

# 基因治療人體試驗申請與操作規範

86. 8. 28 衛署醫字第 86054675 號公告

91. 9. 13 衛署醫字第 0910062497 號公告修正

## 第一章 緒論

### 一、基因治療之定義

本規範所稱「基因治療」(gene therapy)係指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。

依行政院衛生署(以下簡稱本署)八十六年八月二十八日衛署醫字第八六〇五四六七五號函規定，基因治療屬於應施行人體試驗之新醫療技術。

基因治療人體試驗(以下簡稱基因治療)應依本規範行之，本規範未規定者，適用醫療法、醫療法施行細則、新醫療技術人體試驗申請與審查作業程序等相關法令規定。

### 二、基因治療之適用原則

1. 限於威脅生命或明顯影響生活品質之疾病。
2. 有充分的科學根據，可預測基因治療對該疾病為有效且安全的治療方法。
3. 預測其治療效果將比現行治療方法更為優異。
4. 預測對受試者是利多於弊之治療方式。
5. 僅限於對體細胞為基因治療，禁止施行於人類生殖細胞或可能造成人類生殖細胞遺傳性改變之基因治療。

### 三、安全性之確認

1. 施行基因治療應確實遵守「保護受試者」之相關規範(參閱第二章相關法規)。
2. 基因治療所使用之製品，應依其試驗之階段及製品之性質，符合相關優良操作或製造規範(GLP、GMP或GTP)或類似之規範。
3. 基因治療所使用之實驗室，應符合相關實驗室標準規範。
4. 施行基因治療，應注意生態環境保護及生物安全性(Biosafety)，實驗室操作應遵守基因重組實驗守則。

## 第二章 相關法規

### 一、醫療法（條文節錄）

第七條 本法所稱人體試驗，係指醫療機構依醫學理論於人體施行新醫療技術、藥品或醫療器材之試驗研究。

第五十六條 為提高國內醫療技術水準及醫療，或預防疾病上之需要，教學醫院經擬定計畫，報請中央衛生主管機關核准，或經中央衛生主管機關委託者，得施行人體試驗。

非教學醫院不得施行人體試驗。

第五十七條 教學醫院施行人體試驗時，應善盡醫療上必要之注意，並應先取得接受試驗者之同意；受試驗者為無行為能力或限制行為能力人，應得其法定代理人之同意。

第七十三條 中央衛生主管機關，應設置醫事審議委員會，依其任務分別設置各種小組，其任務如左：

- 一、關於醫療制度之改進事項。
- 二、關於醫療技術之審議事項。
- 三、關於人體試驗之審議事項。
- 四、關於司法或檢察機關委託鑑定事項。
- 五、關於專科醫師制度之改進事項。
- 六、關於醫德之促進事項。
- 七、關於一定規模以上大型醫院設立或擴充之審議事項。
- 八、其他有關醫事之審議事項。

前項醫事審議委員會組織規程，由中央衛生主管機關擬訂，報請行政院核定之。

第七十九條 教學醫院違反第五十六條第一項或第五十七條之規定者，由中央衛生主管機關處二萬元以上五萬元以下罰鍰。其情節重大者，並得處一個月以上一年以下停業處分。

非教學醫院違反第五十六條第二項規定者，由中央衛生主管機關處五萬元以上二十萬元以下罰鍰。其情節重大者，並得處一個月以上一年以下停業處分或撤銷其開業執照。

第八十條 醫療機構違反第四十四條第二項、第四十六條第一項、第四十九條、第五十六條或第五十七條規定之一者，除依第七十七條、第七十九條規定處

罰外，對其行為人亦處以各該條之罰鍰。其觸犯刑法者，並移送司法機關辦理。前項行為人如為醫師，並依醫師法懲處之。

## 二、醫療法施行細則（條文節錄）

第二條 本法第七條所定於人體施行新醫療技術、藥品或醫療器材之試驗研究，以合於左列情形之一者為限：

- 一、在國內或國外業經實驗室、動物實驗研究，有相當文獻發表者。
- 二、國外主要國家在人體試驗階段者。
- 三、其他經中央衛生主管機關認可者。

第三條 在國外已施行於人體之醫療技術，中央衛生主管機關認為仍有施行人體試驗之必要者，得預先公告之。

在生產國已核准使用於人體之藥品或醫療器材，其醫療效能或安全性未經證實者，中央衛生主管機關在核准查驗登記前，得令其施行人體試驗。

第五十條 教學醫院依本法第五十六條第一項規定擬定之人體試驗計畫，應載明左列事項：

- 一、試驗主題。
- 二、試驗目的。
- 三、試驗方法。
  - (一)接受試驗者標準及數目。
  - (二)試驗設計及進行方法。
  - (三)試驗期限及進度。
  - (四)追蹤或復健計畫。
  - (五)評估及統計方法。
- 四、試驗主持人及主要協同人員之學、經歷及其所受訓練之背景資料。
- 五、有關文獻報告及其證明文件。
- 六、所需藥品或儀器設備，包括必須進口之藥品或儀器名稱、數量。
- 七、預期試驗效果。
- 八、可能發生的傷害及處理方式。

前項計畫，教學醫院應提經有關醫療科技人員、法律專家及社會工作人員會同審查通過後，報請中央衛生主管機關核准；計畫變更時，亦同。

第五十一條 中央衛生主管機關得於人體試驗施行期間，命教學醫院提出試驗情形報告，認有安全之慮者，得停止其試驗。

教學醫院於人體試驗完成時，應製作試驗報告，報請中央衛生主管機關核備。

第五十二條 教學醫院依本法第五十七條規定取得接受試驗者或其法定代理

人之同意，應作成書面，並載明左列事項：

- 一、試驗目的及方法。
- 二、可能產生之副作用及危險。
- 三、預期試驗效果。
- 四、其他可能之治療方法及說明。
- 五、接受試驗者得隨時撤回同意。

### 三、「新醫療技術人體試驗計畫作業規範」

(格式請參閱網址：

<http://www.doh.gov.tw/newdoh/90-org/org-1/policy/trial.html>)。

### 四、「研究用人體檢體採集與使用注意事項」

行政院衛生署 91.1.2 衛署醫字第 0910012508 號公告

一、為確保研究用檢體之正當採集及使用，保障受檢人之權益，特訂定本注意事項。

採集檢體供研究使用，除依法令規定外，依本注意事項為之。

將供研究用或非供研究用所採集之檢體，使用於教學時，不視為供研究使用。

二、本注意事項用詞定義如下：

(一)檢體：指採集自受檢人之細胞、組織、器官、體液或其衍生物質，包括採集自與母體分離之胎兒者，但不包括採集自死後之人體者。

(二)受檢人：指接受檢體採集之人。

(三)檢體使用者：指直接使用檢體、指示他人使用檢體或依與受檢人間之契約等特定關係而得使用檢體之人。

三、檢體之採集與使用不得違背醫學倫理，並應注意防制對人類及生態環境之危害。

四、採集檢體使用，除法律有規定者外，應告知受檢人下列事項，並取得其同意。受檢人未滿十七歲或無識別能力者，由其法定代理人、配偶或家屬代為同意。

(一)採集之目的及其可能使用範圍與使用期間。

(二)採集之方法及數量。

(三)可能發生之併發症與危險。

(四)受檢人之權益與檢體使用者之義務。

(五)檢體是否有提供或轉讓他人或國外使用等情形。

(六)研究經費來源及所有參與研究之機構。

(七)其他與檢體採集或使用有關之重要事項。

前項告知與同意應以書面為之，必要時輔以口頭告知，使受檢人明瞭其內容。但受檢人同意不使用書面者，得不使用書面。

五、因採集檢體使用可能衍生其他權益時，檢體使用者應告知受檢人並為必要之書面約定。

六、檢體使用者應在受檢人所同意或依法得使用之範圍內使用檢體。  
使用檢體如逾越前項範圍，應依第四點規定再次告知受檢人並取得其同意。

七、除法律有規定者外，受檢人得拒絕接受採檢、終止檢體使用之同意或變更所同意之檢體使用範圍。受檢人拒絕接受其個人醫療使用以外之採檢者，應不影響其醫療上之權益。

八、檢體使用者應妥善保存、處置並使用檢體。使用完畢並應確實銷毀。

九、檢體使用者應尊重並保護受檢人之人格權。  
對於因檢體採集、保存、使用所知悉之受檢人秘密、隱私或個人資料，不得無故洩漏。

十、本注意事項頒行前已採集之檢體，有下列情形之一者，得不受第四點、第五點、第六點規定之限制：

- (一)難以辨認受檢人身分。
- (二)難以重新取得受檢人同意。
- (三)已可公開取得之檢體。

## 五、相關規定

(一)行政院衛生署 76.2.27 衛署醫字第 647327 號公告，補充說明人體試驗之範圍如下：

1. 所稱新醫療技術係指左列情形：

- (1)在國內或國外業經實驗室或動物實驗研究，相當文獻發表，可在人體施行試驗之醫療技術。
- (2)在國外主要國家仍在人體試驗階段之醫療技術。
- (3)經中央衛生主管機關公告須施行人體試驗之醫療技術。

