

薬生審査発 0328 第 19 号

平成 28 年 3 月 28 日

各都道府県衛生主管部（局）長殿

厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課長
（公印省略）

「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」について

ナノテクノロジーを製剤技術に応用し、標的部位への医薬品の選択的な送達や生体内安定性の向上などにより、副作用の低減及び有効性の向上を目指した革新的医薬品の開発が世界的規模で進んでおり、その一つとしてリポソーム製剤の開発が進んでいます。

このため、厚生労働省では、リポソーム製剤のより適切な開発を推進し、患者への迅速な提供を図る観点から、①品質及び非臨床評価について配慮すべき事項、②初めてヒトに投与する試験に先だて確認しておくべき事項について、「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」として別添のとおりまとめました。本ガイドラインをリポソーム製剤を開発する際の検討方法の手引きとして利用されるよう、また、個別の医薬品の開発に当たっては、必要に応じて独立行政法人医薬品医療機器総合機構と相談しながら進めるよう、貴管下関係業者等に対し周知方を願います。





リポソーム製剤の開発に関するガイドライン

目次

1. はじめに	3
2. 適用範囲	3
3. 化学、製造及び品質管理	3
3. 1. 組成・性状	4
3. 2. 製剤設計及び特性解析	4
3. 2. 1 製剤開発	4
3. 2. 2 製剤の特性解析	5
3. 2. 3 <i>in vitro</i> 放出試験	6
3. 3. リポソーム製剤の製造工程及び品質管理	7
3. 3. 1 リポソームの形成工程	7
3. 3. 2 リポソームの有効成分の封入工程	8
3. 3. 3 サイズ調整工程	8
3. 3. 4 PEG 等による表面修飾工程	8
3. 3. 5 滅菌工程	8
3. 4. リポソーム構成成分の管理	8
3. 4. 1 品質特性	9
3. 4. 2 製造工程及び工程管理	9
3. 4. 3 規格及び試験方法	9
3. 4. 4 安定性	10
3. 5. リポソーム製剤の管理	10
3. 5. 1 規格及び試験方法	10
3. 5. 2 確認試験	10
3. 5. 3 エンドトキシン試験	10
3. 5. 4 活性試験	10
3. 6. 安定性	11

3. 7. 製法の変更	12
4. 非臨床試験	12
4. 1. 概論	12
4. 2. 非臨床薬物動態	13
4. 2. 1 分析法	13
4. 2. 2 薬物動態	14
4. 3. 非臨床薬力学	15
4. 4. 安全性薬理試験	16
4. 5. 毒性試験	16
4. 5. 1 トキシコキネティクス	17
4. 5. 2 追加の試験	17
5. ヒト初回投与試験において考慮すべき事項	17
6. 用語集	18
付属文書： 関連するガイドライン等	20
補遺 (Appendix) : 製法変更時の同等性/同質性評価	22

1. はじめに

リポソームは、両親媒性脂質分子の二分子膜からなる微小胞で、通常、内部に水性画分を有しており、リポソーム製剤は有効成分をリポソームの脂質二分子膜又は内相に封入することにより作製される。リポソーム製剤は、多くの場合において有効成分の生体内安定性、組織移行性プロファイルをはじめとする薬物動態、細胞内動態などの改善を目的として設計されている。したがって、新規リポソーム製剤の有効かつ安全な用法・用量を確立するためには、組織移行性プロファイルをはじめとする薬物動態を明らかにすることが不可欠である。

リポソーム製剤では、Enhanced permeability and retention (EPR) 効果やリガンド（標的素子）・抗体を利用した能動的なターゲティングにより、有効成分単独で投与した時に比べ、組織・細胞内移行性が変化していることから、血中有効成分濃度が同様であったとしても標的組織・細胞・オルガネラ内有効成分濃度が異なる可能性がある点において、薬物動態試験の解釈に注意が必要である。また、標的組織・細胞内分布は、リポソームの品質特性と関連していることから、リポソームのサイズ、表面電荷など、リポソームの物理的、化学的及び生物学的特性も含めた評価が必要となる。また、多くの場合、リポソームは生体にとって異物と認識されやすいサイズを有する粒子であることから、適切な生体内安定性を有するリポソームの設計と、機能評価が重要になる。

本文書は、リポソーム製剤の開発時に留意すべき事項を明らかにし、承認申請に必要とされる事項の例を挙げることにより、リポソーム製剤の合理的な開発と審査の効率化を図ることを目的としている。

2. 適用範囲

本文書は、有効成分の生体内安定性、組織移行性プロファイルなどの薬物動態、細胞内分布などに影響するように設計され、製造されたリポソーム製剤を対象とする。有効成分の内包や可溶化、輸送促進を目的として用いられた、脂質二分子膜を形成しない脂質・有効成分混合物及び会合体は本文書の適用範囲外であるが、本文書の考え方は有益である。本文書は、製剤開発、非臨床試験及び初期の臨床試験に関する情報を中心に提供するものであるが、製造販売後に関わる事項にも参考となるものである。なお、本文書の対象となるリポソーム製剤は、他の関連する通知やガイドラインの適用も受ける。

本文書において対象とする有効成分は、低分子化学合成品、核酸、又はペプチドやタンパク質などの生物起源若しくはバイオテクノロジーを利用して産生された成分である。

3. 化学、製造及び品質管理

化学、製造及び品質管理に関する推奨事項は、リポソーム製剤に特有の情報に焦点を当てている。有効成分及び添加剤それぞれの品質に係る一般的な事項については、関連通知及びガイドラインを参考にすること。また、脂質などのリポソーム構成成分の品質がリポ

ソーム製剤全体の品質に影響を及ぼす可能性があるため、リポソーム構成成分は、3. 4項に示すような適切な方法で品質管理すること。

3. 1 組成・性状

リポソームは、主として有効成分及び脂質から構成されるが、ポリエチレングリコール (PEG) やリガンド (標的素子) などで修飾された機能性脂質などが含まれる場合がある。また、リポソーム製剤には、一般的な注射剤と同様に pH 調整剤、安定化剤などの添加剤が含まれる。

リポソーム製剤の特性を規定する上で、以下の特性は特に重要である。

- リポソームの構成成分
- 有効成分及び各脂質の分量
- 有効成分に対する脂質 (機能性脂質を含む) のモル比又は重量パーセント

リポソーム製剤の品質特性、薬物動態学的特性、薬力学的特性及び安全性プロファイルは、脂質組成を含めた処方大きく依存する場合があるため、製剤処方開発の経緯とその適切性を示すこと (3. 2項参照)。

3. 2 製剤設計及び特性解析

3. 2. 1 製剤開発

リポソーム化の目的及び用途に応じた品質・非臨床・臨床上のプロファイルについて明確にすること。その上で、剤形及び処方を含めた製剤設計、品質特性、製造方法、容器栓システム、使用方法などが、使用目的に合うことを裏付けるために実施された開発段階での検討について製剤開発の経緯として記述する。

リポソーム製剤中には、有効成分が封入されていないリポソームや脂質二分子膜上の修飾分子 (例えば、PEGやリガンド (標的素子) ・抗体など) が欠損又は変性したリポソームが一定の割合で存在すると考えられる。したがって、リポソーム製剤を単一リポソームから構成される集合体として捉えず、上記の点に留意した上で、非臨床試験及び臨床試験に用いたロットの当該試験成績を考慮し、製剤全体として製剤設計及び品質特性に対する評価を行い、管理範囲を設定していく必要がある。また、リポソーム製剤は製剤学的に複雑であり、必ずしも最終製品の品質試験のみでは十分に品質を管理できない場合がある。よって、日米EU医薬品規制調和国際会議 (ICH) Q8(R2)及びQ11ガイドラインに概説されているクオリティ・バイ・デザイン (QbD) の考えに基づいた製剤開発を強く推奨する。重要品質特性及び関連する特性値を踏まえ、製剤品質の一貫性を保証するための管理戦略を策定した上で、必要な規格及び試験方法を決定すること。リポソーム構成成分の選択・処方と各成分の機能については、目標製品品質プロファイル及び製剤特性 (例えば、放出性、標的指向性など) への影響と関連付けて記述すること。また、製剤設計、品質特性 (物理的、化学的及び生物学的特性) 、製造工程などの変動が製剤特性にどのように影響するのか、

開発段階で行った検討を明らかにし、必要に応じて薬物動態、有効性及び安全性に及ぼす影響についても評価・検討すること。

3. 2. 2 製剤の特性解析

リポソーム製剤の *in vivo* での薬物動態及び薬力学的特性に影響する重要品質特性を明らかにすることは安全性と有効性を担保する上で重要である。重要品質特性に関連する物理的、化学的及び生物学的な特性項目を適切に設定することは、リポソーム製剤の品質を確保する上で重要であることから、複数ロットに対し詳細な特性解析を行い、評価すること。凍結乾燥注射剤及び粉末注射剤として供給されるリポソーム製剤については、再調製後の薬液に対しても評価すること。

物理的、化学的及び生物学的な特性の詳細な解析は、製造条件が変更された場合の影響を評価する際にも有用である（3. 7項参照）。有効成分や修飾分子などとして、タンパク質やアプタマーなどの高次構造が当該分子の機能に強く影響する分子などを含む製剤では、当該成分及び／又は製剤全体に対し、生物薬品に準じた生物活性、免疫学的特性などの特定・評価を行うこと。

リポソーム製剤において特に考慮すべき品質特性としては、以下のようなものがあげられる。

- 粒度分布：平均値又は中央値とともに、分布を図及び多分散指数などの定量的な指標で示すこと。試験法としては、動的光散乱測定が主として用いられるが、粒子径が大きい製剤ではレーザー回折測定も用いられる。動的光散乱測定を行う場合、解析に用いた分布表示（個数基準分布や体積基準分布など）を明記することが重要である。
- リポソームの形態・構造：リポソームの凝集状態やラメラ構造を確認すること。画像解析手法として透過型電子顕微鏡、低温電子顕微鏡、原子間力顕微鏡、小角 X 線散乱測定などを用いることができる。
- 表面電荷（ゼータ電位）：リポソームの表面電荷は、*in vivo* でのクリアランス、組織分布、細胞内への取り込みに影響を及ぼすため重要な特性である。水溶液中の対イオンによってリポソーム表面に形成される電気二重層の影響で、表面電荷を直接測定することはできないことから、一般的にはゼータ電位として評価検討される。試験法としては、電気泳動光散乱（レーザードップラー法）が主として用いられる。なお、測定に使用する溶媒の種類、pH、電気伝導度などによってゼータ電位は変動することから、試験条件を特定すること。
- リポソーム膜の熱力学的特性：示差走査熱量測定や脂質膜挿入型蛍光プローブの蛍光スペクトル特性における温度依存性などにより評価する。コレステロールや脂溶性の高い有効成分などの含有によって明確な相転移温度が定まらないリポソームにおいても、発熱や吸熱プロファイルなどの熱力学的特性は脂質二分子膜の流動性と均一性を

表す指標として有用である。

- リポソーム製剤からの有効成分の *in vitro* 放出特性：3. 2. 3項を参照のこと。
- 浸透圧：リポソーム構造の破裂や収縮を防ぐために、調製後の薬液は等張（約 280mOsm/kg）であることが望ましい。
- pH：分散液（外相液）の pH を特定すること。また、pH 変動によりリポソームの特性・機能に変化が想定される場合には、指標とすべき品質特性を特定し、その影響評価を行うこと。
- 凝集：リポソーム凝集物や沈殿物はインフュージョンリアクション（輸注反応）の頻度を上昇させる可能性があること¹⁾から、適切な試験（濁度試験など）により評価すること。
- 有効成分の封入率：リポソームに封入された有効成分と遊離有効成分を、固相抽出、サイズ排除クロマトグラフィー、超遠心法、ゲル濾過法、透析法などにより分離した後、各分画の有効成分量を高速液体クロマトグラフィーや分光光度計により定量する手法が用いられる。
- 不純物：有効成分及び製剤の不純物に関する既存のガイドライン（ICHQ3A, Q3B, Q3C, Q3D, M7 ガイドライン）を参考とする。特にリポソーム製剤については、原料に由来する不純物、製造工程に由来する不純物、目的物質由来不純物（リポソーム凝集物や変化物など）及び経時的分解物について留意し、プロファイルを特定すること。重要な不純物については、構造又は分子種を特定すること。なお、構造決定ができなかった不純物については、不成功に終わった研究の要約を添付資料に記載すること。

リポソーム製剤の特徴によっては、以下の特性解析についても考慮すべきである。

- 封入有効成分の状態：電子顕微鏡や小角 X 線散乱測定などを用いて評価する。有効成分の封入方法として硫酸アンモニウム法を用いることにより、封入された有効成分がゲル化している場合など、封入有効成分の状態が有効成分の保持能（有効成分の漏出性）に重要と考えられる場合に評価すること。
- リポソームの表面にリガンドなどを修飾した製剤では、標的細胞への親和性などに影響することがあるため、修飾分子の（高次）構造、修飾比率、標的細胞への結合能などについても検討すること。これらの検討が困難である場合には、活性試験をもって代替とすることも可能である。

3. 2. 3 *in vitro* 放出試験

リポソーム製剤が一貫した生体内安定性及び有効成分の放出特性を有していることを保証するために、生理的条件を適切に反映した試験液中でリポソームからの有効成分の放出特性を測定する *in vitro* 放出試験法を確立すること。リポソームの特徴及び製剤設計・使用

¹⁾ Szebeni J, et al. Adv Drug Deliv Rev. 2011;63:1020-1030.

