

【合同シンポジウム】

第18回核酸医薬レギュラトリーサイエンスシンポジウム 核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発 第2回公開シンポジウム

核酸医薬開発を支援する業務受託機関等の取り組み

【日時】 2023年11月22日(水) 13時00分～16時25分(予定)

【開催】 Zoom webinar (上限500名), 参加費無料

参加登録URL:

https://us02web.zoom.us/webinar/register/WN_TOnL8QuAQvaSvtwl5yw-4A

【主催】 日本核酸医薬学会レギュラトリーサイエンス部会

【共催】 日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会

【後援】 日本医療研究開発機構



【プログラム】

座長: 井上 貴雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

13:00～13:05 趣旨説明 井上 貴雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

講演: 第1部 (発表16分+質疑4分)

13:05～13:25 LC/MSを用いた核酸医薬の分析法開発
赤嶺 隆太 (住化分析センター)

13:25～13:45 核酸医薬の品質評価における分析技術の確立
高尾 英伸 (東レリサーチセンター)

13:45～14:05 陰イオン交換クロマトグラフィーを用いたsiRNA医薬品の分析技術の
確立
騰川 博之 (化学物質評価研究機構)

14:05～14:25 核酸医薬品の毒性試験の現状
松下 聡紀 (新日本科学)

14:25～14:45 核酸医薬の非臨床試験に関する現状と課題 –安全性試験受託研究機関の立場から–
大竹 誠司 (LSIM安全科学研究所)

14:45～15:05 核酸医薬のハイブリダイゼーション依存的オフターゲット毒性の予測・評価に関する取り組みと受託試験の紹介
石田 和也 (化学物質評価研究機構)

15:05～15:20 休憩 (15分)

講演: 第2部 (発表16分+質疑4分)

15:20～15:40 核酸医薬品の研究開発で求められる支援業務
中嶋 暁彦 (東京新薬株式会社/TPC)

15:40～16:00 非臨床評価における留意点: ケーススタディ
中澤 隆弘 (オープンサークルパートナーズ)

16:00～16:20 核酸医薬品開発の薬事戦略 –非臨床試験から臨床試験への橋渡し–
玄番 岳践 (Fortrea Japan)

16:20～16:25 まとめ
小比賀 聡 (大阪大学)

【問い合わせ先】

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部内
kakusan-rs-sympo@nihs.go.jp (担当: 吉田 徳幸, 内田 安則)

大阪大学大学院 薬学研究科 生物有機化学分野内
yakka-cmc@phs.osaka-u.ac.jp (担当: 天羽 直美)

LC/MS を用いた核酸医薬の分析法開発

赤嶺 隆太

株式会社住化分析センター

核酸医薬品の有効成分であるオリゴ核酸ではその製造工程で欠損体や付加体、PS/PO 置換体などの不純物が生じる可能性がある。核酸医薬品の有効性や安全性を評価するためにはこれら不純物の構造や量を把握することは不可欠である。我々は AMED 事業に参画し、不純物の分離、同定及び定量を行う上で現時点での限界を見極め、品質規格設定のための分析手法の技術的ガイダンス案の作成に必要なデータ取得を進めている。

オリゴ核酸中の不純物の分析には逆相イオンペア液体クロマトグラフィー (RPIP-LC) や陰イオン交換クロマトグラフィー (AEX-LC) が広く用いられている。しかしながら、オリゴ核酸は塩基長や修飾の違いによって分離挙動が異なるので、その不純物の分離分析は対象化合物毎にカラムや移動相のほか、カラム温度等の条件も最適化する必要がある。そのうち、RPIP-LC は、揮発性のイオンペア試薬や酸を使用すれば LC/MS により不純物の構造に関する情報を得ることができる。一方、AEX-LC は高濃度の不揮発性塩を含む移動相のため、試料を MS に導入できないが、2次元 LC により MS に導入可能な分離モードを2段階目を選択することで不純物の評価が可能となる。今回、イノテルセン及びヌシネルセンの構造情報をもとに合成した試料(試料1及び試料2とする)を用いて RPIP-LC 及び AEX-LC による分析を行った例を紹介する。RPIP-LC において、試料1では目的物質と関連不純物を分離できたが、試料2では一部の不純物を目的物質から分離できなかった。AEX-LC では有機溶媒の添加が分離改善に有用な事例がみられた。具体的には、試料2ではメタノールを添加した移動相により関連不純物を分離できたが、同条件では試料1は不純物と分離しなかった。分離挙動の違いは、オリゴ核酸の糖部への修飾の違いによる可能性がある。

