

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第1部門第1区分  
 【発行日】令和3年12月9日(2021.12.9)

【公表番号】特表2021-502123(P2021-502123A)  
 【公表日】令和3年1月28日(2021.1.28)  
 【年通号数】公開・登録公報2021-004  
 【出願番号】特願2020-544560(P2020-544560)  
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/864 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/12 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/113 (2010.01)  
 C 1 2 N 15/88 (2006.01)  
 C 1 2 N 9/16 (2006.01)  
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)  
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 9/08 (2006.01)  
 A 6 1 K 47/18 (2006.01)  
 A 6 1 K 47/02 (2006.01)  
 A 6 1 K 47/10 (2006.01)  
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 21/02 (2006.01)  
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z  
 C 1 2 N 15/12 Z N A  
 C 1 2 N 15/113 1 3 0 Z  
 C 1 2 N 15/88 Z  
 C 1 2 N 9/16 Z  
 A 6 1 K 35/76  
 A 6 1 K 48/00  
 A 6 1 K 9/08  
 A 6 1 K 47/18  
 A 6 1 K 47/02  
 A 6 1 K 47/10  
 A 6 1 P 43/00 1 0 5  
 A 6 1 P 21/02  
 A 6 1 P 25/00

【手続補正書】

【提出日】令和3年10月29日(2021.10.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

A A V ウィルスベクターの製造方法であって、  
 a . 接着細胞を培養すること；

- b. 前記接着細胞に1つ又は複数のプラスミドをトランスフェクトして前記AAVウイルスベクターの産生を可能にすること；
- c. 前記接着細胞を溶解させて前記AAVウイルスベクターを単離すること；
- d. 前記(c)の細胞ライセートを酸性化及び清澄化すること；
- e. 前記(d)の産物を陽イオン交換クロマトグラフィー(CEX)を用いて精製すること；
- f. 前記(e)の産物をタンジェンシャルフローろ過(TFF)を用いてろ過すること；
- g. 前記(f)の産物を塩化セシウム(CsCl)緩衝液中で超遠心すること；及び
- h. 前記(g)の産物から前記AAVウイルスベクターを回収すること

を含む方法。

【請求項2】

- a. 前記AAVがAAV9である、及び/又は
- b. 前記AAVが自己相補的(scAAV)である、及び/又は
- c. 前記接着細胞がHEK293細胞であり、場合により、ステップ(a)が、細胞培養培地の連続循環を提供することができる大規模バイオリアクターに前記細胞を播種することを含み、好ましくは前記播種密度が約8,000~12,000細胞/cm<sup>2</sup>である、及び/又は
- d. トランスフェクションステップ(b)が、アデノウイルスヘルパープラスミド(pHELP)、並びにAAV rep 遺伝子及びAAV cap 遺伝子をコードするプラスミドを前記接着細胞に接触させることを含み、場合により前記AAV rep 遺伝子がrep2であり、前記AAV cap 遺伝子がcap9であり、及び/又は
- e. トランスフェクションステップ(b)が、生存運動ニューロン(SMN)タンパク質をコードするポリヌクレオチド、MeCP2タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又はSOD1 shRNAをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドを前記接着細胞に接触させることを含み、場合により、
  - i. SMN1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む前記プラスミドが、修飾AAV2 ITR、ニワトリ - アクチン(CB)プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)前初期エンハンサー、修飾SV40後期16sイントロン、ウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化シグナル、及びAAV2 ITRを含む、及び/又は
  - ii. 前記ポリヌクレオチドが配列番号2のSMNタンパク質をコードする、
- f. 前記AAVウイルスベクターが配列番号1を含む、及び/又は
- g. トランスフェクションステップが、トランスフェクション剤ポリエチレンイミン(PEI)を前記接着細胞に接触させることを含む、及び/又は
- h. トランスフェクションステップが、血清、カルシウム、グルタミンのいずれも含まないトランスフェクション培地を前記接着細胞に接触させることを含む、及び/又は
- i. 溶解するステップが、ベンゾナーゼ及びTWEENを補足した溶解緩衝液を使用することを含む、及び/又は
- j. ステップ(c)の細胞ライセートを前記(d)の酸性化ステップ前に凍結することを更に含む、

