

合体，液体クロマトグラフィー法を用いた類縁物質のそれぞれの試験を設定した。重合体以外にSDSポリアクリルアミド電気泳動で分離可能な不純物としては，大腸菌たん白質やメチオニル化体などのセルモロイキン類縁物質が考えられるが，これらは製造工程でSDSポリアクリルアミド電気泳動の検出限度以下となるとのデータが示された。したがって，重合体の試験法としてSDSポリアクリルアミド電気泳動を採用した。緩衝液成分として，酢酸アンモニウムを用いていることから，幅をもった規格として酢酸アンモニウム量を規定した。原案では発熱性物質が規定されていたが，エンドトキシンへ変更することとした。定量法として，IL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞のセルモロイキン依存的な増殖活性を指標として，IL-2標準品を用いて定量する方法を採用した。また，別にたん白質量を測定し，比活性を求めることとした。貯法温度は， -20°C 以下とし，滅菌した気密容器を用いることとした。

⑦ テセロイキン

テセロイキンの本質は組換えDNA技術によって作られるメチオニル化IL-2であり，進行腎細胞がん，悪性黒色腫，血管肉腫などに点滴静注ないしは皮下投与される。

基原，性状，確認試験，pH，純度試験，エンドトキシン，比活性，定量法が設定された。確認試験として，IL-2中和抗体を用いた生物活性抑制の確認試験，構成アミノ酸分析法，SDSポリアクリルアミド電気泳動による分子量，等電点電気泳動法を採用した。中和抗体を用いた生物活性抑制試験では，定量法を準用し，生物活性の中和率を規格として採用した。分子量および等電点の規格は，標準品を用いるのではなく標準物質から算出した分子量や等電点の値を規格として設定するこ

ととした。純度試験として，大腸菌由来たん白質，テトラサイクリン塩酸塩，デスメチオニル体，二量体，その他の異種たん白質，酢酸を設定した。大腸菌由来たん白質は，当初イムノラジオメトリックアッセイ法を採用していたがイムノエンザイモメトリック法に変更した。

テセロイキンは，メチオニル化体であるために，メチオニンがはずれたデスメチオニル化体の量を液体クロマトグラフィー法を用いて求めることにした。二量体およびその他の異種たん白質に関して，それぞれ液体クロマトグラフィー法を用いる試験法を採用した。定量法として，IL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞を用いた増殖能促進作用を指標とする生物活性試験を採用し，IL-2標準品を用いて力価を求めることとした。また，別にたん白質量定量試験より，テセロイキンのたん白質量を求め，比活性を規格として採用した。貯法温度として -10°C 以下とし，密封容器に保存することとした。

⑧ 注射用テセロイキン

テセロイキン注射液として，基原，製法，性状，確認試験，pH，純度試験，乾燥減量，エンドトキシン，製剤均一性，不溶性異物，不溶性微粒子，無菌，定量法を規定した。確認試験として，テセロイキンの確認試験を準用し，IL-2中和抗体を用いた生物活性抑制の確認試験，およびSDSポリアクリルアミド電気泳動による分子量の試験を規定した。定量法としては，同様に，テセロイキン定量法のIL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞を用いた増殖能促進作用を指標とする生物活性試験を準用することとした。貯法温度は，凍結を避けた 10°C 以下とし，凍結乾燥品であることから，密封容器に保存することとした。

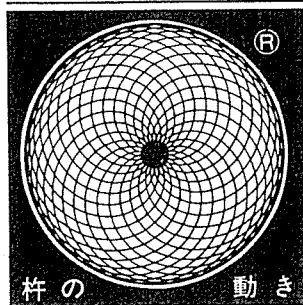
生物薬品各条審議のポイントと 生物薬品改正の基本方針と その対応

生物薬品改正の基本方針については最初に述べたが、この基本方針に沿った各条審議での対応については以下のとおりである。

ゴナドレリン酢酸塩およびオキシトシンでは当初、生物活性試験が規定されていたが、収載にあたって物理的定量法へ変更を行った。セラペプターゼの酵素製剤の原薬について、単位質量当たりの範囲のある含量規格の

設定を行うこととした。発熱性物質を規定していたセルモロイキンでは、エンドトキシンに替えることになった。また、リゾチーム塩酸塩では、試験法の見直しを行い、より精度の高い方法を採用した。また、全般的に規格値の見直しを求め、安定性を考慮した実測値に基づいた規格値を設定した。

今回の収載品目ではセルモロイキンとテセロイキンの同種同効医薬品を収載した。これらの審議にあたっては、共通の標準品を用いるものであり、各条の構成などの調和を図った。



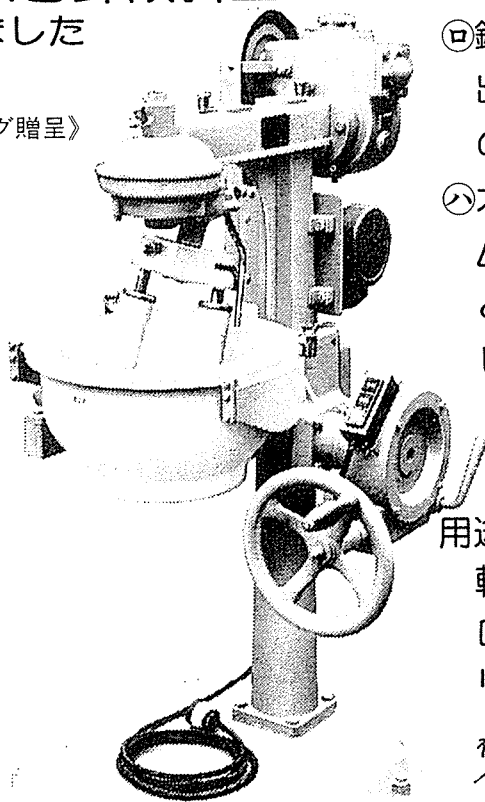
新しい小型機械 “第24号鉢傾斜型”が 出来ました

《カタログ贈呈》

攪拌・混合・ねり合せ作業を精密に組み合わせ、貴重な薬剤をムラなく安定して製造する機械として、大学医学部、病院、薬局にて長年ご愛用頂いています。小型石川式攪拌擂潰機にウォーム式機構の第24号型が開発され、ご好評を頂いております。

**AGA型用に
高純度アルミナ鉢・杵
新発売!!**

加熱型・冷却型もあります



標準第24号機に比べ

- ①ずっと静かな運転
- ②鉢をハンドルで傾斜出来ますので鉢・杵の着脱が容易
- ③大型機と同じウォーム機構ですから一段と安定した作業を致します

用途——

軟膏・散薬・顆粒・
ローション・パップ剤・
リニメント剤

株式会社 石川工場

〒135-0053
東京都江東区辰巳1-1-8
TEL 03-3522-1018 / FAX 03-3522-1017
<http://www.ishikawakojo.jp>

Gene Therapy Discussion Group の動向について**

山口 照 英*

1. 横浜会議とこれまでの経緯 (Table 1)

遺伝子治療薬は、まだ製品が世の中に出ておらず、ICH においても他の EWG と異なる取組みをしています。

本稿では、これまで遺伝子治療専門家会議で行われてきた活動について概説すると共に、横浜会議で取り上げた三つのテーマについて説明します。

一点目は、各極の遺伝子治療に関する最近の進展について、横浜会議で報告し、議論したことがあげられます。

二点目は、この遺伝子治療専門家会議で議論を続けています見解案 (Considerations) についてです。横浜会議ではこの「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列の意図しない伝達リスクを最小にするための方策」見解案の Draft 3 の議論を行いました。

三点目は、遺伝子治療の専門家会議で今後取り上げるべき課題についてです。横浜会議で今後の課題について議論し、ステアリングコミッティにいくつかの課題を提案し、了承を得ました。

2. 遺伝子治療について

遺伝子治療とは、様々な遺伝子的疾患あるいは重篤な疾患に対し、目的遺伝子を患者の体内にあるいは体外で患者の細胞に導入して行う治療です (Fig. 1)。

遺伝子治療専門家会議では、例えば新聞で報道されたフランスでの白血病様症状の発症など、有害事象が起きた場合、どのように対処するかも含め、その時点でのサイエンティフィックな到達点に基づき、サイエンスベースの recommendation を出すといった取組みを行っています。

2.1 遺伝子治療の対象疾患

遺伝子治療の対象疾患は、Table 2 に示すように重篤な遺伝性疾患、がん、血管の疾患あるいは神経病などがあげられます。

2.2 遺伝子治療の光と影 (Table 3)

遺伝子治療は、当初なかなか治療効果は得られませんでした。最近になっていくつかの画期的な成果が得られるようになってきました。

例えば、フランスで行われた重度の免疫不全症である X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する造血幹細胞の遺伝子治療において、10 人中 9 人に著効が得られました。この結果、今まで無菌室でしか生活できなかった子供が室外に出られるようになった画期的な治療成果です。その他同じような重度免疫不全症であるアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症でも有効な治療成績が得られています。更に、最近では白血球による殺菌機能が欠損している慢性肉芽腫症 (CGD) という遺伝子疾患についても、遺伝子治療で極めて有望な結果が得られています。

上記三例は先天性遺伝子疾患ですが、これらは導入効率の上昇等の進歩により、非常に著効が得られるようになった事例です。

一方、影の部分として重篤な副作用の発現があります。例えば、アメリカのペンシルベニア大学では 1999 年に遺伝子治療においてアデノウイルスベクターを所定以上に大量に投与したために死亡した例があり、これを受けて、アデノウイルスベクターの投与量あるいはベクター粒子数の上限が設定されるようになりました。

また、2002 年から、フランスのネッカー病院で、レトロウイルスベクターを用いた X-SCID 遺伝子

* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

** 当協会主催の第 14 回 ICH 即時報告会 (平成 18 年 7 月 26 日) における講演による。

Table 1 遺伝子治療専門家会議横浜会議とこれまでの経緯

- 遺伝子治療専門家会議のこれまでの活動
- 横浜会議で取り上げられたテーマ
 - 各極の遺伝子治療に関する進展
 - ICH 見解案「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列への意図しない伝達リスクを最小にするための方策」Draft3 の議論
 - 今後取り上げるべき課題

Table 2 遺伝子治療の対象疾患

- 重篤な遺伝性疾患，がんその他の生命を脅かす疾患又は身体の機能を著しく損なう疾患
- 先天性遺伝子疾患（単一遺伝子疾患）：ADA 欠損症，X-SCID，血友病，筋ジストロフィーなど
 - ガン：肺ガン，腎ガン，前立腺ガン，食道ガン，脳腫瘍，黒色腫など
 - 末梢性血管疾患：閉塞性動脈硬化症など
 - 虚血性心疾患：狭心症，心筋梗塞など
 - 神経変性疾患：アルツハイマー病，パーキンソン病，筋萎縮性側索硬化症（ALS）など
 - ウイルス感染症：HIV，B 型，C 型肝炎ウイルスなど
 - 生活習慣病，慢性疾患：糖尿病，関節リウマチなど

