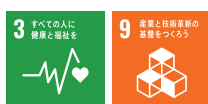


核酸医薬品の不純物等の構造解析と品質評価への取り組み

株式会社住化分析センター
 大阪ラボラトリー
 韋 宏
 医薬事業部
 長 野 裕 夫
 大分ラボラトリー
 高 橋 友 章



はじめに

核酸医薬品は、生物の遺伝情報をつかさどるデオキシリボ核酸 (DNA) やリボ核酸 (RNA) の構成成分であるヌクレオチドおよびその誘導体を基本骨格とする医薬品の総称である。従来の低分子医薬品や抗体医薬品とは異なり、DNAまたはRNAのレベルで生体に作用することから、がんのほか、遺伝性疾患や難治性疾患に対する新しい治療薬として期待されている。2020年からの3年間に日米欧で計9品目が承認¹⁾され、国内でも多くの製薬企業が核酸医薬品の研究開発に取り組んでいる。なお、核酸医薬品は生体内の酵素で分解されやすいことから、化学修飾による安定化技術や標的分子まで薬を送達するためのDrug Delivery System技術の開発も活発に行われている。

核酸医薬品の品質管理における課題

一般に核酸医薬品は固相合成により製造され、その過程において目的成分以外に同じような構造を有するオリゴヌクレオチドが不純物として複数生成する。固相担体から切り出した後に精製されるもののこれらの不純物を除去することが難しいため、純度が95%程度にとどまることが多い²⁾。オリゴヌクレオチド不純物は、標的外の遺伝子 (オフターゲット) に作用し、毒性を発現させることから、核酸医薬品の品質を担保するため、これら不純物の種類と量を正しく評価し管理することは重要である。しかしながら、目的成分とオリゴヌクレオチド不純物は物理的・化学的性質も類似しているためクロマトグラフィー等で分離することは難しく、不純物の構造同定や品質評価法の開発もまた技術的な課題である。

2018年に厚生労働省から「核酸医薬品の品質の担保と評価において考慮すべき事項について」³⁾が発出され、核酸医薬品の開発時に把握すべき構造特性や不純物管理の考え方が示された。しかしながら、その分析技術の難しさから、低分子医薬品では示されている不純物の管理戦略として重要な構造決定や安全性確認が必要とされる不純物量の閾値^{いきち}に関する見解が示されていない⁴⁾。このため、核酸医薬品の製造販売承認申請では品目ごとに目的成分の特性に応じた不純物の管理戦略が申請者によって説明され、個々に当局で審査されているが、核酸医薬品を病気に苦しむ患者に少しでも早く届けることができるよう、審査要件が明確になることが望まれてきた。そこで、核酸医薬品に係る規制科学の推進のための基礎データの取得と社会実装に向けた実用化の加速のため、2021年度から国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) において産官学による核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発プロジェクトが5カ年計画で立ち上げられた⁵⁾。当社も本プロジェクトに参画し製薬企業等における核酸医薬品の研究開発に寄与すべく、当社が多くの経験を有するLC/MSを用いて分析基盤技術の開発に取り組んでいる。

核酸医薬品の承認申請で求められる分析技術

これまでに承認された核酸医薬品の審査報告書を参考に、特性解析および品質規格で求められる特徴的な分析手法をまとめた (Table 1)。また、直近の承認品目では2次元LC/MS (2D-LC/MS) によるオリゴヌクレオチド不純物の特性解析が示されており^{6),7)}、本技術の重要性が高まっている。以下に、当社における

Table 1 Characteristic analysis methods for oligonucleotide therapeutics

Evaluations	Analysis methods
Characterization	LC/MS, MS-MS sequencing, melting temperature (UV/VIS), sodium counter-ion content, UV, FT-IR, CD, 1D-NMR (^1H , ^{13}C , ^{19}F and ^{31}P), DSC, TGA, 2D-LC/MS
Specifications	
Identification	IPRP-LC/MS, melting temperature (UV/VIS)
Purity	IPRP-HPLC (non-denaturing/denaturing), AEX-HPLC (non-denaturing/denaturing)
Sodium counter-ion content	Atomic absorption spectrophotometry, ICP-OES
Assay	UV absorption

2D-LC/MSの分析事例と上述のAMEDのプロジェクトで実施したUV検出と質量分析を組み合わせた分析法により、分離困難な不純物を評価した事例を紹介する。

1. 2D-LC/MS分析例

上市されている核酸医薬品には、生体中での分解を抑える目的でホスホロチオエート型の修飾 (S化) ヌクレオチドが多く採用されている。この修飾核酸では一部の硫黄原子が酸素原子に変換されたオリゴヌクレオチド (PSPO変換体) が製造工程不純物として生成する。PSPO変換体は、核酸医薬品の品質管理で汎用されるイオンペア逆相クロマトグラフィー

