

TOPICS

製剤試験部門 拡張

2010年12月、製剤試験部門のスペースを拡張し、機器を増設しました。HPLC2台、溶出試験器2台等を増設し、多くの溶出試験のご依頼にスピーディにお応えできるようになりました。2011年度にはさらにHPLC3台、溶出試験器2台を増設し、新たな試験メニューとしてエンドトキシン試験、不溶性微粒子試験等を加える予定です。



■ Master Controlから文書管理システムを導入



■ 前処理ロボット



米国ラボ受託試験開始

ついに受託試験を開始いたしました。最新システムも続々と導入。お客様のニーズに柔軟にお応えするJCLバイオアッセイならではのサービスを、米国ラボでも追求していきます。

最新設備導入状況

- ・文書管理システム ————— Master Controlを導入、2011年7月から本格運用予定
- ・前処理ロボット ————— Hamilton Star, Nimbusを導入しトレーニング中
- ・LC-MS/MS ————— 今期4台増設予定、10台体制に
- ・LIMS ————— 機種選定中



【本社・営業本部】

〒560-0082
大阪府豊中市新千里東町1丁目4番2号
千里ライフサイエンスセンタービル16階
TEL06-4863-5225 FAX06-4863-5021

【西脇ラボ】

〒677-0032
兵庫県西脇市中畑町17番18
TEL0795-23-5725
FAX0795-23-4756

【大阪ラボ】

〒564-0043
大阪府吹田市南吹田5丁目16-26
TEL06-6338-8102
FAX06-6338-3775

【米国ラボ】

JCL Bioassay USA, Inc.
2860 Forbs Avenue, Hoffman Estates
Illinois 60192-3702, USA
TEL+1-847-645-0407 FAX+1-847-645-0412



株式会社 **JCL バイオアッセイ**
Japan Contract Laboratories

URL <http://www.jclbio.com/>

E-mail order@jclbio.com

JCL BIOASSAY

ESSENTIAL REPORT

vol.3

質量分析計による 核酸医薬品 分析法の開発

低分子医薬品、タンパク質医薬品に続き、次世代の医薬品として注目されている核酸医薬品。

核酸医薬品は化学合成が可能で、またターゲットへの特異性が高いという利点があります。しかしその一方で、生体内で分解しやすく、安定性やドラッグデリバリーの問題が挙げられており、これらの問題を解決するため、核酸医薬品は天然の核酸とは異なる複雑な修飾が、多くの場合に施されています(参考文献1)。

