

附件：3431 质粒 DNA 构象测定法公示稿

通则 3431 质粒 DNA 构象测定法

本法系依据质粒 DNA 的大小及构象不同所带电荷密度的差异，在凝胶分子筛中所受阻力的不同而实现分离，用毛细管凝胶电泳荧光检测法（CGE-LIF）测定质粒 DNA 超螺旋、线性、开环三种构象的含量。

照毛细管电泳法（通则 0542）测定。

试剂（1）水 电阻率不低于 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 。

（2）EDTA 溶液 取乙二胺四乙酸二钠（EDTA）186.1g，加水溶解并稀释至 900ml，用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 8.0，并用水稀释至 1000ml。

（3）Tris 溶液 取三羟甲基氨基甲烷（Tris）121.1g，加水溶解并稀释至 900ml，用盐酸溶液调节 pH 值至 8.0，并用水稀释至 1000ml。

（4）Tris-硼酸缓冲液（ $10\times\text{TBE}$ ） 取 Tris 108g 与硼酸 55g，加 EDTA 溶液 40ml，用水稀释至 1000ml。使用时用水稀释 10 倍。

（5）TE 缓冲液 取 Tris 溶液 10ml 与 EDTA 溶液 2ml，用水稀释至 1000ml。

（6）DNA 染料 用二甲基亚砷溶解的 $10000\times\text{SYBR Gold}$ 核酸染料，按试剂使用说明书配制。或符合系统适用性要求的其他适宜 DNA 染料。

（7）DNA 凝胶缓冲液 含硼酸、Tris 以及亲水性聚合物作为分子筛或等效的缓冲液。用 $1\times\text{TBE}$ 稀释到适宜浓度使用。或选择符合系统适用性要求的商品化 DNA 凝胶试剂。

系统适用性溶液 取系统适用性对照品溶液 $1\mu\text{l}$ ，与 TE 缓冲液 $9\mu\text{l}$ 混匀，加 TE 缓冲液 $100\mu\text{l}$ 混匀。

供试品溶液 用 TE 缓冲液将供试品稀释成浓度为 $4\sim 8\text{ ng}/\mu\text{l}$ 。

空白溶液 TE 缓冲液。

电泳条件（1）涂层熔融石英毛细管（内径 $100\mu\text{m}$ ），切割至总长度约为 40cm，有效长度为 30cm，使用次数不超过 150 次，或选择适宜长度以满足系统适用性要求；（2）设置毛细管温度为 20°C ，样品室温度为 $4\sim 10^\circ\text{C}$ 。（3）激光诱导荧光检测器，激发波长 488nm，发射波长 520nm。（4）毛细管的预处理：

在 20psi 压力下，用 DNA 凝胶缓冲液冲洗 20 分钟，每次运行前进行。（5）毛细管的预填充：在 20psi 压力下，用 DNA 凝胶缓冲液冲洗 2 分钟。（6）进样压力 0.2psi，进样时间 4 秒；分离电压 10 kV，运行 25 分钟，反向极性。

测定法 分别取系统适用性溶液、空白溶液、供试品溶液、系统适用性溶液依序进样：系统适用性溶液（至少进样 3 针）、空白溶液进样 1 针、供试品溶液 1 进样 3 针、供试品溶液 2 进样 3 针……系统适用性溶液（至少进样 1 针），记录电泳图。按峰面积归一化法计算，供试品溶液各构象的校正峰面积占所有校正峰面积之和的百分比即为该种构象的含量。

系统适用性要求

系统适用性溶液的电泳图应与参考图谱基本一致；系统适用性溶液的电泳图中质粒 DNA 三种构象峰之间的分离度不低于 2；以各构象校正峰面积占所有峰校正峰面积之和的百分比计算，三种构象的相对百分含量应在规定范围内（见该批次系统适用性对照品说明书）；系统适用性溶液相邻两针之间同一构象峰的迁移时间差应不高于 0.5 分钟，超螺旋构象迁移时间的 RSD 应不大于 3% ($n \geq 4$)；线性构象峰和开环构象峰的信噪比均应不小于 10。空白溶液电泳图中应无干扰峰。

