

厚生労働科学研究委託費（医療技術実用化研究事業（臨床研究・治験
推進研究事業））

委託業務成果報告（業務項目）

PCSK9 をターゲットとした核酸医薬の薬事申請を目指した治験に
橋渡しするための非臨床試験

品質保証に関わる検討

担当責任者

小比賀 聡 大阪大学薬学研究科附属創薬センター・教授

研究要旨

PCSK9 をターゲットとした核酸医薬の薬事申請を目指した治験に橋渡し
するための非臨床試験を着実に遂行するために、分担機関である大阪大
学薬学研究科では、1) 核酸医薬の原薬となる人工核酸搭載型オリゴヌ
クレオチドの製造における原料（アミダイト体）の品質を検証するた
めに、逆相 HPLC、³¹P-NMR、¹H-NMR による分析を実施し、各分析手法の Scope
と Limitation について精査を行った。その結果、逆相 HPLC では定量分
析、純度解析に、一方、¹H-NMR では特性解析に適することが確認された。
また、³¹P-NMR は特性解析に加え純度解析への応用にも期待が持てること
が見出された。

研究協力者

大阪大学薬学研究科

小林 直之

山本 剛史

橋 敬祐

A. 研究目的

一般に核酸医薬の原薬となるオリゴヌクレオチドは、DNA 自動合成装置を用いた固相合成により調製される。従来の低分子医薬品で主に用いられている液相合成とは異なり、固相合成では厳密に制御された化学反応を繰り返し行うことでオリゴヌクレオチドやペプチドのようにモノマー（オリゴヌクレオチドの場合はヌクレオチドモノマー、ペプチドの場合はアミノ酸モノマー）を決められた配列通り合成することが可能であり、自動化に対応しやすく、比較的簡便に目的とする中～長鎖の生成物を得ることができるという利点を有する。特に、オリゴヌクレオチドの固相合成においては、ホスホロアミダイト法と呼ばれる成熟した化学合成法が利用でき、比較的純度の高いオリゴヌクレオチドを得ることが可能である。一方で、繰り返し行われる化学反応サイクルの過程においては基本的に精製工程が含まれないことから、医薬品の原薬としてオリゴヌクレオチドを捉えた場合に、その品質担保は極めて重要であり、とりわけ、DNA 自動合成に用いる原料(アミダイト体)の品質には一定の注意を払う必要が有ることとは言うまでもない。

そこで、今年度は原薬製造における重要な検討項目の一つであるアミダイト体の品質評価に関して、各種の分析手法を利用して精査を行うこととした。

B. 研究方法

今回、原薬製造の原料となるアミダイト体の品質を評価するために、1) 逆相 HPLC、2) ^{31}P -NMR、3) ^1H -NMR の各手法を用い分析を実施した。対象とした原料は原薬となるオリゴヌクレオチドに搭載されている人工核酸 AmNA アミダイトであり、これらは国内化学メーカーにより受託合成されたものである。また、AmNA アミダイトの分析は株式会社ジーンデザインの協力のもと実施した。

1) 人工核酸 AmNA アミダイト体の RP-HPLC 分析

今回のオリゴヌクレオチド原薬には、AmNA と呼ばれる架橋型人工核酸が搭載される。核酸のアミダイト体には紫外吸収のクロモフォアとなる核酸塩基が含まれるため、一般に 260 nm の紫外吸収を測定することでその検出が可能である。そこで、これら AmNA のアミダイト体(A, G, C, T の 4 種)について、紫外吸収 (260 nm) を指標とした逆相 HPLC による分析を実施し、その純度を評価した。

2) 人工核酸 AmNA アミダイト体の ^{31}P -NMR 分析

アミダイト体合成の最終段階では、基質となるヌクレオシド体の 3' 位水酸基への亜リン酸化が施され、その後クロマト等による精製が行われる。そのため、アミダイト

体に含まれる不純物として各種のリン誘導体が想定される。またアミダイト体自身には3個のリン原子が含まれること、そのリン原子の立体化学は制御されないことから、一般に³¹P-NMR測定により、その構造の特定、純度の評価が可能となる。そこで、各AmNAアミダイト体について³¹P-NMR測定を実施し、その構造並びに純度情報を収集した。

3)人工核酸AmNAアミダイト体の¹H-NMR分析

上述の通り、アミダイト体には3個のリン原子が含まれることから³¹P-NMR分析は非常に強力な分析手法である。しかし、リン原子を含まない不純物の確認に³¹P-NMRは非力である。そこで、一般的な有機化合物の分析に広く用いられている¹H-NMR測定を行い、リン原子を含まない夾雑物の検出の可否について検討を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

1)人工核酸 AmNA アミダイト体の RP-HPLC 分析

AmNA アミダイト体の純度を精査するために、逆相 HPLC による分析を実施した(図 1-a~h)。アミダイト体はその化学構造上、リン原子の立体化学が異なる2種のジアステレオマー混合物として存在するが、今回これらジアステレオマーは一般的な

逆相 HPLC 条件下で分離可能であった。HPLC 分析では、立体化学の同定は困難であるが、その比率は AmNA-T アミダイトの場合 $a : b = 70 : 30$ (ここで、 a は逆相 HPLC において保持時間の短い異性体を、 b は保持時間の長い異性体の割合を示す)、AmNA-mC においては、 $a : b = 74 : 26$ 、また AmNA-A、AmNA-G についてはそれぞれ $a : b = 56 : 44$ 及び $a : b = 59 : 41$ であった。なお、ここでそれぞれの割合については、260 nm の紫外吸収を指標とした面積百分率より算出している。一方、今回分析を行った AmNA アミダイト体は、いずれも比較的純度が高く今回の逆相 HPLC 分析では、いずれも 96%以上の純度(両ジアステレオマーを合算して算出)を示した。上述の通り、本分析においては 260 nm における紫外吸収を指標とした際の各ピーク面積を基準に異性体の生成比並びに純度の算出を行っている。異性体比については両異性体間でモル吸光係数に違いがないと考えられることから、正確な比率を算出できているものと判断できるが、一方で純度評価に関しては、260 nm における紫外吸収を示す化合物(目的化合物であるアミダイト体及びその他不純物)のみが検出対象となる。すなわち、クロモフォアを含まない不純物については評価対象外となる点には留意が必要である。

2)人工核酸 AmNA アミダイト体の ³¹P-NMR 分析

次に、AmNA アミダイト体の ³¹P-NMR 分

析を実施した(図 2-a~d)。逆相 HPLC 分析において確認されたリン原子の立体化学が異なる 2 種のジアステレオマーの存在については、今回の ^{31}P -NMR 分析においても明確に検出された。すなわち、各アミダイト体は 150ppm 付近にジアステレオマー由来の 2 本のシングレットシグナルを与えた。 ^{31}P -NMR のシグナル強度(シグナルの積分値)からその存在比を決定することは一般的ではないが、今回測定を行った 4 種の AmNA アミダイト体について、 ^{31}P -NMR のシグナル積分値から両ジアステレオマーの存在比を算出したところ、AmNA-T アミダイトの場合 $a : b = 71 : 29$ (HPLC では $70 : 30$)、AmNA-mC では $a : b = 73 : 27$ (HPLC では $74 : 26$)、AmNA-A、AmNA-G についてはそれぞれ $a : b = 56 : 44$ (HPLC では $56 : 44$) 及び $a : b = 59 : 41$ (HPLC では $58 : 42$) という結果を与え、いずれも逆相 HPLC 分析での結果と良い一致を示した。

また、今回の ^{31}P -NMR 測定において、各アミダイト体に由来する 150 ppm 付近のシグナル以外に、高磁場側に複数のシグナルが観測されている(図 2-e,f)。これらシグナルがどのような構造の不純物に由来するものかは現時点で同定できていないが、いずれのシグナルもそのケミカルシフト値が目的とするアミダイト体と大きくずれていることから、リン原子近傍の化学構造に比較的大きな変化があるものと推察される。