2. 所稱新藥品、醫療器材，指未經中央衛生主管機關許可查驗登記之左列藥品成分或醫療器材：

- (1)在國內或國外業經實驗室或動物實驗研究，有相當文獻發表，可在人體施行試驗之藥品成分或醫療器材。
- (2)在國外主要國家仍在人體試驗階段之藥品成分或醫療器材。

(3)生產國已核准上市，但其安全性與療效未經我國許可，尚須施行人體試驗之藥品成分或醫療器材。

供新療效複方或新使用途徑之藥品，視同新藥品。

(二)行政院衛生署 85.7.4 衛署醫字第 85037482 號公告：

供新療效之藥品，自本公告之日起非屬醫療法第七條所稱之新藥品。

(三)行政院衛生署 85.10.15 衛署醫字第 85059561 號函：

教學醫院施行人體試驗計畫，除施行人體試驗前對受試病患所為之常規性醫療費用，得收取費用外，施行人體試驗時之一切醫療費用及該人體試驗計畫未解除列管前之相關追蹤診療費用，均應免費。

(四)行政院衛生署 90.2.5 衛署醫字第 0900005739 號公告

下列三項醫療器材於人體施行，屬須施行人體試驗之新醫療技術：

1. 長波紫外光活化系統「舍拉克」(UVAR XTS photopheresis)。
2. 血氧療法「H.O.T」(Hematogenic Oxidation Therapy)。
3. 尿失禁植入器「Medtronic」INTERSTIM THERAPY (Sacral Nerve Stimulation (SNS) for Urinary Control)。

(五)行政院衛生署 90.10.26 衛署醫字第 0900071121 號公告

「癌症疫苗免疫療法」屬須人體試驗之項目與範圍

1. 以病人(自體)或他人(異體)之腫瘤細胞或免疫細胞加以製備，或以基因重組技術人工合成之製劑，所進行已改變免疫治療方式。
2. 前項製劑之內容包含腫瘤細胞或免疫細胞(淋巴細胞、樹突細胞)，細胞之成分(細胞溶解物 cell lysate、蛋白質 protein and peptide、或基因物質 DNA、RNA)及細胞產生之細胞激素、抗體等。

(六)行政院衛生署 91.1.21 衛署醫字第 0910013380 號公告

下列二項屬須施行人體試驗之新醫療技術項目

1. 腹腔鏡子宮血流阻斷術。
2. 攝護腺冷凍手術。

(七)行政院衛生署醫學倫理委員會 90.8.23 決議：「對於可能將遺傳物質傳給下一代之細胞(例如：生殖細胞)，施行可能增加、改變或置換其基因之新醫療技術，均屬人體試驗範圍。現階段基於倫理上之考量，尚不宜准許施行該類人體試驗。」

### 第三章 申請程序

#### 一、申請醫院資格

- (一)經本署會同教育部評鑑合格之教學醫院（以下簡稱醫院）。
- (二)試驗主持人及主要協同人員曾接受人體試驗、基因治療實驗室規範及相關訓練。
- (三)所使用之基因治療實驗室，應符合相關實驗室標準規範。
- (四)醫院人體試驗審議委員會之設置與功能，應符合新醫療技術人體試驗申請與審查作業程序之規定。委員會審議試驗計畫時，必要時，得邀請分子生物學、細胞生物學、基因學或臨床藥理學專家參與討論。

#### 二、申請作業

醫院申請基因治療人體試驗，應提經該院人體試驗審議委員會通過，依醫療法第五十六條第一項、同法施行細則第五十條及新醫療技術人體試驗申請與審查作業程序規定，向本署提出人體試驗計畫書（計畫書格式及填寫說明，如附件）。

## 第四章 審查作業

### 一、行政審查作業

基因治療人體試驗計畫之審查作業程序，依新醫療技術人體試驗申請與審查作業程序規定辦理。

本署醫事審議委員會審查基因治療人體試驗計畫尚包括下列事項：

1. 試驗所依據的醫學理論是否適當。
2. 試驗所依據的資料是否得自適當的體外前期試驗和活體試驗模式。
3. 載體及基因遞送系統是否適當。
4. 是否能確保不致過度偏離預期效果，以保護接受試驗者。
5. 是否會對生殖細胞造成影響，使基因變異異傳至後代。
6. 是否有造成細菌或病毒感染的危險性。
7. 接受試驗者同意書之內容是否充分。

### 二、專家初、複審

依新醫療技術人體試驗申請與審查作業程序規定辦理。



## 第五章 臨床前實驗操作準則

### 壹、說明

本準則所制定之內容，主要是提供研究人員一般性的實驗操作原則，每個基因療法計畫所應遵循的規範，仍視其個別計畫之科學性背景而有所不同。若本準則所列舉之測試方式在個別之計畫中無法被達成，研究人員需在計畫書內提出合理的說明，或採取其他替代方法來進行測試。

下列各節的規定，是基因治療之臨床前研究階段，所應遵循的一般性原則，研究人員應確實的遵守，並應受機構內之人體試驗審議委員會的監督，以確保在臨床試驗時受試者有最大的安全保障。

貳、種源細胞庫 (Master cell banks)、生產細胞庫 (Working cell banks) 及生產細胞 (Producer cells) 的製備和分析。

基因治療所用之載體，通常是在細胞株內繁殖製備得來，例如由細菌生產質體 (Plasmid)，或在哺乳類動物細胞生產重組病毒載體。這些生產細胞都需有詳細的來源紀錄、完善之庫存系統，及良好的品質管制。

### 一、細胞株來源及一般性檢測

#### (一) 細胞株來源

對於用來生產載體之細胞株，必須對其來源有詳盡的記載，包括：

1. 取自何種動物，以及動物的年齡與性別。
2. 若為人類細胞株，如可能，則供應者之病歷以及是否曾遭外來病原感染 (adventitious infection) 之檢查結果。
3. 細胞株之培養歷史，例如從組織分離出細胞的方法，培養過程、培養基、以及是否曾打入過動物體內等。
4. 所有定性分析及病原菌之測試結果。

#### (二) 一般性檢測

細胞株之生長方式及細胞形態都應有記錄，且需確保這些特性從種源細胞庫到最後所使用的生產細胞都沒有改變。若細胞株有特殊之標誌 (marker，如染色體或細胞表面的標誌) 可用來辨識，應檢測這些標誌的穩定性。若細胞只能有一定的培養期限，則需測出細胞至死亡前可做幾次的分盤培養。

### 二、細胞庫

用以生產載體之細胞株選定後，應準備一細胞庫以確保在整個生產過程中所需之細胞有穩定之來源，它的好處還包括可以用來詳細檢測細胞株、降低細胞間的相互混合污染之可能，以及檢測病原菌。細胞庫應有兩種：種源細胞庫及生產細胞庫。

