Research  
Immunology—Review

## CAR-T 细胞产品的质量控制和非临床研究——一般原则和关键问题

李永红, 霍艳, 于雷, 王军志\*

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 August 2018

Revised 10 November 2018

Accepted 7 December 2018

Available online 29 December 2018

## 关键词

嵌合抗原受体 T 细胞

质量控制

非临床研究

安全性

有效性

临床试验

癌症免疫治疗

## 摘要

采用嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T cells, CAR-T cells) 的过继性细胞治疗是一种很有前途的肿瘤免疫治疗策略, 近年来发展迅速。CAR-T 细胞是通过基因修饰能够特异性识别肿瘤细胞表面特定抗原的 T 细胞, 对肿瘤细胞具有强大的杀灭作用。目前 CAR-T 细胞在恶性血液病患者中的临床应用已经取得振奋人心的结果, 国内外对于 CAR-T 细胞针对多种靶点以及用于治疗实体瘤的研究开发形成了很大的热点, 越来越多的产品将会进入临床试验和上市使用。这些产品的质量控制和非临床研究对于保障产品安全、有效具有重要意义, 同时也具有较大的挑战和困难。本文在相关细胞治疗和基因治疗产品指导原则的基础上, 结合 CAR-T 细胞产品的具体特点, 探讨其质量控制和非临床前研究的一般原则, 以及其中的一些关键问题。

© 2019 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

嵌合抗原受体 T (CAR-T) 细胞是一种经基因工程化的 T 细胞, 通常表达能识别特定肿瘤抗原的嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptors, CAR), 进而激活免疫系统以消灭肿瘤。CAR 通常包含三个结构域: 识别肿瘤相关抗原的胞外域 (如 scFv)、信号转导结构域 (如 CD3 $\zeta$ ) 和一个或多个胞内共刺激结构域 (如可源自 CD28、4-1BB、OX40 等)。CAR-T 细胞免疫疗法通常是从采集的患者血液中分离出 T 细胞, 然后在 GMP 生产车间对其进行基因改造, 通过逆转录病毒和慢病毒载体、转座系统 (如 SB 转座系统) 或直接将 mRNA 转导到 T 细

胞内, 使 T 细胞表面表达 CAR。在生产车间对这些 T 细胞进行扩增后将其回输到患者体内, 这种经过修饰的 T 细胞能够特异、高效地识别和杀死肿瘤细胞, 从而达到在治疗肿瘤的同时又避免对正常组织的损伤。

在靶向 CD19 分子治疗 B 细胞恶性肿瘤 (急性 B 淋巴细胞白血病及 B 细胞淋巴瘤等) 的临床试验中, CAR-T 细胞显示出令人振奋的疗效及较少的副作用 [1,2]。2017 年 8 月 31 日, 诺华 (Novartis) 公司宣布, 美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 已批准其开发的靶向 CD19 的 CAR-T 产品 Tisagenlecleucel (曾用名为 CTL019, 商品名为 Kymriah) 上市, 用于治疗 B 细胞前体急性淋巴性白血病 (acute lymphoblastic

\* Corresponding author.

E-mail address: [wangjz@nifdc.org.cn](mailto:wangjz@nifdc.org.cn) (J. Wang).

leukemia, ALL) [3]。不到两个月后, FDA又批准了第二个CAR-T药物上市, 商品名为Yescarta (axicabtagene ciloleucel), 是Kite Pharma公司开发的同样靶向CD19的CAR-T疗法, 用于治疗某些类型的大B细胞淋巴瘤的成年患者[4]。针对其他恶性肿瘤的CAR-T细胞治疗也在不断进展[5,6]。

目前已有500多项关于CAR-T的临床试验正在进行。对于恶性血液病, 需要继续开展临床试验, 以确定新靶点和新组合[7,8]。对于实体肿瘤, 需要研究更好的靶点, 或优化不完善的靶点, 以及克服肿瘤微环境中阻碍T细胞功能的障碍[9-11]。中国是除了美国之外的第二大进行CAR-T临床研究的国家。截至2018年6月, 中国进行的CAR-T临床试验占据了全球的30%左右。从目前临床研究的涉及范围与研究程度来看, CAR-T已经成为了一种不可替代的全新的免疫治疗疗法, 未来CAR-T将会成为肿瘤治疗中一块重要的基石。

随着越来越多的CAR-T细胞产品申请临床试验和上市, 由此带来的这类新产品的质量、有效性和安全性研究以及相关管理问题亟待解决。目前国内外关于细胞治疗和基因治疗产品的技术指导原则中对此有一些基本的叙述[12-16], 但这些指导原则较为宏观, 没有具体针对CAR-T细胞产品的技术要求和规范[17]。本文在

这些指导原则的基础上, 结合CAR-T细胞产品的特点, 进一步探讨其质量控制和非临床研究的一般原则, 以及其中的几个关键问题。

## 2. CAR-T 细胞质量控制和非临床研究的一般原则

图1总结了CAR-T细胞质量控制和非临床研究的一般原则。

### 2.1. 质量控制

CAR-T细胞产品目前还没有统一的技术标准, 各个制造商在CAR设计、培养技术、基因导入的方法、其他淋巴细胞的去除方法等方面各自不同, 对CAR-T细胞的质量控制需结合其具体的生产工艺情况和特点进行考虑。CAR-T细胞的生产过程应按照cGMP的要求进行。cGMP的意图是提供一个框架, 以确保在受到良好控制的设施和设备中, 由经过良好的定期培训合格的工作人员进行高质量的生产, 同时需要一个广泛的系统来记录操作的各个方面以证明持续的合规性。CAR-T细胞产品的质量、有效性和安全性, 须在参考国内外相关指导原则的基础上, 从生物产品、细胞产品和基因治疗产品不同层次综

