

基因治疗产品的质量控制分析方法及研究进展*

李永红, 毕华, 秦玺, 饶春明**

(中国食品药品检定研究院 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 100050)

摘要: 基因治疗产品近年来已成为国内外药物研发的热点。对研发阶段的基因治疗产品开展质量研究, 建立相应的质量控制方法和质量标准, 是产品安全、有效的重要保证和产业化进程中的重要环节之一。基因治疗产品的质量控制项目包括鉴别、含量、效价、纯度、杂质和其他常规检测项目等。本文较为详细地介绍了在各种基因治疗产品中这些质控项目可采用的分析方法。对于新型基因治疗产品, 迫切需要研究适当的分析方法进行有效的质量控制, 而已批准上市或进入临床研究产品的质控方法和标准则需要进一步的提高和完善。

关键词: 基因治疗产品; 质量控制; 质量标准; 分析方法; 安全性; 有效性; 鉴别试验; 含量; 效价; 纯度; 杂质

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2020)01-0004-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2020.01.01

Research progress in quality control analysis methods for gene therapy products*

LI Yong-hong, BI Hua, QIN Xi, RAO Chun-ming**

(National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 100050, China)

Abstract: In recent years, gene therapy products have become a hot spot in drug R&D at home and abroad. For the gene therapy products in R&D stage, quality research should be conducted to establish corresponding quality control methods and standards, which is an important guarantee for product safety and effectiveness and one of the important steps in the industrialization process. Quality control items of gene therapy products include identification, content, potency, purity, impurities and other routine test items, etc. This paper describes in detail the analytical methods that can be used for these quality control items in various gene therapy products. For novel gene therapy products, it is urgent to develop appropriate analytical methods for effective quality control, while the quality control methods and standards for products which have already been approved for market or clinical research need to be further improved and perfected.

Keywords: gene therapy products; quality control; quality requirement; analytical methods; safety; effectiveness; identification test; content; potency; purity; impurity

* 国家科技重大专项课题资助项目(2018ZX09733002-005)

** 通信作者 Tel:(010)67095380; E-mail: raoem@nifdc.org.cn

第一作者 Tel:(010)67095684; E-mail: sebjlyh@sohu.com

基因治疗 (gene therapy) 是指将外源正常基因导入靶细胞,以纠正或补偿基因缺陷和异常引起的疾病,从而达到治疗目的,也就是通过基因转移技术将外源基因插入患者适当的受体细胞中,使外源基因表达的产物能治疗某种疾病。从广义说,基因治疗还可包括在核酸水平治疗某些疾病的措施和新技术,如 RNA 干扰技术。基因治疗技术从 1990 年开始第 1 例临床试验至今,经历了近 30 年的发展,其间一度跌入低谷,后在争议中前行,直至最近几年取得了不俗的进展,重新成为各国研究的热点^[1-4]。2019 年 5 月美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准了 1 个用于治疗小儿脊髓性肌萎缩症 (SMA) 的基因治疗产品 Zolgensma^[5]。除此以外,目前国内外还有 10 个基因治疗产品已被批准上市^[6]。截至 2019 年 10 月 20 日, ClinTrials.gov 网站的数据显示全球已登记基因治疗临床试验总数为 4 091 项,其中美国 2 198 项,中国 279 项。在基因治疗产品的研究开发以及规模化生产过程中,如何控制产品的质量,保证其安全性和有效性是这类产品获得成功应用的一个关键环节。本文针对基因治疗产品的质量控制在分析方法以及问题和展望进行介绍。

1 基因治疗产品的质量控制在分析方法

基因治疗产品的组成结构复杂,生产流程烦琐,需要对其从起始原材料到成品进行全过程的质量控制,原液和成品的质量控制是其中的关键环节,也是国家药品检定机构进行产品质量监管的主要手段^[7]。产品质控方法和质量标准的研究是创新基因治疗产品研发中的一个重要内容,是决定产品能否进入临床研究以及顺利上市的重要环节之一。基因治疗产品通常由各种病毒或非病毒载体携带治疗基因组成,不同种类基因治疗产品的结构特点和属性差异较大,质控方法和质量标准具有较大的复杂性。基因治疗产品质量控制的项目包括鉴别、含量、效价、纯度、杂质和其他常规检测项目等,针对每个项目,不同类型的产品具有不同的分析方法。本文对基因治疗产品在原液和成品中常见的质控项目及其分析方法进行概括性的介绍。

1.1 鉴别试验

基因治疗药物的鉴别试验常需要从核酸水平和蛋白水平进行。核酸水平常采用限制性酶切图谱分析、聚合酶链式反应 (PCR)、逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 和核酸序列测定等方法对载体和目的基

因进行鉴定。限制性酶切图谱分析中需要选用适当的内切酶,必要时可使用多个内切酶,使切得的 DNA 片段能比较充分地反映载体的情况,并能在电泳时得到良好的分离;分析中应设置对照品,要求样品的酶切图谱和对照品相一致。在 PCR 和 RT-PCR 中,应对载体部分、插入基因、缺失片段以及影响表达的重要部分进行鉴定,同时应设置合适的阳性和阴性对照样品。蛋白水平鉴定常采用的方法有十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和免疫印迹,也应设置合理的对照品进行比较。病毒颗粒还可进一步通过衣壳蛋白、免疫标记和表型特征等进行鉴别。

1.2 含量

在以病毒为载体的基因治疗产品中,滴度是表示产品含量即病毒数量的指标。病毒滴度分为总颗粒数、基因组滴度、感染性滴度、转导滴度等不同的类型。总颗粒数和基因组滴度表示病毒的物理数量,为物理滴度;感染性滴度和转导滴度表示有生物活性病毒的数量,为生物滴度。非病毒载体的基因治疗产品的含量通常是指其中的质粒 DNA 含量。

