

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

腺相关病毒载体类体内基因治疗产品
临床试验申请药学研究与评价
技术指导原则

国家药品监督管理局药品审评中心

2023 年

22	目录	
23	一、前言	1
24	二、适用范围	1
25	三、一般原则	2
26	四、生产用物料	3
27	五、生产工艺	5
28	六、质量研究与质量标准	7
29	七、稳定性研究	10
30	八、包装与密封容器系统	11
31	九、参考文献	11
32		
33		
34		
35		
36		
37		
38		
39		
40		
41		
42		

43 一、前言

44 体内基因治疗一般选用适当的载体或转染方式将外源基因（或基
45 因编辑工具）导入人体，通过替代、补偿、阻断、修正特定基因以达
46 到治疗疾病的目的。腺相关病毒（**adeno-associated virus, AAV**）载体
47 因其理化性质稳定、致病性弱、整合风险低、外源基因表达持久等结
48 构和生物学方面的优势，已成为体内基因治疗领域研究、应用最为广
49 泛的载体之一。

50 为规范和指导以 **AAV** 为载体的体内基因治疗产品（以下简称为
51 “**AAV 载体类产品**”）按照药品研发规律和相关技术管理规范进行研
52 究，提交符合临床试验申报要求的药学研究资料，根据《中华人民共
53 和国药品管理法》、《药品注册管理办法》等相关法律法规特制定本指
54 导原则。本指导原则仅基于此类产品现阶段的研究水平和科学认知，
55 从技术审评的角度对此类产品在申报临床试验时应完成的药学研究
56 提出一般性建议。因不同产品在设计 and 临床应用方面可能存在差异，
57 具体品种的药学研究可采用具体问题具体分析的原则，但应能满足药
58 学技术评价的需求，并符合临床研究样品质量的可控性。后续，相关
59 技术要求将随着行业水平的提高、技术的进步，以及产品认知的积累
60 逐步完善。

61 二、适用范围

62 本指导原则中的 **AAV 载体**是指基于腺相关病毒的结构和理化特
63 性，经设计和重组改造所形成的用于携带外源目的基因（或核酸片段）
64 的病毒载体。指导原则主要针对用于体内基因治疗的 **AAV 载体类产**

65 品在申报临床试验时应完成和提交的药学研究信息提出建议。

66 三、一般原则

67 临床试验申报阶段，AAV 载体类产品的药学研究原则上应符合
68 《中国药典》的相关要求，尤其是“人用基因治疗制品总论”的要求，
69 如有特殊情况需说明原因。临床研究用样品应按照“《药品生产质量
70 管理规范（2010 年修订）》临床试验用药品附录”（2022 年 第 43 号）
71 的相关要求进行生产。产品的研发、生产、使用和废弃处理应符合生
72 物安全相关法律法规的要求。

73 按照药品研发的 AAV 载体类产品应遵循药品研发的一般规律，
74 在临床试验申报时提供必要的药学研究信息，说明和/或证明产品设
75 计的合理性，生产工艺的可重复性，临床研究样品质量的可控性，分
76 析产品风险控制策略的合理性和充分性，最大程度降低产品的安全性
77 风险，以支持临床试验的开展。

78 AAV 载体类产品可参考《体内基因治疗产品药学研究与评价技
79 术指导原则（试行）》中的一般原则进行风险分析和控制。在临床试
80 验申报阶段应完成临床研究用样品生产相关的种子批、细胞库的制备
81 和检定，并开展必要的稳定性研究，以支持临床样品生产所需的传代
82 代次。基于产品特点，完成临床研究样品生产工艺的开发和初步确认，
83 并建立必要的生产过程中控制项目。选择代表性样品开展质量研究，
84 并基于对产品质量属性的理解和前期积累的数据建立临床研究用样
85 品的质量标准。质量控制相关分析方法经研究确认，应能满足分析和
86 质控的需求。基于产品设计和作用机制，初步建立生物学活性分析方