請求項1に記載の方法。

【請求項3】

細胞培養ライセートからのAAVウイルスベクターの精製方法であって、

- a. 前記細胞ライセートを酸性化及び清澄化するステップ；
- b. 前記(a)の産物を陽イオン交換クロマトグラフィー(CEX)を用いて精製するステップ；
- c. 前記(b)の産物をタンジェンシャルフローろ過でろ過するステップ；
- d. 前記(c)の産物を2~4M塩化セシウム(CsCl)緩衝液を用いて超遠心するステップ；
- e. 前記(d)の産物から前記AAVウイルスベクターを収集するステップ；及び

f. 前記(e)の産物をタンジェンシャルフローろ過でろ過するステップを含む方法。

【請求項4】

a. 酸性化ステップが、前記細胞ライセートを約3.0~4.0のpHに酸性化することを含む、及び/又は

b. 前記超遠心が40,000~50,000rpmで実施される、及び/又は

c. 前記CsCl緩衝液が約3M CsCl、トリス、MgCl<sub>2</sub>、及びポロキサマー188を含み、約pH7.5~8.5である、及び/又は

d. 前記細胞ライセートが酸性化ステップの前にTweenと共にインキュベートされる、及び/又は

e. 前清澄化ステップが、前記細胞ライセートをデプスフィルタでろ過することを含む、及び/又は

f. 前記CEXがスルホニル樹脂を含む、及び/又は

g. 少なくとも1つのTFFステップが、300kDa MWの分子量カットオフのセルロース膜を使用することを含む、及び/又は

h. 空のウイルスカプシドの数が、前記超遠心した細胞ライセートから前記AAVウイルスベクターを収集した後の総ウイルスカプシドの7%未満、5%未満、3%未満、又は1%未満である、

請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

a. 2回目のTFFステップ後に収集される前記AAVウイルスベクターが、トリス、MgCl<sub>2</sub>、NaCl、及びポロキサマー188を含む溶液中に貯蔵され、pHが約pH7.5~8.5である、及び/又は

b. 2回目のTFF後に収集される前記AAVウイルスベクターが、約30µg/g未満又は約20µg/g未満のCsClを含有する、及び/又は

c. 2回目のTFF後に収集されるAAVウイルスベクターの濃度が約 $3 \times 10^{13}$ vg/ml以上である、

請求項3又は4に記載の方法。

【請求項6】

a. 産生されるAAV収率が、製造バッチ当たり $5 \times 10^{15}$ vg超、又は $8 \times 10^{15}$ vg超又は $1 \times 10^{16}$ vg超である、及び/又は

b. 前記AAVベクターが、生存運動ニューロン(SMN)タンパク質をコードするポリヌクレオチド、MeCP2タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又はSOD1shRNAをコードするポリヌクレオチドを含む、

請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

請求項1~6のいずれか一項に記載の方法により製造される、AAV9ウイルスベクターを含む医薬組成物。

【請求項8】

以下のうちの少なくとも1つ：

a.  $1.0 \times 10^{13}$ vg当たり約0.09ng未満のベンゾナーゼ、

b. 約30µg/g(ppm)未満のセシウム、

c. 約20~80ppmのポロキサマー188、

d.  $1.0 \times 10^{13}$ vg当たり約0.22ng未満のBSA、

e.  $1.0 \times 10^{13}$ vg当たり約 $6.8 \times 10^5$ pg未満の残留プラスミドDNA、

f.  $1.0 \times 10^{13}$ vg当たり約 $1.1 \times 10^5$ pg未満の残留hcDNA、

g.  $1.0 \times 10^{13}$ vg当たり約4ng未満のrHCP、

h. 約pH7.7~8.3、

i. 約390~430mosm/kg、

j. 容器当たり約600個未満の25µmサイズの粒子、

k . 容器当たり約 6 0 0 0 個未満の 1 0 μ m サイズの粒子、  
 l . 約  $1 . 7 \times 1 0^{13} \sim 2 . 3 \times 1 0^{13}$  v g / m L のゲノム力価、  
 m .  $1 . 0 \times 1 0^{13}$  v g 当たり約  $3 . 9 \times 1 0^8 \sim 8 . 4 \times 1 0^{10}$  I U の感染力価

n .  $1 . 0 \times 1 0^{13}$  v g 当たり約 1 0 0 ~ 3 0 0 μ g の全タンパク質、

o . 約 7 0 ~ 1 3 0 % の相対効力、及び

p . 約 5 % 未満の空のカプシド

を含む、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

a .  $1 \sim 8 \times 1 0^{13}$  A A V 9 ウイルスベクターゲノム / m L ( v g / m L ) ;

b . 約 7 % 未満の空のウイルスカプシド ;

c .  $1 \times 1 0^{13}$  v g / m L 当たり約 1 0 0 n g / m L 未満の宿主細胞タンパク質 ;

d .  $1 \times 1 0^{13}$  v g / m L 当たり約  $5 \times 1 0^6$  p g / m L 未満の残留宿主細胞 DNA を含む医薬組成物であって ;

