

表3. エフェクター活性の増強を目的とした Fc 領域改変の例

開発	改変部位、技術	特徴	文献
Genentech	IgG1-S298A, E333A, K334A	ADCC 増強 (II ↓, IIIa ↑)	a
Xencor	IgG1-S239D, I332E	ADCC 増強 (IIIa/IIb ↑)	b, c
	IgG1-S239D, A330L, I332E	ADCC 増強、CDC 減弱 (IIIa/IIb ↑, C1q ↓)	b, d
	IgG1-G236A, S239D, I332E	ADCC 増強 (IIa/IIb ↑, IIIa ↑)	e
AME/Eli Lilly	IgG1-D280H, K290S, S298D	ADCC 増強 (IIb ↓, IIIa ↑)	f
Macrogenics	IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L	ADCC 増強 (IIa ↑, IIIa ↑)	g
Abgenix/Amgen	IgG1-K326A, E333A	CDC 増強、ADCC 維持 (C1q ↑)	h
	IgG1-K326W, E333S IgG2-E333S	CDC 増強、ADCC 消失 (C1q ↑)	h
協和発酵キリン	IgG1/IgG3 mixed isotype	CDC 増強、ADCC 維持 (C1q ↑)	i, j
	Fucose depletion from IgG1 oligosaccharide (FucT8(-/-) CHO)	ADCC 増強 (IIIa ↑)	i, k
GlycArt/Roche	Enrichment of Fucose-free mAb (GnTIII overexpression)	ADCC 増強	l
MIT	IgG1-S298G, T299A	糖鎖修飾を受けず ADCC 活性を維持	m
Univ. of Texas	IgG1-E382V, M428I (produced in E.coli)	FcγI を介した単球による 抗腫瘍活性	n

Strohl WR *et al.* Cur. Opin. in Biotech. 2009, 20:685-691 を参考に作成

* 特徴の項の括弧内は対象とする受容体あるいは補体との親和性の変化を記載している。

(IIIa/IIb ↑ は FcγRIIIa との親和性と FcγRIIb との親和性の比が増加したことを示す)

* 本表ではマクロファージ等による抗体依存性細胞食作用(ADCP)も ADCC 活性の一部として区別無く表記した。

- a) R.L. Shields, *et al.*, *J Biol Chem*, 276, 6591 (2001)
- b) G.A. Lazar, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 4005 (2006)
- c) H.M. Horton, *et al.*, *Cancer Res*, 68, 8049 (2008)
- d) E.M. Bruckheimer, *et al.*, *Neoplasia*, 11, 509 (2009)
- e) J.O. Richards, *et al.*, *Mol Cancer Ther*, 7, 2517 (2008)
- f) J. Watkins, *et al.*, *Fc region variants. WO 2004/074455 A2*. 2004.
- g) J.B. Stavenhagen, *et al.*, *Cancer Res*, 67, 8882 (2007)
- h) E.E. Idusogie, *et al.*, *J Immunol*, 166, 2571 (2001)
- i) T. Kubota, *et al.*, *Cancer Sci*, 100, 1566 (2009)
- j) A. Natsume, *et al.*, *Cancer Res*, 68, 3863 (2008)
- k) T. Shinkawa, *et al.*, *J Biol Chem*, 278, 3466 (2003)
- l) C. Ferrara, *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 93, 851 (2006)
- m) S.L. Sazinsky, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 20167 (2008)
- n) S.T. Jung, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 604

表4. エフェクター活性の減弱を目的とした Fc 領域改変の例

開発	改変部位、技術	特徴	文献
Alexion (Eculizumab)	IgG2/IgG4 キメラ	ADCC, CDC 減弱	a
Bristol-Meyers (Abatacept)	IgG1-C220S, C226S, C229S, P238S	ADCC 減弱	b
Tolerx/GlaxoSmithKline (Otelixizumab)	IgG1-N297A	ADCC 減弱 (Fc 部の糖鎖の除去)	c
GlaxoSmithKline (Clenoliximab)	IgG4-S228P, L236E	ADCC, CDC 減弱	d
Ortho Biotech (huOKT3)	IgG1-L234A, L235A	ADCC, CDC 減弱 サイトカインストームの抑制	e
Protein Design Labs (visilizumab)	IgG2-V234A, G237A	ADCC, CDC 減弱 サイトカインストームの抑制	f
Wellcome Lab.	IgG4-L235A, G237A, E318A	ADCC 減弱	g
Merck	IgG2-H268Q, V309L, A330S, P331S (IgG2m4)	ADCC, CDC 減弱	h
MedImmune	IgG1-L234F, L235E, P331S	ADCC, CDC 減弱	i
Xencor	IgG1-S267E, L328F	抑制型FcγIIb への選択的結合	j

Strohl WR *et al.* Cur. Opin. in Biotech. 2009, 20:685-691 を参考に作成

- a) R.P. Rother, *et al.*, *Nat Biotechnol*, 25, 1256 (2007)
- b) P.M. Davis, *et al.*, *J Rheumatol*, 34, 2204 (2007)
- c) S. Bolt, *et al.*, *Eur J Immunol*, 23, 403 (1993)
- d) M.P. Reddy, *et al.*, *J Immunol*, 164, 1925 (2000)
- e) D. Xu, *et al.*, *Cell Immunol*, 200, 16 (2000)
- f) M.S. Cole, *et al.*, *Transplantation*, 68, 563 (1999)
- g) J.T. Hutchins, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 92, 11980 (1995)
- h) Z. An, *et al.*, *MAbs*, 1, 572 (2009)
- i) V. Oganessian, *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 64, 700 (2008)
- j) S.Y. Chu, *et al.*, *Mol Immunol*, 45, 3926 (2008)

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

製造方法の異なるバイオ医薬品の有効性の評価試験方法に関する研究

研究分担者 新見伸吾 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第三室長
協力研究者 日向昌司 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第三室主任研究官

研究要旨 CHO 細胞、High-5 昆虫細胞、マウスミエローマ細胞で発現させ精製した組換えヒト HGF の生物活性、抗原価及び受容体に対する結合能について、それぞれ初代培養ラット肝細胞の DNA 合成促進、ELISA 及び表面プラズモン共鳴法により測定した。その結果、各 HGF 標品は各測定法で異なる値を示し、各製品間における相対強度は全ての測定法で同じ傾向を示した。したがって、製造方法によって活性が異なることが示され、活性の観点からも同等/同質性を評価することが重要であることが示された。

A. 研究目的

組換え DNA 技術を応用した治療用タンパク質は 1980 年代に始めて承認されて以来、多くの治療用タンパク質が開発・承認された。現在、これらの治療用タンパク質は特許切れを迎えることとなり、それらのバイオ後発品の開発が活発に行われつつあり、その評価研究は急務の課題である。実際、我が国においても成長ホルモンとエリスロポエチンのバイオ後続品が承認されるに至っている。

治療用タンパク質は化学薬品に比べて構造が複雑で、様々な翻訳後修飾を受けるため、製造方法が異なる場合、一次構造は同じであっても翻訳後修飾や高次構造が同一であるかどうかは不明である。したがって、臨床試験を行う前に、有効性評価の一環として生物活性を測定し、バイオ後続品と先発品と同等/同質性を評価することが必要である。さらに、品質特性に違いがある場合においても、有効性及び安全性において