種源細胞庫之定義為：從單一組織或細胞增生得來的同質性細胞群，它們應分

裝、保存於液態氮內。帶有 2 倍染色體 (diploid) 細胞株之種源細胞庫，應從早期培養之細胞製備而來。從種源細胞庫之細胞解凍後，經過幾代的培養，將所有的細胞混合，分裝至安瓶(ampules)中保存，即為生產細胞庫，此細胞庫為用來生產大量載體之細胞來源。若要使用到一個以上的生產細胞庫安瓶，在解凍時要將所有的細胞混合後再培養。用來生產載體的細胞，應在一定的培養期間內使用。

這兩種細胞庫應保存於液態氮內，每一個安瓶的位置、內容及清單都應詳加記錄；最好都有兩個以上的存放地點，以避免細胞株之遺失。

細胞庫的品質管制包括：

(一)確定無污染物質——例如：污染之細菌、黴菌、黴漿菌(myco plasma) 及病毒。對於生產質體之細菌種源細胞庫，需注意是否有外來噬菌體(adventitious phage)污染，因為噬菌體會影響質體製造的穩定性及產量。對於脊椎動物或昆蟲細胞之種源細胞庫，也應排除所有黴漿菌或病毒的污染。

(二)細胞特性的認證——細胞的認證，應以適當之基因型 (genotypic)和表現型 (phenotypic) 之標誌來確認，這些標誌也可以用來計量細胞族群的純度。這些特性包括：細胞形態 (用光學或電子顯微鏡)、來源的動物種類及性別、限制酶圖譜、載體分子的數目、載體產物的活性等，而且需確定這些特性的穩定度。生產過程中若需要將細胞從含血清的培養基中移到無血清的培養基，則需重新挑選單株細胞來做種源及生產細胞庫，以維持細胞的生長速率。

### 三、細胞培養

#### (一)培養基

培養基之成分及來源要詳加記錄，若使用有專利的培養基或添加物，則在申請計畫時也應附上這些專利的必要資料。所用的血清及添加物不可有污染物質 (例如會產生牛海綿樣腦炎病, Bovine Spongiform Encephalopathy 的物質)，且應提供無污染的測試證明。

動物血清可能會對人體造成過敏反應，因此，最好能儘量降低細胞培養時的血清用量。最終產物的血清或其他培養物之殘流量，需測量且不得超過 1：

1,000,000。若使用牛或豬的胰蛋白 (trypsin) 來取出細胞，則應確保內無污染物 (包括牛或豬的微小 DNA 病毒, parvovirus)。

用來生產載體之細胞培養，應避免使用 penicillin 或其他  $\beta$ -lactam 類之抗生素，因為它們可能會對一些人造成過敏反應。如果必須使用抗生素，最好選擇臨床上較不常用之抗生素 (如 kanamycin)，且在最終產物內抗生素的殘餘量及其引起過敏的可能性都需注意及避免。使用極少量的其他種抗生素或許可以容許，但一般來說最好避免。

#### (二)細胞培養之操作

細胞之種類可分為單層細胞 (monolayer) 及懸浮細胞 (suspension)，可被培養的時間又分為短期、長期及永久的培養。若使用只能短期培養的細胞來生產載體，則載體可從單一次的培養液或多次的收集而得來，若是分批次的收集，則品

管的測試要針對每一批次在混合之前進行。若是使用長期培養的細胞來生產載體，則可將多次的收集物混合成一大量 (bulk)，品管測試可在混合後進行。品管檢驗的方法，要有最高的敏感度，而且長期培養細胞的連續使用期限也要有所限制。

細菌及真菌污染的檢查要包括未處理過的混合液、最終混合液及最終的產物成品。所謂未處理過的混合液是指將細胞培養液混合，其中含均質之混合物可以用來製造成單一批次的產物。在過濾、沈澱或其他處理之前，就應測試是否有外來物之污染。最終產物成品是指經過濃縮、純化的均質溶液，且可分裝出產的成品。

#### 四、品管測試

品管測試包括細菌、真菌、黴漿菌及病毒污染的檢查，以及細胞引發腫瘤能力的測試。細菌、真菌及黴漿菌的偵測方法，為一般的細胞培養操作方法，不再重複敘述。

對於病毒之測試：

##### (一)例行測試

培養的細胞在製造完產物後，應觀察是否有一般病毒感染情形，如果產物是分批收集的，則每次收集的培養液都需做此檢查。檢查方法是取一部分的量來接種細胞、卵及老鼠或其他實驗動物：

1. 取一適當的量接種至少三種類型的單層細胞

- (1) 與生產細胞同種或同組織型的單層細胞。
- (2) 人類雙倍染色體單層細胞。
- (3) 猴子腎臟單層細胞。

用來做測試的樣本應避免稀釋，且受試細胞應觀察至少 2 星期，以觀察是否有細胞病態 (cytopathic effects) 或附血性病毒 (hemadsorbing virus)。若生產細胞可受人類巨噬病毒 (HCMV) 感染，則受試細胞應至少觀察 4 星期。

2. 測試樣本之培養液或溶解液 (lysates)，亦應用活體動物實驗來檢查是否有病毒感染。一般可使用成鼠、乳鼠及受精之雞卵，有時也可使用天竺鼠、兔子或猴子來檢查。

##### (二)特殊測試

另外，需考慮所用細胞株之組織來源及病人病例而決定是否要檢測特殊病毒的污染。例如齧齒類 (rodent) 細胞株特有的病毒種類可用老鼠的抗體反應來偵測 (如 mouse, rat, and hamster antibody production tests)。另外也需做 lymphocytic choriomeningitis 病毒 (LCM) 的活體試驗。人類細胞應考慮人類病原病毒 (如 EBV, HBV, CMV, HCV 等)。這些病毒可用適當生化學或免疫學方法來檢驗。

### (三)反轉錄病毒之測試

對於樣品是否有反轉錄病毒污染，可使用下列方法測試：

1. 利用穿透式電子顯微鏡(transmission electron microscopy)觀察。
2. 樣本在高速離心下(125,000 X g/1 hr/4°C)所得沉澱物質之反轉錄酶活性檢驗。
3. 感染力檢驗：為增加檢驗的敏感度，一般可先將測試樣本接種至可提供病毒生長之細胞株（如 *Mus dunni* 或 SC-1）共同培養，使較低量污染之病毒增生後，再利用螢光抗體免疫法或 S+L-方式檢驗培養液中是否有反轉錄病毒的存在。
4. 此外，亦可利用聚合酶鏈反應（PCR）、探針雜交技術（probe hybridization）及病毒之單株抗體來檢查是否有病毒之污染。

### (四)引發腫瘤之測試：

使用齧齒類細胞株一般不需另檢驗是否會引發腫瘤（因此類細胞一般均有致瘤性），但是有些人類表皮細胞或某些細胞療法或基因療法所用的特殊細胞株，就得試驗其引發腫瘤的可能性。需使用裸鼠或免疫系統被抑制或缺陷的新生小鼠或其他鼠類來檢驗其引發腫瘤的能力。

測試方法為皮下(subcutaneous)或肌肉(intramuscular)接種 10<sup>7</sup> 細胞/0.2ml 培養液。每一測試至少要接種 10 隻動物。而且要使用正在生產載體階段的細胞，另外，也應包括 10 隻接種癌細胞的對照組動物，且對照組應至少有 9 隻要長出腫瘤。若接種的是初生動物，則所使用的對照組細胞（如 KB, HT-1080, FL）應有癌轉移的現象。使用初生動物時，要在出生第 2、7 及 14 天分別用皮下或肌肉注射 0.1 ml 的 ATG (antithymocyte globulin)或 ATS (antithymocyte serum) 來抑制其免疫系統的發育。被接種的動物應定期觀察及觸診以檢查腫瘤的出現。任何突起都應測量其大小並記錄，若此突起在觀測期中開始有萎縮現象，則應在突起消失前，將動物做病理解剖。若動物有持續長大之突起，應繼續觀察 1~2 週。對於沒有長出突起的動物，半數應再觀察 3 週，另一半觀察 12 週，再做病理解剖，並檢查接種部位、淋巴結、肺、腦、肝、腎、脾臟等器官是否有腫瘤形成，因為有些細胞雖無明顯的外表腫瘤，但細胞會轉移至其他器官。

