

溶瘤病毒产品药学研究与评价技术指导原则  
(征求意见稿)

国家药品监督管理局药品审评中心  
生物制品药学部

2021 年 4 月

# 目录

一、前言 .....	3
二、适用范围 .....	3
三、一般原则 .....	3
四、风险评估和控制 .....	5
五、生产用材料 .....	6
1、起始原材料.....	7
1.1 病毒种子 .....	7
1.2 细胞基质 .....	9
2、其他生产用材料.....	10
3、辅料.....	11
六、生产工艺 .....	12
1、工艺开发.....	12
1.1 原液生产工艺 .....	12
1.2 制剂生产工艺 .....	12
1.3 工艺过程控制 .....	13
2、工艺验证.....	13
3、工艺变更.....	14
七、质量研究和质量控制 .....	14
1、质量研究.....	14
1.1 特性研究 .....	15
1.2 效价 .....	15
1.3 含量 .....	15
1.4 纯度和杂质 .....	16
1.5 一般特性 .....	17
1.6 微生物安全 .....	17
2、质量控制.....	17
八、稳定性研究 .....	18
九、包装及密闭容器系统 .....	18
十、名词解释 .....	19
十一、参考文献 .....	19

## 1 一、前言

2 溶瘤病毒治疗作为肿瘤免疫治疗的一种方法，主要通过激活机体自身免疫系  
3 统和裂解肿瘤细胞来发挥作用。近年来，随着研究的不断深入和技术不断发展，  
4 越来越多的病毒基因组改造方法用于溶瘤病毒产品的开发，通过一系列手段不断  
5 提高溶瘤病毒对肿瘤的靶向性，降低其对正常细胞的影响，提高安全性。由于生  
6 物技术发展迅速，溶瘤病毒类产品类型日新月异，各类产品从基因设计、生产工  
7 艺、剂型选择、质量控制等方面均可能存在差异。

8 为规范和指导溶瘤病毒产品的研究、开发和评价，制定本指导原则。本指导  
9 原则仅基于当前的技术发展和科学认知，针对溶瘤病毒产品药学研究的基本属性  
10 和特殊性提出一般性技术要求，每种溶瘤病毒产品技术要求的适用性还应当采取  
11 具体问题具体分析的原则。后续随着技术的发展，认知的深入和经验的积累，将  
12 逐步补充和完善本指导原则。

13 本指导原则中的观点仅代表当前对溶瘤病毒类产品药学研究与评价的一般  
14 性认识，除非引用了特定的法规和法定要求，否则应视为建议。

## 15 二、适用范围

16 本原则适用于野生的、减毒的或经过基因修饰的具有复制能力的病毒产品，  
17 其可以选择性感染肿瘤细胞并在肿瘤细胞中复制继而裂解肿瘤细胞，和/或刺激  
18 机体产生抗肿瘤免疫反应，对人体正常细胞或组织选择性或复制性较差。

## 19 三、一般原则

20 溶瘤病毒产品的研发和申报应符合现行法规的要求并参考相关技术指南的  
21 内容。人体使用的溶瘤病毒产品的生产应符合《药品生产质量管理规范》（简称  
22 GMP）的基本原则和相关要求。

23 溶瘤病毒产品属于具有复制能力的活病毒，其从基因设计、生产工艺、质量

24 研究、贮存和运输，以及制剂类型等方面均面临诸多挑战，为保证临床受试者的  
25 安全，临床试验申报阶段的工艺开发和质量管理应重点关注与产品安全性相关的  
26 问题，如病毒本身体内的安全性、内外源病毒因子污染、杂质、微生物安全、稳  
27 定性以及临床前动物安全性评价与后续人体临床试验所用样品的质量可比性等。  
28 为确保产品使用的安全性，应从病毒来源、传代历史、作用机制、致病性、毒力  
29 等方面加强研究，同时还应结合病毒的非临床安全性和有效性数据，以及既往人  
30 体临床使用数据综合评估。同时，生产用材料和生产工艺过程是引入内外源病毒  
31 因子的主要途径，应从生产用材料、生产工艺过程控制等方面加强对内外源病毒  
32 因子的控制，尽可能使用非生物来源物料，如采用了动物/人源性物料，应详细说  
33 明来源、组成成分、质量等级、使用的工艺阶段及质量控制和检测报告等，加强  
34 动物/人源性物料的微生物和病毒因子污染的控制，评估使用的合理性和安全性。  
35 为了保证生产批次质量的一致性，生产用病毒和生产用细胞基质应建库管理，并  
36 进行全面的检定，生产用病毒和细胞的建立与生产过程中使用的原材料来源也需  
37 进行全面的检定并开展风险评估。临床试验申报时，应确定与临床试验阶段相适  
38 应的生产工艺步骤、参数、以及生产过程控制措施等，并结合生产工艺特点及产  
39 品特性，设计可有效去除工艺和产品相关杂质的生产工艺，建立具有一定灵敏度  
40 的分析方法与开发阶段相适应的指控标准检测杂质的残留。该阶段应开展初步的  
41 质量研究，质量研究一般包括病毒结构、理化特性、纯度和杂质、生物学活性、  
42 一般特性等，临床试验阶段开展对产品的全序列分析和传代稳定性研究中的病毒  
43 序列分析，如果经过基因改造，应特别关注改造后的序列，为后续产品开发积累  
44 相关信息。建立初步的质量标准，用于安全性相关的质量控制项目应参考已经开  
45 展的药理毒理学研究结果，或遵循已有同类产品的安全性标准或已有的共识标准。  
46 临床试验阶段，需要开展初步的检测方法学研究确认工作，安全性相关和预期与  
47 产品作用机制相关的关键质量属性的分析方法应予以特别关注，并建议开展较为  
48 全面的研究。在开展临床试验前，建议建立反映生物学活性的测定方法，以初步  
49 证明其对肿瘤细胞具有选择性。稳定性研究应涵盖样品的保存、运输和使用的各  
50 个阶段，稳定性数据应可以支持临床试验的使用。工艺开发过程中需要关注用于  
51 毒理学研究的批次与拟用于临床试验批次的工艺和质量的异同，如发生工艺变更，  
52 需开展可比性研究以确定变更对产品的安全性、纯度、杂质、理化特性，以及生

