

総説

核酸医薬品に含まれる不純物の管理に対する考え方

関口光明^{*1}, 伊藤浩介^{*2}, 齊藤隼^{*3}, 滝口直美^{*4},
製薬協核酸医薬品質評価タスクフォース^{*7},
吉田徳幸^{*5,*6}, 小比賀聡^{*6}, 井上貴雄^{*5,*6}

Consideration for Impurities Contained in Oligonucleotide Therapeutics

Mitsuaki SEKIGUCHI^{*1}, Kosuke ITO^{*2}, Jun SAITO^{*3}, Naomi TAKIGUCHI^{*4},
JPMA Oligonucleotide Quality Task Force^{*7},
Tokuyuki YOSHIDA^{*5,*6}, Satoshi OBIKA^{*6} and Takao INOUE^{*5,*6}

1. はじめに

アンチセンスや siRNA に代表される核酸医薬品は、これまで治療法がなかった難治性疾患や遺伝性疾患に対する新しい治療手段として注目を集めている。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、化学合成により製造される。また、「核酸」で構成されるものの、天然核酸の使用は限定的であり、そのほとんどに修飾核酸が含まれている。作用の観点からも、RNA と相補的に結合する性質があるなど、構造的にも作用様式としても、核酸医薬品は従来の医薬品にはない新規の性質を有する。以上の観点から、核酸医薬品の品質評価についても、オリゴヌクレオチドに特有の考慮事項が存在すると考えられるが、現時点では核酸医薬品に特化した国際的なガイドラインは存在しない。

この背景の下、国内では厚生労働省が主導する「革新的

^{*1} 塩野義製薬株式会社 兵庫県尼崎市杭瀬寺島 2 丁目 1-3 (〒660-0813)

Shionogi & Co., Ltd., 1-3 Kuise Terajima 2-chome, Amagasaki, Hyogo 660-0813, 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} 協和キリン株式会社 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188 (〒411-8731)

Kyowa Kirin Co., Ltd., 1188 Shimotogari, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka 411-8731, Japan

^{*4} 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

^{*5} 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

^{*6} 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

^{*7} 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・スミスクライン: 浅原初木

医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業(2012～2016年度)」において、大阪大学大学院薬学研究科の小比賀聡教授を中心とする研究班により、「核酸医薬の品質の担保と評価における考慮事項」が取り纏められた。この成果は更に、厚生労働省においてパブリックコメント等も考慮しながら適宜修正が行われ、「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)」(以下、考慮事項)として発出された¹⁾。

一方、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の医薬品等規制調和・評価研究事業では、規制整備に資するウェット研究を推進する研究班(「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)が2018年度に立ち上げられた。本研究班(以下、AMED研究班)では、核酸医薬品の品質・安全性評価法の確立や審査指針の根拠となるデータの取得が行われており、品質については、オリゴヌクレオチドの分析手法や不純物閾値の判断基準など、科学的根拠に基づく知見を上述の考慮事項に付与するための研究が行われている。更に、日本製薬工業協会(製薬協)では、AMED研究班の立ち上げに呼応する形で、「核酸医薬品質評価タスクフォース(以下、核酸品質TF)」が設置された。核酸品質TFには核酸医薬開発に関心を持つ22社が参画しており、AMED研究班と一体となり、規制整備を目指した活動を行っている。

AMED研究班は、これまで核酸品質TFと共に、考慮事項及びOligonucleotide Safety Working Group(OSWG)が2017年に発表したホワイトペーパー(WP)「Impurities in Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products」²⁾を基に、核酸医薬品の不純物管理の現状と課題を議論してきた。本稿では、考慮事項及びOSWGのWPにおける核酸医薬品の不純物の考え方を低分子医薬品のICHガイドラインと比較しながら概説するとともに、AMED研究班の現時点での考え方についても紹介する。

2. ICHガイドラインを踏まえた考察

化学合成で製造される低分子医薬品の不純物は、有機不純物、無機不純物(元素不純物)及び残留溶媒の三つに分類される。ICHでは、有機不純物に関するガイドラインとしてQ3A(原薬)及びQ3B(製剤)、残留溶媒に関するガイドラインとしてQ3C、更に残留金属や無機塩などの元素不純物に関するQ3Dが発出されている。本稿で対象と

している核酸医薬品の品質を議論するには、特に原薬の品質制御や品質管理が重要であると考えており、以降は原薬であるオリゴヌクレオチドに焦点を当てていく。

核酸医薬品の有効成分であるオリゴヌクレオチドは、一般に固相担体上で伸長反応を繰り返した後に担体から切り出され、カラムクロマトグラフィー精製、限外ろ過濃縮、凍結乾燥を経て製造される。各反応工程で生じる不純物は除去される機会が非常に限られるため、製造工程の最後、すなわちオリゴヌクレオチド原薬まで残存するものが多い。また、分子サイズが大きく、性質がよく似た不純物が含まれやすいため、有効成分と不純物の分離が困難な場合が多い。そのため、低分子医薬品の品質管理の考え方をそのまま適用することが難しい。実際ICHガイドラインQ3Aは、オリゴヌクレオチドを原薬とする医薬品を対象外としている。ICHガイドラインQ3Bには、製剤中の不純物のうち原薬の分解生成物の管理について記載があるが、基本的な考え方はQ3Aに従うため、オリゴヌクレオチド製剤は対象としていない。このように、オリゴヌクレオチドの品質管理に特化したICHガイドラインは存在していない。一方で、オリゴヌクレオチドが低分子医薬品と同様に化学合成される点を考慮し、既存のガイドラインに示されている原則を部分的に適用可能な場合がある(Table 1)。

残留溶媒及び無機不純物は、核酸医薬品においても製造中に混入し、残留する可能性のある不純物であることから、考慮事項並びにWPでは、ICHガイドラインQ3C及びQ3Dを適用して管理することが望ましいと述べている。

一方、有機不純物については、低分子医薬品と核酸医薬品では異なる考え方が必要になる。有機不純物は「製造工程由来の不純物」と「目的物質由来の不純物」に分類される。低分子医薬品では製造工程由来不純物及び目的物質由来不純物のいずれにおいても、ICHガイドラインQ3Aに従って管理される。しかし、核酸医薬品では製造工程由来不純物と目的物質由来不純物^{注1)}を区別して、個別に考慮する必要がある。核酸医薬品における製造工程由来不純物は、出発物質であるホスホロアミダイト体や脱保護工程で生じる保護基に由来する不純物などであり、いずれも低分子化合物であることから、AMED研究班ではICHガイドラインQ3Aに従って管理することが妥当と考えている^{3,4)}。一方、核酸医薬品における目的物質由来不純物については、その構造・物性が目的物質に類似していることから、分離分析が難しく、既存のICHガイドラインの適用が難しい

