

核酸医薬品のバイオアナリシスにおける NonIP-RP-LC/MSの開発

○林 善治¹, 孫 雨晨², 小山 亜紀¹

1: シミックファーマサイエンス株式会社

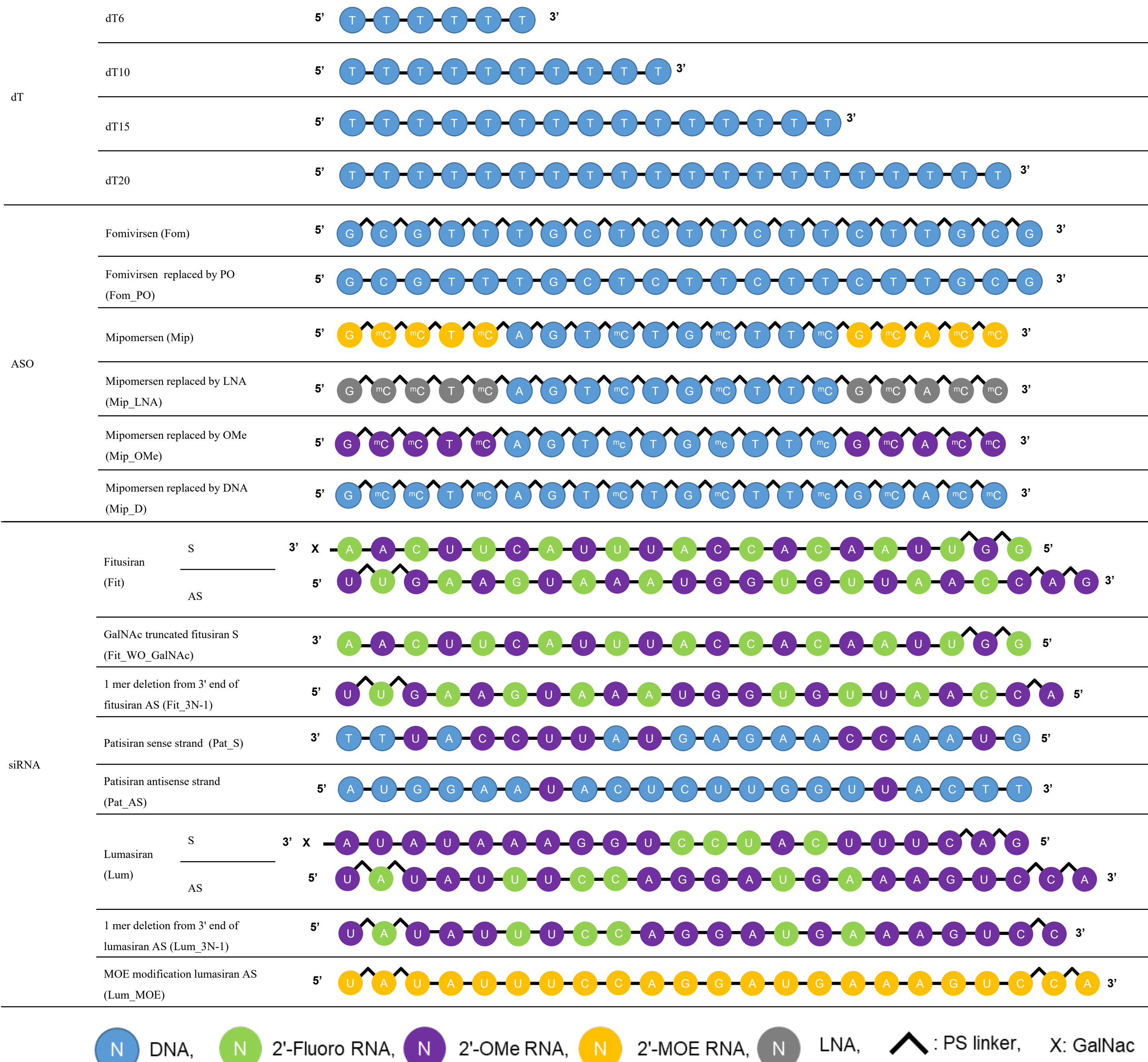
2: 国立医薬品食品衛生研究所

問い合わせ先：林 善治（e-mail to yoshiharu-hayashi.yg@cmicgroup.com）

緒言

質量分析計（MS）を用いた核酸医薬品の分析においては、アルキルアミンに酸性 modifier としてフッ素化アルコールを添加したイオンペア逆相クロマトグラフィー-質量分析法（IP-RP-LC/MS）が主流である。しかし、使用試薬が測定装置に残留し、クリーニングのために長時間のダウンタイムが必要であること、移動相が劣化しやすく頻回での移動相調製が必要でフッ素系アルコールが高価であることなど、IP-RP-LC/MSは手間と費用面の両面に課題がある。そこで我々はイオンペア試薬フリーのRP-LC/MS (NonIP-RP-LC/MS)分析法の構築を本研究の目的とした。

