

|   |   |                        |         |           |      |
|---|---|------------------------|---------|-----------|------|
| Onoue S, Hosoi K, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Matsuoka N, Nakamura K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Seto Y, Kato M, Yamada S, <u>Ohno Y</u> , Kojima H | Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation                                  | J. Appl. Toxicol.      | 33(11): | 1241-50   | 2013 |
| Yamaguchi H, <u>Kojima H</u> , Takezawa T   | Vitrigel-Eye Irritation Test Method using HCE-T cells (ヒト角膜上皮細胞を用いるビトリゲル眼刺激性試験法)  | Toxicological Sciences | 135(2)  | 347-55    | 2013 |
| Uehara T, Kondo C, Morikawa Y, Hanafusa H, Ueda S, Minowa Y, Nakatsu N, Ono A, Maruyama T, Kato I, Yamate J, Yamada H, <u>Ohno Y</u> , Urushidani T                             | Toxicogenomic Biomarkers for Renal Papillary Injury in Rats.  | Toxicology             | 303     | 1-8       | 2013 |
| Okubo S, Miyamoto M, Takami K, Kanki M, Ono A, Nakatsu N, Yamada H, <u>Ohno Y</u> , Urushidani T.   | Identification of novel liver-specific mRNAs in plasma for biomarkers of drug-induced liver injury and quantitative evaluation in rats treated with various hepatotoxic compounds | Toxicological Science  | 132     | 21-31     | 2013 |
| Ono A, Takahashi M, <u>Hirose A</u> , Kamata E, Kawamura T, Yamazaki T, Sato K, Yamada M, Fukumoto T, Okamura H, Mirokuji Y, <u>Honma M</u>                                     | Validation of the (Q)SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavor chemicals.  | Food Chem Toxicol.     | 50      | 1536-1546 | 2012 |
| <u>西川秋佳</u>   | 安全性等に関するトピックの動向. ICH S1A Informal Working Group Meetingの進捗状況  | 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス    | 43      | 726-731   | 2012 |

|  |   |                   |     |         |      |
|--|---|-------------------|-----|---------|------|
| <u>平林容子</u>  | ICH-S6(R1)ガイドラインの改定の要点と今後の課題  | レギュラトリーサイエンス学会誌   | 2   | 175-184 | 2012 |
| Mekenyan OG, Petkov P, Kotov S, Stoeva S, Kamenska VB, Dimitrov S, <u>Honma M</u> , Hayashi M, Benigni R, Donner M, Patlewicz GY | Investigating the relationship between in vitro - in vivo genotoxicity: Derivation of mechanistic QSAR models for in vivo liver genotoxicity and in vivo bone marrow micronucleus formation which encompass metabolism. | Chem Res Toxicol. | 25  | 277-296 | 2012 |
| <u>山口照英</u>  | 第十六局方第一追補に収載された生物薬品と関連する試験法について   | Pharm Tech Japan  | 28  | 39-43   | 2012 |
| <u>山口照英</u>  | バイオシミラーについて. 「分子標的薬」  | 日本臨床              | 増刊号 | 678-687 | 2012 |
| Sakamoto T, Portieri A, Arnone D D, Taday P F, <u>Kawanishi T</u> , Hiyama Y   | Coating and Density Distribution Analysis of Commercial Ciprofloxacin Hydrochloride Monohydrate Tablets by Terahertz Pulsed Spectroscopy and Imaging  | J Pharm Innov.    | 7   | 87-93   | 2012 |

|  |  |                         |         |         |      |
|--|--|-------------------------|---------|---------|------|
| 川西 徹   | 第16改正日本薬局方製剤総則における「経口投与される製剤」および「口腔内に適用する製剤」－口腔内崩壊錠の位置づけ－  | Pharm Tech Japan        | 28      | 20-25   | 2012 |
| 川西 徹   | 日本薬局方の今とこれから   | ファルマシア                  | 48      | 119-123 | 2012 |
| 川西 徹   | 医薬品の品質を巡る話題－化学合成医薬品に関わるレギュラトリーサイエンス－   | レギュラトリーサイエンス誌           | 2       | 67-73   | 2012 |
| Kuribayashi R, <u>Hashii N</u> , Harazono A, <u>Kawasaki N</u> | Rapid evaluation for heterogeneities in monoclonal antibodies by liquid chromatography/mass spectrometry with a column-switching system. | J. Pharm. Biomed. Anal. | 67-68   | 1-9     | 2012 |
| Nakazawa S, <u>Hashii N</u> , Harazono A, <u>Kawasaki N</u>    | Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry.                                 | Anal. Biochem.          | 420 (1) | 61-67   | 2012 |

|  |   |                    |     |           |      |
|--|---|--------------------|-----|-----------|------|
| Sakai-Kato K, Ishikura K, Oshima Y, Tada M, Suzuki T, <u>Ishii-Watabe A</u> , Yamaguchi T, Nishiyama N, Kataoka K, <u>Kawanishi T</u> , <u>Okuda H</u> | Evaluation of intracellular trafficking and clearance from HeLa cells of doxorubicin-bound block copolymers   | Int J Pharm.       | 423 | 401-409   | 2012 |
| Sakai-Kato K, Nanjo K, <u>Kawanishi T</u> , <u>Okuda H</u>   | Rapid and sensitive method for measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites  | Chem. Pharm. Bull. | 60  | 391-396   | 2012 |
| Shibata H, Saito H, <u>Kawanishi T</u> , <u>Okuda H</u> , <u>Yomota C</u>  | Comparison of particle size and dispersion state among commercial cyclosporine formulations and their effects on pharmacokinetics in rats   | Chem Pharm. Bull.  | 60  | 967-975   | 2012 |
| Shibata H, Saito H, <u>Yomota C</u> , <u>Kawanishi T</u> , <u>Okuda H</u>  | Alterations in the detergent-induced membrane permeability and solubilization of saturated phosphatidylcholine/cholesterol liposomes: effects of poly(ethylene glycol)-conjugated lipid | Chem Pharm. Bull.  | 60  | 1105-1111 | 2012 |
| Shibata H, <u>Yomota C</u> , <u>Kawanishi T</u> , <u>Okuda H</u>   | Polyethylene glycol prevents in vitro aggregation of slightly negatively-charged liposomes induced by heparin in the presence of bivalent ions  | Biol Pharm. Bull.  | 35  | 2081-2087 | 2012 |

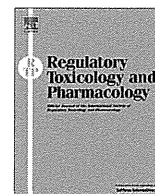
|   |  |                       |        |           |      |
|---|--|-----------------------|--------|-----------|------|
| Un K, Sakai-Kato K, Oshima Y, <u>Kawanishi T, Okuda H</u> | Intracellular trafficking mechanism, from intracellular uptake to extracellular efflux, for phospholipid/cholesterol liposomes           | Biomaterials.         | 33     | 8131-8141 | 2012 |
| Ohno A, <u>Kawanishi T, Okuda H, Fukuhara K</u>           | A new approach to characterization of insulin derived from different species using <sup>1</sup> H-NMR coupled with multivariate analysis | Chem Pharm. Bull.     | 60     | 320-324   | 2012 |
| <u>内田恵理子</u>  | 遺伝子治療臨床研究の現状   | PharmStage            | 12(11) | 1-3       | 2012 |
| <u>内田恵理子</u>  | 遺伝子治療の現状と課題について  | Risk Management Times | 28     | 1-4       | 2012 |
| <u>内田恵理子</u>  | 講座こうすればできる日本薬局方微生物試験7日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件   | 日本防菌防黴学会誌             | 40(7)  | 435-444   | 2012 |
| 米山智城, 井上則子, 立木秀尚, 富樫一天, 中山聡, 工藤喬, 清水久夫, <u>香取典子</u>       | 日本におけるバイオアナリシス分析法バリデーションの実施に関する指針(バイオアナリシスフォーラム素案)について   | 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス   | 43(8)  | 750-760   | 2012 |
| <u>香取典子</u>   | 生体試料中薬物濃度測定規制の最近の動向  | Pharm Stage           | 12(3)  | 1-2       | 2012 |
| <u>香取典子</u>   | 日本のバイオアナリシスの現状   | Pharm Tech Japan      | 28(3)  | 21-24     | 2012 |
| 新見伸吾, 日向昌司, <u>石井明子</u>                                   | バイオ医薬品の免疫原性について  | PHARM TECH JAPAN      | 28(10) | 117-126   | 2012 |

