

核酸医薬品のバイオアナリシス法の 開発と標準化

Development and standardization of bioanalytical methods for oligonucleotide therapeutics.

孫 雨晨

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部

これまでに上市した核酸医薬品及びその標的組織

製品名 (化合物名)	分類	承認年	標的分子	適応疾患	標的組織	化学修飾
Vitravene (fomivirsen)	アンチセンス	USA 1998 EU 1999	Cytomegalovirus (CMV) IE2 mRNA	CMV性網膜炎 (AIDS患者)	眼球(硝子体)	PS
Macugen (pegaptanib)	Aptamer	USA 2004 EU 2006 JP 2008	VEGF ₁₆₅ protein	滲出型 加齢黄斑変性症	眼球(硝子体)	2'-OMe 2'-F, PEG
Kynamro (mipomersen)	アンチセンス	USA 2013	ApoB100 mRNA	ホモ接合型家族性 高コレステロール血症	肝臓	PS 2'-MOE
Exondys 51 (eteplirsen)	アンチセンス	USA 2016	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	筋肉	Morpholino
Spinraza (nusinersen)	アンチセンス	USA 2016 EU, JP 2017	SMN2 pre-mRNA	脊髄性筋萎縮症	脊髄	PS 2'-MOE
HEPLISAV-B (HBsAg protein with CpG1018 adjuvant)	CpG OGN	USA 2017 EU 2021	TLR9	B型肝炎 (予防)	なし (ワクチンのアジュバンド)	S-oligo
Tegsedi (inotersen)	アンチセンス	EU, USA 2018	Transthyretin (TTR) mRNA	遺伝性ATTR アミロイドーシス	肝臓	PS 2'-MOE
Onpattro (patisiran)	siRNA	USA, EU 2018 JP 2019	TTR mRNA	遺伝性ATTR アミロイドーシス	肝臓	2'-OMe LNP (for DDS)
Waylibra (volanesorsen)	アンチセンス	EU 2019	ApoCIII mRNA	家族性 高カイルミクロン血症	肝臓	PS 2'-MOE
Givlaari (givosiran)	siRNA	USA 2019 EU 2020 JP 2021	ALAS1 mRNA	急性肝性 ホルフィリン症	肝臓	PS(partial), 2'-OMe, 2'-F, GalNAc
Vyondys53 (golodirsen)	アンチセンス	USA 2019	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	筋肉	Morpholino
Viltepso (vitolarsen)	アンチセンス	USA, JP 2020	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	筋肉	Morpholino
Oxlumo (lumasiran)	siRNA	USA, EU 2020	HAO1 mRNA	原発性 高シュウ酸尿症 I 型	肝臓	PS(partial), 2'-OMe, 2'-F, GalNAc
Leqvio (inclisiran)	siRNA	EU 2020 USA 2021	PCSK9 mRNA	高コレステロール血症 混合型脂質異常症	肝臓	PS(partial), 2'-OMe, 2'-F, GalNAc
Amondys45 (casimersen)	アンチセンス	USA 2021	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	筋肉	Morpholino
Amvuttra (vutrisiran)	siRNA	USA, EU,JP 2022	TTR mRNA	遺伝性ATTR アミロイドーシス	肝臓	PS(partial), 2'-OMe, 2'-F, GalNAc

核酸医薬品の規制に関する既存ガイドライン

国内

- **核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドラインについて** (薬生薬審発 0330 第1号、令和2年3月30日)

適応範囲：**アンチセンス、siRNA、miRNA、アプタマー、デコイ核酸**

記載内容：核酸医薬の非臨床安全性評価に関する留意点

代謝物：化成品と同様に、ICH M3 (R2) に準じて非臨床安全性を評価する(血中AUCの10%以上)

類縁物質：原薬(or製剤)を用いた非臨床安全性試験の試験成績(不純物/毒性プロファイル)を基に評価

海外(FDA)

- **Clinical Pharmacology Considerations for the Development of Oligonucleotide Therapeutics - Guidance for Industry** (Draft, June 2022)

適応範囲：**RNA標的型核酸医薬品 (タンパク質を標的とするアプタマーや免疫刺激用の核酸医薬は対象外)**

記載概要：臨床薬理に関する留意点

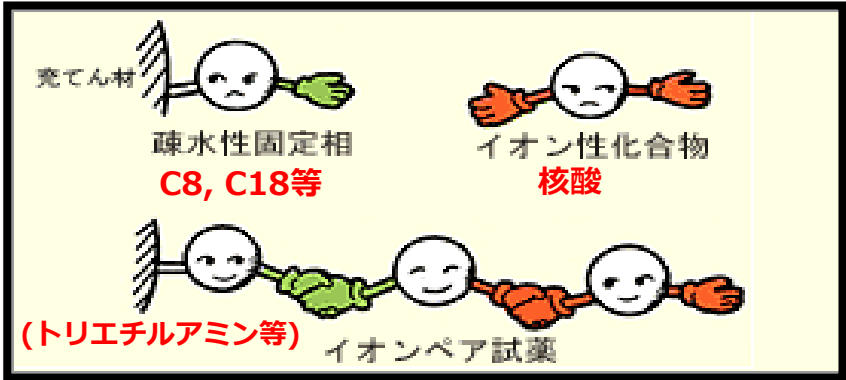
- ・ QT延長及び催不整脈作用の評価
- ・ 免疫原性評価
- ・ 臓器機能不全による薬物動態・薬力学・安全性への影響の検証
- ・ 薬物間相互作用に関する留意点 (薬物動態学的相互作用・薬物力学的相互作用)

