

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 —

滝口直美^{*1}, 伊藤浩介^{*2}, 小林夏季^{*3}, 溝口潤一^{*4},
製薬協核酸医薬品質評価タスクフォース^{*10},
南海浩一^{*5}, 廣瀬賢治^{*6}, 笛木修^{*2}, 佐藤秀昭^{*7},
吉田徳幸^{*8,*9}, 小比賀聡^{*9}, 井上貴雄^{*8,*9}

Quality Evaluation for Oligonucleotide Therapeutics — Virtual Case Studies —

Naomi TAKIGUCHI^{*1}, Kosuke ITO^{*2}, Natsuki KOBAYASHI^{*3}, Junichi MIZOGUCHI^{*4},
JPMA Oligonucleotide Quality Task Force^{*10},
Hirokazu NANKAI^{*5}, Kenji HIROSE^{*6}, Osamu FUEKI^{*2}, Hideaki SATO^{*7},
Tokuyuki YOSHIDA^{*8,*9}, Satoshi OBIKA^{*9} and Takao INOUE^{*8,*9}

^{*1} 大日本住友製薬株式会社 大阪府吹田市江の木町 33-94 (〒564-0053)

Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd., 33-94 Enoki-cho, Suita, Osaka 564-0053, Japan

^{*2} 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞が関 3-3-2 新霞が関ビル (〒100-0013)

Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Shin-Kasumigaseki Building, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan

^{*3} アストラゼネカ株式会社 東京都千代田区丸の内 1-8-3 丸の内トラストタワー本館 9 階 (〒100-0005)

AstraZeneca K.K., Marunouchi Trust Tower Main 9F, 1-8-3 Marunouchi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0005, Japan

^{*4} エーザイ株式会社 茨城県つくば市東光台 5-1-3 (〒300-2635)

Eisai Co., Ltd., 5-1-3 Tokodai, Tsukuba, Ibaraki 300-2635, Japan

^{*5} 味の素バイオファーマサービス株式会社 ジーンデザイン 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-7-29 (〒567-0085)

Ajinomoto Bio-Pharma Services, GeneDesign, Inc., 7-7-29 Saitoasagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

^{*6} 日本ウォーターズ株式会社 大阪府大阪市淀川区西中島 5-14-10 新大阪トヨタビル 11F (〒532-0011)

Nihon Waters K.K., Shin-Osaka Toyota building 11F, 5-14-10 Nishinakajima, Yodogawa-ku, Osaka 532-0011, Japan

^{*7} ルクサナバイオテック株式会社 大阪府吹田市山田丘 2-8 テクノアライアンス C 棟 C907 (〒565-0871)

Luxna Biotech Co., Ltd., C907 Bldg. C, Techno-Alliance Complex, 2-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^{*8} 国立医薬品食品衛生研究所 神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-26 (〒210-9501)

National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan

^{*9} 大阪大学大学院薬学研究科 大阪府吹田市山田丘 1-6 (〒565-0871)

Graduate School of Pharmaceutical Sciences Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^{*10} 製薬協核酸医薬品質評価タスクフォース (代表: 滝口直美) のメンバーは以下の通り。アステラス製薬: 下山敦子, アストラゼネカ: 小林夏季, エーザイ: 溝口潤一, MSD: 井上友美, 大塚製薬: 長谷川哲也, キッセイ薬品工業: 安田鉄郎, 協和キリン: 齊藤隼, サノフィ: 小林祐子, 三和化学研究所: 上地一広, 塩野義製薬: 関口光明, セルジーン: 古市将志, 大正製薬: 忍田祐一, 武田薬品工業: 長田敏明, 田辺三菱製薬: 宮原佑弥, 第一三共: 小林直樹, 大日本住友製薬: 滝口直美, 中外製薬: 宮野正明, 日本新薬: 井上俊彦, バイエル薬品: 中根サチ, バイオジェン・ジャパン: 小栗英生, ヤンセンファーマ: 石原亜矢, グラクソ・スミスクライム: 浅原初木

1. はじめに

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、固相合成法や液相合成法等の種々の化学合成法により製造される。現在は固相合成が主流であるが、特に固相合成においては、反応工程で生じる不純物を除去する機会が少なく、目的物質と性質が類似した不純物が含まれやすい。また、オリゴヌクレオチドは高分子量で負電荷を帯びた性質を持つため、核酸医薬品の品質評価において、構造の決定や不純物の分離分析をはじめ、低分子医薬品と比べて品質管理が困難な場合がある。

核酸医薬品の品質評価に関する規制整備の状況を見ると、核酸医薬品に特化したガイドラインは存在しないものの、海外では品質確保のための規格試験項目の提案文書や、不純物の管理方法に関するホワイトペーパー（以下、不純物 WP）が公表されている^{1,2)}。本邦においては行政文書である「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 日付け薬生薬審発 0927 第 3 号、以下、考慮事項通知³⁾）が発出されている。また、AMED 医薬品等規制調和・評価研究事業「アンチセンス医薬品の品質及び安全性評価に関する研究」班（代表：井上貴雄、以下、AMED 研究班）と日本製薬工業協会核酸医薬品質評価タスクフォース（以下、核酸品質 TF）が協力して、前述の不純物 WP や考慮事項通知を基に、現在の不純物管理の考え方を整理した⁴⁾。現在、開発が進められている核酸医薬品の品質評価は、これらの文書や既存の ICH ガイドラインを参考に、化合物の特性に応じてケースバイケースの対応を行うことが求められる。しかし、これまでに承認された核酸医薬品はまだ少なく、また、特に品質関連情報は各社の機密情報であるため開示内容も限られており、開発戦略を考えるための参照可能な情報は十分でない。

