

· 细胞治疗 · 研究评价 ·

CAR-T 细胞治疗产品中复制型病毒的风险分析及控制

吴雪伶, 赵翔, 孟淑芳* (中国食品药品检定研究院, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 100050)

摘要: 嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T细胞) 因其在血液肿瘤中的显著疗效已成为肿瘤免疫治疗领域中的国际研究新热点, 成为肿瘤治愈新的希望。目前, 在CAR-T细胞产品的生产中, 通常是利用逆转录病毒载体或慢病毒载体将CAR基因高效地导入T细胞中, 但在使用这些病毒载体的同时也带来了CAR-T产品污染复制型逆转录病毒 (RCR) 或复制型慢病毒 (RCL) 的潜在风险。虽然随着病毒载体设计及生产体系的不断改进, 这种风险已大大降低, 但仍不能完全排除。因此, 监管机构要求对于临床使用的慢病毒或逆转录病毒载体、转导的CAR-T细胞产品以及患者均要进行复制型病毒的检测。本文主要通过分析复制型病毒污染检测的必要性、降低复制型病毒污染风险的措施、复制型病毒检测的阶段以及检测方法等方面, 提出在CAR-T细胞生产过程中控制RCR/RCL的策略, 以供CAR-T细胞产品研发者参考。

关键词: 嵌合抗原修饰T细胞 (CAR-T细胞); 逆转录病毒载体; 慢病毒载体; 复制型病毒

中图分类号: R392-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7777(2018)07-0879-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.07.006

Risk Analysis and Control of Replication Competent Virus in CAR-T Cell Therapy Products

Wu Xueling, Zhao Xiang, Meng Shufang* (National Institutes for Food and Drug Control, The Key Laboratory of Biotechnology Product Test Method and Its Standardization, National Health Commission, Beijing 100050, China)

Abstract: Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) has become a new research focus in the field of tumor immunotherapy due to its remarkable therapeutic effects in hematological tumors, and has become a new hope for the cure of cancer. At present, retroviral vectors or lentiviral vectors are commonly used to efficiently introduce CAR gene into T cells in the production of CAR-T cell products. However, the use of these vectors may cause the risk of contamination of CAR-T cell products with replication competent retroviruses (RCR) or replication competent lentiviruses (RCL). Although this risk has been greatly reduced with the continuous improvement of virus vector design and production systems, it cannot be completely eliminated. Therefore, Regulatory agencies require the detection of replicative viruses for the clinically used lentivirus or retroviral vectors, transduced CAR-T cell products and patients. This article mainly focuses on the necessity of the replication competent virus contamination detection, the measures to reduce the risk of replication competent virus pollution, the stage

基金项目: 国家科技重大专项“创新生物技术药评价及标准化关键技术研究”(编号 2018ZX09101001)

作者简介: 吴雪伶, 博士, 副研究员; 研究方向: 病原生物学; Tel: (010) 67095414; E-mail: wuxueling46@sina.com

通信作者: 孟淑芳, 博士, 研究员; 研究方向: 病原生物学; Tel: (010) 67095414; E-mail: mengsf@263.net

of replication competent virus detection and the detection methods, and putting forward the consideration for controlling RCR/RCL in the process of CAR-T cell production for reference by CAR-T cell product developers.

Keywords: chimeric antigen receptor T cell (CAR-T); retroviral vectors; lentiviral vectors; replication competent virus

目前,嵌合抗原受体T细胞(Chimeric Antigen Receptor T Cell, CAR-T)治疗产品对多种血液肿瘤显示了非常好的临床效果,对实体瘤治疗也表现出了非常大的潜力,已经成为肿瘤免疫治疗领域中新的国际研究热点。2017年8月及10月美国FDA分别批准了2个针对血液肿瘤的CD19-CAR-T细胞治疗产品上市,我国也有众多研究机构及制药公司投入到了CAR-T细胞产品的研发中。但总体来看,我国CAR-T细胞治疗产品的研发还处于起步阶段,因此,为推进我国CAR-T细胞治疗产品的产业化发展,由中国食品药品检定研究院牵头起草并在CAR-T细胞基础研究及产品研发单位的大力支持下,于近期共同完成并发布了《CAR-T细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要点》^[1](简称《要点》),为CAR-T研发提供更具可操作性的参考。

