

思われる。

### C. 1. 10. 1. 8 抗血管新生療法としての分子標的薬剤の問題点と今後の課題

#### C. 1. 10. 1. 8. 1 各種 VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤

VEGF リガンド受容体ネットワークに対する理解が深まったことおよび各種 VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤で好ましい臨床結果が得られたことにより、この新しい治療アプローチが腫瘍学の領域における重要な治療モダリティとなる可能性が高まった。しかし、臨床および方法論において幾つかの解明すべき問題がある。それらは、①異なったチロシンキナーゼを単剤あるいは化学療法との組み合わせで治療した場合相反する臨床結果が得られている原因、②VEGFR チロシンキナーゼを長期間投与した場合における安全性、③今後の分子標的薬剤を用いる臨床試験において評価項目および方法論的なアプローチについて研究を開始する必要性である。これらの薬剤で抗腫瘍活性が異なっているのは、分子標的および活性が異なっていること、あるいは単に臨床試験において非有効投与量を選択したことにより説明できる。分子標的薬剤について最適な投与量およびスケジュールを設定することは重要な課題である。さらに、肺癌における EGFR で報告されているように、標的が高く発現していることと標的薬の反応性とは必ずしも相関しない。Bebacizumab を用いた抗 VEGF 治療と化学療法を組み合わせた場合、幾つかのフェーズ III 試験で全生存およびバイパー疲労自己報告スケールが優れており、腫瘍と内皮細胞の両方を標的とする有効性が高まる可能性が確認された。これらの結果と VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (Vatalanib, Semaxinib) で見

られた結果が異なる理由については解明されていない。Semaxinib の場合、重篤な毒性を示すこと、この薬剤を静脈に長期間投与することは患者に不利益となることから、この薬剤の開発を中止することが強く勧告された。Vatalanib の場合は以下のように幾つかの理由が考えられる。①この薬剤の半減期は短いため、1日に1回の投与では不適切である。②未知の薬物間相互作用がある。③以下に述べるように、血管周囲の細胞における PDGFR-β を標的とすることにより、反対に有効性が低下する可能性がある。PDGFR-β をブロックすると、血管周囲の細胞の動員がブロックされることにより血管の正常化が阻害され、その結果組み合わせ治療による相乗的な効果が抑制される。一方、PDGFR-β をブロックすることにより周皮細胞による腫瘍内皮細胞の安定化が抑制される可能性もある。最近、単剤としての複数標的チロシンキナーゼ阻害剤と化学療法を組み合わせると、Bebacizumab+化学療法により誘導される相乗効果を再現できるという仮説が提唱された。この考えは、腎細胞癌および Imatinib 抵抗性の胃腸間質腫瘍における Sunitinib 治療、腎細胞癌における Sorafenib 治療のように単剤として複数標的チロシンキナーゼ阻害剤を用いた臨床試験で最近報告されている肯定的な結果から支持される。この仮説は、進行性非小細胞肺癌において化学療法と他の複数標的薬剤である ZD6474 の組み合わせでみられた初期の肯定的な結果は大いに異なっているように思われる。しかし、化学療法による活性の増強は低投与量の ZD6474 (100 mg) では多くの場合みられているが高投与量 (300 mg) ではみられていない。興味深いことに、このキナーゼ阻害剤は EGFR よりも VEGFR に対する親和性が高い。従って、

Bebacizumab と化学療法でみられているように、この薬剤は低投与量では VEGFR-2 のみを阻害し細胞傷害性薬剤の有効性を促進すると考えられる。一方、高投与量では、VEGFR と EGFR の両方を阻害するため Docetaxel との相乗効果はみられないということはある。この知見は EGFR 阻害剤と化学療法の組み合わせで報告されている否定的な結果と一致している。このような理由により、VEGF/VEGFR ファミリーの血管新生における役割および VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤の作用機構をさらに解明することが必要である。

これら薬剤を長期間投与した場合に起きる有害事象は、この点に関する知識が不足していることおよび病勢が進行しない患者では長期間治療を行うことを考慮すると問題となる。高血圧は VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤による治療における最も共通な有害事象の一つである。高血圧が発症する機構は不明であるが、血管が希薄になること、内皮が機能不全になること、亜酸化窒素の代謝が変化することに起因する可能性がある。しかし、高血圧は薬物療法で対処可能である。倦怠感も他の共通の有害事象であるが、処置時間はほとんど影響されない。他の有害事象はこれら薬剤により共通してみられ、Vatalanib では頭の軽さ/目まい、運動失調、Sunitinib では下痢、粘膜炎、皮膚毒性、Sorafenib では食欲不振、下痢、皮膚毒性、ZD6474 では補正 QT 間隔の持続であった。しかし、これら薬剤が長期間投与される患者の数が増大すれば、有害事象が今後増えることが予測される。

これら薬剤の臨床開発における最適な方法論のアプローチに関しては様々な未解決の問題が存在する。フェーズ I 試験における主要な

問題は、これら化合物が適切な生物学的活性を示す投与量の確認である。最小標的阻害投与量は最大忍容投与量とは異っており、その量は薬剤の開発の非臨床試験の段階で同定された生物学的なサロゲートバイオマーカーを用い妥当性が検証された測定系により決定すべきである。非臨床の有効性を臨床の設定にトランスレートする場合において困難な点は、適切で予測可能な非臨床モデルが不足していることである。試験する投与量およびスケジュールは準最適であり、血漿レベルが *in vitro* の研究から得られた阻害濃度以上で得られてもそれは適切な評価項目とはならない。フェーズ II 試験のデザインでは例えば無憎悪期間あるいは成長調節インデックスのような革新的な活性に関する評価項目を設定すべきである。転移性腎癌患者における Sorafenib の活性を示すために選択された無作為中断デザインは薬剤の病勢安定効果の評価が可能であり、感受性のある患者を同定可能な信頼できるアッセイがない場合には標的薬剤における初期の開発に特に適している。フェーズ III における試験デザインには、生物学的に活性を示す患者の選択基準および活性が予測可能な生物学的マーカーを含むべきである。患者は標的指向性を基に選択すべきであり、疾患指向性を基に選択すべきではない。興味のある問題は、最適な臨床試験を設定してこれらの化合物を評価することであり、非臨床の研究から示唆されているように可能ならば腫瘍の負担が軽い患者から構成したほうが望ましい。過去にさまざまな化学療法で治療されて従来の治療では抵抗性である腫瘍の負担が大きい患者では、既存の腫瘍を縮小させないで細胞増殖を抑制する標的薬剤による治療効果は低い。今後の大きな課題は VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤を細胞傷害性薬剤、ホ



ルモン療法、放射線治療あるいは他の生物学的薬剤と組み合わせることにより、相乗的な抗腫瘍効果を目指して治療することである。

### C. 1. 10. 1. 8. 2 進行性非小細胞肺癌の治療における Sorafenib および Sunitinib

進行性非小細胞肺癌の Sorafenib および Sunitinib による治療は化学療法との組み合わせ、他の標的治療との組み合わせ、単剤治療で将来発展する可能性がある。Sorafenib+化学療法対化学療法単独の二つの独立した無作為フェーズIII試験が進行中であり、一つは化学療法レジメンとして Carboplatin+Paclitaxel もう一つは Cisplatin+Gemcitabine である。Sorafenib 単剤による米国東海岸癌臨床試験グループ試験が、過去に治療経験のある非小細胞肺癌の患者で進行中であり、これは大規模な無作為中止試験である。さらに、この薬剤による治療効果を最大限に引き出すことを目的として、進行性固形腫瘍において各種化学療法剤 (Irinotecan, Dacarbazine, Gemcitabine) あるいは分子標的薬剤 (Gefitinib) と Sorafenib を組み合わせた各種フェーズ I/II 試験が進行中である。特に、Sorafenib+Gefitinib のフェーズ I 試験では Sorafenib と Gefitinib はそれぞれ 1日に2回 400 mg および毎日 250 mg という治療効果が十分期待される量で組み合わせることが可能であることが示された。進行性の固形腫瘍の患者 17 人で行われた Sorafenib と Erlotinib のフェーズ I 試験から、フェーズ II の推奨投与量は Sorafenib で 1日2回 400 mg、Erlotinib で 1日 150 mg と十分な推奨投与量であり、有害事象は許容できることが示された。進行性非小細胞肺癌の年長者患者 (>70 歳) あるいは一般状態が 2 の患者における Sorafenib+Gemcitabine そして

