

# 核酸医薬品分析における HybridizationのLC-MSへの応用

○丸本 美穂, 春山 祐介, 林 善治, 羽成 優, 砂川 明弘, 高原 栄二  
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

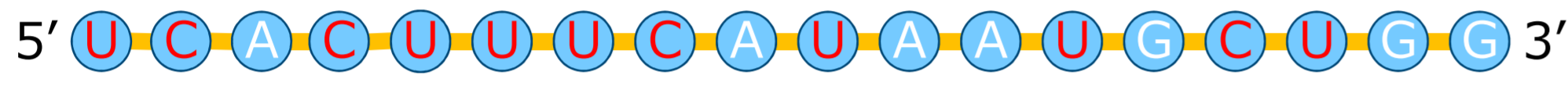
核酸医薬品のバイオアナリシスではLBA法を用いた報告が多いが、近年LC-MS法を用いた報告も増えている。HybridizationとLC-MS法を組み合わせ手法 (Hy-LC-MS法) は、液液抽出法や固相抽出法と比較し、選択性の向上やサンプルの精製度が高まることによる測定系の堅牢性向上が期待される。

本研究では、モデルアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) として Nusinersen (Spinraza) を用い、Hy-LC-MS法を用いたバイオアナリシス分析法開発のアプローチについて実例を交えて報告する。

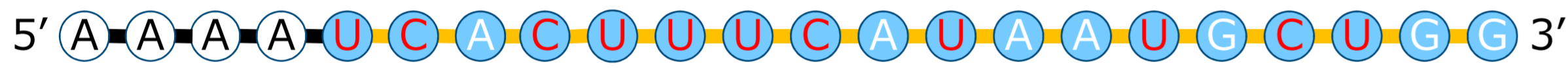
## 材料及び方法

### 材料

測定対象物質： Nusinersen



Internal standard (IS)



