



寡核苷酸原料藥品質之化學製造 管制指導原則

第一版

中 華 民 國 1 1 5 年 1 0 月 1 3 日

財團法人醫藥品查驗中心

序言

隨著核酸藥品之開發與臨床應用日益廣泛，寡核苷酸原料藥已逐漸成為精準醫療的重要策略之一。由於寡核苷酸分子結構複雜且特殊，其化學合成製程與傳統小分子藥物迥異，涉及固相合成、保護/去保護及純化等多重步驟，製程中各環節對品質之穩定性與一致性均有顯著影響，亟需以科學原則與風險導向之品質管理策略加以控管。為提供業界於開發及製造寡核苷酸原料藥時，得以依循科學性、系統性原則進行化學製造與品質管制（Chemistry, Manufacturing and Controls, CMC）之規劃與實施，確保藥品之品質、效能與安全性，故制定本指導原則，期能共同促進寡核苷酸藥品之品質提升與技術創新。

【撰寫團隊】

莊秉澄、黃振瑋、葉嘉新、陳可欣、徐麗娟、劉明勳

目錄 (Table of Contents)

1	介紹	4
1.1	指導原則之目標	4
1.2	背景	4
1.3	指導原則適用範圍	4
2	寡核苷酸原料藥於化學製造管制(CMC)之考量	5
2.1	一般資訊	5
2.1.1	命名	5
2.1.2	結構	5
2.1.3	一般性質	5
2.2	製造	6
2.2.1	製造廠	6
2.2.2	製程及製程管制之描述	6
2.2.3	物料管制	7
2.2.4	關鍵步驟及中間體管制	8
2.2.5	製程確效及/或評估	9
2.2.6	製程開發	9
2.3	特徵及結構鑑定	9
2.3.1	結構解析及其他特徵	9
2.3.2	不純物	10
2.4	原料藥管制	12

2.4.1	規格	12
2.4.2	分析方法描述	13
2.4.3	分析方法確效	14
2.4.4	批次分析	14
2.4.5	規格合理性之依據	14
2.5	對照標準品或對照物質	14
2.6	容器封蓋系統	15
2.7	安定性	15
2.7.1	安定性概要及結論	15
2.7.2	核准後安定性試驗計畫書及承諾	15
2.7.3	安定性試驗數據	15
3	參考文獻	15

本指導原則係參考 ICH 及 EMA 之規範，亦代表醫藥品查驗中心 (Center for Drug Evaluation, CDE) 對此議題的當前想法。如果未來有相關的科學證據，則會進一步修訂此指導原則。本指導原則非審查基準，若有不同的研發方式，可透過諮詢管道與查驗中心討論。凡涉及政策方向及法規解釋與適用，仍應依中央衛生主管機關之指示為準。

若對此指導原則有任何疑問，歡迎來信至 feedbackbox@cde.org.tw

1 介紹

1.1 指導原則之目標

有關化學合成來源之原料藥，常以 ICH Q3A、Q6A 及 Q11 等指引，做為研發製造與品質建立之評估依據，惟前述指引並不適用於寡核苷酸(oligonucleotide)原料藥，僅有 ICH Q11 之某些概念，可與法規單位討論是否可應用於寡核苷酸原料藥之開發。有鑑於此，故制訂本指導原則，以期能做為前述指引之補充說明。

1.2 背景

隨著分子生物學興起，核酸藥品研究於 20 世紀後期開展，科學家嘗試探索利用核酸分子如反義寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASO)及干擾核糖核酸(RNA interference, RNAi)等技術，直接調控基因表現，以治療各類疾病。早於 1998 年時，就有第一個核准之核酸藥品 Vitravene® (fomivirsen sodium)，用於治療免疫低下患者之巨細胞病毒(CMV)視網膜炎。隨著藥品製造及遞送技術之進步，大幅改善先前藥品開發所遭遇之障礙如藥品安定性與免疫原性等問題，進而促使其他核酸藥品如 Spinraza® (nusinersen)及 Onpatro® (patisiren)等獲得核准上市。尤其在 Covid-19 疫情期間，Comirnaty®與 Spikevax®之 mRNA 疫苗迅速取得緊急使用授權，並於後續取得完整許可，從而獲取更多關注。

核酸藥品之原料藥可依據結構分為短鏈與長鏈，目前核酸原料藥開發以短鏈寡核苷酸為主，如反義寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASOs)、小分子干擾核糖核酸(small interfering RNAs, siRNAs)、微小核糖核酸(micro-RNA, miRNA)、核糖核酸適體(aptamer)、導引核糖核酸(guide RNA, gRNA) 等；而長鏈核酸原料藥如信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)等則以 Comirnaty®與 Spikevax®之 mRNA 疫苗為代表。