目的によっては、複数の放出試験条件を設定すること。生理的及び／又は臨床的に適切な溶媒（例えば、緩衝液やヒト血漿など）を用い、必要に応じて攪拌しながらリポソームからの有効成分の放出を測定すべきである。*in vitro* での有効成分放出特性が十分に生体内での有効成分放出特性を反映しない場合であっても、以下の項目を必要に応じて考慮し、識別性を有する *in vitro* 放出試験法を開発し、その適切性が示されるべきである。

- 血中や標的組織におけるリポソームからの有効成分の放出プロファイル
- 標的組織又はエンドソームでの環境変化（pH 変化など）にตอบสนองして有効成分を放出するリポソームにおいては、生理的環境を反映したリポソームからの有効成分の放出プロファイル
- 温度変化や外部刺激によって有効成分を放出するリポソームにおいては、想定した温度変化や外部刺激によるリポソームからの有効成分の放出プロファイル

3. 3 リポソーム製剤の製造工程及び工程管理

リポソーム製剤の品質確保のためには、単に製造工程における中間体及び工程管理、最終製品の品質試験を実施するだけでなく、製造工程を理解して適切な管理戦略を策定することが重要である。また、3. 2. 1 項において前述したように、リポソーム製剤は製造パラメータの変動の影響を受けやすいことから、開発の過程を通じて製造工程に係る知識を集積し、変動要因（例えば、工程パラメータや原料の変動）を十分に把握しておく必要がある。

リポソーム製剤の製造方法は、封入する有効成分や脂質成分の種類・物性、リポソーム製剤の機能や物性により異なるが、その多くでは、製造において以下の特徴的な工程を経ると考えられる。管理戦略に基づき、工程条件、製剤特性、工程管理試験などを必要に応じて設定し管理する。

3. 3. 1 リポソームの形成工程

均質なリポソームが、製造ロット毎に頑健に製造されるよう、工程を設計すること。ロット間でリポソームの脂質組成が同程度になるよう管理する。また、リポソームの構造に影響するプロセスパラメーターを特定し、適切な管理範囲を設定すること。

脂質薄膜や脂質混合液を製造中間体としてリポソームを形成する工程においては、当該製造中間体の均一性、一貫性を保証することが重要である。また、水和の工程における、水和時間や混合速度、温度が重要な管理項目となりうる。

なお、タンパク質のような巨大分子を内包するリポソームでは、リポソームの形成と同時に有効成分の内包が行われる。このようなリポソームの形成工程では、有効成分の封入効率が一定の範囲内に収まるように、管理することも重要である。また混合工程における溶媒の種類とイオン強度、混合速度、混合温度などが重要な管理項目となりうる。

3. 3. 2 リポソームへの有効成分の封入工程

ロット間で、有効成分の封入効率が同程度となるよう工程設計を行い、管理を行う。pH 勾配や溶解度の違いを利用して有効成分を封入する場合には、リポソーム内部の水相と外部の水相の液性と組成、操作条件（温度、時間など）などが、封入効率に影響する重要な管理項目となる。

リポソームに封入されていない有効成分の除去工程がある場合には工程能力を評価し、遊離している有効成分量を管理すること。

3. 3. 3 サイズ調整工程

リポソーム製剤は、粒子径の違いによって体内動態に大きな影響が生じるため、製造されるリポソーム粒子の粒度分布が大きい場合には、サイズ調整が行われる。

サイズ排除クロマトグラフィーを利用した精製操作が行われる場合には、クロマトグラフィー樹脂の種類及びカラムスケール、リポソーム負荷量、クロマトグラム条件、分取方法などについて、分離能力などの観点から最適化した際の検討内容を示すこと。

また、メンブレンフィルターを用いたエクストルーダーによる粒子径調整を行う場合には、脂質濃度、温度、圧力、フィルターの孔サイズなどのパラメータが重要である。また、エクストルージョンを繰り返し行う場合や、数種のフィルターを用いて段階的に行う場合には、エクストルージョン操作の回数や、フィルターの組み合わせ、順番などに関する条件検討の内容を示すこと。

3. 3. 4 PEG 等による表面修飾工程

リポソーム製剤では、生体内での安定化を目的として表面が PEG 鎖で修飾されるほか、標的指向性の向上を企図して、リガンド（標的素子）・抗体を用いて修飾される場合がある。表面修飾の目的及び機能発現に必要な修飾分子数などを考慮した上で、ロット間でリポソームの修飾状態が同程度となるよう工程設計を行い、管理をすること。最終製品の品質試験だけでは十分に品質を管理できない可能性があるため、3. 4 項で述べるように修飾脂質の品質及び製造プロセスの管理が重要である。

3. 3. 5 滅菌工程

リポソームは一般的な乾熱滅菌、高圧蒸気滅菌に使用される操作条件下において不安定であることから、滅菌操作にはろ過滅菌が広く用いられる。ろ過滅菌工程については、バクテリアチャレンジ試験などによって工程能力を評価し、フィルター選択の適切性を示すこと。

3. 4 リポソーム構成成分の管理

リポソーム製剤においては、脂質二分子膜を構成する脂質分子、その表面を修飾する PEG

鎖、リガンド（標的素子）、抗体などが有効成分の生体内安定性、薬物動態、細胞内動態などの改善に寄与している。このため、リポソーム構成成分、とりわけ製剤の機能に大きな影響を及ぼすリガンド（標的素子）、抗体などの構成成分については、一般的な添加剤と異なり、より目的とする特性が保証されるように評価・管理される必要がある。

3. 4. 1 品質特性

脂質については、構造式が単一で表される合成脂質である場合には、一般的には、標準的な分光学的方法で構造を明らかにする。天然脂質混合物（大豆レシチンや卵黄レシチンなど）又は半合成脂質（例えば、水素添加大豆ホスファチジルコリンなど）の場合は、脂質組成の変動によってリポソーム製剤の特性は変動しうることから、脂質組成（すなわち、各脂質成分の百分率）及び脂質を構成する脂肪酸組成（各脂肪酸の百分率）を明らかにする。

PEG などの高分子や標的指向性付与を目的とした分子（リガンド（標的素子）など）を結合した修飾脂質などでは、リンカーを含めたその構造解析を行うこと。特に、PEG の分子量分布は、生体内安定性だけでなくリポソームの粒子サイズや有効成分の放出にも影響を及ぼす可能性があるため重要である。

3. 4. 2 製造工程及び工程管理

合成脂質及び半合成脂質については、出発物質及び製造方法が特定され、適切に管理されているものを用いること。半合成脂質の合成に使用される生物起源成分については、生物学的起源（卵黄など）、供給業者を示すこと。合成脂質及び半合成脂質を開発者又は製造委託先にて製造する場合には、出発物質の規格、重要工程及び中間体の管理方法を特定し、品質に影響する工程パラメータを示すこと。

生物由来成分又は組換えDNA技術を応用したタンパク質を出発物質又は原料として若しくは直接用いる場合には、生物薬品に関連する他の通知やガイドラインの要件に準じた管理・検討を行うこと。

3. 4. 3 規格及び試験方法

脂質二分子膜を構成する脂質分子、リガンド（標的素子）などが製剤品質に及ぼす影響に関する検討結果を踏まえ、十分な試験項目を設定し、規格及び試験方法を詳細に記述すること。添加剤は使用目的に適った特性を有している必要があることから、公定書収載品であっても、製剤品質に影響を及ぼす特性が公定書に規定されていない場合、又は公定書に定められる管理基準により、目的とする製剤品質を確保できない場合には、別途、必要な規格値と試験方法を追加設定し、管理すること。分析法はバリデートされたものを使用し、規格には少なくとも含量（又は力価）、確認試験、純度試験及び定量法を含めること。標準品又は標準物質を設定する場合は、設定した標準品又は標準物質の調製法、規格及び

試験方法並びに保存条件及び有効期間を記載すること。

タンパク質のような生物起源又はバイオテクノロジーを利用して産生された成分を使用する場合には、ICH Q6B ガイドラインを参考に、適切に規格設定を行うこと。

3. 4. 4 安定性

リガンド（標的素子）で修飾された脂質などは、一般的な添加剤の使用状況と比較して製剤中で高度な機能発現が求められていることから、十分な安定性を有していることが確認される必要がある。ICH Q1A(R2)ガイドライン及び／又は ICH Q5C ガイドラインの考え方に従って適切に安定性評価を行い、リテスト期間又は有効期間を設定すること。

3. 5 リポソーム製剤の管理

3. 5. 1 規格及び試験方法

規格及び試験方法については、日本薬局方及び ICH Q6A 又は Q6B ガイドラインを参照すると共に、リポソーム特異的な評価項目（有効成分の封入率、有効成分の放出性、脂質の定量、分解物など）については、必要に応じて適切に設定すべきである。また経時的に変化する品質特性については、薬物動態、有効性及び安全性への影響の観点から、設定された規格値の適切性を示すこと。リポソーム製剤に適用するバリデートされた試験方法を定める必要があり、その試験項目及び試験方法などは、適宜 3. 2. 2 項に例示したものを含め、製剤を特徴づける特性に基づいたものとする。なお、リポソーム製剤における規格及び試験方法の設定については、特に以下の点に留意すること。

3. 5. 2 確認試験

脂質、修飾分子などが目的とするリポソームを構成していることを、他の規格試験と併せて複合的に判断できるよう、規格及び試験方法を設定すること。

3. 5. 3 エンドトキシン試験

リポソーム製剤においてエンドトキシン試験を行った場合、脂質とライセート試薬が交差反応を起こし正しく測定できない場合があるため²⁾、適切にバリデーションを実施すること。エンドトキシン試験を適切に実施できない場合には、発熱性物質試験として管理すること。

3. 5. 4 活性試験

有効成分や修飾分子などとして、タンパク質やアプタマーなどの高次構造が当該分子の機能に強く影響する分子などを含む製剤では、必要に応じて、当該成分及び／又は製剤全体に対し、生物活性の評価を行う。

²⁾ Dobrovolskaia MA, et al. *Nanomedicine (London)*. 2010;5:555–562.

リポソーム製剤において生物活性試験などを実施する場合には、リポソーム製剤の標準物質の設定が必要となる場合がある。リポソーム製剤の標準物質を設定する場合には、製造方法並びに規格及び試験方法を示すこと。また、標準物質の安定性については、適切な特性解析項目を選択して評価し、有効期間内で品質特性が一貫していることを確認・保証すること。

3. 6 安定性

リポソーム製剤の安定性試験は、ICH Q1A(R2)ガイドラインに則って実施すること。特に有効成分やリポソーム構成成分に生物薬品（生物起源成分又は組換え DNA 技術を応用したタンパク質）が用いられている場合には、ICH Q5C ガイドラインの考え方も適用される。なお、リポソーム製剤の安定性に関する現時点での知識には限界があるため、長期保存試験において安定性が確認された期間を越えて、有効期間を設定することは原則できない。

リポソーム製剤は製剤学的に複雑であることから、安定性試験において品質特性の経時変化を十分に把握するために、必要に応じて、規格及び試験方法に設定された試験項目に加えて、特性解析項目からも試験項目を選択して設定すること。特に重要な試験項目の一例として、以下の特性が挙げられる。

- リポソーム製剤中での各種脂質の安定性：

不飽和アシル基を含む脂質は酸化的分解を受けやすく、それが相転移温度などの変化を引き起こし、リポソームの安定性に影響する。また、飽和及び不飽和アシル基を含む脂質ともに加水分解を受けやすく、リン脂質及び遊離脂肪酸が生成される。脂質の分解が進行することで、リポソーム製剤は本来の機能を失う、又は脂質二分子膜構造の崩壊に至ることから、脂質の分解の程度とリポソーム製剤の品質特性への影響を明確にすること。

- 修飾分子の付加状況、構造安定性：

修飾分子の結合様式によっては、リポソームから修飾分子が徐々に解離し、修飾分子数が低下する。また、リポソーム外部の水相の種類や保存条件によっては、修飾分子の高次構造が長期保存により変化する場合がある。修飾分子数の低下や高次構造の変化が認められた場合には、リポソーム製剤の品質特性への影響を明確にすること。

- 粒子径分布、凝集：

リポソームは、長期保存中に融合や凝集を起こすことがある。例えば、小さい単層小胞では、小胞の融合により粒子径の増大が認められやすい。濁度や粒子径分布などを試験項目として設定し、経時変化とリポソーム製剤の品質特性への影響を評価すること。

- 封入率：

リポソームの脂質二分子膜構造の崩壊の有無にかかわらず、内包された有効成分の漏出が認められる場合があるので、経時変化とリポソーム製剤の品質特性への影響を評価すること。

3. 7 製法の変更

リポソーム製剤は一般的な低分子化学合成医薬品とは異なることから、製法の変更がリポソーム製剤の品質に影響を及ぼさないことを証明するための一般的なデータセットを提示することは困難である。

製剤に設定された規格及び試験方法に加えて、製剤特性、管理戦略、製造方法の変更内容を考慮して、当該変更により影響する可能性が否定できない物理的、化学的及び生物学的特性に関する試験項目を特定して評価を行い、変更前後で製剤品質が同等/同質性 (comparable) であることを確認すること。製法の変更前後における製剤間の同等性/同質性 (comparability) 評価の考え方については、ICH Q5E (生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) の製造工程の変更に伴う同等性/同質性評価について) ガイドラインに示された考え方を参考にすること。変更の程度が大きく、品質の観点のみでは同等性/同質性の評価が不十分と考えられる場合や、物理的、化学的及び生物学的特性などから製剤品質が同等/同質であることを説明できない場合には、補遺に記載した内容に留意し、薬物動態、有効性及び安全性に及ぼす影響についても評価・検討すること。