前記  $1 \sim 8 \times 1 0^{13}$  A A V 9 ウイルスベクターゲノム / m L の少なくとも約 8 0 % が機能性である、医薬組成物。

【請求項 1 0】

a . 前記 A A V 9 ウイルスベクターが、生存運動ニューロン ( S M N ) タンパク質をコードするポリヌクレオチド、M e C P 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は S O D 1 s h R N A をコードするポリヌクレオチドを含む、及び / 又は

b . 前記 A A V 9 ウイルスベクターが、修飾 A A V 2 I T R、ニフトリ - アクチン ( C B ) プロモーター、サイトメガロウイルス ( C M V ) 前初期エンハンサー、修飾 S V 4 0 後期 1 6 s イントロン、ウシ成長ホルモン ( B G H ) ポリアデニル化シグナル、及び 非修飾 A A V 2 I T R を含む、及び / 又は

c . 前記 A A V 9 ウイルスベクターが配列番号 1 を含む、及び / 又は

d . 組成物が、 $1 . 7 \sim 2 . 3 \times 1 0^{13}$  A A V 9 v g / m L を含む、及び / 又は

e . 組成物が、水性医薬製剤であり、場合により

i . 前記水性医薬製剤が、トリス緩衝液、M g C l <sub>2</sub>、N a C l、及び ポロキサマー 1 8 8 を含む、及び / 又は

i i . 前記水性医薬製剤が保存剤を含まない、

請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 1】

前記ポリヌクレオチドが配列番号 2 の S M N タンパク質をコードする、請求項 1 0 a 又は 1 0 b に記載の医薬組成物。

【請求項 1 2】

( i ) 前記トリス緩衝液濃度が約 1 0 ~ 3 0 n M である、

( i i ) 前記製剤の pH が約 7 . 7 ~ 約 8 . 3 である、

( i i i ) 前記 M g C l <sub>2</sub> 濃度が約 0 . 5 ~ 1 . 5 m M である、

( i v ) 前記 N a C l 濃度が約 1 0 0 ~ 3 0 0 m M である、

( v ) 前記製剤が、約 0 . 0 0 5 % w / v のポロキサマー 1 8 8 を含む、又は

( v i ) 前記水性医薬製剤が、3 9 0 ~ 4 3 0 m O s m / k g のオスモル濃度を有する、請求項 1 0 e ( i ) 又は 1 0 e ( i i ) に記載の組成物。

【請求項 1 3】

それを必要としている患者における I 型脊髄性筋萎縮症 ( S M A ) の治療のための請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の組成物であって、前記患者が、

a . 9 ヶ月齢以下であり ;

b . 少なくとも約 2 . 6 k g の体重であり ;

c . 両アレル性 S M N 1 ヌル突然変異又は欠失を有し ; 及び

d . S M N 2 の少なくとも 1 つの機能性コピーを有する、組成物。

【請求項 1 4】

a . 前記ウイルスベクターが約  $1 \sim 2.5 \times 10^{14}$  v g / k g の用量で投与される、及び / 又は

b . 前記患者が約 8 . 5 k g 以下の体重である、及び / 又は

c . 前記患者が S M N 2 遺伝子の少なくとも 1 つのコピーのエクソン 7 に c . 8 5 9 G > C 置換を有しない、及び / 又は

d . 前記組成物が 6 ヶ月齢より前に、又は筋緊張低下、運動技能遅滞、定頸不全、円背姿勢及び関節過度可動性から選択される 1 つ以上の S M A 症状が発生する前に前記患者に投与される、及び / 又は

e . 前記ウイルスベクターが、約 5 ~ 2 0 m L / k g、約 1 0 ~ 2 0 m L / k g、又は約 5 . 5 ~ 6 . 5 m L / k g のトリス緩衝生理食塩水で投与される、及び / 又は

