



张孝兵, 北京协和医学院特聘教授, 细胞生态海河实验室领军科学家, 博士生导师。张孝兵教授在细胞与基因治疗(CGT)及生物工程领域深耕36年, 拥有独特的“工程+科学”双重背景。他早年于四川大学攻读生物化学工程专业, 深谙发酵工程与生物制药车间设计; 随后在华东理工大学及香港中文大学从事研究期间, 率先开展了大孔微载体动物细胞规模化培养及可长期植入的造血干细胞扩增研究, 为后期攻克细胞药物制备工艺难题奠定了坚实的工程学基础。2002年至2009年, 张孝兵教授在全球基因治疗研究重镇——美国Fred Hutchinson肿瘤研究中心(Fred Hutch)从事前沿探索, 专注于干细胞基因治疗, 拓展了国际顶尖的科研视野并积累了载体安全性评价经验。归国前, 他曾历任美国罗马琳达大学助理教授及副教授。作为血液与健康全国重点实验室研究员及细胞生态海河实验室领军科学家, 张孝兵教授目前带领数十人的科研团队, 致力于血细胞重编程、iPS细胞定向分化以及基因治疗与编辑的基础与转化研究。团队在技术源头创新方面成果卓著, 持有中美发明专利20项, 自主开发的高效重编程和基因编辑载体系统已被全球数百家实验室采用。目前, 张孝兵教授团队正整合包括引导编辑(PE)、胞嘧啶碱基编辑(CBE)、CRISPRoff等最新工具与长读长测序技术, 构建从“原材料设计”到“临床长期随访”的端到端质量控制(QC)体系, 旨在解决AAV、慢病毒及LNP等递送系统的合规性难题。同时, 团队正全力开发安全高效的新型靶向型LNP/VLP递送工具, 以期实现体内造血干细胞和免疫细胞的精准基因治疗。

基因治疗药物质量控制的研究进展与趋势

张健萍^{1, 2#} 张洋洋^{1, 2#} 张孝兵^{1, 2*}

(¹中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 血液与健康全国重点实验室, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 细胞生态海河实验室, 天津 300020; ²天津医学健康研究院, 天津 301600)

摘要 该综述聚焦基因治疗(gene therapy, GT)从研发到临床的全流程质量控制(quality control, QC)体系构建。其中, 围绕腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)和慢病毒(lentiviral vector, LV)两大主流载体, 系统梳理了AAV载体在生产中的空壳率、载体基因组完整性、反向末端重复序列(inverted terminal repeat, ITR)异常以及外源DNA杂质等关键质量属性(critical quality attributes, CQAs), 以及LV载体在体外基因治疗应用中涉及的整合位点分布、整合体全长结构和克隆动力学等安全性考量。在基因编辑部分, 基于第一代CRISPR-Cas9的临床经验, 讨论其脱靶效应和大片段缺失的检测方法与缓解策略, 并延伸至新一代基因编辑工具——碱基编辑(base editing, BE)和引导编辑(prime editing, PE)的精确性评估与递送策略。在方法学上, 提出以第三代测序(长读长测序)为核心支柱, 联合液滴数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)、无动物致热源检测[如重组因子C法

收稿日期: 2025-09-26

接受日期: 2025-12-01

国家自然科学基金(批准号: 82570286)和中国医学科学院医学与健康科技创新工程基金(批准号: 2024-I2M-3-018、2024-I2M-ZH-015)资助的课题

*共同第一作者

*通信作者。Tel: 022-23909411, E-mail: zhangxbhk@gmail.com

Received: September 26, 2025

Accepted: December 1, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82570286) and the Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) (Grant No.2024-I2M-3-018, 2024-I2M-ZH-015)

*These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-22-23909411, E-mail: zhangxbhk@gmail.com

(recombinant factor C assay, rFC)和单核细胞致热源试验(monocyte activation test, MAT)等]以及功能学与免疫学/组织分布评估,构建“方法—指标—工艺—临床结局”相闭合的证据链。在监管层面,归纳了美国FDA、欧盟EMA和中国CDE对于深度分子表征和长期随访的共识要点。在未来展望中,指出了三大关键趋势:一是靶向脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)/病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)的体内递送策略,二是基于长读长测序和数据智能的QC常态化,三是连续化制造与过程分析技术(process analytical technology, PAT)的融合。这些进展有望为基因治疗提供更加安全、可审计、可规模化的实践路径。

关键词 基因治疗; AAV; 慢病毒; CRISPR/BE/PE; 长读长测序; 质量控制; LNP/VLP

Progress and Future Trends in Quality Control of Gene Therapy Products

ZHANG Jianping^{1,2#}, ZHANG Yangyang^{1,2#}, ZHANG Xiaobing^{1,2*}

(¹State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; ²Tianjin Institutes of Health Science, Tianjin 301600, China)

Abstract This review outlines an end-to-end QC (quality control) framework for gene therapies from development to clinic. For AAV (adeno-associated virus) and LV (lentiviral vector), CQAs (critical quality attributes) are synthesized: empty/full ratios, vector-genome integrity, ITR (inverted terminal repeat)-associated defects and exogenous DNA impurities for AAV; and genome-wide integration profiles, full-length integrant structures, and clonal dynamics for LV. Building on first-generation CRISPR clinical experience, detection and mitigation of off-targets and large deletions are addressed, extending to accuracy profiling and delivery strategies for BE (base editing) and PE (prime editing). Methodologically, a long-read sequencing-anchored paradigm integrated with ddPCR (droplet digital PCR), rFC (recombinant factor C assay)/MAT (monocyte activation test), functional readouts, and immunology/distribution assessments is advocated to establish a verifiable “methods-metrics-process-clinical outcomes” evidence loop. On the regulatory side, converging FDA/EMA/CDE expectations for deep molecular characterization and long-term follow-up are summarized. Looking forward, targeted LNP (lipid nanoparticle)/VLP (virus-like particle) for *in-vivo* programming, routine QC powered by long-read platforms and data intelligence, and the fusion of continuous manufacturing with online process analytical technologies are highlighted, enabling safer, auditable, and scalable gene therapy translation.

Keywords gene therapy; AAV; lentiviral vector; CRISPR/BE/PE; long-read sequencing; quality control; LNP/VLP

基因治疗正从概念验证阶段迈向规范化临床和产业化应用。在递送载体方面,病毒载体[主要包括腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)和慢病毒(lentiviral vector, LV)]、病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)以及非病毒载体[如质粒DNA、脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)]的持续优化显著提升了体内外基因递送的效率并扩展了安全边界。其中,AAV载体在多种遗传病中实现了长期基因表达且免疫原性相对可控^[1]; LV载体由

于可以将基因稳定整合到宿主细胞基因组,在造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)基因添加和嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)等细胞治疗中成为关键工具^[2]。基因编辑技术以CRISPR-Cas9为代表,近十年快速演进,碱基编辑(base editing, BE)和引导编辑(prime editing, PE)等新兴工具大幅拓展了突变精确校正的范围并提升了编辑精度,成为基因治疗中不可或缺的技术工具^[3-4]。随着基因治疗进入临床,质

量控制(quality control, QC)成为保障其安全性和有效性的核心环节。在载体制备过程中, AAV需重点控制空壳率、基因组完整性(截断/嵌合)及外源DNA杂质^[5]; 整合型LV则侧重于复制型慢病毒(replication-competent lentivirus, RCL)监测与随机整合导致的插入突变风险评估^[6-7]。在基因编辑应用中, 应系统监控脱靶效应、大片段缺失/结构变异以及递送体系与宿主免疫的相互作用, 常用方法涵盖GUIDE-seq与DISCOVER-seq等^[8-9]; 临床用药环节要严格把关内毒素/致热源与免疫原性, 欧盟药典已将单核细胞致热源试验(monocyte activation test, MAT)(2.6.30)作为体内发热试验[(如: 兔致热原试验(rabbit pyrogen test, RPT)]的体外替代试验, 并逐步接纳重组因子C法(recombinant factor C assay, rFC)用于细菌内毒素检测^[10-11]。临床用药环节还需严格把关内毒素/致热源与免疫原性, 并建立长期随访机制。基于此, 构建贯穿“原材料—生产—体外效力—体内安全—长期随访”的全流程QC体系, 尤其是依托长读长测序技术作为支撑, 是推动基因治疗产品从研发走向可审计、可规模化生产的必由之路。

本文系统梳理基因治疗产品及其质控体系的最新进展: 以AAV和LV两大主流载体为主线, 纳入LNP/VLP等新兴体内递送策略, 概述不同平台的关键质量属性与质控框架; 在回顾第一代CRISPR临床成果和局限的基础上, 讨论BE/PE工具的应用前景和质控要点; 重点阐述第三代测序技术在AAV载体基因组完整性解析和LV整合体全长/插入位点监测中的价值, 并介绍rFC和MAT等新方法在基因治疗药物致热原/内毒素风险控制中的应用价值及其在未来监管中的意义, 旨在为构建以长读长测序为支撑的基因治疗QC体系提供可操作的思路和指标参考。如图1所示, 本综述以“测序锚定的端到端QC”作为整体框架, 贯穿载体与编辑工具的方法—指标—工艺—临床闭环, 契合CMC(chemistry, manufacturing and controls)开发及监管关注要点^[12]。

1 基因治疗的发展历程与监管体系演进

1.1 历史挫折与安全性反思

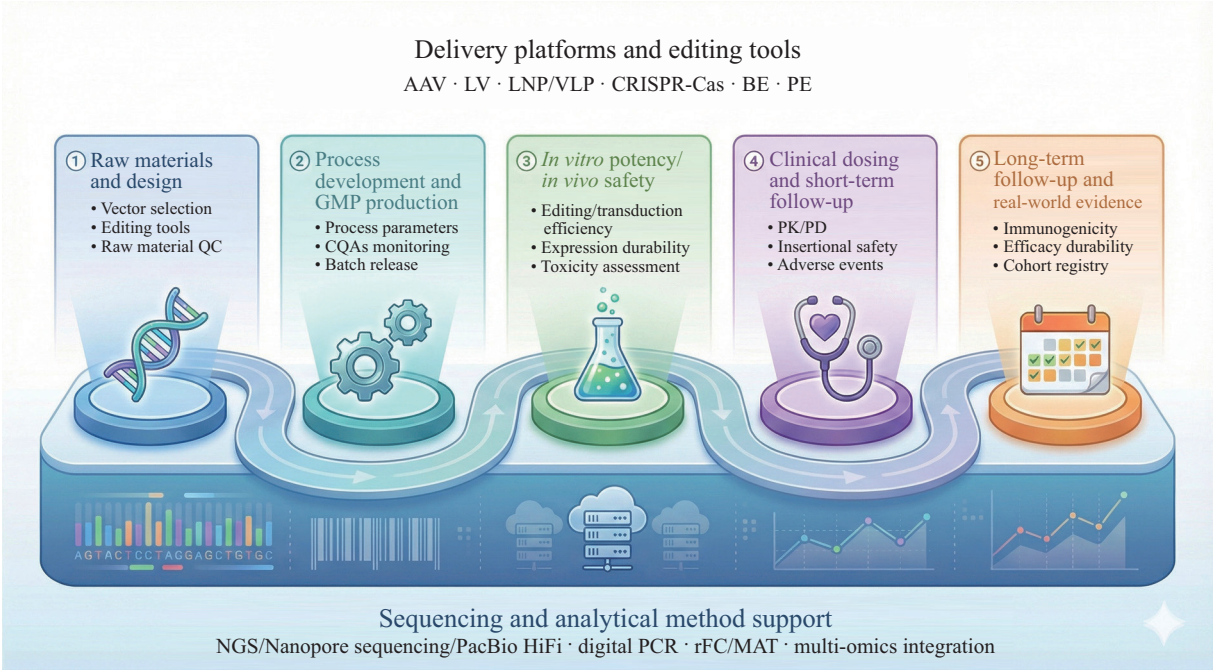
基因治疗的概念萌芽于20世纪后期。1990年, 美国科学家首次使用逆转录病毒将正常的腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)基因导入一名先天性

ADA缺陷导致免疫缺陷的患儿体内, 标志着基因治疗进入临床实践^[13]。此后十余年间, 腺病毒和逆转录病毒/慢病毒载体成为主要的基因递送工具, 临床研究遍地开花。然而, 在初期试验中也暴露出严重的安全隐患, 引发了整个领域的深刻反思。

