

総説

核酸医薬品の薬物動態特性とその評価

高草 英生^{*1}, 岩崎 紀彦^{*2}, 西川 元也^{*3},
吉田 徳幸^{*4,*5}, 小比賀 聡^{*5}, 井上 貴雄^{*4,*5}

Drug Metabolism & Pharmacokinetics of Oligonucleotide Therapeutics :
Profiles and Evaluation Approaches

Hideo TAKAKUSA^{*1}, Norihiko IWAZAKI^{*2}, Makiya NISHIKAWA^{*3},
Tokuyuki YOSHIDA^{*4,5}, Satoshi OBIKA^{*5} and Takao INOUE^{*4,5}

1. はじめに

オリゴ核酸を基本骨格とする「核酸医薬品」は、これまでの創薬手法では標的とするのが難しかった遺伝性疾患等に対する新しい創薬モダリティとして注目を集めている¹⁾。従来の核酸医薬開発では生体内における安定性や標的組織への送達に課題があったが、修飾核酸技術や薬物送達(DDS)技術が進展したことで、有効性、安全性、体内動態等の面で優れた化合物が創生されるようになった。2013年に、Mipomersenが全身投与型の核酸医薬品として初めて実用化されて以降、核酸医薬品の研究開発が加速し、2020年11月時点での承認薬は13剤を数える(Table 1)。

このような背景の下、国内では厚生労働省あるいは日本医療研究開発機構(AMED)の研究班において、核酸医薬品の品質評価並びに安全性評価に関する考慮事項が継続的

に議論されてきた。また、日本核酸医薬学会レギュラトリーサイエンス(RS)部会が主催する核酸医薬RSシンポジウム(<http://www.nihs.go.jp/mtgt/section2/file2.htm>)等においても、品質・安全性評価の考え方について幅広く意見交換されてきた。これらの取り組みは最終的に、厚生労働省通知やコンセプトペーパー、総説の発表につながっており、広く周知されている²⁻⁹⁾。以上の経緯を受け、品質、安全性に続き、動態評価についても議論を深めるべく、AMED「アンチセンス医薬品の品質及び安全性評価に関する研究」班(AMED研究班、代表:井上貴雄)の呼びかけにより、「核酸医薬動態評価タスクフォース(核酸動態TF)」が日本製薬工業協会に設置された(2019年9月)。

このたび、核酸動態TFはAMED研究班と連携して、核酸医薬品の動態評価に関する調査研究を実施した。具体的には、規制当局の審査報告書や原著論文などの情報から、核酸医薬品の動態的特徴とその評価方法について、現状や

^{*1} 第一三共株式会社 東京都品川区広町 1-2-58 (〒140-8710)

Daiichi Sankyo Co., Ltd., 1-2-58, Hiromachi Shinagawa-ku, Tokyo 140-8710, Japan

^{*2} 田辺三菱製薬株式会社 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地 (〒227-0033)

Mitsubishi Tanabe Pharma Corp., 1000, Kamoshida-cho, Aoba-ku, Yokohama, Kanagawa 227-0033, Japan

^{*3} 東京理科大学薬学部 千葉県野田市山崎 2641 (〒278-8510)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan

^{*4} 国立医薬品食品衛生研究所 神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-26 (〒210-9501)

National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan

^{*5} 大阪大学大学院薬学研究科 大阪府吹田市山田丘 1-6 (〒565-0871)

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

Table 1 承認済みの核酸医薬品 (2020年11月時点)

商品名	一般名	分類	塩基長 (DDS等)	化学修飾等	承認国/年	標的	適応	投与
Vitravene®	fomivirsen	アンチセンス	21	S化	US 1998 EU 1999	CMV IE2 mRNA	CMV性網膜炎 (AIDS患者)	硝子体内
Macugen®	pegaptanib	アプタマー	28 (PEG)	2'-F 2'-OMe	US 2004 EU 2006 JP 2008	VEGF165 (タンパク質)	滲出型 加齢黄斑変性症	硝子体内
Kynamro®	mipomersen	アンチセンス (Gapmer)	20	S化 2'-MOE	US 2013	ApoB-100 mRNA	ホモ接合型家族性 高コレステロール血症	皮下
Exondys 51®	eteplirsen	アンチセンス (SSO)	30	モルフォ リノ核酸	US 2016	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	静脈内
Spinraza®	nusinersen	アンチセンス (SSO)	18	S化 2'-MOE	US 2016 EU 2017 JP 2017	SMN2 pre-mRNA	脊髄性筋萎縮症	髄腔内
HEPLISAV-B®	(CpG1018)	CpG オリゴ	22	S化	US 2017	TLR9 (タンパク質)	B型肝炎 (予防)	筋肉内
Tegsedi®	inotersen	アンチセンス (Gapmer)	20	S化 2'-MOE	US 2018 EU 2018	TTR mRNA	遺伝性ATTR アミロイドーシス	皮下
Onpattro®	patisiran	siRNA	21 (LNP)	2'-OMe	US 2018 EU 2018 JP 2019	TTR mRNA	遺伝性ATTR アミロイドーシス	静脈内
Waylivra®	volanesorsen	アンチセンス (Gapmer)	20	S化 2'-MOE	EU 2019	ApoCIII mRNA	家族性 高カイロミクロン血症	皮下
Givlaari®	givosiran	siRNA	23 (GalNAc)	S化 2'-OMe 2'-F	US 2019 EU 2020	ALAS1 mRNA	急性肝性 ポルフィリン症	皮下
Vyondys 53®	golodirsen	アンチセンス (SSO)	25	モルフォ リノ核酸	US 2019	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	静脈内
Viltepso®	viltolarsen	アンチセンス (SSO)	21	モルフォ リノ核酸	US 2020 JP 2020	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	静脈内
Oxlumo®	lumasiran	siRNA	23 (GalNAc)	S化 2'-OMe 2'-F	US 2020 EU 2020	HAO1 mRNA	原発性高シュウ酸尿症 I型	皮下

