



# 基因治療產品非臨床藥毒理 研發策略指導原則

第一版

中華民國 109 年 04 月 17 日

財團法人醫藥品查驗中心 著

# 目錄

1.	緒論.....	3
1.1.	目的.....	3
1.2.	適用範圍.....	3
1.3.	一般性原則.....	3
1.4.	特性分析.....	4
1.5.	分析方法.....	4
2.	動物物種/模式的選擇.....	5
3.	藥理學.....	7
3.1.	主藥效學.....	7
3.2.	次藥效學.....	7
3.3.	安全性藥理.....	8
4.	藥物動力學.....	8
4.1.	生體分布 (Biodistribution)試驗.....	8
4.1.1.	生體分布、持久性和清除.....	8
4.1.2.	預期之基因體嵌入.....	9
4.1.3.	種系傳遞(Germline transmission)之風險.....	10
4.1.4.	脫落 (Shedding).....	10
4.2.	其他藥物動力學試驗.....	10
5.	毒理學.....	10
5.1.	毒理試驗設計.....	11
5.2.	基因毒性 (Genotoxicity).....	12
5.2.1.	嵌入性突變.....	12
5.2.2.	載體特定的考量.....	12

5.3.	致腫瘤性(Tumorigenicity).....	13
5.4.	其他毒性試驗.....	14
5.5.	生殖及發育毒性 (Reproductive and developmental toxicity).....	14
5.6.	局部耐受性(Local tolerance) .....	15
6.	藥品交互作用.....	15
7.	藥物非臨床試驗優良操作規範 (GLP).....	15
8.	首次人體臨床試驗申請應提供之非臨床試驗.....	15
9.	參考文獻.....	17

本指導原則係參考 EMA: Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (March 2018)、Draft guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational advanced therapy medicinal products in clinical trials (February 2019) 以及 US FDA: Guidance for industry: preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products (November 2013) 規範，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. 緒論

### 1.1. 目的

本指導原則之目的係提供有關基因治療產品在非臨床藥毒理研發策略上，符合當前國內法規與國際標準之建議，使開發者在規劃此類產品之非臨床藥毒理試驗時能有所依循，並得以獲得充足的非臨床藥毒理資訊，以支持此類藥品人體臨床試驗之申請或上市查驗登記。

### 1.2. 適用範圍

本指導原則適用範圍包括內含重組核酸序列 (如 DNA 載體) 或基因修飾之微生物或病毒的基因治療產品，以及含有基因修飾細胞的細胞治療產品 (例如，在投予人體之前，即已經基因治療載體進行體外修飾的同種自體或同種異體細胞)。請一併參照「人類細胞治療產品臨床試驗申請作業及審查基準」。本指導原則所描述的原則也適用於用來修飾這些細胞的載體。

此外，本指導原則所指的基因治療產品不包含化學合成的治療核酸序列，然而本指導原則多項關於試驗設計或安全上的考量，仍可沿用於化學合成的治療核酸序列。

### 1.3. 一般性原則

非臨床試驗的主要目的是為了提供基因治療產品充足的資訊，以便評估此類產品用於人體之的風險及效益。本指導原則提供之非臨床試驗相關考量，可用於支持基因治療產品的臨床試驗或上市申請。

非臨床階段的法規要求會因為基因治療產品的獨特性及多樣性而有所變動。這些獨特性及多樣性包括產品所含之轉殖基因或其他重組核酸序列潛在的體內作用、載體 (vector) 骨架 (即病毒、細菌或質體產生之序列) 以及賦形劑 [包括任何所使用的攜帶子 (carrier)]

或支持性醫療器材]等，皆會影響基因治療產品在非臨床開發之要求。

基因治療產品非臨床開發的性質與程度，須依據基因治療產品的種類和可獲得的相關模式、臨床用途、臨床目標族群、預期的給藥途徑和治療方案...等決定。非臨床開發可依風險為考量，設計合適的評估指標，並應基於對載體之瞭解來選擇合適的對照組別（例如，使用沒有轉殖基因的載體、空載體，或包含無功能的轉殖基因之載體來作為控制組）。試驗設計還應考慮轉殖基因對於動物品種的特異性、病毒載體的感染性、動物生理差異性，亦可考慮使用與人體疾病型態相類似的動物模式，如此將有助於提供進入臨床試驗前所需的安全性及有效性資料。若產品的開發過程中，執行非臨床試驗的試驗物質與臨床使用的產品有所差異，則應註明其差異處，並討論這些差異的可能影響。非臨床試驗可以個別獨立執行，若可行，亦可以合併試驗方式執行。

一般而言，建議使用相同的動物模式進行毒理試驗和藥物動力學試驗，尤其當觀察到載體相關的毒性訊號時，更應使用相同的動物模式。若認為重要且需監測任何變化者，可於試驗設置期中犧牲組 (interim sacrifice groups)，例如在發炎反應最強烈時（例如腺病毒載體）或當基因表現程度達最高時，應考慮設置期中犧牲組，以利即時觀察。

當基因治療產品與醫療器材結合使用時，其醫療器材應遵循醫療器材適用的相關法規；根據過去關於傳輸裝置及(或)賦形劑的經驗多寡，可能需要執行相關非臨床試驗來探討這些裝置或賦形劑對於基因治療產品活性的貢獻程度。

