

核酸医薬品分析における Dual-hybridization assayの有用性検証

○羽成 優, 小宮 薫, 林 善治, 丸本 美穂, 團野 典行, 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

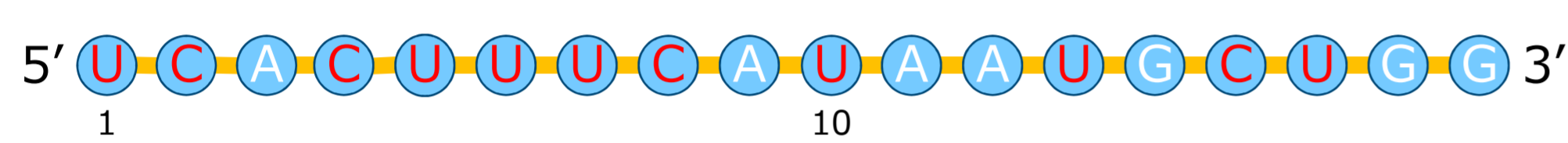
生体試料中の核酸医薬品濃度分析には、LC-MSやHybridization LBA, qPCRなど様々な分析法が開発されているが、Hybridization LBAは他の分析法に比べ高感度分析が可能である点や分析法の構築が容易である点がメリットとして挙げられる。

