

# 厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業) 分担研究報告書

## 多剤耐性結核に対する新規治療用 DNA ワクチンの開発・実用化に関する研究

研究分担者 中島俊洋 ジェノメディア株式会社・代表取締役社長

### 研究要旨

多剤耐性結核に対する新規治療用 DNA ワクチンの開発を進めるには、ワクチン成分であるプラスミド DNA (pVAX-IgHSP65-hIL12 DNA) を治験薬 GMP に準拠して製造する必要がある。プラスミド DNA は大腸菌を用いて GMP 製造を実施するため、安全性の確保と品質の安定化に必要なバンクシステムを作成した。国立遺伝研より大腸菌の DH5 株を入手し、動物由来成分を含まない培地で培養した後に、エレクトロポレーション法によりプラスミド DNA を導入し、形質転換を行った。導入後に大腸菌のクローニングを行って、クローン由来の大腸菌から小規模でプラスミド DNA の確認を行って、目的の DNA と制限酵素地図が一致することを確認した。確認後に、1種類の大腸菌クローンを選択してマスターセルバンクの作成を行った。マスターセルバンクの作成のため、選択した大腸菌のクローンを動物由来成分を含まない培地で拡大培養を実施し、計 300 本で構成されるバンクシステムを構築した (pVAX-IgHSP65-hIL12(DH5 ))。構築したバンクシステムについての品質試験の結果、全ての品質管理項目に適合であることを確認したため、製造を行ってプラスミド DNA の暫定規格設定に必要な品質確認データの取得を行った。プラスミド DNA の治験薬 GMP 製造と並行して、治験届までに必要な前臨床試験パッケージ案の作成を行った。既に国内における規制当局である医薬品医療機器総合機構 (PMDA) との薬事戦略相談を通じて、品質規格や試験デザインの相談を進めており、両者で合意した内容に従って治験届に必要なデータパッケージを作成した。今後、作成したバンクシステムを用いて治験薬 GMP レベルで製造したプラスミド DNA を用いて、安全性試験などの非臨床試験データ、治験薬の品質規格の設定を進め、医師主導治験を実施する予定である。

### A . 研究目的

近畿中央胸部疾患センター・臨床研究センターでは、純国産で革新的な多剤耐性結核に対する治療用ワクチン (pVAX-IgHSP65-hIL12 DNA/HVJ-E) の開発を進めており、ヒト結核に最も近いとされているカニクイザルを用いた動物モデルで治療効果と予

防効果を評価した。その結果、平成 24 年度までに投与を行ったカニクイザルにおいて新規治療用 DNA ワクチンによる治療効果、及び予防効果を確認したため、薬事法上の承認申請を目的とする医師主導治験を国内優先で実施することとなった。

そこで平成 25 年度の研究では、純国産の治療用 DNA ワクチンを用いて国内で医師主導治験を実施するために必要な治験薬 GMP 製造、非臨床試験データ（毒性試験、薬効薬理試験）を取得することを目的として研究開発を行った。

また、国内で製造を実施する新規の治療用 DNA ワクチンにより治験を実施するのは初めてのケースになるため、国内における規制当局である医薬品医療機器総合機構（PMDA）と、薬事戦略相談を実施し、国内のガイドラインの制定に繋げる事も目的として研究開発を行った。

これらの研究成果により、国内と海外とのドラッグ・ラグの原因の一つである、欧米先行の新規ワクチンの開発の国内回帰へも目的として研究を実施した。

## B . 研究方法

- 1 ) 治験薬製造用バンクシステムの構築
  - ・ 国立遺伝研究所から入手した大腸菌 DH5 株を用いて形質転換を行ってマスターセルバンク作成に必要な種細胞の調製を行った。生物由来原料の使用を最低限とするため、植物由来成分の培養液を用いて培養を行って形質転換用の大腸菌を培養し、遺伝子導入用の大腸菌のストック細胞を調製した。
  - ・ 大腸菌の形質転換を行うための遺伝子導入は、プラスミド DNA による形質転換で通常使用されている薬剤添加による化学的な方法ではなく、エレクトロポレーション法によ

る物理的な方法で実施した。その結果、目的のプラスミド DNA である pVAX1-IgHSP65-hIL12 で形質転換された大腸菌のクローンを得た。

- ・ 得られた大腸菌のクローンを小スケールで培養し、目的のプラスミド DNA である pVAX1-IgHSP65-hIL12 の導入を確認した。培養した大腸菌より抽出したプラスミド DNA を用いて制限酵素地図を作成し、理論サイズとの一致を確認した後に、マスターセルバンク作成用の大腸菌クローンを選択した。
  - ・ バンクシステム作成用に選択した大腸菌クローン使用し、生物由来原料を含まない培養液で拡大培養を行った後に、グリセロールを最終濃度 15% になるよう添加し、バンク作成用のチューブに分注した。
  - ・ 分注後にマイナス 80 度で凍結して計 300 本のマスターセルバンク（pVAX1-IgHSP65-hIL12 /DH5）の作成を完了した。
- 2 ) 構築したバンクシステムの特性確認
    - ・ 作成したマスターセルバンクについては、品質試験を実施してセルバンクとして適切な品質であることを確認した。
    - ・ ICH のガイドラインである Q5D「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品 / 生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析について」( 医薬審 第 873 号、平成 12 年 7 月 14 日付 ) に記載された内容に従って試験項目の選択を行った。

