

## 固相抽出およびトリプル四重極LC/MSを用いた 血漿中核酸医薬品の定量法バリデーション

### 目的

近年、オリゴ核酸医薬品の開発が注目を集めています。既に pegaptanib や nusinersen などいくつかの核酸医薬品が承認されている他、多くのアンチセンス医薬品、siRNA 医薬品が臨床開発中で、今後も核酸医薬品の開発は増加すると考えられます。核酸の測定にはリガンド結合法 (LBA) が広く用いられています。LBA は高感度かつハイスループットな一方、代謝物の分離が困難であったり、塩基配列が変わるとプローブ再作成が必要であったり、マトリックスが変わると測定への影響が大きくメソッド開発に時間を有するなどの問題があります。そうした中、LBA の代替として LC/MS が注目を集めています。一般に LC/MS は、LBA ほど高感度ではないものの、測定対象物質と代謝物とを分離測定できるなどの特異性の高さ、塩基配列やマトリックスが変わったとしてもメソッドの変更が容易などの長があります。一方で、感度不足、システムへの吸着、キャリアオーバー、前処理法の開発が必要など LC/MS ならではの課題もあります。本稿では、国立医薬品食品衛生研究所が主導する研究班に参画し、ラット血漿中の核酸医薬品を Thermo Scientific™ TSQ Altis™ トリプル四重極質量分析計で定量し、LC/MS の妥当性・有用性を検証しました。モデルオリゴ核酸医薬品として、家族性高コレステロール治療薬である Mipomersen (国内未承認) を使用しました。Mipomersen を添加したラット血漿を固相抽出後、TSQ Altis トリプル四重極質量分析計で測定しました。本定量法が「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」<sup>1)</sup> を参考に設定したバリデーション判定基準値 (選択性、検量線、真度および精度、キャリアオーバー) を満たすか確認し、妥当性を評価しました。

### 実験

#### 検量線試料、QC サンプルの調製

Mipomersen (表1)、mipomersen 2' -O-methyl (OMe、mipomersen の塩基配列の 2' -O-methoxyethyl 修飾を OMe 修飾に変換。内標準物質 (IS) ) およびラット血漿 (SD ラットプール血漿) は国立医薬品食品衛生研究所から提供を頂きました。ラット血漿を遠心 (2400×g, 30 sec, 4 °C) しデブリスを除いた上澄み液をブランク血漿としました。Mipomersen を Invitrogen™ TE buffer (TE) /メタノール (7:3, v/v) で希釈し、標準溶液としました。ブランク血漿 100 μL に TE/メタノール (7:3, v/v) で希釈した標準溶液 (10~5,000 ng/mL) を 10 μL 添加し、1~500 ng/mL 検量線試料に調製しました。Quality Control (QC) サンプルは、ブランク血漿 980 μL に標準溶液 50、150、2,000、20,000 ng/mL を 20 μL 添加して調製し、それぞれ QLLOQ、QL、QM、QH としました。Mipomersen 2' -OMe を TE/メタノール (7:3, v/v) で希釈し、50 ng/mL に調製し内標準溶液とし、前処理時に各検量線試料および QC サンプルにスパイクしました。前処理を表2に記載します。

表1. オリゴ核酸

化合物名	塩基数 mer	理論分子量 Da
Mipomersen	20	7177.3
Mipomersen 2' -OMe	20	6652.6

表2. 前処理手順

1	遠心チューブにQCサンプル100 µLを分取し、TE/メタノール (7:3, v/v) 10 µLを添加。
2	1および検量線試料に内標準溶液20 µLを添加し、攪拌。
3	Clarity™ OTX Lysis-Loading buffer v2.0 (Phenomenex Inc. 製) 250 µLを添加し、約30秒攪拌。
4	あらかじめメタノール250 µLおよび50 mMリン酸二水素ナトリウム (pH 5.5) 250 µLでコンディショニングしたClarity™ OTX 96-well plate (25 mg) (Phenomenex Inc.製) に全量ロードし、溶液を減圧し排出。
5	50 mMリン酸二水素ナトリウム (pH 5.5) 500 µLで洗浄 (減圧)。
6	100 mMリン酸二水素ナトリウム (pH 5.5) /アセトニトリル (1:1, v/v) 500 µLで洗浄 (減圧)。これを3回繰り返した後、遠心 (36×g, 2 min, 20 °C)。
7	400 mM炭酸水素アンモニウム/アセトニトリル (1:1, v/v) 250 µLを添加し3分放置後、96ウェルディーププレートに遠心 (30×g, 2 min, 20 °C) し溶出。
8	遠心チューブに移し、窒素気流下40 °Cにて乾固。
9	TE/メタノール (7:3, v/v) 50 µLを添加し、約3分間攪拌。
10	Ultrafree™-MC, GV (PVDF, 0.22 µm、メルク社製) フィルターに分取し、遠心 (5000×g, 2 min, 20 °C)。ポリプロレン製バイアルに分取。

