

(2-4-3) 欧州の状況

欧州医薬品庁（EMA）におけるナノメディシンに関するレギュラトリーサイエンス活動の一環として、2010年9月にEMA主催によるナノメディシンに関する国際ワークショップが開催された。本ワークショップには欧州各国の他、米国、カナダ、日本、オーストラリアなど27カ国から産官学、さらに患者団体の代表等が出席し、1）現在までにどのようなナノメディシンが実用化されてきたか、また開発中であるか、2）医薬品への実用化に向け取り組まれている先端技術、3）ナノメディシンの品質特性評価、非臨床評価、リスク管理（ヒト及び環境へのリスク評価）、4）ナノメディシンを用いることによる患者の利益と利益享受のための課題、など広範な内容が議論された。¹⁴⁾

さらに、2011年以降は、リポソーム、鉄ナノ粒子、ブロック共重合体ミセル医薬品、ナノメディシンの表面被覆に関するリフレクションペーパーが作成され、このうちブロック共重合体ミセル医薬品に関するリフレクションペーパー（以降、ミセルRPと称する）は厚生労働省と共同で作成された¹⁵⁾。EMAにおいて公表されているリフレクションペーパーとは、特に新しい分野で経験が限られている領域やトピックスに関する技術の現状を整理し、開発者との間で共有化を図る目的で作成される文書である。将来、ガイドラインその他の関連文書が作成される際にはその参考となりうるものである（EMA「Procedure for European Union Guidelines and Related Documents within the Pharmaceutical Legislative Framework」）。一方、第一世代のナノメディシンとして臨床応用されているリポソームや鉄ナノ粒子製剤には既に特許切れの製品も存在し、先発品を参照として開発されたナノメディシン（EMAは、これらを“ナノシミラー”と称している¹⁶⁾）の規制当局への申請も行われているため、リポソーム製剤と鉄ナノ粒子製剤に関するリフレクションペーパーは、それぞれのナノシミラーを開発する際の留意点を記した文書となっている。リポソーム製剤では、その体内分布（biodistribution）及び有効成分の体内での放出速度と放出量が、薬効や安全性に影響を及ぼす重要な因子である。先発医

薬品と全く同じではなく、類似の製品を作る場合は、製品の複雑さにより一部省略も可能であると考えられるが、追加的な比較試験（PK試験、組織分布、薬理的な試験、製品によっては毒性試験）が臨床的な生物学的同等性試験の前に必要になるであろうことが記されている¹⁷⁾。

なお、欧州でのナノ医薬品の作業定義は、「医療応用を目的としてデザインされたシステムであり、少なくともナノスケールを有する一つの構成要素からなり、特定の特性を有する医薬品purposely designed systems for clinical applications, with at least one component at nanoscale, and resulting in definable specific properties and characteristics.」とされている¹⁸⁾。

(3) リポソーム製剤の評価に関する研究：

リポソーム製剤の開発において留意すべき点、また評価に関する文書案をまとめるにあたっての主な論点は以下のとおりである。2-4) で述べたように、すでに欧米ではリポソーム製剤のガイドライン等が発出されているためそれらを参考にした。

(3-1) 構成について：

品質特性、製造工程管理、薬物動態、作用メカニズム、非臨床安全性の評価にあたっての留意点および評価試験法、さらに初回ヒト試験に先だって確認しておくべき事項（First in human）をまとめることとした。FDAでは、新規に開発されるリポソーム製剤を対象に2002年にドラフトガイダンスが発出されており¹¹⁾、EMAでは、先発品を参照として開発されたリポソーム製剤の開発に関するリフレクションペーパーが2013年に発出されている¹⁷⁾。また、厚生労働省とEMAが共同で作成したミセルRP¹⁵⁾も2014年に発出されている。これらのガイダンス等のTOC（Table of Contents）を図5にまとめた。ナノ医薬品は国際的に開発が展開されており、ガイドライン作成にあたって国際的な調和に配慮する必要性から、欧州との調和のもと作成されたミセルRPと同様のTOCで文書を策定することとした。また、品質特性、製造工程管理、薬物動態、作用メカニズム、非臨床安全性評価の節は、申請時に必要なデータセットを想定して作成することとする。一方、First in human

の節は、ヒトに初めて投与するまでに確認しておくべき品質、非臨床データは何か、またヒト初回投与量設定において考慮すべき点に関して記述することとした。

(3-2) 適応範囲：

今回対象とするリポソーム製剤は、先発リポソーム製剤を参照して開発される製剤(後発品と称する)ではなく、新たに開発されるリポソーム製剤の評価を対象とすることとした。ただし、本文書で議論される内容は今後の後発品の評価にも参考となるであろう。また、脂質をキャリアとした製剤は日本でも市販されているが、本文書では生体内での安定性向上を指向した脂質二重膜を基盤とする製剤を扱い、脂質エマルジョンは対象としないこととする。

(3-3) 品質特性、製造工程管理：

品質関連の項目は、リポソームと脂質構成成分に分けて記載することとした。いずれにおいても、標的性付与のための標的素子による修飾がなされている事例が増えつつあることから、抗体等の標的素子に関する考慮点も記載することとした。

(3-4) 非臨床試験について：

①薬物動態試験について：非臨床試験、ヒト初回投与試験において考慮すべき事項に関しては、リポソーム製剤と同様のコンセプトで開発されているブロック共重合体ミセル製剤についてEMAと調和しつつ作成された経緯から、ブロック共重合体ミセル医薬品における議論を基に作成することが重要である。ただし、ドキシルの製造法がステルスリポソームから硫酸アンモニウム勾配法により製造されていることからわかるように、リポソームでは薬剤を含んでいない状態でもリポソームであり、キャリアと薬剤を別々に議論することが可能である。その点が、ブロック共重合体ミセル医薬品の評価と異なる部分であろう。

DDS製剤では、循環血中における有効成分は、単独で静脈内投与された医薬品、あるいは経口投与型の医薬品とは異なり、循環血中に入った後も、組織・

あるいは臓器への分布や代謝・排泄等の消失がナノサイズのキャリアにより制御されているため、血中濃度の他に、標的組織、その他主要な臓器あるいは組織における有効成分の分布、さらには消失(代謝+排泄)の解析が重要であると考えられる。これらを考慮し文章をまとめることとした。

②毒性試験について：ICHガイドラインS4、S6、S9を参考にすることとした。有効成分を含まないリポソームを用いた評価の在り方、新規添加剤とされた場合の評価の在り方、等の論点から、評価点をまとめることとした。

D. 考 察

核酸医薬品においては、標的指向性の向上により標的細胞に医薬品を送達することで、副作用を低減し、有効性を増強させた画期的医薬品の開発が期待できる。細胞、及び細胞内小器官レベルでの動態を共焦点顕微鏡により可視化する手法に着目し、リポソームを蛍光標識しその細胞内動態を追跡する手法を検討した。共焦点顕微鏡を用いた細胞内動態の解析では、生細胞でリポソーム、あるいはその構成成分の局在を観察することが可能であり、リポソームの取り込み機構についても知見を得ることが可能であった。異なる構成脂質を別々に蛍光標識したリポソームを用いて、それぞれの細胞への取り込み機構や細胞内局在を追跡することで、リポソームがどのような状態で細胞内にとりこまれ、細胞内のどこで崩壊し薬物が放出されるかを考察することが可能となる。また、本研究では、細胞によりsiRNA-リポソーム複合体取り込み量が細胞種により大きく異なることが明らかとなった。polyICによるTLR3の活性化によって複数のヒト細胞よりIP10と呼ばれるケモカインが産生されることが報告されているが¹⁸⁾、我々の実験では、MD細胞ではIP10の産生が非常に少ないという結果を得た。その原因として複合体の取り込みが大きく影響していることが、今回の共焦点顕微鏡による細胞内取り込み評価により示唆された。以上のような考察が本細胞内動態評価手法を用いることにより可能となるであろう。

DDS製剤の開発においては、最先端のバイオテクノロジーやナノテクノロジーを用い、様々な素材を利用した複雑な構造を有する医薬品の開発が進められている。また、医療デバイスとの融合製品の開発も活発である。これらの新素材が生体に投与された際に、血液成分や細胞など生体を構成する要素に直接接触して利用されるため、生体反応、特に免疫学的反応に関わる評価が安全性の観点からも重要であろう。静脈血中にナノDDS製剤が投与された際の赤血球や補体成分との相互作用評価の必要性については受け入れられつつあり、また製剤の特性によっては血液凝固への影響についても懸念されている²⁰⁾。これらを*in vitro*で評価する試験について欧米での議論は進んでいるが、我が国では十分とは言えない。リポソーム製剤等の静脈注射用ナノ医薬品と血中タンパク質との相互作用は、生体内安定性、有効成分の放出性、輸注反応など、ナノ医薬品の臨床上的有効性及び安全性に影響する重要なファクターである。重量当たりの表面積は粒子径が小さくなると急激に増大するため、バルク固体と比べ、ナノメートルサイズの製剤では、その相互作用の頻度も増大すると考えられる。そこで、有効性と安全性確保の観点より、その評価手法として、ナノ医薬品の血液適合性、つまり補体系活性化試験、赤血球との相互作用（溶血性試験）、及び血漿成分への影響（血液凝固試験）について、昨年度はリポソーム製剤を対象に最適化した。安全性に関わる*in vitro*試験法開発の目的は、開発中のナノ医薬品を*in vivo*投与した際に生じ得る急性の毒性反応を迅速に評価することである。したがって、製剤設計の段階からこれらの*in vitro*評価を行うことが可能となるよう評価法を検討した。本年度は、開発した*in vitro*試験法を用いて、製剤の品質特性と*in vitro*での血液適合性との関連に関するデータを蓄積した。今後は、さらに詳細な検討を行うとともに、種差の問題も含め*in vitro*での血液適合性と*in vivo*での安全性との関連性について情報を蓄積していきたい。

