

出國報告（出國類別：參加會議及研習）

赴美國參加 2009 年第 5 屆細胞與基因治療國際論壇研習（5th Cell and Gene Therapy Forum, 2009）

服務機關：行政院衛生署藥物食品檢驗局

姓名職稱：王德原科長

派赴國家：美國

出國期間：中華民國 98 年 01 月 25 日至 01 月 30 日

報告日期：中華民國 98 年 04 月 21 日

目 次

一、目的-----	3
二、行程與工作紀要-----	4
三、會議內容重點	
壹、基因治療產品品質與安全的製造重點-----	5
貳、基因治療產品臨床前試驗的特殊考量-----	11
參、基因治療產品之病毒載體遞送系統-----	17
四、心得與建議-----	23

一、目的

Phacilitate 機構係推動生命科學領域尖端知識交換，並提供聯繫網絡平台之國際組織，本次於 98 年 1 月 26 至 28 日在美國華盛頓特區舉行之 2009 年第 5 屆細胞與基因治療國際論壇（CELL AND GENE THERAPY FORUM 2009），為 Phacilitate 機構每年舉辦六種國際論壇之一，會議包含基因治療、細胞治療、複合性組織工程等產品管理體制與產業最新發展。

全球迄今已有多種基因治療與細胞治療產品正進行上市前臨床試驗評估。國內於 97 年亦有 1 件基因治療與 8 件細胞治療人體試驗案提出申請，顯示國內新興生醫產品發展，已逐步和國外先進科技接軌，因此建立國內新興生醫產品管理體系實刻不容緩。

我國基因治療之發展，早自 90 年初期即有以質體轉殖 VEGF 生長因子治療軀幹壞死組織再生的創新療法，惟當時國內尚未有任何關於基因治療技術與產品之管理規範。92 年衛生署公告基因治療人體試驗申請與操作規範，成為國內第一種基因治療的管理規範，而有關基因治療產品之製備與品質管制要求，仍付之闕如。

時至 97 年，衛生署業已收到國內第二件基因治療人體試驗申請案，顯示我國醫療技術亦隨歐美先進國家，重新進入基因治療領域，然近幾年歐美各國業已將基因治療產品之定義、管理架構與品質安全要求，逐一公佈供生技醫藥界參考，以進行有效管理。

因此，本次參加該基因治療論壇研習，擬學習歐美先進國家對此類新興生醫產品之定位、分類與規範，除了解基因治療臨床試驗之最新進展外，亦將基因治療產品製程管制與成品檢驗規格與要求，列為學習重點。相關經驗將有助於本局未來協助衛生署辦理基因治療等新醫療技術人體試驗訪查作業，以及進行產品技術資料審查、檢驗之參考。

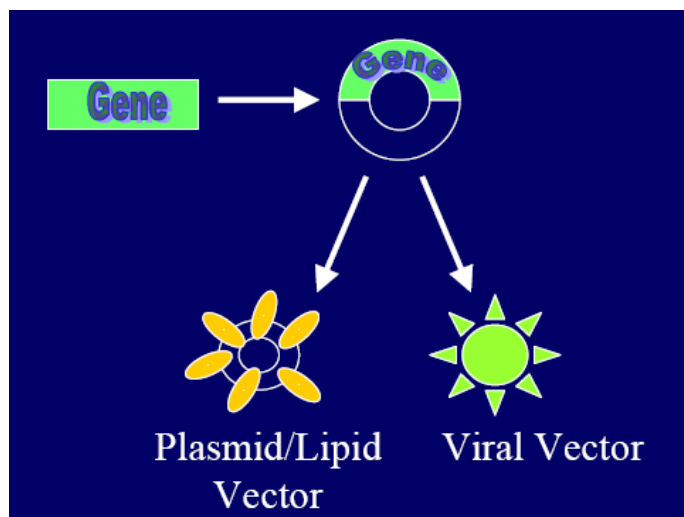
二、行程與工作紀要

日期	工作記要
一月二十五日	啓程(台北→日本東京轉機→美國華盛頓特區)
一月二十六日	報到、參加研習會議
一月二十七日	研習會議
一月二十八日	研習會議
一月二十九日	返程(美國華盛頓特區→日本東京轉機)
一月三十日	抵日本東京轉機返台

三、會議內容重點

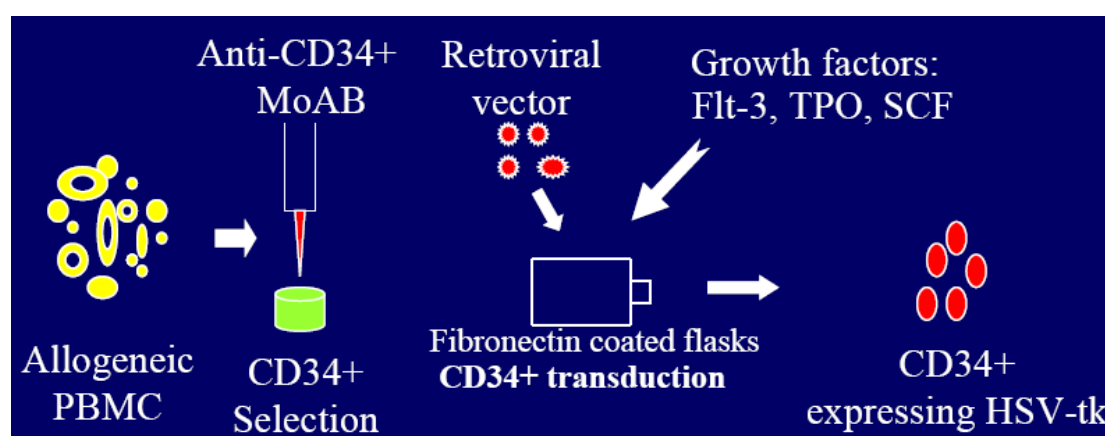
壹、確保基因治療產品品質與安全的製造重點：CBER 觀點 (Manufacturing of Gene Therapies: Ensuring Product Safety and Quality: CBER Perspectives)

