

製造委託の際に知っておきたい核酸医薬の特性 — 品質と安全性評価面を中心に

Properties of oligonucleotide therapeutics that is need to know for outsourcing

甲南大学 核酸医薬研究所, フロンティアサイエンス学部

川上純司

JUNJI KAWAKAMI

KONAN UNIVERSITY



はじめに

生体高分子の優れた分子認識能を利用した医薬品として、抗体医薬に続き核酸医薬の開発がブームとも呼べる勢いで進められている。主にタンパク質を標的とする抗体医薬と異なり、核酸医薬はセントラルドグマの上流にある遺伝情報を標的とすることができるため、共通性の高い開発戦略であらゆる標的タンパク質に対する薬剤を創り出すことができると期待できる。さらに十数個から数十個のヌクレオチドから成る核酸医薬品は化学合成が可能であることから、後述するICHガイドラインに規定されるバイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の取り扱いではなく、化合物ベースの品質管理およびプロセス管理が可能である。ただし、核酸医薬品の特殊性に鑑みてその特性評価や機能評価を行う必要がある。

核酸医薬品としては、アンチセンス、siRNA、miRNA mimic、アプタマー、CpGオリゴそしてデコイ等が挙げられ、いずれも一本鎖または二本鎖核酸が薬効成分である。核酸医薬品は、その機能向上を目的として、天然型のDNAもしくはRNAに化学修飾を施した修飾核酸を使用していることがほとんどである(図1)。また、ヌクレオチドには水酸基やアミノ基が多く含まれているため、化学合成の際にさまざまな副産物が生成される可能性が高い。医薬品の承認プロセスにおいて評価すべき特性や不純物プロファイルを含む品質管理等については、独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)や国立医薬品食品衛生研究所(NIHS)、大学そして日本製薬工

業協会という産・官・学のメンバーからなる日本核酸医薬学会レギュラトリーサイエンスセッション(主任幹事: NIHS 井上貴雄)で議論が進んでいる。

本稿では、最近耳にする「委託元と委託先でクライテリアの設定が噛み合わず受注してもらえなかった」といった問題を回避するため、主に製造面で外部委託の際に知っておきたい核酸医薬の特性について紹介する。さらに、われわれが現在進めている日本医療研究開発機構(AMED)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(核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発)」での取り組みを紹介する。

1. 製造過程で混入する核酸医薬の不純物

現在核酸合成法として最も一般的なホスホロアミダイト法(亜リン酸法)は、高速な固相担体上での反応が自動化され広く用いられるようになったが、固相合成は途中に精製過程を経ないため、目的産物以外の不純物が蓄積していく。そのため、いかに各ステップでの反応効率を高め、また副反応を抑えるかが重要な検討課題として研究されてきた。しかし、反応時の温度や時間や溶液条件に関して、各ステップの反応効率を高める方向と副反応を抑える方向は逆である。つまり、反応効率の向上を重視すれば予期せぬ副生成物を生じ、副反応の抑制を重視すれば未反応物の蓄積をもたらす。どちらを重視すべきかは目的に応じてあらかじめ決定し、目標を数値化しておくべきである。

