

# 国家药监局药审中心关于发布《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》的通告（2022年第31号）

发布日期：20220531

为规范和指导体内基因治疗产品的药学研发、生产和注册，在国家药品监督管理局的部署下，药审中心组织制定了《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》（见附件）。

根据《国家药监局综合司关于印发药品技术指导原则发布程序的通知》（药监综药管〔2020〕9号）要求，经国家药品监督管理局审查同意，现予发布，自发布之日起施行。

特此通告。

附件：体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）

国家药监局药审中心

2022年5月26日

## 相关附件

序号	附件名称
1	<a href="#">体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）.pdf</a>

**体内基因治疗产品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 .....	3
四、风险评估与控制 .....	6
五、产品设计的一般考虑 .....	9
1. 病毒载体类产品 .....	9
2. 核酸类产品 .....	15
3. 细菌载体类产品 .....	17
六、生产用物料 .....	18
1. 起始原材料 .....	18
2. 其他生产用物料 .....	25
七、生产工艺 .....	27
1. 生产工艺开发 .....	27
2. 生产工艺的确认与验证 .....	33
八、质量研究与质量标准 .....	34
1. 质量研究 .....	34
1.1 鉴别和结构分析 .....	35
1.2 生物学活性 .....	37

1.3 纯度、杂质和污染物 .....	38
1.4 含量 .....	41
1.5 其他特性分析 .....	41
1.6 基因编辑技术的相关考虑 .....	41
2. 质量标准 .....	43
九、稳定性研究 .....	45
十、包装及密封容器系统 .....	47
十一、名词解释 .....	48
十二、参考文献 .....	49

## 一、前言

随着基因递送载体和基因编辑等生物技术的快速发展，基因治疗产品的临床应用不断取得新的进展，为难治性疾病提供了新的治疗方案。基因治疗产品一般通过将外源基因（或基因编辑工具）导入靶细胞或组织，替代、补偿、阻断、修正、增加或敲除特定基因以发挥治疗作用。按照基因导入人体的方式不同，基因治疗可分为体内（*in vivo*）基因导入和体外（*ex vivo*）基因导入两种方式。体内基因治疗产品将外源基因（或基因编辑工具）通过适当的载体直接导入人体发挥治疗作用，而体外基因治疗产品一般在体外将外源基因（或基因编辑工具）导入细胞，制备成为经基因修饰的细胞或细胞衍生产品，最终经回输以发挥治疗作用。由于体内和体外基因治疗产品在产品类型、基因载体类型与设计、载体的靶向性需求、起始原材料的管理、产品的纯度、杂质水平的控制、生产模式和质量风险等方面存在一定差异，因此，两类产品在研发和技术要求方面存在一定的差异，有必要进行分类规范。

为了规范和指导体内基因治疗产品按照药品的研发规律和管理规范进行研究，参照《中华人民共和国药品管理法》、《药品注册管理办法》等相关法律法规制定本指导原则。本指导原则仅基于当前认知，对此类产品的药学研究提出科学性的建议和一般性的技术要求，相关技术要求对具体品种的

适用性应遵循具体问题具体分析的原则，产品研发过程中可基于科学考虑选用其他更有效的方法或技术，但必须符合药物研发的规律并具有充分合理的依据。

本指导原则主要针对产品申报上市阶段的药学研究制定，临床试验阶段的药学研究可根据各阶段的研发特点和研究目的，参考本指导原则开展与阶段相适应的研究。由于生物技术的发展迅速，尤其在产品设计、质量研究等方面，不同类型产品的药学研究不尽相同，随着技术的发展、认知的深入和经验的积累，本指导原则中的相关技术要求也将逐步进行修订和完善。

## 二、适用范围

本指导原则中的体内基因治疗产品是指进入人体后，在体内通过对人体细胞的遗传物质进行修饰、表达外源基因、操纵细胞基因表达或调控细胞生物学特性等方式以达到治疗疾病目的的药品。产品通常由含有工程化基因构建体的载体或递送系统组成，其活性成分通常为 DNA、RNA、基因改造的病毒等，部分细菌或真菌也可能被开发为载体应用于基因治疗。产品常见的作用机制如，转录和/或翻译外源目的基因、调节细胞内靶基因的表达水平、对靶细胞的遗传物质进行修饰等，部分产品的作用机制可能需要配合使用蛋白质成分，如各种基因编辑酶类，以发挥作用。

由于体内基因治疗产品组成复杂、多样，对于已有相对

成熟的技术指导原则覆盖的组成部分（如重组蛋白质成分），本指导原则将不再赘述，可参考相应的技术要求。部分溶瘤病毒产品在设计 and 作用机制上也可能具有基因治疗产品的特征，可适当参考本指导原则。考虑到生产工艺的差异，本指导原则主要涵盖基于生物技术制备的产品，可能不完全适用于通过化学合成工艺生产的核酸类产品，如反义寡核苷酸类产品及其衍生物。对于多组分或复合型产品，如核糖核蛋白复合物，应分别对各组分和组合产品进行药学研究，并符合相应的技术要求。例如，基于酶的基因编辑技术（如 CRISPR-Cas、TALEN、ZFN、Meganuclease 等）而研制的产品，其活性组分可能为 DNA、RNA（如 sgRNA）和/或蛋白质。根据工艺特点，化学合成的核酸组分（如 sgRNA）的药学研究在参考本指导原则的同时，还需参考化学合成产品相关的技术要求。蛋白质组分的药学研究应综合参考既往已发布的重组蛋白质类生物制品相关指导原则中的药学研究要求。此外，部分体内基因治疗产品可能需要配合特定的给药装置或作为药械组合产品使用，给药装置或药械组合产品中的器械部分建议参考医疗器械相关指导原则的要求。

### 三、一般原则

体内基因治疗产品的药学研究应符合《中华人民共和国药典》（以下简称《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。供人体使用的基因治疗产品的

生产应符合《药品生产质量管理规范》及其附录的相关要求。由于体内基因治疗产品的活性成分和作用机制特殊，产品的研发、生产、使用和废弃处理应同时符合生物安全相关法规的要求。

### 1. 产品设计、研发和生产的一般要求

体内基因治疗产品的药学研究需考虑各类产品的特殊性和研究阶段的适用性。研发过程中，鼓励基于“质量源于设计”的研发理念，探索生产用物料和生产工艺对产品质量的影响，建立产品质量属性与临床安全性、有效性的相关性，持续进行工艺优化和质量提高，建立全过程的质量控制体系 and 全生命周期的管理理念。

体内基因治疗产品的活性成分和作用机制特殊，例如，病毒载体复制特性的变化可能会引起病毒的非特异性感染和扩散，部分产品的基因修饰活性可使细胞的遗传物质或生物学特性发生不可逆的改变，因此，需严格论证产品设计、生产和质量控制等各个环节的合理性，在产品研发的过程中建立风险意识，基于风险制定相应的风险控制策略。载体的选择和设计需全面考虑载体的类型、复制特性、基因组整合特性、靶向特性和脱靶风险、规模放大、临床适应症、作用机制、用药方法和给药频率、免疫风险等，生产过程中严格控制外源因子污染的潜在风险，以及监测载体同源/非同源重组的潜在风险，基于质量研究和关键质量属性的鉴别建立完



善的质量控制策略。生产过程需做好生产人员的安全防护和环境安全控制，尤其是病毒载体类产品。生产线的清洗和消毒需经过充分验证，严格控制不同产品之间的交叉污染和同一产品批次间的残留污染。基于环境和生物安全评估制定原材料、中间产物及产品的废弃程序，避免活性物质在环境中扩散。

## 2. 一般研发规律

产品的研发和生产需遵循药物研发的一般规律，逐步完善并持续优化。由于各阶段产品的研究目的不同，不同阶段的研发和生产要求也各不相同。

申报临床试验阶段，产品的药学研究应能支持临床试验的开展。该阶段需根据前期研究，结合同类产品的使用情况，对产品的质量风险相关因素进行识别和控制，最大程度地降低产品在人体使用的安全性风险。例如，生产用细菌/病毒种子批和/或细胞库等的制备、检定，以及必要的稳定性评估和/或研究；生产用物料的安全性评估和质量控制；临床样品制备工艺的开发和确认，中间体控制的初步建立；代表性样品的质量研究和早期质量标准的建立；质量控制方法的开发和确认，包括安全性检测方法的建立与确认，活性分析方法的初步建立；支持临床试验开展的稳定性研究；容器密封系统的筛选和适用性评估等。非临床研究是评估产品在人体使用的安全性的重要参考依据，需要特别关注非临床研究用样品