執行樞紐性非臨床安全性試驗 (pivotal non-clinical safety studies)時，應遵循藥物非臨床試驗優良操作規範 (Good Laboratory Practices, GLP)執行，若因科學上之限制無法符合時，建議可先與法規單位討論是否有合理的替代方案，再行規畫試驗與執行。

#### 1.4. 特性分析

在進入到非臨床開發階段前，申請者應審慎考量產品品質的發展程度，並給予產品 (Drug Product, DP)適當的定義。非臨床試驗使用的產品應經過充分的特性分析，以確保非臨床試驗所使用的材料足以代表未來用於人體臨床試驗的產品。在開發過程中，任何製造過程和試驗物質的變動，都應考量其對於未來使用動物試驗結果推論人體風險時的潛在影響。任何核酸序列的變動或是任何影響最終產品特性的其他序列變動，均可能會產生額外的安全性評估需求。此外，應說明所選用之評估方法的科學依據。

#### 1.5. 分析方法

非臨床試驗使用的分析方法應使用含有合適基質的試驗物質進行確效。申請者應說明選擇這些測定方法之理由，並說明其專一性和敏感性，亦應以適當的確效程序，訂立所用測定方法的敏感性限制範圍。

當開發非臨床試驗所使用的分析方法時，應先謹慎考慮如何取得細胞/組織，同時也應考慮準備用於測定之樣本的品質和合適性。

例如，在使用核酸擴增檢測法 (Nucleic Acid Amplification Testing, NAT)的情況下，由於此方法的專一性取決於引子 (primers)和探針 (probes)的選擇與設計、反應條件以及偵測方法，因此應仔細說明選擇此引子和探針序列的理由。且由於核酸擴增檢測法具有高敏感性，很容易發生交叉汙染以及假陽性結果，因此需要特別謹慎。此外，亦應說明測定方法的細節，並說明使用哪些陰性/陽性對照物。

當以 NAT 為基礎的測定方法來測量嵌入型載體之載體套數 (copy number)時，其偵測極限和定量宜以「載體套數/基因體 (vector copy number/genome)」的單位來表示；對於附加型載體 (episomal vector)的偵測極限和定量則宜以「套數/ $\mu\text{g}$  分析的宿主細胞 DNA (copy number / $\mu\text{g}$  host cell DNA analyzed)」的單位來表示。

若進一步開發出原位核酸擴增和雜交技術，或許可在細胞或組織內，明確定位載體 DNA 或轉殖基因之位置。

## 2. 動物物種/模式的選擇

非臨床試驗應使用最適當、且可取得之藥理相關體外(*in vitro*)及體內(*in vivo*)模式來執行。有關非臨床開發的理由和試驗模式挑選的標準，應在非臨床概述中論述並說明理由。若缺少可滿足所有非臨床試驗要求的合適動物模式，申請人應基於科學方面的理由，盡可能開發此類模式，或使用能適當反映疾病狀態的體外模式進行評估。

選擇動物模式時應考慮以下幾個觀點：

- (1) 應考量欲使用的載體，是否能在所選擇的動物物種/模式中有效的轉染 (transfect)/轉導 (transduce)和感染 (infect)。以複製缺陷型病毒為載體者，動物模式應對病毒感染具有敏感性。以有完整複製能力病毒或微生物為載體者，選擇動物模式時應考慮其在動物體內之複製能力。至於被歸類為基因治療產品的溶瘤病毒 (oncolytic viruses)，為了在非臨床試驗中評估病毒在腫瘤細胞內複製的作用，可能須使用免疫缺陷或免疫缺損之異種移植瘤 (tumor-bearing human xenograft)動物模式或同種腫瘤移植動物模式 (syngeneic animal tumor model)。
- (2) 應檢視病毒/細菌的受體在動物模式的表現量和組織分布，受體的表現量和組織分布可能會影響宿主的攝取效率以及載體在細胞和組織的游離程度。根據載體的類型，基因治療產品可能會具有組織特異性，或是藉由在組織或器官中的選擇性表現、選擇性傳染細胞/組織或選擇性表現治療基因，達到組織表現之特異性。當為這些基因治療載體選擇動物模式時，應對所採用的動物模式和人體之間的組織特異性進行比較，並提供論述和合理性說明。
- (3) 轉殖基因之調控因子的活性與轉殖基因如何調控組織表現特異性及程度。

