

Passion for Innovation.
Compassion for Patients.™



NMRプラットフォームシンポジウム2024

CMC研究におけるNMR活用事例

2024年12月16日

第一三共株式会社 テクノロジー企画部 テクノロジープロジェクトグループ
丸吉 京介

◆ 医薬品の開発プロセスについて

◆ NMR活用事例

- ・多糖体の確認試験
- ・合成核酸の不純物確認
- ・光学純度決定（キラル液晶NMR）
- ・より正確な帰属を（Pure Shift NMR）
- ・抗体の特性解析：高次構造（非標識サンプルでのタンパク質NMR）
- ・結晶形の確認＋定量
- ・共結晶の評価
- ・NMR Crystallography
- ・実生産における異物分析

◆ 最後に

◆ 医薬品の開発プロセスについて

◆ NMR活用事例

- ・多糖体の確認試験
- ・合成核酸の不純物確認
- ・光学純度決定（キラル液晶NMR）
- ・より正確な帰属を（Pure Shift NMR）
- ・抗体の特性解析：高次構造（非標識サンプルでのタンパク質NMR）
- ・結晶形の確認＋定量
- ・共結晶の評価
- ・NMR Crystallography
- ・実生産における異物分析

◆ 最後に

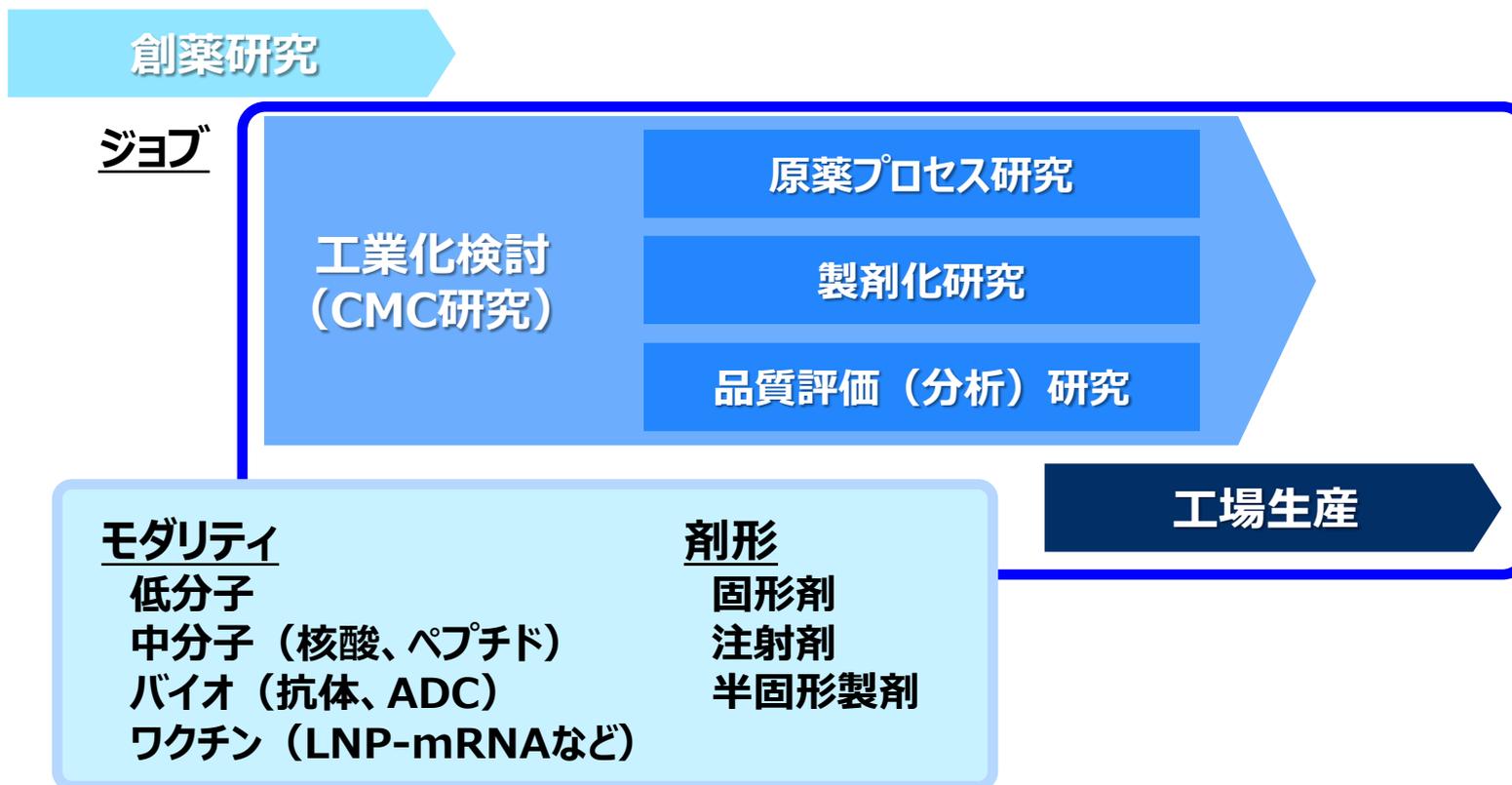
医薬品の開発プロセス



CMC: Chemistry, Manufacturing, and Controls

原薬及び製剤の化学、製造、品質管理（分析法）に関する情報を指していたが、現在はこれに関わる各業務、あるいはこれらの業務を担当する部門全体を指す言葉として使われている。

医薬品の開発プロセス | 工業化検討から実生産まで



モダリティ × 剤形 × ジョブ = 多岐に渡る課題

医薬品の開発プロセス | 工業化検討から実生産まで

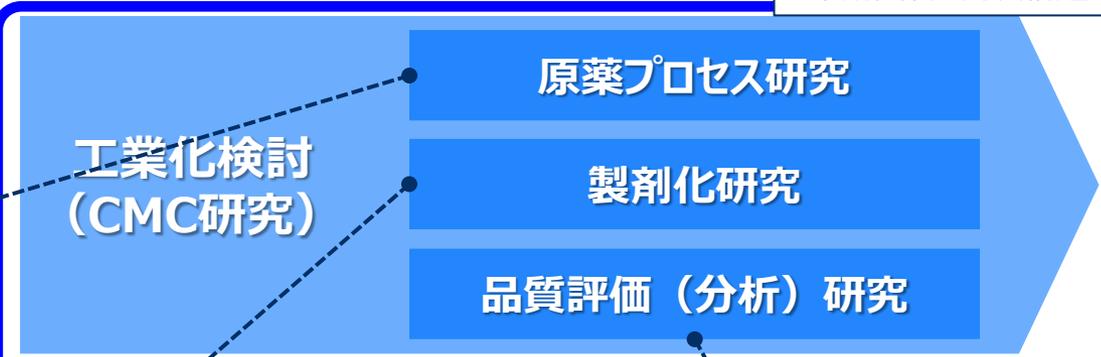


Phase 1 Phase 2 Phase 3

創薬研究

治験届・承認申請
 ・申請資料 構造解析 (NMR帰属、低分子)
 ・申請資料 高次構造 (バイオ医薬品)

プロセス開発 (原薬)
 ・反応モニタリング
 ・中間体の定量
 ・不純物 (類縁物質)
 構造推定 LC-NMR
 ・結晶形評価



実生産におけるトラブル
対応、知財対応
 ・異物分析
 ・結晶形評価

工場生産

プロセス開発 (製剤)
 ・結晶形評価
 ・固形製剤の安定性予測
(緩和時間)

特性解析
 ・構造解析 (NMR帰属、低分子)
 ・結晶構造 (NMR crystallography)
 ・高次構造解析 (バイオ医薬品)

規格試験
 ・規格試験としての定量NMR (原薬、製剤)
 ・確認試験 (低分子・バイオ)

結晶形評価 (原薬、製剤)
 主原料の残留溶媒
 光学分割 (キラル液晶NMR)
 塩・共結晶の評価

安定性試験
 ・結晶形評価 (原薬、製剤)
 ・固形製剤の安定性予測 (緩和時間)

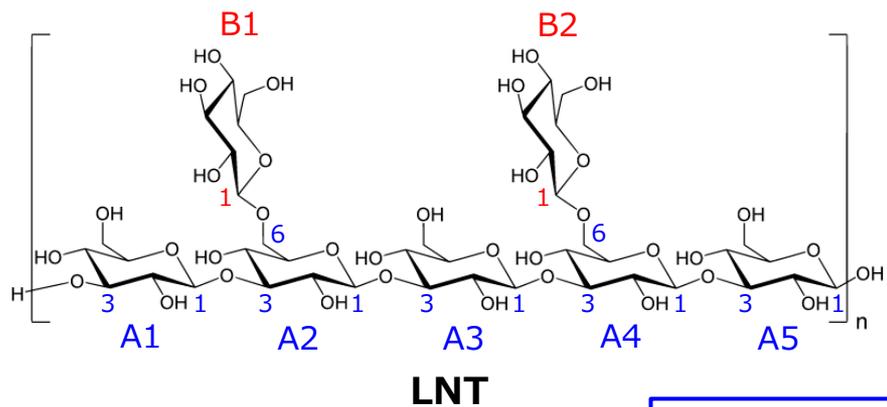
◆ 医薬品の開発プロセスについて

◆ NMR活用事例

- 多糖体の確認試験
- 合成核酸の不純物確認
- 光学純度決定（キラル液晶NMR）
- より正確な帰属を（Pure Shift NMR）
- 抗体の特性解析：高次構造（非標識サンプルでのタンパク質NMR）
- 結晶形の確認＋定量
- 共結晶の評価
- NMR Crystallography
- 実生産における異物分析

◆ 最後に

多糖体の確認試験

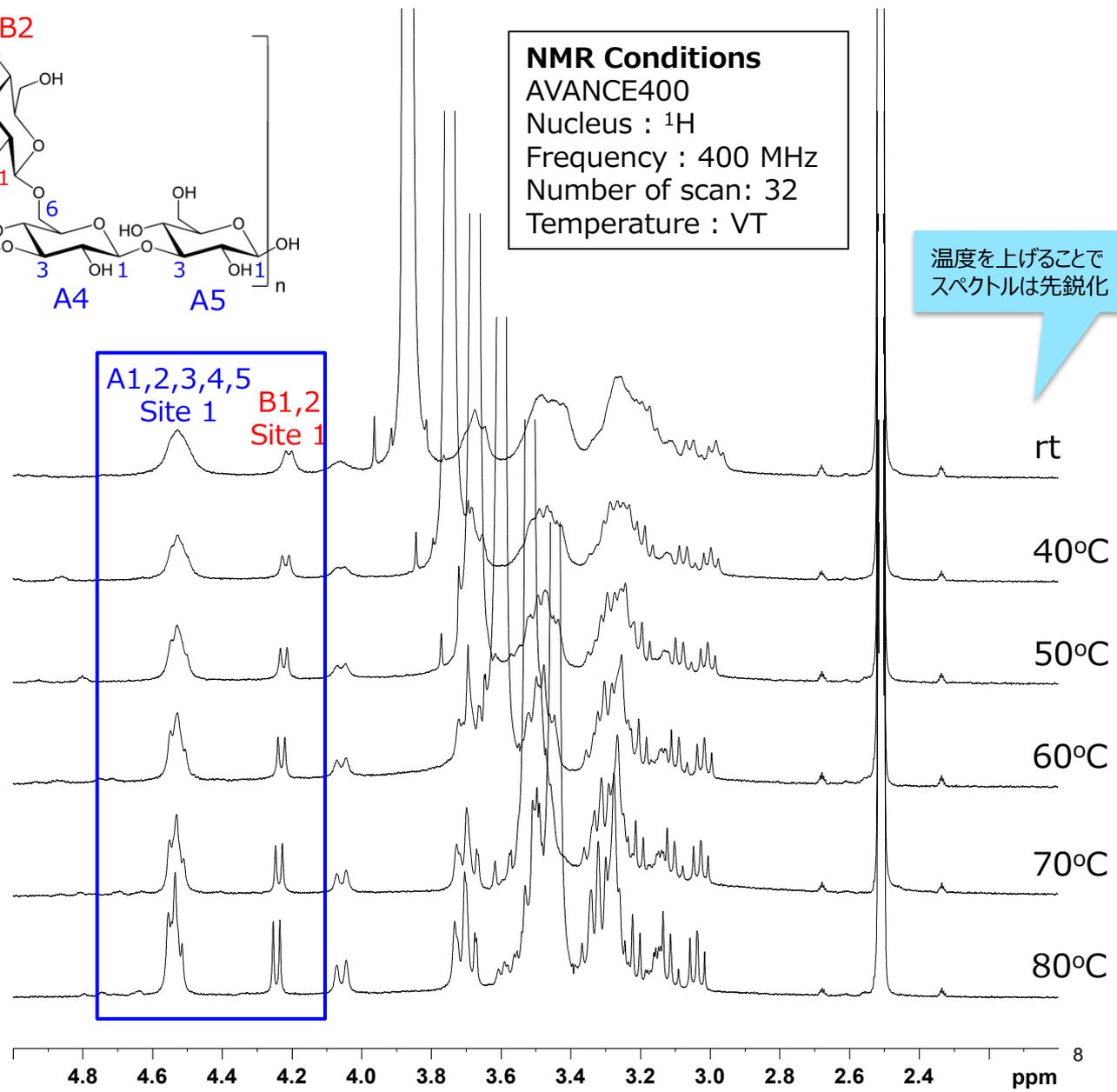


NMR Conditions
 AVANCE400
 Nucleus : ^1H
 Frequency : 400 MHz
 Number of scan : 32
 Temperature : VT

