



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

生物技术-分析方法-细胞治疗产品的试验 和表征的一般要求及考虑因素

Biotechnology — Analytical methods — General requirements and considerations
for the testing and characterization of cellular therapeutic products

ISO 23033:2021(E)

（工作组讨论稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由××××提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引言

细胞治疗产品的出现增加了对高质量、稳健且经过验证的测量方法的需求，以表征和测试含有细胞作为活性物质的产品。这些产品由区域卫生当局监管，他们通过适当的生物、物理和化学测定（分析方法）评估产品质量属性（QA）。

分析方法用于细胞起始材料、过程测试以及产品一致性测试、可比性研究和稳定性测试中的一部分。这些分析方法用于评估与产品质量特征和制造控制（过程控制）相关的属性，并在临床研究和商业化的所有阶段确定身份、纯度、细胞计数、活力、效力和稳定性。质量属性用于确保只发布符合规定规格的产品批次。质量属性还用于稳定性测试和趋势分析以及过程指标。

分析方法还通过提供对生物作用机制的洞察并促进推动制造业发展的研发，来支持新细胞治疗产品的开发。此外，分析方法还用于评估和比较不同批次的细胞治疗产品，例如，这些产品是在不同日期、不同地点或通过改变的制造工艺生产的。

由于活细胞和细胞样本的复杂性和高度动态性、细胞类型和处理步骤的易损性不同、对基础细胞生物学缺乏了解以及与生物加工和测量过程相关的大量参数，定量测量细胞治疗产品具有挑战性。生物变异性进一步使测量复杂化。此外，不同的供体样本对处理步骤的敏感性可能不同，这使得在测量过程中进行过程控制的需求变得更加关键。

因此，分析方法是评估细胞治疗产品以及细胞起始材料和中间体的关键，尽管具体性能标准可能与最终细胞治疗产品的性能标准不同。

本文件提供了一种通用方法来设计适合目的的分析方法来测量和评估细胞治疗产品的质量属性。本文件的各个方面也适用于病毒、外泌体和抗体生产中所使用的细胞的测试和表征。选择和设计适合目的的分析方法的一般过程可应用于细胞起始材料、中间体、细胞最终产品、对照细胞、饲养细胞和用于测定的细胞（例如靶细胞）。它还提供了理解、最小化和监测变异源的一般方法。可接受的准确度和精密度水平由测量结果的生物学含义和测量过程的实际限制决定。

本文件还提供了为最终细胞治疗产品测试制定规范的一般考虑。还提供了为常见类别的关键质量属性（CQA）（即用于确定身份、细胞计数、纯度或杂质、效力或相关生物活性、活力、无菌性、稳定性和成熟度概况的属性）建立分析方法和分析策略（包括分析方法矩阵）的一般考虑。

该文件旨在为细胞表征提供额外的技术指导，并具体概述了细胞治疗产品表征和测试分析方法的战略发展方法（有关本文件中提出的概念的示意图，请参阅附件 A）。

生物技术-分析方法-细胞治疗产品的试验和表征的一般要求 及考虑因素

1 范围

本文件提供了用于人类的细胞治疗产品测试的一般要求。

本文件提供了细胞治疗产品表征的考虑因素，包括选择和设计适合目的的分析方法，考虑因素可用于确定细胞治疗产品的关键质量属性。

本文件适用于细胞起始材料（包括组织工程产品的起始材料）和细胞治疗产品的中间体。

本文件不适用于移植组织。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

验收标准 acceptance criteria

用于验收分析测试结果的数值限度、范围或其他适当检测，产品或者其他制造阶段的材料应满足这些要求

3.2

外源因子 adventitious agent

无意引入制造过程中的微生物

注 1：微生物可以包括细菌、真菌、支原体、螺原体、分枝杆菌、立克次体、原生动物、寄生虫、传染性海绵状脑病 (TSE) 病原体 and 病毒。

注 2：外源因子是细胞治疗产品杂质的一个子集 (3.15)。

3.3

分析方法 analytical method

定性、定量、评估目标实体（分析物）的存在、数量或功能活性的检测方法

3.4

分析目标概况 analytical target profile

ATP

规定测试方法 (3.52) 的性能标准 (3.34) 的预定义目标

注 1：ATP 规定了测试方法 (3.52) 产生的结果的质量要求。

3.5

辅助材料 ancillary material**AM**

在细胞处理过程中与细胞或组织产品接触但不会成为最终产品配方一部分的材料

注 1: AM 不包括非生物消耗品（例如组织培养瓶、袋子、管子、移液器、针头）和与细胞或组织接触的其他塑料器皿，但包括可能具有生物成分的消耗品（例如涂层培养皿或磁珠）。

注 2: AM 不包括饲养细胞（在制造过程中使用的细胞，但不属于细胞起始材料的一部分）。

注 3: 在某些情况下，AM 被描述为原材料。[来源：ISO/TS 20399-1:2018，3.1，修订版 — 注释 2 已缩减，排除了饲养细胞，并调整了相应示例。]

注 4: 就本文件而言，最终产品是细胞治疗产品(3.15)。

注 5: 生物材料和合成材料的性质及其对细胞的影响可能非常复杂。因此，假设合成材料比生物材料影响更小或更复杂是错误的。

3.6

面积密度 area density

细胞培养器皿表面粘附细胞的细胞计数 (3.14)，通常以单位面积上的细胞数表示[来源：ISO 20391-1:2018，3.4]

3.7

分析方法矩阵 analytical method matrix

两个或多个互补的分析方法 (3.3)，用于测量质量属性 (3.38) 的不同方面

3.8

属性 attribute

物理、化学、生物及微生物的特性或特征 [来源：ISO 20391-1:2018，3.5]

3.9

属性成分 attribute component

用于推导质量属性 (3.38) 的量值 (3.39)

3.10

生物活性 biological activity

产品实现特定生物学效应的特定能力或容量

注 1: 生物活性可能会因刺激而改变，例如化学、物理或机械刺激，以及时间和时间的其他变化。

3.11

生物特性 biological property

用于评估质量属性 (3.38) 的生物现象

3.12

校准 calibration

在第一步规定条件下，建立具有测量标准所提供的测量不确定的量值 (3.39) 和具有相关测量不确

定度的相应指示之间的关系，并在第二步中使用该信息建立用于从指示中获得测量结果的关系。[来源：ISO/IEC 指南 99:2007，2.39，修订版 - 注释已删除。]

3.13

细胞浓度 cell concentration

每体积细胞计数（3.14）

注 1：通常用于悬浮细胞。[来源：ISO 20391-1:2018，3.6]

3.14

细胞计数 cell count

离散的细胞数

注 1：细胞计数通常表示为细胞浓度（3.13）或面积密度（3.6）。[来源：ISO 20391-1:2018，3.7]

3.15

细胞治疗产品 cellular therapeutic product

含有细胞作为活性物质的产品[来源：ISO/TS 20399-1:2018，3.5，修订版 - 示例已删除。]

注 1：以下是细胞治疗产品的示例：

- a) 一种细胞治疗药物；
- b) 一种组织工程产品。

3.16

细胞起始材料 cellular starting material

存在于细胞治疗产品（3.15）制造过程开始时的活细胞和功能性细胞材料

注 1：还有其他类型的起始材料也与细胞治疗产品（3.15）相关。

3.17

经过认证的参考物质 certified reference material

以一个或多个指定属性，可以用计量学有效测试表征的参考材料，并附有 RM 证书，该证书提供指定属性的值、其相关的不确定度和计量可追溯性说明[来源：ISO 指南 33:2015，3.2]

3.18

可比性 comparable

产品在制造工艺变更前具有高度相似的质量属性（3.38），对药品的安全性或有效性，包括药品的免疫原性，没有产生不良影响的结论

注 1：此结论可以基于对产品质量属性（3.38）的分析。在某些情况下，非临床或临床数据可以有助于得出结论。

3.19

污染物 contaminant

任何不打算成为药物或药品制造工艺一部分的外来引入材料

注 1：外来引入的材料可以是化学、生物化学或微生物种类的。

3.20

关键质量属性 critical quality attribute

CQA

物理、化学、生物和微生物特性或特征，应在适当的限度、范围或分布内，确保产品所需的质量和一致性

注 1：CQA 通常与产品的临床功效和安全性有关。

3.21

最终细胞治疗产品 final cellular therapeutic product

用于人体给药的细胞治疗产品（3.15）

3.22

符合预期 fit for purpose

适合于预期用途 fitness for the intended purpose

符合预期用途要求（3.26）[来源：ISO 20387:2018，3.24，修订版 - 注释已删除。]

3.23

杂质 impurity

产品中存在的任何非预期产品、与产品有关的物质或辅料(包括缓冲成分)。

注 1：杂质可以是工艺过程相关的，也可以是与产品相关的。

3.24

内部标准物质 in-house reference material

由一个实验室生产的未经认证的材料或物质，其一个或多个属性值足够均匀且已得到充分确定，可用于预期用途（3.26）

注 1：内部标准物质的使用可以包括但不限于验证（3.54）、校准（3.12）、监测可比性和效力（3.36）以及过程评估。[来源：ISO 16140-1: 2016，2.32，修订版 - “验证”替换为“预期用途”，添加注释。]

3.25

安装确认 installation qualification

IQ

通过客观证据确定工艺设备和辅助系统安装的所有关键方面均符合制造商批准的规范（3.50），并且适当考虑了设备供应商的建议

3.26

预期用途 intended use

预期目的 intended purpose

根据制造商或用户提供的规范（3.50）、说明、信息中的一个或多个，将产品、工艺或服务用于该用途 [来源：ISO/IEC 指南 63:2019，3.4，修订版——在定义中增加了新术语以及“一个或多个”和“或用户”；“和”被“或”取代。]

3.27

中间体 intermediate

制造过程中名义上介于两个操作单元之间的材料

3.28

中间精密度 intermediate precision

在一组中间精密度条件下的测量精度（3.37）[来源：ISO/IEC 指南 99:2007，2.23，经修改——从术语中删除“测量”，注释已删除。]