以上のように、LC の最適な分離条件はオリゴ核酸及びその不純物の構造に応じて異なるため、様々な分離パラメータを組み合わせ最適化を試みるが、その難易度により、目的物質と不純物の分離が達成できるとは限らない。この場合、2次元 LC を用いて更なる分離を行い、次に LC/MS を用いることで不純物の構造情報を得ることができ、核酸医薬品の研究開発の進展に寄与できる。今回、試料1を用いて RPIP-LC/MS による分析を行った例について、その利点と課題について報告する。

核酸医薬の品質評価における分析技術の確立

高尾 英伸

株式会社東レリサーチセンター

1. はじめに

医薬品の品質評価に必要な分析機能は多岐にわたる。さらにオリゴヌクレオチドでは、従来の種々の理化学的分析に加え、オリゴヌクレオチドに特有の分析が求められる。私たちはオリゴヌクレオチドの品質評価に適応可能な分析法の整備を目指し、不純物の配列解析、FLP と不純物の構造比較、残留溶媒の測定に関する分析法を確立した。

2. LC-HRMS による配列解析及び不純物分析(パラメータの標準化)

オリゴヌクレオチドに含まれる微量不純物の配列の同定には、質量分析計の感度を向上しつつ、配列情報を維持した MS/MS 断片を得る必要がある。私たちは **Macugen** と同一配列の合成核酸を対象に、高解像度の質量分析計を用い、まず FLP で解析パラメータを最適化、次いでそのパラメータを不純物に適用し、モノアイソトピック質量及びプロダクトイオン情報から多くの目的物質由来の不純物が確認できた。

3. CD 分析による FLP と欠損体等の比較(T 検定による同一性評価)

円偏光二色性(CD)スペクトル分析はオリゴヌクレオチドの高次構造評価に有用であり、ロット間差をスペクトルの同一性から評価できる。従来、スペクトル比較は熟練の分析者が目視で実施してきたが、日本分光の「qHOS」プログラムにより、統計学的な客観的評価が可能となった。私たちは本プログラムを **Inotersen** と同一配列の合成核酸の FLP とその塩基欠損体の解析に適用し、数%の塩基欠損体の混入を有意に検出できることを確認した。

4. ICH ガイドライン Q3C を参考に選定した残留溶媒測定

化学的に合成されるオリゴヌクレオチドは、製造工程に由来する残留溶媒を評価する必要がある。私たちはオリゴヌクレオチドに残存する可能性のある 12 溶媒を選定し、各物性に応じて複数の装置で分析法を検討した。その結果、GC/MS にてベンゼン、トルエン、ジクロロメタン、アセトニトリル、メタノール、テトラヒドロフラン、ピリジン、2,6-ルチジンの分析法を、LC/MS にて 1-メチルイミダゾール、4,5-ジシアノイミダゾールの分析法を、イオンクロマトグラフィーにて酢酸、ジクロロ酢酸の分析法をそれぞれ確立した。

陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた siRNA 医薬品の分析技術の確立

騰川 博之

一般財団法人化学物質評価研究機構 (CERI)

