

日本医療研究開発機構
次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(RNA 標的創薬技術開発)
事後成果報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発
（英語）Development of Manufacturing and Analytical Infrastructure Technologies
for the Practical Application of Oligonucleotide Therapeutics

研究開発実施期間：令和 3 年 9 月 15 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）小比賀 聡
（英語）Satoshi Obika

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 大学院薬学研究科・教授
（英語）Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Osaka

II 研究開発の概要

我が国における高機能性核酸医薬品開発の加速、及びその国際競争力の強化を目的・目標とし、産官学からなる計 3 グループ（計 33 機関）の複合型の実施体制のもと、核酸医薬品の製造・精製・分析から規制まで一貫した研究開発を実施した。さらに、「核酸医薬分析技術拠点を」整備し、核酸医薬品の原料や中間体、原薬等の分析法の開発や品質データの収集を進め、製造プロセス開発や品質管理に有益な情報の共有を図った。これら取り組みの結果、プロジェクト全体で学術論文 50 報以上、学会発表 250 件以上の成果を挙げる事ができた。

<各グループの研究概要概要>

- 原料・原薬の製造基盤技術の開発（グループ (I)）

大阪大学と民間企業 13 社が協働し、各研究機関それぞれの強みを活かしたオリゴ核酸製造基盤技術の開発を目標に、①原料アミダイトの高純度化（結晶性アミダイトの開発）、②原薬製造技術の開発（マイクロ波を利用した原薬製造）、③機能性人工核酸を搭載した原薬の高効率・高純度製造、④核酸合成装置の開発と最適化、⑤原薬の分離精製技術の確立の 5 つの研究開発を実施してきた。さらに、本研究開発の中で確立したオリゴ核酸製造技術を用いて、非臨床・臨床試験用オリゴ核酸の中量製造を行ってきた。これら一連の研究開発を通じて、我が国の核酸医薬製造の技術力を大きく高める事ができた。

【①原料アミダイトの高純度化】

アミド架橋型核酸 (AmNA) アミダイトの粗体から結晶を取得可能なプロセスの確立を目標に、AmNA アミダイト 4 種類の結晶化溶媒や条件のスクリーニングを行った結果、4 種類すべての結晶を取得することに成功した。特に AmNA-MeC と AmNA-G については晶析製造法を確立するとともに、数百 g 製造を実施し、各クラス 3 不純物 0.1% 以下の高純度な結晶品を取得することに成功した。この一連の研究成果は特許として出願した。

また、ホスホロアミダイトのカップリング反応の加速化を目指して、立体障害性の小さいジエチルアミノ基、ジメチルアミノ基を有する LNA、ENA アミダイトを合成し、核酸医薬合成に適用した。その結果、ジイソプロピルアミノ基を有する従来品と比較して、開発したジエチル体、ジメチル体の方がより短時間でカップリング反応が進行し、LNA、ENA 由来の短鎖不純物を低減できることを明らかにした。

【②原薬製造技術の開発】

マイクロ波を活用した独自の核酸医薬製造法の確立を目指して研究開発を行った中で、マイクロ波を照射可能な合成装置とマイクロ波照射工程の全自動化機構を開発し、アミダイトのカップリング反応におけるマイクロ波照射の優位性を確認することができた。また、核酸医薬の精製を簡便化する方法として、高脂溶性のコレステロールアミダイトをキャッピング試薬として利用する独自の核酸医薬合成、簡便精製法を開発した。

【③機能性人工核酸を搭載した原薬の高効率・高純度製造】

人工核酸原料に含まれる不純物が核酸医薬の品質に与える影響を明らかにすることを目的に、AmNA アミダイト原料と原料由来不純物に焦点を当てて研究に取り組んだ。その結果、AmNA アミダイト製造時に生じる不純物の中でも特に 5'→3' reverse 体の管理が重要であることを実験的に明らかにした。さらに、AmNA アミダイトの保管条件決定を目標に長期安定性試験を行ったところ、適切な梱包下においては 5 °C 以下で保管できることを明らかにし、上述の AmNA アミダイト結晶は従来品の非晶質固体より安定性に優れることを見出した。その他、シチジン類のデアミネーションについて検討を重ねた結果、デアミネーション体が生じやすい条件 (アミノ基がベンゾイル保護されていることなど) を洗い出すとともに、デアミネーション体の分離に適した HPLC 分析条件を見出し、2D-LC/MS と組み合わせて MS/MS で配列解析を行うことでデアミネーション部位を特定することにも成功した。また、グアニン塩基由来の 2,6-ジアミノプリン誘導体の発生に、キャップ化工程および脱シアノエチル化工程が関与していることを突き止めた。

さらに、大阪大学 下條 (臨床開発案件 A)、名古屋大学 神田 (臨床開発案件 B)、東京大学 程 (臨床開発案件 C)、金沢大学 谷口 (臨床開発案件 D) との連携体制を整え、非臨床・臨床試験用オリゴ核酸の中量製造を行うことで、本研究開発を通じて確立した原薬製造技術を検証した。特に臨床開発案件 B の核酸医薬については、GGGenome を用いた *in silico* 解析と *in vitro* マイクロアレイ解析を行い、非臨床・臨床試験安全性評価においてリスク評価すべきオフターゲット遺伝子の絞り込みを行った。

