



# 病毒載體之基因治療產品於化學 製造管制研發策略指導原則

第一版

中華民國 107 年 11 月 20 日

財團法人醫藥品查驗中心 著

## 目錄

1. 前言 .....	1
2. 病毒載體之基因治療產品的開發考量 .....	1
2.1 病毒載體選擇的一般性原則 .....	1
2.2 製程設計開發之考量 .....	2
3. 慢病毒載體之基因治療產品 .....	3
3.1 慢病毒特性與載體設計 .....	3
3.2 慢病毒載體之製備 .....	4
3.3 慢病毒載體品質管制之特殊考量 .....	5
4. 腺相關病毒載體之基因治療產品 .....	6
4.1 腺相關病毒特性與載體設計 .....	6
4.2 腺相關病毒載體之製備 .....	7
4.3 腺相關病毒載體品質管制之特殊考量 .....	8
5. 基因治療產品開發過程之變更 .....	11
5.1 基因構築成分/載體變更情境之討論 .....	11
5.2 基因治療產品開發過程之法規原則 .....	15
6. 參考資料 .....	16

本指導原則係參考歐盟公告之基因治療產品的指引<sup>(1,2)</sup>和考量文章<sup>(3,4)</sup>所編撰，亦代表醫藥品查驗中心 (Center for Drug Evaluation, CDE)對此議題的當前想法，並非政府機關所發佈之法規。凡涉及政策方向及法規解釋與適用，仍應依衛生主管機關之指示為準。

若對此指導原則有任何疑問，歡迎來信寄至電郵 [feedbackbox@cde.org.tw](mailto:feedbackbox@cde.org.tw)

## 1. 前言

基因治療產品在國際上有突破性的發展，國內產學研界亦有意開發基因治療產品，為輔導國內再生醫療製劑的開發，衛福部在再生醫療製劑管理上推出許多精進措施。但在鼓勵先進醫療產品開發的同時，亦須使開發者了解並依循國際法規在科學性的考量，並作為基因治療產品開發之指導依據。

藉由設計確保品質 (quality by design)是目前公認的藥品開發模式，風險相對較高的基因治療產品，特別是病毒載體為攜帶治療基因之產品系統，更應在建構主成分之治療基因和病毒載體時，把可能的安全性風險考量在產品設計中。在基因治療產品開發過程，應評估並全面性探索，製程批量及品質一致性之限制、製程衍生的品質管制要求以及檢測分析方法的效能/合適性。對於已執行非臨床/臨床試驗的基因治療產品，在評估其動物/人體使用的療效安全性資料後，認為必須透過主成分設計之變更，以改善/提升作用機轉或臨床反應，在其變更後應有適當的比較性/銜接性試驗，以評估是否可連結變更前已有的產品特性資料。

## 2. 病毒載體之基因治療產品的開發考量

### 2.1. 病毒載體選擇的一般性原則

病毒載體系統的選擇，取決於預期的臨床適應症、作用機轉和給藥方法，亦應考慮載體對目標細胞/組織的選擇性、轉導效率 (transduction efficiency)、以及轉導後治療序列的功能/活性等。載體設計應考量與評估基因治療產品在達到療效作用前可能的細胞生化反應過程，包括：載體被目標細胞攝入、載體顆粒 (particle)之運送與去殼 (uncoating)、治療基因轉錄和表現，與體內對載體或治療基因之蛋白質既有或被誘發的免疫反應等。

設計病毒載體時，應充份評估病毒本身既有之安全疑慮，並儘可能排除或減少潛在風險因子，應考量的風險因子如下：

- (1) 載體之原生種 (parental organism)對於人類或其他動物具有病毒性 (virulence)和致病性 (pathogenicity)，則儘可能移除病毒之致病成份。
- (2) 應避免使用非必需之附屬基因 (accessory gene)或包裝蛋白質 (packaging protein)，以降低病毒載體具複製能力的可能性。
- (3) 載體序列應避免與生產/包裝細胞株有相近的同源 (homology)序列。
- (4) 載體序列應避免與人類病原體或內源性病毒有同源性的序列，以減少產生新型致病病原體或具複製能力病毒 (replication competent virus)之風險。
- (5) 確認載體之組織向性 (tropism)，並評估載體對目標細胞族群或特定細胞類型的轉導效率，例如分裂中的細胞、最終分化的細胞或表現病毒內吞受體的細胞等。
- (6) 組織 (可讓載體進行複製的組織)複製特異性。
- (7) 載體是否帶有與病毒藥物抗藥性有關之基因。
- (8) 評估是否會經由生殖系統傳播 (germline transmission)。
- (9) 嵌入型載體 (integrating vectors)須考慮到嵌入突變 (insertional mutagenesis)的風險。

若使用複製型病毒載體或條件複製型 (replication-conditional)病毒載體，則應說明構築成分 (construct)中每個調控功能區，及其調控載體複製所扮演的角色，亦應評估此類病毒載體用於臨床之安全性。若使用複製缺陷型 (replication deficient)病毒載體，應說明使病毒載體失去複製能力的程序，並確認該載體永久失去複製缺陷。其應於包裝/生產細胞株、適當製程中間物/主成分階段檢測具複製能力病毒。

若使用複製型病毒載體，應符合以下要素：

- (1) 病毒複製能力是療效的必要條件。
- (2) 無致癌性 (oncogenicity)或致瘤性 (tumourigenicity)。
- (3) 若病毒原生種為已知病原體，則在病毒載體完成基因修飾工程後，評估此複製型病毒的感染性 (infectivity)、病毒性和致病性，以確保病毒載體之安全性。
- (4) 組織複製特異性。