注意事项

紧邻超螺旋的峰 4 可能为多聚体峰，该峰不计入三种构象的相对百分含量，但在计算中计入所有峰的校正峰面积。

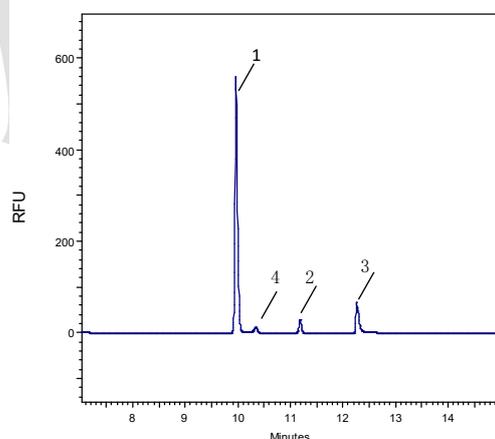


图 系统适用性对照品溶液参考图谱

1.超螺旋 2.线性 3.开环 4.未知



高橋 新

质粒 DNA 构象测定法的起草说明

1. 概况

近年来，以嵌合抗原受体T细胞（CAR-T）为代表的基因修饰的免疫细胞治疗产品因其肿瘤治疗的临床应用前景在全球制药领域、临床医学及资本领域获得高度关注，特别是2018年FDA批准的两款CAR-T细胞治疗产品的上市，更是带动了产品生产相关行业的快速发展，而与之同时，与这类创新性医药产品监管相关的问题也随之而来，包括对这类产品质量控制的要求。与传统的过继性免疫细胞治疗产品相比，基因修饰免疫细胞的制备工艺更为复杂，质量控制也更为复杂，它不仅包括基因修饰后的免疫细胞，同时也包括用于基因修饰的载体的质量及其载体生产起始材料和中间产品，如包装慢病毒载体的质粒载体，而如何更好地制定质量标准及更有效地控制其质量，到目前为止尚未形成国际共识。因此，非常有必要系统地开展基因修饰免疫细胞质量控制的研究工作。

到目前为止，慢病毒载体仍是基因修饰免疫细胞使用最多的修饰方式，如在美国临床试验（Clinical trial）网站上注册的CAR-T细胞临床试验中，50%以上的CAR-T细胞是采用慢病毒载体转导方式制备。尽管研究者一直都在致力于开发可生产慢病毒载体的稳定细胞株，而采用三质粒或四质粒系统包装慢病毒载体仍占主流。在这个系统中，目的质粒载体及辅助质粒载体是重要的中间产品，其质量会直接影响慢病毒载体包装的质量，其中质粒DNA的构象就是质粒DNA纯度控制的一个重要参数。

质粒DNA的构象，即质粒DNA的拓扑结构，包括超螺旋（ccc）、开环（oc）和线性（liner）这三种形式，可能还有聚体的存在。有研究者报道超螺旋构象的质粒DNA在体内转染效率更高^[1-3]。国内外药品监管机构（如FDA、EMA）发布的与基因治疗产品相关的技术指导原则或产品相关的标准（如EP、《中华人民共和国药典》、USP）中均会将质粒DNA超螺旋比例作为质粒DNA纯度的质量控制要求之一，但所要求的检测方法和质量标准有所不同^[4-6]。目前，检测质粒DNA拓扑结构的方法主要有琼脂糖凝胶电泳法（AGE）、高效液相色谱法（HPLC）和毛细管凝胶电泳法（CGE），这三种方法分别利用质粒DNA不同构象在介质中的迁移行为不同的原理进行分离检测。其中，AGE法是最常用的方法，通常可用于质

粒DNA构象的定性或者百分比半定量分析^[7]。HPLC法与CGE法是近年来发展起来的可以定量检测DNA构象比例的方法，也是EP和USP在质粒DNA超螺旋比例检测时推荐的方法。与这两种方法相比^[8-10]，CGE既可实现定量检测，同时还具有很好的分离度，还有上样量少、灵敏度高、检测时间短等特点。CGE法是较理想、较全面的一种检测方法^[2,11-13]。因此，近两年来，已有国外的研发企业开发这个方法作为放行检验方法^[14]。与国外相比，国内大多还在使用AGE法用于质粒DNA超螺旋比例的检测，有部分研究者在开发HPLC的方法，但开发CGE检测质粒DNA构象的则鲜少。

