



吴钦斌, 目前就职于和元生物技术(上海)股份有限公司(简称和元生物), 担任首席质量官, 负责和元生物临港基地的质量管理工作。和元生物成立于2013年, 作为深耕细胞与基因治疗核心领域的高新技术企业, 专注于为细胞与基因治疗的基础研究提供基因治疗载体研制、基因功能研究、药物靶点及药效研究等CRO服务; 为细胞与基因治疗药物的研发提供工艺开发及测试、IND-CMC药学研究、临床样品及商业化产品的GMP生产等CDMO服务; 为再生医学及抗衰领域提供细胞制备、重组蛋白/外泌体等细胞衍生物生产、细胞存储等技术服务。致力于推动细胞与基因治疗及相关健康产业的技术开发及转化应用, 造福生命健康。和元生物秉承“整合你我资源, 服务生命科学”的理念, 坚守“客户第一、高效执行、追求卓越、创新突破、诚信务实”的价值观, 全方位促进细胞与基因治疗从研究走向临床, 已成长为一家集基因功能基础研究服务、临床级细胞与基因治疗药物商业化生产服务、再生医学服务三大发展方向于一体的高新技术企业。

细胞与基因治疗产品中慢病毒载体生产与质控要求

陈成 刘晶晶 卢京兰 程海子 吴钦斌*

(和元生物技术(上海)股份有限公司, 上海 201321)

摘要 慢病毒载体(lentiviral vectors, LVs)因其能够高效感染分裂和非分裂细胞, 并实现外源基因的长期、稳定表达, 已成为细胞与基因治疗领域最常见的基因递送工具之一, 尤其在CAR-T细胞治疗和遗传病治疗方面具有广泛应用。该文旨在系统综述慢病毒载体的生产与质控要求。该文回顾了慢病毒载体系统的历史发展脉络, 包括其从HIV-1病毒改造而来的发展历程、四代系统的安全性演进, 并对比了国内外在该领域的技术发展路径与监管框架; 系统阐述了当前慢病毒载体生产的主流策略, 包括基于贴壁细胞和悬浮细胞的规模化生产工艺、瞬时转染与稳定生产细胞系构建的优缺点, 以及下游的纯化与浓缩策略; 重点讨论了慢病毒载体的质量控制体系, 涵盖生物学活性(滴度)、纯度、安全性[无菌、支原体、复制型慢病毒(RCL)等]和理化特性等关键指标的检测方法与标准。最后, 展望了慢病毒载体未来发展方向, 包括生产技术的创新(如稳定细胞系开发、无血清悬浮培养工艺)、分析检测方法(新一代测序技术、快速检测方法)的优化以及规模化生产中难题的解决, 以期为推动基于慢病毒载体的细胞与基因治疗产品的临床转化与产业化提供参考。

关键词 慢病毒载体; 细胞与基因治疗; 生产工艺; 质量控制; 复制型慢病毒

Requirements for Lentiviral Vector Production and Quality Control in Cell and Gene Therapy Products

CHEN Cheng, LIU Jingjing, LU Jinglan, CHENG Haizi, WU Qinbin*

(OBio Technology (Shanghai) Corp., Ltd, Shanghai 201321, China)

收稿日期: 2025-09-16 接受日期: 2025-10-21

*通信作者。Tel: 021-58585887, E-mail: wqb2184@obiosh.com

Received: September 16, 2025 Accepted: October 21, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-21-58585887, E-mail: wqb2184@obiosh.com

Abstract LVs (lentiviral vectors), known for their ability to efficiently transduce both dividing and non-dividing cells and achieve long-lasting transgene expression, have become one of the most widely used gene delivery tools in cell and gene therapy, especially in CAR-T cell therapy and the treatment of genetic diseases. This article aims to provide a comprehensive overview of the requirements for producing lentiviral vectors and ensuring quality control. It reviews the historical development of lentiviral vector systems, including their engineering from HIV-1 and safety improvements through three generations of system upgrades, and compares the technological progress and regulatory frameworks established domestically and internationally. This article systematically elaborates on the mainstream strategies for current lentiviral vector production, including large-scale manufacturing processes based on adherent cells and suspension cells, the advantages and disadvantages of transient transfection versus stable producer cell line establishment, as well as downstream purification and concentration strategies. Special focus is placed on the quality control system for LVs, covering critical quality attributes such as biological activity (titer), purity, safety [sterility, mycoplasma detection, RCL (replication-competent lentivirus), etc.], and physicochemical properties, along with their testing methods and standards. Lastly, future directions are discussed, including innovations in production technology (e.g., stable cell line development, serum-free suspension culture methods), improvements in analytical techniques (e.g., next-generation sequencing, rapid testing methods), and strategies to overcome challenges in large-scale production. The goal is to offer insights that support the clinical translation and industrialization of LVs-based cell and gene therapy products.

Keywords lentiviral vectors; cell and gene therapy; production process; quality control; replication-competent lentivirus

细胞与基因治疗(cell and gene therapy, CGT)代表了现代医学革命的前沿,为癌症、遗传性疾病和自身免疫病等难治性疾病提供了新的治愈希望。在这一领域中,安全高效的基因递送系统是技术成功的核心。慢病毒载体(lentiviral vectors, LVs)源于人类免疫缺陷病毒I型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1),经过一系列基因工程改造,已发展为最具应用前景的基因递送工具之一^[1]。与 γ -逆转录病毒载体等其他病毒载体相比, LVs具有能感染非分裂期细胞、承载容量较大、插入突变风险相对较低以及能实现长期稳定的转基因表达等显著优势^[2]。这些特性使其在嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)疗法、造血干细胞基因疗法(如治疗 β -地中海贫血)等领域取得了突破性成功^[3]。然而,将LVs从实验室研究工具转化为临床级乃至商业化的治疗产品,面临着两大核心挑战:大规模、高滴度、高一致性的生产工艺和严格、完善的质量控制体系^[4]。生产过程中的任何偏差都可能影响载体的有效性、安全性和纯度,进而直接关系到最终治疗产品的成败。因此,建立标准化、规范化的生产与质控流程至关重要,这也是全球监管机构[如美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration,

