

の一つであるヒトに対する免疫原性は、現状では臨床試験に加えて市販後の調査を経て評価されている。リスク低減のための対処法を考慮した上で、有用な医薬品開発にあたっての合理的な規制環境の整備が求められる。

C. 6 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性評価に関する研究

— 遺伝子治療用ウイルスベクターの shedding (体外排出) のリスク評価について —

C. 6. 1 遺伝子治療臨床試験におけるウイルス/ベクター排出のリスク評価の現状

Viral shedding (ウイルス排出) とは、遺伝子治療薬や増殖性ウイルス等のウイルスをベースとする医薬品を臨床で使用する場合、患者に投与されたウイルスやベクターが患者の排泄物や体液等を介して排出されることを指す。ウイルス/ベクターの shedding は環境中への拡散による環境汚染や患者家族や医療従事者等への伝播のリスクがあり、公衆衛生の観点からの安全性確保は大きな課題である。

Shedding のリスクを評価するためには、遺伝子治療臨床試験における shedding の現状把握が必要である。Ellen Schenk-Braat らは、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、制限増殖性アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)、ポックスウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床試験に関する文献 260 報を収集し、shedding に関する記載がある 102 報 (39%) から 1619 名の患者のウイルス排出に関するデータを抽出・解析することにより臨床試験における shedding 試験の現状を報告している⁷⁹⁾。本論文では臨床試験の報告の 90% をカバーしており、関連論文の代表例を解析していると考えられる。本論文の内容は遺伝子治療臨床プロトコールでのエビデン

スに基づいたリスク評価法の確立、ウイルス排出のリスク評価に関するガイドラインの作成に有用と考えられることから、以下にその概要を紹介する。

C. 6. 1. 1 Shedding のアッセイ法

遺伝子治療臨床試験で使用されたウイルス/ベクター排出のアッセイ法をまとめたのが Table 12 である。アッセイには主にベクターゲノム配列に基づいた方法である定量 PCR 法または非定量 PCR 法と、感染性ウイルス粒子を検出する生物学的試験 (感染性試験) が用いられている。PCR 法では、主にベクターに特異的なプライマーを用いてベクター DNA を検出している。レトロウイルスベクターの *ex vivo* 投与では、全ての文献で shedding 試験の対象は増殖性レトロウイルスであり、アッセイ法には PCR 法又は生物学的試験が用いられている。レトロウイルスベクターの *in vivo* 投与の場合には、ベクターの shedding は全て PCR 法で検査されており、感染性試験であるマーカーレスキューアッセイや PG4S+L-アッセイは RCR の測定に用いられている。

非増殖性アデノウイルスベクターの場合、PCR 法のかわりにアデノウイルスタンパク質の ELISA による検出が用いられた例もある。アデノウイルスベクターの文献のうち 40% は、PCR 法と生物学的試験の組み合わせで shedding が検討されており、2 種類の方法を用いることにより、陽性であることの確認がなされている。感染性のあるウイルスベクターを増幅可能な 293 細胞と、ベクターの増幅はできない A549 細胞の組み合わせで試験する方法が用いられる場合もある。生物学的試験としてフローサイトメトリーを用いた方法も報告されている。増殖性アデノウイルスは A549 細胞な

どのベクターが増殖しない細胞を用いてアッセイされている。

制限増殖性アデノウイルスの場合、11 報全てにおいて PCR 法が用いられており、うち 5 報ではウイルス培養が併用されている。

AAV ベクターでは、shedding は PCR 法又は生物学的試験でアッセイされている。生物学的試験の場合、試料は AAV の Rep タンパク質を発現しているアデノウイルス感染細胞を用いて AAV ベクターを増幅させた後、細胞から AAV ゲノムを抽出して PCR を行うという方法が用いられている。3 報で、PCR 法または感染性試験が別々に用いられている。アッセイ法の選択は試料の種類により異なり、PCR 法は血液試料の場合に用いられ、その他の排泄物には生物学的試験が用いられている。

ポックスウイルスベクターでは、shedding は Vero 細胞等を用いた感染性試験でアッセイが行われている。このうち 3 報では確認のために PCR 法と感染性試験の 2 種類の試験が併用されている。

C. 6. 1. 2 Shedding 試験で採取する生体試料

遺伝子治療臨床試験において、shedding 試験で採取された生体試料をまとめたものが Table 13 である。どのベクターの場合でも、もっとも一般的に採取されている試料は尿や血液関連試料である。その他の生体試料の選択はベクターの投与経路に依存している。例えば、皮内投与では皮膚試料、吸入/鼻腔内投与の場合には鼻咽頭スワブが採取されている。非増殖性アデノウイルスベクターの排出は、ベクターを局所投与した場合でも、血液関連試料、尿、糞便、咽頭スワブ等、より広範な生体試料について shedding が調べられている。これとは対照的に、制限増殖性アデノウイルスでは、主に

血液関連試料が対象とされている。また、レトロウイルスベクターによる ex vivo 遺伝子治療の場合、血液関連試料を用いた shedding 試験が RCR 測定のために実施されている。AAV ベクターやポックスウイルスベクターは論文数が少ないが、shedding 試験は血液試料には限定されていない。AAV の場合、7 報中 5 報が嚢胞性線維症に対して吸入/経鼻投与で遺伝子治療を実施したものであるが、これらの臨床試験では、投与部位に由来する唾液や鼻咽頭スワブについて shedding 試験が実施されている。精液について調べているのは 100 報中 5 報のみであった。

C. 6. 1. 3 Shedding 試験の実施時期

文献によりばらつきが大きいですが、一般的に、レトロウイルスベクターでは投与 1 ヶ月以内にベクター配列のアッセイが実施されている。一方、増殖性レトロウイルスについては治療 1 年後又はそれ以上まで調べている。

非増殖性アデノウイルスベクター及び制限増殖性アデノウイルスでは、shedding 試験は投与 1 ヶ月以内に実施されている。AAV ベクターでは、投与 1 週間以内に実施されているが、投与 4 ヶ月後まで実施している例もある。ポックスウイルスベクターでは、投与後 2 週間以内がほとんどで、21 日後が最長であった。

C. 6. 1. 4 Shedding データの実例

合計 1619 名の患者の shedding データが収集・解析された。臨床試験によっては患者の一部を対象として shedding データを解析しているので、遺伝子治療を受けた患者実数はこれよりも多い。Shedding データとして定量的解析が行われ、検出感度が記載されているものも多いが、その定量値は文献により様々な単位、例

例えば、PCR法の結果はコピー数、ウイルス粒子数、プラーク形成単位 (pfu)、陽性細胞数で表され、その値もゲノムDNA量あたりが最も多いが、細胞数あたり、サンプル量あたりで表されることもあり、異なる文献の値の相互比較は困難である。そのため、ベクターのshedding量に関して一般的な結論を出すことは困難であるが、ベクター毎の概要は以下のとおりである。

C. 6. 1. 4. 1 レトロウイルスベクター

レトロウイルスベクターの文献全27報中、*ex vivo* 遺伝子治療の報告は11報で、そのsheddingデータはいずれも血液関連試料を対象として増殖性レトロウイルスの出現に焦点をあてたものであった。対象となる103名の患者でいずれもPCR法により増殖性レトロウイルスは検出されなかった。レトロウイルスベクターの*ex vivo* 遺伝子治療では感染性レトロウイルス粒子やベクターゲノムの排出を調べた例はないが、これはベクターの排出は無視できると考えられているからであろう。