依據 CBER/FDA 於 2006 年公布之基因治療臨床試驗產業基準 — 延遲不良反應觀察標的 (2006 Guidance for Industry “Gene Therapy Clinical Trials – Observing Subjects for Delayed Adverse Events”) 之定義，所謂基因治療產品 (gene therapy products)，係指藉由植入遺傳物質 (genetic material) 的轉錄 (transcription) 或轉譯 (translation)、或將核酸片段、病毒或基因工程微生物 (genetic engineered microorganisms) 整合至宿主細胞基因組中以產生某種效果 (即基因治療) 之產品 (如右圖)。



基因工程產品可直接注射於人體內修飾細胞 (used to modify cells in vivo)，或將基因工程產品植入活體外細胞後再注射入接受者體內 (transferred to cells ex vivo prior to administration to the recipient)。

因此，基於基因治療的高變異性，其產品製程亦相對複雜，以下圖為例，



若想以轉殖 HSV-tk 基因之血液幹細胞治療特定疾病，需先收集異體捐贈者之周邊血液單核細胞 (allogeneic peripheral blood mononuclear cells, PBMC)，接著以抗 CD34+ 的單株抗體進行血液幹細胞篩選，之後以攜帶有 HSV-tk 基因之反轉錄病毒載體感染 CD34+ 細胞並在具備適當生長因子條件下繼續培養細胞，最後即可得到攜帶並表現 HSV-tk 基因之血液幹細胞，可作為之後移植手術使用。

- **基因治療產品之安全與品質 (Gene Therapy Product Safety and Quality)**

依據目前 CBER/FDA 的觀點，關於基因治療產品的品質與安全控管，需經由至少以下三個層面來管理：

- 用於產品製造之成分 (Components used in product manufacture)
- 最終產品檢驗與特徵描述 (Final product testing and characterization)
- 符合 CGMP 規範要求之製程管制程序 (Control of Manufacturing process)

- **用於基因治療產品製造成分 (Components used in product manufacture) 之管理**

用於基因治療產品製造成分，大略可區分為以下四種：

- 載體 (vector)
- 細胞 (cells)
包含異體、自體與異種細胞成分。
- 細胞庫系統 (cell bank system)
包含種原細胞庫與工作細胞庫 (master cell bank/working cell bank)、種原病毒庫與工作病毒庫 (master viral bank/working viral bank)
- 輔助產品/試劑 (ancillary products/reagents)
包含生長因子 (growth factors)、細胞激素 (cytokines) 與單株抗體 (monoclonal antibody, mAb) 等。

1. **載體 (Vector)**

有關基因載體部分，機構需提供三種類型資料以供審查，包含：

- 載體之描述、來源歷史資料以及用於組建植入基因之詳細說明。
- 載體圖譜 (vector diagram)。
- 核酸序列分析
 - ◆ 若載體基因組小於 40,000 鹼基 (< 40 KB)，則需有完整之核酸序列。
 - ◆ 若載體基因組大於 40,000 鹼基 (> 40 KB)，則至少需說明插入點序列 (sequence inserts)、flanking 區域與修飾區域。
 - ◆ 另需清楚敘述有關非預期出現序列的成因分析。

2. **細胞 (Cells)**

有關細胞部分，機構需提供二種類型資料以供審查，包含：

- 用於生產基因治療產品之細胞基質 (cells substrates for production of gene therapies)。
- 用於細胞治療或活體外修飾基因治療的自體或異體細胞 (autologous and allogeneic cells used for cell therapies or ex vivo modified gene therapies)，包含：
 - ◆ 特定組織或細胞類型的來源 (source: tissue and cell type)。
 - ◆ 白血球分離術、外科手術等收集程序 (collection procedure: mobilization, surgery, leukapheresis, devices used)
 - ◆ 21 CFR 1271 規範規定之傳染病篩檢之捐贈者合適性 (donor eligibility: infectious disease screening & testing, 21 CFR 1271)。

3. 種原細胞庫與種原病毒庫 (Master Cell Bank & Master Viral Bank)

有關種原細胞庫與種原病毒庫部分，機構需提供安全性試驗 (safety testing) 資料以供審查，包含：

- 無菌試驗 (Sterility)。
- 黴漿菌試驗 (Mycoplasma)。
- 外來病毒試驗 (Adventitious virus)，包含：
 - ◆ 體外或體內外來病毒試驗 (*in vitro* and *in vivo* adventitious virus assays)。
 - ◆ 牛與豬相關病毒 (若試驗使用試劑已檢驗，可免除)。
 - ◆ 人類細胞株 (human cell lines)，至少需檢驗 EBV、HBV、HCV、CMV、HIV 1&2、HTLV 1&2 與 B19 等病毒。
 - ◆ 鼠類細胞株 (murine cell lines)，包含 MAP 與反轉錄病毒等。

4. 種原細胞庫特徵 (Master Cell Bank Characterization)

種原細胞庫，須針對下列項目特徵，進行詳細描述。

- 鑑別 (Identity)。
- ◆ 同功酵素 (isoenzyme)。
- 純度 (Purity)。
- ◆ 汙染其他細胞 (contaminating cells)。
- 致腫瘤性 (Tumorigenicity)。
- 其他 (Other)。
- ◆ 變異性 (Viability)。

5. 工作細胞庫與工作病毒庫 (Working Cell Bank & Working Viral Bank)

有關工作細胞庫與工作病毒庫部分，機構需提供安全性與特徵描述相關資料以供審查，包含：

- 安全性 (Safety) 部分
 - ◆ 無菌試驗 (sterility)。
 - ◆ 黴漿菌試驗 (mycoplasma)。
 - ◆ 體外外來病毒試驗 (*in vitro* adventitious virus)
 - ◆ 複製能力病毒 (Replication competent virus)
- 特徵描述 (Characterization) 部分
 - ◆ 鑑別 (identity)。
 - ◆ 安定性 (stability)。
 - ◆ 其他必要項目。

6. 用於製造之試劑 (Reagents Used in Manufacturing)

