

Hybridization法の自動前処理装置を用いたLC-MS/MS法によるオリゴ核酸の定量分析及び従来法による定量分析との比較

○水落 正慶, 浅野 慎介, 羽成 優, 林 善治, 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：水落 正慶 (e-mail to masayoshi-m.cs@cmicgroup.com)

緒言

近年、新規モダリティとして核酸医薬品の開発に注目が集まっている。従来は核酸の特性である、相補鎖との二重らせん構造形成を利用したHybridizationを用いたLBA法による定量が主流であったが、ここ数年に承認された核酸医薬品においてはLC-MS/MS法による定量の報告も増えている。

LC-MS/MS法による核酸医薬品定量の前処理では液々抽出法 (LLE) や固相抽出法 (SPE) が多く用いられている。また、LBA法で用いられるHybridizationを前処理に応用したLC-MS/MS法による定量も報告されている。今回、我々は核酸医薬品のモデル化合物としてヌシネルセンを使用し、Hybridizationによる前処理法を自動前処理装置に応用したLC-MS/MS法による定量を実施した。同時に従来法を用いたLC-MS/MS法による定量も実施したのでこれらの結果を比較し、LC-MS/MS法の核酸定量における自動前処理装置のメリット/デメリットや効率についての評価を報告する。

材料及び方法

1. 材料

測定対象物質：Nusinersen

T(m)^5(m)^A(m)^5(m)^T(m)^T(m)^T(m)^5(m)^A(m)^A(m)^T(m)^A(m)^A(m)^T(m)^G(m)^5(m)^T(m)^G(m)^G(m)

内標準物質：Nusinersen+2mer

a^a^T(m)^5(m)^A(m)^5(m)^T(m)^T(m)^T(m)^5(m)^A(m)^A(m)^T(m)^A(m)^A(m)^T(m)^G(m)^5(m)^T(m)^G(m)^G(m)

小文字：DNA (m)：MOE修飾
^：ホスホチオエート修飾 5(m)：メチルシチジン-MOE修飾

Captureプローブ

Nusinersenに対するDNA相補鎖 (18mer) の5'末端にBiotinを付加

2-1. 前処理法 (Hybridization)

PCRプレート

- ← 血漿試料 30μL
- ← IS溶液
- ← Proteinase K + Buffer

インキュベーション (60℃)

- ← Captureプローブ溶液

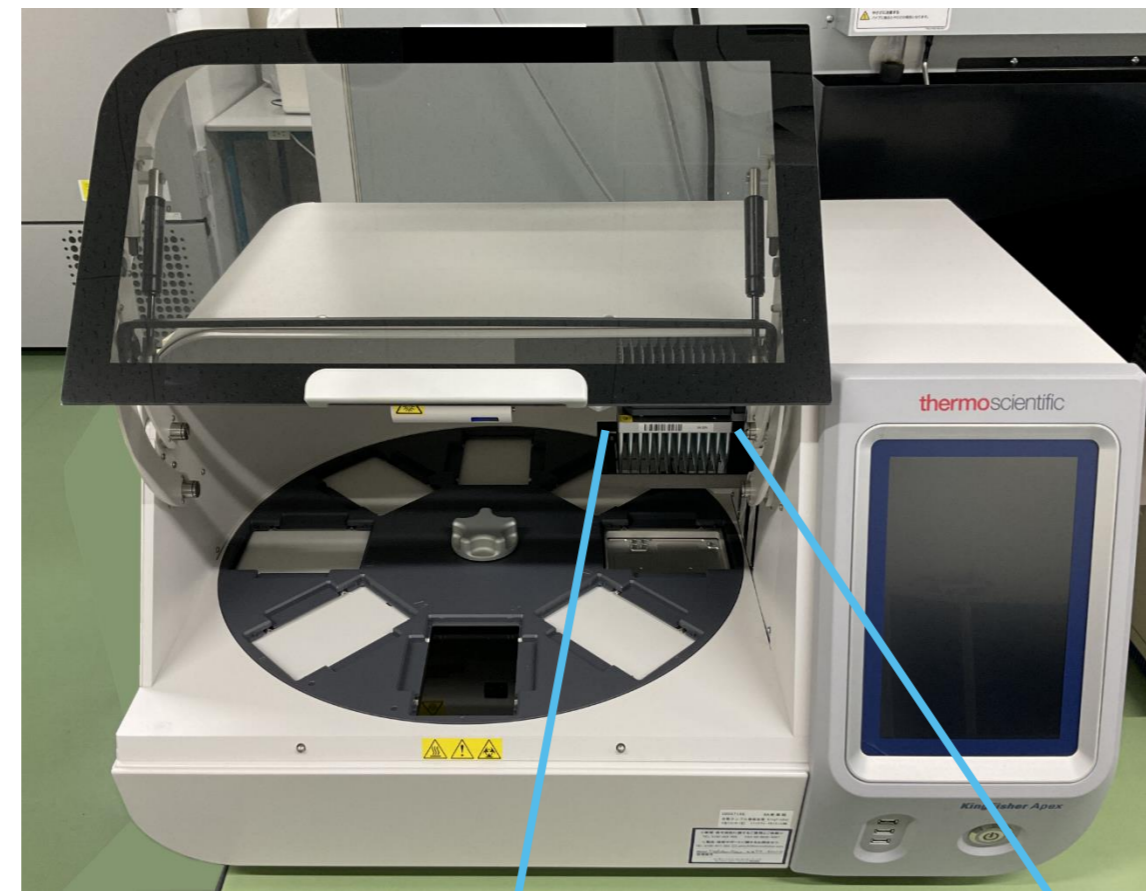
インキュベーション (95℃ → 37℃ → 4℃)