f . 有効性が C H O P - I N T E N D 尺度を用いて決定される、及び / 又は

g . 2 . 6 ~ 3 . 0 k g の体重の患者について 1 6 . 5 m L の用量、3 . 1 ~ 3 . 5 k g の体重の患者について 1 9 . 3 m L の用量、3 . 6 ~ 4 . 0 k g の体重の患者について 2 2 . 0 m L の用量、4 . 1 ~ 4 . 5 k g の体重の患者について 2 4 . 8 m L の用量、4 . 6 ~ 5 . 0 k g の体重の患者について 2 7 . 5 m L の用量、5 . 1 ~ 5 . 5 k g の体重の患者について 3 0 . 3 m L の用量、5 . 6 ~ 6 . 0 k g の体重の患者について 3 3 . 0 m L の用量、6 . 1 ~ 6 . 5 k g の体重の患者について 3 5 . 8 m L の用量、6 . 6 ~ 7 . 0 k g の体重の患者について 3 8 . 5 m L の用量、7 . 1 ~ 7 . 5 k g の体重の患者について 4 1 . 3 m L の用量、7 . 6 ~ 8 . 0 k g の体重の患者について 4 4 . 0 m L の用量、及び 8 . 1 ~ 8 . 5 k g の体重の患者について 4 6 . 8 m L の用量からなる群より選択される用量容積で投与される、及び / 又は

h . 前記組成物が、髄腔内又は静脈内注入によってそれを必要としている患者に投与され、場合により、前記ウイルスベクターが約 4 5 ~ 7 5 分かけて注入される、請求項 1 3 に記載の組成物。

**【請求項 1 5】**

生存運動ニューロン ( S M N ) タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、且つ p H 7 . 7 ~ 8 . 3、で 2 0 m M トリス、1 m M M g C l <sub>2</sub>、2 0 0 m M N a C l、0 . 0 0 5 % w / v ポロキサマー 1 8 8 中約  $2.0 \times 10^{13}$  v g / m L の濃度で製剤化された約 5 . 5 m L 又は約 8 . 3 m L の A A V 9 ウイルスベクターを含むバイアルを含むキット。

**【請求項 1 6】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載により製造される、アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターを含む組成物又は製剤であって、疾患発症を伴う又は伴わない脊髄性筋萎縮症 ( S M A ) I 型小児患者の治療のための組成物。

**【請求項 1 7】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載により製造される、アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクター、又は請求項 7 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物を含む、I 型脊髄性筋萎縮症 ( S M A ) の治療のためのキット。

**【請求項 1 8】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載により製造される、S M N タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクター。

**【手続補正 2】**

**【補正対象書類名】** 明細書

**【補正対象項目名】** 0 2 8 3

**【補正方法】** 変更

**【補正の内容】**

**【0 2 8 3】**

本試験においては、先行ベクターバッチ ( 以下、先行バッチ ) を使用して、0 . 9 % 生理食塩水を使用した 0 ( ゼロ ) 用量 ( 未治療群 ) を含む 5 つの異なる用量レベルで薬物製品 ( 以下、サンプルバッチ ) を投与したときの S M A 7 マウスの生存期間中央値 ( 日 )

の間の線形相関を決定した。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0284

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0285

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0285】

先行バッチ参照標準の線形回帰曲線を薬物製品サンプルバッチ線形回帰曲線と比較することにより、薬物製品サンプルバッチの相対効力を確立した。これは、各線形回帰線（即ち、参照標準及び試験物質）の y 切片及び傾きの比を用いることにより達成された。パーセント相対効力計算は、以下の式（1）に記述される： $\%RP = [ ( \text{試験物質の y 切片} / \text{傾き} ) \div ( \text{参照標準の y 切片} / \text{傾き} ) ] \times 100$ （1）

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0287

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0288

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0288】

7 マウスモデルを使用して、薬物製品を含めた SMA 療法の有効性を実証した。TF F 3 緩衝溶液（媒体）治療対照動物は信頼できるベースライン対照を提供し、それからの生存期間中央値の増加として製品効力を測定することができる。薬物製品による開発作業では、投与用量（v g / k g）を対数変換して、治療された SMA 7 新生仔マウスの生存期間中央値（日数単位）に対してプロットしたとき線形相関でマウスモデルの生存に影響を及ぼすドロップレットデジタル PCR（ddPCR）を用いたゲノム力価によって決定される 3 つの用量（媒体治療用量を除く）が同定された。低力価、中間力価、及び高力価標準については、表 11 の標準力価（v g / m L）を参照のこと。加えて、検量線ゼロ点並びに陰性対照の両方に T F F 緩衝液（媒体）溶液が使用される。40 日の生存期間を実証する用量（生存期間中央値の倍増を実証する用量より高い）もまた、陽性対照として含めた。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0295

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0295】

参照標準用量反応曲線の受入れ限界

投与用量（v g / m L）に対して生存期間中央値（日）をプロットする参照標準線形用量反応曲線について、アッセイ適合性判定基準が決定されることになる。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0296