2. 国内外相关标准比较和法规要求

目前，国内外基因治疗产品的相关法规或者指导原则中，都要求对质粒构象进行检测。2007年，FDA（美国食品药品监督管理局，U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration）在“用于传染病适应症的质粒DNA疫苗的行业考虑指南”中，质粒产品放行检验部分提到，放行标准建议将质粒超螺旋构象检测纳入放行标准，并要求超螺旋质粒含量>80%。2020年，FDA在“人类基因疗法研究性新药申请（IND）的化学，生产和控制（CMC）信息指南”里，“关键步骤和中间体的控制（3.2.S.2.4）”内容中指出，基因治疗生产过程的中间体可能包括用于生产其他基因治疗产品的DNA质粒（如AAV或慢病毒载体），建议DNA质粒中间体从合格的库中获得，并进行无菌性、内毒素、纯度等相关的检测。在纯度中，强调了应对质粒超螺旋构象百分比进行检测。

在美国药典<1047>基因治疗产品章节中，非病毒载体的生产与加工中强调临床使用的质粒须进行鉴定，纯度、效价等项目的检测。纯度检测建议使用HPLC或CE的方法针对质粒构象含量（超螺旋和开环）进行检测，终产品的可接受水平CCC>97%。但因质粒在体内相对效力的数据尚不充分，故检测质粒DNA构象的含量，亦用于评价批间一致性。

在2018年，欧盟（European Medicines Agency，EMA）在“关于基因治疗药品的质量、非临床和临床指南”中“4.2.3.1 结构和其他特征”章节强调对不同的质粒形式进行鉴定和定量，包括开环与线性构象的比例。另外，在产品相关杂质中也提到，对于质粒DNA，应对不同形式的质粒进行限制。

在2019年发布的欧洲药典（European pharmacopoeia 9.7，EP 9.7）“5.14 人

用基因转移药物”章节中“人用质粒载体”部分用超螺旋的单体含量描述质粒的纯度，并要求使用高效液相色谱（HPLC）或毛细管电泳定量超螺旋形式。

我们国家在 2020 年实行的《中国药典》第三部人用基因治疗产品总论，制品检定制品相关杂质中也提及了控制质粒不同形式的比例，但未提到检测方法，也未明确质粒超螺旋形式的相对百分含量。另外，药典中也未收录使用毛细管电泳检测质粒 DNA 构象的方法。

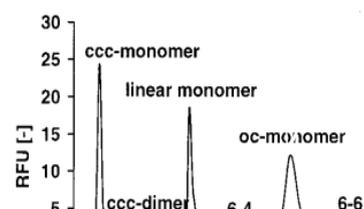
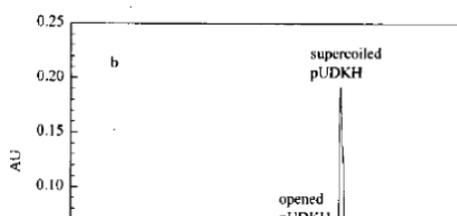
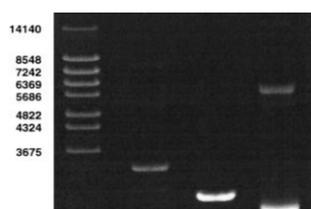
3. 质量制定标准意见或理由

鉴于到目前为止，常使用的检测方法各有优缺点（如表1）。都无法同时满足质粒三种构象的分离和定量，如琼脂糖凝胶电泳法，其只能对质粒DNA的三种构象进行半定量（见图1）；高效液相色谱法在定量过程中，三种构象分离度稍差（见图2）。毛细管凝胶电泳法不仅可以很好的将质粒中的三种构象分离开，还可以实现定量（见图3），因此开展该方法的研究并进行方法验证，以补充或替代现有方法，用于对以慢病毒为载体和以质粒为载体的基因治疗产品中所使用的质粒DNA超螺旋相对百分含量进行定量分析，进一步实现对产品或者产品生产中间过程的质量控制。

