



## 核酸医薬品のバイオアナリシスのための手法

シミックファーマサイエンス株式会社

**林 善治**



1. 核酸医薬品のバイオナリシス背景

2. Hybridization-LBA

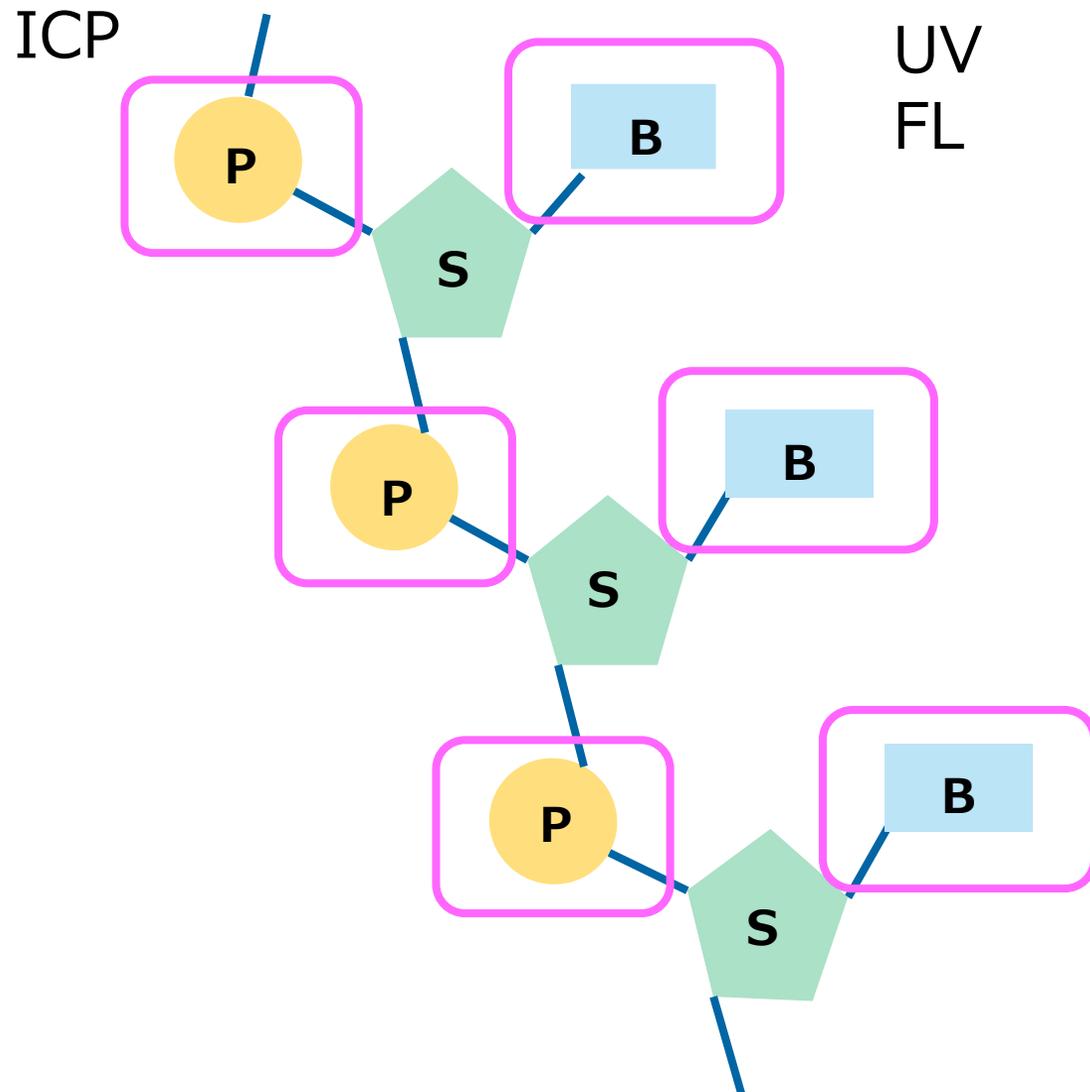
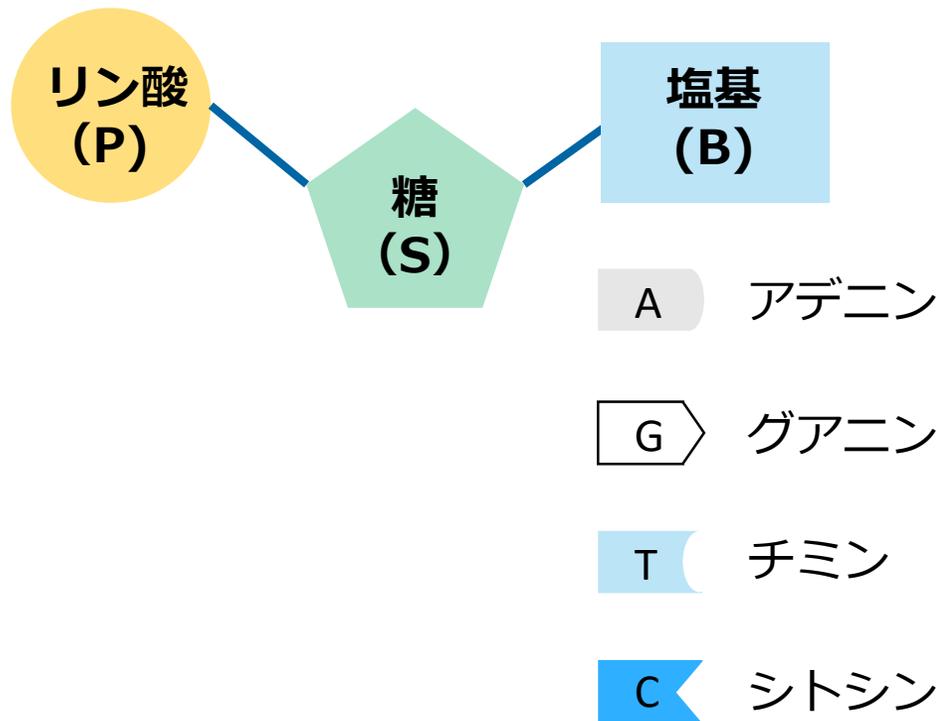
3. Hybridization-LC-FL

