

様式第 1 (第 7 条関係)

第一種使用規程承認申請書

平成 30 年 月 日

厚生労働大臣 加藤 勝信 殿

環境大臣 中川 雅治 殿

氏名 ファイザー株式会社

申請者 代表取締役社長 原田 明久 印

住所 東京都渋谷区代々木 3 丁目 22 番 7 号  
新宿文化クイントビル

第一種使用規程について承認を受けたいので、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 4 条第 2 項（同法第 9 条第 4 項において準用する場合を含む。）の規定により、次のとおり申請します。

<p>遺伝子組換え生物等の種類 の名称</p>	<p><i>rep</i> 及び <i>cap</i> 遺伝子を欠失し、改変型 <i>cap</i> 遺伝子 (Spark100) に由来するキャプシドタンパク質及びアデノ随伴ウイルス 2 型に由来する ITR を有し、ヒト血液凝固第 IX 因子 Padua 変異体を発現するアデノ随伴ウイルス (<i>fidanacogene elaparvovec</i>)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>ヒト遺伝子治療を目的とした投与、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>原液の保管及び運搬</p> <p>(1) 本遺伝子組換え生物等の原液の保管は、容器に密封された状態で遺伝子組換え生物等である旨を表示し、適切に管理された冷凍庫又は冷蔵庫において行う。</p> <p>(2) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。</p> <p>希釈液の調製</p> <p>(3) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行い、密封した状態で保管する。調製時は、作業室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。</p> <p>投与</p> <p>(4) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で静脈内に注入することにより行う。投与時は、治療室内での本遺伝子組換え生物</p>

等の拡散を最小限に留める。

#### 投与後の患者からの排出等の管理

(5) 投与後、患者の投与部位を消毒し、投与部位から排出される本遺伝子組換え生物等の環境への拡散が最小限となるよう医師の判断により対策を講じる。また、必要に応じて、患者の排出物等から第三者への伝播を最小限にするために、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。

(6) 患者の排出モニタリングは、必要に応じて実施する。

(7) 本遺伝子組換え生物等の投与を受けた患者が治療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける際は、第三者への本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限にするために、必要な期間、外部医療施設に第一種使用等の承認を受けている遺伝子組換え生物等が投与された患者であることが情報提供されるよう、本遺伝子組換え生物等の投与を受けた患者に適切な指導を行う。

#### 感染性廃棄物等の処理

(8) 本遺伝子組換え生物等の原液及び希釈液は、不活化処理を行った上で廃棄する。

(9) 希釈に用いた容器及び器具並びに投与に用いたシリンジ、チューブ等及び患者血液の付着した器材等は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和45年法律第137号）に基づいて治療施設その他の外部医療施設（以下「施設等」という。）又は外部受託検査機関で定められている医療廃棄物の管理に関する規程（医療廃棄物管理規程）に従って廃棄する。

#### 検体の取扱い

(10) 試験のために患者から採取した検体は、施設等又は外部受託検査機関において定められた規定に従って取扱う。

(11) 検体の廃棄は、施設等及び外部受託検査機関の医療廃棄物管理規程に従って行う。

## 生物多様性影響評価書

### I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

#### 1 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、パルボウイルス科 (*Parvoviridae*) の中で複製にヘルパーウイルスを必要とするデPENDウイルス属 (*Dependovirus*) に分類される 1 本鎖 DNA を内包したウイルスである (文献1)。これまでに分離されたヒト及び霊長類動物に感染するウイルスは、抗原性の違いに基づき複数の血清型に分けられている (文献2-5)。その中で、ヒトで分離される 2 型 (AAV2) がよく研究されている。AAV は、その VP1 キャプシドタンパク質配列より、異なる系統群 (クレード) に分類されることもある (文献 3)。成人の約 85% は AAV に対する抗体を有するとされるが、病原性は知られていない。本遺伝子組換え生物等 (以下、PF-06838435) は、AAV2 に由来する Inverted Terminal Repeat (ITR) をゲノムの両端に持つ。なお、PF-06838435 のキャプシドタンパク質は、肝臓組織への親和性を有するように人工的に改変されている。

#### 2 使用等の歴史及び現状 (人用若しくは動物用医薬品としての利用の歴史又は産業的な利用の歴史及び現状を含む。)

AAV の遺伝子改変ウイルス (AAV ベクター) はこれまで 15 年以上遺伝子治療に用いられている。現在までに、AAV ベクターは血友病 B を含む様々な疾患の遺伝子治療の臨床試験でヒトに投与されている (文献6-11)。AAV ベクターの投与を受けた数百人の被験者のデータが報告され、安全性プロファイルは全般的に良好であった (文献12)。

#### 3 生理学的及び生態学的特性

##### (1) 基本的特性

AAV のウイルスキャプシドは直径約 25 nm の正二十面体で、エンベロープのない状態で存在している。AAV ゲノムは約 4.7 kb の+鎖又は-鎖の 1 本鎖 DNA であり、DNA 鎖の両端に位置する Inverted Terminal Repeat (ITR) 並びに 2 つの遺伝子 (*rep* 及び *cap*) で構成されている。AAV の感染は、細胞表面に発現している血清型非特異的受容体 AAVR (文献13) 介して感染するが、血清型により組織移行性を規定している受容体 (又はコレセプター) が異なることが報告されている (文献14)。例えば、AAV2 では、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、FGF 受容体、HGF 受容体、 $\alpha V\beta 5$  インテグリン、 $\alpha V\beta 1$  インテグリン及びラミニン受容体等を介して感染することが知られている (文献 13)。PF-06838435 のキャプシドタンパク質は、AAV8 との相同性が高い (別紙 1) が、AAV8 の感染にはラミニン受容体が必要であることが報告されている。

