

核酸藥物關鍵製造 開發經驗分享

日期

2023.8.24

地點

集思北科大會議中心感恩廳

指導單位



衛生福利部

Ministry of Health and Welfare

主辦單位



財團法人醫藥品查驗中心

Center For Drug Evaluation



核酸藥物關鍵製造開發經驗分享

會議邀請函

核酸藥物主要是針對標的 mRNA 進行調控，在藥物研發上相對單純、快速，早期多應用於罕見疾病與遺傳性疾病，但近年有廣泛應用於癌症及慢性疾病的趨勢，有望成為重要標靶工具，為全球藥物發展的重點方向之一。核酸藥物的關鍵技術研發，包括：規模化生產製程、脂質奈米微粒(LNP)包覆遞送系統、昆蟲細胞病毒載體生產等多項產品驗證平台等，為核酸藥物開發與製造提供利基平台。因此，財團法人醫藥品查驗中心擬邀請予宇生技股份有限公司蔡翠敏總經理針對核酸藥物製造關鍵之脂質奈米粒(LNP)遞送系統進行演講，並由查驗中心審查員針對腺相關病毒載體基因治療產品分享製造管制之病毒安全性考量，及食品藥物管理署研究檢驗組許家銓科長分享核酸藥物檢驗方法，期望能對於國內核酸藥物關鍵製造發展有所助益。竭誠歡迎各界先進撥冗參加交流！

- 活動日期與時間：2023年8月24日(星期四) 13:30-17:00
- 活動地點：集思北科大會議中心感恩廳
- 指導單位：衛生福利部
- 主辦單位：財團法人醫藥品查驗中心
- 活動議程：

時間	主題	講者
13:30-14:00	報到	
14:00-14:10	開場致詞	財團法人醫藥品查驗中心
14:10-15:00	由認識攜帶核酸的 LNP 遞送系統 探討核酸藥物製造關鍵	予宇生技股份有限公司 蔡翠敏總經理
15:00-15:40	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	財團法人醫藥品查驗中心 黃芳儀審查員
15:40-16:00	中場休息	
16:00-16:40	核酸藥物檢驗方法分享	食品藥物管理署研究檢驗組 許家銓科長
16:40-17:00	綜合討論	

- ◆ 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影片連結：

<https://youtu.be/nH5pyPqdQxU>

2023.08.24_核酸藥物關鍵製造開發經驗分享

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

財團法人醫藥品查驗中心
黃芳儀審查員

2023.08.24

Fang-I Huang, 黃芳儀

◇ 現職

財團法人醫藥品查驗中心 藥劑科技組 生物製劑小組
審查員

◇ 學歷

國立臺灣大學藥學系研究所 博士

國立臺灣大學病理學研究所 碩士

◇ 經歷

國立台灣大學藥學系研究所 博士後研究員

衛生福利部 食品藥物管理署 藥品組 副審查員

2023.08.24_核對藥物關鍵製造開發經驗分亨

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

財團法人醫藥品查驗中心
藥劑科技組 生物製劑小組
黃芳儀 審查員



1

本次演講內容僅代表查驗中心之觀點，凡涉及政策方向及法規解釋與適用，應依衛生主管機關之指示為準。

2

大綱

- 基因治療簡介
 - ✓ 基因治療定義
 - ✓ 目前上市的藥品
- 基因治療相關法規
 - ✓ 我國的相關法規及指引
 - ✓ FDA
 - ✓ EMA
- AAV病毒載體生產平台
 - ✓ 平台介紹
 - ✓ 製程說明
- 基因治療產品製造管制之病毒安全性考量-以已上市AAV產品為例
 - ✓ 庫系統 (banking system)
 - ✓ 製程中使用試劑
 - ✓ 病毒清除確效
 - ✓ 規格管控

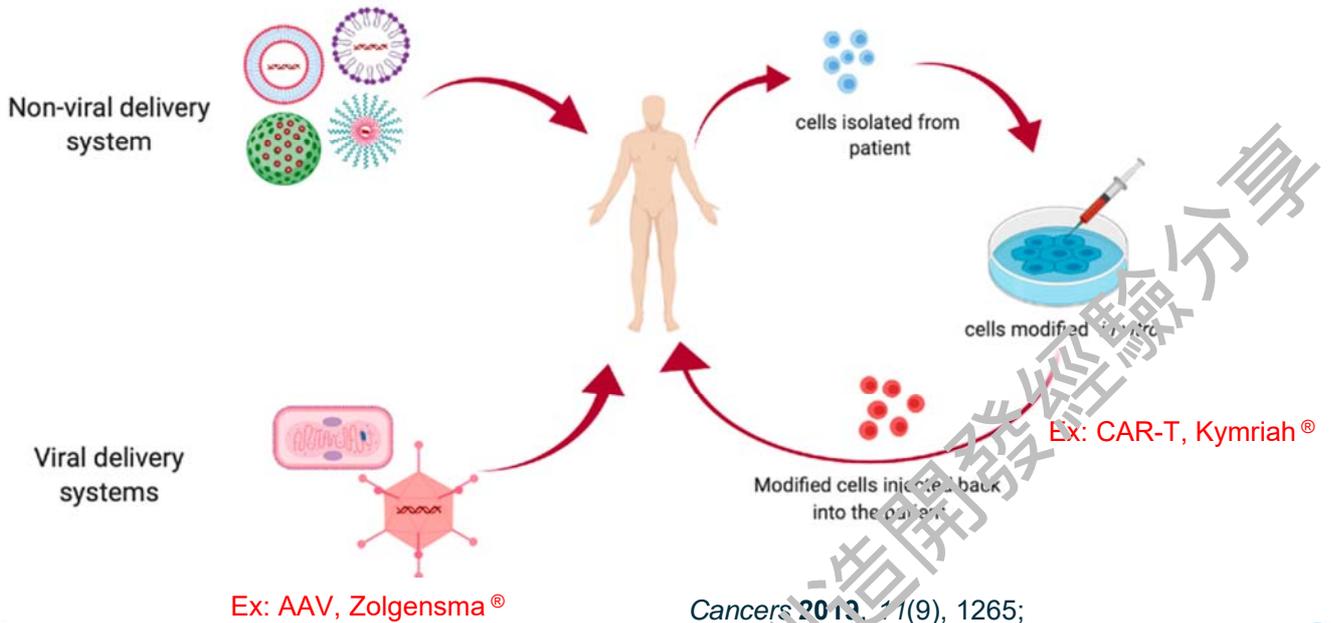
大綱

- 基因治療簡介
 - ✓ 基因治療定義
 - ✓ 目前上市的藥品
- 基因治療相關法規
 - ✓ 我國的相關法規及指引
 - ✓ FDA
 - ✓ EMA
- AAV病毒載體生產平台
 - ✓ 平台介紹
 - ✓ 製程說明
- 基因治療產品製造管制之病毒安全性考量-以已上市AAV產品為例
 - ✓ 庫系統 (banking system)
 - ✓ 製程中使用試劑
 - ✓ 病毒清除確效
 - ✓ 規格管控

基因治療(Gene therapy)