製造委託の際に知っておきたい核酸医薬の特性 — 品質と安全性評価面を中心に

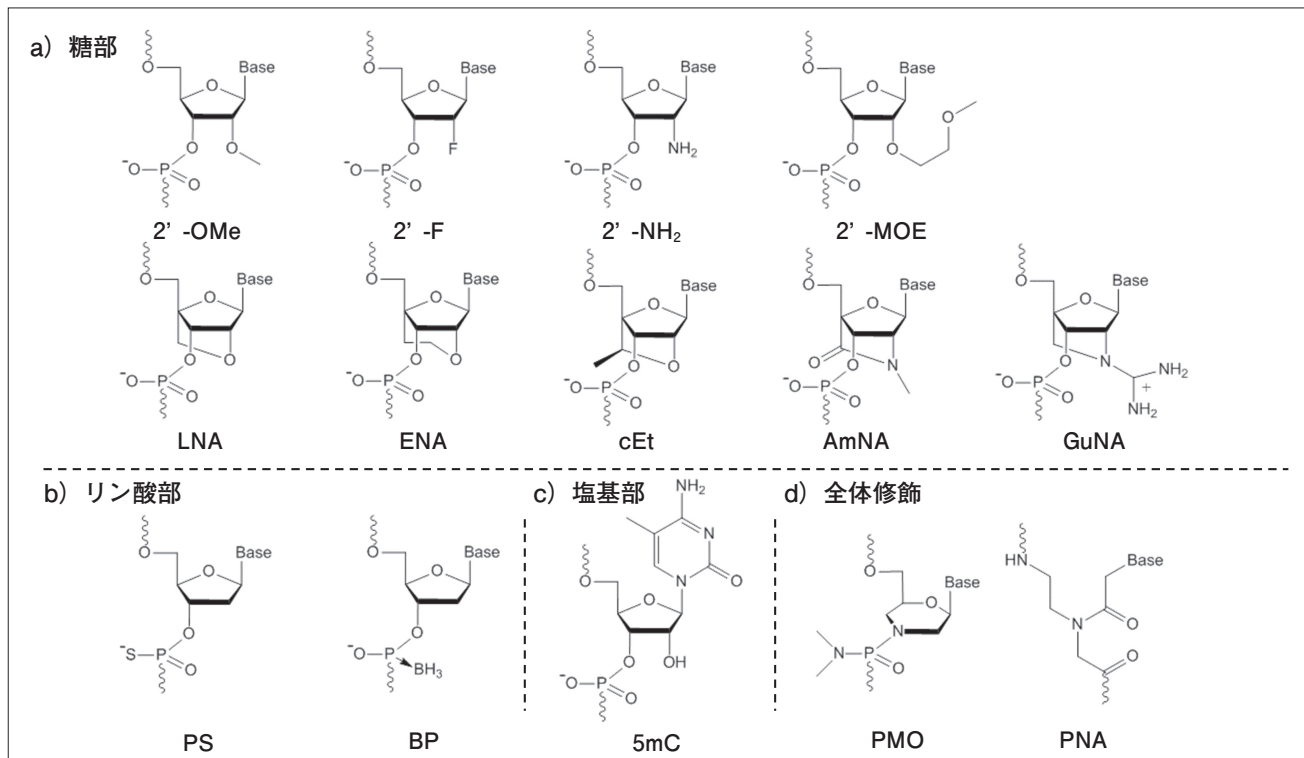


図1 代表的な修飾核酸の例

(a) 糖部修飾, (b) リン酸部修飾, (c) 塩基部における代表的な修飾核酸および糖リン酸骨格以外の骨格を持つ (d) 全体修飾の核酸類縁体
 2'-OMe : 2'-O-methyl, 2'-F : 2'-deoxy-2'-fluoro, 2'-MOE : 2'-O-methoxyethyl, LNA : 2'-O-4'-C- Locked Nucleic Acid, ENA : 2'-O-4'-C-ethylene-bridged nucleic acid, cEt : constrained ethyl, AmNA : Amido-bridged nucleic acid, GuNA : guanidine bridged nucleic acid, PS : phosphorothioate, BP : Boranophosphate, 5mC : 5-methyl-cytosine, PMO : phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide, PNA : peptide nucleic acid

固相ホスホアミダイト法の概略を図2に示す。ホスホアミダイト法では、モノマーユニットであるヌクレオチドは糖の3'末端にリンが連結している構造を持つ。ヌクレオチドが一方方向に連結したオリゴヌクレオチドを合成するため、5'末端の水酸基にヌクレオチドのリン酸を連結していく反応を繰り返す。ここで、ヌクレオチドには①糖の5'水酸基、②塩基のアミノ基、③リンに結合した酸素原子が連結反応の反応点となり得る。RNA合成の場合には、さらに④2'水酸基への反応が起り得る。目的とする反応以外の反応が起きないように、①～④はそれぞれ保護基で化学修飾され、目的の反応に先立って必要な官能基のみ脱保護される。当然ながら①～④は反応サイクル中の種々溶液条件下で安定に存在できるそれぞれ異なる保護基で保護され、また独立に1種類だけが脱保護される条件が存在し、それぞれの脱保護条件下で他の保護基は安定である必要がある。

固相ホスホアミダイト法の反応起点は固相担体にリンカーを介して3'水酸基が連結されたヌクレオシド(糖+塩基)の5'水酸基である(図2A)。ここにヌクレオシドの3'水酸基に3価のリンを結合させたホスホアミ

