

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

# 基因转导与修饰系统药学研究与评价技术指导原则 (征求意见稿)

国家药品监督管理局药品审评中心

生物制品药学部

2020年9月

# 目 录

22		
23		
24		
25	一、前言 .....	3
26	二、范围 .....	4
27	三、风险控制 .....	4
28	四、目的基因及调控元件 .....	5
29	五、基因转导与修饰系统 .....	7
30	(一) 病毒载体类基因转导与修饰系统.....	7
31	1、病毒载体包装系统的设计与构建 .....	7
32	2、生产用原材料 .....	9
33	3、生产工艺.....	12
34	4、质量研究与质量控制.....	16
35	(二) 核酸类基因转导与修饰系统 .....	20
36	1、分子设计和上游构建.....	21
37	2、生产用原材料 .....	22
38	3、生产工艺.....	23
39	4、质量研究与质量控制.....	24
40	六、稳定性研究.....	27
41	七、内包材研究.....	28
42	八、工艺变更 .....	29
43	九、环境和生物安全性 .....	29
44	十、名词解释 .....	29
45	十一、参考文献.....	30
46		
47		

## 48 一、前言

49 近年来，免疫细胞治疗和基因编辑等基础理论、技术手段蓬勃发展，相关临  
50 床医疗探索不断深入，为严重和难治性疾病提供了新的治疗理念和方法。新兴治  
51 疗产品日益增加的临床需求促进了遗传物质导入、传递和表达等基因操作新技术  
52 和新工具的应用和更新。基因转导与修饰系统指含有工程化基因构建体的载体或  
53 递送系统，可有效地将遗传物质转入特定靶细胞，用于修饰靶细胞的遗传物质、  
54 改变基因表达方式或调节细胞生物特性等。细胞和基因转导技术发展迅速，种类  
55 多样，且基因转导与修饰系统设计和制备过程的差异可导致产品质量的显著差异。  
56 CAR-T 细胞、诱导多能干细胞等不同类别细胞治疗产品 (*ex vivo*) 的生产过程常  
57 涉及离体细胞的基因改造或修饰，所用的各类基因转导与修饰系统需经过完整的  
58 安全性、有效性和质量可控性评价，其药学研究与直接应用于人体的基因治疗产  
59 品 (*in vivo*) 存在差异。为满足细胞治疗产品基因操作的需要，规范和指导基  
60 因转导与修饰系统的药学研发，特制定本技术指导原则。本指导原则仅基于当前  
61 的科学认知，对基因转导与修饰系统的药学研究提出一般性技术要求。随着基因  
62 治疗技术的发展、认知的深入和经验的积累，后续将逐步修订和完善相关技术要  
63 求。

64 本指导原则是针对基因转导与修饰系统的建议性的技术要求，旨在为药品注  
65 册申请人（以下简称申请人）的研发、申报提供指导意见，同时，也作为监管机  
66 构监管和评价细胞治疗产品生产用基因转导与修饰系统的重要参考。按照药品注  
67 册的基因修饰后细胞治疗产品，其生产时使用的基因转导与修饰系统作为关键材  
68 料，需接受国家药品监督管理局（NMPA）的监管，研发和申报时在遵循本指导原  
69 则的同时，还应符合《中华人民共和国药品管理法》、《药品注册管理办法》、《中  
70 华人民共和国药典》等相关法律法规的要求，同时综合参考其他相关指导原则，  
71 以及后续发布的关于该领域的相关法规。对具体问题的适用性，应具体问题具体  
72 分析。

## 73 二、范围

74 本指导原则所涉及基因转导与修饰系统，指拟在输入受试者或病人之前，直  
75 接对细胞的遗传物质进行修饰、改变基因表达方式或调节细胞生物特性所用的含  
76 有工程化基因构建体的载体或递送系统，可能包括病毒载体、非病毒载体，以及  
77 特异性的基因编辑工具等。其通过将外源基因导入靶细胞或组织，替代、补偿、  
78 阻断、修正特定基因，以达到治疗疾病的目的。可能的作用机制包括细胞内表达  
79 编码功能性蛋白的转基因，或采用基因沉默、外显子跳跃、基因敲除、基因调控、  
80 核苷酸编辑等方式修复、添加或删除特定的基因序列等。

81 本指导原则中的病毒载体类基因转导与修饰系统包括：(1)慢病毒、逆转录  
82 病毒、腺病毒、腺相关病毒等常见细胞产品生产用病毒载体；除上述常用的病毒  
83 载体外，其他具有基因递送功能的病毒载体如疱疹病毒、牛痘病毒、EB病毒、柯  
84 萨奇病毒等的药学研究也可参考本指导原则。(2)非病毒类基因转导与修饰系统，  
85 包括DNA、RNA、转座子载体、基于染色体的载体，并可能采用脂质体、阳离子多  
86 聚糖等助转试剂及电转等方式进行细胞转导；特异性基因编辑工具包括基于  
87 CRISPR-Cas、锌指核酸酶（ZFN）或TALEN等系统的序列特异性核酸内切酶和序  
88 列特异性核酸修饰酶。

89 本指导原则中基因转导与修饰系统拟修饰的细胞治疗产品，指经过生产工艺  
90 处理的活细胞治疗产品，包括终末分化的体细胞和具有分化潜能的干细胞治疗产  
91 品等。对人类生殖细胞或人类胚胎进行任何形式的基因转导与修饰系统的应用不  
92 在本指导原则适用范围之内。

## 93 三、风险控制

94 与基因转导与修饰系统相关的风险因素取决于载体以及所使用的转基因表  
95 达盒，也取决于要进行基因修饰的细胞群。典型风险因素包括但不限于：载体的  
96 染色体整合潜力及其染色体整合程度、载体免疫原性、载体潜伏/再激活和/或动  
97 员的能力及其重组/混种潜力以及非靶点的生物分布情况。例如，逆转录病毒载  
98 体转导细胞后，可能激活位于前病毒DNA整合位点附近的内源性DNA序列。另

99 外,载体是否具有复制能力以及在经相应野生型或辅助病毒互补后产生回复突变  
100 或意外复制的能力也是重要的风险因素。此外,风险因素也与治疗性转基因表达  
101 或任何其他递送的转基因表达量以及表达持续时间相关。对改变表观遗传、基因  
102 表达水平等,但不基因组本身进行编辑的基因转导与修饰系统,应根据系统作  
103 用机理,全面分析脱靶相关的风险因素,并设计体外和体内实验开展研究,阐明  
104 相关检测系统的科学性等。

105 基因转导与修饰系统依据载体工具的不同,可分为病毒载体类基因转导与修  
106 饰系统、核酸类基因转导与修饰系统等;依据复制能力的不同,可分为非复制型、  
107 条件复制型、复制型基因转导与修饰系统;依据载体在靶细胞基因组中整合能力  
108 的不同,可分为非整合型、定点整合型、弱整合型、随机整合型等不同类型。基  
109 因转导与修饰的作用机制包括同源重组、非同源重组等。因此,需要根据多方面  
110 因素、针对不同类型产品的特性进行风险评估和控制。应通过综合风险分析来论  
111 证产品开发的合理性和科学性,识别、确定与产品质量和安全性相关的风险因素;  
112 确定非临床和临床研究期间所需进行风险评估的数据范围和重点,并制定风险防  
113 控和处理措施。申请人需在产品生命周期内对其进行跟踪分析和更新,收集  
114 数据以进一步确定其风险特征并制定控制策略。

115 本指导原则的适用情形,按照细胞治疗产品的生产工艺特点,可分为细胞基  
116 因转导或修饰后建立细胞库和不建立细胞库两类情形,两类细胞产品应用基因转  
117 导与修饰系统的风险不同,相应药学研究的要求存在差异。本指导原则主要适用  
118 于采用基因转导与修饰系统改造后的细胞,经细胞传代、扩增等操作制备细胞治  
119 疗产品再进行人体回输的情形,该情形下所用的基因转导与修饰系统为高风险系  
120 统。对于基因转导或修饰细胞之后建立细胞库再用于细胞治疗产品生产的情形,  
121 若单克隆细胞筛选、细胞库建立检定和传代稳定性等方面进行了深入研究,早期  
122 所用的基因转导及修饰系统相对风险较低,该情形下,可适当降低相关生产用原  
123 材料、生产工艺、质量研究与质量控制、稳定性和内包材等方面的药学研究要求。

#### 124 四、目的基因及调控元件

125 **目的基因:** 目的基因指载体运输、传递、表达的遗传物质,是基因转导与修

126 饰系统发挥作用的关键元件，因此建议结合其在疾病治疗中的作用或作用机理谨  
127 慎设计和选用基因序列，主要包括关注目的基因的来源、序列筛选及优化过程，  
128 明确完整的核苷酸、氨基酸序列信息，并建议与数据库收录的相关序列进行序列  
129 比对。对于新型改构目的基因，应阐述分子改构的科学评估及验证研究考虑，如  
130 人源化改构，敲减元件，自杀标记，防止高级结构形成、为适应载体递送能力进  
131 行的序列改造和删减等。建议结合非临床研究分析目的基因或其表达产物与靶分  
132 子的特异性结合能力，评估目的基因或其表达产物潜在的非特异性效应、免疫原  
133 性等。