1.2.1 总颗粒数 对于以病毒为载体的基因治疗产品,总颗粒数指标是指其物理性病毒颗粒的总数。测定的方法常采用紫外吸收法、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、透射电子显微镜 (TEM)、高效液相色谱 (HPLC) 法、血凝试验等。例如,纯化的腺病毒 (Ad) 载体总颗粒数可根据腺病毒的紫外吸收和颗粒物浓度之间的换算关系,在 0.1% (W/V) SDS 溶液中于 260 nm 处测定^[8],未纯化的腺病毒载体则可用离子交换色谱法进行测定^[9]; 2 型腺相关病毒 (AAV-2) 载体总颗粒数可以基于选择性识别 AAV-2 衣壳蛋白的单克隆抗体,采用 ELISA 法进行快速和可靠的定量^[10];慢病毒载体的总颗粒数则可采用基于检测 P24 蛋白的 ELISA 法进行定量^[11]。

另外,目前可用来检测病毒颗粒数的方法还有 ViroCyt 病毒计数仪法^[12]、纳米颗粒跟踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA)^[13]、可调电阻脉冲传感 (tunable resistive pulse sensing, TRPS)^[14] 和场流分离-多角度激光光散射 (field flow fractionation-multiple angle laser light scattering, FFF-MALLS)^[15] 等新技术。

1.2.2 基因组滴度 病毒载体内部包装的基因组是转基因表达的基础。空壳病毒内不含基因组,不会有转基因的表达,不仅没有任何疗效,反而会引起免疫

反应。基因组滴度是含有基因组 DNA 的病毒数量,可通过定量 PCR (qPCR)^[16-17]、DNA 斑点杂交^[18]以及数字 PCR^[19]等方法测定病毒基因组核酸的拷贝数来计算。在提取病毒核酸进行 PCR 之前,需要先对病毒外面的 DNA 进行酶降解处理,仅测定包装在病毒颗粒内部的基因组 DNA,故该方法所测得的病毒核酸拷贝数能较准确地反映总的完整病毒颗粒数。由于不是所有的完整病毒颗粒均具有感染力,定量 PCR 法测得的病毒基因组滴度通常显著高于感染性滴度法所测得的结果。

1.2.3 感染性滴度 感染性滴度指标表示产品中具有感染性病毒颗粒的总数。感染性滴度测定的传统方法是噬斑 (PFU) 法和半数组织细胞感染量 (TCID₅₀) 法^[20]。这些方法主要依靠人为识别噬斑或细胞病变作为计数判定的依据,造成测定结果的稳定性和可重复性较差,且耗时长。而在病毒感染细胞后用免疫分析方法检测病毒蛋白^[21],或用定量 PCR 方法来检测病毒基因组 DNA^[22],以及用逆转录-定量 PCR (RT-qPCR) 方法测量复制时产生的病毒 RNA^[23]等方法可以更迅速地得到较为准确的感染性滴度结果。

由于 AAV 感染不会导致细胞病变效应,因此不能用噬斑法测定感染性滴度。但是,在辅助病毒的存在下可以诱导 AAV 基因组的复制,进而可以此测量感染事件来计算感染性滴度。广泛使用的方法之一是中位组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 法。该试验利用表达 AAV2 rep 和 cap 的 HeLa 衍生细胞系,在 96 孔板中生长,并在 5 型腺病毒存在下用 AAV 载体的 10 倍系列稀释液感染。感染后,用定量 PCR 测定复制的载体基因组^[24]。另外,感染中心分析 (ICA) 法也使用 HeLa rep-cap 细胞和腺病毒,但是,在孵育后,细胞被转移到膜上,并且通过与重组基因组的一部分互补的标记探针杂交来检测感染中心 (代表单个感染细胞)^[25]。

1.2.4 转导滴度 转导滴度是指能有效地转导靶细胞并表达出转基因产物的病毒数量,是更能反映基因治疗产品有效成分的功能性含量指标。常用的测定方法是将经系列稀释的基因治疗病毒载体的样品感染测定细胞,观测细胞内转基因产物的表达情况,将可表达转基因产物的细胞计为阳性细胞,在合理的稀释度下认为每个阳性细胞平均被 1 个活性病毒颗粒感染所致,采用荧光显微镜计数或流式细胞仪分析等

方法得到阳性细胞的比例,再根据样品稀释倍数即可计算样品的转导滴度,常采用转导单位 (transduction unit, TU) 为计量单位^[26]。由于检测的方便性,许多实验室转导滴度的测定结果来自绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 等报告基因的表达。但是,在相同的载体上表达不同的转基因,其转导滴度可相差几个数量级,所以根据报告基因测定的结果未必能反映表达治疗基因的转导滴度。除转基因本身外,衣壳蛋白、启动子、增强子、细胞状态等也会对转基因的表达产生影响。因此,较为理想的转导滴度测定方法是采用与病人体内靶细胞相同类型的细胞作为测定细胞,以目标转基因的表达作为测定指标^[27]。在实际操作中,根据情况可以采用其他的允许细胞株,以报告基因的表达作为测定指标,但建议采用合适的标准品或参考品进行滴度的校正。

