

## AAV ベクターの製造・品質に関するリフレクションペーパー

### 目次

1. 序
2. 製造方法（指針第 3 章製造方法 に該当）
  - 2-1. 遺伝子発現構成体（指針第 3 章製造方法 1. 遺伝子発現構成体 に該当）
    - 2-1-1. 遺伝子発現構成体の構造
    - 2-1-2. 目的遺伝子の由来、構造及び機能
  - 2-2. 遺伝子導入方法及びベクターの特性（指針第 3 章製造方法 2. 遺伝子導入方法及びベクターの特性 に該当）
    - 2-2-1. ウイルスベクターの構造
    - 2-2-2. ウイルスベクターの由来及び性質
    - 2-2-3. ウイルスベクターの製造に用いる原料及び製造方法
      - 2-2-3-1. ウイルスを利用しない製造システム
        - 2-2-3-1-1. 複数のプラスミドのトランスフェクション
        - 2-2-3-1-2. パッケージング細胞株を用いる方法
        - 2-2-3-1-3. パッケージング細胞、生産細胞
      - 2-2-3-2. ウイルス利用製造システム
    - 2-2-4. ウイルスベクターの製造工程と工程管理（標準作業手順書(SOP)における注意点)
3. 品質管理（指針第 4 章品質管理 に該当）
  - 3-1. ベクターの特性解析及び品質試験（指針第 4 章品質管理 (1)ベクターの特性解析及び品質試験 に該当）
    - 3-1-1. 精製段階（中間製品）での特性解析・感染性因子に関する試験
    - 3-1-2. 最終製品の特性解析・感染性因子に関する試験
    - 3-1-3. 参照品
  - 3-2. 製品化（指針第 4 章品質管理 2. 製品化 に該当）
    - 3-2-1. 表示

## 1. 序

本リフレクションペーパーは「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保に関する指針」におけるアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターに関する事項について説明するものである。

AAV はパルボウイルス科デペンドウイルス属に属する単鎖 (ss) DNA ウイルスである。ヒトの遺伝子治療用の組換え AAV (rAAV) 製品は、*in vivo* 法または *ex vivo* 法でヒトの体細胞に遺伝子を導入するように改変した rAAV の凍結乾燥品または液体調製品である。rAAV は、筋細胞や神経細胞などの終末分化した非分裂細胞に効率よく遺伝子導入でき、遺伝子発現が長期間持続するという特徴がある。

## 2. 製造方法 (指針第 3 章製造方法 に該当)

### 2-1. 遺伝子発現構成体 (指針第 3 章製造方法 1. 遺伝子発現構成体 に該当)

rAAV は *rep/cap* 遺伝子を目的遺伝子に置き換えることにより作製される。*rep/cap* 遺伝子は *trans* に必要であり、それぞれ複製とパッケージングに機能する。rAAV は末端逆行反復配列 (ITR) と目的遺伝子を含む。

#### 2-1-1. 遺伝子発現構成体の構造

- 構成パーツの起源、複製起点、ウイルスや真核細胞のプロモーター、選択マーカークードする遺伝子の機能を説明する。プラスミドを制限酵素解析、塩基配列解析、PCR により同定する。

#### 2-1-2. 目的遺伝子の由来、構造及び機能

- 単離の方法の説明
- ゲノムの完全性：プラスミドのゲノムの完全性を *rep/cap* 遺伝子や発現カセット領域の制限酵素解析などの適切な方法により検証する。

### 2-2. 遺伝子導入方法及びベクターの特性 (指針第 3 章製造方法 2. 遺伝子導入方法及びベクターの特性 に該当)

#### 2-2-1. ウイルスベクターの構造

ウイルス遺伝子と発現カセットの配列の完全性：挿入したウイルス遺伝子と調節エレメント、妥当な場合は発現カセットの全塩基配列解析を実施する。

#### 2-2-2. ウイルスベクターの由来及び性質

野生型 AAV は通常、同時感染したアデノウイルスやヘルペスウイルスから供給されるヘルパー機能がある場合のみ複製する。野生型 AAV は非病原性である。現時点で様々な血清型が確認されており (Pacak, 2006<sup>1</sup>; Limberis, 2006<sup>2</sup>; Gao, 2004<sup>3</sup>)、異なる AAV 血清型は異なる組織指向性を持つ。これらの血清型を基にする *in vitro* で選択された異なるトロピズムを持つ AAV ベクターとハイブリッドベクター (例えば ITR と *rep* (複製) は 2 型、*cap* (キ

ャプシド)は8型などの他の血清型に由来するベクター)について、指向性と2型 AAV (AAV2) に対する既存免疫を回避できるかを評価するための *in vitro* と動物モデルを用いた調査が行われている。

## 2-2-3. ウイルスベクターの製造に用いる原料及び製造方法

### 2-2-3-1. ウイルスを利用しない製造システム

#### 2-2-3-1-1. 複数のプラスミドのトランスフェクション

ITR と目的遺伝子を含むプラスミド (ベクタープラスミド)、*rep / cap* 遺伝子などを含む AAV ヘルパープラスミド、そしてアデノウイルスヘルパープラスミドをポリエチレンジアミン (PEI) 等を用いてトランスフェクションする。アデノヘルパープラスミドは rAAV の複製に必要なヘルパーウイルスの遺伝子要素を含み、ヘルパーウイルスの同時感染が必要なくなる。細胞または培養上清を回収後濃縮し、超遠心分離またはクロマトグラフィーを用いて精製する。別の方法として、パッケージング配列とアデノウイルスの最小のヘルパー機能を一つのプラスミドで供給する方法もある (Grimm *D et al*, 1998<sup>4</sup>)。これは結果として2種類のプラスミドを用いるプロトコールとなる。

