



DG2020-48

Hybridization assayによる 核酸医薬品の定量

**Quantitative analysis of oligonucleotide
therapeutics by Hybridization assay**

<http://bioanalysisforum.jp/>



DG members



Name	Company
葛西 康之 <i>Yasuyuki Kasai</i>	塩野義製薬株式会社 <i>SHIONOGI & CO., LTD.</i>
才原 良子 <i>Ryoko Saihara</i>	株式会社LSIメディエンス <i>LSI Medience Corporation</i>
辻野 好美 <i>Yoshimi Tsujino</i>	株式会社東レリサーチセンター <i>Toray Research Center, Inc.</i>
羽成 優 <i>Suguru Hanari</i>	シミックファーマサイエンス株式会社 <i>CMIC Pharma Science CO., Ltd.</i>
早田 洋平 <i>Yohei Hayata</i>	株式会社新日本科学 <i>Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.</i>
山本 卓 <i>Takashi Yamamoto</i>	積水メディカル株式会社 <i>SEKISUI MEDICAL CO., LTD.</i>
村越 かおり <i>Kaori Murakoshi</i>	田辺三菱製薬株式会社 <i>Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation</i>
渡辺 恭子 <i>Kyoko Watanabe</i>	第一三共株式会社 <i>Daiichi Sankyo Co., Ltd.</i>



活動の内容 Activities

➤ Jul 2020～Aug 2020

✓メンバー募集 Members application

➤ 1 Sep 2020

✓キックオフミーティング Kick of meeting

➤ Sep 2020～Dec 2020

✓TCとメールを用いた議論 TC and discussion used by E-mail

✓アンケート (Oct 2020) Survey

➤ Dec 2020～Feb 2021

✓ポスター作成 Posters preparation

1. イントロダクション

本DGの目的

DG2017-33
qPCR

DG2018-36
LC-MS

DG2020-48
Hybridization assay
(LBA)

核酸医薬品の測定法には様々な分析手法があるが、DGではLBAに関する議論はまだ実施されていなかった。

昨今、Hybridization assayを用いる核酸医薬品定量が増えてきている。

<http://bioanalysisforum.jp/>

Hybridization assayは、測定手法、プローブ作製法、サンプル調製法が様々。
各社で試行錯誤が繰り返されている。

Hybridization assayの全体像の把握、現状の課題を抽出するとともに、LC-MSとの違いについてDG内で議論し、**問題解決への一助**としたい。



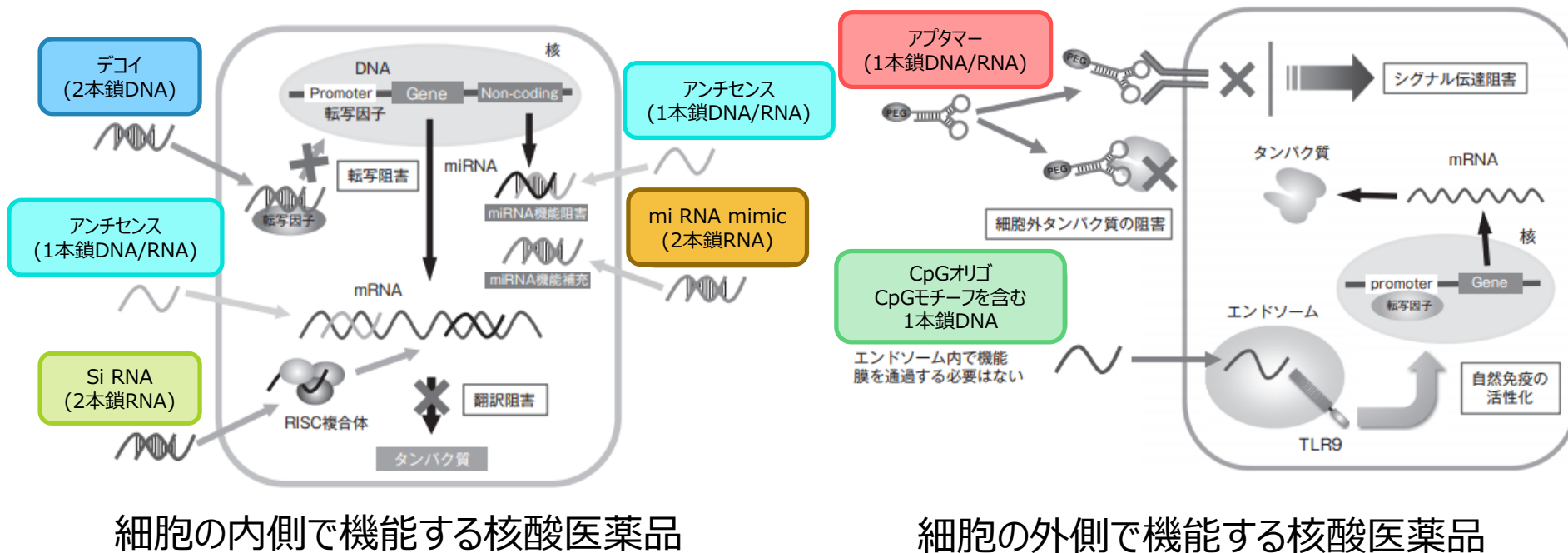
本DGにおける「核酸医薬品」の定義

（修飾） 核酸が十数～数十塩基連結したオリゴ核酸で構成され、遺伝子発現を介さず直接生体に作用するもので、化学合成により製造される医薬品

引用：

井上貴雄：核酸医薬品の開発動向と規制整備の現状
(Pharm Tech Japan) , Vol. 35, No. 13, P8 (2019)

核酸医薬品の分類 Classification



引用：井上貴雄,核酸医薬品開発の現状, Drug Delivery System, 31-1, 2016

既存の医薬品との比較

	化学合成医薬品	核酸医薬品	バイオ医薬品
分子量	< 1kDa	≤ 10kDa	30 kDa
生産方法	化学合成	化学合成	バイオテクノロジー技術
標的	細胞内、細胞外	細胞内、細胞外	細胞外
特異性	非特異的	時に特異的	特異的
主な 定量法	主に クロマトグラフィー法 (LC-MS, HPLC等)	クロマトグラフィー法 (LC-MS, HPLC等) Hybridization assay (ELISA, ECL等)	LBA法 (ELISA, ECL等)

引用（一部改変）：

ICH S6 対応研究班，核酸医薬品の非臨床安全性を考える，医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス，PMDRS, 46(5), 286～289 (2015)

本間尚子：核酸医薬品の承認審査における薬物動態評価，第40回薬物動態談話会講演資料（2018）

核酸医薬品は中分子としての位置づけ

低分子医薬品とバイオ医薬品の特徴を併せ持つ

核酸医薬品のBioanalysis

クロマトグラフィー法とHybridization assay（LBA法）のどちらも適用可能

核酸医薬品 各種分析法

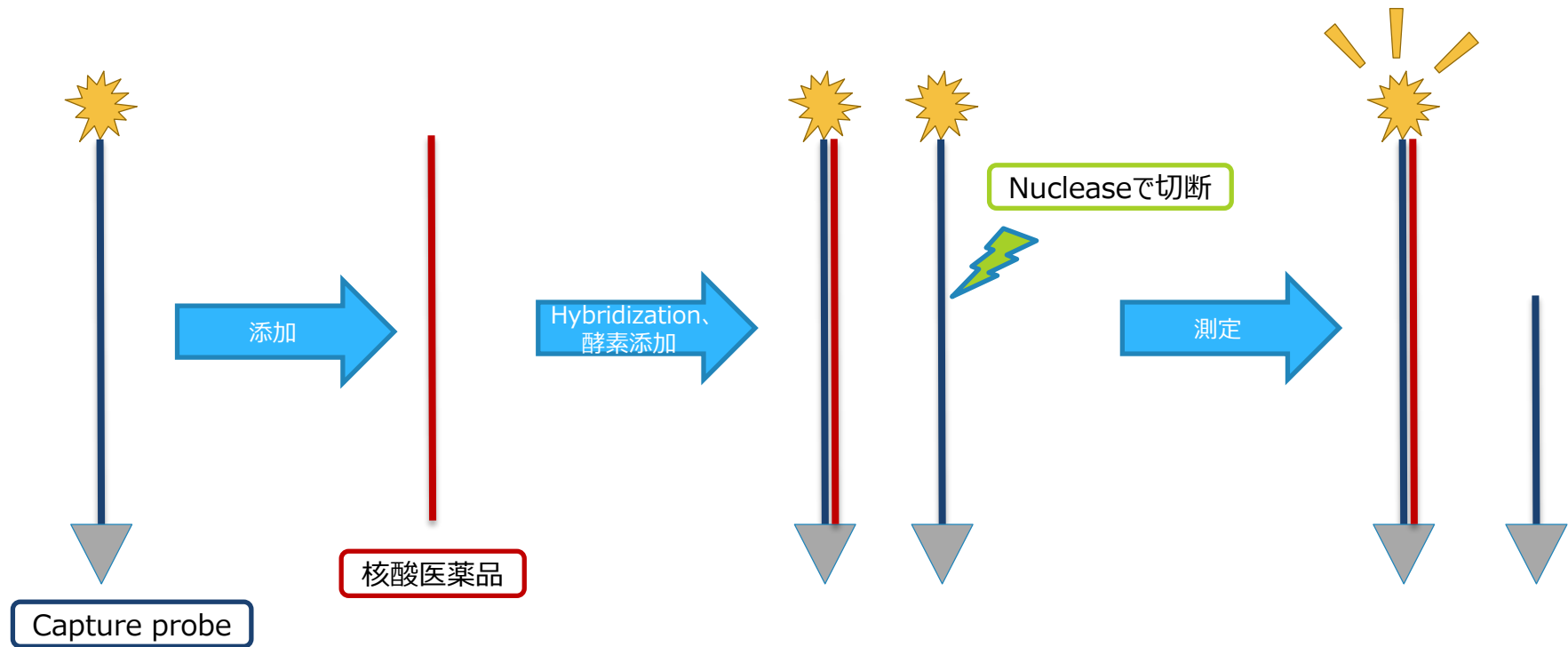
分類	Pros	Cons
LC-MS(/MS)	LCガイドラインに準拠可 代謝物との分離が可能	前処理が煩雑 感度不足
HPLC-UV	LCガイドラインに準拠可 代謝物との分離が可能	感度不足
Hybridization-LC-fluorescence	高感度 代謝物との分離が可能 前処理が簡便	報告例少ない やや高コスト
Hybridization assay (LBA)	LBAガイドラインに準拠可 スループットが高い 高感度	前処理が煩雑 定量法確立に時間必要 代謝物との分離が困難
qPCR	高感度 前処理が簡便	日間差があり再現性が悪い 代謝物との分離が困難
電気泳動	条件検討が不要で、簡便	工程数が多く、スループットが悪い 感度不足 代謝物との分離が困難
ラベル化 (蛍光 or RI)	前処理等が無く、最も簡便	RIは合成に時間・コストがかかる 蛍光色素修飾は化合物の物性が変わる 可能性がある

引用 : 10th JBF Symposium, DG2018-36 (2018)



