

重组腺相关病毒载体类体内基因治疗产品 申报上市药学共性问题与技术要求

国家药品监督管理局药品审评中心

2025 年 9 月

目录

一、概述	1
二、常见问题与技术要求	1
(一) 外源病毒因子风险控制的一般要求	1
(二) 纯度检测方法选择和标准限度制定的一般要求...	8
(三) 基因组滴度检测方法选择和不同方法桥接对比研究 的一般要求	10
(四) 空壳率检测方法选择和标准限度制定的一般要求	11
(五) 效价检测方法选择的一般要求	12
(六) 可复制型腺相关病毒 (Replication-competent AAV, rcAAV) 检测方法和标准限度制定的一般要求 ...	13
(七) 残留宿主 DNA 片段大小质量控制的一般要求 ...	14
三、参考文献	16

一、概述

重组腺相关病毒（Recombinant adeno-associated virus, rAAV）载体因理化性质稳定，致病性、整合风险低，外源基因表达持久等特点，成为基因治疗领域内重要的病毒载体之一。rAAV 产品创新程度较高，生产工艺复杂多样，质量研究和控制方法发展迅速，监管和业界对 rAAV 产品生产工艺和质量研究等方面的认知仍处于不断探索和完善中。

本文根据现阶段的科学认知、行业实践和经验积累，对不同生产工艺的外源病毒因子风险控制策略、质量研究和质量标准制定过程中的共性问题提出一般性技术要求，以供申请人/持有人参考。

本文件仅反映监管部门当前对 rAAV 产品生产工艺和质量研究相关共性问题的一般要求，随着科学技术的发展和监管经验的积累，相关内容将不断完善与更新。

二、常见问题与技术要求

（一）外源病毒因子风险控制的一般要求

目前 rAAV 产品生产工艺类型多样，不同类型生产工艺生产的 rAAV 产品，可能引入的病毒污染风险程度不同，因而外源病毒因子控制策略有所不同。因此，建议深入分析不同

生产工艺病毒污染的潜在来源，并根据工艺特点、产品特点采用多阶段控制策略以控制整体风险。

1. 情形一：采用瞬时转染细胞系或稳定转化细胞系生产的 rAAV 产品

采用瞬时转染细胞系或稳定转化细胞系生产的 rAAV 产品，病毒污染的风险可能来自细胞系（即生产用细胞），生产过程中使用的动物/人源生产用原材料，也可能来自生产过程中的偶然引入。因此，该情形下的 rAAV 产品外源病毒因子风险控制策略建议如下：

（1）细胞库方面，建议按照 ICH Q5A（R2）、《中国药典》等相关技术指南要求对主细胞库、工作细胞库、生产终末细胞或生产限定代次细胞进行检定，结合细胞来源、传代或改造历史、建库过程中使用的原材料情况等进行风险评估后确定外源病毒因子检测种类。

（2）动物/人源生产用原材料方面，应结合其来源、生产工艺等开展特异性外源病毒因子检测，外源病毒因子检测种类应全面，检测方法应足够灵敏。

（3）生产工艺控制方面，建议选择适宜的生产步骤进行工艺过程中外源病毒因子的风险控制，并设立合理的验收标准。通常选择未加工收获液作为检测样品，具体检测方法可参考 ICH Q5A（R2）、《中国药典》等相关技术指南的要求。

(4) 病毒清除验证方面, 根据上述 (1) - (3) 检测结果, 如果在细胞库检定和未加工收获液中未发现除 rAAV 以外的其他病毒、病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLP) 或逆转录病毒样颗粒 (Retrovirus-like particle, RVLP), 则建议使用非特异“模型”病毒开展病毒去除/灭活验证, 评估现有生产工艺步骤对非特异“模型”病毒的清除能力。同时, 如果在细胞库检定和未加工收获液中未检出 RVLP, 且 PERT 检测结果为阴性, 则不需要进一步评估每个剂量中逆转录病毒颗粒量。反之, 如果在细胞库检定和未加工收获液中发现除 rAAV 以外的其他病毒、VLP 或 RVLP, 病毒清除验证研究建议使用已鉴定的病毒, 如果不能使用已鉴定的病毒, 则应使用“相关”病毒或特异“模型”病毒开展研究。同时, 还应考虑使用对物理或化学方法处理具有显著耐受性的非特异“模型”病毒进行验证。

