

# 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

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 核酸医薬を高感度・高精度に分離分析する技術の開発と品質と安全性評価への応用  
(英語) Development of evaluation method for quality and safety of the oligonucleotide  
therapeutics using high-sensitivity and high-accuracy separation analysis

研究開発実施期間: 令和2年4月1日～令和3年12月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 辻野 博文  
(英語) Hirofumi Tsujino

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立大学法人大阪大学・総合学術博物館・准教授  
(英語) The Museum of OSAKA UNIVERSITY

## II 研究開発の概要

### 研究の目的

本研究は、申請者らが革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業（H24～28年度）において、「核酸医薬の有効性・安全性の評価方法」を確立するための課題点・留意点として挙げた中でも、核酸医薬の分析法に焦点を当て、品質と安全性の評価法の基準の策定へと繋げることを目的とする。

### 研究背景

核酸医薬は十数個から数十個の核酸が鎖状に繋がった高分子化合物であるにも関わらず、精製の機会が少ない固相合成されるため、合成過程で生じる長さの異なる類縁物質(目的以外の物理化学的性質が類似した不純物)が原薬に混入する(日本核酸医薬学会会誌 2016)。また、毒性を回避するために糖鎖 N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)等の薬物送達分子で修飾した核酸の開発が盛んだが(Mol Ther Nucleic Acids 2017)、in vivo では代謝により修飾分子が外れたり、塩基長の短い核酸が混在する。即ち、核酸医薬の品質や安全性を担保するためには、塩基長、塩基配列、修飾分子の違い等の異なる特徴を踏まえた上で適切に評価する必要がある。しかし、核酸医薬は承認事例が限られており、有効性や安全性の評価法が十分に確立されておらず、開発製品毎にケースバイケースで対応しているのが現状である。従って、核酸医薬の発展には分析法を確立した上で、品質や安全性を評価する基準を策定することが必要不可欠である。

目的物質との分離精製に係る技術もさることながら、製品となる原薬や製剤に含まれる目的物質とそれ以外の類縁物質を明確に区別する定量分析法の役割は、品質管理や品質保証において非常に重要な役割を担う。そこで本研究では、塩基長、塩基配列、修飾分子の違い等の異なる特徴を踏まえた上で核酸医薬の品質を管理・担保するための技術を開発することを目的とした。

## 本研究の特色・独創的な点

既存の ELISA 法を応用した定量法では、全長核酸と類縁物質との区別や、糖鎖修飾の有無を検知不能であること等が課題である。一方、質量分析法では高分子化合物である核酸分子のピークが分離できず、全長核酸と類縁物質との分離能の低さが問題である。

本法は、核酸分子の本質的な特性である相補鎖と安定に二本鎖を形成する性質に着眼し、全長核酸と類縁物質や代謝物との二本鎖形成能の違いを利用して、目的核酸のみ二本鎖を形成させて電荷など物理化学的性質を大きく変えることで、分離分析を可能とする全く新しい技術である。本法が、これからさらに研究が活発になるであろう核酸医薬品の品質管理や分析において重要な選択肢の一つとなることを期待する。

## 手法・結果

アンチセンス核酸の本質的な特性である相補鎖と安定な二本鎖を形成(ハイブリダイゼーション)する性質を利用して、核酸医薬に特有の類縁物質(目的の核酸医薬以外の物理化学的性質が酷似する核酸の不純物)から目的アンチセンス核酸を特異的に分離することを目指した。

まずは、①アンチセンス核酸と相補鎖核酸(ハイブリダイゼーションプローブ)を混合して二本鎖を形成し、得られた二本鎖が HILIC カラムに保持されると共に、一本鎖核酸と十分に分離できるカラム、及び移動相の検討(有機溶媒の種類と比率、pH 等)を行った。核酸の相補鎖形成能は溶媒条件に大きく左右されるため、一般的な相補鎖形成能測定が行われる水溶媒を基本とした分離が可能なカラムを選択し、検討した。まずは HILIC カラムを用いて検討を行ったが、モデル二本鎖核酸とモデル一本鎖核酸の分離は困難であった。そこで次に陰イオン交換カラムを用いて検討を行ったところ、モデル二本鎖核酸とモデル一本鎖核酸を分離することに成功し、カラム、移動相等の分離条件を決定することができた。

次に、②類縁物質に由来する二本鎖を、一本鎖に分離するための条件検討を行った。具体的には、形成した二本鎖に熱をかけると、親和性の高いアンチセンス核酸由来のものは二本鎖を維持するが、親和性の低い類縁物質は一本鎖に分かれる。このように目的とするアンチセンス核酸のみが二本鎖形成を維持できる温度条件を、明確にした。

