

オリゴヌクレオチド医薬品のバイオアナリシス 定量のための、自動化および標準化されたキッ トベースのサンプル前処理ワークフロー

Nikunj Tanna, Mary Trudeau, Margot Lee

Waters Corporation

要約

オリゴヌクレオチド医薬品 (ONT) は、遺伝子の転写および翻訳のレベルで疾患生物学に対処する強力な能力と、ターゲットに対する高い特異性および低毒性から、今日の多くの医薬品開発者が注目している重要な分野です。このクラスの医薬品のパイプラインが拡大し続けるにつれて、この医薬品の探索および開発のパイプラインをサポートする、高感度で正確かつ頑健なバイオアナリシスアッセイの必要性が高まっています。LC-MS による検出および定量は、その多くのメリット (医薬品に対する広い適用性、感度、選択性、広いリニアダイナミックレンジ) により、バイオアナリシス試験において広く受け入れられているテクノロジーです。ただし、LC-MS ベースのバイオアナリシスアッセイで再現性のある性能を得ることは困難になる場合があります。一般に、これらのアッセイのばらつきの最大の原因は、生体液から医薬品およびその代謝物を抽出するのに必要なサンプル前処理です。特に、オリゴヌクレオチドの抽出時にばらつきが発生します。液-液抽出 (LLE) と固相抽出 (SPE) の 2 つは、LC-MS ベースの定量に用いる生体液からの ONT の抽出に最も広く使用されている手法です。LLE は低スループットで自動化が困難な手法であり、これらの分析法を開発および最適化して、ラボ内または組織全体にわたって導入するには、熟練した経験豊富な科学者が必要です。SPE はより自動化に適したハイスループットのアッセイですが、目的の回収率、再現性、感度を得るには、すべてのステップを体系的に最適化する必要がある場合があります。したがって、この目的を達成するため、分析法開発の必要性を低減し、LC-MS バイオアナリシスの結果の一貫性と再現性を向上させる、シンプルで幅広く適用できる ONT 用のサンプル前処理ワークフローが強く望まれます。ウォーターズの OligoWorks™ SPE マイクロプレートキット (OligoWorks キット) は、このことを考慮して設計されています。このキットでは、標準化された界面活性剤を含まない試薬と、多様な ONT に対応する最適化済みの頑健なプロトコルが使用されており、分析法開発はほとんど必要ありません。各キット




に含まれる自動化に適した試薬および SPE デバイスにより、Andrew+™ ピペッティングロボットなどの自動リキッドハンドリング装置でのサンプル前処理手順を容易に自動化できるため、分析性能および生産性をさらに高め、人的ミスやばらつきを低減することができます。

この試験では、OligoWorks キットのコンポーネントおよび Andrew+ ピペッティングロボットで自動化された標準プロトコル（図 1）を使用して、血漿からさまざまな ONT を正常に抽出し、分析法開発の必要性がほとんどないかまったくなく、正確で頑健かつ再現性のあるバイオアナリシス性能を実現しています。

OligoWorks™ SPE アプリケーションの概要

生体液サンプル

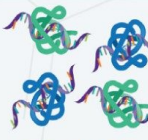

血漿、尿、組織

↓

サンプルの前処理

核酸のタンパク質への結合を破壊するためのプロテアーゼ K 消化





→


↓

固相抽出

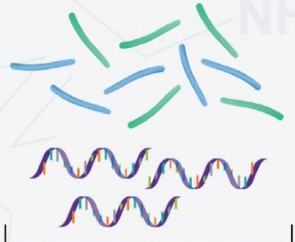
ロード: サンプルのキャプチャー
使用可能な SPE のフォーマット:

- 96 ウェルマイクロプレート
- 96 ウェルマイクロプレート
- 1、3、6 cc カートリッジ


または

または


洗浄: 廃液へ送液
消化済みのタンパク質およびその他の生体液成分を廃液に送液



溶出: 回収
抽出されたオリゴヌクレオチド




↓

定量的 LC-MS 分析*

定量分析のための LC-MS システムへの直接注入

*組織の均質化は、キットのプロトコルに記載されていませんが、OligoWorks Care and Use Manual (『OligoWorks 維持管理マニュアル』) にガイダンスが記載されています。