- ITR：ゲノムの両末端には、T字型のヘアピン構造が存在し、複製の開始、ウイルス粒子へのパッケージング、宿主細胞の染色体DNAへの組込みなどに関与するとされる。
- *rep* 遺伝子：*rep* 遺伝子は、野生型 AAV ウイルスの複製に必要な 4 種の Rep タンパク質（Rep78、Rep68、Rep52 及び Rep40）をコードする。そのうち、large Rep と呼ばれる Rep78 及び Rep68 タンパク質の発現は、p5 プロモーター制御下に生じる 2 つのスプライシングバリエント mRNA にコードされ、ともに部位特異的エンドヌクレアーゼ、インテグララーゼ及びヘリカーゼとして機能する。small Rep と呼ばれる Rep52 及び Rep40 は下流のプロモーター（p19）による制御下に転写されるスプライシングバリエント mRNA によりコードされ、そのアミノ酸配列は、それぞれ Rep78 及び Rep68 タンパク質の C 末端側の部分配列である。Rep52 及び Rep40 タンパク質の正確な役割は分かっていないが、ヘリカーゼドメインが含まれている。
- *cap* 遺伝子：*cap* 遺伝子は 3 種のキャプシドタンパク質（VP1、VP2 及び VP3）をコードしている。これらのタンパク質は AAV の構造を構成している。いずれの mRNA も同一のプロモーター p40 の制御下に転写されるが、VP1 と VP2/VP3 は異なるスプライシングバリエントにコードされる。また、VP2 及び VP3 の翻訳には異なる開始点が用いられる。

#### （2）生育又は生育可能な環境の条件

AAV はヘルパーウイルス（アデノウイルス又は単純ヘルペスウイルス等）の共感染により増殖し、種々の血清型 AAV に関して、ヒト以外にげっ歯類、イヌ、サルなどの哺乳動物に感染することが報告されている（文献15）。ヘルパーウイルス非存在下では、AAV はエピゾーマル DNA として、又はまれに第 19 番染色体に組み込まれた形で潜伏する（潜伏感染）。AAV が潜伏した細胞にヘルパーウイルスであるアデノウイルスが共感染すると、AAV の複製が開始され、細胞破壊により放出される（溶解感染）。AAV の生活環はヘルパーウイルス及び宿主タンパク質との複雑な相互作用により制御されている（文献16）。

#### （3）捕食性又は寄生性

捕食性はない。AAV は哺乳類動物に感染することが知られているが、ウイルス種によって感染宿主域は異なる。

#### （4）繁殖又は増殖の様式

AAV は、主に飛沫の吸入、粘膜の接触、食物摂取を介して、経気道又は経口で感染する。ヘルパーウイルスと同時に感染した場合、感染個体で増幅し、ヘルパーウイルスと共に分泌物中に排出され、他の個体に感染する。ヘルパーウイルスとしてアデノウイルスが共感染した場合には、溶解感染となり、アデノウイルス由来の E1A、E2A、E4、VA 遺伝子産物の存在下で、*rep* 及び *cap* 遺伝子産物が産生され、AAV が複製されるとともに、感染細胞は溶解する。

ヘルパーウイルスが存在しない潜伏感染の場合、AAV ゲノムは、扁桃・肺・脾臓などの組

織において、2本鎖環状 DNA (エピゾーマル DNA) として存在し、まれに 19 番染色体上 (AAVS1) に組み込まれる (文献17、18)。この組み込みには、Rep78/Rep68 が関与するとされる。

#### (5) 病原性

野生型の AAV の感染は不顕性に終わると考えられており、これまでに感染に伴ういかなる病原性も知られていない。

#### (6) 有害物質の産生性

AAV の感染に際して細胞内に産生されるタンパク質性の毒素等は報告されていない。

#### (7) その他の情報 (不活化条件等を含む。)

パルボウイルスに共通する性質として物理化学的に安定なキャプシドを有していることから、AAV の不活化には 85°C で数分の加熱処理が必要とされ (文献2)、オートクレーブ (121°C、20 分) により完全に不活化される。また、次亜塩素酸ナトリウム (1~10%に希釈、1 時間以上) によって不活化される。

## II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

### 1 供与核酸に関する情報

#### (1) 構成及び構成要素の由来

Fidanacogene elaparovvec (以下、PF-06838435) ゲノムでは、*rep* 及び *cap* 遺伝子を取り除き、以下の構成要素に置換している (括弧内は、ゲノム上の塩基番号で、別紙3、図9のプラスミド phFIX39v2 の塩基番号に等しい。)