ナノ医薬品の特性は、サイズによりもたらされる場合が多く、欧米では少なくとも1つ以上のナノメートルサイズの構成要素を有していることが作業定

義の一つとして用いられている。1つの製剤が複数のナノサイズの構成要素から構成されている場合、各要素を分解して特性解析することも必要になってくるかもしれない。そのような場合は、複数の分析手法の組み合わせによる特性評価が重要になってくるであろう。

すでに我が国においても、リポソーム製剤、高分子ポリマー結合製剤など、「ナノ医薬品」に分類されるようなナノメートルサイズの製剤は承認されている。さらに高分子ミセルなど新規な素材をキャリアとし、抗癌剤、核酸等の標的部位への送達を狙った製剤の研究開発は世界に先駆けて進行中であり、臨床試験中の製剤も複数存在する。これらナノメートルサイズの製剤は、従来の製剤とは体内での挙動や生体との相互作用など様々に異なると考えられ、ナノ医薬品の特性に配慮した評価が必要と考えられる。そのため、ナノ医薬品の評価基準作成は国際的に重要視されており、我が国においてもナノ医薬品開発、承認申請、承認審査において、配慮すべきポイントを明確にし、さらには評価ガイドライン等としてまとめることが危急の課題となっている。我々は、2014年にブロック共重合体ミセル製剤の開発・評価に関する文書を国際的にも発信させた。さらに、リポソーム製剤についても、ブロック共重合体ミセル医薬品とは異なる特性に留意しつつ、海外より発出されているナノ医薬品関連の文書を参考にして文書化・国際的な発信を目指したい。

我々は、本研究課題で得られた知見・成果を広く情報提供するために、ナノ医薬品に関するホームページを整備・充実させた（図6）²⁰⁾。

E. 結 論

核酸（siRNA）を搭載したナノ医薬品の細胞内動態評価法を構築した。有効性と安全性確保の観点より、その評価手法として、ナノDDS製剤の血液適合性試験、赤血球との相互作用（溶血性試験）、及び血漿成分への影響（血液凝固試験）を用い、物理的・化学的特性の異なる様々なリポソーム製剤を用いて測定し、血液適合性と物理的・化学的特性との関連性について考察した。ナノ医薬品の分類に関する国際的

な動向を調査するとともに、国際的な個別ナノ製剤の規制文書を参考に、リポソーム製剤の評価に関する文書化を開始した。

謝 辞

厚生労働省及び国立医薬品食品衛生研究所が事務局となり設置された検討会「ナノ医薬品に関する勉強会」において、ブロック共重合体ミセル医薬品及びリポソーム医薬品の評価に関し技術的な御助言を賜りました勉強会委員の先生方に深謝致します。

参考文献

- 1) Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238-252, 1965.
- 2) Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* 23:457-62, 2005.
- 3) 医療機器の製造販売承認申請等に必要となる生物学的安全性評価の基本的考え方について 平成24年3月1日付け薬食機発0301第20号
- 4) Xue HY, Liu S, Wong HL. Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine. *Nanomedicine (Lond).* 9:295-312, 2014.
- 5) 宮川伸 核酸医薬の毒性と安全性 医学のあゆみ238, 519-523, 2011
- 6) Dobrovolskaia, M A., McNeil SE. Understanding the correlation between *in vitro* and *in vivo* immunotoxicity tests for nanomedicines *J. Control. Release* 172,456-66, 2013
- 7) Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 46, 6387-6392, 1986.
- 8) Pridgen EM, Alexis F, Kuo TT, Levy-Nissenbaum E, Karnik R, Blumberg RS, Langer R, Farokhzad OC. Transepithelial transport of Fc-targeted nanoparticles by the neonatal fc receptor for oral delivery. *Sci Transl Med.*;5(213):213ra167, 2013
- 9) Nanotechnology Regulatory Science Research Plan; website:<http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/ucm273325.htm>
- 10) Guidance for Industry: Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, June 2014
- 11) Draft Guidance, Liposome Drug Products – Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation, US Food and Drug Administration, 2002
- 12) Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride, US Food and Drug Administration, 2010.
- 13) Draft Guidance on Iron sucrose, US Food and Drug Administration, 2013.
- 14) 1st International Workshop on Nanomedicines 2010 Summary Report, European Medicines Agency
- 15) 「ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省／欧州医薬品庁の共同リフレクシオンペーパーの公開等について」平成26年1月10日付 薬食審査発0110第1号
- 16) Ehmann F, Sakai-Kato K, Duncan R, et al. Next-generation nanomedicines and nanosimilars: EU regulators' initiatives relating to the development and evaluation of nanomedicines. *Nanomedicine (Lond).* 2013, 8, 849-856.
- 17) Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product, European Medicines Agency, 2013
- 18) Bartlett JA, Brewster M, Brown P, Cabral-Lilly D, Cruz CN, David R, Eickhoff WM, Haubenreisser S, Jacobs A, Malinoski F, Morefield E, Nalubola R, Prud'homme RK, Sadrieh N, Sayes CM, Shahbazian H, Subbarao N, Tamarkin L, Tyner K, Uppoor R, Whittaker-Caulk M, Zamboni W. Summary Report

of PQRI Workshop on Nanomaterial in Drug Products: Current Experience and Management of Potential Risks. AAPS J. 17, 44-64. 2015.

- 19) Lundberg AM, Drexler SK, Monaco C, Williams LM, Sacre SM, Feldmann M, Foxwell BM. Key differences in TLR3/poly I:C signaling and cytokine induction by human primary cells: a phenomenon absent from murine cell systems. Blood 110, 3245-352 2007.
- 20) ナノ医薬品に関する参考情報 http://www.nihs.go.jp/drug/section4/nanomedicine_j/nano_j.html

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Sakai-Kato, K., Nanjo, K., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, Y. "Size Exclusion Chromatography Coupled with Multi-Angle Light Scattering Analysis of Physicochemical Properties of Block Copolymer Micelles." Chromatogr., in press
- (2) Un, K., Sakai-Kato, K., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, Y. "Effects of liposomal phospholipids and lipid transport-related protein on the intracellular fate of encapsulated doxorubicin" Mol Pharm. 11, 560-567 (2014)
- (3) Sakai-Kato, K., Un, K., Nanjo, K., Nishiyama, N., Kusahara, H., Kataoka, K., Kawanishi, T., Goda H., Okuda, H., "Elucidating the molecular mechanism for the intracellular trafficking and fate of block copolymer micelles and their components " Biomaterials 35, 1347-1358 (2014)
- (4) Sakai-Kato, K., Nanjo, K., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, H.: Sensitive method for measuring the concentration of doxorubicin and its metabolites in biological samples. Chromatogr., 35(suppl2):81 (2014)
- (5) 加藤くみ子 "ナノメディシンに関するレギュラトリーサイエンスの動向" BIO Clinica 29 (12) 1170-1174, 2014
- (6) 原島秀吉、秋田英万、加藤くみ子、石井武彦、

松村保広、片岡一則 "ナノテクノロジーを基盤とした医薬品のレギュラトリーサイエンス研究への取り組み" Drug Delivery System 29(3) 217-225, 2014

- (7) 加藤くみ子 "ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省/欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパー: 作成の経緯と概要" Pharm Tech Japan30, 1011-1015, 2014
- (8) 加藤くみ子 "ナノ医薬品の評価に関する本邦および欧米の規制動向について" 製剤機械技術学会誌Vol 23 No.1, 24-30, 2014
- (9) 加藤くみ子 "ナノ医薬品の機能と実用化に向けた課題" Pharm Tech Japan 30, 425-428, 2014

2. 学会発表・講演

講演

- (1) 加藤くみ子 「ナノ薬品の評価」日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 第119回 基礎研究部会総会 平成26年12月15日 京都
- (2) 加藤くみ子 川崎スマートライフケアCOI拠点 COINSリトリート パネルセッション 平成26年11月15日 ラフォーレ修善寺
- (3) 加藤くみ子 「リポソーム製剤の評価について」第32回物性物理化学研究会 平成26年6月26日 京都大学薬学記念講堂
- (4) Kumiko Sakai-Kato "Current initiatives for regulatory science researches for nanomedicines in Japan" The European Summit for clinical nanomedicines 2014 2014年6月24日 (Basel)
- (5) 加藤くみ子 「DDS製剤の概説」日本病院薬剤師会東北ブロック第4回学術大会 平成26年5月31日 仙台国際センター