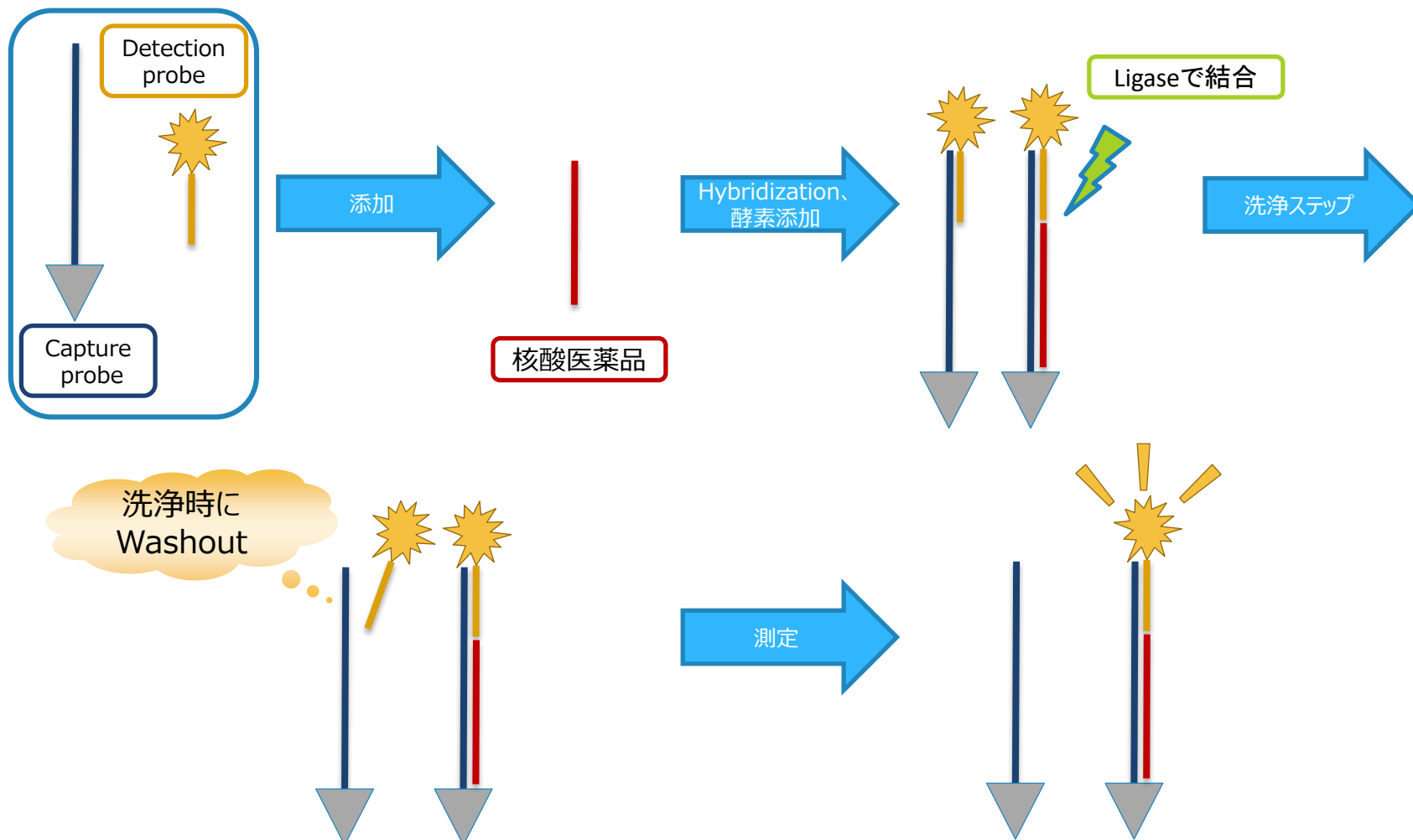
Hybridization assayによる核酸医薬品定量

【Cutting assay】



<http://bioanalysisforum.jp/>

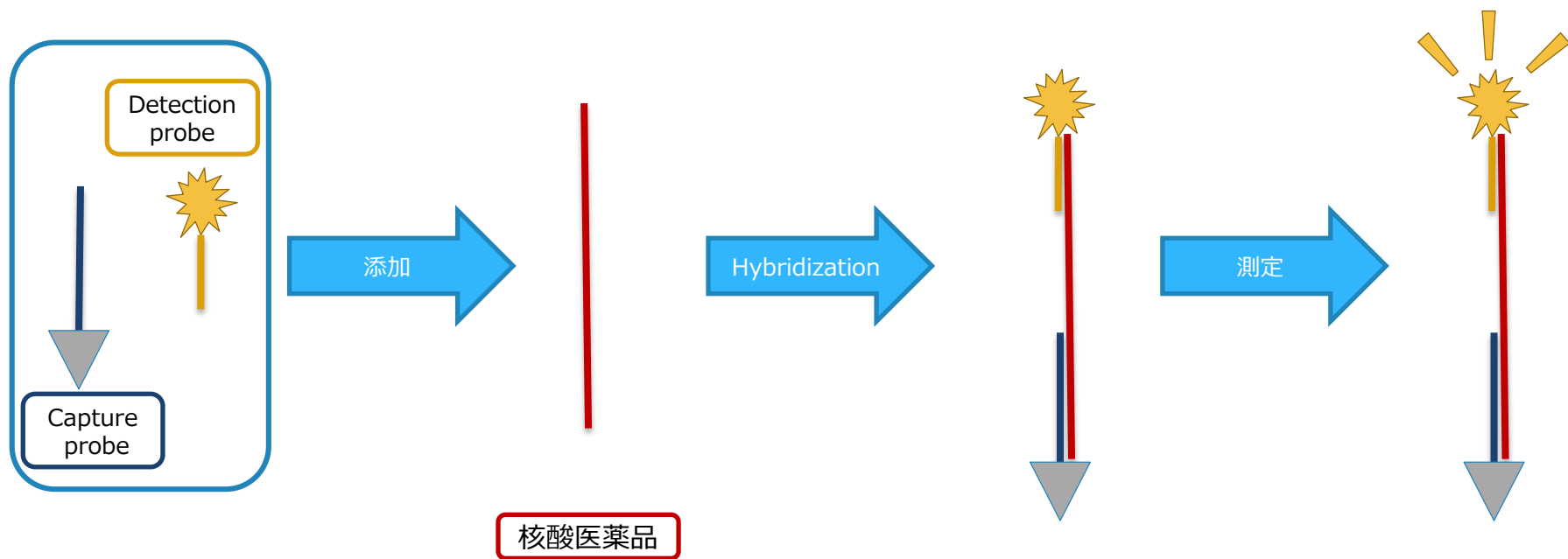
【Ligation assay】





Hybridization assayによる核酸医薬品定量

【Dual Hybridization assay】



<http://bioanalysisforum.jp/>

2. アンケート結果

アンケート期間：2020/10/19～10/30

回答者数：28名

- ① 属性および核酸医薬品の経験
- ② 分析手法
- ③ 核酸医薬品のハンドリング
- ④ 分析法バリデーション



2. アンケート結果

①属性および核酸医薬品の経験

属性および核酸医薬品の経験

Q1 : 所属について教えてください

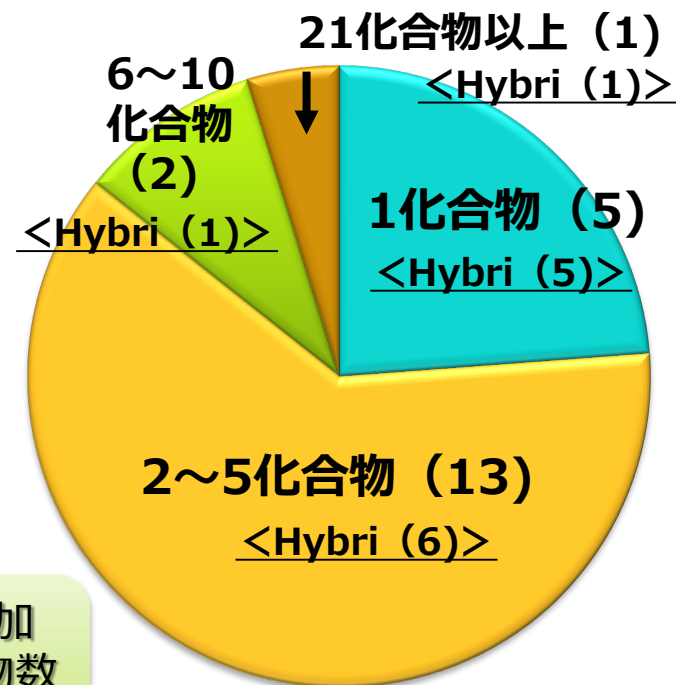
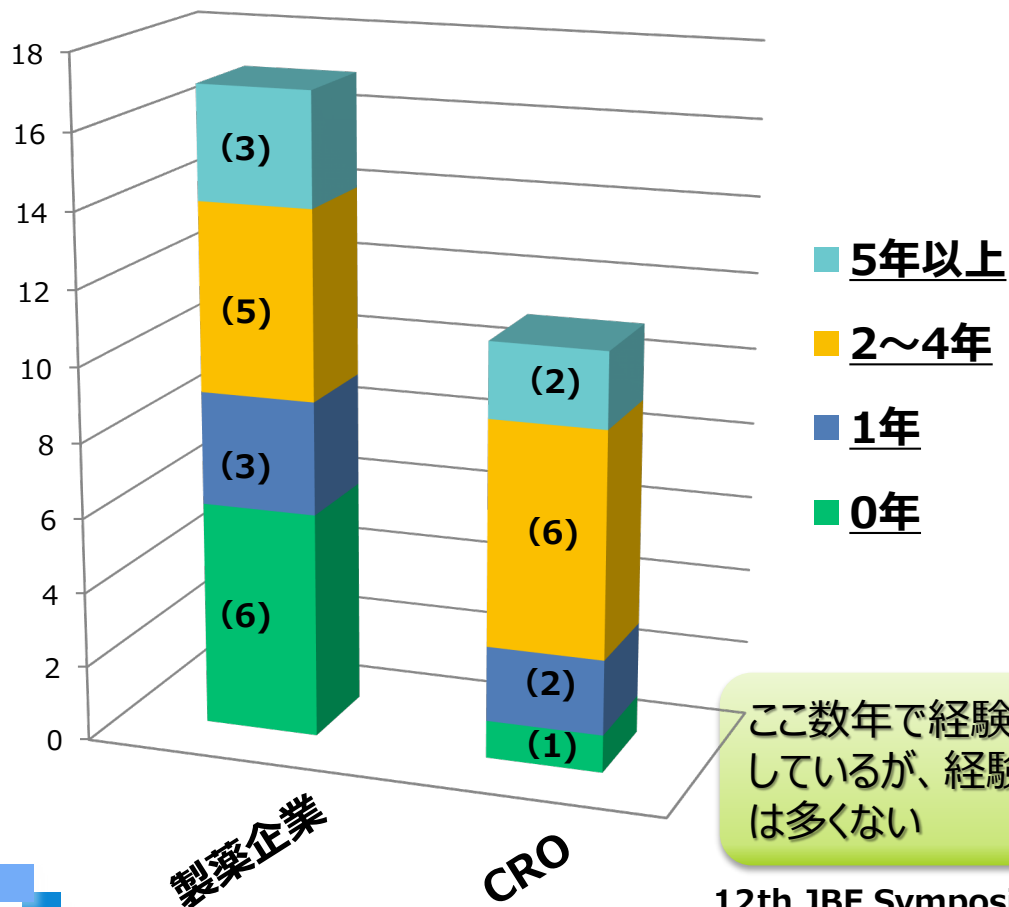
Q2 : 核酸医薬品の分析経験年数は何年
くらいになりますか？

回答者数 : 28名

Q3 : 核酸医薬品の分析経験化合物
数はどれくらいになりますか？

回答者数 : 28名

<> 内はHybridization assayの経験化合物数



属性および核酸医薬品の経験

Q1 : 所属について教えてください

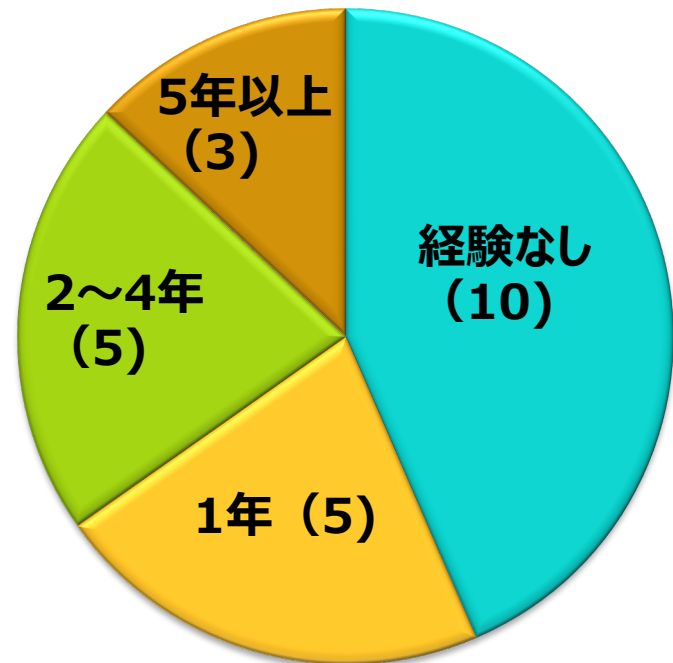
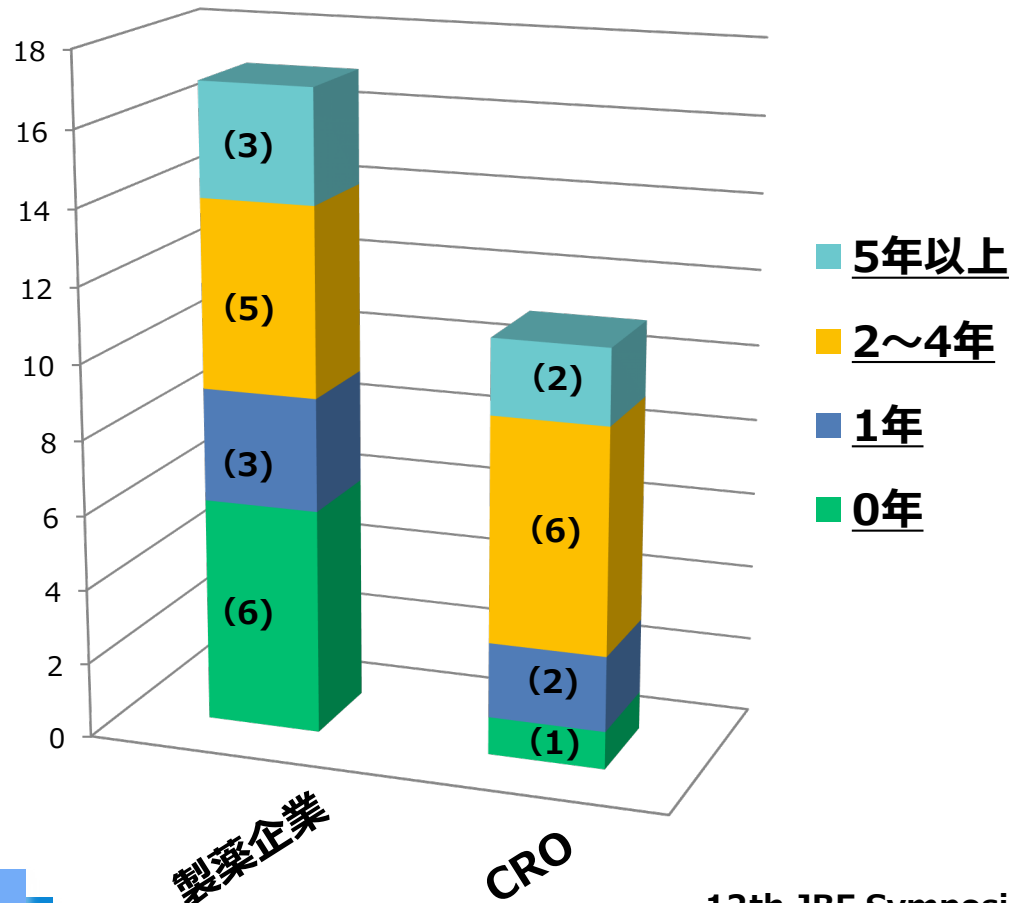
Q2 : 核酸医薬品の分析経験年数は何年くらいになりますか？

回答者数 : 28名

Q8 : Hybridization assayの経験

年数は何年くらいになりますか？

回答者数 : 23名



核酸医薬品の分析経験者でも
Hybridization assayの経験者は半分ほど

属性および核酸医薬品の経験

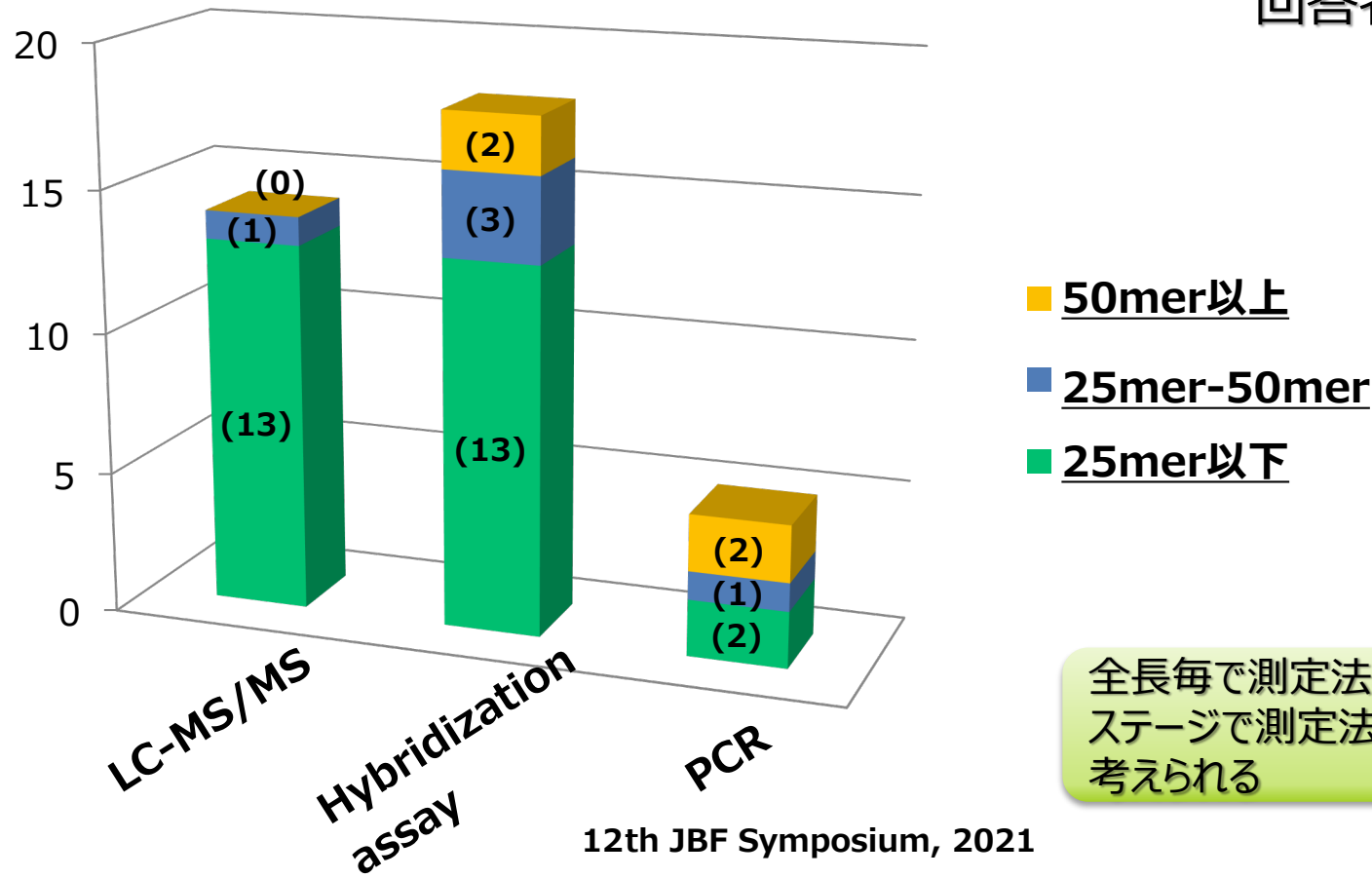
Q4：核酸医薬品の分析経験のある核酸医薬品分析法を教えてください

(複数回答)

回答者数：21名

Q5-7：経験のある核酸医薬品の全長を教えてください (複数回答)

