

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：4 種の新規モダリティ医薬品を対象とする薬物動態評価のための生体試料中濃度等分析法の開発と標準化に関する研究

Study on development and standardization of bioanalytical methods toward pharmacokinetic evaluation for 4 types of new modality drugs

研究開発実施期間：令和 4 年 4 月 15 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：斎藤 嘉朗

Yoshiro Saito

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立医薬品食品衛生研究所 副所長

Deputy Director general, National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

核酸や中分子ペプチド等の新規モダリティ医薬品の開発が進展しているが、これまでに多くの開発経験がある低分子やタンパク質医薬品に比して、薬物動態や安全性評価に関して標準的な評価方法が構築されておらず、医薬品開発上の隘路となっている。この特徴的な隘路として、薬物動態評価における基盤的かつ最大の問題は、生体試料中の薬物濃度等分析法（バイオアナリシス手法）が未確立であり、製薬企業で try and error が必要なことである。本研究の目的は、核酸医薬品、中分子ペプチド医薬品、抗体薬物複合体（ADC）、及び遺伝子治療用製品という 4 種の新規モダリティ医薬品の薬物動態に関する最も重要な障害を解消し、本邦における開発を一段と促進する基盤技術とすることである。

核酸医薬品の新規薬物分析法の開発と標準化に関しては、核酸医薬品代謝物・類縁物質の代謝試験法や網羅的構造解析法を開発した。アンチセンス医薬品については、モデル核酸としたミポメルセンとその既報代謝物 10 種及び類縁物質 2 種の肝臓及び腎臓中濃度を同時定量可能なペプチド吸着制御 LC (PAC-LC) -質量分析計 (MS/MS) 法を開発した。開発した分析法について ICH M10 「生体試料中薬物濃度分析バリデーション及び実試料分析」ガイドラインに従いフルバリデーションを実施した結果、全ての分析対象分子について、0.1 µg/g から 50 µg/g の範囲において良好な定量性や再現性を有することを示した。さらに、全評価項目について ICH M10 指針の判定基準値を充たすことを確認した。次に、本手法の再現性や頑健性を多施設バリデーション試験で評価したところ、試験に参加した 4 施設において全ての評価項目について当該指針の判定基準値を充たす結果を得た。残り 1 施設については、分析装置の感度不良により基準値を充たさない結果が得られた。以上より、高感度かつ再現性の高いアンチセンス医薬品およびその代謝物・類縁物質の組織中濃度定量法を構築でき、その標準化に向けた基盤データを取得することができた。また、本手法には高感度な MS 装置の利用が重要であることが明らかとなった。一方、siRNA に関しては、ルマシランをモデルとして、組織中における代謝物・類縁物質の網羅的構造決定法を

開発すると共に、肝 S9 画分を用いてモデル核酸を代謝し、主要代謝物を同定した。次いで、当該有効成分と代謝物に関し、その同時定量が可能な PAC-LC-MS/MS 測定法を開発し、簡易バリデーション試験にてその良好な再現性を確認した。現在、本分析法の標準化に向けて、多施設検証試験を実施中である。また以上の結果を基に、LC-MS を用いた核酸医薬品のバイオアナリシス法の開発及び検証に関する技術指針を作成している。

ペプチド薬物複合体 (PDC) の新規薬物分析法の開発と標準化に関しては、モデル化合物として選定した BT1718 の血漿中分析法を構築した。まず親化合物及びそのペプチド部とペイロード部の分析法を構築したが、ペプチド部及びペイロード部については、不安定な構造のため、誘導体化による安定化を行い分析した。構築した分析法について、主要なバリデーション項目を評価し、マトリックス効果を除き、ICH M10 の判定基準値を満たす結果を得た。マトリックス効果については、多施設評価を通して検証したところ、複数の施設でマトリックス効果が基準値を満たさない結果が再現された。PDC の薬物濃度分析における主要な留意点として、その解消方法について議論を継続している。さらに BT1718 の標的組織である肺を対象として、親化合物及びそのペプチド部とペイロード部の分析法を構築した。親化合物である BT1718 については、血漿と同様の手法を用いて、同等の添加濃度まで測定可能な分析法が構築できたが、ペプチド及びペイロードについては、感度が不十分であったため、誘導体化を行うことで、血漿と比較して同等の添加濃度まで測定可能な分析法が構築できた。さらに、同一分析法を用いない場合に、多施設間で分析法バリデーション項目にどの程度のバラツキが生じるのか明らかとするため、血漿中 Cyclosporin 9A5 及び 3003pep 分析法の構築と多施設評価を行った。前者では、キャリーオーバーを除き、全ての施設において ICH M10 の基準値を満たす結果を得た。検討の結果、キャリーオーバーはサンプル分析間にブランクを注入することで軽減できることを複数の施設で確認した。後者に関しては、全ての施設において ICH M10 の基準値を満たす結果を得た。今後は、技術指針案の最終化や成果の公表を行う。

