

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業  
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語) Study on quality and safety assessment of antisense oligonucleotide therapeutics

研究開発実施期間：平成30年7月1日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 井上貴雄  
(英語) Inoue Takao

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 部長  
(英語) Director, Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences

## II 研究開発の概要

### 【背景と目的】

近年、アンチセンスや siRNA に代表される核酸医薬品の開発が急速に進展しており、遺伝性疾患および難治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。オリゴ核酸で構成され、RNA に作用するこれらの核酸医薬品は、従来の低分子医薬品やバイオ医薬品を対象とした品質・安全性評価の考え方では対応できない点が多くあるため、その特性を踏まえた規制整備が急務である。国内では、革新的医薬品・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、大阪大学のグループ（代表：小比賀聡氏）により「核酸医薬品の品質評価ならびに非臨床安全性評価に関する留意点」が議論・整理された。品質評価については、この成果を基に 2018 年 9 月に厚生労働省通知「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（平成 30 年 9 月 27 日付薬生薬審発 0927 第 3 号）」が発出されている。非臨床安全性評価については、AMED 研究班（代表：国立医薬品食品衛生研究所 平林容子氏）において更なる検討・改訂が進められ、その成果を踏まえて、2020 年 3 月に「核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン（令和 2 年 3 月 30 日付薬生薬審発 0330 第 1 号）」が発出されている。これらの厚生労働省通知は、核酸医薬品に特有の考慮事項を踏まえた非常に有用な文書であるが、現段階では承認品目（審査経験）が十分ではなく、また、ウェット研究に基づく科学的エビデンスが不足しているため、概念的な留意事項の提示に留まらざるを得ない点が残されている。

以上の背景を踏まえ、本研究（2018 年 7 月開始）では核酸医薬品の品質・安全性評価の在り方を考察する上で基盤となるウェット研究を実施し、技術的ガイダンス案を作成すること、また、承認審査時の判断基準の設定に資する科学的根拠を取得すること目的とした。具体的には、核酸医薬品の中で臨床開発品目が最も多く、また、最もシンプルな構造を有するアンチセンス医薬品にフォーカスし、オリゴ核酸の分析手法（不純物の分離定量、特性解析等）の検討、不純物閾値の設定に資する検討、ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット毒性（オフターゲット効果に起因する毒性）の予測・評価法に関する基盤データの取得等を行った。

### 【実施内容と成果】

核酸医薬品（オリゴ核酸）には特有の不純物として「オリゴヌクレオチド類縁物質」が含まれる。具体的には、N 塩基長のオリゴ核酸を想定した場合、1 塩基欠落した N-1 塩基長など鎖長の異なるオリゴ核酸（ヌクレオシド欠失体）、一部の塩基が欠落したオリゴ核酸（塩基部欠失体）、S 化したリン酸部が一部 0（酸素原子）に置換されたオリゴ核酸（PS/PO 置換体）などが混入することが知られている。オリゴ核酸は一般的に固相合成で製造されるため、精製の機会が限定される。また、有効成分のオリゴ核酸とその類縁物質の物理化学的性質が類似していることから、類縁物質（不純物）の分離/精製には限界がある。したがって、核酸医薬品は一般的な化学合成医薬品と比較して、不純物の混入率が高い傾向にある。

以上の背景を踏まえ本研究では、品質評価に関する研究として、アンチセンスの分離定量法、特性解析（分子量確認・配列/修飾部位確認）、不純物解析（不純物の構造同定）について検討を行い、現在の技術で評価可能な範囲と限界を明確化した。また、不純物に関する研究として、ヌクレオシド欠失体が標的外遺伝子に及ぼす影響を解析し、不純物の混入閾値の設定に資する科学的根拠を取得した。さらに、オフターゲット効果に関する研究として、*in silico* 解析ならびに *in vitro* 解析（ヒト細胞を用いたアレイ解析）により特定したオフターゲット遺伝子について、臨床リスク評価の必要性を考察するためのウェットデータを取得した。以下に、本研究の成果の概要を記載する。