(IPRP) では目的成分 (Full Length Product : FLP) との分離が困難である。また、陰イオン交換クロマトグラフィー (AEX) ではFLPとの分離は可能であるが、不揮発性塩を高濃度で含む移動相を使用する必要があるため質量分析計に直結して測定できない。この課題に対して2D-LC/MSシステムでは、オンラインの脱塩と2次元目のIPRPによる分離から質量分析を行うことで不純物の構造解析が可能となる。以下に、20塩基長のS化オリゴヌクレオチドON_1 (配列 : 5'-atggattcagagtcagagtc-3' ; 小文字 : DNA ; 組成式 : $\text{C}_{197}\text{H}_{246}\text{N}_{79}\text{O}_{98}\text{P}_{19}\text{S}_{19}$) を分析した事例を紹介する。

1次元目 (^1D) で水酸化ナトリウムと過塩素酸ナトリウムを含む移動相でAEXを実施して分析対象のピー

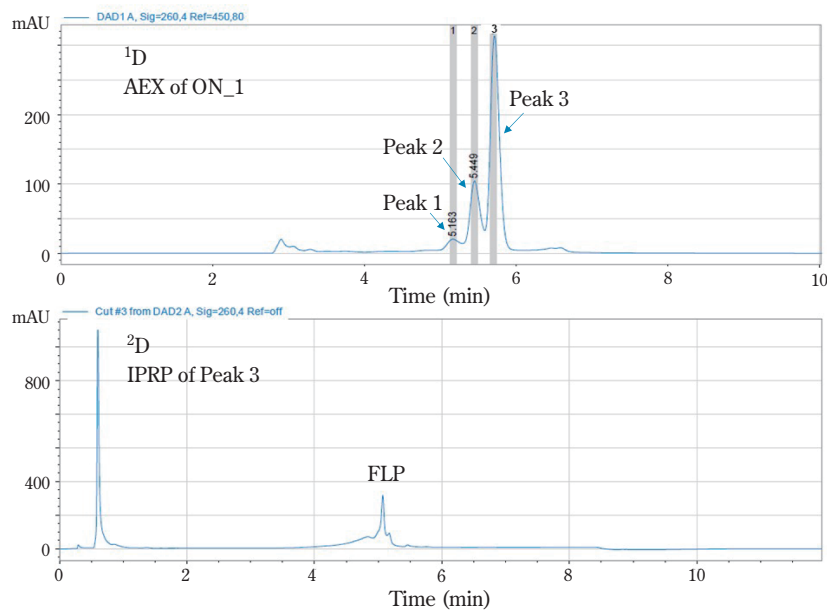


Fig. 1 2D-Liquid chromatograms of ON_1 (^1D : AEX of ON_1; ^2D : IPRP of Peak 3)

