



吴钦斌，目前就职于和元生物技术(上海)股份有限公司(简称和元生物)，担任首席质量官，负责和元生物临港基地的质量管理工作。和元生物成立于2013年，作为深耕细胞与基因治疗核心领域的高新技术企业，专注于为细胞与基因治疗的基础研究提供基因治疗载体研制、基因功能研究、药物靶点及药效研究等CRO服务；为细胞与基因治疗药物的研发提供工艺开发及测试、IND-CMC药学研究、临床样品及商业化产品的GMP生产等CDMO服务；为再生医学及抗衰领域提供细胞制备、重组蛋白/外泌体等细胞衍生物生产、细胞存储等技术服务。致力于推动细胞与基因治疗及相关健康产业的技术开发及转化应用，造福生命健康。和元生物秉承“整合你我资源，服务生命科学”的理念，坚守“客户第一、高效执行、追求卓越、创新突破、诚信务实”的价值观，全方位促进细胞与基因治疗从研究走向临床，已成长为一家集基因功能基础研究服务、临床级细胞与基因治疗药物商业化生产服务、再生医学服务三大发展方向于一体的高新技术企业。

GMP级质粒的生产与质控：从基础研究到临床应用的规范化路径

陈成 衣玉兰 程海子 吴钦斌*

(和元生物技术(上海)股份有限公司, 上海 201321)

摘要 质粒DNA作为细胞与基因治疗产品的活性物质或关键原材料，其生产工艺和质量控制是保障生物制品安全性和有效性的核心环节。该文论述了质粒的战略价值和GMP需求，梳理了质粒从基础研究中的分子工具逐步发展为工业化产品的历程，并深度对比了中国、美国、欧盟三大监管体系在不同应用场景下对质粒的分类和监管策略。作者根据和元生物已完成的近百个GMP质粒工业化项目的实践经验，总结了工业化质粒的生产工艺及质量控制要求，希望能为基因治疗领域的研发企业和科研人员提供有益参考，助力其更高效地实现质粒从实验室研究向临床应用的转化。

关键词 基因治疗；原材料；GMP质粒

GMP-Grade Plasmid Production and Quality Control: a Standardized Approach from Basic Research to Clinical Application

CHEN Cheng, YI Yulan, CHENG Haizi, WU Qinbin*

(OBio Technology (Shanghai) Corp., Ltd, Shanghai 201321, China)

收稿日期: 2025-09-16 接受日期: 2025-11-14

*通信作者。Tel: 021-58585887, E-mail: wqb2184@obiosh.com

Received: September 16, 2025 Accepted: November 14, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-21-58585887, E-mail: wqb2184@obiosh.com

Abstract As the active substance or critical raw material in cell and gene therapy products, the production process and quality control of plasmid DNA are essential for ensuring the safety and effectiveness of biologics. This article discusses the strategic importance of plasmids and their GMP (good manufacturing practice) requirements, traces the evolution of plasmids from molecular tools in basic research to industrialized products, and provides a detailed comparison of the classification and regulatory strategies for plasmids across various application scenarios under the NMPA, FDA, and EMA frameworks. Based on the practical experience from nearly one hundred GMP plasmid industrial projects completed by OBiO, the authors summarize the production processes and quality control requirements for industrial-scale plasmids. It is hoped that this work will provide valuable insights for research and development companies and researchers in the field of gene therapy, facilitating the more efficient translation of plasmids from laboratory research to clinical applications.

Keywords gene therapy; raw materials; GMP plasmid

质粒是一种具有环状双链结构的小型DNA分子, 在细菌中独立于染色体进行复制。它们是分子生物学和生物技术的基础工具, 在基础研究中扮演着极其核心且多样化的角色, 其最主要应用包括基因克隆与扩增、基因表达研究、DNA测序、基因敲除及沉默、载体的开发与优化等。质粒技术的不断成熟与发展, 极大地推动了现代生命科学的进步, 成为实验室日常研究中不可或缺的重要工具。然而, 在生物医药领域, 质粒已由基础研究的工具逐步提升为临床级关键物料。

1 质粒的战略价值与GMP需求

在细胞与基因治疗(cell and gene therapy, CGT)这一创新性医疗领域, 质粒DNA作为核心原材料, 其战略价值与药品生产质量管理规范(good manufacturing practice, GMP)需求共同构建了产业链的基础^[1-3]。尽管质粒体积微小, 但其承担着改写生命密码和治愈顽疾的重任, 其质量直接关系到最终产品的安全性与有效性^[4-5]。质粒在CGT产品中扮演着不可替代的核心角色, 其战略价值体现在多个维度。①作为基因的稳定载体: 质粒是环状双链DNA分子, 具备天然稳定性, 能够高效携带并稳定扩增治疗性基因序列[如嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)基因、治疗性抗体基因、基因编辑工具基因、缺失/突变的功能基因等], 是构建复杂基因结构的理想“骨架”。②用于病毒载体生产的关键原材料(critical raw material): 这是质粒当前最核心的战略价值。绝大多数基于病毒载体(如慢病毒、腺相关病毒、逆转录病毒)的CGT产品依赖于瞬时转染技术实现生产。该方法需要将多个质粒(如三质

