



細胞外囊泡製劑製造與管制之  
研發策略指導原則  
第一版

中華民國 113 年 05 月 17 日  
財團法人醫藥品查驗中心

# 序言

細胞外囊泡 (extracellular vesicles) 製劑為通過分離和純化細胞分泌於細胞外的脂雙層囊泡而製造的藥物，由於其中應不含細胞，因此不屬於當前細胞治療製劑的分類。

我國已有相當產學研單位投入此製劑之開發項目，有鑑於我國尚未發布針對此類產品之法規，故制定此細胞外囊泡製劑製造與管制之研發策略指導原則，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】

李倍慈小組長、盧青佑副組長、葉嘉新組長、林純江專案經理、陳可欣主任秘書、徐麗娟副執行長、林時宜執行長

## 目錄 (Table of Contents)

1 適用範圍.....	2
2 製造與管制考量.....	2
2.1 原物料管控.....	2
2.1.1 起始物.....	3
2.1.2 其他原料、試劑及賦形劑.....	3
2.2 細胞外囊泡製劑的製備、分離和純化.....	4
2.3 特性分析.....	4
2.4 細胞外囊泡製劑的品質管控.....	4
2.4.1 外觀檢測.....	5
2.4.2 細胞外囊泡之數量.....	5
2.4.3 細胞外囊泡之尺寸.....	5
2.4.4 黴漿菌檢測.....	5
2.4.5 無菌試驗.....	5
2.4.6 內毒素檢測.....	5
2.4.7 外源性病毒檢測.....	5
2.4.8 鑑別試驗.....	6
2.4.9 純度及不純物測試.....	6
2.4.10 效價分析.....	6
2.5 細胞外囊泡製劑的安定性.....	7
3 參考文獻.....	7

本研發策略指導原則係參考 ISEV: Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) and update of the MISEV2014 guidelines ; PMDA エクソソームを含む細胞外小胞 (EV) を利用した治療用製剤に関する専門部会: エクソソームを含む細胞外小胞 (EV) を利用した治療用製剤に関する報告書; MFDS: 세포외소포체 치료제 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인 [민원인 안내서] (Guideline on Quality, Non-clinical and Clinical Assessment of Extracellular Vesicles Therapy Products) 及國際上相關規範與審查經驗，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。

## 1 適用範圍

本指導原則之訂定係提供研發者針對細胞外囊泡製劑製造與管控之法規科學建議及研發策略考量。細胞外囊泡製劑的定義是指：藉由分離和純化活細胞分泌物而製得的具有雙脂層結構的囊泡。未經分離或純化的細胞培養液或細胞裂解物，以及經由人為操作破壞細胞而產生的囊泡，均不屬於本指導原則中細胞外囊泡製劑的定義。

本指導原則適用於使用人源細胞製得的細胞外囊泡製劑。使用非人源細胞製得的細胞外囊泡製劑以及上述未經分離或純化的細胞培養液或細胞裂解物以及經由人為操作破壞細胞而產生的囊泡不在本指導原則之適用範圍。此外，若細胞外囊泡作為載體來搭載藥物，但該細胞外囊泡不具療效，亦不適用於本指導原則。然若細胞外囊泡為載體搭載藥物，且細胞外囊泡部分也宣稱具療效之製劑，以及非本指導原則之適用範圍之產品，例如但不限於使用非人源細胞製得的細胞外囊泡製劑等，則應以個案來討論，建議於研發階段儘早諮詢中央衛生主管機關。

因細胞外囊泡為衍生自細胞，故除本指引中介紹的內容外，亦須考量每種來源細胞的特性進行額外評估，因此相關法規除參考「藥品臨床試驗計畫-技術性文件指引」，亦須參考「人類細胞治療製劑臨床試驗申請作業及審查基準」。對於使用經基因修飾之細胞製造的細胞外囊泡製劑，相關法規須同時參考「人類基因治療製劑臨床試驗審查基準」。文中描述的建議及要求為申請臨床試驗時所需，而這些原則亦可用於開發階段策略參考。

## 2 製造與管制考量

### 2.1 原物料管控

## 2.1.1 起始物

起始物可包含用於生產細胞外囊泡的自體或同種異體之組織或細胞，應描述收集該組織或細胞的程序。對於細胞或組織提供者的特定病原篩選與檢驗項目標準，可參照「人類細胞治療產品捐贈者合適性判定基準」。細胞外囊泡的生產製造，應考慮由於不同細胞提供者，或同一提供者但不同次提供之細胞可能產生的細胞外囊泡功能之差異，為維持製造品質之一致性，故建立細胞庫系統有其必要性。細胞庫之建立及管控，以及其安定性試驗部分，請參考我國之「人類細胞治療製劑臨床試驗申請作業及審查基準」，及 ICH Q5A、ICH Q5D 之相關說明。

