

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 次世代バイオロジクスの品質安全性評価に関するレギュラトリーサイエンス研究  
(英語) Regulatory science research on quality and safety evaluation of next-generation biologics

研究開発実施期間: 令和3年4月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 石井明子  
(英語) Akiko Ishii-Watabe

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長  
(英語) Director, Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

コロナ禍にある令和3年(2021年)4月に開始された本研究では、次世代バイオロジクスの品質安全性確保と迅速な開発を推進することを目的とし、組換えウイルスワクチンや抗体等、COVID-19の予防治療にも用いられる製品を中心に、品質安全性確保のための評価法に関する検討を行うと共に、開発の指針となるガイドラインの作成を行った。具体的には、(1)ワクチンに関して、組換えウイルスの生体内分布評価法、混入ウイルス検出法、(2)抗体に関して、抗SARS-CoV-2モノクローナル抗体の特性、ヒト生体試料中の抗SARS-CoV-2抗体の評価法、バイオ医薬品に対する抗薬物抗体評価法、抗薬物抗体標準パネル作成法等に関する検討を行い、得られた成果に基づき、組換えウイルスワクチンに関するガイドライン案、mRNAワクチンに関するコンセプトペーパー、および免疫原性評価に関するガイドライン案を作成した。

## (1) 組換えウイルスワクチン等遺伝子導入型ワクチンの評価技術と規制要件

### i) 組換えウイルスワクチンの生体内分布評価法

COVID-19 に対するワクチンとして、組換えウイルスワクチンが開発され、臨床使用されている。組換えウイルスワクチンの有効性や安全性の評価や第三者への伝播等のリスクの評価では、組換えウイルスの定量が必要となるが、生体内分布・排出評価における定量法の判定基準は示されていない。本研究では、ヒトアデノウイルスを利用した組換えウイルスワクチンモデルを作製し、droplet digital PCR(ddPCR)と定量 PCR(qPCR)で定量法を開発し、マウスに組換えウイルスワクチンを接種して生体内分布・排出の評価を行った。モデル組換えウイルスワクチンとして Ad-CMV-HKU1S-2A-GFP (ワクチンモデル) の DNA の 4 箇所プライマー・プローブを設計し ddPCR と qPCR で定量法を構築し、良好なバリデーション結果が得られた。また、生体試料からワクチンモデル DNA を抽出する方法を最適化し、60%以上の回収率を得た。ワクチンモデルをマウスに投与し、構築した ddPCR と qPCR の定量法で生体内分布・排出の評価を行った。ddPCR と qPCR で同様のベクターコピー数が確認されたが、測定感度の違いから低コピー試料では ddPCR のみで検出できた個体が存在していた。さらに、生体内分布の評価に影響する抗ワクチンモデル抗体の定量法を電気化学発光イムノアッセイ法 (ECL) で構築し、ワクチンモデル接種後のマウス血清中の抗体量を定量した。投与後 8 日目以降に抗ワクチンモデル抗体が検出される事が確認された。これらの検討を基に、組換えウイルスワクチンの生体内分布・排出を実施する上での留意事項をまとめた。

### ii) 組換えウイルスワクチンにおける混入ウイルス検出法

バイオ医薬品のウイルス安全性に関する ICH Q5A ガイドラインの改定で言及された in vivo 及び in vitro ウイルス試験の代替法の候補である次世代シーケンシング (NGS) 法について、研究分担者の田中より譲渡された SARS-CoV-2 ワクチン (組換えアデノウイルスベクター) のモデルである AdV-hCoV-HKU1-A2-eGFP を用いて検討を進めた。最初にスパイクタンパク質の発現とベクターシーケンスを確認し、試料としての適格性を確認したのち、網羅的な外来性ウイルスをスパイクして、NGS によりウイルスベクター中に混入する外来性ウイルスの検出系を確立した。改定 Q5A には、DNA/RNA, 1 本鎖/2 本鎖, 環状/直鎖状などが異なり、検出の感度、特異性および範囲を実証するために REO1, RSV, FeLV, OC43, EBV, PCV1, MVMp, hAdV と言ったレファレンスパネルウイルスの使用が推奨されている。我々はこのうち、3 種のウイルス Reovirus type 1, RSV, FeLV をスパイクし、RNA-seq NGS によって 3 種のウイルスを検出したが、同じ量のウイルスをスパイクしても、検出感度に差が生じることが確認された。以上の検討に基づき、現行の試験法の代替や補完的な評価法として NGS により評価を行う際の留意点として、①スパイクするウイルスの特性の違いを考慮し、②製品ごとの Host cell 由来の核酸違いも考えた前処理が必要であること、さらに、③測定試料の違いや特徴によって試験法の適格化および検証が必要であること、を明らかにした。

