

革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業（厚生労働省）

課題名：核酸医薬の臨床有効性，安全性の評価方法

報告書

本成果物は，厚生労働省の革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業に採択された研究に基づき作成されたものである。

本書は，この事業による人材交流の一環として，独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）との連携の下，核酸医薬の開発に係る品質担保に関する評価及び非臨床安全性評価に関連した試験を実施する際，現時点で考慮しなければならないであろうとされた点や今後の課題になると考えられた点について検討をおこない，その内容についてまとめたものである。

なお，本事業の一環として PMDA の職員が検討過程において助言等を行ったが，当該助言等及び本成果物は PMDA の公式見解ではなく，本事業に採択された大阪大学大学院薬学研究科の責任においてまとめたものである。

平成 29 年 3 月 31 日

大阪大学大学院薬学研究科

目次

I. 大阪大学における取り組み.....	3
1. 目的と方針.....	4
2. 調査体制とスケジュール.....	4
II. 中間報告として作成した核酸医薬開発における課題と留意点.....	6
1. 作成の方針と手順.....	7
2. 中間報告書.....	8
III. 中間報告を基に作成した核酸医薬開発に係る考慮事項.....	70
1. 作成の方針と手順.....	71
2. 考慮事項.....	71
IV. 考慮事項作成中に懸念された課題と留意点, 盛り込むことが出来なかった内容等.....	108
1. 盛り込むことが出来なかったこと.....	109
2. 懸念された課題と留意点.....	109
3. 臨床試験に関する調査研究から抽出された課題と留意点.....	110

I. 大阪大学における取り組み

1. 目的と方針

1-1. 目的

高コレステロール血症等を対象とした核酸医薬の臨床開発を通じて、核酸医薬の安全性・有効性の評価方法を確立することを目的に実施した。

1-2. 方針

本事業の開始当初は、開始から3年目終了時にはガイダンスの基となる調査研究のまとめを作成し、4年目よりマイクロドーズ試験を含む臨床試験を行うことを目標として、品質の評価及び担保、非臨床安全性評価に係る試験を実施しつつ、核酸医薬のレギュラトリーサイエンスを担う人材を育成し、且つ核酸医薬の安全性・有効性の評価のガイダンス策定に貢献することを方針とした。

しかしながら、本事業の全体計画について、3年目の終了時点において当初計画の見直しを実施し、高コレステロール血症を対象とした核酸医薬の臨床開発は、国立循環器病研究センター研究所（国循）が実施する事業に引き継ぎ、別事業として実施することとした。なお、国循とは密に連携をとりながら、国循が事業を遂行する中で得られた知見等については本調査研究にも生かすこととした。また、ガイダンス等作成の基礎となる調査研究については、作業をしていく中で作成方針の度重なる変更等が生じたことから、3年目にはそれまでに抽出されてきた核酸医薬の実用化に向けた開発を行う上での課題や留意点をまとめることに止め、5年目の終了時に本事業のガイダンス等作成の基礎となる「考慮事項（point to consider）」としてまとめることに目標を変更した。

2. 調査体制とスケジュール

2-1. 調査体制と人材交流

大阪大学大学院薬学研究科を中心として、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）、国立医薬品食品衛生研究所（NIHS）及び国循との連携により、ICH ガイドラインのパート区分と同様の①CMC、②非臨床安全性、及び③臨床試験関連の3つのパートに加え、④オフターゲット効果の評価に関するパートの合計4パートに担当者を振り分け、調査を実施した。特に、①と②のパートに関しては、PMDA から職員を在籍招聘により招聘し、ディスカッションをお

こなったり、アドバイスを頂くなどしつつ調査を実施した。また、④に関しては NIHS が主体となって実施した。さらには、国循が主体となって実施した、高コレステロール血症を対象とした核酸医薬の臨床開発に協力し、核酸医薬の開発に実地に携わることで抽出されてくる課題や留意点も本事業に反映させながら進めることとした。

なお、事業の全期間を通して、PMDA に対して人材を派遣することで、審査業務に係る人材の育成を諮ることを計画していたが、最終年度については、人材の転出等の理由で PMDA に対しての派遣が出来なかった。一方、NIHS 及び国循との間では期間全体を通して人材交流を実施した。

2-2. ガイダンス策定の基盤となる調査・研究に関するスケジュール

平成 24～26 年度：「核酸医薬の開発における留意点と課題について」（中間報告）の作成

平成 27～28 年度：「核酸医薬の品質担保及び非臨床安全性評価に関する考慮事項」の作成

II. 中間報告として作成した核酸医薬開発における 課題と留意点

1. 作成の方針と手順

事業3年目までの中間報告を作成するにあたっては、核酸医薬全般の開発を想定した課題と留意点について、現行のガイドラインを参照しつつ抽出することを主眼としているものの、可能な限りこれらについての解決策も提示することを試みている。従って、本中間報告には現行のガイドラインの範疇を超えた内容が含まれる箇所もある。

作成の手順は以下の通り。

①事業1年目：核酸医薬が人工的に化学合成される分子であることに焦点をあて、核酸医薬と低分子の化学合成医薬品との対比や、化学合成医薬品に適用されるガイドライン等を核酸医薬の開発に用いた場合に生じる課題を、PMDA や NIHS 等と協議を行いながら抽出・精査した。また、核酸医薬の配列依存的なオフターゲット効果の安全性評価に向けた課題については、NIHS が中心となって抽出した。

②事業2年目：品質の評価と担保に関する調査研究に関しては、前年度に抽出した課題を踏まえて、在籍招聘の PMDA 職員や NIHS の職員等と共に既存のガイドラインを参考に第一次草案を作成した。作成した第一次草案を基に、PMDA 職員等による検討及びチェックを経て修正を行うことで第二次草案とした。

非臨床安全性評価に関する調査研究においては、前年度抽出した課題及びオフターゲット効果に関する課題を踏まえて既存のガイドラインを基に第一次草案を作成し、作成した草案について PMDA らと共同で再検討、修正することで第二次草案を作成した。

③事業3年目：品質の評価と担保に関する調査研究に関しては、前年度に作成した第二次草案について、在籍招聘の PMDA 職員や NIHS の職員等と種々意見交換を行い、第三次草案を作成した。また、核酸医薬レギュラトリーサイエンス勉強会において第三次草案を用いて内容を説明し、製薬企業等からの出席者の意見を徴募した。それら内容についても検討を行い、中間取り

纏めを作成した。

非臨床安全性評価に関する調査研究においては、核酸医薬レギュラトリーサイエンス勉強会において前年度に作成した第二次草案を用いて内容を説明し、産官学の出席者から意見を徴募した。それらも含めて第二次草案について PMDA や NIHS 等と共同で再検討、修正することで第三次草案、さらには中間取り纏めを作成した。

これら品質の評価と担保、及び非臨床安全性評価に関する中間取り纏めを一つにすることで、「核酸医薬の開発における留意点と課題について」（中間報告）を作成した。

2. 中間報告書

上記作成の方針と手順に従って作成した「核酸医薬の開発における留意点と課題について」（中間報告）を、次項以降に掲載する。

革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業（厚生労働省）

課題名：核酸医薬の臨床有効性，安全性の評価方法

核酸医薬の開発における留意点と課題について (中間報告)

本成果物は，厚生労働省の革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業に採択された研究に基づき作成されたものである。

本書は，この事業による人材交流の一環として，独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）との連携の下，核酸医薬の開発に係る品質担保に関する評価及び非臨床安全性評価に関連した試験を実施する際，現時点で留意しなければならないであろうとされた点や今後の課題になると考えられた点について検討をおこない，その内容についてまとめたものである。

なお，本事業の一環として PMDA の職員が検討過程において助言等を行ったが，当該助言等及び本成果物は PMDA の公式見解ではなく，本事業に採択された大阪大学大学院薬学研究科の責任においてまとめたものである。

平成 27 年 3 月 31 日
大阪大学大学院薬学研究科

【趣旨】

平成24年度から厚生労働省の「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」が開始された。大阪大学大学院薬学研究科は、本事業において「核酸医薬の臨床有効性、安全性の評価方法」として採択され、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）、国立医薬品食品衛生研究所及び国立循環器病研究センターとの連携の下、核酸医薬の品質評価や非臨床安全性評価に係る調査研究及び試験実施のシミュレーション等をおこない、本研究の基となっている高コレステロール血症を対象とした核酸医薬をモデルケースとして、核酸医薬の実用化に向けた研究を進めている。

本書は、本事業の一環として連携各機関及びその他外部機関の協力を得て、核酸医薬の開発及び規制（核酸医薬の品質管理及び非臨床安全性）に関して、現時点での考え方や留意すべき事項、さらには今後の課題について取り纏めたものである。なお、大阪大学大学院薬学研究科は、取り纏めた留意点及び課題（本書）を広く公開することにより、今後のガイドラインの策定を志向した検討に際して議論の基盤となることを期待している。

本書をまとめるにあたっては、核酸医薬全般の開発を想定して課題と留意点を抽出することに主眼を置いているが、可能な限りこれらについての解決策を提示することを試みている。しかしながら、現時点では核酸医薬についての承認事例が限られており、議論が不十分な箇所も多々存在する。さらに、核酸医薬に関する科学的・技術的な発展も著しいことから、各課題に対する科学的に妥当な解決策については、今後の研究の進展や国内外でおこなわれている試験によって得られる経験など、最新の知見と動向を踏まえて継続的に議論を続けていくことが必要であると考えている。

【本書作成にあたって助言等を行った PMDA 職員】

審議役	山田雅信
新薬審査第三部	笛木 修
ジェネリック医薬品等審査部	高木和則
新薬審査第三部（特任職員）	伊藤浩介 ¹⁾
新薬審査第二部（特任職員）	橘 敬祐 ¹⁾

1) 大阪大学大学院薬学研究科の招聘教員を兼任

目次

核酸医薬の品質管理に関する課題と留意点.....	13
はじめに.....	16
適用対象.....	16
用語・略語の定義.....	17
第一部 品質管理に係る一般原則.....	20
1. 有効成分と類縁物質.....	21
2. 品質管理に関する事柄.....	22
3. 特性の解析.....	25
4. 製剤.....	26
5. 製造.....	27
6. 製品のライフサイクルを通じた品質管理.....	28
第二部 医薬品開発における品質管理に係る留意点.....	30
1. 原薬.....	31
2. 製剤.....	37
核酸医薬の安全性評価のための課題と留意点について	
～ ガイドライン策定を志向した課題の抽出と考察 ～.....	40
用語の定義と略号表.....	43
まえがき（作成方針の概要）.....	44
1. はじめに.....	46
2. 被験物質について.....	47
3. 試験のデザインについて.....	48
4. 安全性薬理試験，副次的薬理試験及び動態に関する評価.....	52
5. 一般毒性試験.....	54
6. 遺伝毒性試験.....	56
7. 生殖発生毒性試験.....	57
8. がん原性試験.....	59
9. 局所刺激性に関する評価.....	60
10. 免疫毒性試験.....	60
11. ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果に係る考察.....	61
12. 臨床試験に関する考察.....	64
13. 早期探索的臨床試験.....	65

14. 注釈.....	66
15. 参考文献.....	66

核酸医薬の品質管理に関する課題と留意点

中間報告

大阪大学大学院薬学研究科

＜「核酸医薬の品質管理に関する課題と留意点（中間報告）」について＞

本文書は、革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業の一環として、核酸医薬に関する品質ガイドラインの基盤となる課題や留意点の抽出を目的とし、大阪大学大学院薬学研究科が連携機関との協力の下で検討を進めてきた成果に関する中間報告である。

本文書は課題と留意点を抽出することを主眼としているものの、これらについて可能な限り解決策を提示することを試みている。しかしながら、核酸医薬については承認事例が限られており、科学的・技術的な発展も著しいことから、各課題に対する科学的に妥当な解決策については今後の研究の進展及び経験の蓄積を踏まえて、継続的に議論されるべきと考える。したがって、個別の製品の品質管理においては、それぞれの特性を考慮した上で、適切な段階で規制当局と議論することが推奨されると考える。

なお、化学合成される核酸医薬については、創薬段階を通じて主たる医薬品候補化合物の配列・化学修飾の最適化がなされることから、原薬として製造される化合物を「有効成分」としているが、核酸医薬中に含まれる一部の類縁物質については有効成分に匹敵する活性を有する可能性があることから、原薬として製造される化合物を「目的物質」とし、目的物質に匹敵する活性を有する類縁物質については、「目的物質関連物質」とすべきとする指摘もあり、継続した議論が必要と考える。

目次

はじめに.....	16
適用対象.....	16
用語・略語の定義.....	17
第一部 品質管理に係る一般原則.....	20
1. 有効成分と類縁物質.....	21
1.1. 有効成分.....	21
1.2. 類縁物質.....	21
2. 品質管理に関する事柄.....	22
2.1. 有効成分を構成する立体異性体.....	22
2.2. 高次構造等の管理.....	22
2.3. オリゴヌクレオチド類縁物質の管理.....	23
2.4. オリゴヌクレオチド類縁物質の安全性確認.....	24
2.5. その他不純物の管理.....	25
3. 特性の解析.....	25
4. 製剤.....	26
5. 製造.....	27
5.1. 製品品質の一貫性と頑健な製造方法の確立.....	27
5.2. 位置異性体及び立体異性体の管理.....	27
5.3. 出発物質.....	27
5.4. 中間体の分析、製造工程のモニタリングと管理.....	28
6. 製品のライフサイクルを通じた品質管理.....	28
第二部 医薬品開発における品質管理に係る留意点.....	30
1. 原薬.....	31
1.1. 製造.....	31
1.2. 特性.....	32
1.3. 原薬の管理.....	34
1.4. 原薬の安定性.....	37
2. 製剤.....	37
2.1. 製造.....	37
2.2. 製剤の管理.....	37
2.3. 製剤の安定性.....	39

はじめに

核酸医薬の品質管理に関して、不純物の管理や規格及び試験方法に関する既存の ICH ガイドライン (ICH ガイドライン Q3A (R2)、Q3B (R2) 及び Q6A) はオリゴヌクレオチドを対象外としている。化学合成されるオリゴヌクレオチドについて、化学合成医薬品を対象とした既存のガイドラインに示されている原則を部分的に適用することが可能な場合があるが、たとえば不純物の安全性の確認に関する考え方や薬理学的な活性の発現に高次構造の形成が重要となる核酸医薬の管理については、既存の化学合成医薬品を対象としたガイドラインが適用できない場合や不十分な場合がある。このように、低分子量の化学合成医薬品やバイオ医薬品とは異なる特徴を有している核酸医薬の品質を管理するための基本的な考え方を示すことは、核酸医薬の有効性と安全性の確保のために有意義であると考えられる。また、核酸医薬の品質管理に関する課題について議論することは、核酸医薬の開発促進にも役立つものである。

この文書では、核酸医薬の品質管理に関する留意点や考え方を提案することを目的として、第一部に核酸医薬の品質を管理する上で必要となる有効成分の定義付けなど品質管理の基礎となる事柄並びに原薬や製剤を製造する際に重要となる考え方を“一般原則”としてまとめ、第二部では核酸医薬を開発する際の留意点について整理した。その際、核酸医薬が作用メカニズムなどに基づいていくつかのタイプに分類されることを踏まえ、核酸医薬に共通と考えられる事柄とタイプごとに考慮すべき事柄を整理することを心がけた。しかしながら、製造販売承認を受けた核酸医薬は世界的に限られており、この文書で述べている内容については、今後の核酸医薬の開発経験の蓄積等を踏まえた継続的な議論が必要と考えている。

なお、核酸医薬の臨床適用を考えた場合には DDS 技術が用いられることもあるが、DDS 技術に関する具体的な品質管理に関する議論は本文書の対象から除外し、オリゴヌクレオチドに関連する議論に焦点をあてた。

適用対象

この文書で述べられている基本的な考え方は、化学合成されるオリゴヌクレオチドを有効成分とする医薬品及び化学合成品とコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドを有効成分とする医薬品に適用される。これらには、二重鎖を形

成しているオリゴヌクレオチドも含まれる。DDS など複雑な製剤学的な特性を有する核酸医薬製剤には適用されないが、それらの原薬の管理などにおいては本文書に書かれている原則が適用できる場合がある。生物由来あるいはバイオテクノロジーを応用して作られる抗体、ペプチド又はその他のタンパク質とコンジュゲートされるオリゴヌクレオチド及び mRNA のような長鎖のポリヌクレオチドを有効成分とする医薬品には適用されない。

用語・略語の定義

<用語の定義>

アニーリング

相補鎖と塩基対を形成させるために行う操作。一般に、加熱と冷却を伴う。

アプタマー医薬

標的タンパク質に対して特異的に結合するオリゴヌクレオチドを有効成分とし、標的タンパク質との立体的な相互作用を介して薬効を発現する医薬品。

アンチセンス医薬

標的 RNA と配列特異的に二重鎖を形成するオリゴヌクレオチドを有効成分とし、標的 RNA の機能を制御することで薬効を発現する医薬品。

カウンターイオン

塩からなる有効成分における対イオン。たとえば、オリゴヌクレオチドと塩を形成しているナトリウムイオン。

核酸医薬

化学合成されるオリゴヌクレオチド (DNA、RNA 及びそれらの誘導体) 及びそのコンジュゲートが有効成分となる医薬品。

コンジュゲート

何らかの機能性の獲得を期待して他の分子と共有結合により結合させること、又は結合された医薬品。

デコイ核酸医薬

オリゴヌクレオチドを有効成分とし、転写因子を捕捉し、標的遺伝子の転写を阻害することで薬効を発現する医薬品。

ホスホロチオアート

ホスホジエステル結合を有するオリゴヌクレオチドのリン酸エステルの一つの酸素原子が硫黄原子によって置換された化合物。

オリゴヌクレオチド類縁物質

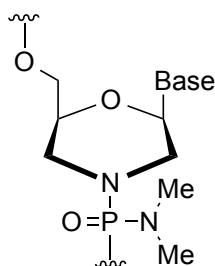
原薬又は製剤中に含まれる有効成分以外のオリゴヌクレオチド。

オリゴヌクレオチド類縁物質群

HPLC や LC/MS などを用いた分析において技術的に個々に定量管理することが現実的ではなく、単一のピークとして観察されるなど物理化学的性質が類似した一群のオリゴヌクレオチド類縁物質。

モルフォリノ核酸

非天然型人工核酸の一種。下図を参照。



<略語の定義>

DDS

薬物送達システム (drug delivery system)。

HPLC 又は LC

高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography)。

ICH

日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)。

MS

質量分析法 (mass spectroscopy) 又はその測定装置、及びその測定によって得られたスペクトル。

siRNA

small interfering RNA と呼ばれる短鎖の二重鎖 RNA であり、RNA 干渉を誘導することで標的とする遺伝子の転写産物の発現を抑制する。

第一部 品質管理に係る一般原則

第一部 品質管理に係る一般原則

核酸医薬は、その薬理学的作用発現のメカニズムや施される化学修飾などが多岐にわたることから、それぞれの製品に応じて適切な品質管理を実施することが原則となる。ここでは、核酸医薬の品質を管理する上で基礎となる有効成分や不純物の定義、並びに原薬や製剤を製造する上で重要となる留意点についてまとめた。

1. 有効成分と類縁物質

1.1. 有効成分

核酸医薬は、オリゴヌクレオチドが標的とする RNA やタンパク質の機能を制御することで薬効を発現する。核酸医薬の創薬段階においては、オリゴヌクレオチドの標的との結合親和性や生体内での安定性、標的組織への移行性を改善することなどを目的として、薬理的な試験などを通じて医薬品候補化合物が選択され、適切な化学修飾等（コンジュゲート化を含む）が施される。このような核酸医薬の作用機序や設計・創薬段階を踏まえると、核酸医薬の有効成分は、“開発化合物として選択された塩基配列及び化学修飾を有する化合物”として定義される。したがって、リン原子の立体化学を制御せずに製造される核酸医薬の場合は、後述するようにリン原子の立体に関するいずれの異性体も有効成分とみなされる。

siRNA 医薬やデコイ核酸医薬のように二重鎖を形成している複合体が有効成分となる場合や、アプタマー医薬などのように高次構造が薬効発現に不可欠なタイプの核酸医薬では、目的とする複合体又は高次構造の形成が担保されなければならない。

1.2. 類縁物質

類縁物質は、原薬又は製剤中に含まれる有効成分以外のオリゴヌクレオチドとして定義される。本文書では、この類縁物質のことを「オリゴヌクレオチド類縁物質」として表現する（以下、特に断ることなく単に「類縁物質」とすれば「オリゴヌクレオチド類縁物質」のことをさす）。

また、二重鎖を有効成分とする医薬品においては、有効成分を構成する遊離の一本鎖オリゴヌクレオチドも類縁物質に含まれる。

2. 品質管理に関する事柄

2.1. 有効成分を構成する立体異性体

現在のところ、多くの核酸医薬がリン原子の立体化学に関する異性体の混合物として製造され、臨床的に使用されている。各々の異性体間の有効性及び安全性の違いは明らかではないが、ホスホロチオアートの立体化学が異なる場合には、相補鎖に対する親和性や酵素耐性が変化することが報告されている[1]。本来、有効性及び安全性を一貫して担保するためには、有効成分を構成する立体異性体の組成を一定に管理することが必要であろう。しかしながら、ホスホロチオアート修飾が施されたオリゴヌクレオチドの場合には多数の立体異性体の混合物となることから、有効成分の立体異性体の分布を評価することは、多くの場合技術的に困難であることを鑑みれば、製造工程や製造パラメータの管理などに基づく、製造方法の一貫性により品質を担保することが現実的であると考え[2]。

以上のような観点からリン酸骨格の立体異性体に係る考え方をまとめると、ホスホロチオアート修飾が施されたオリゴヌクレオチドやモルフォリノ核酸のように、リン原子の立体化学を制御せずに製造される核酸医薬の場合は、リン原子の立体化学の違いが有効性に一定の影響を与える可能性はあるものの、相補鎖を認識する塩基配列及びそれを支持する糖部について立体異性体間で違いがないことから、特定の立体異性体において薬理的な活性を完全に失うことは考えにくい。また、個々の立体異性体を活性に基づいて分類して管理することは不可能であることを考慮すると、製造工程が適切に管理されることを前提とした上で、リン原子の立体に関するいずれの異性体も有効成分として見なすことは妥当と考える。

なお、医薬品品質の継続的な改善の一環として、立体異性体の管理においても、最新の科学的知見を品質管理に適切に反映させることは重要な責務である。

参考文献

[1] *Perspect. Drug Discovery Des.*, **1996**, 4, 17-40.

