

细胞和基因治疗产品中逆转录病毒载体药学审评考虑

崔靖^{1,2†}, 刘丹^{1,2†}, 韦薇^{1,2*}

1. 国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100076

2. 药品监管科学全国重点实验室, 北京 102629

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: weiw@cde.org.cn

药品监管科学全国重点实验室课题(2023SKLDRS0138)资助

以慢病毒及 γ 逆转录病毒为基础改造的复制缺陷型逆转录病毒载体, 作为介导基因修饰的关键原材料, 越来越多地应用至细胞和基因治疗产品中^[1]. 自2017年美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准首款以重组慢病毒载体为基础开发的嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor-T cell, CAR-T)产品(Kymriah)以来, 截至2024年12月, 全球已经有14个以慢病毒载体为基础的体外基因修饰细胞产品获批上市, 包括11个自体CAR-T产品、2个基因修饰的造血干细胞产品和1个基因修饰的骨髓干细胞产品. 同时, 全球至少还有2个以 γ 逆转录病毒载体为基础开发的细胞和基因治疗产品上市. 目前, 已经有超过100项重组逆转录病毒载体相关产品的临床试验正在美国、欧盟、中国等多地区开展, 包括基于慢病毒载体的体内基因治疗产品和体外修饰的细胞治疗产品^[2], 以及基于 γ 逆转录病毒载体的其他细胞治疗产品, 如通用型CAR-T细胞、T细胞受体T细胞(T cell receptor T cell, TCR-T)产品等^[3].

慢病毒和 γ 逆转录病毒是单链RNA包膜病毒, 均属于逆转录病毒科, 呈二十面体对称球形结构, 粒径为80~120 nm, 均具有较广的宿主范围, 其种属易感性取决于其包膜蛋白. 慢病毒可分为灵长类慢病毒和非灵长类慢病毒, 其中灵长类慢病毒包括人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)等. 以HIV-1为基础开发的慢病毒载体在细胞和基因治疗产品中使用最为广泛, 而 γ 逆转录病毒载体一般是基于鼠干细胞病毒(mouse stem cell virus, MSCV)和鼠白血病病毒(murine leukemia virus, MuLV)改造而成. 区别于仅感染分裂细胞的 γ 逆转录病毒载体, 慢病毒载体对分裂细胞和非分裂细胞均有感染能力, 适用于难转染的细胞(如干细胞等)以及对腺病毒感染具有较强免疫反应的免疫细胞(如T细胞、自然杀伤细胞)等, 其载体容纳外源目的基因片段较 γ 逆转录病毒



韦薇 博士, 主任药师, 国家药典委员, 国家级检查员. 主要从事生物制品药学专业的审评工作. 其团队承担了多项国家“十四五”课题、全国重点实验室课题和药监局科学监管课题研究. 主笔撰写了多项国际或国内首发的技术指导原则, 参与了多项WHO技术指南的撰写讨论工作.

大. 此外, 慢病毒及 γ 逆转录病毒载体具有随机整合至宿主细胞的基因组中稳定长期表达以及不易诱发宿主免疫反应等优点^[4,5], 亦可用于基因敲除或RNA干扰. 然而, 由逆转录病毒载体本身特性, 如随机整合、同源重组等可能带来的潜在安全性风险^[6], 研发和监管应在产品设计和质量控制时应予以关注, 且需要在后期的临床研究中长期监测.

受技术发展及安全性要求驱动, 病毒载体包装系统不断迭代更新. 目前在细胞和基因治疗产品中普遍/经常使用复制缺陷型重组病毒载体, 其病毒毒力基因被外源目的基因所取代, 同时, 载体设计使用U3区缺失改造的3'长末端序列(long terminal repeated, LTR), 使其具备自失活(self-inactivating, SIN)的特性, 因而不能在细胞中复制并包装产生新的子代病毒. 但其生产过程仍存在同源重组产生可复制型病毒(replication competent virus, RCV)的风险. 随着此类复制缺陷型病毒载体系统的广泛应用, 对其生产规模及产量的需求也日益增加, 其作为关键原材料可独立于细胞产品生产线, 且生产成本在整个产品的生产成本中占比较高, 目前大多数临床或商业化开发阶段产品所用病毒载体多来源于委托生产, 呈现集约式生产模式, 且鉴于辅助质粒及包装细胞的通用性, 有望逐步发展成为通用型平台技术的态势. 此外, 随着商业化开

