

Hybridization-electrochemiluminescence 検出による 生体試料中ヌシネルセン定量法の開発

○ 才原 良子, 上田 俊彦, 細貝 龍太, 若林 弘樹, 新田 真一郎, 赤川 唯, 村田 英治, 岩井 淳, 中井 恵子, 上田 哲也
(株式会社LSIメディエンス)

要約

近年、核酸医薬品は抗体医薬品に続く次世代医薬品として注目を集めている。その中でも承認数と臨床試験数において先行しているアンチセンス核酸医薬品は今後さらに研究開発が加速することが予想される。核酸医薬品の生体試料中濃度を定量する方法として、前処理が簡便で汎用性が高く、少量のサンプルで定量が可能な Hybridization を利用した Ligand-Binding Assay が主流である。そこで我々はアンチセンス核酸医薬品であるヌシネルセンを用いて、ラット生体試料中アンチセンス核酸医薬品の Hybridization-electrochemiluminescence (Hyb-ECL) 検出による定量法の開発を行った。また、確立した定量法と別途開発した LC-MS/MS による定量法にて、ヌシネルセンを単回静脈内投与して得られたラット試料中のヌシネルセン濃度を定量し、LC-MS/MS にて得られた測定結果との相関性を確認を行った。さらに、ヌシネルセンの代謝物として推定されたヌシネルセン(3'N-1)(3'N-2)を合成し、これら代謝物存在下における測定系への影響についても確認した。

前処理・測定方法概要

ハイブリダイゼーション

↓ 5%ラット血漿 または 5%ラット組織溶解液
(血漿または組織溶解液使用量: 1.25 μL)
↓ Analyte + Probe

未反応 1 本鎖 DNA 除去

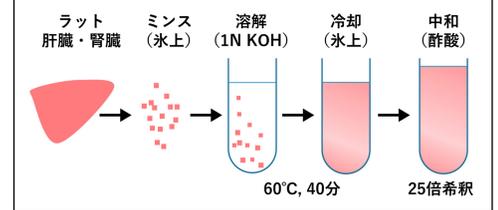
↓ S1による分解

固相化

↓ Streptavidin + Biotin

↓ 測定 (Meso Quickplex SQ 120)

● 組織溶解液作成方法



結果

バリデーション

マトリックスとしてラット血漿、組織（肝臓・腎臓）溶解液 1.25 μL を用いて、Hyb-ECL における定量法の妥当性を確認した。血漿中濃度として 0.713-713 ng/mL・組織溶解液中濃度として 17.8-17800 ng/g において良好な検量線ならびに測定内変動が確認された。

ヌシネルセン投与サンプル測定 (LC-MS/MS測定値との相関性確認)

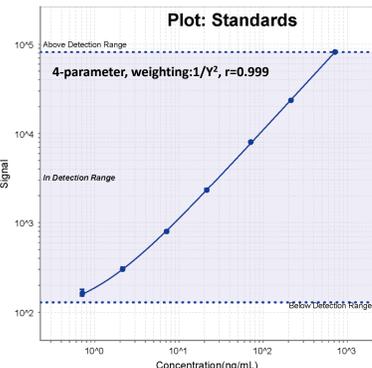
Hyb-ECL を用いて、ヌシネルセン投与ラット生体サンプルを測定した。サンプルは、6 週齢雄ラット: CrI:CD(SD) にヌシネルセン 1 mg/kg を単回静脈内投与することにより得られた血漿および組織（肝臓・腎臓）を用いた。さらに、別途開発した LC-MS/MS にて測定した定量値と比較し、良好な相関性が確認された。

血漿

検量線			
regression method	4-parameter logistic		
weighting	1 / Y ²		
r	0.999		
Nominal concentration (ng/mL)	Back calculated concentration (ng/mL)	Accuracy (%)	CV (%)
0	0	-	-
0.713	0.748	105	7.8
2.14	2.14	100	2.8
7.13	6.96	97.7	2.4
21.4	21.2	99.1	1.5
71.3	73.5	103	0.1
214	211	98.6	1.8
713	715	100	2.1

