

细胞与基因治疗产品评价中的基因组整合位点检测与分析

Detection and analysis of genome integration sites in cell and gene therapy product evaluation

李振东¹, 钟振鹏¹, 董风晴¹,
廉美婷¹, 彭祥翔¹, 朱国振¹,
陈一飞^{2a}, 李 刚^{2b}, 黄启宽¹

(1. 上海精翰生物科技有限公司, 上海 200120;
2. 上海药品审评核查中心, a. 创新与监管科学
发展部; b. 药理临床核查部, 上海 201203)

LI Zhen - dong¹, ZHONG Zhen - peng¹,
DONG Feng - qing¹, LIAN Mei - ting¹,
PENG Xiang - xiang¹,
ZHU Guo - zhen¹, CHEN Yi - fei^{2a},
LI Gang^{2b}, HUANG Qi - kuan¹

(1. Accurant BioTechnology Co., Ltd.
(Shanghai), Shanghai 200120, China;
2. a. Innovation and Regulatory Science
Development Department; b. Department
of GCP and GLP Inspection, Shanghai
Center for Drug Evaluation and
Inspection, Shanghai 201203, China)

作者简介: 李振东 (1990 -), 男, 主管技师, 主
要从事药物生物分析工作
通信作者: 黄启宽, 高级工程师
Tel: (021) 50833588 - 532
E - mail: qikuan.huang@accurantbio.com

摘要: 无论是体内基因治疗产品还是经体外基因修饰的细胞治疗产品, 基因修饰后的安全性评价中基因插入风险以及整合后突变风险都是关键的关注内容。随着高通量测序与生物信息学分析技术的发展, 整合位点检测与注释分析已可以为理解和判断风险提供重要的数据信息, 但尚未实现理想预测体内治疗安全性的水平。其中的核心挑战之一即是对基因组整合位点的方法学开发, 一方面是分析手段自身的技术限制, 另一方面是整合位点分析的技术规范尚无公认标准。本文分析了细胞与基因治疗产品安全性评价中的整合位点检测现状与商业化常用技术, 讨论了现有挑战与未来的解决策略。

关键词: 基因插入; 基因组整合; 生物分析; 生信分析

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.07.021

中图分类号: R97 **文献标志码:** B

文章编号: 1001-6821(2025)07-1013-07

Abstract: Whether *in vivo* gene therapy products or *in vitro* gene - modified cell therapy products, the risk of gene insertion and mutation of integration in the gene modification safety evaluation are all key contents of concern. With the development of high - throughput sequencing and bioinformatics analysis technology, integrated site detection and analysis have been able to provide important information for understanding and judging risk. However, the safety prediction has not been achieved ideally. One of the core challenges is the methodological development of integration sites detection. On the one hand, it is the technical limitation of the assays, on the other hand, there is no public technical standard for the assays. In this paper, the commercial integration site detection technologies in safety evaluation of cell and gene therapy products are introduced. The challenges and future solutions are also discussed.

Key words: gene insertion; genome integration; bioanalysis; bioinformatic analysis

在过去 20 年, 细胞与基因治疗产品在治疗肿瘤、遗传性疾病等临床应用中获得突破性进步^[1]。基因治疗产品一般通过将外源基因 (或基因编辑工具) 导入靶细胞或组织, 替代、补偿、阻断、修正、增加或敲除特定基因以发挥治疗作用。无论是导入外源基因还是编辑基因, 均存在潜在的遗传毒性风险, 以及可能的致癌性。目前在动物实验和人体临床使用中, 均发现了由于基因组整合产生的安全性风

险^[2-4]。随着高通量测序技术的发展,整合位点检测和分析技术愈发成熟,已经可以实现从多样性和偏好性等角度对整合事件进行综合评价,但是该类技术的方法学开发与结果可靠性仍面临很多挑战,尚未形成对技术细节的共识性要求。本文汇总了国内外相关合规要求,介绍了基因组整合位点的检测分析技术,讨论了现有的方法挑战,展望了未来的可能发展趋势。