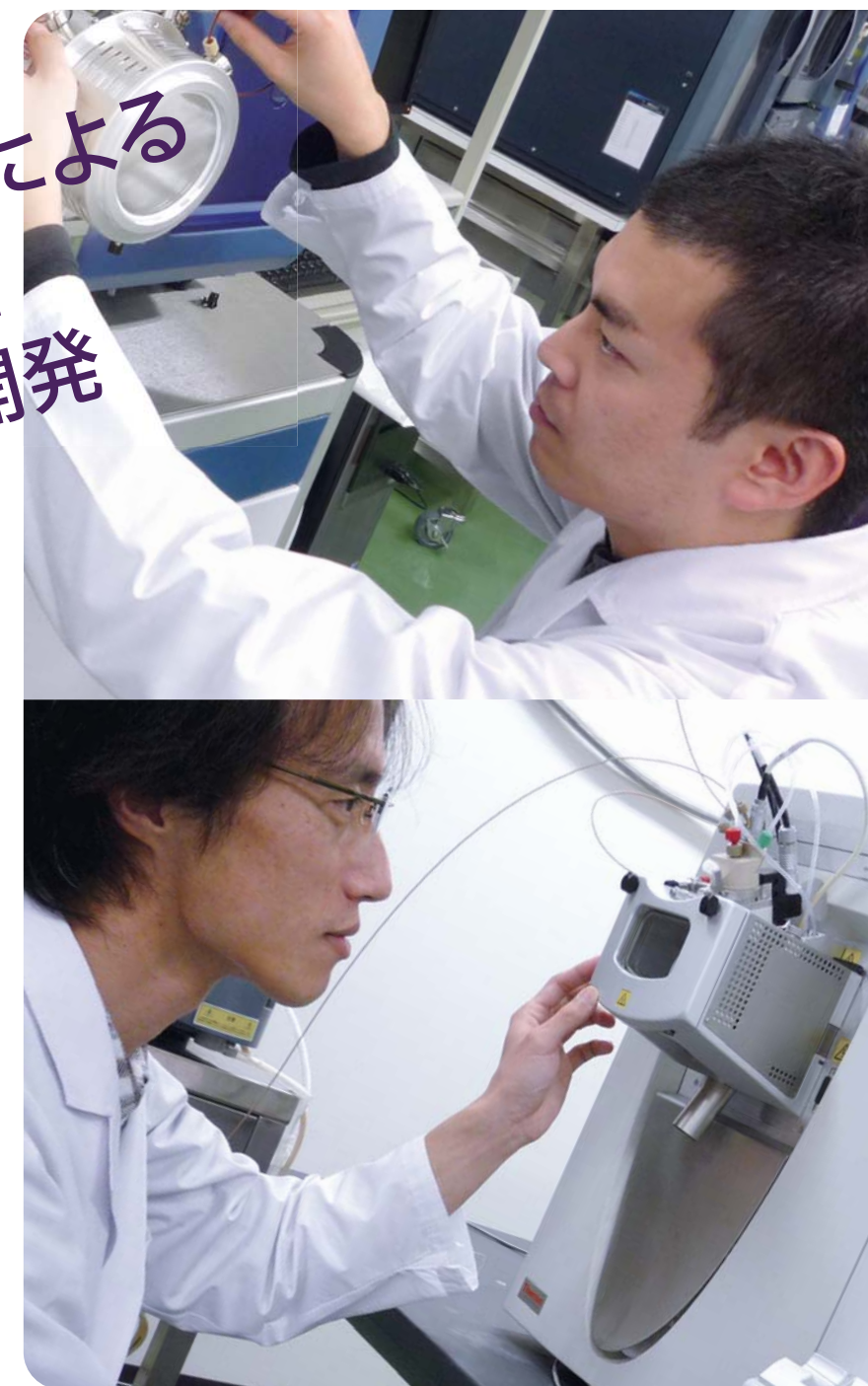
当社では、核酸医薬品として開発する過程で、あらゆる修飾核酸を定性的及び定量的に分析する技術が求められると考え、分析技術確立に取り組んできました。

特許出願中! 配列確認法の確立

核酸医薬品の開発において、詳細な塩基配列確認は重要なテーマのひとつであり、当社でも質量分析計を用いた配列確認法を検討してまいりました。そしてその結果、今までできなかった直接的に対象核酸を分析するという革新的な方法を確立しました。

LC-MS/MSでも! 核酸医薬品を定量

RNAの定量分析では、現在多くの場合、逆転写酵素により相補的な配列のcDNAを合成し、cDNAを鋳型としたリアルタイムPCRにより増幅及び検出する方法が採用されています。しかし、多種多様な修飾が施されたsiRNA医薬品に対して、PCRでどこまで対応できるのかという点に疑問があります。そこで当社では、修飾の種類によらず測定が可能と考えられるLC-MS/MSでのsiRNAの定量分析に着手しました。



ついにできた!