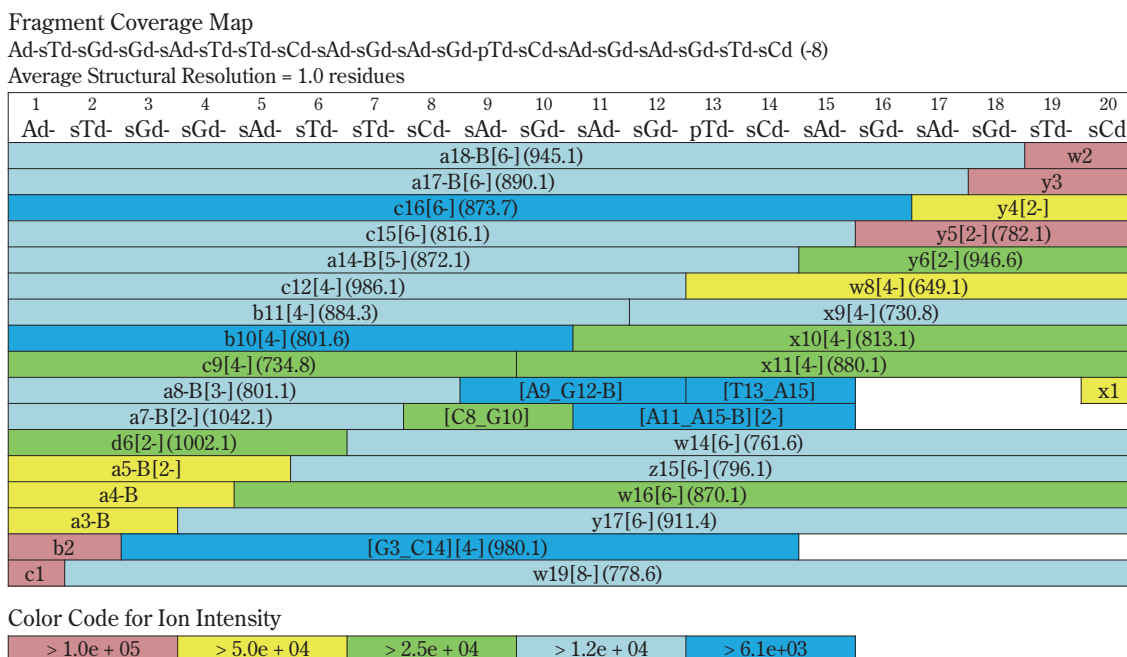


Fig. 2 Fragment coverage map for PSPO impurity of peak 2 in Fig. 1

クをループにトラップし、2次元目 (2D) のヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) とトリエチルアミン (TEA) を添加したIPRPを用いて脱塩と分離を行って質量分析を実施した。1次元目のAEXでON_1を分析したところ、3ピークが検出された (Fig. 1)。これらのピークをそれぞれループにトラップし、2次元目のIPRPおよび質量分析を行ったところ、質量スペクトルをデコンボリューション処理した精密質量から、保持時間の早い順に6449.685、6465.672および6481.648のモノアイソトピック質量 (Mi) を得た。計算精密質量と比較してそれらの構造を解析したところ、それぞれPSPO変換が2カ所発生した不純物 (Mi計算値: 6449.686)、PSPO変換が1カ所の不純物 (Mi計算値: 6465.663) およびFLP (Mi計算値: 6481.640) であることが明らかとなった。また、これらの成分につき同時にMS/MS測定を実施し、解析ソフト (BioPharma Finder 4.1) を用いて配列解析を行ったところ、配列情報からも同様の解析結果が得られた (Fig. 2)。このように、2D-LC/MSにより分離困難なオリゴヌクレオチド不純物を同定することができた。

2. LC/MS分析例

既承認の核酸医薬品と同一の配列を有するS化オリ

ゴヌクレオチドON_2 (配列: 5'-T^mCTTGg^{tt}a^mcat-gaaAT^mC^mC^mC-3'; 小文字: DNA; 大文字: 2'-O-(2-methoxyethyl)-RNA; ^mC: 2'-O-(2-methoxyethyl)-5-methylcytidine; ^mc: 2'-deoxy-5-methylcytidine; 組成式: C₂₃₀H₃₁₈N₆₉O₁₂₁P₁₉S₁₉) を用いて不純物の分析方法を検討した。別途合成したヌクレオチド欠損体 (N-1 (T))、(N-1 (^mC))、(N-3 (T^mCT))、ヌクレオチド付加体 (N+1 (T)) およびPSPO変換体を代表的な不純物としてON_2に添加し、分析検体を調製した。分離モード、カラム、移動条件等、種々分離条件を検討したものの全ての不純物を完全に分離することはできなかった。そこで、ヘキサフルオロ-2-プロパノールおよびヘキシルアミンを添加したIPRPで分離を行い、UV検出と質量分析を組み合わせることで定量分析を行った事例を次に紹介する。

ON_2はリン原子の立体異性に由来するジアステレオマーの混合物であるため、LCにおける各ピークはブロードであった (Fig. 3)。また、FLPとPSPO変換体は分離せず、N-1 (T) とN-1 (^mC) は分離不十分であったため、これら成分の正確な量はUVクロマトグラムからは算出できなかった。そこで、UVピークの面積百分率と質量スペクトルのイオン強度を使用して各成分の定量化を試みた。

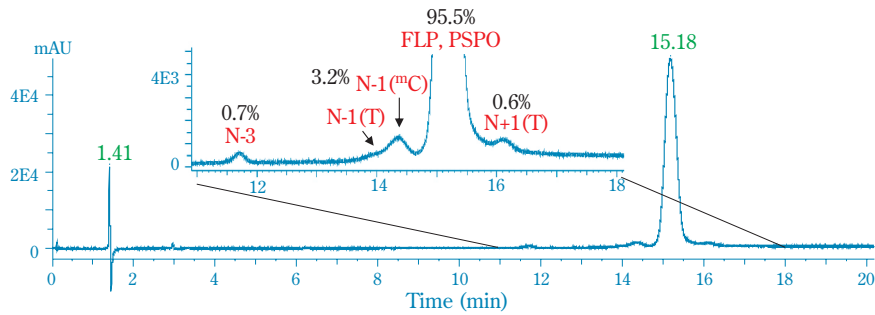


Fig. 3 LC/UV chromatogram of ON_2 spiked sample

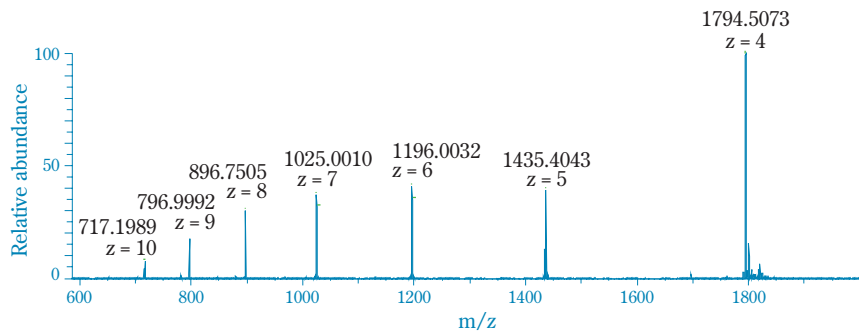


Fig. 4 Mass spectra of the highest peak of ON_2 spiked sample (RT: 15.18 at Fig. 3)

