重组腺相关病毒产品的生产工艺要点及已上市案例分析

Key Production Process Points and Marketed Cases Analysis of Recombinant Adeno-associated Virus Products

孙程洁，卓　阳*
（上海药品审评核查中心，上海　201203）

SUN Chengjie, ZHUO Yang*
(*Shanghai Center for Drug Evaluation and Inspection, Shanghai 201203*)

摘要：重组腺相关病毒产品为经设计和重组改造所形成的、用于携带外源目的基因（或核酸片段）的病毒载体，属于体内基因治疗产品，其生产平台常见的主要有三质粒瞬转系统及昆虫细胞 / 杆状病毒系统。该文重点梳理了重组腺相关病毒产品的生产平台技术特点、优势、劣势以及上下游工艺要点并结合实例分析，以期为该类产品的生产实践、质量管理、上市监管提供理论指导。

关键词：腺相关病毒；基因治疗；生产工艺；重组

中图分类号：TQ464.6　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)08-1156-07

引用：孙程洁 , 卓　阳．重组腺相关病毒产品的生产工艺要点及已上市案例分析 [J]．中国医药工业杂志 , 2024, 55(8): 1156-1162．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.08.018

腺相关病毒（adeno-associated virus，AAV）载体是目前体内基因治疗产品中广泛使用的载体之一。与其他病毒载体相比，AAV 具有感染能力强、可持续表达目的基因、无致病性和非基因组整合等优点，并被广泛应用于基因缺陷型罕见病治疗领域 [1—2]。截至 2023 年 9 月，共有 7 款重组腺相关病毒（recombinant adeno-associated virus，rAAV）产品被 FDA 或 EMA 批准上市（包含已退市产品），如表 1 所示。其中，近 2 年 FDA 或 EMA 共批准了 4 款 rAAV 产品，审批速度明显加快，为罕见病患者的治疗提供了希望。国内目前也已有多款产品已获得临床试验申请默示许可，其中有 3 款产品已进入关键临床阶段。国家药品监督管局药品审评中心近年来对于基因治疗产品发布了多个指导原则，对基药学、非临床、临床方面均提出了相关要求 [3—5]。

本文总结和梳理了 rAAV 产品的生产工艺特点、上下游生产控制要求，并结合 FDA 已上市审评案例分析，以期为相关产品的上市监管提供参考。

收稿日期：2024-05-29

作者简介：孙程洁（1993—），女，工程师，从事生物制品监管的研究。

通信作者：卓　阳（1984—），女，硕士，工程师，从事药品注册管理的研究。

E-mail：zhuoyang@smda.sh.cn

1　AVV 载体生产平台

AAV 是一种小型无囊膜单链 DNA（single stranded DNA，ssDNA）细小病毒，可作为载体转导细胞进行长期转基因表达。迄今为止，已经分离和研究了约 12 种天然血清型和 100 多种 AAV 变体作为基因递送载体 [6]。AAV 本身由 *rep* 基因和 *cap* 基因以及两侧的 2 个反向末端重复序列（inverted terminal repeat，ITRs）构成。rAAV 则是将目的基因取代两侧 ITR 之间的 *rep* 基因和 *cap* 基因，并作为基因递送的载体。rAAV 的有效载荷可以是 ssDNA 或自身互补 DNA（self-complementary DNA，scDNA）。

rAAV 载体的生产是一个复杂的过程。其生产平台各有不同，但可根据以下特点进行区分，即所使用的细胞系类型、细胞生长的基质和所需的生产用原材料。由于 AAV 是一种复制依赖型病毒，所有的生产方法都需要将辅助病毒基因、AAV 特异性 *rep* 基因和 *cap* 基因，以及携带目的基因递送至生产细胞系。常用的主要有 4 种生产平台：HEK 293 细胞