|   |   |                         |       |                 |      |
|---|---|-------------------------|-------|-----------------|------|
| <u>中村秀文</u>   | シリーズ小児医療<br>第2回 小児の臨床<br>試験   | あいみつく                   | 33(3) | 44(2)-4<br>6(4) | 2012 |
| <u>Kojima, H.</u> , Ando,<br>Y., Idehara, K.,<br>Katoh, M., Kosaka,<br>T., Miyaoka, E.,<br>Shinoda, S., Suzuki, T.,<br>Yamaguchi, Y.,<br>Yoshimura, I., Yuasa,<br>A., Watanabe, Y. and<br>Omori, T. | Validation Study of<br>the In<br>Vitro Skin Irritation<br>Test with<br>the LabCyte<br>EPI-MODEL24                                     | ATRA                    | 40    | 33-50           | 2012 |
| <u>Kojima, H.</u>   | The Japanese Center<br>for the Validation of<br>Alternative Methods<br>(JaCVAM): Recent<br>ICATM<br>Contributions and<br>Future Plans | ALTEX<br>Proceeding     | 1/12  | 337-8           | 2012 |
| Seto Y, Hosoi K,<br>Takagi H, Nakamura K,<br><u>Kojima H</u> , Yamada S,<br>Onoue S   | Exploratory and<br>regulatory<br>assessments on<br>photosafety of new<br>drug entities  | Current Drug<br>Safety, | 7 (2) | 140-8           | 2012 |
| Nakatsu N, Igarashi Y,<br>Ono A, Yamada H,<br><u>Ohno Y</u> , Urushidani T  | Evaluation of DNA<br>microarray results in<br>the Toxicogenomics<br>Project (TGP)<br>consortium in Japan.                             | J Toxicol Sci           | 37    | 791-801         | 2012 |
| Minowa Y, Kondo C,<br>Uehara T, Morikawa Y,<br>Okuno Y, Nakatsu N,<br>Ono A, Maruyama T,<br>Kato I, Yamate J,<br>Yamada H, <u>Ohno Y</u> ,<br>Urushidani T  | Toxicogenomic<br>multigene biomarker<br>for predicting the<br>future onset of<br>proximal tubular<br>injury in rats.                  | Toxicology              | 297   | 47-56           | 2012 |

|  |   |                            |    |         |      |
|--|---|----------------------------|----|---------|------|
| 渡邊裕司, 景山茂, 楠岡英雄, 藤原康弘, 小野俊介, 齊藤和幸, 中村秀文, 山本晴子, 笠井宏委, 川島弓枝, 米盛勸, 山本学, 栗原千絵子, 中島唯善, 青木寛, 可知茂男, 鈴木千恵子, 中山智紀, 近藤恵美子, 星順子 | 医師主導治験の現状と課題  | 臨床評価                       | 40 | 5-18    | 2012 |
| <u>Nakamura H,</u><br><u>Kawashima H,</u><br>Azuma R, Sato I,<br>Nagao K, Miyazawa K                                 | Pharmacokinetics of the H2 blocker roxatidine acetate hydrochloride in pediatric patients, in comparison with healthy adult volunteers. | Drug Metab. Phar macokinet | 27 | 422-429 | 2012 |
| Inoue Y, Otsuki T,<br><u>Nakamura H,</u><br>Nakagawa E, Usui N   | Efficacy, safety, and pharmacokinetics of fosphenytoin injection in Japanese patients.  | 臨床医薬                       | 28 | 623-632 | 2012 |

#### **【IV. 研究成果の刊行物・別刷】**





## Considerations for non-clinical safety studies of therapeutic peptide vaccines <sup>☆</sup>



Mineo Matsumoto <sup>a,\*</sup>, Shinichi Komatsu <sup>b</sup>, Mayumi Tsuchimoto <sup>c</sup>, Hajime Matsui <sup>d</sup>, Kazuto Watanabe <sup>e</sup>, Kazuichi Nakamura <sup>f</sup>, Kohei Amakasu <sup>a</sup>, Kanako Ito <sup>a</sup>, Osamu Fueki <sup>a</sup>, Jun-ichi Sawada <sup>a</sup>, Kazushige Maki <sup>a</sup>, Hiroshi Onodera <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Review Division, Pharmaceuticals & Medical Devices Agency (PMDA), Kasumigaseki 3-3-2, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan

<sup>b</sup> Pre-Clinical Development, GlaxoSmithKline K.K., Sendagaya 4-6-15, Shibuya-ku, Tokyo 151-8566, Japan

<sup>c</sup> Research & Development, Sanofi K.K., Nishi Shinjuku 3-20-2, Shinjuku-ku, Tokyo 163-1488, Japan

<sup>d</sup> Pathology Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kyokushi Kawabe 1314-1, Kikuchi-shi, Kumamoto 869-1298, Japan

<sup>e</sup> Research Division, Chugai Pharmaceutical Co. Ltd., Komakado, 1-135, Gotemba, Shizuoka 412-8513, Japan

<sup>f</sup> Global Regulatory Affairs Department, Shionogi Co. Ltd., Shibuya 2-17-5, Shibuya-ku, Tokyo 150-8673, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 January 2014

Available online 17 July 2014

#### Keywords:

Guidelines

Non-clinical safety study

Prophylactic vaccines against infectious diseases

Therapeutic peptide vaccines

Cellular immunity

Cytotoxic T-cells (CTLs)

Human leukocyte antigen (HLA)

On-target toxicity

Off-target toxicity

### ABSTRACT

Guidelines for non-clinical studies of prophylactic vaccines against infectious diseases have been published widely, but similar guidelines for therapeutic vaccines, and especially therapeutic peptide vaccines, have yet to be established. The approach to non-clinical safety studies required for therapeutic vaccines differs from that for prophylactic vaccines due to differences in the risk–benefit balance and the mechanisms of action. We propose the following guidelines for non-clinical safety studies for therapeutic peptide vaccines. (i) Since the main safety concern is related to the immune response that might occur at normal sites that express a target antigen, identification of these possible target sites using *in silico* human expression data is important. (ii) Due to the strong dependence on HLA, it is not feasible to replicate immune responses in animals. Thus, the required non-clinical safety studies are characterized as those detecting off-target toxicity rather than on-target toxicity.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction – what are therapeutic peptide vaccines?

Therapeutic peptide vaccines designated herein indicate an ‘antigen–peptide product’ for the cure of diseases, with a pharmacological function of inducing a cellular immune response specific to the peptide. They do not include vaccines such as dendritic cell (DC) vaccines based on collection of DCs from a patient and subsequent administration after *ex vivo* culture to increase antigen presentation. Administered peptide antigens are associated with class I-human leukocyte antigen (HLA) on antigen-presenting cells (APCs) such as DCs and are then presented to CD8<sup>+</sup> T-cells. This leads to proliferation and activation of cytotoxic T-cells (CTLs) that have T-cell receptors (TCRs) specific for the peptides. The induced

CTLs assemble around disease sites and attack and disrupt abnormal cells (e.g., cancer cells) that express these particular peptides in association with HLA class I. This is the basis of the pharmacological action (e.g., anticancer activity). The immune response can also be promoted by induction of CD4<sup>+</sup> helper T cells that express TCRs specific for peptides presented in association with HLA class II (Fig. 1). A therapeutic peptide vaccine can be a single peptide or a combination of peptides and often includes an immunopotentiator (an adjuvant) to accelerate the immune response. The most frequently used peptides have 8–10 amino acids. The vaccine may also include a fusion of multiple peptides or a combination of peptides and highly antigenic proteins.

Peptides are not necessarily covered by guidelines of nonclinical studies for biopharmaceuticals (ICH-S6 (R1) guideline, ICH, 2011) and are outside the scope of nonclinical guidelines for prophylactic vaccines against infectious diseases (Guidelines for nonclinical studies of prophylactic vaccines for infectious diseases, 2010). Immune responses to vaccinated peptides differ between humans and animals in some aspects. One important difference is the

<sup>☆</sup> The views expressed in this article are those of the authors and do not necessarily reflect the official views of Pharmaceuticals and Medical Devices Agency.

\* Corresponding author. Fax: +81 3 3506 9467.

E-mail address: [matsumoto-mineo@pmda.go.jp](mailto:matsumoto-mineo@pmda.go.jp) (M. Matsumoto).

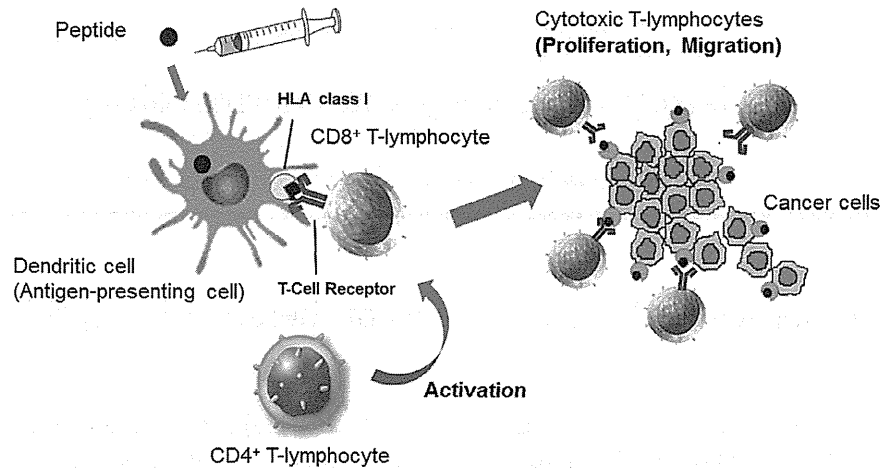


Fig. 1. Mechanisms underlying the therapy of therapeutic peptide vaccines.

process of antigen presentation, which is based on the discrepancy of the structure of major histocompatibility complex (MHC). Humans have the particular structure of MHC; human leukocyte antigen (HLA) (see Section 2.2). Taking those differences into account will be essential in establishing the standards for conduct of nonclinical studies for safety evaluation of therapeutic peptide vaccines.