ダイト試薬(図2B)を活性化剤と共に加え、重リン酸でヌクレオシド間結合を形成させる(図2C)。その後3価のリンを酸化して5価のリン酸トリエステルに変換し、1サイクルの反応が完了する(図2D)。なお、未反応の5'水酸基をそれ以降の反応に関与しないようアシル化(キャッピング, 図2E)するが、このステップは目的産物がリン酸ジエステル結合を持つかチオリン酸ジエステル結合を持つかにより実施のタイミングが異なる。この段階で固相担体上に保持されているヌクレオチド鎖の反応点は全て保護されているが、5'末端の水酸基のみ酸で脱保護し、続くサイクルの反応点とする。

この反応サイクルを繰り返すことで望む鎖長のオリゴヌクレオチドを合成し、最後に塩基性条件で固相担体からの切り出しと塩基部およびリン酸部の脱保護を同時に行う。この製造プロセスにおいて、最も問題となる分離困難不純物は短鎖あるいは長鎖不純物である。目的産物(Full Length Product, FLP)の鎖長をnとすると、n±1が最も多く、n±2, n±3, …の不純物は比較的少ない。また、ヌクレオチドの欠損あるいは付加が多いと塩基やリン酸の数の変化が大きく、化合物としての物性もFLP

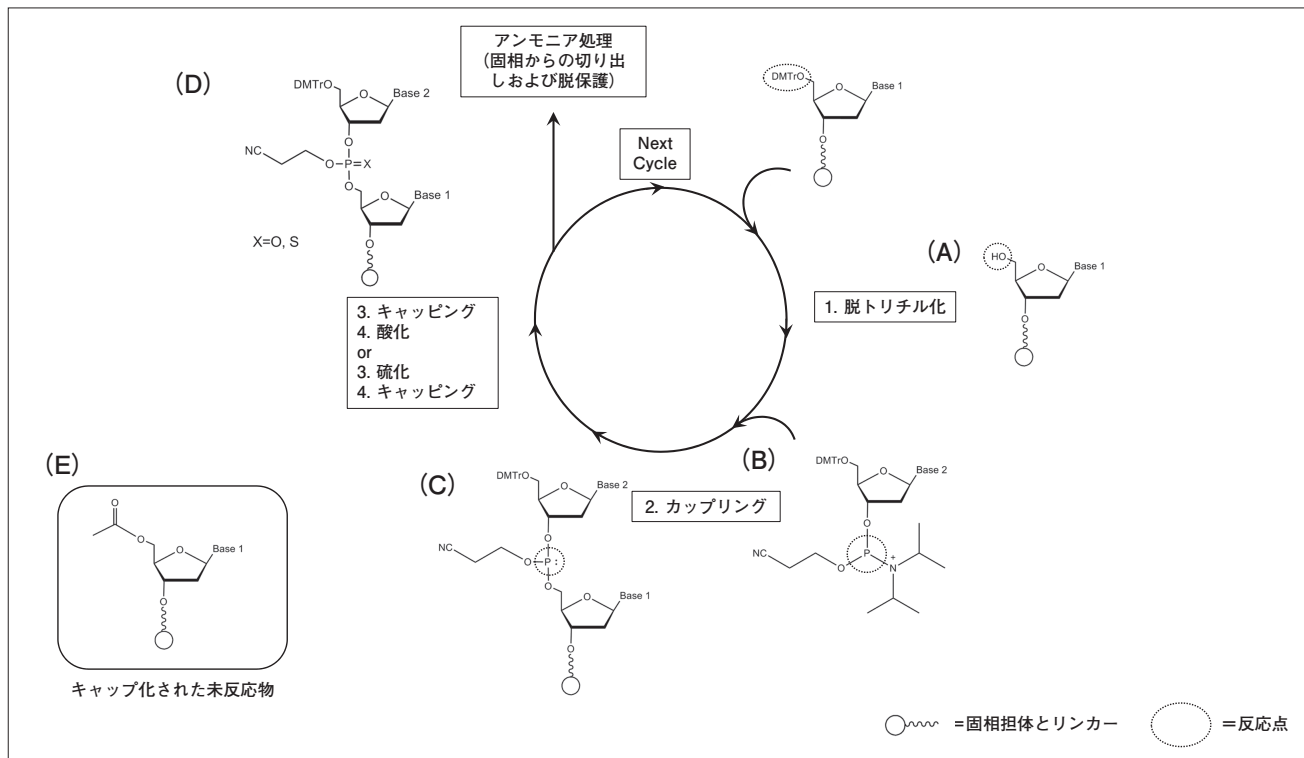


図2 ホスホロアミダイト法の合成サイクル

- DMTr基の脱保護（脱トリチル化）。糖の5'水酸基を保護していたDMTr基を脱保護し、反応点を作る。
- ホスホロアミダイトとのカップリング。脱保護された5'水酸基(A)とホスホロアミダイト(B)のリン原子が反応し、オリゴヌクレオチド鎖が伸長する。
- 未反応の5'水酸基のキャッピング。未反応の5'水酸基をアセチル化し、それ以上の鎖の伸長を防ぐ。
- 亜リン酸の酸化または硫化。オリゴヌクレオチド鎖の末端に導入された亜リン酸(C)を酸化、または硫化し、リン酸トリエステルに変換する。硫化の場合は、PS⇒PO変換体生成を防ぐため、キャッピングに先立って硫化を行う。

と離れていくため、分離精製もさほど困難でない場合が多い。したがって、現実的には $n \pm 1$ の生成を抑える製造技術と、生成した $n \pm 1$ 不純物の分離を可能にする精製技術の開発が必要となる。また、核酸医薬ではヌクレアーゼ耐性付与の目的でリン酸部に硫黄原子を導入したホスホロチオエート（ホスホロチオアート）が用いられることが多いが、硫黄の代わりに酸素原子が入った天然型ホスホジエステル結合の混入も問題となる。このPS⇒PO変換体も $n \pm 1$ と同様、FLPと物性が極めて近い分離困難不純物である。