学会発表

- (1) 加藤くみ子、南條邦江、川西徹、奥田晴宏、合田幸広 「生体試料中におけるドキシソルビシンとその代謝物の高感度分析法の開発」 第25回クロマトグラフィー科学会議 京都 2014年12月12日 京都
- (2) 加藤くみ子、運 敬太、合田幸広 "カチオン性

リポソーム構成成分の細胞内動態に関する研究”
第29回日本DDS学会、東京、2014年 7月

2014年 5月22日

- (3) 加藤くみ子、桜井真理、川西徹、奥田晴宏、合
田幸広 “リポソーム製剤の血液適合性に関する
評価法研究” 日本薬剤学会第29会年会、大宮、

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 本研究で用いたリポソームの脂質組成

#1 DOPC : chol (50 : 50 (mol))	DOPC: 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine DLPC: 1,2-Dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine DMPC: 1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine DPPC: 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine DSPC: 1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine DOTAP: 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane Chol: Cholesterol PEG2000-DSPE: 1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]
#2 DLPC : chol (50 : 50 (mol))	
#3 DMPC : chol (50 : 50 (mol))	
#4 DPPC : chol (50 : 50 (mol))	
#5 DSPC : chol (50 : 50 (mol))	
#6 DOTAP : chol (50 : 50 (mol))	
#7 DOPC : chol : DSPE-PEG2000 (45 : 50 : 5 (mol))	
#8 DOTAP : chol : DSPE-PEG2000 (45 : 50 : 5 (mol))	
#9 DSPC : chol : DSPE-PEG2000 (45 : 50 : 5 (mol))	

表 2 血小板凝集への影響が報告されている
ナノマテリアル

ナノマテリアル	文献例
Amorphous silica	Nanotechnology 23 (2013)045101
Carbon nanoparticle (in vivoとの関連も)	Br. J. Pharmacol. 146 (2005) 882-893.
Carbon nanotube (in vivoとの関連も)	Toxicology 269(2010) 148-154.
PAMAM dendrimers	Mol. Pharm.9 (2012) 382-393.

表 3 血小板凝集を評価する試験法

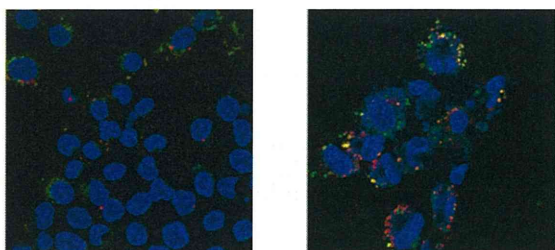
測定法	測定法概要
コールター法	粒子そのものを直接計数する手法であり、再現性がとりやすく評価法としては最適といえる。
凝集(PRP)法	血小板のみを取り出し測定するため、再現性が良くない。実際の薬効を見るのには適さない。
インピーダンス法	装置の構造上、同一の血小板が複数回カウントされることがある。再現性の点で問題がある。
比濁法	吸光度法に準じる。感度が低い。

表 4 日本で認可された主なナノ医薬品*

分類	商品名	薬効分類名	販売開始年
リポソーム製剤	ビスダイン*	加齢黄斑変性症治療剤	2004年
	アムビゾーム*	ポリエチレンマクロライド系抗真菌性抗生物質製剤	2006年
	ドキシル*	抗悪性腫瘍剤	2007年
鉄ナノ粒子製剤	リソビスト*	MRI用肝臓造影剤	2002年
	フェジン*	鉄欠乏性貧血治療剤	2007年**
ナノ結晶製剤	イメンド*	選択的NK ₁ 受容体拮抗型制吐剤	2009年
	ゼブリオン*	持続性抗精神病剤	2013年
その他のナノ医薬品	アブラキサン*	抗悪性腫瘍剤	2010年

*現時点でナノメディシンの定義は存在しませんが、サブミクロン以下のナノメートルサイズの構成要素を含む医薬品を記しました。

**フェジン静注40mgとしての販売開始年。



MD細胞

HUVEC

図1 MD細胞とHUVECの共焦点顕微鏡像
青：核、赤：siRNA、緑：リポソーム

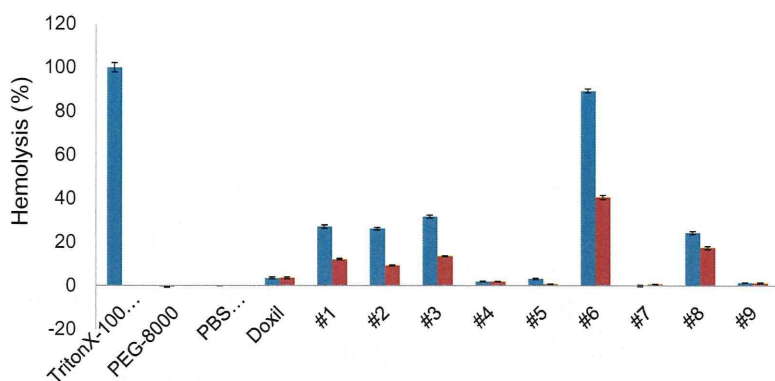


図2 種々の組成からなるリポソームを用いた溶血性試験

#1-9は表1の組成を有するリポソーム
青：2 mg/mL、赤：0.4mg/mL 脂質濃度

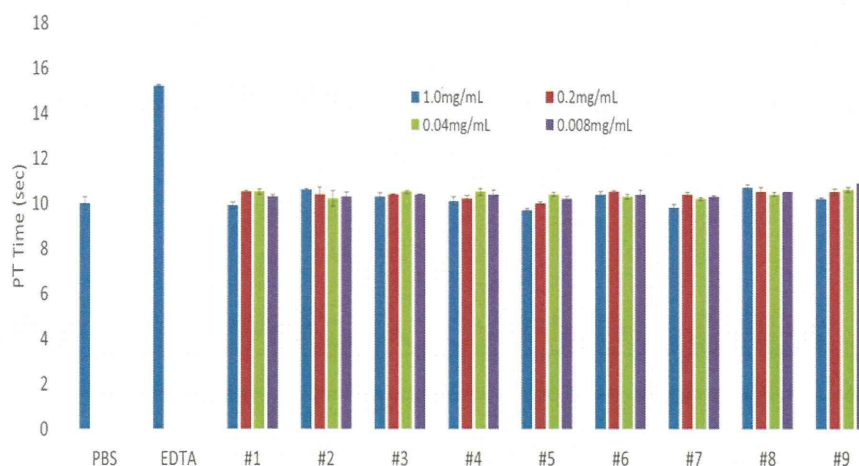


図3 種々の組成からなるリポソームを用いた血液凝固試験
#1-9は表1の組成を有するリポソーム

機能の事例		医薬品の事例*
主として製剤側の特性を利用	磁性の変化	造影剤(超常磁性酸化鉄(SPIO))
	原薬結晶の溶解性・溶出性の向上	ナノ結晶製剤
主として生体側の特性を利用	体内分布の制御(EPR効果など)	抗癌剤内封ナノ医薬品
	生体内における有効成分の安定性向上	核酸医薬品やペプチド・タンパク質性医薬品を内封したナノ医薬品
	標的細胞への取り込み向上	

* 研究開発中の製剤も含む。

図4 ナノ医薬品に期待される主な機能の事例

日欧ミセル (新薬の開発)

1. 序文
2. 適用範囲
3. 考察
 3. 1. 化学、製造、及び品質管理
 3. 1. 1 医薬品品質
 3. 1. 2 組成・性状
 3. 1. 3 品質の特性解析
 3. 1. 4 製造工程及び工程管理
 3. 1. 5 製品規格
 3. 1. 6 安定性
 3. 1. 7 開発段階における製法の変更
 3. 2. 非臨床試験
 3. 2. 1 概論
 3. 2. 2 非臨床薬物動態
分析法
薬物動態
 3. 2. 3 非臨床薬力学
 3. 2. 4 安全性薬理試験
 3. 2. 5 毒性試験
3. 3. ヒト初回投与試験において考慮すべき事項
4. 結論

EUリポソーム (後続品・シミラー)

1. 序文
2. 適用範囲
3. 考察
 3. 1. 製剤の品質
 3. 1. 1 品質特性解析
 3. 1. 2 製剤学的な同等・同質性の立証(確立)
 3. 1. 3 製剤開発
 3. 2. 非臨床、臨床試験要件
 3. 2. 1. 概要
 3. 2. 2. 分析手法
 3. 2. 3 非臨床試験
 3. 2. 4 臨床試験
4. 結論

FDAリポソーム (新薬の開発)

1. 序文(適用範囲についても含む)
2. 化学、製造、及び品質管理
 - A 組成・性状
 - B 物理的・化学的特性
 - C 製造工程と工程管理
 - D 添加剤の管理:脂質成分
 - E 製剤の管理:規格
 - F 安定性
 - G 製法の変更
3. ヒトのPKとバイオアベイラビリティ
 - A 生体分析手法
 - B in vivoでの安定性への考慮
 - C タンパク質結合
 - D in vitro安定性
 - E PKとバイオアベイラビリティ
4. 表示
 - A 製品名
 - B 留意事項
 - C 投与経路