上記のいずれのガイドラインにおいても、核酸医薬品のバイオアナリシスに関する言及はなされていない。また、昨年最終化されたICH M10においても核酸分析に特化した記載はなされていない。

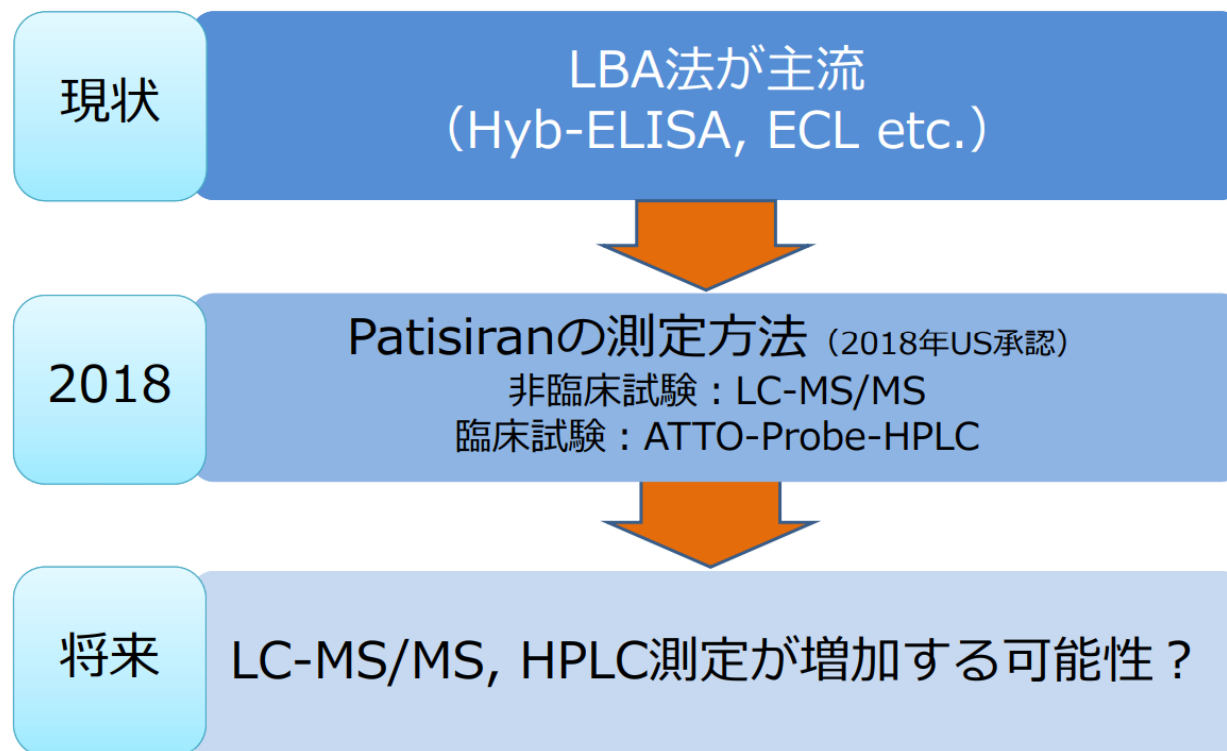
核酸医薬品の分析法

方法	Pros	Cons
<i>HPLC-UV</i>	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
<i>Hybridization-LC-fluorescence</i>	高感度 代謝物との分離が可能 前処理が簡便	報告例が少ない ややコストが高い
<i>Ligand binding assay (LBA)</i>	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 定量法の確立に時間が必要 代謝物との分離が困難
<i>qPCR</i>	高感度 前処理が簡便	再現性が悪い 代謝物との分別が困難
<i>Capillary electrophoresis-UV</i>	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
<i>Fluorescence or RI labeling</i>	前処理が無く、最も簡便	コストが高い 蛍光色素修飾により化合物の物性が変わる可能性がある
<i>LC/MS</i>	LCガイドラインに準拠可、 分析標的変更の際の分析法の再構築が簡便 原薬と代謝物・不純物の両方を同時定量可能	LBAと比べてやや感度が劣る 前処理が煩雑

核酸医薬品の分析法

方法	Pros	Cons
モルフォリノ核酸のLC/MS分析 モルフォリノ修飾によりリン酸基の負電荷が消失するため、低分子と同様一般的な逆相LCを用いた分離、ポジティブモードでのMS検出が可能である。 Meng et al., <i>Bioanalysis</i>, 2017;9:827-839.		
モルフォリノ核酸以外のアンチセンス核酸やsiRNAのLC/MS分析 リン酸基が負電荷を有するため、親水性相互作用LC (HILIC) あるいはイオンペア試薬を利用した逆相LCによる分離、ネガティブモードでのMS検出がよく利用される。現状、分離度、感度面並びに平衡化の容易さから、イオンペア試薬を利用したLC/MS分析が一般的である。 Meng et al., <i>Bioanalysis</i>, 2017;9:827-839. Kaczmarkiewicz et al., <i>Crit Rev Anal Chem</i>, 2019;49:56-270. Liu et al., <i>Int J Mol Sci</i>, 2022;23:15474.		 (SHIMADZU HPより一部改変)
LC/MS	LCガイドラインに準拠可、 分析標的変更の際の分析法の再構築が簡便 原薬と代謝物・不純物の両方を同時定量可能	LBAと比べてやや感度が劣る 前処理が煩雑