今回、モデルアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) として Nusinersen (Spinraza) を、検出法として Electrochemiluminescence (ECL) 法を用いて、Dual-hybridization assay (DHA) 及び Cutting assay (CA) の2つの手法を構築した。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

材料

測定対象物質：Nusinersen



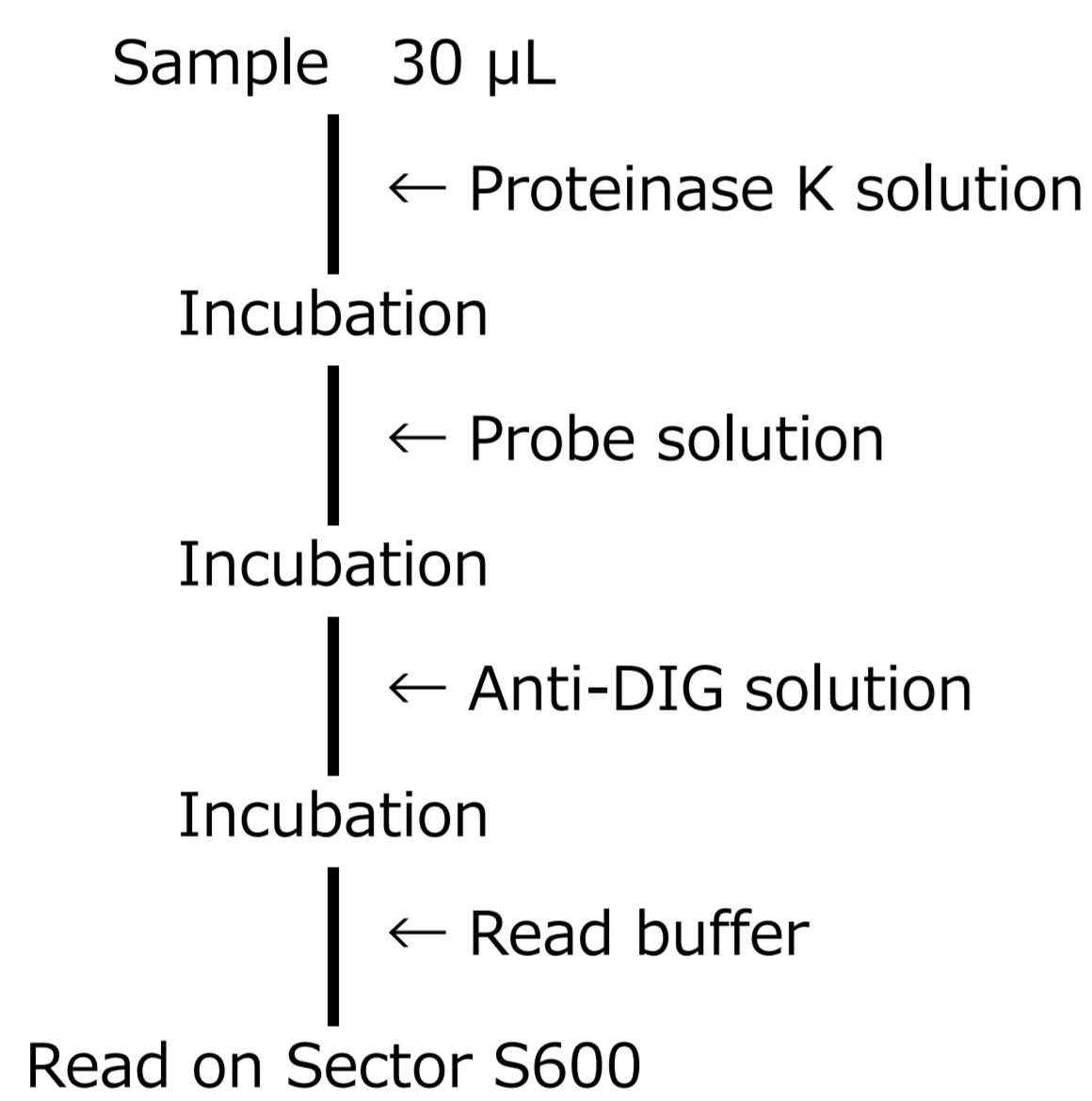
- N 2'-O-methoxyethyl
- N 5-Methyl pyrimidine
- Phosphorothioate

