技術報告 1

HPLC による核酸医薬品の不純物分析法の開発

発　表　者：小幡　友貴（クロマト技術部門）

1.　はじめに

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形でラインアップを拡充してきた。常に性能の向上を重視した開発体制を取ることにより、2007年には微量分析の重要性の高まりに対応した低吸着な*L-column2* を、2017年には溶離液の使用可能なpH範囲がアルカリ性の領域にまで拡大した*L-column3* を上市した。一方、本機構は逆相カラムを用いた分析法の開発にも注力している。近年、医薬品業界では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りRNAのレベルで生体を制御できる核酸医薬に注目が集まっている[1), 2)]。核酸医薬品は20塩基長程度のオリゴ核酸で構成され、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。我々は、この核酸医薬品に着目し、HPLCによる核酸医薬品の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.　核酸医薬品の不純物分析

2.1　構造

核酸医薬品の構造は、塩基、リボース及びリン酸からなるユニットが連続したものである。生体内におけるヌクレアーゼによる分解を防ぐため、ホスホロチオエート化オリゴ核酸（S 化オリゴ核酸）（図 1）が用いられることが多く、世界で承認された核酸医薬品の 6 割を占める [3)]。不純物として脱硫体、欠損体、付加体、プリン塩基が脱離したものなどが考えられ、その各々に位置異性体が存在する。さらに S 化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 塩基長の S 化オリゴ核酸では最大 2^{19}（524288）通りの立体異性体が生じ、逆相 HPLC では疎水性のわずかな差によりブロードなピークとして検出される [4)]。

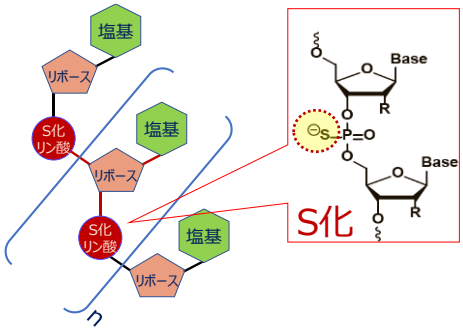
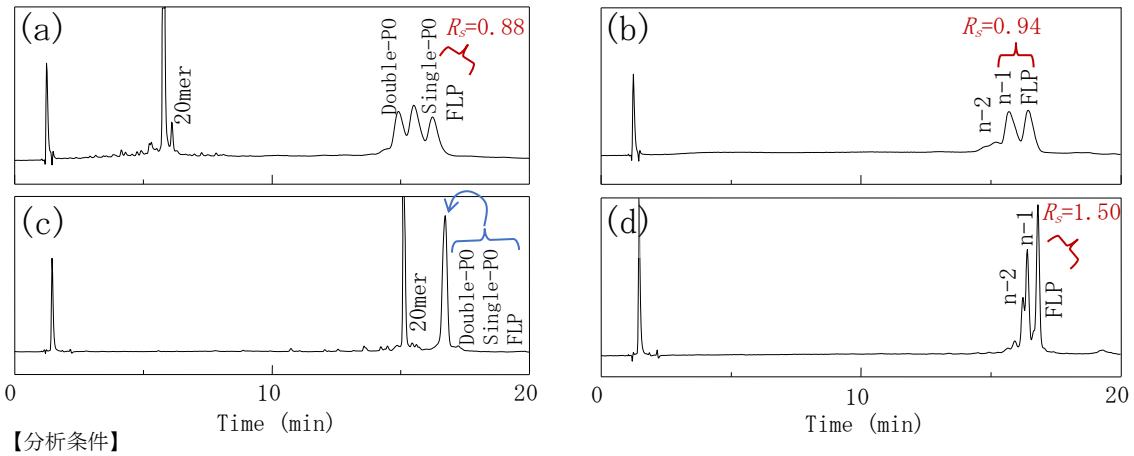


図 1　S 化オリゴ核酸

2.2　従来の分析法

核酸医薬品の不純物の物理化学的性質は主成分と類似しているものも多く、これらの分離を困難にする。代表的な不純物である欠損体との分離は疎水性の差を認識する逆相 HPLC が、脱硫体との分離は電荷の差を認識するイオン交換クロマトグラフィーが有効と考えられる。このように多岐にわたる不純物に対応するには複数の異なる分離モード

の組合せが必要となるため、分析コストが一般的な低分子医薬品と比較して高い。逆相 HPLC で核酸医薬品を分析する場合、親水性であるオリゴ核酸をカラムに保持させるためイオン対試薬を介在させる逆相イオン対クロマトグラフィー（IP-RPLC）が用いられる。トリエチルアミン-酢酸溶液（TEAA）を用いて FLP（塩基長 20、配列 GACT の繰り返し、すべて S 化）、Single-PO（FLP の 3’側末端の S 化リン酸が 1 か所脱硫）及び n-1（FLP の 3’側末端のユニットが 1 か所欠損）の混合試料を分析したところ、ピークは明らかにブロードとなり完全に分離できなかった（図 2(a),(b)）。これは前述のように FLP、Single-PO 及び n-1 が無数の立体異性体から構成されることが原因と考えられる。一方、LC/MS で汎用される 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール（HFIP）を用いた分析法では、ピークは非常にシャープとなり FLP と n-1 は分離できたが(図 2(d))、Single-PO は分離できなかった（図 2(c)）。



