

Strategy to select fit-for-purpose Bioanalytical methods for successful measurement of Translational Biomarkers

ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

Translational Research Laboratories

Motohiko Morihara, Ph.D

- ① バイオマーカーのバイオアナリシス
- ② プロスタノイド代謝物のバイオマーカー評価
- ③ 尿中バイオマーカー評価の課題

シーズ探索

リード探索

最適化

前臨床

臨床

テーマ創出

トランスレーショナルリサーチ

標的探索

標的検証

有効性モデル評価

機能解明

バイオマーカー候補

臨床バイオマーカー

- ✓ ヒトPD
- ✓ MoA解析
- ✓ 患者層別化

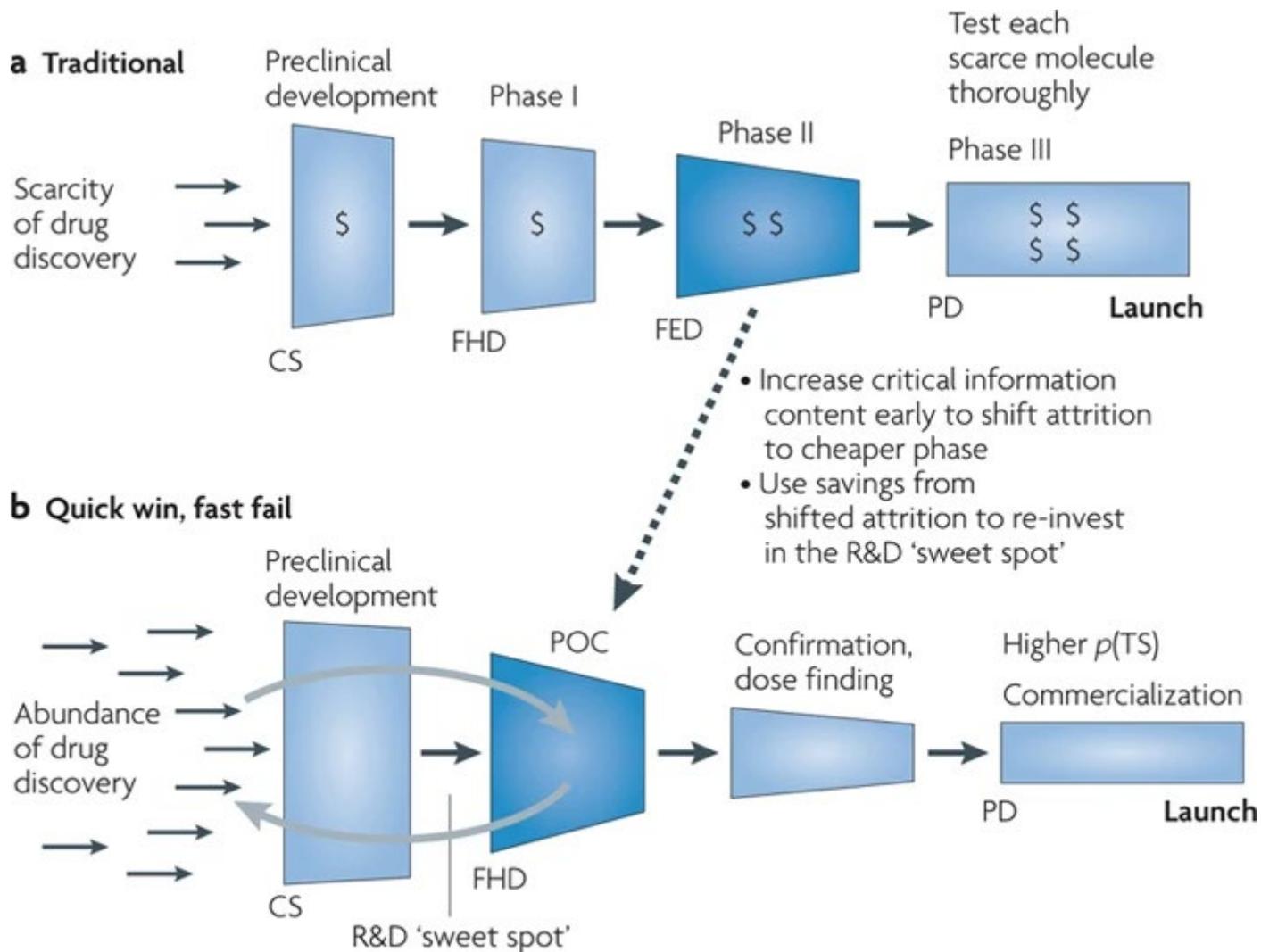
新規テーマ創出

試験デザイン最適化
(非臨床・臨床)

リバーストランスレーション
(疾患メカニズム解析, 新規ターゲット探索)



創薬プロセス改善にバイオマーカーは大事（10年前の論文）



Nature Reviews | Drug Discovery

臨床バイオマーカーの評価目的

- ✓ 基礎での薬理作用をヒト臨床で確認（PDマーカー）
- ✓ ヒト MoA（機序解明）を追求
- ✓ 患者層別化マーカーの探索

susceptibility/risk biomarker
diagnostic biomarker
monitoring biomarker
prognostic biomarker
predictive biomarker
response biomarker
safety biomarker

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK338448/#top>



バイオアナリシス研究者の悩み

- ✓ ヒトバイオマーカー変動はFIH（First in Human）試験以前は未知数探索段階で、網羅的分析とターゲット分析法のどちらを選択するかどこまで高感度化すべきか、どこまでバリデーションするか
- ✓ 治験施設での検体採取や輸送等の制限も考慮しないといけない
- ✓ 検体測定データを得た後に、期待していた変動が検出できなかったり、定量下限以下の検体が多く、分析法が悪いと責められる。。。



