

2020年 TRC CMC分析研究部

多様化する医薬品モダリティに対する 不純物分析について

—低分子医薬品・核酸医薬品・タンパク質医薬品—

内容

1. 医薬品中の不純物について

◆ 低分子医薬品, 核酸医薬品, 抗体医薬品

2. 分析機能紹介

◆ GC-MS

◆ キャピラリー電気泳動

◆ イオンクロマトグラフィー (IC)

◆ HPLC-CAD

3. まとめ

医薬品中の不純物について

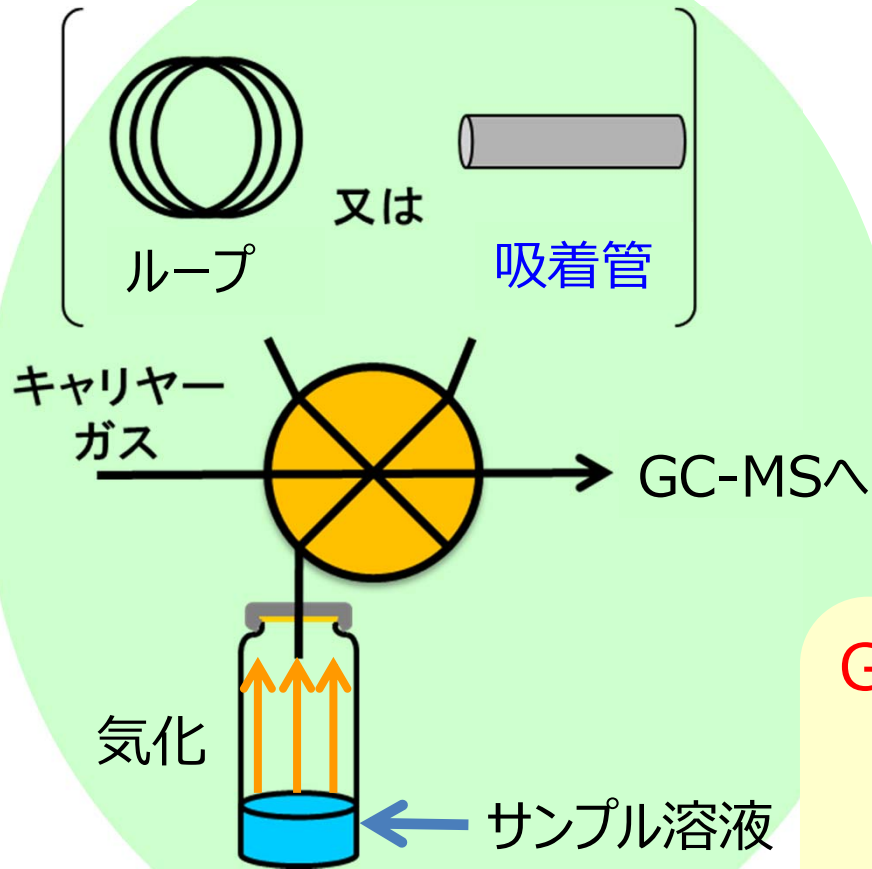
| 低分子医薬品 | | 核酸医薬品 | | タンパク質医薬品 | |
|----------|---|-------------------|---------------------------------|---------------------------|---|
| 不純物 | 分析手法 | 不純物 | 分析手法 | 不純物 | 分析手法 |
| 有機低分子不純物 | LC-MS/MS, GC-MS , MS, NMR, UHPLC | オリゴヌクレオチド 類縁物質 | UHPLC, キャピラリー電気泳動 | 電荷不均一性 | イオン交換クロマトグラフィー |
| | | | | | 等電点電気泳動 (ゲル, キャピラリー) |
| 残留溶媒 | GC-MS, GC, IC | 有機低分子不純物 | LC-MS/MS, GC-MS, MS, NMR, UHPLC | 凝集体 | サイズ排除クロマトグラフィー (UV, MALS) |
| | | | | 切断体 | 電気泳動 (ゲル, キャピラリー) |
| | | 残留溶媒 | GC-MS, GC | 非結合型修飾物 | UPLC |
| 元素不純物 | ICP-OES, ICP-MS | 元素不純物 | ICP-OES, ICP-MS | 宿主細胞由来タンパク質, 宿主細胞由来DNA | ELISA, ウェスタンブロットティング 定量PCR |
| | | | | 製造工程不純物 | GC-MS, GC, IC, HPLC-CAD |

さまざまな分析手法が必要。

トラップ法を用いたヘッドスペースGC-MS

ヘッドスペースサンプラーで気化したサンプルを、活性炭の吸着管でトラップし濃縮する。
従来のループ法によるサンプル導入に比べ、さらなる微量分析が可能である。

ヘッドスペースサンプラー



気化した成分のみを注入。
良好な再現性!!