#### ① 品質評価に関する研究

- ・ 分離定量法の確立に関して、複数のモデルアンチセンス（N 塩基長の S 化オリゴ核酸）に対して、考えられる全てのヌクレオシド欠失体（N-1 体）および PS/PO 置換体（1 箇所の置換）を網羅的に合成した。さらに、これらのモデル不純物と目的のアンチセンスを様々な組み合わせで混合した試料について、イオンペア逆相カラム、陰イオン交換カラム等を用いて分離条件（分析カラム、溶媒、流速等）を検討し、各不純物に適した分離カラムを特定するとともに、それぞれの分離モードにおいて、アンチセンスと不純物を可能な限り分離するための条件を最適化した。

- ・上記の検討において、アンチセンスの塩基長や修飾核酸の配置（ギャップマー型、ミクスマー型など）が分離に及ぼす影響を特定した。
- ・さらに、2本のカラムを組み合わせた分離条件を検討した結果、1次元目に陰イオン交換カラム、2次元目にイオンペア逆相カラムを用いた2次元液体クロマトグラフィー質量分析（2D-LC-MS）システムを用いることで、目的アンチセンスとヌクレオシド欠失体ならびに PS/P0 置換体をより効率よく分離できること、また、質量分析による分子量の確認も可能であることを見出した。
- ・複数の LC-MS 分析機器メーカーの協力を得て、同一のアンチセンスについて、複数の汎用的機種で不純物解析ならびに特性解析を実施し、機器間の分析能の違いならびに現状での分析限界を明確化した。

## ② 不純物の安全性評価に関する研究

- ・汎用されるホスホロアミダイト法によるオリゴ核酸の製造について、オリゴ核酸の塩基長やカップリング効率をパラメーターとして設定し、最終産物のオリゴ核酸に含まれるヌクレオシド欠失体の混入率を算出する数理モデルを構築した。さらに、核酸医薬製造の現状を踏まえた上で、不純物含有率が最大になると考えられるパラメータを設定し、個々のヌクレオシド欠失体が目的オリゴ核酸に混入する割合の最大値（ワーストケースの理論）を算出した。
- ・上記の数理計算による理論値を念頭に、不純物として混入するヌクレオシド欠失体（N-1 体）が標的外遺伝子の発現に与える影響を細胞レベル（ヒト細胞）ならびに個体レベル（マウス）で解析した。その結果、ギャップマー型（RNA 分解型）アンチセンスの場合、目的アンチセンスに対して、混入割合の最大値（ワーストケース）以上のヌクレオシド欠失体を意図的にスパイクしても、N-1 体が相補結合する遺伝子群の発現に影響を与えないことを見出した。この結果は不純物の混入限度値を考察する際の一つの目安となる。

## ③ 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・評価法に関する研究

- ・オフターゲット効果による毒性発現の予測については、先行研究の成果も踏まえ、「ヒト RNA を対象とした *in silico* 解析でオフターゲット効果が起こる可能性がある遺伝子を選別し、その上で、ヒト細胞を用いた *in vitro* 解析を行うことで実際にオフターゲット効果（50%未満への抑制）が起こる遺伝子を絞り込む」という評価スキームを提案し、原著論文として発表した。この中で、*in silico* 解析に用いる RNA データベース、検索アルゴリズム、検索条件、*in vitro* 解析のデータ処理等の技術的な指針を提示している。
- ・マウスをモデルとしてオフターゲット効果が個体に及ぼす影響を解析した。具体的には、特有の毒性（表現型）を引き起こすオフターゲット遺伝子を選定し、細胞レベルでの発現抑制の程度、個体レベルでの発現抑制の程度、ならびに、実際に現れる毒性の強度の関連を明らかにした。この結果は、オフターゲット遺伝子に起因する有害事象の可能性について、臨床リスク評価の必要性を考察するための知見のひとつとなる。