Sorafenib+Erlotinib のフェーズ II 無作為試験が始まった。進行性非小細胞肺癌の治療において Bebacizumab で良好な結果が得られていることを考えると、化学療法および Erlotinib の組み合わせ、Sorafenib あるいは Sunitinib と Bebacizumab の組み合わせは非常に興味深い。フェーズ I の進行性固形腫瘍の治療において Sorafenib は Bebacizumab との組み合わせで用量漸増試験が行われた。この試験では、Sorafenib および Bebacizumab の単剤投与でみられるよりも臨床効果が増大するが有害事象も増加させるように思われた。本研究から示唆された今後の研究における投与スケジュールは、1週間のうち 1.5 日、1日に2回 200 mg の Sorafenib および 2週間 5 mg/kg の Bebacizumab であった。

Sorafenib は Bebacizumab 抵抗性の非小細胞肺癌の治療で将来発展する可能性がある。幾つかの興味あるデータが転移性腎細胞癌で最近報告されている。Bebacizumab のように VEGF と結合する薬剤に抵抗性の患者における Sunitinib の活性が Bebacizumab 難治性の転移性腎細胞癌で行われたフェーズ II 試験で評価されている。Bebacizumab に抵抗性の腫瘍では部分的に Sunitinib に感受性の経路を介して成長が促進されるという仮説が立てられた。登録された 60 人の患者のうち 32 人で反応が評価された。26 人の患者 (81%) である程度腫瘍が縮小し、その中には客観的な部分奏功を示した患者が 4 人いた (13%、95%信頼区間、4-29)。このように、Sunitinib は Bebacizumab 難治性の転移性腎細胞癌の患者において十分な抗腫瘍活性を示し、Sunitinib は Bebacizumab の抵抗性に関与するシグナル伝達経路を阻害することが示唆された。Bebacizumab に抵抗性の腫瘍における

Sunitinib に対する反応の正確な作用機構を今後明らかにする必要がある。

最近提出された非常に興味深い非臨床モデルにおいて、非小細胞肺癌を含む固形腫瘍の治療に Sunitinib を臨床応用できる可能性が示唆された。他の難治性末期膵臓癌に対する有効性を向上させるため、Imanitinib と Sunitinib が PDGFR- $\beta$  を介した周皮細胞による腫瘍内皮細胞の安定化を抑制することを期待して、最大忍容投与量あるいはメトロノーム化学療法そして VEGFR の阻害の組み合わせで用いられた。Imantinib は単独治療としては有効性が疑わしいが腫瘍血管に対する周皮細胞の被覆を減少させ、メトロノーム化学療法あるいは VEGFR 阻害剤との組み合わせで有効性を増強した。これら三つの全てを含むレジメンはさらに効果的であった。Cyclophosphamide を最大忍容投与量用いると一過性の退行が起きるがすぐに再成長する。一方、Imatinib+Cyclophosphamide のメトロノーム療法では安定した病勢が得られた。最大忍容量のレジメンでは腫瘍細胞のアポトーシスは引き起こされるが内皮細胞のアポトーシスは起きない。一方、他のレジメンでは有効性と一致して内皮細胞のアポトーシスを増加させる。連続した最大忍容投与量とメトロノーム化学療法を含む chemo-switch プロトコールでは、PDGFR- $\beta$  および VEGFR の複数を標的した阻害が重なり、完全寛解および前例のない延命効果が得られた。この研究の戦略は、標準治療化学療法の次に新規の維持レジメンで治療するというものである。すなわち、PDGFR- $\beta$  を標的として周皮細胞により腫瘍血管の安定化を阻害し、一方で化学療法そして VEGFR 阻害剤はこれら薬剤に感受性のある内皮細胞を標的とする。その結果、共同で既存の腫瘍血管を

不安定化し進行している血管新生を阻害する。このように厳密に設定された非臨床モデルにおける結果は、このような戦略が臨床試験においても有効である可能性を示唆している。

#### C. 1. 10. 1. 8. 3 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤

Gefitinib および Erlotinib の開発により進行性非小細胞肺癌患者の治療により多くの選択肢が提供された。Gefitinib は最初に発見された EGFR に選択的な阻害剤であり、延命効果ではなくフェーズ II の IDEAL 試験からの予備的な結果に基づいて FDA により迅速承認された。進行性非小細胞肺癌の患者に無作為に Gefitinib あるいはプラセボが振り分けられた ISEL 試験では Gefitinib 単独で延命効果は示されなかった。これはプラセボを上回って 2 箇月まで全生存を改善させた Erlotinib 試験 (BR.21) の結果と対照的である。Gefitinib と Erlotinib における結果の違いは多くの研究者の驚きであり、なぜ Gefitinib では延命効果における有効性が失敗したか疑問に思った。考えられる解釈は Gefitinib と Erlotinib の作用機構が必ずしも同じではない可能性である。最近報告された結果によると、EGFR チロシンキナーゼドメインにおける幾つかの変異は Gefitinib および Erlotinib に対する反応性と関連していることが示された。これらの変異は Gefitinib と Erlotinib で重複しているが、両薬剤がどの変異についても同等な活性を有するかどうかは不明である。Gefitinib は Erlotinib よりも特定の EGFR 変異に対する親和性が低いこともあり得る。別の考えられる解釈は、Gefitinib の試験では最大忍容投与量よりも低い投与量で行われたため有効性が示されなかった可能性である。Gefitinib および Erlotinib



のフェーズ I 試験では推奨投与量として、Gefitinib では 250 mg Erlotinib では 150 mg の毎日の持続的な固定された量の経口投与が選択された。Gefitinib の場合、IDEAL 試験で示されるように、250 mg の投与量では毒性が少なく、500 mg の投与量と有効性は同じであった。従って、250 mg は最適な生物活性を示す投与量に近い。Erlotinib の場合、150 mg の投与量は過去に規定された最大忍容投与量に対応する。EGFR チロシンキナーゼおよび下流のシグナル伝達経路を最大に抑制するには、チロシンキナーゼ阻害剤は可能な限り最大限投与すべきである。150 mg の投与量では、Erlotinib の AUC は 38.42  $\mu\text{g}/\text{h}$  である。同様な AUC (36.08  $\mu\text{g}/\text{h}$ ) がほとんど最大忍容投与量である 700 mg/日の Gefitinib で得られている。Erlotinib について mg 投与量当たりの高い AUC と EGFR に対する高い親和性 (50% 阻害濃度、Gefitinib で 5 nM に比べ 2 nM) を組み合わせると、Gefitinib を上回る Erlotinib の顕著な有効性が得られる。経口投与薬剤の場合、多くの因子が活性薬剤の体内動態に影響を与える。特に、患者間の違いにより Gefitinib と Erlotinib の吸収および代謝が顕著に影響を受ける。最終的に EGFR に到達する実際の量は個々の患者で異なっている。これらの点についてはさらに検討する必要がある。

Gefitinib および Erlotinib は組み合わせ治療 (Gefitinib, INTACT-1 および 2; Erlotinib, TALENT および TRIBUTE) で単剤治療を上回る有効性が得られなかった。これらの研究の論理的根拠は、細胞傷害性薬剤と Gefitinib あるいは Erlotinib と組み合わせると EGFR を高発現するヒト異種移植で相乗的に作用するという *in vivo* の非臨床試験の結果に基づいている。組み合わせ治療が失敗した原因は、用いた

組み合わせおよびスケジュールが非臨床試験とは大きく異なり、お互いに拮抗した可能性がある。非臨床試験では細胞傷害性薬剤を毎週投与するまでの週末の 48 時間は動物に Gefitinib あるいは Erlotinib は投与されなかった。その結果腫瘍細胞が G1 から S への移行の阻止から解放され細胞傷害性薬剤に感受性を有するようになったと考えられる。一方、臨床試験では、Gefitinib および Erlotinib は中断することなく持続的に投与された。

Gefitinib と Erlotinib 治療に関する最近の関心は将来の方向性である。Gefitinib と Erlotinib の開発により EGFR の変異が特に非小細胞肺癌の患者特に腺癌の非喫煙患者でかなり見られるという予期しない知見が得られた。これらの発見により非小細胞肺癌の治療に対するアプローチが多くの変更されることが期待される。