1999年, 美国宾夕法尼亚大学在一项治疗鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症(ornithine transcarbamylase deficiency, OTC deficiency)的基因治疗临床试验中发生严重不良事件: 年仅18岁的受试者杰西·格尔辛格(Jesse GELSINGER)因腺病毒载体引发的急性免疫反应和多器官衰竭不幸去世^[14]。这一事件导致美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)紧急叫停相关临床试验, 并对负责人实施研究限制^[15]。格尔辛格事件沉重打击了公众和学界对基因治疗的信心, 直接使全球基因治疗研究陷入将近二十年的低谷。同样引人警醒的还有2002—2003年发生在法国和英国的X-连锁重度联合免疫缺陷症(X-linked severe combined immunodeficiency, X-SCID)基因治疗试验: 研究团队利用 γ -逆转录病毒载体为患儿进行了基因添加, 初期临床疗效显著, 但在随后的长期随访中, 观察到数例患儿继发了白血病。研究证实, 这是由载体插入激活了LMO2(LIM domain only 2)致癌基因所致^[16-18]。该事件成为整合型载体设计与长期安全性监管的分水岭, 促使学界开始反思如何降低载体插入突变带来的风险。上述安全事件促使学术界和监管部门迅速采取措施, 加强基因治疗研究的质控和安全要求。例如, 对于腺病毒载体, 严格控制给药剂量以避免严重急性炎症反应; 对于逆转录病毒/慢病毒载体, 则开发自灭活(self-inactivating, SIN)载体骨架, 通过去除强启动子和病毒复制相关元件来降低插入致突变风险^[19-20]。在监管方面, 美国FDA于2006年发布指导原则, 要求所有接受整合型载体治疗的受试者进行为期不少于15年的长期随访, 以监测迟发不良事件^[21]。这些举措奠定了现代基因治疗领域基本的安全框架, 推动了公众信任的重建, 并提升了产品的监管可接受性与审评通过的可行性。

1.2 行业复兴与全球监管体系建立

进入21世纪后, 随着载体工程和质控体系的完善, 基因治疗逐步走出早期的低谷, 迎来了复兴时期。当前, AAV体内基因治疗和慢病毒介导的细胞基因治疗成为双引擎: AAV以较低的免疫原性、特



图中示意了基因治疗药物从原材料与设计到临床患者长期随访的全生命周期质量控制路径。自左向右依次为: ①原材料与设计阶段, 聚焦载体类型(AAV/LV/LNP/VLP等)和基因编辑工具(CRISPR-Cas、碱基编辑器、引导编辑器等)的选择与构建, 以及质粒、细胞库和辅料等关键原材料的质量属性; ②工艺开发与GMP生产阶段, 围绕滴度、空/实粒子比例、基因组完整性、残留杂质等关键质量属性(critical quality attributes, CQAs)优化工艺参数并建立放行标准; ③体外效力与体内安全性评价阶段, 利用细胞模型和动物模型系统评估转导/编辑效率、表达持续时间、组织分布、急性及亚急性毒性等; ④临床给药与短期随访阶段, 在临床试验和真实用药场景中动态监测药代/药效学、免疫原性、不良事件及初步疗效指标; ⑤长期随访与真实世界证据阶段, 通过队列登记和长期随访评估插入致癌风险、血液学恶变、疗效持续性和再给药可能性。长读长测序及相关新兴分析技术贯穿上述各阶段, 为AAV/LV/LNP/VLP等递送平台和多种基因编辑工具提供统一的分子证据支撑, 帮助构建以CQAs为核心的“方法-指标-工艺-临床”闭环质控体系。

The figure illustrates the end-to-end quality control pathway for gene therapy products, spanning from raw materials and design to clinical patient long-term follow-up. From left to right: ① raw materials and design phase: focuses on the selection and construction of vector types (AAV/LV/LNP/VLP, etc.) and gene editing tools (CRISPR-Cas, base editors, prime editors, etc.), as well as the quality attributes of critical raw materials such as plasmids, cell banks, and excipients; ② process development and GMP production phase: optimizes process parameters and establishes release criteria centering on CQAs (critical quality attributes) such as titer, empty/full particle ratios, genome integrity, and residual impurities; ③ *in vitro* potency and *in vivo* safety assessment phase: systematically evaluates transduction/editing efficiency, expression durability, tissue distribution, and acute/sub-acute toxicity using cell and animal models; ④ clinical dosing and short-term follow-up phase: dynamically monitors PK/PD (pharmacokinetics/pharmacodynamics), immunogenicity, adverse events, and preliminary efficacy indicators in clinical trials and real-world administration scenarios; ⑤ long-term follow-up and real-world evidence phase: assesses the risk of insertional oncogenesis, hematologic malignancies, efficacy durability, and redosing feasibility through cohort registries and long-term monitoring. Long-read sequencing and related emerging analytical technologies span across these stages, providing unified molecular evidence support for delivery platforms (AAV/LV/LNP/VLP) and various gene editing tools, helping to construct a CQAs-centric “methods-metrics-process-clinical” closed-loop QC system.

图1 从实验台到患者: 基因治疗端到端质量控制(quality control, QC)框架
Fig.1 Bench-to-patient: end-to-end QC (quality control) framework for gene therapy

定组织的高亲和性以及长期基因表达等优势, 确立了体内基因替代疗法的主力地位; 慢病毒载体则凭借其基因整合的持久性, 在造血干细胞基因添加和CAR-T等细胞治疗中不可或缺, 推动了实体产品的产业化和标准化临床路径的形成。

全球范围内, 一系列标志性成果和产品的问世, 进一步提振了基因治疗的发展信心并推动了监管体系的逐步建立(表1)。表1简要列出了1990年至2025年间基因治疗领域具有里程碑意义的事

件和产品, 包括首例基因治疗临床试验、具有深远影响的安全事件, 以及近年陆续获批的代表性基因治疗药物等。可以看到, 自2015年后, 多个基因治疗产品相继在美欧获批上市, 如针对视网膜疾病的Luxturna(2017, AAV2)^[22]、针对脊髓性肌萎缩的Zolgensma(2019, AAV9)^[23]、以及针对血友病A的Roctavian(2022, AAV5)^[24]和针对杜氏肌营养不良症的Elevidys(2023, AAVrh74)^[25]等, 标志着基因治疗开始走向常规临床应用。与此同时, 基于慢病毒载

表1 全球基因治疗领域重要里程碑(1990—2025)
Table 1 Global milestones in gene therapy (1990—2025)

年份 Year	事件/产品 Event/product	载体/平台 Vector/platform	适应症/场景 Indication/setting	批准/发表 Approval/ publication	意义摘要 Significance (summary)
1990	First human gene therapy trial: ADA-SCID ^[13]	γ -retrovirus	ADA deficiency (immunodeficiency)	USA	Marked the clinical advent of human gene therapy
1998	SIN (self-inactivating) LV (lentivirus) design ^[34]	LV	Vector engineering	J Virol	Reduced enhancer/promoter-driven insertional activation risk; blueprint for clinical-grade LV
1999	Jesse Gelsinger incident (OTC deficiency trial) ^[14-15]	Adenovirus	Ornithine transcarbamylase deficiency	USA	Fatal immune reaction triggered field-wide safety reassessment
2002— 2003	X-SCID insertional oncogenesis ^[16-18]	γ -retrovirus	X-linked SCID	France/UK	LMO2-proximal integrations caused leukemia; drove SIN designs & long-term follow-up
2003	First human LV clinical trial (VRX496) initiates ^[35]	LV	HIV infection	US (IND)	Clinical debut of LV vectors in humans
2003	Gendicine (p53) approval ^[36]	Adenovirus	Head & neck squamous cell carcinoma	China	First marketed gene therapy product worldwide
2012	CRISPR-Cas9 genome editing reported ^[37]	—	Genome editing research	Science (publication)	Ushered in programmable gene editing era
2017	Kymriah becomes first FDA-approved LV-modified CAR-T ^[38]	LV	B-ALL/lymphoma	US (FDA)	Opens LV era in commercial cell therapy (CAR-T)
2017	Luxturna approval ^[22]	AAV2	RPE65-mediated inherited retinal dystrophy	US (FDA)	First approved <i>in vivo</i> AAV gene therapy
2019	Zolgensma approval ^[23]	AAV9	SMA (spinal muscular atrophy)	US (FDA)	One-time dosing achieved transformative efficacy
2022	Roctavian approval ^[24]	AAV5	Hemophilia A	US/EU (FDA/EMA)	First gene augmentation therapy for hemophilia A
2022	ZYNTEGLO FDA approval ^[39]	LV	Transfusion-dependent β -thalassemia	US (FDA)	First US approval of LV-HSC for hemoglobinopathies; durable benefit and safety to date
2022	SKYSONA FDA approval (c-ALD; boxed warning) ^[40]	LV	Cerebral ALD	US (FDA)	Approved with hematologic malignancy boxed warning; elevated risk management
2023	Elevidys approval ^[25]	AAVrh74	DMD (Duchenne muscular dystrophy)	US (FDA)	Breakthrough in neuromuscular genetic disease
2023	Casgevy (exagamglogene autotemcel) approval ^[32]	<i>Ex vivo</i> CRISPR-Cas9 (autologous HSC)	Sickle cell disease/ β -thalassemia	US (FDA)	First approved CRISPR-based gene editing therapy
2024— 2025	NEJM analysis reports hematologic cancers after SKYSONA; FDA strengthens labeling/use ^[41-43]	LV	Cerebral ALD	US (FDA)	Landmark safety signal and label updates sharpen risk-benefit assessment for LV-HSC
2024	Beqvez (fidanacogene elaparvovec) approval ^[44]	AAV	Hemophilia B	US (FDA)	Another major advance of AAV therapy in hemophilia
2024	Eladocogene exuparvovec approval ^[45]	AAV	AADC deficiency (intracerebral delivery)	US (FDA)	First direct brain-delivered gene therapy for AADC deficiency
2025	BBM-H901 (Xin Jiuning) approval ^[33]	AAV	Hemophilia B	China (NMPA)	First domestically approved gene therapy in China

本表为示例性梳理, 仅选取影响临床与监管格局的代表性节点, 非穷尽。—: 不适用。

This is an illustrative summary highlighting high-impact milestones shaping clinical practice and regulation; not exhaustive. —: not applicable.

体的体外细胞/造血干细胞疗法也在同一时期快速落地: 以LV改造的CAR-T产品Kymriah(2017, LV-T细胞)与Yescarta(2017, γ -RV-T细胞)相继获批, 开启了商业化细胞治疗时代^[26-27]; 在HSC领域, Zynteglo(2022, LV-HSC)与Skysona(2022, LV-HSC, 带黑框警示)先后在美国获批, 前者长期随访未见载体相关肿瘤学信号、显示持久获益^[28], 而后者在随访队列中观察到血液恶性肿瘤个案, 推动对LV-HSC产品的风险再评估与标签更新^[29-30]; 此外, 针对异染性白质脑病(metachromatic leukodystrophy, MLD)的LV-HSC疗法Lenmeldy亦已在美国获批, 进一步拓展了LV的治疗版图^[31]。此外, 2023年美国FDA批准了全球首个CRISPR基因编辑疗法Casgevy(CTX001, 体外CRISPR-Cas9修饰自体HSC, 用于镰状细胞贫血和 β -地中海贫血), 表明基因编辑治疗也取得历史性突破^[32]。在中国, 首个自主研发的AAV基因治疗产品BBM-H901(2025, 用于血友病B)^[33]已获国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)批准, 实现了国产基因治疗零的突破。随着这些重大进展, 各国监管机构也相应建立和完善了基因治疗产品的审核审批体系, 加强了对产品质量、安全风险和长期随访的规范要求。

1.3 产品监管要点与质量合规共识

基因治疗的复兴伴随着监管体系的完善和行业质量共识的形成。面向产品注册和产业化生产, 欧美及中国监管机构在药学、临床和质控方面逐步生成了一套共识性的关键质量属性(critical quality attributes, CQAs)要求及证据体系, 包括但不限于以下几个方面。

1.3.1 药学质量一致性 对于AAV载体, 重点关注空壳率、载体基因组完整性、残留DNA和杂质谱等参数^[12,46]; 对于慢病毒载体, 则强调同时报告物理滴度和功能滴度、证明无复制型慢病毒污染, 并对载体插入结构进行深入表征, 以保证不同批次产品在质量和效力上的一致性^[6,47]。