ウイルスベクター産生細胞のマスターセルバンク、大腸菌プラスミドマスターセルバンク、精製プラスミドロット、トランスフェクション試薬などの製造に用いる原料は品質を確認したものである必要がある。

製品の品質や収量を一定に保つために、トランスフェクション条件を製造の各スケールで徹底的に評価し最適化することが推奨される。特に、製造スケールは (自己増殖可能な replication competent (rc) AAVの産生に影響することが知られている。これは3つのプラスミドを用いる製造工程のスケールアップにより報告されているが、小規模スケールの製造では混入は見られない (Allen, 1997<sup>5</sup>)。しかし、ヘルパープラスミドの塩基配列の種類によっては rcAAVの産生は低下する (Grimm, 1998<sup>4</sup>)。従って、遺伝子の相同性を最小限にし、rcAAV産生が最小限となる手法 (例えば *rep / cap* 遺伝子の転写方向の変更、ほ乳類以外の発現カセットシステムや細胞株を用いるなど) を用いてプラスミドをデザインすることが必要である。

セルバンクとその後の細胞培養のすべての処理は、他の細胞やウイルス、ベクターが同時に扱われることのない適切な封じ込めレベルを持つ隔離された空間で実施する。細胞の懸濁液の調製や培地に用いるヒトまたは動物由来の物質はすべて安全性を確認する。細胞培養用培地はフェノールレッドなどの pH 指示薬や最低有効量の抗生物質を含む必要がある。製造用細胞培養の一部を非感染細胞 (対照細胞) として確保する。バクテリア細胞マスターセルバンクのヒト用プラスミドベクター製造に用いるバクテリア細胞の項の要件への適合を確認する。

製造に用いるウイルスと rAAV は連続継代細胞株を用い、シードロット、細胞バンクシステムを用いて製造する。rAAV 製品の製造に用いる細胞株は細胞バンクシステムに従い、

EP5.2.3に記載されている原則で制御すべきである。細胞は rAAV 製造に用いることを考えると、外来性病原体試験では特に野生型 AAV と rAAV の複製に用いるヘルパーウイルスの混入を調べる必要がある。

十分な妥当性が示されない限り、ウイルスストックは野生型 AAV の汚染がないことを保証するように管理すべきである。ヘルパー機能のために組換えウイルスを用いる場合は、増殖性ウイルス含量の観点でストックを管理する必要がある。

#### 2-2-3-1-2. パッケージング細胞株を用いる方法

*rep - cap* 遺伝子が安定に発現する細胞株が利用できる（パッケージング細胞株）。Rep は過剰発現すると細胞毒性を持つため、あるコンストラクトでは誘導性プロモーターを用いて発現調整している。また、強力な異種プロモーターを *cap* 遺伝子の上流につなぎこむことにより、この遺伝子を過剰発現させている。導入遺伝子プラスミドとアデノヘルパープラスミドは、パッケージング細胞に一過性でトランスフェクションさせる。

#### 2-2-3-1-3. パッケージング細胞、生産細胞

- コピー数：細胞数の明らかな細胞からゲノム DNA を抽出・精製し、挿入されたウイルス遺伝子と発現カセットのコピー数を定量 PCR 等の適切な方法により測定する。
- 遺伝的安定性：細胞の遺伝的安定性は、製造に用いる細胞の最大の倍加時間を越えた時点で検証する。
- 野生型 AAV：野生型 AAV の混入がないことを PCR で検証する。

何らかの転写調節法を *rep* 遺伝子等の発現に用いる場合、製品の精製には誘導試薬やその限度値を出荷規格に入れる必要がある。誘導性プロモーターによるバックグラウンドの発現量を測定し、その量が細胞の培養上限を超えて培養しても変化しないこと（細胞株の表現型の特徴）を保証することが望ましい。

#### 2-2-3-2. ウイルスを利用した製造システム

タンパク質の大量生産系を利用し、バキュロウイルスを rAAV の産生に用いる例がある。この目的を達成するためには、パッケージングまたは導入遺伝子配列を持つ 3 種類の組換えバキュロウイルスを Sf9 細胞などの昆虫細胞株に同時感染させる。感染 3 日後には rAAV が回収される (Urabe, 2002<sup>6</sup>; DiMattia, 2005<sup>7</sup>; Aucoin, 2007<sup>8</sup>)。Sf9 細胞におけるウイルス感染の可能性を考慮し、PCR など適切な方法を用いて確認することが望ましい。

#### 2-2-4. ウイルスベクターの製造工程と工程管理（標準作業手順書(SOP)における注意点)

以上をまとめると、以下に特に注意する必要がある。

- ベクタープラスミド(ssDNA/scDNA) の品質管理
- 細胞種（接着細胞/浮遊細胞）の一貫性
- 培地の一貫性
- 血清の有無、血清の由来
- トランスフェクション試薬（PEI / リン酸カルシウム / electroporation 等）
- 培養上清の回収/細胞の回収

- Tangential Flow Filtration (TFF) の仕様 (排除分子量や膜の材質等)
- 硫酸アンモニウム沈殿/PEG沈殿
- 超遠心分離法
- クロマトグラフィーの条件
- rAAV 作製プロトコルをフローチャートなどで詳細に記載すること

超遠心分離法は常に同じ品質を担保することには不向きであり、SOPにおいて品質管理に課題を残す。そのため超遠心を使用しない方法、具体的にはクロマトグラフィー技術のみによる精製法が開発されている (Tomono *et al*, 2016<sup>9</sup>)。

用いる製造法にかかわらず、rcAAV 混入の可能性を調べて評価する必要がある。さらに非臨床および臨床試験を計画する場合には、これらの不純物混入の可能性と製品の安全性に与える影響を考慮すべきである。製法の一貫性が求められるが、製法を変更した場合はそれまで行っていたものと同様以上の品質・安全性を担保出来なければならない。