表 1 FDA/EMA 已批准上市的 rAAV 产品

Tab.1 rAAV Products Listed by FDA/EMA

序号	产品名称	企业名称	获批年份（机构）	适应证	AAV 血清型	生产平台
1	Glybera[1)]	uniQure	2012（EMA）	脂蛋白脂肪酶缺乏症（lipoprotein lipase deficiency，LPLD）	AAV1	昆虫细胞 / 杆状病毒系统
2	Luxturna	罗氏 /Spark	2017（FDA） 2018（EMA）	双等位 RPE65 基因突变导致的 2 型先天性黑矇症（Leber congenital amaurosis，LCA）	AAV2	人胚肾细胞（HEK 293 细胞）三质粒瞬转系统
3	Zolgensma	诺华 /AveXis	2019（FDA） 2020（EMA）	2 岁以下的脊髓性肌肉萎缩（spinal muscular atrophy，SMA）	AAV9	HEK 293 三质粒瞬转系统
4	Upstaza	PTC Therapeutics	2022（EMA） 2022（MHRA）	芳香族 L- 氨基酸脱羧酶缺乏症（aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency，AADC）	AAV2	HEK 293 三质粒瞬转系统
5	Roctavian	BioMarin	2022（EMA） 2023（FDA）	A 型血友病	AAV5	昆虫细胞 / 杆状病毒系统
6	Hemgenix	CSLBehring	2022（FDA） 2023（EMA）	B 型血友病	AAV5	昆虫细胞 / 杆状病毒系统
7	Elevidys	Sarepta Therapeutics 与罗氏	2023（FDA）	4 ～ 5 岁可独立行走的进行性假肥大性肌营养不良（duchenne muscular dystrophy，DMD）	AAV rh74	HEK 293 细胞三质粒瞬转系统

注：[1)] 2017 年 4 月退市。

三质粒瞬转系统（可包括贴壁和悬浮培养形式）、昆虫细胞 / 杆状病毒系统、稳定包装 / 生产细胞系体系、单纯疱疹病毒系统，不同生产工艺平台的优缺点如表 2 所示[7]。本文中重点介绍目前已上市产品主要采用的 2 种生产平台：HEK 293 细胞三质粒瞬转系统和昆虫细胞 / 杆状病毒系统。

1.1 HEK 293 细胞三质粒瞬转系统

HEK 293 细胞三质粒瞬转系统包括含有 *rep* 基因和 *cap* 基因的 rAAV 编码质粒、含有 3 个腺病毒辅助基因（E2a、E4、vaRNA）的辅助编码质粒，以及含有包含目的基因（gent of interest，GOI）及 2 个 ITRs 的表达质粒（图 1）。

该生产系统优势在于早期工艺开发周期较短，不需开发较多的生产原材料（如转染病毒、稳定细胞系等）即可完成工艺开发，并较快速进入临床试验。但该工艺的主要缺点是生产成本较高，同时其放大规模生产的限制因素也较多。例如，转染试剂 PEI 和质粒 DNA 混合形成的复合物会随时间延长而变得不稳定，导致转染效率降低[8]。因此，需要在给定的时间内制备大量转染复合物并将其添加到细胞中，以便进行高效转染。该系统中 HEK 293 细胞培养方式有贴壁培养和悬浮培养 2 种。在开发早期，一般采用贴壁的细胞培养方式，但贴壁工艺较难进

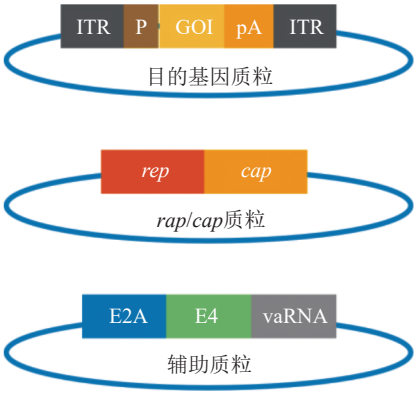


图 1 HEK 293 细胞三质粒瞬转系统设计示意图

Fig.1 Design Schematic Diagram of Triple Transfection of HEK 293 Cells

表 2 rAAV 生产工艺平台的优缺点

Tab.2 Advantages and Disadvantages of rAAV Production Process Platforms

生产平台	HEK 293 细胞三质粒瞬转系统	昆虫细胞 / 杆状病毒系统	稳定包装 / 生产细胞系体系	单纯疱疹病毒系统
优点	安全性好、开发速度快、灵活度好	安全性好、生产规模易于线性放大、单位体积病毒生产力高	生产规模易于线性放大	生产规模易于线性放大
缺点	生产成本较高、难以扩大规模	开发周期较长	开发周期较长、需要采用肿瘤细胞系、需采用辅助病毒（腺病毒）、需去除辅助病毒	开发周期较长；单纯疱疹病毒颗粒较大且带有包膜，较难除菌过滤，生产要求较高