- i. アポリポタンパク質 E/C-1 (apoE/C-1) 遺伝子の遺伝子座調節領域 (Locus control region) である Hepatic Control Region-1 (以下、HCR-1 配列) (152-472)
- ii. ヒト  $\alpha 1$  アンチトリプシン (hAAT) 遺伝子プロモーター (482-878)
- iii. ヒト血液凝固第 IX 因子 Padua ミニ遺伝子 (以下、hFIX ミニ遺伝子。コードされるタンパク質 FIX-Padua のアミノ酸配列を別紙2、図4に示す。)
  - ◇ エクソン1 (908-995) (879-907 は 5'非翻訳領域。翻訳領域はコドン最適化。)
  - ◇ イントロン1断片 (996-2433)
  - ◇ エクソン2~エクソン8 (2434-3731、コドン最適化)
  - ◇ 3'非翻訳領域 (3732-3779)
- iv. ウシ成長ホルモン (bGH) ポリアデニル化シグナル配列 (3820-4047)

#### (2) 構成要素の機能

ヒト血液凝固第 IX 因子 Padua ミニ遺伝子 (hFIX ミニ遺伝子) は、肝臓特異的な hAAT 遺伝子プロモーター、HCR-1、及び bGH ポリアデニル化シグナル配列により転写調節されて

いる。発現タンパク質であるヒト血液凝固第 IX 因子 Padua は、338 位のアルギニンがロイシン (R338L) に置き換わった自然発生の一塩基変異を持ち (別紙 2、図 4)、野生型に比べ 5~10 倍の比活性を有する高比活性変異体である。

HCR-1 は、ApoE 及び apoC-1 遺伝子の肝臓特異的発現の遺伝子座調節領域として、エンハンサー機能及び目的遺伝子を安定的かつ高効率に発現させる機能を有している (文献19)。

## 2 ベクターに関する情報

### (1) 名称及び由来

### (2) 特性

## 3 遺伝子組換え生物等の調製方法

### (1) 宿主内に移入された核酸全体の構成

PF-06838435 のゲノムの構成を別紙 3、図 6 に示した。hAAT プロモーター、hFIX-Padua ミニ遺伝子、bGH ポリアデニル化シグナルよりなる hFIX-Padua 発現カセットが両端の AAV2 由来 ITR により挟まれている。

### (2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

PF-06838435 は、ウイルスベクターゲノム配列を含むプラスミド phFIX39v2、パッケージングプラスミド pSpark100PK、ヘルパープラスミド pCCVC-AD2HPv2 をヒト胎児腎臓に由来する HEK293 細胞に導入することによって作製した。これらのプラスミドの構造等を別紙 3、図 8、11 及び 14 に示す。

#### プラスミド phFIX39v2 の構築 :

プラスミド phFIX39v2 は、PF-06838435 ゲノム配列を含有し、カナマイシン耐性遺伝子及び DNA stuffer の他に、pUC 及び M13 ファージ由来の複製起点を含むプラスミドである。プラスミド phFIX39v2 の構築に関する詳細を別紙 3 に示す。

#### プラスミド pSpark100PK の構築 :

プラスミド pSpark100PK (Spark100 と表記される場合もある) は以下の構成要素を含む : ①複製及びウイルス粒子の構築に必要なタンパク質をコードする AAV2 由来 *rep* 遺伝子、② Spark100 キャプシドタンパク質をコードする改変型 *cap* 遺伝子 (天然に存在しない AAV 血清型に由来する)、③pUC プラスミド由来の複製起点を含む領域、④カナマイシン耐性遺伝子。

プラスミド pSpark100PK を構築するために、プラスミド pCCVC-AAV8PKv3 (詳細を別紙 3 に記載) を *SwaI* 及び *SnaBI* で消化し、プラスミド pCCVC-AAV8PKv3 の AAV8 キャプシド

配列をプラスミド pRHM4-1 *Rep Cap* (別紙 3) 由来の Spark100 キャプシド配列に置き換えた。野生型の *cap* 遺伝子と同様に、Spark100 遺伝子からは、VP1、VP2 及び VP3 タンパク質が生じる。また、*rep* 遺伝子からは、野生型と同様に 4 種の Rep タンパク質が生じる。プラスミド pSpark100PK の構築に関する詳細を別紙 3 に示す。

#### ヘルパープラスミド pCCVC-AD2HPv2 :

ヘルパープラスミド pCCVC-AD2HPv2 は、pUC プラスミド由来の複製起点を有するプラスミドにアデノウイルス 2 型の E2A 領域、E4 領域、VA I 及び VA II をコードする遺伝子等が挿入されたもので、HEK293 細胞内で AAV の複製に必要とされる転写因子や RNA を供給する。ヘルパープラスミド pCCVC-AD2HPv2 の構築に関する詳細を別紙 3 に示す。

#### (3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

以下の工程及び品質管理は、別紙 4 に示す施設で行われる。

#### PF-06838435 の調製 :

ヒト胎児腎臓細胞株に由来する HEK293 細胞のゲノムには、アデノウイルス 2 型の E1 領域の配列が組み込まれており、AAV の複製に必要とされる E1A 及び E1B 由来タンパク質が供給されることが報告されている (文献<sup>20</sup>)。PF-06838435 は、その都度、HEK293 細胞に上述した 3 つのプラスミドをリン酸カルシウム沈殿法によりコトランスフェクションし、HEK293 細胞をローラーボトルにて 1 晩培養することにより調製する (1 回あたり、約  $10^{15}$  virus genomes (vg) を製造)。

#### 精製及び製剤化 :

陰イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー及び陽イオン交換クロマトグラフィーにより、PF-06838435 を精製する。

PF-06838435 の最終製剤は、1 mL に  $1 \times 10^{13}$  vg を含む (これは 1 mL に約 0.1 mg の PF-06838435 を含む濃度に相当する)。最終製剤は  $-90 \sim -60^{\circ}\text{C}$  で保存する。

#### 品質管理 :

品質管理の詳細を、別紙 4 に示した。最終製品の品質管理の試験項目には、複製能を有する AAV の否定試験、残存プラスミド DNA 量試験等が含まれる。

#### 4 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

宿主に移入された核酸は、PF-06838435 ゲノムの一部として、冷凍保管中は安定に存在する。PF-06838435 を用いた遺伝毒性試験は実施していないが、他の遺伝子治療用 AAV ベクターの肝臓での遺伝子導入を検討した結果より、主に染色体に組み込まれない形 (エピゾーマル DNA として) で安定に存在し (文献 18、21-23)、目的タンパク質の安定的な発現が認められる。動物試験の結果から AAV ベクターによる染色体への組込みは僅かであることが示

されている。

エピゾーマル DNA として存在する AAV ゲノムは非増殖性の細胞において数年にわたって維持されることがある。

#### 5 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

現在、hAAT プロモーター領域、hFIX の 5'UTR からエクソン 1 にわたる領域をリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法で増幅することにより定量する試験法を確立中であるが、試験方法の検出限界は 25 コピー/反応である。

#### 6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違点

野生型の AAV は 1 本鎖 DNA のデPENDウイルスであり、ヘルパー DNA ウイルスが複製に必要である。PF-06838435 は野生型の AAV に由来しているが、ウイルスのタンパク質をコードしている *rep* 及び *cap* 遺伝子を欠失しており、これらのタンパク質を発現することはない。*rep* 及び *cap* 遺伝子産物はウイルス DNA の複製、感染細胞染色体への組込み (潜伏感染時)、AAV 粒子の形成に必須である。PF-06838435 は、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を欠失しているため、ヘルパーウイルス共存下ですら、複製しないため、その外界での生存性は極めて低く、野生型 AAV を上回ることはない。複製に必須な遺伝子を提供する野生型 AAV と、アデノウイルス又は単純ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルス及び PF-06838435 が同時に一つの細胞に感染 (3 重感染) することはまれであるため、自然界で PF-06838435 の複製が起こる可能性は極めて低い。

PF-06838435 は、調製時に改変ウイルス AAV-Spark100 より供給されるキャプシドタンパク質 (Spark100) を外殻に有している。Spark100 キャプシドの作製にあたり、10 以上の AAV 血清型のキャプシドの配列を比較し、高度可変領域を同定した。その上で肝臓組織への親和性を有することが知られている血清型 (AAV8 及び AAV10) に保存されている特定のアミノ酸残基となるように変異を *cap* 遺伝子に導入した (別紙 1 に、キャプシドタンパク質のアミノ酸配列及び AAV8、AAV10 等との相違点を示す)。サルにおける PF-06838435 の生体内分布試験において、肝臓への指向性が示されている (別紙 5)。

PF-06838435 ゲノムでは、2 つの ITR に挟まれた *rep* 及び *cap* 遺伝子領域が hFIX39-Padua 発現カセットに置換されている。発現カセット中では、hAAT 遺伝子プロモーターと bGH ポリアデニル化シグナル配列を導入することにより、感染細胞内で、Rep 及び Cap タンパク質の代わりに Padua タンパク質が産生される。

### III 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

#### 1 使用等の内容

ヒト遺伝子治療を目的とした投与、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

## 2 使用等の方法

### 原液の保管及び運搬

- (1) 本遺伝子組換え生物等の原液の保管は、容器に密封された状態で遺伝子組換え生物等である旨を表示し、適切に管理された冷凍庫又は冷蔵庫において行う。
- (2) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、密封した状態で行う。

### 希釈液の調製

- (3) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行い、密封した状態で保管する。調製時は、作業室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。

### 投与

- (4) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で静脈内に注入することにより行う。投与時は、治療室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。

### 投与後の患者からの排出等の管理

- (5) 投与後、患者の投与部位を消毒し、投与部位から排出される本遺伝子組換え生物等の環境への拡散が最小限となるよう医師の判断により対策を講じる。また、必要に応じて、患者の排出物等から第三者への伝播を最小限にするために、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。
- (6) 患者の排出モニタリングは、必要に応じて実施する。
- (7) 本遺伝子組換え生物等の投与を受けた患者が治療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける際は、第三者への本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限にするために、必要な期間、外部医療施設に第一種使用等の承認を受けている遺伝子組換え生物等が投与された患者であることが情報提供されるよう、本遺伝子組換え生物等の投与を受けた患者に適切な指導を行う。