若選擇特定病毒載體之目的，係基於該病毒具有特定器官/組織向性，則應確認該病毒載體可選擇性轉導至預期的器官/組織，且在該器官/組織中表現治療基因。

## 2.2. 製程設計開發之考量

質體 (plasmid)在建構或重組過程，應評估質體序列交叉污染到細胞受質 (cell substrate)內生性基因序列，或是製程中使用到的基因序列之可能性。儘可能在質體設計、建構和生產過程中進行純化與檢測，以降低或移除可能的基因污染物。

產品開發和生產過程中，為確保載體和治療基因的序列安定性，應使用高度正確性的基因複製系統，以提升擴增核酸 (amplified nucleic acids)的完整性和同質性，並於適當階段進行全基因序列定序，以確認序列在擴增過程中無任何不正確的複製或修飾。

製程中用於擴增/攜帶基因物料 (genetic materials)的細胞/細菌/病毒，應有相關歷史資料，並進行合適的特性分析，包括：鑑別、特徵分析以及無其他細胞、細菌、病毒或外源性基因序列的污染。若該細胞/細菌/病毒適用庫系統進行品質管控，建議建立細胞/細菌/病毒庫系統，其品質及特性分析之檢測項目可參考 ICH Q5D(R1)<sup>(5)</sup>和 Q5A(R1)<sup>(6)</sup>，並應確認庫系統在製備過程中的品質一致性，如：基因安定性及瓶間均質性 (inter-vial homogeneity)等等。

製程中有使用包裝細胞株 (packaging cells)/輔助病毒 (helper virus)時，應有詳細的背景資訊，包括：包裝細胞株/輔助病毒的來源、鑑別和生物特性，以及其他潛在病毒污染之評估。亦建議以庫系統方式確保包裝細胞株/助病病毒的品質一致性。

製程中可能的製程不純物，包括：基因物料、宿主細胞之蛋白質、宿主細胞 DNA、輔助病毒或其序列、包裝病毒或其序列、在生產過程中使用的生物性材料之殘餘物 (如胎牛血清或白蛋白等等)、抗生素、製程設備之可滲出物、內毒素、具複製能力病毒、與治療基因共同表現的蛋白質、細菌發酵生產系統中可能產生之脂質和多醣、以及質體純化過程可能污染到 RNA 和染色體 DNA 等等。此外，亦應考量到基因治療產品可能會污染到製程所衍生的基因序列，例如：載體生產時異常轉錄 (read-through)之產物，或輔助序列的污染。應在製程設計、建置和生產過程中，採取合適的純化步驟減少或移除這些不純物，以確保殘餘量符合可接受標準。

### 3. 慢病毒 (lentivirus)載體之基因治療產品

#### 3.1. 慢病毒特性與載體設計

慢病毒為反轉錄病毒科的其中一屬。慢病毒載體之基因治療產品有許多優點，例如：(1) 慢病毒載體可轉導治療基因至不分裂細胞內，例如：淋巴細胞、樹突狀細胞和神經細胞等；(2) 慢病毒載體可用於體外細胞轉導，亦適用於體內基因遞送；(3) 慢病毒載體可在細胞內長期表現治療基因，且轉錄沉默 (transcript silencing)的頻率較低，因此有機會用於慢性疾病的長期治療。

然而，慢病毒載體有許多安全性的疑慮，例如：(1) 慢病毒載體在生產過程，可能產生具複製能力慢病毒 (replication competent lentivirus)；(2) 慢病毒載體在體內可能與慢病毒多核苷酸序列發生重組；(3) 慢病毒 DNA 插入或插入位鄰近原致癌基因 (proto-oncogene)可能導致腫瘤。

應考量慢病毒可能造成的安全性風險，在設計慢病毒載體時，可藉由以下作法排除相關疑慮：(1) 移除不必要的慢病毒致病/輔助基因，以產生「最小慢病毒基因體」；或(2) 將製備慢病毒載體所需的基因或序列，分散至不同的構築成分或基因匣 (cassette)中，降低產生具複製能力慢病毒的風險。

慢病毒載體之製備至少會使用到三個構築成分：(1) 套膜 (envelope)構築成分：可使用異源病毒套膜蛋白 (例如：水泡性口炎病毒糖蛋白 (vesicular stomatitis virus-glycoprotein, VSV-G))取代同源慢病毒套膜蛋白，以製備假型 (pseudotype)慢病毒載體顆粒；(2) 輔助 (helper)構築成分：含有病毒結構蛋白 (*gag*)、反轉錄酶等酵素 (*pol*)和調節蛋白 (*rev* 和 *tat*)之相關基因；(3) 轉移 (transfer)構築成分：攜帶治療基因以及生產和包裝慢病毒載體所需的序列。此三個構築成分通常會建構在不同質體中，在質體建構時應儘量降低包裝 (包括套膜和輔助) 和轉移質體間的序列同源性，以減少重組事件發生的風險。

其他可提高慢病毒載體安全性之設計，包括：(1) 使包裝構築成分中的各個輔助基因，以各自獨立的轉錄系統進行表現；(2) 將 *rev* 基因建構於另一個質體中；(3) 利用人類細胞偏好的密碼子建構 *gag/pol* 基因匣；或是(3) 利用外源性反轉錄病毒聚腺苷酸化訊號 (polyadenylation signal)取代內源性訊號。

另外，慢病毒載體可藉由改造成自我滅活 (self inactivating, SIN)載體的形式，降低載體 DNA 遷移 (mobilization)，以及避免載體與野生型人類免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)重組的可能。但某些自我滅活載體含有高活性的啟動子 (如巨細胞病毒啟動子(cytomegalovirus promoter))，可能因其具增強子 (enhancer)活性而導致原致癌基因之活化。