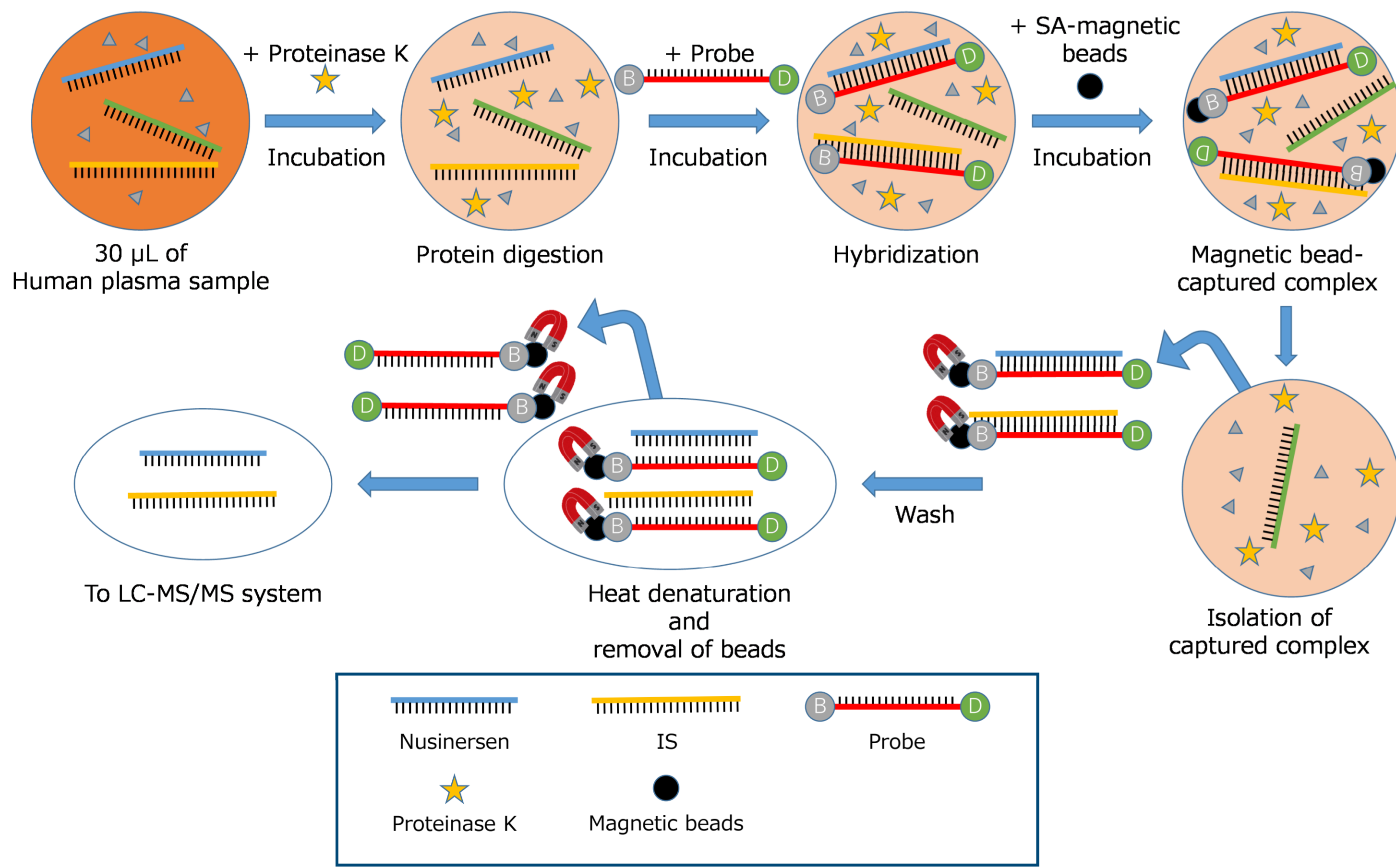
Hybridizationプローブ



	2'-O-methoxyethyl		5-Methyl pyrimidine		DNA
	Digoxigenin*		Biotin		
	Phosphorothioate		Phosphodiester		C6 amino linker

\*: DIGはハイブリダイゼーション反応確認にのみ使用

### 試料処理法



## 結果

### 1. DIGを用いたHybridization反応の確認

Nusinersenが

- ①Hybridizationプローブとハイブリダイズしていること
- ②Magnetic beadsでNusinersen-プローブ複合体が回収できることを確認

方法

- 1.Nusinersen及びHybridizationプローブをハイブリダイズ
- 2.Magnetic beadsで複合体を回収
- 3.酵素処理により未反応プローブを分解
- 4.HPR標識抗DIG抗体を反応させ発色

