

核酸医薬品に由来する代謝物の評価

ICH S6 対応研究班^{*1}

Considerations on the Preclinical Safety Assessment of Metabolites of Chemical Moiety of Oligonucleotide Therapeutics

Working Group for the ICH S6 & Related Issues^{*1}

1. はじめに

オリゴヌクレオチド製剤(核酸医薬品)は、標的分子の転写や翻訳といった、遺伝子発現の制御を標的とすることから極めて特異性の高い治療薬となりうる反面、生体内ではヌクレアーゼによる分解を受けやすく、局所投与でない限り標的部位(細胞/組織/臓器)への送達性が低いことが課題とされてきました。このため、現在開発中の多くの核酸医薬品では、ヌクレオシドやリン酸ジエステル結合部分への修飾、更に他分子(ペプチド、糖、PEGなど)との

コンジュゲート化など、血中動態や組織移行性の改善を目指した様々な化学修飾が試みられています¹⁾。このように様々な化学修飾を受けた核酸医薬品は、未変化体のまま、又はより低分子の様々な代謝物となって生体内に分布した後、排泄されるものと考えられます。

生体内で核酸医薬品が代謝物に変化する過程としては、ヌクレアーゼによる分解と、それ以外の例えば肝酵素による代謝などが考えられます。核酸成分がヌクレアーゼで分解されてより短い核酸配列や単一の核酸になることは、バイオ医薬品がペプチダーゼでアミノ酸に分解されることと

^{*1} 平成 27 年度日本医療研究開発機構研究費(医薬品等規制調和・評価研究事業)「医薬品の安全性および品質確保のための医薬品規制に係る国際調和の推進に関する研究」(研究代表者:西川秋佳)の分担研究「S6: バイオ/核酸医薬品の安全性に関する研究」研究班(ICH S6 対応研究班), 研究分担者:平林 容子(Yoko Hirabayashi)^{*2}, 協力研究者:真木 一茂(Kazushige Maki)^{*3}, 笛木 修(Osamu Fueki)^{*3}, 松本 峰男(Mineo Matsumoto)^{*3}, 渡部 一人(Kazuto Watanabe)^{*4}, 木下 潔(Kiyoshi Kinoshita)^{*5}, 中澤 隆弘(Takahiro Nakazawa)^{*6}, 小比賀 聡(Satoshi Obika)^{*7}, 荒戸 照世(Teruyo Arato)^{*8}, オブザーバー:小野寺 博志(Hiroshi Onodera)^{*3}, 篠田 和俊(Kazutoshi Shinoda)^{*3}

^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyohga, Setagayaku, Tokyo 158-8501, Japan

^{*3} 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞が関 3-3-2 新霞ヶ関ビル (〒100-0013)

Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA), Shin-Kasumigaseki Building, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyodaku, Tokyo 100-0013, Japan

^{*4} 中外製薬株式会社 静岡県御殿場市駒門 1-135 (〒412-8513)

Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., 1-135 Komakado, Gotenbashi, Shizuoka 412-8513, Japan

^{*5} MSD 株式会社 東京都千代田区九段北 1-13-12 北の丸スクエア (〒102-8667)

MSD KK., Kitanomaru Square, 1-13-12, Kudan-Kita, Chiyodaku, Tokyo 102-8667, Japan

^{*6} アンジェス MG 株式会社 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-7-15 彩都バイオインキュベータ 4 階 (〒567-0085)

AnGes MG, Inc., 4F, Saito Bio-Incubator, 7-7-15, Saito-asagi, Ibaraki, Osaka, 567-0085, Japan

^{*7} 大阪大学大学院薬学研究科 大阪府吹田市山田丘 1-6 (〒565-0871)

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suitashi, Osaka 565-0871, Japan

^{*8} 北海道大学大学院医学研究科 札幌市北区北 15 条西 7 丁目 (〒060-8638)

Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Kita 15, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan

類似しています。天然型の核酸成分からなる代謝物であれば、最終的には単一の核酸となって再取込・再利用されるものと考えられます。他方、化学修飾された核酸がヌクレアーゼで分解され、単一の非天然型核酸となった場合、ヒトのDNA/RNAに取り込まれたり代謝拮抗作用を有する可能性も否定できません²⁾。また、化学修飾部分がヌクレアーゼによるものとは異なる代謝を受けた場合、その代謝物が想定外の影響を引き起こす可能性も考えられます。

このように、核酸医薬品の化学修飾部分を含む代謝物の毒性について、現時点では知識や経験の蓄積が十分ではありません。しかし、このような毒性の多くは、従来の低分子化学合成医薬品の代謝物の毒性と同じように、通常の*in vitro/in vivo* 毒性試験により検出が可能と考えられます。核酸医薬品の代謝物のヒトに対する配列特異的な毒性は試験動物で検出することはできませんが、その場合にも核酸医薬品ならではの予測手法を活用することにより、毒性を予測することが可能な場合があると考えられます。

本稿では、核酸医薬品及びその代謝物による毒性を、「ハイブリダイゼーション」、「核酸の性質」などをキーワードとして便宜的に分類し、更に、核酸医薬品及びその代謝物による毒性を予測するための種々の方法について、現時点で考えておくべきポイントを整理してみました。

2. ハイブリダイゼーションによる毒性

多くの核酸医薬品の薬効は、標的となる核酸配列にハイブリダイズすることにより発現します(アプタマーを除く)。しかし、標的となる核酸配列にハイブリダイズして生じる作用が想定以上に強いと、過剰な薬理作用となって毒性が発現する可能性があります(オンターゲット毒性)

(Fig. 1)。また、標的と類似した配列に核酸医薬品がクロスハイブリダイズして、標的以外の分子を介した意図しない毒性が発現することも考えられます(狭義のオフターゲット毒性)。

核酸成分由来の代謝物における配列長は、親化合物の配列より短いことから、理論的にはハイブリダイゼーション可能な配列数が親化合物より増えることとなります。しかし、核酸医薬品における核酸配列の長さは、標的となる配列に対して適切な結合親和性と配列特異性を有し、薬効を発現できるように最適化されているため、多くの場合、単一のミスマッチでさえ薬理作用が減弱し、二つ以上のミスマッチではその作用がほとんど又は完全に欠損する程度にまで減弱するとされています³⁾。したがって、親化合物の断片である核酸成分由来代謝物では、配列が短くなると相補鎖に対する結合親和性が低下することで、ハイブリダイゼーションによるオンターゲット毒性(過剰な薬理作用)やクロスハイブリダイゼーションによる狭義のオフターゲット毒性の生じる可能性は、親化合物である核酸医薬品のそれらと比較して、低いものと考えられます。

なお、これまでオリゴヌクレオチド製剤において、明確なオンターゲット毒性に加えてクロスハイブリダイゼーションに起因する狭義のオフターゲット毒性が臨床でみられた報告がないことから⁴⁾、これら薬剤の代謝物によるクロスハイブリダイゼーションに起因する毒性も検出されていないものと考えられます。その理由として、親化合物による意図しないクロスハイブリダイゼーションは、*in silico* 解析(データベース検索による解析)及びヒト由来試料を用いた*in vitro* 系でのマイクロアレイ解析などにより予測可能であることから、スクリーニングの段階で懸念のある配列が除外されているためではないかと考察されています。