由於細胞外囊泡製劑之粒徑等特性可能類似於病毒，且不易移除及/或去活化，因此，用於生產製造的來源細胞，須參照 ICH Q5A 之相關說明執行病毒安全性檢測，例如反轉錄病毒試驗、體內 (*in vivo*)、體外 (*in vitro*) 外來病毒試驗及人類及/或動物特定病毒檢測等，若測得具有危害性之種類的內源性病毒或病毒樣顆粒細胞，不應用於細胞外囊泡製劑之生產製造。

在製造細胞外囊泡製劑到達最長 (或更長) 體外培養細胞年齡 (limit of *in vitro* cell age, LIVCA) 的細胞，亦須進行特性分析及病毒相關試驗，以確認整個生產培養期間均維持所要求的細胞特性；若因特定培養條件驅使之特性改變，亦應確認該變化在不同批次間之一致性，建議包含但不限於進行其形態特徵 (morphological characteristics)、生長特徵 (growth characteristics)、生化標記 (biochemical markers)、免疫標記 (immunological markers)，與/或其他具相關性的基因型或表現型標記等分析。

## 2.1.2 其他原料、試劑及賦形劑

生產細胞外囊泡的所有試劑均應有適當的品質管控，使用生物性來源原料，應參考「製程中使用生物性原料之研發策略指導原則」。

使用成分複雜之試劑，例如血清、血小板裂解液等，除了病毒風險外，該試劑中可能會含有其本身之細胞外囊泡，進而影響評估安全性及療效之複雜性。若無法避免使用成分複雜之試劑，建議應建立模擬細胞外囊泡 (mock extracellular vesicle) 對照組，以提供有關細胞外囊泡功能活性之背景效應的資訊。模擬細胞外囊泡可由例如但不限於包含成分複雜之試劑，但未進行細胞培養的培養基中分離或純化獲得。

應考量動物來源試劑可能會增加異源感染因子，與/或不良免疫反應，若評估仍須使用如胎牛血清等動物來源成分，則應確認病毒安全性，以避免感染傳染性海綿狀腦病 (transmissible spongiform encephalopathies, TSEs) / 牛海綿樣腦病 (bovine spongiform encephalopathy, BSE) 之可能風險。

製程中使用之可能與藥品接觸和包裝設備的組件和組成材料，以及一級和二級包裝組件與系統，此類接觸可能造成藥品與前述組件和材料之間產生交互作用，

相關法規可參考中華藥典或藥品查驗登記審查準則所載之十大醫藥先進國藥典之相關規定。

## 2.2 細胞外囊泡製劑的製備、分離和純化

細胞培養條件的微小變化，可能會對細胞外囊泡的產生和生物特性有很大影響，例如包含細胞培養密度、繼代次數和頻率、倍增時間、氧氣濃度、pH、培養基成分（包含糖類、血清、細胞激素、抗生素、生長因子等）、培養容器、使用共同培養系統（co-culture systems）、類器官培養（organoid cultures）等，均可能對細胞外囊泡的數量、品質產生影響，此外，例如垂死的細胞可分泌凋亡小體（apoptotic body）等成分，而凋亡小體可能具有與目標細胞外囊泡不同之成分及作用，為達批次間的品質一致性，因此應建立標準化之細胞培養程序，並詳實記載於批次製造紀錄。

細胞外囊泡之分離和純化方法，研發單位可依據自身產品特性規劃，使用一種或多種分離及純化步驟，建立標準化流程，然隨著不同開發階段，必要時須調整或變更製程步驟，故應詳細記載每一階段之製造程序，以及製程中管控項目。分離細胞外囊泡的方法，可能會影響細胞外囊泡的完整性（integrity）和功能特性，故應採用能維持細胞外囊泡之純度和功能特性等之分離方法。

## 2.3 特性分析

需要對細胞外囊泡的組成和數量（包含蛋白質、RNA 和脂質等）進行圖譜分析（profile analysis），以評估通過特定製造過程分離純化的細胞外囊泡，具有一致的特性。對於圖譜分析，建議盡可能使用新技術（例如但不限於 LC-MS/MS）進行，以利分析細胞外囊泡內各種蛋白質、RNA、脂質等。