1 对于基因组整合和插入突变评价的合规要求

由于细胞与基因治疗产品可能涉及对宿主基因组的修改,其安全性始终是研发过程中最为关注的问题之一。当外源遗传物质整合在基因组中,可能会通过增强子插入、启动子插入、插入失活和3'末端截断激活等机制改变原有基因表达^[5]。特别是插入到原癌基因或抑癌基因,改变癌基因的表达状态,从而增加致癌性风险。虽然目前对于基因组整合与致癌性风险之间的关系还没有系统成熟的理解,但对基因组整合位点的研究必要性得到普遍认同,并在多份国家药品监督管理局药品审评中心(Center for Drug Evaluation, CDE)和美国食品药品监督管理局(U. S. Food and Drug Administration, FDA)技术指导原则中被明确提出,涉及药学研究、非临床评价、临床随访等阶段。

在药学研究阶段,2017年12月CDE发布的《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》提出质量监控需要关注“基因进入细胞后的整合情况”^[6]。2022年5月CDE发布的《免疫细胞治疗产品药学研究和评价技术指导原则(试行)》进一步强调在生产质量研究中要关注基因插入位点和拷贝数,“由于其关系到产品的安全性和有效性,需采用适用的检测方法进行研究,探索其与安全性和疗效的相关性”^[7]。同时发布的《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》强调“应对产品的整合位点、整合稳定性和位点分布趋势进行研究,分析插入引起的致突变或致癌风险”^[8]。

在非临床安全性研究中,2021年11月CDE发布的《基因治疗产品非临床研究技术指导原则(试行)》提到“需要分析基因组改变(载体或遗传物质整合进基因组、对基因组编辑等)的特征,并评估相关潜在风险”^[4]。同期发布的《基因修饰细胞治疗产品非临床研究技术指导原则(试行)》建议综合分析风险因素,“评估潜在的插入突变、致瘤/致癌性风险”^[4]。2024年6月CDE发布的《腺相关病毒载体基因治疗产品非临床研究技术指导原则(征求意见稿)》,针对腺相关病毒(adeno-associated virus,

AAV)“应进行基因组整合分析,当存在整合至宿主基因组中的可能性时,需分析基因组整合位点,评估对宿主细胞基因组完整性的影响,以及是否带来安全性风险”^[9]。

在临床研究阶段,CDE在2021年2月发布的《免疫细胞治疗产品临床试验技术指导原则(试行)》考虑“外源基因随机整合到细胞基因组形成插入突变,导致成瘤性和恶性转化等。临床试验结束后,需要对临床试验受试者进行长期随访”^[10]。2021年11月CDE发布的《嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)治疗产品申报上市临床风险管理计划技术指导原则》强调嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)治疗产品可能存在致瘤性的安全性风险^[11]。2024年8月CDE发布的《嵌合抗原受体T细胞治疗淋巴血液系统恶性肿瘤临床试验技术指导原则(征求意见稿)》提出“申办方应高度重视CAR-T细胞产品治疗可能导致的继发肿瘤风险,在临床随访过程中持续监测克隆形成和继发肿瘤风险”^[12]。此外,2021年CDE发布的《基因治疗产品长期随访临床研究技术指导原则(试行)》以及2020年FDA发布的《Long term follow-up after admin human gene therapy products》均强调了长期随访监控整合风险的重要性^[3,13]。

2 由基因组整合/插入突变导致安全性风险的案例分析

2.1 SKYSONA (Elivaldogene autotemcel) 治疗引起继发性恶性肿瘤

SKYSONA是Bluebird Bio公司的一种体外干细胞基因治疗产品,用慢病毒载体将外源基因腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)结合盒亚家族D1号成员基因(ATP binding cassette subfamily D member 1, ABCD1)导入到自身造血干细胞中,再回输到患者体内,用于治疗肾上腺脑白质营养不良。于2022-09-16,美国FDA加速批准SKYSONA上市,用于延缓4~17岁早期活动性脑性肾上腺脑白质营养不良(cerebral adrenoleukodystrophy, CALD)男童的神经功能障碍的进展。

在SKYSONA开发过程中,曾有3例儿童被诊断出患有骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)^[14]。其中2例发生在给药后的2年内,并确认是由于慢病毒整合到原癌基因的克隆扩增所致。这2个受试者都存在一个主克隆,称为MDS1和EVI1复杂基因座(MDS1 and EVI1 complex locus, MECOM),并且Ecotropic病毒整合位点1基因

(Ecotropic viral integration site 1, *EV1*) 过度表达。*MECOM* 的倒位或易位是导致 *MDS* 和急性髓细胞性白血病 (acute myeloid leukemia, *AML*) 的已知原因, *EV1* 的过度表达与不良预后相关。