53 物学活性等方面的影响。

54 临床试验期间，随着对产品质量属性和生产工艺认识的不断加深，以及临床  
55 试验数据与产品质量属性相关性的分析，应不断优化生产工艺和质量研究与控制，  
56 明确关键工艺步骤、工艺参数和过程控制，并尽量在关键临床试验前确定生产工  
57 艺、生产规模和场地等。遵循一般生物制品研发的规律，临床试验期间可能涉及  
58 不同程度的变更，在该种情况下，需结合产品变更的程度和类型，开展必要的药  
59 学可比性研究以进行质量桥接，必要时还需进行非临床或临床桥接研究。针对临  
60 床试验期间的变更，药学研究的基本原则是以不增加临床受试者安全性风险为前  
61 提，并用以说明前期研发数据能够用于支持后续临床试验的开展，并为产品最终  
62 上市提供充分的支持性数据。

63 上市申请时，基于前期对产品生产工艺和质量属性的理解和数据的积累，需  
64 确定产品的关键质量属性、关键工艺参数，完成工艺性能确认，并完成全面的工  
65 艺验证。完成全面的分析方法和方法学验证，根据临床期间多批次数据积累制定  
66 合理的质量标准。基于临床期间工艺变更情况，提供全面充分的可比性评估。本  
67 指导原则的主要内容将针对注册上市申请时提出相应的技术要求。

#### 68 四、风险评估和控制

69 溶瘤病毒产品生产用病毒类型较多、生物学特性和作用机制不同、基因设计  
70 和修饰也各有不同，因而导致不同的溶瘤病毒产品生产用细胞基质的选择、生产  
71 工艺和质量控制等各有不同，因此，对于不同类型的溶瘤病毒产品，可基于风险  
72 特征和特定控制措施，采用适合其产品的特有的技术要求。

73 基于目前的认知，溶瘤病毒产品质量相关风险包括：病毒类型较多，对病毒  
74 传染性、致病性和毒力等认识不足引入的潜在风险；病毒基因修饰和/或多次传代  
75 过程导致病毒发生回复突变、插入致细胞基因突变和细胞癌变的风险；生产用细  
76 胞基质来源和类型不同，由于对细胞基质认知不够充分、检定项目不够全面以及  
77 细胞基质残留 DNA 的风险；生产过程中添加的生产用原材料及辅料，尤其是动  
78 物/人源性材料检定不够充分以及新药用辅料使用的风险；生产工艺相关操作对  
79 病毒理化特性、感染性、生物学活性等产生不利影响的风险，以及生产工艺过程

80 中污染/交叉污染的风险；质量研究项目和方法因病毒类型不同而选择不同，如质  
81 量控制项目不够全面，以及涉及分子变异体、非完整包装病毒（如非包膜病毒、  
82 空壳病毒等）、生物学活性等分析方法变异性较大引入的风险；生产、储存和  
83 临床使用过程中对直接或间接接触人群的潜在风险（如接触产品生产的人员、检  
84 测人员、参与给药或患者护理的临床工作人员、可能与患者直接接触的家庭人员  
85 等），以及对动物、植物、微生物以及环境的潜在风险等。

86 基于以上风险分析，建议制定相应的风险控制方案。建议使用来源清晰、研  
87 究基础较好的病毒和细胞基质，对细胞库、病毒种子批、生产终末期细胞和限传  
88 代次病毒进行全面的检测和控制，对生产过程中使用的原材料尤其是动物/人源  
89 性材料应进行充分的病毒因子和微生物污染的控制。严格参照 GMP 要求进行操  
90 作和控制，防止生产过程中外源因子的污染和/或交叉污染，在生产过程中的关键  
91 节点进行病毒和微生物污染检测。基于产品特性和作用机制等进行全面的表征研  
92 究，分析方法建议采用分子生物学、物理化学和免疫学等一系列方法，并对使用  
93 的方法进行全面的验证研究。环境和生物安全应符合《中华人民共和国生物安全  
94 法》的相关要求。在产品开发和使用过程中，加强产品在生产过程（如废液处理）、  
95 临床使用、存储、处置等过程中对密切接触人群及环境的影响，可采用多种方式  
96 来降低环境风险，如设定合理的废物处理手段，在适当的生物防护条件下进行产  
97 品的处理，尽可能减少患者与易感人群或物种的接触，尽可能减少气雾形成的控  
98 制措施等。

## 99 五、生产用材料

100 本指导原则中生产用材料主要指用于制备溶瘤病毒产品的物质或材料，包括  
101 起始原材料（如病毒种子、细胞基质等）、其他原材料（如培养基及其添加成分、  
102 纯化试剂及耗材等）以及辅料等。