建議但不限於使用如冷凍電子顯微鏡（cryo-electron microscope，Cryo EM）、穿透式電子顯微鏡（transmission electron microscope，TEM）等方法，分析細胞外囊泡之雙脂膜結構，建議但不限於使用奈米粒子追蹤分析儀（nanoparticle tracking analysis，NTA）、電阻脈衝感測（resistive pulse sensing，RPS）、流式細胞儀等方法，分析細胞外囊泡之大小分佈、比例及數量等。

應建立細胞外囊泡功能活性（functional activity）的定量分析方法（quantitative analysis），該功能活性應能反應與本研發產品適應症之有效性相關聯。故應於研發階段探討本產品之特定生物標記（例如核酸或蛋白質之生物標記或作用於目標細胞之反應標記（response marker）等），並提出試驗數據（例如非臨床或臨床試驗相關數據）以支持其與本產品適應症之關聯性。

若細胞外囊泡製劑之規格有限定囊泡大小，則未包含於該尺寸範圍內之細胞外囊泡，應視為不純物而加以管控。

製程變更時，應進行比較性試驗，其中成分分析（component profile analysis）等之結果，為證實變更前後可比性的重要資料，可參考 ICH Q5E 之說明。

## 2.4 細胞外囊泡製劑的品質管控

## 2.4.1 外觀檢測

應建立外觀測試之標準，例如目視確認懸浮液不含非預期之可見顆粒物質，以及顏色、濁度的特性等。

## 2.4.2 細胞外囊泡之數量

應有細胞外囊泡之數量標準，可以使用 NTA 等方法測定細胞外囊泡的數量，並建議與蛋白質含量等測試結果進行比較。

## 2.4.3 細胞外囊泡之尺寸

細胞外囊泡之尺寸，可以使用例如具高解析度之影像分析方法（例如但不限於，電子顯微鏡及相關分析技術、掃描探針顯微鏡 (scanning-probe microscopy, SPM)、超解析度顯微鏡 (super-resolution microscopy) 等），以及使用例如但不限於 NTA、動態光散射技術 (dynamic light scattering)、電阻脈衝感測 (resistive pulse sensing)、螢光相關光譜 (fluorescence correlation spectroscopy) 等，測量細胞外囊泡的大小分佈。

## 2.4.4 黴漿菌檢測

細胞外囊泡製劑成品中雖然不含細胞，但考量其起始物為細胞，可能於培養過程受到動物來源原料、試劑或培養場所等之黴漿菌的污染。

建議可選在分離和純化細胞外囊泡之前的階段，例如最終培養 (final culture) 完成時，將收集的培養液和 (/或)細胞一起進行檢測。

## 2.4.5 無菌試驗

應詳細說明使用之無菌試驗方法，並提供試驗結果等資料。應於成品放行前取得無菌試驗結果，檢測方法為中華藥典第九版 (3071)無菌試驗 (亦可參照 EP 2.6.1、USP <71>藥典章節)。

## 2.4.6 內毒素檢測

細胞外囊泡製劑之製造過程中，包含設備、環境或使用的各種試劑等可能造成內毒素污染，應執行內毒素檢測，並應根據給藥量、給藥方法與給藥時間，製定檢測標準。

## 2.4.7 外源性病毒檢測

由於細胞外囊泡製劑存在被病毒污染的可能，且不易移除及/或去活化，特別是自細胞培養基進行細胞外囊泡之濃縮步驟時，若已有混入病毒，病毒也有極高的可能被濃縮，因此證明製劑中沒有病毒污染非常重要。

建議在分離和純化細胞外囊泡之前的階段，例如但不限於於最終培養完成時，將收集液 (unprocessed bulk harvest)和細胞 (end of production cell)一起進行外

源性病毒檢測。

## 2.4.8 鑑別試驗

原料藥或製劑應使用各種指標 (indicator)與檢測方法，確認細胞外囊泡的本質，例如細胞外囊泡的類型和活性，建議使用例如形態學 (morphological)、免疫學 (immunological)、生物學 (biological)等方面之檢測，並針對每個特性設置不同的指標。

例如若有細胞外囊泡特異性標記，則應包含於檢測項目中。此外應測量細胞外囊泡的蛋白質、RNA 或脂質等組成，這些物質是預期存在於胞外囊泡中的特定膜蛋白、具有與膜結合能力的胞漿內蛋白 (intracytoplasmic proteins)、雙脂膜成分或 miRNA 等。應根據細胞外囊泡組成的特性分析結果選擇幾種蛋白質、RNA 或脂質等，至少以半定量 (semi-quantitative)方式呈現檢測結果。