測定用プローブ

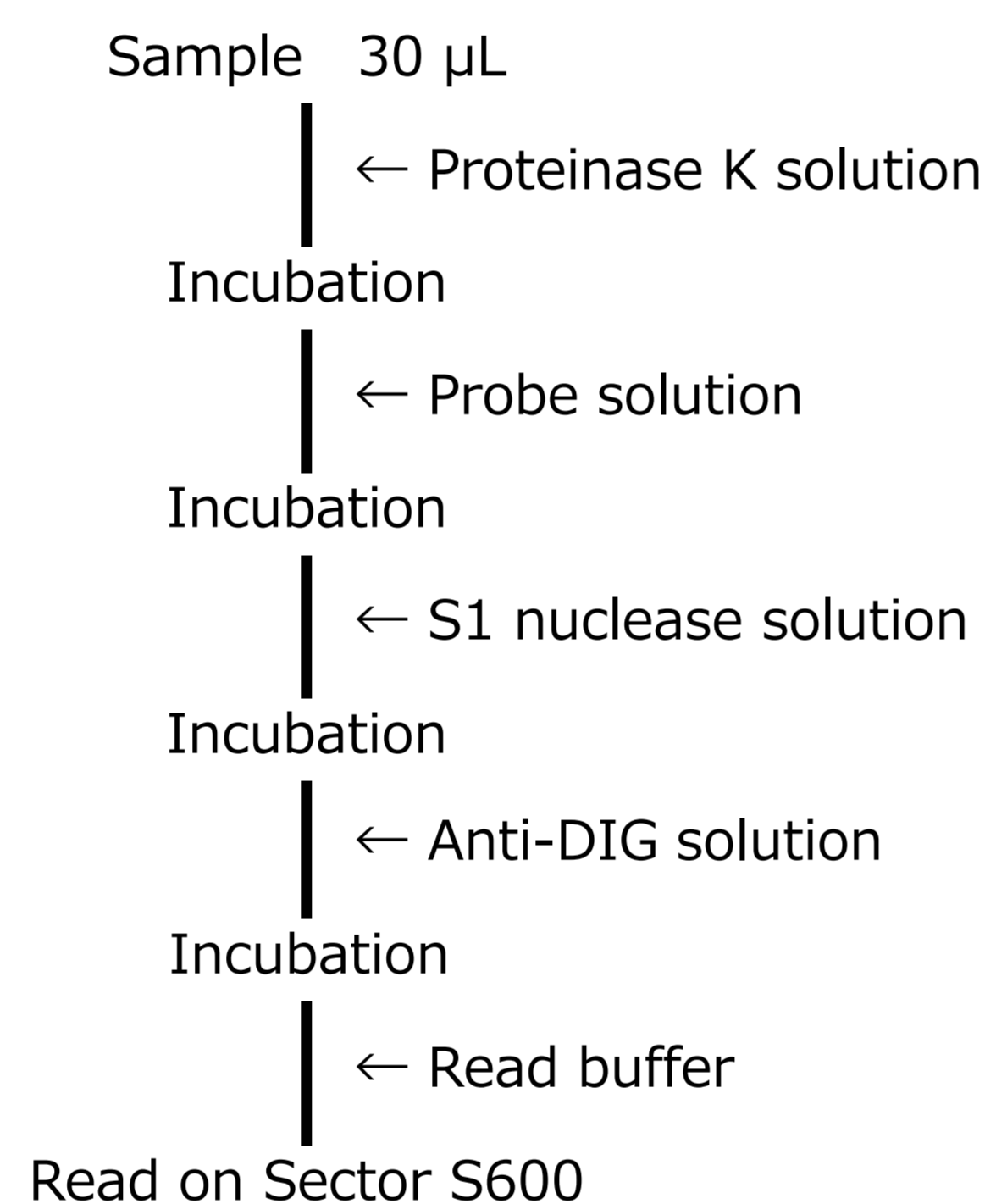
- DHA用プローブ：3'末端にBiotinを付加した8merのCaptureプローブ及び5'末端にDigoxigeninを付加した8merのDetectionプローブ
- CA用プローブ：3'末端にBiotin, 5'末端にDigoxigeninを付加した18merプローブ