在CAR-T细胞治疗产品的制备过程中,通常利用逆转录病毒载体或慢病毒载体将CAR基因高效地导入T细胞中^[2-4],这也同时带来了产品安全性方面一个备受关注的问题,即复制型逆转录病毒(Replication Competent Retroviruses, RCR)或复制型慢病毒(Replication Competent Lentivirus, RCL)污染的潜在风险。针对该风险,FDA及欧盟先后出台了相关文件^[5-8],要求建立灵敏、可靠的RCR/RCL检测方法,对于使用 γ -逆转录病毒载体及慢病毒载体生产的基因治疗产品,需要在生产及应用的的不同阶段进行RCR/RCL的控制,包括生产病毒的细胞库、终末细胞、病毒载体及CAR-T细胞,并对CAR-T细胞回输后的患者个体进行监测^[5-7],以保证患者不受RCL的感染。笔者在前述《要点》中同样提出了该风险控制的要求,本文即在此《要点》的基础上,进一步分析讨论复制型病毒污染检测的必要性、降低复制型病毒污染风险的措施、复制型病毒检测的阶段以及检测方法等方面,并提出在CAR-T细胞生产过程中控制RCR/RCL的策略,以进一步提高CAR-T细胞治疗产品的安全性。

1 关注RCR/RCL污染风险的必要性

目前,制备CAR-T细胞所用的 γ -逆转录病毒载体和慢病毒载体均为复制缺陷型载体,理论上已经极大地降低了产生复制型病毒的风险,但病毒载体的制备方法以及制备过程中仍存在产生RCR或RCL的潜在风险,如病毒载体生产过程中因穿梭载体、包装载体及包装细胞中的内源性逆转录元件之间,或病毒载体与T细胞的内源性逆转录元件之间发生同源或非同源重组,从而导致RCR或RCL产生^[9-11]。

RCR/RCL对患者的风险表现在两个方面:一方面,它们同逆转录病毒载体一样可以整合在细胞基因组中,从而产生因整合出现的激活原癌基因、破坏抑癌基因或使促细胞生长的因子表达增高而造成二次肿瘤的风险;另一方面,因其具有复制性,即可产生具有复制能力的病毒,加之采用了可感染多种细胞的膜蛋白,大大增加了整合而造成二次肿瘤的风险。比如,尽管早期的研究显示,鼠 γ -逆转录病毒MLV在非人灵长类动物中并不能造成严重的安全性问题^[12-13],但研究者在一项对严重免疫缺陷恒河猴进行体外输注骨髓祖细胞的试验中发现,在输注 γ -逆转录病毒载体转导的骨髓祖细胞的10只动物中,有3只动物发生了淋巴瘤,并在200天内死亡^[14],原因分析结果显示,动物的淋巴瘤组织中可检测到RCR,并且在感染的动物中可检测到RCR引起的 γ -逆转录病毒血症^[15],因而证实引起动物发生淋巴瘤的真凶正是RCR,是由于转导骨髓祖细胞的 γ -逆转录病毒载体污染RCR所致。再如,自然界中的慢病毒,因受其病毒结合受体及宿主的限制性因子的制约,感染通常具有种属特异性,如HIV-1/2在人类可引起艾滋病,马传染性贫血病毒(Equine Infectious Anemia Virus, EIAV)会引起马的复发性发热伴病毒血症、血小板减少和消耗症状,猫免疫缺陷病毒(Feline Immunodeficiency Virus, FIV)会引起猫免疫缺陷综合症等。但是,为了扩大感染细胞的类型,慢病毒载体的包膜通

常采用其它病毒的膜蛋白进行替换,如常用的 VSV-G 膜蛋白,即可能形成的 RCL 是假型病毒,这样就能特异地感染人源细胞,因此,可能会增加 RCL 污染而带来的潜在风险。因此,使用逆转录病毒载体生产的基因治疗产品中 RCR/RCL 的污染风险始终是药品监管机构的一个重要的关注点。

