体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则（试行）

国家药品监督管理局药品审评中心

2022 年 05 月

目 录

一、前言 1

二、适用范围 2

三、一般原则 2

四、风险评估与控制 5

五、基因修饰系统的设计、制备和质量控制 8

六、稳定性研究与直接接触性容器/材料研究 39

七、参考文献 41

一、前 言

近年来，细胞治疗和基因编辑等技术手段蓬勃发展，相关临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。日益增加的临床需求促进了基因操作新技术的应用和更新。

在人体外，采用基因工程技术构建的修饰系统,可有效地将遗传物质等转入特定目的细胞，用于修饰目的细胞的遗传物质、改变基因表达方式或调节细胞生物特性等。目前，慢病毒载体、γ-逆转录病毒载体等常见用于将嵌合抗原受体（Chimeric Antigen Receptor, CAR）基因导入 T 细胞，以实现 CAR-T 细胞对肿瘤的靶向杀伤；游离型载体（Episomal Vector）、仙台病毒载体等可用于将转录因子导入细胞，通过重编程获得诱导多能干细胞，为其衍生细胞产品的生产提供起始原材料。将来，预计会有更多样的载体设计适用于不同类型的产品。

基因修饰系统种类多样，载体设计、制备过程以及质量控制等方面的差异直接影响到最终产品的安全性和有效性，且其来源可能不同，质量管理体系存在差异。为保证基因修饰系统质量符合临床应用的要求，需对其进行充分的质量研究。因此，有必要细化不同类型基因修饰系统药学研究的技术要求。

本指导原则基于当前的科学认知，针对体外用基因修饰

系统提出申报上市阶段的建议性技术要求，旨在为研发单位提供指导意见，同时，也作为监管机构评价的重要参考。本指导原则不具有强制性，若有可替代或适用的其他研究方法，或本指导原则中有不适用的内容，申请人/持有人可提供相应说明及相关替代研究的支持理由和依据。随着技术的发展、认知的深入和经验的积累，针对本指导原则内容后续将逐步修订和完善。

二、适用范围

本指导原则中，基因修饰系统指在人体外，将外源基因等导入细胞，通过添加、替代、补偿、阻断、修正特定基因从而为获得细胞治疗产品或细胞治疗产品生产用种子细胞而使用的修饰系统。可能的作用机制包括细胞内表达功能性目的基因，或采用基因敲除、修复、插入等核苷酸编辑方式改变特定的基因序列等。

目前，基因修饰系统包括慢病毒、γ-逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、仙台病毒等病毒载体，以及 DNA、RNA、蛋白质和蛋白质-RNA 复合物等非病毒基因修饰系统。本指导原则对病毒载体类和非病毒载体类两类基因修饰系统进行论述。随着本领域技术的不断更迭，新的基因修饰系统也可能应用，如适用，其药学研究也可参考本指导原则。

三、一般原则

基因修饰系统的设计合理性、工艺稳定性、质量可控性

可直接影响细胞终产品的安全性和有效性，是药学研究的重点。需要开展的药学研究，可能包括上游设计、制备工艺、质量研究与控制、稳定性研究等多个方面。基因修饰系统的制备全过程原则上应符合药品生产质量管理规范（GMP）的要求，具体的要求根据其使用情形的不同可具体问题具体分析。

基因修饰系统的质量风险虽与体内基因治疗产品有相似之处，但又有别于体内基因治疗产品。体外基因修饰后的细胞还可能经过体外培养、换液清洗步骤，在应用于人体之前还要经过细胞终产品放行检测。因此，基因修饰系统相较于体内基因治疗产品，其修饰特性可能在回输前得到控制，一些相关的杂质残留可以经过质量控制后进行放行，需要结合其特点开展体外基因修饰系统的设计和质量研究与控制。

（一）不同研发阶段的一般要求

同其他药物的研发一样，基因修饰系统的药学研究也具有阶段性、渐进性等特征，随细胞终产品非临床和不同临床试验阶段研究的推进而变化。研发者应提前制定研究计划和策略，鼓励按照“质量源于设计”的理念进行相关研究，随着研发深入，逐步优化制备工艺，加强质量控制。

临床试验申报阶段，需识别和控制基因修饰系统的相关风险，明确其分子设计，完成生产用种子（如适用）的建库和检定，初步评估选用生产用原材料的合理性和安全性，通

过工艺研究建立相对稳定的制备工艺，开展相应的质量研究，建立适当的质量标准，以确保基因修饰系统及其所修饰细胞临床应用的安全性。

基因修饰系统应用于申报上市阶段的细胞产品时，随着对工艺和质量属性认识的加深，工艺不断优化，经过充分的工艺开发及验证研究确定基因修饰系统的商业化工艺。

如果在临床试验期间，基因修饰系统的工艺发生变更，需完成基因修饰系统和相应细胞产品的可比性研究；建议在确证性临床试验前，完成重大变更，并确定工艺。基于充分深入的质量研究和多批次数据积累，制定合理的质量控制策略，明确关键质量属性（Critical Quality Atribute，CQA），确定适宜的分析方法，进行全面的方法学验证；同时，应关注修饰系统相关或工艺相关的杂质研究，并制定相应的风险控制策略。规范开展并完成稳定性研究和包材相容性研究，制定合理的贮存条件和时间。

（二）不同来源基因修饰系统的一般要求

基因修饰系统可能存在自行生产、委托生产、购买等多种来源，不同来源基因修饰系统遵循相同的技术要求和质量控制原则，药学研究均可参考本指导原则开展。

细胞终产品的上市许可持有人应对基因修饰系统的质量负主体责任，通过加强内部质量控制或对基因修饰系统生产方的审核、制定质量协议等控制相应的质量风险。如果基

因修饰系统发生变更，应及时评估风险，开展相应的药学可比性研究，在某些情况下可能还需要非临床或/和临床桥接研究。

四、风险评估与控制

（一）整体风险识别与控制策略

基因修饰系统涉及的风险主要包括病毒载体回复突变、载体在基因组中整合致癌或致病、脱靶风险、外源因子污染、杂质残留等。

药学研究可从修饰系统的设计、制备工艺和质量控制等多个方面开展风险因素的分析，识别、确定与产品质量和安全性相关的风险因素,确定研发期间所需进行风险评估的数据范围和重点，并制定风险防控和处理措施。同时，需结合细胞类型、剂量、给药途径、使用人群、作用机制、体内分布、体内作用时间等方面综合考虑风险。

基因修饰系统设计方面，典型风险因素可能包括：风险元件的使用，同源序列可能导致的序列重组，病毒载体经相应野生型或辅助病毒互补后产生回复突变,载体在细胞中潜伏/再激活和/或动员，载体在细胞染色体整合程度和整合位点的偏好性等。制备工艺方面，相关风险因素可能包括：高风险原材料的使用，制备过程中外源因子的污染，中间产物的贮存和质量控制，有害杂质的引入与生成，以及修饰系统的基因序列稳定性等。质量控制方面，相关风险因素可能包

