



当前位置：新闻中心>>工作动态>>通知公告>>新闻正文

国家药监局药审中心关于发布《可复制型慢病毒检测共性问题与技术要求》的通告（2024年第45号）

发布日期：20241029

为提高企业研发和申报的规范性、建立科学规范的审评体系、加快国内细胞和基因治疗产品的高质量发展，药审中心对细胞和基因治疗产品中可复制型慢病毒检测共性问题进行整理，组织制定了《可复制型慢病毒检测共性问题与技术要求》（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：可复制型慢病毒检测共性问题与技术要求

国家药监局药审中心

2024年10月28日

相关附件

序号

附件名称

1 [可复制型慢病毒检测共性问题与技术要求.pdf](#)

可复制型慢病毒检测共性问题与技术要求

国家药品监督管理局药品审评中心

2024 年 10 月

目录

一、概述.....	2
二、常见问题与解答.....	3
1、检测样品	3
2、检测量	4
3、检测方法	6
4、方法学验证	10
三、参考文献.....	10

一、概述

近年来，慢病毒载体在临床上得到广泛应用，其可以直接作为载体产品用于人体，也可以介导目的基因在靶细胞（如 T 细胞、NK 细胞、干细胞等）的转移和表达以制备体外基因修饰细胞用于人体。目前临床使用的慢病毒载体系统经过改造和优化，比如删除非必需基因、删除长末端重复序列与转录起始相关的区域、减少转移质粒与包装质粒序列间的同源性、降低质粒载体/辅助基因序列与包装细胞 DNA 之间的同源性、将辅助基因序列分离于不同的质粒中，避免同源/非同源重组形成可复制型慢病毒（Replication competent lentivirus, RCL）。虽然这些改造极大降低了形成 RCL 的风险，但考虑到关于 RCL 形成机制和结构的研究尚不充分，且 RCL 可能产生的产品质量风险、对患者的临床风险以及可能的公共生物安全风险，目前各国监管机构仍将 RCL 检测作为慢病毒载体质量研究和控制的重要项目。

稳定的慢病毒载体包装细胞系不容易制备和获得，通常使用多个质粒瞬时转染细胞用于慢病毒载体的生产。目前以 HIV-1 病毒骨架结构为基础并采用水疱型口炎病毒糖蛋白（Vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSV-G）进行包膜替换的慢病毒载体在临床上得到广泛应用，下述内容旨在针对这类慢病毒载体系统的 RCL 检测问题提出一般性技术要求，但不包含体外转导细胞 RCL 检测相关技术要求。

根据目前国内申报细胞和基因治疗产品情况，RCL 检测大多数委托第三方检测机构，但也有部分企业采用自建方法。由于我国目前尚未颁布 RCL 检测的针对性技术指南，因而在检测样品、检测量、检测方法和方法学验证等方面存在诸多共性问题。药品审评中心结合初步调研情况以及国外监管相关技术指南的要求，形成这些问题的技术要求，以供申请人/检测机构参考。

本技术要求仅反映监管部门当前观点和认知，随着科学技术的发展和监管知识经验的积累，相关内容将不断完善与更新。

二、常见问题与解答

1、检测样品

问题 1. 慢病毒载体生产阶段，病毒载体上清液和生产终末细胞同时检测或选择其一？每个生产批次的病毒载体上清液和生产终末细胞是否均要求检测 RCL？

答复：

慢病毒载体通常采用多个质粒瞬时转染细胞进行生产。根据 RCL 形成机制，在病毒载体包装阶段，转移质粒与包装质粒可能在细胞中发生同源序列重组形成具有复制能力的病毒，另外，质粒载体与细胞中潜在的内源性病毒颗粒基因组也可能发生同源或者非同源重组形成具有复制能力的病毒。考虑到基因重组形成 RCL 的风险在批次之间可能存在差

异，且研究发现病毒载体上清液和生产终末细胞并不总是一致的检测到 RCL。因而，为确保病毒载体阶段无 RCL 风险，建议每个临床试验用批次和商业化生产批次的病毒载体上清液和生产终末细胞均需要采用细胞培养法进行 RCL 检测。

问题 2. 慢病毒载体生产阶段，RCL 检测样品选择的一般考虑？

答复：

通常情况下，应选择最易检出 RCL 的样品进行检测。考虑到下游纯化工工艺可能会破坏样品中可能存在的 RCL，因而，在条件允许情况下，检测样品优先选择未处理的病毒载体上清液。