4. LC-MS

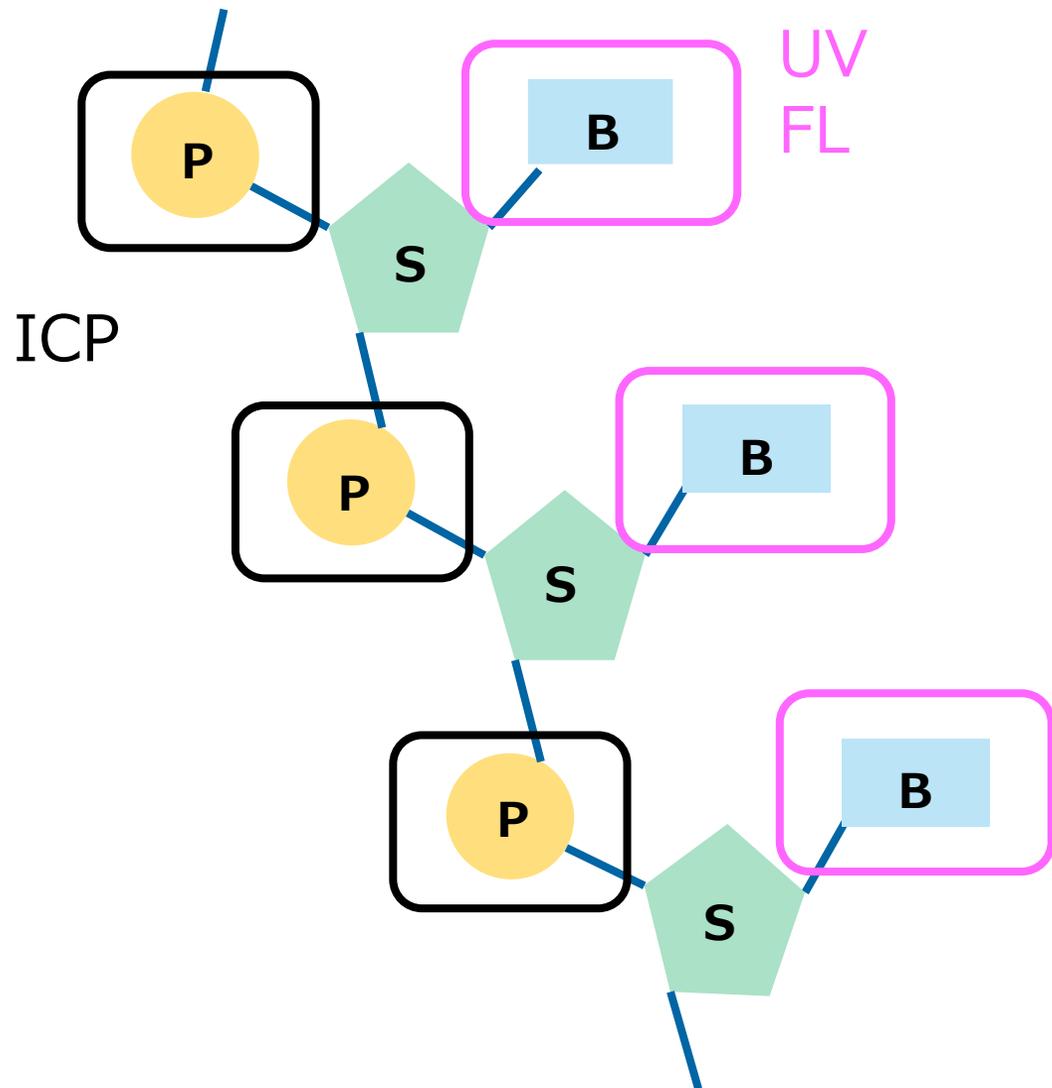
5. 各手法の比較



# 核酸医薬品の構造



# 核酸医薬品の測定方法



核酸（モノマー）に着目した測定方法



選択性が課題

ターゲット核酸医薬品

特有のパラメーターを利用

✓ **分子量**

✓ **配列**



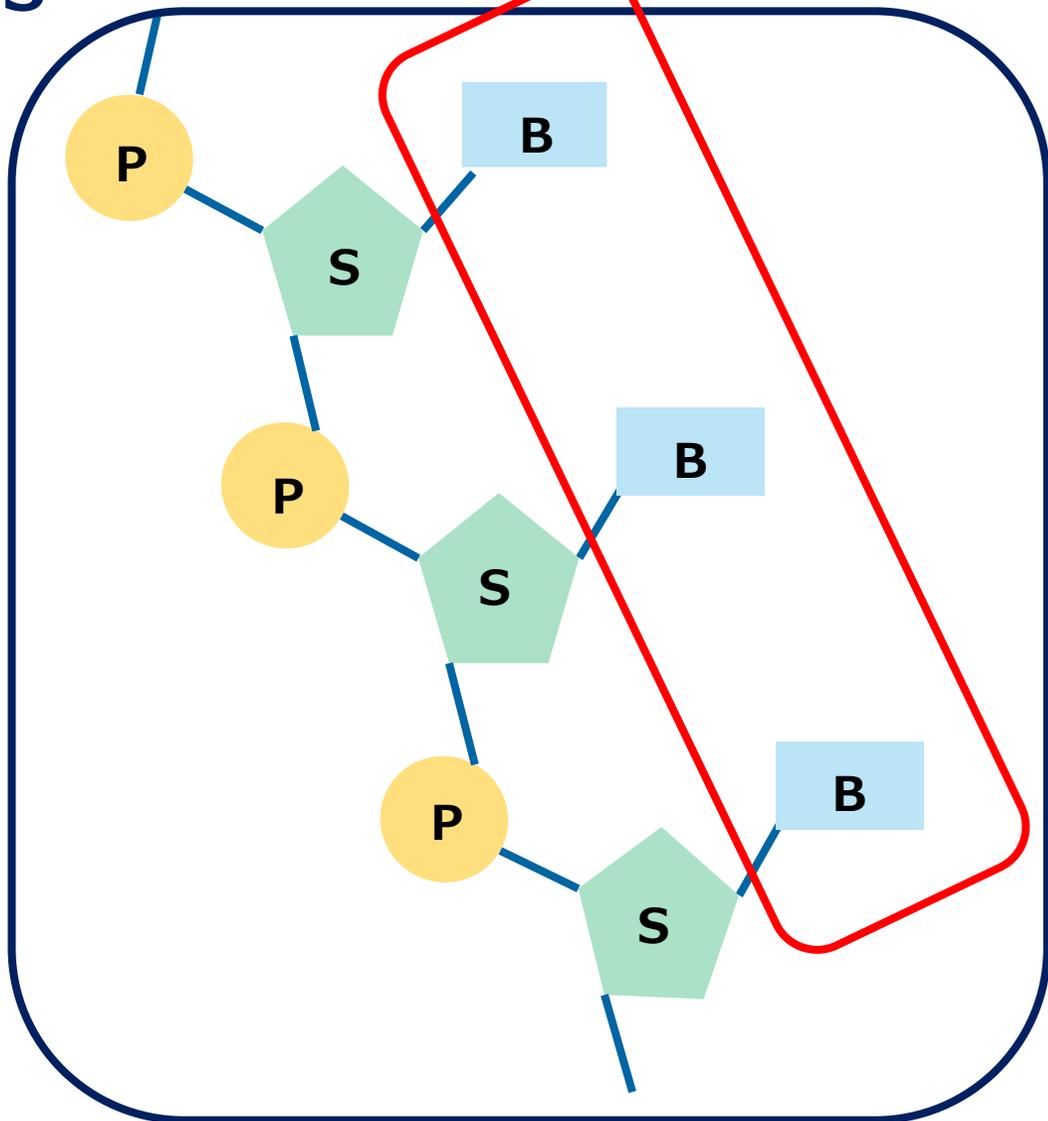
高選択的，高特異的に測定

# 核酸医薬品の測定方法



MS

## Hybridization



核酸（モノマー）に着目した測定方法



選択性が課題

ターゲット核酸医薬品

特有のパラメーターを利用

✓ 分子量

✓ 配列



高選択的, 高特異的に測定

# Hybridization

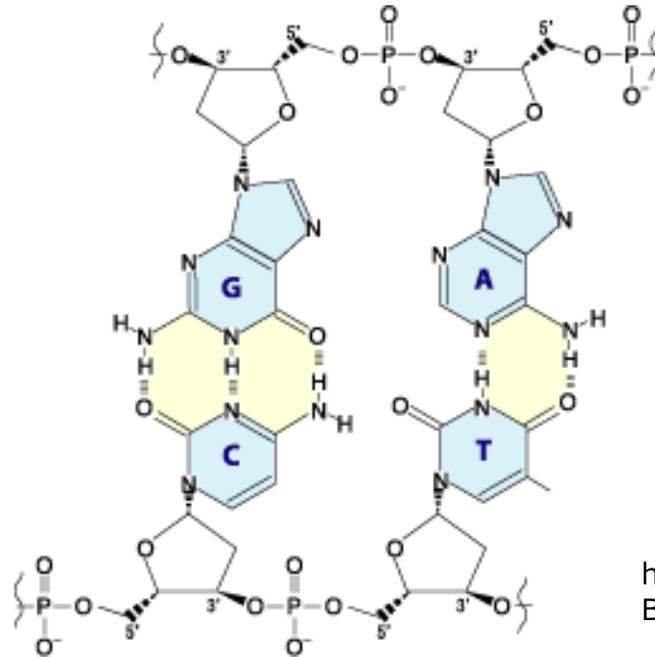


✓ 核酸（医薬品）分子に含まれる塩基はGとCまたはAとT（U）で

**特異的（相補的）に水素結合**を形成

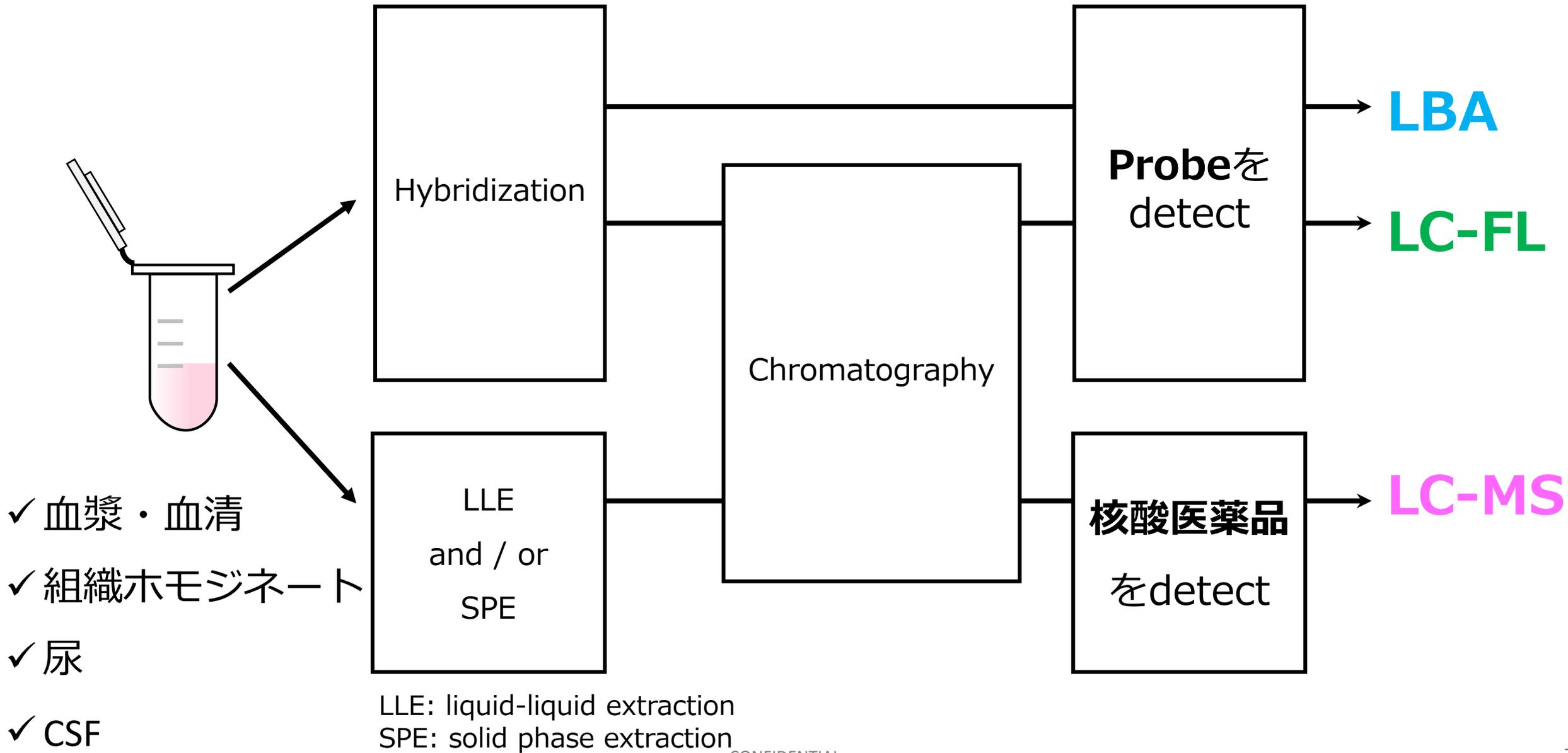
✓ ターゲット核酸医薬品に対して相補的な配列を有する核酸（probe）を用意し、

測定に使用する



<https://www.wikiwand.com/ja/%E3%83%87%E3%82%AA%E3%82%AD%E3%82%B7%E3%83%AA%E3%83%9C%E6%A0%B8%E9%85%B8>

# 核酸医薬品のBA



# 承認済み核酸医薬品測定方法



Category	Drug Name	Developer	FDA/EMA * Approval Year	Therapeutic Indication	Modification/Delivery	Length (nt)	Bioanalysis Method
ASO	Fomivirsen	Ionis Pharmaceuticals	1998	CMV retinitis in AIDS patients	PS	21	CGE-UV [7]
	Mipomersen	Ionis Pharmaceuticals	2013	Familial hypercholesterolemia	PS, 2'-MOE	20	CGE-UV [8,9], ELISA [8-10], LC-MS [9]
	Eteplirsen	Sarepta Therapeutics	2016	Duchenne muscular dystrophy	PMO	30	NA
	Nusinersen	Ionis Pharmaceuticals/Biogen	2016	Spinal muscular atrophy	PS, 2'-MOE	18	ECL, ELISA [11]
	Defibrotide	Jazz Pharmaceuticals	2016	Veno-occlusive disease in the liver		NA	LC-UV [12] LC-MS [13]
	Inotersen	Akcea Therapeutics and Ionis Pharmaceuticals	2018	Nerve damage in adults with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis	PS, 2'-MOE	20	ELISA [14]
	Volanesorsen	Ionis Pharmaceuticals/Akcea	2019	Familial chylomicronemia syndrome	PS, 2'-MOE	20	ELISA, LC-MS, LSC [15]
	Golodirsen	Sarepta Therapeutics	2019	Duchenne muscular dystrophy	PMO	25	LC-MS [16]
	Viltolarsen	NS Pharma	2020	Duchenne muscular dystrophy	PMO	21	LC-MS [17]
Casimersen	Sarepta Therapeutics	2021	Duchenne muscular dystrophy	PMO	22	NA	
siRNA	Patisiran	Alnylam Pharmaceuticals	2018	Hereditary transthyretin-mediated amyloidosis	2'-OMe, LNP	21 (sense strand) + 21 (antisense strand)	LC-fluorescence [18]
	Givosiran	Alnylam Pharmaceuticals	2019	Acute hepatic porphyrias	PS, 2'-OMe, 2'-F, GalNAC	21 (sense strand) + 23 (antisense strand)	LC-HRMS [19,20]
	Inclisiran	Alnylam Pharmaceuticals/Novartis	2021	Hypercholesterolemia	2'-OMe, 2'-F, GalNAC	21 (sense strand) + 23 (antisense strand)	LC-HRMS [21]
	Lumasiran	Alnylam Pharmaceuticals	2020	Primary hyperoxaluria type 1	PS, 2'-OMe, 2'-F, GalNAC	21 (sense strand) + 23 (antisense strand)	LC-HRMS [22]
	Vutrisiran	Alnylam Pharmaceuticals	2022	Hereditary transthyretin-mediated amyloidosis	PS, 2'-OMe, 2'-F, GalNAC	21 (sense strand) + 23 (antisense strand)	LC-HRMS [23]
Aptamer	Pegaptanib	OSI Pharmaceuticals	2004	Neovascular age-related macular degeneration	PEG	28	LC-UV [24,25], ELISA [25]

\*: Volanesorsen was approved by the EMA, and the others were approved by the U.S. FDA. 2'-F: 2'-fluorine; 2'-MOE: 2'-O-methoxyethyl; 2'-OMe: 2'-O-methylation; ASO: antisense oligonucleotide; CGE: capillary gel electrophoresis; CMV: cytomegalovirus; CSF: cerebrospinal fluid; ECL: electrochemiluminescence; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; EMA: European Medicines Agency; FDA: Food and Drug Administration; GalNAC: N-acetylgalactosamine; LC-HRMS: liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry; LC-MS: liquid chromatography-mass spectrometry; LSC: liquid scintillation counting; LNP: lipid nanoparticle; NA: not available; PEG: polyethylene glycol; PMO: phosphorodiamidate morpholino oligomer; PS: phosphorothioate; UV: ultraviolet.

Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 15474

■ LBA  
■ LC-FL  
■ LC-MS

# 使用したモデル核酸医薬品



測定対象物質：Nusinersen

N	2'-O-methoxyethyl
N	5-Methyl pyrimidine
—	Phosphorothioate

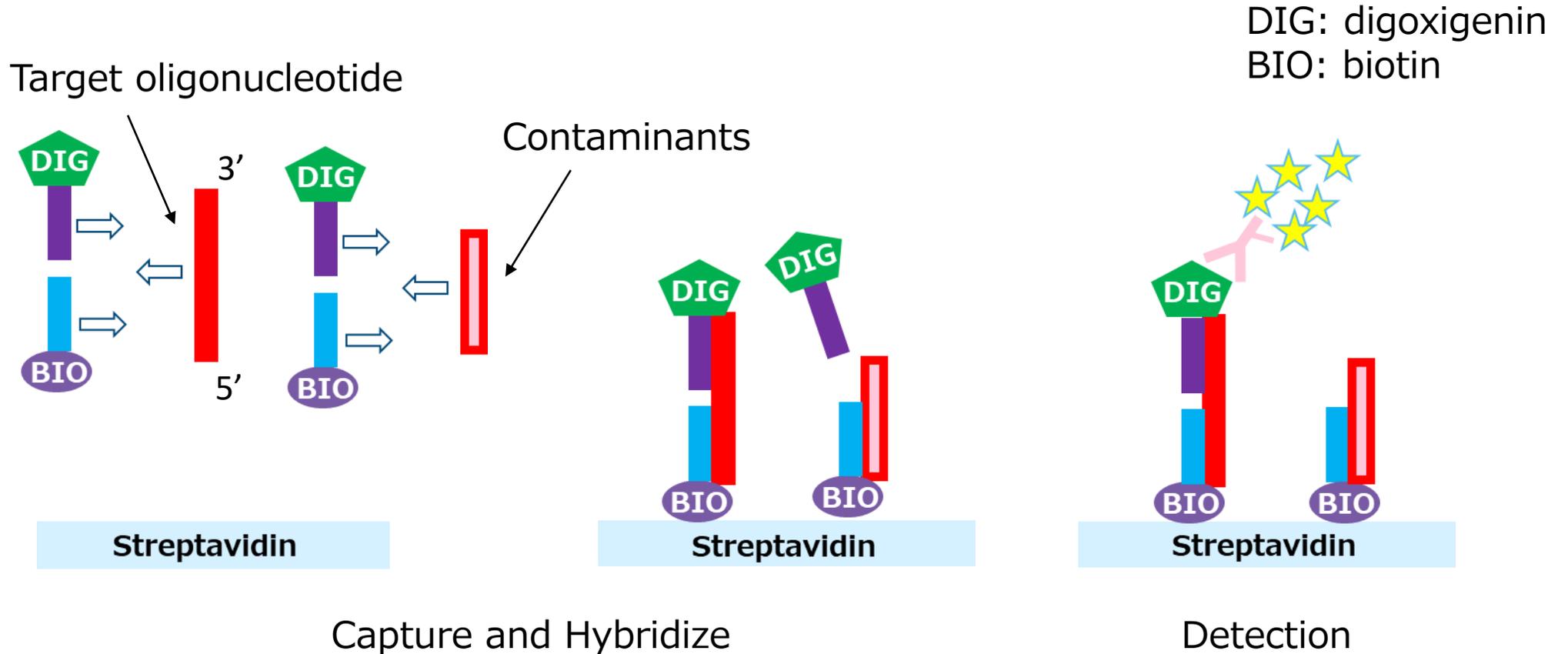


- ✓ 18 merの核酸医薬品
- ✓ ホスホジエステルがすべてホスホロチオエート化
- ✓ すべての2'の水酸基をO-メトキシエチルに置換



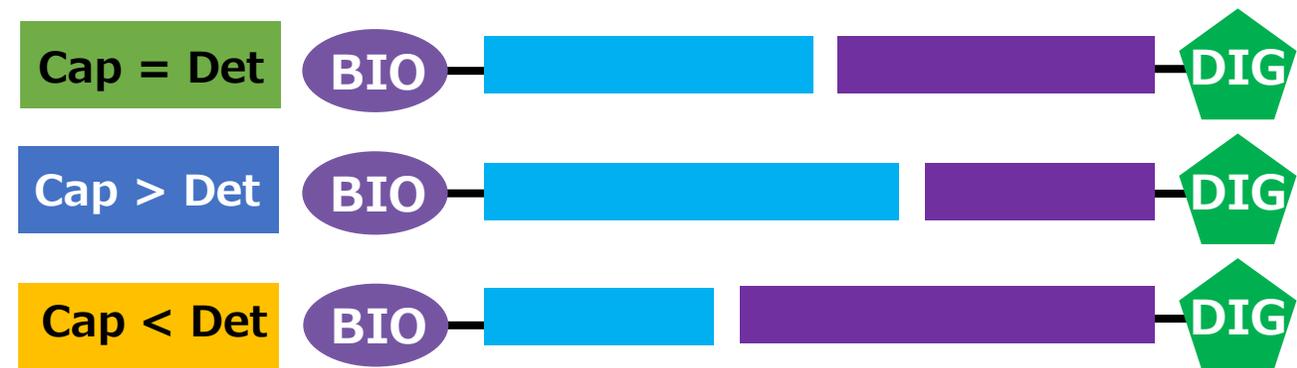
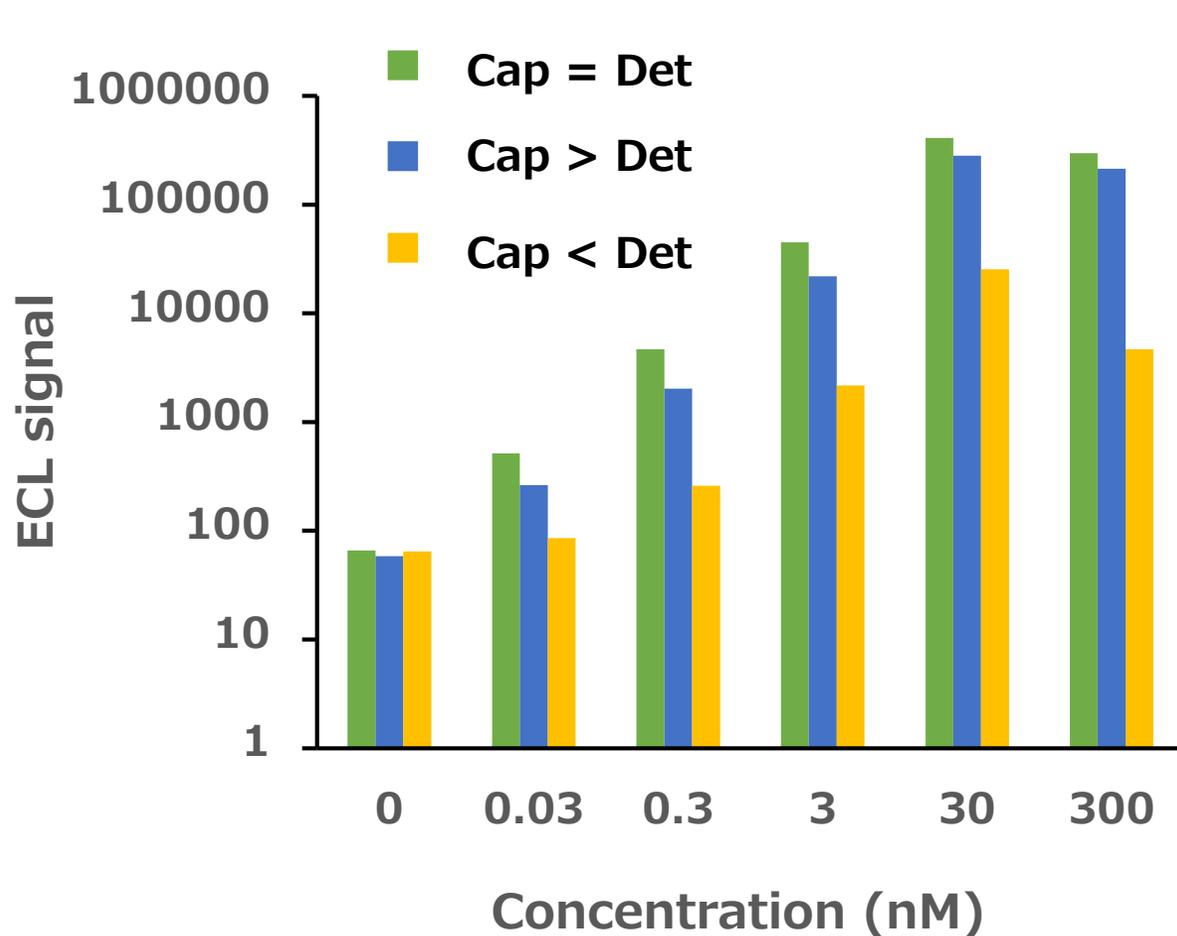
# Hybridization-LBA法を用いた定量法

# Hybridization-LBA\_Dual hybridization assay



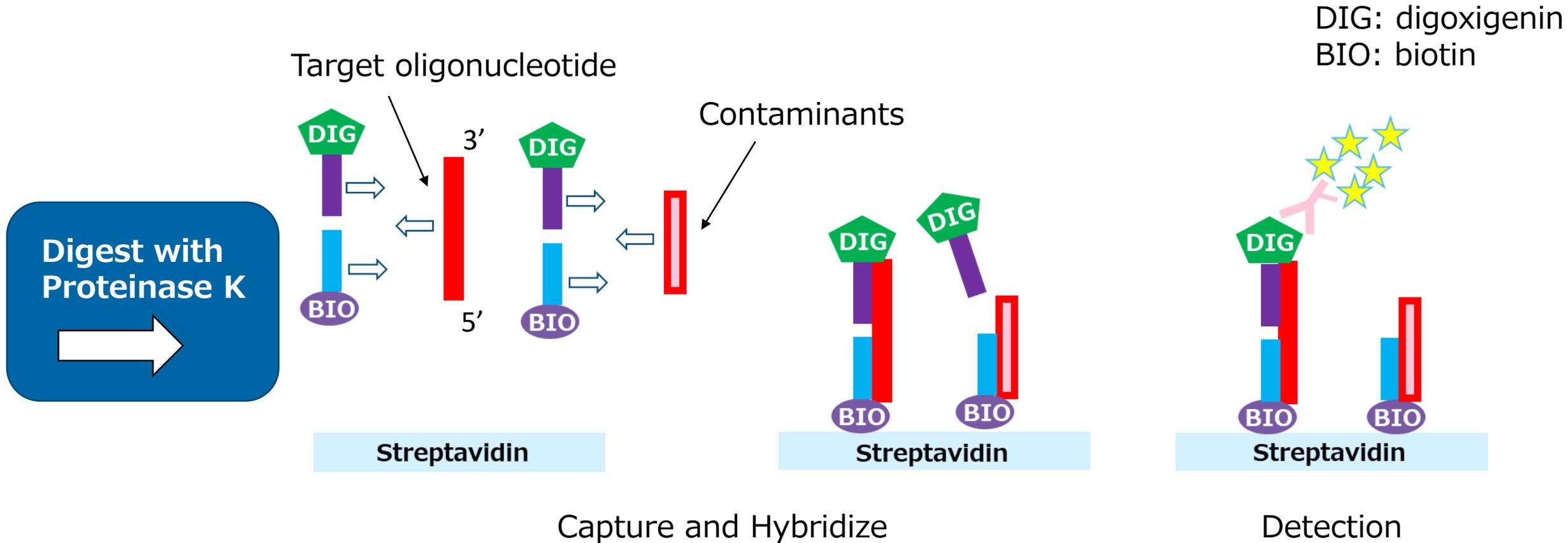
- ✓ Capture用 (BIO結合) とDetection用 (DIG結合) の2本のプローブを使用
- ✓ 検出にはECL(電気化学発光法, Electrochemiluminescence)を使用

# Probeの組み合わせ



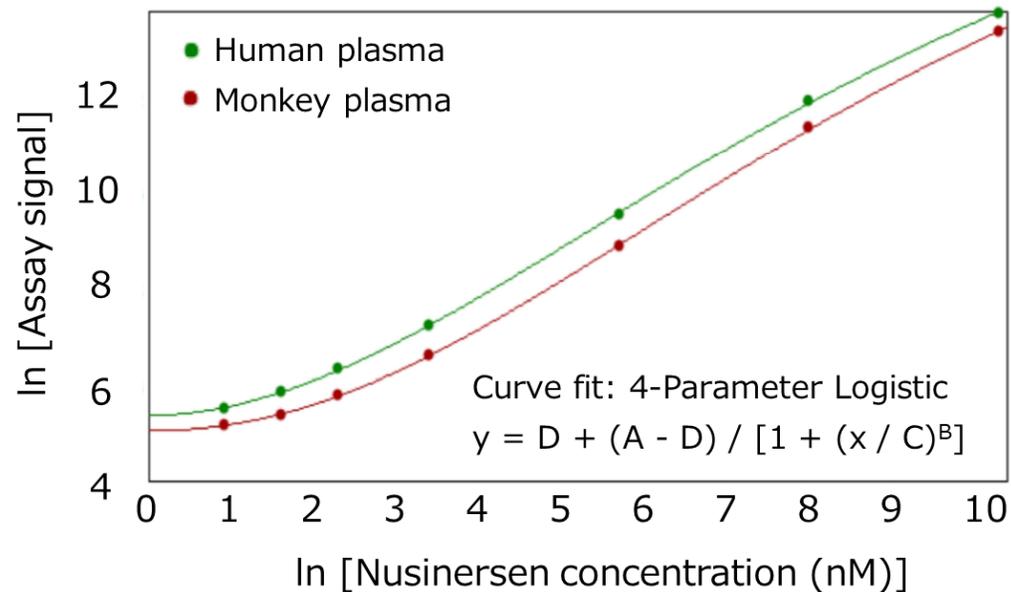
- ✓ Cap=Detの組み合わせが最も高感度
- ✓ いずれの組み合わせも傾向は同じ
- ✓ 最適な組み合わせは配列依存的  
(今回の系ではCap probe側の影響大)

# Hybridization-LBA\_Dual hybridization assay



- ✓ Capture用 (BIO結合) とDetection用 (DIG結合) の2本のプローブを使用
- ✓ 検出にはECL(電気化学発光法, Electrochemiluminescence)を使用

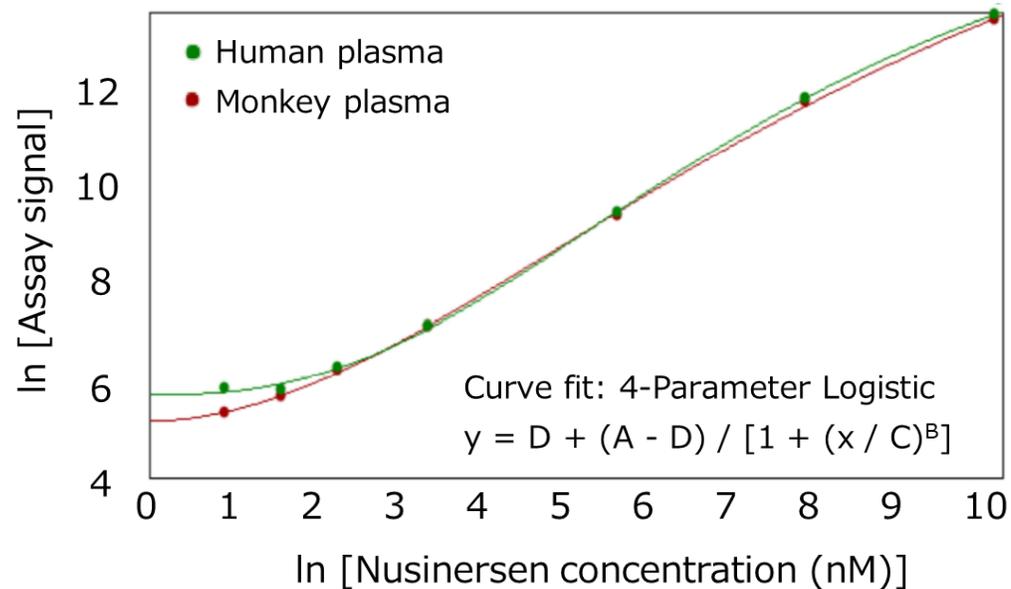
# 前処理中における消化stepの影響



検量線 (ProteinaseK処理なし)

- ✓Sオリゴは高タンパク結合率を示す
- ✓種差がある  
(HRGはサルで高濃度に存在)
- ✓Proteinase Kによる消化はassay系の  
堅牢性・再現性向上に繋がる

# 前処理中における消化stepの影響



検量線 (ProteinaseK処理あり)

- ✓Sオリゴは高タンパク結合率を示す
- ✓種差がある  
(HRGはサルで高濃度に存在)
- ✓Proteinase Kによる消化はassay系の  
堅牢性・再現性向上に繋がる