### 3. 品質管理 (指針第 4 章品質管理 に該当)

#### 3-1. ベクターの特性解析及び品質試験 (指針第4章品質管理 (1)ベクターの特性解析及び品質試験 に該当)

##### 3-1-1. 精製段階 (中間製品) での特性解析・感染性因子に関する試験

複数の未精製ロットを精製工程前にプールする場合がある。精製工程は不純物を充分除去できることを検証する。以下の要件を満たす精製製品は最終バルクの調製に使用できる。

- 同定：免疫学的手法、PCR または制限酵素解析により同定する。
- 遺伝的特性解析：以下の試験を実施する
  - 適切な数の製造行程について、精製製品または最終バルクの段階でベクターの全ゲノムをシーケンスにより決定された配列と、ベクター構築およびデータベースに基づき得られる理論的配列を比較する。
  - ベクターDNA についてゲノムの完全性をチェックする。PCR 分析が用いられる。
- ベクター濃度：ベクターの感染価とウイルス粒子濃度を決定する。
- 製造に使用した残存ウイルス：残存ウイルスは用いた製造システムに従い、プラークアッセイまたは許容細胞を用いた TCID<sub>50</sub>、または定量 PCR により評価する。
- 残存タンパク質：宿主細胞由来またはウイルス由来タンパク質の濃度は、工程により適切に除去されることが確認されていない限り、適切な免疫化学的方法で定量する。
- 残存 DNA：工程により適切に除去されることが確認されていない限り、産生細胞由来の残存 DNA 量と、該当する場合はプラスミドや製造用ウイルスなどの中間体からの残存 DNA 量を適切な方法で求める。感度と特異性から定量 PCR 法が推奨されるが、他の適切な方法を用いてもよい。
- 残存試薬：工程により適切に除去されることが確認されていない限り、製造工程で試薬を用いた場合は精製ロットでの試験を実施する。

残存抗生物質：製造工程で抗生物質を用いた場合、工程により適切に除去されることが確認されていない限り、残存含量を微生物学的試験、または他の適切な方法（例えば液体クロマトグラフィー）で求める。

### 3-1-2. 最終製品の特性解析・感染性因子に関する試験

rAAV粒子には産生細胞ゲノム、ヘルパープラスミドやヘルパーウイルスゲノムが僅かながらも誤パッケージされることが知られている。特性解析では、誤パッケージされたDNAに open reading frames (ORF) が含まれているかどうかの検証が必須であり、ORF が含まれることが判明した場合はほ乳類細胞でこれらの配列からタンパク質が翻訳されるかどうかを調べる必要がある。誤パッケージされたDNA からタンパク質が発現する可能性がある場合、rAAV の生体内分布プロファイルを反映する細胞株を用いることが重要である。誤パッケージされたDNA を含む粒子の比率は同一製造ロット間で一定であることを示すべきであり、適切に妥当性が示された出荷規格がバッチリリースに含まれることが理想的である。野生型よりも大きいDNA がパッケージされたウイルス粒子がエピソームを形成して細胞内に長期間留まるか否かは不明であるため、可能であれば、誤パッケージされたDNA を含むウイルスゲノムの消長を確認すべきである。もしも目的遺伝子と誤パッケージされたDNA が細胞内に長期間留まることが確認された場合、長期間に渡る影響についての総合的なリスクアセスメントにより、この様な粒子が存在しても製品全体の安全性に問題がないことを示す必要がある。

- 同定：ベクターは免疫化学的手法、PCR、制限酵素解析のいずれかの方法で同定すること。
- 残存宿主細胞 DNA：残存する宿主細胞 DNA 含量は、製造工程により適切に除去されることを確認されていない限り、適切な方法で決定する。感度と特異性から定量 PCR が推奨されるが、その他の適切な方法を使用しても良い。
- ベクター粒子濃度：ベクター粒子濃度は定量 PCR 等の適切な方法を用い、プラスミドまたは AAV 標準品を用いた標準曲線との比較により定量する。
- 感染力価：被験試料を培養細胞に接種して感染力価を求める。各アッセイを検証するため、適切なベクター標準品の感染力価を求める。被験試料の感染力価は表示の最低量を下回らないこと。
- ベクター粒子濃度と感染力価の比率：特定の製品の承認限度値以下
- 遺伝子導入産物の発現：遺伝子導入産物の発現は、可能な限り、既に決定されている MOI で培養細胞への接種後、適切な免疫化学的試験または生化学的試験またはフローサイトメトリーにより測定する。
- 生物活性：他に妥当性が示されない限り、生物活性は適切な *in vitro* または *in vivo* 試験により決定する。(FACS, ELISA, 感染力価)
- 品質検査：qPCR, SDS-PAGE により、Benzonase (または DNase) 耐性ウイルスゲノム力価・純度を測定し、品質検査を行う。また、適切な方法(電子顕微鏡や analytical

ultracentrifugation など) で中空粒子の混入率を測定すること。

- 浸透圧：製品で承認された限度値以内
- pH：製品で承認された限度値以内
- 抽出可能量：抽出可能量試験に適合すること
- 水分含量：凍結乾燥製品の承認限度値以内
- 牛血清アルブミン：牛血清を製造に用いた場合、適切な免疫化学的手法により定量し、製品に固有の調製品の承認値以下であることを示す。
- rcAAV の濃度：承認された限度値以内  
rcAAV の検出は、replication center assay などを用い、ヘルパーウイルスを感染させた細胞での増殖性試験により実施する。
- ベクター凝集体：ベクター凝集体を適切な方法(例えば光散乱)により定量する。
- 無菌性：無菌性試験に適合 (全体容量の 1%を使用する：参照 1)
- バクテリアエンドトキシン：製品で承認された値以下

rAAV ストックは通常、空のカプシド (DNA を含まない) と非感染性粒子 (DNA を含むが *in vitro* での発現は認められない)、感染性粒子 (細胞に入り、導入遺伝子の発現やDNA 増幅が *in vitro* で観察される) の不均一な混合物である。そのため、製品ではこれらすべてのウイルス粒子の種類ごとの含量を解析し、患者に投与した際の免疫原性「抗原負荷」の一貫性について妥当な出荷規格を導入する必要がある。

