

核酸医薬品の品質評価 — 原薬および合成原料の分析例 —

大阪ラボラトリー 韋 宏・荻原 毅 / 医薬事業部 長野 裕夫

核酸医薬品は、従来の低分子医薬やバイオ医薬では治療が困難であった疾患に対する次世代医薬品として期待されている。しかし、核酸医薬品は、オリゴ核酸（原薬）の合成過程において構造や性質がよく似た不純物が多数生成される可能性があり、それらの分離分析が困難なことから、その品質評価が難しい。そのため、オリゴ核酸およびその合成原料の純度分析に用いられる高速液体クロマトグラフィー（HPLC）において分離困難な不純物が存在することを踏まえて、複数の分析手法の組み合わせにより、総合的に品質を評価することが望まれている。本稿では、当社で提供を開始した核磁気共鳴分光法（NMR）による核酸合成原料のホスホロアミダイトの品質評価事例と高速液体クロマトグラフィー / 質量分析（LC/UV/MS）によるオリゴ核酸における不純物の分析事例を紹介する。

1 はじめに

核酸医薬品は、化学合成により製造された十数から数十塩基長のオリゴ核酸で構成されており、遺伝性疾患、癌や内分泌・代謝系疾患など、従来の低分子医薬やバイオ医薬では治療が困難であった疾患に対する次世代医薬品として期待されている。核酸医薬品は、構造や作用機序によって siRNA やアンチセンス核酸、miRNA やアプタマー、デコイ核酸、CpG オリゴ核酸などに分類される。これらは細胞内の標的遺伝子の mRNA 分解・阻害、細胞外の標的タンパク質の機能阻害、細胞表層のタンパク質に作用しての免疫賦活といった機序で作用する。

2 合成、精製および分析上の課題

核酸医薬品の有効成分であるオリゴ核酸（原薬）は、アミダイトを出発原料とし、固相担体上でトリチル基除去、縮合、リン原子の酸化や硫化、キャッピングなどの合成サイクルを繰り返す重合反応により合成される。重合体は固相担体からアンモニア等で切り出され、リン酸ジエステル部や塩基部の脱保護を経て HPLC 等で精製し、さらに限外ろ過濃縮、凍結乾燥を経てオリゴ核酸として製造される。この合成法では、塩基伸長不良、塩基過剰伸長、硫化不良、保護基の除去不良や塩基脱離等により様々な不純物が生成される。それらは、オリゴ核酸（原薬）とだけでなく不純物間でも構造や物性が類似しているため、分離が難しい¹⁾。

このようなオリゴ核酸（原薬）を製造する上での課題に対し、国内では、「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（平成 30 年 9 月 27 日付薬生薬審発 0927 第 3 号）」²⁾ が発出された。そこでは、開発初期から市販後までのオリゴ核酸の品質の一貫性を説明する上でオリゴヌクレオチド類縁物質の詳細かつ多角的なプロファイリング検討が必要であることが言及されている。また、その他の不純物の管理として、低分子不純物、残留溶媒や元素不純物は、ICH ガイドライン Q3 および M7 を参照することとなっている。

3 分析事例

3.1 ³¹P NMR によるホスホロアミダイトの品質評価

3.1.1 ホスホロアミダイトの不純物の影響

固相合成において、オリゴ核酸の伸長反応に関与するホスホロアミダイト中の不純物は、最終生成物の品質に影響を与えることが知られている。ホスホロアミダイト中の不純物例を図 1 に示す³⁾。不純物 1～4 は反応性がなく、合成の過程や精製工程で除去される。しかし、不純物 5～9 は、反応性があり、塩基伸長反応において最終生成物の構造に取り込まれ、不純物となる可能性が高い。しかし、最終生成物からこれらの不純物を選択的に除去することは極めて困難である⁴⁾。そのため、アミダイトの不純物プロファイルをあらかじめ検証し、管理する必要がある。

