



刘超, 博士, 副研究员, 中国科学院遗传与发育生物学研究所博士, 美国加州大学圣地亚哥分校博士后。深圳市海外高层次人才, 深圳市盐田区未来产业企业核心成员, 现为深圳市禾沐基因生物技术有限责任公司首席执行官。主要研究方向为造血干细胞干性维持机制及细胞基因治疗产品开发。在基因治疗领域, 带领团队完成国内首个慢病毒路径的 β -地中海贫血治疗药物HGI-001注射液的研发, 获批国家药品监督管理局的新药临床试验(IND)批件, 该产品帮助多例重症地中海贫血患者脱离输血, 并于2024年在东南亚地区(泰国)实现技术落地, 获泰国FDA批准临床试验, 有力推动“天下无贫”计划的全球落地。在基础研究领域, 率先揭示脂蛋白脂酶介导的自由脂肪酸代谢途径对造血干细胞干性维持的关键作用, 构建新型遗传性代谢疾病动物模型, 利用单细胞组学技术解析造血干细胞扩增的分子机制。主持国家自然科学基金面上项目“造血干细胞分子特征及扩增机理的单细胞水平研究”、深圳市科技创新重大专项“治疗罕见遗传性疾病的基因治疗药物关键技术研发”等科研项目, 以通信作者身份在*Nat Commun*(Highlighted)、*Clin Transl Med*、*Hum Gene Therapy*等期刊发表系列研究成果, 累计发表SCI论文20余篇, 申请发明专利6项、软件著作权4项, 获评“华大研究院重大贡献奖”、“深圳创新创业大赛半决赛晋级企业”等荣誉。

造血干细胞基因治疗产品的研发应用和质量控制

陈悦¹ 华君男^{1,2} 刘超^{1,3*}

(¹深圳华大生命科学研究院, 深圳 518083; ²中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049;

³深圳市禾沐基因生物技术有限责任公司, 深圳 518083)

摘要 造血干细胞(HSCs)凭借其自我更新能力与多谱系分化潜能, 已成为细胞和基因治疗领域的重要工具。造血干细胞基因治疗(HSC-GT)通过对患者自体HSCs进行体外基因修饰并回输, 可从病因层面纠正疾病, 实现“一次治疗、终身获益”的治疗目标, 同时规避异体造血干细胞移植中供体配型困难及移植物抗宿主病等风险。该文系统梳理了HSC-GT的技术发展历程, 包括从 γ -逆转录病毒载体的初步尝试, 到第三代自灭活型慢病毒载体在安全性与效率上的突破, 再到CRISPR-Cas9、碱基编辑及先导编辑等技术推动的精准基因修饰革命。临床转化方面, HSC-GT领域已有多款创新药物在欧盟和美国获批上市(包括全球首款CRISPR编辑药物), 其适应症已从血红蛋白病等血液系统疾病, 逐步拓展至溶酶体贮积症和中枢神经系统疾病等非血液领域, 展现出广阔的应用前景。质量研究与控制是HSC-GT产品开发及生产的核心环节, 需围绕造血干细胞特性、基因修饰功效、细胞纯度、安全性四个维度, 贯彻“质量源于设计”理念, 遵循药品生产质量管理规范, 建立过程控制和终端质量放行标准, 从而确保产品的安全性、有效性与质量可控性。展望未来, HSC-GT将朝着体内基因修饰、适应症拓展以及更精准的质量评价体系等方向持续发展, 有望从高端个体化治疗手段逐步转化为更普及、更可负担的医疗产品, 为多种难治性疾病提供新的治疗选择。

关键词 造血干细胞; 基因治疗; 病毒载体; 基因编辑; 质量控制; 临床应用

收稿日期: 2025-09-19

接受日期: 2025-12-10

*通信作者。Tel: 0755-36352083, E-mail: liuchao4@genomics.cn

Received: September 19, 2025

Accepted: December 10, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-755-36352083, E-mail: liuchao4@genomics.cn

Development, Application and Quality Control of Hematopoietic Stem Cell Therapy

CHEN Yue¹, HUA Junnan^{1,2}, LIU Chao^{1,3*}

(¹BGI Research, Shenzhen 518083, China; ²College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³BGI Hemogen Therapeutic, Shenzhen 518083, China)

Abstract HSCs (hematopoietic stem cells) possess self-renewal capacity and multi-lineage differentiation potential, making them an ideal vehicle in the field of cell and gene therapy. HSC-GT (hematopoietic stem cell gene therapy) involves *ex vivo* genetic modification of a patient's autologous HSCs followed by reinfusion, which can correct diseases at the etiological level, achieving “one-time treatment, lifelong benefit” while avoiding the donor-matching difficulties and the risk of graft-versus-host disease associated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. This review systematically outlines the technological evolution of HSC-GT: from the early exploratory applications of γ -retroviral vectors, to the breakthroughs in safety and efficiency achieved by third-generation self-inactivating lentiviral vectors, and to the advent of precision editing technologies including CRISPR-Cas9, base editing, and prime editing. In terms of clinical translation, multiple innovative HSC-GT products have already been approved in the European Union and the United States (including the world's first CRISPR-based medicine). The therapeutic scope has expanded from hematologic disorders such as hemoglobinopathies and immunodeficiencies to non-hematologic diseases, including lysosomal storage disorders and central nervous system diseases, demonstrating the field's enormous potential. Quality research and control are critical to the HSC-GT development and manufacturing. These efforts, guided by the principle of “Quality by Design” and compliant with GMP (Good Manufacturing Practice), must focus on four key dimensions: characteristics of HSCs, gene-modification efficacy, cell purity and safety. Moreover, establishing rigorous process controls and final product release standards is essential to ensuring safety, efficacy, and consistency. Looking ahead, HSC-GT is expected to advance toward *in vivo* gene therapy, expanded indications, and more precise quality assessment systems. With these developments, HSC-GT holds promise to evolve from a high-end, personalized therapy into a more accessible and affordable product, providing innovative solutions for numerous refractory diseases.

Keywords hematopoietic stem cells; gene therapy; viral vectors; gene editing; quality control; clinical application

1 造血干细胞和造血干细胞基因治疗

造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)是维持血液系统和免疫系统稳态的种子细胞,具有长期自我更新能力和多向分化潜能,能够分化为红细胞、血小板、粒细胞、单核-巨噬细胞以及淋巴细胞等各类成熟血细胞,在机体造血与免疫重建中发挥不可替代的作用^[1]。相较于其他免疫细胞或干细胞, HSCs能够从“源头”上修复血液系统各个方面的缺陷,并且实现“长期化”的治疗效果;另外, HSCs具有良好的体内归巢特性,静脉输注后会自动迁移至骨髓并定居,无需复杂的体内定位技术。自20世纪60年代以来,基于HSCs的造血干细胞移植(hemato-

poietic stem cell transplantation, HSCT)已成为白血病、再生障碍性贫血、重型地中海贫血等血液系统疾病的重要治疗手段^[2]。然而,传统HSCT长期依赖异基因供体,面临供体来源不足、移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)、免疫重建延迟等问题^[3]。尽管单倍体移植技术的发展使更多的患者能够找到亲属供者,但强化疗相关副作用,移植后GVHD和长期预后问题,以及对医疗设施和医护团队经验的要求,仍限制了HSCT的广泛应用^[2]。

造血干细胞基因治疗(hematopoietic stem cell gene therapy, HSC-GT)通过对患者自体HSC进行体外基因修饰,弥补缺失基因功能后再回输至体内^[4]。

其优势在于对“种子细胞”进行修饰改造后,可在其衍生的多种细胞类型中持续发挥功能。HSC-GT能够通过一次性回输实现长期疗效,甚至根治疾病,从而减少对长期药物或酶替代治疗的依赖^[5]。与对症治疗相比,HSC-GT能够在病因学层面实现矫正。经基因修正的HSC及其衍生细胞在机体中不仅可恢复造血和免疫功能,还可分化并替代多种组织特异性巨噬细胞,例如中枢神经系统的小胶质细胞,从而产生多系统治疗效应^[6]。这种“系统性获益”的特点使HSC-GT不仅适用于原发性免疫缺陷病和血红蛋白病等血液系统疾病,还可用于治疗溶酶体贮积症、代谢性疾病等非血液系统疾病^[6-8]。此外,HSCs临床操作技术较成熟,涵盖动员采集、分离培养、预处理回输和术后监护等多个环节,为标准化的HSC-GT方案设计提供了便利。由于采用自体移植策略,HSC-GT从根本上解决了供体配型困难和GVHD等难题^[3]。同时,HSC-GT所采用的清髓方案化疗强度显著低于异体HSCT,并可根据疾病特征优化调整,从而为患者提供更优的风险获益比^[9]。

近年来,随着多个HSC-GT产品在临床上的成功应用,该技术正从罕见病的“最后选择”转变为部分遗传病的一线治疗选项^[4]。随着技术进步和评价体系完善,HSC-GT未来有望为更多复杂疾病(包括多基因疾病与获得性疾病)提供更为先进的治疗策略。

