



致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

以腺相關病毒(Adeno-Associated Virus, AAV)為載體之基因治療 產品製造管制之病毒安全性考量

黃芳儀¹

前言

依據我國基因治療人體試驗申請與操作規範^[1]，基因治療之定義為：「利用基因或含該基因之細胞，輸入人體內之治療方法，其目的在治療疾病或恢復健康。」基因治療的執行方式可分為二種^[2]，一為活體外(*ex vivo*)，自患者體內取出細胞後以基因修飾之，再進行細胞移植，例如：CAR-T (chimeric antigen receptor-T cell)之 Yescarta[®]^[3]；另一為活體內(*in vivo*)，直接將特定的基因送入病患體內，使之達成目的基因產物，從而使疾病得到治療，例如：Zolgensma[®]^[3]。

早在 1960-1970 年代，科學家們發展出可以將基因送至真核細胞表現的可行性^[4]。經過近 20 年的努力，Rosenberg 等人於 1989 年，利用反轉錄病毒(retrovirus)將抗 neomycin 的基因送入人類腫瘤浸潤淋巴細胞 (tumor-infiltrating lymphocytes)，然後將該細胞送進五名晚期黑色素瘤患者。該研究證實，利用活體外反轉錄病毒修飾後細胞送入人體之基因治療的安全性和可行性^[5,6]。隔 (1990)年，第一次成功的在一位罹患嚴重複合免疫不全症 (severe combined immunodeficiency, SCID)的小女孩，進行基因治療臨床試驗^[4,7]，各國科學家為之振奮，基因治療的研究熱潮就此如火如荼的展開，並認為這樣的治療模式對於過去無法治療的疾病，開啟了無限的可能。就在科學家對於各項基因治療研究充滿想像與願景之際，1999 年一位 18 歲青少年 Jesse Gelsinger，因罹患罕見代謝疾病 ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency 接受基因療法的人體試驗後，因多重器官

¹ 財團法人醫藥品查驗中心 藥劑科技組



致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

衰竭而死亡，此為基因治療死亡的第一案例^[4]，此事件發生後，陸續出現一些基因治療臨床試驗失敗的案例，使得基因治療的發展由原本的狂熱狀態陷入了低潮期。在這低潮的十幾年中，科學家及大藥廠仍鍥而不捨的研究，以尋求更安全、更有效的病毒載體，希望為難治癒疾病尋求一線希望^[4,8]。

2012 年，歐盟 EMA 核准第一個基因治療產品 Glybera[®] 用於治療患有 lipoprotein lipase deficiency 的成年人^[9]；爾後，2015 年美國 FDA (USFDA) 核准用於治療 melanoma 的產品 Imlygic[®]^[3]；接著，2016 年 EMA 核准用於治療 severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency (ADA-SCID) 的產品 Strimvelis[®]^[9]；2017 年，USFDA 核准 Kymriah[®] (Novartis) 及 Yescarta[®] (Kite Pharm) 二款用於治療血液癌症的 CAR-T 產品^[3]；同年 USFDA 核准第一個活體內治療 (*in vivo*) 的 AAV (adeno-associated virus) 產品 Luxturna[®]^[3]，用於治療 RPE65 基因突變相關的失明。2019 年 USFDA 核准以 AAV 為載體的基因治療藥品 Zolgensma[®]^[3]，以透過靜脈注射的方式，將功能性存活運動神經元 (survival motor neuron, SMN) 蛋白的 DNA 導入缺乏該基因患者細胞內，使細胞產生 SMN 蛋白，用於治療因 SMN-1 突變，導致 SMN 蛋白表現不足而引發新生兒脊髓性肌肉萎縮症 (spinal muscular atrophy, SMA)^[10]。這是對人類在醫學上對抗癌症及難治癒疾病的重要里程碑。自此；各種不同形式的基因治療產品如雨後春筍般發展^[4]。根據 Fatemeh Arabi 等人 2022 年發表於 Biomedicine & Pharmacotherapy 的文章顯示，截至 2022 年 4 月，統計有 60 餘種基因治療產品申請上市許可，該篇論文也預測在未來的三年，將有數十種基因治療藥品獲得上市核准^[4]。