括：检测方法的适用性、标准限度的合理性等。

近年来，基于酶的基因编辑系统逐渐应用于细胞治疗产品的基因修饰，常见的系统包括转录激活子样效应因子核酸酶（Transcription activator-like effector nucleases，TALEN）、规律性重复短回文序列簇-相关蛋白（Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated protein，Cas）等。该类系统的临床使用风险主要包括基因工具酶的自身毒性、免疫原性、基因编辑时基因上靶、脱靶导致的毒性和杂质残留等。

因此，应根据多方面因素，结合细胞终产品的特点，针对不同类型基因修饰系统的特性进行风险评估和控制。例如，根据风险评估情况，合理设计修饰系统的结构和序列，避免使用致癌元件等高风险的元件，进行相关检测，尽可能降低同源重组和病毒载体回复突变的可能性；对高风险的生产原材料进行质量控制，在适当的制备环节，设定过程控制的检测项目和验收标准；根据修饰系统作用机理，针对基因序列稳定性等安全性相关的风险因素开展研究等。在细胞终产品生命周期内对修饰系统进行跟踪分析和更新，收集数据以进一步确定其风险特征并制定控制策略。

（二）不同生产使用情形的风险

基因修饰系统在细胞治疗产品生产过程中的使用情形可能不同，目前研究可能包括体外基因修饰后直接制备细胞

产品（情形一）和体外基因修饰后建系/库再制备细胞产品（情形二）两种使用情形。两种使用情形相应基因修饰系统的风险不同，其药学研究的要求可能存在差异，需要具体问题具体分析。

对于情形一，基因修饰系统建议在GMP的条件下制备，该情形下所用的基因修饰系统与回输人体的细胞直接接触，应关注该系统生产用原材料的质量控制、批次间的质量差异、杂质水平等可能影响细胞治疗产品安全性、有效性的研究内容。本指导原则后文主要论述该情形。

对于情形二，基因修饰系统用于细胞系/库的建立，其序列的设计、生产用材料、制备工艺、质量、稳定性、内包材的要求可依具体情况，结合细胞系/库的质量研究结果进行综合评估。由于基因修饰系统使用情况的复杂性（如一次使用或多次使用），可结合生产使用情况和细胞系/库的研究和检测情况，制定修饰系统的风险控制策略。良好的基因修饰系统质量研究与控制有利于筛选、建立出质量良好的细胞系/库，有利于后续的生产研究。细胞系/库建立过程中，建议进行单克隆筛选，对细胞系/库进行检定和传代稳定性研究，关注细胞系/库功能是否符合理论设计和预期、安全是否可控，必要时对细胞终产品进行基因修饰相应的质量研究，以确认基因修饰系统的适用性。

（三）变更风险

随着基因修饰技术不断更新和研究经验的逐步积累，研发过程常常伴随基因修饰系统的升级和工艺的优化，因此研发各阶段基因修饰系统有可能发生变更。

基因修饰系统变更可能显著影响细胞产品的安全性和有效性，是细胞治疗产品药学研究的重要风险之一，研发者需评估变更引入的影响和风险。根据风险评估情况，对基因修饰系统及其细胞终产品（如适用）的质量、工艺控制、稳定性等方面进行深入研究，合理设计变更可比性研究方案。

五、基因修饰系统的设计、制备和质量控制

（一）病毒载体类基因修饰系统

1. 病毒载体的设计与构建

1.1 目的基因及调控元件

目的基因是基因修饰系统中实现预期功能的关键序列，调控元件是影响目的基因序列转录、翻译和稳定性的重要序列。研发者应基于细胞终产品的安全性和有效性，结合风险评估，进行基因修饰系统各元件的设计与构建。

目的基因：本文中是指基因修饰系统传递、表达的遗传物质，研发者应结合其在疾病治疗中的作用或作用机理谨慎选用和设计目的基因序列，关注目的基因的来源、序列筛选及优化过程，明确完整的核苷酸、氨基酸（如适用）序列信息，并建议与数据库收录的相关序列进行序列比对。目的基因的优化中，应阐述分子改构的科学评估及验证研究考虑，

如人源化改构，敲减元件，自杀标记，以及为调控高级结构形成或为适应载体大小进行的序列改造和删减等。同时，建议结合目的基因或其表达产物与靶分子的特异性结合能力，评估潜在的非特异性效应等。可以结合目的基因序列特征、目的蛋白与细胞基因组的相互作用等，充分考虑目的基因对目的细胞基因组稳定性的影响。如目的基因属于非人源或改构的序列等，也可结合种属间目的基因序列差异和表达产物的免疫特性，评估目的基因的免疫原性。

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，研发者应关注其设计原理并进行确认研究。可以根据目的基因的表达量、预期作用和持续时间以及目的细胞的类型等合理选择和设计调控元件，相关的调控元件可能包括信号肽、转录启动子、增强子、终止子、隔离子、5’非翻译区、3’非翻译区、多聚腺苷酸信号区、内含子、其他增强转录及翻译效率相关元件、复制起始位点、额外引入的基因序列等。各调控元件的序列来源及选择依据应明确。例如启动子设计方面，建议结合目标细胞类型、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。调控元件设计时需充分考虑元件的安全性和有效性，关注相关序列引入的必要性和合理性，尽量避免使用高风险的元件，如必需使用，应进行相关序列的安全性改构。对于序列改构或优化的元件，

均应明确序列更改的依据与安全性考虑。此外，还建议关注功能元件设计对细胞基因组内源性基因的干扰。

1.2 病毒载体

病毒载体通常可以稳定、高效地转导目的基因至目的细胞中发挥作用。病毒载体的选择和设计可综合考虑目的基因表达时间、表达量，病毒载体的致病性、整合能力、感染过程、转导效率、细胞毒性以及细胞产品的细胞类型、作用机制、临床适应症、给药方法等多方面。病毒载体的结构优化策略包括提高病毒稳定性、增强细胞转导率、拓宽可转导细胞类型等。

目前常用的病毒载体通常进行了毒力、致病性或复制能力相关基因的删除，以确保使用的安全性。设计中，应尽可能降低与野生型病毒相关的任何致病性，并尽可能将病毒重组和回复突变的风险降到最低。对于改构的病毒载体需关注亲本病毒的来源、培养历史和生物学特性等，对改构用材料、方法、步骤及鉴定进行充分研究。病毒载体进行改构时，不应引入新的安全风险。

下面以目前研究中常见的病毒载体为例进行说明。

1.2.1 γ-逆转录病毒载体（γ-Retroviral Vector）

γ-逆转录病毒可逆转录其 RNA 基因组成为 DNA 拷贝，病毒 DNA 随机整合进入有丝分裂活跃的细胞基因组。目前，体外基因修饰用 γ-逆转录病毒载体常见有鼠白血病病毒

（Murine Leukaemia Viruses，MuLV），猫白血病病毒（Feline Leukaemia Virus，FeLV）和长臂猿白血病病毒（Gibbon Ape Leukaemia Virus，GALV）等载体。其基因设计与改造主要包括提高载体安全性和基因转导有效性。