リポソーム製剤では、スケールアップ時に特性が変化するリスクが通常の低分子医薬品などと比較して高いと考えられることから、スケール依存性に関する評価についても慎重に行うこと。例えば、リポソームのサイズ調整のエクストルージョン工程においては、スケールアップに際して加圧方法や使用されるフィルターの種類などの変更を伴う場合がある。また、サイズ排除クロマトグラフィーを利用した精製操作においては、カラムスケールの変更に伴う分取条件 (流量、処理量など) の変更が必要である。これらの工程変更の内容とリポソーム製剤の品質特性の関係について精査し、変更前後で製剤品質が同等/同質であることを確認する必要がある。

なお、リポソーム製剤において、リポソームの形成に関連する製造原理、リポソームへの有効成分の封入方法、脂質量と有効成分量の比、脂質二分子膜の組成に係る変更及びリポソームへの表面修飾工程などの変更は、有効性及び安全性への影響を否定できない場合があるので留意すること。

検証的試験実施後における製法変更では、承認後に製法変更を行う場合と同様に、広範かつ詳細に製法変更前後の製品の同等性/同質性を評価する必要がある。

4. 非臨床試験

4. 1 概論

有効成分をリポソーム製剤として投与することにより、有効成分単独で投与した時に比

べ薬物動態学的特性が著しく変化することがある。すなわち、分布容積とクリアランスが変化し、半減期が延長し、体内分布が変化することがある。このような薬物動態学的特性の変化に伴い、有効性及び安全性も著しく異なることがある。リポソームが組織へ到達後、有効成分を放出し薬効を発揮するには、リポソームが細胞内に取り込まれた後に有効成分が放出される場合や、細胞外でリポソームから放出された有効成分が細胞に取り込まれ効力を発揮する場合がある。

一般にリポソーム製剤に封入された有効成分の薬物動態学的特性は、以下の要因により変化し得る。

- 有効成分を封入したリポソームのクリアランス
- 封入された有効成分のリポソームからの放出速度
- リポソームの体内分布（分布する臓器や組織、有効分量の変化）
- リポソーム及び有効成分と血漿、血清タンパク質又は血液細胞や血管内皮との相互作用

in vivo における有効成分の放出速度と放出部位は、多くの場合、薬効や安全性に影響する重要な特性であり、有効成分の放出の状態を推測するための手法の開発を試みるべきである。

非臨床試験は、品質特性プロファイルが明確にされた臨床使用製品と同等のリポソーム製剤を用いて行うべきであり、選択した試験条件における有効成分のリポソームからの放出速度及び製剤の安定性について情報を得ておくべきである。

4. 2 非臨床薬物動態

4. 2. 1 分析法

血液、血漿又は血清中に存在する有効成分（総量、遊離有効成分、必要に応じて封入有効成分）、並びに臓器や組織中の有効成分（総量）を測定できる分析手法を開発することが必要である。リポソーム製剤の特性（血中での有効成分の放出性など）によっては、リポソームに封入された有効成分濃度を測定することも重要である。なお、リポソーム構成成分が安全性に影響を与えると予測される場合は、構成成分を測定可能な分析法を確立することも必要である。

投与後の各測定時点の血液、血漿又は血清試料において、封入及び遊離有効成分を分離しない値を「総量」として、遊離有効成分とともに定量すべきである。血液、血漿又は血清中の遊離有効成分及び総量を測定することは可能であるが、臓器や組織中では、組織の処理過程でリポソームが破壊されてしまう可能性があるため、各臓器組織中での遊離有効成分の測定が困難である場合が多い。得られた生体分析結果の適切性と解釈の正当性を保証するため、分析手法を開発する際には、試料の処理過程が適切に管理されていることに注意を払う必要がある。

血液、血漿又は血清中における有効成分（総量、遊離有効成分、必要に応じて封入有効成分）、臓器や組織における有効成分（総量）、及び代謝物を定量するために用いた分析手法は、その手法のバリデーションに関する記述が必要である。バリデーションに関しては、「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」薬食審査発 0711 第 1 号（平成 25 年 7 月 11 日）、及び「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法（リガンド結合法）のバリデーションに関するガイドライン」薬食審査発 0401 第 1 号（平成 26 年 4 月 1 日）が参考となる。

4. 2. 2 薬物動態

リポソーム製剤の体内動態は、リポソーム化せずに投与された有効成分の体内動態とは大きく異なることがあり、このことが有効性と安全性に著しく影響することがある。このため、有効成分単体とリポソーム化した製剤で *in vivo* での薬物動態を比較評価することが重要である。*in vivo* での薬物動態及び有効成分の放出を検討する際には、リポソーム製剤の予定される臨床使用法及びリポソームの組成のほか、有効成分の特性、リポソーム及び有効成分の標的臓器や標的組織における蓄積・滞留性、血中濃度及び組織分布などに特に留意し、用いる動物種及びモデルの選択の妥当性を示すべきである。標的性付与を目的としてリポソーム表面にリガンド（標的素子）・抗体などを結合した場合、動物種及びモデルの選択に当たっては、受容体やエピトープなどの発現・分布などの種差を考慮する必要がある。

リポソームのサイズ、表面電荷、形態、リガンド（標的素子）・抗体などによる表面修飾などの品質特性は、リポソーム製剤の体内分布に影響することがあるので、その特性の変動が体内分布に及ぼす影響を考察すべきである。品質特性と体内分布に関する考察は将来、製品規格を設定する際に、その妥当性を説明するために有用である。ICH S3 (S3A 及び S3B)、S6(R1)並びに M3(R2)で推奨している情報に加えて、リポソーム製剤を評価する上で重要なポイントを以下に述べる。

- リポソーム製剤と単独投与された有効成分について、薬物動態を比較することにより、リポソーム化することの目的や意義を説明することは有益である。
- 血液、血漿又は血清中の有効成分の総量及び遊離有効成分について、 C_{max} 、AUC 及び半減期など、適切な薬物動態パラメータを算出する。また、解析結果に基づき、リポソーム化することによる有効成分の薬物動態の変化について考察する。
- 薬物動態パラメータは、複数の用量で、適切な時点で採取された試料を用いて算出する。
- 予定される臨床使用法及び投与経路に関連する臓器や組織中におけるリポソーム製剤の体内分布を評価する。具体的には、臓器や組織中の有効成分の総量について、時間経過に応じて有効成分の変化を正確に評価できるよう採取期間と試料採取時点を設定した上で、体内分布の経時的変化を観察する。

- 試料採取時点、採取期間など、試料採取スケジュールの決定に際しては、投与後のリポソームの安定性や、特定の臓器や組織への局在プロファイルなどの要素を考慮すべきである。特に最初の分布相（例えば<15分）において採取した試料は、その測定値から分布容積を計算し循環血中におけるリポソームの安定性（バースト現象に関わる安定性）を評価することができるため、有益である。
- 有効性や安全性に関わる臓器や組織中の遊離有効成分の測定は、各臓器や組織中でのリポソームの安定性や有効成分の放出特性を評価する上で有益であるが、測定が困難である場合は、代謝物の測定を試みることも有益である。
- 試料採取方法や時期など試験デザインは薬物動態パラメータの算出値の精度に影響を与える。適切な投与量、必要な試料採取計画、動物数を慎重に決定する。
- リポソームの主要な代謝や排泄に関わる臓器や組織とともに、安全性や有効性に関与すると思われる臓器や組織はリポソーム製剤の体内分布を評価する対象に加えられることが望ましい。安全性の観点から懸念される臓器の例としては、肝臓、脾臓、腎臓、骨髄、肺、心臓などの細網内皮系やクリアランスと関連する重要な臓器、蓄積しやすい臓器、脳や精巣など血液組織関門により保護されている臓器が挙げられる。
- 有効成分の代謝物が主要な活性本体であることが知られている場合は、血液、血漿又は血清中の活性代謝物、可能な場合には臓器や組織中における活性代謝物を測定することは特に重要である。一つ又はそれ以上の代謝物が実質的な臨床効果を有している場合は、それぞれの代謝物に対して薬物動態を解析し比較することが望ましく、場合によっては、反復投与による蓄積性を評価するためにトキシコキネティクスを比較することも必要となる。
- リポソーム製剤の体内分布や、安定性及び安全性に影響する可能性があるため、静脈内に投与したリポソームとタンパク質及び細胞との相互作用について考察することも重要であるだろう。
- 適切な動物モデルを用いたイメージング手法により、リポソーム製剤の体内動態を把握しておくことも有益である。
- リポソーム表面へのリガンド（標的素子）・抗体などの導入は、リポソームの組織・細胞内移行性に大きな影響を及ぼしうるため、標的臓器や標的組織とともにそれ以外の臓器や組織への集積性の変化にも留意する必要がある。
- リポソーム製剤の有効成分の代謝及び排泄経路の評価は、製剤の安全性、有効性の評価に重要である。リポソーム構成成分が安全性に影響を与えると予測されるのであれば、構成成分の分布、代謝及び排泄経路についても必要に応じて評価する。

4.3 非臨床薬力学

非臨床薬力学試験は、適切な裏付けのある *in vitro*（可能であれば）及び *in vivo* のモデルを用いて薬力学反応を実証する。適切な投与経路及び予定される臨床使用に応じた投与

量・投与計画により *in vivo* 評価を行うべきである。その薬力学的モデルが適切であるかどうかについては、リポソーム製剤の体内動態並びに有効成分の単独投与での薬物動態及び薬力学を考慮し評価するべきである。

リポソーム製剤の化学的組成及び物理的・化学的性質（サイズ、表面電荷及び有効成分の放出速度を含む）は、薬力学特性に影響する。作用機構を考察するための試験をデザインする際に考慮すべき要素には、次のようなものがある。

- *in vivo* における有効成分の放出部位と放出速度
- リポソーム表面にリガンド（標的素子）・抗体などを結合させた場合は、標的分子や標的細胞への結合
- 細胞内における有効成分の放出が薬効発現に重要である製剤においては、エンドサイトーシスなどによる細胞内への取り込み後のリポソーム（脂質又は他の成分を含む）の細胞内動態

リポソーム製剤の薬力学については、*in vitro*（可能であれば）及び *in vivo* の薬力学モデルを用いて評価する必要がある。リポソームと標的細胞との相互作用の特性を示す *in vitro* 試験の実施を推奨する。リポソーム表面にリガンド（標的素子）・抗体などを結合させた場合は、標的細胞などを用いた親和性の評価とともに、必要に応じてリガンド（標的素子）・抗体などに由来する薬理作用についても明確にしておく必要がある。*In vitro* 及び *in vivo* の両モデルを用いてリポソームの薬力学を評価できない場合は、開発者は評価方法と評価結果の妥当性を論理的に十分に示すべきである。

4. 4 安全性薬理試験

例えば、ICH S9 適用範囲外のリポソーム製剤のように、安全性薬理評価が必要な場合には、4. 5 項を考慮して、ICH M3(R2)、並びに ICH S7A 及び ICH S7B に準じて安全性薬理試験を実施する。

4. 5 毒性試験

リポソーム製剤の安全性を非臨床試験により評価するためには、基本的に新有効成分含有医薬品に準じた評価が必要であり、毒性プロファイル及び曝露-反応関係について評価するために、以下の点に留意しつつ ICH 安全性ガイドライン及び M3(R2)ガイドラインに基づいて、毒性試験を実施すべきである。

- 有効成分単独での毒性評価が終了している薬物を有効成分とする同一の臨床投与経路によるリポソーム製剤の毒性評価では、1種の動物を用いた臨床投与経路による短期反復投与毒性試験を行い、その毒性プロファイル及び曝露を有効成分単独投与の場合と比較し、その結果を考慮して、新有効成分含有医薬品の安全性評価のために通常実施される毒性試験のうち、当該リポソーム製剤の毒性評価に必要と考えられる試験を実施する。

- 有効成分に新規性があり、毒性及びトキシコキネティクスデータが得られていない場合には、ICH 安全性ガイドラインに準拠して当該リポソーム製剤の毒性/曝露評価を行う。有効成分が遊離の状態では循環血中に存在する可能性がある場合は、適切な動物種を用いて有効成分単独での臨床投与経路による反復投与毒性試験を実施して、その毒性発現及び曝露をリポソーム製剤と比較することが必要な場合がある。
- 添加剤としてのリポソーム構成成分の安全性評価は、当該製剤に限定した承認とする前提で、製剤（リポソーム全体）で評価を行うことでよい。ただし、リポソーム構成成分の毒性に関する既知データがなく、脂質構造や蓄積などによる新たな毒性が予測されるなどの理由により、リポソーム製剤の毒性試験のみでは脂質成分などが関与する安全性が適切に評価できない場合には、リポソーム製剤から有効成分を除いた構成成分の安全性評価が求められる場合がある。

4. 5. 1 トキシコキネティクス

血液、血漿又は血清中の有効成分に加えて、標的臓器や標的組織、及び毒性上懸念される臓器や組織中においても有効成分を測定することは、毒性評価の上で有用である。

4. 5. 2 追加の試験

リポソーム製剤やその製造に用いる脂質の物理的・化学的性質や薬物動態学的特性に応じて、標的臓器の組織的・機能的変化について評価が必要となる場合がある。

急性の輸注反応は、リポソーム製剤では比較的一般的に起こり得る。*in vitro* と *in vivo* の試験、例えば、補体活性化の測定（及び/又はマクロファージや好塩基球の活性化測定）や、適切な動物モデルを用いた試験などが、有害事象発現の可能性を評価するために考慮されるべきである。その他の血液毒性、抗原性又は免疫毒性（ICH S8）については、リポソームの特性や、有効成分の薬理学的特性など、リポソーム製剤の特性に応じて試験の実施を考慮する必要がある。

5. ヒト初回投与試験において考慮すべき事項

リポソーム製剤は、有効成分の生体内安定性、組織移行性プロファイルなどの薬物動態、細胞内分布などに影響するように設計されることが多い。したがって、ICH S3 (S3A と S3B)、S6(R1)、S9、M3(R2) 及び「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス」薬食審査発 0402 第1号（平成24年4月2日）で推奨している情報に加えて、ヒト初回投与試験を検討する際は、リポソーム製剤及び有効成分の非臨床薬物動態データ、予定される臨床使用法及び投与経路など、リポソーム製剤に特有の情報を考慮することが重要となる。