**2. General considerations on nonclinical safety evaluation and selection of relevant animal species for therapeutic peptide vaccines**

**2.1. Safety concerns**

Toxicity of pharmaceutical applications can be divided into two general categories of systemic and local toxicity. Systemic toxicity is further classified into ‘on-target toxicity’ which is related to the originally intended pharmacology of the drug; and ‘off-target toxicity’, which is unrelated to the pharmacology (Fig. 2①–③). On-target toxicity for vaccines is related to the

immune response against vaccine antigens. Cellular immunity is the main action of the immune response for therapeutic peptide vaccines, whereas humoral immunity is more important for prophylactic vaccines against infectious diseases (prophylactic vaccines).

Peptides used as active ingredients of therapeutic peptide vaccines are designed based on the antigenic determinant (T-cell epitope) of endogenous peptides produced exclusively or in relatively large amounts by target cells. High binding specificity of TCRs to the peptide–HLA complex is also required for the vaccine function. These peptides (molecular weight ~1100 for 10 amino acids) are considerably smaller than general biopharmaceuticals (molecular weight of tens of thousands), but unintended effects on tissues and cells (off-target toxicity) do not generally need to be considered because peptides are easily digested and inactivated by peptidases, unless they have particular modifications or are administered with carriers. Thus, as is the case with biopharmaceuticals, the safety concerns for therapeutic peptide vaccines is almost exclusively limited to on-target toxicity (Fig. 2③, note the difference in the colors). In this paper, ‘on-target toxicity’ is defined as the toxicity that is attributed to the immune response of a

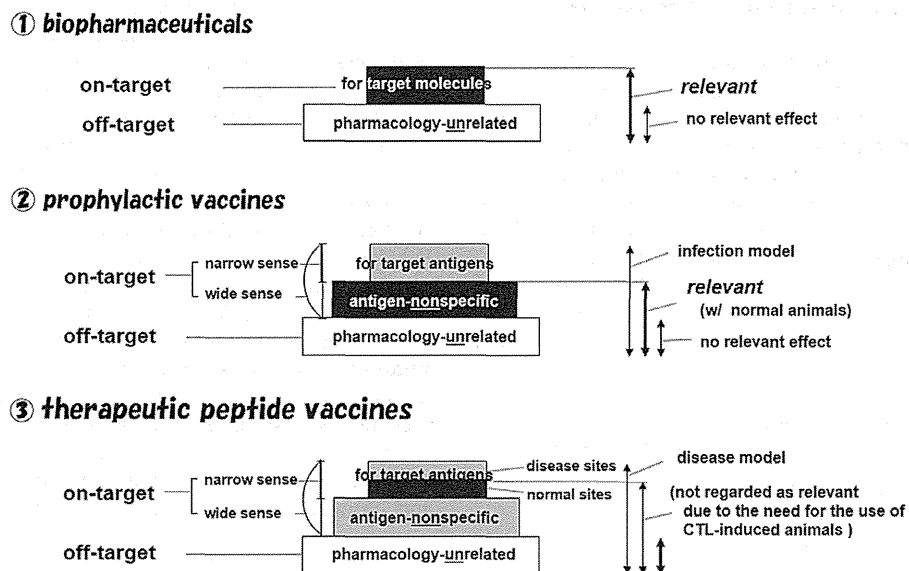


Fig. 2. On-target vs. off-target toxicities of biopharmaceuticals, prophylactic vaccines and therapeutic peptide vaccines (see Note 1).

vaccine, whereas ‘off-target toxicity’ is defined as the one that has nothing to do with the vaccine immune response (see below as to the detailed explanations).

Distinctive toxicity areas are colored with black > gray > white based on the order of the assumed degree of safety concerns for each pharmaceutical type. In Fig. 2, the safety concerns for prophylactic vaccines or therapeutic peptide vaccines are due to the active ingredients, rather than adjuvants. The thick arrows indicate the standard nonclinical safety study suggested for each pharmaceutical type.

The general perspective on the on-target toxicity for vaccines is that this includes narrow-sense on-target toxicity caused by the action of the vaccine immune response to the target antigen itself, and on-target toxicity derived from the antigen-nonspecific immune response at sites other than the target antigen. The conjunction of these two toxicities can then be defined as the wide-sense on-target toxicity (Fig. 2② and ③).

The examples of narrow-sense- as well as wide-sense on-target toxicity for prophylactic vaccines are explained as follows. Suppose a case in which a person who has been administered with a vaccine against a certain external pathogen (e.g., virus). First, when this person gets infected with this particular pathogen, which leads him or her to exhibit a certain symptom that is also attributable to the immune response to the previously administered vaccine, this symptom belongs to “narrow-sense on-target toxicity”. Next, if this person demonstrates a safety concern that is related to the vaccine immune response but is not attributed to the presence of the target antigen, (e.g., before or long after the pathogen infected), this symptom is understood as “antigen-nonspecific on-target toxicity”. As aforementioned, the conjunction of the above two is categorized as “wide-sense on-target toxicity”, in a sense that they are equally related to the vaccine immune response. On the other hand, if this person demonstrates some safety concern that is not at all attributed to the immune response to the vaccine, this belongs to “off-target toxicity”, which is the case regardless of the presence of the target antigen.

In contrast to prophylactic vaccines, where the targets are exogenous antigens such as viruses or bacteria, the targets of therapeutic peptide vaccines are endogenous antigens related to diseases such as cancer. However, these endogenous antigens can also be expressed on the surface of normal cells and the adverse effects of targeting normal cells are likely to be more serious compared to destruction of diseased cells. Hence, unlike prophylactic vaccines, the narrow-sense on-target toxicity of therapeutic peptide vaccines must account for toxicity caused by an immune response to target antigens on normal cells (Fig. 2③ narrow sense on target toxicity (normal sites)), in addition to toxicity due to an excessive intended immune response to abnormal tissue (Fig. 2③, narrow-sense on-target toxicity at disease sites).

The examples of those potential target antigen of therapeutic peptide vaccines are as follows. (1) Cancer-testis antigens are literally expressed not only in tumor cells, but also in testis (Mistry et al., 2013). (2) Some forms of tumor-associated antigens, i.e., carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEAC-AMs) are expressed also in normal blood cells (Singer et al., 2002). These characteristics of the ‘tumor antigens’ that are not necessarily limited to tumor cells are similarly seen in both humans and animals (Mistry et al., 2013; Singer et al., 2002).

## 2.2. Selection of relevant animal species

Unlike biopharmaceuticals or prophylactic vaccines, it is often difficult to select a ‘relevant animal species’ for nonclinical evaluation of therapeutic peptide vaccines. This is because the selection of an animal species that can mimic the action of a therapeutic peptide vaccine in humans is very limited. That is, there is no

guarantee that administration of peptides in animals will elicit an immune response, due mainly to HLA restriction (Yoshimura et al., 2014). Still, it is possible to induce CTLs against therapeutic peptide vaccines in animals in which HLA restriction has been overcome (e.g., immunodeficient mice with a functional human immune system, or HLA transgenic mice). However, even with model animals that have acquired the intended immune response, evaluation may be difficult due to limited data accumulation and the number of animals needed for the evaluation. It is thus unreasonable to regard these model animals as relevant species. It might also be possible to generate homologous peptides that could elicit immune responses in animals similar to those in humans. However, these peptides can only be viewed as a model experimental system that makes use of analogs differing from active ingredients in the pharmaceutical preparation, which makes it difficult to use this approach for safety evaluation (Fig. 4, grey area). Based on these facts, the on-target toxicity of therapeutic peptide vaccines is currently difficult to evaluate in animal studies.

*In silico* data on the target antigen distribution in human normal tissues and tissue cross reactivity (TCR) data (see Note 2) in human tissues (Fig. 3①) is useful in nonclinical evaluation of on-target toxicity of therapeutic peptide vaccines. In particular, information should be obtained on expression of target antigens in normal human tissues during the embryonic and neonate stages.

In animal studies, CTL-induced animals may be considered for evaluating on-target toxicity (Fig. 3②-1). However, as indicated below, the prerequisite for a safety evaluation using HLA-transgenic mice or homologous peptides is that there needs to be sufficient similarity between the immune responses of the animals and humans, including antigen presentation, induction of CTLs, activation of T-cells, and T-cell migration toward target APCs (see Note 3). There has been no report of animals that satisfy this condition to date, and thus it is difficult to perform an animal study of the on-target toxicity of therapeutic peptide vaccines. Consequently, animal studies of these vaccines should focus on off-target toxicity (Fig. 3②-2).

Regarding nonclinical evaluations other than those in Fig. 3, an *in vitro* study in cultured human cells is initially suggested. This study should be considered when it is suspected that a vaccine may induce an unexpected immune response, including a cytokine storm. The safety concern to be evaluated in this study corresponds to antigen nonspecific on-target toxicity in Fig. 2③. Next, an *in vitro* study of the peptide bioactivity or of peptide action on an unintended receptor that may competitively inhibit its function may be performed. These studies should particularly be considered if the corresponding concern arises in an animal study in Fig. 3②. The safety concern to be examined in these studies is related to an unintended bioactivity of the administered peptide and corresponds to off-target toxicity in Fig. 2③.