### 3.2. 慢病毒載體之製備

慢病毒載體製備策略，例如：(1) 將數個包裝 (套膜/輔助)質體和轉移質體短暫 (transient)共轉染 (co-transfection)至易受感染 (permissive)細胞株；或是(2) 將轉移質體轉染至已帶有一個或多個包裝 (套膜/輔助)構築成分的包裝細胞株中。短暫轉染的製造方式有批量上的限制，所製備慢病毒載體之產量可能僅夠供小規模臨床試驗之需求。若透過穩定表現包裝構築成分之包裝細胞株生產，可獲得較高慢病毒載體的產量，此包裝細胞株應有完整的資料與紀錄，並說明所有導入基因的序列，以及相對應之品質和安全性資料。

當製備策略係利用異源病毒包膜蛋白的構築成分 (如 VSV-G)製備假型慢病毒載體顆粒時，應設法去除帶有異源病毒包膜蛋白基因的慢病毒載體，以避免該包膜蛋白基因被內源性 (endogenous)或外來 (adventitious)病毒所用之風險。雖

載體可能難以排除 *gag/pol* 序列的非專一性 (non-specific) 共同包裝 (co-packaging)，但仍應設法移除 *gag/pol* 序列之污染。

若利用質體 DNA 短暫共轉染的生產方式，應確保質體 DNA 之品質，以及提供轉染質體和包裝於慢病毒載體中之全部序列分析資料，亦應確認批次間的一致性。

### 3.3. 慢病毒載體品質管制之特殊考量

慢病毒載體應進行詳盡之特性分析，例如：轉導活性、載體顆粒的其他特性以及不具複製能力慢病毒的分析等等，並應根據特性分析結果訂定合適之批次放行規格。若以短暫共轉染的製備方式，應於共轉染後以去氧核糖核酸酶移除殘餘之質體 DNA，並於規格中限制質體 DNA 之殘餘量。

#### 3.3.1. 載體含量分析

載體的含量分析可藉由病毒套膜或殼體 (capsid) 蛋白的免疫染色，再利用共軛焦顯微鏡觀察染色結果，接著和已知濃度的螢光微粒作相對量的比較，以定量出全病毒顆粒數。慢病毒載體顆粒在分析上有其難度，若是載體中有缺陷慢病毒顆粒 (缺乏包裝蛋白)，則須額外評估缺陷慢病毒顆粒之比例，若是製造方法係過度表現 Gag 蛋白，而產生空慢病毒顆粒，則應有慢病毒載體之 Gag 蛋白量和其相對應之轉導活性的數據。另外，反轉錄酶的活性可能與病毒顆粒數和轉導效率有關。故 Gag 蛋白量以及反轉錄酶活性，係可間接評估慢病毒載體顆粒數量。

另外，即時聚合酶連鎖反應 (real time PCR) 等已驗證的定量核酸擴增技術 (nucleic acid amplification, NAT) 方法，可分析載體之基因體數，並估計慢病毒載體顆粒的數量。然而，慢病毒載體中可能有其他 DNA 污染物 (可能來自短暫轉染和共包裝的 *gag/pol* 序列)，因此應採取適當的預防措施，以避免 DNA 污染物干擾核酸擴增技術的分析結果。

#### 3.3.2. 效價/轉導活性分析

基因治療產品之效價/轉導活性，可為嵌入能力、治療基因表達和功能性。嵌入能力的測定，可藉由病毒載體 DNA 嵌入至目標細胞內證實，其評估方法可將轉導細胞進行限制稀釋 (limiting dilution)，再以可標的治療基因或轉移載體上包裝訊號的探針 (probe) 進行核酸擴增技術分析。本分析應有標準作業程序和適當分析參數，分析參數可包括：(1) 感染用慢病毒載體的病毒量；(2) 轉導用細胞株；(3) 轉導時之細胞培養條件；(4) 轉導後進行 PCR 測試的時間點；(5) 受轉導的細胞數之定量估計；以及(6) 慢病毒之參考標準品。

定量慢病毒載體之治療基因功能性，一般係評估治療基因的表現程度與其功能活性。本分析亦應有標準作業程序和適當分析參數，分析參數可包括：(1) 慢

病毒載體的病毒量；(2) 轉導之細胞株；(3) 轉導時之細胞培養條件；(4) 轉導細胞表現治療基因的時間點；以及(5) 其他與「嵌入能力」有關的參數。

### 3.3.3. 具複製能力慢病毒之測試

儘管慢病毒載體生產系統已採取保護措施，排除具複製能力慢病毒產生的可能性，但仍然有具複製能力慢病毒污染的風險，因此，應進行適當的測試確認是否有具複製能力慢病毒存在。有許多方法可檢測具複製能力慢病毒，例如：先以具複製能力慢病毒感染細胞株，經過細胞上清液 (supernatant) 的連續繼代培養擴增具複製能力慢病毒，再利用即時定量 PCR 檢測嵌入的 *gag/pol* 特異性核酸。

以 HIV-1 衍生之慢病毒載體為例。慢病毒載體在取得 HIV-1 之 *gag* 和 *pol* 基因後，才可能產生具複製能力慢病毒，因此，可藉由檢測 HIV-1 Gag 蛋白或 *gag* 基因序列偵測是否有具複製能力慢病毒，目前已有經良好確效且靈敏的分析方法 (如：p24 Gag 免疫捕獲 (immunocapture) 測定法或 *gag* RNA PCR 測定法) 可做此檢測。

除了 Gag/Pol 外，具複製能力慢病毒可表達 VSV-G 等載體包裝蛋白，因此，在以 VSV-G 作為假型包裝蛋白的情況下，可用 VSV-G 免疫測定和(或)VSV-G DNA 或 RNA 之分子檢測法測定具複製能力慢病毒。其他可行之作法，如：在細胞感染後連續繼代培養數次，使具複製能力慢病毒擴增，再定量分析反轉錄酶活性。