©2023 Waters Corporation. Printed in the U.S.A. 2023 年 10 月 KP-PDF

図 1.オリゴヌクレオチドのバイオアナリシス定量のためのサンプル前処理、抽出、LC-MS

ワークフローの図示

アプリケーションのメリット

- 分析法開発をほとんどまたはまったく必要としない、バイオマトリックスからのオリゴヌクレオチド医薬品の抽出および LC-MS 定量用の、界面活性剤を使用しない標準化されたキットベースのソリューション
- さまざまな ONT にわたり、低 %CV (15% 未満) で優れた回収率 (80% 超) を実現
- Click & Execute OneLab™ ソフトウェアライブラリーメソッドにより、導入が容易になり、アッセイ性能が向上した、Andrew+ ピペッティングロボットで実証された自動化に適したワークフロー
- 抽出された血漿サンプルから、一連の多様なオリゴヌクレオチド医薬品の正確で高感度かつ再現性のある定量を実現

はじめに

ソリューション

OligoWorks キットは、多様なオリゴヌクレオチドについて正確かつ頑健な LC-MS ベースのバイオアナリシス定量が可能になるように設計された、シンプルで標準化された、柔軟で自動化に適したサンプル前処理キットです。このキットでは、RapiZyme™ プロテイナーゼ K 消化モジュールによる効果的な酵素ベースの消化サンプル前処理ステップを用いて、オリゴヌクレオチドとバイオマトリックスタンパク質の結合を効果的に破壊した後、ミックスモード SPE 吸着剤を含む OligoWorks SPE デバイスを使用して選択的精製を行います。このデバイスは、オリゴヌクレオチドに対して高性能を発揮できるように設計され、QC 検証されています。各キットには、測定済みかつロット追跡可能で、界面活性剤を含まない試薬、およびオリゴヌクレオチドサンプル前処理ワークフローを効率化し、あらゆる経験レベルのユーザーが容易に実施できる汎用的なプロトコルが含まれています。

この試験の目標は、OligoWorks マイクロプレートキットを使用し、Andrew+ ピペッティングロボットで自動化された、血漿からのオリゴヌクレオチドの効率的な抽出および正確な定量を実証することでした。この評価では、25 mer のホスホロチオエート化アンチセンスオリゴヌクレオチド (分子量 7771) である遺伝子発現モジュレーター 91 (GEM91)、2' メトキシキャップ付きの 20 mer のホスホロチオエート化アンチセンスオリゴヌクレオチド (分子量 6600) である GEM 132、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 結合 siRNA (分子量 8590)、および 20 mer の一本鎖 DNA (ssDNA) オリゴヌクレオチド (分子量 6122) を使用しました。

実験方法

LC-MS クロマトグラフィー分離および実験条件

LC システム:	ACQUITY™ Premier UPLC システム (FTN 搭載)
カラム:	ACQUITY Premier Oligonucleotide C ₁₈ カラム、130 Å、1.7 μm、2.1 mm × 50 mm、1 本入り (製品番号 : 186009484)
カラム温度 (°C) :	55 °C
サンプル温度 (°C) :	10 °C
移動相 A:	1% HFIP (ヘキサフルオロ-2-プロパノール) および 0.1% DIPEA (N, N-ジイソプロピルエチルアミン) 水溶液
移動相 B:	0.75% HFIP (ヘキサフルオロ-2-プロパノール) 、 0.0375% DIPEA (N,N-ジイソプロピルエチルアミン) 含有 65% アセトニトリル: 35% 水
パーズ溶媒:	25:25:25:25 メタノール: アセトニトリル: イソプロパノール: 水
注入量 (μL) :	10 μL

LC グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
初期条件	0.600	95	5	6
3.25	0.600	77	23	6
3.75	0.600	10	90	6
4.10	0.600	10	90	6
4.25	0.600	95	5	6

MS システム条件

MS システム: Xevo™ TQ Absolute MS

イオン化モード: ESI-

取り込みモード: MRM

キャピラリー電圧 (kV): 3

脱溶媒温度 (°C): 600

脱溶媒ガス流量 (L/時間): 1000

コーンガス流量 (L/時間): 150

コリジョンガス流量 (L/時間): 0.2

ネブライザー (bar): 7

MRM トランジション

MRM トランジション				
オリゴヌクレオチド	プリカーサー (<i>m/z</i>)	プロダクト (<i>m/z</i>)	コロン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
GEM91	646.6	95.0	40	30
GEM132	824.5	94.9	40	40
GalNAc	714.6	227.4	40	20
ssDNA (20 mer)	764.3	125.1	40	30