非臨床安全性評価に関しても同様の状況があり、日本核酸医薬学会レギュラトリーサイエンス (RS) 部会では、2017 年 7 月の第 8 回核酸医薬 RS シンポジウムにおいて、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を開催し、具体的な三つのケースについて安全性評価の考え方を議論した⁵⁻⁷⁾。本パネルディスカッションでは、開発段階に応じた安全性評価の具体的な考慮事項について目線を合わせることができ、産官学でコンセンサスを得る非常に有用な機会となった。

そこで、品質評価に関しても同様に、具体的に四つのケースを設定し、2019 年 7 月の第 12 回核酸医薬 RS シンポジウムにおいて「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—」と題したパネルディスカッションを行った。具体的なケースの設定は、核酸品質

TF 及び AMED 研究班を中心に議論し、1) ホスホロチオアート修飾結合におけるリン原子上の立体異性体の管理方法、2) 一本鎖オリゴヌクレオチドの不純物量と品質担保並びに含量算出方法、3) 二重鎖オリゴヌクレオチドの不純物管理及び含量算出方法、4) 製法変更時の同等性/同質性の考え方をテーマとして取り上げた。これらの論点について、核酸品質 TF が「相談者（開発者）」、独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA)、国立医薬品食品衛生研究所 (国立衛研)、大学、分析機器メーカー、製造企業等に所属する AMED 研究班のメンバーが「返答者（規制当局）」の立ち位置で「模擬 RS 戦略相談」を実施し、フロアからの意見も交えながら品質評価の考え方を議論した。

本稿では当日の議論内容について論点を整理して紹介する。核酸医薬品の構造や核酸医薬品に用いられる修飾核酸等の予備知識については他項を参照し^{8,9)}、その上で本項をお読み頂きたい。

2. パネルディスカッションを始める前に

医薬品の開発においては、基礎研究により医薬品となる可能性のある候補物質が見出された後、非臨床試験及び臨床試験においてその有効性及び安全性が評価される。これら評価結果に基づき製造販売業者により製造販売承認申請されると、PMDA において、「品質」、「有効性」及び「安全性」について現在の科学技術水準に基づき審査され、最終的に厚生労働大臣により、医薬品として製造販売が承認される。

医薬品候補物質の原薬製造は、小スケールの製造から検討が開始され、開発が進むに従い、徐々にスケールアップが実施される。その過程で、原薬の品質管理に重要となる有効成分の構造決定及び物理的・化学的性質、並びに不純物プロファイル等の分析評価が行われる。非臨床試験及び初期の臨床試験を実施する開発初期は、暫定的な製造工程並びに規格及び試験方法を設定し、原薬及び製剤を各試験に供す。開発後期は、市販製品を製造するための製造工程並びに規格及び試験方法を設定するため、製造工程や試験方法の改善が実施される。また、承認を取得した市販後も、継続的な改善が求められる。

上記のように、開発期間中及び市販後において、製造工程や試験方法を変更することがあるが、変更前後の品質の一貫性又は同等性/同質性を保証した上で実施する必要がある。開発期間を通じて試験に提供された原薬及び製剤の品質の一貫性を保証することにより、有効性及び安全性を評価する各試験で得られた結果を解釈することができる。

3. パネルディスカッション

本パネルディスカッションでは、核酸医薬品の品質評価を行う上で、既存のガイドライン等をそのまま適用することが困難な項目として、1) ホスホロチオアート修飾結合におけるリン原子上の立体異性体の管理方法、2) 一本鎖オリゴヌクレオチドの不純物量と品質担保並びに含量算出方法、3) 二重鎖オリゴヌクレオチドの不純物管理及び含量算出方法、4) 製法変更時の同等性/同質性の考え方の四つのテーマを設定した。冒頭でそれぞれのケースに対する開発者の考えを述べ、それに対してパネリストや会場の参加者に意見を求める形で議論を進めた。

3.1 ケース1：ホスホロチオアート修飾結合におけるリン原子上の立体異性体の管理方法

本ケースでは、「DNAのみで構成され、リン酸部が全てホスホロチオアート修飾された20塩基長のアンチセンスオリゴヌクレオチド」を仮想核酸医薬品に設定し、固相合成で製造した際のホスホロチオアート修飾におけるリン原子上の立体異性体の管理方法について議論した。本アンチセンスオリゴヌクレオチドの標的遺伝子は肝臓で発現しているX遺伝子とし、適応疾患は代謝性疾患とした。