134 **调控元件：**功能性元件对目的基因的转录和表达具有重要调控作用，建议关  
135 注其设计原理并进行确认研究。建议明确信号肽、转录启动子、增强子、5' UTR、  
136 3' UTR、PolyA、增强转录及翻译效率相关元件、选择性标记、复制起始位点、  
137 额外引入的基因序列等的来源及选择依据，明确完整的带注释的序列信息。质粒  
138 构建时应避免使用  $\beta$ -内酰胺类抗生素抗性基因。

139 目的基因表达常用的启动子包括 CMV、EF1 $\alpha$ 、PGK 等，也存在可调控基因表  
140 达的开关式启动子如 Tet-On、Tet-off 等，还有为增强靶细胞目的基因表达能力  
141 使用组织特异性启动子等。RNA 的表达一般用 III 类启动子启动，如 H1、hU6 等。  
142 建议结合靶细胞类型、目的基因表达时间和表达量的需求、启动子的人用经验等  
143 分析其启动子使用的安全性，在风险评估的基础上合理选用，如使用来自巨细胞  
144 病毒的强启动子 CMV 时曾发现与之相关的高肿瘤发生率。若对功能元件进行了任  
145 何序列改构或优化（如删除部分序列、密码子优化），均应详细提供序列更改的  
146 依据与安全性考虑。建议关注功能元件设计对细胞基因组内源性基因的干扰，比  
147 如终止子、隔离子等元件的设计。例如为降低安全风险，建议整合型基因转导与  
148 修饰系统设计时对土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件 WPRE 进行改构。

## 149 五、基因转导与修饰系统

### 150 (一) 病毒载体类基因转导与修饰系统

#### 151 1、病毒载体包装系统的设计与构建

152 病毒载体按照基因组性质可分为单链或双链的 DNA 病毒、RNA 病毒等类型，  
153 按照结构特点可分为有包膜、无包膜等类型。建议对病毒载体基因组性质进行研  
154 究，包括单链、双链、自身互补的 DNA 或 RNA，以及每个病毒颗粒的基因组拷贝  
155 数等。建议关注病毒载体的结构组成以及对结构的所有修饰（如对抗体结合位点  
156 或趋向性改变元件的修饰等）。应采用所有可能的手段降低与野生型病毒相关的  
157 任何致病性，并将病毒重组和回复突变的风险降到最低。若属新的或改变结构的  
158 病毒载体，须关注亲本病毒的来源、培养历史和生物学特性等，对组建的材料、  
159 方法、组建步骤及鉴定进行充分研究。对病毒载体的改构不应引入新的安全风险。  
160 对于选择性感染某种器官/组织的病毒载体，建议研究插入基因或相应报告基因  
161 在目标器官/组织的选择性表达情况。

162  **$\gamma$ -逆转录病毒载体 (Retroviral Vector):**  $\gamma$ -逆转录病毒可反向转录其 RNA  
163 基因组成为 DNA 拷贝或前病毒，病毒 DNA 随机整合进入有丝分裂活跃的细胞。 $\gamma$   
164 -逆转录病毒包括鼠白血病病毒 (MuLV)，猫白血病病毒 (FeLV) 和长臂猿白血病  
165 病毒 (GALV) 等。采用逆转录病毒进行基因修饰的风险包括前病毒序列在靶细胞  
166 基因组中启动子、增强子序列中的整合引起的致癌风险，mRNA 3' 端取代导致的  
167 细胞癌基因的异常激活等。早期临床试验曾发现，逆转录病毒对造血干细胞进行  
168 基因改造回输人体后诱导了肿瘤的发生。目前对逆转录病毒载体的临床使用安全  
169 性仍在探索中，建议谨慎使用  $\gamma$ -逆转录病毒载体进行分裂活跃的干细胞类产品的  
170 基因编辑。

171 逆转录病毒载体曾通过转移质粒、辅助质粒瞬转细胞进行病毒包装，后期为  
172 防止复制型病毒的产生，稳定整合转基因、辅助基因 (*gag-pol*、*env*) 的稳定产  
173 毒细胞株开始广泛应用。为提升包装系统的安全性，逆转录病毒稳定产毒细胞株  
174 经历了三次优化，第一代产毒株删去了病毒的包装信号，第二代产毒株对病毒辅  
175 助元件进行了改构，如删去 5' LTR 的 5' 端，替换 3' LTR 等。第三代产毒株中

176 *gag-pol* 和 *env* 基因分别置于不同转录单元，对病毒同源序列进行了替换（如采  
177 用其他病毒序列替换 LTR、使用异源启动子等）。常见的第三代稳定产毒细胞株  
178 包括小鼠 NIH/3T3 PG13、HEK293-Phoenix 细胞等不同类型。为调控病毒亲嗜性，  
179 逆转录病毒载体假病毒的包膜蛋白通常替换为其他包膜蛋白，常见包括  
180 Amphotropic MLV envelope 4070A 或 10A1、长臂猿白血病毒包膜蛋白 GALV  
181 等。由于第三代稳定产毒细胞株提高了逆转录病毒的包装效率、批间质量一致性  
182 和病毒使用的安全性，使用逆转录病毒载体进行人体细胞治疗产品基因修饰时，  
183 建议优先使用删除了非必需元件、经充分改造、安全性级别较高的稳定产毒细胞  
184 系生产  $\gamma$ -逆转录病毒。

185 **慢病毒载体 (Lentiviral Vector):** 慢病毒属于逆转录病毒科慢病毒亚科。  
186 慢病毒载体通过介导目的基因整合至非分裂细胞发挥作用，其亲本病毒包括人灵  
187 长类慢病毒 (HIV)、非人灵长类和非灵长类慢病毒如猴免疫缺陷病毒 (SIV)、猫  
188 免疫缺陷病毒 (FIV)、马传染性贫血病毒 (EIAV)、山羊关节炎/脑炎病毒 (CAEV)  
189 和牛 Jembrana 病毒等。目前尚不清楚人类感染非人灵长类和非灵长类慢病毒的  
190 后果，建议使用该类载体时关注产生重组病毒嵌合体和跨物种传播的相关风险。

191 通常慢病毒载体基因组含有载体包装、逆转录和载体基因组整合入宿主细胞  
192 基因组所需的顺式作用序列。对于 HIV 衍生的慢病毒载体，为增强载体的趋向性  
193 和颗粒稳定性，一般用编码异源病毒包膜蛋白（如 VSV-G）的基因替换 HIV 包膜  
194 蛋白来生产假病毒。慢病毒载体包装系统应进行复制缺陷设计。慢病毒载体生产  
195 和临床使用的主要风险点包括：（1）生产过程中可能产生复制型慢病毒（RCL），  
196 （2）载体与慢病毒多核苷酸序列进行体内重组，（3）在活性基因中或其附近插  
197 入前病毒 DNA 从而可能引起或促进肿瘤发生。因此慢病毒包装系统设计方面，建  
198 议采用所有可能降低慢病毒致病风险的措施，其中包括不同基因应分离于不同质  
199 粒表达（如 *gag/pol* 和 *rev* 分离），降低辅助质粒和转移质粒间的序列同源性以防  
200 止与人体内源性病毒重组，删除病毒包装不必要的调控元件 (*Tat*、*Vif*、*Vpr*、*Vpu*、  
201 *Env* 和 *Nef*)，改构长末端重复序列使得末端自失活 (SIN)，利用人类细胞偏好密  
202 码子合成病毒元件等。对于转移质粒，鼓励进行相关序列改构，降低启动子插入  
203 靶细胞引起原癌基因活化的几率。采用慢病毒进行基因转导时，建议选择含有末  
204 端自失活结构、删去非必需元件、同源序列经充分改造、病毒包装元件拆分于多



205 个质粒的慢病毒包装系统。

206 **腺病毒载体 (Adeno Viral Vector):** 腺病毒载体是较常见的基因递送载体，  
207 其一般不整合入细胞染色体，直接进行短暂的转基因表达。腺病毒载体的早期人  
208 体应用过程中曾出现细胞因子风暴等严重不良反应，因此建议合理选择腺病毒载  
209 体的类别，关注其免疫原性等安全性风险。采用腺病毒进行基因转导时，建议进  
210 行复制缺陷设计（如删除 E1A 和 E1B 基因和部分 E3 基因序列），并最大程度降低  
211 其免疫原性（如删除 E2A、E2B 或 E4 序列等）。此外，建议关注腺病毒载体序列  
212 与细胞中病毒序列同源重组产生复制型腺病毒的风险。

213 **腺相关病毒载体 (Adeno-associated Viral Vector):** 使用 AAV 进行基因  
214 转导的风险可能包括复制型 AAV 相关的非预期免疫反应、辅助病毒残留相关毒  
215 性、病毒中和及引入的非预期安全性风险、AAV 载体元件与已存在 AAV Rep 和 Cap  
216 序列之间发生同源或非同源重组事件产生假野生型 AAV 等。为最大程度降低上述  
217 风险，建议设计 AAV 包装系统时分析包装质粒序列，如 Rep/Cap 基因序列和 ITR  
218 等序列之间的相似性，并需要针对具体结构设计进行安全性评价。建议包装时将  
219 AAV 的不同结构基因分离于不同质粒的转录单元中，尽量采用异源启动子替换  
220 AAV 内源性启动子等。一般情况下重组 AAV 载体基因较少整合到基因组中，但近  
221 年来已发现 AAV 载体基因整合到特定基因座中导致肿瘤的可能性。建议设计时充  
222 分考虑重组 AAV 载体的安全性，关注目的基因的启动子选择、给药剂量、整合区  
223 域等多种相关因素。