3) 人工核酸 AmNA アミダイト体の ^1H -NMR

分析

ほぼ全ての有機化合物にはプロトンが存在するため、 ^1H -NMRは対象とする化合物の構造同定、特性解析に有力な手法である。しかしながら定量下限の問題から、医薬品並びにその原料の不純物分析には用いられることが少ない。ここでは、AmNAアミダイト体の ^1H -NMR測定を行い、その特性解析並びに不純物分析の可否について検証を行った(図3-a~d)。

今回測定を行った各アミダイト体は、高磁場側から低磁場側の比較的広い領域に特徴的なシグナルを与えた。特に、3.8 ppm付近に見られるDMTr基由来の強いシングレットシグナルや5.5 ppm付近の1'位水素原子に由来するシングレットシグナル等が特徴的である。またその他にも、アミド窒素原子上のメチル基やT又はmC塩基の5位メチル基など、特徴的なシングレットシグナルが観測されている。先述の通り、アミダイト体はジアステレオマー混合物であるため、各シグナルはそれぞれのジアステレオマー存在比に応じた強度で観測されており、比較的複雑なチャートを与えるが、今回の試料のように比較的純度が高い場合には、ほぼ全てのシグナルを帰属することが可能であり、構造同定、特製解析には十分利用可能であると言える。一方で、純度分析という観点からこのチャートを検証した場合、 ^1H -NMR測定はアミダイト体の純度を正確に判断する分析法であるとは言い難いことがあらためて確認された。

D. 考案

I. 各AmNAアミダイト体の品質管理に向けた分析手法について

今回、核酸医薬の製造原料となるAmNAアミダイト体を、逆相HPLC、 ^{31}P -NMR、 ^1H -NMRにより分析した。アミダイト体には、クロモフォアとして核酸塩基や5'位の保護基であるDMTr基等が存在するため、紫外吸収により高感度検出が可能である。そのため、逆相HPLCによる分析は高い検出力をもって行うことができ、純度確認においても高い有効性を示すことが確認された。一方で、紫外吸収を示さない不純物の検出には他の分析手法の利用が必要となる。今回は検証を行っていないが、例えばLC-MSのように質量分析を併用する手法はその候補の一つであろう。また、アミダイト体の化学合成過程を鑑みて、リン原子を含む不純物の混入にも注意を払う必要がある。

今回、 ^{31}P -NMR分析により、逆相HPLC分析に匹敵する精度で、各アミダイト体のジアステレオマー比を算出可能であることが示された。今回は、 ^{31}P -NMRの定量下限を精査するには至らなかったため、本法がアミダイト体の純度試験にどの程度利用可能かは十分に検証できていないが、今後純度試験への利用の可否について検討する価値があると考えられる。また、 ^{31}P -NMRでは化合物に含まれるリン原子の環境の違い（リンの酸化状態、リン原子に結合した原子種等）を検出できることから、構造解析において強力な分析手法であることが確認された。

一方で、今回の検討から ^1H -NMR分析は比較的純度の高いアミダイト体の構造同定、特性解析には有効であるものの、純度試験には適さないことがあらためて確認された。これは、アミダイト体自身に数多くのプロトンが存在することに加えて、アミダイト体がジアステレオマー混合物であることに起因する。

今回の結果から、高度に官能基化され、その構造中にクロモフォアやリン原子を含むアミダイト体の品質管理においては、その構造特性に応じた分析手法を単独であるいは複数組み合わせることが重要であることがわかる。また、今回は詳細な検証に至らなかったが、高純度に精製されたアミダイト体にも含まれる不純物の構造同定を進めることで、核酸医薬の製造における課題を原料の純度という観点から議論することが望まれる。

E. 結論

本研究では、我々が検討を進めているPCSK9をターゲットとした核酸医薬の原薬となる人工核酸AmNA搭載型オリゴヌクレオチドの製造原料（アミダイト体）の品質を検証するために、逆相HPLC、 ^{31}P -NMR、 ^1H -NMRによる分析を実施し、それぞれの分析手法の有効性、適用範囲等について検証を行った。今回得られた知見に加えて、アミダイト体に含まれる不純物の構造同定が今後進むことによって、核酸医薬製造における

種々の課題を原料の純度という観点から議論することが可能になるものと考えられる。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

論文

1. Yamamoto T, Yahara A, Waki R, Yasuhara H, Wada F, Harada-Shiba M, Obika S, Amido-bridged Nucleic Acids with Small Hydrophobic Residues Enhance Hepatic Tropism of Antisense Oligonucleotides *in vivo*, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, *in revision*.
2. Mori K, Kodama T, Obika S, Synthesis and Hybridization Property of a Boat-shaped Pyranosyl Nucleic Acid Containing an Exocyclic Methylene Group in the Sugar Moiety, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, *23*, 33-37.
3. Mitsuoka Y, Fujimura Y, Waki R, Kugimiya A, Yamamoto T, Hari Y, Obika S, Sulfonamide-Bridged Nucleic Acid: Synthesis, High RNA Selective Hybridization, and High Nuclease Resistance, *Org. Lett.*, 2014, *16*, 5640-5643.
4. Mori S, Morihiro K, Obika S, C5-Azobenzene-substituted 2'-Deoxyuridine-containing-oligodeoxynucleotides for Photo-switching Hybridization Ability, *Molecules*, 2014, *19*, 5109-5118.
5. Morihiro K, Kodama T, Mori S, Obika S, Photoinduced Changes in Hydrogen Bonding Patterns of 8-Thiopurine Nucleobase Analogues in a DNA Strand, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, *12*, 2468-2473.
6. Shimo T, Tachibana K, Saito K, Yoshida T, Tomita E, Waki R, Yamamoto T, Doi T, Inoue T, Kawakami J, Obika S, Design and Evaluation of 2',4'-BNA/LNA Based Splice-switching Oligonucleotides *in Vitro*, *Nucleic Acids Res.*, 2014, *42*, 8174-8187.
7. Yamamoto T, Wada S, Wada F, Shigesada H, Harada-Shiba M, Obika S, Evaluation of Multiple-Turnover Capability of Locked Nucleic Acid Antisense Oligonucleotides *in Cell-Free RNase H-Mediated Antisense Reaction and in Mice*, *Nucleic Acid Therapeutics*, 2014, *24*, 283-290.