FDA)、欧盟药品监督局(European Medicines Agency, EMA)、国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)]关注的焦点^[5-7]。

本文将从慢病毒载体起源与演进,中美欧监管和法规要求,生产工艺与质量控制和未来展望等方面系统论述,希望为相关领域的研究者和产业界人士提供有益参考。

1 慢病毒载体系统起源与演进

1.1 慢病毒结构和功能

慢病毒载体是一种由慢病毒(最常用的是HIV-1)改造而成的基因递送工具。其结构包括3个核心组成部分,即转移载体(transfer vector plasmid)、包装系统(packaging system)和包膜糖蛋白(envelope glycoprotein)。转移载体含有目的基因(gene of interest, GOI),包含病毒基因组中包装、逆转录和整合所必需的顺式作用元件[例如LTR、包装信号 Ψ 、Rev应答元件(rev response element, RRE)等],但缺少所有病毒蛋白编码基因。包装系统提供病毒复制和包装所需的所有反式作用蛋白(如Gag、Pol、Rev等)对应的质粒,这些蛋白可反式补偿转移载体的功能缺失,但自身不能组装成病毒颗粒。包膜糖蛋白

通常由另一个质粒提供,以实现病毒假型化(pseudotyping),其中最常用的是水疱性口炎病毒G糖蛋白(VSV-G),它赋予病毒载体更广泛的宿主细胞嗜性(tropism)及更高的病毒颗粒稳定性。

1.2 慢病毒载体的发展史

慢病毒载体的发展史是一部不断追求更高安全性的进化史,慢病毒改构核心目标是在保留高效转导分裂和非分裂细胞能力的同时,最大限度地削弱其毒力,确保其生物安全性。慢病毒载体整个发展历程正是一部围绕“效能”与“安全”不断博弈和优化的历史。截至目前慢病毒已发展为第四代系统,其分代的演变主要体现在包装系统的不断拆分和优化上。历代慢病毒系统演变过程和特点分别见图1和表1。

1.2.1 第一代系统 1996年, NALDINI等^[8]首次验证了基于HIV-1的慢病毒载体能够有效感染非分裂细胞。第一代LVs系统采用了绝大部分的野生型HIV-1基因组(约9 Kb)作为包装元件,仅用目的基因序列替换了病毒包膜基因(*env*),该系统的生物安全风险较高。HIV-1具有感染性,其研究必须在BSL3

等级或者BLS-2+实验室进行。为了降低慢病毒载体回复突变的风险,第一代慢病毒载体采用三质粒系统进行包装,其中包括1个负责表达*gag/pol*及相关辅助蛋白的包装质粒、1个表达VSV-G包膜蛋白的包膜质粒,以及1个携带目的基因的穿梭质粒。因为包装元件质粒与包膜蛋白质粒均不含有包装信号 ψ 及LTRs,所以导致包装后的慢病毒自我复制的能力非常低。另外,穿梭质粒不表达*tat*基因,5'LTR在没有*tat*蛋白的作用下转录能力非常弱,因此导入的外源基因一般需要通过一个额外的启动子进行表达。

1.2.2 第二代系统 为了降低风险,研究人员将HIV-1基因组中的辅助基因(如*vif*、*vpr*、*vpu*、*nef*)删除。研究表明,这些基因的缺失虽并不影响病毒的包装和转导效率,但却显著提高了系统的生物安全性^[9]。因此,第二代慢病毒载体包装系统删除了*vif*、*vpr*、*vpu*和*nef*4个基因,且用VSV-G取代HIV-1的*env*,第二代慢病毒载体仅包含HIV-1的9个基因中的4个:*gag*、*pol*、*tat*、*rev*基因。

1.2.3 第三代系统 第三代系统是当前临床应用中被广泛采用的黄金标准。该系统通过将包装功

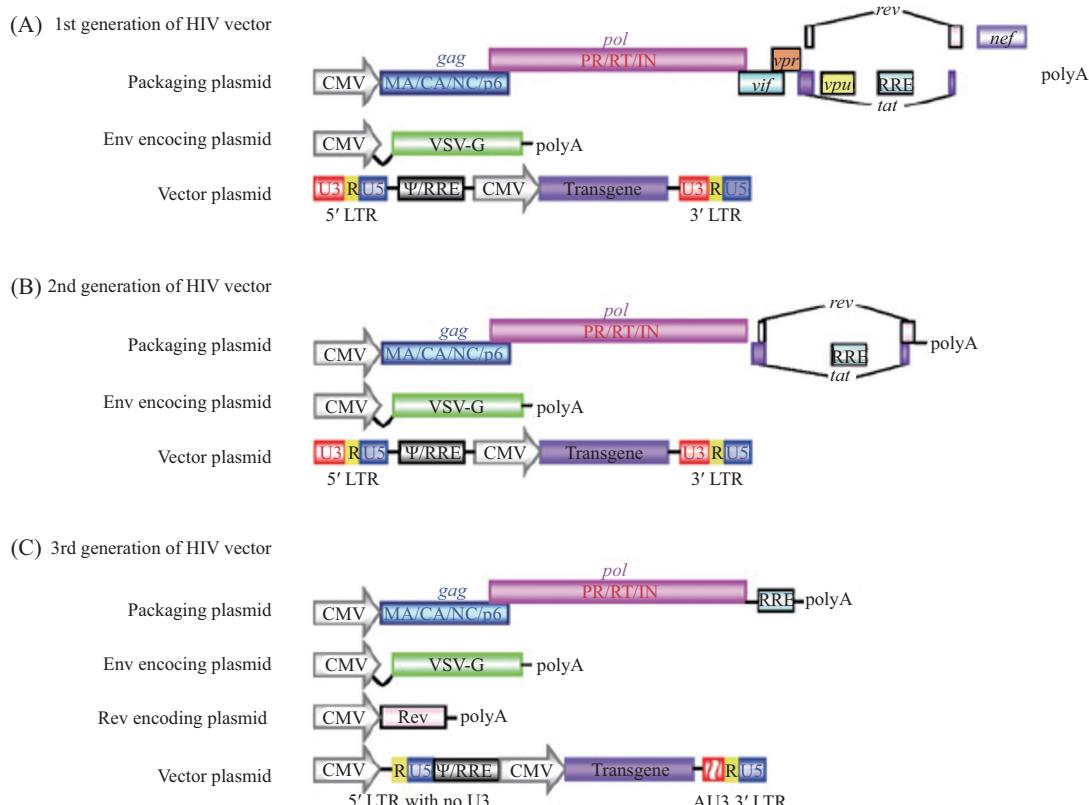


图1 不同代慢病毒改构策略(根据参考文献[11]修改)