図5 リポソーム製剤関連のガイドライン等 Table of Contents の比較

ナノ医薬品(ナノメディシン)に関する参考情報

ナノ医薬品とは?
ナノ医薬品関連ガイドライン
国際的な協力
ナノ医薬品に関するレギュラトリーサイエンス研究
ナノ医薬品関連国際ワークショップ

ナノ医薬品に関するレギュラトリーサイエンス研究

国立医薬品食品衛生研究所で進められているナノ医薬品に関するレギュラトリーサイエンス研究について紹介いたします。本研究では、ナノ医薬品の開発環境整備のために、品質、有効性、安全性の観点から、ナノ医薬品の適切な評価戦略を構築することを目的としております。

1. ナノ医薬品の評価法の開発とガイドライン作成に関わる研究

- ・化学、製造、及び品質管理において考慮すべき事項の整理
- ・非臨床薬物動態、薬力学、毒性試験において考慮すべき事項の整理
- ・ヒト初回投与試験において考慮すべき事項の整理

図6 ナノ医薬品に関する参考情報を掲載した国立医薬品食品衛生研究所薬品部内のホームページ

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）
分担研究報告書

－改変タンパク質製剤（改変型抗体医薬品）の評価に関するRS研究－

研究分担者：石井 明子（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部）

研究協力者：多田 稔（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部）

鈴木 琢雄（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部）

佐藤 淳（東京工科大学 応用生物学部）

研究要旨

本研究では、改変抗体やFc融合タンパク質等の改変タンパク質製剤の開発環境整備を目的に、改変タンパク質製剤の開発初期からヒト初回投与試験（FIH）までの非臨床試験段階における留意事項の整理、及び、関連する評価法の開発とその有用性評価を行っている。本年度は、(1)SPR法を用いた結合親和性評価法により、Fc γ 受容体結合性の種差を明らかにして、抗体等改変タンパク質製剤のFIH安全性確保に必要なヒトへの外挿性に関する留意事項を明らかにした。また、(2)新規改変タンパク質製剤の候補となるLactoferrin-Fc融合タンパク質（LF-Fc）をモデルとして、これまでに構築したFc γ 受容体結合性／活性化能評価系の有用性を明らかにした。さらに、(3)これまでの調査ならびに研究を総括して、改変タンパク質製剤の分子設計と非臨床評価に関する留意事項をまとめた。

A. 研究目的

近年のバイオ医薬品開発動向の特徴は、抗体医薬品の開発品目数が多いことであり、本邦においても、承認されたバイオ医薬品の3分の1近くを抗体医薬品が占めるまでになった。最近では、サブクラス置換型抗体、抗体薬物複合体、糖鎖改変抗体、アミノ酸配列置換抗体、低分子抗体など、種々の改変抗体の開発が進んでいる。

本研究ではFc領域改変抗体やFc融合タンパク質など、近年開発の進展の著しい改変型抗体医薬品類を中心に、ヒト初回投与試験に先立って実施される非臨床試験における留意事項を明らかにするとともに、薬理作用の発現および薬物動態に直接的に関与するFc領域の機能の評価法の確立と有用性評価を行っている。

本年度は、(1)SPR法を用いた結合親和性評価法により、Fc γ 受容体結合性の種差を明らかにして、抗体等改変タンパク質製剤のFIH安全性確保に必要なヒ

トへの外挿性に関する留意事項を明らかにした。また、(2)新規改変タンパク質製剤の候補となるLactoferrin-Fc融合タンパク質（LF-Fc）をモデルとして、これまでに構築したFc γ 受容体結合性／活性化能評価系の有用性を明らかにした。さらに、(3)これまでの調査ならびに研究を総括して、改変タンパク質製剤の分子設計から非臨床評価までの留意事項をまとめた。

B. 研究方法

B.1 SPR法を用いたFc γ R結合に関する種差の解析

SPR解析にはBiacore T200（GEヘルスケア）を使用した。アミンカップリングによりセンサーチップCM5に抗His抗体（GEヘルスケア）を固定化した。His-tag付加されたFc γ R細胞外ドメインの組換えタンパク質（Sino Biologicals）をキャプチャーし、アナライトとして各種の抗体医薬品を用いて結合親和性の解析を行った。

測定用緩衝液はHBS-EP+ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA and 0.05% Surfactant P20)、再生用緩衝液は10 mM glycine (pH1.5) を用いた。キャプチャー分子の濃度は1 µg/ml、結合時間は1分、流速は10µl/minとした。アナライト結合、解離、再生の時間はそれぞれ3分、5分、1分とし、流速は30µl/minとした。解析には、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIaについてそれぞれ、1:1 binding model、steady state model、two state reaction modelを適用し、結合解離定数 (K_D) を算出した。

B.2 Fc受容体結合性・活性化能評価系の有用性評価：LF-Fcの特性解析への応用

CHO細胞で発現したLF-Fc (hLF-hinge-CH2-CH3、及び、hLF-CH2-CH3) は、研究協力者の東京工科大学佐藤教授より供与された。

SPR解析では、Protein Aをセンサーチップに固定化し、LF-Fcを捕捉した。FcγR細胞外ドメインの組換えタンパク質をアナライトとして添加し、結合と解離をモニターした。

レポーター細胞を用いたFcγ受容体活性化能の評価では、エフェクター細胞としてFcγRIIIaとカルシウムシグナル応答性のレポーター遺伝子 (NFAT-Luc) を導入したJurkat細胞 (Jurkat/FcγR/NFAT-Luc) を使用した。Jurkat/FcγR/NFAT-Lucを培養した96穴プレートから培養液を取り除きOPTI-MEMで洗浄した後、OPTI-MEMに懸濁したJurkat/FcγR/NFAT-Luc細胞を播種し、各濃度のLF-Fc存在下で37°C、4時間共培養した。各ウェルにONE-Glo Luciferase Assay試薬 (Promega) を添加し、Enspireマルチモードプレートリーダーを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

B.3 改変タンパク質製剤開発における留意事項

高濃度溶液製剤が求められる近年の抗体医薬品の開発動向を踏まえ、抗体等改変タンパク質製剤の分子設計において求められる要件を考察した。また、「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス」を参照し、改変タンパク質製剤に特有の留意事項をまとめた。

(倫理面への配慮)

本研究では、倫理面での配慮を要する試薬等はない。

C. 研究結果

C.1 FcγR結合に関する種差の解析

Fcγ受容体は、IgGのFcに結合する受容体であり、IgG結合に伴い細胞内にシグナルを伝達することで、抗体医薬品の抗体医薬品細胞傷害活性 (ADCC) 活性や、免疫複合体の細胞内への取り込みに関与する。Fcγ受容体の活性化は、エフェクター細胞からのサイトカイン放出によるinfusion reaction等の有害反応に関与する可能性もあり、改変型抗体の非臨床試験結果からのヒトでの有効性・安全性の予測には、評価対象となる改変型抗体によるFcγ受容体結合の種差を明らかにしておく必要がある。

図1にヒト、カニクイザル、及びマウスのFcγ受容体ファミリーの模式図を示す。ヒトと動物では、Fcγ受容体ファミリーを構成する受容体の種類や機能に違いがあり、例えば、ヒトFcγRIIIbの相同タンパク質は、カニクイザルやアカゲザルなどの非ヒト霊長類やマウスには存在しない。また、マウスには、ヒトや非ヒト霊長類にはないFcγRIVが発現している。したがって、非臨床試験結果のヒトへの外挿には、これらFcγ受容体ファミリーを構成する分子の種類、発現分布、機能、ならびに、評価対象となる抗体の各受容体への結合性を明らかにしておく必要がある。

そこで、改変抗体のモデルとして、糖鎖構造改変抗体、及び、IgG1以外のサブクラスの抗体について、ヒト、カニクイザル、マウスのFcγ受容体との結合親和性を比較した。糖鎖構造改変抗体として、抗CCR4抗体モガムリズマブを用いた。モガムリズマブは、IgGのFc領域に付加している糖鎖の還元末端のNアセチルグルコサミンに結合しているフコースの含量が低く、ADCC活性が、従来型の抗体と比較して増強されている。IgG2として、抗EGFR抗体パニツムマブ、IgG4として、抗α4インテグリン抗体ナタリズマブを用いた。また、対照として、マウスIgG2aである抗CD3抗体ムロモノブCD3を用いた。

図2に、FcγRIとの結合をSPR法で解析した結果を

示す。ヒトFcγRIとマウスFcγRIの結合性を比較すると、ヒトFcγRIの方が、抗体との解離速度が遅い傾向があった。FcγRIは、貪食等の機能に関わる受容体である。ヒトFcを持つ抗体について、マウスを用いた非臨床試験を行う場合、FcγRIの結合・解離がヒトとは異なり、FcγRI発現細胞の活性化についても、マウスとヒトで異なる可能性が考えられる。

図3に、FcγRIIaとの結合を解析した結果を示す。ヒトFcγRIIaと抗体の結合性の特徴として、結合速度、及び、解離速度が共に大きいことが挙げられる。この特徴は、カニクイザルFcγRIIaに対しても認められた。