- (4) 應檢視所選用動物模式對於轉殖基因產物之生物反應，包括其目標基因的表現、分布、受體結合能力與佔據受體的比例、功能性結果等（包括細胞訊息傳遞及相關基因的調控）。
- (5) 應考量所選用動物的免疫狀態、免疫反應及既存的潛在免疫力。在選擇動物模式時，亦應考量到人體的免疫狀態和既存免疫力。攝入之核酸於生物體內之持久性和清除率 (clearance) 大多取決於免疫監控機制。因此，動物模式的免疫狀態應盡可能模擬病人的免疫狀態。對於用來驅動基因治療產品表現的原生病毒 (parental virus) 或細菌，應考量試驗動物對它們所產生的免疫反應。若在適當的情況下，任何會潛在影響試驗結果或其解讀者皆須進行評估。可預先對動物給予載體，藉此模擬病人體內既存免疫力對載體 (vector vehicle) 及 (或) 載體基因產品 (vector gene products) 的情形。
- (6) 應考量所使用的動物基因/基因產物是否與治療基因/基因產物具有同源性。例如，若是表現人類細胞激素，最好能測試該細胞激素對於動物受體及人類受體結合之親和性是否具有差異，評估此細胞激素在動物所誘發的藥理反應是否與人體內預期作用相似。
- (7) 若使用基因轉殖動物來模擬不同的人類疾病，須適當討論轉殖基因動物模式的選擇依據。
- (8) 在必要的情況下，應檢視動物模式的代謝及其他藥物動力學參數。依據基因治療產品的特性、投予途徑，或是選用的傳輸系統 (例如腦內給藥) 可能需要使用大型動物或疾病動物模式，來模擬基因治療產品在臨床條件下的生體分布情形。
- (9) 應考量基因治療產品的個別成分，在所選用物種體內的生物特性，尤其是應考量在試驗動物中，該治療產品各組成成分的劑量與投予體積的安全性。
- (10) 應檢視病毒/載體在所選用生物模式體內的主動與/或被動分布，以及基因治療產品 (或基因治療產品部分組成) 與宿主內源性病毒發生重組的可能性。

若單一個動物模式無法同時滿足上述所有層面的考量，則應採用多種不同的動物模式來進行這些試驗。所選擇的動物模式可包含野生型、免疫缺陷、基因剔除/增加 (knock-out/knock-in)、自然發生基因變異的動物模式、人源化或基因轉殖的動物，動物實驗可考慮使用疾病模式或同源模式。

小型啮齒動物模式，包括轉殖基因、基因剔除和自然疾病模式等，或許可為具相關性的模式，但應考量此類動物有體型小及壽命短之限制。另需注意每一劑量組的動物隻數會影響偵測毒性的能力，若樣本數過少，可能無法觀察到低發生率的毒性事件 (無論此事件嚴重與否)。樣本數量所導致的限制，如同在非人類靈長類試驗中經常會發生的情況，或許可藉由增加臨床監測頻率和延長監測時間來部分彌補。一般情況下，試驗應同時使用

兩種性別的動物，若僅使用單一性別，則應提供合理說明。為加強安全議題的評估，應特別考量對照組的樣本大小，尤其是當所選用的動物模式/物種的歷史資料缺乏，或相關資料極為有限時，更需考量對照組的樣本大小的問題。

### 3. 藥理學

#### 3.1. 主藥效學

##### 概念驗證試驗

概念驗證試驗 (proof of concept studies) 之目的係瞭解基因治療產品使用於目標病人群體之基本原理與可行性。概念驗證試驗應產出可支持具潛在臨床療效之非臨床證據，或至少提供相關生物作用或分子作用機制之資訊。當使用體外(*in vitro*)或體內(*in vivo*)試驗進行概念驗證試驗時，應選用合適物種或模式中執行，於此物種或模式中，其基因治療產品的核酸序列需可到達目標器官/細胞、表達預期之基因產物，並產生預期功能，藉以探討基因治療產品的最有效劑量且無毒性作用之劑量範圍。此外，同時亦應考量動物體內是否可能存有與該基因治療產品互相抗衡的機制而使其功能減損。若有助於概念驗證，鼓勵使用同源動物模式(homologous animal models)來探索基因治療產品可能的生物作用。

概念驗證試驗應探討 (1)所設計之核酸序列是否表現出正確的轉殖基因產物/表現時間/生物活性/作用機制等相關治療作用，與藥理學有效劑量範圍 (即最小有效劑量和最佳生物劑量)； (2)基因治療產品到達作用目標部位/組織/細胞及其表現程度與調控； (3)給藥途徑； (4)相對於疾病進程所設計之合理給藥時機、給藥方案設計；(5)基因治療產品其基因表現程度、功能活性與療效，提出可作為選擇並測試與疾病和安全性相關之評估指標等項目。

若預期基因治療產品作用機制係藉由嵌入宿主染色質達到其療效，因嵌入表現的載體〔例如： $\gamma$ 反轉錄病毒 (gamma retrovirus)，慢病毒 (lentivirus)] 會留在染色質環境中，進而影響到宿主之表觀遺傳調控機制 (host epigenetic regulatory machinery)，在設計載體時，應探討表觀遺傳調控機制對於最終基因治療產品療效和安全性之影響。因此，鼓勵在早期研發階段利用離體 (*ex vivo*)試驗分析此類產品於宿主基因體中之分布，將可依據目標細胞的基因體和表觀遺傳狀態，提供關於「宿主影響載體」的重要資訊。

#### 3.2. 次藥效學

基因治療產品可能會因為分布至目標以外的其他解剖部位/組織/細胞、產生其他生物活性物質或合成出非預期的基因產物，而造成非預期的生理作用，這些可能性皆應進行適當之評估。如果基因治療產品合成出異常或非預期之基因產物，且無法由品質管控方式排除，則應探討此異常或非預期產生之基因產物可能之生物影響。



### 3.3. 安全性藥理

安全性藥理試驗可依據該產品的生體分布資訊而評估是否需要執行。若評估結果為需執行，投予劑量建議參考 ICH S7A，於相當於治療劑量或以上的劑量區間，探討基因治療產品潛在的不良藥效作用對生理功能的影響，此生理功能包括中樞神經系統、心血管系統、呼吸系統和其他與該產品生體分布相關的系統。