試料処理法

DHA用試料処理法



CA用試料処理法



非マトリックス (非生体成分含有溶液) での確認の際は Sample 10 µL で実施し、Proteinase K 処理は実施しなかった。

分析は、電気化学発光法 (ECL: Electrochemiluminescence) を利用した機器である Sector S600 を用いて分析した。

結果

1. マトリックス中ASO結合タンパク質の影響低減検討

- ASOの多くはヌクレアーゼ耐性の獲得や細胞内への取り込み効率改善を目的として、ホスホロチオエート修飾 (S化) されることが多い。S化されたASOはタンパク質結合率が高いことが知られている。
- ヒト血漿と比較し、サル血漿中にはASO結合タンパク質が高濃度に存在するという報告も見られる。

サル及びヒト血漿を用い、感度の違いを確認するとともに、Proteinase K 処理による影響低減の確認を行った。

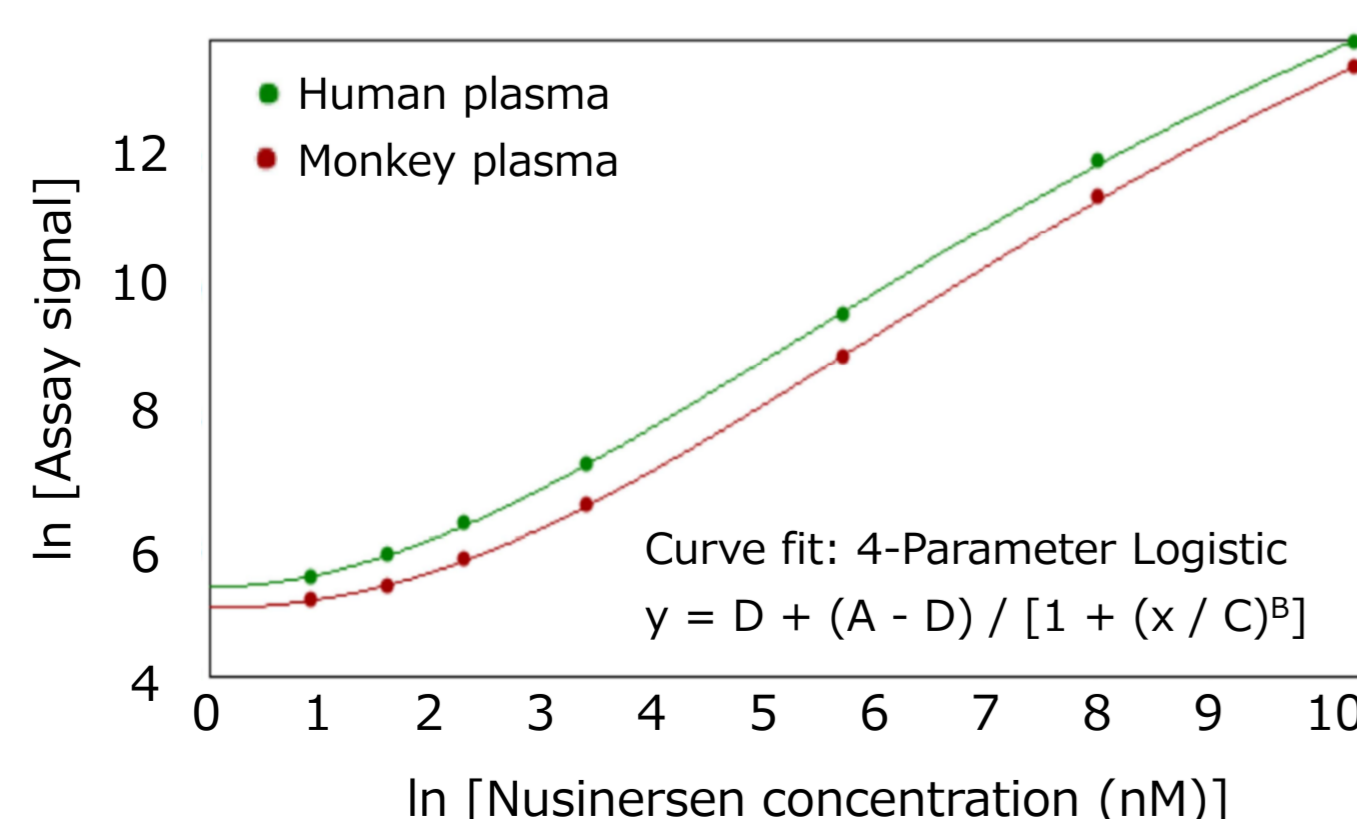


図1. 検量線 (Proteinase K処理なし)