注 1：中间精度条件是指一组条件，包括相同的测量、相同的位置以及在较长时间内对相同或相似物体进行的重复测量，但可以包括涉及变化的其他条件（例如分析人员或仪器）。

3.29

检测限 limit of detection

样品中可以检测到的分析物的最低量（3.46），但不一定能定量为准确值

3.30

定量限 limit of quantitation

样品中可以以适当的精度（3.37）和准确度定量测定的分析物的最低量（3.46）

注 1：定量限是样品基质中低含量化合物的定量分析方法的参数，特别用于测定杂质（3.23）或降解产物，或两者兼而有之。

3.31

测量目标 measurement target

预期的测量对象

注 1：测量目标可以表示细胞的一个或多个复杂特征，这些特征可以提供细胞状态或质量的信息。在不适当或不使用被分析物或被测量物的情况下，该术语是对这些术语的补充。

3.32

标称特性 nominal property

一种现象、物体或物质的特性，该特性没有量纲 [来源：ISO/IEC 指南 99:2007，1.30，已修改——注释和示例已删除。]

注 1：测量目标的标称特性是可以描述，但不能用量值来量纲化。

3.33

操作确认 operational qualification

OQ

通过客观证据确定控制范围和行动水平，，从而建立符合所有预期的分析方法（3.3）

3.34

性能标准 performance criteria

测试方法（3.52）所需的功能和操作方式

3.35

性能确认 performance qualification

PQ

通过客观证据确定分析方法（3.3）在预期条件下始终符合所有的要求

3.36

效力 potency

使用适当的定量分析方法（3.3），基于与相关生物学特性（3.11）相关的产品属性（3.8）测量生物活性（3.10），

3.37

精密度 precision

在指定条件下对相同或相似物体进行重复测量，获得的指示值或测量量值（3.39）之间的一致性接近程度

注 1：精密度通常用数字表示，即在规定的测量条件下，用标准差、方差或变异系数等非精密度的量度。

注 2：“规定条件”可以是测量的重复性条件、测量的中间精密度条件或测量的重现性条件。[来源：ISO/IEC 指南 99:2007，2.15，修改——删除了术语“测量精度”。注释 3 和 4 被删除。]

注释 3：测量量值(3.39)是指代表测量结果的量值(3.39)。

3.38

质量属性 quality attribute

物理、化学、生物和微生物特性或特征，是质量的指标

3.39

量值 quantity

可以用数字和标准物质表示的具有一定量值的物质的属性[来源：ISO/IEC 指南 99:2007，1.1，修订——注释、示例和“现象、主体或”被删除。]

3.40

参考物质 reference material

在特定属性方面足够均匀和稳定的材料，已确定适合其在测量或检查标称特性中的预期用途（3.32）[来源：ISO/IEC 指南 99:2007，5.13，修订——注释和示例被删除。]

3.41

重复性 repeatability

在一组重复性测量条件下的测量精度（3.37）[来源：ISO/IEC 指南 99:2007，2.21，修订——术语“测量重复性”删除。]

注 1：测量的重复性条件是指在一组测定中，采用相同的测量、相同的操作人员、相同的测量系统、相同的操作条件和相同的位置，在短时间内对相同或相似的物体进行重复测量的测量条件。

3.42

代表性样品 representative sample

准确代表或反映系统属性（3.8）的样品（3.46）

注 1：通常旨在提供有关系统的信息，通常作为对系统或其生产的决策基础。

3.43

再现性 reproducibility

再现性测量条件下的测量精度 (3.37) [来源: ISO/IEC 指南 99:2007, 2.25, 修订 - 注释和术语“测量再现性”已删除。]

注 1: 再现性测量条件是指在包括不同位置、操作员、测量系统和对相同或相似物体进行重复测量的测量条件。

3.44

稳健性 robustness

衡量测试方法 (3.52) 不受方法参数细微但有意变化影响的能力, 并指示其在正常使用过程中的可靠性

3.45

耐用性 ruggedness

在各种正常测试条件下分析相同样品 (3.46) 所获得的测试结果的可重复性 (3.43) 程度

注 1: 正常测试条件可以包括: 不同的实验室、不同的分析人员、不同的仪器、不同的试剂批次、不同的分析天数、不同的耗时、不同的温度等。

3.46

样品 sample

从系统中取出的一个或多个部分

3.47

灵敏度 sensitivity

测量系统指示的变化与被测量量值 (3.39) 相应变化之间的比值 [来源: ISO/IEC 指南 99:2007, 4.12, 已修改——注释和术语“测量系统的灵敏度”已删除。]

3.48

专属性 specificity

测试方法 (3.52) 的特性, 从定性和定量表示其在不受伴随物种干扰的情况下检测或确定单个分析物的能力

注 1: 专属性随灵敏度 (3.47) 和分析物数量的增加而增加, 并随交叉敏感性和伴随物种数量的增加以及干扰效应的增大而降低。

3.49

保质期 shelf life

细胞治疗产品 (3.15) 可以保持其预期用途适用性的特定时间段 (3.26)

3.50

规范 specification

测试列表、分析程序参考和适当的验收标准 (3.1), 证明其对预期用途的适用性 (3.26) [来源: ISO/TS 20399-1:2018, 3.9, 修订 - 将“预期用途定义”替换为“预期用途”。]

3.51

稳定性 stability

材料在特定条件下储存时，在特定时间内将所述属性的值保持在特定限度内的特性 [来源：ISO/TS 20399-1:2018，3.10]

3.52

测试方法 test method

与特定分析方法一起使用的技术程序（3.3）

3.53

治疗细胞 therapeutic cells

治疗产品中发挥治疗效果所需的细胞

注 1：有时称为细胞活性物质。

3.54

确认 validation

通过提供客观证据，确认特定预期用途或应用的要求已得到满足 [来源：ISO 9000:2015，3.8.13，修改 - 注释已删除。]

3.55

验证 verification

通过提供客观证据，确认特定要求已得到满足 [来源：ISO 9000:2015，3.8.12，修改 - 注释已删除。]

3.56

活细胞 viable cells

样本（3.46）中的细胞，具有基于预期用途（3.26）定义的活性属性（3.8）（例如，具有代谢活性、能够增殖、拥有完整的细胞膜或具有恢复这些功能的能力）[来源：ISO 20391-1:2018，3.29]

4 细胞起始材料

细胞的来源和生物加工对细胞治疗产品的质量属性有着重要的影响。这是由于供体之间的差异和细胞起始材料的细胞状态不同所致。

应记录可能影响分析方法设计和获取数据评估的细胞起始材料信息。至少应提供以下信息：

- a) 人类供体数据和材料的同意书；
- b) 供体的病史以及对供体进行的病毒和微生物感染检测分析的结果。

注 1：记录细胞来源的细节并不须详尽无遗。例如，根据具体应用，可以提供允许跟踪和追溯细胞起始材料的文档。

应记录细胞生物加工过程的各个方面。细胞培养历史的记录可以包括：

- 1) 收获细胞的组织来源；
- 2) 分离的解剖部位；
- 3) 用于细胞分离的方法；

- 4) 种群倍增次数、传代次数和培养总时间；
- 5) 使用的辅助材料（例如培养基）和基质材料；
- 6) 用于确定身份的属性的分析结果；
- 7) 外来（污染）物质的分析结果；
- 8) 保存历史（例如冷冻和解冻）；
- 9) 对于扩增细胞，其他详细信息，例如接种密度和传代培养时的汇合度；
- 10) 核型检测结果（针对性别和染色体丢失）。

应确定确保生物安全的测试方法。

注 2：细胞中的传染性物质或有毒物质会影响进行分析人员的生物安全。

进行分析研究的个人或组织应了解与细胞起始材料有关的国家、地区和国际认可的相关伦理、法律和法规。

注 3：相关法规的示例包括欧盟法规 2004/23/EC^[15]、欧盟法规 2006/17/EC^[16] 和欧盟法规 2006/86/EC^[17]。

5 质量属性评估的适合分析方法的设计

5.1 一般概念

细胞治疗产品应通过一组属性（特性）来描述，这些属性（特性）可用于：

- a) 确保质量（安全性和有效性）；
- b) 定义产品规范；
- c) 确定身份。

这些属性通常称为关键质量属性（CQA），理想情况下与预期的临床结果、作用机制（MOA）或产品安全性相关。应使用已确认适合目的的分析方法来表征给定的细胞治疗产品的质量属性。如果这些分析方法被用作细胞治疗产品制造的常规测试方法，则应对其进行验证。

细胞治疗产品的 CQA 应包括一组与以下内容相关的质量属性：

- 1) 身份特征；
- 2) 细胞计数；
- 3) 细胞活力；
- 4) 纯度或杂质；
- 5) 效力或相关的生物活性；
- 6) 稳定性；
- 7) 微生物含量

注1：每种细胞治疗产品通常都有一套基于产品预期用途或MOA，甚至两者兼有的CQA。因为细胞治疗产品是复杂的、动态的，而且往往是由活细胞、非活性细胞、细胞的衍生物（例如外泌体和细胞因子）以及活性或非活性物质或两者混合而成。

在实践中，CQA是基于全面的研发以及临床前和临床数据的质量属性来定义的。细胞治疗产品的特性的分析方法应在产品开发过程中加以改进。通常，质量属性的关键性质在确定质量属性与患者结果的相关性的临床数据之前是不确定的。评估工艺变化对产品质量的影响的可比性研究也需要重新考虑CQA及其应用。

识别相关的质量属性通常需要采用一种基于风险的方法，以确保要评估的属性是可控的和有意义的。分析方法有望在开发过程中不断发展，并随着整个产品生命周期的新理解而不断改进（请参见附录A）。