原則上應執行適當的安全性藥理學試驗，若未執行，應提供科學性理由說明，並得到主管機關的同意，始得減免。評估是否可准予免除之依據將視個案具體情況而定，包括對病人的預期給藥途徑、載體類別及其現有可獲得的資訊及其生體分布，以及轉殖基因產物的作用機制等資訊。可運用風險為基礎的方法進行上述評估。

安全性藥理試驗通常為單一劑量給予。因此，安全性藥理試驗的評估指標可與單一劑量毒性試驗和生體分布試驗（例如來探討藥品的持久性）合併同時監測。然而，若基因治療產品投予後，藥效作用需要較長時間才能發揮，或者重覆劑量試驗以及人體使用的結果顯示會有安全藥理作用的疑慮，則安全性藥理試驗的期程設計應據此進行適度調整。

## 4. 藥物動力學

傳統標準的藥品吸收/分布/代謝和排泄試驗未必可完全適用於基因治療產品。基因治療產品之藥物動力學試驗應著重其分布/持久性/清除與驅動 (mobilization)，且應探討其種系傳遞 (germline transmission) 之風險。此類試驗可與非臨床安全性試驗做整合。

藥物動力學試驗是以偵測所使用的核酸（載體及/或轉殖基因）為基礎，應分析包括目標器官組織在內的所有相關的器官和組織。此外，應針對其表現之基因產品，探討其持續時間與表現和/或作用的位置等相關藥物動力學行為。

針對基因治療產品之藥物動力學試驗，應使用經過確效的方法（例如核酸擴增檢測法）來探討其組織分布和持久性。申請者應說明選擇這些檢測法的理由，以及其專一性和靈敏度。

### 4.1. 生體分布 (Biodistribution) 試驗

#### 4.1.1. 生體分布、持久性和清除

生體分布試驗之劑量應模擬臨床劑量，並設定適當之安全係數，例如於動物模式中使用 10 倍的臨床劑量。給藥途徑和給藥方案應能代表臨床使用的情況。此外，可藉由在單次給予基因治療產品後評估其生體分布的方式，進一步瞭解其清除狀況。在特定情況下，可使用全身性最高暴露濃度的給藥途徑（例如靜脈注射等）執行生體分布試驗，以模擬基因治療產品於生物體最大暴露之情況，即「worst-case-scenario」。

基因治療產品應以能夠確認在目標和非目標位置的最高分布程度，以及隨著時間的清除變化狀況為目標，來選擇生體分布試驗之取樣時間點和頻率。生體分布試驗之觀察時間

應持續至偵測不到任何訊號或訊號維持長期穩定為止。取樣時應採集所有相關器官和組織，以探討基因治療產品存在和清除的情形。

若以核酸擴增檢測法來偵測非預期的組織/器官中所投予的核酸序列，則應依個案考量，選擇使用反轉錄聚合酶鏈鎖反應法 [Reverse Transcriptase (RT)-PCR]、免疫學測定 (immunological assays) 和/或偵測功能性蛋白質等合適的測定方法，進一步瞭解基因產物的表現量和持續時間。

若使用具複製能力之載體，為評估被偵測到的核酸是否具感染潛力，以核酸擴增檢測法進行檢測到非目標位置中的病毒序列之後，應另進行適當的定量感染性試驗。前述之感染性試驗方法應經確效，且申請者應說明該試驗方法具有足夠的專一性與靈敏度。生體分布試驗之設計應涵蓋載體於體內複製後所造成的第二次病毒血症。若載體/病毒無法在所使用的動物模式中進行複製，應藉由重複投予基因治療產品的方式來模擬載體複製情況。在設計生體分布試驗時，應考慮到基因治療產品任何可能影響生體分布的特殊性質，例如潛伏/再活化或載體 DNA 之驅動。

當已有相同載體但轉殖基因不同之基因治療產品的生體分布資料時，若申請者可將這些資料與擬開發之基因治療產品適當地連結與銜接，則可依個案考量對於擬開發基因治療產品生體分布試驗之需求與內容。

#### 4.1.2. 預期之基因體嵌入

若要以病毒整個載體 (例如反轉錄病毒或慢病毒) 或載體部分組成 [例如含有反轉錄病毒 (retroviral)/慢病毒 (lentiviral) 部分基因序列的嵌合載體] 嵌入宿主基因體中，應使用離體組織培養 (*ex vivo* tissue culture) 或體內嵌合試驗探討此載體特性。除非提供合理的科學性說明可減免之合理性，否則嵌合試驗應至少 (但不限於) 探討 (1) 嵌合發生的組織/器官。不只要監測預期作用之目標，也應將所有觀察到具有生體分布的組織納入分析。(2) 於宿主基因體中，嵌入載體的套數以及其嵌入的位置。應提供潛在可能之脫靶嵌入事件 (off-target integration events) 的發生頻率和位置。(3) 所嵌入載體的結構完整性 [尤其是與轉殖基因調控相關的基因序列 (transgene expression cassette of interest)]，以偵測任何可能基因重新排列/重組事件。(4) 隨著時間演進，載體嵌入基因體後的穩定性與平均載體套數的持久性。(5) 預測靶向目標 (on-target)、脫靶 (off-target) 的嵌入情形。