有鑑於現今投入核酸藥品領域之國內產業及學研單位越來越多，對相關法規要求之資訊需求日益增加。因此，遂參考歐盟藥品管理局 EMA 於 2024 年七月發表之「Guideline on the Development and Manufacture of oligonucleotides」草案，並綜合國內對相關藥品/或原料藥查驗登記審查之相關經驗制定本指導原則，期能提供相關人員可依循之方向。

1.3 指導原則適用範圍

本指導原則適用於化學合成來源之反義寡核苷酸原料藥及小分子干擾核糖核酸原料藥，並排除信使核糖核酸原料藥。截至目前為止，其它如微小核糖核酸、核糖核酸適體、導引核糖核酸等其他類型之核糖核酸原料藥，原則上可適用本指引。惟可能視其特徵如分子結構與功能等，而有其它法規要求，故目前尚需視個案而定。本指導原則主要係作為申請查驗登記參考之用，相關內容亦可作為臨床實驗階段之參考。

2 寡核苷酸原料藥於化學製造管制(CMC)之考量

做為 ICH 品質指引之補充，本原則以 ICH M4Q 模組三為基準，與一般化學合成原料藥小分子進行比較，說明寡核苷酸原料藥於各章節中，須提供之資訊與評估資料。

2.1 一般資訊

2.1.1 命名

與小分子化學原料藥相同，無其他額外要求。

2.1.2 結構

相較於一般小分子原料藥可直接以化學結構呈現，寡核苷酸原料藥結構相對龐大且複雜，故可改以圖例表示寡核苷酸原料藥之一級結構，圖例應包含各核苷酸單元字母代碼，所使用之代碼應包括核苷鹼基、糖類及其任何取代物，並應反映連接各核苷酸間之鍵結性質例如磷酸二酯(phosphodiester, PO)、硫代磷酸二酯(phosphothiolate, PS)等。每一寡核苷酸鏈應清楚標明鏈之 5'-末端和 3'-末端。對於小分子干擾核糖核酸，應提供有義股(sense strand)和反義股(antisense strand)之結構，並應標明互補核苷酸之雜交位置、各股中其他未雜交之核苷酸，以及其相對離子(counter ion)。除化學結構外，還應提供原料藥之分子式和分子量，若原料藥為小分子干擾核糖核酸，應額外提供有義股和反義股個別之前述資料。

2.1.3 一般性質

多數寡核苷酸原料藥係為凍晶粉末，應如同一般小分子藥物提供以下但不限於如外觀、含水量、溶液之 pH 值、莫耳吸光率、吸濕性以及在不同溶媒之溶解度等物化性質。相關更詳細之資訊或可於 3.2.S.3.1 節提供。由於大多數寡核苷酸原料藥不具有晶形(amorphous)，故通常不具有多晶形性(polymorphism)。若原料藥係以溶液形式製備，應說明包含相對離子在內之內容組成及 pH 值。

有關原料藥骨架上核苷基(nucleoside)和硫代磷酸二酯鍵之立體化學，可於本節或 3.2.S.3.1 節討論。如果原料藥結構中具有立體中心卻無絕對構型，亦即原料藥為具有非鏡像異構物之混合物時，應明確說明並解釋可確保原料藥立體化學一致性之管制策略。

2.2 製造

2.2.1 製造廠

與小分子化學原料藥相同，無其他額外要求。

2.2.2 製程及製程管制之描述

寡核苷酸原料藥之合成可藉由固相、液相或酵素催化等方式進行，其中又以固相合成方法最為成熟。該合成通常是在具有官能基修飾之固相載體(solid support)上，以自動合成儀執行。故本指導原則僅就固相合成法進行說明。

2.2.2.1 製程圖示

為了提高易讀性，原料藥合成路徑圖中可用字母代碼替換某些化學結構，而字母代碼應附有圖例。製造流程圖則與小分子化學合成藥物類似，將重要之單元操作以流程圖表示之。

2.2.2.2 製程描述

製程描述應描述製造過程中每個步驟。在寡核苷酸原料藥合成過程中，通常會重複循環相同之標準化步驟如去保護(deprotection)、偶合(coupling)、氧化/硫化和封端(capping)等，連接各個核苷酸單元，如果這些標準化步驟可以藉由通用條件，如當量、試劑、溶劑及反應時間等描述涵蓋所有操作範圍時，就不需要每步反應都逐一描述這些已驗證可接受範圍(PARs)之標準化步驟。完成標準化步驟後之載體移除和去保護步驟須提供詳細之製程描述，包括任何試劑之使用量及操作條件。

在原料藥製造過程中，製造廠可能基於設備容量或固相合成之操作效率，於不同步驟執行分批或併批操作。此時應提供分批操作或合併子批次時之合理性說明，並明確定義量產批量(commercial scale)之範圍。當製程計劃採用連續製造方法時，應參照 ICH Q13 關於製造過程描述之要求。

