



基因體編輯技術用於人類
基因治療製劑之製造管制
研發策略指導原則
第一版

中 華 民 國 1 1 5 年 9 月 1 日

財團法人醫藥品查驗中心

序言

基因體編輯技術於人類基因治療製劑的應用正持續快速地發展，此類藥品對於疾病治療具有相當潛力，透過對其品質與安全性之控管，期可降低整體之相關風險，並促進基因體編輯技術之人類基因治療製劑於臨床應用的發展。我國已有相當產學研單位投入相關製劑之開發，考量我國目前尚未發布針對此類製劑之法規，故研擬此基因體編輯技術用於人類基因治療製劑之製造與管制研發策略指導原則，期能提供研發階段之策略參考，及闡述品質相關法規科學建議。

【撰寫團隊】

呂佳馨、李倍慈、黃豐淳、葉嘉新、陳可欣、徐麗娟、
劉明勳

目錄 (Table of Contents)

1. 前言	3
2. 一般考量	3
2.1 基因體編輯之方法	3
2.2 基因體修飾的種類和程度	4
2.3 基因體編輯元件的遞送方法	4
3. 製造與管制考量	5
3.1 基因體編輯元件的設計	5
3.2 基因體編輯元件之製造和檢測	5
3.3 製劑的製造與檢測	6
4. 參考文獻	7

本研發策略指導原則係主要參考美國 FDA 公告之 Human Gene Therapy Products Incorporating Human Genome Editing、國際上之相關規範及審查經驗等，亦代表醫藥品查驗中心 (Center for Drug Evaluation, CDE)對此議題的當前想法。如果未來有相關的科學證據，則會進一步修訂此指導原則。本指導原則非審查基準，若有不同的研發方式，可透過諮詢管道與查驗中心討論。凡涉及政策方向及法規解釋與適用，仍應依中央衛生主管機關之指示為準。

若對此指導原則有任何疑問，歡迎來信至 feedbackbox@cde.org.tw

1. 前言

基因體編輯技術為於離體(*ex-vivo*)或體內(*in-vivo*)對體細胞基因體 (genome)之特定位置進行 DNA 序列的新增、刪除、改變或替換等編輯程序。應用基因體編輯技術之人類基因治療製劑(本文簡稱人類基因體編輯製劑)需有適當之利益風險評估，應依據目標適應症和病人族群、療效和持續時間、及其他可用的替代治療選項等。依照使用之基因體編輯方法，可能須特別考量包含脫靶 (off-target) 編輯、非預期的靶向目標 (on-target)編輯之結果、以及靶向目標與脫靶編輯之未知長期影響等。

本研發策略指導原則之訂定係針對人類基因體編輯製劑之研發者，提供該製劑在製造管制之法規科學建議及研發策略考量。臨床試驗申請時，應參照衛生福利部食品藥物管理署公告之「人類細胞治療製劑臨床試驗申請作業及審查基準」、「人類基因治療製劑臨床試驗審查基準」等規範。

2. 一般考量

基因體編輯技術可由單一或多個基因體編輯元件所組成。基因體編輯元件為基因體修飾所必須之所有材料，可包括但不限於編輯器 (editor)、DNA 標靶元件(例如 guide RNA)和用於修復標靶序列的供體 DNA 模板 (donor template DNA)。應用基因體編輯技術時，應考量改變 DNA 序列的方法、達到預期療效所須的基因體修飾類型、以及基因體編輯元件的遞送方法。

2.1 基因體編輯之方法

基因體編輯技術可分為依賴核酸酶 (nuclease-dependent)或不依賴核酸酶 (nuclease-independent)方式。依賴核酸酶的基因體編輯技術可在特定 DNA 序列位置產生斷裂，進而改變斷裂處的 DNA 序列。核酸酶包括但不限於鋅指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs)、類轉錄活化因子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs)、巨核酸酶 (megannucleases)和 CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated

nucleases)；不依賴核酸酶的基因體編輯技術則可在不切斷 DNA 下改變 DNA 序列。像是某些類型的鹼基編輯和可形成三股螺旋的合成肽核酸 (peptide nucleic acids, PNA)。在選擇合適的基因體編輯技術時，應考量預期的編輯結果 (例如基因不活化、恢復 (restoration) 或導入 (introduction))，專一地標靶 DNA 序列的能力，以及是否能優化基因體編輯元件以提升安全性、編輯效率、專一性或安定性。