该方法的原理是将 DNA 凝胶移到毛细管中作为支撑物，基于质粒 DNA 分子的迁移速度取决于分子的大小和构象，质粒 DNA 与荧光染料结合后，可以用 LIF 检测器检测到这种因分子大小和构象不同造成的迁移差异，以定量分析各构象的相对百分含量。

表 1 常用检测方法的优缺点比较

检测方法	优点	缺点
琼脂糖凝胶电泳法（AGE）	常用、成本低，易操作，可重复性较好	定性或者百分比半定量分析。
高效液相色谱法（HPLC）	可定量分析，灵敏度高，可重复性较好，成本相对低，需建立方法	三种构象分离度稍差，无标准方法。
毛细管凝胶电泳法（CGE）	可定量分析，上样量少，配合荧光检测器灵敏度高，可重复性好，三种构象分离度好	成本相对高，无标准方法。



参考文献

- [1] 哈小琴, 吴祖泽, 张庆林, 等. 质粒超螺旋比例对其细胞转染效率及表达的影响 [J]. 生物技术通讯, 2005 (4): 392
- [2] WALTHER W, STEIN U, VOSS C, et al. Stability analysis for longterm storage of naked DNA: impact on nonviral in vivo gene transfer [J]. Anal Biochem, 2003, 318 (2): 230
- [3] ESCOFFRE JM, NIKOLOVA B, MALLET L, et al. New insights in the gene electrotransfer process: evidence for the involvement of the plasmid DNA topology [J]. Curr Gene Ther, 2012, 12 (5): 417
- [4] FDA. Guidance for Industry: Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) [EB/OL]. [2020-01-31]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/chemistry-manufacturing-and-control-cmc-information-humangene-therapy-investigational-new-drug>
- [5] EMA. Quality, Preclinical and Clinical Aspects of Gene Therapy Medicinal Products [EB/OL]. [2018-07-13]. <https://www.ema.europa.eu/en/quality-preclinical-clinical-aspects-gene-therapymedicinal-products>
- [6] FDA. Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications [EB/OL]. [2007-11]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considerations-plasmid-dna-vaccines-infectious-disease-indications>

-
- [7] MOLLOY MJ, HALL [7] MOLLOY MJ, HALL VS, BAILEY SI, et al. Effective and robust plasmid topology analysis and the subsequent characterization of the plasmid isoforms thereby observed [J] . *Nucleic Acids Res*, 2004, 32 (16) : e129
- [8] QUAACK SG, NUIJEN B, HAANEN JB, et al. Development and validation of an anion-exchange LC-UV method for the quantification and purity determination of the DNA plasmid pDERMATT [J] . *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49 (2) : 282
- [9] SMITH CR, DEPRINCE RB, DACKOR J. Separation of topological forms of plasmid DNA by anion-exchange HPLC: shifts in elution order of linear DNA [J] . *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 854 (1-2) : 121
- [10] MAHUT M, GARGANO A, SCHUCHNIGG H, et al. Chemoaffinity material for plasmid DNA analysis by high-performance liquid chromatography with condition-dependent switching between isoform and topoisomer selectivity [J] . *Anal Chem*, 2013, 85 (5) : 2913
- [11] NACKERDIEN Z, MORRIS S, CHOQUETTE S, et al. Analysis of laser-induced plasmic DNA photolysis by capillary electrophoresis [J] . *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996, 683 (1) : 91
- [12] SCHMIDT T, FRIEHS K, SCHLEEF M, et al. Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis [J] . *Anal Biochem*, 1999, 274 (2) : 235
- [13] SCHLEEF M, SCHMIDT T. Animal-free production of cccsupercoiled plasmids for research and clinical applications [J] . *J Gene Med*, 2004, 6: S45

起草单位：中国食品药品检定研究院

联系电话：010-53851709

国家药监局