

Production and Quality Control of Adenoviral Vectors for Clinical Trials

Seung-Won Park, Young-Sun Sohn* and Soon-Young Paik*

Department of Microbiology, College of Medicine, the Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Received : December 15, 2008

Revised : December 18, 2008

Accepted : December 19, 2008

The importance of recombinant adenoviral vectors for the development of gene therapy and prophylactic and therapeutic vaccines has led to efforts for process development of large scale production of clinically safe adenoviral vectors. First of all, cell lines producing replication incompetent adenoviral vectors required for clinical application have been developed and the concept of banking and characterization of cell lines and adenoviral vectors has been established. In order to meet the need of amount of adenoviral vectors for clinical trials, various large scale suspension culture methods using serum-free media have been developed along with development of large scale purification methods using chromatography instead of cesium chloride method. In addition, methods for the quality control of adenoviral vectors have been established and applied for the clinical lots.

Key Words: Adenoviral vector, Gene therapy, Clinical application, Quality control

서 론

유전자치료제 또는 예방 및 치료백신 개발에 아데노바이러스 벡터의 중요성이 증가해 왔고 이로 인해 임상적으로 안전한 아데노바이러스 벡터의 대량 생산을 목적으로 공정개발 연구가 활발히 진행되어 왔다. 먼저 임상적으로 안전한 복제불능 아데노바이러스를 생산할 수 있는 세포주가 개발되었고, 이를 이용한 Master Cell Bank (MCB) 및 Working Cell Bank (WCB) 그리고 Master Virus Bank (MVB) 및 Working Virus Bank (WVB)를 구축하고

이에 대한 특성 분석에 대한 개념이 확립되었다. 임상적 용을 위해서는 다량의 바이러스가 요구되므로 이를 충족시키기 위해 무혈청 배지를 이용한 현탁배양 공정 및 크로마토그래피를 이용한 정제 공정이 개발되어 적용되고 있다. 아울러 임상용으로 생산된 아데노바이러스의 품질관리 항목 및 분석법이 확립되어 활발히 임상에 적용되고 있다.

지난 10년 동안 보고된 약 1,020건의 유전자치료제 임상 프로토콜중 약 26%가 재조합 아데노바이러스 (recombinant adenovirus, Ad) 벡터를 이용하여 치료용 혹은 마커 유전자를 전달하고 있다 (9). 이들 임상 프로토콜들은 재조합 아데노바이러스 벡터를 후천성 또는 유전성 질환에 대한 유전자치료법, 암치료를 위해 유전자를 기반으로 하는 면역치료법, 자살유전자 치료법 그리고 암억제 유전자를 기반으로 한 치료법 등으로 다양하게 시도되고 있다. 또한, 재조합 아데노바이러스 벡터는 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) 등을 포함하는 감염성 물질 (1)과 바이오디펜스 (3)를 위한 예방 및 치료백신 개발에 있어 전달 시스템으로 빠른 속도로 개

*Corresponding author: Young-Sun Sohn. Department of Microbiology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, 137-701, Korea.

Phone: +82-2-590-1225, Fax: +82-2-596-8969

e-mail: yssohn@abxign.com

*Corresponding author: Soon-Young Paik. Department of Microbiology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, 137-701, Korea.

Phone: +82-2-590-1217, Fax: +82-2-535-6473

e-mail: paik@catholic.ac.kr

**This work was supported by the BK21 project team for Biomedical Science.

발되고 있다. 2005년 중국에서 세계 최초로 아데노바이러스 벡터에 암억제 유전자인 p53를 탑재한 유전자치료제인 Gendicine이 두경부암치료용으로 승인되었다 (14). 재조합 아데노바이러스 벡터가 다른 벡터에 비해 많이 사용되는 이유로는 첫째, 벡터제작이 간단하고 편리하며 둘째, 증식 또는 휴지기의 세포에 전달이 용이하고 셋째, 동물세포주를 이용하는 경우 생산성이 높으며 넷째, 안정성이 우수하여 정제 및 장기 보관이 용이하다는 장점에 있다 (11). 본 중설에서는 상기의 장점을 갖고 있는 아데노바이러스를 바탕으로 임상을 위해 개발된 다양한 종류의 재조합 아데노바이러스 생산용 세포주, 대량 생산을 위한 배양 및 정제방법과 품질관리를 위한 기준 및 시험방법에 대해 고찰하고자 한다.