γ-逆转录病毒载体可通过转移质粒（含有目的基因）、辅助质粒瞬转细胞进行病毒载体包装，也可通过整合了转移质粒序列、辅助包装元件的稳定产毒细胞系制备。为提升基因修饰载体的安全性，建议对修饰系统进行优化，例如使用删除了非必需元件、经充分改构、安全性级别较高的γ-逆转录病毒载体，尽可能将病毒重组和回复突变的风险降到最低。具体优化操作还可能包括使用异源启动子和异源 polyA 信号表达辅助包装元件、将辅助包装元件拆分于不同质粒表达、改造长末端重复序列（Long terminal repeat，LTR）使得末端自失活（Self Inactivating, SIN）等方式。

基因转导有效性方面，鼓励研发者对病毒载体包装元件进行优化，提高病毒载体包装效率、结构稳定性和转导活性等，如将γ-逆转录病毒载体的包膜蛋白替换为其他包膜蛋白以提高病毒稳定性等。针对改造情况，需进行充分的研究与验证。

1.2.2 慢病毒载体（Lentiviral Vector）

慢病毒载体通过介导目的基因整合至细胞基因组发挥作用，与γ-逆转录病毒载体只能感染有丝分裂活跃的细胞不

同，慢病毒载体能感染有丝分裂活跃和不活跃的细胞。目前，体外基因修饰用慢病毒载体常见有人慢病毒、非人灵长类和非灵长类慢病毒等载体。使用非人灵长类和非灵长类慢病毒载体时建议关注产生重组病毒嵌合体和/或跨物种传播的相关风险。慢病毒载体的设计与改造主要包括提高载体安全性和基因转导有效性。

慢病毒载体制备和临床使用的主要风险点包括：产生复制型慢病毒（Replication-competent lentivirus，RCL），发生体内重组，以及在相关基因中或其附近插入前病毒 DNA 从而可能引起或促进肿瘤发生和其他细胞病变等。因此，慢病毒载体设计方面，建议采用所有可能降低慢病毒致病风险的措施，包括不同包装基因分离于不同质粒表达（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，删除不必要的调控元件，改造 LTR 使得末端自失活等。对于转移质粒，鼓励进行序列优化，提高安全性，如降低启动子插入目的细胞引起原癌基因活化的几率等。

为了提高基因转导有效性，可考虑采用替换包膜蛋白、提升定点整合能力等改造策略。例如，人类免疫缺陷病毒（HIV）衍生的慢病毒载体，可通过用编码异源病毒包膜蛋白（如 VSV-G）的基因替换 HIV 包膜蛋白基因序列来制备以增强载体的亲嗜性和稳定性。通过对整合酶和 LTR 等序列进行改造，提升慢病毒载体的定点整合性能。对载体改造

的同时，建议关注病毒载体稳定性的变化、整合位点的偏好性等可能引入的风险。

1.2.3 仙台病毒载体（Sendai Viral Vector）

仙台病毒载体是在细胞质表达目的基因，通常不整合于细胞基因组中的单链反义 RNA 病毒载体。目前有研究将其应用于细胞重编程建立诱导多能干细胞系（iPSC）的过程中。设计和构建时，在稳定表达目的基因的同时，为防止产生具有复制能力的病毒颗粒，可考虑删除或改构病毒组装相关蛋白，例如参与病毒组装的核衣壳结构蛋白以及基质蛋白等。为确保有效地控制 iPSC 中仙台病毒载体的残留量，可以考虑改构复制相关元件，例如通过 RNA 聚合酶的突变等方式，构建具有温度依赖型复制能力的仙台病毒载体；同时，需建立相关方法检测和验证仙台病毒载体在 iPSC 克隆中是否残留以控制风险。

其他病毒载体还可能包括腺病毒、腺相关病毒等载体，其分子设计和构建可以结合特定病毒结构、目的基因序列特征、包装序列的安全性等综合考虑。基本原则可参考上述内容。

2. 生产用物料

2.1 质粒

对于采用多个质粒瞬时共转染方式制备的病毒载体，需根据风险、结合载体特性等，开展相应的质粒设计构建、生

产工艺、质量控制和稳定性等研究。

设计和构建：根据研究，选择合理的质粒骨架、质粒复制起始点、启动子以及选择性标记等组成元件，删除非必需元件（特别是致癌等风险较高的序列），并完整确认质粒的核苷酸序列。质粒构建时一般应避免使用β-内酰胺类抗生素抗性基因，且质粒设计时建议最大程度防止抗性基因序列插入病毒载体基因组中，鼓励开发研究采用非抗性基因筛选的质粒。采用额外的增强转录或翻译的元件时，应充分评估其功能性和安全性，在必要时，进行相应的安全性改造，如土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件（Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element, WPRE）等。建议尽可能将不同包装元件拆分于多个质粒进行表达，以降低同源重组发生的概率。

生产工艺：根据工艺研究情况，通过对关键工艺参数的探索和优化，确定稳定的质粒规模化生产工艺，生产工艺应有明确的生产规模、工艺流程、工艺步骤的详细描述以及过程控制策略等。质粒生产过程中应尽量避免使用人源和动物源性材料，避免使用β-内酰胺类抗生素，如需使用其他种类的抗生素，应对抗生素的残留量进行控制和安全性评估。基于研发阶段和风险评估，开展质粒工艺验证或确认研究，如工艺过程控制确认、中间产物贮存稳定性研究、多批次质量分析以及杂质清除研究等。

质量控制：需建立合理的质量标准并进行放行检验。质粒放行的质控项目一般包括：pH 值、外观、鉴别（限制性内切酶分析和测序）、质粒浓度/含量、纯度与杂质（A260/A280、超螺旋比例、宿主菌 DNA 残留、宿主菌 RNA 残留、宿主蛋白残留、抗生素残留（如适用））、无菌及细菌内毒素等。

稳定性研究：选择合理、敏感的考察项目（如超螺旋比例等）进行稳定性监测，根据研究结果制定合理的贮存条件和有效期。

2.2 细菌种子批

本指导原则细菌种子批指通过将病毒包装质粒转化宿主菌，经单克隆筛选及培养传代后建立的种子库。对于选用的宿主菌，需充分考虑宿主菌的来源、基因型、表型、既往使用经验和生产需求等因素，如使用新型菌株，需关注其可能引入的额外风险。

细菌种子批的建立：根据研究建立各级细菌种子批，明确制备规模、扩增条件、贮存条件等。研究中关注目标克隆筛选的情况，关注用于生成种子批的材料的来源、生产过程等以评估分析安全性风险。

细菌种子批的质量控制：建立适宜的放行检测项目、标准和检测方法。检测项目一般包括细菌形态学鉴别、染色镜检、生化特性分析、抗性检查、质粒限制酶切图谱分析、目

的基因和其他元件序列准确性分析等。检测方法需经过研究确认和/或验证。通过质量控制应确保不存在其它细菌、真菌和噬菌体的污染，以及确保目的基因序列和其他元件序列的准确性。

细菌种子批稳定性研究：传代稳定性一般包括质粒大小、质粒序列准确性、质粒限制酶切图谱、质粒保有率、质粒拷贝数等，根据研究结果明确种子批的限定传代代次。贮存稳定性建议关注在贮存条件下和时长内种子批的活率等。