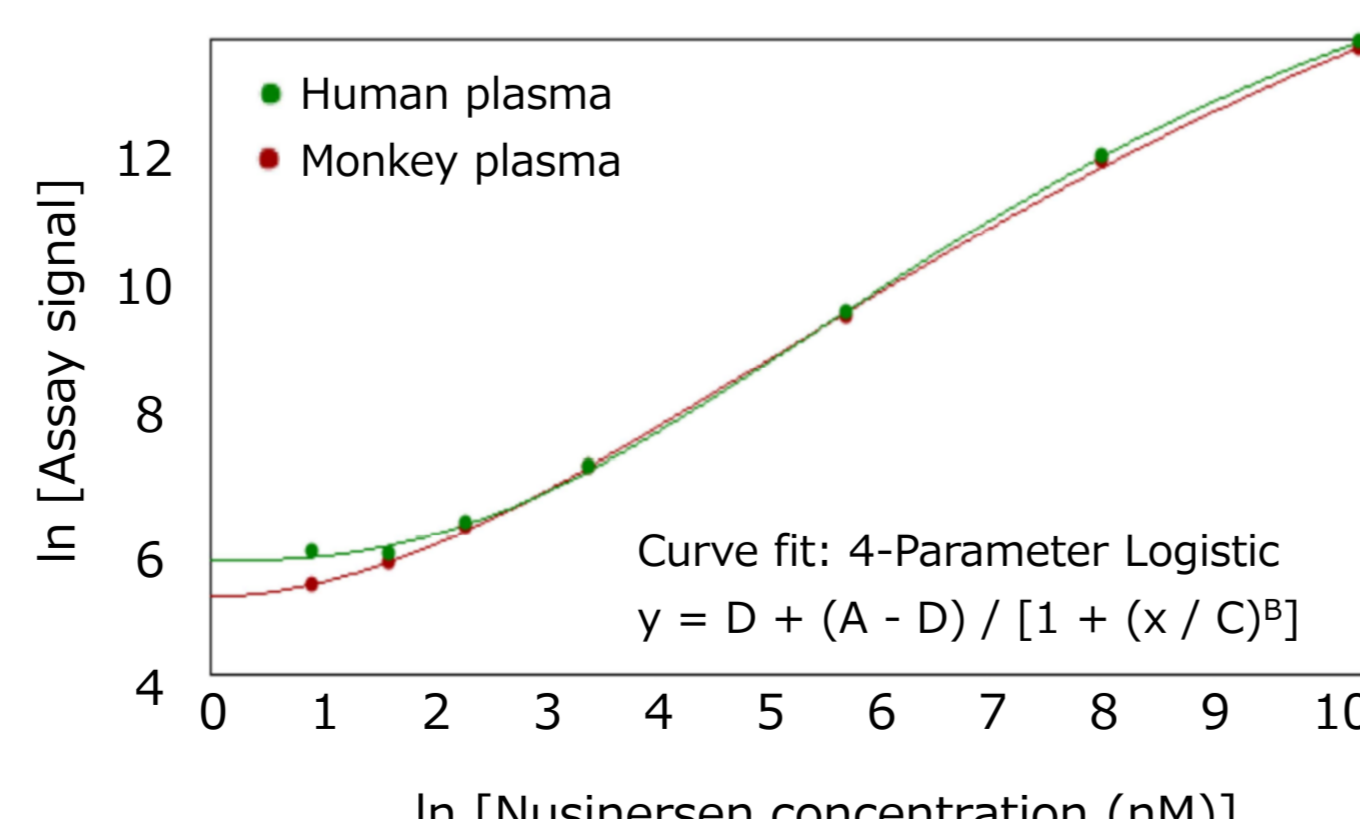


図2. 検量線 (Proteinase K処理あり)

Proteinase K 処理をしない場合、サル血漿で Signal 値の低下がみられた。Proteinase K 処理を追加することにより、ヒト血漿とサル血漿で Signal 値の差はなくなり、結合タンパク質の影響を低減することが出来た。

2. 簡易バリデーション

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

バリデーション項目	Dual-hybridization assay	Cutting assay
検量線	0.005~10 nM Accuracy: 97.3%~103.0%	0.0025~3 nM Accuracy: 96.7%~105.0%
真度及び精度	0.005, 0.01, 0.3, 5, 10 nM	0.0025, 0.005, 0.1, 1.5, 3 nM
Intra-assay	Accuracy: 95.6%~121.2% CV: 0.6%~4.6% TE: 2.6%~25.8%	Accuracy: 95.3%~107.2% CV: 0.7%~9.0% TE: 4.4%~16.2%
Inter-assay	Accuracy: 96.8%~112.8% CV: 2.7%~8.9% TE: 5.0%~21.7%	Accuracy: 102.0%~113.2% CV: 3.0%~7.4% TE: 7.2%~20.6%
選択性	0, 0.005 nM Blank: <LLOQ (10個体) Spiked: 30.8%~101.6% (9/10個体でPass)	0, 0.0025 nM Blank: <LLOQ (10個体) Spiked: 88.0%~143.6% (9/10個体でPass)

いずれの手法もLBAガイドラインの判断基準を満たした。

感度に大きな差はなかった。

3. 代謝物の影響確認

非マトリックス条件にて、代謝物が分析系に及ぼす影響を確認した。

Nusinersen 分析と同一の測定用プローブを使用し、Nusinersen 及び代謝物を個別に分析した。Nusinersen の Signal 値を 100% とした際の、個々の代謝物の Signal 値を %Nusinersen として求めた。