此外,另外 4 例儿童也可能发展成 *MDS*,因为这些儿童的原癌基因上的整合位点相对频率在增加。FDA 咨询委员会曾就该产品的风险与获益会议讨论,并认为其对患者的益处大于风险。但由于其肿瘤生成风险,根据联邦食品、药品和化妆品法案第 505 (o) 条,申办方将开展一项为期 15 年的上市后安全性研究,即药物上市后监测,以进一步表征 *SKYSONA* 治疗引起的继发性恶性肿瘤的严重风险 (研究编号 REG-502)。

2.2 FDA 要求更新 CAR-T 细胞疗法的黑框警告

自 2023 年 7 月起, FDA 调查已获批上市的 6 款 CAR-T 产品治疗后发生 T 淋巴瘤的情况,并评估采取监管措施的必要性。虽然上市的产品的总体获益超过潜在致癌风险,但可以确定这些 CAR-T 疗法存在继发性 T 细胞恶性肿瘤风险。文章中也提到, CAR-T 产品迄今为止与继发性肿瘤的关联较少,但是仍然存在基于基因组整合或其他机制导致肿瘤发生的可能性。通过对 3 例接受 CAR-T 治疗后发生癌变的患者进行基因测序,结果均发现恶性细胞克隆中存在 *CAR* 基因,这表明 CAR-T 产品很可能参与了这些患者的 T 细胞肿瘤的发生。同时文章建议接受产品治疗的患者和临床试验参与者终身接受安全性监测^[15]。

于 2024-04-18, FDA 正式要求更新 CAR-T 细胞疗法的黑框警告,提醒患者和处方医师继发性 T 细胞恶性肿瘤的风险。FDA 要求对这些产品标签中的警告和注意事项、上市后经验、患者咨询信息和用药指南部分进行修改和更新。同时,接受这些产品治疗的患者和临床试验参与者还应该终身监测继发性 T 细胞肿瘤的发展风险^[16]。这说明了整合位点的检测对于患者的安全性至关重要。

2.3 对腺相关病毒载体类产品的讨论关注

虽然 AAV 是一种非整合性病毒,通常以游离的形式存在于宿主细胞中,随染色体复制,但是 AAV 也可以发生低频率的定向整合。

针对 AAV 病毒载体的基因组整合与致癌风险, FDA 在 2021 年 9 月召开基于 AAV 的基因治疗产品临床前和临床阶段由于病毒整合导致的致癌风险以及其他安全性风险咨询会议。会议中,专家分析了 AAV 基因治疗药物的临床前和临床阶段的数据,发现

了 AAV 整合于基因组中的证据,但没有直接的证据证明其致癌,需要长期随访关注其安全性^[17]。

值得关注的是, AAV 的反向末端重复 (inverted terminal repeats, *ITR*) 序列通常 GC 含量高,会形成发夹结构,而且整合的过程中 *ITR* 还会发生截断。因此, AAV 类基因治疗药物的整合位点检测更复杂,开发难度更高。

3 整合位点分析方法

目前国内外技术指导文件中并未具体指定应用哪种整合位点的检测方法。现有的整合位点的检测多是基于分子生物学的方法,评估是否发生基因组整合以及基因组整合的位置。传统的检测方法有 Southern blot 和反向聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, *PCR*) 等^[18-19], 这些分析方法分辨率有限且检测效率低,无法确定整合事件发生的准确位置,也无法评估整合事件是否为随机发生。随着测序技术的发展,进一步推动了整合位点的序列分析的精度。

3.1 线性扩增介导的 PCR (linear amplification-mediated PCR, *LAM-PCR*)

LAM-PCR 方法的主要原理是针对长末端重复 (long terminal repeats, *LTR*) 设计生物素标记的引物并进行线性扩增,后通过磁珠分离富集载体-基因组连接处。然后在半固体链霉亲和素相上进行双链合成、限制性内切酶酶切、连接盒连接,高温变性,最后通过针对 *LTR* 序列和接头的引物进行巢式 *PCR* 等步骤,完成文库构建,文库通过二代测序来鉴定未知的基因组序列^[20]。*LAM-PCR* 的方法依赖限制性内切酶,选择合适的限制性内切酶对整合位点鉴定至关重要。为了鉴定更全面的整合位点,一般会用具有不同限制性位点的多种酶。但是多种酶组合也不一定能够完全识别出转染样品中存在的所有整合位点。