先発品と同等/同質性が認められれば承認が可能な場合もありうる。したがって、バイオ後続品は品質特性だけでなく、生物活性の観点からも評価を行うことが重要と考えられた。そこで、本研究では治療用タンパク質における製造方法の違いが活性に及ぼす影響について、劇症肝炎の治療が行われている肝細胞増殖因子（HGF）をモデルタンパク質として検証した。

B. 研究方法

1. 試薬

研究用試薬として市販されている、Mouse myeloma 細胞由来（R&D Systems）、CHO 細胞（R&D Systems）、High-5 昆虫細胞由来（R&D Systems）の組換えヒト HGF（rhHGF）を購入し、表示値に従い 5 μ g/ml となるよう 0.1% 牛血清アルブミン（BSA）を含む PBS に溶解した。

2. 肝細胞の単離と培養

Wistar 系ラット（オス、体重 約 180g）

からコラゲナーゼ灌流により消化した肝臓を、50×g、1分遠心した。この操作を4回繰り返し、肝細胞を沈殿に得た。肝細胞は5%ウシ胎児血清(FBS)、 10^{-8} M インスリン、 10^{-8} M デキサメタゾン を添加した Williams' E (WE) 培地 0.6ml を用いて 5×10^4 cells/cm² となるようにコラーゲンコートした 24 ウエルマイクロプレートに播種した。培養 2.5 時間後、1 μ g/ml アプロチニンを含む WE 培地に交換し、さらに 18 時間培養した。1 μ g/ml アプロチニン及び 0.1%BSA を含む WE 培地 0.4ml に交換し、rhHGF を各種の濃度で添加した。培養 1 日後、³H 標識チミジンを最終濃度として 60 kBq/ml 添加し、1 日培養した。

3. DNA 合成の測定

培養液を取り除き、氷冷した PBS(-) 0.4 ml で 2 回洗浄後、10% TCA を 0.4 ml 添加して 4°C で 2 時間放置した。10%TCA を除去し、1 N 水酸化ナトリウム溶液 0.4 ml を添加し、37°C で 1 時間インキュベーションし、細胞を溶解した。得られた細胞溶解液をポリプロピレン製遠心チューブに移し、そのうち 32 μ l をタンパク量の測定に用い、残りの液に、1 N 水酸化ナトリウム溶液 0.65 ml、10 mg/ml BSA 12.8 μ l を加え混合後、さらに 100% TCA 0.2 ml を加えて混合した。氷中で 1 時間放置後、3000 rpm、10 分間、4°C で遠心した。上清を除き沈殿に 10% TCA 1.0 ml を加え、沸騰水中で 15 分間放置した。氷中に 5 分間放置後、3000 rpm、10 分間、4°C で遠心した。上清 0.7 ml をアクアゾール 25 ml に加え攪拌後、液体シンチレーションカウンターでカウントを測定した。得られたカウントをタンパク量で補正し、DNA 合成活性を求めた。

4. タンパク量の測定

クーマシー染色を用いたタンパク質測定液 (バイオラッド) 1 ml を用い、BSA をコントロールとし、595 nm における吸光度を測定した。

5. ELISA による HGF 抗原価の測定

Quankine[®] Human HGF (R&D Systems) を用いて操作法に従い測定した。なお、予備的な検討結果から、測定値が同時に測定した検量線の中央部に位置するように、Mouse myeloma 細胞由来、CHO 細胞、High-5 昆虫細胞の rhHGF を、それぞれ 3571 倍、758 倍、2500 倍希釈して用いた。

6. 表面プラズモン共鳴法を用いた rhHGF 受容体-Fc 融合タンパク質との結合能の解析

速度論的解析は、BIAcore 3000 を用い、解析はすべて 25°C で行った。NHS (50 mM) / EDC (200 mM) 溶液 (50/50) で 7 分間活性化させた CM5 センサーチップに 10 mM 酢酸緩衝液 pH6.0 に溶解した rhHGF 受容体-Fc 融合タンパク質をインジェクトし、1530 resonance unit 固定化した。残存活性基は、1 M ethanolamine でブロッキングした。

Mouse myeloma 細胞由来 rhHGF、High-5 昆虫細胞由来 rhHGF、CHO 細胞由来 rhHGF について、それぞれ 2.5、5、10 nM となるように HBST 緩衝液で希釈し、流速 20 μ l/min で 2 分間の結合、3 分間の解離で得られたセンサーグラムを BIAevaluation software により curve fitting させることで結合速度定数(k_a)および解離速度定数(k_d)を求め、 K_d (k_d/k_a)を算出した。なお、センサーチップは、1 M NaCl を 1 分間流すことで再生した。

C. 結果

1. DNA 合成促進を指標とした rhHGF の生物活性の測定

Mouse myeloma 細胞由来の rhHGF のほうが、High-5 昆虫細胞由来よりもより低濃度で DNA 合成を促進した。40 ng/ml における最大値は両者で同じであった (図 1)。一方、CHO 細胞由来の rhHGF は両者よりも DNA 合成促進により高濃度必要であり、40 ng/ml における値は両者の約 60% であった。Mouse myeloma 細胞及び High-5 昆虫細胞由来の 40 ng/ml における値を最大値として 50% 有効濃度を比較すると、Mouse myeloma 細胞由来、High-5 昆虫細胞由来、CHO 細胞由来で、それぞれ 2.86 ng/ml, 3.71 ng/ml, 17.1 ng/ml であった。

2. ELISA による rhHGF 抗原価の測定

ELISA により求めた rhHGF 抗原価の表示値に対する比率を計算すると、Mouse myeloma 細胞由来、High-5 昆虫細胞由来、CHO 細胞由来で、それぞれ 1.43、1.01、0.338 であった (表 1)。

3. 表面プラズモン共鳴法を用いた rhHGF の rhHGF 受容体-Fc 融合タンパク質との結合能の解析

各 rhHGF の rhHGF 受容体-Fc 融合タンパク質に対する結合の解離速度定数は異なり、Mouse myeloma 細胞由来、High-5 昆虫細胞由来、CHO 細胞由来で、それぞれ 0.18 nM, 0.25 nM, 2.69 nM であった (表 2)。

D. 考察

CHO 細胞、High-5 昆虫細胞、Mouse myeloma 細胞で発現させ精製した rhHGF の生物活性、抗原価及びヒト HGF 受容体に対する結合性について、それぞれ初代培養ラット肝細胞

の DNA 合成促進、ELISA 及び表面プラズモン共鳴法により測定した。その結果、各 rhHGF 標品は各測定法で異なる値を示し、標品間の相対強度は全ての測定法で同じ傾向を示した。