1. 재조합 아데노바이러스 생산용 세포주

유전자치료제 및 백신 생산용으로 사용되는 아데노바이러스는 65~80 nm 크기로 외피가 없는 이중나선 DNA를 갖는 인간 혈청형 5 아데노바이러스 (human serotype 5 adenovirus, Ad5)로 게놈 중 복제에 필수적인 E1 (early region 1) 염기서열이 결실되어 있다 (5). 이로 인해 아데노바이러스는 복제불능이며 결실된 E1 염기서열에는 전달하고자 하는 유전자를 삽입할 수 있게 되어 있다. 현재 임상용 아데노바이러스 생산용으로 사용되고 있는 세포주로는 HEK (human embryonic kidney) 293 세포주 (7)와 PER.C6 세포주 (6)가 대표적이다.

1) HEK293 세포주

HEK293 세포주는 HEK 세포에 절단된 Ad5 DNA를 형질전환하여 제작되어 Ad5 게놈의 1-4,344 염기를 포함하고 있다. E1이 결실된 아데노바이러스 벡터와 아데노바이러스 게놈의 1-4,344 염기를 포함하고 있는 HEK293 세포주 사이의 상동성 (homology)에 의한 상동 재조합 (homologous recombination)이 일어나고 이로 인해 복제가능 아데노바이러스 (replication-competent adenovirus, RCA)가 발생하게 된다 (Fig. 1A). 이 RCA의 출현은 E1이 결실된 아데노바이러스 벡터가 통제할 수 없는 양상으로 복제되어 염증반응을 일으켜 안전성 측면에서 바람직하지 않으므로 임상제품의 품질에 대한 특별한 관리가 요구된다. 이러한 단점에도 불구하고 현재까지의 임상용 아데노바이러스 벡터 생산에는 아직도 HEK293 세포주가 많이 사용되고 있다.

2) PER.C6 세포주

HEK293 세포주의 단점인 RCA를 방지하기 위한 전략은 E1이 제거된 아데노바이러스 벡터와 세포주사이의 상동성 부분을 제거하는 것이다 (Fig. 1B). PER.C6 세포주는 인간배아망막 (human embryonic retina, HER) 세포에 인간 포스포 글리세레이트 키나제 프로모터 (human phosphoglycerate kinase promoter, PKG)에 의해 조절되며 아데노바이러스의 E1A와 E1B 유전자의 염기서열 459-3,510을 포함하는 플라스미드 (pIGE1A.E1B)를 전달시켜 제작되었다. PER.C6 세포주는 RCA와 연계된 안전성 측면에서,

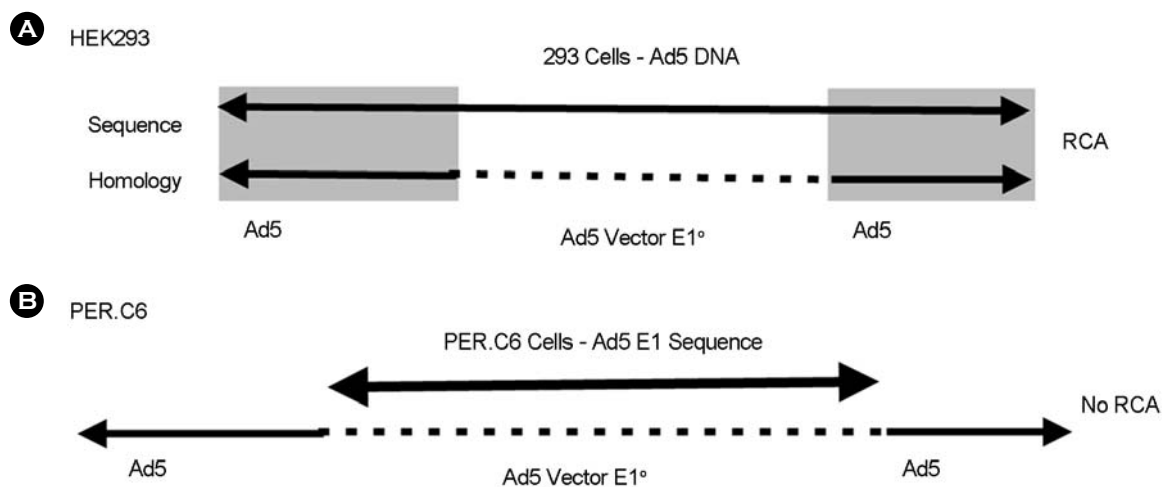


Figure 1. Adenovirus packaging cell line and adenoviral vector. **A)** HEK293 cell: Appearance of RCA (replication competent adenovirus) by homology (gray box) between packaging cell line and vector. **B)** PER.C6 cell: No appearance of RCA due to the absence of homology between packaging cell line and vector.