測定載體存在及其在基因體套數之適當測定方法，可包括核酸擴增法和定序測定。應說明任何所使用之嵌入測定法的理論基礎，包括該方法的可能缺點，此外，申請者應提供該測定方法的靈敏度極限，以及所使用的正負對照組。除了探討將核酸嵌入宿主細胞基因體的可能性，可藉由使用適當的細胞株和初代目標細胞進行體外試驗，研究嵌入事件對細胞型態、功能和行為造成的改變，以瞭解其致癌的可能風險。

若核酸具有嵌入之性質，應將之視為嵌入型載體需進行規範。若使用非嵌入型載體，但卻有長時間維持其基因表現之跡象，申請者應評估是否可能發生了非預期的嵌入。基因

治療產品可依個案情況，以風險考量為基礎的方式來探討基因治療產品嵌入基因體情形，並提供充分的理由與說明。

#### 4.1.3. 種系傳遞(Germline transmission)之風險

需探討施予病人/受試者某些基因治療產品時，是否會造成載體 DNA 在親子間的垂直種系傳遞。除非能提供符合科學的合理性說明，例如臨床適應症和/或病人族群顯示無需進行此類研究，否則應從生體分布程度的角度探討種系傳遞之風險（生殖腺的訊號、配子的訊號、精液分離試驗和嵌入分析）。

#### 4.1.4. 脫落 (Shedding)

脫落的定義係載體/病毒藉由分泌物和/或排泄物散播 (dissemination)，此現象應在動物模式中探討。脫落不應與生體分布混淆（生體分布係指載體/病毒從施藥位置於體內散播）。脫落試驗可納入生體分布試驗或其他非臨床試驗中一併觀察。

脫落試驗的目的是要決定病毒/載體的分泌/排出之特性。可藉由非臨床脫落試驗所取得的資訊，來預測病毒/載體在人體中脫落的可能性和程度，以此作為臨床脫落試驗的設計指引。如果已知基因治療產品的可能脫落模式，則無須進行額外的非臨床評估。因為提供這些信息足以協助設計人體的脫落試驗。

#### 4.2. 其他藥物動力學試驗

基因治療產品應探究任何器材或結構組成所造成的藥物動力學特性。例如，應研究用於輸送非病毒或病毒載體的材料（例如陽離子脂質複合材料和用來控制載體釋出的材料）之分布和清除。在可行的情況下，也應分析這些成分對載體於時間和空間的分布影響情況。

### 5. 毒理學

基因治療產品的非臨床安全性評估，有助於探討其在臨床試驗可接受的風險—效益比 (risk-benefit ratio)。安全性評估應足以完整鑑別、描述和量化潛在之局部和系統性毒性、發作時間（急性或延遲）、毒性回復的可能性，以及不同劑量觀察到的毒性結果。應針對完整的基因治療產品（病毒/載體顆粒/傳輸系統、核酸序列等）和轉殖基因產物進行毒性評估，以確認載體分布與持續性、載體感染/轉導/轉染，及治療基因和載體基因的表現和生物活性所造成非預期的後果。若可行，應評估其引發免疫反應和非預期藥理作用。

非臨床安全性評估的範圍和安全性試驗之設計，不僅應依產品類型，還應取決於基因治療產品的組織向性(tropism)、生物分布和持久性。與野生型病原體基因重配 (reassortment) 和/或重組的可能性亦應納入考量。毒理試驗採用的劑量、投予途徑和方法應足以代表臨床使用情況，此外，於動物體內探討合適的安全係數是執行毒理試驗重要的目的之一。在所使用的動物模式中，應選擇適當的觀察終點與生物標記以預測毒性。另根據基因治

療產品的特性，應考量增加可模擬造成全身性最高暴露濃度的給藥途徑(例如靜脈注射等)組別。

針對最終產品中潛在不純物(例如，任何未預期的異常基因產物和載體轉譯蛋白所造成之毒性結果)，申請者應考慮納入相關指標，採用以風險為基礎的方法進行安全性評估。

### 5.1. 毒理試驗設計

應使用對基因治療產品具有與人類相似生物反應的動物物種進行毒理試驗，並需一併提供說明選用該物種的理論依據。可從自家或相似產品之藥理概念性驗證試驗所獲得的結果，作為選擇毒理試驗劑量和給藥期間之參考，並綜合這些非臨床數據作為臨床試驗設計的指引。一般而言，單一和重覆劑量試驗使用一相關物種可能即足夠，除非另有特殊的安全考量，方需使用第二個物種之動物。與傳統的毒理試驗一樣，應說明毒理試驗劑量選擇與設計的依據，劑量組應盡可能涵蓋擬執行臨床試驗的給予劑量與頻率，若無法涵蓋則應提出符合科學性之說明。若需要時，建議在試驗中設置一衛星(satellite)對照組，以幫助蒐集所選用物種的歷史資料。