添付書類によると、各 rhHGF とも SDS-PAGE あるいは HPLC で 95% 以上の純度であり、不純物及び分解物の含量の違いにより rhHGF の含量が違う可能性は極めて低い。また、付加した糖鎖が異なることも予想されるが、HGF の糖鎖は活性に影響を及ぼさないことが既に報告されている。したがって、標品間の活性の違いは、高次構造の違いが原因であると考えられる。すなわち、各産生細胞の特性によって、あるいは精製過程の違いにより rhHGF の高次構造が異なるため、生物活性、抗体との結合性、rhHGF 受容体との結合性に差異が観察されたものと考えられる。これに関連し、ELISA では標準曲線の作成に Sf-21 昆虫由来の rhHGF を用いているが、High-5 昆虫細胞由来の rhHGF では表示値と同じ値が得られている点は興味深い。少なくともこの場合は、宿主の起源が同じであれば細胞の種類が異なっても同じ抗原性を有する rhHGF が産生されることを示している。

本研究は研究用の組換えタンパク質で行ったものであるが、治療用タンパク質においても製造方法の違いにより活性が異なる可能性を示した点で興味深い。したがって、バイオ後続品の評価は品質だけでなく活性についても同等/同質性を評価することが極めて重要であることが示された。

E. 結論

CHO 細胞、High-5 昆虫細胞、Mouse myeloma

細胞で発現させ精製した rhHGF の生物活性、抗原価及び rhHGF 受容体に対する結合性について、それぞれ初代培養ラット肝細胞の増殖促進、ELISA 及び表面プラズモン共鳴法により測定した。その結果、各 rhHGF 標品は各測定法で異なる値を示し、各製品間における相対強度は全ての測定法で同じ傾向を示した。本結果は、製造方法の違いにより、治療用タンパク質の活性が異なる場合がある可能性を示しており、バイオ後続品の評価において活性の観点からの検討の重要性が示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kita, T., Nishida, H., Shibata, H., Niimi, S., Higuti, T., Arakaki, N., Possible role of mitochondria remodeling on cellular triacylglycerol accumulation. *J. Biochem.*, 146, 787-796 (2009)
2. Shibata, H., Nakano, T., Parvez, MA., Furukawa, Y., Tomoshi, A., Niimi, S., Arakaki, N., and Higuti, T.: Triple combination of lower and longer alkyl gallates and oxacillin improve antibiotic synergy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2218-2220 (2009),
3. 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口

照英 RNA interference を用いた医薬品開発の現状と展望 医薬品研究 2009 vol. 40 No. 12 789-809

4. 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英 治療用タンパク質の免疫原性 その1 医薬品研究 2009 vol. 40 No. 11 703-715
5. 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英 治療用タンパク質の免疫原性 その2 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2010 vol. 41 No. 5 390-400 (印刷中)
6. Niimi, S., Harashima, M., and Hyuga, M.: Current Status of Therapeutic Angiogenesis with Protein, Gene and Cell Therapy *Current Drug Therapy*, 4, 221-233 (2009).
2. 学会発表
 1. 後藤洋子、石塚保行、松浦知和、新見伸吾: ラクトース修飾絹フィブロインのスポンジ基材で培養したヒト肝癌細胞株 FLC-4 細胞のスフェロイド培養と機能発現. 第18回ポリマー材料フォーラム (2009.11.26-27) 名古屋
 2. 原島 瑞、新見伸吾、江添悠、日向昌司、関泰一朗、有賀豊彦、山口照英 初代培養肝細胞において HGF と Annexin A3 はプロスタグランジン E2 の産生を促進しない 第82回日本生化学会大会、神戸 (2009年10月21-24日)
 3. 原島 瑞、新見伸吾、長岡陽子、斉藤千恵子、布留川みなこ、関泰一朗、有賀豊彦、山口照英 初代培養ラット肝細胞における Dexamethasone 依存的な mRNA レベルの増加のプロテアソーム阻害剤による阻害 第16回肝細胞研

研究会 山形 (2009年6月26-27日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 なし
2. 実用新案登録 なし
3. そのほか なし

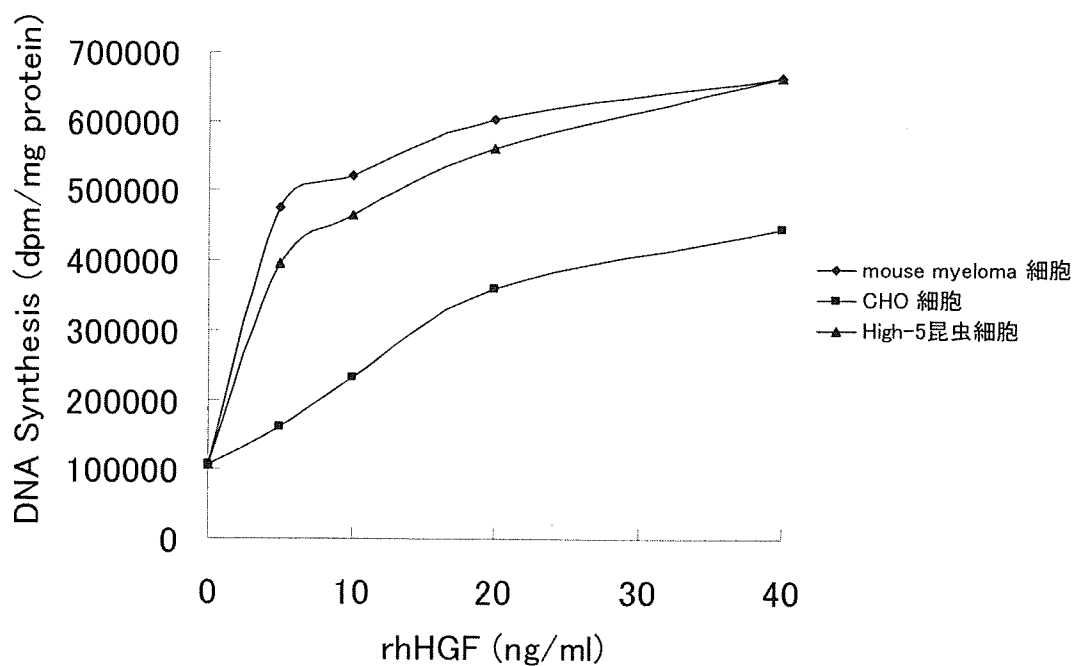


図1 初代培養ラット肝細胞における rhHGF による DNA 合成促進

表1 ELISA による rhHGF 抗原価の測定

	Mouse myeloma 細胞	High-5 昆虫細胞	CHO 細胞
表示値	5 ug/ml	5 ug/ml	5 ug/ml
測定値	7.18 ug/ml	5.07 ug/ml	1.69 ug/ml
表示値/測定値	1.43	1.01	0.338

表2 表面プラズモン共鳴法を用いた rhHGF の rhHGF 受容体-Fc 融合タンパク質との結合能

	k_a (M^{-1}/S^{-1})	k_d (S^{-1})	K_d (nM)
Mouse myeloma 細胞	5.76×10^6	1.04×10^{-3}	0.18
High-5 昆虫 細胞	3.76×10^6	9.26×10^{-4}	0.25
CHO 細胞	2.19×10^6	5.90×10^{-3}	2.69