注2：本文件中，描述细胞治疗产品的属性被称为质量属性，但在某些情况下，这些质量属性可以在产品开发过程中被确认为关键属性。

产品测试和测试策略的制定是确保生产过程和一致性的重要组成部分（见附录A）。

测试可以在整个生产过程中进行，包括对细胞库的建立，以评估生产过程本身并确保产品的质量和一致性。

在细胞治疗产品开发的不同阶段和细胞治疗产品的不同生产步骤（例如细胞起始材料、过程中和最终产品测试）中，质量控制要求可能是不同的。分析方法的选择、设计和优化应从特定细胞治疗产品的开发方案开始。该开发方案部分是收集关于各批次细胞起始材料的特征和相应的预期目的的数据的过程，以便确保细胞治疗产品中的治疗细胞的质量。这提供了与细胞本身相关的差异性数据，以及由于分析方法测量过程而产生的差异性数据。这些数据通常构成最终产品规范范围的合理性的一部分。

来自开发方案的特征数据应用于建立质量属性，这些质量属性旨在对每一批细胞起始材料和细胞治疗产品进行评估。在开发过程中进行的额外特征分析为扩展特性提供了基础，以确认对细胞起始材料（例如，新的工作细胞库、不同的活检位置或程序）的变化没有改变细胞治疗最终产品的质量。

5.2 分析方法设计探讨

在可能的情况下，应采用系统的方法进行分析方法设计，以满足质量属性所必需的测量的具体目标。系统的方法可以包括确定具体的测量目标、分析方法的选择和鉴定、减少测量差异性的来源、定义一个设计空间，以确保对分析方法的可信度、控制策略和持续不断的改进，来提高分析方法的稳健性和对分析方法设计空间的理解。

注：这种分析方法设计的系统方法有时被称为分析方法的质量设计（Quality by Design, QbD）。QbD方法有利于分析方法的改进和优化。

分析方法开发过程可以是一个迭代过程，涉及到产品开发的不同阶段的持续改进。这一过程得益于对与生物学活性的联系的更多了解，并最终促进开发出适当的分析方法，以评估产品的效力或相关的生物学活性。这一过程还得益于了解产品的异质性及其与供体差异的潜在关系，以及与生产过程中相关的影响。分析方法的发展始于对各种分析方法的鉴定，并逐步走向验证，同时也考虑到正在进行的分析方法验证。仪器硬件的鉴定也是这一过程中不可或缺的一部分，例如仪器安装确认（IQ）和操作确认（OQ）。支持分析方法开发的基本原理应该考虑正在开发的表征方法与其如何评估细胞治疗产品的预期生物活性之间的关系（见附录A）。

5.3 通过考虑细胞治疗产品的成分来定义质量属性

在产品开发过程中，应尽早确定对细胞治疗产品的生产控制和产品放行具有重要意义的质量属性。这些属性很可能是基于定义细胞治疗产品的有效性和安全性的科学假设。

评估每种质量属性的适当分析方法和数据取决于细胞治疗产品的成分。质量属性可以依赖于细胞治疗产品的一个或多个成分的量化^[12]。

在定义质量属性测量时需要考虑的细胞治疗产品的成分可以大致描述为治疗细胞、残余杂质和其他杂质、以及辅料或悬浮培养基(包括转移培养基)(见图1)^[12]。同样重要的是还要考虑细胞群体的复杂性及其不同的来源,这些复杂性直接关系到产品在确定属性测量时的安全性和有效性(或效力)。

细胞治疗产品的每一类成分都可以细分为更多的子类别。

细胞治疗产品中的细胞成分可以根据细胞的属性进一步分类为用户自定义的细胞群。这些属性可以包括但不限于:

- a) 基因组特征;
- b) 功能;
- c) 形态;
- d) 细胞周期;
- e) 活力;
- f) 特定生物标记物;
- g) 细胞动力学;
- h) 表型

由于细胞具有异质性,因此测量的属性应被视为存在于一个光谱中,这可能会影响其属性的变化。细胞治疗产品中用户定义的细胞群的纳入和排除标准应加以规定和记录。

悬浮培养基可包括生物或化学来源的材料,或者两者兼有,以及其他添加剂(例如防腐剂)。

辅料的定义和注意事项载于ISO/TS 20399-1、ISO/TS 20399-2和ISO/TS 20399-3。

注1:辅料的残留会影响最终产品的安全性、效力和纯度。

潜在的杂质可以包括但不限于生物杂质(例如,非预期的细胞和细胞成分)、外来物(例如内毒素、细菌和病毒污染物)、溶解性气体和挥发物以及非生物杂质(例如可萃取物、可浸出物和其他非生物污染物)。

注2:生物杂质可能是制造过程中的副产品。

注3:识别不同细胞群的标准是用户自定义的,也取决于分析方法的灵敏度和选择性的限制。由于细胞群异质性的持续性,细胞亚群之间可能存在潜在的重叠。

注4:种群具有高度的异质性和可塑性。

细胞样品组成

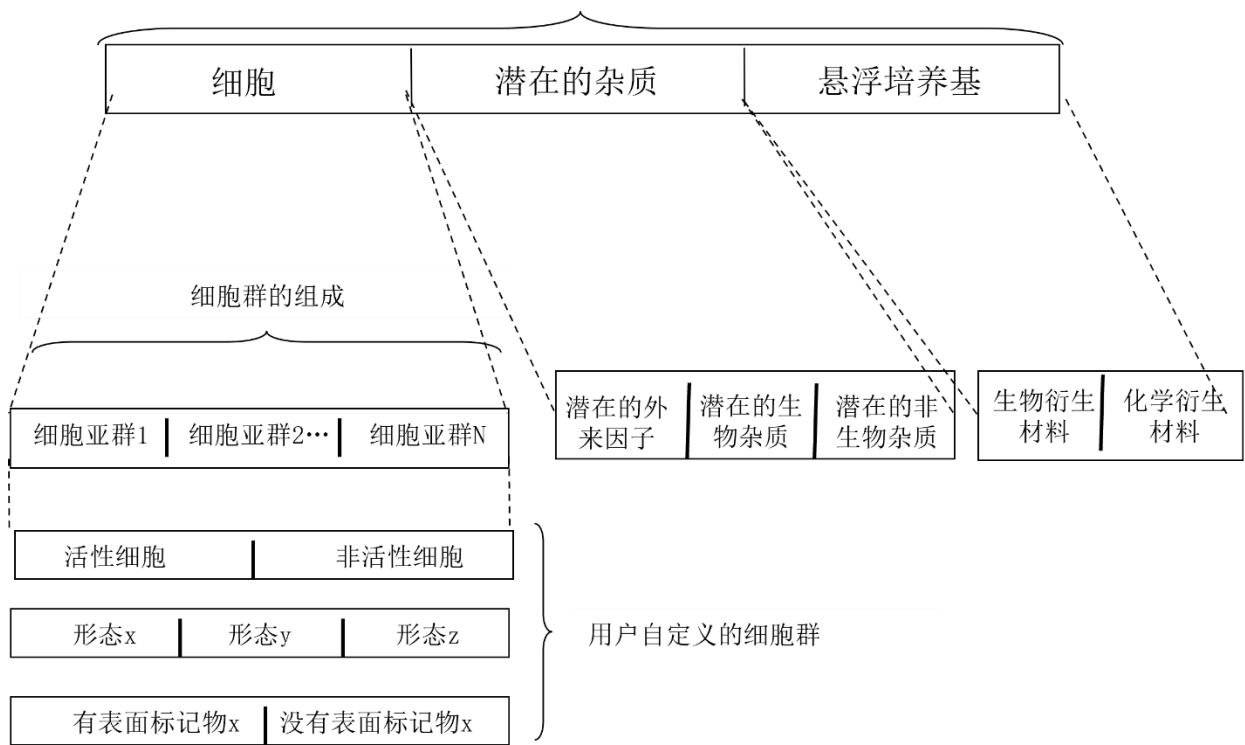


图1-细胞治疗产品在某一时期的成分和子成分示例

质量属性通常表示为特定细胞治疗产品的特定成分的量化。例如，用于建立标识的属性可以由一个或多个成分定义，包括用户自定义的细胞群，并进一步允许对命名成分进行量化。同样，纯度或杂质可以通过评估已被确定为潜在杂质的成分来衡量。

在设计和选择适当的分析方法时，应列出并考虑细胞治疗产品的成分。

在分析方法的设计和选择中，考虑分析方法的目的和分析方法性能的适宜性是很有必要的。

建立质量属性及其检测方法的过程应包括：

- 1) 说明感兴趣的具体质量属性；
- 2) 说明质量属性的预期用途(例如过程中测试、放行测试)；
- 3) 列出质量属性组成(如果指定的质量属性来自多个数量)；
- 4) 确定用于评估质量属性的生物学特性；
- 5) 描述为评价选定的生物学特性而建立的分析方法；
- 6) 描述分析对象概况：
 - 列出所选分析方法的测量对象；
 - 描述分析方法的性能标准。

表1给出了一个用于建立细胞活力的质量属性的例子。

—表1-建立质量属性及其分析方法的过程示例

质量属性	质量属性描述	预期用途	属性组分	生物特性	分析方法	分析目标概况	
						计量指标	性能标准

细胞活 率%	$V = 100 \times \frac{Nt - Nn}{Nt}$ <p>式中 V是细胞存活率%； Nt是细胞总数； Nn是非活性细胞的数目。</p>	放行测试	细胞总数	含有核的细胞	直接细胞 计数法： 基于成像 的吖啶橙 和DAPI染 料排除法	吖啶橙 染色的 细胞	灵敏度 精确度 比例性 特异性
			非活性细胞 的数目	具有膜渗透 染料活性的 细胞		吖啶橙 和DAPI 染色的 细胞	

5.4 分析方法矩阵的设计

在某些情况下，单一的分析方法无法对给定的QA提供足够的度量。如果一种分析方法不够，应使用多种互补的分析方法来衡量质量属性的不同方面。

这种分析方法的集合(或分析方法矩阵)可以由生物和非生物测量的组合构成，或者仅由非生物测量方法组成。分析方法矩阵可以包括给出定量读数(例如浓度)或标称读数(例如通过或不通过)，或两者的分析方法。