아데노바이러스 벡터 DNA와 세포주의 E1 DNA에 존재하는 중복 염기서열이 없을 때 40번 이상의 대량배양 결과 RCA가 전혀 발견되지 않았다 (11). 그러나 불과 5개의 염기가 중복되는 경우 가끔 재조합 의존 염기 재배열이 일어나 아데노바이러스의 다른 부위에서 결실이 있는 복제결핍 E1 바이러스가 도움 바이러스 (helper virus) 의존적으로 만들어 지는 것이 관찰되었다 (12). PER.C6 세포주를 이용하여 대량 생산된 아데노바이러스의 품질 분석 결과 PER.C6 세포주도 안전성 측면에서 최소한의 위험성은 가지고 있는 것으로 지적되고 있다.

2. 재조합 아데노바이러스 생산

1) 생산세포주 및 바이러스 벡터 은행 제조

임상용 아데노바이러스 생산을 위해서는 가장 먼저 생산세포주 및 바이러스 벡터 은행을 제조하고 특성 분석을 해야 한다 (11,15). 생산세포주 은행은 연구용 세포주 은행 (Research Cell Bank, RCB)로 부터 Good Manufacturing Practice (GMP) 시설에서 MCB를 만들고, 이로부터 WCB를 만들게 된다. 아울러 WCB로부터 아데노바이러스

생산 후 End of Product (EPC) 세포주 분석을 해야 한다. MCB 분석항목은 형태, identity (isoenzymes), DNA fingerprinting, karyology (diploid cell lines), 세균과 곰팡이 오염, 마이코플라즈마, *in vitro* 바이러스 분석, *in vivo* 바이러스 분석, 전자현미경적 관찰, specific viruses (인간 세포 사용시), 소유래 바이러스 (bovine serum 사용시), 돼지유래 바이러스 (porcine trypsin 사용시), 레트로바이러스 (PCR-based RTase) 등이다. WCB 분석항목은 형태, identity (isoenzymes), DNA fingerprinting, 세균과 곰팡이 오염, 마이코플라즈마 등이다. EPC 분석항목은 형태, 마이코플라즈마, *in vitro* 바이러스 분석, 소유래 바이러스 (bovine serum 사용시), 돼지유래 바이러스 (porcine trypsin 사용시) 등이다.

아데노바이러스 은행은 연구용 바이러스 은행 (research virus bank, RVB)로부터 GMP 시설에서 MVB를 만들고, 이로부터 WVB를 만들게 된다. MVB 분석항목은 세균과 곰팡이 오염, 마이코플라즈마, *in vitro* 바이러스 분석, *in vivo* 바이러스 분석, 전자현미경적 관찰, specific viruses (인간세포 사용시), 소유래 바이러스 (bovine serum 사용

Table 1. Analysis Items of Cell Line Bank and Virus Bank

Analysis items	Cell line bank			Virus bank		Note
	MCB	WCB	EPC	MVB	WVB	
Morphology	+	+	+	-	-	
Identity - isoenzymes	+	+	-	-	-	
DNA fingerprinting	+	+	-	-	-	
Karyology (diploid cell lines)	+		-	-	-	
Bacterial and fungal contamination	+	+	-	+	+	
Mycoplasma	+	+	+	+	+	
<i>In vitro</i> virus assay (CPE, HA)	+	-	+	+	+	CPE: viral cytopathic effects HA: hemadsorption
<i>In vivo</i> virus assay	+	-	-	+	-	
Electronmicroscopy	+	-	-	-	-	
Specific viruses	+	-	-	-	-	
Bovine viruses	+	-	+	+	-	If bovine serum has been added.
Porcine viruses	+	-	+	+	-	If porcine trypsin has been added.
Retroviruses (PCR-based RTase)	+	-	-	+	-	
Endotoxins (LAL)	-	-	-	-	-	
Host cell DNA	-	-	-	-	-	
Contaminating proteins	-	-	-	-	-	
Virus titration	-	-	-	+	+	

시), 돼지유래 바이러스 (porcine trypsin 사용시), 레트로바이러스 (PCR-based RTase), 바이러스정량 등이다. WVB 분석항목은 세균과 곰팡이 오염, 마이코플라즈마, 바이러스정량 등이다. 세포주 및 아데노바이러스 은행별 분석항목을 Table 1에 정리하였다.