遺伝子治療用医薬品の規制に関する国際調和推進のための基盤的研究

研究分担者 内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第一室長

遺伝子治療用医薬品の規制に関する国際調和推進のための基盤的研究の一環として、今年度は遺伝子治療用ベクターや腫瘍溶解性ウイルス製品を投与した患者の排泄物からのウイルスやベクターの排出に関する基本的な考え方に関する ICH 見解を基に、今後、国際調和ガイドラインに盛り込むべき要件について、ウイルスやベクターの生物学的特性と排出の分析法の観点から検討した。排出と伝播のリスク評価に影響するウイルスやベクターの生物学的特性としては、増殖能や持続性・潜伏感染、感染指向性と投与/感染経路が重要であり、免疫系の影響や導入遺伝子の影響も考慮する必要がある。また排出の分析法として主に用いられる核酸増幅検査と感染性試験を中心に、各分析法の特徴と問題点、分析法確立における注意点及び分析結果の解釈について考察した。

A. 研究目的

遺伝子治療は、先天性遺伝子疾患やがん、心血管疾患、神経変性疾患等、現在効果的な治療法が確立されていない難病や生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患に対する革新的医療として期待されている。本邦では平成 7 年に最初の臨床研究が開始されて以来、現在までに 30 件近い臨床研究・試験が実施され、治療を受けた患者数も 180 名を超えた。平成 20 年には我が国で初めての遺伝子治療薬の承認申請が出されるなど、遺伝子治療薬の開発は急速に進展している。しかし、先天性免疫不全症やレーバー先天性黒内障などで目覚ましい成果が得られている一方で、レトロウイルスベクターを用いた X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) の遺伝子治療における白血病の発症など、遺伝子治療により予想を超える重篤な副作用の発現も認められており、遺伝子治療薬の本格的な実用化・普及には克服すべき課題は未だ多い。特に重要な

課題となるのは遺伝子治療薬の品質・安全性等の確保である。遺伝子治療薬のような先端医薬品は、従来の医薬品にない概念や画期的な機能を有しているため、その品質、安全性、有効性の確保には新たな評価手法の開発が望まれている。このような技術の進歩が著しい分野においては、特に臨床開発が進んでいる海外での開発動向を踏まえ、国際的な水準からみた医薬品の評価手法や開発ステージで明らかにしておくべきデータ、あるいは承認申請において求められるデータ等の科学的妥当性について絶えず評価・検証し、評価手法や規制の国際調和を推進することが医薬品審査の迅速化には重要である。本研究は、以上のような現状を踏まえ、遺伝子治療薬の品質・安全性確保のための評価手法や規制に関する国際調和を推進するための基盤的研究を行うものである。

今年度は、遺伝子治療薬や腫瘍溶解性ウイルス製品を投与した患者からのウイルスやベク

ターの排出の評価法に関して、今後、国際調和ガイドラインに盛り込むべき要件を、ウイルスやベクターの生物学的特性と排出の分析法の観点から検討した。

B. 研究方法

2009年6月付けで発出された「ICH considerations: General Principles to Address Virus and Vector Shedding (ICH見解: ウイルスとベクターの排出に関する基本的な考え方)」(参考資料添付)及び関連する論文や資料を基に、ウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価法に関するガイドラインに盛り込むべき、ウイルスやベクターの生物学的特性と排出の分析法の観点で考慮すべき事項について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面への配慮が必要な試料・資料は取り扱っていない。

C. 研究結果及び考察

ICH (日米 EU 医薬品規制調和国際会議) 遺伝子治療専門家会議により、2009年6月に「ICH見解: ウイルスとベクターの排出に関する基本的な考え方」が発出された。ICH見解では、排出 (shedding) とは、遺伝子治療用ベクターや腫瘍溶解性ウイルスなどを投与した患者から、ベクターやウイルスが患者の分泌物や排泄物を介して拡散することと定義されている。排出は、生体内分布 (患者の投与部位から全身への広がり) とは異なる概念である。ウイルスやベクターの排出は患者家族や医療従事者等の第三者への伝播のリスクや環境中への拡散による環境汚染のリスクがあり、公衆衛生の観点から安全性確保は大きな課題である。ICH見解では、環境へのリスクについてはICH各極で規制が異なることから対象から

は除外され、第三者への伝播 (transmission) のリスクを把握するための排出の評価に関する基本的な考え方が示されている。

ICH見解の構成は、序、ウイルス/ベクターの生物学的特性、分析法に関する考慮事項、非臨床での考慮事項 (動物腫、投与量と投与経路、サンプリングの頻度と試験期間、サンプルの採取、非臨床データの解釈と伝播試験)、臨床での考慮事項 (サンプリングの頻度と期間、サンプルの採取、臨床での排出試験データの解釈)、第三者への伝播、からなる。ICH見解では、非臨床及び臨床での排出試験の実施が適切とされる場合に、推奨されるデザインを提示することに焦点が当てられ、特に、検出に用いる分析法と、非臨床及び臨床試験におけるサンプル採取及びサンプリングスケジュールに関する事項に重点が置かれている。さらに非臨床データの解釈と臨床試験計画の立案への活用、さらにはウイルス/ベクターの伝播試験の必要性の評価における臨床データの解釈についても提示されている。

遺伝子治療薬や増殖性ウイルス薬は中国等では既に承認された製品があり、これらの製品が治療に用いられている。また、欧米や我が国でも遺伝子治療薬や増殖性ウイルス薬等の臨床開発は活発化しているが、排出の評価は必ずしも適切に実施されていない。ICH見解はガイドラインとは異なり、規制としての拘束力はないが、このように遺伝子治療薬や増殖性ウイルス製品がグローバルに開発され、世界中で患者に投与されている現状を考慮し、ICHでは、今後、本見解をもとにウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価に関する国際調和ガイドラインの作成を検討している。本研究では、この国際調和ガイドラインに盛り込むべき事項について、今年度はウイルスやベクターの生物学的特性と排出の分析法の観点から検討した。

C.1 ウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価において考慮すべき生物学的特性

ウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価において考慮すべき生物学的特性として、対象となるウイルスや遺伝子治療用ベクターが由来する野生型株の既知の生物学的特性に関する情報は、排出の試験計画を立案するための基本的要件と考えられる。野生型ウイルスの既知の感染/伝播経路や、ウイルスやベクターの一般的な生物学的特性に加えて、ウイルスやベクターの増殖能の有無は、増殖性ウイルスを使用する場合はもちろん、非増殖性のウイルスやベクターの場合でも製造工程や投与後に意図せずに増殖能を獲得することもあるため、考慮すべき重要な生物学的特性である。

癌治療用ベクターとして腫瘍溶解性生菌を用いる方法も開発されているが、ウイルスベクターだけでなく、このような細菌ベクターも排出を考慮する必要がある。細菌ベクターの場合には、ウイルスベクターの排出評価のためのガイドランスがそのままあてはまるものではないと考えられるが、その手法や一般的な考慮事項のうちの一部は適用可能と考えられる。

遺伝子治療用ベクターのうち、プラスミドベクターについては、naked DNA として排出されても第三者に伝播することはないと一般的に考えられており、ガイドラインから除外してもよいと思われる。