特に患者が Gefitinib, Erlotinib あるいは他の EGFR 阻害剤の治療により恩恵を受けるかどうか、EGFR の変異プロファイルを将来の臨床試験に組み込むことが重要である。最近の研究によると Gefitinib あるいは Erlotinib による耐性に関与する T790M 変異のある腫瘍において HKI-272 は非常に効果的であることが示された。EGFR の変異を検出するための試験が多くの専門の医療施設で確立されまもなく広く利用可能になる。例えば感度の高い PCR アッセイでエクソン 19 と 21 における共通の変異を検出できる。K-ras および akt のような他の遺伝子を共にプロファイリングする研究が最近盛んに行われている。ISEL 試験では Gefitinib 対プラセボで延命効果を示すことができなかったが、これは治療の前に変異のスクリーニングをしていないためバイアスがかかっている可能性がある。登録された患者のな

かで EGFR 変異の患者が Erlotinib 試験 (BR.21) に比べて少なすぎたため、全体の延命効果が希釈された可能性がある。

さらに、世界の異なった地域で EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の臨床試験を始めることが重要である。EGFR および他の可能性のある遺伝子の変異の出現頻度が地域により違うことにより試験結果が異なる可能性がある。特に西アジア対北米・ヨーロッパのようにある薬剤に対する奏効率がある地域では低かったり高かったりする可能性がある。

最近、Gefitinib と Erlotinib が少なくとも過去に 1 回 Pulatinum による治療が失敗した進行性非小細胞肺癌の治療に使用されている。扁平上皮癌および腺癌に対して Erlotinib は効果的であることを考慮すると、Erlotinib の投与は Gemcitabine、Pemetrexed あるいは Docetaxel のような従来の化学療法よりもむしろ第二選択治療として考えるべきである。非小細胞肺癌以外に、上気道消化管、肺、結腸、膵臓、胸部、卵巣、膀胱の腫瘍でも EGFR が過剰発現していることが示されている。これら腫瘍の変異のスクリーニングにより、単独治療あるいは組み合わせ治療として Gefitinib および Erlotinib をさらに開発するうえにおいて有用な情報が提供されることが期待される。有望な結果が Gefitinib を EOLFOX と組み合わせた場合の結腸直腸癌の治療、Celecoxib と組み合わせた場合の頭頸部扁平上皮癌の治療で得られている。Erlotinib は Capecitabine あるいは Oxaliplatin と組み合わせた場合において結腸直腸癌の患者の治療で、Bebacizumab との組み合わせで頭頸部扁平上皮癌の患者の治療で肯定的な結果も得られている。最近、Gefitinib および Erlotinib を放射線療法と組み合わせた場合に有望な結果が得られている。

さらに、非小細胞肺癌の様々なサブグループの患者の最適に理論的枠組みを見つける研究が行われている。EGFR の阻害は病気が初期の患者および EGFR の変異に感受性がある患者の第 1 選択治療としてそして新補助あるいは補助治療として効果的である可能性があるが、これにはさらに検討が必要である。

結論として、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤は将来有望な抗癌剤であるが、治療から最適に恩恵を受ける患者群を選択することは当然である。ISEL 試験により開発者は標的薬剤の開発プロセスを強化すべきであることが示された。薬剤を臨床開発する前に標的に対する薬物動態を十分理解することが重要である。これは患者のために最も成功しやすい開発戦略を選択する手助けとなる。

#### C. 1. 10. 2 RNAi を用いた治療薬

##### C. 1. 10. 2. 1 克服すべき安全性及び特異性に関する懸念

RNAi における有害事象は 2003 年に報告された。最初にヒト細胞で RNAi の有効性が示されたすぐ後に多くのグループで siRNA 処理した細胞において IFN 反応が誘導されることが報告された。さらに、siRNA 及び shRNA による標的としない mRNA の望ましくないダウンレギュレーションという off-target 効果が報告された。その後、大規模の遺伝子発現プロファイルの研究により siRNA と off-target mRNA の 3' 非翻訳領域の間でわずか 6-7 スクレオチドの相同性があれば off-target 遺伝子の抑制が誘導されることが示され、その誘導は多くの場合 micro RNA (miRNA) を介した機構による起きると考えられた。また、siRNA-脂質複合体により TLR 特に形質細胞様樹状細胞において TLR7 の誘導が促進されることが報告さ



れ、この効果は細胞及び配列特異的であり siRNA の GU リッチな danger motif によることも明らかになった。その後、この効果は siRNA を最適化すること及びこれら細胞を標的としない処方を用いることにより回避できることが示唆された。同様に、多くの報告は siRNA の化学修飾により IFN 及びサイトカインの誘導を回避できることが示された。従って、このような有害事象は将来の臨床プロトコールでは完全に除去できる可能性が高いと考えられる。注目すべき点は RNAi に関連した有害免疫反応はこれまで培養細胞でしか見つかっていないということであり、*in vivo* においても起きるかどうかは不明である。さらに先天性免疫反応は動物とヒトにおいて複雑であるため、今後の siRNA デリバリー複合体を用いる場合はその治療の指標の正確な評価が確立されるまでにさらに臨床試験が必要である。

他方、最近のマウスの研究で RNAi 発現の新規の特異的な有害事象が明らかになった。この研究では先に示したマウスの肝臓で 49 種類の異なった shRNA のパネルを発現する非常に効率的な二重鎖 AAV-8 ベクターが用いられた。その中で 36 種類のベクターがレベルの異なる肝臓障害を引き起こし、そのほとんど半分で動物の疾病及び致死が起きた。この原因は高いレベルで shRNA が発現することにより内在性 miRNA 経路のステップが飽和されることによるものであり、その候補として前駆 miRNA と shRNA の細胞質への輸送を仲介する核の karyopherin exportin-5 が示唆された。なお、この *in vivo* の毒性は有効かつ安全な shRNA 発現カセット及び必要最小限に有効なベクターの投与量を選択することにより軽減できることが示された。このような選択を行った AAV/shRNA を用いるとトランスジェニック

クマウスで HBV が 5 ヶ月間ウイルスのタイターで 2 対数以上抑制され、各種のレポーター遺伝子も 1 年間強く抑制されることが示された。

同様な siRNA の多重投与により内在性 miRNA のレベルに影響を及ぼさないで顕著なターゲットとする肝臓遺伝子の抑制がマウスとハムスターにおいて得られた。このように miRNA のレベルが影響を受けないのは、先ほどの飽和モデルに基づく siRNA は miRNA よりも下流の過程で RNAi 経路に入ることから、exportin-5 のような上流の成分の飽和が回避されたためと思われる。しかし、この知見は例えば 2 種類の siRNA をマウスに共投与すると *in vivo* でお互い競合し個々の有効性が阻害されるという初期の報告と一致しない。同様な結果が培養細胞でも報告されており、各種の標的 mRNA に対する多くの shRNA あるいは siRNA を共投与すると個々の RNA トリガーの有効性が低下した。高濃度の siRNA で細胞内 RNAi マシンが飽和される可能性を示す結果が得られている。それらのデータによると外から導入した siRNA を細胞内の RISC が集合させる能力は非常に限られており、RISC を化学量論的に滴定することが可能であることが示されている。このモデルにより観察された siRNA の間の競合がうまく説明可能である。したがって、複数の siRNA は細胞内の限られたプールの RISC 及び結合タンパク質とお互いに競合し、少なくとも特定の組織及び細胞では高投与量の siRNA により RNAi 経路を過剰に飽和させることが実行可能であると考えられる。このモデルと一致して、先のマウス肝臓における結果は RNAi 経路において exportin-5 のみが律速因子ではないことを示している。まだ証明されていないが他の律速タンパク質が RISC の slicer 成分である Ago-2

である可能性がある。Ago-2 は miRNA、shRNA、siRNA の作用発現に必要なタンパク質である。この RISC の飽和により先に示した siRNA の競合を示す知見が説明可能である。このモデルを支持する結果がヒト組織パネルにおける Ago-2 タンパク質の発現解析により得られた。この結果によると、Ago-2 タンパク質は特に肝臓と肺で低いことが示された。

RNAi 治療薬を最適で安全なものとして開発する必要条件として内在性の RNAi 経路をより理解することも必要である。重要なステップは治療の標的となる組織あるいは細胞における各種の RNAi に関与する特定の因子の特性及び発現プロファイルの比較である。それにより多くのウイルスが感染細胞において RNAi 成分と相互作用しその機能を抑制するという知見に基づき RNAi 経路とヒトウイルスの自然に起こる相互作用をさらに解明することの助けになる。例えば、アデノウイルスはそのウイルス RNA により exportin-5 の機能を消失させ飽和する。これはベクターによりコードされる shRNA を高いレベルで発現する細胞において起きるものと似ており、ウイルス・RNAi 相互作用を更に研究することにより治療用 RNAi を最適化する機構及び概念が明らかになると思われる。同様に、*in vivo* における siRNA レベルを定量して比較する方法を考案するだけでなく、異なった RNAi トリガーをデリバリーし複数の利用可能なベクターを用いることが重要である。