粒或四质粒系统)共同转染至哺乳动物宿主细胞(如HEK293)中。例如, CAR-T细胞产品通过慢病毒感染实现基因修饰, 所用慢病毒通常采用四质粒系统, 包括携带目标治疗基因(如CAR)及必要的调控元件的目的基因质粒(gene of interest, GOI)、编码病毒复制和包装所需的结构蛋白(如Gag/Pol、Rev等)的包装质粒、编码决定病毒宿主细胞嗜性的包膜糖蛋白(如VSV-G)的包膜质粒。这些质粒在宿主细胞内协同作用, 生成具有感染能力但自身复制能力缺失的重组病毒颗粒(如慢病毒、腺相关病毒)。质粒的质量(纯度、完整性、序列准确性、超螺旋比例)直接决定了病毒载体的滴度、感染效率以及最终产品的品质^[6-7]。③非病毒载体递送的工具: 裸质粒DNA或经过修饰的质粒DNA亦可作为治疗产品(如DNA疫苗)或通过物理/化学方法[(如电穿孔、脂质纳米粒(lipid nanoparticle, LNP)]直接递送至体内细胞实现表达。④基因编辑“工具箱”: 在基于CRISPR等基因编辑技术的疗法中, 编码sgRNA和Cas核酸酶(或其mRNA)的序列, 通常也由质粒作为初始模板进行生产或体外转录。⑤供应链安全和成本控制的关键: 高品质、大规模、符合GMP标准的质粒生产能力, 是保障CGT产品供应链稳定性和降低生产成本的核心环节。建立先进的质粒平台技术, 实现供应的稳定和成本的优化, 具有极大的战略意义^[8]。

1.1 从实验室工具到工业化生产的演进

质粒的演进史是一部典型的“从基础科学到应用技术”的转化医学和生物技术发展史。其角色从一个不起眼的细菌附属遗传元件, 演变为现代生物医药产业(尤其是基因治疗、疫苗和细胞治疗)不可或缺的“生产原材料”和“递送工具”。其演进历程大

致可分为以下四个阶段。

1.1.1 第一阶段: 发现与认知(1940年~1970年) 质粒最初并非作为工具而被发现的。1952年, 美国微生物学家 Joshua LEDERBERG^[9]在研究细菌的遗传物质时, 首次提出了“质粒”(plasmid)这一术语, 用以描述细菌染色体外存在的、能进行自我复制的遗传因子。当时发现的主要基因是F因子(致育因子)和R因子(抗药性因子)。科学家们意识到, 这些小小的DNA环可以在细菌之间转移, 并传递诸如抗生素抗性等性状。这时的质粒是作为基础生物学的研究对象。

质粒革命性的突破发生在1973年。Herbert BOYER和Stanley COHEN团队^[10]完成了开创性的实验, 利用限制性内切酶(molecular scissors)切割DNA, 随后采用DNA连接酶将其重新组合。他们将一段外源DNA片段插入到一个经过切割的质粒(如pSC101)中, 然后将这个“重组质粒”转入大肠杆菌感受态细胞内。细菌在分裂过程中, 成功地复制了这个重组质粒, 并表达了外源基因。这标志着基因克隆技术的诞生。由于体积较小、易于操作、可以在细菌中高效复制等优点, 质粒被选作载体(vector)。此后, 一系列人工改造的质粒被构建出来, 如pBR322^[11], 它包含了多个限制性酶切位点和抗生素抗性筛选标记, 成为了实验室的“标准工具”。在这一阶段, 质粒主要作为实验室研究的工具, 规模极小(以毫升级培养为主), 主要用途是克隆、扩增和基因研究。制备过程完全依赖研究人员在摇瓶中进行的手工操作。

1.1.2 第二阶段: 探索与初步应用(1980年~1990年) 随着基因克隆技术的成熟, 业界开始探索利用重组DNA技术生产治疗性蛋白药物。科学家将编码特定蛋白质(如人胰岛素、人生长激素)的基因插入表达质粒中, 然后转化到细菌(如大肠杆菌)或酵母中。这些经过基因工程改造的微生物就像一个个“微工厂”, 在大型生物反应器中发酵, 表达大量目标蛋白。质粒在这里扮演了“工厂蓝图”的角色。1982年, 基于此技术的重组人胰岛素(Humulin)上市, 成为了第一个基因工程药物, 开启了生物技术制药的新纪元^[12]。我国侯云德院士作为“中国干扰素之父”, 其团队从人细胞中提取出总的mRNA, 然后通过逆转录得到互补DNA, 从中找到并“剪下”编码 α 1b干扰素的基因片段, 将这个干扰素基因片段“插入”到一个经过特殊设计的质粒DNA中, 获得表达干扰素的重组质粒。

同样, 刘新垣院士在干扰素的作用机制和新型干扰素研发方面做出了开创性和系统性的工作, 在研究干扰素作用机制时, 同样离不开质粒。侯云德院士和刘新垣院士分别从应用开发和基础机制两个维度, 共同将中国的干扰素研究推向了世界前沿, 奠定了我国在现代生物医药产业中的重要地位。

