



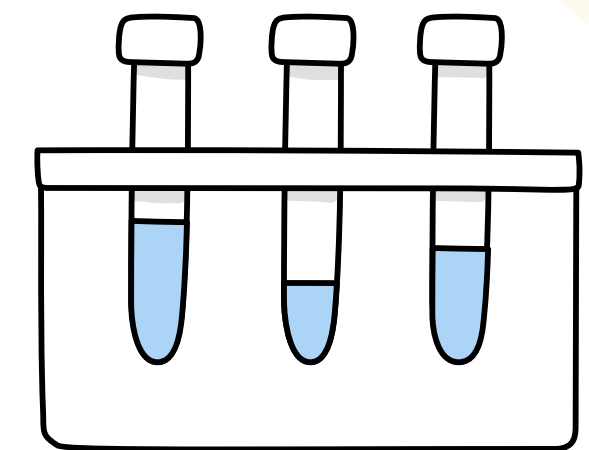
RNAscope法體內追蹤A型血友病病人單次基因治療 經年後AAV病毒及攜帶基因水準

凝血因子FVIII相關的蛋白活性缺乏會導致A型血友病。患者會發生自發或創傷導致的出血，造成疼痛、關節病，甚至出現顱內出血等嚴重危及生命的併發症。目前針對A型血友病的常見治療方式主要是通過長期服用外源性的FVIII，或進行預防性給藥，達到對疾病的控制作用，於此同時，研究人員針對A型血友病的基因治療也在研發中。

目前，一款名為valoctocogene roxaparvovec的基因療法是一種將B結構域刪除的人類F8基因(hFVIII-SQ)與肝臟選擇性啟動子(HLP)包裝在AAV5型載體中(AAV5-hFVIII-SQ)，用於長期管理嚴重A型血友病(FVIII<1 IU dl⁻¹)的治療方法。但對於使用基因療法的患者進行隨訪過程中，藥物本身在體內分佈的臨床資料是較難獲得的。

2022年4月，BioMarin Pharmaceutical的研究人員在Nature Medicine上發表了一篇題為
Interindividual variability in transgene mRNA and protein production following adeno-asso-
ciated virus gene therapy for hemophilia A的文章

對參與A型血友病基因治療的其中5位參與者(取得同意後)進行了肝臟樣本活檢，監測使用基因藥物後
對肝臟組織學等是否有明顯影響(NCT02576795)。在該項研究中對於肝臟中基因治療載體以及所轉
錄的FVIII RNA，使用了RNAscope的方法進行原位檢測。





OPEN

Interindividual variability in transgene mRNA and protein production following adeno-associated virus gene therapy for hemophilia A

Sylvia Fong¹  , Bridget Yates¹, Choong-Ryoul Sihn¹, Aras N. Mattis^{2,3}, Nina Mitchell¹, Su Liu¹, Chris B. Russell¹ , Benjamin Kim¹, Adebayo Lawal¹, Savita Rangarajan⁴ , Will Lester⁵, Stuart Bunting¹, Glenn F. Pierce⁶, K. John Pasi⁷ and Wing Yen Wong¹

5位參與者在活檢前接受了不同劑量的載體藥物注射

5位參與者編號分別為1、11、15、3、4，分別接受的藥物劑量為

6*10¹² vg/kg bw(viral genome per kg body weight) ➡ 參與者1

4*10¹³ vg/kg bw ➡ 參與者11
參與者15

6*10¹³ vg/kg bw ➡ 參與者3
參與者4

Table 1 | Key demographic and baseline clinical characteristics of adult male participants with severe hemophilia A who underwent liver biopsy in the phase 1/2 clinical trial of valoctocogene roxaparvovec (AAV5-hFVIII-SQ)