2 体外造血干细胞基因治疗的操作流程

目前,临床应用的HSC-GT均采用“体外改造+体内回输”模式,主要包括四个步骤(图1)。步骤一:HSCs动员和单个核细胞采集。HSCs动员是将骨髓中的HSCs释放至外周血的关键环节。传统方案是采用粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)联合CXCR4拮抗剂普乐沙福(plerixafor)。G-CSF通过刺激骨髓微环境释放HSCs,而普乐沙福阻断CXCR4与趋化因子CXCL12的结合,解除HSCs在骨髓中的锚定,从而显著提高外周血CD34⁺细胞计数^[10]。HSCs动员至外周血后,单采机设备通过连续离心分离外周血中的单个核细胞,从而捕获HSCs。部分病例(如动员失败或特殊病

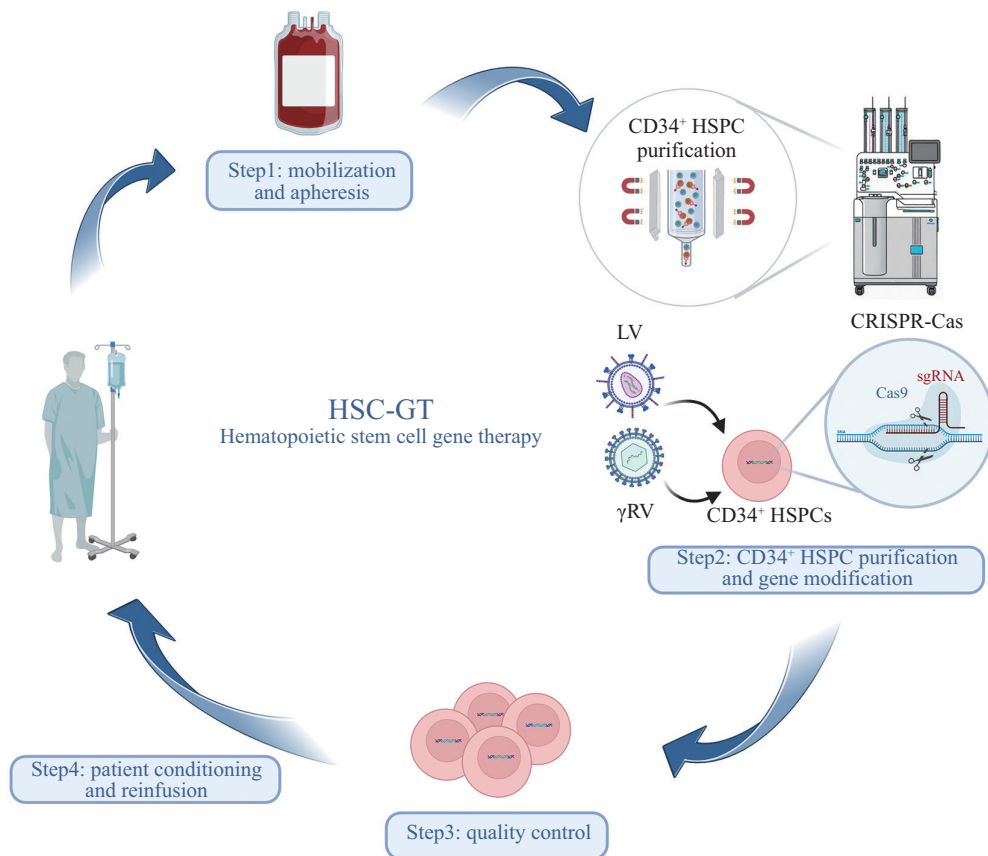


图1 造血干细胞基因治疗示意图

Fig.1 Schematic of hematopoietic stem cell gene therapy

例),也可选择骨髓抽吸作为HSCs来源^[6-7-11]。

步骤二: CD34⁺细胞纯化和基因修饰。CD34⁺细胞是HSCs的表面标记物,虽不等同于长效造血干细胞(long-term HSCs, LT-HSCs),但在临床实践中被用作判定HSCs采集量的关键指标。因此,临床上通过CD34抗体免疫磁珠,从单个核细胞中分选富集到CD34⁺细胞。基因修饰包括使用病毒载体实现外源基因整合表达,或利用CRISPR-Cas9等基因编辑工具进行靶向编辑^[12]。修饰后的CD34⁺细胞添加冻存保护剂,经程序降温后保存于液氮,确保长期活性。

步骤三: 质检放行。预留分装的部分冻存产品细胞,复融后用于质检放行。质检评估指标主要包括造血干细胞特征(如集落形成能力)、细胞纯度(如CD34⁺比例)、基因修饰功效(如慢病毒转导效率或编辑效率)和安全性指标(如微生物污染)等,符合标准后开具放行报告。传统的质检手段主要包括流式细胞术、集落形成实验、细胞分化实验、qPCR等方法,主要针对产品的某个方面、某项指标进行检测。最近,利用单细胞测序技术等高通量的组学技术,研究者能够更加全面地评估产品的造血干细胞特征和基因修饰功效,并揭示某些信号通路(如干扰素、慢性炎症)在产品疗效方面的重要作用^[13-14]。

步骤四: 患者清髓和细胞产品回输。清髓预处理通过化疗(如白消安)或放疗清除患者骨髓中的异常细胞,为修饰后的HSCs提供“生存空间”。传统方案的毒性较大,降低强度(如氟达拉滨+低剂量白消安)或非化疗条件性(如抗体靶向清除)预处理正成为趋势^[15-17]。最后,修饰后的HSCs通过静脉回输进入患者体内,在骨髓中定植扩增,持续分化为功能正常的血细胞,恢复全身造血与免疫功能,并矫正缺失基因的功能。

由于HSC-GT长期安全性仍需验证,患者在临床试验期间接受细胞回输后通常需接受两年随访,随后依据监管要求,进入15年的长期随访期,以监测植入动力学、治疗效果及可能的晚发不良事件^[18]。

3 造血干细胞基因治疗的历史回顾与现有进展

HSC-GT的发展反映了基因治疗领域从概念提出到技术成熟,再到临床转化的演进过程,可分为两个相互关联的阶段: 基因修饰策略的不断演进和临床研究与商业化应用的稳步推进,两个维度共同构成了HSC-GT从基础研究到临床应用的完整发展轨迹(图2)。

3.1 HSC-GT中基因修饰策略的演进

3.1.1 早期探索阶段: γ -逆转录病毒的可行性验证和安全风险

HSC-GT的核心在于实现对HSCs的有效基因修饰和外源基因的长期稳定表达。在该技术发展的早期阶段, γ -逆转录病毒(γ -retroviral vectors, γ RV)是实现HSCs基因修饰的主要工具。20世纪90年代,研究者利用 γ RV对严重复合型免疫缺陷病(severe combined immunodeficiency, SCID)患者的HSCs进行基因转导,使得部分接受治疗的患者成功恢复了免疫功能,并实现了长期生存^[19-22]。这些早期临床成果为“利用基因修饰的HSCs治疗相关遗传疾病”奠定了重要基础。

然而, γ RV的核心缺陷在于其安全性问题,主要风险源于两方面: 其一,其长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)中包含强病毒启动子和增强子元件;其二, γ RV倾向于整合在宿主基因组转录起始位点附近或增强子区域。这两方面因素共同作用,使

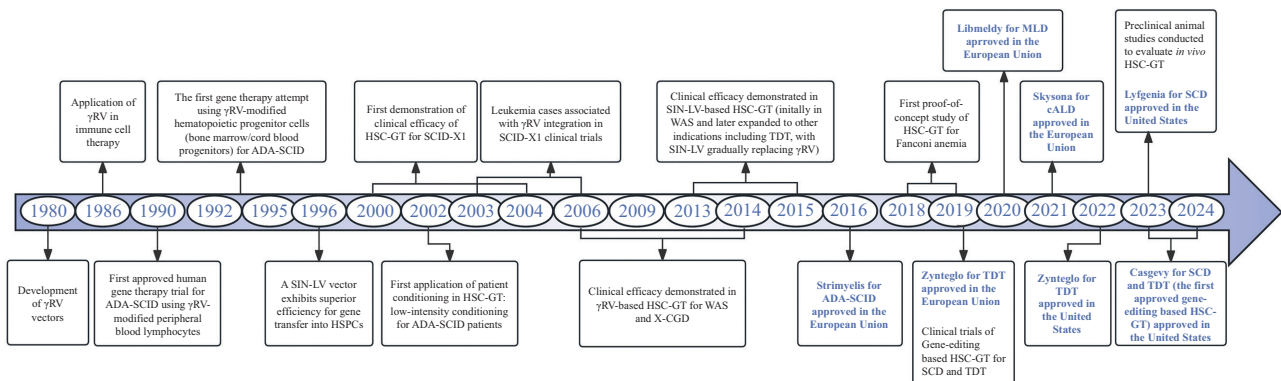


图2 造血干细胞基因治疗的发展历史

Fig.2 The history of hematopoietic stem cell gene therapy

得 γ RV易激活临近宿主基因(包括原癌基因),从而带来插入性致癌风险^[23]。一个典型案例是早期X连锁SCID(X-SCID)的基因治疗临床试验,其中多例患者因 γ RV整合至LMO2原癌基因附近,导致该基因过度激活,进而引发T细胞异常扩增,甚至发展为白血病^[24-25]。这些严重的不良反应揭示出第一代 γ RV载体存在的重大安全隐患,也促使学界重新审视其安全性并积极寻找更安全的替代载体。