【King fisher自動前処理装置】

- ① マグネットビーズへの固定化
- ② 洗浄×3
- ③ 溶出 (マグネットビーズからの脱離)

溶出液を移動相Aと混和してLC-MS/MSに注入

自動前処理装置：KingFisher Apex System

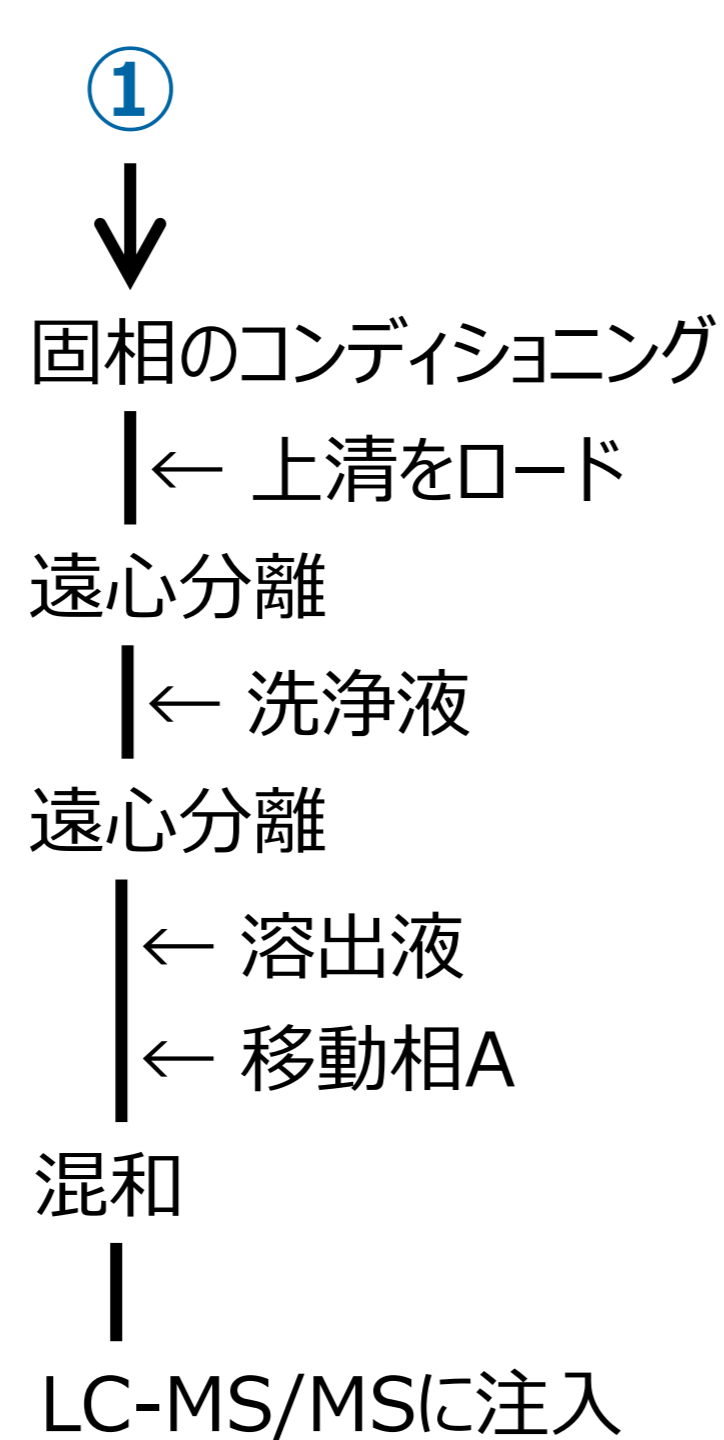
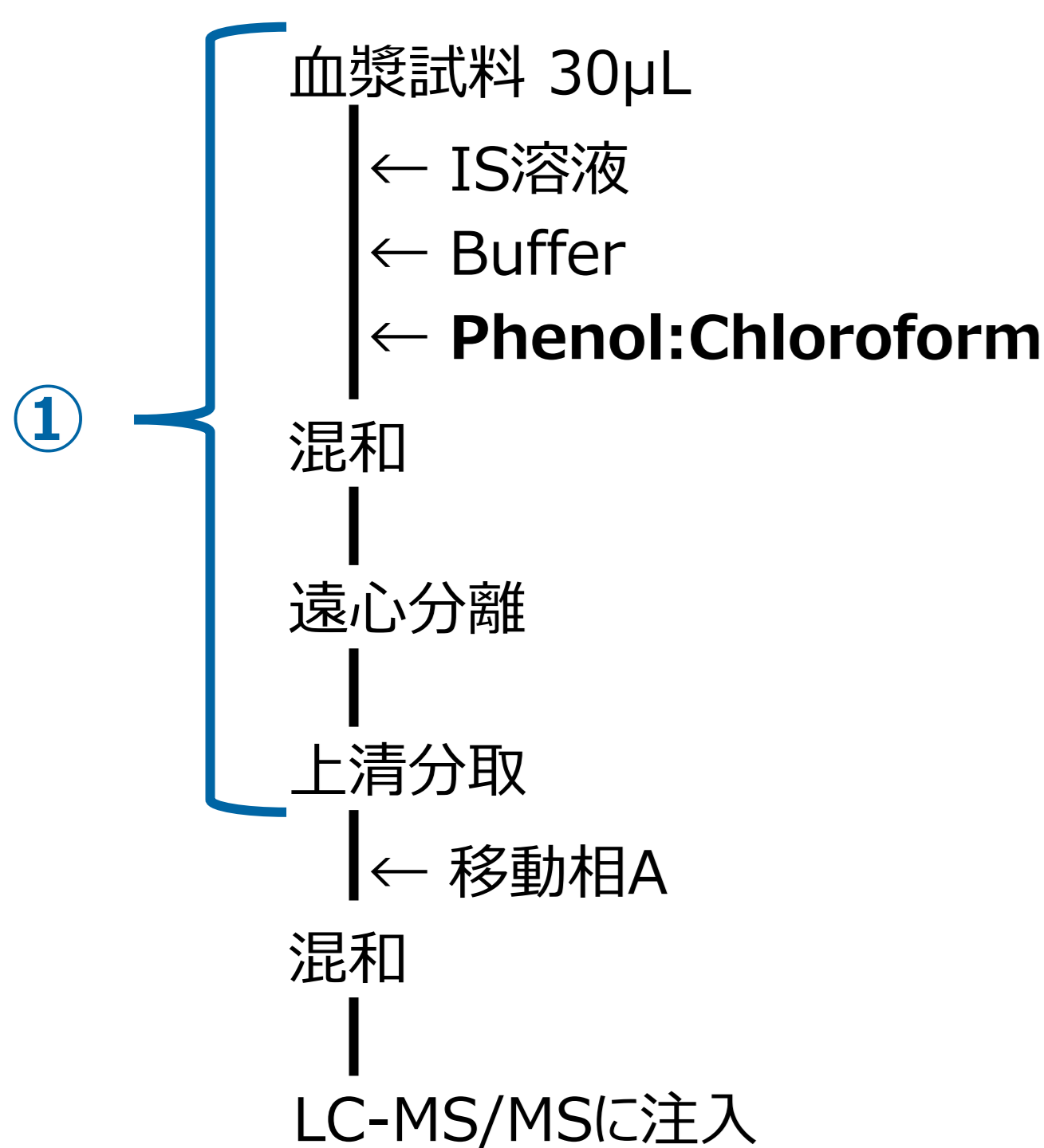


マグネット部

2-2. 前処理法 (液々抽出・固相抽出)

【フェノール・クロロホルム抽出】

【フェノール・クロロホルム抽出 + 固相抽出】



3. 分析条件 (LC-MS/MS)

LC条件 <NANOSPACE NASCA2 (OsakaSoda) >

カラム：Accura Triart C18 1.9μm, 2.1×100mm (YMC)