2) 배양

임상용 E1 결실 아데노바이러스 벡터의 생산을 위해 HEK293 세포주 및 PER.C6 세포주를 이용한 배양방법 및 배양 조건이 개발되었다. 배양방법으로는 roller bottle, batch, fed-batch, perfusion, packed bed perfusion and hollow fiber 방법 등이 있다 (10). 이들 방법 중 널리 이용되고 있는 배양법은 batch, fed-batch 그리고 perfusion 방법으로 세포 농도, 제품의 양 그리고 부피당 생산성을 결정하는 영양소 공급 및 대사산물 제거 방식에서 차이가 있다. Batch 배양법의 경우, 세포는 끊임없이 변화하는 환경에 노출되는 관계로 세포성장률과 대사 잠재력을 최대한 발휘하지 못하는 단점이 있다. 이로 인해 아데노바이러스 비생산성이 저세포 농도인 $0.3 \sim 0.5 \times 10^6$ cell/ml로 매우 낮다. Fed-batch 배양법의 경우, 특별한 영양소 공급 전략을 사용하여 배양을 연장하고 세포 농도의 증가를 유도할 수 있다. 그러나 지금까지 아데노바이러스 생산 과정 중에 특정 아미노산과 포도당을 첨가하더라도 세포 농도 또는 아데노바이러스 생산성 측면에서 큰 진전을 이루지 못하고 있다. 이 배양법에 의한 아데노바이러스 비생산성은 1×10^6 cell/ml로 batch 배양법에 비해 크게 향상되지 못하고 있다. Perfusion 배양법의 경우 영양소 공급이 지속적으로 이루어져 세포가 배양기내에서 유지되고 이로 인해 아데노바이러스의 고생산성이 가능하여 3×10^6 cell/ml의 생산성이 보고되었다.

3) 정제

고순도의 임상용 아데노바이러스 생산을 위해 재현성과 경제성이 있는 대량 정제방법의 개발이 요구된다. 역사적으로 아데노바이러스 정제는 수 차례의 freeze-thawing을 수반하는 cesium chloride (CsCl) 또는 sucrose 밀도 구배 초원심분리법이 이용되었다 (4). 그러나 이 방법은 연구용 규모의 정제에는 적합하나 임상 규모의 대량 생산에는 적합하지 못하다. 반면 칼럼 크로마토그래피 방법은 생산 스케일 확장성과 GMP 요건을 만족시키므로 다양한 방법이 개발되었다. Capture 단계로 음이온 교

환 크로마토그래피를 polishing 단계로 고정화 금속 친화 크로마토그래피 (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) 방법이 최초로 보고되었다 (2,8). 그러나 이들 방법은 $2 \times \text{CsCl}$ 방법에 비해 수율 및 순도 측면에서 동등 이상의 아데노바이러스를 생산하는 데는 실패하였다. 최근에는 hollow fiber 농축을 수반하는 expanded 크로마토그래피 방법으로 기존에 보고된 방법에 비해 약 8배 향상된 32%의 수율과 CsCl 방법에 필적하는 순도를 지니는 정제방법의 개발이 보고되었다 (13).

3. 재조합 아데노바이러스 품질관리

확립된 생산 기술에 의해 생산된 아데노바이러스가 의약품으로 사용되기 위해서는 아데노바이러스의 품질이 생산시마다 일정하여야 한다. 이를 위해 아데노바이러스의 품질을 관리할 수 있는 시험법들을 설정하고, 생산된 시료에 대한 시험을 수행하여 기준을 마련하여야 한다 (11).

