

Dual-hybridization assayを用いた siRNA高感度分析法の開発

○羽成 優, 小宮 薫, 林 善治, 水落 正慶, 團野 典行, 西口 有美, 小山 亜紀

シミックファーマサイエンス株式会社

問い合わせ先 : 羽成 優 (e-mail to suguru-hanari@cmicgroup.com)



緒言

アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) やsiRNAに代表される核酸医薬品は、がんや遺伝性疾患等に有用な新規モダリティとして注目されている。生体試料中の核酸医薬品濃度分析には、LC-MS法やHybridization LBA法、qPCR法など様々な分析法が利用されているが、Hybridization LBA法は他の分析法に比べ高感度分析が可能である点や分析法の構築が容易である点がメリットとして挙げられる。

今回、モデル核酸医薬品として核酸配列部分をInclisiran (Leqvio) としたGalNAc リガンド付きsiRNAを用い、Electrochemiluminescence (ECL) 法によるDual-hybridization assayを用いて、ヒト血漿中siRNA分析の基礎的データを取得した。

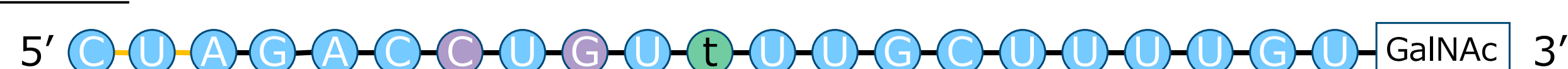
本発表ではその評価結果について報告する。

材料及び方法

1. 材料

測定対象物質 : Inclisiran like siRNA

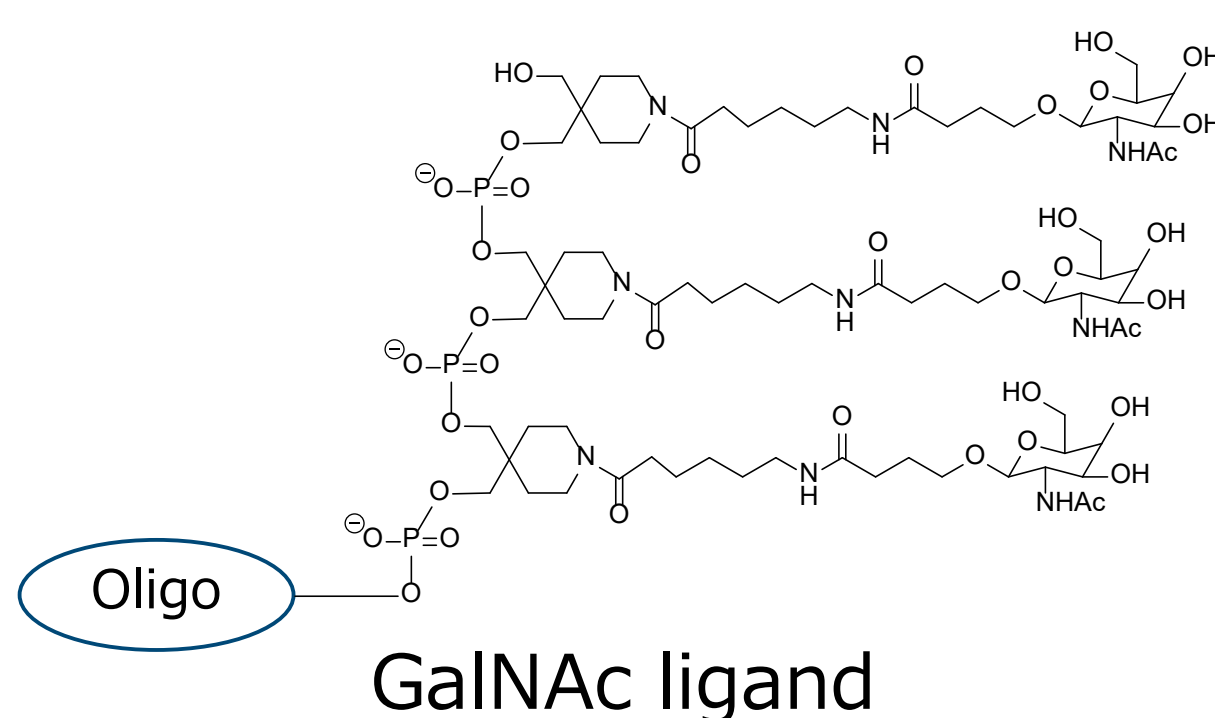
Sense strand



Antisense strand



N	2'-OMe	GalNAc	GalNAc ligand
N	2'-F	—	Phosphorotioate
t	thymidine	—	Phosphodiester