C.1.1 ウイルス/ウイルスベクター

遺伝子治療用ウイルスベクターと腫瘍溶解性ウイルスを以下、ウイルス/ウイルスベクターと呼ぶ。ウイルス/ウイルスベクターでは、ウイルスゲノムの遺伝子改変を行うための工程に関する情報や、組換えウイルス/ウイルスベクターの品質特性の分析は、排出のリスクを評価する上で大変有用と考えられる。排出試験を計画するには、ウイルス/ウイルスベクターの生物学的特性として、感染指向性、増殖特性、

遺伝子構造や核酸配列等の分子生物学的特性等を考慮する必要がある。野生型や天然弱毒化ウイルスでは、ウイルスの樹立と選別の経緯に関する情報が特に重要であろう。第三者への伝播のリスクを評価するには、これらの情報に加えて病原性に関わる遺伝子に関する分子解析が大変有用と考えられる。

製品の開発に当たっては、ウイルス/ウイルスベクターが由来する野生型株に関する既知の特性（感染経路、生体内分布、排出経路、潜伏感染と再活性化等）を参照すべきである。またこのような情報はウイルス/ウイルスベクターによる第三者への感染に対する防御法を確立するのにも有効と考えられる。

(1) 増殖能

ウイルス/ウイルスベクターの増殖能は排出評価にあたって考慮すべき重要な特性である。増殖性ウイルス/ウイルスベクターは患者体内に長期間存続する恐れがあり、患者体内でその量が増える可能性があるからである。このことは排出の可能性を高め、排出期間を増加させ、結果的に伝播の可能性を高めることになる。増殖性ウイルス/ウイルスベクターでは、排出に影響を与える可能性があるため、分子変異体の分析も重要である。

非増殖性ウイルス/ウイルスベクターの場合、製品が排出されたとしても、投与後にその量が増えることはなく、排出は増殖性ウイルス/ウイルスベクターと比べるとはるかに短期間になることが見込まれる。しかしながら、非増殖性ウイルス/ウイルスベクターであっても、製造工程で増殖性ウイルスが生じる可能性がある。従って、製造工程で生じる可能性のある分子変異体の解析を行うことは、製品の品質の観点からも、また排出の考察を行うに当たっても重要である。

遺伝的改変により増殖能を低下させたウイルス/ウイルスベクターでは、その増殖能が復

帰したり変異する可能性も考慮する必要がある。非増殖性ウイルス/ウイルスベクターは、患者の体内において、他のウイルスとの組換えや細胞の遺伝子により相補されたり、あるいは細胞の遺伝子との再配列により増殖性を再獲得する可能性がある。

(2) 持続性と潜伏感染

ウイルス/ウイルスベクターの持続性や潜伏感染は排出速度と排出量に影響する。持続性の高いウイルス/ウイルスベクターでは、排出はより長期間に及ぶ可能性がある。潜伏感染/再活性化の可能性があるウイルス/ウイルスベクター（ヘルペスウイルスなど）では、潜伏感染したウイルスが再活性化する可能性を考慮して、より長期間のモニタリングが必要になると考えられる。

(3) 感染指向性と投与/感染経路

ウイルス/ウイルスベクターの感染指向性と投与経路はウイルス/ウイルスベクターを細胞標的に運ぶための重要な要素であり、排出プロフィール及び伝播の可能性に影響を与える可能性がある。

前述の通り、ベクターが由来する野生型株の感染指向性と投与経路に関する情報は排出を考慮する上で必須である。ウイルス/ウイルスベクターの感染指向性が野生型と同じである場合、排出と伝播の経路は野生型のそれを基に推定することができる。例えば、野生型ウイルスが皮膚、血液、体液等との接触によって感染する場合、血液、体液等によるウイルス/ウイルスベクターの排出を考慮すべきと考えられる。また、野生型ウイルスが空気感染または飛沫感染により非接触感染性を示す場合、ウイルスベクターも同様の経路で感染する可能性がある。非接触感染は伝播の可能性を高めると考えられる。

野生型とは異なる細胞/組織特異性を持つよ

うに遺伝子改変されたウイルス/ウイルスベクターの場合、排出プロフィールは改変された標的特異性に依存する。

しかし、ウイルス/ウイルスベクターの感染と増殖を許容する細胞、組織、臓器へのターゲティングは、投与したウイルス/ウイルスベクターの感染指向性に加えて、ウイルス/ウイルスベクターと細胞、組織、臓器の接触の程度とも密接に関係する。従って、ウイルス/ウイルスベクターの排出は投与部位及び投与経路に依存し、野生型とは異なる排出プロフィールを示すことが考えられる。例えば、呼吸器系組織に感染指向性を持つ野生型ウイルスに由来するウイルス/ウイルスベクターは、野生型と同様に呼吸器系組織に感染指向性を示すと考えられるが、排出プロフィールは投与経路に依存し、呼吸器内投与、腫瘍内投与、全身性投与では排出プロフィールが異なると考えられる。

非増殖性ウイルスベクターを用いて *ex-vivo* で遺伝子導入した細胞を患者に投与する場合は、通常、感染性ウイルスが遺伝子導入細胞から遊離することは考えにくいので、排出のリスクは極めて低いと考えられる。

(4) ウイルス不活化及び治療法

非病原性株に由来するウイルス/ウイルスベクターは病原性株に由来するものよりも排出時の懸念は低いと考えられるが、これはウイルス/ウイルスベクターのその他の生物学的特性、すなわち増殖性や弱毒化の程度に依存する。

ウイルス/ウイルスベクターの生物学的特性として、物理的・化学的な不活化に対する感受性に関する情報は、排出されたウイルスの伝播のリスクを評価するうえで重要である。また、野生型ウイルスに対する有効な不活化法、感染患者の有効な治療法に関する情報を幅広く集めておくことは、感染のリスクとその影響をコントロールする手段として利用できる可能性がある。

C.1.2 非ウイルスベクター

プラスミドベクターは、通常は患者体内で増幅したり、第三者に伝播可能な形で排出されるということはありませんので、プラスミドの排出と伝播のリスクは比較的low、排出試験で考慮すべき事項は限定的なものになると考えられる。しかし、例えばフラーレンからなる安定なナノ粒子のような、特殊なドラッグデリバリーシステムを利用してプラスミドを投与する場合、そのまま修飾を受けない形で排出される可能性がある。また、ウイルスゲノムの一部を持つプラスミドや、動物細胞の自己複製系を持つプラスミドでは、ウイルス粒子やプラスミドの増幅が生じる可能性がある。このような場合には、特別な注意が必要になると考えられる。

細菌性ベクターや治療用細菌は、一般的に増殖性あるいは制限増殖性であり、この点が最も考慮すべき事項である。しかし、これに加えて休眠性/持続性と抗生物質耐性についても考慮する必要がある。

(1) 増殖能

ウイルスベクターの増殖能について記載したC.1.1(1)の関連する部分は、細菌性ベクターや治療用細菌にも一般的に適用できると考えられる。

(2) 休眠状態と持続性

細菌性ベクターや治療用細菌の排出の経路と期間を推定するには、細菌性ベクターの増殖を許容する細胞の種類と、細菌性ベクターが持続感染する、あるいは休眠状態で生存する組織、臓器の特性を考慮することが重要と考えられる。ネズミチフス菌、リステリア・モノサイトジェネス、結核菌など、ある種の細菌は細胞内で増殖(細胞内感染)することが可能である。このような細胞内で増殖性を示す細菌性ベクターの排出は、より長期間に及ぶ可能性がある。