温度を上げることで
 スペクトルは先鋭化

Sample:
 LNT (Lot# 2D2X1)
 10 mg/mL
 in DMSO/D₂O (6:1)

溶解させるためにDMSO
 ベースの試料溶解液とした



Peak area ratio:
 Peak1 (A1,2,3) / Peak 1 (B)
 = 2.5620

他の手法では困難な類似
 多糖体との区別が可能
 → 出発物質の取り違え防止

合成核酸の不純物確認 | ^{31}P NMRスペクトル

NMR Conditions

AVANCE400

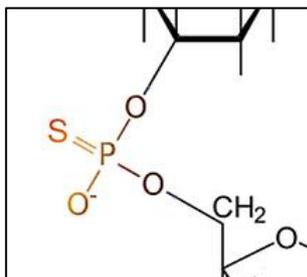
Nucleus : ^{31}P

Frequency : 162 MHz

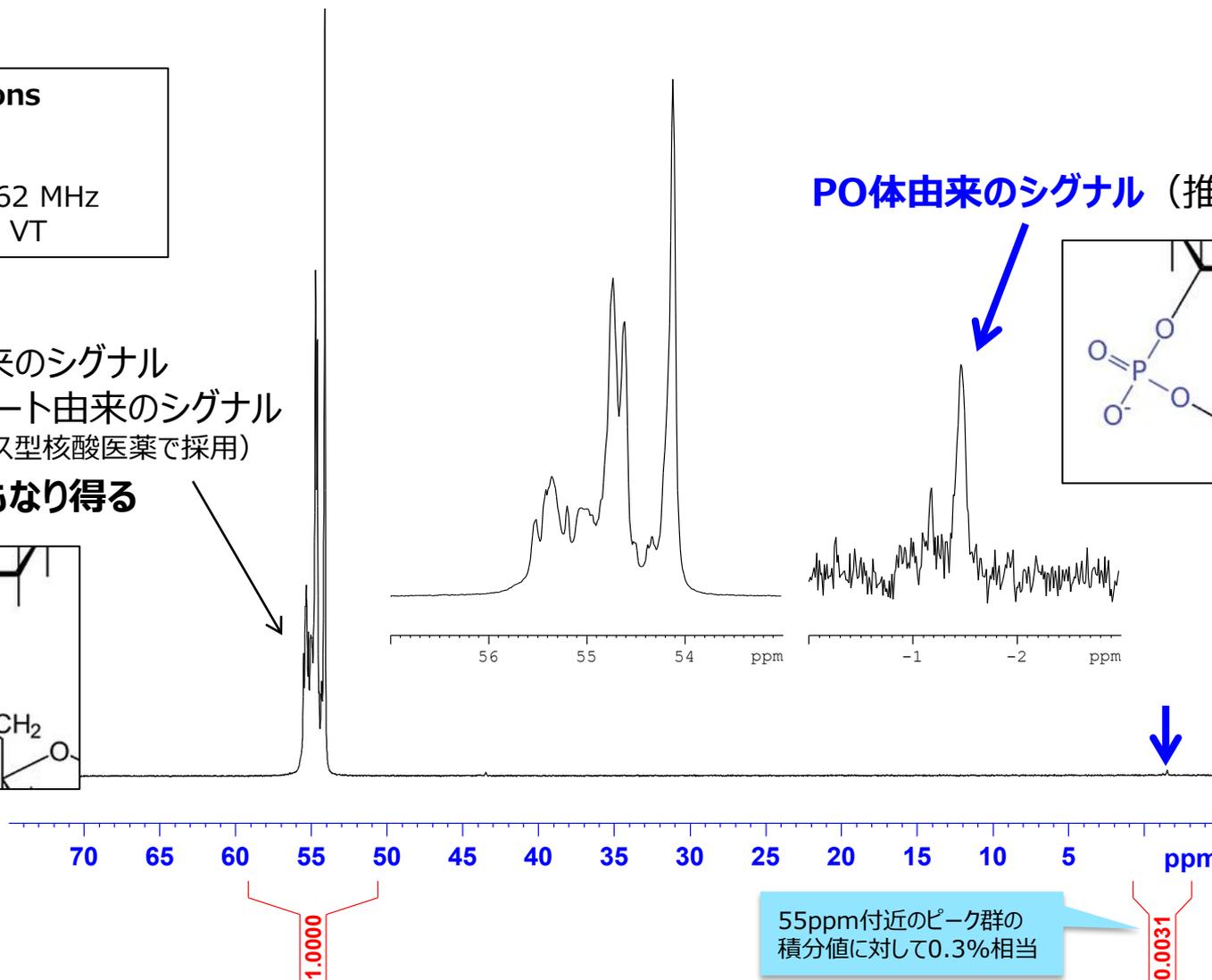
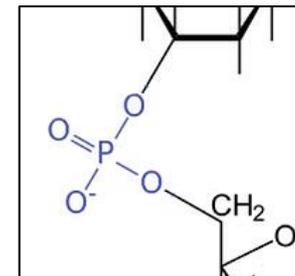
Temperature : VT

目的物質由来のシグナル
ホスホチオエート由来のシグナル
(多くのアンチセンス型核酸医薬で採用)

確認試験にもなり得る



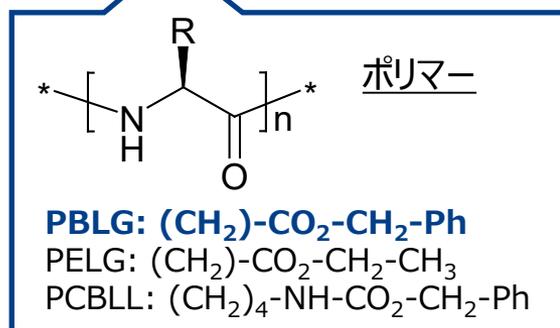
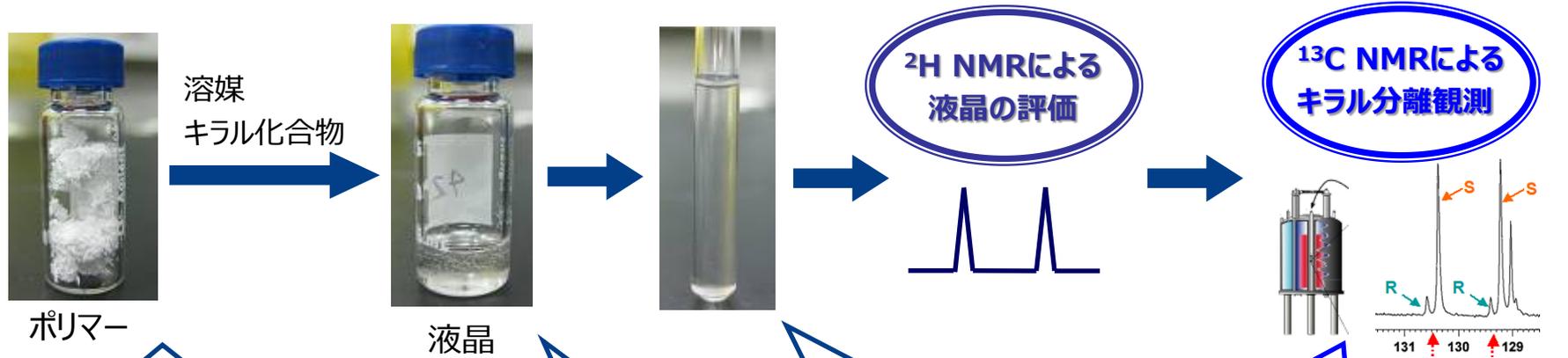
PO体由来のシグナル (推定)



類縁物質であるPO体の存在を確認

一見、PO体の量は少ないように思われるが、一箇所だけがPOに変換された核酸を想定した場合、その存在量は「塩基長×0.3%」程度となる。

キラル分析 | キラル液晶NMR (サンプル調製から測定の流れ)



溶媒

CDCl_3
 $\text{DMF-}d_7$
 THF
 Dioxane

サンプル混合



均一な液晶相となるまでよく
 攪拌。DMF- d_7 を用いた場
 合は**40°C**に加熱。

NMR分解能調整

キラル分離観測後、分解能
 を調整。
 CDCl_3 は**40°C**で測定
 $\text{DMF-}d_7$ は**60°C**で測定

PBLGをポリマーとして選択し、 CDCl_3 、 $\text{DMF-}d_7$ を用いて液晶サンプルを調製
 \Rightarrow ^2H NMRによる液晶状態の確認・評価

最適調製条件

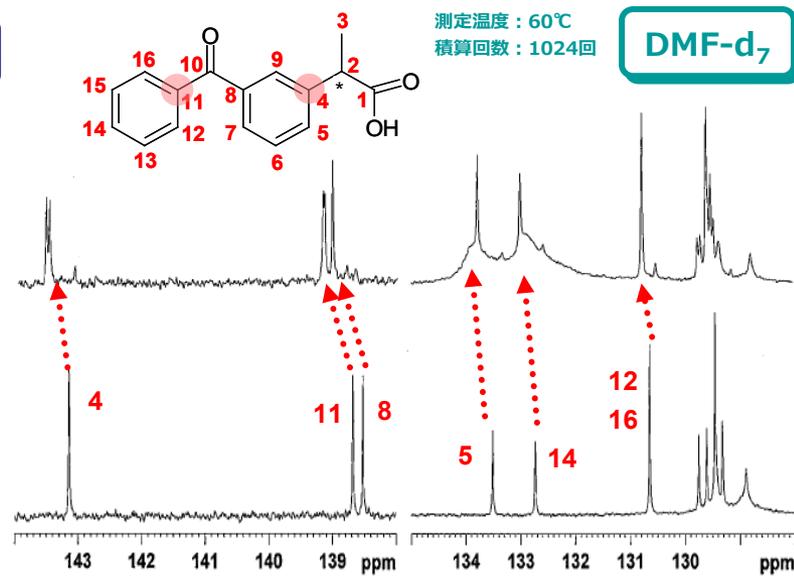
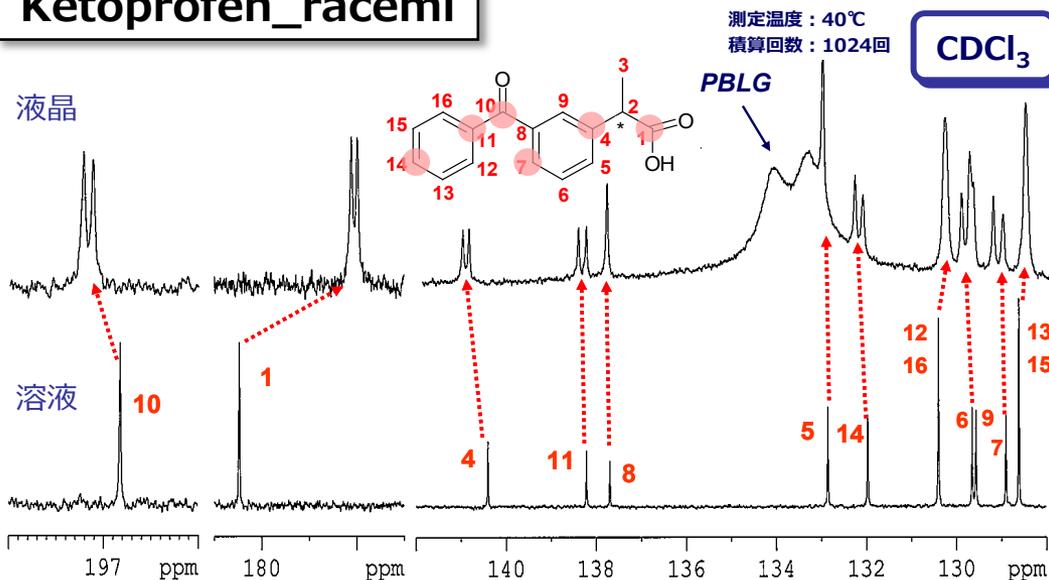
- $\text{CDCl}_3 \Rightarrow$ ポリマー濃度: 20%, 調製温度: 室温
- $\text{DMF-}d_7 \Rightarrow$ ポリマー濃度: 45%, 調製温度: 40~50°C