一方、レトロウイルスベクターの*in vivo* 遺伝子治療に関する論文は16報あり、342名の患者について増殖性レトロウイルスが検査され、いずれも検出されなかった。ベクターのsheddingについては、脳腫瘍、メラノーマ、乳癌に対する*in vivo* 腫瘍内投与、及び卵巣癌に対する腹腔内投与において、16報中10報で血液中、主に末梢血単核球 (PBMC) にベクターの存在が確認された。特に、脳腫瘍への腫瘍内投与では、8報中6報でベクター配列がPBMCで検出された。*In vivo* 遺伝子治療では感染性レトロウイルス粒子が排出される可能性がありうるが、いずれも感染性ウイルス粒子の確認試験は実施されていない。ベクター排出の期間は、投与後1日から28日までと大きな幅が見

られた。血友病Aの遺伝子治療の例では、静脈内投与後53週目まで、患者13名の精液中のベクター配列の存在を定期的に測定した結果が報告されている。この例では、1名の患者で投与後9週目に陽性シグナルが認められたが、それ以前及びそれ以降の精液試料では陰性であったので、運動性精子が陽性であったわけではないと考えられている。

全27報中、10報で定量的なsheddingデータまたはアッセイの検出感度が報告されていた。

C. 6. 1. 4. 2 非増殖性アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターに関する文献50報中、腫瘍内、吸入/鼻腔内、心筋内、冠動脈内、硝子体内、動脈内、胸膜内、筋肉内投与後にベクターの排出が検出されなかったのは21報(42%)であった。硝子体内投与の例ではRCAのみが検査されており、陰性であったと報告されている。腫瘍内投与後に血中、尿その他の排泄物へのベクターの排出が認められなかった9報中、5報は脳腫瘍の遺伝子治療の例であった。しかし、同じ脳腫瘍の例で7名の患者のうち2名で血漿中に一時期ベクターの排出が検出されたという報告もある。

50報中、ベクターDNAまたは感染性粒子の排出が報告されているのは29報(58%)であった。測定された生体試料はベクターの投与経路、投与部位および解析時期により異なる。例えば、ベクターの鼻腔内投与や吸入の場合には、唾液や鼻咽頭液中にベクターが検出されている。腫瘍内投与の場合、26報中17報において主に血液関連試料でsheddingが検出されている。一般的に、血中へのsheddingの継続は短期間であり、投与1時間後にピークとなり、投与2,3

日後には消失している。しかし、ベクターを前立腺癌局所に投与した例では、治療を受けた患者のほとんどで投与 32 日後まで尿中にベクター配列が検出されたという報告もある。ウイルス排出がもっとも長く検出された例は、嚢胞性線維症に対して吸入投与した例と、肺癌に対して気管支内投与した例、腫瘍内投与した例であった。ベクターを一回投与後、気管支肺胞洗浄液、鼻腔スワブ、咽頭スワブ、唾液などの鼻咽頭液において、ベクター配列がそれぞれ 21 日後、30 日後、90 日後まで検出された。精液については、冠動脈内投与 8 週後の狭心症の患者 12 名、及び前立腺癌で前立腺腫瘍内投与 14 日後の患者 1 名について報告されており、後者ではベクター配列が陽性であった。

Shedding 陽性を検証している例は多くないが、PCR での陽性シグナルが感染性のあるアデノウイルスベクター粒子かどうかを確認しているものが 8 報あった。そのうち 7 報で感染性粒子が確認されており、感染性のあるアデノウイルスベクターの排出が実際に起こっていることが示されている。また、50 報中 11 報で増殖性アデノウイルスの排出を調べているが、対象となる 201 名の患者で増殖性アデノウイルスはいずれも検出されなかった。

定量的な shedding データまたはアッセイの検出感度が報告されていたのは 50 報中 18 報であった。

Shedding の定義を考えると、患者の周辺でベクターが検出されるかどうかは重要である。患者に近くで接触した医療関係者の血液、糞便、咽頭スワブについて shedding を調べている報告が 4 報あった。興味深いことに、対象者（ある報告では 54 名にのぼる）のいずれからもベクターや RCA は検出されなかった。

C. 6. 1. 4. 3 制限増殖性アデノウイルス

腫瘍内投与又は腹腔内投与後の血液、尿、皮膚へのベクターの shedding が陰性であったのは、11 報中 3 報であった。残りの 8 報では、腫瘍内投与後に血液中でベクター DNA の存在が PCR 法で検出されている。血液中への shedding の持続期間は、投与後数時間から 76 日後までと幅が見られた。うち 2 報では、血液中のウイルスゲノムの検出が 2 つのピークとなったことから、ウイルスが体内で複製していることが確認された。また別の 2 報では、血液中にベクター DNA が存在すれば感染性ウイルス粒子の排出と結びついているとしている。血液中には感染性ウイルス粒子は検出されなかった。対照的に、前立腺癌腫瘍内投与の例では、8 日目まで尿中に感染性ベクター粒子の排出が検出されている。

定量的な shedding データまたはアッセイの検出感度は 11 報中 7 報で報告されていた。

C. 6. 1. 4. 4 AAV ベクター

嚢胞性線維症遺伝子治療の論文 5 報中 4 報で、吸入投与又は経鼻投与後 1 日目の鼻咽頭液試料と唾液中にベクターの排出が検出された。血液中への排出は認められなかった。AAV ベクターの残りの 2 報は血友病 B の遺伝子治療で、AAV ベクターを筋肉内投与した場合、唾液中には 24 時間後まで、血液中には 48 時間後まで排出が PCR により検出された。しかし、2 ヶ月後の精液中にはベクターは検出されなかった。同一のベクターを肝動脈内投与した場合、投与後 1 週間は尿中への排泄が用量依存的に認められた。この治療を行った患者 7 名中 6 名において、ベクター DNA が精液中に治療後 16 週まで検出された。うち 1 名では、ベクター DNA は、精液中に検出されたが運動精子中には存在してい

ないことを確認した。このケースでは、臨床試験は生殖細胞系列への遺伝子組み込みとそれにより起こりうる結果を調べるために一時停止の措置が取られた。また、精液の長期モニタリングが諮問委員会から推奨されることとなった。

AAV ベクターの報告では、ベクターゲノムが検出されても感染性があることを確認している報告はない。AAV は CPE を起こさないウイルスで、その増殖がアデノウイルスに依存していることから、感染性 AAV 粒子の確認は実験が難しいためと考えられる。

定量的な shedding データ又はアッセイの検出感度は 7 報中 6 報で報告されていた。

なお、AAV ベクターに関して、ICH ワークショップでは、投与方法、血清型、投与量に関係なく、大動物(イヌ、ネコ、非ヒト霊長類)及びヒトに対する rAAV の投与は尿への排出に関連するという報告、ベクター DNA は全身の体液に一過性に分布し、投与量とベクター DNA 濃度もしくはその持続期間に関しては明確な関連が認められなかったこと、生体内分布と排出データはマウスやネコのデータとの相関性が高いという報告もなされている⁸⁰⁾。