- ① バイオマーカーのバイオアナリシス
- ② プロスタノイド代謝物のバイオマーカー評価
- ③ 尿中バイオマーカー評価の課題

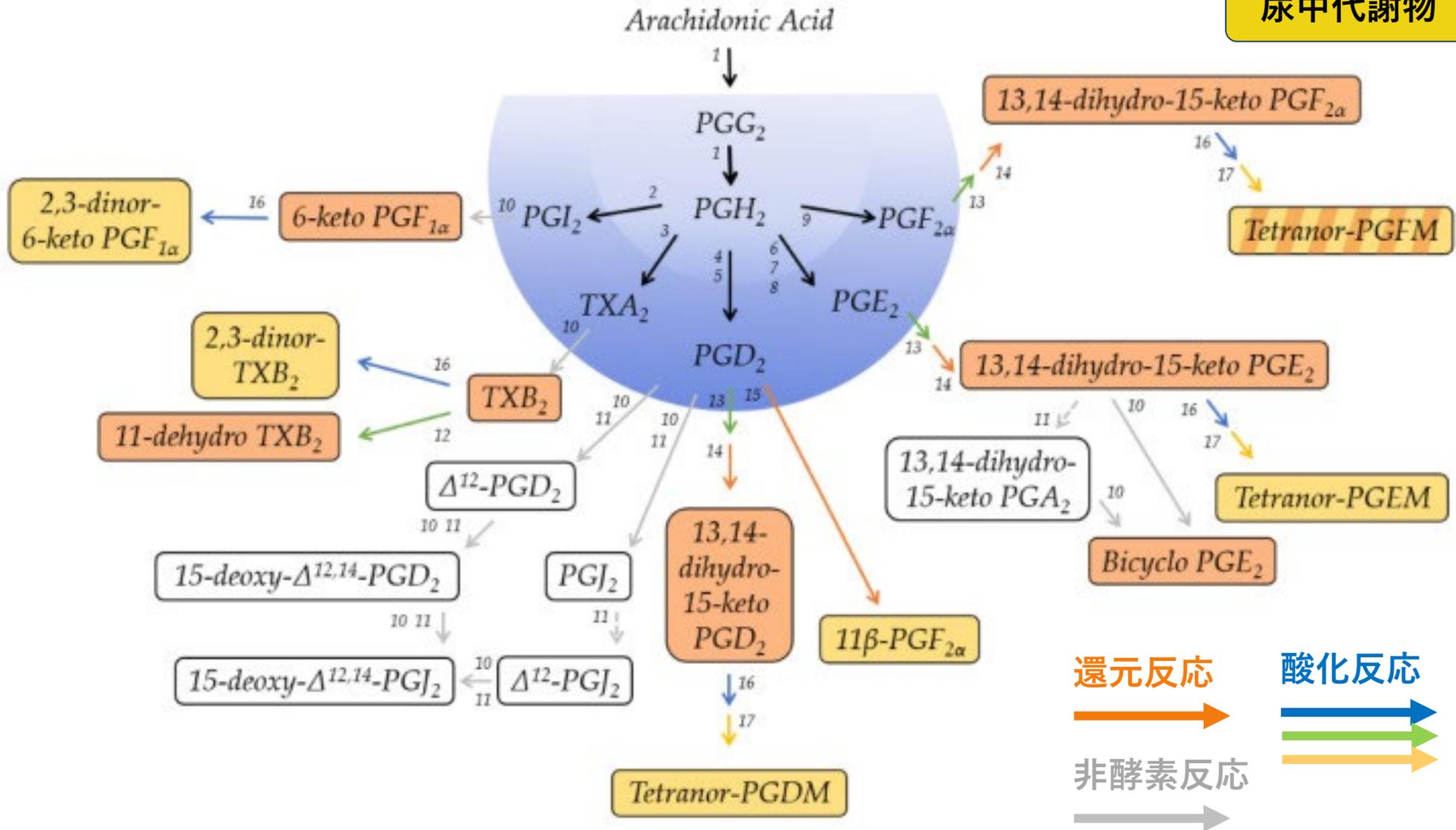
②プロスタノイド代謝物のバイオマーカー評価

- ✓ プロスタノイドとは、アラキドン酸由来の脂質（PGD₂、PGE₂、PGI₂、PGF_{2α}、TXA₂、PGH₂）と代謝物含む関連物質であり、生理活性脂質メディエーター（シグナル伝達物質）である
- ✓ 血圧、睡眠調節、分娩、発熱誘発、疼痛、炎症反応、悪性腫瘍など多くの生理学的・病態生理学的プロセスに関与
- ✓ シグナル伝達が複雑なため、健常・疾患状態にどのように関与しているかの完全理解には至っていない。合成・代謝酵素・受容体の局在、非酵素（分解）反応も混在していることも複雑さの要因