例1：活力分析方法矩阵可以通过包括一个或多个膜透性染料和代谢活性进行测定。

分析方法矩阵中包括的分析方法应在可比样本上进行，以确保所生成数据具有相互操作性。

分析方法矩阵中的结果不一定总是线性相关的。如果两种分析方法测量不同的测量对象，探测到不同的生物学特征，则结果可以解释为累积性的，而不是确认性的。

例2：不定期期望由细胞膜完整的细胞数量和代谢活性决定相同的活细胞数。相反，综合的结果提供了对细胞活力不同方面的更全面的理解。

如果将定性方法作为分析方法矩阵的一部分，以确定用于批次放行、稳定性或可比性研究的质量属性，则应辅之以一种或多种定量方法，尽管在某些情况下，如支原体或病毒制剂的PCR，定性的结果可能就已经足够。

5.5 一种适用于实际应用的分析方法的设计

明确界定的质量属性以及对其预期用途的明确理解指导了具有生物相关性和适当性能标准的分析方法(例如，选择性、灵敏度、精密度、准确性、稳健性、范围)的设计，从而能够作出后续的决策，形成适合预期目的的的分析方法。

分析方法的预期用途指导测量的目的要求。

分析方法的测量对象通常表示用于评估与质量属性相关的生物学特性的替代度量。

当无法获得直接评估生物学特性的分析方法时，应选择一种分析方法，使测量对象尽可能地与生物学特性密切相关。

该分析方法对测量对象具有较高的特异性，不受细胞样品中其他成分的明显干扰。

分析方法应足够灵敏，可以检测最小的相关量，从而使用统计方法识别质量属性的相关变化。

分析方法应足够稳健，使结果不会受到用户为预期目的而定义的测量过程中的微小变化(例如温度波动、微小的样本处理波动)的显著影响。

分析方法还应对测量对象足够稳健，使其结果不会受到细胞样本其他成分(如血清浓度、冷冻保护剂的存在、不同批次的分析试剂)的微小变化的显著影响。

注：在生产过程中，来自不同点的细胞样品可能有差异较大的成分。在这种情况下，由于细胞样品成分的不同，细胞样品可以进行单独的鉴定和验证。另外，还可以使用不同的分析方法来评估生产过程中不同点的细胞样品的质量属性。

适当的分析方法设计应包括测试方法的性能标准和确保测量质量的策略。这可以包括合并重复测量，使用样本随机化来减少偏差，以及使用适当的测量控制和测量控制策略。

5.6 仪器的选择

应选择适用于测试方法的仪器，包括硬件和软件。仪器应能执行选定的测试方法。

可对包括软件在内的仪器的规范进行评估，并作为选择的依据。

仪器应由用户进行评估。一种分析方法的性能应通过使用适当制备的校准物或标准物质进行重复测量来确定检测限、定量限和分析方法的动态范围来评价。分析方法的校准应显示出适当的动态范围，以便测量结果与预期的测量目标成比例。测量方法应在代表待测细胞样品（即代表性样品）的试验材料上进行。

性能标准应包括：

- a) 特异性；
- b) 灵敏度；
- c) 范围；
- d) 线性或比例性；
- e) 可重复性；
- f) 准确性；
- g) 可用性测试。

评估也可以基于现有方法或参考计量程序，或两者兼而有之的可比性结果。

注：如果现有方法的准确度未知，或者现有方法的精密度不高，或者两者兼而有之，那么分析方法结果与现有方法的可比性并不能保证该方法的质量。

关于选择仪器的其他考虑因素可以包括但不限于以下几点：

- 1) 仪器成本；
- 2) 每次测量的成本；
- 3) 所需样品量；
- 4) 易用性；
- 5) 分析方法运行时间；
- 6) 数据记录或可用性；
- 7) 关于遵守地方监管要求的信息（例如，现行药品生产管理规范“cGMP”^[21]）；
- 8) 试剂要求或供应情况；
- 9) 耗材要求或供应情况；
- 10) 不同样品类型的通用性；
- 11) 多功能性，可运行不同的分析方法；
- 12) 分析参数的优化能力；
- 13) 样品制备要求；
- 14) 内置控制策略；
- 15) 仪器与仪器之间的差异性；
- 16) 操作人员与操作人员之间的差异性；
- 17) 转化良好（例如可接驳自动化设备）；
- 18) 对方法的历史优先级或信任度；
- 19) 校准和维护需求；
- 20) 客户支持。

5.7 仪器鉴定与维护

选定的仪器，包括硬件和软件，应根据验证文件中预先确定的程序，验证仪器是否具有满足要求的能力。

验证包括但不限于：

- a) 安装确认 (IQ)；
- b) 操作确认 (OQ)；
- c) 性能确认 (PQ)。

IQ和OQ应由仪器制造商进行。PQ应使用具有代表性的测试样本进行。

重大维护或仪器维修后应对仪器进行重新验证。

仪器须妥善保管。

仪器和软件应定期维护，并在必要时进行校准。

注1：在规定的条件下，校准首先在测量标准提供的测量不确定值与具有相关测量不确定度的相应指示之间建立关系。其次，利用这些信息建立一个用于从指示中获得测量结果的关系。

注2：校准可以用语言描述、校准函数、校准图、校准曲线或校准表来表示。在某些情况下，它可以由具有相关测量不确定性的指示的加法或乘法修正组成。

应保存校准、鉴定和维护记录。

应确保仪器和分析方法所需耗材的供应。

5.8 管理细胞测量的测量差异性来源

5.8.1 概述

图2显示了一个通用的细胞测量过程。该过程由三个一般阶段组成：

- a) 预分析阶段，包括在分析实验室收到样品之前进行的样品处理。
- b) 分析阶段，通常指的是最终提供结果的“实际”的实验室测试程序、过程和产品。
- c) 分析后阶段，产生最终值、结果或报告，或其中的多个。

预分析阶段可以包括样品的选择和收集，以及样品的处理、储存和运输。分析阶段可以包括细胞的混合、稀释和染色、取样以及数据收集。后分析阶段可以包括数据分析，这些数据分析可以或不需要额外的用户输入来设置参数。每个阶段都可以引入可变性的来源从而影响测量结果。

应实施控制战略，以管理每个分析阶段的可变性来源。控制策略可以包括(但不限于)分析方法验证、过程中测量控制的结合、参考材料的使用以及使用实验设计来系统地检查测量过程的质量^[13、14]。

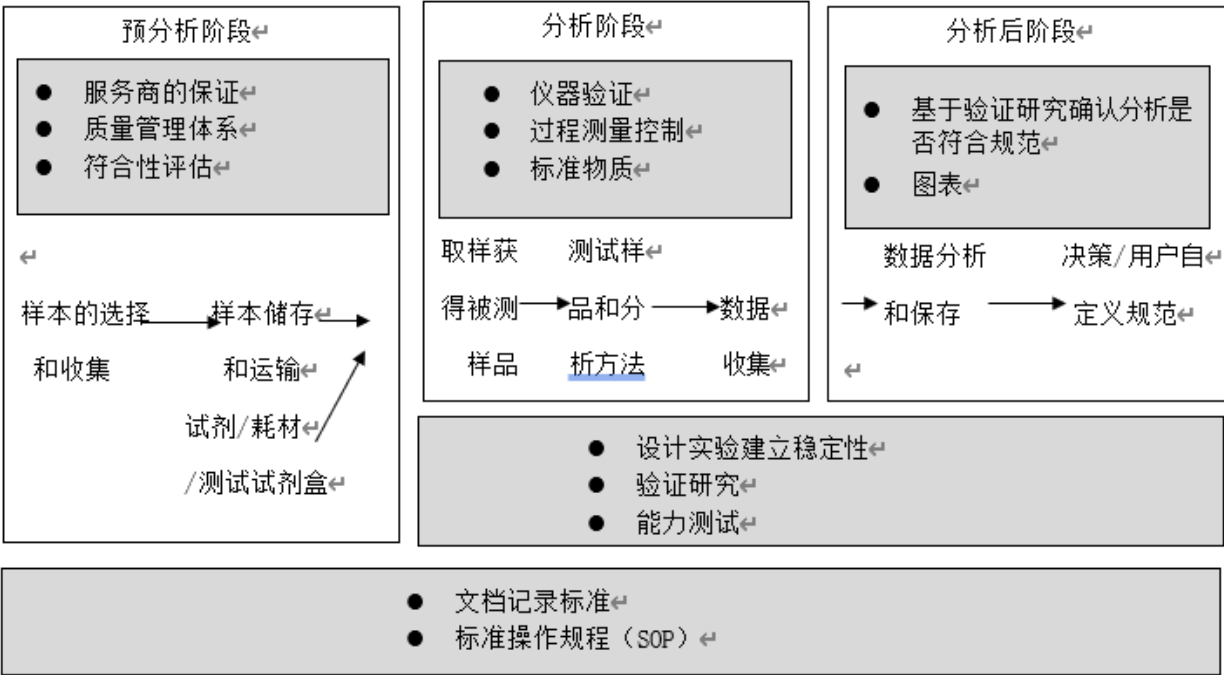
用于识别和管理可变性来源的策略应记录在案。

注1：列出的策略并不是完整的、普遍适用的，也不是所有的细胞测量过程所必需的。

注2：上游操作可显著影响测量结果，如细胞的收集以及后续的加工处理、存储和运输步骤。测试样品的处理时间和温度以及储存和运输都会对测量产生影响。

注3：试剂、耗材和检测试剂盒都会影响测量。

注4：说明了细胞测量过程的三个阶段；其他方面，如供体样品的成分、试剂来源和样品处理，都会给细胞测量过程带来额外的可变性。



附件B展示了通过鱼骨图设计和验证细胞分析方法时可以考虑的可变性来源。其他方法，如失效模式和效果分析(FMEA)，也可用于识别分析方法设计中可能出现的问题。

通常应使用对照或标准样品来确保细胞测量过程的每一个或几个步骤的质量，在某些情况下，对照和标准样品不足以确保整个细胞测量过程的质量。相反，使用多个对照或标准样品来确保测量过程的每一个或几个步骤的质量^[13、14]。

