

HPLC による核酸医薬品の不純物分析

発 表 者：小幡 友貴 (クロマト技術部門)

1. 背景

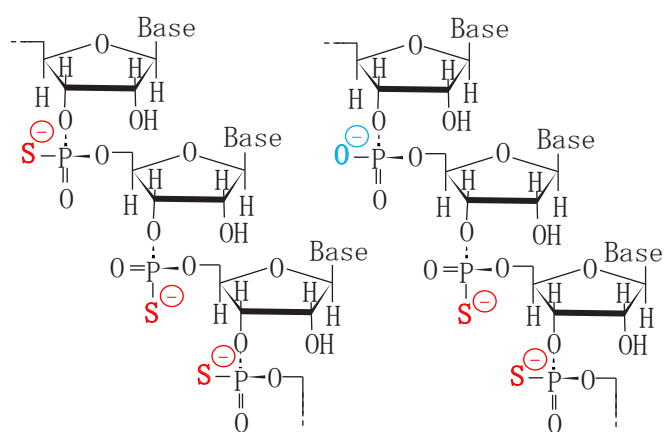
本機構は、1990 年に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用の逆相カラム L-column シリーズを開発し、ユーザーのニーズに対応するためラインアップを拡充してきた。性能の向上を重視した開発体制により、2007 年に微量分析に対するニーズの高まりに対応した低吸着な L-column2 を、2017 年に耐久性が著しく向上した L-column3 を上市している。L-column3 は溶離液の使用可能な pH 範囲が広く、カラム温度の比較的高い条件で長時間使用しても劣化しにくいことが特長である。

本部門は分析カラムの開発だけでなく分析法の開発にも取り組んでいる。医薬品業界では近年、疾病の原因となるタンパク質を標的とした従来の低分子医薬や抗体医薬とは異なる、mRNA をターゲットにすることが可能な核酸医薬に注目が集まりつつある^{1), 2)}。核酸医薬の中でも特に、アンチセンスオリゴ核酸は 20 塩基長 (20-mer) 程度の一本鎖で構成され、分子量は数千程度であることから HPLC による分析が可能である。生体内におけるヌクレアーゼ耐性を向上させたホスホロチオアート化 (PS) アンチセンスオリゴ核酸は、世界で承認された核酸医薬品の 6 割を占める³⁾。我々は、この PS オリゴ核酸に着目し、逆相イオン対 (IP-RP) HPLC による不純物分析法の開発に取り組んでいる。本発表では、その成果の一部について報告する。

2. 分析法の開発

2.1 PS オリゴ核酸の構造と HPLC 分析の課題

PS オリゴ核酸は、塩基、リボース及び PS 化されたリン酸からなるリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドが連続した構造を持つ (図 1)。不純物としてホスホジエステル不純物 (P0)、欠損体、付加体、プリン塩基が脱離したもの等が想定される。PS オリゴ核酸及びその不純物はリン原子が不斉中心となるため、例えば 20-mer の PS オリゴ核酸では最大 2^{19} 通りの



PS オリゴ核酸 ホスホジエステル不純物 (P0)

図 1 PS オリゴ核酸及び

ホスホジエステル不純物 (P0) の構造

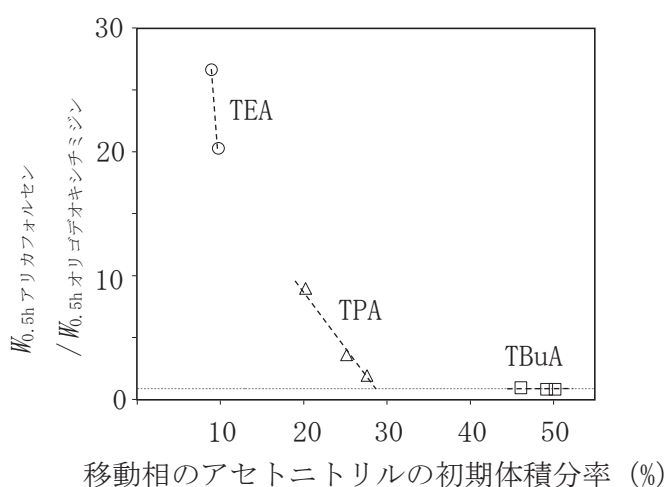
ジアステレオマーが生じ、様々なモードの HPLC でピーク形状がブロードになる⁴⁾。したがって、PS オリゴ核酸の不純物分析は非常に困難であるが、特に P0（図 1）は分離が困難とされる。