As stated above, the significance of safety studies in animals is limited for therapeutic peptide vaccines, unlike for ordinary pharmaceuticals. As a result, sufficient risk control measures must be taken in clinical use. In particular, more discrete measures are

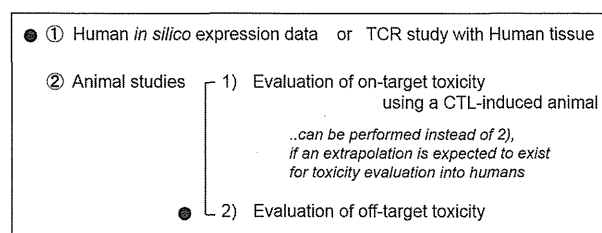


Fig. 3. Nonclinical evaluations required for therapeutic peptide vaccines. Bullets indicate required items (see Note 2).

required in clinical trials if a target antigen of a therapeutic peptide vaccine is found to be expressed in normal sites based on *in silico* or human TCR data (Fig. 3Ⓞ).

### 3. Selection of an animal species/model for therapeutic peptide vaccines

#### 3.1. Selection of animal species/models in general toxicity studies

The decision tree in Fig. 4 should be referred to when considering the criteria for choice of an animal species/model for general toxicity studies for therapeutic peptide vaccines. Since it is difficult to define a relevant animal species for these vaccines as described above, safety studies using animals should focus on toxicity other than on-target toxicity; i.e., off-target toxicity in one animal species. While on-target toxicity related to the pharmacological action of peptides is difficult to evaluate, it is required to conduct an off-target toxicity study of the therapeutic peptide vaccine to at least support the first time in humans.

An animal species which has high sequence similarity to the gene/peptide/protein of a target antigen in humans serves as a justification for animal selection for the off-target toxicity study. However, even use of this animal species does not allow examination of on-target toxicity; therefore, the sequence similarity of the gene/peptide/protein of a target antigen does not necessarily need to be examined prior to evaluating off-target toxicity. Yet, it is preferable in this study to use an animal species in which the anticipated clinical dose can be given via the anticipated clinical route, and to evaluate the local toxicity of the vaccine. Generally, reproductive and developmental toxicity studies for therapeutic peptide vaccines, including evaluating off-target toxicity in any animal species, are not needed.

### 4. Design of nonclinical safety study for therapeutic peptide vaccines, etc

#### 4.1. Selection of the highest dose in toxicity studies

First, as stated in Section 3 above, the standard method for toxicity studies for therapeutic peptide vaccines using animals is an off-target toxicity study in one animal species performed as part

of a general toxicity study. In this study, dose selection is not possible based on the pharmacological action of the therapeutic peptide vaccine (e.g., maximum pharmacological dose: MPD in biopharmaceuticals; (ICH, 2011)). Moreover, considering the immune response to be the primary pharmacological action, dose selection based on blood exposure of the administered peptides is insignificant and unrealistic. Consequently, the anticipated one-time clinical dose is allowed to be selected as the highest dose (mg or mL/body) in this study.

If a decision to perform a study using CTL-induced animals is made in an attempt to evaluate on-target toxicity (Fig. 4, gray letters and Note 3), the highest dose should primarily be considered in each of these studies so that it meets the criteria of MPD. Indeed, there is a report that demonstrated the dose dependent pharmacological effect of therapeutic peptide vaccines in a preclinical study using mice (Motomura et al., 2008). Alternatively, it might be possible to evenly define the highest dose in these studies based on the aforementioned anticipated one-time clinical dose (mg or mL/body). This rule could also be applied as this value is expected to greatly exceed MPD in light of the big difference in body weight between rodents and humans.

In either case of off-target- or on-target toxicity study, a dose that exceeds the human dose by body weight conversion (mg or mL/kg) may be used when it is not feasible to administer the full human dose (Guidelines for nonclinical studies of prophylactic vaccines for infectious diseases, 2010; Sun et al., 2012). Plural dosage setting is not considered necessary in a toxicity study of therapeutic peptide vaccines, provided that the comparable vaccine formulations and components to those of the clinical use are used, as is the case with preventive vaccines against infectious diseases (Guidelines for nonclinical studies of prophylactic vaccines for infectious diseases, 2010; Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines, 2013).

#### 4.2. Dosing period in a general toxicity study

The decision tree in Fig. 5 should be referred to for determination of the dosing period in a general toxicity study for therapeutic peptide vaccines. First, as mentioned in Section 3, the standard general toxicity study for a therapeutic peptide vaccine

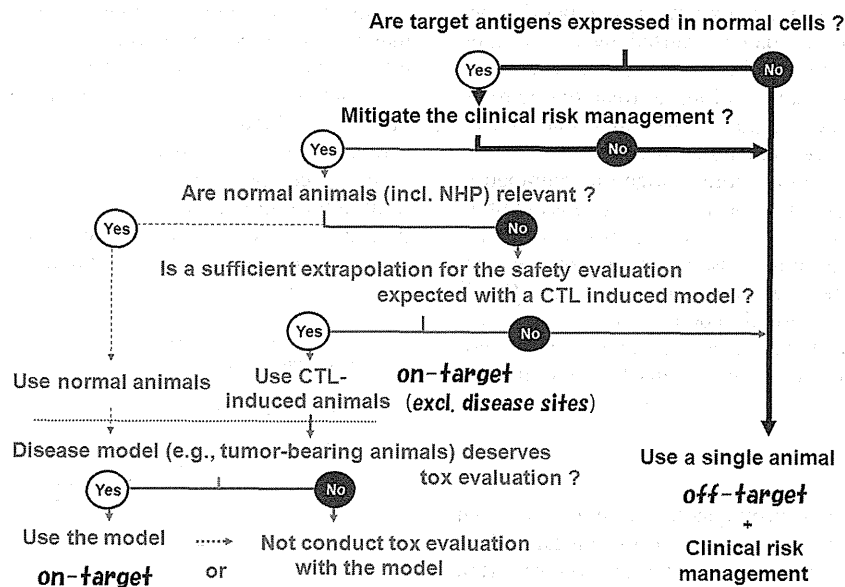
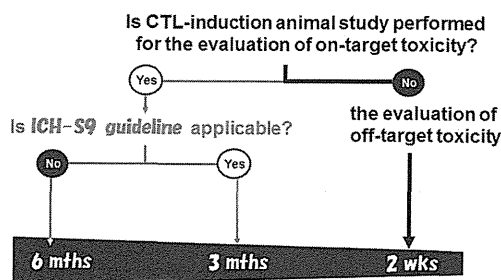


Fig. 4. Animal species/model selection for general toxicity studies of therapeutic peptide vaccines (see Notes 3 and 4). Gray letters, arrows and lines indicate rare situations.



**Fig. 5.** Dosing period of a repeated dose toxicity study for therapeutic peptide vaccines. \*ICH-S9 guidelines for nonclinical evaluation of anticancer pharmaceuticals.

is an off-target toxicity study in one animal species. Thus, the dosing period in rodents or non-rodents should be around two weeks regardless of the clinical dosing period, based on the corresponding approach for biopharmaceuticals (Fig. 5, right, solid line). While referred to as a 2 weeks study, it might virtually have to be a 2 weeks observation after a single administration, namely, single dose toxicity study. Since such a decision could be made for a therapeutic peptide vaccine, the titles in Fig. 5 and in this section refer to a general toxicity study, rather than a repeated dose toxicity study. When repeated administrations are not employed in this study, it means that ‘cumulative local toxicity’, i.e., local toxicity in the event that repeated administrations are given onto a single site, can never be evaluated. In this case, even if a prominent observation of local toxicity is not found in this 2 weeks study, a proper caution should be made in clinical trials as to the possibility that cumulative local toxicity might arise, together with the conduct of a discreet observation upon the local toxicity around the administered site. Alternatively, it would be possible to deal with this concern by clinical labeling to ‘avoid administration at the same site’, taking it for granted that a certain therapeutic peptide vaccine will have a certain level of cumulative local toxicity.

In Fig. 4, there is also a choice of conducting a study to evaluate on-target toxicity in CTL-induced animals as part of a repeated-dose toxicity study, although this is unlikely to be performed. It is reasonable to set the dosing period in this study to 6 months, following the longest dosing period used in repeated dose toxicity studies of biopharmaceuticals in rodents or non-rodents. However, when it is clear that the therapeutic peptide vaccine to be evaluated will be used solely as an anticancer agent, a dosing period of 3 months could be used, in reference to ICH-S9 guidelines (ICH, 2009). In contrast, if the therapeutic peptide vaccine may be used for purposes other than treatment of advanced cancer, e.g., in early treatment for cancer or as postoperative maintenance therapy, the ICH-S9 guidelines do not apply.

## 5. Conclusion

There are no guidelines for non-clinical studies required for development of therapeutic peptide vaccines in Japan and overseas.<sup>1</sup> For the peptide active ingredient, parts of the ICH-S6 (R1) guidelines can be used as a reference, and non-clinical study guidelines for vaccines for infectious disease prevention and WHO guidelines can also be partially used because of the similar mechanism of action of the vaccines. However, meaningful data from non-clinical safety studies for therapeutic peptide vaccines for clinical use are

<sup>1</sup> There are no finalized guidelines in Japan, but the Japan Society for Biological Therapy published “Guidelines for cancer therapeutic peptide vaccines (draft)” (Guidance for cancer therapy peptide vaccines, 2011).

currently limited. In this document, we examined the conceptual details of safety concerns, which are problematic for therapeutic peptide vaccines, and explained the clinical risk management for these vaccines.

