

人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则

二 00 三年三月

人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则

一、引言

基因治疗是指改变细胞遗传物质为基础的医学治疗。目前仅限于体细胞。

基因治疗的技术和方式日趋多样性。按基因导入的形式，分为体外基因导入（ex vivo）及体内基因导入（in vivo）两种形式。前者是在体外将基因导入人细胞，然后将该细胞注入人体。其制品形式是外源基因转化的细胞，适合在具有专门技术人才和 GMP 条件的医疗单位进行。后者则是将基因通过适当的导入系统直接导入人体，包括病毒的与非病毒的方法。其制品形式是基因工程技术改造的病毒或者是重组 DNA、或者是 DNA 复（混）合物。基因治疗制剂种类较多，因此，本指导原则不可能用一个模式来概括，只能提出一个共同的原则，具体的方案应根据这些原则，确定研究技术路线。其基本原则：一是必须确保安全与有效，要充分估计可能遇到的风险，并提出相应的质控要求；二是要促进基因治疗的研究，并加强创新。对一些新的治疗技术路线的相应质控要求，可有一定的灵活性，应注意到基因治疗本身的特点以及它与经典的化学合成药物或基因工程药物的差别。目前，一些基因治疗研究相对比较成熟，而一些则不够完善，更加要求研究者在使用该技术指导原则时不可生搬硬套。为此，研究者应加强咨询和论证，提出一个科学可行的研究方案，最终获得确保安全有效的基因治疗制品。

在向国家药品监督管理局申报临床试验时，除须按本指导原则中“研究内容和制品质量控制”准备材料外，同时需提供下述材料：

（1）国内外研究现状和进展（综述）。包括：

1. 所用基因的研究现状和进展；
2. 所用载体的研究现状和进展；
3. 所用基因导入系统和方法的研究现状和进展；
4. 该研究或制品相关的体外有效性实验资料；
5. 该研究或制品相关的动物试验安全性和有效性资料；
6. 该研究或制品相关的临床试验安全性和有效性资料；
7. 该研究或制品的生产工艺现状；

8. 该研究或制品的质量控制现状；
9. 本研究或制品的先进性和创新点；
10. 本研究或制品产业化的可行性。综述内容须科学客观。

(二) 本研究或制品的知识产权情况。包括：1) 本研究或制品的知识产权情况阐述；2) 本研究或制品的知识产权检索报告和检索结果。知识产权情况的阐述和检索应包括所用基因、载体、重组体、终产品的其它成分、生产用细胞和生产工艺等。

二、研究内容和制品质量控制

(一) DNA 重组体或基因导入系统的构建

1. 治疗用的目的基因

详细说明基因治疗所用的目的基因及其来源（尤其是有否涉及国内外专利问题，应有专利查询资料），获得目的基因的材料方法和基因鉴定结果。

2. 载体

包括载体 DNA 的限制性内切酶图谱或基因库资料。若有特殊的元件，如启动子、增强子及 PolyA 位点等，应提供详细资料。若有改变结构（如丢失片段，点突变或插入片段），须提供 DNA 测序结果。若属新的或改变结构的病毒载体，须提供组建的材料、方法、组建步骤及鉴定结果的全部资料。

非病毒型基因导入系统，均需一个能在人体细胞表达目的基因的质粒。除裸露 DNA 外，还须附加其它的组分进行加工，如脂质体、多肽、金属颗粒等。本指导原则不包括寡聚核苷酸（如 AntisenseRNA, Ribozyme, RNAi 等）类基因治疗制品。

3. DNA 重组体

详细说明克隆步骤，材料方法；DNA 序列分析图谱和结果，注明启动子、增强子、插入顺序、目的基因及 polyA 顺序等；重组体的限制性酶切图谱和鉴定结果；重组体中基因表达水平和时程。

4. 基因导入系统构建包括病毒载体与非病毒载体基因导入系统。

(1) 病毒载体基因导入系统包括腺病毒载体、逆转录病毒载体和腺相关病毒载体基因导入系统等。需详细描述形成单克隆原始病毒颗粒的方法、材料、技术路线和全部的鉴定方法、标准和结果。这些鉴定一般包括：结构鉴定（限制性酶切图谱和 PCR 分析）、整个病毒的序列分析（ $\leq 40\text{kb}$ ），基因体外