2018 年以降で 5 品目の siRNA 医薬品が承認されるなど、近年 siRNA 医薬品の開発が活発となっている。それに応じて、siRNA 医薬品の純度や特性など、品質を管理するための分析方法の必要性も高まっている。

siRNA 医薬品の原薬は、1 本鎖であるセンス鎖とアンチセンス鎖を固相担体上で 1 塩基ずつ伸長合成し、アニーリングして 2 本鎖とすることで製造する。伸長反応が不完全であると、配列の末端もしくは中央で塩基を欠損したショートマーが生じる。ショートマーは精製工程において完全除去が難しいため、目的物質である siRNA から末端又は中央で塩基を欠損した不完全な 2 本鎖が生じる。さらに、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかの 1 本鎖が過剰になり、不純物として残存する。品質管理において、このような不純物を分離可能な分析方法が必要となる。また、siRNA 医薬品にはホスホロチオアート(PS)修飾が導入される場合があり、その結果ジアステレオマーが生じる。Rp 体と Sp 体でヌクレアーゼ耐性、RNA 誘導サイレンシング複合体(RISC)への取込みなどが異なるため、特性の異なる多くの異性体の混合物となる。そのため、ジアステレオマーの比率を確認することは有効性を担保する上で重要である。

本機構では、陰イオン交換クロマトグラフィー(AEX)がオリゴ核酸の非変性条件下での分析に適していることに着目し、siRNA 医薬品の品質管理への応用について検討してきた。これまでの検討から、非変性 AEX により目的物質である siRNA と過剰な 1 本鎖や末端又は中央で塩基を欠損した不完全な 2 本鎖などの不純物を良好に分離可能であることを示した¹⁾。また、非変性 AEX により 2 か所の PS 修飾による 4 つのジアステレオマーを 2 本鎖の状態でも良好に分離でき、4 又は 6 か所の PS 修飾においても多くのピークトップが検出される結果を得ている。本講演では、以上のような非変性 AEX を用いた siRNA の分析事例について紹介する。

1) Togawa, H. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2023, 1691, 463808.

核酸医薬品の毒性試験の現状

松下 聡紀

株式会社 新日本科学 安全性研究所

核酸医薬品の上市により、非臨床試験成績に関する情報が開示され始めているが、核酸医薬品の特徴的な毒性として、標的以外の配列へのハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションに起因しない核酸分子特有の構造や物理的・化学的特性によるクラスエフェクトの二つのオフターゲット毒性が注目されている。そのため、核酸医薬品は低分子医薬品の非臨床試験に似た試験デザインを求められている部分もあり、種々の非臨床に関するガイドライン等を参照しながらケースバイケースで対応することが重要である。また、スピラザ(ヌシネルセンナトリウム)が上市して以降、中枢神経系への投与経路として髄腔内投与が注目されており、投与経路の選択も重要となってきた。一方で、非臨床試験における動物実験において、中枢神経系への投与は難しい点もあり、髄腔内投与後の大槽や脳への薬物の送達に関しては、文献等においても曝露が不十分な個体がいることが報告されている。

本演題では、上市された核酸医薬品の非臨床試験で報告されている毒性情報等とともに、株式会社新日本科学での非臨床試験での毒性所見の経験について紹介する。また、中枢神経系への投与方法としてサルにおける髄腔内投与や側脳室内投与についての当社の経験及び取り組みについても紹介する。

核酸医薬の非臨床試験に関する現状と課題 —安全性試験受託研究機関の立場から—

大竹 誠司

株式会社 LSIM 安全科学研究所

1998年に Vitravene が FDA に承認されて以降、多くの核酸医薬品の開発がなされている。核酸医薬品が承認され始めた当初はドラッグデリバリーシステム(DDS)などを用いていない Naked の核酸医薬品が中心であった。しかし、近年は治療効果を高めるために様々な修飾を加えた核酸医薬品の開発が増加しており、多様な DDS 技術の応用や抗体-核酸複合体の開発など様々な創薬基礎研究が急速に進んでいる。