材料



In this experiment, the fitusiran and lumasiran used different N-acetylgalactosamine (GalNAc) linker structures from the original versions.

LC/MS system : Vanquish instrument with an Orbitrap Q Exactive plus (Thermo Fisher Scientific)

カラム : Accura Triart C18, 2.1 × 50 mm, S-1.9 μm, 12 nm (YMC)

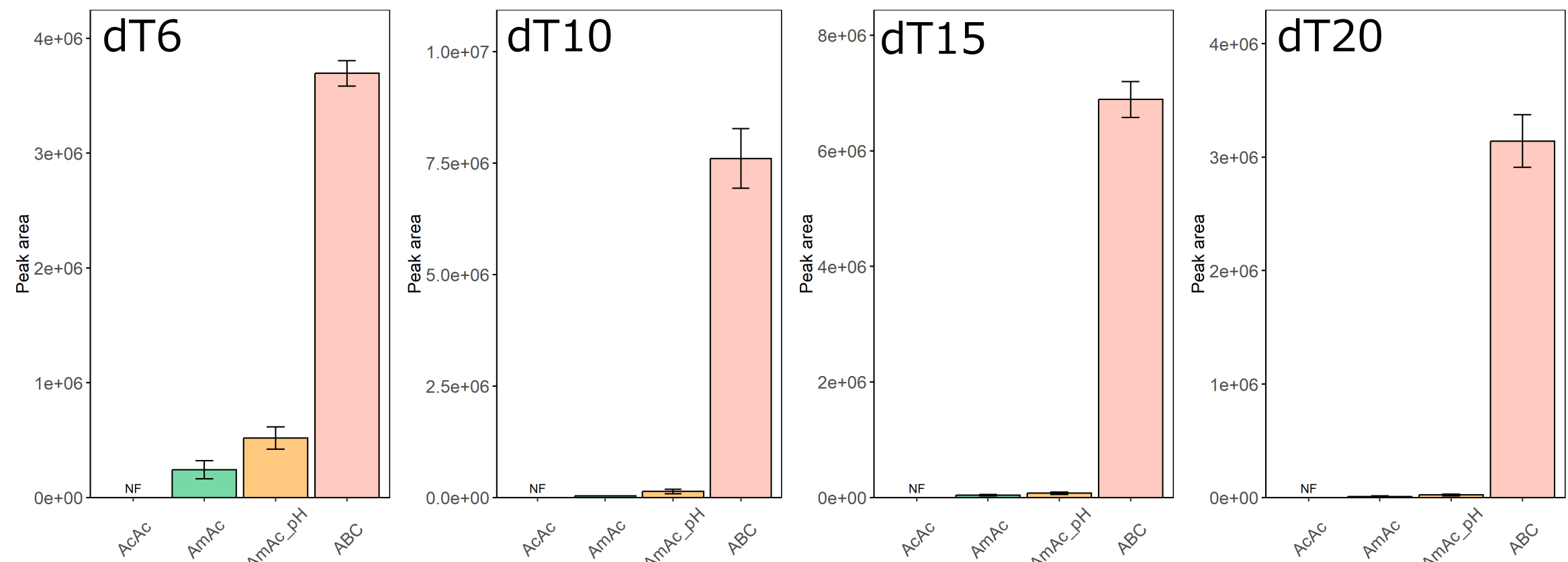
Mobile phase : A; 10 mM ammonium bicarbonate, B; methanol