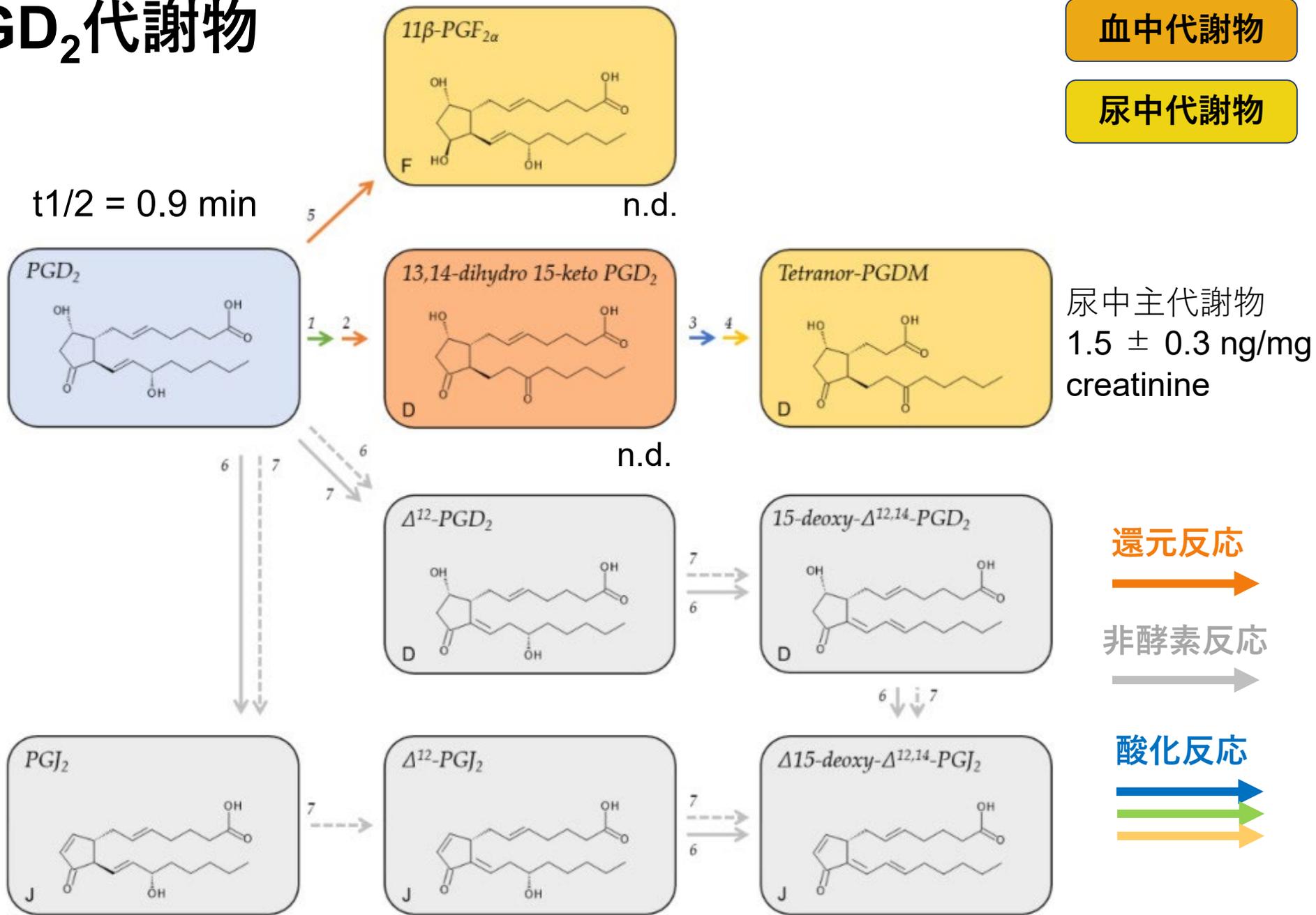
プロスタノイド（アラキドン酸由来）代謝物

血中代謝物

尿中代謝物

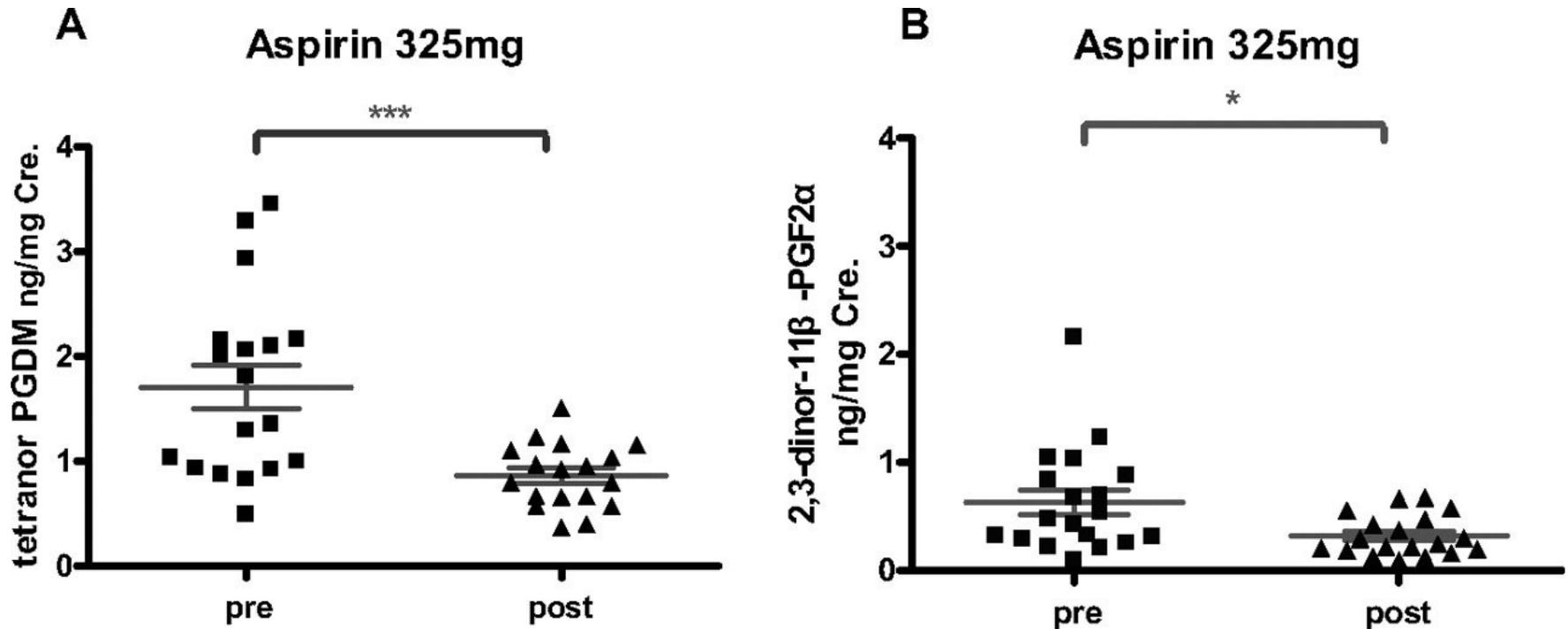


PGD₂代謝物



Idborg H et al., *Metabolites* 2022

アスピリン（COX阻害剤）投与時ヒト尿中PGD₂・PGI₂代謝物量



COX-1/2非選択阻害により、ヒト尿中tetranor PGDM（PGD₂代謝物）及び
2,3-dinor-11β-PGF 2α（PGI₂代謝物）量が減少

TAS-205 (HPGDS*阻害剤) 投与時ヒト尿中PGD₂・PGE₂代謝物量

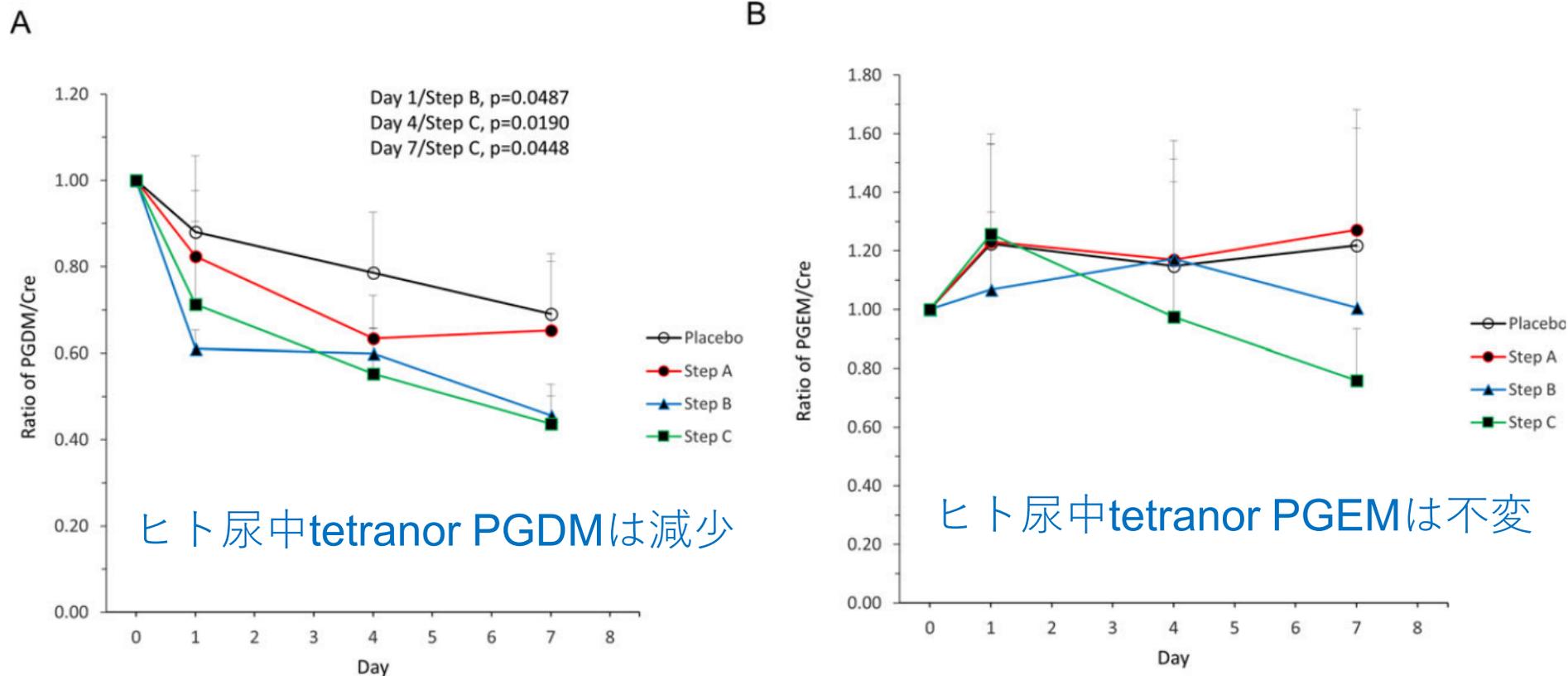


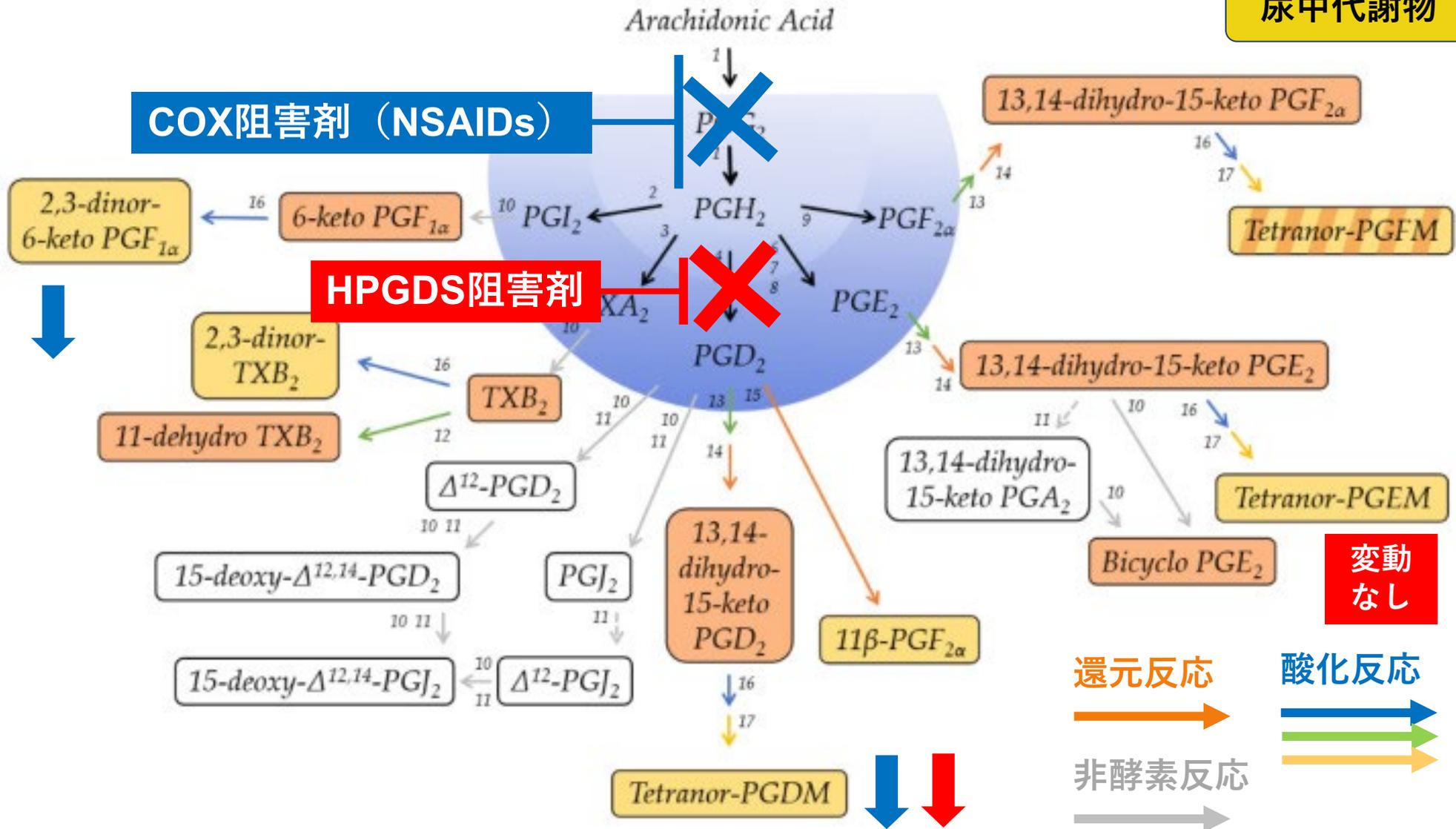
Figure 6. Time-dependent changes in the ratio of (A) tetranor-PGDM/Cre and (B) tetranor-PGEM/Cre in pooled urine in the repeated-dose period. Mean + standard deviation ($n = 3-5$). Day 0 = pre-dose. PGDM, prostaglandin D metabolite; Cre, creatinine; PGEM, prostaglandin E metabolite.