# パーシャルバリデーション

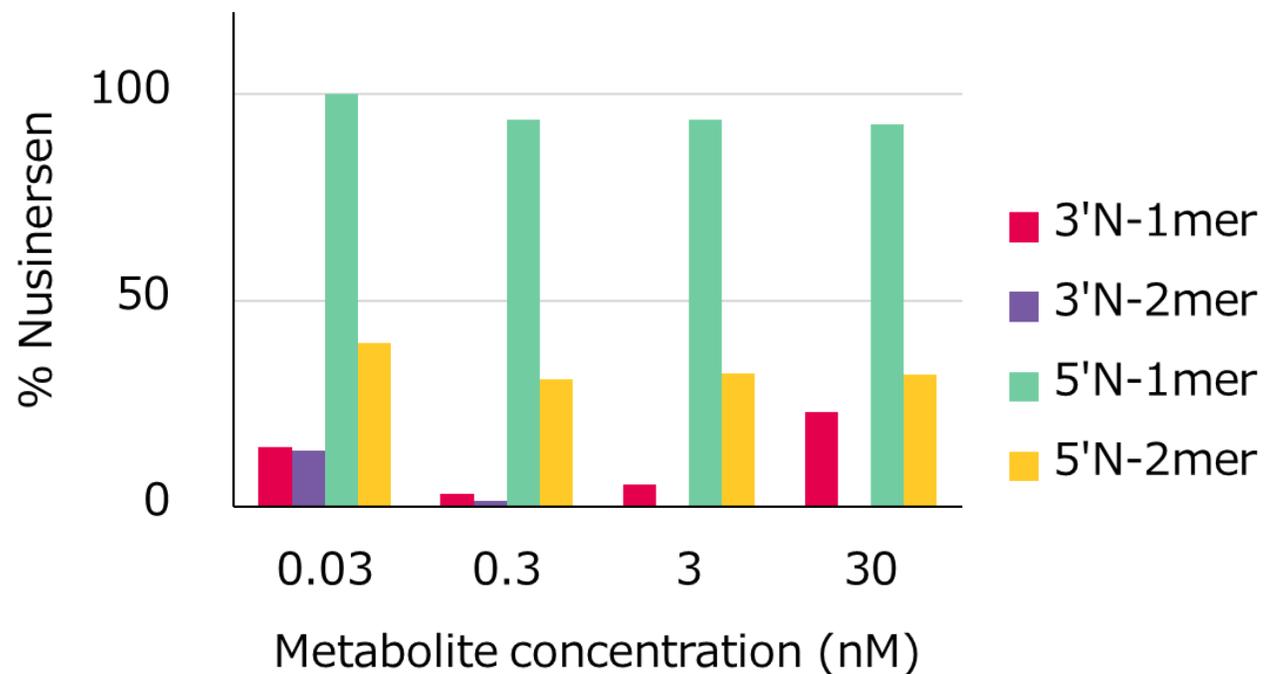


マトリックス：ヒト血漿（抗凝固剤：EDTA-2K）

使用量：30  $\mu$ L

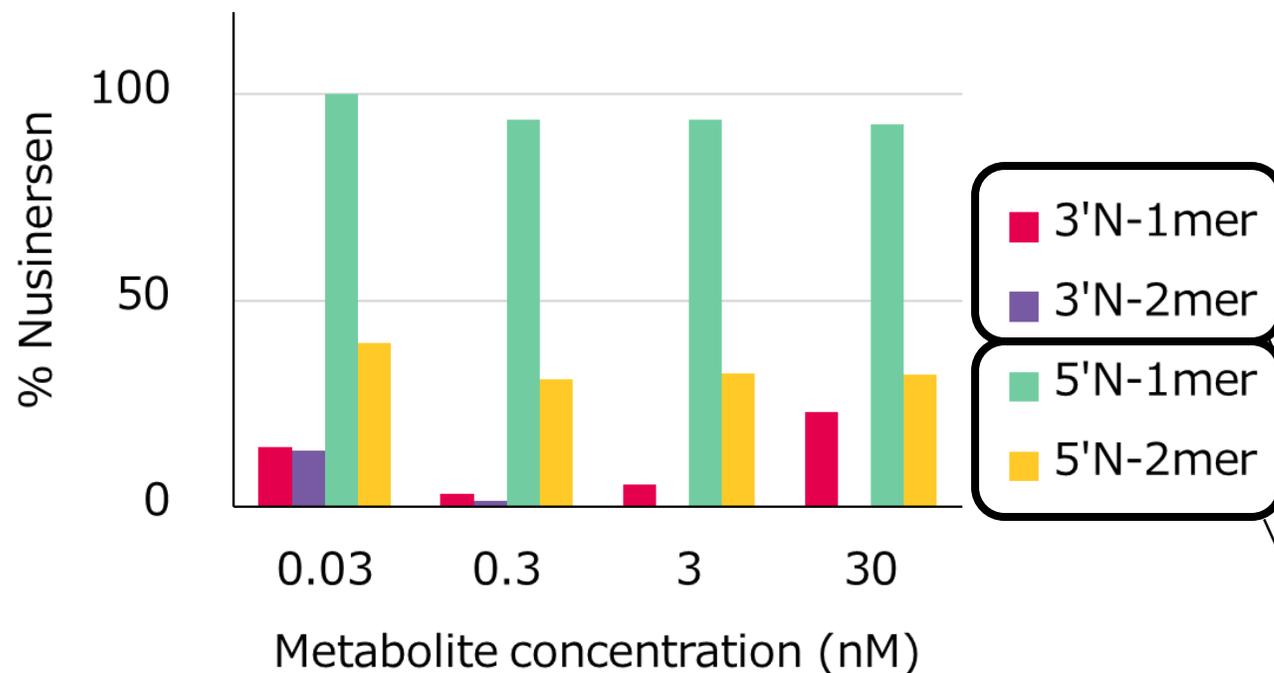
バリデーション項目	結果	Criteria
検量線	<b>0.005~10 nM</b> (Accuracy: 97.3%~103.0%)	✓ Pass
真度及び精度	<u>0.005, 0.01, 0.3, 5, 10 nM</u>	
Within-run	Accuracy: 95.6%~121.2% CV: 0.6%~4.6% TE: 2.6%~25.8%	✓ Pass
Between-run	Accuracy: 96.8%~112.8% CV: 2.7%~8.9% TE: 5.0%~21.7%	✓ Pass
選択性	Blank: <LLOQ (10個体) Spiked: 30.8%~101.6% (9/10個体でPass)	✓ Pass

# 代謝物の影響確認



- ✓ Nusinersen分析と同一のプローブを使用
- ✓ Nusinersen及び代謝物を個別に分析
- ✓ NusinersenのSignal値を100%とし, 個々の代謝物のSignal値を%Nusinersenとして表示

# 代謝物の影響確認

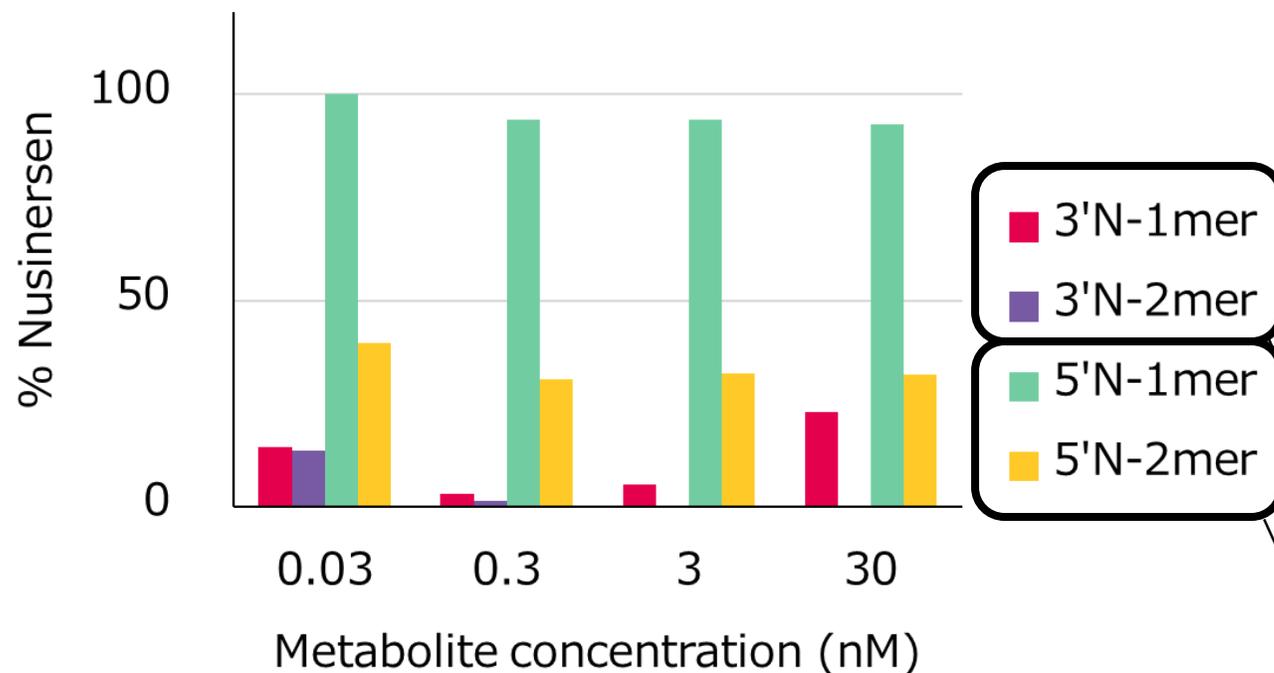


- ✓ Nusinersen分析と同一のプローブを使用
- ✓ Nusinersen及び代謝物を個別に分析
- ✓ NusinersenのSignal値を100%とし、個々の代謝物のSignal値を%Nusinersenとして表示

**未変化体濃度への影響は少ない**

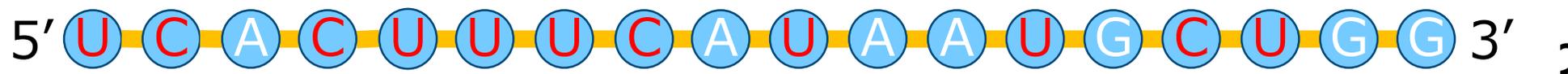
**未変化体濃度への影響の可能性あり**

# 代謝物の影響確認



- ✓ Nusinersen分析と同一のプローブを使用
- ✓ Nusinersen及び代謝物を個別に分析
- ✓ NusinersenのSignal値を100%とし、個々の代謝物のSignal値を%Nusinersenとして表示

未変化体濃度への影響は少ない



**特異性は配列依存的**  
**ハイブリダイズの向きも影響？**

# Hybridization-LBA法まとめ



- ✓ 血漿30  $\mu\text{L}$ を使用して0.005~10 nM (dynamic range 2000倍) の範囲で定量性を確認することが出来た.
- ✓ 代謝物の測定に関して, Truncate位置によって未変化体濃度に影響する場合と影響しない場合がある.

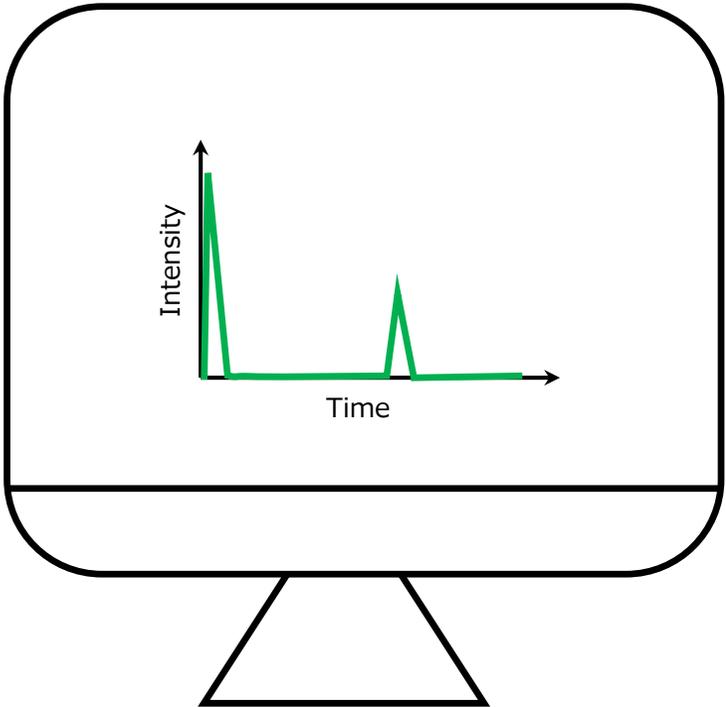
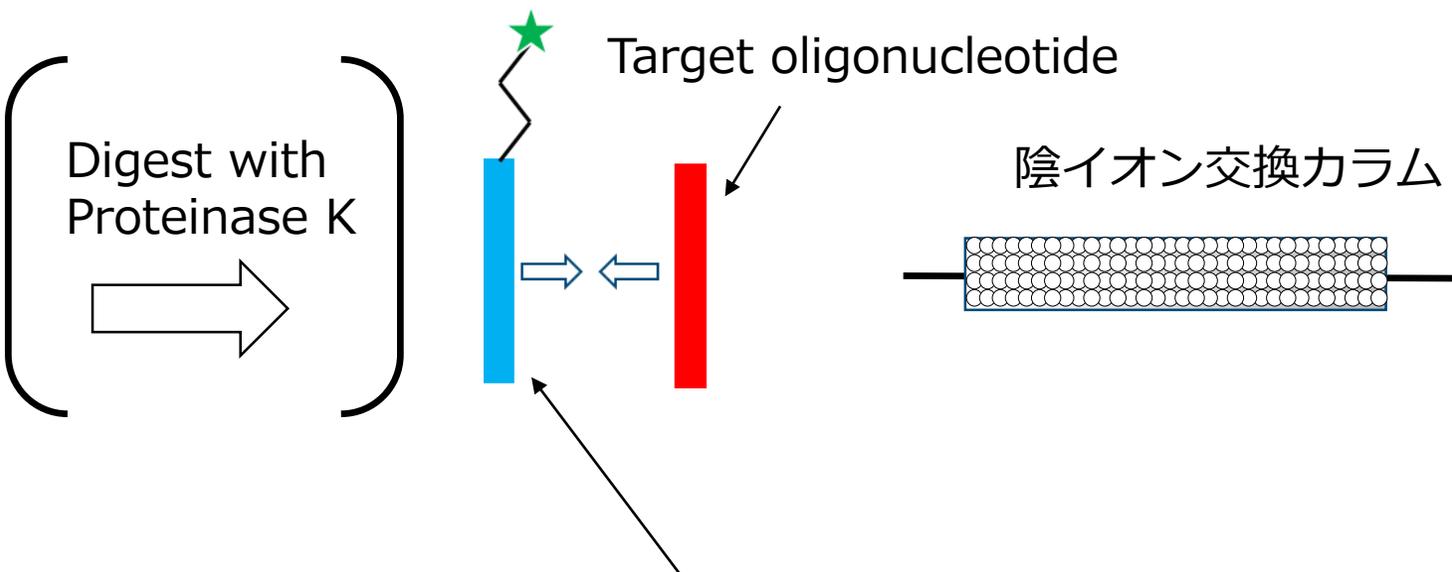


# Hybridization-LC-FL法を用いた定量法

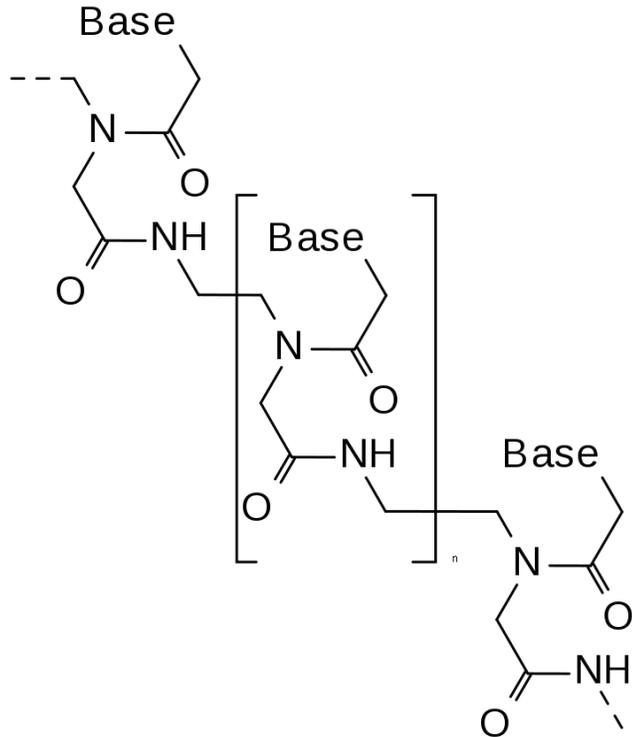
# Hybridization-LC-FL



蛍光検出器



- ✓ 蛍光標識した**PNAプローブ**を使用
- ✓ **イオン交換クロマトグラフィー**を利用



- ✓ Peptide nucleic acid
- ✓ BackboneはN-(2-アミノエチル)グリシンがアミド結合で結合したものの
- ✓ 核酸塩基がメチレン基とカルボニル基を介してbackboneに結合
- ✓ **リン酸部位の電荷が存在しないため**, 静電反発の影響が小さくなり, PNA/DNAの2本鎖はDNA/DNAの2本鎖よりも強い結合を形成

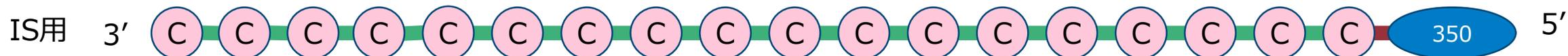
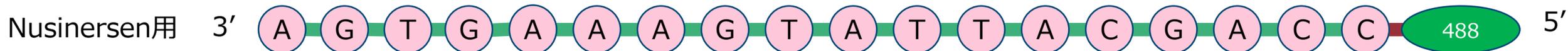
<https://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%9A%E3%83%97%E3%83%81%E3%83%89%E6%A0%B8%E9%85%B8>