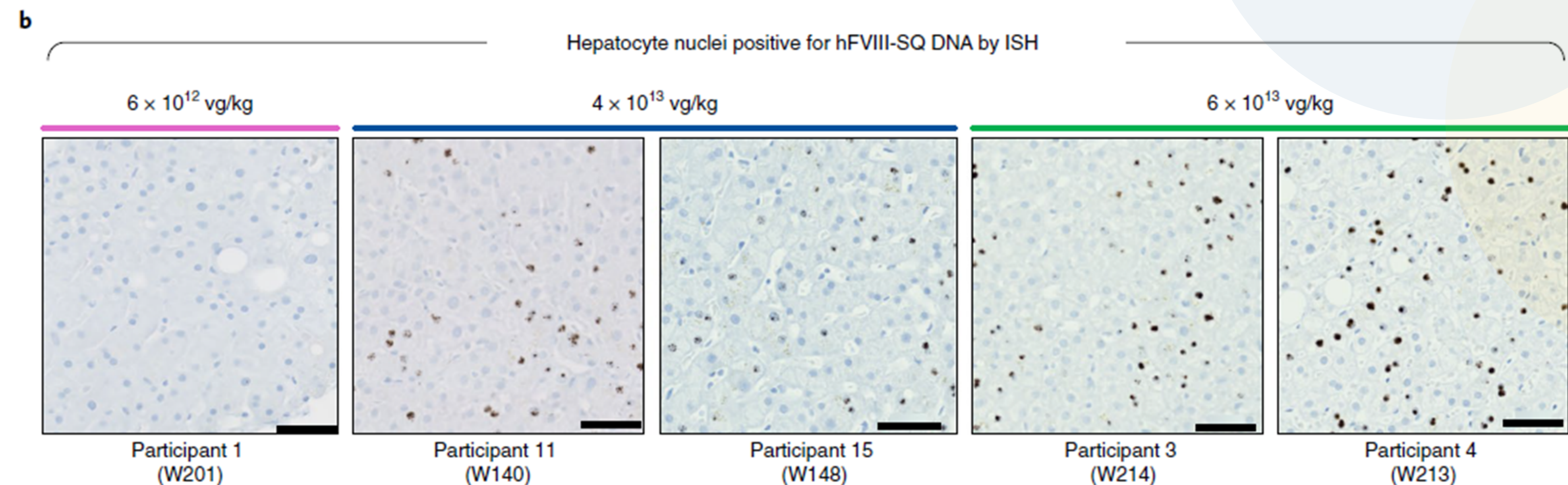
Participant	Dose of AAV5-hFVIII-SQ, vg per kg body weight	Age at first enrollment, years	Biopsy time point (after first enrollment), weeks (years)	Biopsy date	Route of biopsy	No. of hepatic lobules in biopsy sample	ALT at time of biopsy, UI ⁻¹	FVIII activity at time of biopsy, IU dl ⁻¹	
								CS result	OS result
1 ^d	6 × 10 ¹²	25	201 (3.86)	Aug 2019	Transjugular	12	29	BLD	BLD
11	4 × 10 ¹³	37	140 (2.69)	Aug 2019	Transjugular	23	11	18.6	28.4
15	4 × 10 ¹³	37	148 (2.85)	Jan 2020	Percutaneous	15	20	BLD	2.1
3	6 × 10 ¹³	32	214 (4.12)	Jan 2020	Percutaneous	23	12	8.2	14
4	6 × 10 ¹³	23	213 (4.10)	Mar 2020	Percutaneous	18	11	13.5	23.9

^aParticipants were numbered according to the order in which they were enrolled and dosed in the clinical trial¹⁴. ^bAge at enrollment into the valoctocogene roxaparvovec phase 1/2 clinical trial (NCT02576795). ^cFVIII levels were measured using both a one-stage (OS) activated partial thromboplastin time-based clotting assay and a chromogenic substrate (CS) assay¹⁵. ^dParticipants were admitted to hospital on the morning of the procedure and all except participant 1 were discharged on the following day as planned. Participant 1 experienced abdominal pain during the procedure and had post-procedural bleeding. Computed tomography scan revealed a small hepatic hematoma with no evidence of active bleeding or vascular injury. The participant was treated with FVIII replacement and discharged 2 d after the biopsy procedure due to clinical improvement. The participant was readmitted 1 week after discharge with abdominal pain, vomiting and orthostatic hypotension; repeat computed tomography revealed old blood within the liver capsule and a liver laceration but no active bleeding. Although there were complications involving a fever, the participant was managed successfully with supportive treatment and finally discharged 3 weeks after the biopsy procedure. BLD, below limit of detection.