[2] *Org. Process Res. Dev.*, **2002**, 6, 798-806.

2.2. 高次構造等の管理

オリゴヌクレオチドは、塩濃度や温度などの環境やオリゴヌクレオチドの塩基配列に依存して高次構造や複合体（以下、「高次構造等」と表記する）を形成

する可能性があり、アプタマーのように高次構造等がその薬理作用の発現に不可欠な場合がある。したがって、有効成分の高次構造等に関する特性解析などに基づいて、高次構造等の形成が有効性又は安全性に影響する可能性が示された場合には、適切に管理されなければならない。

オリゴヌクレオチドは溶液中で、部分的な水素結合の形成等により意図しない複合体を形成し、性状又はその他の品質特性の変化がもたらされる可能性があることに留意するべきである。これらの変化は、製剤の保存中あるいは製造中間体の保存中に進行する可能性がある。このような複合体形成はしばしば、温度の低下、オリゴヌクレオチド又は塩濃度の上昇に伴って促進されることから、このような場合には特に注意するべきである。

2.3. オリゴヌクレオチド類縁物質の管理

製品中に含まれる微量の類縁物質については、通常他の化学合成医薬品と同様に、不純物とみなされる。しかしながら、類縁物質の構造から一定程度の薬理的な活性が期待され、有効性を保証する上で意味のある量が原薬中に含まれる場合には、当該類縁物質について生物学的な活性を含む適切な特性解析を実施し、品質への影響について検討する必要がある。このような類縁物質が、有効成分に匹敵する生物学的活性を有している場合には、安全性の懸念がない範囲において当該類縁物質を有効成分含量に含めることが適切な場合もあるであろう。

注目する類縁物質がどの程度含まれる場合に、生物学的な活性に基づく分類が必要であるかについては結論を得るに至っておらず、現時点においては規制当局と個別に議論すべきであろう。

オリゴヌクレオチド類縁物質が有効成分含量に含まれるか否かにかかわらず、オリゴヌクレオチド類縁物質を管理する上では以下に述べる基本的な留意点を考慮する必要がある。

現在のところオリゴヌクレオチドの製造においては、担体上で合成されることが一般的である。そのため、製造方法に依存して精製の機会は限定され、最終生成物には物理化学的性質の類似したオリゴヌクレオチド類縁物質が含まれる。例えば、クロマトグラム上の一つのピークに複数種類のオリゴヌクレオチド類縁物質が含まれることはまれではない[3-5]。したがって、LC-MS を用いた

HPLC ピーク中に含まれるオリゴヌクレオチド類縁物質のプロファイリングや、複数の分離様式（例えば、逆相 HPLC とイオン交換 HPLC など）を用いた検討により、類縁物質のプロファイルを多角的に検討する必要がある。また、工程を理解し、原薬中に含まれる類縁物質の挙動及びプロファイルを理解するために、オリゴヌクレオチド中間体の類縁物質プロファイルを検討することは、有用な場合があるだろう。

一つの類縁物質群を構成する個々の類縁物質が互いに類似した生物学的な特性を有するかについては必ずしも明らかではないことを踏まえた上で、適切である場合には、クロマトグラム上で単一のピークを形成するなど物理化学的性質が類似した一群の類縁物質（オリゴヌクレオチド類縁物質群）を一つの類縁物質とみなして管理することができるだろう。

個々のオリゴヌクレオチド類縁物質群をそれぞれひとつの類縁物質とみなした管理を行うことの適切性について現時点で一般化して議論することには限界があるが、最新の科学的な知見、非臨床試験や臨床試験で示される安全性及び品質管理の各観点から検討することが重要と考える。品質管理の観点からは、オリゴヌクレオチド類縁物質群プロファイル、各オリゴヌクレオチド類縁物質群の含量及びそれらの総量について一貫性を担保することは不可欠な要素である。その上で、製造されるロット間でオリゴヌクレオチド類縁物質群を構成する類縁物質の組成の変動を最小限に努めることが重要である。このため、製造工程の管理及び製品や製造中間体に対して適用される試験を適切に組み合わせ、類縁物質について総合的な管理戦略を策定することが重要になるであろう。

参考文献

- [3] *Chromatographia*, **2010**, 72, 215-223.
- [4] *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 5609-5617.
- [5] *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, 403, 1333-1342.

2.4. オリゴヌクレオチド類縁物質の安全性確認

分析技術の限界を考慮すると、ICH ガイドライン Q3A (R2) で示されている報告、構造決定及び安全性確認の各閾値をオリゴヌクレオチドの不純物に対して適用することは現実的ではないと考えられる。また、核酸医薬については、動物種特異的に作用する可能性も考えられること、安全性に関するデータが蓄積されつつあることを鑑みれば、安全性確認に必要な閾値を示すことは、時期

尚早と考えられる。したがって、可能な限り類縁物質の分析及び分類を行った上で、主要な臨床試験及び非臨床試験に用いられた原薬及び製剤中に含まれる類縁物質のレベルに基づいて安全性を評価し、オリゴヌクレオチド類縁物質に対して適切に限度値を設定する必要があるだろう。

一方、安全性に関して十分な知識の蓄積のあるタイプの核酸医薬については、ICH ガイドライン Q3A (R2) を参考に、安全性に十分配慮して、安全性の確認が必要な閾値を個別の製品ごとに設定することは許容される場合があるだろう。

このような場合には、オリゴヌクレオチド類縁物質（又は、オリゴヌクレオチド類縁物質群、以下同じ）の特性及び含量、開発段階における経験や科学的な知見、投与量や対象疾患、対象患者集団等を踏まえ、患者にとって受容可能なリスクに対応したレベルを勘案し、安全性確認の必要な閾値を根拠に基づいて設定することができる。安全性確認に関する手順については、第 2 部を参照すること。

2.5. その他不純物の管理

上に掲げた類縁物質以外の有機低分子、残留溶媒、金属などの不純物については、それぞれ関連したガイドラインに従って管理する必要がある。また、コンジュゲートの場合には、コンジュゲートする分子に由来した不純物の混入が考えられる。このような不純物に対しては、その特性に応じて該当するガイドラインを参照することを原則とし、適切なガイドラインが存在しない場合には、科学的に妥当な方法で管理されなければならない。

不純物は、関連するガイドラインに準拠した上で、製品の安定性に与える影響も考慮する必要がある。たとえば、2 価の金属陽イオンは、RNA の安定性に対して影響を与える可能性がある [6]。

参考文献

[6] *J. Pharm. Sci.*, **2000**, *89*, 443-456.

3. 特性の解析

製品の品質を適切に管理するためには、適切な分析法を用いて、製品の特性を十分に明らかにする必要がある。

作用機序と医薬品設計の観点も含め、核酸医薬の有効成分は、通常、化学修

飾が設計された通り正しく施され、正確な塩基配列を有することが品質特性として重要であると考えられる。また、不純物のプロフィールと各々の不純物量は安全性の観点からも重要な品質特性と考えられる。

その他、他の医薬品と同様に個々の医薬品の特徴にしたがって重要な特性を特定すべきである。作用機序を例にすれば、相補鎖に対する親和性が重要な特性となる場合があるだろう。また、高次構造が薬理作用の発現に不可欠なタイプの医薬品では、高次構造の確認を物理化学的な手法のみに頼ることはしばしば技術的に困難であることから、物理化学的な特性に加え、生物学的あるいは生化学的な特性が重要となる。

なお、特性解析を行う上で ICH ガイドライン Q6B の考え方が参考になる。例えば、開発段階における広範かつ詳細な解析は、有効成分や不純物の特性を理解し、管理する上で有用と考える。

4. 製剤

DDS の技術を用いない一般的な核酸医薬の製剤は、通常凍結乾燥製剤又は溶液注射剤であり、日本薬局方等を参考に製剤の管理を行う必要がある。また、以下に述べるオリゴヌクレオチドの特性を考慮することは重要であろう。製剤設計においては、オリゴヌクレオチドの物理化学的な性質について考慮すべきである。例えば、オリゴヌクレオチドの有する pH 緩衝能及び粘性は、製剤中の有効成分濃度の上昇とともに無視できなくなるだろう。また、オリゴヌクレオチドの部分的な複合体形成に起因すると推察される、浸透圧の理論値からの乖離に留意する必要がある。

凍結融解がオリゴヌクレオチドの分解に影響する可能性があることも報告されている[7]。したがって、溶液製剤の安定性を評価する際には、以上のようなオリゴヌクレオチドの特性を踏まえ、温度変化や凍結融解の影響を考慮すべきである。

参考文献

[7] *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 5092-5096.

5. 製造

5.1. 製品品質の一貫性と頑健な製造方法の確立

製品品質の一貫性が有効性と安全性の担保の観点から重要であるが、これまでに述べてきたように、有効成分が立体異性体の混合物となる場合があることや、オリゴヌクレオチド類縁物質を互いに分離できない可能性がある。このようなオリゴヌクレオチドの特徴を踏まえ、製造工程や製品を評価するための分析方法などの特性解析法を開発することにより、製造工程を評価し、頑健な製造方法を確立していくことが重要である。なお、詳細な特性解析は、重要と考えられる工程の変更に際して行う製品の同等性／同質性の評価に役立つであろう。また、場合によっては、ICH ガイドライン Q5E が参考になる場合もあるだろう。

5.2. 位置異性体及び立体異性体の管理

核酸糖部や塩基部は、合成の過程で化学的環境又は反応性の類似した官能基を複数有する中間体を経る場合が多く、位置異性体や立体異性体についての管理戦略が必要となるだろう。

位置異性体及び立体異性体は、①製造工程に由来する場合[8]、②分解生成物である場合及び③出発物質の不純物に由来する場合が考えられ、それぞれの由来に応じた管理が重要となる。

参考文献

[8] *Anal. Biochem.*, **2011**, *414*, 47-57.

5.3. 出発物質

低分子量の化学合成医薬品と比較してオリゴヌクレオチドの製造において精製の機会が限られていること、及び最終製品においてオリゴヌクレオチド類縁物質の分離精製に限界があることを踏まえると、出発物質に含まれる不純物と原薬中に含まれる不純物であるオリゴヌクレオチド類縁物質とが相関する可能性があり、品質を担保する上で出発物質の選択と管理は重要であろう。

出発物質に関する基本的な考え方は、ICH ガイドライン Q7 及び Q11 に示されており、核酸医薬においても参考にするべきである。上記、異性体の管理の観点からも出発物質の選択及び管理の適切性については十分に検討する必要がある。

5.4. 中間体の分析、製造工程のモニタリングと管理

核酸医薬の原薬製造において、製造中間体に対して実施される種々の分析や製造工程のモニタリングは、品質を管理する上で重要な情報をもたらし、一定の管理基準を設けることによって、品質をより適切に管理できる場合がある。

例えば、未精製原薬を対象として、オリゴヌクレオチドの伸長反応が失敗して生じる副生成物 (failure sequences) を解析することにより、有効成分の塩基配列に関連する情報が得られる[9, 10]。また、有効成分がコンジュゲートオリゴヌクレオチドである場合や、二重鎖である場合には、それぞれコンジュゲートする前やアニーリングをおこなう前の段階における分析では、最終製品を用いた場合の分析と比較して、類縁物質のプロファイルを評価しやすい場合がある。このような品質管理において重要な中間体については、適切な管理項目と管理値の設定が必要となるだろう。

なお、中間体の特性や製造工程のモニタリングによって得られる情報と最終製品の品質特性との関連性を検討することは、適切な工程管理を設定する上で重要である。

参考文献

[9] *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1993**, 7, 195-200.

[10] *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 941-946.

6. 製品のライフサイクルを通じた品質管理

核酸医薬原薬の固相合成法を考慮すると、固相上でおこる反応をモニタリングすることは困難であり、リスクの検出の観点からは、固相からの切り出しを行うまで異常を検出できない可能性がある。したがって、反応ステップごとに分析が可能な低分子量の化学合成医薬品の場合と比べ、潜在的に品質に影響を及ぼすリスクの顕在化する段階が製造工程の下流になる可能性が高く、リスク管理が重要になるであろう。また、製剤には、DDS 技術を応用する等高度な機能が付与されるような場合も想定される。したがって、核酸医薬の製造方法や特徴を踏まえた上で、原薬及び製剤の製造法の頑健性を、開発段階から市販後においても継続的かつ一貫して評価し、確立していくことが重要である。なお、これらの実施にあたっては ICH ガイドライン Q8 (R2)、Q9、Q10 及び Q11 を参照することが推奨される。

なお、核酸医薬の品質が高い科学水準に維持されるよう、製造方法の変更に際して、規制当局と申請者の両者には、相互協力の下に継続的にコミュニケーションがなされることが望まれる。

第二部 医薬品開発における品質管理に係る留意点

第二部 核酸医薬開発における品質管理に関する留意事項

核酸医薬には従来の低分子量の化学合成医薬品や抗体医薬などに代表されるバイオ医薬品とは異なる、特有の特徴が存在する。このことは、核酸医薬の品質管理を行っていく上で重要なものである。ここでは、核酸医薬の特徴に由来して生じる留意点について、医薬品開発の観点から整理を行った。

1. 原薬

1.1. 製造

<製造方法及びプロセスコントロール>

他の医薬品と同様、核酸医薬においても原薬の製造方法の詳細を説明する必要がある。

オリゴヌクレオチドの伸長反応は自動合成により行われることが多く、反応の進行をどのように管理及び監視するかについて、使用する自動合成システムに基づいた説明を必要とする。

担体上で合成される場合は、精製の回数が限られており、精製工程が原薬の品質に及ぼす影響は大きいと考えられる。また、二重鎖のオリゴヌクレオチドを有効成分とした核酸医薬で行われるアニーリングのように、最終的な精製工程の後に行われるすべての工程は原薬の品質に与える影響が大きいことはいうまでもないであろう。したがって、精製工程及びそれ以降の工程について詳細に説明するとともに、当該工程の適切性及び頑健性についても説明することが重要である。

最終製品の重要な品質特性との関連性が高い工程や中間体については、工程管理として設定されるモニタリングや試験の方法及びその適切性、管理値及びその設定根拠について、十分な検討が必要であろう。

<出発物質の管理>

第一部の5.3節で述べた通り、出発物質の選択と管理が原薬の品質を管理する上で重要になると考えられる。したがって、出発物質の管理は、不純物の管理戦略の中で適切に位置づけられる必要がある。また、出発物質の製造方法の概略を把握することは適切な管理戦略を策定する上で有用であろう。

<製造工程の開発の経緯>

他の医薬品と同様、原薬の製造方法を検討した経緯や開発段階における製造方法の変更について説明し、開発段階から品質が一貫していることを科学的根拠に基づいて説明する必要がある。同等性／同質性の評価に際しては、詳細な

特性解析に基づくべきであろう。場合によっては、ICH ガイドライン Q5E に示されている考え方を参考にすることが適切な場合もあるだろう。

1.2. 特性

<構造特性>

有効成分の構造的特徴を評価するために検討した内容について説明されるべきである。また、有効成分の構造特性を特徴付けることができる分析法については、詳細に説明されるべきである。有効成分を構成するオリゴヌクレオチドの構造特性として、以下の①～④の要素は特に重要であり、構造特性の解明に際して考慮される必要があるだろう。

① 組成及び配列：

有効成分となるオリゴヌクレオチドの配列は標的分子の認識に関わる重要な特性である。

② リン酸骨格：

リン酸骨格が化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドについて、意図した化学修飾が適切に導入されていることは重要な特性である。

③ カウンターイオン：

有効成分がカウンターイオンを伴っている場合は、カウンターイオンの組成と含量は、有効成分を特徴付ける上で重要な特性である。

④ 高次構造及び複合体：

高次構造又は複合体の形成は、品質に影響を与える可能性のある重要な特性である。二重鎖などの複合体が有効成分である場合や薬理作用の発現に高次構造の形成が必要なタイプの核酸医薬においては、それぞれの構造特性を評価することが重要となる。

<不純物>

他の医薬品と同様、不純物特性として、原薬に含まれる不純物のプロファイルについて検討した内容を説明する必要がある。また、化学的特性によって以下のように分類した不純物について、適切な解析及び検討結果を提示する必要がある。なお、解析にあたっては最新の薬事規制及び関連ガイドラインを参照して実施するべきであるが、適合しない場合には、適合しない点を明らかにし、科学的に適切な方法に基づく必要がある。

① オリゴヌクレオチド類縁物質：

オリゴヌクレオチド類縁物質は、類似した物理化学的性質を示し、すべてのオリゴヌクレオチド類縁物質を分離する分析方法を開発することはしばしば困難であるが、類縁物質のプロファイルをより適切に評価できる分析法を開発するために行われた検討内容について説明する必要がある。

類縁物質がオリゴヌクレオチド類縁物質群として観察される場合には、各類縁物質群にどのような類縁物質が含まれるか（類縁物質の詳細なプロファイル）について説明する必要がある。類縁物質群に含まれる個々の類縁物質すべてを同定することを求めるものではないが、第一部 2.3.節に述べたように、類縁物質のプロファイルについては多角的に検討される必要がある。開発段階からの品質の一貫性並びに、有効性及び安全性の確認された主要な臨床試験に用いられた原薬及び製剤と市販製品との同等性を説明する上で十分な特性解析がなされていなければならない。

② 有機低分子不純物：

ICH ガイドライン Q3A (R2) や M7 (step 4) 等適切なガイドラインを参照する。

③ 残留溶媒：

ICH ガイドライン Q3C (R3) を参照する。

④ 金属：

ICH ガイドライン Q3D (step 3) を参照する。

⑤ その他：

その他の不純物に関しては、各極の適切なガイドラインを参照する。適切なガイドラインがない場合には、それぞれ適合しない点を明らかにした上で、科学的根拠に基づいた評価を行う。

<生物学的／生化学的特性>

有効性に関連した特性として、標的分子に対する結合親和性などに関して説明する必要がある。物理化学的な手法において、有効性に関連する品質特性を十分に明らかにできない場合には、生物学的あるいは生化学的評価などが必要になる。特に、薬理学的作用の発現に高次構造の形成が必要な核酸医薬においては、生物学的活性や標的分子に対する結合性などと物理化学的特性との関連性について検討が必要になる。

<その他の物理化学的特性>

その他、有効成分の特徴を裏付ける上で重要な特性があれば、その特性及び解析方法について説明する必要がある。

1.3. 原薬の管理

<規格及び試験方法>

ICH ガイドライン Q6A に示されている一般的な規格及び試験方法に関する考え方については、核酸医薬にも適用される。しかしながら、例えば、薬理学的活性を発現するために高次構造の形成が必要な核酸医薬における物理化学的手法の限界、薬理作用や副作用の動物種特異性などを考慮すると、規格及び試験方法の設定に際しては、必ずしも化学合成医薬品を対象とした既存のガイドラインは十分ではない。具体的に設定すべき規格及び試験方法については、原薬の重要な品質特性、特性解析、開発段階における経験や知識、並びに製造工程における管理などを考慮した上で原薬の本質を踏まえて設定されるべきである。