移動相A：400mM-HFIP, 15mM-TEA

移動相B：メタノール

カラム温度：60℃

MS/MS条件 <Triple Quad 6500+ (SCIEX) >

Polarity：Negative

Scan mode：MRM (SRM)

Nusinersen：[M-8H]⁸⁻, m/z 889.9 → m/z 94.9

IS：[M-8H]⁸⁻, m/z 971.7 → m/z 94.9

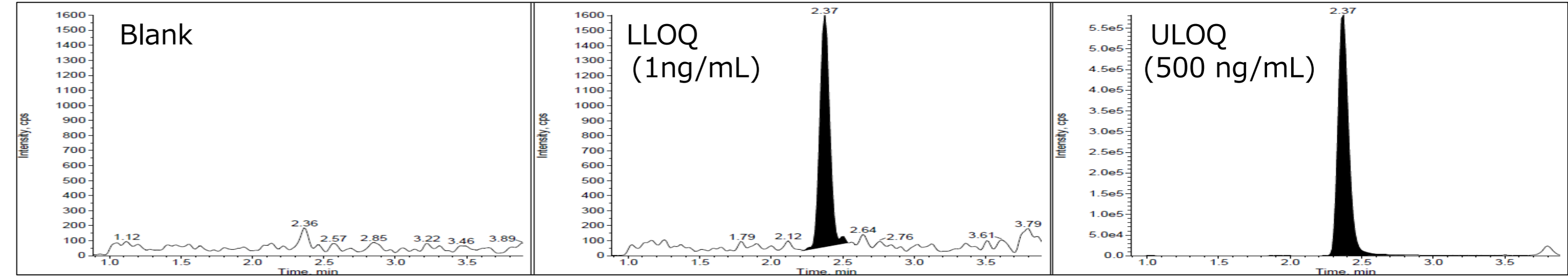
Gradient Table

Time (min)	Flow Rate (μL/min)	A%	B%
Initial	400	80	20
0	400	80	20
3	400	54	46
3.5	400	54	46
3.5	400	10	90
4	400	10	90
4	400	80	20
6	400	40	60
6	400	80	20