データ管理

装置コントロールソフトウェア: MassLynx™ (v4.2)

定量ソフトウェア: TargetLynx™ (v4.2)

自動化ソフトウェア: OneLab (1.19.2)

ケミカル、試薬、材料および溶媒

GEM91 および GEM132 は Avecia Nitto Denko (米国マサチューセッツ州) から入手し、GalNAc 結合 siRNA は、Alnylam Pharmaceuticals (マサチューセッツ州ケンブリッジ) から提供して頂きました。20 mer の ssDNA オリゴヌクレオチドはウォーターズコーポレーション (マサチューセッツ州ミルフォード) から入手しました。

MS グレードのメタノール、水、アセトニトリル、イソプロパノール、ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA)、酢酸アンモニウムは Sigma Aldrich (米国、ミズーリ州セントルイス) から購入しました。K₂ EDTA ラット血漿は BioIVT (米国、ニューヨーク州ウェストバリー) から入手しました。DNase/RNase フリー蒸留水は、ThermoFisher Scientific から購入し (製品番号: 10977015)、オリゴヌクレオチド標準試料の調製および SPE サンプル溶出液の希釈に使用しました。OligoWorks キット (製品番号: [186010614 < https://prod1-author.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/186010614-oligoworks-spe-microplate-kit.html >](https://prod1-author.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/186010614-oligoworks-spe-microplate-kit.html)) はウォーターズコーポレーション (米国、マサチューセッツ州ミルフォード) から入手しました。

OligoWorks キット洗浄試薬の調製

オリゴヌクレオチド医薬品のバイオアナリシス定量のための、自動化および標準化されたキットベースのサンプル前処理ワークフロー

OligoWorks キットSPE 洗浄溶媒 1: 50 mM 酢酸アンモニウムバッファー (pH 5.5) は、3.84 g の酢酸アンモニウムを秤量し、容量を 1 リットルにして、pH を 5.5 に調整することにより調製しました。

OligoWorks キット SPE 洗浄溶媒 2: 30% メタノール/70% 水溶液は、300 mL のメタノールを 700 mL の水に加えて調製しました。

ストック溶液、検量線、および QC サンプルの調製

GEM91、GEM132、GalNAc 結合 siRNA、ssDNA は、Eppendorf DNA LoBind™ チューブ (製品番号: 022431021 および 022431005) を使用して RNase/DNase フリー蒸留水に再溶解して、1 mg/mL のストック溶液を作製しました。4 種類のオリゴヌクレオチドすべてを合わせた作業用ストック溶液 (各 10 µg/mL) は、1 mg/mL のストック溶液を 10 µL ずつ DNA LoBind チューブ内の水 960 µL に加えることにより作製しました。血漿中の検量線 (0.25 ~ 1000 ng/mL) 用サンプルおよび品質管理 (QC) サンプル (LQC 0.75 ng/mL、MQC 50 ng/mL および HQC 750 ng/mL) は、Andrew+ ピペッティングロボットを使用して調製しました。

OligoWorks マイクロプレートキットを使用したサンプル前処理および SPE 抽出

調製した検量線用サンプルおよび QC サンプル (100 µL) を Eppendorf 1 mL ディープウェルプレートに加え、RapiZyme プロテイナーゼ K 消化モジュールに付属の試薬およびプロトコルを使用して消化を行った後、OligoWorks キット SPE マイクロプレートおよび溶離液を使用して、OligoWorks キットおよび OligoWorks 取扱説明書 (720008066 <<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=135127508>>) に付属のプロトコルに従って抽出を行いました。このプロトコルを図 2 に示しています。(注: OligoWorks キットのプロテイナーゼ K の試薬量は 10% 過剰に含まれているので、96 サンプルのプレート全体で自動化するのに十分です。これ以上の過剰量が必要な場合は、追加の RapiZyme プロテイナーゼ K 消化モジュール (製品番号: 186010601 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186010601-rapizyme-proteinase-k-digestion-module.html>>) を別途購入できます。)