87 法。产品的稳定性研究结果应能支持开展临床试验。

88 由于不同产品之间的风险可能不同，不同研发阶段的产品可能存
89 在设计和工艺方面的差异，为支持人体临床试验的安全性，申报临床
90 试验时需提供非临床研究样品与拟用于临床研究的样品在生产用物
91 料、生产工艺、质量等方面的差异数据。临床研究样品质量不得劣于
92 非临床研究样品质量，尤其是安全性相关的质量属性。

93 四、生产用物料

94 生产用物料是指产品生产过程中所使用的生物或化学材料，包括
95 起始原材料（如细胞基质、包装质粒、病毒种子批等）、生产过程使
96 用或添加的物料（如培养基及其添加成分、核酸酶、纯化填料、缓冲
97 盐、转染试剂等）、辅料，以及生产用耗材（如细胞培养袋、滤膜、深
98 层滤器、储液袋、传输管路、暂存容器、包装材料等）等。

99 1. 起始原材料

100 不同病毒包装系统包装生产的 AAV 载体在基因组稳定性、突变、
101 包装效率、外源因子的引入风险等方面可能存在一定差异，建议结合
102 产品特点和风险选择合适的包装系统用于生产。AAV 载体生产常见
103 的病毒包装系统包括质粒瞬转包装系统、辅助病毒包装系统、昆虫细
104 胞/杆状病毒包装系统等，涉及的起始原材料可能包括质粒 DNA、包
105 装细胞、包装用病毒等。产品在设计和上游构建方面，可参考《体内
106 基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》中产品设计和
107 生产用物料章节相关的要求。临床研究用样品生产的起始原材料应来
108 源清晰，具有完整的溯源信息。申报时根据包装系统，提供相应的上

109 游构建信息,以及相关的证明性文件和研究报告,信息应准确、完整。
110 基于包装系统的类型,产品生产如涉及包装质粒、包装用病毒等起始
111 原材料的制备,也应提供相应的药学研究信息,具体可参考同类型生
112 物制品原液的申报资料要求。

113 (1) 目的基因: 详细说明目的基因的序列和来源信息,如基因
114 的筛选、改造和优化过程,与野生型序列的差异等,提供序列设计合
115 理性和科学性的依据。

116 (2) 质粒 DNA: 提供质粒构建的具体信息,包括原始质粒的来
117 源、质粒结构图、重要基因或元件的序列来源及功能信息,详述质粒
118 构建过程并对最终质粒序列进行确认。提供相关的来源证明和研究报
119 告。

120 (3) 细菌种子批: 瞬转生产用质粒的生产用菌种需进行建库管
121 理,提供宿主菌的来源、基因型等信息和证明文件,详述细菌种子和
122 种子批的建立过程。按照药典要求进行种子批的检定,并提供相应的
123 检定报告。

124 (4) 病毒种子批: 用于载体生产的包装用病毒应进行建库管理。
125 提供原始毒种的来源、历史培养信息及相关证明文件,详述病毒种子
126 改造和构建的具体过程,结合溯源信息评估毒种的安全性风险。病毒
127 种子批的检定应满足药典要求,并提供相应的检定报告。

128 (5) 生产/包装细胞库: 提供病毒生产/包装用细胞的来源和证明
129 文件,细胞的历史溯源信息应完整,若存在基因改造,应具体说明改
130 造依据、改造方法和改造结果的确认研究等。细胞的溯源信息和质量

131 控制策略应满足风险控制要求。生产/包装细胞库的建立和检定应符合
132 药典要求，并提供相应的检定报告，尤其应关注种属特异性病毒、
133 历史培养和建库过程中可能引入的病原体的检定。

134 细菌/病毒种子批和生产/包装细胞库的传代稳定性研究结果应能
135 支持临床研究用样品的生产。包装质粒、包装用病毒的制备和质量控
136 制可参考《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》
137 中的相关要求，保存稳定性应能满足生产需求。