4年前のJapan Bioanalysis ForumのDGの予想



<http://bioanalysisforum.jp/>

核酸医薬品の承認品目で用いられた生体試料中薬物濃度分析法（血漿）

商品名	分類	分析手法	抽出手法	サンプル量	回収率	定量範囲
Vitravene	アンチセンス	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Macugen	アプタマー	Hybridization ELISA	N/A	N/A	N/A	N/A
Kynamro	アンチセンス	Hybridization ELISA	N/A	N/A	N/A	0.23-30.4 ng/mL
Exodys51	アンチセンス	HPLC (蛍光検出)	タンパク質 変性沈殿法	100 µL	N/A	Low: 10-1,000 ng/mL High: 1,000-20,000 ng/mL
spinraza	アンチセンス	Hybridization ELISA Hybridization ELA	N/A	N/A	N/A	N/A
Tegsedi	アンチセンス	Hybridization ELISA	N/A	N/A	N/A	1-200 ng/mL
Onpattro	siRNA	HPLC (蛍光検出)	N/A	30 µL	N/A	1-250 ng/mL
Givlaari	siRNA	LC/MS(HRAM) LC/MS/MS	N/A	N/A	N/A	LC/HRAM: 20-1,000 ng/mL LC/MS/MS: 10-5,000 ng/mL
Vyondys53	アンチセンス	LC/MS/MS	SPE	N/A	Low: 34.8% High: 41.8%	Low:10-1,000 ng/mL High: no information
Viltepso	アンチセンス	LC/MS/MS	SPE	N/A	Low: 67.5%-74.3% High: 69.0%-84.5%	Low: 20-1,000 ng/mL High: 500-50,000 ng/mL
Oxlumo	siRNA	LC/TOF-MS	SPE	100 µL	Antisense: 95.2% Sense: 92.3%	10-10,000 ng/mL
Amondys45	アンチセンス	LC/MS/MS	SPE	N/A	Low: 30.9%-41.4% High: 25.2%-26.4%	Low: 10-2,000 ng/mL High: 1000-2,00000 ng/mL
Leqvio	siRNA	LC/TOF-MS	SPE	N/A	N/A	10-10,000 ng/mL
Amvuttra	siRNA	LC/MS-HRMS	LLE	N/A	Antisense: 62.1%-66.2% Sense:60.7%-69.4%	10-1,000 ng/mL

N/A; not applicable. This table was made based on the reports on clinical pharmacology and biopharmaceutics reviews in the FDA website. 7

核酸医薬品の血漿試料の分析法バリデーション試験結果

化合物名	Golodirsen	Vitolarsen	Casimersen	Givosiran	Lumasiran	Inclisiran	Vutrisiran
分類	Antisense	Antisense	Antisense	siRNA	siRNA	siRNA	siRNA
内標	4045 NG5	-	SRP-4044 (antisense [Morpholino])	-	An siRNA w/o detailed information	Givosiran siRNA	-
定量範囲 (ng/mL)	Low: 10-1000 High: not specified	Low: 20-1000 High: 500-50000	Low:1 0-2000 High: 1000-200000	LC/MS(HRAM): 20-1000 LC/MS/MS: 10-5000	10-10000	10-10000	10-1000
直線性(r ²)	Low: 0.9965 High: N/A	0.990-0.995	Low: 0.9978 High: 0.9983	-	-	-	Antisense: 0.9955 Sense: 0.9966
回収率 (ISは割愛)	Low: 34.8% High: 41.8%	Low: 67.5% - 74.3% High: 69.0% - 84.5%	Low: 30.9% - 41.4% High: 25.2% - 26.4%	-	Antisense: 95.2% Sense: 92.3%	-	Antisense: 62.1% - 66.21% Sense: 60.7% - 69.4%
キャリーオーバー	No impact	-	-	-	-	No impact	> 20% for both antisense& sense
真度 (日内)	Low: -9.3% - 11.7% High: -6.3% - 13.0%	Low: 1.0% - 13.0% High: 1.0% - 6.4%	Low: -5.0% - 5.0% High: -7.1% - 3.3%	<15% (≤20% LLOQ)	Antisense: -9.2% - 14.4% Sense: -11.2% - 18.1%	Antisense: -9.1% - 11.8% Sense: 0.1% - 5.8%	Antisense: -8.1% - 11.0% Sense: 1.0% - 12.0%
精度 (日内)	Low: 1.4% - 7.6% High: 0.2% - 2.0%	Low: 1.7% - 9.8% High: 2.7% - 9.1%	Low: 0.9% - 4.3% High: 1.4% - 3.7%	<15% (≤20% LLOQ)	Antisense: 1.3% - 6.7% Sense: 1.9% - 10.5%	Antisense: 1.0% - 12.8% Sense: 2.5% - 11.4%	Antisense: 2.8% - 10.2% Sense: 1.1% - 12.0%
真度 (日間)	Low: -0.7% - 2.0% High: -2.7% - 6.0%	Low: 0.5% - 3.0% High: 1.2% -2.0%	Low: -2.1% - 2.4% High: -5.0% -1.3%	<15% (≤20% LLOQ)	Antisense: -6.3% - 11.2% Sense: 7.5% - 14.5%	Antisense: 0.1% - 5.8% Sense: 0.5% - 12.8%	Antisense: -4.0% - 1.0% Sense: -6.7% - 6.0%
精度 (日間)	Low: 7.2% - 10.4% High: 2.6% - 8.8%	Low: 4.7% - 12.0% High: 4.8% - 6.7%	Low: 2.2% - 3.4% High: 0.4% - 4.4%	<15% (≤20% LLOQ)	Antisense: 3.3% - 7.0% Sense: 4.1% - 11.2%	Antisense: 4.2% - 11.1% Sense: 5.1% - 11.2%	Antisense: 3.8% - 11.3% Sense:1.9% - 10.4%
ストック液安定性	6 hrs, RT 86 days, 5°C	94 days, RT	-	-	16 hrs, RT 76 days, -20°C	-	-
血中短期安定性	-	-	24 hrs, RT	-	24 hrs, RT	24 hrs, RT	6 hrs, 5°C; 24 hrs, RT
血中長期安定性	-	-	Low: 1456 days, -20°C High: 1321 days, -20°C	-	363 days, -20°C and -70°C	367 days, -20°C and -70°C	64 days, -20 °C 69 days, -70 °C
抽出試料安定性	Low: 48 hrs, RT High: 185 hrs, RT	48 hrs, RT	Low: 95 hrs, RT High: 119 hrs, RT	-	120 hrs, RT	-	121 hrs, 5°C
凍結融解安定性	4 cycles	5 cycles, -20°C	5 cycles, -20°C	-	5 cycles, -20°C and -70°C	5 cycles, -20°C and -70°C	4 cycles; frozen at -20 °C /-70°C, thawed at 5 °C
希釈の妥当性	-	-	-	-	200-fold	≤15% RE, Precision	10-fold
選択性 (ロット間)	None, 6 lots	None	None, 6 lots	-	<20% LLOQ <5% IS	<20% LLOQ <5% IS マトリックス効果も実施	None, 6 lots マトリックス効果も実施
選択性 (溶血)	No impact	-	-	-	No impact	No impact	-
選択性 (高脂血症)	-	-	-	-	No impact	No impact	-
特異性	-	-	-	-	-	No inference	-