合成來源之寡核苷酸通常使用層析技術進行純化，一般從相對複雜之中間體粗品開始。該粗品通常包含前段、後段以及共沖提之目標化合物結構相關不純物。製程描述應說明分段收集之根據，以及在純化步驟期間建立之所有允收標準詳細資訊。如果分段收集之溶液需經常性再次進行純化，則該操作應視為常規製程之一部分。此外，製造廠應依照 GMP 之要求，採取適當措施及驗證計畫，以防止因使用相同層析管柱連續純化不同寡核苷酸而導致之交叉污染。

黏合/貼合 (Annealing)

對小分子干擾核糖核酸而言，除上述步驟外，會再進行後續之貼合製程，將兩條互補之有義股和反義股貼合而成一雙股原料藥。製程描述應明確說明如緩衝液組成、時間及溫

度等反應條件。此外，製造廠應優化各單股中間體之使用體積比，以最大限度地減少任何未黏合之單股不純物。該製程之可行性評估可用小批量實驗執行，並輔以用於測量雙股中間體及原料藥純度之非變性(non-denaturing)分析方法做為製程中控制，製程應記錄在製造過程中使用之單股中間體體積比與後續殘留，以及雙股原料藥粗品純化前後之純度與不純物分布等。相關開發資料可於 3.2.S.2.6 節提供。

濃縮

製程若有如減壓濃縮或超濾(ultrafiltration)等濃縮步驟時，製程描述須包括相關製程參數和製程中管制資訊。

凍乾

凍乾為合成來源寡核苷酸原料藥之常見製程，製程中應描述相關凍乾製程參數。

重製、再製及回收

與小分子化學原料藥相同，無其他額外要求。

2.2.3 物料管制

眾所周知，小分子化學原料藥製程之起始物選擇依據為 ICH Q11 及其問答集，其概念亦可應用於寡核苷酸原料藥之合成。有關起始物須提交之資訊與小分子原料藥相同，包含所有起始物製造廠之廠名廠址、起始物之合成路徑(包括所使用之試劑、溶劑和催化劑詳細資訊)，及起始物所含不純物可能對寡核苷酸原料藥不純物分布產生影響之關鍵性評估。製造廠選擇起始物時，應盡量避免使用人或動物來源之起始物，萬一使用，應提供相關風險評估及無牛海綿狀腦病(BSE)/ 傳染性海綿狀腦病(TSE)殘留之證明。

亞磷醯胺核苷 (nucleoside phosphoramidites)

一般而言，帶有簡單保護基修飾(如 5'-羥基和雜環鹼基保護)之亞磷醯胺核苷，可做為市售可得之起始物。相對地，若磷酸鹽、糖基或鹼基部分帶有更複雜修飾之核苷/或核苷酸衍生物，則視之為客製化起始物，須提供其合成路徑、使用之溶劑/試劑和不純物分布資訊。

一般亞磷醯胺核苷之品質屬性通常包括以下但不限於外觀、鑑別、含量/效價、不純物(單一已知、單一未知及總不純物)、純度、含水量和殘餘溶劑等。不管起始物來源為市售可得或客製化，皆應調查起始物製造過程所殘留之不純物分布，及不純物於後續原料藥製程之流向與清除，以評估對後續原料藥品質之潛在影響。

若載體本身接有寡核苷酸序列之第一個核苷或核苷酸時也被視之為起始物，就必須提供前述之所需資料。然而，載體本身若未加載核苷或核苷酸時則被視為一般物料，因為它不帶有原料藥之結構片段。

非核苷酸結構片段 (non-nucleotide structural moieties)

有別於一般載體，核苷酸可藉由共軛連結(conjugation)特定片段以加強寡核苷酸原料藥之

某些特性。例如：連接 N-半乳糖乙醯胺(GalNAc)可更精準地將寡核苷酸原料藥運送至肝臟；聚乙二醇則可改善配體之性質等。一般而言，若該共軛連結片段接有核苷酸片段時，應被歸類為中間體；若僅有共軛連結片段時，可能被視之為起始物或中間體，若為起始物者，便應依據 ICH Q11 及其問答集之建議，提供起始物之合理性說明及相關評估資料。由於共軛連結之片段複雜度因設計之不同而存在巨大差異，建議申請者對於應將其定義為起始物或中間體而有疑慮時，可盡早與法規單位討論。

原料藥製程之其他物料

除起始物外，應提供寡核苷酸原料藥製程中使用之所有其他物料列表，如載體、溶劑、試劑和層析材料等。就如同傳統化學合成原料藥一般，所有物料皆應該依其用途建立適當之規格，其檢驗項目通常應至少包括鑑別、純度及/或含量。對於某些特定試劑，如用於移除三苯甲基保護基之酸，必須管控某些不純物，以減少產生與原料藥結構相關之不純物。對於偶合步驟中使用之物料，水分殘留量亦可能是其關鍵物料屬性。