In vivo gene therapy

Ex vivo gene therapy



財團: Center for Drug Evaluation

Cancers 2013; 21(9), 1265;
<https://doi.org/10.3390/cancers11091265>

5

FTV 新聞網 | 447 人追蹤 ☆ 追蹤

「全球最貴藥劑」6月將納保！一劑4900萬 成健保史上最貴給付藥物

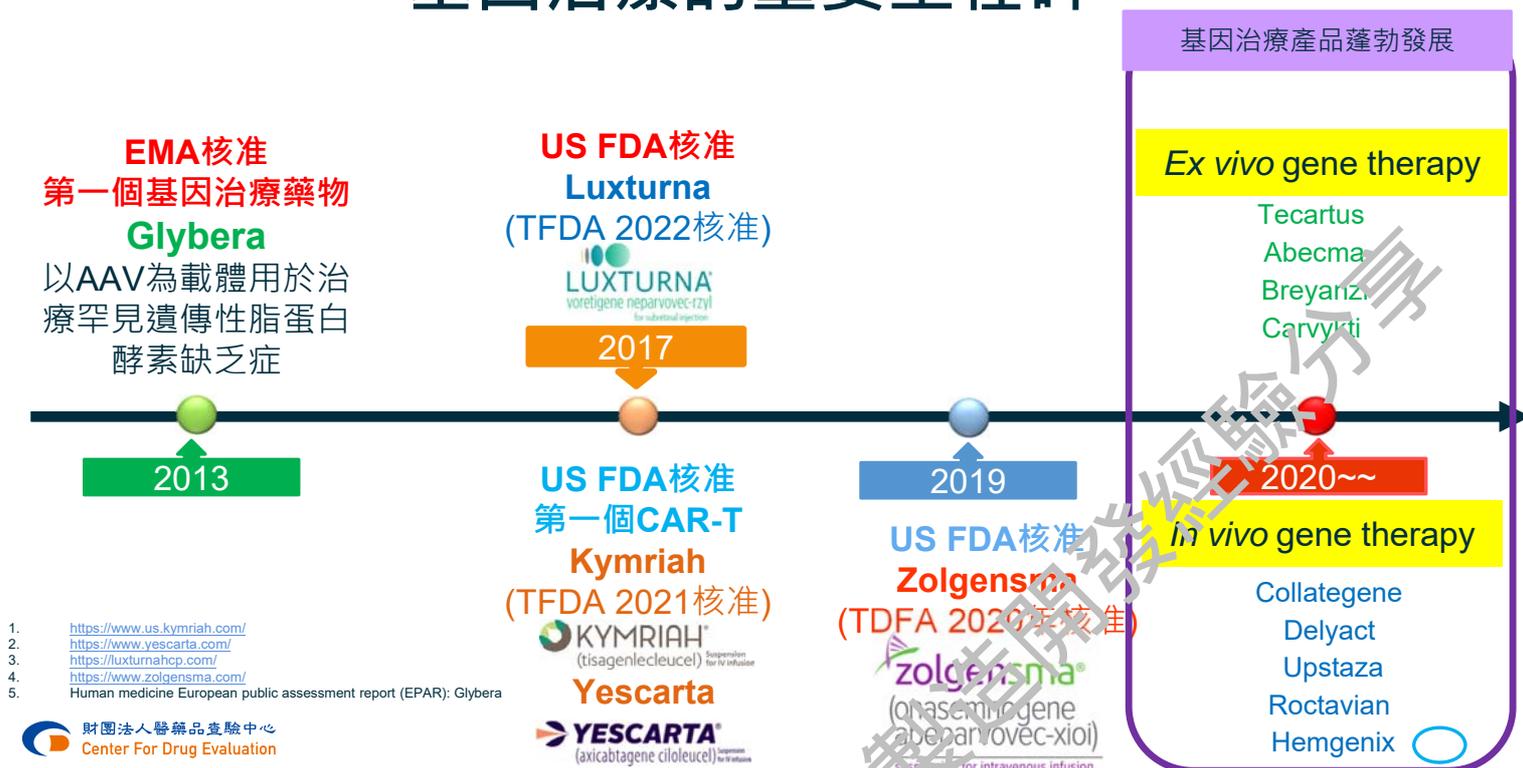
zolgensma[™]
 (onasemnogene abeparvovec-xioi)
 suspension for intravenous infusion

onasemnogene abeparvovec-xioi
ZOLGENSMA
 Rx ONLY
 Suspension for intravenous infusion
 2.0 x 10¹³ vector genomes/mL
 See enclosed prescribing information for dosage and directions for use.
 Contains no preservatives. Discard any unused portion.
 Upon receipt store refrigerated at 2°C to 8°C (36°F to 46°F). Must use within 14 days of receipt. Store in the original carton until time of use. **DO NOT SHAKE. DO NOT REFREEZE.**



There are 3000+ children with SMA have been treated with ZOLGENSMA as of January 2023*

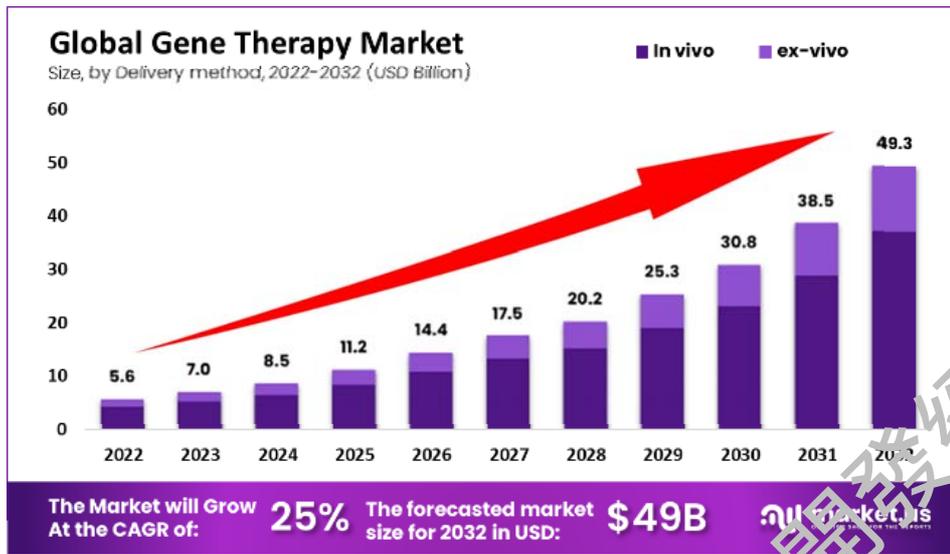
基因治療的重要里程碑



Approved gene therapy product

USFDA	EMA	MHLW	TFDA
Imlygic (2015)	Glybera (2013)	Carvykti (2022)	Zolgensma (2020)
Kymriah (2017)	Imlygic (2015)	Upstaza (2022)	Kymriah (2021)
Yescarta (2017)	Strimvelis (2016)	Roctavian (2022)	Luxturna (2022)
Luxturna (2017)	Zalmoxis (2016)	Hemgenix (2023)	Yescarta (2021)
Zolgensma (2019)	Kymriah (2018)	Breyanzi (2021)	
Tecartus (2020)	Yescarta (2018)	Delyact (2021)	
Abecma (2020)	Luxturna (2018)	Abecma (2022)	
Breyanzi (2021)	Zynteglo (2019)	Carvykti (2022)	
Carvykti (2022)	Zolgensma (2020)		
Zynteglo (2022)	Tecartus (2020)		
Skysona (2022)	Libmeldy (2020)	● Ex vivo 9種	
Hemgenix (2022)	Skysona (2021)	● In vivo 11種	
Adstiladrin (2022)	Abecma (2021)		
Vyjuvek (2023)	Breyanzi (2022)		