同じ観点から多くの研究者により調節可能で組織特異的な RNA 発現を可能にする RNA ポリメラーゼ II をベースにした新規の RNAi プロモーターの開発が行われている。その最終目標はこれらのプロモーターの使用により内在性の miRNA 系特に exportin-5 及び RISC

の過剰飽和のリスクを避けながら、核における shRNA の発現を十分高いレベルで厳密に調節し、強力で持続した RNAi を起こすことである。現在、可逆的あるいは永続的な変異体を含め様々な異なった遺伝子発現ベクター系の改変が行われている。内在性の miRNA は通常 RNA ポリメラーゼ II から発現するため多くの場合ヘアピン RNA が天然の miRNA 構造に組み込まれるということが障害となる。この戦略ではヘアピン RNA の最も効率的な発現とプロセッシングは保障されるが、ハイブリッド shRNA/miRNA 転写物の切断には核における Drosha が必要とされる。従って、他の細胞内 RNAi 成分が飽和されるリスクも同時に増加する。一般的に治療用 RNAi に適したベクターの最終のゴールはこのような最適なプロモーター系を最適なデリバリーベヒクルと結合させることである。このようなオプションはベクターをベースにした RNAi 発現系に限定されており、siRNA をベースにした戦略では適用できない。この組み合わせにより最終的に転写 RNAi の特異的なターゲティングだけでなく最大限の厳密な遺伝子導入が可能になることが期待される。このように、off-target 細胞における有害事象を除去することにより、最大の患者の安全性だけでなく最も高い有効性を保障することが可能となる。

#### C. 1. 10. 2. 2 新規の RNAi を基にした治療戦略

最も明白で直接的な臨床における RNAi 適用はヒトの疾患に関連した遺伝子あるいは mRNA を直接ターゲティングすることである。この概念の妥当性を検証している論文は急激に増加している。



### C. 1. 10. 2. 2. 1 組み合わせ RNAi

病原性のウイルスを標的として治療用 RNAi を用いる際の懸念は、過去において他の単独治療において直面した障害と同じである。最も大きな障害は高いウイルス変異率により急速に生じるウイルスのカプシドミュータントを調節することである。これは特に HCV および HIV のような RNA ウイルスに当てはまる。HCV の場合 1 年間にウイルスヌクレオチド当たり 103 の変異を取り込む。また、HIV は全ての生物で急速に進化し発達している。不幸な事に、これらのケースでは RNAi の優れた特異性が欠点となる。なぜなら siRNA/shRNA とウイルス標的 mRNA の間の単一ヌクレオチドミスマッチにより認識と抑制を無効になるからである。ウイルスの変動の問題をうまく解決する方法は、siRNA のカクテルあるいは多くの shRNA を発現するベクターを用いてそのゲノムをターゲティングすることである。通常これら RNAi トリガーはウイルスゲノム内の異なった部位及び理想的にはウイルスファミリーの全てのメンバーの中で高度に保存されている配列を同時にターゲティングする。この考えに基づくとこれら RNAi トリガーによりエスケープミュータントの形成が効果的に阻止できるはずである。実際多くの研究によりこの組み合わせ RNAi のアプローチの妥当性が評価されており、わずか 3 種類あるいは 4 種類の siRNA/shRNA の組み合わせにより HIV のような非常に変異するウイルスでも十分調節できることが示唆されている。抗ウイルス組み合わせ RNAi のさらに可能性のある修飾はウイルスにハイジャックされる細胞の受容体や細胞質あるいは核タンパク質のような病原体の感染に寄与する細胞内タンパク質をコードする細胞内 mRNA のようなウイルス標的を

混合することである。

組み合わせ RNAi 戦略はがんを含む他のヒトの疾患の治療にも有望であることである。その例は BRAF 及び SKP2 の共抑制であり、結果的に単独治療よりも抗腫瘍効率は優っている。なお、これらの遺伝子はメラノーマ細胞でアップレギュレーション及び変異が起こる頻度が高い。改良型のがん特異的な組み合わせ RNAi は通常のがん治療薬の有効性を増強させることを目的とした化学療法あるいは放射線に対する抵抗性に寄与するがん遺伝子及び遺伝子の相乗的な共抑制である。その例として MDR1 によりコードされる P-glycoprotein がある。結腸癌細胞において P-glycoprotein のレトロウイルス/shRNA を介したサイレンシングにより細胞毒性薬剤に対する感受性が増強する。他の研究では、アデノウイルスベクターを介した shRNA の発現が HIF-1 $\alpha$  の抑制に用いられた。なお、HIF-1 $\alpha$  は低酸素条件下で急速に成長する腫瘍でアップレギュレートされる。この抑制によりマウスにおける腫瘍の成長が遅れるだけでなく、成長の遅れは同時に放射線を投与することにより相乗的に促進された。このようにがんの治療におけるベクターを介した RNAi の組み合わせの概念が有効であることが示されている。その他の RNAi 組み合わせの修飾はリボザイム、アンチセンス、トランスドミナントタンパク質のような他の遺伝子発現の阻害剤のいずれかと組み合わせで shRNA を発現するベクターをデザインすることである。注目すべき候補は HIV 感染を撃退するためにデザインされたレンチウイルスベクターであり最近臨床試験に入っている。このトリプルベクターは抗 HIV shRNA、細胞内 HIV CC 5 receptor に対するリボザイム、ウイルス TAT タンパク質を隔離するための HIV-

TAR デコイを共発現する。それに代わる将来の世代のベクターはレポーターあるいはマーカーとして用いるタンパク質あるいは相乗効果を有するタンパク質を共発現できる。最初の例は  $\gamma$  グロブリン cDNA と共にヒト鎌状 B-グロブリンに対する shRNA を共発現するレンチウイルスである。鎌状細胞貧血患者からの分化する CD34<sup>+</sup> 細胞でこのベクターは B $\beta$  を特異的に低下させるが  $\gamma$ -グロブリンを発現し、幹細胞治療との関連で相乗的な遺伝子のサイレンシング/発現の戦略の可能性が提供された。

このように有望な成功例が示されているが、RNAi 組み合わせとベクターについてはさらに最適化が必要である。現時点における主な不明の点は複数の遺伝子を運ぶヘアピン RNA および関連するプロモーターの遺伝的安定性に関する懸念である。少なくとも DNA プラスミドに関しては、一つのプロモーターでも最大 10 個の shRNA コピーを連結させることは妥当と思われるが、ヘアピン RNA の数が 3 個を超えると不安定になるとの報告もある。これらのパラメーターには、一つあるいは数個のプロモーターにおける多数のヘアピンの位置および個々の shRNA を分離する配列の長さおよび構造のような他の因子も含めて徹底的な試験による最適化が必要とされる。最終的には、特定の疾患のターゲティングに多数の配列を用いる場合、RISC への個々の siRNA の取り込みにおいて有害な競合を避けることが重要であり、競合により特異的な siRNA の効果が制限され、RNAi の組み合わせ治療の最初の概念が無効になる。