核酸医薬における原薬の規格として、以下に「通常必要と考えられる項目（無印）」と「必要に応じて検討すべき項目（※印）」について記載し、核酸医薬に特有の留意点を併記した。なお、「通常必要と考えられる項目」を規格に設定しない場合は、その科学的妥当性を説明しなければならないであろう。

規格及び試験方法として原薬に対して適用される分析法は、他の医薬品の場合と同様、適切にバリデーションが実施されている必要がある。なお、分析法バリデーションについては、ICH ガイドライン Q2 (R1) を参照する。

規格及び試験方法の留意点

- (1) 名称
- (2) 分子式及び分子量
- (3) 性状
- (4) 確認試験

単一の分析法によって有効成分であることを確認し、担保することが難しい場合には、複数の試験を組み合わせることを考慮する必要があるだろう。

薬理学的作用の発現に高次構造の形成が必要な核酸医薬では、標的分子との結合性等を確認するための試験を設定することが必要な場合がある。

- (5) 純度試験

不純物の化学的特性によって以下のように複数の項目に分類できる。

① オリゴヌクレオチド類縁物質：

分析方法

オリゴヌクレオチド類縁物質では、類似した物理化学的性質を示し、複数のオリゴヌクレオチド類縁物質を個々に分離できないことがある。このように個々の類縁物質を分離することが困難な場合であっても、不純物の特性に関する解析結果に基づいて、オリゴヌクレオチド類縁物質のプロファイルをより詳細に評価できるような分析方法を設定するよう努めるべきである。なお、類縁物質のプロファイルがよりよく把握できるなど、有用である場合には、複数の分析方法を設定するべきである。

オリゴヌクレオチド類縁物質の規格

ICH ガイドライン Q3A (R2) で示されている報告、構造決定及び安全性確認の閾値をオリゴヌクレオチド類縁物質に対して適用することは現実的ではない。

以下に示すオリゴヌクレオチド類縁物質（又はオリゴヌクレオチド類縁物質群、以下同様）の安全性確認に関する考え方に基づいて、原薬に含まれるオリゴヌクレオチド類縁物質の許容限度を検討することが必要であろう。

オリゴヌクレオチド類縁物質については、可能な限り分析及び分類を行った上で、主要な臨床試験及び非臨床試験に用いられた原薬及び製剤中に含まれるそれぞれの類縁物質のレベルに基づいて安全性を評価し、適切に限度値を設定する必要がある。

既に安全性試験や臨床試験で十分に安全であることが確かめられている原薬中に存在しているすべての類縁物質については、試験に用いられた試料中に存在するレベルまでは安全性が確認されたものと考えることができる。類縁物質が、動物やヒトでの試験で認められた主要な代謝物と同一である場合についても、一般に安全性が確認されたものと考えることができる。

安全性試験や臨床試験に用いられた原薬又は製剤のロット中に存在するよりも高いレベルの類縁物質を含む場合についても、既に行った適切な安全性試験において実際に投与された類縁物質の量を求め、それに基づいて考察を行うことにより安全性の確認を行うことができる。

ある類縁物質について、規格に設定しようとする判定基準のレベルに

おける安全性を確認できるデータがない場合には、安全性を確認するための試験を行う必要がある。

なお、安全性に関して十分な知識の蓄積のあるタイプの核酸医薬については、ICH ガイドライン Q3A (R2) を参考に、安全性に十分配慮して、安全性の確認が必要な閾値を個別の製品ごとに設定することも許容される場合があるだろう。その場合には、オリゴヌクレオチド類縁物質の特性及び含量、開発段階における経験や科学的な知見、投与量や対象疾患、並びに対象患者集団等を踏まえ、患者にとって受容可能なリスクに対応したレベルを勘案し、不純物の安全性確認の必要な閾値を根拠に基づいて設定する必要がある。

以上に述べた規格設定及び安全性の確認にいたるプロセスについては、科学的根拠に基づいて詳細に説明されるべきである。

なお、核酸医薬の安全性評価に関する考え方については盛んに議論されている状況にあり、類縁物質の安全性を確認するための適切な試験は、個々の原薬又は安全性評価の対象となる類縁物質によって異なると考えられる。したがって、個別のケースごとに検討されるべきであり、規制当局と議論することが推奨されるだろう。

② 有機低分子不純物^{*}：

ICH ガイドライン Q3A (R2) や M7 (step 4) を参照する。

③ 残留溶媒^{*}：

ICH ガイドライン Q3C (R3) を参照する。

④ 金属^{*}：

ICH ガイドライン Q3D (step 3) を参照する。

⑤ その他^{*}：

安全性や有効性に及ぼしうる影響に基づいて検討する。

(6) 示性値^{*}

特性解析に基づいて、オリゴヌクレオチドの品質を担保する上で必要な物理化学的特性について、規格を設定するべきであろう。

(7) 水分含量^{*}

(8) カウンターイオン^{*}

(9) 定量法 (含量)

ICH ガイドライン Q6A に述べられているように、不純物の影響を受けな
いような特異性の高い定量法が設定されるべきである。オリゴヌクレオ
チド類縁物質プロファイルの複雑性を鑑みれば、試験方法全体として原
薬に対して特異的なものとなるように、適切であれば、複数の分析方法
を組み合わせることが許容される。

(10) 生物学的活性試験*

オリゴヌクレオチドの構造や機能の複雑性が高く、その他の手段に基づ
いて有効性を十分に担保できない場合には、生物学的活性に係る試験を
設定するべきであろう。

(11) その他*

バイオバーデンやエンドトキシン試験等は、剤形や製剤化プロセスを考
慮して規格としての要否を検討するべきである。

その他、それぞれの原薬の特性に応じて別に品質を担保するための試験
が必要となる場合がある。そのような場合には、必要に応じて ICH ガイ
ドライン Q6A 及び Q6B などを参考にすることができるだろう。

1.4. 原薬の安定性

核酸医薬原薬の安定性については、ICH ガイドライン Q1 を参照して評価され
るべきであろう。しかしながら、保存中の品質特性の変化に関する理解が十分
ではない場合には、安定性データを外挿することが困難となることに留意する
必要がある。

2. 製剤

2.1. 製造

製剤の剤形と関連する重要な品質特性や期待する製剤学的特性を担保するた
めに、必要な製造の管理がなされなければならない。また、製剤の製造プロ
セスが有効成分の重要な品質特性に影響を与える可能性がある場合には、適切に
管理される必要がある。特に、薬理学的作用の発現に高次構造の形成が必要な
核酸医薬においては、製剤の製造プロセスが高次構造に影響を与える可能性に
ついては注意深く評価する必要がある。

2.2. 製剤の管理

<規格及び試験方法>

原薬の場合と同様、ICH ガイドライン Q6A に示されている基本的な考え方は、
核酸医薬の製剤に対しても適用されるが、DDS が用いられない核酸医薬の製剤

においては、製剤の重要な特性は、原薬の重要品質特性と重なる部分が多いことから、原薬の項も合わせて参照すべきである。

以下に核酸医薬の製剤の規格として、「通常必要と考えられる項目（無印）」と「必要に応じて検討すべき試験（※印）」を記載し、核酸医薬に特有の留意点を併記した。なお、「通常必要と考えられる項目」を規格に設定しない場合は、その科学的妥当性を説明しなければならないであろう。

規格及び試験方法としてオリゴヌクレオチド製剤に対して適用される分析法は、他の医薬品の場合と同様、適切にバリデーションが実施されている必要がある。なお、分析法バリデーションについては、ICH ガイドライン Q2 (R1) を参照する。

規格及び試験方法の留意点

(1) 名称

(2) 性状

(3) 確認試験

1.3. 原薬の管理を参照。

(4) 純度試験

① オリゴヌクレオチド類縁物質：

1.3. 原薬の管理を参照する。

② 有機低分子不純物※：

ICH ガイドライン Q3B (R2) を参照する。

③ 金属不純物※：

ICH ガイドライン Q3D (step 3) を参照する。

④ その他の不純物※：

安全性や有効性に及ぼしうる影響に基づいて検討する。

(5) 定量法（含量）

1.3. 原薬の管理を参照する。

(6) 生物学的活性試験※

原薬及び製剤の特性を考慮した上で、その他の手段に基づいて有効性を十分に担保できない場合は、生物学的活性に係る試験を設定するべきであろう。

(7) その他（製剤試験など）※

剤形に応じて日本薬局方に定められている各試験など必要な試験を設定する必要がある。また、製剤学的な工夫が施された場合は、その機能性を含めた評価のための試験を設定することが必要になる場合もあるだろう。なお、ICH ガイドライン Q6B など関連したガイドラインを参考にすることもできる。

2.3. 製剤の安定性

原薬と同様、核酸医薬製剤の安定性については、ICH ガイドライン Q1 を参照して評価されるべきであろう。しかしながら、保存中の品質特性の変化に関する理解が十分ではない場合には、安定性データを外挿することが困難となることに留意する必要がある。

核酸医薬の安全性評価のための課題と留意点について

～ ガイドライン策定を志向した課題の抽出と考察 ～

(中間報告)

革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業

目次

用語の定義と略号表.....	43
まえがき（作成方針の概要）.....	44
1. はじめに.....	46
2. 被験物質について.....	47
2.1 被験物質の分析.....	47
2.2 代替化合物（サロゲート）を使用する際の留意点について.....	47
2.3 コンジュゲート及び剤形に係る内容.....	47
3. 試験のデザインについて.....	48
3.1 一般的な考え方.....	48
3.2 動物種/モデルの選択.....	49
3.3 動物数/性.....	50
3.4 投与量/投与方法の設定.....	50
3.5 試験期間.....	51
3.6 回復性，遅発性毒性及び残存性.....	51
3.7 免疫原性.....	52
4. 安全性薬理試験，副次的薬理試験及び動態に関する評価.....	52
4.1 安全性薬理試験及び副次的薬理試験.....	52
4.2 薬物動態及び曝露評価.....	53
4.2.1 薬物動態について.....	53
4.2.2 トキシコキネティクス.....	54
5. 一般毒性試験.....	54
5.1 用量設定について.....	54
5.2 急性毒性に関する評価.....	55
5.3 反復投与毒性試験.....	55
6. 遺伝毒性試験.....	56
6.1 試験方法について.....	56
6.2 非天然型人工核酸を含む場合.....	56
6.3 <i>in vivo</i> 試験における課題.....	57
6.4 その他課題と留意.....	57
7. 生殖発生毒性試験.....	57
7.1 一般的な事項.....	57
7.2 動物種について.....	58
7.3 追加試験，実施時期等.....	59
8. がん原性試験.....	59
8.1 試験実施時の留意点について.....	59
9. 局所刺激性に関する評価.....	60
9.1 試験実施時の留意点について.....	60
10. 免疫毒性試験.....	60
10.1 試験実施時の留意点について.....	61
11. ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果に係る考察.....	61

11.1 RNA を標的とする核酸医薬をデザインする段階での留意点について.....	61
11.2 RNA を標的とする核酸医薬のハイブリダイゼーション依存的 オフターゲット効果の予測について ...	62
11.2.1 in silico 解析における留意点について	62
11.2.2 in vitro 解析における留意点について	63
12. 臨床試験に関する考察.....	64
12.1 ヒト初回投与開始における留意点.....	64
12.2 ヒト初回投与量の算出について.....	64
13. 早期探索的臨床試験.....	65
13.1 用量設定について.....	65
13.2 早期探索的臨床試験実施のために推奨される非臨床試験.....	65
14. 注釈.....	66
15. 参考文献.....	66

用語の定義と略号表

用語の定義

- オフターゲット効果： 標的以外の分子に作用して、意図しない作用が発現すること。
- ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果： RNA との相補的結合に依存する発現量又はスプライシングパターンの変化に起因する意図しない作用のこと。
- オンターゲット効果： 標的分子に作用して生じる作用のこと。
- キャリア： 標的となる細胞や組織などに対して、核酸医薬の導入効率を上げるために使用される補助剤のこと。
- サロゲート： 開発の候補である核酸医薬に代わって、動物で標的遺伝子に作用する様に設計される開発候補の代替となる核酸医薬のこと。

略号表

aPTT	活性化部分トロンボプラスチン時間 (Activated Partial Thromboplastin Time)
DNA	デオキシリボ核酸 (Deoxyribonucleic Acid)
HED	ヒト等価用量 (Human Equivalent Dose)
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
mRNA	メッセンジャーRNA (Messenger Ribonucleic Acid)
LOAEL	最小毒性量 (Lowest Observed Adverse Effect Level)
LOEL	最小作用量 (Lowest Observed Effect Level)
MABEL	推定最小薬理作用量 (Minimal Anticipated Biological Effect Level)
MFD	投与可能な最大用量 (Maximum Feasible Dose)
MTD	最大耐量 (Maximum Tolerated Dose)
NHP	非ヒト霊長類 (Non-human Primate)
NOAEL	無毒性量 (No Observed Adverse Effect Level)
NOEL	無影響量 (No Observed Effect Level)
PD	薬力学 (Pharmacodynamics)
RNA	リボ核酸 (Ribonucleic Acid)
siRNA	small interfering RNA
UTR	非翻訳領域 (Untranslated Region)

まえがき（作成方針の概要）

本文書をまとめるにあたって、我々は、「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」における活動の一環として、核酸医薬をその種類や作用機序、性質という分子そのものに焦点を当てるだけでなく、医薬品を開発していく上での開発者側や規制当局側の立場に立って捉えるなど、様々な角度から「核酸医薬」について議論を交わしてきた。本文書はその議論で行われた内容について、中間報告として取り纏めたものである。

文書作成の方針として、アプタマーやアンチセンスなど種々ある核酸医薬ではあるが、種類に関係なく、核酸医薬、すなわち十数個～数十個の核酸からなる鎖状の構造を持つオリゴ核酸を投与するということを念頭におくこととした。その観点の下で核酸医薬を開発していく際に生じるであろう課題や留意点について、現行ガイドラインを参照しつつ抽出、考察をおこなうことで、まとめることに注力をおいた。このような作成理念が明確となるように、表題には副題を付け、「核酸医薬の安全性評価のための課題と留意点について ～ ガイドライン策定を志向した課題の抽出と考察～」とした。

本文書では、我々が議論をおこなってきた中で、課題として或は留意点として挙げられた事柄をまとめるとともに、現行のガイドラインでは対処できないと考えられた点については、我々がおこなってきた議論及び考察を基に、試験の実施方針に関する提案という形でまとめた。従って、現行のガイドラインによって対応が困難な課題については新たな手法や考え方も必要と考えられ、本文書には現行のガイドラインの範疇を超えた内容が含まれる箇所もある。

さらに、核酸医薬による非臨床安全性試験の事例は限られており、本中間報告には現時点で一律に判断出来ない点や科学的又は理論的考察あるいは推察に基づいた議論も含まれる。これらの課題の解決には、今後の核酸医薬の研究や開発に伴い蓄積されるであろうデータや科学的な裏づけが必要になってくることから、上記の点に関しては長期に渡っての課題として取り扱っていくべきであると考えている。

核酸医薬の非臨床安全性評価に係る課題と今後に向けた考察

1. はじめに

本文書では、核酸医薬における非臨床安全性試験に関するガイドラインを策定する際に議論となるであろうと考えられる内容を抽出することを目的として、核酸医薬の非臨床安全性試験を実施する際に生じてくると考えられる課題点や留意すべき点についてまとめている。

本文書の作成にあたっては、現行のガイドラインに従って核酸医薬の開発を想定した試験をシミュレーションした際に生じるであろう課題、あるいは注意が必要と考えられた内容を留意点としてまとめている。課題点を提起する方法として、従来の試験法による試験実施が非常に困難あるいは不可能と考えられた場合においては、代替の方法の提案や現行ガイドラインとは異なった考え方を示している。

また、開発候補化合物を絞り込む段階で行われる試験の結果も、安全性の評価に有用な場合も考えられたことから、核酸医薬の開発過程の全段階を考慮し、非臨床安全性試験や安全性薬理試験に加え、薬理試験に係る内容についても記載している。

さらに、ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果に係る評価については、核酸医薬においてしばしば議論となることから、開発の初期、特にRNAを標的とする核酸医薬をデザインする段階に考慮すべき事柄も含めて議論を行っている。

以上のように、核酸医薬の安全性を評価する上では現行のガイドラインに課題があると考えており、本中間報告においては現行のガイドラインと必ずしも整合しない内容が含まれる。したがって、これらについては今後の議論における重要な論点と考える。

なお、本書では、3R（使用動物数の削減・動物の苦痛軽減・代替法の利用）の原則に従い動物及びその他の医薬品開発資源の不必要な使用を避けることについても目的としている。

2. 被験物質について

本章においては、被験物質である核酸医薬を非臨床安全性試験に使用する際における留意点や課題点について、核酸医薬全般を対象として共通すると考えられる内容についてまとめることとした。従って、siRNA、アンチセンスやアプタマーといったそれぞれの種類に応じて検討すべき事項については、対象疾患やそれぞれの開発戦略など個々の事例を考慮し、規制当局と議論すべきと考えているが、ここで示す基本的な考え方が利用できる場合もあるだろう。

2.1 被験物質の分析

非臨床試験に供される被験物質の特性は、各開発段階に応じて適切に解析されている必要がある。開発の進展とともに試験方法が確立されていく側面があることは認識されているが、非臨床試験に使用された原薬、臨床試験に用いられた原薬及び市販製剤の原薬の品質プロファイルについては十分な比較が可能であり、品質特性の一貫性が担保されなければならない。

一般的に、ヒト初回投与試験に用いる被験物質は、非臨床試験で用いた被験物質との間で、安全性又は有効性に悪影響を及ぼすような類縁物質や不純物等のプロファイルが異なってはならないと考える。開発の過程において、製品の品質及び収量を向上させる等の目的で製造工程に変更を加えた場合、このような変更が与える影響について十分に考慮すべきであり、場合によっては適切な手法で品質の一貫性を示す必要がある。

2.2 代替化合物（サロゲート）を使用する際の留意点について

核酸医薬の場合、その特徴からヒト選択的に設計されることがしばしば考えられ、臨床上用いられる予定の製品が薬理作用を示す動物種が選定できない場合には、非臨床試験においてサロゲートを用いることで、標的分子への作用に起因した有害性の検出及び過剰な薬理作用による有害作用の確認には役立つと考えられる。しかし通常、ヒトへの外挿を目的とする量的なリスク評価やオフターゲット効果の評価には適さないと考える。

サロゲートと臨床上用いられる予定の製品との間において、製造工程、類縁物質等の不純物の程度、薬物動態並びにオフターゲット効果など種々の特性が異なっている可能性があり、結果の解釈には注意が必要であろう。

2.3 コンジュゲート及び剤形に係る内容

開発候補品が、生体内での安定性や標的組織への導入効率の向上などを目的

として、タンパク質、脂質、糖或は低分子の化合物などの担体と共有結合した核酸医薬からなる場合（以下「コンジュゲート」という.），又は上記目的で製剤学的な工夫が施される場合は、臨床で使用される剤形を用いて安全性評価を行うことが原則と考える。

コンジュゲート化や製剤化を行うことで、核酸部分の毒性がマスクされ、それにより安全性が適切に評価できないと考えられる場合などには、原薬（例えば、リポソームに封入される前の遊離した核酸医薬原薬）やコンジュゲート化前の原薬を用いた試験が必要になる場合もあるかもしれない。

曝露評価については、可能であるならば、製剤を投与した後のコンジュゲートされた医薬品と非コンジュゲート状態の医薬品の双方、或はリポソーム製剤など製剤化状態の医薬品と遊離した核酸医薬の双方について、評価を行うべきであると考ええる。

3. 試験のデザインについて

本章では、試験をデザインする上で、核酸医薬の種類に関係なく共通に生じ得る留意点や課題を、海外で承認されている核酸医薬の情報に基づいて考察した。

3.1 一般的な考え方

非臨床安全性試験の目的は、臨床試験実施前のみではなく臨床開発の全段階を通して、開発候補品の薬理的及び毒性学的作用を明らかにすることであり、*in vitro* 及び *in vivo* 試験等適切な試験を実施することにより、臨床試験に必要な安全性に関する評価項目を見いだすことができる。

核酸医薬の非臨床試験実施には以下の点について留意する必要がある。

1) 動物種やモデルの選択, 2) 動物数及び性, 3) 投与量, 投与方法及び試験期間, 4) 予測される毒性プロファイル及び回復性, 遅発性毒性, 5) 被験物質の特性, 6) オフターゲット効果