2.2 基因體修飾的種類和程度

許多基因體編輯方法是藉由固有的 DNA 損傷修復途徑來進行基因體修飾，常見的修復途徑包含同源基因引導修復 (homology directed repair, HDR) 和非同源基因之末端接合機制 (non-homologous end-joining, NHEJ)。HDR 利用同源 DNA 序列修復 DNA 斷裂處；而 NHEJ 則無須同源 DNA 之修復模板，直接重新連接斷裂 DNA 的兩端。兩者雖皆可進行具療效的基因體修飾，但 HDR 需在細胞週期的 S/G2 期才最有作用，而 NHEJ 則相對不需依靠細胞週期。需特別注意，儘管 DNA 損傷修復途徑具有一定地準確性，但此過程會有 DNA 插入或刪除而可能造成非預期的後果。像是多重靶向目標編輯或靶向目標和/或脫靶綜合效應，可能造成 DNA 斷裂，進而導致染色體重組。

達到預期治療效果所需的基因體修飾程度，或可稱為療效編輯閾值 (therapeutic editing threshold)，其取決於適應症和病人。建議在開發人類基因體編輯製劑時，應考量療效編輯閾值 (例如基因體編輯頻率和受編輯細胞數量)，由於臨床治療效果可能取決於該製劑是否能達到預期的療效編輯閾值，故若無相關臨床數據可支持療效編輯閾值之設定，建議進行臨床研究前，應評估該製劑可達到的編輯閾值可能具有療效的科學性依據。

2.3 基因體編輯元件的遞送方法

在選擇基因體編輯元件遞送進細胞的方法時，應考量每個遞送方法的優點與侷限，例如不同遞送載體可承載的核酸含量、遞送至目標細胞的專一性和效率以及基因體編輯元件的作用時間和安定性等。以基因體編輯元件的作用時間為例，若核酸酶的功能活性持續越久，可能造成非預期的基因體修飾 (特別是脫靶編輯和染色體重組) 之風險就越大。因此應依製劑特性，將基因體編輯元件的作用持續時間縮短至基因體編輯所需的時間，以避免可能的脫靶編輯。

選擇遞送方法時，另應依據目標適應症與病人族群所採用離體或體內的基因體修飾方式來評估。以離體的基因體修飾而言，其基因體編輯元件遞送進細胞的方式，通常為轉染、轉導、電穿孔 (electroporation) 或其他的物理方法等。基因體編輯元件可以是 DNA、RNA、蛋白質或核糖核蛋白 (Ribonucleoprotein, RNP) 複合物。如果是利用 HDR 途徑，則供體 DNA 模板可用質體或病毒載體方式，例如重組腺相關病毒 (Adeno-associated virus, AAV)，

AAV)。離體基因體修飾之遞送方式，應考量是否能有效地將編輯元件送入目標細胞，並維持該細胞的存活率。

對於體內的基因體修飾，可利用病毒載體或奈米粒子遞送基因體編輯元件。選擇體內遞送方法時，應考量載體是否能將基因體編輯元件送至目標細胞或組織，並儘可能減少遞送到非目標組織，以及是否可控制載體所遞送的基因體編輯元件表現，例如使用組織特異性啟動子 (promoter) 或小分子抑制劑等。亦應考量各載體之特性，病毒載體可持續表現基因體編輯元件的轉殖基因 (transgene)，而奈米粒子則可用於暫時性遞送不同性質的基因體編輯元件，例如 DNA、RNA 或蛋白質。此外，應考量載體可能引起的毒性，以及基因體編輯元件與載體可能的免疫反應，例如但不限於病人已存在病毒載體之抗體，因而導致治療時病毒載體在體內被迅速中和而失活等，也可能因首次治療導致人體產生免疫抗體，因此難以反覆使用此藥物治療。整體而言，應依據預期用途選擇合適的遞送方式。

3. 製造與管制考量

3.1 基因體編輯元件的設計

建議選擇最適合目標基因和具預期基因體修飾能力的設計平台。臨床試驗資料應詳細說明基因體編輯元件的設計和篩選過程，例如但不限於定位特定的 DNA 序列的位置、靶向目標的效率、編輯元件的穩定性和表達效率、安全性等，以及提供基因體編輯元件和/或表現構築 (expression construct) 的序列。建議優化基因體編輯元件，以儘可能降低脫靶基因體修飾的風險。依據所使用的基因體編輯技術，可對編輯器或標靶元件進行優化，例如可優化 guide RNA 以減少其降解。臨床試驗資料中應詳細描述基因體編輯元件的優化策略。

