

出國報告（出國類別：國際會議）

赴西班牙參加「**2017**年新興先進醫療
產品研討會」

服務機關：衛生福利部食品藥物管理署

姓名職稱：張弘技士

派赴國家：西班牙

出國期間：中華民國 106 年 6 月 25 日至 6 月 30 日

報告日期：中華民國 106 年 9 月 18 日

摘要

本次奉派參加「2017年新興先進醫療產品研討會(Advanced Therapy Medicinal Products Conference)」，該研討會係由歐洲無菌製劑協會(Parenteral Drug Association Europe)所舉辦，會中探討之議題有新興先進醫療產品(ATMP)之GMP規範及經驗分享、ATMP之發展現況(如應用CAR-T細胞治療於癌症)、品質管制試驗(如無菌試驗替代方法、間質幹細胞之效價試驗)及ATMP商品化(如生物保存)等。因應新興先進醫療產品之多樣化及快速發展，參加本次研討會可獲取有關細胞治療等新興先進醫療產品之國際發展趨勢與品質管控資訊，將有助於建立與國際規範協和之細胞治療產品品質管制相關指引，並藉會議建立該專業領域之溝通管道，與國際接軌。

目次

壹、前言與目的	4
貳、行程及工作紀要	5
參、會議內容	7
(一)優良製造規範指引簡介	8
(二)嵌合抗原受體 T 細胞治療	11
(三)間質幹細胞治療	15
(四)無菌試驗替代方法	21
(五)細胞治療產品之生物保存	26
肆、心得與建議	30

壹、前言與目的

隨著新興生物科技技術之進步，醫藥產品的發展趨勢也由最早期的小分子藥物（由化學合成或天然萃取而得）進展到大分子藥物（如疫苗、單株抗體等），而近期新興先進醫療產品（包含細胞治療、基因治療及組織工程產品）更是如火如荼發展的新興領域。美國食品藥物管理局（FDA）在 1997 年首先核准了世界第一個細胞治療產品 Carticel，其利用自體的軟骨組織，在體外將軟骨細胞分離出來並增殖，最後再將細胞注射到受損部位之骨膜下方，以修復受損的軟骨組織。另外，於 2010 年細胞治療應用於癌症之產品 Provenge 首度被核准，其利用基因工程技術產生的融合抗原 PAP-GM-CSF 與病人自體的抗原呈現細胞在體外培養，其中 PAP（prostatic acid phosphatase）為前列腺癌細胞上的抗原，而 GM-CSF 則可以提高免疫系統之抗原呈現能力，體外培養後重新注射回患者體內，藉由活化患者自身的 T 細胞作用，以破壞帶有 PAP 抗原之癌細胞。歐盟在 2012 年更核准第一個基因治療產品 Glybera，其利用 Adeno-associate virus(AAV)將具有功能性之脂蛋白脂酶（Lipoprotein lipase）基因傳遞給骨骼肌，以治療脂蛋白脂酶缺乏症造成之嚴重胰腺炎。

本次「新興先進醫療產品研討會」由歐洲無菌製劑協會（PDA Europe）舉辦，其係非營利組織，成立於 1946 年，主要發佈全球最新藥品及生物製劑製造與管制等相關科學與技術之資訊，該協會不定期舉辦相關訓練課程與會議，供各界提升專業知能並促成國際間之交流。因應新興先進醫療產品之多樣化及快速發展，參加本次研討會可獲取有關細胞治療等新興先進醫療產品之國際發展趨勢與品質管控資訊，將有助於建立與國際規範協和之細胞治療產品品質管制相關指引，並藉會議建立該專業領域之溝通管道，與國際接軌。

貳、行程及工作紀要

日期	行程及工作紀要
106年6月25日 星期日	啟程(台北)
106年6月26日 星期一	抵達(西班牙瓦倫西亞)
106年6月27日 星期二	<p>參加「2017年新興先進醫療產品研討會」</p> <ul style="list-style-type: none"> ● GMP 規範簡介與經驗分享 (speaker: Rocio Salvador-Roldan 等 5 位) ● 建立 ATMP 製造管制策略 (speaker: Christopher Bravery) ● CAR-T 細胞之自動化製造 (speaker: Ulrike Köhl) ● 間質幹細胞產品之效價試驗 (speaker: Marcel Hoefnagel) ● 無菌試驗之替代方法 (speaker: Luís Meirinhos-Soares)
106年6月28日 星期三	<p>參加「2017年新興先進醫療產品研討會」</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 細胞治療用細胞之純化及濃縮 (speaker: Manuel Carrondo) ● 基因修飾 T 細胞產品 (CTL019) (speaker: Margit Jeschke) ● 應用調節性 T 細胞治療於器官移植 (speaker: Alessandra Petrelli) ● 建造符合 GMP 規範之細胞治療設備 (speaker: Lee Chapman) ● 生物保存之必要性 (speaker: Brian Hawkins)

106年6月29日 星期四	返程(西班牙瓦倫西亞)
106年6月30日 星期五	抵達(台北)

參、會議內容

會議第一天由 Dr. Jonathan Appleby 開場介紹 ATMP 之發展及歐洲 ATMP 產品之現況（表一）。之後為期 2 天之會議內容摘要如下：

表一、歐洲先進醫療產品發展現況

核准年份	產品名稱	描述	公司	適應症
2009	Chonfro- Celect	Autologous Articular cartilage derived chondrocytes	Tigenix	Cartilage defects of the knee
2012	Glybera	human lipoprotein lipase (LPL) gene variant LPLS447X in a vector.	UniQure	Lipoprotein lipase deficiency
2013	MACi	matrix-applied characterized autologous cultured chondrocytes	Vericel	Cartilage defects of the knee
2013	Provenge	autologous antigen presenting cells (APCs) and the protein called PAP-GM-CSF	Dendreon	Prostate cancer
2014	Holoclar	autologous human corneal epithelial cells	Chiesi	Limbal stem cell deficiency
2015	Imlygic	Genetically modified herpes simplex virus type 1 produce GM-CSF	Amgen	Unresectable melanoma
2016	Zalmoxis	allogeneic T cells genetically modified with a retroviral vector encoding for a truncated form of the human low affinity nerve growth factor receptor	MioMed	High risk hematological malignancies
2016	Strimvelis	autologous CD34+ retroviral vector that encodes for the human ADA cDNA sequence	GSK	ADA-SCID

(一) 優良製造規範 (Good Manufacture Practice, GMP)

指引簡介

新興先進醫療產品 (Advance Therapy Medicinal Product, ATMP) 根據歐盟的定義包含基因治療產品、體細胞治療產品及組織工程產品，ATMP 製造商有責任確認製程之合適性以保證產品之品質，遵守 GMP 規範是建構藥品品質體系必要的部分，GMP 之主要目標如下：

1. 人員受過充分訓練且責任明確劃分。
2. 廠房和設備適合預期用途並且有適當維護。
3. 有一個合適的文件系統，確保起始材料(starting material)、原料(raw material)、中間產物及產品列有適當的規格，生產過程被清楚瞭解且以適當記錄保存。
4. 製程足以確保生產的一致性，且產品符合相關規格。
5. 具有獨立於生產的品質管制系統。
6. 品質缺陷及製程中的偏差可盡快被鑑定出來，調查原因並採取適當矯正及預防措施。
7. 實施合適的系統以確保 ATMP 及其起始材料和原料的可追溯性。

GMP 指引內容摘要如下：

(1) 基於風險的方法 (Risk base approach, RBA)

ATMP 相關的品質風險與生物學特徵、細胞來源、載體的生物學特性、蛋白質表現的程度及特徵（用於基因治療產品）、其他非細胞成分的性質（如原料、基質）及製程有高度相關。在可獲得的資訊為基礎上，ATMP 製造商應盡可能考量與產品及製程有關的所有潛在風險（包括評估可能涉及產品的品質、安全性和有效性）。RBA 允許製造商根據評估後的風險去設計組織、技術及結構上的方法去管理風險以確保品質。