## 224 2、生产用原材料

225 **1) 细胞基质:** 选择用于病毒载体生产的细胞基质时，建议关注可能影响最  
226 终产品安全性的细胞特征，如是否存在致癌序列等。建议申请人结合细胞生长特  
227 性和载体生产能力等，说明细胞株（包括哺乳动物细胞、昆虫细胞等）选择的考  
228 虑。当病毒载体与非载体 DNA 序列（如质粒 DNA、辅助病毒序列、细胞 DNA 等）  
229 共同包装时（如 AAV 包装），建议进行风险评估，谨慎选择病毒载体生产细胞基  
230 质和辅助序列。

231 包装/生产病毒载体所用的细胞基质应来源清晰，历史培养情况明确。细胞  
232 基质构建方面，建议关注细胞来源（包括来源物种）、鉴别和生物学特性，以及

233 是否存在内源性病毒颗粒或序列等。对细胞基质进行遗传修饰时（例如赋予病毒  
234 蛋白，允许病毒复制或包装），应明确遗传修饰材料，关注有关引入遗传变化的  
235 载体质量和控制信息。应在符合药品 GMP 的条件下建立细胞库，明确细胞库制备、  
236 存储和维护的信息。

237 建议结合细胞来源和特性，参考《中国药典》“生物制品生产检定用动物细  
238 胞基质制备及检定规程”、ICH Q5A、ICH Q5D 等相关要求进行细胞基质和细胞库  
239 的完整检定。应确保细胞基质无特定物种的病原体。对于人细胞系，可能需要的  
240 检测包括：HIV-1 和 2、HBV、HCV、梅毒螺旋体、巨细胞病毒（CMV）、HTLV-1 和  
241 -2、人疱疹病毒 6 和-8（HHV-6 和-8）、Epstein-Barr 病毒（EBV）、人细小病毒  
242 B19、人乳头瘤病毒（HPV）等。对于其他动物或昆虫细胞，建议根据需要对物种  
243 特异性病毒进行检测。例如，对于 Vero 细胞，建议申请人检测猿猴多瘤病毒 SV40  
244 和猿猴逆转录病毒。对于昆虫细胞，申请人可以评估易感细胞系（例如仓鼠肾细  
245 胞（BHK21））是否存在虫媒病毒。应避免使用已知有病毒污染的昆虫细胞系。

246 应确保细胞基质和细胞库不存在微生物污染，检测项目应包括无菌、支原体  
247 （和昆虫细胞螺旋体）以及内、外源病毒因子的体内和体外检测等。对于已暴露  
248 于牛源或猪源成分（例如血清、血清成分、胰蛋白酶）的细胞系，应检测牛源或  
249 猪源外源因子。对于新建立的细胞系，应评估细胞的成瘤性和致瘤性。

250 应对细胞库开展细胞传代稳定性研究，包括细胞生长稳定性、储存稳定性、  
251 遗传稳定性、病毒包装能力稳定性等。建议对生产终末期细胞（EOP）或具有相  
252 似传代历史的生产模拟细胞开展稳定性研究，拟定适合生产病毒载体的细胞的限  
253 传代次。

254 **2) 菌种库：**所有细菌或微生物（如酵母）的细胞库应按《中国药典》相  
255 关规定或与国际通行要求建立菌种库系统。菌种库通常用作生成质粒 DNA 的起始  
256 材料，可将其用作基因转移的载体或其他基因治疗产品（例如慢病毒载体或 AAV  
257 载体）的生产中间体。应明确宿主菌的来源、基因型、表型以及目标克隆筛选的  
258 流程，关注用于生成菌种库的材料的历史和来源，包括有关如何设计和构建质粒  
259 载体等。如使用新型菌株，应关注其可能引入的毒素等。

260 建议明确菌种库建立、鉴定和检定的详细信息，关注各级菌种库的制备规模、  
261 保存条件、扩增条件、允许的传代次数等。为保证菌种库无外源因子污染及目的

262 基因序列和其他元件的准确性，检测项目应包括细菌形态学、培养物纯度、质粒  
263 限制酶切图谱、目的基因和其他元件测序等。鼓励对工程菌活性、质粒保有率、  
264 鉴别、抗生素抗性等指标进行检定。菌种库传代稳定性研究方面，建议开展菌种  
265 遗传稳定性分析（序列大小、序列准确性、质粒限制酶切图谱、质粒拷贝数）并  
266 明确各级菌种库的限定传代代次及依据。

267 **3) 质粒：**应对病毒包装用各质粒的生产工艺开展研究，对各工艺参数进  
268 行探索和优化，建立稳定的质粒规模化生产工艺。应明确各质粒的生产规模、生  
269 产工艺流程，说明相应工艺步骤的目的、工艺流程步骤、过程控制策略、物料流  
270 转及中间产物等。质粒生产过程中应避免使用人源和动物源性材料，建议避免使  
271 用 $\beta$ -内酰胺类抗生素，如需使用，应对抗生素的残留量进行控制和安全性评估。  
272 需开展完整的质粒工艺验证研究，包括工艺过程控制确认、中间体存储稳定性研  
273 究、多批次质量分析以及杂质清除研究等。

274 质粒的质量控制建议包括以下项目：pH 值、外观、鉴别（限制性内切酶酶切  
275 和测序）、质粒浓度/含量、纯度（A260/A280、超螺旋比例）、宿主菌 DNA 残留、  
276 宿主菌 RNA 残留、宿主蛋白残留、抗生素残留（如适用）、无菌/微生物限度及细  
277 菌内毒素等。稳定性研究方面，建议根据质粒存储条件开展长期、加速、反复冻  
278 融等影响因素研究，选择敏感的项目（如超螺旋比例等）进行稳定性监测。

279 **4) 病毒种子库：**病毒种子库一般用于生产病毒载体，或者可作为生产非复  
280 制病毒载体的辅助病毒。建议关注病毒种子的来源、历史培养情况等，明确最终  
281 病毒载体和载体中间体的基因图谱。应在药品 GMP 条件下建立病毒种子库，明确  
282 种子库的建立过程、代次、存储和维护的信息；如有，应说明种子库制备及衍生  
283 过程使用的动物源材料，并进行安全性评估。建议说明在病毒种子扩增过程中，  
284 病毒种子是否经噬菌斑纯化、有限稀释纯化或从 DNA 或 RNA 克隆中回收等。另  
285 外，建议关注种子库是否代表单个克隆或病毒变异体或序列的分布。

286 病毒种子库应经过完整检定，检测项目建议包括：无菌、支原体以及外源病  
287 毒因子的体内和体外检测；细胞来源的特定病原体，如人类病毒、鼠类/非灵长  
288 类动物、禽类、昆虫病毒等；鉴别病毒载体和治疗性转基因（Southern 印迹分  
289 析、限制性核酸内切酶分析等）；病毒滴度/浓度；均一性；对抗病毒药物的敏感  
290 性（如适用）等。建议对病毒载体进行全基因测序，并对预期序列与测序结果所

291 有差异的重要性进行评估。对于序列长度大于 40kb 的病毒载体，建议最大程度  
292 进行序列分析，所分析的序列建议包括基因插入片段、侧翼区域以及载体中被修  
293 饰或可能易于重组的任何区域等。

294 应对生产用病毒种子开展全面的稳定性研究，包括遗传稳定性、目的基因表  
295 达稳定性和生产稳定性研究等。应明确病毒种子库的限定传代代次及依据。如果  
296 采用质粒瞬转方法进行病毒包装，建议在生产工艺中对一个或多个病毒批次进行  
297 测序，以确认病毒载体序列的稳定性。

298 如病毒载体生产过程使用了辅助病毒，应阐明辅助病毒的使用必要性和选择  
299 依据，结合科学认知及生产经验说明辅助病毒的安全性。辅助病毒的溯源、设计  
300 构建、生产制备、建库和检定应遵从上述病毒种子库的一般要求。

301 **5) 其他生产用原材料：**包括试剂、培养基、一次性耗材、培养和包装容器  
302 等。原材料的使用应参考《中国药典》“生物制品生产用原材料及辅料的质量控  
303 制规程”，具体说明原材料的来源、组分、功能、使用阶段、质量标准等，提供  
304 相关的文件（如来源证明、检验报告书（COA）、包装说明书、无 TSE/BSE 声明等）  
305 证明其符合拟定标准，适用于其预期用途。生产过程中应避免使用人或动物来源  
306 的成分，如果必需使用，应符合《中国药典》相关规定和/或参照 ICH Q5A 等技  
307 术指南提供外源因子风险评估资料。建议重点提供以下原材料的相关信息：用于  
308 细胞培养的动物源材料（如牛血清、消化酶），质粒转染试剂（如氯化钙、聚乙  
309 烯亚胺 PEI、阳离子脂质等转染试剂），核酸酶，病毒纯化过程中使用的缓冲液及  
310 纯化介质、过滤膜等。当病毒生产或保存时使用人血白蛋白等血液制品时，应尽  
311 可能选用药用级别的材料。

