バイオ医薬品の安全性評価

中外製薬株式会社 富士御殿場研究所 安全性研究部^{*1)}，前臨床研究部^{*2)}

井上 智彰^{*1)}，八杉 健司^{*2)}

Safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals

Actions of biologics are often species-specific. Pharmacological active animals would be used for preclinical safety studies. Characteristics of toxicities of biologics are immunogenicity, cytokine releases and other immunological effects. *In vitro* evaluation methods using human cells are under investigation. In addition, examples of effects of DDS on safety (effects of pegylation on immunogenicity, accelerated blood clearance by pegylated liposomes, and skin irritation in sustained release formulations) are shown.

バイオ医薬品では、薬理作用に種特異性が高い場合が多く、安全性評価には薬理作用が認められる動物種を用いることが望まれる。毒性の特徴として、医薬品自体に対する免疫反応の誘導、抗体医薬の一部に認められるサイトカイン放出などがあり、ヒト細胞を用いた *in vitro* 評価法などが検討されている。DDS によるバイオ医薬品の毒性への影響の例として、PEG 化による免疫原性の改善、PEG 化リポソームにおける ABC 現象、徐放性製剤における皮膚刺激性について解説する。

Tomoaki Inoue^{*1)}，Kenji Yasugi^{*2)}

Keywords: Biotechnology-derived pharmaceuticals, immunogenicity, cytokine release, drug delivery system, polyethylene glycol-conjugation (PEGylation)

バイオ医薬品は、安全性評価において一般の低分子医薬品とは異なる考慮すべき点がある。試験を行う動物種の問題、免疫原性、免疫系への影響などについて特に配慮して評価することが必要である。バイオ医薬品に特有な毒性に DDS が影響を与える例も含めて解説する。

バイオ医薬品の毒性評価の特徴

1. バイオ医薬品の特徴

バイオ医薬品は、種特異性の問題など前臨床で行う安全性評価において考慮する点が低分子医薬品とは異なる場合がある。特に、タンパク質医薬品の場合は、その標的分子（レセプターや抗原分子）の種特異性が高いために、毒性試験に用いる動物種の選択に関して考慮する必要がある。また、バイオ医薬品に対する生体の免疫反応や、バイオ医薬品自体が

免疫系に影響を及ぼす分子である場合など、免疫系をよく理解したうえで安全性を評価することが重要である。

2. バイオ医薬品の前臨床安全性評価に関するガイドライン

日米欧の代表者の協議により、1997 年 7 月に ICH S6 ガイドラインが Step 4 に到達し、2011 年 6 月に Addendum が追加された¹⁾。本ガイドラインでは、動物種の選択、試験デザイン、免疫原性、安全性薬理、曝露、単回投与毒性、反復投与毒性、免疫毒性、生殖・発達毒性、遺伝毒性、ガン原性、局所刺激性の評価について記載されている。

3. 前臨床安全性評価に用いる動物種

バイオ医薬品は種特異性が高い場合が多いので、標的分子との結合、その結合による薬理活性の発現が認められる動物種を用いることが望まれる²⁾。これらの反応性が認められる動物種がない場合は、ヒト標的分子のトランスジェニック動物や動物での相

^{*1)} Safety Assessment Department,

^{*2)} Preclinical Research Department,

Fuji Gotemba Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

同タンパク質を用いることも考えられる。この場合、リスク評価はある程度可能であると考えられるが、ヒトでの毒性に関する用量反応性を予測することは難しい。

毒性試験の動物種としてサルが用いられる場合が多いが、標的分子との結合性は認められても、標的分子が発現している細胞種やシグナル伝達が必要しもヒトと同一ではない場合もあるので、発現した変化がヒトでの変化を反映しているかどうかは、文献情報や *in vitro* 実験により詳細に検討する必要がある。

4. 免疫系への影響

バイオ医薬品には、抗体医薬やサイトカインなど免疫系に作用するものが多く認められるので、免疫系を介した毒性についての評価法を検討しておく必要がある。

・免疫原性評価

実験動物においてヒトタンパク質は異種にあたるので、免疫原性が認められ免疫誘導が起こる場合が多い。この動物での免疫原性からヒトでの免疫原性を予測することはできないが、動物での毒性試験で