Fig.1 Modification strategies for different generations of lentivirus (modified from the reference [11])

能进一步拆解到更多的质粒,使得基因分离的更彻底。通常采用的四质粒系统包括^[10]: ①转移质粒,包含目的基因、两侧的LTR[经自我失活修饰(self-inactivating, SIN)]、包装信号Ψ等;②包装质粒,提供gag(编码核心蛋白)和pol(编码逆转录酶、整合酶等)基因;③包膜质粒,提供水疱性口炎病毒G糖蛋白(VSV-G)基因,用于病毒假型化,拓宽宿主细胞的范围并提高载体颗粒的稳定性;④辅助质粒,提供rev基因,用于调节gag/pol mRNA的核输出。第三代慢病毒包装系统只包含了HIV-1的9个基因中的3个:pol、gag、rev。这进一步增加了该慢病毒载体的安全性。此外,即使发生重组,导致pol、gag和rev被完整整合到穿梭质粒中,由于LTR丧失了活性,该病毒也难以进行扩增。同时vif、vpu、vpr和nef的删除也将该病毒的致病性降到最低。因此,第三代系统通过将病毒基因组分散到不同质粒中的策略,最大限度地减少了通过同源重组产生复制型慢病毒(replication-competent lentivirus, RCL)的可能性,其安全性得到了极大提升。

1.2.4 第四代系统 前3代系统在业界广泛使用,第四代系统难度较大,目前仍在研发中,尚未取得新的突破。第四代系统旨在进一步提高安全性和产量,例如开发可诱导的包装系统或利用CRISPR等技术构建更稳定的生产细胞系^[12]。构建一个高质量的慢

病毒稳转株是一个系统性的过程,主要包括载体设计与构建,病毒包装与收获,细胞转导与药物筛选,单克隆筛选与验证,细胞建库与保藏。

慢病毒载体质粒包含目标基因表达盒、标记基因筛选和慢病毒包装所需的顺式元件等。目的基因表达盒由强启动子(如CMV、EF1 α 、PGK)、多克隆位点(用于插入目的基因,如EGFP、CD7-EX、PTEN等)和polyA信号组成。筛选标记基因,如嘌呤霉素抗性基因(puro)、新霉素抗性基因(neo)(常用G418筛选)或潮霉素抗性基因(hygro),用于后续的药物筛选。慢病毒包装所需的顺式元件,如5'和3'LTR(长末端重复序列)、包装信号Ψ、RRE等,这些是病毒基因组能够被正确包装和复制所必需的。载体构建时,通过分子克隆技术(如酶切连接、同源重组等)将目的基因插入慢病毒载体,形成重组质粒,例如pLVsX-puro-EGFP或pCDH-CMV-MCS-EF1-puro。

重组载体本身不能形成病毒颗粒,需要与包装质粒共转染至包装细胞中。最常用的是人胚肾293T细胞,因其易于转染且高表达SV40大T抗原,能高效扩增含有SV40复制子的包装质粒。采用第三代慢病毒包装系统,包括包装质粒(如psPAX2, 提供gag、pol、rev等病毒结构蛋白和调节蛋白)和包膜质粒(如pMD2.G, 提供水疱性口炎病毒G糖蛋白,用于假型

表1 不同代慢病毒包装系统特点

Table 1 Characteristics of packaging systems for different generations of lentivirus

代次 Generation	核心特征 Core features	改造策略 Modification strategies	目的 Purpose	优势 Advantages	缺陷 Disadvantages
1st generation	Three-plasmid system	Genome splitting; accessory genes deletion; VSV-G pseudotyping	Initial biosafety; altering cell tropism	First achieved safe and efficient gene delivery	Contains tat; high LTR activity, relatively high risk of recombination
2nd generation	Tat deletion	Deletion of tat from packaging plasmid; use of heterologous promoter in 5' LTR of transfer vector	Further enhanced safety; system simplification	Improved safety; widely used, high titer	Still relies on rev-RRE system
3rd generation	Four-plasmid system	Splitting packaging plasmid into gag/pol and rev plasmids	Minimizing homologous recombination risk, achieving the highest clinical safety standard	High safety, considered the gold standard for clinical therapy	System complexity, potentially slightly lower titer
4th generation	Establishment of stable cell lines	Integration of lentiviral genes into the cellular genome	Obtaining stable cell lines for long-term expression	No need for transfection, high consistency, low cost, no plasmid impurities	Long development cycle, technically challenging, potentially lower yield

化以扩大宿主范围), 通过细胞转导方式将目的基因导入靶细胞并筛选出成功整合的细胞^[13], 并通过单克隆筛选获得遗传背景一致、表达稳定的细胞株。细胞单克隆筛选主要采用有限稀释法, 将筛选后的混合细胞群体进行高度稀释, 并接种到96孔板中, 理论上使每个孔仅含有一个细胞, 并在显微镜下标记确认为单细胞的孔, 培养至细胞克隆形成。

分别从基因组水平、转录水平和蛋白水平对单克隆细胞进行验证。采用PCR或qPCR检测外源基因是否成功整合到宿主细胞基因组中, 通过qRT-PCR检测目的基因的mRNA表达水平, 利用Western blot、流式细胞术(若表达荧光蛋白或细胞表面蛋白)或免疫荧光等方法检测目的蛋白的表达情况、表达量及定位。例如, 在构建293T-GFP-CD7-EX稳转细胞系时, Western blot验证了His-CD7-EX融合蛋白的成功表达^[14]。对经过充分验证的单克隆细胞株进行扩增, 建立研究级细胞库, 并利用液氮进行冻存保藏, 以备后续长期使用。