用於製造基因治療產品之試劑，在向主關機關提出審查申請時，必須提出下列各項資料，證明相關試劑品質安全無虞。

- 需提供使用試劑以下各項數據資料：
 - ◆ 最終濃度 (final concentration)。
 - ◆ 供應商 (vendor)。
 - ◆ 來源 (係指來自人體或動物) (source from human, bovine, ... etc)。
 - ◆ 產品等級 (係指為具許可證藥品、臨床等級或一般試藥等級) (licensed product, clinical grade, reagent grade)。
 - 檢驗成績書 (Certificate of Analysis, COA)。
 - 交叉參考文獻信函 (Cross Reference Letter)。
 - 品質管制計畫 (Qualification Program)。
 - ◆ 包含安全性試驗與品質評估等資料 (safety testing and quality assessment)。
- 最終產品檢驗 (Final product testing) 之管理
- ### 1. 產品製造 (Product Manufacturing)
- 須說明由供應商製造與純化之部分。
 - 有關活體外轉殖細胞部分，亦須說明：

- ◆ 收集或處理方法 (method of collection/processing)。
- ◆ 培養與轉殖程序 (culture/transduction procedures)。
- ◆ 如輻射照射等其他修飾 (other modification, ex irradiation)。
- ◆ 最終收穫 (final harvest)。
- 最終產品組成 (Formulation of final product)。
- ◆ 組成緩衝液 (formulation buffer)。
- ◆ 賦形劑 (excipients)。
- ◆ 供應商與細胞濃度 (vendor/cell concentration)。
- ◆ 貯存 (storage)。

2. 最終產品檢驗 (Final Product Testing)

基因治療產品，其最終產品檢驗係用以確認產品安全性、評估產品特徵與透過批次放行檢驗維持批次間產品一致性的最重要程序。

有關基因治療最終產品安全性試驗部分，需進行下述檢驗：

- 無菌試驗。
- 黴漿菌試驗。
- 內毒素試驗 (endotoxin)。
- 包含體外病毒測試 (in vitro virus) 與複製能力病毒檢測 (Replication Competent Virus) 等之外來病毒試驗。

有關基因治療最終產品特徵確認試驗部分，需進行下述檢驗：

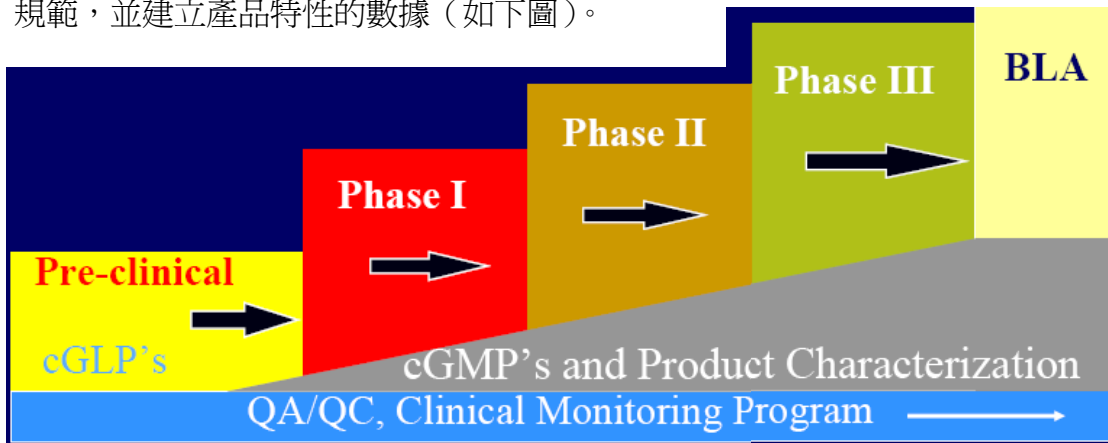
- 純度。
 - ◆ 係指檢測基因治療產品是否有 DNA、蛋白質、培養試劑等殘餘物質的汙染。
- 鑑別。
 - ◆ 係指限制酶圖譜 (restriction map)、結構特徵 (structural characterization) 等轉殖基因載體基本資料比對。
- 效價 (Potency)。
- ◆ 係指產品特定或相對之生物活性 (indicate biological activity specific/relevant to the product)。
- ◆ 需提供定量讀值 (quantification readout)。
- ◆ 須在產品進行第三階段臨床試驗前，完成所有特徵描述檢測項目，

植入基因的表現量與可接受力價 (titers)，在臨床試驗早期時，即應落實執行。

- 安定性。
 - ◆ 應在所有臨床試驗進行期間持續評估。

- **CGMP 規範 (Current Good Manufacturing Practice) 之要求**

有關基因治療產品如何符合 CGMP 規範之要求，應採取逐步執行 CGMP 規範，並建立產品特性的數據 (如下圖)。



- 通常在執行第一階段臨床試驗之前，須先建立基因治療產品在生物安全以及基本產品特性相關資料。
- 基因治療產品之製程中檢驗規格與最終產品放行檢驗規格，係依據臨床前試驗數據來決定。
- 在產品開發過程，可將相關數據與產品表現做更緊密結合。
- 相關分析方法，亦須依據 21 CFR 610 規範規定方式執行，或採取等效性試驗，前述使用之各檢驗方法，須在送審 BLA 查驗登記前，完成確效作業。
- 目前 CBER 已提供下列二項規範文件，作為基因治療產品 CMC 審查與相關作業之基準。
 - Guidance for Review Staff and Sponsors: Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)
 - 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

貳、基因治療產品臨床前試驗的特殊考量：CBER 觀點（Preclinical Considerations for Gene Therapy Products: CBER Perspective）

機構進行基因治療產品研發計畫前，應先針對所設計之基因治療產品特性，了解以下事項：

一、若基因治療產品係被直接注射入接受者體內，需了解~

- 將使用載體（vector type）、啓動子（promoter）或轉殖基因（transgene）等何種類型之基因治療產品植入人體？
- 期望轉殖基因在接受者體內產生短期基因表現或長期基因表現？
- 持續追蹤了解載體進入接受者體內之後，發生哪些變化或反應？

二、若基因治療產品係於活體外（*ex vivo*）被植入細胞中，須了解~

- 將使用何種型態的細胞。
- 這些被使用的細胞從何而來。
- 將使用多少數量的細胞。
- 持續追蹤了解基因轉殖細胞進入接受者體內之後，發生哪些變化或反應。

此外，亦需進一步了解下述各項問題：

- 選用的基因治療產品與何種動物物種具生物關聯性（宿主）。
- 有無潛在相關之疾病或傷害之動物模式（the potentially relevant animal model of disease/injury）。
- 將基因治療產品輸入患病或受傷害接受者之最適途徑或方法為何（the optimal method/route to delivery）。
- 將基因治療產品輸入患病或受傷害接受者之最佳時機為何（the optimal timing）。
- 是否需要重複注射。
- 對於擬治療患者族群而言，接受基因治療產品之風險／利益比例（risk/benefit ratio）為何。