3.1.2 ホスホロアミダイトの品質評価の課題

ホスホロアミダイトの品質評価では、HPLC や LC/MS が一般的に用いられるが、ホスホロアミダイトは水に不安定なため、

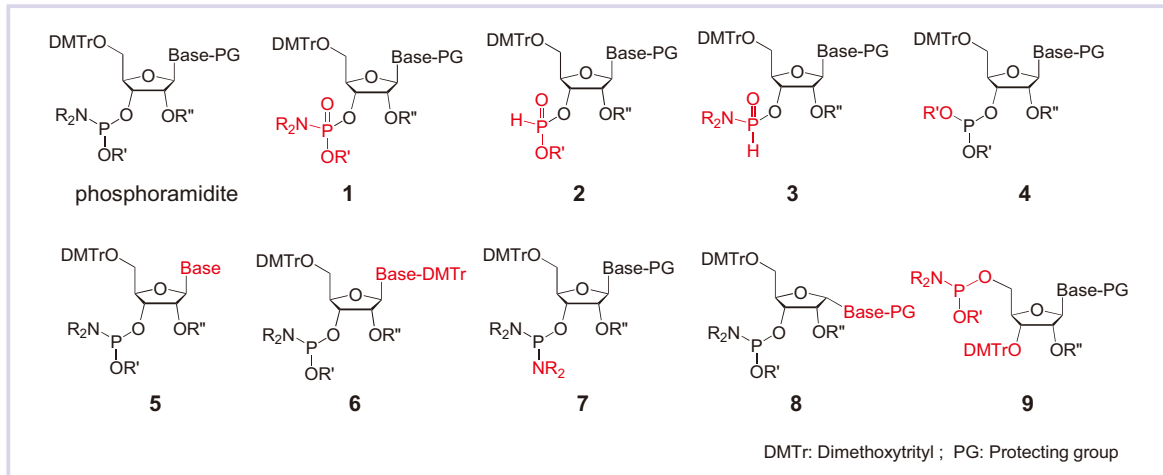


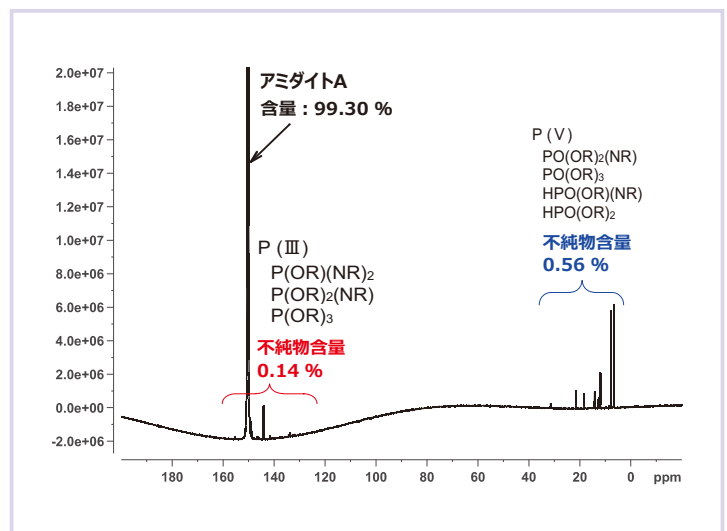
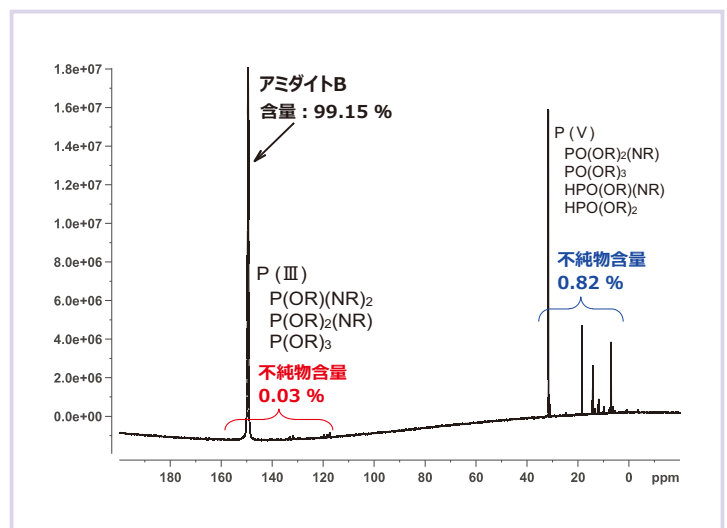
図1 ホスホロアミダイトおよび推定不純物の例 (1~9)