1.2.5 物理滴度与生物滴度的比值 在质量标准中,应对物理滴度和生物滴度的比例进行控制。在所测的病毒物理颗粒数中常包含有大量缺陷颗粒,不能真实反映病毒的实际感染力或功能性,但由于这些缺陷病毒颗粒可能在病人体内产生免疫反应,故需要进行量化控制。例如,以腺病毒为载体的基因治疗药物目前的要求是总颗粒数与感染性滴度的比值不大于 30:1,或感染性滴度占病毒颗粒数的比率应不低于 3.3%,从而控制活病毒所占比例应到达一定的要求^[28]。对于 AAV 载体,载体基因组滴度和感染性滴度之间的比例 (vg·IU⁻¹) 则是评估载体质量的关键参数^[29]。

1.2.6 非病毒载体的含量测定 非病毒载体基因治疗产品通常以质粒 DNA 作为有效成分,其含量测定就是检测质粒 DNA 的浓度或含量。采用在 260 nm 的光密度测量可以最简单地测定大于 500 ng·mL⁻¹ 的 DNA 浓度。但因为 RNA 和蛋白质在 260 nm 处也具有明显的吸收,所以必须进行其他分析,以证明产品中含有很少的 RNA、蛋白质或残留的宿主细胞染色体 DNA 的污染,而不影响该测定。该方法通常也不适用于脂质配制的 DNA。采用特异性结合双链 DNA 的染料可以根据确定的 DNA 标准曲线,精确测量小于 500 ng·mL⁻¹ 的 DNA 浓度。PicoGreen 是其中 1 种这样的荧光染料,它受单链 DNA、RNA、蛋白质、盐和洗涤剂的影响很小^[30]。荧光染料 Hoechst 33258 也结合双链和单链 DNA,并且它可以用于测定低至 0.3 ng·mL⁻¹ 的 DNA 浓度;Hoechst 33258 不结

合蛋白质或 RNA,可用于准确地确定粗制样品中的 DNA 浓度^[31]。另外,毛细管电泳和 HPLC 的方法也常用于将质粒 DNA 与其他成分分离后非病毒载体产品的含量测定^[32]。

1.3 效价

根据产品具体情况,应建立至少 1 个反映产品的生理和 / 或药理作用模式的生物效价指标。效价测定通常包括对表达基因的功能、目的基因表达量 / 表达效率、溶瘤活性和肿瘤选择性的测定等。应在研究产品的量效关系基础上,尽可能开发定量检测的方法,并建立适当的效价测定参考标准品,将待测样品与之相比较后计算效价。

1.3.1 表达基因的功能测定 基因治疗产品的临床疗效需要通过治疗基因在靶细胞中表达相应产物后起到治疗的作用。不同产品中不同的表达基因生物学功能有很大的区别,需要根据其特定的生物学特性开发活性检测方法。通常是在体外感染、转染或转导易感细胞系,随后进行所关注的表达基因的一些功能测定,例如细胞生长刺激或抑制试验、酶活性测定等^[33]。体外方法不可行时,可采用动物离体组织或动物体内检测方法^[34],必要时可采用转基因动物或移植了人体组织或系统的动物。

1.3.2 目的基因表达量 / 表达效率 当转基因表达的生物学功能表现出的活性范围过宽或仅能产生半定量甚至仅为定性结果时,需要使用 ELISA 或其他具有严格规定范围的免疫学或生物化学读数的方法测定治疗序列的表达水平,作为补充或替代的效价测定方法(如可获得广泛的特性数据证明所有表达的蛋白质都具有生物活性,则可替代效价测定方法)^[35-36]。目的基因表达量的检测常采用重组病毒(或质粒)体外感染(或转染)宿主细胞,如目的蛋白为分泌性表达,可采用 ELISA 法检测细胞培养上清中目标蛋白的含量;如目的蛋白不能分泌表达,可采用免疫印迹的方法,或用逆转录实时定量 PCR 检测目的基因转录为 mRNA 的水平。

1.3.3 溶瘤活性和肿瘤选择性 在增殖性溶瘤病毒为载体的基因治疗药物中,应定量检测重组病毒对特定肿瘤细胞的杀伤作用来代表产品的溶瘤活性。肿瘤选择性则是指病毒选择性地感染肿瘤细胞的能力,以及病毒选择性地肿瘤细胞中增殖的能力。为了评价肿瘤细胞的选择性,溶瘤病毒应在体外适当的肿瘤细胞系和正常细胞系中进行细胞毒性 / 溶解和 /

或增殖能力的对比分析^[37]。

1.4 纯度和杂质

1.4.1 总纯度 在适用的情况下应对产品的总纯度水平进行评估,常见的检测方法包括紫外吸收法(如分析吸收度 A_{260}/A_{280} 比值)、HPLC 法、SDS-PAGE 法等。

1.4.2 工艺相关杂质 基因治疗药物的工艺相关杂质来源于制造过程,例如细胞基质(包括残余的宿主细胞 DNA、宿主细胞蛋白),细胞培养和发酵培养基的组分和添加物,以及下游工艺来源的杂质。

残余的宿主细胞 DNA 的检测常采用 DNA 杂交、PicoGreen 染色和定量 PCR 等方法^[38]。对于基因治疗产品,如果基因载体和宿主细胞 DNA 有同源的序列,可能会对 DNA 杂交法检测宿主细胞 DNA 造成干扰,建议使用特异性更好的定量 PCR 法。对于慢病毒、仙台病毒等 RNA 病毒载体,采用对 DNA 特异染色的 PicoGreen 染色法,实验操作更为简便、快速。残留宿主细胞蛋白或来自细胞培养基的蛋白可以通过 ELISA、SDS-PAGE 分析和 / 或免疫印迹法进行检测^[39]。