結果

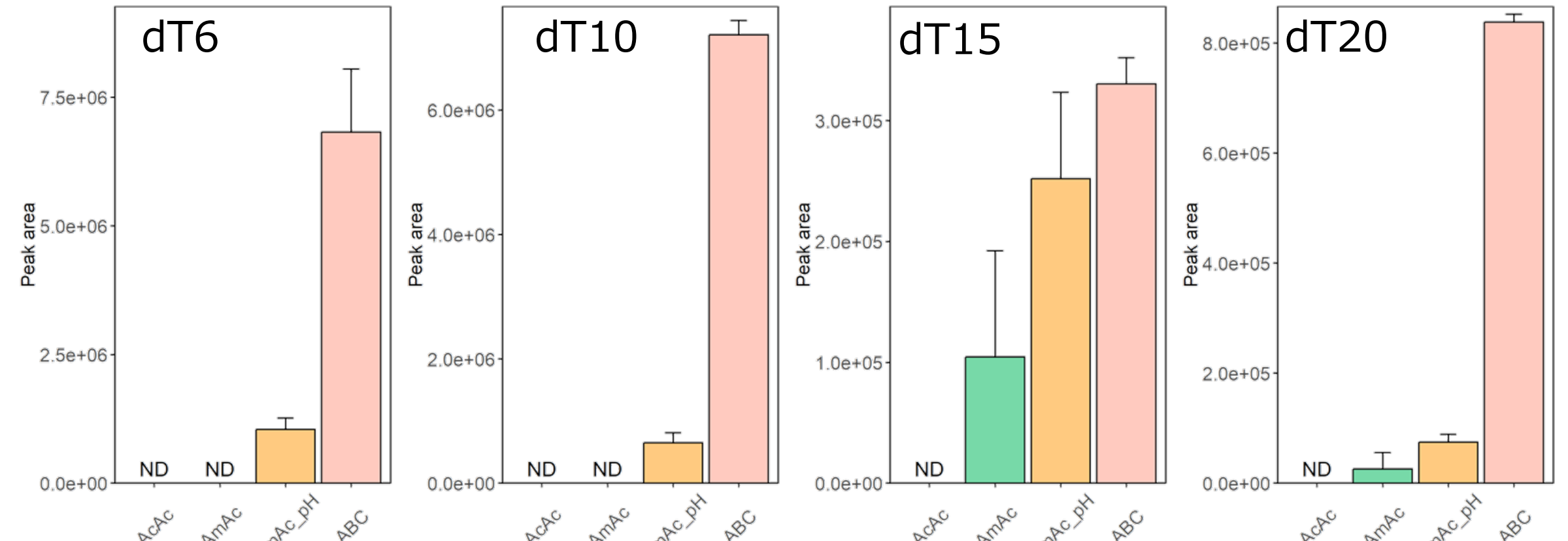
1. オリゴ(dT)プライマーを用いた検証

Relationship between the peak area of dTs and the mobile phases

Positive ion mode



Negative ion mode