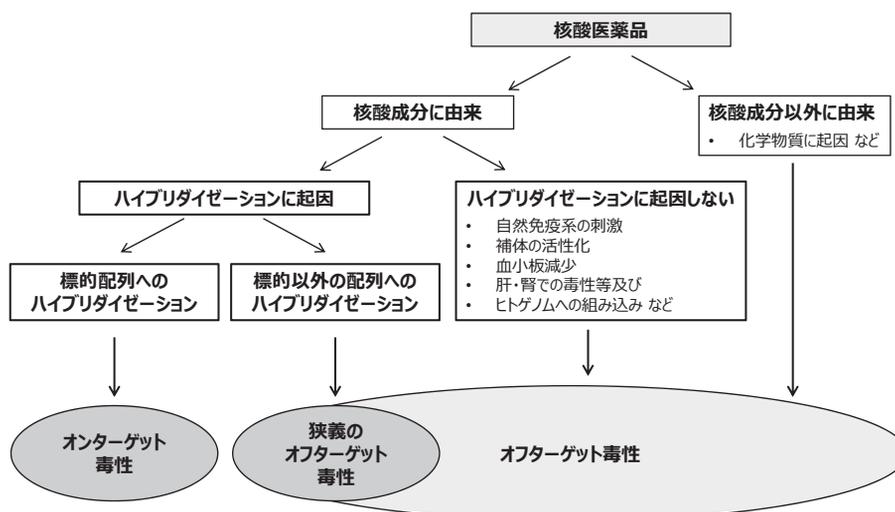


Fig.1 核酸医薬品による毒性の分類

3. 核酸の性質に由来する毒性

核酸の性質すなわち核酸分子特有の構造や物理化学的特性により惹起される毒性として、Toll 様受容体 (Toll like receptor : TLR) を介した自然免疫系の活性化⁵⁾、血漿蛋白の結合に起因する急性・一過性変化 (活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) 延長など)⁶⁾、補体活性化、血小板数減少、高濃度分布臓器 (肝臓、腎臓など) での影響などが知られています⁷⁾ (Fig. 1)。核酸成分に由来する代謝物によってもこれらの毒性が生じる可能性があります。核酸医薬品の代謝物による毒性は、親化合物の毒性評価時に併せて検討することが可能と考えます。なお、免疫系の活性化や肝毒性並びに血小板減少などはヒト以外の霊長類 (non-human primate, 以下 NHP) よりげっ歯類で強くみられるとされており⁸⁾、また、Kynamro[®] (Mipomersen sodium) ではマウスのほうがカニクイザルより腎毒性が弱いなど⁹⁾、核酸医薬品による毒性プロファイルには種差が認められており、これらの副作用のヒトへの外挿には注意が必要です。

核酸成分に由来する毒性変化は、従来の一般毒性試験などで捕捉することが可能です。その変化が親化合物に起因するものか、それとも代謝物に起因するものかの判別は困難ですが、重篤な毒性を認めた際には種差に注意しながらその発現メカニズムを追究することにより、ヒトでの安全性確保に向けたリスクコミュニケーションに重要な情報が得られることも考えられます。

核酸医薬品ではヌクレアーゼに対する抵抗性を考慮した化学修飾が行われていますが、単一又はごく短いヌクレオシドに分解されることで生成する修飾ヌクレオシドによる毒性は考慮する必要があります。更にこれらの修飾ヌクレオシドがヒト DNA/RNA に非特異的に取り込まれ、何らかの影響を及ぼす可能性についても否定できません。これらの懸念については、5章で述べるように、*in vitro* や *ex vivo* の試験系でその影響を予測することができると考えられます。

4. 核酸の性質に由来しない毒性

化学修飾を受けた核酸医薬品においても、ヌクレアーゼ以外の代謝 (例えば肝代謝) により代謝物が生じることも考えられます。ヒト及び動物の *in vitro* 肝臓試料と共に核酸医薬品をインキュベーションし、代謝物プロファイルの類似が認められれば、低分子化合物と同様、その動物を用いた親化合物の毒性試験と併せて代謝物の安全性も評価できると考えます (Fig. 2)。

体内での安定性や標的への送達性を高めるため他分子 (ペプチド、糖、PEG など) とのコンジュゲート構造を有する核酸医薬品については、付加分子及びその代謝物の安全性を考察する必要があると考えます。入手可能な情報があればそれを有効活用すべきですが、付加分子が新規物質であるなどの理由から背景情報がない又は極めて乏しい場合には、適切な方法で付加分子単体での安全性を確認して