非臨床薬物動態試験においては、具体的には以下のように、薬物動態パラメータ、試料採取時点及び期間を適切に選択し、総量としての有効成分及び遊離有効成分並びに代謝物、またリポソーム製剤の特性によっては封入有効成分の経時的推移を把握しておく。

- 血液、血漿又は血清中の総量としての有効成分及び遊離有効成分について、C_{max}、AUC及び半減期などの薬物動態パラメータ
- 血漿濃度－時間プロファイルを適切に記述するために十分な試料数を採取するべきである。試料採取スケジュールには、投与直後の分布過程についての的確な情報が得られるように、特に投与初期の試料採取間隔については短くすることも有益であると考えられる。一般的に、有効成分の曝露が十分評価可能となる時点まで、試料を経時的に採取するよう留意すべきである。
- 標的病変部位及び主要臓器におけるリポソーム製剤の分布。評価の際には、標的病変部位及び主要臓器における有効成分の総量を、適切な期間にわたる経時的な薬物濃度推移の把握が可能な採取頻度で測定する。

ヒト初回投与試験における初回投与量の選択にあたっては、ICH M3(R2) 及び「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス」に準拠すべきである。また、上記3章（化学、製造及び品質管理）及び4章（非臨床試験）で述べたような重要な製品特性、薬理学的な用量反応性、薬物動態及び薬理学的／毒性プロファイルなど、すべての関連する非臨床データを考慮すべきである。

ヒトにおける用量制限毒性は、通常の医薬品と同様な判断が可能であるが、過敏症反応は必ずしも用量依存的でないため注意を要する。

各リポソーム製剤の重要品質特性の候補を特定し、当該重要品質特性により3章で述べたように恒常性を評価するべきである。品質特性の恒常性は、ヒト初回投与試験で用いる製品と非臨床試験で用いた製品との間で確認するべきである。また、その試験手順は、ヒト初回投与試験を開始する前に確立しておくべきである。ヒト初回投与試験の前に非臨床試験用リポソーム製剤製造時の製造工程（スケールアップを含む）が変更された場合は、同等性／同質性を確認するべきである。

リポソーム製剤が、ヒト初回投与試験の期間中、安定性試験により安定であることを確認することが必要である。

6. 用語集

この用語集は、以下の用語が本文書でどのように用いられているかを説明するためのものである。

- 1) Enhanced permeability and retention (EPR) 効果：正常血管から、通常、容易に漏出しないとされているナノ粒子あるいは高分子タンパク質が、網内系に捕獲されず安定的に血中を循環する場合、固形腫瘍においては、腫瘍血管透過性亢進機構とリンパ回収系の未発達ゆえに、固形腫瘍内に選択的に漏出し、長く留まる現象。
- 2) リポソーム：両親媒性脂質分子の二分子膜からなる微小胞で、内相を有する。リポソーム製剤は、有効成分をリポソームの脂質二分子膜又は内相に封入することにより作

製される。

- 3) 有効成分の封入率： $(\text{リポソームに封入された有効成分量} / \text{製剤全体の有効成分量}) \times 100 (\%)$
- 4) 遊離有効成分：リポソームの脂質二重膜又は内相に取り込まれていないが、その製剤の中に存在している有効成分。本文書で、「遊離」という用語は、血漿又は血清タンパク質から有効成分が解離することを意味するものではない。また、「総量」とは、脂質二重膜又は内相に取り込まれている「封入」有効成分と「遊離」の有効成分とを分離・分画せずに得られる有効成分量である。
- 5) バースト現象：リポソーム製剤を静脈内に投与後、標的臓器や標的組織に到達以前に速やかに封入有効成分が放出される現象。

付属文書

関連するガイドライン等

- 平成15年6月3日 医薬審発第0603001号 安定性試験ガイドラインの改定について (ICH Q1A(R2)ガイドライン)
- 平成14年12月16日 医薬審発第1216001号 新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドラインの改定について (ICH Q3A(R2)ガイドライン)
- 平成15年6月24日 医薬審発第0624001号 新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドラインの改定について (ICH Q3B(R2)ガイドライン)
- 平成10年3月30日 医薬審第307号 医薬品の残留溶媒ガイドラインについて (ICH Q3C(R3)ガイドライン)
- 平成27年9月30日 薬食審査発0930第4号 医薬品の金属不純物ガイドライン (ICH Q3Dガイドライン)
- 平成10年1月6日 医薬審第6号 生物薬品 (バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品) の安定性試験について (ICH Q5Cガイドライン)
- 平成17年4月26日 薬食審査発第0426001号 生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) の製造工程の変更にとまなう同等性/同質性評価について (ICH Q5Eガイドライン)
- その他 生物薬品の品質に関するICHガイドライン [平成12年2月22日 医薬審第329号 (ICH Q5A(R1)ガイドライン)、平成10年1月6日 医薬審第3号 (ICH Q5Bガイドライン)、平成12年7月14日 医薬審第873号 (ICH Q5Dガイドライン)]
- 平成13年5月1日 医薬審発568号 新医薬品の規格及び試験方法の設定について (ICH Q6Aガイドライン)
- 平成13年5月1日 医薬審発第571号 生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) の規格及び試験方法の設定について (ICH Q6Bガイドライン)
- 平成22年6月28日 薬食審査発第0628第1号 製剤開発に関するガイドラインの改定について (ICH Q8(R2)ガイドライン)
- 平成26年7月10日 薬食審査発0710第9号 原薬の開発と製造 (化学薬品とバイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) ガイドラインについて (ICH Q11ガイドライン)
- 平成8年7月2日 薬審第443号 トキシコキネティクス (毒性試験における全身的暴露の評価) に関するガイダンスについて (ICH S3Aガイダンス)
- 平成8年7月2日 薬審第442号 反復投与組織分布試験ガイダンスについて (ICH S3Bガイダンス)
- 平成11年4月5日 医薬審第655号 反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について (ICH S4ガイドライン)

- 平成24年3月23日 薬食審査発0323第1号 バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価について (ICH S6(R1)ガイドライン)
- 平成13年6月21日 医薬審発第902号 安全性薬理試験ガイドラインについて (ICH S7Aガイドライン)
- 平成21年10月23日 薬食審査発1023第4号 ヒト用医薬品の心室再分極遅延 (QT間隔延長)の潜在的可能性に関する非臨床的評価について (ICH S7Bガイドライン)
- 平成18年4月18日 薬食審査発第0418001号 医薬品の免疫毒性試験に関するガイドラインについて (ICH S8ガイドライン)
- 平成22年6月4日 薬食審査発0604第1号 抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドラインについて (ICH S9ガイドライン)
- その他、安全性に関する ICH ガイドライン [平成9年4月14日 薬審第315号 (ICH S1Aガイドライン)、平成10年7月9日 医薬審第548号 (ICH S1Bガイドライン)、平成20年11月27日 薬食審査発第1127001号 (ICH S1C(R2)ガイドライン)、平成24年9月20日 薬食審査発0920第2号 (ICH S2(R1)ガイドライン)、平成5年8月10日 薬新薬第88号 (ICH S4ガイドライン)、平成11年4月5日 医薬審第655号 (ICH S4Aガイドライン)、平成9年4月14日 薬審第316号 (ICH S5A, S5Bガイドライン)、平成12年12月27日 医薬審第1834号 (ICH S5B(M)ガイドライン)、平成26年5月21日 薬食審査発0521第1号 (ICH S10ガイドライン)]
- 平成17年9月16日 薬食審査発第0916001号、薬食安発第0916001号 医薬品安全性監視の計画について (ICH E2Eガイドライン)
- 平成22年2月19日 薬食審査発0219第4号 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 (ICH M3(R2)ガイダンス)
- 平成27年11月10日 薬生審査発1110第3号 潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中DNA反応性 (変異原性) 不純物の評価及び管理 (ICH M7ガイドライン)
- 平成10年6月26日 医薬審第496号 非臨床薬物動態試験ガイドラインについて
- 平成13年6月1日 医薬審発第796号 医薬品の臨床薬物動態試験について
- 平成24年4月2日 薬食審査発0402第1号 医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス
- 平成25年7月11日 薬食審査発0711第1号 医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン
- 平成26年1月10日 薬食審査発0110第1号 ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省/欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパーの公表について
- 平成26年4月1日 薬食審査発0401第1号 医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法 (リガンド結合法) のバリデーションに関するガイドライン

補遺 (Appendix)

製法変更時の同等性/同質性評価

リポソーム製剤の製法変更の際、3章(化学、製造及び品質管理)に概説した品質に関する検討により、製法変更前後の製品について認められた品質特性の差異が有効性及び安全性に影響を及ぼさないことを十分保証できるのであれば、当該検討のみに基づいて製法変更前後の製品の同等性/同質性を確定できる。品質に関するデータにより同等性/同質性が確定できない場合、非臨床あるいは臨床試験を追加することにより立証する。

A 1. 非臨床試験

非臨床試験の詳細については、4章(非臨床試験)を参照すること。製法変更時の同等性/同質性評価にあたり実施すべき非臨床試験については、製法変更の程度、当該リポソーム製剤の複雑さ、薬力学的特性、開発段階などに応じて、必要な試験の組み合わせなどをケースバイケースで判断する。

A 1. 1 非臨床薬物動態

ヒトにおけるリポソーム製剤のいくつかの薬物動態学的特性は、動物モデル、更には細胞を用いた *in vitro* モデルなども併せて利用することで予想可能な場合がある。適切な動物種と動物モデルについては、製法変更の目的・内容・程度と品質特性・薬物動態学的特性への影響の観点から、そのモデルの選択の妥当性について示すべきである。また、製法変更の内容や品質特性・薬物動態学的特性への影響を評価する上で、適切な投与量や投与スケジュール、測定項目(総量及び遊離有効成分、必要に応じて封入有効成分の動態)などを選択する。

例えば、脂質の水和、混合、サイズ調整などの製法や工程が変更された場合は、リポソーム製剤の粒度や粒度分布、形態(凝集も含む)又は *in vitro* 放出性、表面にリガンド(標的素子)・抗体を結合させている場合はそれらの修飾率などに影響を及ぼし得る。したがって、これらの変更前後のリポソーム製剤について品質特性を詳細に比較した結果、類似性はあるが分析方法の限界などにより安全性、有効性への影響の有無に結論が下せない場合は、臓器や組織分布に影響を及ぼすことが懸念される。そのため、血中濃度と薬物動態パラメータの比較に加え、臓器分布や組織分布、排泄の比較を含む非臨床薬物動態の比較試験が考慮されるべきである。

A 1. 2 非臨床薬力学試験

可能であれば、リポソームと標的細胞、さらに毒性学上懸念される他の細胞との相互作用を検討するための *in vitro* 試験の実施についても考慮する。ただし、現時点では *in vitro* 試験による検討には限界があると考えられていることから、モデルの感度を考慮に入れた適

切な *in vivo* 試験により、薬力学的反応の類似性を総合的に判断する。

例えば、脂質の水和や混合工程、脂質のグレードなどに変更があった場合は、薬物の放出、有効成分の封入率に影響をもたらす脂質の流動性や脂質組成の均一性に影響を与えるため、類似性はあるがこれらの品質特性に変化が見られ、有効性への影響が不明な場合は、薬力学試験による比較が考慮されるべきである。また、製法変更の前後で、リポソームの粒度、粒度分布、形態（凝集も含む）、*in vitro* 放出性、表面にリガンド（標的素子）・抗体が結合した際は、その修飾率などに変化がみられた場合は、リポソームと標的細胞との相互作用が薬力学に影響を及ぼすことが懸念されるため、薬力学試験による比較が考慮されるべきである。

A 1. 3 非臨床毒性試験

一般的に、品質特性解析により品質上の類似性が認められた場合は、通常、新たな毒性試験を実施する必要はないが、以下の場合については、解析結果によっては試験の実施が必要となる場合もあるであろう。例えば、製法変更により新たな不純物が生じた場合は、その種類や量により毒性試験による安全性評価が必要な場合もある。また、製法変更に伴い、リポソームの粒度や粒度分布、形態（凝集も含む）が変化する場合や、表面にリガンド（標的素子）・抗体などを修飾した場合に、臓器や組織分布に影響を及ぼす懸念がある。これらに影響を及ぼす工程（例えば、脂質の水和、混合、サイズ調製など）が変更され、変更前後のリポソーム製剤について品質特性を詳細に比較した結果、当該変更による安全性への影響が不明な場合は、毒性試験を実施し、製法変更前後の品質特性の差異が臨床へ影響を与える可能性について評価すべきである。

リポソーム製剤投与での輸注反応の多くは、リポソーム脂質組成に依存するため、脂質組成に差異が生じない場合は大きな問題とならないであろう。ただし、工程変更やリポソーム外水相の液性・組成の変化などにより、凝集物の増加、リポソームの粒度や粒度分布の変化、封入率などに差異が認められた場合は、有害事象の可能性の程度を評価するための毒性試験（4. 5項参照）が考慮されるべきである³⁾。

A 2 臨床試験

品質試験、非臨床試験で、リポソーム製剤の同等性／同質性が確定できない場合には、臨床試験を実施する。

A 2. 1 臨床薬物動態試験

原則的に、製法変更前後のリポソーム製剤における薬物動態の同等性／同質性を評価するよう適切にデザインされたクロスオーバー試験により確認する必要があるが、消失半減期が長い場合などにおいては必ずしもクロスオーバー試験が適切でないこともあるので、特性を考慮した試験デザインを検討する。その際、リポソーム製剤や対象疾患によって、

³⁾ Szebeni J. Eur J Nanomed. 2012;4:33-53.