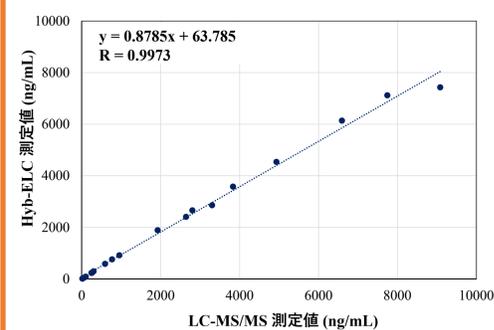
測定内変動						
Nominal concentration (ng/mL)	Observed concentration (ng/mL)	Mean (ng/mL)	RE (%)	CV (%)	Total Error (%)	
LLOQ	0.798					
0.713	0.741	0.760	6.6	4.3	10.9	
	0.741					
QL	2.15					
2.14	2.32	2.26	5.6	4.3	9.9	
	2.32					
QM	37.1					
35.6	38.0	37.1	4.2	2.6	6.8	
	36.1					
QH	563					
570	552	555	-2.6	1.3	3.9	
	549					
ULOQ	677					
713	683	683	-4.2	0.9	5.1	
	689					

安定性					
Nominal concentration (ng/mL)	Storage condition	Observed concentration (ng/mL)	Mean (ng/mL)	RE (%)	Residual ratio (%)
	Initial	2.36			
		2.25	2.38	11.2	-
		2.52			
QL	Room temp. [21 hours]	2.18			
2.14		2.25	2.19	2.3	92.0
		2.14			
	-80°C [1 month]	2.20			
		2.15	2.12	-0.9	89.1
		2.00			
	Freeze and thaw [5 times]	2.05			
		2.19	2.08	-2.8	87.4
		1.99			



血漿

Animal No.	Time after administration (min)	[Hyb-ECL] Observed concentration (ng/mL)	[LC-MS/MS] Observed concentration (ng/mL)	Difference* (%)
1	5	7430	9080	-20.0
	10	4540	4930	-8.2
	15	2660	2800	-5.1
	30	920	951	-3.3
	60	235	242	-2.9
	120	87.9	98.5	-11.4
360	16.4	14.1	15.1	
2	5	6140	6590	-7.1
	10	2860	3300	-14.3
	15	1890	1920	-1.6
	30	586	587	-0.2
	60	297	297	0.0
	120	69.0	77.9	-12.1
360	14.2	12.8	10.4	
3	5	7120	7740	-8.3
	10	3580	3830	-6.7
	15	2410	2640	-9.1
	30	762	766	-0.5
	60	240	257	-6.8
	120	84.3	87.1	-3.3
360	20.2	19.5	3.5	



肝臓

Time after administration (min)	[Hyb-ECL] Observed concentration (ng/g tissue)	[LC-MS/MS] Observed concentration (ng/g tissue)	Difference* (%)
10	1340	1690	-23.1
30	1420	1570	-10.0
120	1820	2070	-12.9
360	2030	2310	-12.9

腎臓

Time after administration (min)	[Hyb-ECL] Observed concentration (ng/g tissue)	[LC-MS/MS] Observed concentration (ng/g tissue)	Difference* (%)
10	17100	16800	1.8
30	22500	23600	-4.8
120	20200	22600	-11.2
360	26100	24900	4.7

*: Difference (%) = (Observed conc. of [Hyb-ECL] - Observed conc. of [LC-MS/MS]) / Average of Observed conc. of [Hyb-ECL] and [LC-MS/MS] × 100