对于生产中使用了辅助病毒的方式,应检测残留的辅助病毒蛋白和核酸^[40-41];使用了辅助质粒 DNA 的,应检测残留的质粒 DNA。在生产中使用了牛血清、Benzonase 核酸酶、抗生素等的产品,还应分别检测残留的牛血清白蛋白、Benzonase 和抗生素活性^[42]。如在生产中使用了其他对人体有害的试剂,如有机溶剂等,也应在产品中进行相应的检测。必须使用特定且灵敏的方法来证明在制造过程中使用的试剂得以去除。对于残留的蛋白杂质,相关检测方法包括 ELISA 和反相 HPLC 或基于质谱法的方法进行鉴定。对于核酸杂质的检测,可以使用适当设计的引物和探针通过定量 PCR 进行定量。

1.4.3 产品相关杂质 基因治疗产品的相关杂质是在制造和储存期间形成的具有与所需产物不同活性、功效和安全性的分子变体,包括空壳等包装缺陷的病毒或颗粒、聚集体、降解产物以及非超螺旋形式的质粒 DNA 等。具体以 AAV 载体为例,其病毒包装过程易于产生“缺陷颗粒”,这些颗粒包括完全不含遗传物质的空病毒衣壳颗粒、包装了不完整的载体基因组或错误包装所需载体基因组以外核酸的病毒衣壳颗粒^[43-44]。由于与所需的 AAV 载体产物高度相似,这些相关杂质难以去除。空壳病毒的存在被认为是

有害的,因为它们是不必要的潜在抗原物质的来源,可能诱导或提高衣壳触发的抗 AAV 先天和适应性免疫反应。此外,空壳病毒竞争性地抑制载体转导并诱导颗粒聚集。AAV 病毒的聚集体可以在制造和纯化过程中形成,也可以在随后的配制和储存过程中形成。聚集体可能降低病毒的感染滴度,从而降低了产品的功效,同时还增加了潜在免疫原性病毒蛋白的负载。另外,如果 AAV 的衣壳蛋白被不适当的下游加工、储存条件破坏或氧化,也可能损害病毒的感染效率^[45]。

空壳病毒等可通过电镜^[46]、HPLC^[47]、分析超速离心^[48-49]、电荷检测质谱^[50]等技术进行检测。病毒聚集体可以通过 A_{320}/A_{260} 比值^[51]、动态光散射(DLS)^[52]、电子显微镜^[53]、场流分离-多角度激光光散射^[54]、差分离心沉降法(DCS)^[55]、纳米颗粒跟踪分析^[56]等方法检测。质粒 DNA 载体的非超螺旋形式可以用琼脂糖凝胶电泳、离子交换 HPLC^[57]、毛细管电泳^[58]等方法分析。

1.5 复制型病毒或野生型病毒

对于复制缺陷型病毒载体,在生产中可能发生经缺失改造的载体与野生型病毒序列之间的同源重组,导致产生复制型病毒。终产品中复制型病毒的存在则可能引起病人的不良反应,构成临床上的隐患和潜在危险。因此,对于这类产品的复制型病毒检测是安全性检测中非常重要的项目。采用的分析方法可以是感染相应细胞并连续培养后,基于细胞病变的方法,或者 PCR 法、定量 PCR 法。在一定情况下也可直接采用 PCR 法或定量 PCR 法检测,但这时检测的是复制型病毒的核酸片段,不一定为活性病毒,因而可造成假阳性结果。不管采用何种方法,都需要验证其检测下限,并且每次实验应包含加标对照(spiked controls)以保证灵敏度达到要求。

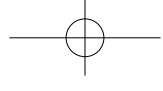
1.5.1 复制型腺病毒 对于以腺病毒为载体的基因治疗产品,复制型腺病毒(RCA)的污染是一个重要的安全问题。可能的后果包括局部炎症反应和组织损伤增加,以及免疫受损个体中不受控制的全身复制等^[59]。RCA 可能是 HEK-293 包装细胞中的人 5 型腺病毒序列和载体序列之间同源重组的结果。对于非复制型腺病毒载体,目前的可接受标准是每 3×10^{10} 个病毒颗粒中少于 1 个 RCA^[60]。

通常使用细胞培养-细胞病变效应方法检查 RCA 的存在,具体操作是用腺病毒载体感染细胞,并

在几次传代后评估是否存在病毒造成的细胞病变效应(CPE)^[61-62]。这些基于 CPE 的 RCA 测定的主要问题是大量的腺病毒载体对细胞有毒,因此在高的载体颗粒/细胞比率下 RCA 的复制受到阻碍。因此,在第 1 次感染步骤中需要采用大量的细胞。基于培养法的 RCA 测定的另一个缺点是,清晰的 CPE 可能仅在长时间后才变得可见。例如,敏感的 RCA 测定需要约 1 个月。通过直接对 RCA 中 E1 区特异性 PCR 的测定是快速的方法^[63-64];然而,PCR 的灵敏度低于基于细胞培养的分析。PCR 的灵敏度在 1 个 RCA/ 1×10^6 载体颗粒到 1 个 RCA/ 1×10^9 载体颗粒之间。改进的方法则是将短期培养步骤与随后通过实时 PCR 检测 E1 阳性颗粒相结合,从而缩短细胞培养时间和提高检测的灵敏度^[65-66]。

1.5.2 复制型逆转录病毒和复制型慢病毒 可能通过重组产生复制型逆转录病毒(replication competent retroviruses, RCR)是逆转录病毒载体使用的主要安全问题之一,这些病毒可能导致慢性病毒血症,并随后由于插入诱变而形成恶性肿瘤^[67]。这种危害已在猴子身上得到证实,故意给予这些猴子具有复制能力的小鼠白血病病毒,后来发展成淋巴瘤^[68]。对于离体(*ex vivo*)基因治疗的逆转录载体以及采用逆转录病毒载体转导的细胞产品应严格控制复制型病毒。通常使用生物测定法筛查载体产品的 RCR,而基因转移后患者的监测采用分子或血清学测试^[69-70]。分子和血清学检测比生物检测快,耗用的资源少,但容易出现假阳性。生物测定法包括至少 5 代的复制允许细胞(如 *Mus dunni* 细胞)共培养扩增,在培养期结束时收获培养基,使用指示细胞检测 RCR,如使用 PG4S⁺/L⁻法、标记物拯救法或 RT-PCR 法中的 2 种方法来检测^[71]。

