ICS 11.100
CCS C 00

T/CIET

团 体 标 准

T/CIET 1785—2025

慢病毒载体质量控制技术规范

Technical specifications for quality control of lentiviral vectors

2025－09－02 发布 2025－09－02 实施

中国国际经济技术合作促进会 发 布

目　　次

前言 II
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 1
4 关键质量控制点 2
5 检测方法 5
6 标志、包装、运输和贮存 10
参考文献 11

前　　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国国际经济技术合作促进会标准化工作委员会提出。

本文件由中国国际经济技术合作促进会归口。

本文件起草单位：苏州博腾生物制药有限公司、北京因诺惟康医药科技有限公司、北京可瑞生物科技有限公司、翌圣生物科技（上海）股份有限公司、通标中研标准化技术研究院（北京）有限公司、途邦认证有限公司。

本文件主要起草人：陈慧、陈晖、吴丽、吴晓鹏、王成、潘兴华、张丽明、李永红、杨路遥、刘岩、吴永利、汪贤峰、时俊伟、郭一凡、徐敬铭、包瑾、孙继祥。

本文件首次发布。

慢病毒载体质量控制技术规范

1 范围

本文件规定了慢病毒载体质量控制技术的关键质量控制点、检测方法、标志、包装、运输和贮存。本文件适用于慢病毒载体质量控制技术。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 42753 实时荧光定量PCR仪性能评价通则

ZBBZH/ZY 中华人民共和国药典

T/CIET 1247-2025 高滴度慢病毒颗粒制备技术要求

3 术语和定义

3.1

慢病毒载体 lentiviral vector

一种逆转录病毒载体，能够将自身基因组整合到宿主细胞染色体中，具有较长的感染周期和高效基因转导能力，常用于基因治疗、基因功能研究等领域。

3.2

物理滴度 physical titer

直接测量病毒颗粒的总数量（包括有感染性和无感染性的病毒）。以病毒颗粒数/mL（VP/mL）、慢病毒颗粒数/mL(LP/mL)或基因组拷贝数/mL（GC/mL）等表示。

3.3

感染滴度 viral infectivity titer

衡量病毒悬液中具有感染活性的病毒颗粒浓度及致病能力的量化指标。通过单位体积内有效病毒颗粒的数量或最小有效稀释倍数进行表示，常用单位包括噬斑形成单位（PFU）、感染单位（IU）、转导单位（TU）或半数致死量（LD_{50}）等。

3.4

关键质量属性 critical quality attributes

在药品或产品开发过程中，直接或间接影响产品安全性、有效性和质量的特性。

3.5

分析方法 analytical method

为了完成检验项目而设定和建立的测试方法，详细描述了完成分析检验的每一步骤。一般包括分析方法原理、仪器及仪器参数、试剂、供试液与对照品溶液的制备，测定，计算公式及检测限度等。生物制品质量控制中采用的方法包括理化分析和生物学测定方法。

3.6

分析方法验证 analytical method validation

根据检验项目的要求，预先设置一定的验证内容，并通过设计合理的实验来验证所采用的分析方法是否符合检验项目的要求。

3.7

药典方法 compendia procedure

经国家药监部门批准的药典收载的质量标准和检验方法。

4 关键质量控制点

4.1 质粒

4.1.1 外观

质粒产品的外观（如颜色、澄清度及可见异物等）会影响质粒产品的质量，采用“目视法”对质粒的外观进行检查，一般为无色、澄清液体，无可见颗粒。

4.1.2 酶切鉴别

质粒作为目的基因的携带者，其结构和序列正确是保证产品发挥生物学效应的基础。通过特定的内切酶酶切后产生两个及以上线性片段，采用琼脂糖凝胶电泳法（AGE）进行检测，供试品条带应与对照品一致。

4.1.3 基因测序

除酶切鉴定外，需采用基因测序法（Sanger法）进一步对质粒进行鉴定，测序结果应与理论序列一致。

4.1.4 含量和 A_{260}/A_{280} 纯度

采用UV法对质粒的浓度和A_{260}/A_{280}纯度进行检测，浓度一般为1.00 mg/mL±0.20 mg/mL，纯度（A_{260}/A_{280}）应在1.80～2.00。

