

核酸医薬の代謝物同定用ソフトNA Metabolite Analyzerの開発

Development of "NA Metabolite Analyzer" for metabolite identification tool of oligonucleotide therapeutics

田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 薬物動態研究所
村越かおり・岩崎紀彦・西條武明



1. Introduction

LC-MS(/MS)は低分子医薬品の代謝物同定に必要不可欠なツールの一つであり、代謝物同定ソフトも各MSメーカーから数多く提供されている。核酸医薬の代謝物同定においても、LC-MS(/MS)は有用なツールであるが、オリゴ核酸はESI測定モードにおいて複雑な多価イオンを発生させることから、代謝物の網羅的な検索は容易ではない。かつ、オリゴ核酸を対象とした同定ソフトは最新の質量分析計に付随するため、高額な設備投資が必要となる。そこで我々は、既存の質量分析計に対応したオリゴ核酸用代謝物同定ソフトNA Metabolite Analyzer (NA Tool)を開発した。

2. Materials and Methods

2.1 Model Compound

Mipomersen (社内合成)

5'-G*-mC*-mC*-T*-mC*-dA-dG-dT-dmC-dT-dG-dmC-dT-dT-dmC-G*-mC*-A*-mC*-mC*-3'

* = 2'-O-methoxyethyl m = 5-methyl d = 2'-deoxy

2.2 Sample Preparation

ラット腎ホモジネート:ラット腎臓 (日本チャールス・リバーより購入) から10倍希釈ホモジネートを調製し、37℃にて24時間プレインキュベーション後に反応に用いた。¹⁾

基質最終濃度: 10 μmol/L

反応時間: 0, 3, 6, 24時間

反応停止: Clarity® Lysis-Loading buffer (Phenomenex)

前処理: Clarity® OTX (100 mg/3 mL, Phenomenex)^{2), 3)}

2.2 LC-MS/MS Conditions

Liquid Chromatography: 1290 Infinity (Agilent Technologies)

Column: InertSustainSwift C18 (2.1 x 150 mm, 1.9 μm)

Mobile Phase A: 15 mmol/L TEA-200 mmol/L HFIP in Water

Mobile Phase B: Mobile Phase A /MeOH (1:1)

Flow Rate: 200 μL/min

Column Temp.: 60 °C

Mass Spectrometry: LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific)

Ion mode: ESI-Negative (Full scan, R=30,000)

Spray Voltage: 5.0 kV Capillary Temperature: 330 °C

Capillary Voltage: -45 V Sheath Gas: 50

Tube Lens: -123.5 V Aux Gas: 15

2.3 Flow of Metabolite Analysis using the NA Tool

[1] Mipomersenの配列 (構造) を入力する

核酸編集機能を搭載, 自社の修飾核酸に対応可能

[2] スクレアーゼによる切断で生成し得る代謝物の配列が自動生成される (Fig. 1)

[3] [2]で求めた代謝物の精密質量および理論上発生し得る多価イオンの精密質量が自動算出される

[4] [3]で求めた理論上のイオン値と実測のイオンがマッチングされ、候補代謝物がリスト化される (Fig. 2)

※ [4]で得られた価数の異なる代謝物をデコンボリューションにより一つに統合することが可能 (Fig. 3)

