

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 中分子ペプチド医薬品の品質及び安全性評価に関する研究  
(英語) Studies on quality and safety evaluation of medium-sized peptides as  
next-generation therapeutics

研究開発実施期間: 令和3年7月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 出水庸介  
(英語) Yosuke Demizu

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・有機化学部・部長  
(英語) Head, Division of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences

## II 研究開発の概要

様々な非天然型アミノ酸を含み特殊な立体構造を形成する中分子ペプチド医薬品は、従来の低分子医薬品やタンパク質医薬品では達成できなかった優れた治療効果が期待されている。中分子ペプチド医薬品は、生体内の標的分子と強く結合し、より選択的に作用することができ、副作用のリスクが低減される。さらに、化学合成が可能なため、製造コストの問題も回避できる可能性がある。このように、中分子ペプチド医薬品は次世代の革新的な医薬品となる潜在力を秘めている。しかしながら、中分子ペプチド医薬品の実用化に向けては、いくつかの課題がある。例えば、高品質な製造法の開発が必須である。ペプチド医薬品は、アミノ酸配列やその立体構造が薬効に大きく影響するため、製造工程における品質管理が極めて重要となる。また、非天然型アミノ酸を含むペプチドの特性を踏まえた品質・安全性評価法の確立が求められる。従来の評価法では、中分子ペプチド医薬品の特性を適切に評価することが難しい場合があるため、新たな評価法の開発が必要となる。このような状況を受けて、本研究では、細胞内標的ペプチドをモデルとして選択し、中分子ペプチド医薬品の品質・安全性評価に関する研究を行った。具体的には、(1)ペプチドの製造に関する研究、(2)ペプチドの品質特性解析、(3)安全性評価に関する研究を実施した。さらに、これらの研究で得られた知見と海外の規制動向を踏まえ、(4)中分子ペプチド医薬品の品質・非臨床安全性評価ガイドライン案の作成を行った。

本研究で開発された品質及び安全性評価法、並びにガイドライン案は、中分子ペプチド医薬品の承認申請時の審査や開発過程で実施される PMDA との様々な相談において、規制側から開発者への適切な助言や照会を可能にする。これにより、承認審査の効率化・迅速化に貢献できる。また、患者数が多いにも関わらず治療手段が少ない疾患や、患者数は少ないものの治療薬の必要性が高い希少疾患に対する革新的な医薬品をより早く患者に届けることに貢献できる。中分子ペプチド医薬品の実用化は、未だ有効な治療法がない疾患に対する新たな選択肢を提供し、患者の QOL 向上に大きく寄与することが期待される。

以下に、研究成果を概括する。

### (1) ペプチドの製造に関する研究

本研究では、細胞内標的ペプチド医薬品のモデルとして、MDM2/MDMX-p53 阻害ペプチド、 $\beta$ -カテニン/TCF 阻害ペプチド等の製造における工程管理の検討を行った。主に固相法による合成条件（樹脂、試薬、温度等）の検討を行い、生成する不純物を単離・同定し、品質特性解析、安全性評価用試料として提供した。また、ペプチド製造ではペプチド鎖の伸長条件のみならず、種類、配列によっては樹脂からの切り出し条件も不純物プロファイルに影響を与えることが知られている。よって、ペプチド医薬品の品質を担保するために、樹脂からの切り出し条件の最適化を行い、生成するペプチド関連不純物プロファイルを評価した。また、ペプチド医薬品の構造特性や膜透過性と薬物相互作用の有無及び程度について検討するために、中分子ペプチドの薬物トランスポーターへの阻害作用評価用の構造的特徴の異なる複数のペプチド医薬品候補の選出及び合成を行った。さらに、中分子ペプチド中に含まれる使用頻度の高い非天然型アミノ酸を集めた「標準化合物パネル」を作成するために、数十種類の非天然型アミノ酸を購入あるいは合成した。各評価結果については、(2)及び(3)に記載した。