移動相に含まれる水によるアミダイトの分解に留意しなければならない。また、検出感度または分離が不十分な場合、HPLCやLC/MSで検出できない不純物も存在する。一方、NMRを用いる際は、有機溶媒を使用するため水分の影響を受けにくく、加えてHPLCやLC/MSで検出が困難な成分も検出可能とされている。以下、 ^{31}P NMRによるホスホロアミダイトの純度分析を試みた結果を示す。

3.1.3 ホスホロアミダイトの分析例

市販のホスホロアミダイト A (成績書：含量 100 %，HPLC法) および B (成績書：含量 99.5 %，HPLC法) について、 ^{31}P NMRを測定し、解析した。150 ppm 付近に主成分、120 ~ 160 ppm、0 ~ 35 ppm に不純物由来のシグナルが検出された。120 ~ 160 ppm のシグナルは、垂リン酸エステルアミド [$P(OR)_2(NR)$ 、 $P(OR)(NR)_2$]、垂リン酸トリエステル [$P(OR)_3$] 等の 3 価リン由来であると推定され、0 ~ 35 ppm のシグナルは、ホスホン酸エステル [$HPO(OR)(NR)$ 、 $HPO(OR)_2$] およびリン酸エステル [$PO(OR)_2(NR)$ 、 $PO(OR)_3$] の 5 価リン由来であると推定された。これらのうち、垂リン酸エステルアミド (図1 不純物 5 ~ 9 に該当する) は、最終生成物に取り込まれ、品質に影響を与える可能性が高いため、120 ~ 160 ppm に検出される不純物の量を把握することが重要である。

次に、シグナルの面積値より各成分の面積百分率を算出した (図2、図3)。ホスホロアミダイト A、B 共に、

図2 ホスホロアミダイトAの ^{31}P NMR分析結果図3 ホスホロアミダイトBの ^{31}P NMR分析結果

主成分は99%以上となり、大きな差はなかったが、120～160 ppmに検出された3価リン由来の不純物の総量は、ホスホロアミダイトAでは0.14%、ホスホロアミダイトBは0.03%であった。仮にこれらを合成原料としてそれぞれ20 merのオリゴ核酸を合成した場合、当該核酸原薬に残留する3価リン由来の不純物の総量は、アミダイトAを用いると2.8%、アミダイトBでは0.6%になると推測される⁴⁾。

3.1.4 考察

本検討により、NMRによりHPLCで検出できないリン酸に関連する不純物の評価が可能となり、さらに、HPLCよりも低い濃度レベルで定量できる可能性も示唆された。そして、今回の事例では、アミダイトの品質評価にNMRによる3価リン由来の不純物を加えるとHPLCによるアミダイト純度による優劣評価を覆すこととなった。このことから、³¹P NMRの120～160 ppm付近のシグナルを3価リン由来の不純物とする評価系を既存の品質管理の手法に加えることの有用性があると考えられる。

3.2 LC/UV/MSによる合成過程のオリゴ核酸の不純物評価

3.2.1 オリゴ核酸の不純物評価の課題

合成プロセスを最適化する際、最終生成物であるオリゴ核酸(原薬)に含まれる主な不純物の構造や量を把握するため、製造過程のオリゴ核酸の不純物評価が必要となる。LC/UVの面積百分率による不純物評価は、低分子医薬では一般的な手法である。オリゴ核酸においても、その不純物のモル吸光係数が同等なことから、イオン化効率の影響を受けるLC/MSよりも量を正確に求めることができるとされている。しかし、HPLCで分離できない不純物は、LC/UVによる評価ができない。