3.2 非限制性线性扩增介导的 PCR (non-restrictive linear amplification-mediated PCR, *nrLAM-PCR*)

非限制性线性扩增介导的 *PCR*, 是对传统 *LAM-PCR* 的改进,不用限制性内切酶,其技术路线为:针对 *LTR* 设计生物素标记的引物并进行线性扩增,后通过磁珠分离来富集载体-基因组连接处。*nrLAM-PCR* 与 *LAM-PCR* 用限制性内切酶不同,在半固体链霉亲和素相上用连接酶将单链脱氧核糖核酸 (deoxyribo nucleic acid, *DNA*) 和扩增产物连接,最后通过针对 *LTR* 序列和接头的引物进行巢式 *PCR* 等步骤,完成文库构建,文库通过二代测序来鉴定未知的基因组序列^[21]。相比于 *LAM-PCR*,不用进行双

链 DNA 合成和限制性酶切,实验操作更简便,减少了实验成本并缩短了实验周期。

通过比较 2 种方法发现, nrLAM - PCR 相比于 LAM - PCR 有更好的重复性(2 次重复结果相关性 0.999)和准确性(nrLAM - PCR 的检测的结果更接近定量 PCR,相关性 0.997)^[22]。因此, nrLAM - PCR 逐渐取代了 LAM - PCR。

3.3 连接介导的 PCR (ligation - mediated PCR, LM - PCR)

LM - PCR 是一种高灵敏度的方法,近年来,其运用越来越广泛。LM - PCR 首先对整合病毒载体的基因组进行打断,打断后的片段两侧连接剃刀形的接头。再经过巢式 PCR,将测序接头序列添加至文库两端,即可进行测序。整个方法操作简便,灵敏度高,是整合位点检测的理想选择。剃刀形的接头双链端增加了氨基修饰,阻止 PCR 过程中接头自延伸成完整的双链,其优势是减少非目的片段文库被扩增,保证包含载体 LTR 片段的文库尽可能多地被扩增和测序。在接头中通常设计独特的分子标签(unique molecular identifier, UMI),可以标记每一拷贝的原始分子。通过生信分析,即可计算出每种整合位点的相对丰度,从而识别异常扩增的克隆。由于病毒等载体两侧的 LTR 序列高度同源,如针对 3'端 LTR 设计引物向下游扩增,那么引物也会从 5'端 LTR 向下游扩增,也就是扩增载体内部的序列,这样就会产生非特异性的产物,测序将会有一半的无效数据无法用于分析。有方法针对非目标区域设计封阻物,阻止非目标区域的扩增和无效的测序数据^[23]。当然,是否设计封阻物应综合考虑成本和流程复杂程度。

3.4 杂交捕获测序(target enrichment sequencing, TES)

杂交捕获法是下一代测序(next - generation sequencing, NGS)靶向测序常用的方法,首先针对目标基因区域设计探针,其次根据碱基互补配对的原则将生物素标记的探针与构建好的基因组文库进行杂交,再经过生物素和链霉亲和素的捕获,富集目标区域,即可对目标区域进行测序和序列分析^[24]。对于整合位点检测,可针对载体序列,特别是 LTR 序列设计探针。由于探针有一定的容错性,针对 LTR 的探针可以将载体 LTR 序列及附近的基因组序列一并进行捕获,捕获后的文库经过 PCR 扩增和测序,可用于后续整合位点分析。需要注意的是, LTR 序列为病毒或其他载体序列,整合位置附近是人基因组序列,两者的参考基因组不同,需要对生物信息算法进行配置和优化。

杂交捕获法相对于 LAM - PCR/LM - PCR 类的扩增子建库方法,不会发生偏好扩增的现象,各整合位点相对均匀地反映原始分子的拷贝数。但是由于基因组区域的位置和序列未知,无法针对其序列设计探针,只能针对载体 LTR 序列设计探针并附带捕获出基因组序列,因此检测效率可能没有 LM - PCR 的方法高。同时,杂交捕获法建库时间和周期更长。

3.5 全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)