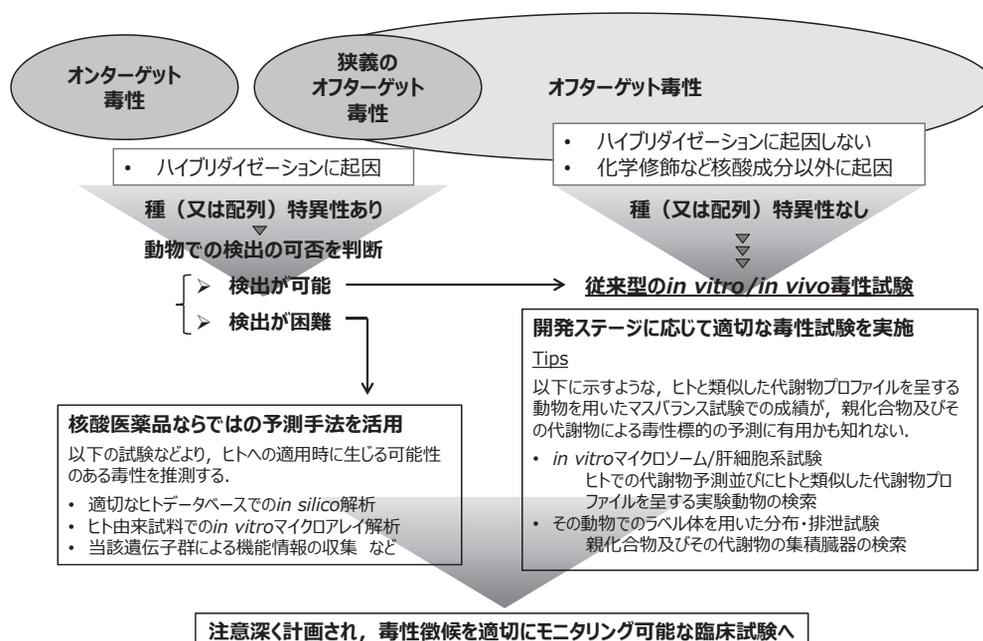


Fig.2 核酸医薬品及びその代謝物によるヒト副作用発現の予測

おく必要があると考えます。

5. 代謝物の安全性評価

通常、核酸医薬品の標的はヒトの塩基配列であるため、塩基配列とその配列に結合することで誘導される機能とが、ヒトと実験動物で完全又はほぼ完全に一致する場合には、当該動物においてハイブリダイゼーションに起因する毒性の検出が可能と考えられます。しかし、現実的には塩基配列やその機能が、毒性試験に汎用される動物種(げっ歯類など)とヒトで一致しない場合がほとんどです。したがって、このような場合にはヒトで発現する可能性のある毒性を、動物試験の成績から正しく検出することはできません (Fig. 2)。しかし、核酸医薬品(親化合物)の設計時には、*in silico* 解析や *in vitro* 系でのマイクロアレイ解析など、核酸医薬品ならではの予測手法を駆使して、より特異性の高いターゲット配列の選択が行われており、ターゲット配列以外とハイブリダイズする危険性を低減しています。また、2章で述べたとおり、核酸医薬品の配列長は最適化されており、それより短い配列では作用が减弱します。したがって、親化合物と比較して配列がより短くなった代謝物により、ハイブリダイゼーションに起因する毒性が生じる可能性は、極めて低いと推測されます。

