

溶瘤病毒产品药学研究与评价 技术指导原则（试行）

国家药品监督管理局药品审评中心

2023 年 02 月

目录

一、前言	4
二、适用范围	4
三、一般原则	5
四、风险评估和控制	7
五、生产用物料	9
1. 起始原材料	9
1.1 病毒种子	9
1.2 质粒 DNA	13
1.3 生产/包装细胞	13
2. 其他生产用物料	16
六、生产工艺	17
1. 工艺研究与开发	17
1.1 原液生产工艺	18
1.2 制剂生产工艺	19
1.3 工艺过程控制	20
2. 工艺验证	21
七、质量研究和质量标准	22
1. 质量研究	22
1.1 鉴别和结构分析	22
1.2 生物学活性	23
1.3 含量	24

1.4 纯度、杂质和污染物.....	24
1.5 其他特性.....	27
2. 质量标准	28
2.1 检验项目.....	28
2.2 标准限度.....	29
2.3 分析方法.....	29
2.4 标准品/对照品.....	30
八、外源病毒因子检测和控制	30
九、稳定性研究.....	32
十、包装及密封容器系统	33
十一、名词解释	34
十二、参考文献.....	34

一、前言

近年来，溶瘤病毒作为肿瘤免疫治疗领域的一类产品受到广泛关注，其主要通过裂解肿瘤细胞和激活机体自身免疫来发挥作用。随着技术不断发展和研究不断深入，溶瘤病毒产品对肿瘤细胞的选择性和有效性不断提高，对正常细胞的影响进一步降低，产品的安全性进一步提高。随之，溶瘤病毒产品类型增加迅速，不同类型产品从基因设计、生产工艺、质量控制等方面均可能存在差异。为规范和指导这类产品的研究、开发和评价，制定本指导原则。

本指导原则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提出建议和一般性技术要求，具体品种的适用性应遵循具体问题具体分析的原则。产品研发过程中亦可根据产品研发实际情况，采用其他更适合或有效的方法，但是必须符合药物研发的规律，并提供科学合理的依据。

本指导原则主要针对产品申报上市阶段的药学研究制定，产品临床试验阶段的药学研究可根据各阶段的研发特点和研究目的，参考本指导原则开展与阶段相适应的研究。

二、适用范围

本指导原则中溶瘤病毒产品包括野生的、减毒的或经过基因修饰的具有复制能力的病毒产品，其可选择性地感染肿瘤细胞和/或选择性地在肿瘤细胞中复制以裂解肿瘤细胞，也可同时表达外源基因以提高相应功能，还可通过刺激机体

产生免疫反应达到治疗目的的一类产品。

三、一般原则

溶瘤病毒产品的研发和申报应符合现行药品管理相关法律法规的要求，用于人体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 GMP）的基本原则和相关要求。同时，溶瘤病毒产品的研发、生产、使用和废弃处理应符合生物安全相关法律法规的要求。

1. 一般要求

溶瘤病毒一般是具有复制能力的活病毒，在基因设计、生产工艺、质量研究和控制、贮存和运输，以及临床使用等方面均面临诸多挑战，因而应结合药物开发阶段开展相应的研究。为了确保安全性，应从生产用物料、生产工艺过程控制和/或终产品等各个阶段严格控制外源因子污染的风险。应关注和充分评估病毒多次传代后基因序列和/或氨基酸序列突变的风险，并采用合理的方法和手段进行监测，确保产品全生命周期的安全性。由于溶瘤病毒产品活性成分特殊，还应关注生产过程中污染和/或交叉污染风险的评估和控制，以及产品生产、储存和临床使用过程中对人员、动植物、微生物及环境潜在风险的评估和控制。

2. 不同研发阶段的考虑

溶瘤病毒产品的研发应遵循药物研发的一般规律，在整个研发周期内应采取循序渐进、逐步完善的策略。

临床试验阶段，重点关注与药物安全性相关的问题，确保临床试验用药物的安全性。一般情况下，临床试验用药物的质量应不劣于非临床研究用药物质量。另外，结合产品特点，还需关注以下方面，如病毒本身的安全性，应从其来源、构建/筛选、传代历史和检定，以及必要的稳定性研究等方面综合考虑；外源因子是溶瘤病毒产品尤为关注的控制项目之一，应从病毒构建/筛选、起始原材料（如病毒种子、生产/包装细胞）、生产过程中可能使用的动物/人源材料、生产过程控制和/或终产品等方面综合考虑，避免外源因子污染；同时，还需对临床试验用药物生产工艺进行初步确认，建立初步的中间体控制项目和标准；开展相关质量研究，进行必要的方法确认，建立适用于临床的质量标准，保证临床样品的质量；开展初步的稳定性研究，稳定性研究应能支持临床试验开展，并对包装及密封容器进行适用性评估。

临床试验期间，以不增加临床受试者安全性风险为前提，适时推进工艺优化和质量研究，使前期药学研发数据能够支持后期临床试验开展。随着对产品质量属性和生产工艺认识的不断深入，以及临床试验数据与产品质量属性相关性分析的不断积累，应逐步确认工艺步骤和关键工艺参数、关键质量属性，建立生产过程控制项目和可接受标准，完善质量研究和质量标准。原则上，建议在确证性临床之前确认生产工艺和处方、生产场地、关键生产用物料来源、产品质量标准