构建高质量的慢病毒稳转株面临多重技术挑战, 这也是其核心壁垒所在。①稳定高产细胞系的筛选: 筛选出能稳定、高产目的蛋白或病毒载体的单克隆细胞系是核心挑战之一。这个过程需要进行大量的单克隆筛选与鉴定工作, 耗时且成本高。例如, 构建用于生产慢病毒的稳转包装细胞系, 需要确保病毒滴度和质量符合要求, 筛选工作量巨大^[15]。②外源基因表达稳定性: 外源基因整合入宿主基因组后, 可能因表观遗传修饰(如DNA甲基化、组蛋白修饰)或整合位点不适而导致基因沉默或表达水平逐渐下降。确保目标基因在长期传代(如超过20代)后仍能稳定表达是关键难点。③细胞适应性及规模化培养: 为满足工业化生产的需求, 构建的稳转细胞系需要适应无血清悬浮培养。同时, 要实现从摇瓶到生物反应器的工艺放大, 此过程可能面临细胞生长、代谢及产物质量不一致的挑战。④合规与质量控制: 用于药物开发(如CAR-T细胞治疗)或临床级生物制品生产的稳转细胞系需满足严格的监管要求。细胞库需进行无菌、支原体、外源病毒因子等检查, 整个构建过程需符合药品生产质量管理规范(good manufacturing practice, GMP)标准, 并满足中美双报等国际申报要求, 这大大增加了技术复杂性和成本。

慢病毒稳转株的优势主要包括以下几个方面。

①长期稳定表达: 外源基因整合至宿主基因组, 可随细胞分裂稳定遗传给予子代细胞, 实现目的基因的长期、稳定表达, 避免了瞬时转染需要反复操作的麻烦。②适用于难转染细胞: 慢病毒能够有效感染多种难转染的细胞类型, 包括原代细胞、非分裂细胞和悬浮细胞, 极大地扩展了基因操作的细胞范围。③表达水平相对均一: 相较于瞬时转染, 稳转株群体中外源基因的表达更为均一, 有利于后续实验的稳定性和可重复性。④简化工艺流程与降低成本: 一旦稳转株构建成功, 就无需再进行频繁的转染或病毒包装, 节省了时间和试剂成本, 特别适合于需要长期进行基因功能研究或大规模生产蛋白/病毒的场景。⑤利于规模化生产: 基于稳转细胞系的生产工艺可摆脱对大量质粒和转染试剂的依赖, 简化生产流程、降低生产成本、提高产量和批次一致性, 更符合工业化生产要求^[16]。

慢病毒稳转株的也存在其劣势, 主要表现在以下方面。①构建周期长: 从载体构建、病毒包装、细胞转导到单克隆筛选验证, 整个流程通常需要数周至数月, 远长于瞬时转染。②技术复杂且要求高: 流程涉及分子克隆、病毒学、细胞生物学等多领域技术, 操作复杂, 对实验人员的技能和经验要求较高。③随机整合风险: 慢病毒的随机整合可能导致插入突变, 可能破坏宿主重要基因的功能或激活原癌基因, 存在潜在的安全风险。在临床应用中, 此风险需严格评估。④基因表达受整合位点影响(位置效应): 外源基因的表达水平易受其整合位点周边染色质环境的影响, 导致不同单克隆株系间表达差异大, 需要筛选大量单克隆以获得理想表达株。⑤生物安全风险: 慢病毒属于复制缺陷型病毒, 但仍属生物危险品, 操作需要在相应生物安全等级实验室(至少BSL-2)中进行, 并需遵守相关法规。

2 中国、美国和欧盟对慢病毒载体的监管要求

2.1 中国慢病毒载体发展历程与监管要求

国内病毒载体的监管框架是伴随着CGT行业的爆发式发展而快速建立起来的。其核心思路是将CGT产品明确作为药品进行管理, 遵循《药品管理法》、《药品注册管理办法》等顶层法规, 并在此基础上, 通过发布一系列技术指导原则来适应CGT产品的特殊性和复杂性, 实现了从“零散监管”到“体系化

监管”的跨越。

国内慢病毒载体领域的发展与全球趋势基本同步,但监管体系的构建呈现出“紧跟前沿、从探索到规范、逐步完善”的特点,其历程大致可分为以下3个阶段。

2.1.1 探索与初创期(2010年—2015年) 该阶段为技术引入与研究阶段。此时慢病毒载体主要作为强大的科研工具,在国内顶尖的科研院所和高校实验室中使用,用于基因功能研究、疾病模型构建等。国内CGT产业开始萌芽,但多为学术驱动,商业化项目稀少。在监管方面,监管体系尚未专门针对CGT产品建立。相关研究活动主要遵循《药物临床试验质量管理规范》(GCP)和《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》(2003年版)等通用性法规,监管职责分散在原卫生部、原国家食药监局等多个部门。

2.1.2 快速发展与监管起步期(2016年—2020年) CAR-T疗法引发行业变革。以CAR-T为代表的细胞治疗在全球范围内取得了突破性进展,其核心工具——慢病毒载体(LVs)和逆转录病毒载体(retrovirus vector, RV)的需求呈现爆炸式增长。大量生物技术公司的成立推动了细胞与基因治疗(CGT)从实验室迈向临床应用。在监管方面,随着2016年“魏则西事件”暴露了细胞治疗临床应用中的混乱局面,监管机构迅速采取了措施。原国家食品药品监督管理总局明确将细胞治疗产品作为药品进行管理,标志着细胞产品进入到严格的监管时代。在此背景下,监管框架初步建立,国家药品监督管理局(NMPA)药品审评中心(Center for Drug Evaluation, CDE)发布了一系列关键的技术指导原则,为行业的研发和申报提供了基准。虽然尚未出台专门针对载体的指导原则,但其质量控制要求已纳入细胞治疗产品的整体规范体系中。