2.3 生产/包装细胞库

病毒载体制备涉及的细胞基质包括包装病毒载体用细胞基质和可以稳定产生病毒载体的细胞基质。选择细胞基质时，需要考虑病毒载体包装和制备的可行性，结合细胞来源（包括物种来源）、生长特性和载体制备能力，以及可能影响最终产品安全性的细胞特征等，选择适合的细胞基质。风险评估时，要充分考虑细胞基质中是否存在内源性病毒颗粒、致癌序列等。对于新建立的细胞基质或具有相应风险的细胞基质（如肿瘤细胞来源的细胞），适用的情况下应评估细胞的成瘤性和致瘤性。有些情况下，需要对细胞基质进行修饰（例如插入特定病毒蛋白表达序列允许病毒复制或包装），研究中应该关注修饰后细胞的遗传、表观和生长等特性以及病毒载体制备情况等。细胞基质选定和/或修饰后需建立细胞库，以确保生产的稳定性和一致性。可参照《中国药典》、

ICH Q5A、ICH Q5D 等相关要求对细胞库进行检定。检测项目需根据风险评估确定，至少包括鉴别、无菌、支原体、螺原体（昆虫细胞）以及内、外源病毒因子、种属特异性病毒等。开展细胞库传代稳定性研究，包括细胞生长稳定性、遗传稳定性、病毒载体包装能力稳定性等，建议研究中纳入病毒载体的生产终末细胞或平行生产的对照细胞，拟定适合病毒载体制备的细胞限传代次。

包装病毒载体用细胞库：细胞库细胞经扩增、质粒转染后合成病毒载体基因序列、表达载体蛋白，并最终形成病毒载体颗粒。例如，目前慢病毒载体包装常见使用 HEK293T 细胞，转入该细胞的质粒 LTR 之间的 DNA 片段被转录成 RNA，由辅助质粒表达的蛋白将其包装形成病毒载体颗粒。需要关注的是，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）共同包装时，非载体 DNA 序列可能与病毒载体同源重组，或其残留可能产生致癌风险，建议开展风险分析与研究，评估细胞基质选用的合理性。例如使用含有腺病毒 E1、SV40LT 抗原等风险元件的细胞基质包装慢病毒载体时，应关注载体中腺病毒 E1 和 SV40LT 抗原序列的残留量。

可以稳定产生病毒载体的细胞库：细胞基质经基因修饰、筛选、建库后可稳定表达或产生病毒包装用蛋白或元件，完成病毒包装和制备。例如，γ-逆转录病毒载体制备常见使用

小鼠 PG13、HEK293-Phoenix 细胞等，生产用细胞需稳定表达 *gag-pol*、包膜蛋白、目的基因等。构建过程中建议关注其病毒包装效率和所产病毒载体的质量，并降低内、外源因子污染和复制型病毒产生等安全性风险。稳定产毒细胞系需经过基因修饰并通过单克隆筛选获得，获得的单克隆细胞系需建立细胞库，并进行全面的检定。同时，开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基因片段的遗传稳定性以及病毒载体的产量和质量等。

2.4 病毒种子批

通过病毒种子制备病毒载体或者辅助病毒的，需建立病毒种子批。病毒种子的来源、历史培养情况等需清晰明确，且风险可控。对于培养历史不清晰，存在其他病毒污染风险，或毒株单克隆性无法确认的病毒种子，不建议使用，如确需使用，可以在构建过程中进行多轮噬斑纯化、有限稀释纯化或通过 DNA/RNA 克隆拯救等，以确保毒株的纯度和单克隆性。

种子批的建立过程、代次、贮存和维护等信息应清晰、明确；如有，应说明种子批制备过程使用的人源/动物源材料，并进行安全性评估。

病毒种子批应经过充分检测，检测项目建议包括：无菌、支原体以及外源病毒因子、病毒载体和目的基因的鉴别与测序、病毒滴度或浓度、生物学活性、杂质、对抗病毒药物的

敏感性（如适用）、回复突变（如适用）等。建议对病毒种子批进行全基因测序，并对测序结果与预期序列进行对比分析，如有，需对所有差异进行评估。对于序列较长的病毒载体，建议最大程度进行序列分析，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饰或可能易于重组的区域。

病毒种子批需开展全面的传代稳定性研究，研究过程应能代表或模拟实际制备工艺，研究中关注病毒种子批的遗传稳定性和生产稳定性等。根据研究，制定病毒种子批的限定传代代次。

如病毒载体制备过程使用了辅助病毒，应开展充分的研究说明辅助病毒使用的必要性和选择依据，结合科学认知及生产经验说明辅助病毒的安全性。辅助病毒的设计构建、建库、生产制备和检定建议参考上述病毒种子批的一般要求。

2.5 其他生产用物料

其他生产用物料包括原材料（如试剂、培养基等）、耗材、培养容器等。结合工艺研究，选用适宜的生产用原材料，制定合理的原材料质量控制标准，进行严格的供应商审计，明确生产用原材料的来源、组分、功能、使用阶段、质量标准等。制备过程中尽量避免使用人或动物来源的成分，如果确需使用，可参考《中国药典》相关规定和/或 ICH Q5A 等指南开展外源因子等安全性相关的风险评估与研究。需要重

点关注的原材料包括：用于细胞培养的人或动物源材料（如牛血清、消化酶），质粒转染试剂（如聚乙烯亚胺、阳离子脂质等），核酸酶等。对于病毒载体制备或贮存时使用的人血白蛋白等风险较高的制品，建议尽可能选用经监管部门批准，并符合国家相关技术要求和管理规范的产品。对于耗材和培养容器，建议经过分析和研究，评估其适用性，尽量降低病毒载体制备过程中的安全性风险。

3. 制备工艺

病毒载体的制备工艺是指从生产用细胞的复苏扩增、病毒载体的收获到病毒载体灌装、贮存（如有）的全过程。对于体外基因修饰后直接制备细胞产品的病毒载体系统，由于病毒载体质量可直接影响终产品质量，因此其制备工艺研究应更加充分完善。在对整体工艺的充分理解和对病毒载体质量的累积经验基础上制定制备工艺，建立规范的工艺操作步骤、工艺控制参数和废弃标准，并明确关键工艺参数。制备工艺应适用于确保细胞产品符合对应开发阶段的质量目标产品概况的要求。另外，还应采取措施避免病毒载体在制备、贮存、运输的整个过程中发生混淆、污染与交叉污染等。

3.1 制备规模和批次定义

不同类型病毒载体的生产用细胞类型、生长特性、病毒载体产量和稳定性等存在较大差异，制备工艺成熟程度及病毒载体使用量等也不尽相同，建议结合待基因修饰细胞的特

性、病毒载体的工艺和临床使用需求等，合理确定病毒载体的制备规模。病毒载体制备规模需与细胞终产品研究阶段（临床试验、商业化制备）相适应。工艺中可能包括生产用细胞培养、质粒转染或病毒感染、收获、纯化等步骤，制备过程中的上、下游工艺规模需尽量匹配且合理。对于较小的规模，建议关注不同批次间的质量一致性。