3.1.2 技术迭代阶段: 慢病毒载体的安全性升级和效率优化 鉴于 γ RV的安全问题,慢病毒(lentiviral vectors, LV)逐渐成为HSC-GT中进行基因修饰的替代方案。第三代自灭活型慢病毒(self-inactivating LV, SIN-LV)通过删除LTR中的U3增强子序列,显著降低了病毒元件对邻近宿主基因的激活能力;同时, LV整合位点更分散,且偏好插入开放染色质区域(而非启动子附近),进一步降低致癌风险^[26]。临床数据显示,超过两百例患者接受SIN-LV治疗后,未出现明确的插入性白血病报道^[27]。此外,与 γ RV依赖细胞分裂才能入核整合不同, LV可通过核孔复合物进入非分裂细胞的细胞核,无需依赖细胞分裂即可完成整合,能高效转导静息期LT-HSCs,从而实现更稳定持久的转基因表达^[28-29]。LV还具有更大包装容量(8~9 Kb),可插入更长的治疗基因或调控元件(如组织特异性启动子),既增强治疗特异性,又进一步提升安全性和有效性^[29]。因此, LV在安全性和有效性上均优于 γ RV。

自2000年以来, LV在多种疾病模型中均表现出长期稳定的表达特性与良好的安全性,并在HSC-GT临床试验中显示良好的风险获益比^[27]。随着LV生产工艺的成熟和GMP相关规范的完善, LV最终成为HSC-GT的主流基因修饰工具,并为后续相关产品的获批奠定了技术基础^[4]。

3.1.3 精准编辑时代: 基因编辑工具从“可用”到“高效”和“精准”的演进 进入2010年代,基因编辑技术的兴起为HSC-GT带来了新的突破。锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFN)和转录激活因子样效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)最早被用于修饰HSCs,并进入临床探索阶段。例如,研究人员利用ZFN敲除*BCL11A*增强子,能够在血红蛋白病患者中激活胎儿血红蛋白(fetal hemoglobin, HbF)的表达,从而起到一定的治疗效果^[30-31]。然而,由于设计复杂、脱靶率较高及专利授权等限制,

ZFN和TALEN并未得到广泛应用。

随着CRISPR-Cas9技术的出现,整个生物医学领域迈入了高效基因编辑的时代。该系统仅需设计简便的gRNA即可实现高靶向效率,显著提升了基因编辑的灵活性和可扩展性,使得定点敲除、修复和基因矫正成为可能^[32-33]。在血红蛋白病治疗研究中,研究者利用CRISPR-Cas9靶向编辑*BCL11A*增强子区域,解除其对HbF的抑制,从而提高患者体内HbF水平^[34]。该策略在镰状细胞贫血(sickle cell disease, SCD)和输血依赖型 β -地中海贫血(transfusion dependent β -thalassemia, TDT)的临床试验中展现出突破性疗效,并最终推动了全球首款基因编辑药物Casgevy的上市^[35-36]。但是,早期CRISPR-Cas技术依赖于对基因组的切割,通过引入双链断裂(double-strand break, DSB)实现目的基因编辑,可能引发基因组重排、脱靶效应等问题^[37]。

针对早期CRISPR-Cas系统存在的脱靶效应与DNA损伤风险,研究人员从两方面开展了技术优化。一方面,通过优化gRNA设计、使用高保真Cas9变体及化学修饰gRNA等技术手段,有效降低了系统的脱靶风险^[38]。另一方面,为减少DNA损伤与提升精准度,碱基编辑(base editing, BE)与先导编辑(prime editing, PE)技术相继被开发出来^[39-40]。BE系统将脱氨酶与Cas9切口酶(nickase)融合,可在不引起DSB的情况下实现单碱基转换(如A $\rightarrow$ G、C $\rightarrow$ T),在临床前模型中已证实可有效校正SCD相关的*HBB*点突变或破坏*HBB*基因抑制元件,展现出良好的效率与安全性^[41-43]。PE系统则结合逆转录酶与Cas9切口酶,能够实现更大范围的插入、缺失及碱基替换,在修复SCD相关突变等方面展示出潜力,但其编辑效率仍有待进一步提高^[44]。

3.2 临床转化与应用现状

3.2.1 已上市HSC-GT产品: 技术平台迭代与适应症突破 随着基因转导与编辑技术的不断成熟, HSC-GT已从实验室走进临床应用阶段,现在全球已有六款产品获批上市(表1),且产品技术呈现从“ γ RV”到“SIN-LV”再到“CRISPR-Cas”的迭代趋势。

基于 γ RV技术的Strimvelis于2016年在欧洲获批上市,成为首个获批的HSC-GT产品^[45]。Strimvelis针对腺苷脱氨酶缺陷型严重复合型免疫缺陷(adenosine deaminase deficiency-severe combined immunodeficiency, ADA-SCID),该类患者由于腺苷脱氨

酶(adenosine deaminase, ADA)功能缺失, 毒性代谢产物在体内蓄积, 阻碍淋巴细胞正常发育, 引发严重联合免疫缺陷, 患者免疫力极度低下, 易受严重感染威胁^[45]。Strimvelis利用 γ RV载体将正常ADA基因导入患者HSCs, 多数接受治疗的患者实现了稳定长期的造血重建, 免疫功能显著恢复, 感染发生率明显降低, 部分患者可停止免疫球蛋白替代治疗, 生存质量大幅改善^[46-47]。尽管存在一定安全隐患和商业推广限制, 但Strimvelis仍为后续的产品获批奠定了关键基础, 标志着基因治疗迈入了商业化。

由于 γ RV自身风险问题, 第三代SIN-LV技术随后逐渐成为HSC-GT的主流平台, 并推动了一系列重要产品获批上市, 覆盖血液系统和中枢神经系统疾病。其中, Zynteglo针对TDT, 通过LV将修饰后的珠蛋白基因(*HBB*^{T87Q})导入HSCs, 促使正常的血红蛋白生成, 使超过90%的临床试验患者实现长期脱离输血依赖^[48-50]。Lyfgenia, 作为同公司同载体开发的SCD疗法, 外源表达珠蛋白形成抗镰状血红蛋白(HbA^{T87Q}), 显著改善血红蛋白聚合异常, 并大幅降低血管闭塞性危象^[51-52]。Libmeldy获批用于儿童型异染性脑白质营养不良(metachromatic leukodystrophy, MLD), 通过HSC衍生的小胶质细胞穿透血脑屏障并表达功能蛋白ARSA, 带来持久中枢神经系统获益^[8-53]。Skysona同样针对中枢神经系统疾病, 治疗早发型脑型肾上腺脑白质营养不良(cerebral adrenoleukodystrophy, cALD)^[54]。Libmeldy和Skysona的临床成功, 证实了HSC-GT不仅适用于造血系统, 也具备治疗中枢神经系统疾病的巨大潜力^[55-56]。

随着基因编辑技术的快速发展, 全球首个CRISPR基因编辑药物Casgevy于2023年11月至2024年2月期间相继在英国、美国和欧盟获批上市, 用于治疗TDT与SCD。该药物通过编辑*BCL11A*增强子解除对HbF的抑制, 从而恢复HbF表达, 以弥补成人血红蛋白不足^[35-36]。Casgevy的成功上市不仅推动了基因编辑疗法进入商业化阶段, 也标志着HSC-GT领域形成“基因添加(SIN-LV)”与“基因编辑(CRISPR)”并行发展的新格局。

3.2.2 在研HSC-GT临床试验: 适应症拓展与技术创新 除已上市产品外, 目前全球有逾百项HSC-GT临床试验正在进行, 适应症从经典血液疾病向更多罕见病延伸^[4], 且中国团队在多个领域展现技术创新性。

在血红蛋白病治疗领域, TDT和SCD仍是研究重点, 中国已有多家企业的TDT产品获国家药品监督管理局默示临床试验许可(investigational new drug, IND), 技术路径涵盖LV基因添加及CRISPR基因编辑(CRISPR-Cas敲除*BCL11A*启动子或*HBB*调控序列、BE修改*HBB*关键碱基位点)^[4,57-58,60]。另外, 针对输血依赖型 α -地中海贫血[包括HbH-CS(Hemoglobin H-Constant Spring)患者], 国内亦有多款HSC-GT产品进入临床研究阶段, 采用的技术路线包括LV介导的*HBA*添加(HGI-002、GMCN-508A)和BE矫正CS突变位点(RM-004)^[61], 均属国际首次临床尝试, 显示中国生物创新药企业在该领域的创新突破。

另外, 对于Fanconi贫血等骨髓衰竭综合征, 尽管患者HSCs脆弱性给操作带来挑战, 但HSC-GT亦取得积极进展。临床试验表明, 通过LV导入*FANCA*基因后, 在8例患者中5例患者实现长期体内定植并部分恢复HSCs功能, 延缓骨髓衰竭进展^[62]。