与临床试验用样品在生产工艺和质量方面的对比或桥接分析，以支持临床试验用样品的安全性评估。

临床试验期间，基于工艺开发和对产品质量属性的理解，需逐步明确产品的生产工艺、关键工艺参数、生产过程中的控制项目和关键质量属性等，建立稳定的生产工艺和完善的质量控制体系。研发期间，产品生产工艺可能会随着工艺开发和优化发生变更。由于该类产品的创新性，产品的认知和研究积累在临床试验期间，尤其在早期临床试验阶段，可能较为有限，无法充分理解变更对产品质量、安全性和有效性的影响，变更计划的评估和实施应更为谨慎。各类变更方案的实施需建立在与研发阶段相适应的可比性研究的基础上，合理评估变更对产品质量特性的影响，必要时可能需要开展适当的非临床或临床试验桥接研究。

上市申请阶段，经过工艺开发最终确定的商业化生产工艺应能持续、稳定地生产出符合目标质量的产品，药学研究数据应能支持产品的安全、有效和质量可控性。同时，制定上市后生产工艺持续验证和优化的工作方案，以更好的保证产品质量。

#### **四、风险评估与控制**

体内基因治疗产品的特点和生产工艺各不相同，不同产品在生产用物料、生产工艺、质量控制、稳定性等方面存在的风险有较大的差异。研发可结合产品和工艺的特点，参考

ICH Q8 和 Q9 的质量风险管理理念,科学利用风险评估工具,基于具体品种具体分析的原则,对生产中的各类风险因素进行识别和评估,根据风险评估结果制定与产品研发阶段相适应的风险控制策略。另外,产品前期知识或同类产品既往使用的安全性数据也可为风险评估提供重要的参考。

常见的风险包括(但不限于)以下方面:

### 1. 生产用物料方面

(1) 生产用细胞内/外源因子的污染、细胞特性和遗传稳定性、细胞基因修饰情况、细胞的成瘤性、促瘤和致瘤性风险等。

(2) 生产用原材料的毒性、免疫原性和外源因子引入的风险;辅料,尤其是新型辅料、复合型辅料的人体使用安全性、免疫原性,辅料的相容性和稳定性;生产用耗材理化性质的稳定性,密闭性能和相容性等。

### 2. 活性成分方面

(1) 病毒载体毒种的历史传代和改造情况,载体类型和改造方法,载体的复制特性,基因组整合能力和整合倾向,病毒基因组的稳定性,感染和表达特性,同源和非同源重组的风险,免疫原性,致病性等。

(2) 核酸序列的正确性和稳定性,调控元件的调控特点,基因和调控元件的致瘤性,靶向特异性和组织表达特性,上靶/脱靶风险,基因组整合特点和整合突变、致瘤风险等。

(3) 细菌或真菌载体的质粒丢失, 抗性变化, 或生物学和遗传特性改变。

(4) 基因编辑工具的靶向特异性和编辑效率, 以及编辑工具相关杂质或降解产物对特异性的影响。

### 3. 生产工艺方面

(1) 生产工艺和过程控制, 工艺变更和工艺偏差, 过程中的污染和混淆风险。

(2) 产品生产与生产环境、人员等的相互影响。

### 4. 产品质量方面

(1) 质量属性表征或质量标准是否全面、充分, 对于尚无有效方法进行研究的的质量风险是否可控。

(2) 分析方法是否可以满足质量控制的需求。

(3) 生产过程中的质量监控, 如生产中发生基因重组和突变的风险的控制等。生产过程和贮存过程中的聚合、聚集、失活、降解、微生物污染、混淆等。

### 5. 容器密封系统方面

相容性相关风险 (如产品的吸附、包装材料的渗出等) 和密封性能相关风险。

根据全面的风险识别和评估结果, 制定合理的质量风险控制策略。控制策略的制定应以降低产品的风险为目的, 例如, 针对原材料的风险进行质量控制, 对生产工艺进行充分的表征和验证研究, 对质量控制方法进行全面验证, 建立从

原材料、生产过程到放行检测全过程的质量控制系统，基于质量研究制定合理的质量标准，根据稳定性研究确定产品的贮存、运输和使用条件，根据相容性和密封性研究选择适宜的内包装材料等。风险控制策略的修订应贯穿于产品的全生命周期，随着生产经验的积累和对产品质量属性的理解不断修订和完善。

## 五、产品设计的一般考虑

产品设计应基于患者的临床需求，充分考虑产品的预期作用机制、工艺性能、安全风险、有效性等多方面因素，同时还需要考虑产品在贮存、运输和临床给药中的安全性和便利性。由于不同类型产品的设计需要考虑的因素或存在较大差异，本部分主要针对当前主要的体内基因治疗产品类型（病毒载体类产品、核酸类产品、细菌载体类产品）提出产品设计需要考虑的一般因素以供参考，具体产品的设计仍需结合产品特点进行综合考虑。由于不同类型的产品在功能或作用机制方面可能具有一定的相似性，因此，产品在设计时可能需要交叉参考其他类型产品的考虑因素。随着基因治疗领域的发展和认知的丰富，产品设计时的考虑因素也将不断补充和完善。

### 1. 病毒载体类产品

本指导原则中的病毒载体类产品是指通过病毒载体将外源目的基因转移至人体内的基因治疗产品。其中，病毒载

体是指经改造用于介导外源基因转移和/或表达的病毒颗粒，常见如腺相关病毒载体、腺病毒载体、单纯疱疹病毒载体等。根据载体携带的核酸是否整合至靶细胞基因组，可分为整合型和非整合型病毒载体；根据载体的复制特性，可分为非复制型、条件复制型和复制型病毒载体。病毒载体和外源基因的选择、设计应根据载体特性、作用机制、人群抗体水平、临床适应症、给药途径和给药频率（即再治疗的潜在需要）等分析和研究确定。

### 1.1 目的基因和调控元件

目的基因是指产品中主要发挥治疗或调控作用的基因或核酸序列，可以 DNA 或 RNA 的形式存在，常见如功能蛋白的编码序列、具有靶向作用的核酸转录序列等。目的基因的选择和设计需考虑疾病的发病机制、产品的作用机制、人种间的序列差异，以及基因表达产物的免疫原性、功能活性和安全性等。由天然序列经密码子优化、基因突变、重组、插入、缺失和/或重排等修饰改造而来的目的基因，需有充分的改造依据，并通过体外和/或体内研究确认序列设计的合理性。通过平台计算或根据序列规则设计的发挥靶向结合作用的核酸序列，如 sgRNA、siRNA 等，需评估设计的合理性，并在开发过程中对序列的靶向特异性和上靶/脱靶风险进行评估和确认。

目的基因表达调控元件的选择和设计需根据目标细胞

的类型、基因表达的调控要求和元件的调控特点确定，评估调控元件对目的基因的表达水平、表达持续性、表达特异性（如适用）等方面的调控是否符合预期，关注调控元件的非预期调控风险，如：元件的远端调控功能，多个相同元件重组导致的基因敲除风险，调控元件的插入对细胞基因组基因的启动、增强、终止、绝缘调节影响等。设计时，需对调控元件的致瘤/促瘤性进行评估，避免使用具有潜在致瘤/促瘤风险的元件，若使用，应对相应元件进行改造以去除其致瘤/促瘤特性。若含有以瞬时或组织特异性的方式控制基因表达的调控元件，需对元件相应的调控特性进行确认。

## 1.2 病毒载体选择和设计的一般原则

病毒载体的选择和设计一般以有效递送和表达目的基因，降低载体的致病性，降低载体的重组和突变风险等为目的，常见的载体改造方法如删除、重组和/或替换病毒基因等。选择和设计病毒载体时，一般需考虑（但不限于）以下方面的因素：

（1）研究野毒株或载体病毒在人群中的基础感染率和中和抗体滴度水平，评估人体免疫反应对病毒载体的体内分布、转导效率和治疗效果的影响。

（2）尽可能删除安全风险相关的基因或组分，例如可能致病/致瘤的基因，否则，需要评估遗留基因/组分对产品安全性的影响。

(3) 最少化病毒载体的非必需元件，或对病毒的包装基因进行拆分，降低病毒载体发生重组和回复突变的几率（如复制缺陷型载体）。

(4) 最少化病毒载体与人体易感病毒或内源性病毒的同源序列，降低重组产生新型感染性病毒或复制型病毒的风险。

(5) 病毒载体的感染特异性/嗜性和基因转导效率对产品的安全性和有效性均有影响，病毒载体的组织或细胞嗜性应与适应症相符。

(6) 研究病毒载体基因序列的稳定性，评估序列突变的潜在安全性风险和对有效性的影响。

(7) 研究病毒载体的改造对其免疫原性、致病性和其他生物学特性的影响，评估对相关抗病毒疗法的敏感性是否发生变化，病毒载体是否可能具有生殖毒性。

### 1.3 病毒载体选择与设计的特殊考虑

#### 1.3.1 整合特性

整合型病毒载体相比非整合型病毒载体可能具有更高效的内基因表达活性，但整合过程可能会对人体细胞的基因组完整性或表达特性产生影响。因此，需根据产品需求进行选择。对于整合型载体，应尽可能采用当下已知的技术方法对载体进行安全性筛选和/或设计改造以降低插入风险，并在此基础上分析载体在基因组中的整合方式和整合位