回答者数：13名

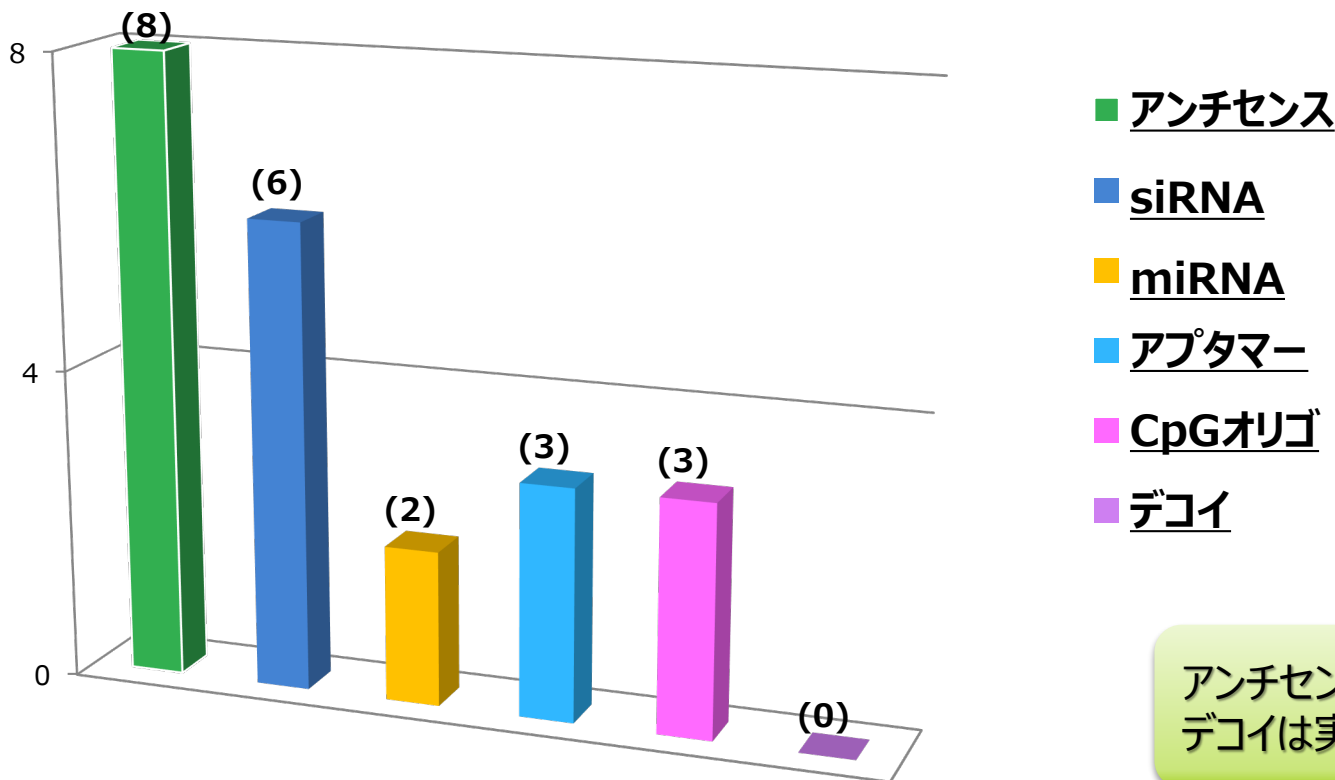


全長毎で測定法の違いは見られず、
ステージで測定法を使い分けられている
と考えられる

属性および核酸医薬品の経験

Q11 : Hybridization assayで経験のある核酸医薬品の種類を教えてください（複数回答）

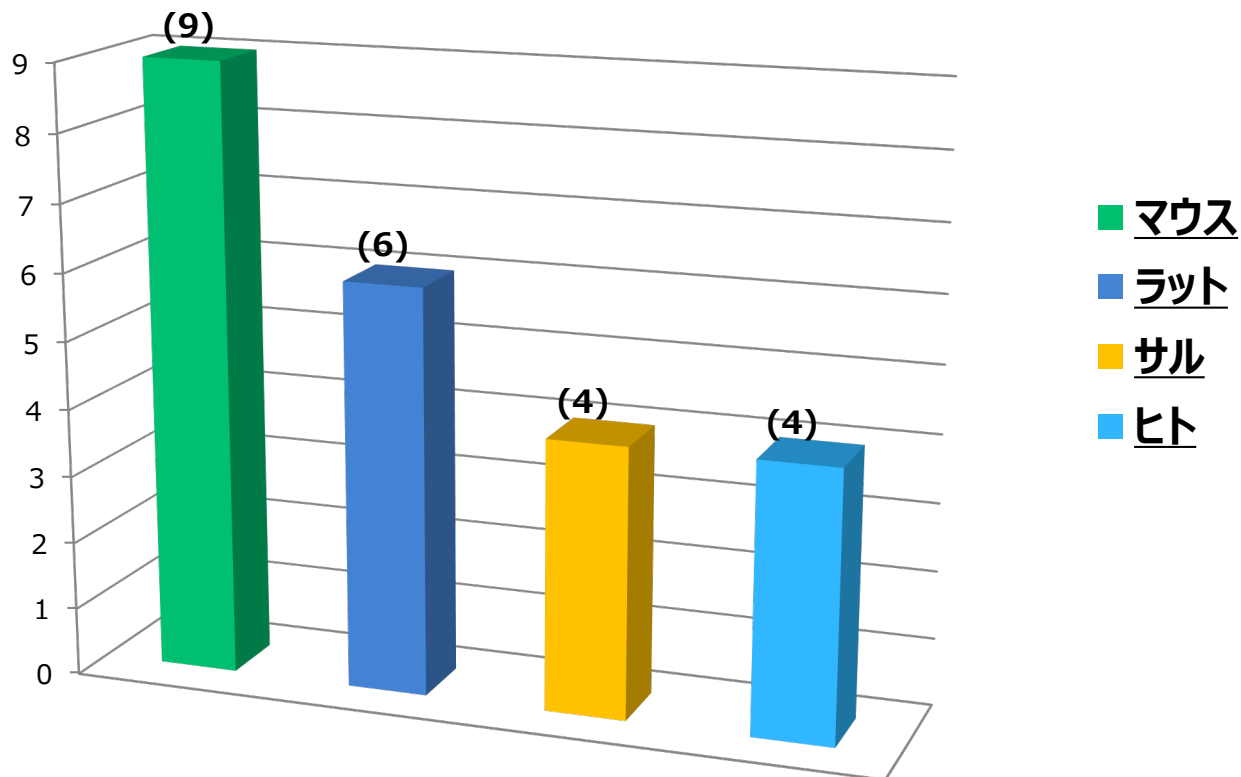
回答者数：13名



アンチセンス、siRNAが多い
デコイは実施されていない

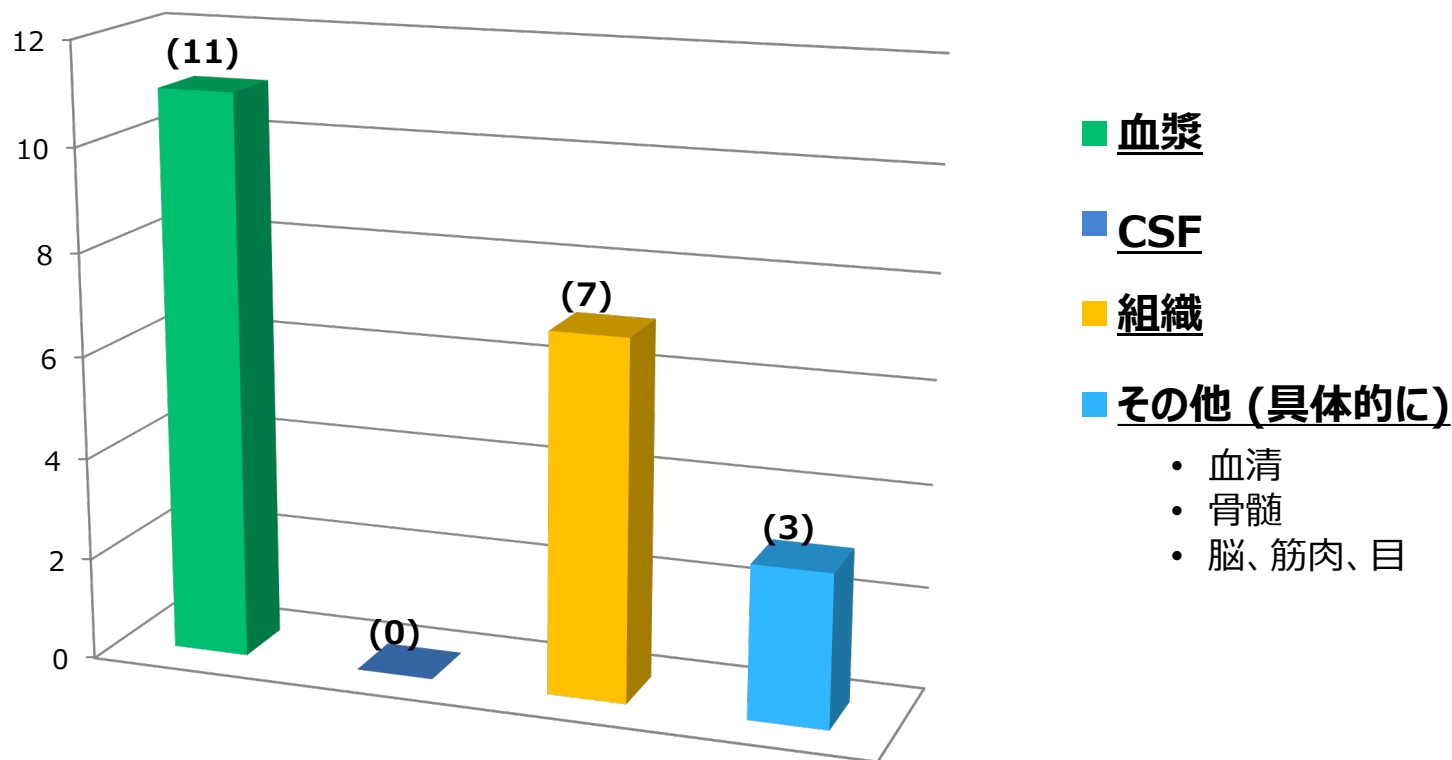
Q13 : Hybridization assayで経験のある動物種 を教えてください（複数回答）

回答者数：12名

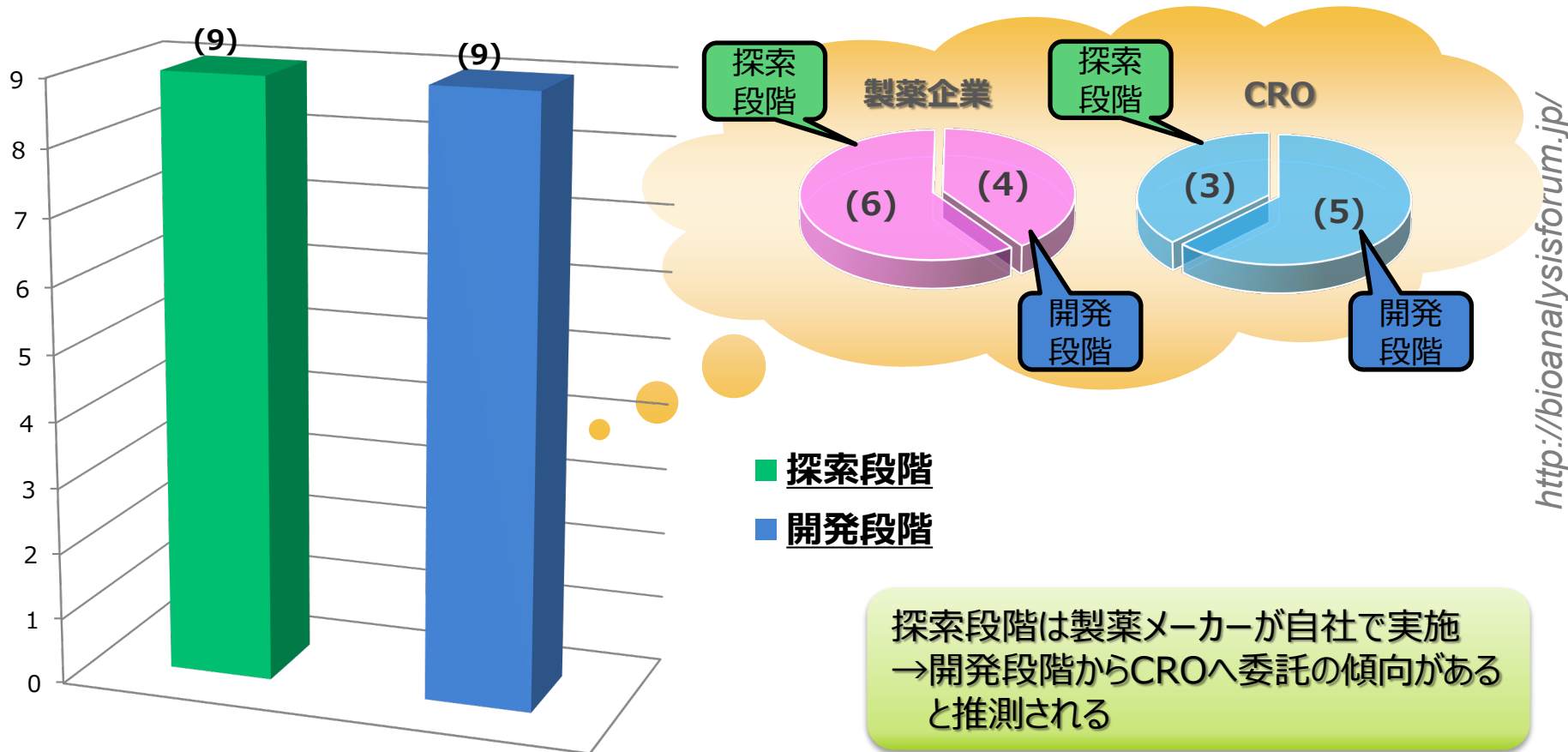


Q14 : Hybridization assayで経験のあるマトリックス種を教えてください（複数回答）

回答者数：12名



Q15 : Hybridization assayを使う時期を教えてください (複数回答) 回答者数：12名





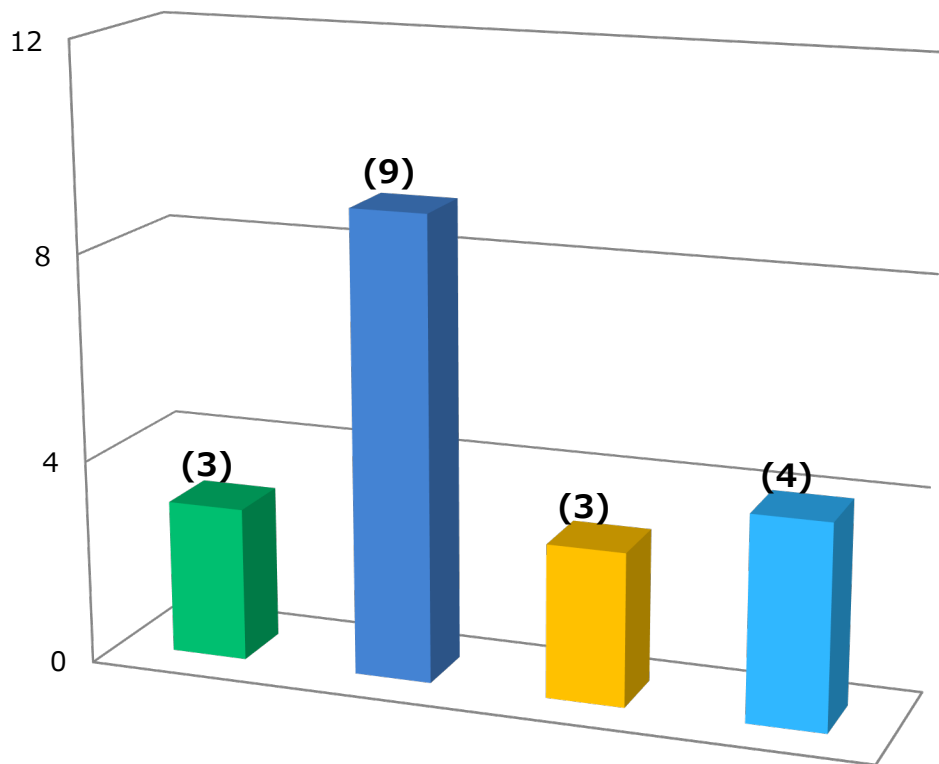
2. アンケート結果

② 分析手法

<http://bioanalysisforum.jp/>

Q10 : Hybridization assayで経験のある分析手法 について教えてください（複数回答）

回答者数：13名



■ Cutting assay (1 probe法)

■ Ligation assay (2 probe法)

■ Dual-Hybridization assay

■ その他 (具体的に)

- 蛍光物質を結合させたProbeと標的核酸をHybridization後、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィーにより検出
- Ligation法以外の2probe法

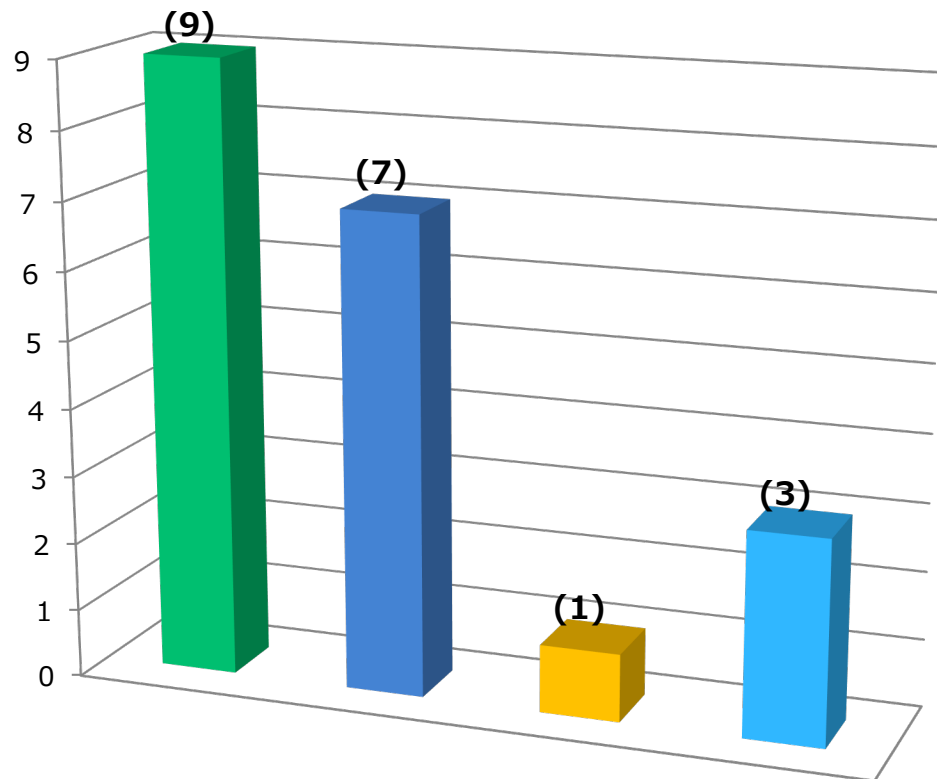
Ligation assay (2 probe法)
の経験数は大半を占める



分析手法

Q12 : Hybridization assayで経験のある分析機器を教えてください（複数回答）

回答者数：13名



■ ELISA

■ ECL

■ Gyrolab

■ その他 (具体的に)

- 高速液体クロマトグラフィー
- Luminex

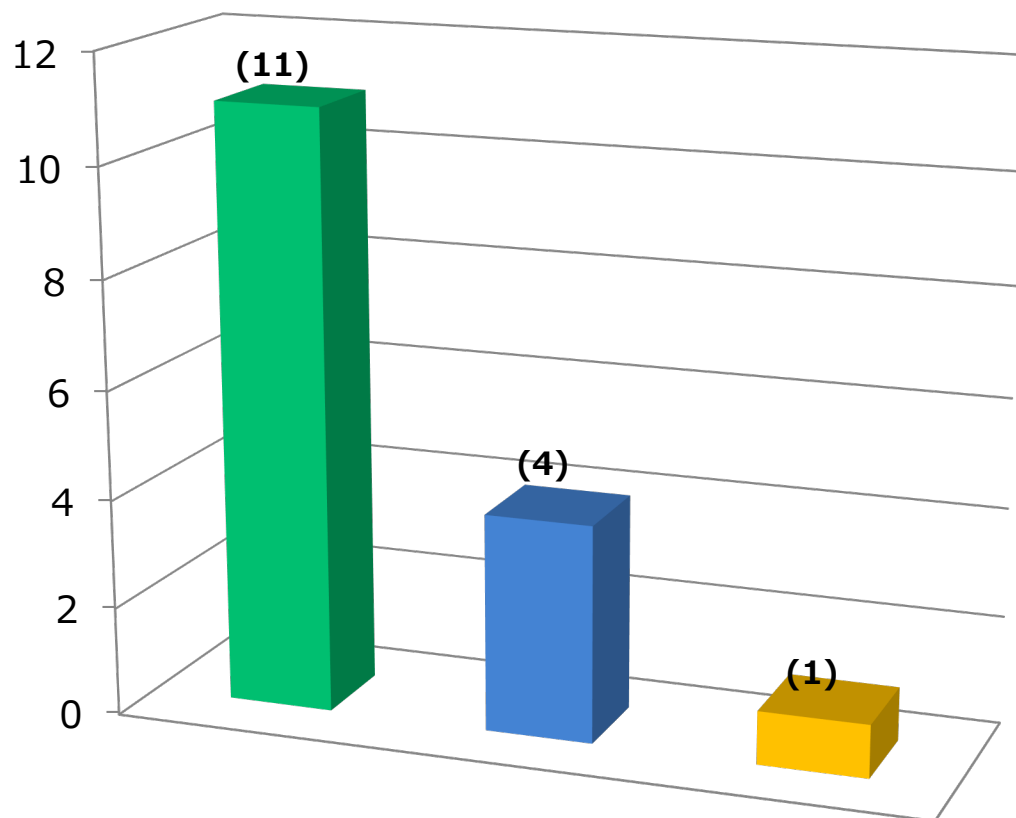
ELISA、ECLでの実施が大半



Probe作製法

Q22 : 検出側の標識はどのようにしますか？（複数回答）

回答者数：12名



■ Digoxigenin (DIG)

