

## 分子牧場之應用與開發 II

# 基因轉殖豬生產 人類第九凝血因子

撰文/張有勝

### 一、前言

傳統製藥主要是利用有機合成或微生物發酵方式生產小分子藥物，如抗生素類；但許多因蛋白質活性喪失或退化所引起的疾病，以及遺傳性疾病等，並無有效的小分子藥物可供治療，必須藉由補充該酵素或蛋白質才能達到治療或預防的效果，如用來治療糖尿病的胰島素與治療血友病的凝血因子等。隨著生物技術的長足進步，近年來生技廠商開發蛋白質藥物已成為主流趨勢且快速成長。蛋白質藥物市場在過去幾年中，從 2001 年的 250 億美元成長到 2006 年的 600 億美元，年成長率在 15% 以上，雖然目前蛋白質藥物僅佔全球藥品市場的 8.5% 左右，但成長性高於小分子藥物，預估 2010 年銷售額將達到 910 億美元以上。因此，蛋白質藥物市場具有相當吸引人的市場潛力。

蛋白質藥物的生產大多是由細菌、酵母菌醱酵或哺乳動物細胞培養而得，由於此種生產方式的設備及操作成本、原料、專業人力與品質控制等均相當昂貴，而且細胞培養所生產的蛋白質濃度很低，使得製造成本相當高。建造一座生產蛋白質藥物的 20 噸細胞發酵槽需耗時 2~3 年，費用更高達美金 2.5 億元以上，由於生產製造的量能不

足，無法滿足現階段的龐大需求，新建生產設施緩不濟急，此即生技藥品價格居高不下的原因之一。因此，生技公司莫不積極尋找生產蛋白質藥物的替代方法，希望可以提高產量、節省時間並降低成本，以提高生產的經濟效益。

自從 1980 年成功產製第一隻基因轉殖小鼠，至 1985 年間陸續成功產製基因轉殖豬、綿羊及家兔，自此動物之基因轉殖科技蓬勃發展。1987 年美國國家衛生研究院 (NIH) 的科學家首度證實基因轉殖動物可以用來生產蛋白質藥物後，利用動植物作為生物反應器 (bioreactor) 生產醫療用蛋白質遂應運而生，近年來許多生技公司相繼投入以各種基因轉殖動物 (如牛、綿羊、山羊、豬或兔) 的乳腺或血液作為生產醫用蛋白質的表現系統，期能大幅降低藥用蛋白質的生產成本。理論上，利用基因轉殖動物可以大量生產藥物卻不危及動物本身的健康，同時能將生產醫療用蛋白質的能力遺傳到下一代，因此，飼養一群動物即是一座生產蛋白質藥物的製藥工廠，此即農場製藥 (Pharming、BioPharming) 或分子牧場 (Molecular Farming)。將人類基因植入山羊、綿羊、豬與其他哺乳動物的染色體中，使動物乳汁中得以產出醫療用蛋白質，如治療血友病的凝血因子，再將這

些蛋白質進一步從乳汁中萃取純化後製成藥物，此方法較細胞培養成本更低且有效率。

## 二、基因轉殖動物生產醫藥產品之技術平台

基本上家畜禽產業利用基因轉殖技術可分為三大用途，即醫療、食品與工業用途，在醫療方面又可再區分為蛋白質藥物、疫苗、活性代謝物、異種器官與疾病動物模式等，屬新興的生技領域，極具發展潛力，其中又以生產蛋白質藥物的發展最成熟(表一)，國際上相關法規已臻完備，且已有產品通過上市核准即將上市。以基因轉殖動物生產醫藥用蛋白質是將人類基因重組 DNA，以顯微注射 (microinjection) 方式直接注入授精卵中，再送入授胎動物體內發育成個體；或是先將 DNA 送入細胞，經細胞篩選後再以複製技術 (cloning) 發育成動物個體，待雌性轉殖動物成熟後利用乳腺細胞合成並分泌該基因所對應的蛋白質。因此，在動物乳汁中表現的重組蛋白質與人類自然產生的蛋白質具有相同的胺基酸序列，可以適當的折疊、組合，同時具有哺乳動物的醣化型態及生物活性，雖然其類型可能有別於人類的型態。

以基因轉殖動物生產外源蛋白質時，必須考

慮幾點因素，包括遺傳特性、動物種類、泌乳量多寡、世代傳承的容易性、特定組織表現的可行性(如在乳腺、血液、或雞蛋中)，以及蛋白質的品質(如安定性、功能性與人體內半衰期等)。以小鼠為例，雖被廣泛應用作為研究各種人類疾病的基因缺損模式，亦用於開發多種擬人化抗體 (humanized antibodies)，但作為生物反應器生產醫用蛋白質卻因其產乳量低而實用性不高。除哺乳動物外，近來亦有生技公司開發以家禽的蛋生產蛋白質藥物。