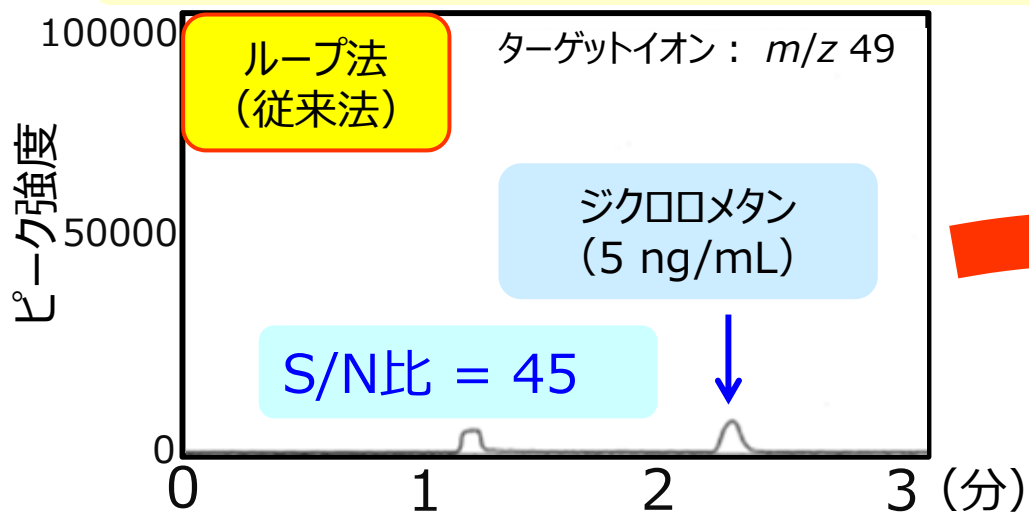
GC-MSシステム

ガスクロマトグラフ：GC-2010 Plus (島津製作所)
ヘッドスペースサンプラー：HS-20 Trap (島津製作所)
質量分析計：GCMS-QP2020 (島津製作所)
CSV, データインテグリティ対応。