1990年, 科学家首次在小鼠实验中证明了直接注射编码抗原的“裸DNA”(即质粒DNA)可以在体内诱导免疫反应, 并提出了“DNA疫苗”的概念^[13]。同时, 基因治疗领域兴起, 质粒被视为一种潜在的基因递送载体, 用于将治疗性基因送入患者细胞以纠正遗传缺陷。此阶段, 质粒开始走出研究实验室, 进入中试生产阶段。质粒的生产过程开始借鉴传统的微生物发酵工艺, 且质粒质量和纯度要求远高于实验室级别, 因此催生了早期的生产和纯化工艺开发。

1.1.3 第三阶段: 工业化浪潮兴起(1990年末~2010年) DNA疫苗和基因治疗(尤其是CAR-T等细胞治疗)的临床发展, 推动了质粒的巨大工业化需求。质粒已不再仅作为“蓝图”, 而成为了关键起始原料(key starting material)和原料药(或原液)(drug substance, DS)。

随着细胞治疗产品研究的不断升温, 对质粒的需求呈现爆炸式增长。例如, 在CAR-T细胞疗法中, 编码CAR的基因通常通过病毒载体(如慢病毒)转导T细胞, 生产病毒载体所需要的病毒包装质粒(通常需要3~4个不同的质粒)的用量呈指数级增长。虽然早期DNA疫苗临床效果有限, 但相关研究从未停止, DNA疫苗的开发为应对突发传染病(如后来的COVID-19)奠定了基础。随着基因编辑技术的兴起, CRISPR等技术需要质粒来递送编辑工具(如Cas9和gRNA)。

在生产规模方面, 工业化需求从克级逐渐扩大至千克级, 甚至更高。生产规模从摇瓶和小型反应器转向大规模发酵(可达1000 L以上)。在产量与质量要求方面, 需要极高的质粒产量(高拷贝数质粒)、超高的质粒纯度(去除内毒素、宿主DNA、RNA和开环质粒等杂质)和严格的质量控制措施(包括无菌操作和无支原体检测)。

在工艺开发方面, 上游工艺主要优化发酵培养基、培养条件(如pH值、溶氧水平、温度)和收获时间, 以最大程度提升细菌的吸光度值和质粒产量^[14]。而下游工艺的开发则侧重于可放大的纯化平台, 例

如碱裂解、切向流过滤以及层析技术(例如离子交换、分子排阻、亲和层析), 旨在取代实验室中采用的酚氯抽提和乙醇沉淀的方法^[15]。

在法规要求与合规性方面, 药监机构[如国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)、美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)、欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)]开始将质粒视为原料药(drug substance), 其生产和质量控制须遵循GMP指南, 从细胞库建立、生产过程到最终检测放行的全流程都必须符合GMP标准。

该阶段的质粒生产标志着从研究工具到工业化产品的蜕变。因此, 出现了一批专门从事合同开发与生产的企业(contract development and manufacturing organization, CDMO), 如国外知名的CDMO企业主要有瑞士Lonza(龙沙)、美国Catalent(康泰伦特), 国内主要以药明生物、和元生物和金斯瑞蓬勃等领先的CDMO企业为主。这些CDMO企业具备规模化的GMP生产线, 能够为制药公司提供临床级和商业级的质粒生产服务, 从而加速了药物开发的进程。

1.1.4 第四阶段: 成熟与新时代(2020年至今)

质粒作为mRNA疫苗的起始原材料。COVID-19大流行成为推动质粒工业化生产的关键因素, 其中, 质粒为mRNA疫苗的关键原材料之一。例如, Moderna和辉瑞-BioNTech的mRNA疫苗, 其核心生产原理是利用质粒DNA作为模板, 在体外转录(*in vitro transcription*, IVT)系统中生产制备mRNA原液^[16]。制造1剂mRNA疫苗, 需要生产出大量且高质量的质粒DNA。由于全球数十亿剂疫苗的巨大需求, 质粒生产成为全球供应链的关键瓶颈。CDMO企业开足马力, 将产能提升至前所未有的规模(万升级反应器), 以满足市场的爆炸性需求^[17]。

质粒作为细胞与基因治疗产品的关键物料。以AAV基因治疗产品为例, 质粒是用于制备重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)的关键原材料。它们被转染到包装细胞(如HEK293细胞)中, 为病毒载体的组装提供所有必要的元件^[18]。目前, 主流的生产体系采用三质粒系统^[19-20], 它包含三种功能不同的质粒, 即目的基因质粒(transgene plasmid)、包装质粒(rep-cap plasmid)和辅助质粒(helper plasmid)。目的基因质粒携带治疗基因序列, 而包装质粒主要提供AAV病毒的结构蛋白和有复制功能的基因, 例如*Rep*

基因编码Rep78、Rep68、Rep52、Rep40四种蛋白。Rep78和Rep68负责识别ITR序列、启动基因组复制和调控基因表达, Rep52和Rep40参与基因组链置换和衣壳的包装。*Cap*基因编码VP1、VP2及VP3三种衣壳蛋白, 它们以特定比例自组装成病毒的蛋白质外壳(衣壳), 决定了病毒的血清型及组织趋向性^[21]。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是缺陷病毒, 需借助辅助病毒(通常是腺病毒)的功能才能完成复制和包装。辅助质粒提供生产过程中必需的辅助病毒功能。该质粒携带了腺病毒的关键基因, 但不产生有复制能力的腺病毒。例如, *E2A*、*E4*基因参与病毒DNA复制^[22-24]; VA(virus-associated) RNA^[25-26]则调节基因表达和抑制细胞免疫反应等。