目前全球至少有 20 家以上的生技公司開發基因轉殖動物生產蛋白質藥物，這些公司或獨立研發或與國際級藥廠合作，積極改良技術並降低藥物開發成本，以提高各種基因轉殖動物生產重組蛋白質的產能。主要開發此種技術的公司有 Genzyme Transgenics Corp. (GTC)、PPL Therapeutics、Pharming Group NV、Nexia Biotechnologies、Abgenix 與 Medarex 等，除美國 GTC 開發的抗凝血酶 III (anti-thrombin III) 外，大多數產品則仍處在研發或臨床試驗階段。抗凝血酶 III 是全球第一個以基因轉殖動物生產並獲准上市的藥物，已於 2006 年 8 月獲歐盟醫藥評估機構 (European Medicament Evaluation Agency, EMEA) 核准，預計將在 2007 年第二季上市；英國的 PPL

表一 基因轉殖家畜在醫療應用的進展

	Experimental stage	Advanced experimental stage	Transition experimental/practical use	Practical use
分子牧場				
蛋白質藥物	██████████	██████████	██████████	██████████
抗體生產	██████████	██████████	██████████	██████████
異種移植				
器官	██████████	██████████	██████████	██████████
組織/細胞	██████████	██████████	██████████	██████████
疾病動物模式	██████████	██████████	██████████	██████████

資料來源：Transgenic farm animals: present and future, Rev sci tech., 2005.

Therapeutics 利用綿羊生產用來治療先天性肺氣腫 (Emphysema) 及纖維囊腫 (Cystic fibrosis) 的重組抗胰蛋白酶 ( $\alpha$ -1 anti-trypsin)，已完成第二階段臨床試驗，然而由於嚴重的副作用使得第三期臨床試驗失敗，公司轉售結束營運；荷蘭的 Pharming 主要是開發兔、牛與老鼠等不同動物生產各種人類蛋白質以治療胃痛及其他出血性疾病，其中以基因轉殖兔子生產人類 C1 inhibitor 重組蛋白用來治療遺傳性血管腫 (Hereditary angiodema) 進展最成熟，目前進行到第三期臨床試驗；加拿大 Nexia 則是從基因轉殖羊奶生產 Protexia™ (一種 human butyryl-cholinesterase)，可保護免於神經藥劑和其它有機磷酸酯毒素的傷害，此外也以基因轉殖羊奶生產蜘蛛絲蛋白應用在國防工業。Abgenix 與 Medarex 則是以基因轉殖小鼠開發人類單株抗體藥物，Abgenix 已在 2005 年 12 月被 Amgen 收購，Medarex 則有多項單株抗體藥物進展到臨床試驗階段。

基因轉殖動物生產蛋白質藥物最大的問題是動物品種的選用及研發耗時，雖然技術上已能製造基因轉殖動物，然而不同物種的生命週期不同 (參考表二)，產仔數目也不同，故順利獲得預期基因轉殖動物的難易程度也不同。而且生命週期更直接關係蛋白質產產所需的時間，目前大約需

3-5 年的時間或更久，方能開發出一隻基因轉殖動物並生產得到一批可供臨床試驗用的產品，視動物種別而定。因此，選取合適的動物品種及有效縮短轉殖動物的開發時程，才有可能將此生產平台轉變為高經濟效益的企業經營模式，進而大幅提升動物的商業價值。

### 三、基因轉殖豬生產人類第九凝血因子

人類第九凝血因子 (human factor IX, hFIX) 為人體內血液凝集反應的重要因子之一，B 型血友病 (Hemophilia B) 患者即為 hFIX 先天缺陷者，因而導致凝血功能異常，此疾病屬性聯遺傳 (基因位在 X 染色體上)，故以男性患者居多，其發生率約 1/30,000。目前，治療 B 型血友病的方式主要仍是補充凝血因子，來預防或是治療血友病患的出血症狀，目前主要使用的產品有濃縮血漿製品及基因重組蛋白產品兩類。然而，血漿製劑須由正常人血漿中純化而得，凝血因子在血漿中含量極低，純化成本非常高；而且人類血液中可能存在的諸多病原，如 B 型、C 型肝炎病毒 (HBV、HCV)、後天性免疫不全病毒 (HIV)、細胞巨型病毒 (CMV)、皰疹病毒 (HSV) 等，如未能完全清除病毒，長期使用可能有感染病毒的危險，因此，市場已逐步遭重組蛋白產品所取代。目前國內醫

表二 不同動物生命週期與泌乳情形之比較

動物	懷孕期 (月)	子代數	性成熟所需時間 (月)	泌乳期 (月)	年產乳量 (L)
牛	9	1	16	33	8,000-9,000
豬	4	10	6	16	300
山羊	5	1-2	8	18	800-1,000
綿羊	5	1-2	8	18	500
兔	1	8	5	7	4-5
小鼠	19-21 天	10-12	1-2	1	0.015
雞	20 天	250/年	6	-	-

資料來源：Production of therapeutic proteins from transgenic animals, BioBusiness, 2001.