The market size of gene therapy



大綱

- 基因治療簡介
 - ✓ 基因治療定義
 - ✓ 目前上市的藥品
- 基因治療相關法規
 - ✓ 我國的相關法規及指引
 - ✓ FDA
 - ✓ EMA
- AAV病毒載體生產平台
 - ✓ 平台介紹
 - ✓ 製程說明
- 基因治療產品製造管制之病毒安全性考量-以已上市AAV產品為例
 - ✓ 庫系統 (banking system)
 - ✓ 製程中使用試劑
 - ✓ 病毒清除確效
 - ✓ 規格管控

我國基因治療製劑審查基準及相關資料

審查基準(TFDA)

- 民國111年 人類基因治療製劑查驗登記審查基準
- 民國109年 人類基因治療製劑臨床試驗審查基準

指導原則/文章 (CDE)

- 民國111年以腺相關病毒(Adeno-Associated Virus AAV)為載體之基因治療產品安全性考量¹
- 民國109年 基因治療產品非臨床藥毒理研發策略指導原則²
- 民國109年 基因治療產品臨床研發策略指導原則²
- 民國107年 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

1. <https://www.cde.org.tw/Content/ebook/FlipBook%20Files/RMV144/RMV144all/index.html>
2. <https://www.cde.org.tw/knowledge/?pid=10&j=4>

FDA

- 7/2023: Manufacturing Changes and Comparability for Human Cellular and **Gene Therapy Products**; Draft Guidance for Industry
- 1/2020: Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for **Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)**; Guidance for Industry
- 1/2020: Testing of Retroviral Vector-Based **Human Gene Therapy Products** for Replication Competent Retrovirus During Product Manufacture and Patient Follow-up; Guidance for Industry
- 1/2011: Guidance for Industry: **Potency Tests for Cellular and Gene Therapy Products**

EMA

- 2/2019: Guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational **advanced therapy medicinal products** in clinical trials – scientific guideline
- 7/2018: Quality, preclinical and clinical aspects **of gene therapy medicinal products** – scientific guideline
- 2/2012: Reflection paper on design modifications **of gene therapy medicinal products** during development
- 7/2010 : Reflection paper on quality, non-clinical and clinical issue related to the development to **recombinant adeno-associated viral vectors**

大綱

- 基因治療簡介
 - ✓ 基因治療定義
 - ✓ 目前上市的藥品
- 基因治療相關法規
 - ✓ FDA
 - ✓ EMA
 - ✓ 我國的相關法規及指引
- **AAV病毒載體生產平台**
 - ✓ 平台介紹
 - ✓ 製程說明
- 基因治療產品製造管制之病毒安全性考量-以已上市**AAV**產品為例
 - ✓ 庫系統 (banking system)
 - ✓ 製程中使用試劑
 - ✓ 病毒清除確效
 - ✓ 規格管控

AAV 的優勢

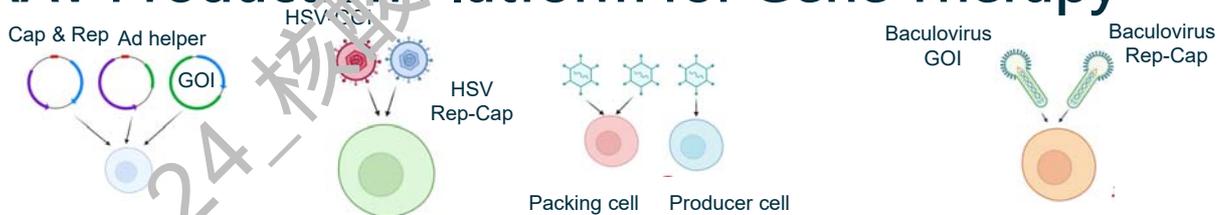
相較於常用於CAR-T療法的慢病毒 (lentivirus)，其啟動子會活化鄰近的基因，且有可能會造成細胞 transcripts 的異常剪接¹；因此，AAV 的特色在於

- 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
- AAV 通常僅在有輔助病毒 (helper virus) 的情況下複製病毒，
- 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
- AAV 的不同血清型對不同器官/組織具有不同的親和力 (tissue-tropism)，例如，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²。