### iii) 組換えウイルスワクチンガイドライン、及び、mRNA ワクチンに関するリフレクションペーパーの作成

海外で組換えウイルスワクチンの開発が進んでいることから、我が国でもトラベラーズワクチンとしての有用性が期待され、先行研究として厚生科学研究において組換えワクチンの考え方をまとめていた。令和 2 年 (2020 年) から新型コロナウイルスのパンデミックで組換えワクチンの開発が急速に進んだことを受け、ガイドライン化に向けた取り組みと、感染症ワクチンの専門家や PMDA ワクチン部と協力し、ガイドライン化を進めた。令和 4 年度にはガイドラインの素案がまとまり、令和 5 年度にかけてガイドラインの産業界への公表と意見を募集した。寄せられた意見を踏まえ、ガイドラインの改定作業を行うとともに、この新しいワクチンの規制的要件を明確にするための Q&A の策定を行った。令和 6 年 3 月に厚生労働省より、「感染症の予防目的とした組換えウイルスワクチンの開発に関するガイドライン」及び Q&A 事務連絡が発出された。

一方組換えウイルスワクチンガイドライン化と並行して、mRNA ワクチンについても、その品質や安全性の評価について検討を進め、令和4年度から5年度にかけて mRNA ワクチンの考え方をまとめ、和文「mRNA ワクチンに関するリフレクションペーパー検討事項」及び英文“The mRNA Vaccine Reflection Paper”で公表した。

## (2) 抗体に着目した次世代バイオロジクスの評価技術と規制要件

### i) 抗 SARS-CoV-2 モノクローナル抗体医薬品の特性に関する研究

COVID-19 に対する感染予防・治療のために用いられる抗 SARS-CoV-2 抗体医薬品の安全性上の課題とされていた抗体依存性感染増強 (Antibody-dependent enhancement, ADE) に着目した抗体の品質特性解析を実施した。結合エピトープなどの特性が異なる抗 SARS-CoV-2 モノクローナル抗体パネルを作製し、抗原結合・ウイルス中和活性、及び、ADE に関連する免疫細胞活性化に関する評価を行った。作成した抗体パネルは、SARS-CoV-2 の受容体結合ドメイン (RBD) 上の結合エピトープの違いにより、4つのクラスに分類可能であり、結合エピトープの違いがウイルス変異に伴う抗原結合能や中和活性の減弱に影響するのみならず、ウイルス-抗 SARS-CoV-2 抗体免疫複合体形成時の Fc $\gamma$  受容体を介した免疫細胞活性化に影響を及ぼすことを明らかとした。免疫複合体による Fc $\gamma$  受容体を介した免疫細胞活性化は、免疫細胞によるウイルスの排除のほか、免疫細胞の活性化を介した炎症反応の増悪などに関与する可能性があることから、抗 SARS-CoV-2 抗体の Fc $\gamma$  受容体を介した免疫細胞活性化能およびそれに関わる結合エピトープの違いは抗体医薬品の臨床における有効性・安全性に寄与しうる重要な特性の一つであると考えられる。

### ii) 抗 SARS-CoV-2 抗体及び抗薬物抗体評価

抗 SARS-CoV-2 抗体検査は、主に感染履歴の調査を目的に世界中で実施されているものの、臨床的な意義が未だ不明である他、抗体検査キットに求める性能基準が明確になっておらず、市販抗体検査キットの性能に多くの懸念が示されている。抗 SARS-CoV-2 抗体検査の信頼性確保のため、S protein 及び N protein に対するモノクローナル抗体や患者血清から調製された WHO 標準品等を用いて、抗体検査キットの性能や陽性判定基準の比較を行った。患者試料を複数の抗体検出キットで測定したところ、測定する抗体の種類によっては、キット間で測定結果に相関性が得られない場合のあることを確認した。さらに、中和活性を評価する複数種類のキット (ELISA 競合法) について分析性能の比較を行った結果、キットによって特性や検出感度が異なること、一部のキットを除いて、COVID19 患者から採取した血清を混合して調製した「標準品」、WHO 標準品や抗体標準パネルの抗体価を算出でき、WHO 標準品の国際単位に基づいて「標準品」の値付けが可能であることを明らかにした。国内患者試料から調製した「標準品」は、キットの性能評価だけでなく、国際単位に換算することで、異なるキット間の結果の有効活用に役立つものと考えられた。抗薬物抗体評価法については、スクリーニング及び確認アッセイを実施する際の留意点として挙げられる、陽性判定基準であるカットポイント設定に係る統計処理方法の留意点を整理すると共に、薬物耐性を改善できる方法を確立した。各バイオ医薬品について確立したアッセイ系を関節リウマチ及び炎症性腸疾患患者試料中の抗薬物抗体測定へ応用し、抗薬物抗体産生に影響する臨床的要因を考察した。実試料測定時に得られた留意点について、免疫原性ガイドライン (案) へ反映した。