治療で，遺伝子の染色体挿入が原因となり 3 名に T 細胞白血病様症状が発症しました。

このような重篤な有害事象が起こることもあり，遺伝子治療はまだ医療として十分に確立していないといえます。このため，有効性，安全性を慎重に検

Table 3 遺伝子治療の光と影

成功例

- X 連鎖重症複合免疫不全症（X-SCID）に対する造血幹細胞遺伝子治療（レトロウイルスベクターで IL-2R コモン γ 鎖を導入）により 10 人中 9 人に著効
- アデノシンデアミナーゼ欠損症（ADA-SCID）に有効
- 慢性肉芽腫症（CGD）の遺伝子治療で極めて有望な結果

重篤な副作用の発現

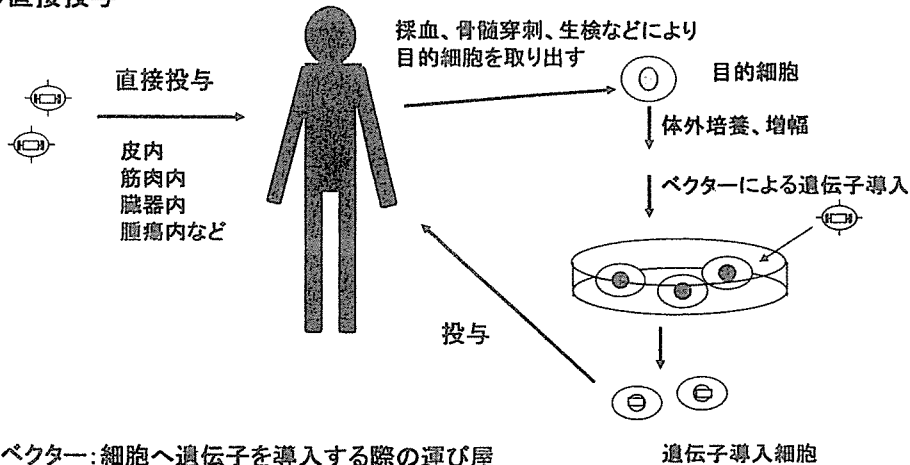
- 1999 年 アデノウイルスベクターの投与による異常免疫反応により死亡（米・ペンシルベニア大）
- 2002 年 レトロウイルスベクターによる X-SCID 遺伝子治療で遺伝子の染色体挿入が原因となり 3 名に T 細胞白血病様症状発症（仏・ネッカー病院）
- 遺伝子治療はまだ医療として十分に確立しておらず，有効性，安全性を慎重に検討する必要がある

討する必要があるとの姿勢で遺伝子治療専門家会議は行われています。

3. ICH 遺伝子治療専門家会議（GTDG）

2001 年 5 月の ICH のステアリングコミッティにおいて，遺伝子治療薬などの製品の規制に重大な影響を及ぼす可能性がある新しい科学的知見に関する情報について，ICH 各極間での情報の交換及び共有を積極的に継続して行う必要があるとの認識のも

遺伝子治療薬（ベクター）の直接投与



ベクター：細胞へ遺伝子を導入する際の運び屋

遺伝子導入細胞

Fig. 1 遺伝子治療とは

と、遺伝子治療専門家会議 (Gene Therapy Discussion Group; GTDG) が ad hoc に新設されました。他の専門家作業グループのように EWG ではない理由は、EWG はガイドラインを作る時に立ち上げる専門家作業グループですが、現時点ではガイドラインに取り上げる取組みをしていないため、遺伝子治療専門家会議となりました。現時点での参加メンバー (Table 4) には、ICH 3 極 6 グループに EFTA とカナダが加わっています。

3.1 遺伝子治療専門家会議の活動 (Table 5)

1997 年及び 2001 年の ICH 会議のバイオテクノロジー専門家会議において遺伝子治療の問題が取り上げられ、2002 年に初めて遺伝子治療専門家会議が正式に発足しました。その後 2003 年は大阪での ICH6、2004 年はワシントン、2005 年はブリュッセルとシカゴで遺伝子治療専門家会議が開催されました。

3.2 遺伝子治療専門家会議の目的 (Table 6)

遺伝子治療専門家会議の目的の一つは、遺伝子治療分野は非常に急速に進展しているため、その科学的事項について調査・検討することです。

二つ目は、遺伝子治療用医薬品に関する規制の国

Table 4 ICH 遺伝子治療専門家会議参加メンバー

Klaus Cichutek (EMEA), Stephanie Simek (FDA), Teruhide Yamaguchi (MHLW), Christine-Lise Julou (EFPIA), Wataru Toriumi (JPMA), Alex Kuta (PhRMA), EFTA, Canada

Table 5 ICH 遺伝子治療専門家会議の活動

1997 年ブラッセル： バイオテクノロジー専門家会議
2001 年 東京・舞浜： バイオテクノロジー専門家会議
2002 年ワシントン： 遺伝子治療専門家会議として正式に発足
2003 年大阪 (ICH6)：遺伝子治療専門家会議
2004 年ワシントン：遺伝子治療専門家会議
2005 年ブラッセル：遺伝子治療専門家会議
2005 年シカゴ：遺伝子治療専門家会議

際調和に有益な影響をもたらす可能性のある一般的原则をあらかじめ公表することです。

三つ目は、ICH における議論の成果が社会に広く浸透し、十分理解されることを保証するための社会に向けた新しいコミュニケーション手段として、インターネット等を利用して公開することです。

例えば 2002 年、2003 年及び 2005 年に公開ワークショップを開催しています。2005 年は、後述する腫瘍溶解性ウイルスに関する公開ワークショップを開催しています。

また、ICH のステアリングコミッティで遺伝子治療専門家会議の公式声明を発表し、その時点での到達点を公開します。更に誰でもアクセス可能な ICH 遺伝子治療のホームページを開設し、これを ICH 事務局のホームページ内に開設する了解を得て公開しています。国立医薬品食品衛生研究所 (衛研) の遺伝子細胞医薬部のホームページでは、これを日本語に仮訳して掲載しています。更にこの衛研のホー

Table 6 ICH 遺伝子治療専門家会議の目的

<ul style="list-style-type: none"> ● 研究が進められている科学的事項について調査・検討 ● 遺伝子治療用医薬品に関する規制の国際調和に有益な影響をもたらす可能性のある一般的原则を予め積極的に提示 ● ICH における議論の成果が社会に広く浸透し、十分理解されることを保証するための、社会に向けた新しいコミュニケーション手段を開発
<p>例：ICH 遺伝子治療公開ワークショップの開催</p> <ul style="list-style-type: none"> → 2002 年 9 月、2003 年 11 月、2005 年 11 月に開催 ICH SC を介しての ICH GTDG 公的声明の発表 誰でもアクセス可能な ICH 遺伝子治療ホームページの開設 → ICH 事務局ホームページ内 (英語)： www.ich.org/cache/html/1386-272-1.html 国立衛研 遺伝子細胞医薬部ホームページ内 (日本語)： www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec1/index1-j.html

ムページでは、日本における遺伝子治療の状況について厚生労働省の厚生科学課の協力を得ながら英語で公開し、国際的な情報共有の場としても役立っています。

3.3 遺伝子治療専門家会議で取り上げられたトピック

過去に遺伝子治療専門家会議は専門家会議として発足して6回、合計8回の会議を開きました。その中で取り上げられたトピックを Table 7 に示します。

1点目は遺伝子治療で用いるウイルスあるいはウイルスベクターの体外への放出について、患者だけでなく患者をケアする人や患者の家族も遺伝子ベクターが伝播される可能性があるため、どのように検出して防げば良いかの議論です。

2点目は、遺伝子治療のベクター作成時における増殖性の replication confident virus (RCV) の混入についての議論です。

3点目は、Viral Shedding あるいは RCV の測定には適切な参照品が必要なため、現在、アデノウイルス5型の参照品が作られています。この参照品の有用性やどのように利用すべきかについての議論です。

4点目は、生殖腺への遺伝子治療ベクターの伝達に関するリスクを最小にするための方策についての議論で、2005年に見解案としてまとめることが方針とされました。

5点目は、前述したフランスでの事例のように、染色体挿入変異による癌化などのリスクについての評価や評価法についての議論です。

6点目は、腫瘍溶解性ウイルスについて、臨床あるいは非臨床のあり方、あるいは特性解析や品質管

Table 7 ICH 遺伝子治療専門家会議で取り上げられたトピック

- Viral Shedding from patients
- Detection of RCV (RCA or RCR)
- Reference Materials (Adenovirus type5)
- Minimize of the Risk of Germline transmission
- Insertional mutagenesis
- Oncolytic virus (Workshop)
- Long term follow up (FDA Guideline 案)
- Lentiviral vector (EMEA Guideline 案)

理をどのように行うべきかについての議論です。

それ以外には、FDA の Long term follow up あるいは EMEA の Lentiviral vector といった各極のガイドライン案について議論し、各極からのコメントが作成されたガイドラインに取り込まれています。

4. 横浜会議

4.1 遺伝子治療をめぐる各極の最新情報 (Table 8)

EUからは、非常に有効な成績が得られているレトロウイルスベクターを用いた慢性肉芽腫症 (CGD) の治療において、スイスとドイツで3名の患者の治療が行われ、そのうちの1名が遺伝子治療の効果が現れる前に原疾患 (感染症) により死亡したことが報告されました。EUは、これは副作用ではないと判断していますが、EFTAでは詳しい情報が得られるまでは、CGDの臨床研究は一時凍結していることが報告されました。

FDAは、臨床研究における遅発性の副作用、すなわち Long term のフォローアップに関するガイドラインを近々発出する予定で、これについていくつかのコメントを提出しました。

また、前述したアデノウイルスベクターの参照品は、遺伝子治療の品質あるいは Viral Shedding を測定するために推奨していますが、その安定性試験

Table 8 遺伝子治療を巡る各極の最新情報

- EU: レトロウイルスベクターを用いた慢性肉芽腫症 (CGD: 好中球の活性酸素生成酵素の異常により殺菌能が欠損し、重篤な感染症を繰り返す) の遺伝子治療での死亡例についての現在の見解。スイスとドイツで3名の患者に本遺伝子治療が行われたが1名の患者が死亡。十分な機能回復が得られる前の原疾患 (感染症) による死亡。副作用ではないとの判断。
- EFTA: CGD の臨床研究については詳しい情報が得られるまで一時凍結
- FDA: 臨床研究における遅発性の副作用のフォローアップに関するガイドラインを発出する予定。遺伝子治療用アデノウイルスベクターの参照品の長期安定性に関する情報: -80°C で50ヶ月の安定性を確認
- Japan: ADA-SCID 遺伝子治療のフォローアップについて報告。現在まで、ガン化等の重篤な副作用は見られていない

