

核酸医薬品の品質評価 – 2D-LC/MSによる不純物の分離および構造解析 –

大阪ラボラトリー 荻原 毅・韋 宏

1 はじめに

低分子医薬品や抗体医薬品などの既存の医薬品に代わり、オリゴ核酸を基本骨格とする核酸医薬品が注目を集めています¹⁾。これまでの核酸医薬開発では生体内における安定性、有効性や輸送システムに課題がありましたが、修飾核酸技術やDDS（ドラッグデリバリーシステム）技術が進展したことで、局所投与のみならず全身投与でも高い薬効や安定性を持つ候補品が次々と開発されています²⁾。

核酸医薬品は十数から数十塩基長のオリゴヌクレオチドで構成されており、化学合成によって製造されます。多くの核酸医薬品はDNAやRNAなどの天然に存在する核酸を基本構造として塩基、糖およびリン酸のいずれか、もしくはすべてに化学的な修飾がされている構造を持ちます。核酸医薬品は作用の観点だけでなく化学的性質の観点からも従来の医薬品とは異なる性質を有しているため、多くの場合において、従来の医薬品のようにUV検出器を用いた逆相クロマトグラフィーだけではすべての不純物を分離することが困難です³⁾。そこで検出器に質量分析計を用いることや、複数のクロマトグラフィー手法を組み合わせることで不純物の評価をすることによる課題の解決が求められています。

当社では長年、低分子や高分子医薬品の構造解析に取り組んできましたが、先述の核酸医薬品の課題に対応するために、2種類の異なる1次元（1D）LCの分離モードを直交的に組み合わせる2次元LC（2D-LC）：1290 Infinity II Bio 2D-LCに、高感度、高質量精度および高分解能に加えて多段階MS/MSおよび m/z 8,000までの分析が可能な質量分析計Orbitrap Eclipse™ Tribrid™を接続した最新鋭の2D-LC/MSシステムを新たに導入しました。また、日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業「RNA標的創薬技術開発/核酸医薬品実用化のための製造及び分析基盤技術開発」」に参画し、様々な構造を有する核酸医薬品の分析技術の開発や、核酸医薬品の品質管理に関するガイドラインの設定に資するデータの収集に取り組んでいます。

2 2D-LC/MSを用いた核酸医薬品の分析例

現在上市されている核酸医薬品は、生体中での分解を抑える目的でリン酸部の酸素原子が硫黄原子に置換されているホスホロチオエート型の修飾核酸が多く採用されています。この修飾では、酸素原子から硫黄原子への置換不良により生じる「PS→PO置換体」と呼ばれる製造工程不純物が発生します。PS→PO置換体は、核酸医薬品の品質管理において最も使用されるイオンペア逆相クロマトグラフィー（IP-RP; Ion Pair Reversed Phase Chromatography）では分離が困難で、陰イオン交換クロマトグラフィー（AEX; Anion Exchange Chromatography）では分離しやすいことが知られています。しかし、AEXで高分離を達成するためには高濃度の塩や高pHの塩を含む不揮発性移動相を使用する必要があり、質量分析計に直結して測定することができません。この課題に対して2D-LC/MSシステムを用いることで、2次元目のLCによる更なる分離および脱塩を経た質量分析が可能となります。

この事例として、1次元目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を用いるAEXにより分析対象のピークを切替パルスによって収集ループに一旦分取した後、2次元目のヘキサフルオロ-2-プロパノール（HFIP）とトリエチルアミン