因此，當機構在設計臨床前試驗時，藥理學試驗（pharmacology studies）部分需考慮使用相關疾病或傷害之動物模式（relevant animal models of disease/injury），而毒理學試驗（toxicology studies）部分則需考慮具生物相關性

之健康動物 (biologically relevant healthy animals)，至於結合藥理與毒理的研究，必須以相關疾病或傷害之動物模式決定活性與毒性之終點 (activity and toxicology endpoints)，且基因治療產品在動物體部分微環境中產生的病理生理狀況 (pathophysiology condition)，將衝擊到產品的安全性。

- **選擇適當的試驗動物物種或模式 (Selection of Appropriate Animal Species/Model)**

目前並無任何規範宣告不得使用非人類靈長類 (non human primate)、或同時使用啮齒類 (rodent) 與非啮齒類動物 (non-rodent)、或同時使用多重物種 (multiple species)，作為基因治療產品臨床前試驗的測試對象，然而操作臨床前試驗機構，必須提出選擇特定物種作為試驗對象的科學證據。

- **直接基因轉移 (Directive Gene Transfer)**

用於直接基因轉移試驗之動物，該動物必須允許載體轉植 (vector transduction)、轉殖基因表現，並存在類似人體之生物反應，此類有關試驗動物物種特異性問題，類似基因工程製劑與單株抗體製劑產品選擇試驗動物的狀況，使用相似的轉殖基因是可行的，重點在於能明確定義被研究物質在試驗動物與在人體內之相似及相異處。

- **活體外基因轉移 (Ex Vivo Transduction)**

用於活體外細胞基因轉殖之試驗動物，須考慮到試驗動物接觸被植入人類細胞後所引發的免疫反應。對於類似細胞的使用 (use of analogous cells)、免疫抑制動物的使用 (use of immunosuppressive animals) 及免疫不全動物的使用 (use of immunodeficient animals)，更為試驗動物的選擇重點。此外，對於這些動物與人體的比較生理學 (comparative physiology)，以及包含遞送系統與步驟 (delivery system/procedure) 與系統性或標靶性注射 (systematic v.s. targeted delivery) 等注射途徑 (route of administration) 有關事項，亦須特別注意考量。

- **基因治療臨床前概念驗證試驗設計：藥理學部分 (Proof-of-Concept Study Design: Pharmacology)**

基因治療產品臨床前動物試驗，在藥理學試驗部分，須注意植入基因在離體 (*in vitro*) 與活體外 (*ex vivo*) 的作用活性，而在活體動物疾病或傷害模式，須能闡述模擬人體疾病或傷害模式的合理性，以支持進行臨床試驗，此包含以下各項的評估：

- **最佳基因治療產品注射劑量與劑型 (Optimize product dose and formulation)。**

- 最佳基因治療產品注射步驟 (Optimize administration procedure)。
 - 最佳基因治療產品注射時機 (Optimize timing of product administration and dosing regimen)。
 - 鑑別最小有效劑量與任何劑量－反應之關係 (Identification of a minimal effective dose and any dose-response relationship)。
 - 鑑別非最終生物標誌與活性終點 (Identification of non-terminal biomarkers and activity endpoints)。
- **基因治療臨床前概念驗證試驗設計：試驗終點部分 (Proof-of-Concept Study Design: Endpoints)**

基因治療臨床前試驗，有關試驗終點的設計，需考量以下數項：

- 無偏差試驗設計 (Nonbiased design)

包含隨機安排試驗動物組別、設計如偽裝 (sham)、賦形劑 (vehicle) 等適當的對照組以及盲樣分組動物在存活時與犧牲後的評估等。

- 功能性輸出 (Functional outcome)

提供每一種功能性測試與基因產品注射後檢測時間點的基本原理闡述。此外，亦須採取適當數量的試驗動物與測試組別，以確保研究結果具統計意義與生物顯著性說明 (statistically and biologically significant interpretation)。

- 生化評估 (Biochemical evaluation)

需使用如免疫組織化學 (immunohistochemistry, IHC)、免疫細胞化學 (immunocellulochemistry, ICC) 等標準化的染色步驟，以鑑定動物組織變化，另需使用定量聚合酶鏈鎖反應 (quantitative polymerase chain reaction, Q-PCR)、反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 等分子生物學技術，驗證動物體特定基因表現的變化。

- **基因治療臨床前概念驗證試驗設計之毒理試驗：專一性部分 (Toxicology Study Design: Specifics)**

- 需考量概念驗證與時間模式的應用。
- 合理的試驗動物分組大小以提供試驗數據的適當解釋。
- 試驗動物的使用數量將依據動物物種 (species)、疾病模式 (disease model)、基因治療產品投遞系統 (delivery system)、手術程序 (surgical

procedures) 等條件來決定。

- 在試驗動物使用與將預定被用於臨床試驗相同的基因治療產品(包含載體類型與核酸序列、啓動子、轉殖基因、細胞型態、產品配方組成等)。
- 在試驗動物使用與臨床注射途徑相等之注射途徑與方法。
- 劑量等級的選擇，則需考慮：
 - ◆ 能提供概念驗證數據之最小有效劑量等級 (minimally effective dose level – POC data)。
 - ◆ 須包含多重劑量等級，以決定無副作用劑量等級 (no-observed adverse-effect-level, NOAEL) 與劑量－毒性反應關係 (dose-toxicity response relationship)。
 - ◆ 日後有關臨床試驗使用劑量，則需基於試驗動物體重、表面積、固定劑量等級及標的器官體積與重量等參數進行推斷。
- 有關標準毒理學終點 (standard toxicology endpoints)，則需評估：
 - ◆ 死亡率、臨床觀察、體重與食慾等參數 (mortality, clinical observations, body weights, appetite)。
 - ◆ 血液學、血清化學與凝血等反應 (hematology, serum chemistry, coagulation)。
 - ◆ 標的器官與非標的器官的病理學分析結果，包含如器官重量等廣泛性的粗略病理學觀察 (comprehensive gross pathology, organ weights)、顯微鏡病理觀察之盲樣評估 (microscopic pathology – blinded assessment)、標準與其他品系差異 (differences between standard and other strains) 及任何非預期之動物死亡的原因分析 (causes of any unscheduled animal deaths) 等。
- 有關其他試驗終點部分，需視下述狀況決定：
 - ◆ 載體與轉殖基因產生致癌性 / 至腫瘤性 (carcinogenicity/tumorigenicity) 的潛力，以及宿主對載體與轉殖基因產生之免疫反應 (host immune response)。
 - ◆ 宿主對轉殖細胞型態 (transduced cell types) 產生之免疫反應，以及轉殖細胞發生非控制性生長 (unregulated growth) 或至腫瘤性潛力。
 - ◆ 如心臟酵素 (cardiac enzymes)、行爲評估 (behavioral assessment)、