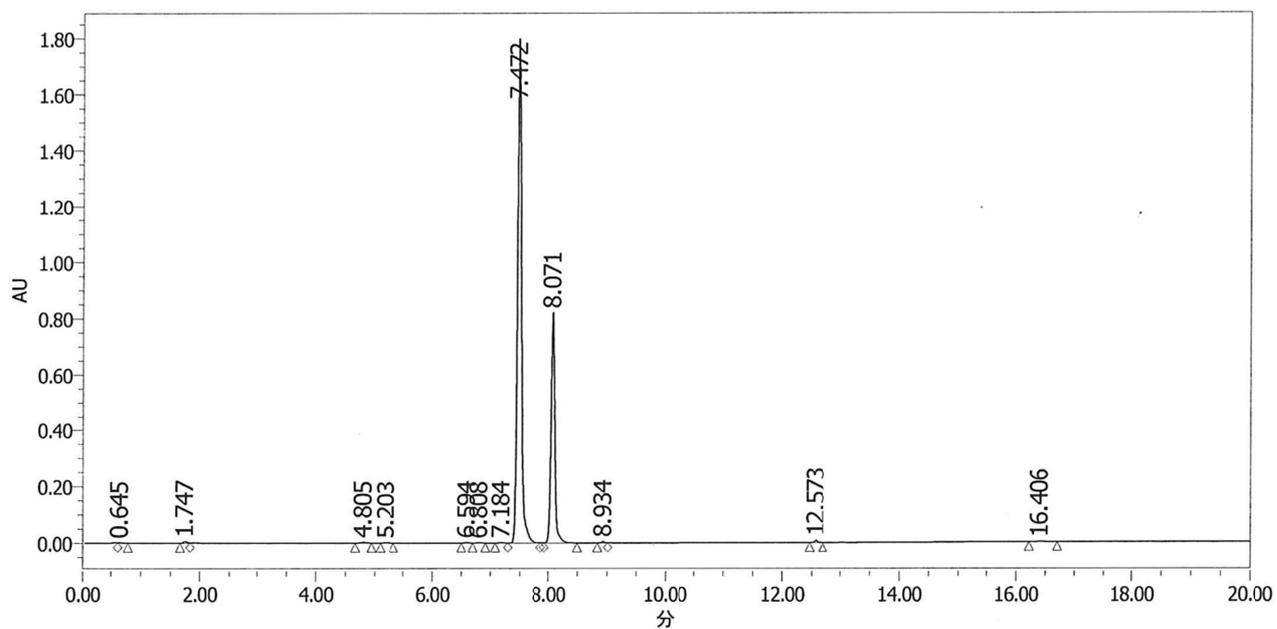


図 1-a. AmNA-T アミダイト体の HPLC 分析

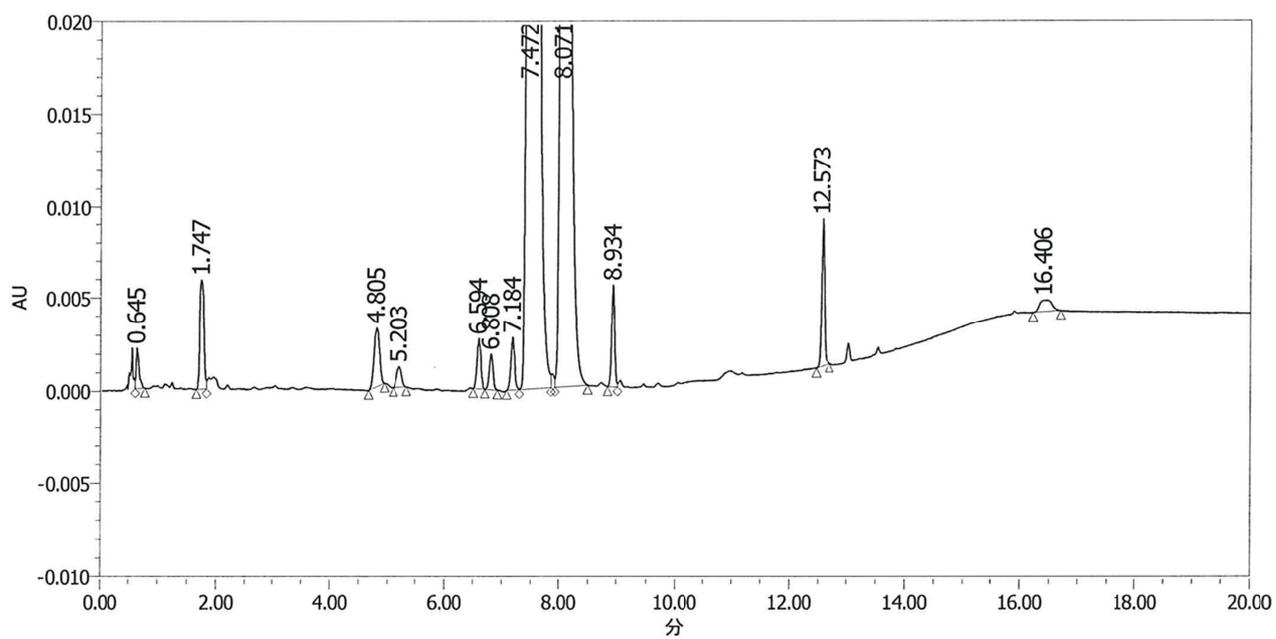


図 1-b. AmNA-T アミダイト体の HPLC 分析 (拡大図)

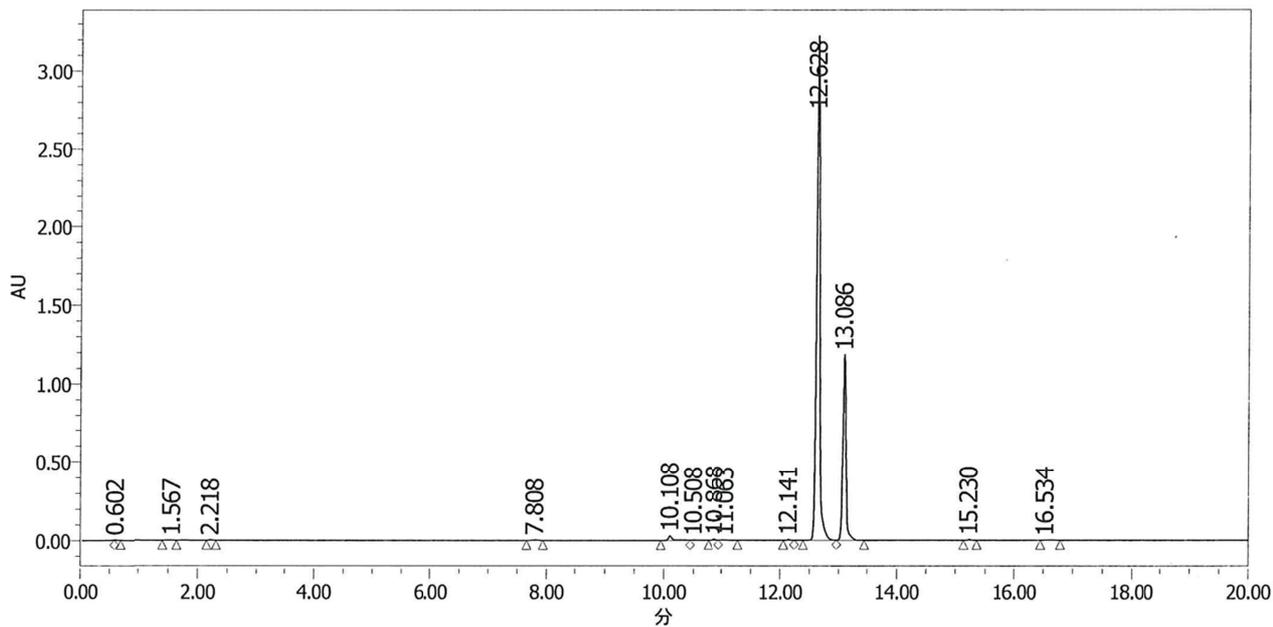


図 1-c. AmNA-mC アミダイト体の HPLC 分析

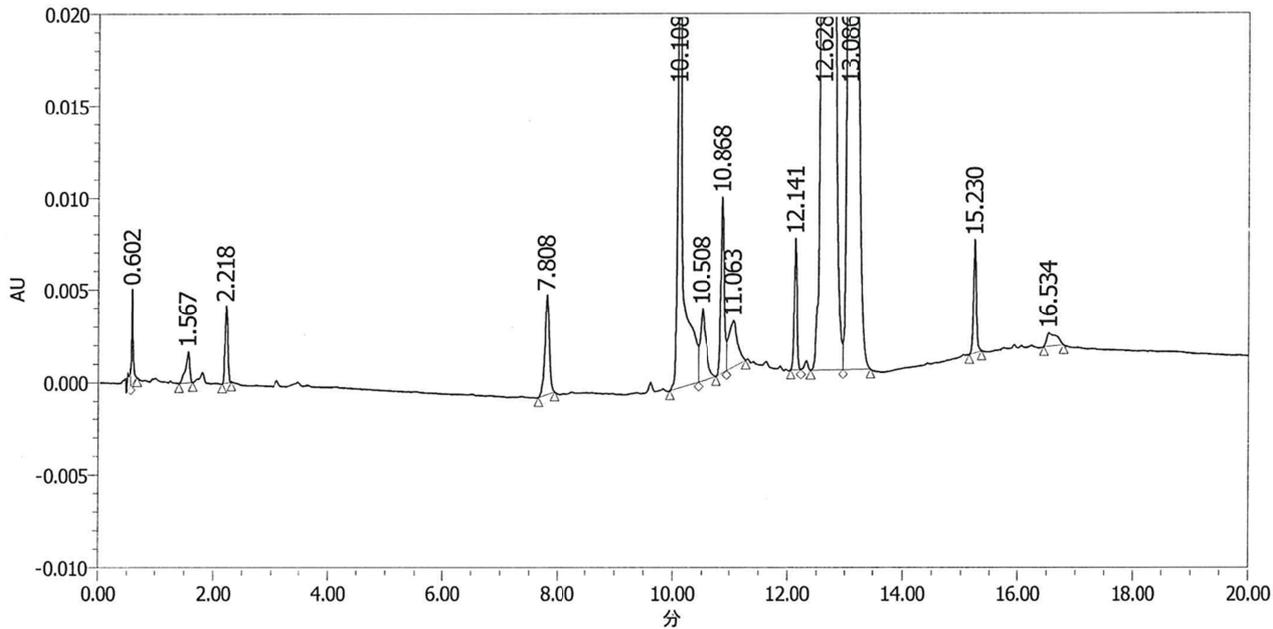


図 1-d. AmNA-mC アミダイト体の HPLC 分析 (拡大図)