毒性試験は、「医薬品の安全性試験の実施に関する基準(以下「GLP」という.）」に適合して実施されることを基本とするが、核酸医薬の場合、特殊な試験系が必要になる場合も想定される。そのような場合には部分的に GLP に適合しない

試験として実施することも許容されるべきと考える。

また、核酸医薬においては、従来の毒性試験法が適切でない場合や不十分な場合、あるいは有用性が不確かな場合があることにも留意が必要であると考えている（例えば、遺伝毒性試験の *in vitro* 試験において用いられる代謝活性化法により、オリゴ核酸の生体内における代謝分解が反映されているか否かは不明であり、当該手法の適切性は明らかではない）。

核酸医薬の安全性評価においては、①標的分子に作用することに起因する毒性、②標的分子以外の分子に作用することに起因する毒性、③タンパク質等との非特異的な結合などに起因する毒性、④修飾型オリゴヌクレオチドの代謝分解物の毒性について考慮する必要がある。

なお、開発候補品が、進行がんで治療方法の選択肢が限られた患者の治療を対象とする場合には、ICH S9 を考慮した非臨床評価の実施も可能であろう。

3.2 動物種/モデルの選択

核酸医薬を用いた安全性評価は、標的分子のヒトと動物における相同性、発現パターンや体内分布など分子レベルにおける種差を考慮し、適切な動物種が用いられるように試験計画の立案を行う必要がある。

一般毒性試験では、通常げっ歯類及び非げっ歯類の適切な 2 種類の動物種を用いた比較的短期間の試験を実施する。原則として、長期の毒性試験においても 2 種の動物種を用いるべきであるが、短期の毒性試験で 2 種類の動物種が同様の毒性所見を示し、且つ当該核酸医薬の薬理作用とクラスエフェクト等から毒性所見が予測されたものである場合は、より長期の一般毒性試験で 2 種類の動物種を用いる意義は低いのではないかと考える。なお、1 種の動物種で試験を行う場合、非げっ歯類を使用する科学的根拠がなければ、げっ歯類を使用するのが適切であろう。

また、オンターゲット効果を示す動物種が選択できない場合には、オフターゲット効果のみを評価するために 2 種の動物種を用いた一般毒性試験を実施する意義は乏しいと考えている。

外来性因子（即ち、細菌、ウイルスなど）を標的とする核酸医薬については、上記のオンターゲット効果が得られない場合に相当すると考えられ、2 種の動物

種を用いた安全性試験を実施する意義は乏しいと考える。或は、病態動物モデルを用いた薬効薬理試験を実施する際に、安全性評価項目を含めることで、標的分子に関連する潜在的なリスクについての情報が得られる場合もある(注1)。

ただし、どのようなケースにおいて2種の動物種を用いないことが許容されるのかなど具体的な要件については結論を得るにいたっておらず、引き続き議論すべき課題であると考えます。

なお、適切な動物種が存在しない場合、標的となるヒト型遺伝子を導入したトランスジェニック動物を使用することで、オンターゲット効果を評価することも一つの選択肢となるかも知れないが、安全性評価の観点から実施する意義については個別のケースに基づいて議論する必要があると考えます。

3.3 動物数/性

試験に用いる動物数等はICH S4に準拠することが原則であると考えます。

トランスジェニック動物や自然発症性病態モデルなどの動物モデルを用いて評価する場合はより少ない動物数での検討も考慮しうる。このように少数例の動物を用いた試験を検討する場合、ICH S6(R1)に記載のある通り、毒性事象の観察を誤ることに繋がる可能性があることから、観察頻度を増やしたり、観察期間を延長したりすることを検討すべきである。

使用する性については、一般的には雌雄両方を用いるべきであり、一方を省略する場合には、妥当性を示さなければならない。

3.4 投与量/投与方法の設定

投与は、臨床適用で予定される投与方法を考慮し、適切な方法を用いる。ただし、曝露が上がらない等の理由がある場合には、臨床投与経路以外の投与経路も考慮しうる。

投与量は、毒性用量及び最大無毒性量(NOAEL)を含み、用量-反応関係に関する情報が得られるように設定することが望ましい。毒性がほとんど認められない、あるいは全く認められない場合は、明確な最大用量を設定することができないことがある。このような場合、ヒトにおけるリスクを予測する観点から、科学的な根拠に基づいて、ヒトにおける投与スケジュールを考慮した用量を設定する必要があると考えます。

非臨床試験に用いる動物種の標的分子に対する親和性や当該動物種における薬理作用がヒトの標的分子やヒト細胞に対する薬理作用よりも低いことが明らかとなっている場合は、より高用量を投与する必要が生じる可能性もある。

3.5 試験期間

基本的な試験実施期間は ICH M3(R2)に準拠する。なお、投与から薬理学的作用の発現までに時差を生じる場合には、この時差を考慮して観察時期や試験期間を設定しなければならない。

例えば、siRNA やアンチセンスのうち mRNA を分解することで効果を示す核酸医薬では、標的組織内において、標的 mRNA を分解した結果、その mRNA がコードするタンパク質の発現量が低下することで薬理学的作用を発現する。そのため、投与から薬理学的作用の発現までの間に時差が生じる場合がある。また、核酸医薬では生体内安定性を向上させるために化学的な修飾が施されることが多く、そのような核酸医薬は生体内半減期が比較的長くなっている。

従って、このような特徴を有する核酸医薬の場合には遅発性の作用による毒性のリスクが潜在的に存在すると考えられ、薬効薬理試験等で得られた投与から薬効の発現時期や持続時間、薬物動態試験で得られる組織内半減期などの知見は、毒性試験の試験計画を立てる上で有用であると考ええる。

3.6 回復性、遅発性毒性及び残存性

臨床において有害作用の懸念がある薬理学的又は毒性学的影響が、臨床的に意義のある曝露量で認められた場合、その作用の回復性を評価する必要がある。回復性は、観察された影響の可逆性について一般的な解釈を検討することや、一般毒性試験の反復投与試験において、休薬期間を設けた回復性評価のための試験を実施することで、評価が可能となると考える。

核酸医薬の中には組織内半減期が比較的長いものが存在し、また投与から作用発現までに時差があることもしばしばである。そのため、毒性の標的となる組織等での蓄積やクリアランスについての検討のみならず、遅発性毒性の可能性についても考慮する必要があるかも知れない。

一般的に、反復投与毒性試験で行われる休薬期間の目的は、観察された影響の可逆性を評価することであるが、期間を適切に設定することで、遅発性毒性及び組織での蓄積やクリアランスの検討も同時に行えるかもしれない。従って、

核酸医薬における反復投与後の休薬の目的は、通常行われる回復性評価や遅発性毒性に係る検討や評価にとどまらず、毒性の標的となる組織や器官における曝露や残存性の評価を含めたものとするのが望ましいと考える。

以上の内容については、さらなる議論が必要な点であるが、現時点においては、残存性に関連する潜在的なリスクについて何らかの説明が必要と考えている。

なお、ICH M3(R2)の Q&A の解説と同様、回復性の評価は、毒性症状が完全に回復するまで観察する必要はないであろう。

3.7 免疫原性

アンチセンス核酸をヒトに投与した際、その核酸医薬に対する抗体が産生される場合があることが報告されている（参考文献 23）。このことは、アンチセンス核酸に限られたことではなく、核酸医薬を投与した際にはその核酸医薬に対する抗体が産生される可能性を示唆していると考えられる。従って、非臨床試験において、開発候補品に対する抗体の産生について検討し、抗体の産生が、薬物動態、薬力学的パラメータや薬理作用に及ぼす影響、或は副作用や毒性の発現などに対する影響について検討することは、開発候補品の非臨床安全性試験の結果を解釈する上で有用と考える。

4. 安全性薬理試験、副次的薬理試験及び動態に関する評価

ここでは、薬理試験や動態試験に分類される内容のうち非臨床安全性試験と密接な関係にある安全性薬理試験、副次的薬理試験やトキシコキネティクス、さらには安全性評価に有用な分布や代謝といった動態に関する評価を行う際の留意点等をまとめるとともに、課題点については、試験をデザインする際に参考になると思われる考え方を提案としてまとめた。

4.1 安全性薬理試験及び副次的薬理試験

開発候補品に有害な薬理活性が認められるか否かを検討することは重要である。このような活性の有無を検討するためには、適切な動物種、或はモデルを用いることを検討すべき場合もあると考えられる。ここでいうモデルには、トランスジェニック動物などの動物モデルやサロゲートを用いることが含まれる。安全性薬理試験については、ICH S6(R1)や ICH S7A など関連するガイドラインを参照することにより、試験をデザインすることができるであろうと考えてい

る。

核酸医薬をデザインする段階、あるいは開発候補品を絞り込む段階で実施される効力を裏付ける薬力学試験（薬効薬理試験）、並びにハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果の検討や核酸医薬でしばしば認められる自然免疫の賦活化の検討などの副次的薬理試験の結果は、非臨床安全性試験で得られた結果を解釈するために有用な情報を与えると考える。また、こうして導いた評価結果をもとに安全性薬理試験の追加試験の必要性について判断することが重要と考える。

4.2 薬物動態及び曝露評価

剤形、濃度、投与方法又は投与用量により、薬物動態プロファイルが影響を受けることもあると考えられることから、薬物動態試験は可能な限り、臨床試験で想定される投与経路及び剤形での実施が望ましいと考える。

4.2.1 薬物動態について

核酸医薬のリン酸部分の修飾に関して、リン酸ジエステル酸素原子が硫黄原子で置換されたホスホロチオアート修飾型オリゴヌクレオチドは、加水分解により切断されると、最終的にホスホロチオアートモノヌクレオチドになる可能性がある。これは、加水分解によりチオリン酸の脱離後に核酸プールへ蓄積することや再利用されることが考えられる。また、これと同時に、ホスホロチオアートモノヌクレオチドとして蓄積、再利用あるいは排泄される可能性も考えられる（参考文献 19）。

また、文献報告に基づけば、ラジオアイソトープで標識したホスホロチオアートを使った分布試験において、腎臓、肝臓、脾臓、リンパ節、骨髄及び心臓で標識体が高濃度に検出されている（参考文献 20, 21）。一方で、³⁵S で標識したホスホロチオアートの排泄試験では、未変化体や切断された代謝分解物が主として尿中に検出されている。さらに、塩基部を ¹⁴C で標識した場合、塩基部がデオキシリボースから切断された後、代謝され ¹⁴CO₂ として呼気中に排泄されることが確認されている。

このような知見を踏まえ、標識体を用いた分布や排泄等の ADME、あるいは残存性に関するデータは安全性を評価する上で考慮されるべきと考える。

薬物動態の評価や実施する時期については、ICH S6(R1), ICH M3(R2), ICH S3B

や非臨床薬物動態試験ガイドライン等の関連したガイドラインを参照して実施できるであろうと考える。

4.2.2 トキシコキネティクス

血中濃度の測定については、急性期の毒性を解釈する上では重要なデータを与えるだろう。一方、長期投与による毒性や遅発性の毒性を解釈するためには、毒性の標的となる組織や器官における蓄積性、あるいは残存性の評価も考慮する必要があるかも知れない。

こういったことを考えれば、一般毒性試験における全身曝露を評価するための血中濃度の測定は、試験に用いられる動物種それぞれにおいて、短期試験などにおいて薬物動態のプロファイリングが実施されており、組織曝露量との関係が明らかにされていれば、その後に実施される反復投与試験等においては、モニタリングによる測定で十分であろうと考える。

上述した血中濃度の測定時点数（プロファイリングかモニタリングか）の十分性については、種々のデータに基づいて議論されるべきと考えることから、データが蓄積された段階で議論する必要があると考える。

以上のことから、各開発候補品の毒性標的となる組織/器官における曝露や残存性の評価は、毒性データの解釈と合わせて行うことが重要であり、トキシコキネティクス、薬物動態試験及び毒性試験の結果を評価することは、核酸医薬の安全性を考える上で重要と考える。

5. 一般毒性試験

ここでは、核酸医薬の種類を超えて、一般毒性試験を実施する際に留意しなければならないであろうと考えられた点についてまとめるとともに、アンチセンス核酸を被験物質として用いた場合を想定した試験をシミュレーションした際、課題となった点についても述べている。

5.1 用量設定について

一般毒性試験において得られるデータからは、用量と全身又は局所毒性、或は薬効領域と毒性領域との関連性についての情報が得られることがある。また、初回の臨床投与量を算出するにあたっては、NOEL, LOEL, NOAEL, LOAEL, あるいはMTDなどといった情報は重要である。こういったことから一般毒性試

験では、想定している対象疾患も考慮し、これらの指標の全てではなくとも、臨床試験の初回投与量の算出に必要な指標が得られる様に試験を計画することが望ましいと考える。

アンチセンス核酸を被験物質とした一般毒性試験をシミュレーションしたところ、高用量設定のために行う予備毒性試験において、毒性がほとんど、あるいは全く認められない場合が想定された。こうした場合には、非臨床試験に用いる動物種における薬理作用や臨床での最大曝露量などを考慮した上で、科学的根拠に基づいて最高用量を設定し、試験を実施することが重要ではないかと考えるに至った。すなわち、ICH M3(R2)に記載されている高用量の選択基準の考え方を参考にしつつも、核酸医薬については現実的に意義のある最高用量の設定基準を別に設けることについて検討する必要があるのではないかと考えている。

どのような基準に基づいて最高用量を設定することが適切であるかについては継続して議論する必要があると考える。

5.2 急性毒性に関する評価

急性毒性の評価やMTDを検討する試験については、ICH M3(R2)やICH S6(R1)などのガイドラインを参照することで実施可能であると考えている。

5.3 反復投与毒性試験

反復投与毒性試験の試験デザインは、ICH M3(R2)などの関連したガイドラインを参照することに加え、第3章に述べた課題や留意点を考慮することで可能であると考えている。

反復投与毒性試験に組み込まれるべきトキシコキネティクスに関しては、第4章で述べた通りである。また、すでに報告されている核酸医薬の毒性標的となる組織/器官(3.6及び4.2参照)における曝露や残存性の評価と毒性所見とを合わせながら評価することは重要であると考えている。

また、KYNAMRO®の投与により核酸医薬に対する抗体の誘導が報告されており(参考文献22)、投与期間中に産生される抗体による作用への影響を検討するなど、長期投与を行う場合には抗核酸医薬抗体に関する評価も必要であるかも知れない。

その他、核酸医薬では、動物種により特有の毒性が見られることが幾つか報告されている（注 2）。このような点に留意して試験を実施することで、用量と毒性との関連性を明らかにできるであろう。

6. 遺伝毒性試験

従来の試験方法を念頭に、核酸医薬の遺伝毒性評価について考察をおこなってきたが、課題が多く存在しているだろうと考えられ、継続的に議論が必要であると考えられた。

ICH M7 ガイドラインはオリゴヌクレオチドを有効成分とする医薬品を対象としていないが、開発候補品に遺伝毒性の懸念のある低分子不純物が残留するリスクが考えられる場合には、ICH M7 ガイドラインを参考にするべきであろうと考える。

一方、従来の遺伝毒性試験法が、突然変異の検出、染色体異常誘発の検出、あるいは DNA 損傷性の検出を目的とした試験系であることを念頭に核酸医薬の場合を考えると、核酸医薬については、例えば代謝物のゲノム DNA への取り込みや挿入など他の医薬品とは異なる機序により遺伝毒性を示す可能性があり、従来の試験方法では十分ではないことも考えられる。

このような観点を踏まえ、本章では、主に課題点についてまとめるとともに、課題克服のための方策を提案する。

6.1 試験方法について

核酸医薬の特性を考慮すると、未変化体の核酸医薬の遺伝毒性の評価には、従来から用いられている標準的な遺伝毒性試験の適切性に疑問はあるものの、現時点では他に適切な試験系は確立されておらず、実施意義が否定されるものではないことから、現時点では依然として標準的な遺伝毒性試験の実施は必要と考える。*In vivo* の遺伝毒性試験については、動物愛護の観点も考慮し、反復投与毒性試験において遺伝子への取り込みや DNA の変異などに関する評価を検討することは重要であると考えられる。

6.2 非天然型人工核酸を含む場合

核酸医薬においては、生体内安定性を向上させるために化学的に修飾した人工核酸が用いられることがある。核酸医薬の構成単位となる非天然型の人工核

酸モノマーの体内動態に関しては明らかではない部分も多く、非天然型人工核酸モノマーが DNA に取り込まれることにより、DNA の変異など遺伝子に影響する潜在的なリスクがある。そのため、核酸医薬のオリゴヌクレオチドとしての遺伝毒性評価に加え、開発候補品で使用される非天然型人工核酸モノマーの遺伝毒性についても評価されることが望ましいと考える。

しかしながら、現在のところ開発候補品を構成する非天然型核酸モノマーについて遺伝毒性を適切に評価するための具体的な試験系は確立されておらず、適切な試験系の構築及び妥当性の確認が必要になると考える。

6.3 *in vivo* 試験における課題

動物を用いた評価では、評価に用いる組織の選択も重要になるであろうと考えられ、開発候補品の毒性標的や蓄積性を考慮することも重要であろう。例えば、核酸医薬では、肝臓での蓄積が骨髄における曝露を上回る可能性が考えられるが、このような場合において科学的な根拠に基づき肝臓又は骨髄のどちらか一方の組織のみを選択して評価することも可能であるだろうと考える。

6.4 その他課題と留意

従来の方法による細胞を用いた *in vitro* 試験においては、核酸医薬の細胞内への移行性が乏しいことも考慮すれば、*in vivo* 試験も含めた遺伝毒性試験の標準的な組み合わせの全てを、ヒトへの初回投与の開始前に完了しておくべきであると考えている。

何れにしても、遺伝毒性試験については、核酸医薬の遺伝毒性を評価する観点から従来の試験方法の妥当性及び十分性の検証、並びに新たな試験方法の開発の必要性を含めて、今後も最新の知見を踏まえた議論が必要な点であると考えている。

7. 生殖発生毒性試験

遺伝毒性試験の場合と同様に、既存のガイドラインでは対応が困難であると考えられる点が散見され、課題があると考えられる。従ってここでは、これらに対する対処法について考察及び提案を提示している。

7.1 一般的な事項

一般的には従来と同様、生殖発生毒性試験の必要性については、開発候補品

の臨床における適応及び想定される対象疾患の患者群により判断されるべきである。

試験の実施には、原則的に ICH S5 (R2) に従うことで実施可能であると考えるが、種特異性、開発候補品の特性及び作用機序、免疫原性及び薬物動態、並びに胚・胎児への曝露に基づいて、個別の試験デザイン及び投与スケジュールを改変することが必要な場合もあると考える。

開発候補品に人工核酸が用いられる場合、その代謝物（断片化されたオリゴヌクレオチドや人工核酸モノマーなど）の胎盤通過能などに関する情報、及び人工核酸モノマーの DNA への取り込み等の潜在的なリスクなど生殖発生に関連した影響を考慮して試験をデザインする必要があると考える。特に、代謝物が DNA に取り込まれるリスクが否定できない場合、性成熟に達した適切な動物種における反復投与毒性試験において、生殖器官の評価、性周期、精子数、精子形態や運動能及び雌雄の性ホルモン等の検査は重要であると考えられる。また、受胎能や発生への影響が懸念される場合においては、試験の早期実施など慎重な評価の実施を提案する。

雄の授胎能への影響については、一般的な場合と同様、一般毒性試験における精子検査、生殖器の病理及び病理組織学的検査による評価により、成人男性を用いた臨床第 I 相試験を開始することが可能であろうと考える。しかし、人工核酸モノマーの再利用を介して次世代に影響を与える潜在的なリスクを考慮すれば、臨床第 I 相試験を開始する前に、予備的な試験等により雄授胎能及び次世代への影響に関する評価を実施することを考慮すべき場合もあるかもしれない。

7.2 動物種について

動物種については、開発候補品を用いたときに薬理的な活性を示す適切な動物種で実施することが望ましく、開発候補品がげっ歯類及びウサギにおいて薬理作用を示す場合は、一般的な場合と同様に両動物種を胚・胎児発生試験に使用すべきであると考えられる。ただし、どちらか一方の動物種で胚・胎児の致死作用又は催奇形性等の重篤な生殖発生毒性が確認され、十分なリスク評価や管理が行えると判断できる場合には、他の種での試験は不要であると考えられる。

NHP 以外に薬理作用を示す動物種が選択できない場合、NHP を用いた発生毒

性試験の実施を検討するべきと考える。しかしながら、このような場合であっても、サロゲートを使用することでNHP以外のより適した動物種を用いた発生毒性試験の実施も重要な選択肢となるのではないかと考える。なお、開発候補品の安全性を評価する上で適切な動物種が存在しない場合、ヒトでの標的分子を発現するトランスジェニック動物の様なモデル動物の使用も考えられるが、バックグラウンドデータ等の情報についても十分な考慮が必要であると考えられる。