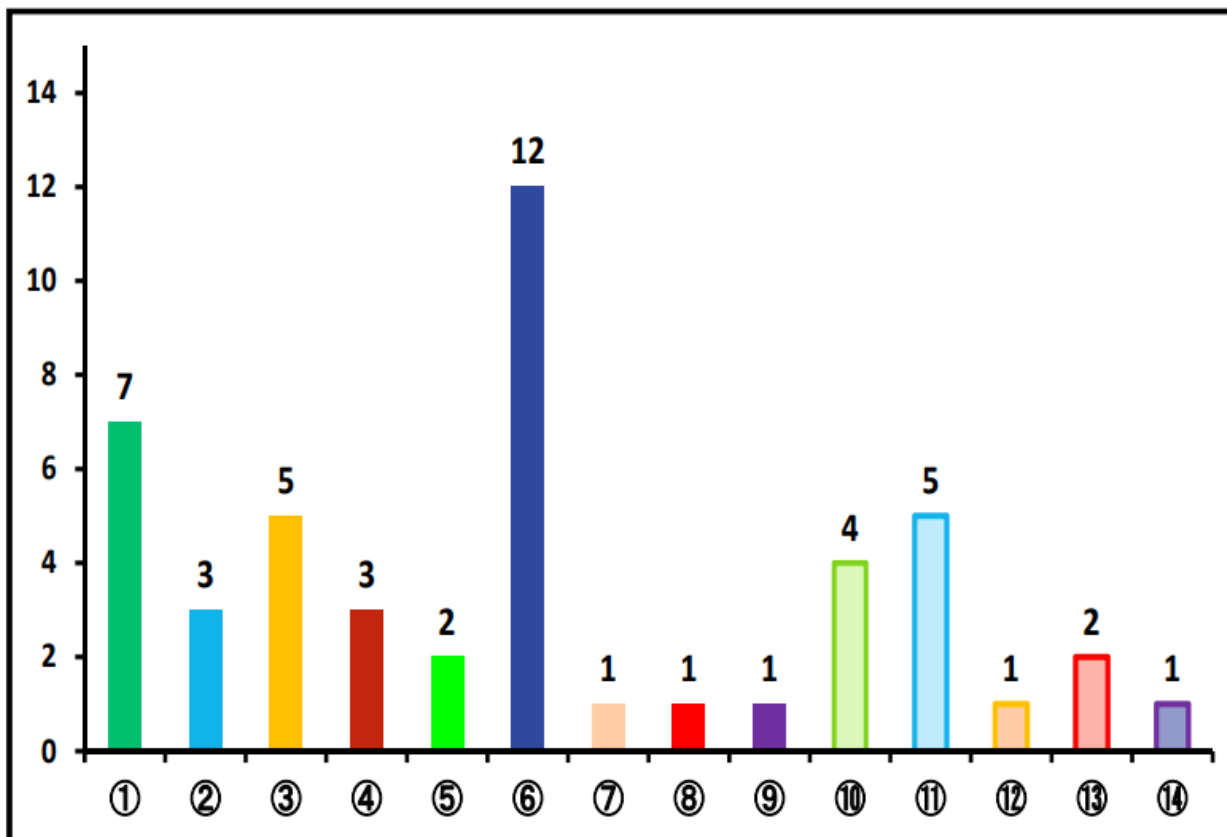
LC/MSによる既承認核酸医薬品の分析では、既存の低分子医薬品の生体試料中薬物濃度分析法バリデーションガイドライン（ICH M10等）を基に、分析法の検証がなされている。しかしながら、その実施項目は開発品目ごとにばらつきがあるのが現状である。8