課題などを体系的に調査した。本誌3月号において、既承認アンチセンス医薬品を対象とした薬物動態特性に関する調査研究の詳細を報告する予定である。

本稿ではこの調査研究の結果を概説する前段階として、低分子医薬品で実施される一般的な薬物動態評価を紹介した後に、核酸医薬品の薬物動態の特徴とその評価における留意点を概説する。

2. 核酸医薬品の分類と特徴

核酸医薬品とは一般に、「核酸あるいは修飾核酸が十数～数十塩基連結したオリゴ核酸で構成され、タンパク質に翻訳されることなく直接生体に作用するもので、化学合成により製造される医薬品」を指す¹⁾。遺伝子治療用製品も核酸で構成されるが、タンパク質に翻訳されて作用する点、また、生物学的に製造される点で核酸医薬品とは異なる。主な核酸医薬品の分類を Fig. 1 に示す。核酸医薬品は大きく分けて、「RNA に作用するもの」と「タンパク質に作用するもの」に大別できる。「RNA に作用するもの」としては、アンチセンスと siRNA があり、これらがこれまで実

用化された核酸医薬品の大部分 (13 剤中 11 剤) を占める (Table 1)。実用化されているアンチセンス医薬品の作用機序は大きく分けて二つのタイプがある。一つは、RNaseH 依存的に RNA の分解を誘導して標的遺伝子の発現を負に制御するもので、構造的には配列の両端に糖部修飾核酸を導入し、中央部には非修飾の DNA を配した gapmer と呼ばれるものである。もう一方は、スプライシング調節部位に結合することでスプライシングを制御するタイプである。これは SSO (splice-switching oligonucleotide) と呼ばれ、エクソンスキップあるいはエクソンインクルージョン等のメカニズムで標的遺伝子の発現を正又は負に制御する。「タンパク質に作用するもの」には、アプタマーと CpG オリゴがあり、それぞれ 1 剤がこれまでに承認されている¹⁰⁾。

核酸医薬品の実用化には、生体内での安定化や標的 RNA との結合力の向上が重要であり、これまでに様々な修飾核酸技術が開発、応用されてきた (Fig. 2)¹¹⁾。オリゴ核酸の分解は主として生体内のヌクレアーゼによる加水分解であるため、リン酸ジエステル結合のバックボーンの安定化が必要となる。臨床開発段階にあるアンチセンス医薬