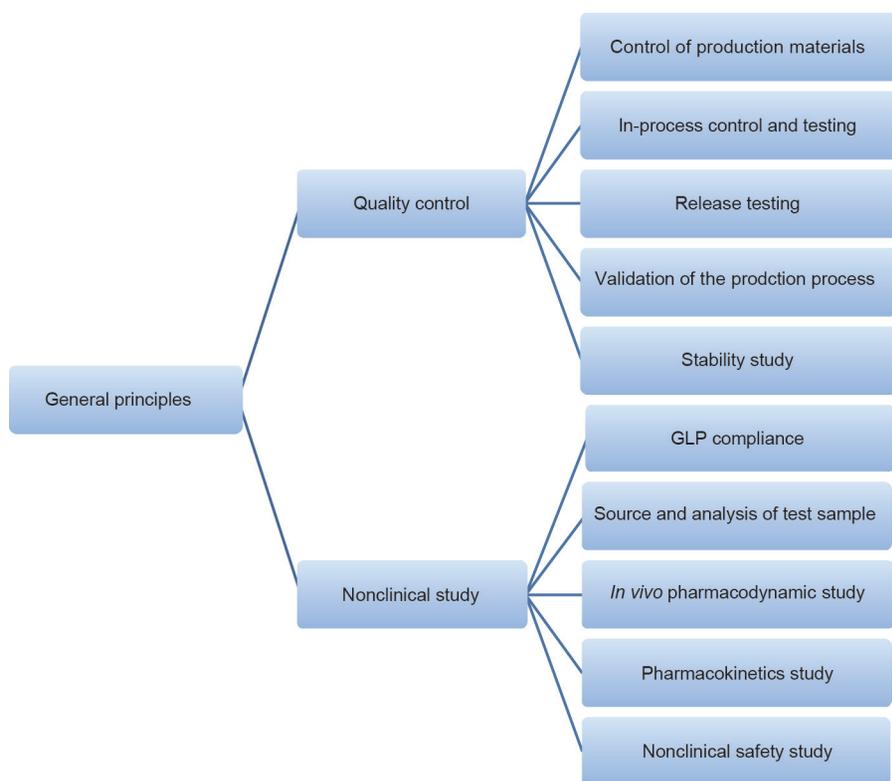


图1. CAR-T细胞治疗质量控制与非临床研究一般原则的结构示意图。

合考虑其特性，进行全面的产品质量、安全性和有效性的检验。CAR-T细胞作为一种活的“药物”，其制备流程复杂，质量控制环节众多，需要对其进行全过程的质量控制。CAR-T细胞的质量控制包括对生产用材料的检验、生产过程控制的过程检验和成品的放行检验，应分别制定相应的检测指标和可接受的标准范围。另外，还应对CAR-T细胞产品进行生产工艺验证及稳定性研究等。

#### 2.1.1. 生产用材料的控制

CAR-T细胞生产用材料是指用于制备该细胞治疗产品的物质或材料，包括细胞、基因修饰用载体物质、培养基、细胞因子、各种添加成分、冻存液和辅料等。生产用材料直接关系到产品的质量，因此研究者应建立良好、规范的生产用材料的质量管理体系，包括使用风险的评估、生产用材料供应商的审计和质量检测等工作程序。

如果由同种异体供者提供T细胞，供者细胞来源应符合国家相关的法律法规和伦理的要求，供者细胞的获取、运输、分选、检验或保存等操作步骤应经过研究和验证，并在此基础上制定明确的规范和要求，比如供者细胞的特征、培养情况、代次、生长特性、保存状态、保存条件以及检验情况等。原则上，对于适合于建立细胞库的供者细胞应建立细胞库进行保存和生产。细胞库的层级可根据细胞自身特性、生产情况和临床应用情况综合考虑；并应建立细胞库的检验标准，检验应满足安全性、质量可控性和（或）有效性的基本要求。自体捐献者不需要资格确认，其病原体筛查和检测是建议性而非强制性的。对于生产过程细胞，如生产病毒载体所用细胞，应符合来源和历史培养情况清晰、安全性风险可控、质量满足生产工艺以及建立细胞库管理等基本原则[18,19]。

目前用于CAR-T细胞生产过程中基因修饰的载体主要是慢病毒载体、逆转录病毒载体和转座子系统，以及采用mRNA电转等方法转染T细胞，使得T细胞表面表达CAR，从而特异性识别和结合肿瘤细胞表面的抗原并裂解肿瘤细胞。基因修饰用载体从生产流程上看是CAR-T细胞生产过程的原材料，但其本质是作为产品的组成部分进入人体，关于其质量控制的要求，将在后面的“3. 关键问题”中做进一步的叙述。

在CAR-T细胞生产过程中使用的培养基、血清、细胞因子、酶、抗体、抗生素和磁珠等每种物质都应予以

明确规定，并评估其是否适合预期用途。应通过检验特性、纯度、细菌内毒素、无菌性、外源因子和生物活性，来证明其质量[20]。建议应尽量避免使用含人或动物来源的成分，使用成分尽可能简单的培养基，并避免使用存在致敏可能性的试剂，如β-内酰胺类抗生素。若使用商业来源培养基，应当选择有资质的生产商并由其提供培养基的组成成分资料及相关质量合格证明。除特殊情况外，应当尽可能避免在T细胞培养过程中使用人源或动物源性血清，不得使用同种异体人血清或血浆。如必须使用动物血清，应当确保其无特定动物源性病毒污染。严禁使用海绵体状脑病流行区来源的牛血清。若培养基中含有人的血液成分，如白蛋白、转铁蛋白和各种细胞因子等，应明确其来源、批号、质量检定合格报告，并尽量采用监管机构已批准的可临床应用的产品。细胞治疗产品中使用的辅料应符合药品辅料相关的要求，宜优选经批准可用于人体的辅料，否则需要开展全面的研究与评估。

#### 2.1.2. 过程控制和过程检验

在CAR-T细胞的生产过程中应进行过程控制和过程检验。过程控制是对生产工艺过程的监控，包括生产工艺参数的监测和过程控制指标的达成等。研究者应在对整体工艺的理解和对生产产品累积经验的基础上，明确过程控制中关键的生产步骤、制定敏感参数的限定范围，以避免工艺发生偏移。过程检验是对制备过程中的细胞进行质量监控，在关键步骤或中间产品的层面对产品的关键质量属性进行相应的检验。通过建立这些过程检验的检测方法和验收标准，与细胞放行检验相互结合和互补，以达到对整体工艺和产品质量的控制，保证生产过程的可重复性和最终产品批与批之间的一致性[21,22]。

#### 2.1.3. 放行检验

在CAR-T细胞产品放行之前，必须进行适当的测试，以确保产品符合明确的放行标准。放行标准的基本原则是提供足够的测试，以确保产品的鉴别、纯度、安全性和效力等符合要求。细胞产品的这些特性通过各种方法进行测试，并通过颁发分析证书来放行产品，分析证书概括了所采用的测试方法和每个测试结果以及其可接受范围。放行检验用方法应经过研究与验证，特别是对于建立的新方法应进行全面的验证，对于药典中收录的方法应进行适用性的验证。当产品的保质期不允许进

行完整的质控检测程序用于放行时，可进行简化的放行检测程序。在这种情况下，应明确地描述和说明简化的放行检测程序的理由，同时更关键的是，在放行时缺少的信息需要通过合理的过程检验和更广泛的工艺验证进行适当的弥补。

CAR-T细胞的质量控制检测项目应当建立在产品质量研究以及对生产工艺、生产过程和临床适应症充分理解的基础之上，同时兼顾产品的特性和当下的科学认知与共识。随着研究的不断深入（如从临床前阶段进行至临床阶段），工艺相关信息应逐渐获得累积，检验方法应逐步完善，以适应各阶段的质量控制要求，建议确证性临床试验用样品的质量控制与商业化生产时的质量控制要求保持一致。质量控制一般应考虑产品鉴别、生物学效力、纯度、杂质、细胞数量（活细胞数、功能细胞数等）和一般检测（如无菌、支原体、内毒素、外观等）[23]。验收标准的制定应以临床前研究批次、临床研究批次和验证批次中检测获得的数据，以及其他相关数据（如稳定性研究、文献报道和经验等）确定。

#### 2.1.4. 生产工艺的验证

应当在对CAR-T细胞产品制备的全过程进行全面的工艺研究和进行连续多个批次（至少3个批次）生产的工艺验证。在此基础上，制定合适的工艺参数和质量标准，确保对每一过程的有效控制。对于工艺验证时生产的几个批次的产品，与常规生产的产品相比，应对其中间产品和成品进行更为广泛的检测、分析和鉴定，并为确定常规生产产品的过程检验和放行检验的检测指标和质量标准的设置提供部分依据[24]。