載體為固相合成之關鍵物料，最常用的是可控孔徑玻璃(Controlled pore glass, CPG)和聚苯乙烯樹脂。影響載體之品質屬性包含外觀、鑑別、網孔/孔徑大小和承載量等。除此之外，交聯和膨脹體積對於聚苯乙烯而言，也是影響品質屬性要素之一。

2.2.4 關鍵步驟及中間體管制

應根據 ICH Q9 - Q11 描述之原則，於開發過程中評估原料藥各製造步驟之關鍵性。原料藥製程中應設置製程中管制，藉由分析檢驗和製程參數控制之組合，以確認可有效控制品質之關鍵步驟。在固相合成製程中，關鍵步驟可能包括如以下但不限於偶合反應、封端監控、氧化/硫化反應、合成循環後之去保護、切割、濃縮、貼合(如適用)或/及凍乾(如適用)等步驟。

通常寡核苷酸中間體及原料藥係透過製備級管柱層析純化，藉由收集個別之沖提液以進行後續純化步驟，申請者應訂定個別及合併後之沖提液的允收標準，並說明其依據。該允收標準至少須包含純度及相關不純物。如果製程中有二次純化之設計，則應如同主要層析純化步驟一般，定義允許進入二次純化之沖提液標準，並應界定最後之合格及捨棄標準。此外，管柱層析純化後之過濾和凍乾步驟若可能影響原料藥品質時，亦應建立適當之管制。所有用於製程中管制及中間體之分析方法，應提供完整描述並說明其適用性。對於雙股寡核苷酸而言，應提供貼合前各單股中間體之規格，該規格應至少包括鑑別、純度和不純物(包含已知及未知不純物)。若單鏈中間體可能因故而未馬上進行後續貼合步驟時，應提供單鏈中間體之暫存時間(holding time)及儲存條件等安定性試驗資料，資料應包含強制降解(forced degradation)試驗之研究結果，以支持該分析方法可有效監測相關潛在降解產物。

前一節所提及之核苷酸-共軛片段連結若為中間體時，申請者應提供開發資料說明可能之不純物分布及後續之流向及清除評估，該不純物包含接有/或未接有共軛片段之核苷酸不純物，並依據評估結果於中間體設立規格管制，其中規格應包含未接有連結片段中間體之殘留量。

2.2.5 製程確效及/或評估

對於合成來源寡核苷酸原料藥之要求，與一般小分子化學合成原料藥需檢附之技術資料無太大差別。需特別留意的是 2.2 節提及之管柱應有適當之驗證計畫，以確保製備級管柱之效能及避免交叉感染。

2.2.6 製程開發

為了支持寡核苷酸原料藥具有適當之製造品質，申請者可應用 ICH Q8、Q9 及 Q11 指引之內容，以基於風險分析之概念進行開發。開發過程應進行風險評估，確定單一個別品質屬性對原料藥及後續成品品質之影響，以做為整體管制策略之支持依據。而品質屬性之變動會受到製程參數影響，故應進行製程風險評估和製程特性研究，包括評估製程參數臨界值和製程失效時對品質及/或製程一致性之潛在影響，當風險明顯存在時，需採取行動以減低風險。在完成風險評估和製程特性研究後，應藉由所獲得之知識與資訊建立原料藥製程管制。

由於寡核苷酸原料藥之合成多使用自動合成儀進行，且使用之載體、偶合試劑或亞磷醯胺核苷常被廣泛使用，相關物料之選擇合理性說明與品質屬性或可直接提供引用來源。然而，製程反應時間、溫度及莫耳當量數等較具專一性之參數，仍應提供相關開發評估資料。

如果該開發評估資料係參考自內部其他產品之知識，則應標明數據來源，並與本品之數據進行區分，說明兩者之關聯及可被引用之合理性。若引用之開發評估資料係已發表之文獻，則需提供該文獻之影本。

2.3 特徵及結構鑑定

2.3.1 結構解析及其他特徵

寡核苷酸原料藥之結構確認需有分析數據支持，其中包括一級、二級和三級結構。質譜為闡明寡核苷酸原料藥結構之適當分析方法，除可確認寡核苷酸原料藥之分子量外，亦可搭配其他技術確認其核苷酸序列，相關技術資料應包含代表性圖譜及分子碎片數據，該數據可用表格呈現理論值與實際值，解釋可能之分子碎片結構。除此之外，可使用元素分析確認其組成。核磁共振圖譜(NMR)亦為結構鑑定方法之一部分，用以確認核苷酸中，鹼基、糖基及骨架之組成排序。由於寡核苷酸原料藥結構相當複雜，故應使用 ^1H 、 ^{13}C 和 ^{31}P NMR 之一維及二維技術指明結構，其中 ^{31}P 之數據係用於確認一級與二級結構之磷酸二酯及硫代磷酸二酯骨架。倘若糖基帶有氟取代基，則可使用 ^{19}F NMR。由於起始物亞磷醯胺核苷本身具有立體中心，故需討論原料藥製程中是否可能發生變旋異構化(anomerization)反應。若有，需提供評估資料，說明原料藥中是否含有其他非鏡像異構物(diastereomer)或變旋異構物(anomer)。

