

美國 FDA 公告《利用次世代定序評估人類基因治療產品基因體編輯的安全性評估》指引草案

發表單位：美國 FDA

摘要整理：呂佳馨

發表時間：2026/04/15

內容歸類：生物製劑

類別：指引草案

關鍵字：Gene therapy、NGS、off-target、on-target

資料來源：[Safety Assessment of Genome Editing in Human Gene Therapy Products Using Next-Generation Sequencing](#)

- 重點內容：
1. 本指引草案為美國 FDA 於 2024 年發布之「基因體編輯技術用於人類基因治療製劑產品指引」(Human Gene Therapy Products Incorporating Human Genome Editing) 之補充文件，主要針對臨床試驗案上市許可申請之基因體編輯產品的非臨床研究，說明如何運用次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 和生物資訊技術等方法設計的非臨床研究，以評估脫靶編輯風險與基因體完整性。適用範圍涵蓋 DNA 編輯器、表觀遺傳 (epigenetic) 編輯器，及剪切 RNA 編輯器等基因體編輯技術。
 2. 靶向 (on-target) 編輯位點評估之考量：
 - (1) 依編輯片段序列大小，選擇合適長度之定序方法，並說明方法的合適性；同時應採用合適的定序深度與策略以減少偏差，以提升非預期基因體編輯之偵測能力，並以表格方式呈現結果。
 - (2) 評估靶向編輯位點之檢品，應與離體 (*ex vivo*) 基因體編輯產品中實際編輯之細胞相同；或選擇能代表體內 (*in vivo*) 基因體編輯產品所編輯之細胞類型。

3. 脫靶 (off-target) 編輯活性之評估研究的考量：

(1) 脫靶編輯位點之鑑別與確認，應進行多次生物學重複試驗 (multiple biological replicates)，並提供數據和科學性說明，以支持細胞檢品之代表性。

(2) 依據基因體編輯機制選擇合適的脫靶位點篩選方法，若採用特殊機制之篩選方法，須考量其作用機制，並提供已發表文獻或科學數據支持。若為既有方法之修改，或創新未發表方法，應提供方法合適性與靈敏度等支持性資料。此外，對於特殊篩選方法之建議如下：

- 生物化學與細胞分析法：應說明檢品來源與是否含編輯器的辨識序列、編輯元件濃度、靶向編輯率、定序總深度、標靶位點及所有脫靶編輯位點讀數 (read counts)。
- 在細胞分析法：檢品的靶向編輯率與最終製劑所預測或實際的靶向編輯率應具可比性；若不一致，應提供合理性說明。

(3) 常見脫靶編輯位點篩選方法

A. 電腦模擬預測 (In Silico) 方法：

- 對於 CRISPR-Cas 基因體編輯機制，應考量 DNA 與 gRNA 的錯誤配對和突起 (bulge)，以及前間隔序列鄰接基序 (Protospacer adjacent motif, PAM) 序列或其他篩選方法之特定序列等進行同源性 (homology) 脫靶編輯位點的搜尋。
- 其他基因體編輯之機制，可依據編輯器的 DNA 結合區塊 (binding domain) 所識別的標的序列，透過電腦模擬人類基因體進行序列同源性進行搜尋，並納入序列變異性考量，列出所有脫靶編輯位點。
- 所使用的搜尋參數應提供科學性說明，包含已發表之科學文獻或研究數據。

B. NGS 技術之脫靶編輯位點篩選方法：

應依據產品使用之編輯器的作用機制，採用相應的 NGS 技術評估編輯位點，相關建議如下：

- 應提供定序品質和深度之允收標準，及科學性說明。
- 依據鹼基品質或序列比對品質進行子集合 (subset) 讀數或變異位點的篩選步驟，應完整敘述其分析流程並提供科學性說明。
- 若有其他用於判定 (或篩選) 脫靶編輯位點之考量因素，應一併提供並闡明其科學合理性。

(4) 應使用適當的細胞類型進行脫靶編輯位點確認，並與未編輯對照組進行配對分析。位點選擇應有科學性依據，且篩選標準不宜過於嚴格。

(5) 分析參數

脫靶編輯位點之篩選與確認的分析參數，應依據實際實驗設計與 NGS 方法而定。無論選擇或排除何種序列，皆須引用公開文獻或科學數據說明合理性。對於 NGS 分析參數，應採用無偏差之定序 (如基因體、外顯子組、轉錄體或表觀基因體等方法)、標靶定序或其他特殊定序方法，並完整提供用於數據分析的篩選參數，並說明其科學合理性。

(6) 脫靶編輯位點之報告應提供讀數或編輯頻率，並說明位點於基因體之註解與資訊，包含：

- 基因體座標資訊
- 與 gRNA 或標靶序列之錯配 (mismatches) 與突起數量。
- CRISPR-Cas 編輯器的 PAM 資訊。
- 脫靶編輯位點在基因間區 (intergenic)、外顯子 (exon) 或內含子 (intron) 之相關資訊。

(7) 若編輯器涉及胺基酸修飾，應完整說明修飾流程，並提供數據或

文獻支持，且須以最終製劑的基因體編輯器進行脫靶編輯評估。此外，若遞送方式會造成編輯器於細胞內表現時間較長，須提供長期脫靶編輯風險評估。

4. 對於 CRISPR 或其他編輯技術等，基因體變異性可能會降低錯配，或增加 PAM 序列而產生新的脫靶位點，增加帶有特定基因體變異的個體有脫靶修飾之風險，故電腦模擬預測方法之建議與考量如下：
 - (1) 應選擇一個或多個人類遺傳變異資料庫，涵蓋健康族群和/或病人族群之資訊，並提供選用該資料庫之科學性依據。
 - (2) 若產品適用於盛行率明確的疾病，建議依遺傳背景與疾病盛行率進行族群分層，並結合各分層之等位基因頻率 (allele frequency) 進行基因變異位點分析，並提供其方法之科學性說明。
 - (3) 電腦模擬分析應盡可能納入完整基因體所有變異資訊，可使用資料庫的全變異位點資料，或設定合理篩選標準。篩選標準應具有充分的科學性依據，建議分析時應涵蓋所有基因間區域之變異。
 - (4) 電腦模擬預測方法之篩選參數設定，應提高序列同源性分析之敏感度。若為 CRISPR-Cas 基因體編輯產品，須納入因基因變異而形成的 PAM 序列之參數。
 - (5) 評估基因變異所導致脫靶編輯風險時，可利用實驗方法對一般檢體或帶有特定基因體變異的檢體，檢測編輯率；或者利用生物資訊技術所計算的分數或指標作為依據。
 - (6) 基因變異所導致的脫靶編輯位點，其報告應包括以下內容：
 - 所使用之資料庫、篩選門檻、族群分層，及科學性說明。
 - 用於因基因變異所造成的脫靶編輯位點之篩選標準。