應根據慢病毒載體預計的劑量和生產批量的大小，設定具複製能力慢病毒檢測方法的定量極限。理想情況下，檢測方法應能在一個人體使用劑量下，檢測出一顆具複製能力慢病毒。建議該方法應有合適且具代表性的陽性對照組或參考標準，以確認具複製能力慢病毒檢測方法的靈敏度。

### 3.3.4. 致癌性

慢病毒 DNA 插入位點分佈廣泛，隨著受感染的細胞數和每個細胞基因體受病毒 DNA 插入數，其嵌入突變所導致腫瘤形成的風險也越大。雖然可藉由核酸擴增技術方法評估慢病毒載體在合適細胞株中的嵌入能力，但應鑑別出載體 DNA 嵌入人類基因體中的位點及其後續之影響，才可確保產品臨床使用的安全性。

## 4. 腺相關病毒 (adeno-associated virus, AAV) 載體之基因治療產品

### 4.1. 腺相關病毒特性與載體設計

腺相關病毒屬於細小病毒科，為無致病性的單鏈線性 DNA 病毒，其可感染分裂或非分裂的細胞，並且，不同血清型之腺相關病毒可感染不同組織類型的細



胞。腺相關病毒感染後會穩定嵌入並潛伏於宿主染色體的特定位置，直到其他輔助病毒提供所需的輔助蛋白，始能進入病毒之感染週期，此輔助病毒通常是腺病毒 (adenovirus)或是單純疱疹病毒 (herpes simplex virus)。腺相關病毒不同於反轉錄病毒，不會隨機嵌入染色體造成突變，而較不會有誘發癌症的風險。由於腺相關病毒具有安全性、可標靶至不同類型組織，以及具穩定表現治療基因的特性，使得臨床上常用腺相關病毒載體開發治療遺傳性疾病之基因治療產品。

腺相關病毒載體的設計通常包括：(1) 主要構築成分中不含 *rep* 和 *cap* 基因，使單獨之腺相關病毒載體失去嵌入染色體能力；(2) 主要構築成分為啟動子引導治療基因，且於兩側帶有反向末端重覆 (inverted terminal repeat, ITR) 序列，使其可透過宿主細胞 DNA 聚合酶合成雙股 DNA。此腺相關病毒載體設計會在轉導細胞中形成染色體外之環形游離基因體 (episome)，其在非分裂細胞中會長期存在，但在分裂細胞中，因不會隨著宿主 DNA 一起複製，故其治療基因之表現與其對應之療效會逐漸下降。

質體設計時應將基因同源性降到最低，並應有合適策略儘可能減少具複製能力腺相關病毒產生，如：改變 *rep/cap* 的轉錄方向，或使用非哺乳類動物的基因匣表現系統和細胞株等。其他可行的腺相關病毒載體設計有：(1) 自互補腺相關病毒 (self-complementary adeno-associated virus, scAAV)，係藉由雙股互補 DNA 的設計，來免除細胞內合成互補股 DNA 的步驟，進而增加腺相關病毒載體的轉導效率；(2) 改造腺相關病毒殼體形成假型，以避免或降低體內對原先殼體的免疫原性，或是達到標靶至特定類型組織之目的。

## 4.2. 腺相關病毒載體之製備

### 4.2.1. 病毒生產系統

輔助病毒：

此生產系統係利用易受感染細胞株，轉染兩個輔助質體來製備，其中一個含有治療基因序列之主要質體，另一個則是含有腺相關病毒的 *rep* 和 *cap* 基因之包裝質體。另外，亦可利用已轉染且穩定持有治療基因和(或)包裝基因的細胞株來製備。接著，須利用野生型或重組型腺病毒作為輔助病毒，透過輔助病毒感染並提供輔助功能，使腺相關病毒基因體可進入腺相關病毒之裂解程序，從質體中複製出單股分子形式 DNA，並合成病毒包裝蛋白，進而組裝形成的腺相關病毒顆粒。一般在感染後 48 到 72 小時可收集上清液和細胞裂解物，並純化出腺相關病毒載體。為避免基因治療產品中有輔助病毒殘留，製程中應設計使輔助病毒失去活性的步驟，例如：藉由加熱 (如：腺病毒可用 56°C 加熱一小時去除活性) 或任何適當且經良好確效之化學方法。

嵌合病毒 (chimeric virus)：

嵌合病毒為輔助病毒之重組形式，係將輔助病毒的基因體嵌合腺相關病毒生產所需的部分或所有基因（治療基因質體及/或包裝質體），其可簡化腺相關病毒載體的製造程序，亦可開發出較大批量的製程。

#### 4.2.2. 非病毒生產系統

三質體轉染：

此策略不同於前述輔助病毒生產系統，係以帶有治療基因和複製腺相關病毒所需輔助病毒基因的三個質體，轉導至細胞中來製備腺相關病毒載體，故不須使用輔助病毒。另外，亦可在單一個質體同時帶有包裝序列和腺病毒輔助功能之基因，因此可僅轉染二個質體來生產腺相關病毒載體。

包裝細胞株：

將包裝基因序列穩定轉染至包裝細胞株中，其包裝基因係利用可誘導式啟動子 (inducible promoter) 來調控 *rep* 的表現，另外用高度活化的啟動子來大量表現 Cap 蛋白。利用此包裝細胞株，可短暫性轉導治療基因質體和輔助質體，生產腺相關病毒載體。