(5) 原液/纯化后产品外源病毒因子检测方面, 根据上述 (1) - (4) 检测结果和风险评估, 如认为外源病毒因子污染风险可控, 则不需要开展原液/纯化后产品的外源病毒因子检测。

2. 情形二: 采用杆状病毒-昆虫细胞系生产的 rAAV 产品

采用杆状病毒-昆虫细胞系生产的 rAAV 产品, 病毒污染的风险可能来自包装/生产用细胞以及病毒种子批, 生产过

程中使用的动物/人源生产用原材料，也可能来自生产过程中的偶然引入。因此，该情形下的 rAAV 产品外源病毒因子风险控制策略建议如下：

（1）包装/生产用细胞、动物/人源生产用原材料方面，控制要求参见情形一“（1）-（2）”所述。

（2）病毒种子批方面，检定应符合 ICH Q5A（R2）、《中国药典》等相关技术指南的要求，并根据病毒种子批建立的特定情况，以及对病毒种子相关特征的评估，设定相应的检定项目，并选择合适的检测方法。

（3）生产工艺控制方面，建议选择适宜的生产步骤进行工艺过程中外源病毒因子的风险控制，并设立合理的验收标准。通常选择未加工收获液作为检测样品，具体检测方法可参考 ICH Q5A（R2）、《中国药典》等相关技术指南的要求。同时，应在上市阶段提供至少 3 批次商业化代表性工艺的未加工收获液的杆状病毒和弹状病毒定量检测结果，用于评估整体生产工艺对外源病毒因子的清除效果。

（4）病毒清除验证方面，由于包装/生产用细胞中可能含有弹状病毒，并且生产体系中引入了重组杆状病毒，因此，应考虑在生产工艺中设立病毒去除/灭活单元，并参考 ICH Q5A（R2）的一般原则开展病毒去除/灭活验证研究。原则上，病毒清除验证研究应使用已鉴定的病毒，如果不能使用已鉴定的病毒，则应使用“相关”病毒或特异“模型”病毒开展

研究，如杆状病毒和水泡性口炎病毒（可代表 sf9 细胞系中内源性弹状病毒）。同时，还应考虑使用对物理或化学方法处理具有显著耐受性的非特异“模型”病毒进行验证。选择模型病毒的种类和数量应根据包装/生产用细胞质量和特性，以及生产工艺综合考虑，一般建议使用至少 3 种不同特性的病毒对工艺的病毒清除能力进行评估。建议评价特定的工艺步骤对特异或非特异“模型”病毒的去除/灭活效果，并评估整体生产工艺步骤对特异“模型”病毒的总体清除效果。常见的病毒去除/灭活步骤通常包括溶剂/去污剂处理、低 pH 孵育、柱层析、纳滤等，建议基于风险评估考虑采用多种不同原理的病毒去除/灭活工艺步骤。

（5）原液/纯化后产品外源病毒因子检测方面，根据上述情形二“（1）-（3）”检测和控制，以及情形二“（4）”对“相关”病毒或特异“模型”病毒的清除能力和效果，开展充分的风险评估，如认为外源病毒因子污染风险可控，则建议上市申请时，提供至少 3 批次商业化代表性工艺的原液/纯化后产品的残留重组杆状病毒和弹状病毒检测结果，检测方法应选择特异性和灵敏度较高的合适方法，并进行充分的方法学验证。在没有充分的证据证明生产工艺对“相关”病毒或特异“模型”病毒具有稳健的清除能力和效果的情况下，应对每个批次原液/纯化后产品进行杆状病毒和弹状病毒残留的检测。

3. 情形三：采用腺病毒、单纯疱疹病毒等辅助病毒生产的 rAAV 产品

采用腺病毒、单纯疱疹病毒等辅助病毒生产的 rAAV 产品，病毒污染的风险可能来自包装/生产用细胞以及病毒种子批，生产过程中使用的动物/人源生产用原材料，也可能来自生产过程中的偶然引入。因此，该情形下的 rAAV 产品外源病毒因子风险控制策略建议如下：