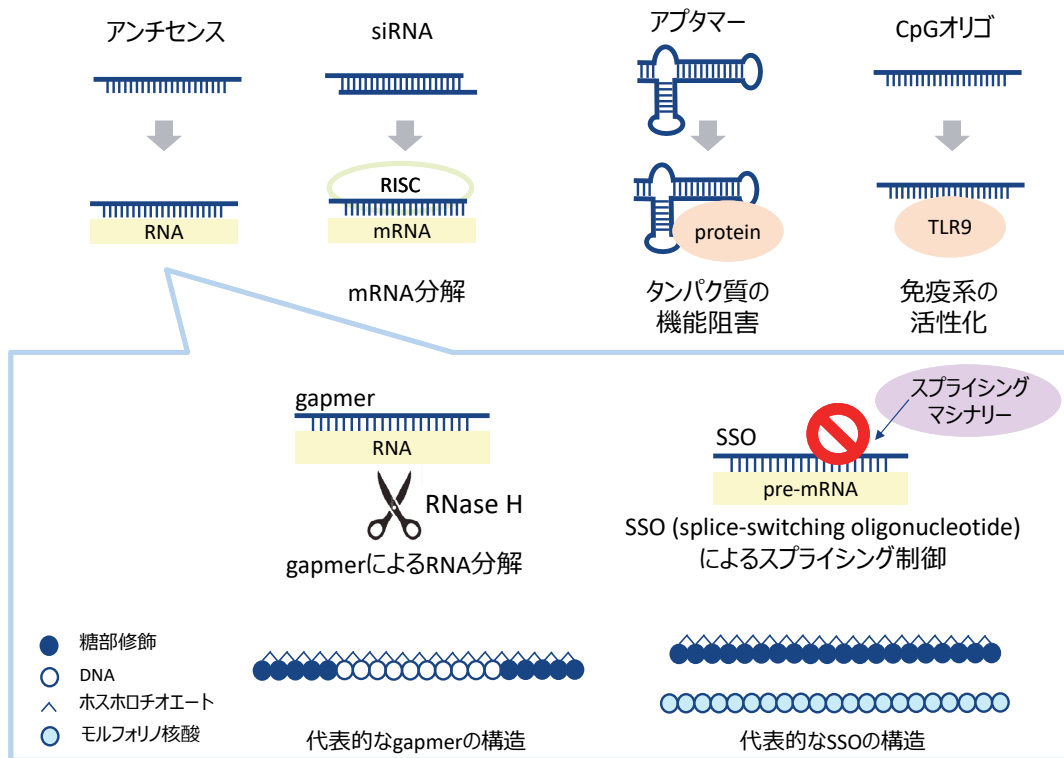


Fig. 1 核酸医薬品の分類

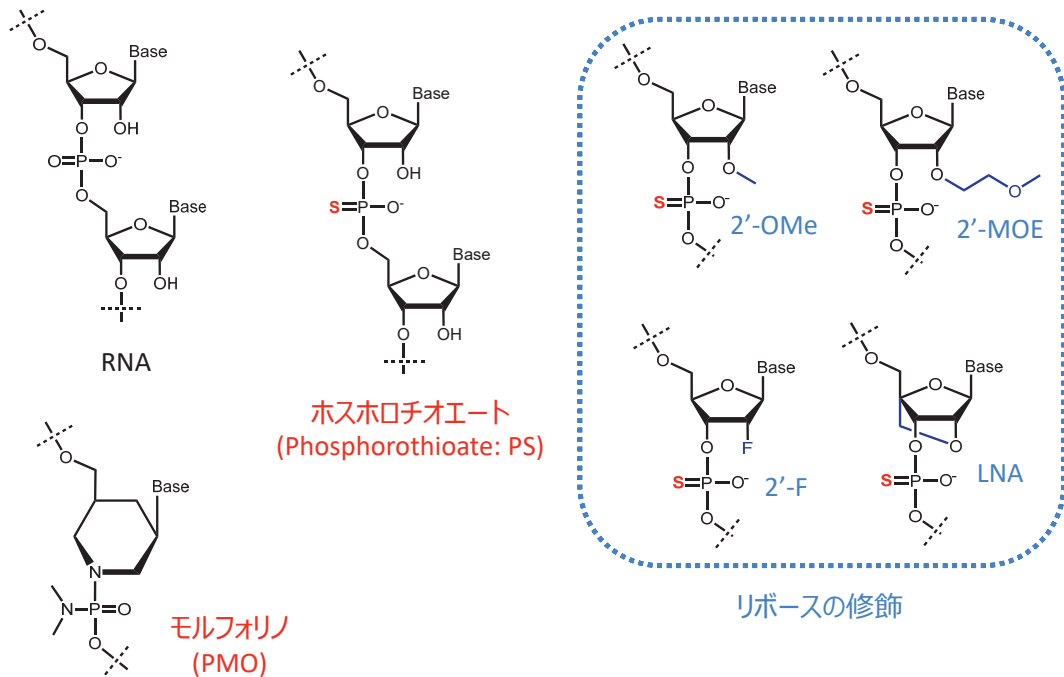


Fig. 2 核酸医薬品に用いられる化学修飾の例

品のバックボーンの修飾としては、リン酸ジエステル部分のO原子をS原子に変換したホスホロチオエート修飾(PS修飾)が用いられている。PS修飾核酸においては、糖部への化学修飾も合わせて導入されることが多く、2'-O-メ

チル化RNA(2'-OMe)、2'-O-メトキシエチル化RNA(2'-MOE)、2'-フッ素化RNA(2'-F)などの2'位への置換基の導入や、LNA(locked nucleic acid)等の架橋型修飾が用いられる。もう一つの代表的な化学修飾として、リン酸ジ

エステル結合を電荷のないホスホロジアミデート結合に変換し、リボースの代わりにモルフォリン環を導入したモルフォリノ核酸も広く用いられている。

現在、臨床開発されているアンチセンス医薬品は、全ての核酸に PS 修飾核酸を用いている S 化オリゴ核酸か、全ての核酸にモルフォリノ核酸を用いているモルフォリノオリゴ核酸に大別される。詳細は後述するが、これらの化学修飾の違いは薬物動態プロファイルにも影響を及ぼす。

3. 低分子医薬品での薬物動態評価

詳細は統報の調査研究にて論じるが、化成品である核酸医薬品の薬物動態プロファイルは、低分子医薬品における薬物動態の考え方、試験方法に準じて評価されている。

本項ではまず、低分子医薬品で主に実施される薬物動態評価^{12,13)}について概説する。薬物動態研究は、薬物が体内に投与されてから排泄されるまでの過程を明らかにするものであり、定量的な分析技術(バイオアナリシス)と数理モデル解析技術とともに進展してきた研究分野である。薬物の生体内での挙動は、投与部位から循環血への吸収(Absorption)、循環血から各組織への分布(Distribution)、肝臓などで酵素によって化学構造変換を受ける代謝

(Metabolism)、そして最終的な消失過程である尿や糞中への排泄(Excretion)、に分類され、各過程の頭文字をとって ADME とも呼ばれる。併用薬が存在する場合には、被験薬が併用薬の動態に影響を与える、あるいは併用薬によって被験薬の動態に影響を受ける場合がある。これは薬物相互作用(DDI: Drug-drug interaction)と呼ばれ、薬物動態研究において明らかにすべき重要な要素である。吸収、分布、代謝、排泄、及び DDI について、低分子医薬品に対して主に実施される試験項目、及び代表的な評価方法を Table 2 にまとめた。

上述のとおり ADME における吸収は投与部位から循環血への吸収の過程を指す。したがって、経口投与や皮下投与など臨床投与経路が静脈内投与以外の場合に評価の対象となる。吸収は化合物の溶解度や膜透過性などの物性に依存し、投与後の循環血漿中曝露を指標に評価する。血漿中濃度を液体クロマトグラフィー質量分析計(LC/MS)等で定量し、血中濃度-時間曲線下面積(AUC: area under the blood concentration time curve)、最高血中濃度(C_{max})、血中濃度半減期($T_{1/2}$)等のファーマコキネティクス(PK)パラメーターを算出する。臨床投与経路で投与後の AUC を静脈内投与時のそれと比較することで算出されるバイオアベイラビリティは、吸収性の重要な指標となる。