一方、LC/MSは構造情報が取得できるだけでなく、抽出イオン強度による定量評価にも使用されている。本項ではLC/MSによる不純物の定性分析を行い、定性された不純物について、LC/UV(260 nm)を用いた含量評価とLC/MSの抽出イオン強度を用いた相対含量評価の比較を実施した。

3.2.2 LC/UV/MSによるオリゴ核酸の不純物評価

ホスホロチオエート型オリゴ核酸の合成品D(FLPの配列:5'-ATGGATTCAGAGTCAGAGTC-3';精密質量:6481.6402)をイオンペア逆相LC/MSで測定した。

一例として、FLPピーク(保持時間9.18分)に含まれる成分の分析方法を示す。

- ①ピーク面積値よりLC/UVの面積百分率を求めた。FLPピークの面積百分率は85.4%であった(図4a)。
- ②モノアイソトピックイオンのデータよりFLPピーク中の各成分の精密質量を算出した(図4e, 4f)。
- ③FLPの構造情報およびFLPピーク中の各成分の精密質量から各成分の構造を推定した(表1)。
- ④LC/MSの抽出イオンの強度より、FLPピークに含まれる各成分の抽出イオン百分率を求めた(表1)。
- ⑤LC/UVで得られたFLPピークの面積百分率(85.4%)およびLC/MSで得られた抽出イオン百分率を用いて、FLPピークから検出された各成分の相対含量を求めた(表1)。

その結果、LC/UVにおいて検出されたFLPピーク中には、FLP以外にPS→PO置換体、ヌクレオチド欠損体(n-1)、ヌクレオチド付加体(n+1)およびメチルアミン付加体が含まれていることがLC/MSの構造解析により確認された。さらに、FLP、各不純物のイオン化効率は同等であると仮定し、FLP面積百分率(85.4%)および抽出イオン百分率から各不純物の相対含量を算出した(表1)。

3.2.3 LC/MSによる含量評価結果の検証

LC/MSの抽出イオン強度を用いた相対含量評価の正確性を確認するため、イオンペア逆相HPLCでFLPと分離が出来なかったPS→PO置換体について、アニオン交換HPLC(AEX-HPLC)を用いてFLPと完全に分離し、LC/UVでFLPとPS→PO置換体の割合を求めたところ、LC/MSで得られた相対含量比と一致した。

3.2.4 考察

本事例では、LC/UV/MSを用いたオリゴ核酸の不純物の構造を解析するとともに、分離困難な不純物の含量評価も可能であることを示した。HPLCで分離が困難な不純物については、物理的・化学的に類似しているため、イオン化効率は同程度であると考えられる。したがって、核酸医薬品のように不純物のHPLC分離が難しい場合でも、LC/MSを適切に組み合わせることにより、不純物を正確に評価することができたと考える。