#### 2.1.5. 稳定性研究

在CAR-T细胞产品的生产和使用过程中，严格管理的冷链运输以及低温存储对保证细胞产品的质量，防止细菌及支原体污染等情况的发生具有重要作用。对于生产过程中需要临时保存的样品应进行稳定性研究，以支持其保存条件与存放期。CAR-T细胞产品稳定性研究的基本原则可参照一般生物产品稳定性研究的要求，并根据产品自身的特点、临床用药的需求，以及保存、包装和运输的具体情况设计合理的研究方案。例如，对于冷冻储存的细胞产品一般应模拟使用情形（如细胞复苏过程）开展必要的冻融研究。考察项目建议涵盖细胞特性、生物学效力、细胞纯度、活细胞数和比率、功能细胞数及与安全性相关的内容等[25]。

## 2.2. 非临床研究

细胞治疗产品的非临床研究主要包括体外和体内（动物）药效学研究（抗肿瘤活性）、药代动力学研究（CAR-T细胞在体内的增殖、分布和存续时间）及动物体内的安全性研究。CAR-T细胞的体外抗肿瘤活性与其效力/生物学活性研究密切相关，因此请参考“3.3. 效力试验”相关论述。本部分只讨论涉及动物的非临床研究。

### 2.2.1. GLP 符合性

CAR-T细胞治疗产品的药效学和药代动力学研究不需要在《药物非临床研究质量管理规范》（good laboratory practice, GLP）条件下进行。而非临床安全性评价研究应符合GLP要求，其中对某些可伴随在药效学研究中进行的特殊指标的检测也可以在非GLP条件下开展，但应保证试验结果的可靠性、完整性，并评估其对产品总体安全性评价的影响[26,27]。

### 2.2.2. 受试物来源

用于非临床研究的CAR-T细胞产品一般不必要使用患者的血液进行制备，可以来源于健康志愿者的捐赠。采用动物来源替代产品进行一些概念验证性研究（proof-of-concept）也具有重要的支持作用[28]。

### 2.2.3. 受试物分析

鉴于CAR-T产品制备过程的特殊性，应提供受试物完整的质量分析报告，并提供覆盖所有给药浓度以及模拟所有运输过程、处理操作，直至动物给药前过程的受试物稳定性研究数据。如果在给药前需要经过复苏、重悬等处理操作，至少还要在动物给药前对细胞形态、活细胞总数、细胞活率、颜色及除细胞之外的其他外源性异物等进行观察或检测。

### 2.2.4. 体内药效学研究

目前常用免疫缺陷鼠的移植瘤小鼠模型研究CAR-T细胞对肿瘤的抑制作用。对于治疗淋巴细胞白血病或淋巴瘤的CAR-T细胞，可采用人源细胞，如Raji、Daudi、Nalm-6、Jeko-1等细胞株，或者通过基因工程导入特异靶标的特殊稳定细胞株（如CD19-K562、CD20-K562等）在免疫缺陷啮齿类动物建立移植淋巴瘤模型[29-32]。也可采用鼠源细胞（如A20等）建立鼠源模型评价鼠源CAR-T细胞。由于未转染CAR的T细胞也会有非特异性的肿瘤细胞杀伤作用，除了溶媒对照外，最好设置T细

胞对照组（未转导CAR的T细胞、模拟转导的T细胞或者半抗原特异性CAR-T细胞）。

CAR-T细胞药效研究的最直观的方法通常采用生物发光成像（bioluminescent imaging, BLI）技术，检测表达荧光素酶的肿瘤细胞。其他检测方法包括：①流式细胞术检测动物体内肿瘤细胞的数量；②流式细胞术、酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA）、MSD（meso scale discovery）等免疫学方法检测血清中与肿瘤相关的细胞因子的变化，间接反映药效学结果[33]。

### 2.2.5. 药代动力学研究

在非临床研究中，还应该阐明细胞的体内过程，这对研究细胞的活性和安全性至关重要。由于免疫排斥问题，人源CAR-T细胞通常采用免疫缺陷动物进行研究。一般情况下，CAR-T细胞进入体内后在肿瘤细胞的存在下会大量增殖并发挥生物学作用，因此，目前CAR-T细胞最常用的药代检测模型多为移植瘤模型。非荷瘤模型的分布研究可以进行分布差异的对比。

CAR-T细胞的药代研究主要关注目标细胞在体内增殖、分布和存续时间，可选择的技术方法有成像技术、流式细胞术、免疫组化技术、定量聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）技术等，不同的方法适用于不同的检测样本和检测目的。成像法可以直观检测CAR-T细胞的体内分布，需要对细胞进行各种标记，如放射性同位素标记、遗传修饰（如表达绿色荧光蛋白、荧光素酶）标记、纳米粒子标记（如铁-葡聚糖纳米粒子）等；流式细胞术可以检测动物血液、骨髓和脾脏中的CAR-T细胞[31]；免疫组化的方法可以检测脾脏或其他脏器中CD3<sup>+</sup>细胞或CAR<sup>+</sup>细胞的分布，以指示人T细胞在脏器中的分布和累积；定量PCR方法可以检测所有类型样本中代表人源CAR-T细胞的DNA或者RNA水平。目前，一些新的技术（如原位杂交等方法）也被开发用来检测CAR-T细胞的组织分布。

### 2.2.6. 非临床安全性研究

根据已经进行的CAR-T细胞的临床研究结果，该类产品的安全性风险主要包括：细胞因子释放综合征[34]、神经毒性[35]、B细胞减少[36]等。另外，转基因细胞的成瘤性/致癌性问题也需要重点考虑。上述不良反应需要在非临床动物研究中进行何种程度的预测国内外尚无统一标准。同时动物毒理学研究也存在着动

物模型、种属特异性等具有挑战性的难题。

动物安全性研究除了常规毒理学指标（临床症状、体重、摄食量、血清生化、血液学、大体病理和组织病理学）外，还包括免疫毒性指标，如移植抗宿主反应（graft-versus-host reaction, GVHR）、外周血细胞计数及表型分析、血清细胞因子水平（如IL-2、IL-6、INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 等）等的检测[37-40]。另外，如果可能，也可以结合或者单独进行安全药理学、局部耐受性等研究。一般不进行常规遗传毒性组合研究和生殖毒性的研究。致癌性研究也需要进行特殊考虑。

## 3. 关键问题

图2总结了Car-T细胞质量控制和非临床研究的关键问题。

### 3.1. 基因修饰用载体的质量控制

CAR-T细胞产品是基因治疗与细胞治疗技术结合的产物。载体作为基因治疗的工具，可能带来插入突变、复制型病毒、外源因子污染等风险，同时其携带的遗传物质是CAR-T细胞的重要组成部分，是使T细胞具有强大的识别和杀伤肿瘤细胞活性的重要基础。因此，载体的质量至关重要，与生产中所用的其他原材料特性完全不同，应作为产品的组成部分进行管理。基因修饰用载体的生产和质量控制应符合已颁布的基因治疗产品相关指导原则的要求。同时，由于对基因治疗产品多年的研究，其质量控制在中国和国外已有许多的经验和文献可供参考[41-43]。