注5：减少可变性来源的一些策略是在常规测量之前实施的，而另一些策略则是在样品测量期间作为过程中的控制或参照。

5.8.2 取样和样品制备

应制定抽样计划。

抽样计划应确保用于测量的样本(测试样本)具有代表性。测试细胞的状态应该与测试方法的样本要求相一致。

试验方法的样品处理，如取样和样品制备，应尽量减少对影响测量的细胞特性的损害。这是为了维持细胞在测量过程中的特性。应建立一种测试样品制备方法，同时考虑到可能影响测量结果的污染物(例如RNA测量中的DNA污染)的影响。

测试样本应足够稳定，以进行测试。应评估试样在制备过程中的稳定性。当样品不具有足够的稳定性时，应审查制备过程，包括操作方法。

在使用细胞悬浮液进行分析的方法中，有时需要将细胞制备成单一且均匀的悬浮液。然而，在制备细胞悬浮液的过程中，对细胞施加的应力(例如物理、化学或时间)可能会使细胞特性恶化。因此，应考虑可能影响细胞样品的样品制备因素。

注：细致的移液操作被认为有助于制备均匀的测试样品。然而，这种方法并不总是适用于细胞，因为它耗费时间，而且可能破坏细胞的特性。

应为分析方法保留足够数量的细胞。当细胞数量有限时，应根据基于风险的方法修改测试样本或性能标准(例如准确性)或两者都修改。

应确定测量对象(如细胞质、细胞膜、上清液)，并针对测试方法对其适当部分进行取样。

5.8.3 标准物质

标准品可用于确保测量的可追溯性、进行比较和验证测量过程。

标准品应根据其参考值用于其预期用途。

应使用适当的标准品进行仪器鉴定、检验和验证。

应使用适当的标准物质进行分析方法的校准。

标准物质也可用于培训或能力测试。

条件允许，应使用适当的基于细胞的标准品来达到预期目的。

条件允许，应使用合适的经过认证的标准物质。

经认证的标准物质应按照供应商的说明储存，并在有效期内使用。

在合适的情况下，应结合参考方法使用经认证的标准物质。

注1：使用经认证的标准物质有助于确保可追溯性。

注2：经过认证的标准物质可与其他标准物质结合使用(例如，内部试剂的属性值可与经过认证的标准物质的量值关联)，以减少不必要地使用有限的供应品。

注3：在某些情况下，某些基于细胞的测量的分析方法还没有提供标准物质。细胞治疗产品的特性和测试的许多方面可以受益于新的参考物质的开发，如流式细胞术的固定细胞参照物，然而，用于细胞治疗生产的仍然是必要的。在某些情况下，一旦标准物质的预期用途得到验证，就可以考虑将标准物质用于最终的细胞治疗产品批次的放行。

在细胞测量过程中，应对内部试剂进行评估。内部试剂的参考值应该用相关的不确定因素来测量，或者证明适合用于对标称特性的检查。

内部试剂应由适当的材料(例如，过程中样品或细胞治疗产品批次材料)制备。内部试剂应是均匀和稳定的，具有适当的保质期。内部试剂的参考值应定期验证，并应确定储存条件。内部试剂应出具分析证书(CoA)。

5.8.4 分析试剂

分析试剂的质量和一致性会影响分析方法的结果。

用于测量样品制备的分析试剂的选择，应考虑其对分析方法的灵敏度、选择性和稳健性的可能影响。

有些分析试剂(如荧光染料、缓冲液)在一定时间内或特定环境下或两者都有时不稳定。细胞测量应在可接受的分析试剂的稳定范围内进行。

某些分析试剂的配方误差可能导致对测量的偏高或偏低。应确定可接受的分析试剂的浓度范围。

应确保分析试剂的供应及其在储存中的稳定性。

有些分析试剂(如抗体)可能因批号或不同供应商，或两者都有而不一致。在使用这些分析试剂之前，应确定可接受的规范。

5.9 程序文件

所建立的分析方法应记录在案。

记录在案的分析方法应包括但不限于：

- a) 使用的仪器和仪器设置；
- b) 使用的分析试剂；
- c) 样本处理程序，例如：
 - 1) 样品混合方法(如模式、速度、持续时间)以及过程之间的等待或保持时间；
 - 2) 样品转移程序(例如移液)；

- 3) 容器和转运设备；
- d) 规定的运行时限；
- e) 数据分析程序；
- f) 任何校准、控制和标准品的使用；
- g) 要获取的数据。

注：测试方法的背景信息可能是有用的。例如：

- 仪器对分析方法的影响；
- 耗材对分析方法的影响；
- 关于仪器资质的信息。

6 分析方法鉴定、确认和持续验证

6.1 概述

应根据测试方法的应用、研发阶段、样本可用性、经验和环境来制定测试方法的鉴定或验证计划。

6.2 分析方法的验证

分析方法的验证是为了确认分析方法在受控条件下具有合理的重现性，并适合其预期用途。

分析方法的受控条件包括但不限于特定仪器、特定试剂和其他可能影响分析方法的条件。

分析方法的验证应证明分析方法在受控条件下的能力，具有以下特征：

- a) 准确性；
- b) 重复性；
- c) 特异性；
- d) 灵敏度；
- e) 线性或比例性；
- f) 范围。

注：通常用特异性来代替选择性进行评估。一般来说，选择性表征了分析方法在不受干扰的情况下检测或确定几种特定物种的能力，即当在多组分系统中分析多个物种时，独立地、不受彼此以及样品中其他成分的干扰^[19]。

分析方法的验证应确认该分析方法符合预先确定的性能标准。性能标准可以根据分析方法的预期用途和历史数据来确定。

验证记录可用于验证分析方法。在分析方法验证时应考虑的要点可包括：

- 1) 活性物质之间的干扰或协同作用；
- 2) 细胞样品中细胞的稳定性；
- 3) 细胞聚集的可能性；
- 4) 细胞群的异质性。

6.3 分析方法确认和持续验证

6.3.1 确认

分析方法的验证是为了确认一种分析方法适合其预期目的。

在实施新的分析方法或将现有的分析方法用于新的目的时，应进行分析方法的验证。

应证明分析方法符合性能标准。

分析方法的性能标准应考虑下列验证特征：

- a) 准确性;
- b) 精密度:
 - 重复性;
 - 中间精密度;
- c) 特异性;
- d) 灵敏度;
- e) 检测限;
- f) 定量限;
- g) 线性或比例性;
- h) 范围。

注1: 中间精密度是指由于实验室内部的变化而产生的变异: 不同的时间、不同的分析、不同的设备, 等等^[20]。

注2: 检测限有时称为检出限, 定量限有时称为定量极限^[20]。

注3: 选定的验证特性列表可以取决于被验证的分析方法的类型和目的。例如, 虽然定量限对于杂质的测试可能很重要, 但它可能不适合用于鉴定的测试。

除了这些验证特性外, 在分析方法用于常规测量的情况下, 还应确定下列特征:

- 1) 稳健性;
- 2) 坚固性;
- 3) 可重复性。

注4: 通常稳健性测试评估“与过程相关”的方法参数的微小变化的影响, 并在正常使用期间提供方法可靠性的指示, 而坚固性测试则在不同的测试条件下进行, 以检查“与非过程相关”因素的影响, 可以表示为对操作和环境的变化对分析方法的测试结果缺乏影响。坚固性测试的目的是确定对该方法所提供的测量结果有强烈影响的变量(外部实验因素), 并确定如何控制这些变量。在确定了实验方法中因素的合理范围后, 如果说这些因素对测量或结果影响不大(统计上), 那么我们就说该方法对影响测试范围的因素是不坚固的。坚固性被认为是在不同实验室以及不同分析人员之间的条件变化下测试结果重复性的一种衡量标准^[22]。

可以采用多变量方法来评价各种因素对方法性能的影响。

示例: 实验设计可用于找出仪器操作参数的范围, 了解样品制备的变化, 以及方法精密度的变化。方法鉴定的特性是实验方法设计中的响应变量。

分析方法验证应使用有代表性的样品。

应采用适当的统计方法进行实验室实验的设计和分析。

在定义分析方法控制空间时, 细胞测量可以具有下列需要进一步考虑的特性:

- 适当的标准品的可用性;
- 供测试的样品数量有限;
- 测量对象的稳定性;
- 定义细胞状态的模糊性。

验证研究的结果应涉及选定的验证特征、可能影响验证特征的因素以及它们是否符合测试方法性能标准。

在报告结果时, 应考虑到分析方法可变性的潜在来源和来自复制实验的变化。

验证文件应包括理由和依据, 并包含足够的信息, 以便对结果进行独立的统计分析和评价。

注5: 实验室记录应记录在案, 包括从所有必要的分析方法中获得的完整数据, 以确保符合既定的规范 and 标准。

验证中标准物质的使用应记录在案。

注6：可能存在没有合适的标准物质可供验证的情况。在这些情况下，可以采用其他办法。例如，细胞计数，可以应用ISO 20391-2中描述进行^[8]。

注7：参见 5.8.3 有关参考材料中的附加信息。

6.3.2 持续验证

在分析方法的常规执行中，应进行持续验证。持续验证是对分析方法保持在受控状态(或验证状态)的持续保证^[21]。

应该开发一个系统，用于检测偏离验证状态的计划外偏差。随着时间的推移，收集和评估有关分析方法性能的信息和数据可以检测出非预期的过程可变性。评估分析方法的性能有助于识别问题并确定是否需要采取行动来纠正、预测和预防问题，从而使分析方法保持在验证状态。