表达和生物活性，SDS-PAGE、表达盒 DNA 序列分析、Westernblot 分析、转染效率、透射电镜负染法观察、复制型病毒的检测和其它污染因子的检测。

(2) 非病毒基因导入系统除裸 DNA 外，一般包括两个部分：一是哺乳动物细胞表达载体；二是其它载体物质，如脂质体、多肽或金属粒子等。为此，需说明目的基因导入系统的性质与内容。由于部分病人对青霉素的过敏反应，最好不用耐氨苄青霉素基因作耐药基因，而建议用卡那霉素或新霉素基因作耐药基因。若用物理方法导入，须提供其详细方法、步骤，基因导入效率及其表达的生物活性以及导入细胞后基因的稳定性，无重排或突变的证据。每一操作步骤必须鉴定其结果，通常的鉴定内容和方法有：限制性酶切图谱，基因的 PCR 扩增，表达盒 DNA 序列分析，SDS-PAGE，Westernblot 分析等。

(二) 细胞库及工程菌库的建立和检定

包括包装和繁殖重组病毒的细胞库和扩增重组质粒的工程菌库。必须建立三级库，即原始细胞库 (PrimarySeedBank)、种子细胞库 (MasterCellBank) 和工作细胞库 (WorkingCellbank)；或原始工程菌库、种子工程菌库和工作工程菌库。

1. 细胞库

(1) 原始细胞库

需说明来源、代数、细胞特性及有关档案资料。对主细胞库和工作细胞库需详细说明建库过程，包括材料、方法、步骤、细胞库存的数量和登记档案等。

(2) 主细胞库

主细胞库由原始细胞库直接传代建立或通过亚克隆方法筛选后建立。应明确使用代次。

(3) 工作细胞库

工作细胞库由主细胞库传代建立。应明确工作细胞库的使用代次。

(4) 细胞库检定

①主细胞库或工作细胞库检定应依据《生物制品生产用细胞的制备及检定规程》的要求进行。

②病毒转导效率和病毒的产量等的检定

③导入基因的存在状态，稳定性及其表达水平的检测

④复制型病毒的检测

若需用其它辅助病毒，须说明其来源、分离的方法步骤和传代次数等。

2. 工程菌库

工程菌主种子库和工作种子库的建立和检测应按现行《中国药典》相关要求建立。

(1) 工程菌主种子库的检定

①菌种同一性鉴定：菌种/株的来源、基因型及表型。基因型通过 RAPD 方法鉴定，通过测定重组质粒的特殊标记和抗药性标记确定表型。

②菌种培养纯度检定：外源因子（如杂菌、真菌、噬菌体等）的检测。

③菌种稳定性检定：转化菌的比例，扩增条件、质粒拷贝数，基因表达量、允许的传代次数。

④基因表达盒序列分析：插入的目的片段以及调控序列进行测序分析。

(2) 工程菌工作种子库的检定

除外基因表达盒序列分析，其它检定内容按上述工程菌主种子细胞库的检定。

(三) 基因治疗制品制备和生产工艺

1. 一般要求

(1) 制备和生产条件及环境说明。强调基因治疗制品的制备和生产须按 GMP 要求进行，特别是对 exvivo 方式的细胞制品和重组病毒制品。临床前研究和临床研究用的重组病毒制品应该在经验证的 (validatable) 生产工艺途径下制备。

(2) 详细的制备和生产工艺方法、材料和技术路线。

(3) 制备和生产过程控制。在生产过程中，一些步骤必须进行监测，并要求有监测记录。

(4) 一批制品生产的原始制造及检定记录。

(5) 中国药品生物制品检定所或由国家药品监督管理局指定的单位对一批制品的检定报告。

2. 以重组病毒作为基因治疗制品者，要求必须建立种子病毒库和工作病毒库。工作病毒库直接从种子病毒库病毒接种细胞传代制备。需详细描述病

毒库的来源、建立、克隆性，传代和保存条件和方法。其质量控制方法和标准见本指导原则有关部分。须从工作细胞库细胞复苏，传代成生产细胞开始工艺过程，不得用非细胞库来源的细胞直接进行生产。做重组病毒制品时，须使用工作病毒库的病毒去感染生产细胞，不得用非病毒库来源的病毒直接进行生产。可以使用贴壁细胞或悬浮细胞大规模培养技术。病毒库可以不经纯化而直接从细胞裂解液来制备。制剂配方也十分重要，不合适的制剂配方会影响制品活性和保存期限。