C. 6. 1. 4. 5 ポックスウイルスベクター

ポックスウイルスベクターに関する文献 5 報は全て、増殖性、制限増殖性、又は非増殖性のワクシニアウイルスベクターを局所投与するものであった。4 報では、血液、尿、糞便、唾液、鼻咽頭試料、皮膚への shedding は検出されなかった。残りの 1 報は、増殖性ワクシニアベクターを皮内投与後に、治療した 8 名の患者全てで生きたワクシニアウイルスが脱落したかさぶたから検出されたが、投与部位以外から得たスワブ中には検出されなかった。ワクシ

ニアベクターは PCR 法により確認された。同じ文献において、創傷包帯、病院の備品やベッドリネン、空気サンプルにおけるベクターの存在を検討しているが、生きたワクシニアウイルスは投与部位に用いた包帯のみで検出された。

ポックスウイルスベクターでは、全ての報告に共通して生物学的感染性粒子試験が実施されていた。

アッセイの感度は 2 報で報告されていた。

C. 6. 2 日本の遺伝子治療臨床研究におけるウイルス/ベクター排出のリスク評価の現状

日本では、ウイルスベクターや遺伝子組換え増殖性ウイルスを臨床で患者に投与することは、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法、平成 15 年法律第 97 号)」で定められた「遺伝子組換え生物等」の「第一種使用等(環境中への拡散を防止しないで行う使用等)」に該当する。そのため、生物多様性影響評価書を作成し、使用規程を定めて、ウイルスやベクターの環境中への拡散、生物多様性への影響を防止することが必要とされている。平成 16 年 8 月以降に継続中あるいは新規申請された遺伝子治療臨床研究については、第一種使用規程・生物多様性影響評価書が公開されている⁸¹⁾。生物多様性影響評価書にはウイルス/ベクターの shedding に関連する非臨床、臨床の情報が記載されているので、Table 3 に生物多様性影響評価書からみた日本の遺伝子治療臨床研究における shedding 試験の現状をまとめた。第一種使用規程・生物多様性影響評価書は 9 機関のものが公開されており、内訳はレトロウイルスベクターの ex vivo 遺伝子治療が 3 件、非増殖性アデノウイルスベクターが 4 件、非伝播型センダイウイルスベクターが 1 件、AAV ベクタ

一が1件であった。レトロウイルスベクターの ex vivo 遺伝子治療では、Ellen Schenk-Braatらの報告と同様、shedding 試験は血液試料中の増殖性レトロウイルスを対象としたもので、アッセイは PCR 法又は感染性試験が用いられている。投与後長期間フォローしても増殖性レトロウイルスは検出されていない。非増殖性アデノウイルスベクターは全て前立腺癌の治療で前立腺局所に投与するものであるが、shedding の対象は血液、尿中のベクターであり、マウスモデルの結果を基に臨床での被験者の隔離の期間が定められている。アデノウイルスベクターは一過性に全身に分布したが、1日後から3日後には消失した。患者に投与した例でも、1-3日後には shedding は検出されず、環境中への排出も確認されなかった。センダイウイルスベクターは本件が世界で最初の臨床投与となるため、動物での体内分布がマウス、ラット、サルを用いて検討されている。血中、尿中の検出は一過性で、一週間後には検出されないことが示されており、被験者も一週間は隔離するとされている。アッセイには PCR 法と生物学的試験が併用されている。AAV ベクターは、非臨床試験でラット及びサルのパーキンソン病モデルを用いて臨床と同じ脳内投与を行い、ベクターが血液中に検出されないことを確認している。

全ての例において、ウイルス/ベクターの環境中への拡散、生物多様性影響を防止するため、投与後数日間は被験者を個室にて管理し、管理中は排泄物や使用した器具等の不活化処理を行うこと、個室管理を解除する前に血液や尿中への shedding がないことを確認することが使用規程として定められている。遺伝子治療に用いるウイルスベクターの生物多様性影響評価、shedding の評価が適切に行われ、臨床使用に

において承認された使用規程が守られている限りにおいて、日本では shedding による環境影響、第3者への伝播が生ずるおそれはないと考えられる。

C. 6. 3 ウイルス/ベクターの shedding に関するワークショップでの議論及び shedding のリスク評価において考慮すべき事項に関する考察

ICH 遺伝子治療専門家会議は、第15回ヨーロッパ遺伝子細胞治療学会(ESGCT)年会との協催で2007年10月30日に、ウイルス/ベクターの shedding に関するワークショップを開催した。ワークショップでは、①多様なベクター系におけるウイルス排出に関する実際のデータに関する議論、②排泄物中に排出されたベクターのアッセイ法に関する議論、③患者家族や医療従事者などの第三者への暴露や公衆衛生への影響に関する議論が行われた⁸⁰⁾。今後、今回のワークショップで得られた情報を基にウイルス/ベクター排出に関する ICH 見解案が作成される予定になっている。ワークショップでの議論の結果と C. 1, C. 2 に示した海外及び日本における遺伝子治療臨床試験での shedding 試験の現状をもとに、ウイルスやベクターの体外排出のリスク評価のあり方、考慮すべき事項を検討した。

C. 6. 3. 1 ウイルス/ベクター排出に関するガイドラインについて

日米EU各極において、ウイルス/ベクター排出試験に関する基準、いつどのようなステージでウイルス/ベクター shedding 試験を実施すべきかについて明らかにしたガイダンスは現在どの極にも存在しない。しかし、各極とも公衆衛生上の懸念、すなわち病原体の伝播の可

能性から、ウイルス/ベクター排出の評価を実施するような規制的枠組みがとられている。EUでは、遺伝子組換え生物（GMO）の環境リスク評価が求められることから、ウイルス/ベクター排出データは環境リスク評価を実施する上でも必要とされる。ICH各極において、ウイルス/ベクター排出試験は段階的およびケースバイケースのアプローチが採用されている。水平伝播に関する試験はほとんど要求されていない。

各国で遺伝子治療の環境影響への規制状況が異なること、shedding分析に関するガイドラインがないことから、現在報告されている遺伝子治療臨床試験に関する論文ではsheddingデータが報告されていない例も多く、報告されていてもshedding分析のデザインは試験毎に大きく異なり、その標準化は現状では困難である。しかし、遺伝子治療臨床試験でウイルス/ベクターのsheddingは現実には起こっていることであり、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療で共通の現象である。ウイルスベクターを用いた遺伝子治療の臨床試験ではshedding試験を実施すべきであること、及び試験すべき生体試料の種類、用いるアッセイ法、shedding試験の技術的要件などを示したガイドラインが必要と考えられる。ガイドラインがあれば、shedding試験の統一化が図られ、エビデンスに基づいた環境リスク評価が可能になると考えられる。今後作成が予定されているウイルス/ベクターのsheddingに関するICH見解にはそのような役割を果たすことが期待される。