等，生产工艺应基本稳定，工艺规模和控制与商业化生产相当，应尽可能避免在确证性临床阶段或确证性临床试验后发生可能影响产品安全性和有效性的重大药学变更。

上市申报阶段，基于产品特性、生产工艺和质量属性的深入研究和数据积累，确定产品的关键质量属性和关键工艺参数，完成全面的工艺验证，确定商业化生产工艺和处方。质量标准中应明确检验项目、分析方法和标准限度，分析方法应进行全面的验证，标准限度的制定要有依据。稳定性研究和包装及密封容器系统相容性研究应采用代表性样品开展，研究内容和数据应完整、全面。

四、风险评估和控制

溶瘤病毒产品类型较多，基因设计、生物学特性和作用机制情况复杂，使用到的生产/包装细胞类型多样，生产工艺和质量研究也各有不同，因此，对于不同类型的溶瘤病毒产品，可基于质量风险特征制定相应的控制措施。

溶瘤病毒产品质量相关风险一般包括以下方面：

1. 生产用物料方面

(1) 对病毒传染性、致病性和毒力等研究和认识不足，缺乏相应的风险控制而引入的风险。

(2) 病毒基因修饰和/或多次传代导致病毒发生基因突变的风险，以及病毒基因插入细胞基因组致癌的风险。

(3) 对细胞基质认知不够充分、检定项目不全面以及肿

瘤细胞、宿主细胞 DNA 和宿主蛋白质残留的风险。

(4) 生产过程中添加的生产用原材料，尤其是动物/人源材料外源因子控制不全面的风险

(5) 新型辅料人体使用安全性、免疫原性的风险。

2. 生产工艺方面

(1) 生产工艺相关操作对病毒理化特性、生物学活性等产生不良影响的风险。

(2) 生产过程中污染/交叉污染的风险。

3. 质量研究方面

(1) 质量研究项目不全面引入的风险。

(2) 分子变体、非完整包装病毒（如非包膜病毒颗粒、空壳病毒颗粒等）、错误包装病毒颗粒、无活性病毒颗粒、病毒颗粒聚集体、生物学活性等分析方法受限或变异性较大引入的风险。

基于以上质量相关风险，应制定相应的风险控制策略。例如，针对生产用物料的风险应进行全面的研究和风险评估，对生产工艺进行充分研究和验证，结合不同病毒特点开展全面的质量研究和质量控制，并对质量控制方法进行全面验证，开展全面的稳定性研究和包装容器相容性研究，采用多种方式来降低环境和人员风险，如设定合理的废弃物处理手段，在适当的生物防护条件下进行产品的处理等。

五、生产用物料

本指导原则中生产用物料主要指用于生产溶瘤病毒产品的物质或材料，包括起始原材料（如病毒种子、生产/包装细胞），生产过程中使用或添加的原材料（如培养基及其添加成分、纯化试剂等）、辅料、以及生产用耗材（如培养袋、储液袋、移液管路、滤膜等）等。生产用物料直接关系到产品的安全性和有效性，需要建立良好、规范的质量管理体系，并参照《中国药典》等相关要求进行风险评估和质量控制。

1. 起始原材料

1.1 病毒种子

1.1.1 病毒选择的一般考虑

病毒选择一般应基于临床应用目的、安全性（病毒研究历史、流行病数据、分子结构、既往使用经验和体内安全性数据、病毒载体设计成熟程度和研究基础等）、体内作用机制、生物学特性（致病性、宿主范围、嗜肿瘤特性）以及生产工艺规模的可放大性等进行充分的考虑。如果使用当前认知尚不充分的病毒进行开发时，需要全面评估安全性风险并制定相应的控制策略。目前常用于溶瘤病毒产品开发的病毒来源包括野生病毒、减毒病毒和基因修饰病毒。

当采用野生病毒或减毒病毒进行产品开发时，病毒的来源、筛选、减毒操作和传代历史情况应明确，并需要对病毒结构和作用机制、病毒宿主范围和对人体致病性，以及病毒

传代稳定性等进行研究和风险评估。另外，减毒病毒还应结合其减毒操作以及减毒目标开展毒力评价试验。

当采用基因修饰技术进行产品开发时，初始病毒的来源、培养情况（如适用）、传代历史（如适用）、初始病毒的遗传信息等情况应明确。基因修饰过程中，工具的选用与设计、操作过程、筛选方法等需要进行适当的研究并结合筛选结果说明其合理性。需要关注的是，研究结果需要说明是否达到基因修饰的预期目的，如基因的沉默或表达等；基因修饰后，病毒在感染活性、复制特性、毒力和致病性等方面是否产生非预期作用的风险，是否满足溶瘤病毒产品开发的质量要求。

1.1.2 病毒基因修饰设计的一般考虑

病毒基因修饰一般以降低对正常细胞杀伤性、增强肿瘤细胞靶向性、优化肿瘤微环境等提高安全性和有效性为目的。常见的基因修饰包括（但不仅限于）以下方面：

- （1）突变在正常细胞中复制比较关键的病毒编码基因。
- （2）插入肿瘤特异性启动子以控制病毒早期基因表达。
- （3）改变病毒的组织趋向性或病毒进入细胞的方式。
- （4）病毒基因组中插入外源基因等。
- （5）病毒外壳蛋白的改造和修饰以降低病毒本身的免疫原性和抗原性。

