

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) 高速液体クロマトグラフ質量分析計を用いた核酸医薬品の代謝物及び類縁物質の網羅的検出・定量手法の開発と評価への応用
(英語) Development of LC/MS-based comprehensive detection and quantitative measurement methods for metabolites and impurities of oligonucleotide therapeutics, and their application to regulatory evaluation

研究開発実施期間: 令和2年7月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 孫 雨晨
(英語) Sun Yuchen

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・医薬安全科学部・研究員
(英語) National Institute of Health Sciences, Division of Medicinal Safety Science, Researcher

II 研究開発の概要

1. 研究の目的及び背景

核酸医薬品とは主として修飾核酸が連結したオリゴ核酸であり、難治性遺伝疾患等の治療における新規モダリティとして注目されている。しかし一方で、現状核酸医薬品の非臨床・臨床開発におけるその原薬、代謝物、類縁物質等に関する分析法の規制ガイドラインはまだ整備されておらず、新規開発参入の足かせの一つとなっている。この原因としては、国内外において核酸医薬品の代謝物及び類縁物質の網羅的な同定・定量手法について標準化された分析法の報告はないことが挙げられる。そのため、核酸医薬品の品質・安全性評価に資する分析法の規制ガイドライン整備に向けて、その代謝物・類縁物質の網羅的検出及び定量法の開発、それら分析法のバリデーションに関するデータの取得が急務である。

そこで、本研究では、本邦における核酸医薬品開発の効率化に向けて、核酸医薬品の非臨床安全性試験や品質評価試験等で利用可能な代謝物/類縁物質の網羅的同定・定量手法を創出し、その分析法のバリデーションに関するデータを取得することを目標として、下記の二項目の研究開発内容を実施する。

- ① 最も臨床試験数が多い核酸医薬品の一種である siRNA 医薬品を対象として、その原薬及び類縁物質(末端核酸残基欠損体等)をモデルとして用い、高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LC/MS)による網羅的代謝物測定に向けた前処理手法・分析法の最適化を行い、*in silico*解析による代謝物・類縁物質同定の一連のワークフローを確立すること。
- ② モデル siRNA 医薬品に由来する代謝物/類縁物質に対して標準物質を用いた定量法を構築し、真度、精度、選択性、特異性、キャリーオーバー等の分析法バリデーションに関するデータを取得すること。

2. 研究の成果

(1) 核酸医薬品の代謝物/類縁物質の網羅的検出手法の開発

本研究では、モデル siRNA 医薬品として現在第三相臨床試験中である fitusiran と、その薬効主体であるアンチセンス鎖由来である複数種の推定代謝物分子(9-22 mer)を化学合成し、分析法の開発に利用した。これら核酸分子の分離にはイオンペア逆相クロマトグラフィーLC(IP-RP-LC)を利用し、その検出はオービトラップ型高分解能型質量分析計(MS)を用いて行った。分析法の最適化のための LC 条件の検討の結果、二本鎖構造を有する siRNA 医薬品の LC カラム上での良好な分離には、二本鎖構造が解離する高いカラム温度が重要であることがわかった。さらに、0.4%のトリエチルアミン及び2%のヘキサフルオロイソプロパノールを添加した移動相を用いることで、塩基鎖長に応じた標的核酸分子の LC カラム上での分離を確認することができ、fitusiran 原薬を含む 9-22-mer の推定代謝物のいずれについても良好なピーク形状が認められた。次に、LC 分離された fitusiran の全長産物(FLP)及び 9-22mer の推定代謝物のすべての検出に最適な MS 条件の検討を実施した。本測定には full-scan data-dependent MS/MS 測定法を利用した。検討の結果、MS 感度を規定する重要な設定値として S-lens レベルを同定した。また、核酸塩基配列の網羅的な構造解析のためには、適切なコリジョンエネルギーで核酸分子を開裂し、MS/MS フラグメント情報を取得することが重要であることを明らかとした。最適化した LC/MS 条件を使い得られた測定データ中における核酸分子の同定および配列構造の決定のために、*in silico* 配列解析ソフトである AQXeNA と BioPharma Finder の解析条件の最適化を実施した。その後、それぞれのソフトウェアにおける構造決定可能な下限濃度の検討を実施したところ、AQXeNA では 25 ng/mL であったのに対し、BioPharma Finder では 5 ng/mL であり、より高感度に標準品混合液中の fitusiran 及びその推定代謝物の核酸分子を同定できることが示された。

上記標準物質溶液を用いた分析条件に加えて、生体試料中からの fitusiran 及びその推定代謝物の前処理手法の開発を実施し、Clarity OTX SPE (25 mg/well) を用いた前処理手法の条件を最適化した。開発した手法では、塩基鎖長に関わらず血中および肝ライセート中から、80%以上の高い回収率で標的核酸分子を