3. 非病毒型重组质粒 DNA 复（混）合物作为最终制品者，要求需详述。

- (1) 重组质粒 DNA 的生产制备和质控
- (2) 脂质体的来源和性质，或者制备方法
- (3) 多肽的来源和性质，或者合成方法
- (4) 其它成分的来源和性质，或者制备方法
- (5) 重组质粒 DNA 复（混）合物终制品的生产制备和质控

通过基因枪等物理和化学方法将基因导入人体者，需说明目的基因的制备、表达、裸 DNA 大量扩增、分离、纯化，仪器设备的性能和详细的导入方法。

4. 以基因工程化的细胞为最终制品者，包括 ex vivo 及其它形式的基因治疗。该类制品应参照《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》进行。详细说明细胞扩增的全部制备工艺，包括生产流程、所用培养液及其配制方法、细胞收集、细胞的 ex vivo 转染方法及筛选。洗涤最终制品中所用的保存液配方。

（四）制品的质量控制

根据基因治疗类制品的生产工艺特点，其质量控制的原则主要是：检定项目尽可能在成品中进行；如成品中的添加成份影响检定结果，则需在原液中进行。

1. 重组病毒作为基因治疗制品的质量控制

根据目前国内外的进展和完善程度，这里以重组腺病毒（rAd）制品来描述重组病毒基因治疗制品的质量控制，其它的重组病毒制品可参考这些质控要点。

（1）重组腺病毒（rAd）作为基因治疗制品的质量控制

①原液检定：

a. 无菌试验

按 2000 年版《中国生物制品规程》附录《生物制品无菌试验规程》进行。

b. 病毒颗粒数测定

c. 具有感染能力病毒颗粒的测定（病毒活性）

②半成品检定

a. 无菌试验

b. 病毒颗粒数测定

c. 内毒素测定

③成品检定

a. 物理检查

b. 外观

c. 装量

d. 化学检定：pH 值

e. 鉴别试验

限制性酶切图谱鉴别

插入基因检测

f. 纯度：可采用 A260nm/A280nm 值法或 HPLC 法

g. 病毒滴度测定

病毒颗粒数测定, 采用 A260 紫外吸收法测定。

具有感染能力病毒颗粒的测定, 采用 TCID₅₀ 法。〔ZK〕

病毒比滴度（比活性 IU）, 病毒感染滴度/病毒颗粒数（IU / VP）应高于 3.3%。

h. 效力试验

插入基因表达活性测定

插入基因的生物学活性测定

i. 复制型病毒（RCA）检测

A549 细胞检测法, 每 3.0×10^{10} VP 中应不高于 1RCA（即 $\leq 1RCA / 3.0 \times 10^{10}$ VP）

j. 腺相关病毒的检测

采用 PCR 法，应无腺相关病毒（AAV）的污染。

k. 残留量测定

应根据生产工艺及成品的添加成份，对有潜在危险性的成份进行残留量检测。

l. 无菌试验

m. 异常毒性试验

n. 内毒素检测

重组病毒制品的稳定性试验：需对保存条件、保存液配方及至少对三批样品进行稳定性考察。应进行不同温度及反复冻融对活性影响的研究。

(2) 以 ex vivo 形式用逆转录病毒转化的细胞（同体或异体）制品的质量控制

该类制品应参照《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》进行。应特别注意复制型病毒的检测。检测的范围，包括前述种子细胞库、工作细胞库，生产后细胞及最后病毒制品。细胞上清液的取样应相当于培养上清液的 5%。生产病毒后细胞取样量须达每批中 1% 或 10⁸ 细胞（取少的）。检测方法应包括至少 5 代的细胞共培养扩增（如用 Musdunni 细胞），随后须用 PG4S+/L-法、标记挽救法或 RT / PCR 中的两种方法来检测。必须用阳性对照（COS4070A 上清液）及阴性对照作严格定量标化，证明其敏感性及其可靠性。PCR 应利用放射性同位素杂交或同样敏感的系统。