表3. 装置

分析装置	HPLC	Thermo Scientific™ Vanquish™ Flex Binary UHPLCシステム (チタン製2-6バルブ装着)
	MS	TSQ Altis トリプル四重極質量分析計
前処理装置	真空マニホールド	Thermo Scientific™ HyperSep™ ユニバーサル真空マニホールド
	加熱/攪拌モジュール	Thermo Scientific™ Reacti-Therm™ 加熱および攪拌モジュール
解析ソフトウェア	解析ソフトウェア	Thermo Scientific™ Xcalibur™ 4.4ソフトウェア

表4. LC条件

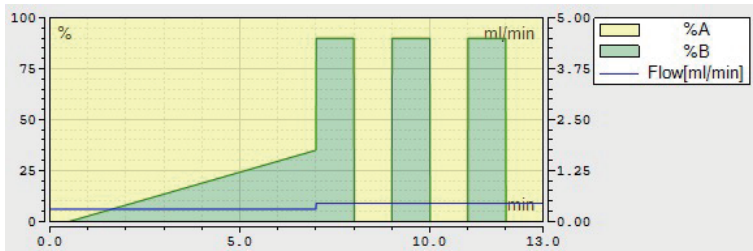
移動相A	蒸留水/メタノール/トリエチルアミン (TEA) /ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) /アセチルアセトン (900:100:4:20:0.1, v/v/v/v)																																																																								
移動相B	メタノール/蒸留水/TEA/HFIP/アセチルアセトン (900:100:4:20:0.1, v/v/v/v/v)																																																																								
流量・グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr><th>No</th><th>Time</th><th>Flow [ml/min]</th><th>%B</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>0.000</td><td></td><td>Run</td></tr> <tr><td>2</td><td>0.000</td><td>0.300</td><td>0.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>0.500</td><td>0.300</td><td>0.0</td></tr> <tr><td>4</td><td>7.000</td><td>0.300</td><td>35.0</td></tr> <tr><td>5</td><td>7.010</td><td>0.450</td><td>90.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>8.000</td><td>0.450</td><td>90.0</td></tr> <tr><td>7</td><td>8.010</td><td>0.450</td><td>0.0</td></tr> <tr><td>8</td><td>9.000</td><td>0.450</td><td>0.0</td></tr> <tr><td>9</td><td>9.010</td><td>0.450</td><td>90.0</td></tr> <tr><td>10</td><td>10.000</td><td>0.450</td><td>90.0</td></tr> <tr><td>11</td><td>10.010</td><td>0.450</td><td>0.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>11.000</td><td>0.450</td><td>0.0</td></tr> <tr><td>13</td><td>11.010</td><td>0.450</td><td>90.0</td></tr> <tr><td>14</td><td>12.000</td><td>0.450</td><td>90.0</td></tr> <tr><td>15</td><td>12.010</td><td>0.450</td><td>0.0</td></tr> <tr><td>16</td><td>New Row</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>17</td><td>13.000</td><td></td><td>Stop Run</td></tr> </tbody> </table> 	No	Time	Flow [ml/min]	%B	1	0.000		Run	2	0.000	0.300	0.0	3	0.500	0.300	0.0	4	7.000	0.300	35.0	5	7.010	0.450	90.0	6	8.000	0.450	90.0	7	8.010	0.450	0.0	8	9.000	0.450	0.0	9	9.010	0.450	90.0	10	10.000	0.450	90.0	11	10.010	0.450	0.0	12	11.000	0.450	0.0	13	11.010	0.450	90.0	14	12.000	0.450	90.0	15	12.010	0.450	0.0	16	New Row			17	13.000		Stop Run
No	Time	Flow [ml/min]	%B																																																																						
1	0.000		Run																																																																						
2	0.000	0.300	0.0																																																																						
3	0.500	0.300	0.0																																																																						
4	7.000	0.300	35.0																																																																						
5	7.010	0.450	90.0																																																																						
6	8.000	0.450	90.0																																																																						
7	8.010	0.450	0.0																																																																						
8	9.000	0.450	0.0																																																																						
9	9.010	0.450	90.0																																																																						
10	10.000	0.450	90.0																																																																						
11	10.010	0.450	0.0																																																																						
12	11.000	0.450	0.0																																																																						
13	11.010	0.450	90.0																																																																						
14	12.000	0.450	90.0																																																																						
15	12.010	0.450	0.0																																																																						
16	New Row																																																																								
17	13.000		Stop Run																																																																						
注入量	5 µL																																																																								
ニードル洗浄液	蒸留水/2-プロパノール/メタノール/アセチルアセトン (500:250:250:2, v/v/v/v)																																																																								
カラム	XBridge™ Oligonucleotide BEH C18 Oligo (2.5 µm, 2.1×50 mm) (Waters 社製)																																																																								
プレヒーター温度	50 °C																																																																								
カラム温度	50 °C, StillAir (非空気循環方式)																																																																								
バルブ	3.00~7.00 min MSへ取り込み																																																																								