核酸医薬品のLC/MS分析で感じる課題点

(10th JBF DGのアンケート調査結果から引用)

- ✓ 簡便なジェネリックメソッドがないこと
- ✓ 吸着／キャリーオーバーの回避方法

大きな課題



- ① 容器への吸着
- ② キャリーオーバー（インジェクター回り）
- ③ キャリーオーバー（配管，カラム）
- ④ 内標準物質の選択、⑤ 安定性
- ⑥ 前処理法の検討、⑦ 検量線レンジ
- ⑧ 検量線が直線になりにくい（2次曲線）
- ⑨ カラムの選択
- ⑩ 定量に使用するイオン（m/z）の設定
- ⑪ 定量下限、⑫ 機器のメンテナンス
- ⑬ 金属アダクトイオンの影響
- ⑭ その他

その他の意見

・ LC条件

10th JBF symposium, DG2018-36

(http://bioanalysisforum.jp/images/2019_10thJBFS/DG2018-36.pdf)

核酸医薬品のLC/MS分析で感じる課題点

(10th JBF DGのアンケート調査結果から引用)

- ✓ 簡便なジェネリックメソッドがないこと
- ✓ 吸着／キャリーオーバーの回避方法

大きな課題

標準的な手法が必要なのではないか？

既存のガイドライン（ICH M10）に適応可能か、またその際の留意点にはどのようなものがあるのか？

吸着が問題なら、どうしたら解決できるのか？



本官民共同研究では、モデル医薬品を用いた核酸医薬品の分析法の開発とその標準化に向けた多施設検証試験を実施してきた。本発表ではその代表的な成果と現在開発している網羅的核酸医薬品代謝物同定法について紹介したい。

アンチセンス医薬品のLC/MS測定法の標準化に向けた取り組み

LC/MSによるアンチセンス医薬品の生体試料中濃度（血中濃度）の標準化に向けて、

STEP1： **高分解能型質量分析計による高感度測定法の構築及び検証**

STEP2： **四重極型質量分析計を利用した測定法の実施分析検証試験（計7施設）**

<分析対象核酸医薬品>

Mipomersen (S-oligo, 2'-MOE 修飾)

- ・ 家族性高コレステロール血症治療薬
- ・ 皮下投与(C_{max} : approx. 1-8 $\mu\text{g/mL}$)
- ・ 20-merのアンチセンス医薬品

<内部標準分子>

Mipomersen 骨格 (S-oligo) + 2'-OMe 修飾

(三連四重極型質量分析計を用いた測定系で使用)

Mipomersen 骨格 (S-oligo) + LNA 修飾

(高分解能型質量分析計を用いた測定系で使用)