4.1.5 超螺旋比例

采用HPLC或CE方法对质粒的超螺旋比例进行检测，超螺旋构型的比例应不低于85%。

4.1.6 宿主菌蛋白残留（HCP）

采用Elisa方法对宿主菌蛋白残留量进行检测，残留量与质粒的质量比应不高于0.1%，即≤0.1%(w/w)。

4.1.7 宿主菌 DNA 残留（HCD）

采用QPCR方法对宿主菌DNA残留量进行检测,残留量与质粒的质量比应不高于1.0%,即≤1.0%(w/w)。

4.1.8 宿主菌 RNA 残留（HCR）

采用QPCR方法对宿主菌RNA残留量进行检测，残留量与质粒的质量比一般应不高于1.0%，即≤1.0%(w/w)；或采用琼脂糖凝胶电泳法上样5 μg样品，应无RNA可见条带检出。

4.1.9 安全性

质粒生产过程中可能引入非生产过程所需的物质，包括各种微生物、细菌内毒素等，因此需对其进行严格控制，将无菌、细菌内毒素纳入质量控制项目。

4.1.9.1 细菌内毒素

采用《中华人民共和国药典》方法对质粒的细菌内毒素进行检查，一般应小于10 EU/mg；或基于质粒的用途制定标准限度。

4.1.9.2 无菌检查

采用《中华人民共和国药典》无菌检查方法对质粒的微生物进行检查，应无菌生长。

4.2 慢病毒载体

4.2.1 外观

病毒载体溶液的外观（如澄清度、可见异物等）会影响病毒载体产品的质量，采用“目视法”对病毒载体的外观进行检查，一般应为无色至微乳白色液体，无异物。

4.2.2 pH 值

病毒载体溶液的pH值对病毒载体的稳定性有很大的影响，采用“电位法”对病毒载体的pH进行测定，一般应为6.0～8.0。

4.2.3 渗透压

病毒载体溶液的渗透压对细胞的转导有较大影响，采用“冰点下降法”对病毒载体的渗透压进行测定，一般应为200 mOsmol/kg～400 mOsmol/kg。

4.2.4 目的基因鉴定

采用逆转录PCR技术（Reverse Transcription PCR，RT-PCR）并结合琼脂糖凝胶电泳试验对病毒载体进行鉴别，目的条带应与对照一致，或目的条带大小应与理论大小一致。

4.2.5 目的基因测序

采用测序方法对载体目的基因进行测序，测序结果应与理论序列一致。

4.2.6 物理滴度

采用Elisa方法对慢病毒P24含量（物理滴度）进行检测，一般应不低于400 ng/mL或5.0×10^{9} LP/mL。

4.2.7 感染滴度

病毒的感染滴度是评估慢病毒载体感染活性的重要指标之一，病毒感染细胞后，其基因组会整合到细胞的基因组中，并表达目的蛋白，采用流式细胞仪等方法检测慢病毒载体的感染滴度，一般应不低于5.00×10^{7} TU/mL。

4.2.8 比活性

由于病毒载体包装过程和下游纯化中可能会形成无转导效力的病毒，而这些无效力的病毒载体不能将目的基因整合到细胞基因组中，因此为限制无转导效力的病毒载体水平以监测病毒载体工艺的一致性，需考察感染滴度与物理滴度的比例，即比活性。通过病毒感染滴度和物理滴度计算比值计算比活性，一般应不低于1000 TU/ng或1：500 TU/LP。

4.2.9 目的蛋白表达

慢病毒载体感染细胞后，其cDNA会整合到细胞的基因组中，并表达其特异性蛋白，以体现慢病毒载体的活性；慢病毒载体感染细胞后采用流式细胞仪测定细胞中目的蛋白的表达情况，测得结果应为有目的蛋白表达。

4.2.10 宿主细胞蛋白残留（HCP）

采用Elisa方法对病毒载体的宿主细胞蛋白残留量进行检测，一般应不高于1.0 μg/5×10^{7} TU或10.0 μg/mL。

4.2.11 宿主细胞 DNA 残留（HCD）

采用QPCR方法对病毒载体的宿主细胞DNA残留量进行检测，一般应不高于100.0 ng/5×10^{7} TU或1000 ng/mL。

4.2.12 质粒 DNA 残留

病毒载体一般由4质粒系统转染HEK293T细胞包装而来，残留的质粒可能会带来一些安全性风险，因此对质粒的残留量需要进行控制。采用QPCR方法对病毒载体的宿主细胞DNA残留量进行检测，一般应不高于10.0 ng/5×10^{7} TU或1×10^{10} copies/mL。

4.2.13 SV40 拷贝数残留

包装病毒的HEK293T细胞是转染SV40基因的人肾上皮细胞，若病毒产品中含有SV40残留，会影响病毒载体的安全性，因此需要对SV40的拷贝数残留进行控制。采用QPCR方法对慢病毒载体的SV40残留量进行检测，一般应不高于1.0×10^6 copies/5×10^7 TU或5×10^7 copies/mL。