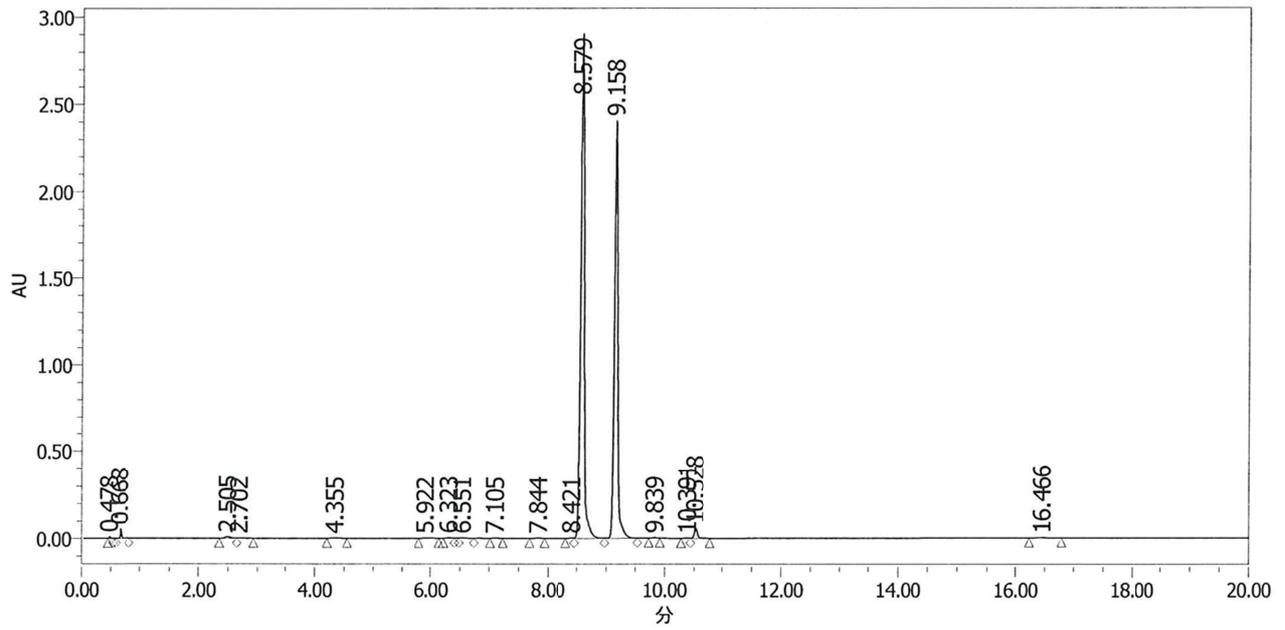


図 1-e. AmNA-A アミダイト体の HPLC 分析

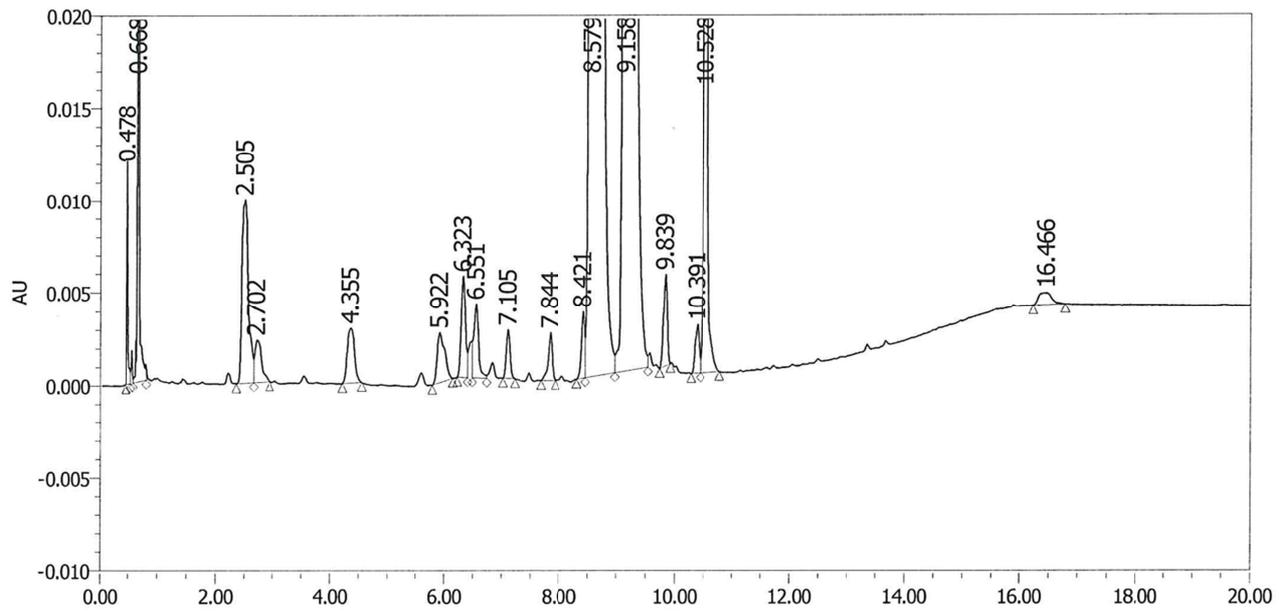


図 1-f. AmNA-A アミダイト体の HPLC 分析 (拡大図)