<前処理手法>

Clarity OTXを用いた固相抽出

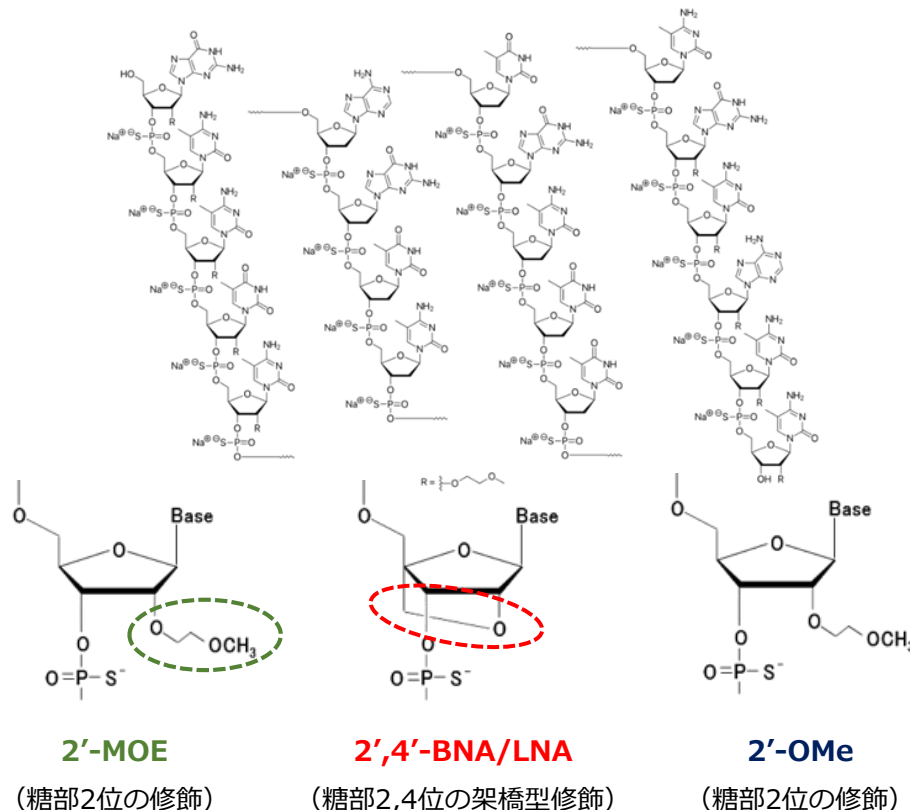
<分析手法>

イオンペア試薬を用いたLC/MS分析

<バリデーション試験内容>

STEP1:検量線, 真度, 精度, 選択性, キャリーオーバー, 安定性(短期/長期/凍結融解), マトリックス効果, 希釈の妥当性

STEP2:検量線, 真度, 精度, 選択性, キャリーオーバー



ラット血漿からのミポメルセン抽出条件

イメージ図

 先行課題
の成果


Kit : Clarity OTX SPE plate(25mg /well, Phenomenex)

作業手順		条件
1. サンプル調製		
	Mipomersen 標準品液	5-2500 ng/mL, 10 μ L
	内標分子溶液	500 ng/mL, 20 μ L (最終濃度 100 ng/mL)
	プールラット血漿	100 μ L
	Lysis-Loading buffer	100 μ L
2. 固相プレートの平衡化 (自然落下)		
2-1. メタノールによる平衡化		
	添加量	250 μ L
2-2. 平衡化液による平衡化		
	平衡化液の組成	50 mM aq. NH_4OAc (pH5.5)
	添加量	250 μ L
3. サンプルロード (減圧)		
	添加量	1.で調製したサンプル全量
3. 固相プレートの洗浄 (減圧)		
3-1. 平衡化液による洗浄		
	添加量	500 μ L
3-2. 洗浄液による洗浄		
	洗浄液組成	50 mM aq. NH_4OAc (pH5.5) / ACN(1/1)
	添加量・洗浄回数	500 μ L x 2回
4. 溶出 (遠心)		
	溶出液組成	100 mM aq. NH_4HCO_3 (pH10.0) / ACN (1/1,v/v)
	添加量	500 μ L
5. 乾固 (減圧エバポレーター)		
		1.5 時間、40°C
5. 再溶解&フィルター処理		
		水/メタノール (80/20, v/v), 50 μ L
		0.22 μ m PVDF膜

 NH_4OAc ; 酢酸アンモニウム. ACN; アセトニトリル. NH_4HCO_3 ; 炭酸水素アンモニウム.

Mipomersenの分析条件（高分解能型MS）

LC	Vanquish (Thermo Fisher Scientific)
Analytical column	Triart C8 metal free [S-1.9 µm, 12 nm, 2.1x100 mm] (YMC)
Column temp.	50 °C
Mobile phase A	Water/TEA/HFIP (1000/4/20,v/v/v)
Mobile phase B	Methanol/TEA/HFIP (1000/4/20,v/v/v)
Autosampler rinse solution	Water/methanol (1:1,v/v)
Flow rate	0.3 mL/min
Injection volume	10 µL

移動相は遮光便で調製．HPLC配管はバイオコンパティブル合金あるいは、フューズドシリカ配管を利用
TEA, トリエチルアミン HFIP, ヘキサフルオロイソプロパノール

Gradient

Percent of mobile phase B;

-3.00 min-0.00 min 10%

0.00 min-5.00 min 10% > 40%

5.00 min-5.10 min 40% > 70%

5.10 min-7.00 min 70%

7.00 min-7.10 min 70% > 10%

7.10 min-8.00 min 10%

カラム洗浄

8.00 min-8.10 min 10% > 90%

8.10 min-9.00 min 90%

9.00 min-9.10 min 90% > 10%

9.10 min-10.00 min 10%

10.00 min-10.10 min 10% > 90%

10.10 min-11.00 min 90%

11.00 min-11.10 min 90% > 10%

HRMS	QExactive plus (Thermo Fisher Scientific)
Mode	PRM
Polarity	Negative
Scan range	50-6000 m/z
Ion spray voltage	4 kV
Capillary temperature	350°C
AUX gas heater	350°C
AUX gas	10
Ion sweep gas	1
Sheath gas	40
S-Lens RF level	80
AGC target	2x10 ⁴
Maximum injection time	100 ms
NCE	100
Isolation window	2 m/z

MS transitions	Precursor ions (m/z)	Product ion (m/z)
Mipomersen	2390.9678 (z3) 1793.0110 (z4) 896.1335 (z8)	94.9362 [PO ₂ S] ⁻
Mipomersen-LNA (internal standard, IS)	2237.5125 (z3) 1677.9116 (z4) 838.4558 (z8)	94.9362 [PO ₂ S] ⁻

バリデーション試験の結果

評価項目	評価結果
定量範囲	0.5 ng/mL - 250 ng/mL
直線性（一次関数、 $1/X^2$ 重みづけ）	0.997 (r^2 値)
キャリーオーバー	未検出 (mipomersen及びIS)
日内真度	102.8% - 116.5% (定量下限)
日内精度	4.2% - 8.0%
日間真度	96.9% - 110.0%
日間精度	4.4% - 10.3%
選択性	妨害シグナルなし（6ロットのラット血漿）
マトリックス効果	真度; 92.8% - 106.3%, 精度; 4.1% - 6.0%
短期生体試料中安定性	室温、4℃で24時間安定
長期生体試料中安定性	-80℃保存で3か月安定
凍結融解安定性	-80℃で5回凍結融解まで安定
抽出後試料安定性	4℃で24時間安定
希釈の妥当性	100倍希釈