目前, 全球已上市的AAV基因治疗产品如表1所示。

1.2 中美欧对质粒的监管要求

质粒在细胞与基因治疗产品中的监管要求主要取决于其用途: 作为最终的活性药物成分(原液/活性物质)或作为生产病毒载体的关键起始物料。中国、美国和欧盟的监管机构在此基础上形成了各自的监管策略。相关监管策略和法规参见表2和表3。

国家药品监督管理局(NMPA)对质粒的监管策略比较清晰, 根据产品的最终形式来定义质粒的身份。当质粒DNA直接作为基因治疗产品(例如DNA疫苗)被注入人体时, 它本身就是活性药物成分(active pharmaceutical ingredient, API), 即“原液”。因此, 其整个生产流程(从细菌发酵、纯化到灌装)必须完全符合GMP对原料药的要求^[27]。国家药审中心CDE(center for drug evaluation)发布的《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》明确指出“质粒DNA作为基因治疗产品的活性成分时, 应参照原料药GMP的相关要求进行生产和管理, 需进行完整的工艺验证和质量研究。”^[5]。在药物临床试验申请和上市申报时, 应提供质粒的工艺流程、质量研究、稳定性和标准制定等方面资料, 质粒按照原液来监管。当质粒用于瞬时转染生产病毒载体(如慢病毒、AAV)时, 它被视为生产用的一种关键原材料。虽然它本身不是最终药品, 但其质量直接影响病毒载体的安全性和有效性, 监管重点在于建立严格的质量标准(specification)并执行放行检测。CDE发布的《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》、《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》明确要求“生产过程

表1 全球已上市AAV基因治疗产品
Table 1 Globally approved AAV gene therapy products

产品名称(通用名) Product name (generic name)	商品名 Brand name	公司 Company	适应症 Indication	批准日期 Approval date
Alipogene Tiparvovec	Glybera	UniQure	LPLD (lipoprotein lipase deficiency)	Approved by the EU (European Union) in 2012; the first AAV-based gene therapy to reach the market. Subsequently withdrawn for commercial reasons
Voretigene Neparvovec	Luxturna	Spark Therapeutics	Inherited retinal disease (Leber congenital amaurosis type 2 caused by RPE65 mutations)	Approved by the US (United States) FDA in 2017; the first <i>in vivo</i> gene therapy for an inherited eye disease
Onasemnogene Abeparvovec	Zolgensma	Novartis (AveXis)	SMA (spinal muscular atrophy) (5q type, for patients under 2 years old)	Approved by the US FDA in 2019
Eftrenonacog Alfa	Roctavian	BioMarin Pharmaceutical	Hemophilia A (for adults without a history of factor VIII inhibitors)	First approved by the EU in 2022, followed by US FDA approval in 2023
Eladocagene Exuparvovec	Upstaza	PTC Therapeutics	AADC (aromatic L-amino acid decarboxylase) deficiency	Approved by the EU in 2022; the first gene therapy directly administered into the brain for AADC deficiency
Etranacogene Dezaparvovec	Hemgenix	CSL Behring (licensed from uniQure)	Hemophilia B (for adults)	Approved by the US FDA in 2022
BBM-H901 Injection	Xin Jiu Ning	Belief BioMed	Hemophilia B	Launched in China in April 2025; the first domestically developed AAV gene therapy product approved in China

数据来源于医药魔方数据库PharmaGO[®]。

Data sourced from the PHARMCUBE database (PharmaGO[®]).

中使用的质粒DNA等起始原材料,应提供包括来源、制备工艺、质量标准、检验报告等信息”,强调对关键原材料的严格控制^[28-29]。

美国食品药品监督管理局(FDA)的监管策略具有风险导向性与灵活性,对用于生产病毒载体的质粒提出了近乎原液的高标准要求,即使其身份被归类为“生物中间体”或“关键原材料”。当质粒作为基因治疗的最终产品时,与中国的策略一致,直接用于治疗的质粒按原液管理,须符合cGMP(21 CFR Part 211和Part 610)对于生物制品原液的规定。当质粒作为生产病毒载体的起始物料时,FDA通常将这类质粒称为“质粒主细胞库(plasmid master cell bank, pMCB)”或“生物中间体(biological intermediate)”^[30]。尽管身份是中间体,但FDA要求其生产、纯化和质量控制必须遵循近乎原液的严格标准,因为其质量是病毒载体质量的源头^[31]。

欧洲药品管理局(EMA)的监管框架定义清

晰,强调对起始物料的“资质认证”和从起点开始的GMP符合性。当质粒作为终产品时,其身份是“活性物质”,生产必须符合《欧盟GMP指南》第二部分关于活性物质的生产要求。EMA *Guideline on the Quality, Non-Clinical and Clinical Aspects of Gene Therapy Medicinal Products*详细规定了作为活性物质的质粒应满足的质量标准^[32]。当质粒作为生产病毒载体的起始物料时,EMA明确将其定义为“起始物料(starting material)”。根据欧盟ATMP(advanced therapy medicinal products)法规,从质粒生产开始,所有后续步骤都需符合GMP。申请人必须对质粒进行全面的特性鉴定和质量控制,其标准常参考《欧洲药典》专论^[33]。EMA基因治疗指南要求提供作为起始物料的质粒的详细描述、制造工艺和全面控制措施。《欧洲药典》专论0784虽然针对的是DNA疫苗的生产用质粒,但已成为业界对临床级质粒放行的黄金标准。