図4に、FcγRIIbとの結合を解析した結果を示す。特徴的な点は、IgG2であるパニツムマブに関して、ヒトFcγRIIbに対する結合親和性と比較して、カニクイザルFcγRIIbとの結合性が高いことが挙げられる。ヒトFcγRIIaでは、IgGとの結合性に影響する遺伝子多型 (R131H) が知られているが、この部位に相当するアミノ酸残基が、ヒトFcγRIIbではRであるのに対して、サルFcγRIIbではHであることが報告されている (Trist HM et al. J. Immunol. 192, 792-803, 2014)。ヒトIgG2の場合、ヒトFcγRIIbに対する結合性と、サルFcγRIIbに対する結合性に、特に大きな差が生じることが明らかになった。

図5に、FcγRIIIaとの結合を解析した結果を示す。糖鎖改変によるFcγRIIIa結合親和性の上昇は、サルFcγRIIIaにおいても検出されたが、マウスFcγRIIIでは、非改変及び糖鎖改変ヒトIgG1への結合性が低く、糖鎖改変による親和性上昇は検出されなかった。実験に用いたマウスFcγRIIIの機能が保持されていることは、マウスIgG2aであるムロモナブCD3の結合により確認している。

図6に、ヒトFcγRIIIaとの結合を解析した結果を示す。FcγRIIIbは、カニクイザルやマウスには存在しない。FcγRIIIaに対する結合親和性が増している糖鎖改変IgG1については、FcγRIIIb結合親和性も上昇していた。

図6に、マウスFcγRIVとの結合を解析した結果を示す。マウスFcγRIVでは、糖鎖改変IgG1の結合親和性が高くなっており、フコース低減糖鎖改変抗体の

ADCC活性増強効果は、マウスでは、FcγRIVが関与していると考えられる。

以上のように、改変型抗体医薬品の評価では、FcγRファミリー分子への結合親和性プロファイルを明らかにすることが、非臨床試験結果のヒトへの外挿において、重要と考えられる。

C.2 Fc受容体結合性・活性化能評価系の有用性評価：LF-Fcの特性解析への応用

新規改変タンパク質製剤のモデルとして、LactoferrinとFcの融合タンパク質 (LF-Fc) の特性解析を行った。LF-Fcとして、ヒトLFとヒンジ領域を含むFcを融合したhLF-hinge-CH2-CH3、及び、ヒンジ領域を欠損させたhLF-CH2-CH3の2種類を用いた。ヒンジ領域欠損LF-Fcは、Fcを介した免疫活性化による有害反応の回避と血中安定性の向上を目的に改変が施されたものである。

C.2.1 LF-FcのFcγRIIIa結合性

hLF-hinge-Ch2-CH3では、infliximabより低いながら、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIaとの結合が認められた。hLF-Ch2-CH3のFcγR結合性は、hLF-hinge-Ch2-CH3より低く、FcγRIIa、FcγRIIIaとの結合は検出されなかった (図8)。

C.2.2 LF-FcのFcγRIIIa活性化能

FcγRIIIaを発現するレポーター細胞にhLF-hinge-CH2-CH3を添加したところ、用量依存的にレポーター遺伝子の活性化が検出された。一方、ヒンジを欠くhLF-CH2-CH3では活性化は認められなかった (図9)。

本実験系は抗原非存在下で実施しているため、通常、抗体医薬品単独の添加ではレポーター細胞の活性化は検出されない。hLFがJurkat細胞の何らかの表面タンパク質と結合することにより、Fc受容体の架橋が起こり、レポーター細胞の活性化が生じたと考えられる。

C.2.3 LF-FcのFcRn結合親和性

抗体医薬品等のリサイクリングに関与するFcRn

とLF-Fcの結合性をSPR解析により調べたところ、LF-Fcと抗体がFcRnと結合するpH6.0においても、抗体がFcRnから解離するpH7.4においても、LF-FcとFcRnの結合が認められた(図10)。同じセンサーチップにおいて、pH7.4で抗体のFcRnへの結合が検出されないことは、確認している。

今回用いたSPR解析の方法で、抗体とFcRnの結合親和性は、バイバレントモデルによりカイネティクス解析ができるが、LF-FcとFcRnの結合は、フィッティングするモデルがなく、カイネティクス解析はできなかった。

モデルへのフィッティングを用いず、平衡値解析により、LF-FcとFcRnの解離定数(K_D)を算出した結果を図11に示す。LF-FcのFcRn結合に関する解離定数は、hLF-CH2-CH3が365 nM、hLF-hinge-CH2-CH3が554 nMであり、同時に測定した抗体医薬品influximabやFc融合タンパク質etanercept、alefacept、abataceptと比較して、高い親和性を示すという結果になった。

FcRnを介したリサイクリングには、エンドソーム内の酸性条件下での結合と、細胞表面での中性条件下での解離が重要であるとされている。LF-Fcは、中性でもFcRn結合しているため、抗体や他のFc融合タンパク質と比較した*in vivo*での挙動の違いについては、解析しておく必要があるだろう。

以上のように、FcγRあるいはFcRnとの結合親和性評価系や、FcγR活性化評価系は、新規改変タンパク質製剤の特性解析に有用であることが示された。

C.3 改変タンパク質製剤開発における留意事項

C.3.1 分子設計における留意事項

改変型抗体やFc融合タンパク質等の改変タンパク質製剤では、近年、皮下投与製剤が増えている。改変タンパク質の分子設計においては、標的部分子との結合性のみでなく、1) 有効性・安全性に関連する薬理作用、薬物動態、免疫原性、2) 製剤化に関連する溶解性、安定性、さらに、3) 製造工程を考慮した構造の至適化が必要である。開発目標となる適応疾患、用法、薬理作用・体内動態・免疫原性・製剤化・製造工程等を考慮した分子設計における要

件を以下にまとめた。

C.3.1.1 有効性・安全性

C.3.1.1.1 薬理作用

(1) 抗原結合の至適化

CDR及びその周辺のフレームワーク部のアミノ酸置換により、抗原結合の至適化を図る。1つの抗体が2種類の抗原に結合することで薬理作用の発揮が期待できる場合、1つの抗体に2種類の可変部を持たせ、二重特異性抗体とすることが有効な場合がある。

(2) エフェクター活性の至適化

ADCC活性やCDC活性等のエフェクター活性には、Fcドメインのアミノ酸配列及び糖鎖構造が関与している。通例、細胞傷害活性を期待する抗体医薬品ではエフェクター活性を増強、中和活性のみを期待する抗体医薬品ではエフェクター活性を低減する方向で改変を行う。

エフェクター活性を考慮した至適化においては、IgGサブクラスを選択の他、Fcγ受容体や補体結合に関与するアミノ酸残基の改変が有用な場合がある。また、フコース含量の低減によりADCC活性が増強されることが知られており、糖鎖構造改変が有用な場合がある。

エフェクター活性の増強は、infusion reaction等の有害反応につながる可能性があることに留意する。

(3) 化学薬品による修飾

抗腫瘍効果を期待する抗体医薬品では、抗体と強力な細胞傷害作用を持つ薬物を共有結合させた抗体薬物複合体(ADC)として開発することが有用な場合がある。薬物の放出性はリンカーの構造に依存するため、必要な時にのみ薬物を放出できるリンカーの設計が重要である。

C.3.1.1.2 薬物動態

IgG抗体では、FcRn結合親和性向上や、抗原非結合型抗体のリサイクリング等を目的とした改変が有用な場合がある。低分子抗体では、Fcとの融合、ア

ルブミンとの融合、FcRn結合性配列の付与、PEG化等が有用とされる。

C.3.1.1.3 免疫原性

抗薬物抗体の産生は、薬物の血中半減期短縮等による有効性の低下、免疫応答による有害作用発生につながる可能性があるため、分子設計の段階で、免疫原性に寄与する構造についても考慮する必要がある。

免疫原性の回避について、今のところ定型化された手法はないが、抗原提示に関わるMHCクラスII分子に結合するペプチド配列（T細胞エピトープ）を推定することや、リード抗体選択に際し、ヒトT細胞の活性化を指標とした*in vitro*アッセイ等が利用されており、ヒトでの抗薬物抗体産生が起りにくいと想定される構造を選択することが望ましい。

C.3.1.2 製剤化

C.3.1.2.1 溶解性

皮下投与製剤では液量が限られ、高濃度の溶液が必要となる。抗体医薬品の投与量は高く、数十mg/ml程度の高濃度の溶液が必要になることもあり、製剤処方の最適化のみでは目的とする濃度での溶液製剤の作製が困難な場合もあり得るため、必要な溶解度を確保できるものを選択する。

C.3.1.2.2 安定性

脱アミドや酸化等の化学的な修飾が生じにくいアミノ酸配列の抗体を選択することが有用である。免疫原性との関与が懸念される凝集体についても、凝集体形成を起こしやすいアミノ酸配列を予測する方法が検討されているため、これらに一致する配列を回避することも有用な可能性がある。