4.2.14 E1A 拷贝数残留

包装病毒的HEK293T细胞是转染腺病毒E1A基因的人肾上皮细胞，若病毒产品中含有E1A基因残留，会影响病毒载体的安全性，因此需要对E1A的拷贝数残留进行控制。采用QPCR方法对慢病毒载体的SV40残留量进行检测，一般应不高于1.0×10^6 copies/5×10^7 TU或5×10^7 copies/mL。

4.2.15 核酸酶残留

病毒产品中的DNA残留（如宿主残留DNA和质粒残留DNA）会影响病毒载体的感染效率，因此在生产工艺中会使用核酸酶消化产品中的DNA残留杂质，而核酸酶残留过高也会影响到产品的质量，因此需要对慢病毒载体的核酸酶残留量进行控制。采用Elisa方法对病毒载体的核酸酶残留量进行检测，一般应不高于1.0 ng/5×10^7 TU或10.00 ng/mL。

4.2.16 DNA 残留片段分布分析

虽经严格的纯化工艺，但慢病毒产品中仍有可能含有宿主细胞DNA的残留。现有研究表明，一个功能基因至少在200 bp以上，因此残留DNA片段越大，风险等级越高，故需要对残留的大片段基因进行控制，在《基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则的征求意见稿》中指出，HCD的片段应小于200 bp。病毒收获液经核酸酶酶切后，仍有可能含有较大的DNA片段残留，因此需要对慢病毒载体的大片段DNA残留（＞200 bp）进行分析。采用CE-LIF法进行DNA残留片段分布分析，一般要求大于200 bp的DNA片段未检出；采用qPCR法进行分析，宿主细胞DNA片段（如≥122 bp）残留应≤100 ng/mL。

4.2.17 转染试剂残留

质粒转染HEK293T细胞生产慢病毒载体时，常会添加转染试剂以提高质粒转染效率，从而引入了转染试剂杂质。一般采用RP-HPLC方法检测转染试剂的残留，应根据加入转染试剂的类型及成份的安全性评估转染试剂的质控限度。

4.2.18 无菌检查

为保证慢病毒载体的安全性，需要对成品进行无菌检测。参照《中华人民共和国药典》通则“1101无菌检查法”对慢病毒载体进行无菌检测，要求无菌生长。

4.2.19 细菌内毒素

为保证病毒载体成品的安全性，需要对成品进行细菌内毒素检测。参照《中华人民共和国药典》通则“1143细菌内毒素检查法”对慢病毒载体进行细菌内毒素的检测，一般应小于10 EU/mL，即＜10 EU/mL；或基于产品的用途制定标准限度。

4.2.20 支原体

为保证慢病毒载体的安全性，需要对病毒进行支原体检测。根据最适样本的原则，取病毒载体的收获液进行检测能最大程度地反映污染的风险。依据《中华人民共和国药典》通则“3301支原体检查法”和《美国药典》USP<63>“MYCOPLASMA TESTS”使用培养法和指示细胞培养法（DNA染色法）对慢病毒载体的支原体进行检测，检测结果应为阴性；或基于产品使用用途和特性采用快检方法进行检测，如NAT等，检测结果应为阴性。

4.2.21 复制型慢病毒

结合法规要求，慢病毒载体的RCL检测应采用敏感细胞培养法进行检测，检测结果应为阴性；根据最适样本的原则，取病毒载体的收获液进行检测。

4.2.22 内外源病毒因子

4.2.22.1　生产用到的起始原材料、制备过程或制剂中可能添加的原材料或辅料以及生产过程中均有可能受到的病毒污染，是慢病毒载体产品内外源病毒因子污染的主要风险来源。为了保证病毒产品的质量，对于起始原材料（如生产用细胞库）应进行全面检定，工艺过程添加的原辅料也需进行内外源病毒因子的控制，病毒下游纯化过程中应做如下等控制：

a)　通过设计合理的厂房布局和气流走向保持房间正压；
b)　使用符合 GMP 要求的物料及设备系统；
c)　对人员进行严格的进入生产区域限制管理及定期的 GMP 相关培训及考核，确保符合相关资质要求等措施控制污染引入的风险。

4.2.22.2　除对上述工艺过程进行控制以防外源病毒因子污染外，为了保证病毒载体产品的质量，仍需对慢病毒载体进行内外源病毒因子的检测。结合最适样本原则，取病毒载体的收获液参照《中华人民共和国药典》通则“3302 外源病毒因子检查法”进行检测，检测结果应为阴性。