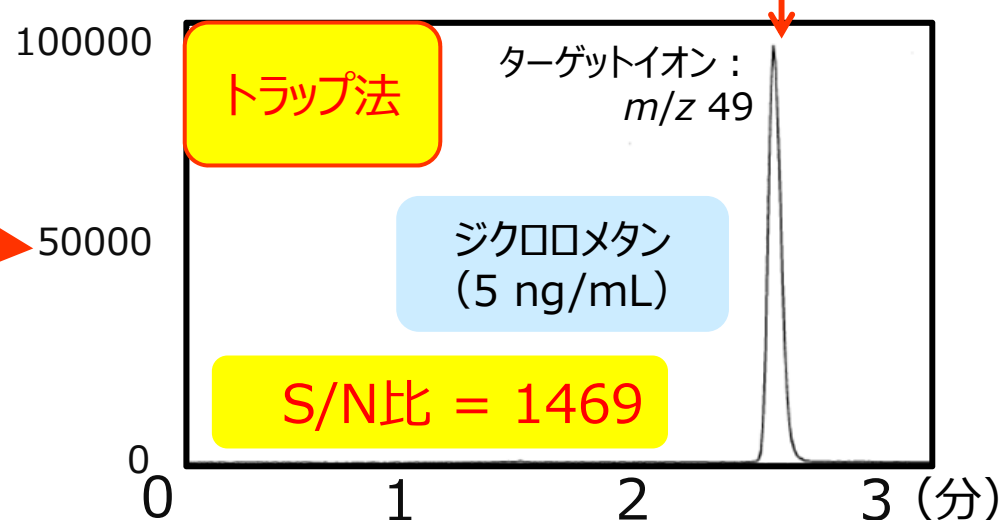
GC-MSによる核酸中の残留溶媒分析

トラップ法による検出能力の増大

ジクロロメタン溶液 (5 ng/mL) を測定



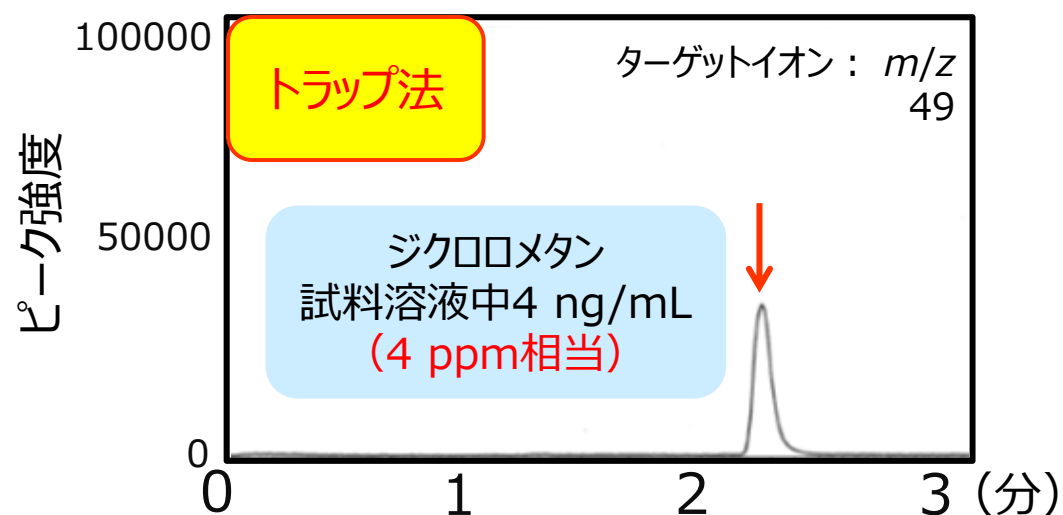
トラップ法では, SN比が約 30倍向上した.



トラップ法による核酸中の微量残留溶媒分析

合成DNA (C-Myc antisense DNA) 中の残留ジクロロメタンを測定.

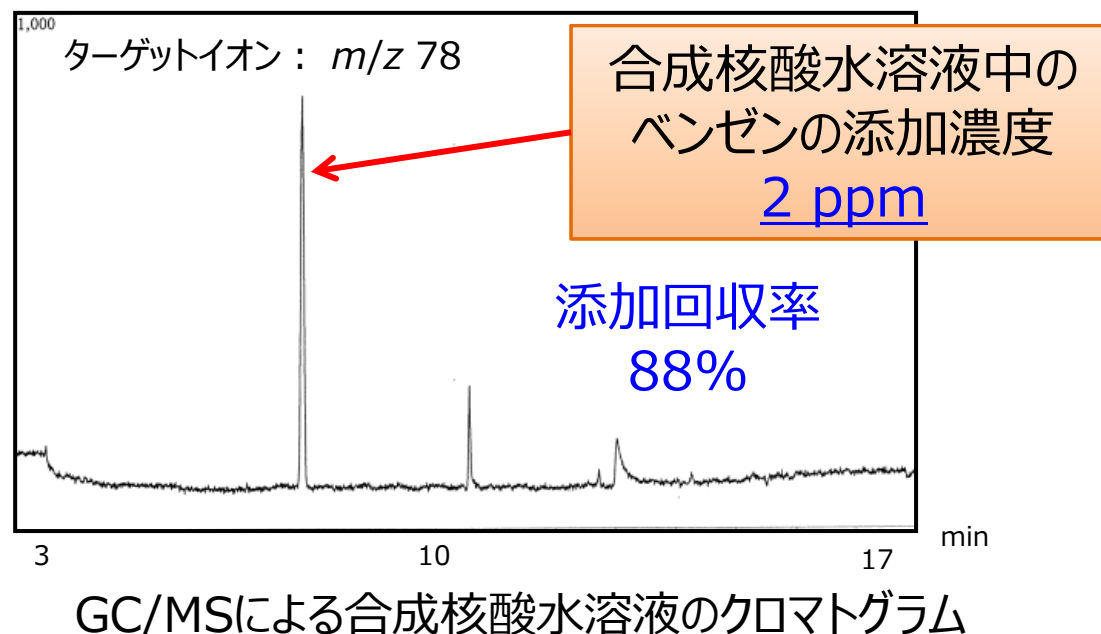
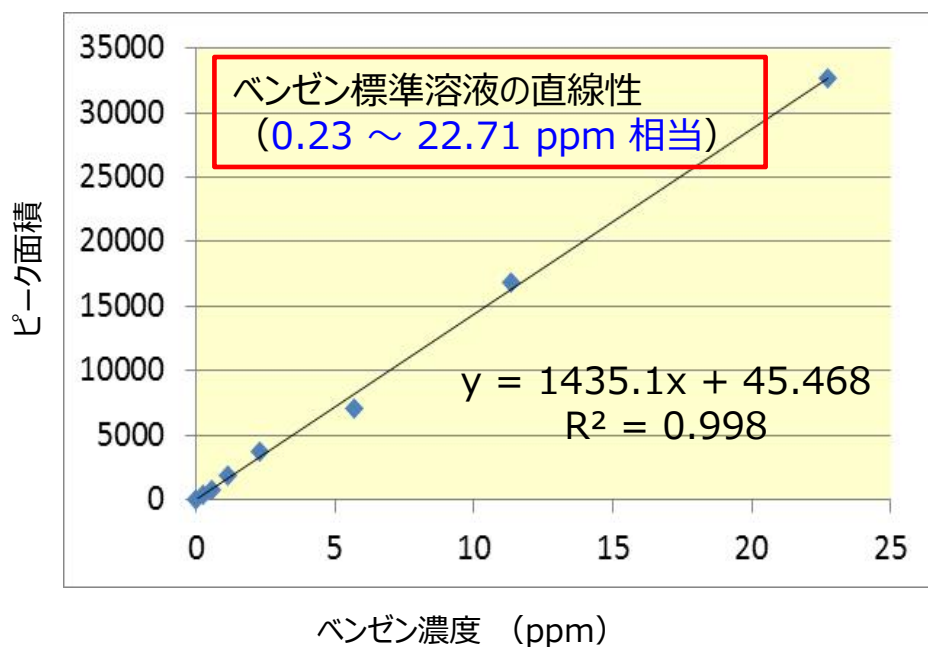
サンプル中含量 4 ppm 相当の微量のジクロロメタンを検出した.