液晶の成否、シグナル分離の善し悪しは試料/PBLG/溶媒の構成比、NMR装置の分解能調整により決まる

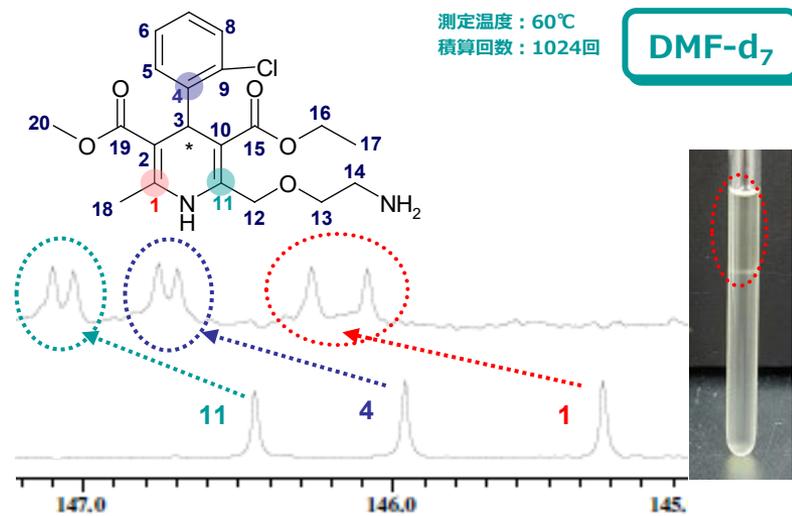
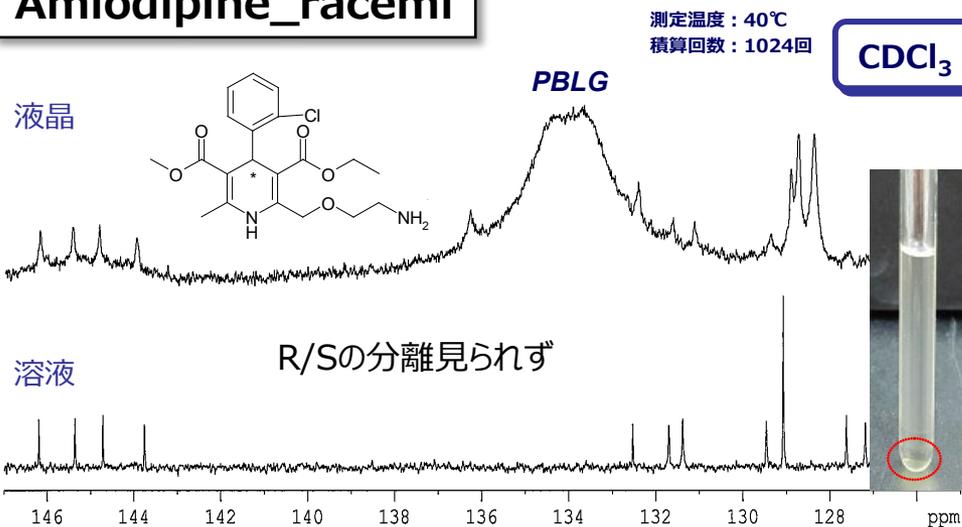
キラルクロマトグラフィーに比べ、より簡便かつ迅速なキラル分析が可能

光学純度の決定 | キラル液晶NMR (^{13}C NMR)

Ketoprofen_racemi



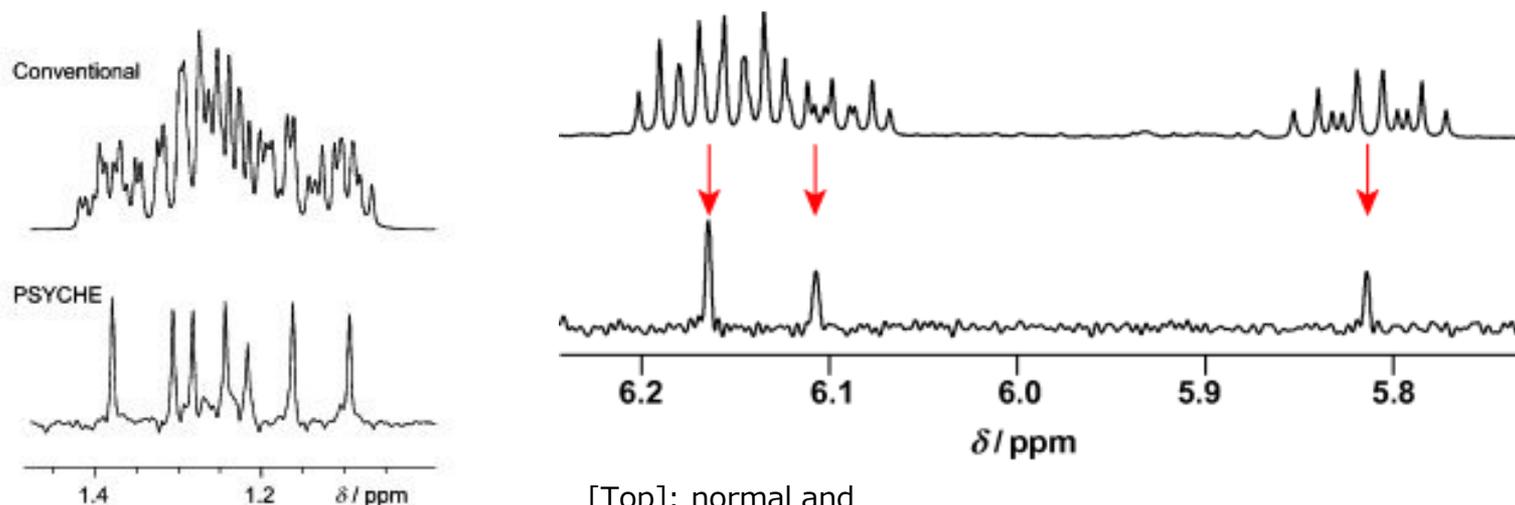
Amlodipine_racemi



より正確な帰属を | Pure Shift NMR

背景：ドラッグリンカーや糖鎖のように分子量の大きな合成分子を取り扱うようになり、帰属の際にピークオーバーラップが問題となるケースが増えている。

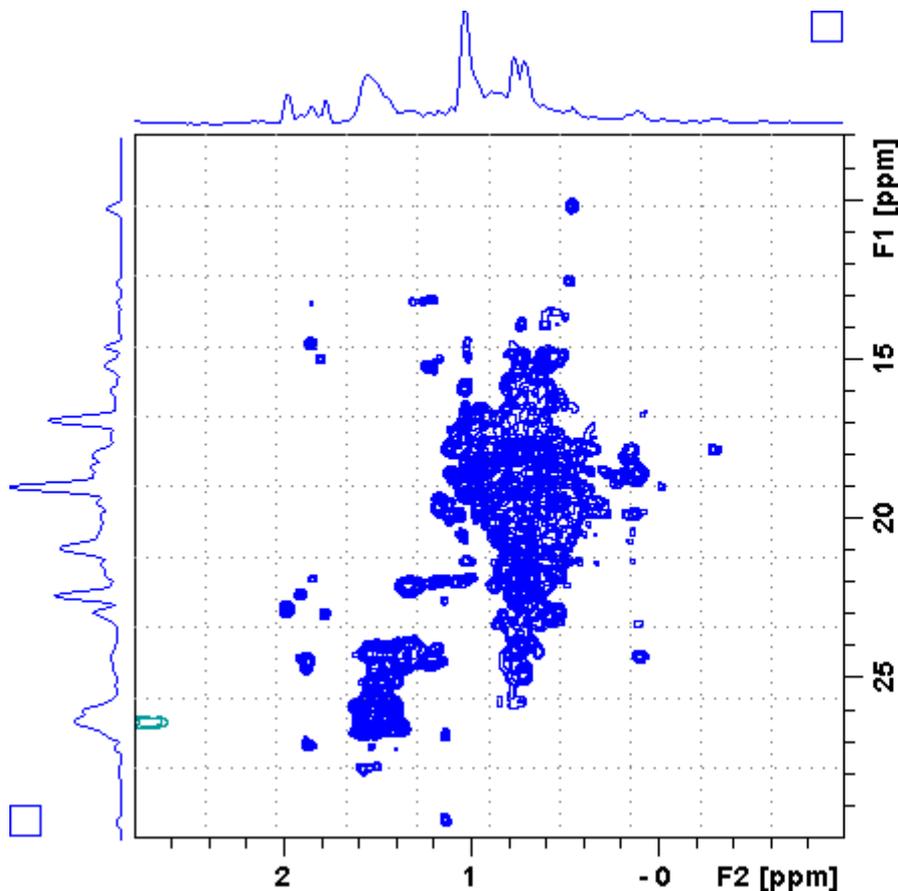
- ✓ **PSYCHE (Pure Shift Yielded by Chirp Excitation)** : 同核カップリングをサプレスする手法。PSYCHEはその他のPure shift技術に比較して、感度やスペクトル純度に優れ、強いカップリングを許容するなどのメリットがある。
- ✓ 500 MHz装置でのPure shift測定で得られた¹Hスペクトルは、5 GHz装置での測定結果に匹敵する（分解能は10倍向上）。
- ✓ Pure shift TOCSYやPure shift DOSYといった手法も開発されている。



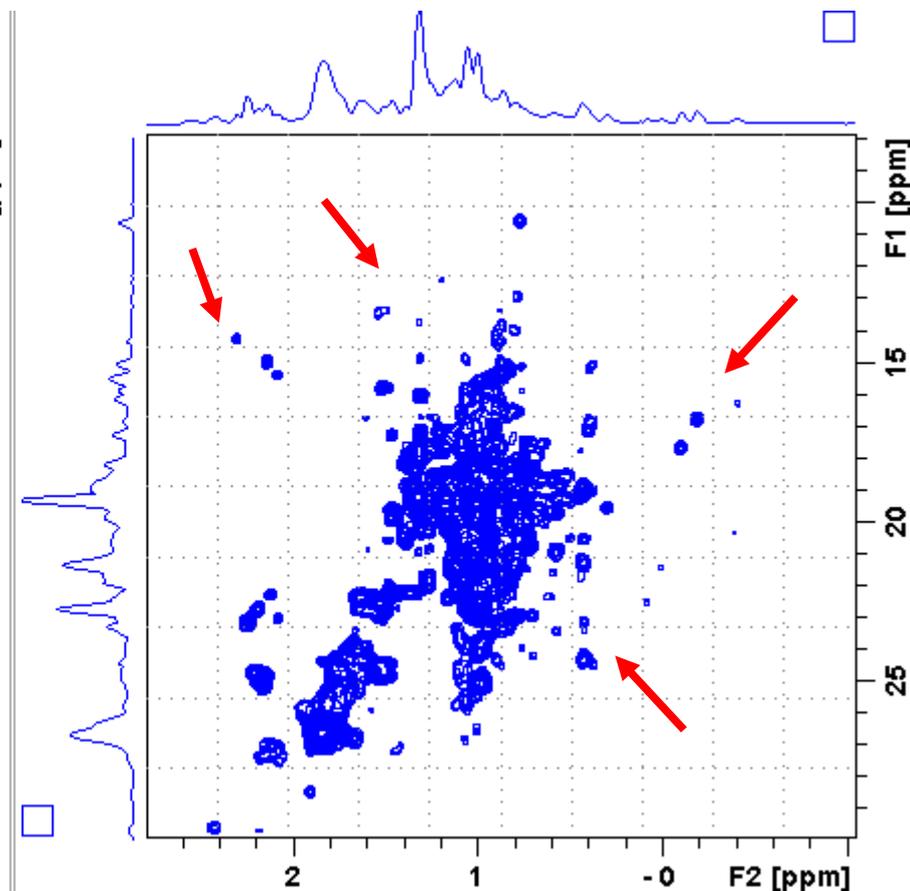
[Top]: normal and
[bottom]: pure shift 500 MHz ¹H spectra of a calixarene.