引用格式: 崔靖, 刘丹, 韦薇. 细胞和基因治疗产品中逆转录病毒载体药学审评考虑. 科学通报, 2025, 70: 3757-3763

Cui J, Liu D, Wei W. Considerations for the pharmaceutical evaluation of retroviral vector in cellular and gene therapy products (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 3757-3763, doi: [10.1360/TB-2025-0039](https://doi.org/10.1360/TB-2025-0039)

发进程不断推进、供应需求、降本增效及安全性保障要求的变化,涉及病毒载体的变更情形也越来越多,使得工业界和监管机构对其关注程度进一步提高。

病毒载体的生产工艺及质量控制关系到目的基因转导性能及细胞生产工艺的稳健性,对终产品的安全性、有效性至关重要。鉴于 γ 逆转录病毒及慢病毒在上游设计、生产工艺及安全性风险控制方面具有相似性,本文结合近期细胞和基因治疗产品申报资料审评和沟通交流中这两类病毒载体相关的药学共性问题,并参考目前国内外已经发布或试行的技术指导原则要求,重点围绕重组病毒载体基因元件设计、生产用物料控制、生产工艺与过程控制等提出一般性建议,以供研发者和监管方交流讨论。

1 病毒载体的基因设计和药学评价

1.1 慢病毒载体包装系统

慢病毒基因组结构比较复杂,含有三个结构基因 gag 、 pol 、 env ,调节基因 tar 和 rev ,辅助基因 nef 、 vif 、 vpr 、 vpu ,以及病毒基因组5'端和3'端的LTR。其中 gag 基因编码形成核衣壳蛋白、内膜蛋白和衣壳蛋白, pol 基因编码病毒复制所需的酶类, env 编码包膜糖蛋白,可以决定病毒感染宿主的靶向性; Rev 识别 rev 应答元件(rev response element, RRE),促进病毒RNA从细胞核向细胞胞质的转运;辅助基因 nef 、 vif 、 vpr 编码蛋白插入病毒颗粒中,辅助基因 vpu 编码的蛋白可以参与病毒颗粒的组装。文献研究表明,4个辅助基因编码蛋白虽然不是病毒复制所必需的,但可增强病毒复制,并且与体内致病性相关^[5]。5'LTR区包含启动子和增强子序列,负责启动和调控目的基因转录;3'LTR参与mRNA加工和逆转录中双链DNA(double-stranded DNA, dsDNA)的形成,该dsDNA包含完整的LTR结构并随机整合到宿主基因组中。通常情况下,逆转录病毒载体可以采用多质粒瞬时转染包装细胞或通过稳定产毒细胞库进行生产。因慢病毒载体的某些包装成分,如HIV蛋白酶和水泡性口炎病毒糖蛋白(vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSV-G)具有细胞毒性,并抑制细胞生长,因此,构建合适的稳转包装细胞系存在一定挑战,因而,慢病毒载体目前通常采用质粒瞬转方式进行生产^[7]。目前,慢病毒载体包装系统已经由早期的第一代慢病毒载体系统发展更新至第四代慢病毒载体系统。第四代慢病毒载体系统进一步进行 gal 和 pol 基因密码子优化,但制备的病毒滴度尚不及第三代,尚未在临床上广泛应用。目前,临床应用较多的仍是第三代四质粒慢病毒载体系统,该系统将 gag/pol 和 rev 编码序列分散在不同的质粒上,并且在第二代病毒载体(三质粒系统)基础上进一步采用异源启动子序列替换 tar 基因,降低了病毒基因的转录水平^[8,9];此外,还将3'LTR的U3区启动子进行失活突变,减弱增强子和启动子的活性,形成SIN慢病毒载体,在不影响病毒滴度的同时提高了载体安全性^[8,9]。此外,基于