### 312 3、生产工艺

313 病毒载体的生产全过程应当符合《药品生产质量管理规范》（GMP）的基本原  
314 则和相关要求。可结合质量源于设计、全生命周期管理和全过程控制等新理念，  
315 以及对产品相关风险控制的一般要求开展工艺研究。在对整体工艺的充分理解和  
316 对病毒载体产品的累积经验基础上进行工艺设计，应建立规范的工艺操作步骤、  
317 工艺控制参数和废弃标准，并明确关键工艺参数和关键质量属性。应对生产的全  
318 过程进行监控，包括生产工艺参数的监测和过程控制指标的监测等。生产工艺应

319 适用于确保成品质量符合对应开发阶段的质量目标产品概况(QTPP)要求。另外，  
320 应采取措施确保病毒载体在生产、储存、运输的整个过程中未发生混淆、污染与  
321 交叉污染等。

### 322 3.1 生产规模和批次定义

323 不同类型临床级病毒载体的生产用细胞生长特性、病毒产量和稳定性等存在  
324 较大差异，生产工艺成熟程度及临床使用剂量等也不尽相同，建议结合待基因修  
325 饰细胞的特性、病毒载体的生产工艺和治疗方案等，合理确定病毒载体的生产规  
326 模。建议尽可能在临床前采用匹配细胞产品临床试验制备需求的生产工艺规模生  
327 产病毒载体，申报上市阶段的病毒生产工艺规模应满足细胞治疗产品商业化生产  
328 的要求。应明确从包装细胞培养、收获、纯化形成原液、半成品至病毒载体成品  
329 生产批次的定义，包括但不限于生产规模、包装细胞传代次数、编号规则、病毒  
330 液合并规则等。

### 331 3.2 工艺开发

332 病毒载体可以通过质粒 DNA 瞬时共转染包装细胞基质产生，或通过稳定的包  
333 装细胞系生产，该细胞系中包含用于病毒包装的所有必需元件。当使用了编码异  
334 源病毒包膜蛋白（例如 VSV-G）的质粒时，应当去除包膜基因序列对病毒批次的  
335 污染，以消除内源或外源病毒假病毒化的风险。尽管由于非特异性共包装，可能  
336 无法完全消除，但应尽量减少病毒批次中 gag/pol 序列的污染。

337 病毒载体生产工艺一般分为上游、下游两个阶段，即上游的质粒转染细胞包  
338 装病毒或稳定细胞系生产病毒阶段和下游的病毒纯化阶段。包装细胞种类、细胞  
339 培养条件、病毒收获时间、纯化步骤及储存条件均影响着病毒载体的包装效率和  
340 质量。应对工艺步骤、关键工艺参数及其控制范围进行确认，并建立相应的过程  
341 控制检测标准。生产过程中的中间体可能包括来自收集或保存步骤的材料，例如  
342 半成品采集物临时储存、浓缩或纯化步骤的中间体（色谱柱组分或洗脱液等），  
343 应提供中间体质量和控制的信息。应对每个步骤和停留时间进行验证，拟定中间  
344 体限度范围。应提供累积的分析数据，证明病毒批次的批间质量一致性。

#### 345 3.2.1 $\gamma$ -逆转录病毒的生产工艺研究：

346 (1) 稳定产毒细胞株构建及病毒生产

347  $\gamma$ -逆转录病毒生产时常使用稳定产毒细胞株，可采用分别编码 gag-pol、  
348 env、目的基因的三个质粒转染细胞并通过细胞单克隆筛选获得。稳定产毒细胞  
349 株应在符合 GMP 的条件下构建及筛选。应建立细胞库系统，进行全面的检定，开  
350 展细胞传代稳定性研究，关注不同代次稳定产毒细胞中插入的基因片段的遗传稳  
351 定性。

352  $\gamma$ -逆转录病毒生产时一般由稳定产毒株包装后分泌至胞外，由于  $\gamma$ -逆转录  
353 病毒在一般细胞培养条件下的稳定性较弱，生产过程应缩短病毒包装至收获的时  
354 间，可考虑进行多次病毒收获、收获后立即低温储存等策略以确保病毒载体的回  
355 收率。病毒生产过程中如使用牛血清等动物原材料，建议对使用的必要性和合理  
356 性进行充分评估，尽量减少使用量从而降低病毒产品中的杂质残留。

357 (2) 病毒纯化及制剂

358 由于  $\gamma$ -逆转录病毒的包膜蛋白（如包膜蛋白 GaLV、4070A 等）对层析工艺  
359 比较敏感（剪切力），当前难以开发柱层析工艺进行纯化，通常需要采用经验证  
360 的澄清、膜过滤等方法去除收获液中的包装细胞、细胞碎片等有效纯化病毒。为  
361 了较大程度去除杂质获得纯度较高的逆转录病毒载体，鼓励申请人开发新型层析  
362 工艺及装置，在纯化过程中合理选用病毒稳定剂等，实现逆转录病毒的规模化纯  
363 化。由于  $\gamma$ -逆转录病毒较不稳定，应关注病毒制剂处方和保存条件的研究，探  
364 索确保病毒滴度稳定、抑制病毒聚集产生等的最佳存放条件。

365 3.2.2 慢病毒的生产工艺研究：

366 (1) 质粒转染及病毒包装

367 病毒包装细胞通常采用贴壁或悬浮方式培养，建议根据患者群体和目标剂量  
368 选择最优的满足商业化需求的生产平台。病毒包装步骤中需对质粒浓度、质粒比  
369 例、转染试剂浓度、诱导试剂浓度（如有）、转染时间、细胞密度、细胞培养基  
370 组分、细胞培养环境（温度、pH、溶氧）等参数进行研究与优化。应对工艺步骤、  
371 关键工艺参数及其控制范围进行确认，并建立相应的过程控制检测标准，例如在  
372 细胞培养过程中定期检测细胞活率和生物负荷，开展病毒滴度、鉴别、生物负荷、  
373 支原体和外源性病毒等检测，并采集细胞建立 EOPC 用于可复制型慢病毒（RCL）  
374 检测等。病毒收获液如需储存，应明确储存条件、储存方式并进行相关支持性研

375 究。对于外源因子检测，应最大程度提高检测的灵敏度，在最有可能检测到污染  
376 的生产阶段进行检测。例如应当在进一步加工（澄清、过滤、纯化和灭活等步骤）  
377 之前，检测病毒生产细胞培养物中的外源因子。复制型慢病毒作为一个重要安全  
378 性风险关注点，申请人应在制备过程中对病毒（收获上清液、病毒生产终末期细  
379 胞）采用经验证的指示细胞培养法完成标准检测。

## 380 (2) 病毒纯化及制剂

381 慢病毒的纯化工艺通常采用核酸内切酶去除病毒载体中的大片段核酸，经澄  
382 清、过滤及离子层析或分子排阻色谱等纯化步骤进行杂质的去除，最后经制剂、  
383 除菌过滤、灌装、冻存制成病毒载体成品。应明确各纯化工艺步骤的目的并建立  
384 杂质谱。应对核酸酶浓度、纯化方式、介质选择依据、动态载量、流速、回收率、  
385 病毒制剂处方、灌装工艺参数等进行研究，并对核酸酶残留、BSA 残留、风险元  
386 件残留（如 SV40、E1A 元件残留）、质粒 DNA 残留、宿主残留蛋白及宿主残留 DNA  
387 等杂质的去除率进行研究。需对纯化工艺建立过程控制检测标准，如过程控制项  
388 目可以包括生物负荷、内毒素、病毒鉴别、病毒物理滴度、转导滴度、病毒颗粒  
389 完整性等。

## 390 3.3 工艺验证

391 应采用商业化规模生产工艺生产多个批次病毒载体，确认各步骤的工艺性能，  
392 各批次检测结果均应符合质量标准和过程中控制项目的限度，各批次产品的产量  
393 和回收率应相对一致，残留的核酸酶、宿主细胞蛋白、宿主细胞 DNA、质粒 DNA、  
394 细胞碎片等杂质应有效清除至低于质量标准范围的水平，以支持病毒载体在定义  
395 的正常参数范围内的生产工艺的稳健性和可控性。生产过程中如出现病毒液混批  
396 的情况，应开展混批前后完整的工艺验证，并制定混批的原则。另外，应完成中  
397 间体储存条件和时间验证、培养基模拟灌装验证、层析柱循环使用次数和除菌滤  
398 器的验证以及运输验证等。对于重组腺相关病毒等病毒载体，还应根据包装细胞  
399 类型、纯化工艺特点等开展相应的病毒灭活/去除验证。商业化规模工艺确认后，  
400 应收集和分析工艺性能和产品质量的变化趋势相关数据，开展持续工艺验证。

## 401 4、质量研究与质量控制

### 402 4.1 质量研究

403 应开展多个代表性批次病毒载体的全面质量研究,尽量确保不同批次病毒间  
404 工艺、质量的一致性。常见的研究项目包括但不限于外观、鉴别、病毒滴度检测、  
405 纯度、生物学活性、复制型病毒、风险元件残留、外源因子、杂质等。

406 **外观:**如采用目视检查,应由经培训的人员对病毒成品进行外观检查,确保  
407 包装完整未损坏。关注高浓度病毒载体中是否存在可见异物、不溶性颗粒等。

