

オリゴヌクレオチド API のための 熱安定性測定の最適化

Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計を用いた
高速・高精度の熱融解 (T_m) 測定



著者

Sarina Schuler, Gerd Berger,
and Dr. Alexandra Heussner
Vetter Pharma-Fertigung,
Ravensburg, Germany

Dr. Wesam Alwan and
Dr. Mathieu Rault
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

医薬品の安全性を確保するため、医薬品製造プロセスに入る前に、リリースの一環として医薬品のすべての原材料に対し、分析的な同一性 (ID) の確認を行う必要があります。このような規制要件は、医薬品の医薬品有効成分 (API) も対象としています。同一性を確認するためには、簡単かつ迅速に実行でき、非常に特異的な分析方法が必要となります。比較的新しいクラスの API であるオリゴヌクレオチドには、同一性の確認で大きな課題があります。クロマトグラフィーメソッドや電気泳動メソッドなど、一般的に使用され、十分に確立されたメソッドはサイズの確認に最適ですが、配列確認の場合は、塩基対の変化を区別できる手法が必要となります。¹ さらにこれらのメソッドは、短いオリゴヌクレオチドに関して選択性に優れていません。同じ長さの類似のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド配列に関わらず、結果として似たような HPLC クロマトグラムとリテンションタイムになる可能性があるからです。



図 1. Agilent Cary 3500 マルチセルペルチェ UV-Vis 分光光度計

ただし、融解温度 (T_m) は非常にオリゴヌクレオチド配列に特異的であり、インタクト質量の測定と組み合わせると、 T_m の測定を使用して同一性を確認することができます。¹² したがって、Agilent Cary 3500 マルチセルペルチェ UV-Vis 分光光度計とマルチゾーンソフトウェアアドオンを使用し、オリゴヌクレオチド融解温度を高い精度と信頼性で測定できる紫外線 (UV) ベースの分光分析手法を、Vetter で実施しました (図 1)。

オリゴヌクレオチドの融解温度

オリゴヌクレオチド二本鎖を含む二本鎖核酸は、相補的塩基間の非共有水素結合 (H-結合)、およびヌクレオチドの塩基における芳香族環のスタッキングにより、熱力学的に安定的です。オリゴヌクレオチド二本鎖サンプルを熱変性させることにより (加熱など)、H-結合と塩基スタッキングの相互作用が解離し、鎖が分離されます (図 2)。すべての二本鎖のうち 50 % が一本鎖オリゴヌクレオチドに分離される正確な温度は、オリゴヌクレオチドの融解温度に相当し、安定性の指標になります。³



図 2. オリゴヌクレオチド熱融解の概略図。オリゴヌクレオチド二本鎖の相補一本鎖への、可逆的で温度制御された解離と会合のプロセスは、「融解」と呼ばれています。

オリゴヌクレオチドの長さや全体的な塩基組成（比率）に関わらず、配列内の正確なヌクレオチドの順序が、 T_m の特性を示します。さらに、オリゴヌクレオチドの化学的特性と修飾、大気中の塩、鎖濃度が融解温度に影響を及ぼす可能性もあります。³

融解のプロセスはモニタリングでき、溶液中の一本鎖オリゴヌクレオチドの 260 nm (A_{260}) における吸光度は二本鎖オリゴヌクレオチドの吸光度よりも高いため、 T_m は UV 分光分析を使用して測定できます。熱変性中のオリゴヌクレオチドサンプルの吸光度を継続的に測定することにより、融解曲線をプロットできます（図 3）。この曲線で、変曲点はオリゴヌクレオチドの特定の融解温度に相当します。融解曲線の一次微分を計算し、最大値を特定することにより、 T_m を簡単に求めることができます。³