神經毒理評估 (neurotoxicity evaluation)、眼科檢查 (ophthalmology exam) 等之疾病/損傷重點 (disease/injury of focus)。

- 需依據基因治療產品的生物學特性，提供足夠的臨床前研究期間，以進行功能、實驗室、型態輸出 (morphological outcome) 等適當的評估。
- 需包含數個時間點量測非試驗終點及試驗終點參數，以評估在基因治療產品注射試驗動物後之早期與晚期，有關載體於試驗動物體內之生物分佈 (vector biodistribution)，以及轉殖細胞命運 (fate of transduced cell) 等的發現，

● **基因治療臨床前試驗設計：載體生物分佈分析 (Biodistribution Assay)**

臨床前試驗需決定基因治療產品，在試驗動物體內之生殖腺 (germline)、血液、標的器官與非標的器官內之生物分佈 (biodistribution) 以及持久量變曲線 (persistence profile)，而其中最重要之部分，在於必須使用相同物種試驗動物來進行毒理學試驗。

- 載體生物分佈特殊考量：
 - ◆ 若為新穎基因治療產品 (novel gene therapy products)：需在進行臨床試驗前，完成臨床前動物試驗的生物分佈數據評估，以確認藥物動力量變曲線 (kinetic profile) 與病毒/載體的持久性 (persistence of vector/virus)。
 - ◆ 若為先前已用於人體之載體：需在臨床試驗初期同步進行生物分佈研究，且在試驗動物取得之相關生物分佈研究數據，應可與先前臨床試驗結果相呼應。

■ **臨床前試驗數據來源 (Sources of Preclinical Data)**

用以支持臨床試驗進行之臨床前藥理學與毒理學動物試驗數據，係來自於：

- 合約實驗室執行之符合 GLP 規範之毒理學研究 (GLP-compliant toxicology studies conducted by a contract laboratory)。
- 良好管控之自行執行研究 (well-controlled studies conducted in house)。
- 經同儕審核並發表於期刊之試驗數據 (published data in peer-reviewed journals)。
- 先前已製造或已進行臨床研究類似產品之交互參照 (cross-reference to similar products in previously submitted manufactures/INDs)。

◆ **安全性與活性之評估 (Assessment of Safety and Activity)**

簡言之，基因治療產品的臨床前動物試驗，係用以進行產品安全性與活性評估之重要程序，開始於適當試驗動物物種/模式的選擇 (relevant animal species/models)，並經藥理學試驗與安全試驗分別評估產品之可能活性與可能毒性後，且在計算風險：利益比例後，該產品始可進入人體臨床研究階段。

參、基因治療產品之病毒載體遞送系統 (Viral Vectors for the Targeted Delivery of Gene-based Therapies)

● 腺相關病毒載體 (Adeno-Associated Virus Vectors)

■ 腺相關病毒 (Adeno-Associated Virus, AAV)

腺相關病毒 (Adeno-Associated Virus, AAV) 是一種屬於小病毒科 (*family parvoviridae*)、*Dependovirus* 屬之小型正單股或負單股 DNA 病毒 (+ ssDNA virus or - ssDNA virus)。AAV 其病毒顆粒小，僅約 20 奈米 (nanometer)，為複製缺陷型非外套膜病毒 (replication-defective, non-enveloped virus)。目前已發現 AAV 多以人類與其他靈長類動物為感染宿主。AAV 感染宿主後，僅會引起微弱之免疫反應，目前尚未發現會造成宿主嚴重疾病之 AAV。

AAV 基因組僅含 4 千 7 百鹼基 (4.7 kilobase)，在基因組兩端各具一組反向終點重複 DNA 序列 (inverted terminal repeats, ITRs) 與 *rep*、*cap* 二組開放讀取結構 (open reading frame, ORF)，其中 *rep* 含有四組重疊之 *rep* 基因序列，產生之 Rep 蛋白參與 AAV 生活史，而 *cap* 則含有 VP1、VP2、VP3 等病毒 capsid 之重疊基因序列，使 AAV 可以感染分裂中與非分裂之細胞 (dividing and non-dividing cells)，因此導致其基因組可以混入包含人類在內之宿主基因組中，此一特徵令 AAV 可被用以作為基因治療的候選病毒載體 (candidate viral vector of gene therapy)。

野生型 (wild-type) AAV 因其具有缺乏致病性 (lack of pathogenicity)、可感染非分裂中細胞 (infect non-dividing cell) 及具有穩定地混入人類宿主細胞基因組第十九條染色體特定區域 AAVS1 的能力 (ability to stably integrate into the host cell genome at specific site, AAVS1, in human 19th chromosome) 的特徵，故已被廣泛應用於基因治療中。而前述特徵亦使 AAV 較反轉錄病毒更易被預測，而反轉錄病毒則常在宿主細胞內隨機插入 (insertion) 基因組或引發突變生成 (mutagenesis)，進而導致宿主產生癌症。

■ 腺相關病毒載體 (Adeno-Associated Virus Vector, AAV Vector)

而將 AAV 用於基因治療載體，需先將其基因組內 *rep* 與 *cap* 基因移除，再將擬轉殖基因與其啓動子 (promoter) 插入 AAV 基因組兩端 ITR 之間。以 AAV 為基礎之基因治療載體會在宿主細胞核內形成游離基因連鎖子 (episomal concatamers)，在非分裂細胞中，這些由 AAV 形成的游離基因連鎖子，會隨著宿主細胞之生命週期而原封不動的存在，在分裂細胞中，AAV 形成之游離基因不會隨細胞分裂而分裂，因此 AAV DNA 會隨宿主細胞進行細胞分裂而逐漸流失。目前研究已證實，AAV DNA 隨機混入宿主細胞基因組之機率低，但仍可被偵測到。