## ④ 成果発表

- ・核酸医薬品の不純物管理の考え方について、現時点で考えられる考慮事項を取り纏め、コンセプトペーパーとして発表した（医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 51, 11-21, 2020）。
- ・核酸医薬品の品質評価の在り方について、仮想核酸医薬品をモデルとしたケーススタディを文書として発表した（医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 51, 145-153, 2020）。具体的には、第 12 回核酸医薬レギュラトリーサイエンスシンポジウムにおいて、相談者として日本製薬工業協会メンバー、返答者として研究班メンバー（医薬品医療機器総合機構の職員を含む）を設定した「模擬レギュラトリーサイエンス戦略相談」を実施し、その議論の内容を総説として取り纏め、発表した。
- ・アンチセンス医薬品のオフターゲット効果の評価法に関する研究成果（技術的ガイダンス案に相当）を原著論文として発表した（*Genes to Cells*, 24, 827-835, 2019）。また、当該論文を国内で周知するため、日本語の解説文書を 2 報発表した（PHARMSTAGE, 19, 1-14, 2020 ; PHARM TECH JAPAN, 36, 75-83, 2020）。
- ・既承認アンチセンス医薬品を中心に薬物動態評価の現状を包括的に調査し、総説として発表した（医薬品医

療機器レギュラトリーサイエンス, 52, 150-163, 2021)。また、核酸医薬品に特有の薬物動態評価の考え方を取り纏め、コンセプトペーパーとして発表した(医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 52, 76-84, 2021)。以上の取り組みは日本製薬工業協会における核酸医薬動態評価タスクフォースとの連携で行った。

#### 【意義】

本研究ではアンチセンス医薬品を対象に品質・安全性評価に係るウェットデータを取得したが、本研究で得られた成果はアンチセンス(短鎖の1本鎖核酸)のみならず、siRNA(短鎖の2本鎖核酸)やアプタマー(中鎖の1本鎖)など、他の核酸医薬品の品質・安全性評価の基盤となるものであり、その波及効果は大きい。本研究の知見は、核酸医薬の研究開発の推進ならびに承認審査の効率化に寄与し、ひいては遺伝性疾患や難治性疾等の早期克服につながるものと期待される。

In recent years, the development of oligonucleotide therapeutics, such as antisense oligonucleotides and siRNAs, has been progressing rapidly and is attracting attention as new therapeutic tools for hereditary and intractable diseases. These oligonucleotide therapeutics, which consist of oligonucleotides and act on RNAs, are in many respects incompatible with the conventional approach to quality and safety assessment for small molecule medicines and biologics, and there are urgent needs to develop methods for quality and safety assessments that take account of their characteristics. In Japan, a group at Osaka University (led by Dr. Satoshi Obika) discussed and summarized "Points to note regarding quality assessment and non-clinical safety assessment of oligonucleotide therapeutics" in the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) project (2012-2016). Based on the results of the quality assessment, MHLW issued a notice "Matters to be considered in the quality assurance and assessment of oligonucleotide therapeutics" in September 2018. With regard to non-clinical safety evaluation, the AMED research group (led by Dr. Yoko Hirabayashi) has been conducting further studies and revisions, and based on the results of these studies, the "Guidelines for non-clinical safety evaluation of oligonucleotide therapeutics" was issued in March 2020. These MHLW notifications are very useful documents that take into account considerations specific to oligonucleotide therapeutics, but at this stage there are not enough approved products and there is a lack of sufficient scientific evidence based on wet research, so there is still a point where only conceptual notes have to be presented.

In light of the above background, this study aimed to conduct wet research as a basis for considering how the quality and safety assessment of oligonucleotide therapeutics should be, to prepare a draft technical guidance, and to obtain scientific evidence that would contribute to the establishment of decision criteria at the time of approval review. Specifically, we focused on antisense oligonucleotides, which are the most commonly developed oligonucleotide therapeutics and have the simplest structure. First, we developed the separation and quantification methods of antisense oligonucleotides and clarified the range and limitation of evaluation by using current technology. As for studies on impurities, we analyzed the effect of oligonucleotides with nucleoside deletions on off-target effects, and obtained scientific evidence for setting the threshold for impurity contamination. A selection of the papers presented are listed below.