^{注1)} ICH Q6Bにおいて「目的物質由来不純物」は「製造中や保存中に生成する分子変化体であって、かつ生物活性、有効性及び安全性の点で目的物質に匹敵する特性を持たないものである」と定義されている。一方、本総説で議論する「核酸医薬品の目的物質由来不純物」は、構造的要素に着目した分類であり、生物活性、有効性及び安全性の要素は考慮していない。

Table 1 核酸医薬品の ICH ガイドラインに対する考え方

ICH ガイドライン トピック		国内	海外
		考慮事項 ¹⁾	ホワイトペーパー ²⁾
ICH Q1	安定性	適用される	議論されていない
ICH Q3A*	有機不純物	製造工程由来純物は適用される	
		目的物質由来不純物は部分的に適用される	独自の閾値を提案
ICH Q3C	残留溶媒	適用される	適用される
ICH Q3D	元素不純物	適用される	適用される

*「オリゴヌクレオチドを原薬とする医薬品は対象としない」と明記されている

場合もあると考える。例えば、WP においては原薬に含まれる不純物の報告、構造決定及び安全性確認の各閾値について、分析技術の限界等を考慮し、Q3A とは異なる独自の閾値を提案している。

AMED 研究班では、核酸医薬品の目的物質由来不純物に焦点を当て、ICH ガイドライン Q3A に述べられている化学的及び安全性の両観点から、不純物の分類、分析法及び管理の考え方について議論してきた。更に、不純物の管理又は安全性の確認を行う上で、重要な指標となる閾値の設定についても議論してきたので、次章以降に述べる。

3. 不純物の化学的観点からの考察

3.1 不純物の構造的分類

オリゴヌクレオチドはヌクレオチドを構成単位とする縮合反応の繰り返しにより連結され、その後、固相担体からの切り出し・脱保護工程とそれに続く精製工程を経て製造される。したがって、合成・切り出し・精製の各ステップにおける不純物の生成経路を把握することで、核酸医薬品の目的物質由来不純物を合理的に理解することができる。これまでに発表されている文献^{2,5,6)}を参考に、核酸医薬品に含まれる目的物質由来不純物を分類・整理した (Table 2)。

オリゴヌクレオチドのリン酸構造と関連する不純物としては、ホスホロチオアート修飾結合がホスホジエステル結合に変化した PS → PO 変化体がある。この不純物は、質量分析において、硫黄原子が酸素原子に変化したことに由来する 16Da 小さい質量を有する化合物として観測される。また、垂リン酸結合の酸化反応が不十分な場合、脱保護工程において脱離したジメトキシトリチル (DMTr) 基と垂リン酸官能基が反応した C- ホスホネート体不純物が生成することが報告されている⁷⁾。更に、合成工程で用いるジクロロ酢酸中の不純物 (トリクロロアセトアルデヒド) がリン酸部位に付加した不純物も報告されている⁸⁾。

オリゴヌクレオチドの糖部構造と関連する不純物は、主として精製工程において生じることが報告されている。

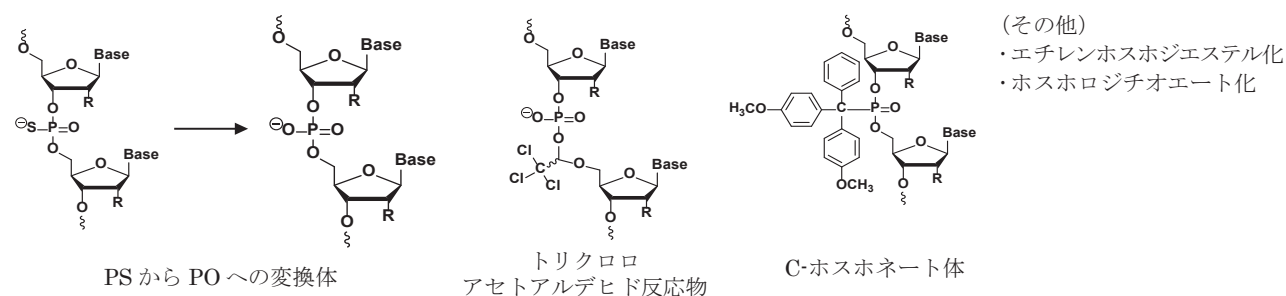
DNA オリゴヌクレオチドにおけるプリン塩基は酸性条件下で加水分解を受けやすく、プリン塩基が脱離した abasic 不純物を生成する。アデニン塩基が脱離すると 117Da 小さい質量を有する化合物として、グアニン塩基が脱離すると 133Da 小さい質量を有する化合物として、それぞれ観測される。RNA オリゴヌクレオチドは、2' 位保護基の脱保護工程あるいは精製工程において塩基性条件になると、2' 位と 3' 位水酸基間でリン酸ジエステルの交換が起こり、2'-5' ホスホジエステル体不純物を生じることがある。この不純物は目的オリゴヌクレオチドと同じ分子量であるが、構造変化に伴い高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離が可能となる。

オリゴヌクレオチドの塩基部位と関連する不純物は、主に固相担体からの切り出し・脱保護工程において生成する。DNA オリゴヌクレオチドの場合、汎用されるアンモニア水による切り出し条件において、リン酸エステルの保護基である 2'-シアノエチル基が脱離して生じるアクリロニトリルがチミン塩基の 3 位窒素原子に付加した結果、シアノエチル付加体が不純物として生成することがある。また、*N*-ベンゾイル基で保護されたシトシン塩基を含むオリゴヌクレオチドの場合、メチルアミン水溶液を用いて担体からの切り出しを行うと、シトシン塩基のアミノ基がメチルアミノ基に変換した不純物を生成することが知られている。グアニン塩基のイソブチリル保護基は他の保護基と比較すると加水分解を受けにくいいため、残存することでイソブチリル付加不純物が混入することがある。