研究人員對5位參與者的肝臟組織分別進行了H&E染色，結果顯示肝臟均未發現明顯的壞死、纖維化、異常增生等現象。隨後使用RNAscope的方法對5位參與者肝臟的不同肝葉活檢樣本中原位定位AAV5-hFVIII-SQ載體DNA在組織中的分布，發現在不同肝葉中，基因治療藥物DNA載體的分佈量與最初接受的藥物注射量成正相關關係，且在肝臟的不同葉中均有分佈(圖1)。

圖 1

RNAscope法檢測參與者肝臟組織中原位檢測AAV5-hFVIII-SQ載體DNA(圖中棕色訊號點)



相對而言，參與者15對於藥物的反應性較低，但原位檢測結果顯示，其藥物在肝細胞中陽性率僅略低於同劑量藥物組的參與者11(圖2)。

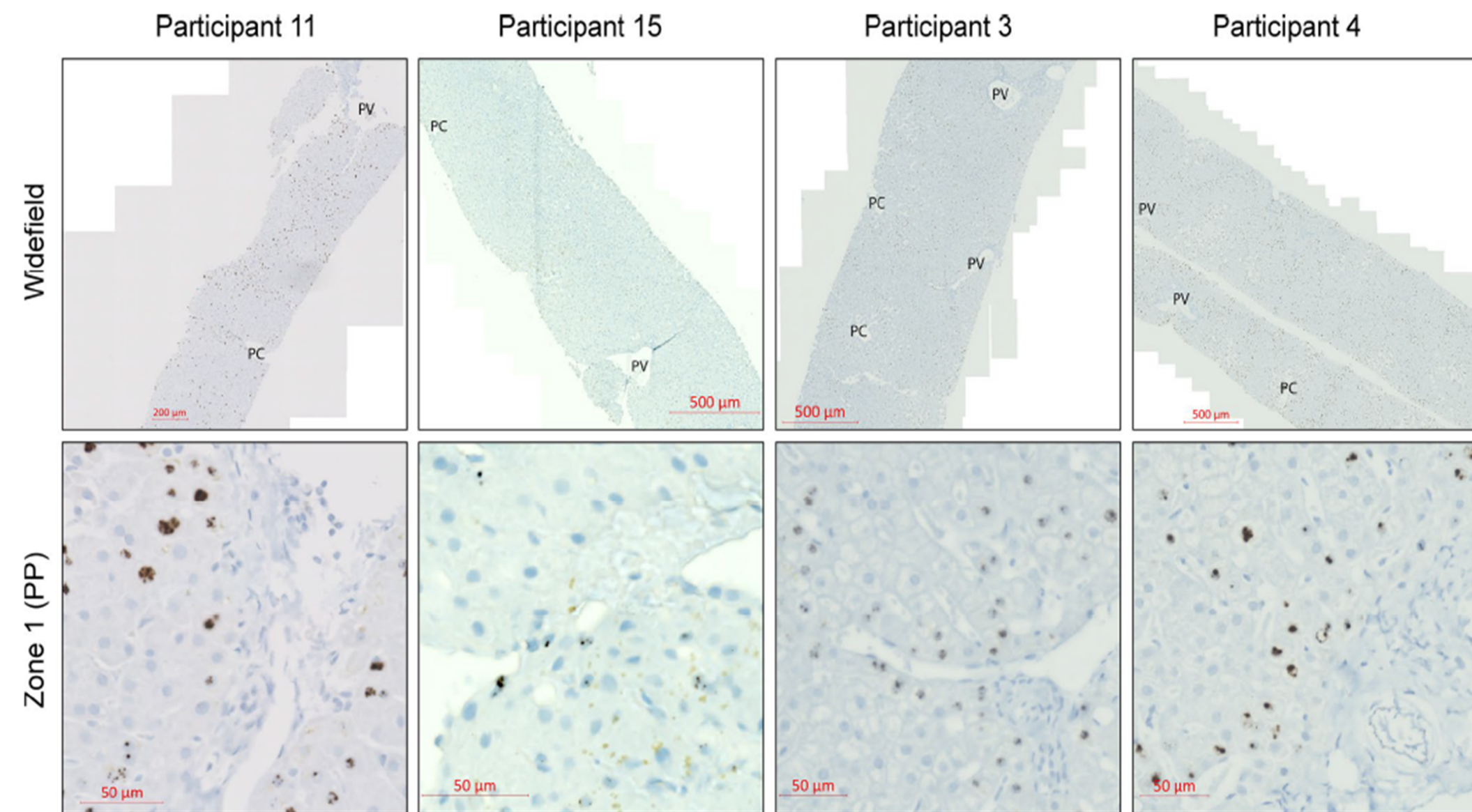