通过持续验证收集的数据也可以提出改进和优化分析方法的方法。

当要测量具有未知特性的新的细胞样本时，应重新鉴定或重新验证试验方法。在重新鉴定或重新验证的过程中，观察到的测量精度、可变性或检查的相称特征都应在预定的范围内。

在继续验证的同时，可以提取可变性，并确定验证中使用的方法。

6.4 试验方法性能标准

试验方法的性能标准应与试验方法的预期用途相一致。测试方法性能标准可以由外部需求预定义。例如对以下方面的测试：

- 内毒素水平；
- 无菌。

测试方法的性能标准可以是：

- 定性或定量；
- 由性能指标或界限/限制/标准样品或两者定义。

试验方法性能标准应在验证前确定。

性能标准应记录在案。

文件应包括性能标准的理由和依据，并包含足够的信息，以便对结果进行评估。

当测试方法不满足性能标准时，应重新考虑测试方法。考虑因素可以包括仪器，试剂或方案的变更或者其中的多个。

应针对测试样本进行与其相适应的分析方法预实验和基质特异性的核酸提取。

7 细胞治疗产品的检验

7.1 细胞治疗产品的规范和释放标准的考虑

7.1.1 概述

应充分详细地制定细胞治疗产品的规范，以确保：

- a) 细胞治疗产品在日常生产时的一致性；
- b) 生产用于商业批次的细胞治疗产品的安全性试验、临床试验与之前的商业批次或多个产品相当。

规范应包括：

- 1) 分析方法列表；
- 2) 分析方法的参考资料；
- 3) 合适的验收标准^[23]，以证明其适合于预期用途。

注：可以建立与产品研发阶段相适应的规范，并且在产品从研发到许可的过程中，通常会对验收标准进行改进和收紧。

还应说明中间产品验收标准的规范。

对于生产过程(中间产品)重要的质量属性和规范可能与最终产品不同。

7.1.2 对细胞治疗最终产品放行标准的考虑

细胞治疗最终产品的放行标准应基于在产品开发过程中获得的科学证据和生产经验。放行标准是最终产品测试和发布的验收标准。

注1：放行标准的开发过程可以由风险分析指导，并用于确定在产品开发或临床测试期间或两者的CQA进行限制。

最终产品测试应对每一批产品进行。

注2：根据生产过程的不同，每种剂量可以被认为是一个批次。

细胞治疗产品的放行所需的测试应符合产品可使用保质期的时间尺度。

最终产品放行标准测试的结果应该在人体受试者用药前提供。

如果最终产品测试的结果不希望在细胞治疗产品放行前或可以使用的保质期内提供，则应制定一项调查计划，以便在细胞治疗产品不符合规定标准的情况下采取措施(例如，在某些类型的无菌检测的情况下)。

7.2 细胞治疗产品检验的一般要求

细胞治疗产品的检测应包括与鉴别、细胞计数、细胞活力、纯度或杂质、效力或相关生物活性、稳定性以及微生物质量有关的质量属性的评价。

评估质量属性的要求应基于使用经过验证或合格的分析方法获得的充分数据。

应根据科学证据和生产经验选择测试的分析方法。

测试所需的分析方法应至少合格。

测试所需的分析方法应进行验证。

分析方法矩阵可用于细胞治疗产品的检测。

7.3 评价细胞治疗产品特性的试验

用于鉴别属性的测试对于确保细胞治疗产品的容器被适当地标记是非常重要的。

用于建立鉴别属性的分析方法应针对特定细胞治疗产品的预期检测目的而进行特定的检测。

用于鉴别属性的分析方法应能够：

- a) 确认生产工艺已用于交付预期的治疗细胞；
- b) 区分多种细胞类型，如果已知一种细胞治疗产品需要多种细胞类型才能达到治疗效果；
- c) 区分治疗细胞与其他合理存在于细胞治疗产品中的细胞；
- d) 区分细胞治疗产品与在同一设施中加工的其他产品。

注1：根据产品的不同，鉴定分析方法可以测试供者身份(例如STR、HLA单倍型)或表型检测，或两者同时进行。

细胞治疗产品的鉴别规范应包括一个或一系列分析方法的矩阵，用于测试必要的鉴别属性，从而确认治疗细胞的存在。

例如，许多的细胞类型在不同的显微镜条件下可能看起来很相似，同一细胞类型也可能表现出不同的形态，这取决于培养条件(基质和培养基)以及细胞循环状态(即活跃的有丝分裂或衰老)，因此单凭形态学本身并不能进行鉴别。

用于鉴别的属性可以包括对治疗细胞的基因型、表型和其他标志物的评估。

表型分析方法可以确认是否存在已建立的表面或细胞内标记物或两者兼具，这些都是某些细胞的特征。表型评估还应包括测试其他细胞类型的标记，这些标记可以根据细胞的来源合理地预估。

注2：虽然表征更适用于确定群体纯度的范围，但纯度和鉴别属性是相关的，表征策略可以考虑可能是通过细胞起始材料或生产过程的其他方面引入的非预期的细胞的可能性。

注3：预分析步骤，包括延长样品储存时间，可能会改变细胞的表型。

7.4 评估细胞治疗产品中细胞计数的试验

预定义的细胞群中的细胞计数应记录在案。一般来说，细胞计数可以包括：

- a) 细胞总数；
- b) 活细胞计数；
- c) 治疗细胞的活细胞或死亡细胞计数；
- d) 用户自定义的细胞群的计数。

最终的细胞治疗产品的生物活性一般取决于细胞的各种活性，因此测定活细胞浓度是有用的。

应建立活细胞计数的放行标准。有关定义活性的更多信息，请参见7.5。

应为被鉴定为治疗细胞的细胞计数建立放行标准。

注1：细胞的离散数或细胞计数通常表示为悬浮液中的细胞浓度(即单位体积的细胞数)和附着在表面上的细胞的面积密度(即单位面积的细胞数)。

注2：标准可参见细胞计数法的一般指导[7]和一种量化计数方法性能的实验设计和统计分析方法^[8]。

7.5 评估细胞治疗产品中细胞活力的试验

细胞治疗产品中是否存在无活力的细胞是一个值得关注的问题。因此，细胞治疗产品中活细胞占细胞总数的比例应予以评估。

注1：除治疗细胞本身由无活性的细胞组成的情况外，无活性的细胞通常被认为是一种杂质。

细胞活性实验应显示活细胞占群体中细胞总数的比例。

注2：细胞活性通常用百分比表示(即活率%)。

应建立细胞治疗产品中细胞活性的放行标准。

活细胞的定义取决于活细胞测定的预期用途。

注3：活细胞的定义有时可以表达细胞的健康状态。细胞的健康可视为一个连续的过程。

注4：由于细胞培养中的持续降解过程，细胞活性的测量可能有偏差，这意味着细胞总数、活细胞数或死细胞数的测量值都是不断波动。

用户应根据其预期用途选择活细胞或失活细胞的定义。选择用于区分活细胞和失活细胞的生物特性应记录在案。

应对细胞治疗产品中所有已鉴定的细胞群的活性进行评估。

7.6 评价细胞治疗产品效力的试验

7.6.1 概述

效力是描述产品产生预期结果能力的概念。评估效力的分析方法应证明治疗细胞对预期用途的生物活性。

7.6.2 效力作为CQA的重要性

效力测量是制定稳定性方案时产品放行测试和可比性研究的重要组成部分，从而在临床研究阶段建立稳定的生产产品。

评价效力的分析方法可以量化产品内的治疗细胞或产品的整体相关生物活性。因此，效力分析方法矩阵中的某些分析方法可以与用于鉴别和计数的方法相同。

7.6.3 效力评估

评估生物制品效力的常用方法是开发一种定量的生物测定法，以测定产品的生物活性，即产生特定结果的能力。生物测定法可以通过评估产品在生物系统中的活性成分来衡量其效力。生物测定法可以包括动物体内研究、体外器官、组织或细胞培养系统，或这些系统的任意组合。

注1：体外或体内生物试验均可用于测量细胞活性物质的生物活性。如果开发适当的生物测定方法不适合产品放行（例如，用于放行的生物试验的时间太长，或无法进行验证），那么可以使用与相关产品特定的生物活性相关联的生物活性的替代测量法来证明其效力。

示例1：一种实用的显示出适合批量放行的性能特征的非生物分析方法，可以通过评估产品的免疫化学、生化或分子属性，提供广泛的产品特性数据。

例如，生物活性可以包括细胞产生所需功能蛋白、改变其表型、对其他细胞施加影响或通过履行生化功能或多种能力对刺激作出反应的能力。

治疗细胞的相关生物活性应根据导致临床功能细胞治疗产品所需的性质或行为进行定量或定性评估。

注2：效力不一定等同于临床疗效。单一的测试不太可能充分测量那些预测临床疗效的产品属性。控制良好的临床调查的疗效数据可以提供证据，证明一种产品具有相关的生物活性，因此是有效的。评价效力的方法仍被用定量地检验产品放行的效力。

注3：理想情况下，评价效力的分析方法代表产品的作用机制（即相关的治疗活性或预期的生物学效应）。然而，许多细胞治疗产品具有复杂性（例如依赖多种生物活性）或作用机制（MOA）没有被完全表征，因此很难确定哪些产品属性与测量效力最相关。

如果细胞治疗产品含有多个活性成分或细胞活性物质，应考虑采用一种以上的分析方法来测量效力。

7.6.4 评价效力的分析方法的要求

评价效力的分析方法应：

- a) 反映产品的相关生物学特性；
- b) 针对每种产品类型进行专门设计；
- c) 基于单个产品属性和成分。

注：活性成分之间潜在的非加性效应，如干扰或协同作用，会影响评估效力的分析方法的设计。在许多情况下，分析方法不能提供足够的效力。如果一种分析方法不足以测量效力来表示产品属性，则可以使用分析方法矩阵。

7.6.5 评价效力的分析方法的设计

对建立产品效力属性的理解通常随着更多信息的获取而发展，并随着产品的开发而发生重大变化（参阅附件A）。实施渐进式的效力评估的分析方法可能是有益的。适当了解细胞治疗产品的生物学特性