在免疫缺陷疾病治疗领域, HSC-GT亦取得了显著进展。例如, 在Wiskott-Aldrich综合征(Wiskott-Aldrich syndrome, WAS)的治疗中, 研究人员使用携带*WAS*基因启动子和*WASP*基因的SIN-LV进行转导, 在13例受试者中实现了WASP蛋白稳定表达和有效的免疫重建, 且未观察到插入性致癌风险^[63-64]。在X-连锁慢性肉芽肿病(X-linked chronic granulomatous disease, X-CGD)的治疗中, 通过SIN-LV递送*CYBB*基因, 9例患者中6例中性粒细胞NADPH氧化酶活性恢复正常, 未出现新的CGD相关感染, 且未出现优势克隆扩增现象^[65]。

在溶酶体贮积症与神经系统疾病治疗领域, LV修饰后的HSCs可分化为表达治疗性酶的单核细胞, 实现跨血脑屏障的基因递送, 显著改善多种疾病表型^[8,53,66]。例如, 在黏多糖贮积症I型(mucopolysaccharidosis type I, MPS-I)治疗中, 8例患者接受LV介导HSC-GT治疗后, 严重进展性骨骼发育异常得到有效缓解, 且效果优于异体HSCT患者, 凸显HSCs作为药物载体及HSC-GT在功能基因过表达方面的优势^[67]。

综上所述, HSC-GT的临床应用正处于快速发展阶段, 已从血液系统相关疾病拓展到非血液系统相关疾病, 形成多个获批产品与多个临床试验管线。未来, 其临床应用前景不仅局限于单基因、罕见遗传病的治疗, 还可能延伸至常见的多基因疾病及中枢神经系统疾病等领域。

表1 全球获批上市的HSC-GT产品目录

Table 1 List of globally approved HSC-GT products

产品名称 Product name	生产厂家/公司 Manufacturer	上市时间(地区) Approval year (regulatory agency)	针对适应症 Indication	作用机制 Mechanism of action	核心风险 Key risks
Strimvelis	GlaxoSmithKline (GSK)/Orchard Therapeutics	2016 (EMA)	ADA-SCID	γ RV-mediated transfer of the ADA gene into patient-derived HSCs enables ADA expression, detoxifies metabolites, and restores lymphocyte development	Integration of γ RV may activate nearby proto-oncogenes (e.g., LMO2), potentially lead to leukemia; conditioning regimens may induce myelosuppression, increase infection risk, and cause hepatotoxicity and nephrotoxicity; delayed immune reconstitution may increase susceptibility to infections
Zynteglo (betibeglogene autotemcel)	Bluebird Bio	2019 (EMA) 2022 (US FDA)	TDT	LV-mediated transfer of the β^{A-T87Q} -globin gene into patient-derived HSCs promotes functional hemoglobin synthesis and reduces transfusion dependence	Potential risks of insertional mutagenesis; conditioning regimens may induce myelosuppression, increase infection risk, and cause hepatotoxicity and nephrotoxicity
Libmeldy (atidarsagene autotemcel)	Orchard Therapeutics	2020 (EMA) 2024 (US FDA)	MLD	LV-mediated transfer of the ARSA gene into patient-derived HSCs restores arylsulfatase A expression, degrades accumulated sulfatides, and slows neurodegeneration	Potential risks of insertional mutagenesis; conditioning regimens may induce myelosuppression, increase infection risk, and cause hepatotoxicity and nephrotoxicity
Skysona (elivaldogene autotemcel)	Bluebird Bio	2021 (EMA) 2022 (US FDA)	cALD	LV mediated transfer of the ABCD1 gene into patient-derived HSCs enables ALD expression, promotes very-long-chain fatty acid metabolism, and prevents neuroinflammatory damage	Integration-associated clonal dominance may lead to hematological malignancies; conditioning regimens may induce myelosuppression, increase infection risk, and cause hepatotoxicity and nephrotoxicity; therapeutic efficacy varies significantly among individuals, particularly across different disease stages
Lyfgenia (lovotibeglogene autotemcel)	Bluebird Bio	2023 (US FDA)	SCD	LV-mediated transfer of the β^{A-T87Q} -globin gene into patient-derived HSCs, enables expression of anti-sickling hemoglobin (HbA ^{T87Q}) and reduces red blood cell sickling	Reports of acute leukemia/myelodysplastic syndrome in clinical trials (causality requires further investigation); potential risks of insertional mutagenesis; conditioning regimens may induce myelosuppression, increase infection risk, and cause hepatotoxicity and nephrotoxicity
Casgevy (exagamglogene autotemcel)	Vertex Pharmaceuticals/CRISPR Therapeutics	2023 (US FDA, UK MHRA) 2024 (EMA, SFDA, CDA, Swissmedic)	SCD, TDT	CRISPR-Cas9 disrupts the BCL11A enhancer, downregulating BCL11A, reactivating HbF production, and compensating for defective HbA in SCD and TDT patients	Off-targets mutations (no significant risks observed in clinical trials); conditioning regimens may induce myelosuppression, increase infection risk, and cause hepatotoxicity and nephrotoxicity; long-term stability of HbF expression and potential clonal selection require continuous monitoring

4 造血干细胞基因治疗产品的质量研究与控制

作为细胞与基因联合治疗的典型代表，HSC-

GT的研发与临床应用需在安全性、有效性和可控性方面达到高标准。不同于传统小分子或蛋白类药物，HSC-GT属于活细胞制品，并携带外源基因修饰，

其质量研究与控制需涵盖造血干细胞生物学特性、基因修饰效率、细胞纯度和安全性等多个层面。近年来,国家药品监督管理局(NMPA)、美国FDA和欧洲EMA相继发布了相关技术指南^[68-72],其中《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》为我国细胞治疗产品的质量研究与评价提供了基础框架^[69]。结合当前主流的LV转导和CRISPR基因编辑策略,本节将从造血干细胞特性、基因修饰功效、细胞纯度与安全性四个方面进行阐述(图3)。

4.1 造血干细胞特性

HSC-GT的持久疗效依赖于HSCs的干性维持与定植能力,而多谱系分化潜能亦是其核心特征。在体外进行基因修饰过程中,需尽量避免对这些细胞特性的影响,这是质量研究的关键内容之一。

干性主要通过表型标志物与功能实验结合进行评估。在表型标识物检测方面,流式细胞术是最常用的分析手段,通过检测CD34、CD38、CD90、CD45RA、CD49f、CD133等表面抗原,可定量分析HSCs及其亚群组成。其中,CD34⁺CD38^{low}、CD90⁺CD45RA⁻等亚群被认为更能富集LT-HSCs,在生产工艺开发过程中具有重要参考价值^[73]。流式检测具有高通量、灵敏度高、可多参数分析等优点,但其结果仅能反映细胞表型状态,难以直接说明功能性

干性的保持。功能干性评价主要采用体外长期培养细胞(LTC-IC)实验与免疫缺陷小鼠移植实验。LTC-IC实验可在体外评估HSCs的长期自我更新潜能,但实验周期较长,且结果易受培养条件的影响^[74]。免疫缺陷小鼠模型(如NSG、NCG-X1等)能够验证基因改造HSCs的长期造血重建能力,是目前公认的“金标准”方法,但其成本高、周期长,且存在动物个体差异^[74]。多谱系分化能力主要通过集落形成单位(colony-forming unit, CFU)实验评估。通过检测CFU-GM、CFU-E、BFU-E、CFU-GEMM等集落,可判断产品向不同造血谱系的分化潜能。该方法操作简便,但结果多为半定量,难以全面反映长期造血功能。免疫缺陷小鼠移植同样可用于评估多谱系分化能力,但受跨物种差异性和不同鼠系遗传背景影响,可能出现分化偏倚。此外,分子层面的检测可进一步评估干性和多谱系分化能力。例如,转录组测序(RNA-seq)或单细胞RNA-seq可分析基因修饰后干性或分化相关基因网络的改变^[75]。这类方法分辨率高、能提供机制层面的信息,但成本较高且依赖专业的数据分析能力。