Table 9 ICH遺伝子治療専門家会議見解(案)「意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組み込みリスク評価における原則」

報告担当者 (1st) :	Markku Pasanen (EMEA)
同 (2nd) :	Teruhide Yamaguchi (MHLW)
同 (3rd) :	Dan Takefman (FDA)

- 2005年10月：欧州医薬品庁が第1次案を作成。各極に配付
- 2005年11月：各極から寄せられた事前コメントを基に、GTDG会議で第2次案を作成
- 2006年1月：第2次案に対する各極からのコメントを切り取りまとめ(MHLW)→第3次案を作成
- 2006年6月：横浜GTDG会議で検討→第4次案を作成
- 2006年7月：Draft4に対するコメント締め切り(予定)
- 2006年9月：Draft5作成(予定)
- 2006年10月：シカゴGTDG会議でDraft5の検討。最終案の作成(予定)

の結果が報告されました。

日本は、北海道大学で行われたADA-SCID遺伝子治療のフォローアップについて、現在までのところガン化等の重篤な副作用は見られていないと報告しました。

4.2 生殖細胞への挿入リスクの問題について (Table 9)

ICH GTDG見解案は後述しますように、題名が変更されております。

「意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組み込みリスク評価における原則」の最初の見解案はEMEAが作成、次に筆者がDraft3を作成し、現在はFDAに交代しています。ほぼ大きな論点はなくなっていますので、2006年度中に最終案にする予定です。

これまでの経過はTable 9に示すように、2005年10月にEMEAが第1次案作成、11月のシカゴ会議で各極から寄せられたコメントを基に第2次案を作成、更に第2次案に対する各極のコメントを基に第3次案を作成し、横浜会議ではそれを検討して第4次案を作成しました。

現在は第4次案のコメントを求めているところで、7月中に締め切り、FDAに送付することとなっています。

5. 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組み込みリスク評価における原則

5.1 構成

Table 10に示すように最初に序論があり、次にリスクに影響する因子として、ベクターの種類、投与量、及び投与方法や投与部位について記載されています。3番目には非臨床試験で実施すべきこととして一般的考慮事項と生体内分布試験について記載され、4番目は何らかのリスクが想定される場合、患者に対するモニタリングをどのように行っていくべきかが記載されています。

5.2 見解案議論の主なポイント (Table 11)

この見解案のタイトルについては、最初はtransmissionという言葉を用いて「伝達リスク」という

Table 10 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組み込みリスク評価における原則

● 序論
● 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞(染色体)への組み込みリスクに影響する因子
- ベクターの種類
- 投与量
- 投与方法や投与部位
● 非臨床試験
- 一般的考慮事項
- 生体内分布試験
● 患者のモニタリング
● 用語

Table 11 見解案議論の主なポイント

- 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列への意図しない伝達リスクを最小にするための方策 (Draft3)
 - ↓
 - 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞 (染色体) への組込みリスク評価における原則 (Draft4) (遺伝子改変が次世代へ及ぶことを防止するための方策に限定することを明記)
 - 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞 (染色体) への組込みリスクに影響する因子
 1. 生体内分布様式, 増殖特性, 組込み能等のベクターの性質に依存してリスクが分類できる
 2. リスクは次の順で低くなる
 - ① 搭載遺伝子を核内へ送達し, かつ染色体への組込み機能を持つベクター
 - ② 搭載遺伝子を核内へ送達するが, 染色体への組込み機能を持たないベクター (非ウイルスベクターを含む)
 - ③ 搭載遺伝子を核内へ送達せず細胞質にのみ局在
 - ④ 体外で遺伝子導入された細胞 (非増殖性ベクター)
 3. 投与量, 投与方法, 投与部位
 - 非臨床試験
 1. 非臨床試験のデザインに関しては, ICH M3 や ICH S6 などの他の GL のスコープには含まれないが, 基本原則は適用できるかもしれない。
 2. 生体内分布試験
 - ・ 生体内分布試験では, 生殖腺への分布を試験すること
 - ・ 生殖腺への分布の検出に当たっては, 定量的 PCR 等の適切な感度をもつ試験法を用いて試験すること
 3. 生殖腺への分布が認められたときにはそのシグナルが持続性があるかを試験すること. 持続性が認められたときには, 生殖細胞へのシグナルが認められるかどうかを明らかにすること
 - 患者のモニタリング

非臨床試験において生殖腺に一過性のベクターシグナルが認められたときには, 臨床試験において患者の精子への伝達が無いかモニタリングすることが推奨される

言葉を用いていましたが, 基本的に遺伝子治療用ベクターの生殖細胞の染色体への組込みリスクにおける原則, つまり次世代へ影響が及ぶことを避けるといったことに限定することとし, 例えば卵子の染色体外にベクターが入った場合にも発生に影響が及ぶ可能性があります, それについて発生毒性あるいは他の非臨床的試験でカバーすべきであるといったことを明記しています。

5.2.1 意図しない遺伝子治療用ベクターの生殖細胞 (染色体) への組込みリスクに影響する因子

染色体への組込みリスクに影響する因子として, ベクターの生体内分布様式, 増殖特性, あるいは組込み能等のベクターの性質に依存してリスクが分類できます。

リスクの分類として最も高いのは, 遺伝子を核内へ送達し, かつ染色体への組込み機能を持つベクターです。

2番目は, 核内には送達するけれども, 通常は組込み能がなく, 高濃度に存在すると組込みが行われ

る場合です。

3番目は遺伝子を核内に送達せず, 細胞質のみに局在する場合です。例えばセンダイウイルスベクターを用いた場合は, ここに該当します。

4番目は体外で遺伝子導入された細胞で治療を行い, かつ非増殖性ウイルスベクターを使う場合で, 非常にリスクは低く, 生殖細胞への組込みリスクに関する非臨床試験を行う必要はないと考えられます。

その他に投与量, 投与方法及び投与部位がリスクに関与します。

5.2.2 非臨床試験 (Table 11)

5.2.1 で述べたようなリスクに基づいて非臨床試験をデザインします。

デザインに関しては, ICH M3 や S6 など他のガイドラインのスコープには含まれません。ただし基本原則については, 適用できる可能性もあると考えています。

遺伝子治療ベクターでは, 当然生体内分布試験が行われます。その試験においては, 必ず生殖腺への分布も試験することが求められます。生殖腺への分

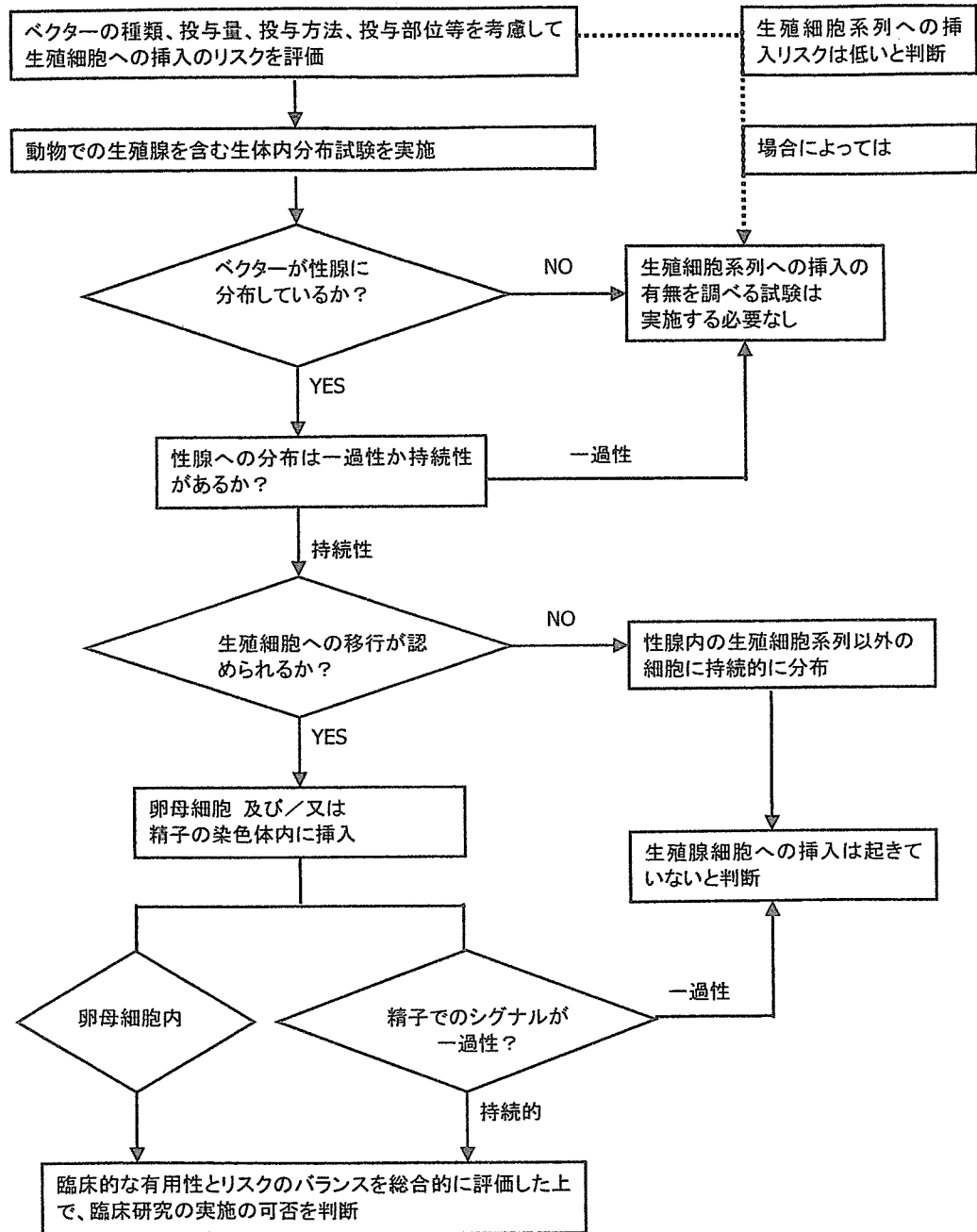


Fig. 2 遺伝子治療用医薬品の生殖細胞系列への組込みの有無を調べるための動物試験のフロー（案）

布を試験するに当たっては、定量的 PCR 等の適切な感度を持つ試験法を用いて試験をすることが求められます。

生殖腺への分布が認められた場合、そのシグナルに持続性があるかどうかを試験し、持続性が認められれば更に生殖細胞へのシグナルが認められるかどうかを明らかにします。これをフローチャートで表

すと、Fig. 2 のようになります。

まずはベクターに応じてリスクを評価します。生殖細胞への挿入リスクが低いと判断された場合は、もともと生殖細胞の挿入リスクがないと考え、試験を実施する必要がない場合もあります。しかし生体内分布試験を実施してベクターが性腺に分布しないのであれば、それ以上の試験は必要ありません。こ