103 生产用材料直接关系到产品的安全性和有效性，应建立良好、规范的生产用  
104 材料的质量管理体系，并参照《中国药典》相关要求进行评估和质量控制。  
105 生产过程中使用的病毒和细胞基质应符合《中国药典》通则“生物制品生产检定  
106 用菌毒种管理及质量控制”和“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控

107 制”的相关要求；使用的原材料和辅料应符合《中国药典》通则“生物制品生产用  
108 原材料及辅料质量控制”的相关要求。应对可能影响产品安全性的所用材料在最  
109 终制品或工艺最适阶段中的残留情况进行研究和风险评估，并根据具体情况确定  
110 需要控制的残留限度。应尽可能避免使用动物或人源性材料，如必须使用应严格  
111 控制外源因子污染的风险。

## 112 1、起始原材料

### 113 1.1 病毒种子

#### 114 1.1.1 病毒选择的一般考虑

115 溶瘤病毒的选择一般应基于病毒研究历史、分子结构、生物学特性(致病性、  
116 宿主范围、嗜肿瘤特异性)、既往使用经验和安全性数据、作用机制、病毒载体  
117 设计成熟程度和研究基础、生产工艺规模的可放大性等进行充分的考虑，尤其使  
118 用目前认知尚不够充分的病毒株进行溶瘤病毒产品开发时，需要全面评估安全性  
119 风险并制定相应的控制策略。

120 目前用于溶瘤病毒产品开发的病毒常见于野生病毒、减毒病毒和基因修饰的  
121 病毒。选择用于生产的野生病毒或减毒病毒，建议提供来源、筛选和传代历史、  
122 肿瘤选择性、致病性、宿主范围、病毒结构和作用机制等研究数据，尽可能选择  
123 对病毒结构、活性及毒力方面有充分认知，具有相应的非临床安全性和有效性评  
124 价数据，以及一定临床使用基础的病毒。同时，减毒病毒还应结合其减毒操作开  
125 展其毒力评价试验和基因变异性研究。基因修饰病毒的目的主要包括提高病毒的  
126 肿瘤细胞选择性、肿瘤细胞杀伤活性、提高病毒的体内安全性等方面，常见的基  
127 因修饰包括：对病毒在正常细胞中复制所必需的关键基因进行突变，插入肿瘤特  
128 异性启动子以控制病毒早期基因表达，改变病毒组织趋向性或进入细胞的方式，  
129 病毒基因组中插入外源基因以提高免疫应答等。对于基因修饰溶瘤病毒，一方面  
130 需要开展相关的验证研究说明基因修饰后所达到的目的；另一方面需要开展研究  
131 说明基因编辑后感染活性、毒力和病毒致病性等方面是否具有产生非预期作用的  
132 风险，或在传代过程中回复突变为亲本病毒的风险等。同时，还应关注开发过程  
133 中野生病毒/基因组来源，携带病毒基因组及主要元件的来源、结构和序列，野生

134 病毒培养历史、生物学特性、宿主范围和致病性，基因编辑依据和操作过程，插  
135 入基因序列来源及获取操作过程，以及病毒种子筛选方法等。

### 136 **1.1.2 病毒种子批的建立和检定**

137 为了确保病毒种子的一致性、均一性以及生产产品的质量稳定性，生产用病  
138 毒应采用种子批系统管理。在病毒种子批建立过程中，原始病毒或病毒基因组应  
139 满足来源清晰、鉴定全面（如形态学检查、基因组序列分析等）、传代历史清楚  
140 等要求。在建库之前应采用相应的筛选技术确保种子批的一致性，可采用的技术  
141 或方法包括噬菌斑纯化、有限稀释或 DNA 或 RNA 克隆中恢复拯救等。

142 种子批建立过程中请尽可能避免使用高风险原材料（如动物/人源性材料等），  
143 如果经过生产工艺研究后确定需要使用高风险原材料，应对其进行充分的安全性  
144 评估和质量控制。病毒种子批建立后，结合验证研究，应选用合理的保存容器、  
145 冻存剂和冷冻保存条件等。种子批的层级（二级或三级种子批）和数量应满足生  
146 产的要求。

147 种子批检定项目应符合《中国药典》的相关规定，并根据病毒种子批自身特  
148 点设定相应的检测项目，建议结合病毒种子批建立过程使用的材料（如动物/人源  
149 性材料）、使用的细胞基质、病毒自身特性或基因修饰后理化特性进行设定。一  
150 般检定项目至少应包括鉴别（血清学、基因型、全病毒测序）、病毒滴度、微生  
151 物安全性（无菌、支原体、分枝杆菌（如适用））、内外源病毒因子、回复突变病  
152 毒、功能性检测（如肿瘤选择性、增殖能力、裂解细胞能力等）、抗病毒药物敏  
153 感性（如适用）、目的蛋白表达量（如适用）。外源病毒因子检测中，请特别关注  
154 结果的假阳性，必要时可加入中和抗体消除试验误差，同时为增加外源因子检测  
155 的敏感性，可增加聚合酶链反应（PCR）、基因测序技术等敏感检测技术排除外  
156 源因子。