(2) 原料

原料應該使用試藥級，但某些情況下只有研究級原料可取得，則使用

研究級原料的風險應加以評估，製造商應進行功能性及安全性試驗以確保這類原料的適用性，且需採取適當的方法確保原料可被追蹤。ATMP 製造商應驗證供應商的原料符合約定規格，監督的程度及進一步測試應跟各種原料所帶來的風險相稱，如果風險已被充分的瞭解、已消除或已減輕到可接受的水平，則信任供應商所提供之檢驗成績書是可以接受的。若是獲上市許可（marketing authorization）的醫藥產品原料（如細胞因子、人血清白蛋白、重組蛋白），供應商所提供之檢驗成績書是不需要的。若製造過程有使用抗生素，則必須於最終產品中移除，以確保不會干擾無菌試驗的結果。

（3）起始材料

ATMP 製造商應驗證供應商的起始材料是否符合約定規格（包括生產、檢驗、管制及操作方面），監督的程度及進一步測試應跟各種材料所帶來的風險相稱，此外，供應商應提供有關檢驗結果、追蹤數據及捐贈者之完整資訊。細胞庫建立時應避免於同區域同時操作其他細胞或感染性材料，細胞庫建立後，應驗證並記錄解凍後細胞之存活率及效能，以確保細胞庫之穩定性。

（4）製程確效

為確認產品之製造程序及其管制條件，具有良好的有效性與再現性，而進行製程確效。製造商應先編訂確效計畫書，內容包括關鍵製程參數、關鍵品質屬性、經過校正之生產設備、確效過的分析方法、製程管制（in process control）之項目及合格標準。確效時應監測重要的製程參數並記錄之，將監測過程收集的數據加以分析，可得各次生產作業時製程因素之變異性，並可確認設備與製程管制是否足以確保產品能符合規格。

因為細胞治療產品之細胞通常取得有限，因此製程確效有較彈性的作法：

1. 利用替代性材料（surrogate materials）進行確效：當起始材料短缺時，使用經評估後的替代性材料是可以接受的。替代性起始材料需評估捐

贈者年齡、由健康捐贈者而來、解剖學來源、較高細胞代數等因素。

2. 併行性確效 (Concurrent validation approaches)：併行性確效為一邊進行正常生產，一邊進行確效作業之措施。由於起始材料有限且評估對病人的利害得失後，採用併行性確效是可接受的。通常對最初生產之第三批產品，予以廣泛的製程中監控與加強試驗，將所得結果來訂定適用之規格及標準，以供後續製程中管制及最終產品之試驗用。
3. 同類型產品之製程確效：當相同製程應用於同類型產品時，製程確效不用再重複驗證。

(5) 無菌製程確效

使用無菌微生物培養基來進行製程模擬，以測試製程中是否有效避免微生物污染，而確效的目標則是無微生物生長。製程模擬中所有污染都需被鑑定出來。每 6 個月或有重大製程變更時應進行無菌製程確效，但若兩批產品之生產間隔大於 6 個月，則確效可以在第二批產品製造前再做。當最終產品於無菌試驗結果出來前即要應用於病人身上時，降低確效頻率是不可接受的。

(6) 檢品留樣 (Retention of samples)

1. 原料：關鍵原料 (如 cytokines、growth factor) 對調查可能的品質問題是很重要的，因此關鍵原料必須留樣至產品放行後 2 年或有效期限後 1 年。
2. 起始材料：應留樣至產品放行後 2 年或有效期限後 1 年，但因為起始材料通常量很少，因此若是自體 ATMP 或經過捐贈配對之異體 ATMP，則可以不用留樣。
3. 最終產品：應留樣至有效期限後 1 年，但若是自體 ATMP 或經過捐贈配對之異體 ATMP，則可以不用留樣。
4. 留樣期間可以依據安定性及效期適當的縮短，製造商應評估以冷凍保存留樣之可行性。

(7) 重組 (Reconstitution)

重組包含了由產品放行到施打於病人期間非屬製造之行為，可在非 GMP 規範之施打端執行。其行為包含：

1. 解凍、清洗、更換緩衝液、移除保存液（如 DMSO）之必要離心步驟、去除製程相關的雜質（如死細胞），包括過濾。
2. 用溶劑/緩衝液懸浮、溶解或稀釋。
3. 冷凍儲存後之細胞復原。
4. 由於給藥的目的，將產品與患者自身的細胞、佐劑或其他物質混合。但將基因治療載體與自體細胞混合是一個製造活動，應該在 GMP 規範下進行。
5. 拆分產品為若干等份，而在一段時間中使用不同的劑量。
6. 裝載到輸送系統/外科設備，傳輸到輸液袋/注射器。

製造商應確保重組程序，以確保其為有效及穩定的，可使產品施打後不會有 ATMP 品質、安全、有效性的負面疑慮。製造商應制訂關於重組程序之指引，應夠詳細、清楚以避免對產品品質造成負面衝擊。

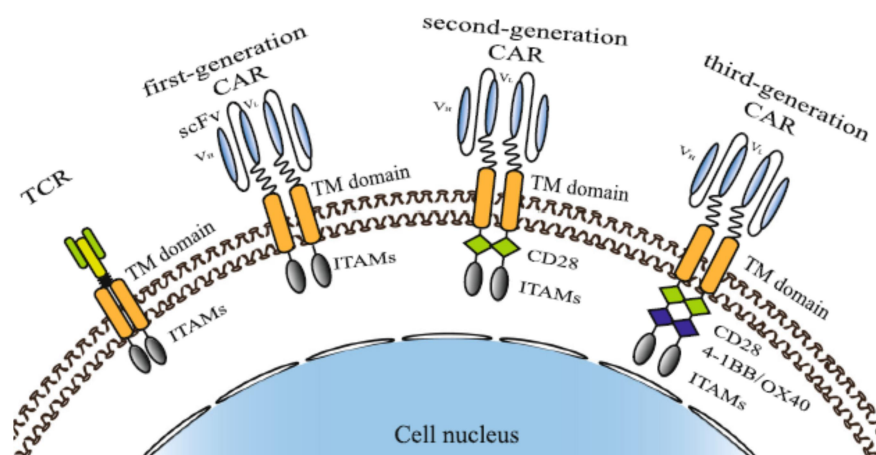
(二) 嵌合抗原受體 T 細胞治療 (CAR-T cell therapy)

Chimeric antigen receptor T (CAR-T) 細胞治療，其基本原理是在體外將患者自身的 T 淋巴細胞改造，使其表現一個可以跟腫瘤細胞表面分子結合的“CAR”，讓這些改造後的 T 淋巴細胞具有辨認與殺傷腫瘤細胞的能力，再透過將這些細胞回輸到患者體內以達到控制腫瘤、治療癌症的目的。研究發現 CD19 只會表現於 B 細胞或 B 細胞前驅細胞，而不會表現於造血幹細胞，且大部分 B 細胞相關癌症皆會表現 CD19，因此 CD19 可成為 B 細胞癌重要的標記，近年來 CD19 CAR-T 在治療血液腫瘤有非常顯著的療效，如由國際藥廠 Novartis 所開發的 CD19 CAR-T 係用於治療復發性和難治性 B 細胞急性淋巴細胞白血病 (ALL) 的 25 歲以下患者，由其針對患有急性淋巴細胞白血病兒童、年輕人之臨床試驗數

據 (n=68) 顯示，83%接受治療的患者在 3 個月內癌症症狀就出現緩解，到 6 個月時，89%受試患者仍舊存活，1 年時則仍有 79%存活，展現絕佳的治療成效，已於 2017 年 8 月 31 日在美國取得藥物許可證，為過去視為難以治療的癌症帶來一線希望；而 kite Pharma 所開發的 CD19 CAR-T 則針對治療侵襲性非霍奇金淋巴瘤，亦完成三期臨床試驗並在美國申請藥物許可證，有望於 2017 年底上市。

(1) CAR 結構 (圖一)

