株，经驯化后的 293T 细胞也是含有大 T 抗原的。而 293F 细胞是一类能够在无血清培养悬浮的野生型 293 细胞。

Q5：CAR-T 细胞在回输的时候有必要把成品中其他类型的细胞都剔除掉吗？

A5：目前，CAR-T 细胞是多种 T 细胞亚群的混合物，通过 T 细胞分离纯化工艺得到高纯度的 CD3 阳性 T 细胞，经过转染，扩增，收获高纯度的 CAR 阳性 T 细胞。终产品检测中对肿瘤细胞进行质控（如 CD19 阳性 B 细胞），其他类型的细胞对人体没有什么危害，并不一定都要剔除掉，是否要剔除其他类型的细胞，剔除哪种类型的细胞，要结合工艺和质检，以及药理毒理研究结果来判断。除此之外，T 细胞亚型是否影响 CAR-T 的转染效率和效力还需进一步研究，建议对细胞的混合特性进行鉴定研究和定量质控。

Q6：质粒菌种库保存稳定性的检测项目分享

A6：菌种保存稳定性是对保存一定时间后的菌种进行复苏，发酵，检测生长曲线，发酵后纯化提取质粒检测质粒序列，酶切图谱，表达量等项目。关注质量和产量。

Q7：CAR-T 体外实验放行时发现阳性率和体外活性有关，如何把控每次转染的阳性率使其可通过体外放行指标？

A7：根据具体阳性率和体外活性的量效关系，个体差异，生产工艺和质检方法相结合来考虑。稳定 CAR-T 细胞制备工艺，CAR 阳性率的限度可设定在合理范围内波动。选择合适的体外放行检测方法，体外放行指标可以检测细胞杀伤和 IFN- γ 分泌，如细胞杀伤检测过程中可能出现非特异性释放，导致背景值太高，影响检测结果。细胞杀伤检测过程中可以控制每次 CAR+ 细胞数目一致。

Q8：如何控制每批的 PBMC 的质量？

A8：要通过原材料的控制，生产过程的控制，工艺验证和放行检测等全过程来保证质量。检测 PBMC 的表面活性剂特异性标记物，如 CD3+，CD4+，CD8+，以及 T 细胞数量和活率等。

Q9：CAR-T 生产环境必须要 B 级吗，C 级可以吗？

A9：CAR-T 细胞制备场所至少包括质粒制备区，病毒制备区，细胞制备区。载体的制备至少是 C+A 洁净度级别，除菌过滤应在 B+A 洁净级别进行。CAR-T 细胞制备过程中与细胞有关的操作，如细胞分离，转染，扩增，收获等应在 B+A 洁净区进行。

Q10：支原体和 RCL 方法学验证如何开展？必需要使用阳性对照吗？

A10：支原体和 RCL 方法学验证可参考相关指导原则开展，必须要使用阳性对照。不仅方法学验证，包括常规的批检验都需要用到阳性对照。任何限度检测，尤其是安全性的杂质检测，阳性是不可缺少的对照。

支原体检查如果使用药典方法，如直接培养法或指示细胞培养法，对专属性和精密度等做适当的验证，证明该方法适用即可。如果因药典方法周期长，同时开发了 q-PCR 或其他方法，则需

要对新方法进行全面的验证。目前 CAR-T 行业多采取快速法 (q-PCR) 放行，药典法同步检测。所以企业面临的更多的是支原体的快速替代验证，可参考 2015ChP 9201，当然最重要的核心仍然是专属性、检测限（灵敏度）、精密度以及耐用性。

RCL 的方法学验证可参考指导原则或相关文献进行全面验证。如果 RCL 的方法检测样品为阴性，可是同法检测阳性对照结果也是阴性，那么这样的方法就不适用，灵敏度根本无法达到。还有一种情况，如果样品检测是阴性，阳性检测是阳性，可是样品中加入一定量的阳性对照后检测出的结果为阴性，那么就可能存在样品抑制或干扰了阳性对照，方法一样存在问题，所以说阳性是检测方法灵敏度和专属性的必需对照，并且灵敏度和专属性也是 RCL 方法学验证的核心。

Q11：分析方法学验证参考哪些指导原则，注意事项有哪些？

A11：方法学验证可参考国内的法规，指导原则，电子刊物等等，如《中国药典》《中国药典分析检测技术指南》国家药典委员会 编著、《生物制品质量控制分析方法验证技术审评一般原则》药品审评中心、《CAR-T 细胞治疗产品中复制型病毒的风险分析及控制》、《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》，国外指导原则如《ICH Q2 (R1) 分析方法验证：文本及方法学》、《ICH Q6B 质量标准：生物技术产品及生物制品的检测方法和验收标准》、《Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation》FDA、《WHO Guide to Good Manufacturing Practice Requirements, Part2 : Validation》WHO 等等。注意事项可参考指导原则，结合实际工艺和检测方法确定。所有的方法学验证，最核心的验证项目就是专属性，考察其方法的适用性，另外对于限度杂质项目的验证，需关注检测限（灵敏度）/定量限，对于纯度/含量项目的验证，需关注线性、范围、准确度。