截至目前 2022 年 6 月為止，包括 USFDA^[3]、EMA^[9]、日本 MHLW^[10] 和我國食品藥物管理署 (TFDA)^[11] 等共核准 5 種屬於 *in vivo* 治療方式的基因治療產品，將基因片段以病毒載體的方式送入體內以達治療目的，而我國核准其中一項以 AAV 為載體的基因治療產品，Zolgensma[®]，用於治療新生兒遺傳疾病 SMA (表一)。

台灣藥物法規
資訊網法規公告台灣藥品
臨床試驗資訊TFDA藥物
食品安全週報致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

由於以病毒載體製造過程中須透過質體 (plasmid)轉染至細胞進行(例如：HEK293)·然·這些用來製造病毒載體的質體或細胞·可能具有致瘤基因序列及反轉錄病毒序列·用來生產病毒載體的細胞本身亦可能有潛在的感染性病毒存在·為確保產品之安全性·製造過程中針對原料中可能帶有的病原體及可能致病的基因片段都應該加以控管。本文將以病毒為載體之基因治療產品之公開摘要報告為例·說明病毒載體於製造管制之病毒安全性考量。

表一、USFDA、EMA、MHLW、TFDA 核准的 in vivo 基因治療產品

商品名	許可證持有者	核准單位	適應症
載體：Adeno-associated virus (AAV)			
Zolgensma [®] (onasemnogene abeparvovec)	Novartis	USFDA (2019) ^[12] MHLW (2020) ^[13] EMA (2020) ^[14] TFDA(2020) ^[11]	SMA (type I)
Luxturna [®] (voretigene neparvovec)	Spark Therapeutics	USFDA (2017) ^[15] EMA (2018) ^[16]	RPE65 mutation associated retinal dystrophy
Glybera [®] (alipogene tiparvovec)*	UniQure	EMA (2012) ^[17]	lipoprotein lipase deficiency
載體：Herpes simplex virus (HSV)			
Delytact [®] (teserpaturev)	Daiichi Sankyo Company, Limited	MHLW (2021) ^[18]	malignant glioma
Imlygic [®] (talimogene laherparepvec)	Amgen Inc.	USFDA (2015) ^[19] EMA (2015) ^[20]	melanoma

*歐盟於 2013 年核准 Glybera[®]上市·最終因價格過於昂貴而自行下市。



台灣藥物法規
資訊網法規公告



台灣藥品
臨床試驗資訊



TFDA藥物
食品安全週報



致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

AAV 病毒特性

AAV 是一種 non-envelope single-stranded DNA 病毒，大小約為 20-26 nm 為二十面體病毒顆粒。AAV 基因體由大約 4.7 kb 的單股 DNA 組成，兩側有兩個反向末端重複序列 (inverted terminal repeats, ITR)。AAV 啟動子 (promoter) 稱為 p5 和 p19 負責調節 Rep78、Rep68、Rep52 和 Rep40 的轉錄。cap 基因的表現是由 p40 啟動子調控，產生三個 capsid protein (VP1、VP2 和 VP3) 形成 3.9 kDa 的二十面體病毒衣殼。這些蛋白質 VP1:VP2:VP3 的比例約為 1:1:10^{[21],[22],[23]}。

不同血清型 AAV 對不同器官/組織具有不同的親和力 (tissue-tropism)，目前對至少有九種不同的 AAV 血清型，有較為深入的研究。藉此特性，可以精準地將 AAV 靶向到希望治癒的器官。舉例來說，AAV2 是最早被分離出來，也是目前研究最多的 AAV serotype，其特色為傾向感染骨骼肌、神經、平滑肌、肝細胞與眼睛等，而 AAV9 具有穿越血腦障壁的能力^[23]，這也是 Luxteuna[®]使用 AAV2，Zolgensma[®]使用 AAV9 做為載體的原因。現今的研究也致力於找到能提高 tissue-tropism 的 AAV capsid，甚至朝向以「混血清型」的方式進行研究，例如：利用人工方式將 AAV6 與 AAV9 capsid 做結合，測試是否能提供特定器官的感染親和力。目前國際上已核准的基因治療藥品中 Zolgensma[®]、Luxturna[®]、Glybera[®]皆以 AAV 做為病毒載體^[3]，然，Delytact[®]以及 Imlygic[®]則是以 herpes simplex virus (HSV) 為病毒載體^[18,19,20]。