ハイブリダイゼーションに起因しない毒性については、適切な動物種を用いた一連の毒性試験により検出できると考えられます (Fig. 2)。現実的には親化合物である核酸医薬品の安全性評価時に併せて代謝物の評価を行うこととなりますが、ヌクレアーゼ溶液とのインキュベーション試験により抗ヌクレアーゼ耐性を確認しておくこと、更に、ヒト及び動物の *in vitro* マイクロソーム/肝細胞系試験で代謝物の類似性を確認することで、毒性試験や組織分布試験を実施する適切な動物種を選択することができます (Fig. 2)。適切な動物でのラベル体を用いた分布・排泄試験で未変化体及び代謝物の集積する臓器・組織の特定や排泄経路を推定することにより、一般毒性試験の成績と併せてヒトでの毒性標的臓器を予測できると考えられます。例えば、全身投与を前提とした初の核酸医薬品である Kynamro[®] は、ホスホ チオエート骨格と糖の 2'-*O*-methoxyethyl (2'-MOE) 修飾を付加することにより、血中半減期が約 20-50 日に延長しましたが、*in vitro* 試験においてヒト肝マイクロソームや培養肝細胞では代謝されませんでした^{9,10}。動物の *in vivo* 試験においても組織中から検出された大部分が未変化体であり、本薬は一定期間体内に留まった後、未変化体もしくはより短いオリゴヌクレオチドとなって尿中に排泄されることが判明しました。これらの検討より、Kynamro[®] の場合については、高濃度に集積する

腎臓が主要な標的臓器ですが、ヌクレアーゼ以外による代謝はみられないと推測されました。このような試験結果は、臨床試験実施時のモニタリングや副作用の軽減策などのリスクコミュニケーションに有用な情報を提供できるものと考えられます。なお、第一世代のオリゴヌクレオチド (phosphorothioate oligodexynucleotide) と第二世代のオリゴヌクレオチド (2'-MOE 修飾) では、共に、マウス及び NHP で共通にみられる毒性所見 (アンチセンスの class-effect) として、aPTT 延長、炎症誘発作用、補体活性化、尿細管の変化 (顆粒、空胞、変性/再生像) 及び血小板減少症が知られています^{7,11}。血小板減少症を除き、それぞれの発現機序は、第 X 因子活性化複合体阻害、単球/樹状細胞の活性化を介したサイトカイン放出、補体制御因子 factor H 阻害及び腎臓中オリゴヌクレオチド濃度によると考えられており、ヒトでは関連する変化として、aPTT 延長、炎症誘発作用 (発熱、投与部位発赤) 及び血小板減少症が観察されています¹¹。

修飾ヌクレオチドについては、これまでの核酸医薬品で問題となった事例はありませんが、過去に核酸アナログの抗がん剤において問題となったような、細胞毒性やヒト DNA/RNA への取り込みについても考えておく必要があります。ヌクレオチドは一般的には代謝活性化(リン酸化によるヌクレオチドへの代謝)されるので、その際には種々の核酸代謝酵素の阻害に繋がり、結果として細胞毒性を示す可能性があります¹²。これを確認するためには、ヌクレオチド系代謝拮抗剤に対して感受性の高い細胞 (例えば CCRF-CEM 細胞株) などを用いて、修飾ヌクレオチドの *in vitro* 試験を実施することで、細胞毒性の有無を確認することができます。ただし、その際の試験条件、特に薬液濃度や細胞内への送達の方法については考慮が必要です。また、修飾ヌクレオチドが宿主の DNA に取り込まれる可能性については、*in vivo* で核酸医薬品を一定期間反復投与した後の高蓄積臓器・組織由来の DNA を直接調べることや、これらの臓器・組織における遺伝毒性を調べること、あるいは修飾ヌクレオチドを用いた *in vitro* 形質転換試験により、何らかの示唆が得られるものと考えられます。核酸医薬品で生成する代謝物により細胞毒性やヒト DNA/RNA への取り込みが起るかどうか検討するために、既知の修飾ヌクレオチドの構造毒性相関データベースも有効活用できるかもしれません。

6. 終わりに

核酸医薬品の代謝物の安全性評価において、特に懸念がなければ代謝物を単離精製して独立した試験で安全性を検討する必要はなく、適切な動物種を用いた *in vivo* 試験で