発色の様子：				
Nusinersen濃度：	0 nM	0.03 nM	0.3 nM	3 nM

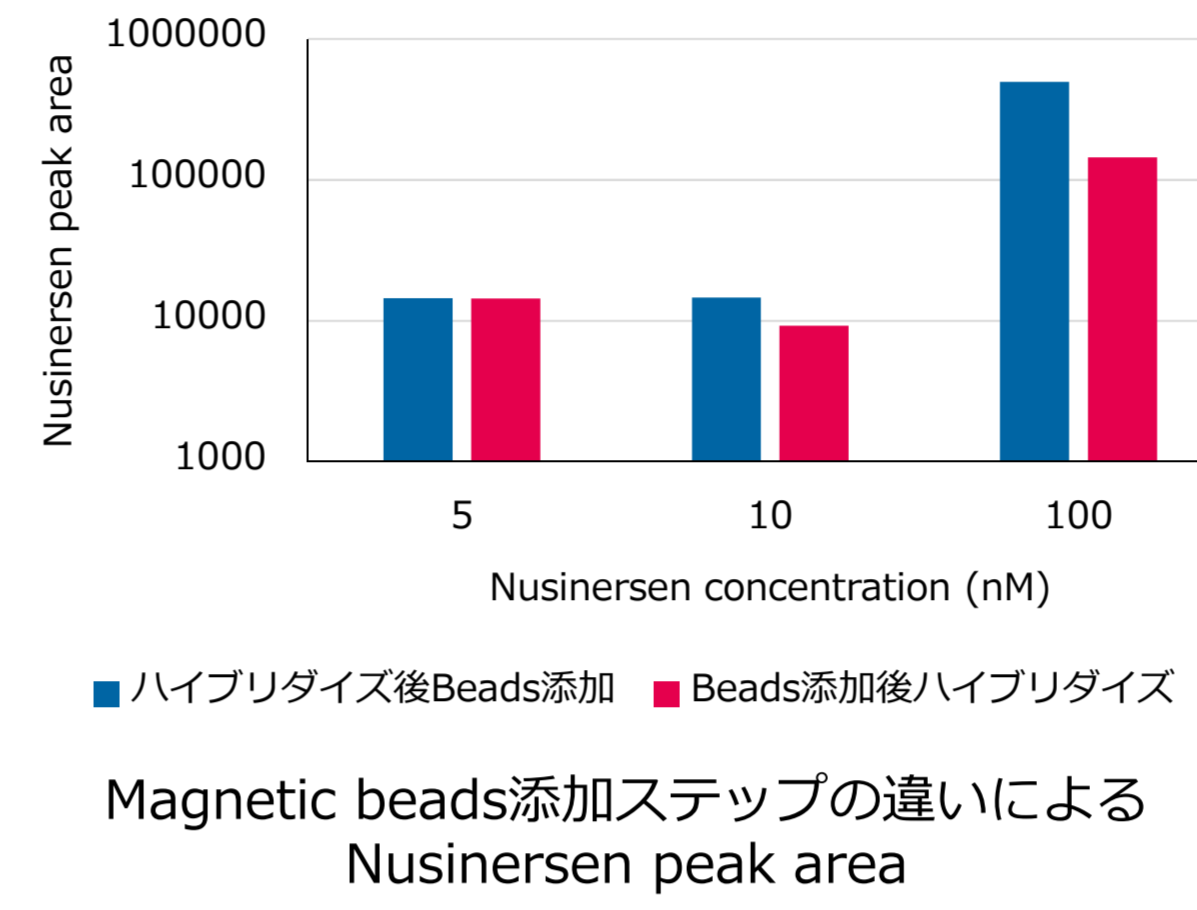
発色によるHybridization反応の確認

Nusinersen濃度が高くなるにつれ青色が濃くなり、Hybridizationプローブでハイブリダイズされ、Magnetic beadsで複合体を回収できていることが確認された。

## 2. Magnetic beads添加ステップ順序の検討

Magnetic beads添加ステップ順序を入れ替えた検討を実施

- ✓ Magnetic beads及びHybridizationプローブを反応後にハイブリダイズ
- ✓ ハイブリダイズ後にMagnetic beads及びHybridizationプローブを反応