有關磷酸酯鍵部分，不同於磷酸二酯鍵不具有對掌性，硫代磷酸二酯官能基之磷原子則具有對掌性，其立體化學位向係於偶合反應時決定。當寡核苷酸原料藥具有 n 個硫代磷

酸二酯鍵時，便可能產生 2^n 個非鏡像異構物，如果實際上無法分離所有非鏡像異構物時，建議可提供相關異構物比例之評估，及說明該組成比例於其他批次之原料藥是否具有再現性。相關寡核苷酸立體化學對生物及藥理活性是否會產生影響也需一併討論。其他如紫外光光譜(UV)、圓偏光二色光譜(CD)及紅外光譜(IR)亦為常用於結構鑑定之分析方法。對於接有共軛連結片段之寡核苷酸原料藥，需比較與寡核苷酸原料藥自身之二級結構差異。有關 siRNA，除原料藥之結構鑑定外，亦鼓勵申請者同時提供單獨之有義股和反義股結構鑑定資料。原料藥之物化性質研究可包含如以下但不限於溶解度、吸濕性、等電點、熱分析(DSC/TGA)及晶型等可能影響目標產品品質之因子。

2.3.2 不純物

純度為寡核苷酸原料藥重要之關鍵品質屬性，不純物通常可區分為與原料藥結構相關或非寡核苷酸不純物。與原料藥結構相關之不純物如寡核苷酸序列片段等；非寡核苷酸不純物包括製程試劑及其潛在副產物、殘餘溶劑、元素不純物及潛在致突變性不純物等。

原料藥結構相關不純物

與原料藥結構相關之不純物可能來源包含：(1)起始物；(2)製程中生成；(3)製程或儲存期間降解所致。三個不純物來源不一定完全互斥，有時可能在不同階段皆可檢測出同一不純物。申請者應基於以下資訊如對原料藥合成之深入了解、起始物所含之不純物分布與流向、中間體及原料藥潛在降解路徑等，區辨出實際或潛在殘留不純物。由於此類不純物通常具有較高之分子量且不易逐一分離，故在區辨時確實存在挑戰性。以下就三個來源逐一進行討論：

(1)源自起始物之原料藥結構相關不純物

起始物中具有反應活性之不純物，可能於原料藥製程中與寡核苷酸反應而被納入序列中，進而殘留至最終原料藥中，其殘留量多寡取決於原不純物於起始物之殘留量及反應性強弱。該不純物可能來自於糖基、鹼基或亞磷醯胺等。不同於小分子化學藥有多個製程中間體可預先清除相關不純物，寡核苷酸原料藥為自動合成儀一次完成，故原料藥製程下游步驟對相關不純物之清除能力相對不佳。故應於起始物規格中限縮相關不純物之允收標準。

(2)製程中生成之原料藥結構相關不純物

製程中所生成之不純物係指合成或切除載體時，發生未預期之反應。其可能來源與類型如下：

各核苷酸單元間之鍵結：寡核苷酸中間體或原料藥結構之硫代磷酸二酯基(PS)，可能會被氧化取代轉換成磷酸二酯基(PO)不純物，該副反應可能發生於任一硫代磷酸二酯基上，故會有不同組成之不純物。其成因可能來自於氧化、封端或去保護反應條件不夠完美，而另一可能原因則為溶劑本身含有具氧化力之不純物如氧氣等未完全清除乾淨。

立體異構物：如原料藥結構鑑定章節所述，主要來源係來自於起始物亞磷醯胺核苷，需在本章節提供相關討論與管制策略。

缺失序列(deletion sequences)和截短序列(truncated sequence):缺失序列是缺少一個或多個核苷酸單元之寡核苷酸不純物，其來源可能是因去三苯甲基化(detritylation)、硫化或氧化不完全所致。一般可藉由系統性之乙醯化反應來封閉未反應之偶合反應位點，以防止相關不純物形成。乙醯化過程產生之乙醯化寡核苷酸片段(截短序列)，大部分可於下游純化步驟中被移除。

插入序列(insertion sequence):若特定核苷酸單元在偶合反應時重複多次反應時，便會生成此類型不純物。其來源可能是來自於反應過程期間保護基脫落而引發連鎖反應，抑或是反應試劑濃度比例失當所致。