の評価を全ての製品について行わなければならないかについては、例えば対象が非常に高齢であったり、重篤な患者に限定される場合は、次世代への影響を考慮する必要がないことから、試験を実施する必要はないことが記載されています。

一方、ベクターが性腺に分布していた場合は、性腺の分布が一過性か持続性かを判断し、一過性であれば組み込みは起きていないと判断できますが、持続性であって、かつ生殖細胞に移行した場合は、精子の染色体内に行っているかどうかを試験し、精子でのシグナルが一過性であれば、生殖腺細胞への挿入は起きていないと判断できます。一過性でない場合、よほどの理由がない限り臨床試験は実施できないこととなります。ただし、先ほど述べたように次世代への影響が起るような患者を対象としていない場合は判断が変わってきます。

5.2.3 患者のモニタリング (Table 11)

非臨床試験において、生殖腺内に例えば一過性のベクターシグナルが認められた場合は、臨床試験において患者の精子への伝達が無いか、特に精子の成熟サイクルの期間を越えて試験をすることが推奨されます。

6. 遺伝子治療専門家会議の今後の活動予定 (Table 12)

ICH 見解の策定を次の二つについても行うべきではないかと議論しました。

まず、「腫瘍溶解性ウイルス」について、2005年のシカゴ会議でオープンワークショップを行った成果を基に ICH としての見解案、もう一つは、ウイルスやウイルスベクターの体外への放出の評価についても見解案を作成すればどうかといった意見が出ました。

更に、ICH7 での活動予定についても議論をしま

Table 12 ICH 遺伝子治療専門家会議の今後の活動予定

- ICH GTDG 今後の活動予定
 - ・ ICH 見解の策定
 - ・ ICH 見解「腫瘍溶解性ウイルス」
 - ・ ICH 見解「ウイルス/ベクターの体外放出評価」
 - ・ ICH7 での活動予定

した。

6.1 腫瘍溶解性ウイルス

非増殖性のウイルスを用いたがん治療においては、腫瘍部位にベクターが入った部分のみがん細胞は死に、入っていない部分は生き残ります。ところが腫瘍溶解性ウイルスは、がん細胞でのみ増殖できる性質を持っており、がん細胞を破壊し、更に隣のがん細胞も破壊して増殖していくという制限増殖型ウイルスです¹⁾。

世界的に見ると、腫瘍溶解性ウイルスはアメリカ、カナダ、ヨーロッパで多くの製品の開発が行われています。国内では遺伝子治療としてはまだ行われていませんが、野生型あるいは弱毒化されたウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルスの臨床研究は行われています。名古屋大学で行われている例を Table 13 に示します。

それ以外にも動物実験の段階のステージにある製品を Table 13 に示しています。これらはほとんどが遺伝子組換えのウイルスのタイプです。

6.2 ICH 腫瘍溶解性ウイルスワークショップ (Table 14)

2005年にシカゴにおいて、腫瘍溶解性ウイルスのワークショップが開催されました。その目的は、腫瘍溶解性ウイルスについて以下のような臨床開発に関連する問題点を整理し、意見交換を行うことです。

問題点の一つ目は、腫瘍溶解性ウイルスには、野生型、弱毒型、遺伝子組換え型がありますが、それぞれどのような設計に基づき腫瘍に特異的に作用するかについての検討です。

二つ目は、非臨床試験の有効性・安全性の確認及び至適用法・用量の検討です。

三つ目は、腫瘍選択性で、例えば腫瘍にのみ発現しているタンパク質や発現が抑えられているタンパク質をターゲットにしたり、若しくは腫瘍細胞に特異的に発現している抗原をターゲットにするといった選択性が検討されています。

四つ目は、臨床での安全性で、患者体内であれば生きたウイルスが存在し続けることも含めた安全性をどのように評価するかの検討です。

五つ目は、安全性、投与量、あるいはその有効性を評価するためには適切な動物モデルを策定しなければなりませんので、モデル動物の開発についてです。

Table 13 国内開発中の腫瘍溶解性ウイルスの例（2005年4月現在）

<臨床研究段階>

ウイルスの種類	ウイルスの名称	ウイルスの特徴	実施施設/企業名	対象疾患	実施状況	症例数	治験
変異単純ヘルペスウイルス	HF10	弱毒型の自然変異株*	名古屋大学医学部附属病院	皮膚又は皮膚に再発した乳がん	2003年に臨床研究終了	6	—
				頭頸部がん	2004年に臨床研究開始	5(予定)	
				進行性膵臓がん	2005年に臨床研究終了	6	
				大腸がん, 乳がん	動物実験	—	

*:天然型ウイルスのため,実施前に「遺伝子治療臨床研究指針に関する指針」に基づく厚生労働大臣の確認は不要.また,カルタヘナ法に基づく第一種使用規程承認申請も不要.

<動物実験段階>

ウイルスの種類	実施施設/企業名	対象疾患
遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス	大阪府立成人病センター	平滑筋肉腫
	愛知県がんセンター	卵巣がん
	東京大学医学部	グリオーマ, 前立腺がん
	慶應義塾大学医学部	脳腫瘍, 前立腺がん, 膀胱がん
	九州大学医学部	胆嚢がん, 胆道がん
	和歌山県立医科大学	前立腺がん, 腎がん, 卵巣がん, 乳がん
遺伝子組換えヒトアデノウイルス	岡山大学医学部/オンコリス・バイオファーマ	大腸がん, 非小細胞肺癌
	東北大学医学部	膵臓がん, 膀胱がん
		非小細胞肺癌
	筑波大学	胆嚢がん, 胆道がん
	愛媛大学医学部	卵巣がん
		グリオーマ
	千葉県立がんセンター	肝がん, 肝細胞がん
札幌医科大学	大腸がん, 肝がん	
遺伝子組換えセンダイウイルス	ディナベック	大腸がん, 線維肉腫
レオウイルス3型	大分大学医学部	膵がん, 同腹膜転移

(www.nihgs.go.jp/cgtp/cgtp/sec1/oncltc_v/oncltc-j.html)

Table 14 ICH腫瘍溶解性ウイルスワークショップ2005年シカゴ

● 目的

腫瘍溶解性ウイルスの臨床開発に関連する以下のような問題点を整理し,フローも含めて積極的に意見交換を行う.

- ・腫瘍溶解性ウイルスの設計(野生型,弱毒型,遺伝子組換え型)
- ・非臨床試験での有効性・安全性の確認及び至適用法・用量の検討
- ・腫瘍選択性
- ・臨床での安全性
- ・適切な動物モデル
- ・体外からの排出(測定法,実測データ)

六つ目は,先ほど述べたように長期にわたる体外からの排出をどのように測定し,評価するかについての検討です.

ワークショップでは,世界各国から約10人の演者が講演し,それぞれの発表についての議論を取りまとめ,そのアウトプットとして見解案を作成しようと考えています.

6.3 Viral Shedding (Table 15)

2002年に開催された第1回遺伝子治療ワークショップにおいて,viral sheddingについての議論を行いました.

アデノウイルスベクターの体外への放出について

Table 15 Viral Shedding

- 第1回遺伝子治療ワークショップで viral shedding についても議論 (2002年)
 - ・ アデノウイルスベクターの体外への排出 (Shedding)
 - ・ ウイルスベクターの体外への排出に伴う安全性上の問題は現在までのところ確認されていない
 - ・ アデノウイルス5型国際標準品
 - ・ アデノウイルス5型国際標準品を使用することによって、異なる施設/研究で測定されたウイルス粒子数及び力価のデータ同士を科学的に比較することが可能となる。これにより、用量依存的な毒性のような安全性に関する情報の相関関係を明らかにすること、及び遺伝子治療用アデノウイルスベクターの製品中に含まれる増殖性アデノウイルス (RCA) の真の定量値を求めることが可能となるであろう。
- 2008年 (?) ICH7で virus/vector shedding について総合的に議論 (予定)

Table 16 ICH遺伝子治療専門家会議の将来的課題

- Viral Shedding
 - ・ 測定法の確立・安全性評価。
- ウイルスベクター標準品
 - ・ レンチウイルス (?)
- Insertional Mutagenesis
 - ・ 挿入部位の高感度測定法開発。挿入部位が特定出来るより安全なベクターの開発。
- 腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性・有効性評価

は、安全性上の問題は今までのところ確認されていません。しかし、正確な評価をするためには参照品が必要ですので、アデノウイルス5型の国際標準品を使用することによって、異なる施設、若しくは研究で測定されたウイルス粒子数及び力価のデータを科学的に比較することが可能になること等について議論しました。

更に今のところ決定されているわけではないのですが、2008年にICH7が開催される場合に Viral/Vector Shedding に関する議論を再度行い、それに

Table 17 ICH GTDG国内メンバー (於横浜会議)

MHLW	JPMA
国立医薬品食品衛生研究所	日本製薬工業協会
○ 山口照英	○ 鳥海互
○ 内田恵理子	○ 小澤健夫
医薬品医療機器総合機構	○ 井上誠
○ 荒戸照世	○ 竹迫一任
○ 前田大輔	○ 玄番岳踐
	○ 田中舞紀

基づいて見解案を策定することをステアリングコミッティに申請しました。

7. GTGDの将来的課題 (Table 16)

遺伝子治療専門家会議の将来的課題の一つ目は、先ほど述べた Viral Shedding について、測定法が十分確立されていませんので、今後検討していく必要があります。

二つ目は、ウイルスベクター標準品について、レンチウイルス、AAV (アデノ随伴ウイルス)、又はそれ以外のウイルスについて標準品が必要かどうかを検討し、必要であればどのように作成して、どのように利用するかを検討する必要があります。

三つ目は、Insertional Mutagenesis を評価するために挿入部位についての高感度測定法の開発があげられます。現在のところ専門家会議の議論でも確定的な方法はなく、複数の方法を取り合わせることによって推論するしかないとされており、より適切な方法を開発したり、あるいは挿入部が特定できるような安全なベクターの開発が望まれています。

四つ目は、腫瘍溶解性ウイルスの品質・安全性・有効性評価に関しては、見解を取りまとめる中で明らかにしたいと考えています。

最後に ICH 横浜会議に参加した MHLW, JPMA のメンバーを Table 17 に示し、謝意を表したいと思います。

文 献

- 1) Estaurdo Aguilar-Cordova: *Nature Biotech.*, **21**, 756-757 (2003).

Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products

Teruhide Yamaguchi^{1,*} and Eriko Uchida²

¹*Division of Biological Chemistry and Biologicals, The National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo, 158-8501, Japan;* ²*Division of Cellular and Gene Therapy Products, The National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo, 158-8501, Japan*

Abstract: Many types of oncolytic viruses, wild-type virus, attenuated viruses and genetically-modified viruses, have been developed as an innovative cancer therapy. The strategies, nature, and technologies of oncolytic virus products are different from the conventional gene therapy products or cancer therapy products. From the regulatory aspects to ensure the safety, efficacy and quality of oncolytic viruses, there are several major points during the development, manufacturing, characterization, non-clinical study and clinical study of oncolytic viruses. The major issues include 1) virus design (wild-type, attenuated, and genetically engineered strains), 2) proof of concept in development of oncolytic virus products, 3) selectivity of oncolytic virus replication and targeting to cancer cells, 4) relevant animal models in non-clinical studies, 5) clinical safety, 6) evaluation of virus shedding. Until now, the accumulation of the information about oncolytic viruses is not enough, it may require the unique approach to ensure the safety and the development of new technology to characterize oncolytic viruses.

Keywords: Gene therapy, cancer therapy, replicating virus.

INTRODUCTION

Oncolytic virus therapy has been developed as a new wave of cancer therapies. These therapies are dependent on the replication-selective nature of these viruses in tumor cells, which provides the marked breaths of cancer therapy. More than one century ago, evidence of oncolytic activity caused by replicating viruses was reported, and it was known the viruses could induce tumor lysis. Using these studies as a point of departure, rare but dramatic responses in cancer patients recovering from viral infections were reported. In the early development of oncolytic virus therapy, wild-type viruses with low pathogenicity to normal tissues, or attenuated viruses were selected for the treatment of cancer patients. However, some adverse events, such as the development of encephalitis in immune compromised patients, were reported [1-3]. Other works reported the oncolytic activity of wild-type or attenuated oncolytic viruses to be transient or limited to the site of injection [4-8]. Recently, attention has focused on overcoming the disadvantages of wild-type or attenuated oncolytic virus therapy, and many genetically modified viruses have been developed for cancer treatment. Progress in the development of genetically engineered oncolytic viruses has been based on recent advances in our understanding of the molecular biology of cancer and viruses, and on advances in genetic engineering technologies of virus genomes. Although many gene therapy clinical studies for the treatment of cancer have been conducted during the past decade using replication-incompetent virus vectors, these studies have not achieved satisfying results. Tumor-selective replicating viruses have been suggested to have an advantage over conventional gene therapy vectors for cancer therapy, and oncolytic viruses, especially genetically modified viruses, must be considered to be a special type of gene therapy product since their principle is directly associated with the transfer of the viral genome as the therapeutic gene [9]. In the present report, we review the development of oncolytic viruses as gene therapy products or attenuated virus

products with specific reference to the associated regulatory issues.

Oncolytic virus therapy is based on several strategies, including tumor-selective replication, tumor-selective targeting, and/or the minimization of toxicity to normal cells. Many types of viruses have been utilized in oncolytic virus therapy; including adenovirus, herpes simplex virus (HSV), reovirus, Newcastle disease virus (NDV), vaccinia, measles virus, vesicular stomatitis virus (VSV) and Sendai virus [10-13]. During the development of oncolytic virus products, a number of major issues have arisen with respect to ensuring the quality, safety and efficacy of the products: 1) virus design (wild-type, attenuated and genetically engineered strains); 2) proof of concept in the development of oncolytic virus products; 3) the selectivity of oncolytic virus replication and targeting to cancer cells; 4) relevant animal models in non-clinical studies; 5) clinical safety; and 6) the evaluation of virus shedding. Since the strategies, nature and technologies of oncolytic virus products are different from those of conventional gene therapy products or cancer therapy products, we discuss the regulatory aspects of the development of oncolytic viruses in the present paper.

VIRUS DESIGN AND PRODUCT DEVELOPMENT

While many types of viruses are utilized for oncolytic virus therapies [10, 11, 14], selective replication in tumor cells is essential for the efficacy and safety of oncolytic viruses. Wild-type viruses and naturally occurring attenuated viruses are known to possess the ability to infect and kill transformed cells such as tumor cells. For example, VSV, NDV and reovirus have been used as oncolytic viruses with inherent tumor-selectivity [12, 15-18]. In the case of wild-type viruses or attenuated viruses, the mechanism underlying the virus-selectivity to tumor cells has been analyzed from various points of view. For instance, reovirus has an inherent preference for replicating cells with dysregulated growth factor-signaling cascades by Ras activation [17, 19]. Attenuated strains from HSV-1 have been reported to be potential anti-cancer therapeutics and have necessitated a thorough investigation into the molecular basis of host-cell permissiveness to HSV [20-22]. Since in the

*Address correspondence to this author at the Division of Biological Chemistry and Biologicals, The National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo, 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1926; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: yamaguch@nihs.go.jp

development of wild-type or naturally attenuated oncolytic viruses, intentional genetic modification is not introduced into the virus genome, the tumor selective targeting, tumor-selective replication and pathogenicity of these oncolytic viruses are dependent on the method of selecting the strains. During the characterization of wild-type and attenuated oncolytic viruses, it is extremely important to analyze the molecular mechanisms of the tumor-selectivity and tumor-specific replication, as well as the genetic stability, etc.

There are several strategies used to design and construct the tumor selectivity of genetically engineered oncolytic viruses [10, 11, 23, 24]. One strategy is to engineer viruses through the deletion of virus genes critical for viral replication in normal cells but non-essential in tumor cells. For example, adenovirus E1B55K is responsible for binding and inactivating p53. E1B55K-deleted adenovirus has acquired the ability to propagate and induce cell death selectively in tumor cells, and then to spread to surrounding cells and tissues [25, 26]. Another strategy is transcriptional targeting, in which tumor- or tissue-specific promoters that are active in tumor cells are inserted into the viral genome to regulate the expression of essential viral genes and to restrict viral replication in tumor cells. The promoters used are categorized into different types; telomerase reverse transcriptase (TERT), S-phase of cell cycle promoter (E2F) and hypoxia promoter (HIF-1) are utilized as targeting promoters to all tumor cells; and prostate-specific antigen (PSA) promoter, α -fetoprotein (hepatoma) promoter and albumin promoter for hepatoma are used as tissue-specific promoters. The third strategy is the receptor-mediated targeting of replication-competent viruses to tumor cells [23, 27]. In this approach, the natural virus tropism of a replication-competent virus is adapted to the tumor cells through genetic modification of the virus coat or envelopes. This approach requires the ablation of the natural virus infection pathway and the introduction of new ligands into the virus surface without disrupting viral integrity. To improve the selectivity of oncolytic viruses to tumor cells and to improve safety, constructs with multiple modifications to tumor selectivity are developed. In addition, to improve efficacy, oncolytic viruses carrying a transgene (armed oncolytic viruses) have recently been developed [14, 28, 29].

In the endorsement of clinical trials or the approval of oncolytic virus products, the scientific rationale of the design of the oncolytic virus construct must be thoroughly justified. Furthermore, non-clinical studies should be designed in each case to verify predictions of efficacy and safety. In this context, it is recommended that animal models be developed to provide valuable evidence concerning the non-clinical safety of these products and to assess their proof of concept.

MANUFACTURING AND CHARACTERIZATION OF ONCOLYTIC VIRUSES

There are to date no specific regulatory guidelines related to the manufacture and characterization of oncolytic viruses for clinical use. However, guidelines concerning the manufacturing and characterization of gene therapy products have been issued by the Food and Drug Administration (FDA), the European Medicines Agency (EMA) and the government of Japan [30-33]. While there are some differences in the format of these guidelines, the underlying scientific principles are not fundamentally different, and the scientific principles covered

by the above guidelines for gene therapy products may be applicable to the evaluation of the manufacturing and characterization of oncolytic viruses.

The guidelines should require that the rationale behind the selection of the virus, helper virus and cells used in the production of the virus be described, including the genetic construct of the oncolytic virus, and of the helper virus if applicable. In cases in which the manufacturing method of the oncolytic virus in question has a specific feature, a justification of the feature must be included. The DNA or RNA sequence of the oncolytic virus must be clarified as much as possible, with particular attention to any regions of the virus genome that have been modified. Sequence analysis should be performed by a validated method which must also be described. In the case of genetically modified oncolytic viruses, a full explanation must be provided of the origin and detailed derivation of all constitutive components, such as promoters, enhancers, duplication units, selection markers and other base sequence parts from other constructs of oncolytic virus DNA or RNA. When a transgene is inserted into an oncolytic virus sequence, the construing procedure, amplification method, purification method and any flanking area that may have an important effect on the transcription, translation or stability of the translation sequence must be described in detail.

Cell and Virus Bank System

It is important to establish a cell and virus banking system in order to maintain consistency in the production of oncolytic viruses. A cell banking system for manufacturing oncolytic viruses should be designed and fully characterized; in general, a cell banking system includes a Master Cell Bank (MCB) and Working Cell Bank (WCB) for producing and packaging cell lines ("International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH)" guideline Q5D [34]). The concept of a two-tiered cell bank, in which the MCB is used to generate WCBs, is generally considered to be the most practical approach to providing a supply of cell substrates for the continued manufacture of oncolytic virus products. The strategy for providing a continued supply of cells from their cell bank(s) must be described, including the anticipated utilization rate of the cell bank(s) for production, the expected intervals between the generations of new cell bank(s), and the criteria for qualification of cell bank(s). Generally, the MCB is created first, usually directly from an initial clone or from a preliminary cell bank derived from an initial clone. A WCB is derived from one or more containers of the MCB. It is the WCB which is typically used to directly provide cells for the manufacturing process.

The characterization and testing of banked cells is critical for the control of oncolytic viruses. The MCB and WCB must be subject to extensive quality control, and the established guidelines will be applicable to evaluate these banks (ICH Q5D or regional guidelines). Characterization of the MCB allows the sponsor to assess the source with regard to the presence of cells from other lines, adventitious agents, endogenous agents and molecular contaminants (e.g., toxins or antibiotics from the host organism). A characterization of the criteria for cell banks may include appearance, identity, cell count and viability for cell banks, as well as the sterility, mycoplasma, purity, absence of adventitious viruses and absence of specific human viruses. The objective of this testing is to confirm the identity, purity

and suitability of the cell substrates for manufacturing oncolytic viruses.

Another dimension of cell characterization is the appropriateness for their intended use in oncolytic virus production. There are two concerns for cell substrate stability: the consistent production of the oncolytic virus and the retention of production capacity during storage under defined conditions.

A two-tiered virus banking system, a Master Virus Bank (MVB) and a Working Virus Bank (WVB), is generally constructed for the production of oncolytic virus products. The MVB and WVB should also be characterized and should be subject to extensive quality control; the established guidelines may be applicable to evaluate these banks (ICH Q5D or regional guidelines). A characterization of the criteria for virus banks may include particle number and infectious titer, sterility, mycoplasma, purity, absence of adventitious viruses, replication-competent viruses and molecular variants, and absence of specific human viruses. A MVB is produced from an initial seed virus, and a WVB is derived from one or more containers of the MVB. The MVB and WVB should be produced under optimized culture conditions for viral growth and harvest, and be thoroughly defined, giving an efficient and reproducible downstream purification process. The quality, safety and efficacy of the final formulation of the oncolytic virus in which the virus will be stable for long periods in storage is guaranteed by the establishment of a well-defined virus banking system.