Table 2 低分子医薬品で主に実施される薬物動態評価

評価項目	試験項目	代表的な手法
吸収	血漿中濃度推移	投与後の血漿中濃度を LC/MS 等で定量し、PK プロファイルを評価する。静脈内投与時の曝露との比較から、バイオアベイラビリティを算出する。
分布	血漿蛋白結合	超遠心、平衡透析、限外ろ過などで結合/遊離型薬物を分離し、LC/MS 等で定量して血漿蛋白結合率を算出する。
	血球移行性	血液中の薬物濃度及び遠心後の血漿中の薬物濃度を LC/MS 等で定量し、血球移行率を算出する。
	組織中分布	放射性標識体を投与後の全身オートラジオグラフィーあるいは摘出組織の放射能から、各組織への移行量及び残存性を評価する。
代謝	胎盤・胎児移行性	妊娠動物に放射性標識体を投与して、胎児への移行性を評価する。
	<i>In vitro</i> 代謝	肝臓試料とインキュベーション後の試料を LC/MS 等で分析し、代謝安定性及主代謝物の構造を明らかにする。
	<i>In vivo</i> 代謝	放射性標識体を投与後の血液、尿、糞、胆汁をラジオクロマトグラフィー及び LC/MS で分析し、代謝物の構造や存在量を評価する。
排泄	尿・糞・胆汁・呼吸排泄	放射性標識体を投与後の尿、糞、胆汁、呼吸中の放射能を経時的に測定し、主排泄経路を特定する。
	乳汁移行性	授乳期動物に放射性標識体を投与後の乳汁中の放射能を測定する。
薬物相互作用(DDI)	代謝酵素同定	P450 や UGT の発現系酵素とインキュベーションして化合物の減衰を LC/MS 等で分析し、代謝に主に寄与する酵素・分子種を特定する。
	代謝酵素阻害	P450 や UGT の発現系酵素とインキュベーションして、典型基質の代謝に対する阻害率等を算出する。
	代謝酵素誘導	肝細胞を用いて、主要な P450 分子種の mRNA 及び酵素活性を測定して、誘導作用を評価する。
	トランスポーター基質認識性	肝臓や腎臓に発現するトランスポーターの発現系細胞などを用いて、放射性標識体の取り込み活性を評価し、分布や排泄に寄与するトランスポーターを明らかにする。
	トランスポーター阻害	肝臓や腎臓に発現するトランスポーターの発現系細胞などを用いて、典型基質の輸送を阻害するかどうかを評価する。

分布評価は、薬効標的や毒性発現に関連する組織への薬物の移行と残存を明らかにするために実施され、血液中で挙動を対象とする評価と、全身組織を対象とする評価に大別される。血液中の薬物は、アルブミンなどの血漿蛋白に結合した状態、赤血球などの血球に移行した状態、及び血漿中に遊離した状態として存在する。遊離型の薬物が組織に移行できると考えるため、これらの存在割合を評価することが重要となる。血漿蛋白結合率は、血漿に被験薬を添加した後、超遠心、平衡透析、限外ろ過などで結合/遊離型薬物を分離し、LC/MS等で定量することで算出する。血球移行率は、血液に被験薬を添加した後、遠心で血漿と血球を分離し、それぞれの濃度をLC/MS等で定量することで算出する。血漿蛋白結合評価、血球移行評価には、 ^{14}C 体、 ^3H 体などの放射性標識体が用いられることもあり、この場合は液体シンチレーションカウンター (LSC) が測定に用いられる。全身組織を対象とした分布評価は、主に放射性標識体を動物に投与して実施される。放射性標識体を投与後、経時的に定量的全身オートラジオグラフィ (QWBA: quantitative whole-body autoradiography) あるいは摘出組織の放射能測定を実施し、各組織への移行量及び残存性を評価する。妊娠動物を用いることで、胎盤・胎児移行性の評価も実施される。

代謝評価の目的は、被験薬の消失プロファイルを明らかにすることに加え、薬効や毒性に関連する可能性のある代謝物を特定しその種差を明らかにすることにある。代謝は主に肝臓で進行することが多いため、肝細胞、肝ミクロソームなどの肝臓試料を用いた *in vitro* 評価が実施される。被験薬を動物及びヒトの肝臓試料とインキュベーションした後のサンプルをLC/MS等で分析し、代謝安定性、代謝反応のキネティクス、主代謝物の構造及び代謝経路、代謝の種差などを明らかにする。*In vivo* の代謝は、放射性標識体を投与後のサンプル(血漿、尿、糞、胆汁など)を用いて評価するのが一般的であり、ラジオ検出器を接続したLC/MS分析により、代謝物の構造と存在量を明らかにする。ヒト特異的な代謝物が認められる場合には、薬効、毒性及びDDIへの関連について、より詳細な検討が必要となる。

排泄評価は、投与された被験薬が未変化体及び代謝物としてどのように体外に出て行くかを定量的かつ経時的に明らかにする目的で実施される。放射性標識体を動物に投与後の尿、糞、胆汁、呼気の放射能をLSCで経時的に測定し、主排泄経路及び排泄の時間推移を明らかにする。乳汁への排泄については、授乳期動物に放射性標識体を投与した後、乳汁中の放射能をLSCで測定することで評価される。未変化体及び合成標品のある主代謝物については、非標識体投与後のサンプルをLC/MS等で分析して、排泄率を算出

することもできる。

DDIについては、併用薬の薬物動態に与える影響(DDIを与える影響)と、併用薬によって被験薬の薬物動態が受ける影響(DDIを受ける影響)の両面から評価を行う¹⁴⁾。低分子医薬品の薬物動態に影響を与える分子として、シトクロムP450 (P450) やグルクロン酸抱合酵素(UGT)などの薬物代謝酵素群、及び有機アニオントランスポーター(OATP: organic anion transporting polypeptide) やP糖蛋白質(P-gp: P-glycoprotein)などの薬物トランスポーター群が明らかにされており、これらについて*in vitro*の評価を実施してリスクの見積もりを実施する。「DDIを与える影響」としては、リコンビナントの代謝酵素やトランスポーター発現系細胞などを材料として、被験薬が典型基質の代謝や輸送を阻害するかどうか、またその阻害の強さを評価する。また、P450については酵素誘導が起こることも知られているため、被験薬を肝細胞とインキュベーションした後の主要P450分子種のmRNA及び酵素活性を測定して、誘導作用を評価する。「DDIを受ける影響」については、被験薬の薬物動態に対して寄与の大きい代謝酵素やトランスポーターを同定することが必要となる。リコンビナントの代謝酵素やトランスポーター発現系細胞などを材料として*in vitro*試験を実施し、被験薬の代謝及び輸送に関わる酵素及びトランスポーターを、分子種を含めて特定する。