2.1.3 体系化与成熟期(2021年至今) 2021年,中国迎来了两款CAR-T产品的商业化上市(复星凯特的阿基仑赛注射液和药明巨诺的瑞基奥仑赛注射液),标志着中国CGT产业进入商业化元年。这两款商业化产品的上市,背后离不开对慢病毒载体生产工艺与质量的严格控制。国内监管体系逐步完善,NMPA CDE加快了CGT全产业链监管体系的构建与完善。最具里程碑意义的是2022年发布的《细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)》,该指南详尽规定

了包括病毒载体生产在内的CGT产品生产质量管理要求。随着CGT行业的快速发展,监管指南日益细化,CDE发布了更多针对特定技术的指导原则,对载体的设计、生产、质量研究以及非临床评价提出了更为具体和科学的要求。监管框架已从单纯的“有无”问题,转变为“优劣”和“精细化管理”的问题。

国家药品监督管理局(NMPA)及其下属的药品审评中心(CDE)明确将用于细胞治疗的LVs视为基因治疗产品组成部分,即按照原液(drug substance, DS)进行管理^[17]。病毒载体通常作为免疫细胞治疗产品的起始原材料,但其本身也符合基因治疗产品的定义。因此,病毒载体的制备过程应当遵循《药品生产质量管理规范》和相关指南的基本原则,其质量控制和放行检验可参照基因治疗产品相关指南的要求。

2.2 美国和欧盟对慢病毒的监管要求

美国关于慢病毒监管策略以产品风险为基础,具有灵活适应性,一般可以早期介入。美国负责CGT产品审评的机构为隶属于美国食品药品监督管理局(FDA)的生物制品评价与研究中心(Center for Biologics Evaluation and Research, CBER)及其内部组织的先进疗法办公室(office of tissues and advanced therapies, OTAT)。FDA的监管原则虽以药品框架为依据,但其策略更强调“基于产品风险”和“与申办方早期沟通”。FDA将慢病毒载体视为最终CGT产品的关键组成部分,并对其生产和质量控制设有明确预期。监管机构鼓励申办方通过Pre-IND会议,提前就病毒载体的关键质量属性(critical quality attributes, CQAs)、检测方法(尤其是复制型慢病毒RCL检测)、安全性研究设计等进行早期沟通并达成共识。其监管注重最终产品的安全性和有效性,同时强调通过科学的生产过程控制与物料管理,实现严格的质量保障。

FDA对慢病毒载体的监管基于其在新药申请(临床试验申请、生物制品上市注册申请)中的具体用途,但其监管框架更倾向于将其视为一种生物制品原液(biological drug substance)^[18-19]。申办方需提供LVs的完整CMC(chemical, manufacturing and control)信息,包括详细的生产工艺、过程控制、全面的特性鉴定(如载体滴度、复制型慢病毒RCL检测、载体序列完整性、纯度、效力等)、放行标准和质量控制策略。LVs的生产应符合当前药品生产质量管理规范(current good manufacturing practices,

表2 全球已上市以慢病毒为载体的CGT产品
Table 2 Globally marketed CGT products utilizing lentiviral vectors

产品名称 Product name	公司 Company	类型 Type	适应症 Indication	获批时间 Approval date
Zynteglo	Bluebird Bio	Gene therapy (HSC)	β-thalassemia	EU/2019
Skysona	Bluebird Bio	Gene therapy (HSC)	CALD (cerebral adrenoleukodystrophy)	EU/2021
Lyfgenia	Bluebird Bio	Gene therapy (HSC)	SCD (Sickle cell disease)	USA/2023
Tecartus	Kite Pharma	CAR-T cell therapy	Mantle cell lymphoma	USA/2020
Breyanzi	Bristol Myers Squibb	CAR-T cell therapy	Large B-cell lymphoma	USA/2021
Carvykti	Janssen/Legend Bio	CAR-T cell therapy	Multiple myeloma	USA/2022

数据来源于医药魔方数据库PharmaGO[®]。

Data sourced from the PHARMACUBE database (PharmaGO[®]).

cGMP)。

欧盟采用“集中审批”和“成员国审批”并行的双轨制。欧盟对CGT产品的审评机构为欧洲药品管理局(EMA)及其下属的人用药品委员会(Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP)和先进疗法治疗委员会(Committee for Advanced Therapies, CAT)。针对先进疗法药物(advanced therapy medicinal product, ATMP), 尤其是基因治疗产品, 强烈建议通过集中程序上市, 使其在全部欧盟成员国有效。其对慢病毒载体的监管建立在一套高度协调的法规和指南体系上。

欧洲药品管理局(EMA)对用于体外转导的LVs的监管更侧重于最终的细胞治疗产品本身。LVs通常被定义为一种起始物料, 但其质量标准和要求极其严格, 几乎达到了对活性物质的要求^[20]。在欧盟, 虽然LVs在法律上被归类为“起始物料”, 但监管期望其质量等同于“活性物质”。申报者无需为LVs单独申请上市许可, 但必须在整体药品的上市许可申请(marketing authorization application, MAA)中提供关于LVs的详尽数据, 包含生产和质量研究相关的数据, 以及病毒载体本身的稳定性数据。监管审查的重点是LVs的质量如何影响最终细胞产品的安全性、纯度和有效性。

2.3 全球已上市以慢病毒为载体的CGT产品及相关法规

目前, 全球已上市以慢病毒载体的CGT产品见表2, 相关法规如表3所示。

3 生产工艺与质量控制

作为一种关键原材料, 慢病毒在活性物质或细胞产品的基因修饰系统中扮演着重要角色。其生产

过程须严格遵循GMP标准进行管理, 从人、机、料、法、环、测等多方面进行全方位控制。①人: 人员需要进行培训, 才能获得上岗资质; ②机: 设施设备需要完成计量、验证, 才能投入使用; ③料: 生产中使用的原材料需要建立质量标准, 完成检测, 满足标准后予以放行使用; ④法: 生产工艺必须要制定相关指导GMP生产的工艺规程及生产批记录, 严格按照管理规程执行, 以确保每批产品的一致性; ⑤环: 质粒用于无菌产品, 通常需要控制微限或进行无菌检测, 其生产要在满足相应的洁净等级的GMP车间进行; ⑥测: 产品的中间体及成品, 应制定合理的质量标准, 检测方法需要经过验证或确认, 检测过程应制定详细的检测规程并留存相应的检测记录。