治験・承認申請の提出資料の作成時など、化学シフトを正確に求めたいときに活用できる。

Antibody X (drug substance)
XL-ALSOFAST- ^{13}C , ^1H -HMQC, rt



XL-ALSOFAST- ^{13}C , ^1H -HMQC, 50°C

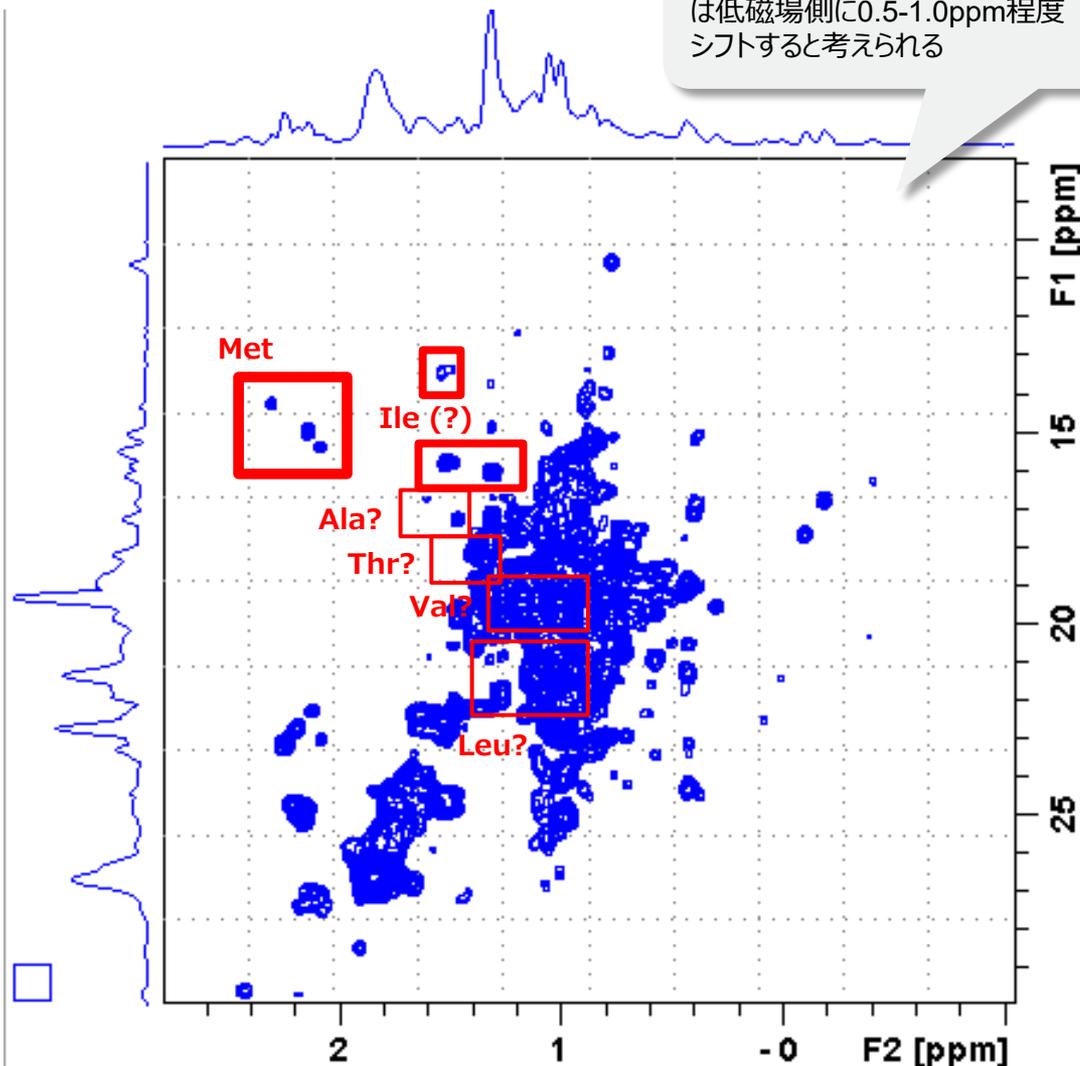


- ✓ **温度を上げることで感度が向上**
→ Fab由来のピークも見えるようになってきているのか。
- ✓ 酵素処理 (パイン等) で断片化し、 ^1H - ^{13}C HSQC測定で由来を確認する必要あり。

^1H - ^{13}C HMQC | 推定帰属

Antibody X (drug substance)
XL-ALSOFAST- ^{13}C , ^1H -HMQC, 50°C

Met酸化が起こると ^1H 化学シフトは低磁場側に0.5-1.0ppm程度シフトすると考えられる



略号	構造式	残基数
Met	<chem>CSCC[C@@H](N)C(=O)O</chem>	6
Ile	<chem>CC(C)[C@@H](N)C(=O)O</chem>	12
Ala	<chem>CC(N)C(=O)O</chem>	33
Thr	<chem>CC(O)[C@@H](N)C(=O)O</chem>	55
Val	<chem>CC(C)[C@@H](N)C(=O)O</chem>	65
Leu	<chem>CC(C)C[C@@H](N)C(=O)O</chem>	44

- ✓ メチオニン由来のシグナルを確認 (^1H 化学シフトからほぼ確定)
- ✓ イソロイシンもピーク形状からほぼ確定か
- ✓ ロイシン、バリンは恐らくピークが潰れている領域
- ✓ 抗体Xのアミノ酸残基数に対して、十分な数の信号は出ていない

※アミノ酸の化学シフト、文献情報などから推定

3. 特性

3.1 構造及び特性

3.1.2 生物物理学的性質

3.1.2.x.x NMRによる高次構造

DSXXXXの二次元NMR (に $F^{13}C$ - 1H 相関) スペクトルの一例を[図2.3.S.3.1-X](#)に示す。横軸約0~2.5 ppm、縦軸約8~30 ppmの側鎖メチル基に由来する特徴的なクロスピークが認められた。この測定結果は、 IgG_x の典型的なスペクトルであり、DSXXXXが適切な三次構造にフォールディングされていることを示している。

3.1.2.x.x+1 NMRによる高次構造(高温測定)

DSXXXXの二次元NMR (^{13}C - 1H 相関) スペクトルの一例を[図2.3.S.3.1-X+1](#)に示す。横軸約0~2.5 ppm、縦軸約8~30 ppmにFc及びFabの側鎖メチル基に由来する特徴的なクロスピークが認められた。この測定結果は、 IgG_x の典型的なスペクトルであり、DSXXXXが適切な三次構造にフォールディングされていることを示している。

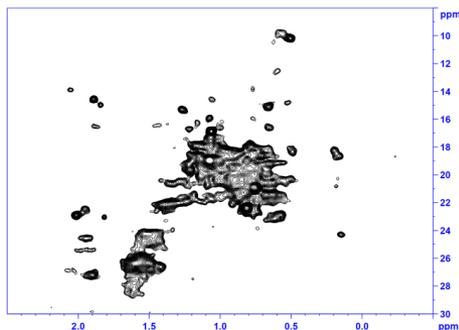


図2.3.S.3.1-X

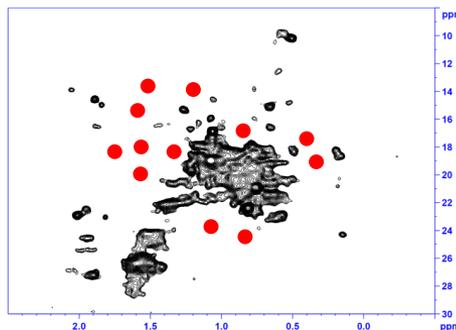


図2.3.S.3.1-X+1

温度を上げることによって、
Fab由来のクロスピークも検出
(確認する必要あり)

複雑な分子では、物理的・化学的情報が広範にあったとしても、それにより高次構造を確定することはできないが、生物活性から高次構造が正しく形成されていることを推定できることが多い。このような場合には、信頼区間が比較的広い生物学的試験であっても、特異的な定量法による測定と組み合わせれば、用いてよいこともある。重要なことは、以下のような場合にのみ、製品の生物活性を測定する生物学的試験を理化学的試験法に置き換えてもよいであろうということである。

- ・ 当該理化学的方法により、高次構造に関する情報を含めて、当該医薬品に関する十分な物理的・化学的情報があますところなく得られ、かつ生物活性との適切な相関が証明されていること。

更に

- ・ 十分に確立された製造実績があること。

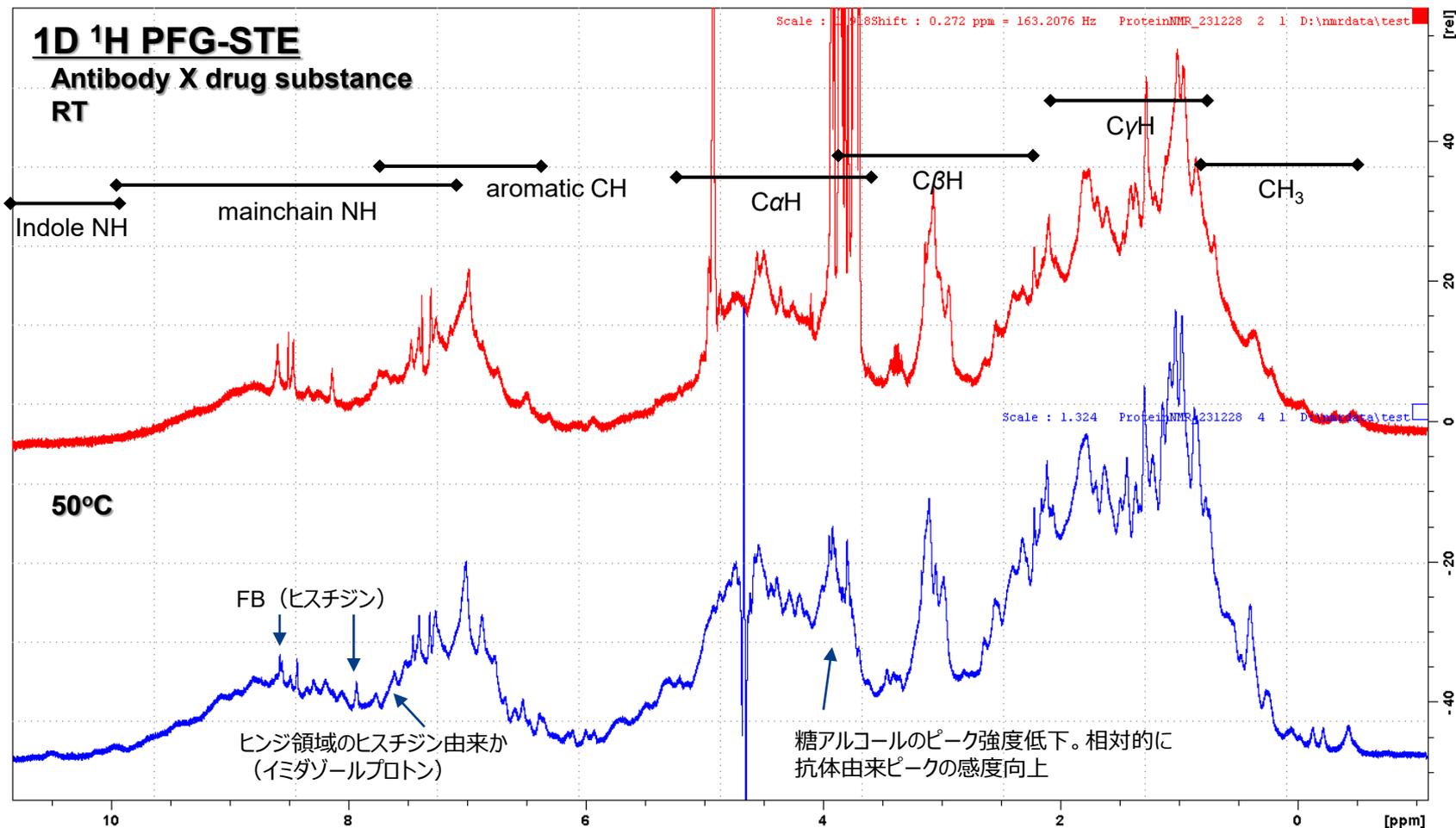
理化学的試験のみを、（適切な相関に基づいて）生物活性の定量法として用いる場合には、結果は質量で表す。