基因修饰用载体应是在cGMP条件下生产的，具有高品质并已经过全面质量检测的临床级产品。载体的生产工艺须经过验证，证明它可以用控制的工艺流程重复生产出安全有效的、质量一致的载体。载体生产通常需要的关键原材料是细胞、培养基和血清以及质粒。其中每一项都必须来自经批准的供应商，并且应该经过严格的测试程序，以降低将外源因子引入生产过程的风险。包装逆转录病毒的稳转细胞需要建立细胞库体系，而瞬时转染的慢病毒载体制备系统需要建立菌种库及细胞库体系，各自需要按照相应要求进行管理和检测。建立的细胞库、毒种库和菌种库以及源自动物的培养基成分同样需要进行广泛的检测。生产过程中收获的载体应进行纯化，并在适宜的制剂配方下保存，同时应开展稳定性研究保证载体产品的稳定性。对于逆转录病毒载体、慢

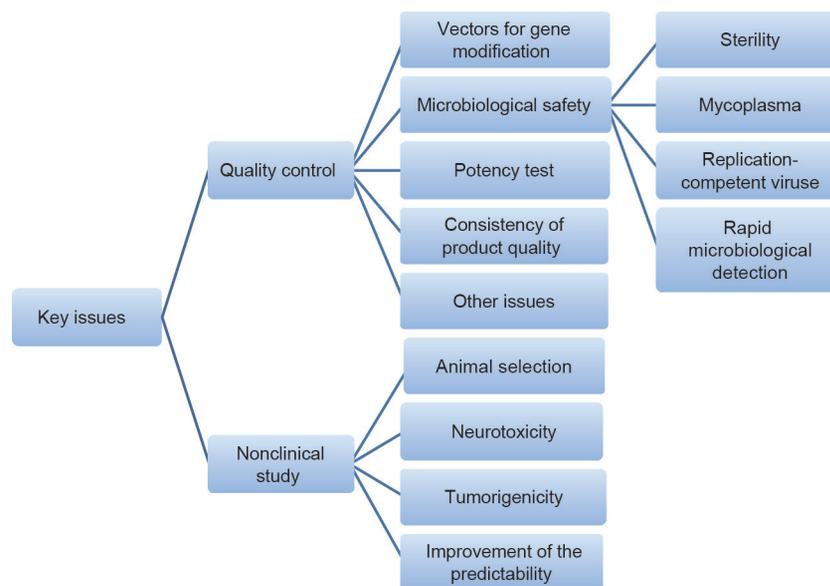


图2. CAR-T细胞治疗质量控制与非临床研究关键问题的结构示意图。

病毒载体[44]以及转座子质粒系统[45]，载体终产品的质量控制在通常的检测项目见表1。应根据不同载体的本身特点及生产工艺情况，建立其质量控制项目和标准。另外，由于CAR-T细胞的基因修饰用载体不是直接进入患者体内，而是随细胞的工艺过程经过稀释和洗涤等步骤，因此需要按照工艺验证和风险评估的情况制定合理的质量标准。

### 3.2. 微生物安全性

CAR-T细胞可能产生的微生物安全性问题包括细菌、真菌、支原体、外源病毒因子的污染以及产生载体来源的复制型病毒等。对微生物安全性问题需要极其关注和高度重视，因为微生物污染在CAR-T细胞的生产制备过程中容易发生，并且细胞终产品无法去污染处理。控制CAR-T细胞的微生物安全性主要是对生产用材料的严格检测、生产过程按照cGMP要求的严格控制，以及对产品的微生物检验。下面主要对微生物检验中的无菌检查、支原体检查、复制型病毒检测以及微生物快速检测方法进行介绍。

#### 3.2.1. 无菌检查

无菌检查的经典方法是药典上所述的14天培养的方法，但由于CAR-T细胞产品常常需要在生产后短时间内及时输注给患者，因此需要采用革兰染色或丫啶橙染色等快速的替代方法进行中间过程控制和放行检测方法，

在快速方法得到充分验证前需要两种方法平行进行。每批培养的CAR-T细胞在患者输注前均应进行无菌检查的监测，建议在培养开始后3~4天起每间隔一定时间取培养液样品进行，并包括放行前48~72 h的检测。如果在细胞制备的早期发现有污染的情况，应终止该批细胞产品的继续制备。产品的放行可仅根据快速检测的结果进行决定，但同时需要跟踪14天培养检测的情况和监测患者的情况。必须制定计划，说明快速放行检测的结果和给药后取得的结果冲突时的解决办法。通常要求有正式的程序通知受试者的医生，识别发生感染的组织器官，并测定抗生素的敏感性，进行及时有效的治疗。如果发生无菌检查出现阳性结果的情况，应及时对生产过程进行检查，提出相应的纠正/预防措施。

#### 3.2.2. 支原体检查

支原体污染可能有几种不同来源，其中可能的主要来源是培养中使用的动物血清产品和细胞培养的环境（特别在采用开放的培养系统时）。建议在高风险的生产阶段对产品进行支原体检查，例如，在收获的培养物富集后细胞洗涤前这个阶段，对细胞和培养物上清液进行检测。由于CAR-T细胞产品常常需要在短时间内制造并回输给患者，采用培养法检测支原体通常在时间上不可行，因此需要同时采用以PCR为基础的支原体分析方法或其他快速的替代检测方法，需要对这些方法进行验证，证明其具有适当的灵敏度和特异性。

表1 CAR-T细胞基因修饰用载体的常规质控项目

Category	Assays of retroviral/lentiviral vectors	Assays of transposon plasmid vectors
Identity	RT-PCR sequencing	Restriction enzyme mapping PCR Sequencing
Potency/concentration	Infectious/transducing titer Particle number (P24 ELISA) Particle to infectious/transducing titer ratio Transgene expression Bioactivity/ functionality	Concentration Transgene expression Bioactivity/ functionality
Purity	Host cell protein Host cell DNA Residual reagents (antibiotics, BSA, Benzonase, etc.)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> HPLC purity (including ratio of supercoiled DNA) Host cell protein Host cell DNA Bacterial RNA Antibiotics
Safety	Sterility Bacterial endotoxin RCR/RCL Adventitious virus Mycoplasma	Sterility Bacterial endotoxin
Physiochemical characteristics	Appearance pH Osmolality Particle size distribution	Appearance pH Osmolality

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; BSA: bovine serum albumin; HPLC: high performance liquid chromatography; RCR: replication-competent retrovirus; RCL: replication-competent lentivirus.

### 3.2.3. 复制型病毒的检测

虽然逆转录病毒载体和慢病毒载体被设计为复制缺陷型，但在细胞产品生产期间或输入患者后体内仍有可能发生重组，导致产生新型的可复制型逆转录病毒或慢病毒（replication competent retrovirus/lentivirus, RCR/L）。美国FDA发布的有关细胞产品和患者中RCR/L检测的指导原则建议在相应的病毒载体、细胞产品和输注后的患者中用合适的生物学和（或）分子检测方法监测RCR/L[46,47]。用于筛查载体产品的RCR通常使用生物测定法，而基因转移后患者的监测依赖于分子或血清学测试[48,49]。分子和血清学检测比生物检测快，耗费资源少，但容易出现假阳性。最常用的RCR生物测定法是扩展的S<sup>+</sup>/L<sup>-</sup>测定法和标记物拯救测定法[50–52]。RCL的生物检测法最常见的是用一个处于在扩增阶段的细胞系将潜在的复制型病毒扩增至较高滴度，随后使用ELISA或分子测定法检测[47,53–55]。迄今为止，文献报道中的相关产品均没有在相应的病毒载体、转导的细胞产物或受试患者中检测到阳性RCR/L结果，有研究者提出是时候修改FDA指导原则中关于RCR/L监测的要求[56–59]。