*造血器型PGD合成酵素

プロスタノイド（アラキドン酸由来）代謝物

血中代謝物

尿中代謝物



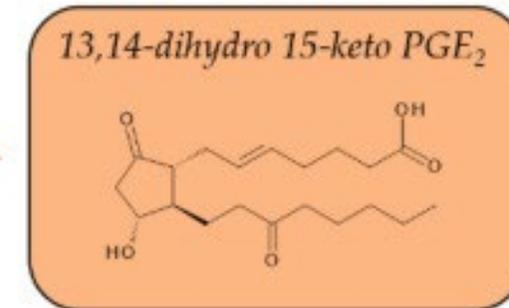
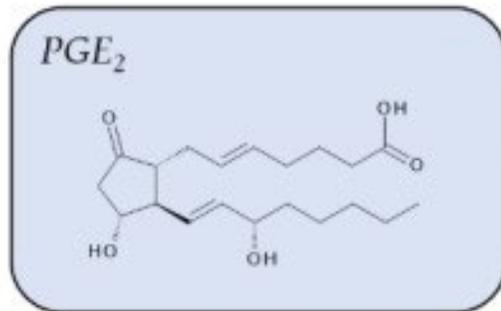
PGE₂代謝物

血中代謝物

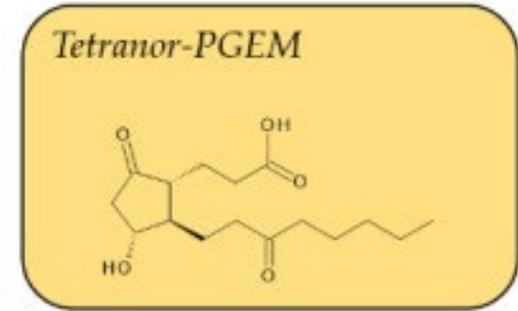
尿中代謝物

尿中主代謝物
7–40 µg/day (24時間畜尿)

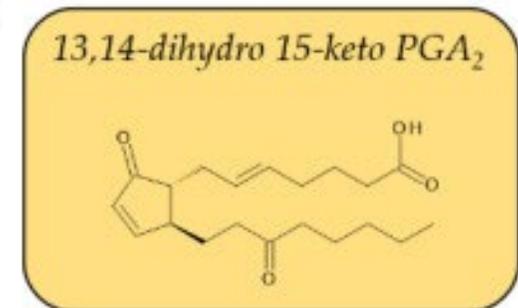
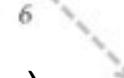
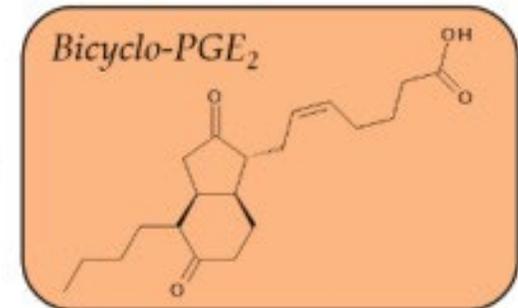
血漿中 3–12 pg/mL
t_{1/2} < 1min



血漿中 10–100 pg/mL
t_{1/2} = 9 min (イヌ *in vivo*)
t_{1/2} = 7 h (タンパクフリー)
t_{1/2} = 3 h (希釈血漿)

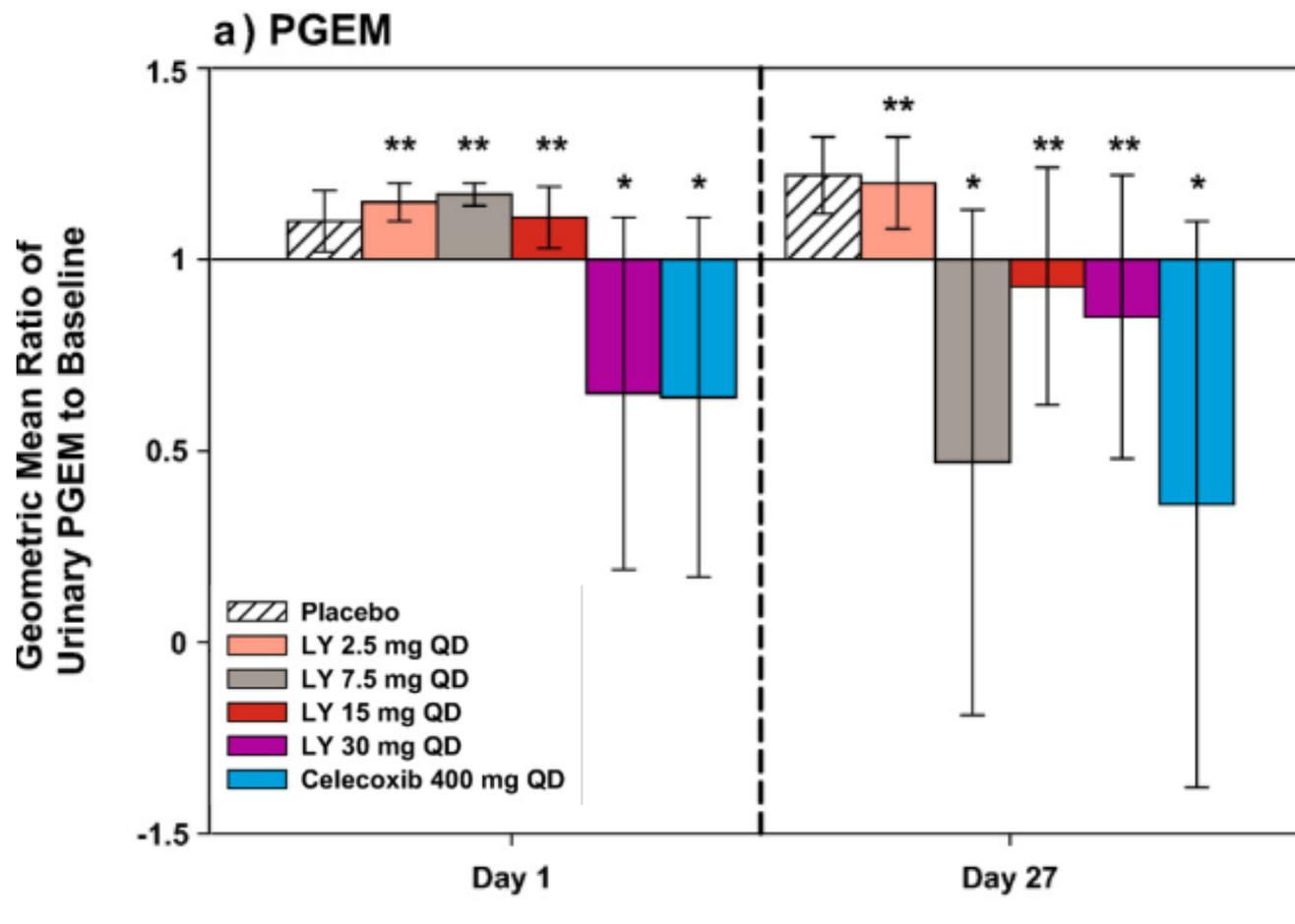


血漿中 20–25 pg/mL (非酵素的)