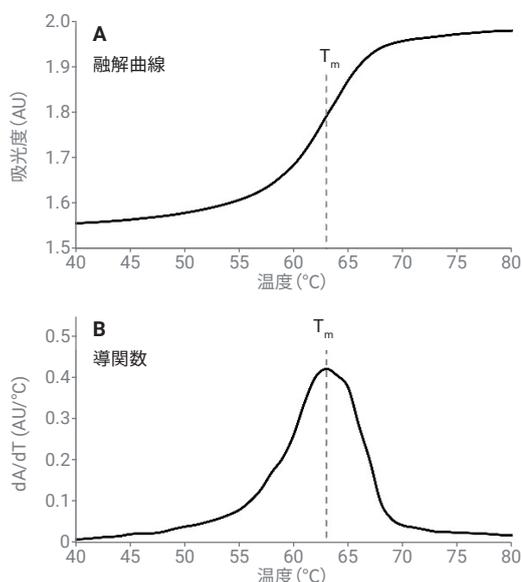


図 3. 融解曲線および微分。サンプル上昇温度に対して 260 nm での吸光度をプロットし、代表的なオリゴヌクレオチド融解曲線を取得しています (A)。融解曲線の一次微分の最大値は T_m に相当します (B)。

Cary 3500 UV-Vis 分光光度計を用いた T_m の測定

サンプル調製

Cary 3500 マルチセルペルチェ UV-Vis 分光光度計とマルチゾーンソフトウェアアドオンを用いた T_m の測定のために、オリゴヌクレオチドサンプルは表 1 に従って調製し、Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアで設定したサーマルメソッドを使用して測定しました。サンプル溶液は、 T_m を測定する前に、十分に攪拌して、2 ~ 8 °C で約 20 分間インキュベーションしました。ランダムに選んだ修飾なしの 20-mer オリゴヌクレオチドとその相補鎖を、メソッド開発実験に使用しました（表 2）。これらの高純度無塩（HPSF）オリゴヌクレオチド配列は Eurofins Genomics（エーベルスベルク、ドイツ）で合成し、1x Tris-EDTA（TE）バッファ（pH 8.0、Fisher Bioreagents、注文番号 BP2473）に再溶解させて、100 μ M オリゴヌクレオチド原液を取得しました。

表 1. T_m 測定に使用したサンプルの組成

コンポーネント	最終濃度
オリゴヌクレオチド (100 μ M)	4 μ M
相補的オリゴヌクレオチド (100 μ M)	4 μ M
10x Tris-EDTA (TE) バッファ (pH 7.4) (Fisher Bioreagents、注文番号 BP2477)	1 倍
2 M NaCl (NaCl から調製) (Sigma-Aldrich、注文番号 S3014)	0.1 M
マクラーゼフリー水 (Invitrogen、注文番号 AM9937)	N/A

表 2. 研究で使用したオリゴヌクレオチドの配列

説明	配列 (5' → 3')
オリゴヌクレオチド	CCA CGA CAG TAA CAT TCT CA
相補的オリゴヌクレオチド	TGA GAA TGT TAC TGT CGT GG

メソッドの開発と最適化

すべての T_m 測定実験で、ベースライン補正は、リファレンスビームパスと、マルチゾーンソフトウェアアドオンを組み合わせた Cary 3500 マルチセルパルチェ UV-Vis 分光光度計で使用されるサンプルビームパスで、TE バッファを使用して実行しました。次に、リファレンスビームパスの TE バッファに対してオリゴヌクレオチドサンプルを測定しました。 T_m を測定するための最適な機器設定と実験設定を確認するために、メソッド開発中に複数の調整可能な機器パラメータを変更しました (表 3)。合計で、9つのメソッドを使用して比較し、最適なパラメータ設定を評価しました (表 3)。測定後、平滑化と微分フィルタを使用して Cary UV ワークステーションソフトウェアにより一次微分と T_m を計算しました (平滑化/微分フィルタ: 31、平滑化/微分の間隔: 0.1)。

T_m 測定の実験条件を最適化するための詳細情報について、実践規範のガイドが作成されています。

メソッド 1 ~ 9 を使用して取得した平均融解温度は同等で、結果は 60.7 °C (メソッド 8) と 62.9 °C (メソッド 6) の範囲でした (図 4)。

