

# 陰イオン交換クロマトグラフィーによる siRNA 医薬品に含まれる不純物の分離 及びその保持機構の考察

発表者：騰川 博之 (日田事業所)

共同研究者：大久保貴史 (日田事業所)

野中 祐美 (久留米事業所)

## 1. 背景及び目的

近年 siRNA (small interfering RNA) 医薬品の開発が活発となっており、複数の siRNA 医薬品が承認されている<sup>1)</sup>。siRNA は低分子の 2 本鎖 RNA であり、RNA 干渉により mRNA (messenger RNA) を分解し遺伝子発現を抑制する。siRNA 医薬品はこのメカニズムを利用し、疾患の原因となる遺伝子の mRNA を標的として、その発現を抑制することで薬効を示す。siRNA 医薬品はセンス鎖と相補的なアンチセンス鎖を 1 本鎖ずつ固相合成した後で、2 本鎖形成 (アニーリング) して製造されるため、合成過程で生成する 1 塩基欠損体等により構成される不完全な 2 本鎖、過剰な 1 本鎖等の不純物が含まれる<sup>2)</sup>。siRNA 医薬品の不純物は主成分と構造が類似しているため分離が困難であり、その分離方法や品質管理に関する報告例はまだ少ない。そこで、主にカラム官能基の正電荷とオリゴ核酸のリン酸の負電荷の静電的相互作用により保持し、塩基長 (リン酸の数) の差により分離する陰イオン交換クロマトグラフィー (AEX) に着目し、siRNA 医薬品に含まれる種々の不純物の分離のための分析条件の確立を目指した<sup>3)</sup>。

## 2. 方法

以下の試料及び分析条件を用いて、siRNA 医薬品に含まれる種々の不純物の分離に AEX が有用か検証し、さらに AEX におけるオーバーハング (相補鎖を形成していない末端のはみ出した塩基) を有する 2 本鎖 RNA の保持機構を解明するための検討を行った。

### 2.1 試料

承認されている siRNA 医薬品である Lumasiran、Inclisiran、Givosiran の天然型の配列を RNA1、RNA2、RNA3 とし、それぞれの完全長又は塩基欠損した配列をモデル配列とした。PBS(-)を用いてそれぞれ終濃度 5  $\mu\text{mol/L}$  となるようにセンス鎖及びアンチセンス鎖の混合液を調製し、アニーリングしたものを試料溶液とした。

### 2.2 分析条件

カラム : DNAPac PA200 RS (4  $\mu\text{m}$ ), 4.6 $\times$ 250 mm (Thermo Fisher Scientific)

移動相 A : 20 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)

移動相 B : 1.25 mol/L NaCl を含む 20 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)

流速 : 0.8 mL/min

カラム温度 : 30°C

波長 : 260 nm

注入量 : 5  $\mu$ L

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 不純物の分離

モデル配列の RNA1 を用いて分析条件を検討した結果、カラム温度及び移動相の pH を至適化することで、siRNA の変性を防ぎ、また過剰な 1 本鎖を主成分である siRNA と良好に分離できることが明らかになった。至適化した条件で、3 つのモデル配列を用いて過剰な 1 本鎖の分離を検討したところ、いずれのモデル配列においても、2 本鎖より 1 本鎖の保持が強く良好に分離できることが示された (図 1)。さらに、目的物質である siRNA と構造が類似し分離が困難であると考えられる不完全な 2 本鎖 (末端 1 塩基欠損体又は中央 1 塩基欠損体) の分離を試みたところ、いずれのモデル配列においても概ね良好に分離できることが示された (図 2 及び 3)。このように、AEX が siRNA 医薬品に含まれる多様な不純物の分離に適しており、品質管理に有用であることが明らかとなった。

