

● LC/MS/MS による核酸医薬品の不純物分析

TN523

Impurity Analysis for Oligonucleotides by LC/MS/MS

[概要]

核酸医薬品（オリゴ核酸）の製造方法のひとつである固相法では、アミダイトを出発原料とし、固相担体上で合成サイクルを繰り返した後、合成された核酸医薬品の固体担体からの切り出し・脱保護を経て、液体クロマトグラフィー精製を行います。この合成法では、最終生成物に含まれるオリゴヌクレオチド類縁物質の物理的・化学的性質が目的成分と類似しているため、さらなる分離精製が困難であることが製造上の課題となっています。このことから、出発物質を含めた原料の品質管理および反応工程の適切な管理が重要です。

当社では、LC/MS/MS で核酸医薬品、その製造工程品（クルード品）、原料などの品質評価を実施しています。本品質評価は、合成法の初期検討時の非規制試験はもとより、製造プロセス評価における承認申請用の GMP に準拠した試験など、開発段階に応じた試験水準で対応します。以下に、LC/MS/MS を用いて CpG オリゴ核酸の製造工程品に含まれる不純物を評価した事例を紹介します。

Keywords : 中分子医薬品、特性解析、オリゴヌクレオチド不純物、ニューモダリティ

[事例]

CpG D35 オリゴ核酸（FLP 配列：5'-G⁺GTGCATCGATGCAGGGG⁺G-3'；⁺：S 化結合；20 塩基長）の製造工程品を LC/MS/MS 測定し、解析ソフト（BioPharma Finder™ 4.1）を用いた解析を行いました。各成分のインタクト質量の算出を行い、成分毎の多価イオン強度の和から各成分の相対含量を算出しました。また、インタクト質量および MS/MS の自動解析結果から各成分の分子組成と配列を推定し、さらに MS/MS フラグメントの理論値と測定値とを照合することで配列を確認しました。その際、面積百分率（UV）0.02% の微量不純物の構造も解析することが出来ました (Fig. 1)。

HPLC クロマトグラム (Fig. 1) およびイオン強度上位 13 成分の解析結果 (Table 1) を以下に示します。目的成分 FLP 以外に、脱保護不良 (No. 7, 11)、塩基部分の脱落 (No. 2, 10)、伸長不良 (No. 5, 6, 9)、硫化不良 (No. 12)、主鎖切断由来 (No. 8, 13) 等の不純物が確認されました。配列解析例として、主鎖切断由来不純物 (No. 8 : G⁺GTGCATCGATGCA (A14 : A loss + NH₃) ; 14 塩基長) の解析結果を Fig. 2, 3 および Table 2 に示します。

当社は核酸医薬品の合成工程や精製工程の改善に資する不純物の情報を提供し、品質向上に貢献します。

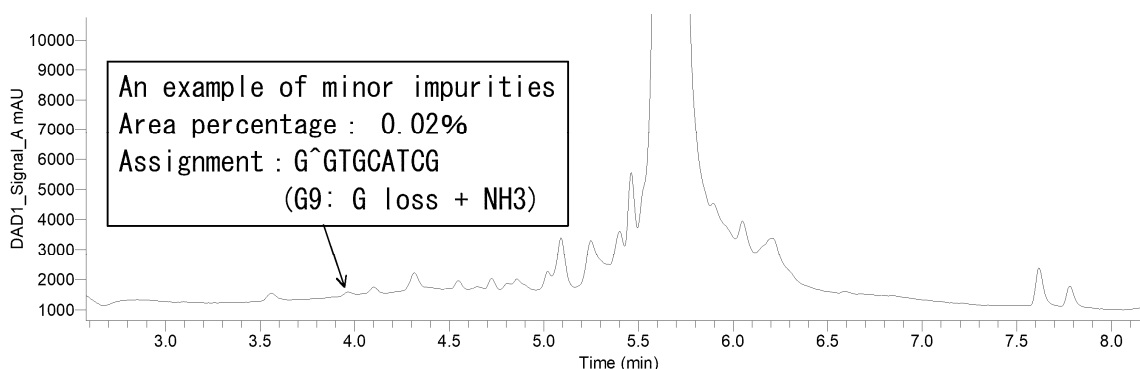


Fig. 1 HPLC chromatogram of CpG D35

Table 1 13 most abundant components derived from CpG D35 oligonucleotides

No.	RT (min)	Sequence Name	Mono Mass Exp.	Mono Mass Theo.	Error (ppm)	Sum Ion Intensity	Fractional Abundance (%)	Mass Different from FLP
1	5.78	FLP	6323.9970	6324.0035	-1.0	1.2E+10	66.0	0
2	5.78	G1-G20 (G Depurination)	6190.9520	6190.9547	-0.4	1.2E+09	6.8	-133.0488
3	5.78	FLP (Na ⁺)	6345.9780	6345.9854	-1.2	8.5E+08	4.7	21.9819
4	5.78	FLP (G loss)	6172.9775	6172.9791	-0.3	3.1E+08	1.7	-151.0244
5	5.70	G2-G20	5978.9600	5978.9738	-2.3	2.6E+08	1.5	-345.0297
6	5.63	T3-G20	5649.9120	5649.9213	-1.6	2.1E+08	1.2	-674.0822
7	7.66	G1-G20 (+ DMTr)	6626.1260	6626.1341	-1.2	1.4E+08	0.8	302.1306
8	5.14	G1-A14 (A14: A loss + NH ₃)	4199.7000	4199.7061	-1.5	1.3E+08	0.7	-2124.2974
9	5.51	G4-G20	5345.8700	5345.8752	-1.0	1.3E+08	0.7	-978.1283
10	5.70	G1-G20 (A Depurination)	6206.9520	6206.9595	-1.2	1.3E+08	0.7	-117.0440
11	5.98	G1-G20 (+isobutryl)	6394.0380	6394.0453	-1.1	1.1E+08	0.6	70.0418
12	5.67	G1-G20(PS→PO)	6308.0150	6308.0263	-1.8	1.0E+08	0.6	-15.9772
13	4.36	G1-A10 (A10: A loss + NH ₃)	2964.4990	2964.5036	-1.6	9.7E+07	0.5	-3359.4999