7.3 追加試験，実施時期等

標的遺伝子を改変した動物の表現型や核酸医薬の作用機序など、受胎能や胎児への有害作用を示唆する様な科学的根拠から、リスクコミュニケーションに必要な生殖発生に関する十分な情報が得られる場合、必ずしも追加の非臨床試験は必要ではないと考えられる。

各試験の実施時期については、臨床における適用及び想定される対象疾患の患者群、臨床試験のデザインや開発候補品の特性から、非臨床試験の早期実施など慎重な対応が必要であろうと考える。また、進行がんで治療方法の選択肢が限られた患者の治療を目的とする場合については、ICH S9 ガイドラインを参照することで対応できると考える。

8. がん原性試験

遺伝毒性と関係が深いがん原性試験に関しても課題があると考えられる。しかしながら、実例が限られた現状を鑑みると、既存のガイドラインを参照して試験を実施し、データの蓄積を踏まえて、継続的に議論する必要があると考える。ここでは、現段階で留意しなければならないと考える点をまとめることとした。

8.1 試験実施時の留意点について

がん原性試験の実施の要否についてはICH S1A の判断基準に従うことで判断する必要があるが、核酸医薬では、未変化体、あるいは代謝物が長期間組織に停滞する点について十分な考慮が必要であると考えられる。

実施時期や試験方法についてはICH S1A 及びICH M3(R2)を参照すべきと考える。しかし、非天然型の核酸モノマーを有する核酸医薬の場合、DNA への人工核酸の取り込みや DNA の変異など遺伝子に対して影響を及ぼす潜在的な懸念がある。このような非天然型核酸モノマーを含む核酸医薬の場合は、*in vitro* 遺

伝毒性試験の有用性に疑問があると考えられることから、遺伝毒性試験の結果に関わらず、反復投与毒性試験において前がん病変の有無を検査するなど、がん原性に関する評価を慎重に行うことが必要と考えられる。

9. 局所刺激性に関する評価

核酸医薬の投与方法について、これまで我々が調査してきたところでは、皮下投与等の経口投与以外での投与方法が大半であった。それらの試験では、投与部位において投与による影響と考えられる炎症等が認められていたことを鑑みて、本章では、非臨床安全性を評価する上で、局所刺激性に関しての留意すべき事柄として考えられた内容をまとめた。

9.1 試験実施時の留意点について

局所刺激性についての評価は、必須項目であると考え。試験実施には、一般毒性試験の一部として、予定臨床適用経路により評価することが望ましく、独立した試験での評価は避けるべきであると考え。臨床で使用を予定している剤形での試験は必ずしも必要とはしないが、臨床製剤の局所刺激性を評価するのに適切なものであるべきである。また、有効成分の標的組織への移行性や薬物動態の改善を目的とした製剤においては、臨床製剤を用いた評価が必要と考えている。

その他については、ICH M3(R2)を参照して実施することが可能であると考えられる。

10. 免疫毒性試験

核酸医薬では自然免疫の賦活化がみられることも少なくなく、その結果、免疫毒性につながる懸念がある。また、核酸医薬を投与することによる免疫系組織の変化として、脾臓、リンパ節及び胸腺の重量変化も認められている（参考文献 22）。さらに、4.2.1 節に記載した様に、ホスホロチオアートが蓄積する組織であり、かつ毒性の標的として考えられる臓器として、脾臓、リンパ節及び骨髄といった免疫に関連した組織が挙げられている。このようなことから、ICH S8 に記載されている様に、一般毒性試験における免疫毒性の徴候を評価することは重要であると考え。

この様な背景から、3.7 節では核酸医薬による免疫原性の評価について述べた

が、本章では免疫毒性に関する評価に関する留意点についてまとめた。

10.1 試験実施時の留意点について

一般毒性試験において、例えば免疫系組織における変化など、免疫毒性の徴候が認められた場合、追加の免疫毒性試験の必要性を検討し、適切な試験系により実施することは重要であると考えます。試験実施については、ICH S8 に従って行うことが妥当であると考えます。

但し、自然免疫の賦活化が起こる条件等を考えた場合、動物によって賦活化を引き起こす原因となる塩基配列が異なっているため、動物を使った試験で認められた結果からヒトにおけるリスクを必ずしも予測できるものではないかもしれないという点には注意が必要である。

なお、追加の免疫毒性に関する試験は、一般的な場合と同様に大規模臨床試験或は長期投与臨床試験（例えば、臨床第Ⅲ相試験）の開始前には完了されている必要があると考えます。

11. ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果に係る考察

アンチセンスや siRNA などの RNA を標的とする核酸医薬は、ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果のリスクがしばしば議論になる。この背景を考慮し、ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果に関して、本章では特にアンチセンス医薬に焦点を当て、核酸医薬をデザインする段階での留意点、ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果の予測と評価法、さらには判断基準について現時点での考察をまとめた。ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果に関して、開発候補品をデザインする段階でどのような検討がなされたのか、非臨床安全性評価としてどのような検討がなされたのかについて、規制当局に具体的に情報を提供することが重要であろうと考えます。なお、アンチセンスを含め核酸医薬のハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果に関しては、継続した議論が必要と考えます。

11.1 RNA を標的とする核酸医薬をデザインする段階での留意点について

RNA を標的とする核酸医薬をデザインする際には、適切な検索アルゴリズムを用いて、ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果を可能な限り抑制するように配列を設計することが望まれる。

11.2 RNA を標的とする核酸医薬のハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果の予測について

現状ではハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果を予測できる段階に達していないが、以下の考察及び考え方を基盤として安全性を評価するための方法論を検討していく必要があると考えている。また、このような評価についてどのようなタイミングでどの程度の評価を実施することが適切であるかについても、今後得られる科学的な知見に基づいて議論を継続する必要があると考えている。現時点では、*in silico* 解析からハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果の発現を正確に予測することができず、また、*in vitro* 試験（マイクロアレイ解析等）では発現していない遺伝子に対する影響が評価できない。従って、ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果に関連する安全性を予測する際には、*in silico* 解析と *in vitro* 試験を組み合わせ互いに補完的に実施されるべきと考えており、これらの解析における留意点や課題について以下にまとめる。

11.2.1 *in silico* 解析における留意点について

ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果はオリゴヌクレオチドの配列に依存して起こる。このため、オリゴヌクレオチドの配列を基に、適切な遺伝子検索アルゴリズムを用いて解析することにより、潜在的に影響を受ける可能性のある遺伝子（以下、オフターゲット候補遺伝子）を予測することができる。*In silico* 解析でヒットする遺伝子の数は、①RNA と相補鎖を形成するオリゴヌクレオチドの塩基長、②相補結合において許容するミスマッチ、インサクション、デリーション等の数により、大きく変化する。*In silico* 解析において検討すべきミスマッチ等の数の設定に関しては、ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果に関する最新の知見を十分に考慮した上で、発現が抑制される可能性のある遺伝子を漏らさないように留意する必要がある。しかしながら現時点では、許容するミスマッチ等の数については明確な根拠はないため、今後科学的知見の集積を踏まえて継続して議論すべきと考えている。

なお、鎖長の短いアンチセンスについては、完全相補する確率が増すため、膨大な数のオフターゲット候補遺伝子が抽出される可能性がある。例えば siRNA に関しては、シード配列（7 塩基長）と RNA の相補結合がハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット遺伝子の発現に関与することが示されており（参考文献 23）、*in silico* 解析から抽出されるオフターゲット候補遺伝子は数千と見

積もられる。

11.2.2 *in vitro* 解析における留意点について

In silico 解析により抽出されたオフターゲット候補遺伝子について、*in vitro* 試験で発現変動を解析することは有用と考えられる。上述のように、相当数のオフターゲット候補遺伝子が存在するケースが考えられることを踏まえると、*in vitro* 試験で遺伝子発現に与える影響を解析するためには、マイクロアレイ解析などの網羅的な手法を用いることが望ましいと考える。*In vitro* 試験に用いる細胞としては、当該オリゴヌクレオチドが到達すると考えられる組織の遺伝子発現パターンに近い細胞を用いることが望ましく、また、それら細胞において用いた核酸医薬のオンターゲット効果が十分に得られていることを示すことが重要であろう。なお、*in silico* 解析によって抽出されたオフターゲット候補遺伝子が、*in vitro* 解析で用いる細胞株において必ずしも発現していない可能性があることには留意する必要があるだろう。

In vitro 試験の結果として、どの程度発現変動した場合にハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果によるリスクに関して考察する必要があるかについては、変動の程度と発現変動する遺伝子の性質を考慮する必要がある。オフターゲット候補遺伝子に関する *in silico* 解析を踏まえて、個別に設定される必要があると考える。なお、*in vitro* 解析においてどの程度の遺伝子発現の変動があった場合に当該遺伝子に対する影響について検討を行う必要があるかについては、①オフターゲット候補遺伝子としては様々な遺伝子が標的となりえること、②意図しない遺伝子を抑制した場合の臨床的な影響について予測することは難しいこと、③発現変動の程度は細胞株や投与量などの実験条件によって変動すると考えられることを踏まえると、発現変動の程度について一律に規定することは難しく、臨床試験の被験者や対象患者が受容可能なリスク、投与期間、被験物質の特性及びハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット候補遺伝子の機能等を考慮した上で、個々のケースごとに規制当局と議論を行うことが重要と考える。

アンチセンスがスプライシングに影響を与えることで、スプライシング異常による遺伝子産物が生じる場合には、発現低下による有害作用を前提とするハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果とは本質的に異なる現象として捉えるべきであり、留意すべきと考える。

12. 臨床試験に関する考察

本章ではハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果の予測とリスク評価を中心として、ヒト初回投与試験の実施、臨床試験期間中及び承認申請時における留意点について、我々が考えた事柄についてまとめた。

12.1 ヒト初回投与開始における留意点

ヒトへの初回投与に先だって、利用可能な評価法を駆使し、ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果の予測とリスク評価を含め、当該核酸医薬を投与した際のリスクについての十分な検討をおこない、かつその内容に基づいて評価項目及び評価方法が適切に設定されるべきであると考えます。

また、初期の臨床試験の結果、非臨床試験の結果から予測できなかった新たなリスクが顕在化し、非臨床試験における更なる評価が必要となる場合には、顕在化したリスクに応じて適用対象となる患者集団等を考慮し、適切な段階で、モデル動物を用いるなど適切な系による非臨床試験における評価や、臨床データの詳細な解析等を実施し、十分なリスク評価を行うべきと考えます。

なお、ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果についてなされた検討に関する資料は、適切な段階で規制当局に提出すべきと考えます。

12.2 ヒト初回投与量の算出について

核酸医薬に限ったことではないが、ヒト初回投与量の決定にあたっては、薬力学的及び毒性学的プロファイル、薬物動態、並びに薬力学的な用量反応性を含む非臨床試験データ全てを考慮しなければならない。

一般にヒト初回投与量は、最も感度の高い動物種を用いた非臨床毒性試験における NOAEL をもとに、アロメトリック補正、あるいは、薬物動態の情報に基づいて HED を算出し、さらに被験薬の特性や臨床試験デザインを踏まえた安全係数を考慮し設定される。しかしながら核酸医薬では、ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果による安全性への懸念や第 3 章で述べた様に非臨床試験における限界もある。そのため、適切な場合には MABEL を用いた検討も考慮し、対象とする疾患や使用する核酸医薬の種類等の様々な要因を踏まえて、判断することが重要であると考えます。

なお、ヒト初回投与量を算出するアプローチは、「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」や各極のガイドラインを参

考にすべきと考える。

13. 早期探索的臨床試験

ここで扱う早期探索的臨床試験は、ICH M3(R2)に述べられているところと同様、その実施目的が、第 I 相試験の初期に実施され、限定的なヒトへの曝露であり、治療を目的とせず、かつヒトにおける忍容性を求めるものではない試験を対象に考察をおこなった。すなわち、ICH M3(R2)を参照することで実施は可能と考えているが、核酸医薬で特に考えられたハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果によるリスクや遺伝毒性の項で述べてきたリスク等を鑑みて留意が必要と考えられた点についてまとめた。

13.1 用量設定について

ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果による潜在的なリスクや非臨床試験における限界があるため、通常の医薬品の場合よりも慎重に検討する必要があるだろうと考える。

13.2 早期探索的臨床試験実施のために推奨される非臨床試験

a) 薬理的試験

低分子医薬の場合に実施すべきとされている *in vitro* 標的/受容体結合プロファイルの解析と同様に、*in silico* 解析或は *in vitro* 試験によるヒトにおけるハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット遺伝子のプロファイル解析は実施されるべきであると考ええる。

b) 一般毒性試験

ICH M3(R2)に記載されている何れのアプローチによって実施するにしても、少なくとも、ICH M3(R2)に記載された試験と同様の試験は必要であると考ええる。

c) 遺伝毒性

3.4 節で述べてきた様な懸念や限界があることから、ICH M3(R2)に記載されている何れのアプローチにおいても、開発候補品における遺伝毒性試験、並びに開発候補品が新規の人工核酸モノマーを構成成分に含む場合の新規人工核酸モノマーによる遺伝毒性試験について、第 6 章で述べた内容に従っておこなっておく必要があると考える。

14. 注釈

1) 病態動物モデルの使用は、毒性評価項目の明確化、臨床適応の選択及び適切な剤形、投与経路及び投与方法の決定において有益である。これらの病態動物モデルに関しては、試験結果を評価する際の参考として利用できる背景データが不足していることが多いということを留意しておかなければならない。このため、試験計画を最適化するために、同時に対照群やバックグラウンドのデータを収集することが重要である。

2) 動物種による特異的毒性の例として以下の症状が報告されている。

ラット： 蛋白尿症を示し易い（参考文献 24）。

イヌ： 遺伝情報に乏しいが血中動態はヒトと類似（参考文献 24）。

サル： 一本鎖オリゴの単回高用量投与（閾値あり）でアナフィラキシー様症状を呈する（参考文献 25）。一過性に aPTT を延長する（参考文献 25, 26, 27）。

15. 参考文献

1. ICH M3(R2):「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンスについて」（平成 22 年 2 月 19 日薬食審査発 0219 第 4 号）
2. ICH S1A:「医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンスについて」（平成 9 年 4 月 14 日 薬審第 315 号）、ICH S1B:「医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改正について」（平成 20 年 11 月 27 日 薬食審査発第 1127001 号）、及び「医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改正について」（平成 20 年 11 月 27 日 薬食審査発第 1127001 号）
3. ICH S2(R1):「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて」（平成 24 年 9 月 20 日薬食審査発 0920 第 2 号）
4. ICH S3A:「トキシコキネティクス（毒性試験における全身暴露の評価）に関するガイダンスについて」（平成 8 年 7 月 2 日薬審第 443 号）

5. ICH S4：単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について（平成5年8月10日 薬新薬第88号），及びICH S4A：反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について（平成11年4月5日 医薬審第655号）
6. ICH S5A, ICH S5B：「医薬品の生殖発生毒性試験に係るガイドラインの改定について」（平成9年4月14日 薬審第316号），及びICH S5B(M)：「医薬品の生殖発生毒性試験についてのガイドラインの改正について」（平成12年12月27日 医薬審第1834号）
7. ICH S6(R1)：「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について（平成24年3月23日 薬食審査発0323第1号）
8. ICH S7A：「安全性薬理試験ガイドラインについて」（平成13年6月21日 医薬審発第902号）
9. ICH S8：「医薬品の免疫毒性試験に関するガイドラインについて」（平成18年4月18日 薬食審査発第0418001号）
10. ICH S9：「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドラインについて」（平成22年6月4日 薬食審査発0604第1号）
11. 「新医薬品等の製造（輸入）承認申請に必要な一般薬理試験のガイドライン」について（平成3年1月29日 薬審第4号）
12. 「非臨床薬物動態試験ガイドライン」について（平成10年6月26日 医薬審発496号）
13. 「医薬品の製造(輸入)承認申請に必要な毒性試験のガイドライン」について（平成元年9月11日 薬審1第24号）
14. 「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」について（平成24年4月2日 薬食審査発0402第1号）
15. Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-inhuman clinical trials with investigational medical products. EMEA/CHMP/SWP/ 28367/07
16. Sims J. Member of ABPI/BIA Early Stage Clinical Trials Taskforce. Calculation of the Minimum Anticipated Biological Effect Level (MABEL) and 1st dose in human. In: EMEA Workshop on the Guideline for first-in human clinical trials for potential high-risk medicinal products. 12 June 2007 London. Available from:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2009/11/WC500010862.pdf

17. Guidance for Industry; Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers (CDER/FDA, July 2005)
18. Henry SP, Giclas PC, Leeds J, Pangburn M, Auletta C, Levin AA, Kornbrust DJ. Activation of the alternative pathway of complement by a phosphorothioate oligonucleotide: potential mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther.* 281, 810–816 (1997)
19. Yu RZ, Geary RS, Levin AA, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antisense oligonucleotides. *In Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Biotech Drugs*, ed. Meibohm B, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp 93-120, 2011.
20. Geary RS, Yu RZ, Watanabe T, Henry SP, Hardee GE, Chappell A, Matson J, Sasmor H, Cummins L, Levin AA. Pharmacokinetics of a tumor necrosis factor- α phosphorothioate 2'-O-(2-methoxyethyl) modified antisense oligonucleotide: comparison across species. *Drug Metab Dispos.* 31, 1419-1428 (2003)
21. Black LE, DeGeorge JJ, Cavagnaro JA, Jordan A, Ahn CH. Regulatory considerations for evaluating the pharmacology and toxicology of antisense drugs. *Antisense Res Dev.* 3, 399-404 (1993)
22. Mipomersen (Kynamro®) FDA 審査報告
23. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, 21, 635-637 (2003)
24. Levin AA, and Henry SP, Toxicology of oligonucleotide therapeutics and understanding the relevance of the toxicities. *In Preclinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals*, ed. Cavagnaro JA, John Wiley & Sons, Inc., pp 537-574, 2008.