408 **鉴别:**病毒载体的鉴别试验可从核酸水平和蛋白水平进行检测。核酸方面可  
409 采用限制性酶切图谱分析、聚合酶链式反应(PCR)、逆转录-聚合酶链反应(RT-  
410 PCR)和核酸序列测定等方法对病毒载体和目的基因进行鉴定。应对治疗序列及  
411 涉及调节和控制目的基因的序列进行完整序列分析,并对预期序列与实验测定序  
412 列之间的差异开展充分评估。建议对病毒载体进行全基因组测序。另外,也可将  
413 病毒载体转导目标细胞后,对整合有载体序列的细胞基因组进行测序,说明载体  
414 骨架及目的基因序列的准确性。在蛋白水平可对载体的结构蛋白、表达产物、蛋  
415 白表达谱、免疫标记、表型特征开展分析。鉴别检测方法开发时应设置合适的阳  
416 性和阴性对照样品。

417 **整合位点特征:**建议研究病毒整合至目标细胞的典型特征,包括优势插入位  
418 点、插入拷贝数、优势克隆异常生长等。关注癌基因附近是否存在优先整合情况  
419 及潜在的致癌风险。

420 **病毒滴度检测:**病毒滴度作为工艺过程监控和产品载体浓度的放行检测至关  
421 重要,应选择灵敏度、准确度、精密度高的检测方法开展病毒物理滴度(病毒总  
422 颗粒数)和转导滴度(病毒感染性颗粒数)的检测。应使用标准品或对照品来校  
423 准病毒滴度检测结果。鼓励申请人采用不同方法进行病毒滴度的检测,并探索不  
424 同方法检测数值的相关性。

425 **物理滴度:**对于 HIV-1 衍生的慢病毒载体,常用 ELISA 方法检测载体样本中  
426 的 p24 蛋白从而进行物理滴度的检测,检测结果可以颗粒数/ml 表示。此外,载  
427 体基因组 RNA 拷贝数的定量也可用于载体颗粒数量的估计,检测时建议关注外源  
428 DNA 的污染。若采用新技术检测病毒颗粒数,如病毒计数仪法、纳米颗粒跟踪分



429 析法、场流分离-多角度激光光散射法等,应关注方法对待测病毒类型的适用性。

430 **转导滴度:**可使用基于细胞的体外检测方法检测成功进入、接触并整合入检  
431 测细胞的功能颗粒的比例。通常待测病毒载体感染检测用细胞一定时间后,通过  
432 细胞基因组提取及定量 PCR、流式细胞术等方法检测转基因整合、表达的水平,  
433 从而计算出病毒载体的转导滴度,检测结果通常以转导单位 TU/ml、噬斑形成单  
434 位 (PFU)、中位组织培养感染剂量 (TCID<sub>50</sub>) 等表示。检测转导滴度时应关注转  
435 基因表达水平来自未整合的病毒载体基因的可能性。

436 **建议控制病毒载体产品中总颗粒对感染性颗粒的比例,**用于比较不同载体批  
437 次之间和载体生产的不同阶段之间载体颗粒的功能性/感染性。例如,腺病毒载  
438 体目前要求总颗粒数和感染性滴度的比值不大于 30: 1,从而控制活病毒所占比  
439 例到达一定的要求。

440 **感染复数 (MOI)**是转染时需要达到特定转染效率的载体转导单位 (TU) 与  
441 所修饰细胞数量之比。应根据对应细胞产品的目标转导效率,探索商业化规模细  
442 胞生产工艺最优的 MOI。

443 **病毒纯度和杂质:**

444 **纯度:**应采用灵敏的方法研究病毒载体产品的纯度,包括高效液相色谱、SDS-  
445 PAGE、紫外吸收光谱法等。

446 **产品相关杂质:**与病毒载体产品相关的典型杂质可能包括错误包装颗粒、缺  
447 陷干扰颗粒、非感染性颗粒、空衣壳颗粒、聚集体或复制型重组病毒污染物。应  
448 对产品相关杂质进行深入的分析 and 检测,应鉴定具有缺失、重排、杂交或突变序  
449 列的载体等相关杂质,可以以含量比率的形式报告检测数值,必要时纳入质量  
450 标准。

451 **工艺相关杂质:**检测项目包括但不限于残留宿主细胞蛋白、外源核酸序列、  
452 辅助病毒污染物 (传染性病毒、病毒 DNA、病毒蛋白等) 和生产工艺中所使用的  
453 试剂,例如细胞因子、生长因子、抗体、选择性磁珠、核酸酶、血清和溶剂等。

454 **残留核酸,**包括与病毒载体共纯化的残留宿主 DNA、质粒 DNA 等,是常见的  
455 工艺相关杂质。转染过程中病毒载体的衣壳内部也可能包装大质粒 DNA 序列以及  
456 包装细胞 DNA,这些杂质可能对产品质量和安全性产生不利影响,建议申请人优  
457 化生产工艺,以减少产品中非载体 DNA 的污染,必要时应对共包装外来 DNA 序列

458 进行确认。此外，申请人应监测和控制产品中无关核酸序列的含量。

459 某些包装细胞还可能携带致癌基因序列或逆转录病毒序列，建议申请人最大  
460 程度降低任何残留 DNA 的生物学活性，例如减小 DNA 序列的大小、减少残留 DNA  
461 含量等。建议申请人将非致瘤细胞的残留 DNA 限度定为小于 10 ng/剂，并且将  
462 DNA 片段大小范围限定为 200 个碱基对以下。

463 如果病毒包装细胞为肿瘤来源的细胞（例如 HeLa 细胞）、致瘤细胞系或其他  
464 需特别关注特征的细胞（例如 HEK293T 细胞），除了控制宿主细胞 DNA 含量和大  
465 小外，还应控制载体产品中相关转化序列的含量，设置可接受的标准范围来限制  
466 患者暴露量。例如，采用 HEK293T 细胞进行慢病毒生产时，应采用具有足够的灵  
467 敏度和特异性的方法检测腺病毒 E1 和 SV40 大 T 抗原序列的残留量。

468 采用复制缺陷型或条件复制型病毒载体时，应在生产工艺的适当阶段检测生  
469 产过程中可能产生的具有复制能力的病毒、亲本病毒或野生型病毒进行检测，并  
470 根据给药剂量等确定残留量的标准限度。建议参考相关原则或文献刊载的专属性  
471 强，精确度、灵敏度较高的检测方法，建立与研发阶段相适应的复制型病毒检测  
472 方法（RCL、RCR、RCA、rcAAV 等），并进行完整验证。常见的检测方法包括指示  
473 细胞培养法、直接 qPCR 法等，待测样品包括病毒生产过程中收获的病毒上清、  
474 生产终末细胞和经病毒转导后的细胞产品等。检测样本量应至少确保 95%以上的  
475 可能性检出一个临床剂量中的 1 个复制型病毒。方法开发时应明确复制型病毒的  
476 扩增细胞和指示细胞的选择依据，需关注各检测方法对应的样本量、阴性对照、  
477 阳性对照、操作流程、检测标志物、检测限、判定标准等。建议申请人根据所用  
478 病毒包装系统设计特异的检测标志物，同时鼓励申请人采取 2 种以上基于不同原  
479 理针对不同标志物的检测方法，从而提高复制型病毒的检出率。另外，申请人应  
480 考虑待检样本对指示细胞生长的抑制作用等，研究、设置合理的待测样本病毒滴  
481 度范围，并在每批样品检测时设置抑制组对照。

482 可复制型逆转录病毒（RCR）检测：建议采用敏感的指示细胞培养法进行 RCR  
483 检测。RCR 扩增细胞与待测样本进行共培养以最大程度扩增 RCR，在一定传代次  
484 数和时间的传代培养后取适量上清接种 RCR 指示细胞培养，以观察、计数细胞病  
485 变集落或者进行 RCR 标志物的检测。

486 可复制型慢病毒（RCL）检测：对于 HIV 衍生的慢病毒载体，其 RCL 检测所

487 用阳性对照可考虑使用缺乏辅助基因的 HIV 弱毒株、以 VSV-G 作为包膜蛋白的  
488 HIV 毒株等，应明确阳性对照毒株的结构和制备方法，并在符合要求的生产环境  
489 中妥善操作和使用。RCL 检测指标方面，通常认为 p24 蛋白、逆转录酶序列、psi-  
490 gag 和 VSV-G 序列等的检出可反映 RCL 的存在。

491 复制型腺病毒（RCA）检测：对于大多数基于腺病毒的产品，建议申请人检  
492 测每个生产批次载体的 RCA。建议质量标准拟定为  $3 \times 10^{10}$  个病毒颗粒中最大 RCA  
493 含量为 1。

494 复制型 AAV（rcAAV）检测：rcAAV 可能会在辅助病毒存在的情况下复制。检  
495 测时可以在辅助病毒存在的情况下扩增 AAV，随后采用 PCR 测定 Rep/反向末端重  
496 复序列（ITR）、连接序列，以及 Rep 和 Cap 序列等，进行 rcAAV 的检测。

497 **生物学活性：**为在整个产品开发过程中研究病毒载体的活性、质量、稳定性  
498 等方面的变化，应在临床前和探索性临床研究期间开发生物学活性检测方法。应  
499 根据产品具体情况，建立至少 1 个反映产品的生理和/或药理作用模式的生物学  
500 活性指标。鼓励检测两种生物学活性：将目的基因转移到细胞的能力；以及表达的  
501 转基因的生物学效应。上市阶段，应根据载体的作用机制，尽可能确定与疗效  
502 （替代、补偿、阻断、修正特定基因作用等）最相关的质量属性，完善检测方法，  
503 建立合适的标准品，明确生物学活性计算方式等。