尽管目前慢病毒载体的设计和生产系统的保障措施基本消除了复制型慢病毒(replication competent lentivirus, RCL)重组产生的可能性,但仍不能完全排除污染的风险,因此应进行 RCL 的检测^[72-73]。当前 RCL 检测的标准方法是基于细胞的检测方法,例如,RCL 感染敏感的允许细胞并进行连续的细胞培养上清的系列传代,实现 RCL 的扩增后,采用定量 PCR 或免疫学方法检测整合的 Gag/Pol 特异性核酸或蛋白。除了 Gag/Pol, RCL 也会表达载体包膜蛋白,如囊泡性口炎病毒 G 糖蛋白(VSV-G)。因此,在 VSV-G 作为假包膜蛋白的情况下,也适合使用 VSV-G 免疫



分析和/或检测 VSV-G 的 DNA 或 RNA 的分子生物学方法来检测 RCL 的复制^[74]。另外,可以采用在敏感细胞系的几次连续传代扩增 RCL 后,进行定量逆转录酶测定的方法^[75]。这些细胞测定的方法通常需要 6 周或更长时间才能获得结果。对于以慢病毒为载体的基因修饰细胞产品,在需要短时间内输注给病人时,可以使用基于定量 PCR 的分析方法来快速测定 RCL 是否存在^[76]。

1.5.3 野生型病毒 溶瘤病毒产品常常被减毒或可以选择性地在癌细胞中生长,而这些病毒在制造过程中可能发生重组或恢复为野生基因型,或者发生野生型病毒的污染,重新产生毒性或失去选择性。因此,应对溶瘤病毒产品检测是否存在野生型病毒。以溶瘤腺病毒为例,常使用定量 PCR 技术检测污染的野生型腺病毒。然而,PCR 方法的检测下限为在 $10^6 \sim 10^8$ 个病毒颗粒中检出 1 个野生型腺病毒^[77]。由于每个病人的临床剂量通常在 10^{12} 个病毒颗粒的范围内,PCR 方法的灵敏度使其尚不能很好地控制野生型腺病毒的水平。在非允许细胞系(nonpermissive cell line)中使用生物扩增测定法则可以实现更高的灵敏度^[78]。通常,将复制型溶瘤病毒感染 1 种或 2 种不是靶细胞的非允许细胞系,检测是否产生子代病毒。为了提高灵敏度,产生足够量的子代群体用于分析,需要将感染物进行多次传代以及延长培养时间。可以采用定量 PCR 等方法测定在非允许细胞系中扩增后的野生型病毒水平。易于培养的 2 种正常成纤维细胞系 WI-38 和 MRC-5 常作为在复制型溶瘤腺病毒产品中检测野生型病毒的模型非允许细胞系。

1.6 其他常规检测项目

1.6.1 常规理化检测项目 包括外观、pH、装量、可见异物、不溶性微粒、渗透压、辅料含量等,需要符合现行版《中华人民共和国药典》相应的规定。有的基因治疗产品由于终产品为高浓度的病毒载体,容易产生病毒聚集造成可见异物、外观等不合格的情况,建议加强对产品制剂配方的研究,抑制病毒聚集的产生。对于脂质体、纳米颗粒等特殊剂型,还需根据其具体特点进行相应的检测,如平均粒径及分布、平均 Zeta 电位、平均包封率、释放效应等。

1.6.2 常规安全性检测项目 对于基因治疗药物的安全性检测,包括无菌检查、细菌内毒素检查/热原检查和异常毒性检查、支原体检查。此外,基因治疗

药物应采用现行版《中华人民共和国药典》中的无菌检查法检测细菌和真菌,支原体检查法检测可能的支原体污染。另外由于基因治疗产品生产中原材料和细胞基质等可能带来其他外源病毒因子,在某些情况下也可能在生产过程中发生病毒污染,因此对外源病毒因子的控制和检测也非常重要。

2 问题和展望

随着近年来各种新型基因治疗产品的纷纷出现,包括 CAR-T 细胞等基因修饰细胞产品、RNA 干扰药物、脂质体、纳米颗粒等采用了新的产品形式、新的作用机制、新的载体或新剂型的药物,迫切需要研究相应的方法对其进行有效的质量控制。另外,对于我国已批准上市或进入临床研究的基因治疗产品所建立的质量标准和质控方法,虽然已基本能较好控制产品的安全性和有效性来保证产品质量,但由于基因治疗产品与其他药品相比具有较大的复杂性,对其进行质量分析鉴定的难度大,可参考的文献少,目前还存在一些不足之处,需要随着相关技术的发展以及对基因治疗产品生产工艺和质量属性认识的加深,进行改进和完善。具体举例如下:①目前建立的部分基因治疗产品效力试验为定性或半定量的方法,需要进一步研究能够准确定量检测的方法。②以病毒为载体的基因治疗产品感染性滴度测定常采用噬斑法、TCID₅₀法等,其检测结果需要进行人工判定,因而人为影响因素较大。③多个检测项目缺乏统一的参考标准品,造成试验误差大,不同实验室间检测结果的可比性差;④目前建立的部分检测方法可重复性、耐用性较差,还需进一步的方法学改进和验证,特别是在不同实验室进行比对和验证。⑤对于基因治疗产品在生产和储存过程中产生的产品相关杂质,如前文所述的空病毒、病毒聚集体等,目前缺乏常规适用的分析手段。⑥部分产品复制型或野生型病毒检测的灵敏度还不能满足要求。⑦对于已经建立的一些产品的质量标准,在质控指标和限度范围的规定存在不合理之处,需要进一步研究。