**表 1. 構築したマスターセルバンク(MCB)システムの品質検査項目について**

試験	項目	規格
宿主の同定試験	薬剤感受性試験	カナマイシン耐性
	栄養要求性試験	栄養要求性なし
	グラム染色試験	グラム陰性
混入否定試験	コロニー形態試験	大腸菌以外の形態のコロニーなし
	ファージ否定試験	ファージ陰性
プラスミド確認	制限酵素地図試験	理論サイズと一致
生存率試験	生菌数試験	10 <sup>7</sup> 大腸菌 /mL以上

・本研究で作成したマスターセルバンクは、大腸菌のバンクであるため、ICHのガイドラインであるQ5Dの微生物細胞に関する記載内容に従って、試験項目を設定した。

・具体的には、**表 1** に示す宿主の同定試験、混入否定試験、プラスミド確認、生存率試験について実施し、試験としては**表 1** に示す7項目(薬剤感受性試験、栄養要求性試験、グラム染色試験、コロニー形態試験、ファージ否定試験、制限酵素地図試験、生菌数試験)の試験を実施して、作成したセルバンクシステムの特性解析及び品質評価を行った。

### 3) 構築したバンクシステムによるプラスミド DNA の製造

・作成したマスターセルバンク(MCB)を用いて GMP 製造を実施し、ワクチン成分となる目的のプラスミド DNA ( pVAX1- IgHSP65-hIL12 ) を製造出来る事を確認した。

・ MCB を用いて種菌培養を行った後に本培養を実施した。培養については全て生物由来原料を含まない原

材料を用いて実施した。適切な細胞濃度まで培養を継続した後に、菌体を濃縮、破碎し、残渣を除去して清浄化した溶液を出発材料として精製工程を進めた。

・3段階のカラムクロマトグラフィーによる精製工程と限外ろ過工程を組み合わせた精製工程により、宿主由来の RNA、DNA、たん白質、エンドトキシンなどの不純物を除去し、保護安定剤を添加した最終バッファーに溶媒を置換して原薬とした。その後、濃度調整と滅菌ろ過を行ったプラスミド DNA 溶液をバイアルに分注・打栓して製剤とした。

### 4) 製造したプラスミド DNA の品質確認試験

・本研究で使用する DNA ワクチンの成分は、プラスミド DNA と不活性化ウイルス粒子 (HVJ-E) であり、それぞれ大腸菌とヒト培養細胞株を用いて製造される。そのため、バイオテクノロジー応用医薬の範疇に分類されると考えられたため、バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品に関するガイドラ

インに従って品質規格項目案の設定を行った。

- ・ ICHのガイドライン Q6B「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品 / 生物起源由来医薬品）の規格及び試験方法の設定について」（医薬審発第 571号、平成 13年 5月 1日付）の「4. 規格及び試験方法」の内容に従って、試験項目を選定した。具体的には、ICH Q6Bの「4.2 製剤の規格及び試験方法」に記載された「4.2.1 外観・性状」、「4.2.2 確認試験」、「4.2.3 純度と不純物」、「4.2.4 力価」、「4.2.5 物質質量」、「4.2.6 その他の一般的試験項目」に従って試験項目を選択し、表 2 に記載の通り試験項目を設定した。

- ・ それぞれの項目についての試験内容・手法については、**表 2**に記載した 16 項目（性状試験、塩基配列、制限酵素地図試験、DNA 濃度、純度試験、吸光度比（A260/A280）、宿主 DNA、宿主 RNA、宿主たん白質試験、たん白質含量試験、不溶性微粒子試験、不溶性異物試験、pH 試験、浸透圧試験、無菌試験、エンドトキシン試験）とし、日本薬局方に記載のあるものはその手順に従って実施した。その他、プラスミド DNA の品質管理に特有の試験については、組み換えたん白質医薬等の情報を参考にして、適切と考えられる試験方法を選択した。

#### 5 ) DNA ワクチンの非臨床試験のデータパッケージ案の作成

- ・ 安全性試験の項目の選択については WHOの DNAワクチンの品質及び非

臨床評価のガイドライン [Annex 1 Guidelines assuring the quality and nonclinical safety evaluation of DNA vaccines (WHO Technical Report Series No 941, 2007)]及び WHO のワクチンの非臨床評価のガイドライン [Annex 1 WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines (Adopted by the 54th meeting of Expert Committee on Biological Standardization, 17-21 November 2003.)]を参考にして設定することとした。

- ・ また、開発する DNA ワクチンの成分であるプラスミド DNA は大腸菌により製造されるバイオテクノロジー応用医薬品であるため、ICHガイドラインの S6「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価について」（医薬審第 326号、平成 12年 2月 22日付）も参考とした。

