

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) NMR フィンガープリント法を用いたペプチド医薬品の品質管理に関する研究
(英語) Development of analytical method for quality assurance of peptide-based drugs using NMR finger-print analysis.

研究開発実施期間: 令和元年7月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 三澤隆史
(英語) Takashi Misawa

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 有機化学部 室長
(英語) National Institute of Health Sciences, Division of organic chemistry, Chief of second section

II 研究開発の概要

本研究では、中分子医薬品の構造変性を検出する新たな品質評価系として NMR フィンガープリント法の応用を検討した。NMR では、ペプチド医薬品の構造変性をスペクトルとして検出可能であり、従来の質量分析(MS)や液体クロマトグラフィー(HPLC)あるいは円二色性分光法(CD)では得られない詳細な構造情報を得ることが可能になる。抗体等のタンパク質の品質評価では、HSQC 測定を行うことで NMR フィンガープリントを作成しロット間でのスペクトルを比較することで評価可能であることが報告されている(*Anal. Chem.* **2015**, *87*, 3556.)。HSQC 測定では直接結合した水素と炭素を検討することが可能であり、HSQC スペクトルの変化は構造変化として検出することができる。本手法をペプチド医薬品に応用することができれば、ペプチド医薬品の構造変性に基づく不純物の検出に繋がると考えた。

本研究では、まず代表的な環状ペプチドとしてシクロスポリンをモデルペプチドとして、加熱等の条件下において構造変化が生じるかを検討した。NMR 測定は日本電子 600MHz を使用し、重メタノールあるいは重ジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液としてプロトン(^1H)、カーボン(^{13}C)、二

次元 HSQC 測定を行った。上記検討では、シクロスポリンの各種 NMR スペクトルを得られたが、溶媒種によりその NMR スペクトルは大きく異なることが示唆された。これまでのペプチド医薬品は注射剤として使用されるため、水溶液中での構造を検出する必要がある。そのため、本研究では水溶性のペプチド医薬品をモデルペプチドとして様々な条件に付したペプチド医薬品の構造変性を NMR フィンガープリント法により検出することを目指した。そこで、シクロスポリンの構造解析を目的に、重水溶液を作成し、NMR スペクトルの測定を行った。しかしながら、シクロスポリンは水への溶解度に乏しく、水溶液での検討は不可能であった。

次に、水溶性ペプチドのモデルとして、日本薬局方収載のペプチドであるバソプレッシン、オキシトシン、ソマトスタチンの3種を選定した。3つのペプチドは水溶性かつ環状構造を有することから、環状ペプチドの構造解析に適していると考えた。バソプレッシンおよびソマトスタチンをモデルペプチドとしてその高次構造を評価するために HSQC 測定を行った。その後、強制的に構造変性を誘導する 90℃の加熱処理を行い、室温に戻した時の構造変化を NMR で検討した。NMR 測定は日本電子 600MHzNMR を用い、各ペプチドを 4 mg/mL になるように重水に溶解し 25℃環境下で行った。各サンプルに関して HSQC 測定を行った結果、7ppm 付近の芳香環領域や 4-5 ppm 付近のペプチド α 位水素の構造において HSQC スペクトルが観測された。一方で、バソプレッシンおよびソマトスタチンの両ペプチドにおいては、加熱前後の二つのサンプルはほぼ同様のスペクトルを示し、本結果からはペプチド構造は変化を示さないことが示唆された。HSQC と同様の測定方法として、HMQC 測定が知られているが、同じサンプルについて HMQC 測定を行ったが明確なスペクトルを得ることができなかった。

次に、オキシトシンについて同様に HSQC 測定を行った。加熱処理を行った場合のプロトン NMR を測定した結果、ペプチド主鎖の α 位プロトンの位置に観測される 4-5ppm 付近のプロトン NMR スペクトルは大きくシフトしており、加熱によりその構造が変化していることが示唆された。上記構造変化はオキシトシンの C-末端のグリシン残基由来の α 位水素であり、加熱条件により相互作用等が変化した可能性が示唆される。また、NMR で検出された構造変性について、従来の検出法である HPLC や CD スペクトルで検出可能であるかを検討した。その結果、HPLC や CD スペクトルでは、加熱前後の構造変性は検出することができなかった。これらの検討から、NMR フィンガープリント法は従来の構造評価法では検出できない微細な構造変化を検出可能な新規品質評価法になりうると期待される。

NMR フィンガープリント法のペプチド医薬品に対する安定性試験への適用を目指す。上市されているペプチド医薬品は注射剤であり、水溶液としての安定性評価は非常に重要になる。これまでペプチド医薬品では加熱や光安定性などの過酷試験によりその安定性を評価されるが、その評価方法は HPLC が使用されている。ペプチド医薬品は分子内水素結合に基づき、安定な二次構造を形成すると考えられているが、加熱等による微細な構造変化については十分に精査されていない。そこで、様々な条件化で保存し、その NMR を測定することでペプチド医薬品の安定性試験への適応の可否を検討した。そこで、さきほど NMR でのスペクトル変化が生じたオキシトシンをモデルペプチドとして、長期保存サンプルを作成し、NMR フィンガープリント法を利用して構造変

化の検出を検討した。オキシトシンは室温下で3週間保存したサンプルについて同様に HSQC 測定を行い、調整してすぐのオキシトシンの各種 NMR スペクトルを比較することで、その変化を検討した。その結果、0.9ppm 付近のロイシンあるいはイソロイシン残基、7.22ppm 付近のチロシン由来のピークについて新たなピークが検出され、不純物の生成が確認された。