### 3-1-3. 参照品

rAAV2 の標準参照品が現在利用可能であり、ベクターゲノムとその他の物理的特性には血清型が関わらないため (Moullier, 2008<sup>10</sup>)、この参照品は他の AAV 血清型にも利用可能である。しかし、導入遺伝子の生物活性を製品規格の一つとして測定する必要があるため、製品特有の参照品も必要である。このような製品特有の参照品は、十分に特性解析されたものであるべきであり、参照品の更新が必要な場合には規定の安定性/性能モニタリングを行う必要がある。理想的には研究室または内部で作製された製品特有の参照品は、可能な限り初代ベクター参照品を基準として規格化すべきである。

## 3-2. 製品化 (指針第 4 章品質管理 2. 製品化 に該当)

### 3-2-1. 表示

- － 活性物質の含量
- － ヒトでの推奨される投与量
- － 凍結乾燥品の場合、
  - － 再構成に用いる液体の組成と容量
  - － 再構成後の使用期限

(参照 1)

- JP 微生物限度試験法 非無菌製品の微生物学的試験：生菌数試験
- EP 細胞製品についての微生物試験法（無菌試験の代替）
- 厚生労働省 各都道府県衛生主管部（局）長  
生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品 / 生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の  
由来、調製及び特性解析、純度試験の項



1. Pacak, C.A., *et al.* Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res* **99**, e3-9 (2006).
2. Limberis, M.P. & Wilson, J.M. Adeno-associated virus serotype 9 vectors transduce murine alveolar and nasal epithelia and can be readministered. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12993-12998 (2006).
3. Gao, G., *et al.* Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* **78**, 6381-6388 (2004).
4. Grimm, D., Kern, A., Rittner, K. & Kleinschmidt, J.A. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther* **9**, 2745-2760 (1998).
5. Allen, J.M., Debelak, D.J., Reynolds, T.C. & Miller, A.D. Identification and elimination of replication-competent adeno-associated virus (AAV) that can arise by nonhomologous recombination during AAV vector production. *J Virol* **71**, 6816-6822 (1997).
6. Urabe, M., Ding, C. & Kotin, R.M. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther* **13**, 1935-1943 (2002).
7. DiMattia, M., *et al.* Production, purification, crystallization and preliminary X-ray structural studies of adeno-associated virus serotype 5. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **61**, 917-921 (2005).
8. Aucoin, M.G., *et al.* Virus-like particle and viral vector production using the baculovirus expression vector system/insect cell system: adeno-associated virus-based products. *Methods Mol Biol* **388**, 281-296 (2007).
9. Taro Tomono, Yukihiko Hirai, Hironori Okada, Kumi Adachi, Akiko Ishii, Takashi Shimada, Masafumi Onodera, Akira Tamaoka, and Takashi Okada. (2016). Ultracentrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1). *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development* **3**.
10. Moullier, P. & Snyder, R.O. International efforts for recombinant adeno-associated viral vector reference standards. in *Mol Ther*, Vol. 16 1185-1188 (United States, 2008).

## AAV ベクターの製法確立および品質特性解析に関するリフレクションペーパー

### 目次

1. 序
2. 製造方法（指針第 3 章製造方法 に該当）
  - 2-1. 遺伝子発現構成体（指針第 3 章製造方法 1. 遺伝子発現構成体 に該当）
    - 2-1-1. 遺伝子発現構成体の構造
    - 2-1-2. 目的遺伝子の由来、構造及び機能
  - 2-2. 遺伝子導入方法及びベクターの特性（指針第 3 章製造方法 2. 遺伝子導入方法及びベクターの特性 に該当）
    - 2-2-1. ウイルスベクターの構造
    - 2-2-2. ウイルスベクターの由来及び性質
    - 2-2-3. ウイルスベクターの製造に用いる原料及び製造方法
      - 2-2-3-1. ウイルスを利用しない製造システム
        - 2-2-3-1-1. 複数のプラスミドのトランスフェクション
        - 2-2-3-1-2. パッケージング細胞株を用いる方法
        - 2-2-3-1-3. パッケージング細胞、生産細胞
      - 2-2-3-2. ウイルス利用製造システム
    - 2-2-4. ウイルスベクターの製造工程と工程管理（標準作業手順書(SOP)における注意点)
3. 品質管理（指針第 4 章品質管理 に該当）
  - 3-1. ベクターの特性解析及び品質試験（指針第 4 章品質管理 (1)ベクターの特性解析及び品質試験 に該当）
    - 3-1-1. 精製段階（中間製品）での特性解析・感染性因子に関する試験
    - 3-1-2. 最終製品の特性解析・感染性因子に関する試験
    - 3-1-3. 参照品
  - 3-2. 製品化（指針第 4 章品質管理 2. 製品化 に該当）
    - 3-2-1. 表示

## 1. 序

本リフレクションペーパーはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの製法確立および品質特性解析に関する事項について「遺伝子治療用製品等の品質及び安全性の確保に関する指針」を補足説明するものである。

AAV はパルボウイルス科デペンドウイルス属に属する単鎖 (ss) DNA ウイルスでエンベロープは持たない。ヒトの遺伝子治療用の AAV ベクター製品は、*in vivo* 法または *ex vivo* 法でヒトの体細胞に遺伝子を導入するように改変した組換え AAV (rAAV) の凍結乾燥品または液体調製品である。rAAV は、筋細胞や神経細胞などの終末分化した非分裂細胞にも効率よく遺伝子導入でき、遺伝子発現が長期間持続するという特徴がある。