AAV 亦呈現極低之免疫生成性 (very low immunogenicity)，似乎

僅限制在當 AAV 對細胞被誘發出難以清楚定義之細胞毒性反應 (cytotoxic response) 時，宿主体內 AAV 中和抗體 (neutralizing antibody) 的產生方面，此與伴隨感染停滯細胞能力等之特徵，在在顯示 AAV 作為人類基因治療載體的優勢。

然而，使用 AAV 作為基因治療載體，仍有一些不利之處，例如：

1. 載體的複製能力 (cloning capacity of the vector) 相對有限，然而大部分擬用於治療的基因，通常需要 4.8 kilobase 大小的載體基因組以供完整置換，因此，對於較大的基因，標準之 AAV 載體並不適用。
2. 二基因組之 AAV 的 ITRs 能形成一條自頭至尾的連鎖游離基因，然而在宿主細胞複製分裂時，這些插入位置會在產生轉錄序列 (transcript) 時移除，因此導致游離基因的流失。
3. 野生型 (wild type) 病毒感染宿主時引發體液免疫 (humoral immunity) 的生成，係非常普遍之現象，然而所產生之中和抗體，卻可能導致 AAV 載體進入體內時，被個體免疫系統快速清除。

■ 腺相關病毒載體的臨床試驗 (AAV Clinical Trials)

時至今日，AAV 已被廣泛用於第一階段與第二階段基因治療臨床試驗，例如被用於治療囊泡性纖維症 (cystic fibrosis)、B 型血友病 (hemophilia type B)、巴金森氏症 (Parkinson's disease)、肌肉萎縮症 (muscular dystrophy) 等遺傳疾病，已呈現相當成效。

這些 AAV 載體基因治療臨床試驗，都具有以下的特徵：

- ◆ 不論在第一階段或第二階段臨床試驗，其受試者數量與一般藥物臨床試驗相較，皆相對很少。
- ◆ 目前 AAV 載體基因治療臨床試驗，幾乎都使用 AAV-1 與 AAV-2 二類載體，但目前已有使用 AAV-1、AAV-5、AAV-6 與 AAV-8 等 AAV 載體，開始被用於新的臨床試驗。
- ◆ 大多數的試驗，都缺少長期追蹤 (long-term follow-up)。
- ◆ 不同的 AAV 基因治療產品，其彼此間之品質與效價差異很大、或不明瞭。

■ AAV 載體之毒性與宿主反應 (Toxicity and Host Response)

迄 2009 年 1 月為止，從全球 AAV 載體基因治療的過程與結果顯示，AAV 載體仍相當安全，亦鮮少有任何與載體相關之嚴重不良反應 (serious adverse events, SAE) 通報，僅有少數試驗之受試者，發生偶發性發燒 (occasional fever) 或接種區域反應 (local injection site reaction)。

■ 免疫學與再接種能力 (Immunology and Ability to Re-administer)

如前所述，AAV 載體會在人體產生免疫反應，而且目前研究業已

證實會產生體液免疫 (humoral immune responses) 與細胞免疫 (cellular immune responses)，且因 AAV 在其病毒外殼蛋白 (capsid) 的序列相似度高，故當一種 AAV 載體在人體產生中和抗體後，該抗體會和 AAV-1 至 AAV-8 等所有種類的 AAV 載體產生交叉反應 (cross-reactive)。

而 AAV 載體在人體內產生免疫反應，與該載體之注射途徑與劑量有極大之關聯性。而這些免疫反應是否影響到轉殖基因的表現與基因治療效果，目前數據仍不明確，免疫反應對於再接種 AAV 載體的影響，目前亦不清楚。

■ 摘要

- ◆ 目前已經由臨床前毒理學試驗、生殖細胞株傳染 (germ-line transmission)、動物胚胎與胎兒毒理學試驗 (embryo-fetal toxicology) 以及第一階段臨床試驗，證明 AAV 載體是安全的。
- ◆ AAV 載體已可在 GMP 工廠中，大規模生產 (large-scale GMP production)，具有 18 個月的效期。
- ◆ 在胰臟炎長期保護效果臨床試驗數據證實 AAV 載體效用符合預期。

● 慢病毒載體 (Lentiviral Vector)

慢病毒 (Lentivirus) 之 "lenti"，係拉丁文 "慢" 的意思，屬於反轉錄病毒科 (*Retroviridae* family)、慢病毒屬 (genus of slow viruses)，具有長潛伏期 (long incubation period) 之特徵。

慢病毒可以遞送大量遺傳訊息至宿主細胞的 DNA 中，因此慢病毒為最有效率之基因遞送載體 (gene delivery vector)，人類免疫不全病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)、猴免疫不全病毒 (simian immunodeficiency virus, SIV) 與貓免疫不全病毒 (feline immunodeficiency virus, FIV) 等，為慢病毒的最佳範例。

■ 慢病毒分類 (Classification)

目前已經有五種血清型 (serotypes) 的慢病毒被辨識出來，反映出其與靈長類、山羊、綿羊、馬、貓與牛等不同類型宿主間的關聯性。感染靈長類的慢病毒，可與人類 CD4 蛋白結合，且缺乏 dUTPase 酵素。而感染綿羊與貓血清型的慢病毒，則在 gag 病毒蛋白間，對相同抗體具有交叉反應性。

■ 慢病毒型態 (Morphology)

慢病毒其病毒顆粒 (virions) 具外套膜 (envelope)，外型為輕微球體 (slightly spherical)，病毒顆粒大小介於 80 至 100 nm 之間。

慢病毒纖外套膜在掃描式電子顯微鏡觀察下，其外套膜呈現粗糙樣，或具有約 8 nm 大小之細微棘蛋白 (tiny spikes) 分布在外套膜上，

而病毒核心之 nucleocapsid 蛋白為等軸立方體 (isometric)，並聚集成桿狀 (rod-shape)。

■ 慢病毒基因組結構與複製 (Genome organization and replication)