(3) 抗生物質感受性/耐性

抗生物質感受性は細菌性ベクターの除去や、感染した第三者への治療計画を考える上で重要な要素である。抗生物質耐性遺伝子を細菌性ベクターに組み込むことは、細菌感染の治療において利用可能な抗生物質を制限することになるので、耐性遺伝子を持たないベクターの利用が望ましい。

C.1.3 免疫系と導入遺伝子

(1) 免疫系の影響

ウイルスやベクターに対する免疫応答は排出プロファイルを変える可能性がある。患者の免疫応答が強力な場合、投与されたウイルスやベクターのクリアランスが早まり、その結果、ウイルスやベクターの排出期間はより短期間になる可能性がある。遺伝子改変を行ったウイルスやベクターに対する免疫応答は、改変された遺伝子の影響で、野生型株に対する免疫応答とは異なっている可能性がある。

第三者への伝播のリスクを考慮する場合、一般の人々が野生型ウイルスまたは親株に対して既存免疫を獲得しているかどうかに関する情報が有用と考えられる。大部分の人々が当該ウイルス種に対して既に免疫を獲得している場合、ウイルスは効果的にクリアランスされるため、ウイルスやベクターの排出が生じててもウイルスやベクターの伝播のリスクは一般的に低いと考えられ、ほとんどの状況で安全であると見なされる。しかし、高齢者や乳幼児など、免疫能が低い人ではクリアランス機構が有効に働かない可能性があり、感染が起こると重大な結果になる可能性がある。免疫能が低下した人と患者が接触する可能性については、常に気を付ける必要がある。

(2) 導入遺伝子の影響

ウイルスやベクターが導入遺伝子を持つよ

うに改変されたものでは、その排出は導入遺伝子により影響を受ける可能性がある。例えば、免疫系を刺激する導入遺伝子の発現により、ウイルス/ベクターのクリアランスが促進される可能性や、ウイルスの増殖機構に影響を与える可能性のある因子を導入する場合などである。

ウイルスやベクターが自殺遺伝子をコードしている場合、特殊な条件下では宿主の細胞死が誘導される可能性がある。そのような導入遺伝子は、ウイルスやベクターが宿主細胞から遊離する引き金となり、排出のタイミングに影響を与える可能性があると考えられる。

C.2 ウイルスやベクターの排出の分析法

排出試験の実施には、適格な分析法を用いることが大変重要である。伝播の可能性を定量的に評価することが可能な定量的な分析法を用いることが望ましい。排出されたウイルスやベクターの検出には、通常、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 等の核酸増幅検査 (NAT) と感染性試験の2つの方法が用いられる。これらの方法はいずれも利点と欠点がある。NATに基づく分析法は感度が高いが、排出されたウイルスやベクターが感染性を有するインタクトなウイルスやベクターなのか、非感染性の分解物なのかを区別できない。一方、感染性試験は感染性のあるウイルスやベクターのみを検出可能であるが、NATよりも感度が低い。従って、適切なアッセイ系を選択することが重要であるが、ウイルスやベクターの遺伝子配列を検出する定量的NATに基づく方法を含めることが望ましいと考えられる。どのような試験法を選択するにしても、その妥当性を明らかにすることが必要である。

C.2.1 分析法の確立における注意点

分析する検体はインタクトなウイルス/ベクター又はウイルス/ベクターの断片や分子変異体である。排出の検出に用いる分析法は、特異

性があり、十分な感度を持ち、再現性のある方法で、何が排出されたのかを十分に区別できるものである必要がある。分析法は定量的方法か定性的方法のいずれかを用いる。

何が排出されたのか、「排出物」を明らかにするために、複数の分析法を組み合わせることが望ましい。例えば、single-site NAT を用いた場合、短いウイルス断片も検出してしまうため、排出を過剰評価してしまう可能性がある。妥当性が示されていれば、multi-target あるいは multiplex NAT を行うことにより、ウイルスやベクターの配列全体を決定することが可能であり、排出されたウイルスやベクターがインタクトか否かに関する有用な情報を得ることが可能と考えられる。

定量的分析法の感度を考慮し、用いた方法の検出限界を明らかにすることが重要である。定量限界、特に定量下限が重要である。ウイルス等の標準参照物質が利用可能であれば、定量的分析法を改良するのに役立つと考えられる。

排出の分析系は標的となる検体のプロファイルに依存して確立する必要がある。血液、唾液、尿などの体液中の「排出物」の量は単位容積当たりで表すことが望ましいが、生体内分布試験のPCRデータでは、ゲノムDNA 1 μ g 当たりの量として表すことが一般的である。検体が糞便の場合には、単位重量当たりで表すことになる。

分析用試料中に含まれる試験の阻害物質となる不純物を除去するステップを入れる必要がある。また、分析データの解釈において、分析系が妨害を受けている可能性を考慮することが重要である。生体試料マトリクスによる測定妨害の評価が重要である。過度の妨害を避けるには、分析前に試料を希釈することが必要となるが、試料を希釈しても試料マトリクスの阻害作用を避けられない場合には、代替試験を開発する必要がある。

排出の適切な分析法は製品開発の初期の段

階から確立する必要があるが、分析法の完全なバリデーションは承認申請までに行えば良いと考えられる。分析法の妥当性の検証には、ICH Q2 及び Q7 ガイドラインに記載されている原則が適用可能である。

C.2.2 分析法

(1) 核酸増幅検査(NAT)に基づく分析法

NAT に基づく分析法は1コピーから数コピーのDNA断片を増幅することによりウイルスやベクターの遺伝子配列を検出することができる。

NAT の利点は、非常に高感度で再現性があり、迅速な方法ということである。NAT の主な欠点は、インタクトなウイルス/ベクターと、感染性のないウイルス/ベクターの分解物とを区別できないことである。試料分析の第一選択としては、まず NAT によりウイルス/ベクターに特異的な核酸断片を定量的に検出することが望ましいと考えられる。

NAT 技術は常に進歩しているので、現時点で望ましいと考えられる事項は以下の通りである。

- 測定対象に特異的で、適切な精度を持つ分析法を確立すること。定量が必要な場合、定量限界と適切な測定範囲を決定すること。
- 既知の量のウイルス/ベクター配列を含むスパイクコントロールサンプルを用いて抽出法の妥当性を示すこと。
- 検出に用いる増幅領域、プライマーとプローブの選択の根拠を示すこと。
- 分析には複数の繰り返し試料を用いること。NAT の妥当性を評価するため、各組織からの試料ひとつに対して、既知の量のウイルス/ベクター配列を持つコントロール DNA のスパイクを含めること。
- 試験の繰り返し数の根拠を提示すること。

(2) 感染性試験

感染性試験には、「排出物」を増殖許容性細胞株と *in vitro* で培養した後、高感度なエンドポイント検出（細胞内で増幅したウイルス/ベクターの高感度検出）により測定する方法が含まれる。非増殖性ウイルス/ベクターの場合、感染性試験には *in vitro* 培養系での形質導入と導入遺伝子の検出が含まれる。