ICH Q6B 医薬審発第571号（平成13年5月1日）より

**バイオ医薬品の品質として “高次構造が正しく形成されていること” が重要
→ 現状、Cell-Based Assayが規格試験方法として設定される**

**治験段階では、結合活性（ELISA）を評価することだけで承認されるケースがあるが、
CBAを実施しない根拠として、NMRデータは強力な材料となり得る**

1D ^1H NMR | 高温測定



- ✓ 温度を上げることで感度及び分解能が向上。
 - ✓ 抗体間でスペクトル差を確認 (データは示さず)。
 - 抗体の確認試験としてNMRが使える可能性あり。
- NMRを有する委託先であれば、受入試験におけるオプションの一つになり得る (ELISAより負担軽減)

試験方法

品名：DSXXXX

試験項目：確認試験：核磁気共鳴スペクトル法 (PFG-STE法)

装置

核磁気共鳴装置

試験条件

測定温度：50°C

観測幅：-1～11ppm

積算回数：32回

パルスプログラム：パルス磁場勾配 誘発エコー法

測定操作

1. 本品540 uLと重水60 uLを混合する。
 2. 核磁気共鳴スペクトル法 (PFG-STE法) により、試料のスペクトルを測定する。
 3. 表1に示した化学シフトでのピークを確認する。(or 参照スペクトルのとの一致を確認)
- 核磁気共鳴スペクトルの一例を図1に示す。

表1

CH3	X ppm
Aromatic CH	Y ppm
Mainchain NH	Z ppm
...	...

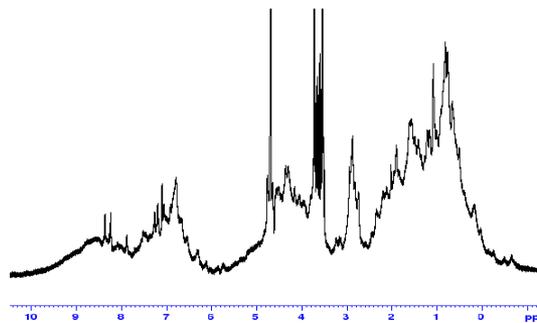
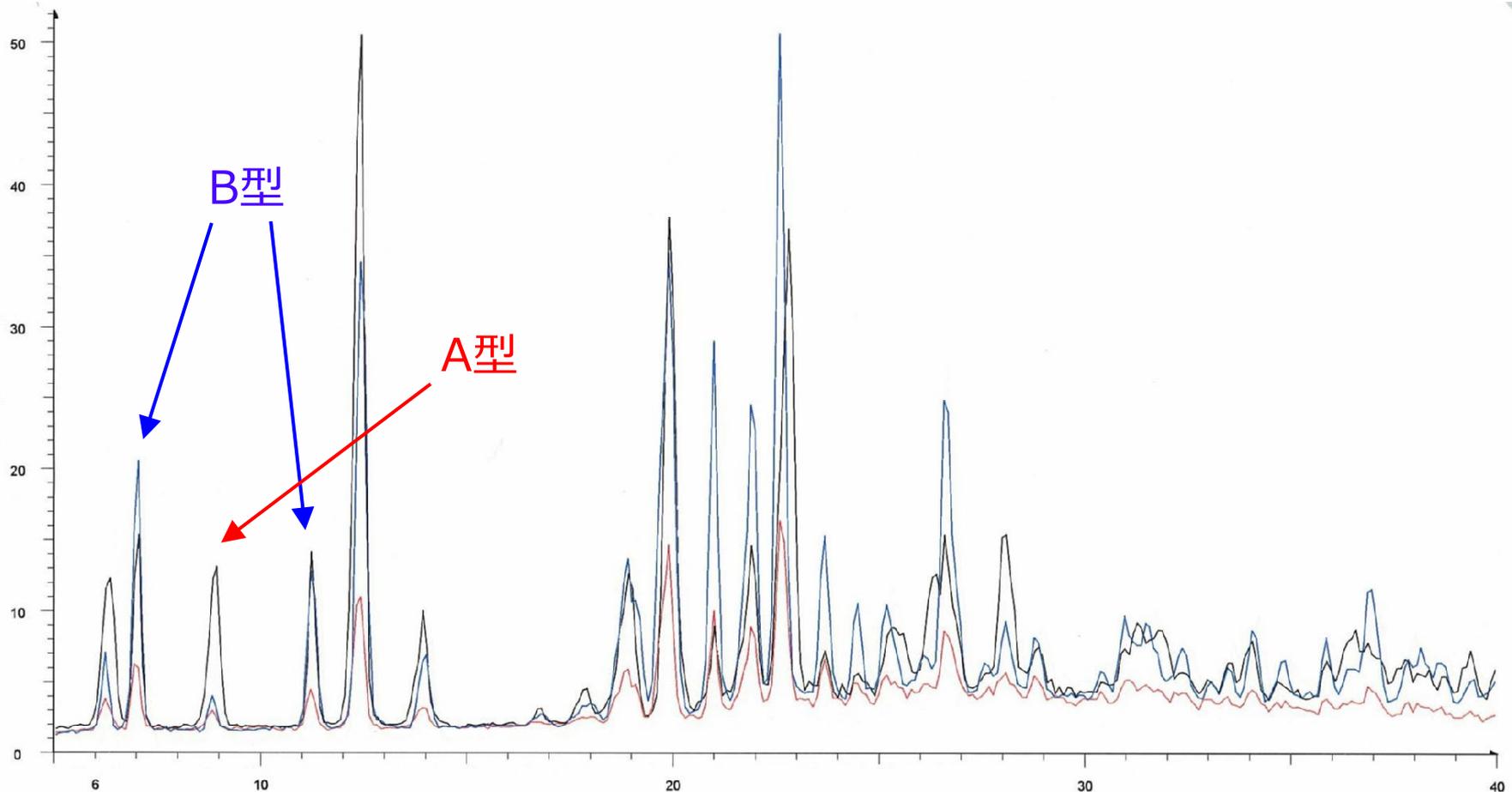


図1

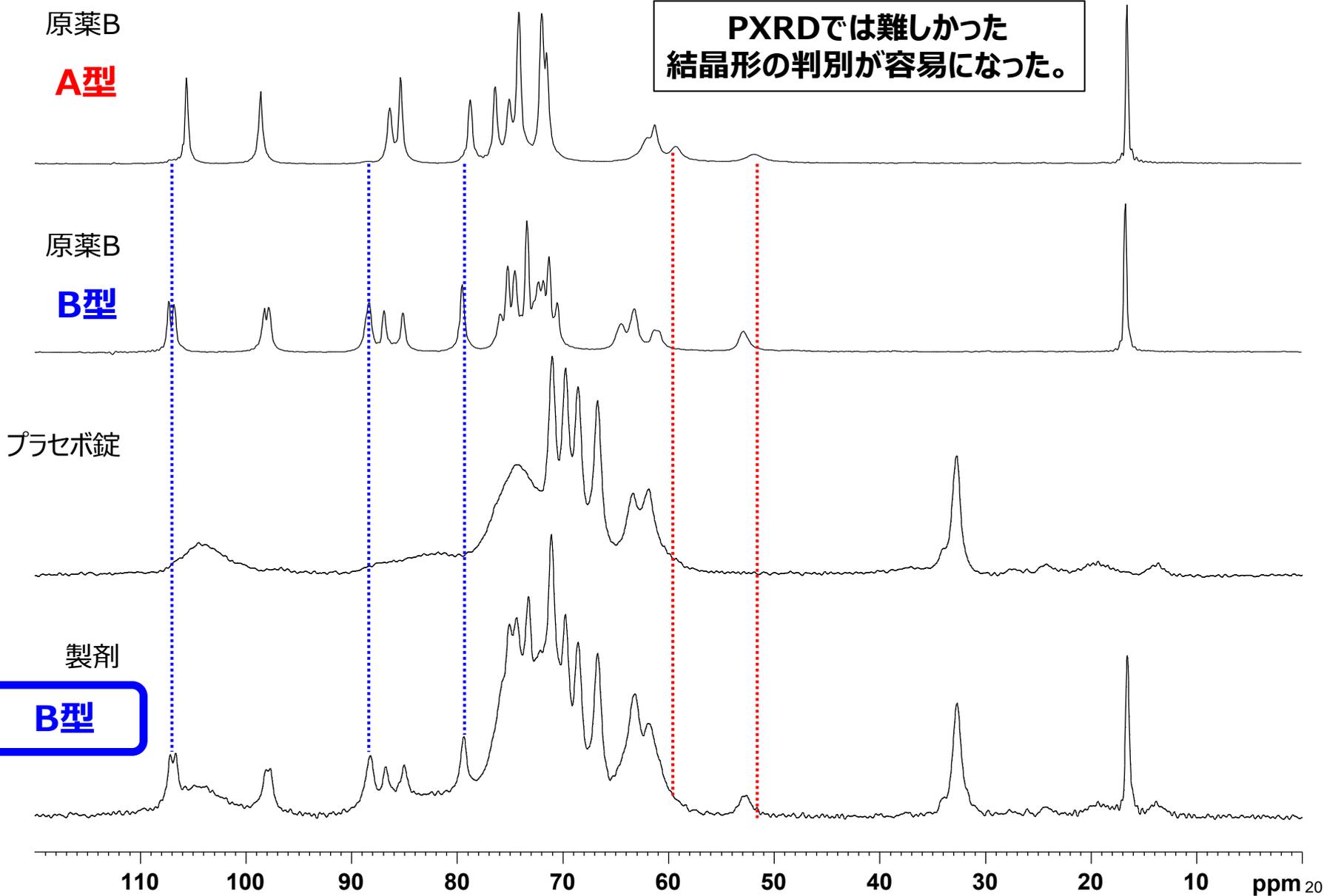
原薬Bの結晶形評価 (PXRD)