### iii) 抗薬物抗体評価と標準パネル

抗体医薬品等のバイオロジクスの投与により抗薬物抗体が産生されると薬物動態、有効性、安全性に大きな影響を及ぼす可能性があるため、患者血清中の抗薬物抗体を検出することが重要である。抗薬物抗体の評価法確立のためには、抗薬物抗体標準品が有用であるため、これまでに抗 TNF・抗体医薬品であるインフリキシマ

ブとアダリムマブについて、IgG1, IgG4, IgE, IgM 型の抗薬物抗体の作製を行い、特性の異なる様々な抗薬物抗体を得た。本課題では抗薬物抗体の特性解析や WHO 国際標準品設定に向け以下の研究を実施した。各種抗薬物抗体と抗体医薬品の抗原抗体複合体について Fc 受容体や補体との結合性を解析し、免疫反応に及ぼす影響の違いや複合体サイズとの関連等について考察した。また、アイソタイプ別抗薬物抗体検出系として微量な IgE 型抗薬物抗体の検出系を構築し、作製した IgE 型抗薬物抗体が検出系の評価に有用であることを示した。これまでに実施した各種特性解析結果も含めて特性の異なる 10 種の抗アダリムマブ抗体を選択し、WHO 国際標準品共同検定用の抗体として各 2 mg ずつ作製し、National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) に提供した。さらに NIBSC と協議の上 WHO 国際標準品パネルとして頒布する抗薬物抗体として 2 種類選択して大量精製を行い、約 50mg と 80mg の抗体を提供した。なお、これらのクローンを含めた候補品に関する国際共同検定は令和 6 年度に実施される。

#### iv) 免疫原性評価に関するガイドライン案の作成

欧米と比較して規制環境整備が遅れているバイオ医薬品の免疫原性評価に関して、上述した抗薬物抗体測定法の確立と標準化、抗薬物抗体標準パネルの作成、実試料を用いた測定上の留意点の抽出等の成果をもとに、「バイオ医薬品に関する免疫原性評価ガイドライン案」を作成した。ガイドライン案の作成に際しては、関係者の意見が反映される体制とするため、研究班構成員に加え、専門家（アカデミア）、行政（厚生労働省医薬品審査管理課、PMDA 新薬審査部・再生医療製品等審査部・次世代評価手法推進部）、業界団体等（日本製薬工業協会、バイアナリシスフォーラム）からなる WG を構築して議論を行った。ガイドライン案では、バイオ医薬品の開発から製造販売後における免疫原性に関するリスク低減のための留意事項を示すことを目的として、免疫原性に影響するリスク要因（ハザード）と考えられる事項について述べると共に、臨床試験での抗薬物抗体評価における留意事項を中心に、免疫原性評価において考慮すべき事項について記載した。作成したガイドライン案は、令和 6 年 2 月から 3 月に e-Gov サイトからの意見公募に付された。

(1) Evaluation techniques and regulatory requirements for recombinant viral vaccines and mRNA vaccines

i) Biodistribution of recombinant virus vaccine

We developed quantitative methods on multi-site of DNA in recombinant adenovirus vaccine (Ad vector) using droplet digital PCR (ddPCR) and quantitative PCR (qPCR), and inoculated mice with a model vaccine using Ad vector to evaluate its biodistribution (BD) and shedding, and we obtained good validation results for ddPCR and qPCR. We evaluated BD and shedding on mice administered the model vaccine. The quantitative results were similar in both ddPCR and qPCR, but some low-copy samples could be detected only by ddPCR. We developed the method of measuring anti-model vaccine antibody, and evaluated the antibody in mice administered the model vaccine. Based on these studies, we summarized the points to be considered to evaluate BD and shedding of recombinant viral vaccines.