### 感染性廃棄物等の処理

- (8) 本遺伝子組換え生物等の原液及び希釈液は、不活化処理を行った上で廃棄する。
- (9) 希釈に用いた容器及び器具並びに投与に用いたシリンジ、チューブ等及び患者血液の付着した器材等は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）に基づいて治療施設その他の外部医療施設（以下「施設等」という。）又は外部受託検査機関で定められている医療廃棄物の管理に関する規程（医療廃棄物管理規程）に従って廃棄する。

### 検体の取扱い

(10) 試験のために患者から採取した検体は、施設等又は外部受託検査機関において定められた規定に従って取扱う。

(11) 検体の廃棄は、施設等及び外部受託検査機関の医療廃棄物管理規程に従って行う。

3 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法  
PF-06838435 の排出については、II、5 項で記載した定量的 PCR を用いて検討を行う。定量的 PCR を用いた試験は排出に関する十分なデータが得られるまで必要な期間実施することとし、対象患者、試験期間等の詳細は治験実施計画書に規定する。

4 生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

PF-06838435 が本治験の被験者以外のヒトへ感染する可能性は、理論的には、否定することができない。PF-06838435 の投与後、AAV ベクターの排出は、被験者検体（血液、尿、唾液、精液）を用いて、バリデーションされた試験法（定量的 PCR）によりベクター DNA を測定することにより評価する。測定は投与後のいくつかのポイントにおいて、3 回連続の陰性結果が得られるまで実施する。精液に関する十分な排出データが得られるまでは、精液を介した水平/垂直伝播のリスクを低減するために、バリア法による避妊を継続するように指導する。

5 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

以下に、PF-06838435 に類似した遺伝子組換え AAV を用いた非臨床安全性試験および排出評価試験の結果の概要を示す。詳細は別紙 5 に示す。

#### 非臨床安全性

マウス、イヌ、サルを用いた非臨床試験で  $6 \times 10^{13}$  vg/kg までの用量を、数週間から最長 11.5 年間の追跡期間を設けて評価している（文献24、25、及び Nichols らの未発表データ）。忍容性はいずれの AAV ベクターにおいても良好であり、マウスへ AAV8-hFIX  $19.6 \times 10^{13}$  vg/kg（本治験の開始用量の 120 倍かつ最高用量の 30 倍の用量）を投与した時の退行性変化（小葉中間帯の空胞化及び単細胞壊死）を除き、顕著な肝臓の病理組織学的変化は認められなかった。

#### 排出

臨床で精液への排出が示されたため、AAV2 ベクター（AAV2-murine FIX、AAV2-canine FIX、AAV2-human FIX）の精液及び精原細胞への影響を評価した非臨床試験が行われたが、AAV ベクターの配列は精原細胞からは検出されず、精液への AAV ベクターの混入は一過性であると考えられた（文献26-28）。また、AAV2-hFIX16 の静脈内投与後に精液からの AAV ベクターのゲノム配列が検出される期間を検討した結果、ゲノムは経時的に減少し、最終

的に検出限界以下となったことから、ゲノム配列の検出は用量・時間依存的であると推定された（文献29）。これらの試験で用いた Nested-PCR 法の検出感度は、6000 細胞あたり 1 コピー（ゲノム DNA 1 µg あたりおよそ 50 コピー）以上であった。AAV8-hFIX16 についても評価されている（文献30）。これら AAV2-hFIX16 及び AAV8-hFIX16 を評価した非臨床試験において、精液からの AAV ベクターのクリアランスは、血清型によらず、用量及び時間依存的であった。さらに、生殖細胞のない精管切除動物の精液から AAV2 及び AAV8 の配列が検出されたことから、精液への AAV ベクターの混入には精巣と同様に尿生殖路も関与していると考えられる。これらの非臨床試験の結果、並びに臨床試験における、AAV8-FIX ベクターを全身投与した後に精液中からベクターゲノムが検出されたが経時的に検出されなくなったとする報告（IND 15149、文献 10）から、男性被験者において AAV8 ベクターが生殖細胞に取り込まれるリスクは、AAV2 と同様に低いと考えられる。

偶発的な生殖細胞への取込みのリスクを評価するため、ウサギを用いて FIX 遺伝子を組み込んだ AAV-Spark100（AAV-Spark100-hFIX16 又は AAV-Spark100-hFIX19-Padua）の精液への伝播を評価する非臨床試験を実施した結果、ほとんどのウサギで投与 10 週以降は AAV-Spark100 ベクター配列は検出されなくなり、投与 4 ヶ月に最終の陽性検体が検出された。

カニクイザルに対して臨床グレードの AAV5 ベクター（ $1 \times 10^{13}$  vg/kg 及び  $5 \times 10^{13}$  vg/kg）を静脈内投与して、その排出を経時的に検討した非臨床試験結果が報告されている（文献 31）。AAV5 ベクターの排出は血清、唾液、尿、鼻汁、便、精液に関して定量的 PCR 法を用いて検討した結果が示されている。血清中の AAV5 ベクター DNA 量は投与後 8 時間にピークを示し、その後低下した。唾液、尿、鼻汁、便では低い量の AAV5 ベクター DNA が一過性に認められた。精液では高用量を投与した雄 1 匹で投与後 8 日目のみで認められた。