- 1) Iwazaki N, Kodaira H, Goto A, Yamanaka Y, Sato M, Miyazawa N, Niwayama Y, Shitara Y, Sekiguchi Y, Tamura N, Takakusa H, Kadotsuji H, Imai S, Fukano Y, Fukuhara K, Tadehara Y, Yoshida T, Obika S, Nishikawa M, **Inoue T**. Current status of pharmacokinetic assessment for antisense oligonucleotide therapeutics. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 52, 150-163 (2021)
- 2) Takakusa H, Iwazaki N, Nishikawa M, Yoshida T, Obika S, **Inoue T**. Drug metabolism & pharmacokinetics of oligonucleotide therapeutics: Profiles and Evaluation Approaches. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 52, 76-84 (2021)
- 3) Yoshida T, **Inoue T**. Evaluation of off-target effects of oligonucleotide therapeutics. *PHARM TECH JAPAN*, 36, 75-83 (2020)
- 4) Yamaguchi T, **Inoue T**, Obika S. The current situation and outsourcing of therapeutic oligonucleotide manufacturing and analysis. *PHARM TECH JAPAN*, 36, 47-56 (2020)
- 5) Yamaguchi T, **Inoue T**, Obika S. Results of questionnaire survey on raw material supply, production, and quality management of oligonucleotide therapeutics. *PHARM TECH JAPAN*, 36, 109-113 (2020)
- 6) Takiguchi N, Ito K, Kobayashi N, Mizoguchi J, JPMA oligonucleotide quality task force, Nankai H, Hirose K, Fueki O, Sato H, Yoshida T, Obika S, **Inoue T**. Quality Evaluation for Oligonucleotide Therapeutics - Virtual Case Studies-. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 51, 145-153 (2020)
- 7) Kinoshita K, Nakazawa T, Arato T, Miida H, Hirabayashi Y, Maki K, Yoshida T, **Inoue T**. Consideration points

- for safety assessment based on review reports of the approved oligonucleotide therapeutics. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 51, 70-82 (2020)
- 8) Yoshida T, **Inoue T.** Current status of development and consideration for safety assessment of oligonucleotide therapeutics. *PHARMSTAGE*, 19, 1-14 (2020)
  - 9) Sekiguchi M, Ito K, Saito J, Takiguchi N, JPMA Oligonucleotide Quality Task Force, Yoshida T, Obika S, **Inoue T.** Consideration for impurities contained in oligonucleotide therapeutics. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 51, 11-21 (2020)
  - 10) Yoshida T, Naito Y, Yasuhara H, Sasaki K, Kawaji H, Kawai J, Naito M, Okuda H, Obika S, **Inoue T.**, Evaluation of off-target effects of gapmer antisense oligonucleotides using human cells. *Genes to Cells*, 24, 827-835 (2019)
  - 11) Yoshida T, **Inoue T.** Current status of regulation of oligonucleotide therapeutics and approach to quality and safety assessment. *Medicine and Drug Journal*, 55, 119-124 (2019)
  - 12) **Inoue T.** Oligonucleotide therapeutics: Diverse functions regulated by oligonucleotides. *Experimental Medicine*, 37, 2-7 (2019)
  - 13) **Inoue T.** Current status of development of antisense oligonucleotide therapeutics. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 50, 12-22 (2019)
  - 14) Yoshida T, Naito Y, Sasaki K, Uchida E, Sato Y, Naito M, Kawanishi T, Obika S, **Inoue T.** Estimated number of off-target candidate sites for antisense oligonucleotides in human mRNA sequences. *Genes to Cells*, 23, 448-455 (2018)
  - 15) Yoshida T, **Inoue T.** Current status of regulation of oligonucleotide therapeutics *The Medical Frontline*, 73, 823-830 (2018)