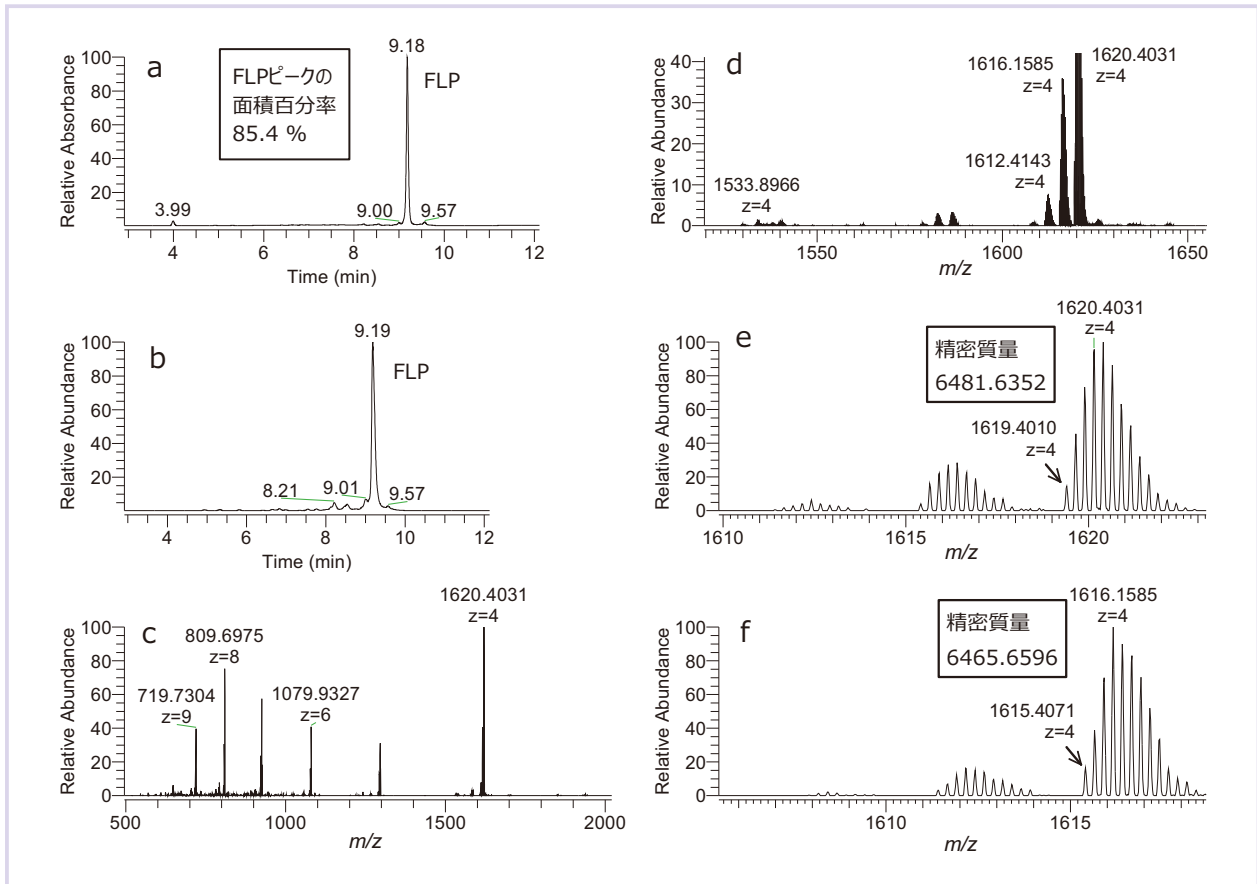


図4 オリゴ核酸合成品DのLC/UV/MS分析結果
 a: HPLCクロマトグラム
 b: トータルイオンカレントクロマトグラム
 c: FLPピーク (9.19 分付近) のマススペクトル (4~9 価イオン)
 d: FLPピーク (9.19 分付近) のマススペクトル (4 価イオン)
 eおよびf: それぞれFLP, PS→PO置換体のマススペクトルおよび精密質量計算結果

表1 合成品D, FLPピーク (9.19 分付近) に含まれる成分

番号	成分	精密質量測定値	FLP との質量差	FLP ピーク中の抽出イオン百分率 (%)	試料中の相対含量 (%)
1	FLP	6481.6352	0.0000	68.31	58.34
2	PS → PO 置換体	6465.6596	-15.9756	23.82	20.34
3	PS → PO 置換体 (2箇所)	6449.6801	-31.9551	4.53	3.87
4	FLP-T	6161.6161	-320.0191	0.83	0.71
5	FLP-G	6136.6164	-345.0188	0.61	0.52
6	FLP+T	6801.6704	320.0352	0.51	0.44
7	FLP-A	6152.6240	-329.0112	0.34	0.29
8	PS → PO 置換体 -G	6120.6212	-361.0140	0.10	0.08
9	PS → PO 置換体 +T	6785.6717	304.0365	0.09	0.08
10	メチルアミン付加体	6495.6386	14.0034	0.06	0.05
11	FLP-C	6176.5878	-305.0474	0.05	0.05
12	FLP+A	6810.6638	329.0286	0.04	0.03
13	FLP+G	6826.6567	345.0215	0.02	0.02