点的分布趋势，评估其插入导致细胞发生基因突变、基因失活/激活，或细胞癌变的风险。

对于非整合型病毒载体，理论上其导致细胞基因组发生插入突变的风险相对较小，但仍需开展充分的研究，评估和/或确认载体的非整合特点。例如，对于 AAV（Adeno-associated virus）等一般认为具有非整合特征的载体，仍有在特定情下载体整合至基因组的报道，因此需要研究确认以控制风险。另外，由于载体的非整合性，目的基因游离于细胞基因组外，目的基因的表达时效易受载体基因稳定性的影响，且可能因靶细胞分裂而导致目的基因的稀释和丢失。因此，需要充分考虑载体的作用机制，整合风险，以及目的基因的表达时效等选择和设计病毒载体。

### 1.3.2 复制特性

非复制型病毒载体理论上在体内引起病毒扩散或感染失控的风险相对较小，但仍需要通过合理、可靠的检测方法对病毒载体的非复制性特征进行确认，同时考虑载体给药途径和嗜性对疗效的影响等因素综合选择和设计病毒载体。非复制型病毒载体的设计和生产病毒包装系统的选择应充分考虑生产和使用过程中通过同源或非同源重组产生复制型病毒的可能，针对出现可复制型病毒的潜在风险建立控制策略，如，对生产过程中适当阶段的样品或终产品进行可复制型病毒的检测等。

对于复制型或条件复制型病毒载体，因其复制特性可能引起非特异性感染、免疫应答、细胞溶解等效应，需结合载体特性、结构设计、安全性和预期作用机制等谨慎选用。此类载体在选择和设计时应重点考虑（但不限于）以下方面：

（1）结合作用机制和适应症分析病毒载体的体内复制能力的必要性。

（2）载体应避免包含任何已知的、具有人体致瘤性风险的元件。

（3）如果病毒载体进行了改造，需评估改造之后病毒载体的致病性、感染活性等方面的变化情况，并控制相关的安全性风险因素。

（4）病毒载体的组织/细胞的感染和/或复制特异性应与临床治疗机制相适应。必要时，需考虑设计增加载体的体内失活或清除机制。

### 1.3.3 靶向特性

病毒载体类产品的疗效和安全性，与病毒载体的感染特异性/嗜性和/或目的基因的表达特异性密切相关，因此，载体的选择和设计需考虑载体的组织/细胞嗜性，结合受体分布特点，以及目的基因表达调控的细胞特异性等因素。不同给药途径对病毒载体的靶向分布也有重要影响。开发过程应基于载体的选择和设计、体外生物学特性研究，以及非临床研究、临床试验等多个方面对载体的靶向特异性/嗜性、目的基因的

表达活性和表达调控（如适用）进行确证。

## 2. 核酸类产品

本指导原则中的核酸类产品是指具有特定功能的核酸活性成分通过物理或化学介导的方式进入人体细胞后，在细胞内经转录、剪切、翻译，或直接发挥作用的产品，产品常见的活性成分为 RNA 或 DNA。根据作用机制的不同，核酸类产品可以 mRNA、shRNA（Short hairpin RNA）、miRNA（Micro RNA）、质粒 DNA、微环 DNA（Minicircle DNA）等单一活性成分发挥作用，也可由 RNA、DNA 和蛋白质中的两种或两种以上成分组合形成功能系统发挥作用，如 CRISPR-Cas 系统。核酸类产品进入人体细胞往往需要借助一定的物理转导装置（如电转染）或化学递送辅助介质（如脂质体复合物、阳离子多聚物、阳离子多肽等）以提高核酸的转染效率，部分具有核酸运输功能的多肽、抗体、配体等也可协助核酸的转运。

核酸类产品的结构、目的基因和相关调控元件的设计应具有合理的科学依据，充分考虑各类核酸活性成分的特点和作用机制，使其符合预期功能。核酸类产品设计时，目的基因和调控元件的设计可参考病毒载体类产品“1.1 目的基因和调控元件”中的一般要求。此外，基于产品特点，可能还需考虑以下（包括但不限于）方面的因素：

（1）对于通过 shRNA、miRNA、CRISPR-Cas、锌指核

酸酶（ZFN）、TALEN 或 Meganuclease 等靶向结合目标基因序列或基因表达产物序列以发挥功能的产品，应考虑产品的靶向特异性和脱靶引起的安全性风险，降低目的基因序列与非目标序列的同源性，优化相关核酸酶结构，提高结合或编辑的特异性。

（2）对于 CRISPR-Cas、ZFN、TALEN 或 Meganuclease 等在细胞内通过对基因组进行编辑发挥作用的产品，应考虑基因组缺口或双链断裂引起的基因错误修复和基因组结构重排的风险。同时，需考虑编辑酶的作用持续时间，以及编辑酶残留对基因组稳定性和细胞毒性的影响。

（3）对于转座子等具有基因组整合特性的产品，应考虑产品的整合位点特异性或整合位点的分布趋势、基因整合的稳定性，以及整合引起的插入突变和致瘤性风险等，合理设计载体序列、转座酶/转座 DNA 的比例、转座基因数量、转座酶表达持续时间及表达调控元件等。

（4）对于 mRNA 类蛋白质编码序列，应考虑 5'-帽或类似物结构的类型和设计、poly A 尾的序列和长度及长度分布、翻译调控元件、核苷修饰类型、序列自我复制能力、递送系统等对产品的免疫原性、表达活性和载体稳定性的影响。

（5）核酸类型和结构与其体内的表达持续时间是否相适应，核酸的自我复制（Self-amplifying）功能和基因持续表达的必要性和安全风险，产品的基因组整合功能和对靶细胞

基因组进行基因修饰的功能的必要性。

(6) 产品的核酸结构和序列的稳定性、基因毒性和免疫原性。

(7) 核酸序列中应避免含有致瘤性基因。如有可能，应尽可能去除非必需元件和筛选用基因（如抗生素抗性基因）。

(8) 化学递送辅助介质的化学稳定性、人体安全性、转染效率，以及递送介质之间、递送复合物的相容性。如有可能，可考虑通过递送辅助介质的设计和筛选，增强产品体内的靶向性/嗜性，或降低免疫原性。

### 3. 细菌载体类产品

本指导原则中的细菌载体类产品是指经基因修饰后作为载体，用于在人体内表达目的蛋白或特定核酸序列的细菌微生物，如沙门氏菌、李斯特菌、大肠杆菌等细菌改造所得的产品。细菌载体的构建一般基于野生菌株的结构和生物学特性，通过转入质粒、游离型载体（Episomal vector），或对菌株的基因组进行修饰而完成。细菌载体的改造应基于合理的科学依据和产品作用机制，以降低或去除微生物的致病性，实现或增强载体的治疗功能为目标。载体的设计和构建应关注改造后细菌载体的遗传特性、生物学特性、致病性、目的基因表达活性、载体的体内分布特性、对人体正常菌群的影响、环境安全性、基因的水平转移，以及对常规治疗方法的敏感性等方面的变化情况。细菌载体的改造应避免使用  $\beta$ -内

酰胺类抗生素抗性基因。外源目的基因的设计可参考病毒类产品“1.1 目的基因和调控元件”中的一般要求。

## 六、生产用物料

本指导原则中的生产用物料是指生产过程中所使用的所有生物材料和化学材料，包括起始原材料（如细胞基质、细菌、毒种、质粒等）、生产过程中使用或添加的物料（如培养基及其添加成分、工具酶、纯化填料、缓冲液等）、辅料，以及生产用耗材（如培养袋、储液袋、移液管路、滤膜等）等。生产用物料与产品的质量、安全性和有效性密切相关，应通过风险评估选择适合产品特点且供应稳定的物料。规范建立生产用物料的质量管理体系，包括风险评估、供应商审核、风险和质量控制等，保障产品质量，降低生产用物料相关的质量风险。

### 1. 起始原材料

体内基因治疗产品类型不同，生产起始原材料或存在一定差异，常见的起始原材料包括质粒 DNA、细菌种子批、病毒种子批、产毒细胞株/库等。起始原材料应有清晰的来源和完整的溯源信息，一般应按照《中国药典》的要求进行建库管理。起始原材料的质量控制应根据其类型、特性、历史溯源信息、制备过程，以及产品的类型、生产工艺、给药途径等方面的风险确定，质量控制应与其风险相适应。