2 降低产生 RCR/RCL 风险的措施

在逆转录病毒载体发展的过程中,研究者一直在采取多种措施以降低 RCR/RCL 的风险,包括载体的设计、病毒载体包装方法等。

早期的 γ -逆转录病毒生产系统仅去除了病毒的包装序列^[16],具有包装功能的病毒结构基因与转导载体之间比较容易发生重组而产生 RCR。于是,人们在病毒载体生产体系上做了多次改进,如 PA317 包装细胞体系,该系统首先删除了病毒基因组的包装信号,同时将 3' LTR 替换为 SV40 病毒上的多聚腺苷酸位点,并将 5' LTR 删除^[17],这样可以去除多个逆转录和整合所必需的信号,从而降低了 RCR 产生的风险,这也是第一个被用于人体基因转移试验的病毒载体系统^[18-19]。但 PA317 包装体系仍然具有可产生 RCR 的倾向性^[14],因此,该系统又被鼠 GP+ envAm12 系统所取代^[20],该系统通过将 Gag-Pol 表达基因和 Env 表达基因分开置于不同的质粒上,并且通过降低载体和包装序列间的同源性,进一步降低了 RCR 产生的风险^[20-22]。而在 PG13 包装体系中^[23],人们利用长臂猿白血病病毒 (Gibbon Ape Leukemia Virus, GALV) 的包膜来代替 γ -逆转录病毒载体的包膜,形成假型 γ -逆转录病毒载体颗粒,而这种 GALV 包膜假型病毒可能能够通过抑制病毒载体的再次感染,而降低重组的发生。另外,越来越多的人源细胞被用于 γ -逆转录病毒载体的生产^[24-27],由于人类基因组中不含有与 γ -逆转录病毒序列同源的 DNA 序列,因此,可大大降低 RCR 产生的几率。

此外,Yu 等人还建立了 γ -逆转录病毒自我失活 (Self Inactivating, SIN) 病毒载体^[28],即将 γ -逆转录病毒载体 3' 端 LTR 的 U3 区删除,该区域包含病毒的强启动子和增强子,在病毒逆转录过程中,3' LTR 的 U3 区会被复制并被转移至 5' 端,将此 U3 区删除后,使载体自我失活,导致病毒不能利用自身的启动子进行基因的表达,而只能利用细胞类型特异的启动子进行基因的表达,这样

可进一步降低病毒载体与内源性逆转录病毒发生重组的风险。

与 γ -逆转录病毒相比,慢病毒具有更为复杂的基因组结构,除结构基因 gag-pol 和 env 外,还含有调节功能基因 tat、rev 及辅助调节基因 vif、vpr、vpu 和 nef。第一代慢病毒载体包含了 HIV 的大部分基因组元件,但将这些元件置于不同的质粒上,如采用三质粒系统,其中穿梭质粒仅含有目的基因、LTR 区及与反转录和包装相关的基因,一个包装质粒含有除 HIV Env 基因外的所有病毒基因元件,另一个包装质粒表达其它病毒来源的膜蛋白,如通常使用的 VSVG 膜蛋白^[29-30],从而降低重组和 RCL 的产生风险。其后,研究者发现,在体外培养系统中,HIV 基因组上的 4 种辅助调节基因 vif、vpr、vpu 和 nef 对于病毒复制并不是必需的,且还与病毒的病变效应有关,因此,在第二代慢病毒载体系统中,将这 4 种辅助调节基因剔除^[31-32],使 RCL 的产生风险进一步降低。在目前常用的第三代慢病毒载体系统中,三质粒系统在剔除 4 种辅助调节基因的基础上,再次将 tat 基因删除^[31],而且为了进一步降低重组的发生和复制型病毒的产生,将 gag/pol 和 rev 基因分别置于不同的质粒上,即形成四质粒包装系统,这种设计不仅可使 RCL 产生的风险再次降低,同时,即使在慢病毒载体生产中产生了 RCL,也会使 RCL 的致病性降低。另外,与 γ -逆转录病毒载体相同,在慢病毒基因组的 3' LTR U3 区引入缺失突变,破坏 LTR 中的启动子/增强子活性,形成 SIN 病毒载体,进一步提高了载体的安全性^[31]。