### 4.3. 腺相關病毒載體品質管制之特殊考量

#### 4.3.1. 病毒生產系統之品質管制

在製備腺相關病毒載體之前，輔助（或嵌合）病毒應進行特性分析與品質控管，納入考量之檢測項目應包括鑑別、基因體完整性、基因穩定性、病毒滴度 (titration)、以及野生型腺相關病毒、具複製能力病毒和其他外來病原污染等。即便使用之輔助/嵌合病毒不具複製能力，但仍有可能因基因重組導致病毒獲得複製所需之基因，因此，具複製能力病毒的檢測應納入規格中管控。此外，應確保腺相關病毒載體中，無污染到有活性之輔助/嵌合病毒，因此，在製程中應有特定步驟可使輔助/嵌合病毒失去活性，並應證實其去病毒活性之能力。儘管已證明輔助/嵌合病毒已完全失去活性，仍須確保不會有殘留病毒 DNA 隨著病毒載體輸注人體，故建議以定量的方法檢測輔助/嵌合病毒 DNA 的含量。若製程無法有效去除輔助/嵌合病毒之活性，則應在純化過程中將輔助/嵌合病毒移除，並進行移除病毒之製程確效。另外，於產品放行時，應於規格中納入檢測輔助/混合型病毒含量的分析方法，並設定限量之允收標準。若使用之輔助/嵌合病毒不具套膜，則在 DNA 酶處理前後都應進行 DNA 定量，以確認分析方法是否受蛋白殼包覆干擾。

人類常受到腺病毒之感染而可能有潛伏之病毒基因，因此，若腺相關病毒載體中有完整 *rep* 序列的話，產品施打於體內後，可能會產生具複製能力腺相關病毒 (replication competent adeno-associated virus, rcaAV)。因此，若使用的

輔助/嵌合病毒含有完整 *rep* 序列，則應在製程中管控時檢測 *rep* 序列的 DNA 含量。

#### 4.3.2. 無病毒生產系統之品質管制

此類生產系統主要利用質體轉染的方式製造，由於操作程序上的限制而難以放大製程，亦由於轉染效率固有的 (inherent) 變異性而難以確保製程的一致性。建議評估及優化每個製造規模下的轉染步驟之製程條件與參數，以確保產品品質及產量的一致性。本系統有其優點，由於沒有輔助/嵌合病毒污染的風險，故較容易控管最終產品的品質，但在不同製造規模下皆有產生複製能力腺相關病毒之可能性，故仍應確保無複製能力腺相關病毒之產生。

製程中所使用的試劑物料應確保其品質，如大腸桿菌質體種源細胞庫、純化的質體批次和轉染試劑等。若製程中使用誘導物質 (induction agent) 調控轉錄活性 (如 *rep* 表現相關之轉錄調控)，則純化過程應有足夠效能可移除誘導物質，或是於產品放行規格中限制誘導物質的含量。亦建議確認可誘導式啟動子在大規模培養過程之基因序列安定性。

#### 4.3.3. 自互補腺相關病毒載體之品質管制

以自互補腺相關病毒載體設計作為基因治療產品時，須考量到此載體的特殊性質，設計合適的製程與分析方法。自互補腺相關病毒載體，其載體 DNA 可能大多呈現二聚體 (dimer) 或多聚體 (multimer)，但以鹼性洋菜凝膠電泳進行分析時，載體單體的純度卻有 90–95%，故鹼性洋菜凝膠電泳無法顯示互補腺相關病毒載體可能的多聚體。因此，製程應以密度分離之方法進行純化，亦由於病毒顆粒在此製備過程中可能呈現異質性 (同時存在二聚體和多聚體)，因此應使用新穎方法搭配常規的分析技術 (如：限制酶圖譜、效價/生物活性測定等等)，對產品中可能的各種分子形態以及產品相關不純物進行特性分析和定量。

#### 4.3.4. 載體含量之分析

分析腺相關病毒載體的含量時，必須以輔助病毒的共同感染才能顯現細胞病變現象 (cytopathic effect)，然而在分析時卻難以評估細胞病變作用是源自輔助病毒或是腺相關病毒，因此，可能不適用一般常用的病毒力價測定方法 (例如 TCID<sub>50</sub>)。此議題可藉由經減毒 PrV 病毒來解決，因其不會造成易受感染細胞株產生細胞病變現象，所以用減毒 PrV 載體為輔助病毒所製備的腺相關病毒載體，可用 TCID<sub>50</sub> 測定腺相關病毒載體之含量<sup>(7)</sup>。此外，可同時進行 DNA 酶耐受顆粒 (DNase-resistant particles) 的 DNA 定量檢測，則可精確測量出病毒顆粒對感染力的比值。在開發 TCID<sub>50</sub> 方法時，應考量各個血清型之腺相關病毒載體對不同細胞株感染效力，並確認細胞株的合適性 (易受感染細胞株)，才能在分析方法中取得較佳的靈敏度。

檢測腺相關病毒載體的含量，亦可在腺相關病毒載體與輔助病毒共感染易受感染細胞株後，以核酸擴增法或分析治療基因表現來評估。由於分析病毒基因體數較能反應基因載體的數量，故若能以基因體數而非病毒顆粒或病毒滴度來定義臨床劑量時，建議使用量化的聚合酶鏈鎖反應方法檢測病毒基因體數，作為載體含量推算臨床劑量的基礎。

#### 4.3.5. 純度

研究顯示，腺相關病毒病毒顆粒也會共同包裝用於生產腺相關病毒之質體<sup>(8)</sup>或輔助病毒 DNA，這些共同包裝 DNA 的病毒顆粒應視為製程不純物。在產品查驗登記前應進行病毒顆粒的完整特性分析，以評估產品中是否有此類不純物。一般應根據產品中共同包裝 DNA 之含量，判斷是否需要進一步的特性分析，此特性分析應先確認此 DNA 序列是否含基因表現的開放閱讀框架 (open reading frames, ORF)，若有開放閱讀框架，則須探討是否可在哺乳動物細胞中轉譯出蛋白質，此評估應使用各種可能反映腺相關病毒載體生體分布 (biodistribution) 狀況的細胞株。若可能，在整個開發過程中，應確認產品中共同包裝 DNA 對病毒顆粒之比例，且於放行規格設定合適的允收標準來管控，並探討病毒基因體中內含之共同包裝 DNA 的命運。如果觀察到治療基因以及共同包裝 DNA 長期存留於細胞中，則須進行完整的風險評估，檢視此事件的長期結果，並確認不會影響產品整體安全性。