鹼基修飾:當去三苯甲基化、封端或切除載體之反應條件控制不佳時，可能造成鹼基自寡核苷酸脫落，於此同時，若封端反應條件控制不佳時，便會造成鹼基進行乙醯化。

寡核苷酸交聯反應 (cross-linked oligonucleotide):寡核苷酸中間體、原料藥或寡核苷酸不純物若有可反應之位點，就可能有發生不預期之交聯反應，形成其他寡核苷酸不純物。

雙鏈寡核苷酸中殘留之單鏈寡核苷酸:其來源為貼合過程中，未完全反應所殘留之有義股或反義股寡核苷酸。

(3)製程或儲存期間產生之降解產物

降解產物可能產生於製造過程之副反應，或是儲存期間受到環境影響而造成之降解，其不純物生成量可能隨著儲存期間而增加，造成原料藥降解之可能途徑包含氧化、熱、酸性、鹼性、水解、縮合(condensation)和光照等，相關研究與討論可藉由執行強制降解試驗而得知。

分析方法

製造廠應開發和描述用於檢測上述實際存在、潛在及結構未知之不純物的分析方法，該分析方法需具有適當之最低檢測濃度和最低定量濃度，並盡可能將各不純物完全分離。由於不純物組成複雜，且許多不純物具有相同分子量，因此通常無法使用單一分析方法完全分離所有與中間體/或原料藥結構相關之不純物。在這種情況下，應努力改善分離效果，例如使用互補之檢測方法，例如於離子對逆相高效液相層析方法(IP-RP-HPLC)中，使用紫外分光光度計檢測器串聯質譜檢測器，或另外增加其他原理之分析方法，盡可能分離所有不純物。如果已盡力使用可能之所有方法，卻仍無法分離所有不純物時，建議可將未分離之不純物做為一個群組，說明相關不純物類型，並提供具代表性之層析圖譜，及批次檢驗所檢測出之不純物殘留量。如果中間體或原料藥為雙股寡核苷酸，則應同時使用變性及非變性條件之分析方法。

單股核苷酸之不純物報告、鑑別及驗證閾值與規格之關連

不純物之報告閾值與其分析方法最低定量濃度有關，而分析方法最低定量濃度可能取決於分子結構複雜度，申請者需說明分析方法最低定量濃度數值之合理性。鑑別閾值係指不純物殘留量達到該數值時，需提供該不純物之結構鑑定資料。一般而言，寡核苷酸不純物之建議鑑別閾值為 1.0%。驗證閾值係指已知不純物殘留量達到該數值時，需評估該不純物之安全性，一般而言，寡核苷酸不純物之建議驗證閾值為 1.5%。然，該數值並不適用於具有潛在致突變性之不純物，相關潛在致突變性不純物仍建議依據 ICH M7 進行

評估。所有原料藥之已知不純物允收標準皆需要有原料藥批次分析數據做為支持，且允收標準高於驗證閾值者，也需要有相關毒理試驗數據支持。

原料藥結構相關不純物之驗證要求

以下將原料藥結構相關不純物分為四類並介紹如下：

- (1) 第一類不純物為主要代謝物，其結構和序列與寡核苷酸原料藥相同，如僅於 3' 或 5' 末端缺少一個或數個核苷酸；或者雙股寡核苷酸原料藥之其中一股。
- (2) 第二類不純物為僅於天然核酸中發現之結構片段，如硫代磷酸二酯基被氧化轉換成磷酸二酯基(PO)不純物。以上這兩類不純物殘留量即便高於驗證閾值，仍不需要進行安全性驗證。
- (3) 第三類不純物為寡核苷酸原料藥序列之變異體，如寡核苷酸序列內(非核苷酸末端)增加或減少核苷酸，這類不純物通常難以區別，所以會將這些不純物歸為一個群組。如果這組不純物殘留量低於 1.5% 時，不需要進行結構鑑定及安全性驗證。然而，當該群組殘留量高於 1.5% 時，就必須確認該群組內之各序列，對於單一序列殘留量高於 1.5% 時，必須執行安全性驗證。
- (4) 第四類不純物為寡核苷酸原料藥與天然核酸未發現之不純物結構片段例如鹼基脫落之不純物。如果這類不純物殘留量高於 1.5% 驗證閾值時，就必須執行安全性驗證。

製程相關之非核苷酸類不純物

非核苷酸類不純物包含製程試劑、副產物、殘留溶劑、元素不純物和保護基團等。進行固相合成時，載體於每一合成循環皆會經過溶劑清洗、用於偶合步驟之試劑與溶劑也需要選擇適當之溶劑洗滌。對於製造過程中使用之所有試劑和溶劑，應於技術文件中提供相關檢驗數據及/或風險分析說明其清除結果。任何試劑和/或溶劑之殘留允收標準應符合相關 ICH 指引之要求。