$n-1$ 不純物は主に、5'水酸基の脱保護が不完全であった場合と未反応物のキャッピング(図2E)が不完全であった場合に生じる。また $n+1$ あるいはそれ以上のヌクレオチド付加体は、カップリング反応の弱酸性条件下においてアミダイトが脱トリチル化され、複数回のカップリング反応が起こることで生成する¹⁾。PS⇒PO変換体は、硫化反応の際に反応系内に微量でも水分子が存在すると生成する²⁾。キャッピングの後の硫化反応では顕著にPS⇒PO変換体の生成が認められるため、無水反応の継続を重視して硫化反応が先に行われる³⁾。またアンモニ

ア処理や脱トリチル化反応の際に用いるトリクロロ酢酸の分解物との反応でもPS⇒PO変換体が生じるという報告もある^{4,5)}。 n molスケールの合成では問題とならない各ステップにおける反応効率も、多量の固相担体を扱う前臨床・臨床試験用の試料製造においては問題となり得る。適切な攪拌等により固相表面が均一に反応溶液にさらされる条件を設定するなど、製造各社は独自のノウハウを持っているが、設定された条件次第で生じる不純物プロファイルは大きく異なることが想像できる。また、大量合成後の精製においては、除去すべき不純物ピークが巨大な目的産物ピークに重なり、分離できないことも往々にしてある。不純物の混入は原料に由来するものなどもあり、製造や精製過程で生じる微量不純物は非常に多い。さらに詳細な微量不純物の生成に関しては別の総説に記載したので参照されたい⁶⁾。

現在のところ不純物としては取り扱われていないが、ホスホロチオエートのジアステレオマーも分離精製の困難さを増す原因の一つとなっている。ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドの製造においては、硫化反応によりリンが不斉中心となるため、通常ホスホロアミダ

製造委託の際に知っておきたい核酸医薬の特性 — 品質と安全性評価面を中心に

イト法によって調製されるオリゴヌクレオチドに含まれる全てのチオリン酸部位でジアステレオマーが生じる。したがって、 n 個のチオリン酸を持つオリゴヌクレオチドは 2^n 種類の異性体混合物となる。高速液体クロマトグラフィーやゲル電気泳動による分離の際、この多数の異性体の存在はピークやバンドのブロード化を引き起こし、 $n \pm 1$ やPS \rightarrow PO変換体の分離精製を更に困難なものにしている。