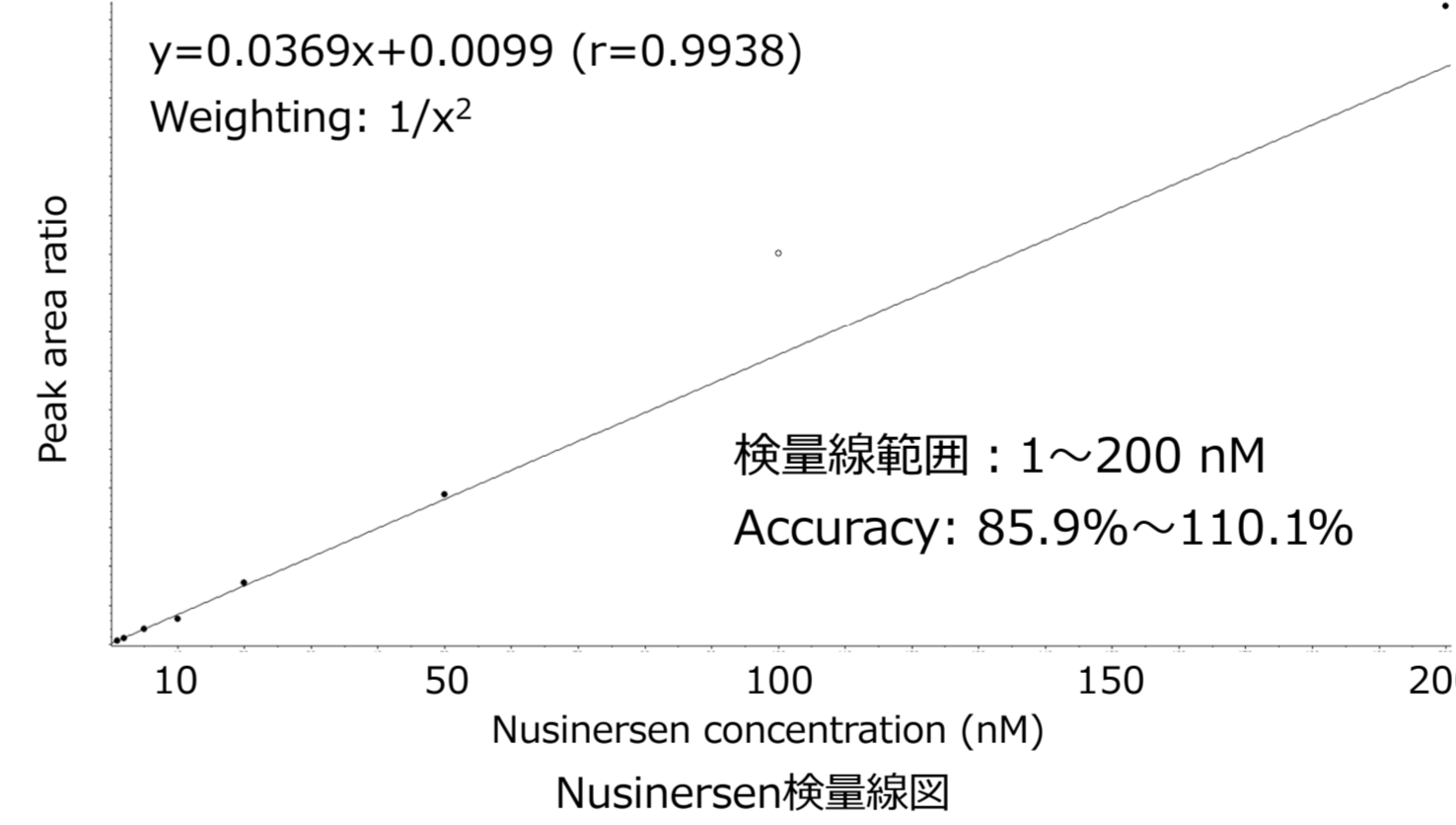