## 6. Notes for ‘Considerations for non-clinical studies of therapeutic peptide vaccines’

### 6.1. Note 1. Interpretation of Fig. 2

It is a precondition for biopharmaceuticals to choose a relevant animal species; i.e., an animal species in which a pharmacological action of the biopharmaceutical can be demonstrated (Fig. 2①). This reflects the understanding that toxicity of biopharmaceuticals is mainly on-target toxicity. For biopharmaceuticals such as monoclonal antibodies and other antibody products directed at foreign targets such as bacteria and viruses, the ICH-S6 (R1) guidelines indicate that use of animal disease models, i.e., animals infected with targets of the biopharmaceutical, is not uniformly required in nonclinical safety evaluation (ICH, 2011). Only a limited description is given of when such an animal disease model should be used in a series of pharmacological studies, in which a safety evaluation can also be included. This is because there is always a question of validity in regarding a study in an animal disease model as a safety study. Toxicity is often difficult to interpret because data accumulation may not be sufficient in an animal disease model and the number of animals may not meet the standard for safety evaluation. For such biopharmaceuticals, a short term study in an animal species is defined as a framework to evaluate off-target toxicity. However, it is important to require appropriate risk control management clinically, given that on-target toxicity may not have been evaluated in animal studies (Note 5 Fig. a). A designation of a relevant animal species in nonclinical studies for prophylactic vaccines against infectious diseases does not indicate a disease model; i.e., animals expressing the same gene/protein as the foreign antigen that is the target of a vaccine immune response, as described above. The designated relevant animal species may be a species that exhibits immune responses toward the vaccine regardless of the presence of the same gene/protein as the foreign antigen, i.e., an animal species that allows evaluation of antigen-nonspecific on-target toxicity (Fig. 2②). See the text for the concept of ‘relevant animal species’ for therapeutic peptide vaccines.

### 6.2. Note 2. Utilization of *in silico* data and conduct of human tissue cross reactivity studies

For therapeutic peptide vaccines where cellular immunity is the main constituent of the immune response, a target antigen can be recognized by TCRs after presentation on a cell by HLA molecules, regardless of whether the origin of the antigen is an intracellularly expressed protein, a secreted protein or a plasma membrane protein. Hence, expression of the target antigen in normal tissues should be investigated with utilization of *in silico* data or conduct of a human tissue cross reactivity study, regardless of the variance of expression sites of the target antigen in a normal cell. However, potential alternative methods for human tissue cross reactivity studies should be examined because it is likely that currently available antibodies will become difficult to obtain or produce. Data may also be obtained for expression levels of HLA class I or II molecules, or for the cytotoxic activity of specific CTLs against tissues expressing the antigen. Knowledge of the distribution of target antigens in normal human tissues and the function of the antigen molecule provides particularly useful information.

### 6.3. Note 3. Conduct of general toxicity studies in CTL-induced animals (gray areas in Fig. 4)

A general toxicity study using CTL-induced animals is not necessarily a good solution for evaluating on-target toxicity of therapeutic peptide vaccines. Yet, such studies may be useful if the target antigen of the vaccine is proved to be expressed at normal sites and the sponsor intends to mitigate the clinical risk management practice by reducing the warning level in the labeling. In such circumstances, the conduct of a study for evaluating on-target toxicity in CTL-induced animals may be an option. However, even when the sponsor has an intent to evaluate this particular concern using CTL-induced animals, this study may only be useful if there is sufficient similarity between immune responses in animals and those in humans. This would be a situation in which target antigens in mice appear on HLA molecules in normal cells, due to a sufficient sequence similarity with those in humans, and T cell receptors of mice that are expressed in CTLs recognize the target antigens, again based on high sequence similarity with those of humans. This is also true when administration of mice homologous peptides is chosen for CTL induction. Whether HLA-induced mice or homologous peptides are used for inducing CTLs, better extrapolation from animals to humans is likely when there is higher sequence similarity between peptides of therapeutic peptide vaccines and the corresponding sequences in animals, with regard to the safety evaluation related to immune responses. The information regarding the potential similarity of the recognition patterns of the target antigens by T cell receptors between those animals and humans, if it is available, might also be a key factor to decide whether those measures can be taken for the safety evaluation. Thus, the satisfactory similarity of immune responses in animals and humans together with the sufficient data accumulation (see Section 2.2) are prerequisites for safety evaluation of therapeutic peptide vaccines in CTL-induced animals.

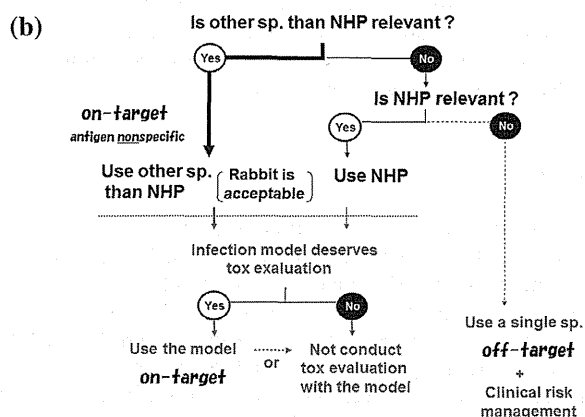
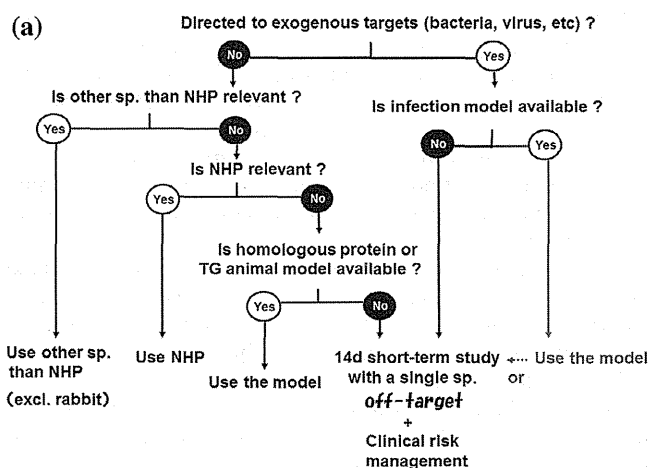
The significance of evaluating narrow-sense on-target toxicity (disease sites), i.e., toxicity derived from the vaccine immune response toward the target antigen expressed at disease sites, is not necessarily negated. However, such a toxicity evaluation often becomes possible only by incorporating the safety evaluation into mode-of-action (MOA) studies in disease models such as a tumor-bearing animals or genetically modified tumor models. Given the peculiarities of studies using CTL-induced animals, it is not considered necessary to conduct these studies in two species (one in rodents and one in non-rodents). If such a study is to be performed, use of one rodent species (mice or rats) is sufficient.

### 6.4. Note 4. Significance of safety evaluation of antigen-nonspecific on-target toxicity for therapeutic peptide vaccines

The significance of performing a safety study of antigen-nonspecific on-target toxicity of a therapeutic peptide vaccine also requires discussion, similarly to prophylactic vaccines against infectious diseases. However, we conclude that this type of study is insignificant. This decision is best understood by revisiting the reasons for evaluation of antigen-nonspecific on-target toxicity for prophylactic vaccines. These are related to the situation in which vaccines are used for prevention, and not for therapy. That is, there is a precondition that such vaccines are mostly administered to healthy individuals, rather than to patients, and thus the related risks compared with the benefits may not be acceptable. Furthermore, the time for which foreign antigens as targets coexist with vaccine immunity in a host is limited clinically. In other words, target antigens only exist in the host for a short time compared to the vaccine immunity, which indicates that antigen-nonspecific on-target toxicity requires evaluation.

The opposite is true for therapeutic peptide vaccines. First, the purpose of these vaccines is almost always therapeutic, rather than preventive, which makes the risks relatively allowable compared to the benefits. Second, the presence of target antigens in a host extends over a relatively long period. A further issue related to antigen-nonspecific on-target toxicity is the concern of a cytokine storm that accompanies administration of therapeutic peptide vaccines. Several reports suggest that CTLs (CD8+ cells) activated through HLA class I molecules and helper T (CD4+) cells stimulated through HLA class II molecules are of importance depending on the length or type of therapeutic peptide vaccine (Shirai et al., 1994; Kitamura et al., 2010; Ribas et al., 2003; Melief, 2003). The concern of a cytokine storm is even greater for a therapeutic peptide vaccine that is a combination of peptides that activate both CD4+ and CD8+ cells. This particular concern may be properly evaluated using an *in vitro* study in cultured human cells, whereas prediction of a cytokine storm based on CTL-induction in animals is difficult. Thus, the conduct of animal studies is insignificant for the purpose of evaluating the toxicities of therapeutic peptide vaccines accompanied by a nonspecific action of the vaccine immune response.

### 6.5. Note 5. Selection of animal/model species for general toxicity studies for biopharmaceuticals (a) and prophylactic vaccines against infectious disease (b)



Gray areas (letters/arrows/lines) indicate a rare situation. NHP: non-human primates

### Conflict of interest

This research was conducted by investigational working group for establishing nonclinical guidelines for vaccines, which was funded by Health and Labor Sciences Research Grant (organizers: Drs. Yasuo Ono and Akiyoshi Nishikawa, National Institute of Health Sciences). This research has not been funded by other grants and organizations.