行规模放大，且培养时倾向使用牛血清等动物来源的原材料，存在较大的安全性风险。因此，现多采用悬浮培养。

1.2 昆虫细胞 / 杆状病毒系统

昆虫细胞 / 杆状病毒系统经历了 Three-Bac、Two-Bac、Mono-Bac/One-Bac 的发展和迭代，减少了杆状病毒共感染的数量，增强了杆状病毒表达载体的表达稳定性。Two-Bac 系统是目前使用较广泛的，含有 2 种重组杆状病毒，一种杆状病毒提供 *rep* 基因和 *cap* 基因，另一种杆状病毒提供携带两侧有 ITRs 的目的基因 GOI，通过共感染昆虫细胞（sf9）产生 rAAV。One-Bac 则是通过将含 GOI 的重组杆状病毒感染含有 *rep*/*cap* 基因的包装细胞系产生 rAAV。

与三质粒瞬转系统相比，昆虫细胞 / 杆状病毒系统具有生产规模可放大性高、单位体积病毒生产量丰富的优点 [9]。同时，其生产常采用无血清培养基，且杆状病毒可辅助 rAAV 的复制，不需要额外添加辅助病毒。因此，杆状病毒系统的安全性较好，目前越来越多的产品使用该系统作为 rAAV 的生产平台。

昆虫细胞 / 杆状病毒系统也存在一些限制。如，由于哺乳动物细胞和昆虫细胞之间的内在差异，3 种 Cap 蛋白 VP1、VP2 和 VP3 的比例并不完全一致，因此产品翻译后修饰可能有差异，并可能对生物学活性产生负面影响。但随着杆状病毒系统的不断开发，经优化的 One-Bac 系统仅采用 1 种重组杆状病毒，重新设计了 *rep* 和 *cap* 的基因表达框，并将 AAV 包装核心元件插入到杆状病毒稳定位点，使得相关蛋白的相对表达量更易调节，生产的 AAV 实心率、滴度和感染活性更高。有研究 [10—11] 显示，One-Bac 系统提高了 AAV5 衣壳蛋白 VP1 的表达水平，使得每个 AAV5 颗粒的感染活性提高了 100 倍。

2 上游工艺开发

HEK 293 细胞三质粒瞬转系统的 rAAV 上游工艺开发过程主要包括细菌种子库（用于质粒生产）和生产用细胞库的建立、HEK 293 细胞扩增、质粒转染和病毒收获。该工艺的主要挑战是在工艺放大时，需在增加病毒滴度的同时降低产品质量的不稳定性，并确保扩大规模生产产品的批间一致性。因此，其上游生产工艺开发应重点关注生产用原材料的控制，包括细菌种子库和生产用细胞库的建立、转染试剂、质粒、培养基等 [12]。而昆虫细胞 / 杆状病毒系统的上游工艺开发过程主要包括生产用细胞库和杆状病毒毒种库的建立、sf9 细胞扩增和杆状病毒扩增、杆状病毒感染、rAAV 病毒收获。

2.1 生产用细胞 / 毒种扩增

细胞培养基与细胞系的选择对上游培养工艺来说至关重要，应尽早确定培养基配方及培养方式。对 HEK 293 细胞三质粒瞬转系统而言，如 HEK 293 细胞由贴壁培养改为悬浮培养，应尽早进行此类工艺变更，进行无血清配方筛选并开展相关研究。在种子培养阶段和生物反应器扩增培养阶段尽量选用相同的培养基，以简化原料来源。