そこで、我々は IP-RP HPLC を用いて PS オリゴ核酸と P0 の分離を改善することを目的とした。本発表では、分離の改善へ重要な影響を及ぼすイオン対（IP）試薬及び対イオンの効果について言及する。なお、ピークの広がりを極力抑制するためにカラム温度は 60℃とし、使用するカラムは耐久性が高くアミン系の IP 試薬の長期間の使用に対して安定した保持が得られる L-column3 を用いた。

2.2 移動相の IP 試薬種の効果

移動相の IP 試薬種（トリエチルアミン（TEA）/トリプロピルアミン（TPA）/トリブチルアミン（TBuA））が PS オリゴ核酸であるアリカフォルセンのピークの半値幅

（ $W_{0.5h}$ ）に及ぼす影響を調べた（図 2）。ただし、 $W_{0.5h}$ の評価はリファレンス（20-mer のオリゴデオキシチミジン）との $W_{0.5h}$ の比を用い、対イオンは四種のアシルカルボン酸を用いた。より疎水性の高い IP 試薬である TBuA はジアステレオマーによるピークのブロードを顕著に抑制することが明らかとなった。



カラム: L-column3 (C18, 2 μ m, 50 mmL, 2.1 mmI.D.)

流速: 0.2 mL/分

移動相: 10 mmol/L TBuA, 対イオン (pH7.0) / アセトニトリル

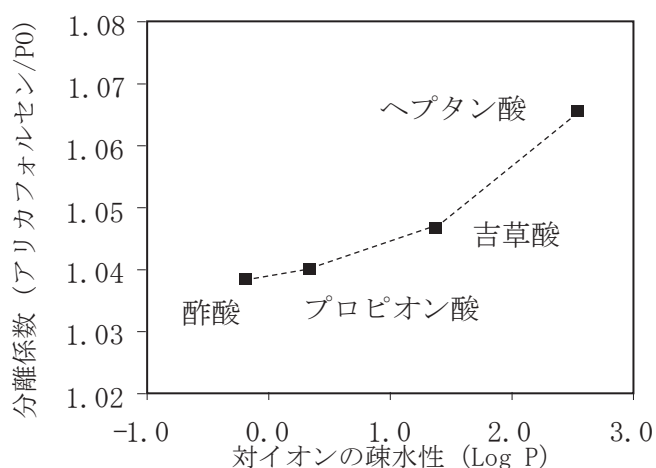
保持時間: アセトニトリルの体積分率によって 12 $\pm$ 1.5 分に調整

対イオン: プロピオン酸、酢酸、ヘプタン酸、吉草酸、酢酸、ヘプタン酸
吉草酸、酢酸（アセトニトリル体積分率の昇順）

図 2 移動相のイオン対試薬がアリカフォルセンのピークの半値幅に及ぼす効果

2.3 対イオン種の効果

図 3 は TBuA 及び対イオン（酢酸/プロピオン酸/吉草酸/ヘプタン酸）を用いたときのアリカフォルセンと P0 の分離係数を示す。疎水性（Log P、P:分配係数）の高いアルキルカルボン酸を対イオンとして用いることが PS オリゴ核酸と P0 の分離係数を向上させることが示された。



カラム: L-column3 (C18, 2 μ m, 50 mmL., 2.1 mmI.D.)