■ AlexaやSulfo-Tag等の直標識

■ その他 (具体的に)

- FITCを使用した経験もあります。

DIGを使用している人が多い
分析機器の変更が容易というメリットも。

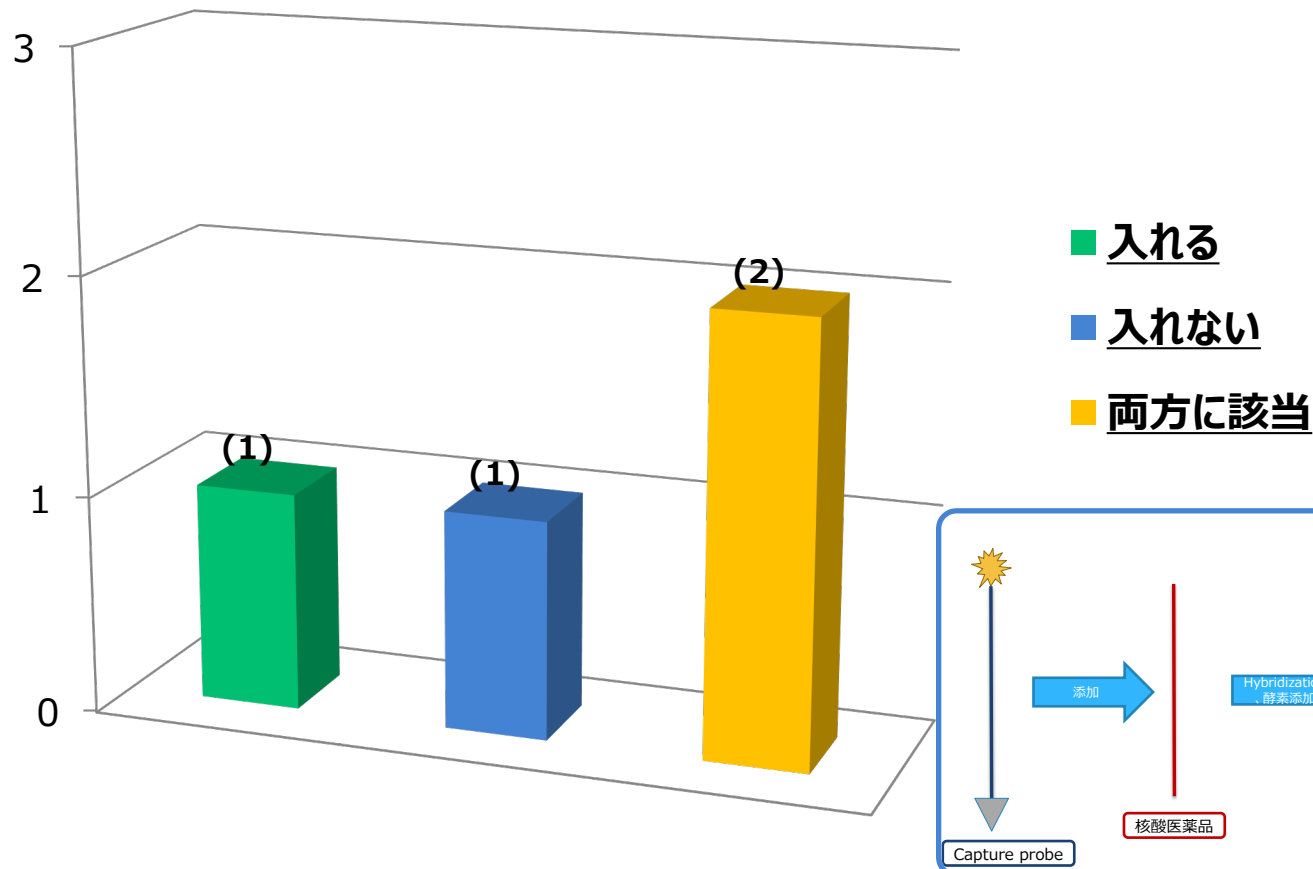
<http://bioanalysisforum.jp/>



Probe作製法

Q23 : Cutting assayで修飾は入れますか？

回答者数：4名

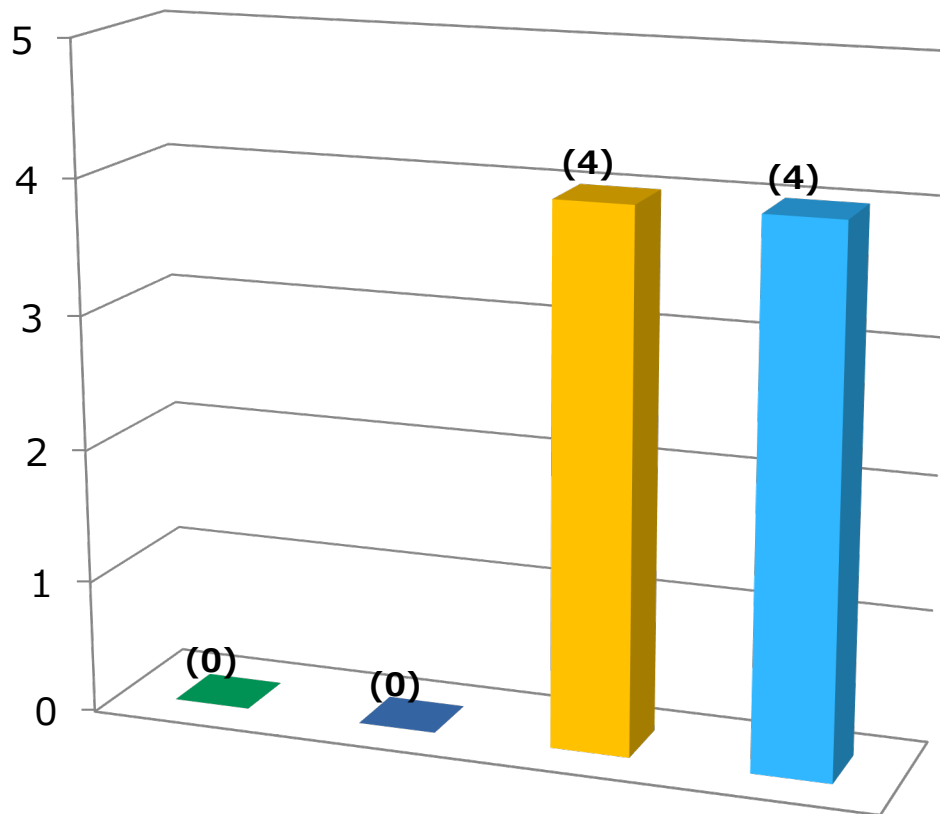




Probe作製法

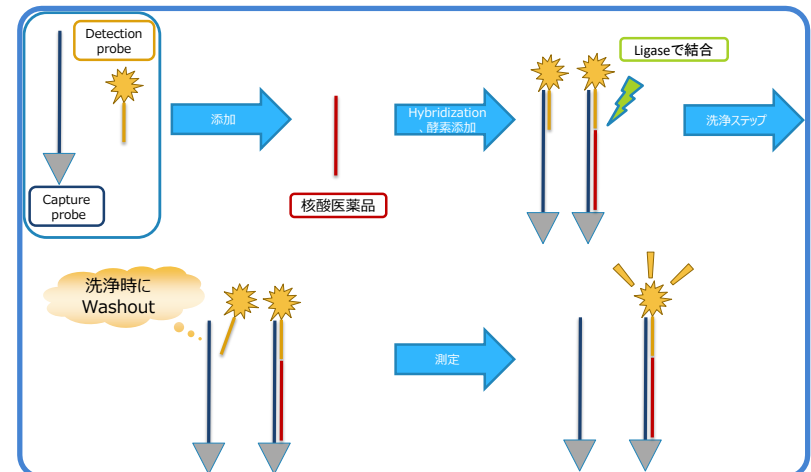
Q24 : Ligation assayで修飾は入れますか？

回答者数 : 8名



片方のプローブのみに修飾を入れる
ケースはなかった

- Capture probeのみ入れる
- Detection probeのみ入れる
- 両方のProbeに入れる
- 両方のProbeに入れない



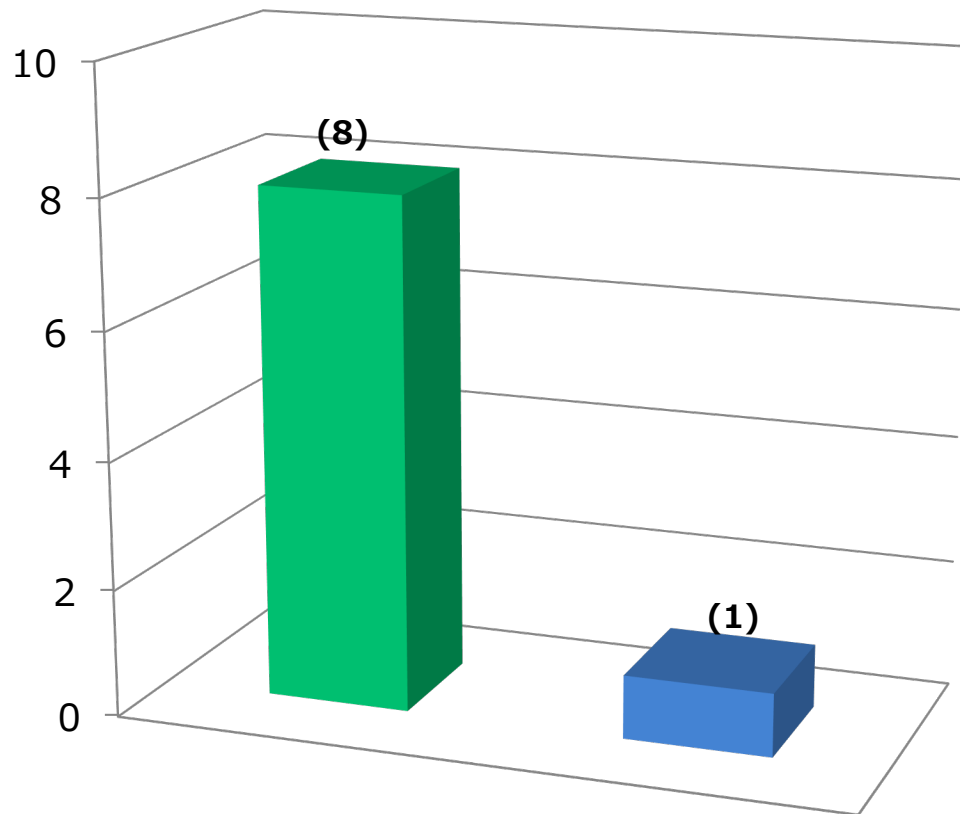
<http://bioanalysisforum.jp/>



Probe作製法

Q25 : Detection probeのLigation方法を教えてください

回答者数 : 9名



■ Capture probeを測定対象より長く、測定対象とDetection probeをLigationする

■ Capture probeを測定対象より短く、Capture probeとDetection probeをLigationする



<http://bioanalysisforum.jp/>

測定対象とDetection probeをLigationするケースが多い



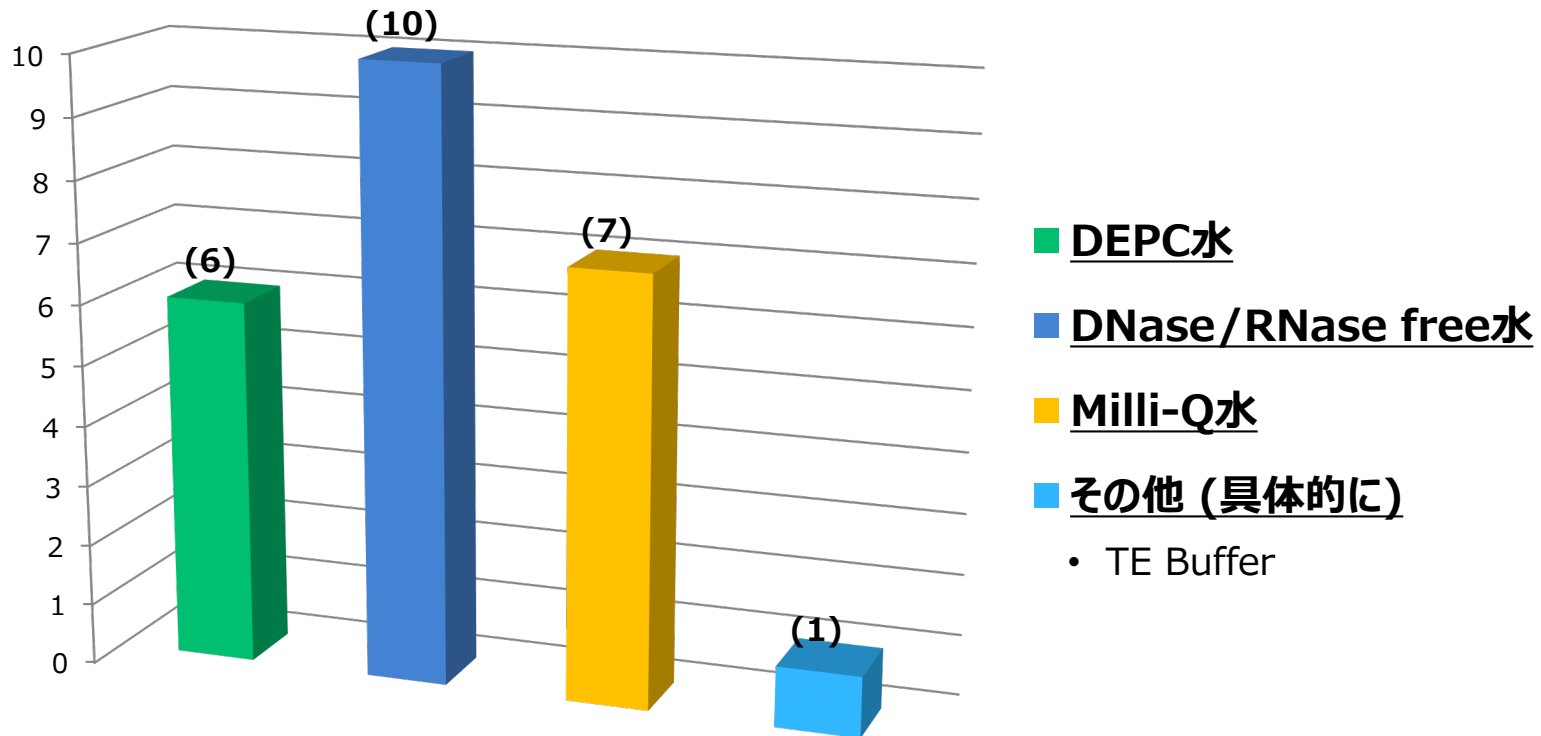
2. アンケート結果

③ 核酸医薬品のハンドリング

核酸医薬品のハンドリング

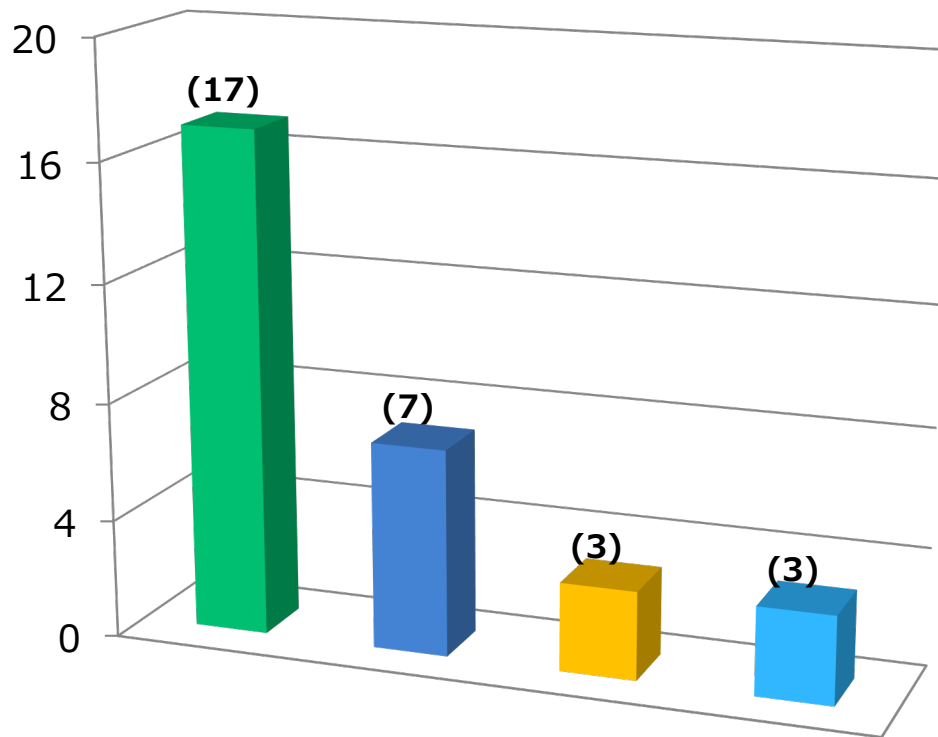
Q17 : 核酸医薬品及びプローブ調製に関する部分で使用する水を教えてください（複数回答）