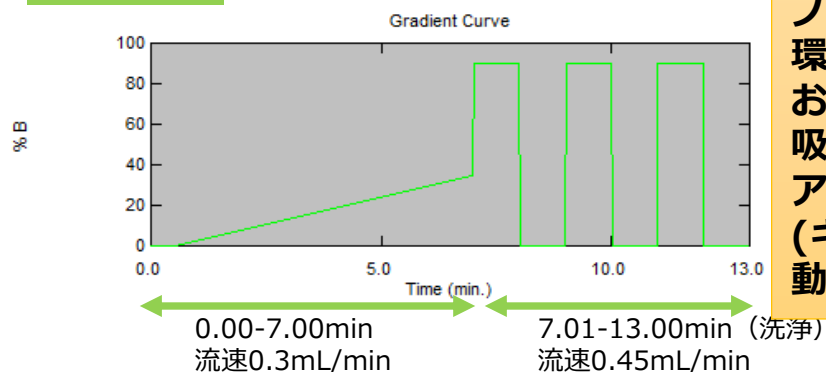
実施した全検証試験結果がICH M10ガイドラインの基準値内であったことから、高感度かつ再現性の高い測定手法を構築できたと考えられた。

Mipomersenの基本分析条件（三連四重極MS）

LC	Nexera X2 (Shimadzu)
Analytical column	X Bridge BEH C18 [2.5 μ m, 2.1 x 50 mm] (Waters)
Column temp.	50 $^{\circ}$ C
Mobile phase A	Water/Methanol/TEA/HFIP/ Acetylacetone (900/100/4/20/0.1,v/v/v/v/v)
Mobile phase B	Methanol/Water/TEA/HFIP/ Acetylacetone (900/100/4/20/0.1,v/v/v/v/v)
Autosampler rinse solution	Water/Methanol/2-propanol/ Acetylacetone (500/250/250/2,v/v/v/v/v)
Injection volume	5 μ L

MS	QTRAP 5500 (AB SCIEX)
Polarity	Negative
Ion spray voltage	-4500 V
CUR	30 psi
TEM	450 $^{\circ}$ C
GS1	80 psi
GS2	80 psi
CAD	10
DP	-135 V
CXP	-11V
CE (mipomersen)	-140 V
CE (mipomersen-2'OMe)	-120 V
Dwell	120msec

Gradient



ノンメタルフリー
環境下の分析に
おける核酸の金属
吸着防止のために
アセチルアセトン
(キレート剤)を移
動相に添加

MS transitions	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
Mipomersen	796.4 (z9)	95.0 [PO ₂ S] ⁻
Mipomersen- OMe (IS)	738.2 (z9)	95.0 [PO ₂ S] ⁻

Sun et al., *Bioanalysis* 2022;18:1213-1227.

ラット血漿からのミポメルセン抽出条件

Kit : Clarity OTX SPE plate(25mg/well, Phenomenex)

作業手順		条件
1. サンプル調製		
	Mipomersen 標準品液	10 - 5,000 ng/mL, 10 μ L
	内標分子溶液	250 ng/mL, 20 μ L (最終濃度 50 ng/mL)
	プールラット血漿	100 μ L
	Lysis-Loading buffer	250 μ L
2. 固相プレートの平衡化 (自然落下)		
2-1. メタノールによる平衡化		
	添加量	250 μ L
2-2. 平衡化液による平衡化		
	平衡化液の組成	50 mM NaH_2PO_4 (pH5.5)
	添加量	250 μ L
3. サンプルロード (減圧)		
	添加量	1. で調製したサンプル全量
3. 固相プレートの洗浄 (減圧)		
3-1. 平衡化液による洗浄		
	添加量	500 μ L
3-2. 洗浄液による洗浄		
	洗浄液組成	100 mM NaH_2PO_4 (pH5.5)/ACN (1/1, v/v)
	添加量・洗浄回数	500 μ L x 3回
4. 溶出 (遠心)		
	溶出液組成	400 mM aq. NH_4HCO_3 / ACN (1/1, v/v)
	添加量	250 μ L
5. 乾固 (窒素気流下)		
		1.5 時間、40°C
5. 再溶解&フィルター処理		
		Tris-EDTA buffer/methanol (70/30, v/v), 50 μ L
		0.22 μ m PVDF膜

NaH_2PO_4 ; リン酸2水素ナトリウム. ACN; アセトニトリル. NH_4HCO_3 ; 炭酸水素アンモニウム.

赤字は高分解能型MSの前処理手法から変更点

Sun et al., *Bioanalysis* 2022;18:1213-1227.