Q12：CART 生产系统是否必须使用封闭系统？

A12：并没有强制要求 CAR-T 生产必须使用封闭系统，相关指导原则建议使用封闭系统，至少要做到半封闭的制备工艺。

Q13：有哪三款自动化设备？

A13：美天旎 Clinic MACS Prodigy，博雅控股 CAR-Txpress，Lonza Co-coon。

Q14：慢病毒的产品一致性是通过哪些参数和指标来评估？

A14：细胞基质来源进行建库，保证细胞库的一致性。培养过程中的培养基等进行控制，保证原材料一致性。生产过程进行控制，起始细胞密度，转染试剂用量，质粒用量，转染试剂与质粒用量的比例，转染时间，培养中设备参数如温度、二氧化碳浓度等的控制，收获时间，检测收获液的物理滴度，转到滴度，RCL，外源因子等。纯化过程中的工艺参数，如离心转速和时间，酶切时间和用量，柱层析中的上样量，缓冲液等等，来控制产品一致性。对纯化后病毒按照质量标准进行全检。最后通过工艺验证对工艺参数和质量等进行验证。

Q15：发酵罐遗传稳定性是指什么？

A15：菌种遗传稳定性研究是传代稳定性研究的一个内容，菌种传一定代次后，上发酵罐，纯化后提取质粒，进行测序，酶切图谱等的分析，看是否有突变。还有按照药典要求通过检测质粒丢失率验证菌种的稳定性。

Q16：慢病毒的杂质标准如何确定？

A16：杂质限度的一般需要综合药学、药理毒理及临床研究结果综合判定。如果已知杂质的毒性在相关文献上已有记载，可直接作为杂质限度确定的依据之一。部分杂质标准设定可以参考疫苗等的杂质标准确定。

慢病毒杂质标准的建立是跟生产工艺相关联的，而且也跟分析方法相关联，主要根据研究批次的数据及生产一致性验证批次的研究数据制定。产品相关杂质和工艺相关杂质应分别制定单独的和/或合计的验收标准。对于某些特定的杂质，通过研究证明其在工艺中可有效控制或去除，并达到可接受水平，就不用对原液或成品中的这些杂质进行检测，也不用纳入质量标准。

Q17：病毒浓缩用超速离心还是建议用膜浓缩？

A17：这个要结合自己的工艺进行选择，我们使用的是超滤浓缩。

Q18：转染效率不高怎么办？有没有好的方法提高？

A18：转染效率不高有两种，一种是质粒转染慢病毒效率不高，一种是慢病毒转染 CAR-T 细胞效率不高。如果是质粒转染慢病毒效率不高，则需要关注质粒纯度，质粒用量，转染方法，转染过程中质粒与转染试剂的比例等等，通过实验设计进行工艺优化。慢病毒转染 CAR-T 细胞效率不高，如果是获得的病毒滴度不高造成的，利用阴离子交换层析的方法，或许可提高病毒的滴度，并且显著提高转染效率，另一方面也要对 CAR-T 工艺进行摸索，如 MOI 值，转染方法，可以结合文献资料和现有工艺进行优化。

Q19：杂质检测方法

A19：质粒，慢病毒，CAR-T 细胞制备工艺中，不同的杂质有不同的杂质检测方法，要分别进行方法开发/优化/验证等。

Q20：慢病毒的纯化工艺

A20：慢病毒的纯化工艺一般包括澄清过滤、酶处理、超滤浓缩、层析纯化等过程，柱层析的选择可以使用分子筛凝胶+高分辨阴离子凝胶，或者复合型凝胶+强阴离子凝胶。

Q21：质粒纯度

A21：普瑞金生物的质粒纯度的控制主要通过工艺纯化进行控制，通过裂解，超滤浓缩，分子筛层析，亲和层析，阴离子层析等去除蛋白质，宿主 DNA 和内毒素等杂质。质量检测包括纯度检测，宿主 DNA，宿主 RNA，宿主蛋白，抗生素残留及其他工艺添加杂质的检测。

Q22：CAR-T 制备工艺应该平行做几个个体呢？

A22：如果说的是 CAR-T 细胞制备的申报批次，至少做 3 个个体，满足连续三批的要求。研究批根据工艺研究情况确定，中试批次三批。如果采用健康志愿者的血液作为原材料进行 CAR-T 细胞制备，建议也用患者血液作为原材料进行 CAR-T 细胞制备，验证血样代表性。

Q23：病毒稳定性试验的设计

A23：病毒稳定性试验设计可参考 ICH 和国内相关指导原则，整个生产过程中，至少包括有细胞库稳定性，病毒收获液稳定性和成品稳定性。细胞库稳定性主要包括传代稳定性和保存稳定性；慢病毒收获液稳定性至少包括储存稳定性研究；成品稳定性主要是长期稳定性，考察病毒载体对保存条件敏感的质量参数，如转导滴度、物理滴度、无菌、细菌内毒素等。

