講演番号: P2-15 (16th JBFシンポジウム)

LC-MS/MSによる核酸医薬品の バイオアナリシスに有効なIS構造の探索

O水落 正慶 , 林 善治, 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)



近年、核酸医薬品の液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)による測定が増加 している。LC-MS/MSを利用したバイオアナリシスの定量分析では、精度を確保するために内標準物 質(Internal Standard: IS)の使用が不可欠である。一般的に、ISとして安定同位体で標識さ れた分子量のみが異なる同じ構造の化合物(Stable Isotope Labeled-IS: SIL-IS)が使用さ れる。SIL-ISの質量は、分析対象物質の同位体パターンと重ならないように設計される。核酸医薬 品は分子量が大きいため、多くの安定同位体元素が必要となり、SIL-ISの使用はコスト面で非常に 困難である。このため、測定対象の核酸配列に対して数塩基長い、または短い類似構造の核酸がIS としてよく用いられる。核酸分析で一般的なイオンペア逆相クロマトグラフィーでは、保持時間が核酸の



<u>3-3. <ターゲットイオン></u>

- ▶ ホスホジエステル結合のみを持つオリゴ核酸のプロダクトイオンはm/z 79.0をターゲットとした。
- ▶ S化を含むオリゴ核酸のプロダクトイオンはm/z 94.9をターゲットとした。
- ▶ いずれのオリゴ核酸も7価から9価に強く分布し、幅広いコリジョンエナジー (CE) の最適値を持っていたため、一律で-150Vに設定し、8価のプレカーサ―イオンで評価した。

3-4. <測定試料の調製>

各オリゴ核酸(凍結乾燥品)にx5 TE-Bufferを添加して1mg/mLの標準原液を調製した。 さらにx5 TE-Bufferを用いて希釈し、5 µg/mLの溶液とした。この溶液を移動相Aで100 ng/mL に希釈した溶液を測定試料とした。







鎖長によって影響されるため、保持時間にずれが生じる。このことでSIL-ISに比べてマトリックス効果を 抑える効果が低減する。

今回、より効率的なIS設定を行うための知見を得るために20merの天然型DNAとRNAに対して 種々の修飾を施し、保持時間の差異を調査した。本ポスターでは、これらの結果をもとに、同一鎖 長、同一配列の核酸をISとして用いる場合の選択方法について提案する。

材料および方法





2. 配列および修飾

No.	Name	Sequence	Molecular Weight
1	RNA	CAGGAUACUUUACUACAGCU	6311.8265
2	DNA-U	caggauacuuuacuacagcu	5991.8465
3	DNA	caggatactttactacagct	6076.0085
4	DNA-5'-C3	3caggatactttactacagct	6214.0672
5	DNA-5'-C6	6caggatactttactacagct	6256.1482
6	DNA-5'-C12	12caggatactttactacagct	6340.3102
7	MOE-full	C(m)A(m)G(m)G(m)A(m)T(m)A(m)C(m)T(m)T(m)A(m)C(m)T(m)A(m)C(m)A(m)G(m)C(m)T(m)	7627.7235
8	MOE-end14	5(m)A(m)G(m)G(m)A(m)T(m)A(m)ctttacT(m)A(m)5(m)A(m)G(m)5(m)T(m)	7155.1955
9	MOE-end10	5(m)A(m)G(m)G(m)A(m)tactttacta5(m)A(m)G(m)5(m)T(m)	6858.8795
10	MOE-skip10	5(m)aG(m)gA(m)tA(m)cT(m)tT(m)a5(m)tA(m)cA(m)g5(m)t	6858.8795
11	MOE-end6	5(m)A(m)G(m)gatactttactacaG(m)5(m)T(m)	6548.5365
12	PS-full	c^a^g^g^a^t^a^c^t^t^t^a^c^t^a^c^a^g^c^t	6381.1675
13	PS-end14	c^a^g^g^a^t^a^ctttac^t^a^c^a^g^c^t	6300.8625
14	PS-end10	c^a^g^g^a^tactttacta^c^a^g^c^t	6236.6185
15	PS-skip10	c^ag^ga^ta^ct^tt^ac^ta^ca^gc^t	6236.6185
16	PS-center10	cagga^t^a^c^t^t^a^c^t^acagct	6236.6185
17	PS-end6	c^a^g^gatactttactaca^g^c^t	6172.3745
18	OME-full	C(M)A(M)G(M)G(M)A(M)U(M)A(M)C(M)U(M)U(M)A(M)C(M)U(M)A(M)C(M)A(M)G(M)C(M)U(M)	6592.3665
19	OME-partial	C(M)A(M)G(M)A(M)UACUUUACUAC(M)A(M)G(M)C(M)U(M)	6452.0965
20	F-full	C(F)A(F)G(F)G(F)A(F)U(F)A(F)C(F)U(F)U(F)A(F)C(F)U(F)A(F)C(F)A(F)C(F)A(F)G(F)C(F)U(F)	6351.6545
21	F-partial	C(F)A(F)G(F)G(F)A(F)UACUUUACUAC(F)A(F)G(F)C(F)U(F)	6331.7405
22	LNA-end6	5(L)A(L)G(L)gatactttactacaG(L)5(L)T(L)	6272.1225