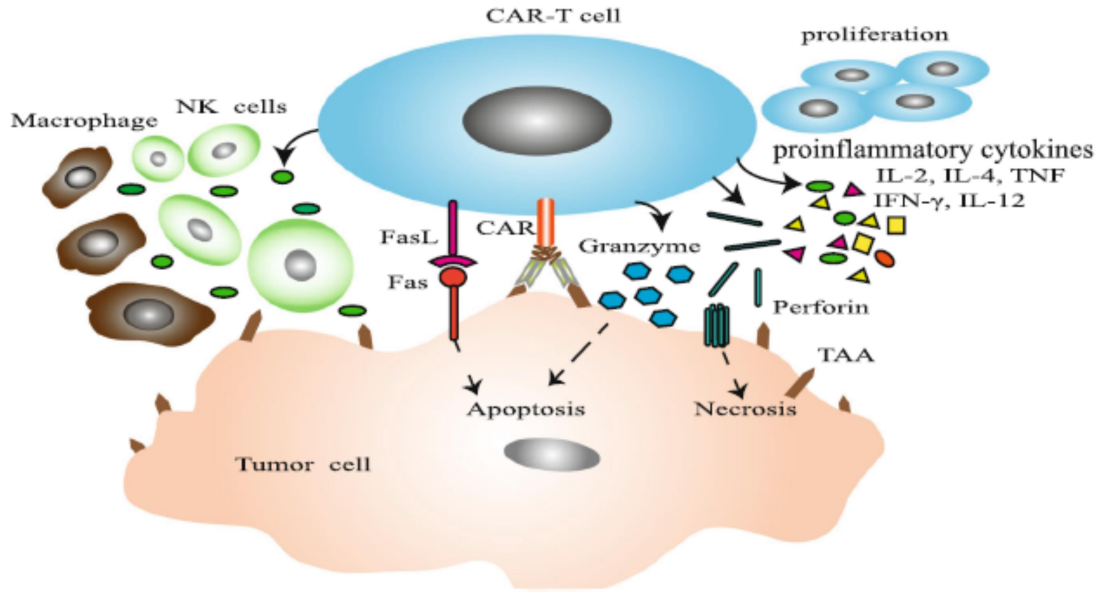
第一代 CAR 包含了一個從單株抗體裡合成的單鏈抗體，連接上 transmembrane domain 和 signal transduction domain (CD3 ζ)。第二代 CAR 額外加入了 1 個 co-stimulatory domains(如 CD28 或 4-1BB)，所以當 CAR-T 細胞和抗原結合後就會引發兩個活化 T 細胞的訊號，因此 T 細胞可以持續活化不會衰亡。多個臨床試驗亦顯示第二代的 CAR-T 細胞在病人體內能持續維持超過六個月高濃度的狀態，引導病人進入長期的血癌緩解。第三代 CAR 則是額外多加了 2 個 co-stimulatory domains。



圖一、三代 CAR 結構 (資料來源:研討會資料)

(2) CAR-T 抗腫瘤機制 (圖二)

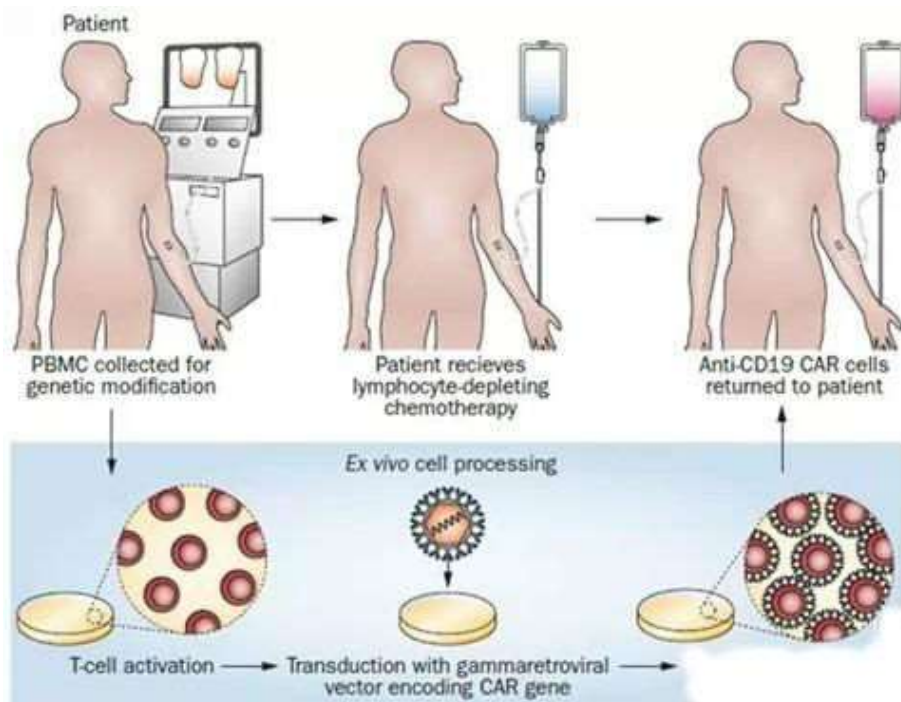
CAR-T 細胞可藉由 CAR 跟腫瘤抗原結合而活化並分泌細胞激素 (如 IL-2、IL-4、IFN-r、IL-12、TNF)，IL-12 可以趨化並活化 NK 細胞及巨噬細胞，活化的 CAR-T 細胞透過分泌 perforin 跟 granzyme 或藉由 Fas/Fas-L 結合，而具有細胞毒殺能力。



圖二、CAR-T 抗腫瘤機制（資料來源:研討會資料）

(3) CAR-T 製造流程（圖三）

利用自動血液分離儀將病人的 T 細胞分離出來並活化，之後利用反轉錄病毒將 CAR 基因轉殖至 T 細胞染色體，幾天後 T 細胞表面便會表現 CAR，增殖至所需要的細胞數目，同時病人接受化療以降低病人的免疫功能，最後再將 CAR-T 細胞回輸至病人體內。



圖三、CAR-T 製造流程（資料來源:研討會資料）

(4) 困境與挑戰

CD19 CAR-T 細胞治療在顯示臨床有效性的同時，也表現出一些臨床副作用，如何改良以降低這些不良反應，也是該治療技術所面臨的挑戰。

1. 細胞激素風暴

這是 CAR-T 技術在臨床應用中最主要的不良反應，由於 T 細胞的大量增殖會釋放過量的細胞激素，進而引起發熱、發燒、肌痛、低血壓、呼吸衰竭等症狀。目前針對 CAR-T 細胞回輸引起的細胞激素風暴，臨床上只能利用 IL-6 受體拮抗藥物 tocilizumab 來緩解。

2. B 細胞發育不全

CD19 CAR-T 細胞治療作用於 B 細胞表面抗原 (CD19)，它不僅能夠殺死腫瘤 B 細胞，也能夠殺死正常 B 細胞，因此 B 細胞發育不全 (低數量的 B 細胞或 B 細胞缺失) 亦是預見的副作用。低數量的 B 細胞降低了製造抗體的能力，使人體對抗感染的的能力下降，目前臨床上只能利用靜脈注射免疫球蛋白來防止患者受到感染。

3. CAR-T 細胞治療目前主要針對血液腫瘤，但對於患者更多的實體瘤 (solid tumor) 研究仍缺乏突破性進展。主要困難點在於實體瘤不同於游離的血液腫瘤，CAR-T 細胞必須侵入實體瘤內部發揮作用，但即使進入腫瘤後，腫瘤內部微環境也可能會抑制免疫細胞產生作用。此外，在實體瘤治療中 CAR-T 細胞對非腫瘤細胞之毒性遠非治療血液腫瘤時 B 細胞發育不全那麼簡單，臨床試驗曾發現一個結腸性轉移的患者在接受 ERBB2 CAR-T 細胞治療 5 天後死亡，調查發現是由於肺部聚積了大量的 CAR-T 細胞，它們辨識肺上皮細胞少量表達的 ERBB2 後引起促炎症細胞激素的大量釋放，過量的促炎症細胞激素造成了肺部毒性、多重器官衰竭，進而導致病人死亡。