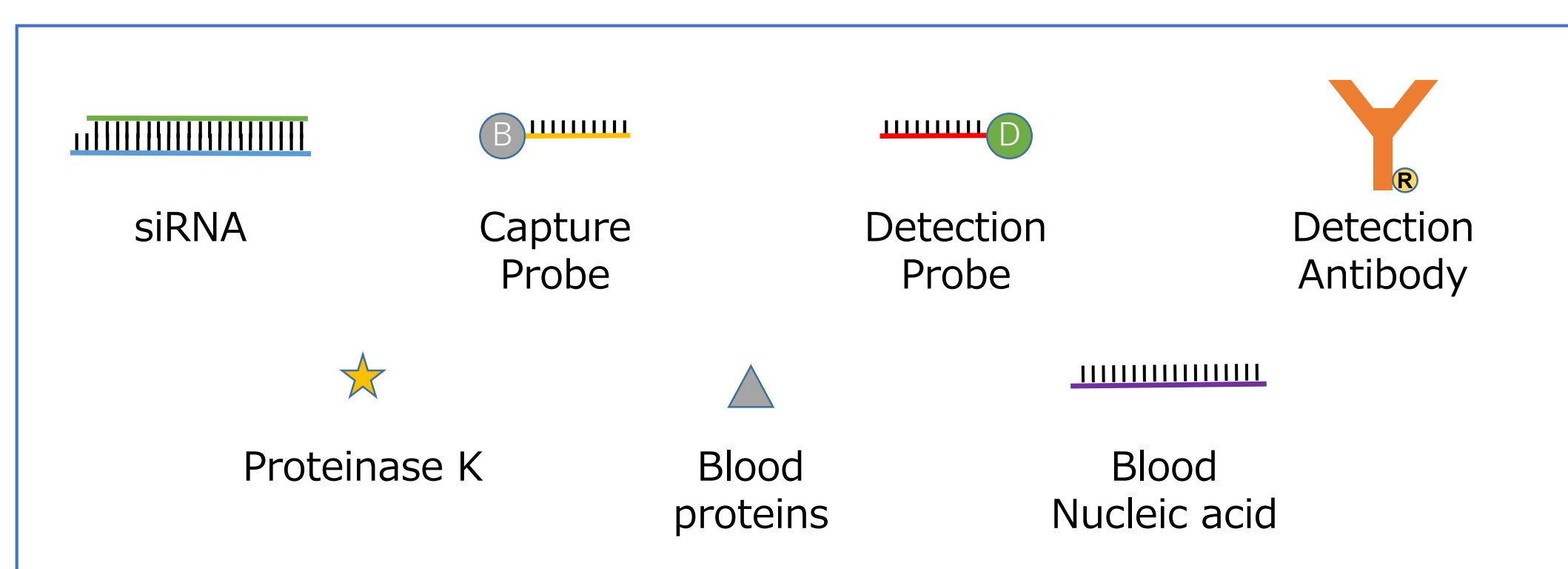
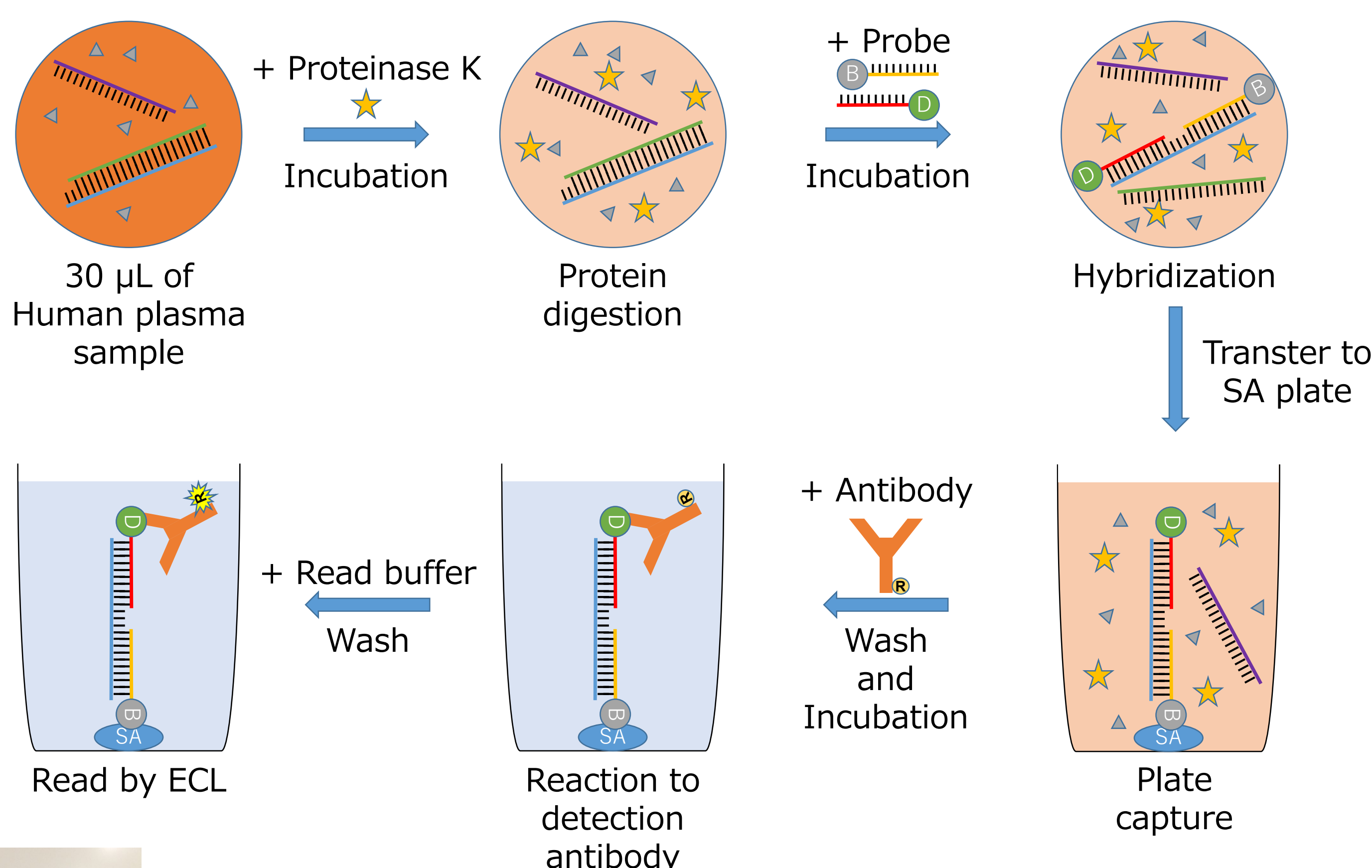