健康被験者を対象とすることが適切な場合と患者を対象とする方が適切な場合がある。また、通常の臨床試験は単回投与で行うが、反復投与により適切な評価が得られると考えられるリポソーム製剤については、反復投与での臨床試験も考慮する。投与量は、予定される臨床用量の範囲内で、薬物動態学的特性も踏まえて科学的に妥当な用量を選択する。採取する試料は原則として血液とする。適切にバリデーションを実施した生体分析法により、遊離有効成分及び総量、またリポソーム製剤の特性によっては封入有効成分を定量する。

製法変更前後のリポソーム製剤における薬物動態の同等性/同質性は、遊離有効成分及び総量の濃度について示す必要がある。主要な薬物動態パラメータとしては C_{max} 、AUC などが考えられるが、リポソーム製剤の薬物動態学的特性によっては、他の薬物動態パラメータによる評価が必要となる場合もある。同等性許容域については事前に規定しておく必要がある。設定した許容域の妥当性については、有効性及び安全性に与える影響の観点から科学的に十分な説明が必要である。

A 2. 2 その他の臨床試験

品質、非臨床、臨床薬物動態試験の結果を以てしても、製法変更前後における製剤の同等性/同質性を判断できない場合は、薬理効果又は臨床効果（効力を裏付ける薬理作用又は効能に対する治療効果）を指標とした臨床試験が必要となる。

A 2. 3 安全性事項

リポソーム製剤投与では、急性の輸注反応は比較的一般的に起こり得ることが知られている。製法変更により、このような反応のリスクが上昇する懸念がある場合は、その原因を明らかにし、場合によっては製剤設計を見直すことも必要である。また、急性の輸注反応に限らず、リポソーム製剤の安全性は、限られた非臨床、臨床試験成績で比較検討できる範囲は限られる。したがって、必要に応じて、製造販売後も引き続きリスク管理を行っていくことが重要である。

Guideline for the Development of Liposome Drug Products

(March 2016, MHLW, Japan)

Table of Contents

1. Introduction	3
2. Scope	3
3. Chemistry, manufacturing, and controls.....	4
3.1 Description and composition.....	4
3.2 Formulation development and characterization	4
3.2.1 Pharmaceutical development.....	4
3.2.2 Characterization of drug products	5
3.2.3 <i>In vitro</i> release test	8
3.3 Manufacturing process and process controls of liposome drug products.....	8
3.3.1 Process of formation of liposomes	9
3.3.2 Encapsulation process of the active substance in liposomes.....	9
3.3.3 Sizing process.....	9
3.3.4 Process for surface modification such as PEGylation	10
3.3.5 Sterilization process	10
3.4 Control of liposome components	10
3.4.1 Quality attributes	10
3.4.2 Manufacturing process and process control	11
3.4.3 Specifications	11
3.4.4 Stability	12
3.5 Control of liposome drug products.....	12
3.5.1 Specifications	12
3.5.2 Identification	12
3.5.3 Endotoxin test.....	12
3.5.4 Biological assay.....	13
3.6 Stability	13
3.7 Changes in the manufacturing.....	14
4. Nonclinical studies	15

4.1	Introduction	15
4.2	Nonclinical pharmacokinetics	16
4.2.1	Analytical methods	16
4.2.2	Pharmacokinetics	17
4.3	Nonclinical pharmacodynamics	19
4.4	Safety pharmacology	19
4.5	Toxicology	20
4.5.1	Toxicokinetics	20
4.5.2	Additional studies	21
5.	Considerations for first-in-human studies	21
6.	Glossary	22
	Related Guidelines	24
	Appendix: Comparability assessment of liposome drug products subject to changes in their manufacturing	27

1. Introduction

A liposome is a microvesicle composed of a bilayer of lipid amphipathic molecules, and usually encloses an aqueous compartment. Liposome drug products are formed when a liposome is used to encapsulate an active substance within the lipid bilayer or in the interior space of the liposome. Many liposome drug products are designed to improve the stability of encapsulated active substances *in vivo*, the pharmacokinetics (including tissue distribution profile) of the active substances, and intracellular behavior of the active substances. Therefore, to establish a safe and effective dose and dosage regimen of a new liposome drug product, the characterization of its pharmacokinetics, including its tissue distribution profile, is essential.

An active substance in a liposome drug product exhibits different tissue and/or intracellular distribution profiles compared to those of the same active substance when administered by itself, due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect or active targeting by the liposome modified with a ligand (targeting moiety) or antibody. Accordingly, the concentrations of active substances in the target tissue, cells, or intracellular organelle may differ between the dosage forms, even if the blood concentrations of active substances are similar. The pharmacokinetic data should, therefore, be carefully interpreted. In addition, as the target tissue and intracellular distributions are related to the quality attributes of the liposome, the physical, chemical, and biological properties of the liposome drug product (such as size and surface charge) also have to be evaluated. Furthermore, because liposomes are particles with diameter that can be readily recognized as foreign matter *in vivo* in many cases, it is critical to ensure appropriate *in vivo* stability in the design of the liposome.

The objective of this document is to facilitate the rational development of liposome drug products and their efficient regulatory review by identifying the points to be considered in the development of liposome drug products, and by presenting some examples required for the registration application.

2. Scope

This document applies to liposome drug products designed and manufactured to influence the stability of encapsulated active substances *in vivo*, and the pharmacokinetics (including tissue distribution profile) of the active substances, and intracellular distribution of the active substances. Although lipid-active substance mixtures and complexes in non-bilayer lipid form that are used to enhance encapsulation/solubilization/transportation of the active substance fall outside the scope of this document, the concepts described here would be helpful. This document mainly provides information regarding the pharmaceutical development and nonclinical and early clinical studies of liposome drug products. In addition, the principles outlined in this document are helpful to discuss post-marketing issues. Liposome drug products

described in this document are also subject to other relevant notifications and guidelines.

The active substances mentioned here include a low-molecular-weight chemical entity, a nucleic acid or a biological or biotechnological entity, including, for example, peptides and proteins.

3. Chemistry, manufacturing, and controls

Recommendations on the chemistry, manufacturing, and controls (CMC) described in this document focus on the specific aspects of liposome drug products. For general recommendations related to the quality of each active substance and excipient, refer to the relevant notifications and guidelines. Because the quality of liposome components such as lipids can affect the quality of whole liposome drug products, the quality of liposome components should be appropriately controlled, as described in Section 3.4.

3.1 Description and composition

Liposomes mainly consist of the active substance and lipid, but may contain functional lipids modified with, for example, polyethylene glycol (PEG) and/or ligand (targeting moiety). In addition, liposomal formulations contain excipients such as pH adjusters and stabilizers such as those found in general injections.

The following quality attributes are particularly important to define the properties of liposome drug products:

- Components of the liposome
- Quantities of the active substance and each lipid
- Molar ratio or percentage by weight of the lipid (including functional lipid) to the active substance

The formulation, including lipid composition, can largely affect the quality, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties, and safety profile of liposome drug products. With this in mind, the formulation development of the liposome drug product should be explained and justified (see Section 3.2).

3.2 Formulation development and characterization

3.2.1 Pharmaceutical development

The quality and nonclinical and clinical profiles required to achieve the purpose of use of liposomal formulation and to meet the intended use of the liposome drug product should be clarified. The development study should be conducted to establish that the drug product design (including the dosage form and formulation), quality attributes, manufacturing, container closure system, and usage instructions is appropriate for the purpose specified in the

registration application, and information on the development study should be described as a pharmaceutical development.

Liposome drug products may contain a liposome without the active substance encapsulated or, for liposomes modified with certain molecules (e.g., PEG, a ligand [targeting moiety], or antibody) on the lipid bilayer, liposomes may lack those molecules or have degenerated molecules in certain concentrations. Therefore, liposome drug products should not be recognized as an assembly of a single liposome. Consequently, formulation development and evaluation of quality attributes of the liposome drug product should be performed as a whole drug product, and the appropriate ranges should be established to ensure the desired quality of the product, taking the nonclinical and clinical data of the relevant lots into consideration. In addition, liposome drug products are pharmaceutically complex, and the end product testing alone is sometimes insufficient to define quality. Therefore, it is highly recommended that appropriate pharmaceutical development is undertaken based on the Quality by Design (QbD) concept as outlined in Q8(R2) and Q11 guidelines in the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). To ensure consistent drug product quality, a control strategy should be established based on the critical quality attributes and relevant parameters, and then the analytical procedures and specifications should be defined. The choice of the liposome components and the composition and function of each component should be described in relation to the quality target product profile (QTPP) and the performance of the drug product (e.g., active substance release, targeting delivery). In addition, investigations implemented on the development study should be clearly explained in terms of how variations in the formulation development, quality attributes (physical, chemical, and biological properties), and manufacturing process would affect the performance of the drug product. Where necessary, the impact on the pharmacokinetics, efficacy and safety profile of the liposome drug products should be investigated and evaluated as well.

3.2.2 Characterization of drug products

To ensure the safety and efficacy of the liposome drug products, it is important to identify the critical quality attributes that would affect its *in vivo* pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. As it is important to appropriately set the parameters of physical, chemical, and biological properties for these critical quality attributes in order to ensure the quality of the liposome drug product, multiple lots should be included in the detailed characterization and evaluated. For liposome drug products supplied as a lyophilized product for injection or an injectable powder, the reconstituted drug solution should be evaluated as

well.

Detailed physical, chemical, and biological characterizations will be useful in evaluating the impact of any changes in the manufacturing (see Section 3.7). For drug products containing molecules such as a protein and aptamer, whose conformation plays an important role in the function of the molecule as an active substance or molecules for liposome modification, the quality characterization, such as biological activities and immunological properties, should be identified and evaluated as the components and/or whole liposome drug product corresponding to the evaluation of biotechnological or biological products.

The following quality attributes are typical examples to be considered particularly for liposome drug products:

- Particle size distribution: The distribution should be expressed not only as the mean or median, but also in figures and as values of quantitative indicators, such as a polydispersity index. Determination of particle size is mainly performed by dynamic light scattering measurement, but for drug products with a large particle size, laser diffraction measurement is also used. If a dynamic light scattering measurement is used, it is important to select the appropriate distribution mode (e.g., count-base and/or volume-base distribution) and to clarify the selected mode.
- Morphology and/or structure of the liposome: The aggregation status and lamellar structure of the liposome should be examined. Image analysis techniques such as transmission electron microscopy, cryoelectron microscopy, atomic force microscopy, and small-angle X-ray scattering measurement can be used.
- Surface charge (zeta potential): Surface charge is usually a critical quality attribute because it has an impact on the *in vivo* clearance, tissue distribution, and intracellular uptake of the liposome. In general, the surface charge is evaluated as zeta potential, because it cannot be measured directly due to an electric double layer on the liposome surface formed by counter ions in the solution. Determination of surface charge is mainly performed by the electrophoretic light scattering (laser Doppler electrophoresis) method. As the zeta potential may vary depending on the compositions, pH, and electrical conductivity of the solvent used in the measurement, the testing conditions should be specified.
- Thermodynamic properties of the liposome membrane: The thermodynamic properties are evaluated by techniques such as differential scanning calorimetry and the temperature dependence of a fluorescence spectrum measured using a fluorescent probe for lipid membrane insertion. Thermodynamic properties such as exothermic and endothermic profiles are useful indicators of the fluidity and homogeneity of the lipid

bilayer membrane, even for liposomes whose definite phase transition temperature cannot be measured due to the presence of cholesterol or a highly lipophilic active substance.

- *In vitro* release characteristics of the active substance from liposome drug products: See Section 3.2.3.
- Osmolality: To prevent rupture or contraction of the liposome structure, the reconstituted drug solution should preferably be isotonic (approximately 280 mOsm/kg).
- pH: The pH of the dispersion fluid (external liquid phase) should be specified. If the properties and/or function of the liposome are expected to vary depending on a pH variation, an appropriate quality attribute should be identified for evaluation of the pH impact.
- Aggregation: As the aggregation and precipitation of liposomes may increase the incidence of the infusion reaction,¹ the aggregation status should be evaluated based on the appropriate test (e.g., turbidity measurement).
- Loading efficiency of the active substances: The active substance encapsulated in the liposome and the unencapsulated active substance are separated by solid-phase extraction, size exclusion chromatography, ultracentrifugation, gel filtration, or dialysis, and the amount of the active substance in each fraction is quantitatively measured by high performance liquid chromatography or a spectrophotometer.
- Impurities: Characterization of impurities should be made in accordance with the guidelines dealing with impurities in active substances and drug products (ICH Q3A, Q3B, Q3C, Q3D, and M7 guidelines). For liposome drug products in particular, material-related impurities, process-related impurities, product-related impurities (such as liposome aggregates and variants), and time-related degradation products should be carefully investigated, and the profiles of these impurities should be identified. The structure or forms of important impurities should be identified. When identification of an impurity is not feasible, a summary of the laboratory studies demonstrating the unsuccessful efforts to identify it should be included in the registration application.

The following additional characterization should also be considered depending on the characteristics of the liposome drug product:

- Physical state of the encapsulated active substance: The physical state of the encapsulated active substance should be characterized by electron microscopy or small-angle X-ray scattering measurement, especially in cases in which the physical state is critical in retaining the active substance (leakage of the active substance); for

¹ Szebeni J, et al. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63:1020–1030.

instance, when the encapsulated active substance is present in the form of a gel by using the ammonium sulfate gradient method for encapsulation of the active substance.

- For drug products in which the liposome surface is modified with a targeting molecule such as a ligand, the (conformational) structure, modification efficiency, and binding capability of the modified liposomes to the target cells should be investigated, because the modification may affect the affinity of the liposome to the target cells. If these characterizations are difficult, they may be substituted with a biological assay.