これまで述べてきた吸収、分布、代謝、排泄、DDIの評価は、主に動物を用いた非臨床試験及びヒト試料を含む*in vitro*試験についてであるが、臨床試験においてもサンプル採取が可能な範囲で同様の評価が実施される。すなわち、被験薬(非標識体)投与後のPK評価、放射性標識体投与による代謝物プロファイリングや排泄評価、併用薬投与時のDDIの評価、などである。これにより、動物試験や*in vitro*試験で特徴付けた薬物動態特性を、ヒトにおいて検証することができる。

4. アンチセンス医薬品の薬物動態的特徴と留意点

新しいモダリティである核酸医薬品の薬物動態特性には未だ不明な点が多く、評価法も十分に確立されていないが、特にアンチセンスについては既承認薬が増えており、薬物動態に関する研究成果も蓄積されてきている。続報では、これまでに承認されたアンチセンス医薬品の薬物動態特性及びその評価法についての調査研究結果を報告するが、本稿ではその導入として、これまでに総説等¹⁵⁻²⁴⁾で報告されているアンチセンスの薬物動態特性について概説したい。2項で述べたように、核酸医薬品には様々な化学修飾核酸が用いられているが、全体としてはオリゴ核酸とい

う共通の構造を有しているため、基本的な動態学的特性は配列によらず類似している。ただし、S化オリゴ核酸(Sオリゴ)とモルフォリノオリゴ核酸(モルフォリノオリゴ)では物性が異なるため、以降では必要に応じて、区別しながら論じる。ここでは、これまでに研究事例の多いSオリゴとモルフォリノオリゴについて、吸収、分布、代謝、排泄、DDIに関する代表的な特徴について紹介する。また、低分子医薬品との違いの観点から、核酸医薬品の動態評価における留意点も合わせて触れたい(Table 3)。

まず、オリゴ核酸の吸収及び血中動態の特徴として、Sオリゴ、モルフォリノオリゴともに分子量や物性の影響で膜透過性が低いこと、経口投与後の吸収性が乏しいことが挙げられる²⁵⁾。低分子医薬品のように経口投与は選択できないが、2項で述べた安定化のための化学修飾を施すことで、静脈内投与及び皮下投与によって全身に曝露させることができる。皮下投与後の吸収は速やかであり、バイオアベイラビリティは高い²⁶⁾。目、中枢神経系など、全身投与では分布しにくい組織をターゲットとする場合には、局所投与も用いられる。このように、オリゴ核酸においては、標的組織に送達するための投与経路選択や化学修飾及びDDSアプローチが重要となる^{27,28)}。吸収された後のオリゴ核酸の血漿中濃度は、組織分布によって速やかに減衰した後、二相性の血中動態プロファイルを示す。組織に移行したオリゴ核酸は組織中で長期間にわたって滞留し、組織

中濃度はゆっくりとした減衰プロファイルを示す。消失相における血漿中濃度と組織中濃度の間には平衡が存在し、血漿中と組織中の濃度はパラレルに減衰することが知られている¹⁶⁾。よって、血漿中濃度は組織中濃度のサロゲートとして重要であり、低濃度で推移する消失相の血漿中濃度を定量するための高感度定量法の開発が鍵となる。核酸医薬品の定量には、低分子医薬品で広く用いられるLC/MS法に加えて、ハイブリダイゼーションやライゲーションを原理とする方法が開発され、活用されている²⁹⁻³⁵⁾。代表的な手法としては、測定対象オリゴ核酸に相補的な配列を含むテンプレート配列を固相化し、測定対象オリゴ核酸をハイブリダイゼーションした後にタグ付きプローブ配列をライゲーションし、酵素標識した抗体を用いて検出するというものである。電気化学発光測定を用いることで、より高感度に検出する改良法なども開発されてきている³⁵⁾。

全身投与後のオリゴ核酸は一般に肝臓、腎臓などの不連続性あるいは有窓性毛細血管のある組織に分布しやすい一方、中枢、眼球、胎盤などタイトな連続性毛細血管のある組織には分布しにくい。オリゴ核酸は膜透過性が乏しいために、受動拡散ではなく貪食あるいは受容体介在性取り込みによって細胞内に入る¹⁵⁻¹⁷⁾。特に、マクロファージなどの貪食細胞に取り込まれやすい性質がある。Sオリゴとモルフォリノオリゴの間で顕著に異なるのは、蛋白結合性である。Sオリゴは、その負電荷を帯びたバックボーンが血