回答者数：18名



Q19 : サンプル調製や保存に使用するチューブの種類を教えてください（複数回答）

回答者数：20名

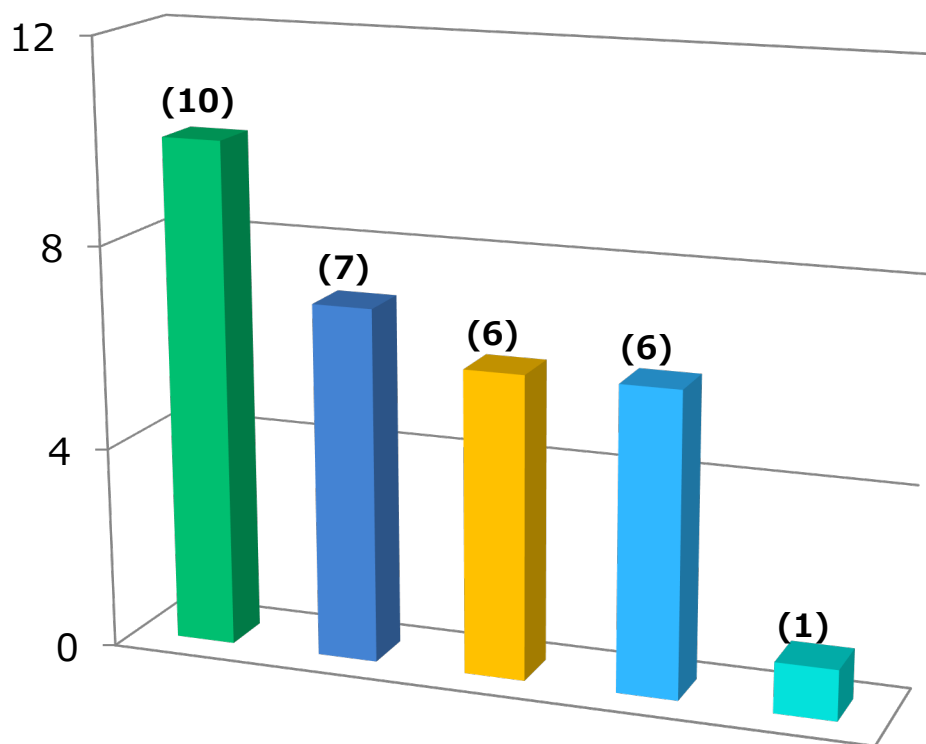


- DNA低吸着チューブ
- PCRグレートチューブ
- 低吸着等でない一般的なチューブ
- その他 (具体的に)
 - TPX製品
 - タンパク低吸着チューブ
 - 吸着等がなければ一般的なRNase, DNaseフリーのチューブを使用しています

低吸着チューブなど
なんらかのケアをしている傾向にある

Q20 : サンプル調製に使用するピペットチップの種類を教えてください（複数回答）

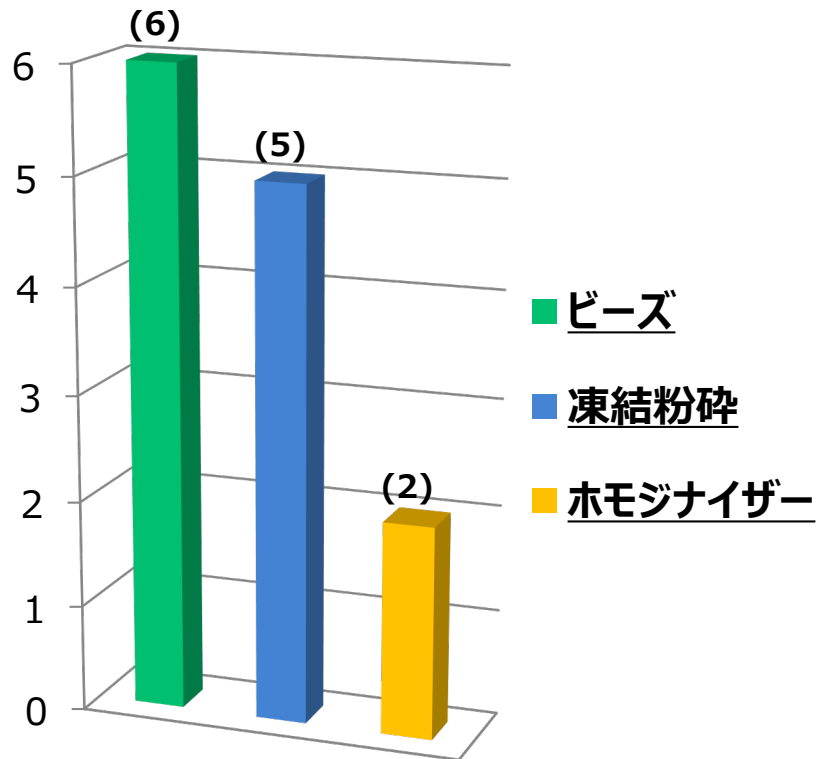
回答者数：20名



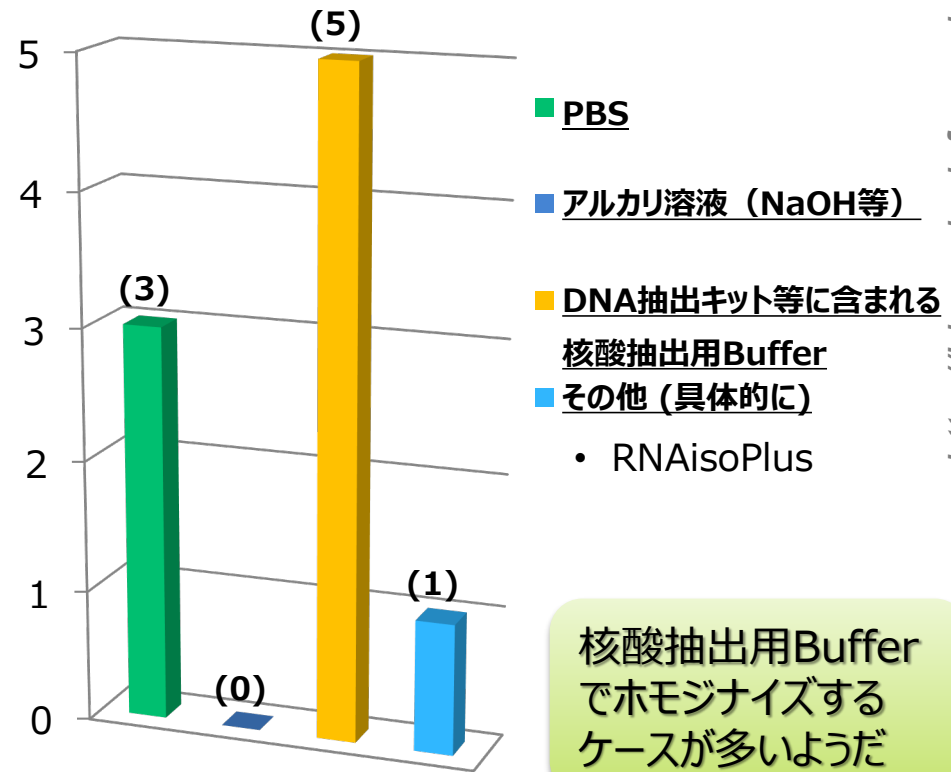
- DNA低吸着チップ
- PCRグレートチップ
- LoRetentionチップ
- DNA低吸着等でない一般的なチップ
- その他（具体的に）
 - 吸着等がなければ一般的なRNase, DNaseフリーのチップを使用しています

使用するチューブ同様
チューブ低吸着チップなど
なんらかのケアをしている傾向にある

**Q26 : 経験のある組織ホモジナイズ方法を教えてください
(複数回答) 回答者数 : 9名**



**Q27 : 組織ホモジナイズを調製する際に使用するBufferを教えてください
(複数回答) 回答者数 : 7名**



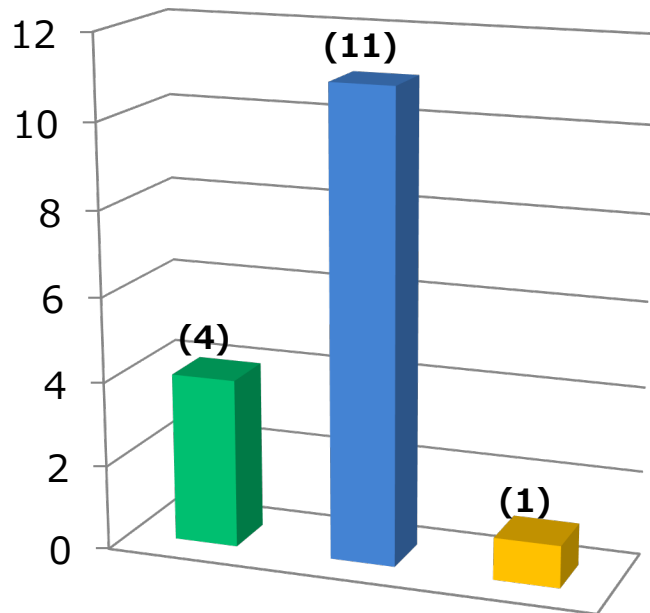
核酸抽出用Bufferでホモジナイズするケースが多いようだ



サンプル調製法

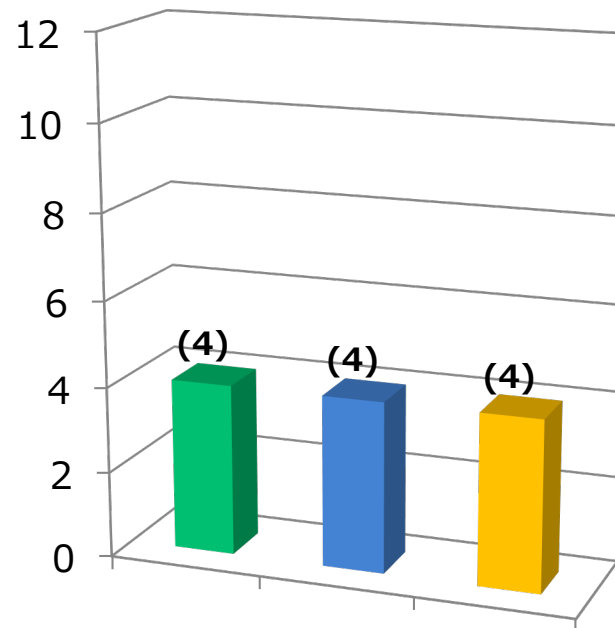
Q28&Q29 : サンプル調製法（血漿・組織）で Proteinase K処理はしますか？

血漿 回答者数：16名



血漿はProteinase K処理を
しないケースが多い

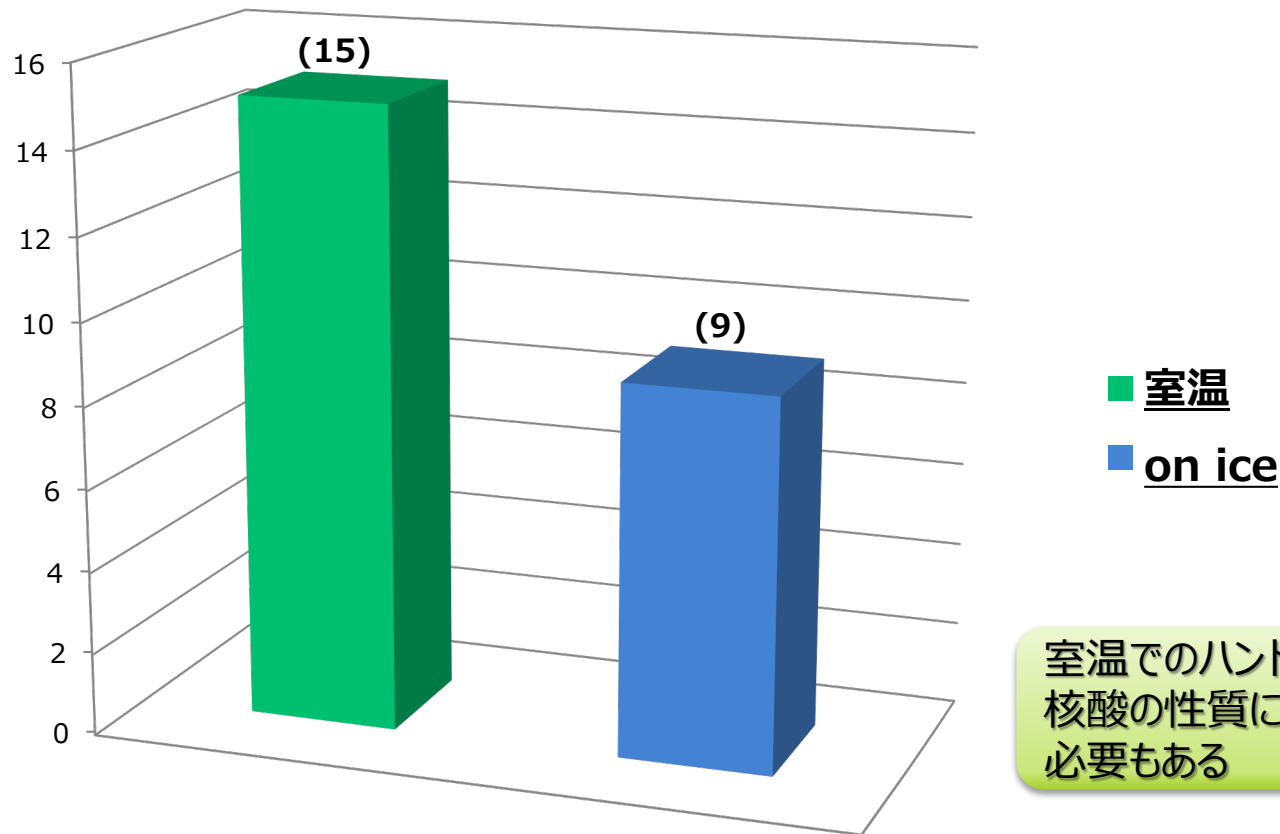
組織 回答者数：12名



■ する
■ しない
■ 両方に該当

Q18 : サンプル調製時の温度を教えてください（複数回答）

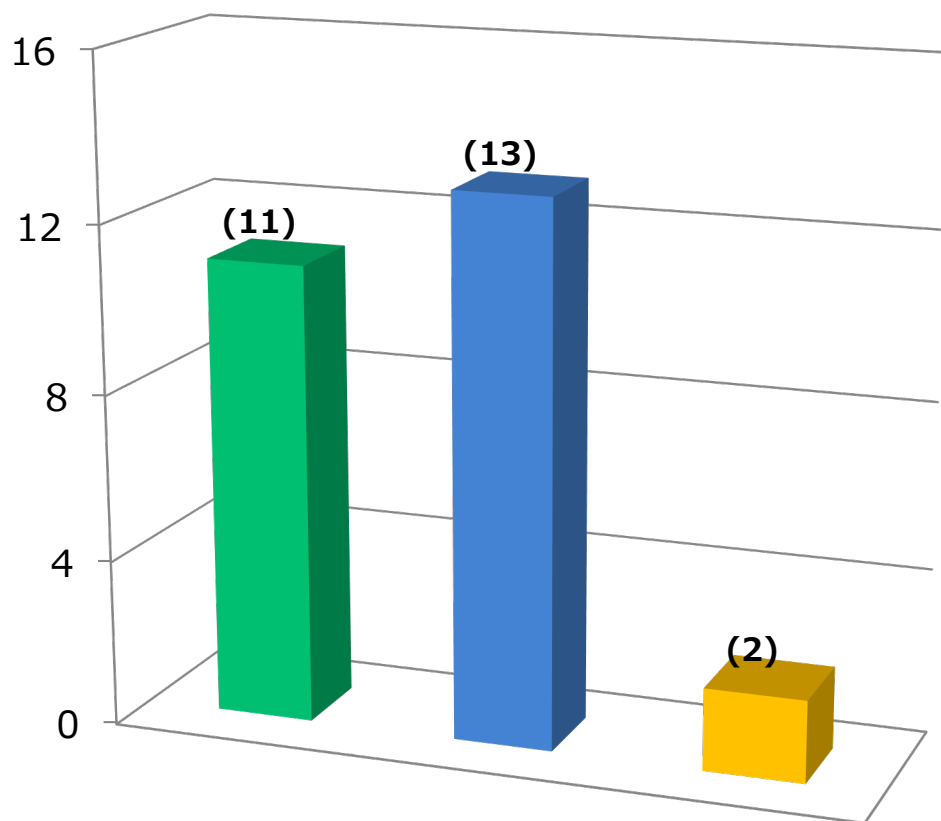
回答者数 : 20名



室温でのハンドリングが多い傾向にあるが、
核酸の性質によってはon iceで実施する
必要もある

Q21 : 検量線試料の調製方法を教えてください（複数回答）

回答者数 : 20名



■ LBA同様、マトリックスを使用して用時調製

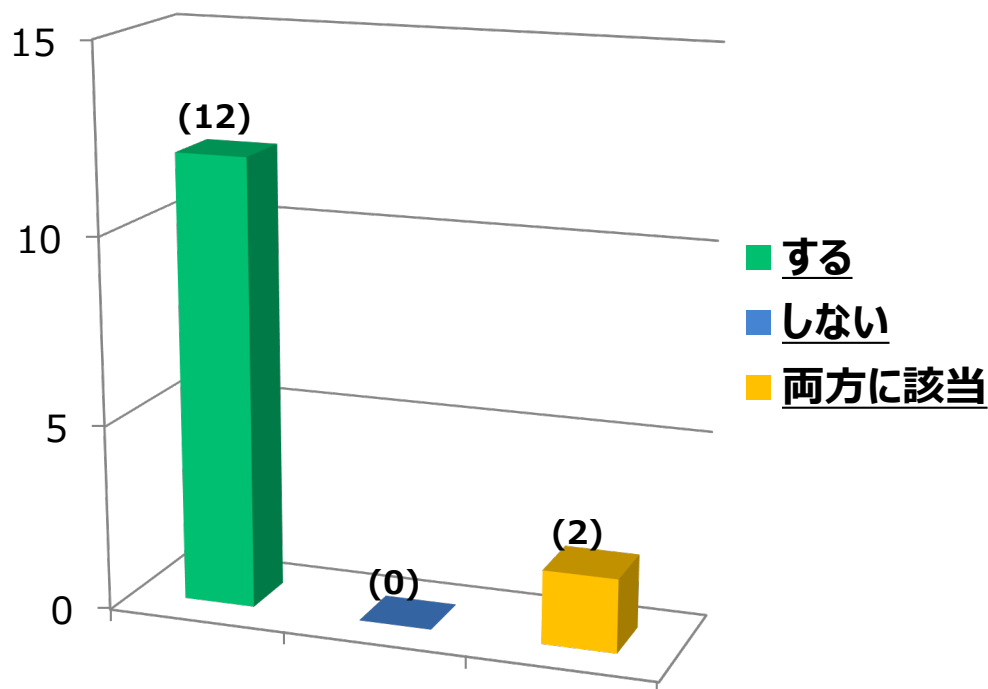
■ 低分子同様、標準溶液を使用してマトリックスへ添加

■ その他（具体的に）

- LC-MS/MSですが、マトリックスで希釈しています。
またはマトリックス（血漿）を使用して標準溶液を調製しています。
- うまく行く方法であればどちらでもよい。