ピーク位置が同じで、ピーク強度が相違する回折パターン

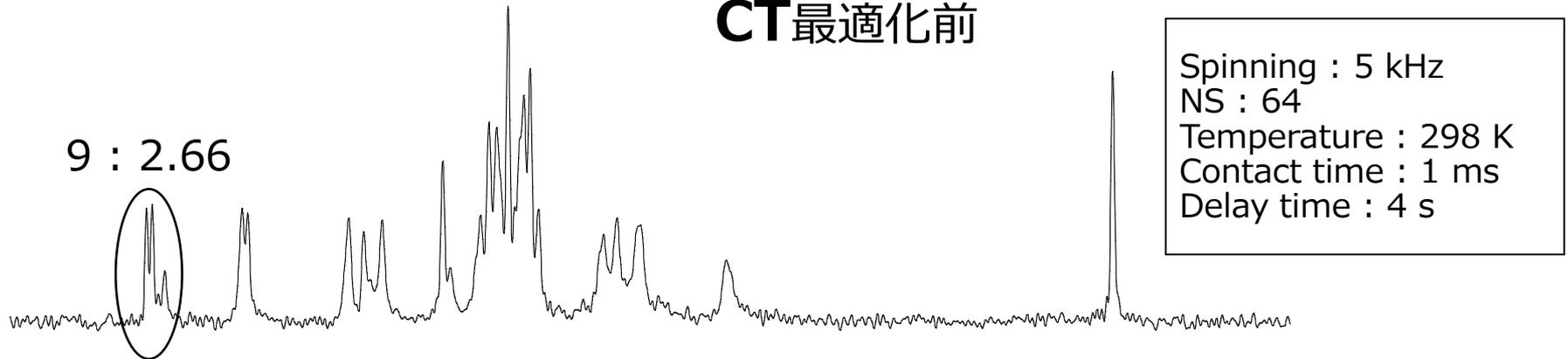
→ **PXRDでは結晶形の判別が難しい**

結晶形の確認及び定量 | ^{13}C CP/MASによる評価

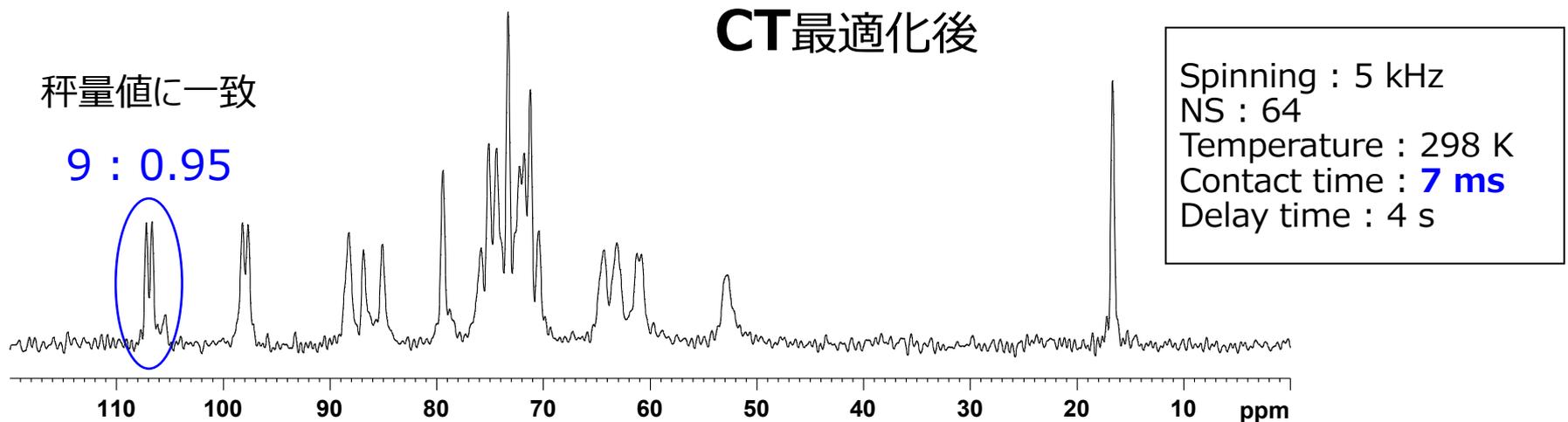


結晶形の確認及び定量 | コンタクトタイムの最適化

CT最適化前

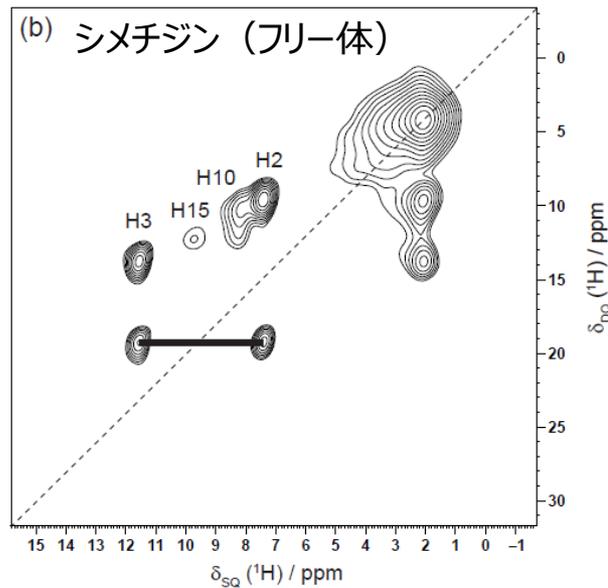
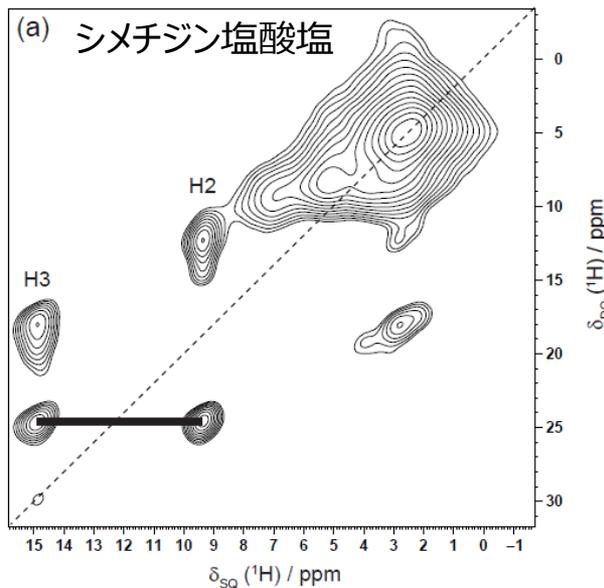


CT最適化後



サンプル : 原薬B 物理的混合末 (A型 : B型 = 1 : 9)

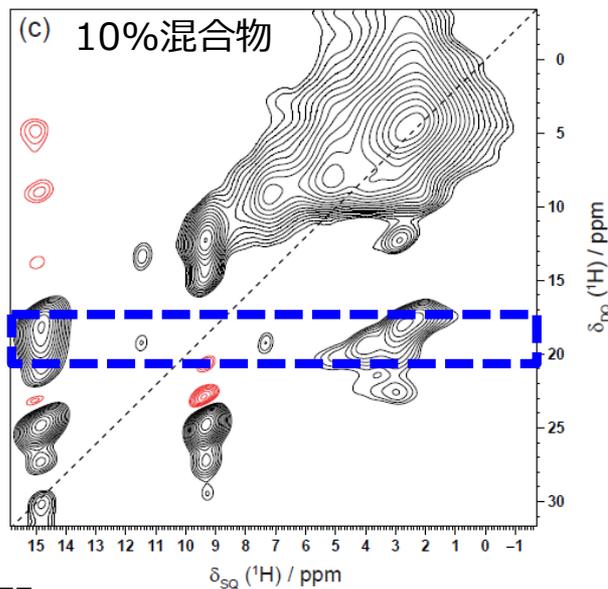
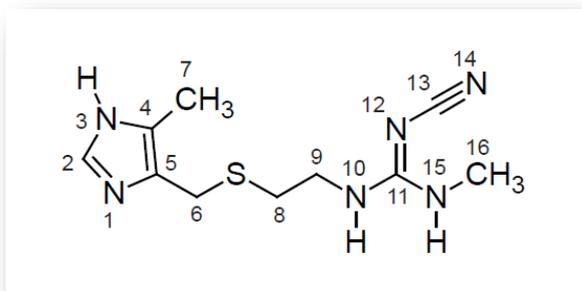
結晶多形の高感度定量 | ^1H DQ MASスペクトル



^1H DQ MAS

^1H Larmor
frequency:
850.2 MHz
($B_0 = 20.0$ T)

MAS: 30 kHz



19.1 ppm
→ DQスライス

The experimental times were (a, b) 2 h and (c) 6 h. The base contour levels are at (a) 5.4%, (b) 11% and (c) 2.6% with respect to the maximum peak height.

DQ 19.1ppmにおけるスライススペクトル

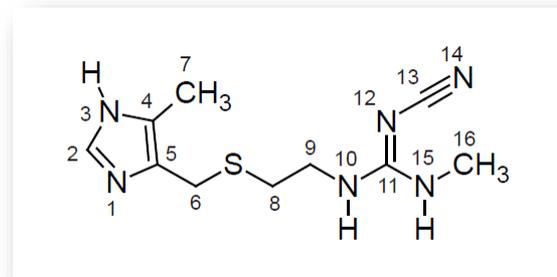
^1H DQ MAS

^1H Larmor frequency: 850.2 MHz

($B_0 = 20.0$ T)

MAS: 30 kHz

Sample: 10 mg



(a) 塩酸塩

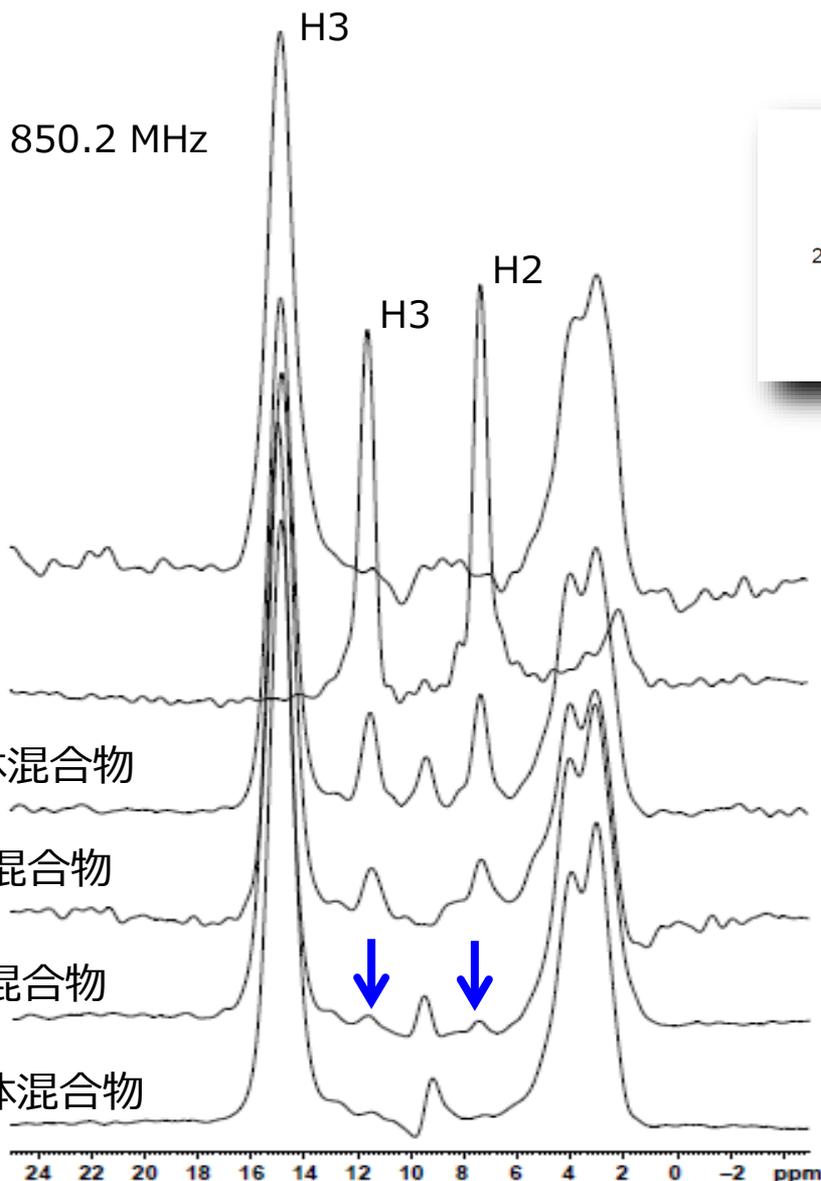
(b) フリー体

(c) 10%フリー体混合物

(d) 5%フリー体混合物

(e) 1%フリー体混合物

(f) 0.5%フリー体混合物



DQ スライス :