3.1.1 開発者の考え

開発品はリン酸部が全てホスホロチオアート修飾された20塩基長のオリゴヌクレオチドであるため、理論上 2^{19} (524,288種)の立体異性体が存在し、これら全てを分離分析することは極めて困難である。立体異性体の管理方法に関して、考慮事項通知では、「多数の立体異性体の混合物となるホスホロチオアート修飾が施されたオリゴヌクレオチド(非架橋酸素原子が硫黄原子によって置換されている場合)やモルフォリノ核酸において、有効成分の立体異性体の分布を評価することが技術的に困難な場合は、リン原子の立体化学に影響を与える製造工程やパラメータを明らかにした上で、当該製造工程及びパラメータを的確に規定し、有効成分の立体異性体分布の恒常性を説明すべき」と記載されている³⁾。

そこで開発者は上記に基づき、二量体や三量体であれば、リン原子上の立体化学に由来する立体異性体の分離分析が可能であることから、二量体の固相合成において、立体異性体比率に影響を与える因子を特定し、このパラメータを適切に管理して20塩基長のオリゴヌクレオチドを合成することで立体異性体分布の恒常性を担保することを考えた。ここで、カップリング反応に用いる活性化剤は1H-テトラゾールとし、反応温度やS化剤の種類と量等の条

件は一定とした上で、主要なパラメータである1H-テトラゾールの添加量及びカップリング反応時間について検討を行った(Table 1)。検討には、2'-デオキシ-P-チオグアニリル-(3'→5')-2'-デオキシシチジン(GC二量体)を選定した。

検討の結果、1H-テトラゾールの添加量が2~4当量、カップリング反応時間が5~40分の範囲であれば、立体異性体比率に与える大きな影響はないことが判明した^{注1)}。そのため、上述の範囲内で一定の反応条件下で合成することにより、立体異性体比率の恒常性を担保することが可能と考えた。

3.1.2 ディスカッションの要約

- 開発者の示す方法は、考えられるアプローチである。ただし、評価に用いたモデル(GC二量体での検討)の妥当性については、十分検討しておく必要がある。
- 先行研究で同様の反応条件における検討が実施されており、それを活用できる場合、必ずしも全ての条件で検討する必要はない。例えば、DNAの立体異性体比率については論文等で報告があるため¹⁰⁾、特定のモデルにおいて検討することで評価できる可能性もある。
- 新規のアミダイト体を用いたホスホロチオアート修飾オリゴヌクレオチド合成の場合は、アミダイト体由来する構造がホスホロチオアート結合の立体構造に与える影響について十分な検討が必要になる可能性が高い。
- 鎖長が長くなると立体異性体比率が変わる傾向も認められている(未発表データ)。実際の立体異性体比率を評価することは困難であるため、申請する製造方法で製造することにより、ロット間で立体異性体比率が変わらないことを科学的に考察することが重要である。

3.1.3 結論

ホスホロチオアート修飾オリゴヌクレオチドの立体異性体の分離分析が困難である以上、全ての立体異性体を正確に評価することは困難である。したがって、先行研究や上述のような二量体での検討結果等に基づいて、製造ロッ

Table 1 二量体の固相合成のカップリング反応時間及び1H-テトラゾール添加量が生成物の立体異性体比率(R:S)に及ぼす影響

	カップリング反応時間					
		5分	10分	20分	40分	80分
1H-テトラゾール 添加量	2当量	51:49	51:49	48:52	50:50	55:45
	3当量	53:47	50:50	48:52	51:48	58:42
	4当量	48:52	52:48	49:51	50:50	58:42
	5当量	55:45	55:45	56:44	57:43	60:40

表中の比は生成された二量体の立体異性体比率(R:S)

^{注1)} 本記載は、議論を進めるために設定した仮のデータであり、実際の実験結果に基づいて設定されたものではない。

ト間で立体異性体比率が変わらないことを科学的に考察し、適切な管理戦略を構築することが重要である。

3.2 ケース2：一本鎖オリゴヌクレオチドの不純物量と品質担保並びに含量算出方法

本ケースでは、「リン酸部が全てホスホロチオアート修飾され、Locked Nucleic Acid (LNA) 及び DNA から構成される 13 塩基長のアンチセンスオリゴヌクレオチド」を仮想核酸医薬品に設定し、不純物量の算出方法、不純物に関する品質の一貫性の考え方及び目的物質の含量算出方法について議論した。本アンチセンスオリゴヌクレオチドの標的遺伝子は肝臓で発現している Y 遺伝子、適応疾患は代謝性疾患とし、現在、非臨床安全性試験用原薬の製造及び分析を実施している段階とした。なお、ここでは不純物としてオリゴヌクレオチド類縁物質に焦点を当てて議論した。