### Acknowledgments

The authors wish to acknowledge fruitful discussions with Drs. Kazutoshi Shinoda and Teruhide Yamaguchi (PMDA).

### References

- Guidance for cancer therapy peptide vaccines (draft), 2011. Committee of guidance for cancer therapy peptide vaccines, Japan Biotherapy Society, November 2011 <<http://www5.ocn.ne.jp/~jbt/pdf/guidance2012b.pdf>>.
- Guidelines for nonclinical studies of prophylactic vaccines for infectious diseases, 2010. Notification of yakushokushinsahatsu. No. 0527-1. May 27, 2010 (Japanese literature).
- Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines, 2013. World Health Organization. <[http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/ADJUVANTS\\_Post\\_ECBS\\_edited\\_clean\\_Guidelines\\_NCE\\_Adjuvant\\_Final\\_17122013\\_WEB.pdf](http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/ADJUVANTS_Post_ECBS_edited_clean_Guidelines_NCE_Adjuvant_Final_17122013_WEB.pdf)>.
- ICH, 2009. Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals. S9. ICH Harmonized Tripartite Guideline.
- ICH, 2011. Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. S6 (R1). ICH Harmonized Tripartite Guideline 2011.
- Kitamura, H. et al., 2010. Long peptide vaccination can lead to lethality through CD4+ T Cell-mediated cytokine storm. *J. Immunol.* 185 (2), 892–901.
- Melief, C.J., 2003. Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming. *Eur. J. Immunol.* 33 (10), 2645–2654.
- Mistry, B.V. et al., 2013. Differential expression of PRAMEL1, a cancer/testis antigen, during spermatogenesis in the mouse. *PLoS One* 8 (4), e60611.
- Motomura, Y. et al., 2008. HLA-A2 and -A24-restricted glypican-3-derived peptide vaccine induces specific CTLs: preclinical study using mice. *Int. J. Oncol.* 32, 985–990.
- Ribas, A. et al., 2003. Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *J. Clin. Oncol.* 21 (12), 2415–2432.
- Shirai, M. et al., 1994. Helper-cytotoxic T lymphocyte (CTL) determinant linkage required for priming of anti-HIV CD8+ CTL *in vivo* with peptide vaccine constructs. *J. Immunol.* 152 (2), 549–556.
- Singer, B.B. et al., 2002. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes. *J. Immunol.* 168 (10), 5139–5146.
- Sun, Y. et al., 2012. Overview of global regulatory toxicology requirements for vaccines and adjuvants. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 65 (2), 49–57.
- Yoshimura, S. et al., 2014. Identification of an HLA-A2-restricted epitope peptide derived from hypoxia-inducible protein 2 (HIG2). *PLoS One* 9 (1), e85267.



## ワクチンの非臨床試験ガイドライン・ 新発出の WHO ガイドラインを中心に

Guidelines for Non-clinical Studies for Vaccines with a Focus on the Newly Released WHO Guidelines

松本峰男<sup>\*1</sup> 小松真一<sup>\*2</sup>

土本まゆみ<sup>\*3</sup> 松井 元<sup>\*4</sup> 真木一茂<sup>\*5</sup>

近年、ワクチン開発においてはアジュバントの使用機会が明らかに増え、それに伴いワクチンの非臨床安全性試験の内容を規定し直す必要性が高まっていた。本稿においては、主にこのような背景のもと 2013 年に発表された WHO 「ワクチンアジュバントとアジュバント添加ワクチンの非臨床試験ガイドライン」について解説する。

### 1. はじめに

ワクチンについては、現在であれば従来型の感染症に対する予防用ワクチンのみならず、がんやアレルギー等の非感染症に対する治療用ワクチンについても考慮する必要がある。実際、これら非感染症に対する治療用ワクチンは従来の範疇を超えた次世代型のワクチンとして認識されつつあるが<sup>1)</sup>、現在までにワクチンの非臨床安全性評価のためのガイドラインは主に感染症予防用ワクチンを対象としている。感染症予防用ワクチンに対する非臨床安全性ガイドラインは、まず EMA<sup>2)</sup>、WHO<sup>3)</sup>、次いで FDA<sup>4)</sup> (生殖発生毒性試験のみ) の順で発表された。わが国では、厚労省科学研究・山西班牙の活動により臨床ガイドラインと同時期に「感染症予防用ワクチンの非臨床試験ガイドライン」(以下、日本のガイドライン) が作成され<sup>5)</sup>、パンデミックインフルエンザのプロトタイプワクチンに関するガイドライン<sup>6)</sup>においても、非臨床安全性評価について記載されている。

これらのガイドラインが最初に作成された十数年前と現在の状況を比較した場合、最も異なる状況の一つとしてアジュバントの使用が考えられる。アジュバントはワクチンの効果を高めるために用いられる免疫補助剤であるが、その使用機会が明らかに増加している。また、近年ではアジュバントの種類についても、従来のアルミニウム塩に加えて、Toll-like receptor (TLR) 作用型や oil-in-water 型等への多様化が進んでいる。アジュバントに特化したガイドラインも EMA より発出されているが<sup>7)</sup>、最近の状況に十分対応できていないとの声が高かった。このような背景のもと、WHO より 2013 年 12 月 19 日に「ワクチンアジュバントとアジュバント添加ワクチンの非臨床試験ガイドライン」が発表された<sup>8)</sup> (以下、2013 年 WHO ガイドライン)。

これら

<sup>\*1</sup>Mineo Matsumoto 御医薬品医療機器総合機構 信頼性保証部 主任専門員

<sup>\*2</sup>Shinichi Komatsu グラクソ・スミスクライン(株) 前臨床開発部 マネージャー

<sup>\*3</sup>Mayumi Tsuchimoto サノフィ(株) 開発薬事第 1 部 シニアマネージャー

<sup>\*4</sup>Hajime Matsui (一財)化学及血清療法研究所 病理部 病理部長

<sup>\*5</sup>Kazushige Maki 御医薬品医療機器総合機構 再生医療製品等審査部 主任専門員

従来発出された上記ガイドラインの内容については、他に詳しい論説が存在し<sup>9)</sup>、日本のガイドラインについても近著において解説されている<sup>10)</sup>。そこで本稿では、今般新たに発出された 2013 年 WHO ガイドラインに焦点を当て、日本のガイドラインを含む従来のガイドラインとの比較からその内容を論ずることにしたい。

なお、本稿で述べる内容は厚生労働省科学研究費補助金・医薬品の品質、有効性及び安全性確保のための規制の国際調和の推進に係わる研究(研究代表者、国立医薬品食品衛生研究所・大野泰雄)・ワクチンの非臨床研究ガイドライン策定に関する調査研究グループ(以下、厚労科研・ワクチン非臨床調査研究グループ)の活動成果を受けたものである。

### 2. 2013 年 WHO ガイドラインの策定の経緯とその概要

新規性の高いアジュバントがワクチンに使われ

始めた状況を踏まえ、アジュバント及びアジュバント添加ワクチンの開発において必要な非臨床評価をどのように規定すべきかをテーマに、WHO によるガイドラインの策定作業が行われた。2011 年に開始されたガイドライン策定作業過程の詳細については、同ガイドラインの巻末を参照されたい<sup>9)</sup>。今後、2013 年 WHO ガイドラインは WHO Technical Report Series (TRS) として発出される予定である。

2013 年 WHO ガイドラインは、日本のガイドラインを含めた上記関連ガイドラインの内容を十分踏まえて作成されている。また、2005 年に発出された WHO 「ワクチンの非臨床評価ガイドライン」(以下、2005 年 WHO ガイドライン)<sup>3)</sup> と比較した場合、ガイドラインの項目(図 1)には「アジュバントの使用に関する理論的根拠」(同 4)、「アジュバント単独の毒性試験」(同 6.2)、「アジュバントによる自己免疫疾患」(同 6.3)、そして「ヒト初回試験における考察」(同 7)が新た

### ワクチンアジュバントとアジュバント添加ワクチンの非臨床試験ガイドライン

#### 目次

|   |  |
|---|--|
| 緒言  |  |
| 背景  |  |
| 範囲  |  |
| 1. 概論   |  |
| 2. 定義   |  |
| 3. ワクチンアジュバントとアジュバント添加ワクチンの非臨床及び臨床評価に関する製造および品質における考察 |  |
| 3.1 非臨床薬理試験において用いられるロットの製造、特性及び品質保証                   |  |
| 3.2 非臨床毒性試験およびヒト初回投与試験において用いられるロットの製造、特性及び品質保証        |  |
| 3.3 後期臨床試験に必要な情報                                      |  |
| 4. アジュバントの使用に関する理論的根拠                                 |  |
| 4.1 <i>In vivo</i> 概念実証研究                             |  |
| 4.2 <i>In vitro</i> 支持研究                              |  |
| 5. ワクチンアジュバントとアジュバント添加ワクチンの非臨床評価に対する動物種の選択における考察      |  |
| 5.1 非臨床薬理試験に対する動物種の選択                                 |  |
| 5.2 非臨床安全性研究に対する動物種の選択                                |  |
| 5.3 動物試験の限界   |  |
| 6. 動物における非臨床安全性評価                                     |  |
| 6.1 概論  |  |
| 6.2 ワクチンアジュバントと最終的なアジュバント添加ワクチン製剤の毒性試験                |  |
| 6.3 更に考慮しなければならないこと                                   |  |
| 7. ヒト初回投与試験における考察                                     |  |