138 2. 其他生产用物料

139 除起始原材料外，需提供所有其他生产使用的原材料和辅料的来
140 源、组分、质量控制、使用阶段等信息，并提供相关的证明文件。原
141 材料和辅料的质量控制可参照《中国药典》通则“生物制品生产用原
142 材料及辅料质量控制”的相关要求，质控策略应与其风险相符。如有
143 可能，应尽量避免使用动物源或人源性原材料。如需使用，需提供相
144 关的必要性和合理性证明，并制定相应的风险控制措施。不得使用 β
145 内酰胺类抗生素、链霉素，以及其他如溴乙锭等有毒有害试剂，尽量
146 减少或避免 Triton X-100 等对环境或人体存在不利影响的试剂。

147 提供重要的生产用耗材、仪器和设备的信息，关注样品接触材质
148 对病毒颗粒的吸附和失活影响。样品直接接触的生产用耗材和设备经
149 研究或评估，应无明显相容性风险。

150 五、生产工艺

151 通过前期的工艺开发和临床研究样品的制备，应能建立并初步证
152 明生产工艺的合理性和可重复性，拟定工艺应能稳定生产出符合预期

153 质量的临床研究用样品。

154 申报资料须明确临床研究用样品的生产厂和检验厂，提供基本的
155 生产工艺信息，包括批次定义、生产规模、工艺流程、具体的工艺参
156 数和过程中控制信息等。工艺开发信息应能支持临床样品生产工艺设
157 定的合理性，如质粒瞬转工艺中质粒的用量和配比、杆状病毒感染工
158 艺中的病毒用量和比例、病毒包装时间和收获条件、层析介质的选择、
159 纯化工艺条件、制剂处方筛选等。综合工艺开发研究信息、非临床研
160 究用批次和临床批次的生产情况，初步评估临床研究用样品的生产工
161 艺的合理性和稳定性。由于 AAV 载体类产品的细胞包装产物中，产
162 品相关杂质种类较多，如空壳病毒等，一般需要通过多个工艺单元进
163 行分离纯化。部分分离纯化方法，如密度梯度离心等，在工艺放大方
164 面可能具有一定局限性，因此，工艺单元的设定还需要考虑后续生产
165 规模放大的可能性和可行性。

166 生产工艺应设立必要的过程中控制项目。除外源因子相关的控制
167 外，可在关键工艺步骤设立与产品质量、杂质清除、回收率等相关的
168 中控项目。对于拟用于临床的生产批次，一般建议在病毒收获液阶段
169 常规开展外源因子中控检测，项目设定应与产品工艺相匹配，常见如
170 无菌/生物负荷、内毒素、支原体、螺原体（SF9 细胞或生产过程中使
171 用了植物源性成分）和内外源病毒因子等检定。如包装用病毒或产品
172 病毒载体可能影响收获液外源病毒因子的检测结果时，可考虑设置对
173 照细胞，或采用 NGS 等敏感分子生物学方法进行内外源病毒因子
174 检查，但检查结果应具有代表性。申报临床时，应参考药典要求对生

175 产终末细胞至少进行一次全面的检定。

176 基于产品内外源病毒因子的风险评估，必要时，应考虑在工艺步
177 骤中设立病毒清除/灭活工艺单元。一般认为，载体生产过程中如使用
178 了包装用病毒或存在其他内/外源病毒污染风险时，应考虑在工艺中
179 增加病毒清除/灭活单元以清除/灭活非目标病毒，如去污剂或低 pH 孵
180 育对包膜病毒的灭活，热灭活工艺对温度敏感病毒的灭活，层析和纳
181 滤步骤对病毒的清除等。针对设立的病毒清除/灭活工艺单元，建议参
182 考 ICH Q5A 的一般原则开展病毒清除/灭活验证研究。如有可能，验
183 证研究应尽可能将原材料或工艺步骤中可能引入的病毒或同类病毒
184 作为指示病毒，如昆虫细胞/杆状病毒包装系统可能引入的杆状病毒、
185 弹状病毒等。有效的病毒清除/灭活工艺单元病毒降低量应能达到 \geq
186 $4\log_{10}$ 的病毒清除/灭活效果。基于风险评估，必要时，可考虑设立多
187 种不同原理的病毒清除/灭活工艺单元。基于载体包装收获液中非目
188 标病毒的载量，根据验证研究结果，评估非目标病毒残留的安全性风
189 险。

