

**重组腺相关病毒载体类体内基因治疗产品
临床试验申请药学研究与评价
技术指导原则**

国家药品监督管理局药品审评中心

2024年01月

目 录

一、前言	1
二、适用范围	1
三、一般原则	2
四、生产用物料	3
五、生产工艺	7
六、质量研究与质量标准.....	9
七、稳定性研究	12
八、包装与密封容器系统.....	14
九、名词解释	14
十、参考文献	14

一、前言

体内基因治疗产品一般选用适当的载体或转染方式将外源基因（或基因编辑工具）导入人体，通过替代、补偿、阻断、修正特定基因以达到治疗疾病的目的。重组腺相关病毒（recombinant adeno-associated virus, rAAV）载体因其理化性质稳定、致病性弱、整合风险低、外源基因表达持久等结构和生物学方面的优势，已成为体内基因治疗领域研究、应用最为广泛的载体之一。

为规范和指导以 rAAV 为载体的体内基因治疗产品（以下简称“rAAV 载体类产品”）按照药品研发规律和相关技术规范进行研究，提交符合临床试验申报要求的药学研究资料，根据《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。本指导原则仅基于此类产品现阶段的研发水平和科学认知，从技术审评的角度对此类产品在申报临床试验时应完成的药学研究提出一般性建议。因不同产品在设计 and 临床应用方面可能存在差异，具体品种的药学研究可采用具体问题具体分析的原则，但应能满足药学技术评价的需求，并符合临床试验用药品质量的要求。后续，相关技术要求将随着行业水平的提高、技术的进步，以及产品认知的积累逐步完善。

二、适用范围

本指导原则中的 rAAV 载体是指基于腺相关病毒的结构

和理化特性，经设计和重组改造所形成的用于携带外源目的基因（或核酸片段）的病毒载体。本指导原则主要针对应用于体内基因治疗的 rAAV 载体类产品在申报临床试验时应完成和提交的药学研究信息提出建议。

需要说明的是，对于携带基因编辑工具的 rAAV 载体类产品，由于其作用机制涉及对人体细胞基因组的编辑操作，而当前此类产品的人体研究经验较为有限，因此仍属于风险相对较高的产品，可能需要开展更全面的风险评估和质量控制。随着研究的深入和经验的积累，相关研究在参考本指导原则的同时，可能需要适当补充和完善相关的技术要求。

三、一般原则

临床试验申报阶段，rAAV 载体类产品可参考《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），结合申报阶段的特点，制定合理的药学研究计划和质量控制策略。临床试验用药品应按照“《药品生产质量管理规范（2010年修订）》临床试验用药品附录”（2022年第43号）的相关要求进行生产。临床试验用药品的研发、生产、使用和废弃处理应符合生物安全相关法律法规的要求。

按照药品研发的 rAAV 载体类产品应遵循药品研发的一般规律，在临床试验申报时提供必要的药学研究信息，说明和/或证明产品设计的合理性，生产工艺的可重复性，临床试验用药品质量的可控性，分析药品风险控制策略的合理性和

充分性，最大程度降低药品的安全性风险，以支持临床试验的开展。

rAAV 载体类临床试验用药品可参考《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》中的一般原则进行风险分析和控制。在临床试验申报阶段一般应完成临床试验用药品生产相关的种子批、细胞库的制备和检定，并开展必要的稳定性研究，以支持临床试验用药品生产所需的传代代次。基于产品特点，完成临床试验用药品生产工艺的开发和初步确认，并建立必要的生产过程中控制项目。选择代表性样品开展质量研究，并基于对产品质量属性的理解和前期的数据积累建立临床试验用药品的质量标准。质量控制相关分析方法经研究确认，应能满足分析和质量控制的需求。基于产品设计和作用机制，初步建立生物学活性分析方法。临床试验用药品的稳定性研究结果应能支持开展临床试验。