WGS 是通过对整个人类基因组进行测序,找到整合性载体序列的位置,从而提供一种全面分析基因组插入位点的方法。理论上全基因组测序能够检测到所有潜在的整合位点,包括其他方法难以检测到的位点。全面性和无偏性是其最主要优点,但面临的挑战是高昂的成本和大量数据的分析需求。由于人基因组有 3 Gb 碱基对,如果实现 10% 的整合位点灵敏度,测序数据量需要约 300 Gb,仅测序成本就近万元人民币。然而, LM - PCR 仅仅对整合区域进行测序,通常 1~2 Gb 可以实现 1×10^{-4} 水平的灵敏度。因此,全基因组测序全面性和无偏性的实现需要较大的代价,现实检测中应用受限。

4 对基因测序结果的生物信息学分析

由于 NGS 高通量的测序数据的复杂性,需要开发生物信息学工具来处理测序数据,实现整合位点检测、信息注释和定量,进而分析整合位点的多样性和安全性,通常包括过滤载体元件、基因组比对、整合位点识别与注释、多样性分析等。

过滤载体元件是指从原始测序结果中筛选匹配载体元件的测序读数,并裁剪掉接头和 LTR 载体元件。一般常用短序列比对工具,如基本局部比对检索工具(basic local alignment search tool, BLAST),将测序结果与基因组序列进行比对,并根据比对结果和预设的过滤策略,去除可能由建库或测序过程错误引入的背景噪声。通过基因组比对结果识别整合位点,并定量整合位点的相对丰度和过滤假阳性位点。继而,对识别出的整合位点进行基因信息注释,包括基因组区域信息、基因功能区、转录功能单元、CpG 岛、癌症相关基因等。最后,基于多样性指标(香农指数、基尼系数等)来评估整合位点在基因组中的分布多样性。

4.1 整合位点生信分析算法

随着 NGS 测序技术和相关生信算法的发展,在过去的 10 年也涌现了许多整合位点检测的生信分析方法或分析软件。

INSPIRED^[25]用 BLAST 工具进行序列比对,序列

中与 LTR 序列完全一致并且与宿主基因组之间一致度超过 75% 时,才纳入整合位点检测。PIC^[26] 流程用 Bowtie2^[27] 进行序列比对, Bowtie2 与 BLAST 相比,具有更快的比对效率和更少的计算资源消耗。IS-Seq^[28] 作者也发现另一种短序列比对工具 BWA^[29] 比 BLAST 具有更高的效率和准确性。升级版本 VISPA2^[30] 用 BWA 作为比对工具,分析速度提升 6 倍并且具有更高的准确性。

PIC 先用高质量 reads 进行整合位点识别,基于识别的位点,对由于重复区或者同源区导致多重比对的 reads 进行回捞,提高整合位点丰度的准确性。PIC 作者还发现用去除接头和载体元件后的 reads 进行比对,能够提升比对质量、并减少耗时^[26]。ISA-Analysis-Pipeline^[31] 和 IS-Seq^[27] 都发现,需合并基因组上临近整合位点,从而提高整合位点丰度的准确性,ISA-Analysis-Pipeline 合并 10 bp 以内的整合位点,IS-Seq 合并 7bp 以内的整合位点。VSeq Toolkit^[32] 工具支持 LAM-PCR、TES 和 WGS 的数据分析,具有更广泛的应用范围。INSERT-seq^[33] 是基于长读长的三代测序开发出来的整合位点识别工具,能够提升在基因重复区、高 GC 含量区、同源区附近整合位点识别的准确度。上述软件都支持对检测到整合位点进行基因信息注释,研究者也可以用 Python 或者 R 等工具基于公共数据库信息进行个性化的信息注释和数据分析。HAMADA 等^[34] 定义了 5 个基因组安全区,不在安全区内的整合位点可能会影响基因表达或者生物学功能。

4.2 多样性评估

INSPIRED 软件支持 Chao1、香农指数 (Shannon index)、基尼系数以及 UC50 指标来评估整合位点的多样性。香农指数广泛应用于物种多样性评估,同样也常用于评估整合位点多样性。香农指数与整合位点的多样性呈正相关,整合位点在基因组上分布得越均衡,香农指数则越高。基尼系数 (Gini coefficient) 可用来衡量基因组上整合位点的平均程度,基尼系数取值范围为 0~1,基尼系数越小,分布越平均;基尼系数越大,整合位点分布越不均一,基尼系数为 1 表明该整合位点为单克隆。Chao1 指数越高表明有更多未被观察到的插入位点,可能意味着更高的多样性。UC50 表示达到样本所有整合位点丰度的前 50% 时对应整合位点的数量,数值越大表明整合位点丰度越均一,数值越小表明样本中整合位点分布越不均匀。由于文库大小、整合效率等原因,不同样本整合位点的多样性存在批间差异。DEL CORE 等^[35] 通过形状约束