上記のような基礎研究において得られた画期的な成果を臨床応用するためには動物等を用いた非臨床安全性試験が必要となる。本邦における核酸医薬品の非臨床安全性試験については「核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン」に示されているところであるが、本ガイドラインは核酸自体の安全性評価に主眼がおかれた指針であり、核酸に付加された新しい修飾技術等に関連した安全性評価についてはケースバイケースの対応を求めている。従って過去事例も少なくケースバイケースとされる評価をどのように実施するかが非臨床安全性評価を立案するうえでの課題となるが、これらの課題が我々のような安全性試験受託研究機関での試験計画立案段階で見いだされることが少なくない。また、見いだされた課題への対応は技術的な難しさや GLP 等の規制対応も含めてコストと時間を要するものも多く、基礎研究の成果を遅滞なく臨床応用へ進めるためには非臨床試験計画面前に課題解決を図っておくことが望まれる。

今回、我々が安全性試験受託研究機関として20年以上に亘って関わってきた核酸医薬品開発支援の経験をもとに、核酸医薬品の非臨床安全性試験実施までに解決しておくべき課題と対応について現在進められている開発事例も参考にしながら紹介する。多くの基礎研究の成果が遅滞なく臨床応用するための一助となれば幸いである。

核酸医薬のハイブリダイゼーション依存的オフターゲット毒性の 予測・評価に関する取り組みと受託試験の紹介

石田 和也

一般財団法人化学物質評価研究機構 (CERI)

アンチセンス医薬等の核酸医薬によって引き起こされるオフターゲット毒性は、「RNA との相補結合に起因する毒性 (ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット毒性)」と「タンパク質など RNA 以外の生体成分との結合に起因する毒性」に分類される。前者は、核酸医薬に特有の毒性であり、動物試験では評価できないことから、ヒトに由来する評価ツール (ヒト RNA データベース及びヒト培養細胞/組織) を用いて、毒性の発現を予測する必要がある。具体的には、核酸医薬が相補結合しうる RNA (= オフターゲット候補遺伝子) を検索・抽出し (*in silico* 解析)、次に、ヒト細胞を用いた遺伝子発現変動解析により、実際に発現に影響する候補遺伝子 (= オフターゲット遺伝子) を特定する (*in vitro* 解析)。

CERI ではこれまで、国立医薬品食品衛生研究所との共同研究を通じて、アンチセンス (RNA 分解型、スプライシング制御型) 及び siRNA のオフターゲット評価に関する種々の検討を行ってきた。*in silico* 解析と *in vitro* 解析の関連については、各モダリティの特性に応じて検索条件をどのように設定すればよいか、また、どの程度の相補性を有するオフターゲット候補遺伝子が発現変動するか等の考察に資するデータを数多く取得している。また、*in vitro* 解析については、異なるメーカーのマイクロアレイを比較検証することにより、オフターゲット評価における遺伝子発現の検出能力、再現性及び定量性について基盤的なデータを取得した。さらに、原薬 (目的物質) のオフターゲット評価時の網羅的遺伝子発現変動解析の結果を再解析することより、目的物質由来不純物 (N-1 体、N+1 体等) によるオフターゲット毒性も同時に予測・評価可能であることを、理論的かつ実験的に示した。

CERI では 10 年以上にわたるマイクロアレイ解析の受託試験の実績があり、その技術・経験を基に、核酸医薬のオフターゲット毒性の予測評価の受託試験を実施している。さらに、*in silico* 解析及び *in vitro* 解析に関して、上記の共同研究を通じて得た知見に基づく専門的な助言も行っている。本発表では、受託試験概要とともに、これまでの共同研究での取り組み内容について解析データ等も含め紹介する。