根据病毒载体工艺特点，制定批次定义和编号规则。如有需要，可明确制备过程中不同工艺步骤，特别关注如有分批和合批的操作步骤时的批次定义和编号规则。确保病毒载体批次的可追溯性。

3.2 工艺研究与开发

用于制备病毒载体的工艺有多种，包括通过质粒 DNA 瞬时转染包装细胞基质制备，通过稳定的生产用细胞系制备，或通过病毒种子感染细胞基质制备。

鼓励结合质量源于设计和全过程控制等新理念，以及对相关风险控制的一般要求开展工艺研究。随着生产经验的积累和质量属性认识的加深，不断优化工艺，最终完成实验室工艺到商业化规模工艺的转化。制备工艺一般可以分为上游、下游两个阶段，即上游病毒载体收获阶段和下游病毒载体纯化阶段。制备过程中的生产用细胞种类、细胞培养条件、转染或感染条件、收获时间、纯化步骤及贮存条件等均会影响病毒载体的包装效率和质量。研究中需对工艺步骤、关键工

艺参数及其控制范围进行研究、确认或验证，并建立相应的过程控制标准。例如，复制型病毒（Replication competent virus, RCV）是过程控制中的安全性风险关注点之一，应根据病毒载体种类、工艺特点等开展风险评估，在制备过程中选择合理的检测点（如病毒载体收获液、生产终末期细胞或纯化后的病毒载体原液等），采用经验证的方法开展检测。另外，基于风险，结合病毒对于理化条件的耐受性，必要时，还需根据生产用细胞类型、辅助病毒使用、纯化工艺特点等建立相应的病毒去除/灭活步骤并进行充分的验证。

下文以 γ-逆转录病毒载体和慢病毒载体为例分别对稳定产毒和质粒转染两种制备工艺进行介绍。其他病毒载体和其他制备方式，如适用，也可参考。

3.2.1 稳定产毒制备工艺研究

（1）制备

以γ-逆转录病毒载体为例，制备时其由稳定产毒细胞分泌至培养液中，可经过澄清过滤等步骤纯化获得病毒载体。建议根据病毒载体的结构特性、包装机制、稳定性等制定合理的工艺步骤和参数，关注制备过程中的细胞培养体积、接种密度、培养条件、收获时间等。例如，有报道称由于 γ-逆转录病毒载体的一些包膜蛋白在通常细胞培养条件（37℃）下的稳定性较弱，针对该情况建议开展研究，制定相应的病毒制备和收获策略，以确保病毒载体的活性和回收率。

（2）纯化

根据γ-逆转录病毒载体的结构特点、宿主细胞的种类、杂质残留的成分等,设计合理的纯化工艺，以提高病毒载体的纯度，降低杂质残留的安全性风险。

例如,某些病毒载体的包膜蛋白可能对层析工艺比较敏感（如剪切力），因此，鼓励开发先进的纯化工艺，在满足病毒载体结构稳定性和功能活性的基础上,尽可能提高病毒载体的纯度，实现病毒载体的规模化纯化。

3.2.2 质粒转染制备工艺研究

（1） 包装与制备

以慢病毒载体为例,用于质粒转染的病毒包装细胞通常采用贴壁或悬浮方式培养，细胞培养方式建议根据规模、制备工艺设计和质量研究等选择以满足商业化制备的需求。病毒包装工艺的研究包括对质粒浓度、质粒比例、转染试剂及浓度、诱导试剂浓度（如有）、转染时间、细胞密度、细胞培养基组分、细胞培养环境（温度、pH、溶氧）、收获时间、收获次数等参数的优化。根据研究，确认工艺步骤、关键工艺参数及其控制范围，并建立相应的过程控制标准。例如在细胞培养过程中定期检测细胞活率和生物负荷,开展载体滴度、支原体和外源性病毒等检测,并进行复制型慢病毒（RCL）检测等。载体收获液如需贮存，需开展相应的研究以确认贮存条件、贮存方式等。对于外源因子检测，建议尽量提高检

测方法的灵敏度,在适宜的检测点(如外源因子富集的阶段)进行检测。

（2）纯化

目前,慢病毒载体的纯化工艺通常采用核酸内切酶去除附在病毒载体表面的大片段核酸杂质，经澄清、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、除菌过滤、灌装制成病毒载体以备使用。根据研究，纯化工艺可以进行适当的调整和优化,研究确定各纯化工艺步骤以达到去除杂质，纯化病毒的目的。如适用，工艺研究中建议对核酸酶浓度、纯化方式、介质选择、动态载量、流速、回收率、病毒载体贮存条件、灌装工艺参数等进行研究，并对核酸酶残留、BSA 残留、风险元件残留（如腺病毒 E1 和 SV40LT 抗原序列残留）、质粒 DNA 残留、宿主蛋白残留、宿主 DNA 残留及转染试剂残留等杂质的去除率进行研究。纯化工艺过程中需加强过程控制检测或质量研究,如生物负荷、内毒素、物理滴度、转导滴度等。

3.3 工艺验证

制备工艺锁定后需开展工艺验证以对各步骤的工艺进行确认，如适用，可以包括细胞扩增和载体制备各个步骤的验证、中间产物贮存条件和时间验证、杂质清除验证、培养基模拟灌装验证、层析柱和超滤膜循环使用次数和除菌滤器的验证以及运输验证等。通过工艺验证证明制备工艺及其在

设定的工艺参数范围内可持续、稳定的开展生产，病毒载体的产量和回收率应相对稳定，对残留的核酸酶、宿主细胞蛋白、宿主细胞 DNA、质粒 DNA、细胞碎片、转染试剂等杂质，应有效清除至低于质量标准范围或经过验证研究的水平。

鼓励建立上、下游规模匹配的制备工艺，如果在制备过程中出现合批和/或分批的情况，需结合实际制备情况进行充分的研究验证，根据研究结果制定合批和/或分批的原则及具体操作规范。用于合批的样品在合批前应经过检验确认为合格样品。

4. 质量研究与质量标准

4.1 质量研究

鼓励运用先进的分析方法，多角度、多层面地开展质量研究。分析方法需经过研究和确认，确保结果的准确、可靠。

一般建议采用多个代表性批次开展质量研究，常见的研究项目包括外观、病毒载体形态、鉴别、整合特征（如适用）、病毒载体滴度、生物学活性、纯度、杂质（如复制型病毒、风险元件残留、外源因子）等。根据研究结果，确定关键质量属性。

4.1.1 鉴别与序列确认

可从病毒载体的整体水平、蛋白水平和核酸水平进行检测。整体水平方面，可采用电子显微镜观察、免疫血清学等方法分析鉴别。蛋白水平方面，可采用蛋白质电泳、免疫印

迹等分析方法对载体的结构蛋白、表达产物、蛋白表达谱、免疫标记、表型特征等开展分析。核酸水平方面，建议对病毒载体进行全基因组测序以确认序列。需特别关注目的基因及调控元件序列的完整分析，对比分析测定序列与预期序列的一致性。对于整合型病毒载体，也可将病毒载体转导目的细胞后，对整合有载体序列的细胞基因组进行测序，验证载体骨架及目的基因序列的准确性。另外，还可采用限制性酶切图谱分析、聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction，PCR）等方法对病毒载体和目的基因进行鉴别。鉴别试验应设置合适的阳性和阴性对照。