## 2. 製造方法 (指針第 3 章製造方法 に該当)

### 2-1. 遺伝子発現構成体 (指針第 3 章製造方法 1. 遺伝子発現構成体 に該当)

rAAV は野生型 AAV の増殖に必要な *rep/cap* 遺伝子を目的遺伝子に置き換えることにより作製される。*rep/cap* 遺伝子は AAV ベクターのウイルス粒子形成に必須の要素であり、AAV の複製とパッケージングに機能する。rAAV は AAV の末端逆行反復配列 (ITR) と目的遺伝子を含む。

#### 2-1-1. 遺伝子発現構成体の構造

- 遺伝子発現構成体の要素の起源、複製起点 (Ori)、ウイルスや真核細胞のプロモーター、選択マーカーをコードする遺伝子の機能を説明する。プラスミドを制限酵素解析、塩基配列解析、PCR により同定する。

#### 2-1-2. 目的遺伝子の由来、構造及び機能

- 目的遺伝子を AAV プラスミドに構築する方法の説明
- ゲノムの完全性：プラスミドのゲノムの完全性を *rep/cap* 遺伝子や発現カセット領域の制限酵素解析などの適切な方法により検証する。

### 2-2. 遺伝子導入方法及びベクターの特性 (指針第 3 章製造方法 2. 遺伝子導入方法及びベクターの特性 に該当)

#### 2-2-1. ウイルスベクターの構造

AAV ベクターの遺伝子発現構成体の塩基配列の確認：挿入した目的遺伝子、ウイルス遺伝子と調節エレメント、妥当な場合は発現カセットの全塩基配列解析を実施する。

#### 2-2-2. ウイルスベクターの由来及び性質

野生型 AAV は単独では複製できず、通常、同時感染したアデノウイルスやヘルペスウイルスから供給されるヘルパー機能により複製が可能になる。野生型 AAV はヒトに対して非病原性である。現時点で様々な血清型が確認されており (Pacak, 2006<sup>1</sup>; Limberis, 2006<sup>2</sup>; Gao, 2004<sup>3</sup>)、AAV 血清型ごとに異なる組織指向性を持つ。組織指向性は *cap* (キャプシド)

の血清型に依存する。これらの血清型を基にする *in vitro* で選択された異なるトロピズムを持つ AAV ベクターやハイブリッドベクター（例えば ITR と *rep*(複製)は 2 型、*cap*(キャプシド)は 8 型などの他の血清型に由来するベクター) が利用されている。

### 2-2-3. ウイルスベクターの製造に用いる原料及び製造方法

rAAV ベクターの製造にはウイルス粒子形成に必要な以下の構成要素の供給が必要であり、プラスミドやバキュロウイルスを用いた方法が利用されている。

-AAV 由来 ITR と目的遺伝子を含むベクターコンストラクト

-AAV の複製とカプシドの発現に必要な Rep/Cap 遺伝子発現タンパク質

-AAV の複製に必要なアデノウイルスやヘルペスウイルスのヘルパーウイルス機能

-ヘルパーウイルスと AAV の複製が可能な細胞株

#### 2-2-3-1. ウイルスを利用しない製造システム

##### 2-2-3-1-1. 複数のプラスミドのコ・トランスフェクション

ITR と目的遺伝子を含むベクタープラスミド、*rep/cap* 遺伝子などを含む AAV ヘルパープラスミド、そしてアデノウイルスヘルパープラスミドの 3 種類のプラスミドをポリエチレンイミン (PEI) 等を用いて細胞にコ・トランスフェクションする。ヘルパーウイルスの遺伝子配列を含むアデノヘルパープラスミドを用いることにより、rAAV の複製に必要なヘルパーウイルスの同時感染が不要となる。ウイルスベクター産生細胞にはアデノウイルスの E1 配列が挿入されている HEK293 に由来する細胞が多く用いられる。細胞または培養上清を回収後濃縮し、超遠心分離やクロマトグラフィーを用いて精製する。別の方法として、パッケージング配列とアデノウイルスの最小のヘルパー機能を一つのプラスミドで供給する方法もある (Grimm D *et al*, 1998<sup>4</sup>)。これは結果として 2 種類のプラスミドを用いるプロトコールとなる。

ウイルスベクター製法確立に際しては、ICH Q5D に従ってウイルスベクター産生細胞のセルバンクシステム (マスターセルバンクやワーキングセルバンク) の構築とウイルス安全性を含めた十分な特性解析の実施 (ICH Q5A)、さらにウイルスベクター製造に用いる大腸菌セルバンクシステムの構築と特性解析や製造したプラスミドの特性解析と品質管理を実施すると共に、培養に用いる培地やトランスフェクション試薬などの製造に用いる原料/原材料の品質管理が重要となる。

ウイルスベクター製品の品質の恒常性を担保し、一定の収量を得られるようにするために、培養条件やトランスフェクション条件の最適化が重要であり、確立した製法の妥当性を説明する必要がある。特に、製造スケールを拡大していった場合に自己増殖可能な (replication competent (rc)) AAV の産生に影響することも知られており、例えば 3 種類のプ

ラスミドを用いる製造工程のスケールアップにより報告されているが、小規模スケールの製造では混入は見られない(Allen, 1997<sup>5</sup>)。スケールアップ時には、rc AAVの産生が起こっていないことを十分確認しておく必要がある。但し、ヘルパープラスミドの塩基配列の種類によってはrcAAVの産生が増加することはないとされており (Grimm, 1998<sup>4</sup>)、用いるヘルパープラスミドの塩基配列を最適化し、rc AAVが産生されにくい配列を用いることが重要である。すなわち、遺伝子の相同性を最小限にし、rcAAV産生が最小限となるようにデザイン (例えば *rep* / *cap* 遺伝子の転写方向の変更、ほ乳類以外の発現カセットシステムや細胞株を用いるなど) されたプラスミドを用いることが必要である。