3.2.3 *In vitro* release test

To ensure that the liposome drug product has a consistent *in vivo* stability and active substance release profile, an *in vitro* release test should be established using a test solution that appropriately reflects physiological conditions. Multiple release test conditions should be set depending on the characteristics of the liposome, drug product design, or intended use. The release of active substances from liposomes should be monitored using a physiologically and/or clinically relevant medium (e.g., buffer solution or human plasma), with suitable agitation where necessary. Even if the *in vitro* release profile of the active substance does not completely reflect the *in vivo* profile, a discriminatory *in vitro* release test should be developed and justified, taking the following aspects into consideration, where necessary:

- Release profile of the active substance from the liposome in blood and target tissue
- For liposomes that are designed to release the active substance in response to an environmental change (e.g., a pH change) in the target tissue or endosome, release profiles of the active substance from the liposome that reflects the physiological environment.
- For liposomes that are designed to release the active substance in response to a temperature change or external stimulation, release profiles of the active substances from the liposomes resulting from the response to the expected temperature change or external stimulation.

3.3 Manufacturing process and process controls of liposome drug products

To ensure the quality of liposome drug products, it is important not only to implement intermediate and process controls in the manufacturing process and to perform quality tests on the final product, but also to develop an appropriate control strategy based on the understanding of the manufacturing process. As previously described in Section 3.2.1, liposome drug products are sensitive to variations in manufacturing parameters. Therefore, the variation factors should be sufficiently understood by accumulating knowledge about the manufacturing process (e.g. process parameters and variability of raw materials) through the

development process.

Although the manufacturing of liposome drug products differs depending on the active substance to be encapsulated, the type and properties of lipid components, and the function and properties of the liposome drug product, the following are typical examples of manufacturing processes. The process conditions, product properties, and process control test should be set and controlled, where necessary, based on the control strategy.

3.3.1 Process of formation of liposomes

The process should be designed so that homogeneous liposome can be robustly manufactured in each manufacturing lot. The lipid composition in the liposome must be controlled to ensure consistency among the lots. In addition, process parameters that have an impact on the structure of the liposome should be identified, and appropriate control ranges should be set.

During the process wherein liposomes are manufactured using lipid thin membranes or lipid suspensions as manufacturing intermediates, it is important to ensure the homogeneity and consistency of these intermediates. The hydration time, mixing speed, and temperature of the hydration process can be critical process parameters.

For liposomes encapsulating macromolecules such as proteins, the formation of liposomes and encapsulation of the active substance take place at the same time. Therefore, it is important to ensure that the loading efficiency of the active substance is within a certain range during the process of this liposome formation. In the mixing process, the type of the solvent, ionic strength, mixing speed, and mixing temperature can be critical process parameters.

3.3.2 Encapsulation process of the active substance in liposomes

The process should be designed and controlled to ensure that the loading efficiency of the active substance is consistent between lots. If the active substance is encapsulated based on a pH gradient or a difference in the solubility, critical process parameters that affect the loading efficiency include, for example, pH and composition of the aqueous phases inside and outside the liposome and operating conditions (e.g., temperature, time).

If a removal process of active substances that were not encapsulated in the liposomes is included, the process capability should be evaluated, and the amounts of unencapsulated active substances should be controlled.

3.3.3 Sizing process

The pharmacokinetic behavior of liposome drug products is largely affected by the particle size. If the particle size distribution of the manufactured liposomes is large, particle sizing is

performed.

If size exclusion chromatography is used for purification, the type of the chromatography resin and column scale, liposome load, chromatography conditions, and fractionation method should be optimized, and the results of the optimization study should be provided from the viewpoint of, for example, separation capacity.

In addition, if particle sizing is performed by extrusion through membrane filters, parameters such as the lipid concentration, temperature, pressure, and filter pore size would be important. If the extrusion is repeated or carried out in a stepwise manner with multiple filters, conditions such as the number of extrusion operations, combination of the filters, and the order should be studied, and the results of the study should be provided.

3.3.4 Process for surface modification such as PEGylation

In some liposome drug products, the surface is modified with PEG to maintain its *in vivo* stability, or modified with a ligand (targeting moiety) or antibody to improve targeting delivery. This process should be designed and controlled to ensure that the modification status of the liposome is consistent between lots, considering the purpose of the surface modification and the modification efficiency required to exhibit the function. Considering the limitations of the final product testing, it is particularly important to adequately control the quality of the modified lipids and the manufacturing process, as described in Section 3.4.

3.3.5 Sterilization process

As liposomes are unstable under operating conditions used in dry-heat sterilization and autoclaving, sterilizing filtration is widely used for sterilization of liposome drug products. The process capability of sterilizing filtration should be assessed by a bacterial challenge testing to justify the filter selection.

3.4 Control of liposome components

In liposome drug products, lipid components forming the lipid bilayer and molecules for liposome modification such as PEG, ligands (targeting moiety), or antibodies, contribute to an improvement in the *in vivo* stability, pharmacokinetics, and intracellular behavior of the active substance. Therefore, liposome components, especially ligands (targeting moiety) and antibodies that have a significant impact on the function of the drug product, should be evaluated and controlled to a greater extent than general excipients to ensure their intended properties.

3.4.1 Quality attributes

If the lipid is synthetic and expressed in a single structural formula, its structure should be generally elucidated by standard spectroscopic techniques. If the lipid is a natural mixture (e.g., soy lecithin and egg lecithin) or semisynthetic (e.g., hydrogenated soybean phosphatidylcholine [HSPC]), its lipid composition (i.e., percentage of each lipid) and the composition of fatty acid of lipid (i.e., percentage of each fatty acid) should be clarified, because the properties of the liposome drug product may change due to variations in lipid composition.

Lipids modified with polymers such as PEG or molecules for targeting delivery (e.g., ligands [targeting moieties]) should be structurally characterized, including the linker. The molecular weight distribution of PEG is particularly important, because it may have an impact on not only the *in vivo* stability of the liposome, but also on its particle size and release of the active substance.

3.4.2 Manufacturing process and process control

For synthetic and semisynthetic lipids, the starting material and manufacturing should be specified and appropriately controlled. Regarding the biological source used for the synthesis of semisynthetic lipids, the biological source (e.g., eggs) and supplier should be provided. If a synthetic and semisynthetic lipid is manufactured by the applicant or has been contracted, the specifications of the starting material, as well as the controls for the critical process and intermediates, should be defined, and the process parameters that have an impact on the quality of the lipid should be provided.

If a biological entity or biotechnology-derived recombinant protein is used as the starting material or raw material, or is directly used in the liposome drug product, it should be controlled and investigated in accordance with the requirements of the other notifications and guidelines relevant to such biotechnological/biological products.

3.4.3 Specifications

The impact of components of the lipid bilayer such as lipids and ligands (targeting moiety) on drug product quality should be investigated. Based on the study results, the tests should be adequately set, and the analytical procedures and specifications should be provided in detail. As the excipients should have properties that suit the intended use of the liposome drug product, even for those listed in the compendia, the analytical procedures and acceptance criteria may have to be additionally set and controlled in the following cases: where the properties relevant to drug product quality are not specified in the compendia, or where the intended drug product quality cannot be ensured by the control standard defined in the compendia. Validated analytical procedures should be used, and the specifications should

include at least the content (or strength) of the component, its identification, purity test, and an assay. To establish the reference standard or reference material, the preparation method, specifications, and analytical procedures, as well as the storage conditions and shelf life, should be described.

If a biological or biotechnological entity such as a protein is used, the specifications should be appropriately defined in accordance with the ICH Q6B guideline.

3.4.4 Stability

Lipids, especially those modified with a ligand (targeting moiety), should be sufficiently stable, as they are required to exhibit special functions compared with the general excipients in the drug product. The stability of such lipids should be appropriately evaluated in accordance with the concepts in the ICH Q1A(R2) guideline and/or ICH Q5C guideline to establish the retest date or shelf life.

3.5 Control of liposome drug products

3.5.1 Specifications

The analytical procedures and acceptance criteria should be set based on the Japanese Pharmacopeia and ICH Q6A or Q6B guidelines. In addition, tests specific to liposome drug products (e.g., loading efficiency of the active substance, release rate of the active substance, assay of lipid components, and degradation products) should be appropriately established where necessary. For the quality attributes that can change over time, acceptance criteria should be established, taking into consideration the effects on the pharmacokinetics, efficacy, and safety of the liposome drug product, and then the established acceptance criteria should be justified. Validated analytical procedures applicable to the liposome drug product should be established. These tests and the analytical procedures should be based on the properties selected to characterize the drug product, including those listed in Section 3.2.2, as appropriate. In particular, the following points should be considered in establishing the specifications for a liposome drug product.

3.5.2 Identification

The analytical procedures and acceptance criteria should be established, so that they can comprehensively ensure, in combination with the other specification tests, that liposome components such as lipids and molecules for liposome modification constitute the liposome appropriate for the purpose specified in the registration application.

3.5.3 Endotoxin test

Some liposome drug products are not compatible with the endotoxin test, failing to provide accurate values due to a cross-reaction between the lipid and lysate reagent.² Therefore, validation of the endotoxin test should be appropriately implemented. If the endotoxin test is not appropriately performed, the endotoxin should be controlled by the pyrogen test.

3.5.4 Biological assay

The biological activities of the components and/or the whole drug product should be evaluated where necessary, if the liposome drug products contain molecules such as a protein and aptamer, whose conformation plays an important role in the function of the molecule, as an active substance or a molecule for liposome modification.

To perform a biological assay with a liposome drug product, the reference material for the liposome drug product may have to be established. To establish the reference material, the manufacturing as well as the analytical procedures and acceptance criteria should be provided. To evaluate the stability of the reference material, characterization tests should be appropriately selected, and consistent quality attributes of the reference material throughout the shelf life should be ensured.

3.6 Stability

The stability study of liposome drug products should be conducted in accordance with the ICH Q1A(R2) guideline. If a biotechnological/biological product (biological entity or biotechnology-derived recombinant protein) is used as the active substance or liposome component, the concepts in the ICH Q5C guideline are also applied. Because the current state of knowledge on the stability of liposome drug products is limited, establishing the shelf life beyond the stability period confirmed via long-term stability testing is basically not acceptable.

As liposome drug products are pharmaceutically complex, stability testing should include not only those test items in the specification, but also additional specific characterization tests, where necessary, to thoroughly understand the changes in quality attributes over time. The following properties may be evaluated as important tests specific to liposome drug products:

- **Stability of each lipid component in the liposome drug product:**
Lipids with unsaturated acyl chains are subject to oxidative degradation, which then causes changes in phase transition temperature, consequently affecting the stability of the liposome. Both saturated and unsaturated lipids are subject to hydrolysis to form lysolipids and free fatty acids. Degradation of the lipids can deprive liposome drug products of their original function or lead to disintegration of the lipid bilayer structure. Therefore, it is important to clarify the extent of degradation of the lipids and the impact

²Dobrovolskaia MA, et al. *Nanomedicine* (London). 2010;5:555–562.

on the quality attributes of the liposome drug product.

- **Modification efficiency with molecules and their structural stability:**
Depending on the binding modality of PEG and other molecules for modification of liposome, those molecules can be gradually disassociated, leading to a decrease in modification efficiency. In addition, conformational changes may occur in PEG or other molecules for liposome modification due to long-term storage, depending on the type of aqueous phase outside of the liposome or the storage condition. If a decrease in modification efficiency or conformational change is observed, the impact on the quality attributes of the liposome drug product should be clarified.
- **Particle size distribution and aggregation:**
Liposomes are susceptible to fusion or aggregation during long-term storage. For instance, small unilamellar vesicles are susceptible to an increase in particle size as a consequence of fusion of the vesicles. Therefore, tests such as turbidity and particle size distribution should be set to evaluate these changes over time and the impact on the quality attributes of the liposome drug product.
- **Loading efficiency:**
Leakage of the encapsulated active substance may be observed, irrespective of whether the lipid bilayer structure of the liposome is disintegrated or intact. Therefore, the changes of the loading efficiency over time and the impact on the quality attributes of the liposome drug product should be evaluated.

3.7 Changes in the manufacturing

Because liposome drug products are different from general low-molecular-weight chemical drug products, it is not possible to provide recommendations on the standard dataset to demonstrate that the change has not adversely affected the quality of the drug product.

In addition to the specifications for the drug product, tests relevant to the physical, chemical, and biological properties that may be affected by the change in manufacturing should be identified, taking into consideration the properties of the liposome drug product, the control strategy, and the type of change. Using those tests, the liposome drug products should be evaluated to confirm that the quality before and after the changes made in the manufacturing is comparable. The concepts outlined in the ICH Q5E guideline (Note for Guidance on Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process) should be considered for assessing the comparability of liposome drug products before and after changes are made in the manufacturing. If the extent of the change is significant and the data on quality attributes are unlikely to assist in determining whether pre- and post-change product are comparable, or if comparability of the drug product quality cannot be explained

based on the physical, chemical, and biological properties, the impact of the change on the pharmacokinetics, efficacy, and safety of the liposome drug product should be evaluated and investigated, taking the content in the Appendix into account.

The properties of liposome drug products are considered to be more sensitive to the scale-up than those of conventional low-molecular-weight drug products. Therefore, scale dependency should be carefully evaluated. For instance, a scale-up of the extrusion process for sizing of the liposome may involve changes in the pressurization method and filter type. A scale-up of the purification process using size exclusion chromatography will involve a change in the column scale, which in turn requires a change in the fractionation condition (e.g., flow rate and liposome load). The relationship of these process changes with the quality attributes of the liposome drug product should be thoroughly investigated to confirm that the quality of pre- and post-change liposome drug products is comparable.