3.1 生产工艺

当前, 慢病毒载体主流的生产方法是基于人胚肾293(HEK293)细胞系的瞬时转染^[21-22]。培养模式一般有贴壁培养和悬浮培养。贴壁培养是传统培养方式, 使用细胞工厂(cell factory)或多层次培养瓶(HyperStack)可以在一定程度上扩大规模, 但操作繁琐, 难以实现真正的工业化放大。悬浮培养则是大规模生产的主要方向, 通过将293细胞驯化为悬浮生长习性, 并在生物反应器(如搅拌式反应器)中进行培养, 可实现高密度细胞培养和过程参数(pH、溶氧、温度)的精确控制, 悬浮培养方式可以将生产规模放大到百升。除此之外, 还可以构建慢病毒稳定生产的细胞株, 无需采用质粒瞬时转染的方式, 具有成本低、安全性高的优势, 但技术壁垒高, 产量通常比较低。慢病毒载体主要生产工艺对比见表4。

以目前最为成熟的瞬转贴壁培养为例, 病毒生产可分为上游生产工艺和下游生产工艺, 生产工艺流程如图2所示。上游生产工艺主要包括细胞复苏、

表3 中国、美国、欧盟慢病毒相关法规
Table 3 Lentivirus-related regulations in China, United States, and European Union

法规名称 Regulatory document name	发布时间 Release date	发布机构 Issuing authority
<i>Guidelines for Pharmaceutical Research and Evaluation of In Vivo Gene Therapy Products (Trial Implementation)</i>	May 2022	Center for Drug Evaluation
<i>Guidelines for Quality Management of Plasmid Production Used in the Manufacture of Immune Cell Therapy Products</i>	May 2023	Center for Food and Drug Inspection
<i>Guidelines for Research and Evaluation of Cell Therapy Products (Trial Implementation)</i>	December 2017	National Medical Products Administration
<i>Guidelines for Pharmaceutical Research and Evaluation of Immune Cell Therapy Products (Trial Implementation)</i>	May 2022	Center for Drug Evaluation
<i>Guidelines for Pharmaceutical Research and Evaluation of Ex Vivo Gene Modification Systems (Trial Implementation)</i>	May 2022	Center for Drug Evaluation
<i>General Chapter on Human Gene Therapy Products</i>	October 2025	Chinese Pharmacopoeia Commission
<i>Questions and Answers on Rcl Testing for Lentiviral Vectors (Draft for Comments)</i>	October 2023	Center for Drug Evaluation
<i>Common Issues and Technical Requirements for Replication-Competent Lentivirus (RCL) Testing</i>	October 2024	Center for Drug Evaluation
<i>Draft-Considerations for the Development of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Products</i>	April 2008	Food and Drug Administration
<i>USP45<1040> Quality Considerations of Plasmid DNA as a Starting Material for Cell and Gene Therapies Including RNA Products</i>	December 2025	United States Pharmacopeia
<i>USP45<1046> Cell-Based Advanced Therapies and Tissue-Based Products</i>	December 2025	United States Pharmacopeia
<i>USP45<1047> Gene Therapy Products</i>	December 2025	United States Pharmacopeia
<i>Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)</i>	January 2020	Food and Drug Administration
<i>Testing of Retroviral Vector-Based Human Gene Therapy Products for Replication Competent Retrovirus During Product Manufacture and Patient Follow-Up. 2020</i>	January 2020	Food and Drug Administration
<i>Gene Therapy Product Quality Aspects in the Production of Vectors and Genetically Modified Somatic Cells</i>	December 1994	European Medicines Agency
<i>Guideline on Quality, Non-Clinical and Clinical Aspects of Live Recombinant Viral Vectored Vaccines</i>	August 2010	European Medicines Agency
<i>Guideline on the Quality, Non-Clinical and Clinical Aspects of Gene Therapy Medicinal Products</i>	July 2018	European Medicines Agency
<i>Draft-Guideline on Quality, Non-Clinical and Clinical Requirements for Investigational Advanced Therapy Medicinal Products in Clinical Trials</i>	January 2019	European Medicines Agency
<i>Guideline on Quality, Non-Clinical and Clinical Aspects of Medicinal Products Containing Genetically Modified Cells</i>	December 2020	European Medicines Agency
<i>Guideline on Development and Manufacture of Lentiviral Vectors</i>	September 2025	European Medicines Agency

细胞传代培养、细胞扩大培养、质粒转染和病毒收获；下游生产工艺包括澄清过滤、核酸酶切、超滤浓缩、层析纯化、除菌过滤和灌装。在生产之前，应依据现行版《中国药典》标准，完成至少二级细胞库[MCB(master cell bank)和WCB(working cell bank)]的建库和检定，并对慢病毒生产终末细胞(end of production cell, EOPC)和生产过程中未处理的收获液(unprocessed bulk, UPB)进行外源病毒因子检测。

慢病毒生产需要遵循药品生产质量管理规范(GMP)，生产过程中需要取样进行中间品控制和无菌检查。上游工艺过程控制主要严格监控和控制温度、pH、溶氧、细胞传代密度和质粒转染条件等参数，确保工艺的重现性；下游工艺的目标是最大化回收高纯度的慢病毒，并彻底去除杂质，例如宿主DNA、宿主蛋白、宿主RNA、转染试剂和细菌内毒素等杂质。慢病毒的灌装一般要求在C级背景下隔离器或A级生物安全柜中进行无菌灌装。为

表4 慢病毒载体主要生产工艺对比
Table 4 Comparison of major production processes for lentiviral vectors

生产方式 Manufacturing process	优势 Advantages	缺点 Disadvantages	适用阶段 Applicable stage
Transient transfection (adherent culture)	Mature technology, high flexibility	Limited scale, labor-intensive, risks associated with serum use	Preclinical and early clinical stages
Transient transfection (suspension culture)	Easy to scale up, closed-system operation, serum-free culture	Challenging transfection efficiency optimization, massive plasmid demand	Late-stage clinical and commercialization
Stable producer cell line	No transfection needed, high consistency, low cost, no plasmid impurities	Long development cycle, technically challenging, potentially lower yield	Commercialization