Table 3 アンチセンスの薬物動態的特徴と留意点

評価項目	アンチセンスの薬物動態的特徴		留意点や課題
	S化オリゴ核酸	モルフォリノオリゴ核酸	
吸収 (血中動態)	<ul style="list-style-type: none"> 膜透過性が低く、経口吸収性が乏しい 皮下投与後のバイオアベイラビリティが高い 分布による速やかな血中濃度の減衰の後、二相性の血中動態プロファイルを示す 血漿中濃度と組織中濃度の間には平衡があり、パラレルに減衰する 	<ul style="list-style-type: none"> 肝臓、腎臓などの有窓性毛細血管のある組織に分布しやすい 蛋白結合率が低い スカベンジャー受容体を介した細胞取り込みが報告されている 	<ul style="list-style-type: none"> 標的組織に送達するための投与経路選択や化学修飾及びDDSアプローチが重要となる 血漿中濃度は組織中濃度のサロゲートとして重要であり、消失相における血漿中濃度を定量するための高感度定量法の開発が必要となる
分布	<ul style="list-style-type: none"> 肝臓、腎臓などの有窓性毛細血管のある組織に分布しやすい マクロファージなどの貪食細胞に取り込まれやすい 蛋白結合率が高く、エンドサイトーシスによる細胞取り込みが促進される 組織中薬物濃度の半減期が長い 	<ul style="list-style-type: none"> 肝臓、腎臓などの有窓性毛細血管のある組織に分布しやすい 蛋白結合率が低い スカベンジャー受容体を介した細胞取り込みが報告されている 	<ul style="list-style-type: none"> 細胞レベルでの取り込みや細胞内輸送のメカニズムには不明な点が多い マクロファージへの取り込みやリソソーム内腔への蓄積などがあるため、組織全体の濃度が薬効の指標とならない可能性がある 低分子と比較して、放射性標識体合成の難易度が高い
代謝	<ul style="list-style-type: none"> 全身に存在するヌクレアーゼによって加水分解を受ける ヌクレアーゼ代謝の受けやすさや代謝部位は化学修飾に依存する 	<ul style="list-style-type: none"> 極めて代謝安定である 	<ul style="list-style-type: none"> <i>in vitro</i> 代謝試験の材料や方法が十分に確立されていない 末端の短鎖化による代謝物は活性を有する傾向がある
排泄	<ul style="list-style-type: none"> 未変化体及び短鎖化代謝物として尿中にゆっくりと排泄される 	<ul style="list-style-type: none"> 未変化体として尿中に速やかに排泄される 	<ul style="list-style-type: none"> PS修飾核酸は排泄が長期間にわたるため、排泄が完了するまでの評価は困難である
薬物相互作用	<ul style="list-style-type: none"> P450、薬物トランスポーターに対する阻害能や基質性は低い 		<ul style="list-style-type: none"> 代謝や分布のメカニズムが低分子とは異なるため、低分子のDDI評価のスキームが妥当でない可能性がある

漿蛋白質の親水性部位と相互作用し、概して血漿蛋白結合率が高い^{16,36,37}。リボース 2' 位の修飾構造が蛋白結合性に影響を及ぼし、糖部に OMe, F, LNA の修飾を導入した化合物では、特に高い結合率を示す³⁷。一方で、電荷的に中性タイプのモルフォリノオリゴは、血漿蛋白結合率が低い傾向がある^{21,22}。蛋白結合性は細胞への取り込みや糸球体ろ過に関与する因子であり、Sオリゴの組織からの消失や尿中排泄がモルフォリノオリゴと比較してゆっくりであることは、蛋白結合性の違いから説明することができ¹⁵⁻¹⁷。オリゴ核酸の分布評価の課題は、細胞レベルでの取り込みや細胞内輸送のメカニズムが複雑で十分に解明されていない点にある。マクロファージへの取り込みやリソソーム内腔への蓄積などがあるため、組織全体の濃度が薬効の指標とならない可能性がある。よって、低分子医薬品で実施される従来の分布評価に加えて、蛍光イメージングや免疫染色などのより微視的なアプローチが有用と考えられる³⁸。また、低分子医薬品と比較して、放射性標識体合成の難易度が高いため、オートラジオグラフィーの実施に時間とコストがかかる。

Sオリゴは、血漿や組織に普遍的に存在するエンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによって加水分解を受ける。ヌクレアーゼ代謝の受けやすさや代謝部位は糖部の化学修飾に依存する。両端に糖部修飾が施された gapmer では、中央のギャップ部分がはじめにエンドヌクレアーゼで切断され、その後エキソヌクレアーゼで短鎖化される場合が多い^{16,39}。配列全体にわたり糖部修飾された SSO タイプでは、末端からのエキソヌクレアーゼ代謝が進行する²²。一方で、モルフォリノオリゴは極めて安定であることが知られている²¹。オリゴ核酸の代謝は、肝臓の P450 や抱合酵素で代謝される低分子医薬品とは全く異なるプロセスであるため、*in vitro* 代謝試験の材料や方法論が十分に確立されていないのが現状である。低分子医薬品同様に、放射性標識体を用いた代謝物プロファイリングも実施されるが、短鎖化の過程で標識が外れる可能性を想定した標識位置のデザイン及びデータの解析が必要である。また、末端からの短鎖代謝物は薬理活性を有する可能性があるため、留意が必要である。

Sオリゴは未変化体及びヌクレアーゼによって短鎖化された代謝物として、モルフォリノオリゴは未変化体として、主に尿中に排泄される^{15,16}。尿中排泄は血漿蛋白結合率に依存するため、上述したように Sオリゴの方がモルフォリノオリゴよりも排泄が緩徐である。そのため、Sオリゴでは、排泄が完了するまで評価するのは困難な場合がある。

オリゴ核酸の DDI については、低分子医薬品に対する評価と同様に、併用薬の薬物動態に与える影響と、併用薬によって被験薬の薬物動態が受ける影響の両面から評価が

行われている。オリゴ核酸の薬物代謝酵素及び薬物トランスポーターに対する阻害能、誘導能はなく(あるいは弱く)、これら酵素やトランスポーターの基質とならない⁴⁰⁻⁴³。臨床での DDI 試験の事例も含め、オリゴ核酸の DDI リスクは報告されていない。オリゴ核酸の代謝や分布のメカニズムは低分子医薬品とは異なるため、低分子医薬品の DDI 評価スキームを当てはめることの妥当性については議論が必要と考えられる。

5. 終わりに

核酸医薬品の薬物動態特性は、低分子医薬品における薬物動態の考え方、試験方法に準じて評価されているのが現状である。しかしながら、これまで述べてきたように、核酸医薬品の動態を特徴付ける因子、特に分布・代謝のメカニズム及び関与する分子が、低分子医薬品とは異なることが分かってきている。これを踏まえ、核酸医薬品に最適化された薬物動態及び DDI に関する試験系、データの解釈、及び予測法などが確立されることが望まれる。核酸医薬品の薬物動態は、用いられる化学修飾や DDS アプローチによって影響を受けるため、修飾構造ごとに薬物動態特性を整理することが重要である。