C. 6. 3. 2 非臨床試験におけるウイルス/ベクターshedding試験について

非臨床試験におけるウイルス/ベクターshedding試験計画に関連する議論の主な要点

は以下の通りである。

C. 6. 3. 2. 1 動物モデルの選択法と妥当性

非臨床試験において、臨床におけるsheddingを予測するための動物モデルを使用した試験が必要と考えられる。試験に使用される動物モデルとしては、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、非ヒト霊長類等が挙げられる。動物モデルの妥当性は議論になるところである。適切な動物モデルを使用し、臨床の投与経路を反映した投与を行うことにより、臨床のshedding試験において採取すべきサンプルの種類や採取すべき時期を決定できる可能性がある。しかしながら、ウイルスの体内分布、ウイルスの感染や複製は生物種により感受性が異なること、腫瘍溶解性ウイルスの場合、癌異種移植モデルでは指向性が異なること、全ての免疫応答を動物でモデル化することはできないことなどを含めて、動物モデルには限界があると考えられる。Shedding試験は動物試験だけで済むものではなく、臨床試験での実施により実態を把握することが重要と考えられる。

C. 6. 3. 2. 2 Sheddingのアッセイ法

ウイルス/ベクターsheddingのアッセイ法には、主にウイルスゲノムの塩基配列を検出する方法であるPCR法とウイルスの感染性を調べる生物学的試験（感染性試験）が用いられている。各アッセイ法の長所および短所、試験の妥当性は議論になるところである。PCR法を用いたベクター配列の検出が最も頻繁に用いられている手法であるが、PCRでの陽性はベクターのDNA、RNAの存在を示しても、有害な感染性ウイルス粒子の存在とは必ずしも一致しない。感染性粒子の排出に関する生物学的試験データは価値があるが、このような情報は限られ

ている。PCR 法で陽性になった場合のみ、感染性試験により確認するという段階的解析も用いられているが、試料の種類やベクターの種類によっては感染性試験の実施が困難であるという技術的限界も認識されている。可能な限り、PCR 法だけではなく感染性も調べることが望ましいと考えられることから、生体試料を用いた高感度な感染性試験の技術開発も必要である。

C. 6. 3. 2. 3 その他

その他、非臨床の排出試験において使用される被検試料は GMP で製造されたものである必要があるかどうか、また非臨床試験は GLP レベルで実施する必要があるかどうか、ワークショップでは問題点として挙げられた。

C. 6. 3. 3 臨床試験におけるウイルス/ベクター shedding 試験について

臨床試験におけるウイルス/ベクター shedding 試験に関する議論の要点は以下の通りである。

C. 6. 3. 3. 1 患者のモニタリングの時期と期間

患者のモニタリングの時期と期間は、ベクターの種類、投与経路、投与量、投与スケジュールにより異なることが考えられ、現在の臨床試験の知見から結論を出すのは難しい。動物モデルで shedding が認められた期間を基に、モニタリングの時期と期間を設定することが必要であろう。増殖性ウイルスの場合、shedding は in vivo での複製後に見られることから、増殖性ウイルスでは長期間に渡り排出される可能性が示唆され、モニタリングの期間も長くなることが考えられる。

C. 6. 3. 3. 2 解析すべき生体試料

臨床試験で採取する生体試料の例としては、尿、糞便、汗、唾液、精液、痰、口腔・咽頭スワブ、うがい液、皮膚等が挙げられる。血漿/血液、末梢血単核球などの血液関連試料は排泄物の範疇には入らないが、血液を介した第三者への感染の可能性は高いことから shedding 試験の対象とされる。ウイルス/ベクターの体内分布や排出は、ベクターの種類や投与経路により異なる。臨床試験の実データ⁷⁹⁾を見ると、shedding 陽性の試料は投与部位の近傍の排泄物から得られることが多い。例えば、吸入や経鼻吸収の場合は鼻咽頭スワブや唾液中、皮内投与では皮膚やかさぶた、前立腺癌では尿中に検出されることが多いので、このような試料の検査が必要であろう。レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターの腫瘍内投与では、一般的に血液中に排出が認められている。例外的に、アデノウイルスベクターの脳腫瘍への局所投与では排出がほとんど見られないことから、アデノウイルスベクターは脳からは排出されないと考えられる。対照的に、レトロウイルスベクターの脳腫瘍局所投与では、8 報中 6 報で PBMC からベクターが検出されている。ベクターやベクター産生細胞の血液中への漏出や、局所で遺伝子導入したリンパ球や癌細胞の血液中への遊走が報告されている。ウイルスベクターは局所投与後に血液中に拡散する可能性が高く、臨床モニタリングや治療に携わる医療関係者及び患者に近い環境にいる人にとって、血液は汚染の原因となりうることから、血液試料の測定は必須と考えられる。

AAV ベクターによる血友病 B の治療の例では、筋肉内投与の場合にはベクターは投与後 2 日以内に唾液や血清に現れるだけで尿中には排

出されず、2ヵ月後の精液中にも検出されなかったが、肝動脈から同一ベクターを点滴投与すると、投与後1週間は尿中に排出され、7名中6名で投与16週後まで精液中に検出された。このような知見が得られているベクター・投与経路を用いる場合、陽性が報告されている試料を試験することが望ましいであろう。

なお、ワークショップでは、ウイルス/ベクターsheddingデータの質を担保するためには、生体試料の取り扱い、保存、輸送に関する手順書の作成とスタッフの全段階におけるトレーニングも重要であると報告されている⁸⁰⁾。

C. 6. 3. 3. 3 生殖細胞系列への shedding

遺伝子治療の安全性上の懸案事項として、生殖腺へのベクターの拡散、生殖細胞系列への遺伝子導入リスクの問題がある。ベクターの精液中への排出は生殖腺への生体内分布を示すものである。遺伝子治療臨床研究で精液のshedding試験はあまり実施されていないが、精液中に長期間ベクターが検出された例も報告されている。2006年にICHより発表された「ICH見解：生殖細胞への遺伝子治療用ベクターの意図しない組み込みリスクに対応するための基本的な考え方」⁸²⁾には、ベクターの生殖細胞系列への分布に関する非臨床試験や患者のモニタリングなどの基本的考え方が提示されている。非臨床試験でベクターが一過性にせよ生殖腺に局在する可能性が示された場合には、臨床試験で患者の精液のモニタリングを考慮する必要があるとされ、検査期間も精子形成の1サイクルである64-74日間を超えて複数回実施することが望ましいとされている。ベクターの精液中への排出試験については、このICH見解に従って実施することが望ましい。

C. 6. 3. 3. 4 試験対象

Shedding評価の対象とされるのは、投与したベクターまたは非増殖性のウイルスベクターを投与後に出現した増殖性ウイルスである。増殖性ウイルスはベクターに混入している場合と、患者体内で野生型ウイルスとの組換えにより生じる場合が考えられる。非増殖性ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターの場合、患者の体内での増殖性ウイルスの出現が安全性上の重要な懸案事項となることから、増殖性ウイルスの排出が検討されている。レトロウイルスベクターによるex vivo遺伝子治療では、shedding分析はもっぱら増殖性レトロウイルスを対象とし、ベクターの検出は行われていない。遺伝子導入細胞でフリーのベクター粒子が存在しないことは品質規格で設定されており、ベクターの排出は考慮しなくて良いと考えられる。なお、これまでの臨床試験の報告では、レトロウイルスベクターを用いた445名、アデノウイルスベクターを用いた201名について増殖性ウイルスが調べられているが、患者で検出された例はない。