若基因治療產品的臨床使用為單次投藥，應進行延伸性(extended)單一劑量毒理學試驗，適當延長投藥後的觀察時間，並納入「重覆劑量毒性試驗」所有的評估指標，例如，剖檢、組織病理學結果、臨床生化血液、毒性持續時間與可逆性等觀察，並應著重於與該基因治療產品特性相關的評估指標，及其他與基因治療產品特性相關且可能具潛在毒性的觀察項目，包含體液性與細胞性的免疫反應、載體生物分布與持久性、重要器官/系統安全性觀察、以及輸入過程可能的潛在性風險等。另外，應考量在生體分布的高峰期設置期中犧牲之組別。基因治療產品的單一劑量毒性試驗不應類似急性毒性試驗設計，不應以動物的死亡作為最終評估指標。

若基因治療產品人體使用採多次給藥方式，則應進行重覆劑量毒性試驗，給藥的模式和時程規畫應能適當地反映臨床之給藥方式。若於人體(非在動物模式中)單次給藥，就足以使核酸序列及(或)其產物發揮長時間的功效，而動物體內載體的複製能力無法反映人體的狀況時，則應考慮於動物進行重覆劑量毒性試驗來模擬人體情況。

與其他生物藥品相較，基因治療產品在單一劑量或重覆劑量試驗的持續時間，可能會比其他生物製劑的標準毒性試驗更長，這取決於基因治療產品的持續性、表現程度和位置以及預期之潛在風險等因素。申請者應根據載體和轉殖基因表現的持久性，以此說明設定這些試驗的時間長短以及恢復期時間長短的理由。

基因治療產品在毒理試驗的給藥途徑，應盡可能模擬臨床試驗使用方式。預定用於臨床試驗的傳輸/醫療器材(delivery/medical device)，應於毒理試驗一併評估。若此傳輸器材未能於毒理試驗中評估，則需合理說明。關於此傳輸器材及藥品輸送過程的安全性可能需

要額外的非臨床試驗評估。

## 5.2. 基因毒性 (Genotoxicity)

依據基因治療產品的性質，可能會需要進行基因毒性試驗。可藉由下述之三步驟方法，達成執行這些試驗的目的：

- 探討是否發生基因體修飾之現象，並偵測後續任何異常的細胞行為
- 評估嵌入性突變所導致的毒性議題，並探討造成這些毒性的作用機轉；還應評估脫靶修飾 (off-target modifications) 而導致的毒性問題。
- 鑑別並描述基因體嵌入位點之特性，並評估轉殖基因和鄰近序列可能產生的交互作用。

### 5.2.1. 嵌入性突變

基因毒性議題包括嵌入性突變和後續的致癌作用等，應於合適的體外/體內模式中審慎評估。倘若出現陽性結果，則應在基因治療產品首次投予至人體之前，進行額外的測試，以確保此產品之安全性。應根據擬開發與使用之產品類別，明確說明可達成上述目標的試驗計畫。

標準的基因毒性試驗一般較不適合用來評估基因治療產品之基因毒性風險，但若須釐清特定不純物或產品傳輸系統中成分(如複合材料)的基因毒性風險疑慮時，仍可能需要執行標準的基因毒性試驗。需特別注意的是，可能會需進行 ICH S2 中某些類型的基因毒性測試，以利基因治療產品首次投予至人體之前，排除任何可能歸因於最終產品配方中可能引發基因毒性作用之成分。

載體 DNA 嵌入基因體所導致的嵌入性突變可能會造成多種情況，例如改變宿主基因的表現(活化/抑制)、使宿主基因失去活性(破壞了 open reading frame, ORF)、活化/抑制鄰近的沉默/活化基因、或是轉譯出新類型的活性融合蛋白等。嵌入性突變可能造成多種不同的結果，這可能不會影響細胞生長，也可能會造成細胞的生長優勢或劣勢。為了探討此類基因修飾所誘發的任何不良反應，建議可藉由體外及(或)體內試驗探討嵌入性突變的影響。應考慮在已建立之細胞株、初代細胞或動物模式中執行基因毒性試驗，藉此評估基因治療產品的安全性。

### 5.2.2. 載體特定的考量

若是載體會嵌入宿主基因體以表現相關之轉殖基因，應探討其嵌入宿主基因體可能產生之風險，無論是依循預期的嵌入表現方式 [例如當使用反轉錄病毒/慢病毒 (retroviral/lentiviral) 載體時]，或是預期不會發生嵌入 (例如當使用腺病毒、腺相關病毒或質體載體時)，皆應進行研究及討論。

對於具有嵌入宿主 DNA 能力的基因治療產品，依據最終產品的投予方式(局部投予或系統性投予)、標的目標組織/器官，以及目標細胞的生物狀態，來決定是否需要進行基因毒性試驗。即使基因治療產品所含之活性藥物成分預期不會嵌入宿主 DNA，仍須視產品特性決定是否需要進行體內或體外試驗以偵測嵌入情形之發生，以排除任何安全性的疑慮。例如：若治療基因的表現會持續很久時間，則應謹慎探討基因治療產品的持久性，以及 DNA 載體嵌入基因體的可能性。如果確定有嵌入情形，則應確定嵌入之套數和鑑別嵌入位置，並監測後續不良的生物效應和細胞行為變化。另外，根據所使用的載體特性(例如，使用會嵌入人類基因體之載體)，在首次投予基因治療產品至人體之前，可能需要進行延伸性之體外及體內試驗，來說明該產品是否有因嵌入造成腫瘤形成(insertional oncogenesis)的問題。