肝臓

検量線			
regression method	4-parameter logistic		
weighting	1 / Y ²		
r	0.999		
Nominal concentration (ng/g tissue)	Back calculated concentration (ng/g tissue)	Accuracy (%)	CV (%)
0	0	-	-
17.8	18.4	103	2.1
53.5	53.2	99.4	6.5
178	177	99.4	4.0
535	530	99.2	0.7
1780	1770	99.2	0.8
5350	5370	101	0.0
17800	17900	101	0.9

測定内変動						
Nominal concentration (ng/g tissue)	Observed concentration (ng/g tissue)	Mean (ng/g tissue)	RE (%)	CV (%)	Total Error (%)	
LLOQ	17.9					
17.8	18.1	18.5	3.9	4.4	8.3	
	19.4					
QL	52.0					
53.5	55.0	53.1	-0.7	3.1	3.8	
	52.4					
QM	919					
891	912	914	2.6	0.4	3.0	
	912					
QH	14500					
14300	14300	14300	0.0	1.4	1.4	
	14100					
ULOQ	18200					
17800	17400	17700	-0.6	2.3	2.9	
	17600					

腎臓

検量線			
regression method	4-parameter logistic		
weighting	1 / Y ²		
r	0.999		
Nominal concentration (ng/g tissue)	Back calculated concentration (ng/g tissue)	Accuracy (%)	CV (%)
0	0	-	-
17.8	18.2	102	3.8
53.5	52.4	98.0	2.2
178	181	102	3.8
535	521	97.5	0.9
1780	1820	102	2.6
5350	5340	99.9	2.1
17800	17800	99.9	8.1

測定内変動						
Nominal concentration (ng/g tissue)	Observed concentration (ng/g tissue)	Mean (ng/g tissue)	RE (%)	CV (%)	Total Error (%)	
LLOQ	18.0					
17.8	19.2	18.3	2.8	4.1	6.9	
	17.8					
QL	55.9					
53.5	56.5	56.6	5.8	1.4	7.2	
	57.5					
QM	941					
891	962	941	5.6	2.3	7.9	
	919					
QH	15100					
14300	14000	14500	1.4	3.8	5.2	
	14400					
ULOQ	18300					
17800	19000	18100	1.7	5.6	7.3	
	17000					

代謝物の影響確認

未変化体と等量の代謝物存在下において、Total Error: 10.4%以下でヌシネルセンの定量が可能であった。
3'N-1を添加したサンプルにおいて、ヌシネルセンの signal が検出されたが定量下限未満であった。
3'N-2を添加したサンプルにおいて、ヌシネルセンの signal は検出されなかった。

Nominal concentration (ng/mL)	Nusinersen 3'N-1 (ng/mL)	Nusinersen 3'N-2 (ng/mL)	Nusinersen Observed concentration (ng/mL)	Mean (ng/mL)	CV (%)	RE (%)	Total Error (%)
35.6	-	-	38.3	36.5	4.5	2.5	7.0
			35.2				
			35.9				
35.6	35.6	-	36.7	36.2	1.6	1.7	3.3
			36.4				
			35.6				
35.6	-	35.6	39.5	37.3	5.6	4.8	10.4
			37.1				
			35.3				
-	35.6	-	0.110*	0.130	13.4	-99.6	-
			0.138*				
			0.142*				
-	-	35.6	-	-	-	-	-
			-				

*: Below lower limit of quantification

Nusinersen (18mer): 5'-TCACTTTTCATAATGCTGG-3'
3'N-1 (17mer): 5'-TCACTTTTCATAATGCTG□-3'
3'N-2 (16mer): 5'-TCACTTTTCATAATGCT□□-3'

結語

- 我々は、Hyb-ECLを用いたラット血漿・組織（肝臓・腎臓）溶解液中ヌシネルセン定量法を開発した。
- ヌシネルセン投与サンプルの Hyb-ECL による定量値は LC-MS/MS による定量値と良好な相関が確認された。
- 本法では、代謝物（3'N-1 または 3'N-2）が未変化体と等量含有するサンプルにおいても選択的にヌシネルセンを定量することが可能であった。