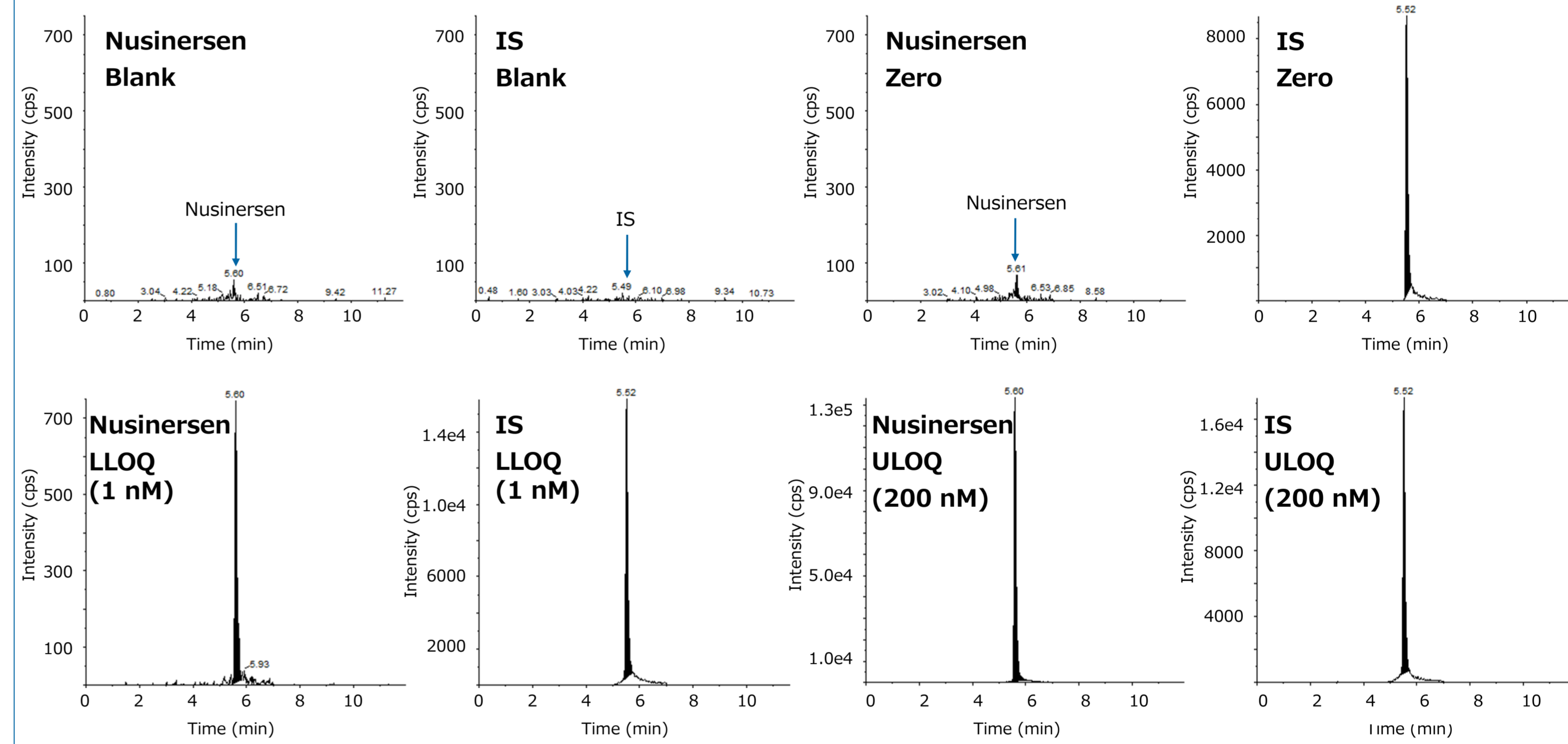