3.2.1 開発者の考え

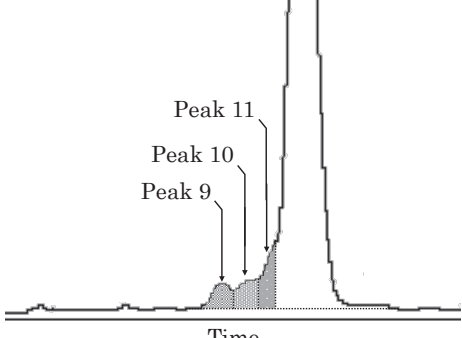
開発品には目的物質と性質の類似したオリゴヌクレオチド類縁物質が多種類混在しており、完全な分離分析は困難である。オリゴヌクレオチド類縁物質の管理方法に関し、考慮事項通知では、「一つの類縁物質群を構成する個々の類縁物質は生物学的な特性が互いに異なる可能性があることを踏まえた上で、適切である場合には、一群のオリゴヌクレオチドとして管理することができる」との記述や、「類縁物質群に含まれる個々の類縁物質全てを同定することを求めるものではないが、開発段階からの品質の一貫性並びに、有効性及び安全性の確認された主要な臨床試験に用いられた原薬及び製剤と市販製品との同等性/同質性を説明する上で、十分な特性解析がなされていなければならない」との記述がある³⁾。

そこで開発者は、この考えに基づき以下の手順によりオリゴヌクレオチド類縁物質量の適切な算出が可能であると考えた (Table 2)。

- 1) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で可能な限り分離分析を行い、各ピークの面積百分率 (Area%) を求める。
- 2) 各ピーク中に存在する不純物の構造を質量分析法 (MS) の結果得られた質量より推定する。
- 3) 各ピーク中の各不純物の存在比を MS で得られるイオン強度より算出する。前提として、オリゴヌクレオチド類縁物質は互いに構造が類似していることから、各不純物間でイオン化効率率は同一と仮定する。
- 4) HPLC で求めた Area% にイオン強度比を乗じて、個々の不純物量を算出する。

今回、HPLC/MS のうち、HPLC は逆相イオン対高速液体クロマトグラフィー (RP-IP-HPLC) を、MS はエレ

Table 2 オリゴヌクレオチド類縁物質量の算出方法



ピーク番号	ピーク面積百分率 (Area%)	推定構造	存在比 ^{*4}	含量 (Area% × 存在比)
9	3%	FLP - 5 (L)MP ^{*1}	1	3%
10	5%	FLP - 5 (L)MP ^{*1}	1	1% (5% × 1/5)
		FLP - dCMP	2	2% (5% × 2/5)
		FLP - 284.4 ^{*2}	2	2% (5% × 2/5)
11	3%	FLP - dCMP	1	1% (3% × 1/3)
		PS → PO ^{*3}	2	2% (3% × 2/3)

^{*1}: 目的物質 (FLP) より一つの 5-メチルシトシン LNA 体 [5 (L)MP] が欠損した n-1 欠損体

^{*2}: FLP より質量が 284.4 Da 小さい構造

^{*3}: ホスホロチオアート修飾結合の一つがホスホジエステル結合に変化した変化体

^{*4}: 各ピークに含まれる各不純物のイオン強度比から算出

クトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) を用いた。また、目的物質 (Full Length Product, FLP) より一つのデオキシチジン体 (dCMP) が欠損したオリゴヌクレオチド類縁物質 (FLP-dCMP) は、FLP 中の dCMP の欠損位置の判断は困難であるため、「FLP-dCMP 群」として群管理を行うことを考えた。今後、メジャーな製法変更がなければ、本分析法によりオリゴヌクレオチド類縁物質を管理する考えである。また、不純物に関する品質の一貫性の考え方としては、上述の方法を用いて算出した非臨床安全性試験用ロットの各不純物量を指標として、臨床試験用ロット中の不純物量は、それを上回らないように管理することを考えた。

次に、一本鎖オリゴヌクレオチドの含量算出方法について考察した。一般に開発初期では、HPLC で都度定量を行うための高純度な標準物質を十分量得ることが困難な場合が多い。そのため、少量の標準物質から決定したモル吸光係数を用いて、試料溶液の吸光度から総オリゴヌクレオチド量を求め、上述の HPLC/MS より求めた純度 (%) を掛け合わせることで、目的物質の適切な含量算出が可能になると考えた。

3.2.2 ディスカッションの要約

- 不純物分析は HPLC でできる限りの分離条件を検討することが重要だが、どうしても分離できない場合には

HPLC/MSを用いることは考えられる方法である。ここでは、不純物ごとにイオン化効率を同一としている点が論点となる。

- HPLC/MSでは、保持時間が重なることによるマトリックス効果も実際には起きており、厳密に言えばイオン強度＝存在量とはならない。それを理解した上で評価すべきであるが、現状の分析技術で本方法の代替になるものはおそらくないと考えられるため、イオン強度を存在量と仮定する考え方は、開発初期の段階であれば受け入れられるのではないか。
- 一方、MSを用いてオリゴヌクレオチドを分析する際には、データ処理方法についても十分に注意を払う必要がある。MSで分析する場合、多価イオンの分散があり、金属イオンが付加したアダクトイオン等も発生する。更に、アイソトープイオンもある。定量を行うにあたっては、これらを全て合算するのが真値に近いと考えられる。市販の解析ソフトは、このような合算が可能なものがほとんどであり、最新のインフォマティクスを使うことも重要である。
- 非臨床安全性試験用ロットの各不純物量を超えない、つまり、安全性が確認された範囲で臨床試験用ロットを管理していくという考え方は重要であり、問題ない。
- 特に開発初期の製造経験が多くない時期においては、品質特性に影響を与える要因が全て明らかになっていないと考えられるため、メジャーな変更の有無に関わらず、製造方法が確立されるまでは不純物プロファイルの変化を可能な限り捉えるという観点で、HPLC及びHPLC/MSだけでなく、多角的に複数の分析方法を検討すべきである。
- 含量の算出方法については、開発初期の段階で目的物質のモル吸光係数を決定し、吸光度から求めた含量値に、HPLC純度を掛け合わせるという考え方は問題ない。ただし、HPLC純度を掛け合わせるにあたり、分析方法が十分に検討され、適切にバリデートされていることが前提となる。