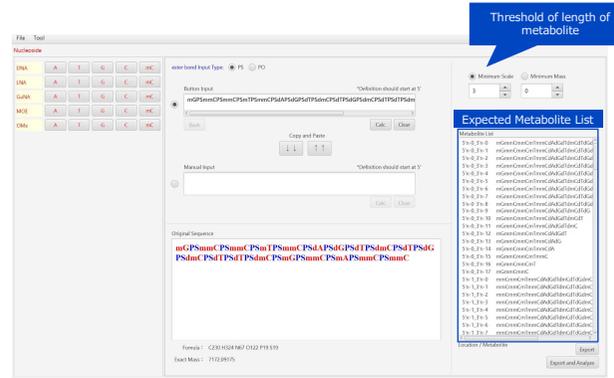


Figure 1. Sequence and expected metabolite of Mipomersen

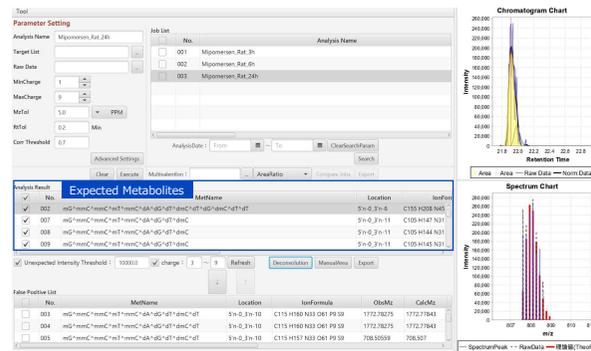


Figure 2. Analysis results of rat kidney homogenate, after incubation for 24 h

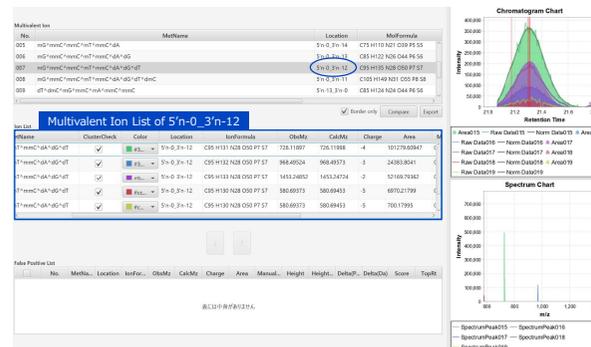


Figure 3. Deconvolution results of multivalent metabolites

3. Results and Discussion

NA ToolによるMipomersenの検索対象代謝物は3 mer以上とし、2.3項の流れに従い解析した。その結果、Mipomersenはラット腎臓中のヌクレアーゼによる代謝を受け随時的に減少し、24時間反応後の試料中に最も多くの代謝物が生成していた。

◆24時間反応後のラット腎ホモジネート中に、Mipomersenから生成し得る代謝物全170種のうち12種の代謝物を検出した。(Table 1)

◆マスクロマトグラムあるいはマススペクトルの目視では検出困難な、両末端から切断された短鎖代謝物 (5'n-6_3'n-7, 8, 9) も含まれていた。

◆報告されているMipomersenの代謝物を複数検出することができた。¹⁾

◆NA Toolは核酸医薬の代謝物を簡便かつ網羅的に同定可能なツールであると考えらる。

Metabolite Name	Nucleotide sequence
Mipomersen	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC
5'n-0_3'n-15	GCCTC
5'n-0_3'n-14	GCCTCA
5'n-0_3'n-13	GCCTCAG
5'n-0_3'n-12	GCCTCAGT
5'n-0_3'n-11	GCCTCAGTC
5'n-0_3'n-6	GCCTCAGTCTGCTT
5'n-13_3'n-0	TCGCACC
5'n-12_3'n-0	TTCGCACC
5'n-10_3'n-0	GCTTCGCACC
5'n-6_3'n-9	GTCTG
5'n-6_3'n-8	GTCTGC
5'n-6_3'n-7	GTCTGCT

Table 1. Metabolite list of Mipomersen (known metabolites¹⁾ are highlighted in blue

4. Conclusion

既存の質量分析計に対応した核酸医薬用代謝物同定ソフトNA Toolを開発した。NA Toolは、*in vitro*同様、*in vivo*試料中の代謝物同定にも応用可能である。

We newly developed metabolite identification tool for oligonucleotide therapeutics, applicable to conventional mass spectrometer data formats.

The "NA tool" is extremely useful for the identification of metabolites in *in vivo* samples as well as *in vitro*.

Acknowledgments

NA Metabolite Analyzerの開発は三井情報株式会社様にご尽力頂きました。

References

- 1) Min-Son Baek et al., Oligonucleotides 2010;20:309-316.
- 2) Buyun Chen and Michael Bartlett, AAPS Journal 2012;14:772-780.
- 3) Lukasz Nuckowski et al., Journal of Chromatography B 2018;1090:90-100.