2.これまでの規制整備

核酸医薬品の品質および評価に関する重要な文書は、筆者(日本核酸医薬学会事務局)が管理している日本核酸医薬学会のホームページに「レギュラトリーサイエンス関連文書」としてまとめている⁷⁾。中でも、厚生労働省発出文書の「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」(平成30年9月27日)および「核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン」(令和2年3月30日)は必読である。

医薬品の製造と分析に関しては、日本の医薬品承認審査を担うPMDAも参加して、医薬品規制に関するガイドラインを科学的・技術的な観点から作成する国際会議

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH; 医薬品規制調和国際会議)のガイドラインが基本となる⁸⁾。ICHガイドラインには、品質(Quality)に関するICH Q1~Q14、非臨床安全性(Safety)試験に関するICH S1~S12、有効性(Efficacy)を評価する臨床試験に関するICH E1~E20、そしてそれらの複合領域(Multidisciplinary)に関わるICH M1~M14が設定されている。これらの中で、核酸医薬品のCMCに関しては、不純物を取り扱うQ3A (R2)「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」、Q3B(R2)「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」、生物製品の品質を取り扱うQ5E「生物製品(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もともなう同等性/同質性評価」、規格及び試験方法を取り扱うQ6A「新医薬品の規格及び試験方法の設定」、Q6B「生物製品(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」、およびバイオテクノロジー応用医薬品の安全性を取り扱うICH S6「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」等が参考になるが、直接的に該当するガイドラインが存在しない。

厚生労働省発出文書「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」においては、ICH Q3A (R2), Q3B (R2), Q6A, M7 (変異原性不純物の評価及び管理)についてはオリゴヌクレオチドを対象外としているが、含まれる低分子不純物や残留溶媒、元素不純物の評価に関してはICH Q3やM7を参照するよう指示がある。また、製造工程の開発や変更においてはICH Q5Eに示されている考え方を参考にすることが推奨され、原薬や製剤の管理に関してはICH Q6Aに示される基本的な考え方が適用されるものとしている。

これらの通知においてはまだ曖昧な部分も残されているが、最近(令和4年6月9日)、「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」に関する質疑応答集(Q&A)が出され、これも日本核酸医薬学会ホームページの「レギュラトリーサイエンス関連文書」に掲載してあるので是非参照されたい。また、仮想核酸医薬品をモデルとしたパネルディスカッションは核酸医薬品のCMCを考える上で非常に参考となるので是非こちらも一読して欲しい⁹⁾。

3.日本医療研究開発機構プロジェクト(AMED-CMC)における取り組み

われわれは現在、AMED 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(核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発)」(研究開発代表者:大阪大学 小比賀聡, 甲南大学 川上純司, NIHS 井上貴雄)プロジェクトを進めている。当該事業は「新規高機能性核酸医薬品(オリゴヌクレオチド医薬品)について、製造、精製及び分析等の各工程の一貫した研究開発を実施する。これにより、従来の各工程における課題を解決し、実用化に直結する技術開発を推進する。…(中略)… また、1塩基欠損体等をLC/MSにより分析する技術の開発…(中略)…等の高度分析を可能にする分析技術開発を行い、これらの手法及び技術を含んだ分析拠点を形成し、上記の新規製造技術の評価及び合成した新規モノマーを含んだ化合物の高度分析を可能にする体制を構築する。得られた品質分析データは実施者間での共有及びAMED 医薬品等規制調和・評価研究事業

製造委託の際に知っておきたい核酸医薬の特性 — 品質と安全性評価面を中心に

と連携し、基礎データとして広く活用することとする。」(公募要領より)ことを目的としたものである。

現在、小比賀を代表とする「原料・原薬の製造基盤技術の開発」グループ、川上を代表とする「原薬の分析基盤技術の確立」グループ、井上を代表とする「不純物の毒性評価」グループがそれぞれ多数の研究分担者・研究協力者と共に国産核酸医薬品の実用化に向けて協力的に研究を進めている。参画している企業、団体は以下の通りであり、30機関を超える幅広い分野の専門家集団となっている。

【製造】グループ

代表機関：大阪大学

分担機関：マイクロ波化学、日本テクノサービス、東レエンジニアリング、十全化学、UBE、神戸天然物化学、大阪合成有機化学研究所、ルクサナバイオテック、ジーンデザイン、ワイエムシィ、東ソー