HS-GC/MSによる核酸中の残留ベンゼン分析

発がん性の高いベンゼンは、医薬品原薬中での残存が 2 ppm 以下であることが求められる。ヘッドスペース-GC/MSを使用し、オリゴ核酸中の 2 ppm以下の微量のベンゼンを測定する手法を開発。

試料：合成核酸（C-Myc antisense DNA, S化）
配列：CACGTTGAGGGGCAT
濃度：1 mg/mL（水溶液）



良好な感度、直線性、および添加回収率が得られ、本法によりオリゴ核酸中の 2 ppmのベンゼンが測定可能であることが示唆された。

核酸中のオリゴヌクレオチド類縁物質の測定

核酸医薬品中の不純物であるオリゴヌクレオチド類縁物質は、主成分の核酸と構造が類似する高分子であり、識別が難しく、定量が難しい。そこで、キャピラリー電気泳動法を用いた測定法を検討した。

キャピラリー電気泳動法

I. 分離の検討

リン酸基部分をS化した合成DNAを用い、長さの異なるオリゴヌクレオチドの分離を検討した。

- ・使用機器：PA800plus (AB Sciex社)
- ・検出方法：UV280 nm

II. 設定した分析手法の定量性を確認

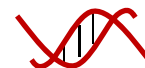
合成DNAをTris緩衝液で段階希釈し、本法の定量性（直線性, LOD, LOQ）について確認。

分離したオリゴヌクレオチドの塩基配列

A : CACGTTGAGGGGCAT S化 (MW:4857)
B : CACGTTGAGGGGCA S化 (MW:4537)
C : CACGTTGAGGGG S化 (MW:3902)