除了活體試驗外，也可用體外實驗來檢查形成腫瘤的能力，例如：在軟洋膠(soft agar)或組織培養(organ culture)上形成群落(colony)的能力是一敏感的方法，尤其是適用於一些尚無引起腫瘤能力的早期細胞株。

### 參、基因療法各類載體的一般規定

#### 一、載體建構(vector construction)和種源載體庫存(master vector seed stock)

建構載體之各段 DNA 來源，都需澈底了解清楚，除非已有構造相似的載體已被定序完成，否則載體任何重要部分的核酸序列，都應利用直接定序方法(direct sequencing)加以確認。對某些類型載體，整個結構都應被定序，但對一些載體（如較大之病毒），並無法完全定出所有序列，則至少要定出所插入基因、鄰接

區域及任何經大幅改變的載體主幹部分之 DNA 序列。所有序列資料應以電腦檔案儲存。其他用以確認載體構造之方法，例如：限制酶圖譜（restriction enzyme mapping）、雜交反應（hybridization），或聚合酶鏈反應（PCR），都可在建構過程中使用，但是對最終的載體構造，其基因表現部分（包括調控區及插入之基因）則需應用直接定序之方法來確認。

在建構載體時，若最終構造需含一段選擇標誌基因（selection marker），則最好使用抗 ampicillin 基因以外的選擇標誌基因。

病毒載體或質體（plasmid）的種源庫存需經由分子選植（molecularly cloned）的方式製備，且其構造應加以確認。用以調節載體與寄主間相互作用的載體序列，以及寄主細胞與載體系統的穩定性，都需加以確認。種源庫存不可以有任何外來物包括細菌、真菌及其他不應存在之病毒污染，若載體是由脊椎動物或昆蟲細胞培養中分離得來的，則更需確定無黴漿菌之污染。

## 二、主檔案（Master files）

有些載體可能會被用於數種不同的臨床試驗上，則可用一主檔案來記載此載體，以簡化計畫書及避免重複申請的步驟。主檔案所記載的載體資料，只是提供使用此載體於臨床試驗時審核的參考。在不同病人身上使用同一種載體，可能會產生不同的結果或造成不同程度的風險，所以，事先審視主檔案之資料可幫助提早發現或解決這些問題。

## 三、製造批次的品管及出產測試，以及大量生產載體的考量

一般性的測試方法將說明如下，但是若一系統有特殊之生物特性及危害，則需有其他特別之測試方法。如果使用之系統將只做一次大量的生產，且不再經過任何進一步的製備步驟，則不需做下列的測試。

大量之載體生產，都需用下列或類似方法檢驗下列性質。任何之檢驗都需包括對照組（即為已知量的檢驗）以確保檢驗結果無誤。這些分析之方法與結果，都需附於申請之計畫書中。

### （一）純度測試

1. 所得載體之 DNA 或 RNA 總量，可用 A260/A280。
2. 檢驗 DNA 之大小，均質性（homogeneity）、構造、是超螺旋（supercoiled）或線性（linear）結構，可用電泳膠片法。
3. 是否被 RNA 或寄主 DNA 污染，可用電泳法或 E. coli 的探針（probe）來檢驗。
4. 是否有蛋白質污染，可用電泳膠片銀染色法（silver stain）。
5. 是否有無感染性（non-infectious）病毒，如空蛋白殼（empty capsids）的污染。請參閱下列關於腺病毒（adenovirus）載體之介紹。
6. 產物中是否含有毒物質。

### （二）驗證測試

1. 使用數種限制酶來確認載體之限制酶圖譜。
2. 若在同一設備內製造數種不同的載體，需有可用以分辨不同結構之載體的方法。

法。

### (三)安全性測試

1. 嗜氧性(aerobic)及厭氧性(anaerobic)的細菌或真菌的污染檢驗。
2. 若使用的是脊椎動物或昆蟲類的細胞株，需檢驗是否有黴漿菌(mycoplasma)污染。
3. 檢驗是否有外來的及有複製能力之病毒的污染。製造載體之來源，常有遭受病毒污染之風險，有時在建構有複製缺陷(replication-defective)之病毒載體時，也可能遭受同類之可複製(replication-competent)病毒之污染，這些可能都需加以檢驗並排除。

### (四)活性測試(potency)

在製造過程中要有適當之活性測試方法，若無定量之方法，至少要有定性測試。活性測試主要為測量基因產物的生物活性，而不只是證明其存在，例如：若酵素之活性有治療之作用，則應測量此酵素將受質(substrate)轉換成產物(product)的能力，而不是只用免疫方法來檢驗酵素蛋白質上抗原的存在。要測量插入基因的表現能力，可將其轉移感染(transfection)至適宜之細胞內，以證明它可製造有活性的基因產物，並須測量產物活性之敏感度(sensitivity)及專一性(specificity)。

## 四、最終產物及分批之測試

載體產品在最後分裝釋出前，都需針對下列各點做定量的、再確認的檢驗。

- (一)純度、驗證、安全性及活性測試。如果大宗的生產物已經過檢驗，有些項目(如化學物質污染)可以不需重複的檢查。但每批產品應進行無菌(sterility)檢驗。特別是生產有複製缺陷病毒載體時，應檢查是否有可複製之病毒的污染。
- (二)內毒素(endotoxin)檢驗：用LAL(Limulus Amebocyte Lysate)或其他檢測方法來證明產物不會影響測試。
- (三)一般安全性檢驗。
- (四)測量製造過程中添加物之殘留量。

## 五、第三期臨床試驗及產品執照申請

執行第一期臨床試驗所期求之資料主要在安全性的考量，但試驗的科學根據亦應合理。在產品開發之後續過程中，需繼續提供更詳盡的測試結果之資料，包括產品之活性及效力的檢驗。如果在開發過程中對產品之配方做了變更，則需提供改變的配方在生物活性上的定量分析，以及臨床前安全性評估的比較。若後期臨床試驗所用的產品與早期的試驗有大幅度的變更，則應重新執行第一期臨床試驗。第三期臨床試驗之一切產品都需符合優良製造規範(Good Manufacturing Practices;GMP)。

## 肆、細胞及基因治療之臨床前評估

### 一、總則

臨床前試驗的目的為測定產品的藥理及毒理作用，以推衍初期人體臨床試驗及產

品發展過程中人體的反應。試驗目標包括：決定人體臨床試驗的安全起始投與劑量及劑量增加之方式；測定產品在標的器官中引發的毒性及臨床試驗的觀察檢測參數；決定對該細胞或治療用之基因產品的毒性最敏感的高危險群的病人。

臨床前試驗應考量以下因素：(1)欲投與之細胞族群或載體種類；(2)與臨床使用最相關之試驗動物品種及生理狀態；(3)劑量、與臨床使用最相關之投與途徑及治療方式。

基於細胞、基因產品的獨特性及多樣性，傳統的藥理及毒理測試方法不一定適用。試驗設計應考慮轉導基因之動物品種的特異性、病毒載體的感染性、動物生理差異性，若有與人體疾病型態相類似的動物模型，有助於提供進入臨床試驗之前所需的安全性及有效性資料。

國際醫葯法規協會（ICH）指導準則 S6 “生物製劑醫藥品之臨床前安全性評估”中，論及優良實驗室操作規範(Good Laboratory Practices；GLP)之依循彈性，雖然作為支持產品上市的樞紐安全性試驗（例如致癌性、生殖毒性），仍需依循 GLP 規範進行，然而支持進入人體臨床試驗的臨床前試驗可採用彈性的方式，唯仍應儘量遵行規範的原則，當有偏離 GLP 的情況發生時，應評估對臨床使用的影響，並應在送交法規單位的報告中有所討論。