流速: 0.2 mL/分

移動相: 10 mmol/L TBuA, 対イオン(pH7.0)/アセトニトリル

酢酸, プロピオン酸, 吉草酸, ヘプタン酸

保持時間: アセトニトリルの体積分率により 12 $\pm$ 1.5 分に調整

図 3 対イオンの疎水性がアリカフォルセンとホスホジエステル不純物 (P0) の分離係数に及ぼす影響

2.4 開発した分析法

IP 試薬種及び対イオンを最適化することにより開発した分析法によって得られたクロマトグラム⁵⁾を図 4 に示す。これらのクロマトグラムは単一の移動相及びグラジエント条件で得られた。つまり、塩基長が類似した PS オリゴ核酸であれば、単一の分析法で分析が可能であることが示唆される。従来法として TEA と酢酸を用いたメソッドがよく使用されるが、さらにカラム温度を 80 $^{\circ}$ C に高めた場合の分離度と比較しても、開発した分析法はよりシャープなピークとなり、良好な分離が得られた。

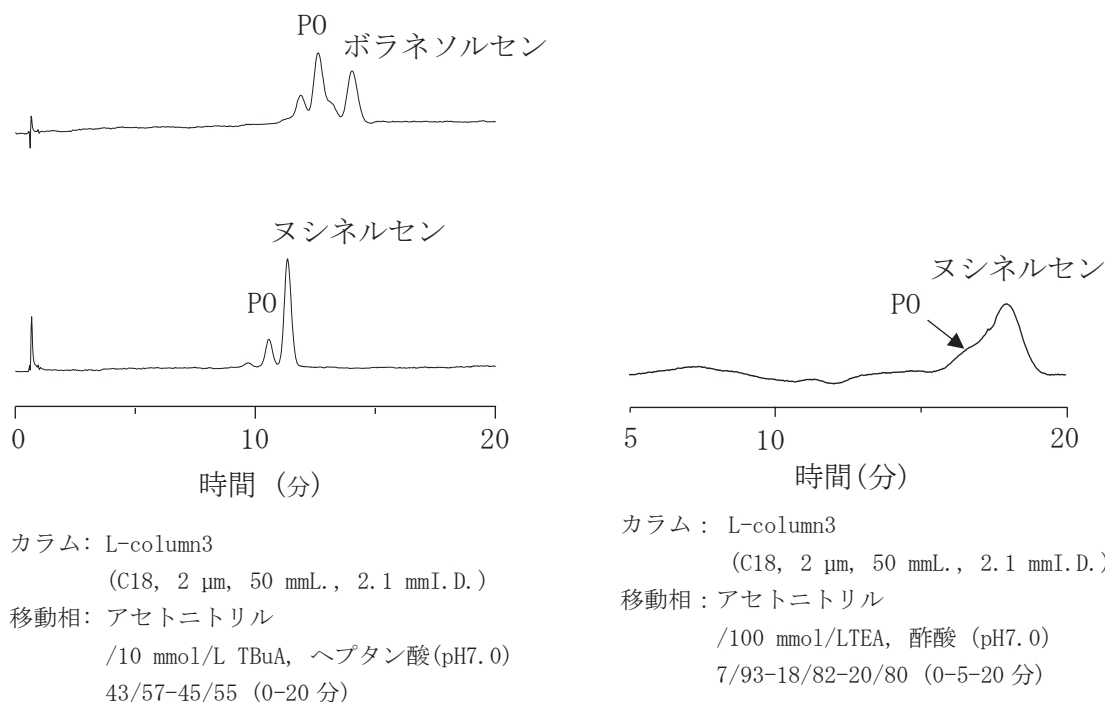


図 4 開発した分析法 (左) と従来の分析法 (右) のクロマトグラム

3. 結論

クロマト技術部門では、カラムの開発/製造/販売だけでなく、分析法の開発も可能である。今回開発した分析法は PS 結合を含んだアンチセンスオリゴ核酸の品質管理への適用が期待できる。今後も高い技術力による魅力的な分析法の提案を行っていく。

4. 参考文献

- 1) 小比賀聡, 笠原勇矢. 日本薬理学雑誌. 2016, 148(2), 100-104.
- 2) 井上貴雄. PHARM TECH JAPAN. 2019, 35(13), 2533-2545.
- 3) 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部ホームページ. 日米欧のいずれかで承認された核酸医薬品 (2023 年 12 月 25 日更新).
<https://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/section2-1.pdf> (accessed 2024-05-21)
- 4) Iwamoto, N. et al. Nat. Biotechnol. 2017, 35(9), 845-851.
- 5) 小幡友貴. 日本核酸医薬学会第 8 回年会講演要旨集. 2023, 159.