OligoWorks サンプル前処理プロトコル

RapiZyme プロテイナーゼ K 消化のサンプル前処理

サンプルの前処理

100 μ L サンプル、20 μ L GuHCl (変性) + 10 μ L TCEP (還元)
+ 50 μ L RapiZyme プロテイナーゼ K (消化)

55 $^{\circ}$ C、600 rpm で 60 分間インキュベート

OligoWorks WAX 96 ウェル μ Elution プレート (2 mg/ウェル)

ロード

前処理したプロテイナーゼ K 消化済みオリゴヌクレオチドサンプル全体
(約 180 μ L)

洗浄

洗浄 1 : 1 \times 200 μ L の 50 mM NH_4OAc (pH 5.5)

洗浄 2 : 1 \times 200 μ L の 30% MeOH

溶出

2 \times 25 μ L の OligoWorks 溶離液
50 μ L の水で希釈 (オプション)

図 2. 100 μ L の出発血漿/血清サンプル用に最適化された OligoWorks キットプロトコル (製品番号: 186010614) のグラフィック表示

自動化プラットフォーム

OneLab ソフトウェアライブラリーからシンプルな連続希釈の作製 <

<https://onelab.andrewalliance.com/app/lab/GK6ovDkA/library/simple-serial-dilution-preparation-9jn2GGwa>>

メソッドをダウンロードして変更することにより、Andrew+ ピペッティングロボットを使用して、Waters

QuanRecovery 700 μ L プレート中に検量線用および QC 用の血漿サンプルを作製しました。次に、OneLab ソフトウェアメソッドライブラリーから Click & Execute OligoWorks RapiZyme プロテイナーゼ K 消化メソッド (図 3A) および OligoWorks WAX SPE マイクロプレート分析法 (図 3B) をダウンロードして、すべての検量線と QC を 3 回繰り返して抽出しました。OligoWorks マイクロプレートキットを使用した、血漿中の検量線サンプルおよび QC サンプルの作製からオリゴヌクレオチドの消化および抽出までの完全なワークフローが、Heater-Shaker+ および Extraction+ コネクテッドデバイスを備えた Andrew+ ピペッティングロボットで完全に自動化されました。

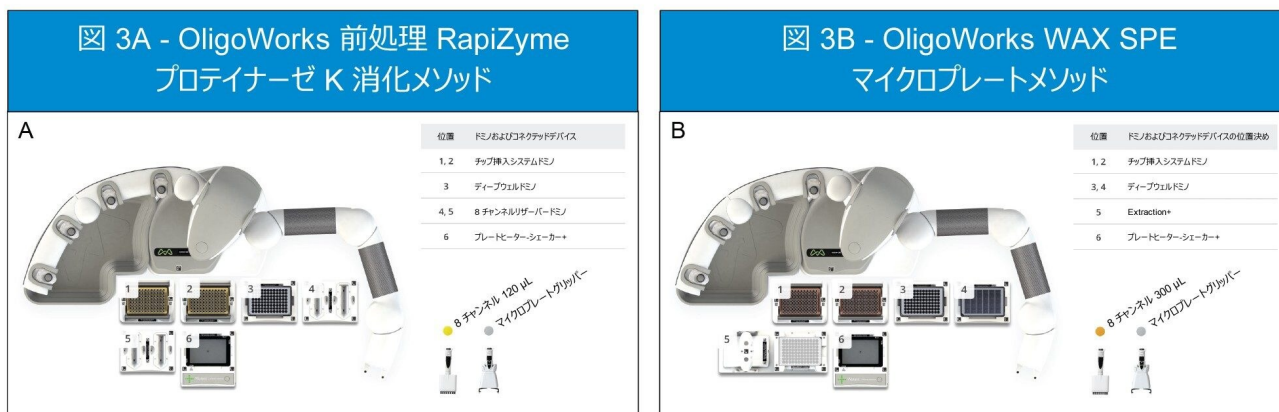


図 3. プロテイナーゼ K 消化 (A) および *OligoWorks WAX SPE* 96 ウェルマイクロプレート (B) を使用した、オリゴヌクレオチドサンプル前処理用の代表的な *Andrew+* ピペッティングロボットのデッキレイアウト。いずれのレイアウトでも、これらのメソッドの実行に必要なすべてのドミノ、コネクテッドデバイス、適切なピペットの配置が示されています。