- ・ 更にプラスミド DNA を成分とするワクチンについては、同様の範疇の製品が米国で臨床開発されていることから、FDAの感染症用プラスミド DNA ワクチンのガイダンス [Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, November 2007)]も一部参照にして設定を行った。

**表2. プラスミドDNAの暫定規格(案)について**

試験	項目	規格	試験法
性状	性状試験	無色透明の液体	目視
確認試験	塩基配列	参照配列と一致	2本鎖の配列解析
	制限酵素地図試験	理論サイズと一致	電気泳動法
定量試験	DNA濃度	規定から±10%以内	吸光度(A260)
純度試験	純度試験	既知異性体として含量を95%以上 OC+LN体を分解物とし、SC体の含量を90%以上	HPLC法
	吸光度比(A260/A280)	1.80-1.97	吸光度
	宿主DNA	適合	電気泳動法
	宿主RNA	適合	電気泳動法
	宿主たん白質試験	プラスミドDNAの重量あたり一定量以下	ELISA法
	たん白質含量試験	プラスミドDNAの重量あたり一定量以下	BCA法
不溶性微粒子	不溶性微粒子試験	適合	日局
不溶性異物	不溶性異物試験	適合	日局
pH	pH試験	規定から±10%以内	日局
浸透圧	浸透圧試験	規定から±20%以内	日局
無菌性	無菌試験	適合(菌の増殖なし)	日局
エンドトキシン	エンドトキシン試験	適合(50EU/mg未満)	日局

SC体:Supercoil体(スーパーコイル状のプラスミドDNA)、OC体:Open circular体(開環状のプラスミドDNA)、LN体:Linear体(直鎖状のプラスミドDNA)

6) PMDA薬事戦略相談

・プラスミドDNAをワクチン成分とする治療用DNAワクチンの国内開発は初めてのケースとなるため、規制当局である医薬品医療機器総合機構(PMDA)と事前に相談を行い、規制当局との合意を得た上で開発を進めることが重要である。そこで、PMDA薬事戦略相談・個別面談を平

25年5月31日に、事前面談を平25年6月20日にそれぞれ実施し、開発の方向性の妥当性について相談を行った。更に、アジュバント成分であるHVJ-Eについては、平成26年2月13日に対面助言を実施し、規格及び安全性の確保に関して相談を実施した。

- ・具体的にはアジュバント成分である HVJ-E のマスターセルバンクと治験薬の品質管理項目、工程管理項目案の設定を行い、PMDA との薬事戦略相談（事前面談）を実施し、ガイドライン策定に向けた準備を進めた。
- ・更に、治験薬の有効期間の設定に必要な長期安定性試験に関して試験計画書の策定を行い、長期安定性試験の開始準備を進めた。
- ・更に、非臨床試験（安全性試験、薬効薬理試験）についても、実施する試験項目、試験デザインの内容について、「「感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドライン」について」（平成 22 年 5 月 27 日付、薬食審査発 0527 第 1 号、以下「ワクチン GL」）、ICH のバイオ医薬に関するガイドラインである「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について（平成 24 年 3 月 23 日付、薬食審査発 0323 第 1 号、以下「ICH S6 GL」）、「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」（平成 7 年 11 月 15 日付、薬発第 1062 号薬務局長通知、平成 14 年 3 月 29 日付の医薬発第 0329004 号および平成 16 年 12 月 28 日付の薬食発第 1228004 号でそれぞれ一部改定、以下遺伝子治療指針）を参照して原案を策定し、PMDA との薬事戦略相談を実施したところ、WHO の DNA ワクチンのガイドラインも参考にして検討を進めるよう指摘を受けたため、それに従って変更案の策定を行った。
- ・治験薬 GMP 製造を実施するジェノメディア株式会社については、池田ラボラトリーの所在地である独立行政法人産業技術総合研究所の規定に従い、国で定められている、組換え DNA 実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会で実験許可を受けてから実験を行う。
- ・また、臨床治験のための治験薬 GMP 製造については、薬事法に基づいて製造を実施すると共に、規制当局である医薬品医療機器総合機構（PMDA）との薬事戦略相談（対面助言）を実施すると共に、治験届を提出して規格及び安全性について確認する。
- ・更に、所在地である産業技術総合研究所・関西センターの医工学応用実験倫理委員会、社外委員をメンバーとする社内倫理委員会へ報告する。

## C . 研究結果

- 1 ) 治験薬製造用バンクシステムの構築
  - ・治験薬 GMP 製造に使用する大腸菌については、起源・由来を明確にする必要があるため、大腸菌株 DH5 RDB108（コード番号：ME9088）を国立遺伝研究所から入手した。その大腸菌株（DH5 株）を生物由来成分を含まない LB 培地を用いて小スケールで培養し、形質転換用使用する種菌ストックを作成した。
  - ・形質転換用の種菌ストックを生物由来成分を含まない LB 培地で培養し、菌体を回収・洗浄し、生物由来成分を含まない形質転換用の培地に懸

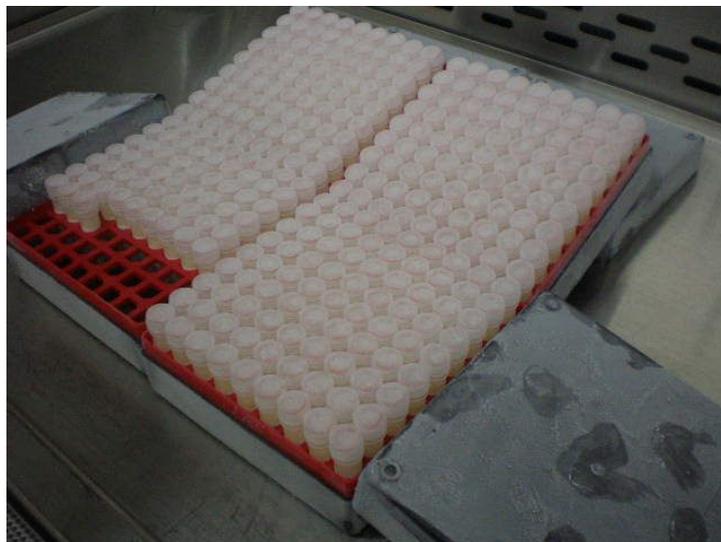
## （倫理面への配慮）

濁後にマイナス 80 度で凍結したストックを作成し、コンピテント細胞として使用した。

- ・コンピテントセル化した大腸菌株 DH5 RDB108 を、解凍して目的のプラスミド DNA ( pVAX1- IgHSP65-hIL12 ) を添加し、電気パルス法 ( エレクトロポレーション ) により導入を行った。プラスミド DNA を導入した後に、生物由来成分を含まない LB 培地で前培養を行ってから、生物由来成分を含まない LB 寒天培地 ( カナマイシン含有 ) に菌液を添加して一晩培養してからクローニングを行った。通常の形質転換では、化学物質によるプラスミド DNA 導入が実施されるが、治験薬 GMP 製造に使用することを考慮して物理的な導入方法である電気パルス法 ( エレクトロポレーション ) を選択した。
- ・その結果、プラスミド DNA の導入により、カナマイシン耐性となった大腸菌が認められたため、導入に成功したと判断し、単一のコロニーを採取して目的のプラスミド DNA が導入されているかを確認したところ、目的のプラスミド DNA ( pVAX1- IgHSP65-hIL12 ) と制限酵素地図が一致するプラスミド DNA の導入を認めた。そのため、採取した大腸菌のクローンを用いてマスターセルバンクの作成を行った。
- ・マスターセルバンクを作成するため、上記のようにして採取した大腸菌クローンに由来する大腸菌を、生物

由来原料を含まない植物由来成分を使用して LB 培地内で拡大培養を行った。

- ・目的の大腸菌が、適切な細胞濃度 ( 対数増殖期 ) に達するまで培養を継続した後に培養を停止し、グリセロールを最終濃度 15% になるよう添加し、バンク作成用チューブ 300 本に無菌的に分注し、マイナス 80 度で凍結してのマスターセルバンク ( pVAX1- IgHSP65-hIL12/DH5 ) の作成を完了した ( 図 1、図 2 )
  - ・マスターセルバンク ( pVAX1- IgHSP65-hIL12 / DH5 ) については、上記のようにして作成した調製記録を全て確認し、保管・管理することとした。また、セルバンクのチューブには、プラスミド DNA の名称と使用した大腸菌の菌株、及び調製日を識別できるようにする必要があるので、図 2 に示すように名称と調製日完了を記入して、GMP 製造施設内に設置されたマイナス 80 度の冷凍庫内で保管管理を行う事とした。
- 2 ) 構築したバンクシステムの特性確認
- ・上記のようにして治験薬 GMP 製造用に大腸菌のマスターセルバンクを作成した。実際に製造用に使用するには、ガイドラインに従ってセルバンクの特性及び品質を実証するための試験を実施し、製造用に適したレベルのバンクであることを確認した上で使用する必要がある。
  - ・医薬品製造用に使用するセルバンクについては、ICH のガイドラインで

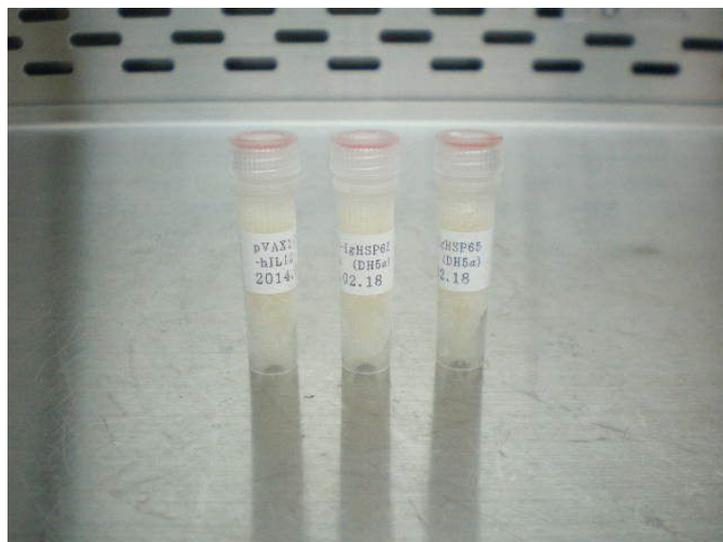


**図1. 作成したマスターセルバンク**

**治験薬 GMP 製造に必要なバンクシステムを構築するため、治験薬 GMP 製造用大腸菌について計 300 本で構成されるマスターセルバンクシステムを作成した。**

ある Q5D「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品 / 生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析について」（医薬審第 873号、平成 12年 7月 14日付）に記載された内容に従って試験データを取得する必要があるため、先ず試験項目の選定を行った。

- ・ガイドラインには、培養細胞株を使用した場合と、細菌株を使用した場合の両者について記載があり、それぞれに適した試験を実施することとされている。本研究において、プラスミド DNAを治験薬 GMPレベルで製造するために作成したマスターセルバンクは、大腸菌のセルバン



**図2 マスターセルバンクの外観とラベル**

マスターセルバンクの各チューブに上記ようにラベルを貼付した。

クであるため、ICHのQ5Dガイドラインに記載された微生物細胞のバンクのための試験項目を設定し、特性及び品質に関する検査を実施した(表1)。

- ・そこで、関連するガイドラインに記載された内容に従って、宿主である大腸菌を同定するための試験、他の

微生物の混入を否定する試験、導入したプラスミドDNAを確認する試験、大腸菌の生存率(生菌数)を測定する試験を、それぞれ実施することとした(表1)。

- ・先ず、薬剤感受性試験を実施し、アンピシリン感受性、カナマイシン耐性であることを確認した。大腸菌を

使用した組換え実験などでは通常アンピシリン耐性遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を使用することが多いが、臨床用に使用するにはアレルギー反応のリスクがあるためアンピシリンの使用は望ましくないとされている。そのため、本研究で使用するプラスミド DNA は、アンピシリン耐性遺伝子の代わりにカナマイシン耐性遺伝子を組み込んでいる。従って、試験の結果得られた薬剤耐性プロファイルは、目的の表現型を示しているものと判断された。

- ・次に、栄養要求性試験、グラム染色試験、コロニー形態試験を実施し、使用した大腸菌株である DH5 のみが認められ、他の微生物の混入は認められない事を確認した。その結果、予測された栄養要求性、グラム染色パターン（グラム染色陰性）元の DH5 と同じ形態のコロニーのみが認められることが明らかとなり、使用した大腸菌株である DH5 以外の細菌の混入は否定された。
- ・更にプレート法によりファージ否定試験を実施したところ、ファージの混入を示すプラーク形成が認められなかったことからファージの混入についても否定できると判断された。
- ・続いて作成したセルバンクの大腸菌の懸濁液から直接プラスミド DNA を抽出し、制限酵素地図試験を実施したところ、目的とするプラスミド DNA と同一の制限酵素切断パターン

ンが確認されたことから、セルバンクの大腸菌は目的とするプラスミド DNA を保持していることが確認された。

- ・最後に、治験薬 GMP 製造を実施するのに十分な大腸菌数を含むかを確認するため生菌数試験を実施した。その結果、作成したセルバンクシステムは 1mLあたり 1000万個以上の大腸菌を含むことが明らかとなり、治験薬製造には十分な菌数を含むものと判断された。
- ・以上のようにして、作成した大腸菌のセルバンクに関して特性解析及び品質評価を行った結果、全ての試験で適合する結果を得ることが出来たため、作成したセルバンクは治験薬 GMP 製造に適したバンクである事が実証された。

### 3) 構築したバンクシステムによるプラスミド DNA の製造

- ・上記のように作成したマスターセルバンク (MCB) の特性及び品質の解析を完了したため、実際に作成したセルバンクを用いて目的のプラスミド DNA の GMP 製造を実施した。本研究で治療用ワクチンの成分となるプラスミド DNA (pVAX1-IgHSP65-hIL12) を GMPパイロットプラント内で製造を実施した。治験薬 GMP 製造を想定した製造であるため、生物由来原料を含まない原材料を使用して培養、菌体回収、菌体破碎、粗精製液調製、カラムクロマトグラフィーによる精製、バッファ置換、無菌ろ過、濃度調整の各工程を経て、最終的に遮光バイアル

へ充填し、シリコンコートしたゴム栓を打栓した。

- ・最終的には、冷蔵でも保存安定性が高い凍結乾燥製剤を検討する予定であるが、現時点では液剤での凍結保存とした。

- ・GMP 製造を実施した結果、大腸菌の培養条件や精製条件の最適化することで更に収量を向上できることが示唆されたため、更に GMP 製造を行って、非臨床試験、安定性試験のための製剤製造を実施して最適化を進め、臨床試験用の治験薬を製造する予定である。

#### 4) 製造したプラスミド DNA の品質確認試験

- ・上記のようにして製造したプラスミド DNA の品質を確認し、暫定規格設定の根拠となるデータを取得するための品質確認試験を実施した。
- ・プラスミド DNA は大腸菌で製造されるバイオテクノロジー応用医薬であると考えられたため、適用となるガイドラインとして ICH のガイドライン Q6B「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起由来医薬品)の規格及び試験方法の設定について」(医薬審発第 571号、平成 13年 5月 1日付)を選択して、試験項目の設定を行った。
- ・ガイドラインの「4. 規格及び試験方法」内容に従って試験項目の設定を進めることとした。製剤の暫定規格としては、ガイドラインの「4.2.1 外観・性状」、「4.2.2 確認試験」、

「4.2.3 純度と不純物」、「4.2.4 力価」、「4.2.5 物質質量」、「4.2.6 その他の一般的試験項目」の各項目の内容に準拠して設定することが妥当であると考え、**表 2**に記載の通り試験項目、試験方法で暫定規格を設定する方向性で進める事とした。

- ・**表 2**に記載した試験のうち、不溶性微粒子試験、不溶性異物試験、pH 試験、浸透圧試験、無菌試験、エンドトキシン試験については、それぞれ日本薬局方の記載に従って手順書を作成し手試験を実施した。

- ・一方、性状試験、塩基配列、制限酵素地図試験、DNA 濃度、純度試験、吸光度比( A260/A280)、宿主 DNA、宿主 RNA、宿主たん白質試験、たん白質含量試験、の各試験については、科学的根拠に基づいて社内で試験手順書の策定を行い、試験データの取得を行った。

- ・これらの試験データと、ガイドラインなどの記載内容に基づいて純国産の治験薬として製造するプラスミド DNA の暫定基準を設定し、治験薬の製造と品質管理試験を実施する。

#### 5) DNA ワクチンの非臨床試験のデータパッケージ案の作成

- ・プラスミド DNA を成分とする治療用ワクチンについては、国内で初めての治験実施となるため、国内のガイドライン策定に貢献することも考慮して開発を進める必要がある。そのため、平成 25年度は、治験届けまでに必要となる非臨床試験の

- データパッケージ案の策定を進める事とした。
- ・ プラスミド DNA を用いた医薬品の開発は遺伝子治療の範疇になることが想定されたため、国内外のガイドラインについて調査を行った結果、WHOの DNA ワクチンの品質及び非臨床評価のガイドライン [Annex 1 Guidelines assuring the quality and nonclinical safety evaluation of DNA vaccines (WHO Technical Report Series No 941, 2007)]と FDA の感染症用プラスミド DNA ワクチンのガイダンス [Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, November 2007)]の、2種類のガイドラインを参考とすることが、最も適切であると考えられた。
  - ・ また、ワクチン開発におけるガイドラインについても参考にする必要があると考えられたため、ワクチンに関するガイドラインについて調査を行った結果、WHO のワクチンの非臨床評価のガイドライン [Annex 1 WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines (Adopted by the 54th meeting of Expert Committee on Biological Standardization, 17-21 November 2003.)]を参考にする事が適切であると考えられた。
  - ・ 更に、プラスミド DNA の製造については、上記のように大腸菌で作成したマスターセルバンクを使用することから、組み換えたん白質など大腸菌により製造されるバイオテクノロジー応用医薬品を対象としたガイドラインである、ICH ガイドラインの S6「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価について」(医薬審第 326号、平成 12年 2月 22日付)についても、適宜参考にして非臨床試験の内容を検討する事とした。
  - ・ これらのガイドラインを参考にして、治験届までに必要な安全性試験について、必要な試験項目と試験内容を検討した。その結果、一般毒性試験である反復投与毒性試験に、安全性薬理試験(中枢神経系)、免疫毒性(抗体産生)などを組み込んだ試験と、単回投与で実施する安全性薬理試験(循環器系、呼吸器系)の、2つの試験を実施することが最低限必要であると考えられた。その概要を表 3 と表 4 に示す。今後策定したデザイン案の妥当性について、規制当局である PMDA の薬事戦略相談で相談を行って、最終的に実施する非臨床試験の内容を最終化する予定である。
- 6) PMDA 薬事戦略相談
- ・ プラスミド DNA をワクチン成分とする治療用 DNA ワクチンの国内開発は初めてのケースとなる。また、アジュバントとして使用する HVJ-E についても、アジュバントとしての臨床応用は国内で初めてとなるため、適切に医師主導治験を

**表3. カニクイザルを用いた毒性試験1(案)について: 一般毒性 + 安全性薬理**

試験動物	カニクイザル
被験物質	pVAX1 - IgHSP65 - hIL12+ HVJ-E
投与方法 投与期間 観察期間	投与経路: 皮内投与 投与期間: 2週間 観察期間: 投与期間 2週間 + 回復期間 2週間
群構成	投与群:       で 4群 (対照群 + 3用量) 回復群:       で 2群 (対照群 + 1用量)
評価項目	一般状態観察 摂餌量測定 体重測定 血液学的検査 血液生化学的検査 眼検査 尿検査 剖検 器官重量測定 病理組織標本作製及び検査
安全性薬理 (中枢神経系)	FOB: 投与前後で実施
抗体価測定	採血を行って抗体価を ELISA で測定
備考	投与液の濃度分析及び安定性分析を実施

実施するには規制当局である PMDA と、治験開始前に密接に相談を行い、開発内容や方向性について合意形成を進める必要がある。

- ・ PMDA では薬事戦略相談の制度があり、医師主導治験の実施内容や、新規医薬品開発に関する個別面談、事前相談、対面助言を実施している。本研究で開発するプラスミド DNA をワクチン成分とする治療用 DNA ワクチンについては、新規性が高いため、薬事戦略相談の制度を利用し、規制当局と開発内容に関して密接に事前相談しながら医師主導治験の準備を進めることが重要である

と考えられた。

- ・ そこで、プラスミド DNA の規格及び安全性と、治験デザインの骨子、非臨床試験のデータパッケージ案について、PMDA の薬事戦略相談・個別面談を平成 25 年 5 月 31 日に、事前面談を平成 25 年 6 月 20 日にそれぞれ実施し、開発の方向性の妥当性について相談を行った。当初は、「感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドライン」について (薬食審査発 0527 第 1 号、平成 22 年 5 月 27 日付)、ICH のバイオ医薬に関するガイドラインである「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床に

**表4. カニクイザルを用いた毒性試験2(案)について:安全性薬理試験**

試験動物	カニクイザル
被験物質	pVAX1-IgHSP65-hIL12+ HVJ-E
投与方法	投与経路：皮内 投与回数：単回
評価	評価時点：投与前と投与後の適切なタイムポイントで評価を実施
群構成	3群（対照群 + 2用量）
評価項目 （呼吸器系、 循環器系）	血圧（収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧） 心拍数 心電図（PR間隔、QRS時間、QT間隔、QTc間隔） 呼吸機能（呼吸数、1回換気量、分時換気量） 体温
一般状態	ビデオ撮影により投与前から投与後に、動物の状態を観察し、各評価時点の動物の状態を観察する。
血圧	予めテレメトリー送信機留置手術を行い、術後2週間以上経過後、安定した循環パラメータが得られる個体を選抜する。

おける安全性評価」について（薬食審査発 0323 第 1号、平成 24年 3月 23日付）「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」（薬発第 1062号薬務局長通知、平成 7年 11月 15日付、平成 14年 3月 29日付の医薬発第 0329004号および平成 16年 12月 28日付の薬食発第 1228004号でそれぞれ一部改定、以下遺伝子治療指針）を参考にして試験デザイン案を策定していたが、薬事戦略相談の結果、参考となるガイドラインの選定（WHO のガイドラインなども参考にすること）、治験前に実施が必要な動物試験のレベル（GLP、信頼性基準適合）、プラスミド DNA の規格及び安全性と製造レベル（GMP）などについて、適切なコメントを得ることが出来た。そのため、

実施した事前面談でのコメントに従って、非臨床試験デザイン案の改定を行い、より適切な非臨床試験のデータパッケージ案の策定を完了した（表3、表4）。改定した内容については、再度 PMDA 相談を実施して最終化した上、試験を実施する予定である。

- ・ 更に、アジュバント成分である HVJ-E については、平 26年 2月 13日に対面助言を実施し、規格及び安全性の確保に関して相談を実施した。具体的にはアジュバント成分である HVJ-E について治験薬 GMP 製造を行う際に必要な、品質管理項目、工程管理項目の設定に関して、一部追加データの取得を進めることで合意した。これにより、治験届けまでに必要なデータがより

明確になったため、現在追加データの取得を進めている状況である。

- ・ 以上のようにして PMDA の薬事戦略相談を活用し、国内で初めてとなる治験の実施に必要な項目に関して相談を行い、規制当局との合意形成を進めた。これらの成果を活用し、実際に治験を実施することで、引き続き国内のガイドライン策定に向けた準備を進める事とした。

#### D . 考察

- ・ 本研究では、DNA ワクチンのワクチン成分としてプラスミド DNA を使用する。そのため、治験薬 GMP 製造に必要な大腸菌のマスターセルバンク ( MCB ) を作成し、特性及び品質試験を実施した結果、治験薬 GMP 製造用に適合することを示すデータを取得した。今後規制当局である PMDA の薬事戦略相談において、その妥当性について確認を行う予定である。
- ・ 作成した MCB を用いてプラスミド DNA の GMP 製造を実施した。培養液あたりの収量については、今後最適化を行う事で増加できることを示唆するデータを得ており、製造工程の改善により収量を増加できる可能性があると考えられた。
- ・ GMP 製造を実施したプラスミド DNA の品質確認データの取得を行った。規格設定項目、暫定規格値の設定については、複数バッチの品質確認データを根拠として進める予定である。今後数バッチから 10バッチ程度のデータの取得を進め、結果を取

り纏めた後に暫定規格値を PMDA と相談しながら設定していく必要があると考えられた。

- ・ 非臨床試験のデータパッケージについては、複数のガイドラインを参考に改定案の策定を完了した。その妥当性については、PMDA の薬事戦略相談を利用して確認を進めることが適切であると考えられた。

#### E . 結論

- ・ 開発に関する概要については **図 3** に示すとおりである。治療用の DNA ワクチンの開発は国内で初めてとなるため、規制当局である PMDA の薬事戦略相談を活用して着実に進める計画である。
- ・ また、ICH、米国、WHO のガイドラインを参考に開発を進めることで、国内の実態に適したガイドラインの策定に繋がりたいと考えている。
- ・ 平成 25 年度の研究結果のまとめと結論は以下の通りである。
  - 1 ) ICH のガイドライン Q5D に従って GMP レベルで治験薬製造用の大腸菌マスターセルバンク ( MCB、pVAX-IgHSP65-hIL12 (DH5 ) ) システムを構築した。
  - 2 ) 構築したマスターセルバンク ( MCB ) については ICH のガイドライン Q5B と Q5D に従って特性解析を実施し、適格性を実証した。
  - 3 ) MCB を使用してプラスミド DNA ( pVAX-IgHSP65-hIL12 ) の GMP



**表5. 登録済み特許の一覧(国内特許)**

番号	種類	名称	特許番号	状況
1	基本特許	遺伝子導入のためのウイルスエンベロープベクター	特許 3942362 特許 4219957	登録 登録
2	用途特許	抗腫瘍作用を有する組成物	特許 4855250	登録
3		化学療法剤を封入した医薬製剤	特許 4746877	登録
4	製造特許	単離されたヒト細胞、その取得方法及び用途	特許 5134964	登録
5		改変パラミクソウイルスおよびその作製方法	特許 5102630	登録

製造を実施し、暫定規格の設定に必要な品質確認データを取得した。

- 4) ICHのバイオ医薬のガイドラインや、WHOのDNAワクチンに関するガイドライン等を参考にして、カニクイザルを用いた毒性試験のデザイン案を策定し、試験項目、試験デザイン等、試験骨子を設定した。
- 5) 治験薬の規格及び安全性、長期安定性試験、毒性・薬効薬理試験に関して PMDAの薬事戦略相談(個別相談、事前面談、対面助言)での相談結果に基づいて、必要な変更を行い、次回相談用の書類作成を実施した。
- 6) 医薬品製造企業との提携相談実施中

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

**1. 論文発表**

特になし

**2. 学会発表**

特になし

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

(予定を含む。)

1) 登録特許

本研究で開発する DNA ワクチンのアジュバント成分である HVJ-E に関する国内特許については、基本特許、用途特許、製造特許を国内および海外で登録している(表5、表6)。

現在までに、国内特許については、基本特許、用途特許、製造特許について計5件を成立させ、それぞれ登録と維持管理を行っている(表5)。

一方、国際特許については、欧米を中心に基本特許、用途特許、製造特許について計4件を海外で登録している(表6)。

欧州での製造特許については、欧州特許庁へ適切な対応を進めた結果、本年度成立(特許番号: EP1950285)したため、英国、ドイツ、フランス、イタリア、スペイン・スイスの計6カ国に移行手続きを行い、移行した各国におけ

**表6. 登録済み特許の一覧(国際特許)**

番号	種類	名称	特許番号	状況
1	基本特許	遺伝子導入のための ウイルスエンベロー プベクター	EP1170363 DE60131498 US 6913923 US 7279333 US 7803621 CN01800567.5 CN200410100219.5 CA2369491 AU769385 I303663 KR 10-0776475 KR 10-0847385	登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録
2	用途特許	抗腫瘍作用を有する 組成物	US7871765	登録
3	用途特許	化学療法剤を封入 した医薬製剤	US7427395	登録
4	製造特許	ヒト細胞、その取得 方法及び用途	US8012749 EP1950285	登録(米) 登録(英国、ド イツ、フランス、 イタリア、スペ イン・スイス の6カ国に移行)

**本年度は欧州において製造特許(特許4、特許番号:EP1950285)が成立した。**

**表7. 出願中特許の一覧(国内特許)**

番号	種類	名称	特許番号	状況
1	高機能化 + 薬効向上	高機能化 HVJ-E	特願 2009-201114	出願中
2		IL-2含有HVJ-Eベクター及び それを含む脳腫瘍治療剤	特願 2010-024286	審査請求

る登録を全て完了した(表6)。

2) 出願中の特許

現在出願中の国内特許は、全身投与のための高機能化、薬効向上のための修飾などの特許など計2件であり、それぞれ出願中、ま

たは審査中の状況である(表7)。これらの特許を成立させ、医薬品として実用化した後の特許の有効期間を最長にするための対策を進める必要がある。未成立の特許のうち、用途特許(特願 2010-529778)については、審査請求

を実施し、請求項の修正など、登録に向けて国内の特許庁への対応を進めている（表7）。

出願中の特許については、順次成立に向けた特許庁への対応（意見書の作成・提出、請求項の修正など）を進めており、医薬品として実用化した際に必要な知的財産の権利確保を進めている状況である。