表2 中国、美国和欧盟对质粒的监管策略

Table 2 Plasmid regulatory strategies in China, United States, and European Union

监管机构 Regulatory authority	情形1: 质粒作为基因治疗产品 Scenario 1: plasmid as a gene therapy product	情形2: 质粒作为生产病毒载体的起始物料 Scenario 2: plasmid as starting material for viral vector production
China NMPA	Regulated as a DS (drug substance)/active ingredient	Regulated as a critical raw material, but stringent quality standards must be established, and release testing is mandatory
United States FDA	Regulated as a DS (drug substance)/active ingredient	Regulated as a biological intermediate or a critical raw material, with standards approaching those for a DS
European Union EMA	Regulated as an active substance	Regulated as a starting material, but requires comprehensive control

表3 中国、美国和欧盟关于细胞与基因治疗质粒的相关法规

Table 3 Cell and gene therapy plasmid-related regulations in China, United States, and European Union

法规名称 Regulatory document name	发布时间 Release date	发布机构 Issuing authority
<i>Technical Guideline for Pharmaceutical Research and Evaluation of In Vivo Gene Therapy Products (Trial Implementation)</i>	May 2022	Center for Drug Evaluation
<i>Guidance on Production Quality Management of Plasmids for Immunocyte Therapy Products</i>	May 2023	Center for Food and Drug Inspection
<i>Technical Guideline for Research and Evaluation of Cell Therapy Products (Trial Implementation)</i>	December 2017	National Medical Products Administration
<i>Technical Guideline for Pharmaceutical Research and Evaluation of Immunocyte Therapy Products (Trial Implementation)</i>	May 2022	Center for Drug Evaluation
<i>Technical Guideline for Pharmaceutical Research and Evaluation of Ex Vivo Gene Modification Systems (Trial Implementation)</i>	May 2022	Center for Drug Evaluation
<i>General Requirements for Human Gene Therapy Products</i>	October 2025	Chinese Pharmacopoeia Commission
<i>Technical Guideline for Pharmaceutical Research of mRNA Vaccines for the Prevention of COVID-19 (Trial Implementation)</i>	August 2020	Center for Drug Evaluation
<i>Development and Licensure of Vaccines to Prevent COVID-19</i>	October 2023	Food and Drug Administration
<i>Draft-Considerations for the Development of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Products</i>	April 2008	Food and Drug Administration
<i>USP45<1040> Quality Considerations of Pasmid DNA as a Starting Material for Cell and Gene Therapies Including RNA Products</i>	December 2025	United States Pharmacopeia
<i>USP45<1046> Cell-Based Advanced Therapies and Tissue-Based Products</i>	December 2025	United States Pharmacopeia
<i>USP45<1047> Gene Therapy Products</i>	December 2025	United States Pharmacopeia
<i>Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)</i>	January 2020	Food and Drug Administration
<i>Gene Therapy Product Quality Aspects in the Production of Vectors and Genetically Modified Somatic Cells</i>	December 1994	European Medicines Agency
<i>Guideline on Quality, Non-Clinical and Clinical Aspects of Live Recombinant Viral Vectored Vaccines</i>	August 2010	European Medicines Agency
<i>Guideline on the Quality, Non-Clinical and Clinical Aspects of Gene Therapy Medicinal Products</i>	July 2018	European Medicines Agency
<i>Draft-Guideline on Quality, Non-Clinical and Clinical Requirements for Investigational Advanced Therapy Medicinal Products in Clinical Trials</i>	January 2019	European Medicines Agency
<i>Guideline on Quality, Non-Clinical and Clinical Aspects of Medicinal Products Containing Genetically Modified Cells</i>	December 2020	European Medicines Agency
<i>Committee for Advanced Therapies (CAT) Expert Meeting on Scientific and Regulatory Considerations for Adeno-Associated Viral Vector (AAV)-Based Gene Therapy</i>	July 2018	European Medicines Agency