核酸医薬品の研究開発で求められる支援業務

中畠 暁彦

東京新薬株式会社／TPC

東京新薬株式会社／TPC(以下、TPC)は 2009 年 10 月に医薬品の開発戦略及び薬事支援を主たる事業としてビジネスを開始し、2023 年現在、医療領域のシンクタンクとして 14 年の業務実績を築き上げております。創業当初の業務対象は低分子の開発品でしたが、その後、診断薬(抗体医薬)、医療機器・器材、再生医療、更に核酸医薬へと進展し、バイオベンチャー、医薬品原料製造会社、総合化学会社、製薬会社、そして臨床医師や研究者の皆様の伴走者として、開発戦略図や AMED 事業等への応募資料の作成から薬事に関わる実務、専門家のインタビュー、各種領域に関する調査まで、お客様の状況に応じた細やかな支援を特色として参りました。一方、核酸医薬の分野では、各国で公表された 2006 年以降の開発情報の集約と発信を続け、開発・申請薬事とビジネスの視点から、核酸医薬の開発の支援活動を積み重ねています。本シンポジウムではこれまでに集積してきた核酸医薬情報を元に、核酸医薬の開発動向、承認状況、及び承認薬の対象疾患を解説するとともに、核酸医薬の開発で求められる支援業務、今後に必要なと予測される支援、またそのなかで TPC が果たすべき役割を、具体的な事例を示しながらご紹介致します。

非臨床評価における留意点: ケーススタディ

中澤 隆弘

オープンサークルパートナーズ合同会社

本邦においては、核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン¹⁾が発出され、核酸医薬品の非臨床安全性評価において推奨される基本的な枠組みが示されている。さらに、このガイドラインを詳細に説明した非臨床試験ガイドライン解説²⁾も発刊されている。これらの文書は大変有用であるものの、個別の核酸医薬品の課題解決のために必ずしも十分な支援を与えてくれるものではない。

例えば、種差、クラスエフェクト、ハイブリダイゼーション依存オプターゲット毒性などの特徴的な性質を考慮して、核酸医薬品の試験計画立案やデータ解釈を行う必要がある旨がガイドラインには記載されているが、具体的な進め方は必ずしも十分には示されていない。これは、ガイドラインやその解説書は様々なケースに対応できるように一般的に記載する必要があり、具体例を示すには限界があるためである。

本発表においては、実際の事例を参考にして、核酸医薬品の開発でデータ解釈や試験計画立案の疑問が生じたという想定で3つの仮想ケースを用意した。これらのケースを通じて、種差、クラスエフェクト、ハイブリダイゼーション依存オプターゲット毒性といった留意点を考慮して、安全性評価をどう進めるのが得策かという具体例を示したい。

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長:核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドラインについて. 令和2年3月30日薬生薬審発0330第1号
- 2) 医薬品非臨床試験ガイドライン解説2020, 薬事日報社 pp239-251, 2022

核酸医薬品開発の薬事戦略－非臨床試験から臨床試験への橋渡し－

玄番 岳 践

Fortrea Japan 株式会社 Global Regulatory Affairs

現在(2023年4月時点)、17品目(うち日本は6品目)の核酸医薬品が承認されている。また、約200件の核酸医薬品の臨床試験が実施されており、それらのうち約30件が第Ⅲ相試験等後期臨床開発段階にある。核酸医薬品は、低分子薬品やバイオ医薬品では不可能な分子(undruggable targets)を標的にできることから、まだ治療薬の存在しない希少疾患やがんを対象とした開発が進められている。一方、核酸医薬品はICHのような統一されたガイドラインは存在せず、各規制当局が独自にガイドラインを策定している。演者は薬事の立場で規制当局との相談に関わってきたが、特に近年は、核酸医薬品関連の技術革新に伴い規制当局の考え方も変化している印象がある。

実際にこれまでの規制当局との相談において、通常の医薬品では問題にならないことが論点になることがある。例えば、非臨床試験においては、動物種を選択、サロゲート核酸の使用、免疫毒性の評価等が挙げられる。また、臨床試験に関しては、臨床初回投与量の設定及び薬物動態の民族差等共通の論点も多いが、安全性評価や安全性フォローアップ期間等、核酸医薬品特有の課題もある。これらの点について、演者の経験も交えて留意すべき点や規制当局へどのように対応したかについて紹介したい。

核酸医薬品は製造コストの問題や医療ニーズの点から、冒頭に述べたように、希少疾患を対象とした臨床試験の頻度が高い。最後に、希少疾患を対象とした臨床試験を例に、核酸医薬品の臨床試験をいかに効率よく行うかについて考察したいと考えている。