### 157 **1.1.3 病毒种子批的传代稳定性**

158 为了证明病毒在传代过程中的稳定性，病毒种子批应开展规范的传代稳定性  
159 研究。传代研究条件应该符合实际生产条件或具有代表性。研究项目应至少涵盖  
160 遗传特性（全基因组测序）、生物学特性（病毒滴度、溶瘤活性等）和目的蛋白  
161 表达量（如适用）等，根据传代稳定性研究结果合理拟定病毒种子批的限传代次，  
162 并在实际生产过程中加以限定。需要关注的是，个别病毒种类在多次扩增传代后



163 易发生核苷酸甚至氨基酸突变等变异，如有此情况，请加强病毒的变异研究，采  
164 用灵敏的、可量化的检测方法识别病毒全基因组的所有突变，尤其关注改造区域  
165 或编码区域基因突变情况，充分评价突变对产品质量的影响。除另有规定外，应  
166 对主种子和生产限传代次病毒种子进行全基因组分析，病毒基因组的完整序列进  
167 行分析，或至少应确认重要区域（如目的基因和调控元件，以及被人为修改的任  
168 何区域及其侧翼至少 0.5kb 内的区域）的序列与理论预期相符。

## 169 1.2 细胞基质

### 170 1.2.1 细胞基质选择的一般考虑

171 细胞基质是指培养病毒时所使用的细胞，是生产溶瘤病毒必不可少的起始原  
172 材料，一般包括病毒种子批构建时使用的细胞基质和生产病毒过程中使用的细胞  
173 基质，两种细胞基质可能相同也可能不同，其选择和使用应具有一定的依据并符  
174 合相应的生产要求，任何细胞基质均应满足来源清晰、历史培养过程清楚、风险  
175 可控及经过全面检定的要求，以确保其适用性和安全性。

176 目前用于溶瘤病毒生产的细胞基质类型较多，在选择细胞基质前应进行研究  
177 和评估，一般包括细胞的种属及组织来源、细胞对病毒的敏感性、扩增病毒的稳  
178 定性、细胞的特性及全面检定的可行性、细胞对制品的安全性、生产工艺的便利  
179 性和可行性以及下游纯化工艺能够去除风险因素的可能性等。通常情况下，细胞  
180 基质一般包括原代细胞、传代细胞和人二倍体细胞，原代细胞和人二倍体细胞在  
181 疫苗生产中已应用多年，具有较好的安全性基础，采用该类细胞作为生产用细胞  
182 基质时，需要综合考虑其来源、历史培养情况是否满足安全性要求，并结合《中  
183 国药典》“生物制品的生产和检定用动物细胞基质制备及质量控制”和各论相关检  
184 定要求开展全面的质量评估。目前传代细胞在溶瘤病毒产品生产中普遍使用，常  
185 见肿瘤细胞系含有非预期基因序列和活性物质残留的风险，建议在使用时充分评  
186 估其潜在风险，并提供相关研究资料说明其使用的必要性、安全性和合理性，并  
187 在产品放行检测中严格控制其残留水平。使用含有内源性病毒的正常细胞连续传  
188 代衍生细胞系时，应充分鉴定和分析内源性病毒的种属和性质、是否具有感染性、  
189 与目前生产病毒在理化特性、抗性、颗粒大小方面的差异，并在生产工艺中采取  
190 有效的去除/灭活非目标病毒的步骤，同时对其残留量进行严格控制和安全性评

191 估；应避免使用本身携带内源性病毒且工艺过程无有效灭活/去除工艺的生产用  
192 细胞基质。使用正常细胞连续传代衍生细胞系时，应关注连续传代过程中成瘤性  
193 和/或致瘤性风险。

194 如采用的生产用细胞进行了基因修饰（如赋予病毒蛋白、允许病毒复制或包  
195 装等），需开展基因修饰的相关研究，包括基因修饰时所采用质粒、病毒、基因  
196 元件的质量控制研究资料，以确保产品的安全性和有效性。

### 197 **1.2.2 细胞基质建库和检定**

198 为了保证产品质量的一致性和均一性，细胞基质应建库管理。通常细胞库包  
199 括主细胞库和工作细胞库，具体请参照《中国药典》“生物制品生产检定用动物  
200 细胞制备及质量控程序”的相关要求规范建库和保存。

201 细胞库检定项目和要求应符合《中国药典》通则“生物制品生产检定用动物  
202 细胞基质制备及质量控制”，一般包括：鉴别、微生物安全、内外源病毒因子检  
203 测、染色体检查和成瘤性/致瘤性、插入序列的鉴别和完整性确认（如适用）等。  
204 具体的检定项目和要求可参照《中国药典》“生物制品生产检定用动物细胞制备  
205 及质量控程序”的相关要求等。一般情况下外源因子检测的最适宜方法会随外源  
206 因子、细胞基质来源和历史的不同而不同。根据细胞类型、产品的性质以及生产  
207 工艺，决定是否有必要采用染色体检查和成瘤性和/或致瘤性试验来评价二倍体  
208 细胞系的安全性或鉴定一个新的细胞系，具体的原则可参照 ICHQ5D。

### 209 **1.2.3 细胞基质的传代稳定性**

210 传代稳定性研究的目的是为了确保细胞基质可以稳定的生产预期质量一致  
211 的产品和贮存在规定条件下细胞可维持其生产能力。细胞库的传代稳定性研究条  
212 件应代表或模拟商业化生产工艺，其考察项目一般应考虑鉴别、微生物安全（如  
213 无菌、支原体等）、内外源病毒因子、特定外源病毒因子（如适用）、逆转录病毒、  
214 染色体检查（二倍体细胞）、细胞生长特性、病毒滴度等，同时需考虑细胞库随  
215 着传代代次增加成瘤性和/或致瘤性风险。根据研究结果制定细胞库限传代次，实  
216 际生产过程中应在细胞限传代次内进行病毒产品生产。