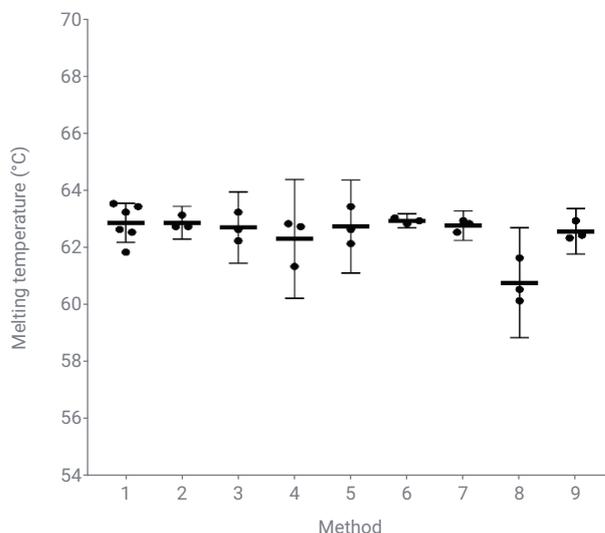


図 4. メソッド 1 ~ 9 を使用して得られた、 T_m 測定データ。 T_m の測定は、4 μ M オリゴヌクレオチド、4 μ M 相補的オリゴヌクレオチド、0.1 M NaCl を含む TE バッファで実行しました。グラフは、平均 T_m (中央: メソッド 1 では $n = 6$ 、メソッド 2 ~ 9 では $n = 3$)、繰り返し測定 (ドット) および 95 % 信頼区間 (棒) の単一の T_m を示しています。

表 3. メソッド開発中に使用されたメソッド

パラメータ [設定範囲]	メソッド								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
昇温速度 (°C/min) [0.1 ~ 40.0]	10	10	10	10	10	20	1	10	10
データ間隔 (°C) [0.1 ~ 10.0]	0.5	0.5	0.1	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
平均化時間 (秒) [0.004 ~ 1,000.000]	1.0	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
スペクトルバンド幅 (nm) [0.10 ~ 5.00]	2	2	2	2	5	2	2	2	2
キュベットタイプ [セミマイクロ/マイクロ/マクロ]*	セミマイクロ	マイクロ	マクロ						
キュベット内攪拌 (rpm) [オフ/400 ~ 1,400 rpm]	オフ	オフ	500						
温度プローブ [あり/なし]	あり	あり	あり						
開始温度 (°C) [-5.0 ~ 110.0]	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
終了温度 (°C) [-5.0 ~ 110.0]	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0
昇温ステップ数 [1 ~ 10]	1	1	1	1	1	1	1	1	1

* 使用容量: 0.8 mL (セミマイクロ)、0.4 mL (マイクロ)、2.0 mL (マクロ)。

メソッドの評価

医薬品環境の同一性検査の一環として使用可能な、 T_m 測定の信頼性の高いメソッドには、優れた測定精度が必要です。測定精度は信頼区間 (CI) を計算することにより定量化します。CI が小さいほど、高い測定精度を示します。また、同一性検査に適したメソッドを選択する際には、1 回の測定と一般的な処理に要する時間を考慮する必要があります。

昇温速度

メソッド 6 および 7 では、昇温速度を変更して 10 °C/min の昇温速度 (メソッド 1 ~ 5 および 8 ~ 9) と比較しました (約 10 分の測定時間が必要)。20 °C/min のより速い昇温速度 (メソッド 6) では、分析時間は約 8 分でした。昇温速度が通常の設定の 2 倍であることを考慮すると、時間の差は小さいと考えられます。しかし、測定にかかる時間が重要である場合は、メソッド 6 を使用できます。メソッド 7 (昇温速度 = 1 °C/min) による T_m の測定は約 1 時間を要し、分析上のメリットはありませんでした。これは Cary 3500 UV-Vis の優れた精度レベルを示しています。より速い昇温速度を使用すると、データ品質を損なうことなく、 T_m 実験にかかる時間が短縮されます。

データ間隔

メソッド 3 および 4 を使用して、データ間隔の影響を評価しました。1.0 °C (メソッド 4) と 0.1 °C (メソッド 3) のデータ間隔を比較したところ、メソッド 3 による T_m 測定でより小さな CI となり、より優れた精度が得られました。ただし、10 °C/min の昇温速度は 0.1 °C のデータ間隔に対し速すぎると思われるため、これら 2 つのメソッドを除外し、他のすべてのメソッドでデータ間隔の平均値 (0.5 °C) を適用しました。