4.1.2 整合特征

对于整合型病毒载体，建议选用适用的方法，研究载体整合至目的细胞基因组的典型特征，包括优势插入位点、插入拷贝数、优势克隆异常生长等。关注是否存在病毒载体优先整合至目的细胞基因组癌基因附近的情况及其他潜在的致癌风险。

4.1.3 病毒载体滴度

滴度是病毒载体生物学活性和含量的重要检测项目，可用于工艺过程监控和放行检测，需选择灵敏度、准确度、精密度等符合要求的检测方法开展研究。鼓励采用多种方法进行滴度的检测，并探索不同方法检测数值的相关性。滴度检测包括物理滴度（病毒载体总颗粒数）和转导滴度（病毒载

体感染性颗粒数)。研究中需使用标准品或对照品来校准滴度检测结果。可以通过病毒载体中感染性颗粒与总颗粒的比例,用于比较不同批次之间和载体制备的不同阶段之间的质量特征。

物理滴度：载体特定蛋白/核酸的定量可用于载体颗粒数量(物理滴度)的估计。例如,HIV-1 衍生的慢病毒载体,常用酶联免疫吸附测定法（ELISA）检测载体样本中的 p24 蛋白从而进行物理滴度的检测,检测结果可以 p24 蛋白含量/ml 或颗粒数/ml 表示，检测时应关注游离 p24 蛋白对结果的影响。此外，载体基因组拷贝数的定量也可用于物理滴度的估计，检测时建议关注外源 DNA 的干扰。若采用新技术检测，如病毒计数仪法、纳米颗粒跟踪分析法、场流分离-多角度激光光散射法等,建议关注方法对待测病毒载体类型的适用性。

转导滴度: 可使用基于细胞的体外检测方法检测病毒载体的感染能力。通常待测病毒载体感染细胞一定时间后，通过细胞基因组定量 PCR、流式细胞术、组织/细胞病变或形成噬斑等方法检测，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)、半数组织培养感染剂量($TCID_{50}$)或噬斑形成单位（PFU）等表示。

4.1.4 生物学活性

一般指将目的基因转移到目的细胞的能力以及目的基

因表达产物的生物学效应，其中基因转移能力也与病毒载体的转导滴度相关。生物学活性研究贯穿在整体研究开发过程中，建议在研发早期建立生物学活性检测方法；上市阶段，建议根据载体的作用机制和质量属性，尽可能确定与实现预期功能（替代、补偿、阻断、修正特定基因作用等）相关的生物学活性检测方法，必要时，建立合适的标准品。由于病毒载体的生物学活性发挥可能在细胞终产品中体现，因此，也可以结合终产品的生物学活性综合评价病毒载体的生物学活性。

4.1.5 纯度和杂质

（1）载体相关杂质：与病毒载体相关的典型杂质可能包括错误包装颗粒、缺陷干扰颗粒、非感染性颗粒、空衣壳颗粒、聚集体或复制型病毒等，建议采用适用的方法，例如高效液相色谱、电泳法、毛细管电泳法、紫外吸收光谱法等进行研究。通过病毒载体中总颗粒与感染性颗粒的比例，也可以反映病毒载体的纯度和杂质情况。另外，在核酸水平，可以考虑鉴定具有缺失、重排、杂交或突变序列的载体等相关杂质，以含量比率的形式报告检测数值，必要时应纳入质量标准。

（2）复制型病毒的检测：采用复制缺陷型或条件复制型病毒载体时，需在工艺的适当阶段检测制备过程中可能产生的具有复制能力的病毒，并根据细胞终产品给药剂量、病

毒载体风险等确定残留量的标准限度。复制型病毒与产品的安全性相关，需参考相关研究经验或文献，研究并建立灵敏的检测方法。常见的检测方法包括指示细胞培养法、直接qPCR法等。待测样品包括病毒载体制备过程中收获的病毒载体收获液、生产终末细胞和细胞终产品等。方法开发时，需关注各检测方法对应的操作流程、样本量、阴性对照、阳性对照、检测标志物、检测限、判定标准等方面的设定和验证研究。建议根据所用病毒包装系统设计特异的检测标志物，如适用，研究中鼓励同时采取两种以上基于不同原理或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。当采用指示细胞培养法时，需选择合理的扩增细胞和指示细胞，并应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滴度范围，并建议设置干扰组对照。

复制型逆转录病毒（RCR）检测：根据目前的研究技术水平，建议采用敏感的指示细胞培养法对γ-逆转录病毒载体进行RCR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、计数细胞病变集落或者进行RCR标志物的检测。

复制型慢病毒（RCL）检测：根据目前的研究技术水平，建议采用指示细胞培养法对慢病毒载体进行RCL检测。对于HIV衍生的慢病毒载体，其RCL检测所用阳性对照可考

虑使用满足检测要求的 HIV 病毒，如缺乏辅助基因的，同时具有复制能力的病毒，研究并评估阳性对照病毒的结构和制备方法，并在符合要求的环境中妥善操作和使用。RCL 检测指标方面，通常认为 p24 蛋白、逆转录酶活性、psi-gag 和 VSV-G 序列等的检出可反映 RCL 的存在，结合病毒载体具体情况和研究情况，选择合适的检测指标。

（3）工艺相关杂质：可能包括残留宿主细胞蛋白、非目的核酸序列、辅助病毒污染物（如传染性病毒、病毒 DNA、病毒蛋白等）和工艺中所使用的试剂残留，例如细胞因子、生长因子、抗体、转染试剂、磁珠、核酸酶、血清和溶剂等。

以非目的 DNA 残留为例，其可能包括与病毒载体共纯化的残留宿主 DNA、质粒 DNA 等，是常见的工艺相关杂质。包装过程中病毒载体的衣壳内部也可能共包装非目的 DNA，这些杂质可能对产品质量和安全性产生不利影响，建议优化工艺，以减少其污染。必要时，对残留的非目的 DNA 序列进行确认和含量的监测。当生产/包装细胞为肿瘤来源的细胞、致瘤细胞系或携带有致癌基因序列等需要高度关注的细胞时，在优化工艺、降低其残留的基础上，还建议控制非目的 DNA 片段大小（建议在 200bp 以下），并对已知的高风险基因进行专项监测。例如，采用 HEK293T 细胞进行慢病毒载体制备时，需采用具有足够的灵敏度和特异性的方法检测腺病毒 E1 和 SV40LT 抗原序列的残留。