測定用プローブ

Captureプローブ (10 mer) : 3'末端にBiotinを付加

Detectionプローブ (10 mer) : 5'末端にDigoxigeninを付加

2. 試料処理法



結果

1. プローブ及び抗Digoxigenin抗体濃度の最適化

プローブ濃度 4条件及び検出抗体濃度 3条件から、最適な濃度を確した。

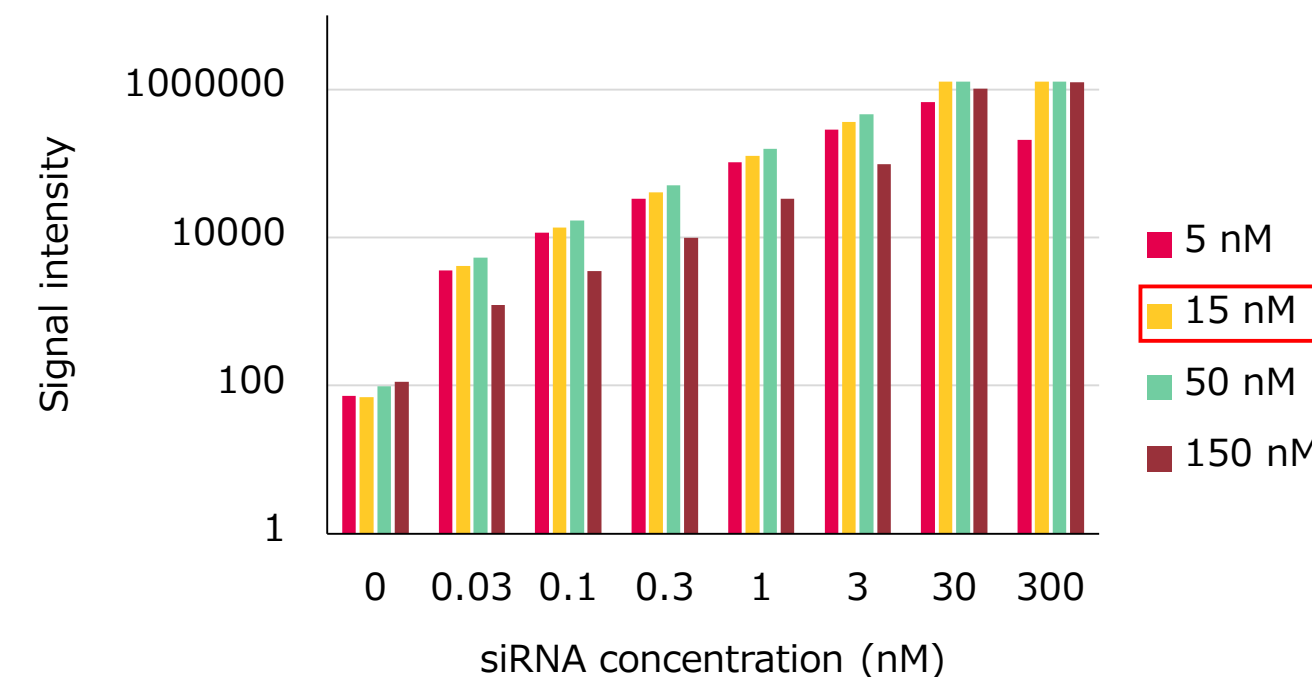