由于不同产品之间的风险可能不同，不同研发阶段的产品可能存在设计和工艺方面的差异，为支持人体临床试验的安全性，申报临床试验时需提供支持申报的非临床研究样品与拟用于临床试验的药品在生产用物料、生产工艺、质量等方面的对比信息。临床试验用药品的质量不得劣于非临床研究用样品的质量，尤其需要关注与安全性相关的质量属性。

四、生产用物料

生产用物料是指产品生产过程中所使用的生物或化学材

料，包括起始原材料（如生产/包装用细胞、包装用质粒、包装用病毒等）、生产过程使用或添加的物料（如培养基及其添加成分、核酸酶、纯化填料、缓冲盐、转染试剂等）、辅料，以及生产用耗材（如细胞培养袋、滤膜、深层滤器、储液袋、传输管路、暂存容器等）等。

1. 起始原材料

不同病毒包装系统包装生产的 rAAV 载体在基因组稳定性、包装效率、外源因子的引入风险等方面可能存在一定差异，建议结合产品特点和风险选择合适的包装系统用于生产。rAAV 载体生产常见的病毒包装系统包括质粒瞬时转染（瞬转）包装系统、辅助病毒包装系统、昆虫细胞/杆状病毒包装系统等，涉及的起始原材料可能包括包装用质粒、生产/包装用细胞、包装用病毒等。产品在设计和上游构建方面，可参考《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》中“五、产品设计的一般考虑”和“六、生产用物料”章节的相关要求。用于临床试验用药品生产的起始原材料来源应清晰，具有完整的溯源性信息。申报时，根据包装系统提供相应的上游构建信息，以及相关的证明性文件和研究报告，信息应准确、完整。基于包装系统的类型，药品生产如涉及包装用质粒、包装用病毒等起始原材料的制备，也应提供相应的药学研究信息，具体可参考同类型生物制品原液的申报资料要求。

(1) 目的基因: 详细说明目的基因的序列和来源信息, 与野生型序列的差异, 提供序列设计 (如基因筛选、改造和优化等) 合理性和科学性的依据。

(2) 质粒 DNA: 提供质粒构建的具体信息, 包括原始质粒的来源、质粒结构图、重要基因或元件的序列来源及功能信息, 详述质粒构建过程并对最终质粒序列进行确认。提供相关的来源证明和检定报告。瞬转生产 rAAV 的包装用质粒的生产应基于细菌种子批系统, 采用适宜的方法纯化, 并基于风险分析和产品特性对每批质粒进行质量检测, 检测结果符合要求后方能用于载体生产。

(3) 细菌种子批: 瞬转生产用质粒的生产用菌种需进行建库管理, 申报时需提供宿主菌的来源、基因型等信息和证明文件, 详述细菌种子和种子批的建立过程。按照《中国药典》要求进行种子批的检定, 并提供相应的检定报告。

(4) 病毒种子批: 用于 rAAV 载体类产品生产的包装用病毒应进行建库管理。申报时需提供原始毒种的来源、历史培养信息及相关证明文件, 如有改造, 需详述病毒种子改造和构建的具体过程, 结合溯源信息评估病毒种子的安全性风险。病毒种子批的建立和检定应满足《中国药典》要求, 并提供相应的检定报告。

(5) 生产/包装细胞库: 提供 rAAV 载体类产品的生产/包装细胞的来源和证明文件, 细胞的历史溯源信息应完整,

若存在基因改造，应具体说明改造依据、改造方法和改造结果的确认研究等。细胞的溯源信息和质量控制策略应满足风险控制要求。生产/包装细胞应进行建库管理，建库过程和细胞库检定应符合《中国药典》要求，并提供相应的检定报告，尤其应关注种属特异性病毒和历史培养、建库过程中可能引入的病原体的检定。

细菌/病毒种子批和生产/包装细胞库的传代稳定性研究结果应能支持临床试验用药品的生产。包装用质粒、包装用病毒的制备和质量控制可参考《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》中的相关要求，保存稳定性应能满足生产需求。