1.3.2 安全性分子证据 AAV载体需要提供深度的分子表征数据[如ITR-to-ITR的载体基因组完整性分析(截断、串联/拼接等异常构型)以及外源DNA杂质的定量]以及免疫相容性评估结果; LV载体要求开展全基因组范围的插入位点分布分析和整合体全长结构解析, 并结合克隆动力学进行长期安全性监测; 基因编辑疗法需体系化评估脱靶效应和大片段缺失/结

构变异, 并设定相应的阈值控制标准^[6,12,48]。

1.3.3 无菌与致热源控制 在传统细菌内毒素检查[鲎变形细胞溶解物(limulus ameobocyte lysate, LAL)法]的基础上, 监管与药典层面接受基于适用性验证的替代方法, 如rFC和MAT, 用于拓展非内毒素性致热源覆盖范围并减少动物使用^[49-50]。

1.3.4 长期随访要求 对于使用整合型载体或基因修饰细胞的治疗, 要求对患者进行至少15年的长期随访监测已成为各主要监管机构的共识^[21]。对于高剂量AAV体内给药潜在的肝毒性以及可能的插入突变事件, 监管亦将其纳入长期随访观察要点^[7,51]。

1.3.5 数据可追溯与审计 监管机构强调方法学验证、可复现的定量指标与数据可追溯; 鼓励采用长读长测序等先进手段获取更全面的分子证据, 并将“方法-指标-工艺-临床”闭环关联用于放行与变更管理^[12]。

2 基因治疗载体与质控体系

各国监管指南对基因治疗产品的CMC提出了更明晰的质量合规要求。总体而言, 现代监管框架强调: 产品必须以明确的CQAs为导向, 结合经验证的方法学, 提供充分证据证明质量、安全性与有效性的一致性^[21,46]。这要求企业在研发生产中部署先进分析技术、对关键质量属性深入表征, 并通过长期随访支撑临床安全性。在下文中, 我们将围绕具体载体平台和基因编辑技术, 对这些质控要点和技术进展进行更深入的讨论(表2)。

2.1 AAV载体的应用与质控

2.1.1 AAV载体的应用概览 AAV因其低致病性和相对温和的免疫原性、多样的组织定向输送能力以及能够介导长期基因表达等优点, 已成为体内基因治疗的核心载体平台之一。自2017年首个AAV基因治疗药物Luxturna获批以来, AAV载体在多个疾病领域展现出临床价值: 针对视网膜遗传病的Luxturna^[22], 针对脊髓性肌萎缩症的Zolgensma^[23], 针对血友病A的Roctavian^[24], 针对血友病B的Hemgenix/Beqvez^[44], 以及针对杜氏肌营养不良症的Elevidys^[25]等一系列AAV基因疗法相继获批, 适应症涵盖眼科、神经系统、血液和神经肌肉等疾病领域。与此同时, 全球范围内仍有大量在研的重组AAV(recombinant adeno-associated virus, rAAV)临床试验, 显示出AAV载体在更多罕见病乃至更广泛疾病适应症中的开发潜力。

表2 基因治疗载体平台关键质量属性与检测矩阵

Table 2 Key CQAs-assay matrix for gene-therapy platforms

载体类型	核心关键质量属性(按优先级归类)	推荐检测方法(放行/过程控制)	监管关注重点	放行/过程控制指标示例(非强制; 以已验证方法与内部标准为准)	典型应用场景
Vector type	Core CQAs (clustered by priority)	Recommended assays (release/process control)	Regulatory focus	Example release/process targets (non-binding; per validated methods & internal specs)	Typical use cases
AAV	Genome integrity/truncation & chimeras; empty/filled/intermediate capsids; infectivity (VG:TU) & potency; ITR integrity; particle size/aggregation; residual host DNA/protein & plasmid; endotoxin/pyrogen	Long-read or NGS full-length mapping; AEX-HPLC or SV-AUC for capsid species; ddPCR/qPCR (VG)+cell-based infectivity/potency (TU/functional readout); ITR quantitation (ddPCR/NGS); DLS/TEM/NTA (size/aggregation); residual DNA (qPCR/length profiling), HCP (ELISA/LC-MS); rFC/MAT for pyrogens ^[6,11-12,46,50]	High (integrity, capsid species, infectivity, ITR); medium (aggregation, residuals) ^[6,12,46]	Set specs from validated assays; trend full-length genome, capsid species, TU:VG; control residual DNA (amount/size); justify rFC/MAT strategy ^[6,11-12,46,50]	<i>In vivo</i> (primary), also <i>ex vivo</i>
LV	RCL negative; provirus full-length/packaging recombination; integration-site distribution & clonal dynamics; functional titer/potency; residual plasmid DNA, p24 and other impurities; endotoxin/sterility	RCL amplification culture+qPCR (with positive control & LoD); LRS+UMI-consensus for provirus full-length & recombination; integration-site NGS/LRS (e.g., Alu-PCR)+longitudinal clone tracking; functional titer (flow/reporter); DpnI-qPCR (plasmid residual); p24 ELISA; rFC/MAT; sterility ^[6-7,11-12,47,50]	High (RCL, integration safety, recombination); Medium (residuals/potency) ^[6,7,12,47]	Show RCL not detected with validated LoD; justify functional titer/VCN specs; monitor integration-site diversity/clone dynamics; assess vector integrity/recombination ^[6-7,12,47]	<i>Ex vivo</i> (cell/gene-modified cell products)
VLP	Non-replicating (genomic nucleic acid residuals negative); cargo identity/dose consistency (protein/RNP/nucleic acid); particle purity/aggregation; potency (entry/delivery, functional readout); host residuals/endotoxin	Nuclease-protection+qPCR (nucleic-acid residuals); LC-MS/ELISA/digital PCR (cargo identity/dose); NTA/DLS/TEM (purity/size/aggregation); cell-based functional assays; rFC/MAT; HCP/host DNA standard methods ^[6-7,12,46-47]	Medium-High (replication risk, potency consistency) ^[6,12,46]	Define product-specific specs; confirm non-replicating (genomic residuals negative); control cargo ID/dose and host residuals; justify rFC/MAT ^[6,7,12,46-47]	<i>In vivo/ex vivo</i> (transient delivery of proteins/RNPs/nucleic acids/editors)
LNP (mRNA)	Encapsulation efficiency; size/PDI; mRNA integrity [Cap1, UTRs, poly(A) profile]; dsRNA impurities; lipid molar ratios/purity & residual solvents; potency (translation/functional); stability; endotoxin/sterility/osmolality/pH	RiboGreen/SEC-HPLC (encapsulation); DLS/NTA (size/PDI); CE/gel/LC-MS [integrity, Cap1, poly(A)]; J2-antibody/LC-MS (dsRNA); HPLC/GC (lipids/solvents); <i>in-vitro</i> expression/functional readouts; accelerated & real-time stability; rFC/MAT; sterility/physicochemistries ^[6,7,12,46,47,66,71]	High (encapsulation, size/PDI, mRNA structural integrity, dsRNA); medium (lipid quality/stability) ^[6,12,46,66,71]	Set specs for encapsulation, size/PDI, Cap1/poly(A) integrity, dsRNA; support with method validation and stability program ^[6,12,46,66,71]	<i>In vivo</i> (primary), also <i>in-vitro</i> transfection

AAV: 腺相关病毒; LV: 慢病毒载体; VLP: 病毒样颗粒; LNP: 脂质纳米颗粒; VG: 载体基因组拷贝数; TU: 转导单位; ITR: 反向末端重复序列; AEX-HPLC: 阴离子交换高效液相色谱; SV-AUC: 沉降速度分析超速离心; ddPCR: 液滴数字PCR; NGS: 下一代测序; LRS: 长读长测序; UMI: 唯一分子标识符; DLS: 动态光散射; TEM: 透射电子显微镜; NTA: 纳米颗粒跟踪分析; HCP: 宿主细胞蛋白; rFC: 重组因子C法; MAT: 单核细胞致热源试验; PDI: 多分散指数; RCL: 复制型慢病毒; VCN: 载体拷贝数; LoD: 检出限。

AAV: adeno-associated virus; LV: lentiviral vector; VLP: virus-like particle; LNP: lipid nanoparticle; VG: vector genomes; TU: transducing units; ITR: inverted terminal repeat; AEX-HPLC: anion-exchange HPLC; SV-AUC: sedimentation-velocity analytical ultracentrifugation; ddPCR: droplet digital PCR; NGS: next-generation sequencing; LRS: long-read sequencing; UMI: unique molecular identifier; DLS: dynamic light scattering; TEM: transmission electron microscopy; NTA: nanoparticle tracking analysis; HCP: host-cell protein; rFC: recombinant factor C assay; MAT: monocyte activation test; PDI: polydispersity index; RCL: replication-competent lentivirus; VCN: vector copy number; LoD: limit of detection.

2.1.2 AAV载体的关键质控难点与应对策略 在AAV载体的研发生产和质控过程中,有几项关键质量属性被认为是确保产品安全有效所必须严控的难点^[1,5,12]。

第一点是空壳率。AAV生产过程中除了含有目的基因组的“满颗粒”外,往往伴随大量不含基因组的“空颗粒”或载有部分基因片段的次级颗粒。这些空壳颗粒会稀释制剂的有效生物滴度,并可能诱发先天免疫反应。因此需将空壳率作为放行的关键指标之一。在实践中,推荐采用液滴数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)与沉降速度分析超速离心(sedimentation-velocity analytical ultracentrifugation, SV-AUC),或酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)+荧光定量PCR(quantitative PCR, qPCR)的方法进行交叉校准测定,通过两种互补技术准确量化空壳率,从而建立生产工艺参数与放行指标之间的量化闭环^[12]。

第二点是载体基因组完整性及ITR相关异常。AAV包装载荷接近其上限(约4.7~5.0 Kb)时,容易出现基因组不完整的截断体或串联重复的融合体;此外AAV两端的ITR序列结构复杂,是必要的包装元件,也可能在复制过程中发生异位重组或缺失。这些情况都会影响疗效并带来安全隐患。为此,建议在研发和工艺放大阶段引入长读长测序(如Nanopore或PacBio SMRT平台),以单分子全长读取方式直接从ITR读到另一端ITR,解析每个病毒颗粒的完整基因组,并统计断点位置和串联重复的比例^[5]。通过这种方法可真实量化载体截断和串联现象的发生频率,为优化包装系统和工艺参数提供依据;一旦后续批次出现异常,还可据此追溯工艺偏差来源并及时调整。

第三点是外源DNA杂质谱^[12]。AAV制备所得产品中往往混杂来源于质粒骨架或包装辅助质粒片段以及宿主细胞基因组的残留DNA。这些外源DNA杂质需被定量监控并尽可能减少,因为有些残留片段(如抗生素抗性基因序列等)可能带来潜在风险。传统的琼脂糖凝胶、电泳和短读长测序(二代测序)在检出未知杂质或复杂重组片段方面存在灵敏度不足的问题,而长读长测序能够在一次测序中同时识别并定量不同来源的DNA片段,从而为每批产品生成独特的“杂质指纹”。将这些杂质指纹与原材料批次、生产工艺参数关联分析,有助于在源头

和工艺上降低杂质残留。

第四点是无菌以及内毒素与致热源控制。AAV产品需符合严格的无菌标准,并杜绝内毒素或其他微生物致热源的污染。除了药典规定的无菌检查和细菌内毒素(LAL法)外,建议根据产品特性和风险评估结果引入rFC法和MAT试验作为补充检测手段。rFC利用重组鲎试剂替代传统LAL,避免了对活鲎的捕获,具有良好的灵敏度和伦理优势;MAT通过检测人源血液单核细胞释放的炎症因子来评估样品致热源,总体可覆盖内毒素以外更多类型的致热源。将rFC和MAT纳入检测不仅拓展了潜在热原污染的覆盖范围,也符合减少动物使用的监管趋势。需要注意的是,采用新方法需在申报资料中提供充分的验证数据,并在放行标准和稳定性考察方案中阐明其应用场景和判定限度,确保与CMC文件要求一致^[12]。