核酸医薬品中に含まれる不純物

オリゴヌクレオチド
類縁物質



金属不純物



残留溶媒

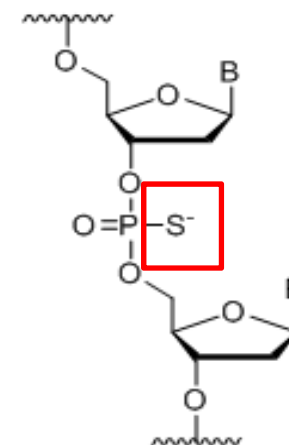


有機低分子不純物



S化：リン酸基の酸素を硫黄に置換する修飾。

DNAを安定化する修飾として用いられる。

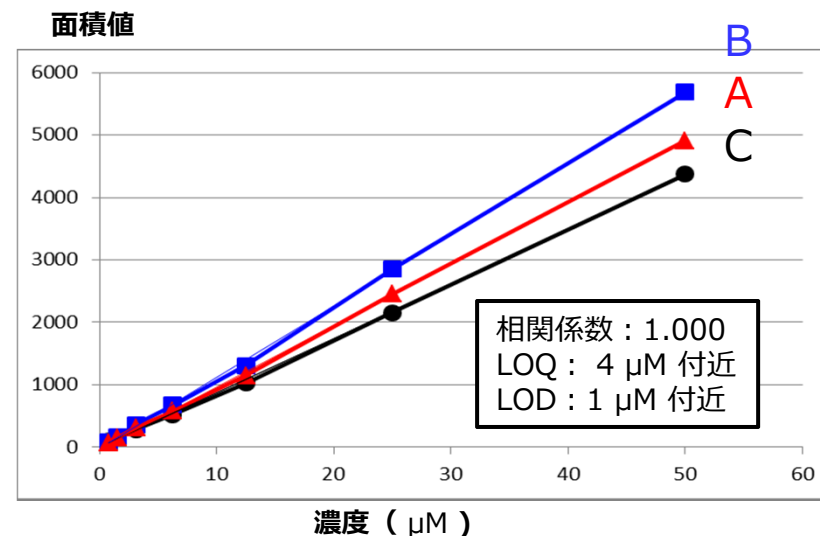
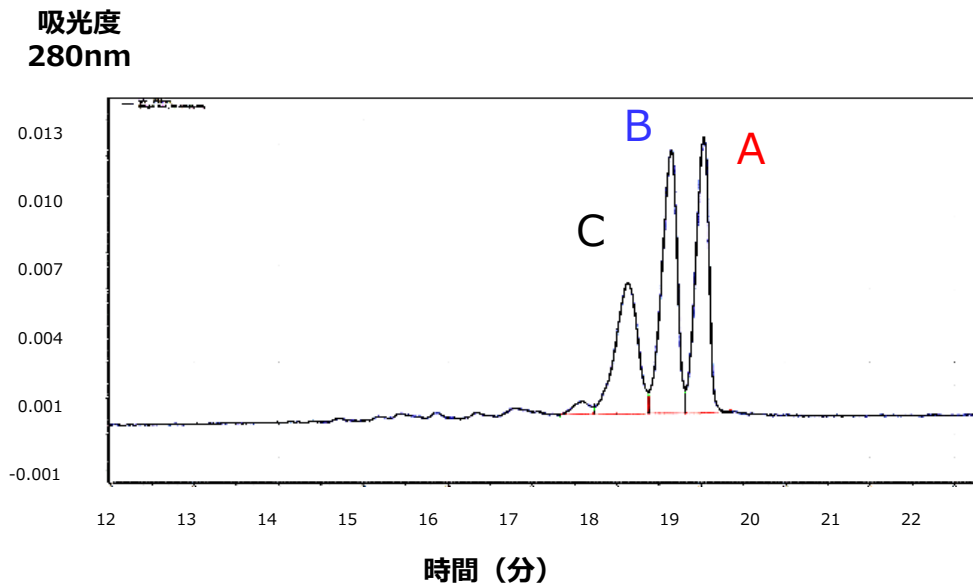


核酸中のオリゴヌクレオチド類縁物質の測定

結果

I. 分離の検討

II. 定量性の確認



3種類の試料が分離し、分子量順に溶出した。
1塩基違いのオリゴヌクレオチドの分離が可能であることを確認できた。

相関係数1.000で、**直線性は良好**だった。LOQ 及びLODはμMオーダーであり、**定量性を確認**できた。

結論

キャピラリー電気泳動は、核酸医薬品中の不純物 (オリゴヌクレオチド類縁物質) の定量法として、有用であることを確認できた。

イオンクロマトグラフィーによる医薬品中の残留溶媒分析

医薬品の製造承認申請において、原薬や製剤中の不純物量を把握するために、残留溶媒の測定が求められている。多くの残留溶媒はGCで分析可能であるが、GCでは分析が困難なイオン性化合物や有機酸について、イオンクロマトグラフィーを用いた分析を開発した。