综合来看,HSCs的特性评价可结合表型、功能与分子三层手段,其研究既是质量控制的起点,也是保证长期疗效的关键。

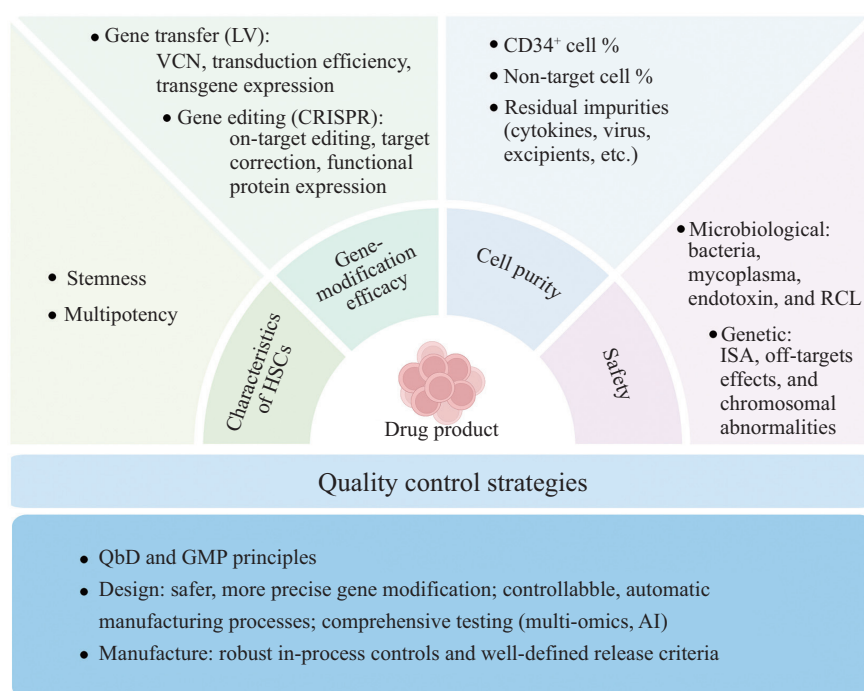


图3 HSC-GT产品的质量研究与控制框架图

Fig.3 Framework of quality research and control for HSC-GT products

4.2 基因修饰功效

基因修饰功效的质量研究旨在验证基因修饰手段在临床应用层面能否实现预期治疗效果。对于LV转导类产品,转基因的表达效率与长期稳定性是评估基因修饰功效的关键指标,其转导效率可通过数字PCR(dPCR)或定量PCR(qPCR)检测外源基因拷贝数(vector copy number, VCN),并结合CFU克隆阳性率进行量化^[76]。根据监管机构的通用建议,VCN需控制在0.5~5.0范围内,以在保障疗效的同时降低潜在安全风险。VCN检测灵敏度高、方法成熟,但仅能反映细胞群体的平均水平;CFU克隆阳性率能够评估具备克隆形成能力的细胞的转导效率,但无法区分祖细胞和LT-HSC。对于CRISPR基因编辑类产品,基因修饰功效评估更侧重于编辑效率与靶点矫正率。Sanger测序结合TIDE分析可用于快速初筛,但灵敏度有限,无法检测低频突变。结合dPCR和高通量测序(next-generation sequencing, NGS)可精准量化目标位点的插入/缺失频率或精确修复比例,但建库流程较长,测序成本较高^[77]。同时,基因修饰后目的基因的表达也是功效评价的核心维度,可通过qRT-PCR、Western blot、ELISA或流式细胞术检测mRNA与蛋白水平的变化,从而判断目的基因表达和功能性恢复。

在疾病相关功能验证方面,以TDT治疗产品为例,可通过红系分化诱导实验与高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC),验证基因修饰后的HSCs能否正常分化为成熟红细胞,并在目的细胞中稳定表达 β -球蛋白或 γ -球蛋白。此外,还可在患者来源细胞模型中评估外源珠蛋白表达是否能够矫正内源性珠蛋白失衡^[34-48]。对于其他适应症的HSC-GT产品,则需根据疾病的病理机制与治疗需求,针对性验证基因修饰细胞能否表达具有生物学活性的功能蛋白,且其表达水平是否达到临床治疗阈值^[64-65]。在体内验证方面,人源化NSG小鼠模型可用于评价HSC-GT产品的长期功能稳定性,但其周期长、成本高。

值得注意的是,基因修饰功效研究需突破分子与细胞水平的局限,构建“分子-细胞-动物模型-临床试验”的多维度评价体系。例如,在血红蛋白病的临床试验中,疗效终点通常设定为“脱离输血依赖”与“血管阻塞危象发生率降低”;而在免疫缺陷疾病中,则以“免疫细胞重建速度”和“感染事件发生频次

下降”为关键指标。这种多维度的功效评价贯穿产品研发、临床试验至上市后监测的全生命周期,通过在各阶段明确基因修饰功效放行指标,有助于确保产品生物学效应与临床获益的一致性。

4.3 细胞纯度

细胞纯度与数量是确保HSC-GT产品安全性和疗效的关键质量属性。在HSC-GT领域,细胞纯度与数量主要指回输细胞群体中HSCs的比例与绝对数量。

细胞纯度通常通过流式细胞术检测细胞表面标志物。在临床实践中,回输细胞群体中CD34⁺的占比需达到90%以上。同时,还需鉴定非目的细胞的表型特征,如检测CD3、CD19、CD14、CD56等表面标志物,以识别T、B、单核及NK细胞等杂细胞成分,以研究其对治疗效果的可能干扰。流式检测具有方便、快捷等优点,但其结果取决于选择的流式抗体,检测得到的细胞纯度可能并不能反映真正的功能细胞纯度。此外,细胞纯度控制还需涵盖残余杂质的评估与清除。例如,在病毒载体制备过程中可能残留的包装细胞成分(如细胞碎片、蛋白)、培养基添加剂(如血清白蛋白)及质粒DNA,可通过定量检测技术(如dPCR、酶联免疫吸附实验)进行排查。这些方法灵敏度高、特异性强,可作为产品放行的关键质量指标。

细胞数量的确定一般通过自动细胞计数仪或锥虫蓝计数法进行,以保证足够的回输剂量。由于HSC-GT产品基于自体HSCs移植,不存在同种异体免疫排斥风险,为缩短体内定植时间、降低移植期间感染风险,临床通常要求设定最低回输细胞剂量。HSC-GT产品的剂量一般高于HSCT的最低标准($2 \times 10^6/\text{kg}$),以确保足量HSCs参与体内造血功能重建^[78]。

在工艺控制层面,细胞纯度主要通过免疫磁珠分选技术实现,同时需在培养体系中添加适宜的细胞因子与小分子化合物,以维持HSCs的干性与活性^[79]。鉴于HSC-GT产品需保留HSCs的干性与多谱系分化能力,体外培养通常不进行长时间扩增,因此细胞数量主要由细胞采集流程决定,具体包括HSCs动员方案、单采循环时间及单采次数等因素。

4.4 安全性

安全性是HSC-GT产品研发与临床应用的核心环节,主要包括细胞治疗产品共有的微生物学安全性,以及基因修饰技术特有的遗传学安全性两大维

度。

4.4.1 微生物学安全性 微生物学安全性需确保产品符合“无菌、无支原体、低内毒素”的基本要求。无菌检测可采用培养法,方法可靠但检测周期较长;支原体检测可采用qPCR、荧光染色或培养法,其中qPCR法具有快速灵敏的优势;内毒素检测常用鲎试剂(*Limulus ameobocyte lysate*, LAL)法,可实现快速定量。对于采用病毒载体的HSC-GT产品,为避免在患者体内引发继发感染,还需特别关注是否存在复制型病毒,例如复制型慢病毒(*replication-competent lentivirus*, RCL)或复制型逆转录病毒(*replication-competent retrovirus*, RCR)。RCL检测的常用方法包括敏感细胞扩增检测及qPCR检测病毒*gag/pol*序列。敏感细胞扩增检测是药典认可的金标准,但需要使用阳性对照品,对检测环境要求高且耗时长。qPCR方法更加快捷,可作为快速放行方法。在质量研究过程中,这些微生物学风险主要通过物料管控、生产工艺(如全密闭工艺)、环境管理等进行控制。

4.4.2 遗传学安全性 遗传学安全性的核心是评估基因修饰对HSCs基因组稳定性的影响。对于病毒转导类产品,整合位点分析(*integration site analysis*, ISA)是检验遗传学安全性的核心检测手段,采用的主流技术包括结合高通量测序的线性扩增介导PCR(*linear amplification-mediated PCR*, LAM-PCR),或连接器介导PCR(*linker-mediated PCR*, LM-PCR),可实现病毒整合位点在全基因组范围内的检测^[80-81],用于评估病毒载体整合是否位于致癌基因或基因调控区附近。该类方法覆盖度高、精度好,但成本高且数据分析复杂。对于CRISPR编辑类产品,需重点关注脱靶效应与基因组结构变异风险。脱靶效应检测分为三个层面:一是计算预测(如Cas-OFFinder、CRISPOR、CCLMoff软件),用于初步筛选潜在脱靶位点^[82-84];二是实验检测(如GUIDE-seq、CIRCLE-seq),用于验证体外脱靶事件^[85-86];三是全基因组水平验证(如全基因组测序、DISCOVER-seq),用于排查低频率脱靶位点^[87]。此外,染色体易位、大片段缺失等结构性异常需通过长读长测序(如PacBio SMRT测序)、断点PCR及光学图谱技术进行评估^[88]。

同时,根据法规监管要求,由于HSC-GT产品在体内具有长期存活与分化潜能,患者需接受至少15年的长期随访,以监测克隆动力学、潜在肿瘤发生风险和免疫学变化^[18]。遗传学安全性的质量研究与

