

円二色性(CD)分析による核酸医薬品の品質評価

円二色性(CD)分析は迅速かつ簡便にオリゴ核酸の高次構造評価が可能であり、核酸医薬品の品質評価に非常に有用である。また統計的手法を用いることで、CDスペクトルの同一性を客観的に評価し、不純物の検出やロット間などの同等性確認が可能である。

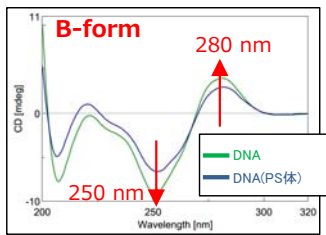


機器:円二色性分散計 J-1500(日本分光)

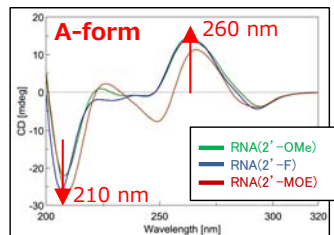
客観的なスペクトル同一性の判定

オリゴ核酸(二本鎖)のCDスペクトル

配列:d(CGCGAATTCGCG)₂ RNAの場合はT→U
濃度:0.2 mg/mL、溶媒:Phosphate buffer



DNA



RNA

- DNAはB型、RNAはA型に特徴的なCDスペクトル
- 化学修飾により異なるCDスペクトルが得られる
→オリゴ核酸の高次構造(塩基の配向性)の違いを反映
- CDは高次構造を簡便かつ高感度に評価可能

オリゴ核酸(一本鎖)と不純物のCDスペクトルの比較

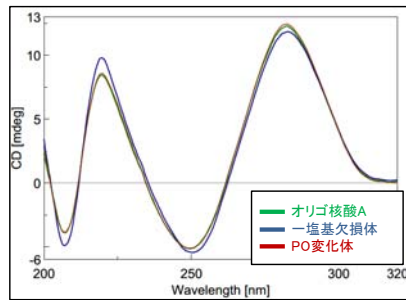
試料

•オリゴ核酸A(一本鎖、PS体)

不純物

- 一塩基欠損(n-1)体
- 一部PO変化体*(一原子違い)

*PO変化体はPS(チオリン酸ジエステル結合)修飾がリン酸ジエステル結合に変換されたもの



オリゴ核酸と不純物のCDスペクトル

比較結果

- スペクトル形状(ピーク波長)は同じ
- 一塩基欠損体はピーク毎に強度の差あり
- PO変化体のスペクトルはほぼ一致
→一原子の構造の違いをスペクトルから視覚的に判断することは困難

統計的なスペクトル同一性評価

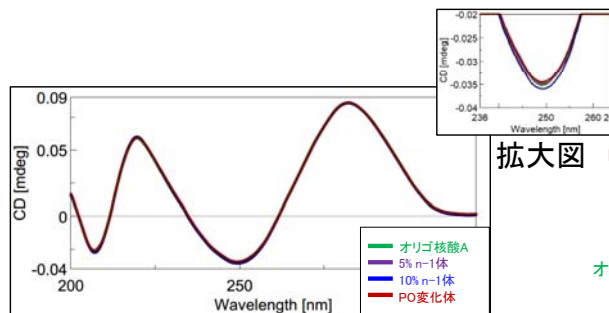
オリゴ核酸AのCDスペクトルをリファレンスとし、各試料のCDスペクトルの同一性を統計的に評価

リファレンス

•オリゴ核酸A(一本鎖、PS体)

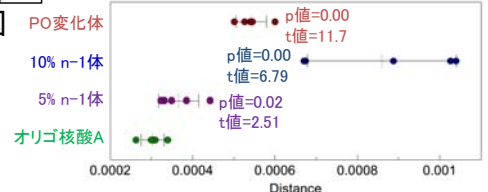
評価試料

- 一塩基欠損(n-1)体を5%及び10%含有するオリゴ核酸A
- 一部PO変化体(一原子違い)



5回測定の平均スペクトルの比較

拡大図



いずれもp<0.05で有意差あり

判別し難い一原子違いや一塩基欠損による僅かなCDスペクトルの差異を高感度に検出

【謝辞】本研究は AMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業「核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発」プロジェクト(代表:小比賀聡)による支援の成果である。