从第一代到第三代,慢病毒载体系统得到了不断改进,安全性不断提高,到目前为止,使用第一代到第三代慢病毒载体系统所生产的病毒载体的临床试验均未发现 RCL 污染的案例。近期,Cornetta K 和 Marcucci KT 等人分别发表了较大样本量的 RCL 污染调查研究的论文,一篇论文的研究对象包括 460 份 CAR-T 细胞及 296 位 CAR-T 细胞输注病人样本^[33]。另一篇论文的研究对象包括 17 份病毒载体、375 份 CAR-T 细胞产品及 308 位 CAR-T 细胞输注病人样本^[34]。两项研究均显示,在所有被检测的样本中,不论是病毒载体,还是 CAR-T 细胞样本及接受治疗的患者样本,均未发现 RCL 污染^[33-34],进一步证实了目前使用的慢病毒载体具有较高的安

全性。另外,基于研究数据^[33],研究者认为,对病毒载体进行充分的RCL检测对确保CAR-T细胞成品无RCL污染具有关键作用。

3 RCR/RCL检测的阶段

虽然通过以上病毒制备系统的改进,已大大降低RCR/RCL产生的风险,但仍不能完全排除,因此,美国FDA要求对于 γ -逆转录病毒载体和慢病毒载体,需要在生产的整个过程及不同阶段进行RCR/RCL检测,以确保无RCR/RCL的污染^[6-7]。对于RCR的控制,需对载体生产用主细胞库、工作细胞库、生产终末细胞、载体上清液及在体外培养超过4天的载体转导细胞进行检测。对于RCL的控制,由于慢病毒载体生产目前尚不能使用稳转细胞株,因此,RCL检测点主要包括生产病毒载体的终末细胞、载体上清液和载体转导的细胞。另外,在临床研究中,对于接受载体转导细胞输注的患者,应对病人样本进行RCR/RCL的检测。同样,在发布的《要点》中,也分别在逆转录病毒生产的稳转细胞的细胞库、生产终末细胞、病毒载体及CAR-T细胞治疗产品这几个质控阶段设置了相应的检测要求。

与FDA检测载体上清液的观点稍有不同,欧洲药典中则要求,对纯化后的病毒载体进行RCR/RCL的检测。从理论上来说,在病毒载体的制备过程中,因复制型病毒的产生与病毒载体特点及载体设计有关,是病毒载体生产体系自身存在的风险,而非外源引入,因此,在对病毒载体进行RCR或RCL检测时,用病毒载体收获液或纯化后的病毒载体进行检测均具有一定的合理性,各有利弊。如以病毒载体收获液作为样本,可以直接地反映病毒载体在包装过程中出现RCR/RCL的风险,但为达到有效的检出,可能需要取较大的样本量进行检测;如以纯化后的病毒载体为检测样本,因病毒载体在经过纯化及浓缩工艺后,RCR或RCL同样也会得到浓缩,检测时可能需要相对小的样本量,同时,也可直接反映出转导的病毒载体中是否含有RCR或RCL,但也存在纯化工艺可能会对原本含量可能很低的RCR或RCL造成破坏从而影响检出的风险。基于病毒载体中RCL污染的检测在整个生产工艺及临床应用的重要性^[33],不论选择何种样本,均需要对病毒载体进行充分的复制型病毒的检测,以降低在CAR-T成品中RCR/RCL污染的风险。

4 RCR/RCL检测的方法

建立高敏感的RCR/RCL检测方法是提高CAR-T产品安全性的另一个重要措施。目前,RCR/RCL的检测方法主要包括针对特定基因(如VSV-G基因、psi-gag基因或GALV基因)的PCR法或QPCR法以及敏感细胞感染试验法。为了提高试验的灵敏度,FDA推荐利用以细胞培养为基础的感染性试验进行RCR/RCL的检测,该方法首先将可能存在的RCR/RCL在敏感细胞上扩增,并在培养终点利用敏感、快速的检测方法进行检测。有效的感染试验法首先要求RCR/RCL可以感染敏感细胞,其次要求在敏感细胞中可产生感染性病毒颗粒并释放出来,且感染试验要具有足够的灵敏度,可以检出低MOI的阳性对照病毒。