控制主要依赖于基因修饰策略的优化,包括病毒载体设计(如自失活型载体)、编辑工具的选择(如高保真Cas9变体, BE或PE编辑器)及编辑位点的筛选^[12]。

4.5 质量控制策略

在质量控制策略方面,应遵循“质量源于设计”(Quality by Design, QbD)理念,对拟开发的HSC-GT产品进行系统的分析与评估。结合临床应用场景,明确质量目标产品概况(*quality target product profile*, QTPP),并科学界定关键质量属性(*critical quality attributes*, CQAs),包括基因转导效率、目的基因表达水平、CD34⁺细胞比例、细胞数量与活力等,以确保质量与疗效及安全性的直接关联。在工艺研发过程中,应引入更安全、精准的基因修饰手段(如优化的病毒载体系统或高精度基因编辑技术);同时需重点优化HSC-GT的细胞操作工艺。在细胞采集环节,采用G-CSF联合plerixafor进行动员,可使HSCs采集量稳定在 5×10^6 CD34⁺细胞/kg以上,从而保障充足的细胞回输量^[10]。在体外培养过程中,通过优化培养条件、缩短培养时间、改进操作方法,以及添加细胞因子、转导辅剂和细胞保护添加剂等措施^[79-89-93],既能维持HSCs的干性和活性,又能提升CD34⁺细胞的基因修饰水平。此外,结合更智能可控的工艺流程(如自动化操作与密闭式工艺体系),可进一步提升操作的稳定性与可追溯性。在质量控制方面,应构建更全面的评估监测体系,实现对关键工艺参数(*critical process parameters*, CPPs)的实时识别与严格控制,确保产品质量在CQAs关键指标上的一致性与可预测性。同时,在产品的全生命周期中,应通过长期数据积累与分析,持续开展工艺验证与优化。综上,QbD理念通过“目标设定-风险评估-工艺优化-过程控制-持续改进”的全流程,帮助应对HSC-GT产品个体化制备、工艺复杂及质量属性敏感等挑战,为其质量控制策略提供关键支撑,最终推动HSC-GT产品从“实验性治疗”升级为“标准化药品”,向着“更安全、更可及、更可负担”的方向发展。

为确保HSC-GT治疗产品在临床应用中的安全性、有效性与质量可控性,其生产与放行必须严格遵循《药品生产质量管理规范》。生产环节应建立覆盖全过程的质量控制体系,结合HSC干性维持与基因修饰特性,通过严格的工艺验证明确关键控制点,包括细胞采集数量、预激活时间、病毒转导复数或CRISPR电转参数等。生产用材料需严格控制质量,

包括CD34分选磁珠、病毒载体及各类培养添加剂, 确保其无菌、无支原体、低内毒素(<0.5 EU/mL)等特性。生产线清场应制定专属操作规范, 以避免外源性污染或交叉污染。针对“一人一批、供者唯一性”的特点, 应实施唯一供者编号与全流程追溯系统, 确保每批产品的特异性与安全性。终产品放行应综合考虑多维度指标: 针对HSCs的干性和多谱系分化能力, 可设置CD34⁺细胞纯度、CFU克隆等放行项目; 针对基因修饰的有效性和安全性, 可设置VCN、转导阳性率、编辑效率、目的蛋白表达水平等放行项目; 针对细胞定植的需求, 可设置最低回输剂量; 同时, 为确保产品安全性, 还需纳入无菌、支原体、内毒素、RCL等放行项目。

此外, 放行指标与检验方法应随工艺发展与产品认知深化而不断完善, 但确证性临床试验阶段的质量控制要求应与商业化生产阶段保持一致, 以确保产品全生命周期的质量稳定性与临床应用的可靠性。

5 造血干细胞基因治疗的未来展望

HSC-GT在过去三十余年取得了突破性进展, 从早期的 γ RV载体探索, 到LV的稳定应用, 再到多款产品成功上市, 已从实验性疗法逐步发展为临床可行方案。尽管如此, HSC-GT仍处于快速演进阶段, 其未来发展将取决于技术迭代的成熟度、适应症范围的拓展以及质量评价体系的完善程度, 整体将沿技术创新、适应症扩展、质量评价升级三个维度持续推进。

5.1 技术层面: 从体外操作向体内修饰转型

目前HSC-GT均采用“细胞采集-体外修饰-回输”的模式, 其制备需经历细胞动员、分选、培养及基因修饰等复杂步骤, 存在制备成本高、质量控制风险大等问题; 且回输前需进行清髓处理, 副作用显著, 大幅降低患者依从性并削弱治疗的风险获益比。近年来, 随着靶向病毒^[94]、脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)^[95]、改造型腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)^[96]等体内递送技术的快速发展, 直接在体内对HSC进行修饰的可能性逐渐显现^[97]。LIEBER课题组^[98-99]通过筛选与工程化改造辅助依赖型腺病毒(helper-dependent adenovirus, HDAd), 显著增加了其对CD34⁺细胞的嗜好性, 并在动物模型中实现了体内递送功能性基因(转座子介导的基因组整合)

或编辑元件(CRISPR、PE), 从而在一定程度上纠正了血液系统疾病相关表型^[100-102]。此外, BREDA等^[103-104]利用CD117(c-kit)抗体偶联LNP, 实现了DNA、RNA和蛋白的递送, 在小鼠模型中完成了HSCs的体内递送和体内编辑。相比于传统的体外修饰模式, 体内HSC基因修饰不仅显著简化操作流程、降低对GMP设施的依赖、具备更高的成本效率, 还能避免体外培养过程中干性和活性的损失。若未来在递送效率、靶向特异性和免疫安全性方面进一步优化, 该策略将为HSC-GT从个性化治疗迈向标准化应用奠定重要基础。

此外, 基因编辑工具本身也在不断迭代。CRISPR-Cas9虽已在血红蛋白病等疾病中证实疗效, 但仍存在脱靶效应和结构变异风险。BE和PE等新型编辑工具的出现, 使得在无需产生双链断裂的情况下即可实现精准突变修复, 不仅提高了安全性, 也拓展了可矫正的突变范围。未来, 随着这些技术在HSCs中的编辑效率和稳定性进一步提升, 有望实现更加精准、安全的治疗方案。

5.2 应用领域: 从罕见病向多系统疾病拓展

目前HSC-GT临床试验适应症主要集中于血红蛋白病、免疫缺陷和溶酶体贮积症等少数罕见病。未来, 随着经验积累、成本下降与技术进步, 其适应症有望延伸至更多常见疾病和多基因疾病。例如, 在血液系统中, 通过向HSCs导入耐药基因并结合特定化疗药物, 骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)和部分髓系肿瘤可能成为潜在适应症^[105]; 在免疫相关疾病中, 对HSCs进行改造以产生长期稳定的工程化免疫细胞, 可用于治疗自身免疫性疾病或实现免疫耐受重建^[106-107]; 在神经系统疾病中, HSCs衍生的小胶质细胞能够跨越血脑屏障, 为阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病提供新的治疗思路^[6]; 在衰老相关疾病领域, 对衰老HSCs进行年轻化改造, 可通过免疫系统重塑延缓或治疗衰老相关疾病^[108]; 在肿瘤治疗领域, HSCs可作为长期免疫治疗平台, 在体内持续分化产生携带嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)的T细胞或巨噬细胞, 从而形成持久抗肿瘤效应^[109]。在这些新兴应用中, HSCs正突破“造血系统修复”的传统定位, 有望发展为跨系统的基因和细胞治疗核心平台。

5.3 质量评价体系: 多组学与智能化升级

当前HSC-GT质量评价主要依赖VCN测定、脱

靶分析、ISA检测、CFU分析等传统分子与细胞检测方法。随着多组学技术的发展,更全面的评价手段将逐步引入:转录组数据可反映移植细胞炎症信号水平与定植潜力,单细胞转录组学能够揭示基因修饰后HSC异质性,表观遗传组学有助于评估长期干性与分化潜能变化,多组学整合分析则为长期安全性和有效性预测提供更丰富的证据^[13-14]。此外,人工智能与大数据分析的引入,有望使克隆动力学预测、脱靶效应评估及长期风险建模更趋智能化与精准化^[84-110]。

6 小结

HSC-GT在过往三十余年中经历了从概念验证到临床应用的快速发展,多款治疗产品已获批上市,在血红蛋白病、免疫缺陷病和溶酶体贮积症等领域展现出治愈潜力,并推动基因编辑药物首次实现商业化。与传统药物相比,HSC-GT通过一次性干预有望带来长期获益。HSC-GT产品应遵循“质量源于设计”理念,符合药品生产质量管理规范要求,做好质量研究与控制,并持续改进产品的疗效与安全性,这仍是其推广应用的关键。展望未来,随着体内递送技术的成熟,新型编辑工具的迭代以及质量评价体系的升级,HSC-GT的可及性、精准性和安全性将进一步提升。其应用也将从罕见病拓展至多系统疾病,有望从面向少数患者的个性化治疗方案,发展为更通用、更及可及的先进医学干预手段,为更多复杂疾病患者带来长期安全的治愈机会。

参考文献 (References)

- [1] DONG F, ZHANG S, ZHU C, et al. Heterogeneity of high-potency multilineage hematopoietic stem cells and identification of “Super” transplantability [J]. *Blood*, 2025, 146(5): 546-57.
- [2] GRANOT N, STORB R. History of hematopoietic cell transplantation: challenges and progress [J]. *Haematologica*, 2020, 105(12): 2716-29.
- [3] CHABANNON C, KUBALL J, BONDANZA A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in its 60s: a platform for cellular therapies [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(436): eaap9630.
- [4] JOHN T, CZECHOWICZ A. Clinical hematopoietic stem cell-based gene therapy [J]. *Mol Ther*, 2025, 33(6): 2663-78.
- [5] BOOTH C, MASIUK K, VAZOURAS K, et al. Long-term safety and efficacy of gene therapy for adenosine deaminase deficiency [J]. *N Engl J Med*, 2025, 393(15): 1486-97.
- [6] BIFFI A, MONTINI E, LORIOLI L, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy [J]. *Science*, 2013, 341(6148): 1233158.
- [7] AIUTI A, BIASCO L, SCARAMUZZA S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome [J]. *Science*, 2013, 341(6148): 1233151.
- [8] FUMAGALLI F, CALBI V, NATALI SORA M G, et al. Lentiviral hematopoietic stem-cell gene therapy for early-onset metachromatic leukodystrophy: long-term results from a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial and expanded access [J]. *The Lancet*, 2022, 399(10322): 372-83.
- [9] FERRARI G, THRASHER A J, AIUTI A. Gene therapy using hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Nat Rev Genet*, 2020, 22(4): 216-34.
- [10] SUREDA A, CORBACIOGLU S, GRECO R, et al. The EBMT handbook: hematopoietic cell transplantation and cellular therapies [M]. Cham: Springer Cham, 2024: 151-7.
- [11] KOHN D B, BOOTH C, SHAW K L, et al. Autologous *ex vivo* lentiviral gene therapy for adenosine deaminase deficiency [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(21): 2002-13.
- [12] FERRARI S, VALERI E, CONTI A, et al. Genetic engineering meets hematopoietic stem cell biology for next-generation gene therapy [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(5): 549-70.
- [13] SOBRINO S, JOSEPH L, MAGRIN E, et al. Severe inflammation and lineage skewing are associated with poor engraftment of engineered hematopoietic stem cells in patients with sickle cell disease [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 3137.
- [14] SOBRINO S, MAGNANI A, SEMERARO M, et al. Severe hematopoietic stem cell inflammation compromises chronic granulomatous disease gene therapy [J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(2): 100919.
- [15] UCHIDA N, STASULA U, DEMIRCI S, et al. Fertility-preserving myeloablative conditioning using single-dose CD117 antibody-drug conjugate in a rhesus gene therapy model [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6291.
- [16] PALCHAUDHURI R, SAEZ B, HOGGATT J, et al. Non-genotoxic conditioning for hematopoietic stem cell transplantation using a hematopoietic-cell-specific internalizing immunotoxin [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(7): 738-45.
- [17] GAGELMANN N, KRÖGER N. Dose intensity for conditioning in allogeneic hematopoietic cell transplantation: can we recommend “when and for whom” in 2021 [J]? *Haematologica*, 2021, 106(7): 1794-804.
- [18] DE HAART K, ASAO K, ATAHHER Q, et al. Long-term follow-up after authorization of gene therapy: leveraging real-world data [J]. *Drug Discovery Today*, 2025, 30(5): 104337.
- [19] BLAESE R M, CULVER K W, ANDERSON W F, et al. Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD34⁺ selected autologous peripheral blood cells transduced with a human ADA gene (Amendment). National Institutes of Health [J]. *Human Gene Therapy*, 1993, 4: 521-7.
- [20] BORDIGNON C, NOTARANGELO L D, NOBILI N, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA⁻ immunodeficient patients [J]. *Science*, 1995, 270(5235): 470-5.
- [21] KOHN D B, WEINBERG K I, NOLTA J A, et al. Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency [J]. *Nat Med*, 1995, 1(10): 1017-23.

- [22] CAVAZZANA-CALVO M, HACEIN-BEY S, BASILE G V D S, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease [J]. *Science*, 2000, 288(5466): 669-72.
- [23] OTTAVIANO G, QASIM W. Current landscape of vector safety and genotoxicity after hematopoietic stem or immune cell gene therapy [J]. *Leukemia*, 2025, 39: 1325-33.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] TUCCI F, GALIMBERTI S, NALDINI L, et al. A systematic review and meta-analysis of gene therapy with hematopoietic stem and progenitor cells for monogenic disorders [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1315.
- [28] YAN K K, CONDORI J, MA Z, et al. Integrome signatures of lentiviral gene therapy for SCID-X1 patients [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(40): eadg9959.
- [29] BULCHA J T, WANG Y, MA H, et al. Viral vector platforms within the gene therapy landscape [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(53): 1-24.
- [30] BJURSTRÖM C F, MOJADIDI M, PHILLIPS J, et al. Reactivating fetal hemoglobin expression in human adult erythroblasts through BCL11A knockdown using targeted endonucleases [J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2016, 5(e351): 1-12.
- [31] PSATHA N, REIK A, PHELPS S, et al. Disruption of the BCL11A erythroid enhancer reactivates fetal hemoglobin in erythroid cells of patients with β -thalassemia major [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018, 10: 313-26.
- [32] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23.
- [33] MALI P, YANG L, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 1232033.
- [34] 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.
- [35] FRANGOUL H, LOCATELLI F, SHARMA A, et al. Exagamglogene autotemcel for severe sickle cell disease [J]. *N Engl J Med*, 2024, 390(18): 1649-62.
- [36] LOCATELLI F, LANG P, WALL D, et al. Exagamglogene autotemcel for transfusion-dependent β -thalassemia [J]. *N Engl J Med*, 2024, 390(18): 1663-76.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] HARDOUIN G, ANTONIOU P, MARTINUCCI P, et al. Adenine base editor-mediated correction of the common and severe IVS1-110 (G>A) β -thalassemia mutation [J]. *Blood*, 2023, 141(10): 1169-79.
- [42] ANTONIOU P, HARDOUIN G, MARTINUCCI P, et al. Base-editing-mediated dissection of a γ -globin *cis*-regulatory element for the therapeutic reactivation of fetal hemoglobin expression [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6618.
- [43] 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.
- [44] EVERETTE K A, NEWBY G A, LEVINE R M, et al. *Ex vivo* prime editing of patient haematopoietic stem cells rescues sickle-cell disease phenotypes after engraftment in mice [J]. *Nat Biomed Eng*, 2023, 7(5): 616-28.
- [45] AIUTI A, RONCAROLO M G, NALDINI L. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an *ex vivo* gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products [J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(6): 737-40.
- [46] CICALESE M P, FERRUA F, CASTAGNARO L, et al. Update on the safety and efficacy of retroviral gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency [J]. *Blood*, 2016, 128(1): 45-54.
- [47] MIGLIAVACCA M, BARZAGHI F, FOSSATI C, et al. Long-term and real-world safety and efficacy of retroviral gene therapy for adenosine deaminase deficiency [J]. *Nat Med*, 2024, 30(2): 488-97.
- [48] THOMPSON A A, WALTERS M C, KWIATKOWSKI J, et al. Gene therapy in patients with transfusion-dependent β -thalassemia [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(16): 1479-93.
- [49] LOCATELLI F, THOMPSON A A, KWIATKOWSKI J L, et al. Betibeglogene autotemcel gene therapy for non- β^0/β^0 genotype β -thalassemia [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(5): 415-27.
- [50] KWIATKOWSKI J L, WALTERS M C, HONGENG S, et al. Betibeglogene autotemcel gene therapy in patients with transfusion-dependent, severe genotype β -thalassaemia (HGB-212): a non-randomised, multicentre, single-arm, open-label, single-dose, phase 3 trial [J]. *The Lancet*, 2024, 404(10468): 2175-86.
- [51] RIBEIL J A, HACEIN-BEY-ABINA S, PAYEN E, et al. Gene therapy in a patient with sickle cell disease [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(9): 848-55.
- [52] KANTER J, WALTERS M C, KRISHNAMURTI L, et al. Biologic and clinical efficacy of lentiglobin for sickle cell disease [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(7): 617-28.
- [53] SESSA M, LORIOLI L, FUMAGALLI F, et al. Lentiviral haematopoietic stem-cell gene therapy in early-onset metachromatic leukodystrophy: an ad-hoc analysis of a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial [J]. *The Lancet*, 2016, 388(10043): 476-87.
- [54] EICHLER F, DUNCAN C, MUSOLINO P L, et al. Hematopoietic stem-cell gene therapy for cerebral adrenoleukodystrophy [J].

- N Engl J Med, 2017, 377(17): 1630-8.
- [55] FUMAGALLI F, CALBI V, GALLO V, et al. Long-term effects of atidarsagene autotemcel for metachromatic leukodystrophy [J]. N Engl J Med, 2025, 392(16): 1609-20.
- [56] 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.
- [57] LI S, LING S, WANG D, et al. Modified lentiviral globin gene therapy for pediatric β^0/β^0 transfusion-dependent β -thalassemia: a single-center, single-arm pilot trial [J]. Cell Stem Cell, 2024, 31(7): 961-73.e8.
- [58] ZHENG B, LIU R, ZHANG X, et al. Efficacy and safety of Br1-101, CRISPR-Cas9-mediated gene editing of the BCL11A enhancer in transfusion-dependent β -thalassemia [J]. Blood, 2023, doi: 10.1182/blood-2023-186031.
- [59] LIU R, WANG L, XU H, et al. Updated safety and efficacy results of RM-001, autologous HBG1/2 promoter-modified CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells, in treating transfusion-dependent β -thalassemia [J]. Blood, 2024, doi: 10.1182/blood-2024-206549.
- [60] LAI Y, LIU R, WANG L, et al. Rapid, efficient and durable fetal hemoglobin production following CS-101 treatment in transfusion-dependent β -thalassemia participants: an autologous, *ex vivo* edited CD34⁺ stem cell product using the innovative transformer base editor (tBE) [J]. Blood, 2024, doi: 10.1182/blood-2024-200691.
- [61] 刘倩宜, 李欣瑜, 方建培, 等. α -地中海贫血的基因治疗研究进展 [J]. 广西医科大学学报 (LIU Q Y, LI X Y, FANG J P, et al. Progress on gene therapy for α -thalassemia [J]. Journal of Guangxi Medical University), 2025, 42(5): 655-62.
- [62] RÍO P, ZUBICARAY J, NAVARRO S, et al. Haematopoietic gene therapy of non-conditioned patients with Fanconi anaemia-A: results from open-label phase 1/2 (FANCOLEN-1) and long-term clinical trials [J]. The Lancet, 2024, 404(10471): 2584-92.
- [63] MAGNANI A, SEMERARO M, ADAM F, et al. Long-term safety and efficacy of lentiviral hematopoietic stem/progenitor cell gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome [J]. Nat Med, 2022, 28(1): 71-80.
- [64] LABROSSE R, CHU J I, ARMANT M A, et al. Outcomes of hematopoietic stem cell gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome [J]. Blood, 2023, 142(15): 1281-96.
- [65] KOHN D B, BOOTH C, KANG E M, et al. Lentiviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease [J]. Nat Med, 2020, 26(2): 200-6.
- [66] GENTNER B, TUCCI F, GALIMBERTI S, et al. Hematopoietic stem- and progenitor-cell gene therapy for hurler syndrome [J]. N Engl J Med, 2021, 385(21): 1929-40.
- [67] CONSIGLIERI G, TUCCI F, PELLEGRIN M D, et al. Early skeletal outcomes after hematopoietic stem and progenitor cell gene therapy for Hurler syndrome [J]. Sci Transl Med, 2024, 16(745): eadi8214.
- [68] Committee for Advanced Therapies. Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products [Z]. London: European Medicines Agency, 2018.
- [69] 国家药品监督管理局. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)[Z]. 北京: 国家药品监督管理局, 2017.
- [70] 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)[Z]. 北京: 国家药品监督管理局药品审评中心, 2022.
- [71] 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心. 细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)[Z]. 北京: 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心, 2022.
- [72] Center for Biologics Evaluation and Research. Considerations for the design of early phase clinical trials of cellular and gene therapy products [Z]. Silver Spring, MD: Food and Drug Administration, 2020.
- [73] ANJOS-AFONSO F, BONNET D. Human CD34⁺ hematopoietic stem cell hierarchy: how far are we with its delineation at the most primitive level [J]? Blood, 2023, 142(6): 509-18.
- [74] JASSINSKAJA M, GONKA M, KENT D G. Resolving the hematopoietic stem cell state by linking functional and molecular assays [J]. Blood, 2023, 142(6): 543-52.
- [75] SAFINA K, VAN GALEN P. New frameworks for hematopoiesis derived from single-cell genomics [J]. Blood, 2024, 144(10): 1039-47.
- [76] MILONE M C, O'DOHERTY U. Clinical use of lentiviral vectors [J]. Leukemia, 2018, 32(7): 1529-41.
- [77] YAO B, YANG Q, GONÇALVES M A F V, et al. Comparative analysis of methods for assessing on-target gene editing efficiencies [J]. Methods Protoc, 2025, 8(2): 23.
- [78] YAMAMOTO C, OGAWA H, FUKUDA T, et al. Impact of a low CD34⁺ cell dose on allogeneic peripheral blood stem cell transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2018, 24(4): 708-16.
- [79] WILKINSON A C, IGARASHI K J, NAKAUCHI H. Haematopoietic stem cell self-renewal *in vivo* and *ex vivo* [J]. Nat Rev Genet, 2020, 21(9): 541-54.
- [80] WELLS D W, GUO S, SHAO W, et al. An analytical pipeline for identifying and mapping the integration sites of HIV and other retroviruses [J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 216.
- [81] OZIOLOR E M, KUMPF S W, QIAN J, et al. Comparing molecular and computational approaches for detecting viral integration of AAV gene therapy constructs [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2023, 29: 395-405.
- [82] BAE S, PARK J, KIM J S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases [J]. Bioinformatics, 2014, 30(10): 1473-5.
- [83] CONCORDET J P, HAEUSSLER M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(W1): W242-W5.
- [84] DU W, ZHAO L, DIAO K, et al. A versatile CRISPR/Cas9 system off-target prediction tool using language model [J]. Commun Biol, 2025, 8(1): 882.
- [85] 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, 2014, 33(2): 187-97.
- [86] 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]. Nature Methods, 2017, 14(6): 607-14.
- [87] 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.
- [88] AUSSEL C, CATHOMEN T, FUSTER-GARCIA C. The hidden risks of CRISPR/Cas: structural variations and genome integrity [J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 7208.

- [89] ELLISON S, BUCKLAND K, LEARMONTH Y, et al. Design and validation of a GMP stem cell manufacturing protocol for MPSII hematopoietic stem cell gene therapy [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2024, 32(2): 101271.
- [90] HEFFNER G C, BONNER M, CHRISTIANSEN L, et al. Prostaglandin E2 increases lentiviral vector transduction efficiency of adult human hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(1): 320-8.
- [91] PETRILLO C, THORNE L G, UNALI G, et al. Cyclosporine H overcomes innate immune restrictions to improve lentiviral transduction and gene editing in human hematopoietic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(6): 820-32, e9.
- [92] MASIUK K E, ZHANG R, OSBORNE K, et al. PGE2 and poloxamer synergetic F108 enhance transduction of human HSPCs with a β -globin lentiviral vector [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 13: 390-8.
- [93] DU C, LIU C, YU K, et al. Mitochondrial serine catabolism safeguards maintenance of the hematopoietic stem cell pool in homeostasis and injury [J]. *Cell Stem Cell*, 2024, 31(10): 1484-500, e9.
- [94] CORADIN T, KEATING A L, BARNARD A R, et al. Efficient *in vivo* generation of CAR T cells using a retargeted fourth-generation lentiviral vector [J]. *Mol Ther*, 2025, 33(10): 4953-67.
- [95] BRIMACOMBE C A, KULKARNI J A, CHENG M H Y, et al. Rational design of lipid nanoparticles for enabling gene therapies [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2025, 33(3): 101518.
- [96] WANG J H, GESSLER D J, ZHAN W, et al. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 78.
- [97] BALL J, BRADLEY A, LE A, et al. Current and future treatments for sickle cell disease: from hematopoietic stem cell transplantation to *in vivo* gene therapy [J]. *Mol Ther*, 2025, 33(5): 2172-91.
- [98] WANG H, GEORGAKOPOULOU A, ZHANG W, et al. HDAd6/35⁺: a new helper-dependent adenovirus vector platform for *in vivo* transduction of hematopoietic stem cells [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2023, 29: 213-26.
- [99] GEORGAKOPOULOU A, WANG H, KIM J, et al. *In vivo* HSC transduction in humanized mice mediated by novel capsid-modified HDAd vectors [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2025, 33(2): 101448.
- [100] LI C, WANG H, GEORGAKOPOULOU A, et al. *In vivo* HSC gene therapy using a bi-modular HDAd5/35⁺ vector cures sickle cell disease in a mouse model [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(2): 822-37.
- [101] LI C, WANG H, GIL S, et al. Safe and efficient *in vivo* hematopoietic stem cell transduction in nonhuman primates using HDAd5/35⁺ vectors [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2022, 24: 127-41.
- [102] LI C, GEORGAKOPOULOU A, NEWBY G A, et al. *In vivo* HSC prime editing rescues sickle cell disease in a mouse model [J]. *Blood*, 2023, 141(17): 2085-99.
- [103] 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.
- [104] SHI D, TOYONAGA S, ANDERSON D G. *In vivo* RNA Delivery to hematopoietic stem and progenitor cells via targeted lipid nanoparticles [J]. *Nano Lett*, 2023, 23(7): 2938-44.
- [105] BERTINO J R. Transfer of drug resistance genes into hematopoietic stem cells for marrow protection [J]. *Oncologist*, 2008, 13(10): 1036-42.
- [106] SHU S A, WANG J, TAO M H, et al. Gene therapy for autoimmune disease [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2014, 49(2): 163-76.
- [107] NASR M B, TEZZA S, D'ADDIO F, et al. PD-L1 genetic overexpression or pharmacological restoration in hematopoietic stem and progenitor cells reverses autoimmune diabetes [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(416): eaam7543.
- [108] LI X, ZENG X, XU Y, et al. Mechanisms and rejuvenation strategies for aged hematopoietic stem cells [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 31.
- [109] GUO Q, PARIKH K, ZHANG J, et al. Anti-HIV-1 HSPC-based gene therapy with safety kill switch to defend against and attack HIV-1 infection [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2025, 33(2): 101486.
- [110] LIN T Y, CEOLDO G, HOUSE K, et al. Modeling integration site data for safety assessment with MELISSA [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 7868.