オリゴヌクレオチドはヌクレオチドの伸長反応により合成されるため、ヌクレオチド単位で構造変化した不純物を生じることがある。固相合成における脱トリチル工程の効率が不十分な場合、本来連結するはずのヌクレオチドが導入されず、その結果、ヌクレオチド欠損体 (n-1 欠損体等) を生じる。また、縮合反応工程の弱酸性条件において DMTr 基の脱離が副反応として起きると、過剰にヌクレオチド伸長が起こり、ヌクレオチド付加体 (n+1 付加体等) を生成することになる。このようなヌクレオチド付加体はグアニン塩基の伸長反応時に生じやすいことが

Table 2 核酸医薬品の目的物質由来不純物の分類

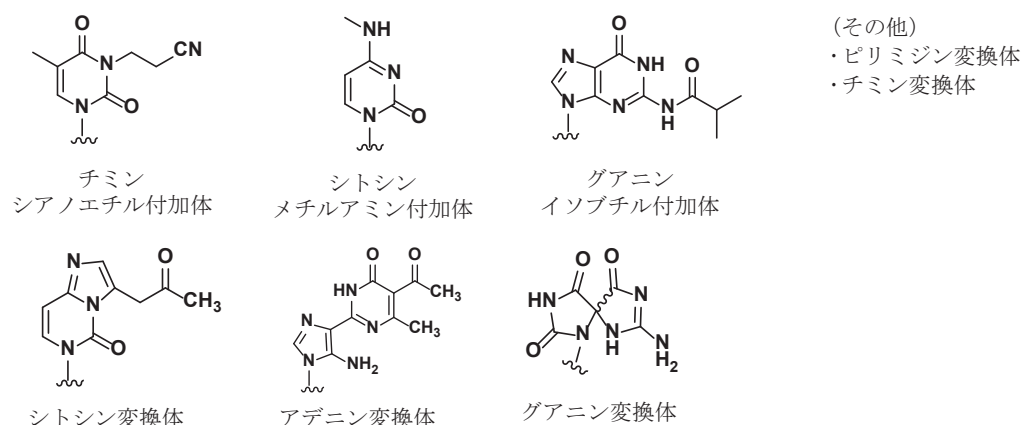
1. ヌクレオチド間のリン酸構造に関連する不純物



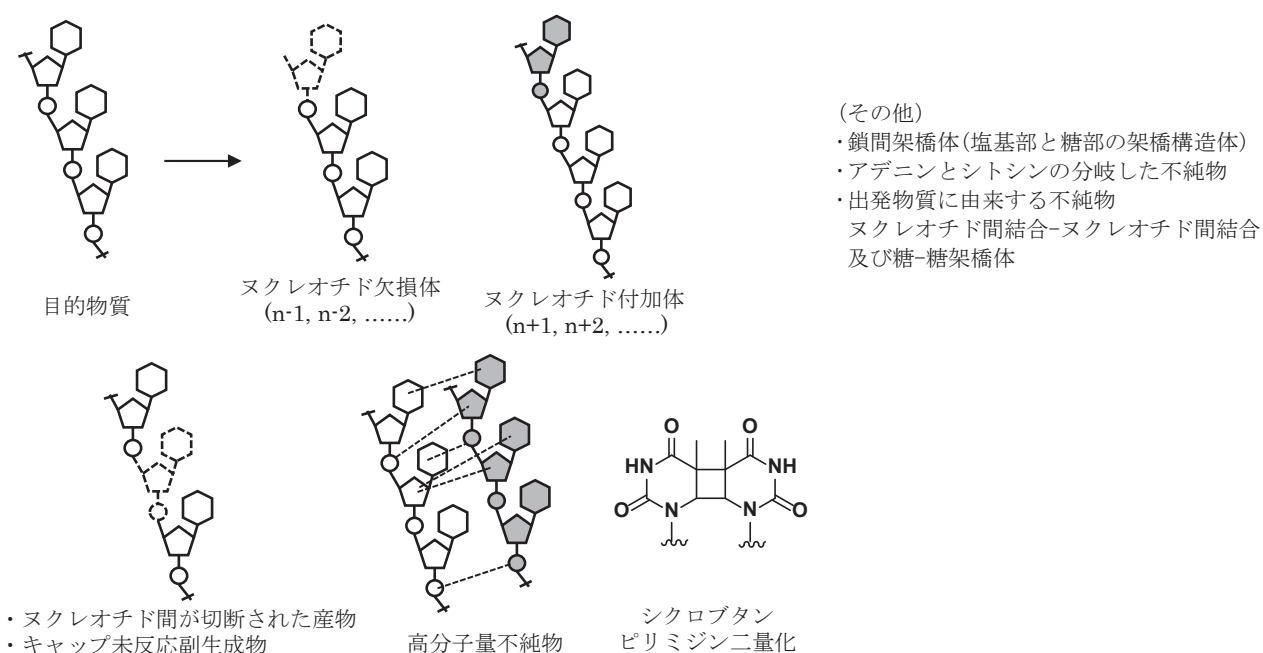
2. 糖部構造に関連する不純物



3. 塩基部位構造に関連する不純物



4. オリゴヌクレオチド鎖中の任意のヌクレオチドが欠損又は付加している構造体に関連する不純物



知られている。

このように、一般的に生成機構がよく理解されている不純物は、測定される質量情報から構造推定することが比較的容易であり、不純物の特性解析において、当該化合物に特有の試験データが求められることは少ないと考えられる。一方、生成機構との関連が明確ではない不純物の場合、簡便な質量分析だけでは構造決定に足る十分な根拠が得られないケースもあると考えられ、特有の実験データが求められる可能性がある。可能であれば、NMR 分光法、化学及び酵素消化、反応モデル系並びに合成による確認など、不純物の構造を説明する特性解析を適切に組み合わせることが必要と考える。

3.2 ホスホロチオアート結合の立体異性体

多くの核酸医薬品に用いられているホスホロチオアート結合は、リン原子上の立体化学に起因する異性体混合物を生じる。ホスホロチオアート結合の立体化学の違いにより、相補鎖に対する結合親和性や酵素耐性が変化することが知られている。製造パラメータの一つである活性化剤の種類を変えることで、リン原子上の立体異性体比率が変化すること^{9,10)}、また、これに伴い、活性発現に関与するタンパク質との親和性が変化することが報告されている^{10,11)}。これまでに承認されている核酸医薬品において、リン原子上の立体異性体を不純物とみなす例はないが、核酸医薬品の有効性を保証するためには立体異性体比率が一定になるように管理することが重要と考えられる。これに関して考慮事項では、「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には、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の一貫性により有効成分の立体異性体分布の恒常性を説明すべきである」と述べられている。