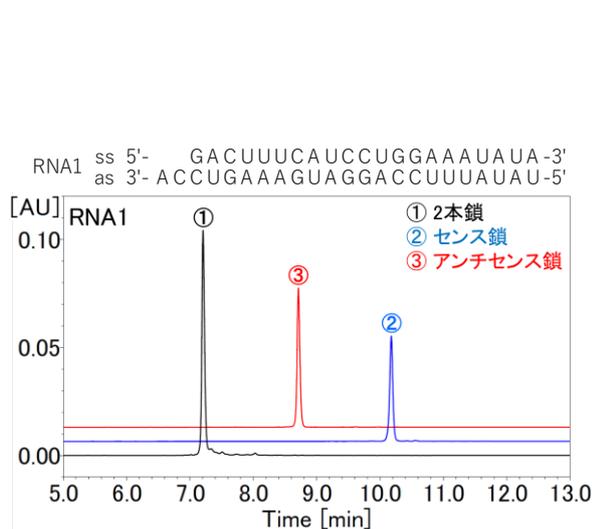


図 1 目的物質と過剰な 1 本鎖の分離

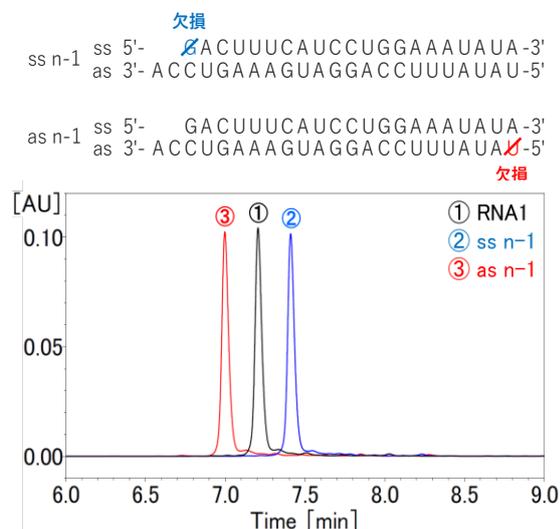


図 2 目的物質と不完全な 2 本鎖 (末端 1 塩基欠損) の分離

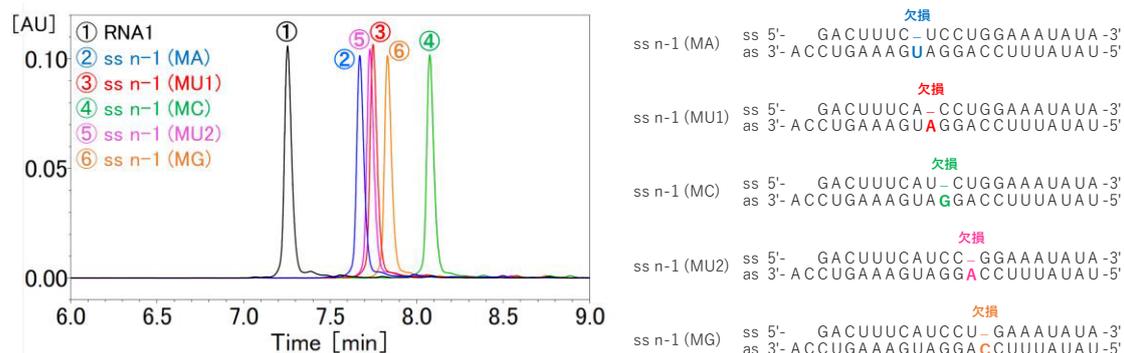


図 3 目的物質と不完全な 2 本鎖 (中央 1 塩基欠損) の分離

### 3.2 保持機構の考察

各種不純物を良好に分離できることが示された一方で、2 本鎖の約半分のリン酸しか有さないにも関わらず 1 本鎖の保持が強いこと、1 塩基を欠損した際に保持が弱くなることもあれば強くなることもあるなど、その保持機構にはリン酸の負電荷の数以外の要因も寄与していることが示唆された。

そこで、末端から 1~5 塩基を欠損した配列を分析しオーバーハングの塩基長による保持への影響を評価したところ、欠損する塩基数すなわちオーバーハングの塩基数が増えるほど保持が強くなる傾向が示された。また、RNA と DNA の 1 本鎖と 2 本鎖の保持時間を比較したところ、RNA では 2 本鎖より 1 本鎖の保持が強い一方で、DNA では反対に 1 本鎖よりも 2 本鎖の保持が強い結果となった。2 本鎖 RNA と 2 本鎖 DNA の 2 重らせんの立体構造を比較すると、2 本鎖 DNA (B 型 DNA) ではリン酸が外向きなのに対し、2 本鎖 RNA (A 型 DNA) ではリン酸が内向きとなる (図 4)。これらのことから、siRNA (A 型 DNA) では負電荷を有するリン酸が内側に向いた状態となり、相補鎖を形成していない 1 本鎖やオーバーハングよりもカラム官能基とのアクセシビリティが低下し、保持が弱くなると考えられた。