1) 바이러스 입자수 (virus particles)

아데노바이러스 입자수의 측정은 환자에게 적용할 바이러스 양을 설정하는 값이 되므로 정확한 바이러스 입자수의 측정은 품질평가 항목 중에서도 가장 중요한 항목이다. 아데노바이러스 입자수를 측정하는 방법은 바이러스의 capsid 단백질을 sodium dodecyl sulfate (SDS)를 이용하여 변성시킨 뒤, 노출된 바이러스 계층의 A_{260} 값을 측정하여 환산식으로 계산하는 방법이 주로 사용된다. 그러나 이러한 측정법은 흡광도 측정기의 편차, SDS 처리 시간 등 실험상 오차가 발생할 소지가 많은 방법이다. 따라서 정확한 바이러스 입자수 측정을 위해 Resource Q를 이용한 HPLC 분석을 추가적으로 적용하여 정확한 바이러스 입자수를 측정하는 것이 바람직하다.

2) 감염성 바이러스 수 (infectious particle titer)

바이러스의 역가를 구하기 위하여는 plaque assay가 보편적으로 사용된다. 그러나 아데노바이러스의 경우 감염의 확인까지 2주일 이상의 시간이 소요되는 등 품질 검사방법으로 적합하지 않으므로 TCID₅₀법을 이용하는 것이 바람직하다.

3) 숙주유래 DNA

단백질 의약품의 경우 숙주유래 DNA를 측정하는 방

법은 southern blotting을 이용하는 방법이 주로 이용되고 있다. 이는 숙주의 게놈을 분리하여 probe로 사용함으로써 샘플 내에 존재하는 숙주유래 DNA를 검출하는 방법이다. 그러나 아데노바이러스의 경우, 생산에 사용하는 HEK293 세포의 게놈에 아데노바이러스 DNA 일부가 포함되어 있기 때문에 HEK293 세포의 게놈은 probe로 사용하기에 적절하지 않다. 따라서 숙주세포에만 존재하는 특정 유전자를 이용한 real time PCR 법으로 숙주유래 DNA를 측정하는 것이 바람직하다.

4) Aggregation

아데노바이러스의 경우는 pH 변화를 포함한 다양한 외부자극으로 인해 바이러스 간에 뭉치는 현상이 발생하는데, 이러한 aggregation은 바이러스의 감염성에 영향을 미치기 때문에 품질평가의 주요 항목이다. 기존의 보고에 의하면 A_{320}/A_{260} 으로 아데노바이러스의 aggregation 정도를 평가하며, A_{320}/A_{260} 이 0.1에서 0.3 사이면 역가에 영향을 미치지 않는 것으로 보고되었다.

5) 역가

아데노바이러스는 강한 면역반응을 유도하기 때문에 전체 아데노바이러스 입자수 (virus particle, vp) 중 감염

성이 있는 아데노바이러스 입자수 (infectious particle titer, pfu)는 안전성 측면에서 중요한 의미를 갖는다. 임상시험 중 아데노바이러스의 면역반응으로 인해 환자가 사망하는 사고가 발생함에 따라 미국 FDA에서는 규정을 개정하여 vp/pfu 값을 30 미만으로 제한하였다.

6) 순도

아데노바이러스의 순도는 생물학적 그리고 물리학적 방법으로 분석한다. 생물학적 순도 결정에는 RCA 부제를 측정한다. 이를 위해 HeLa 또는 A549와 같은 아데노바이러스에 non-complementing한 세포주에 생산된 아데노바이러스를 감염시켜 cytopathic effect (CPE)를 관찰한다. 물리학적 순도는 이온교환수지를 이용하여 생산된 아데노바이러스의 단백질체 분석을 하며 필요한 경우 mass spectrometry 분석을 겸용한다.

7) 제조 과정 중 잔류물질

아데노바이러스의 생산 공정에는 숙주세포를 분해하기 위한 Triton X-100, 숙주세포의 DNA를 제거하기 위한 핵산분해효소 등이 사용된다. 생산 공정 중 사용되는 물질들이 최종원액에 잔류하는 양을 측정하여 안전성을 제고하기 위해, 해당 잔류물질들의 검출을 시험항목으로 설

Table 2. Category and Standards for Quality Evaluation of Adenoviral Vector

Test items	Standard
Appearance	Self-standard
pH	Self-standard
Sterility test	No Sterile
Endotoxin test	Self-standard (commonly <5 EU/ml)
Content	Virus titer (OD_{260})
	Virus titer (HPLC)
	Infectious titer
Verification	Restriction enzyme map
	Expected band pattern
Purity test	Host DNA test
	Self-standard
	Host protein test
Potency test	Aggregation (A_{320}/A_{260})
	Self-standard
Residual materials during manufacturing process	Infectious titer/virus particle
	<30 (USA FDA standard)
	BSA content
	Self-standard
	Benzonase content
	Self-standard
	Triton X-100 content
	Self-standard

정하여야 한다.