若產品與已有廣泛臨床使用經驗的產品類似，或插入不同表現系統（expression cassette)但預期並不會改變其毒性或不會改變載體的傳播，臨床前試驗或可酌量減免進行。

## 二、動物品種的選擇與另類動物模型的使用

並非每種細胞或基因治療系統都有類似人類疾病之動物模型，臨床前藥理及安全性測試應使用最適當、藥理最相關的動物模型，與人體相關的動物品種，因治療而產生的生物反應應與人體反應類似，例如測試一種表現 cytokine 的載體時，選擇的動物品種，其 cytokine 與 cytokine 受體結合的親和力最好與人體相似，產生的藥理反應，也與人體反應類似。

## 三、體細胞與基因改造過的細胞治療

### 1. 體內(in vivo)的生物、藥理活性：

轉導步驟、增殖或基因改造過細胞之劑量、與臨床試驗所預計使用的投與途徑，應在臨床前試驗中評估過。動物藥理試驗可提供該基因改造過的細胞在活體內之功能、存活時間及流向等有用之相關資訊。

### 2. 毒理測試：

增殖、被活化或基因改造過的體細胞的安全性測試應在適當的動物模型進行。此外，細胞在注回活體內後的分布、流向及持久性也應評估，最低限度應檢驗動物的一般健康狀態、血清生化檢驗、血液檢驗，標的組織應以顯微鏡做組織病理檢驗。

#### 四、直接輸入病人之載體的安全性測試

目前已有數種可直接輸入病人的載體正在開發中，直接將這種載體輸入病人體內會有安全性之顧慮。所有的毒性及分布試驗，包括生殖組織試驗，應使用最終劑型之產品，因為添加的物質例如 liposome 或改變 pH 值、鹽類含量等，可能會改變載體的毒性或分布型態。對各類載體特殊安全性之要求，應以個案審理，目前鼓勵申請者和審查單位討論。

##### 1. 載體輸入途徑(route of administration)

載體輸入途徑之不同，會影響其在體內之毒性。因此，在評估對動物及人體的安全性時，所用的載體輸入途徑與方法必須一致。若此要求無法達到(也許是因為受測動物的體積太小)，也應儘量使用類似的輸入途徑，例如對棉花鼠(cotton rat)或小鼠從鼻腔內注入(intranasal)做肺腔灌輸(intrapulmonary instillation)腺病毒載體，可用以取代支氣管鏡(bronchoscope)直接做肺內輸入之方法。

##### 2. 受試動物品種的選擇 (Selection of animal species)

做臨床前毒性評估的受試動物，應選擇可被與載體相關之野生型(wild-type)病毒所感染且會引發病理症狀之動物，亦需考慮它是否適於做為測試載體結構的生物活性模式。小型齧齒類動物若會接受病毒感染且會引發病症時則可選用為動物模式，而寧可不用非人類靈長類動物。另外，在評估臨床適應症之動物模式內的載體的活性時，亦可由同一模式收集安全性資料以評估對載體反映中疾病相關生理及病理變化的影響。

##### 3. 劑量之選擇(Selection of dose to be employed)

臨床前研究所選用的載體劑量，應取決於體外及體內研究所得的結果；「無藥效劑量」，「明顯毒性劑量」，及數個中間劑量，並且包括適當的控制對照組。若產品的產量有限或是毒性很低時，最高可能投與劑量(maximum feasible dose)或可當為最高劑量。做臨床前研究之安全性評估時，應使用劑量等於及至少一個劑量大於臨床試驗用劑量，需要使用臨床劑量多少倍數的劑量以決定適當的安全性界限，則依載體的種類及動物模型而定。劑量之計算要考慮受試者之總重量或身體總表面積，才可做不同受試品種之間的比較。這些結果可用以決定臨床試驗時載體的安全性界限及可接受之劑量提昇計畫。

##### 4. 毒理測試(Toxicologic testing)

給藥的動物應檢驗其一般健康狀態、血清生化、血液及組織病理變化。

##### 5. 載體在輸入位置之外的分布(Distribution of vector out of the site of administration)

載體在輸入後是否會分布在預期的位置，也應加以研究。這種檢驗應儘量使用預計輸入之方法注射動物，可在另組的動物給予靜脈注射，以代表最糟情況之下載體的廣泛擴散的反應。基因是否轉移至正常、鄰近、遠端、或標的組織，應使用最敏感的偵測方法來檢驗，包括基因持久性之評估，劑量選擇應與毒性試驗一致。若發現有不正常的或非預期的載體分布狀況，則應繼續研究那些基因是否被



表現，以及基因產物是否與病理現象有關。這些研究還應包括基因及其產物在轉殖與非轉殖器官內的持久性。

#### (1) 基因產物的表現與免疫反應的引發

治療用之基因產物在預期轉殖或非預期轉殖組織的表現，可能造成非預期的毒性，所以，要在臨床前試驗中測試發炎反應、免疫反應、自體免疫等，動物試驗的時程都需夠長，才能讓這些反應顯現出來，而宿主對於病毒或轉殖基因蛋白質的免疫反應可能會限制臨床上重覆輸入的有用性。

#### (2) 載體於生殖器官的分佈

將載體直接注射入組織的方法，應考量載體轉移至生殖細胞的風險，因此，若要採用直接輸入載體的方法，在臨床前之安全性研究時，就要特別分析載體進入生殖細胞的可能性。睪丸及卵巢的組織，要用敏感度最高的方法來檢測是否有載體的基因存在。如果生殖組織含有載體基因之序列，應檢測其生殖細胞(非基質細胞)，檢測方法例如原位(in situ)PCR法、或細胞分離法等。另外，也可自成熟的動物，如小鼠精液內檢測是否有載體移殖入生殖細胞的現象。

### 6. 宿主免疫狀態及對基因治療載體的影響(Host immune status and effects on gene therapy vectors)

接受基因治療者，尤其是將接受病毒載體者的免疫狀態，在作效益與危險評估時應加以考慮。當臨床試驗排除免疫功能不全的病人，會造成過度限制臨床試驗進行的話，可於臨床前試驗時，在免疫抑制、遺傳性的免疫缺陷或新生的動物上先評估其安全性。

## 伍、基因療法各類載體的特殊規定

### 一、質體載體 (Plasmid vector)

針對質體 DNA 載體，上述的各項規定都需遵守。RNA、蛋白質及細菌的 DNA 在這種載體都屬污染物質，因此，要監測產物中是否有這類污染存在。一般而言，質體都很小，可以一次就完成定序。由質體衍生的 DNA，例如直線型 (linear) DNA 在轉殖基因表現上可能沒有作用，因此可被視為是污染物質，所以它們的存在需受偵測及限制。對產物中超螺旋結構 DNA 的最低含量也應做出明確測定。有毒物質如 ethidium bromide 及 cesium chloride 需避免在質體純化的過程中使用，否則也需有定量的方法來檢驗毒物的存在，並定出毒物最低容許量。

對於質體之調控序列 (regulatory sequences)，須考量它們在轉殖或非轉殖細胞內的生物性作用。

質體載體有時會與脂質、局部麻醉劑及其他可加速 DNA 攝取的化學物質共同施用。若這些物質是在製造過程中添加的，則需有檢驗最終產物內其含量及偵測的方法。若使用如 chloroform 類的毒性有機溶劑來製造脂質物，則應再加工去除，且產品釋出前應檢驗其殘餘量。

### 二、反轉錄病毒載體 (Retroviral vector)

(一) 具複製力之反轉錄病毒 (Replication Competent Retrovirus, 以下簡稱 RCR) 測試

本節適用於具複製力之反轉錄病毒(Replication Competent Retrovirus, RCR)在體內(in vivo)或者體外(ex vivo)載體製劑製造過程中之測試包括它的時程、取量和一般測試法外，亦適用於追蹤監控病人是否感染反轉錄病毒。由於對反轉錄病毒感染之風險所知有限，下述測試方法係根據目前現有的知識而訂定，將來若有更多的研究結果，這些測試方法應作適當的修正。