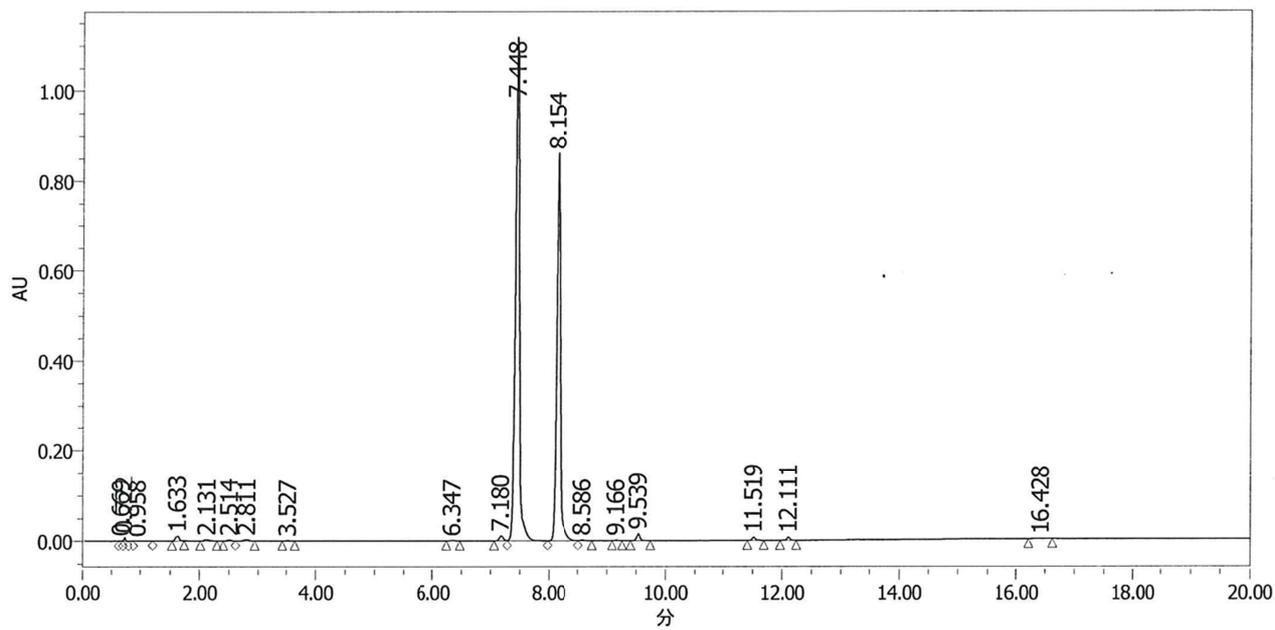


図 1-g. AmNA-G アミダイト体の HPLC 分析

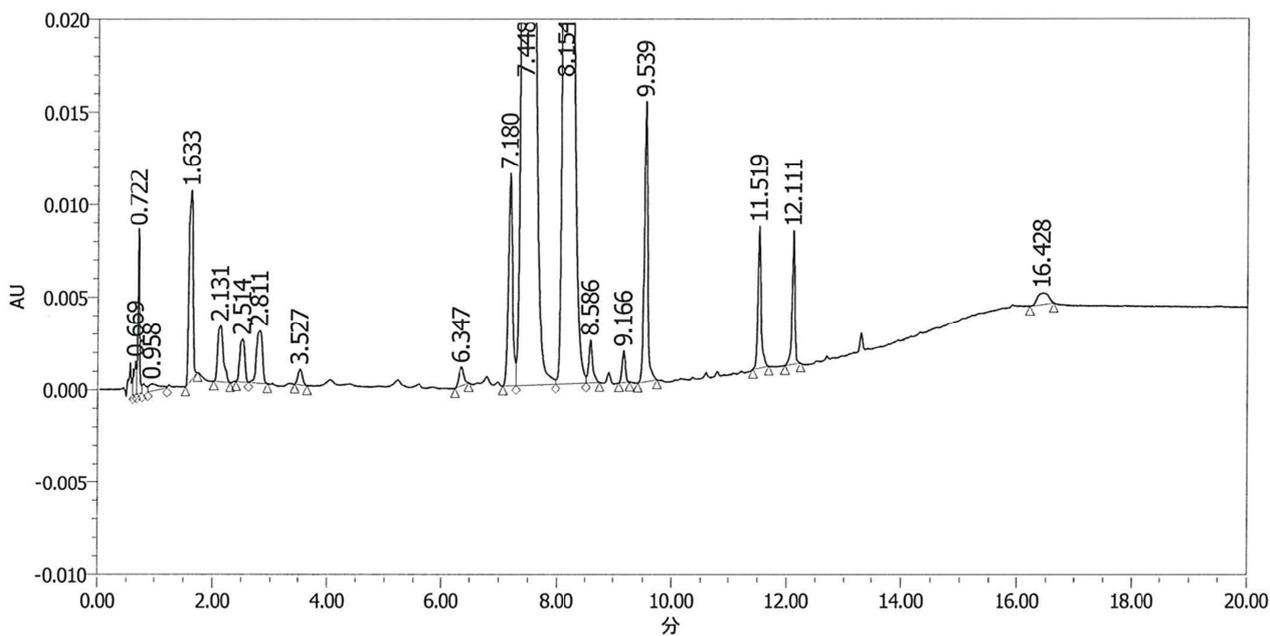


図 1-h. AmNA-G アミダイト体の HPLC 分析 (拡大図)