C. 6. 3. 3. 5 患者の隔離に関する見解

各極の規制状況で大きく異なるものに、患者の隔離に関する見解がある。日本ではカルタヘナ法に基づき、遺伝子組換え生物等に該当するウイルスベクターや増殖性ウイルスを臨床で患者に投与する場合、遺伝子組換え生物等の第一種使用となる。この場合、使用規程を定めた上で、環境中への拡散、生物多様性への影響を防止するために、患者を一定期間個室に隔離し、ウイルス/ベクターの排出がないことを確認した後に隔離を解除するという措置が執られている。しかし、海外ではこのような患者の隔離は行われていないという。Sheddingの実態に

関するデータの蓄積により、shedding のリスク評価が適切にわれるようになれば、過剰な隔離は必要なくなることも考えられる。

C. 6. 3. 3. 6 Shedding 試験のインパクト

患者から排出された感染性ウイルスベクターに暴露した場合の影響は、ベクターの増殖能と遺伝子挿入能、治療用遺伝子に依存すると考えられる。例えば、自殺遺伝子をコードした非増殖性ベクターの排出が環境に与える影響は、プロドラッグがなければ何も影響がないため、細胞毒性遺伝子を搭載した増殖性ベクターの排出と比較すると影響はずっと低いであろう。患者の排泄物を介して環境中に排出されたウイルスベクター粒子が実際に第 3 者に感染することが可能かどうか、相互汚染を起こすリスクに関しては、現時点では不明である。アデノウイルスでは、 10^3 pfu のウイルスを吸入すると十分に気道の感染が認められるというが、このようなデータを shedding のリスク評価として人の汚染に外挿することは難しい。ウイルス/ベクターの shedding による伝播のリスクを正しく評価するためには、shedding データの質、量を向上させ、相互比較の出来るデータを蓄積し、汎用性のあるデータを得ることが必要であろう。そのためにも、ウイルス/ベクター shedding に関する ICH 見解の作成が期待される。

C. 7 包括的な医薬品品質監督システムの国際動向に関する研究

C. 7. 1 医薬品規制国際調和会議における Pharmaceutical Quality System (医薬品品質システム Q10) の議論の経過

医薬品の品質保証の基礎は科学とリスクマネジメントであるとの認識から、ICH におい

て製剤開発 (ICH コード:Q8) および品質リスクマネジメント (ICH コード:Q9) を 2003 年より新トピックとして取り上げた。言うまでもないが、2003 年のワークショップでは厚生労働省は欧米の行政当局とともにこの流れを強く支持した。この二つのガイドライン作成が一段落した 2005 年 5 月ベルギーの専門家会議において品質システムの非公式会議が開催された。2005 年 11 月のシカゴ専門家会議においてはガイドラインの目的、適用が議論され仮構成が決められた。2006 年 5 月横浜における専門家会議では『Q10 を企業はどのように使うか?』という設問に対して、ラポーターの考察が示された。それらには①自社の品質システムの評価に用いる。②品質システム内の構成要素を明確化し、それらの間の連携を図る。③研究開発と製造の連携を強化する。④経営者・管理者の責任およびレビューの構築に役立てる。⑤効果的な品質システムを行政当局にアピールする。の 5 点であった。この時点における認識を以下にまとめておく。

C. 7. 1. 1 ガイドラインの概要

医薬品の製品研究開発から製造・品質管理全般を包括管理し、継続的改善を推進するシステムに関する製薬企業向けガイドラインである。具体的には、GMP (製造所ごとの製造・品質管理規則—各極とも法的な要件であり、ほぼ国際調和は出来ている) で包含されていない経営者・管理者の責任、製品開発 (ICHQ8 でカバーされる) と生産工場間の技術・知識の共有などに係わる指針となる。

C. 7. 1. 2 ガイドラインの性格、適用範囲

推奨事項であって、法的な要件とするものではない。研究開発ベース企業、後発品企業、原薬

製造メーカー、バイオテック、小企業から国際大企業まで幅広く使える指針とする。したがって、ガイドラインに書かれている要素のすべての適用を推奨するものではない。

C. 7. 1. 3 ガイドラインの使用

現存のシステムの自己評価、経営・管理者の責任の明確化、研究開発部門と生産部門の連携改善などに用いる。

C. 7. 1. 4 各行政の立場

ICH のガイドとしては推奨事項とする。

ただし、日本においては Q10 ガイドラインに記述される一部が GQP 省令を通じ、製造販売業者の許可要件となっていることが想定される。

欧州においては Q10 を GMP ルールの付属書とすることを表明している。

米国 FDA は現在ドラフトとして公表している“GMP 関連の品質システム”ガイダンスの代わりに Q10 を採用する可能性を示唆している。

2006 年 10 月シカゴにおける専門家会議では PQS の要素である①製造プロセスおよび製品品質の監視システム、②CAPA、③変更管理、および④経営者レビューが、各 Life cycle 段階において、どのようにあるべきかを整理した。2007 年 1 月の電話会議では、さらなる改定の方針が決定された。重要な点は①Q10 は推奨事項をまとめたものであることを明確に表現するために OPTION という言葉を再度入れなおした。②Regulatory Flexibility という言葉から想定することが各極において異なる。言葉自体が適切ではないので改める。共通認識を行うために付属書を用い、Regulatory Flexibility のもとで議論されてきたあるべき

姿へ（ビジョン）向かうための機会を説明することとなった。

C. 7. 2 2007 年 5 月ブリュッセル専門家会議

2006 年の 2 回の専門家会議ならびに 2007 年 1 月の電話会議における合意に対し大きな異議は出ず、ガイドライン案（ステップ 2）に合意した。各極における意見聴取を 2007 年中に行い、2008 年初夏の専門家会議において最終合意に至る計画を運営委員会に提出し承認された。

C. 7. 3 2007 年日本における説明会及び意見聴取

製薬協 ICH プロジェクトの協力も得て、医薬品品質システムガイドライン案の日本語訳を完成させ、意見聴取を行った。

日本の専門家会議メンバーによる ICHQ10 ガイドライン（ステップ 2）説明会を医薬品品質フォーラム・製薬協の協同で開催した。

C. 7. 4 ICH 品質サテライト円卓会議

2007 年 9 月 27 日、28 日、米国 Maryland Rockville FDA において日・米・欧の規制当局・産業界のバイオおよび化学薬品の専門家が参加して円卓会議が開催された。下記の過程を踏み、化成品、バイオ両方を適用範囲とする原薬プロセスガイドライン作成の道筋がつけられた。

27 日

- ・ Q8~Q9 のハイレベルな原則の総括
- ・ 化学薬品及び生物薬品に関する開発及び製造プロセスのレビュー
- ・ 生物薬品および化学薬品の専門家が均等に含まれるように配慮し、3 分科会に分かれて生物薬品と化学薬品の相違点を検討

(分科会毎に個別のテーマを設定したのではないことに注意； 密度の高い討論が目的)

- ・ 分科会の座長がそれぞれの検討結果を報告
 - 生物薬品の特質として、本質的に多様性があること、特性解析の困難さ、変更の影響評価の困難さ、製造環境が工程に与える sensitivity が大きいこと、開発過程における製造されるバッチの数などの問題が指摘された。