図 1 2013 年 WHO ガイドラインの目次<sup>8)</sup>



に付け加わっている。このうち、「アジュバントによる自己免疫疾患」については2013年WHOガイドライン策定活動とほぼ同時期に進行した国際生命科学研究機構/健康環境科学研究所 (ILSI/HESI)・「アジュバントと自己免疫プロジェクト」における議論内容が重要である(後述)。2013年WHOガイドラインで規定されているアジュバント及びワクチンのための非臨床安全性試験は、一部の例外を除けば動物試験に関する3R (Replacement, Reduction 及び Refinement) が考慮され、全体として従来に比べ限定的なものとなっている。今回新たに「ヒト初回試験における考察」の項が加わった背景には、非臨床安全性試験の規定内容に関するこのような事情が存在する。以下、2013年WHOガイドラインの策定にあたり争点となった事項、特に日本のガイドラインを含む従来のガイドラインと異なる事項について論じていきたい。

### 3. 2013年WHOガイドライン策定おいて争点となった事項

#### 3.1 ガイドラインの適用範囲(図1,「範囲」)

「本ガイドラインは、感染症に対する予防と治療の両方に用いられるアジュバント添加ワクチンに適用する」との記載がなされている。当該内容については、2005年WHOガイドラインからの変更はなく、また日本のガイドラインの記述とも共通している。ここで「感染症に対する治療を目的としたアジュバント添加ワクチン」とは、具体的にはB型肝炎ウイルス、帯状疱疹、狂犬病に対する治療を指すものと理解される。

しかしながら、2013年WHOガイドラインにおいては、「本ガイドラインの原則のいくつかは、他の適応症(例、がん)に対するアジュバント添加治療ワクチンの非臨床及び初期臨床試験にもあてはまるかも知れない」との記載が加わった。当該記載はこれまで国内外のワクチン非臨床ガイドラインのいずれにも見られない新しい見解である。つまり、2013年WHOガイドラインは従来のガイドラインよりも適用範囲が若干広くなった

と考えられる。これに関し、厚労科研・ワクチン非臨床調査研究グループでは、2013年WHOガイドライン中の「局所刺激性評価」(図1, 6.2)は、非感染症に対する治療用ワクチンにも応用できると考えている。一方、「動物種選択の妥当性」(同5.2)及び「アジュバント単独の毒性試験」(同6.2)については、当該記載をそのまま非感染症に対する治療用ワクチンに対して応用することはできないとの見解を示している(論文投稿中)。

#### 3.2 アジュバント添加ワクチンの反復投与毒性試験における投与回数(図1, 6.2)

ワクチンの反復投与毒性試験における投与回数については、国内外のこれまでのガイドラインとの比較において、その規定内容が以下の二つに分かれていた。即ち、①投与回数は予定臨床投与回数と同一でも受け入れ可能であり、かつそれ「以上」であるべきとする考え方、②予定臨床投与回数と同一では受け入れ不可であり、反復投与毒性試験においては少なくとも臨床投与回数より1回多い投与を行うべきとする考え方(いわゆる「N+1回ルール」; Nとは予定臨床投与回数のこと)である。これまで2005年WHOガイドラインは①の立場を、対して日本のガイドラインは「原則、臨床試験の接種回数を超える回数の投与を行う」としており、②の立場を選択してきた。また、EMAではガイダンス上は①の立場を選択し、FDAではガイダンス上、当該事項に関する規定はみあたらない。しかしながら、いずれの規制当局とも近年のワークショップ等ではわが国同様、②の立場を支持する旨を宣言していた<sup>13)</sup>。一般に②の「N+1回ルール」を支持する論拠としては、「本来、毒性試験においては、臨床で想定される以上の過酷な条件により毒性プロファイルを把握すべきである」こと、及び「開発過程もしくは承認後にワクチンの投与回数が増やされる場合があるため、あらかじめ反復投与毒性試験においてはその分の回数を見越した投与を行うべきである」ことが考えられている。

2013年WHOガイドラインにおいては上記の

規制当局からの意見が考慮され、これまでの①の立場に加えて②の立場が加味された記載内容となった。即ち、「反復投与毒性試験での投与回数は予定臨床接種回数と同じか、それ以上とする。しかしながら多くの場合、臨床試験の追加接種の可能性を見越して、臨床試験で計画した接種回数よりも1回多い投与回数でデザインされる」というものである。

#### 3.3 アジュバント添加ワクチンの生殖発生毒性試験の投与時期(図1, 6.2)

通常、「三試験計画法(I, II及びIII試験)」が適切とされる一般の低分子医薬品の生殖発生毒性試験と異なり、ワクチンの生殖発生毒性試験ではIとII試験の投与期間を統一した「単一試験計画法」<sup>12)</sup>で実施されることが多い。これは低分子化合物に比べて、アジュバント添加の如何にかかわらず、一般にワクチンに起因した生殖発生毒性の懸念は高くはないものと認識されていることによる。ワクチンの生殖発生毒性試験について最も詳細な規定を行っているFDAのガイダンスにおいても、この「単一試験計画法」を前提とした記載がなされている。

2013年WHOガイドラインにおいて従来のガイドラインの記載内容から変化がみられたのは、その「単一試験計画法」の投与期間である。具体的には、「交配前投与」の必要性について変更が加えられた。即ち、2005年WHOガイドラインでは交配前投与について、「必要な場合が多い」と記載され、これはFDAのガイダンスにおいても同様である。ところが2013年WHOガイドラインでは「交配前投与は必要かも知れないが、アジュバントに起因する生殖発生毒性の観点からはむしろ妊娠1日(交尾確認日:妊娠0日)からの投与を推奨する」旨の内容に変更された。

上記変更をもたらした要因については、同じ項の「アジュバントによっては、アジュバント誘発全身性炎症反応についての懸念があるかもしれない。例えば、発熱は、妊娠の早期には有害な影響を及ぼす可能性がある」という記述が何らかの鍵

を握るものと思われる。即ち、アジュバント添加ワクチンの生殖発生毒性については本来、①ワクチンの有効成分に対する抗体(ワクチン抗体)と②ワクチンに添加されたアジュバントに起因する生殖発生毒性の二つに分けて考えられるのであるが、上記の記述からは現在、①よりもむしろ②、即ちアジュバントに関連した要因に重きを置かれつつあることが推察される。

なお、日本のガイドラインでは、ワクチン製剤の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する評価は、反復投与毒性試験における病理組織学的検査で生殖器官への影響が懸念される場合に必要であるとされており、①と②の区別はなされていない。

#### 3.4 新規アジュバント単独の毒性評価(図1, 6.2 他)

ワクチンにおいて新規アジュバントが用いられた際、アジュバント単独での毒性評価をどのように行うかは重要な事項である。2005年WHOガイドラインでは「新規アジュバントについて毒性データが存在しない場合には、アジュバントのみでの毒性試験を最初に実施する」と規定していたが、2013年WHOガイドラインでは「新規アジュバント単独の毒性評価は重要となる可能性があるが、アジュバント添加ワクチンの毒性試験の中にアジュバント単独の1群を設けることで対処可能」と変更された。これには、新規アジュバントの安全性は、あくまでそれを含むワクチン製剤の毒性の一環として捉えることが重要であるという考え方が一般化してきたことに加え、3Rの精神も関係しているものと理解される。

次にこうした新規アジュバント単独での毒性評価において、一般毒性試験及び生殖発生毒性試験では何種類の動物種を用いた評価が必要であろうか。これについて2005年WHOガイドライン及びEMAのアジュバントガイドラインでは、一般の低分子医薬品と同様、げっ歯類1種及び非げっ歯類1種の合わせて2種の動物種による毒性評価が必要であると記載していた。これに対し、2013年WHOガイドラインにおいて本件に関しての

積極的な記載はなされていない。しかしながら、上記のように「新規アジュバント単独での毒性評価はそれを含むワクチン製剤としての毒性試験の1群を設けることで対処可能」及び「アジュバント添加ワクチン製剤での毒性評価は適切な動物種、即ちワクチンに対して免疫応答を示す1種の動物種を用いて行う」(図1, 5.2及び6.2)という記載から判断すると、新規アジュバント単独についても基本的にはワクチン製剤同様、1種の動物種を用いて毒性評価を行えば良いものと解釈できる。新規アジュバント単独の毒性評価に係る件は、2005年WHOガイドラインとの比較において最も大きな変更事項の一つと言えよう。なお、日本のガイドラインでは、新規アジュバントについては、それ自体の毒性評価並びに新規アジュバントと抗原の両方を含んだ製剤での毒性評価も必要とされているが、使用する動物種をはじめ、具体的な評価方法については記載されていない。