190 六、质量研究与质量标准

191 1. 质量研究

192 AAV 载体类产品的质量研究应根据产品的设计、作用机制和生
193 产工艺确定，一般包括（但不限于）：鉴别、结构分析、一般理化特
194 性、含量、纯度、生物学活性、杂质、安全性相关检测等。研究样品
195 应具有代表性，如工艺相近的非临床研究用样品、临床研究用样品等。
196 质量研究报告应完整，包括分析方法原理介绍、研究样品、试验条件

197 和基本步骤、数据处理和结果分析等，分析方法应能满足预期用途。

198 病毒载体的结构和理化特性研究一般包括全基因组的序列分析，
199 衣壳蛋白的分子量、氨基酸序列和翻译后修饰研究，病毒颗粒的衣壳
200 蛋白比例、热稳定性、颗粒形态和粒径分析等。由于生产过程中 AAV
201 载体可能出现基因序列的缺失、基因组不完整或序列突变的情况，建
202 议对以上情况进行研究。AAV 载体的含量、纯度和活性分析一般包括
203 病毒载体的滴度（如病毒颗粒数、基因组滴度、感染滴度等）、衣壳
204 蛋白的纯度、病毒颗粒纯度、比滴度、转导活性等。由于 AAV 载体
205 类产品具有较高的异质性，需全面分析各类产品相关杂质，如空壳病
206 毒、不完整包装病毒、游离衣壳蛋白、游离核酸、DNA 错误包装、病
207 毒聚集体、可复制型 AAV 等。基于产品作用机制的设计，需对外源
208 目的基因的表达产物进行确认并初步建立相关的生物学活性分析方
209 法，如目的基因的表达水平、表达产物的生物学活性等。根据产品特
210 性，必要时，应对病毒载体细胞嗜性及目的基因的选择性表达特性进
211 行研究。

212 结合工艺，对引入的各类工艺相关杂质的残留水平进行分析或检
213 测，并评估其安全性风险，例如，S/D 灭活试剂、亲和配基、宿主细
214 胞蛋白、宿主细胞 DNA、包装质粒（如有）、核酸酶、E1A/E1B 基因
215 （如有）、转染试剂、裂解试剂、氯化铯或碘克沙醇等沉降剂、非目
216 标病毒残留（如包装用病毒及其相关杂质等）、残留 DNA 片段大小
217 等。对生产中可能引入的污染物如细菌、真菌、支原体、内/外源病毒、
218 细菌内毒素等进行检测，或结合过程控制进行风险分析。

219 其他一般特性分析可能还包括外观、装量、pH 值、渗透压、可
220 见异物、重要辅料含量、不溶性微粒等。

221 2. 质量标准

222 产品质量标准应根据产品特点、生产工艺、质量研究，以及前期
223 对产品认知的积累等综合评估后拟定。AAV 类产品质量标准常见包
224 括一般检查（如外观、可见异物、不溶性微粒、渗透压、pH 值、装
225 量、粒径等）、鉴别（单链/自身互补型双链、基因组鉴别和衣壳蛋白
226 鉴别）、活性、滴度（基因组滴度、感染滴度等）、比滴度、纯度、产
227 品和工艺相关杂质、可复制型 AAV、无菌、内毒素、关键辅料含量等。

228 工艺如使用了风险较高的生产用细胞，如肿瘤细胞系、致瘤细胞系，
229 或携带致瘤基因、病毒来源序列的细胞（如 HEK293T 细胞），建议持
230 续收集残留宿主细胞的 DNA 片段大小和残留水平数据，并结合风险
231 评估合理控制片段大小和残留水平。由于 AAV 类载体的包装产物类
232 型较多，拟定的质量标准应能有效控制各类组分的含量，如病毒颗粒
233 总量、目标载体含量、空壳病毒含量等。一般建议参考非临床毒理研
234 究批次样品的质量初步拟定临床研究样品的标准限度，尤其是安全性
235 相关项目，尽可能保障临床研究样品的安全性。