腺相關病毒載體庫存通常是非常異質性的混合物，其組成包括空殼 (不含 DNA)、非感染性顆粒 (含 DNA 但無 DNA 擴增能力) 及感染性顆粒 (具 DNA 擴增能力且可表現治療基因)。因此，空顆粒與非感染性顆粒可視為製程相關不純物，兩者皆會影響產品施用於病患時的免疫原性。因此，在產品特性分析時必須評估所有病毒顆粒的組成與含量，並應有合適之放行規格管控，以確保施用於病患的產品品質一致性。

#### 4.3.6. 具複製能力腺相關病毒之測試

腺相關病毒載體製造過程可能發生同源或非同源的基因重組事件，而有機會導致腺相關病毒載體具有 *cap* 和 *rep* 基因序列，進而產生具複製能力腺相關病毒。腺相關病毒雖無致病性，但產品中若有具複製能力腺相關病毒污染，使得被感染的細胞大量表現 Cap 和 Rep 蛋白，而可能活化了未預期的免疫反應，進而產生中和抗體抵銷療效，或是有其他安全性疑慮。因此，建議檢測具複製能力腺相關病毒並報告其結果。在檢測具複製能力腺相關病毒時，應在特定細胞株且有輔助病毒存在下擴增腺相關病毒，分析製備之腺相關病毒載體是否會挾帶有疑慮的基因，通常是以核酸擴增方法檢測是否有 *rep*、*cap* 或 *rep*/ITR 連接處 (junction region) 的基因序列。

## 5. 基因治療產品開發過程之變更

產品在開發過程中常見修飾或變更基因治療產品，為確保產品品質一致性，應儘可能降低修改的幅度，以避免對產品特性造成顯著的影響。然而，廠商在產品開發過程中，透過製程和產品特性之探索而更加了解整體輪廓，有必要為了改善基因治療產品的安全性/療效，而須改變基因治療產品的構築成分和治療基因序列等，例如：改變啟動子、引入組織特異性的增強子，以及添加絕緣子 (insulators) 等基因座控制區 (locus control region)，或其他基因構築成分之變更，這些變更皆可能影響基因治療產品的特性，且後續的影響相當複雜而難以評估可能導致的風險。

以法規單位的角度而言，樂見廠商於開發過程中改善藥品的整體特性而提升臨床表現，但由於難以全然地預測變更對原先產品已建立之安全/療效特性的可能影響，因此，建議開發廠商應及時評估該變更對藥品的安全和療效特性可能的影響，以避免在申請新臨床試驗或查驗登記時，法規單位因無法評估風險而要求執行額外的研究來消弭此疑慮。

在評估變更造成的影響時，應視個案的改變狀況來考量。由於變更後之產品仍應保留先前產品的部分特性，例如：治療基因轉譯後產物的藥理作用和基因載體的組織向性等，因此，可根據原先產品已建立的安全/療效特性資料為基礎，並評估變更對產品可能的特定影響，再進一步執行相關試驗或提供佐證資料說明 (例如：提高治療基因表現量，應評估增加藥理作用可能造成的毒性狀況)。除了基因構築成分設計的變更外，亦可有製程之變更，一般生物產品之變更需參考 ICHQ5E 執行比較性試驗，基因治療產品亦需遵循此原則，以確認變更前後產品的可比性，由於製程變更之比較性原則可參考 ICHQ5E 之內容，故本文僅針對為提高產品的功效/安全性而進行之基因構築成分設計的變更來討論。本章節提供的技術性建議適用於不同臨床試驗開發階段，目的是釐清開發過程中若變更基因構築成分設計時，可能需要執行的比較性或銜接性試驗。

### 5.1 基因構築成分/載體變更情境之討論

#### 5.1.1 RNA 剪接供體/受體 (splice donor/acceptor) 序列之變更

在產品的臨床試驗開發期間，若發現治療基因序列中含有潛在的 RNA 剪接位點，且此剪接位點可能被剪接體 (spliceosome) 作用而使治療基因失去功用，一般會在第三期臨床試驗前在此剪接位點進行沉默突變 (silent mutation)，以確保只會轉譯具活性的蛋白。在這種情況下，一般會認為活性成分的特性已經改變，故應執行變更前後的比較性試驗，以釐清產品特性的改變狀況。

以一個較複雜的產品來舉例說明：若上述的變更發生在反轉錄病毒之基因載體，且此基因載體係於體外轉導至特定標的細胞群，再將成功轉導的細胞回

輸至病患體內，由於反轉錄病毒載體須利用穩定轉染的包裝細胞株來製備，因此，此變更須重新建立穩定轉染的包裝細胞株。在這種情況下，比較性試驗須評估病毒上清液之品質和載體之轉導效率，以及變更前後體外轉導之細胞的特性及可比性，並確保體外轉導細胞輸回病患體內，不會影響臨床試驗觀察到之安全性或有效性。

另外，應有製程中管制和各階段放行檢測（病毒採收、主成分和產品）的可比性數據，亦須於最終產品進行較詳盡的比較性特性分析，包括：免疫表徵 (immune-phenotype)、特定基因區間之定序、細胞存活率、內毒素、載體完整性、送入細胞之基因體數目、具複製能力病毒、治療基因表現情況與表現量和安定性、外來病毒、黴漿菌、特定剪接形式以及無菌性。