慢病毒载体大规模生产的需求及工艺优化,也有研究者进一步开发诱导型稳定包装细胞用于慢病毒生产,该系统可能引入诱导型启动子,以规避细胞建库阶段的细胞毒性,仅在生产期间条件性表达VSV-G等包膜蛋白^[10]。

1.2 γ 逆转录病毒载体包装系统

γ 逆转录病毒载体基因组结构相对慢病毒载体较为简单,仅含编码结构及功能核心蛋白的 gal/pol 基因以及 env 包膜蛋白编码基因,缺乏慢病毒调节蛋白如 tar 或 rev 。由于其整合偏好不同于慢病毒载体,更倾向插入基因组转录起始位点附近,理论上其插入整合风险相对较高^[11]。逆转录病毒的整合高度依赖于LTR序列,基于安全性的考虑,上述载体也可采用SIN设计(包括3' LTR U3区和/或5' LTR),理论上进一步降低了临床应用的风险。因SIN设计可能带来的病毒转录终止或包装滴度过低问题,载体元件除病毒包装信号、选择标记元件(如抗性基因)等,还可能引入特异性启动子(EF-1 α 等)、增强子、土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, WPRE)、中央多聚嘌呤区(central polypurine tract, cPPT)等功能元件,以增强基因表达或提高病毒滴度^[11]。早期,采用多质粒(如目的基因转移质粒、 gal/pol 编码质粒、VSV-G包膜蛋白编码质粒)瞬转包装细胞(如人胚肾细胞系HEK293T)制备 γ 逆转录病毒载体。目前多采用分别表达 gal/pol 及 env 包膜蛋白二质粒系统构建稳定产毒细胞系用于生产,进一步简化工艺流程,且生产成本相应降低。稳定产毒细胞多以PG13、HEK 293细胞等作为亲本细胞改造,可组成型表达不同细胞嗜性的低毒包膜蛋白,如猫内源性逆转录病毒RD-114。此外,产毒细胞上游改造可能涉及使用转座子、基因编辑系统等特异性插入工具,且通常需要筛选单克隆用于构建稳定产毒细胞库。

1.3 基因设计的药学评价

对国内采用逆转录病毒载体生产并且批准上市和临床试验的细胞和基因治疗产品进行总结分析,经梳理逆转录病毒(包括慢病毒、 γ 逆转录病毒等)载体基因设计中需要重点关注的内容如下。

正如前所述,慢病毒载体包装系统经历了从第一代至第四代慢病毒载体系统的发展,从安全性风险角度考虑,鼓励使用安全性更高的质粒系统包装慢病毒以及含有末端SIN结构的病毒载体。如果采用风险较高的质粒系统,需要对潜在的高风险进行评估,并说明采用高风险质粒系统的合理性,如果无法提供充分的依据,建议开展相应的安全性研究^[12]。

质粒是构建稳定产毒细胞库或生产病毒的基础,通常包括转移质粒、辅助质粒(gal/pol 质粒、包膜蛋白质粒等)。通常情况下应明确转移质粒上目的基因的来源及序列、质粒构建操作以及质粒基因测序结果等,提供原始测序报告以确认构建质粒的基因序列是否与理论序列一致。另外,还需要

重点关注转移质粒上WPRE元件是否经过改造,文献报道,野生型WPRE元件具有致癌/致瘤风险^[13]。因而,目前常见操作是通过引入突变或截短片段对野生型WPRE元件进行改造以降低相关风险。辅助质粒来源有3种常见的形式,包括自行生产、委托生产和从供应商购买。无论何种来源,均应明确辅助质粒来源、构建操作、基因序列确认和主要元件功能等相关信息,如对购买的质粒进行过部分基因元件的改造,应详细提供改造的依据、改造过程以及改造后基因序列确认的研究数据等,以确保改造后基因序列与理论序列一致。同时,它的生产工艺和质量控制对确保质粒DNA的质量非常重要,有必要提供全面的工艺研究、质量研究和稳定性研究等研究数据。