抽出できることを示した。

以上より、本研究では核酸医薬品の代謝物/類縁物質の構造決定のための分析手法、およびそれら核酸分子の生体試料中からの抽出法を開発した。

(2) 核酸医薬品の代謝物プロファイリング法の開発

核酸医薬品の代謝物プロファイリング解析のための、*in vitro* 代謝試験法の実施した。核酸代謝用緩衝液条件の検討を肝がん細胞である HepG2 を用いて実施したところ、最も原薬の分解度が高かった緩衝液は 100 mM の Tris-HCl (1 mM の酢酸マグネシウム及びペニシリン・ストレプトマイシンを含む、pH8.0) であることが分かった。そこで、本緩衝液を用いて複数の異なるラット肝由来組織ホモジネート画分 (S1、S9、サイトゾル、ミクロソーム) を調製し、代謝実験を実施した。その結果、各種肝ホモジネートとのインキュベーションにより、fitusiran のアンチセンス鎖とセンス鎖の両方が時間依存的な分解を受け、その分解速度はアンチセンス鎖の方が早いことが示された。加えて、単位タンパク質量あたりの fitusiran 分解度が最も高かったのは、ミクロソーム画分であることが明らかとなった。原薬由来核酸代謝物分子の網羅的配列決定解析の結果、ミクロソームにおいて最も多くの代謝物が同定され、アンチセンス鎖及びセンス鎖のそれぞれについて 10 種以上の代謝物が観測された。また、主要な fitusiran 代謝物は、アンチセンス鎖の 3' N-1 体であることが明らかとなった。さらに代謝物の産生パターンから、fitusiran の代謝様式として、アンチセンス鎖は末端からエキソヌクレアーゼによる分解が主要な分解経路であり、センス鎖は塩基配列の内部からエンドヌクレアーゼによる分解を受けやすい傾向があることが明らかとなった。以上より、本研究では、*in vitro* 肝試料を用いた siRNA 医薬品の代謝物プロファイリングに有用なワークフローを構築でき、siRNA 医薬品の代謝様式の解析や主要代謝物の同定に有用であることを実証した。

(3) 血中の核酸医薬品の代謝物/類縁物質の同時定量法の構築および分析法バリデーション

上述の代謝物プロファイリング法では、半定量的な代謝物量の計算しかできないため、同定された代謝物の生体試料中の正確な濃度を把握するためには、標準物質を用いたバイオアナリシス法の構築が不可欠である。そこで、本研究では、分析法構築に利用した fitusiran 及びそのアンチセンス鎖由来代謝物/類縁物質分子 (9-22-mer) をモデルとして、これら核酸分子の血中濃度の同時定量が可能な測定法を構築した。構築した手法の再現性・頑健性の評価のために、ICH M10 に記載の評価項目 (検量線、真度、精度、キャリーオーバー、選択性、希釈の妥当性、安定性、マトリックス効果、特異性) についてバリデーション試験を実施した。その結果、特異性以外のすべての評価試験の結果は既存ガイドラインの判定基準値内であることを確認された。一方で、特異性については、LC カラム上で分離できない標的代謝物/類縁物質分子間の質量値干渉と、原薬中に不純物として含まれる鎖長短縮核酸が定量性に悪影響を与えることを明らかとした。以上より、本研究では再現性に優れた血中 siRNA 医薬品及びその代謝物/類縁物質の同時定量法を構築することができた。本手法を用いる際には、代謝物/類縁物質間の質量値の干渉と、原薬由来不純物の定量値への影響に留意することが重要であることが明らかとなった。

3. 本研究の意義

本研究では、これまでに手動で膨大な時間と労力をかけて実施する必要があった核酸医薬品の代謝物/類縁物質の同定解析に対する自動化かつ網羅的な配列構造決定のための測定及び解析ワークフローを構築した。本手法は *in vitro* における核酸医薬品の代謝様式の推定のみでなくオンターゲット効果やオフターゲット効果を起因とする副作用の発生につながる実試料中の核酸医薬品の代謝物/類縁物質を網羅的に同定することに有用である。加えて、本手法は核酸医薬品の原薬中に含まれる不純物の同定にも利用可能である。以上のように、本研究で構築した手法は、核酸医薬品の製造、非臨床安全性試験、ならびに臨床試験中の試

料に対して使用することが可能である。本手法を利用することにより、臨床試験までの開発期間の短縮、開発コストの低減、上市までの成功確率の向上など、本邦の核酸医薬品開発全体の活性化につながることを期待される。また、本研究で実施した血中の核酸医薬品及びその代謝物/類縁物質の同時定量法に関するバリデーション試験の結果は、今後の核酸医薬品の生体試料中薬物濃度分析法の開発、及びその規制に関するガイドラインや技術指針を作成する際に、判定基準値等を決定する議論のための重要な基盤データになることが期待される。