### 3.2.4. 微生物的快速检测方法

大多数基于CAR-T细胞的治疗法具有有限的保存期限。在一些情况下，转导的细胞可以被冷冻，从而在产品放行之前完成检测。然而，多数情况下CAR-T细胞疗法不可能在给药之前对产品完成传统的无菌检查、支原体检查、RCL和外源病毒因子检测等实验操作。因此亟待研究开发相应的快速检测方法。

目前市场上有多种快速微生物检测仪器被应用于临床血液培养检测、食品卫生及其他行业。这些仪器通常基于二氧化碳传感器、三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）生物发光、荧光标记生物的流式细胞术等技术，可用于替代目前的无菌检测[60]。对于支原体检查[61,62]和RCL[63]检测，目前有核酸检测（nucleic acid testing, NAT）的方法用于替代传统的方法。对于外源病毒因子的检测，大规模平行测序或深度测序可用于检测来自不同病毒的多个DNA序列，可能用于替代传统方法[64–66]。但这些方法均需要进行广泛、深入的优化开发和验证，并证明其与标准测试方法具有可比性或优越性，从而获得相关国家监管机构的认可。

### 3.3. 效力试验

效力试验用来检测CAR-T细胞产品是否具有目标治疗能力，这与产品的疗效密切相关[67,68]。效力试验对产品的相关生物功能提供定量测定，以保证批次放行产品的质量和一致性，并为稳定性评价以及工艺变更后的可比性评价等提供重要的基础。可能影响CAR-T细胞效力/活性的因素有许多，包括转染效率、CAR结构、基因载体、培养条件、细胞类型及其比例等。通常检测的项目包括转导的T细胞的数量、抗原特异性T细胞功能（如IFN- $\gamma$ 的产生和细胞毒性刺激）。细胞表面上CAR的表达是了解CAR-T细胞产品活性的关键特征，CAR<sup>+</sup>细胞比例数量是重要的活性指标，可通过流式细胞术和PCR检测CAR-T细胞。在成品中应设置相应的放行标准保证含有足够多的CAR<sup>+</sup>T细胞来保证疗效。只要可能，应该建立具有效力赋值的参考批细胞并用于校准后面的检测。

抗原特异性T细胞功能常采用体外细胞毒试验（*in vitro* cytotoxic assay）的方法，检测CAR-T细胞产品对带有靶抗原肿瘤细胞的杀伤能力，经典的方法是采用<sup>51</sup>Cr释放试验，由于其放射性则需要研发其他替代方法，如荧光染料双（乙酰氧基甲基）2,2':6',2''-三联吡啶-6,6''-二羧酸酯[bis(acetoxymethyl)-2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-dicarboxylate, BATDA]或羟基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯（carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE）标记等。由于CAR-T产品的复杂性质，单独的效力试验往往难以反映产品的有效性，因此建议在产品研发的早期阶段开发多种检测方法，以便随着经验的积累，可以更灵活地选择最具指示效力的检测方法。

CAR-T细胞疗法的作用机制是多方面和复杂的，并且尚不完全明确。目前常采用IFN- $\gamma$ 和细胞毒性测定的效力试验还不能很好预测产品的临床疗效和安全性。因此，有必要对CAR-T细胞产品进行全面的分析，深入了解不同T细胞亚型所起的多种作用，分析CAR-T细胞与肿瘤微环境的相互作用机制，进一步研究更好或更多种效力试验测定方法，以更准确地反映CAR-T细胞产品功效的完整情况。此外，由于CAR-T在体内扩增，有必要评估CAR<sup>+</sup>T细胞占总T细胞的比率、CAR拷贝数和效力之间的相互联系。而在最近的文献中，Xiong等[69]通过定量F-肌动蛋白、肿瘤抗原簇集、裂解颗粒（lytic granule, LG）的极化和关键信号分子在免疫突触（immunological synapse, IS）内的分布来评估CAR-T介导

的免疫突触的质量，从而较好地预测CAR-T修饰细胞的有效性。

### 3.4. 产品质量的一致性

CAR-T细胞产品的质量依赖于完善的质量控制（quality control, QC）系统来保证不同生产批次间的一致性。在生产过程中应对起始材料、中间产品和最终产品进行严格测试并确保符合设置的可接受标准。CAR-T细胞的起始材料目前主要是患者来源的T细胞和基因修饰用载体。细胞材料来源的一致性通常因为供体的巨大差异而难以进行准确的限定，从而给保证终产品的一致性带来很大的困难。供体的控制内容不仅包括对供体身体状况的要求，如肿瘤类别及分期、采集初始样本前与当下治疗方案的间隔、与治疗相关的常规身体检查指标外，还包括外周血细胞的数量或某种表型细胞的数量、病原体筛查要求等。基因修饰用载体由于可在GMP条件下规模化生产，其质量的一致性对于保证转染效率的稳定性和最终CAR-T细胞产品的一致性显得尤为重要。根据诺华制药公司使用牛津生物医学公司（Oxford BioMedica, OXB）生产的慢病毒载体的经验，他们发现一致的载体质量可以在随后的CAR-T细胞生产过程中最大限度地减少不同生产场地间的差异（site to site variation）[70]。另外，鉴于CAR-T细胞在体外生产过程的复杂性，良好的过程控制和过程检验能对生产过程中直接或间接影响产品质量的各种因素进行有效控制，以确保获得的产品满足预期的要求，从而保证产品的一致性。目前一些先进的过程分析技术，包括各种生物传感器[71]、图像分析技术[72]、自动流式细胞术[73,74]、代谢通量分析[75]等在CAR-T细胞生产过程中的应用有待于进一步研究，以最终提高CAR-T细胞的生产过程质量控制水平，达到和重组单抗药等生物产品一样能采用质量源于设计（quality-by-design, QbD）的策略[76]。另外，自动化生产技术的整合将会更好地实现生产的一致性[77,78]。在整个制造过程和终产品中控制CAR-T细胞产品的转导效率、表达载体的拷贝数、CAR表达的水平、CAR-T细胞的表型和成熟以及功能能力，如细胞因子释放、靶细胞杀伤等，是确保获得一致性产品的基本要求。而通过进行工艺验证，可以提供能够持续生产质量一致性产品的科学证据。

### 3.5. 质量控制的其他问题

在CAR-T细胞以及基因修饰用载体的检测中，如流

式细胞法检测细胞表面标志物、CAR-T细胞效力试验、病毒滴度[79]等，需要使用参考物质用于分析方法的开发、验证和检测。通常采用已充分表征的产品作为测量标准来评估不同制造商、不同批次的产品，这对于确保产品的质量和生产的一致性以及建立适当的临床剂量等必不可少。目前缺乏相应的被认可的参考物质，特别是对于如何建立细胞类产品的参考物质还缺乏成熟的经验，需要不同标准制定机构、制造商和学术机构之间的积极合作，建立不同级别如国际、区域以及国家的参考物质。

另外，在CAR-T的生产成本中，分析质控占到了很大比例，因此需要在效率和成本效益方面大力优化和改进，从而建立简便、有效以及合理的质量控制检测体系，对于促进CAR-T细胞疗法惠及更多患者具有非常重要的现实意义。

