# 染色体非組み込み型ウイルスベクター (アデノウイルス・AAV)

# 岡田 尚巳 東京大学 医科学研究所



### 遺伝子治療と再生医療の融合



#### 遺伝子治療用製品の創薬ストラテジー



### 遺伝子治療に用いられる主なベクターの特徴

	ベクター	長所	短所	対象(標的)
	レトロウイルス (RV)	染色体に組み込まれる →長期発現が可能	発癌性 非分裂細胞に導入不可	造血幹細胞
	レンチウイルス (LV)	染色体に組み込まれる 非分裂細胞にも導入	発癌性 大量生産が困難	造血幹細胞 脳
	アデノウイルス	高発現 非分裂細胞に導入	短期発現 免疫原性 細胞傷害性	がん 分子スイッチ
A.	ヘルペスウイルス (HSV-1)	大きな遺伝子を搭載可能 非分裂細胞に導入	大量生産が困難 免疫原性	疼痛、がん
Ø	アデノ随伴 ウイルス(AAV)	病原性・細胞傷害性なし 非分裂細胞に導入	免疫原性 大量生産が困難 挿入遺伝子サイズの制限	<mark>神経筋疾患</mark> 網膜疾患
	DNA/mRNA	非ウイルス性	DDSが必要	慢性動脈閉塞症 ワクチン



Figure 1.12b Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

## カルタヘナ法と拡散防止措置

1992年 生物多様性条約(LMO:Living Modified Organisms使用の国際的規制) 2000年 カルタヘナ議定書採択(コロンビアで交渉会議、米国は不参加) 2003年 カルタヘナ法成立(日本での対応、国際的に協力) 「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」

・第一種使用等→環境中での使用・環境影響評価、大臣承認
 (例:遺伝子組換え植物の栽培、遺伝子治療の臨床試験)

・第二種使用等→拡散防止措置、機関/大臣確認実験
 (例:実験室での遺伝子組換え操作、遺伝子組換え動物の飼育)





アデノウイルスベクター

- 特徴
- ・ ベクター作製
- ・ 腫瘍溶解性ウイルス
- ・ ワクチン
- ➢ AAVベクター
- 特徴
- ベクター作製
- ・ カプシド改変
- 医療応用と全身大量投与による副作用
- ・ 製造プロセスの開発動向
- 今後期待される技術

# **Adenovirus Vector**



- Replication deficient
- 8 kb foreign DNA
- High titer production
- Infect variety of tissues
- High expression in non-replicating tissues





# Adeno-associated virus (AAV)



Figure 21.10 Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)



アデノウイルスベクターの特徴と改良

Replication deficient dsDNA, 8-30kb foreign DNA High titer production Infect variety of tissues High expression in non-replicating tissues







#### AdEasy<sup>™</sup> XL







# Efficient directional cloning of recombinant adenovirus vectors using DNA-protein complex



Okada *et al.*, Nucleic Acids Res., 1947-1950, 1998

### Large-scale Production of the Recombinant Ad



Okada T. *et al*., Hum. Gene Ther., 1212–1218, 2005

# アデノウイルスベクターの力価測定(物理,生物学的)

Physical determination Genome copy (qPCR) 1 OD<sub>260</sub>= 1.1 x 10<sup>12</sup> vp



Biological determination Physical characteristics likelihood of vector and cell meeting "pfu"= plaque forming unit "MOI"= multiplicity of infection (pfu/cell) g.c./pfu = quality index (小さい方が高活性)

Functional characteristics gene expression (marker gene) gene function





### アデノウイルスベクターの力価測定(プラーク形成能の定量化、TCID<sub>50</sub>)

tissue culture infectious dose



ウイルスによる細胞変性 50%以上

🛆 希釈列上でジャンプして現れた変性 50%以上は有効とカウントしない

Kärber の式から、TCID<sub>50</sub> =(1 列目の希釈倍率)×(希釈倍率)<sup>2-0.5</sup> ただし、Σ=各希釈段階における(変性50%以上のウェルの数)/(検体数)の総和 上記の例では、Σ= 8/8+8/8+8/8+8/8+8/8+7/8+3/8+2/8 = 6.5 従って、TCID<sub>50</sub> = 3×10<sup>4</sup>×3<sup>6.5-0.5</sup> = 2.2×10<sup>7</sup> 使用したウイルス液は 50µl なので、TCID<sub>50</sub> = PFU とすると、 ウイルス原液の力値は 2.2 × 10<sup>7</sup> × 1ml÷0.05ml = 4.4 × 10<sup>8</sup> (PFU/ml)



Adenoviruses enter human cells by recognizing two receptors, CAR and integrin. The virus is taken into the cell attached to the receptors and surrounded by a membrane vesicle that dissociates in the cytoplasm. The adenovirus injects its DNA into the nucleus through a nuclear pore.

#### Ad5-mediated Gene Transfer with CAR-SCF fusion protein



J. Gene Med., 929-940, 2003

### 非増殖型アデノウイルスによる癌抑制遺伝子の強制発現



遺伝子非導入細胞には効果がなく、再発のリスクが高い

# 薬剤感受性遺伝子による殺細胞効果

単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子 + GCV



腫瘍溶解性(制限増殖型)ウイルス



https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.707290/full

腫瘍溶解性(制限増殖型)ウイルス



Adenovirus	Other treatments	Route of administration	Phase	Dosage (viral particles)	Maximum tolerated dose (viral particles)
Safety and feasibility of injection with an E1B- 55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX- 015) into primary carcinomas of the pan- creas: a phase I trialONYX-015—adenovirus N/A with a 55 kDa deletion in the E1B regionIntratu guid		Intratumoural (CT- guided + intraoperative)	Ι	6 doses ranging from $2 \times 10^9$ to $2 \times 10^{12}$	Not reached
<b>ONYX-015</b> —adenovirus with a 55 kDa deletion in the E1B region	Gemcitabine	Intratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transduodenal and transgastric)	I–II	2 doses: $2 \times 10^{10}$ and $2 \times 10^{11}$	Not reached
Ad5-yCD/mutTKsr- 39rep-ADP	Gemcitabine, 5-FC, val- ganciclovir, radiation	Intratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)	Ι	3 doses ranging from 10 <sup>11</sup> to 10 <sup>12</sup>	Not reached
Ad5-yCD/mutTKsr- 39rep-hIL-12	5-FC, FOLFIRINOX or gemcitabine and albumin-bound pacli- taxel	Intratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)	Ι	3 doses ranging from 10 <sup>11</sup> to 10 <sup>12</sup>	Not reached
VCN-01	Gemcitabine or nab- paclitaxel with gem- citabine	Intratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)	Ι	2 doses: 10 <sup>10</sup> and 10 <sup>11</sup>	10 <sup>11</sup>
VCN-01	Nab-paclitaxel and gem- citabine	Intravenous	I ancer Re	2 doses: $3.3 \times 10^{12}$ and $10^{13}$	10 <sup>13</sup>
	Adenovirus ONYX-015—adenovirus with a 55 kDa deletion in the E1B region ONYX-015—adenovirus with a 55 kDa deletion in the E1B region Ad5-yCD/mutTKsr- 39rep-ADP Ad5-yCD/mutTKsr- 39rep-hIL-12 VCN-01 VCN-01	AdenovirusOther treatmentsONYX-015—adenovirus with a 55 kDa deletion in the E1B regionN/AONYX-015—adenovirus with a 55 kDa deletion in the E1B regionGemcitabineAd5-yCD/mutTKsr- 39rep-ADPGemcitabine, 5-FC, val- ganciclovir, radiationAd5-yCD/mutTKsr- 39rep-hIL-125-FC, FOLFIRINOX or gemcitabine and albumin-bound pacli- taxelVCN-01Gemcitabine or nab- paclitaxel with gem- citabineVCN-01Nab-paclitaxel and gem- citabine	AdenovirusOther treatmentsRoute of administrationONYX-015—adenovirus with a 55 kDa deletion in the E1B regionN/AIntratumoural (CT- guided + intraoperative)ONYX-015—adenovirus with a 55 kDa deletion in the E1B regionGemcitabineIntratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transducdenal and transgastric)Ad5-yCD/mutTKsr- 39rep-ADPGemcitabine, 5-FC, val- ganciclovir, radiationIntratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)Ad5-yCD/mutTKsr- 39rep-hIL-125-FC, FOLFIRINOX or gemcitabine and albumin-bound pacli- taxelIntratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)VCN-01Gemcitabine or nab- paclitaxel with gem- citabineIntratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)VCN-01Nab-paclitaxel and gem- citabineIntratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)VCN-01Nab-paclitaxel and gem- citabineIntratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)VCN-01Nab-paclitaxel and gem- citabineIntratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)	AdenovirusOther treatmentsRoute of administrationPhaseONYX-015—adenovirus with a 55 kDa deletion in the E1B regionN/AIntratumoural (CT- guided + intraoperative)IONYX-015—adenovirus with a 55 kDa deletion in the E1B regionGemcitabineIntratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transduodenal and transgastric)I-IIAd5-yCD/mutTKsr- 39rep-ADPGemcitabine, 5-FC, val- ganciclovir, radiationIntratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)IAd5-yCD/mutTKsr- 39rep-hIL-12Gemcitabine, 5-FC, val- ganciclovir, radiationIntratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)IVCN-01Gemcitabine or nab- paclitaxel with gem- citabineIntratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)IVCN-01Nab-paclitaxel with gem- citabineIntratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)IVCN-01Nab-paclitaxel and gem- citabineIntratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)IJournal of Cancer ReI	Adenovirus       Other treatments       Route of administration       Phase       Dosage (viral particles)         ONYX-015—adenovirus with a 55 kDa deletion in the E1B region       N/A       Intratumoural (CT- guided + intraoperative)       I       6 doses ranging from 2×10 <sup>9</sup> to 2×10 <sup>12</sup> ONYX-015—adenovirus with a 55 kDa deletion in the E1B region       Gemcitabine       Intratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transduodenal and transgastric)       I–II       2 doses: 2×10 <sup>10</sup> and 2×10 <sup>11</sup> Ad5-yCD/mutTKsr- 39rep-ADP       Gemcitabine, 5-FC, val- ganciclovir, radiation       Intratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)       I       3 doses ranging from 10 <sup>11</sup> to 10 <sup>12</sup> Ad5-yCD/mutTKsr- 39rep-ADP       5-FC, FOL-FIRINOX or genetitabine and albumin-bound pacli- taxel       Intratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)       I       3 doses ranging from 10 <sup>11</sup> to 10 <sup>12</sup> VCN-01       Gemcitabine or nab- paclitaxel with gem- citabine       Intratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)       I       2 doses: 10 <sup>10</sup> and 10 <sup>11</sup> VCN-01       Nab-paclitaxel and gem- citabine       Intratumoural (endo- scopic ultrasound- guided transgastric)       I       2 doses: 3.3×10 <sup>12</sup> and 10 <sup>13</sup>

#### Clinical trials exploring the use of oncolytic adenoviruses in PDAC

### ワクチンの種類

全病原体ワクチン <sup>(Whole-Pathogen Vaccines)</sup> 病原体すべてを用いる			成分ワクチン (Subunit Vaccines) ≒ 組換えタンパクワクチン			核酸ワクチン <sup>(Nucleic Acid Vaccines)</sup> 設計図を用		ベクターワクチン (Vector vaccine)	樹状細胞ワ クチンなど その他のワク チン	
			病原体の一部を用いる					いる		
生ワクチン live- attenuate d vaccines,	不活化ワクチン inactivated vaccines,	キメラワクチン chimeric vaccine	組換えタンパク ワクチン一般 recombinant protein vaccine,	VLP7775 virus-like particles (VLPs)	ナノパーティクル ワクチン nanoparticles	トキソイド ワクチン toxoid vaccine s	mRNAワクチン レプリコンワクチン	DNAワクチン		
弱毒化したウ イルスを「生 きたまま」用 いる	ウイルスを「殺し て」(不活化)用 いる	別のウイルス の表面に抗原 を呈示させる	ウイルスの一部 の成分のタンパ ク質を用いる	タンパク質成 分が VLP と なる	タンパク質成分が ナノパーティクル となる	細菌の外 毒素タン パク質を 成分とす る	病原体成分の設 計図をRNAとして 投与する	病原体成分 の設計図を DNAとして投 与する	病原体成分の設計図を ベクターウイルスにのせ て投与する	その他
<b>W</b>	Щ.		<b>\</b>	Ö	×		ىسىسىنىتىنىتىنى قاغانىن بايەللىنىلىنىلىنى	of accente	X	
麻疹、風疹、 ロタ、BCG	インフルエンザ ポリオ 肺炎球菌 (プレ ベナー)		нви	HPV、帯状 疱疹	新型コロナ (Novavax)	百日咳 ワクチン ヒブワク チン	新型コロナウイ ルス (ファイ ザー・ビオンテッ ク、モデルナ、第 一三共)		新型コロナウイルス (アストラゼネカ、 ジョンソン・エンド・ ジョンソン、Sputnik V) エボラウイルス	

参考 CDC https://www.niaid.nih.gov/research/vaccine-types



遺伝子組換えワクチンは、予防を目的とするものであるため、 再生医療等製品(遺伝子治療用製品)には該当せず、薬機法上は医薬品に該当

### Intracellular and membrane bound sensors of Adenovirus





#### mRNA and adenovirus vector vaccines elicit immunity to SARS-CoV-2

John R. et al., Nature Reviews Immunology volume 21, pages 195–197 (2021)

#### In Deltoid Muscle



#### In Deltoid Muscle and Lymph Nodes



https://www.ebsco.com/blogs/health-notes/adenovirus-vectored-vaccines-covid-19-how-do-they-work

Innovator	Vaccine	Vector Type	Phase	Formulation
AstraZeneca/ University of Oxford	AZD1222 (Covishield and Vaxzevria)	ChAdOx1	III NCT05293665 NCT04973449 NCT05236491 and 14 more trials are ongoing.	<ul> <li>Active Component:</li> <li>Replication-deficient chimpanzee Adenovirus vector containing S protein gene of coronavirus.</li> <li>Excipients:</li> <li>L-Histidine, L-Histidine hydrochloride monohydrate, magnesium chloride hexahydrate, polysorbate 80, ethanol, sucrose, sodium chloride, disodium edetate dihydrate, water for injections</li> </ul>
Gamaleya Research Institute/Acellena Contract Drug Research And Development	GamCOVID-Vac (frozen) and GamCOVID-Vac Lyo (lyophilized) (Sputnik V)	rAd26 and rAd5	III NCT04640233 NCT04564716 NCT04530396 NCT04642339 NCT04656613 NCT04954092	<ul> <li>Active Component:</li> <li>Replication-deficient rAd26 and rAd5 vector with S protein gene of coronavirus.</li> <li>Excipients:</li> <li>Tris(hydroxymethyl)aminomethane, sodium chloride, sucrose, magnesium chloride hexahydrate, disodium EDTA dihydrate (buffer), polysorbate 80, ethanol 95%, water</li> </ul>
Janssen Pharmaceutical	Ad26Cov2-S (JNJ-78436735)	rAd26	III NCT05047640 NCT04505722 NCT04614948 NCT04838795 NCT05220397 and 3 more trials are ongoing.	<ul> <li>Active Component:</li> <li>Replication deficient rAd26 vector, encoding a stabilized variant of the SARS-CoV-2 Spike (S) protein</li> <li>Excipients:</li> <li>Ethanol, polysorbate-80, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, citric acid monohydrate, trisodium citrate dehydrate, sodium chloride</li> </ul>
CanSino Biologics/Beijing Institute of Biotechnology	Ad5-nCoV (Convidecia)	rAd5	III NCT05169008 NCT04540419 NCT04526990	<ul> <li>Active Component:</li> <li>Replication deficient rAd5 vector with S protein gene of coronavirus.</li> </ul>
Gamaleya Research Institute/Acellena Contract Drug Research And Development	Gam-COVID-Vac	rAd5	II NCT05248373; Phase III is ongoing	<ul> <li>Active Component:</li> <li>Replication deficient rAd5 vector with S protein gene of coronavirus.</li> <li>Excipients:</li> <li>Tris(hydroxymethyl)aminomethane, sodium chloride, sucrose, magnesium chloride hexahydrate, disodium EDTA dihydrate (buffer), polysorbate 80, ethanol 95%, water</li> </ul>
Gamaleya Research Institute/ Acellena Contract Drug Research And Development Chavda <i>et al.</i> , Vaccines 20	Sputnik Light 23, 11, 432	rAd26	III NCT04741061 and 5 more trials are ongoing.	<ul> <li>Active ingredients:</li> <li>Replication deficient rAd26 containing the SARS-CoV-2 protein S gene</li> <li>Excipients:</li> <li>Tris (Hydroxymethyl) amino methane, sodium chloride, sucrose, magnesium chloride hexahydrate, EDTA disodium salt dehydrate, polysorbate, ethanol, water for injection</li> </ul>

#### Licensed adenoviral vector-based vaccines for COVID-19 via intramuscular route

#### Safety Concerns of Intramuscular vaccines and Intranasal vaccines

Adverse Event	Vaccine Reported	Explanation		
Guillain-Barré syndrome (GBS) J&J/Janssen		In the uncommon illness known as GBS, the immune system of the body damages nerve cells, leading to muscular weakness and occasionally paralysis. Men 50 years of age and older make up the majority of GBS cases reported.		
Capillary leak syndrome (CLS) mRNA COVID-19 Vaccines		The COVID-19 vaccination-related adverse event after immunization (AEFI) known as capillary leak syndrome (CLS) has recently appeared. Increased capillary permeability in CLS, a rare disorder that mostly affects the upper and lower limbs, causes hypoalbuminemia, hypotension, and edema.		
Anaphylaxis	Pfizer-BioNTech or Moderna (mRNA COVID-19 vaccines), A tetravalent cold-adapted live-attenuated influenza vaccine (LAIV) produced by Medimmune/AstraZeneca and Nasovac <sup>®</sup>	Approximately five incidences of anaphylaxis have been reported after receiving the COVID-19 vaccine for every million doses of the vaccine. Any sort of immunization might result in anaphylaxis, a severe allergic response.		
Thrombosis with thrombocytopenia syndrome (TTS)J&J/Janssen, Pfizer-BioNTech or Moderna (mRNA COVID-19 vaccines)		Approximately four incidences of thrombosis with thrombocytopenia syndrome (TTS) following J&J/Janssen COVID-19 vaccine have been reported per million doses given. TTS is an uncommon but dangerous adverse effect that results in low platelets and blood clots in big blood arteries.		
Myocarditis and pericarditis Pfizer-BioNTech or Moderna (mRNA COV vaccines)		Pericarditis is an inflammation of the heart's outer membrane, whereas myocarditis is an inflammation of the heart muscle. The majority of people who had myocarditis or pericarditis after receiving the COVID-19 vaccine reacted favorably to treatment, rest, and improved swiftly. The majority of instances, notably in male teenagers and young adults, have been linked to Pfizer-BioNTech or Moderna (mRNA COVID-19 vaccinations).		
Reports of death	J&J/Janssen	Clinicians from the CDC and FDA examined death reports submitted to Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS), which may include death certificates, autopsies, and medical records. Nine deaths that can be directly linked to the J&J/Janssen COVID-19 vaccine have been found via ongoing surveillance. The CDC and FDA keep track of reports of fatalities following COVID-19 vaccinations and update data when it becomes available.		
Bell's palsy	(Nasalflu, Berna Biotech, Leiden, The Netherlands)	Bell's palsy is a disorder that causes the muscles on one side of the face to suddenly weaken. The weakness often subsides over a few weeks and is only transitory. The weakening makes the lower portion of the face look sagging. One-sided smiles causes the afflicted eye to resist closing.		
Postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS)	mRNA-based vaccines	After standing or sitting up, a condition known as postural tachycardia syndrome (PoTS) causes an unnatural rise in heart rate. Consistent signs include fainting and dizziness. Postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS) is another name for it.		

- 特徴
- ベクター作製
- ・ 腫瘍溶解性ウイルス
- ワクチン
- ➢ AAVベクター
- 特徴
- ベクター作製
- ・ カプシド改変
- 医療応用と全身大量投与による副作用
- ・ 製造プロセスの開発動向
- 今後期待される技術

# **Discovery of adeno-associated virus (AAV)**

1965年 アデノウイルス標本の電顕解析で新規のウイルス様粒子として発見(AAV1) パルボウイルス科、デペンドウイルス属、ssDNAのゲノム、アデノウイルスがヘルパー



	主な標的組織	対象疾患、応用
1	骨格筋,神経	LGMD, BMD, ポンペ病, LPL欠損, PPCA欠損
2	神経	LGMD, <mark>レーバー先天黒内症</mark> , DMD, AD, パーキンソン病, AADC欠損, 血友病B, CF
5	骨格筋,肝	血友病A, 血友病B
6	骨格筋,神経	LPL欠損, Sanfillipo症候群, HSPC, CD4/8
8	骨格筋,肝,脳	LGMD, 血友病B, ポンペ病, Crigler Najar症候群
9	骨格筋,肝,脳,心筋	ポンペ病, Sanfillipo症候群, <mark>SMA</mark> , DMD

#### AAVベクター血清型と臨床応用

Virus Particles

Science 149: 754-6, 1965

- 1966-7 AAV2~4の発見、キャプシド、ゲノム、疫学の検討(ヒトにへの病原性なし)
- 1985 AAV5の発見
- 1989 AAV2ベクターの開発(Samulski)
- 2002- AAV7-9ほか多数の血清型が応用(100以上)

#### Pros

- · Wide range of cells, including non-dividing cells, can be transduced
- · Long-term transgene expression
- Non-pathogenic, non-toxic ?

#### Cons

- · Limited capacity for foreign genes (4.9kb as an expression cassette)
- · Laborious production of pure stocks in high-titer, high-performance



# AAVベクターの力価測定 (qPCR vs. dd/ndPCR)



#### ベクターの設計において考慮すべき事項

【ベクターゲノム】

組織特異的小型プロモーター/エンハンサー

発現スイッチ

免疫応答の回避(CpG排除、メチル化)

由来不明配列の除去、誤封入の防止

コドン至適化、高機能変異体

ssAAV/scAAV(自己相補型)

【血清型、カプシド変異体】 知財障壁(徐々に解消) 変異体の効率的スクリーニング 翻訳後修飾(安全性、有効性)

### AAVベクターの細胞内取込み、核移行と遺伝子発現までの過程



### **AAVR (multi-serotype receptor for AAV)**


Vector Genome PAMP (pathogen-associated molecular patterns) CpG Content Determines the Fate of rAAV-Transduced Hepatocytes



J.F. Wright, Mol. Ther., 2020, 1756-1758



# scAAVによる低ホスファターゼ症の新生児遺伝子治療



▶ アデノウイルスベクター

- 特徴
- ベクター作製
- ・ 腫瘍溶解性ウイルス
- ・ ワクチン



特徴



- カプシド改変
- 医療応用と全身大量投与による副作用
- 製造プロセスの開発動向
- 今後期待される技術

### **Genomic organization of AAV**





### **CREATE** (Cre recombination–based AAV targeted evolution)



指向性は動物種や投与経路に依存

Deverman et al., Nat. Biotechnol. 2016









### **DELIVER (Transcript-based In Vivo Selection)**



# CapsidMap<sup>™</sup> Platform (Dyno Therapeutics)



machine-guided approach to engineering AAV vector capsids with improved tissue tropism and manufacturability  $\rightarrow$  eye diseases, muscle diseases

### Ag presenting cell-mediated immune response toward rAAV



Mahuri M, et al., J Clin Invest e143780, 2021

[Strategies against immune cells]

- proteasome inhibitors (MHC-I presentation blocking)
- capsid modification (tyrosine mutants)
- cell-type specific promoter (inactive in APC)
- miRNA-mediated de-targeting (miR-transgene fusion)
- viral peptides interfering with Ag presentation (VIPRs)



# 内境界膜剥離による遺伝子導入効率の改善(非ヒト霊長類)



Takahashi, Igarashi, et al. Mol Ther, 2017

### カプシド改変の課題、懸念事項

### ≻ヒトにおける<u>免疫毒性</u>が予測不能

- >ヒトにおける<u>体内動態</u>、主要臓器の障害が予測不能
- >既存血清型に対する中和抗体の交差性が不明

### >アフィニティー精製担体の再開発

≻生産性低下の可能性

▶カルタヘナ対応、CMC評価

# ICH guideline on Biodistribution (ICH S12)

- guideline on Non-clinical Biodistribution Studies for Gene Therapy Products
- nonclinical studies with biodistribution and/or dosing in early clinical trials
- guidance on the design of the studies
- streamlined development of the gene therapy products
- minimising the unnecessary use of animals

2018年 International Pharmaceutical Regulators Programme(IPRP)の Gene Therapy Working Group (GTWG) が、"Expectations for Biodistribution (BD) Assessments for Gene Therapy (GT) Products" (リフレクションペーパー)を公表

2019年11月	ガイドライン作成のためのExpert Working Group(EWG)が発足
2021年6月~7月	Step2; ガイドライン案の承認
2021年夏	厚生労働省からStep2ガイドライン案についてのパブリックコメント募集
2022年1月	各地域でのパブリックコメント募集が終了
2023年	Step 3, 4; 意見による修正、ガイドライン最終合意
今後	Step 5; 日米欧3極における国内規制への取入れ

▶ アデノウイルスベクター

- 特徴
- ベクター作製
- ・ 腫瘍溶解性ウイルス
- ・ ワクチン



- 特徴
- ベクター作製
- カプシド改変
- 医療応用と全身大量投与による副作用
- 製造プロセスの開発動向
- 今後期待される技術

#### **ADVISORY COMMITTEE MEETING**

### FDA

#### Cellular, Tissue, and Gene Therapies **Advisory Committee September 2-3,** NCT Num2e021ProMeting A **nept**ipany (vg/kg $2 \times 10^{14}$ NCT03769116 SRP-9001 Sarepta SEPTEMBER 2<sup>MD</sup> 3 2021 uniOure NCT04652259 **AMT-061** Hemophilia B **BioMarin**

NCT05109469 ACT+協床および臨床試験の評価中に特定 1.1×10<sup>14</sup> Audentes NCT05375555 NCT0537555 NCT05375555 NCT0537555 NCT05375555 NCT0537555 NCT0537555 NCT0537555 NCT0537555 NCT0537555 NCT0537555 NCT0537555 NCT053755 NCT0537555 NCT053755 NCT057555 NCT057555 NCT05755 NCT0575 NCT05755 NCT0575 N

ベクターゲノムの染色体挿入による発癌リスク
→ ステロイド、免疫抑制剤ではリスク回避できない(RB考慮)

Condition	Vector	Dose (vg/kg)	Severe Adverse Event
	Serotype		
SMA1	AAV9	$6.7 \times 10^{13}$ to	Elevated liver enzymes, acute liver injury,
		$1.1 imes 10^{14}$	thrombocytopenia, TMA
DMD	AAV9	$5 \times 10^{13}$ to	Thrombocytopenia, anemia, complement activation,
		$3  imes 10^{14}$	acute kidney injury, cardiopulmonary insufficiency,
			persistent vomiting
XLMTM	AAV8	$1 \times 10^{14}$ to	Gastrointestinal infection, elevated troponin,
		$3  imes 10^{14}$	hyperbilirubinemia, liver failure, sepsis, death

Cellular, Tissue, and Gene Therapies Advisory Committee September 2-3, 2021 Meeting Announcement - 09/02/2021 - 09/03/2021 | FDA Modified from Nicole Paulk; July 7, 2020 in commentary: Gene Therapy: It's Time to Talk About High Doses

# AAVベクターの細胞内取込み、核移行と遺伝子発現



# BOMARIN

# U.S. FDA Placed a Clinical Hold on BMN 307 Phearless Phase 1/2 Gene Therapy Study in Adults with PKU Based on Interim Preclinical Study Findings

BioMarin Also Pausing Further Enrollment of Additional Participants Outside the U.S. in Phearless Phase 1/2 Study

BioMarin is Working with FDA and Other Health Authorities and Will Communicate Next Steps When Available

NEWS PROVIDED BY BioMarin Pharmaceutical Inc.→ Sep 06, 2021, 02:00 ET

phenylketonuria (PKU) AAV5-phenylalanine hydroxylase (PAH) gene therapy 2e13 vg/kg or 6e13 vg/kg

pre-clinical, non-GLP pharmacology study with immunodeficient mice highest dose group (2e14 vg/kg) had <u>tumors on liver necropsy (adenomas, HCC</u>) 52 weeks after dosing <u>integration of portions of AAV vector into the genome</u> <u>translatability of these findings to humans is uncertain</u>

# Adeno-associated virus (AAV)-mediated transduction of male germ line stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation

Ali Honaramooz,<sup>\*,1,2</sup> Susan Megee,<sup>\*,1</sup> Wenxian Zeng,<sup>\*</sup> Margret M. Destrempes,<sup>‡</sup> Susan A. Overton,<sup>‡</sup> Jinping Luo,<sup>\*</sup> Hannah Galantino-Homer,<sup>\*</sup> Mark Modelski,<sup>\*</sup> Fangping Chen,<sup>\*</sup> Stephen Blash,<sup>‡</sup> David T. Melican,<sup>‡</sup> William G. Gavin,<sup>‡</sup> Sandra Ayres,<sup>§</sup> Fang Yang,<sup>†</sup> P. Jeremy Wang,<sup>†</sup> Yann Echelard,<sup>‡</sup> and Ina Dobrinski<sup>\*,3</sup>

\*Center for Animal Transgenesis and Germ Cell Research, Department of Clinical Sciences, New Bolton Center, and <sup>†</sup>Department of Animal Biology, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Kennett Square, Pennsylvania, USA; <sup>‡</sup>GTC Biotherapeutics, Framingham, Massachusetts; and <sup>§</sup>Tufts Cummings School of Veterinary Medicine, North Grafton, Massachusetts, USA FASEB J 2008 Feb:22(2):374-82



FASEB J. 2008 Feb;22(2):374-82.

# 大量投与に伴う副反応の懸念(脊髄性筋萎縮症の非臨床試験)

### Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN<sub>Hinderer C., Wilson J., et al., Hum. Gene Ther., 2018</sub>



サル、18ヶ月 AAVhu68 (AAV9 variant)-hSMN 2 x 10<sup>14</sup> v.g./kg BW, i.v.

急性肝機能障害(1/3, day 4) 後根神経節障害

子豚、7-30日令 AAVhu68 (AAV9 variant)-hSMN 2 x 10<sup>14</sup> v.g./kg BW, i.v.

固有感覚障害 運動失調 後根神経節障害

# AAVベクターの大量投与に伴う、肝機能不全、死亡例の報告(MTM)

### Astellas' Audentes reports 3rd death in gene therapy trial

by Nick Paul Taylor Aug 21, 2020 8:10am

X連鎖性ミオチュブラー・ミオパチーを対象とする遺伝子治療用製品の第1/2相試験 (米Audentes Therapeutics社、ASPIRO試験)

[AT132] AAV8、デスミンプロモーター、ミオチューブラリシMFM/遺伝子、単回静脈内投与 FDA:再生医療先進治療(RMAT)、希少小児疾患、ファストトラック、希少疾病用医薬品 EMA:優先審査(PRIME)、希少疾病用医薬品

ランダム化非盲検、5歳未満のXLMTM男児患者24例を目標 高用量(3×10<sup>14</sup> v.g./kg)、低用量(1×10<sup>14</sup> v.g./kg)、各6例投与 発達指標や呼吸器使用時間が改善 高用量群で進行性肝機能不全、死亡例(2020年8月FDA差し止め、12月通告解除) 低用量群でSAE(2021年9月、自主的に中止、FDA差し止め)



- ・用量(生物力価、体重+年齢/免疫機能、予備能、標準品)、低力価抗体、遺伝的素因
- 品質規格管理(凝集、カプシド、プロモーター、ゲノム安定性、糖鎖)→免疫刺激の回避
- 必要量の低減化(免疫寛容誘導、免疫抑制、感染能改善、GOI発現量や機能の改善)

### Astellas' Pompe disease gene therapy placed on hold by FDA



遅発性ポンペ病の成人患者 第1/2相臨床試験(FORTIS試験)

**[AT845]** 

AAV8-GAA 成人被験者12例、単回静注

低用量(3×10<sup>13</sup> v.g./kg)、中用量(6×10<sup>13</sup> v.g./kg)、高用量(1×10<sup>14</sup> v.g./kg)、計12例投与

中用量群で末梢性感覚ニューロパチー(SAE、投与1ヶ月弱) (2022年6月FDA差し止め)

自己免疫疾患、代謝性疾患(DMなど)、感染症、がんについて精査中

https://www.fiercebiotech.com/biotech/astellas-gene-therapy-strategy-faces-fresh-setback-fda-puts-pompe-disease-drug-hold

https://www.fiercebiotech.com/biotech/astellas-gene-therapy-strategy-faces-fresh-setback-fda-puts-pompe-disease-drug-hold

# Pre-existing humoral immunity to rAAV restricts the treatable patient population and efficacy



中和抗体で治療適応を判断するが、現行ELISA法は低感度、中和活性の判定が不正確 不適切な症例が除外されていない可能性(SAEとの関連)

→ 高感度な感染細胞による検出手法を新規に開発(特願2021-167826) コンパニオン診断薬として応用(安全な遺伝子治療)

### AAVによる補体活性化



【キャプシド免疫に対する戦略】

- 免疫抑制剂 (rituximab, rapamycin)
- ・ 血中循環IgGの非特異的切断 (IdeS, NAb-free windows)
- AAV特異的血漿交換カラム
- ・ エピトープマスキング (lipids, exosome)
- 中和抗体を回避するための構造改変(定向進化)
- その他 (serotype switching, route, saline flushing, empty capsids as decoys, ...)

# **Thrombotic Microangiopathy (TMA)**



Figure 1: Diagram of a healthy capillary

Figure 2: Diagram of a capillary damaged by TMA

### AAVベクターを用いたDuchenne型筋ジストロフィーの治験

serotype	Transgene	Promoter	Phase	Company	Dose, route	Clinical trials ID	Annotation	
AAV2.5	Mini-Dys	СМV	I	Asklepios Biopharmaceutical, Nationwide Children's Hospital	2 cohorts 2x10 <sup>10</sup> vg/kg, 1x10 <sup>11</sup> vg/kg	NCT00428935		
AAV9	Mini-Dys	human muscle specific	lb	_ Pfizer, PF-06939926	2 cohorts 1-3x10 <sup>14</sup> vg/kg, i.v. 心的障害	NCT03362502	<b>腎障害</b>	
			ш			NCT04281485	(C5阻害剤)	
AAVrh74	μDys	МНСК7	I/II	Sarepta, Nationwide Children's Hospital	2x10 <sup>14</sup> vg/kg, i.v.	NCT03375164 NCT03769116 NCT04626674	Stable dose of corticosteroids throughout trial	
AAVrh74	GALGT2	МСК	l/lla	Nationwide Children's Hospital	2 cohorts : 2.5x10 <sup>13</sup> vg/kg/leg, 5x10 <sup>13</sup> vg/kg/leg, intravascular limb infusion	NCT03333590	血小板減少 ↓	
AAV9	μDys	СК8	ı/II	Solid Biosci., SGT-001	2x10 <sup>14</sup> vg/kg, i.v.	NCT03368742	clinical protocol manufacturing (EP/F) changed (C5/C1阻害剤)	
AAV8	μDys		1/11/111	Genethon	> 1.0x10 <sup>13</sup> /kg, i.v.	EudraCT: 2020-002093-27		
AAV9	U7-snRNA (ACCA)		l/lla	Audentes Therapeutics, Nationwide Children's Hospital	Cohort 1, minimal effective dose, peripheral limb vein inj.	NCT04240314		
AAV3b	U7-snRNA- E53		I/II	Genethon, Institute of Myology		NCT01385917	AAV-mediated Exon53 skipping	
【全身大量投与に伴う副作用が課題、ステロイドによるリスク回避は効果不十分】 補体制御(抗C5抗体エクリズマブ、C1阻害剤)、ステロイドや免疫抑制剤を併用								

CMC、中和抗体対策(IgG分解)、自然/細胞性免疫の制御、治療タンパク質の免疫寛容 → 投与量低減



EGFP expression rAAV transduction (Pixel2/visual field) 50,000 20,000 30,000 40,000 60,000 10,000 70,000 80,000 0 rAAV8EGFP  $(3 \times 10^{11})$ rAAV8EGFP A rAAV8EGFP PE rAAV8EGFP + rAAV8EGFP PE 35% rAAV8hA1AT PE rAAV8EGFP + rAAV8hA1AT PE 69% AAV8 CE (REV: 75%) G CE AAV8 rAAV8*EGFP* + CE AAV8 76% b а P < 0.01 120 100-\*\* ## ۰ 100 ALT activity (IU/L) ٥ 80 ALT activity (IU/L) P < 0.05 80 P = 0.0960 \*\* ## 60 40 40 20 20 3 7 14 21 28 35 0 Days O PBS PBS rAAV8EGFP  $(3 \times 10^{11})$ ★ rAAV8EGFP (3 × 10<sup>11</sup>) rAAV8EGFP PE  $(9 \times 10^{11})$ rAAV8EGFP PE (9 × 10<sup>11</sup>) • rAAV8EGFP (3 × 10<sup>11</sup>) + rAAV8EGFP PE (9 × 10<sup>11</sup>) (REV: 75%) rAAV8EGFP (3 × 10<sup>11</sup>) + rAAV8EGFP PE (9 × 10<sup>11</sup>) (REV: 75%) V rAAV8hA1AT PE  $(9 \times 10^{11})$ rAAV8*hA1AT* PE  $(9 \times 10^{11})$ ••• rAAV8EGFP (3 × 10<sup>11</sup>) + rAAV8hA1AT PE (9 × 10<sup>11</sup>) (REV: 75%) ٥

- AAV8 CE  $(9 \times 10^{11})$
- rAAV8EGFP (3 × 10<sup>11</sup>) + rAAV8 CE (9 × 10<sup>11</sup>) (REV: 75%)
- rAAV8EGFP (3 × 10<sup>11</sup>) + rAAV8hA1AT PE (9 × 10<sup>11</sup>) (REV: 75%)
- AAV8 CE (9 × 10<sup>11</sup>)
- rAAV8EGFP (3 × 10<sup>11</sup>) + AAV8 CE (9 × 10<sup>11</sup>) (REV: 75%)

G.Gao et al., Molecular Therapy – Methods & Clinical Development (2014

# br Better or for Worse?

**Empty AAV capsids retain IgG** more efficiently than full capsids →中和抗体吸着カラムへの応用



F. Mingozzi et al., Scientific Reports (2020)

### **Efficient Cansid Antigen Presentation** From AAV Empty Virions In Vivo



X.Pei et al., Front. Immunol. (2018)

# UPDATED: After delays, Sarepta's DMD gene therapy Elevidys finally crosses FDA finish line at \$3.2M

By Zoey Becker - Jun 22, 2023 02:25pm



https://www.fiercepharma.com/pharma/sareptas-dmd-gene-therapy-finally-makes-it-accelerated-approval-finish-line-restricted approval-finish-line-restricted a

# 特定の HLA 対立遺伝子を持つ小児の肝障害



Adeno-associated virus 2 infection in children with non-A-E hepatitis Ho A. *et al.,* Nature 2023 May:617(7961):555-563

肝炎患者32名中26名(81%)の血漿および肝臓検体でAAV2の感染 健常者の検体では74名中5名(7%)が陽性

HLA-DRB1\*04:01対立遺伝子は肝炎患者27名中25名(93%)で検出 健常者の検体では 64名中10名(16%; P = 5.49 × 10<sup>-12</sup>)が陽性 肝炎患者におけるHLA-DRB1\*04:01対立遺伝子頻度は0.54、健常者では0.08 (オッズ比(OR) of 13.7 (95% CI of 5.5-35.1), P = 5.49 × 10-12)

英国バイオバンクの健常者集団 HLA-DRB1\*04:01対立遺伝子頻度は0.11 (29,379対立遺伝子中2,942、オッズ比(OR) of 112.3 (95% CI of 26.6-474.5), P = 3.27 × 10-23 )

英国アイルランド北西ヨーロッパ人集団 HLA-DRB1\*04:01対立遺伝子頻度は0.11 Adeno-associated virus type 2 in US children with acute severe hepatitis Servellita V. et al.,

Nature 2023 May;617(7961):574-580

2022年以降、英国や米国など35カ国で原因不明の小児肝炎が1000例以上報告 肝移植を必要とする重症の肝炎や死亡例も

米国の原因不明の急性重症肝炎の患児血液検体(14件)では、93%(13件)でAAV2が検出 患児14人全員、ヒトアデノウイルス陽性 対照群(113人)では3.5%(4件)

AAV2に感染していた患児(13人)は、EBウイルスやヒトヘルペスウイルスの同時感染 AAV2とヘルパーウイルスの同時感染が小児肝炎の重症度と関連

Genomic investigations of unexplained acute hepatitis in children Morfopoulou S. *et al.* Nature 2023 May;617(7961):564-573

小児肝炎患者28名中27名で肝臓、血液、血漿、尿にAAV2検出(high titer)

小児肝炎患者31名中23名でヒトアデノウイルス検出 (low titer) 23名中26名でヒトベータヘルペスウイルス6B (HHV-6B) 検出 (low titer)

▶ アデノウイルスベクター

- 特徴
- ベクター作製
- ・ 腫瘍溶解性ウイルス
- ・ ワクチン



- 特徴
- ベクター作製
- カプシド改変
- ・ 医療応用と全身大量投与による副作用
- 製造プロセスの開発動向
- 今後期待される技術

### 品質リスクマネジメント(有効かつ安全であることの確認)



リスクアセスメント (要因特定、可能性分析、重大性評価) ↓ リスクコントロール (<u>リスク・利益バランス</u>の設定、制御、低減、受容)

# **Guidance for Industry (US FDA; 2020)**

Statement from FDA Commissioner Scottlieb, M.D. on agency's efforts to advance development of gene therapies

### **Guidances on Manufacturing Gene Therapies**

• Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)

遺伝子構造 タンパク質構造 物理化学的特徴 生化学的特徴 製造工程由来不純物 配列、安定性 キャプシドの構成、構造、翻訳後修飾 分子量、粒子サイズ、中空粒子/完全粒子の比率 糖鎖修飾部位 SV40 Large T antigen (腫瘍原性、免疫原性)

- Testing of Retroviral Vector-Based Human Gene Therapy Products for Replication Competent Retrovirus During Product Manufacture and Patient Follow-up
- Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products

### **Disease Specific Gene Therapy Guidance**

- Human Gene Therapy for Hemophilia
- Human Gene Therapy for Rare Diseases
- Human Gene Therapy for Retinal Disorders

開発手法の進化 (Process Analytical Technology:PAT) Quality by Design(QbD)アプローチ 品質信頼性、リスク回避









A case study-based approach to integrating QbD principles in Gene Therapy CMC programs



CQAs

Identify quality attributes that impact potency, pharmacokinetics/pharmacodynamics, immunogenicity, or safety (i.e., those that affect the drug recipients).

#### 抗体医薬の経験を活用、物理的性質を重視 QbDの考え方を安全性に反映させるためには 医学・生物学的評価(生物活性、免疫毒性)が重要 → より進化したenhanced QbD

#### **Control Strategy**

- Release testing
- Stability testing
- In-process control testing
- Control of material attributes
- Control of process parameters

Understanding functional relationships between process and CQA provides for an enhanced approach

Process

Characterization

再生医療等製品は、原料となる細胞の性質が不安定 安全性や有効性と相関が高い<u>重要品質特性CQA</u>を厳密に特定することが困難

最終製品の規格試験のみで管理するのではなく、 QbDの考え方を取り入れ、原材料管理、工程内管理や中間製品試験によって 変動やばらつきをモニタリング・制御し、製品のデザインスペースを確保

### AAVベクター大量製造の工程とProcess Analytical Technology (ヘルパーフリー法の製造プラットフォームの例)

上流工程

主なrAAV作製細胞の特徴



ヒト組織に由来するベクター生産細胞が重要

セルバンクシステム(MCB,WCB;ICH-Q5B/Q5D) ウイルス否定試験、マイコプラズマ否定試験、無菌試験 形態観察試験、増殖試験
## 細胞開発と新統合指針(医学系指針+ゲノム指針、生命・医学系指針)

	Poten List	tially Actionable S	SF Gene	NCC Or	ncopanel	Founda tion One CDx	開示推 奨度	T-only panel における Germline testの必要性
C	Gene	Major Phenotype	備考	tumor	germline	tumor	注1	注2
/	APC	FAP		0	0	0	AAA	$\bigtriangleup$
/	A <i>TM</i>	Breast Ca		0		0	А	$\bigcirc$
2	BAP1	Malignant Mesothelioma etc.		0		0	В	
1	BMPR1A	Juvenile Polyposis					AA	
1	BRCA1	НВОС		0	0	0	AAA	O
1	BRCA2	НВОС		0	0	0	AAA	O
1	BRIP1	Ovarian Ca				0	A	Ô
(	CDH1	Diffuse Gastric Ca				0	AA	0
(	CDK4	Melanoma		0		0	В	0
(細胞の品質評価	遣伝:	子改変 ウイルスクリ	$ \mathbf{r} \rightarrow \mathbf{v} \mathbf{z}\rangle$	0		0	A	0
			0		0	A	0	
がの通ばすいれが							AA	
(個人識別符号 勇	もう しょうしょう しょうしょう しょうしん しょうしん しょうしん あんし しょうしん しょうしん しょうしん しょうしん しょうしん しょうしょう ひょうしょう しょうしょう ひょうしょう ひょうしょう ひょうしょう ひょうしょう しょうしょう しょう	固人情報 個情法の				0	В	0
					0	В	0	
						В		
(エクソームシークエンス)					0	AAA	0	
一塩基多型(SNP)			0		0	В		
<u>独立な40箇所以上のSNPの構成</u>			0	0	0	AAA	O	
9座位以上の4塩基単位の繰り返し配列(STR)			0	0	0	AAA	O	
						0	AAA	Ô

(二次的所見、遺伝カウンセリングとIC、「遺伝情報の開示」→「研究によって得られた結果等の説明」)
健康管理や診療方針に関し<u>結果説明</u>が必要(遺伝子解析に未対応→国際競争上のリスク)
→ 知る権利、<u>知らないでいる権利</u>(細胞提供者の同意が必要)

「医療現場でのゲノム情報の適切な開示のための体制整備に関する研究」(小杉班, 2019)



### 生産AAV2の超遠心分析



Burnham et al., Human Gene Therapy Methods, 2015

### AAVベクター大量製造の工程とProcess Analytical Technology (ヘルパーフリー法の製造プラットフォームの例)



- ・ 需要ショック長期化への対応、互換性バッグ、カーボンリサイクル
- ・ 生産回復状況の地域別モニタリング

AAVベクター大量製造の工程とProcess Analytical Technology (ヘルパーフリー法の製造プラットフォームの例)



完全粒子と中空粒子の分離は困難

AAVベクター大量製造の工程とProcess Analytical Technology (ヘルパーフリー法の製造プラットフォームの例)



### Zonal超遠心分離によるAAVベクター製造



Wada M, Okada T, *et al.*, Gene Ther. (in press)

超遠心精製の課題(処理能力・生物活性)と次世代技術の開発



Wada M, Okada T, *et al*., Gene Ther. 2023 Wada M, Okada T, *et al*., Mol Ther, 2022;30(4S1):194 岡田ほか、PCT/JP2022/17762

# 遺伝子治療用製品の分析対象と品質管理

プロセス段階	確認内容	論点
原料	感染性因子	NGS (ICH-Q5A)
中間体	感染性因子、CQA	QbD(再現性、規格に依存)
原薬	外観、純度、力価( <i>in vitro/in vivo</i> 生物活性) 目的物由来不純物·関連物質 製造工程由来不純物	中空粒子、不完全粒子 ゲノム(細胞, プラスミド, Km <sup>r</sup> ) rcAAV
製剤	目的物由来不純物·関連物質、安定性	中空粒子、不完全粒子

分析対象	項目	手法
目的物質	カプシド、ゲノム (定量、 <mark>完全性、不均一性</mark> )	電気泳動、質量分析(VP構成比) dd/ndPCR、NGS、生物学的力価
目的物関連物質	目的物質の特性、翻訳後修飾	糖鎖解析、免疫毒性評価
目的物由来不純物	中空/不完全粒子(dsRNA、HCP)、 凝集/分解物	AUC、クロマト、cryoTEM、 質量測光
製造工程由来不純物	感染性因子、プラスミド、 細胞由来DNA/RNA/タンパク質	ウイルスクリアランス、 ELISA、PCR、NGS、HPLC

# Analytical Ultracentrifugation (AUC)



Burnham et al. Human Gene Therapy Methods 228-242, 2015

## Single-molecule counting by mass photometry



▶ アデノウイルスベクター

- 特徴
- ベクター作製
- ・ 腫瘍溶解性ウイルス
- ・ ワクチン



- 特徴
- ベクター作製
- カプシド改変
- 医療応用と全身大量投与による副作用
- ・ 製造プロセスの開発動向
- 今後期待される技術



## 霊長類における外来遺伝子発現低下と免疫応答制御の効果

正常カニクイザル, 3~4 years old Tacrolimus, 0.06 g/kg BW AAV8-CMV-LacZ, 1x10<sup>13</sup>v.g./muscle

筋肉内投与(上腕二頭筋、前脛骨筋)



発現の維持には 免疫応答制御が有効

Tacrolimus (カルシニューリン阻害薬)

課題(特に高齢者) 連日投与による 肝・腎障害のリスク 易感染性

85

Ishii A, Kinoh H, Okada T. *et al.*, Molecular Therapy - Methods & Clinical Development, 2020

### AAVベクターによる自然免疫系(パターン認識)の活性化とDC制御



Muhuri M, et al., J Clin Invest e143780, 2021

# MSCを用いたDC制御と免疫寛容誘導

(i.m., local)



岡田ほか、特許第6750782号 Kinoh H, Okada T, *et al.*, Mol Ther - Methods Clin Dev, 20:133-141, 2021 Nature Reviews Drug Discovery, DOI: 10.1038/s41573-023-00775-6, 2023

### 間葉系細胞(MSC)を活用した低用量AAVベクターによる長期遺伝子発現



岡田ほか、特許第6750782号

Kinoh H, Okada T, *et al.*, Mol Ther - Methods Clin Dev, 20:133-141, 2021 Nature Reviews Drug Discovery, DOI: 10.1038/s41573-023-00775-6, 2023 1/100重で長期的効果 → 安全性とコストの大幅な改善 (企業導出、他の疾患にも展開)

### AAVベクターとMSCを用いた次世代の遺伝子・細胞治療



岡田ほか、特許第6750782号 Kinoh H, Okada T, *et al.*, Mol Ther - Methods Clin Dev, 20:133-141, 2021 Nature Reviews Drug Discovery, DOI: 10.1038/s41573-023-00775-6, 2023

## 免疫寛容誘導によるAAV反復投与の遺伝子治療(米Selecta社)

ラパマイシン封入ナノ粒子→Treg活性化、MMA(メチルマロン酸血症)臨床試験の再開



# 神経疾患の遺伝子治療(SMAのモダリティ間競争)

#### 脊髄性筋萎縮症: Spinal Muscular Atrophy (SMA)

- ・脊髄前角細胞の変性による神経原性萎縮症
- ・進行性の体幹、四肢の筋力低下及び筋萎縮
- ・第5染色体(5q13.2)上の運動神経細胞生存遺伝子(SMN)異常
- ・I、II型SMAではSMN遺伝子欠損が9割以上であり、遺伝子診断可能
- ・人工呼吸管理を行わない場合、死亡年齢は平均6~9ヶ月
- ・SMN2mRNA前駆体を標的としたスピンラザ (antisense-oligo)
- ・1、2、4、9週、その後4ヶ月毎に髄液内投与

型	病名	発症年齡	運動機能	遺伝
i.	Werdnig-Hoffmann病 急性乳児型SMA	0~6ヶ月	坐位未獲得	常劣
П	Dubowitz病 慢性乳児型SMA	~1歳6ヶ月	立位未獲得	常劣
Ш	Kugelberg-Welander病 若年性SMA	1歳6ヶ月~ 20歳	立位、歩行	常劣 まれに 常優
IV	成人型SMA	20歲以上	正常運動	孤発

小野寺雅史 国立成育医療研究センター 遺伝子細胞治療推進センター 設立シンポジウム 2019



### ゾルゲンスマとスピンラザの比較

製品名 (社名)	ゾルゲンスマ (ノバルティスファーマ)	スピンラ <del>ザ</del> (バイオジェン・ジャパン)
一般名	オナセムノゲン アベパルボベク	ヌシネルセンナトリウム
	遺伝子治療薬	アンチセンス核酸医薬
作用機序	SMN遺伝子を補充し、SMN タンパク質を発現させる	SMN遺伝子がSMNタン パク質を産生する過程に 作用し、正常なSMNタ ンパク質を産生させる
投与対象年齢	2歳未満	制限なし
投与頻度 投与形態	1回(再投与は行わない) 静脈内投与	4カ月に1回(乳児型・維持期) 髄腔内投与
薬価	1億6707万7222円	949万3024円
市場規模予測	年間42億円 (投与患者数は年間25人)	年間119億円 (投与患者数は年間414人)

※スピンラザの市場規模予測は乳児型とそれ以外の合計

それぞれの薬剤の薬価収載を審議した中医協総会の資料をもとに作成

AnswersNews>ニュース解説>初の「億超え新薬」ゾルゲンスマの薬価はどう決まったか

Zolgensma (SMN1発現rAAV9、1.1x10<sup>14</sup> v.g./kg BW、静脈内)

Exogenous SMN1 sequence 2021.6 Evrysdi<sup>™</sup> (risdiplam)国内承認 SMN2スプライシングを修飾する経口低分子薬

Reed et al., Arq Neuropsiquiatr, 265-272, 2018

# 時代に合わせた価値評価と保険償還制度



# 予防的治療への展開(希少疾患から慢性疾患へ) ウイルスベクターを用いた治療の方向性(日本版 Target 10)



アルツハイマー病、パーキンソン病

## Luxturna, a copy of the RPE65 gene (rAAV2)



Russell *et al.*, Lancet. 2017 Aug 26; 390(10097): 849–860

同一疾患でも病態によって異なるモダリティが必要



- ・ 視細胞移植では、視細胞を保護する網膜色素上皮および視細胞より中枢側にある<u>双極細胞</u>な どが解剖学的、機能的に一部でも残存していることが前提
- 光遺伝学治療では治療標的となる、(視細胞より中枢側にある)<u>神経節細胞が一部でも残存</u>していれば治療が行えるため、末期の網膜変性症例も対象となりうる
- ・ 光遺伝学治療ではユニバーサルな治療遺伝子で治療可能、加齢黄班変性症にも応用可能



### アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターワクチンの特徴と課題



Zabaleta et al., 2021, Cell Host & Microbe 29, 1437-1453



日刊工業新聞 2023年2月8日

98

アルツハイマー病に対するワクチン療法(能動免疫療法)



# 次世代のベクターや治療方法に求められる特性

- 大きな遺伝子搭載容量
- ・低い遺伝毒性
- ・低い中和抗体活性
- 反復投与の可能性
- ・長期的な発現
- ・限定された組織親和性

Capacity: 5543-nt DNA genome (800bp larger than rAAV)
Tropism: Discovered in 2005 from human respiratory samples. highly tropic for airway.
Safety: Not found to cause disease.
Redosability: Evades neutralizing antibodies. Re-infection occurs after seroconversion.

35

30

25

20

15

10

5

0

Prima Secon

No. children



Human Bocavirus 1 (HBoV1)

Carbon Biosciences



謝 辞

### 東京大学 医科学研究所

Mikako Wada Hiromi Kinoh Yuko Kasahara Yuko Kakiuchi Hitomi Igarashi Ayumi Nagano Miho Nagoya Chikako Yanagiba Masakatsu NIshihacijo Ava Okazaki Aki Kato Yukage Kobari Hiroko Miyatake Kenji Sakamoto Mizuho Takahashi Yasunari Matsuzaka

Takako Sasaki Wu Yang Tori Sato Kaya Ohtaki Rimi Miyaoka Junpei Hayakawa Hirokazu Motoyama Yae Kurosawa Azusa Onodera Yukage Kobari Ken Sugo Posadas Guillermo Akiko Ishii Koichi Kimura Yukihiko Hirai Yuji Tsunekawa



大学院生 (医学系研究科 分子細胞生物学)、 教員(准教授、講師、助教)、研究員募集中 t-okada@ims.u-tokyo.ac.jp

### 東京大学 脳神経内科

Atsushi Sudo Motoi Kanagawa Tatsushi Toda

### 日本医科大学

Kumi Adachi Yoshitaka Miyagawa Maika Kobayashi Tsutomu Igarashi

### 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所/CareCureNMD

Hirofumi Komaki Mutsuki Kuraoka Sachiko Ohshima Jing-Hong Shin Hideki Kita Norio Motohashi Yoshitsugu Aoki Shin'ichi Takeda 株式会社カネカ 第一三共株式会社 AGC株式会社 ロート製薬株式会社 タカラバイオ株式会社 東ソー株式会社 Mesoblast Inc. Cytiva/PALL (Danaher Group) Thermo Fisher Scientific

### 第31回 JSGCT日本遺伝子細胞治療学会 学術集会

Great expectations 国際貢献と新たな時代の幕開け

숲	期	2025年7月21日-24日
会	場	東京大学安田講堂ほか
숲	長	岡田尚巳(東京大学)

特別講演 J. Fraser Wright (Stanford, USA) (予定) Philip J. Brooks, PhD (NIH NCATS, USA) Robert Kotin (MIT/Carbon Biosciences, USA) Silviu Itescu, MBBS, FRACP (Mesoblast, Australia)

シンポジウム 遺伝子治療ウイルスベクターの製造技術開発 自然免疫応答と対策

(予定)

[後援]

(予定)

DMDの遺伝子・細胞治療 中枢神経・感覚器疾患の遺伝子治療 血液・免疫疾患の遺伝子治療 先天性代謝異常の遺伝子治療

一般社団法人日本再生医療学会
一般社団法人日本人類遺伝学会
一般社団法人日本遺伝カウンセリング学会
日本遺伝子診療学会
国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム
AMED委託費「再生医療・遺伝子治療の産業化に向けた基盤技術開発事業」(岡田班)
AMED委託費「再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム、実用化支援課題」

(岡田班)