本稿の続報として、本誌 3 月号に既承認アンチセンス医薬品の薬物動態特性に関する調査研究の詳細を報告するとともに、課題や展望について議論を深めたい。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 井上貴雄：核酸医薬 - オリゴ核酸による多彩な生体制御 - (なぜ、いま核酸医薬なのか - 次なる創薬モダリティの本命 - 企画：井上貴雄)。実験医学。2019, 150, p.2-7.
- 2) 木下潔, 真木一茂, 荒戸照世, 太田哲也, 小野寺博志, 佐藤秀昭, 中澤隆弘, 平林容子, 笛木修, 三井田宏明, 吉田徳幸, 渡部一人, 小比賀聡, 井上貴雄。核酸医薬品の安全性評価に関する考え方 - 仮想核酸医薬品をモデルにして - 第 1 回: オンターゲット毒性の評価。医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス。2018, 49 (2), p.105-111.
- 3) 木下潔, 真木一茂, 荒戸照世, 太田哲也, 小野寺博志, 佐藤秀昭, 中澤隆弘, 平林容子, 笛木修, 三井田宏明, 吉田徳幸, 渡部一人, 小比賀聡, 井上貴雄。核酸医薬品の安全性評価に関する考え方 - 仮想核酸医薬品をモデルにして - 第 2 回: 局所投与剤の毒性評価。医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス。2018, 49 (3), p.157-163.
- 4) 木下潔, 真木一茂, 荒戸照世, 太田哲也, 小野寺博志, 佐藤秀昭, 中澤隆弘, 平林容子, 笛木修, 三井田宏明, 吉田徳幸, 渡部一人, 小比賀聡, 井上貴雄。核酸医薬品の安全性評価に関する考え方 - 仮想核酸医薬品をモデルにして - 第 3 回: 既存情報の有効活用。医薬品医療機器レギュラト

- リーサイエンス. 2018, 49 (4), p.207-214.
- 5) 関口光明, 伊藤浩介, 齊藤隼, 滝口直美, 製薬協核酸医薬品質評価タスクフォース, 吉田徳幸, 小比賀聡, 井上貴雄. 核酸医薬品に含まれる不純物の管理に対する考え方. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2020, 51 (1), p.11-21.
 - 6) 木下潔, 中澤隆弘, 荒戸照世, 三井田宏明, 平林容子, 真木一茂, 吉田徳幸, 井上貴雄. 既承認核酸医薬品の審査報告書を読み解く. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2020, 51 (2), p.70-82.
 - 7) 滝口直美, 伊藤浩介, 小林夏季, 溝口潤一, 製薬協核酸医薬品質評価タスクフォース, 南海浩一, 廣瀬賢治, 笛木修, 佐藤秀昭, 吉田徳幸, 小比賀聡, 井上貴雄. 核酸医薬品の品質評価に関する考え方 - 仮想核酸医薬品をモデルにして -. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2020, 51 (3), p.145-153.
 - 8) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長. 核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドラインについて. 薬生薬審発 0330 第1号, 令和2年3月30日.
 - 9) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長. 核酸医薬品の品質の担保と評価において考慮すべき事項について. 薬生薬審発 0927 第3号, 平成30年9月27日.
 - 10) 井上貴雄. 核酸医薬品の開発動向と規制整備の現状, PHARM TECH JAPAN. 2019, 35, p.2533-2545.
 - 11) 小比賀聡, 笠原勇矢. アンチセンス核酸医薬のデザイン戦略. 日薬理誌. 2016, 148, p.100-104.
 - 12) 厚生労働省医薬安全局審査管理課長. 非臨床薬物動態試験ガイドラインについて. 医薬審第496号, 平成10年6月26日. <https://www.pmda.go.jp/files/000206161.pdf>.
 - 13) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長. 「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. 薬食審査発 0219 第4号, 平成22年2月19日. <https://www.pmda.go.jp/files/000156948.pdf>.
 - 14) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長. 「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」について. 薬生薬審発 0723 第4号, 平成30年7月23日. <https://www.pmda.go.jp/files/000225191.pdf>.
 - 15) Andersson, P.; den Besten, C. Preclinical and Clinical Drug-metabolism, Pharmacokinetics and Safety of Therapeutic Oligonucleotides, *Adv Nucleic Acid Ther.* 2019, Chapter 20,
 - 16) Geary, R. S. Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009, 5, p.381-391.
 - 17) Geary, R. S.; Norris, D.; Yu, R.; Bennett, C. F. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015, 87, p.46-51.
 - 18) Dirin, M.; Winkler, J. Influence of diverse chemical modifications on the ADME characteristics and toxicology of antisense oligonucleotides. *Expert Opin Biol Ther.* 2013, 13, p.875-888.
 - 19) Bosgra, S.; Sipkens, J.; de Kimpe, S.; den Besten, C.; Datson, N.; van Deutekom, J. The Pharmacokinetics of 2'-O-Methyl Phosphorothioate Antisense Oligonucleotides: Experiences from Developing Exon Skipping Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *Nucleic Acid Ther.* 2019, 29, p.305-322.
 - 20) Crooke, S. T.; Wang, S.; Vickers, T. A.; Shen, W.; & Liang, XH. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* 2017, 35, p.230-237.
 - 21) Amantana, A.; Iversen, P. L. Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. *Curr Opin Pharmacol.* 2005, 5, p.550-555.
 - 22) Dirin, M.; Winkler, J. Influence of diverse chemical modifications on the ADME characteristics and toxicology of antisense oligonucleotides. *Expert Opin Biol Ther.* 2013, 13, p.875-888.
 - 23) Yu, R. Z.; Grundy, J. S.; Geary, R. S. Clinical pharmacokinetics of second generation antisense oligonucleotides. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013, 9, p.169-182.
 - 24) Andersson, S.; Antonsson, M.; Elebring, M.; Jansson-Löfmark, R.; Weidolf, L. Drug metabolism and pharmacokinetic strategies for oligonucleotide- and mRNA-based drug development. *Drug Discov Today.* 2018, 23, p.1733-1745.
 - 25) Tillman, L. G.; Geary, R. S.; Hardee, G. E. Oral delivery of antisense oligonucleotides in man. *J Pharm Sci.* 2008, 97, p.225-236.
 - 26) Yu, R. Z.; Kim, T. W.; Hong, A.; Watanabe, T. A.; Gaus, H. J.; Geary, R. S. Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100. *Drug Metab Dispos.* 2007, 35, p.460-468.
 - 27) Juliano, R. L. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44, p.6518-6548.
 - 28) Dowdy, S. F. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. *Nat Biotechnol.* 2017, 35, p.222-229.
 - 29) Yu, R. Z.; Baker, B.; Chappell, A.; Geary, R. S.; Cheung, E.; Levin, A. A. Development of an ultrasensitive noncompetitive hybridization-ligation enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of phosphorothioate oligodeoxynucleotide in plasma. *Anal. Biochem.* 2002, 304, p.19-25.
 - 30) Wei, X.; Dai, G.; Marcucci, G.; Liu, Z.; Hoyt, D.; Blum, W.; Chan, K. K. A specific picomolar hybridization-based ELISA assay for the determination of phosphorothioate oligonucleotides in plasma and cellular matrices. *Pharm. Res.* 2006, 23, p.1251-1264.
 - 31) Burki, U.; Keane, J.; Blain, A.; O'Donovan, L.; Gait, M. J.; Laval, S. H.; Straub, V. Development and Application of an Ultrasensitive Hybridization-Based ELISA Method for the Determination of Peptide-Conjugated Phosphorodiamidate Morpholino Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2015, 25, p.275-284.
 - 32) Norris, D. A.; Post, N.; Yu, R. Z.; Greenlee, S.; Wang, Y. Bioanalysis considerations on the pharmacokinetic evaluation of antisense therapeutics. *Bioanalysis.* 2019, 11, p.1909-1912.
 - 33) Sips, L.; Ediage, E. N.; Ingelse, B.; Verhaeghe, T.; Dillen, L. LC-MS quantification of oligonucleotides in biological matrices with SPE or hybridization extraction. *Bioanalysis.* 2019, 11, p.1941-1954.
 - 34) Li, P.; Gong, Y.; Kim, J.; Liu, X.; Gilbert, J.; Kerns, H. M.; Groth, R.; Rooney, M. Hybridization Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: An Alternative Bioanalytical Method for Antisense Oligonucleotide Quantitation in Plasma and Tissue Samples. *Anal. Chem.* 2020, 92, p.10548-10559.