常用於 CAR-T 療法的慢病毒 (lentivirus)，其啟動子會活化鄰近的基因，且有可能會造成細胞 transcripts 的異常剪接^[24]；然，相較於 lentivirus，AAV 的優點如下：1) 可以感染分裂細胞和非分裂細胞，通常不會引起疾病或症狀，只會引起非常輕微的免疫反應；2) AAV 僅在有輔助病毒 (helper virus) 的情況下複製病毒；及 3) 作為基因治療的 AAV 為 recombinant AAV，病毒基因並不會嵌入宿主細胞的 genomic DNA 中。基於上述特性，AAV 為載體傳送 DNA 進行基因治療為安全的方式之一^[21]。

台灣藥物法規
資訊網法規公告台灣藥品
臨床試驗資訊TFDA藥物
食品安全週報致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

表二、以 AAV 為病毒載體之藥品及其生產細胞系統

藥品名稱	病毒載體	製備載體的細胞系統
Zolgensma [®]	AAV 9 ^[25]	HEK293 ^{[11],[12],[13],[14]}
Luxturna [®]	AAV 2 ^[25]	HEK293 ^{[15],[16]}
Glybera [®]	AAV 1 ^[25]	sf9 ^[17]

AAV 病毒載體的生產細胞庫製備之考量

建立完整的細胞庫系統有助於生物製劑的管控與產品的一致性。因此，建立細胞庫系統時，從轉染質體骨架類型的挑選與建構、細菌細胞庫到病毒生產細胞庫的建立，每個環節除了考量生產細胞/細菌的穩定度及效能外，應考量所建置生產細胞庫之細胞/細菌及原料是否會影響最終產品的安全性(例如：致瘤性等)^{[26], [27]}。

在細胞庫的建構方面，可分為建構質體的細菌細胞庫以及載體產生的生產細胞庫，依據國際醫藥品稽查協約組織 (PIC/S) 發布「Annex 2A manufacture of advanced therapy medicinal products (ATMP) for human use」^[28]之規範，有關 ATMP 質體的建構與製備建議依照 GMP 的原則來製備。然，製造 ATMP 從生產細胞庫(主細胞庫與工作細胞庫)建立、轉染、誘導、收成、純化、配方調製及最後填充都須符合 GMP 的規範。

以下將針對不同的細胞庫系統之管控項目進行分項說明。

一、細菌或微生物細胞庫^[26,27]

細菌的細胞庫常作為質體的起始物，質體可為基因治療的原料藥(drug substance)，或做為製造中間物的原料。一般來說，建議建立質體的細菌細胞庫，為製造質體或微生物載體提供品質一致的起始材料，且建議對細菌細胞庫進行適當的品質管控，並提供足夠證明細胞庫及其生產之質體之品質保證的相關資訊。

台灣藥物法規
資訊網法規公告台灣藥品
臨床試驗資訊TFDA 藥物
食品安全週報致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

質體的建構除符合 GMP 的原則外，依照 TFDA 於民國 109 年發布的「人類基因治療製劑臨床試驗審查基準」^[27]，以及 USFDA 於 2020 年發布的「Guidance for industry: chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications」^[26]，有關細菌細胞庫的建立應該提供細胞庫細胞的歷史與來源描述，包括如何設計與建構質體的資訊，對於細胞庫本身而言，應描述微生物細胞基因型及來源，如何建立該細胞庫、細胞庫的保存及維護、細胞庫的品質管控(可以有品質證明書)以確保製造過程中微生物的安全性、鑑別、純度及穩定性。對於用於製造質體的細菌細胞庫，建議測試項目包括：