### 3.5 ワクチンアジュバントによる自己免疫疾患 (図1, 6.3)

アジュバント本来の免疫補助剤としての作用より類推される安全性上の懸念の一つに自己免疫疾患が考えられる。当該事例としては、米兵において発症したいわゆる「湾岸戦争症候群」において、炭疽菌ワクチンにおけるアジュバントの接種に関係していたとの報告がある<sup>13)</sup>。本件については、2013年WHOガイドライン策定活動と並行して実施された国際生命科学研究所/健康環境科学研究所 (ILSI/HESI) の「アジュバントと自己免疫」において議論され (2012年10月18・19日、オランダ・アムステルダムにおいて同名のワークショップ開催)、本ワークショップでの結論が2013年WHOガイドラインに反映された。例えば、アジュバントの一種であるプリスタン (サメ肝臓から抽出される天然油の夾雑物) を単回投与した場合、全身性エリテマトーデス (SLE) で認められる同様の種類の自己抗体の産生が惹起されるというマウスの試験系が報告され<sup>14)</sup>、自己抗体の産生はType I IFN 及び TLR7 に依存した現象

と考えられている。また、別のワクチンアジュバントであるスクアレニ (サメ肝油の不飽和炭化水素) や不完全フロイントアジュバントをマウスに投与した場合にも、自己抗体の産生が惹起されることから、当該試験系は、ヒトにアジュバントが投与された場合に起こり得る自己免疫疾患を理解するための有用なモデルと考えられている<sup>14)</sup>。しかしながら、本ワークショップでは、当該試験系について、ヒトにおけるワクチン接種とアジュバントの組成、投与量及び投与経路等について大きく異なることが指摘され、現段階では当該モデルによる試験結果をヒトに外挿することについて慎重となるべき、との結論に至った。

以上を含む議論を踏まえ、2013年WHOガイドラインには「現時点において、アジュバントにより自己免疫疾患が誘発されるという有力な臨床的な証拠は存在せず」、「現時点で、本件に関する確固とした動物モデルは存在しない、したがって、推奨できる特別な非臨床試験は存在しない」、更に「自己免疫疾患は複雑かつ多要因が絡む現象であり、追加のバイオマーカーを同定する更なる研究が必要である」の文言が加えられた。

## 4. おわりに

近年、ワクチン開発においてはアジュバントの使用機会が明らかに増え、それに伴いワクチンの非臨床安全性試験の内容を規定し直す必要性が高まっていた。2013年WHOガイドラインの発出はこのような昨今の状況に照らし、正に時宜を得たものと言えよう。本総説で述べてきた内容が、2005年WHOガイドラインとの主な違いとなる。

また、2013年WHOガイドラインには、ワクチンの規制に関する事項ではあるものの、各国固有の状況に左右されるため、規定することができないとして、その現状を吐露している箇所が存在する。即ち、「規制当局の多くは、免疫促進生物活性に基づくアジュバントの定義に加え、各国それぞれアジュバント成分の規制及び/又は法的分類を提供する。規制当局によって用いられる詳細

な定義に応じて、追加試験が必要となる可能性がある。これらの規制及び法律問題は、各規制当局に特有のものであり、本文書の範囲を超えている」(図1, 「範囲」という記載がそれである。これに関し、わが国では薬事上の取り扱いにおいて、アジュバントは「添加剤」として位置づけられているが、添加剤としてのアジュバントの位置づけと免疫補助剤としてのアジュバントの実体との間の隔たりが大きくなり、規制上で様々な問題が生じつつある。具体的な問題点としては、「添加剤の定義からの逸脱」「申請資料上の記載に関する問題」「GMP 準拠の必要性」「添加剤としての位置づけでは安全性評価が不十分となる問題」、逆に「添加剤としての位置づけで過剰な評価が求められる項目の存在」及び「アジュバントの毒性評価を行うべきタイミング」等が挙げられる。一方、既に欧米においては、アジュバントについては、単なる添加剤という立場を越えた位置づけが与えられており、該当する問題は基本的には解決済みである。その意味で、わが国においても欧米の方式を参考にし、薬事上の取り扱いにおいて早期にアジュバント独自の位置づけを確立していくべきであろう。以上が筆者ら調査研究グループの見解である。詳しくは近著を参照されたい<sup>15)</sup>。

[謝辞] 本稿の執筆にあたってご協力並びに貴重なご助言を頂いた以下の方々に感謝の意を表したい (敬称略)。大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所、当該研究事業班主任研究員)、小野寺博志、笹木修、伊藤かな子、甘粕晃平、澤田純一 (いずれも PMDA)、渡部一人 (中外製薬)、中村和市 (塩野義製薬) (以上、当該調査研究グループ参加者)、篠田和俊 (PMDA 毒性領域)、國澤純 (医薬基盤研究所)、石井健 (大阪大学、医薬基盤研究所)、浦野勉、紀平哲也 (いずれも PMDA ワクチン審査部)、宮崎生子 (PMDA 信頼性保証部)、安田尚之 (厚生労働省)。

注) 本稿は、著者の個人的見解に基づくものであり、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の公式見解を示すものではない。

## 文 献

- 1) 山内一也, 三瀬勝利, ワクチン学, p.191, 岩波書店 (2014)
- 2) European Agency for the Evaluation of Medicine (EMA), Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines, CPMP/SWP/465/95 (1997)
- 3) World Health Organization (WHO), Guidelines on nonclinical evaluation of vaccines, WHO Technical Report Series No.927 (2005)
- 4) Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry: Considerations for Developmental Toxicity Studies for Preventive and Therapeutic Vaccines for Infectious Disease Indications (2006)
- 5) 厚生労働省医薬食品局審査管理課, 感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドライン, 薬食審査発 0527 第1号 (2010)
- 6) 厚生労働省医薬食品局審査管理課, パンデミックインフルエンザに備えたプロトタイプワクチンの開発等に関するガイドライン, 薬食審査発 1031 第1号 (2011)
- 7) European Agency for the Evaluation of Medicine (EMA), Guideline on adjuvants in vaccines for human use, EMEA/CHMP/VEG/134716/2004 (2005)
- 8) World Health Organization (WHO), Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines (2013) [http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/ADJUVANTS\\_Post\\_ECBS\\_edited\\_clean\\_Guidelines\\_NCE\\_Adjuvant\\_Final\\_I7122013\\_WEB.pdf](http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/ADJUVANTS_Post_ECBS_edited_clean_Guidelines_NCE_Adjuvant_Final_I7122013_WEB.pdf)
- 9) 下村和裕, ワクチン開発における最新動向: 規制動向・安全性評価・品質管理・アジュバント・開発事例, p.27, 情報機構 (2013)
- 10) 医薬品非臨床試験ガイドライン研究会, 医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2013, p.229, 薬事日報社 (2013)
- 11) Y. Sun *et al.*, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 65, 49 (2012)
- 12) 厚生省薬務局審査課, 医薬品の生殖毒性検索のための試験法ガイドライン, 薬審第 470 号 (1994)
- 13) G. Matsumoto & A. Vaccine, The covert government that's killing our soldiers and why GIs are the only first victims, BasicBooks (2004)

- 14) M. Satoh *et al.*, *J. Autoimmun.*, 21, 1 (2003)  
15) 松本峰男, わが国の薬事上の取り扱いにおけるア

ジュバントの位置づけについての考察, レギュラト  
リーサイエンス学会誌, 3 (3), 175 (2013)

オピニオン

## わが国の薬事上の取り扱いにおける アジュバントの位置づけについての考察

### Consideration of the Regulatory Issues for Vaccine Adjuvants in Japan

松本 峰男

Mineo MATSUMOTO

#### Abstract

In Japan, the position of the vaccine adjuvants in the pharmaceutical regulation has not been established, although both the EU and the US have adopted specific positions with regard to the regulation of vaccine adjuvants. In Japan, adjuvants are currently classified into excipients according to the Japanese Pharmacopoeia. However, the novel adjuvants that exceed category of excipients (which must be harmless and should not show any pharmacological effects) have induced regulatory problems. These include 1) the necessity of a statement in every review report that the adjuvant should not be used in other drug products like a general excipient, but used only for vaccine products, 2) limitation of the safety information assigned for adjuvants in the common technical document (CTD), 3) no requirement of GMP compliance, 4) concerns about requiring excessive, or conversely, insufficient toxicological evaluation for adjuvants, and 5) concerns about the delay of the timing of toxicity studies needed for adjuvants (e.g., genotoxicity studies) as compared with the stages of clinical trials of vaccines. It should be noted that no vaccine adjuvant has yet been authorized in its own right; adjuvants have been approved as components of vaccine products in all three regions. Therefore, it does not seem realistic to regard adjuvants as one of the active components of a vaccine. Instead, we hereby propose that the appropriate position for adjuvants as different from excipients be newly established in Japan, which is consistent with the regulation of both the EU and the US.

#### 抄 録

わが国のワクチン規制においては、解決すべき問題が存在する。それは、薬事上の取り扱いにおいてアジュバントの位置付けが確立していないという問題である。これは既にアジュバントがワクチン有効成分に並んだそれ独自の位置づけを有する欧米とは対照的な状況にある。わが国においてアジュバントに与えられているのは添加物という位置づけであるが、これはもっぱら旧来の日本薬局方の記載に依ったものである。しかしながら近年、添加物の範疇（薬理作用を示さず、無害）を超えたアジュバントが登場してきたことで、ワクチン規制において以下に述べるような問題が提起されている。すなわちアジュバントについて、1) 分類上は添加物ではありながらも、一般的な使用前例としては扱わない旨の但し書きを毎度審査報告書に記載する必要が生じる、2) CTDで割り当てられる記載範囲が限られる、3)