表5. MSトランジション条件

化合物名	アリカー サイオン m/z	プロダク トイオン m/z	衝突 エネルギー eV	RFレンズ V	ソースフラグ メンテーション V
Mipomersen	896.1	318.8	34	125	15
Mipomersen 2' -OMe	830.6	318.8	34	125	15

表6. MS イオンソース条件

イオン化法	H-ESI Negative
スプレー電圧	-2800 V
シース/AUX/スイープガス	20 / 25 / 1 Arb
イオントランスファー チューブ温度	275 °C
ペーポライザー温度	425 °C
分解能 (FWHM)	Q1 2.0 / Q3 2.0
CIDガス	2.5 mTorr
サイクルタイム	0.40 s

表7. 設定したバリデーション基準

項目	測定内容	判定基準
選択性	個別6ロット (各zero sample (ISのみ添加) およびblank sample)	LLOQの20%以下 ISの5%以下
検量線	zero sample, blank sample 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 ng/mL (n=1, 9点)	各検量点の逆回帰濃度値±15%以内 (LLOQは20%以内)
真度および精度	QLLOQ: 1 ng/mL, QL: 3 ng/mL, QM: 40 ng/mL, QH: 400 ng/mL (各濃度前処理からn=3)	平均真度 理論値±15%以内、精度15%以下 (LLOQはどちらも20%以内)
キャリアオーバー	検量線500 ng/mL測定直後のblank試料のピーク面積	分析対象物質: LLOQの20%以下 IS: 5%以下

## 装置および測定条件

オリゴ核酸をステンレス (SUS) フリーのバイオコンパチブル仕様のシステムで測定することで、鉄の溶出や鉄と核酸との相互作用によるピーク面積の急激な低下など不要なトラブルを回避できます。そのため、HPLCにバイオコンパチブル仕様のVanquish Flex UHPLCシステムを使用し、TSQ Altisトリプル四重極質量分析計で測定しました (表3)。配管にはSUSを含まない特殊合金MP35N材質のThermo Scientific™ Viper™ キャピラリーMP35N フィンガータイトフィッティングおよびPEEKsil (PEEKとフューズドシリカ製) 材質のThermo Scientific™ nanoViper™ フィンガータイトフィッティングを、ダイバートバルブにチタン製バルブを採用しました。LCの条件を表4に、MSの条件を表5、6に示します。

## バリデーション基準

バリデーション基準は「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」を参考に表7のように設定しました。

## 結果

Mipomersenの価数分布をフルスキャンで確認した結果、8価のイオン ( $m/z$  896.1) が強く検出されたため、プリカーサーイオンとして本イオンを選択しました。次にプロダクトイオンスキャンを行いプロダクトイオンを確認しました。チオリン酸イオン ( $m/z$  95) よりもホスフォロチオエートヌクレオチドイオン ( $[T(S) - H_2O]^-$ ,  $m/z$  319)<sup>2)</sup>の方が高感度に検出されました。いずれもチオリン酸基を有しており内在性のオリゴ核酸と構造が異なり特異性が高いイオンです。一般的に、プロダクトイオンの $m/z$ が高い方が選択性が高く、夾雑ピークと重なりにくいというメリットがあります。そのため本解析では、感度と選択性を考慮し、プロダクトイオンにホスフォロチオエートヌクレオチドイオン ( $m/z$  319) を選択しました。