Sponsors are also encouraged to employ state-of-the-art methods and technological improvements in oncolytic virus characterization and testing as they become available, as long as the specificity, sensitivity and precision of the newer methods are at least equivalent to those of existing methods. Since oncolytic virus therapy has been developed only very recently, technologies for the characterization of oncolytic viruses remain to be fully elucidated. There remain a number of technical challenges concerning oncolytic virus testing and product characterization.

Manufacturing of Oncolytic Viruses

The manufacturing method for oncolytic viruses (vectors) must be fully described, including a description of the cells used for the production of the oncolytic viruses, and all relevant data on the name, manufacturing method, pathogenicity, propagation, growth factor dependence, phenotype, tumorigenicity, stability, etc. Changes in the character of the original cells must be clarified and the cultivation method of the cells described, including the medium, serum, antibiotics or other growth factors used. When a packaging cell is used, the manufacturing procedure, selection, identification method and isolation purification method to produce a seed cell strain must be established and characterized and the genetic stability of any sequence inserted into a packaging cell should also be described. The purification method of oncolytic viruses should be described in detail. When scaling up for manufacturing, suitable validation data to describe the contents should be made available. Additionally, descriptions must be included of the preparation and storage method of the MCB and WCB, as well as of the controlling and renewal methods. Finally, tests should be performed to confirm that the cell phenotype between the lots has not changed during

the cultivation period. The test period, method and results of any safety tests necessary for quality control should be justified.

Genetic Stability, Replication-Competent Viruses (RCVs) and Molecular Variants

The biological and manufacturing consistency of oncolytic viruses depends primarily on the genetic stability of virus genomes as well as on the nature of the producer cells. A well-defined cell banking system partially ensures the genetic stability of oncolytic viruses during the manufacturing process. Relevant concerns include the generation of replication-competent viruses (RCVs) and molecular variants during manufacturing. RCVs in products can be evaluated by bioamplification assay [35]. Semiquantitative bioamplification systems are used to detect recombination that may occur during manufacturing. These assays are able both to detect contaminating wild-type viruses and to evaluate the genomic stability of an engineered virus; the oncolytic virus product tested in such assays requires multiple passages. Wild-type viruses that contaminate a preparation of engineered oncolytic virus are also typically detected using quantitative polymerase chain reaction (PCR) [36]. When the molecular variants are predicted by recombination, a preparation of engineered oncolytic virus should be tested for molecular variants using quantitative PCR [35].

The selection of the cell substrate is another strategy to minimize the appearance of recombinant RCVs. In the case of adenovirus production, the amount of replication-competent adenovirus (RCA) detected is higher in batches produced in conventional cell lines (e.g., 293 cells [37]) compared to that found in batches produced in recently engineered cell lines (e.g., PER.C6 cells [38]) because of the sequence homology between the engineered adenoviruses and the integrated sequences in the 293 cells. PER.C6 cells are reported to have produced no RCAs in large-scale adenovirus product [39]. A novel cell line, C139 derived from A549 human lung cancer cells, it has been reported that the E1a and E1b coding regions were reduced to their minimal sequences and that native promoters were deleted [40]. Additionally, it has been reported that neither RCAs nor cytopathic effect (CPE)-inducing replication-deficient recombinants are generated during the production of adenoviral vector using C139.

Adventitious Agent Testing

For more information on adventitious agent testing, ICH guidance Q5A: "Guidance on Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin" [41] should be referred if applicable. *In vitro* viral testing should be performed on the MCB, WCB, MVB, WVB, CAL (cells at the limit of *in vitro* cell age used for production) and oncolytic virus products. In such testing, the test sample (for example, MCB or MVB) is inoculated onto various susceptible indicator cell lines such as the human or primate cell line. The choice of cells used would depend on the species of origin of the oncolytic virus and the cell substrate used. In addition, the test would include a measure of both cytopathic and hemadsorbing viruses.

In vivo viral assays should be carried out by inoculating the test sample (MCB, MVB, etc.) into animals such as adult and

suckling mice, and embryonated hen's eggs. Additional testing of guinea pigs, rabbits or monkeys should also be considered. An assay for species-specific viruses should be performed and rodent cell lines used during production should be tested for rodent-specific viruses. If human cell lines are used in the therapeutic product, testing for human pathogens, including cytomegalovirus (CMV), human immunodeficiency virus (HIV) -1 and 2, human T-cell lymphotropic virus (HTLV) 1 and 2, Epstein-Barr virus (EBV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), B19, and other human viral agents should be performed if appropriate. Human viral agents may be tested using a PCR-based test system. Retroviral contamination in MCB and MVB must be analyzed using reverse transcriptase (RT) assays and electron microscopic analysis.

Adventitious agent testing may be particularly challenging for oncolytic virus products. One strategy is based on the neutralization of the oncolytic virus with a specific antibody prior to testing for adventitious agents both for *in vitro* and *in vivo* assays. This is done to prevent the product from generating false positive results.

Batch Release

Typical release criteria for oncolytic viruses may be based on appearance, identity, virus titer, virus particles, potency, purity (including product-related and process-related impurity), safety (sterility, mycoplasma, endotoxins, adventitious viruses), and characterization.

In general, a standard potency assessment for oncolytic virus products is carried out based on the ratio of virus particle numbers to infectious titers in the final products. For replication-defective adenoviral vectors, the ratio of adenovirus vector particles to infectious titers must be less than 30:1 to satisfy FDA guidelines [31]. At present, however, no specific guidelines exist concerning the acceptable ratio of physical and infectious titers for oncolytic viruses. In addition to measuring tumor cell line killing in an *in vitro* assay, biological characteristics such as viral infectious titer and particles to infectious unit ratio are very useful to ensure batch-to-batch consistency.

Furthermore, it will be necessary to develop standardized testing procedures that will allow the evaluation and comparison of the selectivity, potency and toxicity of oncolytic viruses. If applicable, a wild-type strain may be useful as a positive control in order to allow normalization of infectivity and viral replication capability between different cell types. In the case of adenovirus products, the Adenovirus Type 5 Reference Material established by FDA and Adenovirus Reference Material Working Group can be used to standardize and normalize quantification methods, particle numbers and infectious titers [42].

The following numerical estimation of expressing the selectivity of an oncolytic virus effect in tumor cells compared to a normal cell line has been proposed [43]:

Selectivity =

$$\frac{[\text{effect of oncolytic virus in tumor cell}/\text{effect of wt in tumor cell}]}{[\text{effect of oncolytic virus in normal cell}/\text{effect of wt in normal cell}]}$$

"Effect" can be measured in terms of viral yield (or burst size, CPE (IC50 values), viral late protein expression or viral DNA replication level. Progeny production is considered the most relevant for the desired analytical effect [9].

NON-CLINICAL STUDIES

Non-clinical studies of oncolytic virus products are crucial to establish the safety and proof of concept in advance of clinical trials. Since oncolytic viruses have very unique safety issues, such as the emergence of genetic variants and the risk of germline transmission, international harmonized guidelines such as ICH S6 or other documents do not seem to be applicable. The design of non-clinical studies for oncolytic virus products will depend on the type and nature of the specific oncolytic virus product.

In each case, the objective and design of the animal studies, including the type of animal and the reason for selecting it, must be explained. Non-clinical studies should be designed to obtain data that demonstrate the proof-of-principle of oncolytic virus products and that provide biosafety features: target organs for toxicity, risk of shedding, etc. In general, animal models are valuable for testing non-clinical safety and assessing proof of concept, however, they have certain limitations. Some viruses have species-specific susceptibility to viral infection and replication, there may be differential tropism in tumor-xenograft models, and it is impossible to model all aspects of the immune response. Differences in the tissue architecture between animal models and humans are also an important factor, especially with respect to the role of the connective tissue and intermixed normal cells. Nevertheless, animal models are useful to address specific questions such as the choice of a route of administration, biodistribution, safety/toxicity, dose selection and dose regimen. When possible, the selectivity of virus replication has also been studied using *in vivo* models.

Non-clinical safety studies should initially include single-dose toxicity studies, repeated-dose toxicity studies if appropriate, and biodistribution studies, which can incorporate pharmacodynamic-like endpoints. The type and duration of repeated-dose non-clinical safety studies should be considered dependent on the type of oncolytic virus and potential concerns about insertional mutagenesis, for instance.

A quantitative nucleic acid amplification test (NAT) may be used to investigate tissue distribution and the persistence of the oncolytic virus sequence in biodistribution studies. If the administered oncolytic virus sequence is detected in unintended tissues or organs by a NAT assay, this may assist in determining mRNA for the gene product by RT-PCR. Additionally, RT-NAT immunological-based assays may be used to verify the duration and level of expression of the gene product to detect functional protein.

According to the potential risk of inadvertent germline integration of oncolytic viruses based on the vector type, route of administration and patient population, it may also be necessary to determine whether or not the nucleic acid of the oncolytic virus is incorporated into gonads. The key element in the assessment of inadvertent germline integration is a well-conducted biodistribution study in animal models.

CLINICAL STUDIES AND SAFETY EVALUATION

Due to the complexity of oncolytic virus products and the limited usefulness of animal models, many concerns, including safety issues, remain to be addressed in early-phase clinical studies. These studies must focus on safety and definitions of dose and clinical strategy.

Clinical Pharmacokinetics

With respect to the pharmacokinetics of oncolytic viruses, both quantitative PCR and infectivity assays may be used to monitor patients. In some cases, quantitative monitoring of administered oncolytic virus genomes may provide data supporting viral replication in permissive tissues.

DOSE SELECTION AND DOSE REGIMEN

The dose selection and dose regimen of oncolytic viruses in clinical use should be carefully assessed to ensure their safety and evaluate their toxicity for humans. In one case, a patient who was enrolled in a phase-one clinical trial using replication-deficient adenovirus vector died due to the injection of high-dose vector [44]. The use of replication-competent viruses poses special concerns since the replication of the virus in the patient may lead to an enhanced level of and prolonged exposure to the virus, and thus might increase the risk of virus-induced toxicity. Replication competence of the oncolytic virus does not eliminate the need to perform dose ranging studies to determine an effective dose level.