薬物に対する免疫反応が誘導され、薬物に対する抗体が誘導された場合は、投与後、急速に血中から薬物が消失し、長期曝露での毒性が評価できないことや、薬理作用の中和活性のために毒性も減弱する場合がある。よって、毒性試験では、抗薬物抗体などの測定が重要となる。動物実験での免疫原性の結果はヒトに外挿できないが、ヒト配列のバイオ医薬品であっても、臨床において抗薬物抗体が認められる場合があり³⁾、バイオ医薬品の前臨床での免疫原性の評価は非常に重要である。免疫原性のメカニズムは図1に示した。最近、ヒト末梢血単核球を用いた *in vitro* アッセイが報告されており⁴⁾、評価系の構築が可能であると考えられる。今後、臨床での免疫原性の結果と比較することにより、validation がすすむことが期待される。

・サイトカインリリース評価

抗体医薬品の場合は造血系細胞や免疫系細胞に作用し、サイトカインリリースが認められる場合がある。抗ヒト CD28 抗体 (TGN1412) の臨床試験で、2006 年に認められたサイトカインストームによる致死的症状が報告されて以来、前臨床におけるサイトカインリリース評価法について議論が高まってい

図1 バイオ医薬品の免疫原性メカニズム

図2 バイオ医薬品(抗体医薬品)によるサイトカイン放出メカニズム

る⁵⁾。抗体医薬によるサイトカインリリースのメカニズムは主に2つあり、標的細胞に存在する標的分子に直接 signal を入れ、標的細胞からのサイトカインリリースを誘導するものと、ADCC (抗体依存性細胞傷害) 抗体医薬の Fc レセプター (FcR) を介して FcR 陽性細胞である NK 細胞や好中球などからのサイトカインリリースを誘導するものがある (図2)。例としては、TGN が標的分子である CD28 を介して T 細胞からのサイトカインリリースを誘導し、ADCC メカニズムの抗ガン薬 Campus が FcR (CD16) を介して NK 細胞などからのサイトカインリリースを誘導する⁶⁾。これらのサイトカインリリースは、抗体医薬が動物の標的分子に結合したとしても実験動物では認められない場合も報告されており、TGN の場合はサルにおいてサイトカインリリースは認められなかったが、臨床試験では重篤なサイトカインリリースが認められている⁷⁾。これらのことから、前臨床におけるサイトカインリリースの評価は、ヒト細胞を用いた *in vitro* 系での評価が報告されている。健常ヒト血液が用いられることが多いが、Campus の場合は血液への添加培養により、*in vitro* でのサイトカインリリースがヒト臨床でのサイトカイン放出と相関することが報告されている。一方、TGN の場合は、血液と抗体医薬を混合し、培養しただけでは、サイトカインリリースはほとんど認められず、血管内皮細胞との共培養や、あらかじめ抗体医薬を培養容器表面に固着化したう

えでヒト血液を培養するとサイトカインリリースが認められている。

・ Vascular leak syndrome (VLS)

バイオ医薬品投与後に IL-1, TNF- α , IFN- γ などのサイトカインリリースが誘導された場合は、血管内皮細胞の活性化が起こり、接着分子である VCAM, E-selectin の発現が亢進し、白血球の血管内皮への接着が起こる。その後、更に白血球の活性化などが起こり、組織内への浸潤が起こる。この血管内皮細胞と白血球の相互活性化により、血管内皮のバリア機能が低下し、タンパク質などの血漿成分の組織への漏出が起こる⁸⁾。また、IL-2 は典型的な VLS を起こすサイトカインであることが知られており、血管内皮への直接刺激による NO 産生などを介して血圧低下、VLS を起こすことが eNOS (endothelial nitric oxide synthase) ノックアウトマウスの系で示唆されている⁹⁾。VLS の前臨床での評価はヒト血管内皮細胞を用いた *in vitro* assay も報告されているが¹⁰⁾、医薬品の直接作用ではなくサイトカイン放出などの間接的作用によって発現する場合は、血管内皮細胞だけで構成される *in vitro* 系での評価は難しい。

・ 免疫抑制

バイオ医薬品により免疫系が抑制される場合は、感染症やガンのリスクが考えられる。試験法として

は、低分子医薬品と同じように、薬効が認められる動物種での *in vivo* 試験での抗体産生や NK 活性というような免疫機能試験での評価が必要となる。

・自己免疫

免疫に抑制的に働いている細胞の機能を低下させる作用がある場合に、自己免疫反応が認められる場合がある。自己免疫はバイオ医薬品の作用機序により試験系の組み方も異なるので、ケースバイケースでヒト標的細胞を含む *in vitro* 系または薬効が認められる動物種での *in vivo* 試験で評価することとなるが、評価が難しい場合も多い。