另外,尽管目前常用的慢病毒和 γ 逆转录病毒已经经改造设计为复制缺陷型病毒载体,但在细胞建库或生产工艺中可能发生同源或非同源重组,产生可复制型病毒RCV的可能。因此,应基于科学合理的系统设计,尽可能降低可复制型慢病毒(replication competent lentivirus, RCL)或可复制型逆转录病毒(replication competent retrovirus, RCR)产生的风险。近年来,基于降低细胞治疗产品生产成本以及用药可及性的迫切需求,一些新型体内CAR-T疗法开始出现在研发管线中,例如新型Fast CAR-T疗法,其将体外CAR-T扩增过程,转移至体内^[14];也有研发者探索通过新型病毒载体将CAR基因定向导入体内T细胞,体内直接生成和激活CAR-T细胞。上述技术路线可明显缩短工艺周期,降低生产成本,突破现有CAR-T疗法的局限性。此类病毒载体的分子设计还可能涉及使用具有体内受体特异性结合/定向功能的靶向配体、新型包膜蛋白、启动子的改造,以实现组织的趋向性或特异性限定表达^[15]。建议研发者关注包膜蛋白及其他分子设计元件的选择依据,结合作用机制及给药途径开展充分的概念验证及安全性评估,关注脱靶转导与免疫原性等风险。鉴于目前阶段国内此类技术路线尚处于起步阶段,尚无产品进展至临床试验阶段,鼓励研发人员与监管机构进行沟通交流 and 探讨。

2 病毒载体的生产用物料和药学评价

2.1 生产用细胞的药学评价

逆转录病毒载体生产过程中需要使用到生产用细胞,生产用细胞对于确保病毒载体的质量和安全性具有十分重要的意义。因此,为保证病毒载体质量稳定性和批间一致性,应对生产用细胞进行建库和检定,建库和检定需参照《中国药典》“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”的要求。针对构建的稳定产毒细胞库,可通过转染编码载体基因组的质粒或转导另一个含有所需病毒载体基因组的逆转录病毒载体进入包装细胞,并经单克隆筛选和表征研究获得稳定高效生产病毒载体的细胞,然后建立载体生产用细胞(vector producer cell, VPC)库进行病毒的生产。因此,还需进

行VPC的RCV检测,同时考虑增加目的基因序列的鉴别及产毒能力相关检测项目。上市阶段需开展规范的细胞库传代稳定性和贮存稳定性研究,传代稳定性研究应模拟并能代表实际商业化生产工艺,并对限传代次的细胞进行鉴别、遗传稳定性、内外源病毒因子、包装病毒能力和包装病毒质量等关键项目进行考察,结合研究结果合理拟定细胞体外限传代次。此外,因逆转录病毒基因组整合位点和数量不均一,如需基于单克隆筛选构建稳定产毒细胞株,建议临床期间结合多种不同技术手段确证产毒细胞株的单克隆性,关注产毒细胞在生产培养过程中的稳定性。

2.2 潜在安全性风险生产用原材料的药学评价

逆转录病毒载体建库及生产工艺过程中可能还会使用到一些具有潜在安全性风险的原材料,如贴壁工艺通常使用的胎牛血清、胰蛋白酶、血清替代物、转染试剂等。胎牛血清、胰蛋白酶及血清替代物有引发外源因子污染的潜在风险,因此病毒载体生产过程中建议避免使用动物/人源材料,尽可能使用成分明确的安全性物料予以替代。如果经充分的研究评估认为生产中需使用这些高风险的原材料,应严格审核生产商资质、检测报告、安全性评估报告等,并结合供应商质量标准以及产品控制要求,建立合理的企业内控标准,控制相关风险。此外,病毒生产可能用到多种类型的转染技术及转染试剂,转染试剂的选择关系到生产运行和成本,目前常见的转染试剂包括磷酸钙(calcium phosphate, CaPi)、阳离子脂质体(例如脂质体转染胺)、聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)。其中较为常用的PEI转染试剂价格经济,适用于大规模生产,但其具有一定的细胞毒性,因此建议结合PEI用量的研究,对产品中PEI残留情况进行检测和安全性评估,合理拟定PEI残留标准限度。