以上を念頭に、AMED 研究班では、立体異性体の具体的な管理方法について議論した。長鎖のホスホロチオアート修飾オリゴヌクレオチドに含まれる個々の立体異性体を分離分析することは技術的に極めて困難であるが、2～3

量体の短鎖長であれば HPLC による分析が可能となる¹²⁾。これを活用し、例えば2量体をモデルに、活性化剤の種類、当量、反応時間・温度等の製造パラメータと立体異性体比率の関連性を解析すれば、立体化学に影響を与える製造パラメータを特定できると考えられる。これらのデータを取得した上で、鍵となる製造パラメータの一貫性を示せば、科学的根拠に基づいて立体異性体の分布の恒常性を説明することが可能であり、立体異性体の管理方法として有用と考える。

3.3 不純物の分析法

核酸医薬品の開発においては、目的オリゴヌクレオチドから可能な限り、不純物を分離する手法の開発が求められる。核酸医薬品の品質管理に関する論文^{13,14)}を参考に、オリゴヌクレオチドに含まれる不純物の分析手法を整理した (Table 3)。一般的に用いられている技術としては、キャピラリーゲル電気泳動 (CGE) やアニオン交換高速液体クロマトグラフィー (AEX-HPLC) がある。最近では、逆相イオン対高速液体クロマトグラフィー (RP-IP-HPLC) 技術が普及し、鎖長の違いに基づく分離方法として CGE に代わって利用されてきている。また、試料を直接イオン化することができるエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) と HPLC との組み合わせは有効であり、RP-IP-HPLC/ESI-MS 技術がより一般的に利用されるようになってきている。一方、二重鎖オリゴヌクレオチドの場合、それぞれの一本鎖について実施される分析に加えて、二重鎖オリゴヌクレオチドに混在する過剰な一本鎖及び凝集体を分離・定量する観点から、非変性条件下における特性解析を実施することが重要になる。非変性条件下における不純物の主要な分析方法として、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、AEX-HPLC、RP-IP-HPLC 及び CGE が挙げられる。

このように様々な分析法が確立されてきているが、上述のとおり、核酸医薬品の不純物の多くは物性が類似しているため、一般に分離が困難である。また、核酸医薬品は塩

Table 3 一本鎖及び二重鎖核酸医薬品に含まれる不純物の分析手法

一本鎖核酸	アニオン交換高速液体クロマトグラフィー (AEX-HPLC) 逆相イオン対高速液体クロマトグラフィー (RP-IP-HPLC) キャピラリーゲル電気泳動 (CGE) エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS)
二重鎖核酸	非変性 サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 非変性 アニオン交換高速液体クロマトグラフィー (AEX-HPLC) 非変性 逆相イオン対高速液体クロマトグラフィー (RP-IP-HPLC) 非変性 キャピラリーゲル電気泳動 (CGE) 変性 アニオン交換高速液体クロマトグラフィー (AEX-HPLC) 変性 逆相イオン対高速液体クロマトグラフィー (RP-IP-HPLC) 変性 キャピラリーゲル電気泳動 (CGE)

基長、修飾核酸の種類や配置等の観点から構造が多様であるため、特定の核酸医薬品について最適化された分析法を他の核酸医薬品に適用することが難しいケースもあると考えられる。そのため、個々の核酸医薬品の特徴を踏まえて分析系を最適化し、状況に応じて複数の分析法を組み合わせることも有効であると考えられる。また、分離困難な不純物については、それらを一群として管理する考え方が有用であり、この場合、不純物プロファイルの一貫性を担保することが重要である。

3.4 不純物の管理

核酸医薬品は、オリゴヌクレオチドによって構成される比較的分子量の大きい化合物であるため、原薬に含まれる全ての不純物を特性解析することは技術的に難しい。そこで、特にオリゴヌクレオチドの製造工程において生成することが知られている不純物及びオリゴヌクレオチドの構造に由来して含まれることが予想される不純物を潜在的な不純物として想定し、そのうち実際に混入が認められる不純物について、規格を設定することが推奨される。

一本鎖オリゴヌクレオチドにおいて、n-1 欠損体は、固相合成中の脱トリチル化工程の効率に相関して生成しているとする報告があり^{2,6)}、核酸医薬品の原薬中によく見られる不純物である。そのため、多くの一本鎖オリゴヌクレオチドの規格では、純度試験の一つとして n-1 欠損体の規格が設定されることが想定される。しかしながら、一般に n-1 欠損体は目的オリゴヌクレオチドと分子量や物性が似ているため、分離が困難な場合がある。このことから、できる限りの分離分析ができる HPLC 条件の設定が求められるが、HPLC/MS を用いた質量差による分離分析法の適用も考えられる¹⁵⁾。二重鎖オリゴヌクレオチド原薬の場合、中間体とみなすことができる一本鎖オリゴヌクレオチドの製造に伴う不純物に加えて、二重鎖形成時に生じる可能性のある凝集体や残存する過剰な一本鎖オリゴヌクレオチドを考慮する必要がある。これら不純物は目的とする二重鎖オリゴヌクレオチドとは分子量が大きく異なるため、SEC を用いた純度試験が適していると考えられる。

核酸医薬品の製剤の規格は、製剤プロセス中の分解物及び副生すると考えられる不純物に焦点を当てることから、主として強制分解試験の結果に基づいて、管理する不純物を選択することが推奨される。規格の設定には、低分子化合物と同様に、pH (酸及びアルカリ)、温度、光照射などの条件下で実施された測定データを参考にすることができる¹⁶⁾。

3.5 構造決定及び安全性確認の必要な閾値

低分子医薬品の不純物の閾値については、ICH ガイド

ライン Q3A において、「原薬として 1 日当たりの摂取量が 2 g 以下の場合、報告の必要な閾値は 0.05%、構造決定及び安全性確認の必要な閾値はそれぞれ 0.10% 及び 0.15% 又は 1.0 mg (いずれもどちらか小さい方)」と設定されている。一方、核酸医薬品については Q3A ガイドラインの対象外であることが明記されている。考慮事項では、ICH ガイドライン Q3A に記載されている閾値を核酸医薬品に適用することは現実的ではないと記されていることから、現状では開発者が個々に不純物の閾値を適切に設定する必要がある。今後、統一された閾値が設定されることによって、核酸医薬品の開発が迅速化・効率化することが期待される。