Viral Shedding and Risks of Contact Person

Since data on viral shedding are limited with respect to oncolytic viruses [29, 45-49], precautions to reduce the risk of exposure of healthcare providers, family members and other patient contacts should be taken. The possibility of virus shedding and the site of shedding may depend on the site and route of administration, dose and replication efficacy of the virus in question. During clinical trials, risk must be monitored not only in the patient but also in the general population. The monitoring of viral shedding and mobilization/recombination with wild-type strains is recommended, and the need to establish long-term follow-up programs must be evaluated. However, all of these measures should take into account the special aspects of oncolytic viruses, such as the disease spectrum and pathogenicity of wild-type strains versus modified oncolytic viruses, the level of pre-existing immunity in the general population, and the ability of the virus to evade the immune system. The onset of tropism-modified versions of some oncolytic viruses requires additional control since the tropism can be narrowed or expanded, and previous clinical experience with non-modified strains is not necessarily relevant.

Schedule for Patient Follow-Up

It is important to establish observation and follow-up schedules for patients, including investigation of the *in vivo* distribution of the administered oncolytic virus, survival and functional expression terms of the gene of interest, symptoms caused by replication-competent viruses or molecular variants, etc. If the oncolytic virus is found to be transiently distributed to the gonads in animal studies, assaying patient semen for the presence of vector may be considered. However, if the patient population is sterile, or if the patient has a severe disease condition with short life expectancy, monitoring of semen samples may not be necessary.

ABBREVIATIONS

CMV = Cytomegalovirus
CPE = \sim Cytopathic effect

E2F = S-phase of cell cycle promoter
EBV = Epstein-Barr virus
EMEA = European Medicines Agency
EOP cells = End of production cells
FDA = Food and Drug Administration
HBV = Hepatitis B virus
HCV = Hepatitis C virus
HIF-1 = Hypoxia-inducible factor-1
HIV = Human immunodeficiency virus
HSV = Herpes simplex virus
HTLV = Human T-cell lymphotropic virus
ICH = International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use
MCB = Master cell bank
MVB = Master virus bank
NAT = Nucleic acid amplification test
NDV = Newcastle disease virus
PCR = Polymerase chain reaction
PSA = Prostate-specific antigen
RCA = Replication-competent adenovirus
RCV = Replication-competent virus
RT = Reverse transcriptase
TERT = Telomerase reverse transcriptase
VSV = Vesicular stomatitis virus
WCB = Working cell bank
WVB = Working virus bank

REFERENCES

- [1] Southam, C. M.; Moore, A. E. Clinical studies of viruses as antineoplastic agents with particular reference to Egypt 101 virus. *Cancer* 1952, 5, 1025-1034.
- [2] Huebner, R. J.; Rowe, W. P.; Schatten, W. E.; Smith, R. R.; Thomas, L. B. Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* 1956, 9, 1211-1218.
- [3] Russell, S. J. Replicating vectors for gene therapy of cancer: risks, limitations and prospects. *Eur. J. Cancer* 1994, 30A, 1165-1171.
- [4] Yamanishi, K.; Takahashi, M.; Kurimura, T.; Ueda, S.; Minekawa, Y. Studies on live mumps virus vaccine. 3. Evaluation of newly developed live mumps virus vaccine. *Biken J.* 1970, 13, 157-161.
- [5] Csatory, L. K.; Eckhardt, S.; Bukosza, I.; Czeglédi, F.; Fenyvesi, C.; Gergely, P.; Bodey, B.; Csatory, C. M. Attenuated veterinary virus vaccine for the treatment of cancer. *Cancer Detect. Prev.* 1993, 17, 619-627.
- [6] Shimizu, Y.; Hasumi, K.; Okudaira, Y.; Yamanishi, K.; Takahashi, M. Immunotherapy of advanced gynecologic cancer patients utilizing mumps virus. *Cancer Detect. Prev.* 1988, 12, 487-495.
- [7] Okuno, Y.; Asada, T.; Yamanishi, K.; Otsuka, T.; Takahashi, M.; Tanioka, T.; Aoyama, H.; Fukui, O.; Matsumoto, K.; Uemura, F.; Wada, A. Studies on the use of mumps virus for treatment of human cancer. *Biken J.* 1978, 21, 37-49.
- [8] Heicappell, R.; Schirmacher, V.; von Hoegen, P.; Ahlert, T.; Appelhans, B. Prevention of metastatic spread by postoperative immunotherapy with virally modified autologous tumor cells. I. Parameters for optimal therapeutic effects. *Int. J. Cancer* 1986, 37, 569-577.
- [9] European Medicines Agency (EMA). Report from the CPMP Gene Therapy Expert Group Meeting 26th-27th February 2004. EMA/CPMP/1879/04/Final, 2004.
- [10] Ries, S. J.; Brandts, C. H. Oncolytic viruses for the treatment of cancer: current strategies and clinical trials. *Drug Discov. Today* 2004, 9, 759-768.

- [11] Lin, E.; Nemunaitis, J. Oncolytic viral therapies. *Cancer Gene Ther.* 2004, *11*, 643-664.
- [12] Russell, S. J. RNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Ther.* 2002, *9*, 961-966.
- [13] Kinoh, H.; Inoue, M.; Washizawa, K.; Yamamoto, T.; Fujikawa, S.; Tokusumi, Y.; Iida, A.; Nagai, Y.; Hasegawa, M. Generation of a recombinant Sendai virus that is selectively activated and lyses human tumor cells expressing matrix metalloproteinases. *Gene Ther.* 2004, *11*, 1137-1145.
- [14] Aghi, M.; Martuza, R. L. Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene* 2005, *24*, 7802-7816.
- [15] Barber, G. N. VSV-tumor selective replication and protein translation. *Oncogene* 2005, *24*, 7710-7719.
- [16] Stojdl, D. F.; Lichty, B. D.; tenOver, B. R.; Paterson, J. M.; Power, A. T.; Knowles, S.; Marius, R.; Reynard, J.; Poliquin, L.; Atkins, H.; Brown, E. G.; Durbin, R. K.; Durbin, J. E.; Hiscott, J.; Bell, J. C. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 2003, *4*, 263-275.
- [17] Norman, K. L.; Lee, P. W. Reovirus as a novel oncolytic agent. *J. Clin. Invest.* 2000, *105*, 1035-1038.
- [18] Stoekel, J.; Hay, J. G. Drug evaluation: Reovirus--wild-type reovirus as a cancer therapeutic. *Curr. Opin Mol. Ther.* 2006, *8*, 249-260.
- [19] Shmulevitz, M.; Marcatò, P.; Lee, P. W. Unshackling the links between reovirus oncolysis, Ras signaling, translational control and cancer. *Oncogene* 2005, *24*, 7720-7728.
- [20] Kimata, H.; Takakuwa, H.; Goshima, F.; Teshigahara, O.; Nakao, A.; Kurata, T.; Sata, T.; Nishiyama, Y. Effective treatment of disseminated peritoneal colon cancer with new replication-competent herpes simplex viruses. *Hepatogastroenterology* 2003, *50*, 961-966.
- [21] Takakuwa, H.; Goshima, F.; Nozawa, N.; Yoshikawa, T.; Kimata, H.; Nakao, A.; Nawa, A.; Kurata, T.; Sata, T.; Nishiyama, Y. Oncolytic viral therapy using a spontaneously generated herpes simplex virus type 1 variant for disseminated peritoneal tumor in immunocompetent mice. *Arch. Virol.* 2003, *148*, 813-825.
- [22] Teshigahara, O.; Goshima, F.; Takao, K.; Kohno, S.; Kimata, H.; Nakao, A.; Nishiyama, Y. Oncolytic viral therapy for breast cancer with herpes simplex virus type 1 mutant HF 10. *J. Surg. Oncol.* 2004, *85*, 42-47.
- [23] Mathis, J. M.; Stoff-Khalili, M. A.; Curiel, D. T. Oncolytic adenoviruses - selective retargeting to tumor cells. *Oncogene* 2005, *24*, 7775-7791.
- [24] Post, D. E.; Khuri, F. R.; Simons, J. W.; Van Meir, E. G. Replicative oncolytic adenoviruses in multimodal cancer regimens. *Hum. Gene Ther.* 2003, *14*, 933-946.
- [25] Bischoff, J. R.; Kim, D. H.; Williams, A.; Heise, C.; Horn, S.; Muna, M.; Ng, L.; Nye, J. A.; Sampson-Johannes, A.; Fattaey, A.; McCormick, F. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996, *274*, 373-376.
- [26] Ries, S.; Korn, W. M. ONYX-015: mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. *Br. J. Cancer* 2002, *86*, 5-11.
- [27] Nakamura, T.; Peng, K. W.; Harvey, M.; Greiner, S.; Lorimer, I. A.; James, C. D.; Russell, S. J. Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses. *Nat. Biotechnol.* 2005, *23*, 209-214.
- [28] Hermiston, T. W.; Kuhn, I. Armed therapeutic viruses: strategies and challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes. *Cancer Gene Ther.* 2002, *9*, 1022-1035.
- [29] Freytag, S. O.; Khil, M.; Stricker, H.; Peabody, J.; Menon, M.; DePeralta-Venturina, M.; Nafziger, D.; Pegg, J.; Paielli, D.; Brown, S.; Barton, K.; Lu, M.; Aguilar-Cordova, E.; Kim, J. H. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer Res.* 2002, *62*, 4968-4976.
- [30] US Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry: Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy. 1998.
- [31] US Food and Drug Administration (FDA). Guidance for FDA Review Staff and Sponsors: Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs). DRAFT GUIDANCE. 2004.
- [32] European Medicines Agency (EMA). Note for Guidance on the Quality, Preclinical and Clinical Aspects of Gene Transfer Medicinal Products. CPMP/BWP/3088/99. 2001.
- [33] Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW). Notification of Pharmaceutical Affairs Bureau, Yaku-hatsu No.1062: Guidance for Assuring the Quality and Safety of the Gene Therapy Products. (in Japanese) 1995.
- [34] ICH Harmonized Tripartite Guideline. ICH-Q5D: Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of BioTechnological/Biological Products. 1997.
- [35] Working, P. K.; Lin, A.; Borellini, F. Meeting product development challenges in manufacturing clinical grade oncolytic adenoviruses. *Oncogene* 2005, *24*, 7792-7801.
- [36] Bernt, K.; Liang, M.; Ye, X.; Ni, S.; Li, Z. Y.; Ye, S. L.; Hu, F.; Lieber, A. A new type of adenovirus vector that utilizes homologous recombination to achieve tumor-specific replication. *J. Virol.* 2002, *76*, 10994-11002.
- [37] Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 1977, *36*, 59-74.
- [38] Fallaux, F. J.; Bout, A.; van der Velde, I.; van den Wollenberg, D. J.; Hehir, K. M.; Keegan, J.; Auger, C.; Cramer, S. J.; van Ormondt, H.; van der Eb, A. J.; Valerio, D.; Hoeben, R. C. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 1998, *9*, 1909-1917.
- [39] Lusky, M. Good manufacturing practice production of adenoviral vectors for clinical trials. *Hum. Gene Ther.* 2005, *16*, 281-291.
- [40] Farson, D.; Tao, L.; Ko, D.; Li, Q.; Brignetti, D.; Segawa, K.; Mittelstaedt, D.; Harding, T.; Yu, D. C.; Li, Y. Development of Novel E1-Complementary Cells for Adenoviral Production Free of Replication-Competent Adenovirus. *Mol. Ther.* 2006, *14*, 305-311.
- [41] ICH Harmonised Tripartite Guideline. ICH-Q5A: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products derived from Cell Lines of Human or Animal Origin. 1997.
- [42] Hutchins, B.; Sajjadi, N.; Seaver, S.; Shepherd, A.; Bauer, S. R.; Simek, S.; Carson, K.; Aguilar-Cordova, E. Working toward an adenoviral vector testing standard. *Mol. Ther.* 2000, *2*, 532-534.
- [43] Alemany, R.; Balague, C.; Curiel, D. T. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat. Biotechnol.* 2000, *18*, 723-727.
- [44] Raper, S. E.; Chirmule, N.; Lee, F. S.; Wivel, N. A.; Bagg, A.; Gao, G. P.; Wilson, J. M.; Batshaw, M. L. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 2003, *80*, 148-158.
- [45] Lichtenstein, D. L.; Wold, W. S. Experimental infections of humans with wild-type adenoviruses and with replication-competent adenovirus vectors: replication, safety, and transmission. *Cancer Gene Ther.* 2004, *11*, 819-829.
- [46] Makower, D.; Rozenblit, A.; Kaufman, H.; Edelman, M.; Lane, M. E.; Zwiebel, J.; Haynes, H.; Wadler, S. Phase II clinical trial of intravesical administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in patients with hepatobiliary tumors with correlative p53 studies. *Clin. Cancer Res.* 2003, *9*, 693-702.
- [47] Small, E. J.; Carducci, M. A.; Burke, J. M.; Rodriguez, R.; Fong, L.; van Ummersen, L.; Yu, D. C.; Aimi, J.; Ando, D.; Working, P.; Kim, D.; Wilding, G. A Phase I Trial of Intravenous CG7870, a Replication-Selective, Prostate-Specific Antigen-Targeted Onco-lytic Adenovirus, for the Treatment of Hormone-Refractory, Metastatic Prostate Cancer. *Mol. Ther.* 2006, *14*, 107-117.
- [48] DeWeese, T. L.; van der Poel, H.; Li, S.; Mikhak, B.; Drew, R.; Goemann, M.; Hamper, U.; DeJong, R.; Detorie, N.; Rodriguez, R.; Haulk, T.; DeMarzo, A. M.; Piantadosi, S.; Yu, D. C.; Chen, Y.; Henderson, D. R.; Carducci, M. A.; Nelson, W. G.; Simons, J. W. A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res.* 2001, *61*, 7464-7472.
- [49] Todo, T.; Feigenbaum, F.; Rabkin, S. D.; Lakeman, F.; Newsome, J. T.; Johnson, P. A.; Mitchell, E.; Belliveau, D.; Ostrove, J. M.; Martuza, R. L. Viral shedding and biodistribution of G207, a multimutated, conditionally replicating herpes simplex virus type 1, after intracerebral inoculation in aotus. *Mol. Ther.* 2000, *2*, 588-595.