2.1.3 AAV载体质控方法学改进与放行建议 综合以上质控要点,AAV产品的QC体系正朝着更定量、更全面的方向发展。在产品放行和申报材料中,建议以“定量、可复现、与工艺参数联动”的形式报告空壳率、基因组完整性以及杂质谱等指标。例如,利用ddPCR进行载体基因组拷贝数的精确定量,结合AUC或ELISA+qPCR对空壳率进行交叉验证;采用三代测序对载体全基因组进行深入解析并输出标准化报告,包括读长分布、ITR断点热点、串联及杂质序列来源等信息,将这些深度分子表征数据作为工艺开发、批次放行和工艺变更可比性评估的核心依据;同时,将rFC/MAT等致热源检测的验证结果及其适用性写入放行和稳定性方案。上述方法学改进与数据要求,实际上与当前美国FDA/欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)等监管机构对AAV产品的关注点(如空壳率、全基因组测序、残留DNA控制等)高度一致。这种以科学数据为支撑的全面质控策略,将有助于实现AAV基因治疗产品的安全可控、可审计和规模化生产。

2.2 慢病毒载体: 应用进展与整合安全性监控

2.2.1 慢病毒载体应用地位 慢病毒载体(LV)源自HIV-1,因其能够高效转导分裂期和静止期细胞并实现外源基因的长期稳定表达,成为体外基因治疗的核心工具之一^[52]。在造血干细胞和T细胞的基因改造中,LV体系表现出优异的安全性与表达持久性,并逐渐取代早期的 γ -逆转录病毒载体(γ -retroviral vector, γ -RV)。典型的临床成功案例包括: Strimve-

lis(2016年欧盟批准)——采用 γ -RV转导自体CD34⁺造血干细胞,用于ADA-SCID治疗^[44]; Kymriah(又称tisagenlecleucel)——采用LV转导的自体CAR-T细胞,是首个获批的LV-T细胞产品^[27]; Yescarta(又称axicabtagene ciloleucel)——采用 γ -RV转导的CAR-T细胞,是早期CAR-T平台的代表^[26]; 阿基仑赛注射液(中国批准)——同样基于LV-T细胞技术^[53]。这些案例共同确立了LV在造血干细胞和T细胞基因治疗领域的主导地位,同时也反映出载体技术从 γ -RV向LV的代际演进与安全性提升趋势。

2.2.2 慢病毒载体整合特性与安全风险 LV载体将基因永久整合入宿主基因组,这一特性既带来了持久表达的收益,也隐含着插入突变和潜在致癌的风险。因此,从临床前到临床各阶段,监管要求对LV介导基因治疗的受试者进行全面的整合位点分析和克隆动态监测,以评估长期安全性^[21]。研究发现,不同逆转录病毒载体具有整合位点的偏好性:早期使用的 γ -逆转录病毒倾向插入于宿主基因启动子区域附近,因而更容易引发插入突变^[54];而改良后的HIV-1慢病毒载体更偏好于基因的内含子区域,且通过设计自灭活(SIN)型的载体骨架,大幅降低了其激活内源基因的风险^[55]。尽管如此,监管机构[如FDA和中国国家药品监督管理局药品审评中心(Center for Drug Evaluation, CDE)]均明确规定,凡使用整合型载体的基因治疗须对患者进行至少15年的长期随访,重点监测是否出现因载体插入引发的克隆异常增生或肿瘤发生。这体现出监管层面对慢病毒等整合型载体长期风险的高度重视^[7]。

2.2.3 慢病毒载体整合检测方法的演进 为了满足上述安全监控需求,学术界持续改进慢病毒插入分析的方法学。传统上,常用线性扩增介导PCR(linear amplification-mediated PCR, LAM-PCR)结合二代测序来大规模捕获整合位点信息,但该方法每次只能读取插入位点附近几百个碱基的序列,无法获得整合的全长载体信息,对检测复杂重组或大缺失事件也存在局限。近期发展出的长读长测序策略大大拓展了整合分析的深度,例如PCIP-seq方法:先将宿主基因组与整合的病毒序列环化,再利用特异性核酸酶(如CRISPR-Cas)在已知载体序列处切割,然后进行长片段测序。研究表明,此类策略可同时获取插入位点序列和整合载体的全长结构^[56]。通过长读长测序,发现传统方法遗漏的大片段缺失、串

联重复、载体-载体重组等复杂整合事件得以被及时识别,显著提升了整合分析的灵敏度,并减少了对大量细胞克隆扩增的需求。这类先进的整合检测方法正逐步应用于临床样本监测,并受到监管机构的关注。

2.2.4 慢病毒载体质控要点与放行实践 第一个质控要点是滴度测定,慢病毒制品通常需同时报告物理滴度和功能滴度^[12]。物理滴度(如p24抗原含量测定或qPCR/ddPCR测定载体拷贝数)反映颗粒总数,而功能滴度通过感染指示细胞测得,代表有生物学活性的载体数目。一般物理滴度高于功能滴度,两者比值可指示无效颗粒比例。质控中应并行报告两者,并将功能滴度作为核心放行指标,以确保产品具备足够的有效感染能力。

第二个质控要点是RCL检测^[6]。RCL是慢病毒制备过程中需要严防的一种杂质,即在包装过程中产生具有复制能力的HIV-1重组病毒。尽管现代慢病毒系统通过拆分包装质粒和删除关键元件已大幅降低RCL污染风险,但放行前仍须进行高灵敏度的RCL检测。通常采用基于细胞扩增培养的检测方法,检出限可达到约1个RCL/ $10^8 \sim 10^9$ 个载体颗粒。一旦检测呈阳性则该批次产品不得放行,RCL阴性是慢病毒产品安全性的红线底线。

第三个质控要点是杂质控制^[46]。与AAV类似,慢病毒制品中也可能残留宿主细胞蛋白(host-cell protein, HCP)、宿主DNA碎片、质粒DNA等杂质,需要通过工艺纯化加以清除。高效的纯化工艺(如层析、多步超速离心等)可去除>99%的杂质并保留载体活性。放行时需检测HCP、DNA等残留是否在限度内,并提供工艺验证数据证明杂质清除的一致性。

第四个要点是质控细菌、内毒素及外源因子污染^[11,50]。慢病毒属于体外使用产品,但其无菌和内毒素标准仍需符合药典要求。同时应通过广谱PCR或培养法验证无支原体、无外源病毒等污染。在质控上,这些要求与AAV载体基本一致,均需严格执行并记录在案。

经过上述多维度的质控,慢病毒产品的安全性大为提高。在申报资料中,监管通常要求提供慢病毒载体整合位点分布和克隆随访的数据^[12]。例如,通过二代测序分析数百个克隆的插入位点,观察有无偏向于原癌基因或其他风险位点的整合,同时纵

向跟踪受试者体内改造细胞的克隆组成变化,及早发现异常克隆扩增迹象。一旦出现可疑信号,需结合长读长测序深入解析相关克隆的整合体结构,以判断是否存在插入突变驱动异常增殖^[57]。可以说,慢病毒质控体系正从传统的“滴度+整合位点”拓展到“整合体全长+克隆动力学”,与监管对于长期安全性和深度分子监测的要求逐步接轨,形成更系统的安全评估框架。

2.3 其他载体平台与质控要点

除了AAV和慢病毒载体外,基因治疗还涉及腺病毒载体(adenoviral vector, Ad)、质粒DNA、mRNA-LNP以及近年来兴起的病毒样颗粒(VLP)等多种递送平台。这些载体在应用场景、工艺复杂度和监管要求上各有特点,但共同遵循以关键质量属性(CQAs)为核心、与工艺参数相联动的质量控制思路。以下分别加以论述。

2.3.1 腺病毒载体(Ad) 腺病毒是较早用于基因治疗的人类病毒载体。第一代腺病毒载体保留了较多野生型病毒基因,因而免疫原性强、易引发炎症反应(如前述的GELSINGER事件^[14])。随后发展出的辅助依赖型/高容量“去基因”腺病毒删除了全部或几乎全部病毒编码序列,整体免疫毒性降低且可装载容量最高可达37 Kb,适合携带大基因、多元件或长顺式调控元件^[58]。这类载体广泛用于溶瘤病毒治疗和新型疫苗平台(如COVID-19疫苗AZD1222即采用腺病毒载体^[59])。

腺病毒载体质控需要关注以下几点。(1) RCA(replication-competent adenovirus)污染排查:通过使用早期区1(early region 1, E1)缺陷型包装细胞系并采用灵敏qPCR检测E1序列残留,确保产品中不含能自主复制的腺病毒;(2) 杂质控制:监测宿主细胞蛋白、DNA及培养基成分等杂质残留是否符合限度要求;(3) 无菌与内毒素:严格按药典规范进行无菌和内毒素检查,并完成相应方法学验证;(4) 一致性:放行时应证明关键工艺参数与质量指标间的联动关系,确保不同批次产品的质量稳定^[12,60]。

2.3.2 质粒DNA 质粒DNA是AAV和LV等病毒载体生产过程中的关键原料,也是部分非病毒基因疗法直接使用的递送载体。“源头质量”是质控首要理念,需从设计、菌株与工艺体系上保证一致性与可追溯性^[12]。质粒常含长串重复序列[如AAV的ITR、长poly(A)尾等],在大肠杆菌扩增时易发生重组/缺

失,形成缺陷质粒混合物并影响后续包装与载体完整性,因此放行时应进行全长序列表征;若存在高重复区,可引入长读长测序以识别微小缺失或重排^[61]。建议同时测定超螺旋构型比例(较高比例通常与更好的转染效率相关)^[62],并系统控制内毒素和抗生素相关风险(如筛选标记策略及残留控制/清除管理),以满足杂质谱与安全性关键属性。方法学需要经过验证,且具有可复现性^[46]。用于生产的质粒批次如发生菌种、培养条件或提取纯化工艺的变更,应通过等效性/可比性研究证明不会影响CQAs^[12]。

2.3.3 mRNA-LNP递送系统 近年来兴起的mRNA-LNP在体递送策略,为基因治疗提供了非整合、胞质表达的实现路径,在安全性与可控性方面具有先天优势。LNP可将mRNA高效递送至特定器官,以静脉给药为例,递送后多主要富集于肝脏。目前,mRNA-LNP已在体内基因编辑[如NTLA-2001用于转甲状腺素蛋白淀粉样变性(transthyretin amyloidosis, ATTR)]以及蛋白替代疗法中显示出可行性^[63]。更进一步,已有靶向免疫细胞与造血干细胞的在体基因改造概念验证:在LNP表面偶联CD3或CD117抗体,可分别实现对T细胞或HSC的特异性靶向递送^[64-65]。对于mRNA-LNP系统,其质控维度与传统载体有所不同,主要包括以下几点。(1) mRNA分子质量:需检查5'端帽子结构形式及完整率、3'端poly(A)尾长度及均一性,以及有无双链RNA(double strand RNA, dsRNA)杂质(dsRNA为转录副产物,会激活免疫反应);一般采用高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)、毛细管电泳等手段检测,并通过方法学验证确保准确性。(2) LNP理化特性:监控粒径和多分散指数[动态光散射(dynamic light scattering, DLS)测定]、表面电位、封装率、渗漏率以及在不同条件下的稳定性曲线,以保证递送载体批间一致和稳定储存。(3) 免疫反应与安全性评估:考察LNP是否引发补体和凝血系统激活,评估给药后细胞因子释放谱;通过qPCR或NGS监测mRNA-LNP在体内的组织分布与清除速率,用于评估靶向性和安全边际。(4) 无菌/内毒素及致热源:同样需按无菌和LAL标准检测,并建议根据风险增加rFC/MAT等广谱致热源检测,确保制剂中无有害致热因子。(5) 一致性与变更管理:对于处方中关键材料[如离子化脂质、胆固醇、辅脂、聚乙二醇

(polyethylene glycol, PEG)-脂质]的来源或配比调整,以及工艺参数(如混合方式、剪切力)变化,都应通过对比试验提供产品质量等效性的证据,保证改动不会降低递送效率或安全性^[66]。

2.3.4 病毒样颗粒(VLP)系统 VLP由病毒结构蛋白(如逆转录病毒 Gag)自组装形成,不含可复制基因组^[67]。其优势在于可高效装载并递送蛋白或核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein, RNP),实现短时表达与编辑^[68]。与腺相关病毒或慢病毒载体相比,VLP不发生基因组整合,也不会体内长期存在,从而显著降低持续暴露及插入突变风险^[2];相较于脂质纳米颗粒(LNP),VLP在大分子复合物(如Cas9蛋白、碱基编辑器、引导编辑器)的高效跨膜递送方面表现更佳。近年来,工程化病毒样颗粒(engineered VLP, eVLP)与慢病毒衍生纳米颗粒(lentivirus-derived nanoparticle, LVNP)在动物模型中已展示出体内递送Cas9、BE和PE的潜力^[69-70]。例如,改良型eVLP在肝脏、视网膜及造血系统模型中实现了高效、短暂的基因编辑,并通过瞬时表达显著降低了脱靶及免疫风险^[70];PE-eVLP系统可一次性共递送PE蛋白与引导RNA(prime editing guide RNA, pegRNA),并在体内与体外均实现高效编辑,同时避免了长期表达带来的安全隐患^[69]。