总之,随着基因治疗产品的研究开发不断取得进步,不久的将来会有越来越多的产品进入临床试验和上市使用,这些产品的质量控制方法是非常重要的研究内容,需要研发单位和监管机构共同努力,根据实际需要和科技发展水平制定相应科学合理的质控方法和质量标准,从而保障这些产品安全、有效和质量可控,保证人民健康水平的提高。

参考文献

- [1] NALDINI L. Gene therapy returns to centre stage [J]. *Nature*, 2015, 526 (7573): 351
- [2] COLLINS M, THRASHER A. Gene therapy: progress and predictions [J]. *Proc Biol Sci*, 2015, 282 (1821): 20143003
- [3] KUMAR SR, MARKUSIC DM, BISWAS M, *et al.* Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2016, 3: 16034
- [4] LUKASHEV AN, ZAMYATNIN AA Jr. Viral vectors for gene therapy: current state and clinical perspectives [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2016, 81 (7): 700
- [5] HOY SM. Onasemnogene abeparvovec: first global approval [J]. *Drugs*, 2019, 79 (4): 1255
- [6] 李永红, 毕华, 史新昌, 等. 人用基因治疗制品生产和质量控制的通用性技术要求 [J]. *中国新药杂志*, 2018, 27 (21): 2482
LI YH, BI H, SHI XC, *et al.* General technical requirements for production and quality control of human gene therapy products [J]. *Chin J New Drug*, 2018, 27 (21): 2482
- [7] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制 [M] 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2018: 876
WANG JZ. *Research, Development and Quality Control of Biopharmaceuticals* [M]. 3rd Ed. Beijing: Science Press, 2018: 876
- [8] MITTEREDER N, MARCH KL, TRAPNELL BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy [J]. *J Virol*, 1996, 70 (11): 7498
- [9] WHITFIELD RJ, BATTOM SE, BARUT M, *et al.* Rapid high-performance liquid chromatographic analysis of adenovirus type 5 particles with a prototype anion-exchange analytical monolith column [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216 (13): 2725
- [10] GRIMM D, KERN A, PAWLITA M, *et al.* Titration of AAV-2 particles via a novel capsid ELISA: packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2 [J]. *Gene Ther*, 1999, 6 (7): 1322
- [11] LOGAN AC, NIGHTINGALE SJ, HAAS DL, *et al.* Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors [J]. *Hum Gene Ther*, 2004, 15 (10): 976
- [12] ROSSI CA, KEARNEY BJ, OLSCHNER SP, *et al.* Evaluation of ViroCyt[®] Virus Counter for rapid filovirus quantitation [J]. *Viruses*, 2015, 7 (3): 857
- [13] KRAMBERGER P, CIRINGER M, ŠTRANCAR A, *et al.* Evaluation of nanoparticle tracking analysis for total virus particle determination [J]. *Virol J*, 2012, 9: 265
- [14] WEATHERALL E, WILLMOTT GR. Applications of tunable resistive pulse sensing [J]. *Analyst*, 2015, 140 (10): 3318
- [15] BOUSSE T, SHORE DA, GOLDSMITH CS, *et al.* Quantitation of influenza virus using field flow fractionation and multi-angle light scattering for quantifying influenza A particles [J]. *J Virol Methods*, 2013, 193 (2): 589
- [16] MA L, BLUYSSSEN HA, DE RAEYMAEKER M, *et al.* Rapid determination of adenoviral vector titers by quantitative real-time PCR [J]. *J Virol Methods*, 2001, 93 (1-2): 181
- [17] WERLING NJ, SATKUNANATHAN S, THORPE R, *et al.* Systematic comparison and validation of quantitative real-time PCR methods for the quantitation of adeno-associated viral products [J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2015, 26 (3): 82
- [18] GRIEGER JC, CHOI VW, SAMULSKI RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1 (3): 1412
- [19] SANMIGUEL J, GAO G, VANDENBERGHE LH. Quantitative and digital droplet-based AAV genome titration [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1950: 51
- [20] LABARRE DD, LOWY RJ. Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID₅₀ and plaque assays [J]. *J Virol Methods*, 2001, 96 (2): 107
- [21] MURAKAMI P, HAVENGA M, FAWAZ F, *et al.* Common structure of rare replication-deficient E1-positive particles in adenoviral vector batches [J]. *J Virol*, 2004, 78 (12): 6200
- [22] WANG F, PUDDY AC, MATHIS BC, *et al.* Using QPCR to assign infectious potencies to adenovirus based vaccines and vectors for gene therapy: toward a universal method for the facile quantitation of virus and vector potency [J]. *Vaccine*, 2005, 23 (36): 4500
- [23] AZIZI A, TANG M, GISONNI-LEX L, *et al.* Evaluation of infectious titer in a candidate HSV type 2 vaccine by a quantitative molecular approach [J]. *BMC Microbiol*, 2013, 13: 284
- [24] ZEN Z, ESPINOZA Y, BLEU T, *et al.* Infectious titer assay for adeno-associated virus vectors with sensitivity sufficient to detect single infectious events [J]. *Hum Gene Ther*, 2004, 15 (7): 709
- [25] SALVETTI A, ORÈVE S, CHADEFU G, *et al.* Factors influencing recombinant adeno-associated virus production [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9 (5): 695
- [26] BARDE I, SALMON P, TRONO D. Production and titration of lentiviral vectors [J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2010, 53 (1): 4. 21. 1
- [27] 刁勇, 王启钊, 吕颖慧, 等. 重组腺相关病毒基因药物的病毒滴度定量测定 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2010, 29 (10): 728
DIAO Y, WANG QZ, LÜ YH, *et al.* Biological assay of recombinant adeno-associated virus gene medicine [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2010, 29 (10): 728
- [28] PALMER DJ, NG P. Physical and infectious titers of helper-dependent adenoviral vectors: a method of direct comparison to the adenovirus reference material [J]. *Mol Ther*, 2004, 10 (4): 792
- [29] D' COSTA S, BLOUIN V, BROUCQUE F, *et al.* Practical utilization of recombinant AAV vector reference standards: focus on vector genomes titration by free ITR qPCR [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2016, 5: 16019
- [30] BLOTTA I, PRESTINACI F, MIRANTE S, *et al.* Quantitative assay of total dsDNA with PicoGreen reagent and real-time fluorescent detection [J]. *Ann Ist Super Sanita*, 2005, 41 (1): 119