#### 1.1 质粒 DNA

体内基因治疗产品生产用的质粒 DNA，可瞬时转染用于生产病毒载体，体外转录用于 RNA 核酸产品生产，或经转染/转化用于细菌种子、病毒种子和细胞系的构建。各类质粒 DNA 的结构、基因和元件设计应符合前述的一般原则和预期用途，构建所用的原始质粒的来源和序列应明确，构建过程中应对各步构建结果进行确认。质粒序列，尤其是作为终产品活性组分的序列中，应不含具有潜在致癌风险的基因或元件，如有必要，应对此类基因/元件进行替换或改造。为避免抗生素滥用和由抗生素残留引起的过敏风险，建议避免选用  $\beta$ -内酰胺类抗生素抗性基因作为质粒的筛选基因。

除细菌种子批、病毒种子批或细胞系构建过程中一次性使用的质粒外，起始原材料质粒 DNA 应基于细菌种子批系统，采用经验证的发酵和纯化工艺制备，质粒生产规模应与后续生产步骤的规模相适应。质粒 DNA 的质量标准一般包括质粒鉴别、含量、纯度、完整质粒或重要基因序列的确认、超螺旋比例、无菌、细菌内毒素、抗生素残留（如适用）、一般理化性质（如 pH 值等）、工艺相关杂质（如宿主菌 DNA 残留、宿主菌 RNA 残留、宿主细菌蛋白质残留等）等，具体项目应根据质粒的制备工艺和用途分析确定。每批质粒通过放行检测方能用于产品生产。质粒的贮存稳定性应能支持后续生产步骤的生产。

细菌种子、病毒种子或细胞系构建过程中一次性使用的

质粒，可不通过细菌种子批系统制备，但应对质粒序列进行确认，同时避免污染风险。

瞬时转染用于病毒载体包装的质粒，应考虑前述病毒载体设计的一般要求。为了降低病毒生产和使用过程中重组产生可复制型或假野生型病毒的风险，建议优先选择经验证具有较高安全等级的病毒包装系统，将病毒包装必需元件适当拆分至不同的质粒中，尽量去除非必需的病毒基因，降低质粒之间，质粒与包装细胞及野生病毒序列之间的同源性。例如，AAV 包装系统构建时，将 AAV 的结构基因分离于不同质粒的转录单元中，并尽可能降低 Rep/Cap 基因序列和 ITR 等序列之间的相似性等。

## 1.2 细菌种子批

细菌种子批可用于核酸类基因治疗产品（如质粒 DNA、minicircle DNA、mRNA 等）生产，也可能经培养后作为细菌载体类基因治疗产品。菌种的来源应明确，细菌种子批的制备过程应清晰、完整，制备过程应尽量避免使用人源或动物源性原材料，并对种子批的单克隆性进行确认。

细菌种子批的制备和检定应符合《中国药典》通则“生物制品生产检定用菌毒种管理及质量控制”和“人用基因治疗制品总论”的要求，种子批的检定一般包括菌落形态、鉴别、染色镜检、生长特性、生化反应特征、活率、抗生素抗性、电镜检查、质粒测序、限制性酶切图谱、转基因的表达和/或



活性分析（如适用）等，细菌种子批应无其他细菌、真菌、噬菌体等污染。经基因修饰的细菌载体应关注修饰后细菌的表型和基因型，对基因组或基因组的重要区域（如引入的治疗基因和调控元件，以及目的基因侧翼至少 0.5kb 内的区域）进行测序确认，对改造基因的插入位点、基因拷贝数等进行分析，必要时检测目的基因的表达水平和功能活性。对于经减毒改造的细菌载体，应鉴定其减毒的特性和稳定性，并检测其抗生素敏感性的变化。质粒等生产用的细菌种子批或含有质粒、附加体的细菌载体种子批，应对含有的质粒或附加体序列进行确认。

考虑传代过程中细菌的生长特性、基因组整合或修饰基因、目的基因的表达和活性、质粒序列、质粒拷贝数和质粒丢失比例的变化，需用模拟或代表实际生产工艺的条件开展传代稳定性研究，种子批的遗传和表型特征应能满足生产需求。

细菌种子批的贮存稳定性应能满足生产需求。

### 1.3 生产/包装细胞库

生产/包装细胞库用于病毒包装和生产，可影响病毒载体的质量和产量，可能存在引入外源因子的风险，细胞培养残留的细胞蛋白质、DNA 等杂质具有一定的免疫原性，部分细胞的裂解产物或 DNA 可能还存在一定的致瘤性风险。另外，体内基因治疗产品开发中可能适用的生产/包装细胞类型较

多，如具有或不具有成瘤特性的传代细胞株/系、昆虫细胞系等，不同细胞可能存在不同类型的风险。基于以上原因，应优先选择来源明确，培养历史清晰，且无病毒污染的细胞基质用于病毒包装和生产。若使用含有内源性病毒的细胞基质，应评估其使用的必要性和安全性，如，内源病毒的人体感染活性、免疫原性、工艺残留水平、病毒基因表达活性等，必要时应在工艺中增加经验证的病毒去除/灭活工艺单元，并在适当的阶段对病毒的残留和活性进行检测。对于成瘤性或致瘤性风险未知的细胞，尤其是新型细胞基质和新建细胞株/系，需参考《中国药典》的相关要求评估生产/包装细胞的相应风险，必要时开展相应的研究。由于肿瘤细胞系的成瘤或致瘤风险相对较高，建议谨慎选用。如使用具有成瘤性的细胞，需结合临床风险获益、给药途径和生产工艺的杂质去除性能（如活细胞残留、致瘤基因片段的残留等）等评估其使用的必要性、合理性和安全性，分析细胞中是否携带具有致瘤风险的基因或其他因子，必要时应对其残留水平和基因片段大小进行控制。一般不建议使用具有致瘤性的细胞。另外，需通过生产过程控制和/或产品放行对完整细胞，尤其是成瘤性细胞的残留水平进行控制。

为了保证产品质量的稳定性，生产/包装细胞需进行建库管理，细胞库的制备和检定应符合《中国药典》通则“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”的相关要求。

细胞库的检定一般包括：细胞鉴别、细胞数量、活率、基因型和表型（如适用）、生长特性（如适用）、外源因子等，对于成瘤特性不明的细胞，建议进行成瘤性检查。外源因子检测一般包括无菌、支原体、螺原体（昆虫细胞，或生产过程中使用了植物源性成分）、外源病毒因子等。外源病毒因子的检测可按照药典要求，结合细胞改造特点进行风险评估后确定，一般应包含非特异性病毒、逆转录病毒、细胞种属特异性病毒，以及细胞建株或细胞库构建培养过程可能引入的潜在外源病毒因子。细胞培养历史或培养过程中如使用了牛血清、猪胰酶等动物来源的原材料，应进行牛源性、猪源性等相关动物种属相关病毒的检测。

基于生产的需要，若对细胞基质进行了遗传修饰，如组成性表达病毒包装蛋白或复制辅助因子等，应考虑基因修饰的必要性和修饰方法的适用性，修饰过程不应增加外源因子引入的风险，修饰基因的选择应尽量避免或降低病毒包装过程发生重组的风险。例如，腺病毒等非复制型或条件复制型病毒载体应使用不含同源序列或同源序列较少的细胞系用于病毒载体生产，降低生产/包装过程中的重组风险。对于经基因修饰建立的稳定传代细胞株/系，细胞库的表征研究中还应对基因修饰的结果，如基因序列、修饰位点、拷贝数、表达水平等进行确认。

为了确认限定代次内的生产/包装细胞能生产出质量稳

定的病毒载体，需在模拟或代表实际生产工艺条件下开展细胞传代稳定性研究，根据研究结果确定细胞库的生产限传代次。限传代次内的细胞应不影响包装病毒的遗传和表型特征，能支持病毒的生产。对于新型细胞基质或新建细胞株/系，需关注其传代过程中成瘤性的变化，必要时还需对其致瘤性进行研究；经基因修饰的稳定传代细胞株/系，需关注传代过程中病毒包装基因的序列和拷贝数是否稳定，病毒包装产物质量是否均一且满足质量要求。

#### 1.4 病毒种子批

生产用的病毒可能包括病毒载体种子和/或包装用病毒，其来源、培养历史、构建过程应清晰、完整，病毒特性需满足生产的需求，且经评估其安全性风险应可控。对于培养历史不清晰，存在其他非目的病毒污染风险，或毒株单克隆性无法保证的病毒种子，建议谨慎选用。如需使用，可在构建过程中采用多轮噬斑纯化、有限稀释纯化，或通过 DNA/RNA 拯救等方式，以确保毒株的纯度和单克隆性。