2.3 基因编辑工具的药学评价

稳定产毒细胞株构建过程中,如使用转座子、成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及CRISPR相关蛋白(CRISPR-associated proteins, CRISPR-Cas)等基因编辑工具,应提供相关编辑工具的结构图谱、序列及功能元件信息,并采用敏感方法对病毒载体、不同阶段工艺中间体或终产品进行编辑工具的残留检测及安全性评估。

3 病毒载体的生产工艺和药学评价

3.1 生产工艺类型

相比较于在稳定细胞系生产的 γ 逆转录病毒载体,慢病毒载体大多是通过多质粒瞬时转染HEK-293或HEK-293T细胞生产。HEK-293T稳定表达SV40 T抗原,该抗原与抑制p53和阻止细胞内先天免疫反应的激活有关,并已被证明能提高慢

病毒滴度。HEK-293T与HEK-293细胞相比,具有倍增时间更短、转染效率及载体滴度较高,经驯化可适应悬浮培养等多种优势,有助于大规模生产。常规的慢病毒载体生产工艺通常包括细胞种子扩增培养、多质粒共转染、培养和收获上清液、核酸酶消化、捕获/浓缩、纯化(超滤/渗滤、切向流过滤、层析等)、除菌过滤、分装等。

γ 逆转录病毒的生产通常基于上游构建的稳定产毒细胞株,常见诸如采用长臂猿白血病病毒(gibbon ape leukemia virus, GALV)包膜蛋白基因的PG13包装细胞或采用RD-114包膜的HEK 293细胞衍生细胞,采用培养瓶、细胞工厂、固定床生物反应器或微载体进行扩大培养生产,无需质粒转染,其生产及纯化步骤相比较为简单,通常仅涉及扩大培养、收获、浓缩过滤/离心纯化等简易步骤^[16]。

慢病毒及 γ 逆转录病毒均为包膜病毒,颗粒的固有复杂性和敏感性使其极易失去感染活性,颗粒的热稳定性、对冻融循环的敏感性,对生产工艺提出了较大的挑战。生产工艺过程中温度、盐浓度、pH、流速、剪切力和缓冲液渗透压都有可能影响病毒颗粒的稳定性^[17]。因此,关键工艺参数的控制对生产纯化制备高滴度及生物活性的病毒载体至关重要。此外,包装细胞的特性比如细胞状态、细胞活率等也影响病毒的生产。

3.2 生产工艺过程控制的药学评价

结合国内外批准上市产品中逆转录病毒载体使用情况,梳理并总结了逆转录病毒载体生产工艺需要关注的内容如下。

为确保工艺过程的重现性和产品质量的批间一致性,需要合理拟定病毒载体生产工艺过程控制项目和可接受标准。一般建议提供全面完整的工艺开发、工艺表征和工艺验证等研究资料和数据,详细列表提供病毒载体生产工艺各个阶段的关键工艺控制项目和可接受标准,包括但不限于对于病毒物理滴度、转导滴度及工艺相关杂质的过程监测,以积累数据评价工艺的稳健性及批间一致性。需要特别关注,应对未处理的病毒收获液开展全面的外源因子检测和控制,检项包括无菌、支原体、外源病毒因子(体外法)、RCL/RCR检测等。用于细胞和基因治疗产品中的病毒载体通常经基因改造成为复制缺陷型病毒,但在生产过程中仍可能存在基因元件通过同源或非同源重组形成RCL/RCR的风险^[18]。由于复制型病毒具有在体内不可控复制、插入体内基因组、引入免疫原性等致病风险,不仅影响产品安全性,给临床患者带来风险,而且还具有潜在的生物安全风险,在环境中传播造成污染或再次感染,因而需要特别关注RCL/RCR的检测和控制。研究表明,病毒载体上清液和生产终末细胞并不总是稳定一致地检测到RCL/RCR,因而,为尽可能降低病毒载体阶段RCL/RCR污染的风险,建议同时对收获上清及终末细胞采用敏感的指示细胞培养法进行RCL/RCR检测。具体检测方法