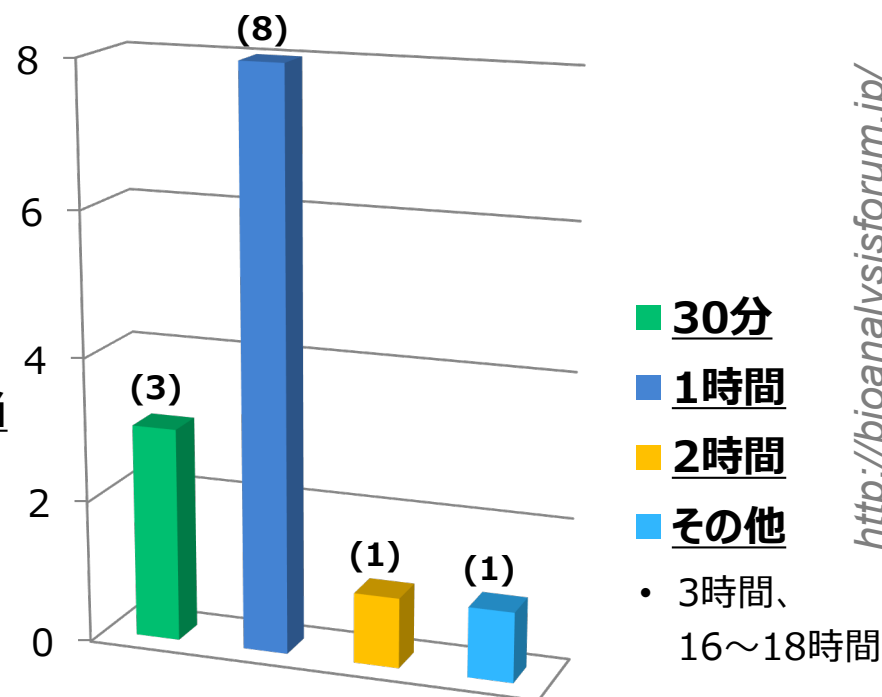
回答者の半数が
低分子と同じ手法を採用している

Q30 : ハイブリダイズ時に
熱処理をしますか？
回答者数 : 14名



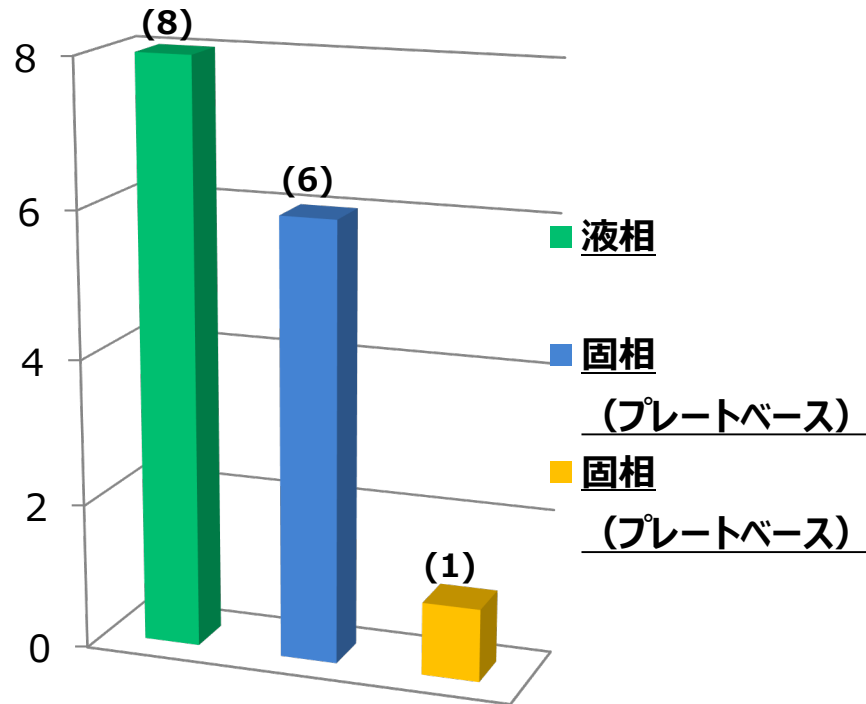
ハイブリダイズの工程では熱処理を
するケースがほとんどであった

Q31 : ハイブリダイズ時の
反応時間を教えてください
回答者数 : 13名



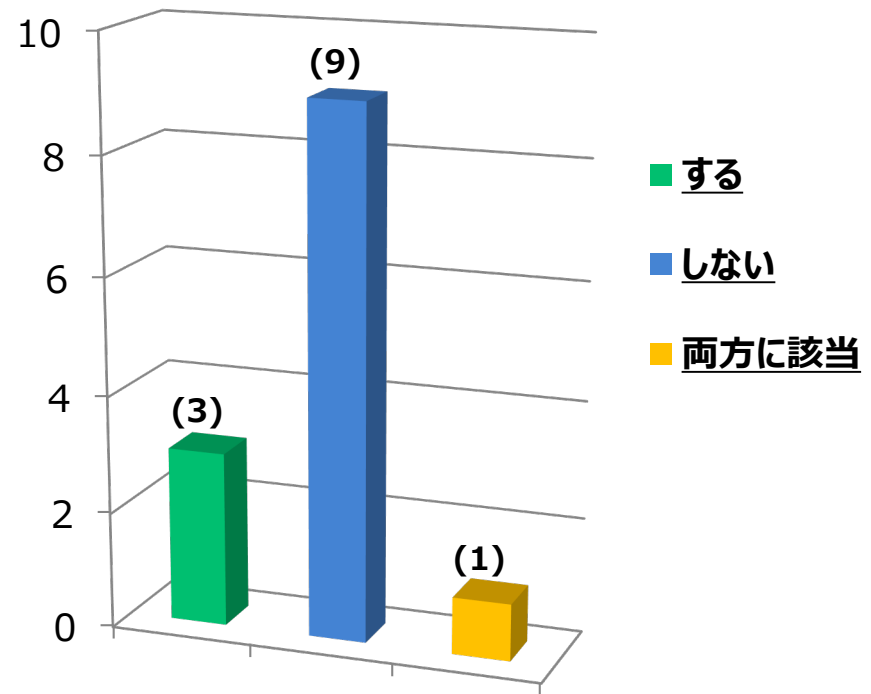
1時間程度で実施するケースがほとんどであったが、
オーバーナイトで実施するケースも見られた