3.2 基因體編輯元件之製造和檢測

施用於體內的基因體編輯元件，該編輯元件即為活性藥物成分或原料藥，經最終配方 (final formulation) 後即為最終成品。如果基因體編輯元件用於離體修飾細胞，基因體編輯元件則被認為是藥品的關鍵原物料。

如果基因體編輯元件僅使用一次，例如基因體編輯元件僅用於主細胞庫 (master cell bank, MCB) 之製備，該 MCB 即用於藥品的常規製造，則該基因體編輯元件所需之相關資料和放行檢測的要求可能會減免，但仍須足以支持基因體編輯元件的品質和起始物 (例如 MCB) 的安全性。若有此考量，建議在早期開發階段與中央衛生主管機關討論管控策略等相關資訊。

申請臨床試驗資料時，建議詳細說明每個基因體編輯元件的製造、純化方式和檢測項目。建議敘述每個基因體編輯元件的製程和製程管控，包括製程流程圖和步驟詳細敘述等，並提供這些製程中所使用原物料/試劑的清單和檢驗成績書。另應提供以下資訊：

- 品質管控和品質保證計劃 (quality assurance programs)
- 確保不同批次、來源和類型的編輯元件的追溯性和區隔 (segregation)之程序
- 用於製程中預防、偵測和改正缺失之程序
- 將基因體編輯元件從其製造場所運送到成品製造場所之程序

即使基因體編輯元件是由供應商製造和/或檢測，也應提供相關資訊。臨床試驗申請時，請依照「人類基因治療製劑臨床試驗審查基準」。

應對基因體編輯元件進行適當的檢測。除無菌性、鑑別、純度和活性檢測外，應依據製程進行其他檢測，例如製程不純物的檢測等。應評估基因體編輯元件分析方法的適用性，包含靈敏度(例如偵測/定量極限)和專一性，此外，應有適當製程中的檢測，以確保基因體編輯元件之品質。

應根據基因體編輯元件存放時的狀態 (例如凍乾)執行安定性試驗，應評估包含與安定性指標相關的關鍵品質屬性檢測，例如純度和活性檢測等。

3.3 製劑的製造與檢測

請詳細敘述製程步驟，包含製程流程圖、所有製程中管控項目相關資料，及製程中使用試劑的清單和檢驗成績書。對於無法進行最終滅菌的藥品，應有可確保無菌製程之相關資訊。有關人類基因體編輯製劑之製程和檢測可參考中華藥典(5050)基因治療製劑。

技術性資料中應有藥品檢測計劃的詳細敘述。對於離體修飾細胞的人類基因體編輯製劑，檢測項目應包括基因體編輯的效率 (例如靶向目標的編輯程度)、專一性 (例如脫靶編輯的程度)、無菌性等。應有檢測方法之詳細說明，包含其準確度、精密度、靈敏度和專一性，以及對照組與標準品的相關資訊 (若適用)。

為了確保製劑之安全性，應從起始物、製程、最終製劑之品質屬性和非臨床研究多方面考量來制定成品規格。最終製劑可為體內施打的基因體編輯元件或離體修飾的細胞兩種類型，對於不同類型之製劑的建議如下：

i. 體內施用之人類基因體編輯製劑

若基因體編輯元件是透過質體或病毒載體施打至人體後於體內表現，則該質體/載體在最終配方狀態下被視為成品，應完整敘述其製造和檢測。若基因體編輯元件以奈米粒子作為遞送方法，則應有奈米粒子的配方組成、奈米粒子與成品的製程及檢測方法，放行檢測項目應包含基因體編輯元件包覆於奈米粒子之包覆效能檢測。

在早期研究階段，效價檢測可評估基因體編輯元件修飾預期基因序列的效能。然而，對於旨在提供主要有效性證據以支持查驗登記申請的研究時，應以可評估基因體編輯元件在目標細胞或組織 (或代表性替代物)內達成之預期的下游生物活性 (例如修正後細胞功能)，作為效價檢測項目。成品安定性試驗檢測項目建議亦應包含該效價檢測。

ii. 離體修飾的人類基因體編輯製劑

製程敘述應清楚說明執行基因體修飾步驟的時機，對於可能影響基因體編輯元件的編輯效率或專一性的關鍵步驟（例如 CRISPR 編輯系統的 RNP 形成步驟），應說明製程管控和製程中檢測項目，並提供其允收標準或限量及合理性說明。