#### A. 測試時間

RCR 可從初級種源細胞庫(initial master cell bank)之研製，以適合反轉錄病毒載體之細胞上清液之取得過程中產生。並且，本不易被偵測之微量 RCR 污染源，在體外生長的轉導細胞提供了增生機會。所以，基因治療製劑之生產過程中應該進行多步驟測試（參看表一）。藉由細胞庫系統的建立，以保障載體生產細胞(Vector Producer Cells; VPC)供應之充分與持續性，種源細胞庫(Master Cell Bank; MCB)是由單一細胞種構成，生產細胞庫(Working Cell Bank; WCB)是由一個以上的安瓶之種源細胞庫取得，再以系列增殖達到一個特定的繼代數目。

表一 對基因製劑測試之建議

		可預期之 RCR 測試	外生性 MLV 之 RCR 測試		
製造過程	來源	細胞	上清液	細胞	上清液
種源細胞庫(MCB)	由老鼠白血病毒(MLV)感染而得	+	+	+	+
	由反轉錄病毒質體之載體轉殖感染而得	+	+	-	-
生產細胞庫(WCB)		+	OR +	-	-
生產細胞末期		+	不適用	-	-
含載體之上清液		不適用	+	-	-
體外轉導細胞	4 天內培養	無資料	無資料	-	-
	超過 4 天培養	+	+	-	-

#### 1. 載體生產細胞之種源細胞庫之測試(Testing of Vector Producer Cell Master Cell Bank)(一次測試)

載體生產細胞(VPC)及其上清液在製造種源細胞庫時應該測其 RCR，RCR 之測試應以一種敏感細胞株來進行。例如，含老鼠白血病毒(MLV)包膜之 VPC 應以 Mus dunni 細胞株來測試 MLV 類似之 RCR 病毒。另外，像含長臂猿白血病毒(Gibbon Ape Leukemia Virus, GALV)包膜之 VPC 應以一種人類細胞株來測試 RCR 病毒。其他各種不同之反轉錄病毒包膜應以適當敏感細胞株來偵測不同的 RCR 污染物。

在研製 VPC 時，所用之反轉錄病毒載體，須含帶一異種病毒(即異於原包裝用之反轉錄病毒，例如一外生性的 MLV)之替換包膜。如此，則該替換包膜之來源病毒將可能被引入。縱使一個外生性的 MLV VPC 對人類並無直接的安全顧慮。不過，在一個具複製力基因體環境下的 VPC，因為在人類宿主體內，該 VPC 之內容物可能引發基因重組，並製造一個新的 RCR，而有危險之虞。

VPC 用外生性的反轉錄病毒載體去感染細胞時，種源細胞庫(MCB)必須測試該外生性的 RCR。它的細胞和上清液兩者都要接受測試，所用方法該以適當之陽性對照組[例如:D56 (Ref. 2) or XC (Ref. 10)]同時進行比對。請參照本法規第(一)B 節以決定測試用量。

## 2. 生產細胞庫測試(Working Cell Bank Testing) (一次測試)

以上清液測試，或以測試組細胞與對照組細胞同皿培養(Cocultivation)，進行 RCR 檢測。其方法可參照種源細胞測試法。

## 3. 反轉錄病毒載體上清液製劑及生產終了細胞(End of Production Cells)之測試法

上清液生產批次和生產終了之細胞都應該進行 RCR 測試，參考第(一)B 節。重複測試可以相互佐證以確認反轉錄病毒上清液沒有 RCR 存在。

## 4. 體外轉導細胞(Ex Vivo Transduced Cells)之測試

### a. 轉導後 4 天內培養

轉導後至少需要 4 天的培養，以利於 RCR 的增殖與偵測。因此，在培養少於 4 天的體外轉導細胞，應以持續取樣存查，來替代 RCR 實際測試。取樣存查之數量，請參考第(一)B 節。作取樣存查時，應採用安全措施，以便長期保存(例如，裝置具有警報監控功能之冷凍系統)，以及具有效追蹤儲存檢體之病人醫學病歷和生產批次紀錄。

### b. 轉導後超過 4 天培養

當體外轉導細胞自轉導後培養 4 天以上，細胞及其適當量之上清液必須進行 RCR 測試，取量標準請參照(一)B 節。體外轉導細胞在試驗中不能冷藏，且尚未能取得測試結果，但人體注射之計畫勢在必行時，在人體試驗進行之前，培養試驗必須立刻開始。在這種情況下，其他替代法例如 PCR 分析法可以採用；其他偵測替代法之採用，應該諮詢本署醫事審議委員會。使用替代法時，必須提供有關該方法之敏感性、專一性、以及可重複性之資料。

## B. 樣品測試之取量

### 1. 上清液測試

測試時應該採用至少 5% 的上清液，以敏感細胞株進行增殖培養。不過，如果上清液的總量超過 6 公升時，要採用 5% 的上清液作測試是不實際的。在這種情形下，使用任何替代法時，必須決定能偵測單一具感染力 RCR 病毒(a single infectious RCR)的最大試驗所需量。當高單位反轉錄病毒載體製劑被使用時，

RCR 的偵測上可能發生干擾現象。在如此情形下，因為單一具感染力 RCR 病毒之偵測可能只需很小劑量，每次需用極小劑量做出分析，如此替代法也不實際。所以鼓勵廠家自動研發，並建立比較敏感的替代性偵測法，來克服高劑量所面臨的干擾現象。

#### a. 替代法以決定供測試用之上清液總量

測試 RCR 所需反轉錄病毒上清液之總量可以統計法決定之。該計算方法係以 Poisson 分布法則(Poisson distribution)為依據，與生產批次之體積無關。該法建議，在 100 毫升液體中含有單一 RCR 顆粒之濃度下，測試足夠的上清液，以確保能獲得 95% 的偵測機率。在此濃度下，300 毫升的溶液中，含有一個 RCR 的機率將達 95%。所以，能夠偵測到單一 RCR 病毒的敏感度之試驗法，需要 300 毫升的容積以便達到 95% 的 RCR 偵測機率。更詳細的說明及所用數學公式請參閱附錄 1-1。

為了支持能夠偵測到單一反轉錄病毒的假設，必須決定該特定的測試容積。總測試容積必須分成兩個”對等容積”的樣品，每一個樣品都可以測試出單一 RCR 病毒。一個 RCR 的對照標準品已經被發展出來，它的感染力價已經被決定，而且可以由美國標準培養蒐集(American Type Culture Collection; ATCC)取得。此標準品可以做為對照參考，用來決定單一 RCR 病毒測試之容積取量。有關 RCR 標準品及如何決定”對等容積”與其數目以便進行 RCR 偵測的詳細資料，請參考附錄 1-2、附錄 1-3。

#### b. 上清液的測試分析法

上清液的測試包括上清液以敏感細胞株(例如 Mus dunni 細胞株以測試兩棲性的 MLV)作 5 個繼代培養，以期增殖任何可能的 RCR 病毒。增殖後的液體可以用適當的指示細胞(Indicator cell)作培養分析(例如 PG-4 S+L- ; Ref. 1)。所有的分析法必須包含適當的陽性與陰性對照組，以評估該法的專一性、敏感性、及可重複驗證性。每一個反轉錄病毒載體上清液之製造批次，應該使用陽性對照樣品偵測是否具有抑制效果。

### 2. 細胞測試

現行的建議是測試總細胞數量的 1%，或者 108（兩者取其少數），累集之載體生產細胞，或者體外轉導細胞，以敏感細胞株共同培養，仍然可行。因為考慮到生產細胞及載體的架構之多樣性，以及建立一個標準的 RCR 病毒生產之對照用細胞庫之困難度，所以，大家一致對細胞測試的共識仍然支持現行的建議方案。

細胞共同培養分析法應該包括一個敏感細胞株(例如 Mus dunni 細胞株以測試兩棲性的 MLV)進行至少 5 個繼代培養，以便增殖任何可能的 RCR 病毒。增殖後的液體可以用指示性細胞培養分析(例如 PG-4 S+L-)。所有的分析法必須包含適當的陽性與陰性的對照組，以評估該法的專一性、敏感性、及可重複驗證性。