- (一) 細菌菌株的鑑別。
- (二) 質體的存在與否。此項目可以透過可篩選(x-gal selection)的培養基、限制酶或 DNA 序列來確認。
- (三) 細菌數的計算。
- (四) 細菌菌株純度(沒有不適當的微生物、噬菌體檢測為陰性)。
- (五) 透過限制酶分析質體特性。
- (六) 建議針對質體進行完整定序。
- (七) 轉基因(transgene)的表現與活性(如適用)。

以目前已上市的藥品 Zolgensma[®]之公開資料為例，細菌細胞庫的製備部份，將帶有 SMN cDNA, Rep2/Cap9, E2a, E4 及 VA1 genes 的質體轉殖到 *Escherichia coli* 中^[13]，並挑選最適合的殖株(clone)來建立主細菌細胞庫及工作細菌細胞庫。表三說明該藥品在主細菌細胞庫及工作細菌細胞庫進行的檢測。

台灣藥物法規
資訊網法規公告台灣藥品
臨床試驗資訊TFDA藥物
食品安全週報致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

表三、Zolgensma[®]細菌細胞庫之檢測項目*

檢測項目	主細菌細胞庫	工作細菌細胞庫
宿主細胞鑑別 (host cell identity)	√	√
宿主細胞基因型 (host genotype)	√	X
細胞數 (viable cell count)	√	√
質體的基因穩定性 (the genetic stability of the plasmid)	√	X
菌落型態 (colony morphology)	√	√
革蘭氏染色 (Gram staining)	√	√
純度 (purity)	√	√
限制酶消化圖譜 (restriction digest map)	√	√
無菌性 (sterility)	√	√
質體的基因序列 (plasmid Sequencing)	√	√

* 本表格僅說明 Zolgensma[®]於日本 MHLW 揭露之檢測項目，未揭露部分不代表未進行相關試驗。√代表已揭露進行該項試驗；x 代表未揭露是否有進行該項試驗。

二、作為生產病毒載體的主細胞庫(Master cell bank)與工作細胞庫(Working cell bank)

建立生產病毒載體的主細胞庫時，除考量細胞是否會對最終產品產生安全性疑慮(例如：致瘤性)外，建議考量細胞庫之歷史、細胞來源之物種、細胞庫如何建立(單一細胞落，以及稀釋極限)、細胞庫之特性分析，若該細胞庫系統是經過基因修飾(例如：被修飾為用來製造病毒載體的細胞)，除了考量細胞庫本身之特性外，對於修飾細胞所使用的原料(例如：質體等)亦須納入考量中，以確保最終基因治療產品之安全性與純度^[26,27]。有關細胞庫的管控應考量下列項目：

(一) 應確保細胞庫沒有微生物汙染，包括無細菌、黴菌、黴漿菌、以及昆蟲細胞的螺旋體，

台灣藥物法規
資訊網法規公告台灣藥品
臨床試驗資訊TFDA藥物
食品安全週報致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

以及其他外來的病毒汙染。以反轉錄病毒檢測為例，建議使用敏感細胞培養之感染性試驗、穿透式電子顯微鏡試驗以及反轉錄酶 (reverse transcriptase, RT) 試驗來檢測反轉錄病毒^[26,27,29,30]。

(二) 若已知細胞庫存有外來病原體的可能，若可行，應考慮重新建立細胞庫，若為該細胞潛在的病毒汙染源，可能須要進行強而有力的病毒清除研究來去除，或降低外來汙染因子^[26,27]。

製備 AAV 病毒載體的細胞系統大致上可分為二類^[22]：一是哺乳類動物的細胞系統，二是昆蟲來源的細胞系統，baculovirus/insect cell。以下將簡述不同種類的細胞系統運作時外來汙染源的考量。