協力機関：日本触媒、クロマジン

【分析】グループ

代表機関：甲南大学

分担機関：大阪大学、アジレント・テクノロジー、島津製作所、ユービー・サイエックス、住化分析センター、東レリサーチセンター、化学物質評価研究機構

協力機関：サーモフィッシャー・サイエンティフィック、日本ウォーターズ、日本製薬工業協会(塩野義製薬、住友ファーマ、田辺三菱製薬)、スペクトリス/マルバーン、日本分光、ナカライテスク

【毒性評価】グループ

代表機関：国立医薬品食品衛生研究所

分担機関：化学物質評価研究機構

協力機関：医薬品医療機器総合機構

令和3年度に開始したこのプロジェクトでは、大阪大学吹田キャンパス内に「核酸医薬分析技術拠点」を設置した。分析技術拠点には4台のLC/MSを整備し、常駐する専従研究員を複数擁して、令和4年度から本格稼働している。この分析技術拠点にはLC/MSメーカーのみならず、核酸合成や分析を専門とする企業から研究員が訪れ、活発に議論しながらの研究開発が進められている。製造、分析、規制までを取り扱う産官学の緊密な連携で

進められるこのプロジェクトの先に、多くの国内発核酸医薬の上市があるものと考えられる。

おわりに

医薬品の貿易赤字はついに年間3兆円を超えるまでに。安全なそして効果の高い核酸医薬を迅速に開発し上市するために、一丸となって規制を含めた基盤整備を急がなければならない。今回紹介した内容が、今後活発に進められるであろう核酸医薬品の開発における原薬の製造および分析の外部委託に際して、含有する不純物まで考慮した品質管理のクライテリアを委託側と受託側が共通の認識で設定し、速やかな核酸医薬開発の進展に資する情報となることを期待する。

■引用文献

- 1) Achim H. Krotz, Patrick G. Klopchin, Kathleen L. Walker, G. Susan Srivatsa, Douglas L. Cole and Vasulinga T. Ravikumar, "On the Formation of Longmers in Phosphorothioate Oligodeoxyribonucleotide Synthesis", *Tetrahedron Letters*, 38, 1997, 3875-3878.
- 2) Amar B. T. Ghisaidoobe, Martijn C. de Koning, Howard I. Duintjema, Paul B. W. Ten Kortenaar, Herman S. Overkleef, Dmitri V. Filippov, Gijs A. van der Marel, "A two-step sulfurization for efficient solution-phase synthesis of phosphorothioate oligonucleotides", *Tetrahedron Letters*, 49, 2008, 3129-3132.
- 3) Andrei P. Guzaev, "Reactivity of 3H-1,2,4-dithiazole-3-thiones and 3H-1,2-dithiole-3-thiones as sulfurizing agents for oligonucleotide synthesis", *Tetrahedron Letters*, 52, 2011, 434-437.
- 4) Colin B. Reese and Quanlai Song, "Avoidance of sulfur loss during ammonia treatment of oligonucleotide phosphorothioates", *Nucleic Acids Research*, 25, 1997, 2943-2944.
- 5) Jacek Cieślak, Cristina Ausin, Marcin K. Chmielewski, Jon S. Kauffman, John Snyder, Alfred Del-Grosso, and Serge L. Beaucage, "³¹P NMR Study of the Desulfurization of Oligonucleoside Phosphorothioates Effected by "Aged" Trichloroacetic Acid Solutions", *The Journal of Organic Chemistry*, 70, 2005, 3303-3306.
- 6) 富田恵麗沙, 秋田智香, 川上純司, 「核酸医薬品と核酸化学」, 核酸医薬品のCMC管理戦略(品質評価・不純物管理)第2章, サイエンス&テクノロジー, 2022, in press.
- 7) レギュラトリーサイエンス関連文書, 日本核酸医薬学会ホームページ, https://www.natsj.jp/society/regulatory_science
- 8) ICHガイドライン, 医薬品医療機器総合機構ホームページ, <https://www.pmda.go.jp/int-activities/int-harmony/ich/0070.html>
- 9) 関口光明, 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, 井上貴雄, 「核酸医薬品の品質評価に関する考え方 - 仮想核酸医薬品をモデルとして - 」, *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 51, 2020, 145-153.