可参考《可复制型慢病毒检测共性问题与技术要求》^[19]、《体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则(试行)》^[20]及FDA相关指南规范的相关要求^[21]。需特别关注的是,对于体内治疗用新型病毒载体骨架及包膜蛋白设计,应考虑RCV检测方法的适用性,包括指示细胞及阳性病毒选择的合理性。

3.3 生产工艺变更的药学评价

病毒载体工艺开发过程中乃至产品上市后常伴随工艺优化和调整,目前较为常见的变更包括生产用细胞系的变更,比如贴壁培养生产系统向悬浮细胞生产系统的变更以适应规模放大需要,采用 γ 逆转录病毒载体稳定产毒细胞替代瞬转包装细胞等;以及载体生产技术的跨境转移及生产场地变更,以匹配商业化或临床供应需求;同时还可能伴随关键原材料的变更,例如载体生产用质粒类型及核酸酶等其他关键试剂变更。对于临床期间或上市后涉及病毒载体重大变更的情形,应充分评估变更风险及变更前后质量属性差异对最终产品安全性和有效性的影响,变更研究需要结合变更程度、变更阶段及变更风险综合评估开展,具体可参考《自体CAR-T细胞治疗产品药学变更研究的问题与解答》^[22]。

病毒载体自临床前、临床研究、上市阶段至上市后可能伴随着多个不同版本的生产工艺,需明确不同版本工艺生产病毒载体批次的用途(如临床前药学研究、非临床、临床/IIT研究、国内外供应等);建议详细梳理各个阶段工艺变更情况及开展的可比性研究数据,包括工艺性能、质量特性对比。需重点关注工艺变更对病毒滴度以及杂质清除能力的影响。基于病毒滴度、比活性的对比,进一步分析对后续细胞生产工艺中感染复数(multiplicity of infection, MOI)值的适用性以及目的基因转导效率的影响。开展病毒载体总收率及杂质水平的对比,必要时进一步优化病毒生产工艺,提高杂质清除能力及批间一致性,确保临床试验样品生产用病毒载体批次杂质水平不高于非临床毒理研究批次,或变更前后病毒载体质量可比。对于涉及病毒载体重大变更的情形,例如同时更换生产用细胞库、质粒类型的情形,考虑到上游构建及细胞基质来源杂质类型的差异,建议开展充分的病毒载体扩展特性对比分析及安全性评估,以及开展细胞的可比性研究,必要时还需考虑开展非临床对比和/或临床桥接研究,以评估变更对病毒载体及产品安全性和有效性的影响。鉴于包膜病毒的易失活性,还需开展病毒载体的稳定性对比研究。

此外,基于生产场地变化、降低检测成本及缩短周期等实际需求,载体工艺开发期间还可能涉及外源病毒因子、RCV委托检测机构及方法等过程控制的变更。鉴于RCV指示细胞培养法的敏感性及准确性,对RCV过程控制检测结果判定至关重要,如涉及RCV委托检测机构及方法设计的变更,建议详细梳理检测操作处理、方法设计、阳性病毒构建以

及方法系统适用性标准等对比信息,需充分开展拟变更方法的全面验证(如采用平台方法,应包括产品特异性的验证),以及与变更前方法的检测限和/或定量限以及准确度的对比,以确保RCV检测方法性能可比。

4 结语

多年来,以慢病毒和 γ 逆转录病毒为基础的病毒载体系统不断发展,其在细胞和基因治疗领域方面的广泛应用以及在基因转导方面的独特优势,已经被广泛认可。随着以逆转录病毒载体为基础研发的细胞和基因治疗产品批准上市和临床试验数量的快速增长,逆转录病毒载体生产及质量控制方