Uppercase: RNA, Lowercase: DNA, (m): MOE, ^: Phosphorothioate, (F): F, (L): LNA, 5: 5-Methylcytidine, 3: C3 spacer, 6: C6 spacer, 12: C12 spacer

<u>3. 分析条件(LC-MS)</u>

▶ すべてのオリゴ核酸について、良好な感度とピーク形状を得ることができた。

- ▶ 保持時間について修飾による違いが大きく表れる結果となった。
- 保持時間の変化が大きいMOEについて、DNA、MOE-end6、MOE-end10、MOE-end14 およびMOE-fullについて修飾数と保持時間の間に強い正の相関が認められた。(グラフ参照)
- ➤ S化オリゴは修飾に対して、保持時間の変化は小さかった。
- ➢ OMEとF修飾はRNA配列に対して導入されているため、DNAベースのオリゴ核酸よりも保持時間が 早かった。OMEの方がF修飾に対してわずかに保持が強い結果となった。
- ▶ LNAの保持時間の影響は元のDNAに対してわずかであった。
- ➢ Spacerは炭素鎖が長くなると保持が増え、C12はC3およびC6に対して非常に強い保持を示した。

<u>3-1.<LC条件></u>

LC: Shimadzu Nexera X2 UHPLC System Column: Accura Triart Bio C18, 150 mm × 内径2.1mm, 粒径1.9 µm (YMC) Mobile phase A: 400mM HFIP + 15mM Triethylamine Mobile phase B: Methanol Column temperature : 70°C, Flow rate: 0.5 mL/min

Gradient: 0.00 min (B%:12.5) → 8.00 min (B%: 32.5) → 8.01 (B%:12.5) Run time: 8.50 min, Injection volume: 20 μ L

<u>3-2.<MS条件></u>

MS: TripleQuad 5500+ (AB SCIEX) Multiple reaction monitoring (MRM) Scan Type: Polarity: Negative Ionization mode: Electrospray Ionization (ESI) CUR: 25 psi TEM: 500°C EP: -10 V CAD: 12 GS2: 70 psi CXP: -20 V GS1: 60 psi CE: -150 V -100 V \sim -90 V -4500 V DP: IS:



- ▶ 修飾の中ではMOEが最も大きな保持時間の増加を示した。このことから、Analyteに対して少ない 修飾を導入することで、ピーク位置の調整が可能である。
- ▶ S化およびLNAは保持時間への影響が小さいため、AnalyteとISの保持時間を揃えたい場合は、 少数のこれらの修飾を導入することで実現できる可能性がある。
- ➢ MOE-end10とMOE-skip10の比較においてMOE-end10の方が保持が強かった。このことから 糖の2'位への疎水性修飾について、末端に修飾を入れるか修飾部位を集めることにより保持が強 くなることが推測される。
- S化オリゴについて、PS-end10とPS-skip10では大きな差がなかったことから、S化の導入位置は 保持時間に大きな影響がないことが分かった。末端からの分解を防ぐため、中央より両端に修飾を 入れたほうが安定性の向上にメリットがあると考えられる。
- ▶ 近年増えているHybridization-LC-MSへの応用を想定した場合、同一配列で若干の保持時間のずれを作ることができるC3、C6のSpacerはISへの応用可能性が大きいと感じられた。
- ▶ 今後はこれらの核酸に対して、キャプチャープローブを使用した精製への応用可能性を検討したい。