236 3. 分析方法

237 提供质控相关的分析方法信息，包括方法学原理、分析仪器、试
238 剂耗材、操作步骤、数据处理、结果分析和结果判断等。申报临床时，
239 应对产品质控相关分析方法进行确认研究。由于部分 AAV 产品相关
240 杂质，如空壳病毒、不完整包装病毒等理化特性与目标产物较为接近，

241 分离和定量分析相对困难，建议选择分离度好、性能稳定的分析方法
242 用于质量控制。可复制型 AAV 作为 AAV 类产品中重要的控制项目，
243 应针对产品建立敏感、适用的分析方法。鉴于不同衣壳类型的 AAV
244 对细胞的感染特性可能存在差异，方法建立需关注分析用细胞、对照
245 设立的适用性。一般认为，相同血清型或衣壳类型的阳性对照病毒可
246 能在感染特性方面更具有代表性。分析方法的传代方式和培养条件应
247 有利于可复制型 AAV 的复制和检出，检测靶点的选择需充分考虑可
248 复制型 AAV 产生的方式和类型。

249 根据检测需要，建立质控分析用标准品/对照品。标准品/对照品
250 的建立、制备和保管可参照《中国药典》“生物制品国家标准物质制
251 备和标定规程”的相关要求。基于标准品/对照品的特性和使用目的，
252 进行特性分析（如结构、活性、纯度、含量和其他特性等）、标定和稳
253 定性研究，并确保数量足够用于研究和生产。

254 七、稳定性研究

255 参考《生物制品稳定性研究技术指导原则（试行）》、《体内基因
256 治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》等指南开展 AAV 载
257 体类产品的稳定性研究，可能涉及的研究样品包括生产中间品、原液
258 和制剂等，研究条件和包装容器应具有代表性，考察指标应能敏感反
259 应样品的稳定性，常见的考察指标包括如外观、可见异物、不溶性微
260 粒、纯度、滴度（基因组滴度和感染滴度）、比滴度、生物学活性、无
261 菌、关键辅料含量等。研究项目一般包括长期稳定性、加速稳定性、
262 影响因素研究等，建议重点关注冻融、高温等病毒敏感条件对样品的

263 影响。

264 根据临床研究用样品生产和使用可能涉及的运输、临床使用情况，
265 开展必要的运输和使用稳定性研究。基于不同的适应症和产品设计，
266 AAV 载体类产品的临床给药方式可能较为多样。部分给药器械可能
267 会对 AAV 载体类产品产生明显的吸附作用，导致产品滴度下降。建
268 议关注 AAV 载体类产品与拟定使用的给药器械之间的相容性，并通
269 过模拟临床给药流程，考察给药剂量的准确性，评估产品的滴度、纯
270 度、生物学活性、不溶性微粒等是否会受给药器械的影响。

271 产品的稳定性研究应能支持临床试验的开展。

272 八、包装与密封容器系统

273 提供样品接触的包装材料的选择依据和相关信息，包括供应商、
274 包装材质、包材组成、质量标准、供应商提供的相容性研究等。开展
275 相关的研究或评估，初步分析说明包材的适用性、密封性和相容性符
276 合临床试验用样品的使用要求。部分产品内包材，如环烯烃聚合物
277 （cyclic olefin polymer）类包材，可能具有一定的透气性，建议关注
278 样品储存期间二氧化碳等气体的渗透风险，充分评估包装材料的适用
279 性和风险控制策略的充分性。

280 九、参考文献

281 [1] 国家药典委员会. 《中华人民共和国药典》（2020 年版）. 2020.

282 [2] CDE. 体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）

283 [EB/OL]. 2022.