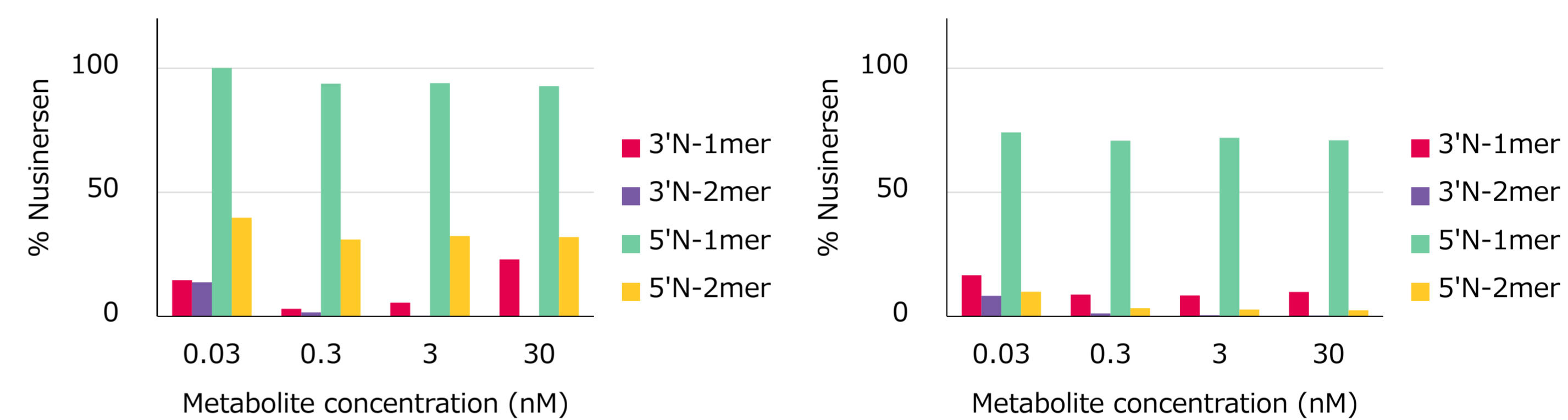


図3. DHAにおける代謝物の影響確認

図4. CAにおける代謝物の影響確認

いずれの手法でも、一般に代謝を受けやすいと言われている3'側代謝物の交差反応性が低い結果となった。

DHA: 3'-N-1merは3-23%, 5'-N-1merは93-100%の交差反応性を示した。代謝により欠損する塩基がプローブとの親和性に大きく影響すると考えられる。

CA: 3'-N-1merは7-17%, 5'-N-1merは69-74%の交差反応性を示した。5'-N-1merではS1 nucleaseの反応が進行していないと考えられる。Biotin側にスパーサーを入れることで反応が促進される可能性もある。

4. 各手法に対する所感

	Dual-hybridization assay	Cutting assay
Pros	<ul style="list-style-type: none"> 作業時間がCAより1.5時間程度短縮できた 系構築が容易でCAよりトータルコストを抑えることが出来た 	<ul style="list-style-type: none"> DHAより感度がよい結果となった プローブの準備は1種類のため、管理が楽であった
Cons	<ul style="list-style-type: none"> 2種類のプローブの準備が必要で、それぞれ合成量が異なるため、管理が煩雑となった 	<ul style="list-style-type: none"> 酵素処理が追加となることにより、作業時間、検討期間が長くなった 酵素のロット間差や劣化の不安

結言

今回、Dual-hybridization assayの核酸医薬品分析における有用性を検証した。

Dual-hybridization assayについて

一般的にDHAはASOのような鎖長の短い核酸医薬品の分析には不向きな手法であると認識されている。ASOの配列にも依存すると思われるが、今回の結果からは16mer以上の長さであれば測定系の構築を検討する価値はあると考えられた。

結合タンパク質

血漿試料についてもProteinase K 処理を追加することにより、結合タンパク質の影響を低減することが出来た。本処理は、ADAの分析系への影響の低減にも有用であると考えられる。

代謝物の影響

いずれの手法も影響を受ける結果となり、両方で顕著な差は見られなかった。DHAについては欠損する塩基により影響の度合いが異なることが示唆された。

今回の結果から、ASO分析についてDual-hybridization assayはCutting assayに劣らないスペックを有しており、生体試料中ASO分析に有用な手法であると考えられる。