2.2 转染 / 感染

2.2.1 HEK 293 细胞三质粒瞬转系统的质粒转染

HEK 293 细胞三质粒瞬转系统中，质粒转染步骤是影响 rAAV 载体质量的重要因素，对转染效率有显著影响，并决定了最终病毒滴度和产品质量。

质粒本身是影响转染的一个重要因素，用于生产 rAAV 的质粒，应采用经验证的发酵和纯化工艺制备。质粒的超螺旋比例会影响 rAAV 的包装效率，生产时应关注变异性、均一性等问题。FDA 于 2007 年发布的“Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications”[13] 建议超螺旋比例大于 80%。

rAAV 生产时，应关注所采用的转染步骤工艺参数，如质粒转染量及比例、转染试剂与质粒比例、转染复合物配制条件等。质粒 DNA 用量与转染时的细胞密度有关，质粒总量通常约为每 10^6 个细胞 1.5 μg，在同一生产规模下，更高的质粒总量并不能提高转染效率。一般来说，等物质的量比例的辅助质粒、*rep*/*cap* 基因和目的基因质粒能获得最高的感染滴度。但也有研究 [14] 结果显示，采用 2 ∶ 1.5 ∶ 1 的辅助质粒、*rep*/*cap* 基因和目的基因质粒的比例可能有助于平衡 rAAV 的合成速率，并获得更高的载

体基因组滴度。

质粒转染可通过化学递送法或电转法进行。其中，化学递送法在质粒瞬时转染中使用更广泛。主要的化学递送分子包括阳离子脂质体（liposome）和阳离子聚合物（如 PEI）。使用 PEI 时，可根据特定质粒优化 PEI，调整络合方式。如可通过线性化或增加官能团、调节分子长度等方式优化 PEI，同时可调节 DNA 和转染试剂的比率和用量，以提高 AAV 转导效率及病毒滴度。此外，可在转染时引入增强剂等，以提高转染效率和病毒产量[15]。

2.2.2 杆状病毒感染

昆虫细胞 / 杆状病毒系统中，需对杆状病毒感染 Sf9 昆虫细胞的工艺过程进行控制。在生产过程中，应重点关注杆状病毒的用量和细胞昆虫细胞比例、病毒感染复数、细胞转导密度、细胞培养温度等参数。一般要将复苏的 sf9 细胞培养至一定密度，如用含 *rep*/*cap* 基因和 GOI 的 2 种重组杆状病毒生产 rAAV，需确定 2 种杆状病毒的用量和比例，以最适的感染复数（multiplicity of infection，MOI）感染细胞。但杆状病毒连续传代可能导致 ITR 和包装序列的基因不稳定，并导致终产品存在差异。因此，应尽早识别杆状病毒生产工艺或生产规模与产品质量的变化情况，以更高效地进行产品研发。

3 下游工艺开发

下游工艺主要是从产品和工艺相关杂质中纯化并得到 rAAV 颗粒，其工艺步骤主要包括细胞裂解、深层过滤、亲和色谱、密度梯度离心或离子交换色谱、超滤、除菌过滤等。目前，下游工艺控制的难点主要是减少单元操作的损失，以及提高下游纯化步骤的可放大性和收率。对于 rAAV 载体产品而言，工艺相关杂质主要包括宿主 DNA/RNA、宿主蛋白、上游细胞培养基，以及辅助病毒和质粒 DNA，还包括残留纯化缓冲液、亲和配体、核酸酶、洗涤剂、无机盐等。产品的相关杂质主要包括生物合成过程的中间产物、包装内容物不正确的病毒颗粒（如空衣壳）、部分包装衣壳（如包装残留质粒或宿主细胞 DNA 的类 AAV 病毒颗粒），以及降解、氧化、聚集载体[16]。对于不同的生产系统而言，所考虑的工艺相关杂质不尽相同，而产品相关杂质则类似，如 HEK 293 细胞三质粒瞬转系统应考虑质粒 DNA 残留、转染试剂残留、牛血清残留、核酸酶残留等工艺相关杂质。

3.1 深层过滤

由于 rAAV 荷负电，需要格外注意过滤器与 rAAV 相互间的静电吸附作用对产品收率带来的影响。并且，由于 rAAV 具有不同的血清型和 GOI，前序工艺差异也会影响料液中颗粒的粒度分布，所以不同料液的过滤具有异质性。

3.2 亲和色谱

亲和色谱的目的是去除工艺相关杂质，如宿主蛋白、宿主 DNA、残留质粒等，但不能分离空衣壳和完整病毒衣壳。最初，亲和色谱只能针对单一或部分 AAV 血清型。目前已有对多种 AAV 血清型有良好分离作用的 AVB 琼脂糖配体，但其对 AAV8、AAV9 效果不佳[17]。亲和色谱输入参数主要包含 AAV 装载浓度、载量、流速、洗脱 pH 值、洗脱缓冲液电导率等，需要根据每一个基因产品进行优化。