アニオン交換カラムに保持されない  
= PNA probeが妨害ピークにならない

# 標準物質及びプローブ



## PNAプローブ



<span style="border: 1px solid blue; border-radius: 50%; padding: 2px;">N</span>	2'-O-methoxyethyl	<span style="color: red;">N</span>	5-Methyl pyrimidine	<span style="border: 1px solid blue; border-radius: 50%; padding: 2px;">N</span>	DNA	<span style="border: 1px solid blue; border-radius: 50%; padding: 2px;">N</span>	PNA
<span style="background-color: yellow; width: 15px; height: 10px; display: inline-block;"></span>	Phosphorothioate	<span style="background-color: black; width: 15px; height: 10px; display: inline-block;"></span>	Phosphodiester	<span style="background-color: green; width: 15px; height: 10px; display: inline-block;"></span>	Peptide bound	<span style="background-color: darkred; width: 15px; height: 10px; display: inline-block;"></span>	C6 amino linker
<span style="background-color: green; border-radius: 50%; padding: 2px;">488</span>	Alexa Fluor 488	<span style="background-color: blue; border-radius: 50%; padding: 2px;">350</span>	Alexa Fluor 350				



## LC

カラム : ポリマータイプの**強陰イオン交換カラム**  
4 mm I.D. × 250 mm, particle size 8 μm

流速 : 1.5mL/min

移動相 : A : **Tris-Buffer** with EDTA/Acetonitrile  
B : **NaClO<sub>4</sub>** in 移動相 A  
グラジエント分析

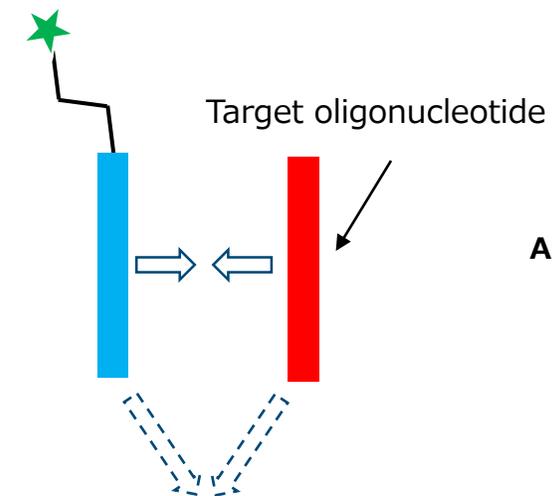
カラム恒温槽 : 65℃

## FL

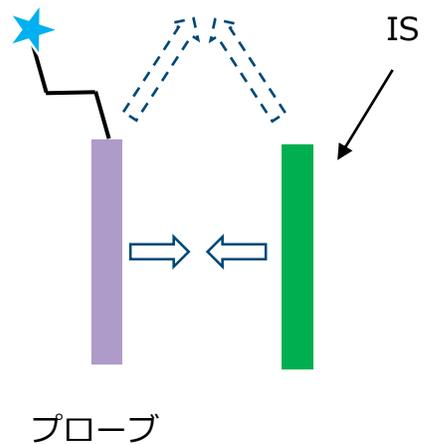
Nusinersen : Ex 490 nm/ Em 525 nm

IS : Ex 346 nm/ Em 442 nm

# 蛍光の漏れ込み及び交差反応の確認

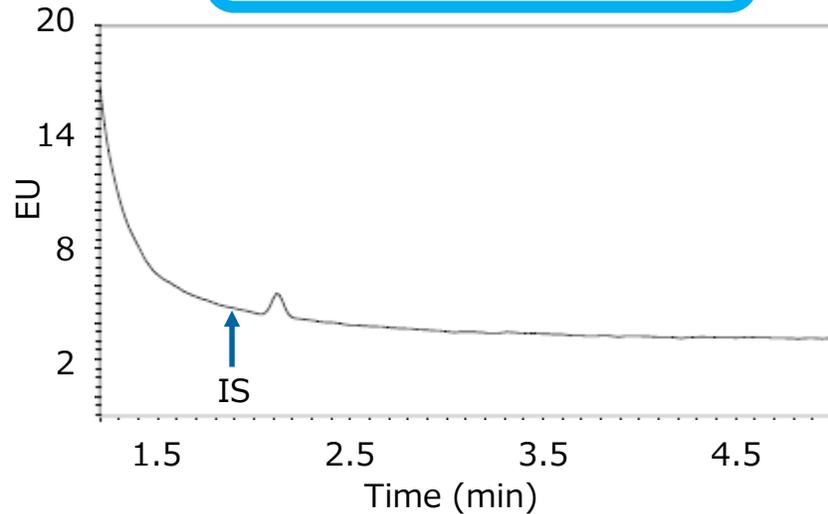


Analyte -  
 Analyte probe +  
 IS +  
 IS probe +

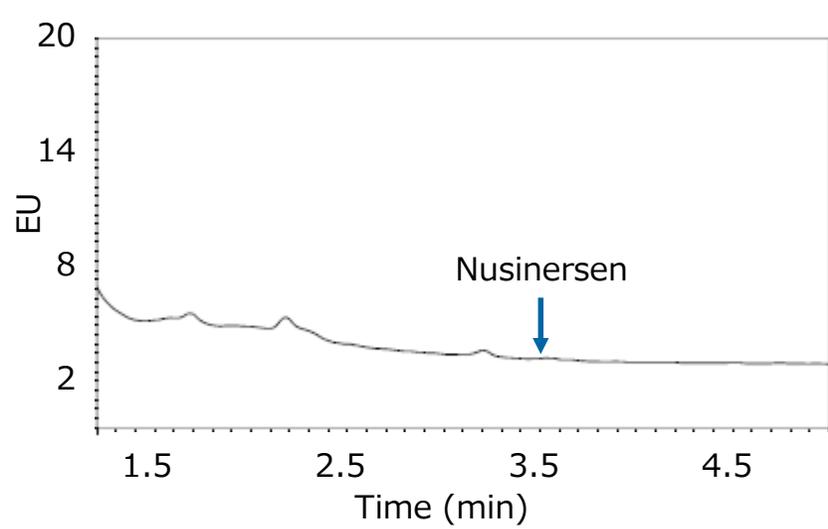
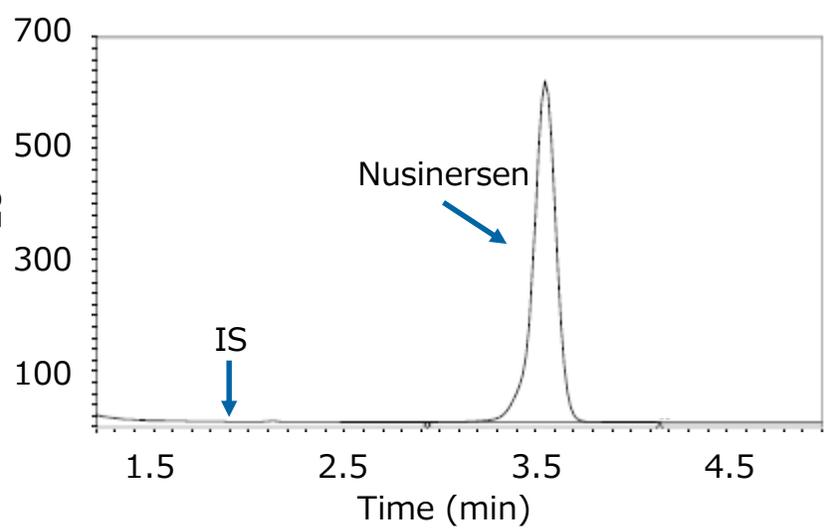
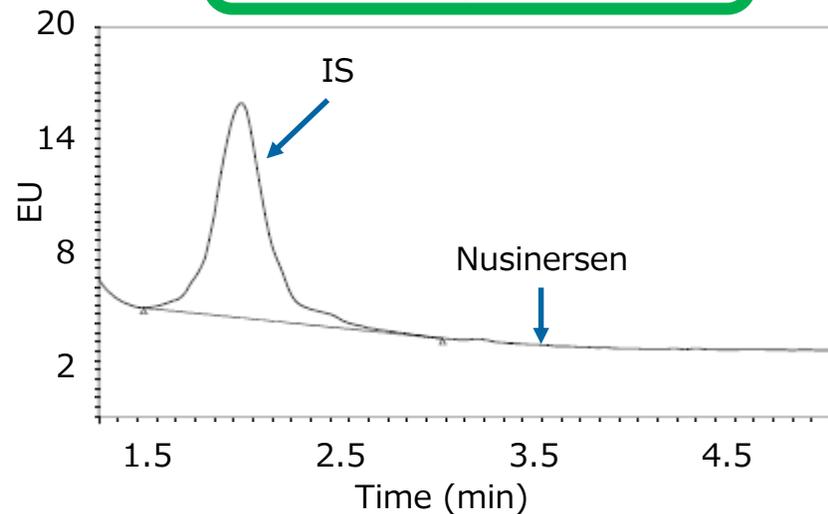


Analyte (ULOQレベル) +  
 Analyte probe +  
 IS -  
 IS probe +

**Nusinersen**  
 Ex490 nm/ Em525 nm



**IS**  
 Ex346 nm/ Em442 nm



# パーシャルバリデーション



マトリックス：ヒト血漿（抗凝固剤：EDTA-2K）

使用量：30  $\mu$ L

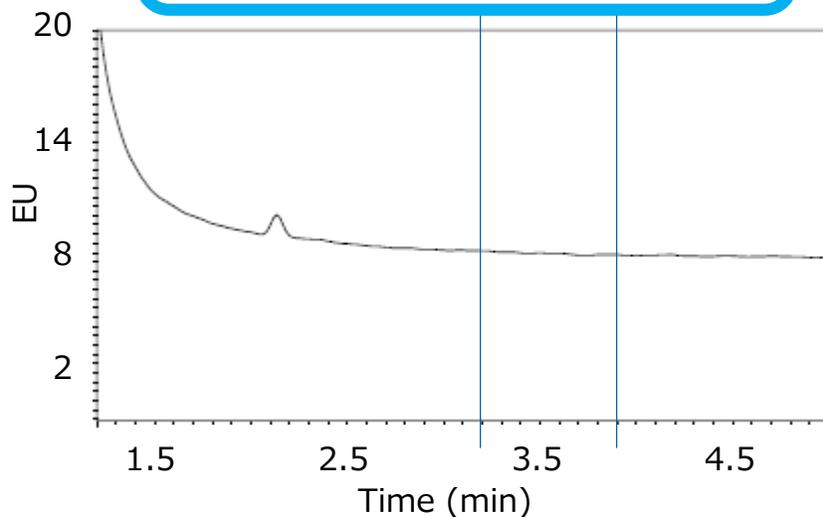
バリデーション項目	結果	Criteria
検量線	<b>0.5~300 nM</b> Accuracy : 85.7%~114.0%	✓ Pass
真度及び精度	<u>0.5, 1, 15, 225 nM</u>	
Within-run	Accuracy : 86.0%~101.3% CV : 5.9%~13.5%	✓ Pass
Between-run	Accuracy : 95.6%~104.4% CV : 5.3%~13.7%	✓ pass

# クロマトグラム

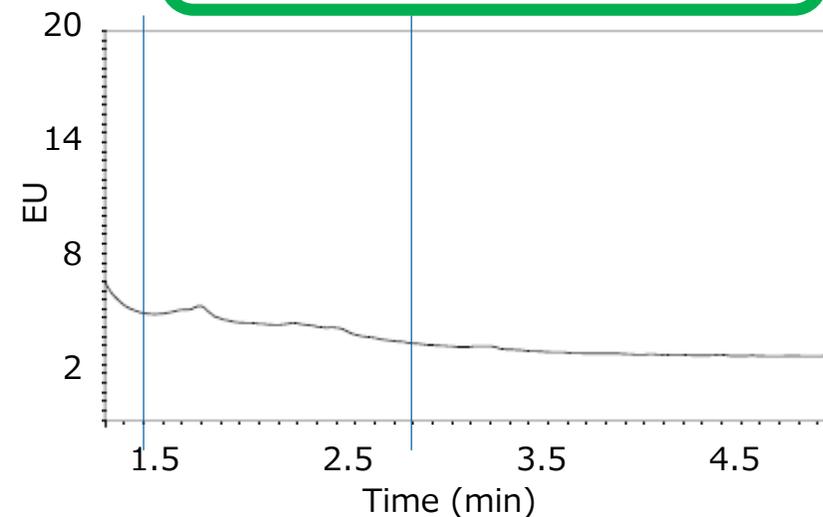


Blank

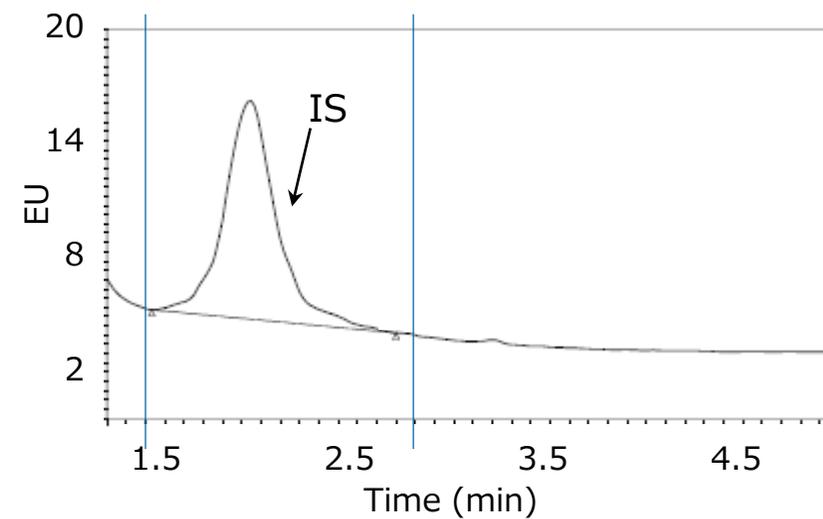
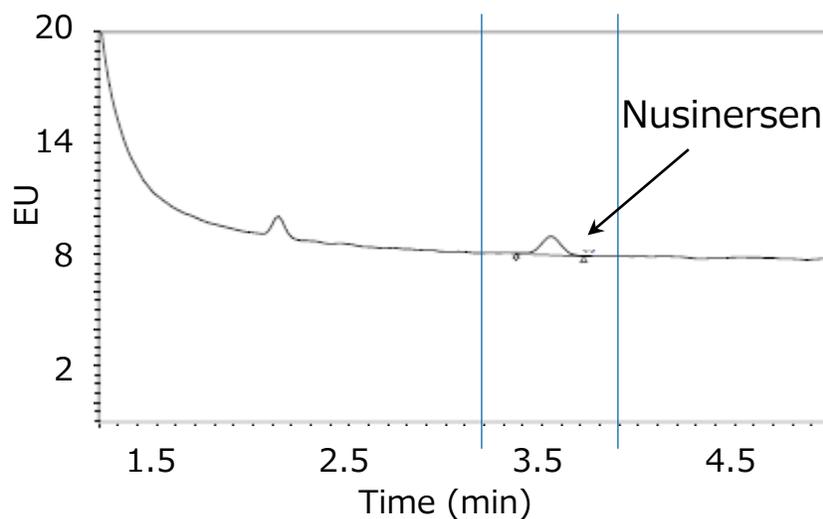
Nusinersen  
Ex490 nm/ Em525 nm