相应的，针对病毒基因修饰，一般需关注（但不仅限于）以下方面：

(1) 删除或突变病毒中与安全性相关的致病基因，如神经毒性基因、潜在致癌风险基因等。

(2) 减少生产用载体与包装细胞的同源序列，减少包装质粒之间的同源序列；减少生产用载体与人体易感病毒或内源性病毒的同源序列，以降低回复突变或同源重组产生的风险。

(3) 开展基因修饰后病毒遗传稳定性研究，特别关注经修饰后的基因稳定性，评估序列突变引入的潜在安全性风险或对有效性的影响。

(5) 研究基因修饰后病毒的生长特性、对肿瘤细胞选择性和感染特性、细胞内的复制能力，以及神经毒性（如适用）等方面的变化。

1.1.3 病毒种子批的建立和检定

为了确保产品质量的一致性和稳定性，生产用病毒需采用种子批系统管理。在病毒种子批建立过程中，需采用合理的筛选技术进行病毒的单克隆筛选。病毒种子批建立过程中可能使用到的原材料如初始病毒、质粒 DNA 和包装细胞等需进行适当的研究和质量控制。

病毒种子批建立后，需开展相应的检定。检定项目应符合《中国药典》或其他通行技术指导原则的相关规定，并根据病毒种子自身特点设定相应的检定项目。检定项目一般包括鉴别（基因序列、血清型、电镜形态等）、病毒滴度、外源

因子（细菌、真菌、支原体、分枝杆菌（如适用）、病毒等）、初始病毒（或野生型病毒）、功能性检测（如肿瘤选择性、病毒复制能力、裂解/杀伤肿瘤细胞能力等）、抗病毒药物敏感性（如适用）、目的蛋白鉴定和功能检测（如适用）、病毒物理特性（如适用）等。

病毒种子批保存容器、冻存剂和冷冻保存条件等需经过研究确认。种子批的层级（二级或三级种子批）和数量应满足生产的要求。

1.1.4 病毒种子批的稳定性

为了确保病毒在传代过程中的遗传稳定性和生物学特性等的稳定性，病毒种子批应开展规范的传代稳定性研究。传代研究条件应符合实际生产条件或具有代表性，研究项目建议涵盖全基因组测序并关注特定基因序列分析、产品质量（如病毒滴度、裂解/杀伤肿瘤细胞能力等）、目的蛋白鉴别和功能检测（如适用）、初始病毒（或野生型病毒）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，并在实际生产过程中加以限定。需要关注的是，某些病毒在多次传代后易发生基因序列甚至氨基酸突变，因此建议加强病毒分子变体的研究。一般情况下，应对主种子和生产限传代次病毒进行全基因组分析，关注多次传代后病毒在基因序列和/或氨基酸序列上变化。可采用灵敏的、可量化的检测方法识别病毒全基因组中的所有突变，尤其关注改造区域或编码区

域基因突变情况，充分评估突变对产品安全性和有效性的影响。

另外，为了确保病毒种子批在贮存过程中的稳定性，需要规范开展贮存稳定性研究。

1.2 质粒 DNA

质粒 DNA 可用于制备病毒种子，也可通过瞬时转染方式生产溶瘤病毒。根据研究确认各类质粒 DNA 的来源、序列信息、主要元件及功能等。

通常情况下，制备病毒种子的质粒 DNA 在构建过程中一次性使用，一般不需要建立细菌种子批，因而，需要对质粒 DNA 序列的完整性和准确性进行确认，同时避免操作过程中外源因子污染的风险。重组构建的病毒种子需进行单克隆筛选、建库及检定等，具体可参考前文。

瞬时转染方式用于生产溶瘤病毒产品的质粒 DNA，一般需要建立细菌种子批进行生产，其具体要求可参考《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》。

1.3 生产/包装细胞

1.3.1 生产/包装细胞选择的一般考虑

本指导原则的生产/包装细胞是指培养病毒时所使用的细胞，一般包括病毒种子构建过程中使用的细胞基质和生产病毒使用的细胞基质，两种细胞基质可能相同也可能不同。原则上，生产/包装细胞的选择和使用应满足来源清晰、历史

培养过程清楚、风险可控及经过全面检定的要求，以确保其适用性和安全性。选择细胞基质可以考虑（但不仅限于）以下方面：

- （1）细胞的种属及组织来源。
- （2）细胞对病毒的敏感性以及能稳定生产病毒的能力。
- （3）细胞的特性及全面检定的可行性。
- （4）生产工艺的便利性和可行性。
- （5）下游纯化工艺能够去除风险因素的可能性和达到的安全水平以及使用经验等。

目前溶瘤病毒产品开发中可能适用的生产/包装细胞类型较多，如正常细胞群连续传代建立的细胞系/株（如 Vero）、肿瘤细胞系/株（如 Hela、A549 等）、携带致瘤基因的传代细胞系/株（如 HEK293）等。原则上，应避免使用含有内源性病毒的细胞基质，如确因病毒生产需要，应提供充分的安全性评估研究数据。如适用，还需结合内源性病毒与溶瘤病毒在理化特性方面的差异，在生产工艺中设置病毒去除/灭活单元，并在产品或收获液阶段建立敏感的检测此类内源性病毒的方法。由于肿瘤细胞或携带肿瘤基因的细胞系成瘤或致瘤风险较高，建议谨慎选用。如使用具有成瘤性细胞，需要结合临床风险获益、给药途径和生产工艺对杂质（如活细胞残留、致瘤基因片段残留等）去除能力等评估使用的必要性、合理性和安全性。一般不建议使用具有致瘤性的细胞。对于