バイオ医薬品の DDS による毒性への影響

核酸、タンパク質、ペプチドなどの医薬品化がすすむに従い、DDS を適用したバイオ医薬品もまた多くなっている。DDS の役割は薬物そのものでは成し得ない特性の付加を通じ、薬物に新たな価値を付与することにより、生体内安定性や吸収性の改善に加えて免疫原性の低減などの安全性の改善もまた大きな利点の 1 つであるが、一方で、DDS の適用において新たに毒性が生じるケースも指摘されてきている。表 1 にバイオ薬品に適用される DDS における主な利点と欠点を示した。これらのバイオ医薬品における DDS に焦点をあて、特に安全性の観点から DDS の有用性および問題点を紹介する。

1. PEG 化医薬における免疫原性

バイオ医薬品の生体内での安定性を改良するために、さまざまなアミノ酸置換体をトリアンドエラーで作成し、タンパク表面電荷の中性化、酸性化を行うことで、体内動態の改善や細網内皮系への取り込みの回避が試みられてきた。しかしながら、こ

の方法では非常に多くの労力を費やすうえ、作成可能な変異体の種類にも限界があるなど、期待どおりのタンパク質が得られにくい¹¹⁾。

一方で、水溶性高分子をタンパク質に修飾するバイオコンジュゲートは汎用的に生体内安定性を高められることから、すでに多くの PEG を用いたコンジュゲートがタンパク質などに適用され、医薬品として市販されるに至っている。1990 年に PEG 化製剤として最初に上市されたアデノシンデアミラーゼ¹²⁾、1994 年に承認されたアスパラギナーゼにおいては生体内での安定性向上のみならず、タンパク質そのものと比較して明らかに免疫原性の低下が観察されており、PEG 化の有用性が示されている¹³⁾。高尿酸血症に用いられるウリカーゼ(尿酸分解酵素)は本来、人は持っていないため、2002 年に組み換え型のウリカーゼが市販 (Ellitek[®], Sanofi-Aventis 社) されたが、免疫原性が高いことが確認されている¹⁴⁾。一方で、豚由来のウリカーゼの PEG 化によりこの免疫原性の低下が明らかにされている¹⁵⁾。このように、PEG 化の利点の 1 つとしてタンパク質の免疫原性を下げ、安全性を向上するといわれている¹⁶⁾。

一方で PEG 化ウリカーゼの Phase I/II 試験において一部の患者で PEG のメトキシグループに対する抗体が観察され¹⁷⁾、PEG 化製剤においては PEG 自体の安全性も考慮する必要性が示されている。このような結果も受け、PEG の安全性に関しては多くの研究がすすめられており、さまざまな懸念事項も報告されている。

たとえば PEG や PEG 化タンパクの大量投与においては分子量依存性の捕体の活性化¹⁸⁾ や腎臓尿細管における空胞化現象¹⁹⁾ (機能異常とは無関係) が報告されている。しかしながらここで観察された所見は、現在、実際の治療で用いられている投与量

DDS 技術	利点	欠点
PEGylation (PEG 化タンパク)	生体内安定性の向上 (頻回投与の回避), 免疫原性の低減	PEG 自体の免疫原性, 生物活性の低下, Vacuolation (空胞化現象)
PEG-Liposome		Accelerated blood clearance (ABC) 現象
PLGA microsphere, depot	徐放性の付加 (頻回投与の回避)	皮下刺激性 (発赤, 硬結)

表 1 DDS 製剤における主な利点と欠点

の 1000 倍以上の量での変化であり、臨床上是安全で不活性な物質といえることができる。

ただし、大量頻回投与を必要とする病気、特に慢性疾患などでの長期間にわたる使用においては、その危険性を考慮する必要がある、PEG 化による生体内での安定化、タンパク質の免疫原性の低下という利点と PEG 自体の毒性のバランスから、その利用性が決まってくると考えられる。

PEG 化技術において高分子量や分岐型を用いることにより、より免疫原性を抑えることや²⁰⁾、構造を維持したままコンジュゲートすることにより、活性を維持するコンジュゲート法²¹⁾ もすすんでおり、今後、薬効と毒性との乖離が更に進むことが期待される。

2. PEG 化リポソームにおける ABC 現象

ナノキャリアの利用は低分子薬剤が先行したが、近年、核酸医薬品開発の活性化に伴い再びナノキャリアが注目されている。特に siRNA のデリバリー分野においてはリポソームなどのキャリアを用いたデリバリー技術が大きく進展した。Alnylam Pharmaceuticals 社、Tekmira 社は独自の stable nucleic acid-lipid particles (SNALP) 技術を用い臨床試験を行っており (Phase I)、NeoPharm 社は antisense DNA / liposome で固形癌への臨床試験を行っている (Phase I/II)。