4.1 RCR检测方法

目前应用较多的检测RCR的方法包括2种类型的细胞感染性试验,即S+/L-试验和标记拯救试验^[35]。在这些试验中需先有一个扩增阶段,即将待检样本与敏感细胞共培养至少3周,将可能存在的RCR进行扩增,再将扩增后的样本接种到检测的指示细胞上,通过病变或特定产物表达显示是否存在RCR。

在S+/L-试验中,用于扩增RCR的最常用的细胞为Musdunni细胞,该细胞可用于鼠双嗜性 γ -逆转录病毒的扩增,但不适用于具有GALV包膜的 γ -逆转录病毒的扩增,对于GALV病毒,可使用293细胞进行扩增。在检测阶段使用指示细胞,如猫星型胶质细胞系PG-4^[36],该细胞系是一个S+/L-细胞系,它含有鼠肉瘤病毒基因组(S+),但缺少鼠白血病病毒基因组(L-),只有在细胞中同时表达鼠肉瘤病毒和鼠白血病病毒时,细胞才会出现病变。基于该原理,当将扩增阶段的细胞培养上清液接种到PG-4细胞上时,如果细胞发生病变,则表明样品污染了RCR。

标记拯救试验的原理是用于RCR扩增的敏感细胞系中含有一个带标记基因的 γ -逆转录病毒载体^[21],在检测阶段,将扩增阶段收集的上清液接种到初始培养的扩增细胞上,如果存在RCR污染,RCR的基因组和带标记基因的 γ -逆转录病毒载体将会被RCR包装,感染细胞后,RCR将会使标记基因表达。

4.2 RCL检测方法

目前已经建立的RCL检测方法还并不多。最初

建立的RCL PCR检测方法是通过检测牛Jembrana病毒载体感染上清液中的tat序列来检测RCL^[37]，但是目前通常使用的第三代以HIV-1为基础的慢病毒载体中，tat基因已从载体中被删除，因此，该方法已不适用。合胞体形成试验也被用于RCL的检测^[38]，即将病毒载体或转导细胞在HIV敏感细胞系进行培养，检测合胞体的形成，但该试验适用于具有完全复制能力的且含有HIV包膜的慢病毒的检测，不一定适用于HIV-1载体中RCL的检测。而基于逆转录酶活性检测的方法，虽然该方法灵敏度较高且可用于筛选广谱的逆转录病毒，但该方法可能会受到细胞状态或培养基的影响造成试验背景高和假阳性的结果^[39-40]。

FDA推荐的RCL检测方法是利用敏感细胞对病毒载体中可能存在的RCL进行培养扩增，并在培养终点进行检测^[7]。由于人T细胞系C8166对HIV及以VSV-G为包膜的慢病毒载体均具有高度的敏感性，因此多被用于RCL的扩增培养与检测^[41-43]。该方法是将病毒载体与C8166共孵育培养21天，用于扩增潜在污染的RCL，然后，收集扩增的培养上清液，再接种于C8166细胞上，继续培养7天，培养结束时，检测病毒蛋白或核酸。常用的检测方法包括针对Gag区P24抗原的ELISA检测^[44]、针对逆转录酶的产物增强型逆转录酶活性检测（PERT）试验^[39-40]、针对载体质粒和包装质粒间重组产生的Psi-Gag序列的PCR方法以及针对VSV-G包膜基因的PCR方法^[42]。

C8166感染试验除了病毒扩增阶段外，同样需要设置检测指示阶段，其目的在于降低2种情况可能造成的假阳性结果：首先，如待检测的样本为浓缩后的病毒载体，其P24抗原含量可能较高，对于这种样本即使经过3周的传代仍然可能有较低水平的P24抗原被检出，造成假阳性结果；其次，病毒载体和包装质粒间可能会发生重组^[42]，尽管该重组并不一定形成RCL，但会造成PCR法的假阳性结果，而通过指示阶段的再培养可大大降低假阳性结果的发生，从而确保检测到真正的RCL。