僅單依據載體的選擇和細胞的嵌入總量(total integration load)，是無法用來預測基因治療產品的基因毒性風險，需對帶有基因毒性嵌入風險的細胞是否仍然在體內形成，以及細胞過度增生是否最終會惡化成腫瘤的所有因素，來做全面通盤瞭解。因此，必須將有關載體嵌入人類基因體及其可能產生之相關風險列入考量。

由於微生物不太可能造成 DNA 轉移和嵌入宿主細胞基因體的安全問題，因此針對噬菌體(bacteriophages)和基因修飾之微生物(genetically modified microorganisms；如乳酸桿菌、沙門氏菌)，可無須考量其是否具有基因毒性。。

### 5.3. 致腫瘤性(Tumorigenicity)

基因治療產品通常不須進行嚙齒類標準全生命週期之致癌性試驗。然而，根據不同的產品類別，仍應藉由相關的體內/體外模式，檢測腫瘤訊號、致癌基因活化或細胞增生等指標，以探究基因治療產品致瘤和致癌的可能性。

應根據證據權重(Weight of Evidence)方法，來決定是否需要探討基因治療產品的致瘤或致癌風險，並且亦應將以下幾個結果納入考量：〔可同時參考 ICH S6(R1)及 ICH S1 致瘤性試驗相關建議內容執行〕

- (1) 有關藥物作用標的或訊息傳遞路徑的藥理知識(例如，轉殖生長因子基因的爭議)；
- (2) 作用標的或訊息傳遞路徑相關的作用機轉，及已知的次藥效學特性是否與致癌性試驗的結果相關，或是否與預測人體潛在致癌基因有關；
- (3) 基因嵌入性突變的試驗結果；
- (4) 重覆劑量毒理試驗的組織病理學評估，是否出現細胞增生 (cellular hyperplasia)、瀰漫性及 (或)局部細胞增生、持續性組織損傷和 (或)慢性發炎、癌症先期變化和腫瘤等組織病理學結果；
- (5) 干擾荷爾蒙之證據；

- (6) 免疫抑制(免疫抑制是人類的腫瘤致病因子之一)；
- (7) 特殊的試驗和評估指標(特殊的染色技術、新的生物標記、或其他有助於解釋或預測動物及人類致瘤性機轉的新穎技術或替代測試體系)。

#### 5.4. 其他毒性試驗

##### 免疫原性和免疫毒性 (Immunogenicity and immunotoxicity)

基因治療產品傳輸至體內時，可能導致先天性免疫反應 (系統性的細胞激素上升、多重器官發炎)與適應性免疫反應 (產生抗體對抗載體和轉殖基因產物、毒殺性 T 淋巴球攻擊基因轉殖之細胞、分泌細胞激素的 T 淋巴球，針對轉殖基因進行攻擊)。許多因素會嚴重影響人體對於基因治療產品的先天和適應性免疫反應，例如來自宿主的因素 (宿主過去曾暴露於病毒和/或轉殖基因產物、免疫系統的狀態等)、基因轉移的步驟 (傳輸系統的類型、轉殖基因的傳輸途徑、標的作用組織)、轉殖基因傳輸載體 (病毒載體的類型、血清型、載體劑量和轉殖基因啟動子的種類、存在選擇標記或自殺基因可能具有潛在免疫原性)和轉殖基因產物本身。申請者進行非臨床開發時，應將這些因素都納入考量。

應特別注意補體 (complement)的活化及其後續影響，亦應考量交叉反應或旁觀者效應引起的自體免疫 (bystander autoimmune responses)風險。若重覆劑量的投藥會引發補體活化，則應於動物和人類血清中探討補體活化的相關指標。

#### 5.5. 生殖及發育毒性 (Reproductive and developmental toxicity)

生殖/發育毒性之風險，需要根據產品類型、作用機制、分布和脫落特性以及病人族群來綜合評估。可依據 ICH S5 最新版指南所提供之生殖毒性檢測一般性原則進行評估。若無法確定基因治療產品是否具有種系傳遞的風險，則應進行繁殖試驗 (breeding studies) 來直接評估在親代所投予的核酸是否會傳遞至子代，並且，當執行此試驗時，應謹慎考量精子生成和卵母細胞成熟的時程。此外，除非有根據產品類型提供合理的說明，否則皆應進行胚胎發育和週產期前後之毒性試驗，以及種系傳遞試驗。

同樣地，若具有生育能力的女性將暴露到基因治療產品，也必須根據其臨床用途和臨床使用族群，進行胚胎發育和週產期前後生殖毒理試驗，以探討此類產品對胎兒的影響 (例如局部細胞激素產生的胎盤轉移情形)。此類動物試驗可能不需於早期開發階段即執行，然而仍應提供合適的安全性評估，並於臨床試驗採用適當的安全性設計，保護受試者；並於執行晚期臨床試驗前提供這些生殖毒性試驗之試驗結果。

依據 3R 原則，在任何情況下，均應彈性地採用科學、經確效，且可有效轉譯成臨床結果的測試策略。雖然常規非臨床生殖毒性試驗對於某些產品類型可能缺乏預測性，但對於人體風險評估而言，闡述這些非臨床生殖毒性試驗的限制、不確定性和數據缺口仍十分重要。