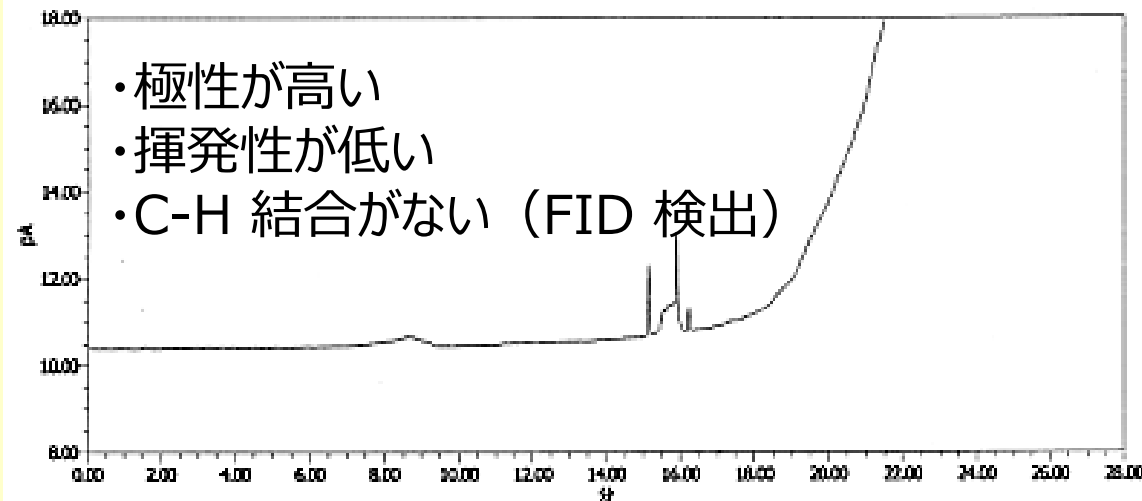
1. 医薬品の残留溶媒試験

ICH Q3C 医薬品の残留溶媒ガイドライン

- ・クラス 1 (使用を避けるべき溶媒)
ベンゼン、四塩化炭素など全 5成分
- ・クラス 2 (残留量を規制すべき溶媒)
アセトニトリル、クロロホルム、メタノールなど全 26成分
- ・クラス 3 (GMP 又はその他の品質基準により規制されるべき溶媒)
酢酸、エタノール、ギ酸など全 28成分

2. 分析手法

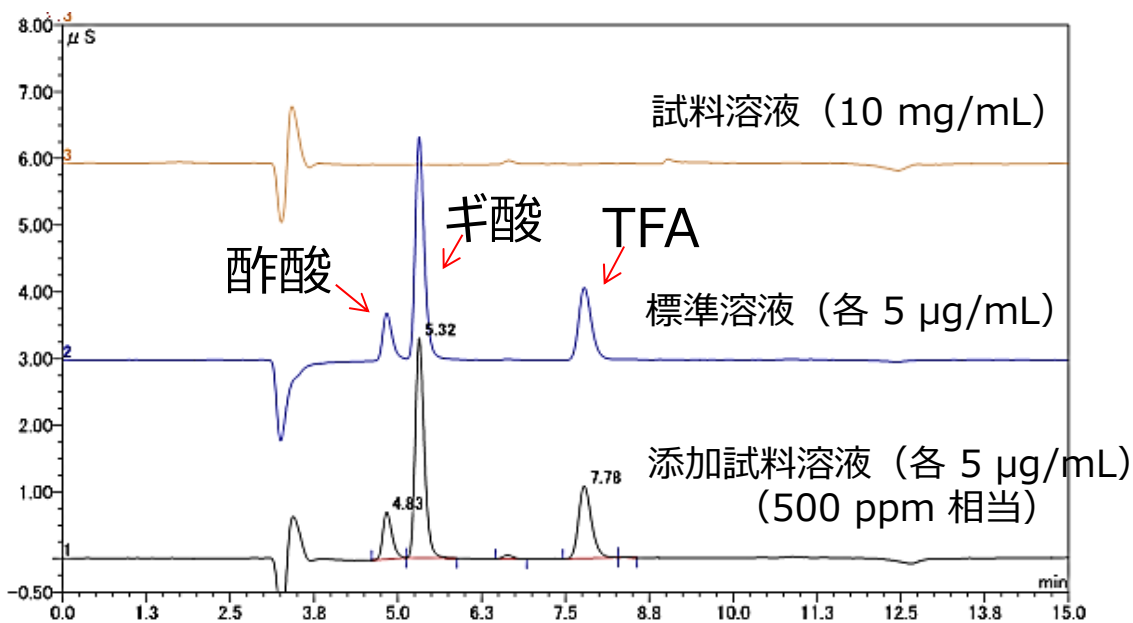
残留溶媒の定量には、一般的にGCが用いられるが、GCでは測定が容易でないものもある。