病毒载体种子和包装用病毒等可建库的病毒种子应建库管理，以减少产品的批间差异。病毒种子批的质量控制应符合《中国药典》“人用基因治疗制品总论”的要求，检验项目应根据种子批的特征、培养历史、建库过程等具体确定，一般包括鉴别（基因组和免疫血清学特征）、病毒滴度、目的基因序列的转录/表达（如适用）、目的基因序列表达产物的

生物学活性（如适用）、病毒载体外源因子污染（如细菌、真菌、支原体、外源病毒等）、复制型病毒（载体为非复制型或条件复制型）等。另外，需要关注种子批历史传代和构建过程中可能引入的特定外源因子，如昆虫包装细胞可能引入的螺原体、弹状病毒等种属特异的外源因子。病毒载体的基因组序列应与理论序列一致，如有差异，需分析突变的来源和病毒基因组的稳定性，以及突变对产品质量、安全性和有效性的影响。

病毒种子批的传代稳定性研究应能代表或模拟实际生产的工艺条件，关注病毒种子批的遗传稳定性、目的基因的表达特性、复制特性和产品质量变化等，根据传代稳定性研究结果合理拟定病毒种子批的生产限传代次。开展病毒种子批的贮存稳定性研究，病毒种子批的贮存应能满足生产需求。

## 2. 其他生产用物料

其他生产用物料是指除起始原材料外，其他在生产中使用的原材料（如工具酶、抗生素、培养基、去污剂、纯化试剂等）、辅料和耗材等。

生产过程中所使用的原材料应符合《中国药典》通则“生物制品生产用原材料及辅料质量控制”的相关要求，原材料的质量应符合其预期用途，关键性原材料建议优先选用药品监管机构批准的产品或药用级别的原材料。原材料的选用应经过充分的评估，其来源、组分、功能、质量、使用阶段、用

量等情况应明确，尽量不使用非必需的原材料，降低原材料残留和引入外源因子的风险。全面审核原材料生产相关的风险因素以及原材料生产商对相应风险的控制，根据风险评估建立合理的内控标准。如有可能，应避免选用血清、猪胰蛋白酶等动物或人来源的原材料，尽量以成分明确的血清替代物或重组制品替代。若经研究认为必须使用，应采取必要的风险控制措施（如  $\gamma$  射线辐照处理等），并针对原材料的物种来源、生产地区、生产工艺、质量标准等建立完整的质控体系，评估其 TSE/BSE 安全性风险。严禁使用海绵状脑病流行疫区来源的易感动物制备的原材料，不得使用未经过安全性检验的血清/血浆。评估生产用试剂的安全性，避免使用  $\beta$ -内酰胺类抗生素、链霉素，以及其它如溴乙锭等有毒有害试剂。如在生产中使用了有毒、有害的原材料，应证明下游的纯化工艺能将其良好的清除，或进行使用警示。

辅料相关要求请见“七、生产工艺”项下“1.2.2 辅料”部分。

生产过程中使用的耗材和容器，如一次性反应袋、移液管路、储液袋、滤膜等，应具有稳定的物理和化学特性，耗材与直接接触的溶液、生产中间产物等应有良好的相容性。根据耗材的材质、使用阶段、供应商研究等因素对耗材、容器的相容性进行评估或研究。

## 七、生产工艺

### 1. 生产工艺开发

生产工艺一般是指从细胞或细菌微生物的培养/发酵、纯化到终产品分装、贮存的全过程。由于产品类型不同，不同产品的生产工艺可能存在较大的差异，如质粒、病毒载体类产品，生产工艺中可能涉及诱导表达、质粒转染、病毒感染等操作，RNA 等部分核酸类产品，也可能采用非细胞体系的体外转录工艺用于生产。

生产工艺的开发应基于对目标产品质量概况的理解，结合生产工艺与产品质量之间的相关性，通过工艺研究，逐步完善工艺，完成从实验室到商业化规模生产的开发过程，最终明确工艺步骤和关键工艺参数。若采用缩小模型用于工艺研究，应对缩小模型的代表性进行确认，以支持其研究结果能充分代表实际生产工艺。如可行，建议尽量采用密闭式的生产工艺，减少生产过程中的环境暴露和储存环节。生产过程如存在中间产物的暂存，应对暂存条件和暂存时限进行研究和验证。基于风险分析，建立全过程的控制策略，合理设定生产过程中的控制，尤其是生产过程中外源因子的污染和关键中间产物的质量控制。生命周期中，生产工艺应随着工艺技术的进步和对产品理解的深入不断优化，针对工艺变更进行相应的可比性研究，以保证产品质量。

#### 1.1 原液工艺开发

### 1.1.1 发酵/培养工艺

起始于细菌种子批发酵或生产/包装细胞培养的生产工艺，发酵/培养过程可直接影响产品的质量。基于对产品质量属性的理解，需要对发酵/培养条件，如发酵/培养的规模和模式、培养基及添加成分、培养温度、pH 值、渗透压、搅拌速度、 $p\text{CO}_2$ 、溶氧量、培养时间、接种条件、转染/感染条件、收获时间等进行充分的研究，制定适合生产的条件和参数。例如，病毒载体包装工艺的开发应考虑提高载体的包装效率和包装准确性，减少空载体、错误包装载体、无活性载体、游离核酸等产品相关杂质的形成；质粒 DNA、微环 DNA 等核酸产品，应考虑核酸的序列正确性、结构完整性、重组效率（如微环 DNA 等）及构象等。发酵/培养过程中应避免引入不必要的工艺相关杂质，在适当的步骤对杂质和/或外源因子进行检测。对于病毒载体的包装生产，一般建议对未处理的培养收获液的外源因子污染进行检测。在病毒种子或收获液的外源因子检查因产品病毒不能被充分中和而受到干扰的情况下，可在生产中设置对照细胞，用对照细胞进行外源因子检查。对于非复制型或条件复制型病毒载体，应在适当的工艺阶段采用敏感的方法对可复制型病毒进行监测。

### 1.1.2 体外转录工艺

mRNA 等通过体外转录方式制备的核酸产品，可通过对原材料、转录模板和转录条件的研究，控制转录产物的质量。



转录用的重要原材料，如核苷酸、修饰核苷酸、5'-帽或类似物、工具酶（如转录酶等）等应进行适当的质量控制，可关注其纯度和杂质，转录酶还需关注其保真度等。转录模板的制备应能确保模板的序列准确性和纯度，减少杂质残留。体外转录条件应经过充分的研究，提高转录序列的准确性、均一性和完整性，减少副反应产物，如不完整 RNA、双链 RNA、截短 RNA、长链 RNA 等的形成。

### 1.1.3 纯化工艺

纯化工艺应根据产品类型、上游工艺和潜在的杂质情况而确定，在不影响产品完整性和活性的同时，应能稳定去除或降低工艺和产品相关杂质。培养阶段若使用了辅助病毒、包装用病毒，或具有其他潜在的病毒污染风险，应根据目标产物与非目标病毒之间的理化性质差异，在纯化过程中增加必要的病毒去除/灭活工艺步骤，如去污剂灭活、低 pH 灭活或除病毒过滤等工艺单元，控制非目标病毒残留的安全性风险。纯化过程中，可考虑在关键步骤对外源因子污染和产品质量进行监测。

## 1.2 制剂工艺开发

### 1.2.1 制剂处方

剂型的选择需考虑产品贮存和运输的稳定性，临床用药的便利性和安全性等多方面因素，在可达到临床治疗目的的前提下，尽量设计和选用易于贮存、运输和使用的剂型。制

剂处方的设计需与剂型相适应，应能有效维持产品的功能活性和稳定性，满足临床用药需求。部分产品由于稳定性较差，需要采用低温、冷冻或冻干等条件进行贮存，制剂处方中往往需要添加冷冻保护剂、冻干保护剂、活性保护剂等具有特定功能的辅料成分。在保证产品活性和稳定性的前提下，处方的设计和筛选应尽量选择结构简单、组分明确、质量可控、安全性风险较小的处方辅料。辅料的选择依据应充分，作用应明确，用量应合理，并有相应的研究数据支持。尽量避免选用毒性高，安全性风险大的辅料。

### 1.2.2 辅料

辅料是指产品配方中使用的辅助材料，如稳定剂、缓冲体系等，其选择、用量和质量标准应基于制剂的处方开发确定。辅料质量应满足其预期功能，并符合《中国药典》通则“生物制品生产用原材料及辅料质量控制”的相关要求，优先选用符合药用标准的辅料。如使用多种来源（如动物、植物与合成来源）或多个供应商的辅料，尤其是脂质体等复杂的辅料，应按照来源和辅料变更风险分别开展相应的产品特性检定和可比性研究，以证明采用不同来源辅料所生产的产品具有等效性。