在质量控制(QC)方面,VLP的评价应围绕“粒子-负载-效力”的逻辑主线展开^[12]。在粒子与形态学一致性上,可采用DLS、纳米颗粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)及透射或冷冻电镜(transmission electron microscopy/cryo-electron microscopy, TEM/cryo-EM)等手段检测粒径、多分散指数(polydispersity index, PDI)、 ζ 电位(zeta potential, ζ -potential)及形态;在负载计量学方面,建议通过ELISA或液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)定量蛋白负载量,并结合逆转录-液滴数字PCR(reverse transcription droplet digital PCR, RT-ddPCR)定量RNA含量,建立粒子数与功能效力间的定量关系;在效力评价上,推荐设置哨兵位点(如PCSK9、B2M)编辑率为主读数,辅以表型功能验证;在杂质与安全性检测方面,应提供RCL阴性结果并验证检测灵敏度,同时监测宿主DNA/质粒残留(推荐采用长读长测序绘制杂质谱),并评估VLP与细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV)共分离/共纯化的程度[采用多标志物面板定量EV相关宿主膜蛋白(如

CD9、CD63、CD81)信号及其相对丰度,并结合阴性标志物(如Calnexin、GM130)及粒子数/蛋白比等指标进行综合判定];靶向活性则应通过定量结合实验验证包膜或配体的结合效率与介导内吞活性,确保批次间一致性。据此,可形成以功能效力与负载计量学为双主指标、以RCL阴性与长读长阴性证据为安全门槛、以粒子学与向性活性为一致性指标的放行框架。在监管层面上,VLP属于新兴基因递送平台,审评重点集中于“深度分子表征”与“长期风险排查”。建议申请人提交以下材料:①长读长测序排除载体基因组残留;②RCL阴性及方法学验证数据;③重复给药条件下的免疫风险评估;④包膜或配体改动的等效性数据。总体而言,VLP平台填补了“短时递送蛋白/RNP”的技术空白,其质控逻辑与AAV、LV、LNP基本一致,但在放行时更强调RCL阴性和粒子-负载-效力的耦合关系;未来有望在体内RNP短时递送场景中与LNP、AAV形成互补。

2.3.5 共性质量建议 针对上述不同的平台载体,仍可以总结出若干共性的质控原则,以满足监管要求并指导CMC开发。

方法-指标-工艺闭环: 将各平台的核心CQAs(如RCA/RCL阴性、空/满或功能滴度、载体全长/杂质谱、mRNA完整性、LNP粒径/包封率等)与生产工艺参数建立双向关联。一方面,这些质量指标用于放行时量化评估产品质量;另一方面,它们的波动亦可反馈工艺偏差,实现生产过程的质量回溯与持续改进。

深度分子表征作为关键支撑: 在研发和工艺放大阶段尽早引入长读长测序、高通量测序等深度表征手段,累积全面的分子数据作为质量基线。这些数据资产可作为“锚定”证据,一旦产品在规模化生产或注册申报阶段需要证明质量等同性或调查异常情况时,深度分子表征将为产品的技术审评与监管审批提供有力支持。

风险导向的检测策略: 除了常规的无菌和内毒素检测外,应根据不同产品的特性选择增加相应的安全性检测项目。例如,针对AAV或慢病毒体内递送载体,可考虑补充检测体液中补体/凝血激活指标、免疫细胞因子谱;针对基因编辑产品,注重脱靶和遗传毒性标志物;针对靶向递送的LNP/VLP制剂,需要评估其组织分布和靶向配体的一致性与活性。所有新增检测项目均应在申报资料中说明适

用的场景和已完成的方法学验证状态,以获得监管认可。

3 基因编辑技术的进展与质控

3.1 CRISPR-Cas9基因编辑的应用实践与安全监控

3.1.1 CRISPR-Cas9基因编辑临床试验成果 自2012年CRISPR-Cas9基因编辑工具被发明以来,其仅用数年时间便迅速进入临床研究,并取得一系列里程碑式成果。

造血干细胞基因编辑(CTX001): 研究人员利用CRISPR-Cas9切除造血干细胞中*BCL11A*基因的红细胞增强子,成功重激活胎儿血红蛋白(fetal hemoglobin, HbF)的表达,用于治疗镰状细胞贫血和 β -地中海贫血。在临床试验中,接受该“Exa-Cel”基因编辑疗法(即CTX001, 商品名Casgevy)的绝大多数重症患者实现了停药后持续的输血独立或症状缓解,疗效被认为接近功能性治愈。2023年,该疗法获得美国FDA批准上市,成为全球首个获批的CRISPR基因编辑药物^[32]。

体内眼科基因编辑(EDIT-101): EDIT-101项目将AAV载体用于将CRISPR-Cas9递送至患者视网膜,以编辑*CEP290*基因的小片段突变来治疗Leber先天性黑矇(LCA10, 一种遗传性失明)。初步临床结果显示,部分患者的视觉功能有所改善,证明了在体直接编辑人类眼部组织的可行性^[72]。

免疫细胞编辑疗法(*PD-1*敲除T细胞): 2016年,四川大学团队开展了全球首例CRISPR临床试验,将*PD-1*基因经CRISPR敲除的自体T细胞回输肺癌患者,以增强抗肿瘤免疫反应。结果显示该方法安全可行,部分患者病情稳定,研究成果发表在*Nature Medicine*上^[73]。

在体肝脏基因编辑(NTLA-2001): 美国Intellia公司开发的NTLA-2001项目利用LNP将Cas9 mRNA和sgRNA递送至患者肝脏,以编辑突变的*TTR*基因来治疗ATTR淀粉样变性。临床试验报告显示,接受单次静脉注射的患者血清致病蛋白水平平均下降约87%,首次证明了体内基因编辑在成人患者中的安全性和有效性^[63]。

CCR5敲除HSC移植(抗HIV): 北京大学邓宏魁团队与解放军总医院陈虎教授团队^[74]合作探索将自体造血干细胞经CRISPR编辑敲除CCR5受体后移植,用于艾滋病(HIV)合并白血病患者治疗。结果

证实,经基因编辑的造血干细胞在患者体内成功长期重建,且未见明显安全问题。这为实现HIV功能性治愈提供了新的思路。

上述临床探索共同绘制了第一代CRISPR基因编辑疗法的应用图谱,证明CRISPR技术可以从实验室走向临床,在不同疾病领域展现疗效潜力。

3.1.2 CRISPR-Cas9基因编辑局限与安全顾虑 尽管取得重大进展,CRISPR-Cas9系统在临床应用中也暴露出一些需要重点关注的挑战。

第一点是脱靶效应。Cas9核酸酶在剪切目标位点的同时,可能与sgRNA序列部分匹配的非目标基因组位点产生非预期切割,从而引入突变或错误激活癌基因。这种“脱靶”风险是监管和公众关注的焦点。目前已有多种脱靶检测方法(如GUIDE-seq、DISCOVER-seq、CIRCLE-seq、SITE-seq等)用于发现潜在脱靶位点,但各有局限。为提高检测灵敏度,科研人员开发了如OliTag-seq等新一代工具,可在一定程度上更灵敏地捕获低频脱靶事件^[8-9,75-77]。此外,利用蛋白工程获得高保真Cas9变体(如eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaCas9,以及商品化的HiFi SpCas9等)以提高靶向特异性,以及优化sgRNA设计以降低误切风险,均是降低脱靶效应的有效策略^[78-81]。

第二点是大片段缺失与复杂基因组重排。CRISPR-Cas9造成的DNA双链断裂(double-strand break, DSB)在细胞修复过程中有时会引发大范围的基因组改变,包括Kb级的大片段缺失、倒位、插入或染色体易位等。这类结构变异通常无法通过常规短读测序检测全面解析。针对这一问题,研究者采用长片段PCR扩增结合长读长测序的方法来量化CRISPR编辑在目标位点附近造成的大片段缺失发生频率和特征^[82]。此外,在编辑过程中提供同源定向修复模板(如ssODN单链寡核苷酸、AAV载体供体或双链DNA供体),可显著降低随机末端连接引起的大片段缺失和异常重排,从设计层面减少这些大型变异的发生率。

第三点是免疫反应,CRISPR系统的组成成分可能引发宿主免疫应答。许多人类个体在暴露于细菌源性Cas蛋白(如SpCas9)时会因为既往感染而产生免疫记忆,从而对Cas9蛋白产生体液或细胞免疫反应;此外,用于递送的载体如AAV或LNP本身也可能引发先天免疫激活(如补体激活或凝血因子介导的反应),导致炎症或其他不良反应^[1,83-84],需要在临床

前评估中充分考量这些免疫相关风险,并在临床试验中通过合适的纳入排除标准和预处理方案加以控制。

第四点是递送瓶颈,将CRISPR工具高效递送到靶细胞仍是一大挑战。AAV载体受自身基因组容量(~4.7 Kb)限制,难以同时容纳Cas9蛋白和多个sgRNA表达框;LNP虽然对mRNA/蛋白的容量较大,但其组织靶向性有限,目前LNP主要富集于肝脏。为提高递送效率和特异性,研究者正探索更小型的Cas蛋白(如SaCas9)或全新CRISPR系统(如Cas12a、Cas12f),以及在LNP表面偶联特异配体以靶向特定细胞类型等策略^[64,85-86]。这些递送技术的进步将直接关系到CRISPR疗法在更多疾病中的可行性。

3.1.3 CRISPR-Cas9基因编辑临床应用质控启示与监管动向 随着CRISPR疗法进入后期临床,其质控与监管重点也逐渐清晰。监管审评对基因编辑产品的放行标准已不再局限于编辑效率一种指标,而是逐步扩展为一个综合指标集合,包括:目标位点的编辑效率、有代表性的潜在脱靶位点清单及其突变频率、大片段缺失发生率阈值,以及经过功能验证的细胞表型读出等^[7,12,51,87]。换言之,一个“编辑细胞产品质控指标体系”正在形成,其核心是在保障目标编辑达到有效水平的同时,将脱靶和意外变异控制在安全阈值内,并证明细胞仍保持期望的功能属性。

为了支撑上述质控要求,新方法的引入是关键。推荐采用OliTag-seq结合长扩增PCR-长读长测序的双重策略,一方面高敏识别低频脱靶位点,另一方面全面捕捉大片段缺失和复杂重排事件,从技术上补齐传统短读测序的短板^[76]。这些先进检测手段提升了风险评估的可信度,也为制定合理的质控阈值提供了依据。

除了检测和质控外,监管层应鼓励申请人在产品设计和工艺上预先采取措施降低风险。例如,在设计阶段就引入修复模板以减少DSB,或选用低免疫原性的Cas变体、添加短期免疫抑制方案来缓解免疫反应^[46,48]。这种“安全设计”理念实质上是將部分风险控制前移到研发阶段,从源头上优化产品安全性。未来,能够体现安全设计思路的产品方案将更容易获得监管部门的认可。

综上,第一代CRISPR基因编辑疗法奠定了基因编辑药物的临床可行性,但也凸显了脱靶、结构变异以及递送/免疫方面的挑战。通过系统化的质控

策略和工艺上的安全性优化设计,才能推动新一代基因编辑工具更稳健地走向临床应用和监管审评。

3.2 新一代基因编辑工具: 碱基编辑与引导编辑

3.2.1 新一代基因编辑工具原理简介 碱基编辑和引导编辑是近年来发展起来的两类新型基因编辑技术平台,被认为是对传统CRISPR-Cas9切割型编辑策略的重要补充与升级。

碱基编辑系统通过将失活或弱化的Cas核酸酶(如dCas9或Cas9 nickase)与DNA脱氨酶融合,使之在无需产生DNA双链断裂(DSB)的情况下实现特定位点的碱基转换。目前的BE工具可实现C·G→T·A或A·T→G·C这两类互补碱基对的单碱基替换^[3]。由于避免了DSB, BE可极大降低大片段变异和随机插入缺失的发生率,是校正点突变或引入终止突变的一种高效方案。在体外和体内模型中, BE已显示出在精确敲除有害突变、引入保护性突变等方面的巨大潜力。