28 日

- ・ 前日の総括
 - Q8~Q10 の原則は適用可能である
 - ただし、生物薬品が有する原薬の複雑性が Q8 の原則の implementation に影響を与える。
 - 従来手法であれ新しいパラダイムの手法であれ、適切な開発手法が CTD 文書に記載される必要がある
 - 今後作成される原薬 GL は品質保証する工程を促進することに焦点を当て、用語の問題からは距離を置く
- ・ 今後の ICH 活動
 - コアメンバー (各極化学薬品 1 名、生物薬品 1 名) を組織し、コンセプトパーパービジネスプランを起草することを SC に提案
 - 進め方 (ガイドラインの構成 - 1 ガイドライン、2 ガイドライン、あるいは 1 上位ガイドラインの下に 2 サブガイドライン - 等) はコアメンバーの議論で決定

C. 7. 5 2007 年 10 月 28 日横浜における Q8, Q9, Q10 Implementation 予備会合

ICH 専門家会議内外において Q8 から Q10 の実践に関わる議論が活発になっている。

この中で、ICH 自体が各ガイドラインの実践に関して、Q&A を作成するなどして積極的な関与をすべきであるとの議論が 1-2 年されてきた。これを踏まえ、この会合では各極から問題提起が行われ、ICH による活動に関する提案が作成された。これにより、以下が基本合意された。①Q8-Q10 は相互に関連するため、Q8、Q9、Q10 に対応する個別の作業グループを結成するのではなく、一つの作業グループを結成する。②ガイドラインの導入・実践を推進するためには、ICH 外部からの事例研究を引用し、又、ICH の作業グループで Q&A を作成する。③2008 年 6 月の専門家会合で第一回目の正式 Implementation group 会合を開催する。

C. 7. 6 学会などにおける関連する議論

C. 7. 6. 1 2007 年 9 月 APEC ソウル開催された ICH 教育プログラム

APEC 主催による ICH に関するワークショップが韓国ソウルで開催された。

テーマは ICH Q8 から Q10 のガイドラインの概説およびガイドラインを用いての展望を日米欧の企業、行政代表が講演した (添付資料 5)。筆者は日本の薬事法改正の諸規則構築と ICH ガイドラインの関連を述べた。

C. 7. 6. 2 2007 年 9 月 米国 PDA・FDA 合同会議

この会議では ICHQ8 を基礎におく製造法開発の発表が多くあった。この中で日本 PDA 製薬学会の QAQC 委員会が ICHQ10 に関する課題について発表した。

これには『経営者』の品質システムへの関わ

り方など日本企業から見た、ICHQ10 実践の課題が表現されている。

C. 7. 6. 3 2007年12月 製剤機械技術研究会・医薬品品質フォーラム合同シンポジウム

当シンポジウムは Q8(製剤開発)と Q9 (品質リスクマネジメント)の二つをとりあげたものの、製剤開発におけるリスクマネジメントの応用が議論の中心となり、二つのガイドラインの同時的な実践の重要性が認識された。

C. 7. 6. 4 2008年1月—2月 添加剤セミナー (大阪、東京)、粉体工学会 (横浜) における ICHQ8-Q10 に関する講演

筆者は ICHQ8、Q9、Q10 のガイドラインの概要と実践の展望について講演した。参加者から『個別に説明に受けるより、同時に説明を受けた方がそれぞれのガイドラインの意図がわかりやすい。ただ、3つのガイドラインの総合的な理解を推進するためには、教育活動が必要である。』とのコメントを受けた。

C. 7. 7 考察

Q10 ガイドライン作成開始時に合意されたスコープ: 製品ライフサイクルを通じた包括的品質システム (Comprehensive quality system for product life cycle)の具体的な上位概念には、

1. 現在の GMP を補完するシステム

(complements existing cGMPs or GMPs)

2. ICH の Q ガイドラインの要点を適用したシステム (focuses on those elements that facilitate application of ICH Quality Guidelines (e.g. ICH(Q8))

3. 継続的改善を推進するシステム

(facilitates continuous improvement in pharmaceutical manufacturing)

の3つが含まれた。ステップ2に達したガイドライン案ではこれらのスコープは十分満たされているだろうか? 原薬プロセスのガイドライン作成が完成すれば技術的ガイドラインは網羅されることとなり、Q10 に基づく品質管理監督システムを構築し、運営していくための基礎はできたのではないだろうか。しかし、その一方で、ICH の外からは Q8、Q9、Q10 を包括的に説明、教育することに対する要望が強く寄せられている。これに応えるためには、Q8 に記述されている Quality by Design の実践例を増やし、その情報を共有することがまず必要である。それに加え、深い知識と適切なシステムをもって運営する企業へ対しては手続きなどの軽減化が現実を示されることも必要であろう。

「Q10 “品質システム” の下に、官側は企業に明確な経営者責任 (ISO 要素)、製品ライフサイクルを通じた科学 (ICH Q ガイドライン Q1-Q8) とリスクマネジメント (Q9) をもって適切な品質保証を求める。一方、企業側は当該“品質システム”を適切に運営すれば、変更手続きの軽減化を含めた継続的改善の機会が与えられる」との構図を広げていくためには、ICHQ8-Q10 Implementation の作業を通じ認識および情報の共有が行われることが期待される。

又、わが国においては新薬に対する基準と既存製品に対する基準は必ずしも同一ではないことが Q10 実践への足かせになる恐れがある。時間をかけてこれらの基準を統一していくことが適切な品質システムの運営上に必要だと思われる。

D. 結論

D.1 新規医薬品の品質基準の評価・特性・品質解析等に関する研究—タンパク質単独、核酸、細胞以外の抗血管新生治療法の現状と展望に関する研究—

最近抗血管新生療法として血管新生に関与する分子特に VEGFR および EGFR を標的とした低分子化合物の治療薬の開発が進んでいる。一部の薬剤については既に承認されており、さらに単剤あるいは化学療法等との組み合わせで他の疾患に対する臨床試験が行われている。また、承認には至っていないが臨床試験において良好な結果が得られている分子標的薬剤もある。一方、非臨床試験においては有効性を示すことできたが、臨床試験においては重篤な有害事象の発現と有効性を示すことができなかつたため開発が中止されたものも多い。今後の課題としては、有効性が示される可能性の高い患者の選択、適切な投与量および投与スケジュールの設定、他の作用機構が異なる薬剤との適切な組み合わせなどがあげられる。今後の分子標的薬剤を用いた抗血管新生療法の発展に期待したい。

D.2 医薬品の製造方法の評価に関する国際動向研究

現在 ICH 品質分野で議論の中心となっている新しい品質管理システム (QbD アプローチ) については、Q8(R1)「製剤開発に関するガイドライン付属書」の作成過程において、その概念等が明らかとなってきた。バイオ医薬品では従来から製品の規格と工程管理を相互補完的に製造管理に取り入れて、品質の一定性を確保する品質管理手法が積極的に取り入れられており、その点では QbD アプローチは特段新しい概念ではないので、化成品原薬とバイオテク

応用医薬品原薬に共通して適用できよう。しかし、バイオテクノロジー応用医薬品の多くでは、有効成分における分子多様性にみられるように、品質特性パラメータは多様であり、品質特性パラメータや工程パラメータ間の相互作用が科学的に明らかになっているものは限られる。さらに有効性・安全性へ悪影響がない品質特性パラメータの変動幅を、臨床データなしに明確にすることは、通常は困難である。したがって、バイオテクノロジー応用医薬品原薬において設定可能なデザインスペースは限られると予想される。一方リアルタイムモニタリングのような PAT 解析手法については、品質向上にも寄与するところ大であり、積極的に手法の開発を行うとともに、実際の製造工程での活用をはかるべきと考えられる。