AcAc: 0.1% acetic acid, AmAc: 10 mM ammonium acetate,

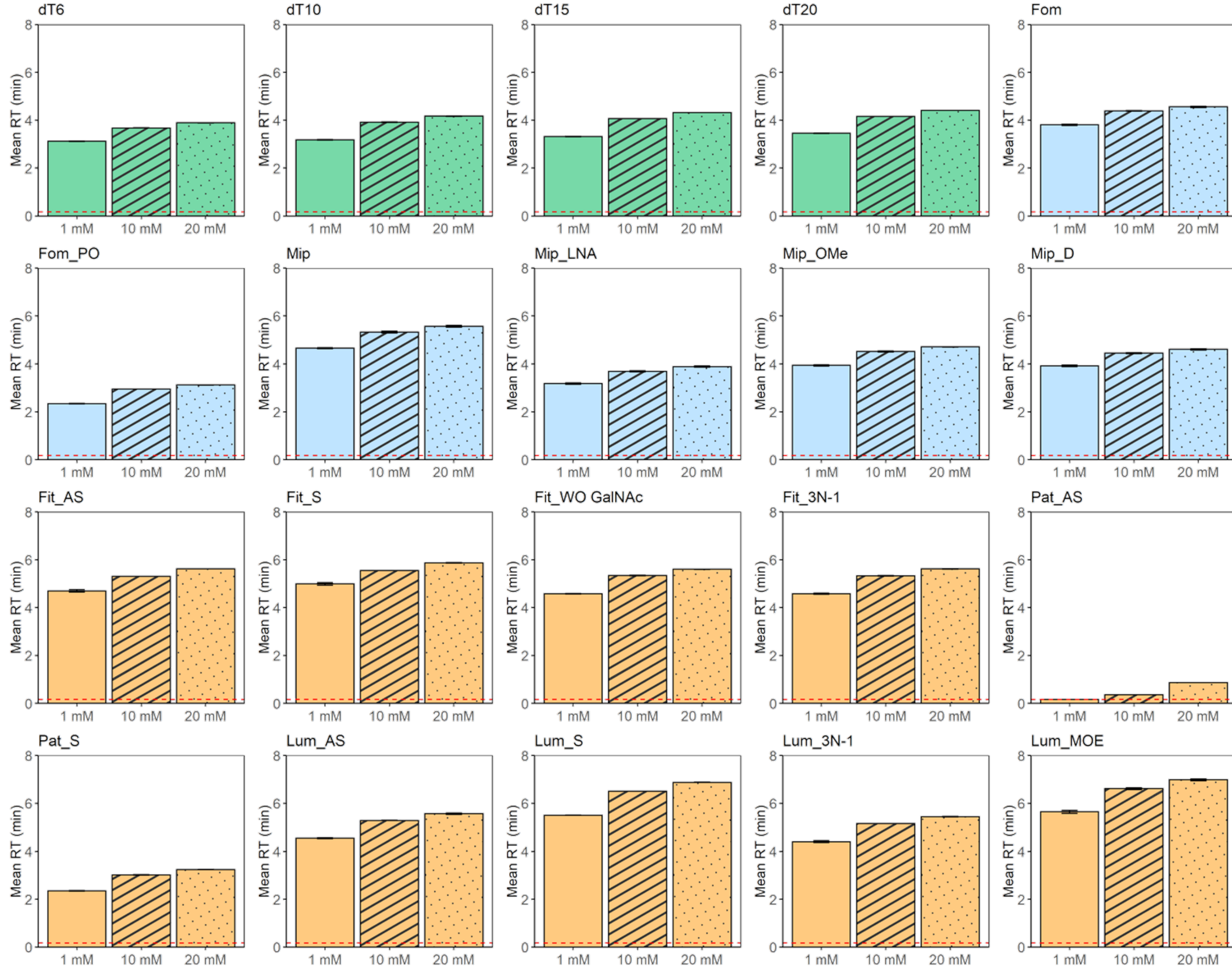
AmAc_pH: 10 mM ammonium acetate adjusted pH 8, ABC: 10mM ammonium bicarbonate

Data are expressed as mean ± SD (n = 3).