### 3.6. 非临床研究中动物的选择

CAR-T细胞作为一种个体化的人源细胞产品，其非临床研究首先要选择相关的动物种属。人源CAR-T细胞给予免疫功能正常的动物时会出现异种物种间排斥，导致人源细胞被清除或者出现移植物抗宿主反应(GVHR)，可考虑采用遗传性免疫缺陷动物进行研究；给予正常动物免疫抑制剂也可能解决异源细胞带来的免疫反应问题，但是由于对药效或者毒理作用的评价有一定干扰，需要对评价结果进行慎重评估。在免疫缺陷小鼠植入人的造血细胞、淋巴细胞或者组织而具有部分人免疫功能的免疫系统人源化小鼠在CAR-T细胞产品的评价中初步得到应用[80]。然而由于当前的人源化小鼠模型仍不完善，基于该模型的应用仍以探索为主，尚不能全面应用到非临床研究中[81]。也可以考虑采用动物源性的CAR-T代替人源细胞在动物上进行验证性研究[82]。

目前常用免疫缺陷鼠的移植瘤小鼠模型研究CAR-T细胞对肿瘤的抑制作用。也有报道采用同源小鼠模型和转导人肿瘤相关抗原基因的小鼠模型研究小鼠CAR-T细胞产品的抑瘤作用，这两种小鼠具有完整免疫系统，可在一定程度上反映宿主对CAR-T细胞的免疫反应，是一种概念验证性研究。对于治疗淋巴细胞白血病或淋巴瘤的CAR-T细胞，可采用人源细胞，如Raji、Daudi、Nalm-6、Jeko-1等细胞株，或者通过基因工程导入特异靶标的特殊稳定细胞株(如CD19-K562, CD20-K562等)在免疫缺陷啮齿类动物建立移植淋巴瘤模型[29-32]。

也可采用鼠源细胞如A20等建立鼠源模型评价鼠源CAR-T细胞。

目前用于CAR-T细胞非临床安全性研究的动物模型各有优缺点。同源小鼠模型和表达人肿瘤相关抗原(TAA)的转基因小鼠具有完整的免疫系统，但是，其局限性在于受试的CAR-T细胞需要的是鼠来源的细胞。移植瘤小鼠模型作为疾病动物模型可以模拟CAR-T的作用过程，其缺点是没有宿主免疫系统，不能完全模拟人体中出现的CRS带来的级联反应，不能检测脱靶毒性。非荷瘤的免疫缺陷鼠由于缺乏免疫细胞，不会产生免疫排斥反应，可以使CAR-T细胞在其体内较长时间存活，更适合对CAR-T细胞制剂的整体安全性风险以及成瘤性/致瘤性进行研究。免疫系统重建小鼠模型可以在动物体内模拟人免疫系统，但是，这种模型的统一和标准化目前尚存在难点，比如，用于制备模型的人CD34<sup>+</sup>造血干细胞/祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cells, HSPC)的来源多种多样、重建鼠个体差异大、重建的免疫系统与CAR-T细胞会发生免疫排斥、髓系细胞发育不全等。非人灵长类(猴)免疫系统和生理学与人接近，对于预测CAR-T细胞在人体的安全性本该是较为适宜的动物模型。但是，因为免疫原性的问题，在猴体内不能对CAR-T进行长期毒性的研究，目前在CAR-T研究中应用的报道很少。

### 3.7. 神经毒性的考察

目前，还没有很好的动物模型和方法可以在临床前很好地预测临床上出现的CAR-T细胞的神经毒性。常规的安全药理学功能观察试验组合(functional observation battery, FOB)研究等不一定适合CAR-T细胞的作用特点，有研究认为，CAR-T细胞治疗产生的神经毒性可能与细胞因子水平升高有关[83]。因此，可以尽可能地考虑神经毒性研究与其他毒性研究的结合，重点是在临床研究中出现CRS的时间点观察神经毒性。对于在不能很好地模拟CRS的动物模型中进行的神经毒性考察的意义需要审慎考虑。

### 3.8. 致瘤性研究

作为一种终末分化的体细胞治疗产品，理论上CAR-T细胞成瘤性/致瘤性风险较低。体外评价方法软琼脂克隆试验可通常表现为阴性结果。在基因组插入位点分析中，因插入是随机的，每例患者的插入位点可能不尽相同；即使插入位点为可能致瘤的位点，随着

CAR-T细胞死亡或体内对CAR-T细胞的免疫应答，也无法确定其致瘤性。但对于导入了外源基因的CAR-T细胞产品，需通过病毒载体插入人基因组的插入位点分析、体外细胞永生化和增殖、体内研究中异常/异位增生性病变（如增生、肿瘤）等研究初步评估其致瘤性风险。体内致瘤性研究可与较长周期的动物毒理学研究伴随开展，可以在临床试验期间完成。

### 3.9. 提高非临床研究的预测性

目前CART非临床动物研究亟需解决的问题是对临床研究安全性风险预测的相关性问题。如果没有特别合适的动物模型模拟人源细胞在机体内最主要的生物学活性反应过程，动物研究对临床风险的外推意义就会大打折扣。鉴于CAR-T细胞是个性化程度很高的治疗产品，并且有很多的临床研究经验，动物实验研究应该侧重于生物分布以及机理/活性验证研究，比如，采用同源细胞产品在动物源性疾病模型进行药效和毒性研究，或者与常规肿瘤药效学相同，采用免疫缺陷动物移植人肿瘤模型进行人源CAR-T细胞的研究。最终的安全性和有效性评价应该以临床试验作为最重要的证据支持。

## 4. 结论

CAR-T细胞产品是一种新型的复杂的生物产品，其不断开发将会带来越来越多的产品进入临床试验和上市使用，这些产品的质量控制在非临床研究对于保障这些产品安全、有效具有重要意义，同时也具有较大的挑战和困难。本文针对CAR-T的具体特点，结合细胞治疗和基因治疗的相关技术指南提出其中的一般原则和关键问题，希望能为相关产品的研发和生产人员有益参考。

## Compliance with ethics guidelines

Yonghong Li, Yan Huo, Lei Yu, and Junzhi Wang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## References