- 35) Thayer, M. B.; Lade, J. M.; Doherty, D.; Xie, F.; Basiri, B.; Barnaby, O. S.; Bala, N. S.; Rock, B. M. Application of Locked Nucleic Acid Oligonucleotides for siRNA Preclinical Bioanalytics. *Sci. Rep.* 2019, **9**, p.3566.
- 36) Watanabe, T. A.; Geary, R. S.; Levin, A. A. Plasma protein binding of an antisense oligonucleotide targeting human ICAM-1 (ISIS 2302). *Oligonucleotides*. 2006, **16**, p.169-180.
- 37) Crooke, S. T.; Vickers, T. A.; Liang, X. H. Phosphorothioate modified oligonucleotide-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 2020, **48**, p.5235-5253.
- 38) González-Barriga, A.; Nillessen, B.; Kranzen, J.; van Kessel, I. D. G.; Croes, H. J. E.; Aguilera, B.; de Visser, P. C.; Datson, N. A.; Mulders, S. A. M.; van Deutekom, J. C. T.; Wieringa, B.; Wansink, D. G. Intracellular Distribution and Nuclear Activity of Antisense Oligonucleotides After Unassisted Uptake in Myoblasts and Differentiated Myotubes In Vitro. *Nucleic Acid Ther.* 2017, **27**, p.144-158.
- 39) Baek, M. S.; Yu, R. Z.; Gaus, H.; Grundy, J. S.; Geary, R. S. In vitro metabolic stabilities and metabolism of 2'-O-(methoxyethyl) partially modified phosphorothioate antisense oligonucleotides in preincubated rat or human whole liver homogenates. *Oligonucleotides*. 2010, **20**, p.309-316.
- 40) Geary, R. S.; Bradley, J. D.; Watanabe, T.; Kwon, Y.; Wedel, M.; van Lier, J. J.; VanVliet, A. A. Lack of pharmacokinetic interaction for ISIS 113715, a 2'-O-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting protein tyrosine phosphatase 1B messenger RNA, with oral antidiabetic compounds metformin, glipizide or rosiglitazone. *Clin Pharmacokinet.* 2006, **45**, p.789-801.
- 41) Yu, R. Z.; Warren, M. S.; Watanabe, T.; Nichols, B.; Jahic, M.; Huang, J.; Burkey, J.; Geary, R. S.; Henry, S. P.; Wang, Y. Lack of Interactions Between an Antisense Oligonucleotide with 2'-O-(2-Methoxyethyl) Modifications and Major Drug Transporters. *Nucleic Acid Ther.* 2016, **26**, p.111-117.
- 42) Shemesh, C. S.; Yu, R. Z.; Warren, M. S.; Liu, M.; Jahic, M.; Nichols, B.; Post, N.; Lin, S.; Norris, D. A.; Hurh, E.; Huang, J.; Watanabe, T.; Henry, S. P.; Wang, Y. Assessment of the Drug Interaction Potential of Unconjugated and GalNAc3-Conjugated 2'-MOE-ASOs. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017, **9**, p.34-47.
- 43) Li, Z.; Hard, M. L.; Grundy, J. S.; Singh, T.; von Moltke, L. L.; Boltje, I. Lack of clinical pharmacodynamic and pharmacokinetic drug-drug interactions between warfarin and the antisense oligonucleotide mipomersen. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014, **64**, p.164-171.