2. 各種核酸医薬品分析への重炭酸アンモニウム(ABC)の適用

Relationship between the retention time and the concentration of ABC



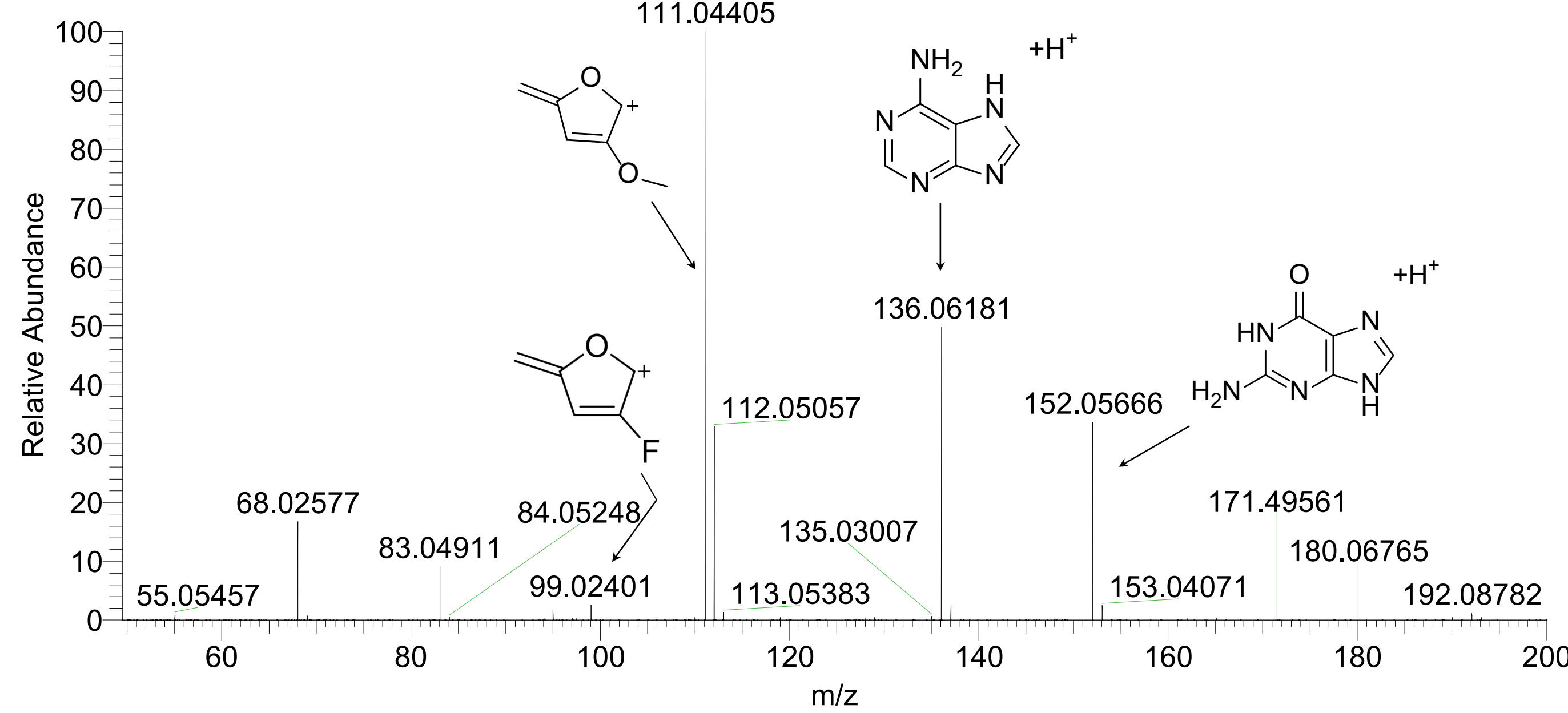
Green: dT, Blue: ASO, Orange: siRNA.

Red dashed lines denote the void time (approximately 0.17 min).