#### C. 1. 10. 2. 2. 2 治療標的としての miRNA

最近の考えによると、哺乳類およびヒトにおける RNAi 経路の主な機能は内在的にコード

される miRNA の産生及びプロセッシングである。miRNA は、通常は 3'UTR にある部分的に相補性のある mRNA へ結合し阻害することによりおそらくは数千の遺伝子発現を転写後で調節する。これには明らかにオーバーラップするプロセスがあり、正確な機構は十分には解明されていないが、大部分は mRNA の分解よりもむしろ転写の阻害を介して起こる可能性が高い。この結果、miRNA が分化、形質転換、あるいはウイルス感染のような多数の多様性のある良性あるいは悪性の細胞プロセスの重要なレギュレーターになる。したがって miRNA は疾患の治療戦略について幅広い可能性を提供する。最近の報告によると、一過性のあるいは安定な表現型の機能を消失させることを目的として、特異的かつ効率的に miRNA の機能を阻害する新規の方法論が導入された。その方法では、任意の miRNA あるいは全体の miRNA ファミリーの多くの 3'UTR に対する最大 7 個の直列の結合部位を有する強力なポリメラーゼ II (例えば CMV) あるいは III (例えば U6) から転写産物が発現される。導入した細胞で、miRNA スポンジと呼ぶこれらコンストラクトは相補的な 7 個の配列を有する miRNA と結合し選択的に阻害できた。その効果は標準的な条件で用いた場合、antagomir 及び locked nucleic acid (LNA) アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む過去に最も多く報告されている miRNA の阻害剤と少なくとも同等であった。重要なことは、スポンジも通常 miRNA により調節されている内在性標的を抑制できることから、ターゲティングの妥当性評価において非常に可能性のある手段であることが示唆される。実際、少なくとも一過性に導入した細胞におけるスポンジのコピー数は細胞当たり数千倍でありおそらくほとんどの



miRNAを抑制するのに十分であると推定された。

治療用 RNAi の観点から、この新しい方法論はウイルスの治療用ベクターから発現されるトリガーを用いて miRNA の機能を抑制する多くのオプションを提供できるため非常に興味深い。適用が可能と考えられる例として腫瘍形成における miRNA の機能の評価、最終的には動物モデルおよび患者においてがんを引き起こす miRNA の抑制が含まれる。別の興味あるオプションは肝細胞で高発現し 5'UTR に対する結合により HCV の複製に必要である miRNA-122 (miR-122) の遮蔽に用いることである。これにより新規なウイルス肝細胞感染の抑制法が提供されるだけでなく、他の RNAi の組み合わせの例として他の抗 HCVshRNA およびその阻害剤を容易に組み合わせることができる。

しかしこの場合も、この系の多くのパラメーターを十分に特性解析し最適化する必要がある。例えば、理想的な miRNA 結合部位の数、スポンジ内におけるお互いの配置は不明である。これらの問題は今後動物実験で評価する必要がある。また、この新規方法論には安全性についてリスクがある。懸念の一つは特に一つの miRNA がおそらく数百あるいは数千の標的を調節するという事実から内在性 miRNA を完全かほぼ完全に遮蔽することにより細胞が有害な効果を受ける可能性があるということである。膨大な大部分の miRNA ファミリーの機能は不明であるので、多数の miRNA の同時抑制が細胞および生物体に耐容でない可能性は否定できない。

### C. 1. 10. 2. 2. 3 導入遺伝子の組織選択的な発現

先ほどの戦略と別に、強い新抗原である GFP のコーディング配列の 3'UTR に miRNA (mir-142-3p) の結合部位を挿入する戦略も取られている。この特異的な miRNA は血液系統の細胞に選択的に発現する。この考えは肝臓にベクターを全身的にデリバリーさせながら、過失により導入された血液細胞からの発現を選択的に消滅させるというものである。実際、免疫不全マウスにレンチウイルスでデリバリーさせると、GFP は造血系統ではなく非血液細胞、特に肝細胞および内皮細胞にのみ発現する。その結果、GFP は抗原提示細胞で発現しないためマウスは抗 GFP 免疫反応を起こさず、ベクターの発現は維持される。ごく最近のフォローアップ研究で、同じ原理が造血細胞における組換え clotting human factor IX (hFIX) の off-target 発現を抑制するために用いられた。これは抗原提示細胞における hFIX の発現を阻止し、通常マウスにおいて長期間の hFIX の導入を障害する抗 hFIX 特異的適応免疫反応の誘導を抑制する。実際、hFIX-mir-142-3p 融合ベクターで処理した免疫応答性血友病 B マウスは治療効果を有する hFIX 活性が9ヶ月持続した。過去における導入遺伝子の組織選択的な発現は例えば肝臓特異的なプロモーターのように転写のコントロールを介して主に行われた。従って、新規の RNAi を介した転写後の調節が加わればベクターを介した組織特異的な遺伝子発現戦略の見通しが明るくなる。

これらの研究では異なる種の間で導入遺伝子が用いられたので、ヒトには同様に当てはまらないように思われる。従って、shRNA 発現カセットを含む他の導入遺伝子とベクターの組み合わせでこのアプローチの可能性を確認する必要がある。実際、shRNA 配列と miRNA 結合部位を融合させることにより、理想的には

全身的な RNAi ベクターの投与からでも望ましい標的細胞にのみ RNAi トリガーの選択的および特異的に発現を起こすことが理論上は可能である。このアプローチにより有効性と選択性を最大限に得るために、例えば細胞あるいは組織特異的なベクター及びプロモーターを用いて翻訳及び転写ターゲティング戦略を組み合わせたことが可能である。他方、組織選択的な発現の方法論には例えば miRNA の結合部位の理想的な数及び位置の同定など miRNA スポンジとしての同様な最適化がさらに必要である。

RNAi をベースにした発現系の中で注目すべき点は調節領域の遺伝子配列に対する小さな dsRNA が転写レベルでその発現を停止させるという報告である。そのようなプロセスが哺乳動物細胞で実際に起こるなら、核においてこのような dsRNA を短時間で一過性に発現させることにより遺伝子発現を止めることができるかもしれない。これを上記の miRNA を基にした系だけでなく通常の RNAi 戦略と組み合わせることにより、疾患に関連した遺伝子の発現を調節する新規の治療アプローチを提供できる可能性がある。この戦略については現在 siRNA を核に効率よくデリバリーする技術はないのでウイルスベクターを用いることにより可能になるかもしれない。

## C. 2 医薬品の製造方法の評価に関する国際動向研究

### C. 2.1 ICH-Q8 ガイドライン作成の背景

ICH 品質分野において、新しい品質システム構築が提唱された背景としては、FDA の新しい戦略があるものと思われる。

米国 FDA は、ゲノム創薬等新しい医薬品開発手法が生まれ、医薬品開発が活発化している

にもかかわらず、近年、承認される医薬品数が減少傾向にあることに危機感を表明するとともに、2004年に“Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products”（平成18年度分担研究報告書資料1）という文書を発表し、医薬品開発および承認審査を妨げる要因を解析し、これを克服するための戦略を打ち出した。これとほぼ時を同じくして、医薬品の品質管理においても新しい考え方を打ち出し、“Pharmaceutical CGMPs for the 21<sup>st</sup> century- A risk-based approach”（平成18年度分担研究報告書資料2）として公表し、品質リスク管理に基づくアプローチによる、新しい総合的品質システム構築を提唱した。その後、後者の品質管理システム構築の提案は、前者の総合的な医薬品開発促進策の提案の一部に組み込まれ、“Critical Path Initiatives”という国家計画として FDA によって再編成されている（“Critical Path Opportunities Initiated During 2006”(2006)（平成18年度分担研究報告書資料3））。

FDA の医薬品品質管理についての危機意識は以下のようなものである。医薬品はヒトに投与される商品であり、特に健康にかかわるがゆえに、歴史的に極めて厳しい規制体制が確立されてきた。このことが要因の一つとなり、医薬品の開発製造コストが高騰し、承認までの時間が延長し、医薬品開発は困難になってきている。また一度開発、承認されても、品質の向上あるいは製造コストの改善等を目指した製法変更は、規制当局による承認あるいは届出が必要なため、実施までに時間、経費がかかる。そのため製造工程の変更を避ける傾向にあり、工業製品の中でも製造管理は旧態依然のシステムで行われていることが少なくない。一方規制側からみると、製法変更に関する承認審査のために



大きなリソースが必要とされるため、規制コストの増大を招いている。このような問題を解決するために、医薬品の品質管理に製造科学と品質リスク管理の考えを導入した新しい開発アプローチを導入し、品質管理システムを近代化させる必要がある。

FDA はこの新しいアプローチを “Quality by Design (QbD)” のアプローチと称しているが、その意味するところは、環境要因、工程上の要因、原材料、品質特性といった工程上の重要な要素を確認し、これら要素が医薬品の性能や品質へ及ぼす影響を解析、それに基づき品質管理システムを構築するアプローチである。このアプローチをとる目的は、製造工程を科学的に解析することにより、生産される製品の品質を評価あるいは改善する能力を高め、最終製品の規格試験に頼らずに品質確保を行うことを可能とする新しい製造管理手法を構築することにあるとされる。その際、製品の品質特性を近赤外やラマン分光あるいはイメージングによってリアルタイムにモニタリングする手法 (Process Analytical Technology (PAT)) は、品質を保証する上で重要な製造段階をモニターするための分析手法となり、これらの手法を活用すれば、最終製品のロット試験なしにリアルタイムの出荷が可能となる。したがって、PAT は QbD アプローチを実現させるために極めて有力な技術と位置づけられる。