5　检测方法

5.1　质粒

5.1.1　外观

参考《美国药典》和《中华人民共和国药典》（例如：USP<790>、ChP<0901>及<0902>）制定企业内部产品的通用外观检查方法，对质粒成品的外观进行目视法检查。主要仪器设备包括：伞棚灯、澄明度检测仪等。

5.1.2　pH 值

参考《美国药典》和《中华人民共和国药典》的方法（USP<791>和ChP<0631>）制定企业内部产品的通用pH检查方法，对质粒成品的pH值进行电位法测定。主要仪器设备包括：pH计和微量电极。

5.1.3　质粒酶切鉴定

采用琼脂糖凝胶电泳法（AGE）对质粒进行酶切鉴别检测，将质粒样品稀释后用相应的限制性内切酶进行酶切处理，对酶切后的质粒样品进行琼脂糖凝胶电泳试验。主要仪器设备包括水平电泳、凝胶成像仪、电子天平、移液器、微波炉等。

5.1.4　基因测序

采用基因测序法（Sanger法）进一步对质粒进行鉴定，Sanger法是根据核苷酸在某一固定的点开始，随机在某一个特定的碱基处终止，并且在每个碱基后面进行荧光标记，产生以A、T、C、G结束的四组不同长度的一系列核苷酸，然后在尿素变性的PAGE胶上电泳进行检测，从而获得可见DNA碱基序列的一种方法。主要仪器设备包括测序仪、电泳仪等。

5.1.5　含量和 A_{260}/A_{280} 纯度

采用UV法对质粒的浓度和A_{260}/A_{280}纯度进行检测，测量其在260 nm和280 nm处的吸收值，根据朗伯比尔定律计算其浓度值，根据260 nm和280 nm处的吸收值比值计算质粒的A_{260}/A_{280}纯度。主要仪器设备包括：紫外可见分光光度计、移液器等。

5.1.6　超螺旋比例

可采用阴离子交换色谱法对质粒的不同拓扑构型进行分离，进而得到质粒超螺旋构型的比例。阴离子交换色谱法是以离子交换树脂或者化学键合离子交换剂为固定相，利用被分离组分离子交换能力的差别或选择性系数的差别而实现分离的色谱方法。质粒是一种闭合环状的DNA分子且带有负电荷，其拓扑构型分为开环、超螺旋、线性，利用不同的质粒构型其电荷的分布情况存在差异，其与阴离子交换树脂的结合力强度不同而达到分离效果。主要仪器设备包括高效液相色谱仪、分析天平、pH计、超纯水机、移液器等。

5.1.7　宿主菌蛋白残留（HCP）

采用Elisa方法对宿主菌蛋白残留量进行检测，利用捕获抗体-E.coli HCP-酶标二抗形成三明治夹心结构，加显色底物后，采用酶标仪检测分析（利用四参数拟合模型拟合标准曲线，计算样品中所含蛋白残留量），从而对质粒产品的HCP指标进行了质量控制。主要仪器设备包括酶标仪、恒温振荡器等。

5.1.8 宿主菌 DNA 残留（HCD）

通过设计特异性的引物和探针，采用qPCR的方法（Taqman探针法）进行定量检测HCD。Taqman探针是由5’端标记报告基团荧光染料与3’端标记淬灭基团染料组成的一段核酸序列。当探针完整时，邻位的淬灭基团可以通过荧光共振能量转移，大幅降低报告基团染料发出的荧光。如果存在目标序列，探针便会在其中一个引物结合位点的下游发生退火，并随着引物的延伸通过Taq DNA聚合酶切断探针上的报告基团。探针的切除将会引起报告基团染料和淬灭基团染料分离，增强了报告基团染料的信号。每经过一个循环，就会有更多的报告基因染料分子从各自的探针上切断，荧光强度会随着合成的扩增片段数量的增加而增加，从而达到定量检测HCD的目的。主要仪器设备包括实时荧光定量PCR仪、微型低速离心机、涡旋振荡器等。

5.1.9 宿主菌 RNA 残留（HCR）

5.1.9.1 方法一：通过设计特异性的引物和探针，采用 qPCR 的方法（Taqman 探针法）进行定量检测 HCR。如以 Nuclease-Free Water 为稀释剂，将 E.coli RNA 定量参考品配制成 5 个不同浓度（20、2、0.2、0.02 及 0.002 pg/μl）的标准品溶液并作标准曲线，基于标曲计算样品中残留的 HCR 量。主要仪器设备包括实时荧光定量 PCR 仪、微型低速离心机、涡旋振荡器等。

5.1.9.2 方法二：采用凝胶电泳法对宿主菌 RNA 残留进行检测，取供试品或 RNA 标准品与 SYBR Gold 染料混合，0.7%琼脂糖凝胶 180 V 电泳 15 min 后成像；若出现与标准对应条带则判 RNA 残留不合格，无条带为合格。

5.1.10 内毒素

参照《中华人民共和国药典》通则“1143细菌内毒素检查法”对质粒样品进行细菌内毒素的检测。主要仪器设备包括酶标仪、生物安全柜、涡旋振荡器等。

5.1.11 无菌检查

参照《中华人民共和国药典》通则“1101无菌检查法”对质粒样品进行无菌检查，主要仪器设备包括隔离器、培养箱、集菌仪、生物显微镜等。

5.2 慢病毒载体

5.2.1 外观

参考《美国药典》和《中华人民共和国药典》的方法（例如：USP<790>、ChP<0901>及<0902>）进行外观检测，用到的主要设备包括澄明度检测仪、伞棚灯等。

5.2.2 pH 值

参考《美国药典》和《中华人民共和国药典》的方法（例如：USP<791>和ChP<0631>）进行pH值的检测，用到的主要设备包括pH计和微量电极等。

5.2.3 渗透压

参考《美国药典》和《中华人民共和国药典》的方法（例如：USP<42>和ChP<0632>）采用“冰点下降法”对病毒载体的渗透压进行测定，用到的主要设备包括渗透压仪等。

5.2.4 目的基因鉴定

基于PCR法建立逆转录PCR技术（Reverse Transcription PCR，RT-PCR）检测方法，首先提取病毒样品中的总RNA，消化残留DNA后，以总RNA为模板，逆转录为cDNA，再以cDNA作为模板进行目的序列的PCR扩增；对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳试验，与对照质粒标准品PCR产物的电泳图谱进行比对判断目的条带是否一致，以此来鉴别慢病毒载体的目的基因，用到的主要设备包括PCR仪、电泳仪、凝胶成像仪等。

5.2.5 目的基因测序

采用Sanger法对慢病毒载体的目的基因进行测序，Sanger法是根据核苷酸在某一固定的点开始，随机在某一个特定的碱基处终止，并且在每个碱基后面进行荧光标记，产生以A、T、C、G结束的四组不同长度的一系列核苷酸，然后在尿素变性的PAGE胶上电泳进行检测，从而获得可见DNA碱基序列的一种方法。用到的主要设备包括PCR仪、电泳仪、测序仪等。

5.2.6 目的蛋白表达

由于慢病毒载体感染细胞后，其cDNA序列会整合到靶细胞的基因组中，并表达其特异性蛋白，故可通过将携带目的基因的病毒载体转导敏感细胞（如HEK293T细胞）后，经过吸附、融合、入核、反转录、转录、翻译，在细胞表面表达目的蛋白，再利用荧光标记的抗体特异性结合细胞表面表达的目的蛋白，通过流式细胞术可进行目的蛋白的表达检测。用到的主要设备包括流式细胞仪、培养箱等。

5.2.7 物理滴度

采用酶联免疫（Elisa）双抗体夹心法测定病毒的P24蛋白含量，即将抗P24的单克隆抗体包被于微孔板，待测样本加入已包被的反应孔内孵育。若样品中含有P24蛋白，则该蛋白可与孔内的抗体形成抗原抗体复合物，加入酶标抗P24单抗，孵育后，酶标抗体与抗原抗体复合物上的抗原结合，再与底物反应显色，最后用终止液终止反应。用酶标仪测定OD450值，OD450值的大小与相应的样品中的P24蛋白含量成正比，计算样品中的P24蛋白含量，进而换算为病毒物理滴度。

5.2.8 感染滴度

流式细胞仪采集的光信号包括散射光信号和荧光信号，散射光信号包括FSC（前向散射光，反应细胞的大小）、SSC（侧向散射光，反应细胞的复杂程度），因此带有荧光标记的抗体可以特异性与各种细胞表面的抗原进行结合，被激光激发后，会发射荧光信号，进而可以得到细胞表达某抗原分子强弱及比例。慢病毒载体感染细胞后，其cDNA序列会整合到靶细胞的基因组中，并表达其特异性蛋白，可以通过流式细胞仪测定细胞中成功被感染的细胞比例，再根据细胞阳性率和病毒体积可计算病毒的感染滴度，病毒载体的感染滴度以“TU/mL”表示，即每毫升病毒中含有的具有生物活性的病毒颗粒数。用到的主要设备包括流式细胞仪、培养箱等。