最後に得られた構造変性による不純物が細胞毒性に繋がる可能性について検討した。構造変性による不純物が毒性や副作用につながる場合、構造変性を正しく評価する検出系はペプチド医薬品の品質および安全性を確保するために重要な役割を担うと考えられる。そこで、オキシトシン、および加熱サンプル (50℃、90℃) あるいは3週間保存サンプルについて、その細胞毒性を評価した。各サンプルを 100 μ M から 1 μ M まで希釈したサンプルを調整し、HeLa 細胞に対し 24 時間インキュベーションした後の細胞生存率を CellTiter-Glo 2.0 を用いて評価した。その結果、いずれのサンプルにおいても顕著な細胞毒性は認められなかった。

本手法では、従来の評価法では得られなかったペプチド医薬品の構造情報を検出する新規 NMR フィンガープリント法の開発を目指した。本手法の完成により、ペプチド医薬品などの分子量の大きな化合物に特異的な構造変性による不純物を検出することが可能になり、ペプチド医薬品の品質および安全性の確保につながると期待される。

本研究成果の一部は、下記の国内学会にて公表した。

1. 三澤隆史, 出水庸介, NMR フィンガープリント法を用いたペプチドの構造変性検出に関する検討, 日本薬学会第 142 年会, 2022/3/28, 国内, ポスター.
2. 三澤隆史, 次世代中分子ペプチド医薬品創出に向けた基盤技術の開発, 第 65 回日本薬学会関東支部大会, 2021/9/11, 国内 web, 口頭

In this study, we investigated the application of NMR fingerprinting as a new quality assessment system for detecting structural modifications of small molecule pharmaceuticals. NMR can detect structural changes in peptide drugs as spectra, providing detailed structural information that cannot be obtained by conventional mass spectrometry (MS), liquid chromatography (HPLC), or circular dichroism spectroscopy (CD). It has been reported that HSQC measurements can be used to evaluate the quality of proteins such as antibodies by generating NMR fingerprints and comparing spectra from lot to lot (*Anal. Chem.* **2015**, 87, 3556.). We hypothesized that if this method could be applied to peptide drugs, it would lead to the detection of impurities based on structural denaturation of peptide drugs. spornine as a representative cyclic peptide model, we investigated whether structural changes occur under conditions such as heating, etc. NMR measurements were performed using a JEOL 600 MHz, heavy methanol or heavy dimethyl sulfoxide (DMSO) solution for proton (^1H), carbon (^{13}C), and two-dimensional HSQC measurements were performed. In the above study, various NMR spectra of cyclosporine were obtained, suggesting that the NMR spectra of cyclosporine vary greatly depending on the solvent species. Since previous peptide drugs are used as injectable drugs, it is necessary to detect their structures in aqueous solution. Therefore, in this study, we aimed to detect conformational changes of peptide drugs subjected to various conditions by NMR fingerprinting using water-soluble peptide drugs as model peptides. Therefore, for the structural analysis of cyclosporine, heavy aqueous solutions were prepared

and NMR spectra were measured. However, cyclosporine has poor aqueous solubility and could not be studied in aqueous solution.

Next, oxytocin, which is listed in the Japanese Pharmacopoeia, was selected as models for water-soluble peptides. Oxytocin was considered suitable for the structural analysis of cyclic peptides because they are water soluble and have cyclic structures. NMR measurements were performed using a JEOL 600 MHz NMR system at 25°C with each peptide dissolved in heavy water at a concentration of 4 mg/ml. HSQC spectra were observed in the aromatic ring region around 7 ppm and in the structure of peptide a hydrogen at 4-5 ppm. The proton NMR spectrum of the heat-treated peptide showed a large shift in the proton NMR spectrum around 4-5 ppm observed at the position of the positional proton of the peptide main chain, suggesting that the structure of the peptide was changed by heating. The above conformational change is the positional hydrogen derived from the C-terminal glycine residue of oxytocin, suggesting that the heating conditions may have changed the interaction and other factors. We also examined whether the structural denaturation detected by NMR could be detected by conventional detection methods such as HPLC and CD spectra. As a result, the structural denaturation before and after heating could not be detected by HPLC or CD spectra. Based on these studies, the NMR fingerprinting method is expected to be a new quality evaluation method that can detect minute structural changes that cannot be detected by conventional structural evaluation methods.

Finally, the possibility that impurities due to structural denaturation obtained could lead to cytotoxicity was discussed. If impurities due to structural denaturation lead to toxicity or adverse effects, a detection system that correctly evaluates structural denaturation would play an important role in ensuring the quality and safety of peptide drugs. Therefore, we evaluated the cytotoxicity of oxytocin and heated (50°C, 90°C) or 3-week-stored samples. Samples were diluted from 100 µM to 1 µM, and cell viability was evaluated using CellTiter-Glo 2.0 after 24-hours incubation with HeLa cells. As a result, no significant cytotoxicity was observed in any of the samples.

The aim of this method was to develop a novel NMR fingerprinting method to detect structural information of peptide drugs that could not be obtained by conventional evaluation methods. The completion of this method is expected to make it possible to detect impurities due to structural denaturation specific to compounds with large molecular weights, such as peptide drugs, and to ensure the quality and safety of peptide drugs.