【④機能性人工核酸を搭載した原薬の高効率・高純度製造】

国産の合成装置の開発を目指し、(1) 3~100 mmol スケールのオリゴ核酸が合成可能な装置、(2) オリゴ核酸のスクリーニングに適した合成装置を試作し、大阪大学の核酸医薬分析技術拠点へ導入した。種々合成検討の結果、反応容器の加温や攪拌回転がアミダイト原料の縮合効率向上につながる可能性が示唆された。

【⑤原薬の分離精製技術の確立】

ヌシネルセンの精製において連続クロマトグラフィー (MCSGP) による生産性検討を実施した。10 サイクルの連続運転を行ったところ、粗体純度に関わらず、製品純度 93% 以上を満足し、サイクル間の再現性も良好であった。一般的なシングルカラム精製との比較では、回収率は 30% 改善され、単位時間当たりの生産性は 60% 向上した。また、200 g 製造シミュレーションでは、分析検体削減を含む精製時間の 70% 削減や、材料コストの約 340 万円削減を達成できた。さらに、臨床開発案件 A および B の核酸医薬の粗体に MCSGP 精製を適用し、核酸医薬の中量製造における MCSGP の有用性を実証することができた。

- 原薬の分析基盤技術の確立 (グループ (II))

核酸医薬品の不純物管理について産官学が議論するための研究施設「核酸医薬分析技術拠点」を大阪大学吹田キャンパス内に設置した。LC/MSなどの分析機器導入、秘密保持契約、試料・データの保管・管理・分配システムの構築など環境を整備した。従来法・新規法様々な手法で合成されたオリゴ核酸の不純物の定量分析をLC/MSで実施し、カラム分離することが望ましいという点や、解析方法によって回収率が異なり注意が必要であるといった点が明らかになり、品質管理において重要な知見を得た。得られた知見からより最適化された分析条件を開発した。また、コンジュゲート体や siRNA などの 2 本鎖核酸中に含まれる目的物質由来不純物の同定も達成し、モルフォリノ核酸を含むオリゴ核酸の配列解析手法を開発した。種々開発した試験法をもとに、核酸医薬品開発候補品の目的物質由来不純物、残留溶媒および水分含量の分析法バリデーションを完了し、実用化に必要な品質規格を構築した。新規分析技術の開発では、2D-LC/MS での分離・分析の最適化、円二色性 (CD) スペクトル測定法、熱量測定 (DSC、ITC) による核酸の構造不純物の検出など、新技術を開発した。不純物の定量性や検出下限の向上に成功し、これらの手法の有用性を示すことができた。また、MALDI-TOF/MS を活用した迅速評価法を確立し、MALDI 法の活用に関する特許を二件出願した。さらに、LC-MS/MS を用いた短鎖不純物の異性体個別定量法を確立し、短鎖不純物の存在量と遺伝子発現抑制の関連を示す結果を得た。得られた成果をもとに、製薬協核酸品質 TF と連携し、分析法に関する技術的ガイダンス (厚労省通知の補遺文書) を作成した。技術的ガイダンスは分析グループのみならず、原料・原薬の製造基盤技術の開発 (グループ (I))、不純物の毒性評価 (グループ (III)) および PMDA が協働して作成し、事業終了後に公表する予定であり、本技術的ガイダンスは、国内における核酸医薬開発の実装に大きく貢献すると考えられる。

- 不純物の毒性評価 (グループ (III))

標的外 RNA に相補結合することによって生じる「ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット作用に起因する毒性 (オフターゲット毒性)」の発現が最も懸念されるヌクレオチド欠損体/付加体について、オフターゲット評価の在り方を検討するための基盤データを取得し、下記の結果を得た。(1) 原薬 (目的物質) のオフターゲット評価時に網羅的な遺伝子発現変動解析を行うことで、ヌクレオチド欠損体/付加体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示した。(2) 数理計算によりオリゴヌクレオチド原薬におけるヌクレオチド欠損体の存在割合の理論値を算出し、特に N-1 体の分析と生体作用に関する考察が重要であることを示した。(3) ヒト細胞を用いた検討から、N-1 体/N+1 体によりハイブリダイゼーション依存的オフターゲット作用が実際に起こりうることを示した。以上から得られた知見を基に、不純物の影響を考慮したオフターゲット毒性の評価手順を整理し、生物学的評価と分析的評価を組み合わせた評価スキーム案を提示した。

規制関連文書として、本事業で得られた成果を基に核酸医薬の分析手法とその留意事項を整理し、品質評価に関する技術的ガイダンス (厚労省通知の補遺文書) を作成した。

therapeutics in Japan and enhance their international competitiveness. Under a collaborative implementation framework comprising three groups (including 33 institutions) from industry, government, and academia, comprehensive R&D was conducted covering the entire spectrum from manufacturing, purification, and analysis of nucleic acid therapeutics to regulatory affairs. Furthermore, research platform was established in The University of Osaka to develop analytical methods for active pharmaceutical ingredients (APIs) of oligonucleotide therapeutics, collect quality data, and facilitate the sharing of valuable information for manufacturing process development and quality control. As a result of these efforts, we have reported over 50 academic papers and over 250 conference presentations.