## 217 **2、其他生产用材料**

218 其他生产用原材料系指生产过程中使用的所有生物原材料和化学原材料，以

219 及使用的耗材，但不包括前面所述的起始原材料。生产过程中所使用的生物和化  
220 学原材料应符合《中国药典》通则“生物制品生产用原材料及辅料的质量控制”的  
221 相关要求，并在研究中充分评价其使用的必要性、合理性和安全性，原材料的质  
222 量应符合其预期用途，其选用需要考虑其来源、组成、用途和质量控制情况。对  
223 于风险较高的原材料，尽可能采用已经获得批准用于人体或符合中国药典要求的  
224 原材料；对于动物/人来源原材料或可能对产品产生非预期影响的原材料（如酶、  
225 抗体、细胞因子、血清、抗生素、微载体、片状载体、细胞培养过程中接触的  
226 生产设备或材料、去垢剂（细胞裂解缓冲液成份）、病毒稳定剂等）需要重点进行  
227 风险评估，明确使用的每种物质使用阶段及用量，对其预期用途的适用性进行评  
228 估，并在检测中严格控制该类材料的无菌、细菌内毒素和外源病毒因子等。对生  
229 产过程中添加的具有潜在毒性的外源物质，应对后续工艺去除效果进行验证，残  
230 留物检测及限度应符合相关规定。

231 生产过程中使用的耗材，如一次性生物反应器、滤器/滤膜等，应具有稳定的  
232 物理或化学特性，与直接接触的溶液、中间产物有较好的相容性。结合耗材的材  
233 质、使用阶段、供应商检测报告和生物相容性研究等因素综合评估使用耗材和容  
234 器的安全性，必要时应对耗材进行相应的相容性研究

### 235 3、辅料

236 制剂辅料需符合《中国药典》通则“生物制品生产用原材料及辅料的质量控  
237 制”的相关要求，优先选用符合药用标准的辅料，质量需满足其预期功能作用。  
238 产品中辅料的选择和用量应基于充分的制剂处方筛选研究和开发，尤其对于制剂  
239 处方中动物源性来源辅料的使用需开展充分的研究，已证明其使用的必要性、安  
240 全性和合理性。使用新药用辅料时，应提供其来源、生产工艺、质量研究和稳定  
241 性研究等资料，并结合动物毒理学试验研究结果和既往临床应用情况充分评估。

## 242 六、生产工艺

### 243 1、工艺开发

244 生产工艺开发的目的是为了建立一个可持续生产出预期质量产品的商业化  
245 生产工艺。应根据目标产品质量属性，进行充分的工艺开发、工艺研究和验证，  
246 建立稳健的生产工艺。

#### 247 1.1 原液生产工艺

248 原液生产工艺指从细胞培养、病毒感染、病毒扩增和收获及溶瘤病毒的纯化  
249 等一系列操作过程。研究中需结合病毒和细胞基质的特性采用适宜的培养方式，  
250 同时还应考虑培养工艺的操作便利性、技术成熟度、工艺的可放大性、病毒产率  
251 的可提高性以及污染的可控性等。

252 上游细胞培养和病毒收获工艺部分，需结合充分的工艺开发和研究，确定发  
253 酵和病毒收获工艺相关参数，如发酵规模和模式、培养时间、接种密度、病毒感  
254 染复数（MOI）、病毒收获方式和条件等，同时需确定培养过程中可能影响到产  
255 品质量的各工艺参数，如 pH 值、温度、溶氧、pCO<sub>2</sub> 等相关参数。下游纯化工  
256 艺开发时需充分考虑相关操作对病毒理化特性、感染性、生物学活性等产生不利  
257 影响的风险以及杂质去除效果等，对于产品生产过程中可能引入的其他病毒，需  
258 在纯化工艺中充分考虑去除/灭活非目的病毒的工艺步骤，并评估该工艺步骤可  
259 能对目标产品纯度、活性和生物学特性的影响。

#### 260 1.2 制剂生产工艺

261 制剂生产工艺一般指从纯化原液到最终制剂的生产过程。根据产品的特性  
262 （如作用机理、稳定性等）和临床使用情况开发产品的剂型、制剂处方和制剂工  
263 艺。制剂工艺研究中应考虑配制、除菌过滤、灌装以及任何相关的进一步冻干或  
264 冷冻等所有步骤。根据研究情况，明确关键工艺步骤和操作参数，生产过程控制  
265 和可接受标准等；明确生产规模和批次的定义，关注上下游规模的匹配性等。如

266 工艺过程中存在混批或分批的情况，需要开展充分的研究并制定相应的原则。在  
267 某些情况下，限于病毒的物理性质，制剂工艺过程中缺少除菌过滤步骤时，需加  
268 强工艺研究、验证并制定相应措施确保产品的无菌性。