結果および考察

オリゴヌクレオチド医薬品は、特定の種類の遺伝性疾患や翻訳調節不全疾患に対して非常に有効な治療法であることが証明されています。さまざまな臨床状態でのこのクラスの医薬品の探索に対する関心が高まっており、これらの分子を分析および定量するためのシンプルで正確かつ頑健な分析手法が求められています。比較的シンプルなサンプル前処理プロトコルを使用して、複雑な生体マトリックスからこれらの分析種を、高い回収率で効率的かつ再現性よく抽出することが、LC-MS による定量において非常に重要です。効率と再現性を高めるために、多くの ADME/DMPK ワークフローが高度に自動化されています。生体マトリックスからのオリゴヌクレオチドの抽出には、液-液抽出 (LLE) -SPE が一般に使用されています。LLE は、効果的ではあるものの、時間がかかり、スループットが低い手動プロセスであり、その自動化や拡張は容易ではありません。このワークフロー用の他の市販の SPE キットには界面活性剤ベースの試薬が使用されており、SPE の間にこれらの界面活性剤を除去するために手間のかかる洗浄が必要です。また多くの場合、SPE 溶離液の適合性を確保するために、LC-MS システムに注入する前に蒸発乾固および再溶解を行う必要があります。これらのステップにはさらに時間がかかります。多くの場合、吸着、溶解度、潜在的な分解によってオリゴヌクレオチドが失われる可能性があり、アッセイのばらつきが大きくなります。

一方、*OligoWorks* キットベースのソリューションでは、生体液中の ONT の LC-MS 定量に、界面活性剤を使用しないシンプルなワークフローを利用しています。このワークフローはさまざまな ONT にわたって十分に機能し、分析法開

発がほとんどまたはまったく必要ありません。この試験で実証したように、このワークフローは容易に自動化できます。RapiZyme プロテイナーゼ K 消化モジュールによるサンプルの前処理により、界面活性剤を使用せずに、生体液中で生じるオリゴヌクレオチドとタンパク質の強い結合が効果的に破壊されるため、LC-MS 分析前の手間のかかる洗浄および蒸発乾固のステップが不要になります。OligoWorks WAX SPE 吸着剤は、オリゴヌクレオチドと選択的に結合し、サンプル中に含まれる不要なマトリクス成分を洗い流して、LC-MS システムに直接注入できるきれいな SPE 溶出液が得られるように設計されています。OligoWorks ソリューションは、アプリケーションノート 720008086 で説明されているように、幅広いオリゴヌクレオチドにわたり、さまざまな出発生体サンプル容量で、回収率と再現性が高い優れた性能を示します。OligoWorks サンプル前処理および SPE 用の Click and Execute OneLab ソフトウェアライブラリーメソッドにより、人的ミスリスクが低減すると同時に、分析法の迅速な展開、実行、拡張が可能になるため、再現性が向上して頑健な分析性能が得られます。Andrew+ で完全に自動化された OligoWorks キット開始プロトコルを使用することで、血漿からの優れたオリゴヌクレオチド回収率（96% 超）が得られ、手動と自動でのサンプル処理に見られる差は 5% 未満でした（図 4 参照）。