またペプチドの細胞内動態評価技術の開発に関しては、ラマン顕微鏡解析の応用に関する検討を行った。中分子ペプチド医薬品に対し、文献調査で有用性が示唆されたアルキン型アミノ酸を導入することで、細胞内で検出可能なペプチド型ラマンプローブの開発に成功した。また、開発したアルキン型ラマンプローブを用いて測定条件の最適化検討を行い、ペプチドの細胞内局在を評価可能であることを示した。具体的には、ペプチド医薬品である ATSP7041 をモデルペプチドとして、N 末端にアルキンプローブ PAPA を導入したペプチド PAPA-ATSP-7041 を合成した。PAPA-ATSP7041 を HeLa 細胞に処理し、その細胞内挙動をラマン顕微鏡で評価した。その結果、1 時間処理後のラマンスペクトルを測定し、顕微鏡画像を作成することで、ATSP が細胞全体に広く分布していることが明らかになった。ATSP は疎水性が高いため、受動拡散により細胞内に広がったと考えられる。次に、プローブによる細胞内局在の影響を検討するため、ラマンスペクトルの比較として蛍光基を修飾した ATSP である FAM-ATSP を合成し、蛍光顕微鏡画像を検討した。FAM-ATSP を HeLa 細胞に添加し、1 時間後の蛍光顕微鏡画像から、FAM-ATSP は細胞全体に広がって分布していることが明らかになった。本結果から、ATSP の細胞内分布においては、ラマン顕微鏡は蛍光顕微鏡と同等の結果が得られることが示唆され、ラマン顕微鏡によるペプチド医薬品の細胞内動態評価技術に関し、一定の成果を得た。

抗体薬物複合体の新規薬物分析法の開発と標準化に関しては、抗体薬物複合体 (ADC) の薬物動態に影響する薬物抗体比 (DAR) 及び部位毎のペイロード修飾率の分析法を開発した。DAR 分析法に関しては、モデル ADC として、トラスツズマブ エムタンシン (T-DM1, Lys 結合型 ADC) を使用した。まずヒト血漿試料からの T-DM1 の精製に関し、糖鎖除去方法、アフィニティー精製法の条件を最適化した。また、LC のグラジエント条件についても、2 段階グラジエントを用いることで、良好な選択性と感度が得られることを実証した。DAR 分析法に関する分析法バリデーション項目は確立されていないことから、次に、平均 DAR とその室内再現精度、感度、質量精度、特異性、キャリーオーバー、及びオートサンプラー安定性に関する評価法を考案したが、実際の評価結果も良好であった。同様に Cys 結合型 ADC のブレントキシマブ ベドチン (B-MMMAE) についても分析法バリデーションを実施し、良好な結果が得られることを確認した。次に、T-DM1 を分析対象とした多施設共同研究により、分析法バリデーションを実施した。その結果、何れの機関も全ての判定基準を満たし、本分析手法の汎用性が高いことが確

認められた。これらの結果から、本分析手法を標準的分析手法として利用可能であることを確認した。さらに分析上の留意点を明らかにし、その知見を取りまとめて、分析手法の手順、独自に構築したバリデーション方法、多施設バリデーションの結果を含む技術指針に関する内容について論文を発刊した。また、部位毎のペイロード修飾率評価法の構築に関しては、その一環として、T-DM1 をモデルとして ADC のサブユニット毎の DAR/DLD 分析法（サブユニット質量分析法）を検討した。部分分解する酵素の選定と消化条件、回収方法の最適化を行い、さらに分析法を構築した。次に、T-DM1 をモデルとしてペプチドマッピング及び多重反応モニタリング (MRM) を利用した部位毎のペイロード修飾率変化を評価する手法を検討した。MRM 分析条件を検討した結果、DM1 標識ペプチドの特異的検出では、DM1 由来のフラグメントイオンを共通サロゲートとして利用できることを明らかにするとともに、複数の DM1 修飾ペプチドのモニタリングが可能であることを実証した。