【分析条件】
カラム：*L-column3*(C18 2 μm, 12 nm), 2.1 mm I.D.×100 mm L.
溶離液(a)(b)：A_100 mmol/L TEAA(pH7.0)/アセトニトリル(80/20)、B_100 mmol/L TEAA(pH7.0)
A/B 40/60-90/10 (0-20 min)
溶離液(c)(d)：A_メタノール、B_400 mmol/L HFIP, 15 mmol/L TEA
A/B 10/90-28/72 (0-20 min)
流速：0.2 mL/min、温度：60 ℃、検出：265 nm、試料：10 μmol/L in TE buffer(pH8.0)、注入量：1 μL

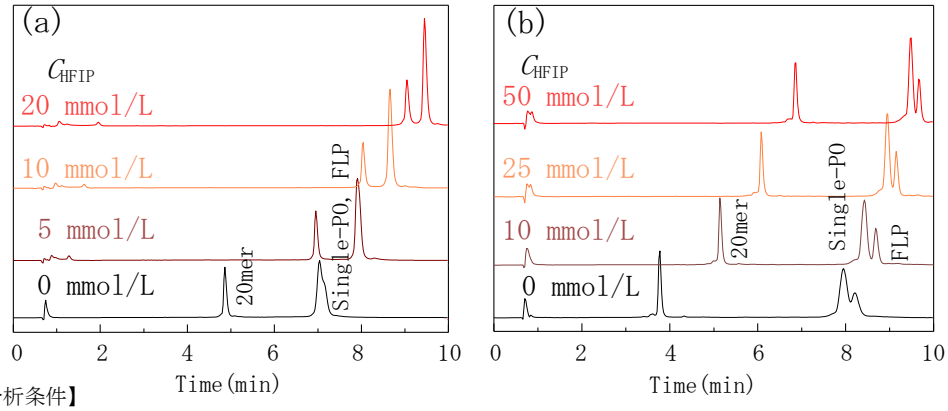
図 2　従来の分析法（(a)(b)TEAA メソッド、(c)(b)HFIP メソッド）

2.3　分析法の開発

IP-RPLC の単一の分析法で FLP を代表的な不純物である欠損体（n-1）と脱硫体（Single-PO）から完全分離した報告はない。そこで、我々は IP-RPLC の単一の分析法で FLP を Single-PO 及び n-1 から完全分離（分離度 R_s≧1.5）することを目的とした。TEAA メソッドにおいて FLP 及び Single-PO の保持の差は十分に得られている(図 2(a))。したがって TEAA メソッドを出発点として、いかにピークの広がりを抑制するかというアプローチを取ることとした。ここでは、分析法開発のプロセスで得た 2 つの重要な発見に絞って報告する。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℃にし、使用するカラムは耐久性が高くトリエチルアミン（TEA）の長期間の通液に対して安定した分離性能が得られる ***L-column3*** を用いた。

2.3.1　HFIP 添加の効果

前述のように HFIP メソッドでは、脱硫体は分離できないが、ピークの広がりの抑制効果は顕著に得られた。そこで、TEAA メソッドに HFIP を添加した結果、比較的低濃度の添加でもピークの広がりは抑制され、ピークがシャープになった（図 3）。ただし、FLP と Single-PO の保持の差は HFIP を添加しないときが最も大きく、HFIP の添加は FLP と Single-PO の分離を阻害すると考えられる。さらに有機溶媒にアセトニトリルを使用すると、不完全ではあるものの FLP を Single-PO から分離できることが明らかとなった（図 3(b)）。

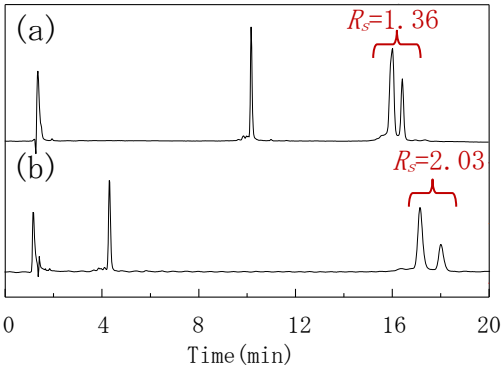


【分析条件】
カラム：*L-column3*(C18 2 μm, 12 nm), 2.1 mm I.D.×50 mm L.
溶離液(a)：A_メタノール、B_1 mol/L HFIP in メタノール、C_100 mmol/L TEAA(pH7.0)
A/B/C (10-0.1×C_{HFIP})/(0.1×C_{HFIP})/90 - (45-0.1×C_{HFIP})/(0.1×C_{HFIP})/55 (0-10 min)
溶離液(b)：A_アセトニトリル、B_1 mol/L HFIP in アセトニトリル、C_100 mmol/L TEAA(pH7.0)
A/B/C (8-0.1×C_{HFIP})/(0.1×C_{HFIP})/92 - (20-0.1×C_{HFIP})/(0.1×C_{HFIP})/80 (0-10 min)
流速：0.2 mL/min、温度：60 ℃、検出：265 nm、試料：10 μmol/L in TE buffer(pH8.0)、注入量：1 μL