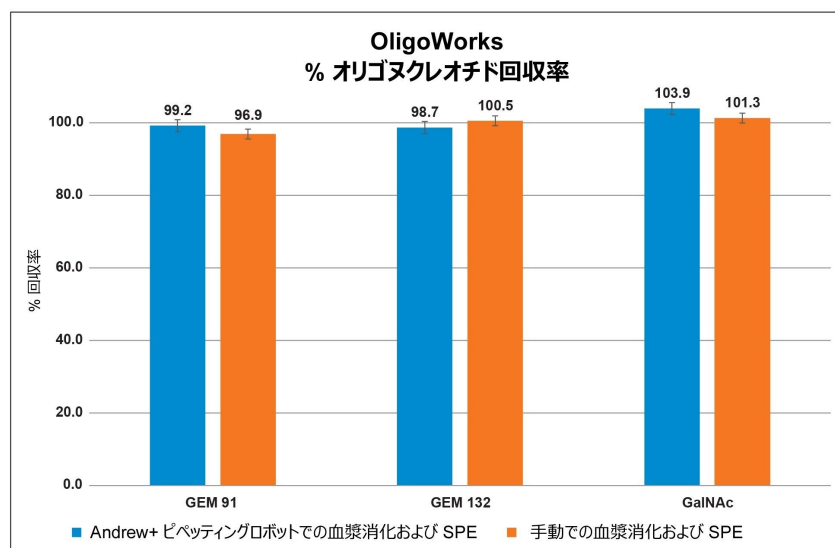


図 4. GEM91、GEM132、GalNAc オリゴヌクレオチドに OligoWorks を使用した場合、自動（Andrew+ ピペッティングロボット）と手動のサンプル前処理および抽出の比較で同等の性能が得られ、回収率は 96% 超で、手動と自動のサンプル処理の差は 5% 未満です。これにより、自動 OligoWorks サンプル前処理および抽出溶液が目的に適合していることが保証されます。

この試験で用いた OligoWorks キットにより、分析法開発が不要になり、100 μ L の血漿サンプルから 4 種類のオリゴヌクレオチド医薬品の正確な定量が行え、優れた定量性能（内部標準試料の補正なし）が得られました。Andrew+ ピ

ペッチングロボットでのワークフローを自動化し、GEM91、GEM132、GalNAc 結合 siRNA では 250 pg/mL、20 mer の ssDNA オリゴヌクレオチドでは 0.50 ng/mL の定量下限 (LLOQ) が得られました。検量線は、0.25 ~ 1000 ng/mL (GEM91、GEM132、GalNAc-siRNA) および 0.5 ~ 1000 ng/mL (ssDNA) で直線性を示し ($r^2 > 0.99$)、各レベルのすべての 3 回繰り返しポイントについての % バイアスおよび変動係数 (CV) は 15% 未満で、低分子バイオアナリシス分析法の推奨バリデーション基準を達成していました (表 1 参照)。具体的には、GEM91、GEM 132、GalNAc、ssDNA の検量線全体にわたる正確性と CV はそれぞれ 85.2 ~ 119.2% および 1.97 ~ 13.87% の範囲でした。

3 回繰り返し抽出におけるすべての QC レベルでの正確性および精度も、バイオアナリシス分析法のバリデーションガイドラインの $\pm 15\%$ 以内でした。GEM91、GEM132、GalNAc 結合 siRNA、20 mer ssDNA オリゴヌクレオチドの QC ポイントの平均正確性は 92.30 ~ 104.07%、平均 CV は 2.82 ~ 6.77% でした (表 1 参照)。QC ポイントの面積レスポンスは、図 5 に示すように、濃度範囲全体にわたって直線的に増加していました。

高感度、直線的、正確かつ精密

検量線の統計データ					
分析種	範囲	重みづけ	直線回帰	% 真度範囲	% CV 範囲
GEM91	0.25~1000 ng/mL	1/x	>0.99	85.4~114.7	2.01~11.43
GalNAc				85.2~114.4	2.01~13.44
GEM132				85.9~119.2*	1.97~9.67
ssDNA (20 mer)				0.50~1000 ng/mL	85.7~112.4

*LLOQ の %正確性の 119.2 - バイオアナリシスメソッドのバリデーションガイドラインに従って許容可能

QC 統計データ					
分析種	QC 濃度	予想濃度 (ng/mL)	平均実測濃度 (ng/mL) (N = 3)	平均 %正確性 (N = 3)	平均 % CV (N = 3)
GEM91	LQC	0.75	0.74	98.17	6.42
GalNAc			0.69	92.30	2.90
GEM132			0.78	104.07	5.13
ssDNA (20 mer)			0.69	92.63	8.69
GEM91	MQC	50	52.97	105.95	2.82
GalNAc			49.79	99.56	6.42
GEM132			51.72	103.43	7.41
ssDNA (20 mer)			55.15	110.29	0.99
GEM91	HQC	750	756.55	100.87	4.61
GalNAc			733.97	97.87	13.44
GEM132			748.28	99.82	6.77
ssDNA (20 mer)			763.63	101.84	4.66