ハイブリダイズ後にBeadsを添加する方がピークエリアが大きかった。

- ✓ プローブがBeads表面上に固相化されるため添加順がハイブリダイゼーション効率に影響を与えたと考えられる
- ✓ スパースーを介してBiotinとプローブ用核酸を結合させることも有用であると考えられる

## 3. クロマトグラム

Nusinersen及びISのクロマトグラムを下記に示した。



Mobile phase: A: Water/HFIP/TEA, B: Methanol  
LC column: ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18 (1.7 µm, 2.1 × 50 mm)  
Column temp.: 50°C  
Flow rate: 0.4 mL/min  
Injection vol.: 20 µL

## 結言

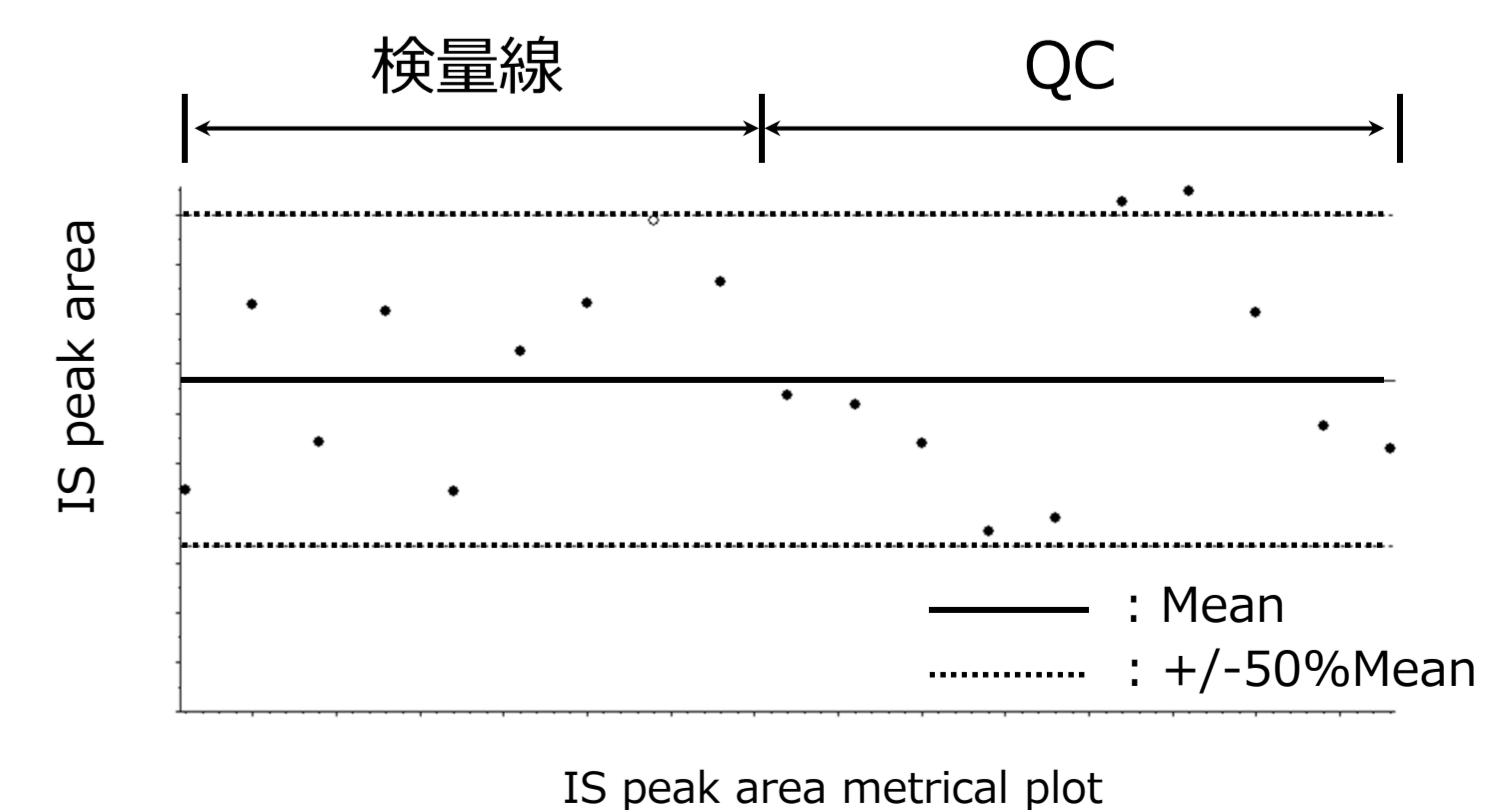
Hy-LC-MS法を用いた分析法開発の検討を行った。作業としては可能であったが、課題が残る結果となった。

### Hybridizationプローブのデザイン

- DIGを付加したプローブの作製は必須ではないが、問題発生個所がBeads回収まで (ハイブリダイズやキャプチャーのステップ) か、それ以降 (変性のステップ) かの切り分けが可能となり、分析法開発時には有用であると考えられた。
- HybridizationプローブのデザインによってはMagnetic beads添加のタイミングが感度に大きな影響を与える可能性がある。

### 課題

- 前処理回収のばらつきが大きい (再現性の不良)
- 感度不足



まだ課題は残るものの、前処理後サンプルの精製度は高い。クロマトグラムのバックグラウンドノイズは低く、測定系の堅牢性向上も見込めることからHy-LC-MS法は核酸医薬品のバイオアナリシスの手法の1つとして有望と考えられる。