AAV5 ベクターの排出プロファイルの特徴としては、血清では投与直後にピークを示し、その後は経時的に減少した。一方で、唾液、尿、鼻汁、便においては、血清でみられたような投与直後に明らかなピークは認められず、比較的なだらかな変化を示している。尿におけるベクター排出は、唾液、便等と比較して排出頻度も量も少ないと考えられる。

## 6 国外における使用等により得られた情報

現在までに、遺伝子治療用の AAV ベクターは、血友病 B を対象とする複数の臨床試験（文献 811、32）の他、様々な疾患を対象とする臨床試験でヒトに投与されており、安全性プロファイルは全般的に良好であった（文献 6、12）。AAV ベクター投与後に、一部の被験者で肝機能値の上昇が報告されており、これは肝細胞に感染した AAV のキャプシドのペプチドに対する T 細胞応答の結果であり、AAV ベクターの用量依存的であると考えられている。肝機能値の上昇は無症候性かつ一過性であり、重大な転機に至った患者は報告されていない。これらの臨床試験において、増殖能を持つ AAV の出現は報告されていない。また、投

与後の体液への AAV ベクターの排出は一定期間認められるものの、その量は投与量に比して少なく、また経時的に減少し、最終的に検出されなくなることが報告されている。

PF-06838435 については、現在■■■■試験が進行中である。2016年6月に公表された中間報告(文献33)では、PF-06838435 を  $5 \times 10^{11}$  vg/kg を投与された4例の被験者の投与後7~26週までの評価において、被験者の FIX 活性は、1例目から4例目までそれぞれ29%、35%、27%及び28%であり、治験薬及び治験手順に関連のある重篤な有害事象は報告されておらず、FIX に対するインヒビター(中和抗体)の発現もみられていない。また、本製品投与後に被験者由来の検体(唾液、尿、精液)からベクターDNA が検出されるが、経時的に減少することが確認されている(別紙5)。

AAV2-FIX16 を肝動脈から投与した臨床試験では、尿、血清、末梢血単核球、精液への排出を評価し、投与された7例全例の検体からベクターのゲノム配列が検出されたが、経時的に検出されなくなった(文献9)。また、AAV8-FIX ベクターを用いた臨床試験においても尿、唾液、血清、末梢血単核球、精液への排出を評価し、投与された3例全例の検体からベクターのゲノム配列は検出されたが、AAV2 を用いた臨床試験と同様に、経時的に検出されなくなった(別紙5)。

血友病 B 患者に対する FIX 遺伝子治療の臨床試験において、AAV8 ベクター ( $2 \times 10^{11}$ 、 $6 \times 10^{11}$  及び  $2 \times 10^{12}$  vg/kg) を静脈内投与して、排出を経時的に検討した結果が報告されている(文献11)。排出は血漿、唾液、尿、便、精液に関して定量的 PCR 法を用いて検討されている。血漿中の排出量は、 $2 \times 10^{12}$  vg/kg 投与した患者から投与初日に約  $1 \times 10^6$  コピー検出され、投与初日をピークにその後急速に低下した。 $2 \times 10^{11}$  及び  $6 \times 10^{11}$  vg/kg 投与した患者では約 100~1000 コピー及び  $1 \times 10^3$ ~ $1 \times 10^5$  コピー検出され、その後高用量投与した患者と同様に急速に低下した。唾液、便でも低い量の排出が認められた。唾液、便に比較して尿で検出される頻度は低く排出量も低値であった。

急性間欠性ポルフィリン症患者に対する遺伝子治療の臨床試験において、AAV5 のキャプシドを有する AAV2/5 ベクター ( $5 \times 10^{11}$ 、 $2 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12}$  及び  $1.8 \times 10^{13}$  vg/kg) を静脈内投与し、血清、唾液、鼻汁、尿、便、精液に関してその排出を定量的 PCR 法を用いて検討した結果が示されている(文献34)。血清中のベクター排出量は投与初日にピーク(最大約  $3 \times 10^6$  コピー/ $\mu$ L)を示しその後低下した。唾液、鼻汁、尿、便でも低レベルの排出が認められた。唾液、鼻汁、尿に関しては排出が検出された頻度も低く、排出プロファイルに一定の傾向は認められなかった。便に関しては投与後1週間に排出のピーク(最大約 3000 コピー/ $\mu$ L)が認められた。精液では AAV2/5 ベクターはほとんど検出されなかった。

上述のとおり、PF-06838435 を用いた■■■■試験の中間報告において、本製品投与後に被験者由来の検体からベクターDNA が検出されるが、経時的に減少することが確認されてい

る。なお、本試験における投与後最初の規定来院日は投与後 1 週間であることから、投与直後の排出プロファイルは明らかではないが、ヘルパーウイルス非存在下では、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子を欠失した遺伝子組換え AAV は増殖性はないこと、さらに考え得る第三者への曝露は静脈以外の経路を介した曝露であり、経静脈投与と比較して高率に標的臓器である肝臓に移送される可能性は低いことから、医療従事者・家族などの曝露の可能性が最も高い第三者ですら患者由来の検体に含まれる AAV ベクターを介した有害な影響はないと考えられる。