1. Backgrounds of this study

Oligonucleotide (OGN) therapeutics are getting attention as a new drug modality for intractable and rare diseases. Recently, liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) has been used as a major bioanalytical tool in drug development of OGNs. However, LC/MS-based methods capable of comprehensive identification and quantification of oligonucleotide therapeutics and their metabolites have yet to be standardized. Furthermore, from a regulatory perspective, data is urgently required to examine if the conventional bioanalytical method validation (BMV) guidelines can be applied to such methods. Thus, in this study, we aimed to develop the LC/MS-based methods for comprehensive identification and quantification of metabolites/analogs of OGN therapeutics, and to obtain the validation data of the developed bioanalytical methods.

2. Research achievements

Development of an LC/MS-based method for comprehensive characterization of OGN metabolites and analogs in biological samples

Fitusiran (an siRNA under phase III trial) was chemically synthesized and used as a model of therapeutic OGN in this study. In addition, several putative metabolites of fitusiran antisense strand (9-mer - 22-mer) were also prepared for analytical method development. Firstly, we optimized conditions for LC separation of fitusiran and their putative metabolites using mobile phases supplemented with triethylamine and hexafluoroisopropanol. The developed LC method could separate fitusiran and the putative metabolites based on their chain length. As a next step, we optimized the MS conditions for full-scan data-dependent MS/MS measurements along with the parameters for *in silico* structural analysis of the detected OGNs using AQXeNA and BioPharma Finder. Afterwards, a sample preparation method for the extraction of fitusiran and the putative metabolites from rat plasma and liver lysates was developed using Clarity OTX SPE plate. The developed method showed high recovery rate for fitusiran antisense strand and the putative metabolites (>80%).

Development of a workflow for metabolite profiling of siRNA drugs

Methods to study *in vitro* metabolism of siRNA drugs are still sparse. To develop such methods, we explored the best assay buffer using whole cell lysates of HepG2 cells prepared from five different buffers. The highest nuclease activity for fitusiran was observed in the lysate prepared by 100 mM Tris-HCl supplemented with 1 mM magnesium acetate, penicillin and streptomycin. Using this buffer, we next performed *in vitro* metabolism assays to study metabolic patterns of fitusiran using S1, S9, cytosol, and microsomes prepared from the rat livers. The data showed that the highest nuclease activity for fitusiran was observed in the microsome among all liver subfractions. As a result of the metabolite profiling analysis in microsomes, we detected 11 and 12 chain-shortened metabolites of the antisense strand (AS)

and the sense strand of fitusiran respectively. AS-3'N-1 was found to be a predominant metabolite. Additionally, the data showed that the AS strand tended to be degraded mainly by exonucleases, while the sense strand tended to be metabolized by endonucleases. Collectively, the data in this study suggest that our method is useful not only to comprehensively identify major metabolites of siRNA drugs but also to study their metabolic patterns.

Development of a bioanalytical method for siRNA drugs and their metabolites/analogs

In addition to the method for metabolite profiling, we also developed the bioanalytical method for representative fitusiran metabolites along with several fitusiran analogs (9-mer - 22-mer) in rat plasma. The method validation was performed according to the ICH M10 guideline. The quantification range of the developed method for all analytes was 1 – 250 ng/mL. Our validation tests of calibration curve, accuracy, precision, carry-over, selectivity, dilution integrity, stability, matrix effect met the acceptance criteria in ICH M10. Meanwhile, the decreased specificity was observed due to the contamination of metabolites as impurities of chemically synthesized fitusiran, and mass interference between the target analytes detected at the same retention time. Taken together, the data demonstrate that the current method is reproducible and useful to quantify fitusiran and its metabolites/analogs in rat plasma, but the measured values of some analytes with concerns about the decreased specificity because of the above-mentioned reasons should be carefully interpreted.

3. Future perspectives

In this study, we established an automated and comprehensive analytical workflow for the identification of metabolites/analogs of OGN therapeutics. Our method is useful not only for analyzing the metabolic patterns of OGN therapeutics *in vitro*, but also for the comprehensive identification of metabolites/analogs potentially associated with both on-target and off-target effects leading to side effects in study samples. Additionally, the method can also be utilized for the identification of impurities present in chemically synthesized OGN therapeutics.

The methodology developed in this study can be applied to various stages of nucleic acid drug development, including manufacturing, non-clinical safety studies, and clinical trials. By utilizing this method, it is expected to shorten the development timeline, reduce development costs, and improve the success rate of drug candidates, which would facilitate the development of OGN therapeutics in Japan. Additionally, the results of the validation tests provide important foundational data for future development of guidelines for validating methods of bioanalyzing nucleic acid drugs.