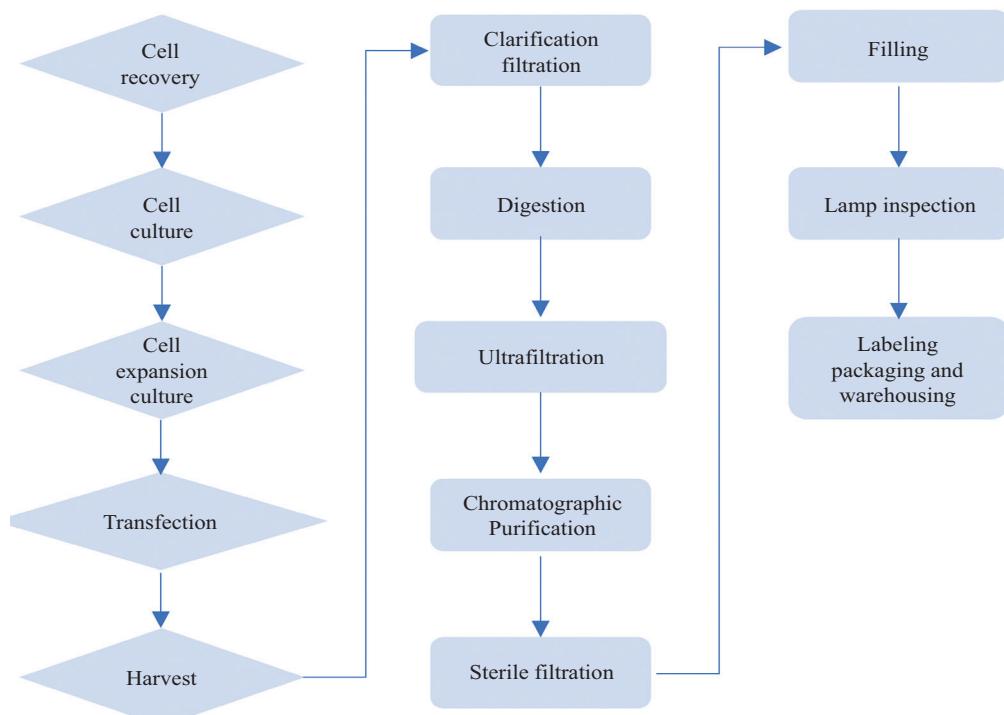


图2 慢病毒生产工艺流程图
Fig.2 Lentivirus production process flowchart

了保障灌装的均一性, 业内通常采用自动化灌装机进行灌装。

3.2 质量控制

质量控制遵循质量源于设计(quality by design, QbD)的理念, 在工艺开发阶段就深入理解关键物料属性(critical material attributes, CMA)、关键工艺参数(critical process parameter, CPP)和关键质量属性(CQA); 同时, 完善的质量管理体系(quality management system, QMS)是GMP级慢病毒质量控制的保障。

慢病毒载体的质量标准检测项目通常包括外观、鉴别、纯度、含量、物理滴度、转导滴度、生物学活性、杂质、无菌检查、细菌内毒素、支原体、

复制型慢病毒(RCL)以及外源病毒因子等。杂质包括工艺相关杂质(宿主细胞DNA和蛋白残留、质粒DNA残留, 以及转染试剂残留等), 产品相关杂质主要指空病毒颗粒(不含载体基因组), 目前缺乏绝对定量的金标准方法, 常通过分析p24蛋白/功能滴度值或电子显微镜进行间接评估。

检测方法需经过研究与验证, 以确保检测结果可靠和准确。尽量建立对照品/标准品, 并对其开展相应的质量研究、含量/活性的标定、贮存条件的确定等。一般情况下, 可接受标准的制定依据包括产品质量设计、质量研究、工艺开发、验证研究、方法学研究与验证、多批检测和稳定性结果, 以及合理的统计学方法等^[23]。

表5 细胞和基因治疗产品生产用慢病毒载体质控要求

Table 5 Quality control requirements for lentiviral vectors used in the production of cell and gene therapy products

检测项目 Test items	检测方法 Test method	可接受标准 Acceptance criteria
Transgene sequencing	Sanger method	The measured sequence should be consistent with the theoretical sequence
P24 protein	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	Report result
Biological titer	FCM (flow cytometry)	Product-dependent
Specific activity	Biological titer/P24 protein	Report result
Residual benzonase	ELISA	≤10 ng/mL
Residual plasmid DNA	qPCR (quantitative polymerase chain reaction)	Product-dependent
Residual transfection reagent	CAD-HPLC (charged aerosol detection HPLC)	<2 μg/mL
Residual SV40 LTA	qPCR	Product-dependent
Residual E1A	qPCR	Product-dependent
Residual HCP (host cell protein)	ELISA	Product-dependent
Residual HCD (host cell DNA)	qPCR	Product-dependent
DNA fragment distribution	qPCR	Report result
Endotoxins	Gel-clot limit test	<10 EU/mL
Sterility	Membrane filtration	No growth
Mycoplasma	Culture method and indicator cell method	Negative
RCL (replication competent lentivirus)	Culture assay	Negative
Appearance	Visual inspection	Report result
pH	Potentiometry	Formulation-dependent
Osmolality	Freezing point depression	Formulation-dependent

临床使用的每个批次慢病毒均需要通过放行检测方能用于产品生产。质量控制相关标准可参考表5。

4 未来展望

尽管LVs技术已取得长足进步,但要满足全球日益增长的商业化需求,仍面临诸多挑战,未来发展方向主要集中在生产技术的创新与突破、质控方法的优化与升级,以及应对规模化生产挑战这三个方面。

4.1 生产技术的创新与突破

构建能够稳定整合所有必需元件的细胞系,是突破瞬时转染瓶颈的根本途径。通过采用诱导型系统(如Tet-On)或工程化改造(如FRT/Flp重组酶系统),可建立高产、可控的稳定细胞系,从而显著降低生产成本与工艺复杂度^[24-25]。同时,借助无血清/化学成分确定的悬浮培养工艺,能够进一步优化培养基与培养参数,提升细胞密度与病毒产率,保障生产过程的稳健性与一致性^[26]。此外,探索灌流培养等连续生产工艺模式,可实现病毒的连续收获,从而提高总产量^[27]。在下游纯化环节,开发高分辨率、高载