ICH の Q8 以降のガイドラインがテーマとして取り上げられていることについては、以上の FDA の新たな戦略が背景にあると考えられ、このような方向は、医薬品の世界同時開発を目指す医薬品開発企業の向かう方向にも合致したため、これら新しい ICH 品質ガイドライン作成が推進されているものと考えられる。

## C. 2. 2 ICH Q8 ガイドラインについて

### C. 2. 2. 1 Q8 製剤開発ガイドライン

ICHQ8「製剤開発ガイドライン」は、CTD に示された承認申請時に必要とされる添付資料の中で、3.2.P.2 「製剤開発の経緯」の項において推奨されるべき記載内容に関するハイレベルな指針として作成された。

製剤開発研究の目的は、第一に適正な品質を有する医薬品を設計することであり、第二に意図した機能を有する医薬品を一貫して供給できる製造工程を設計することである。この目的を達成する過程においては、科学的手法と品質リスク管理の適用が推奨される。製剤開発研究や製造経験を通して得られた情報の理解により、製造管理法、及び規格が確立されるが、製造工程の理解が深まるにつれ、最終製品の規格試験による品質保証は、製剤設計及び工程の設計による品質保証に置き換えることが可能となる。さらに製造方法に関する科学的理解が深まり、製造管理においてその範囲では品質の一定性が保証されるデザインスペースを確立することができれば、その範囲での運用は規制上の製法変更とはみなされず、承認事項一部変更のための規制手続きの必要がなくなり、製法変更の手續きの弾力的な運用が可能となる。

このように Q8 ガイドラインは「製剤開発の経緯」の項の記載方法のガイドラインであるばかりでなく、医薬品製剤の品質管理における科学的手法と品質リスク管理の本格的導入を推奨する先進的/先導的ガイドラインである。これは、化成品規格および試験法ガイドライン (Q6A) においてスキップテストあるいはパラメトリックリリースとして萌芽的に導入された、最終製品規格試験に代わる工程管理による品質管理手法を、さらに品質管理法として様々な工程で導入することを推奨するガイドライ

ンといえる。その際、デザインスペースという概念を導入し、製法変更の弾力的運用を可能にする方法の導入を図ったガイドラインでもある。

#### C. 2. 2. 2 Q8Annex 製剤開発 Q8 付属書

Q8 ガイドラインは、新しい製造工程開発・品質管理手法を提案する先進的/先導的ガイドラインであるが、それを現すための象徴的言葉であり、Q8 ガイドライン作成の過程の議論において汎用されていた「QbD アプローチ」という用語そのものはQ8 文書中では用いられておらず（文書中では“to design a quality product”, “quality should be built by design”と表現されている）、その定義についても文書化されないままにあった。また、規制上に柔軟性をもたらすための「design space デザインスペース」の概念についても、用語集の中で「品質を確保することが立証されている入力変数（原料の性質など）と工程パラメーターの多元的な組み合わせと相互作用；このデザインスペース内で運用することは変更とみなされない；デザインスペース外への移動は変更とみなされ、通常は承認事項一部変更のための規制手続きが開始されることになる；デザインスペースは申請者が提案し、規制当局がその評価を行って承認する」と説明されているものの、その具体例、設定方法、さらには規制への具体的な取り込み等について、必ずしも統一的な理解がされていないままに合意に至ったと思われる。

そこで、次のステップとして、経口固形製剤、注射剤、経口液剤を例に、具体例や設定方法について明確にし、さらには従来行われてきた製造工程開発の手法（この文書では「最小限アプローチ」あるいは「基本となるアプローチ」と

称せられる）とリスク管理手法を導入して製造科学に基づいて行う「体系的アプローチ（QbD アプローチ）」を比較検討、まとめるという方向でQ8を補足する複数の付属書の作成が開始された。しかしこの付属書を作成する過程で、QbD アプローチの中でも、規制上の弾力性を持たせるうえで要となる概念である「デザインスペース」の定義、具体例、設定方法へ議論の中心が移り、ステップ2 ガイドラインは製剤別の具体例あるいは設定方法の例示というより、デザインスペースの概念の明確化、設定の考え方、CTD フォーマットにおける記載法に議論の中心が移り、ステップ2 文書においても、記述の相当部分がこの点に割かれることとなった。

さらに、製剤毎に具体例を検討するとされていた、注射剤あるいは経口液剤については、付属書作成は立ち消えとなってしまった。さらに当初「QbD アプローチ」とともにまとめられていた「最小限アプローチ」についても最小限の記述にとどめられ、「QbD アプローチ」と対比した表一つに概念がまとめられたのみとなった。

#### C. 2. 3 バイオテク応用医薬品の開発における欧米で行われている QbD アプローチについての議論

##### C. 2. 3. 1 デザインスペースの定義の試み

QbD アプローチはまず標的製品プロファイル（製剤の望ましい品質、ひいては安全性及び有効性を保証するために理論的に到達すべき製剤の品質特性についての先を見越した要約）の考察に始まる。次に望ましい品質、安全性、有効性に影響を及ぼす品質特性からなる重要品質特性（CQA）の特定に進む。CQA の特定には、Q9 で用意されているような各種リスク



評価法を用いることとなる。その際、研究室レベルでのデータ、関連物質に関して得られている文献データ、非臨床試験の経験、臨床試験の経験が重要となる。特定した CQA については、さらに開発過程でも品質上、非臨床データ、臨床データ等をもとに、CQA を精査してゆく (Q8 Annex では示されていないが、ここで最終的に確認された CQA を Product Design Space と称する論文もある)。

続いて、(1) CQA に影響を及ぼす原料特性及び工程パラメーターをリスクアセスメントで特定する；(2) デザインスペースの理解・定義に役立つようなデータをとるために実験計画法 (design of experiments (DOE)) を利用して、研究をデザインする；(3) 研究が実行され、デザインスペースの定義および重要性が決定される。(3) においては 故障モードとその影響の解析 (Failure mode and effects analysis (FMEA)) の手法がしばしば解析に用いられる。(平成 20 年度分担研究報告書資料 1)

デザインスペースの解析例としては、(1) 培養工程の原料特性、培養液のパラメーター、操作パラメーターに関する解析、(2) 精製工程、特にカラムクロマトグラフィーへの、遊離液のグラジエント条件、pH、流出速度、温度、ベッドサイズ等のパラメーターの解析、などがあげられる。

### C. 2. 3. 2 バイオテック応用製品における QbD アプローチ研究の新しい流れ

もう一つの新しい流れとしては、FDA の QbD に対する積極的な取り組みに対応するものとして、業界側が抗体医薬を特定した QbD アプローチ研究が開始されたことである。これは、7つの製薬大手企業 (Amgen, Genentech, Abbotto Bio Mediimmune (AstraZeneca)),

GlaxoSmithKline Bio, Eli Lilly Bio そして Pfizer Bio) が参加してコンソーシアムを立ち上げ、ICH Q8-10 に示された考えを反映させた、架空ではあるが現実的なモノクローナル抗体の製造工程プログラムを検討するというものである (平成 20 年度分担研究報告書資料 2)。

近年に市販され、今後も開発されるであろう抗体医薬の多くは遺伝子組換え技術を利用して開発したキメラ抗体、ヒト抗体、あるいはヒト抗体であり、またその多くは IgG である。したがって相補性決定領域 (CDR) 以外は構造上極めて類似している。そのため、製造工程は共通性の高いものであり、標準的製造工程を考える際の材料として最適である。

昨年暮れに公表された、EMEA の「モノクローナル抗体およびその関連製品の開発、製造、特性解析、および規格に関するガイドライン」(平成 20 年度分担研究報告書資料 3) においても、「Platform manufacturing」という概念であらわされた考えが打ち出されており、モノクローナル抗体の製造工程のように、製品間で共通性の高い製造工程については、バリデーショナルデータなどは共有化可能な場合があることが示されている。

上記の活動を反映した学術集也会も企画、開催されつつある (平成 20 年度分担研究報告書資料 4)。

### C. 2. 4 Q8 および Q8(R1) ガイドラインにおける QbD アプローチ のバイオテック応用医薬品原薬の製法開発への適用

Q8(R1) 付属書では、製剤開発における旧来のアプローチ: 最小限アプローチ において必要な要素は、以下のようにまとめられている。(1) 投与経路、剤形、生物学的利用能、用量、安定性などを考慮した、品質、安全性、有効