2 生产工艺与质量控制

2.1 生产工艺

工业化GMP级别的质粒生产是一项多步骤且

高度受控的过程, 可划分为上游生产工艺和下游生产工艺, 生产工艺流程如图1所示。上游生产工艺主要涵盖种子复苏和培养、扩大培养、罐上发酵培养

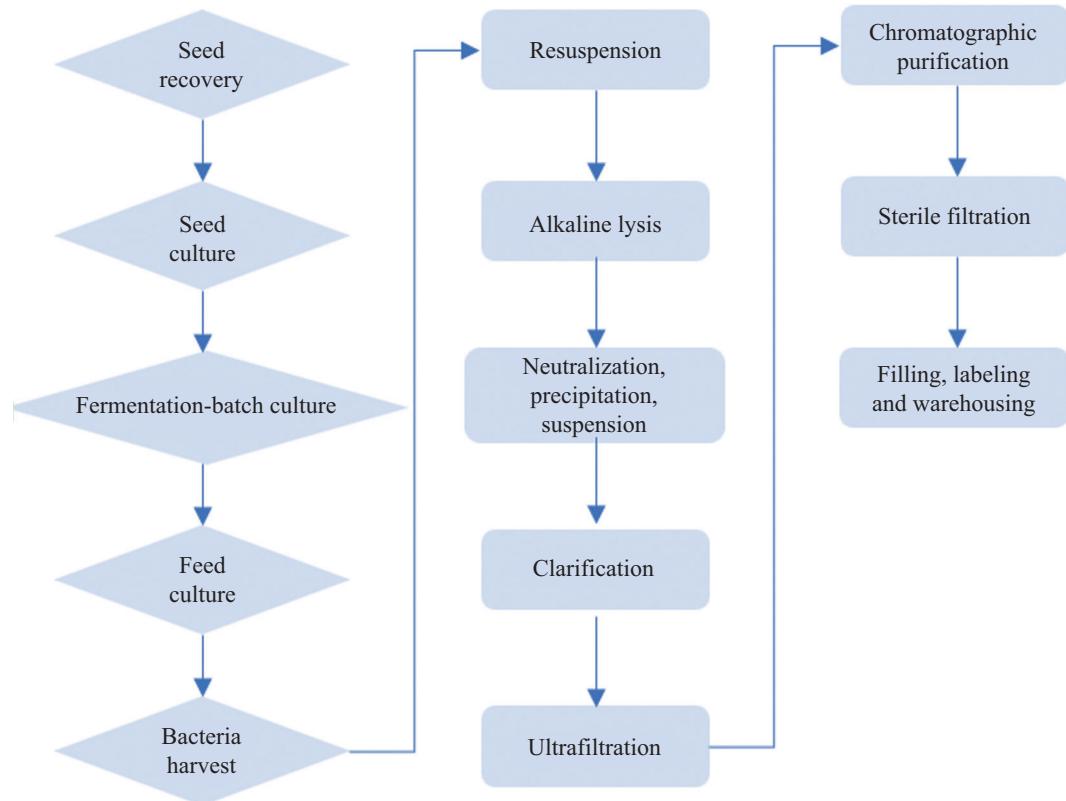


图1 质粒生产工艺流程图
Fig.1 Plasmid production process flowchart

和菌体收获；下游生产工艺包括菌体重悬、裂解、中和、沉淀、悬浮，澄清过滤、超滤浓缩、层析纯化、除菌过滤和质粒灌装。在生产之前，须构建工程菌，并依据现行《中国药典》的要求，完成至少2级菌种库 [MCB(master cell bank)和 WCB(working cell bank)] 的建库和检定。

质粒的生产要求遵循 GMP 标准，生产过程应实施严格的过程控制和无菌管理。在上游工艺中，主要通过严格控制温度 [$(36.5\pm0.5)^\circ\text{C}$]、pH(7.20 ± 0.10)，空气通量 [$(60\pm0.2) \text{ L/min}$]、搅拌速度 [$(50\pm1.5) \text{ r/min}$]、补料策略等参数，确保工艺的可重现性；而下游工艺的目标是最大限度地回收高纯度的质粒DNA，并彻底去除杂质，例如宿主DNA、宿主蛋白、宿主RNA和细菌内毒素等。质粒的灌装一般要求在C级背景局部A级隔离器或生产安全柜条件下进行无菌操作。为了保障灌装的均一性，业内通常采用自动化灌装机进行灌装。

质粒作为病毒载体的关键原材料，其生产须遵循 GMP 标准进行管理，从人、机、料、法、环、测六个方面对整个过程进行控制。人：人员需要进行

培训，才能获得上岗资质；机：设施设备需要完成计量和验证，才能投入使用；料：生产中使用的原材料必须建立明确的质量标准，经过检测合格后方可放行；法：生产工艺必须要制定相关指导 GMP 生产的工艺规程及生产批记录，严格按照管理规程执行，以确保每批产品的一致性；环：由于质粒用于无菌产品，通常需要控制微生物限度或进行无菌检测，其生产应在符合相应洁净等级的 GMP 车间进行；测：产品的中间体及成品需要制定合理的质量标准，检测方法须完成验证或确认，检测过程应制定检测规程并保持完整的检测记录。

2.2 质量控制

质量控制遵循质量源于设计(quality by design, QbD)的理念，在工艺开发阶段就应深入理解关键物料属性(critical material attributes, CMA)、关键工艺参数(critical process parameter, CPP)和关键质量属性(critical quality attribute, CQA)，同时完善的质量管理体系(quality management system, QMS)是 GMP 级质粒质量控制的保障。

基因治疗产品生产用的质粒DNA，可瞬时转染

表4 细胞与基因治疗生产用质粒质量要求

Table 4 Quality requirements for plasmids used in cell and gene therapy production

类别 Category	检测项目 Test items	检测方法 Test method	可接受标准 Acceptance criteria
Identification	DNA sequencing	Sanger method	The measured sequence should be consistent with the theoretical sequence
	Restriction enzyme map	Electrophoresis method	The measured band should be consistent with the theoretical band
Content	Content	UV (ultraviolet) spectrophotometry	80%-120% of label claim (mg/mL)
Purity	A_{260}/A_{280}	UV (ultraviolet) spectrophotometry	1.80-2.00
	Supercoiled plasmid purity	CGE (capillary gel electrophoresis)	$\geq 85.0\%$
	Host protein residue	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	$< 10 \text{ ng/mg}$
	Host DNA residue	qPCR (quantitative polymerase chain reaction)	$< 2.0 \mu\text{g/mg}$
	Host RNA residue	qPCR (quantitative polymerase chain reaction)	$\leq 10.0 \mu\text{g/mg}$
Physicochemical properties	Appearance	Visual inspection	Report result
	pH	Potentiometry	Buffer pH ± 0.5
	Endotoxin	Gel-clot method	$< 10 \text{ EU/mL}$
	Sterility	Membrane filtration	No growth

数据来源于和元生物企业标准“Q/310115-OBiO-STP-QS-DP-002-2021”。

Data sourced from the OBiO enterprise standard “Q/310115-OBiO-STP-QS-DP-002-2021”.