Changes relevant to the manufacturing principle, the loading method of the active substance, the weight ratio of lipids to the active substance, composition of the lipid bilayer, and surface modification process of the liposome could affect the efficacy and safety of the liposome drug product, and such changes will require special consideration.

A change in the manufacturing after confirmatory trials requires a comparability assessment of the liposome drug products as comprehensively and thoroughly as those required for the post-approval change.

4. Nonclinical studies

4.1 Introduction

Significant changes in pharmacokinetic characteristics can occur when an active substance is administered as a liposome drug product from those of the active substance administered by itself (i.e., changes in distribution volume and clearance, extension of the half-life, or a change in *in vivo* distribution may occur). Consequently, significant differences not only in the pharmacokinetic characteristics but also in the efficacy and safety of the active substance can be observed when the active substance is administered as a liposome drug product.

After being delivered to the tissue, the liposome usually exhibits the pharmacodynamic response through the following processes: the liposome is incorporated into the cells and then releases the active substance, or the active substance is extracellularly released from the liposome and then incorporated into the cells.

In general, the pharmacokinetic characteristics of the liposome drug product could be dependent on:

- Clearance of the liposome encapsulating active substance
- Release rate of the encapsulated active substance from the liposome

- Distribution of the liposome (changes in organ and/or tissue distribution and the amount of distributed active substances)
- Interaction of the liposome or active substance with plasma or serum protein, blood cells, or vascular endothelium

The rate and location of *in vivo* active substance release is a crucial parameter, which often determines the pharmacological effect and safety. An attempt should be made to develop the necessary methodology to understand the active substance release profile.

Nonclinical studies should be conducted using a well-characterized liposome drug product equivalent to the drug product for clinical use, and the release rate of active substance and product stability should be known under the chosen test conditions.

4.2 Nonclinical pharmacokinetics

4.2.1 Analytical methods

Analytical techniques should be developed that are capable of measuring the concentrations of active substances (in total and unencapsulated forms and where necessary encapsulated form) in blood, plasma or serum, and the total concentration of active substance in organs and/or tissues. Depending on the properties of the liposome drug product (e.g., release properties of active substances *in vivo*), it may be important to measure the concentrations of active substances encapsulated in the liposome. If a liposome component is predicted to affect safety, analytical techniques that are capable of measuring the concentration of liposome components should be developed.

The concentrations of active substances that are not separated into the encapsulated and unencapsulated forms in the blood, plasma, or serum sample at each time point after administration should be measured as the "total concentration," along with the unencapsulated active substance concentration. Although the concentrations of the active substance in the unencapsulated forms as well as in total in the blood, plasma, or serum can be measured, measurement of the unencapsulated active substance concentration in organs and/or tissues may be difficult because the liposome can disintegrate during sample processing. Careful attention should be paid to appropriately control the sample processing procedures during the course of method development in order to verify the suitability and interpretability of the obtained bioanalytical results.

The analytical technique used to measure the active substance concentration (in total and unencapsulated forms and where necessary encapsulated form) in the blood, plasma, or serum, and concentration of the total active substance in organs and/or tissues and metabolites should be validated, and such validation practices should be described. The references for such validation may include the PFSB/ELD Notification No. 0711-1 "Guideline for validation of

bioanalytical methods in drug development” (dated July 11, 2013) and PFSB/ELD Notification No. 0401-1 “Guideline for validation of bioanalytical methods (ligand-binding method) in drug development” (dated April 1, 2014).

4.2.2 Pharmacokinetics

The pharmacokinetic behavior of a liposome drug product can be largely different from that of the active substance administered in a non-liposomal form, and this difference may have a remarkable impact on the efficacy and safety of the product. It is therefore important to compare the *in vivo* pharmacokinetics of the active substance administered by itself and the liposome drug product. When the *in vivo* pharmacokinetics and active substance release are investigated, the selection of animal species and animal model should be justified, with careful consideration of the following points: the expected clinical application of the liposome drug product, liposome composition, the properties of the active substance, and blood concentration and tissue distribution including the accumulation and retention in the target organ and/or tissue of both the active substance and liposome drug product. If ligands (targeting moiety) or antibodies are conjugated to the liposome surface to provide targeting delivery, the animal species and model should be selected considering the differences in the expression and distribution of the receptor or epitope between the selected animal species and humans.

As the quality attributes of liposomes such as the size, surface charge, morphology, and surface modification with a ligand (targeting moiety) or antibody may affect the *in vivo* distribution of a liposome drug product, the impact of variations in such properties on the *in vivo* distribution should be assessed. Investigating the relationship between the quality attributes and *in vivo* distribution will help justification of the product specifications in the future. In addition to the recommendations in the ICH S3 (S3A and S3B), S6(R1), and M3(R2) guidelines, the following factors are important in assessing the liposome drug product:

- It is useful to explain the purpose and significance of the liposome formulation by comparing the pharmacokinetics of the liposome drug product and the active substance administered by itself.
- The appropriate pharmacokinetic parameters such as the C_{max}, area under the curve (AUC), and half-life of the total active substances and unencapsulated active substance in the blood, plasma, or serum should be analyzed, and changes in the pharmacokinetics of the active substance due to the liposome formulation should be discussed.
- The pharmacokinetic parameters should be measured at different dose levels and at appropriate time points.
- Distribution of the liposome drug products in organs and/or tissues relevant to proposed clinical use and route of administration should be evaluated. Specifically, total amounts

of active substance in organs and/or tissues are required. A distribution time profile should be obtained using adequate sampling time points and sampling duration so as to accurately quantify the time course of the active substances.

- Some factors should be considered for the sampling schedules, such as sampling time points and sampling duration (e.g., the liposome stability after administration, and the profile of localization to specific organs and/or tissues). In particular, samples taken in the initial distribution phase (e.g., <15 min) are considered informative for calculating the distribution volume to estimate the stability of liposome in blood circulation (i.e., stability related to the initial burst of the liposome).
- If data on the concentration of the unencapsulated active substance in the relevant organs and/or tissues with regard to the safety and efficacy of the liposome drug product are not available on account of difficulties in the analytical technique, attempts to measure the metabolites are useful.
- Study design details such as sampling method and sampling time points will affect precision of derived parameters. The appropriate dose levels, necessary sampling schedule, and the number of animals should be carefully determined.
- It is desirable to analyze the distribution of liposome drug product in organs and/or tissues associated with the safety and efficacy of the liposome drug product, as well as those involved in major metabolism and elimination of liposomes. Organs with safety concerns include the reticuloendothelial system, important organs related to clearance, and organs with accumulation potential (e.g., liver, spleen, kidneys, bone marrow, lungs, and heart), as well as organs protected by a blood-tissue barrier (e.g., the brain and testes).
- Measurement of active substance metabolites in blood, plasma, or serum (and also the organs and/or tissues, if possible) is especially important when the metabolite is acknowledged to be the primary active compound. If one or more metabolites have substantial clinical activity, it is recommended to compare their pharmacokinetics and, where necessary, toxicokinetics, to determine accumulation following multiple doses.
- It may also be important to consider the protein and cellular interactions of intravenously administered liposome because this factor is known to have the potential to influence the distribution, stability, and safety of liposome drug products.
- It is also useful to understand the pharmacokinetic behavior of the liposome drug product using an appropriate animal model and imaging technique.
- A ligand (targeting moiety) or antibody on the liposome surface can have a substantial impact on the tissue distribution and intracellular distribution of the liposome. It should be noted that these modifications can change the accumulation of liposome drug product,

not only in target organs and/or tissues, but also in the other organs and/or tissues.

- The metabolic and excretion pathways of the active substance of a liposome drug product should be evaluated, because such an evaluation is linked to the safety and efficacy evaluation of the drug product. If a liposome component is predicted to affect safety, the distribution, metabolic, and excretion pathways of the component should be evaluated, where necessary.

4.3 Nonclinical pharmacodynamics

The nonclinical pharmacodynamic studies should include demonstration of pharmacodynamic response in appropriately justified *in vitro* (where possible) and *in vivo* models. *In vivo* evaluation should involve an appropriate route of administration, justified dose levels, and a justified dosing regimen, depending on the proposed clinical application. Appropriateness of the pharmacological model should be discussed in respect of the pharmacokinetic behavior of the liposome drug product, as well as the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the active substance when administered by itself.

The chemical composition and physicochemical properties (including size, surface charge, and the release rate of the active substance) of a liposome drug product affect pharmacodynamic properties. Some important factors to consider when designing studies to discuss the mechanisms of action include:

- The location and rate of *in vivo* active substance release.
- The binding of the liposomes to the target cells if a ligand (targeting moiety) or antibody is conjugated to the liposome surface.
- The intracellular fate of the liposomes (including lipids or other components) following cellular entry by endocytosis or other mechanism, if the intracellular release of the active substance plays an important role in exhibiting the pharmacodynamic effect.

The pharmacodynamic effect of the liposome drug products should be assessed using *in vitro* (where possible) and *in vivo* pharmacodynamic models. The development of *in vitro* tests capable of characterizing any interaction between liposomes and target cells is encouraged. If a ligand (targeting moiety) or antibody is conjugated to the liposome surface, the pharmacological action derived from the ligand (targeting moiety) or antibody should be determined in addition to the affinity to the target cells. Failure to use both *in vitro* and *in vivo* models to assess the pharmacodynamic effects of the liposomes should be extensively justified using the evaluation method and the result by the applicant.

4.4 Safety pharmacology

For liposome drug products (e.g., those that fall outside the scope of ICH S9 and require the

safety pharmacology evaluation), safety pharmacology studies should be conducted in accordance with ICH M3(R2), ICH S7A, and ICH S7B, and in consideration of Section 4.5.

4.5 Toxicology

In principle, the nonclinical evaluation of toxicities of liposome drug products should be equivalent to the evaluation for drug with new active ingredients. The toxicity studies of the liposome drug product should be conducted to assess the toxicological profile and exposure-response relations according to the ICH safety guidelines and M3(R2) guideline in consideration of the following points:

- If a toxicity evaluation of the active substance administered by itself has already been completed, the toxicity of the liposome drug product using the same clinical route of administration as the active substance administered by itself should be evaluated by means of a short-term repeated-dose toxicity study using the intended clinical route of administration in one animal species. The obtained toxicity profile and toxicokinetic data should be compared with those of the active substance administered by itself. Based on the results, studies necessary for toxicity evaluation of the liposome drug product should be conducted from the generally conducted toxicity studies for drugs with new active ingredients.
- When the active substance is novel and toxicity and toxicokinetic data are unavailable, toxicity and exposure evaluations should be performed for the liposome drug product based on the ICH nonclinical safety guidelines. When the active substance is likely to be present in blood circulation in the unencapsulated form, it may be necessary to perform repeated-dose toxicity studies of the active substance alone in appropriate animal species, using the intended clinical route of administration, and to compare the obtained toxicity and toxicokinetic data with those of the liposome drug product.
- Safety evaluation of the liposome components as excipients can be performed with the complete drug formulation (the whole liposome drug product) if the intention is to have the components approved exclusively for that drug product. However, a toxicity evaluation of the components alone may be required when a suitable toxicity evaluation derived from the liposome components cannot be performed by using only the whole liposome drug product (e.g., because of novel toxicity concerns derived from the lipid structure or the potential for accumulation of the liposome components).

4.5.1 Toxicokinetics

In addition to blood, plasma, or serum concentration, measurement of the active substance in the target organs and/or tissues and toxicologically relevant organs and/or tissues is useful for toxicity evaluation of liposome drug products.

4.5.2 Additional studies

Depending on the physicochemical and/or pharmacokinetic characteristics of the liposome drug product and/or the lipids used for its manufacture, histological and functional evaluation of target organs may be necessary.

Acute infusion reactions are relatively common with liposome drug products. The use of *in vitro* and *in vivo* studies such as complement activation assays (and/or macrophage/basophil activation assays) and studies in appropriate animal models should be considered in order to evaluate the potential adverse events.

Studies to investigate hematotoxicity, antigenicity, and/or immunotoxicity (ICH S8) should be considered depending on the characteristics of the liposome drug product, including the characteristics of the liposome or the pharmacological properties of the active substance.

5. Considerations for first-in-human studies

Liposome drug products are often designed to influence the stability of encapsulated active substances *in vivo*, the pharmacokinetics (including tissue distribution profile) of the active substances, and intracellular distribution of the active substance. Therefore, in addition to the information recommended in the ICH S3 (S3A and S3B), S6(R1), M3(R2), and the PFSB/ELD Notification No. 0402-1 "Guidance for establishing safety in first-in-human studies during drug development" (dated April 2, 2012), when considering the first-in-human studies, it will be essential to consider information specific to the liposome drug product (e.g., nonclinical pharmacokinetic data of the liposome drug product and the active substance, proposed clinical use, and route of administration).

In a nonclinical pharmacokinetic study, the time course of liposome drug products for the total active substance, unencapsulated active substance, and metabolites (and encapsulated active substance, depending on the properties of the liposome drug product) should be quantified before first-in-human studies conducted using pharmacokinetic parameters, sampling time points and durations that have been carefully selected, as follows:

- Pharmacokinetic parameters such as C_{max} , AUC, and half-life, both for the total active substances, and for unencapsulated active substances in the blood, plasma, or serum.
- A sufficient number of samples should be collected to adequately describe the plasma concentration-time profile. Frequent sampling at early time points is considered useful for providing reliable information about the initial distribution process. In general, the sampling schedule should be designed to provide a reliable estimate of the total extent of exposure.
- Distribution of liposome drug products in target lesions and major organs: During evaluation, the total amount of the active substance in the target lesion and major organs

should be measured at the time points that enable the estimation of the plasma concentration time profile over an adequate period of time.