处方中若含有在人体内首次使用或在拟定给药途径中首次使用的新型辅料，应根据辅料生产相关的风险因素系统评价辅料的安全性并制定相应的质量标准。在缺乏人体安全

性研究数据支持的情况下，需参照《新药用辅料非临床安全性评价指导原则》进行研究。

核酸类产品常需配合使用一定的化学递送材料/介质以促进或提高核酸的转染效率，常见如纳米粒子、脂质体、阳离子聚合物等。由于辅助递送材料/介质与常规辅料不同，在核酸类产品的体内递送过程中具有保护、转染和/或胞内释放等辅助作用，可认为其属于功能性辅料。递送材料/介质的选择需要有合理的依据，对材料/介质本身一般应考虑材料/介质的生产工艺、质量控制、人体安全性、材料/介质的稳定性等，对递送材料/介质与核酸组成的递送系统，还需考虑系统的核酸保护作用、递送效率、胞内核酸释放功能、递送系统的稳定性，以及递送系统的工艺稳定性和质量变化等。对于多组分递送系统，应对系统各组分分别进行质量控制和安全性评估，同时对系统组分之间的相互作用和系统的稳定性进行研究，确定其是否符合预期功能。

### 1.2.3 制剂生产工艺

制剂生产工艺需结合产品特点、制剂处方、剂型等研究确定，规模应与原液生产规模相匹配，尽量避免生产过程中混合批次的操作。如确需混合，应对混合工艺进行充分验证，各混合批次需按照规定的工艺生产并符合拟定标准。开发过程中可能需要关注处方的配制方式、工艺操作时间、灌装准确度、无菌条件的控制等，冻干等特殊剂型还应对制剂的冻

干曲线进行研究。

对于 mRNA 等核酸产品，核酸与递送材料/介质的复合/包封过程可能需要关注温度、投料比、溶液浓度、搅拌速率、缓存体系、混合流速和混合顺序等对递送系统质量有重要影响的工艺参数，关注复合/包封过程和纯化步骤对复合/包封率、颗粒形态、颗粒聚集/解散、核酸泄露、杂质残留、核酸完整性和稳定性等的影响，合理设定过程中的控制项目。

### 1.3 工艺开发过程中的优化与变更

生产工艺可能会随着工艺的开发发生变更，如生产场地的变化、设备的改变、原材料的替换、工艺的优化、规模的扩大、质量控制策略的调整等，变更的实施应基于充分的可比性研究。可比性研究可参考 ICH Q5E 的一般原则，基于变更的风险评估建立可比性研究方案或桥接计划。风险评估中，应考虑产品的研发阶段、变更的类型、变更涉及的工艺等对产品质量的影响。早期临床试验阶段，由于生产工艺尚未最终确定，批次数量较少，工艺变更可基于有限批次的研究数据进行可比性研究，但应关注安全性、纯度、杂质、结构、含量等相关质量属性的变化；随着批次数据的积累和对产品工艺、质量理解的深入，变更的实施应基于更全面和严格的可比性研究。根据变更类型的不同，药学对比可能包括工艺和过程中控制、放行检测、拓展的质量研究、稳定性等多个方面。对比研究的批次应根据变更的类型、质量属性的重要

性和变异度、数据分析方法和研发阶段确定。一般认为，风险/影响较高的变更需要在过程控制、表征研究、放行检测和稳定性等方面进行更全面和更多批次数据的统计分析。在产品属性非完全可比的情况下，应对研究中观察到的质量差异进行评估。当现有认知或平台经验无法预测质量属性的差异对产品安全性和/或有效性的影响，或产品质量变化预期可能会对产品安全性和/或有效性产生不利影响时，应考虑进一步增加非临床和/或人体的桥接研究数据。

由于目前基因治疗产品的认知和应用经验较为有限，一般不建议在确证性临床试验开展阶段或结束后对生产工艺进行重大变更，此阶段的变更可能会增加可比性研究的复杂性和结果的不确定性，甚至会影响临床试验数据的可接受性。产品开发过程中，应注意做好阶段性或代表性工艺样品的留样工作，以便于后期的回顾分析或可比性研究。

## 2. 生产工艺的确认与验证

工艺开发过程中，根据阶段性研究目的不同，需要开展与阶段相适应的生产工艺确认或验证研究。临床试验申请阶段，应对临床研究用样品的生产工艺进行确认，同时做好生产过程中的风险控制，如外源因子的污染、交叉污染、产品混淆等。商业化生产工艺确定后，应在上市前采用代表性的商业化生产工艺进行规范的工艺验证。验证研究的内容应根据产品的生产工艺和风险分析确定，一般包括细胞培养、转

导/转染、体外转录、纯化、制剂等所有工艺步骤。验证研究的批次数与工艺的复杂性、变异度，以及前期工艺研究的充分性、平台经验等有关，一般不少于三批，如有其他特殊情况，建议提前与监管机构开展沟通交流。验证研究应关注各步工艺的可控性、中间产物的质量和工艺性能的稳定性的，针对验证过程中出现的偏差，开展偏差调查，并根据调查结果制定纠正方案。此外，验证研究可能还包括（但不限于）生产工艺的无菌验证、滤器除菌验证、填料和膜包的使用寿命研究、运输验证、清洁验证、设施和设备验证等，生产过程中若存在中间产物的暂存，还应对中间产物的暂存条件和时限进行研究。验证研究的结果应能证明工艺的稳定性、控制性、过程中控制项目设定的合理性。上市后，应在商业化生产过程中开展持续的验证研究。

对于病毒载体等基因治疗产品，若工艺中存在病毒去除/灭活单元，可适当参考 ICH Q5A，对工艺的病毒去除/灭活效果进行验证，根据验证研究结果进行安全性评估。验证研究应能证明，工艺能有效去除或灭活生产过程中使用的包装用病毒、内源性病毒等非目标病毒，同时，目标病毒载体的活性和结构等特性不会受到非预期影响。

## **八、质量研究与质量标准**

### **1. 质量研究**

质量研究贯穿于产品的生命周期，随着认知的深入和分

析技术的发展不断补充和完善。根据研发的阶段或研究目的的不同，质量研究可选择相应工艺生产的代表性批次（如非临床研究批次、中试工艺批次、临床样品批次或商业化工工艺验证批次等）和适当生产步骤的样品（如起始原材料、生产中间品、原液、制剂等）进行研究。上市申请阶段，质量研究一般应至少包含代表性临床样品批次和商业化工工艺验证批次。原液和制剂之间若存在质量特性的差异，应分别取样进行分析。对于与化学递送材料/介质结合形成的核酸复合物，应对核酸、复合物组分和完整复合物分别进行研究。

通过全面的质量研究确认产品的关键质量属性（Critical quality attributes, CQA）。质量研究一般选择先进、成熟且灵敏度满足分析需求的方法。由于分析方法本身可能存在的局限性，可考虑同时采用原理互补的不同方法进行研究。具体研究项目应根据产品的类型、作用机制和生产工艺确定，常见的质量研究项目包括（但不限于）：鉴别、结构分析、生物学活性、纯度、杂质、含量、转染/感染效率、一般理化特性等。

### 1.1 鉴别和结构分析

对于病毒载体类产品，可分别从基因组、结构蛋白和完整病毒颗粒等不同水平对载体进行鉴别和结构研究。基因组水平可采用测序、限制性内切酶酶切图谱、PCR 扩增特异性片段等方法对病毒的基因组、目的基因和相关的调控序列进

行确认。研究中若观察到碱基或序列的突变，应对突变的原因进行分析，同时结合突变位点对基因功能的影响，以及病毒载体的遗传稳定性特点评估突变对产品安全性和有效性的影响。结构蛋白和病毒颗粒水平，可通过衣壳蛋白的分离鉴定、免疫印迹、病毒颗粒的血清型鉴别、镜下结构、颗粒大小分布、折光度等方法对结构蛋白的表达和病毒颗粒的组装进行确认。对于部分结构复杂或分析方法有限的病毒载体，可考虑结合病毒载体的表型、活性，以及病毒载体感染靶细胞后的基因序列分析等，综合进行病毒的鉴别和结构分析。

对于核酸类产品，需要对核酸序列的正确性和结构的完整性进行确认。核酸若存在单/双链、线性、环状、超螺旋等多种拓扑异构体，应对各组分进行鉴别和比例分析。部分核酸产品的功能活性可能与核酸的二级或高级结构相关，如局部的发夹结构等，建议对此类结构进行研究。对于 mRNA 等的结构和修饰，如核苷酸修饰、加帽修饰、PolyA 尾等，应分别进行鉴别和确认。

对于核酸与化学递送材料/介质结合形成的递送复合物，建议对核酸分子、递送复合物的结构，以及核酸和递送复合物之间的相互作用进行研究。例如，复合物的研究可包括如等电点、结构形态、粒径及分布、表面电荷、复合物组分比例、核酸复合/包封率、颗粒聚集、核酸释放、特定环境中的稳定性等，另外，还应对所用的脂质等递送材料/介质进行鉴