- [31] ZHOU Y, MAO S, LI Y, *et al.* Improved fluorometric DNA determination based on the interaction of the DNA/polycation complex with Hoechst 33258 [J]. *Microchim Acta*, 2004, 144(1-3): 191
- [32] MOTAÉ, SOUSA Â, ČERNIGOJ U, *et al.* Rapid quantification of supercoiled plasmid deoxyribonucleic acid using a monolithic ion exchanger [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1291: 114
- [33] FAWAZ FS, ELSHEIKH MA, OGAWA Y, *et al.* A potency assay for a replication incompetent adenovirus type 5 carrying a human *fgf-4* gene [J]. *Anal Biochem*, 2005, 342(1): 34
- [34] ROMAN AJ, BOYE SL, ALEMAN TS, *et al.* Electroretinographic analyses of Rpe65-mutant rd12 mice: developing an *in vivo* bioassay for human gene therapy trials of Leber congenital amaurosis [J]. *Mol Vis*, 2007, 13: 1701
- [35] WAERNER T, GIRSCH T, VARGA S, *et al.* A receptor-binding-based bioassay to determine the potency of a plasmid biopharmaceutical encoding VEGF-C [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(7-8): 2109
- [36] HUANG L, CHIN E, CHIANG YL. Development of potency assays for a plasmid containing vascular endothelial growth factor 2 [J]. *Electron J Biotechnol*, 2010, 13(1): 1
- [37] YAMAGUCHI T, UCHIDA E. Oncolytic virus: regulatory aspects from quality control to clinical studies [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2018, 18(2): 202
- [38] WANG X, MORGAN DM, WANG G, *et al.* Residual DNA analysis in biologics development: review of measurement and quantitation technologies and future directions [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(2): 307
- [39] WRIGHT JF. Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(11): 840
- [40] THORNE BA, QUIGLEY P, NICHOLS G, *et al.* Characterizing clearance of helper adenovirus by a clinical rAAV1 manufacturing process [J]. *Biologicals*, 2008, 36(1): 7
- [41] YE GJ, SCOTTI MM, LIU J, *et al.* Clearance and characterization of residual HSV DNA in recombinant adeno-associated virus produced by an HSV complementation system [J]. *Gene Ther*, 2011, 18(2): 135
- [42] ALLAY JA, SLEEP S, LONG S, *et al.* Good manufacturing practice production of self-complementary serotype 8 adeno-associated viral vector for a hemophilia B clinical trial [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(5): 595
- [43] WRIGHT JF. Product-related impurities in clinical-grade recombinant AAV vectors: characterization and risk assessment [J]. *Biomedicines*, 2014, 2(1): 80
- [44] SCHNÖDT M, BÜNING H. Improving the quality of adeno-associated viral vector preparations: the challenge of product-related impurities [J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2017, 28(3): 101
- [45] RODRIGUES GA, SHALAEV E, KARAMI TK, *et al.* Pharmaceutical development of AAV-based gene therapy products for the eye [J]. *Pharm Res*, 2018, 36(29): 1
- [46] ALLAY JA, SLEEP S, LONG S, *et al.* Good manufacturing practice production of self-complementary serotype 8 adeno-associated viral vector for a hemophilia B clinical trial [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(5): 595
- [47] TAKAHASHI E, COHEN SL, TSAI PK, *et al.* Quantitation of adenovirus type 5 empty capsids [J]. *Anal Biochem*, 2006, 349(2): 208
- [48] BURNHAM B, NASS S, KONG E, *et al.* Analytical ultracentrifugation as an approach to characterize recombinant adeno-associated viral vectors [J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2015, 26(6): 228
- [49] YANG X, AGARWALA S, RAVINDRAN S, *et al.* Determination of particle heterogeneity and stability of recombinant adenovirus by analytical ultracentrifugation in CsCl gradients [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97(2): 746
- [50] PIERSON EE, KEIFER DZ, ASOKAN A, *et al.* Resolving adeno-associated viral particle diversity with charge detection mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(13): 6718
- [51] KONZ JO, LEE AL, LEWIS JA, *et al.* Development of a purification process for adenovirus: controlling virus aggregation to improve the clearance of host cell DNA [J]. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(2): 466
- [52] WRIGHT JF, LE T, PRADO J, *et al.* Identification of factors that contribute to recombinant AAV2 particle aggregation and methods to prevent its occurrence during vector purification and formulation [J]. *Mol Ther*, 2005, 12(1): 171
- [53] KAHLER AM, CROMEANS TL, METCALFE MG, *et al.* Aggregation of adenovirus 2 in source water and impacts on disinfection by chlorine [J]. *Food Environ Virol*, 2016, 8(2): 148
- [54] MCEVOY M, RAZINKOV V, WEI Z, *et al.* Improved particle counting and size distribution determination of aggregated virus populations by asymmetric flow field-flow fractionation and multiangle light scattering techniques [J]. *Biotechnol Prog*, 2011, 27(2): 547
- [55] SHIH SJ, YAGAMI M, TSENG WJ, *et al.* Validation of a quantitative method for detection of adenovirus aggregation [J]. *Bioprocess J*, 2011, 9(2): 25
- [56] KRAMBERGER P, CIRINGER M, ŠTRANCAR A, *et al.* Evaluation of nanoparticle tracking analysis for total virus particle determination [J]. *Virology*, 2012, 265: 1
- [57] SMITH CR, DEPRINCE RB, DACKOR J, *et al.* Separation of topological forms of plasmid DNA by anion-exchange HPLC: shifts in elution order of linear DNA [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 854(1-2): 121
- [58] SCHMIDT T, FRIEHS K, SCHLEEF M, *et al.* Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis [J]. *Anal Biochem*, 1999, 274(2): 235
- [59] CHUAH MK, COLLEN D, VANDENDRIESSCHE T. Biosafety of adenoviral vectors [J]. *Curr Gene Ther*, 2003, 3(6): 527
- [60] SCHALK JA, DE VRIES CG, ORZECOWSKI TJ, *et al.* A