The starting dose for first-in-human studies should be chosen in compliance with ICH M3(R2) and "Guidance for establishing safety in first-in-human studies during drug development," and by considering all related nonclinical data, including critical product attributes, pharmacological dose-response, pharmacokinetics, and pharmacological/toxicological profile as discussed in Section 3 (Chemistry, manufacturing, and controls) and Section 4 (Nonclinical studies) above.

Dose-limiting toxicity in humans can be determined in a similar way to that of conventional drugs, except for hypersensitivity reactions, because these reactions are not always dose dependent.

Potential critical quality attributes for each liposome drug product should be identified and used to evaluate consistency as discussed in Section 3. Consistency of the quality attributes should be confirmed between the products used for the first-in-human studies and those for nonclinical studies, and test procedures should be established before the commencement of first-in-human studies. If the manufacturing process (including the scale-up) used to prepare a liposome drug product for nonclinical studies is changed before the first-in-human studies are conducted, comparability should be demonstrated.

The stability of the liposome drug product must be ensured throughout the first-in-human studies by using the stability test.

6. Glossary

The purpose of this glossary is to describe terms as they are used in this document.

- 1) EPR effect: When a nanoparticle or high molecular protein that would not usually leak through an intact blood vessel is steadily circulated in the blood without being trapped by the reticuloendothelial system, the molecule preferentially leaks into solid tumors and accumulates there due to its microvascular hyperpermeability and impaired lymphatic drainage. This phenomenon is called the EPR effect.

- 2) Liposome: A liposome is a microvesicle composed of a bilayer of lipid amphipathic molecules enclosing an interior compartment. Liposome drug products are formed when a liposome is used to encapsulate an active substance within the lipid bilayer or in the interior space of the liposome.

- 3) Loading efficiency of the active substance: (Amount of the active substance encapsulated in the liposome/amount of the total active substance in the drug product) \times 100 (%).
- 4) Unencapsulated active substance: An active substance present in the drug product that is not incorporated within the lipid bilayer or in the interior space of the liposome. In this guideline, the term “unencapsulated” does not suggest the disassociation of active substances from plasma or serum proteins. The concentration of active substances that are not separated into the encapsulated active substances within the lipid bilayer or in the interior space of the liposome and unencapsulated active substances is referred to as the “total concentration.”
- 5) Initial burst of liposome: The release of active substances from liposome drug product immediately after intravenous administration of a liposome drug product before being delivered to the target organs and/or tissues.

Related Guidelines

- ICH Harmonised Tripartite Guideline Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2) [June 3, 2003, PMSB/ELD Notification No.0603001]
- ICH Impurities in New drug Substances Q3A(R2) [December 16, 2002, PMSB/ELD Notification No.1216001]
- ICH Impurities in New drug Products Q3B(R2) [June24, 2003, PMSB/ELD Notification No.0624001]
- ICH Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R3) [March 30, 1998, PMSB/ELD Notification No.307]
- ICH Guideline for Elemental Impurities Q3D [September 30, 2015, PFSB/ELD Notification No. 0930-4]
- ICH Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/biological product Q5C [January 6, 1998, PMSB/ELD Notification No.6]
- ICH Note for Guidance on Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process Q5E [April 26, 2005, PFSB/ELD Notification No.0426001]
- ICH Quality of biotechnological/biological products Q5A(R1)-Q5D [February 22, 2000, PMSB/ELD Notification No.329 (Q5A(R1)), January 6, 1998, PMSB/ELD Notification No.3 (Q5B), and July 14, 2000, PMSB/ELD Notification No.873 (Q5D)]
- ICH Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances Q6A [May 1, 2001, PMSB/ELD Notification No.568]
- ICH Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products Q6B [May 1, 2001, PMSB/ELD Notification No.571]
- ICH Pharmaceutical Development Q8(R2) [June 28, 2010, PFSB/ELD Notification No.0628-1]
- ICH Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/ Biological Entities) Q11 [July 10, 2014, PFSB/ELD Notification No.0710-9]
- ICH Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies S3A [July 2, 1996, PMSB/ELD Notification No.443]
- ICH Pharmacokinetics: Guidance for Repeated Dose Tissue Distribution Studies S3B [July 2, 1996, PMSB/ELD Notification No.442]

- ICH Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (Rodent and Non rodent Toxicity Testing) S4 [April 5, 1999, PMSB/ELD Notification No.655]
- ICH Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals S6(R1) [March 23, 2012, PFSB/ELD Notification No.0323-1]
- ICH Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals S7A [June 21, 2001, PMSB/ELD Notification No.902]
- ICH The Non-clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals S7B [October 23, 2009, PFSB/ELD Notification No.1023-4]
- ICH Immunotoxicology Studies for Human Pharmaceuticals S8 [April 18, 2006, PFSB/ELD Notification No.0418001]
- ICH Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals S9 [June 4, 2010, PFSB/ELD Notification No.0604-1]
- ICH Safety [April 14, 1997, PMSB/ELD Notification No.315 (S1A), July 9, 1998, PMSB/ELD Notification No. 548 (S1B), November 27, 2008 PFSB/ELD Notification No. 1127001 (S1C(R2)), September 20, 2012, PFSB/ELD Notification No.0920-2 (S2(R1)), August 10, 1993, PMSB/ELD Notification No.88 (S4), April 5, 1999 PMSB/ELD Notification No.655 (S4A), April 14, 1997, PMSB/ELD Notification No.316 (S5A, S5B), December 27 2000, PMSB/ELD Notification No.1834 (S5B(M)), May 21, 2014, PFSB/ELD Notification No.0521-1 (S10)]
- ICH Pharmacovigilance Planning E2E [September 16, 2005, PFSB/ELD Notification No.0916001 and PFSB/SD Notification No.0916001]
- ICH Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals M3(R2) [February 19, 2010, PFSB/ELD Notification No.0219-4]
- ICH Assessment and Control of DNAreactive (Mutagenic) impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk M7 [November 10, 2015, PSEHB/ELD Notification No.1110-3]
- Guidelines for Non-clinical Pharmacokinetic Studies [June 26, 1998, PMSB/ELD Notification No. 496]
- Clinical Pharmacokinetics Studies on Drugs [June 1, 2001, PMSB/ELD Notification No. 796]
- Guidance for Establishing Safety in First-in-Human Studies during Drug Development [April 2, 2012, PFSB/ELD Notification No. 0402-1]
- Guideline for Validation of Bioanalytical Methods in Drug Development [July 11, 2013, PFSB/ELD Notification No. 0711-1]

- Joint MHLW/EMA Reflection Paper on the Development of Block Copolymer Micelle Medicinal Products [January 10, 2014, PFSB/ELD Notification No.0110-1]
- Guideline for Validation of Bioanalytical Methods (Ligand-Binding Method) in Drug Development [April 1, 2014, PFSB/ELD Notification No. 0401-1]

Appendix

Comparability assessment of liposome drug products subject to changes in their manufacturing

The comparability of liposome drug products before and after the change in manufacturing can be determined based solely on quality considerations, if the applicant can ensure that any differences in quality attributes have no adverse impact upon safety or efficacy of the drug product through analytical studies, as suggested in this document (see Section 3 [Chemistry, manufacturing, and controls]). Additional evidence from nonclinical or clinical studies is required when quality data are insufficient to establish comparability.

A1. Nonclinical studies

For details on nonclinical studies, see Section 4 (Nonclinical studies). The combination of nonclinical studies for comparability assessment will be determined on a case-by-case basis, taking various factors into consideration, including: the extent of the change in manufacturing, the development stage, the complexity of the liposome drug product, and pharmacological properties.

A1.1 Nonclinical pharmacokinetics

Some of the pharmacokinetic properties of the liposome drug product in humans may be predicted based on the data from animal models, as well as *in vitro* cell culture models. The choice of animal species and model should be justified considering the purpose, nature, and extent of the change in manufacturing, as well as the impact on the quality attributes and pharmacokinetic properties. In addition, study conditions such as the dose levels, dosing schedule, and measurement parameters (pharmacokinetics of the total active substance and unencapsulated active substances and where necessary encapsulated active substances) should be justified from the viewpoint of the nature of the changes in manufacturing as well as the impact on the quality attributes and pharmacokinetic properties.

For instance, changes in the manufacturing or manufacturing process such as lipid hydration, blending of lipids, and sizing of the liposome can have an impact on the size, size distribution, morphology (including aggregation), and *in vitro* release rate of the liposome drug product. For liposome drug products whose surface is modified with a ligand (targeting moiety) or antibody, such changes can have impact on the modification efficiency. A detailed comparison of the quality attributes between the liposome drug products before and after these changes shows some similarity, but fails to reach a conclusion in terms of the impact on drug safety and efficacy due to, for example, limitations of the analytical procedures used. In such situations,

nonclinical pharmacokinetics studies comparing organ and/or tissue distribution and elimination should be considered in addition to the comparison of the blood concentrations and pharmacokinetic parameters.

A1.2 Nonclinical pharmacodynamics

It is recommended that *in vitro* studies be developed to characterize interactions of the liposome with target cells as well as with other cells of toxicological concern, if possible. Because it is recognized that the current state of knowledge on *in vitro* studies is limited, similarities in pharmacodynamic response should be evaluated in a comprehensive manner using appropriate *in vivo* models, taking the sensitivity of the model into consideration.

For instance, changes made to the lipid hydration or blending process or quality grade of the lipid can affect the lipid fluidity or homogeneity of the lipid composition, which consequently has an impact on the drug release and loading efficiency of the active substance. Although these pre- and post-change products appear similar, some differences have been identified in the comparison of quality attributes, and a possible impact on efficacy profiles is not clear. In such situations, the applicant should consider the comparison through pharmacodynamic studies. Furthermore, interactions between the liposome and target cells can affect pharmacodynamics. Therefore, if a change is observed in the following quality attributes that could have an impact on the interactions between the liposome and target cells after the change in manufacturing, the comparison through pharmacodynamic studies should be considered: size, size distribution, morphology (including aggregation), *in vitro* release rate, and modification rate for the liposome drug product whose surface is modified with a ligand (targeting moiety) or antibody.

A1.3 Nonclinical toxicity

In general, further toxicity studies are not needed if similar quality attributes between the pre- and post-change product are confirmed in the quality characterization studies. However, in the following cases, some outcomes of the comparability studies on quality attributes can lead to additional toxicity studies. For instance, if the change in manufacturing introduces new impurities, depending on the impurity type and amount, it might be appropriate to conduct toxicity studies to confirm that there is no adverse impact on safety of the post-change drug product. The change of size, size distribution, morphology (including aggregation), and surface modification of liposome with a ligand (targeting moiety) or antibody caused by the manufacturing changes can affect the tissue and organ distribution. If processes affecting these attributes (e.g., hydration and blending of lipids, and sizing of liposome) are changed, and a detailed comparison of the quality attributes between the pre- and post-change liposome drug

products has shown some similarity (but possible adverse impact on safety and efficacy profiles cannot be excluded), the applicant should consider performing toxicity studies to evaluate the impact of some differences in quality attributes on clinical safety and efficacy.

Infusion reactions by administration of liposome drug products mostly depend on the lipid composition of the liposome. Changes in the manufacturing may not increase the incidence of these reactions as long as the lipid composition remains unchanged. If a change in the manufacturing process or a change in pH or its composition of the aqueous phases outside of the liposome results in an increase in aggregates, size, or size distribution of the liposome, or different loading efficiency, a toxicity study (see Section 4.5) should be considered to evaluate the extent of potential adverse events.³

A2 Clinical studies

When quality and nonclinical data are insufficient to establish the comparability of a liposome drug product, additional evidence from clinical studies is required.

A2.1 Clinical pharmacokinetic studies

In principle, cross-over studies designed to appropriately evaluate the comparability of the pharmacokinetics between the pre- and post-change liposome drug products should be employed. However, cross-over studies are not appropriate in some cases (e.g., with liposome drug products with a long half-life). In these circumstances, adequate study design should be determined in consideration of the properties of the liposome drug product. The selection of subjects (i.e., healthy volunteers or patients) should be determined depending on the properties of the liposome drug product and target indications. In general, a single-dose study should be conducted. However, if a multiple-dose administration will provide a suitable evaluation, multiple-dose pharmacokinetic studies should also be considered. Dose levels should be determined based on the pharmacokinetic properties of the product within the proposed clinical dose level, and should be scientifically sound. In principle, blood samples should be collected. The unencapsulated active substance and total active substance (and depending on the properties of the liposome drug product, the encapsulated active substances) should be quantified using validated bioanalytical methods.

The comparability of the pharmacokinetics of an unencapsulated active substance and total active substance should be determined between the pre- and post-change liposome drug product. The primary pharmacokinetic parameters are, for example, C_{max} and AUC. Studies using other parameters might be required depending on the pharmacokinetic properties of the liposome drug product. The comparability limits for the pharmacokinetic parameters should be

³ Szebeni J. *Eur J Nanomed.* 2012;4:33–53.

defined prior to conducting the study and scientifically justified taking into consideration the effects on the pharmacokinetics, efficacy, and safety of the liposome drug product.

A2.2 Other clinical studies

If data from quality, nonclinical, and clinical pharmacokinetic studies have failed to demonstrate the comparability between drug products before and after the change in manufacturing, additional clinical studies are required (i.e., pharmacodynamic studies indicated by pharmacological effects supporting therapeutic efficacy or clinical efficacy studies indicated by the therapeutic effectiveness in indications).

A2.3 Safety issues

Acute infusion reactions are relatively common following the administration of liposome drug products. If there is any concern that the change in manufacturing would increase the risk of such reactions, the cause should be identified and, where necessary, the formulation development should be also reviewed. Not limited to acute infusion reactions, the safety of liposome drug products has to be compared based on the limited nonclinical and clinical data. Therefore, it is important to continue risk management efforts where necessary, even after marketing has begun.