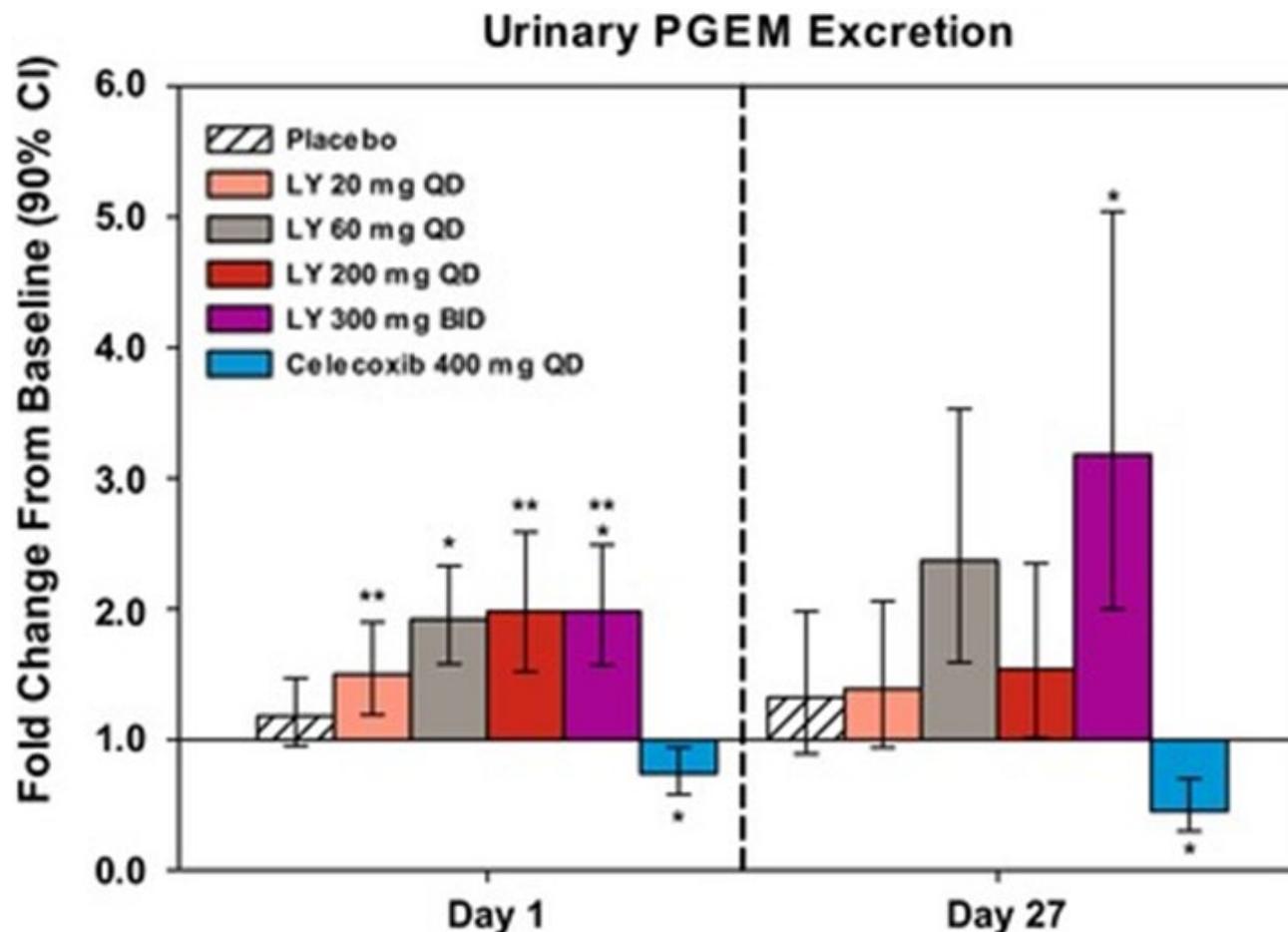
n.d.

LY3023703 (mPGES1*阻害剤) 又はCelecoxib (COX2選択的阻害剤) 投薬時ヒト尿中PGE₂代謝物量



mPGES1又はCOX2阻害により、PGE₂合成が減少し、尿中tetranor PGEM量は減少

LY3127760 (EP4受容体選択的阻害剤) 又はCelecoxib (COX2選択的阻害剤) 投薬時ヒト尿中PGE₂代謝物量

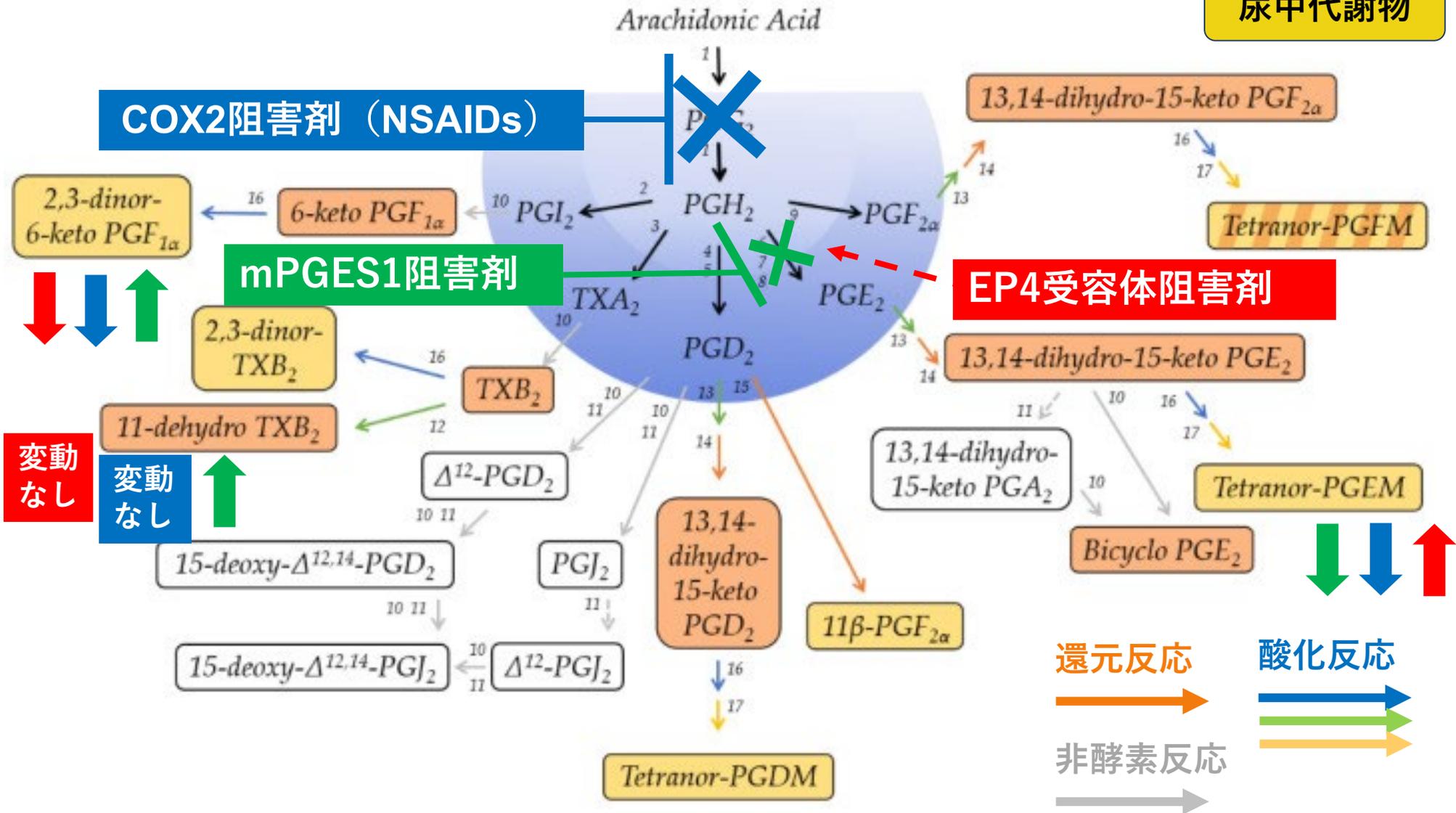


EP4受容体阻害によりPGE₂合成が促進し、尿中tetranor PGEM量は増加
COX2阻害によりPGE₂合成が減少し、尿中tetranor PGEM量は減少

プロスタノイド（アラキドン酸由来）代謝物

血中代謝物

尿中代謝物

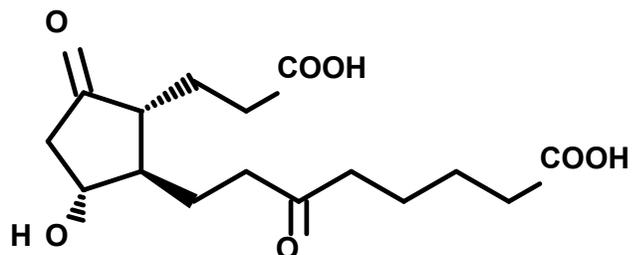


Idborg H et al., *Metabolites*. 2022

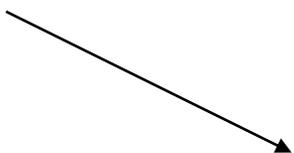
Jin Y et al, *Clin Pharmacol Ther* 2016

Jin Y et al, *Clin Transl Sci*. 2018

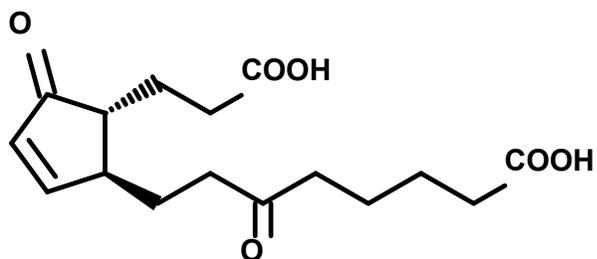
尿中PGE代謝物の新しい分析法（PGE-MUM）



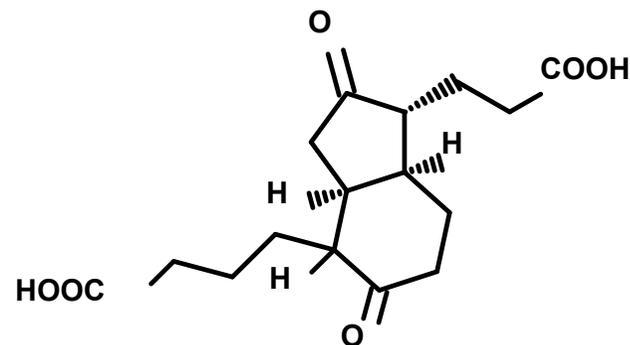
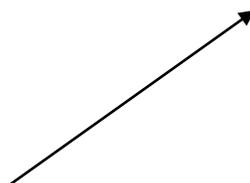
tetranor PGEM