3.2.3 結論

オリゴヌクレオチド類縁物質及び一本鎖オリゴヌクレオチド含量の算出において、開発者が示す試験方法は考えられるアプローチである。ただし、試験法の開発に際し、開発初期の段階から十分な検討を行い、妥当性を示すことが重要である。また、開発期間を通じて品質の一貫性を担保する際に、非臨床安全性試験及び臨床試験で安全性が確認された各不純物量を超えないよう、以降に製造するロットの品質を管理していく考え方が重要である。

3.3 ケース3：二重鎖オリゴヌクレオチドの不純物管理及び含量算出方法

本ケースでは、「リン酸部が全てホスホジエステル結合で連結された21塩基長のセンス鎖及び23塩基長のアンチセンス鎖からなる二重鎖オリゴヌクレオチド (siRNA)」を仮想核酸医薬品に設定し、ケース2の一本鎖オリゴヌクレオチドと同様に不純物管理及び含量算出方法について議論した。本siRNAの標的遺伝子は肝臓で発現しているZ遺伝子、適応疾患は代謝性疾患とし、現在、非臨床安全性試験用原薬の合成及び分析を実施している段階とする。

3.3.1 開発者の考え

二重鎖オリゴヌクレオチドは一本鎖オリゴヌクレオチドと比較し、より複雑なオリゴヌクレオチド類縁物質のプロファイルを有する。二重鎖オリゴヌクレオチドに特有の不純物としては、二重鎖形成時に生じる過剰な一本鎖オリゴヌクレオチドや、完全長のアンチセンス鎖とn-1欠損体のセンス鎖からなる鎖長の異なる二重鎖オリゴヌクレオチド等が考えられる。特に、後者の例のような二重鎖オリゴヌクレオチドの類縁物質は、目的物質及び同様の類縁物質と物性が非常に似ているため、完全な分離分析は極めて困難となる。

このような中、開発者は二重鎖オリゴヌクレオチドの不純物の管理方法として、アニーリング前の一本鎖オリゴヌクレオチドの段階において一定の範囲内で不純物量を管理し、その上でアニーリング後に非変性分析にて過剰な一本鎖オリゴヌクレオチド含量等を管理するという段階的な管理を行うことを考えた。つまり、アニーリング前に各鎖に由来する不純物の推定構造及び含量をケース2と同様にHPLC/MSにより解析し、アニーリング後は非変性条件のRP-IP-HPLCやサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) で過剰な一本鎖オリゴヌクレオチド及び凝集体の含量を確認するという考えである (Fig. 1)。なお、アニーリング前の分析データを用いることの妥当性については、アニーリング後の二重鎖オリゴヌクレオチドを変性分析し、アニーリング工程における新規不純物の産生がないことを確認する。

二重鎖オリゴヌクレオチドの含量算出についても、ケース2と同様に、モル吸光係数を活用した評価を行うことを考えた。しかし、開発者は完全長の二重鎖オリゴヌクレオチドのみを検出する試験法を開発できておらず、含量算出に用いる開発化合物の純度を正確に算出できない状況にあった。そこで開発者は、非変性条件のRP-IP-HPLCにより得られた二重鎖オリゴヌクレオチドのピークのArea%を純度とし (Fig. 2, 純度 = 99%)、暫定の含量を算出することを考えた。この考え方の妥当性の根拠として、1) 鎖長が数塩基短くなっても、遺伝子発現抑制効果が低

