

論文内容要旨

Phos-tag Tip を用いた核酸医薬品の 新規不純物分析法の開発

主指導教員：小池 透 教授

(医系科学研究科 医薬分子機能科学)

副指導教員：木下 英司 准教授

(医系科学研究科 医薬分子機能科学)

副指導教員：熊谷 孝則 准教授

(医系科学研究科 微生物医薬品開発学)

常弘 昌弥

(医歯薬保健学研究科 薬科学専攻)

【背景】

核酸医薬品は、これまで治療が難しかった遺伝性疾患や難治性疾患に対する治療効果が期待できることから、アンメットメディカルニーズにこたえるモダリティとして注目を集めている。核酸医薬品は一般的な化学合成医薬品と比較して、不純物の混入率が高い傾向にあり、現在の分析技術では、各類縁物質を個別に管理することは困難であるケースが多い。末端にリン酸基がつくとイオン化効率が下がることが想定されるため、メインピークに溶出位置に近い場合は、MSでの検出が難しいと考えられる。この背景をふまえて、種々のタイプの不純物を含む試料溶液から末端リン酸化オリゴヌクレオチドの分離を可能にするシンプルで包括的な方法が必要であると考えた。筆者が所属する研究室で開発された Phos-tag は、生理条件下において、二つの亜鉛イオンとリン酸基の二つの酸素アニオンは強固な配位結合を形成するため、リン酸モノエステルを特異的に捕捉することができる。本研究では、Phos-tag Tip を用いて、核酸医薬品の不純物分析のための Phos-tag Tip 法の分離精製条件の検討及びその活用方法について検討を行った。

【結果と考察】

1) 分離条件の検討

天然型オリゴヌクレオチドと3'末端がリン酸化されたN-1不純物を等モル量含む試料溶液を用いて、Phos-tag Tip法におけるリン酸化不純物の優先的な結合に最適な緩衝液の検討を行った。最適な緩衝液を検討した結果、試料溶液には50 mM Bis-Tris/ CH₃COOH (pH 6.8) と10 mM ブトレンシン、洗浄液として0.10 M Bis-Tris / CH₃COOH、10 mM CH₃COONa及び10 mM MgCl₂ (pH 6.8)、溶出液として0.10 M Na₄P₂O₇及び0.10 M CH₃COOH (pH 7.0) を選定した。Phos-tag Tipを用いた分離プロトコールは、生理条件下、室温で、試料当たり30分未満で分離が可能であった。本分離方法により、大部分の非オリゴヌクレオチドはFT画分へ、非リン酸化オリゴヌクレオチドはW画分へ、リン酸化オリゴヌクレオチドはE画分へそれぞれ回収されることができるとわかった。また、このバッファー系では、各画分はそのままLC-MS分析に使用することができるため、汎用性が高い方法であると考えられる。

2) 種々サンプルへの適用検証

このプロトコールが様々なサンプルに適用可能であるかを検証するために、塩基長が10から20までの種々の塩基配列のサンプルを用いてPhos-tag Tipによる分離を試みた。その結果、大部分の親オリゴヌクレオチドはW1画分で除去され、大部分の3'末端リン酸化体はE画分で優先的に回収された。このPhos-tag Tip法の修飾オリゴヌクレオチドへの適合性を確認するために、LNA含有DNAオリゴヌクレオチドとOMe含有RNA/DNAオリゴヌクレオチドをそれぞれ等量含む試料を用いてPhos-tag Tipによる分離を行った結果、大部分の親オリゴヌクレオチドはいずれも洗浄画分で除去され、大部分の3'末端リン酸化N-1不純物は、いずれも溶出画分に選択的に回収された。以上の結果より、Phos-tag Tip法は、天然型及び修飾型オリゴヌクレオチドのいずれも、非リン酸化親オリゴヌクレオチドとの混合物から末端リン酸化オリゴヌクレオチドを分離可能であることを確認した。

3) LC-MS による測定

核酸医薬品に実際に混入する不純物量としては、それぞれ数%以下である。そのため、実際のサンプルを想定し、1%のリン酸化不純物を親オリゴヌクレオチドに添加したサンプルを用い、実験を行った。その結果、試料溶液中では確認できなかったマススペクトルが、Phos-tag Tip

により分画した E 画分において、リン酸化された不純物を検出することができた。E 画分でのみ検出できた理由としては、リン酸化不純物を E 画分に分画することで、メインピークによるイオン化抑制を回避でき、検出することができたと考えられる。また、FT 画分に主に検出されたマススペクトルであれば、非オリゴヌクレオチド、W 画分に主に検出されたマススペクトルであれば、非リン酸化オリゴヌクレオチド、E 画分に主に検出されたマススペクトルであれば、リン酸化オリゴヌクレオチドである可能性が高いと考えられるので、本手法は、構造推定の一助として有用であると考えられる。

【結論】

Phos-tag Tip 法の分離条件を検討した結果、天然型及び修飾型オリゴヌクレオチドについて、それらの非リン酸化オリゴヌクレオチドからの末端リン酸基を有するオリゴヌクレオチドを分離可能となり、分離した試料は前処理不要で、そのまま LC-MS を用いて分析可能であった。また、非オリゴヌクレオチド、非リン酸化オリゴヌクレオチド、リン酸化オリゴヌクレオチドに分画可能であるため、構造推定にも有用であると考えられる。以上より、Phos-tag Tip 法と LC-MS の組み合わせた手法は、核酸医薬品開発における種々の合成オリゴヌクレオチド中のリン酸化不純物を特異的に分離分析することのできる新しいタイプの分析法として有用であると考えている。この手法を用いた分析を通じて、核酸医薬品開発に貢献できることを願っている。