是必要的，以开发相关的和有意义的效力分析方法。建立评估效力的相关和有意义的分析方法，考虑的因素可包括：

- a) 评估相关的临床前调查，概念论证研究，早期临床研究，可用的历史经验，以及可用的参考资料和对照品；
- b) 评价产品开发过程中获得的表征数据。

注：除常规批量放行检测外，还可以测量多种细胞治疗产品的属性。这些探索性的研究可以帮助评估哪些产品属性与效力最相关。虽然有些分析方法不适用于批量放行，但它们可以提供与相关生物活性或临床有效性有关的产品属性的有用信息。

7.6.6 关于评估效力的分析方法的思考

生物活性取决于细胞的许多不同特性。细胞群中的单个细胞可能处于细胞周期的不同阶段或处于不同的分化状态，从而导致蛋白质表达、信号传递能力等功能特征的异质性。在确定细胞群的整体生物活性时，应考虑种群异质性的潜在影响。

用户应了解用于评估放行检测期间效力评估的分析方法的适用规则（例如，良好的生产规范）。

在组织工程中，可以结合不同类型的细胞，或者在生产阶段由细胞活性物质产生细胞外基质（ECM）的情况下，由于其他类型的细胞、ECM、生物支架材料的存在可能影响其功能，因此没有必要在细胞库或者产品阶段完全表征细胞的生物活性。应制定组织策略以确定现有的替代测试方法对临床结果具有更高的预测价值。

7.7 细胞治疗产品纯度的检测

纯度被认为是细胞治疗产品相对不含外来物质的程度。

纯度测试应包括对下列生物杂质的测试：

- a) 热原性或内毒素；
- b) 可以合理存在于细胞治疗产品中的非预期的细胞表型。

纯度测试还应包括对其他生物或非生物杂质的检测：

- 1) 残留物和过敏原；
- 2) 辅料及其成分。

已知会携带到最终产品的辅料产生的杂质应确认在放行标准之内。

注1：“纯度”与用于鉴定和细胞计数的属性密切相关。用于鉴定或评估特定细胞群计数的属性的分析方法也可以产生关于非预期的细胞杂质地含量信息，例如污染细胞。

污染细胞的放行标准限值应基于以下数据的组合：

- 典型的各种非预期细胞类型的百分比；
- 该百分比细胞对临床安全性的影响的评估。

注2：在生产过程中，不需要的细胞类型的数量通常保持在用户指定的可接受范围内。

注3：可在研发过程中中监测非预期细胞类型的水平，以确定这些细胞在生产过程中减少的程度。过程中对纯度或细胞杂质的控制也是有用的。

注4：细胞分离和分离技术可用于分离目标培养物中的不同细胞群。

7.8 细胞治疗产品微生物污染的评估试验

微生物污染是细胞治疗产品的潜在安全隐患。

细胞治疗产品的微生物检测(包括无菌、支原体和特异性病毒因子检测)可用于评估人体治疗产品的安全性。

在细胞治疗产品中,有几个潜在的支原体污染来源,包括用于培养的动物血清产品和培养设施环境。

微生物检测应对细胞库、过程中间体和最终的细胞治疗产品进行。

当潜在的生物外来因子在可接受的范围内时,即基于检测限或用户自定义的极限,证明该细胞样品无菌。

细胞治疗最终产品(或适当时,中间产品或细胞起始材料)的微生物测试应评估是否存在:

- 1) 细菌和真菌污染物;
- 2) 支原体;
- 3) 外来因子;
- 4) 病毒。

对于细胞治疗终产品,细菌和真菌污染物、支原体和其他可合理存在于细胞治疗产品中的外来因子的存在应保持在可接受的限度内。

外来因子的检测包括体外病毒试验、体内病毒试验和针对外来病毒的特定试验。

如果在细胞治疗产品的生产中使用抗生素,那么应进行无菌检测之前去除抗生素。如果抗生素不能去除,应进行测试(如抑菌和真菌抑制试验),以确保产品中残留的抗生素不会干扰无菌检测的结果。

如果在使用最终的细胞治疗产品之前使用了保存策略(例如低温保存),则应考虑相应的无菌检测。结果一般应在产品放行前获得。如果细胞治疗产品在保存后进行进一步处理(如洗涤、培养),应进行重复无菌试验,并应将过程中的无菌检测结果纳入细胞治疗最终产品规范的放行标准中。

如果可能的话,无菌试验的选择应使无菌试验的结果可以在细胞治疗产品的保质期内获得。

如果无法获得具有适当时限的无菌检测结果,则可以开发替代方法来提供无菌保证。

在细胞治疗最终产品具有较短的保质期的情况下,在产品开发过程中可以考虑采用具有快速检测的分析方法来建立和评估产品的放行标准。

注1: ISO 24190关于微生物快速检测的研究正在开发中。

在生产过程的关键步骤进行无菌测试是最有效的。

注2: 使用基于风险的评估可能是适当的。

无菌性测试计划应确定在生产过程中何时进行无菌性测试，以及打算使用的测试方法。为过程中的无菌性测试选择的测试方法应足以保证产品的无菌性。

注3：产品的支原体检测可以在最有可能检测到污染的生产阶段进行，例如，在收集培养物后，在细胞洗涤之前。可以对细胞或上清液进行检测。

7.9 评价细胞治疗产品稳定性的试验

当细胞治疗产品的特定质量属性的变化在所确定的细胞治疗产品既定的保质期内或临床研究期间处于接受范围内时，稳定性达到合格。指定的质量属性用稳定性指示的分析方法来监测，作为评估稳定性的函数。质量属性通常类似于批量放行中使用的属性。稳定性测试应证明指定的质量属性在指定的持续时间内和在指定的条件下处于可接受的范围内。稳定性的持续时间应对应所需的细胞治疗产品的保质期或与临床研究的持续时间。

应制定并记录稳定方案。

应为最终的细胞治疗产品制定稳定性方案。

稳定性方案应包括无菌性的评估，以及用于鉴定、纯度、细胞计数、活力和效力的属性。

对于进行的每一次测试，测试方法、取样时间点(包括零点)、测试温度和其他适当的信息都应记录在案。用于表明产品稳定性的分析方法的合理性也应记录在案。

例如，在无菌的情况下，可以在取样开始点、稳定性研究结束点和研究的中间点进行测试。

对治疗细胞中间体稳定性的考虑可包括：

- a) 维持细胞在扩增和冷藏过程中的遗传和表型的稳定性；
- b) 监测细胞在扩增过程中生物学活性的累积变化；
- c) 监测冷冻保存的中间体的解冻后细胞活力和回收率；
- d) 对评估遗传稳定性的分析方法使用适当的控制。

注：这些信息有助于设定生产过程中的控制和最大生产水平。

8 报告

8.1 概述

这一条款涉及分析方法的结果报告。

8.2 一般性要求

数据报告应包含足够详细的内容，以便对细胞治疗产品测试结果进行独立评估，并能够对来自细胞治疗产品测试的数据进行数据比较。

例如，信息可以包括：

- a) 原始数据；
- b) 经处理的数据；

- c) 定量或相对数据的标度;
- d) 以良好的属性值或参考价值的基准;
- e) 元数据(详细说明样本、程序、条件等);
- f) 控制策略的结果(为分析方法的性能提供可信度);
- g) 鉴定、验证或验证的结果;
- h) 详细描述了数据采集过程。

细胞治疗产品测试的报告要素应包括但不限于:

- 1) 样本-ID, 细胞描述符(类型, 批号或标识, 生产来源日期);
- 2) 试剂-名称, 来源, 批号;
- 3) 样品制备程序和条件;
- 4) 使用的仪器-包括仪器设置;
- 5) 使用的标准品;
- 6) 测试方法性能标准的描述;
- 7) 带有适当的单位和不确定度的测量结果;
- 8) 数据分析程序;
- 9) 不符合预期的观察结果。