Q32 : ハイブリダイズ時の条件を教えてください（複数回答）
回答者数 : 13名



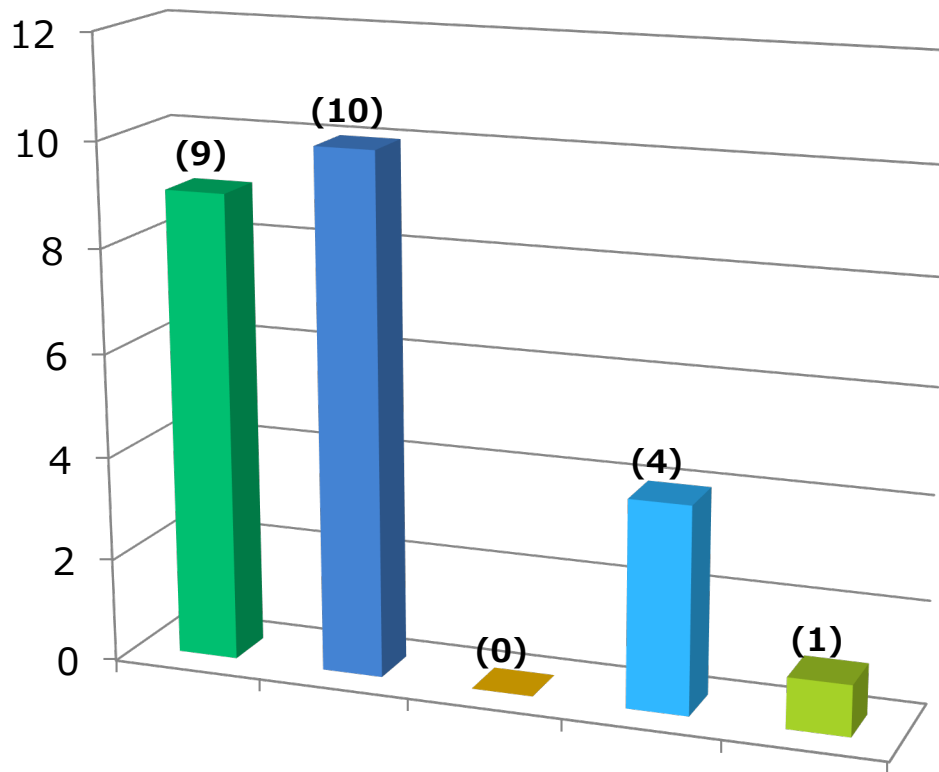
液相、プレート内（固相）
半々であった

Q33 : ハイブリダイズ中の振盪の有無を教えてください
回答者数 : 13名



ハイブリダイズ中に振盪しない場合が多い

**Q34 : 分析法の構築Hybridization assayで
直面する頻度が高い問題を教えてください（複数回答）**
回答者数：13名



- 感度
- 堅牢性 (再現性)
- 希釈直線性
- 安定性
- 特になし

感度、堅牢性で悩むケースが多い
→組織中濃度測定の場合、
高感度が求められるためと考えられる



2. アンケート結果

④分析法バリデーション

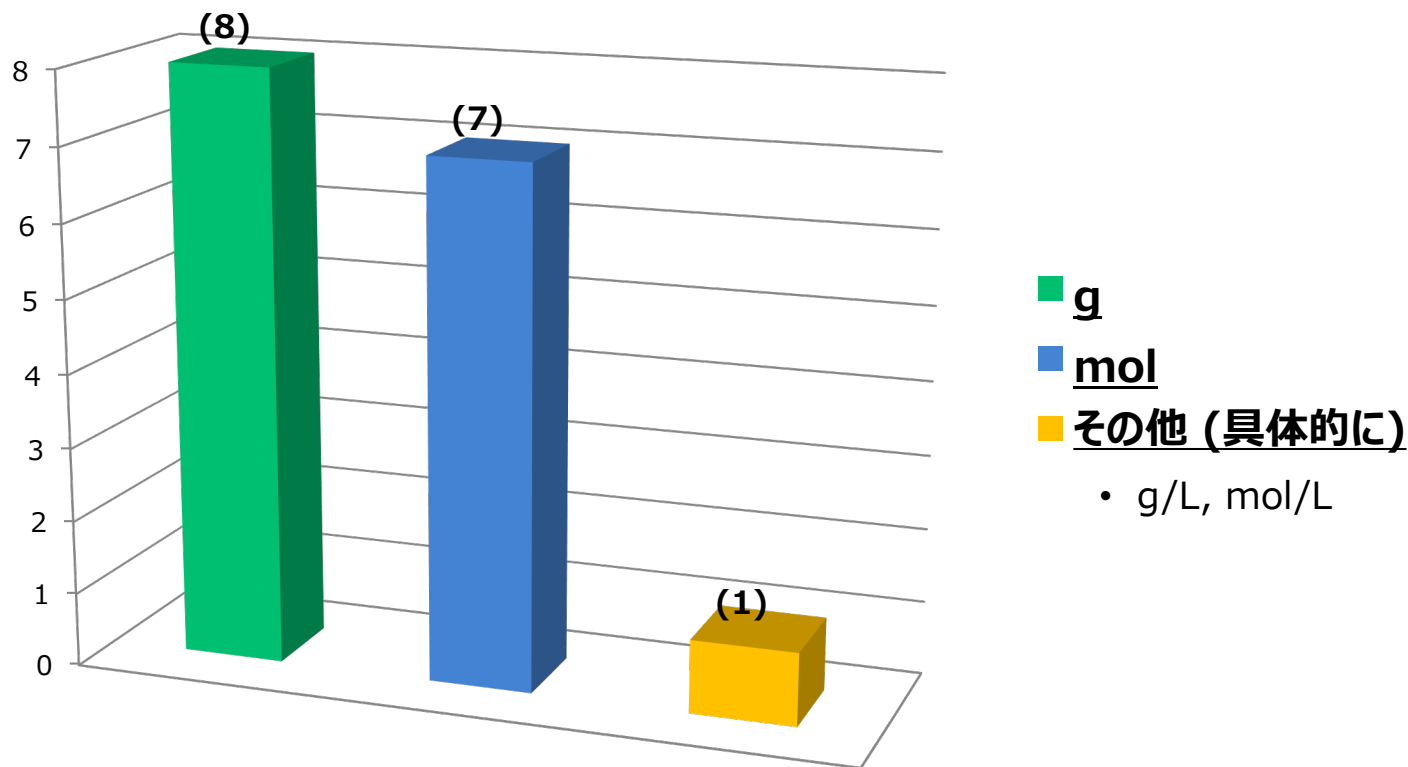
<http://bioanalysisforum.jp/>



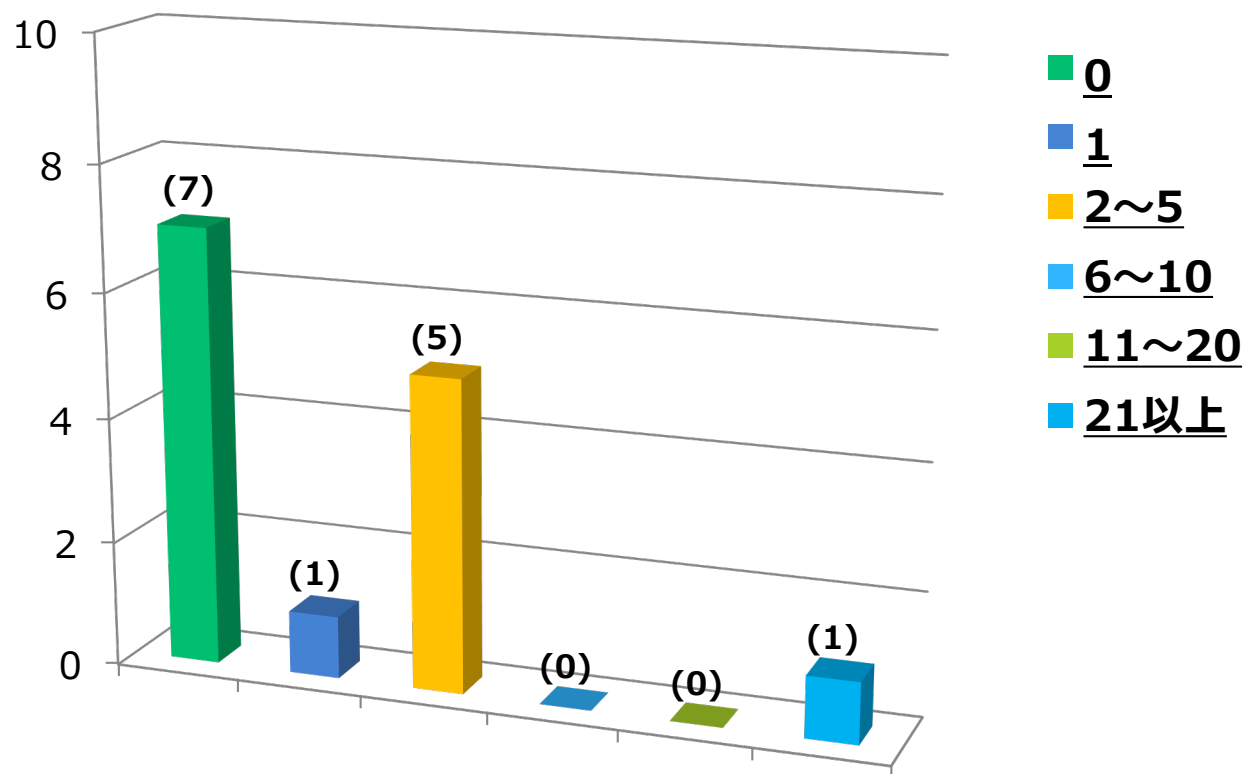
測定単位

Q16 : Hybridization assayで使用する測定単位 を教えてください（複数回答）

回答者数 : 13名

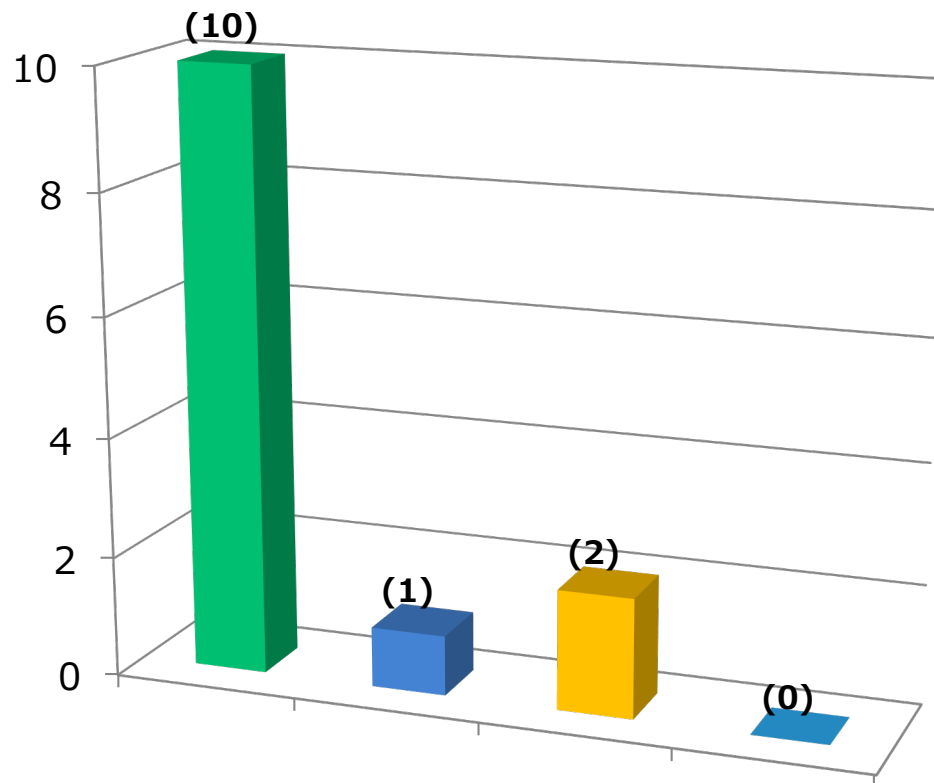


**Q35 : Hybridization assayを使用した
分析法バリデーションの経験数を教えてください**
回答者数：14名



Q36 : Hybridization assayの分析法バリデーションにおいて、実施項目はどのように決定しますか？（複数回答）

回答者数：10名



■ LBAガイドラインを参照

■ クロマトグラフィーガイドラインを参照

■ LBAガイドラインから数項目抽出

■ クロマトグラフィーガイドラインから数項目抽出

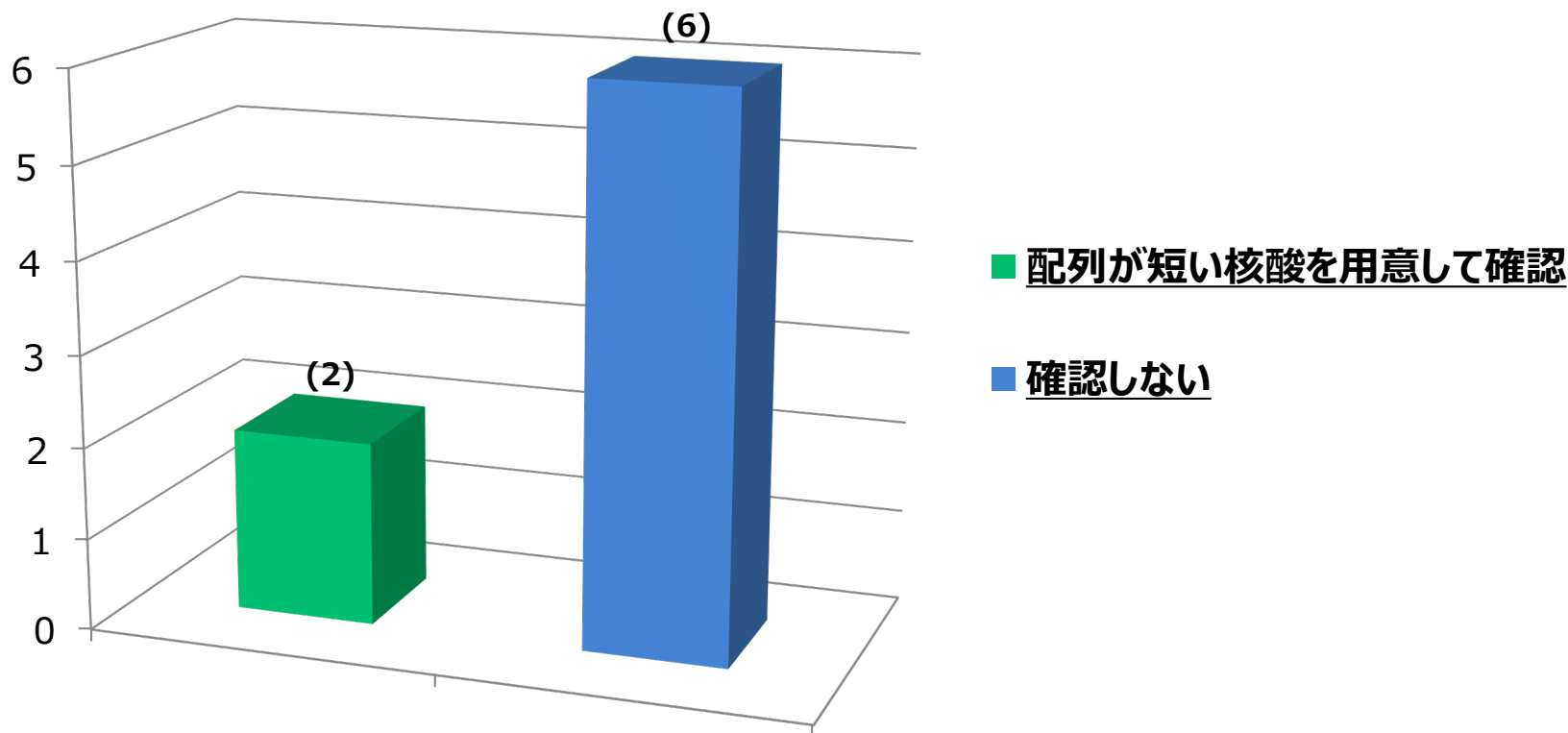
LBAガイドラインを
参考に行っている人が多い



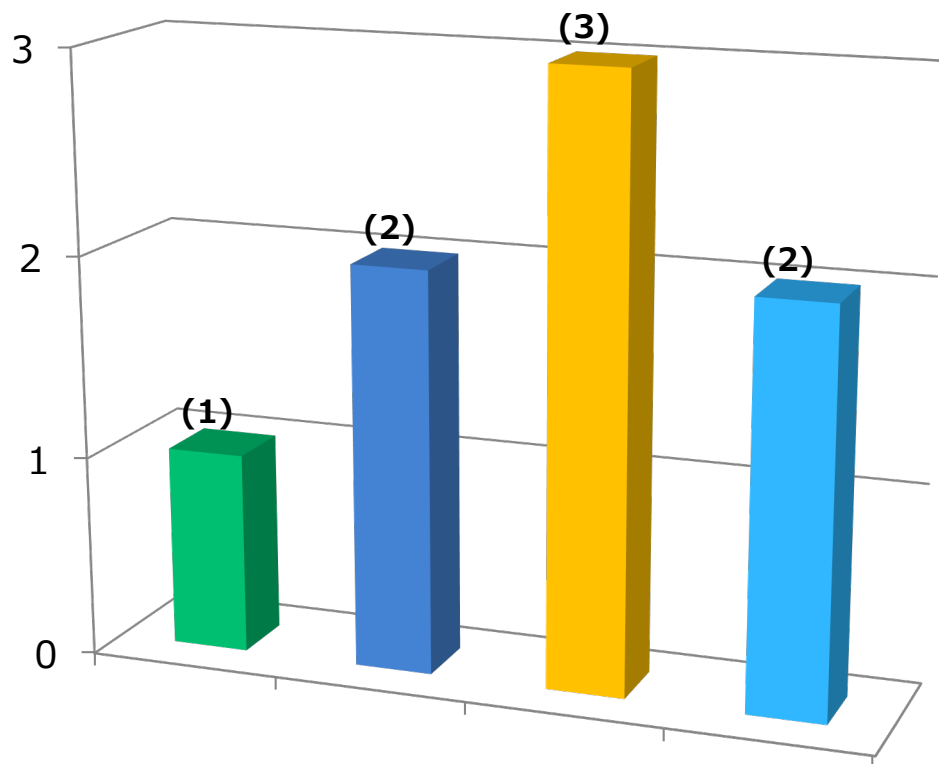
分析法のバリデーション

**Q37 : Hybridization assayの分析法バリデーションにおいて、
特異性は確認しますか？**

回答者数：8名



Q38 : Hybridization assayにおいて、プローブのロットが切り替わった場合、パーシャルバリデーションは実施しますか？
回答者数：8名



■ する

■ 実施しない

■ 両方に該当

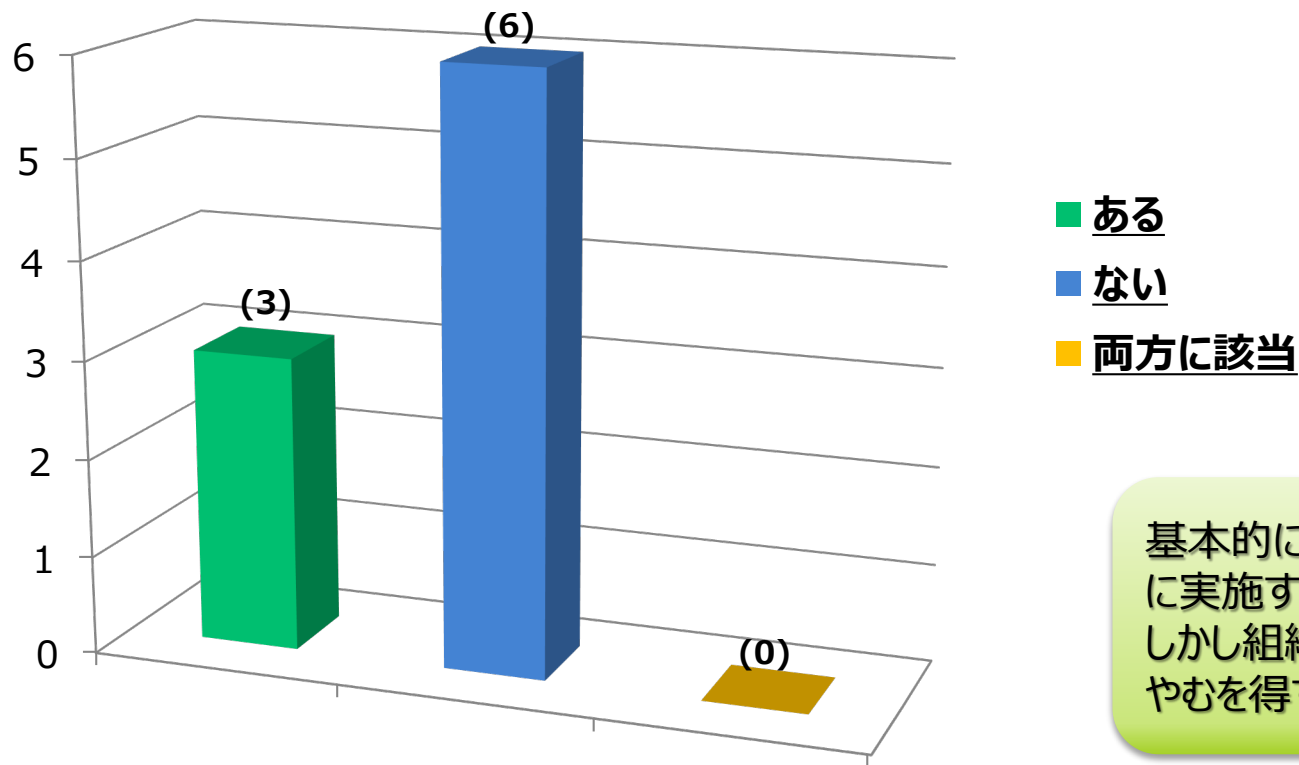
■ その他 (具体的に)

- 経験がないが、おそらくしない
- ロットが切り替わったことがない

LBAのガイドラインに従うなら重要試薬の位置付けのため確認は必要？
しかし、あくまで化学合成品のためロット間で差が出るかは不明。
DG内でも意見が分かれた。

Q39 : Hybridization assayの分析法バリデーションにおいて、 クライテリアを広げたことはありますか？

回答者数：9名

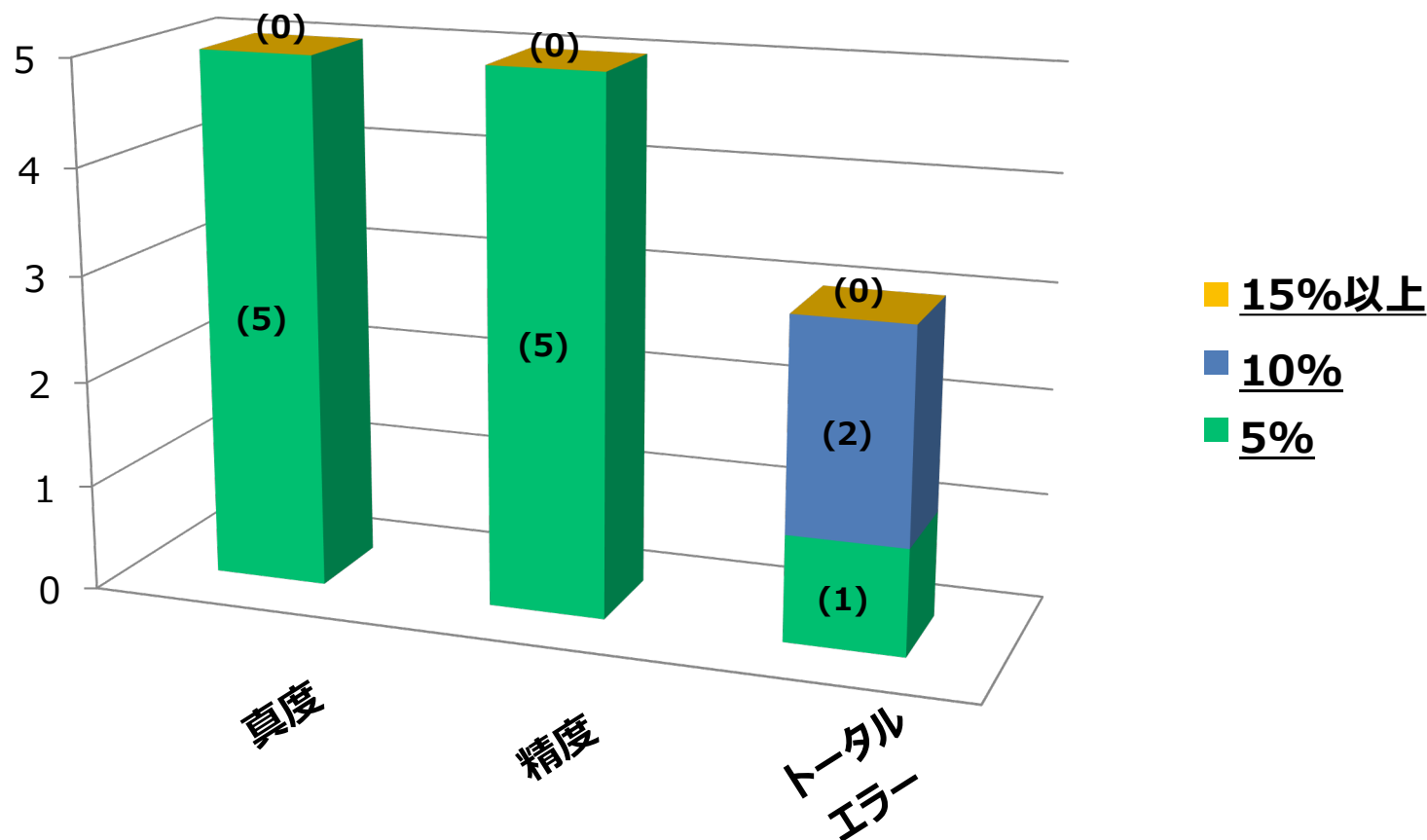


基本的にはクライテリアは広げずに実施することが多い。
しかし組織中濃度測定などで、
やむを得ず広げることも。



分析法のバリデーション

Q40-42 : クライテリアを広げたことがある場合、
どの程度広げましたか？ 回答者数：5名



3. トラブル事例紹介

トラブル事例-1



バックグラウンドが高くなりました。

バックグラウンドが高い原因として、下記があげられると思います。

- ① プローブの非特異的反応
- ② Cutting assayの場合、Cutting処理がうまく行われていない
- ③ Ligation assayの場合、Detection probeがうまく洗浄できていない
- ④ 検出抗体の非特異的反応

①の場合、ブロッキング剤を検証する、プローブ濃度を下げる必要があるかもしれません。

②の場合、S1ヌクレアーゼ等の酵素量をあげることで改善する場合があります。①同様プローブ濃度を下げることも検討ください。

③の場合、Washの回数を増やすことで改善する場合があります。改善が見られない場合、Detection probeを更に短いものにする、もしくは修飾をなくし親和性を下げるなど、プローブ設計を検討ください。Capture probeとDetection probeをLigationさせる検出法に変えることも検討ください。S1ヌクレアーゼ処理を追加することでバックグラウンドが下がる場合があります。