2.4 原料藥管制

2.4.1 規格

合成來源之寡核苷酸原料藥雖不適用 ICH Q6A，但該指引描述之原則及內容，仍可做為制定寡核苷酸原料藥規格之參考。寡核苷酸原料藥通常用於生產無菌製劑，因此通常會制定微生物和細菌內毒素之允收標準。常見之檢驗項目如下但不限於：

- 1) 外觀
- 2) 鑑別：該分析方法需要具有專一性，若無法達成，需使用兩個以上不同原理之鑑別分析方法。常用之分析方法可參考原料藥結構鑑定章節。
- 3) 原料藥含量
- 4) 相對離子含量

- 5) 純度/不純物：除基本之已知不純物、未知不純物及總不純物外，可能還有群組不純物(groups of impurities)。如原料藥為雙鏈寡核苷酸，則需同時使用變型與非變性分析方法。
- 6) 溶液之 pH 值
- 7) 水分含量
- 8) 殘餘溶劑
- 9) 元素不純物 (若原料藥製程有蓄意添加 ICH Q3D 所列之元素)
- 10) 細菌內毒素
- 11) 微生物限制

2.4.2 分析方法描述

某些檢驗項目如相對離子、水分、pH 值、細菌內毒素及微生物限量等檢驗項目，除了廠內自行開發之分析方法外，亦可使用我國認可之藥典檢驗方法。特定之檢驗項目如鑑別、純度/不純物、含量等分析方法則需要自行開發以符合其目的與用途。

鑑別

原料藥之鑑別需逐批檢驗，如同原料藥規格所述，常需要兩個以上之分析方法進行檢驗，如以下但不限於 HPLC-UV/MS 等；此外，原料藥之相對離子，亦應進行鑑別。若原料藥為雙股寡核苷酸，其單股及雙股皆需鑑別，最常使用之分析方法亦為 HPLC-UV/MS (包含變性與非變性)。

純度

寡核苷酸原料藥雖不適用 ICH Q3A，但該指引對不純物之分類概念亦可應用於此，故寡核苷酸原料藥相關不純物可區分為已知結構不純物、已知滯留/或相對滯留時間但不確定結構之不純物、未知不純物及總不純物。一般而言，傳統層析方法無法分離所有寡核苷酸原料藥的不純物，且常有為數不少之不純物會與目標化合物一起沖提而出。故結合不同之層析方法與偵測器時，便可增進不純物之分離、鑑定和定量效果。

基於寡核苷酸原料藥合成方法之特性及結構複雜度，不純物分布除單一已知不純物外，另有成群具有相等序列長度之寡核苷酸不純物。因此，可以接受該類不純物以特定形式如群組、混合物或類別等報導其結果。以化學結構或滯留時間做為群組分類之方法，只要充分說明其合理性便可行。在此之前，不純物結構鑑定結果是此分類方法之先決要件。對雙股寡核苷酸原料藥而言，使用不同原理之分析方法，可檢測不同類型之不純物，且方法偵測極限亦不同。使用非變性分析方法時，應明確指明各單股不純物並測定其殘留量。寡核苷酸原料藥不純物之閾值可引用已發表文獻做為支持資料。除此之外，每個不純物或群組不純物之限值，需有以下資料如毒理數據做為閾值之安全性依據、批次檢驗及安定性數據、管制策略、分析方法及藉由製程探討了解可能影響原料藥關鍵品質屬性之不純物來源及流向。

含量

原料藥含量計算方式需有明確之定義，其分析方法可以使用 UV 或 HPLC-UV。計算公式若需要使用消光係數時，須於技術文件說明。由於寡核苷酸原料藥之凍乾粉末常含有高水量且可能會隨著儲存期間而增加。因此，除非有其他考量，一般原料藥含量通常以無水格式呈現。若計算公式中有導入其他校正因子，如原料藥純度、相對離子等，需於公式載明並說明其合理性。

2.4.3 分析方法確效

一般而言，寡核苷酸原料藥分析方法確效之注意事項與一般小分子合成原料藥無太大差別，其執行皆是以 ICH Q2 為依據。除此之外，不純物分析方法確效之專一性圖譜需包含質譜圖數據，用以輔助說明不純物積分方法之適當性。

2.4.4 批次分析

本節應歸納用於非臨床和臨床研究之寡核苷酸原料藥批次分析數據，以及用於支持原料藥品質之批次分析數據。一如其他指引之建議，以表格形式呈現相關資訊可有助於理解。表格資訊除分析結果外，還須提供以下資訊如製造廠廠名廠址、製造日期、批號、批量規模、合成路徑選擇(如適用)以及批次用途。