PF-06838435 の排出プロファイル、並びに患者由来排出物の環境への影響についての詳細な考察は別紙 5 に示す。

## IV 生物多様性影響評価

### 1 他の微生物を減少させる性質

#### (1) 影響を受ける可能性のある微生物の特定

PF-06838435 の感染宿主域は AAV8 又は AAV10 と同様と考えられ、他の微生物に感染することはなく、競合や有害物質の産生を通じて他の微生物に影響を与えることもない。したがって、影響を受ける可能性のある微生物は特定されない。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

該当せず。

#### (3) 影響の生じやすさの評価

該当せず。

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上より、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられる。

### 2 病原性

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

PF-06838435 の感染宿主域は、AAV8 又は AAV10 と同様と考えられ、ヒト、マウスやサル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

これまでに、数百人にのぼる遺伝子治療用 AAV ベクターの投与経験と、全般的に良好な安全性プロファイルを示すデータが報告されており、遺伝子治療用 AAV ベクターに関する病原性や重篤な副作用の報告はない。

(3) 影響の生じやすさの評価

野生型 AAV は、病原性がないことが知られているが、PF-06838435 は *rep* 及び *cap* 遺伝子を欠失しており、さらに安全性が高められている。PF-06838435 の製造の際に、複製能を有する AAV が非常にまれではあるが生成される可能性は、完全には否定できない。しかし、最終製品に複製能を有する AAV が存在しないことは規格試験において確認されている。したがって、第一種使用規程に従って使用等を行う限り、PF-06838435 が第三者及び野生動物に対して病原性を示す可能性は極めて低い。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上より、病原性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれは極めて低いと考えられる。

3 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

PF-06838435 の感染宿主域は、AAV8 又は AAV10 と同様と考えられ、ヒト、マウスやサル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

PF-06838435 により、感染細胞内でヒト内在性タンパク質である血液凝固第 IX 因子が新たに産生され、血中の血液凝固活性が上昇する可能性があるが、新たな有害物質が産生されることはない。

(3) 影響の生じやすさの評価

PF-06838435 を第一種使用規程に基づいて使用する限り、第三者や野生動植物に伝播することはなく、影響を生じることはない。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上より、PF-06838435 を第一種使用規程に基づいて使用する限り、有害物質が産生される可能性は低く、有害物質の産生性に基づいて生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられる。

4 核酸を水平伝達する性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物又は他の微生物の特定

PF-06838435 の感染宿主域は、AAV8 又は AAV10 と同様と考えられ、ヒト、マウスやサル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

PF-06838435 の生活環及び感染経路は野生型 AAV と同様であると考えられる。野生型 AAV

は、ヘルパーウイルスとの共感染により増殖し、第三者や野生動物に水平感染する可能性は否定できないが（文献35）、野生型 AAV の 2 本鎖 DNA が *in vivo* で染色体に組み込まれる可能性は低いと考えられる。

複製に必須の遺伝子産物を提供する野生型 AAV と、アデノウイルス又は単純ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルス及び PF-06838435 が同時に一つの肝細胞に感染する（3 重感染）などのまれな状況が起きた場合、AAV の複製が起きる可能性がある。ウイルス学的な結果として PF-06838435 及び野生型 AAV の産生増加となる。

### （3）影響の生じやすさの評価

*rep/cap* 欠損 AAV は単独でヒト体内で増殖する能力はなく、また体外への排出量も微量とされており、PF-06838435 も同様の性質を有すると考えられる。したがって、第三者あるいは動物への感染リスクは非常に低い。類似の *rep/cap* 欠損 AAV について検討した試験において、その排出レベルは比較的低く、時間経過に伴って完全に消失することが報告されている。PF-06838435 は *rep/cap* 遺伝子を欠損していることから増殖性はない。また、第三者等への水平感染が生じた場合においても、引き続き PF-06838435 由来の核酸が感染細胞のゲノムに挿入されるリスクは極めて低いと考えられる。

PF-06838435 が、製造プロセスに由来する野生型 AAV 又は環境中の野生型 AAV との間で、相同組換えを起こす可能性があるが、PF-06838435 及び野生型 AAV の間での相同組換えは同じ細胞に存在した場合のみ起きる。しかしながら、そのような組換えは hFIX 発現カセットが野生型ウイルスの *rep* 及び *cap* 遺伝子と組み換えられるだけである。ウイルス粒子のパッケージングの限界があるので、*rep/cap* 遺伝子及び導入遺伝子の両者を含んだ新たな遺伝子組換え AAV は生じない。

### （4）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規程に従って PF-06838435（これに混入した、又は PF-06838435 由来の野生型 AAV を含む）を使用した場合に、第三者が PF-06838435 に曝露されるリスク、引き続き核酸が感染細胞に水平伝達されるリスクはいずれも低いと考えられ、核酸を水平伝達する性質に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられる。

## 5 その他の性質

なし

## V 総合的評価

PF-06838435 が感染しうる動物は哺乳類動物であり、影響を受ける可能性のある植物及び他の微生物はない。PF-06838435 は野生型 AAV と同様に病原性はない。また、第一種使用規程に従う限り、第三者が PF-06838435 に直接曝露する可能性は非常に低く、万一第三者へ