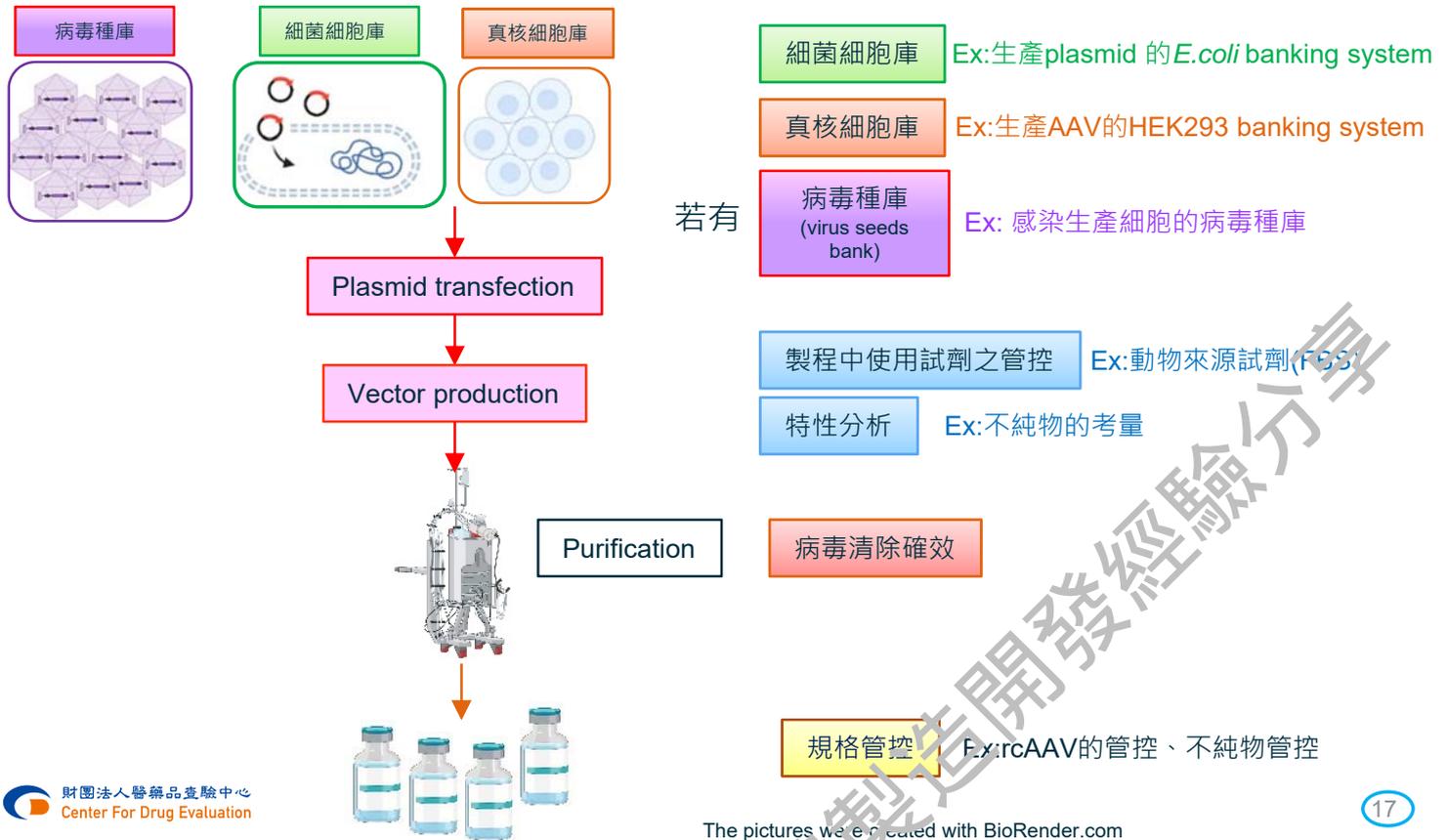
基於上述特性，AAV 為載體傳送 DNA 進行基因治療為安全的方式之一³。

1. Bulcha JT et al., Viral vector platforms within the gene therapy landscape. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1):53-77.
2. Naso MF et al., Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. BioDrugs. 2017;31(4):317-334.
3. Büning H et al., Capsid modifications for targeting and improving the efficacy of AAV vectors. Mol Ther Methods Clin Dev. 2019;12:248-265.

AAV Production Platform for Gene Therapy



Expression system	Plasmid mammalian cell	HSV mammalian cell	mammalian cell Stable cell lines	Baculovirus Insect cell
Packing cell line	HEK293(T)	HEK293, BHK and Vero	HeLa, A549 or HEK293	Sf9
Advantages	<ol style="list-style-type: none"> 1. 目前最常見的方法 2. 小量生產較快 	容易scale up	<ol style="list-style-type: none"> 1. 容易scale up 2. 生產成本較低 3. AAV及GOI在細胞中穩定表現 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 可以使用無血清培養基培養 Sf9 細胞中的外來病毒轉錄物質，不會在哺乳類動物複製(但不代表可以忽略) 2. 經過優化的baculovirus系統，不需要輔助病毒即可製造AAV 3. 容易scale up、生產成本較低
challenges	<ol style="list-style-type: none"> 1. 體積放大不易 2. 製造成本高 	<ol style="list-style-type: none"> 1. HSV safety 2. 2種HSV的病毒庫製備較複雜 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 研發時間較長 2. 不同產品的stable cell line需要分開製備 	設計 recombinant baculovirus所需的時間較長
Approved drug	Luxturna Zolgensma	Imlygic Delytact	None	Roctavian Hemgenix



17

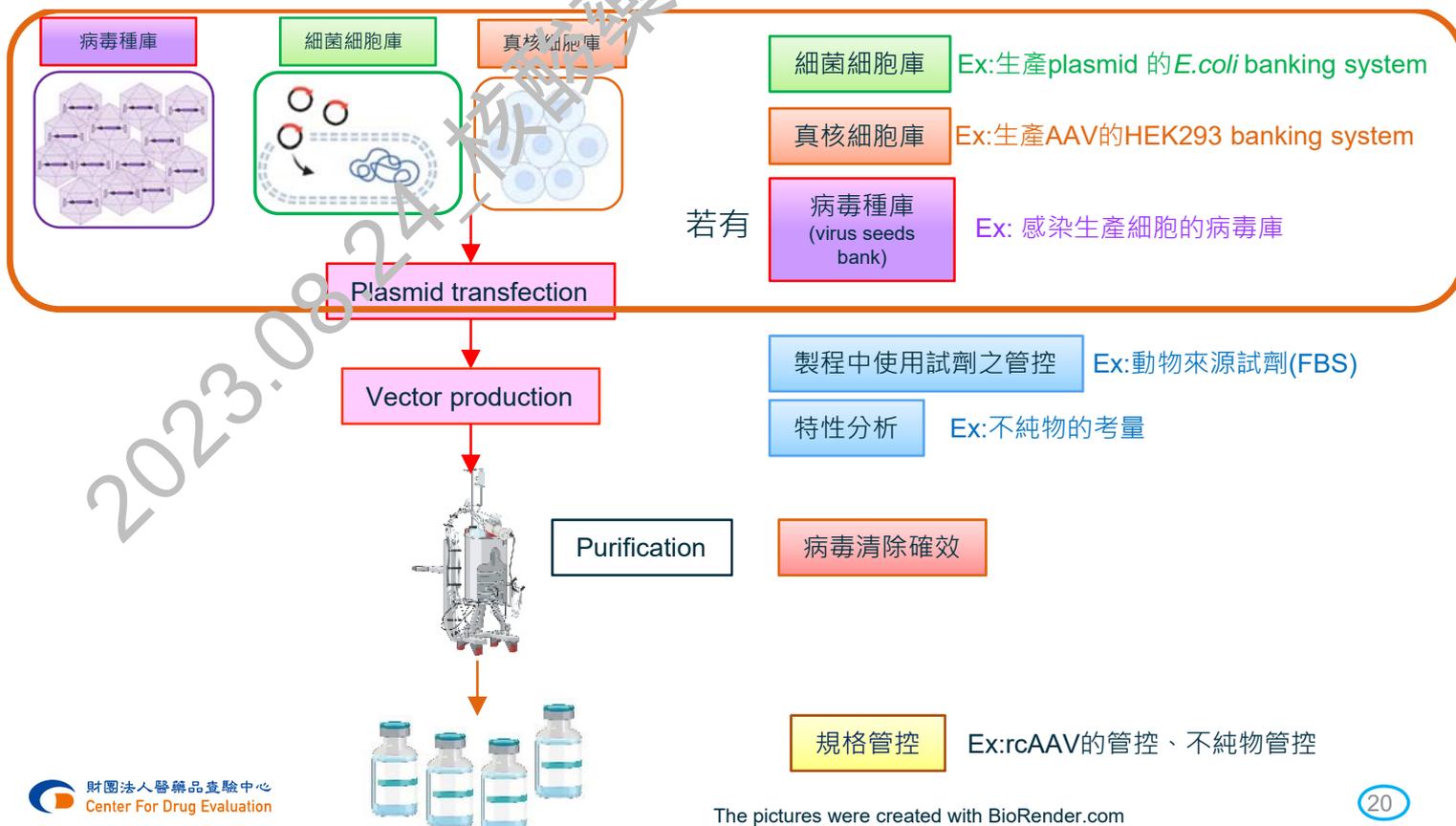
大綱

- 基因治療簡介
 - ✓ 基因治療定義
 - ✓ 目前上市的藥品
- 基因治療相關法規
 - ✓ FDA
 - ✓ EMA
 - ✓ 我國的相關法規及指引
- AAV病毒載體生產平台
 - ✓ 平台介紹
 - ✓ 製程說明
- 基因治療產品製造管制之病毒安全性考量-以已上市AAV產品為例
 - ✓ 庫系統 (banking system)
 - ✓ 製程中使用試劑
 - ✓ 病毒清除確效
 - ✓ 規格管控