5.2.9 比活性

计算感染滴度与物理滴度的比例，即为比活性。

5.2.10 宿主细胞蛋白残留（HCP）

采用酶联免疫吸附法测定慢病毒载体中HCP残留量。在该方法中，能够与HCP结合的捕获抗体被固定在包被板上，往微孔中依次加入样品或HCP标准品、酶标二抗，经共孵育后形成：捕获抗体-HCP-酶标二抗的夹心复合物，然后与TMB比色底物反应生成有色产物。每个孔的吸光度与HCP的量成正比，使用四参数拟合模型拟合标准曲线，从而计算样品中HCP的残留量。用到的主要设备包括酶标仪、恒温振荡器、离心机等。

5.2.11 宿主细胞 DNA 残留（HCD）

采用定量PCR法对HCD进行检测（基于TaqMan探针法），TaqMan探针定量PCR反应体系中，包括一对PCR引物和一条探针。探针5’端标记有报告基团，3’端标记有荧光淬灭基团，并且通过碱基配对特性与模板DNA特异性地结合，结合位点位于两条特异引物之间。当探针完整的时候，报告基团所发射的荧光能量被淬灭基团吸收，分析仪器检测不到信号。而随着PCR的进行，在Taq酶的5’→3’聚合酶作用下，按照5’→3’方向延伸，当延伸到与模板结合的探针的位置时，Taq酶的5’→3’外切酶活性会将探针切断，报告基团远离淬灭基团，其能量不能被吸收，即产生荧光信号。因此，每经过一个PCR循环，荧光信号也和目的片段一样，有一个同步指数增长的过程，信号的强度就代表了模板DNA的拷贝数。因此可根据标准曲线对宿主细胞残留DNA进行检测。用到的主要设备包括荧光定量PCR仪、恒温金属浴、离心机、涡旋振荡器等。

5.2.12 质粒 DNA 残留

采用定量PCR法对质粒残留进行检测（基于TaqMan探针法），TaqMan探针定量PCR反应体系中，包括一对PCR引物和一条探针。探针5’端标记有报告基团，3’端标记有荧光淬灭基团，并且通过碱基配对特性与模板DNA特异性地结合，结合位点位于两条特异引物之间。当探针完整的时候，报告基团所发射的荧光能量被淬灭基团吸收，分析仪器检测不到信号。而随着PCR的进行，在Taq酶的5’→3’聚合酶作用下，按照5’→3’方向延伸，当延伸到与模板结合的探针的位置时，Taq酶的5’→3’外切酶活性会将探针切断，报告基团远离淬灭基团，其能量不能被吸收，即产生荧光信号。因此，每经过一个PCR循环，荧光信号也和目的片段一样，有一个同步指数增长的过程，信号的强度就代表了模板DNA的拷贝数。因此可根据标准曲线对质粒残留DNA进行检测。用到的主要设备包括荧光定量PCR仪、恒温金属浴、离心机、涡旋振荡器等。

5.2.13 SV40&E1A 拷贝数

采用定量PCR法对SV40&E1A 拷贝数残留量进行检测（基于TaqMan探针法），通过磁珠在微观界面上与核酸分子特异性地识别和高效结合，提取病毒样品的残留DNA，再对提取的DNA样品进行定量PCR测定，TaqMan探针定量PCR反应体系中，包括一对PCR引物和一条探针。探针5’端标记有报告基团，3’端标记有荧光淬灭基团，并且通过碱基配对特性与模板DNA特异性地结合，结合位点位于两条特异引物之间。当探针完整的时候，报告基团所发射的荧光能量被淬灭基团吸收，分析仪器检测不到信号。而随着PCR的进行，在Taq酶的5’→3’聚合酶作用下，按照5’→3’方向延伸，当延伸到与模板结合的探针的位置时，Taq酶的5’→3’外切酶活性会将探针切断，报告基团远离淬灭基团，其能量不能被吸收，即产生荧光信号。因此，每经过一个PCR循环，荧光信号也和目的片段一样，有一个同步指数增长的过程，信号的强度就代表了模板DNA的拷贝数。因此可根据标准曲线对SV40&E1A拷贝数残留量进行检测。用到的主要设备包括荧光定量PCR仪、恒温金属浴、离心机、涡旋振荡器等。