（1）包装/生产用细胞、动物/人源生产用原材料方面，控制要求参见情形一“（1）-（2）”所述。

（2）病毒种子批检定方面，控制要求参见情形二“（2）”所述。

（3）生产工艺控制方面，建议选择适宜的生产步骤进行工艺过程中外源病毒因子的风险控制，并设立合理的验收标准。通常选择未加工收获液作为检测样品，具体检测方法可参考 ICH Q5A（R2）、《中国药典》等相关技术指南的要求。同时，应在上市阶段提供至少 3 批次商业化代表性工艺的未加工收获液的辅助病毒定量检测结果，用于评估整体生产工艺对外源病毒因子的清除效果。

（4）病毒清除验证方面，由于生产过程中使用了辅助病毒，因此，应考虑在生产工艺中设立病毒去除/灭活单元，并参考 ICH Q5A（R2）的一般原则开展病毒去除/灭活验证研究。原则上，病毒清除验证研究应使用已鉴定的病毒，如果不能

使用已鉴定的病毒，则应使用“相关”病毒或特异“模型”病毒开展研究，如腺病毒、疱疹病毒等。同时，还应考虑使用对物理或化学方法处理具有显著耐受性的非特异“模型”病毒进行验证。选择模型病毒的种类和数量应根据包装/生产用细胞质量和特性，以及生产工艺综合考虑，一般建议使用至少 3 种不同特性的病毒对工艺的病毒清除能力进行评估。建议评价特定的工艺步骤对特异性或非特异“模型”病毒的去除/灭活效果，并评估整体生产工艺步骤对特异“模型”病毒的总体清除效果。常见的病毒去除/灭活步骤通常包括溶剂/去污剂处理、低 pH 孵育、柱层析、纳滤等，建议基于风险评估考虑采用多种不同原理的病毒去除/灭活工艺步骤。

（5）原液/纯化后产品外源病毒因子检测方面，根据上述情形三“（1）-（3）”全面检测和控制，以及情形三“（4）”对“相关”病毒或特异“模型”病毒的清除能力和效果，开展充分的风险评估，如认为外源病毒因子污染风险可控，则建议上市申请时，提供至少 3 批次商业化代表性工艺的原液/纯化后产品的残留辅助病毒检测结果，检测方法应选择特异性和灵敏度高的合适方法，并进行充分的方法学验证。在没有充分的证据证明生产工艺对“相关”病毒或特异“模型”病毒具有稳健的清除能力和效果的情况下，应对每个批次的原液/纯化后产品进行残留辅助病毒的检测。

（二）纯度检测方法选择和标准限度制定的一般要求

1. rAAV 产品纯度检测方法选择的一般要求

CE-SDS 方法和 SDS-PAGE 方法均可用于 rAAV 产品的纯度控制，以上方法是基于在变性条件下蛋白与 SDS 结合形成带负电的蛋白质-SDS 复合物，这些复合物在电场作用下根据分子量大小进行分离，是目前蛋白质纯度检测比较常见的方法。其中，CE-SDS 方法在分离度、精密度、耐用性等方面优于 SDS-PAGE 方法。随着技术的不断发展和进步，新的更优的检测方法也可能逐步应用，因此，鼓励优先采用精密度和准确度较高的检测方法用于产品纯度检测。

临床试验推进过程中，纯度检测方法可能随着检测技术的发展发生变更。如在临床期间发生纯度检测方法的变更，建议尽可能在早期临床试验阶段进行方法变更，同时根据方法变更情况评估风险，开展必要的变更后方法的确认或验证，并开展变更前后方法的桥接对比研究，应确保变更后方法对产品质量的控制能力与变更前方法相当或更优。变更前后方法检测结果存在差异时，建议尽可能采用变更后方法对既往临床试验用代表性批次及稳定性研究代表性批次进行重新检测，积累批次数据，为质量标准制定提供依据。

2. rAAV 产品单体和聚集体含量质量控制的一般要求

rAAV 产品单体和聚集体含量可反映生产工艺的稳健性和产品质量特性，因此，建议开展 rAAV 产品单体和聚集体的质量研究，并纳入质量标准。目前用于检测 rAAV 产品单体和聚集体的方法较多，比如 SEC-HPLC/MALS、AUC、DLS 等，各种方法具有各自不同的特点，考虑到早期研发阶段对产品的认知尚浅，建议尽可能采用多种技术手段或方法对产品单体和聚集体开展全面的表征研究。临床试验阶段建议监测各批次单体和聚集体的数据，以及稳定性期间数据的变化情况，以合理拟定单体和聚集体的标准限度。