アルカリ処理



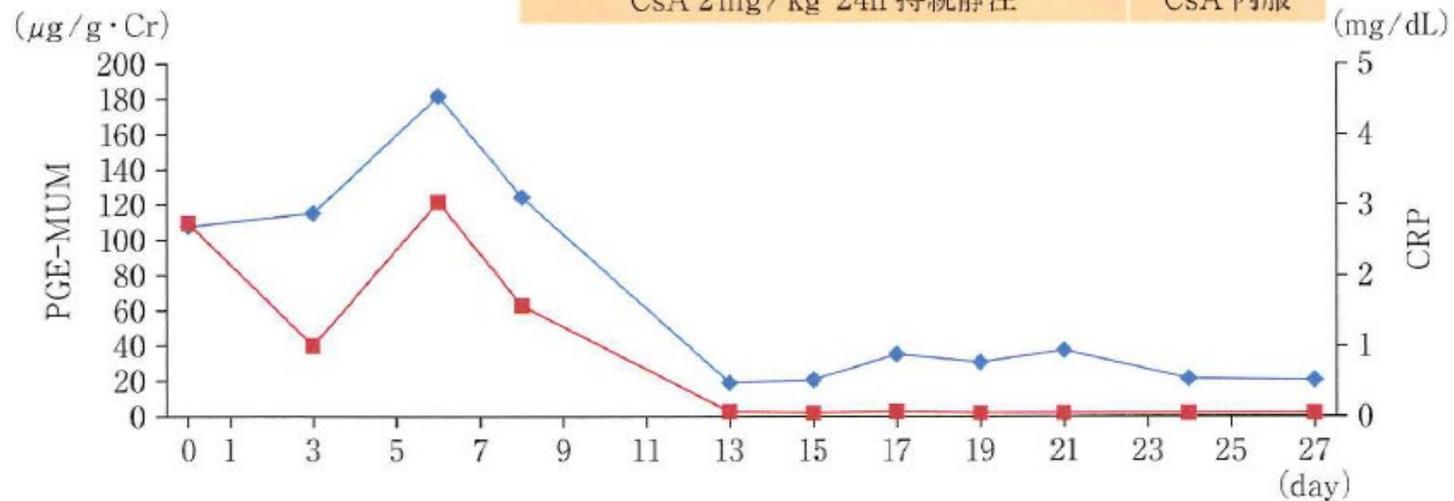
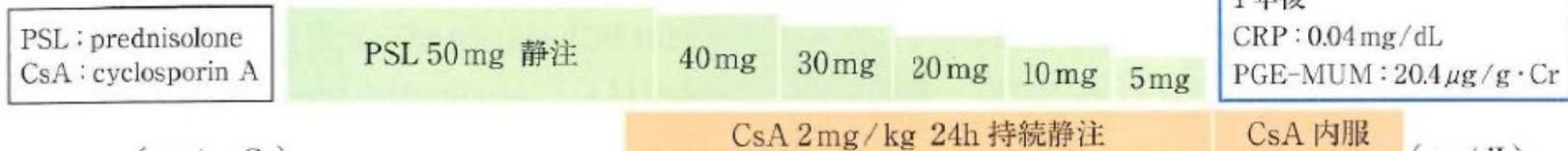
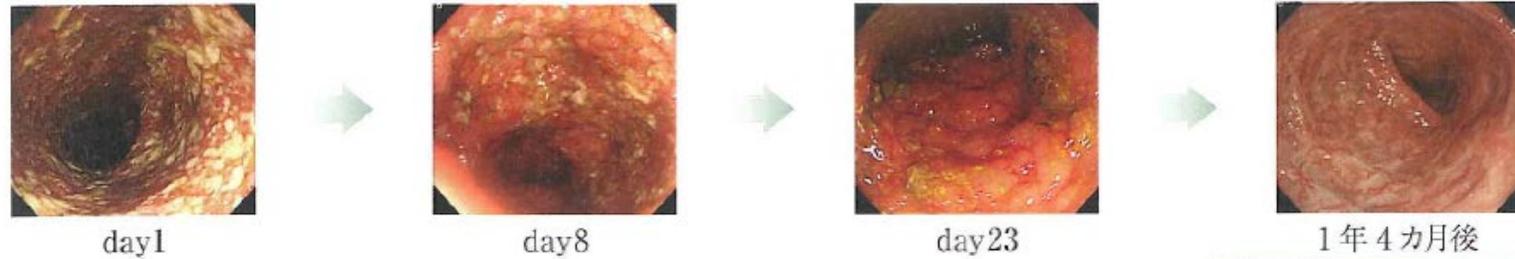
tetranor PGAM



PGE-MUM

CLEIA：化学発光酵素免疫測定法
認定検査試薬：日米欧で登録認証機
関が認定した研究用試薬

PGE-MUM 潰瘍性大腸炎モニタリングに適した迅速尿検査

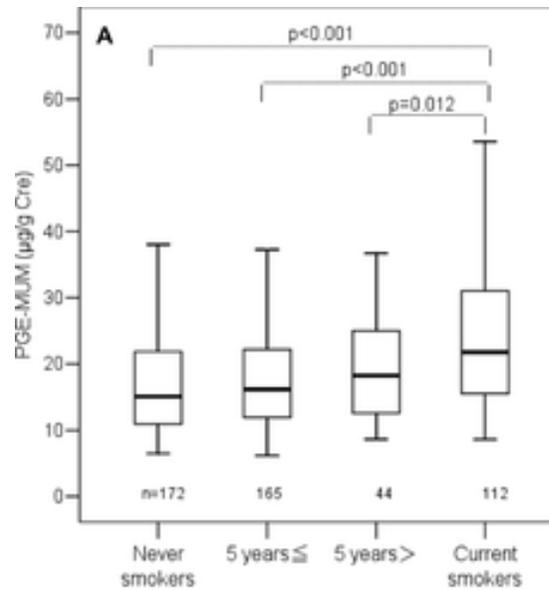


◆ PGE-MUM	107.7	115.2	182.1	124.4	19.4	20.7	35.0	30.6	37.5	21.6	20.4
■ CRP	2.73	0.99	3.04	1.56	0.06	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04