C.3.1.2.3 製造工程

IgG骨格を持つ典型的な抗体医薬品の製造工程としては、プラットフォーム化された技術があり、分子設計の際に考慮すべきことは多くないが、その他の改変抗体では、個別に対応すべき問題を考慮して、分子設計を行う。代表的な例は二重特異性抗体であ

る。2種類のH鎖にそれぞれ鍵と鍵穴となるアミノ酸置換を施し、目的とするH鎖の会合を促進する方法や、L鎖の共通化等、不均一性を低減するための分子設計が重要である。

また、Fcドメインを持たない低分子抗体の精製には、IgG型抗体で汎用されるProtein Aカラムを用いることができないため、別のアフィニティーカラムに結合させるためのアミノ酸配列の導入も考慮する。培養上清中の安定性が悪い等、大量生産に適さない抗体は、除外すべきである。

C.3.2 FIHに向けた改変型抗体医薬品の非臨床試験における留意事項

「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス」(薬食審査発0402第1号 平成24年4月2日)においてリスク要因とされている標的分子（作用部位）の特性や、モデル動物の妥当性を検証する際、改変抗体医薬品に共通の課題として、Fc受容体との結合性/活性化能の種差とヒトへの外挿性を考慮する必要がある。また、ヒト初回投与試験投与量の設定には、推定最小薬理作用量（MABEL）の利用を考慮することが有用である。

C.3.2.1 Fc γ 受容体の関与する薬理作用、安全性の非臨床評価

C.3.2.1.1 Fc γ 受容体と改変型抗体医薬品

抗体医薬品ではFc領域の機能が薬理作用の発揮に直接的に関与することはもとより、天然型のIgG骨格を有する生体内の抗体に比べて過剰な免疫エフェクター細胞の活性化を誘導する可能性が高いことから、臨床試験の実施に先立ち、非臨床試験においてFc γ 受容体を介した薬理作用に関して十分な評価を行うことが重要である。

抗体医薬品の非臨床薬理試験および非臨床毒性試験においては一般にマウス等の齧歯類やカニクイザル等の非ヒト霊長類を試験動物として用いるが、これら実験動物とヒトとではFc γ 受容体の種類や免疫細胞における発現分布に種差があることから、非臨床試験結果をヒトに外挿する際には注意が必要である。

C. 3. 2. 1. 2 Fc γ 受容体の関与する薬理作用、安全性 の非臨床評価とヒトへの外挿性

抗体医薬品の非臨床薬理試験においては、病態モデルとしてヒトの標的タンパク質（抗原）を遺伝子導入したトランスジェニックマウスやヒト癌細胞を移植した担癌マウスが用いられることが多い。これらのモデルマウスを用いた試験は抗体医薬品の作用機序の理解や*in vivo*での薬理作用の評価という点で有用であるが、免疫エフェクター細胞を介した薬理作用を発揮する抗体医薬品では、先に述べたFc γ 受容体の種差が薬理作用の発現に影響を及ぼす可能性を十分に考慮すべきである。

近年ではバイオ医薬品のヒト初回投与量の算出にあたり、非臨床薬理試験に基づいた推定最小薬理作用量（MABEL：Minimal Anticipated Biological Effect Level）を考慮することが求められているが、発現している受容体の種類の違い等から、マウスを用いた試験では、Fc γ 受容体を介した薬理作用のヒトへの外挿は困難であると言えるだろう。また抗体医薬品の毒性は薬理作用の延長として発現することが多いことから、非臨床毒性試験にマウスを用いた際には、Fc γ 受容体を介した薬理作用の種差により毒性発現に達する用量が異なる可能性も考慮する必要がある。

カニクイザルなどの非ヒト霊長類はヒトに近い構造と発現分布を示すFc γ 受容体を有しており、抗体医薬品の非臨床試験において有用な実験動物であるといえる。マウスとは異なり病態モデルの作製が困難であるため非臨床薬理試験への適応は難しいが、既承認の抗体医薬品においても非臨床毒性試験に用いられることが多い。一方で、マウスに比べて非ヒト霊長類のFc γ 受容体とヒトIgGとの相互作用については未解明な点が多く、非臨床試験の実施にあたってはヒトとの間で潜在的な差異が存在する可能性を考慮すべきであろう。

Fc γ 受容体を介した薬理作用に関しては実験動物を用いた非臨床試験のヒトへの外挿が困難なケースが多いと考えられる。特にヒト初回投与量の算出にあたっては、ヒト細胞等を用いた*in vitro*の薬理試験結果を合わせた考察が不可欠である。

我々はこれまでに、ヒトIgG-Fc領域を持つ抗体医

薬品とマウス及びカニクイザルのFc γ 受容体結合親和性の解析を行い、Fc γ 受容体結合性の種差を見出している。動物を用いた次世代抗体医薬品の非臨床試験では、Fc γ 受容体ファミリーを構成する分子種や、発現している細胞、及び、各Fc γ 受容体との結合性が、ヒトと異なる可能性を考慮して、試験結果を解釈する必要があるだろう。

C. 3. 2. 2 FcRnの関与する体内動態の非臨床評価

C. 3. 2. 2. 1 FcRn親和性改変抗体の血中半減期に関する非臨床評価とヒトへの外挿性

改変体の評価においては、FcRn結合親和性に加え、FcRn結合のpH依存性が重要事項の一つになる。ヒトでの血中半減期は、マウスやサルよりもヒトFcRnトランスジェニックマウスでの血中半減期と相関性が高いとの報告もあり、体内動態の動物からヒトへの外挿においては、試験に用いる動物に発現しているFcRnとの結合特性の影響を考慮する必要がある。

C. 3. 2. 2. 2 FcRn結合親和性改変の生体内分布等への影響

FcRnは、IgGのリサイクリングのみならず、トランスサイトーシスを担う受容体でもあるため、FcRn親和性改変の体内動態については、血中半減期の他、局所での動態が変化する可能性についても考慮する必要がある。これまで、FcRn結合親和性向上により、皮下投与後のバイオアベイラビリティが向上した例や、腫瘍局所での利用効率の向上が示唆された例がある。また、FcRn親和性の違いと体内分布の関係については未解明な点も多く、FcRn親和性改変抗体では、体内分布が変化し、治療効果に影響を与える可能性があるため、体内分布についても考慮すべきであろう。

その他、FcRn結合親和性改変が、Fc γ 受容体結合親和性に影響することが報告されており、FcRn親和性改変を意図したアミノ酸置換により、FcRn結合性以外にも影響が生じるケースも少なくないと想定される。次世代抗体の評価においては、ヒトFcRnとの結合親和性や結合のpH依存性といった目的の特性を持つことを確認すると共に、抗原、Fc γ 受容体、補

体との結合性について、野生型と比較しながら、各種の生物活性を明らかにすることが、その後の非臨床・臨床試験を進める上で、有用と考えられる。

D. 考察

抗体等タンパク質製剤の非臨床試験では、標的分子結合性の種差が課題となるが、改変抗体では、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性や、infusion reaction 等の有害反応に関わるFc γ 受容体等との結合性に関しても、ヒトへの外挿性を考慮する必要がある。SPR法を用いたFc γ 受容体結合性解析法や、Fc γ 受容体発現レポーター細胞を用いたFc γ 受容体活性化能解析法は、抗体、Fc融合タンパク質の改変タンパク質製剤の評価手法として有用と考えられた。近年、Fc改変タンパク質製剤の開発が増えていることから、これらの評価法を活用し、非臨床試験の段階でヒトでの作用を適切に予測することが、FIH安全性確保に役立つと考えられる。

E. 結論

- (1) SPR法を用いた結合親和性評価により、Fc γ 受容体結合性の種差を明らかにし、抗体等改変タンパク質製剤の薬理作用の外挿性には、Fc γ 受容体結合性を考慮すべきであることを明らかにした。
- (2) 改変タンパク質製剤の候補となるLF-Fcの特性解析により、これまでに構築したFc受容体との結合性、及び、Fc γ 受容体活性化能の評価系の有用性を明らかにした。
- (3) 改変タンパク質製剤の分子設計から非臨床評価までの留意事項を明らかにした。

F. 研究発表

(1) 原著および総説

- 1) Tada M, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Kawasaki N: Development of a cell-based assay measuring the activation of Fc γ RIIIa for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies *PLOS ONE* 9(4), e95787 (2014)
- 2) 石井明子, 川崎ナナ: 第13章第2節 バイオ医薬品 (組換えタンパク質医薬品) の品質関連規

制と対応の留意点 動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術 pp.523~531 技術情報協会 (2014)

- 3) 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の現状と展望 *ファルマシア* 51(5) (印刷中)
- 4) 角田慎一, 石井明子: 次世代バイオ医薬開発に向けた創薬イノベーション *薬学雑誌* (印刷中)
- 5) 石井明子, 多田稔, 鈴木琢雄, 川崎ナナ: 抗体医薬品の非臨床試験 *薬学雑誌* (印刷中)