3. rAAV 产品特征性衣壳蛋白（VP1、VP2、VP3）控制策略的一般要求

rAAV 产品中，VP1、VP2、VP3 含量差异较大，通常 VP1 和 VP2 含量较低，VP3 含量较高，其中某些血清型的 rAAV 产品含有部分 VP3 分子变体，因此，建议结合产品特点、分子设计、受工艺影响的程度以及对安全性、有效性、质量可控性的影响程度等，综合考虑制定特征性衣壳蛋白（VP1、VP2、VP3）以及 VP3 分子变体的控制策略。必要时，除了对 rAAV 产品 VP1+VP2+VP3 总量进行控制外，还应结合 VP3 变体对病毒结构或功能影响的风险评估，对 VP3 分子变体含量进行单独控制。

（三）基因组滴度检测方法选择和不同方法桥接对比研究的一般要求

1. rAAV 产品基因组滴度检测方法选择的一般要求

目前 rAAV 产品基因组滴度检测方法常见 qPCR 和 d(d)PCR 方法，其中，d(d)PCR 方法相比 qPCR 方法是对基因拷贝数的绝对定量，不依赖标准品和标准曲线，具有较好的精密度和准确度。随着技术的不断发展和进步，新的更优的检测方法也可能逐步应用，因此，鼓励优先采用精密度和准确度较高的检测方法用于产品基因组滴度检测。

2. 不同的基因组滴度检测方法桥接对比研究的一般要求

临床试验推进过程中，基因组滴度检测方法可能随着检测技术的发展随之发生变更。鉴于基因组滴度对于确保产品剂量准确性及安全性至关重要，如发生方法学变更，建议尽可能在早期临床试验阶段进行方法变更，同时根据方法变更情况综合评估风险，开展必要的变更后方法的确认或验证，并对变更前后方法进行桥接研究，应确保变更后方法对产品质量的控制能力与变更前方法相当或更优，以确保临床使用剂量的准确性。

以目前常见的两种基因组滴度检测方法为例，由于 qPCR 方法和 d(d)PCR 方法在检测原理、引物设计等方面存在差异，

不同检测方法的检测结果可能存在差异，建议尽可能采用变更后方法对既往临床试验用代表性批次及稳定性研究代表性批次进行重新检测，积累批次数据，为质量标准制定提供依据。

（四）空壳率检测方法选择和标准限度制定的一般要求

1. rAAV 产品空壳率检测方法的一般要求

目前 rAAV 产品常见的空壳率检测方法包括 AUC 方法、IE-HPLC 方法、SEC-MALS 方法等。IE-HPLC 方法和 SEC-MALS 方法平台成熟，分析速度快，通量高，但可能无法完全区分部分包装病毒和完整包装病毒。相比 IE-HPLC、SEC-MALS 方法，AUC 法对完整包装病毒、部分包装病毒和空壳病毒的分离效果较好，实测空壳率与理论空壳率差异较小，目前也被行业广泛认可和应用。随着技术的不断发展和进步，新的更优的检测方法也可能逐步应用，因此，鼓励优先采用精密度和准确度较高的检测方法用于空壳率检测和控制。

2. rAAV 产品空壳率标准限度制定的一般要求

建议基于产品特点、生产工艺和既往历史批次检测数据、给药方式和剂量，以及与临床安全性和有效性的相关性等因素综合考虑制定空壳率标准限度。应特别关注，如果空壳率检测方法发生变更，应评估变更对检测结果的影响，开展变

更前后检测方法的桥接对比研究，以合理拟定空壳率标准限度。

（五）效价检测方法选择的一般要求

效价是反映产品生物学活性的关键质量属性。鼓励早期临床试验阶段，根据产品设计和对产品作用机制的理解，初步建立生物学活性分析方法，并对各批次进行检测，例如，对目的基因表达产物的确认，目的基因的表达水平，表达产物的生物学活性等研究。随着临床试验不断推进，持续完善效价相关的关键质量属性的确认和效价控制策略，并尽可能建立关键质量属性与效价之间的相关性。产品上市申请阶段，效价标准限度应基于生产经验以及产品开发和临床研究批次积累的数据进行设定，综合考虑关键临床试验批次数据、方法变异度以及稳定性期间的变化情况进行修订和完善。

通常情况下，不同 rAAV 产品的作用机制可能不同，一些产品可能含有多种活性成分和/或多种生物学活性，某些产品可能需要测定多种活性成分的浓度和效价。因此，不同产品效价检测方法应结合具体情况具体分析。