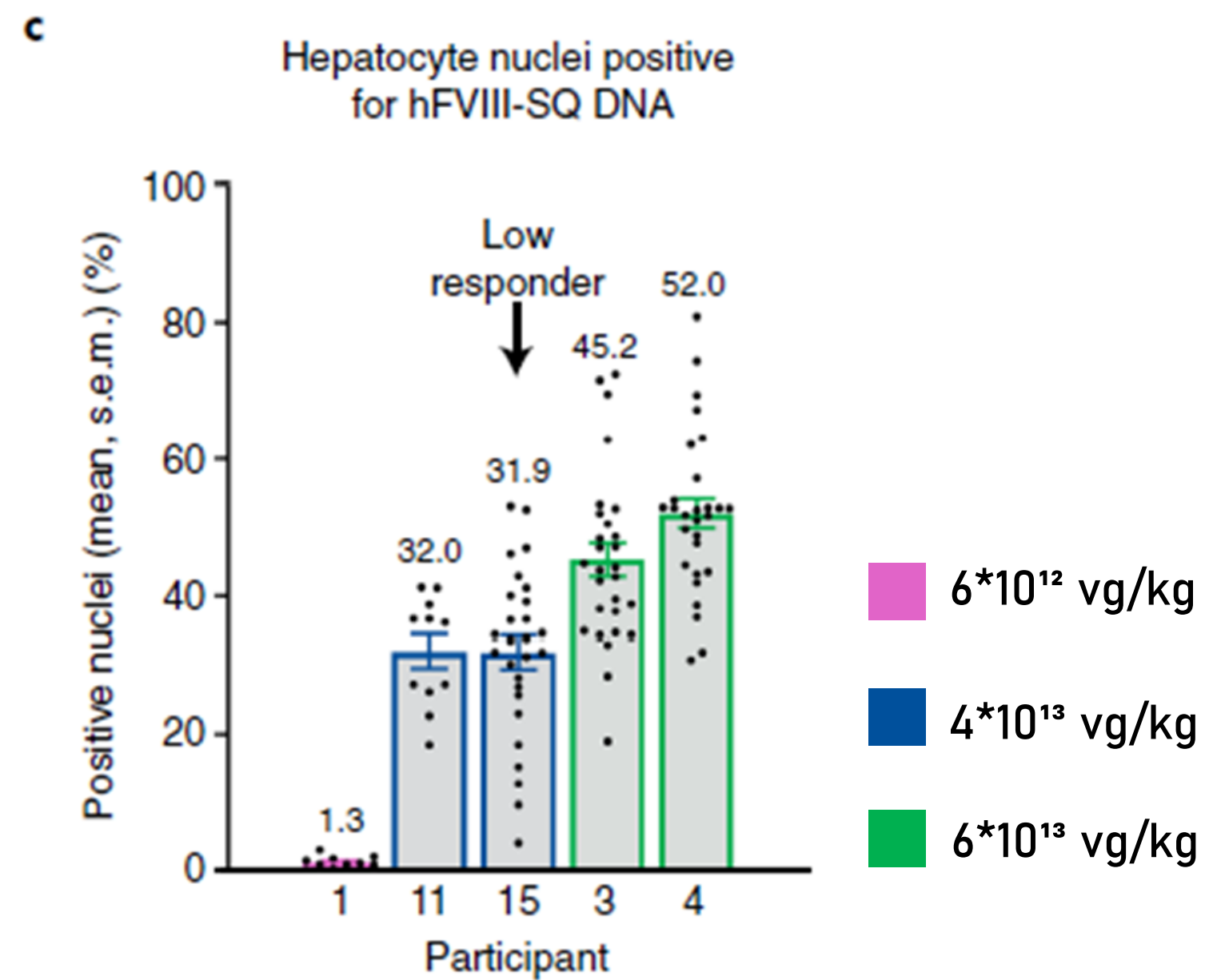
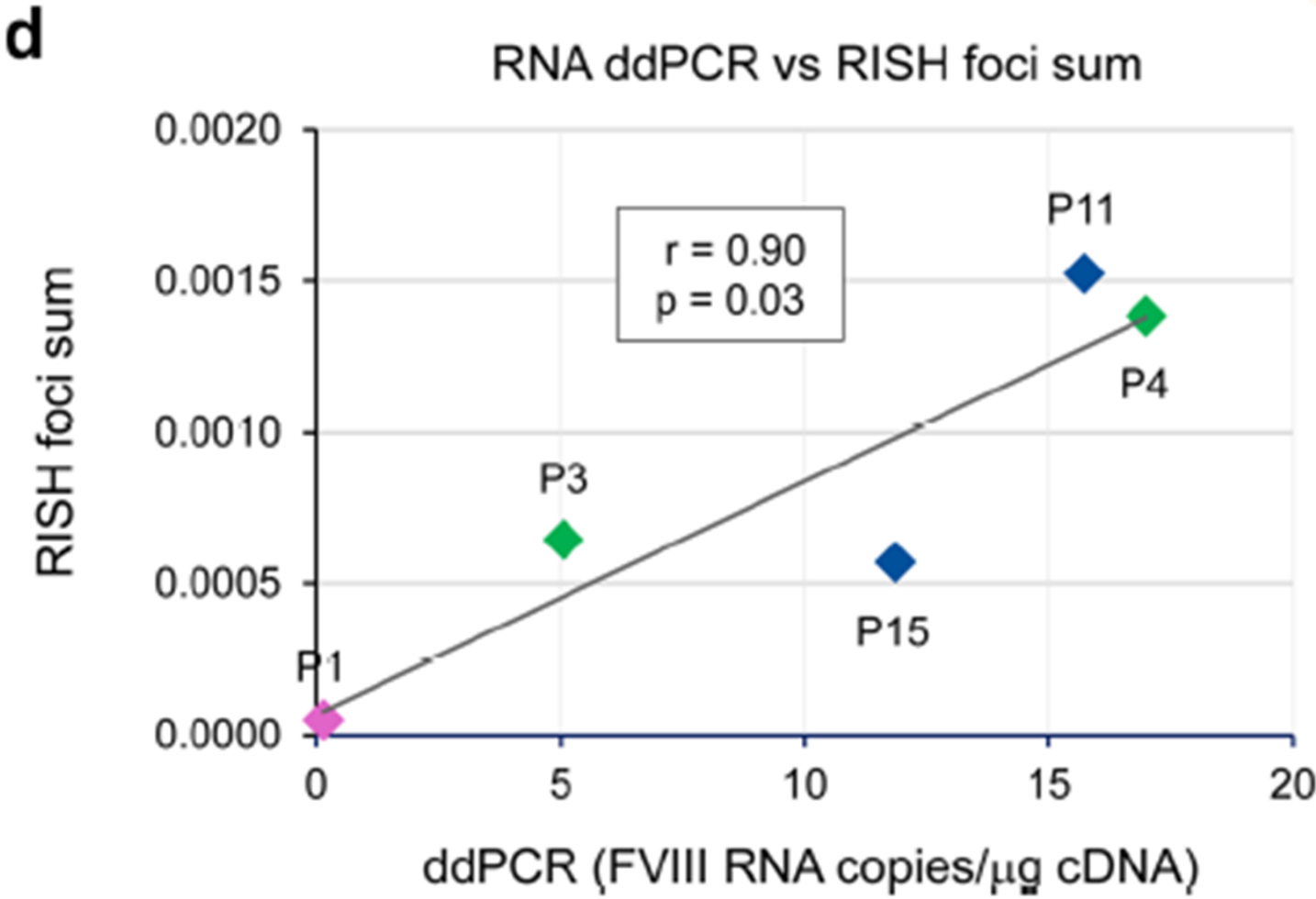
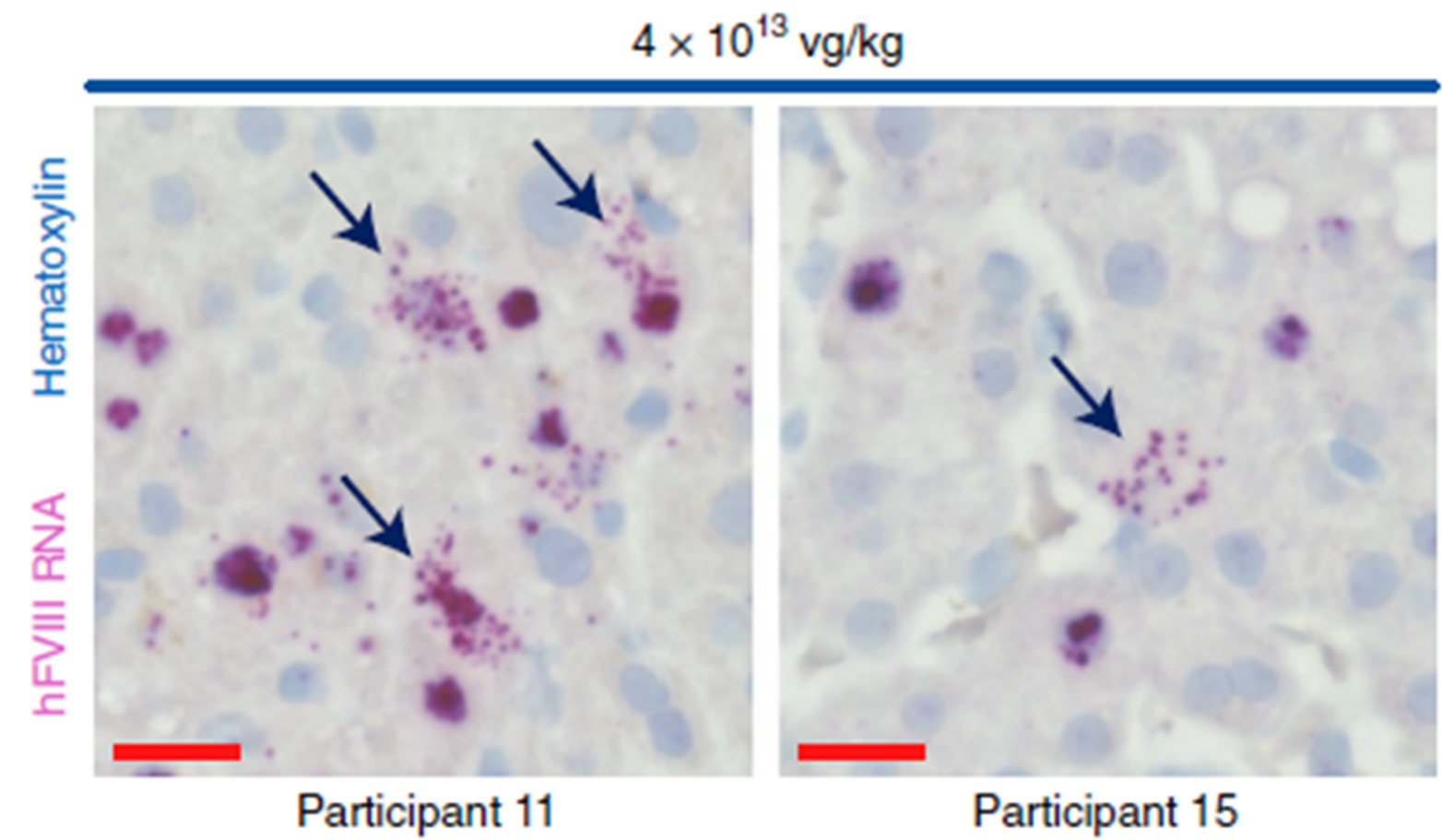