遺伝子治療用製品の新規薬物濃度分析法の開発と標準化に関しては、モデル遺伝子治療用製品として、GFP 遺伝子を搭載した組換えアデノ随伴ウイルスベクター (AAV-GFP) 2 型 (AAV2-GFP)、9 型 (AAV9-GFP) に関し、生体試料中のベクター由来 DNA の抽出法及びコピー数を定量する方法を構築した。まず、生体試料に AAV-GFP DNA を添加したサンプルで、抽出法を細胞溶解方法及び生体試料の量に関して DNA 添加回収率を指標に条件検討を行い、最適な条件を構築した。また、DNA 抽出法は、フェノール・クロロホルム法、シリカカラム法、磁気ビーズ法で検討し、添加回収率に基づいた抽出法の最適化を達成した。遺伝子治療用製品の班内で仮の定量バリデーション基準を設定し、検量線 (qPCR のみ)、選択性、真度・精度、添加回収率について多施設バリデーションを実施した。マウスの生体試料 (全血、筋肉、肝臓) から抽出したマトリックス genomic DNA に AAV-GFP viral genomic DNA を添加して、各施設において定量 PCR (qPCR) 及びデジタル PCR (dPCR) で定量を行った。添加回収率については、マウス生体試料に AAV-GFP DNA を添加した場合と、カプシド化された AAV2-GFP または AAV9-GFP を添加した場合を評価した。その結果、良好なバリデーション結果が得られた。開発した生体試料中の AAV-GFP 定量法について、研究参加施設のべ 8 施設 (dPCR: 6 施設, qPCR: 3 施設) が参加し、のべ 7 施設においてバリデーションを完了した。本研究における生体試料中の組換えベクターの定量法開発およびバリデーションの結果より、生体試料およびベクターの種類によってはさらなる DNA 抽出法の最適化、及び PCR を利用した測定ではコンタミネーションの影響を十分に考慮することが、適切な生体内分布の評価において重要と考えられた。PCR 技術を用いた生体試料中の遺伝子治療用製品の定量について、これらの本研究における検討事項および施設間の結果の差、等に関する留意事項を抽出し、技術指針を作成している。

Standard evaluation methods for pharmacokinetics and safety have not yet been established on new modality drugs. One of the most fundamental and critical problems in pharmacokinetic evaluation is that their standard analytical methods for drug concentrations in biological samples (bioanalysis methods) have not yet been established, and pharmaceutical companies need to try and error. The purpose of this study is to resolve this most important obstacle in the pharmacokinetics of four new drug modalities (nucleic acid drugs, peptide drugs, antibody-drug conjugates (ADCs), and gene therapy products), and to provide a basic technology to further promote their development in Japan.

With regard to oligonucleotide therapeutics, we developed a peptide adsorption-controlled LC (PAC-LC)-mass spectrometry (MS/MS) method for simultaneous determination of liver and kidney concentrations of model antisense drug mipomersen and their 10 previously reported metabolites and 2 related substances. All the evaluation parameters fulfilled the acceptance criteria in the ICH M10 guideline. In a multicenter validation study, the method satisfied the guideline requirements for all evaluation items at the four facilities participating in the study. For siRNA drug, lumasiran was selected as a model compound. A comprehensive analytical workflow was developed and the major metabolite was identified. A multi-laboratory validation study of this analytical method is currently in progress.

The development and standardization of a bioanalytical method for peptide-drug conjugates (PDCs) was conducted using BT1718 as a model PDC. Bioanalytical methods were established for the parent compound (PDC), its peptide moiety, and the payload. All the key validation parameters met the criteria in ICH M10, except for matrix effects. The complexity of parameter was replicated in a multi-laboratory study, and discussions are ongoing to address this issue as a "point to consider." Additionally, to investigate variability when different analytical methods are used, a multi-laboratory evaluation was conducted for plasma on cyclorasin 9A5 and 3003pep. For both analytes, ICH M10 criteria were met across all laboratories, except for carryover, and its mitigation was developed.

The application of Raman microscopy was explored as a technique to evaluate the intracellular dynamics of peptide drugs. An alkyne-containing amino acid (PAPA) was introduced into a model peptide ATSP-7041 to develop a Raman-detectable probe, and applied to HeLa cells. Raman imaging revealed a broad intracellular distribution of the peptide, likely due to passive diffusion driven by its hydrophobicity. To assess the effect of the probe modification, a fluorescein (FAM) labeled peptide, FAM-ATSP, was also synthesized and evaluated using fluorescence microscopy. Similar distribution patterns were observed. These findings indicate that Raman microscopy provides comparable effectiveness to fluorescence microscopy in evaluating intracellular peptide distribution.

For development of an intact LC/MS method for evaluating the drug-antibody ratio (DAR) of ADCs in plasma, an affinity purification method and the original LC gradient condition for the intact LC/MS analysis of a non-reduced ADC was established. A validation method for the intact LC/MS approach for analyzing the average DAR and drug load distribution (DLD) of ADCs in plasma sample was proposed for the first time. A collaborative study revealed the feasibility of our method. In addition, a method for subunit DAR distribution analysis was also established using partial digestion and intact LC/MS. Furthermore, an analytical method for evaluating changes in the payload modification level for each site of ADC was successfully established using peptide mapping and multiple reaction monitoring.

To standardize the method of gene therapy products in biological samples, we developed the quantifying methods using digital PCR and quantitative PCR. The model products of gene therapy products were recombinant adeno-associated virus (AAV) serotype 2 and 9 inserted GFP gene. In development of methods, the methods of DNA extraction were optimized based on recovery of AAV DNA copy number. The developed quantifying methods were fulfilled with our pre-determined acceptance criteria. Then, multi-laboratory method validation study was performed to evaluate their robustness. Almost all parameters met the pre-determined acceptance criteria on this validation study.