18

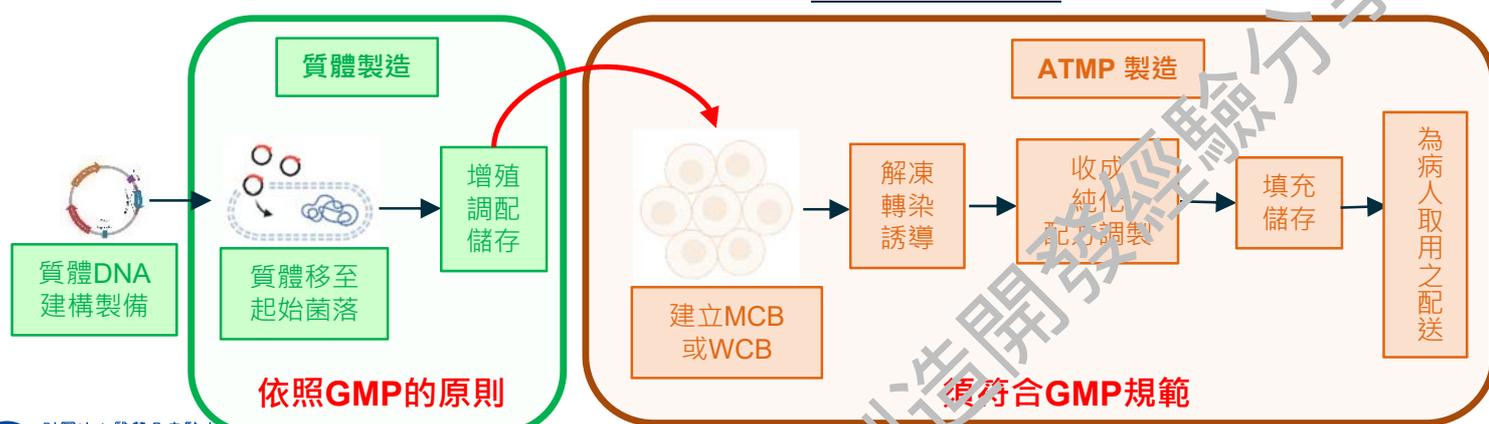
AAV病毒載體生產細胞庫之考量-1

- 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。
- 若起始物之真核細胞、細菌或病毒可建立庫系統 (banking system)，則建議以庫系統管控品質，並說明其來源、培養歷史和庫系統建置過程。
- 庫系統應進行特性分析和品質檢測，並確保無微生物、真菌及病毒之污染，亦須驗證在最初和最終培養製程下，庫系統之基因穩定性與生產效率一致性。相關規範可參考ICH Q5A(R1)、Q5B及Q5D(R1)。



AAV病毒載體生產細胞庫之考量-2

- 以AAV為病毒載體的製備，細胞庫的建構方面，可分為建構質體的細菌細胞庫、載體產生的生產細胞庫，基因治療產品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」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。



細菌細胞庫-以Zolgensma[®] 為例

- ✓ 細菌細胞庫通常為製備質體的起始物

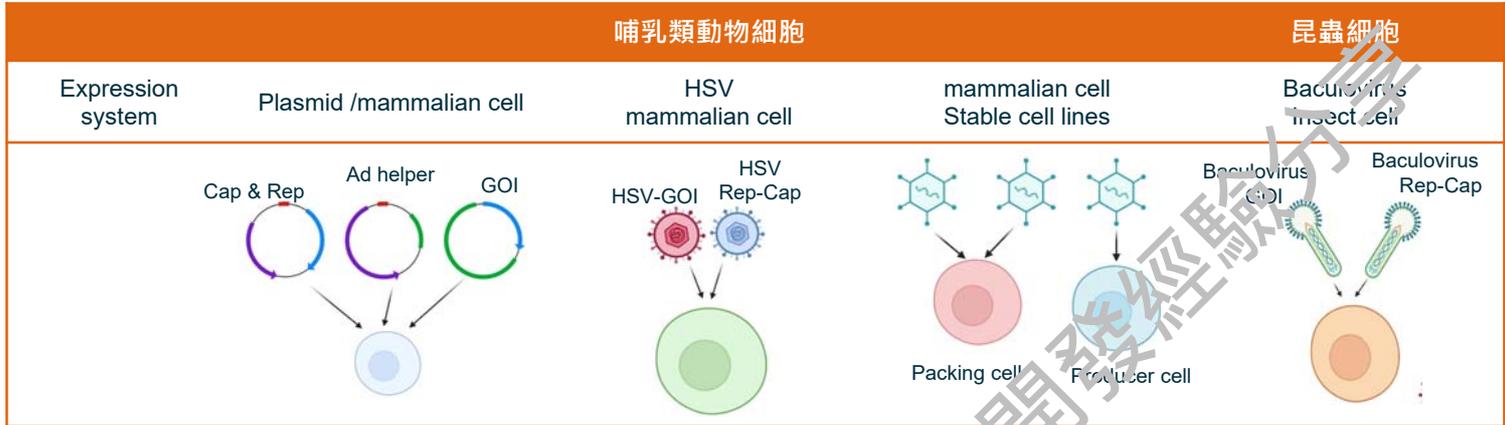
Zolgensma[®]細菌細胞庫之檢測項目*

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。

真核細胞庫之考量-不同種類的細胞系統

- 製備AAV病毒載體的細胞系統大致上可分為二類：一是**哺乳類動物的細胞系統**，二是**昆蟲來源細胞系統**。
- 依據不同細胞系統的特性，建立不同種類的細胞庫系統時，外來汙染源的考量亦不相同。



真核細胞庫之考量-建議檢測項目

- ✓ 挑選細胞株時，應考量該**細胞特性**是否會影響最終產品的安全性，例如細胞株是否具有**致癌基因序列**等。

真核主細胞庫之建議檢測項目

<p>一般細胞檢測項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 鑑別、純度 ✓ 細胞數量、細胞存活率、 ✓ 細胞株特性分析、基因型與表現型 <p>其他微生物汙染：</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 細菌 ✓ 真菌 ✓ 黴漿菌（若使用昆蟲細胞來源則為螺原體） 	<p>外來物質檢測應包含：</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ 反轉錄病毒(retroviruses)及其他內生性 (endogenous)病毒檢測 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 感染力 ✓ 電子顯微鏡之鏡檢 ✓ 分析反轉錄酶活性 ✓ 種系特異性病毒的病毒檢測(例如：昆蟲來源的細胞檢測nodavirus) ➤ 非內生性 (non-endogenous)或其他外來(adventitious)病毒檢測 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 抗體產生試驗 ✓ 根據細胞株的來源及培養中使用試劑來規劃檢測項目
--	---

真核細胞庫之考量-以已上市藥物Zolgensma®為例

- 已上市藥物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，Zolgensma®依據ICH Q5A (R1)、Q5B以及Q5D等規範進行細胞庫(MCB、WCB)的鑑別與純度檢測。