### 269 1.3 工艺过程控制

270 生产工艺过程控制一般包括对工艺性能的评价、产品和相关杂质的控制以及  
271 微生物安全的控制，生产工艺性能评价应至少对细胞传代代次、生长速率和细胞  
272 活率等进行评价，并拟定合理的验收标准。在生产工艺中的合适阶段应开展病毒  
273 纯度、感染滴度和比活、以及影响产品生物学活性和转基因表达水平等的检测，  
274 并拟定合理的验收标准。微生物安全作为产品安全性保证的一个重要考虑，应在  
275 生产工艺过程的合适阶段进行微生物限度或无菌、细菌内毒素和支原体等安全性  
276 项目的控制，同时应在病毒收获液阶段进行病毒外源因子的中间控制并拟定验收  
277 标准，如病毒种子或收获液的外源病毒因子检查因制品病毒不能被充分中和而受  
278 到干扰的情况下，应在生产中设置对照细胞，对照细胞的外源病毒因子检查应符  
279 合现行《中国药典》的要求。

## 280 2、工艺验证

281 工艺验证的目的是证明一个生产工艺按照规定的工艺参数能够持续生产出  
282 符合预期用途和注册要求的产品，工艺验证应当包括首次验证、影响产品质量的  
283 重大变更后的验证、必要的再验证以及在产品生命周期中的持续工艺确认，以确  
284 保工艺始终处于验证状态。工艺开发结束时和原液、制剂生产工艺最终确定时，  
285 应考虑采用代表性工艺或商业化生产工艺进行验证，以证明生产工艺的一致性。  
286 一般情况下，建议采用实际工艺生产规模进行工艺验证。在某些情况下，如需要  
287 采用缩小规模进行验证，需对其进行全面论证，充分说明缩小规模的模型能代表  
288 商业化生产规模的生产工艺。建议选用多个批次进行验证研究，并考虑以下方面：  
289 验证工艺的复杂程度；工艺可变性水平；对于验证工艺的积累数据水平和/或工艺  
290 认知水平等。

291 如生产工艺过程中涉及到中间体暂存，需提供支持其暂存条件和时间的验证  
292 数据，同时结合产品工艺类型和特点还应考虑以下验证内容：生产环境和设施设

293 备验证、培养基/缓冲液制备和放置条件验证、层析柱使用寿命验证、过滤器验证、  
294 运输验证、无菌工艺模拟验证、清洁验证等。在完成商业化生产工艺验证后，还  
295 需进行持续的工艺确认与优化研究，以确保工艺处于受控状态。

### 296 3、工艺变更

297 生产工艺开发过程中不可避免会伴随着生产工艺的变更，在变更发生前，  
298 需要进行全面的评估与分析，结合变更的阶段、变更的类型、变更对产品质量属  
299 性的影响确定可比性研究的策略和范围，设计可比性研究方案。通过对变更前后  
300 数据的比较分析，以确定变更前后的可比性，必要时，可能还需开展非临床和  
301 /或临床研究。具体的原则和相关要求可参照 ICH Q5E 和变更相关技术指导原则。  
302 在不同研发阶段，获得的工艺研究和开发数据的了解程度和经验不同，工艺变化  
303 引入的风险程度也不同，因此，需要结合具体产品的具体情况，选用合理的研究  
304 方法和检测手段开展有针对性的研究。

## 305 七、质量研究和质量控制

### 306 1、质量研究

307 质量研究是保证产品质量和产品临床使用时安全性和有效性的前提，产品的  
308 质量研究应随着研究的深入不断完善并贯穿于产品的整个生命周期。质量研究需  
309 选择代表性工艺批次和适当生产阶段的样品作为研究对象，代表性批次，如非临  
310 床研究批次、中试批次、验证性临床批次和（或）商业化工艺批次等；生产阶段  
311 样品，如起始原材料、中间体、原液和成品。质量研究建议采用分子生物学和免  
312 疫学试验等一系列先进的正交技术进行特性鉴定研究和质量研究，采用的质量研  
313 究方法需要经过研究确认，具有可以接受的专属性、准确度等。质量研究项目需  
314 全面、充分，尽可能涵盖所有可能与产品安全性、有效性相关的特性，一般包括  
315 特性研究、效价、含量、纯度和杂质、一般特性、微生物安全等。

## 316 1.1 特性研究

317 建议采用多种先进的技术方法和手段对病毒基因组、病毒形态和结构等进行  
318 鉴别，一般对病毒基因组序列的研究可采用测序、限制性内切酶酶切、PCR 等方  
319 法进行分析。研究结果应可以证明重组病毒基因组、目的基因或调控基因特定序  
320 列的稳定性。如在基因组分析中发现基因序列的变化，应针对序列变化进行分子  
321 变异体的评估，可基于文献中报道，或根据其对蛋白质相互作用或功能的潜在影  
322 响的模型进行评估。

323 病毒形态和结构的鉴别一般在蛋白质水平和病毒颗粒完整性进行分析，常见  
324 的分析方法包括蛋白电泳、免疫印迹、免疫中和试验、病毒颗粒血清型鉴别、颗  
325 粒形态、颗粒大小及分布、聚集体和折光度等。

## 326 1.2 效价

327 根据产品的作用机制、生物学特性和基因修饰目的等至少建立一种可反映体  
328 内疗效的生物效价指标。一般效力检测应考虑病毒对肿瘤细胞的选择性和杀伤性，  
329 可采用体外测定方法评价产品对多种易感肿瘤细胞的毒性/裂解作用和/或复制能  
330 力等，但某些情况下，体外试验并不能完全反应产品的体内效应，可采用动物/人  
331 体肿瘤细胞原代培养物或动物体内检测方法等进行考察。在有些产品中，生物学  
332 活性检测需要结合转基因表达水平和生物学特性进行定量和定性分析。效价测定  
333 应采用相应的活性标准品或参比品，用于计算供试品的相对效价或作为对照。