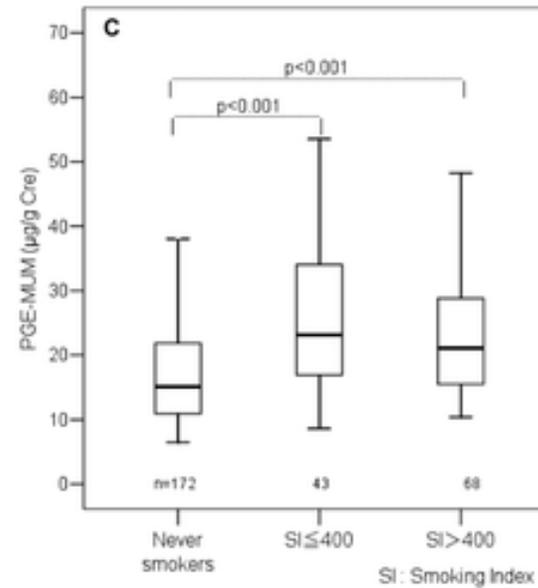
図3 PGE-MUMがUCの経過観察に有用だった症例

PGE-MUMによる喫煙と年齢差の影響評価（健常者対象）

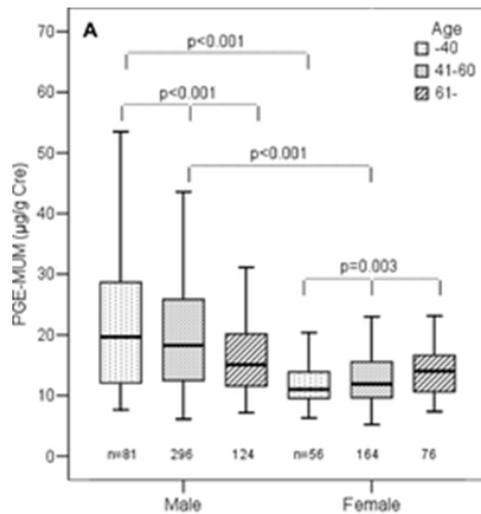
(A) 男性の非喫煙者、元喫煙者、現在の喫煙者



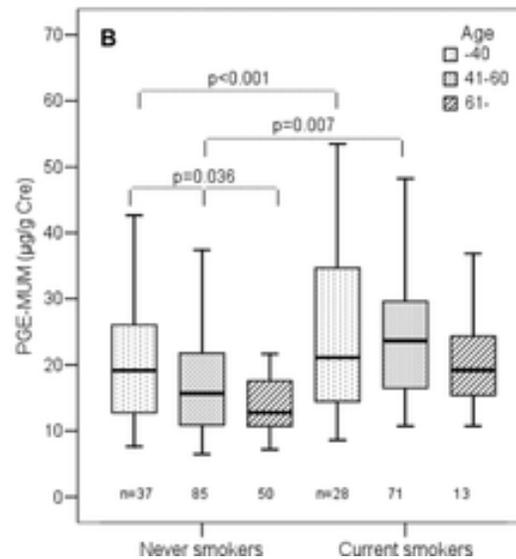
(C) 男性喫煙者における喫煙指数*



男女の年齢別 PGE-MUM の比較



(B) 男性の非喫煙者と喫煙者の年齢差



*SI（喫煙者指数、タバコの本数（1日あたり）×累積喫煙年数）

②プロスタノイド代謝物のバイオマーカー評価

- ✓ 血中PGD₂やPGE₂等は微量で消失も早いいため、量的評価は難しい
尿中代謝物量を評価することで、PGD₂やPGE₂等の全身暴露量を推定可能
- ✓ プロスタノイド代謝物を網羅的に分析することで、有効性メカニズム (MoA) 解明につながるデータが得られる
- ✓ 探索段階では、情報量多く得られる網羅的分析法が有効
LC又はGC-MS/MS分析は、分子量が同じで構造類似の代謝物もクロマト分離により、特異性を高めて正確に定量できる
- ✓ LC-MS/MS分析装置は高額でメンテナンスや操作に技術習得も必要
CLEIA (化学発光酵素免疫測定法) 等の分析法はより多くの施設に実装可能
- ✓ バイオマーカー評価をする上で、被検者背景として、年齢、性別、喫煙歴やNSAIDs (非ステロイド性抗炎症薬) の併用状況も考察に役立つ



- ① バイオマーカーのバイオアナリシス
- ② プロスタノイド代謝物のバイオマーカー評価
- ③ 尿中バイオマーカー評価の課題

③尿中バイオマーカー評価の課題

- ✓ 尿中成分の量的評価には、24時間蓄尿し、濃度を尿量で補正するのがベスト。しかし、通院の場合には、自宅、外出時の採尿又は入院が必要となり受け入れにくい。測定成分の尿中での安定性、尿成分の腐敗などが分析に影響を与えるときは、冷蔵の蓄尿設備も必要
- ✓ スポット採尿の尿中濃度をクレアチニン補正する方法は一般的だが、性差、個体差、疾患や併用薬等の影響により、正確に補正できないことがある。浸透圧法は測定装置保有の有無が制限になる場合あり



③尿中バイオマーカー評価の課題

成人の1日（24時間）のクレアチニン排泄量は約 1gと仮定し、

尿中クレアチニン 1g あたりの目的成分の濃度を求める（クレアチニン補正）

⇒クレアチニン排泄量は筋肉量に比例し、年齢、性別や運動強度等で個体差あり

【尿中クレアチニン量の基準値】 *

男性：1.1～1.9 g/日 女性：0.5～1.6 g/日

【減少する疾患】

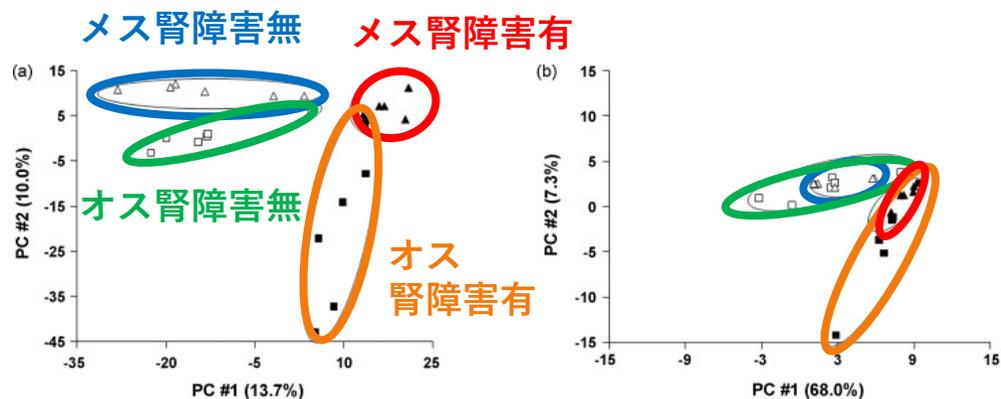
重症筋ジストロフィー症, 長期臥床など

【増加する疾患】

ネフローゼ症候群、急性腎不全など

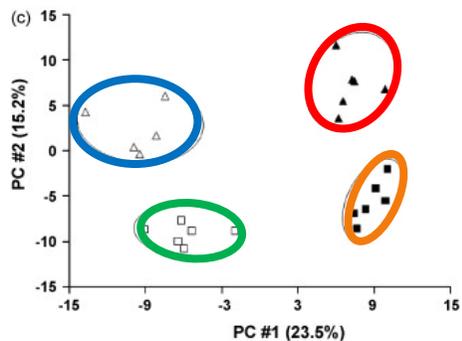
メタボロミクスでラット腎障害（リン脂質症）の尿中BM*量補正比較

A：補正なし



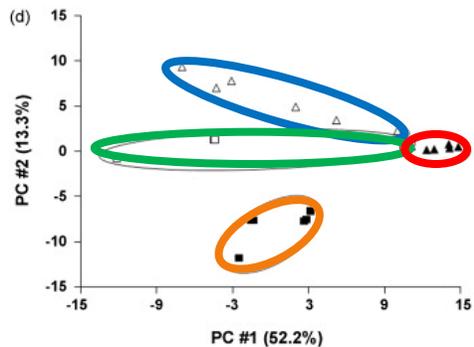
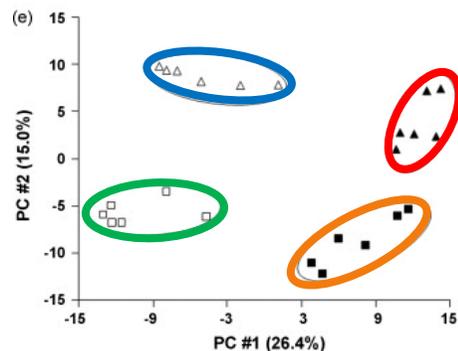
B：尿量補正

C：浸透圧補正

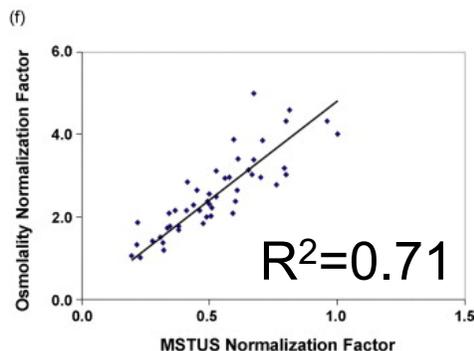


D：クレアチニン補正

E：MS total useful signal** (MSTUS) 補正



F：MSTUSと浸透圧の相関



*PAG：フェニルアセチルグリシン

**1100成分のシグナルの総計

- ① バイオマーカーのバイオアナリシス
- ② プロスタノイド代謝物のバイオマーカー評価
- ③ 尿中バイオマーカー評価の課題

バイオマーカー分析法の分類

定量

Quantitative

Definitive

Relative

Quasi

標品あり

Biomarker levels determined using a reference standard

Reference material is representative of test samples (parallelism)

