

核酸医薬品のバイオアナリシスにおける LC-FL 法の適応

○砂川 明弘, 羽成 優, 林 善治, 丸本 美穂, 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

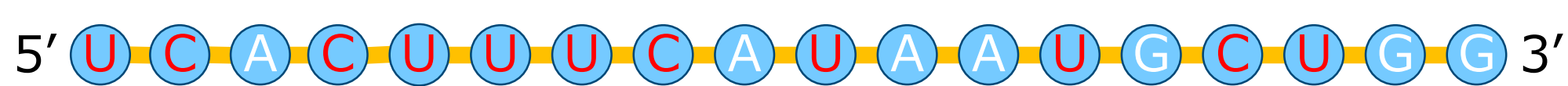
核酸医薬品における LC-FL 法は、蛍光プローブをターゲット核酸医薬品にハイブリダイズさせ、陰イオン交換液体クロマトグラフィーを用いて蛍光分析する手法である。本手法は、LC-MS が苦手とする鎖長の長い核酸もターゲットにすることができ、LC-MS の補完的使い方が可能となると考えられる。

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、LC-FL 法を用いた核酸医薬品バイオアナリシスの基礎的データを取得した。以下、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

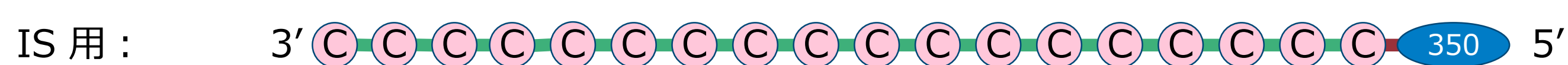
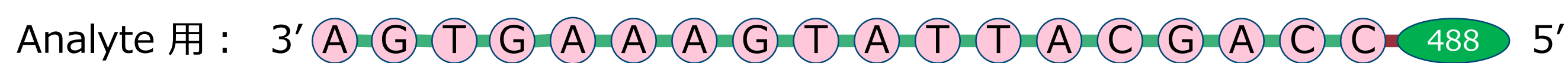


Internal standard (IS)



IS 候補として、ホスホロチオエート化 (S 化) した Poly-G も準備したが、S 化した Poly-G では適切なピークを得ることが出来ず、今回は上記の Poly-G を使用することとした。

測定用 PNA プローブ



Analyte 用 PNA プローブ及び IS 用 PNA プローブに付加する蛍光物質として、図1 に示すような励起波長ができるだけ被らない 2種類を準備した。

	2'-O-methoxyethyl		5-Methyl pyrimidine		DNA		PNA
	Phosphorothioate		Phosphodiester		Peptide bound		C6 amino linker
	488 Alexa Fluor 488		350 Alexa Fluor 350				

試料処理法

- Sample 30 µL
 - ← IS
 - ← Proteinase K solution
- Incubation
 - ← Probe solution
- Incubation
 - ← Centrifuge
- HPLC-FL system