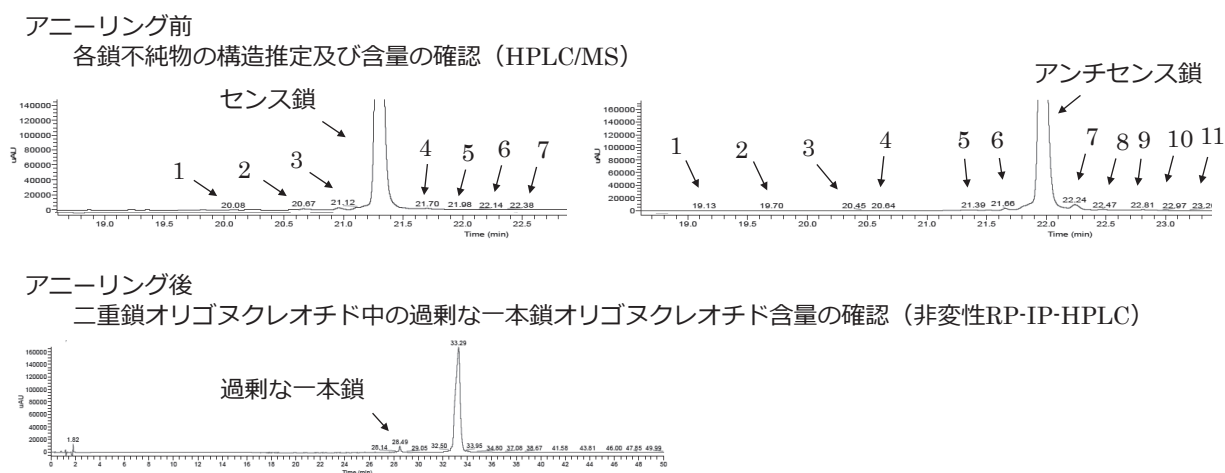


Fig. 1 二重鎖オリゴヌクレオチドの不純物の管理方法

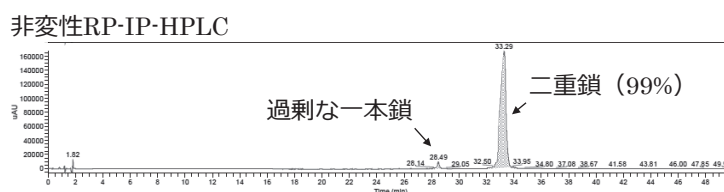


Fig. 2 二重鎖オリゴヌクレオチドの含量の算出方法

下しないとの報告があり¹¹⁾、不完全な二重鎖オリゴヌクレオチドでも活性が全くないものではないと想定されること、2) 開発初期の段階であるため、今後分析法開発を継続していくことで、非臨床安全性試験で用いた原薬データの妥当性を評価可能になることが挙げられた。

3.3.2 ディスカッションの要約

- 二重鎖オリゴヌクレオチドに含まれる不純物の管理方法について、アニーリング前に各一本鎖オリゴヌクレオチド段階で不純物を管理しておくことは重要なアプローチである。しかし、アニーリング後の原薬が保存中に分解する可能性もあり、分解生成物のプロファイルを評価する試験方法は必ず必要になるため、早期からアニーリング後の変性分析試験法も開発すべきである。
- 含量の試験方法は、考慮事項通知にも記載されている通り、原則、特異性の高い方法が求められる。可能な限り不純物の影響を受けない方法を検討すべきである。
- 開発初期においては開発者の考える方法で含量算出を行い、開発が進んで試験法も確立されてきた段階で、非臨床安全性試験に用いた原薬ロットを再評価し、有効性や安全性の妥当性を再確認するという方法も考えられる。しかし、不純物が含まれる可能性のある方法を含量の評価方法として設定するリスク(有効成分量の過大評価)を考慮して、開発初期から特異性の高い含量算出法を設定することが勧められる。

3.3.3 結論

二重鎖オリゴヌクレオチドの不純物評価において、アニーリング前に各鎖の不純物を管理しておくのは重要なアプローチである。更に、開発初期の段階からアニーリング後の変性分析法による試験方法も開発し、詳細に検討すべきである。また、含量の試験方法についても、後の開発リスクの低減のためにも、特異性の高い試験法を早期に開発することが勧められる。

3.4 ケース4：製法変更時の同等性/同質性の考え方

本ケースでは、製造方法の変更に伴う核酸医薬品の同等性/同質性の評価に関して議論した。考慮事項通知では、「製造方法の変更に伴う同等性/同質性の評価に際しては、ICH ガイドライン Q5E に示されている考え方を参考にすることが適切な場合がある」と述べられている³⁾。この考えに基づき、核酸医薬品の原薬の製造方法の変更に伴う同等性/同質性の評価をすることを想定し、パネルディスカッションにおいては、特に、製造方法の変更前後における原薬の不純物プロファイルの比較方法及び評価方法について議論した。

議論の対象とした仮想核酸医薬品は、ケース1と同じ20塩基長のDNAから構成されるアンチセンスオリゴヌクレオチドとした。代謝性疾患を適応症として開発中であ

り、第3相試験開始後、承認申請前の段階において、原薬の製造方法を固相合成法の「製法1」から液相合成法の「製法2」に変更することとした。

3.4.1 開発者の考え

製法1及び製法2により製造した原薬(以下、それぞれ「製法1原薬」及び「製法2原薬」)の不純物プロファイルについて、ケース2と同様に可能な範囲でHPLCにより不純物分離を試み、各ピークに含まれる不純物の構造は質量分析から求められた質量データを基に推定した。また各不純物の含量については、不純物が含まれるピーク面積比及びMSにおけるイオン強度比を基に算出した。

製法1原薬及び製法2原薬の不純物プロファイルを比較した結果、RP-IP-HPLCのUVクロマトグラムは類似していたが、MSから推定される不純物の種類やその含量に差異が認められた(Table 3)。そこで、ICHガイドラインQ5Eに定められる同等性/同質性の一般原則に基づき、製法変更前後の品質特性になんらかの差異があったとして