試料中のウイルス/ベクターの感染価を測定する方法としては、プラークアッセイが広く用いられている。50%組織培養感染量(TCID50)試験も用いられる。感染性試験の利点は、インタクトで感染性のあるウイルス/ベクターのみを検出可能なことである。感染性試験は増殖能を再獲得したウイルスベクターや分子変異体も検出することができる。感染性試験の主な欠点は、NAT に基づく分析法と比べて本質的に感度が低いことである。

感染性試験は、適切な感度と再現性を示すことが必要であり、統計的な妥当性を明らかにできるように、十分な繰り返し数を用いて実施する必要がある。検出感度を明らかにするには、適切な参照ウイルスを用いる必要がある。また、用いた細胞株の選択の合理性を示す必要がある。

しかしながら、感染性試験には一定の限界がある。例えば、ヒトは広範なウイルスに感染するということから生じる問題がある。臨床試料の測定には、用いる標的細胞は投与したウイルス/ベクターに特異的な感受性を持つことが必要とされるが、そのために方法の開発が困難な場合がある。感染性試験はまた、生物学的試験法の全てに共通する、値の変動が問題となる。

このような測定の難しさと定量的分析法の重要性を考慮すると、感染性試験は NAT のような定量的分析法と組み合わせて用いることが望ましいと考えられる。

しかしながら、「排出物」による伝播の可能性を正確に評価するには感染性試験を用いる

ことが重要と考えられる。感染性試験は、「排出物」の性質、すなわちインタクトなウイルス/ベクターなのかウイルス/ベクターの断片なのかを正確に評価することが可能だからである。感染性試験は排出された増殖性ウイルス/ベクターを検出する基本的な試験として通例用いられる。また、非増殖性ウイルス/ベクターを投与した場合、「排出物」が非増殖性のウイルス/ベクターなのか、増殖性を有する組換え体なのかを確定するのに感染性試験は有益と考えられる。このような場合、感染性試験においてウイルス増殖を相補する遺伝子を持つ細胞株と持たない細胞株を用いることで実施できる。例えば、アデノウイルスベクターの場合、アデノウイルスベクターの増殖を相補するE1a領域を持たないA549細胞と、同領域を持つHEK293細胞を用いることで「排出物」の特性解析が可能である。

(3) その他の分析法

その他の分析法として、いくつかの方法が特殊なケースや特定のウイルス/ベクターの検出に用いられる。

- イムノアッセイやサザンブロットをウイルス/ベクターの検出に用いることができる。これらの方法の主な欠点は、インタクトのウイルス/ベクターと、感染性を持たないウイルス/ベクターの分解物とを区別できない点である。
- 細菌性ベクターの場合、NATに加えて、特殊な条件下でのコロニー形成試験が通常用いられる。
- RNAベクターの場合、特殊な分析法を考慮する必要があるかもしれない。

C.2.3 解釈

NATで検出された「排出物」の量が感染性試験の検出限界以下の場合、試験感度の制約から、感染性試験による「排出物」の更なる分析

を実施しない、という選択も考えられる。このように、NATのみを実施し、感染性試験を実施しない場合、NATにより検出された「排出物」は感染性があるものと見なすべきである。また、高感度アッセイにより複数の連続した排出サンプルが陰性となるまで、感染の可能性があると見なす必要があると考えられる。

D. 結論

遺伝子治療用ベクターや腫瘍溶解性ウイルス製品を投与した患者の排泄物からのウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価法に関する研究を実施した。ICH見解「ウイルス/ベクターの排出に関する基本的考え方」を基に、今後、国際調和指針の作成に当たり、指針に盛り込むべき要件をウイルスやベクターの生物学的特性と排出の分析法の観点から検討した。排出と伝播のリスク評価に影響するウイルスやベクターの生物学的特性としては、増殖能や持続性・潜伏感染、感染指向性と投与/感染経路が重要であり、免疫系の影響や導入遺伝子の影響も考慮する必要がある。また排出の分析法としては、核酸増幅検査と感染性試験が主に用いられるが、それぞれ長所と短所がある。これらの分析法を中心に各分析法の特徴と問題点、分析法確立における注意点及び結果の解釈について考察した。

E. 参考資料

ICH Considerations : General Principles to Address Virus and Vector Shedding, June 2009

<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA5521.pdf>

ICH見解：ウイルスとベクターの排出に関する基本的な考え方 June 2009

http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec1/ich_gtdg/ICH-GTDG%20VVS%20con%20JP_N%20PC%20s49509014002.pdf

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 内田恵理子：“バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験”、日本薬局方技術情報 2010 追補(JPTI2010)第 1 5 改正第一追補/第二追補対応、(財)日本公定書協会編、(株)じほう、東京(2010)、 pp85-91
- 2) 内田恵理子、山口照英：医薬品のウイルス安全性確保：核酸増幅検査 (NAT) による C 型肝炎ウイルス検出の評価と NAT による高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発、*YAKUGAKU ZASSHI*, 130 (2), 163-169 (2010)
- 3) 宮田直樹、川崎ナナ、内田恵理子、蜂須賀暁子：平成 19 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告：日本薬局方の名称関連項目の科学的整備に関する研究、*医薬品研究*, 40, 587-598 (2009)
- 4) 山口照英、内田恵理子：核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保、*Pharmstage*, 9 (2), 1-5 (2009)

2. 学会発表

- 1) 眞田由親、新村卓也、井関寛、内田恵理子、山口照英、小木美恵子：HL60 細胞における Dimethyl Sulfoxide による分化誘導と c-myc の変化について、第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月、横浜
- 2) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：造血支持能を持つフィーダー細胞膜タンパク質のプロテオーム解析による探索、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月、岡山

G. 知的財産権の出願・登録状況

ICH Considerations

General Principles to Address Virus and Vector Shedding

June 2009

1.0 Introduction

For the purpose of this ICH Considerations document, shedding is defined as the dissemination of the virus / vector through secretions and/or excreta of the patient. Virus / vector shedding should not be confused with biodistribution, e.g., spread within the patient's body from the site of administration.¹ Virus / vector² includes gene therapy vectors³ and oncolytic viruses.

Assessment of shedding can be utilized to understand the potential risk associated with transmission to third parties and the potential risk to the environment. The scope of this document excludes shedding as it relates to environmental concerns because it is regulated differently in various regions.

The focus of this document is to provide recommendations for designing non-clinical and clinical shedding studies when appropriate. In particular, emphasis will be on the analytical assays used for detection, and considerations for the sampling profiles and schedules in both non-clinical and clinical studies. The interpretation of non-clinical data and its use in designing clinical studies is also within the scope of this paper, as well as the interpretation of clinical data in assessing the need for virus / vector transmission studies.

2.0 Biological Properties of the Virus / Vector

Information on the known properties of the wild-type strain from which the virus / vector under consideration was derived is essential in guiding the design of shedding studies.