図 1. プローブ濃度の最適化 (検出抗体 : 1 µg/mL)

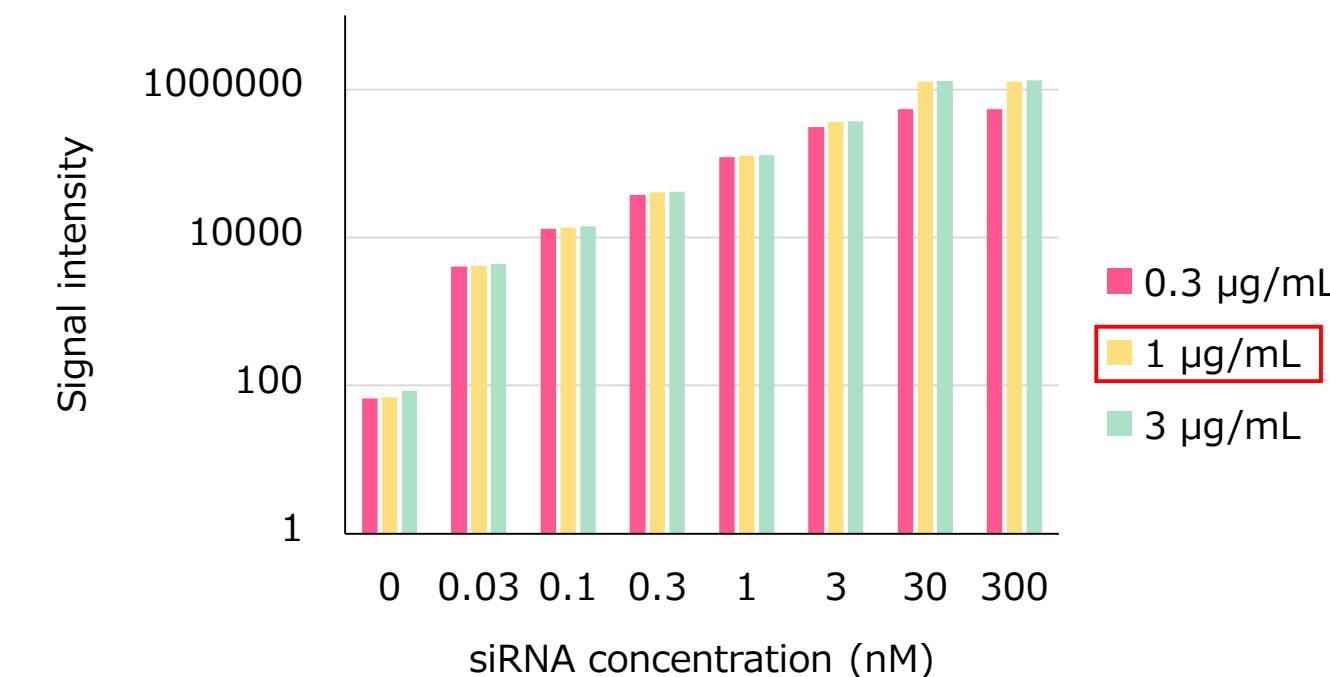


図 2. 抗体濃度の最適化 (プローブ : 1 µg/mL)

- ✓ プローブ濃度 : バックグラウンドが低く高濃度でシグナルが高い 15 nMを選択 (ULOQ (3 nM) で8倍mol相当量)
- ✓ 抗体濃度 : バックグラウンドが低く高濃度でシグナルが高い 1 µg/mLを選択