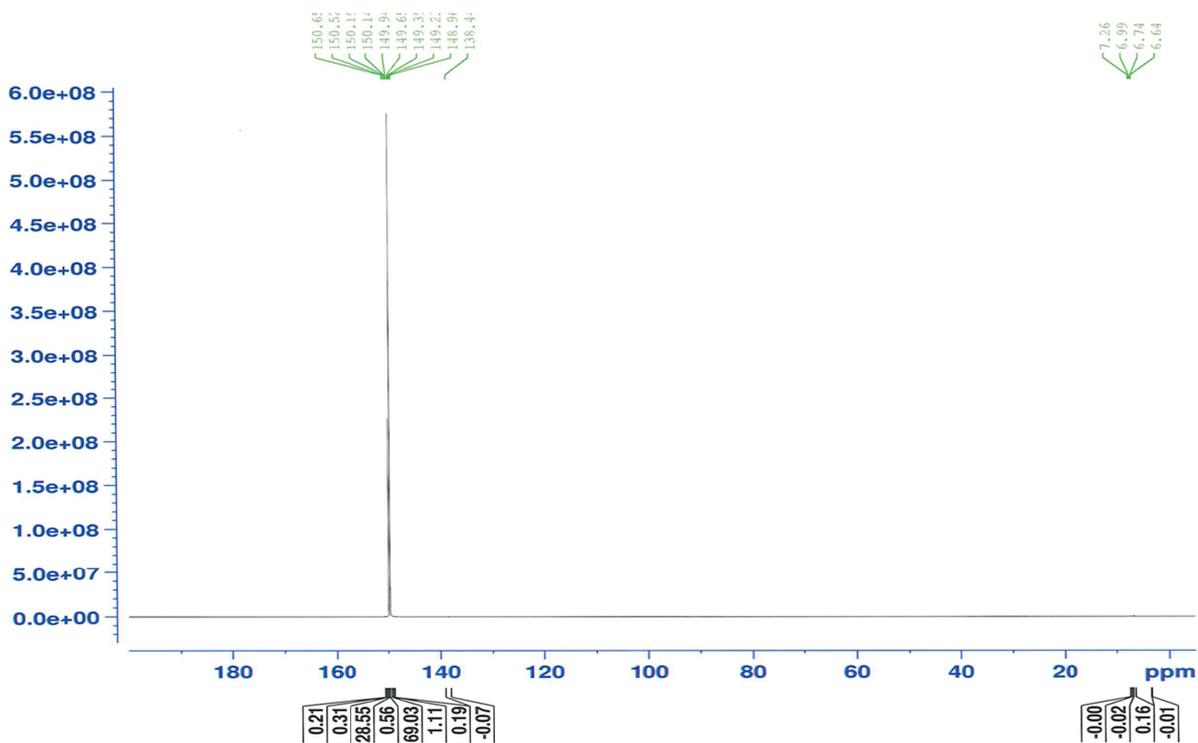


図 2-a. AmNA-T アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート

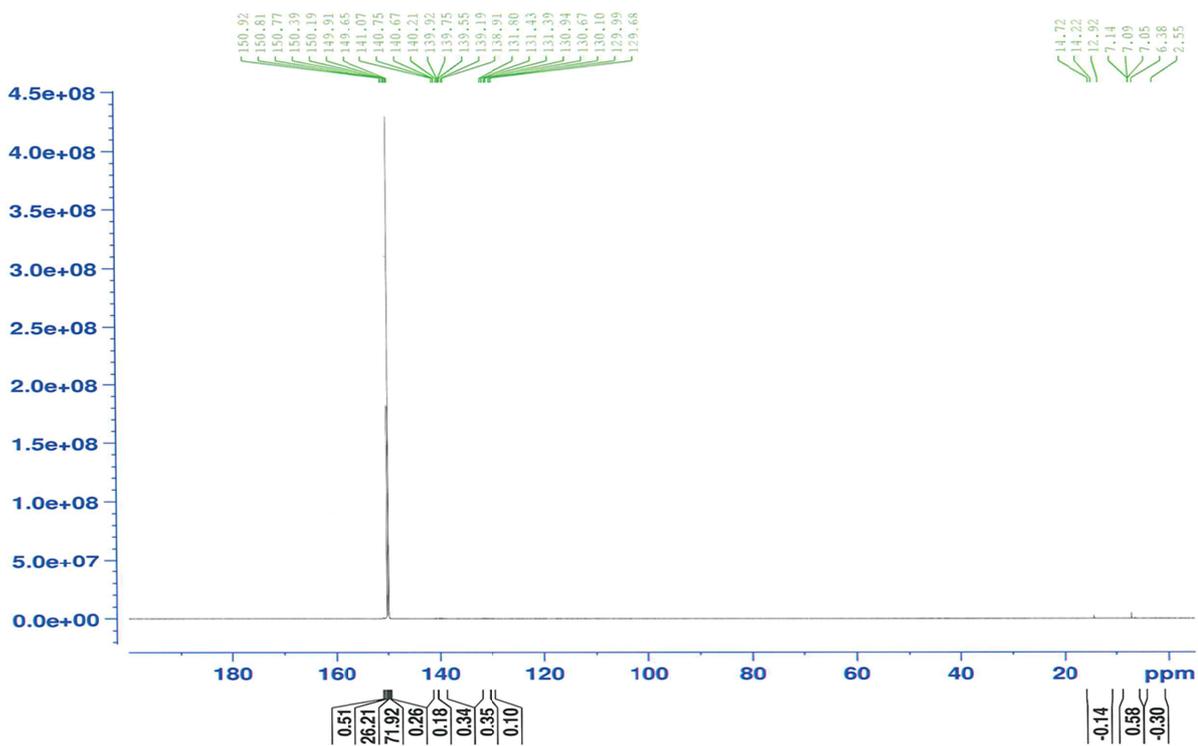


図 2-b. AmNA-mC アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート

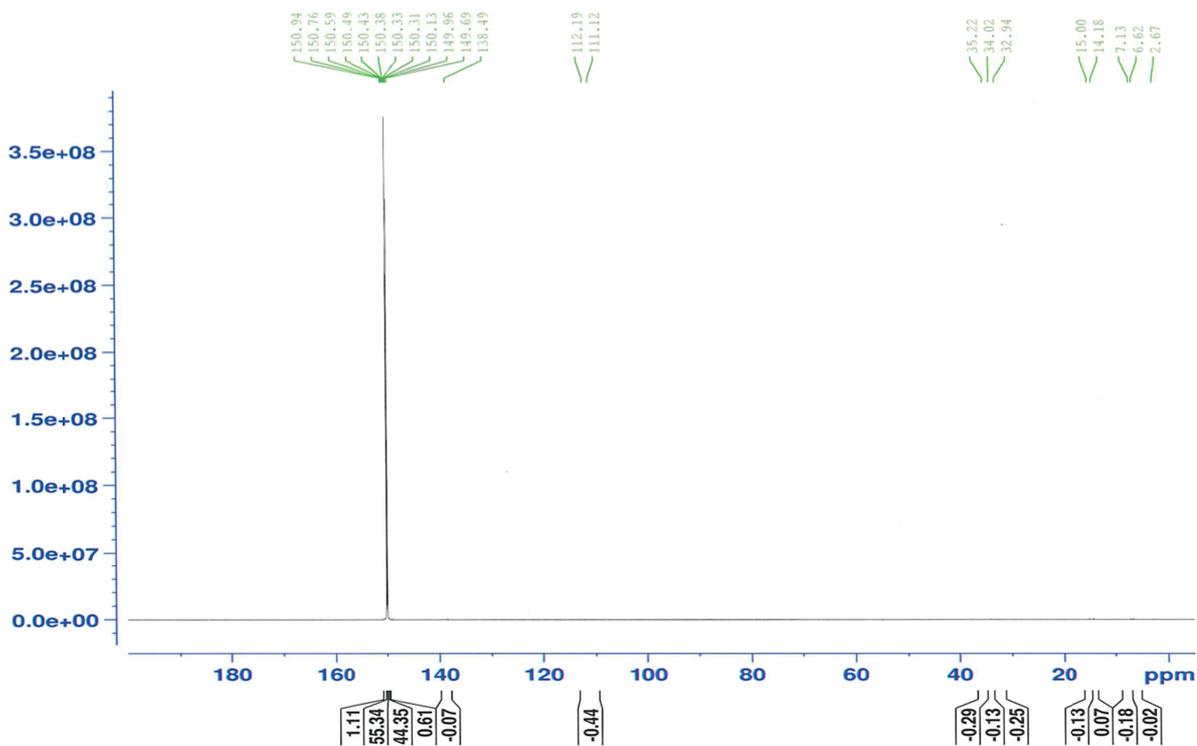


図 2-c. AmNA-A アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート

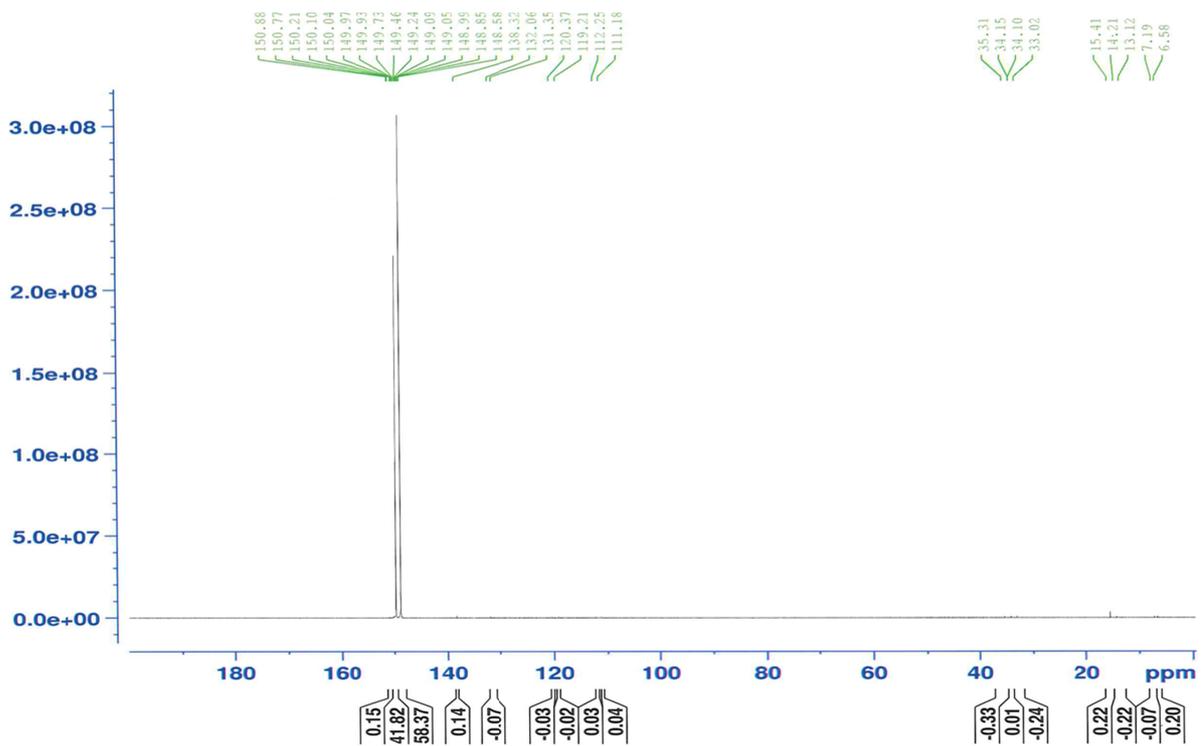


図 2-d. AmNA-G アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート

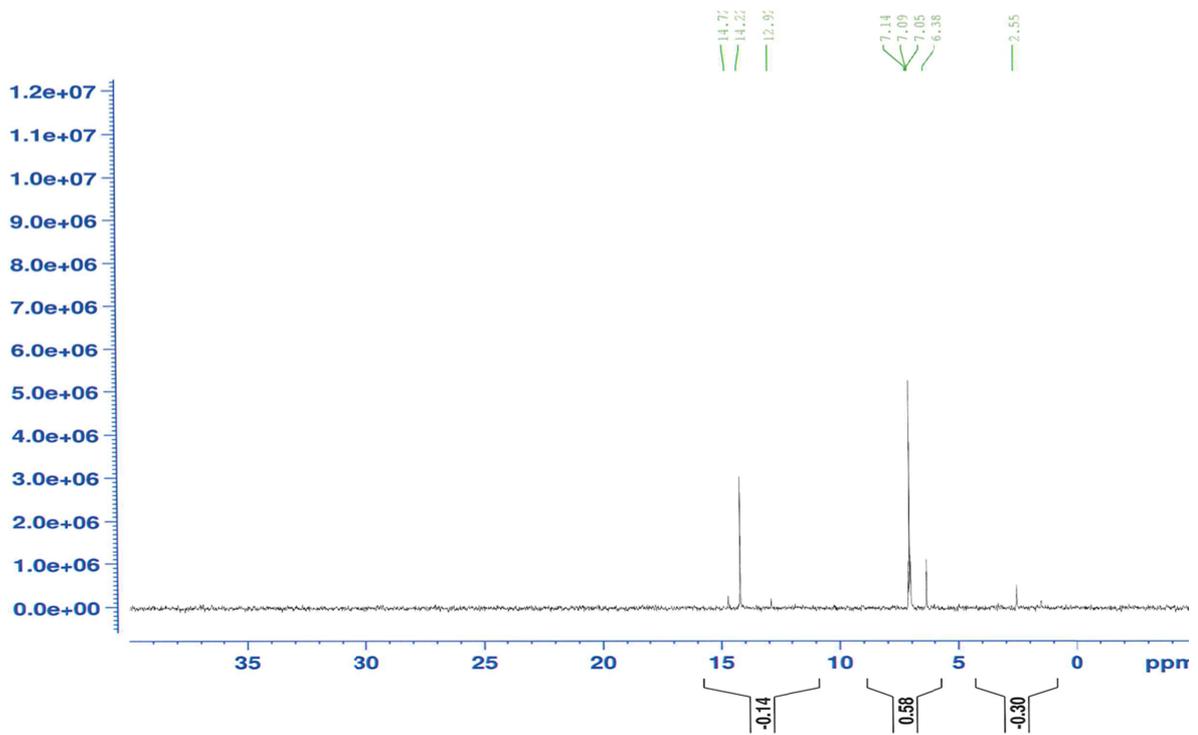


図 2-e. AmNA-mC アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート (高磁場側拡大図)

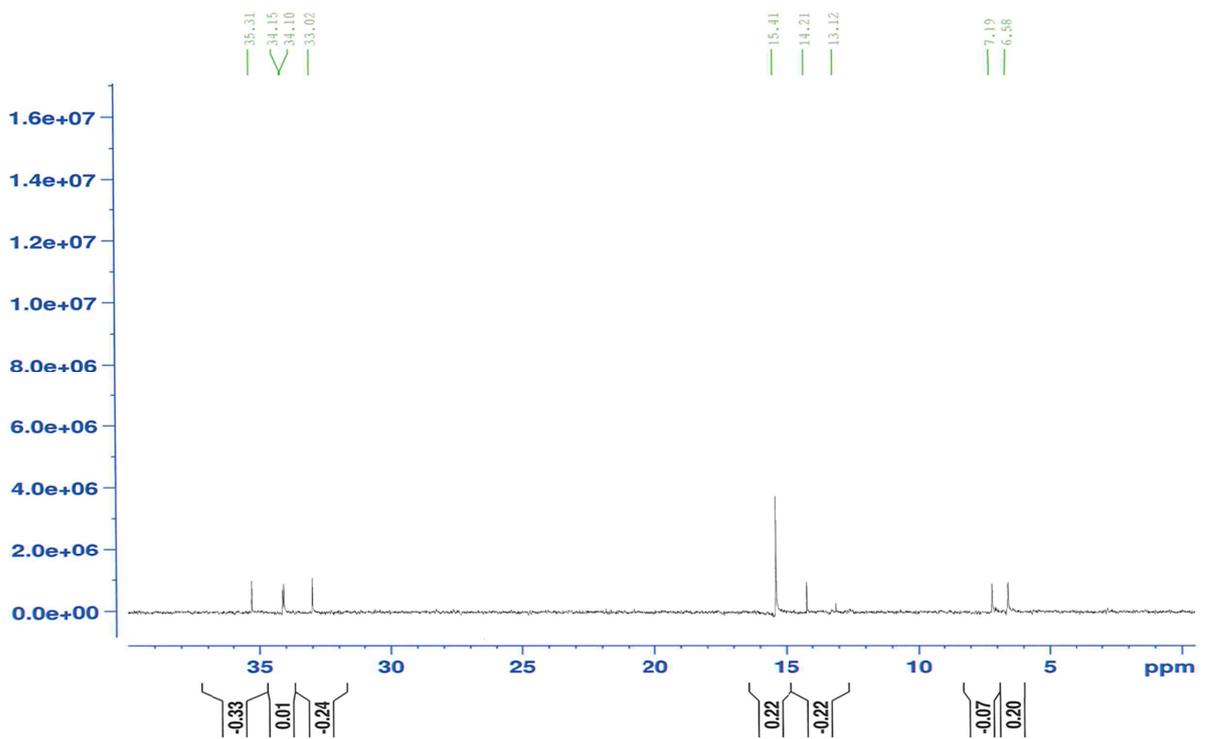


図 2-f. AmNA-G アミダイト体の ^{31}P -NMR チャート (高磁場側拡大図)