も、最終製品の安全性や有効性には影響を及ぼさないであろうことを示すことを試みた。不純物WPにおいて、核酸医薬品の安全性確認の必要な閾値として1.5%が提案されていることから²⁾、本ケースでは、当該閾値を利用して、安全性について考察することとした。

各原薬の不純物プロファイルを比較した結果、以下のことを確認した。

- 両製法により製した各原薬において共通で認められた不純物
 - 製法2原薬の各不純物量が製法1原薬以下である
 - 製法2原薬の各不純物量が製法1原薬以上であるが、いずれも、不純物WPに示される安全性確認の必要な閾値である1.5%以下である
 - 製法2原薬において新たに認められた不純物
 - 不純物WPに示される安全性確認の必要な閾値である1.5%以下である
- 以上の評価結果より、開発者は製法変更前後の原薬の不

Table 3 製法変更前後の不純物プロファイルの比較

製法1(変更前)				製法2(変更後)				
ピーク	質量	推定構造	含量	ピーク	質量	推定構造	含量	変更前との比較
1	6028.0	FLP - dTMP	0.8%	1	—	—	—	不検出
—	—	—	—	—	6042.8	FLP - dCMP	0.6%	新規
2	6027.9	FLP - dTMP	0.6%	—	—	—	—	不検出
—	6032.7	unknown	0.6%	—	—	—	—	不検出
—	6332.2	PS → PO	0.6%	—	6332.5	PS → PO	0.4%	共通 A (↓)
—	—	—	—	—	6364.6	unknown	0.4%	新規
3	6348.3	FLP	*1	2	6348.4	FLP	*2	—
4	6348.2	FLP	*1	3	6348.0	FLP	*2	—
—	—	—	—	—	6352.5	unknown	0.5%	新規
—	—	—	—	—	6344.8	unknown	0.4%	新規
5	6348.0	FLP	*1	4	6348.2	FLP	*2	—
—	6401.7	FLP + シアノエチル基	1.0%	—	6401.5	FLP + シアノエチル基	0.8%	共通 A (↓)
6	6348.2	FLP	*1	5	6348.1	FLP	*2	—
—	6418.3	FLP + イソブチリル基	0.9%	—	6418.2	FLP + イソブチリル基	1.2%	共通 B (↑)
—	6433.2	unknown	1.0%	—	—	—	—	不検出

*1: 製法1における Total FLP: 94.5%

*2: 製法2における Total FLP: 95.7%

新規: 製法変更前では検出されなかったが、製法変更後に新たに検出された不純物。

共通 A (↓): 両製法において共通で認められた不純物。製法変更後の不純物量が製法変更前以下。

共通 B (↑): 両製法において共通で認められた不純物。製法変更後の不純物量が製法変更前以上であるが、不純物WPで提唱される安全性確認の必要な閾値(1.5%)以下。

不検出: 製法変更前では検出されたが、製法変更後に検出されなかった不純物。

純物プロファイルは同等/同質であると考えた。

3.4.2 ディスカッションの要約

- 不純物 WP で示された安全性確認の閾値を同等性/同質性の判定に利用することの適切性が論点となる。閾値は各々の開発品ごとのデータに基づいて設定する必要があり、規制当局として、不純物 WP で示された閾値をそのまま受け入れることは難しい。閾値設定のために産官学で議論する必要がある。また、海外との整合性も必要であるため、ICH 等で議論すべきと考える。
- 現在 AMED 研究班では、原薬に含まれるオリゴヌクレオチドに特有の不純物が生体に与える影響について解析を行っている。これまでに得られているデータとしては、不純物として 1.5%程度が原薬に混入しても、ハイブリダイゼーション依存的な遺伝子発現変動には影響を与えず、また、強い毒性を誘発するオリゴヌクレオチドについて、1.5%に相当する量をマウスに投与しても、毒性が生じないという予備的データを得ている。これらの実験的データが不純物の閾値設定に資する科学的根拠になると考えられる。
- 不純物 WP を引用することによる閾値の利用はすぐには受け入れられないが、開発過程で得られた情報や文献情報に基づく科学的根拠から、安全性を考慮した上で、開発者が適切な閾値を設定することは可能と考えられる。
- 製法変更した場合はどうしても不純物プロファイルが変わってしまうため、開発者側としては、製法変更前後のブリッジングのための必要な評価について具体的な情報(試験の規模感等)が示されると有用である。
- 製品中の不純物が少ないことは望ましいことではあるが、製法変更においては、品質の同等性/同質性を担保することが重要である。例えば、不純物を低減させるための製法変更に伴い、立体異性体比率が変化することで有効性及び安全性が保証できなくなるのであれば、製法変更しないことが望ましいケースも考えられるかもしれない。

3.4.3 結論

製法変更前後の HPLC/MS を基にした不純物プロファイルと比較し、適切な安全性確認の必要な閾値を利用して同等性/同質性を評価することについては異論がなかった。しかし、現時点では核酸医薬品の安全性確認の閾値について十分な議論ができていないと難しい。広く核酸医薬品に適用可能な一律の閾値を設定することはコンセンサスが得られていない。今後、閾値の設定のために、安全性に関する根拠となるデータを基にした産官学での議論や、海外との整合性を得るための ICH 等における議論が必要である。