確認したいDQ周波数において、切り出してきた ^1H 1次元スペクトル

^1H DQ MASの検出限界は、シメチジン塩酸塩/フリー体混合物に対して約**1%**

医薬品Cocrystalの有用性

- 難結晶化化合物の結晶化
- 難溶解性化合物の溶解性改善

溶出性、バイオアベイラビリティといった製剤特性の改善

- 製造性の向上
- 安定性の向上
- 特許戦略上も有用な技術

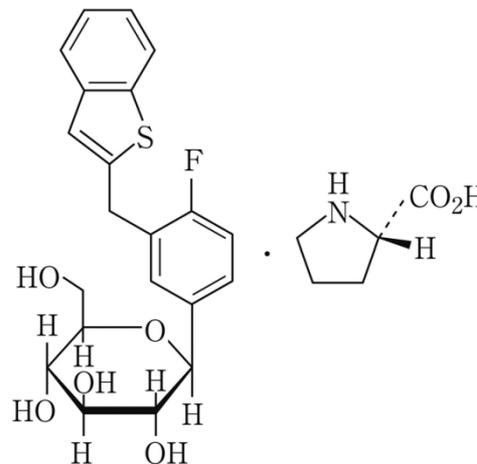
Cocrystalとすることで、新規性が付与

Guidance for Industry

Regulatory Classification of
Pharmaceutical Co-Crystals

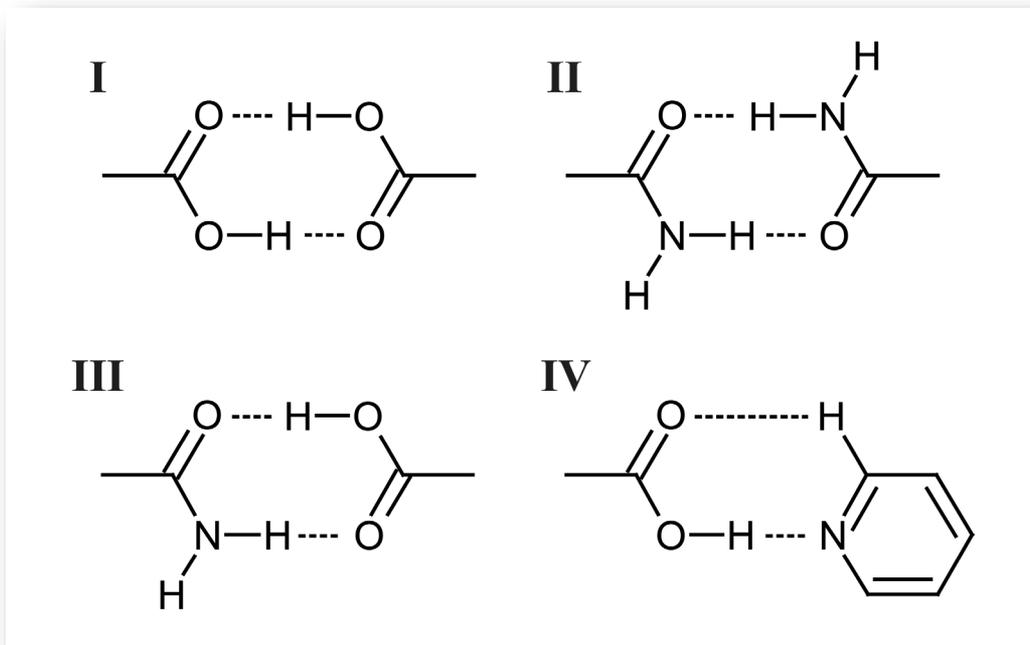
U.S. Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)
April 2013
CMC

Cocrystalの開発事例



イプラグリフロジン L-プロリン
(スーグラ錠、アステラス製薬)

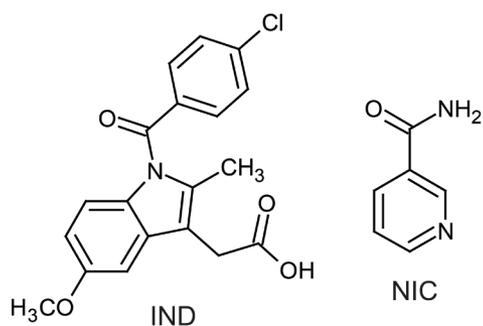
IND-NICを構成する超分子シントン



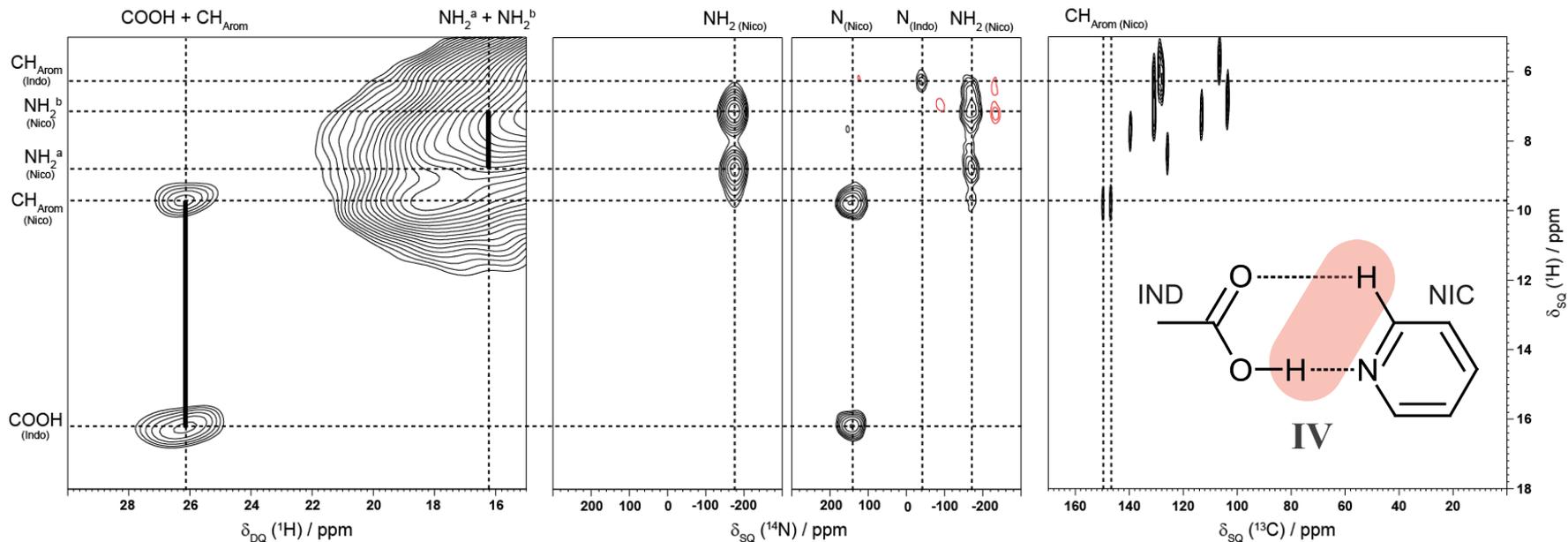
候補となる超分子シントン

※この他の可能性としては、**I**と**II**がN-H...Oの相互作用を通して共存する形がある

Cocrystalの設計において、分子間相互作用の最小単位
(超分子シントン)を理解することが重要

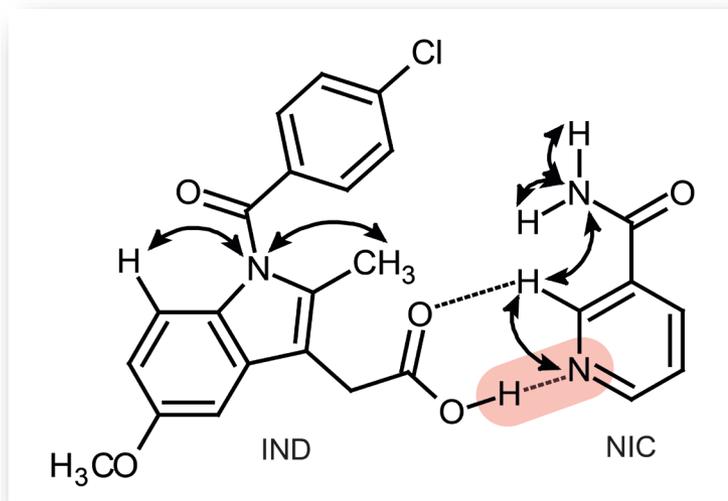


IND-NICの超分子シントンの決定



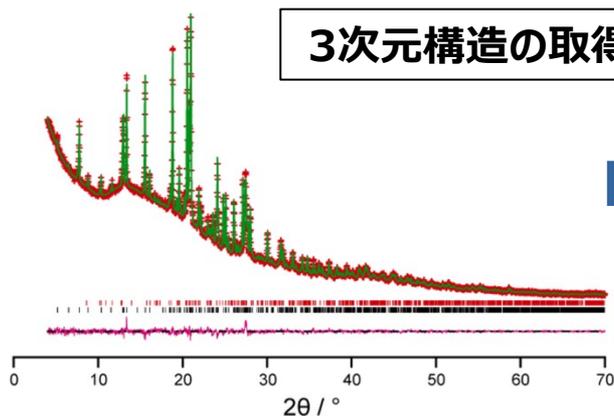
✓ 種々の2次元固体NMR測定 (DQ-MAS、¹³C-¹H Refocused INEPT、¹⁴N-¹H HMQC) によって、分子間の近接性を確認、IND-NIC cocrystalの水素結合様式を解明した。

✓ ¹⁴N-¹H HMQC実験は、塩とcocrystalの区別に有用な手法になり得る。

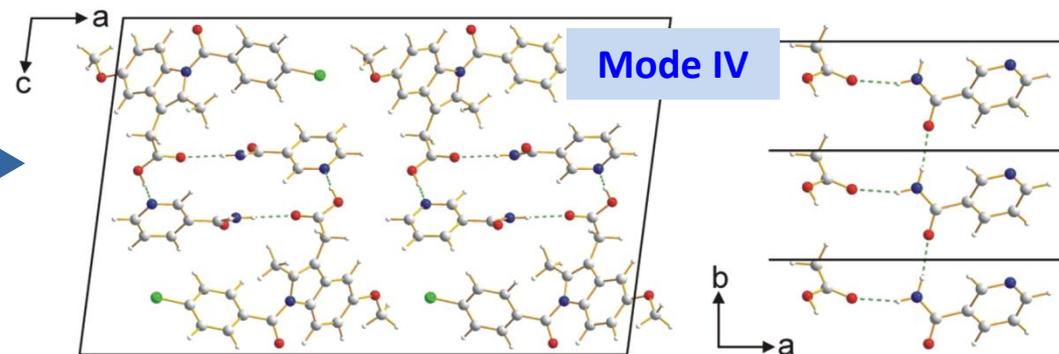


固体NMRデータから、粉末法で得られた3次元構造の正当性を立証する。

3次元構造の取得¹

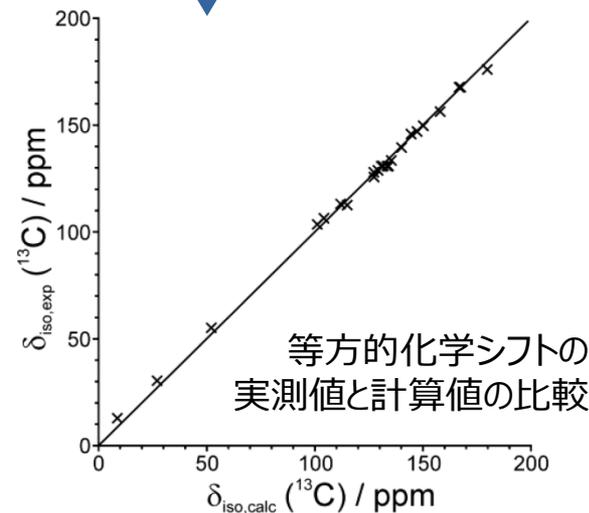
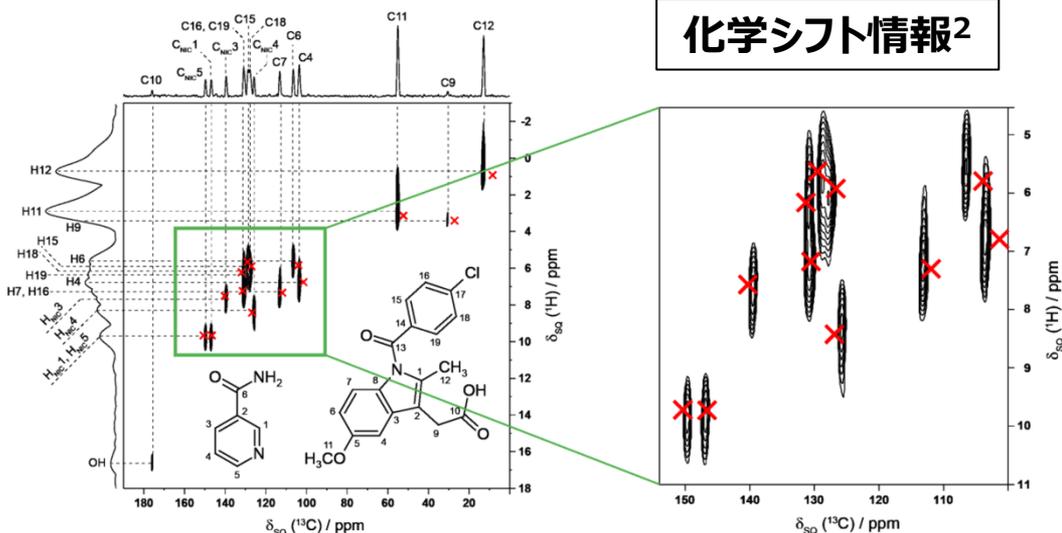