Q24：申报前如何与 CDE 沟通呢？

A24：申报前与 CDE 的沟通非常重要，CDE 发布了多个沟通交流指导原则，如《药物研发与技术审评沟通交流管理办法（试行）》和《药品审评中心与注册申请人沟通交流质量管理规范（试行）》，可以在不同阶段就不同问题与 CDE 沟通交流，普通的技术问题咨询可以通过 CDE 的申请人之窗提交，关键的技术问题需要在申请人之窗提交沟通交流会目的和问题，PPT 和支



持性材料等申请面对面沟通交流，如药学研究问题，药理毒理研究问题，临床方案设计问题都可以进行沟通交流。前期沟通交流做得越充分，后期 IND 申报也就会越顺畅。

Q25：那些过程里面需要纯化呢？

A25：质粒，慢病毒，CAR-T 细胞制备过程中，都有纯化过程。纯化工艺的确很难，需要进行工艺研究确定纯化路线和关键参数。

更多技术达人精心准备的课程在路上，我们也欢迎您通过网站、微信、邮箱 (course@acrobiosystems.com) 把您的问题及建议分享给我们，还可以告诉我们您心仪的讲师是谁呀，小编可能会把他请来给大家分享技术干货哦。



新品上市

▼ 点击了解详情 ▼

全长CD20蛋白
[真核系统表达 | 完整构象 | 高生物活性]

E (Extracellular)
P (Plasma Membrane)
C (Cytoplasmic)

N-Terminal
C-Terminal

FGL1蛋白 LAG-3 免疫治疗新配体

- HEK293表达
- 多种属 (Human, Mouse, Cyno) & 多标签 (His, Fc)
- Avitag™生物素标记加速筛选

Cancer cells
Anti-FGL1
T-cells

新品上市
NEW RELEASE

● ● ● 热门产品列表，了解更多详情请[点击](#)。



Conjugate	Targets	Cat. No.	Product Description
FITC- Labeled	BCMA	BCA-HF2H1	Human BCMA, His Tag
	BCMA	BCA-HF254	Human BCMA, Fc Tag
	CD19	CD9-HF2H2	Human CD19, His Tag
	CD19	CD9-HF251	Human CD19, Fc Tag
	CD22	SI2-HF2H6	Human Siglec-2 / CD22, His Tag
	CD30	CDO-HF2H3	Human CD30, His Tag
	Glypican 3	GP3-HF258	Human GPC3, Fc Tag
	Glypican 3	GP3-HF2H1	Human GPC3, His Tag
	Mesothelin	MSN-HF223	Human MSLN, His Tag
	Mesothelin	MSN-HF253	Human MSLN, Fc Tag
	SLAMF7	SL7-HF2H7	Human SLAMF7, His Tag
	Protein L	RPL-PF141	Recombinant Protein L
PE-Labeled	Mesothelin	MSN-HP223	Human MSLN, His Tag
Biotin-Labeled	BCMA	BCA-H82E4	Human BCMA, His & Avi Tag
	BCMA	BC7-H82F0	Human BCMA, Fc & Avi Tag
	CD19	CD9-H8259	Human CD19, Fc Tag
	CD22	SI2-H82F8	Human CD22, Fc & Avi Tag
	EGFRVIII	EGR-H82E0	Human EGFRVIII, Avi & His Tag
	Glypican 3	GP3-H82E5	Human GPC3, His & Avi Tag
	Mesothelin	MSN-H82E9	Human MSLN, His & Avi Tag
	Mesothelin	MSN-H82F6	Human MSLN, Fc & Avi Tag
	CD30	CDO-H82E6	Human CD30, Avi & His Tag
	CD33	CD3-H82E7	Human CD33, Avi & His Tag
	CD38	CD8-H82E7	Human CD38, Avi & His Tag
	CD70	TN7-H82F4	Human CD70, Avi & Fc Tag
	EGF R	EGR-H82E3	Human EGFR, His & Avi Tag
	EpCAM	EPM-H82E8	Human EpCAM, Avi & His Tag
	EpCAM	EPM-H82F9	Human EpCAM, Fc & Avi Tag
	FOLR1	FO1-H82E2	Human FOLR1, His & Avi Tag
	FOLR1	FO1-H82F9	Human FOLR1, Fc & Avi Tag
	HER2	HE2-H82E2	Human Her2, His & Avi Tag
	HER2	HE2-H822R	Human Her2, His Tag
	HGF R	MET-H82E1	Human HGF R, Avi & His Tag
	ROR1	R01-H82E6	Human ROR1, His & Avi Tag
	ROR1	R01-H82F4	Human ROR1, Fc & Avi Tag
	SLAMF7	SL7-H82E0	Human SLAMF7 / CRACC / CD319 Protein, His Tag, Avi Tag
	Protein L	RPL-P814R	Biotinylated Recombinant Protein L, His Tag