隨著藥品早期開發階段到最後上市之過程，原料藥規格常有所更替，申請者應解釋各批次結果之差別，並解釋其合理性。此外，分析方法於藥物開發過程亦會進行優化，便可能進一步找出新的不純物。在這種情況下，應重新檢視與比較原料藥批次間之數據，並討論是否需要執行安全性驗證。

2.4.5 規格合理性之依據

原料藥規格應以非臨床、臨床研究和其他用於支持原料藥品質之批次數據為基礎，並結合對原料藥製造過程之了解，與可能影響寡核苷酸原料藥關鍵品質屬性之要素進行制定。有關於原料藥之鑑別，需要使用至少兩種不同原理之分析方法，其中一種為定序檢驗。對於殘餘溶劑、元素不純物、細菌內毒素和微生物等檢驗項目，應按照相關指引或/及我國認可之藥典建立允收標準。寡核苷酸原料藥不純物之規格合理性應依 3.2.S.3.2 和 3.2.S.4.2 之內容進行說明。

2.5 對照標準品或對照物質

寡核苷酸原料藥通常為非常吸濕之粉末，因此，在儲存和分析過程中，應採取適當之預防措施，以防止標準品吸收水分。申請者應簡要說明標準品之來源，如該標準品係來自於量產規模之原料藥生產批次。如果同時使用一級標準品及工作標準品，則應簡要說明製備和標定程序，並提供標準品批次之結構鑑定結果。此外，該程序亦用於標準品重新驗證及未來標準品批次之標定，這其中應包含為防止寡核苷酸含量標定結果浮動而採取之措施。

對於雙股寡核苷酸原料藥而言，標準品應包含有義股、反義股和原料藥本身。

2.6 容器封蓋系統

申請者應考慮原料藥之性質、儲存條件及後續用途，選擇適當之容器封蓋系統。例如對於易吸濕之粉末，應包含適當之乾燥劑，或者可以考慮在惰性氣體下儲存。

2.7 安定性

2.7.1 安定性概要及結論

寡核苷酸原料藥安定性試驗與一般小分子化學藥無太大差異，皆應遵循 ICH Q1A 指引內容，檢附相關技術資料並說明安定性試驗條件之選擇考量。除此之外，原料藥需執行強制降解試驗，以全面了解原料藥之(潛在)降解途徑，這些數據對於後續成品開發尤為重要。在寡核苷酸原料藥之潛在降解途徑中，應考慮原料藥主鏈骨架和糖基是否發生改變，其中最常見之降解產物，係因氧化造成脫胺基和脫嘌呤/脫嘧啶等不純物，故開發之原料藥分析方法(stability indicating method)應可偵測和定量這些(潛在)不純物。此外，應特別注意相關降解產物是否有安全性疑慮。對於具吸濕性之原料藥而言，水分含量應列入原料藥安定性檢驗規格中。

2.7.2 核准後安定性試驗計畫書及承諾

與小分子化學原料藥相同，無其他額外要求。

2.7.3 安定性試驗數據

建議將安定性試驗研究，包括強制降解或苛酷試驗等，以適當之表格或圖形格式呈現。用於安定性試驗之原料藥批次資訊至少應包含批號、廠址、製程選擇(如適用)、容器封蓋系統和批量。相關資訊可與 S.4 章節其他部分中交叉比對。如果在安定性試驗期間使用之分析方法與 3.2.S.4 不同時，應在本節提供該分析方法之完整描述及確效資料。

3 參考文獻

1. EMA: Guideline on the Development and Manufacture of oligonucleotides
2. CDE: 用於治療嚴重衰弱或危及生命疾病之個人化反義寡核苷酸藥品於臨床試驗階段之化學製造管制指導原則
3. Sabat et al: Towards the controlled enzymatic synthesis of LNA containing oligonucleotides, *Front. Chem.* **11** 01-10 (2023).
4. 署授食字第 1021401257 號公告：原料藥主檔案技術資料查檢表
5. 署授食字第 1021400426 號公告：原料藥查驗登記技術資料查檢表

6. ICH Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products
7. ICH Q2 (R2): Analytical Validation
8. ICH Q3A (R2): Impurities in New Drug Substances
9. ICH Q3C (R9): Guidelines for Residual Solvents
10. ICH Q3D (R2): Guidelines for Elemental Impurities
11. ICH Q6A: Specification: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances
12. ICH Q8 (R2): Pharmaceutical Development
13. ICH Q9 (R1): Quality Risk Management
14. ICH Q10: Pharmaceutical Quality System
15. ICH Q11: Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological Entities)
16. ICH Q11 Q&A: Questions and Answers: Selection and Justification of Starting Materials for the Manufacture of Drug Substances
17. ICH Q13: Continuous Manufacturing of Drug Substance
18. ICH M4Q (R1): Common Technical Document