離體修飾的人類基因體編輯製劑之放行檢測，應包含靶向目標編輯效率和基因體編輯的細胞數(或基因體編輯的頻率)，也應對靶向目標位置的編輯進行額外特性分析。此外，根據非臨床試驗結果，放行檢測亦可能需評估脫靶編輯的發生頻率及位置、染色體內與染色體間的重組，以及基因體編輯元件之殘留量。亦建議安定性試驗應監測基因體編輯的細胞數(或基因體編輯的頻率)。

建立離體修飾的人類基因體編輯製劑之效價試驗時，建議應測量基因體編輯預期的生物活性和其細胞特性，例如基因體編輯的 CD34⁺造血幹/前驅 (progenitor)細胞製劑的效價檢測，可測量該細胞的活性和基因體編輯相關之生物活性。在早期研究階段，效價項目可為檢測基因體修飾後之正確性。然而，對於旨在提供主要有效性證據以支持查驗登記申請的研究，應以可評估預期下游生物活性的方法（例如基因體修飾後的細胞功能）作為效價檢測，並建議成品安定性試驗應包含效價檢測。若擬使用替代的效價檢測，應有數據能支持替代的效價檢測結果與基因體編輯後生物活性之間的相關性。

如果離體修飾的細胞為人類同種異體細胞，則可能需要額外的成品檢測，並建立合適的允收標準。以同種異體 T 細胞製劑為例，放行檢測應包含外來病原檢測、具異體排斥性的淋巴細胞數和無異常細胞增殖等。關於同種異體細胞製劑的細胞提供者合適性和細胞庫的建立及檢測，請參照「人類細胞治療產品捐贈者合適性判定基準」、ICH Q5A 及 ICH Q5D 等規範。

對於製程複雜的製劑（例如經過多次的基因體編輯或建立多個細胞庫），可能需要額外的製程中檢測、批次放行檢測，以及特性分析。此外，檢測的時機和檢測方法依製程中進行基因體編輯的時間點而定，例如若使用已完成基因體編輯之 MCB 來生產製劑，製程中無其他的基因體編輯步驟，則某些檢測可在 MCB 進行即可。

至於離體修飾的細胞冷凍保存、維護與使用等操作，可參考中華藥典 (5046)細胞冷凍保存的相關內容。

4. 參考文獻

1. US FDA: Guidance for Industry: Human Gene Therapy Products Incorporating Human Genome Editing; January 2024.
2. US FDA: Guidance for Industry: Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications

(INDs); January 2020.

3. US FDA: Draft Guidance for Industry: Potency Assurance for Cellular and Gene Therapy Products; December 2023.
4. US FDA: Guidance for Industry: CGMP for Phase 1 Investigational Drugs; July 2008.
5. 當代醫藥法規月刊：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，第 144 期，黃芳儀，2022
6. 衛生福利部：人類基因治療製劑臨床試驗審查基準，民國 109 年 10 月 26 日
7. 衛生福利部：人類基因治療製劑查驗登記審查基準，民國 111 年 6 月
8. 衛生福利部：人類細胞治療產品捐贈者合適性判定基準，民國 104 年 10 月
9. 衛生福利部：人類細胞治療製劑臨床試驗申請作業及審查基準，民國 109 年 5 月 1 日
10. 衛生福利部：人類細胞治療製劑查驗登記審查基準，民國 111 年 11 月 1 日
11. Guo C, Ma X, Gao F, Guo Y. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023; Mar 9;11:1143157.
12. Bao XR, Pan Y, Lee CM, Davis TH, Bao G. Tools for experimental and computational analyses of off-target editing by programmable nucleases. *Nat Protoc*, 2021; Jan;16(1):10-26.
13. ICH Q2(R2): Guideline on validation of analytical procedures; Dec 2023.
14. ICH M4Q(R1): The Common Technical Document for The Registration of Pharmaceuticals for Human Use; Sep 2002.
15. ICH Q5D: Derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products; Mar 1998.
16. ICH Q5A: Guideline on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin; Jun 2024.
17. ICH Q7: Good manufacturing practice for active pharmaceutical ingredients; Nov 2000.
18. Cox DB, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*, 2015; Feb;21(2):121-31.
19. 中華藥典第九版通則(5046) 細胞冷凍保存
20. 中華藥典第九版通則(5050) 基因治療製劑