若經由以上的品質比較性試驗確認產品的特性有所改變，但經由多方面的評估後認為此品質改變不影響產品之安全性/療效時，則可能不須要執行額外的非臨床試驗來銜接原先載體所有安全性數據。

### 5.1.2 非人類嵌合腺病毒載體中的E4基因之變更

用於基因治療的腺病毒載體大多以人類腺病毒為主，但由於人們經常受到腺病毒的感染而普遍具有人類腺病毒的中和抗體，可能導致人類腺病毒之基因載體無法達到療效，為克服此問題，須用人類鮮少感染的腺病毒來開發基因載體，可避免人類既有的體液性免疫（中和抗體）造成無效的現象。在此考量下，非人類腺病毒成為基因載體開發的熱門標的，因體內若無既有對抗載體的免疫反應，將能增進載體整體的安全性和/有效性。然而，由於不同物種腺病毒之血清學特性差異甚大，須合適的宿主細胞株才能使基因載體有效地擴增至足夠產量，為解決此問題，須以嵌合腺病毒載體來開發。

一般為了去除基因載體之複製能力，會將 E1 基因剔除，但為了擴增已剔除 E1 的非人類腺病毒載體，可利用持續表達人類 Ad5 E1 蛋白的包裝細胞株<sup>(9)</sup>。另有研究指出，以人類 E4 基因變異型取代 E4 ORF3 和 ORF4 可提高非人類腺病毒載體的產量。

若基因治療產品已經進入臨床試驗開發階段，為增加載體產量而進行表現系統的變更，而利用人類 E4 開放閱讀框來取代非人類 E4 開放閱讀框的載體時，必須完整比較兩個基因構築成分之特性。比較性試驗的設計應能評估出兩基因載體在鑑別、純度、體外之細胞效價和體內效價的可比性，然而，僅由品質特性上的比較性特性分析，可能無法解決結構變化對以下兩者的影響：1) 腺病毒載體本身的免疫原性和 2) 治療基因表現所連帶的下游免疫反應。因此，變更後的基因載體若不執行額外的臨床試驗，則須執行非臨床試驗來銜接變更前後載體。非臨床銜接性試驗可能需有藥物動力學、分佈和重複劑量毒理試驗，並應進行基因載體變更前後免疫原性之特性分析。

另應注意的是，儘管基因載體是複製缺陷型，但體內若帶有可互補的野生型腺病毒，仍可能使基因載體獲得複製能力。由於互補的野生型腺病毒可能會

存在於病患體內，卻不會存在非臨床試驗的動物中，故此風險難以利用非臨床試驗來評估，而須於臨床試驗中考量。此外，人類和常用的非臨床動物物種，在腺病毒受體的性質、表現位置和蛋白表達量上都有所不同，這些與宿主相關的特性可能會影響基因載體之藥物動力學和分佈的結果。因此，在評估非臨床銜接性試驗結果的預測價值時須採取較保守的方法，這些變更後基因載體是否須再次執行臨床試驗，將取決於該載體所選動物模型是否具有臨床的可預測性。

### 5.1.3 質體載體中的篩選標記 (selection marker)之變更

質體載體骨架中若使用抗生素抗藥性基因作為篩選標記，可能對目標群體在臨床治療時 (如：感染)產生不利影響，故在可行的情況下，應避免使用此類篩選標記。但如果必須使用抗生素抗性的基因，則應優先選擇目前臨床上未使用的抗生素之基因來作為篩選標記。在此法規考量下，建議若最初質體載體的設計和構築成分具有氨苄青黴素 (ampicillin)抗性篩選標記的話，應在進入人體試驗前，置換成其他類型的篩選標記。

此篩選標記的變更可能會導致產品分子特性的改變，亦可能牽涉到產品在細胞內表現之特性。如果治療基因於人體細胞的表達量，不會因篩選標記變更而有明顯差異，則可銜接篩選標記變更前的質體載體所執行之非臨床試驗 (例如藥效學試驗)，不必重複執行。然而，由於新導入的標記基因可能影響質體嵌入染色體的能力，因此，除非有序列分析等其他資訊可以證明新導入之基因不具有嵌入染色體的能力，不然應考慮額外進行嵌入研究。

### 5.1.4 腺相關病毒載體血清型之變更

目前已有許多腺相關病毒載體的臨床使用經驗，其中以 AAV2 的血清型占大多數，不同血清型腺相關病毒載體，可能有不同的組織特異性和病毒殼體的免疫原性。研究資料顯示不同的腺相關病毒血清型具有特定偏好之組織向性，例如：AAV8 對肝有較高的向性，AAV1、6、7 較易感染骨骼肌。因此，可以在某些產品開發過程中改變血清型，以加強組織或細胞靶向作用，同時可提升安全療效。另外，腺相關病毒載體開發上一個重要議題，是腺相關病毒殼體 (尤其是 AAV2)的免疫原性，因其可能會降低基因載體的療效，亦可能造成安全上的疑慮。因此，腺相關病毒開發時，可試圖以其他假型腺相關病毒或不同血清型腺相關病毒作為基因載體，例如：用 AAV2/8 代替 AAV2 以治療 B 型血友病<sup>(10)</sup>和用 AAV6 替代 AAV2 以治療囊狀纖維化 (cystic fibrosis)<sup>(11)</sup>等等，這些血清型的改變有機會可以增進載體轉導效率，並降低免疫相關的風險。

改變載體殼體的血清型，預期可能造成產品特性的影響包括：(1) 在遺傳學和品質特性上發生部分變化；(2) 製程有顯著變化；(3) 組織向性、生物分佈或免疫原性上有顯著 (理論上應提升產品安全性)差異；(4) 以及在藥理作用或效