25. Henry SP, Novotny W, Leeds J, Auletta C, Kornbrust DJ. Inhibition of coagulation by a phosphorothioate oligonucleotide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7, 503-510 (1997)
26. Sheehan JP, Lan HC. Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex. *Blood* 92, 1617-1625 (1998)
27. Sheehan JP, Phan TM. Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex by an allosteric mechanism. *Biochemistry.* 40, 4980-4989 (2001)

III. 中間報告を基に作成した核酸医薬開発に係る考慮事項

1. 作成の方針と手順

事業の3年目までに抽出し、まとめた「核酸医薬の開発における留意点と課題について」（中間報告）を基に、核酸医薬ならではの課題や留意点をICH等の既存のガイドラインではカバーできない点を主体として、また既に記載されていても特に注意が必要と思われる点については重複を恐れず、記載することとした。

作成の手順は以下の通り。

①事業4年目：前年度までに作成した中間報告を基にしたヒアリング等による意見徴募をおこない、第一次草案作成に向けた構成、中間報告で抽出した課題やヒアリングで得た意見に対する対応等について、在籍招聘であるPMDA職員やNIHS職員とディスカッションを行いつつ、大阪大学大学院薬学研究科が主体となって第一次草案を作成した。

②事業5年目：上半期に、前年度に作成した第一次草案について、在籍招聘のPMDA職員による検討及びチェックを経て得られたコメントを検討し、大阪大学大学院薬学研究科で修正を行うことで第二次草案とした。

下半期には、第二次草案についてPMDAと共同で再検討、修正することで最終案から本事業の成果物である「核酸医薬の品質担保及び非臨床安全性の評価に関する考慮事項」を作成した。

2. 考慮事項

上記作成の方針と手順に従って作成した「核酸医薬の品質担保及び非臨床安全性の評価に関する考慮事項」を、次項以降に掲載する。

革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業（厚生労働省）

課題名：核酸医薬の臨床有効性，安全性の評価方法

核酸医薬の品質担保及び非臨床安全性の評価に関する考慮事項

本成果物は，厚生労働省の革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業に採択された研究に基づき作成されたものである。

本書は，この事業による人材交流の一環として，独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）との連携の下，核酸医薬の開発に係る品質担保に関する評価及び非臨床安全性評価に関連した試験を実施する際，現時点で考慮しなければならないであろうとされた点について検討をおこない，その内容についてまとめたものである。

なお，本事業の一環として PMDA の職員が検討過程において助言等を行ったが，当該助言等及び本成果物は PMDA の公式見解ではなく，本事業に採択された大阪大学大学院薬学研究科の責任においてまとめたものである。

平成 29 年 3 月 31 日
大阪大学大学院薬学研究科

【趣旨】

大阪大学大学院薬学研究科は、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）、国立医薬品食品衛生研究所及び国立循環器病研究センター研究所との連携の下、平成24年度から開始された厚生労働省の「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」に、「核酸医薬の臨床有効性、安全性の評価方法」として採択された。

本事業において大阪大学大学院薬学研究科は、平成24年度より連携各機関及びその他の外部機関と協力し、本研究の基となる高コレステロール血症を対象とした核酸医薬をモデルケースとして、現行のガイドラインを参考にしながら核酸医薬の品質管理及び非臨床安全性評価における課題の検討を開始した。平成26年度終了時には、核酸医薬の開発及び規制（核酸医薬の品質管理及び非臨床安全性）に関する考え方や留意すべき事項、さらには今後の課題について、「核酸医薬の開発における留意点と課題について（中間報告）」と題した本事業の報告書を取り纏め、中間報告として公表するに至った。我々はその内容に関して関係学会等で広く意見を募りつつ、引き続き議論を深めてきた。

平成28年度は本事業の最終年度にあたることから、これまでの議論を集約して、核酸医薬全般の開発を想定した品質管理及び非臨床安全性評価における考慮事項をまとめることとした。本書をまとめるにあたっては、中間報告の内容に基き、現行ガイドラインや現時点での知識や技術を踏まえた上で、可能な限り品質担保と評価及び非臨床安全性の評価に関する考慮事項を提示することを試みている。しかしながら、核酸医薬についての承認事例が限られていることから、議論が不十分な箇所も存在する。さらに、現行のガイドラインによって対応が困難な事柄に対しては新たな手法や考え方も必要であり、一部現行のガイドラインの範疇を超えた内容も含まれている。これら課題に対する科学的に妥当な解決策については、今後の核酸医薬に関する科学的・技術的な発展や国内外でおこなわれている試験によって得られる経験など、最新の知見と動向を踏まえて継続的に議論を続けていくことが必要である。

【本書作成にあたって助言等を行った PMDA 職員】

ワクチン等審査部	笛木 修
ジェネリック医薬品等審査部	高木和則

目次

核酸医薬の品質の担保と評価における考慮事項.....	75
はじめに.....	77
適用対象.....	77
用語・略語の定義.....	78
1. 原薬.....	80
2. 製剤.....	86
核酸医薬の非臨床安全性評価における考慮事項.....	89
用語の定義と略号表.....	91
まえがき（作成方針の概要）.....	92
1. はじめに.....	93
2. 適用対象.....	94
3. 被験物質.....	94
4. 試験のデザイン.....	95
5. 安全性薬理試験及び動態に関する評価.....	99
6. 一般毒性試験.....	99
7. 遺伝毒性試験.....	100
8. 生殖発生毒性試験.....	101
9. がん原性試験.....	102
10. 局所刺激性に関する評価.....	103
11. 免疫毒性試験.....	103
12. 光毒性試験.....	103
13. ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果に係る考察.....	103
14. 代謝物の毒性評価.....	104
15. 注釈.....	104
16. 参考文献.....	105

核酸医薬の品質の担保と評価における考慮事項

革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業

目次

はじめに.....	77
適用対象.....	77
用語・略語の定義.....	78
1. 原薬.....	80
1.1. 製造.....	80
1.2. 特性.....	81
1.3. 原薬の管理.....	83
1.4. 原薬の安定性.....	86
2. 製剤.....	86
2.1. 製造.....	86
2.2. 製剤の管理.....	87
2.3. 製剤の安定性.....	88

はじめに

核酸医薬の品質管理に関して、不純物の管理や規格及び試験方法に関する既存の ICH ガイドライン (ICH ガイドライン Q3A (R2)、Q3B (R2) 及び Q6A) はオリゴヌクレオチドを対象外としている。化学合成されるオリゴヌクレオチドについて、化学合成医薬品を対象とした既存のガイドラインに示されている原則を部分的に適用することが可能であるが、たとえば不純物の安全性の確認に関する考え方や薬理学的な活性の発現に高次構造の形成が重要となる核酸医薬の管理については、既存の化学合成医薬品を対象としたガイドラインが適用できない場合や不十分な場合がある。

本文書は、既存のガイドラインにおいて対象外とされている核酸医薬の製造、不純物の管理、規格及び試験方法に関連する部分に特化している。核酸医薬の製造販売承認申請に際して提出すべき添付資料等の作成にあたって留意すべき事項については、他の最新のガイドライン等も合わせて参照することが推奨される。

なお、本文書は作成時点の科学的な水準に基づいて策定しており、ここで述べられていることであっても科学的な根拠に基づいて個別に規制当局と議論することができる。

適用対象

本文書は、化学合成されるオリゴヌクレオチドを有効成分とする医薬品及び化学合成品とコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドを有効成分とする医薬品を対象とする。これらには、二重鎖や高次構造を形成しているオリゴヌクレオチドも含まれる。DDS など複雑な製剤学的な特性を有する核酸医薬製剤には適用されないが、それらの中間体や原薬となるオリゴヌクレオチドの管理においては、本文書を参考にできる場合がある。生物由来あるいはバイオテクノロジーを応用して作られる抗体、ペプチド又はその他のタンパク質とコンジュゲートされるオリゴヌクレオチド及び mRNA のような長鎖のポリヌクレオチドを有効成分とする医薬品には適用されない。

用語・略語の定義

<用語の定義>

アニーリング

相補鎖と塩基対を形成させるために行う操作。一般に、加熱と冷却を伴う。

アプタマー医薬

標的タンパク質に対して特異的に結合するオリゴヌクレオチドを有効成分とし、標的タンパク質との立体的な相互作用を介して薬効を発現する医薬品。

アンチセンス医薬

標的RNAと配列特異的に二重鎖を形成するオリゴヌクレオチドを有効成分とし、標的RNAの機能を制御することで薬効を発現する医薬品。

カウンターイオン

塩からなる有効成分における対イオン。たとえば、オリゴヌクレオチドと塩を形成しているナトリウムイオン。

核酸医薬

化学合成されるオリゴヌクレオチド（DNA、RNA及びそれらの誘導体）及びそのコンジュゲートが有効成分となる医薬品。

コンジュゲート

何らかの機能性の獲得を期待して他の分子と共有結合により結合させること、又は結合された医薬品。

デコイ核酸医薬

オリゴヌクレオチドを有効成分とし、転写因子を捕捉し、標的遺伝子の転写を阻害することで薬効を発現する医薬品。

ホスホロチオアート

ホスホジエステル結合を有するオリゴヌクレオチドのリン酸エステルの一つの酸素原子が硫黄原子によって置換された化合物。

オリゴヌクレオチド類縁物質

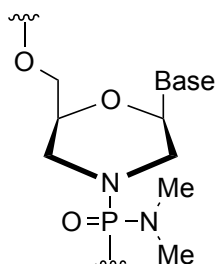
原薬又は製剤中に含まれる有効成分以外のオリゴヌクレオチド。

オリゴヌクレオチド類縁物質群

HPLC や LC/MS などを用いた分析において技術的に個々に定量管理することが現実的ではなく、単一のピークとして観察されるなど物理化学的性質が類似した一群のオリゴヌクレオチド類縁物質。

モルフォリノ核酸

非天然型人工核酸の一種。下図を参照。



<略語の定義>

DDS

薬物送達システム (drug delivery system)。

HPLC 又は LC

高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography)。

ICH

医薬品規制調和国際会議 (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)。

MS

質量分析法 (mass spectroscopy) 又はその測定装置、及びその測定によって得られたスペクトル。

siRNA

small interfering RNA と呼ばれる短鎖の二重鎖 RNA であり、RNA 干渉を誘導することで標的とする遺伝子の転写産物の発現を抑制する。

1. 原薬

1.1. 製造

<製造方法及びプロセスコントロール>

オリゴヌクレオチドの伸長反応は多段階の合成により行われ、不純物を適切に管理する観点から反応の終点をどのように管理及び監視するかについて、説明する必要がある。自動合成機を用いて製造される場合には、使用する自動合成システムに基づいて各合成工程がどのようにモニタリングされ、管理されるのかについて説明する必要がある。

二重鎖のオリゴヌクレオチドを有効成分とする核酸医薬では、最終的な精製工程の後にアニーリングを行うことが多く、このような工程は原薬の品質に与える影響が大きいため適切な管理が必要である。また、有効成分がコンジュゲートオリゴヌクレオチド又は二重鎖である場合の製造におけるコンジュゲート前中間体やアニーリング前中間体など最終製品の重要な品質特性との関連性が高い工程や中間体については、最終製品を用いた場合の分析と比較して、類縁物質のプロファイルを評価しやすい場合がある。このような品質管理において重要な中間体については、適切な管理項目と管理値の設定が必要となるだろう。これら工程管理として設定されるモニタリングや試験の方法及びその適切性、管理値及びその設定根拠について、説明する必要がある。なお、適切に管理された製造プロセスのモニタリング結果は、原薬の構造特性（例えば、塩基配列）を支持する根拠の一つとして用いることができる。

多数の立体異性体の混合物となるホスホロチオアート修飾が施されたオリゴヌクレオチドやモルフォリノ核酸において、有効成分の立体異性体の分布を評価することが技術的に困難である場合には、リン原子の立体化学に影響を与える製造工程やパラメータを明らかにした上で、当該製造工程及びパラメータの一貫性により有効成分の立体異性体分布の一貫性を説明すべきである。

<出発物質の管理>

原薬に組み込まれるような出発物質に含まれる不純物はリスクが高いと考えられることから、出発物質の不純物プロファイルについては十分な検討が必要である。その上で出発物質の管理は、低分子量の化学合成医薬品と比較してオリゴヌクレオチドの製造において精製の機会が限られていること、及び最終製品においてオリゴヌクレオチド類縁物質の分離・検出に限界があることを踏まえた上で、不純物の管理戦略の中で適切に位置づけられる必要がある。

出発物質の管理戦略を理解する上で有用であることから、出発物質の製造方

法の概略を示すことが推奨される。

<製造工程の開発の経緯>

原薬の製造方法を検討した経緯や開発段階における製造方法の変更について説明し、開発段階の経験がどのように製造方法の開発に活用されているのかについて明確に説明する必要がある。

開発段階で製造方法の変更が行われる場合には、品質の一貫性について注意深く評価し、データに基づいて説明できるようにしておく必要がある。製造方法の変更に伴う同等性/同質性の評価に際しては、ICH ガイドライン Q5E に示されている考え方を参考にすることが適切な場合がある。特に、不純物については、詳細な特性解析や製造工程中に得られる重要な中間体の分析データを取得した上で評価し、不純物のプロファイルが製造方法の変更前後で一貫していることを確認するべきである。

1.2. 特性

<構造特性>

有効成分の構造的特徴を評価するために検討した内容が提示されるべきである。また、有効成分の構造特性を特徴付けることができる分析法については、詳細に説明されるべきである。以下の①～④の要素はオリゴヌクレオチドの構造特性として特に重要であり、構造特性の評価に際して考慮される必要がある。

① 組成及び配列：

有効成分となるオリゴヌクレオチドの配列は標的分子の認識に関わる重要な特性である。

② リン酸骨格：

リン酸骨格が化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドについて、意図した化学修飾が適切に導入されていることは重要な特性である。

③ カウンターイオン：

有効成分がカウンターイオンを伴っている場合は、カウンターイオンの組成と含量は、有効成分を特徴付ける上で重要な特性である。

④ 高次構造及び複合体：

高次構造又は複合体の形成は、品質に影響を与える可能性のある重要な特性である。オリゴヌクレオチドは、塩濃度や温度などの環境やオリゴヌクレオチドの塩基配列に依存して高次構造や複合体を形成する可能性があり、二重鎖などの複合体が有効成分である場合や薬理作用の発現に高次構造の

形成が必要なタイプの核酸医薬においては、それぞれの構造特性を評価することが特に重要となる。

<不純物>

不純物特性として、化学的特性によって以下のように分類した不純物のプロファイルについて、適切な解析及び検討結果を提示する必要がある。

① オリゴヌクレオチド類縁物質：

オリゴヌクレオチド類縁物質は、類似した物理化学的性質を示し、すべてのオリゴヌクレオチド類縁物質を分離する分析方法を開発することはしばしば困難であるが、類縁物質のプロファイルをより適切に評価できる分析法を開発するために行われた検討内容について説明する必要がある。

一つの類縁物質群を構成する個々の類縁物質が互いに類似した生物学的な特性を有するかについては必ずしも明らかではないことを踏まえた上で、適切である場合には、一群の類縁物質を一つのオリゴヌクレオチド類縁物質群として管理することができる。この場合、各類縁物質群にどのような類縁物質が含まれるか（類縁物質の詳細なプロファイル）について、多角的に検討した結果を説明する必要がある。類縁物質群に含まれる個々の類縁物質すべてを同定することを求めるものではないが、開発段階からの品質の一貫性並びに、有効性及び安全性の確認された主要な臨床試験に用いられた原薬及び製剤と市販製品との同等性を説明する上で十分な特性解析がなされていなければならない。必要である場合には、製造工程の中間体における類縁物質のプロファイルを取得し、最終製品のオリゴヌクレオチド類縁物質のプロファイルについて十分に説明する必要がある。

類縁物質の構造から一定程度の薬理学的な活性が期待され、有効性を保証する上で意味のある量が原薬中に含まれる場合には、必要に応じて当該類縁物質について生物学的な活性を含む特性解析を実施し、品質への影響について検討しておくべきである。

② 有機低分子不純物：

ICH ガイドライン Q3A (R2) 及び M7 ガイドラインを参照する。なお、M7 ガイドラインはオリゴヌクレオチドを有効成分とする医薬品を対象外としているが、核酸医薬品が化学合成により製造されることを踏まえると、残留するリスクのある遺伝毒性不純物（有機低分子不純物）がないか ICH M7 ガイドラインを参考にリスク評価を実施するべきである。

③ 残留溶媒：

ICH ガイドライン Q3C (R5) を参照する。

④ 金属：

ICH ガイドライン Q3D を参照する。

<生物学的／生化学的特性>

有効性に関連した特性として、標的分子に対する結合親和性などに関して説明する必要がある。物理化学的な手法において、有効性に関連する品質特性を十分に明らかにできない場合には、生物学的あるいは生化学的評価などが必要になる。特に、薬理学的作用の発現に高次構造の形成が必要な核酸医薬においては、生物学的活性や標的分子に対する結合性などと物理化学的特性との関連性について検討が必要になる。

<その他の物理化学的特性>

その他、他の医薬品と同様に各作用機序の観点から、あるいは有効成分を特徴付ける上で重要な特性があれば、その特性及び評価方法について説明する必要がある。

1.3. 原薬の管理

<規格及び試験方法>

ICH ガイドライン Q6A に示されている一般的な規格及び試験方法に関する考え方については、核酸医薬にも適用される。しかしながら、例えば、薬理学的活性を発現するために高次構造の形成が必要な核酸医薬における物理化学的な手法の限界、薬理作用や副作用の動物種特異性などを考慮すると、規格及び試験方法の設定に際しては、必ずしも化学合成医薬品を対象とした既存のガイドラインは十分ではない。具体的に設定すべき規格及び試験方法については、原薬の重要な品質特性、特性解析、開発段階における経験や知識、並びに製造工程における管理などを考慮した上で原薬の本質を踏まえて設定すべきである。

核酸医薬における原薬の規格として、下記の項目を参考にされたい。「通常必要と考えられる項目（無印）」と「必要に応じて検討すべき項目（※印）」について、核酸医薬に特有の留意点を併記した。なお、「通常必要と考えられる項目」を規格に設定しない場合は、その科学的妥当性を説明しなければならない。

規格及び試験方法として原薬に対して適用される分析法は、他の医薬品の場合と同様、適切にバリデーションが実施されている必要がある。なお、分析法バリデーションについては、ICH ガイドライン Q2 (R1) を参照する。

規格及び試験方法の記載項目の例

(1) 名称

(2) 分子式及び分子量

(3) 性状

(4) 確認試験

単一の分析法によって有効成分であることを確認し、担保することが難しい場合には、複数の試験を組み合わせることを考慮する必要があるだろう。

薬理学的作用の発現に高次構造の形成が必要な核酸医薬では、標的分子との結合性等を確認するための試験を設定することが必要な場合がある。

(5) 純度試験

不純物の化学的特性によって以下のように複数の項目に分類できる。

① オリゴヌクレオチド類縁物質：

試験方法

オリゴヌクレオチド類縁物質では、類似した物理化学的性質を示し、複数のオリゴヌクレオチド類縁物質を個々に分離できないことがある。このように個々の類縁物質を分離することが困難な場合であっても、不純物の特性に関する解析結果に基づいて、オリゴヌクレオチド類縁物質のプロファイルをより詳細に評価できるような試験方法を設定するよう努めるべきである。なお、類縁物質のプロファイルがよりよく把握できるなど、有用である場合には、複数の分析方法を設定するべきである。

オリゴヌクレオチド類縁物質の規格

ICH ガイドライン Q3A (R2) で示されている報告、構造決定及び安全性確認の閾値をオリゴヌクレオチド類縁物質に対して適用することは現実的ではない。

オリゴヌクレオチド類縁物質（又はオリゴヌクレオチド類縁物質群、以下同様）については、可能な限り分析及び分類を行った上で、主要な臨床試験及び非臨床試験に用いられた原薬及び製剤中に含まれるそれぞれの類縁物質のレベルに基づいて安全性を評価し、適切に限度値を設定する必要がある。

既に安全性試験や臨床試験で十分に安全であることが確かめられている原薬中に存在しているすべての類縁物質については、試験に用いられた試料中に存在するレベルまでは安全性が確認されたものとする。

ことができる。類縁物質が、動物やヒトでの試験で認められた主要な代謝物と同一である場合についても、一般に安全性が確認されたもの
と考えることができる。

安全性試験や臨床試験に用いられた原薬又は製剤のロット中に存在するよりも高いレベルの類縁物質を含む場合についても、既に行った適切な安全性試験において実際に投与された類縁物質の量を求め、それに基づいて考察を行うことにより安全性の確認を行うことができる。

ある類縁物質について、規格に設定しようとする判定基準のレベルにおける安全性を確認できるデータがない場合には、安全性を確認するための試験を行う必要がある。

なお、原薬に含まれる可能性のある類縁物質について、副次的な薬理活性を示さないと想定される閾値を科学的な考察に基づいて設定できる場合には、ICH ガイドライン Q3A (R2) を参考に、安全性に十分配慮して、報告・構造決定・安全性の確認が必要な各閾値を個別の製品ごとに設定することも許容される。その場合には、オリゴヌクレオチド類縁物質の特性及び含量、開発段階における経験や科学的な知見、投与量や対象疾患、並びに対象患者集団等を踏まえ、患者にとって受容可能なリスクに対応したレベルを勘案し、不純物の安全性確認に必要な閾値を根拠に基づいて設定する必要がある。

以上に述べた規格設定及び安全性の確認にいたるプロセスについては、科学的根拠に基づいて詳細に説明すべきである。

② 有機低分子不純物^{*}：

ICH ガイドライン Q3A (R2) 及び M7 を参照する。

③ 残留溶媒^{*}：

ICH ガイドライン Q3C (R5) を参照する。

④ 金属^{*}：

ICH ガイドライン Q3D を参照する。

⑤ その他^{*}：

安全性や有効性に及ぼしうる影響に基づいて検討する。

(6) 示性値^{*}

特性解析に基づいて、原薬の品質を担保する観点から必要な物理化学的

特性について検討する必要がある。

(7) 水分含量*

(8) カウンターイオン*

(9) 定量法（含量）

ICH ガイドライン Q6A に述べられているように、不純物の影響を受けな
いような特異性の高い定量法が設定されるべきである。オリゴヌクレオ
チド類縁物質プロファイルの複雑性を鑑みれば、適切な場合には、試験
方法全体として原薬に対して特異的なものとなるように複数の分析方法
を組み合わせることもできる。

(10) 生物学的活性試験*

オリゴヌクレオチドの構造や機能の複雑性が高く、その他の手段に基づ
いて有効性を十分に担保できない場合には、生物学的活性に係る試験を
設定すべきである。

(11) その他*

バイオバーデンやエンドトキシン試験等は、剤形や製剤化プロセスを考
慮して検討すべきである。

その他、それぞれの原薬の特性に応じて別に品質を担保するための試験
が必要となる場合がある。

1.4. 原薬の安定性

核酸医薬原薬の安定性については、ICH ガイドライン Q1 を参照すべきである。

2. 製剤

本文書の対象となる核酸医薬の製剤においては、製剤の重要な特性は原薬の
重要品質特性と重なる部分が多いことから、原薬の項も合わせて参照すべきで
ある。

2.1. 製造

製剤の剤形と関連する重要な品質特性や期待する製剤学的特性を担保するた
めに、必要な製造の管理がなされなければならない。また、製剤の製造プロセ
スが有効成分の重要な品質特性に影響を与える可能性がある場合には、適切に
管理される必要がある。また、オリゴヌクレオチドは、塩濃度、温度などの環
境および粉末、溶液などの性状およびオリゴヌクレオチドの塩基配列に依存し、
高次構造や複合体を形成する可能性がある。したがって薬理学的作用の発現に