続いて、③得られた温度条件を基にカラムをオープンで加熱し、目的物質(二本鎖)と類縁物質(一本鎖)を分離試みた。アンチセンス核酸(核酸医薬モデル)と相補鎖核酸(ハイブリダイゼーションプローブ)を混合して二本鎖を形成させ、陰イオン交換カラムを用いてハイブリダイゼーションしていない一本鎖から分離する条件を決定した。次に、カラムオープンを用いてカラムの温度を制御し、カラム中で二本鎖融解を引き起こすことで、温度ごとに変化する二本鎖残存量情報を収集した。さらに、一塩基短いアンチセンス核酸(類縁物質モデル)とハイブリダイゼーションプローブを同様に混合して二本鎖を形成させ、同様に温度ごとに変化する二本鎖残存量情報を収集した。核酸医薬モデルと類縁物質モデルの結果を比較すると、ハイブリダイゼーションプローブの完全相補配列を有する核酸医薬モデルが、より高い温度まで二本鎖由来のピークを維持することが確認した。以上より二本鎖形成を利用した分離分析手法の基盤の確立に成功した。

## Background

Nucleic acid drugs are high-molecular compounds consisting of chains of many nucleic acids, and they have few steps of solid phase purifications. The synthesis process also can generate varied lengths of unexpected nucleic acids which show similar physicochemical properties to the targeted nucleic acids but as impurities in drug substances. In addition, nucleic acids modified with drug delivery molecules such as a sugar chain, N-acetyl galactosamine, have been developed to avoid toxicities; however, the modified molecules are either metabolized *in vivo* or contained shorten lengths of nucleic acids. Therefore, quantitative analyses which can clearly distinguish between the target substances and other related ones in their properties are prerequisite to assure their qualities and safeties for proper evaluations. However, such drugs have hardly approved, and the methods to evaluate efficacies and safeties have not been sufficiently established yet. Hence, developing products have been evaluated individual methods. Therefore, not only analytical methods but also criteria for evaluations are essential for the development of nucleic acids drugs. Here, this study aims to develop a technology to control and to assure the quality of various nucleic acid drugs based on their characteristics such as lengths, sequences, and modifications.

## Results

In this study, we focused on the essential properties of nucleic acid molecules, *i.e.*, forming stable double strands with complementary strands. By use of differences in formations of double strands between full-length nucleic acids and related substances, analogues, we have been developing a method for separation and quantification. The difference can cause dramatical improvement of the resolution in mass analysis and can change their physicochemical properties such as electric charge, significantly.

First, ❶ we prepared a double-strand nucleic acid by mixing of antisense and its complementary strand (hybridization probe) nucleic acids, and conditions of column purification were explored on aqueous solvents. Although a HILIC column which is commonly used to evaluate formation of complementary strand in aqueous condition was insufficient to separate a double-strand nucleic acid from a single-strand nucleic acid, an anion exchange column could afford distinguishable separation between single-stranded and double-strand nucleic acids. Consequently, we identified column condition such as a type of column and mobile phase.

Next, ❷ we examined experimental conditions for separating the double-strand nucleic acids derived from the analogues into single-strand ones. A certain heating process to double-strand chains promotes either retainment of the double strands derived from antisense chain with high affinity or to divide into two single strands derived from an analogue with low affinity. Thus, we clarified the temperature conditions which could afford formation of double strands for the targeted antisense nucleic acids.

Then, ❸ the column was heated to the proper temperature designated above and was applied to separate the target substance (double strand) from analogues (single strand). An antisense nucleic acid (model for nucleic acid medicine) and a complementary strand (hybridization probe) were mixed to form a double-strand nucleic acids, and the conditions for separation from the unhybridized single strand using an anion exchange column were determined. Subsequently, the temperature was controlled to induce double-strand melting in the column, and the amount of remained double-strand nucleic acid that changed with temperature was measured and analyzed. In addition, an analogue which was one nucleotide shortened than the model of nucleic acid medicine was mixed with a hybridization probe, and the amount of double strands was monitored in various temperatures as the same way. Comparing the results of the nucleic acid medicine model with those of the related substance model, it was confirmed that the nucleic acid medicine model with the full complementary sequence of the hybridization probe could maintain the double strand up to a higher temperature. In conclusion, we have succeeded in establishing the basis for a method to separate and to analyze by using double-strand formation.