1. 哺乳類動物的細胞系統

哺乳類動物的細胞系統一般為人類及齧齒類動物來源。

- (1) 人類來源細胞常使用的有 HEK293、HEK 293(T)、HeLa，應視情況針對人類特異性之病毒檢測，例如：cytomegalovirus (CMV), HIV-1 &- 2, HTLV-1 &-2, human herpesvirus-6, -7 and -8 (HHV-6, -7& -8), JC virus, BK virus, epstein-barr virus (EBV), human parvovirus B19, HBV, human papillomavirus (HPV)，和 HCV 之檢測^[26,27,30]。
- (2) 齧齒類動物來源的細胞，例如：BHK21^[22]，建議依照 ICH Q5A(R1) 規範^[29] 進行齧齒類動物相關病毒檢測，例如反轉錄病毒檢測、*in vitro* 試驗、*in vivo* 試驗與 MAP (mouse antibody production)、HAP (hamster antibody production)、RAP (rat antibody production) 抗體產生試驗。
- (3) 其他動物，建議依據物種特異性進行病毒檢測，例如：vero cell 建議檢測 SV40 及 simian retrovirus^[26, 27]。



台灣藥物法規
資訊網法規公告



台灣藥品
臨床試驗資訊



TFDA藥物
食品安全週報



致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

2. 昆蟲來源的細胞系統^[22,31]

昆蟲來源的細胞系統，例如：*sf9 (Spodoptera frugiperda)*，除了昆蟲相關的病毒檢測(例如：*nodavirus*)，目前已知 *sf9* 細胞系潛在具有 *rhabdovirus*^[30]，因此使用 *sf9* 細胞系生產 AAV 病毒載體，除了針對主細胞庫應增加 *rhabdovirus* 在細胞系內潛在量與感染能力的評估外，製程中亦須有病毒清除步驟以清除具有感染能力的病毒顆粒，最終產品亦須將潛在污染的病毒感染力列入管控。以昆蟲細胞作為生產病毒的細胞庫其優勢為：A) 可以使用無血清培養基培養；B) *sf9* 細胞中的外來病毒轉錄物質 (*adventitious virus transcripts*)，大多數感染昆蟲細胞的病毒不會在哺乳類動物複製(但不代表可以忽略)；及 C) 經過優化的 *baculovirus* 系統，已設計帶有病毒組裝所需的元素，不需要輔助病毒即可製造 AAV。

在人類來源的病毒生產細胞庫系統，以已上市藥品 *Zolgensma*[®] 為例，該產品以 HEK293 作為病毒生產細胞庫，根據日本 MHLW 公開摘要報告顯示^[13]，*Zolgensma*[®] 依據 ICH Q5A (R1)^[29]、Q5B^[33] 以及 Q5D^[34] 等規範進行細胞庫的鑑別與純度檢測，有關該細胞庫之外來病原體檢測項目如表四。

致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

表四、Zolgensma[®] 細胞庫外來病原體檢測項目(已揭露部分)^[13]

檢測項目	Zolgensma [®]
<i>in vivo</i> virus tests	suckling and adult mice, guinea pigs, embryonated eggs
<i>in vitro</i> virus tests	MRC-5 cells, Vero cells, HeLa cells
<i>in vitro</i> tests for bovine viruses	BVDV, PI3, BTV, BAV, IBRV, BPV, RSV, Reo-3, and RABV
<i>in vitro</i> tests for porcine viruses	PAV, PPV, RABV, Reo-3, TGEV, PHEV, and BVDV
electron microscopy	√
reverse transcriptase activity assay	√
test for adenovirus	√
test for AAV	serotypes 1-13
tests for human viruses	HSV-1/2, PVB19, EBV, SV40, CMV, HHV-6, HHV-7, HHV-8, HBV, HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, HCV, and HAV
sterility test	√
test for mycoplasma	√

(三) 建立具有穩定性的細胞庫^[26,27]