2. 簡易バリデーション

ヒト血漿 (抗凝固剤 : EDTA-2K, 血漿使用量 : 30 µL) を使用して、簡易バリデーションを実施した。

検量線

Calibration range: 1 to 3000 pM (8 points)

Accuracy

Run1: 97.7%~102.0%

Run2: 98.8%~101.0%

Run3: 98.7%~101.0%

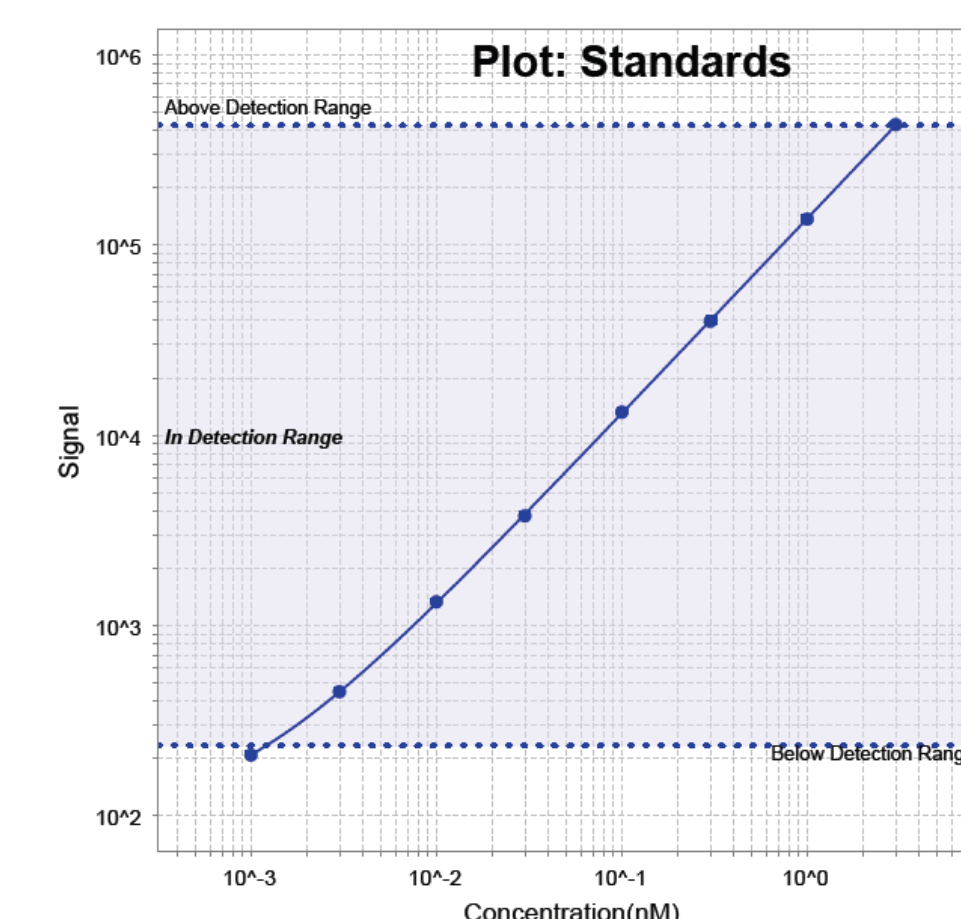


図 3. 検量線図

真度及び精度

QC concentration: 1, 3, 9, 100, 2400, 3000 pM (6 concentrations)

Within-run (n=3, each run)

Accuracy

CV

Total Error

Run1: 95.8%~102.0%

0.7%~6.9%

1.7%~8.9%

Run2: 87.7%~97.1%

0.4%~5.0%

5.4%~13.1%

Run3: 97.1%~110.0%

1.0%~5.5%

1.7%~15.5%

Between-run (total n=9)

Accuracy

CV

Total Error

95.0%~102.0%

2.1%~8.8%

5.1%~11.0%

選択性

Blank: <LLOQ (10 individuals)

Spiked (1 pM): Accuracy: 79.5%~110.0%

Passed with 10 individuals.

各項目について、LBAガイドラインの判断基準を満たした。

結言

Dual-hybridization assayによるヒト血漿中siRNA分析の基礎的データを取得した。

- ✓ 本手法を用いて、定量下限1 pMでダイナミックレンジの広い (3000倍) 分析が精度よく実施できることが示された。
- ✓ GalNAcの結合はHybridizationに影響しなかった。
- ✓ 酵素処理等の検討が不要なDual-hybridization assayを用いることにより、短期間で分析法を確立することが出来た。

Hybridization LBA法は核酸医薬品のバイオアナリシスの発展に寄与する手法になり得ると考える。