引导编辑由一种Cas9切口酶(产生单链切口)与一段反转录酶,以及特殊设计的引导RNA(pegRNA)共同组成。其工作原理类似“搜索-替换”: Cas9切口酶在目标位点一条DNA链上切开缺口,同时pegRNA的一段模板序列被反转录酶用来合成与目标基因组序列略有差异的新DNA片段,插入缺口处,从而实现预先设定的小片段DNA插入、缺失或多碱基替换^[4]。PE理论上拥有极其广泛的编辑能力,可以校正多种类型的致病突变,甚至进行小片段基因敲入。但目前PE在效率上偏低,且由于Cas9-RT-pegRNA复合物的尺寸较大,递送也是一大瓶颈。

3.2.2 新一代基因编辑工具应用进展 虽然BE和PE尚处于早期研究或临床前阶段,但已有一些值得关注的成果。在碱基编辑方面,用于提升胎儿血红蛋白(HbF)表达的碱基编辑HSC改造疗法已进入临床验证阶段^[88](这与CTX001通过敲除BCL11A增强子的策略异曲同工,但BE方式不产生DSB);在免疫细胞中,通过并行多个位点的碱基替换,可构建“通用型”CAR-T细胞,避免宿主抗原和移植排斥反应^[89];在多种遗传病的细胞和动物模型中,碱基编辑均展现出相当高的等位基因校正效率和良好的特异性,证明其在罕见病矫正方面具有很大应用潜力^[90]。在引导编辑方面,研究者已经在细胞和小鼠模型中利用PE实现了多种致病突变的精准纠正以及外源短序列(数十碱基对级)插入和缺失变异的修复^[80]。围绕

提高PE效率的工程优化也在持续推进,包括设计更有效的pegRNA结构、将Cas9切口酶与逆转录酶融合为单一多功能蛋白、探索更小型的Cas切口酶或逆转录酶替代物等。这些改进有望逐步克服PE当前面临的效率不高和载体过大的问题^[91]。

3.2.3 新一代基因编辑工具质控与安全评估要点 美国FDA《人用基因治疗产品——人类基因组编辑(GE)指南(2024)》已将碱基编辑(BE)/引导编辑(PE)纳入GE产品监管框架,要求在研究性新药申请(investigational new drug application, IND)中系统阐述产品设计与制造、分析方法与放行、非临床安全、临床方案与风险-获益权衡;重点风险包括脱靶编辑、靶向编辑的意外后果与潜在染色体重排,并建议尽量缩短编辑组分在体功能持续时间以降低意外修改概率^[48]。

在分析策略上,指南鼓励采用多方法、全基因组范围的脱靶发现与验证,并对靶点编辑效率与事件谱系(碱基替换、插入/缺失等)进行定量表征;必要时补充结构变异与残留编辑组分评估,并以科学依据设定可接受限度^[48]。实践中常组合使用体外高灵敏度筛查(如CIRCLE-seq、CHANGE-seq)与细胞/在体招募因子法(DISCOVER-seq/DISCOVER-seq+),再对候选位点实施深度验证;对大片段缺失与复杂重排,建议加入长扩增-长读长或靶向捕获-长读长策略以覆盖低频风险^[9,75,92-93]。

在长期安全方面,美国FDA要求对部分GE产品实施最长可至15年的长期随访(long-term follow-up, LTFU),以监测迟发不良事件与基因组改变的远期后果^[7];欧盟EMA对含遗传修饰细胞药物在整合/插入致突变风险、LTFU与临床监测方面给出框架性要求;中国CDE亦发布在体基因治疗CMC技术指南(英文版);强调处方一致性、关键质量属性(CQAs)与可追溯性,显示主要辖区在原则层面的收敛^[12,46]。

在工具学特征方面:BE的核心优势是避免DNA双链断裂,但存在编辑窗口内旁观者(bystander)碱基的连带改写与脱氨酶相关DNA/RNA非目标编辑的报道;工程化去旁系活性的CBE/ABE(如A3A工程体)可部分缓解,仍需在靶点超深度测序基础上,增配全基因组/全转录组层面监测与方法学验证^[94-96]。PE可“搜索-替换”且不依赖DNA双链断裂/供体,但有研究提示pegRNA scaffold片段偶发整合等副产物风险;可通过pegRNA结构优化/化学修饰(epegRNA等)

与工艺控制降低,并在放行设计中明确检出限与上限阈值;同时,尽管BE/PE理论上显著降低大片段缺失/重排概率,仍建议以长读长形成“阴性证据”,且有文献提示在特定条件下ABE亦可诱发低频结构变异,进一步支持将结构变异监测纳入总体风险评估^[97-98]。

放行与方法学建议:将以下要素纳入产品质量与一致性指标并完成验证。①正确编辑率与事件谱系(含BE并邻、PE scaffold插入等已知非预期事件的发生率与统计上限/阴性证明);②(如适用)结构变异监测的阴性证据或统计上限;③功能读出(目标通路/表型恢复)与材料等同性证据;④免疫相容性/生物分布(体内给药时),覆盖组织分布、重复给药免疫原性与炎症/补体指标;⑤定量类检测遵循ICH M10等通用方法学验证(灵敏度、特异性、线性、精密度/稳健性;必要时跨方法/跨实验室比对),并与FDA GE指南和LTFU框架衔接用于申报^[7,48,60]。

3.2.4 新一代基因编辑工具递送与工艺开发考量 BE和PE的应用场景可分为体外和在体两大类,不同场景下递送策略和工艺路径存在差异。

在体外应用(如对造血干细胞HSC或T细胞进行编辑)中,可将编辑工具以核糖核蛋白复合物(RNP)或mRNA形式递送,并通过电穿孔/核转染等瞬时转染方式导入细胞。这种方式的优点是编辑剂量精确可控,编辑后细胞可在体外经过QC检测合格后再回输患者,因而安全性和有效性更可控。放大量产时,需要建立适用于药品生产质量管理规范(good manufacturing practice, GMP)生产的细胞编辑工艺,包括高效的电转条件、细胞扩增与冻存方案等,并在每批产品释放前完成上述定量和功能指标的检测。

在体应用(直接给药)时,根据工具的不同特性选择合适的载体:BE由于涉及的组分相对较少(常为单一多域蛋白),倾向使用AAV载体(可以分包装为两个AAV,分别携带不同亚基,在体内组装)或者LNP递送mRNA/蛋白形式;PE由于Cas9-RT-pegRNA复合系统较大,更适合采用非病毒纳米颗粒(如LNP、VLP)或“分载体”策略(将PE组件拆分到多个载体中同时递送)。无论哪种在体递送方案,在设计工艺和剂量时都需权衡编辑效率与安全性之间的平衡点,例如通过优化给药剂量达到足够的编辑百分比,同时避免因载体剂量过高而引发严重免疫反应。在质控上,则应重点关注载体制剂的靶向性和一致性:例

如靶向LNP表面配体或偶联分子的稳定性和结合活性, 每批之间是否恒定; AAV载体混合感染的比例是否准确可控等。这些都需要在工艺开发阶段通过大量数据摸索确定, 并在申报资料中给予详细说明和验证。

3.2.5 新一代基因编辑工具监管与转化提示 面对BE和PE这样全新的基因编辑工具, 监管机构同样在逐步明确相应要求。申请人在CMC和临床设计中应提前考虑以下几点。

明确适用范围: 在申报资料中清晰界定所用编辑工具适用的突变类型和编辑边界条件。例如BE目前仅能实现特定碱基对的转换, 应说明所针对疾病的致病突变是否属于可被BE校正的范畴, 以及如何评估对非目标碱基的旁系编辑; PE理想情况下覆盖范围更广, 但实际效率随插入/缺失片段大小等变化, 因此, 应报告目标编辑任务对应的实际编辑效率(或可实现的效率范围), 并说明在该效率下相对于传统方法的优势及临床意义。

方法学验证与变更管理计划: 鉴于BE/PE涉及新的检测项目多、工艺复杂, 建议在临床前阶段即着手准备关键质控方法的验证计划, 包括各检测方法的灵敏度、特异性、线性范围、重复性等参数确认。此外, 由于工具和工艺仍在快速改进, 需制定未来可能的工艺变更可比性评估路线图, 提前考虑若编辑元件、载体配方等调整时, 如何通过体外和体内比对试验证明新旧工艺产物等效。这种前瞻性规划有助于后续申报和产业化过程的顺利进行。

风险导向的安全监控: 针对在体递送方案, 监管可能要求增加一系列风险导向的安全性检测项目。申请人应在研发阶段即开展如rFC/MAT(检测广谱致热源)、补体活化、凝血指标、免疫因子谱、生物分布等方面的评估, 将其结果纳入药理毒理研究资料包, 并在IND申请资料及生物制品许可申请(Biologics License Application, BLA)文件中予以呈现。这不仅响应了监管对全面安全数据的期望, 也为日后药物上市后的风险管理提供了基础。总的来说, 应努力形成一条可审计的“方法-指标-工艺-临床”闭环证据链, 让监管方充分信服新工具的安全性和有效性可控。

新一代基因编辑工具BE和PE在可编辑突变谱系、编辑精度和安全性方面弥补了第一代CRISPR的一些不足, 但同时对质控精细化、递送工程改进

以及免疫相容性提出了更高要求。通过构建以高深度靶向测序和全基因组测序为核心的专用检测体系, 叠加长读长技术支撑的系统分子验证, 并将风险导向的免疫学与组织分布评估纳入整体框架, 我们有望形成可复制、可推广的质量管理路径, 助力BE/PE向临床转化与监管认可稳步推进。

4 方法学与数据整合: 长读长测序驱动的深度分子表征

现代基因治疗QC体系的完善, 很大程度上得益于新方法学的应用和多源数据的综合分析。其中, 第三代测序技术(长读长测序)的引入, 成为深度分子表征能力提升的关键支点。通过单分子长读长测序, 我们能够在单次测序中获取传统方法无法获得的完整信息: 例如, 对AAV载体, 可直接读取整个病毒基因组序列, 从而准确判断载体基因组是否完整、定位ITR序列的缺失或重组位置, 并鉴定残留杂质DNA的来源^[5]; 对于慢病毒载体, 可通过长读长测序同时捕获插入位点及整合的全长载体序列, 发现二代测序可能遗漏的大片段缺失、载体串联、多载体插入等复杂事件^[57]; 在CRISPR编辑细胞中, 长读长测序配合长片段PCR扩增, 可直接观察目标位点附近潜在的大范围结构变异, 而无需依赖推测^[82]。这些能力极大拓展了基因治疗产品分子层面质控的深度和广度, 使许多以往难以监测的“黑箱”得以透明化。

与此同时, 其他新兴分析技术与传统方法相结合, 为构建全面的质量证据链提供了可能。例如, ddPCR以高精度定量基因拷贝数和微量残留成分, 在确定AAV空/满颗粒比、慢病毒载体拷贝数等方面已成为标准工具; rFC/MAT等无动物致热源检测拓展了安全性控制的覆盖面; 高通量脱靶检测(如前述OliTag-seq等)和功能组学评估(如单细胞测序、转录组分析)则为基因编辑细胞产品提供了从基因型到表型的多层次验证。对这些方法产出的数据进行综合解读, 可以实现对产品质量的多维度刻画。例如, 利用长读长测序得到的载体全基因组信息, 关联相应批次生产过程中的参数变化, 可以建立起工艺参数与产品质量特征之间的关联模型; 将脱靶检测结果与动物长期观察/长期监测所得的肿瘤发生数据对比, 可以评估脱靶突变是否带来潜在致癌风险, 从而设定合理的脱靶频率阈值。

在数据整合方面, 大量高通量质控数据的获取

也呼唤着信息化和智能分析的介入。随着测序、组学和功能评估手段产生海量数据,依托云计算和机器学习,有望开发出自动化的数据分析管线和风险评估算法,从而实现每批次产品质控数据的快速比对和异常识别。例如,通过机器学习模型学习大量历史生产批次的测序特征与放行结果、临床结果之间的关系,将来有可能在新批次质控数据出来后,自动判断其是否存在偏离正常范围的风险信号,为放行决策和工艺调整提供依据^[99]。这种“智能质控”思路已在生物制品领域开始萌芽,有望在基因治疗领域率先实现突破。