- rapid and sensitive assay for detection of replication-competent adenoviruses by a combination of microcarrier cell culture and quantitative PCR [J]. *J Virol Methods*, 2007, 145 (2): 89
- [61] FALLAUX FJ, BOUT A, van der VELDE I, *et al.* New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9 (13): 1909
- [62] MARZIO G, KERKVLIT E, BOGAARDS JA, *et al.* A replication-competent adenovirus assay for E1-deleted Ad35 vectors produced in PER. C6 cells [J]. *Vaccine*, 2007, 25 (12): 2228
- [63] ZHANG WW, KOCH PE, ROTH JA. Detection of wild-type contamination in a recombinant adenoviral preparation by PCR [J]. *Biotechniques*, 1995, 18 (3): 444
- [64] PUNTEL M, CURTIN JF, ZIRGER JM, *et al.* Quantification of high-capacity helper-dependent adenoviral vector genomes *in vitro* and *in vivo*, using quantitative TaqMan real-time polymerase chain reaction [J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17 (5): 531
- [65] SCHALK JA, de VRIES CG, ORZECOWSKI TJ, *et al.* A rapid and sensitive assay for detection of replication-competent adenoviruses by a combination of microcarrier cell culture and quantitative PCR [J]. *J Virol Methods*, 2007, 145 (2): 89
- [66] LI F, FENG L, LIU Y, *et al.* An integrated cell culture and quantitative polymerase chain reaction technique for determining titers of functional and infectious adenoviruses [J]. *Anal Biochem*, 2009, 391 (2): 157
- [67] CHONG H, STARKEY W, VILE RG. A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs, and endogenous retroviral sequences [J]. *J Virol*, 1998, 72 (4): 2663
- [68] DONAHUE RE, KESSLER SW, BODINE D, *et al.* Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer [J]. *J Exp Med*, 1992, 176 (4): 1125
- [69] LONG Z, LI LP, GROOMS T, *et al.* Biosafety monitoring of patients receiving intracerebral injections of murine retroviral vector producer cells [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9 (8): 1165
- [70] MARTINEAU D, KLUMP WM, MCCORMACK JE, *et al.* Evaluation of PCR and ELISA assays for screening clinical trial subjects for replication-competent retrovirus [J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8 (10): 1231
- [71] HASHIMOTO-GOTOH A, YOSHIKAWA R, MIYAZAWA T. Comparison between S+L-assay and LacZ marker rescue assay for detecting replication-competent gammaretroviruses [J]. *Biologicals*, 2015, 43 (5): 363
- [72] ROTHE M, MODLICH U, SCHAMBACH A. Biosafety challenges for use of lentiviral vectors in gene therapy [J]. *Curr Gene Ther*, 2013, 13 (6): 453
- [73] CORNETTA K, YAO J, JASTI A, *et al.* Replication-competent lentivirus analysis of clinical grade vector products [J]. *Mol Ther*, 2011, 19 (3): 557
- [74] SKRDLANT LM, ARMSTRONG RJ, KEIDAI SCH BM, *et al.* Detection of replication competent lentivirus using a qPCR assay for VSV-G [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018, 8: 1
- [75] SASTRY L, XU Y, DUFFY L, *et al.* Product-enhanced reverse transcriptase assay for replication-competent retrovirus and lentivirus detection [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16 (10): 1227
- [76] MARCUCCI KT, JADLOWSKY JK, HWANG WT, *et al.* Retroviral and lentiviral safety analysis of gene-modified T cell products and infused HIV and oncology patients [J]. *Mol Ther*, 2018, 26 (1): 269
- [77] WORKING PK, LIN A, BORELLINI F. Meeting product development challenges in manufacturing clinical grade oncolytic adenoviruses [J]. *Oncogene*, 2005, 24 (52): 7792
- [78] SHIH SJ, MIYASHITA-LIN E, TSENG WJ, *et al.* Use of a bioamplification assay to detect nonselective recombinants and assess the genetic stability of oncolytic adenoviruses [J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21 (12): 1707

(本文于2019年11月12日收到)