2. 其他生产用物料

除起始原材料外，需提供所有其他生产使用的原材料和辅料的来源、生物源性组分、质量标准、使用阶段等信息，并提供相关的证明文件。原材料和辅料的质量控制可参照《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，质控策略应与其风险相符。如有可能，应尽量避免使用动物源或人源性原材料。如需使用，需提供相关的必要性和合理性说明，并制定相应的风险控制措施。不得使用 β 内酰胺类抗生素、链霉素，以及其他如溴乙锭等有毒有害试剂，尽量减少或避免使用对环境或人体具有潜在不利影响的试剂，如 Triton X-100 等。

临床试验申报时，需提供关键的生产用耗材、仪器和设备的信息。样品直接接触的生产用耗材和设备经评估或研究，应无明显相容性风险，关注样品接触材质对病毒颗粒的吸附和活性的影响。

五、生产工艺

通过前期的工艺开发和临床试验用药品的制备，应能建立并初步证明生产工艺的合理性和可重复性，拟定工艺应能稳定生产出符合预期质量的临床试验用药品。

申报资料须明确临床试验用药品的生产厂和检验厂，提供基本的生产工艺信息，包括生产规模、工艺流程、具体的工艺参数、过程中控制信息、批次定义等。工艺开发信息应能支持临床试验用药品生产工艺设定的合理性，如质粒瞬转工艺中质粒的用量和配比、杆状病毒感染工艺中的病毒用量和比例、病毒收获条件、纯化工艺条件、制剂处方筛选等。综合工艺开发研究信息、非临床研究用批次和临床试验用批次的生产情况，初步评估临床试验用药品的生产工艺的合理性和可重复性。由于 rAAV 载体类产品的细胞包装产物中，产品相关杂质种类较多，如空壳病毒等，一般需要通过多个工艺单元进行分离纯化。部分分离纯化方法，如密度梯度离心等，在工艺放大方面可能具有一定局限性，因此，工艺单元的设定还需考虑后续生产规模放大的可能性和可行性。

临床试验用药品的生产工艺应设立必要的过程中控制项

目。建议在适宜的工艺步骤设立微生物安全性相关的控制项目和与产品关键质量属性相关的中控项目。一般建议在病毒收获液阶段常规开展微生物安全性相关的中控检测，项目设定应与产品工艺相匹配，常见如无菌/生物负荷、内毒素、支原体、螺原体（如涉及昆虫细胞或植物源成分）和内/外源病毒因子等检定。外源因子的检测可参考《中国药典》和 ICH Q5A 的要求。

基于产品内/外源病毒因子的风险评估，必要时，应考虑在工艺步骤中设立病毒清除/灭活工艺单元。一般认为，生产过程中如使用了包装用病毒或存在其他内/外源病毒污染风险时，应考虑在工艺中设立病毒清除/灭活单元以清除/灭活非目标病毒，如去污剂或低 pH 孵育对包膜病毒的灭活，热灭活工艺对温度敏感病毒的灭活，层析和纳滤步骤对病毒的清除等。针对设立的病毒清除/灭活工艺单元，建议参考 ICH Q5A 的一般原则开展病毒清除/灭活验证研究。如有可能，验证研究应尽可能将原材料或工艺步骤中可能引入的病毒或同类病毒纳入指示病毒，如昆虫细胞/杆状病毒包装系统中的杆状病毒和潜在的弹状病毒等。有效的病毒清除/灭活工艺单元病毒滴度下降因子应能达到 $\geq 4\log_{10}$ 的病毒清除/灭活效果。基于风险评估，必要时，建议考虑设立多种不同原理的病毒清除/灭活工艺单元。基于病毒收获液中非目标病毒的载量检测数据，根据验证研究结果，评估非目标病毒残留的安全性

风险。

六、质量研究与质量标准

1. 质量研究

rAAV 载体类产品的质量研究应根据产品的设计、作用机制和生产工艺等方面确定，一般包括（但不限于）：鉴别、结构分析、一般理化特性、含量、纯度、生物学活性、杂质、污染物检测等。研究样品应具有代表性，如工艺相近或相同的非临床研究用样品、临床试验用药品等。质量研究信息应完整，包括分析方法原理介绍、研究样品、试验条件和基本步骤、数据处理和结果分析等，分析方法应能满足预期用途。