504 **微生物污染物：**应参考《中国药典》等相关指南，检测所有可能引入病毒载  
505 体的污染物，包括细菌、真菌、支原体、细菌内毒素等。需按照 ICH 指导原则 Q5A  
506 的规定对种子和细胞库、中间体和最终产品进行严格的外源性病毒检测。必要时，  
507 可通过病毒清除研究确定生产工艺相关步骤的病毒减少倍数。

508 **理化检测：**常规的理化检测项目包括装量、可见异物、不溶性微粒、渗透压、  
509 pH、辅料含量等。应采用经验证的方法开展检测，并根据产品特点、批分析数据  
510 等设置合理的标准限度。

## 511 4.2 质量标准

512 质量标准方面，应根据产品质量设计、工艺开发、验证研究，以及多批放行  
513 检测和稳定性结果，结合早期非注册临床研究批次、非临床研究批次，以及国内  
514 外同类产品质量，结合合理的统计学方法拟定各检测指标的可接受标准。需明确

515 载体原液、半成品（如有）、制剂的可接受标准，包括参数、方法、标准限度等。  
516 病毒载体的质量标准通常应包括鉴别、纯度、含量、生物学活性、无菌性、内毒  
517 素水平和支原体等。应规范开展病毒标准品的标定，确定标准品的稳定性特征和  
518 相关贮存条件。

519 方法学研究及验证方面，应描述评估产品质量的所有分析方法，制定详细的  
520 标准操作规程，并指定使用的标准品、设备等。应按照《中国药典》、ICH 相关指  
521 导原则等全面验证放行所用的分析方法，关注检测方法的灵敏度、重复性、耐  
522 用性等。在启动临床试验之前，用于测定剂量的试验如 qPCR 测定载体基因组滴  
523 度、转化单位、噬菌斑形成单位、转化细胞效率等方法必须经过验证；用于检测  
524 复制型病毒的分析方法应至少完成适用性、灵敏度、检测限等方面的初步方法学  
525 验证，以确保载体产品的安全性。临床试验阶段如进行了方法学优化或方法变更，  
526 应对新旧方法的差异进行研究和论证，做好方法学桥接研究。

## 527 （二）核酸类基因转导与修饰系统

528 随着生命科学研究的深入发展，新兴的基因转导与修饰系统不断涌现，包括  
529 核酸类基因转导与修饰系统和特异性基因编辑工具等。常见的核酸类基因转导与  
530 修饰系统包括 DNA 质粒、iBAC, S/MAR 等基于染色体的载体、转座子载体、TALEN  
531 系统、CRISPR-Cas 系统、episomal 系统、mRNA 等。为提高基因转导靶细胞的效  
532 率，促进载体有效的跨越细胞膜、内涵体-溶酶体系统和核膜，常使用基因递送  
533 材料辅助核酸载体进行目标细胞的基因修饰，包括脂质体复合物、阳离子多聚物、  
534 阳离子多肽、环糊精及衍生物、壳聚糖及衍生物和其他无机材料等。

535 核酸载体的临床使用风险主要包括复合基因递送体系的自身毒性、基因编辑  
536 时基因脱靶导致的毒性、载体自身的免疫原性等。对于整合型载体还应考虑插入  
537 突变的风险，应对插入位点进行分析并说明对细胞存在的潜在的安全性影响，并  
538 对分析方法的合理性进行说明。使用核酸载体进行基因转导或修饰时，应持续关  
539 注细胞产品中载体系统的残留情况，分析外源 DNA 在基因组中的插入位置、拷贝  
540 数等，监控基因编辑用酶的细胞内持续表达时间等，并在受试者给药后进行长期  
541 安全性监测。

542 对含有序列特异性 DNA 结合结构域的基因编辑工具，应考察脱靶效应以及脱

543 靶效应可能带来的潜在安全性影响。非特异性基因打靶主要有三个来源：（1）基  
544 因编辑工具的特异性有限引起的基因组结构性、小范围的突变，或者点突变；（2）  
545 多靶点基因编辑时，靶位点之间会出现基因组重排现象，带来基因组结构突变；  
546 （3）编码基因编辑工具的 DNA 载体非特异性插入基因组位点，残留 DNA 元件随  
547 机存在于基因组。基于此，应该从以下几方面考虑脱靶效应及相应的安全性影响：  
548 （1）基因组结构突变的检测和分析：利用单个细胞核型分析和预测可能出现基  
549 因组重排的区域进行深度测序分析，来监控基因转导造成的基因组结构突变和突  
550 变占比。（2）单点和小规模基因突变的检测和分析：基于生物信息学预测潜在脱  
551 靶位点，或基于细胞的体外试验方法对模式细胞及基因转导目标细胞进行潜在脱  
552 靶位点的研究。对于鉴定到的基因组结构突变位点和基因组单碱基和小范围突变  
553 位点，按照风险程度，需要结合体外试验（软琼脂成瘤试验，或非细胞因子介导  
554 的生长实验等）或/和体内实验（如免疫缺陷小鼠成瘤试验）来进一步评估脱靶  
555 位点产生的突变对相关基因以及相应安全性影响，并进行风险-收益评估。（3）  
556 如果基因转导与修饰系统为非整合系统，需对最终产品中编码基因转导修饰系统  
557 的 DNA 载体残存进行检测，分析和风险评估。

## 558 1、分子设计和上游构建

559 应明确载体基因递送的原理和过程，结合临床使用安全性合理设计转导系统。  
560 根据不同载体类型及作用机制，应阐明靶基因选择的依据、靶位点选择的依据以  
561 及基因修饰后对靶位点和靶基因的预期影响。应提供完整的靶位点序列并列基  
562 因组内所有的完全匹配的靶位点的位置信息，并注明所使用的参考基因组版本信  
563 息。在开发过程中应同时关注基因转导效率、脱靶效率、插入突变情况、目的基  
564 因在靶细胞中整合位点及表达的拷贝数等。建议针对载体的不同类型和靶细胞的  
565 特点，对靶向序列、目的基因序列和基因编辑用酶等的序列进行优化，筛选最佳  
566 的靶向序列（如 gRNA 序列），尽可能提高基因编辑效率、目的基因整合效率等，  
567 并采取措施降低基因脱靶、插入突变的概率及对靶细胞基因组稳定性的不良影响。

568 例如，CRISPR-Cas9 基因编辑系统临床应用的风险包括目的基因脱靶整合、  
569 双链 DNA 损伤、在靶细胞原癌基因和抑癌基因中的插入突变、优势克隆的出现如  
570 p53 突变细胞等。为提高该系统的安全性，应尽量降低 gRNA 与非目标序列的同

571 源性、合理优化 Cas9 剪切酶的结构等。转座子系统临床应用的风险包括：质粒骨  
572 架 DNA 和转座酶基因在靶细胞基因组的插入、抑癌/癌基因中的插入、转座子在  
573 基因组中移动、靶基因组的不稳定性等。安全性相关的设计考虑主要包括为增强  
574 基因整合位点特异性进行的转座酶、转座子序列的优化，防控转座子序列在基因  
575 组中移动从而优化转座酶/转座子 DNA 的比例、质粒个数以及转座酶在细胞内的  
576 表达时间等。

577 根据不同载体类型及作用机制，阐明载体所附带的基因序列的设计考虑，包  
578 括染色体同源序列、启动子、终止子、增强或减弱转录及翻译效率的元件的选择  
579 使用，以及密码子优化方法等。应对可能使用到的病毒性启动子、哺乳动物细胞  
580 或病毒终止子的安全性进行研究分析。若使用非常用性或特殊的控制元件，应分  
581 析其安全性和对基因产物表达的影响以及使用该元件的风险-获益比等。建议关  
582 注载体中质粒骨架、转基因、筛选标记及其他任何调节元件序列的来源、序列优  
583 化过程及安全性设计考虑，尽可能删除非必要的元件，提供完整的载体核苷酸序  
584 列。建议避免使用抗青霉素或其它  $\beta$ -内酰胺类抗生素抗性标记基因，若需要抗  
585 性标记，可使用临床不良反应发生率较低的抗生素对应的抗性标记。应对治疗序  
586 列和调节/控制序列等具体特征进行测序确认，确保载体序列的准确性。

## 587 2、生产用原材料

588 应在符合药品 GMP 的条件下建立菌种库。菌种库建立和检定及其他原材料方  
589 面，可参考病毒载体类基因转导与修饰系统相关要求。对于采用重组技术或生物  
590 /化学合成技术制备的生产用原材料，应明确生产工艺和质量控制情况。核苷酸  
591 等原材料的质量标准应含有可充分表征产品相关杂质的纯度检测指标，包括质谱、  
592 核磁、高效液相色谱等方法。

593 核酸基因递送系统可能使用复合材料，应对递送系统制备涉及的关键原材料  
594 （脂质、阳离子聚合物等）进行充分的筛选和质控。提供各组分的选择依据、作  
595 用原理、来源、生产用原材料、生产工艺、特性鉴定、质量控制和稳定性的研究  
596 资料等，拟定的质量标准应含有可充分表征产品相关杂质的纯度检测方法。另外，  
597 应对递送材料的安全性进行详细的研究。对于明确使用已商品化的递送材料，需  
598 提供国内外使用该类物质的情况及已完成的毒理、安全性研究和人体使用安全性