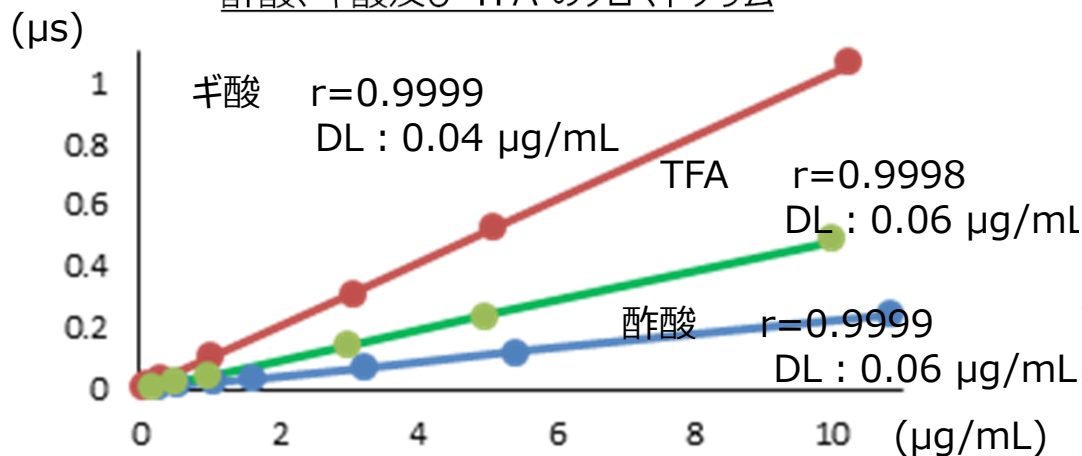
イオンクロマトグラフィー (IC) による分析

イオンクロマトグラフィーによる医薬品中の残留溶媒分析

酢酸、ギ酸及び TFA について、IC による同時分析を検討。分析には陰イオン交換カラムを用いた。また、ペプチド原料を用いて添加回収実験を行い、回収率を算出した。



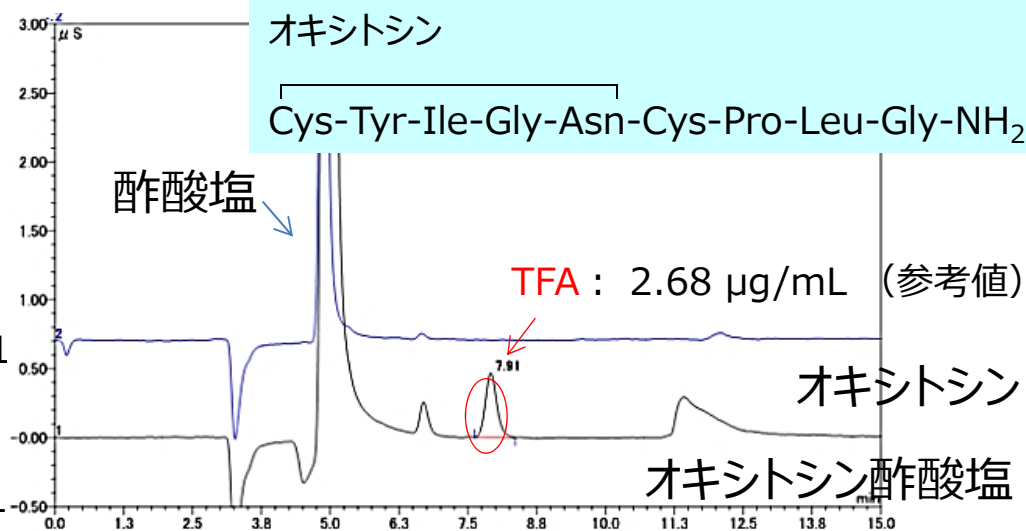
酢酸、ギ酸及び TFA のクロマトグラム



酢酸、ギ酸および TFA の回収率 (% , n=3)

| 添加溶液 | 0.25 µg/mL | 1 µg/mL | 5 µg/mL |
|------|------------|---------|---------|
| 酢酸 | 100.7 | 93.7 | 98.7 |
| ギ酸 | 96.7 | 98.7 | 94.7 |
| TFA | 108.7 | 94.7 | 100.0 |