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 1-15
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	√

真核細胞庫之考量-以已上市藥物Delytact®為例

- 已上市藥物Delytact®為例，該產品以Vero作為病毒生產細胞庫，根據日本MHLW公開摘要報告顯示，Delytact®依據ICH Q5A (R1) 等規範進行細胞庫(MCB、WCB、CAL)的鑑別與純度檢測。

Table 4. Tests for adventitious agents in MCB, WCB, and CAL

Test parameter	Description or method of evaluation	MCB	WCB		CAL
				At preparation	
Retrovirus	test () cells	█	█	█	█
Adventitious virus	<i>In vitro</i> cells	█	█	█	█
	<i>In vivo</i> cells	█	█	█	█
<i>In vitro</i> bovine virus	<i>In vitro</i> cells	█	█	█	█
<i>In vitro</i> porcine virus	<i>In vitro</i> cells	█	█	█	█
Human virus		█	█	█	█
Simian virus		█	█	█	█
Bovine virus		█	█	█	█
Porcine virus		█	█	█	█
Sterility	Direct inoculation method (JP)	█	█	█	█
Mycoplasma		█	█	█	█
Acid-fast bacillus	EP	█	█	█	█

真核細胞庫之考量-昆蟲來源的細胞系統

細胞來源	常見細胞株	建議病毒安全性考量
<i>Spodoptera frugiperda</i> 秋行軍蟲	Sf9	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 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，因此使用sf9細胞系生產AAV病毒載體，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¹ ✓ 對於昆蟲細胞系生產的產品，測試應包括易受蟲媒病毒感染的細胞系（例如 BHK 細胞）。如果無法中和病毒載體和病毒載體衍生產物，則可以使用經過驗證的替代測定法²。

1. Ma H et. al., Identification of a novel rhabdovirus in spodoptera frugiperda cell lines. J Virol. 2014;88(12):6576-85
2. ICH Q5A R2.

病毒庫之考量

主病毒庫之建議檢測項目

<p>一般細胞檢測項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 鑑別（基因和免疫學鑑別） ✓ 病毒濃度或感染力價 (infectious titer) ✓ 基因體完整性 ✓ 轉殖基因的轉錄或表現 ✓ 轉殖基因衍生之生物活性 ✓ 無具複製能力病毒 (replication competent virus) 	<p>外來物質檢測應包含：</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 體外 (in vitro) ✓ 體內 (in vivo) ✓ 種系特异性病毒的病毒檢測 ✓ 細菌、真菌、黴漿菌（若使用昆蟲細胞來源則為螺原體）
--	--

定序：

- ✓ 關鍵基因應完整定序
- ✓ 若可行，病毒載體應於申請查驗登記前進行全基因序列分析。（並納入特性分析項目）
- ✓ 工作病毒庫則至少應執行鑑別及微生物、病毒相關之檢測。

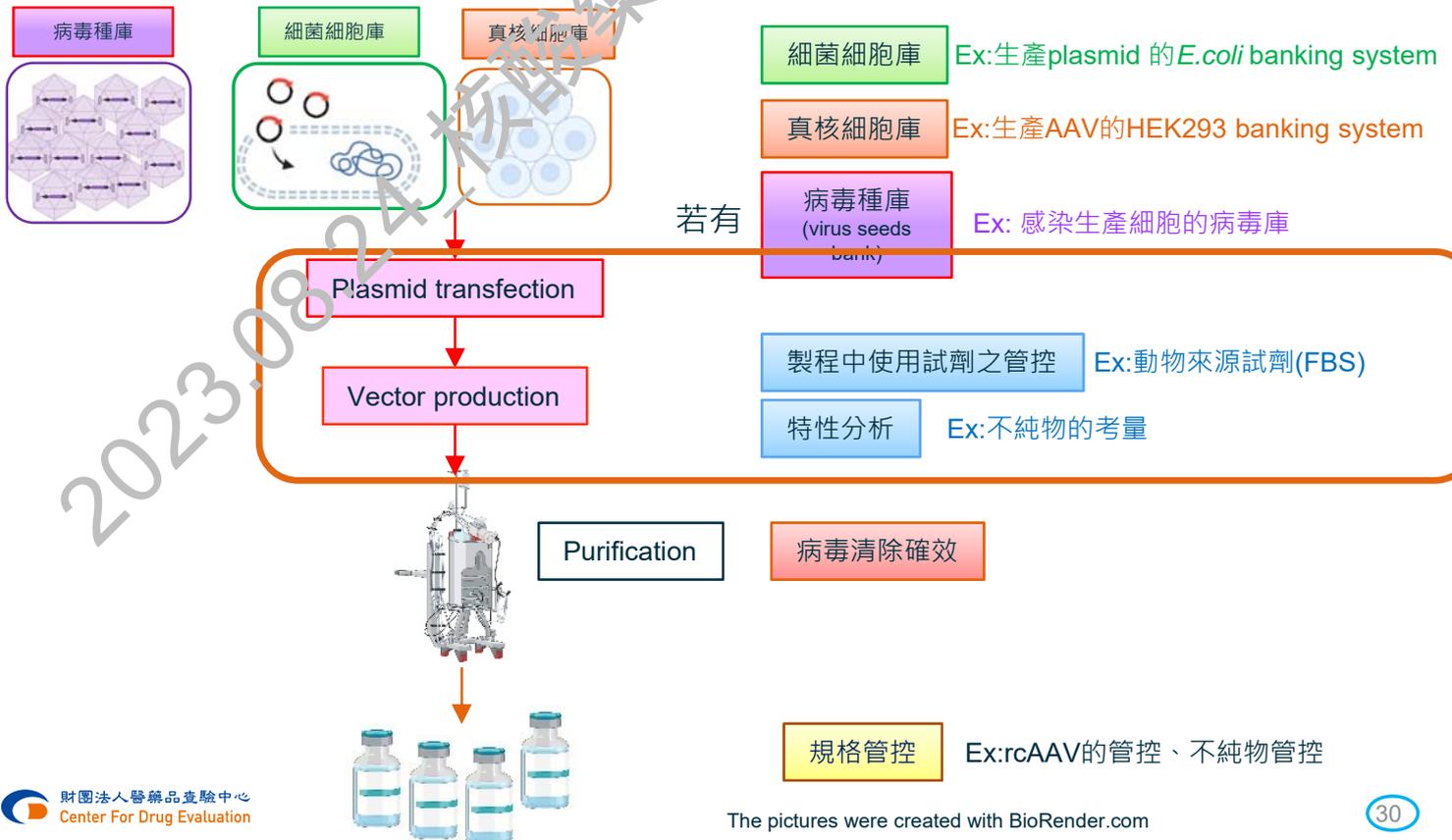
病毒庫之考量-以已上市藥物Delytact®為例

已上市藥物Delytact®為例，該產品以Vero作為病毒生產細胞庫，且以HSV為輔助病毒，根據日本MHLW公開摘要報告顯示，Delytact®在製程中有建立病毒種庫(Virus seed bank)。