- [1] Landoni E, Savoldo B. Treating hematological malignancies with cell therapy: where are we now? *Expert Opin Biol Ther* 2018;18(1):65–75.
- [2] Li S, Yang Z, Shen J, Shan J, Qian C. Adoptive therapy with CAR redirected T cells for hematological malignancies. *Sci China Life Sci* 2016;59(4):370–8.
- [3] Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018;378(5):439–48.
- [4] Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2017;377(26):2531–44.
- [5] Zhang E, Gu J, Xu H. Prospects for chimeric antigen receptor-modified T cell therapy for solid tumors. *Mol Cancer* 2018;17(1):7.
- [6] Gauthier J, Yakoub-Agha I. Chimeric antigen-receptor T-cell therapy for hematological malignancies and solid tumors: clinical data to date, current limitations and perspectives. *Curr Res Transl Med* 2017;65(3):93–102.
- [7] Geyer MB, Brentjens RJ. Review: current clinical applications of chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells. *Cytotherapy* 2016;18(11):1393–409.
- [8] Oluwole OO, Davila ML. At the bedside: clinical review of chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for B cell malignancies. *J Leukoc Biol* 2016;100(6):1265–72.
- [9] Zhang BL, Qin DY, Mo ZM, Li Y, Wei W, Wang YS, et al. Hurdles of CAR-T cell based cancer immunotherapy directed against solid tumors. *Sci China Life Sci* 2016;59(4):340–8.
- [10] Newick K, O'Brien S, Moon E, Albelda SM. CAR T cell therapy for solid tumors. *Annu Rev Med* 2017;68:139–52.
- [11] Mirzaei HR, Rodriguez A, Shepphird J, Brown CE, Badie B. Chimeric antigen receptors T cell therapy in solid tumor: challenges and clinical applications. *Front Immunol* 2017;8:1850.
- [12] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy. *Hum Gene Ther* 2001;12(3):303–14.
- [13] European Medicines Agency. Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells. London: European Medicines Agency; 2010.
- [14] European Medicines Agency. Guideline on human cell-based medicinal products. London: European Medicines Agency; 2007.
- [15] China Food and Drug Administration. Technical guideline on human cell therapy research and quality control of preparation. Beijing: China Food and Drug Administration; 2003. Chinese.
- [16] China Food and Drug Administration. Technical guideline on cell therapy product research and evaluation (trial). Beijing: China Food and Drug Administration; 2017. Chinese.
- [17] Petricciani J, Hayakawa T, Stacey G, Trouvin JH, Knezevic I. Scientific considerations for the regulatory evaluation of cell therapy products. *Biologicals* 2017;50:20–6.
- [18] Plavic M. Q5D: derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products. In: Teasdale A, Elder D, Nims RW, editors. ICH quality guidance: an implementation guide. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 1998. p. 375–93.
- [19] World Health Organization. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Geneva: World Health Organization; 2010.
- [20] The United States Pharmacopeial Convention. Ancillary materials for cell, gene and tissue engineered products. In: The United States pharmacopeia and the national formulary: general chapter <1043>. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2012. p. 6850–8.
- [21] Armstrong A. Advances in assay technologies for CAR T-cell therapies. *BioPharm Int* 2016;28(2):32–7.
- [22] Piscopo NJ, Mueller KP, Das A, Hematti P, Murphy WL, Palecek SP, et al. Bioengineering solutions for manufacturing challenges in CAR T cells. *Biotechnol J*. Epub 2017 Sep 18.
- [23] Gee AP. Manufacturing genetically modified T cells for clinical trials. *Cancer Gene Ther* 2015;22(2):67–71.
- [24] Hollyman D, Stefanski J, Przybylowski M, Bartido S, Borquez-Ojeda O, Taylor C, et al. Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *J Immunother* 2009;32(2):169–80.
- [25] Tumaini B, Lee DW, Lin T, Castiello L, Stroncek DF, Mackall C, et al. Simplified process for the production of anti-CD19-CAR-engineered T cells. *Cytotherapy* 2013;15(11):1406–15.
- [26] Center for Drug Evaluation of the China Food and Drug Administration. Current considerations for non-clinical research and evaluation of CAR-T products. Beijing: Center for Drug Evaluation of the China Food and Drug Administration; 2018. Chinese.
- [27] National Institutes for Food and Drug Control. Notice on the publication of "Considerations for quality control testing and non-clinical research of CAR-T cell therapy products". Beijing: National Institutes for Food and Drug Control; 2018. Chinese.
- [28] Siegler EL, Wang P. Preclinical models in chimeric antigen receptor-engineered T-cell therapy. *Hum Gene Ther* 2018;29(5):534–46.
- [29] Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih PL, Silva-Benedict A, Liu L, Rader C, et al. The non-signaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer Immunol Res* 2015;3(2):125–35.
- [30] Cooper LJ, Al-Kadhimi Z, Serrano LM, Pfeiffer T, Olivares S, Castro A, et al. Enhanced antilymphoma efficacy of CD19-redirection influenza MP1-specific CTLs by cotransfer of T cells modified to present influenza MP1. *Blood* 2005;105(4):1622–31.
- [31] Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2013;121(7):1165–74.