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0343

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0356

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0356】

第1相臨床試験に使用したAVXS-101に関して同等性試験を完了した。評価は、ネーションワイド小児(Nationwide Children's)で製造された1相臨床薬物製品ロットNCHAAV9SMN0613及びAveXisで製造されたAVXS-101薬物製品ロット600156を使用して実施した。加えて、工程Bロット600156及び600307を使用して製造の一貫性を判定した。同等性評価(工程A対工程B)及び製造の一貫性(工程Bロット600156対600307)の両方について、本試験では、新規改良された工程及び分析的方法を用いてAVXS-101臨床試験材料のアイデンティティ、品質、純度を判定し、同等性及び製造の一貫性のロバストな評価を可能にした。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0357

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0357】

定量的品質特性に関して統計的分析を実施した。比較は工程AロットNCHAAV9SMN0613と工程Bロット600156との間でペアワイズで実施した。工程Aと比べて工程Bの方が、より高純度でより多量のウイルスベクターを産生した良好な方法であった。例えば、工程Aと比較したとき、工程Bによって産生されたウイルスベクターは、感染力価が高く、ゲノム力価(genomic titer)が8%高く、10µm径超のサブミクロン粒子が92%少なく、25µm径超のサブミクロン粒子が50%少なく、空のカプシドが100%少なく、及び残留hcDNAが11%少なかった。結果は全て、各品質特性の試験限界と比べて一貫性があった。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0396

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0396】

本試験においては、先行ベクターバッチ(以下、先行バッチ)を使用して、0.9%生理食塩水を使用した0(ゼロ)用量(未治療群)を含む5つの異なる用量レベルで薬物製品を投与したときのSMA7マウスの生存期間中央値(日)の間の線形相関を決定した

。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0397

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0398

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0398】

これは、各線形回帰線（即ち、参照標準及び試験物質）のy切片及び傾きの比を用いることにより達成された。パーセント相対効力計算は、以下の式（1）に記述される：

$$\%RP = [ ( \text{試験物質のy切片} / \text{傾き} ) \div ( \text{参照標準のy切片} / \text{傾き} ) ] \times 100 \quad (1)$$

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0399

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0400

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0401

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0401】

7マウスモデルを使用して、薬物製品を含めたSMA療法薬の有効性を実証した。未治療又は生理食塩水治療対照動物は信頼できるベースライン対照を提供し、それからの生存期間中央値の増加として製品効力を測定することができる。薬物製品による開発作業では、投与用量（vg/kg）を対数変換して、治療されたSMA 7新生仔マウスの生存期間中央値（日数単位）に対してプロットしたとき線形相関でマウスモデルの生存に影響を及ぼすドロップレットデジタルPCR（ddPCR）を用いたゲノム力価によって決定される3つの用量（媒体治療用量を除く）が同定された。低力価、中間力価、及び高力価標準については、表26の標準力価（vg/mL）を参照のこと。加えて、検量線ゼロ点並びに陰性対照の両方にTFE緩衝液（媒体）溶液が使用される。40日の生存期間を実証する用量（生存期間中央値の倍増を実証する用量より高い）もまた、陽性対照として含めた。

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0408

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0408】

参照標準用量反応曲線の受入れ限界

投与用量（vg/mL）に対して生存期間中央値（日）をプロットする参照標準線形用量反応曲線について、アッセイ適合性判定基準が決定されることになる。

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

- 【補正対象項目名】0409  
 【補正方法】削除  
 【補正の内容】  
 【手続補正20】  
 【補正対象書類名】図面  
 【補正対象項目名】図17-2  
 【補正方法】変更  
 【補正の内容】  
 【図17-2】