高次構造の形成が必要な核酸医薬においては、製剤の製造プロセスが高次構造に影響を与える可能性について注意深く評価する必要がある。

2.2. 製剤の管理

<規格及び試験方法>

原薬の場合と同様、ICH ガイドライン Q6A に示されている基本的な考え方は、核酸医薬の製剤に対しても適用される。

以下に核酸医薬の製剤の規格として、「通常必要と考えられる項目（無印）」と「必要に応じて検討すべき試験（※印）」について、核酸医薬に特有の留意点を併記した。なお、「通常必要と考えられる項目」を規格に設定しない場合は、その科学的妥当性を説明しなければならない。

規格及び試験方法としてオリゴヌクレオチド製剤に対して適用される分析法は、他の医薬品の場合と同様、適切にバリデーションが実施されている必要がある。なお、分析法バリデーションについては、ICH ガイドライン Q2 (R1) を参照する。

規格及び試験方法の記載項目の例

(1) 名称

(2) 性状

(3) 確認試験

1.3. 原薬の管理を参照する。

(4) 純度試験

① オリゴヌクレオチド類縁物質：

1.3. 原薬の管理を参照する。

② 有機低分子不純物※：

ICH ガイドライン Q3B (R2) 及び M7 を参照する。

③ 金属不純物※：

ICH ガイドライン Q3D を参照する。

④ その他の不純物※：

安全性や有効性に及ぼしうる影響に基づいて検討する。

(5) 定量法（含量）

1.3. 原薬の管理を参照する。

(6) 生物学的活性試験※

原薬及び製剤の特性を考慮した上で、その他の手段に基づいて有効性を十分に担保できない場合は、生物学的活性に係る試験を設定すべきである。

(7) その他（製剤試験など）※

日本薬局方を参照し、剤形に応じて必要な試験を設定する必要がある。

2.3. 製剤の安定性

原薬と同様、核酸医薬製剤の安定性については、ICH ガイドライン Q1 を参照すべきである。

核酸医薬の非臨床安全性評価における考慮事項

革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業

目次

用語の定義と略号表.....	91
まえがき（作成方針の概要）.....	92
1. はじめに.....	93
2. 適用対象.....	94
3. 被験物質.....	94
3.1 被験物質の特性.....	94
3.2 代替化合物（サロゲート）を使用する際の留意点.....	94
3.3 コンジュゲート及び剤形に係る内容.....	95
4. 試験のデザイン.....	95
4.1 一般的な考え方.....	95
4.2 動物種/モデルの選択.....	96
4.3 動物数/性.....	97
4.4 投与量/投与方法の設定.....	97
4.5 試験期間.....	98
4.6 回復性，遅発性毒性及び残存性.....	98
4.7 免疫原性.....	99
5. 安全性薬理試験及び動態に関する評価.....	99
5.1 安全性薬理試験.....	99
5.2 薬物動態及び曝露評価.....	99
5.2.1 薬物動態.....	99
5.2.2 トキシコキネティクス.....	99
6. 一般毒性試験.....	99
6.1 急性毒性に関する評価.....	99
6.2 反復投与毒性試験.....	100
7. 遺伝毒性試験.....	100
7.1 試験方法及び実施時期.....	100
7.2 <i>In vivo</i> 試験における課題.....	101
8. 生殖発生毒性試験.....	101
8.1 一般的な事項.....	101
8.2 動物種.....	102
9. がん原性試験.....	102
9.1 試験実施時の留意点.....	102
10. 局所刺激性に関する評価.....	103
11. 免疫毒性試験.....	103
12. 光毒性試験.....	103
13. ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果に係る考察.....	103
14. 代謝物の毒性評価.....	104
15. 注釈.....	104
16. 参考文献.....	105

用語の定義と略号表

用語の定義

- オフターゲット効果： 標的以外の分子に作用して、意図しない作用が発現すること。
- ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果： RNA との相補的結合に依存する発現量又はスプライシングパターンの変化に起因する意図しない作用のこと。
- オンターゲット効果： 標的分子に作用して生じる作用のこと。
- キャリア： 標的となる細胞や組織などに対して、核酸医薬の導入効率を上げるために使用される補助剤のこと。
- サロゲート： 開発の候補である核酸医薬に代わって、動物で標的遺伝子に作用する様に設計される開発候補の代替となる核酸医薬のこと。

略号表

aPTT	活性化部分トロンボプラスチン時間 (Activated Partial Thromboplastin Time)
DNA	デオキシリボ核酸 (Deoxyribonucleic Acid)
HED	ヒト等価用量 (Human Equivalent Dose)
ICH	医薬品規制調和国際会議 (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)
mRNA	メッセンジャーRNA (Messenger Ribonucleic Acid)
LOAEL	最小毒性量 (Lowest Observed Adverse Effect Level)
LOEL	最小作用量 (Lowest Observed Effect Level)
MABEL	推定最小薬理作用量 (Minimal Anticipated Biological Effect Level)
MFD	投与可能な最大用量 (Maximum Feasible Dose)
MTD	最大耐量 (Maximum Tolerated Dose)
NHP	非ヒト霊長類 (Non-human Primate)
NOAEL	無毒性量 (No Observed Adverse Effect Level)
NOEL	無影響量 (No Observed Effect Level)
PD	薬力学 (Pharmacodynamics)
RNA	リボ核酸 (Ribonucleic Acid)
siRNA	small interfering RNA
UTR	非翻訳領域 (Untranslated Region)

まえがき（作成方針の概要）

本文書をまとめるにあたって、我々は、「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」における活動の一環として、核酸医薬をその種類や作用機序、性質という分子そのものに焦点を当てただけでなく、医薬品を開発していく上での開発者側や規制当局側の立場に立って捉えるなど、様々な角度から「核酸医薬」について議論を交わしてきた。本文書はその議論で行われた内容を基に、核酸医薬を開発する際の安全性の評価における留意点として取り纏めたものである。

文書作成の方針として、アダマーやアンチセンスなど種々ある核酸医薬ではあるが、種類に関係なく、核酸医薬、すなわち十数個～数十個の核酸からなる鎖状の構造を持つオリゴ核酸を投与するということを念頭におくこととした。その観点の下で核酸医薬を開発していく際に生じるであろう課題や留意点について、現行ガイドラインを参照しつつ抽出、考察をおこなうことでまとめた、「核酸医薬の安全性評価のための課題と留意点について ～ ガイドライン策定を志向した課題の抽出と考察 ～（中間報告）」を基に作成した。

本文書では、我々が議論をおこなってきた中で、課題として、あるいは、留意点として挙げられた事柄をまとめるとともに、現行のガイドラインでは対処できないと考えられた点については、我々がおこなってきた議論及び考察を基に、試験の実施方針に関する提案という形でまとめた。従って、現行のガイドラインによって対応が困難な課題については新たな手法や考え方も必要と考えられ、本文書には現行のガイドラインの範疇を超えた内容が含まれる箇所もある。

さらに、核酸医薬による非臨床安全性試験の事例は限られており、本文書作成時点で一律に結論出来ない点や科学的又は理論的考察あるいは推察に基づいた議論も含まれる。これらの課題の解決には、今後の核酸医薬の研究や開発に伴い蓄積されるデータや科学的な裏づけが必要になってくることから、長期に渡る課題として取り扱っていくべきと考えている。

1. はじめに

核酸医薬における非臨床安全性評価については、既存の ICH ガイドラインなどを参考にして実施できる部分が多いと考えられる。たとえば、核酸医薬の薬理作用の動物種特異性の観点からは ICH S6(R1)ガイドラインに示されている考え方を部分的に参考にすることができるだろう。一方で、ICH S6(R1)の適用対象となるバイオ医薬品は通常生体構成成分である天然のアミノ酸から構成されるのに対して、核酸医薬では化学修飾が施された非天然型人工核酸が用いられることがしばしばである。このような場合には、化学物質としての安全性を評価する観点が必要になるであろう。

本文書では、既存のガイドラインに従って核酸医薬の開発を想定した試験をシミュレーションした際に生じるであろう課題、あるいは注意が必要と考えられた内容を留意点としてまとめている。課題点を提起する方法として、従来の試験法による試験実施が非常に困難あるいは不可能と考えられた場合においては、代替の方法の提案や現行ガイドラインとは異なった考え方を示している。

また、開発候補化合物を絞り込む段階で行われる試験の結果も、安全性の評価に有用な場合も考えられたことから、核酸医薬の開発過程の全段階を考慮し、毒性試験や安全性薬理試験に加え、薬理試験に係る内容についても記載している。

さらに、ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果に係る評価については、核酸医薬においてしばしば議論となることから、開発の初期、特に RNA を標的とする核酸医薬をデザインする段階に考慮すべき事柄も含めて議論を行っている。

以上のように、核酸医薬の安全性を評価する上では現行のガイドラインに従うことには限界があると考えられ、本草案においては現行のガイドラインを補完するような内容が含まれる。

なお、本書では、3R（使用動物数の削減・動物の苦痛軽減・代替法の利用）の原則に従い動物及びその他の医薬品開発資源の不必要な使用を避けることも目的としている。

2. 適用対象

本文書は、化学合成されるオリゴヌクレオチドを有効成分とする医薬品及び化学合成品とコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドを有効成分とする医薬品を対象とする。これらには、二重鎖や高次構造を形成しているオリゴヌクレオチドも含まれる。DDS など複雑な製剤学的な特性を有する核酸医薬製剤には適用されないが、それらの中間体や原薬となるオリゴヌクレオチドの管理においては、本文書を参考にできる場合がある。生物由来あるいはバイオテクノロジーを応用して作られる抗体、ペプチド又はその他のタンパク質とコンジュゲートされるオリゴヌクレオチド及び mRNA のような長鎖のポリヌクレオチドを有効成分とする医薬品には適用されない。

3. 被験物質

3.1 被験物質の特性

非臨床試験に供される被験物質の特性は、各開発段階に応じて適切に解析されている必要がある。開発の進展とともに試験方法が確立されていく側面があることは認識されているが、非臨床安全性試験に使用された原薬、臨床試験に用いられた原薬及び市販製剤の原薬の品質プロファイルについては十分な比較が可能であり、データに基づいて品質特性の一貫性が説明できなければならない。

ヒト初回投与試験に用いる被験物質は、非臨床試験で用いた被験物質との間で、安全性又は有効性に悪影響を及ぼすような品質特性の違いがあってはならない。開発の過程において、製品の品質及び収量を向上させる等の目的で製造工程に変更を加える場合には、このような変更が与える影響について十分に検討し、データに基づいて製造方法の変更前後の品質の一貫性が説明できるようにしておく必要がある。特に核酸医薬では、不純物プロファイルの複雑性に留意すべきである。また、高次構造が薬理作用の発現に重要なタイプの核酸医薬では、被験物質の薬理学的な活性が一貫していることを担保しておくことも重要な観点である。

3.2 代替化合物（サロゲート）を使用する際の留意点

核酸医薬の場合、その特徴からしばしばヒト選択的に薬理作用を示し、臨床上用いられる予定の製品が薬理作用を示す動物種が選定できない場合には、標的分子への作用に起因した有害性の検出及び過剰な薬理作用による有害作用の

確認を目的として非臨床試験においてサロゲートを用いることも検討するべきである。

しかしながら、サロゲートと临床上用いられる予定の製品との間に、薬理学的な活性の強弱、製造工程、不純物のプロファイル、薬物動態並びにオフターゲット効果など種々の特性が異なっている可能性があり、結果の解釈には注意が必要である。したがって、サロゲートを用いた非臨床試験の結果からヒトへの外挿を目的とする量的なリスク評価やオフターゲット効果の評価を行うことは適切ではない。

3.3 コンジュゲート及び剤形に係る内容

開発候補品が、生体内での安定性や標的組織への導入効率の向上などを目的として、何らかの化合物と共有結合した核酸医薬（以下「コンジュゲート」という。）からなる場合、又は上記目的で製剤学的な工夫が施される場合は、臨床で使用される製剤を用いて安全性評価を行うことが原則である。

コンジュゲート化や製剤化を行うことで、毒性プロファイルが大きく変化するなどし、それにより毒性プロファイルが適切に評価できないと考えられる場合には、原薬（例えば、リポソームに封入される前の遊離した核酸医薬原薬）やコンジュゲート化前の原薬を用いた試験の実施を検討する必要があるかもしれない。

曝露評価については、可能であるならば、製剤を投与した後のコンジュゲートされた医薬品と非コンジュゲート状態の医薬品の双方、あるいはリポソーム製剤など製剤化状態の医薬品と遊離した核酸医薬の双方について、評価を行うことが望ましい。

4. 試験のデザイン

4.1 一般的な考え方

非臨床安全性試験の目的は、臨床試験実施前のみではなく臨床開発の全段階を通して、開発候補品の薬理学的及び毒性学的作用を明らかにすることであり、*in vitro* 及び *in vivo* 試験等適切な試験を実施することにより、臨床試験に必要な安全性に関する評価項目を見いだすことができる。

核酸医薬の非臨床試験実施には以下の点について留意する必要がある。

1) 動物種やモデルの選択, 2) 動物数及び性, 3) 投与量, 投与方法及び試験期間, 4) 予測される毒性プロファイル及び回復性, 毒性発現のタイミング, 5) 被験物質の特性, 6) オフターゲット効果

また、核酸医薬においては、従来の毒性試験法が適切でない場合や不十分な場合、あるいは有用性が不確かな場合があることにも留意が必要であると考えている（例えば、遺伝毒性試験の *in vitro* 試験において用いられる代謝活性化法により、オリゴ核酸の生体内における代謝分解が反映されているか否かは不明であり、当該手法の適切性は明らかではない）。

核酸医薬の安全性評価においては、①標的分子に作用することに起因する毒性、②標的分子以外の分子に作用することに起因する毒性、③修飾型オリゴヌクレオチドの代謝分解物の毒性について考慮する必要がある。

なお、開発候補品が、進行がんで治療方法の選択肢が限られた患者の治療を対象とする場合には、ICH S9 を考慮して非臨床安全性評価を実施することも可能であろう。

4.2 動物種/モデルの選択

核酸医薬を用いた安全性評価は、標的分子のヒトと動物における相同性、発現パターンや体内分布など分子レベルにおける種差を考慮し、適切な動物種が用いられるように試験計画の立案を行う必要がある。

一般毒性試験では、原則としてげっ歯類及び非げっ歯類の適切な 2 種類の動物種を用いて試験を実施するべきであろう。

しかしながら、今後の知識の蓄積に伴い、被験物質に導入されている人工核酸の安全性プロファイルが十分に確かめられている場合であり、短期の毒性試験で 2 種類の動物種が同様の毒性所見を示し、且つ当該核酸医薬の薬理作用と用いられている化学修飾体の使用経験から毒性所見が予測されたものである場合は、より長期の一般毒性試験で 2 種類の動物種を用いる意義について検討が必要であろう。

また、オンターゲット効果を示す動物種が選択できない場合や、外来性因子（即ち、細菌、ウイルスなど）を標的とする核酸医薬について、オフターゲット効果のみを評価するために 2 種の動物種を用いた一般毒性試験を実施する意

義についても今後の検討が必要であろう。このような場合には、用いられる化学修飾の臨床的な使用経験、臨床的、又は非臨床における安全性データを考慮し、長期の毒性試験を1種の動物種のみを用いることが許容される場合もあるであろう。なお、1種の動物種を用いる場合には、げっ歯類を使用する科学的根拠がなければ、げっ歯類を使用するのが適切であろう。

非臨床安全性試験に用いる適切な動物種が存在しない場合、病態動物モデルを用いた薬効薬理試験を実施する際に、安全性評価項目を含めることで、標的分子に関連する潜在的なリスクについての情報が得られる場合もある（注1）。あるいは、標的となるヒト型遺伝子を導入したトランスジェニック動物を使用することで、オンターゲット効果を評価することも一つの選択肢となるかも知れないが、安全性評価の観点から実施する意義については個別のケースごとに議論する必要があると考える。

4.3 動物数/性

試験に用いる動物数等は医薬品毒性試験法ガイドラインに準拠することが原則であると考えられる。

トランスジェニック動物や自然発症性病態モデルなどの動物モデルを用いて評価する場合はより少ない動物数での検討も考慮しうる。このように少数例の動物を用いた試験を検討する場合には、ICH S6(R1)に記載のある通り、毒性事象の観察を誤ることに繋がる可能性があることから、観察頻度を増やしたり、観察期間を延長したりすることを検討するべきである。

使用する性については、一般的には雌雄両方を用いるべきであり、一方を省略する場合には、妥当性を示さなければならない。

4.4 投与量/投与方法の設定

投与は、臨床適用で予定される投与方法を考慮し、適切な方法を用いる。ただし、曝露が上がらない等の理由がある場合には、臨床投与経路以外の投与経路も考慮しうる。

投与量は、毒性用量及び最大無毒性量（NOAEL）を含み、用量-反応関係に関する情報が得られるように設定することが望ましい。毒性がほとんど認められない、あるいは全く認められない場合は、明確な最大用量を設定することができないことがある。このような場合、ヒトにおけるリスクを予測する観点から、

科学的な根拠に基づいて、ヒトにおける予想曝露量を考慮した用量を設定する必要がある。

ICH S6(R1)においては、バイオ医薬品の最高用量の設定に関する考え方が示されているが、バイオ医薬品における毒性は、目的とする作用機序と関連していることが多いこと、代謝物が生体構成成分であるアミノ酸やペプチドであり、構成成分の毒性学的な懸念は大きくないことに基づいている。核酸医薬については、バイオ医薬品と同様に特異的な薬理作用が期待される一方で、薬理作用と直接関連しない毒性が認められることもあること、化学修飾された非天然型の人工核酸が用いられることが多いことを踏まえると、最高用量の設定に関しては、非臨床安全性試験に用いる動物種における広義のオフターゲット効果や代謝物の毒性に対する動物における感受性も考慮すべきであり、ICH M3(R2)に示された最高用量の設定に関する考え方も合わせて参考にするべきである。したがって、各品目に導入されている人工核酸の使用経験等も考慮して個別に検討されるべきである。

4.5 試験期間

基本的な試験実施期間はICH M3(R2)を考慮するべきである。なお、投与から薬理学的作用の発現までに時差を生じる場合や、組織中や生体内半減期が比較的長くなっている核酸医薬の場合には、薬効薬理試験等で得られた投与から薬効の発現時期や持続時間、薬物動態試験で得られる組織内半減期などの知見も踏まえて、毒性試験の試験計画を立てるべきである。

4.6 回復性、遅発性毒性及び残存性

薬理作用及び毒性作用の可逆性又は増悪作用の可能性の有無、さらに遅発性毒性の可能性の有無などを明らかにするため、通常、試験計画の中に回復期間を設けなければならない。また、臨床において有害作用の懸念がある薬理学的又は毒性学的影響が、臨床的に意義のある曝露量で認められた場合、その作用の回復性を評価する必要がある。

一般的に、反復投与毒性試験で行われる休薬期間の目的は、観察された影響の可逆性を評価することであるが、同時に遅発性毒性及び組織での蓄積やクリアランスの検討が可能な場合もあろう。従って、核酸医薬における反復投与後の休薬の目的は、通常行われる回復性評価や遅発性毒性に係る検討や評価にとどまらず、毒性の標的となる組織や器官における曝露や残存性の評価を含めた

ものとすることが望ましい。

特に、核酸医薬の中には組織内半減期が比較的長いものが存在し、毒性の標的となる組織等での蓄積やクリアランスについて検討し、トキシコキネティクス試験において得られる血中薬物濃度プロファイルと毒性標的となる組織中の薬物濃度の関係について検討しておくことは、臨床試験を安全に計画する上で重要であろう。

4.7 免疫原性

核酸医薬は免疫原性を示す場合があり（参考文献 18）、ICH S6(R1)にしたがって、抗薬物抗体の測定及びその影響を評価するべきである。

5. 安全性薬理試験及び動態に関する評価

5.1 安全性薬理試験

安全性薬理試験については、ICH S6(R1)やICH S7A など関連するガイドラインを参照すべきである。

5.2 薬物動態及び曝露評価

5.2.1 薬物動態

薬物動態の評価や実施する時期については、ICH S6(R1)、ICH M3(R2)、ICH S3B や非臨床薬物動態試験ガイドライン等の関連したガイドラインを参照して実施すべきである。