## 334 1.3 含量

335 溶瘤病毒产品的含量一般采用生物学滴度和物理滴度进行控制，生物学滴度  
336 可采用噬斑形成单位（PFU）、半数组织/细胞培养感染剂量（TCID<sub>50</sub>/CCID<sub>50</sub>）  
337 等基于细胞的体外检测方法进行控制，物理滴度可采用物理、化学、生物物理等  
338 方法测定总颗粒数、基因拷贝数、病毒结构蛋白含量等，同时还应对比活进行控  
339 制，以确保批间一致性和工艺稳健性。对于生物学活性滴度测定用细胞建议对选  
340 择细胞的适用性进行分析，并尽可能建库管理。

#### 341 1.4 纯度和杂质

342 产品纯度和杂质的分析应结合病毒结构特点、生物学特性以及生产用原材料  
343 的使用等选择不同的分析方法、不同的检测策略和检测项目进行全面研究，由于  
344 病毒结构复杂、易变异及生物学特性不同，难以用单一的纯度指标对其均一性进  
345 行衡量，建议结合产品相关杂质和工艺相关杂质情况，以及病毒产品基因组鉴别、  
346 滴度、效价等指标，综合评价溶瘤病毒产品的纯度。

347 产品相关杂质一般指生产中产生的非功能性和非预期产物，一般包括分子变  
348 异体、非完整包装病毒（如非包膜病毒、空壳病毒等）、回复突变野生型病毒颗  
349 粒及病毒颗粒聚集体等，对于分子变异体的控制应采用适宜的分析方法关注改变  
350 产品复制选择性或溶瘤特性的潜在变异体，对于非预期病毒颗粒的控制应结合颗  
351 粒大小、生物学特性及理化特性等选择多种不同的分析方法如高效液相色谱法、  
352 流式细胞仪法、紫外分光光度计法等对产品相关杂质进行鉴定和分析，并评估其安  
353 全性风险。

354 工艺相关杂质主要来源于生产工艺本身，主要包括起始原材料来源（如残留  
355 宿主细胞 DNA 和残留宿主细胞蛋白等）、生产用原材料来源（如培养试剂、纯化  
356 试剂等）和设备材料来源（如工艺中的可浸出物和可提取物、色谱填料脱落物等）  
357 的杂质，应对潜在的工艺相关杂质进行鉴定、评估，并进行定性和/或定量分析，  
358 结合对工艺相关杂质残留水平进行进行安全性评估。对于宿主残留 DNA，一般  
359 建议对其残留量进行控制，生产若使用了致癌细胞系（如 HeLa 细胞），或携带致  
360 癌基因、病毒改造序列的细胞（如 293T 细胞，也称为 HEK293T），应采用更严  
361 格的控制策略，对残留量和片段大小进行控制，在确保无完整活细胞残留的同时，  
362 将 DNA 的残留量和残留片段大小控制在更严格的范围。另外，对于产品中已知  
363 的具有潜在安全性风险的特定转化序列，如 293T 细胞的 E1A、SV40 大 T 抗原  
364 序列，HeLa 细胞的 E6/E7 基因等，应分别进行残留控制。对于生产工艺过程中使  
365 用的细胞培养添加物（如牛血清）、核酸酶、细胞因子等应分别检测其残留量，  
366 并进行安全性评估。



## 367 1.5 一般特性

368 一般理化特性分析需结合产品类型及剂型不同进行控制，一般包括外观、颜  
369 色、澄清度、可见异物、不溶性微粒、pH 值、渗透压摩尔浓度、装量、水分、赋  
370 形剂等。

## 371 1.6 微生物安全

372 为控制生产过程中引入的污染物（如各种微生物、细菌内毒素等）的风险，  
373 应在生产工艺过程控制及质量研究中开展微生物安全相关项目的检测，一般包括  
374 无菌、细菌内毒素、支原体、异常毒性（如适用）等。如生产过程中使用了动物  
375 源性材料，还应结合材料来源对可能引入的外源病毒因子进行有针对性的特异性  
376 来源病毒因子的研究。

## 377 2、质量控制

378 质量控制广义上指对整体生产工艺的控制，包括生产用材料控制、工艺过程  
379 控制和产品质量控制，下述内容主要针对产品的质量控制，其他质量控制内容已  
380 在相关章节论述。由于不同产品生产工艺不同，需结合工艺特点针对不同阶段样  
381 品制定质量标准，一般包括原液、半成品（如有）和成品质量控制。质量控制一  
382 般包括检验项目、检验方法和标准限度，纳入质量控制的检定项目和验收标准应  
383 结合临床前和（或）临床研究时多批样品的数据、用于证明生产一致性批次的数  
384 据、稳定性等研究数据来综合确定。

385 检验项目一般根据产品特点、质量属性与工艺相关性、稳定性研究和安全性  
386 评估等综合确定，一般包括鉴别、一般检项、纯度和杂质、生物学活性和微生物  
387 安全等，根据制剂处方和剂型等不同，检测项目中还应考虑渗透压、不溶性微粒、  
388 可见异物、装量、水分残留、关键辅料含量等检项。