在细胞扩增及指示阶段检测中，需设置病毒阳性对照，若以HIV弱毒株为阳性对照病毒，即辅助蛋白编码调节基因缺失的HIV-1病毒^[41]，其感染试验所涉及的培养应在P3级生物安全实验室条件下进行；但若采用条件复制型的慢病毒载体作为阳

性对照，则可以在生物安全级别至少为P2的实验室开展试验；若以其它非HIV骨架的慢病毒载体作为阳性对照，可以在P2生物安全实验室进行病毒培养并开展方法学研究和样本检测。

5 结语

综上所述，对CAR-T细胞治疗产品进行RCR/RCL的控制，需要从病毒载体设计、病毒载体生产体系的不断改进完善、建立高灵敏及高效的检测方法以及在生产的不同阶段进行检测等多种措施来共同降低RCR/RCL产生的风险。在检测方法上，虽然RCR/RCL细胞感染试验具有较高的灵敏度，但该试验耗时长、工作量大，且形成系统的风险评估方法尚需一定的时间，因此，在CAR-T细胞产品临床试验早期，可考虑以灵敏且假阳性低的PCR快速检测方法作为RCR/RCL的检测方法^[45-46]，同时，基于现有的RCR/RCL监测的报道^[33-34]以及数据的不断积累，在确证性临床阶段以及上市前，对生产用细胞及病毒载体样本进行充分的RCR/RCL检测，而对CAR-T细胞产品采用快速检测方法放行，同时保留样本备查的策略可能会更好地控制RCR/RCL的风险。

参考文献：

- [1] 中国食品药品检定研究院. CAR-T细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要点 [J]. 中国药事, 2018, 32 (6): 829-852.
- [2] Fraietta JA, Beckwith KA, Patel PR, et al. Ibrutinib Enhances Chimeric Antigen Receptor T-cell Engraftment and Efficacy in Leukemia [J]. Blood, 2016, 127 (9): 1117-1127.
- [3] Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2016, 13 (6): 370-383.
- [4] Wang X, Popplewell LL, Wagner JR, et al. Phase 1 Studies of Central Memory-derived CD19 CAR T-cell Therapy Following Autologous HSCT in Patients with B-cell NHL [J]. Blood, 2016, 127 (24): 2980-2990.
- [5] Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Supplemental Guidance on Testing for Replication-competent Retrovirus in Retroviral Vector-based Gene Therapy Products and During Follow-up of Patients in Clinical Trials Using