新型细胞基质和新建细胞株/系，建议参考《中国药典》的相关要求评估其相关的安全性风险（如成瘤或致瘤等），并开展相应的研究。

如果根据生产需要，对细胞基质进行了基因修饰（如赋予病毒蛋白、允许病毒复制或包装等），应考虑基因修饰的必要性和修饰方法的适用性，修饰过程不应增加额外的安全性风险，修饰基因的选择应尽量避免或降低病毒包装过程发生重组的风险。

1.3.2 生产/包装细胞的建库和检定

为了保证产品质量的稳定性，生产/包装细胞需建库管理。细胞库的制备和检定应符合《中国药典》“生物制品生产检定用动物细胞制备及质量控制”和 ICH Q5D 等相关要求。检定项目一般包括：鉴别、细胞数量和活率、成瘤性和/或致瘤性（如适用）、外源因子等。

经基因修饰建立的稳定传代细胞系/株，除上述检定项目外，还应对基因修饰的结果，如基因序列、修饰位点、拷贝数、表达水平等进行研究确认。

1.3.3 生产/包装细胞的稳定性

为了确保生产/包装细胞在传代过程中可以稳定地生产出预期质量的溶瘤病毒，生产/包装细胞应开展规范的传代稳定性研究。传代稳定性研究条件应代表或模拟商业化生产工艺，其研究项目一般应包括如鉴别、外源因子、细胞生长特

性、生产病毒能力和病毒产品质量等。新建细胞系的传代稳定性研究还需关注随着细胞传代代次增加成瘤性和/或致瘤性风险。经基因修饰建立的细胞系/株的传代稳定性研究还需关注传代过程中基因修饰部分的稳定性，如基因序列、拷贝数、蛋白表达稳定性。根据传代稳定性研究结果制定合理的限传代次，并在实际生产过程中加以限定。

另外，需开展规范的细胞库贮存稳定性研究，制定合理的贮存稳定性考察方案，关注在长期贮存过程中细胞活率、细胞生长特性、生产病毒能力等的变化。根据研究结果确定细胞库的贮存条件，细胞库在拟定的贮存条件下可满足生产需求。

2. 其他生产用物料

其他生产用物料系指除前述起始原材料外，在生产中使用的原材料，如培养基、细胞培养和生产中的添加成分、纯化试剂、辅料和生产过程中使用的关键耗材。

其他生产用物料的质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等。应对可能影响产品质量的原材料在最终产品或工艺最适阶段中的残留情况进行研究和风险评估，必要时，设定合理的限度进行监控。

原则上，生产过程中应尽可能避免使用动物/人源材料（如牛血清、胰蛋白酶等）或可能对产品产生非预期影响的原材料（如酶、抗体、细胞因子、血清、抗生素、裂解剂、

病毒稳定剂等), 研究中应充分评估其使用的必要性、合理性和安全性, 明确使用阶段及用量, 并说明其预期用途, 根据供应商检测报告和安全性评估拟定合理的企业内控标准。如某些关键原材料的检测标准是微生物限度, 建议使用前进行除菌过滤以进一步确保安全性。对于牛血清、动物胰蛋白酶等, 如有可能, 建议尽量以成分明确的血清替代物或重组来源制品(如重组胰蛋白酶)替代。如经研究认为必须使用, 应对其来源(如使用的动物是否来源于非疫区)、生产工艺(如是否采用 γ 射线辐照)、质量标准(如是否开展全面的外源因子检测)、TSE/BSE 风险等进行充分评估, 并建立企业内控标准。另外, 生产过程中不得使用青霉素等 β -内酰胺类抗生素、链霉素, 以及其它如溴乙锭等有毒试剂。

辅料相关要求请见“六、生产工艺”项下“1.2.2 辅料”部分。

生产过程中使用的关键耗材, 如一次性生物反应器、移液管路、一次性配液袋/储液袋、一次性除菌过滤器/过滤膜包等, 应具有稳定的物理或化学特性, 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器的安全性。

六、生产工艺

1. 工艺研究与开发

生产工艺开发系基于对产品已有的认知、研究基础和风

险评估，以及工艺参数与产品关键质量属性的相关性，逐步建立工艺步骤和关键工艺参数。

工艺开发过程中常伴随工艺优化和调整，应充分评估这些变更对产品质量的影响，开展相应的可比性研究，可参考ICH Q5E等相关指导原则的要求。早期临床试验阶段，由于生产工艺尚在完善，批次数量较少，可比性研究可根据有限批次的研究结果进行比较，需关注变更对产品相关质量属性如安全性（如杂质残留等）、滴度、纯度、生物学活性等的影响。随着研发进程不断推进和对产品生产工艺、质量属性认知的不断深入，可比性研究应更加全面，一般可能包括工艺性能（工艺参数和过程控制）、放行检测、扩展特性和稳定性研究等。由于目前认知有限，某些分析方法变异性可能较大，关键质量属性与临床有效性相关性尚不清楚或难以建立等因素，使得药学可比性存在较大的不确定性，建议对研究中观察到的质量差异进行充分评估。当现有认知或平台经验无法预测质量属性的差异对产品安全性和/或有效性的影响时，应考虑进一步开展非临床和/或临床的桥接研究。

1.1 原液生产工艺

目前常见的原液生产工艺包括细胞培养、病毒感染、病毒收获和病毒纯化等一系列操作过程。研究中需结合病毒和生产用细胞的特性采用适宜的培养方式，同时还应考虑病毒质量的可控性、工艺的可放大性、技术的成熟程度、工艺操