ナノキャリアの技術の利点は、核酸、タンパク質、ペプチドなどの担持物質に修飾を加えることなく、生体内での安定性を付与できることにあるが、近年、PEG 化リポソームの頻回投与時において、2 回目の投与時に PEG 化リポソームが血中から速やかに消失する現象 accelerated blood clearance (ABC) 現象^{22), 23)} が観察された。

この現象のメカニズムは以下のように説明されている。

PEG 化リポソームの初回投与に呼応し、脾臓 B 細胞から血中に IgM が分泌され、この IgM が 2 回目の投与時に PEG 鎖に結合することにより捕体系の活性化を誘導し、捕体第三成分である C3 が活性型 iC3b へ変換される。この活性型 iC3b が PEG 化リポソームの肝マクロファージによる取り込みを

亢進し、急激な血中からの消失を引き起こしている。

PEG 化リポソーム製剤である DOXIL[®] (ALZA 社) で代表される細胞傷害性を有する薬物 (抗癌剤 Doxorubicin) を内封する場合、その薬物の効果により ABC 現象は誘導されないが、核酸医薬やタンパク、ペプチドなどのデリバリーにおいては解決しなければならない問題と考えられる。この機構に関して、サイズや投与量による ABC 現象の回避の可能性に関する報告²⁴⁾ があるが、更なる回避方法の検討が望まれる。

3. 徐放性製剤における皮下刺激性

バイオ医薬品の徐放製剤はインスリンに適用された亜鉛やプロタミンによる沈殿化製剤がよく知られているが、亜鉛に関しては使用量の制限があるため、全てのタンパク質やペプチドに適用が可能というわけではなく、特に長期の徐放化には更なる工夫が必要となる。

また、一方で polylactic glycolic acid copolymers (PLGA) のようなマトリックスを用いた徐放性製剤も数多く検討され市販されている。製剤のマトリックスは主に PLGA、ゼラチン、コラーゲンが使用されている。前述の沈殿化製剤技術は主に 1 日程度の短い徐放化に適用され、後述のマトリックスを使用した製剤化技術はより長い徐放性を必要とする場合に使用される場合が多い。PLGA は特に多く利用されており、somatostatin analogs, luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) analogue, glucagon-like peptide 1 (GLP-1) analogue のマイクロスフィア (Sandostatin LAR[®], Lupron Depot[®], Byetta[®]), LH-RH analogue ではロッド形状の製剤 (Zoladex[®]) や皮下で析出するタイプ (Eligard[®]) の製剤とさまざまに市販されており、カルシトニンの PLGA 徐放製剤も臨床開発されている (Phase II)。しかしながら、近年その皮下投与における皮下局所刺激 (発赤、硬結) が問題となってきている。

LH-RH は視床下部から分泌され、下垂体にある受容体に結合してゴナトロピン (LH, FSH) を分泌させ、男性ホルモン (テストステロン) の分泌を促進させる。この LH-RH アナログの PLGA 製剤を用いた治療における皮下硬結の出現率は 15.4% との

結果があり、特に 3 ヶ月製剤に限ってみると皮下硬結の出現率が 19.1% となり、上昇する傾向が観察されている²⁵⁾。また、GLP-1 アナログを用いた治療では皮下の炎症のが 7-13% の出現率で観察されており、PLGA の使用に際しては注意が必要である²⁶⁾。

また、皮下で析出するタイプの insulin に関しても投与部位での反応が報告されており、アルキル鎖を付加した Levemir[®], pI の制御により皮下で沈殿化する Lantus[®] でそれぞれ、4.5%, 1.4% の出現率で観察されることが報告されている²⁷⁾。薬物自体の改変においても、沈殿製剤化により炎症のリスクは上昇することが考えられ、注意が必要である。