### (二)病人監控之建議

參與以反轉錄病毒載體為主之基因治療的病人，是否感染 RCR 病毒，將採主動監控來加以確認。本建議案，具體規範測試的時間點、為期 20 年之年度測試追蹤、

以及採用的測試方法。

#### A. 測試時程表

本建議方案是以現有進行中以反轉錄病毒載體為主的基因治療所得的資訊為依據。這個監控時程表建議應該包括病人的檢體分析，其取樣時間如下：治療前、以及開始治療後 3 個月、6 個月、一年、及之後的每一年（追蹤至治療後 20 年）。如果開始治療後第一一年中的分析結果都是陰性的，此後每年的檢體都必須存檔保留。作取樣存查時，應採用安全措施，以便長期保存（例如，裝置具有警報監控功能之冷凍系統），以及具有效追蹤儲存檢體之病人醫學病歷和生產批次紀錄。如果開始治療後的檢體有任何是陽性的結果，必須採取進一步的 RCR 分析以及更徹底的病人追蹤，並與本署醫事審議委員會通報與諮詢。更進一步的建議在年度病人檢體蒐集時，應該取得一個簡要的臨床病歷，這個病歷應該專注在臨床症狀的判定，以及是否有反轉錄病毒傳染的可能性（例如癌症、神經系統疾病、或其他血液方面的異常）。臨床症候的懷疑可能促使存檔檢體的另外加項分析，以上必須與本署醫事審議委員會通報和諮詢。在臨床試驗中遇到病人死亡或引起腫瘤時，都應該進行屍體之器官、及腫瘤檢體之 RCR 病毒分析。

#### B. 建議試驗法

目前使用之兩種測試 RCR 感染方法如下：1) RCR 專一抗體之測試。2) 以 PCR 檢測病人的週邊血液單核細胞之 RCR 專屬的 DNA。分析法之採用視載體輸入途徑及臨床症狀而定。例如，直接把載體生產細胞(VPC)注入人體，或重複直接將載體注入人體，可導致載體專一性抗體之產生，此抗體並不與 RCR 的存在有直接關係 (Ref 6, 7)。因此，如果以載體或載體生產細胞直接注入體內，使用 PCR 分析法比血清偵測法來得恰當。尤其是對免疫機能不全的病人，其製造抗體能力不如理想，則以 PCR 分析法遠勝於血清偵測法。在任何情況下，所有陽性結果必須進一步以培養分析法來確認及鑑定具感染性的病毒。

#### (三) RCR 測試結果之建檔三

所有製劑之生產批次與從病人監控所得到的 RCR 測試結果，應該以新藥評估(IND)修正案格式做紀錄。病人監控所得的陽性反應結果，必須即刻當作藥品不良反應案例，以 IND 安全通報格式通報。陰性反應結果則以 IND 年報格式通報。

#### (四) 結論

本規範可據以應用於：1) 有效的減低上清液的測試量，特別是遇到大量病毒上清液製造批次的情況；2) 以反轉錄病毒載體為主之基因治療臨床試驗中，對監測病人時所採用的時間點及測試法，可加以修正；3) 由每年主動監測修正為每年檢體收集存檔(為期 20 年)，和適當臨床病史之追蹤。

一個反轉錄病毒載體上清液的標準製劑已經被發展出來，以幫助評估測試分析的敏感度。這個標準製劑的建立支持了以統計方法來決定反轉錄病毒載體上清液的測試容積。並且，本反轉錄病毒載體上清液標準製劑可以作為 RCR 偵測敏感度之

比較，例如在不同實驗室偵測，或(以及) 使用不同測試法。藉此，可以改進 RCR 測試之敏感度。

#### (五)附錄

##### [附錄 1-1] 決定 RCR 測試容積之數學推算

假設生產批次中 RCR 病毒的濃度為  $c$ ，並且對生產批次進行能偵測到單一反轉錄病毒的分析實驗，其偵測機率為  $p$ ，因為 RCR 病毒在  $V_t$  容積中的數量是以 Poisson 分布(Poisson distribution)，因此得方程式為  $p = 1 - \exp(-cV_t)$ ，為解得  $V_t$  值，可循下列方程式：

$$V_t = -(1/c) \ln(1-p)$$

$\ln$  為自然對數

$p$  值

在這一方程式中， $p$  的建議值設為 0.95。在附錄 1-3 中的建議複製容積及複製數量， $p$  則代表在生產批次中偵測到單一 RCR 病毒的機率。

$c$  值

$c$  值建議設在 1 毫升溶液中含不高於 0.01 個 RCR 病毒的濃度(0.01RCR/ml)，或是 100 毫升溶液中含不高於一個 RCR 病毒的濃度(1RCR/100ml)。如果生產批次的 RCR 病毒濃度為大於或等於 0.01RCR/ml，則偵測機率至少為 0.95。如果生產批次的 RCR 病毒濃度為小於 0.01RCR/ml，則無法偵測到 RCR 病毒，此製劑可投予病人。

$V_t$  值

$p$  與  $c$  的建議值既已設定，反轉錄病毒上清液的測試用總體積 ( $V_t$ )，與生產批次的大小無關，可以如下公式計算：

$$V_t = -(1 / 0.01 \text{ RCR/ml}) \ln(1-0.95) \approx 300\text{ml}$$

如建議使用比 300 毫升更小的測試體積，則應該在研發後與本署醫事審議委員會諮詢。

##### [附錄 1-2] 分析敏感度的實驗裁決

ATCC 已建立一個標準的反轉錄病毒種源(ATCC # VR-1450)，可以用來決定分析方法的敏感性與有效性，而此分析方法是為了偵測具複製力的 RCR 反轉錄病毒的存在與否，這個反轉錄病毒可以由含有兩棲包膜(amphotropic envelope)的 VPC 生產而來。這一個標準病毒種源可以用來決定偵測 RCR 病毒分析方法的相對敏感度。這個資訊可被使用在決定反轉錄病毒上清液複製的數量大小，俾能偵測到單一反轉錄病毒之所需充分容積  $V_t$ ，如上所述(參看附錄 1-3)。這一個病毒種源是由一 MoMLV (Moloney murine leukemia virus) 之分子選株 (molecular clone) 轉導一永久細胞株培養而來，而這一個 MoMLV 分子選株的原包膜則由兩棲老鼠白血病毒(amphotropic murine leukemia virus, A-MLV) 之 4070A 品種之包膜基因序列所取代(參考 Ref. 7)。因此，這一個病毒種源是一個典型的基因重組病毒，此病毒可以由一個含有 MLV 包膜基因序列之反轉錄病毒的生產細胞所製造。本 ATCC 標準病毒種源之感染力價可由 S+L-PG-4 直接分析作確認(Ref. 1)。不同

的實驗室可獨立評估本標準病毒種源之感染力價。分析的結果建立了第一個標準種源病毒的感染力價為  $6.9 \times 10^7 / \text{ml}$  加減標準誤差(+/-SD) (三次實驗所得標準誤差為  $2.0 \times 10^7 / \text{ml}$ )。解凍與重複冷凍將導致此標準材料降低感染力價為  $3.7 \times 10^7 / \text{ml}$  (標準差為  $4.7 \times 10^6 / \text{ml}$ )。本 ATCC 標準病毒種源應定期補充力價，致其感染力價達到原先批次。

這一個標準病毒種源及其感染力價的病毒可以用作陽性的實驗對照組，以決定 RCR 病毒偵測法的相對敏感度。特別是，本 ATCC 標準病毒可被用來決定能偵測一個 RCR 病毒所需的最大測試體積。為了控制在偵測 RCR 病毒時，反轉錄病毒載體粒子可能產生抑制反應，因此，這最大體積的測定，必須在一般生產批次的反轉錄病毒載體上清液存在之下進行。這一個標準病毒種源的建立，使得個別的研究員可以建立屬於自己實驗室的評估方法，並且可進一步用以研發新的 RCR 病毒偵測法。