表 1. *OligoWorks* キットを使用して *Andrew+* ピペッティングロボットで自動化し、続いて LC-MS/MS 分析を行って得られた、血漿由来の GEM91、GEM132、GalNAc、20 mer ssDNA オリゴヌクレオチドの、直線的で正確かつ精密な定量検量線サンプル (A) および QC サンプル (B) の性能の統計データ

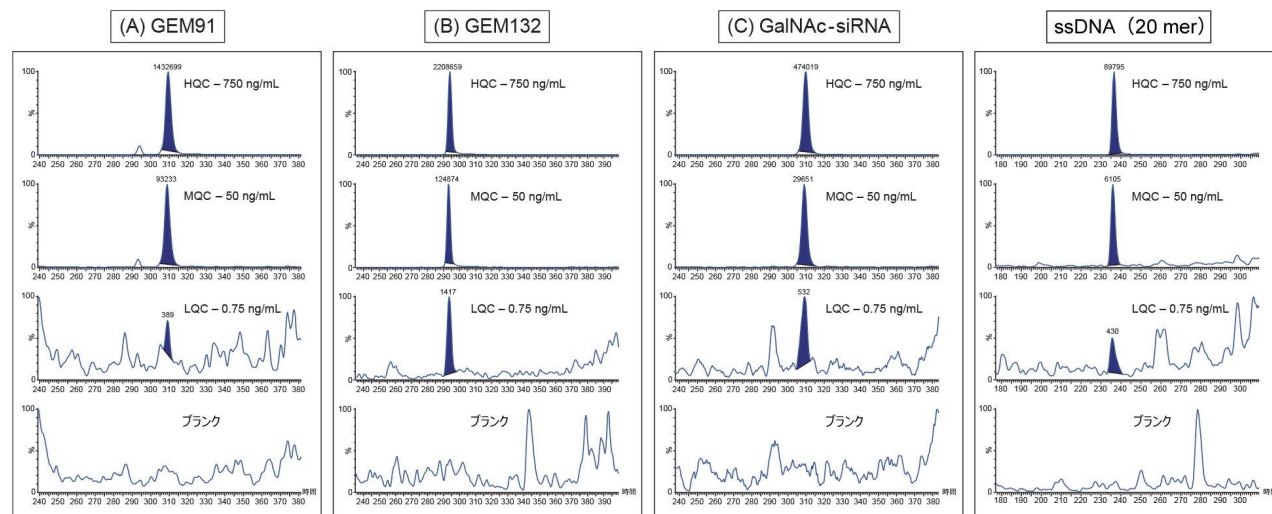


図 5. GEM91 (A)、GEM132 (B)、GalNAc (C)、ssDNA (D) の代表的な QC クロマトグラム

結論

OligoWorks SPE マイクロプレートキットを使用して（シンプルな段階的のプロトコルおよび標準化され、界面活性剤を含まない測定済みの試薬を使用して）、血漿由来のオリゴヌクレオチドの正確で頑健な定量が実現しました。このワークフローは、ダウンロード可能な OneLab Click & Execute ライブラリーメソッドを使用して、Andrew+ ピペッティングロボットで完全に自動化されています。OligoWorks キットサンプル前処理および抽出ワークフローが容易に実行でき、日間、ユーザー間、ラボ間での再現性が高まります。高いオリゴヌクレオチド回収率を達成する、完全に自動化および標準化されたアプローチにより、サンプル抽出が大幅に簡素化および合理化されました。これにより、ラボの生産性が最大化するとともにミスが減少し、全体的な分析法の性能が高く保たれました。

参考文献

1. Margot Lee, Nikunj Tanna, Mary Trudeau. Development of a Standardized, Kit-Based Approach for Selective and Reproducible Sample Preparation and Extraction for Therapeutic Oligonucleotides from Biological Matrices, Waters Application Note [720008086](#), September 2023.

2. OligoWorks SPE Kits and Components, Waters User Manual, 720008066 <
<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=135127508>> .

ソリューション提供製品

ACQUITY Premier システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo TQ Absolute タンデム四重極質量分析計 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

<

<https://www.andrewalliance.com/>

OneLab ソフトウェア搭載 Andrew+ ピペッティングロボット >

720008068JA、2023 年 9 月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)