Table 2. Tests for MVSS and WVSS

Test parameter	Method of evaluation	MVSS	WVSS	
				At preparation
Retrovirus	test () cells cells			
Adventitious virus ^{*1}	In vitro In vivo			
In vitro bovine virus ^{*1}	In vitro			
In vitro porcine virus ^{*1}	In vitro			
Human virus				
Simian virus				
Bovine virus				
Porcine virus				
Sterility	Direct inoculation method (JP)			
Mycoplasma				
Acid-fast bacillus	Culturing method (EP)			
Titer	method			
DNA sequencing of genetically modification site	method			
Uniformity of divided dosage units	method () method ()			
	test test			
	test test			
	method			

*1
*2
*3 only



製程中使用動物來源物料之病毒安全性考量

- **製程物料**係指原料藥製備過程使用的材料、試劑、耗材及設備，但不構成活性物質的一部份，應有良好的品質管控，避免於製程中因試劑的使用導入不純物或外來病原例如：胎牛血清、胰蛋白酶、培養基、生長因子等。
- 製程物料如由動物組織或體液所製備，或含有**動物來源物質**，或該物料於生產過程中與人類或動物來源材料接觸，皆應檢測**微生物與種系特異性病毒**，並評估**傳染性海綿樣腦病(TSE)**的風險。
- 相關製程中使用物料之病毒檢測參考資料
 - ✓ 製程中使用生物性原料之研發策略指導原則
 - ✓ 人類血液來源，若適用，建議參考「人用血漿製劑之查驗登記」、EMA/CHMP/BWP/706271/2010等
 - ✓ 動物來源，若適用，建議參考中華藥典第九版<5094>、<5236>及美國聯邦法規第9篇Part 113 (9 CFR 113)等

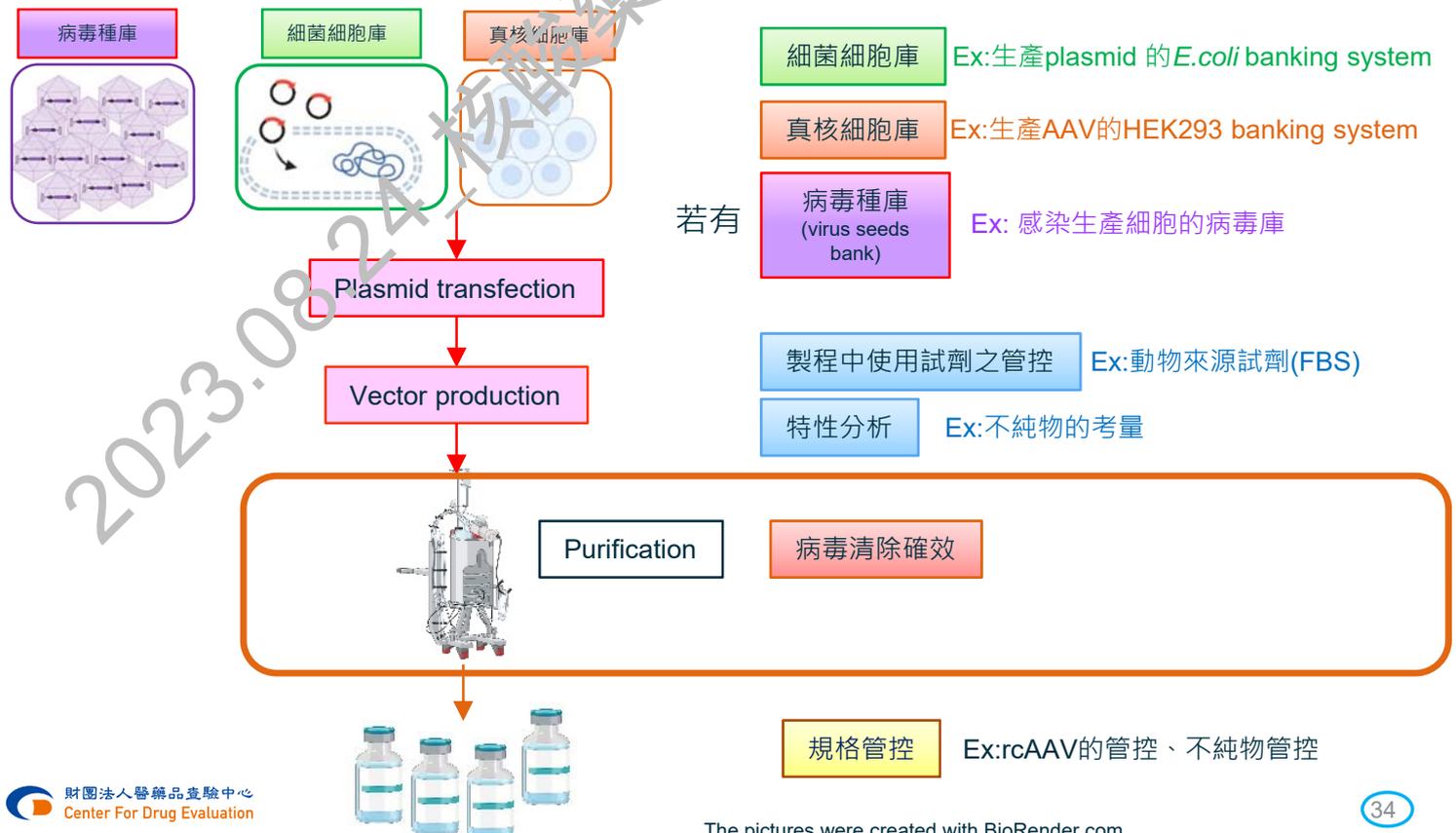
製程中使用動物來源物料之病毒安全性考量 -製程中常用的動物來源的原料為例

Raw material	Animal species	原料來源管控方式
Bovine serum	Bovine (Blood)	1. 建議針對來源國管控，並應確認無傳染性海綿狀腦病/牛海綿狀腦病(TSE/BSE)之風險。 2. 該物料製程應有適當傳染病源體之去活化或清除步驟。
FBS		
Casamino acids	Rovine (milk)	3. 若使用血清，建議對其進行 γ 射線照射。 4. 建議參考中華藥典第九版 (5094) 及9 CFR 113.53 章節。
Transferrin	Human (Blood)	1. 建議提供血品的來源/地區並說明血漿收集及檢測是否符合相關法規。 2. 說明該物料製程對於傳染病源體之去活化或清除能力，並應建立追溯(traceability)系統。 3. 建議參考「人用血漿製劑之查驗登記」、EMA/CHMP/BWP/706271/2010
Trypsin	Porcine (Pancreas)	1. 建議對豬進行豬環狀病毒 1, 2 (porcine circovirus 1 and 2) · 豬小病毒 (porcine parvovirus) 和其他人畜共通傳染性病毒的檢測。 2. 該物料製程應有適當傳染病源體之去活化或清除步驟 3. 建議參考中華藥典第九版 (5238) 及 9 CFR 113.53 。