セルバンクを用いた細胞培養工程で用いる培地や培地に添加されている増殖因子等としてヒトまたは動物由来の成分を用いる場合には、ウイルス等の汚染のない生物由来原料を用いる必要がある。細胞培養用培地はフェノールレッドなどのpH指示薬や最低有効量の抗生物質を含む必要がある。ウイルスベクター製造時のウイルス等の汚染の評価がバルクハーベストで実施できない場合には、製造用細胞培養の一部を非感染細胞(対照細胞)として用いることも可能である。バクテリア細胞マスターセルバンクのヒト用プラスミドベクター製造に用いるバクテリア細胞の項の要件への適合を確認する。

製造にヘルパーウイルスを用いる場合には、ウイルスベクター製造に用いる細胞と同様にバンクシステムを用いてウイルスを製造し、ウイルスバンクシステムを構築すると共に、十分な特性解析を実施する。

rAAV 製造に際しては、内在性ウイルスや外来性ウイルス試験の実施が求められるが、製造に際しては、特に野生型 AAV と rAAV の複製に用いるヘルパーウイルスの混入を十分に評価する必要がある。十分な妥当性が示されない限り、ウイルスストックは野生型 AAV の汚染がないことを保証するように管理すべきであり、基本的に野生型 AAV が混入している細胞を用いることは推奨されない。ヘルパー機能のために組換えウイルスを用いる場合は、生産したバルクハーベスト等を対象として増殖性ウイルスの混入の有無を十分に評価する必要がある。

#### 2-2-3-1-2. パッケージング細胞株を用いる方法

RepおよびCap分子を安定に発現するように染色体に *rep* - *cap* 遺伝子が組込まれた細胞株を利用することが可能である (パッケージング細胞株)。Rep は過剰発現すると細胞毒性を持つため、誘導性プロモーターを用いてベクター生産時にのみ発現調整する方法を用いることも可能である。また強力な異種プロモーターを *cap* 遺伝子の上流につなぎこむことにより、この遺伝子を過剰発現させる方法などが用いられている。このようなパッケージング細胞株を用いる場合には、ベクタープラスミドとアデノヘルパープラスミドを、一過性にコトランスフェクションさせることでAAVベクターを産生することが可能である。

### 2-2-3-1-3. パッケージング細胞

パッケージング細胞を用いる場合には次のような点を評価しておくこと。

- 導入されているウイルス遺伝子のコピー数：パッケージング細胞からゲノム DNA を抽出し、挿入されたウイルス遺伝子と発現カセットのコピー数を定量 PCR 等の適切な方法により測定する。
- 遺伝的安定性：製造期間を通じて挿入されたウイルス遺伝子や発現カセットの安定に維持されていることを ICH Q5B を参考に評価しておくこと。また、評価期間としては製造期間を超えて培養した細胞を用いて評価すること
- 野生型 AAV：野生型 AAV の混入がないことを PCR 等の十分にバリデートされた方法で検証しておくこと。

*rep* 遺伝子等の発現に、何らかの転写調節法を用いる場合、その転写調節に用いた誘導試薬が精製工程において十分に除去可能であることを示すと共に、最終製品での限度値を出荷規格として設定することを考慮する必要がある。誘導性プロモーターによる発現量を測定し、細胞株の表現型の特性の一つとして製造工程を通じて Rep 分子の発現量が変化しないことを確認しておくことが望ましい。

### 2-2-3-2. ウイルスを利用した製造システム

タンパク質の大量生産系として用いられているバキュロウイルスを rAAV の産生にも用いられている。バキュロウイルスを用いて AAV ベクターを製造するには、パッケージング配列を持つ組換えバキュロウイルスおよび目的遺伝子配列を持つ組換えバキュロウイルスを Sf9 細胞などの昆虫細胞株に同時感染させる。通常、感染 3 日後には rAAV が産生されるとされている (Urabe, 2002<sup>6</sup>; DiMattia, 2005<sup>7</sup>; Aucoin, 2007<sup>8</sup>)。Sf9 細胞には未知のラプトウイルスが検出されたとの報告があり (論文)、その病原性については十分な評価ができていない。バキュロウイルスを用いて AAV ベクターを製造する場合には、Sf9 細胞におけるウイルス汚染の事例を参考にして、PCR など適切な方法を用いて汚染の有無を確認することが必要となる。

### 2-2-4. ウイルスベクターの製造工程と工程管理 (標準作業手順書(SOP)における注意点)

AAV ベクターの製法の確立、工程管理については次のような点に特に配慮する必要がある。

- ベクタープラスミドとして用いる構造 (ssDNA/scDNA) に着目した品質管理
- 細胞特性として接着細胞を用いるのか浮遊細胞系を用いるのか
- 培地の品質管理と生物由来原料としての安全性確保
- 血清の使用の有無、血清を用いる場合はどのような検査を実施するのか、また放射線照射等のウイルス不活化工程などの安全性確保対策
- プラスミドのトランスフェクションに用いる試薬の残存性 (PEI/リン酸カルシウム)

/electroporation 等)

- AAVベクター製造した培養上清の回収、あるいは細胞からの抽出を行う場合には細胞の回収と回収されたバルクハーベストの試験
- AAVベクターの製造で濃縮工程にTangential Flow Filtrationを用いる場合は排除分子量や膜の材質等の妥当性
- 硫酸アンモニウム沈殿/PEG沈殿を行う場合の条件設定
- 超遠心分離の条件
- クロマトグラフィーの条件と