D.3 生物薬品の特性・品質評価解析、品質評価法の開発に関する研究

バイオ医薬品の本質、アミノ酸配列等、及び分子式及び分子量を記載するにあたって考慮すべき事項や要素について考察し、モデルペプチド/タンパク質を用いて、記載例を提案した。

D.4 トランスジェニック植物により製造されるタンパク質性医薬品の品質評価等に関する研究

トランスジェニック植物で生産された組換え糖タンパク質に結合している糖鎖には、ヒトに対して免疫原性を示し得る植物特有の構造のものが含まれている。組換えタンパク質に結合している植物糖鎖の存在は、適用対象を植物成分に対してアレルギー反応を示さないヒトに限定するのであれば経口投与される製品では許容されると考えられるが、非経口投与する製品では回避すべきである。植物に特有の糖鎖

を付与しない発現系の開発も進められており、組換えタンパク質医薬品の生産系としてのトランスジェニック植物の有用性のさらなる向上が期待される。

D.5 バイオ医薬品の品質・安全性評価に関する研究

—抗体医薬品等の先端バイオ医薬品の安全性確保—

TGN1412の事故を教訓に、今後、主として医薬品の開発側には、臨床試験の安全性を担保するための新たな試験法の開発や、非臨床試験系の妥当性に関するより確実な検証が求められ、規制側には、被験者の安全を確保しつつ、新薬創出の妨げとならならないよう、非臨床・臨床試験に求められる要件を整理していくことが望まれる。その際には、非臨床試験で全てを明らかにすることは困難であること、医薬品のヒトにおける有効性・安全性は臨床試験を経て明らかにされるものであり、市販後調査なども含めた総合的な対応が必要であると考えられる。

D.6 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性評価に関する研究

—遺伝子治療用ウイルスベクターの shedding (体外排出) のリスク評価について—

遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向を踏まえた評価に関する研究の一環として、遺伝子治療用ウイルスベクターを投与した患者からのウイルスやベクターの shedding (体外排出) 試験の現状と、shedding のリスク評価において考慮すべき事項を検討した。遺伝子治療臨床試験に関する論文で shedding に関する記載があるのは半数以下であるが、長期間に渡り shedding が認められる

例もあることが確認された。ウイルス/ベクターの体内分布や shedding は、ベクターの種類や投与経路 (投与部位)、投与量、投与計画により大きく異なる。Shedding のアッセイ法には PCR 法が頻用されているが、リスク評価には感染性粒子の排出に関するデータが重要である。今後、ウイルス/ベクターの shedding に関する ICH 見解が作成される予定であるが、shedding に関する非臨床試験計画や、臨床試験で採取すべき試料、患者のモニタリングの時期・期間、アッセイ法などに関する基本的な考え方が示されることにより、shedding 試験の統一化が図られ、エビデンスに基づいたリスク評価が可能になることが期待される。

D.7 包括的な医薬品品質監督システムの国際動向に関する研究

ICH 医薬品品質システムガイドライン (Q10) 作成の経過を述べ、Q8、Q9 ガイドラインとともに導入に際しての課題がどのような構図を持つかを考察した。今後、Q10 について医薬品品質保証のあるべき未来をガイドラインとして示すことが期待される。一方、品質システムを円滑に運営していくために、国際的には他の領域の品質の基準作成を進めることと国内においては基準の統一化が必要と考える。

E. 健康危機情報

なし

F. 参考文献

- 1) <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/4831606en.pdf>. "Guideline on the Quality of Biological Active Substances

- Produced by Stable Transgene Expression in Higher Plants” EMEA
- 2) <http://www.fda.gov/cber/gdlns/bioplant.pdf>. “Guidance for Industry: Drugs, Biologics, and Medical Devices Derived from Bioengineered Plants for Use in Humans and Animals” FDA/USDA
 - 3) Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM. The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol Biol.* 6, 347-57, 1986
 - 4) Sijmons PC, Dekker BM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJ, Hoekema A. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology (N Y).* 8(3), 217-21, 1990
 - 5) Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature.* 342(6245), 76-8, 1989
 - 6) Ma JK, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science.* 268(5211), 716-9, 1995
 - 7) Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol.* 7(2), 152-8, 2004
 - 8) Twyman RM, Schillberg S, Fischer R. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opin Emerg Drugs.* 10(1), 185-218, 2005
 - 9) Gomord V, Faye L. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 7(2), 171-81, 2004
 - 10) Cabanes-Macheteau M, Fitchette-Laine AC, Loutelier-Bourhis C, Lange C, Vine ND, Ma JK, Lerouge P, Faye L. N-Glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants. *Glycobiology.* 9(4), 365-72, 1999
 - 11) Samyn-Petit B, Wajda Dubos JP, Chirat F, Coddeville B, Demaizieres G, Farrer S, Slomianny MC, Theisen M, Delannoy P. Comparative analysis of the site-specific N-glycosylation of human lactoferrin produced in maize and tobacco plants. *Eur J Biochem.* 270(15), 3235-542, 2003
 - 12) Karnoup AS, Turkelson V, Anderson WH. O-linked glycosylation in maize-expressed human IgA1. *Glycobiology.* 15(10), 965-81, 2005
 - 13) van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akkerdaas J, Milazzo JP, Loutelier-Bourhis C, Rayon C, Villalba M, Koppelman S, Aalberse R, Rodriguez R, Faye L, Lerouge P. Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *The Journal of biological chemistry.* 275(15), 11451-8, 2000
 - 14) Altmann F. The role of protein glycosylation in allergy. *International archives of allergy and immunology.* 142(2), 99-115, 2007

- 15) Wilson IB, Harthill JE, Mullin NP, Ashford DA, Altmann F. Core alpha1,3-fucose is a key part of the epitope recognized by antibodies reacting against plant N-linked oligosaccharides and is present in a wide variety of plant extracts. *Glycobiology*. 8(7), 651-61, 1998
- 16) Wilson IB, Zeleny R, Kolarich D, Staudacher E, Stroop CJ, Kamerling JP, Altmann F. Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs: widespread occurrence of Lewis a, core alpha1,3-linked fucose and xylose substitutions. *Glycobiology*. 11(4), 261-74, 2001
- 17) Jin C, Hantusch B, Hemmer W, Stadlmann J, Altmann F. Affinity of IgE and IgG against cross-reactive carbohydrate determinants on plant and insect glycoproteins. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 121(1), 185-90 e2, 2008
- 18) Strait RT, Morris SC, Finkelman FD. IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIb cross-linking. *The Journal of clinical investigation*. 116(3), 833-41, 2006
- 19) Jin C, Altmann F, Strasser R, Mach L, Schahs M, Kunert R, Rademacher T, Glossl J, Steinkellner H. A plant derived human monoclonal antibody induces an anti-carbohydrate immune response in rabbits. *Glycobiology*. 2008
- 20) Bardor M, Faveeuw C, Fitchette AC, Gilbert D, Galas L, Trottein F, Faye L, Lerouge P. Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core alpha(1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology*. 13(6), 427-34, 2003
- 21) Zhu A, Hurst R. Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum. *Xenotransplantation*. 9(6), 376-81, 2002
- 22) Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, Muchmore E. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(21), 12045-50, 2003
- 23) Dingermann T. Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges. *Biotechnology journal*. 3(1), 90-7, 2008
- 24) Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, Katagiri Y, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T. Study on the quality control of cell therapy products. Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *Journal of chromatography*. 1160(1-2), 263-9, 2007
- 25) Nguyen DH, Tangvoranuntakul P, Varki A. Effects of natural human antibodies against a nonhuman sialic acid that