5.2.14 核酸酶残留

用酶联免疫吸附法测定样品中的核酸酶含量。一种对核酸酶有特异性识别的单克隆抗体被预先包被在孔板条上，将标准品和样品加入孔中，样品中存在的核酸酶与被固定的抗体结合。孵育后，洗涤孔，加入辣根过氧化物酶结合的抗核酸酶抗体，产生抗体-抗原-抗体“三明治复合物”。再洗涤去除任何未结合的抗体后，加入TMB底物溶液显色，颜色与结合的核酸酶的量成正相关。通过添加终止溶液来终止反应，然后用酶标仪检测吸光度，通过吸光度计算核酸酶的浓度。用到的主要设备包括酶标仪、涡旋振荡器、离心机等。

5.2.15 DNA 残留片段分布

5.2.15.1 方法一：采用定量 PCR 法对残留 DNA 片段分布进行分析（基于 TaqMan 探针法，可针对不同片段大小设计引物探针，如＞122 bp、＞244 bp、＞562 bp 等）。探针 5’端标记有报告基团，3’端标记有荧光淬灭基团，并且通过碱基配对特性与模板 DNA 特异性地结合，结合位点位于两条特异引物之间。当探针完整的时候，报告基团所发射的荧光能量被淬灭基团吸收，分析仪器检测不到信号。而随着 PCR 的进行，在 Taq 酶的 5’→3’聚合酶作用下，按照 5’→3’方向延伸，当延伸到与模板结合的探针的位置时，Taq 酶的 5’→3’外切酶活性会将探针切断，报告基团远离淬灭基团，其能量不能被吸收，即产生荧光信号。因此，每经过一个 PCR 循环，荧光信号也和目的片段一样，有一个同步指数增长的过程，信号的强度就代表了模板 DNA 的拷贝数。因此可根据标准曲线对残留 DNA 片段进行检测。用到的主要设备包括荧光定量 PCR 仪、恒温金属浴、离心机、涡旋振荡器等。

5.2.15.2 方法二：采用毛细管电泳法检测宿主残留 DNA 片段分布，在 dsDNA1000 凝胶缓冲液中添加荧光染料，并将其填充于毛细管中，当样品进入毛细管时，样品中残留的 DNA 片段可以瞬时与荧光染料结合形成 DNA-荧光染料复合物。在高压电场的作用下该复合物会根据 DNA 片段的大小依次通过毛细管窗口而得到 DNA 的检测信号，较小的 DNA 片段优先出峰，较大的 DNA 片段较晚出峰，进而确定待测样品中残留 DNA 片段的分布情况。用到的主要设备包括毛细管电泳仪、离心机等。

5.2.16 转染试剂残留

可采用反相色谱法进行转染试剂残留的检测，反相色谱法是利用非极性的反相介质为固定相，极性有机溶剂的水溶液为流动相，根据溶质的极性的差别进行溶质分离与纯化的洗脱色谱法。用到的主要设备包括超高效液相色谱仪、CAD检测器等。

5.2.17 无菌

参照《中华人民共和国药典》通则“1101无菌检查法”对慢病毒载体进行无菌检查。用到的主要设备包括隔离器、生物安全柜、灭菌锅、培养箱等。

5.2.18 内毒素

参照《中华人民共和国药典》通则“1143细菌内毒素检查法”对慢病毒载体进行细菌内毒素的检测。用到的主要设备包括酶标仪、生物安全柜等。

5.2.19 支原体

参照《中华人民共和国药典》通则“3301支原体检查法”和《美国药典》USP<63>“MYCOPLASMA TESTS ”使用培养法和指示细胞培养法（DNA染色法）对慢病毒载体的支原体进行检测。

5.2.20 复制型慢病毒

采用敏感细胞培养法对复制型慢病毒进行检测。对于敏感细胞培养法，实验设置包括样品组、加标对照组、阳参、阴参，与易感细胞C8166共培养5代后收集上清液，采用QPERT法进行逆转录酶活的终点检测。逆转录酶是逆转录病毒生活周期中最重要的关键元件，将噬菌体的MS2 RNA作为模板，反应体系中不添加逆转录酶。供试品通过裂解释放其可能的酶，进行qPCR检测，若存在特异性的扩增曲线，说明存在逆转录酶活性，即含有可复制的逆转录病毒RCL。