LLOQ 1 ng/mLのクロマトグラムおよび選択性の代表的な結果としてblank sampleのクロマトグラムを図1に示します。LLOQにおけるmipomersenのピーク面積は837であり、mipomersenが十分な感度で検出されました。次に、ラット血漿サンプル6ロットのzero sampleおよびblank sampleを用いて選択性を評価しました。6ロット全てでmipomersenおよびISのピーク周辺のバックグラウンドノイズは低く、周辺ノイズのピーク面積は、それぞれLLOQのピーク面積の20%および5%以下となり判定基準値を満たしました。以上より、選択したトランジションの特異性が高いことが確認できます。

次に検量線の直線性を確認しました (図2、表8)。1~500 ng/mLでサンプルを調製し、内標準法、重みづけ $1/x^2$ で評価しました。検量線は決定係数 ( $r^2$ ) 0.9988、逆回帰濃度の真度値 $100 \pm 6\%$ 以内と良好な結果となりました。低濃度側で急にピーク面積が低下するような吸着の傾向は確認されず、良好な直線性を示しました。

QCサンプルを用いて真度および精度を確認しました (表9)。LLOQの1 ng/mL (QLLOQ) の他、3 (QL)、40 (QM)、400 (QH) ng/mLを $n=3$ で調製し評価しました。QLLOQにおいて、平均真度 (Accuracy) は理論値-13.0%、精度 (precision) は4.6%となりました。QHの精度は14.2%でしたが、同一バイアルを複数

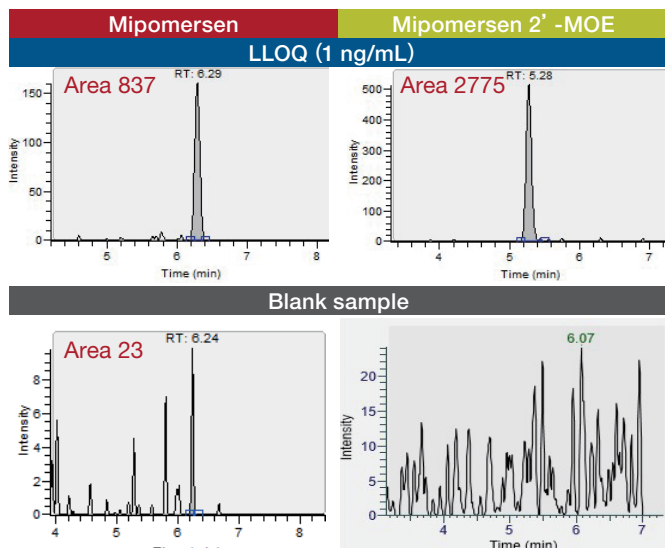


図1. LLOQ (1 ng/mL) およびblank sampleクロマトグラム (選択性評価)

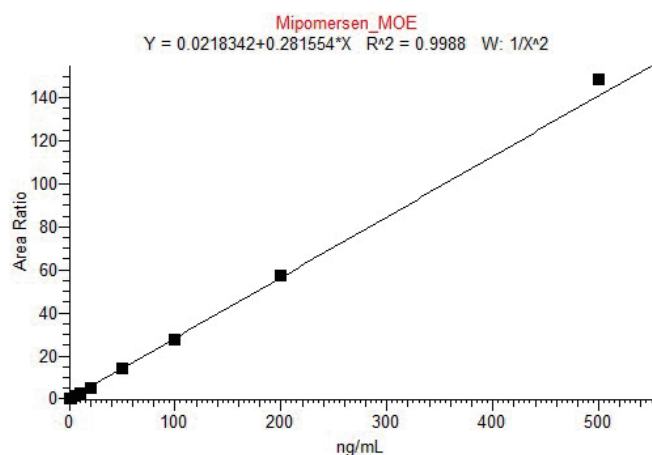


図2. Mipomersenの1~500 ng/mL検量線

表8. 各検量点のピーク面積、逆回帰濃度およびAccuracy

濃度 ng/mL	分析対象 物質面積	IS 面積	面積比	逆回帰濃度 ng/mL	Accuracy %
1	837	2,775	0.302	0.99	99.4
2	1,458	2,417	0.603	2.07	103.4
5	3,488	2,532	1.377	4.82	96.3
10	7,709	2,734	2.820	9.85	98.5
20	15,487	2,851	5.432	19.2	96.1
50	40,040	2,817	14.213	50.5	101.0
100	73,174	2,650	27.612	98.2	98.2
200	162,471	2,843	57.148	203	101.7
500	434,416	2,928	148.365	527	105.5