5.2.2 トキシコキネティクス

血中濃度の測定については、急性期の毒性を解釈する上では重要なデータを与えるだろう。一方、長期投与による毒性や遅発性の毒性を解釈するためには、毒性の標的となる組織や器官における蓄積性、あるいは残存性の評価も考慮する必要がある。

こういったことを考えれば、薬物動態のプロファイリングを実施し、組織曝露量との関係を明らかにすることは重要であろう。

6. 一般毒性試験

6.1 急性毒性に関する評価

急性毒性の評価やMTDの検討については、ICH M3(R2)やICH S6(R1)などの

ガイドラインを参照して実施するべきである。

6.2 反復投与毒性試験

反復投与毒性試験の試験デザインは、ICH M3(R2)などの関連したガイドラインを参照することに加え、第4章に述べた課題や留意点を考慮することで可能であると考えられる。

反復投与毒性試験に組み込まれるべきトキシコキネティクスに関しては、第5章で述べた通りである。また、毒性標的となる組織/器官における曝露や残存性の評価と毒性所見とを見合わせながら評価することは重要であると考えている。

投与期間中に産生される抗薬物抗体による作用への影響を検討するなど、長期投与を行う場合には抗核酸医薬抗体に関する評価も検討すべきである。

その他、核酸医薬では、動物種により特有の毒性が見られることが幾つか報告されている（注2）。このような点に留意して試験を実施することで、用量と毒性との関連性を明らかにできるであろう。

7. 遺伝毒性試験

核酸医薬については、例えば代謝物のゲノムDNAへの取り込みや挿入などの機序により遺伝毒性を示す可能性を考慮しておく必要がある（参考文献19）。

また、開発候補品に遺伝毒性の懸念のある低分子不純物が残留するリスクが考えられる場合、ICH M7ガイドラインはオリゴヌクレオチドを有効成分とする医薬品を対象としていないが、ICH M7ガイドラインの考え方は参考になるであろう。

このような観点から、本章では、主に課題点についてまとめるとともに、課題克服のための方策を提案する。

7.1 試験方法及び実施時期

核酸医薬の特性を考慮すると、未変化体の核酸医薬の遺伝毒性の評価には、従来から用いられている標準的な遺伝毒性試験に限界はあるものの、現時点では、不純物も含めた原薬の遺伝毒性評価として実施意義があると考えられることから、現時点ではICH S2(R1)及びICH M3(R2)に基づく適切な時期に標準的な遺伝毒性試験を実施する必要があると考える。また、化学修飾された人工核酸

を用いる場合には、後述するように潜在的な代謝物である当該人工核酸モノマー又はその代謝物の遺伝毒性ポテンシャルについて十分に検討しておくべきであり、被験物質とともにモノマーについても *in vitro* 遺伝毒性試験を実施しておくことが推奨される。*In vivo* の遺伝毒性試験については、動物福祉の観点も考慮し、反復投与毒性試験において DNA への取り込みやそれに伴う DNA の変異などに関する評価を検討することは重要であると考えられる。

7.2 *In vivo* 試験における課題

動物を用いた評価では、評価に用いる組織の選択も重要になるであろうと考えられ、開発候補品の毒性標的や蓄積性を考慮することも重要であろう。例えば、高度に組織標的化された核酸医薬では、肝臓での蓄積が骨髄における曝露を上回る可能性が考えられるが、このような場合において科学的な根拠に基づき肝臓又は骨髄のどちらか一方の組織のみを選択して評価することも受け入れられる。

8. 生殖発生毒性試験

8.1 一般的な事項

一般的には従来と同様、生殖発生毒性試験の必要性については、開発候補品の臨床における適応及び想定される対象疾患の患者群により判断されるべきである。

試験の実施には、原則的に ICH S5 (R2) に従うことで実施可能であると考えられるが、種特異性、開発候補品の特性及び作用機序、免疫原性及び薬物動態、並びに胚・胎児への曝露に基づいて、個別の試験デザイン及び投与スケジュールを改変することが必要な場合もあると考えられる。

開発候補品に人工核酸が用いられる場合、その代謝物（断片化されたオリゴヌクレオチドや人工核酸モノマーなど）の胎盤通過能などに関する情報、及び人工核酸モノマーの DNA への取り込み等の潜在的なリスクなど生殖発生に関連した影響を考慮する。代謝物が DNA に取り込まれるリスクが否定できない場合、性成熟に達した適切な動物種における反復投与毒性試験において、生殖器官の評価、性周期、精子数、精子形態や運動能及び雌雄の性ホルモン等の検査は特に重要であると考えられる。

雄の授胎能への影響については、一般的な場合と同様、一般毒性試験におけ

る精子検査，生殖器の病理及び病理組織学的検査による評価により，成人男性を用いた臨床第 I 相試験を開始することが可能であろう。

8.2 動物種

動物種については，開発候補品を用いたときに薬理的な活性を示す適切な動物種であることに加え，ICH S5(R2)に準じて，生殖生理に関する特性も考慮した動物種で実施することが望ましく，開発候補品がげっ歯類及びウサギにおいて薬理作用を示す場合は，一般的な場合と同様に両動物種を胚・胎児発生試験に使用するべきである。ただし，どちらか一方の動物種で胚・胎児の致死作用又は催奇形性等の重篤な生殖発生毒性が確認され，十分なリスク評価や管理が行えると判断できる場合には，他の種での試験は不要である。

NHP 以外に薬理作用を示す動物種が選択できない場合，NHP を用いた発生毒性試験の実施を検討するべきである。しかしながら，このような場合であっても，適切なサロゲートを使用することで NHP 以外のより適した動物種を用いて発生毒性試験を実施することも重要な選択肢として検討すべきである。なお，開発候補品の安全性を評価する上で適切な動物種が存在しない場合，ヒトでの標的分子を発現するトランスジェニック動物の様なモデル動物の使用も考えられるが，バックグラウンドデータ等の背景情報についても考慮し，慎重に検討する必要がある。

9. がん原性試験

9.1 試験実施時の留意点

がん原性試験の実施の要否については ICH S1A の判断基準に従うことで判断する必要があるが，核酸医薬では，未変化体，あるいは代謝物が長期間組織に停滞する可能性があることについて十分な考慮が必要である。また，非天然型の核酸モノマーを有する核酸医薬の場合，DNA への人工核酸の取り込みや DNA の変異など遺伝子に対して影響を及ぼす潜在的な懸念についても考慮すべきである。例えば，反復投与毒性試験において前がん病変の有無を検査するなど，がん原性に関する評価を慎重に行うべきである。

実施時期や試験方法については ICH S1A 及び ICH M3(R2)を参照するべきである。

10. 局所刺激性に関する評価

ICH M3(R2)を参照すべきである。

11. 免疫毒性試験

ICH S8 を参照すべきである。

12. 光毒性試験

ICH S10 では、オリゴヌクレオチドを対象外としているが、核酸医薬品においても光毒性にかかるリスク評価は必要であろう。人工核酸塩基を導入している場合で、新規の発色団を有するなど、光毒性発現の懸念がある場合には、光毒性のリスクを明らかにするために ICH S10 に準じた評価を行うべきである。

13. ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果に係る考察

核酸医薬では、データベース上を検索することにより潜在的なハイブリダイゼーション依存的なオフターゲットの検索を行うことができる。したがって、ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果を発現するリスクが否定できない場合には、ヒトのデータベースから潜在的なハイブリダイゼーション依存的なオフターゲットを検索しておき、臨床試験における安全性評価項目を設定する際に考慮すべきである。

しかしながら、データベースの検索により抽出できる潜在的なハイブリダイゼーション依存的なオフターゲットに対して作用することによる影響について定量的なリスク評価を行うことは困難である。また、動物種間で塩基配列が異なることにより、非臨床安全性試験においてハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果について検討できる範囲が通常限定的であることに注意が必要である。

データベースからの検索に加えて、追加の *in silico*, *in vitro* あるいは動物や動物モデルを用いた *in vivo* の検討が必要か否かについては、個別の品目ごとにその対象とする疾患、対象患者集団及びデータベースの検索によって抽出された潜在的なハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット遺伝子の既知の生理学的ないし病態生理学的な知識を踏まえて検討されるべきである。

ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果に関する基本的な検討は、その目的を鑑みて、通常薬理作用を発揮する可能性のある用量が初めて投与される臨床試験（FIH 試験など）を開始するまでに完了しておくべきである。

14. 代謝物の毒性評価

潜在的な代謝物である人工核酸モノマー又はその代謝物の毒性を評価するための非臨床試験の要否に関しては、用いる動物種における曝露を踏まえて、ICH M3(R2)に示されている代謝物の非臨床安全性評価に関する考え方を参考にするべきである。ただし、人工核酸モノマー又はその代謝物の臨床又は非臨床における曝露評価には技術的な限界があることに留意するべきであろう。これらの曝露評価を十分に行うことができない場合には、ICH M3(R2)に示されている代謝物の安全性評価時期を参考に、遅くとも第 III 相試験を開始する前に人工核酸モノマー及びその代謝物の毒性を評価すべきである。

特に、これらの試験については、変異原性、がん原性及び生殖発生毒性の懸念について検討できるように、人工核酸モノマー又はその代謝物の DNA への取り込みや突然変異誘発の可能性について評価できるように計画されるべきである。

ただし、すでに他の核酸医薬での使用経験があり、当該人工核酸モノマーについて十分に安全性が確かめられている場合には改めて試験を実施しなくてもよいだろう。

15. 注釈

- 1) 病態動物モデルの使用は、毒性評価項目の明確化、臨床適応の選択及び適切な剤形、投与経路及び投与方法の決定において有益である。これらの病態動物モデルに関しては、試験結果を評価する際の参考として利用できる背景データが不足していることが多いということを留意しておかなければならない。このため、試験計画を最適化するために、同時に対照群やバックグラウンドのデータを収集することが重要である。
- 2) 動物種による特異的毒性の例として以下の症状が報告されている。

ラット：蛋白尿症を示し易い（参考文献 20）。

イヌ： 遺伝情報に乏しいが血中動態はヒトと類似（参考文献 20）。

サル： 一本鎖オリゴの単回高用量投与（閾値あり）でアナフィラキシー様症状を呈する（参考文献 21）。一過性に aPTT を延長する（参考文献 22, 23, 24）。

16. 参考文献

1. ICH M3(R2):「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンスについて」（平成 22 年 2 月 19 日薬食審査発 0219 第 4 号）
2. ICH S1A:「医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンスについて」（平成 9 年 4 月 14 日 薬審第 315 号），ICH S1B:「医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改正について」（平成 20 年 11 月 27 日 薬食審査発第 1127001 号），及び「医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改正について」（平成 20 年 11 月 27 日 薬食審査発第 1127001 号）
3. ICH S2(R1):「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて」（平成 24 年 9 月 20 日薬食審査発 0920 第 2 号）
4. ICH S3A:「トキシコキネティクス（毒性試験における全身暴露の評価）に関するガイダンスについて」（平成 8 年 7 月 2 日薬審第 443 号）
5. ICH S4: 単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について（平成 5 年 8 月 10 日 薬新薬第 88 号），及び ICH S4A: 反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について（平成 11 年 4 月 5 日 医薬審第 655 号）
6. ICH S5A, ICH S5B:「医薬品の生殖発生毒性試験に係るガイドラインの改定について」（平成 9 年 4 月 14 日薬審第 316 号），及び ICH S5B(M):「医薬品の生殖発生毒性試験についてのガイドラインの改正について」（平成 12 年 12 月 27 日医薬審第 1834 号）
7. ICH S6(R1):「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について（平成 24 年 3 月 23 日薬食審査発 0323 第 1 号）
8. ICH S7A:「安全性薬理試験ガイドラインについて」（平成 13 年 6 月 21 日医薬審発第 902 号）

9. ICH S8 : 「医薬品の免疫毒性試験に関するガイドラインについて」 (平成 18 年 4 月 18 日薬食審査発第 0418001 号)
10. ICH S9 : 「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドラインについて」 (平成 22 年 6 月 4 日薬食審査発 0604 第 1 号)
11. 「新医薬品等の製造 (輸入) 承認申請に必要な一般薬理試験のガイドライン」について (平成 3 年 1 月 29 日 薬審第 4 号)
12. 「非臨床薬物動態試験ガイドライン」について (平成 10 年 6 月 26 日 医薬審発 496 号)
13. 「医薬品の製造(輸入)承認申請に必要な毒性試験のガイドライン」について (平成元年 9 月 11 日 薬審 1 第 24 号)
14. 「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」について (平成 24 年 4 月 2 日 薬食審査発 0402 第 1 号)
15. Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-inhuman clinical trials with investigational medical products. EMEA/CHMP/SWP/ 28367/07
16. Sims J. Member of ABPI/BIA Early Stage Clinical Trials Taskforce. Calculation of the Minimum Anticipated Biological Effect Level (MABEL) and 1st dose in human. In: EMEA Workshop on the Guideline for first-in human clinical trials for potential high-risk medicinal products. 12 June 2007 London. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2009/11/WC500010862.pdf
17. Guidance for Industry; Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers (CDER/FDA, July 2005)
18. Mipomersen (Kynamro®) FDA 審査報告書
19. ペガプタニブナトリウム (マクジェン®) 審査報告書
20. Levin AA, and Henry SP, Toxicology of oligonucleotide therapeutics and understanding the relevance of the toxicities. *In Preclinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals*, ed. Cavagnaro JA, John Wiley & Sons, Inc., pp 537-574, 2008.

21. Henry SP, Giclas PC, Leeds J, Pangburn M, Auletta C, Levin AA, Kornbrust DJ. Activation of the alternative pathway of complement by a phosphorothioate oligonucleotide: potential mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther.* 281, 810–816 (1997)
22. Henry SP, Novotny W, Leeds J, Auletta C, Kornbrust DJ. Inhibition of coagulation by a phosphorothioate oligonucleotide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7, 503-510 (1997)
23. Sheehan JP, Lan HC. Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex. *Blood* 92, 1617-1625 (1998)
24. Sheehan JP, Phan TM. Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex by an allosteric mechanism. *Biochemistry.* 40, 4980-4989 (2001)

IV. 考慮事項作成中に懸念された課題と留意点，
盛り込むことが出来なかった内容等

1. 盛り込むことが出来なかったこと

動態関連については核酸医薬全般に知見に乏しく、全般的にケース・バイ・ケースでの対応が必要だと考えられるが、特に懸念された内容は以下の通り。

吸収：TK や PK の測定法について、例えば人工核酸の種類によっては質量分析法などの従来の方法では検出できない可能性があり、一般化が可能な測定方法の開発が必要かもしれない。また、現状では、開発候補化合物によっては、必要な感度・精度等が確保できない場合もあり得るため、ケース・バイ・ケースでの対応が必要であろう。

分布：吸収と同様、検出方法において既存技術では対応出来ない場合もでてくるであろう。そのような場合の評価方法については、科学的な根拠に基づきケース・バイ・ケースでの対応が必要であろう。

代謝：「核酸医薬の品質担保及び非臨床安全性の評価に関する考慮事項」14. 代謝物の毒性評価に記載したことに関連して、投与した核酸医薬を代謝する主要な代謝組織についての知見が少なく、また人工核酸を使用する場合などでは、DNA への人工核酸の取り込みや DNA の変異など遺伝子に対して影響を及ぼす潜在的な懸念など人工核酸の生体内における“動き”に関する知見も殆どない。これらのことから、投与された核酸医薬の代謝及び代謝物に関しての毒性学的な考察を一般化して行うことが非常に困難であり、開発候補品に応じた規制当局との相談が必要であろうと考えられた。

排泄：前述と同様、主要な排泄経路や排泄時間等に係る知見が少なく、開発品に応じてケース・バイ・ケースでの対応が必要であろう。

2. 懸念された課題と留意点

遺伝毒性、生殖・発生毒性及びがん原性については、人工核酸を含む核酸医薬においては、人工核酸が DNA に取り込まれた場合の影響についての知見が乏しく、継続的に検討が必要な課題として上げるに留まり、毒性評価に関する検討を行うまでには至らなかった。ただし、事前にこれらの影響について何らかのデータが得られている場合には、その内容に従った対応が必要であると考え

られた。

3. 臨床試験に関する調査研究から抽出された課題と留意点

核酸医薬は次世代の革新的医薬品として国内外において注目を集めており、有効性と安全性を評価するための様々な臨床試験が世界的に行われている。2016年9月には、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療薬として開発されたエクソンスキップ誘導型のアンチセンス医薬である *eteplirsen* が、現時点ではその臨床的な治療効果は明確ではなく今後の検証が待たれるものの、4番目の核酸医薬として米食品医薬品局（FDA）から迅速承認を受けた（参考文献1, 2）。また、2016年12月には脊髄性筋萎縮症治療薬として *nusinersen* が FDA から承認を受けた（参考文献3）。

一方で、核酸医薬を投与した際に起こる有害事象による臨床試験の中止例も散見された。例えば、血中 LDL コレステロールの低下を目的としたアンチセンス医薬の第1相臨床試験においては、用量依存的な血中 LDL コレステロール低下効果は認められたものの、急性尿細管壊死が1例に認められたため、本薬の開発は中止された（参考文献4）。また、アポリポ蛋白 C-III 遺伝子を標的としたアンチセンス医薬、及びトランスサイレチン遺伝子を標的としたアンチセンス医薬の臨床試験において、有害事象として重篤な血小板減少症が認められている（参考文献5）。さらに、トランスサイレチン遺伝子を標的とした *N*-アセチルガラクトサミンとコンジュゲートした siRNA を用いた第3相臨床試験においては死亡例が認められ、本剤の開発が中止された（参考文献6）。今後、これらの有害事象について、治験薬との因果関係や毒性が発生した機構の解明など、詳細な解析が待たれる。

これら毒性については、その発現機序の詳細については不明ではあるものの核酸医薬にのみ認められる特有のものではないことから、一般的な化学合成医薬品と同様に注意深く開発を進めることが重要と考えられる。その際、核酸医薬の毒性はマウスでは肝臓に、サルでは腎臓に認められやすいという報告（参考文献7）や、ラットを用いることで腎毒性が評価できるという報告（参考文献4）などがあることから、核酸医薬の開発においても、初期の段階から適切な動物種を用いて肝障害、腎障害、血小板減少症などの毒性に注意しながら開発を

進めていく必要がある（参考文献 8）。

このように、現時点では承認されている核酸医薬に限られており、核酸医薬をヒトに投与した時の有害事象に関する知見が少ないことから、核酸医薬の有効性と安全性を担保する上では、今後の核酸医薬の研究や開発により得られる知識や経験など、常に新しい知見を得ながら継続的に科学的な議論を続けていくべきであると考えている。

参考文献

1. Railroading at the FDA, *Nat. Med.*, 22 (2016) 1193–1193.
2. Patient need versus evidence: a balancing act, *The Lancet*, 388 (2016) 1350.
3. E. Dolgin, Spinal muscular atrophy approval boosts antisense drugs, *Nat. Biotechnol.*, 35 (2017) 99–100.
4. E.P. van Poelgeest, M.R. Hodges, M. Moerland, Y. Tessier, A.A. Levin, R. Persson, M.W. Lindholm, K. Dumong Erichsen, H. Ørum, A.F. Cohen, J. Burggraaf, Antisense-mediated reduction of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): a first-in-human randomized, placebo-controlled trial, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 80 (2015) 1350–1361.
5. S.T. Crooke, B.F. Baker, T.J. Kwoh, W. Cheng, D.J. Schulz, S. Xia, N. Salgado, H.-H. Bui, C.E. Hart, S.A. Burel, H.S. Younis, R.S. Geary, S.P. Henry, S. Bhanot, Integrated Safety Assessment of 2'-O-Methoxyethyl Chimeric Antisense Oligonucleotides in NonHuman Primates and Healthy Human Volunteers, *Mol. Ther.*, 24 (2016) 1771–1782.
6. K. Garber, Alnylam terminates revusiran program, stock plunges, *Nat. Biotechnol.*, 34 (2016) 1213–1214.
7. S.P. Henry, M.V. Templin, N. Gillett, J. Rojko, A.A. Levin, Correlation of toxicity and pharmacokinetic properties of a phosphorothioate oligonucleotide designed to inhibit ICAM-1, *Toxicol. Pathol.*, 27 (1999) 95–100.
8. K.S. Frazier, Antisense oligonucleotide therapies: the promise and the challenges from a toxicologic pathologist's perspective, *Toxicol. Pathol.*, 43 (2015) 78–89.