Research Findings of Group (I)

As foundational technology development for oligonucleotide manufacturing, we conducted five research and development initiatives: 1) High-purity production of phosphoramidites (development of crystalline phosphoramidites), 2) Development of active pharmaceutical ingredient (API) manufacturing technology (API production using microwaves), 3) High-efficiency, high-purity manufacturing of APIs incorporating functional nucleic acids, 4) Development and optimization of oligonucleotide synthesis equipment, 5) Establishment of API separation and purification technology.

Notably, we successfully established a process enabling the crystallization of Amido-bridged nucleic acid (AmNA)-phosphoramidites. Specifically, for phosphoramidites of AmNA-MeC and AmNA-G, we established crystallization manufacturing methods and successfully produced several hundred grams of extremely high-purity crystalline products. In addition, a productivity study using Multi-Column Counter-Current Solvent Gradient Purification (MCSGP) was conducted for the purification of oligonucleotides. Compared to conventional single-column purification, this resulted in a 30% improvement in recovery rate and a 60% increase in productivity per unit time. Furthermore, manufacturing simulations of MCSGP achieved significant reductions in purification time and material costs, including a reduction in the number of analytical samples. These developed technologies on the crystallization of AmNA-phosphoramidites and the MCSGP have been applied for patents. Furthermore, we have established four collaborative Clinical Development Project A–D. Through these partnerships, we have conducted medium-scale production of oligonucleotides for non-clinical and clinical trials, verifying the manufacturing technology established through this research and development. Specifically for the oligonucleotide therapeutics in Clinical Development Project B, we have carried out *in silico* analysis using GGGenome and *in vitro* microarray analysis to identify off-target genes requiring risk assessment in nonclinical and clinical trial safety evaluations.

Research Findings of Group (II)

In analytical research platform was established in The University of Osaka to enable industry– government – academia collaboration in discussions on impurity control for oligonucleotide therapeutics. The facility was equipped with analytical instruments such as LC/MS, and the necessary environment was developed, including non-disclosure agreements and systems for sample/data storage, management, and distribution. Quantitative analysis of impurities in oligonucleotides synthesized by various methods were performed using LC/MS, revealing important findings for quality control. Specifically, that chromatographic separation is desirable for reliable quantification, and that recovery rates differ depending on analysis methods and therefore require careful attention. Based on these insights, more optimized analytical conditions have been developed. Furthermore, the identification of target-derived impurities present in conjugated oligonucleotides and double-stranded nucleic acids such as siRNA was achieved, and a sequencing analysis method for oligonucleotides containing morpholino nucleic acids was developed. Building upon the test methods established throughout the project, analytical-method validation was completed for desired product-derived impurities, residual solvents, and water content in development-stage oligonucleotide therapeutics candidates, enabling the establishment of quality specifications required for practical implementation.

In the development of new analytical technologies, innovative methods were established, including optimized separation and analysis using 2D-LC/MS, circular dichroism (CD) spectroscopy, and detection of structural impurities by calorimetry (DSC, ITC). These approaches successfully improved impurity quantification and limits of detection, demonstrating their utility. A rapid evaluation method using MALDI-TOF/MS was also established, and two patents related to the application of MALDI were filed. In addition, an LC-MS/MS method enabling individual quantification of short-chain impurity isomers was developed, and results indicating the relationship between short-chain impurity levels and gene-expression suppression were obtained. Based on the achievements, a draft technical guidance document on analytical procedures was prepared in collaboration with the JPMA Oligonucleotide Quality Task Force. The guidance was jointly developed not only by the analytical group but also by Group (I), Group (III), and the PMDA, and is scheduled to be published after the completion of

the project. This guidance is expected to significantly contribute to the implementation and further advancement of nucleic acid drug development in Japan.

Research Findings of Group (III)

Nucleotide deletion or insertion impurities may hybridize with off-target RNAs, potentially causing hybridization-dependent off-target effects, such as unintended changes in gene expression. In this study, we obtained foundational data to establish off-target assessment strategies for these impurities and derived the following insights. (1) We showed that transcriptome-wide gene expression profiling conducted during off-target assessment of oligonucleotide drug substances (a desired product) could also predict and evaluate off-target effects attributable to nucleotide deletion and insertion impurities. (2) We theoretically calculated the amounts of nucleotide deletion impurities in oligonucleotide drug substances and indicated that analytical characterization and biological risk assessment should particularly focus on single-nucleotide deletion impurities (N-1 impurities). (3) Studies using human cells demonstrated that both N-1 and N+1 impurities can indeed elicit hybridization-dependent off-target effects. Based on these findings, we proposed a scheme for the assessment of off-target effects of impurities that combines biological and analytical assessments.

As a regulatory outcome of this project, we compiled analytical methods for oligonucleotide therapeutics and key points to note and developed a technical guidance document on quality evaluation (a supplementary document to a notification by the Ministry of Health, Labour and Welfare.)