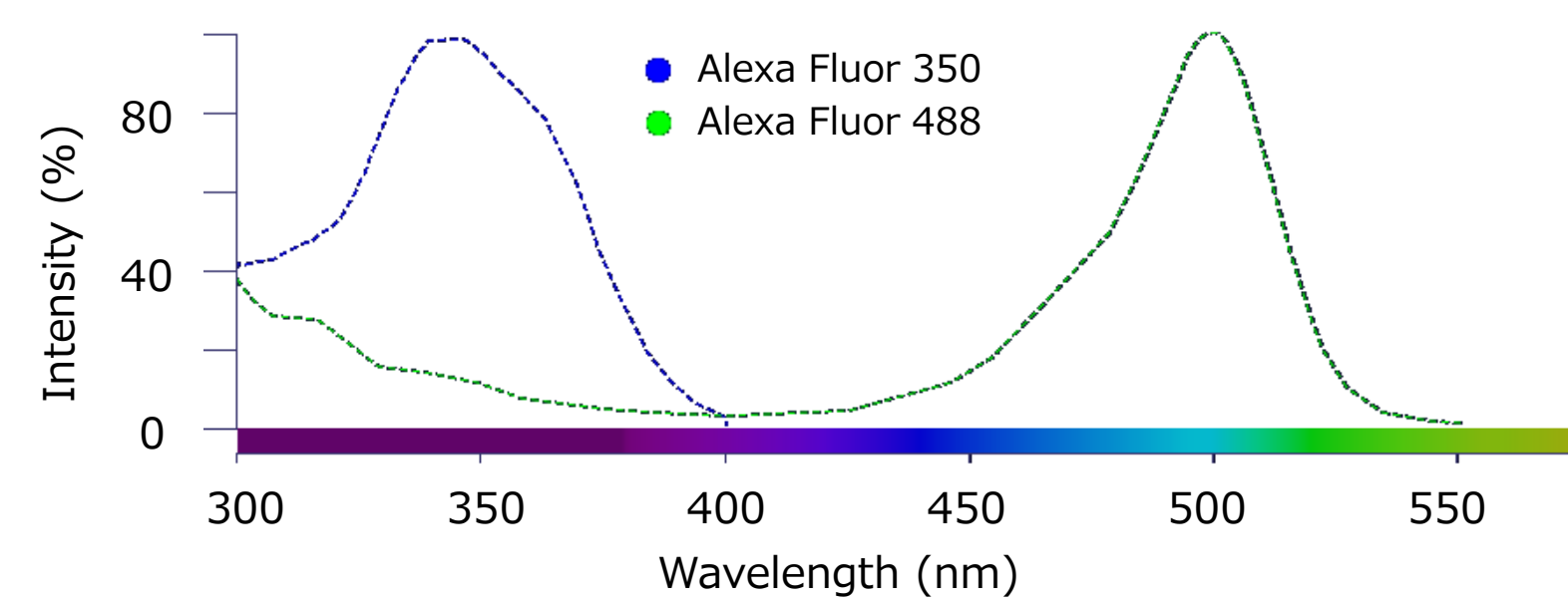


図1. 蛍光物質の Excitation

分析機器条件

LC 条件

- 移動相： A : Tris-Buffer with EDTA/Acetonitrile
B : NaClO₄ in Mobile phase A
グラジエント条件にて分析した。
- 分析カラム： ポリマータイプの強陰イオン交換カラム
 - ✓ Diameter: 4 mm
 - ✓ Length: 250 mm
 - ✓ Particle size: 8 µm