样条 (shape constrained splines, SCS) 方法来标准化批间差异,并提出 SCS 熵来表示样本中整合位点的多样性。

如上述提到的 Chao1、香农指数、基尼系数、UC50 及其他整合位点多样性评估指标,目前尚无明确的阈值范围来定义整合位点的多样性或者安全性是否可控。

5 讨论

基因治疗产品可能会通过随机插入、基因组整合、脱靶编辑等干扰宿主的关键基因表达,激活原癌基因或抑制抑癌基因,从而增加恶性肿瘤的风险。因此,通过对基因治疗产品在体内外的基因组整合位点分析,获得遗传毒性、致癌性的提示信息对评价产品的安全性与制定风险控制措施具有必要性,对长期随访的临床研究设计具有重要指导作用。

整体上看,现有的检测方法仍处于商业化应用的早期,行业尚未积累系统的成熟经验,也未能提出对方法学验证要求、检测能力确认标准及对照标准品制备的共识要求,这既是对检测方法的开发和验证提出挑战,又会影响检测结果的可靠性。

从方法学开发的角度,由于不同基因表达/编辑载体两端的 LTR 序列、ITR 序列、二级结构、GC 含量等各有不同,需要开发相匹配的方法,通过引物与探针设计,建立不同的方法学。如果引物和探针与序列匹配不佳会进一步影响整合位点检出的效率。因此,方法学的优化对于整合位点的检出以及安全性的评估十分重要。

从方法学验证的角度,优化好的方法要进行完整的性能确认,目前没有法规或共识规定性能确认要做哪些验证指标,在实践中可参考美国病理家协会 (College of American Pathologists, CAP) 和国际标准化组织 15189 (International Organization for Standardization 15189, ISO15189) 对于 NGS 的通用验证准则,验证指标通常包括准确度 (通常与测序金标准 Sanger 法进行一致性比较)、精密度、灵敏度 (位点相对丰度、建库投入量、测序数据量等)、特异性和稳定性等。验证的样本可以用转导病毒的单克隆细胞株,其整合位点背景清晰。也可用细胞与基因治疗的细胞注射液作为验证样本,此类样本通常含有丰富多样的整合位点。以所有整合位点为验证目标,难以实现 100% 重复检出,建议以高丰度的位点为研究对象。此外,还可以用世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 整合位点标准品进行验证测试。

从结果解读的角度,整合位点的分析内容一般包

括整合位点的位置信息,整合位点的多样性信息,整合位点的功能区分布信息和癌基因整合偏好性分析等。对于整合性载体,整合位点较多,很难通过单个原癌基因附近的整合位点解读致癌性风险,而要对所有整合位点进行统计学分析,分析整合位点的多样性和偏好性。值得提出的是,现有技术手段尚不能分析某一整合位点在所有有核细胞中的整合频次比例,只能计算某个整合位点占有所有整合位点的相对丰度。

FDA对Bluebird Bio公司的慢病毒载体类基因治疗产品ZYNTEGLO(Betibeglogene autotemcel)和SKYSONA的评审报告中提出,将异常克隆性定义为任何插入位点的相对丰度 $\geq 10\%$,且病毒载体拷贝数(viral copy number, VCN)大于或等于0.1拷贝/细胞基因组(copies/diploid genome, c/dg)。由于回输后患者的血液中被整合的细胞只占有所有有核细胞的一部分,因此结合病毒拷贝数的结果综合判断是否有恶性扩增的细胞克隆是十分合理和必要的。审评建议如果基于临床表现、症状、插入位点的位置及其增长速度,存在患者发展为恶性肿瘤的风险,应采取额外的临床和分子检测,以进一步评估潜在恶性肿瘤的风险^[14-15]。这些已上市品种的经验为基因组整合位点的结果解读提供了宝贵的借鉴。

