

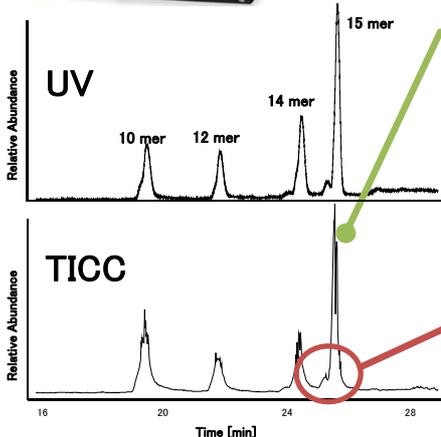
核酸医薬の研究・開発を加速する分析技術 (超高性能LC-MS、NMR、CD分析)

核酸医薬の研究開発において、薬効・薬理を正しく評価するために、核酸不純物の解析は必須である。また、核酸医薬の高次構造や複合体の形成は品質に影響を与える可能性があり、重要な評価項目である。超高性能LC-MS、CD及びNMRを用いた核酸の分析事例を紹介する。

超高性能LC-MS(Orbitrap Fusion Lumos)による一本鎖S化Oligoの分析

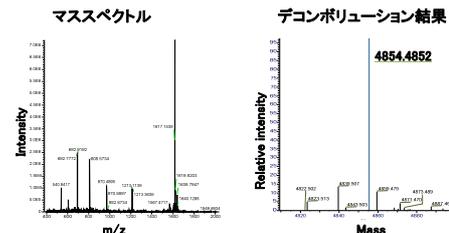


核酸の精密質量を測定する。



サンプル: 一本鎖S化Oligo(5' CACGTTGAGGGGCAT3')と3'末端側が塩基欠損した核酸の4種等量混合溶液
測定条件: 0.6 nM DNA, 5 mM HFIP in MeOH, 5 mM HFIP in Water

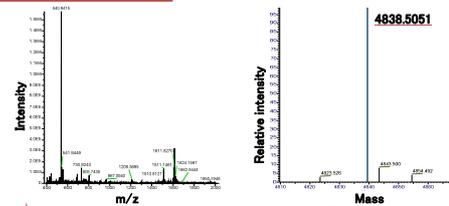
主成分 (15 merのS化Oligo)



S化 Oligo	モノアイソトピック分子量		誤差 (ppm)
	理論値	計算値	
15 mer	4854.4896	4854.4852	-0.9
14 mer	4534.4664	4534.4632	-0.7
12 mer	3900.4081	3900.4054	-0.7
10 mer	3210.3487	3210.3491	0.1

理論値との誤差 1 ppm以内!

微量成分



LCで分離が不十分な主成分の分子量と異なる微量成分検出に成功

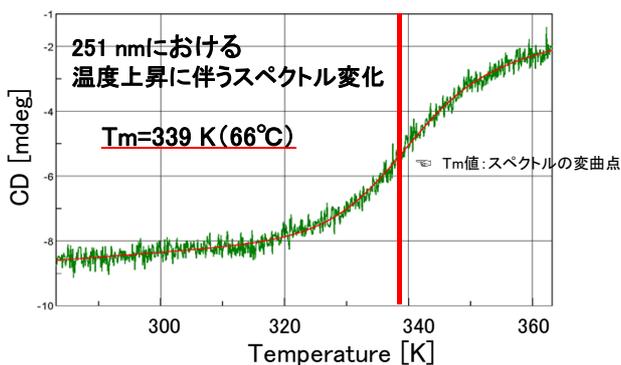
デコンボリューションにより精密質量を算出し、未知成分の構造推定も可能

理論値と分析結果の比較から、15 merのS化オリゴに対して一部S化されずに酸素のままである成分が含まれていると推定された。

不純物解析、代謝物解析
精密質量による定量分析

CD(円偏光二色性)による二重鎖核酸の分析

CDスペクトルは核酸の高次構造を鋭敏に反映する。温度変化測定により二重鎖が熱によりほどけていく過程 (Melting) を追跡し、スペクトル変化から核酸分子の50%が解離して一本鎖となる温度 (Tm値) を算出する。



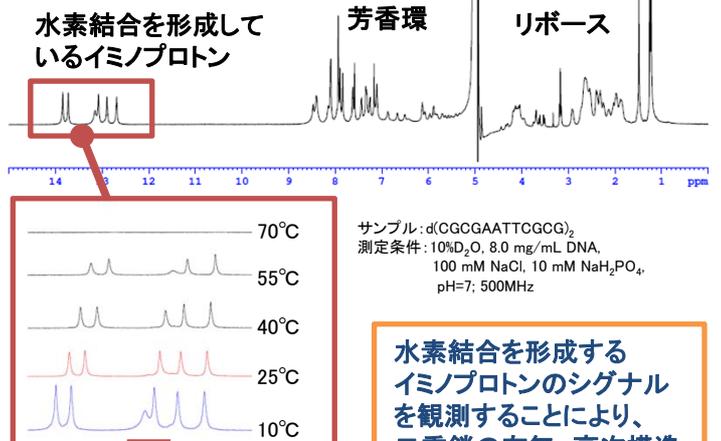
サンプル: d(CGCGAATTCGCG)₂
測定条件: 0.2 mg/mL DNA, 100 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, pH=7

CD分析からTm値の算出が可能
Tm値から核酸の高次構造の熱安定性を評価

核酸のTm値は、配列、溶液の濃度や溶媒などで変化する。核酸医薬品を特徴付ける上で重要な特性。特性解析

NMR(核磁気共鳴)による二重鎖核酸の分析

核酸の¹H NMRスペクトルを測定すると、12~14 ppm付近の低磁場領域に水素結合を形成しているイミノプロトンのシグナルが観測される。



サンプル: d(CGCGAATTCGCG)₂
測定条件: 10%D₂O, 8.0 mg/mL DNA, 100 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, pH=7; 500MHz

水素結合を形成しているイミノプロトン

水素結合を形成するイミノプロトンのシグナルを観測することにより、二重鎖の有無、高次構造の同等性判断が可能。特性解析・構造解析

シグナルの観測により二重鎖の形成を判別
測定温度を上げていくと、水素結合が切れ核酸の二重鎖が解離する割合が増えていく。Tm値以上の温度でイミノプロトンのシグナルが消失。