オキシトシン酢酸塩中の残存TFA の定量



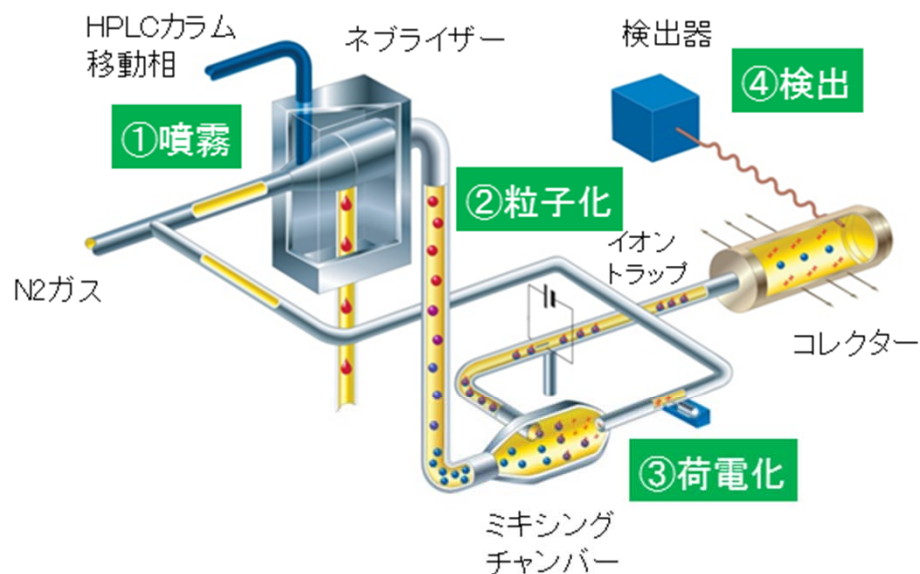
オキシトシン及びオキシトシン酢酸塩のクロマトグラム

荷電化粒子検出器を用いた医薬品中のPEG及び添加剤の分析

荷電化粒子検出器（CAD）は、紫外吸収を有さない化合物の検出が可能で、化合物に関係なく同等の感度が得られる特長がある。TRCでは、CADを用いることにより、修飾バイオ医薬品分析で必要となる遊離PEGと、添加剤として汎用されているポリソルベートの分析が可能となった。

荷電化粒子検出器(CAD)の原理と特長

CAD: Charged Aerosol Detector



高速液体クロマトグラフィーの検出器

- ✓ 紫外吸収を有しない化合物の検出が可能
- ✓ 化合物の化学構造に依存しない応答性
- ✓ RI¹⁾やELSD²⁾に比べ高感度
- ✓ グラジエント分析可能

検出器間の比較

| | 感度 (g) | 選択性 | 検出範囲 | グラジエント |
|--------------------|-------------------|-----|-----------------|--------|
| CAD | 10 ⁻⁹ | 無 | 10 ⁴ | ○ |
| RI ¹⁾ | 10 ⁻⁷ | 無 | 10 ³ | × |
| ELSD ²⁾ | 10 ⁻⁸ | 無 | 10 ³ | ○ |
| UV | 10 ⁻¹¹ | 有 | 10 ⁴ | ○ |

1) 示差屈折 (Refractive Index)

2) 蒸発光散乱検出 (Evaporative Light Scattering Detector)

参考文献: CHROMATOGRAPHY, Vol 32, 161 (2011), JIS K 0124.

まとめ

- ✓ 医薬品中の不純物分析を確実に検出，同定，定量するためには，特異性や感度にすぐれた分析手法が必要となる。
- ✓ HS-GC/MSを用いた残留溶媒分析は，高感度かつ注入再現性の高い手法である。試料の確保が困難な場合，特に威力を発揮する。
- ✓ キャピラリー電気泳動は，オリゴヌクレオチド類縁物質の定量分析に有用な試験法である。
- ✓ 東レリサーチセンターは，さまざまな分析手法を所有し，お客様の研究開発に貢献いたします。