别和含量研究。

对于细菌载体类产品，建议对菌株的染色特性、镜下形态、菌落形态、培养特性等表型和生化特性进行研究，采用测序、PCR、限制性酶切分析等方法对菌株的基因组和/或负载质粒、附加体的序列，尤其是特征序列和工程改造序列进行确认，对质粒大小、拷贝数、质粒丢失率、外源目的基因的突变等进行检测。

## 1.2 生物学活性

生物学活性是反映产品质量和临床有效性的重要指标。上市阶段，需建立与产品体内作用机制相同或相关的生物学活性分析方法用于产品的功能活性研究。产品若存在多种可能的作用机制，应分别对相应的活性进行研究，根据活性与产品作用机制的相关性，确定一项或多项适宜的活性检测方法作为质量控制项目。不同功能活性之间若存在步骤或功能的相关性/承接性，应尽可能在方法中进行整体体现，如产品的转染/感染活性与产品在细胞内的基因替代、补偿、阻断、修正作用的相关性。对于含有多种活性成分的产品，应分别建立方法对各成分的活性进行研究，同时考虑活性成分之间可能存在的干扰、协同等相互作用。方法学体系应尽量模拟产品的体内作用条件，选择与体内过程相同或相关的细胞类型，分析产品的转染/感染效率、基因表达/抑制水平、表达产物的活性，以及其他与载体或递送系统作用机制相关的因素。

对于部分具有选择性递送特性的产品，应对产品的组织/细胞的嗜性、感染特异性，或基因表达的选择性进行研究。活性分析方法应考虑建立适当的活性对照品。

### 1.3 纯度、杂质和污染物

#### 1.3.1 产品相关杂质

产品相关杂质是指生产或储存过程中产生的非预期的、非功能形式的产物。病毒载体类产品潜在的产品相关杂质一般包括非完整包装病毒（如空壳病毒颗粒、非包膜病毒颗粒等）、错误包装病毒颗粒、杂合病毒（Hybrid virus）颗粒、无活性病毒颗粒、病毒颗粒聚集体、游离病毒基因组等；核酸类产品常见的产品相关杂质如，酶切和重组相关序列、编码错误序列、不完整序列、降解片段、结构异常和错误修饰序列，以及脂质体组合过程产生的相关杂质等；细菌载体类产品的产品相关杂质可能为非单克隆性菌株，质粒、改造基因丢失/重排等。

为控制产品质量，建议对各类产品相关杂质进行分离和鉴定，评估其安全性风险，根据评估结果考虑杂质残留的控制策略。杂质分析中，可根据目标产物与产品相关杂质在理化特性方面的差异，选择适当的方法对各组分进行分离，必要时可能需要结合多种原理的检测方法对产品的组分进行分离和表征研究。检测结果可以绝对纯度和/或相对纯度的形式表示，如阴离子交换 HPLC 纯度、紫外分光光度法纯度、

凝胶电泳纯度、SEC-MALS、病毒载体感染性颗粒的比率等。产品在生产和储存过程中可能会产生多种非预期的变异体，应对检测发现的变异体进行鉴别和分析，参考 ICH Q6B 的理念，根据变异体与目标产物在功能活性、安全性方面的差异，考虑将变异体作为产品相关物质或产品相关杂质进行控制。

对于非复制型或条件复制型病毒载体，应选择最适宜的样品，采用敏感的分析方法检测工艺过程中产生的可复制型或野生型病毒。根据可复制型病毒的种类、残留风险、工艺可控性、临床给药剂量等设定合理的残留标准限度，如腺病毒相关的基因治疗产品，一般建议将可复制型腺病毒（Replication-Competent Adenovirus, RCA）控制在  $1 \text{ RCA}/3 \times 10^{10} \text{ VP}$ （Viral particles）以内。慢病毒和逆转录病毒等具有较大安全性风险的产品，不应检出可复制型病毒。

### 1.3.2 工艺相关杂质

工艺相关杂质主要由生产工艺引入，常见如宿主细胞蛋白、宿主细胞 DNA、宿主细胞 RNA、包装质粒、包装用病毒、生产用试剂（如培养基、DNA 模板、工具酶、纯化试剂和填料等），以及设备和耗材如生产管线、包装、容器的浸出物等，应对生产工艺的杂质清除性能和杂质的残留水平进行研究，评估杂质残留的安全性风险，必要时将具有潜在安全性风险的杂质残留纳入产品质量标准进行控制。

生产过程中如使用了包装用病毒，应对包装用病毒的残

留水平、感染活性、复制能力和/或表达活性进行分析，并评估其残留安全性，根据评估结果制定相应的控制策略。生产若使用了肿瘤细胞系（如 HeLa 细胞）、致瘤细胞系，或携带有致瘤基因、病毒来源序列的细胞（如 HEK 293T 细胞），在确保无完整活细胞残留的同时，需对 DNA 的残留量和残留片段大小进行控制，合理拟定标准限度。如有可能，建议尽量将残留 DNA 控制在 10ng/剂以内，DNA 残留片段的大小控制在 200bp 以下。对于产品中已知的、具有潜在安全性风险的特定转化序列，如 HEK 293T 细胞携带的 Adv E1A 序列、SV40 大 T 抗原序列，HeLa 细胞携带的 HPV（Human Papilloma virus）E6/E7 基因等，应分别进行残留控制。对于 AAV 等易于将非载体 DNA 包装入病毒颗粒的病毒载体，在选择包装细胞、辅助病毒和包装质粒时应考虑相关外源 DNA 包装入病毒颗粒的潜在风险。

对于新型或复杂递送系统，脂质体等聚合物辅料的制备工艺相关的杂质，以及聚合物降解产生的杂质，也应纳入杂质的考虑范围。

### 1.3.3 污染物

污染物一般是指生产过程中引入的微生物或相关组分，如细菌、真菌、支原体、外源性病毒、细菌内毒素等，需对其污染风险进行研究与控制。

## 1.4 含量

病毒载体类产品可通过诸如总颗粒数、基因组拷贝数、结构蛋白含量、感染性滴度或感染性颗粒数等检测确定病毒含量。为了在保证产品疗效的同时能有效控制产品免疫原性风险，病毒载体类产品的规格或剂量建议以相应体积的病毒总颗粒数或基因组拷贝数表示，同时通过控制感染性滴度以及感染性颗粒的比率保证活性病毒颗粒的数量。核酸类产品可通过对 DNA/RNA 浓度、拷贝数等检测确定核酸含量，还需对递送系统各组分等特殊辅料含量（如适用）进行研究。细菌载体类产品可以活菌数或菌落数表述含量。含量检测应尽可能使用标准品或对照品予以校准。

## 1.5 其他特性分析

其他特性分析可能还包括如外观、澄清度、重要辅料含量、可见异物、不溶性微粒、pH 值、渗透压、装量等。对于整合型的病毒和核酸产品，应对产品的整合位点、整合稳定性和位点分布趋势进行研究，分析插入引起的致突变或致癌风险。对于非整合型病毒载体，建议对载体的非整合特性进行确认。

## 1.6 基因编辑技术的相关考虑

目前，各界对 CRISPR-Cas、TALEN、ZFN、Meganuclease 等基于酶的基因编辑技术的风险认知较为有限，且编辑酶在不同细胞内的编辑或剪切效果可能存在一定差异，而当前的

研究方法对编辑或剪切效果的分析仍存在一定的局限性。因此，对于基于 CRISPR-Cas、TALEN、ZFN、Meganuclease 等编辑工具而设计的基因治疗产品，建议采用多种方法对编辑系统的风险进行全面的分析和评估。例如，编辑系统自身特定的局限性，序列靶向的特异性，脱靶位点的分析，编辑酶的忠实性（fidelity）和编辑效率，编辑系统的生产和质量控制，编辑技术对细胞促瘤/成瘤的优势筛选，编辑系统组分的免疫原性，编辑工具相关序列的非特异性插入，多靶点编辑的基因组重排，基因组突变等。开发过程中，应结合研究进展和方法学的改进完善编辑系统的质控策略。

CRISPR-Cas、TALEN、ZFN、Meganuclease 等基于酶的基因编辑工具的脱靶风险和脱靶位点的分析需要结合多方面的信息进行综合判断。由于序列设计规则和算法不同，不同序列设计软件或平台推荐的 sgRNA 等候选靶向结合序列可能会有较大的差异，建议综合对比多个平台的设计和潜在脱靶位点的分析筛选候选序列。脱靶位点分析时，在采用生物信息学工具、序列同源比对、脱靶系统评分工具等多种方法对潜在脱靶位点进行理论筛选的同时，可参考治疗方案进行体外细胞模拟试验，通过核型分析、基因组断裂检测、深度测序等方法对潜在的脱靶位点和基因组重排的情况进行分析。模拟试验时，需尽可能模拟编辑系统在体内发挥作用的温度、离子浓度、pH 值等条件，考虑 sgRNA 等靶向结合

