

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：核酸・遺伝子を用いた医薬品、ナノテクノロジーを応用した DDS 製剤等の品質及び安全性評価に関する研究
2. 研究開発代表者：奥田晴宏（国立医薬品食品衛生研究所）
3. 研究開発の成果

本研究班は、核酸・遺伝子を用いた医薬品、ナノテクノロジーを応用した DDS 製剤の品質及び安全性分野におけるレギュラトリーサイエンスを強化し、開発・審査の高度化および迅速化に貢献するため、下記事項① - ③を達成することを目的としている。

- ① 核酸医薬品の合成段階で混入する核酸医薬に特有の不純物(N-1 塩基長のオリゴ核酸等)に関して、品質管理の観点から許容可能な「限度値 (=遺伝子発現に影響を与えない不純物の混入割合の限度)」を設定する。
- ② 遺伝子治療用ウイルスベクターの製造工程に由来するプラスミド等の不純物のカラムクロマトグラフィーによる低減化のための方法を確立とともに品質管理法及び同等性・同質性評価法を確立する。
- ③ ナノ DDS 医薬品では、有効成分や添加剤のサイズや形態が薬効や安全性に大きな影響を与えうる。そのサイズや形態等を解析する手法の構築を検討するとともに、免疫毒性等の評価戦略の構築を目指す。

本年度の研究成果を以下に記す。

核酸医薬品

本年度は、「合成過程で生成する不純物の分析・同定」および「不純物が標的以外の遺伝子発現に与える影響の解析」を実施した。まず、固相合成法により純度の異なるアンチセンスを合成し、LC-Orbitrap-MS により合成段階で混入する不純物を分析した。その結果、①合成過程で生じた目的の配列から数塩基欠失した配列が精製後の画分に混入すること、②S 化が不十分な O-オリゴが混入すること、③合成試薬に由来する官能基を有した配列が混入することが分かった。次に、これらの不純物を解析したアンチセンスのうち 1 種類をヒト細胞に作用させ、内在性遺伝子の発現変動をマイクロアレイにより解析した。その結果、異なる純度のアンチセンスを作用させた場合においても「50%以下まで抑制された遺伝子 (=オフターゲット効果が誘導された遺伝子) の割合」は同等であった。今回の解析から、固相合成法による合成過程で混入する核酸特有の不純物について、標的以外の遺伝子発現に影響しない閾値を明らかとした。

ナノテクノロジー応用 DDS 医薬品

ナノ DDS 医薬品のサイズや形態等を解析する手法の構築するため、ナノ結晶製剤を主な測定対象とし、品質特性解析法の検討を開始した。具体的には、画像解析と分光学的解析による同定とを組み合わせたサイズ・形態の解析手法について、モデル薬物を用いて検討を開始した。画像解析について、数百ナノメートルサイズまでの粒子観察が可能であった。また、海外で発表されている学術論文をもとに我

が国で市販されているナノ DDS 医薬品の調査を開始し、その候補をまとめた。さらに、ナノ DDS 医薬品の免疫毒性等の評価に関しては、ICH 及び FDA の免疫毒性に関するガイドラインの内容を精査し、ナノ DDS 医薬品においてプラスアルファで考慮すべき留意点について整理した。

遺伝子治療用製品

遺伝子治療の臨床開発初期によく用いられるアデノ随伴ウイルス 2 型 (AAV2) ベクターをモデルに、ベクターに混在する工程由来不純物の低減化法について検討した。3 種類のカラムを用いて高度に精製されている市販の AAV2 ベクター参照品について本研究で開発中のカラム X を用いて分画精製したところ、カラムの結合画分に得られた AAV2 ベクターはプラスミドの混入率が 5% から 1% に低下するとともに、比活性（ウイルス粒子当たりの遺伝子導入力価）が向上していることが確認された。今後、回収率向上のための分離条件を検討する。また、3 種類のプラスミドのトランスフェクションにより製造した AAV2 ベクターを用いて 4 種類の精製法を宿主由来タンパク質の除去と比活性を指標として比較し、高度に精製可能な条件を明らかにした。さらに、精製された AAV2 ベクターを用いてウイルス表面タンパク質の高感度標識による新たな特性解析を行うための標識法の条件検討を行った。