## 2.4.9 純度及不純物測試

應對細胞外囊泡製劑中與療效相關之成分之純度，以及可能存在之不純物進行含量分析，例如但不限於應包含可能存在於細胞核、粒線體、高基氏體、內質網、自噬小體 (autophagosome)，與細胞骨架等之蛋白質；可能附著於細胞外囊泡的分泌性蛋白質成分，例如生長因子、細胞激素、細胞外基質 (extracellular matrix) 等；以及細胞質或胞內體 (endosomes) 蛋白跨膜 (transmembrane) 或多醣磷脂肌醇錨定 (glycosylphosphatidylinositol-anchored, GPI-anchored) 等蛋白質、細胞外囊泡液中應含之蛋白質、RNA 等。整體應依據產品設計規劃定義純度及不純物，並進行相關分析鑑定並提供分析數據。製程中使用試劑方面，應建立殘留物去除方法，以及應有殘留物濃度評估與確認資料，並應有相關的管控標準，例如但不限於易與細胞外囊泡一同被分離之蛋白質，血清中白蛋白、載脂蛋白 (apolipoproteins) 等，須進行其殘留量評估。

## 2.4.10 效價分析

於首次進入人體臨床試驗 (first in human, FIH) 時，宜有療效活性成分作用機轉之說明，含體外及/或體內試驗；且由於細胞外囊泡成分及可能作用機制的複雜性，應盡可能於早期臨床試驗階段建立效價測試方法，可依可能作用機制及特性分析結果，評估設定多個功能活性分析項目。於第二期人體試驗結束時，應實施一個包含體內檢測或體外檢測的效價分析，來測量適當的生物活性，該活性分析方法應能反映預期的細胞外囊泡作用機制及與適應症有效性相關聯。這些效價分析方法應於申請產品上市前執行確效試驗以證明該方法的適用性。若擬以細胞外囊泡中的活性成分 (例如但不限於特定的 miRNA、mRNA、蛋白質) 來取代功能活性的定量分析，應有非臨床例如檢測細胞增殖、遷移、毒殺效果、免疫細胞活性、基因表達調節、信號傳遞等之細胞活性評估之數據或臨床數據來支持與臨床有效性相關聯。

如果必須使用體內效價試驗，來證明細胞外囊泡的特定治療效果，則應描述所選擇實驗動物物種的適當性。

當進行效價分析時，應根據劑量進行劑量反應關係 (dose-response relationship) 的定量分析，其適當性 (adequacy) 應在非臨床和臨床試驗期間進行評估。

另建議如可能，應使用例如但不限於密度梯度離心，或粒徑篩析層析法 (size exclusion chromatography) 去除細胞外囊泡後，進行相同之效價測試進行比較。

## 2.5 細胞外囊泡製劑的安定性

為了評估細胞外囊泡在貯藏條件 (溫度及時間等) 下的品質安定性，應進行安定性試驗，應根據特性分析結果評估決定安定性試驗中應追蹤的品質項目。建議參考 ICH Q5C 進行安定性試驗之規劃。

## 3 參考文獻

- 3.1 Clotilde Théry, et.al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicle*, 2018;7(1):1535750.
- 3.2 PMDA エクソソームを含む細胞外小胞 (EV) を利用した治療用製剤に関する専門部会: エクソソームを含む細胞外小胞 (EV) を利用した治療用製剤に関する報告書, 2023
- 3.3 MFDS : 세포외소포체료제 품질, 비임상 및 임상 평가 가이드라인 [민원인 안내서] (Guideline on Quality, Non-clinical and Clinical Assessment of Extracellular Vesicles Therapy Products), 2018
- 3.4 衛生福利部食品藥物管理署: 藥品臨床試驗計畫-技術性文件指引, 2015
- 3.5 衛生福利部食品藥物管理署: 人類細胞治療製劑臨床試驗申請作業及審查基準, 2020
- 3.6 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, 2020
- 3.7 衛生福利部食品藥物管理署: 人類細胞治療產品捐贈者合適性判定基準, 2015
- 3.8 財團法人醫藥品查驗中心: 製程中使用生物性原料之研發策略指導原則, 2022
- 3.9 ICH Q5A: Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin; 1999
- 3.10 ICH Q5C: Quality of biotechnological products: Stability testing of biotechnological/biological products; 1995
- 3.11 ICH Q5D: Derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products; 1997