599 研究数据。

### 600 3、生产工艺

601 应在符合药品 GMP 要求的条件下生产核酸载体。应明确载体的生产规模、批  
602 次定义，明确生产工艺流程，关注相应工艺步骤的目的、工艺流程步骤、过程控  
603 制策略、物料流转及中间产物等。

604 DNA 类非病毒载体（转座子系统、TALEN 系统、CRISPR-Cas 系统等）的生产  
605 工艺主要涉及质粒 DNA 的生产。质粒生产过程应避免使用  $\beta$ -内酰胺类抗生素，  
606 如需使用，应对抗生素的残留量进行控制和安全性评估。生产过程建议避免使用  
607 CsCl、溴化乙锭、氯仿等毒性物质，避免使用胰蛋白胨、动物源 RNA 酶等可能引  
608 入外源因子的原材料等。

609 大规模制备质粒 DNA 的一般步骤包括质粒发酵、菌体收集、菌体裂解、质粒  
610 纯化、浓缩、灌装等。应对关键工艺参数进行探索和优化，建立稳定的质粒规模  
611 化生产工艺。关键工艺参数可能包括发酵培养基组成、发酵培养温度、碱裂解缓  
612 冲液及中和缓冲液的组成、碱裂解时间、层析柱载量、层析流速等。应关注生产  
613 全过程对质粒结构和功能可能的影响，如碱裂解步骤可能产生的质粒不可逆变性  
614 的情况。纯化工艺开发过程中，应根据质粒的实际大小选择合适的柱层析填料，  
615 最大程度去除宿主 RNA、宿主 DNA、DNA 碎片和细菌内毒素等杂质。应设置合理  
616 的过程控制指标和可接受标准，如质粒中间体的浓度、超螺旋比例、杂质残留量  
617 等。

618 RNA 类载体（siRNA、mRNA 等）的生产一般包括体外化学合成和 DNA 转录两  
619 种生产工艺。mRNA 的制备工艺步骤常含有采用转录模板进行 mRNA 体外转录、  
620 mRNA 加帽、去磷酸化、DNA 酶处理、mRNA 纯化等步骤。应对关键工艺参数及控制  
621 范围进行确认，如 NTP 浓度、转录时间、反应温度、加帽反应物料投料比、层析  
622 介质、动态载量等，关注 mRNA 回收率、杂质去除率、加帽率、mRNA 片段的完整  
623 性以及序列的准确性等方面。生产过程中应设置合理的过程控制指标，如 mRNA  
624 浓度、双链 mRNA 含量、不完整 mRNA 含量、残留 DNA、无菌、内毒素等。

625 载体系统如含有重组蛋白质组分的，可参考重组 DNA 制品生产的相关要求。  
626 制剂工艺方面，应明确制剂处方、辅料来源和质量标准等。对于复合核酸载

627 体，应明确制剂处方中每种组分的作用、含量及选择依据，建议根据核酸-递送  
628 系统的相互作用、核酸的转染效率、动物药效学研究、毒理研究、生产工艺可控  
629 性、载体稳定性等方面的研究筛选和确定合适的递送系统和制剂处方。应研究制  
630 剂生产工艺对载体质量属性的影响，如复合率、包封率、粒径及分布、电位等。  
631 应确定关键工艺参数的可接受范围，包括核酸浓度、各复合材料的浓度、缓冲体  
632 系、pH、混合流速、压力、纯化工艺参数等。制剂生产过程可能包括后续纯化步  
633 骤，以去除未包封的核酸、游离的脂质材料或包封过程中引入的杂质等。如果冻  
634 干，应开展冻干工艺对载体质量、颗粒相关特性、生物学活性等方面的研究，拟  
635 定适宜的工艺参数范围。过程控制方面，应在适宜的阶段建立合适的控制指标及  
636 可接受标准，如核酸含量、包封率、粒度大小及分布、溶剂残留等。

637 涉及使用电脉冲装置进行细胞内核酸递送的，应对核酸浓度、细胞密度、电  
638 脉冲程序（脉冲个数、时间间隔、电压、电流等）相关参数进行研究和确认。

639 需开展完整的载体工艺验证研究，包括工艺过程控制确认、中间体存储稳定  
640 性研究、多批次质量分析以及杂质清除研究等。应在早期临床试验阶段完成安全  
641 性相关验证研究，如无菌灌装、清洁验证等。申报上市阶段，应在商业化规模条  
642 件下连续生产多个批次开展工艺验证研究，证明生产工艺的稳健性。

## 643 4、质量研究与质量控制

### 644 4.1 质量研究

645 核酸类载体的质量特性研究通常包括理化特性、结构特征、纯度、杂质分析、  
646 生物学活性等。应采用多个代表性批次开展载体和递送系统的质量研究。载体系  
647 统如含有 RNA 组分以及重组蛋白组分的，可参考相关指导原则等开展质量研究。

648 **结构和理化特性：**应对核酸序列的完整性、准确性进行分析，进行酶切鉴定  
649 及全序列测定等研究。对于 DNA 序列，可采用限制性内切酶对重组质粒进行酶切，  
650 对酶切产物进行电泳分析，观察是否有特征性的带型；可以用 PCR 方法对插入片  
651 段进行扩增，分析插入的基因片段的大小是否与预计的大小一致。对于 RNA 序列，  
652 可采用逆转录测序的方法进行序列确认。应关注核酸序列的降解情况，采用琼脂  
653 糖凝胶电泳、高效液相色谱、毛细管电泳等方法开展纯度的研究。建议开展核酸  
654 浓度、修饰比例、物理特性（如外观、pH）的研究。如可能，建议评估核酸本身



655 的免疫原性。

656 对于复合核酸载体，应考察载体的特性、复合组分和所得复合核酸序列。包  
657 括复合物的结构以及载体与带负电荷的 RNA 或 DNA 之间的相互作用。复合/递送  
658 系统的性质应充分表征，内容应包括形态、粒度分布、表面电荷以及包封率等。

659 **生物学活性：**通常包括对基因转移和编辑效率（转导效率/递送效率）、治疗  
660 序列表达的水平、表达产物的功能或制品的生理功能的测定。应首选定量检测方  
661 法，如可通过转基因或基因编辑产物的表达量和功能进行分析。可以用载体体外  
662 转染检测细胞，检测其蛋白水平表达量变化，其表达目的蛋白的大小应与预计大  
663 小相同。体外方法不可行时，还可以采用动物离体组织或动物体内检测方法进行  
664 检测，检测转基因及基因编辑产物表达或敲低的生理功能等。检测时需要采用相  
665 应的活性标准品作为对照。

666 **杂质：**应对生产工艺、贮存、用于保存载体的密封容器中产生的、稳定性研  
667 究批次中发现的潜在杂质进行充分研究，包括工艺相关杂质和产品相关杂质。应  
668 鉴别含缺失、重排、杂交或突变序列的载体等产品相关杂质，并对杂质水平进行  
669 定量。应关注生产过程中影响载体关键质量属性的潜在降解，例如降低转导效率  
670 的质粒形态或通过氧化或解聚等方式降解的核酸复合物等。对于复合核酸，应说  
671 明在生产过程中形成复合物时产生的副产物。

672 **工艺相关杂质：**核酸的纯化工艺中可能引入乙醇、异丙醇等有机溶剂，这些  
673 物质可能对人体有潜在的危害，应在成品中限制其含量，应建立检测方法并制定  
674 残留量的标准。对于复合核酸，工艺相关杂质包括递送材料相关杂质，如材料合  
675 成产生的杂质、不饱和脂质氧化及相关降解产物、颗粒聚集产生的颗粒物、游离  
676 的复合材料等。

677 **产品相关杂质：**对于 DNA 类产品的相关杂质，建议关注超螺旋比例、残留宿  
678 主 DNA、宿主蛋白残留、残留 RNA 等。超螺旋比例的研究主要是分析超螺旋结构  
679 与线性和松弛性质粒的比例。可采用琼脂糖凝胶电泳的方法对制品进行电泳分析，  
680 分析各带型所占的比例；鼓励采用先进的定量分析技术（如高效液相色谱法）进  
681 行超螺旋比例的分析。一般采用琼脂糖凝胶电泳的方法检测制品中是否有 RNA，要  
682 求无明显的 RNA 带型；鼓励采用先进的技术进行残留 RNA 的检测。可采用  
683 Northern blot、qPCR 的方法检测制品中残留的宿主 DNA 的含量，在该方法的研

684 究时应建立宿主 DNA 的标准品，并对该类试剂的敏感性和特异性进行验证。可以  
685 采用酶联免疫法（ELISA）检测制品中宿主蛋白的残余量，在该方法的研究过程  
686 中应建立宿主蛋白的定量标准。对于 RNA 类产品的相关杂质，建议关注降解/断  
687 裂产生的 RNA 片段、加帽不完全的 mRNA、修饰过度的 RNA、RNA 错配序列、RNA  
688 氧化产物等。

## 689 4.2 质量标准

690 应进行风险控制分析并结合工艺验证、临床试验及商业化批次质量分析、稳  
691 定性研究数据等制定完整的质量标准，明确各检测项对应的分析方法、标准限度  
692 范围及标准品等。对于一般工艺相关杂质，如经充分验证证明工艺可对其有效、  
693 稳定地清除，可结合工艺进行控制，相关残留检测可不列于检定项目中。