試験詳細	試験方法	提案される試験限界	NCH第1相ロット NCHAAV9SMN0613 製造日: 2013年12月18日 試験日: 2017年2月13日~ 2017年8月8日 <sup>(1)</sup>	AVXS-101 ロット600156 製造日: 2017年11月7日 試験日: 2017年11月8日~ 2017年12月26日	AVXS- 101ロット600307 製造日: 2017年12月4日 試験日: 2017年12月5日~ 2017年1月30日
SDS-PAGEによる 総不純物	SOP-180	%総不純物 ≤5%  非単一不特定不純物 >2%  特定不純物: 報告値  -- Imp 1A (約71~73kDa) -- Imp 1 (約51~67kDa) -- Imp 2 (約56~64kDa) -- Imp 3 (約48~58kDa) -- Imp 4 (約33~38kDa) -- Imp 5 (約30~34kDa)	%総不純物: 2% (平均n=4ゲル)  個別不純物 (平均n=4ゲル) -- Imp 1: 1.3% -- Imp 3: <LOQ (1.0%)	%総不純物: 1% (平均n=4ゲル)  個別不純物 (平均n=4ゲル) -- Imp 1: <LOQ (1.0%) -- Imp 3: <LOQ (1.0%) -- Imp 4: <LOQ (1.0%)	%総不純物: 1% (平均n=4ゲル)  個別不純物 (平均n=4ゲル) -- Imp 1: 1.0% -- Imp 4: <LOQ (1.0%)
ウエスタンによる ベクター アイデンティティ	SOP-179	AAVカプシド タンパク質陽性	AAVカプシド タンパク質陽性  主バンド分子量 VP1: 79.7 kDa VP2: 64.1 kDa VP3: 55.7 kDa	AAVカプシド タンパク質陽性  主バンド分子量 VP1: 80.2 kDa VP2: 66.2 kDa VP3: 58.2 kDa	AAVカプシド タンパク質陽性  主バンド分子量 VP1: 79.1 kDa VP2: 64.8 kDa VP3: 57.5 kDa
ELISAによる 残留HCP	SOP-183	1.0×10 <sup>13</sup> vg/mL当たり ≤40ng/mL	< LOQ (8 ag/mL) <sup>(2)</sup>	< LOQ (8 ag/mL) <sup>(2)</sup>	< LOQ (8 ag/mL) <sup>(2)</sup>
ddPCRによるベクター ゲノムアイデンティティ	SOP-137	確認	確認	確認	確認
ELISAによる 残留BSA	SOP-181	1.0×10 <sup>13</sup> vg/mL当たり ≤3.0ng/mL	< LOQ (0.50 ag/mL) <sup>(2)</sup>	< LOQ (0.50 ag/mL) <sup>(2)</sup>	< LOQ (0.50 ag/mL) <sup>(2)</sup>
ELISAによる 残留 ベンゾナーゼ	SOP-182	1.0×10 <sup>13</sup> vg/mL当たり ≤1.0ng/mL	< LOQ (0.20 ag/mL) <sup>(2)</sup>	< LOQ (0.20 ag/mL) <sup>(2)</sup>	< LOQ (0.20 ag/mL) <sup>(2)</sup>
インビボ 相対効力	SOP-285	80~100%	100% <sup>(3)</sup>		

<sup>1</sup> ddPCRによるゲノム力価について、NCH第1相ロットAAV9SMN0613は現在の「提案される試験限界」より前に製造された。

このロットのゲノム力価値は、改良版SOP-137(v3)を用いて2017年8月に確立し直された。

<sup>2</sup> 工程Aロットと工程Bロットとの間のゲノム力価結果の差は、製造目標濃度が異なることに起因する。ロットNCH AAV9SMN0613は当初、現行使用されているddPCRアッセイ(SOP-137)により現在1.1×10<sup>13</sup>vg/mLと決定される低い目標力価濃度で製剤化されたが、一方、AVXS-101ロット600156及び600307は、同じ方法(SOP-137)により測定したとき4.0×10<sup>13</sup>vg/mLの目標力価濃度で製剤化された。

<sup>3</sup> 2.0×10<sup>13</sup>vg/mL~6.0×10<sup>13</sup>vg/mLの許容濃度範囲で適切な規格を実現するための1.0×10<sup>13</sup>vg/mL当たりの調整後の結果。実測値に以下の係数を乗じて1.0×10<sup>13</sup>vg/mL当たりの値が求められた: 1/1.06 (ロットNCH AAV9SMN0613)、1/3.7 (ロット600156)及び1/4.0 (ロット600307)。

<sup>4</sup> 工程Aと工程Bとの間の外観結果の差は、ベクター濃度(ゲノム力価)が異なることに起因する。ロットNCH AAV9SMN0613は工程Bロットと比べてベクター濃度が大幅に低い。結果として、ロットNCH AAV9SMN0613は希釈度が高く、より澄明な無色の溶液につながり、一方、工程Bロットの無色~白色及びやや不透明な観察結果は、1mL当たりの溶液中におけるウイルス粒子濃度が4倍近いことによって生じる。

<sup>5</sup> 結果がそれぞれの方法のLOQ未満であるため、1.0×10<sup>13</sup>vg/mLに調整していない実際の結果。

<sup>6</sup> ロットNCHAAV9SMN0613はSOP-285の初期効力参照標準に指定され、100%の効力値が割り当てられる。結果は全て、SOP-285 v5を用いて生成された。

図 17B

- 【手続補正21】  
 【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 1 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 1 8】