さらに、末端から 1~5 塩基を欠損した配列の保持挙動を pH 9.0 と pH 7.0 の移動相で比較したところ、1 塩基欠損した際に露出する対面塩基の種類により保持挙動への影響が異なり、露出する塩基が互変異性の塩基であるグアノシン(G)又はウリジン(U) (pKa=9.2)<sup>4)</sup>である場合に、pH 9.0 と比較して pH 7.0 で保持が弱くなる結果となった。このことから、アルカリ性の移動相においては G 及び U の負電荷が保持に強く関わると考えられた (図 5)。

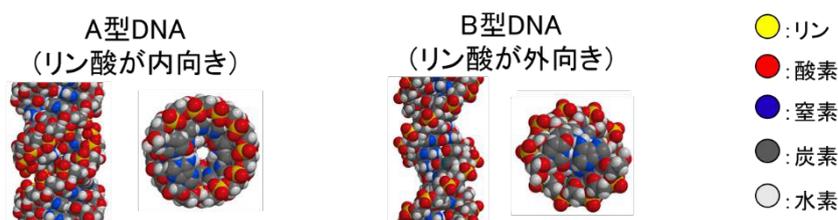


図 4 2 本鎖核酸の二重らせんの立体構造

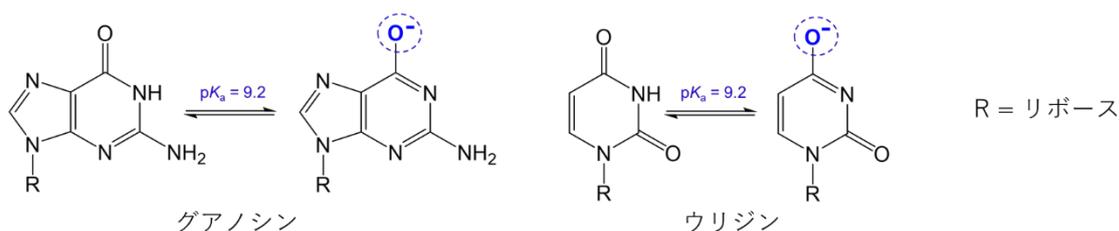


図 5 グアノシン及びウリジンの互変異性

#### 4. 結論

AEX が siRNA に含まれる過剰な 1 本鎖や不完全な 2 本鎖などの不純物の分離に適しており、品質管理に有用であることが示された。さらに、保持挙動の解明のためにオーバーハングの塩基長、RNA と DNA の保持の比較、移動相の pH の保持への影響を検証したところ、2 本鎖 RNA (A 型 DNA) よりも相補鎖を形成していない 1 本鎖やオーバーハングの保持が強く、またアルカリ性の移動相においてはオーバーハングに位置する互変異性の塩基 (G 及び U) の負電荷が保持に強く関わることを明らかにした (図 6)。

⊖ : リン酸の負電荷

⊖ : 互変異性塩基(G及びU)の負電荷

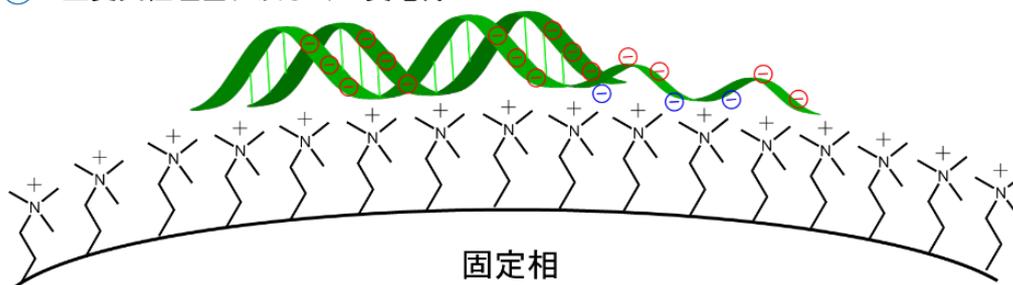


図 6 AEX におけるオーバーハングを有する 2 本鎖 RNA の保持機構

#### 5. 謝辞

本研究は AMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業「核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発」プロジェクト (代表: 小比賀聡) による支援の成果である。

#### 6. 参考文献

- 1) Egli, M; Manoharan, M. *Nucleic Acids Res.* 2023, 51(6), 2529-2573.
- 2) Beverly, M. B. *Mass Spectrom. Rev.* 2011, 30(6), 979-998.
- 3) Togawa, H. et al. *J. Chromatogr. A.* 2023, 1691, 463808.
- 4) Thaplyal, P.; Bevilacqua, P. C. *Methods Enzymol.* 2014, 549, 189-219.