使用機器及び分析条件の変更点の概要

Lab	LC	MS	分離カラム (全施設で統一)	基本条件からの変更点(概要)
Lab A	Nexera (Shimadzu)	QTRAP 6500+ (AB SCIEX)	X Bridge BEH C18 [2.5µm, 2.1 x 50mm] (Waters)	再溶解液量 : 100 µL、 再溶解後のフィルター処理なし、各種MSパラメーターの最適化
Lab B	Prominence (Shimadzu)	API5000 (AB SCIEX)	X Bridge BEH C18 [2.5µm, 2.1 x 50mm] (Waters)	内標準溶液濃度 : 500 ng/mL 再溶解液量 : 100 µL LC/MS注入量 : 10 µL
Lab C	Nexera X2 (Shimadzu)	Xevo-TQ-XS (Waters)	X Bridge BEH C18 [2.5µm, 2.1 x 50mm] (Waters)	LC/MS注入量 : 3 µL 各種MSパラメーターの最適化
Lab D	Prominence (Shimadzu)	API5000 (AB SCIEX)	X Bridge BEH C18 [2.5µm, 2.1 x 50mm] (Waters)	LC/MS注入量 : 10 µL アセチルアセトン不使用 LC条件・各種MSパラメーターの最適化
Lab E	Nexera (Shimadzu)	QTRAP 5500+ (AB SCIEX)	X Bridge BEH C18 [2.5µm, 2.1 x 50mm] (Waters)	各種MSパラメーターの最適化
Lab F	Nexera MPシステム (Shimadzu)	QTRAP 6500 (AB SCIEX)	X Bridge BEH C18 [2.5µm, 2.1 x 50mm] (Waters)	LC/MS注入量 : 10 µL 各種MSパラメーターの最適化
Lab G	Thermo Scientific Vanquish Flex (Thermo Fisher Scientific)	TSQ Altis (Thermo Fisher Scientific)	X Bridge BEH C18 [2.5µm, 2.1 x 50mm] (Waters)	内標準溶液濃度 : 50 ng/mL 各種MSパラメーターの最適化 (8価イオンをプレカーサーイオンとして使用、チオチミジル酸をプロダクトイオンとして使用)

多施設バリデーション試験の結果

	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D	Lab E	Lab F	Lab G
定量範囲	1 ng/mL – 500 ng/mL						
直線性 (一次関数, $1/X^2$)	0.992	0.993	0.997	0.995	0.999	0.993	0.999
キャリーオーバー (対LLOQ)	214.8% (mipomersen) 未検出 (IS)	未検出 (mipomersen及 びIS)	<20% (mipomersen及 びIS)	34.7% (mipomersen) 未検出 (IS)	未検出 (mipomersen及 びIS)	122% (mipomersen) <20% (IS)	<20% (mipomersen) 未検出 (IS)
キャリーオーバー 解消に必要な 洗浄回数	2回	-	-	1回	-	情報なし	-
真度	88.1% - 101.2%	89.1% - 103.0%	95.5% - 101.2%	96.7% - 110.7%	85.5% - 92.2%	97.3% - 109.9%	86.8% - 100.4%
精度	0.2% - 8.9%	0.2% - 9.4%	0.7% - 11.8%	3.1% - 8.7%	0.3% - 2.4%	1.9% - 19.1%(LLOQ)	3.6% - 14.1%
選択性	妨害シグナル なし	妨害シグナル なし	<20% LLOQ <5% IS	妨害シグナル なし	妨害シグナル なし	<20% LLOQ <5% IS	妨害シグナル なし

キャリーオーバー以外すべて評価項目で既存ガイドラインの基準値を充たす結果が得られた。

＜キャリーオーバー対策例＞

- ① ULOQ検量線試料の濃度を下げ、かつ高濃度と予想される実サンプルの希釈を行い測定に供すること
- ② 各サンプル測定間に1-2回ブランク試料測定をはさむこと
- ③ 試料中の濃度が低いと予想されるサンプルから測定を行うこと

まとめ

- これまでの官民共同研究により、アンチセンス医薬品バイオアナリシスのための再現性・頑健性の高いLC/MS分析法を構築した。
- キャリアオーバーの発生に気を付ける必要があるものの、ICHM10等の既存のバイオアナリシス法バリデーションガイドラインの基準値を遵守した核酸医薬品の高感度LC/MS分析法の開発及び検証が可能であることを実証した。
- 核酸医薬品のLC/MS分析ではキャリアオーバー発生抑制のために、核酸の金属吸着の低減を目的とする装置のメタルフリー化が重要である。

謝辞

国立医薬品食品衛生研究所

医薬安全科学部
斎藤嘉朗、齊藤公亮、須藤千工、
縦山利子

遺伝子医薬部

井上貴雄、吉田徳幸

第一三共株式会社

合田竜弥、岸野有紀

武田薬品工業株式会社

掛樋真彰、清水久夫、藤田央

株式会社住化分析センター

山口建、重山拓摩、村田和之

積水メディカル株式会社

山根真一、奥藺剛、舩井直人、
伊藤諭史

LSIメディエンス株式会社

新田真一郎、中井恵子、細貝龍太、
會田由美子、斎藤朋子

株式会社新日本科学

川端光彦、高木宇一郎、鳥谷裕太郎

サーモフィsherサイエティック株式会社

高原健太郎、松沼孝行

株式会社島津製作所

山田真希、加藤紀子

味の素株式会社

中山聡、唐川幸聖

Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社

神野文宏、翁昌子、山和誠

シミックファーマサイエンス株式会社

林善治、丸本美穂

エーザイ株式会社

井上和子、石田友己、菊池きよ美

田辺三菱製薬株式会社

田中広浩

小野薬品工業株式会社

大川星美、花田聖徳

東和薬品株式会社

立木秀尚、内山仁、片桐直宏、宇根理香子

理化学研究所

生命分子解析ユニット
中山洋、小池仁美

日本医療研究開発機構

JP17-21ak0101073, JP22ak0101185,
JP20-22mk0101184,