圖 2

AAV5-hFVIII-SQ DNA在參與者肝臟樣本內陽性細胞計數占比，右圖中的棕色訊號點為RNAscope檢測到的AAV5-hFVIII-SQ載體DNA

隨後，研究人員比較了5位參與者組織內FVIII-SQ基因RNA的表現量，並根據內參基因進行了標準化。結果顯示，5位參與者的FVIII-SQ RNA表現量整體趨勢與給藥劑量成正相關，但對於對藥物反應性弱的參與者15號與同等給藥劑量的參與者11號相比，其FVIII-SQ RNA的表現量低於藥物反應者近10倍(圖3)

圖 3
RNAscope原位檢測FVIII-SQ RNA
左圖中紅色訊號點為RNA訊號點



研究人員透過分析RNA及蛋白合成相關因素，推測肝細胞中內質網特異性分子標記物GRP78可能是與FVIII-SQ活性蛋白的合成有關，最終影響到試驗參與者對基因治療藥物的反應程度。

本文利用Bio-Techne旗下ACD公司的新一代RNA原位雜交檢測法RNAscope方法，在臨床試驗的參與者組織樣本中對基因治療所使用的載體DNA及轉錄的RNA進行了原位檢測及定量分析，對不同參與者用藥後產生的反應差異進行了原因探究，為後續基因治療藥物效果的改善與提高提供了重要參考。

RNAscope技術是由Bio-Techne旗下Advanced Cell Diagnostics (ACD)公司研發的RNA原位雜交產品，在近年來的生物檢測領域發展迅速。與傳統的RNA原位雜交相比，RNAscope技術屬於新一代RNA原位雜交技術，其特異性的雙Z探針設計避免了傳統長鏈RNA探針的弊端，配以自身級聯放大檢測原理，可以高效敏感地檢測到目標RNA。

該方法的具體優勢如下

1 應用廣泛

使用RNAscope技術，目標RNA為大於等於300個鹼基的特異序列，即可進行探針設計。因而RNAscope技術可以應用於幾乎所有物種，所有組織以及所有基因的檢測。

2 特異性強

RNAscope獨特的雙Z(ZZ)探針設計有效的防止了探針的非特異性結合，同時降低了背景干擾。由於結合在非特異性位點的單個的Z探針不會產生完整的訊號放大分子結合位位點，並會在雜交過程中被洗脫掉，從而防止非特異性訊號的放大，使得探針的訊號具有高度特異性。探針設計合成需要2-4週時間即可完成。