院已有使用基因工程製造的重組蛋白質產品，除了可避免病毒的感染，同時不受血漿來源短缺的限制，但缺點是價格昂貴。Genetics Institute, Inc. (於 1992 年被美國 Wyeth 公司收購) 是第一個利用基因工程生產重組 hFIX (recombinant hFIX, rhFIX) 的公司，以基因重組技術將選殖的人類第九凝血因子基因，植入中國倉鼠卵巢細胞 (Chinese Hamster Ovary cells, CHO cells) 中生產 rhFIX (商品為 BeneFIX®)，BeneFIX® 於 1997 年取得美國 FDA 新藥核准，我國衛生署亦於 1998 年核准上市。

除了利用 CHO 細胞生產 rhFIX，國際上也有生技公司投入開發以基因轉殖動物的乳腺生產 rhFIX，包括 PPL Therapeutics、Pharming、Progenetics LLC 與美國紅十字會 (American Red Cross) 等。PPL Therapeutics 以綿羊為生產系統，由於所生產的 rhFIX 不具生物活性，已停止開發計畫；Pharming 以兔為生產系統，目前仍在研發階段；美國紅十字會與 Progenetics LLC 則是開發以豬的乳腺生產 rhFIX，目前也還在研發階段。2007 年 2 月，印度 Intas Biopharmaceuticals Ltd. (IBPL) 宣布與 Progenetics LLC 進行策略聯盟，發展以基因轉殖動物生產藥物進行臨床試驗，並在印度以及國外市場銷售藥物，其第一個發展的藥物即為 rhFIX，IBPL 認為第九凝血因子雖然市場有限，但往往被一般藥商忽略，就印度而言，估計有超過 5000 名 B 型血友病患者，應具市場潛力。由此可知，雖然 B 型血友病患人數不多，國際上也已經有公司注意到此市場，也同樣認同相較於以細胞培養生產高價的藥物而言，利用基因轉殖動物生產具有高產量優勢，因此可以大幅降低成本。

我國自 1995 年起，學研界即開始基因轉殖家畜生產蛋白質藥物之研發工作，台灣大學鄭登貴教授所帶領的研究團隊，過去十多年來投入動物基因轉殖和複製科技的研發，成功產出多種不同基因的轉殖家畜。國內主要投入的研究單位則有

「財團法人台灣動物科技研究所」(簡稱動科所) 與「農委會畜產試驗所」(簡稱畜試所)。動科所自台大鄭教授實驗室引進豬乳鐵蛋白 (lactoferrin) 及人類第九凝血因子 (hFIX) 的雙基因轉殖豬，進行畜群放大及生產蛋白質原料藥之開發工作，並同步建立產業化之相關技術與設施；畜試所則是與台大鄭教授及中興大學陳全木教授合作，開發人類第八凝血因子 (hFVIII) 的基因轉殖乳山羊，已證實 F1 後裔仍可表現 rhFVIII，將進一步確認其乳中 rhFVIII 之生物活性，以評估其產業效益。

動科所開發的雙基因轉殖豬，係以乳腺專一性啟動子 (乳白蛋白  $\alpha$ -lactoalbumin) 調控豬乳鐵蛋白及 hFIX 基因在豬的乳腺細胞表現並分泌到乳汁中，整個泌乳期 (採乳實務運作約 5 週左右) 均可穩定表現高量 rhFIX，每公升乳汁達 250 mg 以上，此成果已獲得美國及我國之專利。配合執行經濟部法人科專計畫之『基因轉殖動物生產蛋白質原料藥之開發』，動科所同步建立產業化之相關技術與適量產設施，包括：SPF 級種源庫之建立、豬隻自動擠乳設備 (取得中華民國新型專利)、符合 cGMP 精神之試量產純化製程 (去除酪蛋白技術獲得美國及我國之專利)、製程與產品生物安全檢測、病毒清除確效、rhFIX 產品生化分析 (產品純度 99% 以上)、不純物鑑定、退化產物與安定性分析等，並將 hFIX 基因轉殖豬進行隔離田間試驗，做為產業化前動物安全性評估。所生產的 rhFIX 經體外功效試驗結果證明，其凝血活性優於 BeneFIX® (CHO cells 生產的 rhFIX)，後續的動物體內功效評估 (以 FIX 基因缺陷小鼠進行試驗)、藥動藥效學評估及免疫原評估試驗，也將在今 (96) 年度陸續完成。之後，rhFIX 之開發將進展到申請新藥研發 IND (investigation new drug) 前的準備工作，明年度將委託國內已取得 FDA 認可的 cGMP 工廠 (如生技中心、永昕生醫公司) 進行 rhFIX 批次純化，作為後續毒理試驗與人體臨床試驗的需求，預計最快 2 年的時間可以完成毒理試驗等臨床前所需之