按照慢病毒实际的商业化生产工艺情况以及取样量计算的要求，可能存在未处理的病毒载体上清液取样量较大，现有的检测条件和检测能力无法满足要求。因而，可以根据病毒载体生产工艺特点选择适宜阶段的样品（如浓缩后病毒载体上清液）或病毒成品进行 RCL 检测，但需要根据具体情况进行评估和验证，以确保检测方法的可靠性和准确性。需要特别关注，经浓缩处理的病毒载体上清液或者病毒成品滴度较高，可能对扩增细胞有毒性，因而试验中需要设计合理的预实验评估检测样品对检测方法的干扰。

2、检测量

问题 1. 病毒载体上清液取样量如何计算？

答复:

根据早期使用逆转录病毒载体的经验（包括生产经验和临床使用经验），建议取至少 5% 的未处理的病毒载体上清液进行 RCL 检测。但随着工艺优化及发展，以及临床使用经验的持续积累，推荐测试足够的病毒载体上清液，以确保取样量满足检出 1RCL/剂量的可能性为 95%。

按照现行 FDA 指南中计算公式，病毒载体作为体内基因治疗产品时，需要检测的病毒成品体积需要根据病毒成品的滴度代入公式进行计算。病毒载体作为体外基因修饰系统时，需要检测的病毒成品体积需要根据病毒成品滴度、感染复数、体外转导细胞数量等代入公式进行计算。如果检测的样品是未处理的病毒载体上清液或经浓缩处理的病毒载体上清液，由于以上样品滴度与病毒成品滴度存在差异，因此需要取更大体积的未处理病毒载体上清液或经浓缩处理的病毒载体上清液，以确保取样量满足检出 1RCL/剂量的可能性为 95%。实际检测体积建议以未处理的病毒载体上清液或经浓缩处理的病毒载体上清液的实际测定滴度代入公式进行计算。公式见下：

$$V_t = - (1 / (1RCL / \text{剂量当量})) \ln(1 - 0.95)$$

其中 V_t 代表样品检测量。剂量当量：对于病毒载体直接作为体内基因治疗的产品定义为临床一次给药的最大剂量；对于体外基因修饰细胞产品，定义为病毒载体转导每个生产

批次最大细胞量下使用的病毒载体的量。

同时，考虑到产品研发早期阶段可能还未完全确认慢病毒转导体外细胞的最大剂量信息，可能无法基于计算公式得到需要检测的病毒载体上清液的最大量，也可以考虑采用 5% 的未处理病毒载体上清液进行检测。

申报资料中应明确检测样品，如未处理的病毒载体上清液、浓缩后病毒载体上清液、病毒成品等。申报资料还应详细提供样品检测量计算的过程及依据，以确保取样量满足检出 1RCL/剂量的可能性为 95%。

问题 2. 生产终末细胞检测量如何计算？

答复：

生产终末细胞指收获病毒载体上清液阶段分离的细胞或者多次收获病毒载体上清液最后获得的细胞。检测量通常按照总细胞量的 1% 计算或 1×10^8 个，以较小细胞量作为检测量。

3、检测方法

问题 1. 细胞培养法检测 RCL 只进行连续扩增培养，而不在扩增期后增加指示期是否可行？

答复：

缺少辅助基因的病毒可能相比野生型病毒增长速度有所减缓。而且，慢病毒载体中 P24 蛋白残留和质粒残留（如 VSV-G）可能造成假阳性结果。此外，在没有 RCL 的情况下，

在扩增期细胞中可能发生低水平的序列转移（如 psi-gag）造成假阳性结果。因此，在扩增期后增加指示期培养再进行检测可以尽可能确保检测结果的准确性和可靠性。如果在扩增阶段有充分数据证明连续传代培养可以去除残留的蛋白（如 P24 蛋白）和质粒残留导致的假阳性风险，或终点检测方法不受质粒及蛋白残留的影响，或者在扩增阶段样品组可以观察到细胞病变，则可不进行指示期。如不能提供充分数据，则建议将病毒载体上清液和生产终末细胞与允许细胞系（如 C8166 细胞）共培养并至少进行 5 次传代，以扩增任何潜在的 RCL，在扩增培养结束后对共培养物进行离心处理，将收集的上清液再次与 C8166 细胞进行共培养作为指示期，并收集指示期的样品进行 RCL 的检测。

问题 2. 细胞培养法检测 RCL 仅选择一种终点检测方法是否可行？

答复：

由于 RCL 形成机制较为复杂，结构尚不明确，目前常见的几种终点检测方法均是基于 RCL 理论上的结构选择的终点指标以侧面反映是否有 RCL。由于不同的终点检测方法适用性不同，因而，鼓励申请人采用至少两种不同原理的终点检测方法进行 RCL 检测，常见的终点检测方法包括序列检测（如 psi-gag、VSV-G）、逆转录酶活性检测（PERT）、功能蛋白检测（如 p24 蛋白）等，以相互验证检测结果的真实性和可靠