[附錄 1-3] 複製容積及其數量之計算公式

需要將總容積分成數個等容積的樣本，(RCR 標準液，請參看附錄 1-2)

複製樣本的數量為  $r$ ，可由下列方程式而得

$$r = V_t / V_s$$

$V_s$  為單一個 RCR 病毒顆粒可以重複一致地被偵測到的容積( $V_s$  容積的定量，請參看附錄 1-2)。例如，如果一個 RCR 病毒可以在 2ml 的容積下被偵測到，那麼總容積為 300ml 的樣本可以分成  $300/2 = 150$  個  $V_s$  複製容積樣本，或是 150 個 2ml 的複製容積樣本。

### 三、腺病毒載體 (Adenoviral vector)

#### (一)病毒粒子 (particles) 與感染單位 (infectious units) 的計算

目前施用腺病毒基因治療載體到病人身上的劑量，是以病毒粒子的數量來計算。由於這些粒子本身可能會造成細胞毒性，所以必須算出病毒粒子的總數以及這些粒子感染轉殖細胞及運送載體的能力。

腺病毒粒子的計算，通常是用定量基因體 DNA 的方法。測量含 SDS 或其他溶解病毒溶液的 OD260 吸光值 (1 OD260 等於  $1.1 \times 10^{12}$  粒子)，可以計算出腺病毒粒子的數目。若有非腺病毒 DNA 核酸存在，會影響計算的準確性，所以在生產或純化病毒過程中要避免污染。另外也可用電子顯微鏡來計算病毒粒子的數目。

目前所謂腺病毒載體的劑量 (titer)，通常是指感染劑量。一般是用生產細胞株來計算此劑量。不同的病毒載體可能會影響細胞株的生長特性。利用溶菌斑 (plaque) 的方法，可以用來計算較易被互補的有複製缺陷腺病毒載體的數目。對於有多重複製缺陷的載體劑量，則可用螢光抗體 TCID50 方法測得。這兩種方法都需先注意病毒感染細胞所需的時間，最好用一個野生型病毒做為標準對照組。

在做第 I 期臨床試驗時，建議所使用之病毒載體應保持其病毒粒子數目與溶菌斑單位 (PFU)、感染單位 (IU) 或轉導單位 (TU) 的比例小於 100:1，以確保重組病毒產量的一致，且可獲得最大的生物活性、粒子數、病人劑量的效果，也能

降低因病毒結構蛋白引發毒性的風險。

#### (二)有複製能力腺病毒（以下簡稱 RCA）的測試

腺病毒載體應無複製能力，因此，有必要偵測產物中是否含有複製能力腺病毒的污染。在生產過程中，很多步驟都有可能因與寄主 DNA 的重組或其他方式而出現 RCA。生產過程中會產生 RCA 的多寡視載體的設計而不同。目前的建議是使用細胞培養致病力來偵測 RCA。這個偵測方法的敏感度，可以在測試樣本裏加入若干數目的野生型病毒粒子來確認。但最好不要用超過 10~200 個複感染

（multiplicity of infection）來測試，因為過高的病毒接種量會引起和 RCA 沒有關連的細胞毒性。而且太高量的複感染也會導致載體抑制 RCA 的生長。可供 RCA 生長的細胞株（如 293）應經過一或二次的繼代（passages）使 RCA 繁殖，再用來與標示細胞（如 HeLa）作用。另外，所使用的測試方法應為定量法，可以計算出 RCA 在病人劑量內的數目。目前的建議為病人劑量內應不含超過 1 個 PFU 的 RCA，或至少證明所含 RCA 不會影響安全性。

進行臨床試驗的病人選擇標準，建議最好是選已對腺病毒有免疫反應，而且目前無腺病毒感染癥狀的病人。病患同意書中也應特別註明萬一遭腺病毒感染的可能後果。試驗過程中應檢查腺病毒的產生。

#### (三)腺衛星病毒（adeno-associated virus）

因為此類病毒常與腺病毒同時存在，所以建議最好種源細胞庫、種源病毒庫存及最終產物都能檢驗是否有腺衛星病毒之存在。

#### (四)用非消化途徑（parenteral）使用腺病毒載體的潛在危險

此種注射途徑有可能造成病毒在肝臟累積，因此最好檢查肝臟是否存有插入基因產物。

### 四、其他基因遞送系統

其他研發中的新遞送系統，例如其他種類的病毒或核酸載體，其實驗規範將再視研究之進展程度而訂定。

### 陸、載體製備過程的更改

一般而言，新的生物性產品都需向本署申請使用核可，但是若有類似的載體已被使用，或是只在載體部份做些微的改變，可視為同一類的載體，但是仍需遵守釋出測試的規定及進行適當的臨床前試驗。若同類載體有相似的結構、相同的使用目的及相似的生物性效果，則其臨床前試驗可以經本署同意而免除。

上述情形，對於組織分布、生殖系改變及動物藥理毒性之臨床研究，可不須重複試驗；對安全性研究，可只針對載體改變的部分進行。這些情形包括相同的載體而有不同但相似的插入基因，或是為降低產生可複製病毒的可能性所做的載體修改，以及使用不同質體與脂質的比例等情形。

#### 一、載體結構

##### (一)載體主幹（Vector backbone）

載體主幹的一些修改，可能使載體被視為新產品，例如有些些微改變會影響載體



的安全性。此種情形載體需進行完整的安全性測試，包括臨床前動物試驗。反之，有些主幹較大幅的改變，卻對安全性影響極小，則可簡化其測試。每種情形都需經個案申請審查，每個案例中，都需提供質體結構的確認資料。

若只改變用以生產質體的細菌寄主，則需做質體構造的確證實驗，但不需做臨床前之動物研究。

### (二)插入基因 (Inserted gene)

在有些情形，插入基因改變，但是載體主幹相同，也可以簡化測試步驟。例如使用相同載體來表現一系列相關的蛋白質時，則安全性的考量主要在於插入基因、基因產物以及品管方面。可能發生的不良反應包括基因產物對病人造成的效應或免疫反應，尤其是在有遺傳缺陷的病人身上，插入基因的過度表現或在不適當的細胞及組織上出現，會有不利影響。若一系列的載體所插入的基因非常類似，且預期的不利影響相同，則每一個載體可不須重複測試。

### (三)定序 (sequencing)

所須提供之載體序列資料，視個案而定，但是載體上與生物性功能相關之組成，都應有序列之分析。對類似之載體，所需提供的資料包括插入基因、鄰近區域及調控區的 DNA 序列。此外，載體上任何與安全性及功能有關之序列，或是容易受重組或其他改變的部位，也應確認。可使用限制酶圖譜及 PCR 方式來輔助這些檢測。

## 二、脂質及其他成份

用來與載體作用以輸入病人體內所用的脂質，若作任何修改，都需提供安全性資料，並提出申請核准始可為之。若此種新脂質已與其他載體配合使用過，可提供相關資料以利審核時決定需進行多少測試。對於臨床前研究之組織分佈、生殖系改變及傳統動物藥理毒性研究等可不需重複進行。但是最好用此新脂質與施用之載體做動物實驗以觀測其基因表現情形。若要加其他脂質成份或使用數種不同形態的同一脂質，則上述之規定也需遵從。

註：本準則係參考美國國家衛生總署 (National Institutes of Health) 所制定之準則，及美國食品藥物管理局 (FDA) 所出版的「Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals」(May 17, 1993)，「Guidance for Industry: Guidance for Human Somatic Cell and Gene Therapy」(March 1998)，「Guidance for Industry: Supplemental Guidance on Testing for Replication Competent Retrovirus in Retroviral Vector Based Gene Therapy Products and During Follow-up of Patients in Clinical Trials Using Retroviral Vectors」(October 2000)，與「Proposal for Long-term Follow-up of Participants in Gene Transfer Clinical Trials」(Nov 17, 2000)，並參考我國現行其他生醫科技相關操作準則而訂定。