3.3 密度梯度离心和离子色谱

空病毒颗粒的存在可能会影响 rAAV 载体的有效性和安全性。因此，在 rAAV 载体生产过程中，需建立有效的纯化方法，以降低 rAAV 载体的空病毒颗粒比例[18]。经历亲和色谱后，可通过密度梯度离心法或离子色谱实现对空病毒颗粒与 rAAV 载体的分离。前法是基于空病毒颗粒和含有部分 DNA 的病毒颗粒会在较低的密度区间聚集的特性，借助碘克沙醇或氯化铯，将空病毒颗粒与 rAAV 载体通过多次密度梯度离心进行分离，适用于所有血清型的纯化，但难以放大。离子色谱则是通过高分辨率阴离子交换树脂，根据等电点的微小差异对空衣壳和完整病毒衣壳进行分离。但影响载体电荷的因素（如血清型、载体设计等）较多，不同产品可能需要建立不同的纯化方法。

4 已上市案例分析

已上市的 7 个 rAAV 产品所采用的载体生产平台是 HEK 293 细胞三质粒瞬转系统或昆虫细胞 / 杆状病毒系统（表 1）。根据产品适应证以及给药方式

分析，若采用局部用药（如眼部注射），所采用的剂量小、所需 rAAV 的数量相对较少，则更适于采用 HEK 293 细胞三质粒瞬转系统生产；若采用全身给药（如静脉注射），所采用的剂量大，则更适于采用易放大的昆虫细胞 / 杆状病毒系统来生产。

Sarepta Therapeutics 公司与罗氏联合开发的 AAV 基因疗法 Elevidys（SRP-9001）于 2023 年 6 月 22 日获 FDA 加速批准上市[19—21]，是世界范围内首款获批上市的、用于治疗 DMD 的儿科 AAV 基因疗法[22]。Elevidys 是 1 种非复制的 rAAV，采用的病毒血清型为恒河猴 74 型（rAAVrh74）。

4.1 生产工艺

Elevidys 采用了 HEK 293 细胞三质粒瞬转系统。该产品自研发至商业化使用了 2 种不同的工艺来生产。在早期临床研究中使用了工艺 A，后续通过超速离心的方法去除空壳。而在商业化生产时因生产规模放大，改为工艺 B，后续的放大纯化工艺采用色谱法来分离空衣壳和完整衣壳。但基于可比性研究的数据分析表明，工艺 B 所得产品中的空衣壳水平更高，残留衣壳杂质水平具有显著差异（P=0.000 2）。由于过多的空壳会增加病患的抗原负荷，增加免疫毒性的风险，或通过竞争细胞表面受体结合位点、内吞作用及胞内过程，降低 rAAV 的转导效率而导致治疗安全性和有效性下降。因此，FDA 对该变更要求增加确证性临床试验，以验证工艺 B 产品中的空衣壳杂质对产品安全性和有效性无影响。临床试验比较了按照剂量用药后患者体内的载体基因组暴露量，最终证明工艺 B 产品中出现的较高数量的空衣壳不会显著影响病毒基因组数量，FDA 才同意该工艺变更。因此，对于此类生产工艺的变更，建议在确证性临床试验开始之前完成，使确证性临床试验阶段所使用产品的规模、工艺等方面与商业化产品的衔接更加密切。

4.2 关键质量属性

相较于慢病毒载体、脂质纳米颗粒（lipid nanoparticle，LNP）等其他病毒或非病毒载体，rAAV 载体的生产更复杂。因此，应关注 rAAV 类产品关键质量属性的风险评估结果。FDA 公布的 Elevidys 放行检测报告中主要包含外观（澄清度、颜色、可见微粒、盖子颜色）、载体基因组、载体衣壳、无菌、细菌内毒素、衣壳纯度、完整衣壳率、不溶性微粒、效价、载体基因组含量、装量等属性。但 FDA 并未公布涉及工艺杂质的检测项目。实际上，企业进行产品放行时应还需考虑质粒 DNA 残留、转染试剂残留、牛血清白蛋白残留、核酸酶残留等与 HEK 293 细胞三质粒瞬转系统工艺相关的杂质残留。