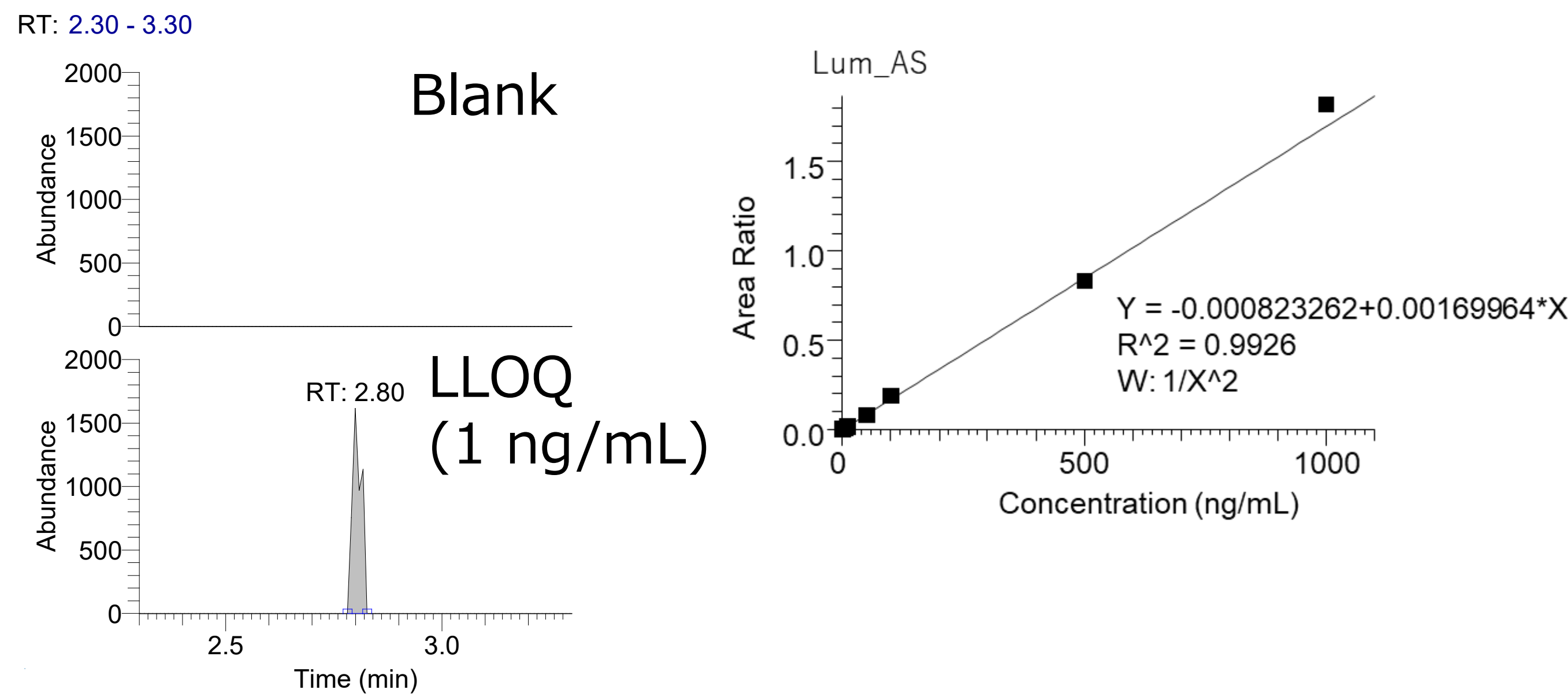
Data are expressed as mean ± SD (n = 3).

ESI-CID fragmentation of Lum_AS using ABC as mobile phase

F: FTMS + p ESI Full ms2 1527.0400@hcd35.00 [50.0000-3145.0000]



PRM chromatogram and calibration curve of Lum_AS in reconstitution plasma



結言

本研究では、核酸医薬品のバイオアナリシスにおけるIP-RP-LC/MSの課題を改善するため、IPを用いないnonIP-RP-LC/MSについて検討した。

- ✓ 移動相にABCを加えることが有効であり、炭酸イオンとアンモニウムイオンが鍵となる。
- ✓ ABCベースの移動相は、さまざまな核酸の分析に対応可能である。
- ✓ Lumasiranを例にとると、取得した定量範囲と感度は既存の方法に匹敵した。
- ✓ ABCベースの手法は残留試薬やコスト面の課題を軽減し、信頼性のあるバイオアナリシスを実現する可能性がある。

謝辞

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の課題番号JP24ak0101185及びJP24mk0121301の支援を受けた。