4.1.6 其他

微生物污染物: 检测可能引入的污染物,包括外源病毒、细菌、真菌、支原体、细菌内毒素等。

理化检测: 常规的理化检测项目可能包括外观（颜色、透明度)、可见异物、不溶性微粒、pH、含量、渗透压等。

4.2 质量标准

质量标准是质量控制的重要部分,包括检测项目、检测用方法学和各检测指标的可接受标准。检测阶段一般包括放行检测和/或过程控制等。

根据现有研究认知,病毒载体的质量标准检测项目通常包括外观、鉴别、纯度、含量/滴度、生物学活性、杂质、无菌性、细菌内毒素、支原体和外源病毒因子等。检测用方法需经过研究与验证以确保检测结果可靠和准确。如适用，尽量建立对照品/标准品，并对其开展相应的质量研究、含量/活性的标定、确定贮存条件等。一般情况下，可接受标准的制定依据包括产品质量设计、质量研究、工艺开发、验证研究、方法学研究与验证、多批检测和稳定性结果，以及合理的统计学方法等。

（二）非病毒载体类基因修饰系统

非病毒载体类基因修饰系统可通过物理、化学或生物转导方式递送进入细胞。进入目的细胞后，通过转录、剪切、翻译等方式发挥作用,其活性组分为DNA、RNA或蛋白质，

也可能为核酸与蛋白质组分的组合。

1. 分子设计

非病毒载体类基因修饰系统的设计影响目的基因修饰或目的基因表达的特异性、准确性和有效性，也影响基因修饰细胞终产品的安全性和有效性，构建时需要对设计和改构的利弊进行权衡分析。

对于 DNA 类基因修饰系统，开发过程中需关注基因转导效率、脱靶效率、插入突变情况、目的基因在目的细胞中的整合位点及拷贝数等。采用的设计策略包括基因密码子优化、染色体同源序列的改构、富含 GC 区序列的改构、信号肽以及合理启动子的应用等。目前体外基因修饰常用的环状 DNA 类基因修饰系统，包括质粒、微环（Minicircle）DNA、纳米质粒（Nanoplasmid）等不同类型。不同类型环状 DNA 的选择可重点关注高纯度载体制备的难易程度、载体重组、细菌来源 DNA 序列在目标细胞内的表观遗传修饰对目的基因表达的影响等。此外，环状 DNA 类基因修饰系统内可引入特殊的 DNA 片段，形成游离型载体，如引入 EBV 来源的顺式作用 DNA 片段 OriP 和反式作用的 EBNA1 基因的载体，此类载体需关注种属、细胞类型对游离型载体功能的影响，载体重组、顺式/反式作用 DNA 片段对目的基因表达的影响等。

对于 RNA 类基因修饰系统，以 mRNA 为例，根据目前

的研究进展，考虑到设计对 RNA 的稳定性和其在目的细胞内的生物学活性等可能具有显著影响，构建时可以关注碱基修饰类型和比例、5’-帽或帽类似物结构、非翻译区序列、Poly（A）加尾结构和自扩增元件（如有）等，并同时进行密码子优化、调控碱基间作用力及高级结构等方面的改造，以实现预期的功能。

对于基因编辑系统，建议对靶向序列、目的基因序列（如有）和基因编辑用酶等的序列和比例等进行优化。通过特定细胞中的基因编辑效果确认基因编辑用酶和靶向序列的特异性，筛选最佳的靶向结合序列（如 sgRNA 序列），并采取措施降低基因脱靶、插入突变的概率及对目的细胞基因组稳定性的不良影响。对于转座子系统，建议考虑整合位点的特异性和分布趋势，以及转座子在基因组中的移动（genomicmobilization）等特征，进行转座子序列、转座酶及相应调控元件的优化，合理设置转座序列/转座酶的比例、序列分布等。

2. 生产用物料

基本原则可参考病毒载体类基因修饰系统部分的相关要求。

对于采用重组技术或生物/化学合成技术制备的生产用原材料，需明确工艺和质量控制情况，特别是需要分析生产过程中可能引入的安全性相关杂质。对于制备过程中使用的

酶类试剂，建议重点关注酶的功能活性，例如需关注所用DNA聚合酶、RNA聚合酶的保真度和活性，消化酶的酶解作用、酶的非特异性消化条件等，同时需要关注酶的纯度、生产过程中引入的杂质等。对于核苷酸、5'-帽或帽类似物等原材料，其整体的质量应符合制备的要求，建议关注鉴别、浓度、纯度和杂质等。制备过程建议避免使用氯化铯、溴化乙锭、氯仿等毒性物质，避免使用动物源胰蛋白胨、核酸酶等可能引入外源因子等风险的原材料。

对于用作递送系统的材料，其制备涉及的关键原材料（脂质、阳离子聚合物等）需进行充分的筛选和质量控制。

3. 制备工艺

基本要求同病毒载体类基因修饰系统。对于体外基因修饰后直接制备细胞产品的情况，需要多次、规模化的制备，具体情况介绍如下。

3.1 DNA类基因修饰系统

以质粒DNA为例，其制备步骤一般包括微生物培养及发酵、菌体收集、菌体裂解、质粒纯化、浓缩、灌装等。工艺研究与确定过程需对关键工艺参数进行探索和优化，建立稳定的制备工艺。关键工艺参数可能包括发酵培养基组成、发酵培养温度、补料培养基组成、补料时间和补料量、溶氧量、碱裂解缓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。研究中建议关注制备全过程对质粒结

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的情况等。纯化工艺开发过程中，可以根据质粒的实际大小和性质选择合适的柱层析填料，最大程度去除宿主 RNA、宿主 DNA、DNA 碎片和细菌内毒素等杂质。根据研究，设置合理的过程控制指标和可接受标准，如质粒中间产物的浓度、超螺旋比例、杂质残留量等。

3.2 RNA 类基因修饰系统

基于研究现状，RNA 的制备一般包括体外化学合成和 DNA 转录两种工艺路线。体外化学合成工艺请参考化学药物的相关技术指南。DNA 转录工艺路线以 mRNA 的制备工艺为例，该工艺一般采用 DNA 转录模板进行 mRNA 体外转录、mRNA 加帽、去磷酸化、DNA 酶处理、mRNA 纯化等步骤。建议对工艺参数进行研究与优化，开发稳健的工艺，确保 mRNA 序列正确性、结构完整性、生物学活性和不同批次间质量的一致性。对工艺中引入的潜在杂质进行研究，明确杂质的来源、去除步骤和去除能力等。工艺研究中需对关键工艺参数及控制范围进行确认，如 NTP 浓度、转录时间、反应温度、加帽反应物料投料比、层析介质、动态载量等，关注产品回收率、杂质去除率、加帽率、poly（A）长度及分布（如适用）、mRNA 片段的完整性以及序列的准确性等方面。制备过程中需设置合理的过程控制指标，如 mRNA 浓度、双链 mRNA 含量、不完整 mRNA 含量、残留

DNA、无菌、细菌内毒素等。

3.3 其他

基因修饰系统如含有重组蛋白质成分，根据具体情况，可以参考重组蛋白质类生物制品生产的相关技术要求。

4. 质量研究与质量标准

4.1 质量研究

质量研究通常包括鉴别、结构特征、理化特性、生物学活性、纯度和杂质分析等。研究中建议采用多个代表性批次开展研究。如含有化学合成的组分和/或重组蛋白组分的，可参考相关指导原则等开展质量研究。