产品的结构和理化特性研究一般包括全基因组的序列分析，单链/自身互补型双链组成情况（如适用），衣壳蛋白亚基的分子量、氨基酸序列和翻译后修饰研究，病毒颗粒的衣壳蛋白亚基比例、热稳定性（温度变化条件下的病毒颗粒结构表征）、颗粒形态和粒径分析等。由于生产过程中 rAAV 载体类产品可能出现基因组不完整或序列突变的情况，建议对病毒基因组完整性进行研究。rAAV 载体类产品的含量、纯度和活性分析一般包括载体含量（如病毒颗粒数、基因组滴度、感染滴度等）、衣壳蛋白亚基的纯度、病毒颗粒纯度、比滴度、生物学活性等。由于 rAAV 载体类产品具有较高的异质性，纯度研究需尽量对各类产品相关杂质进行分析，如空壳病毒、部分包装病毒、游离衣壳蛋白、游离核酸、DNA

错误包装、病毒聚集体、可复制型 AAV 等。基于产品作用机制的设计，建议初步建立相关的生物学活性分析方法，如对外源目的基因表达产物正确性的确认，目的基因的表达水平、表达产物的生物学活性等研究。由于作用机制的差异，除基因编辑类产品外，对于开发难度较大的表达产物的生物学活性分析方法，可考虑在临床试验期间逐步建立并完善，但建议在其他研究水平进行质量控制（如表达量等），必要时可与监管机构进行沟通。

结合工艺，对引入的各类工艺相关杂质的残留水平进行分析或检测，并评估其安全性风险。例如，S/D 灭活试剂，亲和配基，宿主细胞蛋白，宿主细胞 DNA，生产用质粒（如有），核酸酶，E1A/E1B 基因（如有），有安全性风险的转染试剂，裂解试剂，氯化铯或碘克沙醇等沉降剂（如有），非目标病毒残留（如包装用病毒及其相关杂质等），残留 DNA 片段大小分布等。对生产中可能引入的污染物如细菌、真菌、支原体、内/外源病毒、细菌内毒素等进行检测，或结合过程控制进行风险分析。

其他一般特性分析可能还包括外观、装量、pH 值、渗透压、可见异物、关键辅料含量、不溶性微粒等。

2. 质量标准

临床试验用药品的质量标准应根据产品特点、生产工艺、质量研究，以及前期对产品认知的积累等综合评估后拟定。

rAAV 载体类产品的质量标准常见包括一般检查（如外观、可见异物、不溶性微粒、渗透压、pH 值、装量等）、鉴别（如基因组相关的鉴别、衣壳蛋白亚基相关的鉴别等）、含量（如病毒颗粒数、基因组滴度、感染滴度等）、比滴度、生物学活性、纯度、产品和工艺相关杂质、可复制型 AAV、污染物、关键辅料含量等。考虑到病毒包装用细胞的差异，建议持续收集包装用细胞的 DNA 残留水平和片段大小分布数据，结合病毒包装用细胞的风险评估，针对 DNA 残留水平、片段大小、特定转化因子（如 E1A/E1B 等），及其他特定风险序列等建立合理的质控策略。由于 rAAV 载体类产品的包装产物类型较多，拟定的质量标准应能有效控制各类组分的含量，如病毒颗粒总量，有活性的病毒载体含量，空壳病毒颗粒的残留等。一般建议参考非临床毒理研究批次样品的质量初步拟定临床试验用药品的标准限度，特别应关注与安全性相关的项目，保障临床试验用药品的安全性。

3. 分析方法

申报临床试验时，需提供质量控制相关的分析方法信息，包括方法学原理、分析仪器、试剂耗材、主要操作步骤、数据处理、结果分析和结果判断等。对质量控制相关的分析方法进行确认研究。由于部分产品相关杂质，如空壳病毒、部分包装病毒等理化特性与目标产物较为接近，分离和定量分析相对困难，建议选择分离度好、性能稳定的分析方法用于