附录 A
(说明性)
细胞治疗产品测试策略的建立

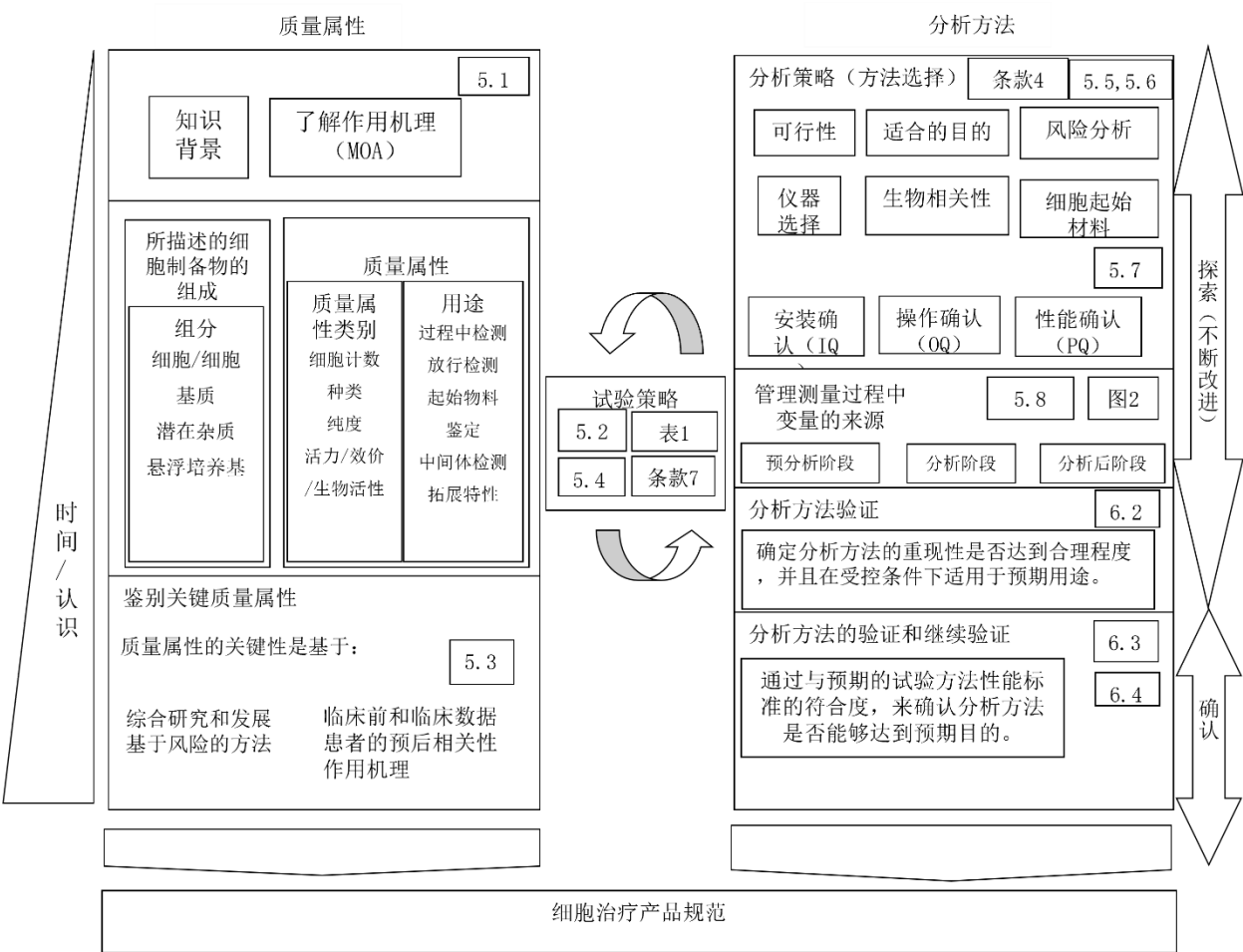


图 A.1-本文件中提出的概念的示意图和相关条款编号

细胞治疗产品的检测策略是基于对相关质量属性的识别和质量属性评价分析方法的建立。本文件的相应条款和子条款在方框中突出显示。

附录 B
(说明性)

细胞分析方法中潜在的变异源实例

细胞分析方法的变异源可能来自但不限于：细胞源、分析试剂、辅助材料、分析仪器、设备和耗材、环境条件、程序、数据采集参数和条件以及数据分析。图B.1 显示了细胞试验中潜在的变异源的示例^[13]。这些来源或变异可能导致细胞试验中的系统性和随机性错误。测量控制和控制策略有时可以用于减少或控制这些可变性的来源。

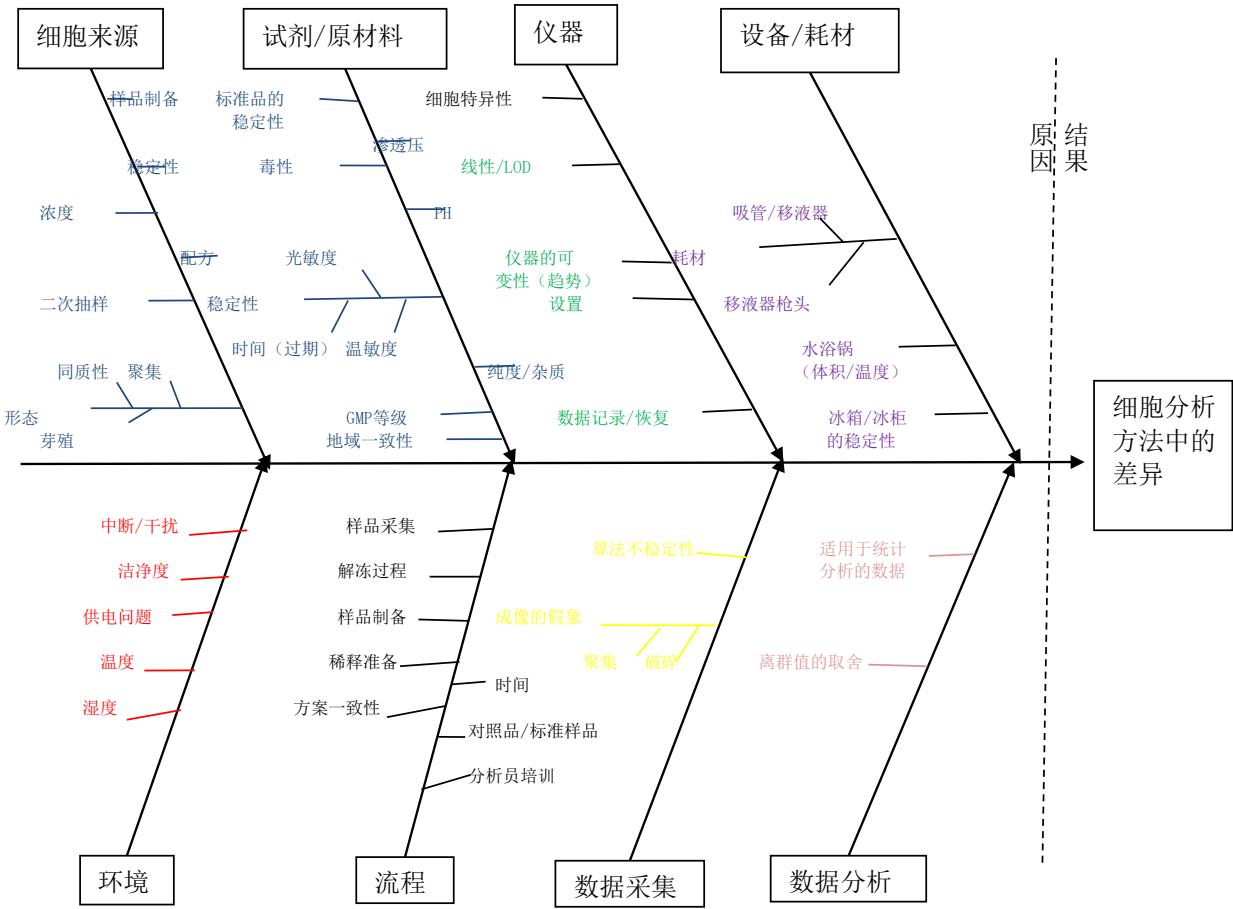


图 B.1-说明细胞分析方法中常见变异源的图表(不全面)

参考文献

- [1] ISO/IEC Guide 63:2019, Guide to the development and inclusion of aspects of safety in International Standards for medical devices
- [2] ISO/IEC Guide 98-3:2008, Uncertainty of measurement — Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995)
- [3] ISO/IEC Guide 99:2007, International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM)
- [4] ISO 9000:2015, Quality management systems — Fundamentals and vocabulary
- [5] ISO 16140-1:2016, Microbiology of the food chain — Method validation — Part 1: Vocabulary
- [6] ISO 20387:2018, Biotechnology — Biobanking — General requirements for biobanking
- [7] ISO 20391-1:2018, Biotechnology — Cell counting — Part 1: General guidance on cell counting methods
- [8] ISO 20391-2:2019, Biotechnology — Cell counting — Part 2: Experimental design and statistical analysis to quantify counting method performance
- [9] ISO/TS 20399-1:2018, Biotechnology — Ancillary materials present during the production of cellular therapeutic products — Part 1: General requirements
- [10] ISO/TS 20399-2:2018, Biotechnology — Ancillary materials present during the production of cellular therapeutic products — Part 2: Best practice guidance for ancillary material suppliers
- [11] ISO/TS 20399-3:2018, Biotechnology — Ancillary materials present during the production of cellular therapeutic products — Part 3: Best practice guidance for ancillary material users
- [12] Lin-Gibson S., Sarkar S., Ito Y., Defining quality attributes to enable measurement assurance for cell therapy products. *Cytotherapy*. 2016 Oct, 18 (10) pp. 1241 – 1244
- [13] Simon C.G., Jr., Lin-Gibson S., Elliott J.T., Sarkar S., Plant A.L. Strategies for Achieving Measurement Assurance for Cell Therapy Products. *Stem Cells Transl. Med.* 2016 Jun, 5 (6) pp. 705 – 708
- [14] Lin-Gibson S., Sarkar S., Elliott J., Plant A., Understanding and managing sources of

variability in cell measurements. Cell Gene Therapy Insights. 2016, 2 (6) pp. 663 – 673

[15] THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, “DIRECTIVE 2004/23/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells”; Official Journal of the European Union, L 102(48–58); 7.4.2004

[16] THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, “COMMISSION DIRECTIVE 2006/17/EC of 8 February 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells”; Official Journal of the European Union; L 38 (40–52); 9.2.2006

[17] THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, “COMMISSION DIRECTIVE 2006/86/ EC of 24 October 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards traceability requirements, notification of serious adverse reactions and events and certain technical requirements for the coding, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells”; Official Journal of the European Union; L 294 (32–50); 25.10.2006 34 © ISO 2021 - All rights reserved ISO 23033:2021(E)

[18] GHTF/SG3/N99-10:2004 (Edition 2) GHTF Guidance: Quality Management system Medical Devices - Process Validation Guidance; SG3; 2004

[19] Vessman J., Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. J Pharm Biomed Anal. 1996 Jun; 14(8–10):867–9. doi: 10.1016/0731-7085(95)01679-1. PMID: 8817990.

[20] International conference on harmonization (ICH) harmonised tripartite guideline, “Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)”, current step 4 version, parent guide dated 27 October 1994.

[21] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Guidance for Industry, “Process validation: general principles and practices”, January 2011, Current Good Manufacturing Practices (CGMP) Revision 1.

[22] USP 1225. Validation of Compendial Methods United States Pharmacopoeia, 29th ed., National Formulary, 24th ed., United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, USA,

2006

[23] International conference on harmonization (ICH) harmonised tripartite guideline, “Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products”, August 1999.

[24] ISO Guide 33:2015, Reference materials — Good practice in using reference materials

[25] ISO 241901), Biotechnology — Analytical Methods — Risk-based approach for method selection and validation for rapid microbial detection in bioprocesses