④の場合、①同様ブロッキング剤の検証、検出抗体濃度を下げる必要があるかもしれません。



目的の感度が得られません。
ダイナミックレンジが狭くなります。

目的の感度、ダイナミックレンジが得られない原因として、下記があげられると思います。

- ① Hybridizationの効率が悪い
- ② 複合体がプレートに補足できていない

①の場合、Probeに修飾を加えたり、Hybridization時に使用するBufferの塩濃度にも注意する必要があるかもしれません。一般的には塩濃度が高いほうがHybridizationの効率は良くなる傾向にあるようです。

②の場合、フリーのCapture probeが多くプレートに反応し、複合体が補足できていない場合も考えられます。プレート添加時は、複合体とフリーのCapture probeの競合となるため、プローブ濃度を下げることが検討ください。

その他にも、測定プレートへの持ち込み量を増やす、検出系や分析機器の変更も有用と思います。ELISAの場合、吸光度検出から蛍光や発光検出への検討、もしくはECLやGyrolabへの変更も検討ください。

トラブル事例-3



Ligation反応が進行しませんでした。
(Capture probeを測定対象より長くし、
測定対象とDetection probeをLigationする場合)

測定対象とDetection probeの反応がうまく進んでいない可能性が考えられます。
測定対象の修飾が多い場合、うまく反応が進まない場合もあるようです。

まずは、Hybridization反応のインキュベーション条件（温度、Buffer条件、反応時間）を変更するなど、条件の最適化を実施してみてください。
それでも改善されない場合、Templateの設計変更（Capture probeを測定対象より短くし
Capture probeとDetection probeをLigationする）ことや、場合によってはCutting assay
に切り替えることも検討ください。

トラブル事例-4



測定系のばらつきが大きいです。

ばらつきが大きい原因は、Hybridization反応やプレートへの反応など、反応の際の影響が大きいと思われます。

反応時の温度均一性を高めるために、適切な機器を使用ください。

室温での反応の場合でも、インキュベーターに入れることで温度均一性が保てると思います。

Hybridization反応時もサーマルサイクラーで実施することもよいと思います。

その他にも、Buffer条件、反応時間の変更も考慮ください。



テストプレート（Hybridization反応用）の外側のウェルでシグナル値が高くなりました。

酵素を用いる場合、酵素を新調し実施してみてください。

また、再現性を得るために、温度は一定で行うよう心がけましょう。

トラブル事例-5



測定法構築後に反応が進まなくなりました。再現性も悪いです。

酵素を用いる場合、酵素を新調し実施してみてください。
また、再現性を得るために、温度は一定で行うよう心がけましょう。
詳細は「トラブル事例-4」をご参照ください。



プレートウォッシャーでの洗浄時、複合体が壊れてシグナル値が減衰してしまいました。

プレートウォッシャーでは洗浄が強すぎたのかもしれません。
手動での洗浄（マルチチャンネルピペットで洗浄液を添加）に変更してみてください。
測定対象とプローブの親和性を高く保つため、Bufferの塩濃度にもご注意ください。

Q43 : Hybridization assayで何か困った経験があれば 差支えのない範囲で教えてください 回答者数 : 4名



1塩基短い核酸も測定されると思いますが、その薬理作用も加味した測定系の妥当性について
LBAのクライテリアをそのまま適応するのが難しい時がある、1塩基違い等の核酸を区別するのが難しい（特異性）

DG回答 :

Hybridization assay (LBA) では1塩基違いを完全に区別することは難しいと思われます。代謝物を分けて分析する必要がある場合にはLC-MS等での分析をご検討ください。どのような代謝物が産生されるかの検証はとても重要となります。代謝物が産生されないことがあらかじめ検証されていれば、代謝物は考慮せずに測定できる可能性もあるかもしれません。
各社のポリシーに沿って対応が必要と思われます。



フック効果を実際に経験したことがあるか？

DG回答 :

DG内でフック効果の経験者はいませんでした。



2. Hybridization assay vs LC-MS

- ① 論文調査結果
- ② メリット&デメリット比較



2. *Hybridization assay vs LC-MS*

① 論文調査結果



Hybridization assay及びLC-MSを用いた生体試料
中薬物濃度分析について，文献調査を実施した．

調査論文数：22報（Hybridization 9 + MS 13）

調査化合物数：39種



論文調査

項目	Hybridization assay (12種類)	LC-MS (27種類)
核酸種	アンチセンス : 7種 (18~25 mer) miRNA : 3種 (20~22 mer) siRNA : 1種 (21 mer) リボザイム : 1種 (33 mer)	アンチセンス : 23種 (13~20 mer) 脂質結合オリゴ : 1種 (13 mer) PS-ODN : 1種 (24 mer) siRNA : 1種 (センス21-mer、アンチセンス23-mer) Unmodified DNA oligonucleotides : 1種 (15mer)
塩基長	~20 mer : 7種 21~25 mer : 4種 26~50 mer : 1種	~20 mer : 25種 21~25 mer : 2種
測定ステージ	前臨床 : 8種 臨床 : 3種 メソッド開発or不明 : 1種	前臨床 : 4種 臨床 : 2種 メソッド開発or不明 : 21種

MSは短い核酸
に強みがある？



論文調査

項目		Hybridization assay (12種類)	LC-MS (27種類)
動物種		マウス、ラット、サル、ヒト	マウス、ラット、ウサギ、サル、ヒト
マトリックス	動物	血漿、血清、CSF、細胞、尿、胆汁、糞、 組織（肝臓、腎臓、脾臓、肺、心臓、）	血漿、CSF、尿、 組織（肝臓、腎臓、脳、肺、脾臓、心臓）
	ヒト	血清、血漿、尿、赤血球、K562細胞	血漿、尿
ダイナミックレンジ		～50倍： 3種 ～100倍： 2種 ～1000倍： 4種 1000倍～： 3種	～50倍： 0種 ～100倍： 1種 ～1000倍： 25種 1000倍～： 0種 （不明1種）

Hybridization assay
のダイナミックレンジは
様々



論文調査

項目	Hybridization assay (12種類)	LC-MS (27種類)
その他	Hybridization手法 Cutting assay (1 probe法) : 2種 Ligation assay (2 probe法) : 8種 Dual-Hybri (2 probe法) : 1種 検出系 ELISA (Alkaline Phosphatase) : 11種 ECL : 2種 プローブ DIG : 12種 ルテニウム直標識 : 1種	検量線サンプル調製 マトリックスにスパイク : 24種 マトリックスで希釈 : 2種 ホモジナイズ条件 Lysis Buffer : 3種 Lysis Buffer + ProK処理 : 1種 水 : 1種 サンプル調製 PCI抽出 : 1種 SPE : 6種 PCI抽出→SPE : 4種 Hybridization : 3種



論文調査 纏め

✓ *Hybridization assay*

- アンケート同様、アンチセンスの分析が多く、今回調査した論文にはデコイの実施はなかった。
- 塩基長に関してもアンケート同様の結果となった。調査した論文にはアプタマーは含まれておらず、論文上で50mer以上の実施は確認できなかった。
- Hybridizationの手法に関してもアンケート同様の結果となり、Ligation assay（2 probe法）での実施が最も多かった。
- 検出系は論文上、ELISAが多く、ECLの実施は2報にとどまった。一方アンケートについても論文同様の傾向とはなったが、ECLの実施はELISAと同程度であり、徐々にECLでの実施にシフトして来ているものと思われる。



調査文献リスト (*Hybridization assay*)

No.	DOI	タイトル
1	10.1038/s41598-019-40187-4	Application of Locked Nucleic Acid Oligonucleotides for siRNA Preclinical Bioanalytics
2	10.1016/j.japna.2003.07.002	Development and validation of a sensitive, specific, and rapid hybridization-ELISA assay for determination of concentrations of a ribozyme in biological matrices
3	10.1089/nat.2014.0528	Development and Application of an Ultrasensitive Hybridization-Based ELISA Method for the Determination of Peptide-Conjugated Phosphorodiamidate
4	10.1089/nat.2011.0319	Enzyme-Linked Bridging Assay Method for the Quantification of Oligonucleotide-Based Drugs in Biological Matrices"
5	10.1007/s11095-006-0082-3	A Specific Picomolar Hybridization-Based ELISA Assay for the Determination of Phosphorothioate Oligonucleotides in Plasma and Cellular Matrices
6	10.1208/s12248-010-9214-0	A Novel Ultrasensitive Hybridization-Based ELISA Method for 2-Methoxyphosphorothiolate MicroRNAs and Its In vitro and In vivo Application"
7	10.1006/abio.2002.5576	Development of an Ultrasensitive Noncompetitive Hybridization-Ligation Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide in Plasma"
8	-	ヌシネルセン申請資料
9	-	Inotersen non-clinical review

<http://bioanalysisforum.jp/>



調査文献リスト (LC-MS)

No.	DOI	タイトル
1	10.1016/j.omtn.2020.01.036.	Dose-Finding Study and Pharmacokinetics Profile of the Novel 13-Mer Antisense miR-221 Inhibitor in Sprague-Dawley Rats
2	10.1016/j.jconrel.2018.12.006	Pharmacokinetic evaluation of liposomal nanoparticle-encapsulated nucleic acid drug: A combined study of dynamic PET imaging and LC/MS/MS analysis
3	10.1021/acs.analchem.0c01382	Hybridization Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: An Alternative Bioanalytical Method for Antisense Oligonucleotide Quantitation in Plasma and Tissue Samples
4	10.1016/j.jpba.2017.12.027	Development and validation of a bioanalytical method for quantification of LNA-i-miR-221, a 13-mer oligonucleotide, in rat plasma using LC-MS/MS
5	10.1016/j.jpba.2020.113451	Development and validation of bioanalytical methods for LNA-i-miR-221 quantification in human plasma and urine by LC-MS/MS
6	10.4155/bio-2017-0145	Quantitative analysis of imetelstat in plasma with LC-MS/MS using solid-phase or hybridization extraction
7	10.1016/j.jpba.2012.06.022	Development and validation of LC-MS/MS method for the detection and quantification of CpG oligonucleotides 107 (CpG ODN107) and its metabolites in mice plasma
8	10.1208/s12248-012-9394-x	A One-Step Solid Phase Extraction Method for Bioanalysis of a Phosphorothioate Oligonucleotide and Its 3' n-1 Metabolite from Rat Plasma by uHPLC-MS/MS

<http://bioanalysisforum.jp/>



調査文献リスト (LC-MS)

No.	DOI	タイトル
9	10.4155/bio.13.319	Quantification of oligonucleotides by LC-MS/MS: the challenges of quantifying a phosphorothioate oligonucleotide
10	10.4155/bio.11.100	Quantitation of locked nucleic acid antisense oligonucleotides in mouse tissue using a liquid-liquid extraction LC-MS/MS analytical approach
11	10.4155/bio-2019-0134	LC-TOF-MS methods to quantify siRNAs and major metabolite in plasma, urine and tissues
12	10.1208/ps060103	Development of a bioanalytical method for quantification of a 15-mer oligonucleotide at sub-ng/ml concentrations using LC-MS/MS
13	10.4155/bio-2019-0117	LC-MS quantification of oligonucleotides in biological matrices with SPE or hybridization extraction

<http://bioanalysisforum.jp/>



2. *Hybridization assay vs LC-MS*

② メリット & デメリット 比較

<http://bioanalysisforum.jp/>

① 前処理、分析機器に関する点 (DG内で最も多かった意見に👑)

	Hybridization assay	LC-MS
メ リ ッ ト	測定系の性能 - 高感度👑 - マトリックス効果を受けにくい	測定系の性能 - 多成分の同時測定が可能👑 - 選択性が高い👑 - 代謝物を分離できる👑 - ダイナミックレンジが広く、再測定頻度が低い。👑 - 構造解析・推定・代謝物検索が可能 - ばらつきが小さい - ダイレクトに化合物を分析できる安心感
	前処理 - 血漿の場合、前処理不要 - サンプル使用量が少ない - LBAと大差ないハンドリング	
	メソッド開発 - メソッド開発に時間を要しない - プローブがあれば比較的簡単に測定系の構築が可能 - 検出が容易 - LBAで使用する一般的なプレートリーダーを使用できる - 操作の自動化が容易	メソッド開発 複数の前処理法から最適な方法を選択することができる

① 前処理、分析機器に関する点 (DG内で最も多かった意見に👑)

	Hybridization assay	LC-MS
デメリット	測定系の性能 - 機器によっては吸着の懸念 - マトリックス効果を受ける Dynamic rangeが狭く、再測定頻発が高い、多段階希釈必要となる👑 ばらつきが大きい - 代謝物との分離が難しい (選択性低) 👑 - 代謝物を含む測定値となる場合がある メソッド開発 - 前処理条件 (ハイブリ条件) が測定対象により多様 - プローブの設計が必要 重要試薬の手配に時間がかかる - 系や測定枚数によっては温度管理が面倒 (恒温攪拌機が複数必要) - 化合物ごとにプローブが必要	測定系の性能 - 感度が低い👑 - キャリーオーバーが多い - マトリックス効果を受ける - ISとの分離 前処理 前処理が煩雑、多岐にわたる - LLE (PCI) and/or SPEが必要 - ISが必要👑 メソッド開発 検討に時間がかかる - 機器が専有化になる - 化合物毎に条件をセットアップ - 適切なISの選択が難しい



メリット&デメリット比較

② スループット、頑健性、コストに関する点 (DG内で最も多かった意見に👑)

	Hybridization assay	LC-MS
メ リ ッ ト	<u>スループット</u> - DDS、修飾違いなど、配列が同じであれば同一メソッドで測定可能 測定のスループットが高い👑 機器トラブルはほぼない	<u>スループット</u> 分析のスループットは良い👑 - n=1測定で問題ない - 分析条件の汎用性が高い
	<u>頑健性</u> 分析装置による影響はほぼない - 全自動化することで高スループット化が可能	<u>頑健性</u> バラツキが少ない - ヒト間差が少ない👑
	<u>コスト</u> - ランニングコストが安い - 測定機器が安価	<u>コスト</u> 特殊なカラム以外は安価👑 - 一般的な試薬のため安価

② スループット、頑健性、コストに関する点 (DG内で最も多かった意見に👑)

	Hybridization assay	LC-MS
デメリット	<u>スループット</u> • 二重測定が必要👑 • インキュベートなど測定外で手順が煩雑	<u>スループット</u> • 測定のスループットが低い👑
	<u>頑健性</u> • LBAの基準に準拠するのが難しいこともある • 再現性が低い (施設間差大) • CVが乱れやすい印象 (特にcutting) 👑 • プレート間差、ロット間差が出る可能性	<u>頑健性</u> • カラムの劣化など、大量サンプル測定に注意が必要 • 装置コンディション (吸着など) が影響しやすい👑 • 経時的なイオン強度の低下が生じやすい (IS必須) 👑 • 機器トラブルが多い
	<u>コスト</u> • 化合物毎にProbeの設計が必要となり、作成時間およびコストがかかる (初動コストが高い) • 化合物毎に分析法を検討 • 分析系構築の際の検討項目が多い • プローブ、試薬等が高価👑	<u>コスト</u> • ランニングコストが高い • 核酸分析に適した分析カラムが必要 • 測定機器が高価 • 機器の管理👑 (低分子と中分子で使用をわけ)

メリット・デメリット 纏め

✓ *Hybridization assay*

- ☺ 高感度で検討時間が比較的短く、通常のLBA同様の操作であることから作業面は容易。
- ☹ 一方で、Duplicate（あるいはTriplicate）分析が必要となるため、1日の処理本数はLC-MSに劣る可能性がある。LBA特有の施設間差、ヒト間差がみられる場合も。代謝物との分離も困難である場合が多い。

✓ *LC-MS*

- ☺ 代謝物との分離が可能で多成分同時分析が可能であることが最大のメリット。
- ☹ Hybridization assayと比較し前処理が煩雑になる傾向が見受けられ、イオンペアを用いた分析の場合、機器は専用機となる可能性も。感度低下や機器トラブルも考えられるため、Hybridization assayより装置コンディションに気を配る必要がある。

分析手法をどのように使い分けるか？？

✓ *Hybridization assay*を選択するステージとして

- 組織など汚い試料に強いため開発初期
- 感度が良いため開発後期

✓ *LC-MS*を選択するステージとして

- メソッド開発がすぐできるため開発初期
- 多検体処理が可能なため開発後期

DG内で注目する視点によって、意見が分かれた
各分析手法の原理、特徴、測定目的を良く考える必要がある。

目的、用途に応じて分析手法を選択する！

シンポジウム中にいただいた質問及び回答を記載します。 ご質問ありがとうございました！



核酸の場合、qPCRなどで増幅させて測定する方式があると思うのですが、qPCR等ではなく、ハイブリダイゼーションアッセイを使用しなければならない理由というのがありますでしょうか？

DG回答：

必ずHybridization assayを選択しなければならないということではなく、それぞれの分析手法の特徴をご理解いただき、選択する必要があると存じます。

q-PCRで増幅させて分析することも可能で、増幅を行いますので高感度に測定できることが利点と思います。

一方で、q-PCRと比較した場合のHybridization assayの利点としては、サンプルを精製する必要がなく、サンプルに直接プローブを添加し処理が可能であるため、抽出効率を考慮する必要がありません。またLBAガイドラインに準拠することも可能です。

さらに、核酸医薬品がターゲットの場合、20mer程度と短い、修飾核酸や末端にDDSがついているなど、増幅自体が難しいこともあるようです。

また、LBAやqPCRでは代謝物を分けて分析することは困難ですので、代謝物を考慮する必要がある場合、LC-MSを用いることが必要となります。

従って、分析の目的やステージなどに応じ、分析手法を選択することが重要になると考えております。

Thank you!

ポスターの内容についてご質問がある場合は
下記メールアドレスまでご連絡ください。

suguru-hanari@cmicgroup.com

受付期間は**2022年3月31日**までとなります