Crystal structure of IND-NIC determined from PXRD data



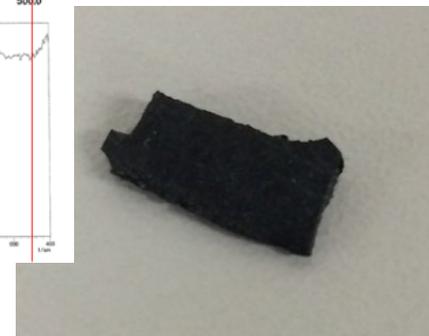
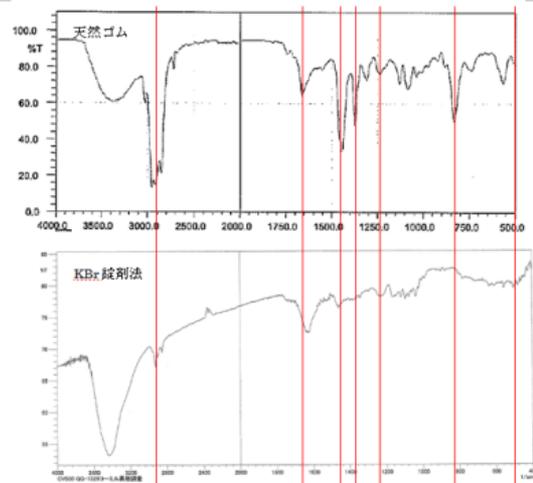
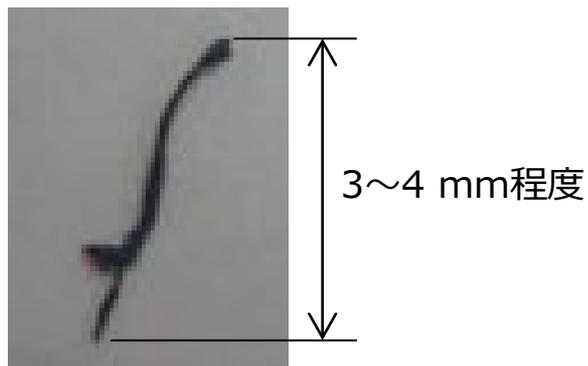
GIPAW

化学シフト情報²



1. Maruyoshi K. et. al. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 10844-10846., 2. Dudenko, D. V. et. al., *J. Phys. Chem. C*, **2013**, 117 (23), 12258-12265.
3. Watts A. E., Maruyoshi K. et. al. *Cryst. Growth Des.* **2016**, 16, 1798-1804.

工場Xの製品Yの
製造工程で発見された黒色異物



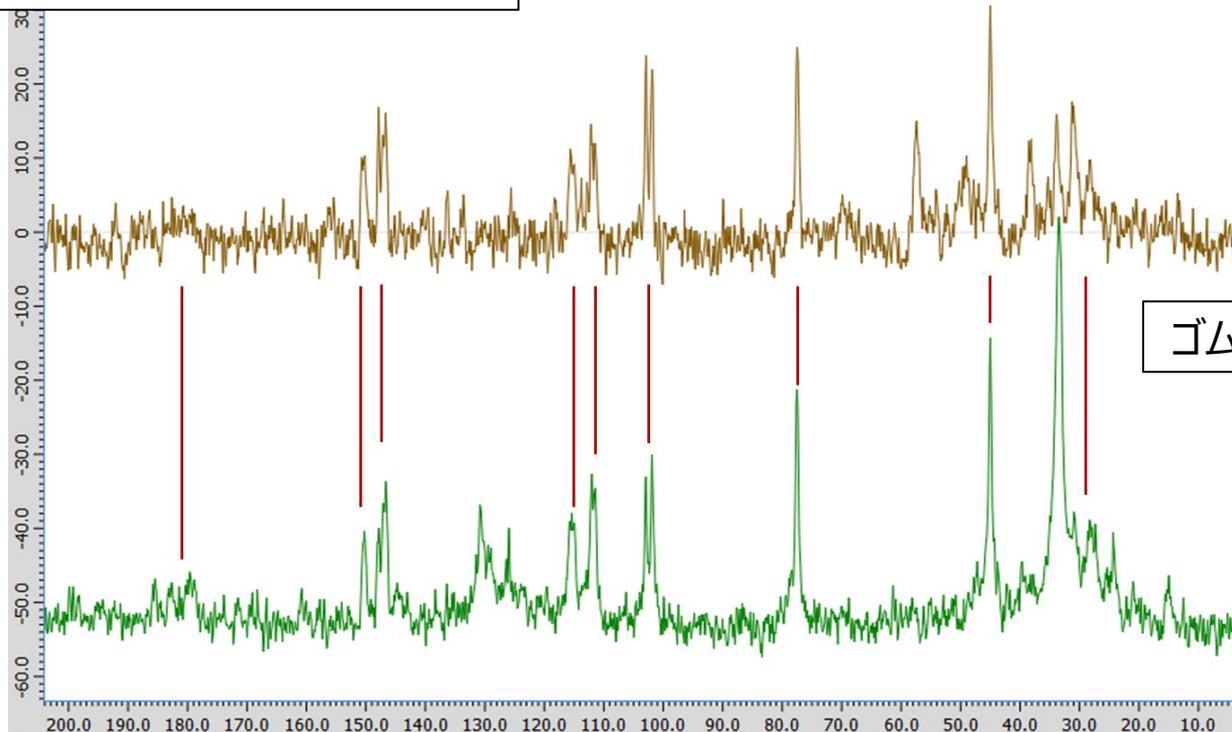
試料量が少量であったため、KBrで
嵩を増し、試料管に充填した。

IRスペクトルは、天然ゴムのものに類似。
= 混入が疑われたのはゴムマット。
こちらは試料管に入るサイズに切り刻み、
KBrと共に充填した。

高磁場装置と細径プローブが威力を発揮

実生産で役立ったケース | 製造工程で発見された異物の評価

使用機器：JEOL RESONANCE社製
FT NMR装置 (JNM-ECA600II)
プローブ：3.2 mm HXMASプローブ
測定： ^{13}C CP/MAS



主要なピークの大部分において化学シフトがよく一致していた。

→ 黒色異物が当該ゴムマットに由来するか、もしくはそれと類似組成の物質であることを示唆。

包装保留となっている数ロットについて、包装への移行が可となった。

●●●●錠 mm/dd付 照会事項

Dummy

＜原薬の結晶形等に関する参考試料＞

申請製剤について結晶の転移を「なし」と判断した根拠資料を提出してください。

1. 「申請製剤に使用した原薬の結晶の転移」
2. 「申請製剤保存中の結晶の転移」

製剤中の結晶形を固体NMRで評価した場合、固体NMRのスペクトルを当局に提出することもあり得る。

◆ 医薬品の開発プロセスについて

◆ NMR活用事例

- ・多糖体の確認試験
- ・合成核酸の不純物確認
- ・光学純度決定（キラル液晶NMR）
- ・より正確な帰属を（Pure Shift NMR）
- ・抗体の特性解析：高次構造（非標識サンプルでのタンパク質NMR）
- ・結晶形の確認＋定量
- ・共結晶の評価
- ・NMR Crystallography
- ・実生産における異物分析

◆ 最後に

医薬品の開発プロセス | 工業化検討から実生産まで

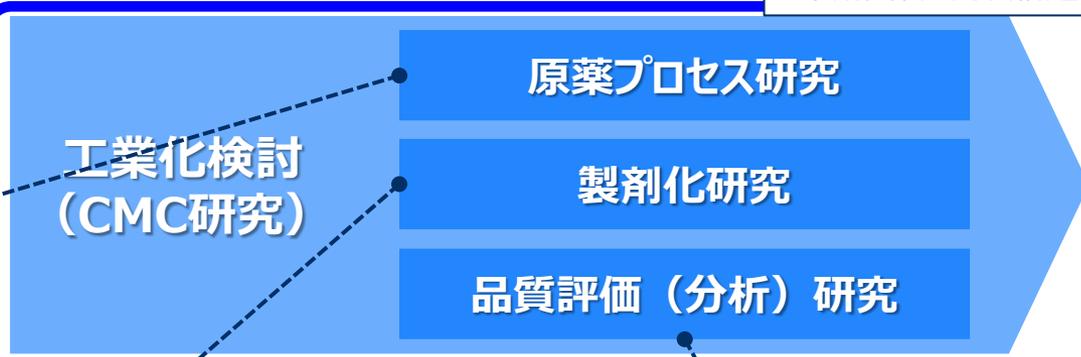


Phase 1 Phase 2 Phase 3

創薬研究

プロセス開発 (原薬)

- ・反応モニタリング
- ・中間体の定量
- ・不純物 (類縁物質)
構造推定 LC-NMR
- ・結晶形評価



治験届・承認申請

- ・申請資料 構造解析 (NMR帰属、低分子)
- ・申請資料 高次構造 (バイオ医薬品)

実生産におけるトラブル
対応、知財対応

- ・異物分析
- ・結晶形評価

プロセス開発 (製剤)

- ・結晶形評価
- ・固形製剤の安定性予測
(緩和時間)

特性解析

- ・構造解析 (NMR帰属、低分子)
- ・結晶構造 (NMR crystallography)
- ・高次構造解析 (バイオ医薬品)

規格試験

- ・規格試験としての定量NMR (原薬、製剤)
- ・確認試験 (低分子・バイオ)

結晶形評価 (原薬、製剤)

- ・主原料の残留溶媒
- ・光学分割 (キラル液晶NMR)
- ・塩・共結晶の評価

安定性試験

- ・結晶形評価 (原薬、製剤)
- ・固形製剤の安定性予測 (緩和時間)

工場生産

University of Warwick, U.K.

Prof Steven P. Brown

Dr Dinu Iuga

Dr Jonathan P. Bradley

第一三共株式会社 分析評価研究所

鈴木 信幸

佐藤 朱美

北村 竜之介

瀧口 あさひ

内田 みず穂

白石 実夕

- ✓ 創薬研究に比べると制限は多いものの、CMC研究においてもNMRを活用できる場面は結構ある。事象に対して、より深い考察、適切な説明ができるようになることも多い。「それ、NMRだったらできるのに」は大切にしたい。
- ✓ たとえ装置を所有していなかったとしても、様々なNMR手法があることを知っておけば、NMRプラットフォームに支援をお願いできる。ハイスペックな装置を利用できるだけでなく、プロのNMRスペクトロスコピストに助けてもらえることは大変ありがたい。
- ✓ 今後のNMR技術の産業利用に期待したい。

丸吉 京介

Email : keisuke.maruyoshi@daiichisankyo.com

LinkedIn : <https://www.linkedin.com/in/keisuke-maruyoshi-79aa3041>