基因轉殖豬採乳作業

評估試驗，及相關法規文件整理，以申請 IND。

至目前為止，以基因轉殖動物生產 rhFIX 的進展，動科所的研發成果並不遜於其他先進國家，十分具有競爭力。為推動 rhFIX 成爲我國研發的第一個蛋白質新藥，建立新型態的蛋白質藥物生產平台，並且真正落實產業化，動科所現階段正積極規劃建立『豬隻分子牧場』以配合 rhFIX 的產品開發進度。爲確保由動物來源生產的醫藥產品安全無虞，必須是無特定病原 (specific pathogen free, SPF) 等級以上之『分子牧場』，配合基因轉殖豬及複製豬產製技術，及 SPF 豬隻之設施、飼養管理與疾病監控，遵循優良實驗室或牧場操作 (good laboratory or farm practice, GLP or GFP) 之規範，並可符合美國 AAALAC 之認證。就動物科技與醫藥產業發展而言，『SPF 豬隻分子牧場』十分關鍵，爲產業瓶頸所在，也是一般藥廠所不熟悉且不願投資的領域，此恰巧爲我國傳統畜牧獸醫產業專長之處，配合現代基因科技與複製等技術，進行畜牧產業轉型升級，補足現代生物醫學需求。

#### 四、分子牧場—台灣畜牧產業再升級

絕大部分蛋白質藥物是人體原有的蛋白質或其突變體，以彌補某些體內蛋白質的功能缺損或增加體內蛋白功能爲主要作用，因其功能的專一性與特殊性，安全性顯著優於小分子藥物，因而具有較高的核准率。此外，蛋白質藥物的臨床試驗期比較短，專利保護相對延長，製藥公司因此有更長的獨家銷售時間，這些都成爲蛋白質藥物研發的重要動力。以細胞培養作爲生物反應器生產重組蛋白質藥物，雖然生產成本依蛋白質的種類、蛋白表現量及生物反應器產能規模而有所不同，但都十分昂貴，以致市場價格居高不下。這也是全球之所以積極開發以基因轉殖動物生產蛋白質的最主要原因。即使上游的動物飼養維持在 SPF 等級以上，以基因轉殖動物的乳腺中生產蛋白質，其生產成本只有細胞培養系統的 1/10 不到，甚至更低。而且，基因轉殖動物的生產系統除成本具有相當的競爭優勢外，所生產的蛋白質其蛋白質結構、穩定性與生物活性也優於其他生產方式。因此，基因轉殖技術有機會成爲下一波的蛋

白質藥物生產系統的主流，而動物製藥工廠將以其特殊的生產方式與產能，供應全球生技藥品的醫療市場需求。

生技醫藥之研發不論是小分子或蛋白質藥物，或其他相關研發成果，均是以國際市場為其最終考量，因此，相關產品之生產製造、品質與產品的安全性，都必須符合國際法規之要求，主要是能符合美國及歐盟（生技醫藥產品的主流市場）之上市規範。目前，動科所以基因轉殖豬生產 rhFIX 之研發成果，已達可進行技術移轉或交易階段，當務之急，也是成果產業化過程的關鍵，在

於建構符合國際規範水平之『SPF 豬隻分子牧場』，符合 GLP/GFP 精神之作業規範，或者符合美國 AAALAC 認證規範，以確保由動物來源生產的醫藥產品安全性。此基盤建設將可協助我國相關產業之發展，提升產業價值與國際競爭力。

以基因轉殖動物生產生醫產品的發展符合我國精緻農業永續發展目標，在台灣逐步進入高品質的醫療服務與醫藥品市場的同時，農場製藥不失為我國發展生技產業的一個選項。

AgBIO

張有勝 財團法人台灣動物科技研究所 副研究員

#### 參考文獻

1. Animal transgenesis: state of the art and applications. *J Appl Genet.* 2007.
2. Intas Biopharma, Progenetics work together to develop drugs from transgenic animals. *Bio News.* Feb 08, 2007. <http://www.biospectrumindia.com/content/news/30702081.asp>
3. Production of therapeutic proteins from transgenic animals. *BioBusiness.* 2001.
4. The promise and challenges of bioengineered recombinant clotting factors. *J Thromb Haemost.* 2005.
5. Transgenic farm animals: present and future. *Rev sci tech.* 2005.
6. Use of Transgenic Animals to Improve Human Health and Animal Production. *Reprod. Dom Anim.* 2005.