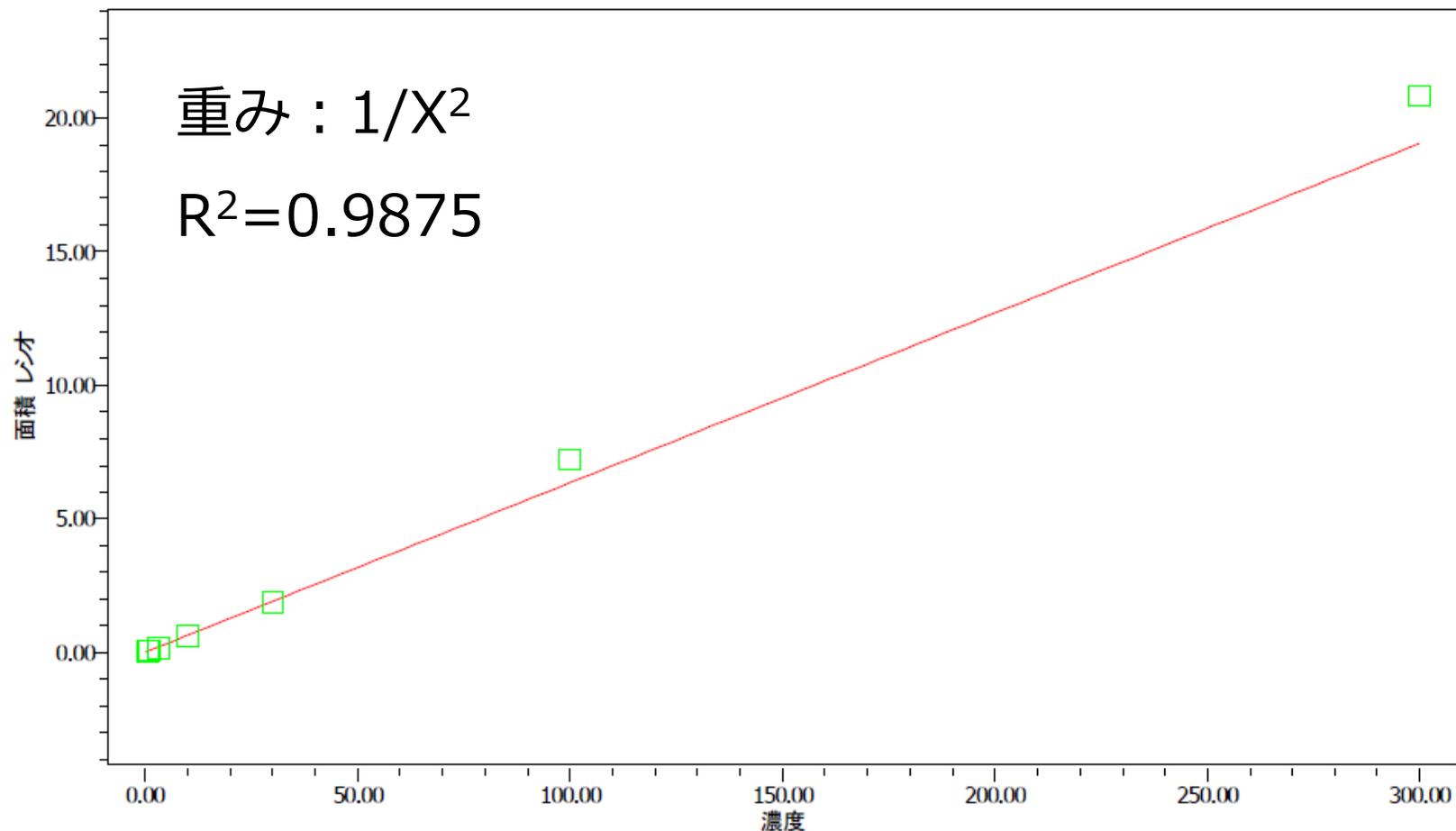
IS  
Ex346 nm/ Em442 nm



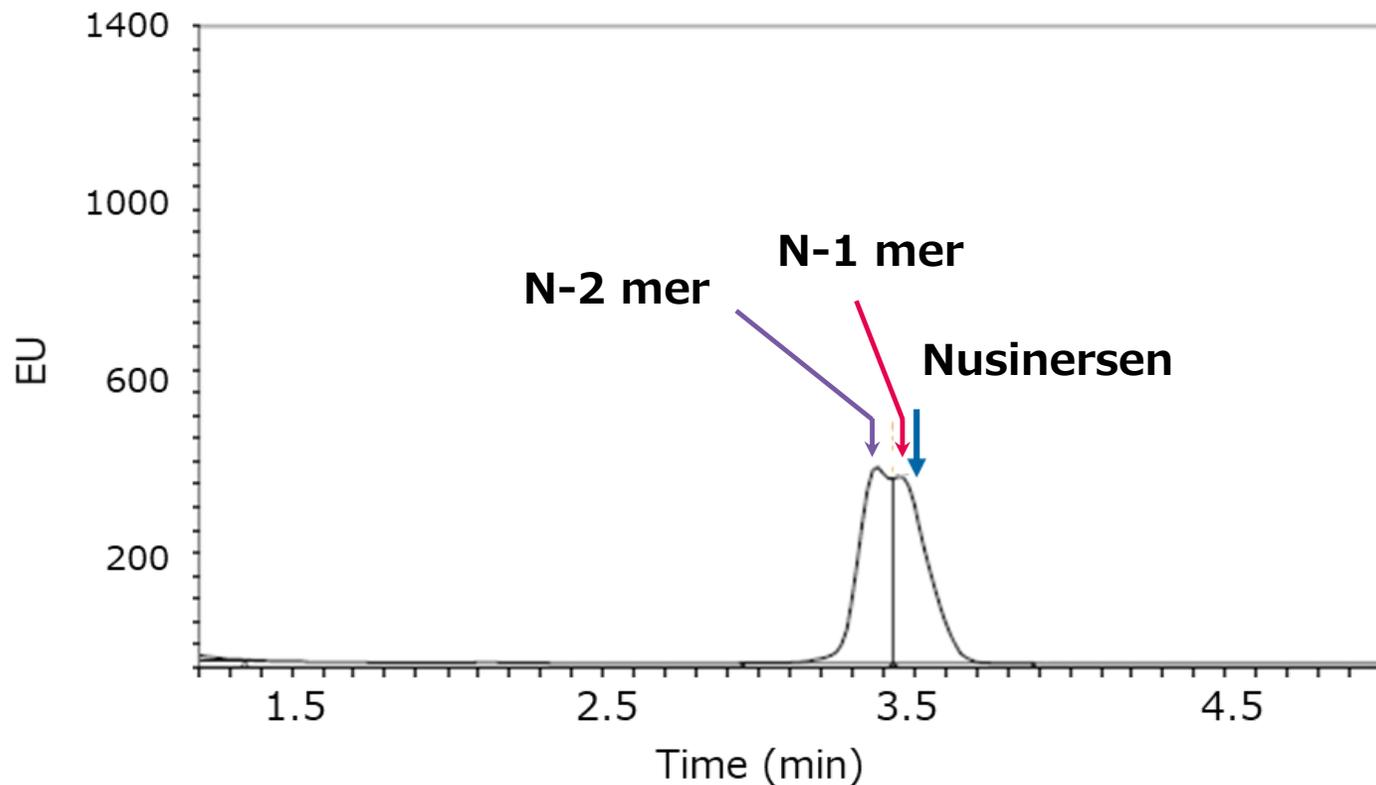
LLOQ  
(0.5 nM)



# 検量線



名前 : Nusinersen; 解析メソッド : CB200001RB; 式の種類 : 直線; 検量線ID : 3452; A0 :  $2.634285e-03$ ; A1 :  $6.349009e-02$ ; A2 :  $0.000000e+00$ ; A3 :  $0.000000e+00$ ;  $R^2 : 0.987519$ ; 重み  $1/(X*X)$



- ✓ Nusinersen及び代謝物のMixtureを血漿に添加（各60 nM）

## 分離検出するためには要LC条件検討

Truncateした核酸モノマー数が同じ  
代謝物の分離は困難か？

# Hybridization-LC-FL法まとめ



- ✓ 蛍光PNA probeを用いたLC-FL法は核酸医薬品のBAの選択肢の1つとなることが示された。
- ✓ 血漿30  $\mu\text{L}$ を使用して0.5~300 nM (dynamic range 600倍) の範囲で定量性を確認することが出来た。
- ✓ 陰イオン交換クロマトグラフィーではアニオンの相互作用が保持の中心であるため構造 (配列) によってはカラム分離が困難な場合がある。

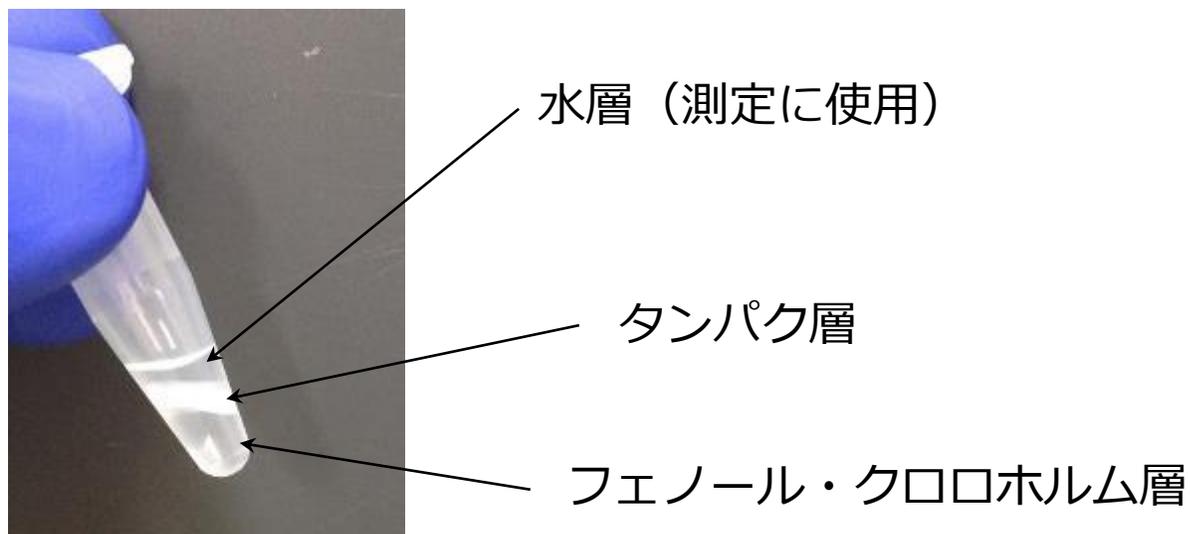


# LC-MS法を用いた定量法

# 液液抽出



- ✓ **抽出溶媒：フェノール・クロロホルム混液**
- ✓ 古典的な方法であり，実績が多い
- ✓ フェノールでタンパクを不溶化，遠心分離後，上層（水層）の核酸を回収．  
（クロロホルムは水層中のフェノールを回収するために使用）



# 固相抽出

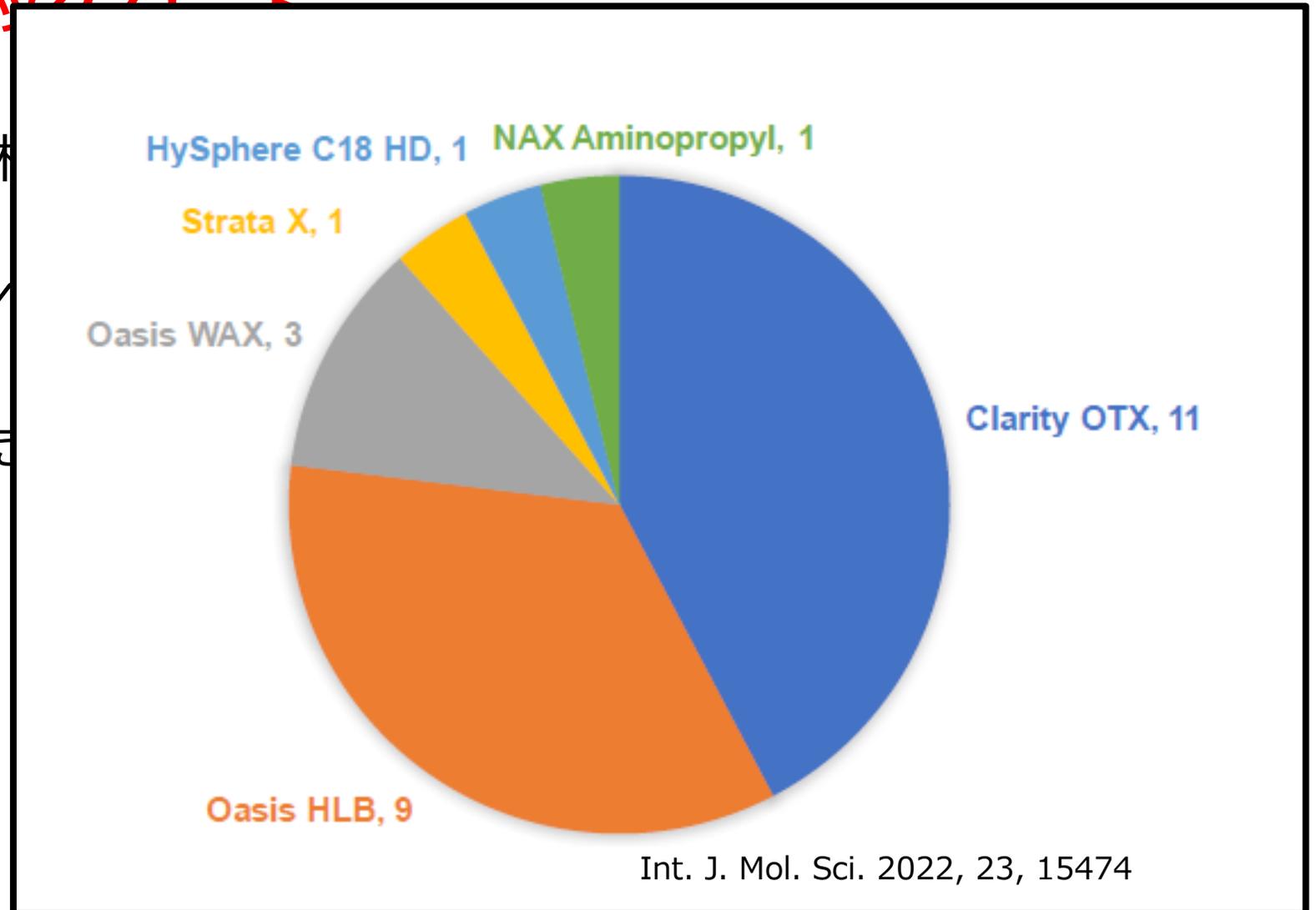


- ✓ **固相：逆相またはミックスモード**
- ✓ ミックスモードは逆相-弱陰イオン交換タイプが第一選択肢
- ✓ 逆相タイプはイオンペア試薬の添加を検討
- ✓ 96wellタイプを用いたハイスループット化や自動化が可能