综上所述,基因组整合位点的检测与分析对于基因治疗产品的评价与风险控制具有重要意义,得到各方的广泛认同与关注。检测的方法学验证、性能指标要求、分析内容等的差异会导致检测结果发生变化,但由于该类分析方法仍属于较新的检测手段,有很多技术细节需要进一步的研究和验证,现阶段并无明确的规范性要求。因此,期待行业各方的协同探索,形成探索性共识,共同为基因治疗领域的高质量创新与发展保驾护航。

参考文献:

- [1] BAKER D J, ARANY Z, BAUR J A, et al. CAR T therapy beyond cancer; the evolution of a living drug [J]. *Nature*, 2023, 619 (7971): 707—715.
- [2] 刘敏, 陈艳, 唐文雅, 等. 113例含靶向B细胞受体相关蛋白CD19的嵌合抗原受体T细胞治疗产品的临床试验个例安全性快速报告分析及风险管理[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40 (18): 2757—2760.
- [3] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《基因治疗产品长期随访临床研究技术指导原则(试行)》的通告(2021年第50号)[EB/OL]. 2021-12-01 [2024-10-24]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/c9de887410ddcc291ce5a1e039a241c6>.
- [4] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《基因治疗产品非临床研究评价技术指导原则(试行)》的通告(2021年第49号)[EB/OL]. 2021-11-30 [2024-10-24]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/41bc557bec23a6ebfb0e148ce989f041>.
- [5] BUSHMAN F D. Retroviral insertional mutagenesis in humans: Evidence for four genetic mechanisms promoting expansion of cell clones[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(2): 352—356.
- [6] 国家食品药品监管总局. 总局关于发布细胞治疗产品研究与评价技术指导原则的通告(2017年第216号)[EB/OL]. 2017-12-08 [2024-10-24]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqtggtg/20171222145101557.html>.
- [7] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》的通告(2022年第30号)[EB/OL]. 2022-05-26 [2024-10-24]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/0584963a84e01bb4d83022f559d22144>.
- [8] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》的通告(2022年第31号)[EB/OL]. 2022-05-26 [2024-10-24]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/c0ec5e347ba84df67b75e15f6ad3f3f>.
- [9] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于《腺相关病毒载体类体内基因治疗产品临床试验申请药学研究与评价技术指导原则(征求意见稿)》征求意见的通知[EB/OL]. 2023-07-25 [2024-10-24]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/c81e168ac50a3bc7cf325a71f7742568>.
- [10] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《免疫细胞治疗产品临床试验技术指导原则(试行)》的通告(2021年第14号)[EB/OL]. 2021-02-09 [2024-10-24]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1936d1c9006ccce2251702221f063b1c>.
- [11] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)治疗产品申报上市临床风险管理计划技术指导原则》的通告(2022年第15号)[EB/OL]. 2022-01-26 [2024-10-24]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/574e71202540d2b38c34df6b5673a86>.
- [12] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于公开征求《嵌合抗原受体T细胞治疗淋巴瘤血液系统恶性肿瘤临床试验技术指导原则(征求意见稿)》意见的通知[EB/OL]. 2024-08-01 [2024-10-24]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/724c91dc92e74d209d4efb685062babbb>.
- [13] FDA. CBER. Long term follow-up after administration of human gene therapy products [EB/OL]. 2020-01-30 [2024-10-24]. <https://www.fda.gov/media/113768/download>.
- [14] FDA. Cellular, tissue, and gene therapies advisory committee meeting [EB/OL]. 2022-06-09 [2024-10-24]. <https://www.fda.gov/media/159010/download>.
- [15] VERDUN N, MARKS P. Secondary cancers after chimeric antigen receptor T-cell therapy [J]. *N Engl J Med*, 2024, 390(7): 584—586.
- [16] FDA. FDA Requires boxed warning for T cell malignancies following treatment with BCMA-directed or CD19-directed autologous