用于病毒载体生产, 或体外转录用于RNA核酸产品生产, 或经转染/转化用于细菌种子、病毒种子和细胞系构建。各类质粒DNA的结构、基因和元件设计应符合预期用途, 原始质粒的来源和序列应明确, 构建过程中应确认每一步的构建结果。质粒序列, 尤其是作为终产品具有活性组分的序列, 不得含有潜在致瘤风险的基因或元件; 如有必要, 应对此类基因或元件进行替换或改造。为避免抗生素滥用和由抗生素残留引起的过敏风险, 建议避免选用 β -内酰胺类抗生素抗性基因作为质粒的筛选基因^[5]。

在质粒构建阶段, 除了记录构建过程和检测数据外, 还应重点关注构建过程中使用的动物源性物料, 如动物来源的酶, 可能引入病原体产生外源病毒因子的风险, 因此尽量避免动物源性物料, 如果必须使用, 建议在种子库建立阶段对外源病毒因子进行检查。

除在细菌种子批、病毒种子批或细胞系构建过程中一次性使用的质粒外, 起始原材料质粒DNA应基于细菌种子批系统, 采用经过验证的发酵和纯化工艺制备, 且质粒生产规模应与后续生产环节相匹配。CDE发布的《体内基因治疗产品药学研究与技术评价指导原则(试行)》明确指出“质粒DNA的质量标准一般包括: 质粒鉴别、含量、纯度、完整质粒或重要基因序列的确认、超螺旋比例、无菌性、细

菌内毒素、抗生素残留(如适用)、一般理化性质(如pH值等)以及工艺相关杂质(如宿主菌DNA和RNA残留、宿主细菌蛋白质残留等)”; 具体内容应根据质粒的制备工艺和用途进行分析确定。每批质粒在放行检测合格后方可用于产品生产。质量控制的相关标准可参考表4。

3 总结与展望

本文系统回顾了GMP级质粒在细胞与基因治疗领域作为活性物质或关键原材料的核心作用, 论述了质粒的战略价值和GMP需求, 并深度对比了中国、美国和欧盟三大监管体系在不同应用场景下对质粒的分类与监管策略。另外, 文章还梳理了质粒从基础研究中的分子工具发展为工业化产品的历程, 以及质粒相关的法规、生产工艺和质量控制的要求。作者根据和元生物已完成的近百个GMP质粒工业化项目的实践经验, 总结了工业化质粒的生产工艺及质量控制要求, 希望能为基因治疗领域的研发企业和科研人员提供有益参考, 助力其更高效地实现质粒从实验室研究向临床应用的转化。

随着细胞与基因治疗从前沿探索迈向产业化浪潮, GMP级质粒作为起始原材料的战略价值日益凸显。质粒不仅是生产病毒载体的工具, 更是直接用于体内基因治疗的“药物”, 其质量直接决定了最

终产品的安全性与有效性。GMP级质粒的战略地位主要体现在其不可替代的桥梁作用。无论是CAR-T、TCR-T等细胞疗法,还是基于AAV、慢病毒的体内基因治疗,其生产都高度依赖于高质量的重组质粒。作为起始原料,质粒的供应稳定性、成本与质量,直接关系到整个治疗产品的研发进程、生产成本和商业化前景。掌握自主、可靠且符合法规的GMP级质粒生产平台,已成为生物医药企业与国家在尖端医疗领域争夺话语权的关键,是保障产业链自主可控的核心战略资源。鉴于其战略性,GMP级质粒的质量控制绝非普通生产物料所能比拟,不但生产需要尽可能遵循GMP,而且其质量控制应贯穿于从菌种库构建、发酵、纯化到灌装的全链条。随着基因治疗管线日益丰富与商业化进程加速,市场对高纯度、高产量、高稳定性的GMP级质粒的需求将呈现指数级增长。同时,质粒的未来发展将聚焦于工艺创新,如开发无抗生素标记的新型质粒系统,优化可降低成本的大规模发酵与纯化工艺。只有将GMP级质粒真正视为“药物”而非“原料”,构建起坚如磐石的质量体系,才能支撑起基因与细胞治疗产业的稳健前行,最终惠及全球患者。

参考文献 (References)