- Retroviral Vectors [J]. Hum Gene Ther, 2001, 12 (3): 315-320.
- [6] U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Supplemental Guidance on Testing for Replication Competent Retrovirus in Retroviral Vector Based Gene Therapy Products and During Follow-up of Patients in Clinical Trials Using Retroviral Vectors[EB/OL].[2018-06-18]. <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm072961.htm>.2006.
- [7] U.S. Food and Drug Administration. Testing for Replication Competent Retrovirus (RCR)/Lentivirus (RCL) in Retroviral and Lentiviral Vector Based Gene Therapy Products — Revisiting Current FDA Recommendations[EB/OL].[2018-06-18].<https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:MteHOI2KSXcJ:https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/CellularTissueandGeneTherapiesAdvisoryCommittee/UCM250027.ppt+&cd=2&hl=en&ct=clnk&gl=us>, 2010.
- [8] European Medicines Agency. Guideline on Development and Manufacture of Lentiviral Vectors[EB/OL].[2018-06-18]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003984.pdf, 2005.
- [9] Chong H, Starkey W, Vile RG. A Replication-competent Retrovirus Arising from a Split-function Packaging Cell Line was Generated by Recombination Events Between the Vector, one of the Packaging Constructs, and Endogenous Retroviral Sequences [J]. J Virol, 1998, 72 (4): 2663-2670.
- [10] Garrett E, Miller AR, Goldman JM, et al. Characterization of Recombination Events Leading to the Production of an Ecotropic Replication-competent Retrovirus in a GP+envAM12-derived Producer Cell Line [J]. Virology, 2000, 266 (1): 170-179.
- [11] Urnovitz HB, Murphy WH. Human Endogenous Retroviruses: Nature, Occurrence, and Clinical Implications in Human Disease [J]. Clin Microbiol Rev, 1996, 9 (1): 72-99.
- [12] Cornetta K, Moen RC, Culver K, et al. Amphotropic Murine Leukemia Retrovirus is Not an Acute Pathogen for Primates [J]. Hum Gene Ther, 1990, 1 (1): 15-30.
- [13] Cornetta K, Morgan RA, Gillio A, et al. No Retroviremia or Pathology in Long-term Follow-up of Monkeys Exposed to a Murine Amphotropic Retrovirus [J]. Hum Gene Ther, 1991, 2 (3): 215-219.
- [14] Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, et al. Helper Virus Induced T Cell Lymphoma in Nonhuman Primates After Retroviral Mediated Gene Transfer [J]. J Exp Med, 1992, 176 (4): 1125-1135.
- [15] Vanin EF, Kaloss M, Broscius C, et al. Characterization of Replication-competent Retroviruses from Nonhuman Primates with Virus-induced T-cell Lymphomas and Observations Regarding the Mechanism of Oncogenesis [J]. J Virol, 1994, 68 (7): 4241-4250.
- [16] Mann R, Mulligan RC, Baltimore D. Construction of a Retrovirus Packaging Mutant and Its Use to Produce Helper-free Defective Retrovirus [J]. Cell, 1983, 33 (1): 153-159.
- [17] Miller AD, Buttimore C. Redesign of Retrovirus Packaging Cell Lines to Avoid Recombination Leading to Helper Virus Production [J]. Mol Cell Biol, 1986, 6 (8): 2895-2902.
- [18] Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, et al. Gene Transfer into Humans-immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction [J]. N Engl J Med, 1990, 323 (9): 570-578.
- [19] Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T Lymphocyte-directed Gene Therapy for ADA- SCID: Initial Trial Results After 4 Years [J]. Science, 1995, 270 (5235): 475-480.
- [20] Markowitz D, Goff S, Bank A. Construction and Use of a Safe and Efficient Amphotropic Packaging Cell Line [J]. Virology, 1988, 167 (2): 400-406.
- [21] Danos O, Mulligan RC. Safe and Efficient Generation of Recombinant Retroviruses with Amphotropic and Ecotropic Host Ranges [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85 (17): 6460-6464.
- [22] Markowitz D, Goff S, Bank A. A Safe Packaging Line for Gene Transfer: Separating Viral Genes on Two Different Plasmids [J]. J Virol, 1988, 62 (4): 1120-1124.
- [23] Miller AD, Garcia JV, von Suhr N, et al. Construction and Properties of Retrovirus Packaging Cells Based on Gibbon Ape Leukemia Virus [J]. J Virol, 1991, 6 (5): 2220-2224.
- [24] Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, et al. High-titer