# 固相抽出



- ✓ 固相：逆相またはミックスモード
- ✓ ミックスモードは逆相
- ✓ 逆相タイプはイオン交換
- ✓ 96wellタイプを用いた



# カラム

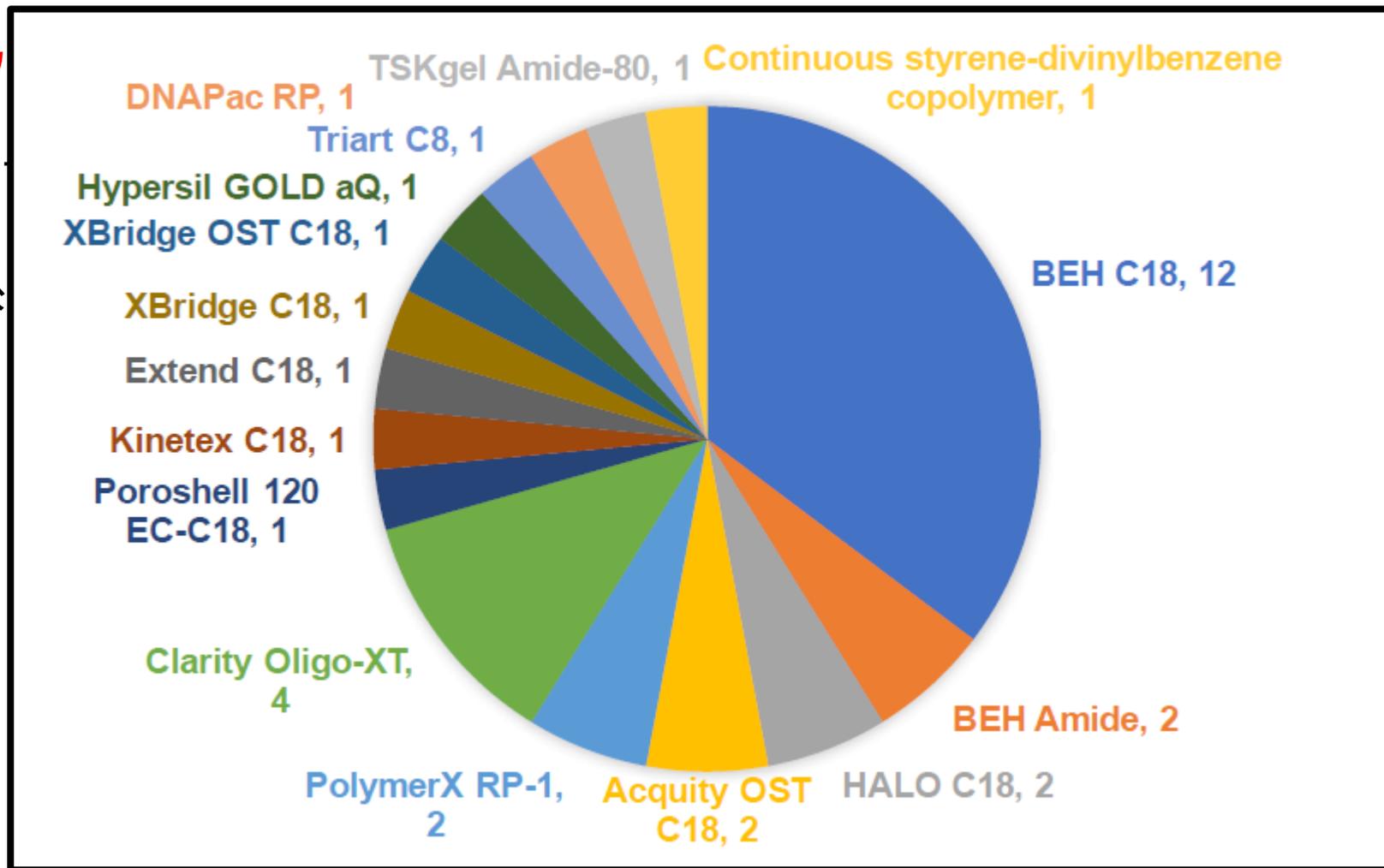


- ✓ **イオンペア逆相クロマトグラフィーが第一選択肢**
- ✓ 酸性Modifierとしてフッ素系アルコール添加
- ✓ 非イオンペアの系にも注目

# カラム



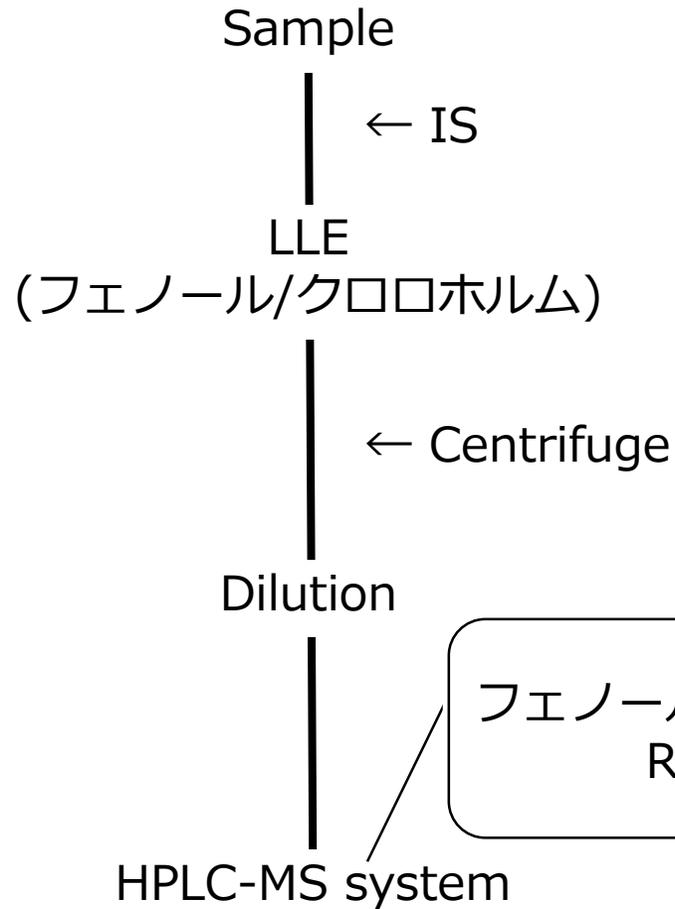
- ✓ **イオンペア逆相ク**
- ✓ 酸性Modifierとし
- ✓ 非イオンペアの系



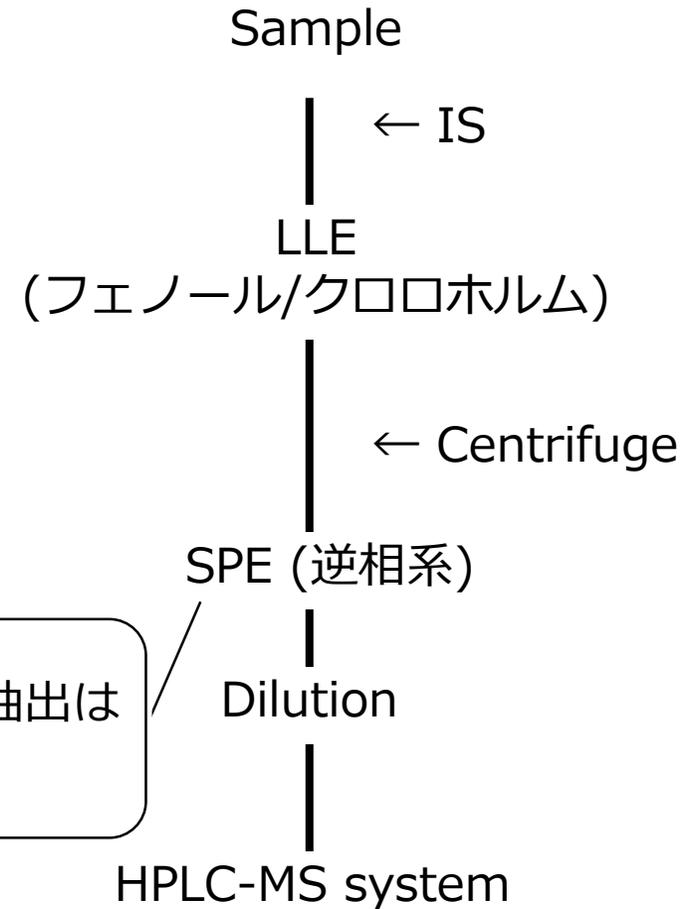
Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 15474



## LLE



## LLE+ SPE



フェノール/クロロホルム抽出は  
RPと相性が良い



## LC

カラム : **C18** 2.1 mm I.D. × 100 mm, particle size 1.9 μm

流速 : 0.4 mL/min

移動相 : A : **水/HFIP/TEA** (1000:42:2.1, v/v/v)

B : メタノール

グラジエント分析

カラム恒温槽 : 60℃

## MS

Nusinersen (precursor ion / product ion) :  $m/z$  890 /  $m/z$  95 ( $z=8$ )

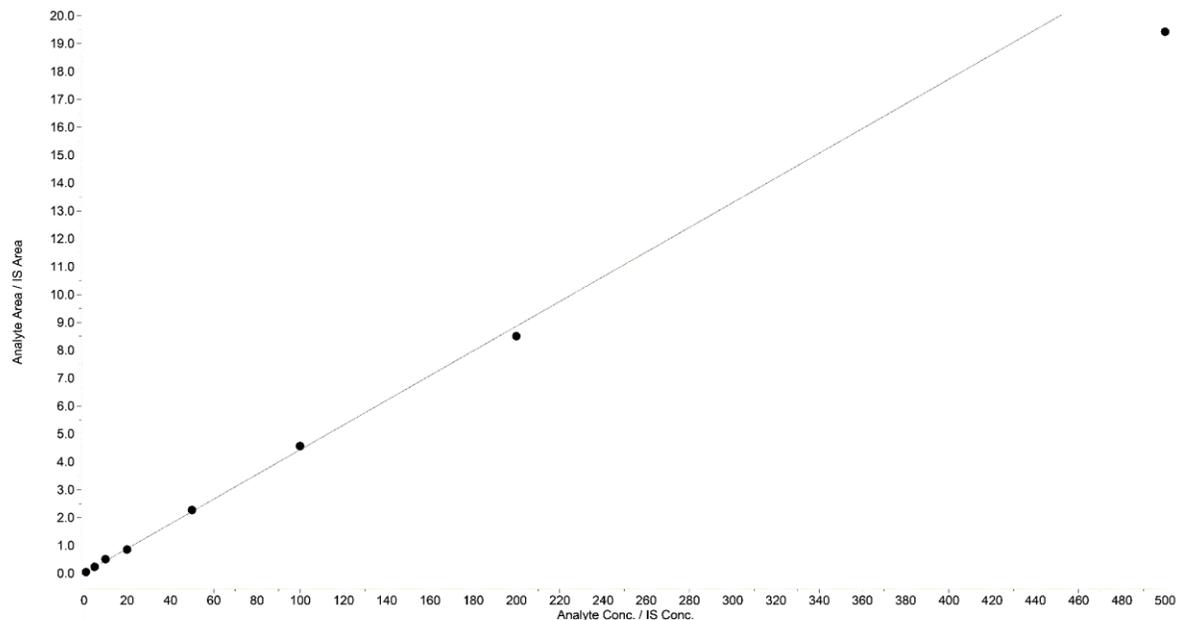
IS (precursor ion / product ion) :  $m/z$  972 /  $m/z$  95 ( $z=8$ )



## LLE

"Linear" Regression ("1 / (x \* x)" weighting)

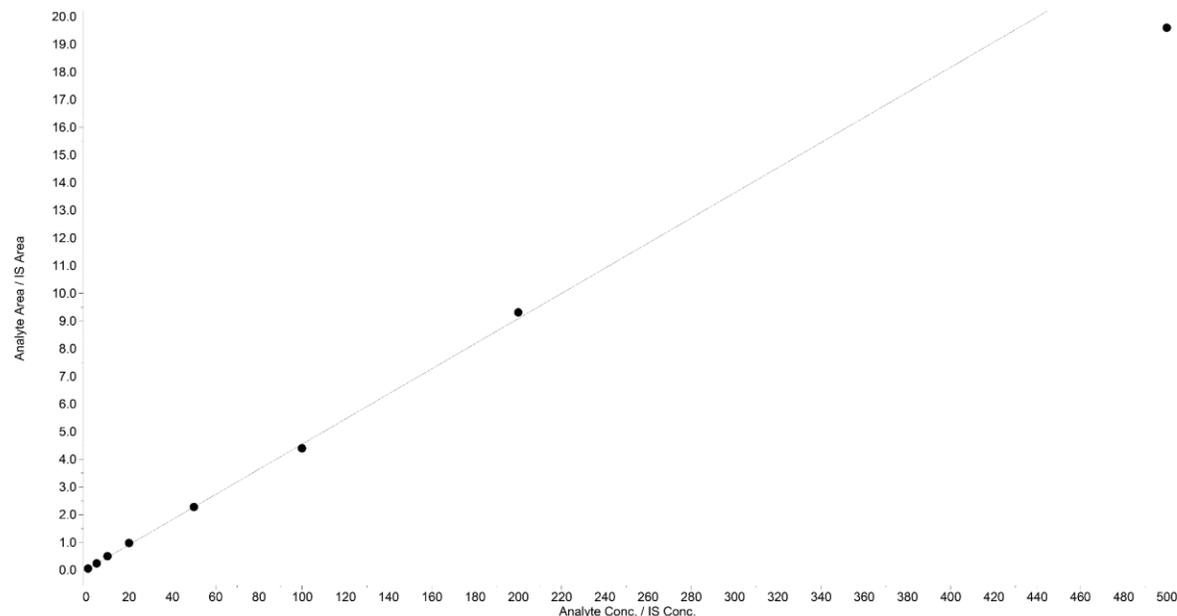
$$y = 0.0443 x + 0.00461 \quad (r = 0.9967)$$