薬の名前

ステムを知れば薬がわかる

Stems used in drug names : For the better understanding of
pharmacological actions of drugs

第7回

国立医薬品食品衛生研究所

川崎ナナ, 内田恵理子

NANA KAWASAKI, ERIKO UCHIDA

National Institute of Health Sciences

名古屋市立大学大学院薬学研究科

宮田直樹

NAOKI MIYATA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

はじめに

本連載第6回(本誌2007年1月号)では、化学薬品類のステムの中で、中枢神経系に作用する薬のステム、

「-ampanel」：アミノヒドロキシメチルイソキサゾールプロピオン酸(AMPA)受容体拮抗薬

「-fylline(-phylline)」：N-メチルキサンチン系中枢神経興奮薬

「-racetam」：ピラセタム系脳機能改善薬

「-piprazole」：フェニルピペラジン系向精神薬

「-azepam」：ジアゼパム系抗不安薬・鎮静薬

「-azenil, -carnil, -quinil」：ベンゾジアゼピン受容体作用薬

「-bamate」：プロバンジオールおよびペンタンジオール系精神安定薬

「-perone」：4'-フルオロ-4-ピペリジノブチロフェノン系精神安定薬

「-peridol」：ハロペリドール系抗精神病薬

「-peridone」：リスペリドン系抗精神病薬

「-pidem」：ゾルピデム系催眠鎮静薬

「-pride」：スルピリド系抗不安薬・鎮静薬

「-spirone」：Buspirone系抗不安薬

「-zafone」：Alozafone系抗不安薬

を紹介した。

今回は、生物薬品類のステムの第2回目として、免疫機能を調節する薬のステム、

「-mab」：モノクローナル抗体

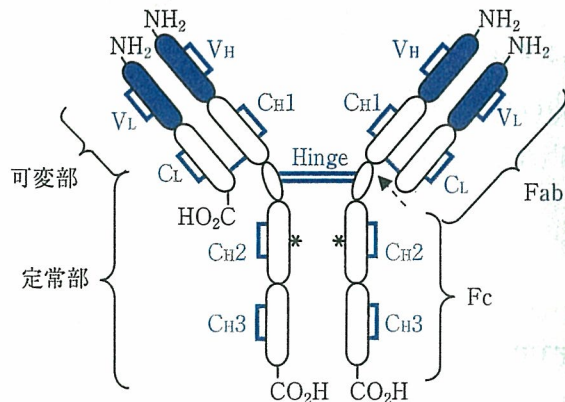
「-cept」：受容体分子

を紹介する。

ステム
47

「-mab」：モノクローナル抗体

「-mab」は、モノクローナル抗体(monoclonal antibody)を表すステムである。モノクローナル抗体とは、一種類の抗原決定基とだけ反応する免疫グロブリンで、一次構造が均一である。免疫グロブリンは作用と構造から、IgG, IgM, IgA, IgD, およびIgEの5つのクラスに分類される。ヒトのIgGはさらにIgG1, IgG2, IgG3, およびIgG4の4つのサブクラスに分けられる。モノクローナル抗体を本質とする医薬品は抗体医薬品と呼ばれ、その多くはIgG1である。



— :ジスルフィド結合, * :N-結合型糖鎖, ←- :パパイン作用部位

図1 IgG1の構造

5つのクラスの基本構造は共通である。図1にIgG1の基本構造を示す。IgG1は2本のH鎖(Heavy chain)と2本のL鎖(Light chain)の計4本のポリペプチド鎖から構成される。H鎖とL鎖の分子量はそれぞれ約50,000と約25,000で、抗体1分子には合計16本のジスルフィド結合が存在する。H鎖とL鎖ともにN末端から約110番目までのアミノ酸残基部分(図1のV_LおよびV_H部分)は、抗原特異性を決定する部分で、可変部と呼ばれる。可変部の中でも一次構造に特に著しい多様性が見られ、抗原分子と相補的な立体構造を形成して抗体の特性を決める部分は、相補性決定部(complementarity-determining region, CDR)と呼ばれる。CDRの立体構造保持に働く枠組み領域はフレームワーク部と呼ばれ、両者はモザイク状に配置している。H鎖とL鎖の残りの部分(図1のCL, CH1, CH2, およびCH3部分)は抗原特異性とは無関係に一定しているので、定常部と呼ばれる。IgG1にパパインを作用させると、H鎖のほぼ中央にあたる225と226番目のアミノ酸残基の間が切断される。L鎖とH鎖の可変部を含むN末端半分をFab、また、H鎖の定常部からなるC末端半部分をFcと呼ぶ。

モノクローナル抗体は、従来は主にマウスなどの異種動物を用いて、免疫グロブリンを産生するB細胞と増殖能力を持つ腫瘍細胞の細胞融合技術によって製造されていた。しかし、現在医薬品として用いられるモノクローナル抗体は、遺伝子組換え技術によってCHO細胞などを用いて製造されている。特に最近では、異種で作製した

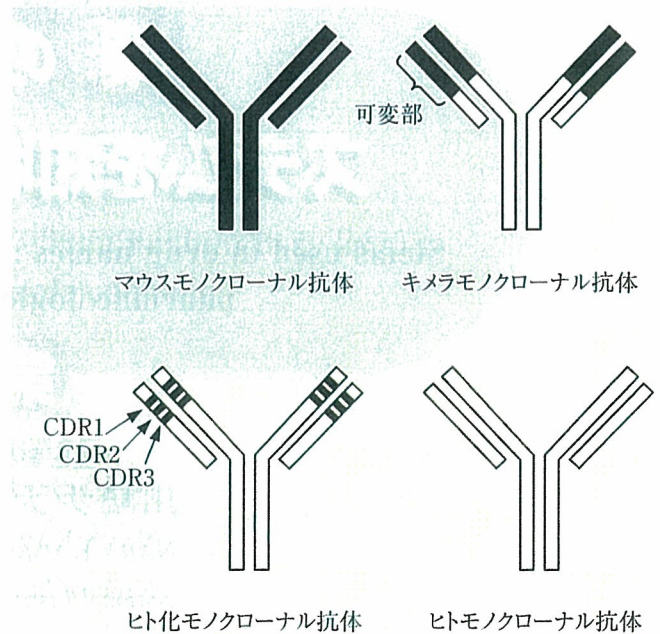


図2 モノクローナル抗体の構造

モノクローナル抗体の免疫原性を低減し、よりヒト抗体に近づくため、ヒト抗体と異種抗体を融合したモノクローナル抗体の開発が活発である。モノクローナル抗体は種によって、異種モノクローナル抗体(主にマウスモノクローナル抗体)、キメラモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、およびヒトモノクローナル抗体の4つの型に分類される(図2)。キメラモノクローナル抗体は異種モノクローナル抗体の可変部とヒト抗体の定常部を融合した分子である。ヒト化モノクローナル抗体はヒト抗体のCDRのみを異種モノクローナル抗体のCDRと置き換えたモノクローナル抗体である。しかし、これらは異種抗体断片を含むため、HACA(human anti-chimeric antibody)やHAHA(human anti-human antibody)反応が引き起こされる。そこで、すべての領域がヒト型から構成される完全ヒトモノクローナル抗体の開発も進められている。ヒトモノクローナル抗体は、ファージディスプレイ法やトランスジェニック法によって製造されている。

抗体医薬品は、抗原との結合による抗原の直接的な機能阻害作用だけでなく、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性や補体依存性細胞傷害(CDC)活性を持つ。現在、抗がん剤、感染症治療薬、抗血栓剤などの循環器用薬、免疫抑制剤、自己免疫疾患治療薬(クローン病)、慢性関節リウマチ治療薬、抗アレルギー剤、抗炎症剤、血管形成異常に対する治療薬として上市あるいは開発されている。抗体医薬品の売り上げは年間1,000億円ともいわれ、今