1. 細胞凍存(在長期保存態下)後存活率

不同凍存時間之細胞庫解凍後，評估細胞解凍後之活力、存活率等檢測項目，來確認生產病毒載體的穩定性。

2. end of production cells (EOP)的檢測

(1) 利用 EOP 或 mock production cells of similar passage history (例如：control

台灣藥物法規
資訊網法規公告台灣藥品
臨床試驗資訊TFDA藥物
食品安全週報致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

cell)檢測細胞中潛在的 endogenous virus 或 retrovirus，是否因細胞老化被偵測到。

- (2) 若產生病毒載體的相關基因都嵌合到生產細胞中，應確認在 limit of *in vitro* cell age (LIVCA)是否能夠穩定生產病毒載體。

AAV 載體之基因治療藥物安全性相關品質管制考量

有關 AAV 為載體的藥品在規格的建立上面除了藥品的鑑別以外，應將基因體完整性、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一併納入考量^[35]。即使在製程中使用的輔助病毒或嵌合病毒不具有複製能力，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，具複製能力腺病毒(replication-competent AAV, rcAAV)的檢測應納入管控。

在不純物方面，研究顯示，腺相關病毒顆粒也會將用於生產腺相關病毒之質體或輔助病毒 DNA 共同包裝進病毒顆粒中，這些共同包裝 DNA 的病毒顆粒應視為製程不純物^[35]。這些不純物的存在可能帶有具有致瘤基因序列或反轉錄病毒序列，應將該等 DNA 活性降到最低。建議透過將 DNA 的片段大小降低到功能基因大小以下，並減少 DNA 殘留量^[35]。若可行，建議將 continuous non-tumorigenic cells 的殘留 DNA 限制在 10 ng/dose，並將殘留 DNA 的大小限制在 200 base pair^{[26],[27]}。若使用的細胞來自腫瘤細胞(例如 HeLa)或具有致瘤性(例如：HEK293、HEK293T)的細胞及其他可能引起特殊問題的細胞株，建議限制殘留 DNA 的數量及片段大小以確保產品安全。除此之外，建議以限制患者接觸這些相關的抗原序列，例如：使用 HEK293T 細胞製造的產品應考量 E1 與 SV40 的 large T^[26,27] 的抗原序列，若使用 HeLa 細胞製造，應考量 E6/E7 基因^[27]。

對於病毒載體，典型的產品相關不純物包括：有缺陷的干擾顆粒 (defective interfering particles)、非感染性顆粒 (non-infectious particles)、空病毒衣殼顆粒

台灣藥物法規
資訊網法規公告台灣藥品
臨床試驗資訊TFDA藥物
食品安全週報致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

(empty capsid particles)或複製重組的病毒污染物 (replicating recombinant virus contaminants)·這些不純物應被偵測·並建議以比例方式呈現不純物的百分比·例如: full: empty particles 或 virus particles : infectious units^[26]·表五列出 Zolgensma[®]及 Luxturna[®]之公開摘要報告說明病毒載體之原料藥特性鑑別、不純物及規格、成品規格檢測項目(包含鑑別及不純物)^[11,14]。

表五、Zolgensma[®]、Luxturna[®]已揭露原料藥/成品之規格與不純物檢測項目

	Zolgensma [®] [13]	Luxturna [®] [16]
原料藥特性分析	titer (genomic copy number) analysis of viral vector genome plasmid DNA host cell DNA <i>in vitro</i> SMN protein expression	未揭露相關資訊
製程中相關不純物	rcAAV plasmid DNA host cell DNA host cell protein (HCP) impurity A, B, C, D 等。	residual host cell DNA residual plasmid DNA residual E1A DNA residual HEK293 protein residual bovine albumin residual Cesium
原料藥規格檢測項目	appearance identification osmolality pH purity (plasmid DNA, host cell DNA, HCP, impurity A, B, C) microbial limits	未揭露相關資訊