3 靈敏度高

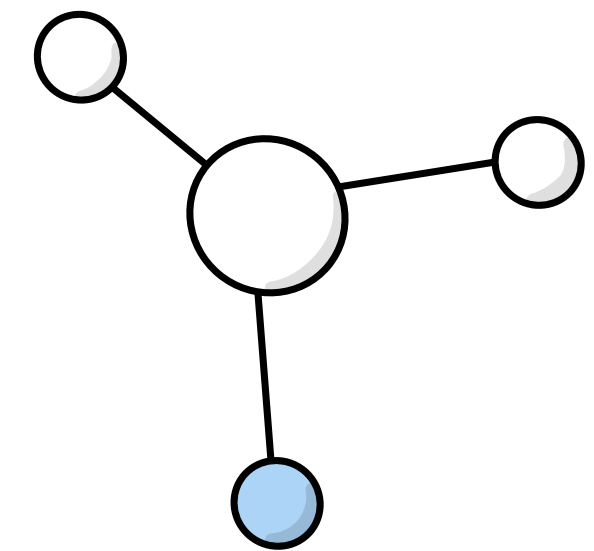
RNAscope方法檢測每個RNA分子時，只需三對雙Z(ZZ)探針即可完成雜交和訊號的視覺化。

4 單分子檢測和單細胞定量

使用RNAscope技術雜交上三對及以上雙Z探針即可在標準的顯微鏡下呈現可觀察到的點狀訊號。
ACD公司提供的分析軟體更可以定量每一個單細胞內RNA的表達水準。

5 兼容降解的RNA

由於RNAscope三對雙Z探針即可檢測到目標RNA，而通常針對目標RNA設計的探針為20對雙Z探針，因而即使目標RNA發生部分降解，仍可以穩定有效地檢測到目標RNA。



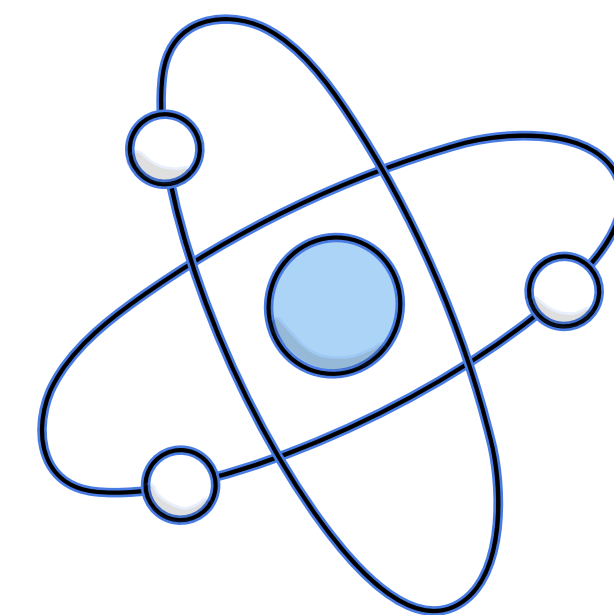
6 檢測結果穩定一致性

RNAscope技術用到的探針以及所有檢測試劑全部由工業化合成，且該技術針對不同樣本類型（冰凍切片，石蠟切片，懸浮細胞，貼壁細胞等）已經有成熟的實驗操作流程，故使得RNAscope技術檢測結果具有穩定性和一致性。除了可以在實驗室進行手工操作外，該產品也可以在Leica以及羅氏Ventana自動平臺上運行，為結果的一致性和穩定性提供了可靠的依據。

7 多通道多目標同時檢測

由於RNAscope技術可以同時進行多通道探針雜交以及訊號放大，故在可見光檢測中可以在同一張切片上同時檢測兩個目標；而在螢光檢測過程中，可以在同一張切片上檢測三個或三個以上目標RNA。

在RNAscope技術的基礎上，ACD公司旗下的Basescope技術可以檢測RNA水準的外顯子跳躍，點突變，環狀RNA等；miRNAscope可以原位對小RNA，包括miRNA, siRNA, ASO進行追蹤定位；而近年來推出的RNAscope HiPlex技術則可以在一張石蠟切片上同時檢測最多12個RNA目標的分佈定位，成為神經科學，腫瘤微環境研究以及單細胞測序後驗證等領域的常用檢測方法。



Reference

1• Nature Medicine volume 28, pages789–797 (2022) Interindividual variability in transgene mRNA and protein production following adeno-associated virus gene therapy for hemophilia A