采用生物学测定方法作为效价检测方法可能受多种因素影响，比如不同仪器之间差异影响，不同分析人员差异影响，以及生物学测定方法中使用的检定用细胞、生物试剂等差异影响。因此，建议尽可能识别可能影响效价检测方法的

潜在影响因素，并充分评估这些因素对方法准确度、精密度等影响。同时，为进一步降低上述因素变异性对效价测定结果的影响，可考虑建立对照品/标准品，或者对每个待测样品进行多次独立分析运行并报告平均值。

如果产品在研发期间发生变更，应结合变更内容、变更程度及变更风险提供充分的风险评估和研究数据，以证明该变更不会对产品的效价产生不利影响。

（六）可复制型腺相关病毒（Replication-competent AAV, rcAAV）检测方法和标准限度制定的一般要求

1. rcAAV 检测方法选择的一般要求

rcAAV 产品生产过程中，由于载体基因组、Rep/Cap 基因以及 ITR 序列可能发生同源和/或非同源重组，可能会形成具有复制能力和潜在感染性的野生型病毒，即 rcAAV。研究显示，rcAAV 在辅助病毒（例如腺病毒 Ad5）存在条件下可以复制扩增，可能影响产品的安全性，是一种具有潜在风险的工艺相关杂质。因此，建议将 rcAAV 检测纳入产品质量标准。为了提高检测方法灵敏度，建议采用细胞培养法与 PCR 相结合的方法。

2. rcAAV 检测方法中阳性对照病毒的一般要求

原则上，阳性对照病毒的血清型建议与产品一致。阳性

对照病毒可以通过商业化购买，也可以自行构建，但无论通过何种途径获得，均应提供阳性对照病毒的来源、制备工艺、主要功能元件及感染滴度标定等研究资料，并关注阳性病毒在贮存期间感染滴度的稳定性。

3. rcAAV 检测方法中共培养细胞选择的一般要求

考虑到不同血清型病毒对不同细胞的感染特性或感染能力不同，鼓励尽可能基于产品特性筛选易感的细胞系，其可以通过商业化购买，也可以自行构建，但无论通过何种途径获得，均应提供检定用细胞来源、细胞库建库和检定等研究资料，关注细胞的传代方式、培养条件等对方法检测灵敏度的影响。

4. rcAAV 标准限度制定的一般要求？

rcAAV 标准限度应在上市阶段结合方法验证结果、批次数据积累、临床安全性和有效性等情况合理设定。

（七）残留宿主 DNA 片段大小质量控制的一般要求

1. rAAV 产品中残留宿主 DNA 大小分布是否需要纳入质量标准

残留宿主 DNA 具有潜在的致癌性、感染性及免疫原性，较长片段的宿主 DNA 风险相对较高，因此，建议在临床试验

阶段对宿主 DNA 片段大小进行持续监测,积累多个批次数据,并关注宿主 DNA 片段大小分布变化情况。同时,根据临床期间积累数据情况开展充分的安全性评估,基于积累的数据和安全性评估情况综合评估是否纳入质量标准。

2. 残留宿主 DNA 片段大小控制的一般要求

按照《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》的要求,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。鉴于目前部分 rAAV 产品可能难以达到残留宿主 DNA 大小 < 200bp 的要求,建议结合具体品种类型,以及现有工艺对残留宿主 DNA 片段的去除能力等具体分析,通过开展更加充分的研究和安全性评估数据,证明残留宿主 DNA 片段大小内控标准限度拟定的合理性。同时,基于提高产品质量和控制产品安全性,降低潜在安全性风险工艺相关杂质水平的考虑,鼓励申请人通过不断优化生产工艺,尽可能降低 > 200bp 残留宿主 DNA 片段的比例。

三、参考文献

1. ICH Q5A(R2). Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. 2023.
2. NMPA. 体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则. 2022.
3. NMPA. 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. 2023.
4. NMPA. 溶瘤病毒产品药学研究与评价技术指导原则（试行）. 2023.
5. 国家药典委员会. 《中华人民共和国药典》（2025 年版）. 2025.
6. FDA. Potency tests for cellular and gene therapy products. 2011.
7. FDA. Potency assurance for cellular and gene therapy products (draft guidance for industry). 2023.