作的便利性等进行设计和制定原液生产工艺。

结合充分的工艺研究和开发，确定细胞培养和收获工艺相关参数，如培养时间、培养温度、细胞密度、病毒感染复数（MOI）或质粒转染比例（如适用）、病毒收获条件等，并拟定合理的工艺参数范围。一般情况下，为确保产品质量批间一致性，病毒接种培养时，同一工作种子批需要根据研究并按照一定范围的 MOI 接种培养。纯化工艺需充分考虑病毒理化特性、病毒活性以及杂质去除效果等进行开发与研究，根据研究结果，确定工艺步骤和工艺参数。

1.2 制剂生产工艺

1.2.1 制剂处方研究

结合质量研究和稳定性研究对辅料类型、用量等进行筛选，研究过程中建议关注病毒滴度、纯度、生物学活性、不溶性微粒、可见异物等质量属性的变化，如制剂类型为冻干剂，还需研究冷冻干燥和复溶后样品外观、pH 值、水分等质量属性的变化。溶瘤病毒产品常见低温冷冻条件下保存，因而制剂处方中一般含有冷冻保护剂、冻干保护剂等功能性辅料，建议在处方筛选研究中充分开展冷冻保护剂和冻干保护剂的种类、加入量的研究。在确保产品稳定的前提下，尽可能选择组分明确、质量可控、安全性风险较小的辅料。

1.2.2 辅料

制剂辅料质量应满足其预期功能，并符合《中国药典》

通则“生物制品生产用原材料及辅料的质量控制”的相关要求。

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，处方中应尽可能避免使用动物/人源辅料，如必须使用，应开展充分的研究以证明其使用的必要性、安全性和合理性。处方中如果使用新型辅料，需进行充分的生产工艺、质量、稳定性等研究，做好供应商审核等，制定相应的质量标准/内控标准，并参照《新药用辅料非临床安全性评价指导原则》进行相关的研究。

1.2.3 制剂工艺研究

制剂生产工艺一般指从纯化原液或配制原液（如适用）到最终制剂的过程。制剂工艺研究中应考虑配制、除菌过滤（如适用）、灌装、冻干（如适用）等操作步骤，结合工艺开发和研究，制定合理的工艺步骤和参数范围。由于溶瘤病毒是具有复制能力的活病毒，为降低其在生产过程中的传播风险，建议尽可能采用密闭灌装方式。另外，制剂生产规模建议与原液生产规模相匹配，尽量避免采用不同批次原液混合后进行半成品或成品制备的情况。在某些情况下，限于病毒的物理性质，工艺步骤中无法进行除菌过滤操作，则应加强生产用原材料的质量控制和加强生产工艺过程控制，以及制定相应措施等，控制污染风险。

1.3 工艺过程控制

为确保工艺过程的重现性和产品质量的批间一致性，强

化生产过程中的风险排查，应制定合理的工艺过程控制项目和可接受标准。工艺过程控制项目应结合工艺特点和产品特点综合考虑确定，如，细胞传代次数、细胞密度、细胞活率、病毒滴度、纯度和杂质、生物学活性等。另外，工艺过程控制中还应关注微生物安全相关项目的检测和控制，建议在生产工艺的合适阶段进行微生物限度或无菌、细菌内毒素、外源病毒因子和支原体等安全性项目的监控。某些工艺过程控制项目需采用快速检测方法，则需进行充分的研究与验证，并建议与《中国药典》方法进行比较研究（如适用）。

2. 工艺验证

工艺验证的目的是证明已经确定的生产工艺能否按照拟定的工艺步骤和参数持续稳定的生产出符合预期标准的产品。一般情况下，商业化生产工艺确定后，应在上市申请前采用代表性商业化生产工艺和规模进行规范的工艺验证，并在上市申请时提供完整的工艺验证报告。验证研究的批次数应结合工艺复杂程度，工艺可变性水平，前期工艺研究的充分性和数据积累水平，以及对生产工艺的认知水平等综合考虑，一般不少于三批，如有其他特殊情况，建议提前与监管机构开展沟通交流。验证研究的结果应能证明工艺的稳健性、可控性，以及过程控制项目和验收标准设定的合理性。此外，验证研究可能还包括（但不限于）培养基/缓冲液制备和放置条件验证、层析填料使用寿命验证、除菌过滤验证、

无菌工艺模拟验证、关键原材料灭菌性能验证等。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数据。

七、质量研究和质量标准

产品研发过程中需对产品的质量进行全面、系统、深入的研究，制定出科学、合理、可行的质量标准，并不断地修订和完善，确保其安全、有效。

1. 质量研究

质量研究需选择代表性工艺批次（如非临床研究批次、临床研究批次和/或商业化工艺批次等）以及适当生产阶段的样品（如起始原材料、工艺中间体、原液、制剂等）作为研究对象，采用物理化学、生物学和免疫学等一系列分析方法进行研究。研究项目需全面充分，尽可能涵盖所有可能与产品安全性、有效性相关的质量项目，一般包括鉴别和结构分析，生物学活性，含量，纯度、杂质和污染物，以及其他特性等。