- Packaging Cells Producing Recombinant Retroviruses Resistant to Human Serum [J]. *J Virol*, 1995, 69 (12): 7430-7436.
- [25] Forestell SP, Dando JS, Chen J, et al. Novel Retroviral Packaging Cell Lines: Complementary Tropisms and Improved Vector Production for Efficient Gene Transfer [J]. *Gene Ther*, 1997, 4 (6): 600-610.
- [26] Sheridan PL, Bodner M, Lynn A, et al. Generation of Retroviral Packaging and Producer Cell Lines for Large-scale Vector Production and Clinical Application: Improved Safety and High Titer [J]. *Mol Ther*, 2000, 2 (3): 262-275.
- [27] Ghani K, Cottin S, Kamen A, et al. Generation of a High-titer Packaging Cell Line for the Production of Retroviral Vectors in Suspension and Serum-free Media [J]. *Gene Ther*, 2007, 14 (24): 1705-1711.
- [28] Yu SF, von Ruden T, Kantoff PW, et al. Self-inactivating Retroviral Vectors Designed for Transfer of Whole Genes into Mammalian Cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83 (10): 3194-3198.
- [29] Cronin J, Zhang XY, Reiser J. Altering the Tropism of Lentiviral Vectors Through Pseudotyping [J]. *Curr Gene Ther*, 2005, 5 (4): 387-398.
- [30] Naldini L, Blomer U, Gally P, et al. In vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector [J]. *Science*, 1996, 272 (5259): 263-267.
- [31] Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A Third-generation Lentivirus Vector With a Conditional Packaging System [J]. *J Virol*, 1998, 72 (11): 8463-8471.
- [32] Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, et al. Self-inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient in vivo Gene Delivery [J]. *J Virol*, 1998, 72 (12): 9873-9880.
- [33] Cornetta K, Duffy L, Turtle CJ, et al. Absence of Replication-Competent Lentivirus in the Clinic: Analysis of Infused T Cell Products [J]. *Mol Ther*, 2018, 26 (1): 80-288.
- [34] Marcucci KT, Jadowsky JK, Hwang WT, et al. Retroviral and Lentiviral Safety Analysis of Gene-Modified T Cell Products and Infused HIV and Oncology Patients [J]. *Mol Ther*, 2018, 26 (1): 269-279.
- [35] Sastry L, Cornetta K. Detection of Replication Competent Retrovirus and Lentivirus [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 506: 243-263.
- [36] Haapala DK, Robey WG, Oroszlan SD, et al. Isolation from Cats of an Endogenous Type C Virus with a Novel Envelope Glycoprotein [J]. *J Virol*, 1985, 53 (3): 827-833.
- [37] Metharom P, Takyar S, Xia HH, et al. Novel Bovine Lentiviral Vectors Based on Jembrana Disease Virus [J]. *J Gene Med*, 2000, 2 (3): 176-185.
- [38] Chang LJ, Urlacher V, Iwakuma T, et al. Efficacy and Safety Analyses of a Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Derived Vector System [J]. *Gene Ther*, 1999, 6 (5): 715-728.
- [39] Sastry L, Xu Y, Duffy L, et al. Product-enhanced Reverse Transcriptase Assay for Replication-competent Retrovirus and Lentivirus Detection [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16 (10): 1227-1236.
- [40] Miskin J, Chipchase D, Rohll J, et al. A Replication Competent Lentivirus (RCL) Assay for Equine Infectious Anaemia Virus (EIAV)-based Lentiviral Vectors [J]. *Gene Ther*, 2006, 13 (3): 196-205.
- [41] Escarpe P, Zayek N, Chin P, et al. Development of a Sensitive Assay for Detection of Replication-competent Recombinant Lentivirus in Large-scale HIV-based Vector Preparations [J]. *Mol Ther*, 2003, 8 (2): 332-341.
- [42] Sastry L, Xu Y, Johnson T, et al. Certification Assays for HIV-1-based Vectors: Frequent Passage of Gag Sequences Without Evidence of Replication-competent Viruses [J]. *Mol Ther*, 2003, 8 (5): 830-839.
- [43] Manilla P, Rebello T, Afable C, et al. Regulatory Considerations for Novel Gene Therapy Products: a Review of the Process Leading to the First Clinical Lentiviral Vector [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16 (1): 17-25.
- [44] Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, et al. High-titer Human Immunodeficiency Virus Type 1-based Vector Systems for Gene Delivery into Nondividing Cells [J]. *J Virol*, 1998, 72 (11): 8873-8883.
- [45] Martineau D, Klump WM, McCormack JE, et al. Evaluation of PCR and ELISA Assays for Screening Clinical Trial Subjects for Replication-competent Retrovirus [J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8 (10): 1231-1241.
- [46] Skrdlant LM, Armstrong RJ, Keidaisch BM, et al. Detection of Replication Competent Lentivirus Using a qPCR Assay for VSV-G [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018, 8: 1-7.

(收稿日期 2018年6月21日 编辑 王雅雯)