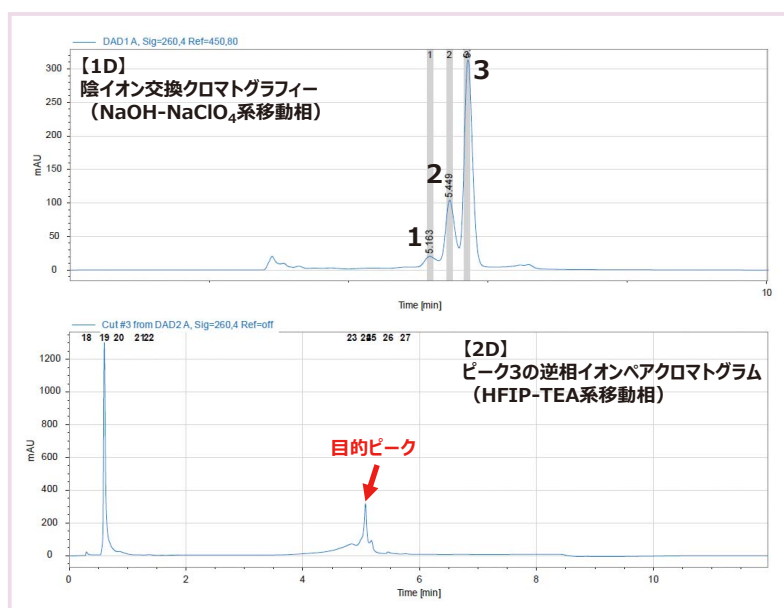


図1 1Dおよび2DのLC/UVクロマトグラム

(TEA) を添加したIP-RPで脱塩と分離を行い、質量分析を実施した内容を紹介しします。塩基数が20のホスホロチオエート核酸^{*1}試料を1次元目のAEXで分析したところ、3ピークが検出されました(図1)。これらのピークをそれぞれループに分取し、それぞれ2次元目のIP-RPおよび質量分析を実施しました。得られたデータをデコンボリューション処理した精密質量より、AEXで得られた3ピークは保持時間の早い順に分子量が6,449.685、6,465.672、および6,481.648であり、それぞれ2箇所がPS→POに置換されたもの、1箇所がPS→POに置換されたもの、および主成分であることが推察されました。さらにこれらの成分について同時にMS/MS測定を行い、解析ソフト(BioPharma FinderTM 4.1)を用いて配列解析を実施しました。その結果、配列情報からもPS→PO置換体であると同定いたしました(図2)。

従来の不明成分を1D-LC分取してから解析する方法では、多量の試料と労力、時間を費やしていたのに対して、本システムを用いてオンライン分取することで、短時間かつ自動での分析が可能です。また、高感度な質量分析計を使用することで、微量の試料からの解析も可能です。

3 2D-LC/MS技術の応用

当社の2D-LC/MSシステムは核酸医薬品だけでなく、抗体医薬品やペプチド医薬品など、従来の1D-LCでは分離や質量分析が困難な分析対象物の不純物分析や構造解析にも対応することができます。

例えば、抗体のチャージバリエーション(電荷不均一性)分析では、1次元目の陽イオン交換クロマトグラフィーで分離を行い、2次元目のLC/MS分析で各種チャージバリエーションの分子量を測定することが可能です。また、抗体薬物複合体の薬物抗体比分析ではサイズ排除クロマトグラフィーによる分析が行われます。ここで不純物として低分子量領域に検出される成分の同定も可能です。

また、本システムは、医薬品分野だけではなく、化成品原料中の不明不純物の解析などにおいても実力を発揮します。

本システムと長年培った2D-LC/MS分離や構造解析技術のノウハウを駆使し、研究開発から承認申請、そして医薬品の上市後まで、お客様の一助となるよう低分子から中分子、高分子の医薬品の不純物分離および構造解析の課題解決に取り組んで参ります。

注 釈

※1 本試料はIntegrated DNA Technologies, Inc.に合成依頼して入手した。

文 献

- 1) 井上貴雄: 実験医学, **37**, 1, 2 (2019) .
- 2) 横田隆徳: 実験医学, **39**, 17増刊, 2 (2021) .
- 3) 関口光明, 伊藤浩介, 齊藤隼, 滝口直美, 製薬協核酸医薬品質評価タスクフォース, 吉田徳幸, 小比賀聡, 井上貴雄: 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **51**, 1, 11 (2020) .

Fragment Coverage Map

Ad-sTd-sGd-sAd-sTd-sTd-sCd-sAd-sGd-sAd-sGd-pTd-sCd-sAd-sGd-sAd-sGd-sTd-sCd (-8)

Average Structural Resolution = 1.0 residues

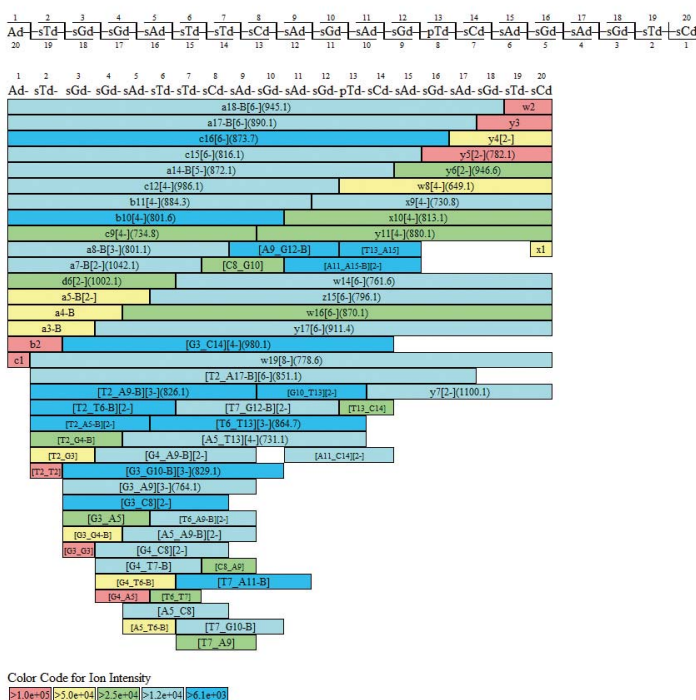


図2 PS→PO置換体(1箇所)のMS/MSフラグメント解析のマッピング結果



荻原 毅
(おぎはら つよし)
大阪ラボラトリー



韋 宏
(い こう)
大阪ラボラトリー