1.1 鉴别和结构分析

建议采用多种技术手段和方法对病毒基因组、病毒形态和结构等进行鉴别。基因组水平可采用测序、限制性内切酶、PCR 等方法对病毒基因组、目的基因或调控基因特定序列进行确认。一般情况下，限制性内切酶法和 PCR 等方法仅能对某些特征性序列进行确认，无法获得全基因组序列中的其他

非预期突变的信息，因而建议采用代表性生产工艺的若干批次进行全基因组测序。如在测序中发现基因序列或位点的突变，应对突变原因进行分析，开展分子变体对产品安全性和有效性影响的评估，也可基于文献报道和/或根据其对蛋白质相互作用或功能潜在影响的模型进行评估。

病毒形态和结构的鉴别一般在颗粒完整性和蛋白质水平进行分析，通常可采用电镜法对病毒颗粒结构、颗粒大小分布等进行分析。蛋白质鉴别可采用蛋白电泳、免疫印迹、免疫中和试验（血清型鉴别）等进行分析。

1.2 生物学活性

根据产品的作用机制、生物学特性和基因修饰目的等建立可反映体内作用机制的生物学活性指标。如果产品设计有多种功能，建议分别建立相应的活性检测方法，根据活性与产品作用机制的相关性，确定一项或多项适宜的活性检测方法作为质量放行检测项目。生物学活性可采用体外法检测溶瘤病毒产品对代表性易感肿瘤细胞的毒性/裂解作用和/或其细胞中的复制能力等，或采用动物/人体肿瘤细胞原代培养物进行检测。在某些情况下，当体外实验并不能完全反映溶瘤病毒产品的体内效应时，可考虑采用动物体内检测方法进行检测。在有些溶瘤病毒产品中，生物学活性检测还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。生物学活性分析中，需要建立和使用适当的标准品，用于标定待

测样品的相对效价或计算待测样品的 IC50 值。

1.3 含量

溶瘤病毒产品可通过物理滴度（如病毒总颗粒数、基因组拷贝数、结构蛋白含量等）、感染性滴度等检测确定病毒含量。物理滴度可通过物理、生物物理等方法来测定颗粒的物理数量，或测量病毒颗粒内已知分子量和拷贝数的某种代表性的结构蛋白来评估病毒颗粒数。感染性滴度可采用噬斑形成单位（PFU）、半数组织/细胞培养感染剂量（TCID50/CCID50）等基于细胞的体外检测方法，感染性滴度检测用细胞的选择应考虑病毒载体的宿主范围和组织嗜性，选择敏感且合适的细胞系/株，检测用细胞需进行建库管理，并按照《中国药典》相关要求对细胞库进行全面检定。另外，建议进行物理滴度与感染性滴度的比值的研究和监测，可以研究并了解产品质量批间一致性和工艺稳健性，同时可以监控杂质含量情况。

1.4 纯度、杂质和污染物

由于病毒结构复杂、传代过程中易发生变异及生物学特性的改变，且对于不同病毒的表征研究手段也比较有限，难以用单一的纯度指标进行衡量，因而，产品纯度和杂质的研究需结合病毒结构特点、生产工艺特点等选择适宜的分析方法和检测项目，并拟定合理的标准限度。

1.4.1 产品相关杂质/物质

产品相关杂质/物质一般指生产中产生的与产品相关的非预期产物，一般包括分子变体、非完整包装病毒（如非包膜病毒颗粒、空壳病毒颗粒等）、错误包装病毒颗粒、无活性病毒颗粒、病毒颗粒聚集体等。一般情况下，可能影响到产品安全性和/或有效性的物质归类为工艺相关杂质，建议采用适宜的方法进行残留量检测，并进行安全性评估，必要时考虑纳入质量标准；研究数据表明对产品安全性和/或有效性无影响的物质归类为工艺相关物质，需要在合适的阶段进行监测，以确保批间一致性。

目前大多数溶瘤病毒已经经过基因修饰后删除或插入了部分基因序列，或者已经经过减毒操作，以提高其选择性并降低其毒性。在病毒包装或生产过程中，这些病毒可能会通过重组或回复突变形成初始病毒（或野生型病毒）等，另外，病毒在多次传代或生产过程中可能会发生基因序列和/或氨基酸序列突变，这些非预期的分子变体可能会改变产品复制选择性、溶瘤特性，也可能影响产品对肿瘤细胞的杀伤功能以及影响插入基因表达水平和生物学特性等，因而需要对这种非预期的分子变体进行研究和控制。鼓励采用适宜的、先进的分析方法进行分子变体的研究和检测，并结合非临床和/或临床数据拟定合理的标准限度。

在病毒生产过程中，可能会由于病毒包装不完整或错误包装产生非完整包装病毒、错误包装病毒、无活性病毒颗粒

等产品相关杂质，建议结合颗粒大小、生物学特性及理化特性等差异，选择不同原理的分析方法进行研究，如高效液相色谱法、透射电镜法、流式细胞仪法、酶联免疫法、分析超速离心法、紫外分光光度计法、PCR 法等。结合残留量的检测结果，制定合理的质量控制策略。

病毒颗粒易发生聚集形成聚集体，可能存在潜在的安全性风险，鼓励采用先进、可量化的方法进行检测，并结合聚集体对产品体外生物学活性和体内效应的影响综合评估风险，必要时进行质量控制。

1.4.2 工艺相关杂质

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(如细胞碎片、宿主细胞 DNA、宿主细胞蛋白等)、生产用原材料来源(如培养试剂、纯化试剂等)和设备/耗材来源的杂质。研究中需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，结合工艺相关杂质残留水平进行安全性评估。