試験詳細	提案される試験限界	ペアワイズ比較		
		工程A (第1相)	工程B (第3相)	%相対差
ddPCRによるゲノムカ価	$2.9 \times 10^{12} \sim 6.0 \times 10^{12}$ vg/mL	$1.1 \times 10^{12}$ vg/mL	$3.7 \times 10^{12}$ vg/mL	NA <sup>(1)</sup>
感染力価	報告結果	$0.59 \times 10^{10}$ IU/mL	$1.3 \times 10^{10}$ IU/mL	120% <sup>(2)</sup>
サブミクロン粒子 $\geq 10\mu\text{m}$	$\leq 6000$ 粒子/容器 $\geq 10\mu\text{m}$	22	119	441% <sup>(3)</sup>
サブミクロン粒子 $\geq 25\mu\text{m}$	$\leq 600$ 粒子/容器 $\geq 25\mu\text{m}$	4	4	0%
pH	7.5~8.5	7.9	7.9	0%
オスモル濃度	384~448 mOsm/kg	410 mOsm/kg	415 mOsm/kg	1%
外観	澄明~やや不透明, 無色~淡白色の溶液, 目に見える 粒子状物質がない	澄明且つ 無色の溶液, 目に見える 粒子がない	淡白色, やや不透明, 目に見える 粒子がない	NA
BCAによる全タンパク質	$1.0 \times 10^{13}$ vg/mL当たり 128~320 $\mu\text{g/mL}$	167 $\mu\text{g/mL}$	179 $\mu\text{g/mL}$	7%
qPCRによる残留hcDNA	$1.0 \times 10^{13}$ vg/mL当たり $\leq 1.2 \times 10^6$ pg/mL	$3.7 \times 10^5$ pg/mL	$0.76 \times 10^5$ pg/mL	80%
AUCによる%空のカプシド	$\leq 7\%$	7%	2%	71% <sup>(4)</sup>
SDS-PAGEによる純度	$\geq 95\%$	98%	99%	1%
SDS-PAGEによる 総不純物	$\leq 5\%$	2%	1%	50%
ELISAによる残留HCP	$1.0 \times 10^{13}$ vg/mL当たり $\leq 40$ ng/mL	< LOQ (8 ng/mL)	< LOQ (8 ng/mL)	0%
ELISAによる残留BSA	$1.0 \times 10^{13}$ vg/mL当たり $\leq 3.0$ ng/mL	< LOQ (0.50 ng/mL)	< LOQ (0.50 ng/mL)	0%
ELISAによる 残留ベンゾナーゼ	$1.0 \times 10^{13}$ vg/mL当たり $\leq 1.0$ ng/mL	< LOQ (0.20 ng/mL)	< LOQ (0.20 ng/mL)	0%
インビボ相対効力	80~120%	100%		

<sup>(1)</sup> ゲノムカ価の製造目標が工程Aと工程Bとの間で変更されたため、%相対差は該当しない。

<sup>(2)</sup> この値は、多くの場合に真の値の50%~200%の間で変わり得る生物学的アッセイについての予想されるばらつきで見るべきである。とはいえ、AveXisは改良の必要性を認識していたとともに、最近になって追加の開発及び認定作業を実施してこのアッセイを改良した(SOP-328及びRPT-471)。また、AAV9ベースのウイルスベクターによるHeLa RC32細胞株の感染効率率は依然として課題であることにも留意しなければならない。

<sup>(3)</sup> 工程Aと工程Bとの間にサブミクロン粒子の大きな%相対差が認められる;しかしながら、工程Bの絶対値は提案される試験限界をはるかに下回っている。

<sup>(4)</sup> CsCl勾配を用いた工程Bは、イोजキサノールを使用した工程Aと比較したとき、空のカプシドの除去に一層有効である。

図 18

【手続補正 2 2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 1 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 図 1 9 】