さらに、rAAV作製プロトコルをフローチャートなどを用いてその詳細を記載することが必要である。

超遠心分離法はわずかな条件の違いにより、混入する目的外物質が異なってくる可能性があり、恒常的な製法が可能であることを十分に説明する必要がある。一方、クロマトグラフィー技術のみによる精製法が開発されているが(Tomono *et al*, 2016<sup>9</sup>)、いずれの精製方法を用いても、不純物としてrcAAV混入の可能性を十分に評価しておく必要がある。宿主タンパク質等の工程由来不純物の残存については定量的な測定を行うと共に、臨床試験の前に、非臨床安全性試験を通じて製品の安全性に与える影響を評価しておく必要がある。製法の一貫性が求められるが、やむを得ず製法を変更した場合は旧製法での安全性マージンが新製法でも担保できているか評価する必要があり、安全性マージンが担保できない場合には、新製法での製品について再度非臨床安全性評価の実施を考慮すること。

### 3. 品質管理（指針第4章品質管理 に該当）

#### 3-1. ベクターの特性解析及び品質試験（指針第4章品質管理（1）ベクターの特性解析及び品質試験 に該当）

##### 3-1-1. 精製段階（中間製品）での特性解析・感染性因子に関する試験

受け入れ試験を実施したバルクハーベストより AAV ベクターの精製が行われるが、複数のロットからなるバルクハーベストをプールして精製することも可能である。各精製工程での不純物の除去状況を解析し、精製工程が不純物を充分除去できることを検証することが重要である。精製した AAV ベクターについて次のような特性解析を実施すること。

- 確認試験：免疫学的手法、あるいはPCR または制限酵素解析により目的とする AAV ベクターの確認を行う。
- 遺伝的特性解析：以下の試験を実施する
  - 複数の製造で得られた精製製品または最終バルクの段階で AAV ベクターの全ゲノムシーケンスにより得た配列と、用いたベクタープラスミドとしてデザインされた理論的配列を比較し、変異等の有無を確認する。
  - ベクターDNA についてゲノムの完全性をチェックする。PCR 分析が用いられる。
- ベクターの品質特性：ウイルス粒子あたりのベクターの感染価と決定し、異なる製造

での恒常性を評価する。

- 製造に使用した残存ウイルス：製造にヘルパーウイルスを用いた場合には、プラークアッセイまたは許容細胞を用いた TCID<sub>50</sub>、または定量 PCR により、残存性を評価する。
- 宿主由来タンパク質等：宿主細胞由来または製造用ウイルスに由来する工程由来不純物タンパク質の濃度は、ELISA 等により評価すると共に、規格試験を設定すること。また、製造工程により再現性よく適切に除去されることが担保できている場合には、規格試験として設定しないことも可能である。
- 宿主由来 DNA 等：宿主細胞由来の残存 DNA 量と、該当する場合は製造用プラスミドや製造用ウイルスなどの残存 DNA 量を、感度と特異性が評価された手法を用いて解析すること。定量 PCR 法等を用いることが可能である。また、製造工程により再現性よく適切に除去されることが担保できている場合には、規格試験として設定しないことも可能である。
- 他の工程由来不純物：精製工程により異なるが、ヌクレアーゼや濃縮のための沈殿剤、超遠心の媒体などが使用されることから、製造工程でこれらの試薬を用いた場合は精製ロットでの試験を実施すること。但し、製造工程により再現性よく適切に除去されることが担保できている場合には、規格試験として設定しないことも可能である。
- 残存抗生物質：製造工程で抗生物質を用いた場合、液体クロマトグラフィーや微生物学的試験により評価すること。製造工程により再現性よく適切に除去されることが担保できている場合には、規格試験として設定しないことも可能である。

### 3-1-2. 最終製品の特性解析・感染性因子に関する試験

rAAVベクター粒子には産生細胞ゲノム、ヘルパープラスミドやヘルパーウイルスゲノムなどが誤ってパッケージされることが知られている。誤ってパッケージされる量はわずかであるとの報告があるものの、特性解析では誤パッケージされたDNAにopen reading frames (ORF)が含まれているかどうかの検証が必須である。ORFが含まれることが判明した場合はほ乳類細胞(ヒト細胞)で検出されたORF配列からタンパク質が翻訳されるかどうかを確認する必要がある。誤パッケージされたDNAからタンパク質が発現する可能性がある場合、発現の評価には用いるAAVベクターの細胞指向性(生体内分布プロファイル)を反映する同等の細胞を用いることが重要である。誤パッケージされたDNAを含む粒子の混入率は同一製造ロット間で恒常的に管理可能であることを示すべきであり、適切に妥当性が示された出荷規格を設定することが望ましい。野生型よりも大きいDNAがパッケージされたウイルス粒子がエピソームを形成して細胞核内に長期間留まるか否かは不明であるため、可能であれば、誤パッケージされたDNAを含むウイルスゲノムの長期に亘る消長を確認するべきである。もしも目的遺伝子と誤パッケージされたDNAが細胞内に長期間留まることが確認された場合、長期間に渡って目的外の遺伝子が発現することの影響についての総合的に評価し、このような粒子が存在しても製品全体の安全性に問題がないことを示す必要がある。