若为释放病毒的细胞，须测定：

①细胞形态、表面标志、染色体组型及其同一性。

②活细胞比例和细胞浓度。

③目的基因存在状态、表达及其稳定性。尤其要说明对基因及其载体导入后是否出现基因“插入性突变”及其观察方法及结果。

④细胞冻融后的质控

冻融后细胞存活数、基因表达或转导基因的活性。

冻融后细胞上清液中的下列检测结果：

a. 无菌试验

b. 热原质实验

c. 冻融后细胞的异常毒性试验。

d. 病毒转导基因活性。

e. 支原体检查。

若为逆转录病毒上清液，须测定：

①病毒滴度

②病毒结构检定

③病毒转导基因的活性

④复制型病毒（RCR）的检测。由于逆转录病毒或 RCR 具有整合入人细胞染色体的特性，有遗传性毒性，因此对制品中 RCR 的检测要严格进行和严格要求。

⑤上清液中的细菌、热原质及其它外源因子等。

⑥上清液中牛血清蛋白残留量。

鉴于某些细胞产品，有效期较短，而有些项目的检查须较长的时间（如支原体），这些试验项目可对每批最终产品作留样检查，而该检测结果将为产品的质控提供完整的资料。若留样检查发现阳性结果，应及时对生产过程作检查，对已发放的产品立即采取措施停止使用。

2. 非病毒型重组 DNA 基因治疗制品

（1）纯度：超螺旋型的含量，细菌基因组 DNA、RNA 和蛋白残留量。

（2）DNA 结构检测

（3）脂质体、多肽或金属粒子等的来源和性质。由于脂质体的形成及多肽类合成过程的随机性，不可能达到一般化学合成物的均一性及纯度，为此应提供不同批号间保证安全有效的可以达到的最大均一性的程度。

（4）无菌试验

（5）热原质试验

（6）过敏试验

（7）异常毒性试验

（8）介导目的基因的活性检测

（9）有害物质残余量的测定

（五）基因治疗的有效性试验

有效性试验包括：

1. 体外试验

须证明该外源基因导入细胞后，能表达并能达到治疗效果的依据。若属 *ex vivo*，须提供该细胞中目的基因的表达量及细胞导入人体内后预期的效果。

2. 体内试验

提供动物实验结果证明在体内靶组织中基因导入的效率、表达状态及可达到治疗的目的。证明在非靶组织器官中基因表达的分布。动物种类根据实验模型的需要而定。导入的途径应尽可能接近于临床试验的途径或条件。由于小动物对某些途径（如动脉插管）有一定困难，若改变导入途径须说明原因及依据。

若有些方案在动物中难以观察其疗效（如种族差异），应充分提供有效性的间接或旁证资料或依据。

（六）基因治疗的安全试验

对质控合格的基因治疗制剂，须提供以下安全性试验的资料：

1. 总体安全性评估

除了在质控中已规定的各项要求外，对于 *ex vivo* 用基因工程化的自体或异体细胞导入人体，应提供以下资料：

（1）生长因子的依赖性细胞，对其生长行为必须予以监检。若某细胞株在传代过程中失去对该生长因子的依赖性，不能再予以使用。

（2）对同种异体细胞的移植，必须从免疫学方面提供其安全性依据。

（3）对异种细胞，必须提供该异种细胞在体内存活的时间及其安全性的依据。

（4）致癌试验。无论是自体或异体细胞，经基因操作后，均须作致癌试验。对于瘤苗类制品，必须提供该瘤细胞经过何种处理能有效地阻止继续增殖的证据。致癌试验包括软琼脂细胞生长及裸鼠内致癌试验。

（5）细胞种类均一性的监控。对瘤苗类制品，应提供如何去除非肿瘤细胞的方法、步骤及其可靠性的依据。若从肿瘤组织中分离非肿瘤细胞（如淋巴细胞），则必须提供消除肿瘤细胞的方法、步骤及其可靠性（包括致癌试验在内）的依据。