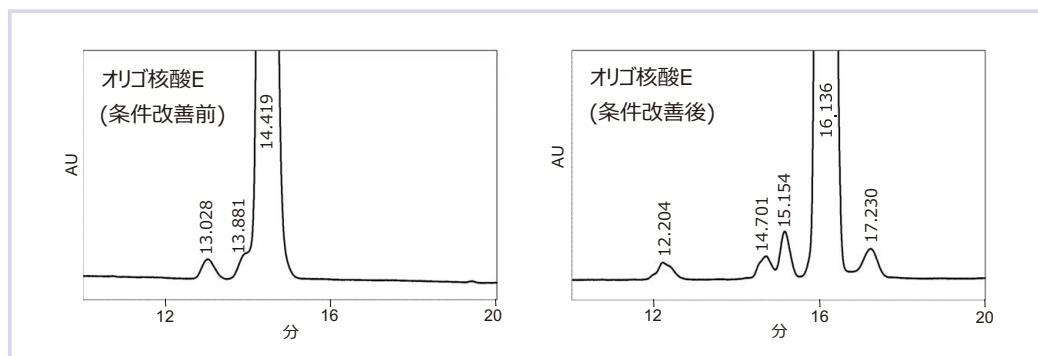


図5 オリゴ核酸Eの分離条件検討結果

4 AMED 事業への参画

当社は、日本医療研究開発機構（AMED）の委託事業である「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」において、研究課題「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（核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発-2）」の再委託先として参画しており、その一環でクロマトグラフィーによるオリゴヌクレオチド類縁物質の分析方法の開発に取り組んでいる。一例として承認済み核酸医薬品の配列をモデルとして合成したオリゴ核酸 E の分離検討の結果を示す。モデルオリゴ核酸 E は、従来のトリエチルアミン-ヘキサフルオロイソプロパノールを用いたイオンペア逆相条件では不純物の分離が困難であったが、分離モードや移動相組成を複数検討し、試料に適した条件を選択することで、分離が大きく改善された（図 5）。

5 おわりに

当社は、LC/UV/MS、2D-LC や NMR 等を活かし、ホスホロアミダイトやオリゴヌクレオチド類縁物質、オリゴ核酸（原薬）の構造解析や特性解析に取り組んでいる。今後とも、核酸医薬品の品質試験や安定性試験、出荷試験に携わり、核酸医薬品の開発と発展に貢献していきたい。

6 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。

文 献

- 1) 滝口直美, 伊藤浩介, 小林夏季, 溝口潤一, 製薬協核酸医薬品質評価タスクフォース, 南海浩一, 廣瀬賢治, 笛木修, 佐藤秀昭, 吉田徳幸, 小比賀聡, 井上真雄: *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, **51**, 145 (2020).
- 2) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長: 薬生薬審発0927第3号, “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” (平成30年9月27日)
- 3) Thermo Fisher Scientific: “Classification and characterization of impurities in phosphoramidites used in making therapeutic oligonucleotides” <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Technical-Notes/amidite-impurity-classification-technote.pdf>>, (accessed 2022.12.9).
- 4) 住友化学株式会社: “アミダイトの品質設計” <<https://www.sumitomo-chem.co.jp/oligonucleotide/jp/development/>>, (accessed 2022.12.9).



韋 宏
(い こう)
大阪ラボラトリー



荻原 毅
(おぎはら つよし)
大阪ラボラトリー



長野 裕夫
(ながの ひろお)
医薬事業部