導致慢病毒感染細胞的主因，在於其具備三種轉譯病毒蛋白之基因，在基因組自 5'端至 3'端分別為 gag、pol 與 env 基因。其它的病毒基因則統稱為輔助基因 (accessory genes)，依病毒種類之不同，如 HIV-1 之 vir、vpr、vpu、tat、rev 與 nef 等，其參與蛋白合成調節及處理病毒 RNA 與其他複製功能之程度亦不相同。而慢病毒之長末端重複序列 (long terminal repeat, LTR) 約為 600 個核苷酸大小，其 U3 區域為 450 個核苷酸大小，R 序列為 100 核苷酸大小，至於 U5 區域則為 70 個核苷酸大小。

慢病毒參與早期複製的病毒蛋白包含反轉錄酶 (reverse transcriptase) 與插入酶 (integrase) 二種蛋白質。其中反轉錄酶為依賴 RNA 之 DNA 合成酶 (RNA-dependent DNA polymerase)，係用於將病毒 RNA 複製成互補之 DNA 序列。插入酶則會將反轉錄酶複製之病毒互補 DNA 與宿主基因組 DNA 相結合，並在將病毒 cDNA 插入宿主基因組前，會先經 LTR 處理。

通常慢病毒會在宿主細胞內形成新病毒顆粒，且在離開宿主細胞後去感染其他細胞，但慢病毒亦可藉由宿主細胞與周邊細胞的接觸，直接感染周邊細胞。

■ 慢病毒之生物學特性 (Biology of Lentivirus)

- ◆ 病毒顆粒含 2%核酸，為正單股 RNA (positive-sense single stranded RNA)。
 - ✓ 基因組總長達 9,200 個核苷酸。
 - ✓ 基因組 5'端具 cap、3'端具 poly (A)尾巴。
- ◆ 病毒顆粒含 60%蛋白質，已發現 11 種主要病毒蛋白。
 - ✓ 基因組總長達 9,200 個核苷酸。

■ 慢病毒的應用

慢病毒最初被用來當作基因轉殖體外或動物試驗系統之工具，亦被用來進行大規模干擾特定基因表現之作用，即 RNA 干擾技術 (RNA interference technology)。

慢病毒目前的最新用途，係被用來做為基因治療產品的植入基因載體。例如在老鼠模式的血友病，可由慢病毒植入正常人類第八凝血因子基因後，改善症狀。

將慢病毒作為基因治療產品的基因載體，其最大優勢在於：

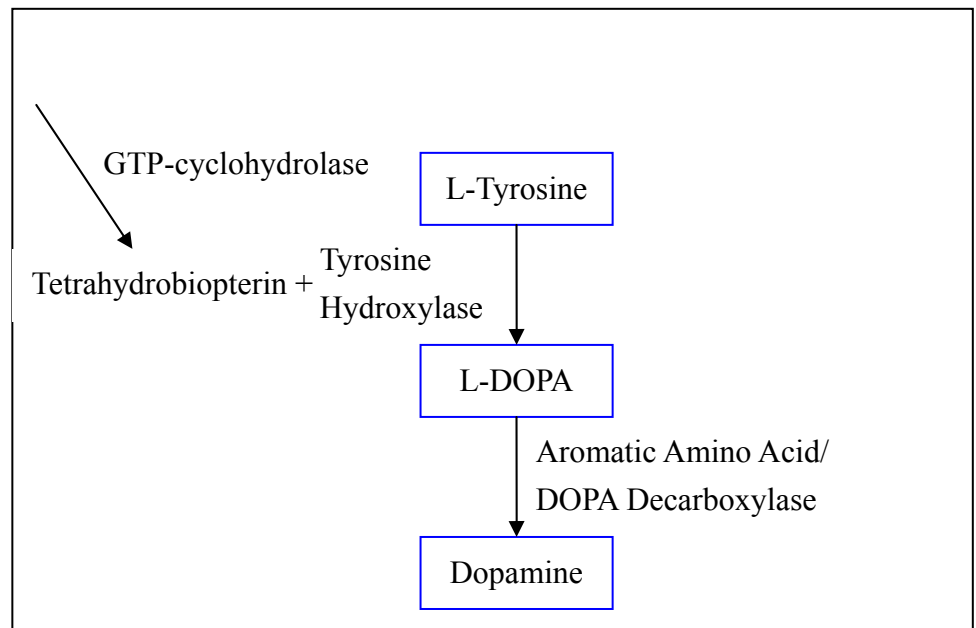
- ◆ 對於複製中細胞與非複製中細胞，皆具有高感染率。

- ◆ 轉殖基因可在宿主細胞中長期表現。
- ◆ 具有低免疫生成效果（low immunogenicity）
- 慢病毒載體的臨床試驗（Lentiviral Vector Clinical Trials）

目前有關應用慢病毒載體作為基因治療產品的最新臨床進展，以法國 BioMedics 公司發展之 ProSavin 產品為例，說明如下：

◆ ProSavin

BioMedics 公司發展之 ProSavin，係以慢病毒載體技術，發展出可攜帶酪胺酸羥化酶（tyrosine hydroxylase, TH）、GTP 環水解酶（GTP-cyclohydrolase, CH1）及芳香族 L-胺基酸脫羧基酶（aromatic amino acid decarboxylase, AADC）等基因，三個用於合成多巴胺（three genes for dopamine synthesis）基因的基因轉殖系統，臨床上利用 MRI 進行腦部立體定位，再將病毒植入大腦硬核（putamen）之 Striatum 區域，以協助患者大腦 Striatum 區域神經細胞，可重新利用該三酵素，將酪胺酸合成多巴胺（如下圖），以治療巴金森氏症（Parkinson's disease）。



◆ 製程

ProSavin 係在符合 GMP 規範之工廠中生產，利用 HEK293T 人類轉型上皮細胞株作為增殖慢病毒之宿主細胞，而在工作細胞培養時，同時感染單獨攜帶酪胺酸羥化酶、GTP 環水解酶及芳香族胺基酸脫羧基酶基因之三種質體，以在宿主細胞內合成慢病毒載體，之後回收細胞並以陽離子交換樹脂純化，最終病毒回收率約達 30%。