親化合物(未変化体)の影響と併せて包括的に評価することができると考えます。しかし、長期にわたり生体内で安定して存在する代謝物や、いわゆるプロドラッグ的な設計により代謝物が薬効成分となるなど特段の懸念がある場合は、これら代謝物の安全性を個別に検討した方が良い場合もあると考えられます。

これからも新しいタイプの核酸医薬品が登場することが予想されており、親和性や送達効率の著しく高い修飾構造を保持した代謝物が生じる可能性もあります。このような性質を有する新規核酸医薬品の安全性を評価する際には、その薬剤の特徴を考慮して適切な方法を探るとともに、臨床試験実施時には適切なリスク軽減の方策を講じておくことが重要であると考えます。

文 献

- 1) 平成 25 年度 規制動向調査報告書：核酸医薬品の開発と規制の動向。2013, HS レポート No.82.
- 2) 大谷章雄, 池田孝則, 石川誠, 大信田系裕, 河合陸文, 里見嘉英, 高垣和史, 恒成一郎, 内藤真策, 花田貴宣, 藤田卓二, 堀川隆司, 渡部一人, 中澤隆弘, 佐神文郎, 三分一所厚司. 核酸医薬品の非臨床安全性評価の課題. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2010, 41 (2), p.158-163.
- 3) Kornbrust, D.; Cavagnaro, J.; Levin, A.; Foy, J.; Pavco, P.; Gamba-Vitalo, C.; Guimond, A. Oligo safety working group exaggerated pharmacology subcommittee consensus document. *Nucleic Acids Ther.* 2013, 23 (1), p.21-28.
- 4) Lindow, M.; Vornlocher, H-P.; Riley, D.; Kornbrust, DJ.; Burchard, J.; Whiteley, LO.; Kamens, J.; Thompson, JD.; Nochur, S.; Younis, H.; Bartz, S.; Parry, J.; Ferrari, N.; Henry, SP.; Levin, AA. Assessing unintended hybridization-induced biological effects of oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* 2012, 30 (10), p.920-923.
- 5) Kleinman, ME.; Yamada, K.; Takeda, A.; Chandrasekaran, V.; Nozaki, M.; Baffi, JZ.; Albuquerque, RJ.; Yamasaki, S.; Itaya, M.; Pan, Y.; Appukuttan, B.; Gibbs, D.; Yang, Z.; Karikó, K.; Ambati, BK.; Wilgus, TA.; DiPietro, LA.; Sakurai, E.; Zhang, K.; Smith, JR.; Taylor, EW.; Ambati, J. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature.* 2008, 452 (7187), p.591-597.
- 6) Sheehan, JP.; Lan, HC. Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex. *Blood.* 1998, 92 (5), p.1617-1625.
- 7) 荒戸照世. 核酸医薬の新潮流：核酸医薬をめぐる規制の動向. *Pharma. Tech. Japan.* 2013, 29 (13), p.2637-2642.
- 8) 宮川伸. 核酸医薬の毒性と安全性. 医学のあゆみ. 2011, 238 (5), p.519-523.
- 9) Food and Drug Administration Center for Drug evaluation and Research. 2013, FDA Briefing Document NDA 203568. Mipomersen Sodium Injection.
- 10) Crooke, ST.; Geary, RS. Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 2013, 76 (2), p.269-276.
- 11) Henry, SP.; Kim, T-W.; Kramer-Stickland, K.; Zanardi, TA.; Fey, RA.; Levin, AA. "Toxicologic properties of 2'-O-Methoxyethyl chimeric antisense inhibitors in animals and man." *Antisense Drug Technology - Principles, Strategies, and Applications.* 2nd ed. Crooke ST ed. CRC Press, 2008, p.327-363.
- 12) 松田彰. ヌクレアーゼ抵抗性化学修飾核酸の開発研究. *Yakugaku Zasshi.* 2011, 131 (2), p. 285-298.