### (2) ペプチドの品質特性解析に関する研究

本研究では、既存のペプチド医薬品の品質管理手法を考慮して、非天然型ペプチド医薬品の品質評価要件を整理することを目的として、試験的製造された MDM2/MDMX-p53 阻害ペプチドを対象として、逆相クロマトグラフィー/紫外検出 (C18-RPLC/UV) 等を利用してクロマトグラフィーパターン解析を行い、不純物プロファイルを明らかにするとともに、環状構造を有する類縁物質、構造異性体等のペプチド関連不純物を分離検出できることを確認した。また、MDM2/MDMX-p53 阻害ペプチドの長期保存試料及び劣化試料（酸・アルカリ処理、加熱処理、光照射処理）を調製して、C18-RPLC/UV 及び液体クロマトグラフィー/質量分析により構造解析を行い、主要なペプチド関連不純物は保護基由来成分 (CO<sub>2</sub>) 付加体及び 2 種類の脱アミド化体であることを特定した。

さらに、長期保存試料の分析により CO<sub>2</sub> 付加体は減少する一方で脱アミド化体が増加すること、劣化試料の分析により僅かに酸化体及び構造異性体が増加することを特定した。加えて、大岡班との共同研究により、2 種類の脱アミド化体のうち、C 末端カルボン酸アミドの脱アミド化体は、有効成分よりも細胞増殖抑制効果が高い可能性があること明らかにした。これらの結果は、特殊環状ペプチドの品質評価要件として、ペプチド関連不純物の構造と生物活性の関連性評価の重要性を示唆するものである。

### (3) ペプチドの安全性評価に関する研究

本研究では、通常の動物を用いた非臨床評価法では予測できないヒトにおける安全性を予測するための評価として、細胞毒性が検出されるか、オフターゲット効果が認められるかなどを必要に応じて実験的に検証し、問題点の抽出や新たな評価法の提案を検討した。有効成分となるペプチドとともに、重要品質特定になり得る不純物についての安全性について検討した。また、中分子ペプチドの多くには非天然型アミノ酸が含まれていることから、非天然型アミノ酸由来代謝物の安全性についても検討した。細胞毒性評価を実施した結果、細胞内標的ペプチド医薬品のモデルペプチドを用いた検討において、その原薬は 30 $\mu$ M 以上の高濃度においてのみ細胞毒性を示し、不純物はそれよりも弱い細胞毒性しか示さないことが確認された。モデルペプチドの非天然アミノ酸を天然アミノ酸に置き換えた検証から、天然アミノ酸のみのペプチドでも毒性発現が見られることがあり、その毒性の程度はケースバイケースであるということがわかった。また、同様の解析から、立体構造由来の毒性発現があることがわかった。マイクロアレイによる遺伝子発現変動解析でオフターゲット効果を検証した結果、アミノ酸が 3 つ程欠落すると新たなオフターゲット遺伝子発現変動が生じる可能性があることを見出した。さらに、中分子ペプチド中に含まれる使用頻度の高い非天然型アミノ酸を集めた「標準化合物パネル」を作成するために、これら非天然型アミノ酸の細胞毒性評価スクリーニングを行い、留意すべきアミノ酸を数種類同定した。

また、これまでのペプチド医薬品と異なる細胞内透過型の特性によって、代謝酵素等を介した薬物相互作用の可能性について検討した。まず薬物代謝酵素を介した相互作用を検討するために、薬物代謝酵素によるモデルペプチドの代謝を評価したところ、モデルペプチドの代謝は認められなかった。また、典型的基質を用いた阻害作用の評価も行ったが、モデルペプチドによる薬物代謝酵素の阻害作用もほとんど認められなかった。一方で、モデルペプチドによって、肝臓における主要な薬物トランスポーター4 種の阻害作用が認められ、トランスポーターを介した薬物相互作用の可能性が示唆された。また、種々の細胞透過性を有するペプチド 37 種についても、薬物トランスポーターの阻害作用を評価し、19 種のペプチドにおいていずれかのトランスポーターの阻害が認められた。従って、細胞内透過性を有するペプチドは、トランスポーターを介した薬物相互作用を引き起こす可能性があり、開発におけるその評価の必要性が明確になった。さらに、阻害作用を示したペプチド数種について、トランスポーターの基質になるかを解析したところ、OATP1B1 については、解析したすべてのペプチドが基質となったのに対し、p-gp 及び BCRP については、いずれのペプチドも基質にはならなかった。