面的诸多问题也越来越突出,考虑到国内细胞和基因治疗产品研发企业风险意识和质控意识方面差异较大,且这些问题可能影响产品安全性、有效性及质量可控性,因此本文详细梳理和总结了逆转录病毒载体基因元件设计、生产用物料控制、生产工艺与过程控制等方面存在的药学常见问题,并结合国内外指导原则、文献资料以及目前初步审评思考提出相关审评考虑,以供研发者参考。随着科学技术发展以及降本增效、用药可及性需求的日益增长,一些新型病毒载体设计及生产技术不断涌现,受限当前审评认知及未知的安全性风险,鼓励研发者与监管方沟通交流,以期共同推动我国细胞和基因治疗产业的快速高质量发展。

推荐阅读文献

- 1 Sengupta R. Gammaretroviral and lentiviral vector manufacture: brief overview. *Cell Gene Therapy Insights*, 2021, 7: 345–354
- 2 Milone M C, O’Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 2018, 32: 1529–1541
- 3 Parkhurst M, Goff S L, Lowery F J, et al. Adoptive transfer of personalized neoantigen-reactive TCR-transduced T cells in metastatic colorectal cancer: phase 2 trial interim results. *Nat Med*, 2024, 30: 2586–2595
- 4 Zhang L, Weng Y C, Zhang Y, et al. Packaging recombinant lentivirus efficiently and establishing quantifying method for lentivirus (in Chinese). *J Bethune Med Sci*, 2015, 13: 3–5 [张玲, 翁云层, 张云, 等. 高效包装重组慢病毒及其定量方法的建立. *白求恩医学杂志*, 2015, 13: 3–5]
- 5 Labbé R P, Vessillier S, Rafiq Q A. Lentiviral vectors for T cell engineering: clinical applications, bioprocessing and future perspectives. *Viruses*, 2021, 13: 1528
- 6 Cornetta K, Lin T Y, Pellin D, et al. Meeting FDA Guidance recommendations for replication-competent virus and insertional oncogenesis testing. *Mol Ther-Methods Clin Dev*, 2022, 28: 28–39
- 7 U.S. Food and Drug Administration. Briefing Document — Testing for Replication Competent Retrovirus (RCR)/Lentivirus (RCL) in Retroviral and Lentiviral Vector Based Gene Therapy Products — Revisiting Current FDA Recommendations. 2010. <https://www.docin.com/p-1770046840.html>
- 8 Li X, Le Y, Zhang Z, et al. Viral vector-based gene therapy. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 7736
- 9 Zhu G F, Zhao M X. Research progress of lentivirus and its vector system (in Chinese). *Sci Technol Infor (Acad Res)*, 2008, (1): 109–112 [朱高风, 赵明星. 慢病毒及其载体系统的研究进展. *科技信息(学术研究)*, 2008, (1): 109–112]
- 10 Klimpel M, Terrao M, Ching N, et al. Development of a perfusion process for continuous lentivirus production using stable suspension producer cell lines. *Biotech Bioeng*, 2023, 120: 2622–2638
- 11 Maetzig T, Galla M, Baum C, et al. Gammaretroviral vectors: biology, technology and application. *Viruses*, 2011, 3: 677–713
- 12 Center for Drug Evaluation, NMPA. Pharmaceutical research Questions and Answers for cell therapy product in clinical trial application (in Chinese). 2019-10-18 [国家药品监督管理局药品审评中心. 细胞治疗产品申报临床试验药学研究问题与解答. 2019-10-18]
- 13 Schambach A, Bohne J, Baum C, et al. Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression. *Gene Ther*, 2006, 13: 641–645
- 14 Bui T A, Mei H, Sang R, et al. Advancements and challenges in developing *in vivo* CAR T cell therapies for cancer treatment. *eBioMedicine*, 2024, 106: 105266
- 15 Huckaby J T, Landoni E, Jacobs T M, et al. Bispecific binder redirected lentiviral vector enables *in vivo* engineering of CAR-T cells. *J Immunother Cancer*, 2021, 9: e002737
- 16 Inwood S, Xu H, Black M A, et al. Continuous production process of retroviral vector for adoptive T- cell therapy. *Biochem Eng J*, 2018, 132: 145–151
- 17 Perry C, Rayat A C M E. Lentiviral vector bioprocessing. *Viruses*, 2021, 13: 268
- 18 Sastry L, Xu Y, Duffy L, et al. Product-enhanced reverse transcriptase assay for replication-competent retrovirus and lentivirus detection. *Hum Gene Ther*, 2005, 16: 1227–1236
- 19 Center for Drug Evaluation, NMPA. Common problems and technical requirements of replication competent lentivirus detection (in Chinese). 2024-10-28 [国家药品监督管理局药品审评中心. 可复制型慢病毒检测共性问题与技术要求. 2024-10-28]
- 20 Center for Drug Evaluation, NMPA. Technical guidelines for pharmaceutical research and evaluation of *in vitro* gene modification systems (Trial