文献

- 1) ICH S6 (R1) : Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals, Addendum incorporated June 2011.
- 2) Bussiere, JL: Species selection considerations for preclinical toxicology studies for biotherapeutics. Expert Opin Drug Metab Toxicol 4: 871-877, 2008.
- 3) Hwang WYK and Foote J: Immunogenicity of engineered antibodies. Methods 36: 3-10, 2005
- 4) Stickler M, et al.: Human population-based identification of CD4+ T-cell peptide epitope determinations. J Immunol Meth 281: 95-108, 2003.
- 5) Sunthalingam G, et al.: Cytokine storm in a Phase I trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. New Engl. J. Med., 10 : 1-11, 2006.
- 6) Uppenkamp M, et al : Monoclonal antibody therapy with CAMPATH-1H in patients with relapses high- and low-grade non-Hodgkin's lymphomas: A multicenter Phase I/II study. Ann Hematol, 81 : 26-32, 2002.
- 7) Pallardy M and Huenig T: Primate testing of TGN1412: right target, wrong cell. Br J Pharmacol 161: 509-511, 2010.
- 8) Gribble EJ, et al.: Toxicity as a result of immunostimulation by biologics. Expert Opin Drug Metab Toxicol 3: 209-234, 2007.
- 9) Samlowski WE, et al. : Endothelial nitric oxide synthase is a key mediator of interleukin-2-induced hypotension and vascular leak syndrome. J Immunotherapy 34: 419-427, 2011.
- 10) Alan L, et al.: *In vitro* studies of ricin A-chain-induced vascular leak syndrome. Med Mol Biol 166: 125-135, 2001.
- 11) 吉岡靖雄 : 医薬価値に優れた機能性変異蛋白質の網羅的作成とその DDS への応用 YAKUGAKU ZASSHI 124 (8) : 531-539, 2004.
- 12) Levy Y, et al.: Adenosine deaminase deficiency with late onset or recurrent infections: response to treatment with poly (ethylene glycol) modified adenosine deaminase. J Pediatr 113: 312-317, 1988.
- 13) Zeidan A, Wang ES, Wetzler M: Pegasparaginase: where do we stand? Expert Opin. Biol. Ther. 9(1): 111-119, 2009.
- 14) Coiffier B, et al.: Efficacy and safety of rasburicase (recombinant urate oxidase) for the prevention and treatment of hyperuricemia during induction chemotherapy of aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results of the GRAALL study. J Clin Oncol 21: 4402-4406, 2003.

おわりに

バイオ医薬品は、その特徴から免疫原性や免疫系の刺激による毒性の評価が重要である。

また、今後もさまざまな DDS とバイオ医薬品が融合し、より利便性の高い製剤開発がすすんでいくことが予想されるが、DDS と薬物との相性によっては新たな毒性の誘起も懸念されるため、DDS 製剤開発においては早い段階での毒性評価が非常に重要な意味をもってくる。それぞれの技術の発展と安全性をケアした更なる融合がよりよい医薬品の創製につながると考えられる。

- 15) Sherman MR, Saifer MGP, Perez-Ruiz F: PEG-uricase in the management of treatment-resistant gout and hyperuricemia. Adv Drug Deliv Rev 60: 59-68, 2008.
- 16) Sehon, AH: Suppression of antibody responses by conjugates of antigens and monomethoxypoly (ethylene glycol). Adv Drug Deliv Rev 6: 203-217, 1991.
- 17) Ganson NJ, et al: Control of hyperuricemia in subjects with refractory gout, and induction of antibody poly (ethylene glycol) (PEG) , in a phase I trial of subcutaneous PEGylated urate oxidase. Arthritis Res Ther 8: R12, 2006.
- 18) Hamad I, Hunter AC, Szebeni J, Moghimi SM: Poly(ethylene glycol) s generate complement activation products in human serum through increased alternative pathway turnover and a MASP-2-dependent process. Mol Immunol 46: 225-232, 2008.
- 19) Bendele A, et al.: Short com communication: Renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins. Toxicol Sci 42: 152-157, 1998.
- 20) Harris JM, Chess RB: Effect of pegylation on pharmaceuticals. Nat Rev Drug Discov 2: 214-221, 2003.
- 21) Brocchini S, et al.: Disulfide bridge based PEGylation of proteins. Adv Drug Deliv Rev. 60:3-12, 2008.
- 22) 石田竜弘, 際田弘志: ポリエチレングリコール修飾リポソーム投与時に生ずる Accelerated Blood Clearance (ABC) 現象 YAKUGAKU ZASSHI 128: 233-243, 2008.
- 23) 市原理子 ポリエチレングリコール修飾リポソームの 2 回目投与時に見られる ABC 現象 生活衛生 52(1): 3-12, 2008.
- 24) 小山裕之 他: PEG 化ナノキャリア頻回投与による accelerated blood clearance 現象の機構解明 YAKUGAKU ZASSHI 129(12): 1445-1451, 2009.
- 25) 鈴木一実 他: 前立腺癌患者における LH-RH アナログ製剤による注射部位皮下硬結の臨床的検討 泌尿器外科 24 (2) : 225, 2011.
- 26) Russell JD: The safety and tolerability of GLP-1 receptor agonists in the treatment of type-2 diabetes. Int J Clin Pract 64: 1402-1414, 2010.
- 27) Poon K, King AB: Glargine and detemir: Safety and efficacy profiles of the long-acting basal insulin analogs. Drug Healthc Patient Saf 2: 213-223, 2010.