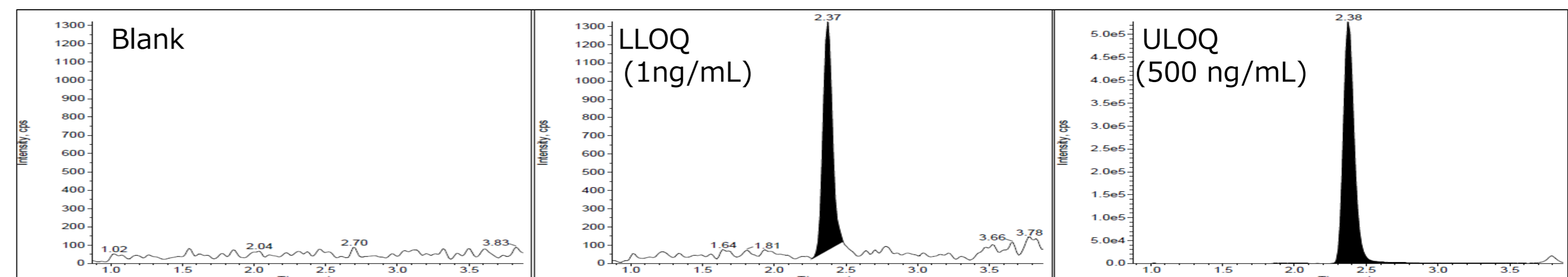
結果

1. クロマトグラム

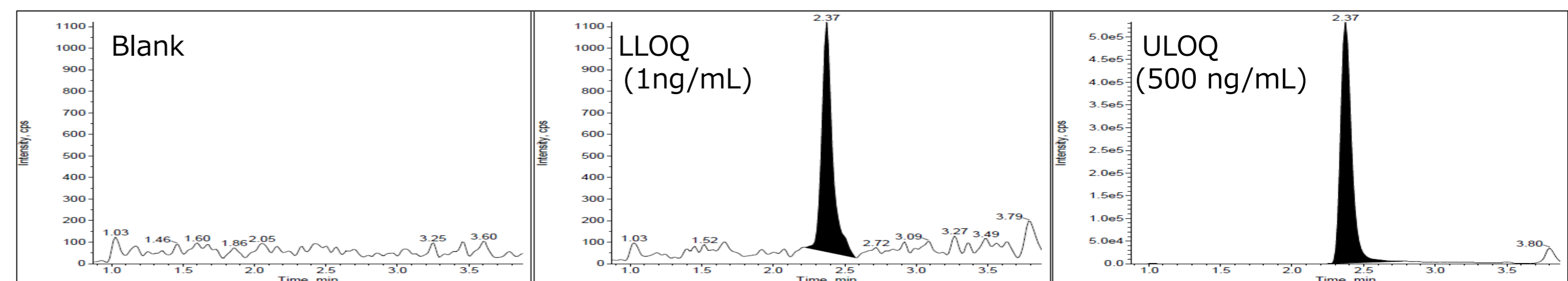
LLE：フェノール・クロロホルム抽出



LLE+SPE：Oasis HLB μElutionプレート



Hybridization：KingFisher Apex System



2. 検量線

血漿試料中濃度 1~500 ng/mLの範囲で検量線を各前処理法で作成・分析して比較した。

Method	Accuracy(%)	Slope	Y-Intercept	r
LLE	87.7 ~ 114.0	0.0443	0.00461	0.9967
SPE	86.3 ~ 107.9	0.0454	0.00729	0.9975
Hybridization	85.9 ~ 108.6	0.0656	0.000725	0.9971

3. 再現性

4濃度のQC試料 (n=3) を使用して再現性 (真度及び精度) を比較した。

Method	Accuracy(%)	CV(%)
LLE	91.2 ~ 108.3	2.1 ~ 9.6
SPE	92.2 ~ 114.3	2.9 ~ 8.4
Hybridization	86.3 ~ 108.0	0.9 ~ 8.8

✓ クロマトグラムのピーク形状に差は認められず、いずれの前処理法からもバリデーションガイドラインの規準を満たす検量線及び再現性が得られ、結果に大きな差は認められなかった。

4. メソッド間の比較

前処理法	LLE	SPE	Hybridization
Total 処理時間	2hr 20min	2hr 40min	4hr 30min
Total 操作時間	1hr 20min	1hr 40min	45min
必要な試薬	フェノール/クロロホルム溶液	Loading buffer, Wash buffer, Elution buffer	専用のCapture プローブ, Proteinase K, マグネットビーズ
必要な機器	微量高速遠心機 (20,000×g以上)	バキュームマニフォールド, プレート用遠心機または加圧装置	マグネツトセパレーター, 加温シェーカーまたはサーマルサイクラー
コスト	低い (一般的な試薬のみ)	高い (主に固相の費用)	比較的安価: 個々のプローブ等は費用が掛かるが、一度の合成で多検体を前処理可能
難易度	高い: 少量の上清分取に慣れを要する	やや難しい: 通常の処理に比べて操作が煩雑。溶媒の留去に注意を要する	容易: 添加操作のみで分取がない
汎用性	高い: 大きな末端修飾が無い限り、おおよそ抽出が可能	普通: 人工核酸の導入や末端修飾により疎水性が異なってくるため、対象ごとに検討を要することが多い	高い: 相補鎖が機能すれば人工核酸や末端修飾の影響は少ない。
精製度	低い: 試料中に多くの水溶性夾雑物を含む。続くエタノール沈殿の操作により大幅に上げることができる	高い: 有機溶媒リッチな洗浄が実施できればLC-MS/MS用の試料として十分な精製度が得られる	非常に高い: 非特異的な吸着による汚れ成分のみで、そのほかの夾雑物質はほとんど除去される
欠点	環境負荷の高い塩素系有機溶媒やフェノールの使用が必須。多検体処理に労力を要する	検討が必要になった場合、洗浄溶媒や溶出溶媒の検討パターンが多いため時間を要する	インキュベーションが多いため、毎処理のトータル時間が長くなるので1日の検回数に限られる
利点	古くから応用されているメソッドなので多くの文献や手順書が入手しやすい	近年の小容量タイプの固相を使用することによりサンプルの濃縮が容易に可能	Hybridizationによる非常に高い特異性のため、圧倒的にきれいな試料を得ることができる

結論

- これまでの経験からLLE及びSPE処理においてはマトリックス及び分析対象物質の違いによる影響から処理法の検討に時間を要していたがHybridizationはそれらの影響を受けにくいので、自動前処理装置を応用した方法をジェネラルメソッドとすることで定量法開発の時間短縮が期待できる。
- 同じHybridization を利用したLBA法による定量と比較した場合、ISを使用できることが分析結果の検証や回収率の確認に使用できるため分析の信頼性向上の面で有利である。
- 今回の検証によりHybridization による前処理の有用性が確認できたことから、将来的にShortmerなどの不純物分析やフラグメント化した代謝物分析への応用を展開していきたい。