### (4) 次世代ペプチド医薬品の規制ガイドライン案の作成

#### (4-1) 中分子ペプチド医薬品の品質評価に関するガイドライン案の作成

産官学のペプチド専門家からなる品質グループを組織し、「中分子ペプチド医薬品の品質確保のためのガイドライン」案に記載すべき項目を整理することを目的とした。特に不純物に関して、文献や学会情報の調査等により具体例を収集するとともに、海外規制当局や局方関連の最新情報を整理し、適切な管理戦略について検討した。また、近年開発されている中分子ペプチドの特性に関する情報を整理し、品質リスクマネジメントの考え方に沿って、原薬の品質確保のための要件について検討した。さらに、医薬品品質に関する各種 ICH ガイドラインを主な参考資料とし、関連する海外の文書として、米国薬局方〈1503〉「Quality Attributes of Synthetic Peptide Drug Substances」、欧州薬局方「General Monograph Substance for Pharmaceutical

Use」、EMA ガイドライン案「Guideline on the Development and Manufacture of Synthetic Peptides」等の内容を参照し、中分子ペプチドに特有の要件を整理した。上記の活動を通じて、「化学合成ペプチド医薬品の品質評価に関するガイドライン」案を完成させた。ガイドライン案は、1. 緒言、2. 中分子ペプチド医薬品（原薬）の品質評価・管理、3. 中分子ペプチド医薬品（製剤）の品質評価・管理の3つの章から構成される。同ガイドライン案を厚生労働省医薬品審査管理課に提出し、令和5年12月13日から令和6年1月27日の間、e-Gov サイトにて意見公募が行われた。意見公募で寄せられたコメントを整理し、最終化に向けて議論が必要な論点を整理した。

#### （4-2）ペプチド医薬品の非臨床安全性評価要件案の作成

産官学のペプチド専門家からなる非臨床安全性グループを組織し、承認されているペプチド医薬品の審査報告書や論文、他のモダリティに関する知見、本研究班の Wet 研究の知見、さらに業界団体等からの意見等を整理し、「非天然型構造を有するペプチド医薬品の非臨床安全性評価」に関するガイドライン案を完成させた。ガイドライン案は、1. 緒言、2. 非臨床安全性試験、3. 各論の3つの章から構成される。同ガイドライン案を厚生労働省医薬品審査管理課に提出し、令和5年10月30日から令和5年12月29日の間、e-Gov サイトにて意見公募が行われた。意見公募で寄せられたコメントを整理し、最終化に向けて議論が必要な論点を整理した。

Medium-molecular peptide drugs, containing non-proteinogenic amino acids (NPAs) and forming unique secondary structures, offer superior therapeutic effects unachievable with conventional small-molecular or protein drugs. These peptides strongly bind to target molecules, acting more selectively and reducing side effect risks. Furthermore, chemical synthesis avoids production cost issues, positioning these peptide medicines as potential next-generation innovative drugs.

However, practical application faces challenges, such as developing high-quality manufacturing methods. Quality control during manufacturing is crucial, as the amino acid sequence and the structure significantly influence medicinal effects. Additionally, quality and safety evaluation methods must be established based on the characteristics of NPA-containing peptides. Conventional evaluation methods may inadequately assess peptide drug properties, necessitating new evaluation methods. In response, this study selected intracellular target peptides as models for quality and safety evaluation of peptide medicines. Specifically, studies were conducted on (1) peptide synthesis, (2) peptide quality characterization, and (3) safety evaluation. Furthermore, based on these findings and overseas regulatory trends, (4) draft guidelines for quality and non-clinical safety assessment of peptide medicines were developed.

(1) This study investigated process control in the production of MDM2/MDMX-p53 inhibitory peptides and  $\beta$ -catenin/TCF inhibitory peptides. The synthetic conditions, including resin, reagents, temperature were explored primarily using solid-phase methods. Produced impurities were isolated, identified, and provided as samples for quality characterization and safety evaluation. It is known that in peptide production, not only the peptide chain elongation conditions but also the cleavage conditions from the resin, depending on the type and sequence, can affect the impurity profile. Therefore, to ensure the quality of peptide pharmaceuticals, the cleavage conditions from the resin were optimized, and the resulting peptide-related impurity profiles were evaluated. Additionally, to investigate the presence and extent of drug interactions with the structural properties and membrane permeability of peptides, several peptide drug candidates with different structural characteristics were selected and synthesized for evaluating the inhibitory effect of peptides on drug transporters. Furthermore, dozens of NPAs were purchased or synthesized to create a 'standard compound panel' of frequently used NPAs in peptides. The results of each evaluation are described in sections (2) and (3).