상기의 품질분석 항목 및 분석법에 따른 아데노바이러스 품질평가 항목 및 기준을 Table 2에 정리하였다.

결론 및 고찰

유전자치료제 또는 예방 및 치료백신 개발에 이용되는 아데노바이러스 벡터 생산을 위한 공정의 개발 및 최적화가 크게 발전되었다. 특히 무혈청 배지를 이용한 현탁 배양 기술의 개발로 임상용 아데노바이러스를 생산하는 것이 가능해 졌다. 배양방법은 batch, fed-batch, perfusion 방법으로 발전하면서 세포주의 증가가 이루어져 임상에 필요한 대량의 아데노바이러스 생산이 가능해 졌다. 그러나 아직도 아데노바이러스 비생산성 측면에서 개선해야 할 여지가 많이 남아 있다. 이를 위해 생산세포주의 중추 대사학 및 감염 동력학에 대한 이해가 더욱 요구되고 있다. 임상규모의 대량 정제에 한계가 있었던 CsCl 방법을 대체하는 이온교환 크로마토그래피와 gel filtration 방법의 개발로 아데노바이러스의 대량 정제가 가능하게 되었다. 그러나 순도 및 수율 측면에서 기존의 CsCl 방법에 비해 월등히 우수한 점이 없으므로 지속적인 개발 및 최적화가 필요하다. 또한 품질관리 측면에서는 임상에서의 안전성을 확보하기 위해 감도가 우수한 분석방법을 지속적으로 개발하여 적용하는 것이 요구되고 있다.

참 고 문 헌

- 1) Barouch DH, Nabel GL: Adenovirus vector-based vaccines for human immunodeficiency virus type 1. *Hum Gene Ther* **16**: 149-156, 2005.
- 2) Blanche F, Cameron B, Barbot A, Ferrero L, Guillemin T, Guyot S, Somarriba S, Bisch D: An improved anion-exchange HPLC method for the detection and purification of adenoviral particles. *Gene Ther* **7**: 1055-1062, 2000.
- 3) Boyer JL, Kobinger G, Wilson JM, Crystal RG: Adenovirus based genetic vaccines for biodefence. *Hum Gene Ther* **16**: 157-168, 2005.
- 4) Croyle MA, Anderson DJ, Roessler BJ, Amidon GL: Development of a highly efficient purification process for recombinant adenoviral vectors for oral gene delivery. *Pharm Dev Technol* **3**: 365-372, 1998.
- 5) Danthinne X, Imperiale MJ: Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther* **7**: 1707-1714, 2000.
- 6) Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wolenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoebe RC: New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* **9**: 1909-1917, 1998.
- 7) Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: Characterization of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74, 1977.
- 8) Huyghe BG, Liu X, Sutjipto S, Sugarman BJ, Horn MT, Shepard HM, Scandella CJ, Shabram P: Purification of a type 5 recombinant adenovirus encoding human p53 by column chromatography. *Hum Gene Ther* **6**: 1403-1416, 1995.
- 9) Journal of Gene Medicine web site: www.wiley.co.uk/genemed/clinical.
- 10) Kamen A, Henry O: Development and optimization of an adenovirus production process. *J Gene Med* **6**: S184-192, 2004.
- 11) Lusky M: Good manufacturing practice production of adenoviral vectors for clinical trials. *Hum Gene Ther* **16**: 281-291, 2005.
- 12) Murakami P, Pungor E, Files J, Do L, Van Rijnsoever R, Vogels R, Bout A, McCaman M: A single short stretch of homology between adenoviral vector and packaging cell line can give rise to cytopathic effect-inducing, helper-dependent E1-positive particles. *Hum Gene Ther* **13**: 909-920, 2002.
- 13) Peixoto C, Ferreira TB, Carrondo MJ, Cruz PE, Alves PM: Purification of adenoviral vectors using expanded bed chromatography. *J Virol Methods* **132**: 121-126, 2006.
- 14) Wilson J: Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Hum Gene Ther* **16**: 1014-1015, 2005.
- 15) Wisher M: Biosafety and product release testing issues relevant to replication-competent oncolytic viruses. *Cancer Gene Ther* **9**: 1056-1061, 2002.