5.2.21 内外源病毒因子

结合最适样本原则，取病毒载体的收获液上清参照《中华人民共和国药典》通则“3302外源病毒因子检查法”进行检测。

5.3 方法验证

5.3.1 一般要求

符合下列情形之一的，应当对分析方法进行验证：

a) 采用新的检验方法；
b) 检验方法需变更的；
c) 采用《中华人民共和国药典》及其他法定标准未收载的检验方法；
d) 法规规定的其他需要验证的检验方法。

5.3.1.1 需验证的检测项目有：鉴别试验、杂质测定（限度或定量分析）、含量测定、生物活性（效价）测定和特性参数（如：药物溶出度、释放度等）。不需要验证的检测项目有外观、密度、重量、pH值、电导率、装量等。

5.3.1.2 验证的指标有：专属性、准确度、精密度（包括重复性、中间精密度和重现性）、检测限、定量限、线性、范围和耐用性。方法验证的指标应根据检测项目的要求，结合所采用分析方法的特点确定。同一分析方法用于不同的检测会有不同的验证要求。

5.3.2 参考验证指标

可参考《中华人民共和国药典》通则 9101 药品质量标准分析方法验证指导原则设计慢病毒样品方法验证的方案；在对慢病毒检测方法进行验证时，可根据检测目的、方法的原理、方法的技术特点等进行验证指标和验证程度的调整，设计具体的验证方案。慢病毒不同类型检测项目对应的参考验证指标见表 1。

表 1 慢病毒各类型检测项目对应参考验证指标

指标		项目				
		鉴别	杂质测定		含量测定	生物活性（效价）测定
			定量	定性		
专属性		+	+	+	+	+
准确度		−	+	−	+	+
精密度	重复性	−	+	−	+	+

表 1 （续）

指标		项目				
		鉴别	杂质测定		含量测定	生物活性（效价）测定
			定量	定性		
精密度	中间精密度	−	+	−	+	+
	重现性	−	+	−	+	+
检测限		−	−	+	−	−
定量限		−	+	−	−	−
线性		−	+	−	+	+
范围		−	+	−	+	+
耐用性		+	+	+	+	+

6 标志、包装、运输和贮存

6.1 标签

标签应包括如下内容：

a) 制剂名称；
b) 制剂数量；
c) 制剂规格；
d) 生产日期（年月日）；
e) 生产批号；
f) 存储条件；
g) 有效期。

6.2 包装

6.2.1 直接与慢病毒产品接触的包装材料，应选择低吸附、对慢病毒关键质量属性无影响的材料和容器。

6.2.2 直接与慢病毒产品接触的包装材料应满足无菌和无热源（无核酶）的要求。

6.2.3 包装内应附带慢病毒产品的使用说明，最小包装上应附带标签。

6.3 运输

6.3.1 慢病毒载体应于干冰环境下运输，并做好运输温度记录。

6.4 存储

6.4.1 慢病毒载体应在低于-80℃环境下存储，避免反复冻融和温度剧烈波动。

6.5 电子数据管理

6.5.1 使用电子数据处理系统、照相技术或其他可靠方式记录数据资料，应当有所用系统的操作规程；记录的准确性应当经过核对。

6.5.2 使用电子数据处理系统的，只有经授权的人员方可输入或更改数据，更改和删除情况应当有记录；应当使用密码或其他方式来控制系统的登录；关键数据输入后，应当由他人独立进行复核。

6.5.3 用电子方法保存的批记录，应当采用磁带、缩微胶卷、纸质副本或其他方法进行备份，以确保记录的安全，且数据资料在保存期内便于查阅。

参 考 文 献

[1] GB/T 42753 实时荧光定量PCR仪性能评价通则
[2] 中华人民共和国卫生部.药品生产质量管理规范（卫生部令第79号）[S].2011.
[3] 国家食品药品监督管理总局食品药品审核查验中心.药品GMP指南（第二版）质量管理体系[S].北京：中国医药科技出版社，2023.
[4] 国家药品监督管理局.人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则[S].2016.
[5] United States Pharmacopeial Convention.United States Pharmacopeia (USP 47-NF 42)[S].Rockville: United States Pharmacopeial Convention，2024.

中国国际经济技术合作促进会
CAPC
China Association for Promoting International Economic & Technical Cooperation

T/CIET 1785-2025

中 华 人 民 共 和 国

团 体 标 准

慢病毒载体质量控制技术规范

T/CIET 1785-2025

*

中国国际经济技术合作促进会

网址 www.capc.com.cn

中国国际经济技术合作促进会标准化工作委员会

网址 www.capcgbw.com.cn

*

开本 880×1230 1/20 印张 1.5 字数 11.2 千字

2025 年 09 月第一版 2025 年 09 月第一次印刷

*

如有印装差错 由中国国际经济技术合作促进会调换

版权专有 侵权必究

举报电话：010-68844089

T/CIET 1785-2025