综上,先进方法学和数据整合正在重塑基因治疗的质控模式。“以长读长测序为核心、多技术并用、数据贯通验证”的模式,能够构建起从实验室到临床的完整证据链,使每一个质量指标的设定和变化都有据可依、有源可溯。例如直接 ITR-to-ITR 的长读长测序已用于 rAAV 基因组完整性与杂合体的表征,可作为关键数据源之一^[5]。这不仅满足了监管机构对可核查性和数据充分性的要求,也为企业自身的产品开发和工艺改进提供了科学指导。可以预见,随着这些方法学逐步成熟并标准化,它们将从现在的“先进选项”演进为未来基因治疗产品开发和申报的常规组成部分。

5 未来展望

展望未来,基因治疗正处于快速演化的新阶段,其发展趋势主要体现在以下几个方面。

其一,更精确的基因编辑谱系。第一代 CRISPR 疗法(如 Casgevy/CTX001)已在血液病中奠定临床可行性^[100],下一步焦点将在更精确和多样的编辑工具上。碱基编辑(BE)和引导编辑(PE)有望率先在血液病和眼科遗传病领域取得突破,目前,眼科 EDIT-101 针对 *CEP290* 的 I/II 期研究已经公布了安全性与部分患者视觉功能改善信号^[101]。当前瓶颈集中在 BE/PE 的递送与效率、精细特异性评估(含结构变异)以及编辑率与功能读数的定量关联。如果 PE 的效率和递送瓶颈得到解决,未来可矫正更多类型的致病突变;此外,调控基因表达的 CRISPR 干扰/激活技术(CRISPRi/a)以及带有开关控制的可编程编辑系统将为“基因电路疗法”提供可能^[102]。相应地,质控手段需要同步升级,例如单细胞测序和更高深度的全基因组扫描用于评估精准编辑效果与安全性。

其二,靶向在体基因治疗的兴起。趋势正从体外改造细胞回输转向在体直接编程——通过靶向偶联的 LNP、改造的 AAV 衣壳或 VLP,直接将基因编辑器或治疗基因递送至患者体内特定的细胞群体(如 T 细胞、HSC、肌肉卫星细胞、神经干细胞等),从而在体内完成基因功能修复或改造^[69-70,103]。这一策略将大大简化治疗流程、降低成本。然而,在体基因治疗对质控提出了新的要求:质控评估必须覆盖组织分布与暴露、脱靶突变以及免疫相容性(如补体相关输注反应、抗 Cas 免疫)等关键维度;特别是对于靶向递送系统,其表面配体/偶联物的一致性、结合活性以及在不同批次间的重现性将成为 CMC 的关键考察指标。如果这些挑战得到克服,在体基因治疗有望带来颠覆性的疗效提升和适应症拓展。

其三,第三代测序与大数据赋能质控。随着基因治疗产品复杂度增加和质控标准提高,产生的数据量呈指数级增长。长读长测序技术预计将成为质控实验室的日常工具,用于常规检测 AAV 载体全基因组、LV 整合体结构、CRISPR 脱靶和大片段缺失等指标^[56-57];云端数据分析平台和机器学习算法将用于处理和解读这些海量数据,实现自动化的风险判定与批间对比^[99];瓶颈在于跨平台一致性与标准缺失(覆盖度、调用阈值等);可通过建立共识标准操作程序(standard operating procedure, SOP)/参考物质与“能力图+异常触发规则”提高可比性。在未来,质控人员不仅要精通实验,也需要掌握数据处理技能,以驾驭“数据驱动的质控”模式。

其四,更严格的监管框架。监管机构在基因治疗领域的要求将日趋严格和精细。当前 FDA、EMA 和 CDE 等已经将载体全基因组序列分析、插入整合分析、长期随访等纳入核心要求^[51],未来可能进一步要求申报者:提供代表性脱靶位点和大片段缺失集合的长期监测数据、提交长期随访中载体拷贝数和克隆演化的分子证据以及将部分目前属于“研究级”的高通量检测方法提升为注册申报必需项目等。监管的提前介入将推动行业朝更高质量标准和更透明的数据披露方向前进,同时也倒逼企业在研发早期就布局完善的质控体系,以满足未来申报需求。

其五,制备工艺与质控的深度融合。连续化/封闭式平台叠加过程分析技术(process analytical technology, PAT)将成为降本提质的主路线^[104]。例如,在生产过程中实时监测颗粒浓度、pH 值、关键营养

代谢物等参数,以保证过程一致性;利用无细胞体系生产AAV衣壳蛋白或mRNA原料,减少来源杂质;通过数字化的工艺控制系统,将质控数据实时反馈至工艺参数调节,实现质控与制造的闭环控制。质控与生产的高度耦合将形成良性循环——生产过程越稳定,质控压力越小;反过来,强大的质控能力又能推动工艺持续优化。多学科融合的人才团队(涵盖分子生物学、分析化学、生物信息、工程自动化等领域)将在这一过程中扮演重要角色,共同推动基因治疗的大规模、规范化制造。

6 结语

经过数十年的探索,基因治疗如今正展现出改变疑难疾病治疗格局的巨大潜能。然而,要实现基因治疗从前沿突破到广泛临床应用,疗效之外的质量控制体系将是决定其成败的关键。安全、可审计、可复制的全流程质控不仅能够保障患者安全、提高疗效可靠性,也是监管审核和产业化的硬性要求。展望未来,通过基因编辑工具的精确化改良、在递送技术的创新、长读长测序等高新技术的赋能、严格监管标准的引导,以及连续化智能制造的协同推进,我们有望构建起一套行之有效的基因治疗质控范式,为基因治疗走向安全、规模化、成本可控的临床应用提供坚实支撑。

参考文献 (References)

- [1] MINGOZZI F, HIGH K A. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy [J]. *Blood*, 2013, 122(1): 23-36.
- [2] GEE P, LUNG M S Y, OKUZAKI Y, et al. Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1334.
- [3] KOMOR A C, KIM Y B, PACKER M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-4.
- [4] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-57.
- [5] NAMKUNG S, TRAN N T, MANOKARAN S, et al. Direct ITR-to-ITR nanopore sequencing of AAV vector genomes [J]. *Hum Gene Ther*, 2022, 33(21/22): 1187-96.
- [6] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Testing of retroviral vector-based human gene therapy products for replication competent retrovirus during product manufacture and patient follow-up: guidance for industry [EB/OL]. (2020-01-31) [2025-11-10]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/testing-retroviral-vector-based-human-gene-therapy-products-replication-competent-retrovirus-during>.
- [7] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Long term follow-up after administration of human gene therapy products: guidance for industry [EB/OL]. (2020-01-30) [2025-11-10]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/long-term-follow-after-administration-human-gene-therapy-products>.
- [8] TSAI S Q, ZHENG Z, NGUYEN N T, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(2): 187-97.
- [9] WIENERT B, WYMAN S K, RICHARDSON C D, et al. Unbiased detection of CRISPR off-targets *in vivo* using DISCOVER-Seq [J]. *Science*, 2019, 364(6437): 286-9.
- [10] EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE. European Pharmacopoeia to put an end to the rabbit pyrogen test [EB/OL]. (2021-06-28) [2025-11-10]. <https://www.edqm.eu/en/-/european-pharmacopoeia-to-put-an-end-to-the-rabbit-pyrogen-test>.
- [11] EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE. Ph. Eur. allows the use of recombinant factor C for control of bacterial endotoxins in water monographs [EB/OL]. (2023-09-13) [2025-11-10]. <https://www.edqm.eu/en/-/ph.-eur.-allows-the-use-of-recombinant-factor-c-for-control-of-bacterial-endotoxins-in-water-monographs>.
- [12] CENTER FOR BIOLOGICS EVALUATION AND RESEARCH, 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) [2025-11-10]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/chemistry-manufacturing-and-control-cmc-information-human-gene-therapy-investigational-new-drug>.
- [13] BLAESE R M, CULVER K W, MILLER A D, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years [J]. *Science*, 1995, 270(5235): 475-80.
- [14] MARSHALL E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector [J]. *Science*, 1999, 286(5448): 2244-5.
- [15] WILSON J M. Lessons learned from the gene therapy trial for ornithine transcarbamylase deficiency [J]. *Mol Genet Metab*, 2009, 96(4): 151-7.
- [16] HACEIN-BEY-ABINA S, LE DEIST F, CARLIER F, et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by *ex vivo* gene therapy [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(16): 1185-93.
- [17] HACEIN-BEY-ABINA S, VON KALLE C, SCHMIDT M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1 [J]. *Science*, 2003, 302(5644): 415-9.
- [18] HACEIN-BEY-ABINA S, GARRIGUE A, WANG G P, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1 [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9): 3132-42.
- [19] BAUM C, KUSTIKOVA O, MODLICH U, et al. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors [J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(3): 253-63.
- [20] MODLICH U, BOHNE J, SCHMIDT M, et al. Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity [J]. *Blood*, 2006, 108(8): 2545-53.
- [21] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for

- industry: gene therapy clinical trials—observing subjects for delayed adverse events; availability [EB/OL]. (2006-11-28) [2025-11-10]. <https://www.federalregister.gov/documents/2006/11/28/E6-20129/guidance-for-industry-gene-therapy-clinical-trials-observing-subjects-for-delayed-adverse-events>.
- [22] RUSSELL S, BENNETT J, WELLMAN J A, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2017, 390(10097): 849-60.
- [23] MENDELL J R, AL-ZAIDY S, SHELL R, et al. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(18): 1713-22.
- [24] OZELO M C, MAHLANGU J, PASI K J, et al. Valoctocogene roxaparvovec gene therapy for hemophilia A [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(11): 1013-25.
- [25] MENDELL J R, MUNTONI F, MCDONALD C M, et al. AAV gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: the EMBARK phase 3 randomized trial [J]. *Nat Med*, 2025, 31(1): 332-41.
- [26] CENTER FOR BIOLOGICS EVALUATION AND RESEARCH, U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. YESCARTA [EB/OL]. (2025-10-28) [2025-11-10]. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/yescarta>.
- [27] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. August 30, 2017 summary basis for regulatory action—KYMRIAH [EB/OL]. (2017-08-30) [2025-11-10]. <https://www.fda.gov/media/107962/download>.
- [28] THOMPSON A A, OLSON T S, WALTERS M C, et al. Sustained efficacy, safety, and improved quality of life in adult and pediatric patients with transfusion-dependent β -thalassemia up to 9 years post treatment with betibeglogene autotemcel (Beti-cel) [J]. *Blood*, 2023, 142(Supplement 1): 1102.
- [29] DUNCAN C N, BLEDSOE J R, GRZYWACZ B, et al. Hematologic cancer after gene therapy for cerebral adrenoleukodystrophy [J]. *N Engl J Med*, 2024, 391(14): 1287-301.
- [30] EICHLER F, DUNCAN C N, MUSOLINO P L, et al. Lentiviral gene therapy for cerebral adrenoleukodystrophy [J]. *N Engl J Med*, 2024, 391(14): 1302-12.
- [31] CENTER FOR BIOLOGICS EVALUATION AND RESEARCH, U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Approved cellular and gene therapy products [EB/OL]. (2025-12-09) [2025-12-22]. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>.
- [32] FRANGOUL H, ALTSHULER D, CAPPELLINI M D, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(3): 252-60.
- [33] 武田中国. 中国首个血友病B基因治疗药物信玖凝®(波哌达可基注射液)正式获批 武田中国携手信念医药深化本土合作 开拓血友病治疗领域新格局[EB/OL]. (2025-04-11) [2025-11-11]. <https://www.takeda.com.cn/zh-cn/newsroom/2025/bbm-h901/>.
- [34] ZUFFEREY R, DULL T, MANDEL R J, et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery [J]. *J Virol*, 1998, 72(12): 9873-80.
- [35] MORRIS K V. VRX-496(VIRxSYS) [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2005, 6(2): 209-15.
- [36] PEARSON S, JIA H, KANDACHI K. China approves first gene therapy [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(1): 3-4.
- [37] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-21.
- [38] CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH, U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA approves tisa-genlecleucel for B-cell ALL and tocilizumab for cytokine release syndrome [EB/OL]. (2017-09-07) [2025-11-11]. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-tisagenlecleucel-b-cell-all-and-tocilizumab-cytokine-release-syndrome>.
- [39] CENTER FOR BIOLOGICS EVALUATION AND RESEARCH, U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. ZYNTEGLO [EB/OL]. (2022-09-19) [2025-11-11]. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/zynteglo>.
- [40] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Package insert: SKYSONA [EB/OL]. (2025-07) [2025-11-11]. <https://www.fda.gov/media/161640/download>.
- [41] DUNCAN C N, BLEDSOE J R, GRZYWACZ B, et al. Hematologic cancer after gene therapy for cerebral adrenoleukodystrophy [J]. *N Engl J Med*, 2024, 391(14): 1287-301.
- [42] CENTER FOR BIOLOGICS EVALUATION AND RESEARCH, U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA investigating serious risk of hematologic malignancy following Skysona (elivaldogene autotemcel) [EB/OL]. (2024-11-27) [2025-11-11]. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/fda-investigating-serious-risk-hematologic-malignancy-following-skysona-elivaldogene-autotemcel>.
- [43] CENTER FOR BIOLOGICS EVALUATION AND RESEARCH, U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA approves required labeling changes for increased risk of hematologic malignancy following treatment with Skysona (elivaldogene autotemcel) [EB/OL]. (2025-08-07) [2025-11-11]. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/fda-approves-required-labeling-changes-increased-risk-hematologic-malignancy-following-treatment>.
- [44] PIPE S W, LEEBEEK F W G, RECHT M, et al. Gene therapy with etranacogene dezaparvovec for hemophilia B [J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(8): 706-18.
- [45] TAI C H, LEE N C, CHIEN Y H, et al. Long-term efficacy and safety of eladocogene exparvovec in patients with AADC deficiency [J]. *Mol Ther*, 2022, 30(2): 509-18.
- [46] EUROPEAN MEDICINES AGENCY, COMMITTEE FOR ADVANCED THERAPIES. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products [EB/OL]. (2018-07-13) [2025-11-11]. <https://www.ema.europa.eu/en/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products>.
- [47] CORNETTA K, LIN T Y, PELLIN D, et al. Meeting FDA guidance recommendations for replication-competent virus and insertional oncogenesis testing [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2023, 28: 28-39.
- [48] CENTER FOR BIOLOGICS EVALUATION AND RESEARCH, U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Human gene therapy products incorporating human genome editing: guidance for industry [EB/OL]. (2024-03-05) [2025-11-10]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/human-gene-therapy-products-incorporating-human-genome>