Table 2 Monoisotopic masses of the components in ON_2 spiked sample

No	Component	Monoisotopic mass (Measured)	Monoisotopic mass (Calculated)
1	N+1 (T)	7572.113	7572.116
2	FLP	7178.057	7178.056
3	PSPO	7162.075	7162.079
4	N-1 (^m C)	6784.986	6784.980
5	N-1 (T)	6783.985	6783.996
6	N-3	5996.852	5996.860

各UVピークの質量スペクトルでは電荷数の異なる複数の種類のイオンが検出された (Fig. 4)。得られた質量スペクトルをデコンボリューション処理し、モノアイソトピック質量の測定値と計算値の比較から各成分の構造同定を行った (Table 2)。次に、UVクロマトグラムで重なった成分は質量分析におけるイオン化効率率が同一と仮定し、質量スペクトルで求めた相対イオン強度比から算出した換算係数を乗じてFLP、PSPO、N-1 (T) およびN-1 (^mC) の相対量 (%) をそれぞれ算出した (Table 3)。結果、UVクロマトグ

Table 3 Relative contents of the components calculated by UV area percentage and relative ion intensity

No	Component	UV Area percentage (%)	MS Relative ion intensity (%)	Conversion factor	Relative content (%)
1	N+1 (T)	0.6	0.5	-	0.6
2	FLP	95.5	92.6	0.964	92.0
3	PSPO		3.5	0.036	3.5
4	N-1 (^m C)	3.2	2.2	0.733	2.3
5	N-1 (T)		0.8	0.267	0.9
6	N-3	0.7	0.4	-	0.7

ラムから算出できなかった成分であっても、質量スペクトルの結果と組み合わせることによりその量を把握できた。なお、定量値を評価する際には、核酸の鎖長の違いなどによる質量分析のイオン化効率の違いやマトリックス効果について考慮する必要がある。

核酸医薬品のオリゴヌクレオチド不純物は、目的成分と物理的・化学的な性質が類似しているため、クロマトグラフィーにより全ての不純物を分離することは困難である場合が多い。今回紹介した2D-LC/MSやUVと質量分析を組み合わせた検出方法は、不純物の定性・定量評価に極めて有用であると考えている。

おわりに

当社は1995年から医薬品関連の分析試験を、主に製薬会社から受託している。大阪および大分にある医薬品の分析を担当するラボラトリーは、国内PMDAや米国FDAなどの規制当局からの査察のほか、顧客から毎年数多くの監査を受け、信頼性の高い品質保証システムを構築してきた。特に、大阪ラボラトリーでは構造解析や試験法開発を得意とし、大分ラボラトリーは住友化学株式会社のグループ会社の医薬品の出荷試験に長年従事してデータの質は高い評価を得ている。2023年からは住友化学株式会社大分工場で製造される核酸に関する原薬やその原料・中間体の出荷試験なども受託しており、核酸医薬品を含め、広く医薬品の研究開発の一役を担うことで、引き続き医薬品産業の発展に貢献していきたい。

謝辞

本研究の一部内容はAMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業「核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発」プロジェクト（代表：大阪大学 小比賀 聡 教授）による支援の成果である。

引用文献

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所, “日米欧のいずれかで承認された核酸医薬品”, 遺伝子医薬部ホームページ, <https://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/section2-1.pdf> (参照2024/02/22).
- 2) 山口 卓男, SCAS NEWS, 2023-I, 3 (2023).
- 3) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長, “核酸医薬品の品質の担保と評価において考慮すべき事項について”, 薬生薬審発0927第3号, (2018).
- 4) 関口 光明 ほか, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 51(1), 11 (2020).
- 5) 川上 純司, PHARM TECH JAPAN, 38(12), 2017 (2022).
- 6) (独法) 医薬品医療機器総合機構, “審議結果報告書”, (1991), https://www.pmda.go.jp/drugs/2021/P20210629002/112773000_30300AMX00292_A100_1.pdf (参照2024/02/22).
- 7) (独法) 医薬品医療機器総合機構, “審議結果報告書”, (1992), https://www.pmda.go.jp/drugs/2022/P20221005002/112773000_30400AMX00432_A100_1.pdf (参照2024/02/22).