Replication competence is an important property to consider. Replication-competent virus /vector might persist in the patient for extended periods and can increase in amount. Therefore, the potential for shedding can be higher with replicating virus / vector and could result in a greater likelihood of transmission. For replicating virus / vector, analysis of molecular variants will also be important and could impact virus / vector shedding⁴.

In practice, most viral / vector products currently under investigation are replication incompetent or conditionally replicative. It is likely that virus / vector shedding in these cases would be of a much shorter duration, and, depending on the route of administration, would display a different shedding profile as compared to shedding following infection with the wild-type counterpart. Additionally, information regarding the known route of transmission of the wild-type strain will help in the interpretation of data from shedding studies and the estimation of the likelihood of transmission. For replication-incompetent products, characterization of any potential replication-competent

¹ Results from biodistribution studies may be used to address blood shed in situations such as surgery or an open wound.

² While not described within this document, the principles also apply to replicating bacteria used in oncology applications.

³ Excluding genetically modified cells, except when there is a risk of mobilisation of the virus / vector.

⁴ ICH Considerations on Oncolytic Viruses

recombinants that might be generated during manufacturing is important from both a product quality standpoint and for consideration of shedding.

Other property of the replication-competent virus / vector that should be considered when designing shedding studies would be whether infection is expected to be short- or long-term. Considerations include whether the virus / vector itself has been genetically modified to alter the cellular / tissue tropism compared to the wild-type strain, and whether the immune status of the patient impacts virus / vector shedding. For example, in some cases a greater immune response to the virus / vector might result in faster clearance of the virus / vector and therefore reduce the duration and extent of viral / vector shedding.

3.0 Analytical Assay Considerations

Having suitably qualified analytic assays in place for shedding studies is very important. Assays should be specific, sensitive and reproducible. Quantitative assays are preferred as these will aid in quantifying the probability of transmission. Assessment of interference from the biological sample matrix is important and it might be appropriate to dilute the sample prior to analysis to avoid extensive interference.

Polymerase chain reaction (PCR) and infectivity are the two assays typically used for the detection of shed virus / vector. Use of a quantitative PCR (qPCR)-based assay to detect viral / vector genetic material is recommended. The advantage of qPCR assays is that they are sensitive, reproducible, and rapid. The main disadvantage of qPCR-based assays is that they will not differentiate between intact virus / vector and non-infectious or degraded virus / vector. Infectivity assays involve *in vitro* culture of shed material with a permissive cell line followed by sensitive endpoint detection.

Infectivity assays have the advantage that they will detect only virus / vector that is intact and has the potential of being transmitted. For replication-incompetent virus / vector, these assays will involve the transduction and detection of transgene in an *in vitro* culture system. The main disadvantage of infectivity assays is that they are inherently less sensitive than PCR-based assays. It might be appropriate for the first line of sample analysis to be based on the detection of nucleic acid fragments by quantitative methods specific for the virus / vector product. Other assays such as immunoassays or Southern blots have also been used; as with PCR assays, the main disadvantage is that they do not differentiate between intact virus / vector and non-infectious or degraded virus / vector. Whatever analytical method(s) is selected, it should be justified.

However, to accurately assess the potential for transmission of shed material, the use of an infectivity assay is considered important as this will allow for an accurate assessment of the nature of the shed material (e.g., intact virus / vector vs. fragments of virus / vector). Infectivity assays are commonly used as the primary assay for detection of shed replication-competent virus / vector. When the virus / vector is replication-incompetent, infectivity assays can also be informative in determining whether the shed material is a replication-incompetent virus / vector or a replication-competent recombinant. This can be done by the use of cell lines with and without complementing genes. For example, with adenoviral vector, one can use non-complementing A549 cells and complementing HEK293 cells, which contain regions of E1a, to characterize shed material. A positive culture from HEK293 cells and negative culture from A549 cells will demonstrate that the shed material is likely defective virus / vector and not a replication-competent recombinant. Molecular characterization could be appropriate to confirm the identity of what was detected in the positive culture.

If the amount of shed material detected by qPCR is below the limit of detection of the infectivity assay, one might not choose to further characterize the shed material by infectivity assays due to the constraints of assay sensitivity.

4.0 Non-Clinical Considerations

Non-clinical shedding studies help guide the design of clinical shedding studies. The aim of a non-clinical shedding study is to determine the secretion / excretion profile of the virus / vector. Information collected from these non-clinical studies can then be used to estimate the likelihood and extent of shedding in humans. The non-clinical shedding study can be integrated into the design of other non-clinical studies (e.g., might not be a stand-alone study). It might be helpful to consider the results of studies conducted with virus / vector products that display similar characteristics (e.g., the same virus strain or a strain of the same virus / vector expressing a marker gene) prior to initiating non-clinical shedding studies.

When designing and interpreting non-clinical shedding studies the following points should be considered:

4.1 Animal Species

One of the difficulties of investigating virus / vector products in non-clinical studies is the relevance of the animal species as a large number of virus / vector products under clinical evaluation are derived from parental strains which do not readily infect and rarely replicate in non-human species. The permissiveness of the animal will clearly be important for interpreting data from non-clinical animal studies. The expression and tissue distribution of viral receptors in a specific animal might affect the profile of shedding of the virus / vector. Thus the profile of shedding might not directly correlate with that in humans, as cellular and tissue sequestration could be different. The use of an animal model to mimic a disease condition can be helpful to best assess shedding. For example, the use of a tumour bearing model might be appropriate to support the replication of oncolytic viral products. The impact of immunity to the virus / vector should be taken into consideration as this can affect the rate of viral / vector clearance and therefore shedding. See also sections 4.3 and 4.4 on sampling.

4.2 Dose and Route of Administration

Wherever possible the dose and route of administration used in non-clinical shedding studies should reflect those intended for use in the clinical setting. The non-clinical protocol should be designed for maximum exposure taking into account the clinical route of administration and dose(s) selected. For example, the use of dose levels bracketing the anticipated clinical dose range could be considered for the evaluation of virus / vector shedding in the non-clinical study.

4.3 Sampling Frequency and Study Duration

Known biological properties of the wild-type strain can be used to guide the frequency of sampling after virus / vector administration. In general, one might need to take samples more frequently in the first days following administration in order to detect a transient shedding profile. Practical considerations should determine the number and frequency of samples, depending on the type of excreta or secreta.

Several factors should be considered when determining the duration of the study. These include the natural course of infection of the parental virus, pre-existing immunity and the replicative capacity of the virus / vector under investigation.

The course of a natural infection with the wild-type strain will give some indication of the expected duration of shedding. It is of particular importance if the virus / vector under investigation is replication-competent, as the duration should be sufficient to detect a possible secondary peak of virus / vector suggestive of viral / vector replication. If the virus / vector persists for a long duration in certain tissues, i.e., kidney, lungs or the blood stream, it is recommended that the duration of shedding analysis should follow a similar time course. However if multiple consecutive negative samples are observed it might be appropriate to shorten the study duration. It is important to note that for certain viral / vector products where latency or reactivation is a concern, negative tests performed in a pre-specified time period might not accurately capture virus / vector shed at later time points. It is recognized that reactivation cannot always be modeled in non-clinical studies. Furthermore, immune