- editing.
- [49] UNITED STATES PHARMACOPEIA. Chapter <86>: frequently asked questions [EB/OL]. (2023-08) [2025-11-11]. https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/press-releases/gss_sa_004_f_chapter86_2023-08_final3.pdf.
 - [50] ECA ACADEMY. PharmEuropa: revision of Chapter 2.6.30 Monocyte Activation Test [EB/OL]. (2022-05-18) [2025-11-11]. <https://www.gmp-compliance.org/gmp-news/pharmeuropa-revision-of-chapter-2-6-30-monocyte-activation-test>.
 - [51] UNITED STATES: NATIONAL ARCHIVES AND RECORDS ADMINISTRATION: OFFICE OF THE FEDERAL REGISTER, UNITED STATES: DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, UNITED STATES: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Human gene therapy products incorporating human genome editing: guidance for industry; availability. Notices [J]. Fed Regist, 2024, 89(20): 5737-6005.
 - [52] 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.
 - [53] 国家药品监督管理局. 国家药监局批准阿基仑赛注射液上市 [EB/OL]. (2021-06-23) [2025-11-12]. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/zhuanli/cxylqx/cxypxx/20210623094232187.html>.
 - [54] LEWINSKI M K, YAMASHITA M, EMERMAN M, et al. Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection [J]. PLoS Pathog, 2006, 2(6): e60.
 - [55] MONTINI E, CESANA D, SCHMIDT M, et al. The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy [J]. J Clin Invest, 2009, 119(4): 964-75.
 - [56] ARTESI M, HAHAUT V, COLE B, et al. PCIP-seq: simultaneous sequencing of integrated viral genomes and their insertion sites with long reads [J]. Genome Biol, 2021, 22(1): 97.
 - [57] SULEMAN S, KHALIFA M S, FAWAZ S, et al. Analysis of HIV-1-based lentiviral vector particle composition by PacBio long-read nucleic acid sequencing [J]. Hum Gene Ther, 2025, 36(5/6): 628-36.
 - [58] KOCHANKE S. High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy [J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(15): 2451-9.
 - [59] FOLEGATTI P M, EWER K J, ALEY P K, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial [J]. Lancet, 2020, 396(10249): 467-78.
 - [60] INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis: step 5 [EB/OL]. (2022-07-21) [2025-11-10]. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-study-sample-analysis>.
 - [61] RADUKIC M T, LE D T, KRASSUSKI T, et al. Degradation and stable maintenance of adeno-associated virus inverted terminal repeats in *E. coli* [J]. Nucleic Acids Res, 2024, 53(2): gkae1170.
 - [62] SOUSA F, PRAZERES D M F, QUEIROZ J A. Improvement of transfection efficiency by using supercoiled plasmid DNA purified with arginine affinity chromatography [J]. J Gene Med, 2009, 11(1): 79-88.
 - [63] GILLMORE J D, GANE E, TAUBEL J, et al. CRISPR-Cas9 *in vivo* gene editing for transthyretin amyloidosis [J]. N Engl J Med, 2021, 385(6): 493-502.
 - [64] BIMBO J F, VAN DIEST E, MURPHY D E, et al. T cell-specific non-viral DNA delivery and *in vivo* CAR-T generation using targeted lipid nanoparticles [J]. J Immunother Cancer, 2025, 13(7): e011759.
 - [65] BREDA L, PAPP T E, TRIEBWASSER M P, et al. *In vivo* hematopoietic stem cell modification by mRNA delivery [J]. Science, 2023, 381(6656): 436-43.
 - [66] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations, Annex 3, TRS No 1039 [EB/OL]. (2022-04-15) [2025-11-12]. <https://www.who.int/publications/m/item/annex-3-mrna-vaccines-trs-no-1039>.
 - [67] AN M, RAGURAM A, DU S W, et al. Engineered virus-like particles for transient delivery of prime editor ribonucleoprotein complexes *in vivo* [J]. Nat Biotechnol, 2024, 42(10): 1526-37.
 - [68] SPIES N, WENG Z, BISHARA A, et al. Genome-wide reconstruction of complex structural variants using read clouds [J]. Nat Methods, 2017, 14(9): 915-20.
 - [69] HALDRUP J, ANDERSEN S, LABIAL A R L, et al. Engineered lentivirus-derived nanoparticles (LVNPs) for delivery of CRISPR/Cas ribonucleoprotein complexes supporting base editing, prime editing and *in vivo* gene modification [J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51(18): 10059-74.
 - [70] AN M, RAGURAM A, DU S W, et al. Engineered virus-like particles for transient delivery of prime editor ribonucleoprotein complexes *in vivo* [J]. Nat Biotechnol, 2024, 42(10): 1526-37.
 - [71] EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Development of a guideline on the quality aspects of mRNA vaccines: scientific guideline [EB/OL]. (2023-06-23) [2025-11-12]. <https://www.ema.europa.eu/en/development-guideline-quality-aspects-mrna-vaccines-scientific-guideline>.
 - [72] MAEDER M L, STEFANIDAKIS M, WILSON C J, et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10 [J]. Nat Med, 2019, 25(2): 229-33.
 - [73] LU Y, XUE J, DENG T, et al. Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer [J]. Nat Med, 2020, 26(5): 732-40.
 - [74] XU L, WANG J, LIU Y, et al. CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia [J]. N Engl J Med, 2019, 381(13): 1240-7.
 - [75] TSAI S Q, NGUYEN N T, MALAGON-LOPEZ J, et al. CIRCLE-seq: a highly sensitive *in vitro* screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets [J]. Nat Methods, 2017, 14(6): 607-14.
 - [76] YANG Z X, DENG D H, GAO Z Y, et al. OliTag-seq enhances in cellulo detection of CRISPR-Cas9 off-targets [J]. Commun Biol, 2024, 7(1): 696.
 - [77] CAMERON P, FULLER C K, DONOHUE P D, et al. Mapping the genomic landscape of CRISPR-Cas9 cleavage [J]. Nat Methods, 2017, 14(6): 600-6.
 - [78] SLAYMAKER I M, GAO L, ZETSCHKE B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity [J]. Science, 2016, 351(6268): 84-8.
 - [79] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, et al. High-

- fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects [J]. *Nature*, 2016, 529(7587): 490-5.
- [80] VAKULSKAS C A, DEVER D P, RETTIG G R, et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Nat Med*, 2018, 24(8): 1216-24.
- [81] DOENCH J G, FUSI N, SULLENDER M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9 [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(2): 184-91.
- [82] WEN W, QUAN Z J, LI S A, et al. Effective control of large deletions after double-strand breaks by homology-directed repair and dsODN insertion [J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 236.
- [83] CHARLESWORTH C T, DESHPANDE P S, DEVER D P, et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans [J]. *Nat Med*, 2019, 25(2): 249-54.
- [84] HOU X, ZAKS T, LANGER R, et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery [J]. *Nat Rev Mater*, 2021, 6(12): 1078-94.
- [85] RAN F A, CONG L, YAN W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 [J]. *Nature*, 2015, 520(7546): 186-91.
- [86] HINO T, OMURA S N, NAKAGAWA R, et al. An AsCas12f-based compact genome-editing tool derived by deep mutational scanning and structural analysis [J]. *Cell*, 2023, 186(22): 4920-35.e23.
- [87] KOSICKI M, TOMBERG K, BRADLEY A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(8): 765-71.
- [88] Base editing boosts hemoglobin in sickle cell disease [J]. *Nat Biotechnol*, 2024, 42(12): 1759.
- [89] CHIESA R, GEORGIADIS C, SYED F, et al. Base-edited CAR7 T cells for relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2023, 389(10): 899-910.
- [90] HAN W, QIU H Y, SUN S, et al. Base editing of the HBG promoter induces potent fetal hemoglobin expression with no detectable off-target mutations in human HSCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(12): 1624-39.e8.
- [91] CHEN P J, LIU D R. Prime editing for precise and highly versatile genome manipulation [J]. *Nat Rev Genet*, 2023, 24(3): 161-77.
- [92] LAZZAROTTO C R, MALININ N L, LI Y, et al. CHANGE-seq reveals genetic and epigenetic effects on CRISPR-Cas9 genome-wide activity [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(11): 1317-27.
- [93] ZOU R S, LIU Y, GAIDO O E R, et al. Improving the sensitivity of *in vivo* CRISPR off-target detection with DISCOVER-Seq [J]. *Nat Methods*, 2023, 20(5): 706-13.
- [94] GEHRKE J M, CERVANTES O, CLEMENT M K, et al. An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(10): 977-82.
- [95] GRÜNEWALD J, ZHOU R, GARCIA S P, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors [J]. *Nature*, 2019, 569(7756): 433-7.
- [96] WU L, JIANG S, SHI M, et al. Adenine base editors induce off-target structure variations in mouse embryos and primary human T cells [J]. *Genome Biol*, 2024, 25(1): 291.
- [97] ANTONIOU P, DACQUAY L, MÅRTENSSON H, et al. Modified pegRNAs mitigate scaffold-derived prime editing by-products [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 3374.
- [98] ZHAO Z, SHANG P, MOHANRAJU P, et al. Prime editing: advances and therapeutic applications [J]. *Trends Biotechnol*, 2023, 41(8): 1000-12.
- [99] RATHORE A S, NIKITA S, THAKUR G, et al. Artificial intelligence and machine learning applications in biopharmaceutical manufacturing [J]. *Trends Biotechnol*, 2023, 41(4): 497-510.
- [100] CENTER FOR BIOLOGICS EVALUATION AND RESEARCH, U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CASGEVY [EB/OL]. (2024-02-21) [2025-11-12]. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/casgev>.
- [101] PIERCE E A, ALEMAN T S, JAYASUNDERA K T, et al. Gene editing for CEP290-associated retinal degeneration [J]. *N Engl J Med*, 2024, 390(21): 1972-84.
- [102] SANTOS-MORENO J, SCHÄERLI Y. CRISPR-based gene expression control for synthetic gene circuits [J]. *Biochem Soc Trans*, 2020, 48(5): 1979-93.
- [103] BANSKOTA S, RAGURAM A, SUH S, et al. Engineered virus-like particles for efficient *in vivo* delivery of therapeutic proteins [J]. *Cell*, 2022, 185(2): 250-65.e16.
- [104] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry: PAT—a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance [EB/OL]. (2004-10-04) [2025-11-12]. <https://www.fda.gov/media/71012/download>.