由于宿主细胞 DNA 残留可能影响产品安全性，因而一般要求对其残留量进行检测和控制。生产中若使用了肿瘤细胞系(如 Hela 细胞)，或携带致癌基因、病毒改造序列的细胞(如 HEK293T)，需开展更有针对性的研究，如对宿主细胞 DNA 残留量和片段大小进行控制，建议尽量将残留 DNA 控制在 10ng/剂以内，将 DNA 残留片段大小控制在 200bp 以

下。对于已知的、具有潜在安全性风险的特定转化序列，如 293T 细胞中的 E1A、SV40 大 T 抗原序列，HeLa 细胞的 E6、E7 基因序列等，应进行相应的残留量检测和控制。

生产工艺过程中使用的细胞培养添加物，如牛血清、核酸酶、（重组）胰蛋白酶、Triton X-100、细胞因子等，应检测残留量并进行安全性评估。

设备/耗材来源的杂质如可浸出物和可提取物、色谱填料脱落物等应结合杂质类型、残留水平等进行相应的安全性评估，关注其对产品安全性和有效性的影响。

以上工艺相关杂质的可接受水平和标准限度，需要结合非临床和/或临床数据或研究经验及业界与监管共识等合理制定。

1.4.3 污染物

污染物指生产过程中引入的微生物（如细菌、真菌、支原体、外源病毒因子等）或其他相关组分（如细菌内毒素等）。生产过程中需采取措施避免引入污染物并对其进行相应的控制，建议采用放行检测，同时辅以过程监控的策略。

1.5 其他特性

结合产品类型及不同剂型开展研究，可能包括外观、颜色、澄清度、可见异物、不溶性微粒、pH 值、渗透压摩尔浓度、装量/装量差异、水分（如适用）、辅料含量等。

2. 质量标准

质量标准一般根据产品的质量研究而确定，质量研究中需要确定关键质量属性，一般情况下，关键质量属性应纳入质量标准。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品制定适用的质量标准。质量标准一般包括原液（如有）、半成品（如有）和成品质量标准。

质量标准主要由检验项目、标准限度和分析方法三方面组成。在全面、有针对性的质量研究基础上，充分考虑产品的安全性和有效性，以及生产、流通、使用各个环节的影响，确定控制产品质量的检验项目和标准限度，制定出合理、可行的、并能反映产品特征和质量变化情况的质量标准，有效地控制产品质量和批间质量的一致性。

2.1 检验项目

质量标准的检验项目应在充分的质量研究基础上，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评估等综合确定。一般包括鉴别、纯度和杂质、含量、生物学活性、污染物和一般检项等。

鉴别试验需结合产品特点选择相对特异性的方法。

纯度和杂质的检测建议采用不同原理的方法。

生物学活性应能反映药物的体内预期作用机制和疗效或具有相关性。

一般检项需根据制剂处方和剂型等制定适宜的项目，除

《中国药典》规定的常规项目外，还应考虑增加功能性辅料含量检测，冻干制剂中水分检测等。

经研究确定为关键质量属性，但是未纳入质量标准的检验项目，应有充分的理由、验证研究的支持和/或合理的质量控制措施。

2.2 标准限度

质量标准的标准限度确定通常基于安全性和有效性的考虑，一般需结合产品特点、临床试验暴露情况、各个阶段样品（特别是临床试验批次）检测数据、分析方法变异性、稳定性研究情况等综合制定，标准限度的制定应有充分的依据。

2.3 分析方法

质量标准的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要求，应进行方法学研究选择适宜的方法，并进行充分的验证。如适用且经研究后，分析方法优先选择《中国药典》规定的方法，选用药典以外的分析方法，需证明替代方法相比药典方法具有等效性或更优越。分析方法可随着产品研究进展逐渐完善，在确证性临床试验开展前建议完成方法学的确认或全面验证，以保证确证性临床试验用样品的质量与商业化生产产品保持一致。临床试验期间如发生分析方法的优化或变更，应对方法差异进行分析和论证，并对变更前后的方法进行比较，以证明两种方

法具有等效性。

2.4 标准品/对照品

为确保检测结果的可靠性和准确性，一般需建立标准品/对照品。建议根据不同研发阶段的质控要求，采用代表性样品建立标准品/对照品，做好不同阶段对照品/标准品的质量桥接研究。溶瘤病毒产品中使用标准品/对照品一般用于鉴别、理化和生物学活性测定。标准品/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定”的相关要求，并开展全面的质量研究、标定和稳定性研究。

八、外源病毒因子检测和控制

溶瘤病毒产品生产中可能存在病毒污染的风险，由于溶瘤病毒具有复制能力，因而外源病毒因子检测和控制存在一定挑战，常见的控制策略包括：

1. 生产用物料的控制

细胞库、病毒种子批以及生产过程中使用的生产用原材料需进行外源病毒因子的全面检测和控制。

细胞库的外源病毒因子检测可参考《中国药典》和 ICH Q5D 相关要求，结合细胞来源、传代或改造历史、建库过程中使用原材料情况等进行评估后确定，一般包含非特异性病毒、逆转录病毒、细胞种属特异性病毒、牛源性病毒（如使用牛血清）、猪源性病毒（如使用动物来源胰蛋白酶）、及其他潜在外源病毒等。