4.3 稳定性

病毒载体类产品由于稳定性差，一般在低温下贮存。因此，需要密切关注病毒载体在贮存、运输和使用过程中的滴度（尤其是感染滴度）、聚集体和生物学活性的变化。通过 Elevidys 的公开稳定性研究数据可知，其开展了长期稳定性、加速稳定性、影响因素稳定性和使用稳定性等研究。另外，依据 ICH Q5C《生物技术产品的质量：生物制品 / 生物技术产品的稳定性试验》的要求，还对 Elevidys 开展了运输稳定性研究。由于该品种的长期保存条件为 －60 ℃以下，使用时需进行解冻，因此在设置考察条件时需要考察药物的冻融操作是否会对产品质量产生影响。该品种的稳定性研究结果表明，载体基因组滴度在效期内未显著下降，但显示出高度可变的特性，同时效力的稳定性数据也高度可变。基于此，FDA 建议将产品的效期末标准与放行标准设置为一致。

5 讨论和展望

自 AAV 作为载体首次使用至今已有 20 余年，随着生产技术的不断迭代，rAAV 载体产品的生产工艺挑战也在不断被克服，新的生产工艺不断被开发，如 HEK 293 细胞悬浮工艺、杆状病毒的 One-Bac 系统，以及基于生态系统位点的服务评估工具包（toolkit for ecosystem service site-based assessment，TESSA）生产系统[23]。然而，用于基因治疗的 rAAV 平台，与抗体治疗领域产品生产平台的成熟度尚有一定差距。如何在控制成本的前提下，在工艺过程中降低空衣壳的比例、提高工艺收率和产品效力一直是被广泛研究的课题，且关于 AAV 载体工程化改造的研究也不断取得突破[24]。企业可结合产品特点、适应

证人群范围、产品开发速度、成本控制等多方面进行总体考虑，选择合适的生产工艺平台，开发稳健的 rAAV 生产工艺。对于 rAAV 产品来说，产品的工艺开发和研究时间较短、生产批次少、批量较小、难度大。同时应注意，产品自早期临床至进入商业化生产阶段会发生场地转移、生产规模放大并伴随工艺变更。因此，需尽早开展对工艺开发和工艺变更的充分研究，确定其商业化规模及对应的生产工艺，并开展相应的可比性研究。国家药品监督管理局药品审评中心近来发布了《重组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》[25]、《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》[3]，明确了对该类产品申报临床试验时的早期药学研发及商业化申报上市的要求。总体而言，rAAV 产品作为广泛使用的基因治疗手段前景巨大，未来期望能通过生产技术迭代、工艺设备升级等推动高产量、高质量、高感染活性、稳定、均一的 rAAV 产品的开发。

参考文献：

[1] PETRS-SILVA H, LINDEN R. Advances in recombinant adeno-associated viral vectors for gene delivery [J]. *Curr Gene Ther*, 2013, **13**(5): 335-345.

[2] SU W, PATRÍCIO M I, DUFFY M R, *et al*. Self-attenuating adenovirus enables production of recombinant adeno-associated virus for high manufacturing yield without contamination [J]. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 1182.

[3] 国家药品监督管理局药品审评中心. 体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）[EB/OL]. (2022-05-31) [2023-12-07]. https://www. cde. org. cn/main/news/viewInfoCommon/c0ec5e347ba84df67bf75e15f6ad3f3f.

[4] 国家药品监督管理局药品审评中心. 基因治疗产品非临床研究与评价技术指导原则（试行）[EB/OL]. (2021-12-03) [2023-12-07]. https://www. cde. org. cn/main/news/viewInfoCommon/41bc557bec23a6ebfb0e148cc989f041.

[5] 国家药品监督管理局药品审评中心. 罕见病基因治疗产品临床试验技术指导原则（试行）[EB/OL]. (2024-01-18) [2024-05-29]. https://www. cde. org. cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=a5c62d069700ed3bfbf9f7ab6c7aca7d.

[6] SRIVASTAVA A, MALLELA K M G, DEORKAR N, *et al*. Manufacturing challenges and rational formulation development for AAV viral vectors [J]. *J Pharm Sci*, 2021, **110**(7): 2609-2624.