4. おわりに

本パネルディスカッションでは、核酸医薬品の品質評価について、四つのケースを設定して議論を行った。核酸医薬品は低分子医薬品と比較し、構造決定や不純物の分離分析が困難であるため、試験法の開発にも相当の努力が必要となる。しかし、開発段階における種々のリスクを考えた場合、可能な限り開発初期から、有効性及び安全性担保の根拠となる試験方法を設定すべきである。

品質評価の考え方を整備する上で基盤となるレギュラトリーサイエンス研究は、本邦では現在 AMED 研究班が先陣を切って進めている。また、分析技術も日々進歩している。本パネルディスカッションでの結論は、あくまで現時点のサイエンスに基づいて導かれたものであり、また、仮想核酸医薬品の前提が異なれば結論も異なる可能性がある。その点は留意いただき、今後も日々進歩するサイエンスに基づき、規制に関する議論を産官学共同で継続する必要があると考える。

おことわり

本稿は日本医療研究開発機構(AMED)医薬品等規制調和・評価研究事業「アンチセンス医薬品の品質及び安全性評価に関する研究」班における現在の見解を示したものである。独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)の職員が共著者に含まれるが、PMDA の公式見解を示すものではない。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Capaldi, D.; Ackley, K.; Brooks, D.; Carmody, J.; Draper, K.; Kambhampati, R.; Kretschmer, M.; Levin, D.; McArdle, J.; Noll, B.; Raghavachari, R.; Roymoulik, I.; Sharma, B.P.; Thürmer, R.; Wincott, F. Quality Aspects of Oligonucleotide Drug Development: Specifications for Active Pharmaceutical Ingredients. *Drug Inf. J.* 2012, 46 (5), p.611-626. doi: 10.1177/0092861512445311.
- 2) Capaldi, D.; Teasdale, A.; Henry, A.; Akhtar, N.; Besten, CD.; Gao-Sheridan, S.; Kretschmer, M.; Sharpe, N.; Andrews, B.; Burm, B.; and Foy, J. Impurities in Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products. *Nucleic Acid Ther.* 2017, 27 (6), p.1-14. doi:10.1089/nat.2017.0691.
- 3) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長。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、薬生薬審発 0927 第 3 号、平成 30 年 9 月 27 日。
- 4) 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, 核酸医薬品に含まれる不純物の管理に対する考え方. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2020, 50 (1), p.11-21.
- 5) 木下潔, 真木一茂, 荒戸照世, 太田哲也, 小野寺博志, 佐藤秀昭, 中澤隆弘, 平林容子, 笹木修, 三井田宏明, 吉田徳幸, 渡部一人, 小比賀聡, 井上貴雄. 核酸医薬品の安全

- 性評価に関する考え方—仮想核酸医薬品をモデルとして—
第1回：オンターゲット毒性評価の省略. 医薬品医療機器
レギュラトリーサイエンス. 2018, 49 (2), p.105-111.
- 6) 木下潔, 真木一茂, 荒戸照世, 太田哲也, 小野寺博志, 佐藤秀昭, 中澤隆弘, 平林容子, 笛木修, 三井田宏明, 吉田徳幸, 渡部一人, 小比賀聡, 井上貴雄. 核酸医薬品の安全性評価に関する考え方—仮想核酸医薬品をモデルとして—
第2回：局所投与剤の毒性評価. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2018, 49 (3), p.157-163.
- 7) 木下潔, 真木一茂, 荒戸照世, 太田哲也, 小野寺博志, 佐藤秀昭, 中澤隆弘, 平林容子, 笛木修, 三井田宏明, 吉田徳幸, 渡部一人, 小比賀聡, 井上貴雄. 核酸医薬品の安全性評価に関する考え方—仮想核酸医薬品をモデルとして—
第3回：既存情報の有効活用. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2018, 49 (4), p.207-214.
- 8) 井上貴雄. 核酸医薬品の創出に向けた産官学の取り組み, 第1回核酸医薬品の開発動向と規制整備の現状. PHARM TECH JAPAN. 2019, 35 (13), p.7-19.
- 9) 井上貴雄. アンチセンス医薬開発の潮流. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2019, 50 (1), p.12-22.
- 10) Jahns, H.; Roos, M.; Imig, J.; Baumann, F.; Wang, Y.; Gilmour, R.; Hall, J. Stereochemical bias introduced during RNA synthesis modulates the activity of phosphorothioate siRNAs. *Nat. Commun.* 2015, 6, 6317, p.1-9. doi: 10.1038/ncomms7317.
- 11) Chang, CL; Yoo, JW; Hong, SW; Lee, SE; Kang, HS; Sun, X; Rogoff, HA; Ban, C; Kim, S; Li, CJ; Lee, DK. Asymmetric Shorter-duplex siRNA Structures Trigger Efficient Gene Silencing With Reduced Nonspecific Effects. *Mol. Ther.* 2009, 17 (4), p.725-732.