図 3　HFIP の添加による効果（(a)メタノール、(b)アセトニトリル）

2.3.2　対イオンの効果

一般的には TEAA メソッドで使用されるイオン対の対イオンに酢酸が使用される。しかし、我々は酢酸ではなくトリフルオロ酢酸（TFA）を使用することにより、FLP から 20mer（塩基長 20、配列 GACT の繰り返し、すべて脱硫）及び Single-PO の脱硫体全般の保持を相対的に低下させ分離を顕著に改善できた（図 4）。これは TFA によるイオン対形成頻度の低下が脱硫体で特に大きいことが原因であると推測される。

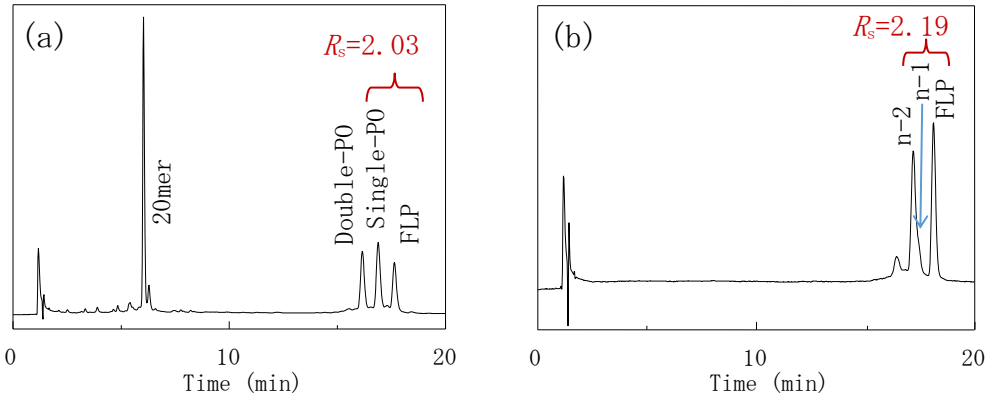


【分析条件】
カラム：*L-column3*(C18 2 μm, 12 nm), 2.1 mm I.D.×100 mm L.
溶離液：A_25 mmol/L HFIP in アセトニトリル
B_25 mmol/L HFIP in 100 mmol/L TEAA(pH7.0)
or TEA-TFA(pH7.0)
(a) A/B 8/92-20/80 (0-20 min)
(b) A/B 8/92-14/86 (0-20 min)
流　速：0.2 mL/min、温度：60 ℃、検出：265 nm
試　料：10 μmol/L in TE buffer(pH8.0)、注入量：1 μL

図 4　対イオンによる効果
((a)TEAA、(b)TEA-TFA)

2.4　開発した分析法

今回開発した分析法による結果を図 5 に示した。この分析法を用いれば、IP-RPLC の単一の分析法で S 化オリゴ核酸を脱硫体及び欠損体から完全に分離できる[5]。複数モードを組み合わせる二次元 HPLC 法など複雑なシステムは不要となり、分析に要する時間やコストを大幅に削減できる。



【分析条件】
カラム：*L-column3*(C18 2 μm, 12 nm), 2.1 mm I.D.×100 mm L.
溶離液： A_30 mmol/L HFIP in {100 mmol/L TEA-TFA(pH7.0)/アセトニトリル(80/20)}
B_30 mmol/L HFIP in 100 mmol/L TEA-TFA(pH7.0)
A/B 35/65-70/30 (0-20 min)
流速：0.2 mL/min、温度：60 ℃、検出：265 nm、試料：10 μmol/L in TE buffer(pH8.0)、注入量：1 μL

図 5　開発した分析法による分離（(a)脱硫体、(b)欠損体）

3.　おわりに

本機構では、***L-column***、***G-column*** の開発、製造、販売だけでなく、分析法の開発も可能である。今回は、その最近の事例として HPLC による核酸医薬品の不純物分析法の開発の成果の一部を報告した。なお、本発表は、2022 年 3 月に開催された日本薬学会第 142 年会において発表し、今後様々な方面へ提案を行う予定である。また、このような新しい分析法の提案だけでなく、お客様からの分析法開発の受託を実施する予定である。

4.　参考文献

1)　小比賀聡, 笠原勇矢: 日本薬理学雑誌, **148**, 100-104(2016).
2)　井上貴雄: *PHARM TECH JAPAN*, **35**, 2533-2545(2019).
3)　国立医薬品食品衛生研究所. “承認された核酸医薬品（2021 年 12 月時点）”. 遺伝子医薬部ホームページ.
https://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/section2-1.pdf, (参照 2022-5-17).
4)　Iwamoto N, Butler DCD, Svrzikapa N et al: *Nat Biotechnol.*, **35**, 845-851(2017).
5)　小幡友貴：日本薬学会第 142 年会要旨集, 1002(2022).