一方、WP では核酸医薬品の不純物について、報告の必要な閾値は 0.2%、構造決定及び安全性確認の必要な閾値は、それぞれ 1.0% 及び 1.5% が提案されている。これは ICH ガイドライン Q3A に規定された低分子医薬品の場合よりも高い。ICH ガイドライン、考慮事項及び AMED 研究班の閾値に対する考え方の比較を Table 4 に纏めた。以降では、WP における閾値の提案根拠を紹介すると共に、AMED 研究班の見解を述べる。

3.5.1 WP における閾値の考え方

報告の必要な閾値の根拠について、WP では定量下限値に基づく見解が述べられている。低分子医薬品の場合、不純物は HPLC で容易に分離され、UV 吸光度で検出されるピークは通常単一成分であり、定量下限 0.02% 以下が容易に達成される。低分子医薬品において設定された報告の閾値 0.05% は、定量下限値の観点から技術的に判定可能であることが考慮されている。一方、核酸医薬品のクロマトグラム上のピークは、ブロード化する場合がある。これは、不純物の物性が似ているために一つのピークに複数のオリゴヌクレオチドが含まれることに由来する。特に、ホスホロチオアート修飾オリゴヌクレオチドの場合、目的オリゴヌクレオチドがジアステレオマー混合物であるためにその傾向が強い。そのため、ベースラインとのシグナルノイズ比 (S/N) が悪くなり、定量下限値が上昇する。HPLC で十分な分離ができない場合には、検出系として MS が用いられるが、MS の定量下限値は一般に 0.1 ~ 0.3% であり、UV 吸光度を用いた低分子医薬品の定量下限値よりも高くなる場合もある。実際の定量下限値は分子構造に依存するが、多くのケースで達成可能と考えられる 0.2% を報告の必要な閾値として提案されている。

構造決定及び安全性確認の必要な閾値について WP では、製造、分析技術及び安全性の観点から妥当性が述べられている。核酸医薬品は固相合成法によって製造され、合成反応の生成物を精製することなく次の反応が繰り返される。そのため、相当な種類と量の分離困難な不純物が混入

Table 4 閾値に対する考え方の比較

閾値	ICH Q3A	考慮事項 ¹⁾	ホワイトペーパー ²⁾	AMED 研究班の見解
報告の必要な閾値	0.05%	—	0.2%	—
構造決定の必要な閾値	0.10%	—	1.0%	—
安全性確認の必要な閾値	0.15%又は1.0 mg	—	1.5%	—
	—	- ICH Q3A の閾値を適用することは現実的ではない - 類縁物質又は類縁物質群として管理できる	- 定量下限値に基づく提案 - 固相合成法における品質管理可能なレベル - 欧州薬局方で規定されたペプチド医薬品における閾値を考慮 - モル量換算で低分子医薬品の不純物と同程度 - 主薬との構造の類似性や既報による不純物の毒性リスクを考慮	- 定量下限を一律設定することは困難 - 安全性確認の閾値及び構造決定の必要な閾値よりも十分に低いことが必要 - LC-UV/MS により技術的に達成可能なレベルである - 適切に設定された安全性確認の閾値よりも十分に低いこと及び不純物の管理戦略が適切に構築されていることが必要 - 主薬の安全性評価データの不純物含量から閾値を設定する

することになり、核酸医薬品の不純物を合理的に管理する上での制約となっている。

実際、同様の製造法が用いられるペプチド医薬品は、欧州薬局方 General Monographs 2034 Substances for Pharmaceutical Use において、構造決定及び安全性確認の必要な閾値は 0.5% 及び 1.0% と、低分子医薬品の場合よりも高い閾値が採用されている。WP では、核酸医薬品における構造決定の必要な閾値 1.0% は、製造及び分析技術の観点から管理可能な最小レベルであると主張されている。また、安全性の観点からの妥当性については以下のように述べられている。

- オリゴヌクレオチド不純物を 1.0% で管理することは、1/10 の分子量と仮定した低分子医薬品の不純物を 0.10% で管理することと、不純物のモル量に関しては、ほぼ同等となること
- 目的オリゴヌクレオチドと構造が類似する不純物は、毒性発現も類似すると推測されること
- 5% 程度の目的物質由来不純物を含む目的オリゴヌクレオチドの非臨床安全性評価データからは、不純物に起因する毒性は認められていないこと

低分子医薬品の安全性確認の閾値については、構造決定の閾値の 1.5 倍に設定されていることから、核酸医薬品についても同様に、構造決定の閾値 (1.0%) の 1.5 倍に当たる「1.5%」を安全性確認の必要な閾値として提案している。

3.5.2 AMED 研究班における閾値の考え方

報告の必要な閾値については、分析技術上の制約 (定量下限値) を考慮するとともに、安全性確認の閾値及び構造決定の閾値よりも十分に低いことが重要であると考えている (Fig. 1)。定量下限値について、LC によって分離可能な不純物の場合、ピークがブロード傾向となるホスホロチオアート修飾オリゴヌクレオチドを含め、UV 測定で定量下限 0.3~0.5% 程度の確保が可能であると考えている。一方、LC のみで分離できない不純物は LC/MS を用いて質量差により分離分析することが想定されるが、MS では不純物のイオン化効率や分析装置・条件の違いによって定量下限が変動するため、一律に下限値を設定することは困難と考えている。以上の見解から、WP で提案された閾値 0.2% を支持するには至っていない。

WP で示された構造決定及び安全性確認の必要な閾値 (それぞれ 1.0% 及び 1.5%) は、LC-UV/MS により技術的に達成可能なレベルであることから、技術的な観点において提案された閾値については支持できる。一方で、安全性確認の閾値を議論するにあたっては、安全性評価に関する科学的な根拠が必要になる。しかしながら、目的物質由来不純物の安全性に関するデータの議論が十分になされていない現状において、AMED 研究班として、安全性確認に必要な閾値 (1.5%) の妥当性についての結論は得られていない。