試験詳細	提案される試験限界	ペアワイズ比較		
		工程B (600156)	工程B (600167)	%相対差
ddPCRによる ゲノムカ価	$2.0 \times 10^{13} \sim 6.0 \times 10^{13}$ vg/mL	$3.7 \times 10^{13}$ vg/mL	$4.0 \times 10^{13}$ vg/mL	8%
感染カ価	報告結果	$1.3 \times 10^{10}$ IU/mL	$0.67 \times 10^{10}$ IU/mL	48%
サブミジブル粒子 ≥10μm	≤6000粒子/容器≥10μm	119	9	92% <sup>(*)</sup>
サブミジブル粒子 ≥25μm	≤600粒子/容器≥25μm	4	2	50%
pH	7.5 ~ 8.5	7.9	8.0	1%
オスモル濃度	384 ~ 448 mOsm/kg	415 mOsm/kg	410 mOsm/kg	1%
外観	澄明~やや不透明, 無色~淡白色の溶液, 目に見える粒子状物質がない	淡白色, やや不透明, 目に見える 粒子がない	無色, やや不透明, 目に見える 粒子がない	NA
BCAIによる全タンパク質	$1.0 \times 10^{13}$ vg/mL当たり 128 ~ 320μg/mL	179 μg/mL	176 μg/mL	2%
qPCRによる 残留hcDNA	$1.0 \times 10^{13}$ vg/mL当たり ≤ $1.2 \times 10^8$ pg/mL	$0.76 \times 10^7$ pg/mL	$0.68 \times 10^7$ pg/mL	11%
AUCによる %空のカプシド	≤ 7%	2%	4%	100% <sup>(*)</sup>
SDS-PAGEによる純度	≥ 95%	99%	99%	0%
SDS-PAGEによる 総不純物	≤ 5%	1%	1%	0%
ELISAによる残留HCP	$1.0 \times 10^{13}$ vg/mL当たり≤40ng/mL	<LOQ (8 ng/mL)	<LOQ (8 ng/mL)	0%
ELISAによる残留BSA	$1.0 \times 10^{13}$ vg/mL当たり≤3.0ng/mL	<LOQ (0.50 ng/mL)	<LOQ (0.50 ng/mL)	0%
ELISAによる 残留ベンゾナーゼ	$1.0 \times 10^{13}$ vg/mL当たり≤1.0ng/mL	<LOQ (0.20 ng/mL)	<LOQ (0.20 ng/mL)	0%
インビボ相対効力	80 ~ 120%			

\* サブミジブル粒子及び%空のカプシドの%相対差は、2つの工程Bロット間で約100%である;しかしながら、値は全て、提案される試験限界をはるかに下回り、工程Bロットはその試験結果に関して一貫していると考えられる。

図 19

【 手続補正 2 3 】

【 補正対象書類名 】 図面

【 補正対象項目名 】 図 2 0

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 図 2 0 】

特性	方法	安定性時点(月)				
		0 2017年2月	3 2017年5月	6 2017年8月	9 2017年11月	12 2018年2月
ddPCR による ゲノム力価	SOP-137 v1.0	$6.6 \times 10^{12}$ vg/mL	$6.1 \times 10^{12}$ vg/mL	$6.5 \times 10^{12}$ vg/mL	NA	NA
	SOP-137 v3.0	NA	NA	$1.1 \times 10^{13}$ vg/mL <sup>※</sup>	$8.7 \times 10^{12}$ vg/mL	目標 18年2月26日
インビボ 相対 効力 <sup>(2)</sup>	SOP-285	100%				保留中
感染力価	SOP-192	$6.3 \times 10^8$ IU/mL	$8.4 \times 10^8$ IU/mL <sup>※</sup>	$1.1 \times 10^{10}$ IU/mL	$6.3 \times 10^8$ IU/mL	保留中
SDS- PAGEによる 純度	SOP-180	%総純度: 98% (n=4ゲル)  %総不純物: 2%(n=4ゲル)  <u>個別不純物:</u> Imp 1: 1.7% Imp 3: <LOQ (1.0%)	%総純度: 98% (n=4ゲル)  %総不純物: 2% (n=4ゲル)  <u>個別不純物:</u> Imp 1: 1.7%	%総純度: 99% (n=4ゲル)  %総不純物: 1% (n=4ゲル)  <u>個別不純物:</u> Imp 1: 1.2%	%総純度: 99% (平均n=4ゲル)  %総不純物: 1% (平均n=4ゲル)  <u>個別 不純物:</u> Imp 1: 1.3%	保留中

<sup>※</sup> ロットは約6か月時点でCAPA-19に従い改良された方法SOP-137 v3.0を用いて再試験した。結果として、NCHロットNCHAAV9SMN0613に $1.1 \times 10^{13}$ vg/mLの新しい力価値を割り当て直した。続く安定性時点は全て、SOP-137 v3.0を用いて分析した。

<sup>※</sup> ロットNCHAAV9SMN0613は2013年12月に製造し、2017年2月にT0として試験した。T0において100%の効力を割り当て、続く全ての時点の効力はT0値に対する相対値として計算した。

<sup>※</sup> 感染力価試験は2017年6月にそれぞれの安定性プロトコルに追加されたため、T0から約4か月で実施した。

図 20