[7] DOBROWSKY T, GIANNI D, PIERACCI J, *et al*. AAV manufacturing for clinical use: insights on current challenges from the upstream process perspective [J]. *Curr Opin Biomed Eng*, 2021, **20**: 100353.

[8] PEZZOLI D, GIUPPONI E, MANTOVANI D, *et al*. Size matters for *in vitro* gene delivery: investigating the relationships among complexation protocol, transfection medium, size and sedimentation [J]. *Sci Rep*, 2017, **7**: 44134.

[9] WU Y, JIANG L Y, GENG H, *et al*. A recombinant baculovirus efficiently generates recombinant adeno-associated virus vectors in cultured insect cells and larvae [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018, **10**: 38-47.

[10] MIETZSCH M, CASTELEYN V, WEGER S, *et al*. OneBac 2. 0: Sf9 cell lines for production of AAV5 vectors with enhanced infectivity and minimal encapsidation of foreign DNA [J]. *Hum Gene Ther*, 2015, **26**(10): 688-697.

[11] JOSHI P R H, CERVERA L, AHMED I, *et al*. Achieving high-yield production of functional AAV5 gene delivery vectors via fedbatch in an insect cell-one baculovirus system [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, **13**: 279-289.

[12] GUAN J S, CHEN K, SI Y N, *et al*. Process improvement of adeno-associated virus (AAV) production [J]. *Front Chem Eng*, 2022, **4**: 830421.

[13] FDA. Considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications [EB/OL]. [2023-12-07]. https://www. fda. gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considerations-plasmid-dna-vaccines-infectious-disease-indications.

[14] GRIEGER J C, SOLTYS S M, SAMULSKI R J. Production of recombinant adeno-associated virus vectors using suspension HEK293 cells and continuous harvest of vector from the culture media for GMP FIX and FLT1 clinical vector [J]. *Mol Ther*, 2016, **24**(2): 287-297.

[15] CERVERA L, FUENMAYOR J, GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ I, *et al*. Selection and optimization of transfection enhancer additives for increased virus-like particle production in HEK293 suspension cell cultures [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, **99**(23): 9935-9949.

[16] WRIGHT J F. Product-related impurities in clinical-grade recombinant AAV vectors: characterization and risk assessment [J]. *Biomedicines*, 2014, **2**(1): 80-97.

[17] MIETZSCH M, SMITH J K, YU J C, *et al*. Characterization of AAV-specific affinity ligands: consequences for vector purification and development strategies [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2020, **19**: 362-373.

[18] HAJBA L, GUTTMAN A. Recent advances in the analysis full/empty capsid ratio and genome integrity of adeno-associated virus (AAV) gene delivery vectors [J]. *Curr Mol Med*, 2020, **20**(10): 806-813.

[19] FDA. CBER CMC BLA review memo—ELEVIDYS [EB/OL]. (2023-07-13) [2023-12-07]. https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/tissue-tissue-products/elevidys.

[20] CBER FDA. CBER-DMPQ CMC-facility BLA review memo—ELEVIDYS [EB/OL]. (2023-07-13) [2023-12-07]. https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/tissue-tissue-products/elevidys.

[21] CBER FDA. Clinical review memo - ELEVIDYS [EB/OL]. (2023-07-13) [2023-12-07]. https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/tissue-tissue-products/elevidys.

[22] Sarepta Therapeutics. Sarepta Therapeutics announces positive vote from U. S. FDA advisory committee meeting for SRP-9001 gene therapy to treat duchenne muscular dystrophy [EB/OL]. (2023-05-23) [2023-12-07]. https://investorrelations.sarepta.com/news-releases/news-release-details/sarepta-therapeutics-announces-positive-vote-us-fda-advisory.

[23] SU W H, PATRÍCIO M I, DUFFY M R, *et al*. Self-attenuating adenovirus enables production of recombinant adeno-associated virus for high manufacturing yield without contamination [J]. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 1182.

[24] LI C W, SAMULSKI R J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy [J]. *Nat Rev Genet*, 2020, **21**(4): 255-272.

[25] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于发布《重组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》的通告（2024年第8号）[EB/OL]. (2024-01-17) [2024-05-29]. https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/635323ee319dacab26eb783b843b8bd3.