694 常见的 DNA 类非病毒载体的质量控制项目包括外观、pH、鉴别、含量/浓度  
695 检测、均一性、序列测定、可见异物、杂质、微生物安全性等，具体如下：

696 外观检查：根据样品的特征建立外观的质量标准。

697 pH 值检测：可参考《中国药典》根据一般生物制品的要求建立标准。

698 DNA 含量检测：应建立检测含量的方法，如紫外吸光光度法。实测值应与制  
699 品的标示量相符。

700 鉴别：建议采用序列测定进行鉴别，也可使用限制性酶切方法，结果应与标  
701 准品一致。

702 纯度：一般可以检测样品在波长为 260nm 和 280nm 的紫外吸收值，并计算  
703 A260/A280 的比值，评价制品的总体纯度。

704 质粒大小的均一性和结构的分析：建议采用灵敏度高的检测方法对质粒结构  
705 和超螺旋的比例等进行检测。

706 生物学活性：根据载体的作用原理，应至少建立一种方法进行生物学活性检  
707 测，建立适宜的可接受标准。

708 无菌实验：应按照《中国药典》建立适宜的方法开展检测，确保制品中应无  
709 微生物的污染。

710 细菌内毒素：应按照《中国药典》建立适宜的方法开展检测。

711 抗生素残余量的检测：应建立检测抗菌素的检测方法并制定抗生素残留量的

712 要求。

713 杂质残留：纯化工艺中可能用的乙醇、磁珠等，如可能对人体有潜在的危害，  
714 应建立检测方法在载体成品中限制其含量，并从临床使用安全性和有效性的角度  
715 说明杂质限度制定的依据。应检测载体成品中宿主 DNA、宿主 RNA 和宿主蛋白的  
716 残留量等，并建立适宜的可接受标准。

717 常见的核酸-复合类载体的质量控制项目包括外观、pH、颗粒大小及分散系  
718 数（PDI）、浊度、折光率、Zeta 电位、渗透压、鉴别、序列测定、含量/浓度检  
719 测、生物学活性、序列完整性、包封率、递送系统各组分含量、游离材料、可见  
720 异物、杂质、微生物安全性等。

721 方法学研究及验证方面，应描述评估产品质量的所有分析方法，制定详细的  
722 标准操作规程，并指定使用的标准品、设备等。申报临床时应能初步验证方法的  
723 适用性，对重要指标或关键质量属性，应提供与研发阶段控制要求相符的验证研  
724 究数据。例如对于杂质含量、细菌内毒素等影响产品安全性的检测项目，申报临  
725 床时应至少完成适用性、灵敏度、检测限等方面的初步方法学验证。申报上市阶  
726 段应按照《中国药典》、ICH 相关指导原则等全面验证批放行所用的分析方法，关  
727 注检测方法的灵敏度、准确度、重复性、耐用性等。

## 728 六、稳定性研究

729 申请人应针对代表性批次载体的原液、制剂和生产过程中储存的中间体开展  
730 稳定性研究，一般包括长期稳定性、加速稳定性、影响因素、强制降解、运输稳  
731 定性研究等。建议在适当的温度下以及在与预期保存时间相符的时间点开展试验。  
732 稳定性考察条件应考虑温度、光照的变化或反复冻融（冷冻储存时）、振摇等方  
733 面。通常载体在冷冻或冷藏条件下保存，应开展载体产品使用中稳定性（复溶后  
734 或解冻）研究，评估载体与复溶稀释剂的相容性等。

735 应明确各稳定性研究所用样品、包装容器、保存容器、检测时间点、试验温  
736 度和分析检项等。稳定性研究样品应采用与商业化载体产品相同材质的包装容器  
737 包装。建议采用能够反映载体安全性、有效性、质量可控性的敏感指标开展稳定  
738 性研究。若稳定性数据提示辅料在有效期内氧化、降解等对产品质量有不良影响，

739 有必要在稳定性试验中对辅料含量加以监测。建议至少在拟定有效期的初期和末  
740 期进行无菌试验或替代试验（如容器/密封系统的完整性试验）。稳定性方案应足  
741 以证明在拟定的储存和运输条件下可维持产品完整性、纯度、可回收的样本体积、  
742 产品聚集特征和效价。

743 对于病毒载体类基因转导与修饰系统，建议重点考察病毒载体的滴度、降解  
744 产物及载体完整性、纯度、杂质、微生物安全性指标、生物学活性等关键质量属  
745 性。对于非病毒载体类基因转导与修饰系统，建议重点关注载体的理化特性、序  
746 列及结构完整性、包封率、杂质等关键质量属性。基于 DNA 或/和 RNA 的基因转  
747 导与修饰系统的产品的稳定性研究建议包括核酸分子量的稳定性。由于 DNA 超螺  
748 旋结构的比例可能影响 DNA 的转染率，该类制品的稳定性研究应重点考察超螺旋  
749 结构的比例。针对基于 RNA 的基因转导与修饰系统（如 siRNA、antisense RNA、  
750 mRNA 等）和针对基于含有蛋白质活性成分的基因转导与修饰系统（如 ZFN 蛋白，  
751 TALEN 蛋白，Cas9 蛋白与 guide RNA 复合物等）应额外关注产品组分在常温下的  
752 稳定性以及在最终使用条件下（如从干粉溶解为注射剂）的稳定性。涉及使用脂  
753 质等递送系统的产品，应关注脂质辅料的降解等。如已评估部分研究项目对载体  
754 储存和运输等条件不敏感，可提供充分的支持性数据，合理简化检测指标。

755 建议基于放行质量标准、稳定性指示特性和降解产物的限度合理设定载体产  
756 品货架期质量标准。

## 757 七、内包材研究

758 应说明载体原液、制剂和中间品的初级、次级包装容器，明确包材的选择依  
759 据，对包装容器的来源、质量要求、相容性进行说明。对生产工艺中所有与载体  
760 产品接触的容器和一次性使用材料（如储存袋、过滤膜、层析介质、管路等），  
761 应开展相容性研究。对于载体成品，应根据制剂组分和保存条件等，完整开展载  
762 体成品与直接接触的包装容器间的相容性研究，包括可提取物和浸出物分析等。

## 763 八、工艺变更

764 工艺开发阶段,常见的基因转导与修饰系统的工艺变更包括生产场地变更、  
765 规模放大、细胞库变更、生产用原材料变更、纯化工艺优化等。应研究工艺变更  
766 具体事项对基因转导与修饰系统和所修饰细胞安全性、特性、纯度、生物学活性  
767 等方面的影响,并对工艺变更前后的基因转导与修饰系统的稳定性进行研究。建  
768 议综合变更事项、分析检测能力以及临床开发所处阶段等因素综合设计可比性研  
769 究方案,设置合理的可比性研究检测指标及可接受标准。质量对比研究中建议纳  
770 入多个代表性批次进行研究,关注检测项目的全面性、预设对比研究标准设置的  
771 合理性、检测方法的有效性和检测结果分析的客观性等。如条件许可,应对各研  
772 发阶段的载体进行留样,留样的数量和保存条件应能满足后续工艺、质量对比研  
773 究的需要。

## 774 九、环境和生物安全性

775 基因转导与修饰系统生产和使用过程应遵守药品的相关基本要求,包括对其  
776 生产和使用环境的要求,以及其生产和使用过程对环境的潜在风险的防控等。应  
777 识别载体对环境的潜在风险,根据载体释放到环境中的组分和受暴露的生物体等  
778 评估对环境影响的程度,通过环境风险评估进行研究并采取对应措施和替代方案。

779 对于在人体及环境中具有生长繁殖能力的病毒载体类基因转导与修饰系统,  
780 需要结合病毒株的宿主范围、传播途径、致病性、遗传稳定性等,进行产品生物  
781 安全及环境影响相关评价,对其在生产(如废液处理)、临床使用、存储、处置  
782 等过程中对密切接触人群及环境的影响,进行风险评估并提供防控措施。可能的  
783 措施包括在适当生物防护条件下处理载体及相关制品;减少气雾形成的控制措施  
784 等。

## 785 十、名词解释

786 **载体 (Vector):** 运载遗传物质的工具,包括病毒类载体和非病毒类载体等。

787 原材料 (Raw materials): 指生产过程中使用的所有生物材料和化学材料, 不包  
788 括辅料。

## 789 十一、参考文献

- 790 1. U.S. DHHS, FDA, CBER. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC)  
791 Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug  
792 Applications (INDs). January 2020.
- 793 2. 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).  
794 2017.
- 795 3. EMA. Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors.  
796 November 2005.
- 797 4. U.S. DHHS. GUIDE-Seq enables genome-wide profiling of off-target  
798 cleavage by CRISPR-Cas nucleases. February 2015.
- 799 5. CDE. 生物制品稳定性研究技术指导原则(试行). 2015.
- 800 6. EMA. Quality, preclinical and clinical aspects of gene therapy  
801 medicinal products. 2018.
- 802 7. CDE. 人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则. 2003.
- 803 8. EMA. Quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal  
804 products containing genetically modified cells. 2012.
- 805 9. CDE. 人用重组 DNA 制品质量控制技术指导原则. 2003.
- 806 10. ICH. Q5C Stability Testing of Biotechnological and Biological  
807 Products. 1995.