病毒种子批的外源病毒因子检测可通过加入中和抗体消除溶瘤病毒对检测结果的影响，中和抗体的选用应避免抗血清中存在中和潜在外源病毒因子的抗体，使用的中和抗体量应为完全中和溶瘤病毒的最低使用量，并且检测样品的浓度应合理且有研究依据，避免检测样品被过度稀释造成检测灵敏度降低的风险。如因中和抗体不能充分中和溶瘤病毒，检测结果受到干扰时，可在病毒种子生产中设置对照细胞，对照细胞的外源病毒因子检测应符合现行《中国药典》的要求。另外，也可考虑增加聚合酶链反应（PCR）、深度基因测序技术等敏感检测技术排除特异性的外源病毒因子污染的风险。

生产过程中使用的动物/人源材料应结合原材料来源进行特异性病毒检测，如人源性病毒、牛源性病毒、猪源性病毒等，病毒检测种类应全面，检测方法应满足要求。另外，还需要加强这类原材料的供应商审计，建立规范的质量管理体系，并结合供应商检测标准和风险评估建立企业内控标准。

2. 生产过程中的检测与控制

选择生产过程中最适阶段的样品（如未处理的培养收获液）进行外源病毒因子的检测和控制，开展相应研究以说明生产过程中检测阶段制定的合理性。

检测方法方面，具体要求见“第八部分 1. 起始原材料和生产用原材料的控制”。

以上可能是针对这类产品外源病毒因子检测常见的控制策略，但在一些情况下，需要结合具体产品的情况，根据研究与验证结果，与以下控制相结合或相互补的控制策略，如：病毒去除/灭活工艺步骤、放行检测（必要时，还可考虑在原液/成品中进行外源病毒因子检测）。

九、稳定性研究

稳定性研究是通过设计一系列实验来指示中间样品或成品的稳定性特征，是药物有效期制定的依据，为药物的生产工艺、制剂处方、包装材料、贮存、运输条件等方面提供依据，同时也是质量标准制定的基础。稳定性研究可参照《生物制品稳定性研究技术指导原则（试行）》和 ICH Q5C 的一般原则和相关要求进行，并根据产品特点、临床使用、贮存、包装和运输情况设计合理的研究方案，方案一般包括研究类别、研究样品、研究项目、研究条件、研究时间和研究结果等内容。

稳定性研究一般包括影响因素试验、加速试验、长期试验等。长期稳定性研究是确定产品有效期的主要依据，其研究时长应覆盖中间样品或成品拟定的有效期。

研究样品通常包括原液（如适用）、成品、需要暂存的中间产品（如适用），应采用代表性工艺生产的样品，采用商业化贮存容器，或与实际其材质相同且能代表最差暴露条件的容器中开展相应稳定性研究。

研究项目和条件应根据产品特点、贮存、运输和临床使用情况来确定，研究项目中建议涵盖对贮存/运输/使用条件敏感的检测项目，例如滴度、纯度和杂质、生物学活性、其他特性等。这些敏感的检测项目可基于产品前期研究的积累以及文献报道和研究共识等。

研究时间点的设定应遵循《生物制品稳定性研究技术指导原则（试行）》的一般要求，针对某些产品的特殊性，也可考虑灵活调整检测时间。

研究结果的分析应对不同的考察项目分别进行分析，并对产品稳定性试验结果进行综合评估。

运输稳定性研究：需根据原液（如适用）和制剂的实际运输环境和条件，开展模拟和/或实际运输过程中的稳定性研究。

使用稳定性研究：一般包括终产品解冻研究、复溶研究、与给药装置的相容性研究等，应真实模拟实际使用情况，并根据研究结果制定合理的使用条件和操作规范。

十、包装及密封容器系统

一般包括原液、中间样品、制剂的包装容器。由于包装及密封容器系统直接影响到终产品的质量，在选用时，应考虑其功能性和安全性，以保证产品质量稳定并符合临床使用的要求。通常情况下，包装及密封容器系统应满足较好的密封性、耐低温和标示内容可清晰追溯等要求，应在上市申请

前开展全面的相容性研究和密封性研究。研究中应采用代表性工艺生产的产品和代表性包装及密封容器系统开展研究，研究条件的设定应考虑容器及密封容器系统在特殊条件下的相容性和密封性。

十一、名词解释

初始病毒 (parental genotype virus): 指来源清晰, 用于重组病毒构建使用的起始病毒, 其可能是野生型病毒, 也可能是经过减毒或适应的病毒, 也可能是经过基因修饰技术改造的病毒。

分子变体 (molecular variants): 指在病毒包装或生产过程中产生的非预期的变异体, 可能包括某些基因序列和/或氨基酸序列突变形成的变异体, 也可能包括重组或回复突变形成的初始病毒 (或野生型病毒) 等。

十二、参考文献

[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(试行). 2017.

[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.

[3] 药品审评中心. 生物制品稳定性研究技术指导原则. 2015.

[4] 国家药典委员会. 《中华人民共和国药典》(2020年版) [M]. 2020.

[5] European Medicines Agency (EMA). ICH Considerations: oncolytic viruses[EB/OL]. 2009.

[6] European Medicines Agency (EMA). Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products [EB/OL]. 2018.

[7] Food and Drug Administration (FDA). Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) Guidance for Industry [EB/OL]. 2020.

[8] ICH. Q5C Stability testing of biotechnological and biological products [EB/OL]. 1995.

[9] ICH. Q5D Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products [EB/OL]. 1997.

[10] ICH. Q5E comparability of biotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process [EB/OL]. 2004.