検出器条件

- 測定波長： Analyte : Ex 490 nm, Em 525 nm
IS : Ex 346 nm, Em 442 nm

結果

1. 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。

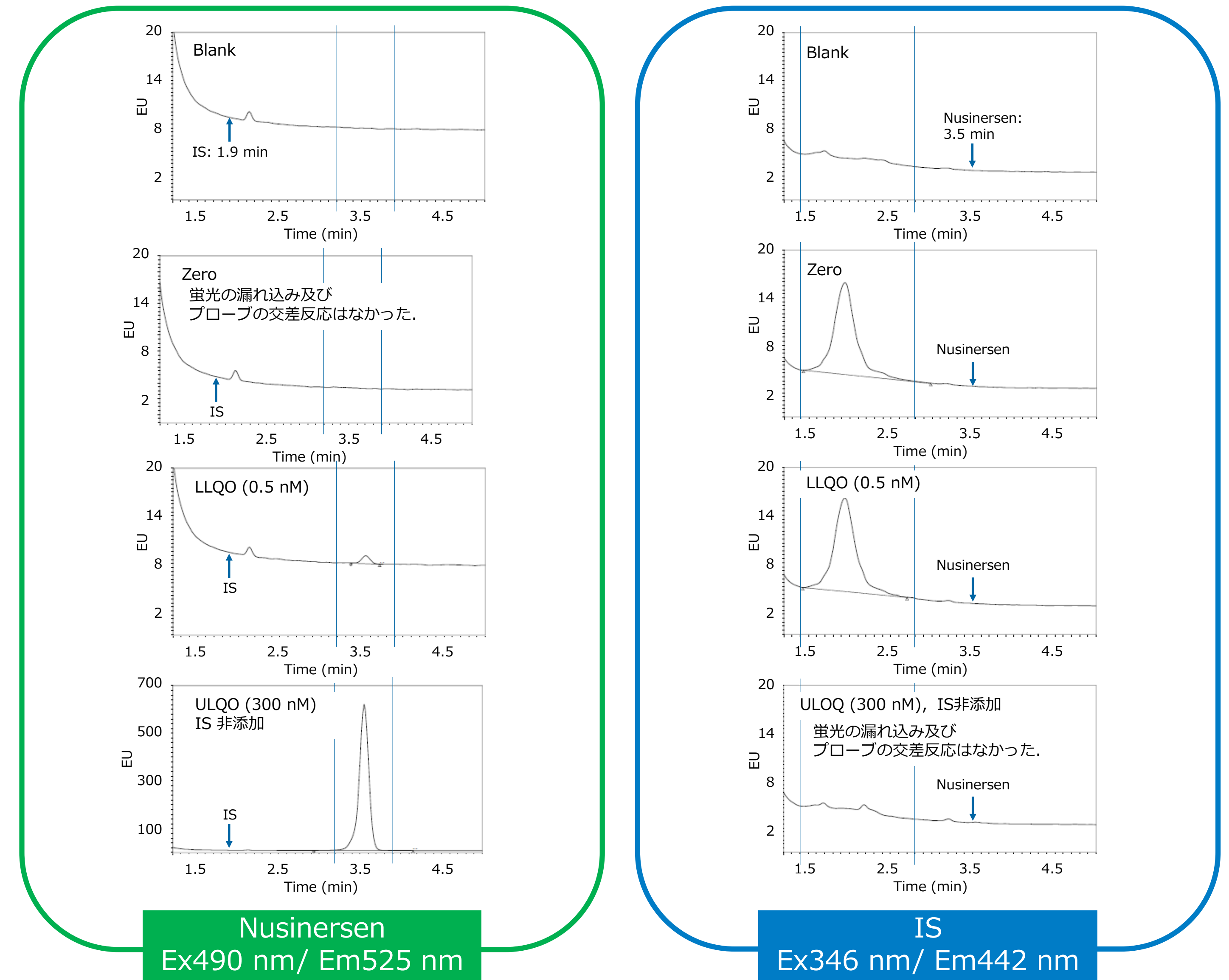
バリデーション項目	結果
検量線	0.5~300 nM Accuracy : 85.7%~114.0%
真度及び精度	0.5, 1, 15, 225 nM
Intra-assay	Accuracy : 86.0%~101.3% (ISなし : 92.3%~110.0%) CV : 5.9%~13.5% (ISなし : 6.5%~14.0)
Inter-assay	Accuracy : 95.6%~104.4% (ISなし : 98.9%~108.0%) CV : 5.3%~13.7% (ISなし : 8.9%~12.1%)