回注入した際の精度は1.5%以下 (data not shown) であったことから、本ばらつきは前処理に起因すると考えられます。

最後に、キャリアオーバーを確認しました (表10、図3)。検量線500 ng/mL測定直後のblank sample中のmipomersenのピーク面積は、LLOQの13.2%であり、判定基準値内でした。次に注入したblank sampleではキャリアオーバーは検出されず、システムおよびカラムへのmipomersenの継続的な吸着は確認されませんでした。また、ISではキャリアオーバーは確認されませんでした。

表9. QLLOQ, QL, QMおよびQHの平均真度および精度

QC	濃度 ng/mL	逆帰帰濃度 ng/mL	平均 ng/mL	Precision %	Accuracy %
QLLOQ	1	0.82	0.87	4.6	87.0
		0.90			
		0.89			
QL	3	2.76	2.85	3.5	95.0
		2.96			
		2.82			
QM	40	37.6	35.9	4.2	89.8
		34.8			
		35.3			
QH	400	368	401	14.2	100.3
		467			
		369			

### 結論

Vanquish Flex UHPLCシステムおよびTSQ Altis トリプル四重極質量分析計を用いることで、ラット血漿に添加したmipomersenオリゴ核酸を定量し、設定したバリデーション基準（選択性・検量線・精度および真度、キャリアオーバー）を満たしました。

- 注入量5 µLで測定した際の定量下限濃度は1 ng/mLであり、本濃度における真度（平均値87.0%）並びに精度（4.6%）は良好な値を示しました。
- ラット血漿6ロットでバックグラウンドノイズが低く、特異性の高いトランジションが選択できました。
- 1~500 ng/mLの広範なダイナミックレンジで定量性を確認でき、ピーク面積の低下などの吸着の傾向は確認されませんでした。
- 500 ng/mL注入直後のblankでのキャリアオーバーは13.4%とバリデーション判定基準値を満たし、その直後のblank sampleではキャリアオーバーは解消しました。

以上から、mipomersenの前処理も含めたLC/MS定量法の妥当性を確認できました。高感度なTSQ Altis四重極質量分析計を用いることで、mipomersen 1 ng/mLをLLOQとして定量でき、核酸のバイオアナリシスにおけるLC/MSの有用性が示唆されます。

表10. MipomersenおよびISのキャリアオーバー評価

化合物	サンプル	面積	面積比 %
分析対象物質	LLOQ	837	-
	Blank sample1回目 (500 ng/mL直後)	112	13.4
	Blank sample2回目	N.D.	N/A
IS	LLOQ	2,775	-
	Blank sample1回目 (500 ng/mL直後)	N.D.	N/A

※N.D.はNot detected、N/AはNot applicableの略

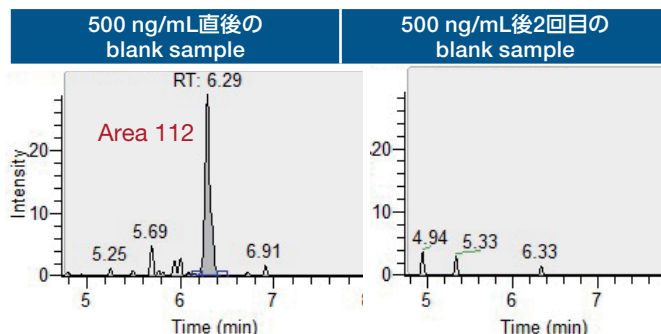


図3. 500 ng/mL検量線試料の測定直後のblank sample測定におけるmipomersenクロマトグラム（キャリアオーバー評価）

### 謝辞

本研究の成果は、AMED創薬基盤推進研究事業の課題である、国立医薬品食品衛生研究所が主導する研究班「革新的医薬品開発のための次世代安全性評価法の開発・標準化と基盤データ取得」に参画して得られたものです。また、本実験を行うにあたり多大なご指導を頂きました国立医薬品食品衛生研究所孫雨農先生に厚く謝意を申し上げます。

### 参考文献

- 1) 厚生労働省：医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン, **2013**.
- 2) Y. Sun et al. : Development of a bioanalytical method for an antisense therapeutic using high-resolution mass spectrometry. *Bioanalysis*, **2020**; 12: 1739-1756.

研究用のみ使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

Clarity is a trademark of Phenomenex. Ultrafree is a trademark of Merck. Xbridge is a trademark of Waters Corporation.

実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。thermofisher.com/jp-tc LCMS236-A22020B

## サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL : 0120-753-670 FAX : 0120-753-671

Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

thermofisher.com