性に関連する標的製品プロファイルの定義

- (2) 当該製剤の重要品質特性(CQA)の特定；この特定により品質に影響を及ぼす製剤特性の研究や管理が可能となる
- (3) 原薬、添加剤などの品質特性の特定及び望ましい品質を製剤に付与する添加剤の種類と量の選択
- (4) 適切な製造工程の選択
- (5) 管理戦略の決定

QbDアプローチでは、以上の要素に加えて下記の要素が必要とされている。

- (6) 製剤処方及び製造工程の体系的な評価、理解、洗練；これには以下に挙げるような作業が含まれる
  - ・従前の知識、実験、リスクアセスメントなどを通じ、製剤のCQAに影響を及ぼす原料特性及び工程パラメーターの特定
  - ・原料特性及び工程パラメーターと製剤のCQAを関連づける機能的関係の特定
- (7) 適切な管理戦略を確率するための、品質リスクアセスメントと組み合わせた深い工程理解の活用；これにはたとえばデザインスペース及び/又はリアルタイムリリースについての提案が含まれる。

以上の要素が満足されるような開発アプローチがとられることによって、製品ライフサイクルの全期間を通じた継続的な改善およびイノベーションが実現する、とされている。

これを原薬に移し替えると、QbDアプローチをとる際、標的製品プロファイルの設定、あるいはCQAを特定するにあたっては、(1)有効成分の特定(定義)が可能な特性、(2)不純物(有効成分に由来する不純物、および工程由来不純物)の特性、(3)混入物質の特性、(4)安定

性を考える必要がある。これらの点について、バイオテク応用医薬品原薬の場合は、化成品原薬とは以下のような違いがある。

(1) 有効成分として特定が可能な特性：化成品原薬においては、NMRあるいは赤外スペクトルといった構造解析によって有効成分を特定(定義)できる。しかしバイオテク医薬品では、構造解析からの定義、構造解析以外の物理化学的特性からの定義、そして生物学的特性からの定義を併用することになる。即ち、多くのバイオテク応用医薬品においては、高次構造解析手法の限界により構造解析データのみから有効成分を特定することは困難である。したがって有効成分を定義する上で、構造解析+物理化学的特性の分析に加えて、生物活性値を合わせて物質を定義せざるを得ない製品がほとんどである。ここで生物活性試験と臨床効果との関係が明瞭な物質の場合は、生物活性から有効性(あるいは安全性)へのインパクトを予測することは可能と考えられるが、生物活性と臨床効果の関係が明瞭でない物質の場合は、有効性・安全性に悪影響を及ぼすことのない変動幅を設定することは必ずしも容易でないが、バイオテク応用医薬品の中には、このように生物活性と臨床効果の関係が明瞭でないものが少なくない。

さらにペプチドのN-末、C-末における翻訳後修飾に由来する分子多様性、あるいは糖タンパク質に代表されるような複合タンパク質のもつ分子多様性ゆえに、有効成分を定義(特定)するために構造の特性をパターンとして表現せざるを得ない。ただし、このパターンは赤外スペクトルのように同一性が明確に判定できるものではなく、同源性/同質性を判定する上での判定基準が明確に設定しにくいパターンである。



また有効成分には、目的物質と同様の生物活性を示す目的物質関連物質も含まれることから、有効成分一つをとってみても、有効性、安全性へ悪影響を及ぼさない品質特性の範囲について境界を明確化することは困難である。

(2) 不純物の特性：化成品不純物の多くは、液クロ、ガスクロでの定量的な解析が比較的容易であり、不純物混入の安全性へのインパクトについては、ICH 不純物ガイドラインで設定されている基準量から整理することができよう。さらに、毒性を確認する必要があるほどの量の不純物が含まれている場合でも、動物実験によって安全性へのインパクトを予測することは比較的容易である。一方、多くのバイオテク応用医薬品の場合、含有される可能性のある目的物質由来不純物については、開発中に行うロット分析によって特定し、CQA の絞り込みも可能かもしれないが、不純物個々の生物作用は種特異的である場合が多いので、動物実験でヒトに対する有効性・安全性へのインパクトを定量性を含めて予測するには限界がある。さらに特にヒトに対する抗原性を示す可能性は、極低レベルでもあるので、安全性へのインパクト予測は困難であり、化成品 ICH 不純物ガイドラインを適用することはできない。したがって例えば不純物に関する CQA と工程パラメーターとの関係は求められても、その変動の安全性へのインパクトを量的に求めることは困難である。

(3) 混入物質の特性：無菌性の評価については、化成品でもバイオテク応用製品でも、同様と考えられる。しかし、デザインスペースを設定する際に必要な、種々条件を変えての検討を、ウイルスあるいはプリオンに関する製造工程の除去能について行うことは、コスト的にも定量的評価の困難さを考えても現実的ではない。したがって、ウイルスあるいはプリオン除去に関

係するような工程パラメーターについてのデザインスペースの設定は困難かと思われる。

(4) 安定性：化成品原薬の実時間、実保存条件での安定性については、加速試験結果からの外挿が可能な場合が多く、安定性という要素をデザインスペースの設定に加味することは比較的容易と考えられる。一方、タンパク質性医薬品の場合、加速試験条件の安定性データからの実時間安定性の予測性は特定のタンパク質製品を除いて十分とはいえない。したがって、実時間、実保存条件での安定性データが基本である。そのため、原料特性および工程パラメーターと安定性との関係の解析は、化成品と比べて格段に制限されると考えられる。

### C. 2. 5 バイオテク応用医薬品のデザインスペース設定の可能性

以上のように、有効成分、不純物、混入物質、安定性という品質特性パラメーターを特定する上で配慮すべき要素に関して、バイオテク応用医薬品の場合、多様であり、工程パラメーターと品質特性パラメーターの関係の解析が困難なものも少なくないと思われる。さらにパラメーター間の相互作用についても、科学的な解析が可能なものは必ずしも多くないことが予想される。

また有効性・安全性へ悪影響を及ぼさない品質特性の変動幅を、臨床データなしに求めることは、多くのバイオテク応用医薬品では困難である。したがって、デザインスペースの設定の検討において、判定基準となる CQA は、第三相臨床試験に用いたロットの品質特性に縛られることとなり、設定できてもデザインスペースは限定的なものになるものと思われる。

ただし、例えば、生産培養工程のように、細胞個々がおかれる物理的、化学的環境要因につ

いて、要因（温度、攪拌条件、スケール、溶液中の物質濃度等）間の相互作用を数式で表現できるような製造工程においては、例えばスケールアップ時の温度あるいは攪拌条件等の工程パラメーターに関するデザインスペースを、リスク管理手法を応用して求めることは可能と考えられる。

また同様に精製工程のカラムクロマトグラフィーなどについても、物理的、化学的解析から、パラメーター間の相互作用の関係を数式で表現できるケースがあり、そのような場合は、工程パラメーターに関するデザインスペースの設定は可能と考えられる。

#### C. 2. 6 バイオテック応用医薬品の製造工程における PAT について

QbD アプローチのメリットとして、リアルタイムモニタリング手法を導入して、製品ロット試験を行わずして、リアルタイム出荷を実現することが挙げられている。このポイントについては、化成品とバイオテック応用医薬品の間に相違はない。ただし、原薬は、最終製剤から見ると、中間体の一つとみなせ、リアルタイム出荷は、製剤におけるほどの実質的なインパクトはない。しかし、リアルタイムモニタリング手法の採用は、原薬の品質向上に役立つと考えられる。

例えば生産培養工程において、細胞の生育状態、培養液中の成分濃度、あるいは目的タンパク質の生合成量、目的物質関連物質や不純物量等をリアルタイムモニタリングし、フィードバック的に培養時間、培養条件等を適宜調節すれば、生産効率の向上、不純物量の低下、原薬の一定性確保という観点から、より合理的な生産管理が可能と考えられる。したがって、培養工程における各種リアルタイムモニタリング手

法、精製工程における不純物、混入物質等のリアルタイムモニタリング手法の開発・導入は、製品の一定性確保および品質向上に資するどころ甚だ大と思われる。

同様のことは、クロマトグラフィーによる精製工程においても当てはまることであり、流出物のリアルタイムモニタリングを行い、フィードバック的に流出条件を調節するようなシステムにすることで、製品の品質向上も期待できる。