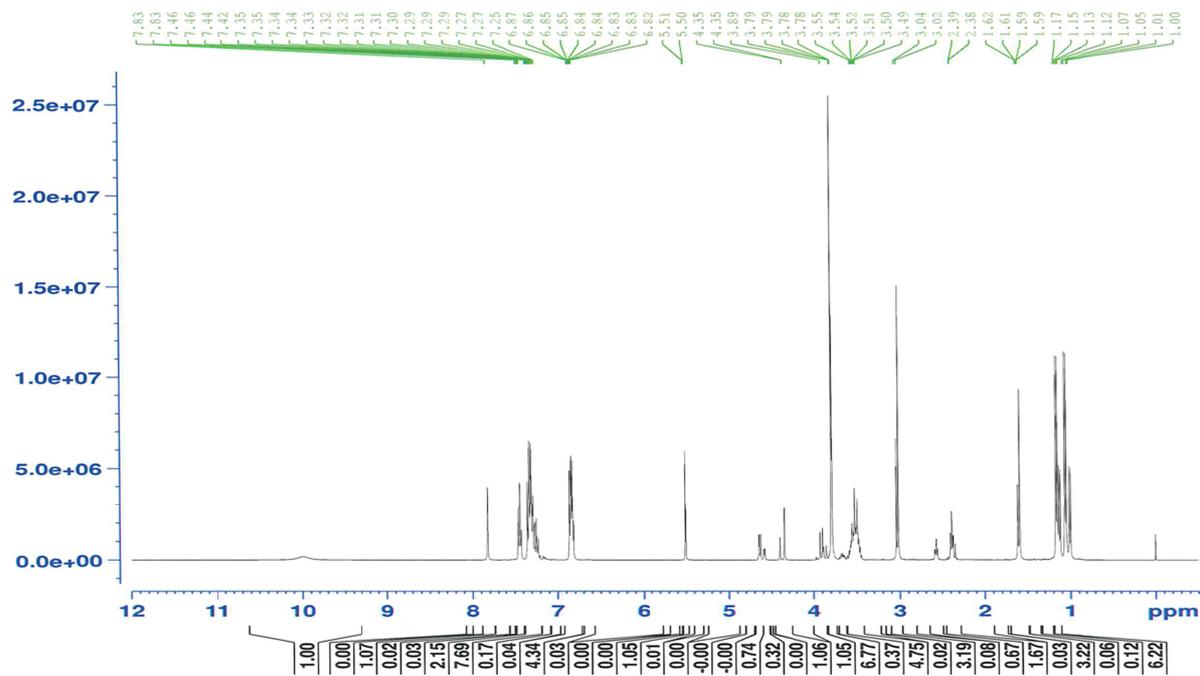


図 3-a. AmNA-T アミダイト体の $^1\text{H-NMR}$ チャート

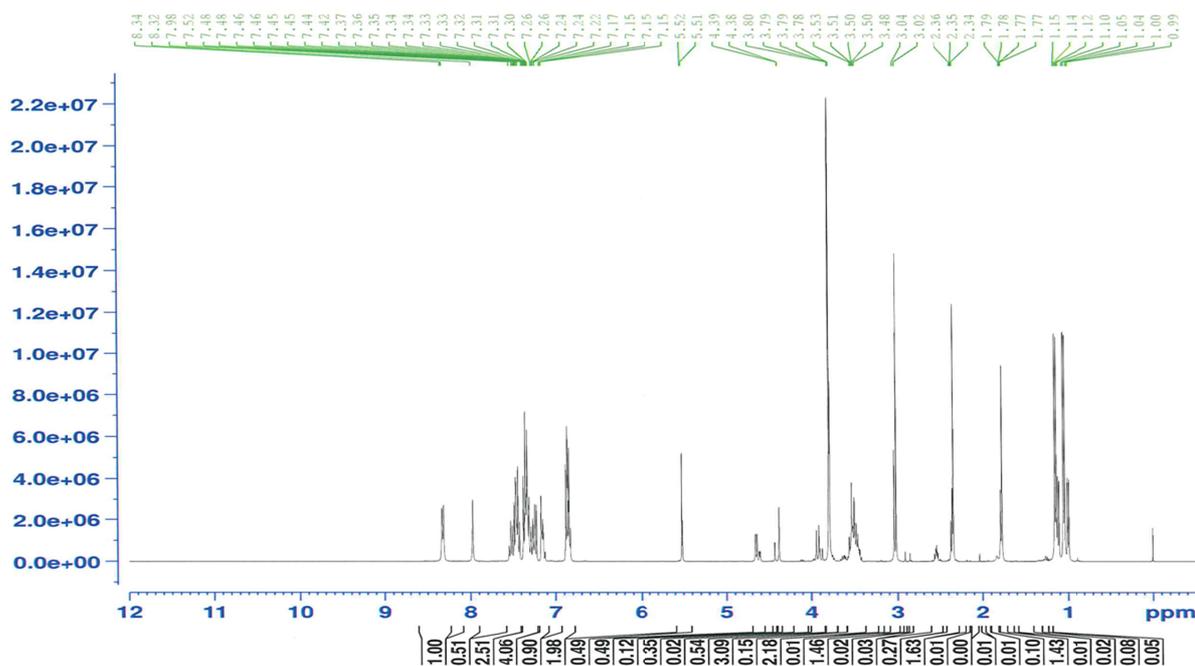


図 3-b. AmNA-mC アミダイト体の $^1\text{H-NMR}$ チャート

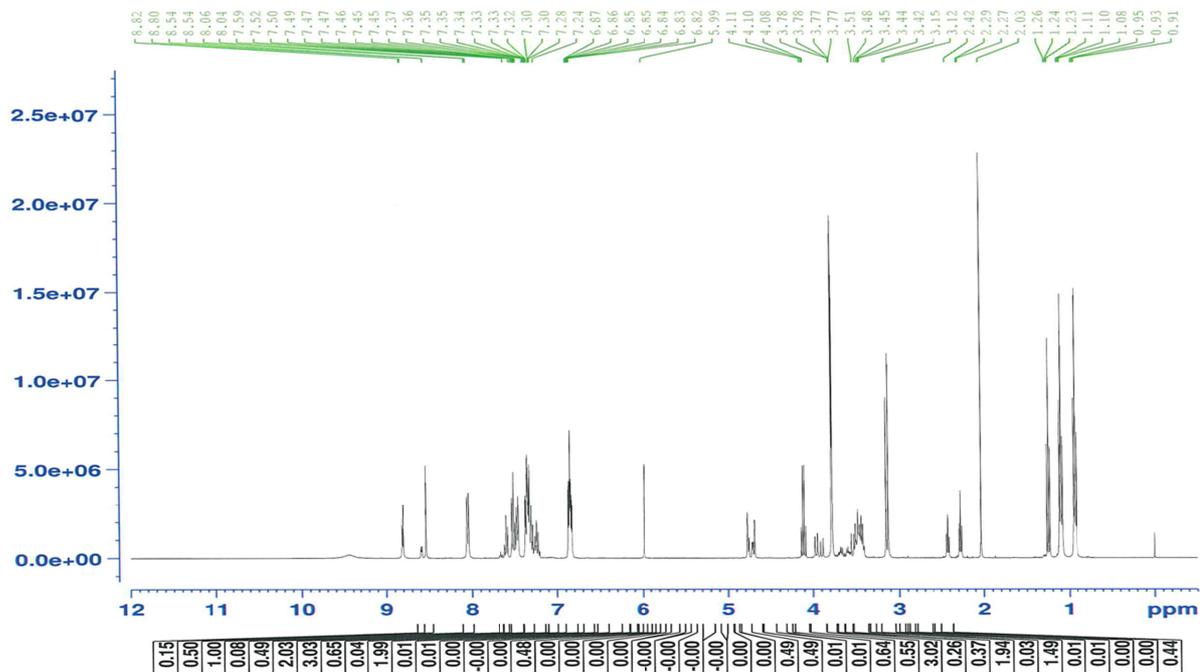


図 3-c. AmNA-A アミダイト体の $^1\text{H-NMR}$ チャート

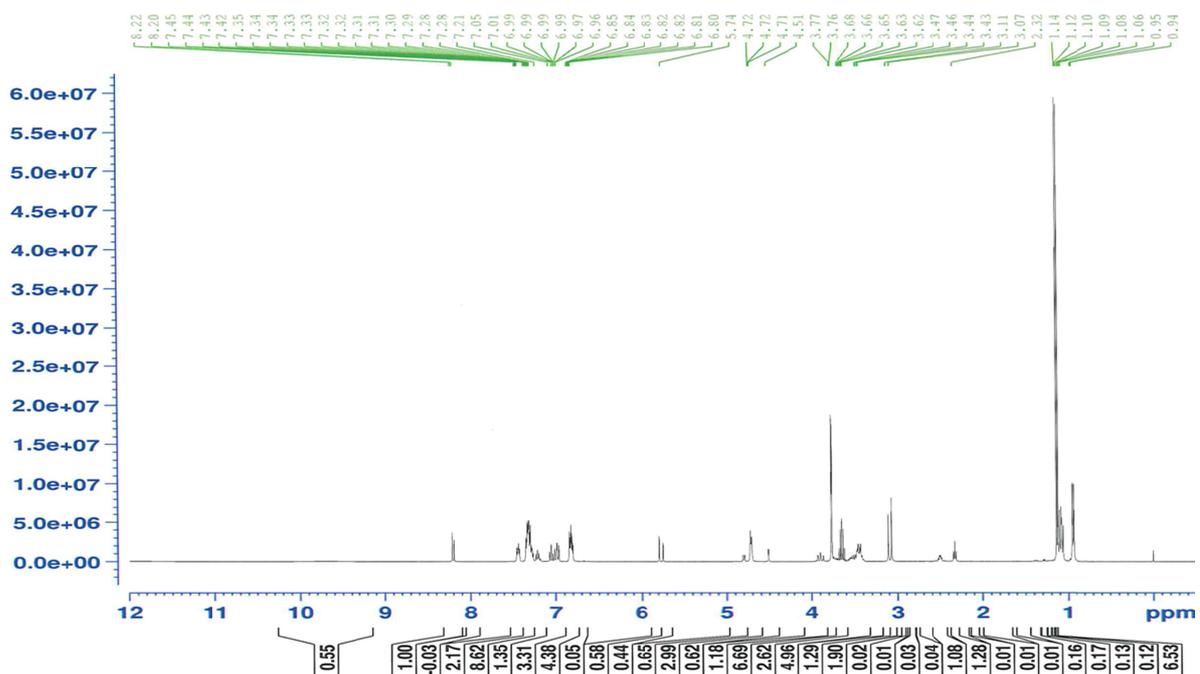


図 3-d. AmNA-G アミダイト体の $^1\text{H-NMR}$ チャート