(2) 学会発表

- 1) 石井明子: バイオ医薬品の品質評価に関する最新動向 *JASIS 2014 日本薬局方セミナー* (2014.9) 東京
- 2) 多田稔, 飯田愛未, 近藤昌夫, 石井明子, 川崎ナナ Fc γ 受容体発現レポーター細胞を用いたADCC活性を有する抗体医薬品候補クローンの選別 第87回日本生化学会大会 (2014.10) 京都
- 3) A. Ishii-Watabe, M. Tada, T. Suzuki, C. Miyama, N. Kawasaki: Analysis of the binding properties of therapeutic monoclonal antibodies to human, cynomolgus and mouse Fc γ receptors 2014 AAPS Annual Meeting, (2014.11) San Diego
- 4) M. Tada, A. Ishii-Watabe, T. Suzuki, N. Kawasaki: Fc γ RIIIa Reporter Cell Assay for the Characterization of Therapeutic Monoclonal Antibodies 2014 AAPS Annual Meeting, (2014.11) San Diego
- 5) T. Suzuki, C. Miyazaki, A. Ishii-Watabe, M. Tada, T. Kawanishi, N. Kawasaki: Development of a fluorescence imaging method of therapeutic antibodies, which can distinguish degraded products from non-degraded antibodies 2014 AAPS Annual Meeting, (2014.11) San Diego
- 6) 村田大輔, 志賀有貴, 大島裕太, 小島由載, 杉本晃規, 多田稔, 石井明子, 竹内崇, 佐藤淳:

IgG Fc融合技術を応用したヒトラクトフェリンの医薬品展開 日本ラクトフェリン学会第6回学術集会 (2014.11) 筑波

- 7) 石井明子：抗体医薬品 さらなる発展への課題：規制の観点から 第39回日本薬学会関東支部学術講演会 (2014.12) 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