完全なる 核酸医薬品の 配列確認法

RP HPLC-LTQ FTを用いた
塩基配列確認法

当社では合成核酸をヌクレアーゼで加水分解し、その分解物の分子量を高精度に測定することによって塩基配列を確認する方法を開発しました。

図1 ヌクレアーゼ分解試料

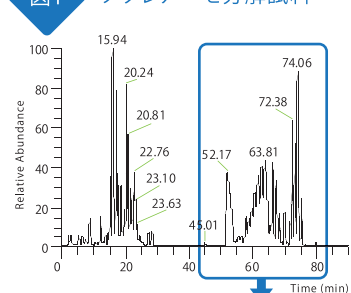


図1に核酸医薬品として近年注目されているアプタマーの分析例を示しています。測定対象のアプタマー由来のピークは溶出時間およそ52分に検出されますが、ヌクレアーゼ処理により図1に示すような、多数の加水分解物由来のピークが検出されています。各分解物の分子量は表1の通りです。塩基配列の確認法は非常に単純で、1塩基違いの2種の分解物の分子量差を計算し、その差に該当する塩基を当てはめるという方法です。例えば5塩基の分解物と4塩基の分解物の分子量差が329Daであった場合、分子量が329Daである塩基はアデニン(A)ですので、5塩基目はAと推定することができます。同様に全ての分解物で分子量差を計算し、対象の核酸の塩基配列を確認するという手法です。

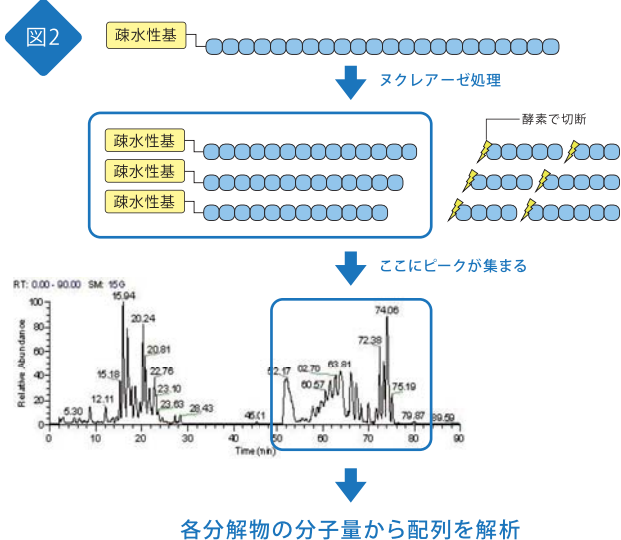
<表1>

分解物	溶出時間 (分)	分子量 (測定値)	分子量の差	推定される塩基
全長	51.89	9836.82	-	-
26塩基	54.88	9173.70	663.1	G(M)-dT
25塩基	55.59	8866.66	307.0	C(F)
24塩基	56.40	8559.62	307.0	C(F)
23塩基	57.38	8251.60	308.0	U(F)
22塩基	57.82	7908.54	343.1	A(M)
21塩基	58.81	7601.50	307.0	C(F)
20塩基	59.69	7258.43	343.1	A(M)
19塩基	60.57	6950.40	308.0	U(F)
18塩基	61.63	6607.34	343.1	A(M)
17塩基	62.76	6299.32	308.0	U(F)
16塩基	63.81	5991.29	308.0	U(F)
15塩基	65.47	5684.25	307.0	C(F)
14塩基	66.13	5325.17	359.1	G(M)
13塩基	67.32	5017.16	308.0	U(F)
12塩基	68.40	4674.08	343.1	A(M)
11塩基	69.25	4331.03	343.1	A(M)
10塩基	69.98	3971.96	359.1	G(M)
9塩基	70.89	3663.92	308.0	U(F)
8塩基	71.65	3304.88	359.1	G(M)
7塩基	72.38	2961.82	343.1	A(M)
6塩基	73.25	2654.78	307.0	C(F)
5塩基	74.06	2346.77	308.0	U(F)
4塩基	75.19	2017.72	329.1	A
3塩基	76.52	1688.65	329.1	A
1塩基	79.56	970.54	718.1	G(M)G(M)
疎水性基	-	662.5 (計算値)	308.0	U(F)