價上發生些許變化。由於此變更影響層面相當廣，可能需要一整套完整的品質技術性文件，亦需有合適的分析方法重新評估血清型變更後，可能產生具複製能力之病毒的風險。新血清型載體需進行非臨床試驗評估，除了銜接性資料外，應重新評估生體分佈狀況、免疫原性和免疫毒性之毒理試驗，以及關鍵藥理試驗的分析結果。

### 5.1.5 反轉錄病毒載體變更為自我滅活之反轉錄病毒載體

遺傳性單基因疾病的基因治療，係將與遺傳疾病成因相關的具功能性等位基因，送入與疾病發展相關或最能解決疾病狀態的體細胞中。為了能在患者的分裂細胞中穩定地校正（可能是終生的）遺傳缺陷，利用反轉錄病毒載體將治療基因嵌入到患者染色體中。已有許多案例將治療基因送入造血幹細胞中，最常見的方法是利用不具複製能力之鼠源白血病毒（murine leukemia virus, MLV）作為基因載體。研究結果顯示，鼠源白血病毒衍生的基因載體在嚴重免疫缺陷的患者具有持久的療效<sup>(12)</sup>。然而，部分接受治療之患者產生淋巴增生性疾病，這被認為是基因治療所造成的預期外嚴重不良反應<sup>(13)</sup>。經過詳盡的探討後發現，鼠源白血病毒載體將基因嵌在已知原癌基因的附近或其中<sup>(14)</sup>，此非預期的基因修飾造成細胞基因異常，進而導致癌化和不正常增生。鼠源白血病毒載體在5'端長末端重複序列（long terminal repeat, LTR）的強啟動子/增強子，會誘導相鄰基因之異常調控，因此，長末端重複序列被懷疑為鼠源白血病毒載體嵌入後，造成原癌基因過度表達的原因。為降低嵌入突變效應，可將鼠源白血病毒載體設計成自我活化的鼠源白血病毒載體，並以較弱的內部啟動子/增強子取代強轉錄啟動子/增強子，以調節治療基因的表現。

如果臨床開發期間有進行以上變更，則會考慮下列幾點：

- (1) 以比較性試驗評估重新設計的載體於人類造血細胞體外轉導的能力，因重新設計的載體會有不同的轉錄活性，故須比較自我去活化鼠源白血病毒載體在轉導後治療蛋白質的表現量。
- (2) 理論上，自我去活化載體不易因嵌入導致腫瘤形成，但必須進行試驗加以證實，若僅透過體外模型評估嵌入致腫瘤（insertional oncogenesis），無法充分說明實際上的安全風險。雖目前沒有經確效的動物模式可以預測嵌入致腫瘤的風險，但是有發現腫瘤易發生動物模式（tumor-prone animal models）對嵌入致腫瘤是敏感的，因此，此動物模式可用於比較，攜帶相同治療基因的非自我去活化和自我去活化之鼠源白血病毒載體，在嵌入致腫瘤風險的差異。若比較不同載體設計之嵌入致腫瘤機率，有諸多研究數據指出嵌入致腫瘤的可能性降低，則應可支持非自我去活化反轉錄病毒載體的使用。
- (3) 非臨床試驗須在合適的體外模式/相關的動物模式中，證明預期的作用機轉和疾病治療效果並未因重新設計載體而改變。



(4) 非臨床試驗中轉導細胞所選用的基因劑量 (即每個細胞的載體數), 應超過預期的臨床基因劑量, 以評估基因載體在最嚴苛情況下的安全風險。原則上, 須證明新基因載體之特性和品質參數與原先基因載體之可比性, 包括: 基因載體數、載體不純物、轉導效率、每個細胞的載體數以及轉導細胞後之效價等。

## 5.2 基因治療產品開發過程之法規原則

基因治療產品在開發過程中可以進行基因載體設計的重大變更, 但須執行比較性試驗以符合法規要求, 相關考量包括: (1) 依產品開發階段評估應執行之比較性試驗; (2) 針對變更本身應執行相對應之非臨床試驗; 以及(3) 是否須額外之銜接性非臨床試驗以聯結變更前產品之安全/療效資訊。若產品特性分析時, 有適合的分析方法可檢測變更產品設計預期的效果, 並且其結果可證明變更不影響原有之安全療效特性, 則可僅由品質特性分析結果, 銜接變更前產品的臨床試驗數據。總結而言, 任何產品設計的變更, 都應評估變更對產品原先的療效/安全特性的影響, 以及對患者潛在風險的影響。

## 6. 參考資料

1. Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors. EMA, 2005.
2. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA, 2018.
3. Reflection paper on quality, non-clinical and clinical issues related to the development of recombinant adeno-associated viral vectors. EMA, 2010.
4. Reflection paper on design modifications of gene therapy medicinal products during development. EMA, 2011.
5. Q5D: Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological product. ICH, 1997.
6. Q5A(R1): Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. ICH, 1999.
7. Shiau AL et al., Novel Strategy for Generation and Titration of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors. *J Virol.*, 2005;79(1):193-201.
8. Wright JF, Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies. *Gene Ther.*, 2008;15(11):840-8.
9. Fallaux FJ et al., New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenovirus. *Hum Gene Ther.*, 1998;9(13):1909-1917.
10. Cunningham SC et al., Gene Delivery to the Juvenile Mouse Liver Using AAV2/8 Vectors. *Mol Ther.*, 2008;16(6):1081-1088.
11. Chen H, Intron splicing-mediated expression of AAV Rep and Cap genes and production of AAV vectors in insect cells. *Mol Ther.*, 2008;16(5):924-30.
12. Fischer A et al., 20 years of gene therapy for SCID. *Nat Immunol.*, 2010;11(6):457-60.
13. Marshall E, Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science*, 2003;299(5605):320.
14. Hacein-Bey-Abina S et al., LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003;302(5644):415-9.