389 分析方法是产品质量控制的基础，为确保采用的分析方法适合于相应的检测  
390 要求应进行方法学验证。分析方法应随着产品研究进展逐渐完善，建议确证性临  
391 床试验用样品的质量控制与商业化生产时质量控制保持一致，如发生了方法变更，  
392 应对差异进行讨论和论证，并对新旧方法进行比较，以证明两种方法具有同等效

393 能。

394 为确保检测结果的可靠性和准确性，建议建立参比品/对照品，溶瘤病毒产品  
395 中使用参考品/对照品一般用于鉴别、理化和效价测定，在产品开发的各个阶段根  
396 据其预期用途，逐步开展参考品/对照品全面的质量研究、标定和稳定性研究。参  
397 考品/对照品的建立和制备可参照《中国药典》“生物制品国家标准物质制备和标  
398 定”的相关要求。

## 399 八、稳定性研究

400 参照《生物制品稳定性研究技术指导原则（试行）》和 ICH Q5C 的一般原则  
401 和相关要求进行，并根据产品自身的特点、临床用药的需求，以及保存、包装和  
402 运输的情况设计合理的研究方案。稳定性研究一般包括长期稳定性、加速稳定性、  
403 影响因素研究、运输稳定性和使用稳定性等。研究中需采用具有代表性的样本、  
404 包装容器和存储条件开展研究，根据产品自身的特点和存储条件等方面，合理地  
405 设计稳定性考察的项目和检测指标，考察项目中建议涵盖对产品有效性、安全性、  
406 稳定性有重要指示意义的检测项目，例如鉴别、滴度和比活、效价、杂质、一般  
407 检项、微生物安全等相关检项等。运输稳定性研究中，结合原液和制剂的实际运  
408 输环境和条件，开展模拟或实际运输过程中的稳定性考察。制剂使用中稳定性（复  
409 溶后或解冻后）研究，包括其与复溶所用稀释剂和给药装置的相容性稳定性研究，  
410 结合研究数据拟定合理的使用条件和时间。对于原液、制剂和生产过程中贮藏的  
411 任何中间体，需开展合理的储存稳定性研究，根据研究拟定贮藏条件和有效期。

## 412 九、包装及密闭容器系统

413 包装和密闭容器系统一般包括原液（如有）、半成品（如有）、制剂的包装容  
414 器。由于包装容器直接影响到产品的质量，在选用时，应考虑其功能性和安全性，  
415 以保证病毒产品质量稳定并符合临床使用的要求。申请临床试验时，建议提供容  
416 器密闭系统的来源、质量标准、生物安全性研究数据，并结合稳定性研究数据初  
417 步证明包装容器与产品的相容性。临床试验期间，应结合产品实际贮存条件，按

418 照相容性相关指导原则要求规范开展相容性研究，并在上市申请时提供全面的包  
419 材相容性研究数据。研究中应采用代表性工艺样品、包装容器和实际储存条件  
420 进行评估。

## 421 十、名词解释

422 **细胞基质：**指培养病毒时所使用的细胞，一般包括病毒种子批构建时使用的  
423 细胞基质和生产病毒过程中使用的细胞基质。

424 **原代细胞：**直接来源于动物组织直接进行培养的细胞，无需建立细胞库。

425 **传代细胞：**有无限生长能力的细胞，常被称作“永生化”细胞系。

426 **二倍体细胞：**染色体成双（整倍体）、体外有限寿命的细胞。

427 **对照细胞：**指生产/包装细胞模拟病毒生产工艺进行传代和培养，但不进行  
428 病毒感染等影响病毒外源因子检测的细胞培养物。

429 **比活：**指病毒物理滴度和生物学滴度的比值。

## 430 十一、参考文献

431 1. 国家食品药品监督管理总局. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试  
432 行), 2017.

433 2. 药品审评中心. 疫苗生产用细胞细胞基质的技术审评一般原则. 2005.

434 3. 药品审评中心. 生物制品稳定性研究技术指导原则（试行）. 2015.

435 4. 国家药典委员会. 《中华人民共和国药典》. 2020.

436 5. 药品审评中心. 生物制品稳定性研究技术指导原则（试行）. 2015.

437 6. EMA. On colytic Viruses. EMEA/CHMP/ICH/607698/2008.

438 7. EMA. Quality, preclinical and clinical aspects of gene therapy medicinal  
439 products. 2018.

440 8. EMA . Scientific requirements for the environmental risk assessment of gene-  
441 therapy medicinal products. 2008.

- 442 9. EMA. Position statement on the use of tumourigenic cells of human origin for  
443 the production of biological and biotechnological medicinal products. 2001.
- 444 10. Eur.P. Cell substrates for the production of vaccines for human use. 2018.
- 445 11. FDA. Chemistry, manufacturing, and control(CMC) information for human  
446 gene therapy investigation new drug application. 2020.
- 447 12. FDA. Characterization and qualification of cell substrates and other biological  
448 materials used in the production of viral vaccines for infectious disease  
449 indications. 2010.
- 450 13. FDA. Cell lines derived from human tumors for vaccine manufacture. 2012.
- 451 14. ICH Q5C. Stability testing of biotechnological and biological products. 1995.
- 452 15. ICH Q5D. Derivation and characterization of cell substrates used for  
453 production of biotechnological、 biological products. 1997.
- 454 16. ICH Q5E. Comparability of biotechnological、 biological products subject  
455 changes in their manufacturing process. 2004.

456  
457  
458