- chimeric antigen receptor (CAR) T cell immunotherapies [EB/OL]. 2024 - 04 - 18 [2024 - 10 - 24]. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/fda-requires-boxed-warning-t-cell-malignancies-following-treatment-bcma-directed-or-cd19-directed>.
- [17] FDA. Cellular, tissue, and gene therapies advisory committee September 2 - 3, 2021 meeting announcement [EB/OL]. 2021 - 09 - 02 [2024 - 10 - 24]. <https://www.fda.gov/advisory-committees/advisory-committee-calendar/cellular-tissue-and-gene-therapies-advisory-committee-september-2-3-2021-meeting-announcement>
- [18] ROHDEWOHL D H, WEIHER H, REIK W, *et al.* Retrovirus integration and chromatin structure; Moloney murine leukemia proviral integration sites map near DNase I - hypersensitive sites [J]. *J Virol*, 1987, 61 (2) : 336—343.
- [19] OCHMAN H, GERBER A S, HARTL D L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction [J]. *Genetics*, 1988, 120 (3) : 621—623.
- [20] SCHMIDT M, SCHWARZWAELDER K, BARTHOLOMAE C, *et al.* High - resolution insertion - site analysis by linear amplification - mediated PCR (LAM - PCR) [J]. *Nat Methods*, 2007, 4 (12) : 1051—1057.
- [21] PARUZYSKI A, ARENS A, GABRIEL R, *et al.* Genome - wide high - throughput integrome analyses by nrLAM - PCR and next - generation sequencing [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5 (8) : 1379—1395.
- [22] GIORDANO F A, APPELT J U, LINK B, *et al.* High - throughput monitoring of integration site clonality in preclinical and clinical gene therapy studies [J/OL]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2015, 2 : 14061. 2015 - 04 - 01 [2024 - 07 - 28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26052530/>.
- [23] SHERMAN E, NOBLES C, BERRY C C, *et al.* INSPIRED: A pipeline for quantitative analysis of sites of new DNA integration in cellular genomes [J/OL]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2016, 4 : 39—49. 2016 - 12 - 18 [2024 - 07 - 28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28344990/>.
- [24] KOZAREWA I, ARMISEN J, GARDNER A F, *et al.* Overview of target enrichment strategies [J/OL]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2015, 112 : 7. 21. 1—7. 21. 23. 2015 - 10 - 01 [2024 - 07 - 28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26423591/>.
- [25] BERRY CC, NOBLES C, SIX E, *et al.* INSPIRED: Quantification and visualization tools for analyzing integration site distributions [J/OL]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2016, 4 : 17—26. 2016 - 12 - 18 [2024 - 07 - 28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28344988/>.
- [26] ROSEWICK N, HAHAUT V, DURKIN K, *et al.* An improved sequencing - based bioinformatics pipeline to track the distribution and clonal architecture of proviral integration sites [J/OL]. *Front Microbiol*, 2020, 11 : 587306. 2020 - 10 - 20 [2024 - 07 - 28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33193242/>.
- [27] LANGMEAD B, SALZBERG SL. Fast gapped - read alignment with Bowtie 2 [J]. *Nat Methods*, 2012, 9 (4) : 357—359.
- [28] YAN A, BARICORDI C, NGUYEN Q, *et al.* IS - Seq: A bioinformatics pipeline for integration sites analysis with comprehensive abundance quantification methods [J]. *BMC Bioinformatics*, 2023, 24 (1) : 286.
- [29] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows - Wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25 (14) : 1754—1760.
- [30] SPINOZZI G, CALABRIA A, BRASCA S, *et al.* VISPA2: A scalable pipeline for high - throughput identification and annotation of vector integration sites [J]. *BMC Bioinformatics*, 2017, 18 (1) : 520.
- [31] 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.
- [32] AFZAL S, FRONZA R, SCHMIDT M. VSeq - Toolkit: Comprehensive Computational analysis of viral vectors in gene therapy [J/OL]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2020, 17 : 752—757. 2020 - 03 - 30 [2024 - 07 - 28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32346552/>.
- [33] IVANČIĆ D, MIR - PEDROL J, JARABA - WALLACE J, *et al.* INSERT - seq enables high - resolution mapping of genomically integrated DNA using Nanopore sequencing [J]. *Genome Biol*, 2022, 23 (1) : 227.
- [34] HAMADA M, NISHIO N, OKUNO Y, *et al.* Integration mapping of piggyBac - mediated CD19 chimeric antigen receptor T cells analyzed by novel tagmentation - assisted PCR [J/OL]. *EBioMedicine*, 2018, 34 : 18—26. 2018 - 08 - 03 [2024 - 08 - 27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30082227/>.
- [35] DEL CORE L, CESANA D, GALLINA P, *et al.* Normalization of clonal diversity in gene therapy studies using shape constrained splines [J]. *Sci Rep*, 2022, 12 (1) : 3836.

(收稿日期 2024 - 10 - 30)