### C. 3 生物薬品の特性・品質評価解析、品質評価法の開発に関する研究

#### C. 3. I INN 及び JAN において糖鎖構造の違いによって区別されている品目の基原及び糖鎖構造に関する調査

INN や JAN では、糖タンパク質の糖鎖の違いをギリシャ文字を用いた 2 語式で区別している。例えば、エポエチン アルファはアルファグリコフォーム分布をもつエポエチンを、同様に、エポエチン ベータはベータグリコフォーム分布を持つエポエチンを意味する。このような 2 語式で区別されている品目を調査した結果、INN には 6 種類収載されていることが分かった（表 1）。また、多糖類では、低分子量ヘパリンが、糖鎖の違いによって明確に区別されていることが分かった。

##### C. 3. I. 1 Agalsidase

Agalsidase は 398 個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質で、ヒト  $\alpha$  ガラクトシダーゼ A と同一のアミノ酸配列をもつ。 $\alpha$  ガラクトシダーゼ A はライソゾーム内で糖脂質の分解に携わる酵素で、この酵素の遺伝的欠損は、スフィンゴ糖質代謝異常症であるファブリー病の原



因になる。ファブリー病ではライソゾーム内にスフィンゴ糖脂質が蓄積し、主に腎臓、心臓、自律神経系障害を呈する疾患である。INN及びJANには *Agalsidase Alfa* (アガルシダーゼ アルファ(遺伝子組換え)) と *Agalsidase Beta* (アガルシダーゼ ベータ(遺伝子組換え)) が記載されている。

*Agalsidase Alfa* はヒト線維肉腫細胞株由来の細胞株により産生される糖タンパク質である。*Agalsidase Beta* はCHO細胞で産生される糖タンパク質で、ファブリー病治療薬として2004年に承認されている。両品目の産生細胞はヒトとCHO細胞と異なるので、糖鎖構造も大きく異なることが予想される。

### C. 3. I. 2 *Antithrombin*

*Antithrombin* は、ヒトアンチトロンビン III と同一のアミノ酸配列を持つ糖タンパク質で、トロンビンや第 Xa 因子を阻害する作用を有する。ヒトアンチトロンビン III は、432 個のアミノ酸残基からなり、分子内に4つのN-結合型糖鎖が結合するサイトがある。INNには同一アミノ酸に異なる糖鎖が結合している *Antithrombin III* と *Anthithrombin Alfa* が記載されている。尚、いずれの品目も JAN 未記載である。

*Antithrombin III* は、血漿分画製剤(乾燥濃縮人アンチトロンビン III 製剤)として、先天性アンチトロンビン III 欠乏に基づく血栓形成傾向治療薬、及びアンチトロンビン III 低下を伴う汎発性血管内凝固症候群(DIC)治療薬として承認されている。

*Antithrombin Alfa* は、遺伝子組換えヤギ(トランスジェニックヤギ)で産生した糖タンパク質で、ヤギの乳中に分泌タンパク質として発現される。2006年に欧州で先天的アンチト

ロンビン欠損症治療薬として認可され、現在米国ではフェーズ III 臨床試験中である。

ヤギ由来の *Anthithrombin Alfa* とヒト血漿由来の *Antithrombin III* の糖鎖構造の違いは詳細に調べられている (Blood, 91, 4561-4571, 1998)。ヤギ由来 *Antithrombin Alfa* はヒト血漿由来 *Antithrombin III* に比べてシアル酸含量が低く、NeuAc に加えて N-グリコシルノイラミン酸が結合している。*Antithrombin III* はフコース結合量が高く、Gal が GalNAc に置換された糖鎖が結合している。また、*Antithrombin Alfa* の Asn155 には高マンノース型糖鎖が結合しているが、*Antithrombin III* には複合型糖鎖しか結合していない。Asn155 はアンチスロンビン III とヘパリンの親和性に大きな影響を与える部位であることから、糖鎖の違いは、両者のヘパリン親和性の違いに関係があるだろうと推定されている。

### C. 3. I. 3 *Epoetin*

*Epoetin* は、ヒトエリスロポエチンと同一のアミノ酸配列を持つ糖タンパク質である。エリスロポエチンは、赤血球前駆細胞に作用して赤血球への分化と増殖を促す造血因子で、主として腎臓から分泌される。天然のヒトエリスロポエチンは、165 個のアミノ酸残基からなる分子量約 30,000 の糖タンパク質で、Asn24、38、及び 83 に N-結合型糖鎖、また Ser126 に O-結合型糖鎖が結合している。糖鎖の非還元末端に結合しているシアル酸数が多いものほど、血中半減期が長く、高い生物活性を示す。

*Epoetin* は主に透析施行中の腎性貧血治療薬として用いられているほか、未熟児貧血にも用いられる。

JAN には、アミノ酸配列は同一で、結合している糖鎖の分布が異なる *Epoetin Alfa*

(*Genetical Recombination*) (エポエチン アルファ(遺伝子組換え))、*Epoetin Beta* (*Genetical Recombination*) (エポエチン ベータ(遺伝子組換え))、*Epoetin Gamma* (*Genetical Recombination*) (エポエチン ガンマ(遺伝子組換え)) 及び *Epoetin Epsilon* (*Genetical Recombination*) (エポエチン イプシロン(遺伝子組換え)) が記載されている。INNにはこれらの他、*Epoetin Delta*、*Epoetin Zeta*、*Epoetin Theta*、*Epoetin Iota*、及び *Epoetin Omega* が記載されている。

#### C. 3.1.4 *Follitropin*

*Follitropin* は、ヒト卵胞刺激ホルモン(FSH)と同一のアミノ酸配列を持つヘテロダイマー型の糖タンパク質である。FSHは下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモンで、女性では、卵巣に作用して卵胞成長、排卵、及びエストロゲン合成を促進させる。男性では、精巣セルトリ細胞に作用して精子形成を促す。ヒト FSHは92個のアミノ酸残基からなる $\alpha$ 鎖1分子、及び111個のアミノ酸残基からなる $\beta$ 鎖1分子から構成される。 $\alpha$ 鎖及び $\beta$ 鎖にそれぞれ2本のN結合型糖鎖が結合しており、糖鎖は血中半減期に影響する。INN及びJANには糖鎖が異なる *Follitropin Alfa* (*Genetical recombination*) (フォリトロピン アルファ(遺伝子組換え)) と *Follitropin Beta* (*Genetical recombination*) (フォリトロピン ベータ(遺伝子組換え)) が記載されている。

*Follitropin Alfa* は、2006年、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)との併用で、視床下部または下垂体前葉の機能及び器質的障害に由来する低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症患者を対象とした精子形成誘導薬として国内承認された。*Follitropin Beta* は、体外受精な

どの生殖補助技術を受ける患者を対象とした複数卵胞発育のための調節卵巣刺激に適応されている(2005年国内承認)。*Follitropin Alfa* 及び *Beta* 共に CHO細胞産生糖タンパク質であるが、糖鎖の違いは不明である。

#### C. 3.1.5 *Nasaruplase*

*Nasaruplase* は、ヒトウロキナーゼの前駆体(プロウロキナーゼ)と同一のアミノ酸配列を持つ糖タンパク質である。プロウロキナーゼは、411個のアミノ酸残基からなる約54kDaの1本鎖糖タンパク質で、プラスミンやカリクレインによって2本鎖に切断されて活性型のウロキナーゼになる。INNには、*Nasaruplase* と *Nasaruplase Beta* が記載されている。

*Nasaruplase* は、ヒト腎臓に由来する2倍体細胞の培養により線維芽細胞をクローン化し、株化した細胞で産生される。急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解を効能とした血栓溶解剤として承認されている。*Nasaruplase* と同一アミノ酸配列を持ち、糖鎖が異なる品目として、INNに *Nasaruplase Beta* が記載されている。これは、murine hybridoma cellで産生した遺伝子組換え糖タンパク質である。*Nasaruplase* の糖鎖がヒト型であるのに対して、*Nasaruplase Beta* はマウス型糖鎖を有する。*Nasaruplase* は、*Alfa* が記載されず、*Beta* が記載されている唯一の例である。

#### C. 3.1.6 *Urokinase*

ウロキナーゼは尿に分泌される分子量約54,000(411アミノ酸残基)の酵素であり、20年以上前から血栓溶解の目的で臨床的に使用されてきた。尿中には二本鎖(活性型)の高分子型とそれが一部分解された低分子型が存在している。INNには、*Urokinase* 及び