疎水性の官能基の付加を特許化

ヌクレアーゼ処理によって、様々な分解物が生じます(図2)が、分子量の差から塩基を推定するためには、5'末端又は3'末端のいずれかの構造が明確でなければなりません。そこで、当社ではヌクレアーゼ処理の前に対象となる核酸の5'末端に疎水性の官能基を付加しています。これにより疎水性の官能基を有する分解物(5'末端の構造が明確な分解物)は逆相カラムに対して保持が強くなり、溶出時間で容易に判断することができます。また、これらの分解物は塩基数が少なくなるに従って、溶出時間が遅くなる傾向も認められ、解析の一助となります。これらの疎水性基を有する分解物の特徴を活用することによって、分子量差を計算するという非常に単純な方法で、塩基配列確認を行うことが可能です。

当社では配列解析における疎水性官能基の付加に有益性を感じ、特許出願を行っています。



提案いたしました塩基配列確認法は直接的に対象核酸を分析している点が大きな特徴の1つと考えています。また、場合によっては、塩基配列が未知であっても、分析データから推定することが可能です。
本レポートのデータは株式会社リボミックとの共同研究により取得したものです。



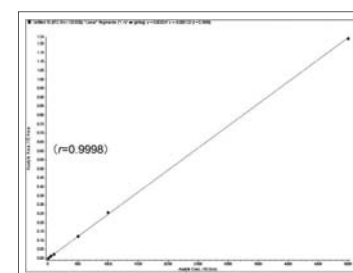
LC-MS/MSでも!

核酸医薬品を定量

核酸医薬品のLC-MS/MSでの定量分析の可能性を図るにあたって、回避できない検量線と実測試料中安定性の検討を行いました。

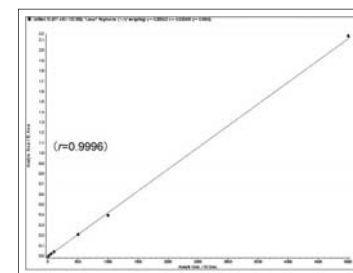
検量線

合成されたPCS-C2 siRNA(参考文献2)をヒトブランク血漿に添加し、phenol/chloroform処理及び固相抽出処理を施した(参考文献3)後、ACQUITY UPLC-Triple Quad 5500にてLC-MS/MS測定を実施しました。その結果、antisense strand及びsense strandの両方において、5-5000 ng/mLの範囲で $r > 0.999$ の良好な検量線を作成することが出来ました。



検量線
PCS-C2 antisense

Nominal concentration (ng/mL)	Back-calculated concentration (ng/mL)	Relative error (%)
5	5 280	5.2
10	9 630	-3.7
50	52 000	4.0
100	92 700	-7.3
500	498 000	-0.4
1000	1040 000	4.0
5000	4970 000	-0.6



検量線
PCS-C2 sense

Nominal concentration (ng/mL)	Back-calculated concentration (ng/mL)	Relative error (%)
5	4 980	-0.4
10	10 200	2.0
50	51 500	3.0
100	101 000	1.0
500	500 000	0.0
1000	938 000	-6.2
5000	5070 000	1.4

実測試料中安定性

実測試料中安定性を確認した結果、antisense strand及びsense strandの両方において、4℃保存下で48時間まで安定である結果が得られました。

以上の結果から、血漿中PCS-C2 siRNAのantisense strand及びsense strandを個別に定量分析ができると考えられます。siRNAの安定化、またDDSに関わる修飾の種類は多岐に渡りますが、化合物の質量を測定するLC-MS/MSはあらゆる修飾を有するsiRNAの分析に対応可能であると考えられます。

バイオ医薬グループ

高見知徳

Takami Tomonori



LTQ FTを用いた薬物代謝物の構造解析試験及びタンパク質・核酸の定性分析を担当。現在はTripleQuad5500を用いた核酸の定量分析をはじめ、主に高分子医薬品の定量分析法の開発に携わっている。第55回日本質量分析学会(2007年)優秀ポスター賞を受賞。