鉴别和序列确认：鉴别研究中，可采用限制性内切酶进行酶切，对酶切产物进行电泳分析，观察是否存在特征性的带型；也可以用 PCR 方法进行扩增，分析片段大小是否与理论大小一致等方法。对于 RNA，可将其逆转录为 DNA 后，采用上述方法进行鉴别，或考虑采用其他适用的方法。序列确认研究中，建议开展全序列测定，重点关注目的基因和调控元件的序列正确性，对于 RNA，如有，建议同时关注 poly（A）序列的正确性。

结构：建议采用适用的方法对结构完整性和大小均一性进行研究。如对于 DNA，可关注其是否存在单链、双链、线性/开环、环状和超螺旋等多种结构形式，以及可能的高级结构等；对于 mRNA，可关注其不同区域结构的完整性

（如 5’-帽或帽类似物结构、poly（A）长度）、碱基修饰结构、去磷酸化程度以及可能的高级结构（如茎环结构）等。若功能活性与高级结构相关，建议分析研究高级结构特征。对于复合核酸类基因修饰系统，建议开展结构分析，如关注复合结构的粒径大小、粒度分布、颗粒聚集等。

理化特性：建议开展分子量、核酸浓度/含量、修饰位点及比例（如有）、物理特性（如 pH、渗透压）等方面的研究。

生物学活性：根据作用机制，生物学活性研究通常包括对基因修饰效率、目的基因表达的水平、表达产物的功能或体外模拟生理功能的测定等。建议首选定量检测方法，如可通过目的基因或基因编辑产物的表达量和功能进行分析，关注表达产物是否与预计一致或蛋白表达/基因是否被抑制、空间结构是否符合设计（如多聚体）等。当采用体外转染检测细胞的方法时，需关注选择的检测细胞是否具有代表性和合理性。

纯度：可以采用琼脂糖凝胶电泳、高效液相色谱、毛细管电泳等方法开展纯度的研究。对于复合核酸类基因修饰系统，建议关注包封率、游离核酸含量等。

杂质：一方面，杂质可能来自原材料、制备过程、制备和贮存过程中直接接触容器和材料的溶解物。如 DNA 模板、酶类试剂、磁珠等原材料和添加的成分；乙醇、异丙醇等有

机溶剂；宿主蛋白残留、宿主 DNA 残留、宿主 RNA 残留等。另一方面，与基因修饰系统相关的杂质，可能包括缺失、重排、杂交或突变序列等相关杂质，建议进行定性和定量的相关研究。对于 DNA 类基因修饰系统，相关研究可以包括开环/线性 DNA 含量、过度甲基化修饰的分子等。对于 mRNA 类基因修饰系统，相关研究可以包括降解/断裂产生的 RNA 片段、加帽不完全的 mRNA、修饰过度的 RNA、RNA 错配序列、RNA 氧化产物等。结合制备工艺的杂质清除能力，采用适用的方法对杂质的残留水平进行分析，评估相关安全性风险。

微生物安全性：可结合工艺过程，检测可能引入的污染物，包括细菌、真菌、支原体（如适用）、细菌内毒素等。

其他特性研究：对于使用基因编辑工具酶的修饰系统，质量研究中建议持续关注对应细胞产品中修饰系统的残留情况，采用生物信息学工具分析靶细胞基因组结构变化、单点和小规模基因突变以及外源 DNA 在基因组中的插入位置、拷贝数等，监控基因编辑用酶的细胞内持续表达时间，考察脱靶效应及相应的安全性影响等。

4.2 质量标准

根据风险分析，结合工艺研究与验证、临床试验及商业化批次质量分析、稳定性研究数据等制定合理的质量标准，明确各检测项对应的分析方法、标准限度范围并建立标准品

/参考品等。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、稳定地清除，可结合工艺进行控制，相关残留检测可考虑不列于检定项目中。

质量控制项目可以包括理化性质、纯度和杂质、生物学活性、微生物安全性等。其中，DNA 类的质量标准可以纳入外观、pH 值、含量、鉴别、序列分析、纯度、超螺旋比例、生物学活性、无菌检测、细菌内毒素、杂质残留等检测项目。mRNA 类的质量标准可以纳入外观、pH 值、含量、鉴别、序列分析、mRNA 完整性、加帽率、poly（A）长度及分布、生物学活性、无菌检测、细菌内毒素、双链 RNA 残留、溶剂残留等检测项目。常见的复合核酸类基因修饰系统的质量控制项目包括外观、pH、颗粒大小及分散系数、渗透压、鉴别、序列测定、含量/浓度检测、生物学活性、纯度、序列完整性、包封率、复合材料各组分含量（例如脂质鉴别和含量）、游离核酸、可见异物、杂质、微生物安全性等。

方法学研究与验证方面，基本原则同病毒载体类基因修饰系统的要求。

六、稳定性研究与直接接触性容器/材料研究

（一）稳定性研究

基因修饰系统如涉及到贮存，则需开展相应的稳定性研究。采用拟贮存阶段样品的代表性批次开展研究，一般包括

贮存、运输（如适用）和使用稳定性研究等。研究开展前，需统筹制定稳定性研究方案，关注各稳定性研究所用样品、直接接触性容器/材料、检测时间点、检测条件和分析检项等。

研究中需对能够反映质量变化的敏感特征进行研究，如含量、完整性、纯度、微生物安全性和生物学活性等。研究中需涵盖拟定的各项条件，如温度、光照、反复冻融（冷冻贮存时）、振摇等方面。根据实际使用情况，开展使用中稳定性研究，例如复溶或解冻，与复溶稀释剂的相容性等研究。研究中需采用与实际使用相同材质的直接接触性容器/材料。

对于病毒载体类基因修饰系统，稳定性研究中建议重点考察病毒载体的滴度、纯度、杂质、微生物安全性指标、生物学活性等关键质量属性。对于非病毒载体类基因修饰系统，建议重点关注理化特性、结构完整性、杂质等关键质量属性。例如，DNA 超螺旋结构的比例可能影响 DNA 的转染率，mRNA 加帽率可能影响 mRNA 的结构稳定性和翻译效率，建议在稳定性研究中重点考察。

（二）直接接触性容器/材料研究

如涉及贮存，需对直接接触的包装容器开展相应的包材相容性研究。根据相容性研究结果，结合稳定性研究，选择合理的包装容器。

另外，对制备工艺中与样品接触的容器和一次性使用材

料（如贮存袋、过滤膜、层析介质、管路等），需开展风险评估和/或相应的相容性研究。

七、参考文献

[1] U.S.FDA. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) information for human gene therapy Investigational New Drug applications (INDs). 2020.

[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). 2017.

[3] EMA. Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors. 2005.

[4] 国家食品药品监督管理总局.生物制品稳定性研究技术指导原则（试行）. 2015.

[5] EMA. Quality, preclinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. 2018.

[6] ICH. Q5A Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. 1999.

[7] ICH. Q5C Stability testing of biotechnological and biological products. 1995.

[8] ICH. Q5D Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products. 1997.

[9] U.S. FDA. Testing of retroviral vector-based human gene

therapy products for replication competent retrovirus during product manufacture and patient follow-up. 2020.

[10] EMA. Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells. 2020.