これまでの議論から、AMED 研究班では、安全性評価

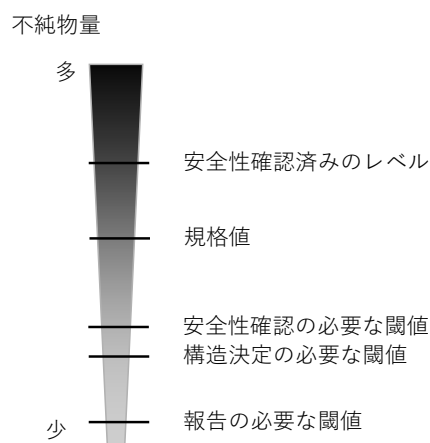


Fig. 1 安全性確認済みのレベル、規格値、安全性確認及び構造決定の必要な閾値、報告の必要な閾値の関係

を実施したオリゴヌクレオチド原薬の不純物含量を考慮して、安全性確認の閾値を設定することを基本的な考え方としている。例えば、不純物含量が多いオリゴヌクレオチド原薬を用いた非臨床試験の安全性評価データを考慮した上で、暫定的な閾値を設定して開発を進める。そして、製造数を重ね、開発期間を通じて安全性が確認できた不純物含量も踏まえた上で、最終的な安全性確認の閾値を設定する方法が考えられる。一方で、開発期間において未知の不純物が発生するごとに安全性確認を行うことは費用的にも期間的にも負担が大きいために、一律の閾値設定を望む意見も多い。現在のところ、核酸医薬品は低分子医薬品と比較して臨床実績が少なく、閾値を一律に設定するためには、より多くの核酸医薬品で実績を積むとともに、データに基づいた不純物の安全性に関する議論が必要であろう。

現在、AMED 研究班では、目的物質由来不純物の混入がどの程度安全性に影響を与えるか検討を進めている。具体的には、あるアンチセンス核酸 (n 塩基長：原薬に相当) に対して、強い肝毒性を誘導することが分かっている別のアンチセンス核酸 ($n-1$ 欠損体：不純物に相当) を様々な割合で意図的に混入させ、 $n-1$ 欠損体による遺伝子発現変動や毒性発現がどの程度観察されるかを細胞並びに動物個体を用いて解析を進めている。このように、ワーストケースを念頭に、不純物の混入率と生体への影響の関連を詳細に検証することで、安全性確認の閾値を考察する上で有用な科学的根拠が得られると考えている。

4. 安全性に基づく不純物の考察

ICH ガイドライン Q3A の考え方は、安全性が実証された以上の不純物量を患者に曝露すべきではないという基本原則に基づいている。したがって、不純物の規格値につい

ては、安全とみなされるレベルを超えない数値を設定する必要がある (Fig. 1)。この基本原則は核酸医薬品にも当てはまると考えられる。第3章で触れたように、WP では核酸医薬品の不純物の構造決定及び安全性確認を行う閾値を提案している。更に、不純物の安全性を考察する目的で、不純物構造に基づき四つのクラスに分類し、それぞれのリスク評価の考え方を提案している (Table 5)。以降では、WP に記載されている核酸医薬品の不純物のクラス分類の考え方について紹介すると共に、AMED 研究班で議論した内容を述べる。

4.1 WP における不純物クラス分類の考え方

クラス I 不純物は、目的オリゴヌクレオチドの主要代謝物と同じ構造を持つ不純物である。例えば、目的オリゴヌクレオチドの末端から数塩基が欠損した不純物は、生体内でヌクレアーゼを介して生成する主要代謝物と構造的に同等と考えて良いと思われる。また、生体内で切断されるように設計されたリガンドコンジュゲート型オリゴヌクレオチド (オリゴヌクレオチドの末端に脂質や糖などの低分子化合物が付加された核酸医薬品) に含まれる「リガンドが脱離したオリゴヌクレオチド」は、生体内で生じる主要代謝物と同じ構造を持つ不純物と考えることができる。二重鎖オリゴヌクレオチドに含まれる過剰な一本鎖オリゴヌクレオチドは、二重鎖オリゴヌクレオチドを生体に投与した際に細胞内で生じる可能性が高い不純物である。以上に例示した不純物については、目的オリゴヌクレオチドの非臨床安全性試験を行う際に、不純物の安全性についても評価していると考えられる。したがって、クラス I 不純物については別途、安全性試験を行う必要はないと考えられる。

クラス II 不純物は、自然界に存在するオリゴヌクレオチドの構造要素のみを含む不純物である。例としては、ホスホロチオアート修飾結合がホスホジエステル結合に変化した PS $\rightarrow$ PO 変化体やヌクレオチド間結合の移動により生成する 2'-5' 結合した RNA 不純物が挙げられる。これらの構造要素は生体内に存在するため、構造に由来する安全性懸念は低く、通常、安全性試験は必要ないと考えられる。

クラス III 不純物は、目的オリゴヌクレオチドの配列が変化した構造を有する不純物であり、代表的な例として $n-1$ 欠損体や $n+1$ 付加体が挙げられる。また、塩基の脱アミノ化によりシトシン (又は 5-メチルシトシン) がウラシル (又はチミン) に置き換わったオリゴヌクレオチドもこのクラスに分類される。これらの不純物では塩基配列が変化するため、標的 RNA 以外の RNA 鎖と相補結合する可能性があるが、一般にその混入量は薬理学的影響も有さないほど低いものである。したがって、個々の不純物は安全性

Table 5 ホワイトペーパーにおける不純物のクラス分類及びリスク評価

不純物のクラス	構造例	リスク評価
クラス I 目的オリゴヌクレオチドの主要代謝物と同じ構造をもつ不純物	目的オリゴヌクレオチドの 3'又は 5'末端から複数のヌクレオチドが欠損した不純物 コンジュゲートされたオリゴヌクレオチドに含まれる非コンジュゲートオリゴヌクレオチド 二重鎖オリゴヌクレオチドを構成する過剰な一本鎖オリゴヌクレオチド	構造的に主要代謝物と同一である可能性が高く、非臨床安全性試験の際に安全性を確認できるため、追加の安全性試験は必要ない 生体内に存在する可能性が高いため、安全性を評価する必要はない
クラス II 自然界に存在するオリゴヌクレオチドの構造要素のみを含む不純物	ホスホロチオアート修飾オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル型オリゴヌクレオチド不純物 2'→5'型で結合した RNA 鎖	構造要素は内因的に存在し、安全上の懸念はなく、通常は安全性試験を追加する必要はない
クラス III 目的オリゴヌクレオチドの配列変異体である不純物	n-1 欠損体 n+1 付加体 核酸塩基の脱アミノ化不純物 (C→U 変異体)	一般的に個々の不純物の含有レベルは薬理学的影響を与えないほど低い 閾値より十分に低い場合は、安全性確認試験は必要ない
クラス IV 目的オリゴヌクレオチド又は天然オリゴヌクレオチドに存在しない構造要素を含有する不純物	未脱保護体 シアノエチル付加体 構造未知の不純物	規格値が安全性の閾値を超える場合は、安全性評価を推奨する