## 5.6. 局部耐受性(Local tolerance)

依據基因治療產品不同的類型、投予途徑和流程(例如，眼內投藥、肌肉注射、靜脈注射、腫瘤內注射...等)，局部耐受性試驗對於特定基因治療產品可能是必要的執行項目。假使已在其他動物試驗中使用擬用於臨床之劑型和給藥途徑並評估過局部耐受性，且試驗結果經法規單位評估後可接受，則無需再分別進行試驗。若需要的話，局部耐受性試驗可在一般毒性試驗中評估。

## 6. 藥品交互作用

如同其他藥品一樣，應依個案情況，探討基因治療產品併用其他藥品之影響，包括是否會影響載體的轉染/轉導/感染、載體向性和效果、治療基因之表現、表現蛋白的生物活性，以及載體的組織分布。舉例來說，合併免疫抑制劑的治療可能會改變載體/病毒的清除率，因此應針對此點有所描述。此外，基因治療產品若會造成肝臟發炎或細胞激素釋放情況，可能會影響併用藥品在肝臟的代謝。例如，如果預期併用免疫抑制劑會改變載體/病毒的清除，或者如果基因治療產品引起肝臟炎症或細胞激素釋放，並可能影響併用藥物在肝臟的代謝，則必須針對藥品交互作用進行探討。

## 7. 藥物非臨床試驗優良操作規範 (GLP)

根據藥物非臨床安全性試驗規範的規定，所有非臨床安全性試驗均應遵循 GLP 進行。但由於某些毒理學評估可能無法完全符合 GLP 規定。例如，有時需於在疾病/損傷動物模式的療效驗證研究中收集基因治療試驗藥品的毒理學數據，可能需要獨特的動物照護和專業技術知識，無法由 GLP 試驗單位提供。同樣地，毒理學試驗中的某些終點指標，例如載體生物分布、細胞動力學或特定免疫終點指標，GLP 試驗單位可能無法提供所需的檢測儀器或技術。一般而言，體外和體內藥理學/概念驗證的試驗研究不需要遵循 GLP，但如果計劃在這些試驗中同時蒐集安全性相關評估指標(例如組織病理學)，則建議於依照 GLP 規範，檢測試驗中的這些安全性項目。

## 8. 首次人體臨床試驗申請應提供之非臨床試驗

對一般藥品而言，其非臨床試驗之項目與內容係隨著臨床試驗的進展逐步增加。然而，為支持首次人體試驗起始劑量之安全性、生物活性、給藥途徑與給藥策略設計之合理性，並提供臨床安全性監測設計之參考，基因治療產品於首次暴露人體之前，即需要完成並提供多項主要的非臨床試驗數據與報告送審。基因治療產品首次進入人體試驗前，至少應提供之非臨床試驗如下：



- (1) 概念驗證試驗。
- (2) 安全性藥理試驗或評估（中樞神經、心血管、呼吸系統）。可合併於毒理試驗中同時評估安全性藥理相關之評估指標。
- (3) 生體分布試驗（包括生體分布、持久性和清除）。雖然在早期臨床試驗階段，可接受尚未經過確效的偵測方法，但仍須提供可支持此方法具有充分專一性及敏感性之資訊。
- (4) 脫落試驗或評估。針對新穎的基因治療產品，脫落試驗須於首次進入人體前提供。
- (5) 單/重覆劑量毒性試驗。於設計良好之概念驗證試驗中，同時納入合適的安全性評估指標，是可接受的。若欲規劃於概念驗證試驗中同時觀察安全性，建議與法規單位申請諮詢，經同意後再執行為佳。
- (6) 基因毒性試驗：應提供嵌入性突變試驗或評估。
- (7) 致腫瘤性試驗或評估。傳統標準的啮齒類動物終身致癌性試驗通常不適用於基因治療產品。然而於早期臨床試驗階段須依產品特性(例如，載體特性與轉基因之生物活性及表現情形...等)，說明試驗產品的致腫瘤風險性。
- (8) 免疫原性和免疫毒性。

上述試驗或評估項目為基因治療產品首次進入人體試驗前必要提供，除此之外，仍可能會依個案情況與臨床試驗進展，要求其他的非臨床試驗項目，或是於臨床試驗階段設計合適的保護措施。原則上，於早期臨床試驗階段未完成之非臨床試驗，需於執行樞紐性臨床試驗前提供完整試驗報告，或者提供合理的論述，並經法規單位審查同意後，方可減免。此外，應於臨床試驗計畫或仿單資訊中提供相關的安全性資訊及保護措施。

## 9. 參考文獻

- (1) EMA: Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products; March 2018.
- (2) EMA: Draft guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational advanced therapy medicinal products in clinical trials; February 2019.
- (3) US FDA: Guidance for industry: preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products; November 2013.
- (4) ICH S1A: Guideline on the need for carcinogenicity studies of pharmaceuticals; November 1995.
- (5) ICH S1B: Testing for carcinogenicity of pharmaceuticals; July 1997.
- (6) ICH S1C(R2): Dose selection for carcinogenicity studies of pharmaceuticals; March 2008.
- (7) ICH S2(R1): Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use; November 2011.
- (8) ICH S5(R2): Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility; November 2000.
- (9) ICH S5(R3): Detection of toxicity to reproduction for human pharmaceuticals; August 2017.
- (10) ICH S6(R1): Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals; June 2011.
- (11) ICH S7A: Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals; November 2000.