(5) 未來展望

1. 實體瘤治療是下一個 CAR-T 細胞治療要攻克的領域，目前已有針對實體

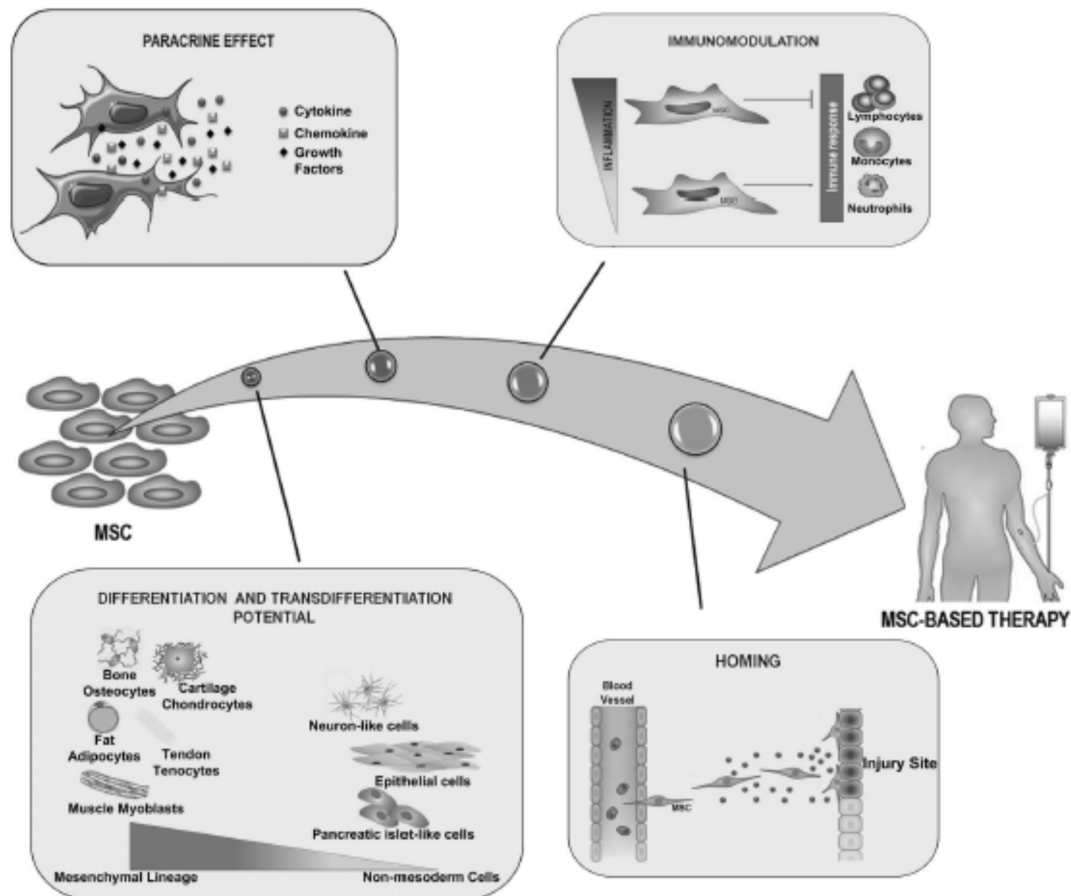
瘤治療（如乳癌、神經瘤、前列腺癌等）的臨床試驗正在進行中。

2. 改良設計以降低對非腫瘤細胞之毒性，可能策略如下：
 - a. 尋找腫瘤特異性更強的抗原（如神經膠質瘤中的 EGFRvIII）。
 - b. 改進 CAR-T 細胞抗原辨識區域的親和力，以較低的親和性辨識抗原高表達的腫瘤細胞，而不攻擊相同抗原低表達的正常細胞。
 - c. 建構雙功能的 CAR，2 個 CAR 同時與腫瘤細胞上之抗原結合時才能活化 CAR-T 細胞，因此，即使其中一個 CAR 可辨識的抗原在正常組織中有少量表達，也不會造成 CAR-T 細胞活化，藉此提高 CAR-T 細胞對腫瘤細胞的特異性。
 - d. 導入自殺開關（如 inducible Casp9 自殺基因）。

（三）間質幹細胞（**mesenchymal stem cell, MSC**）治療

（1）間質幹細胞具有以下特徵（圖四），使 MSC 具有細胞治療的潛力：

1. 分化能力：MSC 具有分化為硬骨細胞、軟骨細胞、肌腱細胞、肌肉細胞、脂肪細胞、類神經細胞、類胰島細胞、表皮細胞等的的能力。
2. 旁分泌（paracrine）作用：MSC 可分泌細胞激素、趨化激素及生長因子。
3. 免疫調節功能：MSC 可抑制過剩的 T 細胞、B 細胞、樹狀突細胞、巨噬細胞、NK 細胞作用，並誘導調節性 T 細胞活化。
4. 歸巢（homing）機制：具有趨向受傷組織的功能。



圖四、間質幹細胞之功能特徵（資料來源:研討會資料）

(2) MSC 在臨床試驗上的應用

1. 移植物對抗宿主疾病（Graft-versus-host disease, GVHD）

GVHD 是一種免疫排斥反應，影響約 50%接受異源性骨髓移植以治療白血病與淋巴癌等癌症的病人，尤其當類固醇治療效果不佳時，有 50-80%的機率會造成死亡；因此，藉由 MSC 免疫調節功能的特性，可以降低發炎細胞激素（TNF- α and IFN- γ ）的產生，並且也可降低 T 細胞複製速率及功能，用以治療對類固醇治療反應不佳的急性 GVHD 病人，可使其存活率增加，並改善排斥症狀（如減少腹瀉、增進細胞層潰瘍的復元及修復皮膚病灶）。

2. 心血管疾病（如心肌梗塞及缺血性心臟病）

希望藉由將 MSC 注射進入冠狀動脈，修補壞死的心肌組織、改善受損心臟的功能。

3. 神經性疾病（如多發性硬化症）

多發性硬化症為一種神經免疫性疾病，由免疫細胞攻擊神經細胞髓鞘，而導致神經訊號傳導失常，希望藉由 MSC 免疫調節功能可以抑制神經發炎反應，保護神經細胞。

4. 軟骨疾病（如退化性關節炎）

希望藉由將 MSC 注射進入關節內進行結締組織的修補，同時調節關節炎處附近的發炎反應，降低因發炎反應所引起的疼痛或不適。

5. 自體免疫疾病（如紅斑性狼瘡）

6. 器官移植（如腎臟移植）

希望藉由將 MSC 注射進入腎動脈，透過免疫調節功能降低排斥現象。

(3) MSC 的鑑別標準

國際細胞治療協會（International Society for Cellular Therapy, ISCT）

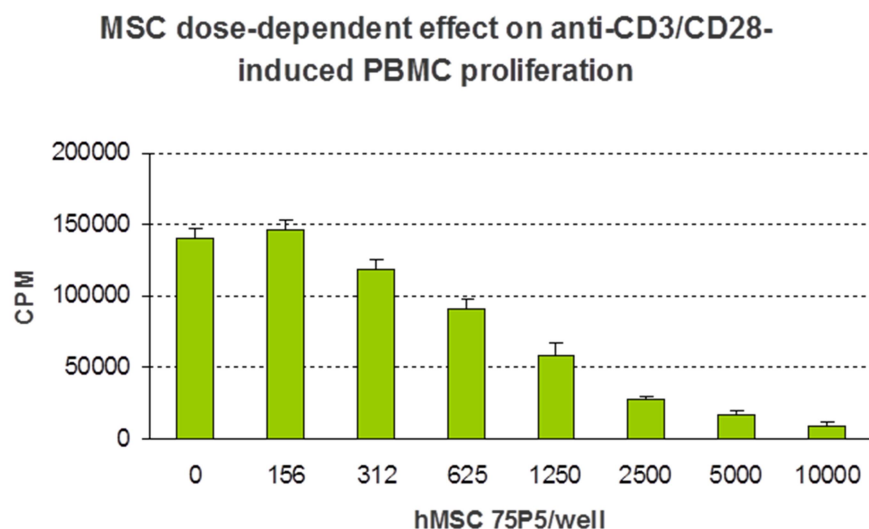
於 2006 年發表間質幹細胞特性的基本標準如下：

1. 在標準的培養條件下可貼覆生長於塑膠材質。
2. 表現特定的細胞表面抗原，CD105、CD73 和 CD90 呈陽性 ($\geq 95\%$) 並且 CD45、CD34、CD14、CD19 和 HLA-DR 呈陰性 ($\leq 2\%$)。
3. 於 *in vitro* 下可分化為成骨細胞（osteocytes）、脂肪細胞（adipocytes）和軟骨細胞（chondrocytes）。