ii) Virus safety evaluation of recombinant virus vaccine

The NGS method, a candidate alternative method for in vivo and in vitro virus testing mentioned in the revision of Q5A, was investigated using AdV-hCoV-HKU1-A2 which is transferred from Dr Tanaka. An exhaustive exogenous virus was spiked and a detection system for exogenous viruses mixed in the viral vector was established by NGS. We spiked Reovirus type 1, RSV and FeLV which were a part of recommended 7 virus by revised Q5A, and detected genome of all three viruses by RNA-seq NGS. However, it was confirmed that differences in detection sensitivity can occur even when the same amount of virus is spiked. Therefore, qualification and validation of the test method is necessary depending on the differences and characteristics of the samples measured.

iii) Establishment of guidelines for recombinant virus vaccine and mRNA

Since the development of recombinant virus vaccines for ebolavirus of dengue virus has been progressing overseas, the Point-to-Consider for recombinant vaccines was published according to a preceding MHLW study because of their potential usefulness as traveler's vaccines in Japan. On the other hand, development of recombinant vaccines in the new coronavirus pandemic from 2020 was rapidly progressed, then we tried to develop the guideline for recombinant viral vaccine. A draft of the guidelines was compiled in FY2023, and then the guidelines were publicized to the industry and opinions were solicited. In March 2024, the guidelines and Q&A were issued by the MHLW.

In parallel with the development of the recombinant virus vaccine guideline, we also studied the quality and safety evaluation of mRNA vaccines, and in FY2022 to FY2023, we summarized our views on mRNA vaccines and published them in Japanese and English.

(2) Evaluation techniques and regulatory requirements for next-generation biologics with a focus on antibodies.

i) Characterization of anti-SARS-CoV-2 mAbs

Antibody-dependent enhancement (ADE) is considered as the safety concerns of vaccines for prevention and monoclonal antibody (mAb) drugs for treatment against COVID-19. We evaluated anti-SARS-CoV-2 mAbs induced immune cell activation which is related to ADE by using anti-SARS-CoV-2 mAb panels. We found that receptor binding domain (RBD) epitopes of spike protein in SARS-CoV-2

affected the antigen-binding and neutralization activity of anti-SARS-CoV-2 mAbs against SARS-CoV-2 variants and Fc $\gamma$  receptor-dependent immune cell activations induced by virus-mAb complex. Our results suggested that Fc $\gamma$  receptor-dependent immune cell activation properties may be a critical characteristic which affects clinical efficacy and safety of anti-SARS-CoV-2 mAbs.

ii) Evaluation of anti-SARS-CoV-2 antibody and anti-drug antibody for biopharmaceuticals

To ensure the reliability of the anti-SARS-CoV-2 antibody test, we compared the performance of antibody test kits and their cut points using monoclonal antibodies against S protein and N protein, WHO standards, and “standards” that we prepared from CODIS-19 patient serum. The “standards” prepared from domestic patient samples were considered useful not only for evaluating the performance of the kits, but also for converting the results into international units, thereby enabling the effective use of results between different kits. Regarding anti-drug antibodies (ADAs) assay, we have established a method to improve drug resistance, and have summarized the points to be noted in the statistical processing for setting cut points. In the course of applying the established ADA assay to patient serums, points to be considered in the ADA measurement were extracted and reflected in the draft immunogenicity guideline.

iii) Establishment of anti-drug antibody panel

To detect the generated ADAs in patients is important because ADAs can impact the pharmacokinetics, efficacy, and safety of biologics. Since the reference standards are necessary to establish the appropriate methods for detecting ADAs, we developed IgG1, IgG4, IgE and IgM types of human-rat chimeric ADA against the anti-TNF- $\alpha$  therapeutic antibodies infliximab and adalimumab. In this study, we clarified the characteristics related to the immune response of the prepared ADAs, and the usefulness of the IgE ADAs as the reference standards for the IgE ADA assay. Moreover, we prepared the adalimumab ADAs for the collaborative study for the evaluation of monoclonal antibodies against adalimumab.

iv) Guideline for Immunogenicity assessment of biopharmaceuticals

The draft guideline was prepared based on the results of the research as described above. The draft guideline describes the risk factors (hazards) that influence immunogenicity, with a focus on points to consider in the evaluation of anti-drug antibodies in clinical trials, with the aim of presenting points to consider in order to reduce the risk of immunogenicity from the development to post-marketing stages of biopharmaceutical products. The draft guideline was submitted for public comment via the e-Gov website from February to March 2024 by MHLW.