The MS response of FLP is not linear at high sample concentration. Thus fractional abundances of the other components may be overestimated.

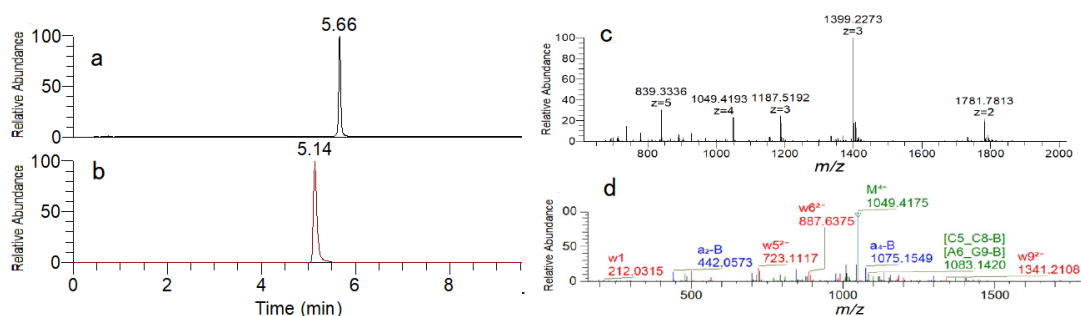


Fig. 2 LC/MS results of Component No. 8

a. HPLC chromatogram of CpG D35 b. Extracted ion chromatogram of Component No. 8 c. Mass spectrum of Component No. 8 d. MS/MS spectrum of Component No. 8

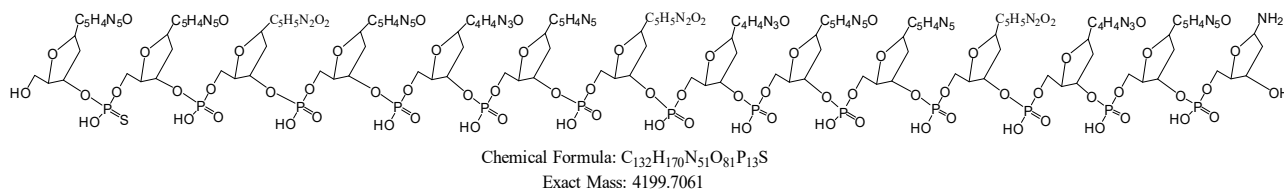


Fig. 3 Putative structure of Component No. 8

Table 2 Structure confirmation of Component No. 8

#1	c ⁻	a-B ³⁺	a-B ²⁺	a-B ⁻	Sequence	w ⁴⁺	w ³⁺	w ²⁺	w ⁻	x ⁻	#2
1	344.0224	31.6717	48.0111	97.0295	G						14
2	673.0749	146.6815	220.5260	442.0592	G	986.6477	1315.8660	1974.3027	3949.6126	3931.6021	13
3	977.1210	256.3657	385.0522	771.1117	T	900.3903	1200.8561	1801.7878	3604.5829	3586.5724	12
4	1306.1735	357.7144	537.0752	1075.1577	G	824.3788	1099.5075	1649.7648	3300.5369	3282.5263	11
5	1595.2198	467.3986	701.6015	1404.2103	C	742.1156	989.8233	1485.2386	2971.4844	2953.4738	10
6	1908.2775	563.7474	846.1247	1693.2566	A	669.8540	893.4745	1340.7154	2682.4380	2664.4274	9
7	2212.3235	668.0999	1002.6535	2006.3142	T	591.5896	789.1220	1184.1866	2369.3804	2351.3698	8
8	2501.3699	769.4486	1154.6765	2310.3603	C	515.5781	687.7733	1032.1635	2065.3344	2047.3238	7
9	2830.4224	865.7974	1299.1997	2599.4066	G	443.3165	591.4245	887.6404	1776.2880	1758.2774	6
10	3143.4800	975.4815	1463.7259	2928.4592	A	361.0534	481.7403	723.1141	1447.2355	1429.2249	5
11	3447.5260	1079.8341	1620.2547	3241.5168	T	282.7890	377.3878	566.5853	1134.1779	1116.1673	4
12	3776.5785	1181.1827	1772.2778	3545.5628	G	206.7775	276.0391	414.5623	830.1318	812.1213	3
13	4065.6249	1290.8669	1936.8040	3874.6153	C	124.5144	166.3549	250.0360	501.0793	483.0688	2
14					NH ₃	52.2528	70.0061	105.5128	212.0329	194.0224	1

The sequence-defining fragments identified from MS/MS results are highlighted in yellow. Error<5 ppm