质量控制。可复制型 AAV 作为 rAAV 载体类产品中与安全性相关的重要控制项目，应建立敏感、适用的分析方法。分析方法中靶细胞的传代方式、培养条件，以及辅助病毒的类型和用量应有利于可复制型 AAV 的复制和检出，检测靶点的选择需充分考虑可复制型 AAV 产生的方式和类型。鉴于不同衣壳类型的 AAV 对细胞的感染特性可能存在差异，方法建立需关注检定用细胞、辅助病毒、对照设立的适用性。一般认为，相同血清型或衣壳类型的阳性对照病毒可能在感染特性方面更具有代表性。

根据检测需要，建立质控分析用标准品/对照品。标准品/对照品的建立、制备和保管可参照《中国药典》“生物制品国家标准物质制备和标定规程”的相关要求。基于标准品/对照品的特性和使用目的，进行特性分析（如结构、活性、纯度、含量和其他特性等）、标定和稳定性研究，并确保标准品/对照品的可溯源性。

七、稳定性研究

参考《生物制品稳定性研究技术指导原则（试行）》、《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》等指南开展 rAAV 载体类产品的稳定性研究，可能涉及的研究样品包括生产中间品、原液和制剂等，研究条件和包装容器应具有代表性，考察指标应能敏感反应样品的稳定性，常见的考察指标包括如一般理化特性、外观、不溶性微粒、含量（如

病毒颗粒数、基因组滴度、感染滴度等)、比滴度、纯度、生物学活性、污染物、关键辅料含量等。研究项目一般包括长期稳定性、加速稳定性、影响因素研究等,建议重点关注冻融、高温等病毒敏感条件对样品的影响。对于产量较少的产品(尤其是罕见病用药),基于质量属性在稳定性方面的变化特征,对于稳定性研究过程中一定期限内可能无显著变化趋势的质量属性检项,经充分评估后,可考虑在该期限内适当减少检测取样点,或检测其他具有相关性的质量属性,如除初期和末期需进行无菌检查外,部分检测点可采用容器的密闭完整性检测作为无菌的支持性检测等。

根据临床试验用药品生产和使用可能涉及的运输,结合稳定性研究,开展运输风险评估,必要时开展运输稳定性研究。参考临床试验方案,开展临床使用稳定性研究。不同适应症设计的 rAAV 载体类产品的临床给药方式可能较为多样,部分给药器械可能会对 rAAV 载体类产品产生明显的吸附作用或活性影响,导致产品滴度下降。建议关注 rAAV 载体类产品与拟定使用的给药器械之间的相容性,并通过模拟临床给药流程,考察给药剂量的准确性和产品的安全性,评估产品的滴度、纯度、生物学活性、不溶性微粒、微生物相关安全性等是否会受给药器械和给药流程的影响。

产品的稳定性研究应能支持临床试验的开展。

八、包装与密封容器系统

提供与样品接触的包装材料的选择依据和相关信息，包括供应商、包材组成、包装材质、质量标准、供应商提供的相容性研究等。开展相关的研究或评估，初步分析说明包材的适用性、密封性和相容性符合临床试验用药品的使用要求。部分产品内包材，如环烯烃聚合物（cyclic olefin polymer）类包材等，可能具有一定的透气性，建议关注储存期间二氧化碳等气体的渗透风险，充分评估包装材料的适用性和风险控制策略。

九、名词解释

部分包装病毒：是指存在基因组部分缺失或衣壳组装不完整的病毒颗粒。

DNA 错误包装：指非目的基因组 DNA（如宿主细胞 DNA、质粒 DNA 等）包装入病毒颗粒的情况。

比滴度：通常以总颗粒数或病毒基因组滴度与感染滴度的比值表示，使用时应予以明确。

十、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] NMPA.《药品生产质量管理规范（2010 年修订）》临床试验用药品附录. 2022.

[3] CDE. 体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则
(试行) [EB/OL].2022.

[4] NMPA. 生物制品稳定性研究技术指导原则 (试行) .
[EB/OL].2022.