クロマトグラフィーガイドラインの判断基準を満たした。

Nusinersen のエリア値のみ (ISなし) で評価を行った場合、Accuracy が高くなる傾向であった。

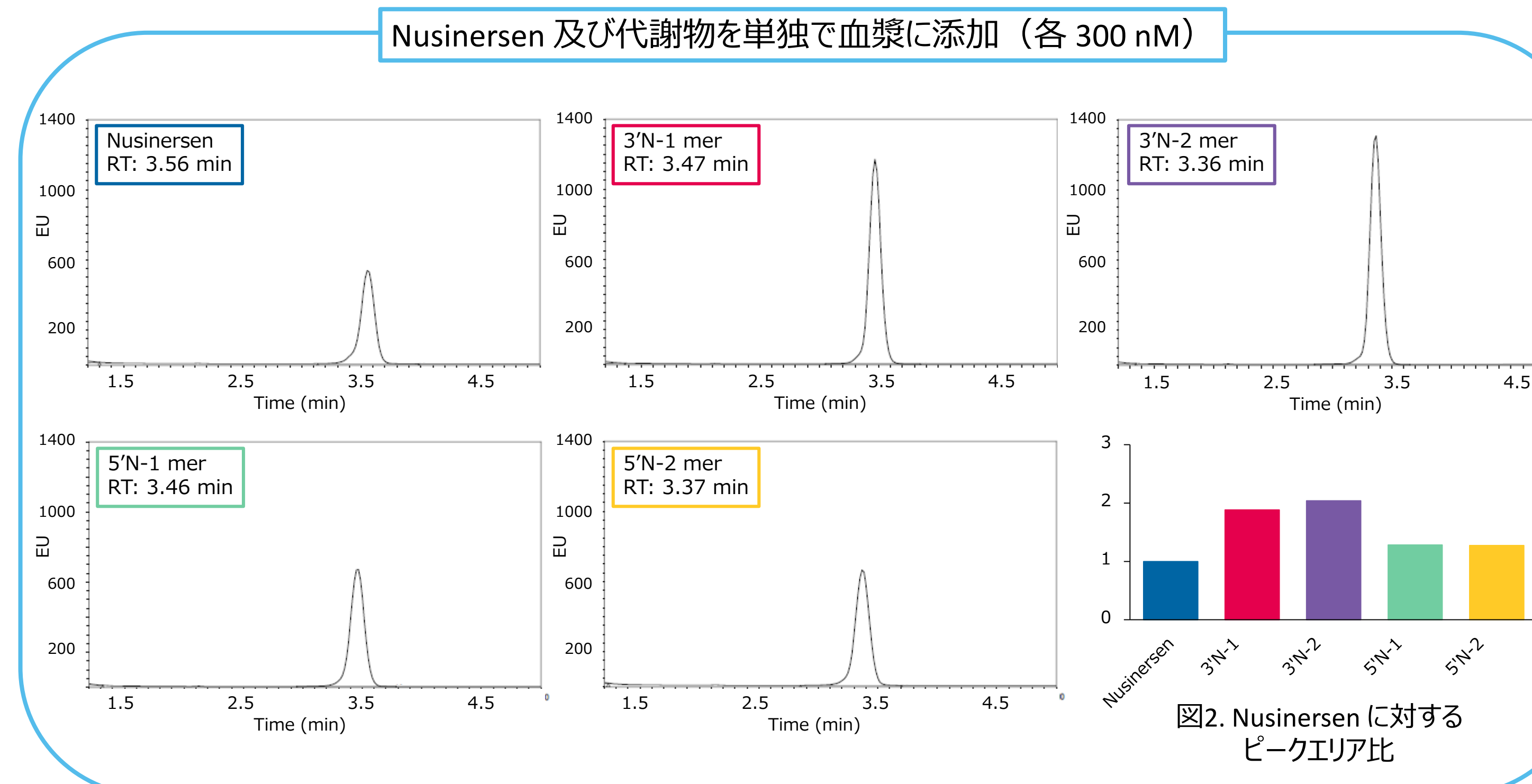
2. クロマトグラム

Nusinersen 及び IS のクロマトグラムを下記に示した。



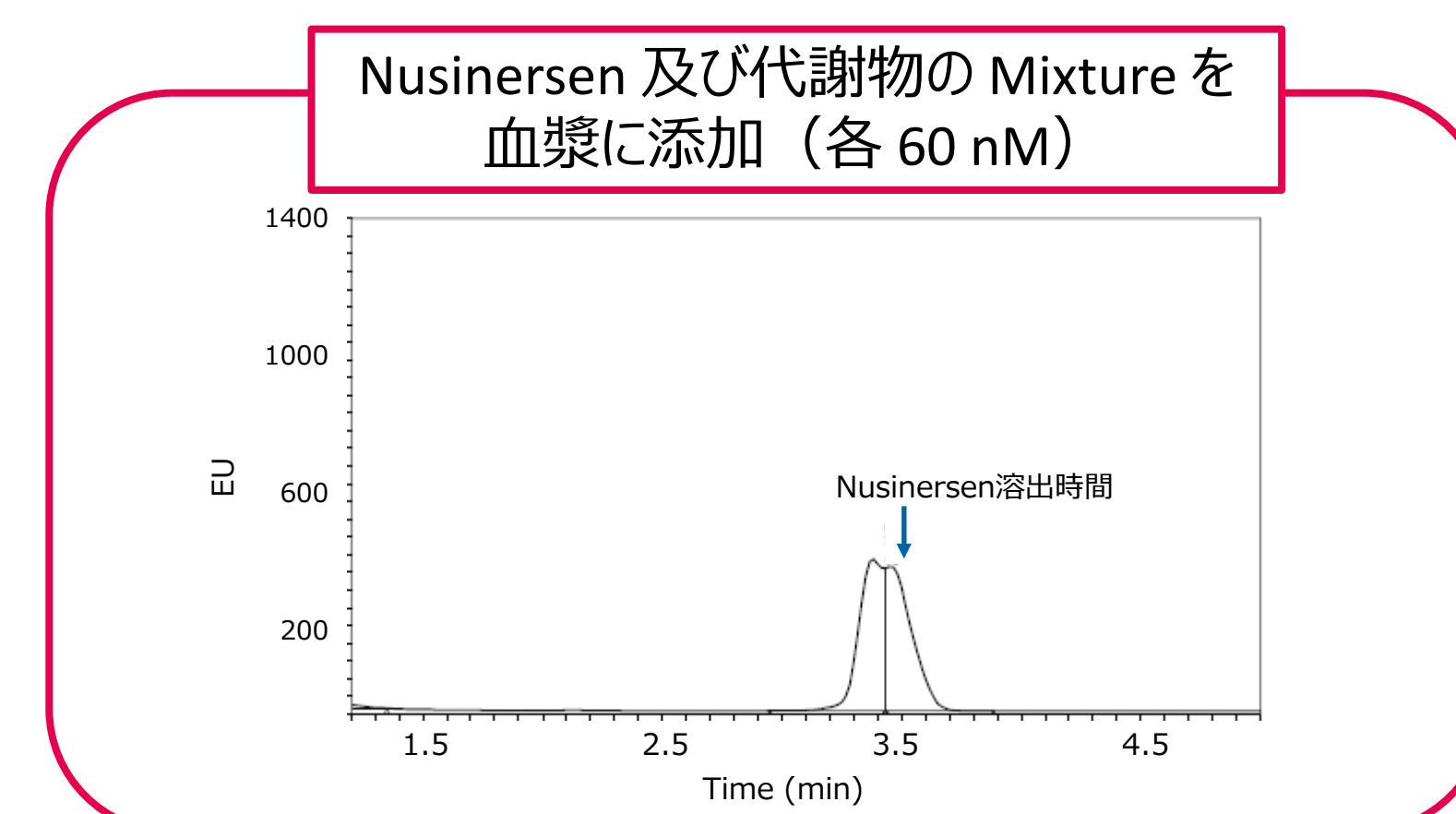
3. 代謝物の影響の確認

Nusinersen 及び代謝物 4種 (3'N-1mer, 3'N-2mer, 5'N-1mer, 5'N-2mer) を分析し、本 LC 条件における代謝物の影響を確認した。



3'N-1, 3'N-2mer では Nusinersen よりピークエリアが大きかった。
5'N-1, 5'N-2mer では Nusinersen と同程度のピークエリアとなった。

- ✓ PNAプローブは、塩基の欠損に関してDNA プローブより insensitive であると考えられた。
- ✓ 今回の手法を用いて大きな代謝物 (未変化体からの欠損が少ない代謝物) の検出は可能であるが、未変化体と 3'側代謝物の検出効率に差がある結果となっており、プローブ設計や反応条件の改善が必要と考える。



今回の LC 条件では代謝物の分離は出来なかった。

- ✓ 大きな代謝物を定量するためには、さらなる分離条件の検討が必要である。

結言

イオン交換クロマトグラフィーによる LC-FL 法の基礎的データ取得を行った。

- ✓ 核酸医薬品のバイオアナリシスにおける蛍光プローブを用いた LC-FL 法は、選択肢の 1つとなることが示された。
- ✓ 内部標準法での定量も可能であることが示されたが、IS を選択 (合成) する際には、配列だけでなく蛍光プローブの測定波長にも注意を払う必要がある。
- ✓ 本手法で大きな代謝物 (未変化体からの欠損が少ない代謝物) を検出可能であることが示された。しかし、代謝物の定量的な議論を行うためには、プローブ設計や反応条件に注意を払う必要がある。