実測試料中安定性 PCS-C2 antisense

Nominal concentration (ng/mL)	Condition	Time (hour)	Observed (ng/mL)	Mean (ng/mL)	Remaining (%)	
15	-	Initial	15.3	14.9	100.0	
		24	14.4			
		48	15.0			
	4000	-	Initial	3970	3870	100.0
			24	3950		
			48	3700		
15		4℃	Initial	15.8	16.7	111.9
			24	17.2		
			48	17.0		
	4000	4℃	Initial	3970	3700	100.0
			24	4210		
			48	3890		
15		-	Initial	13.6	13.8	100.0
			24	13.4		
			48	13.2		
	4000	-	Initial	3710	3700	100.0
			24	3650		
			48	3510		
15		4℃	Initial	13.5	13.4	97.1
			24	13.5		
			48	13.6		
	4000	4℃	Initial	3750	3700	100.0
			24	3730		
			48	3510		
15		-	Initial	13.8	13.8	99.8
			24	14.6		
			48	13.2		
	4000	-	Initial	3710	3700	100.0
			24	3730		
			48	3510		
15		4℃	Initial	13.5	13.4	97.1
			24	13.5		
			48	13.6		
	4000	4℃	Initial	3750	3700	100.0
			24	3650		
			48	3510		
15		-	Initial	13.6	13.8	100.0
			24	13.4		
			48	13.2		
	4000	-	Initial	3710	3700	100.0
			24	3650		
			48	3510		
15		4℃	Initial	13.5	13.4	97.1
			24	13.5		
			48	13.6		
	4000	4℃	Initial	3750	3700	100.0
			24	3730		
			48	3510		

実測試料中安定性 PCS-C2 sense

Nominal concentration (ng/mL)	Condition	Time (hour)	Observed (ng/mL)	Mean (ng/mL)	Remaining (%)	
15	-	Initial	13.6	13.8	100.0	
		24	13.4			
		48	13.2			
	4000	-	Initial	3710	3700	100.0
			24	3650		
			48	3510		
15		4℃	Initial	13.5	13.4	97.1
			24	13.5		
			48	13.6		
	4000	4℃	Initial	3750	3700	100.0
			24	3730		
			48	3510		
15		-	Initial	13.8	13.8	99.8
			24	14.6		
			48	13.2		
	4000	-	Initial	3710	3700	100.0
			24	3650		
			48	3510		
15		4℃	Initial	13.5	13.4	97.1
			24	13.5		
			48	13.6		
	4000	4℃	Initial	3750	3700	100.0
			24	3730		
			48	3510		

医薬品の開発過程ではsiRNA医薬品(親化合物)のみの分析ではなく、その分解物も分析することが必要であると考えられているため、次のステップとしてsiRNA分解物の分析に着手しています。質量分析計を使用すれば、1塩基の違いも高精度で検出ことができ、さらに複数の分解物を同時に量的に評価することも可能と考えられます。

結果は、2011年6月6日(月)にASMS(米国コロラド州)で発表します。

参考文献1

Shim MS *et al.* (2010) Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. *FEBS J.*, **277**, 4814-4827.

参考文献2

Frank-Kamenetsky M *et al.* (2008) Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**, 11915-11920.

参考文献3

Guodong Zhang *et al.* (2007) Strategies for Bioanalysis of an Oligonucleotide Class Macromolecule from Rat Plasma Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **79**, 3416-3424.

塩山昇平

Shiroyama Shohei

バイオ医薬グループ

化学分析部門でLC-MS/MSによる定量分析を担当した後、定性分析部門に移籍し、薬物代謝物の構造解析試験など LTQ FTを用いた定性分析を担当。現在はタンパク質・核酸の特性解析を目的とした分析法の開発に携わっている。