確認の必要な閾値より十分に低いレベルで存在するため、安全性評価は必要ないと考えられる。

クラスIV不純物は、目的オリゴヌクレオチド又は自然界に存在するオリゴヌクレオチド中には存在しない構造要素を含むものである。安全性確認の必要な閾値を超える規格値を設定することが望ましい場合には、非臨床安全性試験において不純物の安全性を評価することが推奨される。

4.2 AMED 研究班における不純物の考え方

上述のとおり、WP では核酸医薬品の不純物を構造と安全性の観点から四つのクラスに分類している。WP で述べられているように、目的オリゴヌクレオチドの主要代謝物と同じ構造を持つ不純物(クラス I)や自然界に存在するオリゴヌクレオチドの構造要素のみを含む不純物(クラス II)については、安全性上のリスクは低いと考えられるが、含有量が安全性確認の必要な閾値を超える場合や生体内に内在的に存在する量と比べて明らかに高値の場合は、安全性を考慮する必要があると考える。その際、実測値に基づく定量的な考察が望まれるが、考察するにあたり有用な文献等があれば、これを参照しても良いと考える。

クラスIIIに分類される n-1 欠損体や n+1 付加体は、物性が類似し、分離困難なケースが多いため、不純物群として管理することが有用と考えられる。この場合、群に含まれる成分の一貫性を説明できるように特性解析を行うとともに、適切に製造工程の管理を行う必要がある。WP では、n-1 欠損体等が目的オリゴヌクレオチドとは異なる RNA 鎖に結合する可能性はあるものの、不純物群として安全性確認の必要な閾値(1.5%)を超えない範囲で管理できれば、

個々の不純物は閾値より十分に低いレベルでしか存在しないため、通常は安全性評価は不要としている。AMED 研究班としては、不純物群に含まれる個々の不純物を定量的に管理することが困難であるが故に不純物を群として管理することを考慮すると、不純物群としての含有量が安全性確認の閾値を超える場合は、例え個々の不純物の含量が当該閾値より低いと見込まれる場合であっても、不純物群として安全性の確認が必要と考える。

以上を踏まえると、非臨床試験及び臨床試験に用いた原薬及び製剤の不純物を群として管理し、安全性が確認された不純物群の含量を基に、規格値として設定することが現実的に実施可能な不純物管理になると考えられる。この場合の安全性評価には、ICH ガイドライン Q3A/B の考え方が参照できる。

最近、臨床開発が行われている核酸医薬品には、生体内での安定性改善あるいは標的組織への送達効率を向上させるための様々な化学修飾が施されていることが多い。そのため、不純物にも天然核酸に存在しない構造要素が多く含まれており、複数の不純物を群として管理する考え方が適用されると、必ずしも WP が提唱するクラス分類に当てはまらないケースが増えてくると考えられる。例えば、糖部 2' 位を修飾したヌクレオシドを有するオリゴヌクレオチドの場合、目的オリゴヌクレオチドの n-1 欠損体不純物と 2' 位修飾ヌクレオシド構造に関連する不純物が同じ保持時間を示し、群として管理される可能性が生じる。このようなタイプの不純物群は、クラスIIIとIVの両方の要素を含むことになる。この場合、単純なクラス分類に基づいて安全性評価の有無を判断できないと思われることから、

クラス分類に固執することなくケースバイケースの考え方は重要になると考える。

4.3 AMED 研究班における目的物質関連物質の考え方

タンパク質性医薬品は、細胞のタンパク質合成系を製造に利用していることから、糖鎖付加等の翻訳後修飾を受けた多様な分子種の混合物になる可能性がある。これらの化合物には生物活性があり、その存在が医薬品の安全性及び有効性に悪影響を及ぼさないこともある。このような性質を示す化合物は、ICH ガイドライン Q6B において「目的物質関連物質」の考え方を適用し、「製造中や保存中に生成する目的物質の分子変化体で、生物活性があり、製品の安全性及び有効性に悪影響を及ぼさないもの。これらの分子変化体は目的物質に匹敵する特性を備えており、不純物とは考えない」と定義されている。この考え方と関連して、考慮事項には、「類縁物質の構造から一定程度の薬理学的な活性が期待され、有効性を保証する上で意味のある量が原薬中に含まれる場合には、必要に応じて当該類縁物質について生物学的な活性を含む特性解析を実施し、有効性への影響について検討しておくべきである」との記載がある。これまで述べてきたように、核酸医薬品の原薬には、分子量や物性が類似している多様な類縁物質が含まれており、これらの類縁物質の有効性に及ぼす影響を考慮することで適切な品質管理戦略が可能になると考えられる。

以上の観点から、AMED 研究班において、オリゴヌクレオチド類縁物質を「目的物質関連物質」として管理するための要件について議論を行っている。現状では、以下の条件を満たす類縁物質については、目的物質関連物質として取り扱うことが適切な場合もあると考えている。

- 目的オリゴヌクレオチドと同程度の薬理活性を有していることが想定される
- 不純物構造を有するオリゴヌクレオチドについて安全性評価を実施した結果、当該構造に安全性上の懸念がないことが確認される
- 頑健な製造工程を構築することで、当該不純物の含有量について一貫性を担保できている

以上を念頭に、siRNA 医薬に含まれる目的物質関連物質の可能性を考察した。センス鎖とアンチセンス鎖が相補結合した二重鎖オリゴヌクレオチドで構成される siRNA は、細胞内に取り込まれた後、センス鎖とアンチセンス鎖が解離し、アンチセンス鎖が標的 mRNA と結合し、RNA 分解を引き起こす。すなわち、直接薬効に寄与するのはアンチセンス鎖である。siRNA に含まれる不純物として、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二重鎖オリゴヌクレオチドが考えられる。こ