性。需要注意，如果两个终点检测结果都为阳性，则一般可判断 RCL 阳性，如果一个终点结果呈阳性另一个终点结果呈阴性，则需要提供充分的调查和研究资料，以确认检测结果的可靠性。

**问题 3. 检测方法中阳性对照病毒选择的一般考虑？
阳性病毒需要提供哪些研究数据？**

答复：

临床使用慢病毒的包膜蛋白大多数为 VSV-G，理论上使用替换为 VSV-G 包膜蛋白的 HIV 作为阳性病毒比使用野生型 HIV 或减毒 HIV 更合理。但是，替换为 VSV-G 包膜蛋白的 HIV 阳性病毒对人员和环境具有较大危害，目前尚未有充分证据表明 RCL 与 VSV-G 包膜蛋白的 HIV 具有相似的生长特性和理化特性。所以，建议选择满足 RCL 验证灵敏度要求的野生型 HIV、减毒 HIV 或重组的条件复制型慢病毒载体作为阳性对照病毒，应确保阳性对照病毒的代表性。

阳性病毒对于确认检测方法的灵敏度至关重要，因而建议申报资料中提供阳性病毒的来源、制备工艺、主要功能元件及生物学滴度的详细资料，并且关注阳性病毒在贮存期间遗传特性、生长特性、生物学滴度等的稳定性。

问题 4. 实验组设置的要求？实验组中是否必须设立抑制对照组？

答复：

采用经过验证的方法进行样品检测时，通常需要设立阳性对照组、阴性对照组、抑制对照组和样品组。阳性对照组和阴性对照组对于评估方法的专属性和重现性至关重要，因而实验组中应设置合理的阳性对照组和阴性对照组。

由于进行 RCL 方法验证/确认时使用的样品与实际试验测定用样品可能在病毒滴度、基质成分等方面均存在不同，且研究发现高滴度慢病毒上清液可能对共培养细胞的扩增有抑制作用，进而影响 RCL 检测灵敏度。同时，检测样品中除病毒以外的其他组分可能也会影响 RCL 的检测。所以，建议实际样品检测时设置抑制对照组，以证明检测样品对阳性病毒的检出无影响。

**问题 5. 细胞培养法中的共培养细胞选择的一般考虑？
共培养细胞是否需要建库和检定？**

答复：

共培养细胞的选择和病毒的包膜有关，同时也要考虑细胞可否支持病毒的复制，通常选择病毒易感和易复制的细胞系作为共培养细胞。目前 C8166 细胞是比较公认的替换为 VSV-G 包膜蛋白的 HIV 病毒易感的细胞系，建议优先选择 C8166 细胞。如选用其他细胞系应开展全面的方法学研究，并验证方法达到等效性后方可考虑作为共培养细胞。

共培养细胞应按照《中国药典》检定用细胞相关要求提供全面的研究资料，如合法来源证明性文件、细胞库建库过

程资料、细胞库检定研究资料等。

4、方法学验证

问题 1. RCL 检测方法学验证的要求？

答复：

RCL 的检测分为共培养和终点检测两个实验阶段，验证也需要考虑开展两个阶段的验证。共培养阶段应设立合理的阳性对照组、阴性对照组和抑制对照组，并根据终点检测结果进行最终试验结果的判断，通常开展的验证项目包括专属性、检测限、耐用性等，专属性应考虑阳性对照组检出率、阴性对照检出率和抑制对照组检出率，检出率的设定标准应有合理的依据。检测限验证通常通过设置不同稀释度的阳性对照，并确保检出率达到一定标准。耐用性验证应结合可能影响方法的因素进行设置，比如传代代次、传代时间、细胞密度等。RCL 的终点检测方法通常是基于生物化学和分子生物学的定量或定性方法，可根据 ICH Q2、《中国药典》关于分析方法验证相关指导原则要求开展相应的验证，一般情况下，定量检测方法应进行专属性、定量限、检测限、准确度、精密度、线性、范围和耐用性等项目的验证，定性检测方法应进行专属性、检测限和耐用性的验证。

三、参考文献

1. FDA. Guidance for Industry – Supplemental guidance on testing for replication competent retrovirus in

retroviral vector based gene therapy products and during follow-up of patients in clinical trials using retroviral vector. 2006.

2. FDA. Testing of Retroviral Vector-Based Human Gene Therapy Products for Replication Competent Retrovirus During Product Manufacture and Patient Follow-up. 2020.

3. EMA. Guideline on Development and Manufacture of Lentiviral Vectors. 2004.

4. EMA. Gene transfer medicinal products for human use. 2019.

5. 体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则（试行）. 2022.