(4) MSC 效價試驗之建立

首先於早期研發階段，根據 MSC 產品特性而利用各種分析方法測試 MSC 的活性，包括 *in vitro* 或 *in vivo* 的功能性（生物活性）測試，藉此測試結果評估哪些效價試驗可能可以反應出預期的療效，效價是決定 MSC 產品有效性的關鍵因子，因此，必須在製程中控管 MSC 的特性，使最終 MSC 產品符合設定的效價，以確保在各研發階段或許可上市後具有品質與療效的一致性。效價試驗除了有助於確保產品的有效性外，亦可用於以下方面：

1. 製程開發：可藉由分析製程各步驟對MSC效價的影響來改善製程之參數，使有療效的MSC族群最大化，亦可減少不必要的細胞族群造成非預期的反應。
 2. 製程變更前後的比較性分析：在各個研發階段常會需要進行製程的變更，為確保製程變更後MSC仍具有相似的細胞活性，因此需以效價試驗評估製程變更對MSC療效的影響。
 3. 產品安定性試驗：MSC治療產品的安定性常以細胞存活率來代表，然而活細胞隨著時間仍可能逐漸失去其生物活性，因此將效價試驗納入安定性試驗中才能確認細胞治療產品的效價是否受儲存條件（溫度或時間）的影響。
- (5) 全球第一個MSC治療產品Prochymal於2005年在加拿大上市，用以治療急性GVHD，以其效價試驗開發流程為範例說明如下：
1. Prochymal最主要是透過免疫抑制的機制來治療GVHD，因此，實驗針對MSC對週邊血單核細胞（peripheral blood mononuclear cell, PBMC）增生的影響來設計，發現MSC對PBMC增生具有劑量依賴效應（圖五）。



圖五、MSC對PBMC增生之劑量依賴效應（資料來源:研討會資料）

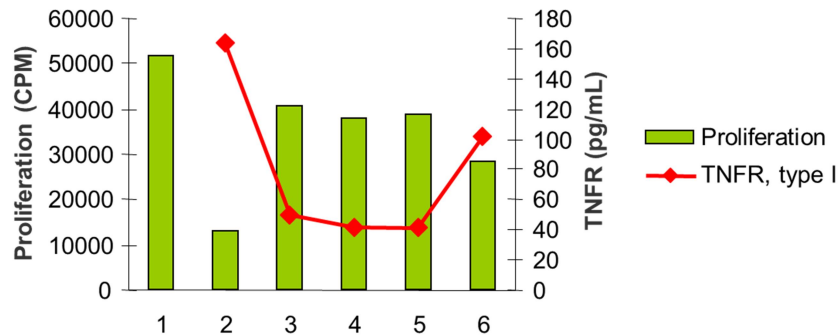
2. 篩選跟抑制 PBMC 增生能力有關的標誌 (表二)

Marker	Justification for marker selection
Prostaglandin E2 (PGE ₂)	PGE ₂ suppresses immune response. MSCs produce PGE ₂ , and PGE ₂ mediates MSC-induced immunosuppressive and anti-inflammatory effects <i>in vitro</i> .
Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enzyme activity	IDO is an enzyme inducible by pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α . IDO inhibits immune response via depletion of tryptophan, an amino acid that is essential for immune cell activation. IDO enzyme mediates MSC-induced immunosuppression <i>in vitro</i> .
Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)	TNF- α is a pro-inflammatory cytokine playing an important role in GVHD. MSCs inhibit TNF- α secretion by immune cells <i>in vitro</i> .
Interferon- γ (IFN- γ)	IFN- γ is a cytokine secreted by Th1 cells that are involved in GVHD development. MSCs can inhibit secretion of IFN- γ that is beneficial for GVHD treatment
Tumor Necrosis Factor- α Receptor (TNFR)	TNFR is expressed on MSCs. TNF α is present in organs targeted by GVHD. TNF- α via TNFR up-regulates secretion of PGE ₂ , induces expression of IDO and stimulates MSC migration <i>in vitro</i> . TNFR is a mediator of MSC biological activities.

表二、跟抑制 PBMC 增生能力有關的標誌 (資料來源:研討會資料)

3. 實驗結果發現 MSC 經過 TNFRI anti-sense oligo 作用降低 TNFRI 表現後，抑制 PBMC 增生的能力亦隨著下降，證實 TNFRI 是可代表效價的標誌 (圖六)

Correlation between TNFRI expression and MSC-mediated immunosuppression



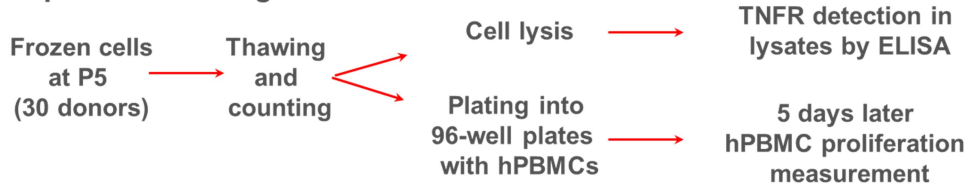
1 - PBMC control; 2 - PBMC+MSC; 3, 4, 5 - PBMC+MSC treated by a 2 μ M, 1 μ M and 0.5 μ M TNFRI anti-sense oligo respectively; 6 - PBMC+MSC treated by a 2 μ M TNFRI sense (control) oligo

圖六、MSC 免疫抑制能力跟 TNFRI 之相關性 (資料來源:研討會資料)

4. 分析來自不同捐贈者的 MSC 其 TNFRI 表現量及抑制 PBMC 增生的能力 (表三)

hMSC analysis from different donors

Experimental Design:



Experimental Results:

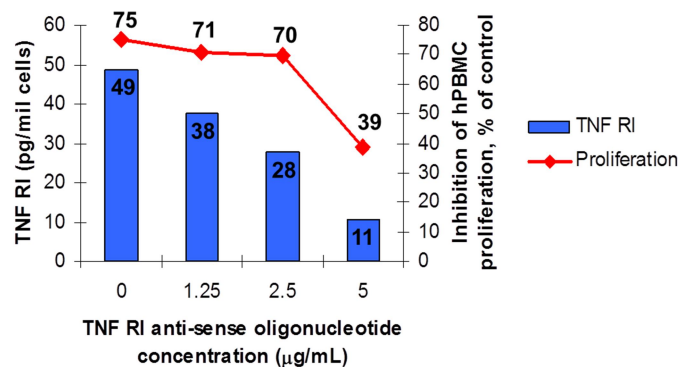
Parameter:	Mean±SD	Range
TNFRI expression	29±7 pg/ 10 ⁶ MSCs	22- 36 pg/ 10 ⁶ MSCs
Inhibition of hPBMC proliferation	59±10%	49- 69%

表三、分析來自不同捐贈者的 MSC 其 TNFRI 表現量及抑制 PBMC 增生的能力 (資料來源:研討會資料)

5. 建立效價試驗 cut-off 值 (圖七)

• Potency cut-off point establishment

Experimental Result: Potency cut off point is 13 pg/10⁶ hMSCs (mean±SD)



圖七、效價試驗 cut-off 值之建立 (資料來源:研討會資料)

6. 應用效價試驗於儲存溫度安定性研究 (圖八), 結果發現效價試驗低於 cut-off 值之儲存溫度 (≥ -60°C), 其細胞解凍後皆未達 70%存活率之標準且亦失去抑制 PBMC 增生的能力。

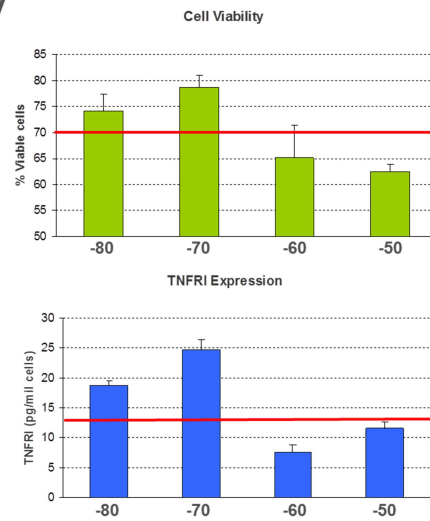
• Temperature tolerance study

Cell storage at higher than -60°C:

— Cell viability < 70%

— TNFRI < 13 pg/ml cells

— No inhibition of hPBMC proliferation in vitro



圖八、儲存溫度安定性研究（資料來源:研討會資料）

（四）無菌試驗替代方法（Alternative methods for sterility test）

關於「細胞治療產品之微生物管控」是品質管制中確保安全性重要的一環，相關內容收載於歐洲藥典（European Pharmacopoeia, EP）第 2.6.27 章，配合細胞治療產品的迅速發展，歐洲藥品品質與衛生保健局（European Directorate for the Quality Medicine & HealthCare, EDQM）亦在最近修訂藥典內容，並於 2017 年 7 月 1 日開始生效，其修訂重點如下：

- （1）修訂名稱為「細胞製劑之微生物檢驗」（Microbiological Examination of Cell-Based Preparations）
- （2）應考量產品的特性與製造之相關限制
 1. 效期：細胞製劑效期取決於細胞特性與保存狀態，對於不須冷凍保存之細胞製劑，效期通常不超過 3~4 日，有時不超過數小時，此類產品無法依據 EP 2.6.1 於注射前測定最終成品的微生物狀態。「迄今陰性（Negative-to-date）」係作為產品尚未完成檢驗時的中間讀值，若細胞製劑有效期限限制，經確認「迄今陰性」之讀值可為檢驗結果。
 2. 檢品組成：微生物污染源可能存在於細胞表面、細胞內或其他基質中，若

僅分析上清液（如培養或運送用培養基）可能無法偵測到。除另經核准，待測檢品須涵蓋細胞製劑之所有組成成分。

- (3) 培養條件之選擇：檢品應儘速接種至培養基容器培養至少 7 日，根據方法適用性測試及考慮相關微生物的檢出結果，培養時間可延長至 14 日。培養溫度的選擇應能偵測廣泛之微生物，通常為 30~37°C，然而保存期限極短之細胞製劑，不低於 35°C 之生長加速溫度（growth-accelerating temperature）為較適合獲得「迄今陰性」讀值之溫度。此外，若製劑有顯著環境汙染風險，使用兩種溫度範圍：20~25°（好氧性）及 30~37°（厭氧性），以涵蓋環境及臨床上微生物之影響。表四列出選擇培養溫度之可能替代方案。

	好氧性微生物培養	厭氧性微生物培養
選項一	20~25°C（自動化系統） 必要時 30~35°C（自動化系統）	30~35°C（自動化系統）
選項二	35~37°C（自動化系統） 必要時，增加低溫培養（手動方法）*	35~37°C（自動化系統）
選項三	30~32°C（自動化系統）	30~32°C（自動化系統）
選項四	30~32°C（自動化系統）	35~37°C（自動化系統）

* 培養於 20~30°C，可購買市售微生物培養基，如用於自動化系統之好氧性培養瓶或大豆分解蛋白質—乾酪素培養基。

- (4) 檢品取樣後應儘速加入培養基中。若需儲存檢品，則需評估儲存對潛在汙染之影響。若接種瓶於放入自動化培養系統前已儲存超過 12 小時，每一接種瓶須進行繼代培養以排除偽陰性。若微生物可生長快速且為最佳培養條件，微生物可能於儲存期間即開始增殖。由於測試期間相關參數可能無顯著增加，恐造成自動化培養系統無法辨識微生物汙染而產生偽陰性。
- (5) 新增替代方法（alternative methods）

1. 結合預先培養及偵測

首先將待測檢品於好氧性與厭氧性液體培養基或效能相當之固體培養基

進行短時間培養（如依所選用替代方法之靈敏度培養 12~24 小時），之後再以適用於微生物快速偵測之替代方法（如核酸擴增技術、流式細胞儀及生物冷光等）來檢驗。

2. 直接偵測

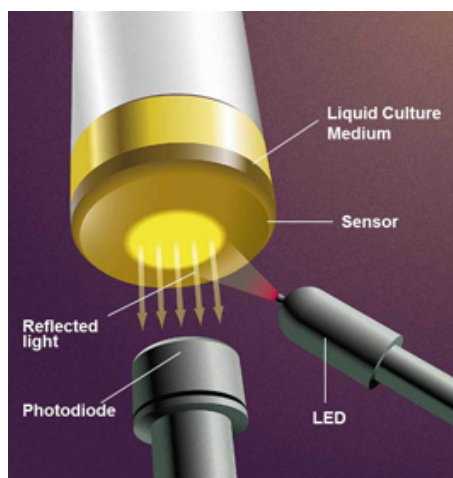
若細胞製劑效期非常短（如幾小時內）或標準方法無法提供對微生物理想的偵測時，則可利用不經培養的直接偵測法（如核酸擴增技術、流式細胞儀及生物冷光等）進行微生物檢驗。

● 無菌試驗檢測方法介紹：

(1) 已商品化之「自動化生長法」（automated growth-based methods）

1. VersaTREK：其原理係利用於培養瓶上端接上壓力感應連接器，以偵測微生物生長及代謝後，瓶頸空間氣體的消耗或產生而造成壓力的變化。

2. BacT/ALERT：其原理（圖九）係於培養瓶底部含有顏色感應器（colorimetric sensor），當微生物於瓶內生長時，會釋放出二氧化碳，經由瓶底的半滲透性薄膜至感應器，二氧化碳與水飽和後，會產生氫離子來改變感應器的酸鹼質，顏色會由深綠色變為黃色。當培養瓶放入儀器的偵測腔後，每一腔底各有一組 LED 雷射器及反射光感應器（Photodiode），隨著培養瓶底部酸鹼質變化而造成顏色感應器之顏色改變，其反射光度（Reflection unit）亦會改變。



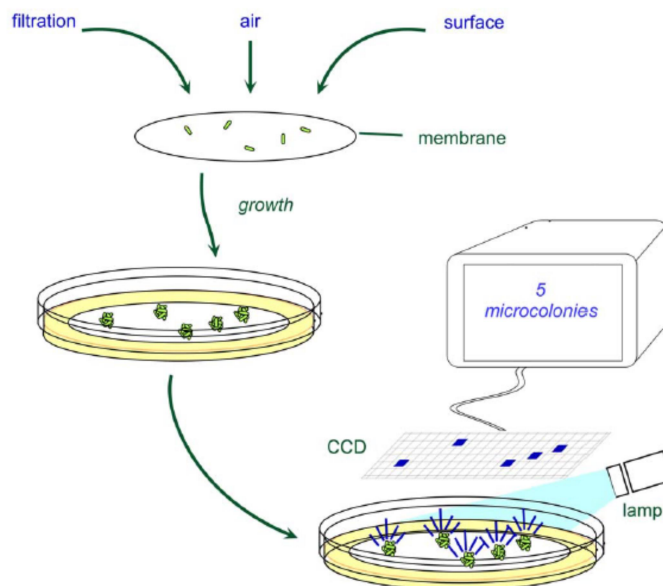
圖九、BacT/ALERT 檢測原理（資料來源:官方網站）

3. BD BACTEC：其原理係利用微生物生長及代謝後產生的二氧化碳而改變 pH 值，經由培養瓶底部的半透性薄膜傳至含有螢光劑的感應器，螢光產生的強度隨著二氧化碳濃度上升而成正比的增加。

(2) 已商品化之「替代方法」(alternative methods)