の不純物は、目的とする siRNA と物性並びに分子量が非常に似ているため、非変性条件下の SEC 分析において、分離分析することは極めて困難である。一方、上述のとおり siRNA の薬効に直接寄与するのはアンチセンス鎖であるため、センス鎖の鎖長が数塩基程度短くなっても、有効性が維持される傾向にある¹⁷⁾。

これまでの報告例を考慮すると、センス鎖長が短い二重鎖の不純物群を目的物質関連物質とみなせる可能性があり、siRNA 含量を過大に見積もる懸念がなくなると考えられる。しかしながら、タンパク質性医薬品の不純物管理の考え方を核酸医薬品に適用するには、それぞれの医薬品の特性を考慮した慎重な議論が必要であろう。前述した要件を満たすための適切な評価方法や考慮事項に記載がある「一定程度の薬理学的な活性や有効性を保証する上で意味のある量」など、不純物群を目的物質関連物質とみなすために必要な要件について、現在も議論を継続している。

5. おわりに

厚生労働省発出の考慮事項、並びに OSWG 発出の WP の記載内容を紹介すると共に、AMED 研究班で議論した核酸医薬品の不純物(特に、目的物質由来不純物)の管理に関する考え方を述べてきた。

核酸医薬品の合成から精製に至る各工程の理解を深めることで、オリゴヌクレオチド不純物を構造に応じて分類・整理することが可能になる。また、不純物同士の物性が似ていることが多いため、一般に分離分析は困難になるが、不純物分類の考え方に基づいた群管理によって、品質の一貫性を担保することが可能になる。一方、不純物の管理戦略を考える上で重要となる構造決定の閾値及び安全性確認の閾値については、低分子医薬品と同様に一律の閾値設定が望まれる。WP で示された考え方は参考にできる点が多い。しかし、現時点では核酸医薬開発の実例・経験が少ないこと、また科学的根拠に乏しい点が多くあることから、WP の考え方を適用する場合には慎重に考慮する必要がある。AMED 研究班で取得しつつある不純物の安全性に関する科学的データのみならず、核酸医薬の承認例が増え、市販後の安全性情報が蓄積されれば、経験則として閾値設定についてコンセンサスが得られるのではないかと考える。それまでは、核酸医薬品の製造工程や不純物の安全性への理解を深めながら、ケースバイケースの対応が必要であろう。そして、独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)との薬事相談を活用して不純物管理に関する議論を行いながら、核酸医薬品の開発を進めていくことも重要であろう。今回紹介した核酸医薬品の不純物管理に対する考え方が、わが国の核酸医薬品開発の一助になることを

期待する。

おことわり

本稿は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。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) 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.
- 2) Capaldi, DC.; 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.309-322. doi:10.1089/nat.2017.0691.
- 3) 藤坂朱紀, 伊藤浩介, 小比賀聡. 核酸医薬品の現状と品質管理に関わるレギュラトリーサイエンス上の課題. レギュラトリーサイエンス学会誌. 2017, 7 (2), p.113-120.
- 4) 伊藤浩介, 小林直之, 橘敬祐, 辻野博文, 藤坂朱紀, 小比賀聡. オリゴヌクレオチドを有効成分とする医薬品の品質管理に関する考え方. 日本核酸医薬学会誌. 2016, p.15-23.
- 5) Cramer, H.; Finn, KJ.; Sinha, ND. "Oligonucleotide Impurities and their Origin". Analysis of Oligonucleotides and their Related Substances. Okafo, G.; Elder, D.; Webb, M. eds. ILM Publications, St Albans, 2013, p.21-100.
- 6) El Zahar, NM.; Magdy, N.; El-Kosasy, A.M.; Bartlett, AM. Chromatographic approaches for the characterization and quality control of therapeutic oligonucleotide impurities. *Biomed Chromatogr.* 2018, 32 (1), e4088. doi:10.1002/bmc.4088.
- 7) Capaldi, DC.; Gaus, HJ.; Carty, RL.; Moore, MN.; Turney, BJ.; Decottignies, SD.; McArdle, J.V.; Scozzari, AN.; Ravikumar, VT.; Krotz, AH. Formation of 4,4'-dimethoxytrityl-Cphosphonate oligonucleotides. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004, 14, p.4683-4690.
- 8) Gaus, HJ.; Olsen, P.; Sooy, K.V.; Rentel, C.; Turney, B.; Walker, K.L.; McArdle, J.V.; Capaldi, DC. Trichloroacetaldehyde modified oligonucleotides. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005, 15, p.4118-4124.
- 9) Ravikumar, VT.; Cole, DL. Development of 2'-O-Methoxyethyl Phosphorothioate Oligonucleotides as Antisense Drugs under Stereochemical Control. *Org. Process Res. Dev.* 2002, 6 (6), p.798-806.
- 10) Jans, 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, p1-9. doi: 10.1038/ncomms7317.
- 11) Lebedev, AV.; Wickstom, E. The chirality problem in P-substituted oligonucleotides. *Perspect Drug Discovery Des.* 1996, 4 (1), p.17-40.
- 12) Enmark, M.; Rova, M.; Samuelsson, J.; Örnkvist, E.; Schweikart, F.; Fornstedt, F. Investigation of factors influencing the separation of diastereomers of phosphorothioated oligonucleotides. *Anal Bioanal Chem.* 2019, 411 (15), p.3383-3394. doi: 10.1007/s00216-019-01813-2.
- 13) Bonilla, JV.; Srivasta, GS. Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products. CRC Press, 2011, 497p.
- 14) 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.; Thurmer, 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.
- 15) Capaldi, D.; Scozzari, AN. "Manufacturing and Analytical Processes for 2'-O-(2-Methoxyethyl)-Modified Oligonucleotides". Antisense Drug Technology. Principles, Strategies, and Applications. Second Edition. Crooke, ST ed CRC Press, 2007, p.401-434.
- 16) Elzahar, NM.; Magdy, N.; El-Kosasy, AM.; Bartlett, MG. Degradation product characterization of therapeutic oligonucleotides using liquid chromatography mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2018, 410 (14), p.3375-3384.
- 17) Chang, CI.; 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.