- [1] FDA. Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs) [S]. 2020. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/chemistry-manufacturing-and-control-cmc-information-human-gene-therapy-investigational-new-drug>.
- [2] EMA. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (EMEA/CHMP/GTWP/671639/2008) [S]. 2018. <https://www.ema.europa.eu/en/quality-preclinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products-scientific-guideline>.
- [3] EUROPEAN COMMISSION. Eudralex—volume 4 GMP guidelines, Annex 2 [S]. 2023. https://health.ec.europa.eu/medicinal-products/eudralex/eudralex-volume-4_en.
- [4] NMPA. 细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)[S]. 2022. <https://www.nmpa.gov.cn/xgk/zhcjd/zhcjdyp/2017122145901282.html>.
- [5] NMPA. 体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)[S]. 2022. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/c0ec5e347ba84df67b7f75e15f6ad3f3f>.
- [6] USP. Chapter <1047> Gene therapy products [S]. 2024. https://online.uspnf.com/uspnf/search?facets=%5B%5B%22productId_1%22%2C%5B%2222%22%5D%5D%5D&query=%20%3C1047%3E%20Gene%20therapy%20products.
- [7] PH. EUR. Monograph 5.14 Gene transfer medicinal products [S]. 2024. <https://www.drugfuture.com/standard/search.aspx>.
- [8] GEE A P, SMITH J A, LEE K, et al. Cell and gene therapy: regulatory and quality considerations [M]. New York: Academic Press, 2023: 87-112.
- [9] LEDERBERG J. Cell genetics and hereditary symbiosis [J]. Physiol Rev, 1952, 32(4): 403-30.
- [10] COHEN S N, CHANG A C Y, BOYER H W, et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, 70(11): 3240-4.
- [11] BOLIVAR F, RODRIGUEZ R L, GREENE P J, et al. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system [J]. Gene, 1977, 2(2): 95-113.
- [12] JOHNSON I S. Human insulin from recombinant DNA technology [J]. Science, 1983, 219(4585): 632-7.
- [13] WOLFF J A, MALONE R W, WILLIAMS P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* [J]. Science, 1990, 247(4949 Pt 1): 1465-8.
- [14] O'KENNEDY R D, BALDWIN C J, PISTORIO M. Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps [J]. J Biotechnol, 2000, 76(2/3): 175-83.
- [15] PRÄTORIUS I, HÖHNE M, SANTOS L, et al. Development of a downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy [J]. Acta Biotechnol, 2002, 22(3/4): 287-97.
- [16] PASZTOR I. The role of plasmid DNA in the production of mRNA therapeutics and vaccines [J]. Pharm Technol, 2021, 45(4): 36-9.
- [17] KIS Z, KONTORAVDI C, SHATTOCK R, et al. Resources, production scales and time required for producing RNA vaccines for the global pandemic demand [J]. Vaccines, 2021, 9(1): 3.
- [18] WANG D, TAI P W L, GAO G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(5): 358-78.
- [19] XIAO X, LI J, SAMULSKI R J. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus [J]. J Virol, 1998, 72(3): 2224-32.
- [20] GRIEGER J C, SAMULSKI R J. Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps [J]. J Virol, 2005, 79(15): 9933-44.
- [21] SRIVASTAVA A. *In vivo* tissue-tropism of adeno-associated viral vectors [J]. Curr Opin Virol, 2016, 21: 75-80.
- [22] BERK A J. Adenovirus E2A and E4 proteins: key regulators of viral DNA replication [J]. Curr Opin Virol, 2019, 36: 1-9.
- [23] BRIDGE E, KETNER G. The role of adenovirus E4 ORF3 in viral DNA replication and host cell response [J]. Viruses, 2021, 13(5): 789.
- [24] LEPPARD K N. Adenovirus E2A DNA-binding protein: a central player in viral replication and gene expression [J]. J Gen Virol, 2022, 103(4): 001739.
- [25] MATHEWS M B, SHENK T. VA RNA of adenovirus: a multi-functional regulator of gene expression and immune evasion [J]. RNA Biol, 2020, 17(11): 1500-10.
- [26] XU Z, WILLIAMS B R G. VA RNA-mediated suppression of innate immunity in adenovirus infection: mechanisms and implications [J]. Cell Mol Immunol, 2023, 20(2): 123-35.
- [27] 国家药品监督管理局. 药品生产质量管理规范(2010年修订)[EB/OL]. (2011-01-17) [2023-10-27]. <https://www.nmpa.gov.cn/xgk/ggtg/ypggtg/ypqtgg/20110224164501312.html>.
- [28] 国家药品监督管理局. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2017-12-22) [2023-10-27]. <https://www.nmpa.gov.cn/xgk/ggtg/ypggtg/ypqtgg/20171222145101557>.

html.

[29] 国家药品监督管理局药品审评中心. 免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2022-05-26) [2023-10-27]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=adac7701a40bf0ad8691c409324a004c>.

[30] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Considerations for the development of chimeric antigen receptor (CAR) T cell products [EB/OL]. (2024-03-15) [2023-10-27]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considerations-development-chimeric-antigen-receptor-car-t-cell-products>.

[31] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry: CGMP for phase 1 investigational drugs [EB/OL]. (2008-07-15) [2023-10-27]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/current-good-manufacturing-practice-phase-1-investigational-drugs>.

[32] EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (EMA/CAT/80183/2014) [EB/OL]. (2018-05-30) [2023-10-27]. <https://www.ema.europa.eu/en/quality-preclinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products-scientific-guideline>.

[33] EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE. European Pharmacopoeia 11.0-monograph 0784 (DNA vaccines) [S]. Strasbourg: EDQM, 2023.