伝播が生じた場合にも、第三者への曝露量は臨床試験における投与量と比較して非常に少ないことからこれに伴って有害な影響が生ずるおそれも低いと考えられる。さらに、PF-06838435 は複製能を欠失している。したがって、第一種使用規程に従い PF-06838435 を使用する限り、他の微生物を減少させる性質、病原性、核酸を水平伝達する性質、その他の性質に基づいて影響が生ずるおそれは極めて低いと考えられる。

## 引用文献

- 1 Carter BJ. In DD Lassic & N Smyth Templeton. Gene Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies. New York City: Marcel Dekker, Inc. 2000;41-59.
- 2 Tijssen, P. ed., Handbook of Parvoviruses, 1990;Volume I:11-30, CRC press, Boca Raton, FL.
- 3 Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, et al. Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. J Virol. 2004;78(12):6381-8.
- 4 Mori S, Wang L, Takeuchi T, et al. Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudo-typing characterization of capsid protein. Virology. 2004;330(2):375-83.
- 5 Schmidt M, Voutetakis A, Afione S, et al., Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. J Virol. 2008;82(3):1399-406.
- 6 Mingozzi F and High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: Progress and challenges. Nat Rev Genet. 2011;12(5):341-55.
- 7 Kay MA, Manno CS, Ragni MV, et al. Evidence for Gene Transfer and Expression of Factor IX in Haemophilia B Patients Treated with an AAV Vector. Nat Genet. 2000;24(3):257-61.
- 8 Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. Blood. 2003;101(8):2963-72.
- 9 Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. Nat Med. 2006;12(3):342-7.
- 10 Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vectormediated gene transfer in hemophilia B. N Engl J Med. 2011;365(25):2357-65.
- 11 Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. N Engl J Med. 2014;371(21):1994-2004.
- 12 High KA and Aubourg P. rAAV human trial experience. Methods Mol Biol. 2011;807:429-57.
- 13 Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, et al. An essential receptor for adeno-associated virus infection. Nature. 2016; 530:108-12.
- 14 Nonnenmacher M and Weber T. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. Gene Ther. 2012;19(6):649-58.
- 15 Lisowski L, Tay SS and Alexander IE. Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. Curr Opin Pharmacol 2015;24:59-67.

- 
- 16 Daya S and Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):583-93.
  - 17 Chen CL, Jensen RL, Schnepf BC, et al. Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J Virol.* 2005;79(23):14781-92.
  - 18 Schnepf B, Jensen RL, Chen CL, et al. Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol.* 2005;79(23):14793-803.
  - 19 Miao CH, Ohashi K, Patijn GA, et al. Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro. *Mol Ther.* 2000;1(6):522-32.
  - 20 Graham FL, Smiley J, Russell WC, et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus Type 5. *J Gen Virol.* 1977;36(1):59-74.
  - 21 Miao CH, Snyder RO, Schowalter DB, et al. The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nat Genet.* 1998;19(1):13-5.
  - 22 Nakai H, Yant SR, Storm TA, et al. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol.* 2001;75(15):6969-76.
  - 23 Rutledge EA and Russell DW. Adeno-associated virus vector integration junctions. *J Virol.* 1997;71(11):8429-36.
  - 24 Niemeyer GP, Herzog RW, Mount J, et al. Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood.* 2009;113(4):797-806.
  - 25 Nichols TC, Whitford MH, Arruda VR, et al. Translational data from adeno-associated virus-mediated gene therapy of hemophilia B in dogs. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2015;26(1):5-14.
  - 26 Arruda, VR, Fields PA, Milner R, et al. Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males. *Mol Ther.* 2001;4:586-592.
  - 27 Couto LB and Pierce GF. AAV-mediated gene therapy for hemophilia. *Curr Opin Mol Ther.* 2003;5(5):517-523.
  - 28 Couto LB, Parker A, Gordon JW. Direct exposure of mouse spermatozoa to very high concentrations of serotype-2 adeno-associated virus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction. *Hum Gen Ther.* 2004;15(3):287-91.
  - 29 Schuettrumpf, J, Liu JH, Couto LB, et al. Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Mol Ther.* 2006;13(6):1064-73.
  - 30 Favaro P, Downey HD, Zhou JS, et al. Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol Ther.* 2009;17(6):1022-30.

- 
- 31 Pañeda A, Lopez-Franco E, Kaepfel C, et al. Safety and liver transduction efficacy of rAAV5-cohPBGD in nonhuman primates: a potential therapy for acute intermittent porphyria. *Hum Gene Ther.* 2013;24(12):1007-17.
  - 32 Kay MA, Manno CS, Ragni MV, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet.* 2000;24(3):257–61.
  - 33 George LA, Sullivan SK, Teitel J, et al. Preliminary results of phase 1/2 trial of SPK-9001, a hyperactive FIX variant derived by a novel capsid, demonstrate consistent therapeutic factor IX activity levels at the lowest dose cohort. 21st Congress of European Hematology Association. July 9-12th, 2016.
  - 34 D'Avola D, López-Franco E, Sangro B, et al. Phase I open label liver-directed gene therapy clinical trial for acute intermittent porphyria. *J Hepatol.* 2016;65(4):776-83.
  - 35 Berns KI and Bohenzky RA. Adeno-associated viruses: An update. *Adv Virus Res.* 1987;32:243-306.