（6）复制型病毒的检测，若应用病毒型导入系统必须严格检查复制型病毒。

（7）添加物：除细胞培养及保存所用的试剂外，某些 *ex vivo* 或

invivo 导入基因或细胞时，需要加用其它添加物，对此类物质必须有动物实验证明其安全性。

2. 分子遗传学的评估

对 invivo 的治疗方案，必须提供动物体内重组病毒或重组 DNA 制品导入靶组织与非靶组织的分布情况、基因的表达情况。对于 exvivo 的方案。须提供导入基因的细胞进入体内后的活性和目的基因的表达情况和分布。

3. 毒性反应的评估

这是安全性试验的重要组成部分。invivo 的方案必须提供毒性反应的详细资料。除目的基因可能导致的毒性外，导入系统的安全性评价至为重要，其安全性评估应包括急性毒性（最大耐受量）及长期毒性试验。毒性试验所用的剂量，除包括相当于临床使用剂量（按体重或表面积计算）外，尚需有一个较大的剂量范围。剂量范围应包括大于临床使用剂量以确定最大耐受量。给药途径应尽可能模拟临床给药或导入的形式。若改变途径须说明其原因及依据。毒性反应的观察，除常规检测项目外。应包括与基因治疗相关的检测指标。对于 exvivo 方案，对瘤苗类或淋巴细胞、巨噬细胞类等自体细胞的导入，一般可免做动物急性和长期毒性试验。但若加入特殊的添加物（如明胶、缝线、特殊的导管等），以及对于某些重要人体脏器内导入（如心、脑、肝等），必须作动物体内毒性作用的试验，并提供详细资料。若 exvivo 方案添加细胞因子，亦必须提供其安全性的资料。对采用皮肤、皮下、肌肉给药途径的方案，无论是 exvivo 或 invivo 均需提供局部刺激性的资料。

4. 免疫学的评估

无论病毒型与非病毒型载体系统，均需注意进入体内后的免疫反应有关的问题，包括过敏反应、排斥反应以及机体的自身免疫反应（如对裸 DNA）等，并对可能发生的免疫反应提出相应的监控及处理措施。

对用于改变机体免疫状态的目的基因及其导入系统（如瘤苗、导入细胞因子基因或输入基因工程化的免疫细胞），更需提供它所引起的机体免疫改变以及可能的副作用的资料（参照《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》）。

5. 致癌试验：见本指导原则相关部分。

（七）基因治疗临床试验方案

基因治疗不同于一般生物技术制品的临床应用，首先是它的复杂性，例如对于 ex vivo 方式，需有经验的临床单位和专家将制品输入或埋入人体的特定组织，甚至通过手术进行操作；二是它的风险性，尚存在许多未知的因素，须对临床研究的全过程进行严密监控，并在申请临床研究时须提供下列资料：

1. 提供申报单位符合 GMP 生产条件的证明。
2. 提供临床研究单位和直接参与研究人员的名单和简历。
3. 明确给药的方式、剂量、时间及疗程。如需通过特殊的手术导入治疗制剂，须提供详细的操作过程。
4. 一般临床指标和实验室检测。
5. 病人及家属的同意书
6. 靶组织和非靶组织的分子生物学检测。

靶组织和非靶组织的分子免疫学检测。若导入重组病毒或可能改变机体免疫状态的制剂，须针对性地提供观察人体免疫学方面的相关检测指标及对可能发生的免疫学反应的必要处理措施。

7. 可能产生的副作用或不良反应的记录，建立实施治疗方案中的事故报告制度。
8. 随访的计划及实施办法。

（八）伦理学考虑

必须充分重视伦理学的原则，并具体按国家药品监督管理局 GCP 规定的要求严格实施。包括在实施本方案前，须向病人说明该治疗方案属试验阶段，它可能的有效性及可能发生的风险，同时保证病人有权选择该方案治疗或中止该方案治疗，以及保证一旦中止治疗能得到其它治疗的权利。严格保护病人的隐私。在病人及家属充分理解并签字后才能开始治疗。