1. Growth Direct，其流程如下(圖十)：

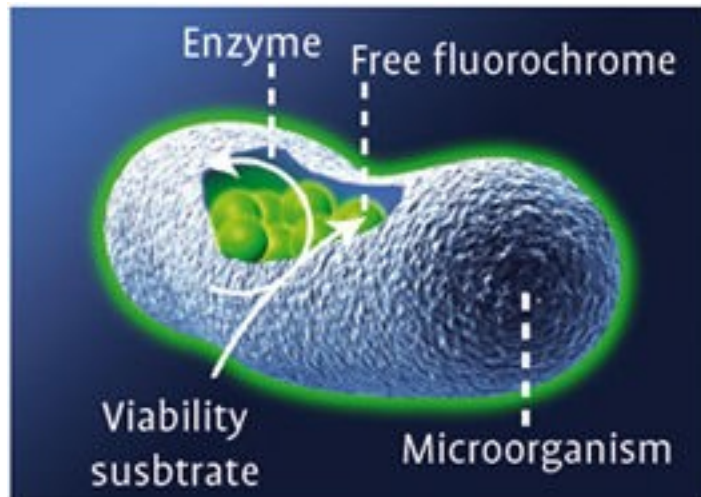
將檢品過濾吸附在膜上後置於培養基培養，再利用藍光激發偵測細胞自體螢光 (autofluorescence)，之後透過影像系統偵測螢光即可判定是否有微生物污染。



圖十、Growth Direct 之檢測流程 (資料來源:官方網站)

2. ScanRDI，其流程如下(圖十一)：

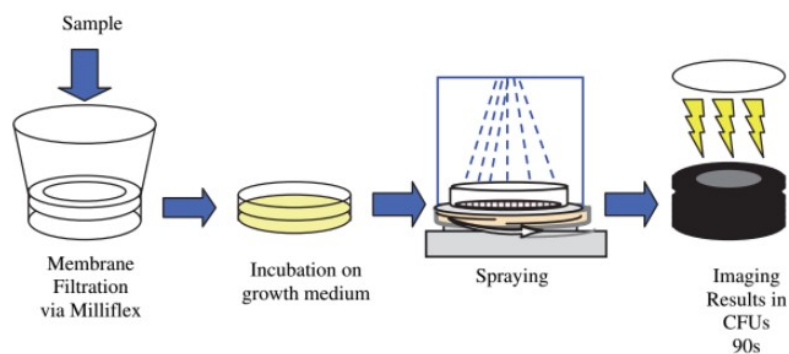
將檢品過濾吸附在膜上，不需經過培養，再將特殊染劑加入膜上，染劑會穿透細胞膜進入微生物體內，活細胞內的酵素會對染劑作用而釋放出螢光小體 (fluorochrome)，螢光小體會聚積在細胞內，再利用雷射激發來釋放出螢光，之後透過影像系統偵測螢光即可判定是否有微生物污染。



圖十一、ScanRDI 之檢測原理（資料來源:官方網站）

3. Milliflex Rapid，其流程如下（圖十二）：

先將細胞製劑用含有 Triton X-100 之試劑溶解（該試劑不會對微生物造成傷害），再利用 apyrase 將細胞溶解後釋放出之 ATP 分解，此前處理為去除細胞內 ATP 干擾偵測之步驟，結束後將檢品過濾吸附在膜上後置於培養基培養，之後利用機器噴灑 ATP-releasing reagent 將微生物胞內之 ATP 釋放出來，再噴灑含有冷光素（luciferin）及冷光素酶（luciferase）之生物冷光試劑（bioluminescent reagent），在 ATP 及冷光素酶同時作用下，會使冷光素產生一連串化學反應而產生冷光，由於 ATP 存在於所有活的生物體內，在去除細胞內 ATP 干擾後，ATP 可成為偵測微生物污染之良好標誌，透過影像系統偵測冷光即可判定是否有微生物污染。



圖十二、Milliflex Rapid 之檢測流程（資料來源:官方網站）

4. Universal PCR:其原理係利用 real-time PCR 偵測細菌 16S rRNA 基因。

(五) 細胞治療產品之生物保存 (Biopreservation)

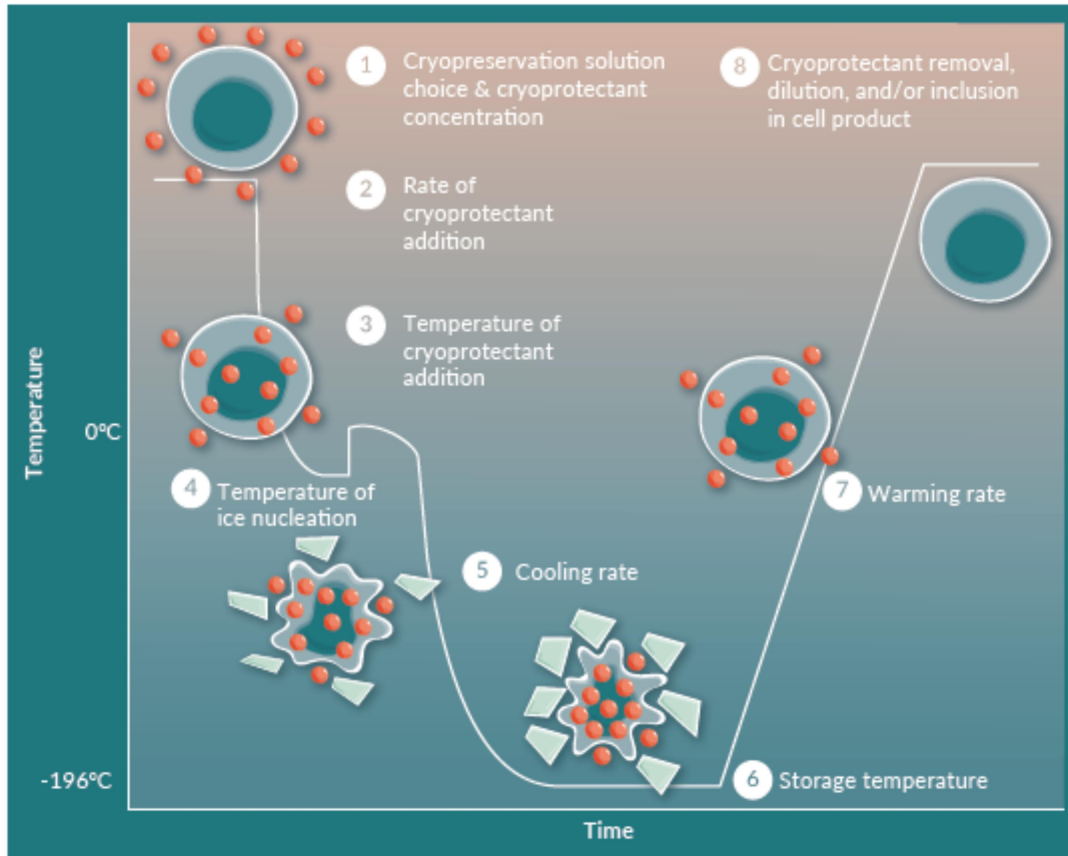
由自體 (autologous) 或異體 (allogeneic) 細胞製成之細胞治療產品，最後在應用到病人身上前，通常需要經過適當的儲存或運送，例如 MSC 治療產品會以冷凍保存 (cryopreservation) 方式建立細胞庫，以確保產品功效之一致性;細胞治療產品從製造完成到運送至病人手中亦需要時間，通常會以低溫保存

(hypothermic storage) 方式以確保在一段期間內可維持原有產品活性。良好的生物保存條件可確保細胞在由冷凍或冷藏回復正常狀態時，產品可以具有高的細胞存活率及維持原有活性，因此生物保存是細胞治療產品實際應用於臨床上之重要課題，探討如下：

(1) 冷凍保存之關鍵步驟 (圖十三)

1. 冷凍保存液之選擇及冷凍保護劑之濃度
2. 加入冷凍保護劑之速率
3. 加入冷凍保護劑之溫度
4. 冰核 (ice nucleation) 形成溫度
5. 降溫速率
6. 儲存溫度
7. 解凍速率
8. 細胞產品中冷凍保護劑之移除、稀釋或保留