AAV載體之基因治療藥物不純物考量

- AAV載體之基因治療藥物特性分析中的不純物可分為**製程相關不純物**以及**產品相關不純物**。

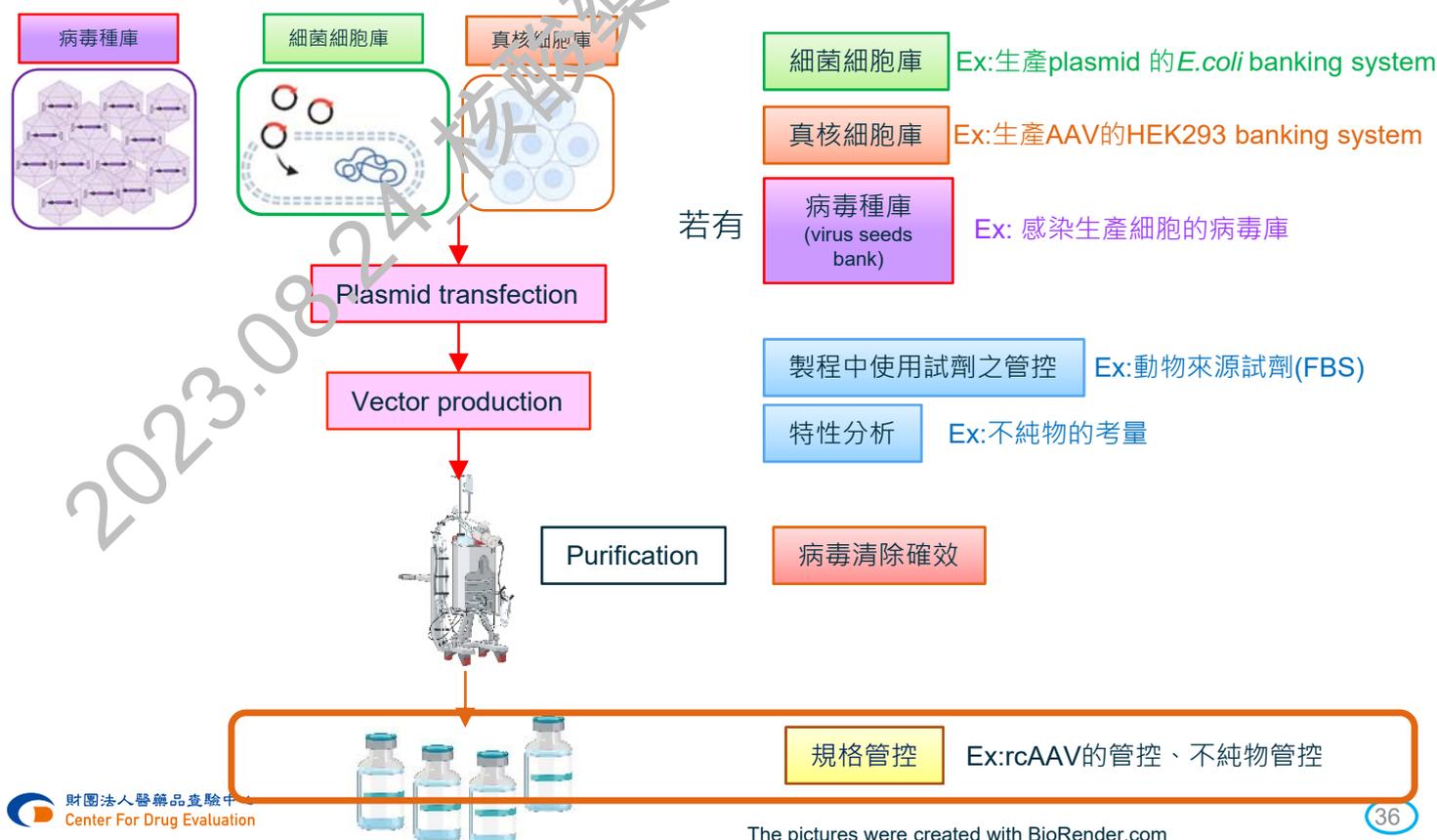
製程相關不純物	產品相關不純物
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 腺相關病毒顆粒也會將用於生產腺相關病毒之質體或輔助病毒 DNA共同包裝進病毒顆粒中，這些共同包裝DNA的病毒顆粒應視為製程不純物。 ✓ 使用來自腫瘤的細胞(例如HeLa)或具有致瘤性(例如：HEK293、HEK293T)的細胞，建議限制殘留DNA的數量及片段大小以確保產品安全。 ✓ 使用HEK293T細胞製造的產品應考量E1與SV40的large T的抗原序列，若使用HeLa細胞製造，應考量E6/E7基因。 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 因氧化或去聚合作用等造成降解的核酸複合 ✓ 外源 DNA 序列被共同包裝之載體 ✓ 無感染力之病毒載體或不含目標序列之空殼病毒 ✓ 以適當敏感度的檢測方法證明無複製能力之病毒 (replication competent virus)。



病毒清除確效

- 細胞有潛在的病毒污染源，需要進行強而有力的病毒清除步驟來去除，或降低外來污染因子，因此，病毒清除確效亦是製程中重要的一環。
- 根據日本MHLW公開摘要報告，Zolgensma®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。
- 根據歐盟公開摘要報告描述，Glybera®是以baculovirus production system生產，以PFV、BVDV、EMCV及CPV為model virus評估製程中清除步驟效能。

公開摘要報告揭露國家		日本MHLW				歐洲
藥品名稱		Zolgensma®				Glybera®
病毒清除確效說明		有三個病毒清除步驟				說明有病毒清除步驟
Model virus	XMuLV	PRV	HAV	MVM	PFV、BVDV、EMCV及CPV	
清除病毒量(log ₁₀)	12.61	15.31	1.88	1.48		



AAV載體之基因治療藥物安全性相關品質管制考量

➤ 主成分規格檢測項目

包含鑑別與完整性、含量、效價、純度/**不純物、外來感染源、具複製能力的病毒**、生物負荷(bioburden)/無菌性、內毒素黴漿菌等。

➤ 不純物

✓ 製程相關不純物：細胞來源污染物的殘留量、製程所使用之物料的殘留量、動物血清蛋白、載體製備時之外源性核酸或輔助病毒等。

✓ 產品相關不純物：無感染性病毒顆粒、空殼病毒、包裹非預期基因序列之病毒等。

➤ 有關AAV為載體的藥物在規格的建立上面除了藥物的鑑別以外，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，應將**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**一併納入不純物考量。

分析方法-具複製能力的病毒檢測

- 應以**易受感染 (permissive)** 或經設計之細胞株，於足夠的細胞培養時間或培養代數來擴增潛在之具複製能力病毒，再以設計或選擇合適的方法加以偵測。
- 檢測方法應有**足夠的專一性、靈敏度與耐變性**，以避免具複製能力病毒危害病人健康，並應根據病毒載體的類型評估基因治療製劑中具複製能力病毒的風險。
- 儘管已有足夠科學或臨床資料支持其風險可評估或管控，亦應根據具複製能力病毒含量相近之批次所執行之非臨床和(或)臨床試驗的相關資料，訂定規格中具複製能力病毒允收標準的上限，並提供安全性評估與合理性說明。

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中，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；
- 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。
- 隨著科技的日新月異，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。

THANK YOU

核酸藥物關鍵製造 開發經驗分享

2023.08.24_核酸藥物關鍵製造開發經驗分享