(in Chinese). 2022-05-26 [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). 2022-05-26]

- 21 Food and Drug Administration. Testing of retrovirus vector-based human gene therapy products for replication competent revirus during product manufacture and patient follow-up. 2020-01
- 22 Center for Drug Evaluation, NMPA. Questions and answers for pharmaceutical changes of autologous CAR-T cell therapy products (in Chinese). 2023-11-16 [国家药品监督管理局药品审评中心. 自体CAR-T细胞治疗产品药学变更研究的问题与解答. 2023-11-16]

Summary for “细胞和基因治疗产品中逆转录病毒载体药学审评考虑”

Considerations for the pharmaceutical evaluation of retroviral vector in cellular and gene therapy products

Jing Cui^{1,2†}, Dan Liu^{1,2†} & Wei Wei^{1,2*}

¹ Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100076, China

² State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, Beijing 102629, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding author, E-mail: weiw@cde.org.cn

Recombinant retroviral vectors represented by lentivirus and gamma-retrovirus are widely applied in cellular and gene therapy products. Lentiviral vectors developed from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and gamma-retroviral vectors developed from mouse stem cell virus or murine leukemia virus are the most commonly used. To date, many of the immune cell products (such as chimeric antigen receptor-modified T cell products) and stem cell products developed based on these vectors have been approved for marketing. With the rapid increase in the number of clinical trials of global cellular and gene therapy products, retroviral vectors have received widespread attention. Retroviral vectors are a type of enveloped RNA viral vectors that can mediate the transduction and expression of target genes in both dividing and non-dividing cells, serving as an essential tool for *in vitro* gene modification or *in vivo* gene delivery. In addition, given the universality of helper plasmids and packaging cells for virus packaging, they are expected to gradually develop into universal platform technologies. Vectors are critical raw materials for cellular and gene therapy products. The gene element design, manufacturing process, and quality control of vectors are important to ensure the safety, efficacy, and quality of the final products. Moreover, due to the urgent needs for scaled-up production, reduced production costs, and improved drug safety, changes related to viral vectors during clinical trials or post-marketing phases have progressively increased in recent years. Along with the advances in technology, continuous deepening of research and cognition of such vectors by applicants and regulators, the packaging system of retrovirus vectors is also constantly being updated and iterated. The potential safety risks brought by the inherent characteristics of retroviral vectors (such as random integration, homologous recombination, etc.) have always been a key concern for applicants as well as regulators. The problems in the manufacturing process and quality control of retroviral vectors become increasingly prominent, meanwhile, there are significant differences in risk and quality management systems among domestic applicants or R&D companies. This paper focuses on putting forward key review considerations and general suggestions of gene element design, raw materials for production, manufacturing process and process control of retroviral vectors, referencing current domestic and international guidelines and the pharmaceutical issues related to retroviral vectors in the review and communication of cellular and gene therapy products. Also, general recommendations are put forward for discussion and communication between applicants and regulators.

cellular and gene therapy products, retroviral vectors, gene element design, raw materials for production, manufacturing process and process control

doi: [10.1360/TB-2025-0039](https://doi.org/10.1360/TB-2025-0039)