- [32] Hudecek M, Lupo-Stanghellini MT, Kosasih PL, Sommermeyer D, Jensen MC, Rader C, et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clin Cancer Res* 2013;19(12):3153–64.
- [33] Tammana S, Huang X, Wong M, Milone MC, Ma L, Levine BL, et al. 4-1BB and CD28 signaling plays a synergistic role in redirecting umbilical cord blood T cells against B-cell malignancies. *Hum Gene Ther* 2010;21(1):75–86.
- [34] Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2016;16(9):566–81.
- [35] Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13(6):370–83.
- [36] Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov* 2013;3(4):388–98.
- [37] Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia* 2016;30(2):492–500.
- [38] Ghosh A, Smith M, James SE, Davila ML, Velardi E, Argyropoulos KV, et al. Donor CD19 CAR T cells exert potent graft-versus-lymphoma activity with diminished graft-versus-host activity. *Nat Med* 2017;23(2):242–9.
- [39] Liu L, Sommermeyer D, Cabanov A, Kosasih P, Hill T, Riddell SR. Inclusion of Strep-tag II in design of antigen receptors for T-cell immunotherapy. *Nat Biotechnol* 2016;34(4):430–4.
- [40] Almásbak H, Walseng E, Kristian A, Myhre MR, Suso EM, Munthe LA, et al. Inclusion of an IgG1-Fc spacer abrogates efficacy of CD19 CAR T cells in a xenograft mouse model. *Gene Ther* 2015;22(5):391–403.
- [41] Li YH, Rao CM, Zhao Y, Gao K, Yuan LY, Han CM, et al. Study of requirements for quality control of recombinant adenovirus-mediated human endostatin. *Chin J Cancer Biother* 2005;12(2):138–42. Chinese.
- [42] Li YH, Zang YC, Yuan LY, Shi XC, Rao CM, Wang JZ. Study on quality control methods and requirements of recombinant plasmid DNA expressing human plasminogen kringle 5. *Chin J Pharm Anal* 2008;28(5):661–6. Chinese.
- [43] Fu ZH, Gao K, Li YH, Li X, Tai L, Wang L, et al. Analysis on quality of recombinant adeno-associated virus 2 encoding tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand. *Chin J Biologicals* 2015;28(5):501–4. Chinese.
- [44] Wang X, Rivière I. Manufacture of tumor- and virus-specific T lymphocytes for adoptive cell therapies. *Cancer Gene Ther* 2015;22(2):85–94.
- [45] Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Olivares S, Zhang L, Yang G, et al. Manufacture of clinical-grade CD19-specific T cells stably expressing chimeric antigen receptor using Sleeping Beauty system and artificial antigen presenting cells. *PLoS ONE* 2013;8(5):e64138.
- [46] Center for Biologics Evaluation and Research [CBER] (United States). Guidance for industry: supplemental guidance on testing for replication-competent retrovirus in retroviral vector based gene therapy products and during followup of patients in clinical trials using retroviral vectors. *Hum Gene Ther* 2001;12(3):315–20.
- [47] Cornetta K, Yao J, Jasti A, Koop S, Douglas M, Hsu D, et al. Replication-competent lentivirus analysis of clinical grade vector products. *Mol Ther* 2011;19(3):557–66.
- [48] Long Z, Li LP, Grooms T, Lockey C, Nader K, Mychkovsky I, et al. Biosafety monitoring of patients receiving intracerebral injections of murine retroviral vector producer cells. *Hum Gene Ther* 1998;9(8):1165–72.
- [49] Martineau D, Klump WM, McCormack JE, DePolo NJ, Kamantigue E, Petrowski M, et al. Evaluation of PCR and ELISA assays for screening clinical trial subjects for replication-competent retrovirus. *Hum Gene Ther* 1997;8(10):1231–41.
- [50] Printz M, Reynolds J, Mento SJ, Jolly D, Kowal K, Sajjadi N. Recombinant retroviral vector interferes with the detection of amphotropic replication competent retrovirus in standard culture assays. *Gene Ther* 1995;2(2):143–50.
- [51] Forestell SP, Dando JS, Böhnlein E, Rigg RJ. Improved detection of replication-competent retrovirus. *J Virol Methods* 1996;60(2):171–8.
- [52] Miller AD, Bonham L, Alfano J, Kiem HP, Reynolds T, Wolgamot G. A novel murine retrovirus identified during testing for helper virus in human gene transfer trials. *J Virol* 1996;70(3):1804–9.
- [53] Escarpe P, Zayek N, Chin P, Borellini F, Zufferey R, Veres G, et al. Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparations. *Mol Ther* 2003;8(2):332–41.
- [54] Farley DC, McCloskey L, Thorne BA, Tareen SU, Nicolai CJ, Campbell DJ, et al. Development of a replication-competent lentivirus assay for dendritic cell-targeting lentiviral vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2015;2:15017.
- [55] Corre G, Dessainte M, Marteau JB, Dalle B, Fenard D, Galy A. “RCL-pooling assay”: a simplified method for the detection of replication-competent lentiviruses in vector batches using sequential pooling. *Hum Gene Ther* 2016;27(2):202–10.
- [56] Bear AS, Morgan RA, Cornetta K, June CH, Binder-Scholl G, Dudley ME, et al. Replication-competent retroviruses in gene-modified T cells used in clinical trials: is it time to revise the testing requirements? *Mol Ther* 2012;20(2):246–9.
- [57] McGarrity GJ, Hoyag G, Winemiller A, Andre K, Stein D, Blick G, et al. Patient monitoring and follow-up in lentiviral clinical trials. *J Gene Med* 2013;15(2):78–82.
- [58] Marcucci KT, Jadlowsky JK, Hwang WT, Suhoski-Davis M, Gonzalez VE, Kulikovskaya I, et al. Retroviral and lentiviral safety analysis of genemodified T cell products and infused HIV and oncology patients. *Mol Ther* 2018;26(1):269–79.
- [59] Cornetta K, Duffy L, Turtle CJ, Jensen M, Forman S, Binder-Scholl G, et al. Absence of replication-competent lentivirus in the clinic: analysis of infused T cell products. *Mol Ther* 2018;26(1):280–8.
- [60] Hocquet D, Sauget M, Roussel S, Malugani C, Pouthier F, Morel P, et al. Validation of an automated blood culture system for sterility testing of cell therapy products. *Cytotherapy* 2014;16(5):692–8.
- [61] Volokhov DV, Graham LJ, Brorson KA, Chizhikov VE. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: review of alternative non-microbiological techniques. *Mol Cell Probes* 2011;25(2–3):69–77.
- [62] Uphoff CC, Drexler HG. Eradication of mycoplasma contaminations from cell cultures. *Curr Protoc Mol Biol* 2014;106. 28.5.1–12.
- [63] Skrdlant LM, Armstrong RJ, Keidaisch BM, Lorente MF, DiGiusto DL. Detection of replication competent lentivirus using a qPCR assay for VSV-G. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2017;8:1–7.
- [64] Mallet L, Gisondi-Lex L. Need for new technologies for detection of adventitious agents in vaccines and other biological products. *PDA J Pharm Sci Technol* 2014;68(6):556–62.
- [65] Mee ET, Preston MD, Minor PD, Schepelmann S; CS533 Study Participants. Development of a candidate reference material for adventitious virus detection in vaccine and biologicals manufacturing by deep sequencing. *Vaccine* 2016;34(17):2035–43.
- [66] McClenahan SD, Uhlenhaut C, Krause PR. Evaluation of cells and biological reagents for adventitious agents using degenerate primer PCR and massively parallel sequencing. *Vaccine* 2014;32(52):7115–21.
- [67] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry—potency tests for cellular and gene therapy products. Silver Spring: US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research; 2011.
- [68] Bravery CA, Carmen J, Fong T, Oprea W, Hoogendoorn KH, Woda J, et al. Potency assay development for cellular therapy products: an ISCT review of the requirements and experiences in the industry. *Cytotherapy* 2013;15(1):9–19.
- [69] Xiong W, Chen Y, Kang X, Chen Z, Zheng P, Hsu YH, et al. Immunological synapse predicts effectiveness of chimeric antigen receptor cells. *Mol Ther* 2018;26(4):963–75.
- [70] Levine BL, Miskin J, Wonnacott K, Keir C. Global manufacturing of CAR T cell therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2016;4:92–101.
- [71] Revzin A, Maverakis E, Chang HC. Biosensors for immune cell analysis—a perspective. *Biomicrofluidics* 2012;6(2):021301.
- [72] Baradez MO, Marshall D. The use of multidimensional image-based analysis to accurately monitor cell growth in 3D bioreactor culture. *PLoS ONE* 2011;6(10):e26104.
- [73] Aghaeepour N, Finak G, Hoos H, Mosmann TR, Brinkman R, Gottardo R, et al. Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nat Methods* 2013;10(3):228–38.
- [74] Kuystermans D, Avesh M, Al-Rubeai M. Online flow cytometry for monitoring apoptosis in mammalian cell cultures as an application for process analytical technology. *Cytotechnology* 2016;68(3):399–408.
- [75] Locasale JW, Cantley LC. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab* 2011;14(4):443–51.
- [76] Lipsitz YY, Timmins NE, Zandstra PW. Quality cell therapy manufacturing by design. *Nat Biotechnol* 2016;34(4):393–400.
- [77] Fesnak AD, Hanley PJ, Levine BL. Considerations in T cell therapy product development for B cell leukemia and lymphoma immunotherapy. *Curr Hematol Malig Rep* 2017;12(4):335–43.
- [78] Lock D, Mockel-Tenbrinck N, Drechsel K, Barth C, Mauer D, Schaser T, et al. Automated manufacturing of potent CD20-directed chimeric antigen receptor T cells for clinical use. *Hum Gene Ther* 2017;28(10):914–25.
- [79] Zhao Y, Stepto H, Schneider CK. Organization lentiviral vector standard: toward the production control and standardization of lentivirus-based gene therapy products. *Hum Gene Ther Methods* 2017;28(4):205–14.
- [80] Wang YS, Tian ZG. Construction and application of humanized immune system mice. *Chin J Immunol* 2016;32(3):289–98. Chinese.
- [81] Siegler EL, Wang P. Preclinical models in chimeric antigen receptor-engineered T cell therapy. *Hum Gene Ther* 2018;29(5):534–46.
- [82] Cheadle EJ, Hawkins RE, Batha H, O'Neill AL, Dovedi SJ, Gilham DE. Natural expression of the CD19 antigen impacts the long-term engraftment but not antitumor activity of CD19-specific engineered T cells. *J Immunol* 2010;184(4):1885–96.
- [83] Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2016;3:16011.