最終製品の品質特性、感染因子に関する評価として次のような点について明らかにしておくこと。

- 確認試験：ベクターの確認試験として、免疫化学的手法、PCR、制限酵素切断マップなど適切な方法を用いること。
- 宿主由来 DNA 等：宿主細胞由来の残存 DNA 量と、該当する場合は製造用プラスミドや製造用ウイルスなどの残存 DNA 量を、感度と特異性が評価された手法を用いて解析し、規格に適合していること。定量 PCR 法等を用いることが可能である。中間工程で、十分に除去されていることが確認できている場合には、最終製品での試験をしなくても良い場合がある。
- ベクター粒子濃度：ベクター粒子濃度は定量 PCR やウイルス粒子タンパク質の ELISA 等を用いて、標準プラスミドまたは AAV 標準品を用いて定量する。
- 感染力価：被験試料を培養細胞に接種して感染力価を求める。各アッセイを検証するため、適切なベクター標準品の感染力価を求める。
- ベクターの品質特性：ウイルス粒子あたりのベクターの感染価と決定し、規格に適合していることを確認する。
- 目的遺伝子の発現：目的遺伝子の発現は、可能な限り、既に決定されている MOI で培養細胞への接種後、適切な免疫化学的試験または生化学的試験またはフローサイトメトリーにより測定すること。
- 生物活性：生物活性は適切な *in vitro* または *in vivo* 試験により決定する。(FACS, ELISA, 感染力価)。他の方法を用いる場合に、その妥当性を示すこと。
- 純度試験：qPCR, SDS-PAGE により、それぞれ Benzonase (または DNase) 耐性ウイルスゲノムの量及びウイルスタンパク質の純度を測定し、規格に適合していることを示すこと。また、適切な方法(電子顕微鏡や分析用超遠心など)で中空粒子の混入率を測定すること。
- 浸透圧：製品で承認された限度値以内
- pH：製品で承認された限度値以内
- 抽出可能量：抽出可能量試験に適合すること
- 水分含量：凍結乾燥製品の承認限度値以内
- 牛血清アルブミン：牛血清を製造に用いた場合、適切な免疫化学的手法により定量し、製品に固有の調製品の承認値以下であることを示す。
- rcAAV の濃度：承認された限度値以内であることを確認すること。  
rcAAV の検出は、replication center assay などを用い、ヘルパーウイルスを感染させた細胞での増殖性試験により実施する。
- ベクター凝集体：ベクター凝集体を適切な方法(例えば光散乱)により定量する。
- 無菌性：日局が適用可能であれば、日局無菌性試験に適合 (全体容量の 1%を使用す

る：参照 1)

- エンドトキシン：製品で承認された値以下(局方参考情報から 5 EU/投与量を参考にすること)

rAAVストックは通常、空のカプシド (DNAを含まない) と非感染性粒子 (DNAを含むが *in vitro*での発現は認められない)、感染性粒子 (細胞に入り、導入遺伝子の発現やDNA増幅が *in vitro*で観察される) の不均一な混合物である。そのため、製品ではこれらすべてのウイルス粒子の種類ごとの含量を解析し、患者に投与した際の免疫原性「抗原負荷」の一貫性について妥当な出荷規格に設定することが必要である。

### 3-1-3. 参照品

rAAV2及びrAAV8の標準参照品が現在ATCCから入手可能である。これらの参照品は、rAAVの粒子数 (ELISA)、ベクターゲノム量 (qPCR)、感染単位 (TCID<sub>50</sub>) の参照品として利用可能であり、rAAV2, rAAV8の測定にはこれらの参照品を利用することが望ましい。ベクターゲノムとその他の物理的特性には血清型が関わらないため (Moullier, 2008<sup>10</sup>)、この参照品は他のAAV血清型にも利用可能である。しかし、導入遺伝子の生物活性を製品規格の一つとして測定する必要があるため、製品特有の参照品も必要である。このような製品特有の参照品は、十分に特性解析されたものであるべきであり、参照品の更新が必要な場合には規定の安定性/性能モニタリングを行う必要がある。理想的には研究室または内部で作製された製品特有の参照品は、可能な限り初代ベクター参照品を基準として規格化すべきである。

## 3-2. 製品化 (指針第 4 章品質管理 2. 製品化 に該当)

### 3-2-1. 表示

- － 活性物質の含量
- － ヒトでの推奨される投与量
- － 凍結乾燥品の場合、
  - － 再構成に用いる液体の組成と容量
  - － 再構成後の使用期限

(参照 1)

- ・ JP 微生物限度試験法 非無菌製品の微生物学的試験：生菌数試験
- ・ EP 細胞製品についての微生物試験法 (無菌試験の代替)
- ・ 厚生労働省 各都道府県衛生主管部 (局) 長

生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品 / 生物起源由来医薬品) 製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析、純度試験の項

1. Pacak, C.A., *et al.* Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res***99**, e3-9 (2006).
2. Limberis, M.P. & Wilson, J.M. Adeno-associated virus serotype 9 vectors transduce murine alveolar and nasal epithelia and can be readministered. *Proc Natl Acad Sci U S A***103**, 12993-12998 (2006).
3. Gao, G., *et al.* Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol***78**, 6381-6388 (2004).
4. Grimm, D., Kern, A., Rittner, K. & Kleinschmidt, J.A. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther***9**, 2745-2760 (1998).
5. Allen, J.M., Debelak, D.J., Reynolds, T.C. & Miller, A.D. Identification and elimination of replication-competent adeno-associated virus (AAV) that can arise by nonhomologous recombination during AAV vector production. *J Virol***71**, 6816-6822 (1997).
6. Urabe, M., Ding, C. & Kotin, R.M. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther***13**, 1935-1943 (2002).
7. DiMattia, M., *et al.* Production, purification, crystallization and preliminary X-ray structural studies of adeno-associated virus serotype 5. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun***61**, 917-921 (2005).
8. Aucoin, M.G., *et al.* Virus-like particle and viral vector production using the baculovirus expression vector system/insect cell system: adeno-associated virus-based products. *Methods Mol Biol***388**, 281-296 (2007).
9. Taro Tomono, Yukihiko Hirai, Hironori Okada, Kumi Adachi, Akiko Ishii, Takashi Shimada, Masafumi Onodera, Akira Tamaoka, and Takashi Okada. (2016). Ultracentrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1). *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development***3**.
10. Moullier, P. & Snyder, R.O. International efforts for recombinant adeno-associated viral vector reference standards. in *Mol Ther*, Vol. 16 1185-1188 (United States, 2008).