量的亲和层析介质,能够提升目标产物的回收率与纯度,并简化纯化步骤。

4.2 质控方法的优化与升级

开发更快速、更灵敏的RCL检测方法(如基于PCR的检测)以缩短产品放行时间,是行业的迫切需求。应用新一代测序技术,利用NGS(next-generation sequencing)对载体产品进行深度测序,全面评估载体基因组的完整性和一致性,检测可能存在的重组或变异。快速微生物检测法,采用快速微生物检测系统,可大幅缩短无菌和支原体检查的放行时间^[28]。空壳率检测,建立能够准确定量空病毒颗粒的方法,为空壳率设定合理限度。

4.3 应对规模化生产挑战

建立封闭式自动化生产系统(包括自动化的生物反应器和纯化系统)是未来药品人工智能的发展方向,对当前的生产方式和规模提出新的挑战。

参考文献 (References)

- [1] NALDINI L. Gene therapy returns to centre stage [J]. Nature, 2015, 526(7573): 351-60.
- [2] MILONE M C, O'DOHERTY U. Clinical use of lentiviral vectors [J]. Leukemia, 2018, 32(7): 1529-41.

- [3] DUNBAR C E, HIGH K A, JOUNG J K, et al. Gene therapy comes of age [J]. *Science*, 2018, 359: 175-85.
- [4] VAN DER LOO J C M, WRIGHT J F. Progress and challenges in viral vector manufacturing [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(R1): R42-R52.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 三部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [6] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry: potency tests for cellular and gene therapy products [S]. 2011. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/potency-tests-cellular-and-gene-therapy-products>.
- [7] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 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 vectors [S]. 2006. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/testing-retroviral-vector-based-human-gene-therapy-products-replication-competent-retrovirus-during>.
- [8] NALDINI L, BLÖMER U, GALLAY P, et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [J]. *Science*, 1996, 272(5259): 263-7.
- [9] ZUFFEREY R, NAGY D, MANDEL R J, et al. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(9): 871-5.
- [10] DULL T, ZUFFEREY R, KELLY M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system [J]. *J Virol*, 1998, 72(11): 8463-71.
- [11] SAKUMA T, BARRY M A, IKEDA Y. Lentiviral vectors: basic to translational [J]. *Biochem J*, 2012, 443(3): 603-18.
- [12] THROM R E, OUMA A A, ZHOU S, et al. A stable producer cell line for the manufacture of a lentiviral vector for gene therapy of Parkinson's disease [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(3): 357-69.
- [13] 苏玥, 张红云, 张颖, 等. LILRB2过表达慢病毒载体以及THP-1-LILRB2稳转细胞株的构建[J]. 首都医科大学学报(SU Y, ZHANG H Y, ZHANG Y, et al. Construction of LILRB2 overexpression lentiviral vector and THP-1-LILRB2 stable transgenic cell line [J]. *Journal of Capital Medical University*), 2023, 42(1): 93-8.
- [14] 刘星慧, 沈志, 吕晓玲, 等. 人CD7胞外区慢病毒载体的构建及其稳转细胞系的构建、表达和纯化[J]. 生物工程学报(LIU X H, SHEN Z, LYU X L, et al. Construction, expression, and purification of a lentiviral vector containing the human CD7 extracellular domain and its stable transgenic cell line [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2021, 37(11): 228-34.
- [15] 王钊, 宋海峰, 姬波, 等. 一种生产慢病毒的低背景稳定生产细胞株的构建及其应用: 中国, CN116837031A[P]. 2023-10-03. <https://pss-system.cponline.cnipa.gov.cn/retrieveList?prevPageTitle=changgui>.
- [16] 体内细胞疗法工艺新突破: EuLV稳转细胞系慢病毒载体系统
- [17] 国家药品监督管理局. 免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2021-02-09) [2024-06-01]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/0584963a84e01b4d83022f559d22144>.
- [18] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Human gene therapy for rare diseases guidance for industry [EB/OL]. (2024-01-31) [2024-06-01]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/human-gene-therapy-rare-diseases>.
- [19] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs) guidance for industry [EB/OL]. (2020-01-31) [2024-06-01]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/chemistry-manufacturing-and-control-cmc-information-human-gene-therapy-investigational-new-drug>.
- [20] EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells [EB/OL]. (2012-05-22) [2024-06-01]. <https://www.ema.europa.eu/en/quality-non-clinical-clinical-aspects-medicinal-products-containing-genetically-modified-cells-scientific-guideline>.
- [21] MERTEN O W, HEBBEN M, BOVOLENTA C. Production of lentiviral vectors [J]. *Mol Ther-Methods Clin Dev*, 2016, 3: 16017.
- [22] SEGURA M M, GARNIER A, DUROCHER Y, et al. Production of lentiviral vectors by large-scale transient transfection of suspension cultures [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(6): 1479-90.
- [23] 国家药品监督管理局药品审评中心. 体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2022-05-26) [2023-10-27]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/6f14372f020446361601bb074a09410d>.
- [24] THROM R E, OUMA A A, ZHOU S, et al. A stable producer cell line for the manufacture of a lentiviral vector for gene therapy of Parkinson's disease [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(3): 357-69.
- [25] STEWART H J, FONG-WONG L, STRICKLAND I, et al. A stable producer cell line for the manufacture of a lentiviral vector for gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency [J]. *Gene Therapy*, 2011, 18(5): 467-75.
- [26] VAN DER LOO J C M, WRIGHT J F. Progress and challenges in viral vector manufacturing [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(R1): R42-R52.
- [27] MANCEUR A P, KIM H, MISIC V, et al. Scalable lentiviral vector production using stable HEK293SF producer cell lines [J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2017, 28(6): 330-9.
- [28] SANDLE T. Rapid sterility testing: a review of current methods [J]. *Eur Pharm Rev*, 2013, 18(3): 58-63.