序列的异质性序列、编辑酶的异构体、编辑系统各组分的浓度等最差条件下的脱靶情况。对检测到的脱靶位点，可根据位点位置、基因功能等进行风险分析，必要时可结合动物或人体试验数据综合判断。

## 2. 质量标准

质量标准作为产品质量控制的重要组成部分，是基于产品质量研究确定的用于控制产品质量的标准，一般由检验项目、分析方法和标准限度组成。质量标准一般包括原液（如有）、半成品（如有）和制剂的质量标准。由于工艺的差异，部分产品可能无明确的原液生产阶段，标准中应对原液、半成品和制剂阶段进行明确的定义。质量标准中的部分项目如无法在制剂或原液中进行检测，或采用其他中间阶段的样品进行检测更有利于对产品质量进行控制时，可以考虑通过检测适当的中间产物对产品的质量进行控制。

### 2.1 检验项目

质量标准中的检验项目通常是根椐质量研究确定的，对产品安全性和有效性有重要影响的质量属性，一般包括鉴别、一般检项、理化特性、纯度、杂质、含量、生物学活性、外源因子等，具体检验项目应基于产品类型、生产工艺、质量研究、稳定性和风险评估等确定。脂质体、纳米颗粒等特殊剂型应根据具体特点选择适当的质量控制项目，如颗粒大小和分布、折光率、包封率、表面电荷等。对于非复制型或条

件复制型病毒载体，需对复制型或野生型病毒进行控制。制剂若采用特殊容器或药械组合装置，还需要根据装置的功能增加特定的检项。其他检验项目可参考《中国药典》“人用基因治疗制品总论”的要求，部分检项可不在原液和制剂中重复检测，但应考虑制剂工艺对相应质量属性的影响。对于研究认为重要且未纳入质量标准的检验项目，应有充分的理由或验证研究数据的支持。

## 2.2 标准限度

质量标准中，各检验项目标准限度（可接受标准）的制定应有合理的依据，一般需考虑目标产品质量概况(QTPP)、临床试验暴露情况、产品质量属性特征、批次放行检测结果以及稳定性研究等。标准限度制定过程中，根据代表性工艺批次数据分析确定工艺对产品质量的控制能力时，还需综合考虑产品的稳定性变化趋势，非临床和临床研究中样品批次在研究对象中的质量暴露情况，商业化规模生产产品质量应与关键性临床研究所用样品一致，标准限度要求一般不应低于临床研究中受试者的最差暴露情况。

## 2.3 分析方法

为实现对产品质量的有效控制，检测应选用先进、成熟，并经过适用性优化的分析方法，鼓励选用多种原理互补的分析方法用于质量控制。方法学验证一般应于上市申请前完成，但基于不同研发阶段产品质量控制和对比研究的需要，建议



尽量在确证性临床试验开展前完成方法学的开发和验证，部分安全性和含量检测相关的质量控制方法需在临床试验开展前进行必要的方法学确认研究。研发期间若发生了方法学变更，应对变更前后的方法进行桥接研究。对于有效期短或样本量少的产品，可考虑选用快速、微量的新型检测方法作为药典方法的替代方法，但应证明该方法相比药典方法具有等效性或优越性。

#### 2.4 对照品/标准品

在缺少国家标准品和国际标准品的情况下，基于方法分析需要，可按照标准品的制备要求自行制备相应的活性标准品或理化对照品，并对其进行相应的质量研究和放行检测。不同研发阶段，可基于质控需要选用相应阶段代表性工艺生产的样品制备标准品/对照品，但应做好不同阶段标准品的桥接研究。对照品/标准品的建立和制备应符合《中国药典》“生物制品国家标准物质制备和标定”的一般要求，根据用途对其进行标定并开展必要的贮存稳定性研究。为做好对照品/标准品的溯源性，一般建议对对照品/标准品进行分级管理。

### 九、稳定性研究

稳定性研究可参照《生物制品稳定性研究技术指导原则（试行）》和 ICH Q5C 的相关要求进行。研究方案应根据产品自身的特点、临床用药方案等情况设定，研究项目一般包括长期稳定性、加速稳定性、影响因素研究、运输稳定性、

使用稳定性等，研究条件应根据具体的贮存、运输和使用情况，以及相应条件下的研究目的确定。研究考察的项目应全面、合理，尤其是对产品的稳定性变化趋势、安全性、有效性有重要指示意义的项目，检测方法应经过验证并能灵敏检测出产品的稳定性变化特征。研究时应选用代表性工艺生产的产品或中间样品，放置在产品/样品实际储存容器，或与实际储存容器材质相同，且能代表最差暴露条件的其他规格的容器中进行。产品/样品的有效期应根据稳定性研究结果设定，研究期限通常应覆盖产品/样品的实际贮存或使用时限。

病毒载体类产品由于稳定性较差，一般采用低温贮存，研究过程中需密切关注病毒载体在贮存、运输和使用过程中的滴度（尤其是感染滴度）、聚集体和生物学活性的变化，限制病毒载体的冻融次数，避免暴露于易使病毒载体失活、降解或聚集的影响条件。

DNA 类核酸的稳定性相对较好，但剧烈的环境条件和核酸酶暴露仍有可能对 DNA 的高级结构、完整性产生破坏。RNA 类核酸稳定性较差，且对 RNA 酶(Ribonuclease, RNase) 较为敏感，其生产和贮存应处于严格的无 RNA 酶的环境。经与化学递送材料/介质结合形成的核酸递送复合物，需关注核酸及复合物的理化特性和生物学活性的变化，如包封率、含量、纯度、粒径及分布、表面电位、颗粒完整性，以及颗粒的聚合、聚集、包封药物的泄露等。另外，需关注核酸递

送复合物中脂质体等化学递送材料/介质成分的稳定性。

细菌载体类产品在适当的冻存液和冻存温度下贮存一般较为稳定，需关注研究条件下细菌载体的活率、转基因的稳定性和生物学特性的变化。

除上述特征外，其他可能在贮存、运输和使用过程中发生变化的理化特性（如 pH 值、渗透压、浓度、不溶性微粒等）、关键成分和微生物污染情况等也应在研究过程中进行适当的考察。

## 十、包装及密封容器系统

包装及容器密封系统一般包括原液（如有）、半成品（如有）、制剂，以及配备的稀释剂的包装容器。容器和密封系统的选择应具有合理的依据，能充分保障样品或产品的贮存稳定性。为避免储存容器或密封系统对产品的质量产生非预期影响，应对容器和密封系统进行相容性研究和密封性研究。研究条件的设定应考虑容器和密封系统在特殊条件下的相容性和密封性，如冷冻条件下的密封性能，加速条件下的相容性等。对于病毒载体等具有生物活性的活性成分，需要关注贮存和使用过程中，浸出物对其活性的影响。对于具有特殊功能的次级包装材料（如遮光材料），应对其相应功能进行研究和验证。涉及特殊给药装置的产品，如电穿孔装置、鼻喷装置、无针注射器等，需考虑相关医疗器械的研发要求，以及给药设备与产品的相容性。

## 十一、名词解释

**起始原材料：**用于生成产品活性成分，或为产品活性成分提供组分的原材料，如病毒载体生产用的病毒种子批、转染质粒、生产/包装细胞库，非病毒载体生产用的质粒、宿主菌、细菌种子批等。

**杂合病毒：**是指生产过程中产生的，混入外来其他病毒基因的病毒。

**病毒载体感染性颗粒比率：**是指病毒载体感染活性滴度与载体颗粒数的比值。

**对照细胞：**是指病毒生产中，按一定比例留取生产/包装细胞，不进行质粒转染或接种目标病毒，与转染质粒或接种目标病毒的其他细胞采用相同的培养基成分，并在同一培养温度和培养场地下，平行培养至规定的时间。采用规定的方法，通过对对照细胞外源因子检测情况的判定，评估该生产细胞批次的外源因子污染情况。

**核酸复合物：**核酸经与化学递送辅助材料/介质混合后形成的聚合物。

## 十二、参考文献

- [1]国家药典委员会.《中华人民共和国药典》(2020年版). 2020.
- [2] European Medicines Agency . Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products [EB/OL]. 2018.
- [3] European Medicines Agency. Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells [EB/OL]. 2020.
- [4] U.S. FDA. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) Guidance for Industry [EB/OL]. 2020.
- [5] U.S. FDA. Recommendations for Microbial Vectors used for Gene Therapy [EB/OL]. 2016.
- [6] CDE. 人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则 [EB/OL]. 2008.