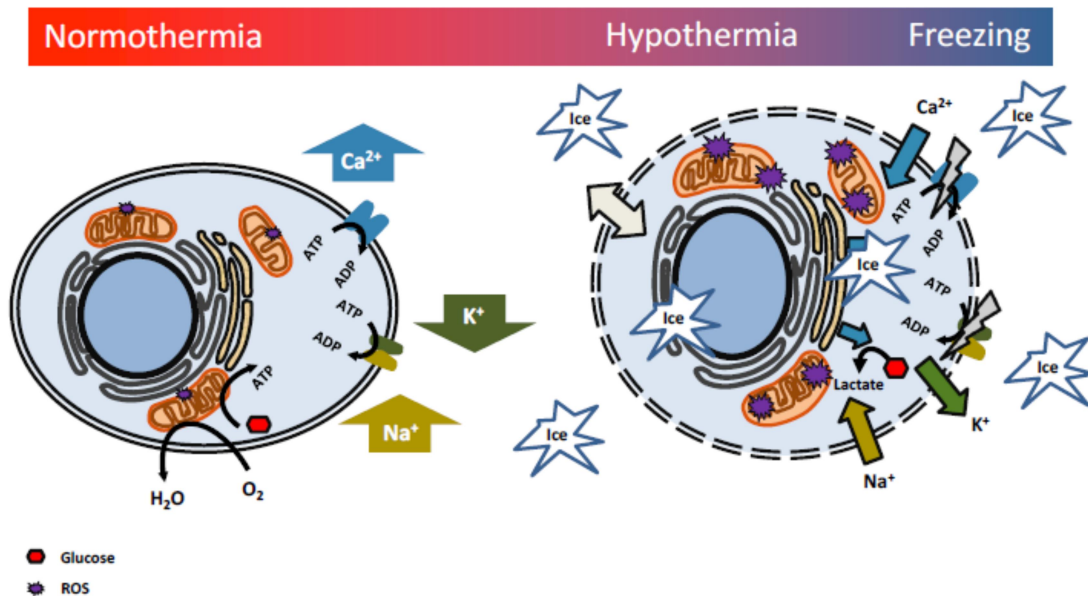
Critical steps in the cryopreservation process.



圖十三、冷凍保存之關鍵步驟（資料來源:研討會資料）

(2) 低溫或冷凍狀態對細胞之影響（圖十四）

1. 增加細胞膜之通透性、降低細胞膜上離子幫浦（ion pump）之活性，使得鈉離子、鈣離子流入胞內，鉀離子流出胞外，造成胞內離子平衡被破壞及滲透性細胞腫脹。
2. 造成粒腺體功能受損，使得氧自由基（oxygen free radicals）增加而破壞細胞膜。
3. 葡萄糖經由糖解作用產生乳酸，使得胞內 pH 值下降而造成細胞損傷。
4. 於胞內、胞外形成冰晶而破壞細胞膜。

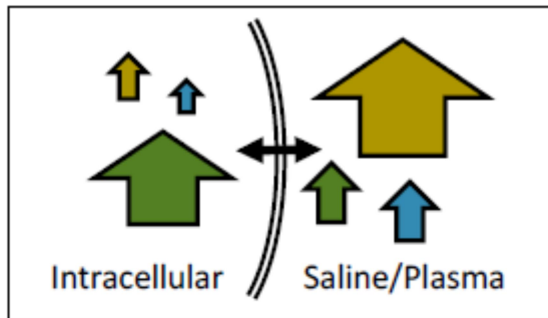


圖十四、低溫或冷凍狀態對細胞之影響（資料來源:研討會資料）

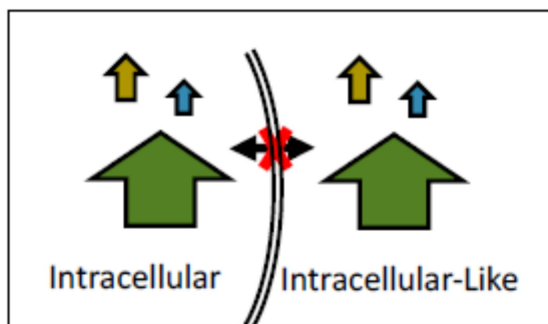
(3) 冷凍保存液及冷凍保護劑之選擇

1. 選擇與胞內離子濃度成分相似之冷凍保存液，可降低不受控制的離子流動（圖十五）。
2. 冷凍保存液加入多糖體及非滲透性大分子來增加胞外滲透壓，以降低滲透壓性腫脹及細胞膜損傷。
3. 選用高張（hypertonic）之冷凍保存液促進細胞快速脫水（dehydration），以降低胞內冰晶形成之可能性。
4. 冷凍保存液內加入適當抗氧化劑，以降低氧自由基對細胞之影響。
5. 冷凍保存液內含有對溫度低度敏感之 pH 緩衝液，以緩衝因為細胞內乳酸生成時所造成之 pH 值下降。
6. 冷凍保護劑可以透過減少胞內冰晶形成及減緩冷凍過程中離子與鹽類濃度之上升來達成保護作用。常用的冷凍保護劑為具有膜穿透性之 DMSO，尚可加入非膜穿透性之冷凍保護劑，以降低使用單一冷凍保護劑所造成之可能毒性。

Plasma/growth media triggers improper ion flow



An intracellular-like media minimizes ion movement



圖十五、細胞內外離子流動（資料來源:研討會資料）

肆、心得與建議

1. 不同於其他藥品，「產量有限及效期短」是細胞治療產品之特性，因此在 GMP 規範（如製程確效及檢品留樣）及品質管制措施（如無菌試驗）都有限度的放寬或允許以替代方法來執行。但 GMP 為確保產品之安全性，特別針對效期短、在最終產品無菌試驗結果出來之前即須對患者進行治療之細胞治療產品，嚴格規範無菌製程確效每 6 個月必須進行一次。
2. 本次研討會多數與會者為來自歐美之產學界，此外，亦有 2 位來自日本產業界代表，會中也跟日方有所交流並瞭解日本目前再生醫療之發展現況，目前在日本上市之再生醫療產品有 2 件，說明如下：
 - (1) TEMCELL：為 Prochymal 在日本上市之名稱，於 2015 年核准上市，其為異體骨髓間質幹細胞產品，適應症為造血幹細胞移植後的急性移植物抗宿主疾病（GVHD）。
 - (2) HeartSheet：於 2015 年有條件核准（conditional approval）上市。為從患者大腿骨骼採集肌母細胞（myoblast），進行培養後再行移植至患者心臟表面之再生醫療產品，適應症為治療缺血性心臟病所造成之嚴重心衰竭。
3. 一般生物製劑之最終產品應經過無菌試驗合格才能放行，歐洲藥典針對細胞治療產品之微生物管控亦制定有專章（EP 2.6.27），因為細胞治療產品有效期短而經常在最終產品無菌試驗結果出來之前即須對患者進行治療之特性，因此 EP 2.6.27 最新修訂版本（於今年 7 月 1 日生效）特別新增替代方法，以縮短偵測微生物污染所需要的時間，若以無菌試驗通則（EP 2.6.1）進行微生物檢測需培養 14 日才可進行結果判斷，而以自動化生長法進行檢測則需要培養 7 日，但以目前商品化之替代方法（如 Growth Direct、ScanRDI、Milliflex Rapid）則只需要不到 1 日的時間即可偵測到是否有微生物污染。建議可評估採購微生物快速檢驗相關設備以強化國家實驗室檢驗效能，並規劃將最新版 EP 2.6.27 內容納入本署每年編撰之生物藥品檢驗基準中，以供各界參考並達成國

際協和化之目的。

4. 目前的細胞治療產品大多數是源自於自體細胞，因為無法大量生產所以價格相當昂貴，以最近核准的 CD19 CAR-T 細胞治療產品 Kymriah 為例，進行一個療程就需要 47.5 萬美元（約 1,440 萬台幣），因此未來勢必要朝向自動化生產及異體細胞治療方面開發，才能降低接受細胞治療的門檻，此外，在細胞治療產品可量產前，通常需要以冷凍方式建立細胞庫，因此，生物保存亦是關鍵步驟，良好的生物保存條件可確保細胞在由冷凍回復正常狀態時，產品可以具有高的細胞存活率並維持原有活性。
5. 參與該研討會，除瞭解最新新興先進醫療產品發展現況、挑戰及未來趨勢外，亦獲得 GMP 規範及無菌試驗替代方法之品質管制相關資訊，此外，並藉此會議跟各國相關領域專家建立交流管道，對建立與國際規範協和之細胞治療產品品質管制與檢驗技術相關指引有相當助益，建議持續編列經費派員參與相關國際研討會議，以利持續修訂與更新相關技術規範，與國際接軌。