◆ 臨床前試驗－非人類靈長類模式

將 ProSavin 用於非人類靈長類巴金森氏症模式之臨床前試驗，結果顯示在注射慢病毒基因載體後六週，其行為表徵已有顯著改善，且至 28 個月後試驗終了時，仍可維持此一結果。

◆ 第一、二、三階段臨床試驗

法國 BioMedics 公司已向法國政府主管機關－法國衛生產品安全局 (French Health Product Safety Agency, AFFSAPS)，提出進行 ProSavin 第一、二階段臨床試驗申請作業。

試驗採 Open Label 研究評估以 ProSavin 治療雙側自發性巴金森氏症 (bilateral idiopathic Parkinson's disease) 的安全與效用 (Open Label Study of Safety and Efficacy)，由法國 Henri Mondor 醫院之神經外科專家 Stephane Palfi 博士負責執行手術，手術後再以非侵入式神經分子影像系統評估成效。

所有受試者皆為 L-DOPA 治療無效且無副作用的患者。第一階段試驗在 2008 年 3 到 5 月進行，以 Open Label 評估三名受試者，在兩種慢病毒載體植入劑量的安全性，並在 2008 年 11 月完成後續 6 個月追蹤。結果顯示受試者未出現任何副作用，亦未在其體內出現對抗慢病毒載體的免疫反應。持續追蹤迄今 1 月，亦無副作用產生。在患者體內亦未偵測到 anti-ProSavin 抗體存在，在患者血液與尿液中無病毒 RNA 存在，在患者白血球中亦無病毒 cDNA 存在。

該二階段之臨床試驗共有 18 名受試者，將以盲樣試驗評估植入患者體內至少 24 個月間的效果。

至於第三階段則將改以量產規模之慢病毒載體，進行安全與效用之銜接性試驗。

四、心得與建議

我國基因治療的發展，可以回溯至民國 90 年初期，由長庚醫院所提出以攜帶血管內皮生長因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）之基因質體治療下肢軀幹長久性潰瘍之人體試驗，透過植入合成 VEGF 生長因子之外來基因，在肢體患部產生大量 VEGF，誘使組織生成新血管網絡，加速傷口癒合。當時國內尚未有任何有關基因治療管理需求，該人體試驗亦僅有極少數之受試者，試驗結束時亦未衍生出安全性議題。

然而近 10 年來，世界各國皆視基因治療產品之發展，與細胞治療產品及組織工程複合式醫療器材等，同屬於本世紀新興生技醫療產品之領域，在安全、品質與管理層面，各國衛生主管機關業多已提出、或實施新的規範與措施。以美國與歐盟為例，美國 CBER/FDA 早已在 1990 年代即已修正 21 CFR 600 生物製劑管理規範，將基因治療產品列為生物製劑之一環，相關產品須經臨床前動物試驗、三階段臨床試驗驗證安全與效能後，才可向 CBER/FDA 申請上市許可，而基因治療產品之製造，不論是單純質體、或複雜之基因轉殖修飾細胞株等，皆須符合 CGMP 規範之規定。

基因治療產品在歐盟之管理，依據歐盟執行委員會最新公告新興生技醫療產品（advanced therapy medicinal products, ATMP）管理規範 Regulation 1394/2007 規定，基因治療產品與細胞治療及組織工程產品一樣，列屬於 ATMP 之一，屬於高風險性工程化（engineered）產品，依據前述規範要求採集中化管理方式，製造廠需向歐洲醫藥品管理局（EMA）直接申請上市許可審查，相關產品亦須經由臨床前動物試驗及三階段臨床試驗，驗證安全與效能，並且其基因治療產品的製造，亦須符合歐盟 GMP 規範規定。

反觀國內，自 8 年前 VEGF 基因治療人體試驗案之後，衛生署雖然已在 92 年公告「基因治療人體試驗申請與操作規範」，提供相關試驗之最基本之管理要求，迄今未有更多之管理研究與要求，因此時至今日，當 97 年底再次面對台大醫院提出以 AAV-2 病毒載體轉移芳香族 L-胺基酸脫羧基酶（aromatic amino acid decarboxylase, AADC）基因，製造多巴胺治療 AADC 缺乏症兒童人體試驗案時，主管機關與申請機構仍無對基因治療載體之製造與品管有具體之共識，不僅對試驗安全之維持有所疑慮，亦非亟需接受治療患者之福。

因此，本次研習業已就美國 CBER/FDA 在基因治療產品之製造管理有所了解，依據研習心得提出以下數點建議，供衛生署及未來 TFDA 整合後新興生技醫療產品管理之參考：

1. 目前歐美國家皆已將基因治療產品視為生物製劑管理，而我國目前仍以新醫療技術方式列管。建議可重新評估基因治療在我國現行醫藥管理架構下之管理屬性，係列屬於新醫療技術管理，或列屬於生物製劑類之新藥管理，以針對日漸增加的基因治療人體試驗申請案，進行適當的管理與推動，並與全球管理體系有所銜接。
2. 目前歐美國家業已公佈實施基因治療產品管理流程，建議可參考美國 CBER/FDA 21 CFR 600 與歐盟執委會 Reg 1394/2007 等規範，及早增訂基因治療產品之臨床試驗要求、化學、製造與管制（chemistry,

manufacturing and control, CMC) 規定、製造廠標準 (例如是否適用衛生署最新公告 PIS/C GMP 規定)、上市前查驗登記審查準則等產品管理規範，以因應日後國內新興生技醫療產業發展需求。

3. 因應國內目前提出基因治療申請案，有關基因載體製造多以委託其他國家製造方式因應，唯相關案件提出申請時，對於委託國外製造基因治療產品之要求與必備文件等，尚無明確規範，建議就該類申請案，應儘速明確訂定機構應於提出基因治療人體試驗時，同時出具委託製造廠符合其所在國 GMP 規範相關證明文件、產品使用病毒庫、細胞庫與質體製備品品資料 (含植入基因與載體核酸圖譜分析等)、產品中間製品管制規格與方法、最終產品放行檢驗規格與方法以及連續三批次製程記錄等資料，以利基因治療產品之品質與安全評估。
4. 建議衛生署醫事處與藥政處應儘速研議基因治療產品之未來管理機制，以利 TFDA 即將展開整合之際，可迅速有效的同步建立 TFDA 之管理模式，發揮 TFDA 整合後對於新興生技醫療產品管理與推動。