- metabolically incorporates into activated and malignant immune cells. *J Immunol.* 175(1), 228-36, 2005
- 26) Chargelegue D, Vine ND, J. DC, W. DPM, Ma JKC. A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice. *Tranegenic Res.* 9, 187-94, 2000
- 27) Sriraman R, Bardor M, Sack M, Vaquero C, Faye L, Fischer R, Finnern R, Lerouge P. Recombinant anti-hCG antibodies retained in the endoplasmic reticulum of transformed plants lack core-xylose and core-alpha(1,3)-fucose residues. *Plant biotechnology journal.* 2(4), 279-87, 2004
- 28) Ko K, Tekoah Y, Rudd PM, Harvey DJ, Dwek RA, Spitsin S, Hanlon CA, Rupprecht C, Dietzschold B, Golovkin M, Koprowski H. Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(13), 8013-8, 2003
- 29) Wright A, Morrison SL. Effect of C2-associated carbohydrate structure on Ig effector function: studies with chimeric mouse-human IgG1 antibodies in glycosylation mutants of Chinese hamster ovary cells. *J Immunol.* 160(7), 3393-402, 1998
- 30) Saint-Jore-Dupas C, Faye L, Gomord V. From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *Trends in biotechnology.* 25(7), 317-23, 2007
- 31) Cox KM, Sterling JD, Regan JT, Gasdaska JR, Frantz KK, Peele CG, Black A, Passmore D, Moldovan-Loomis C, Srinivasan M, Cuison S, Cardarelli PM, Dickey LF. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nature biotechnology.* 24(12), 1591-7, 2006
- 32) Koprivova A, Stemmer C, Altmann F, Hoffmann A, Kopriva S, Gorr G, Reski R, Decker EL. Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plant-specific immunogenic N-glycans. *Plant biotechnology journal.* 2(6), 517-23, 2004
- 33) Strasser R, Altmann F, Mach L, Glossl J, Steinkellner H. Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking beta1,2-linked xylose and core alpha1,3-linked fucose. *FEBS letters.* 561(1-3), 132-6, 2004
- 34) Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SH, Presta LG. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *The Journal of biological chemistry.* 277(30), 26733-40, 2002
- 35) Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1

- complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry*. 278(5), 3466-73, 2003
- 36) Schuster M, Jost W, Mudde GC, Wiederkum S, Schwager C, Janzek E, Altmann F, Stadlmann J, Stemmer C, Gorr G. In vivo glyco-engineered antibody with improved lytic potential produced by an innovative non-mammalian expression system. *Biotechnology journal*. 2(6), 700-8, 2007
- 37) Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LO, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(11), 6741-6, 2003
- 38) Elbers IJ, Stoop GM, Bakker H, Stevens LH, Bardor M, Molthoff JW, Jordi WJ, Bosch D, Lommen A. Influence of growth conditions and developmental stage on N-glycan heterogeneity of transgenic immunoglobulin G and endogenous proteins in tobacco leaves. *Plant physiology*. 126(3), 1314-22, 2001
- 39) Gomord V, Chamberlain P, Jefferis R, Faye L. Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends in biotechnology*. 23(11), 559-65, 2005
- 40) Bakker H, Schijlen E, de Vries T, Schiphorst WE, Jordi W, Lommen A, Bosch D, van Die I. Plant members of the $\alpha 1 \rightarrow 3/4$ -fucosyltransferase gene family encode an $\alpha 1 \rightarrow 4$ -fucosyltransferase, potentially involved in Lewis(a) biosynthesis, and two core $\alpha 1 \rightarrow 3$ -fucosyltransferases. *FEBS letters*. 507(3), 307-12, 2001
- 41) Palacpac NQ, Yoshida S, Sakai H, Kimura Y, Fujiyama K, Yoshida T, Seki T. Stable expression of human $\beta 1,4$ -galactosyltransferase in plant cells modifies N-linked glycosylation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(8), 4692-7, 1999
- 42) Gomord V, Sourrouille C, Fitchette AC, Bardor M, Pagny S, Lerouge P, Faye L. Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant biotechnology journal*. 2(2), 83-100, 2004
- 43) Sharpe AH, Abbas AK. T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *The New England journal of medicine*. 355(10), 973-5, 2006
- 44) Beyersdorf N, Hanke T, Kerkau T, Hunig T. Superagonistic anti-CD28 antibodies: potent activators of

- regulatory T cells for the therapy of autoimmune diseases. *Annals of the rheumatic diseases*. 64 Suppl 4, iv91-5, 2005
- 45) Margulies DH. CD28, costimulator or agonist receptor? *The Journal of experimental medicine*. 197(8), 949-53, 2003
- 46) Investigator's Brochure: TGN1412: Humanized Agonistic Anti-CD28 Monoclonal Antibody. [cited; Available from: http://www.mhra.gov.uk/home/idcplg?IdcService=SS_GET_PAGE&ssDocName=CON2023515&ssTargetNodeId=389
- 47) Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltsis N. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *The New England journal of medicine*. 355(10), 1018-28, 2006
- 48) Expert group on phase one clinical trials: Final report. [cited; Available from: http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/DH_063117
- 49) Kenter MJ, Cohen AF. Establishing risk of human experimentation with drugs: lessons from TGN1412. *Lancet*. 368(9544), 1387-91, 2006
- 50) Saio T. TGN1412 clinical trial -The truth is still shrouded in mystery-. *Clinical Evaluation*. 34, Suppl XIV 13-22, 2006
- 51) Foon KA, Schroff RW, Bunn PA, Mayer D, Abrams PG, Fer M, Ochs J, Bottino GC, Sherwin SA, Carlo DJ. Effects of monoclonal antibody therapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 64(5), 1085-93, 1984
- 52) Breslin S. Cytokine-release syndrome: overview and nursing implications. *Clinical journal of oncology nursing*. 11(1 Suppl), 37-42, 2007
- 53) Tuma RS. Phase I antibody risks, trial safety examined. *Journal of the National Cancer Institute*. 98(14), 956-8, 2006
- 54) Ferran C, Bach JF, Chatenoud L. In vivo T cell activation properties of anti-T cell monoclonal antibodies. *Experimental nephrology*. 1(2), 83-9, 1993
- 55) Norman DJ, Vincenti F, de Mattos AM, Barry JM, Levitt DJ, Wedel NI, Maia M, Light SE. Phase I trial of HuM291, a humanized anti-CD3 antibody, in patients receiving renal allografts from living donors. *Transplantation*. 70(12), 1707-12, 2000
- 56) Wilde MI, Goa KL. Muromonab CD3: a reappraisal of its pharmacology and use as prophylaxis of solid organ transplant rejection. *Drugs*. 51(5), 865-94, 1996
- 57) Xu D, Alegre ML, Varga SS, Rothermel AL, Collins AM, Pulito VL, Hanna LS, Dolan KP, Parren PW, Bluestone JA, Jolliffe LK, Zivin RA. In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant