

遺伝子治療製品の バイオアナリシス

第13回JBFシンポジウム

第一三共株式会社

花田 雄志

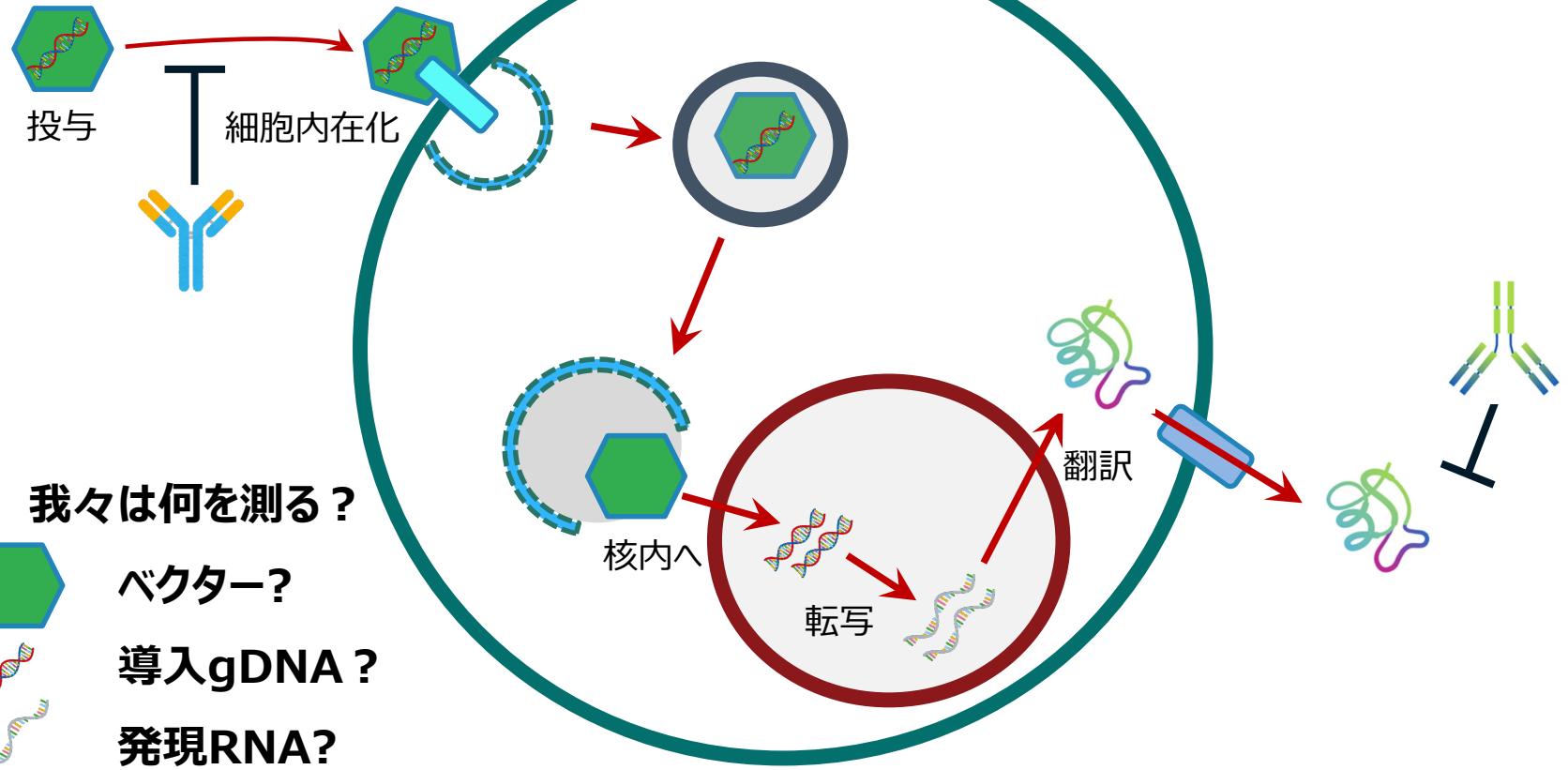
赤羽隆文¹、稲見真倫¹、岸野有紀²、橘田久美子³、
中村隆広⁴、花田雄志²、福永智恵⁵、森 勇伍³

¹アステラス製薬株式会社, ²第一三共株式会社, ³シミックファーマサイエ
ンス株式会社, ⁴株式会社新日本科学, ⁵田辺三菱製薬株式会社

AAV	Adeno-Associated Virus	ITR	Inverted Terminal Repeat
ADA	Anti-drug antibody	LncRNA	Long Non-Coding RNA (Ribonucleic Acid)
AE	Amplification Efficiency	LOD	Limit of Detection
BD	Biodistribution	LTS	Long Term Stability
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool	ME	Matrix Effect
BLOD	Below the Limit of Detection	miRNA	Micro RNA (Ribonucleic Acid)
CDx	Companion Diagnostics	NAb	Neutralizing Antibody
cGMP	Current Good Manufacturing Practices	NBS	Northern Biomolecular Services
CNV	Copy Number Variation	NC	Negative Control
COU	Context of Use	NGS	Next-Generation Sequencing
Cq	Quantification cycle	NTC	No Template Control
Ct	Threshold cycle	PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
ddPCR	Droplet Digital Polymerase Chain Reaction	QC	Quality Control
dPCR	Digital Polymerase Chain Reaction	qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
ELISpot	Enzyme-Linked Immunosorbent Spot assay	RE	Relative Error
FCM	Flow Cytometry	RT	Reverse Transcription
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer	siRNA	Small Interfering RNA (Ribonucleic Acid)
gDNA	genomic DNA (Deoxyribonucleic Acid)	TA	Test Articles
GOI	Gene of Interest	TAb	Total Antibody
GT	Gene Therapy	UL	Ultra Low (lowest concentration at QCset)
IHC	Immunohistochemistry	w/wo	with / without
ISH	in situ hybridization	WB	Western Blotting
ISR	Incurred Sample Reanalysis	WRIB	Workshops on Recent Issues in Bioanalysis



DG2021-50 「遺伝子治療製品のバイオアナリシス」



我々は何を測る？

-  ベクター？
-  導入gDNA？
-  発現RNA？
-  発現蛋白？
-  抗ベクター抗体？
-  抗発現蛋白抗体？

遺伝子治療のBAとして、何を、どんな方法で、どのような基準で測定・評価するか、現時点でのregulationや知見をもとにまとめた。

構成メンバー

氏名	所属
赤羽 隆文	アステラス製薬株式会社
稲見 真倫 (~9月)	アステラス製薬株式会社
岸野 有紀	第一三共株式会社
橘田 久美子	シミックファーマサイエンス株式会社
中村 隆広	株式会社新日本科学
花田 雄志	第一三共株式会社
福永 智恵	田辺三菱製薬株式会社
森 勇伍	シミックファーマサイエンス株式会社

(50音順)



議論の範囲

遺伝子治療

In vivo遺伝子治療
AAVなど

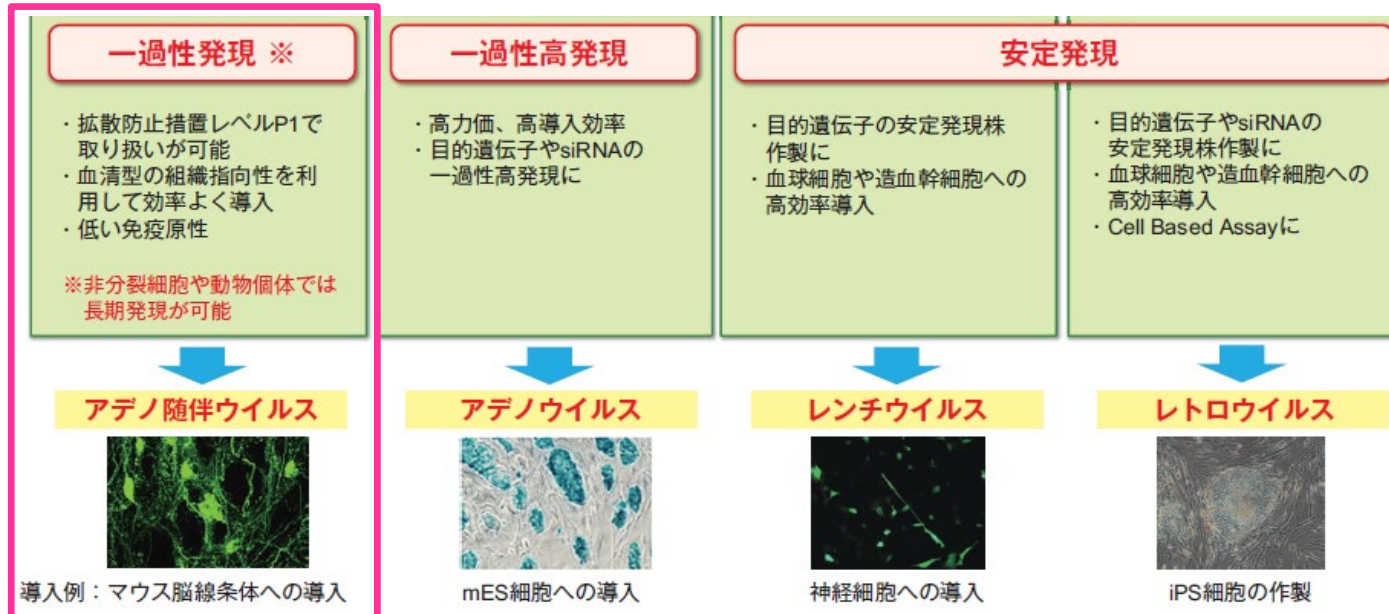
Ex vivo遺伝子治療
CAR-Tなど

主にこちらを議論

遺伝子治療とベクター

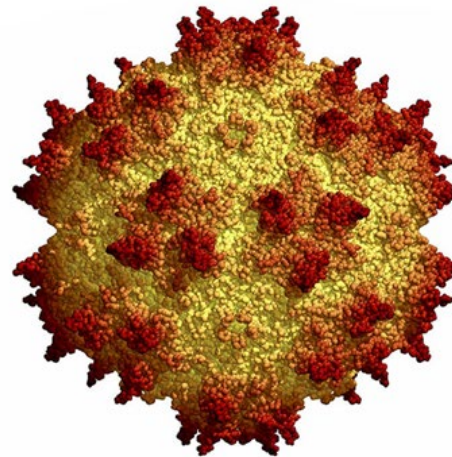
- ◆ 遺伝子治療とは、治療上有効な蛋白質をコードしたgDNAを患者に投与したり（in vivo）、遺伝子を導入・発現させた細胞を患者に投与する（ex vivo）ことにより、治療を達成する先端医療である。
本DGでは、主にin vivo遺伝子治療を取り扱う。
- ◆ 遺伝情報（gDNA）を安定かつ高効率に細胞内に送達し発現させるために遺伝情報をカプセル（遺伝子導入ベクター）に包んで投与する。

【遺伝子導入ベクター】



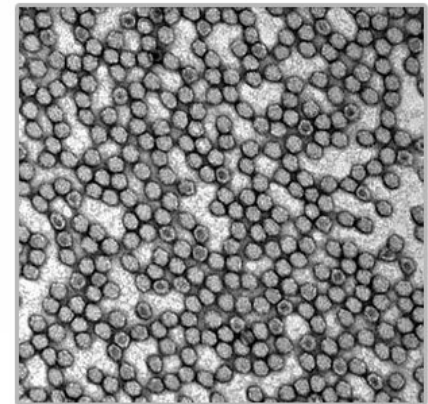
https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/transgenesis_experiment.pdf, 遺伝子導入ハンドブック（タカラバイオ）

- ◆ アデノ随伴ウイルス（AAV）は、ヒトや霊長目の動物に感染する小型の、パルボウイルス科ディペンドウイルス属に分類されるヘルパー依存型のエンベロープを持たないウイルスである。
- ◆ 非常に弱い免疫反応しか引き起こさず、病原性は現在の所確認されていない。
- ◆ 分裂期にある細胞にもそうでない細胞にもゲノムを送り込むことができ宿主細胞にゲノムを送り込まずとも染色体外で生存することができる。
- ◆ そのような特色があるためにベクターウイルスを用いた遺伝子治療やヒトの疾患モデル細胞の作成などに用いられる。



22nm

Electron micrograph image of a concentrated preparation of AAVs

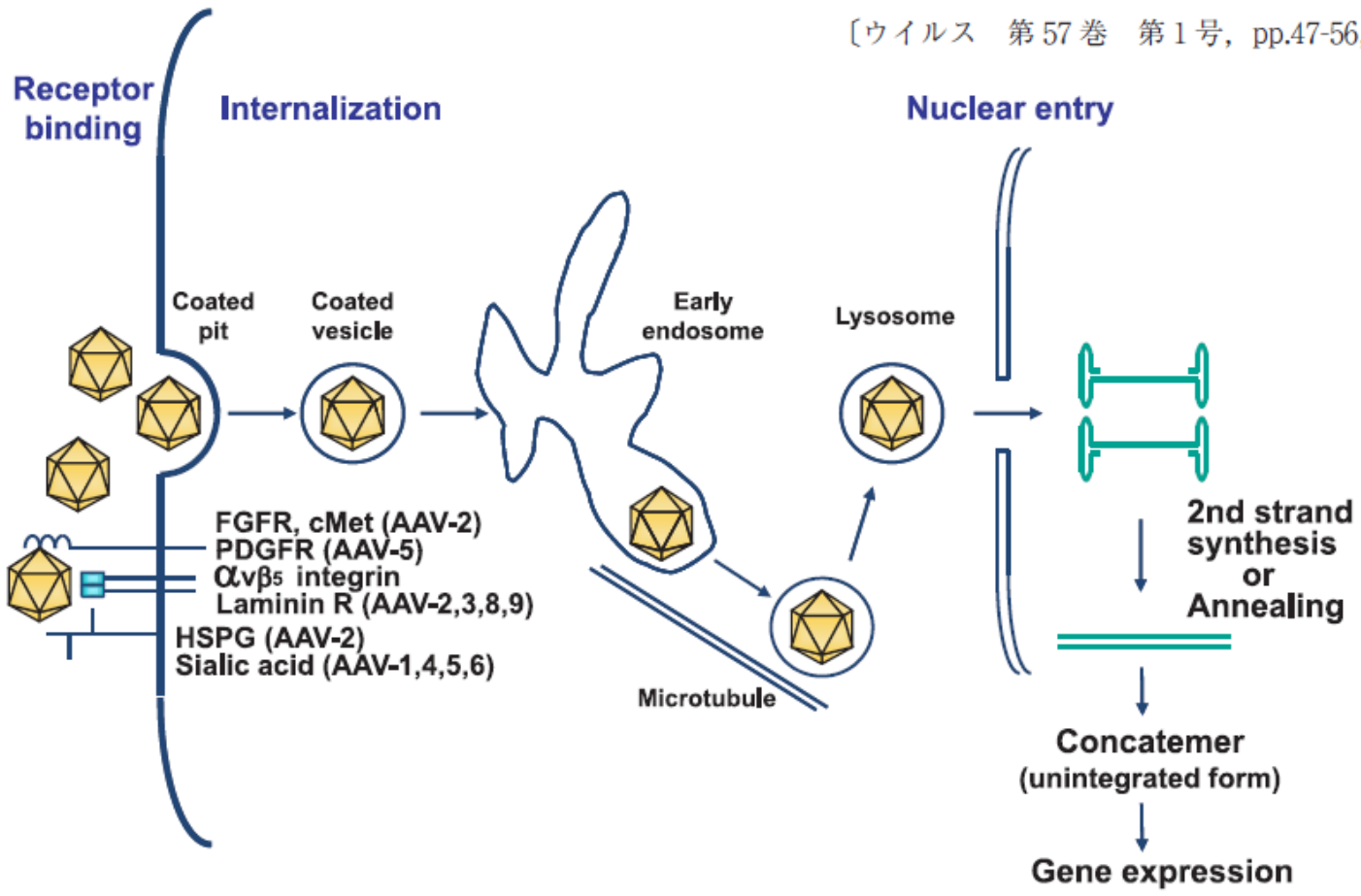


<https://www.cosmobio.co.jp/support/technology/a/adeno-associated-virus-aav-apb.asp>, アデノ随伴ウイルス（AAV）とは（コスモ・バイオ株式会社）



遺伝子治療における遺伝子発現 -AAVを例に-

[ウイルス 第57巻 第1号, pp.47-56, 2007]



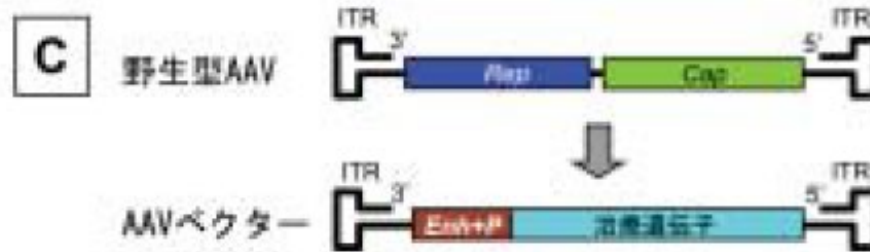
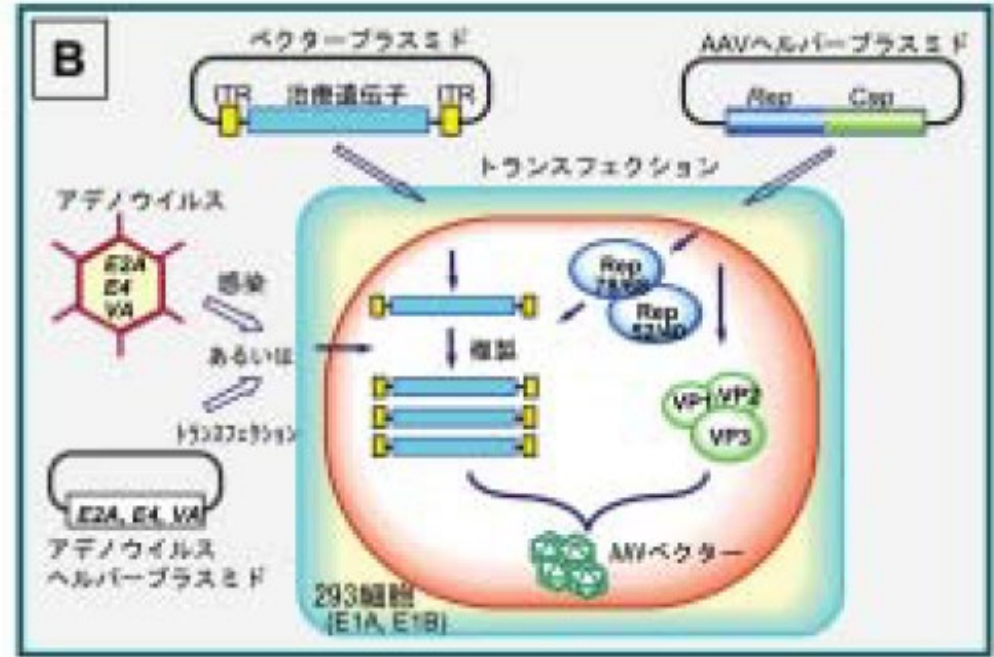
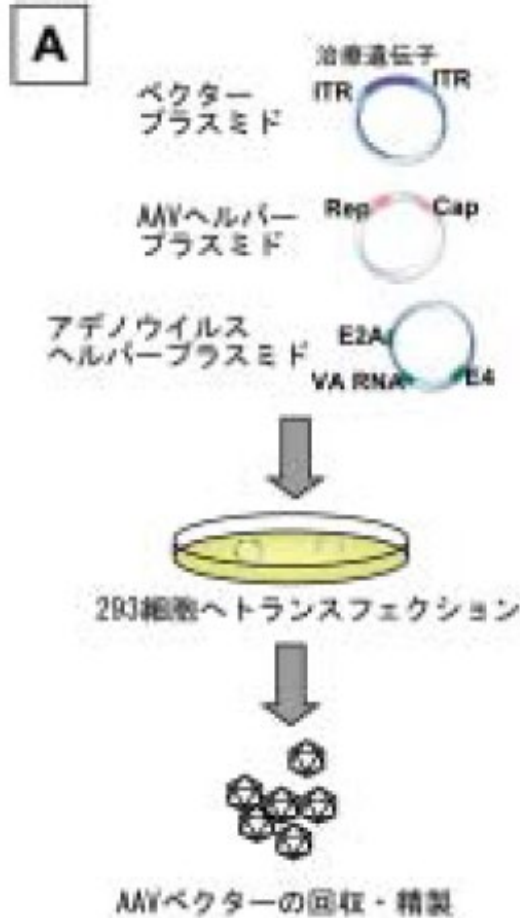
<http://bioanalysisforum.jp/>

1 本鎖DNAがカプシド蛋白に包まれた構造
 種々の受容体を介して細胞内に侵入し、核移行時にカプシドが脱落する。
 核内に侵入した1本鎖DNAはアニーリングにより2本鎖になり、その後遺伝子発現



AAVベクターの構造

[ウイルス 第57巻 第1号, pp.47-56, 2007]



Rep: AAVの複製やgDNAの組込みを担う

Cap: カプシド蛋白をコード

→ 組換えAAVベクターはこれらの遺伝子が欠落……複製やgDNAへの組込みが起こらない

<http://bioanalysisforum.jp/>

AAVの血清型（カプシドの種類）

AAVは血清型（セロタイプ）の違いによって、感染効率や組織特異性が異なる。

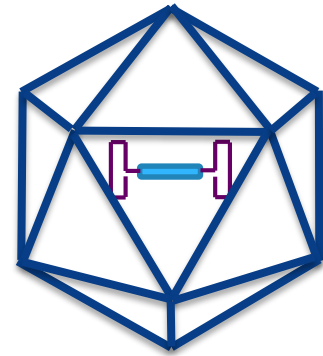
AAVセロタイプとその指向性

	CNS/網膜	心臓	肺	肝臓	骨格筋
AAV1	●	●	●		●
AAV2	●			●	●
AAV3	●	●		●	
AAV4	●	●			
AAV5	●		●		
AAV6		●	●	●	●
AAV7	●			●	●
AAV8	●			●	●
AAV9	●	●	●	●	●
AAV10	●		●		

<https://www.cosmobio.co.jp/support/technology/a/adeno-associated-virus-aav-apb.asp>, アデノ随伴ウイルス（AAV）とは（コスモ・バイオ株式会社）

遺伝子治療の体内動態的特徴

- 増えない。
- 細胞に感染後、DNAのみ核へ移行。カプシドはlysosomeに取り込まれ、分解される。
- ホストの染色体に組み込まれることはない。
- 核へ移行後、ずっとそこにいる。（エピソーム性）
- 主に、分裂しない細胞に感染し、ずっとそこにいる。
- 分裂する細胞に感染すると、gDNAが細胞分裂の際に希釈される。
- 分裂しない細胞の場合、細胞死によってのみ消失する。
- カプシドにより、感染効率や各臓器への指向性が異なる。



遺伝子治療とは、組織内（細胞内）でタンパク質をほぼ一定濃度で恒常的に暴露させる技術

ICH S12ガイドライン草案

医薬品規制調和国際会議（2021年6月3日改訂）「遺伝子治療製品の非臨床生体内分布の考え方」
<https://public-comment.e-gov.go.jp/servlet/PcmFileDownload?seqNo=0000222846>

ICH 調和ガイドライン

遺伝子治療製品の非臨床生体内分布の考え方

S12

草案版

2021年6月3日承認

1. 緒言
2. 非臨床BDの定義
3. 非臨床BD評価の実施時期
4. 非臨床BD試験のデザイン
5. 個別留意事項
6. 非臨床BD試験の適用

ICH S12ガイドライン草案（BAに関する部分を抜粋）

医薬品規制調和国際会議（2021年6月3日改訂）「遺伝子治療製品の非臨床生体内分布の考え方」
<https://public-comment.e-gov.go.jp/servlet/PcmFileDownload?seqNo=0000222846>

5.1 分析法

- BDプロファイルを評価するためには、組織や体液中のGT製品の遺伝物質（DNA/RNA）の量 及び、必要に応じて、発現産物の量を測定する必要がある。
- リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）は、組織や体液中に存在する特定の DNA（又は、逆転写ステップによりRNAも同様）を測定する「ゴールドスタンダード」と考えられている。
- 上記以外の手法として、ELISA, IHC, WB, ISH, dPCR, FCM, 及び様々なイメージング技術、その他進化しつつある技術等が挙げられる。

5.2 発現産物の測定

- GT製品の遺伝物質の定量が主要な BD 評価であるのに対し、様々な組織や体液中の発現産物の濃度を測定することは、GT製品投与後の安全性及び活性プロファイルの特性解析に役立つ。

ICH S12ガイドライン草案（BAに関する部分を抜粋）

医薬品規制調和国際会議（2021年6月3日改訂）「遺伝子治療製品の非臨床生体内分布の考え方」
<https://public-comment.e-gov.go.jp/servlet/PcmFileDownload?seqNo=0000222846>

5.4 免疫原性

- 動物、特にヒト以外の霊長類及びその他の非げっ歯類におけるGTベクターに対する既存免疫は、BDプロファイルに影響を及ぼす可能性がある。非臨床試験に組み入れる前に、ベクターに対する既存の免疫について動物のスクリーニングを検討すべきである。
- 場合によっては、発現産物の種特異的性質のために、動物で発現産物に対する細胞性又は液性免疫応答を生じる可能性がある。また、GT製品投与後にベクターに対する細胞性免疫応答が生じる可能性もある。この免疫応答により、有益なBDプロファイルが得られない可能性がある。このような状況が予想される場合、申請者は、BDデータの解釈を裏付けるために、免疫原性の可能性に関する解析に適した試料の採取及び保管を検討することができる。

ウイルスとベクターの排出に関して -ICH見解-

厚生労働省医薬食品局審査管理課/厚生労働省医薬食品局 医療機器・再生医療等製品担当参事官室
(平成27年6月23日)『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」について』
<https://www.pmda.go.jp/files/000206059.pdf>

ICH Considerations

ICH 見解

General Principles to Address Virus and Vector Shedding

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

1. 序
2. ウイルス/ベクターの生物学的特性
3. 分析法に関する考慮事項
4. 非臨床での考慮事項
5. 臨床での考慮事項
6. 第三者への伝播

ウイルスとベクターの排出に関して -ICH見解-

(BAに関する部分を抜粋)

厚生労働省医薬食品局審査管理課/厚生労働省医薬食品局 医療機器・再生医療等製品担当参事官室
(平成27年6月23日)『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」について
<https://www.pmda.go.jp/files/000206059.pdf>

3.0 分析法に関する考慮事項 (臨床)

- 排出試験の実施には、適格な分析法を用いることが非常に重要である。分析法は、特異性、十分な感度、再現性を示すものである必要がある。
- 排出されたウイルス/ベクターの検出には、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) と感染性試験の2つの方法が通常用いられる。ウイルス/ベクターの遺伝子配列の検出には定量的PCR (qPCR) に基づく分析法の使用が推奨される。qPCR 法の利点は、高感度、再現性、迅速性である。
- 感染性試験は、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するという利点がある。感染性試験の主な欠点は、PCR 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。
- qPCR 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、という選択も可能である。

ウイルスとベクターの排出に関して -ICH見解-

(BAに関する部分を抜粋)

厚生労働省医薬食品局審査管理課/厚生労働省医薬食品局 医療機器・再生医療等製品担当参事官室
(平成27年6月23日)『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」について』
<https://www.pmda.go.jp/files/000206059.pdf>

4.0 非臨床での考慮事項

- ・非臨床の排出試験データは臨床での排出試験を計画するのに役立つ。非臨床の排出試験の目的は、ウイルス/ベクターの分泌/排泄（による排出）のプロファイルを決定することである。

4.4 サンプルの採取

- ・ウイルス/ベクターの特性、投与経路、及び動物種を考慮して、採取するサンプルを決定すべきであろう。最も一般的に採取されるサンプルの例は尿と糞便であるが、他に口腔スワブ（ぬぐい液）、鼻腔スワブ、唾液、気管支洗浄液などのサンプルも含めることができる。

このDGでフォーカスする部分

	測定対象 (想定)					
	gDNA	ベクター (カプシドなど)	mRNA	発現蛋白	ベクターの 免疫原性	発現蛋白の免 疫原性
測定対象かどうか (BAとして)	◎	○, △			◎	○, △
測定対象かどうか (BMとして)		○	○	○	△	△
測定対象、内容	投与された AAV中の gDNA	AAVなど各種 ウイルス、脂 質膜等	発現mRNA	発現蛋白	・中和抗体 ・Total抗体 ・細胞性免疫	・Total抗体 ・細胞性免疫 ・その他
測定法	主にqPCR, ddPCR	LBA LC/MS/MS	主にRT- qPCR	LBA LC/MS/MS WB, IHC,	・感染実験等 ・LBA ・ELISpot	LBA, ELISpot

★ BA

- ◎ gDNAのBA
- ・ベクターのBA
- ・発現蛋白のBA

★ 免疫原性

- ◎ ベクターの免疫原性
- ・発現蛋白の免疫原性



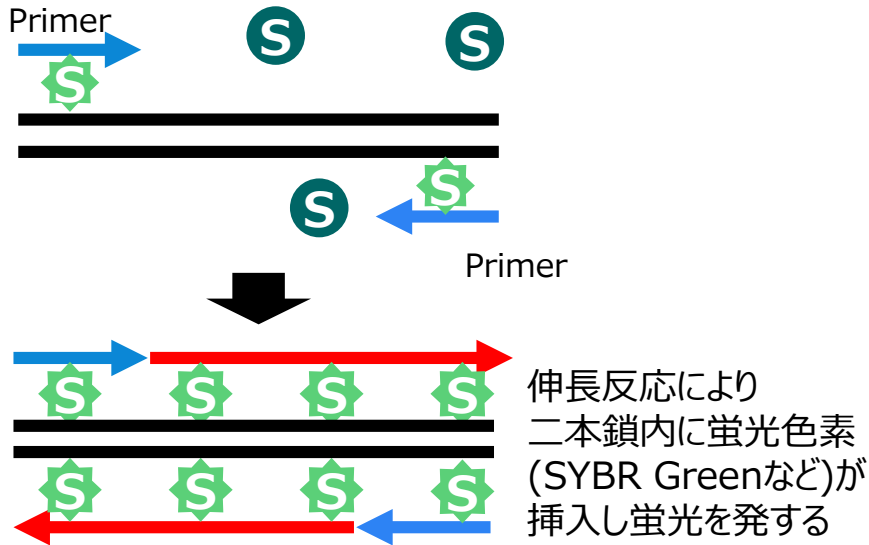
gDNAのバイオアナリシス

- qPCR, dPCR, ddPCRの特徴及び使い分け
- 遺伝子の中のどこを測定するか？
- Validation, criteriaについての考え方

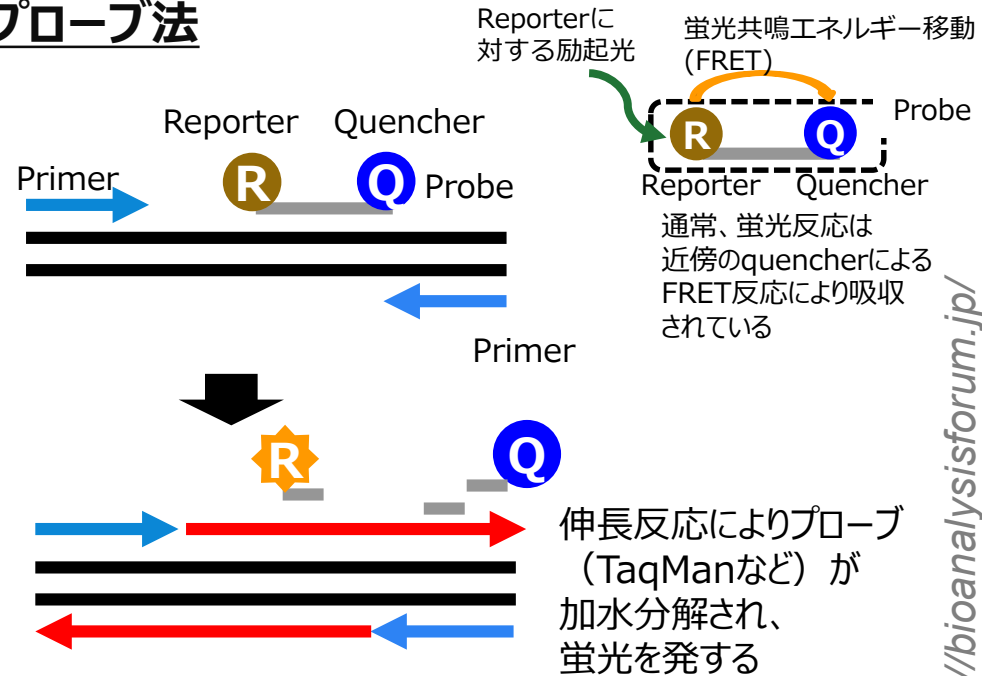


qPCRの基本原理

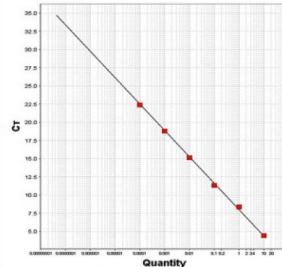
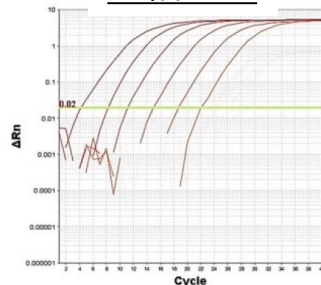
インターカレーション法



プローブ法



蛍光の強度を測定し、DNA量を評価
増幅曲線 検量線



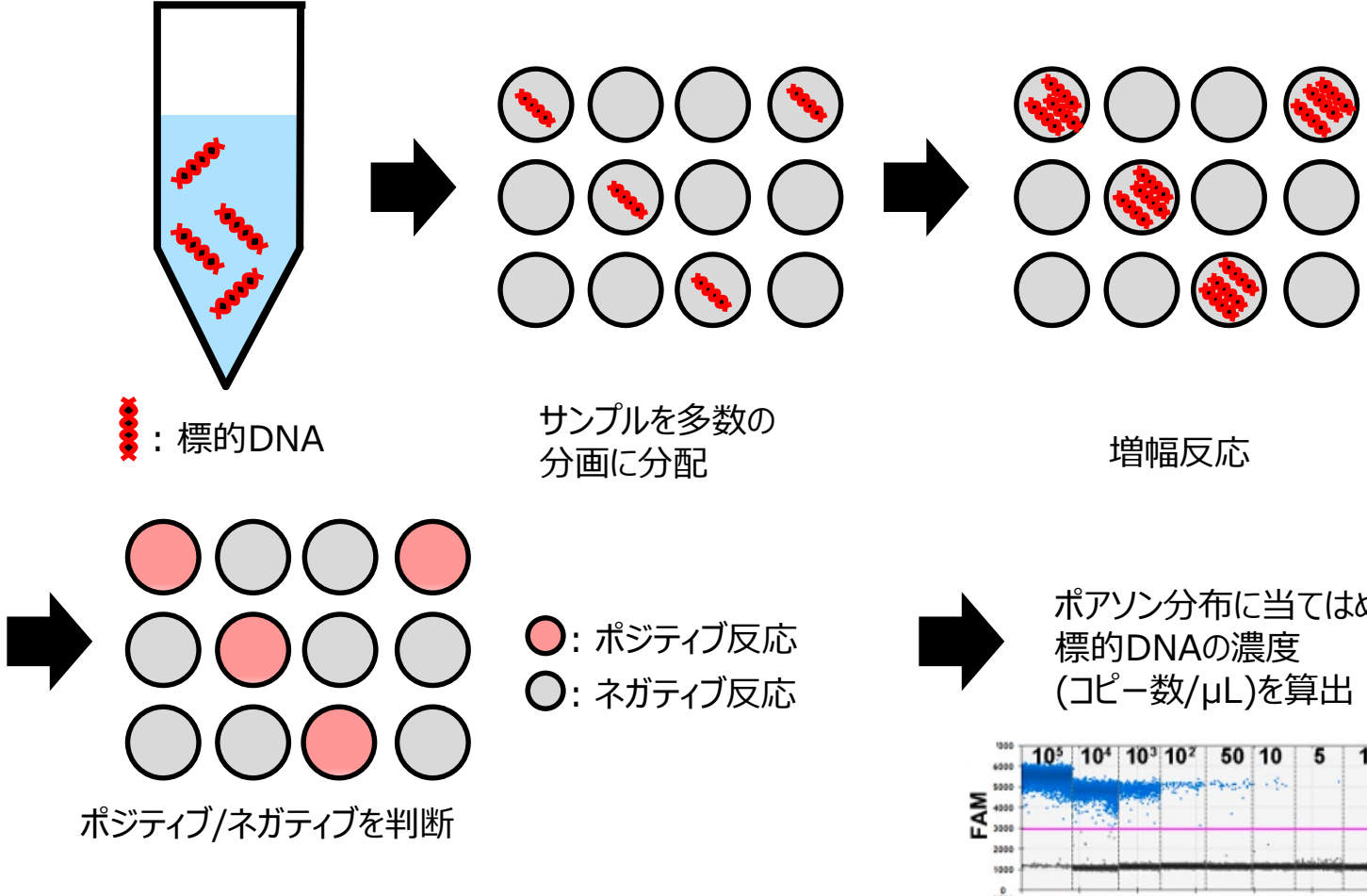
Int J Mol Sci. (2020) 21(9):3043.

	インターカレーション法	プローブ法
測定原理	二本鎖内に挿入した 蛍光色素を検出	加水分解されたプローブの 蛍光色素を検出
Multiplex	不可	可
操作性	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 専用のプローブを必要としない ✓ 増幅遺伝子配列に依存せず 使用可能 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 増幅遺伝子配列毎に専用の プローブが必要
特異性	低	高
ランニング コスト	一般的に低	一般的に高
	(最適化などの回数・程度などにより変動)	

<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html>
リアルタイムPCRの TaqMan® Chemistry と SYBR® Chemistry の比較 (ThermoFisher SCIENTIFIC)



dPCR及びddPCRの基本原理



http://bioanalysisforum.jp/

Anal Chem. (2018) 90(15):8919-8926.

dPCRの内、Droplet (液滴) によるサンプル分配法をddPCR

各プラットフォームの比較

	qPCR	dPCR/ddPCR
定量範囲	9 Log程度	4 Log程度 (機種により異なる)
精度/再現性	中程度	高い
検量線	必要 (相対定量)	不要 (絶対定量)
Throughput	高い	低い
Multiplex	実施可能	
マトリックスなどの阻害物質による耐性	低い	高い
操作性/扱いやすさ	簡便	専門性が必要
ランニングコスト	低い	高い (専用機器/キットなどが必要)
主なアプリケーション	<ul style="list-style-type: none"> • Rare mutation detection • CNV • Nucleic acid standard validation • NGS 	<ul style="list-style-type: none"> • Microarray validation • siRNA, miRNA, lncRNA detection • Gene expression • Pathogen detection

SLAS Technol. (2017) 22:369–86.

<https://www.bio-rad.com/ja-jp/life-science/learning-center/digital-pcr-and-real-time-pcr-qpcr-choices-for-different-applications?ID=OENHBB15>

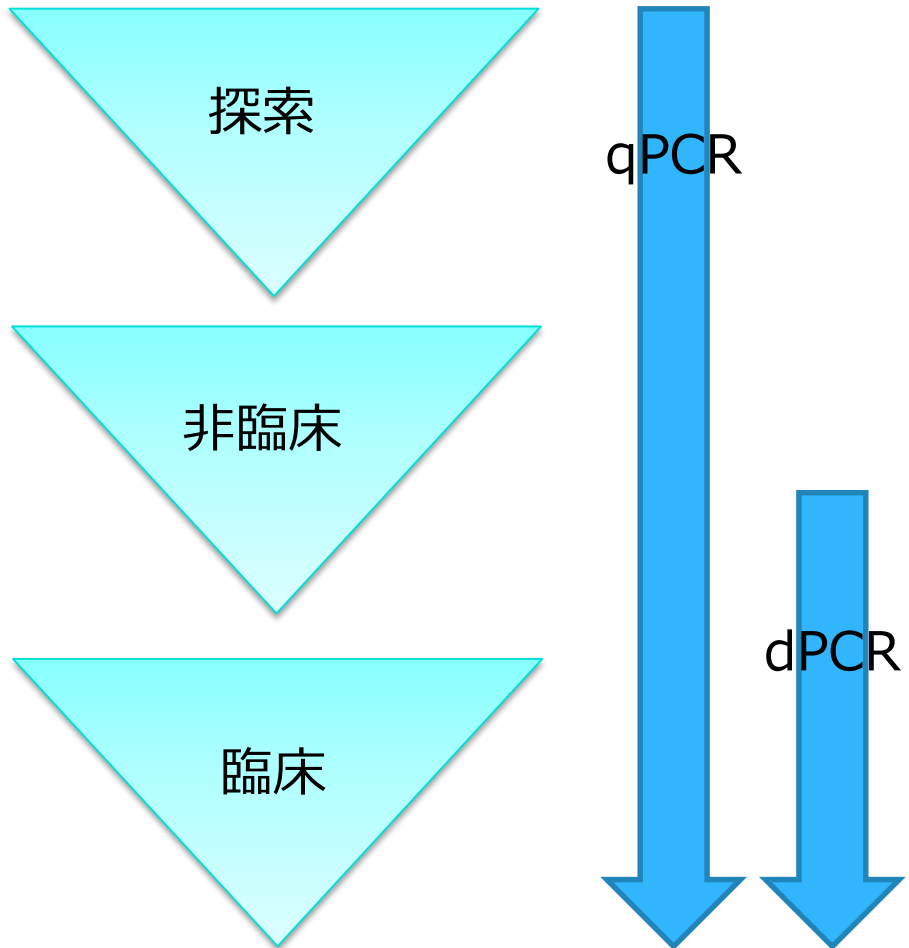
Digital PCR and Real-Time PCR (qPCR) Choices for Different Applications (BIO-RAD)

各プラットフォームのPros/Cons

	qPCR	dPCR/ddPCR
Pros	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 広い定量範囲 ✓ High throughput ✓ 高い汎用性 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 絶対定量の為、標準品や検量線が不要 ✓ 高い感度/精度/再現性 ✓ 高い阻害物質耐性
Cons	<ul style="list-style-type: none"> ✓ マトリックス等による影響を受けやすい 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 高コスト ✓ 専門性

測定におけるdPCR/ddPCRのアドバンテージは大きいですが、新規技術である点、コスト面などにより現状ではqPCRと比較して実績は少なく、まだ発展途上。

gDNA測定： 創薬ステージでの各プラットフォームの利用状況



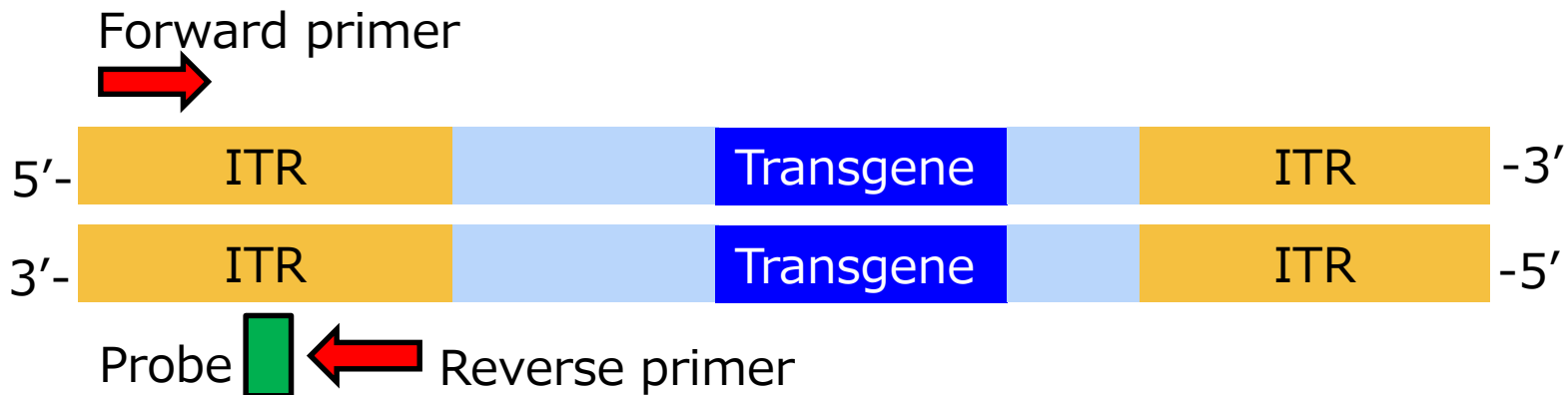
- ・創薬初期はもっぱらqPCR。
- ・dPCRは現在は主にtitrationに用いられている。
- ・開発ステージでも現時点ではqPCRの使用実績が多いが、FDAのガイドライン（LOQとして50 copies/ μ g gDNA）を満たすためにdPCRが有用であるならば、今後dPCRが増える可能性がある。

gDNA測定 遺伝子の中のどこを測定するか？

探索段階でのプライマー、プローブ配列選択

目的遺伝子配列 (GOI) を最適化するまでの間は、ITR認識プライマー、プローブなど、**共通のプライマー、プローブ**を使用することにより**迅速評価**可能

例) ITR領域に設計



gDNA測定 遺伝子の中のどこを測定するか？

GOI決定後のプライマー、プローブ配列設計

GOIとベクター特異的配列を跨ぐかたち、あるいはGOI内に
プライマー、プローブを設計し、**良いものを選ぶ**

より望ましいプライマー、プローブ

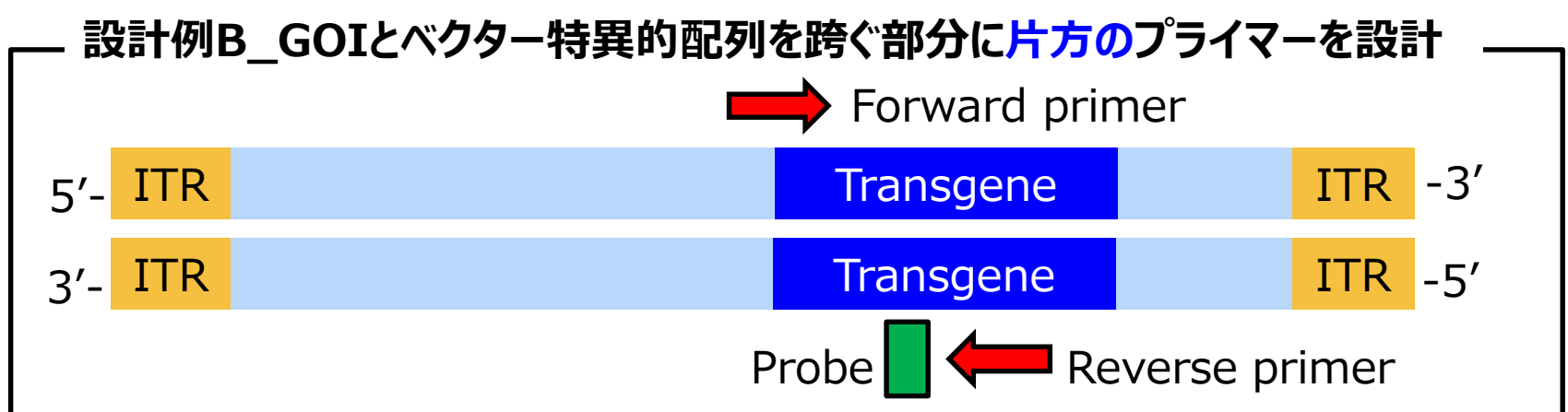
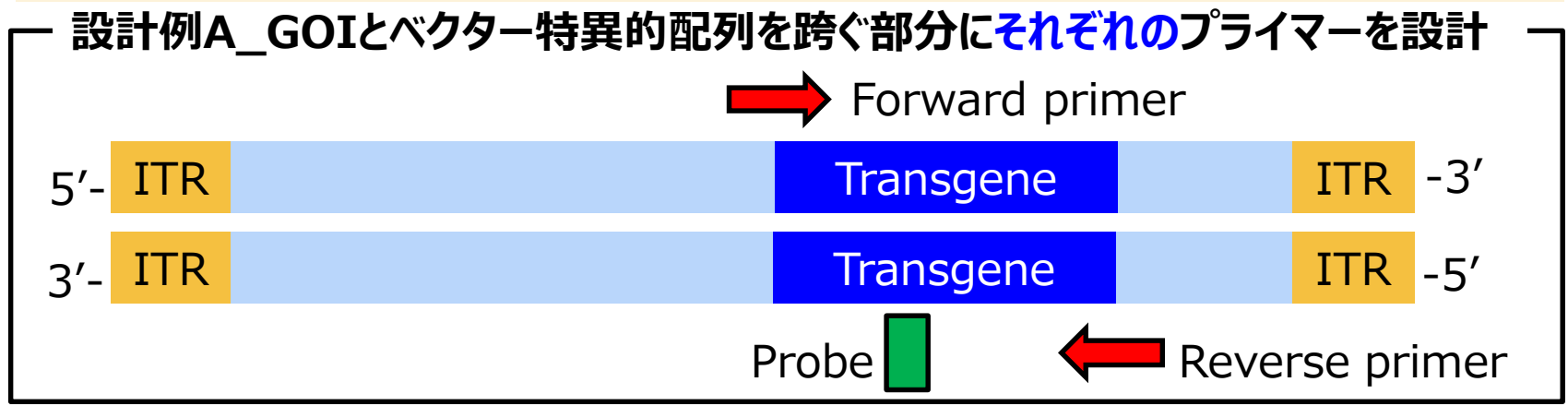
- 増幅効率が良い
- 特異性が高い（非特異的検出が認められない）
- 目的遺伝子配列を特異的に増幅する
他の内在性遺伝子が検出されないことをBLAST等の*in silico*
ツールを用いて確認する

良いものという意味ではITR認識プライマー、プローブも可



gDNA測定 遺伝子の中のどこを測定するか？

最も推奨する設計_優先順位① (理想はA、設計困難であればBのパターン)
ベクター特異的配列とGOIを跨ぐ部分にプライマーを設計し、目的遺伝子を特異的に増幅・検出

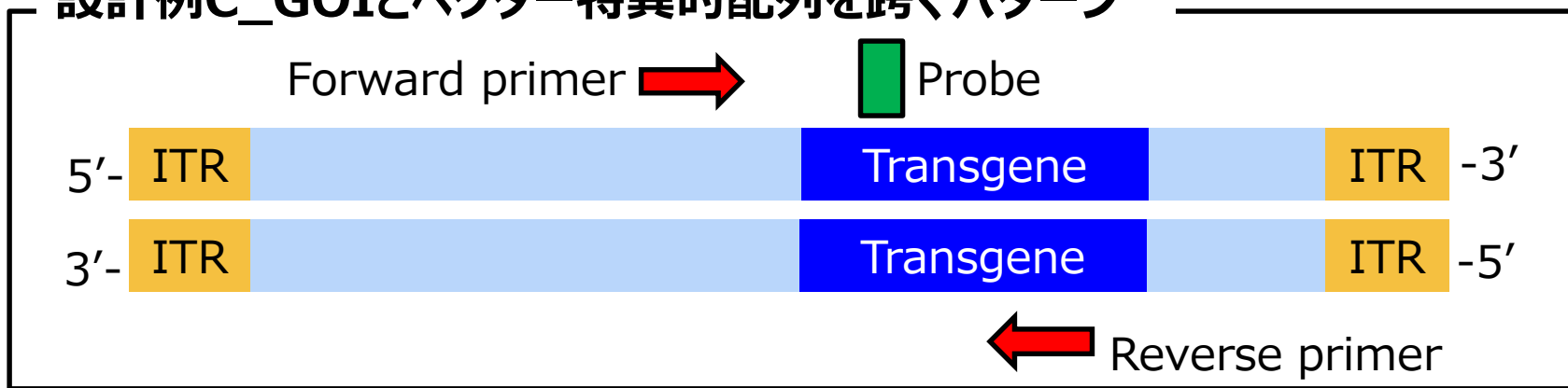


http://bioanalysisforum.jp/

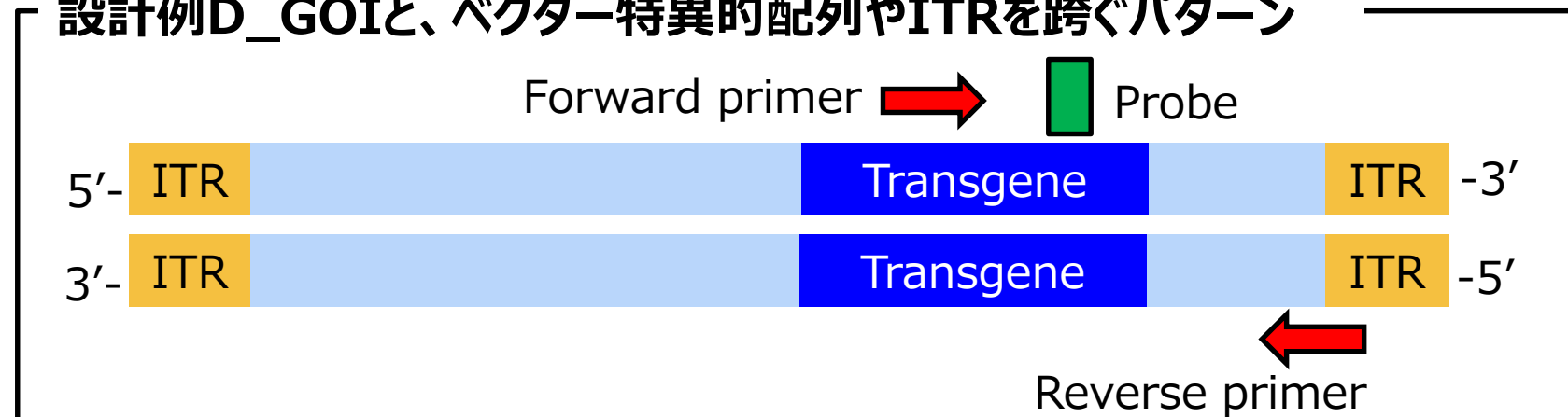
gDNA測定 遺伝子の中のどこを測定するか？

優先順位② **ベクター特異的配列からGOIにかけて増幅し、目的遺伝子を特異的に増幅・検出**

設計例C_GOIとベクター特異的配列を跨ぐパターン



設計例D_GOIと、ベクター特異的配列やITRを跨ぐパターン

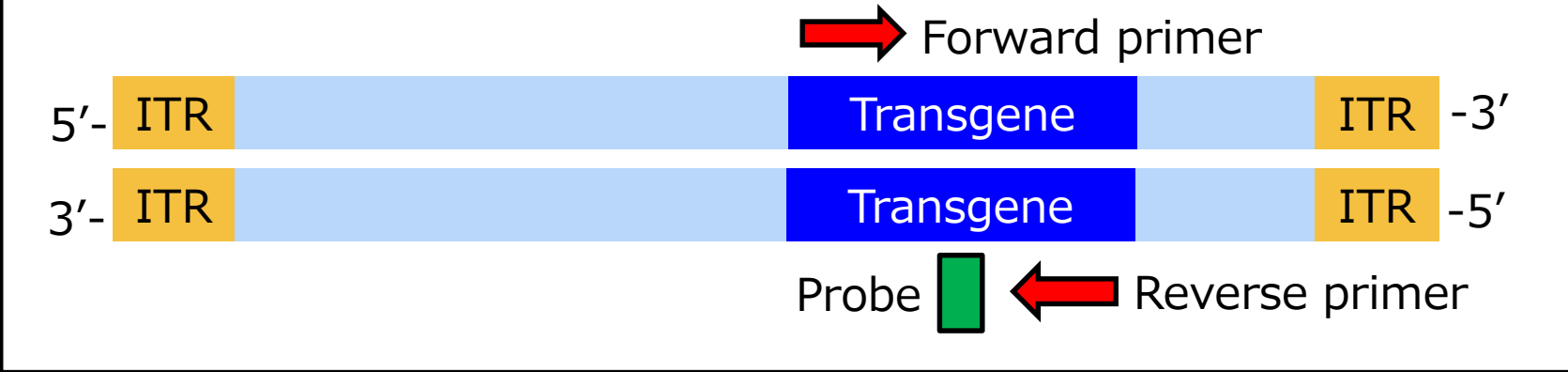




gDNA測定 遺伝子の中のどこを測定するか？

優先順位③ GOIを増幅・検出
(優先順位①②の設計と比較して、特異性は少し低い)

設計例E_GOI内に設計するパターン



<http://bioanalysisforum.jp/>

qPCR: Validation, criteriaについての考え方

— DG2017-33のおさらい —

項目	適合基準
真度及び精度	現状を考慮すると50%程度
検量線	$r^2 \geq 0.98$, 増幅効率が85~110%
特異性	試薬コントロールと動物gDNAの両方で増幅が認められない、あるいは動物gDNAで増幅が認められてもCq値の差 < 1.5 、または定量下限との乖離の差で妥当と判断することもありうる
マトリックス効果	動物gDNA原液 vs. H ₂ O or bufferにQCサンプルをスパイクし、その間でCq値差が < 1.5 、検量線slopeが $-3.6 \sim -3.1$ 。阻害が認められる場合、 ・DNA抽出法の再検討、 ・希釈の適用 ・定性的な判断に用いる
定量下限	真度及び精度のクライテリアを満たす最低濃度
検出限界	95%信頼性で検出できる濃度
安定性	Cq値変動が < 1.5

選択性、キャリーオーバー、希釈直線性は必要なし。



Validation, criteriaについての考え方 :

参照論文リスト

文献・資料	内容	表記
DG2017-33 : qPCRを用いた定量におけるバリデーションの考え方	2017年JBFシンポジウム DGからの発表 http://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/9th_JBF_DG2017-33.pdf	DG2017-33
Mol Ther Methods Clin Dev. (2021) 20:152-168.	米国CRO: Northern Biomolecular Servicesが著者のqPCR評価基準に関するReview	NBS
Bioanalysis (2021) 13(6):415-463.	第14回WRIBワークショップでの議論内容をまとめたReview	WRIB 2020-3
Guidance for Industry: Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products	FDA発行ガイダンス: ヒトGT製品長期フォローアップ試験の推奨事項まとめ https://www.fda.gov/media/113768/download	FDA Guidance_1
Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Nucleic Acid Sequence-Based Analysis of Food, Feed, Cosmetics and Veterinary Products Edition 1.1	FDA発行ガイドライン:DNA配列分析法バリデーション https://www.fda.gov/media/121751/download	FDA Guidance_2
以下はDG-50での参照論文	(備考)	
Clin Chem. (2009) 55(4):611-622.	MIQE Guideline	
Bioanalysis (2019) 11(24):2207-2244.	WRIB white paper 2019-3	
Bioanalysis (2018) 10(22):1781-1801.	WRIB white paper 2018-1	
Bioanalysis (2018) 10(24):1973-2001.	WRIB white paper 2018-3	

Validation/criteriaの比較 (1/6)

Item	Acceptance criteria			備考、コメント
	DG2017-33	NBS	WRIB2020-3	
Calibration curve	AE: 85% - 110% R ² >0.980	AE: 90% - 110% R ² >0.980	AE: 90%(85%) - 110%	FDA Guidance_1
LLOQ	LLOQ: lowest standard level with acceptable assay precision and accuracy	%RE <±25% (<±45% for LLOQ)	Some assays meet LBA criteria based on COU	LLOQ: ≤50 copies/ug gDNA with 95% confidence
LOD	LOD: the lowest standard level with 95% confidence	Ct %CV ≤ 2.0% in duplicate (≤ 3.0% for inter assay)	(%CV %RE<20%, <25% for LOQ)	FDA Guidance_2
		LLOQ:50 copies/ug gDNA with 95% confidence (50 copies/reaction for shedding)	LLOQ:50 copies/ug gDNA	LLOQ: all 12 replicates are positive with %CV ≤ 50%.
		LOD: the lowest standard level, which gives a Ct ≤40 in all replicates tested throughout the 5 vali-runs.	LOD: Y intercept using a standard calibration curve (theoretical LOD)	LOD: all 12 replicates are positive with 95% confidence
		> 75% and a minimum of seven non-zero standard concentrations, LLOQ~ULOQ, should meet the above criteria in each validation run		

<http://bioanalysisforum.jp/>

本DG見解 増幅効率、決定係数、定量限界、検出限界の推奨基準はDG33を継続。NBS論文の相対誤差及びCq値変動係数の基準を満たすケースは限定的。

Validation/criteriaの比較 (2/6)

Item	Acceptance criteria			備考、コメント
	DG2017-33	NBS	WRIB2020-3	
Within-run/ Between run precision & accuracy	%CV ~<50.0% %RE ~<±50.0%	%CV <25% (<45% for LLOQ) %RE <±25% (<±45% for LLOQ)	<満たす場合がある> Some assays meet LBA criteria based on COU %CV & %RE <20%, (<25% for LOQ)	しっかりと基準を示したガイドラインはない。 COUに合わせて Sponsorが設定。 FDA Guidance_2 %CV <25% %RE <±25%

本DG見解

適切なPrimer設計 (in silico活用) 及び予備試験 (3 setを目安) を実施。
 その上で、%CV及びRE : 45~50%以内を判断の基準に使うことを推奨。
 (Cq ±0.5=変動幅70.7~141%:2^{±0.5}、各社の経験を参照して考察)
 臨床用にprimerの再設計が必要なケースも考えられる。
 NBS論文の変動係数及び相対誤差の基準を満たすケースは限定的。

Validation/criteriaの比較 (3/6)

Item	Acceptance criteria			備考、コメント
	DG2017-33	NBS	WRIB2020-3	
Specificity	NTC and NC: undetermined or Cq > LLOQ (>1.5)	All naïve DNA samples should test BLOD (Lack of amplification or BLOD). Naïve DNA samples: Biodistribution : pool of matrix DNA from tissues at least 3 animals, including at least 1 male Vector shedding : DNA from each type of sample from 3 to 6 hosts, including at least 1 male	NTC and baseline should be clear & clean. (distinguish GOI & interfering endogenous gene)	FDA Guidance_2 BLASTなどで適切な In silico設計、及び 実験 (w/wo標的) で確認

<http://bioanalysisforum.jp/>

本DGの見解

原則として、NTC/NCが増幅されないことを推奨。Primer設計位置を考慮する（P26-30参照）。標的特異性により、困難な場合はNTC/NCに対してCq値1.5以上の差を確保することを推奨。LLOQを定量的に定義できることを判断基準とする。

Validation/criteriaの比較 (4/6)

Item	Acceptance criteria			備考
	DG2017-33	NBS	WRIB2020-3	
Matrix effect (ME) 代替	$\Delta Cq < 1.5$ Matrix DNAs from tissues vs H ₂ O/Buffer AE: 90% - 110% (-3.6~-3.1) If not, reconsider DNA extraction, dilution, or use for qualitative purpose.	$\%CV < 25\%$ (<45% for <UL) $\%RE < \pm 25\%$ (< $\pm 45\%$ for <UL) of spiked copies of target DNA each DNA sample is run in triplicate; however, the third well is spiked with a known copy number of the target DNA to monitor any amplification inhibition. It is recommended that the matrix effect from each type of tissue/sample is evaluated for each new strain and species.	Calibrator material should be equivalent or very similar to test samples.	FDA参照資料にクライテリアとしては記載なし

<http://bioanalysisforum.jp/>

本DG見解

DG-33推奨基準は継続。ただし、真度/精度がとれていれば、同一matrix内、もしくは代表臓器(肝臓など)を代替matrixとして測定することは可能と考える。
 実測の際に、n=3の1つに既知濃度を添加し、増幅阻害について確認することを推奨。
 NBS論文の変動係数及び相対誤差の基準を満たすケースは限定的。

Validation/criteriaの比較 (5/6)

Item	Acceptance criteria			備考
	DG2017-33	NBS	WRIB2020-3	
Recovery test	設定なし	<p>30% - 80% can be expected from most of sample types.</p> <p>Vector: Recovery from biofluid samples and clinical shedding samples should be demonstrated using the validated assay.</p> <p>DNA: recovery from various animal tissue and blood samples should be established when setting up the qPCR. It is not necessary to evaluate every sample type for every study if the analytical site has an established DNA extraction method.</p>	<p>Spike recovery with qualified internal control in samples is preferable to assess for interference.</p> <p>Extraction efficiency can be evaluated with encapsulated ss/ds DNA or cloned/synthesized DNA</p>	FDA参照資料にクワイテリアとしては記載なし

<http://bioanalysisforum.jp/>

本DG見解

Sheddingを評価する際に回収率の基準を考慮する。

/ g tissueで臓器間比較や糞中排泄、または/ mLで尿、唾液排泄を考察する際は回収率のばらつきについて考慮する。

各社の経験では一般的な回収法で10~20%程度が目安。

30%以上回収できるケースは限定的で最大50%程度。

Validation/criteriaの比較 (6/6)

Item	Acceptance criteria			備考
	DG2017-33	NBS	WRIB2020-3	
Stability	$\Delta Cq < 1.5$ 凍結融解や LTSの細分化 は未実施	For g DNA QC; freeze-thaw stability (2QC set, 3cycles at 1 validation) %CV <25%(<45% for <UL) %RE < $\pm 25\%$ (< $\pm 45\%$ for <UL) For TA vector; benchtop and storage stability of all clinical matrices 30-170% compared to t0	Storage for each matrix and DNA using spike in controls and processing For long term calibrators, it is preferred to use cGMP material but research lots may be used with bridging	FDA参照資料 に記載なし

本DG見解

<抽出後のgDNA>

凍結融解：3 cycleの凍結融解安定性評価を推奨。

短・長期安定性：ヌクレアーゼの混入がなければ、-80℃で保管可能（評価は必須でない）。

<Test article>

検討が必要な項目は他のmodalityと同じと考えるが、基準については引き続き要議論。

NBS論文の変動係数及び相対誤差の基準を満たすケースは限定的。

Validation/criteriaの比較 (ext: ISR)

Item	Acceptance criteria			備考
	DG2017-33	NBS	WRIB2020-3	
ISR	記載なし	>67% of sample <±45% of mean value. (required for clinical studies in which a larger sampling pool is accumulated)	現状なし。 Limited data is available for ISR to understand the suitable criteria	FDA参照資料に記載なし

本DG見解

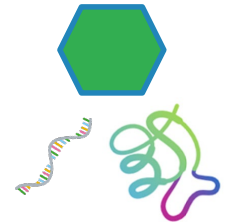
ISRについては現時点での基準設定は難しく、知見の蓄積が必要。

qPCRバリデーション項目と適合基準（2021年版！）

項目	適合基準
真度及び精度	適切なprimer設計（in silico活用）及び予試験（3 setを目安）を実施した上で、%CV及びRE：45~50%以内を判断の基準に使うことを推奨。
検量線	$R^2 \geq 0.98$, 増幅効率が85~110%
特異性	NTCとNCの両方で増幅が認められないことを推奨。困難な場合はCq値の差<1.5を確保。LLOQを定量的に定義できることを判断基準とする。
マトリクス効果	動物gDNA原液 vs. H ₂ O or bufferにQCサンプルをスパイクし、その間でCq値差が<1.5、検量線slopeが-3.6~-3.1。阻害が認められても、同じマトリクスで真度/精度がとれていればOK。
代替マトリクス	真度/精度がとれていれば、代表臓器（肝臓など）を代替マトリクスとして用いることは可能と考える。
定量下限	真度及び精度のクライテリアを満たす最低濃度。
検出限界	95%信頼性で検出できる濃度。
回収率	Sheddingの評価に回収率の基準を考慮。
安定性	抽出後のgDNAについて3 cycleの凍結融解安定性を評価。及び短・長期安定性。基準は真度及び精度のクライテリアを踏襲。

gDNA以外のバイオアナリシス

- ・ベクター（カプシドなど）のバイオアナリシス
- ・mRNA, 発現蛋白のバイオアナリシス





ベクター：AAVなどのウイルスベクター、脂質ナノ粒子（LNP）など

- 毒性、副作用が認められる場合はconcernが生じるので、測定の必要あり。
- 封入率の評価などには用いるが、毒性が無いかぎりにはBAには積極的には用いない。（薬効本体とは関連性が薄いため）
- カプシド蛋白は主にLBAで測定。
- LNPは新規成分については測定が必要。（LC/MS/MS）



(発現蛋白)

- 薬効に直接繋がる**バイオマーカー**であり、測定は必須。
- ただし、標品の入手が難しい場合もあり、対応は一様ではない。
- 項目や基準はcase by case。
- 臨床で測るときはバリデーション実施。非臨床ではバリデーションは必須としない。
- 分析法は主にLC/MS/MSまたはLBA。IHCやWBを実施するときは主に定性（BAとは目的が異なる）。

(mRNA)

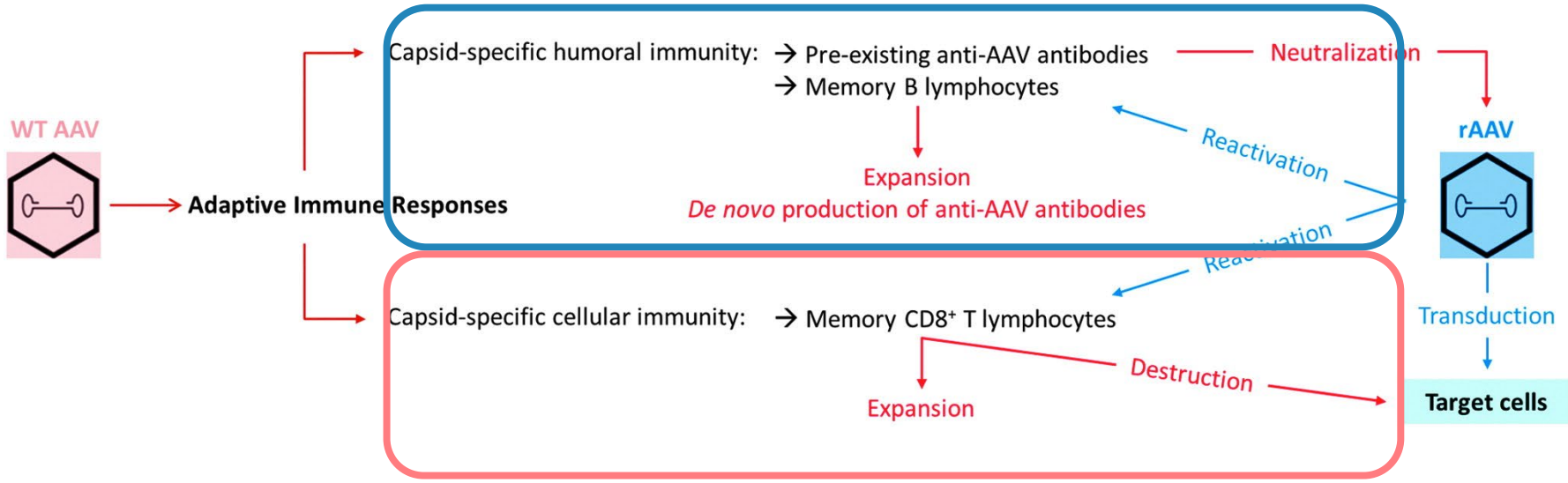
- RT-qPCRで実施。簡易的にバリデーションを実施。
- 特異的な配列で検出するか、内因性も含めて検出するかは、目的に応じてcase by caseで考える。



ベクターの免疫原性

Total抗体、中和抗体、細胞性免疫

【Humoral Immunity】
TAb assay, NAb assay



【Cellular Immunity】
ELISpot

Hum. Gene Ther. (2017) 28(11):1061-1074.

<http://bioanalysisforum.jp/>

- ◆ 遺伝子治療製品では、AAVウイルスを利用して創薬開発されている例が多くある。
- ◆ AAVは自然界に存在するウイルスなので、既感染に伴い抗AAV抗体が血中に存在する可能性がある。
- ◆ AAVはヒト及び霊長類に感染するので、AAVを利用した遺伝子治療薬をヒトに投与する場合や、サルを使用した非臨床試験を実施する際には抗AAV抗体の有無を予め検査することが大切である。
- ◆ 体内に存在する抗AAV抗体が中和抗体の場合、投与したAAV製剤は中和されてしまうため**効果が減弱**する可能性が危惧される。
- ◆ また、体内でIgE抗体などが産生されている場合はアナフィラキシーのような**アレルギー反応**が生じる懸念もある。

Prevalence of anti-AAV

TABLE 1. PREVALENCE OF NEUTRALIZING ANTIBODIES AGAINST AAV SEROTYPES

Study	Dilution	AAV1	AAV2	AAV5	AAV6	AAV7	AAV8	AAV9
Boutin <i>et al.</i> , 2010	1/20	50	59	3	37		19	33
Chirmule <i>et al.</i> , 1999	1/20 (?)		32					
Murphy <i>et al.</i> , 2009	1/3.1		38					
Calcedo <i>et al.</i> , 2009; Australia	1/20	30	35			29	27	
Calcedo <i>et al.</i> , 2009; Europe	1/20	27	35			25	22	
Calcedo <i>et al.</i> , 2009; Africa	1/20	43	56			31	31	
Calcedo <i>et al.</i> , 2009; United States*	1/20	20	28			12	14	
Halbert <i>et al.</i> , 2006*			30	18	30	14	30	
Parks <i>et al.</i> , 1970	1/10		40					
Blacklow <i>et al.</i> , 1968	1/10		40					
Ito <i>et al.</i> , 2009	1/20		40					
Moss <i>et al.</i> , 2004	?		32					
Wagner <i>et al.</i> , 2002	1/20		22					
Erles <i>et al.</i> , 1999*			50	50				
Veron <i>et al.</i> , 2012	1/2	59						
Mingozzi <i>et al.</i> , 2012a	1/10		82	27	64		50	
	1/3.1		100	36	91		90	

The numbers in the columns of specific AAV serotypes indicate the percentage of subjects whose serum inhibited transduction by $\geq 50\%$ at the indicated serum dilution.

*Approximate values.

Hum. Gene Ther. Methods (2013) 24:59-67.

投与前から抗AAV中和抗体を有している患者がいる可能性がある。

4～8歳カニクイザル50匹の中和抗体保有率

Table 1 Prevalence of neutralizing antibodies against AAV

Serotype	AAV2	AAV5	AAV8	AAV9
No. of animals	50	50	50	50
No. of positive	45	39	44	31
% of positive	90	78	88	62

福田剛司他, 第48回日本毒性学会学術年会

カニクイザルの抗AAV抗体保有率は非常に高い！！
 ⇒ サルで安全性試験を実施する際には、事前に
 NAbを測定して抗AAV抗体を保有していない個体を
 選別しないと試験が成立しない。

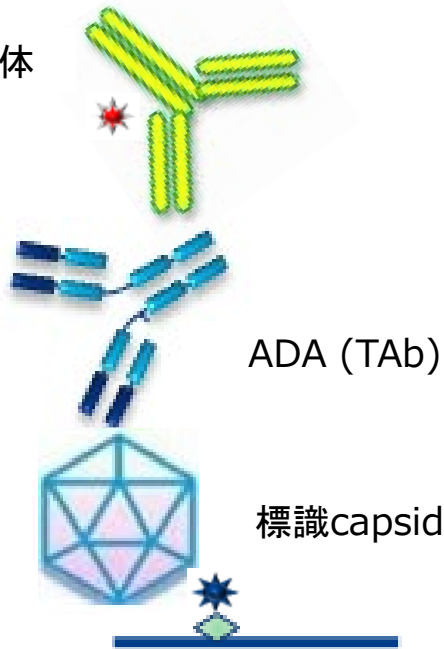




免疫原性：TAb及びNAb評価方法

TAb測定例：薬物とのサンドイッチassay

標識検出抗体

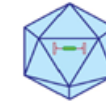


ADA (TAb)

標識capsid

NAb測定例：Cell based assay

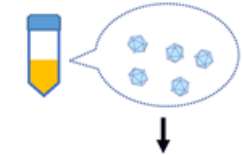
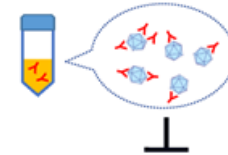
Recombinant AAV expressing firefly luciferase



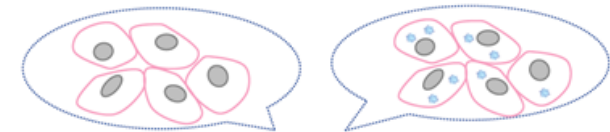
Pre-existing NAb

NAb negative

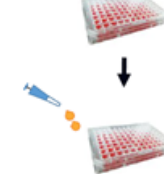
AAV infection of HEK293 cells



AAV infection of HEK293 cells



Chemiluminescent luciferase substrate



Chemiluminescence detection



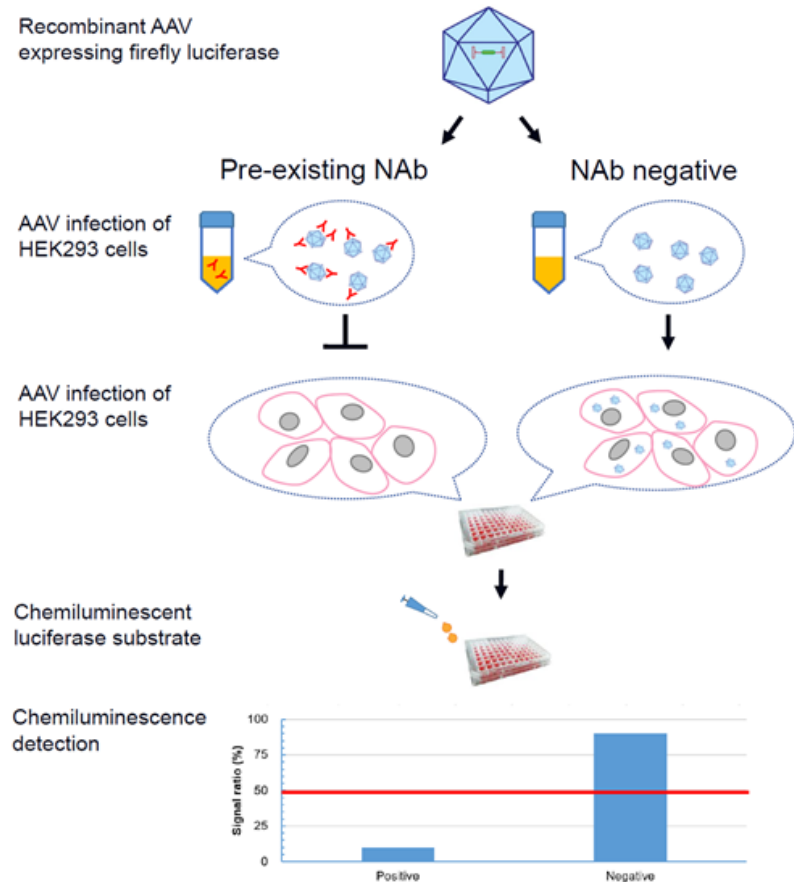
福田剛司他, 第48回日本毒性学会学術年会

抗体などのNAb測定法として、右記 Cell based assayのほか、競合 ELISA法が一般的に用いられている。

しかしながら、P8に示す通り、AAVのレセプターは1つではなく、さまざまな分子がレセプターまたコレセプターとして働くことが報告されている。

このため、レセプターが1つであることを前提とした競合ELISA法はAAVのNAb assayには相応しくなく、現時点ではCell based assayが第一選択になると考える。

NAb測定例:Cell based assay



中和抗体 ? 総抗体 ?

【Question】

総抗体 (TAb) と中和抗体 (NAb) どちらを測定すべきか ? ?

【TAb】

- ◆ AAVに結合するすべての抗体を測定する。
- ◆ LBAで測定する。

【NAb】


- ◆ AAVの感染を中和する抗体を測定する。
- ◆ 培養細胞を使って測定する。

薬効を考えるなら、NAbを測定する方が意味があるだろう。

一方、アナフィラキシーなどのリスクを考慮するならばTAbを測定すべきではないか。

中和抗体 ? 総抗体 ?

- ◆ TAbとNAbの測定結果に相関はあるのだろうか ???
⇒現時点ではわからない。
- ◆ まずはTAb、NAbの両方を測定して結果を比較してみる（データの蓄積）。



TAbとNAbの結果が相関しない場合、どう解釈したらよいだろうか？

TAb測定 : Pros vs Cons

【Pros】

- ◆ セロタイプごとの抗AAV抗体測定キットや抗AAV抗体（陽性対照抗体）が市販されている。
- ◆ バリデーションは既存のガイドライン（後述）が参考にできそう。
- ◆ LBAは測定経験者が多くいるので系の立ち上げが容易。
- ◆ コンパニオン診断薬（CDx）への対応が容易である。

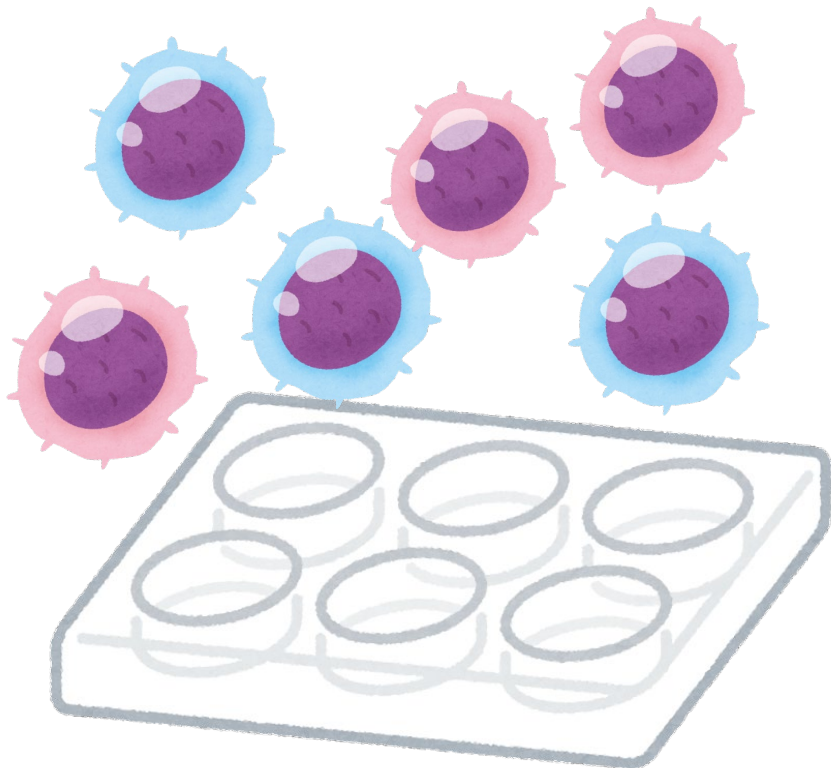
【Cons】

- ◆ 市販抗体を使用する場合、エピトープを考慮するならばモノクローナル抗体よりポリクローナル抗体のほうが適切だろう。ポリクローナル抗体を使用する場合はロット間差のコントロールが難しいかもしれない。
- ◆ 薬効（特に薬効が十分に得られない場合の解釈）を考えるとTAbでは直接的な説明をしにくい（かも）。

NAb測定 : Pros vs Cons

【Pros】

- ◆ 薬効が十分に得られない場合の解釈が容易。

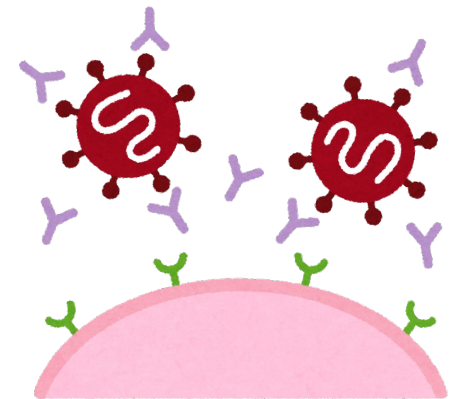


【Cons】

- ◆ 細胞を使用するアッセイなので熟練経験者が少なく系の立ち上げが難しい。
- ◆ 参考にできそうなガイドラインがない。
- ◆ 適切な陽性対照抗体（血清）の作製が必要。
- ◆ バリデーションの判定基準や結果解釈の基準がない。
- ◆ CDx化が現時点では困難。

TAb、NAb測定共通の問題点

- ◆ TAbとNAbは、検出感度は異なるのではないか？
見ているものが違うので致し方ないが、両者の相関を考えると悩ましい。
- ◆ 抗体価の上がり方には個体差があることが推測される。
- ◆ カットオフ値、thresholdを決めるための陰性血清の入手が困難であることが推測される。
- ◆ サンプルの保存安定性の担保をどうしたらよいか、基準の設定が難しい。
- ◆ 臨床検体でTAbやNAbの値と薬効減弱化にはどのような関係があるのか。



TAb、NAb測定バリデーション

- 事前にバリデーションの実施が必要
- TAbはLBAガイドライン及び免疫原性ガイダンスを参考にできそう。ただし判定基準はLBAガイドラインでは厳しすぎるのではないかと⇒妥当と思われる基準範囲の設定が必要
- NAbは参考にできそうなガイドラインがなく、基準の設定も困難
⇒知見を積み重ねて基準を設定する。
- 患者数を考慮したカットポイントの設定の工夫が必要
特に希少疾患では50例の患者のマトリクスを入手するのは困難
健常人のマトリクスで代替可能か？
→患者と健常人のマトリクスにおけるbaselineの同等性を評価

TAbのバリデーション項目と判定基準(例)

項目	評価内容と判定基準
選択性	<p>個体別マトリクス（陰性対照試料）及び個体別マトリクスに陽性対照（低用量）を添加した試料（陽性対照試料）</p> <p>全ての個体において、陰性対照試料 < 陽性対照試料</p>
再現性*1	<p>プールマトリクスの陰性対照試料及び陽性対照試料低・中・高の3用量</p> <p>日内再現性：N=3/用量 CV < 20%</p> <p>日間再現性：N=3/用量、6日間 CV < 20%</p>
Factor Normalization factor	(選択性試料のmean + 1.645 SD) / 陰性対照試料のmean Factorの平均値
Screening cut point*2	各試験の陰性対照試料のmean × Normalization factor
Drug-tolerance	Screening cut point以上の陽性判定となる最大希釈倍率
Confirmatory cut point	<p>選択性試料の陰性対照試料及び陽性対照試料に、それぞれ被験物質を添加した 試料を調製 Inhibition = 被験物質添加試料の値 / 非添加試料の値</p> <p>Confirmatory cut point = Inhibition Mean + 3.09 SD</p>
安定性	プールマトリクスの陽性対照試料低・高の2用量：初期値に対して RE = ±20%以内

医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法（リガンド結合法）のバリデーションに関するガイドライン、Guidance for industry, Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products

非臨床/臨床などの試験の目的やcaseによって評価方法の詳細は異なる

*1: N=6/用量のcaseもある。

*2: 臨床試験では外れ値の取り扱いに注意。また投与前matrixにおける95%信頼性区間上限を設定するcaseもある。

細胞性免疫評価の必要性

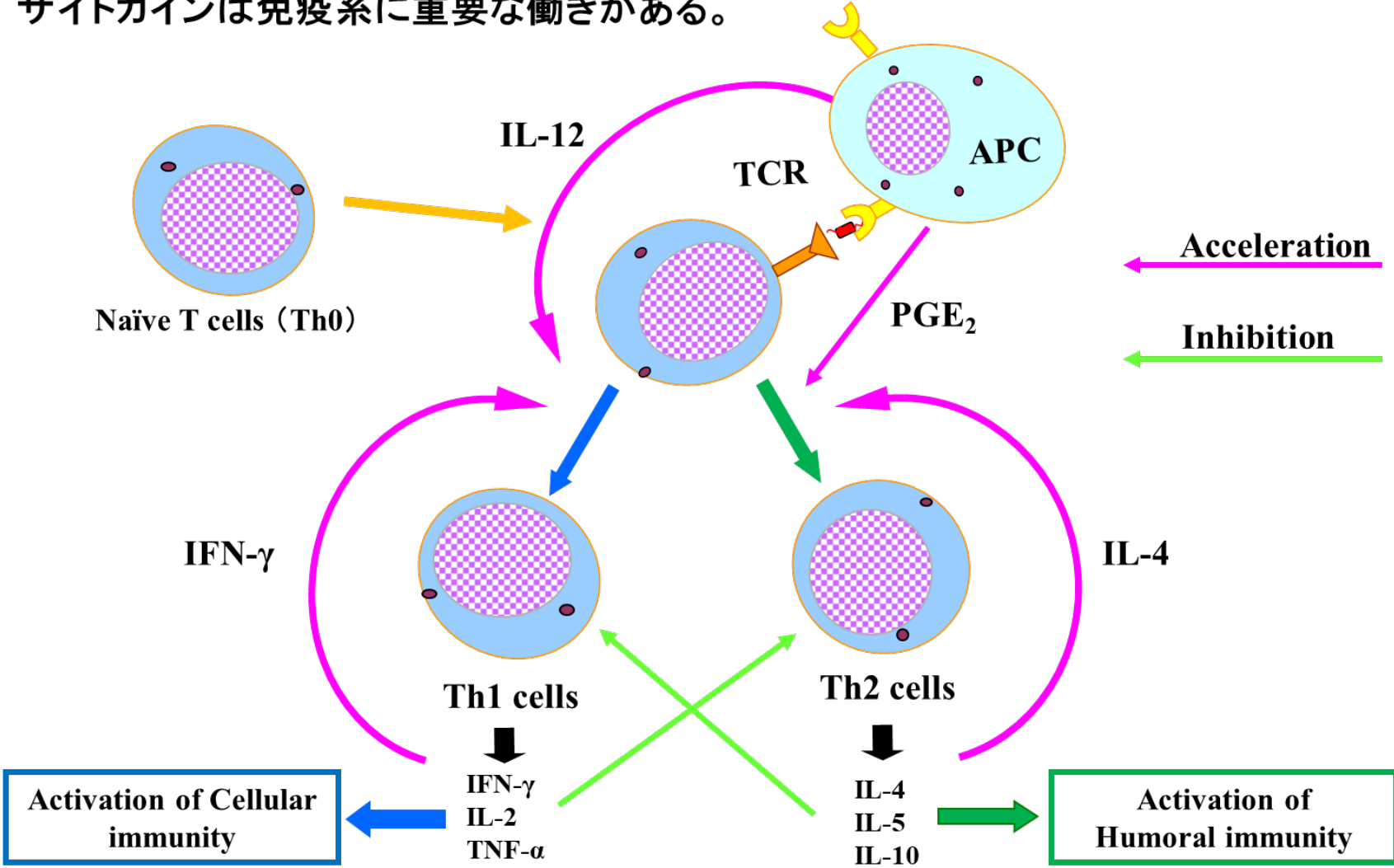
- ◆ バイオアナリシスの観点では免疫応答 = 抗体産生のイメージが強く、ADAの評価の必要性は広く認知されている。
- ◆ 一方、T細胞によりベクターあるいは発現蛋白が排除される可能性も考えられ、液性免疫に加えて細胞性免疫評価も重要である¹⁾。
- ◆ 細胞性免疫評価法の一つに、**サイトカイン検出を目的としたELISpot法**がある。
- ◆ 測定法及びがんワクチンコンソーシアムから報告されたガイドラインが参照可能。
 - Cancer Immunol. Immunother. (2008) 57:303-315.
 - J. Immunol. (2002) 168:545-553.

1) Bioanalysis (2021) 13(6):415-463.



細胞性免疫：サイトカインの役割

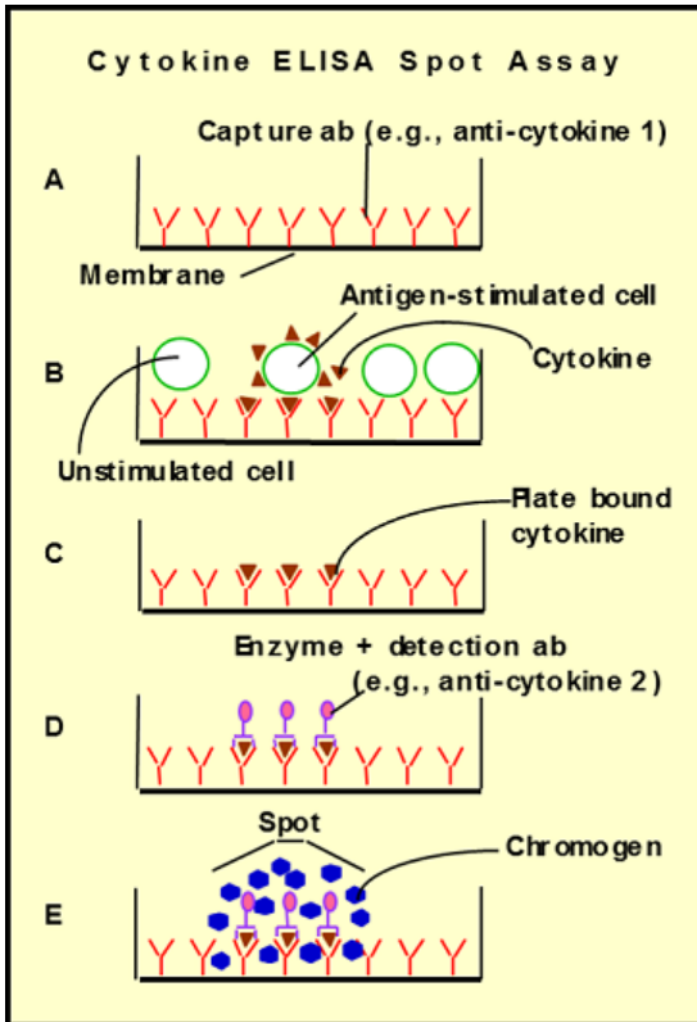
サイトカインは免疫系に重要な働きがある。



<http://bioanalysisforum.jp/>

ELISpot法の原理

サイトカイン検出を目的としたenzyme-linked immunosorbent spot assay(ELISPOT)の原理



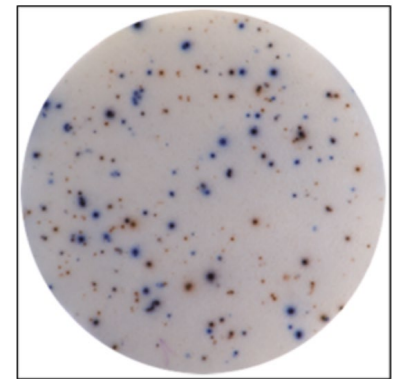
(A) ウェル底面がPVDFメンブレンとなっているELISPOT用プレートにキャプチャー抗体をコートします。

(B) 単離した細胞または解凍した細胞を抗原と共にインキュベートすることで抗原特異的T細胞を活性化し、サイトカイン分泌が誘導されます。

(C) 細胞は取り除かれ、サイトカインが結合した抗体のみがウェル上に残ります。

(D) 検出用抗体を添加し検出します。この図では検出用抗体に直接酵素がラベルされています。検出はストレプトアビジン-ビオチン系を使用し間接的に検出することも可能です。

(E) 発色基質を添加することでキャプチャーされたサイトカインがスポットとして発色されます。



抗原により産生されるサイトカインを検出

T細胞ELISPOTアッセイキット (株式会社エムエステクノシステムズ)

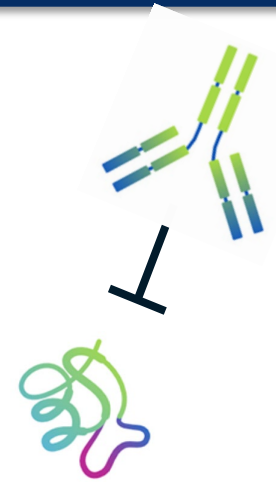
<https://www.mstechno.co.jp/categories/view/85>

ELISpot実施時の留意点

- ◆ Assayに供する細胞 ; PBMCの品質、ロット差
- ◆ PBMCを刺激するペプチド、蛋白等の抗原の品質、純度
- ◆ サイトカインを検出する重要試薬の組み合わせ
- ◆ 指標とするサイトカインの選抜
 - Interferon- γ : 複数のがん免疫剤で細胞障害性T細胞の反応性と相関
 - Interleukins: IL-2, IL-4
 - Tumor necrosis factor- α
- ◆ Assay系、assay技術の標準化
 - 測定プロトコールの標準化
 - 複数施設で実施した測定結果の標準化/結果解釈
 - Spot検出のautomation化
- ◆ ELISpot validation項目
- ◆ 陽性判定の基準
- ◆ Assay系のメンテナンス

発現蛋白の免疫原性

- ・Total抗体
- ・細胞性免疫 (P57-60参照)



発現蛋白に対する抗体

- ◆ 遺伝子治療製品では、治療上有効な蛋白質をコードしたgDNAを患者に投与し、患者体内で転写、翻訳を経て蛋白質となり薬効を発揮する。
- ◆ 患者は発現蛋白を欠損している場合が多く、その場合は発現蛋白が異物と見なされ、抗体が産生される可能性がある。
- ◆ 翻訳された蛋白質が細胞外に分泌されて薬効を発揮する場合、遺伝子治療を始める前に同様な蛋白質を補充投与されていた患者では蛋白質に対する抗体を持っている可能性が高い。
既に抗体を持っている患者では十分な薬効が得られない可能性がある。
- ◆ 一方、事前に蛋白質を投与されていない患者では抗体を持たないことが予想される。
遺伝子治療製品の投与により恒常的に蛋白質が分泌させると、抗体が作られにくいため、高い治療効果が見込まれる。



発現蛋白に対する抗体

- ◆ 翻訳された発現蛋白が循環血を介して薬効を発揮する薬剤の場合は、その蛋白質に対する中和抗体の有無を必ず評価する必要がある。
- ◆ 局所投与されるものや、翻訳された蛋白質が細胞内で薬効を発揮する遺伝子治療薬では抗体を気にしなくてもよいかもしれない。



遺伝子治療開始前の患者
の抗体の評価 (TAb) は
とても重要

発現蛋白に対する抗体：測定における留意点

◆ 重要試薬（発現蛋白に対する陽性対照）の調達

- 市販品の活用
- 標的蛋白を動物に免疫して取得
- 調達の難易度はターゲット蛋白の特性と用途に依存

◆ バリデーション

- 事前にバリデーションの実施が必要
- 既存のガイドライン（前述）を参考にできそう。ただし判定基準は既存ガイドラインでは厳しすぎるのではないか⇒妥当と思われる基準範囲の設定が必要
- 患者数を考慮したカットポイントの設定の工夫が必要

特に希少疾患では50例の患者のマトリクスを入手するのは困難

健常人のマトリクスで代替可能か？

→患者と健常人のマトリクスにおけるbaselineの同等性を評価

DG2021-50 「遺伝子治療製品のバイオアナリシス」 Summary

我々は何を測る？

何を	どんな方法で	どのような基準で
ベクター	主にLBA	必要に応じて
導入gDNA	qPCR, dPCR	適切な項目、基準の設定
発現mRNA	RT-qPCR	Case by caseで、重要BMとして測定
発現蛋白	LBA, LC/MS/MS	
抗ベクター抗体	TAb: LBA	TAb: LBAやADAのGLを参考 NAb, ELISpot: 技術に応じた基準の設定
抗発現蛋白抗体	NAb: Cell-based 細胞性免疫: ELISpot	

- ◆ 測定項目が多々あり、それぞれ重要性や必要な基準が異なる。
- ◆ 遺伝子治療の拡がりとともに方法論や基準も提言されている。都度updateしたい。

皆様からのご意見・経験について、ぜひお寄せください！

連絡先：hanada.takeshi.gt@daiichisankyo.co.jp

第一三共株式会社 花田 雄志