致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

	rcAAV	
成品規格檢測項目	<ul style="list-style-type: none"> ● physicochemical <ul style="list-style-type: none"> ✓ appearance ✓ identification ✓ osmolarity ✓ pH ✓ purity ● activity/potency <ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>in vivo</i> potency (prolongation of survival of SMNΔ7 mice) ✓ <i>in vitro</i> potency (SMN protein expression) ✓ infectious titer (PCR) ● safety <ul style="list-style-type: none"> ✓ endotoxin ✓ foreign insoluble matter ✓ insoluble particulate matter ✓ sterility 	<ul style="list-style-type: none"> ● physicochemical <ul style="list-style-type: none"> ✓ appearance ✓ pH ✓ concentration of Pluronic (μg/mL) ✓ extractable volume (mL) ● identity <ul style="list-style-type: none"> ✓ vector Genome Identity ● concentration <ul style="list-style-type: none"> ✓ vector genome concentration assay (vg/mL) ● activity/potency <ul style="list-style-type: none"> ✓ gene product expression ✓ <i>in vitro</i> relative potency ● purity ● safety <ul style="list-style-type: none"> ✓ endotoxin (IU/mL) ✓ particulate matter ✓ sterility

Zolgensma[®]的公開摘要報告中說明，有尚未揭露的四種不純物(A, B, C, D)，其中 B, C, D 為製程中產生的不純物，將會在製程中的步驟移除；rcAAV, plasmid DNA, host cell DNA, HCP 以及不純物 A, B, C 將會在原料藥進行管控。由上面二個例子中可看出，病毒載體藥品除了藥品效價之外，製程中相關的不純物管控也是重要的一環^[13]。

台灣藥物法規
資訊網法規公告台灣藥品
臨床試驗資訊TFDA藥物
食品安全週報致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

其他外來汙染源的管控

外來汙染可分為下列二種：

- 一、對於非病毒性外來病原體，建議提供有關避免和控制傳染性海綿狀腦病病原體、細菌、黴漿菌和真菌的資訊。該資訊可以包括原料來源的認證和/或測試，以及生產過程的控制。
- 二、對於外來病毒汙染，建議提供有關病毒安全性研究的資訊。例如：製程中病毒清除確效、細胞庫病毒檢測，以及製程中使用原料來源之病毒管制資訊。

以日本 MHLW 公開 Zolgensma[®]摘要報告為例，說明了除 HEK293 之外使用的生物性原料及其來源於表六，但未揭露檢測方式。另外，公開摘要報告亦說明針對製程中特別針對某二個關鍵步驟後分別進行病毒檢測，整理如表七。

表六、Zolgensma[®]製程中使用生物性原料^[13]

Raw material	Animal species	Specific part of animal used
bovine serum	Bovine	Blood
transferrin	Human	Blood
trypsin	Porcine	Pancreas
fetal bovine serum (FBS)	Bovine	Blood
casamino acids	Bovine	Milk

台灣藥物法規
資訊網法規公告台灣藥品
臨床試驗資訊TFDA藥物
食品安全週報致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

表七、製程中中間物管控外來汙染源

Test sample	Control item
after step A culture medium	<i>in vitro</i> virus tests (MRC-5 cells, vero cells, HEK293 cells)
after step B culture medium	sterility test, test for mycoplasma, <i>in vitro</i> virus tests (MRC-5 cells, vero cells, HEK293 cells)

在製程中病毒清除確效部分，Zolgensma[®] [13] 在製程中有三個病毒清除步驟，以 XMuLV、PRV、HAV 及 MVM 為 model virus，分別清除 12.61、15.31、1.88 及 1.48 (log₁₀) 的病毒量。Glybera[®] [17]，是以 baculovirus production system 生產，根據該產品之歐盟公開摘要報告描述，有關 Glybera[®] 以 PRV、BVDV、EMCV 及 CPV 為 model virus 評估製程中清除步驟效能。

結語

近十幾年來；新興科技藥品的蓬勃發展，以病毒為載體藥品研發更是如雨後春筍般的發展，其製程中所使用的關鍵原料包含質體與生產細胞。然，這些用來製造病毒載體的質體或細胞，可能帶有具有致瘤基因序列及反轉錄病毒序列，用來生產病毒載體的細胞本身亦可能有潛在的感染性病毒存在；另外，病毒組裝的過程中所包覆的 DNA 片段亦難以掌握，考量產品之安全性，病毒載體的製造過程中，外來性病原體檢測、去活化及清除為製程中非常重要的一環。隨著科技的日薪月異，陸續有新的檢測方法被開發及驗證，且國際上已有相關法規提供藥物研發人員依循，我國重視新興科技藥品的發展，建議若有相關議題，可利用查驗中心的諮詢輔導機制，進行討論。

參考資料

1. 行政院衛生署基因治療人體試驗申請與操作規範，民國 91 年 9 月 13 日。
2. What is Gene Therapy ?