- (1) 特許取得 なし
(2) 実用新案登録 なし
(3) その他 なし

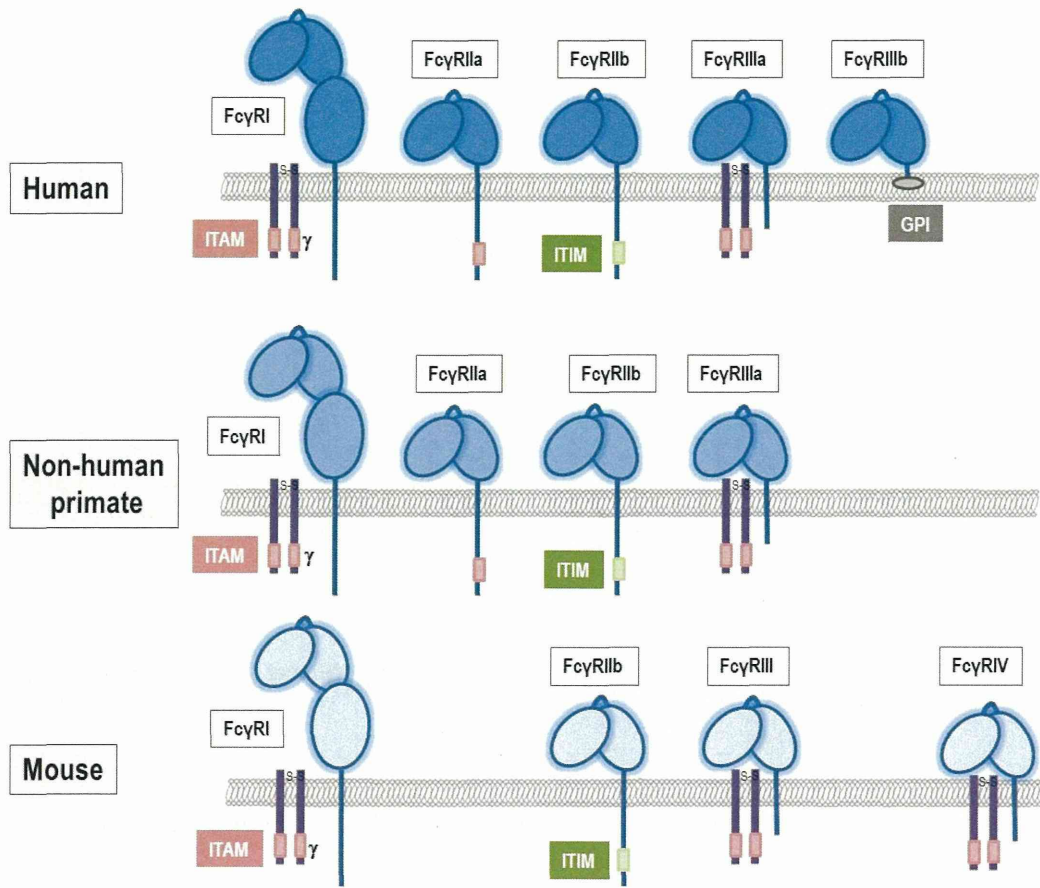


図1 ヒト、非ヒト霊長類、マウスのFc γ 受容体ファミリー

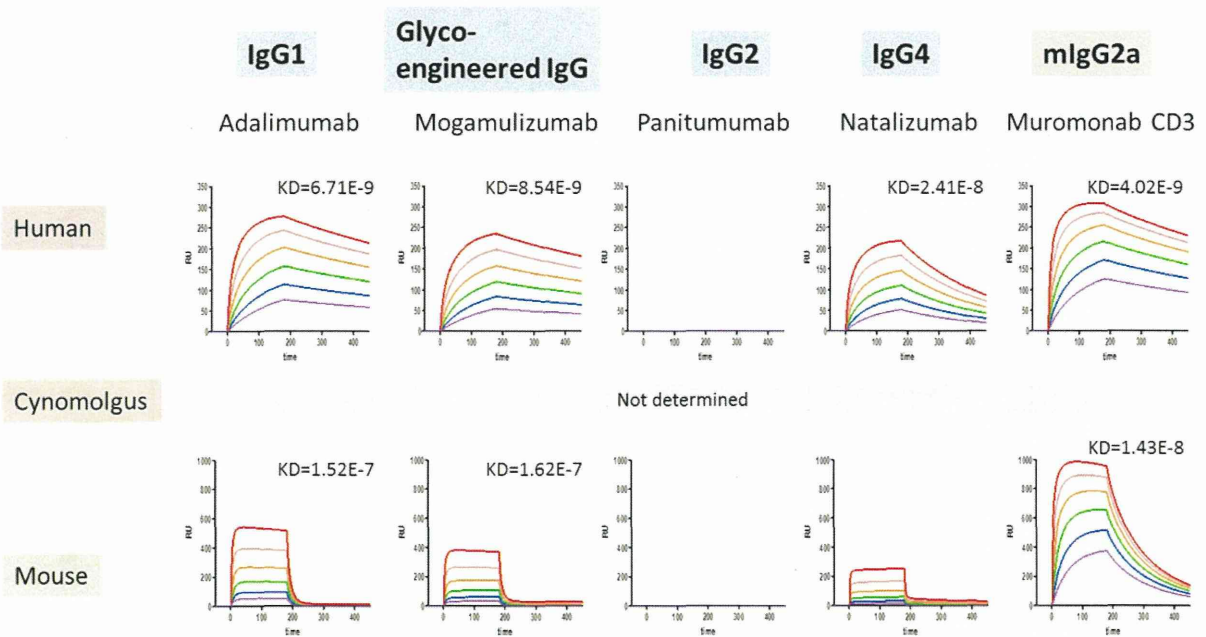


図2 ヒト、及び、マウスFc γ RIに対する抗体医薬品の結合親和性

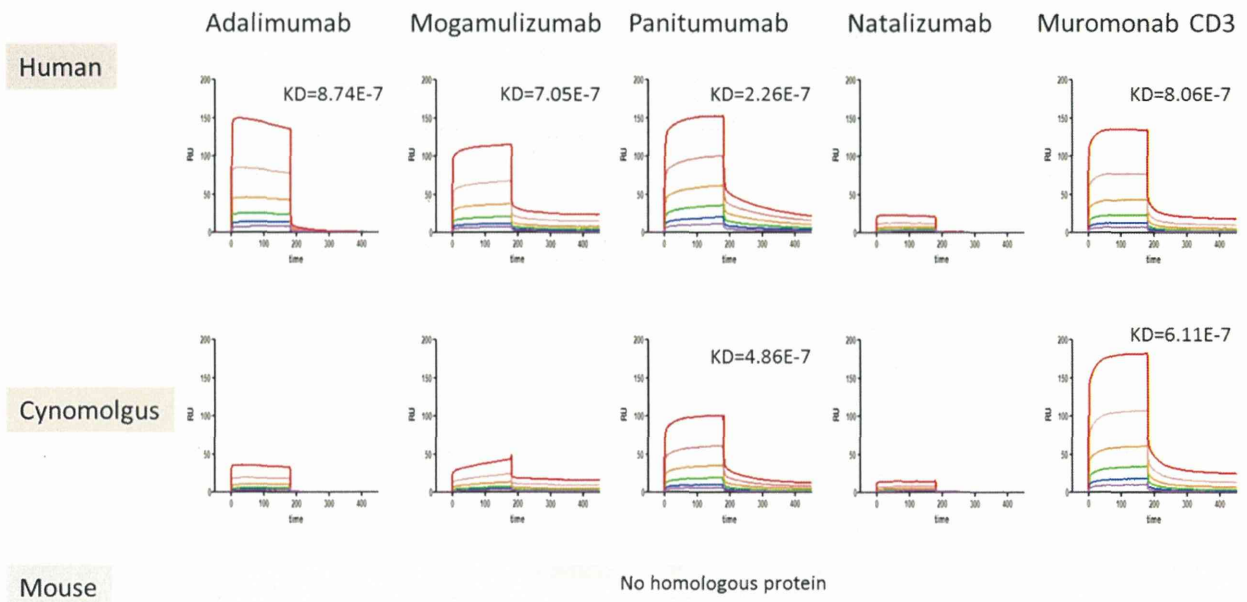


図3 ヒト、及び、カニクイザルFcγRIIaに対する抗体医薬品の結合親和性

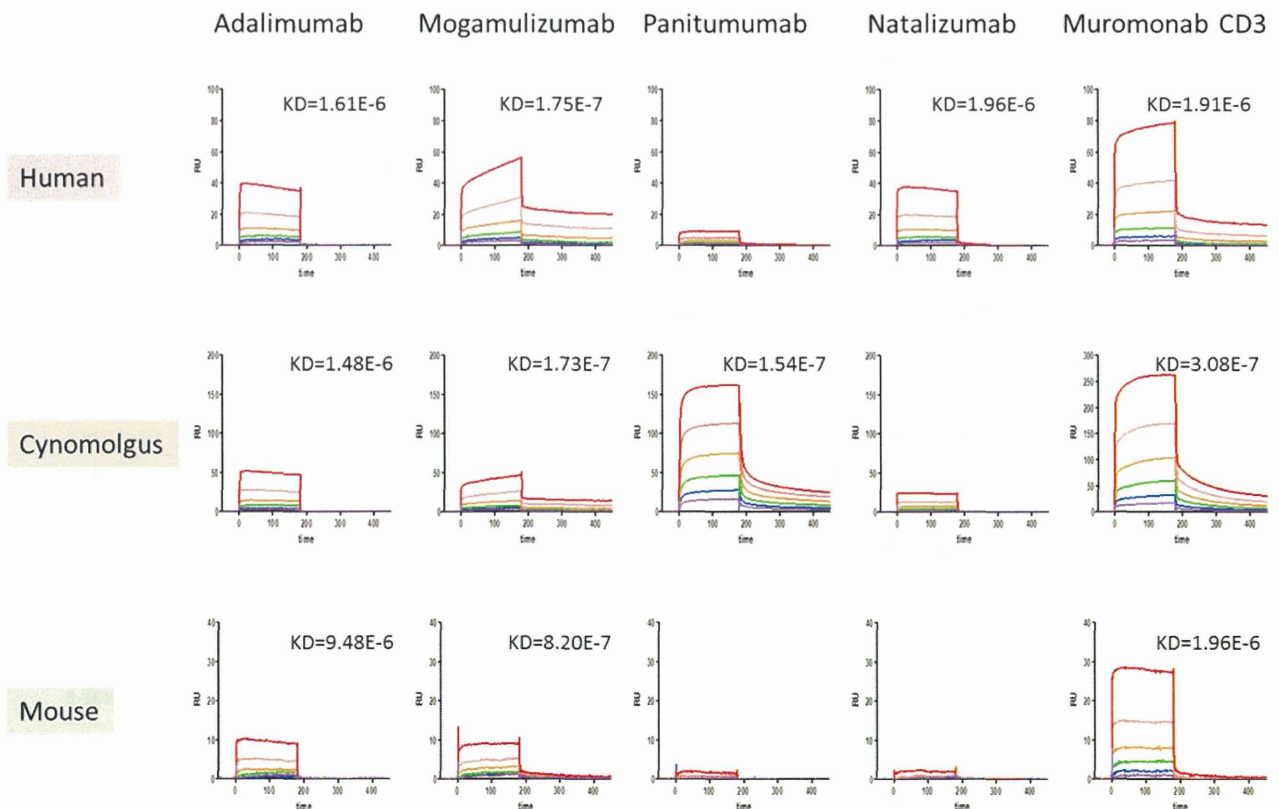


図4 ヒト、カニクイザル、マウスFcγRIIbに対する抗体医薬品の結合親和性

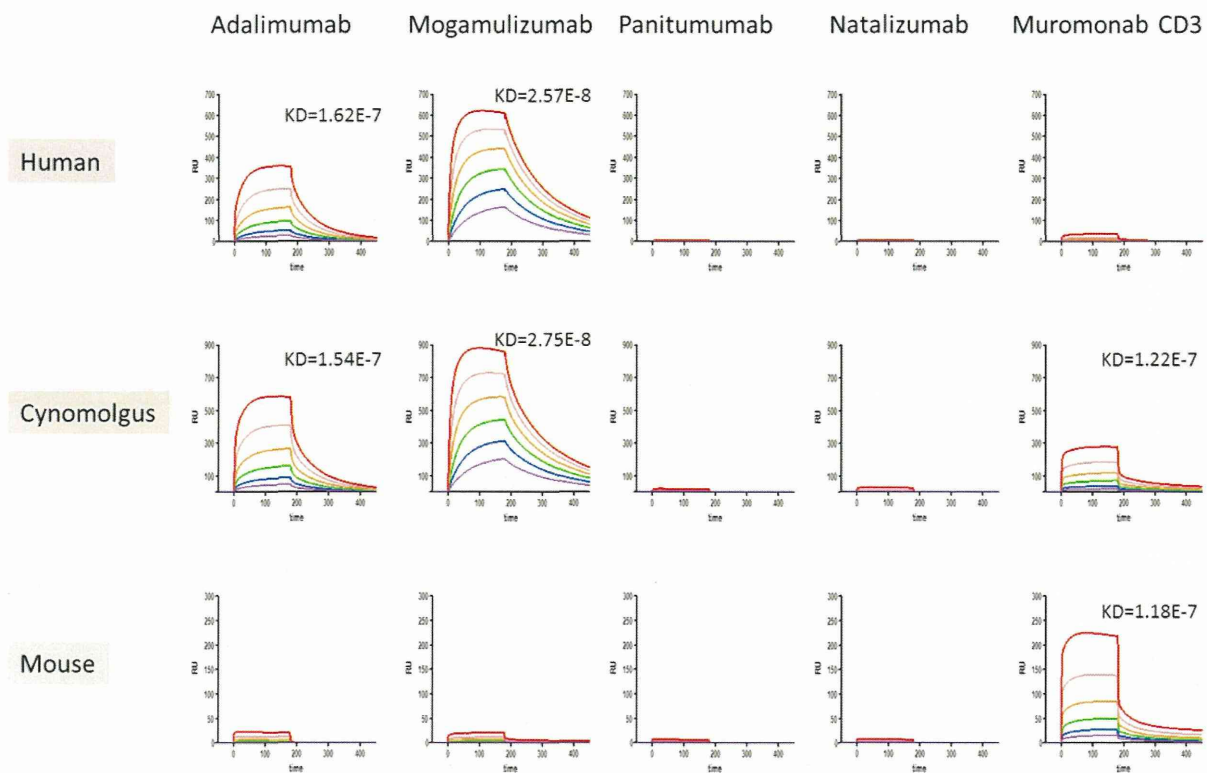


図5 ヒト、カニクイザル、マウスFcγRIIIaに対する抗体医薬品の結合親和性

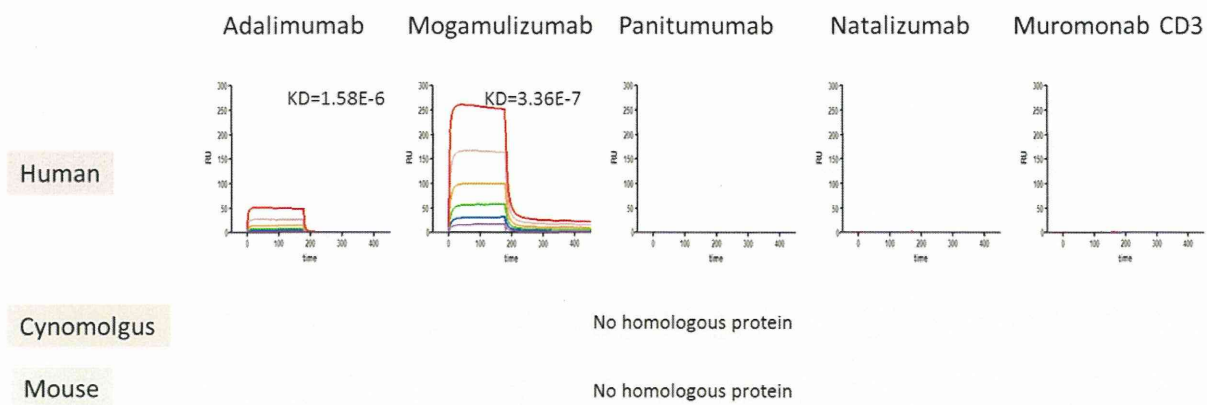


図6 ヒトFcγRIIIbに対する抗体医薬品の結合親和性