(2) This study aimed to organize quality assessment requirements for peptide medicines considering existing quality control methods. Reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection (C18-RPLC/UV) and other techniques were used to analyze pilot-manufactured MDM2/MDMX-p53 inhibitory peptides. Chromatographic pattern analysis was performed to clarify the impurity profile and confirm the separation and detection of peptide-related impurities, such as analogues with cyclic structures and structural isomers. Long-term storage and degraded samples (acid/alkali, heat, and photo-irradiation treatments) of the peptides were prepared for structural analysis by C18-RPLC/UV and liquid chromatography/mass spectrometry. The major peptide-related impurities identified were protective group-derived component ( $\text{CO}_2$ ) adducts and two deamidated forms. Analysis of long-term storage samples showed a decrease in the  $\text{CO}_2$  adduct and an increase in the deamidated form, while degraded sample analysis revealed a slight increase in the oxidized form and structural isomers. In addition, one of the two deamidated forms, the deamidated form of the C-terminal carboxylic acid amide, might be more effective in inhibiting cell growth than the active ingredient. These results suggest the importance of assessing the relationship between the structure and biological activity of peptide-related impurities as a quality assessment requirement for special cyclic peptides.

(3) The study aimed to propose a new evaluation method to predict human safety, which cannot be predicted by conventional non-clinical animal model methods, by experimentally verifying cytotoxicity and off-target effects. The safety of active peptide ingredients and impurities, particularly metabolites derived from NPAs, was evaluated. Results showed that model peptides exhibited cytotoxicity only at high concentrations above 30  $\mu\text{M}$ , while impurities showed weaker cytotoxicity. Peptides substituted with natural amino acids also displayed toxicity on a case-by-case basis. Additionally, toxicity derived from steric structure was identified. Gene expression variation analysis using microarrays indicated that deleting three amino acids could result in new off-target gene expression changes. A cytotoxicity assessment screen of NPAs identified several critical amino acids, leading to the creation of a 'standard compound panel.' The study also investigated potential drug interactions of cell-permeable peptides. Model peptides showed little metabolism by drug-metabolizing enzymes and minimal inhibition of metabolic enzymes. However, inhibition of four major drug transporters was observed, suggesting the possibility of transporter-mediated drug interactions. Nineteen out of 37 peptides showed inhibitory effects on transporters, emphasizing the need for their evaluation in developing cell-permeable peptides. Substrate analysis revealed that all peptides were substrates for OATP1B1, but none were substrates for p-gp and BCRP. These results highlight the importance of detailed evaluations of NPAs and cell-permeable peptides for accurate safety predictions in humans.

(4) The quality group comprising peptide experts from industry, government, and academia was organized to draft the 'Guidelines for Quality Assurance of Medium Molecular Weight Peptide Drugs'. Specific examples of impurities were collected through literature surveys and academic information. The latest information related to overseas regulatory authorities and local laws was organized, and appropriate management strategies were discussed. Additionally, information on the characteristics of recently developed mid-molecular peptides was compiled, and requirements for ensuring the quality of APIs were examined in line with the concept of quality risk management. Various ICH guidelines on pharmaceutical quality were used as main reference materials. Relevant overseas documents, such as the US Pharmacopoeia <1503> 'Quality Attributes of Synthetic Peptide Drug Substances', the European Pharmacopoeia 'General Monograph Substance for Pharmaceutical Use', and the EMA draft guidelines 'Guidelines on the Development and Manufacture of Synthetic Peptides', were also referenced. Specific requirements for mid-molecular weight peptides were organized based on these documents. Through these activities, a draft guideline on the quality assessment of synthetic peptide medicinal products was completed.

The non-clinical safety group, comprising peptide experts from industry, government, and academia, organized review reports and papers on approved peptide products, findings on other modalities, findings from the Wet study, as well as opinions from industry associations and others. They completed a draft guideline on 'Non-clinical Safety Assessment of Peptide Drugs'. The draft guideline consists of three chapters: 1) Introduction; 2) Non-clinical safety studies; and 3) Each section.