台灣藥物法規
資訊網法規公告



台灣藥品
臨床試驗資訊



TFDA藥物
食品安全週報



致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy>

3. FDA Approved Cellular and Gene Therapy Products
<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>
4. Arabi F et. al., Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. Biomed Pharmacother. 2022;153:113-324.
5. Edelstein ML. et al., Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004 – an overview. J Gene Med 2004;6:597–602.
6. Rosenberg SA. et al., Gene transfer into humans – immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. N Engl J Med 1990;323:570–578.
7. Blaese RM. et al., T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. Science 1995;270:475–480.
8. Raper SE. et al., Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. Mol Genet Metab 2003;80:148–158.
9. Medicine <https://www.ema.europa.eu/en/medicines>
10. PMDA Review Reports: Regenerative Medical Products
<https://www.pmda.go.jp/english/review-services/reviews/approved-information/0004.html>
11. Taiwan Food and Drug Administration Assessment Report- Zolgensma Suspension for Intravenous Infusion
12. USFDA Summary Basis for Regulatory Action- ZOLGENSMA
<https://www.fda.gov/media/127961/download>
13. MHLW Report on the Deliberation Results- ZOLGENSMA February 26, 2020
14. Human medicine European public assessment report (EPAR): Zolgensma



台灣藥物法規
資訊網法規公告



台灣藥品
臨床試驗資訊



TFDA藥物
食品安全週報



致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

15. USFDA Summary Basis for Regulatory Action- LUXTURNA
<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/luxturna>
16. Human medicine European public assessment report (EPAR): Luxturna (updated)
17. Human medicine European public assessment report (EPAR): Glybera
18. MHLW Report on the Deliberation Results-Delytact May 24, 2021
19. CBER Product Review Gene Therapy Review- Imlygic
20. Human medicine European public assessment report (EPAR): Imlygic
21. Büning H et. al., Capsid modifications for targeting and improving the efficacy of AAV vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019;12:248-265.
22. Penaud-Budloom et. al., Pharmacology of recombinant adeno-associated virus production *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;8:166-180.
23. Naso MF et al., Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs.* 2017;31(4):317-334.
24. Bulcha JT et. al., Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):53-77.
25. Domenger C et al., Next-generation AAV vectors-do not judge a virus (only) by its cover. *Hum Mol Genet.* 2019;28(R1):R3-R14.
26. USFDA Guidance for Industry: Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)
27. 衛生福利部食品藥物管理署，人類基因治療製劑臨床試驗審查基準，民國 109 年 11 月 2 日。
28. Annex 2A Manufacture of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP) for Human Use
29. ICH Q5A (R1) Quality of biotechnological products: viral safety evaluation of



台灣藥物法規
資訊網法規公告



台灣藥品
臨床試驗資訊



TFDA藥物
食品安全週報



致力法規科學
守護生命健康

Regulatory Science, Service for Life

- biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin
30. Ma H et. al., Identification of a novel rhabdovirus in spodoptera frugiperda cell lines. J Virol. 2014;88(12):6576-85.
 31. Wu Y et. al., A recombinant baculovirus efficiently generates recombinant adeno-associated virus vectors in cultured insect cells and larvae. Mol Ther Methods Clin Dev. 201;10:38–47.
 32. 中華藥典第九版 <5152>
 33. ICH Q5B Analysis of the expression construct in cell lines used for production of rDNA-derived protein products
 34. ICH Q5D Quality of Biotechnological/Biological Products: Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products
 35. 財團法人醫藥品查驗中心，「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」，民國 107 年 11 月 20 日。