量を反映

Reference material not available or not representative of test samples (non-parallelism)

標品なし

Biomarker levels expressed in terms of a characteristic of the test sample (e.g. assay signal, titre, % bound)

特性値に変換

定性

Qualitative

Biomarker levels expressed in nominal (positive or negative) or ordinal terms (e.g. 1 to 5 scoring scale)

有り無し



バイオマーカー分析法を選定する4つの要因

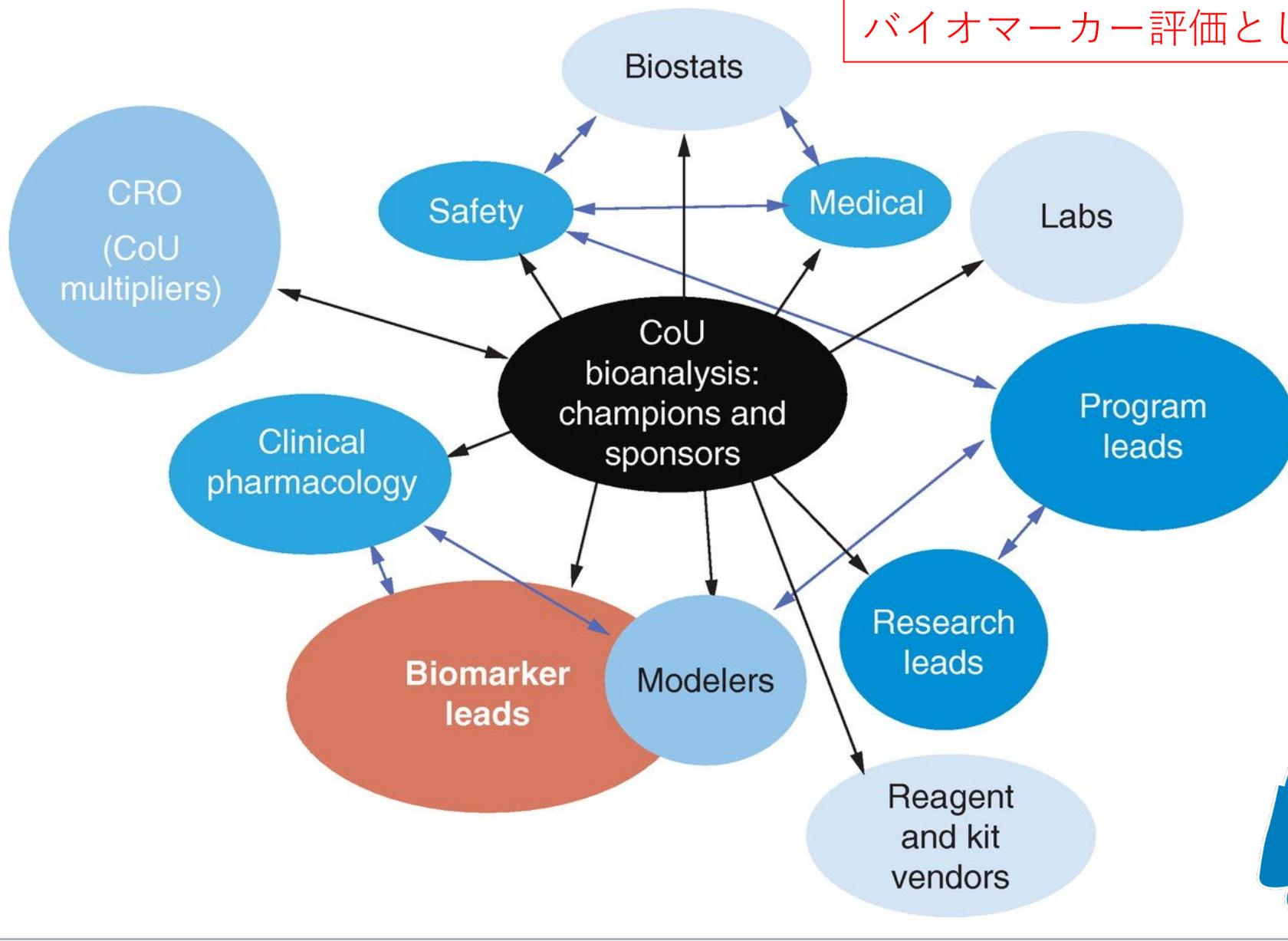
- ✓ 観察又は予測される濃度変化と薬力学的作用（PD）の関係性
Observed or anticipated concentration changes Pharmacodynamic effect (PD)
- ✓ 医薬品開発のステージ別で求められる分析の要件
Drug development phase in which the analysis is requested
- ✓ データに基づく決定
Decisions being taken on the generated data
- ✓ 規制要件との適合性
Possible fit of the assay with the regulatory expectations

評価目的に適した分析法の選択



バイオアナリシス研究者とステークホルダーの関係性

バイオマーカー評価としての判断



Phases of biomarker development studies

探索 Discovery phase

Identify biomarker candidates



実証 Verification phase

Confirm identify and differential expression of candidates

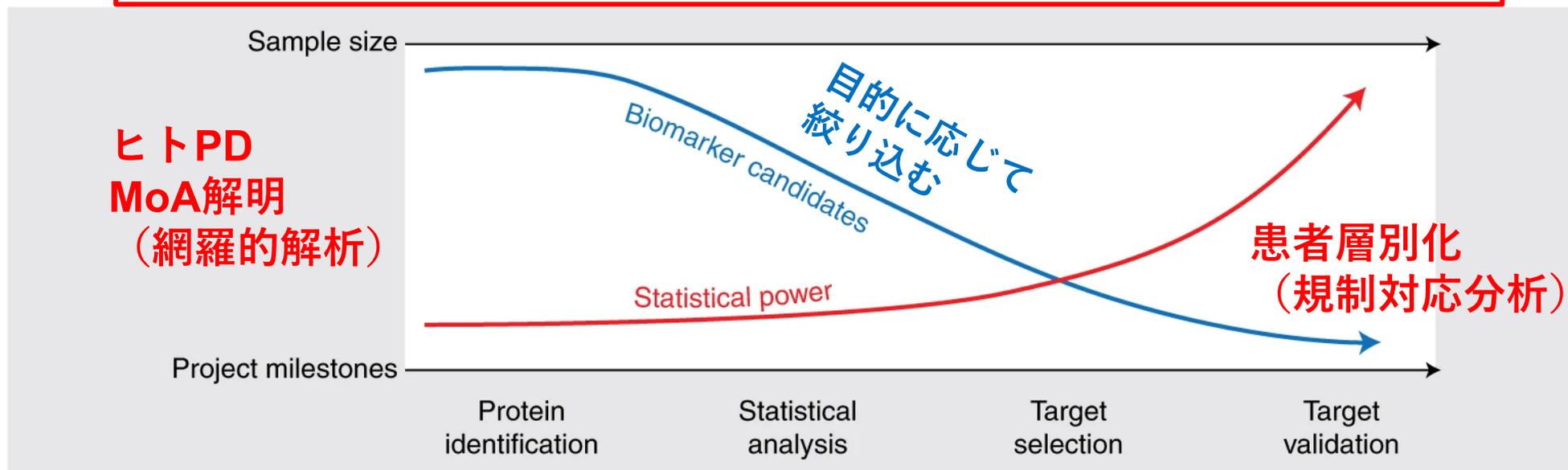


検証 Validation phase

Validate biomarker performance in large cohorts



Fit for purpose = バイオマーカー評価目的に適した分析法



まとめ

Strategy to select fit-for-purpose Bioanalytical methods for successful measurement of Translational Biomarkers

- ✓ 探索段階では、網羅的分析法も活用し、治験検体測定データから多くの情報を得て、ヒトPDマーカ-の可能性検討とMoA解析に活かす
- ✓ 治験施設での対応可能性も考えながら、分析法選択や分析精度（フィージビリティ）試験の計画を練る
- ✓ フィージビリティ試験等の結果から、測定データからわかることの限界を説明できるようにしておく。標品ありのターゲット分析でも精度良く、測れない成分は、バイオマ-評価として採用するのは難しいと割り切る

Topic Base

- ①バイオマ-のバイオアナリシス
- ②プロスタノイド代謝物のバイオマ-可能性
- ③尿中バイオマ-評価の課題





ONO PHARMACEUTICAL CO.,LTD.

Dedicated to the Fight against Disease and Pain