## LLE+ SPE

"Linear" Regression ("1 / (x \* x)" weighting)

$$y = 0.0454 x + 0.00729 \quad (r = 0.9975)$$



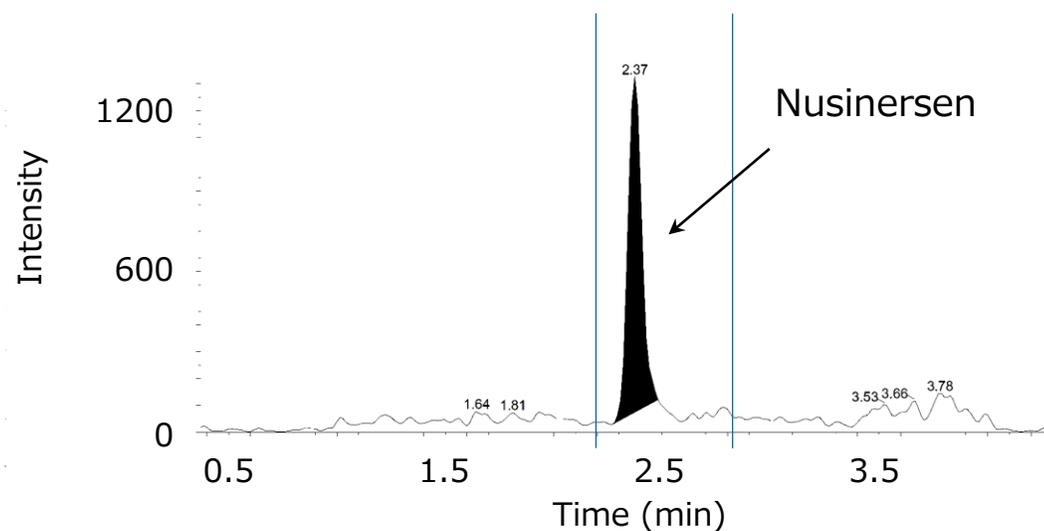
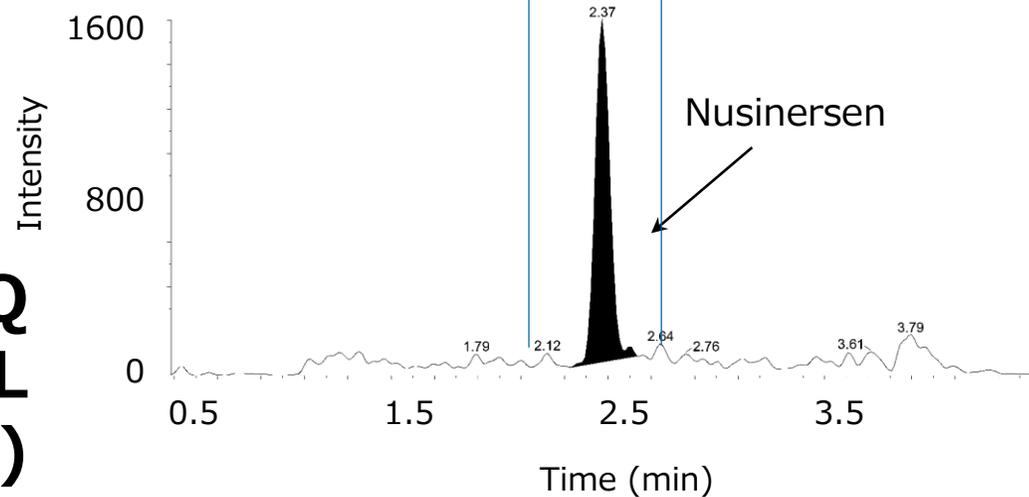
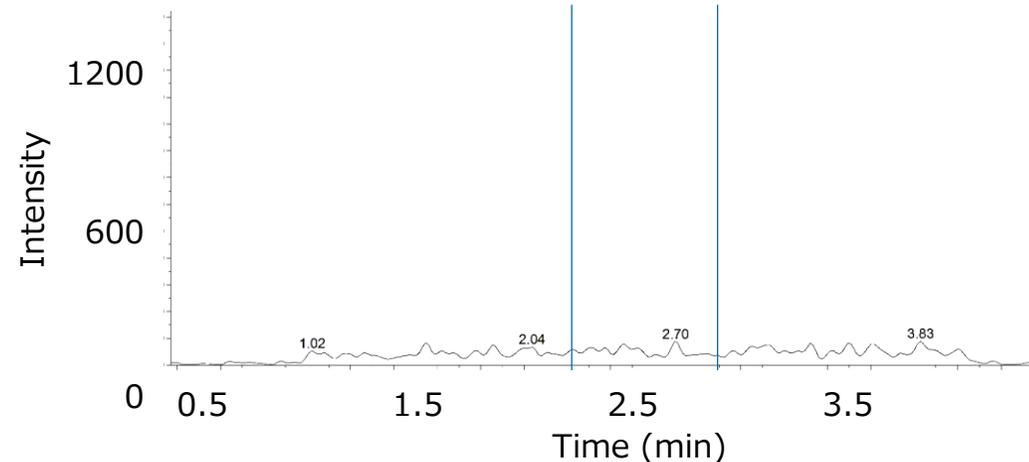
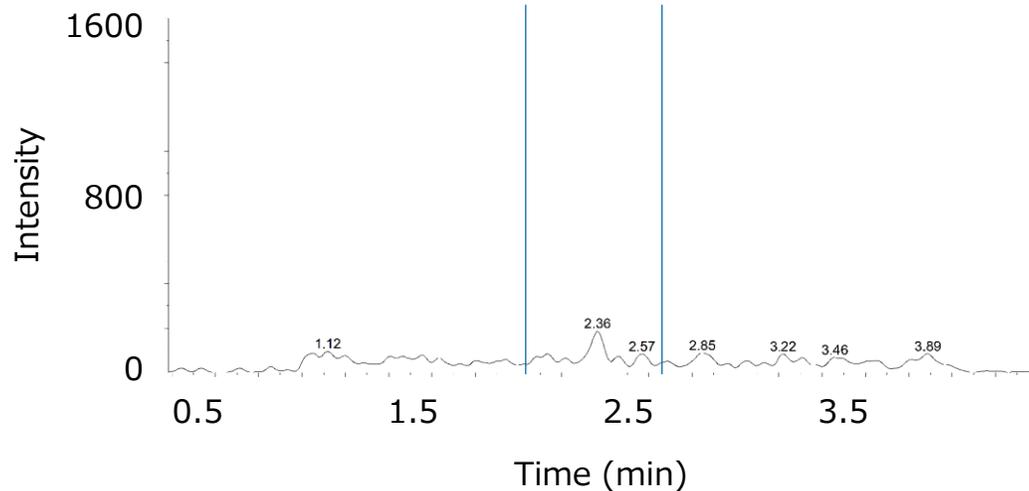
# クロマトグラム



LLE

LLE+ SPE

Blank



**LLOQ**  
**(1 ng/mL**  
**=0.14 nM)**

# パーシャルバリデーション



マトリックス：ヒト血漿（抗凝固剤：EDTA-2K）

使用量：30  $\mu$ L

バリデーション項目	LLE		LLE + SPE	
	結果	Criteria	結果	Criteria
<u>検量線</u> <b>1~500 ng/mL</b> (0.140~70.2 nM)	Accuracy : 87.7%~114.0%	✔ Pass	Accuracy : 86.3%~107.9%	✔ Pass
<u>真度及び精度</u> <b>1, 3, 40, 400 ng/mL</b> (0.140, 0.421, 5.61, 56.1 nM)	Accuracy : 91.2%~108.3% CV : 2.1%~9.6%	✔ pass	Accuracy : 92.2%~114.3% CV : 2.9%~8.4%	✔ pass



- ✓ 血漿30  $\mu\text{L}$ を使用して1~500 ng/mL (0.140~70.2 nM)  
(dynamic range 500倍) の範囲で定量性を確認することが出来た
- ✓ 簡便な前処理でヌシネルセンを血漿から抽出することが出来た

# 手法の比較



	Hybridization-LBA	Hybridization-LC-FL	LC-MS
ガイドライン	○	○	○
報告例数 (承認核酸医薬品)	ASOでの報告多い	少ない	siRNAで報告多い
スループット (前処理)	半日程度 (インキュベーション時間と 回数に依存)	数時間 (インキュベーション時間と 回数に依存)	数時間 SPEでは自動化可
スループット/sample (機器占有)	数秒	数十分	数分
強み	感度 (pg/mL)	適応範囲・簡便性 要求サンプル精製度が低い 不揮発性溶媒使用可	選択性 マルチプレックス
課題	代謝物分離 検出方法	感度 (二桁ng/mL) 代謝物分離	感度 (ng/mL~sub-ng/mL)

# 核酸医薬品のBAにおける各手法の使い分け



	Hybridization-LBA	Hybridization-LC-FL	LC-MS
ターゲット	1本鎖の長鎖の核酸医薬品向き (ASO, アプタマーなど)	1本鎖の核酸医薬品向き (LBAとLC-MSの間)	短鎖の核酸医薬品に向き (ASO, siRNAなど)
マトリックス	制限なし <ul style="list-style-type: none"> <li>ハイブリダイスを阻害する試薬の使用は困難</li> <li>ターゲットgeneを含むサンプルは競合的なハイブリダイズとなる</li> </ul>	制限なし <ul style="list-style-type: none"> <li>ハイブリダイスを阻害する試薬の使用は困難</li> <li>ターゲットgeneを含むサンプルは競合的なハイブリダイズとなる</li> </ul>	制限なし
感度	pg/mL (ECL)	二桁ng/mL	ng/mL~sub-ng/mL
選択性	構造類似体との分離検出は困難 <ul style="list-style-type: none"> <li>コンジュゲート体とフリー体</li> <li>未変化体と代謝物</li> </ul>	2次元化は選択性向上に有効 (?) (IC+RPの組み合わせ)	構造類似体との分離検出可 (QqQではクロストークには注意)
その他	ECLではマルチプレックスは困難	PNA probeは合成鎖長に制限あり	ISが別途必要

# 核酸医薬品のPAにおける手法の使い分け



## Hybridization

ターゲット

1本鎖の長鎖の  
(ASO, アプ

マトリックス

制限なし  
 • ハイブリタ  
 試薬の使用  
 • ターゲット  
 競合的なノ

感度

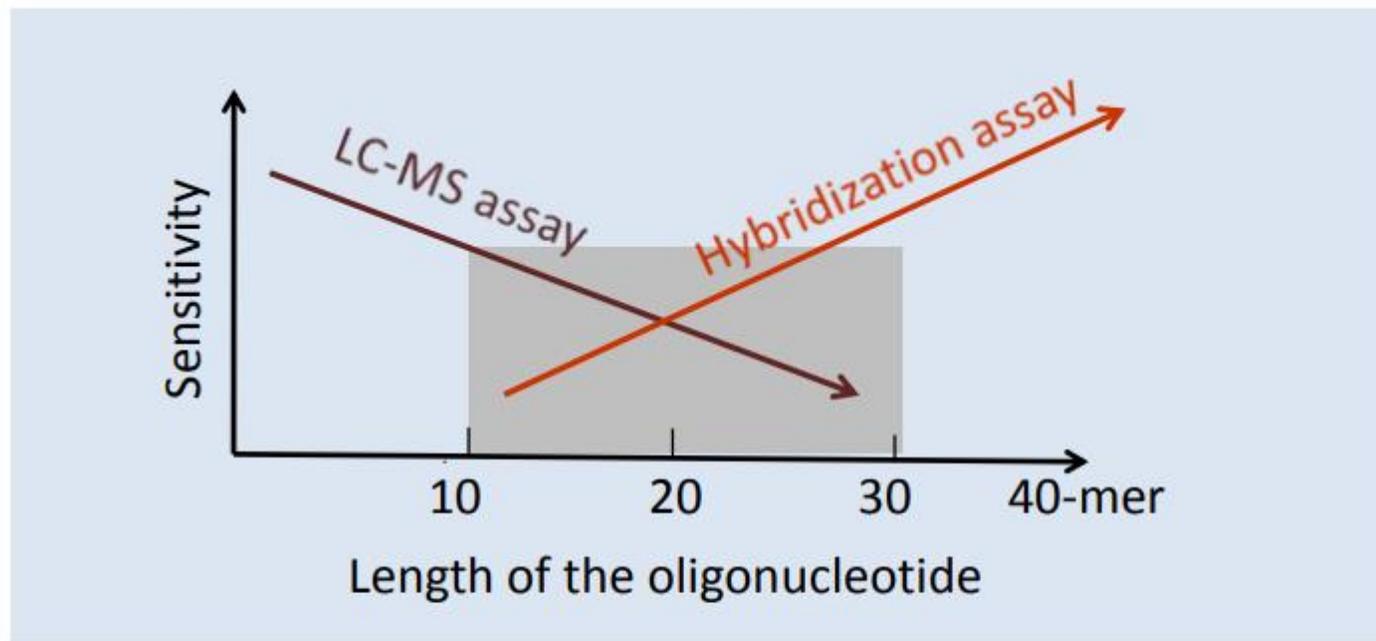
pg/mL (ECL

選択性

構造類似体と  
 • コンジュー  
 • 未変化体と

その他

ECLではマル



- LC-MS/MS (HRAM) assays are a good choice for small oligonucleotides;
- Hybridization-based assays are advantageous for large oligonucleotides.

Wang L, Quantitative Bioanalysis of Oligonucleotides.  
 Presented at: Thermo BioSeparations Workshop, 24 May 2016

# 核酸医薬品のBAにおける各手法の使い分け



## Hybridization-LBA

## Hybridization-LC-FL

## LC-MS

ターゲット

1本鎖の長鎖の核酸医薬品向き  
(ASO, アプタマーなど)

1本鎖の核酸医薬品向き

短鎖の核酸医薬品に向き

マトリックス

制限なし

- ハイブリダイスを阻害する試薬の使用は困難
- ターゲットgeneを含むサンプルで競合的なハイブリダイス

感度

pg/mL (ECL)

選択性

- 構造類似体との分離検出は困難
- コンジュゲート体とフリー
  - 未変化体と代謝物

その他

ECLではマルチプレックスは困難

PNA probeは合成鎖長に制限あり

ISが別途必要

### Hybridizationに影響を与える条件

- ✓ 温度
- ✓ pH (塩基のpKa)
- ✓ 塩濃度 (リン酸基の反発)
- ✓ 有機溶媒組成 (塩基対の $\pi$ - $\pi$ 相互作用)
- ✓ 変性剤 (カオトロピック溶媒)

検出可  
ークには

# Take home message

---



- ✓ LBA及びMSの両方の手法の特徴及び課題を把握することが重要
- ✓ 状況に応じて手法を選択
- ✓ 最新情報のキャッチアップ