平均化時間

メソッド 2 で、0.1 秒の短い代替信号平均化時間 (SAT) は、1.0 秒の SAT と比べて有益な効果をもたらしませんでした。SAT は、次のデータポイントに移動するまでに、信号が平均化される時間を決定します。一般に、SAT が長いほど、バックグラウンドノイズが減少して信号が平滑化されることで、S/N 比 (SNR) が向上します。Cary 3500 UV-Vis は低ノイズで、短い SAT により高品質データを取得できます。

スペクトルバンド幅

スペクトルバンド幅 (SBW) を調整して光スループットを制御することで、SNR とスペクトル分離能に影響を及ぼすことができます。より広い SBW では、サンプルを通過する光が増加し、SNR が向上します。メソッド 5 では、SBW を 2 nm から 5 nm に増加しても T_m の測定中、または計算時に、明らかな影響はありませんでした。5 nm はこのパラメータの上限であるため、ミッドレンジ設定の 2 nm がより適していました。

キュベットタイプおよびキュベット内攪拌 (rpm)

マイクロキュベットを使用した場合は、必要なサンプル量が非常に少ないため (最小サンプル量 0.4 mL)、実用的な観点からメソッド 8 が利便性に優れていると考えられます。ただし、ベストプラクティスガイドにおいて、マイクロキュベットは、サーマルプローブではなくブロック温度コントロールと組み合わせて使用します。サーマルプローブはマイクロキュベットに適合するように設計されていないからです。サンプルの量が少ない場合、マイクロキュベットは、遅い昇温速度 (例、< 0.5 °C)、およびプローブ温度コントロールではなくブロック温度コントロールを組み合わせて使用できます。

許容可能な CI であるものの、メソッド 9 は除外されます。セミマイクロキュベット (最小サンプル量 0.8 mL) よりも、マイクロキュベット (最小サンプル量 2.0 mL) では大幅に多くのサンプル量が必要になるからです。サンプル量が重要でない場合は、サンプル量をより多く使用することが推奨されます。マイクロキュベット内のキュベット内攪拌により、サンプル溶液における均一的な温度分布が確保されるからです。

温度プローブ

すべての測定で、サンプル温度と加熱ブロック温度のオフセットが観察されました (図 5)。本質的に、サンプルを加熱するシステムでは、遅延時間が生じます。この遅延は、キュベットの石英ガラスを通じたブロックからサンプル溶液への熱伝達プロセスによるもので、観察された温度の差はこれで説明されます。したがって、正確な T_m 測定のためには、少なくとも中温度から高温への昇温速度が設定されている場合は (一般的には ≥ 0.5 °C の昇温速度)、キュベット内温度プローブを使用することが不可欠です。

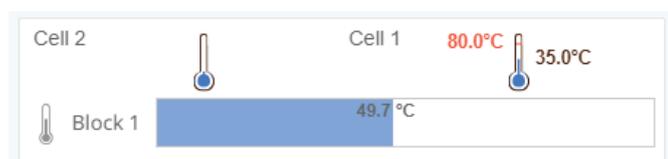


図 5. T_m 測定中における Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアからの温度情報の例。ソフトウェアは、ペルチェブロックとサンプル温度のモニタリングを含む、システム温度管理に関する詳細情報を示します。このスクリーンショットは、マルチゾーンソフトウェアアドオンを組み合わせた Agilent Cary 3500 マルチセルペルチェ UV-Vis 分光光度計とメソッド 1 を使用した、加熱ブロックの実際の温度 (49.7 °C)、サンプル溶液 (35.0 °C)、設定温度 (80.0 °C) を示します。

除外のプロセスに基づき、オリゴヌクレオチドサンプルの T_m の信頼性の高い測定には、メソッド 1 および 9 が最適で優れたメソッドであると判断されました。要約すると、これらのメソッドでは、昇温速度の設定により、全般的に優れた精度で、短時間で測定が実施されました。メソッド 1 のもう一つの利点は、セミマイクロセルにより使用するサンプル量が少ないことです。メソッド 1 を使用して記録された典型的な融解曲線と、対応する平滑化された微分を 図 6 に示します。

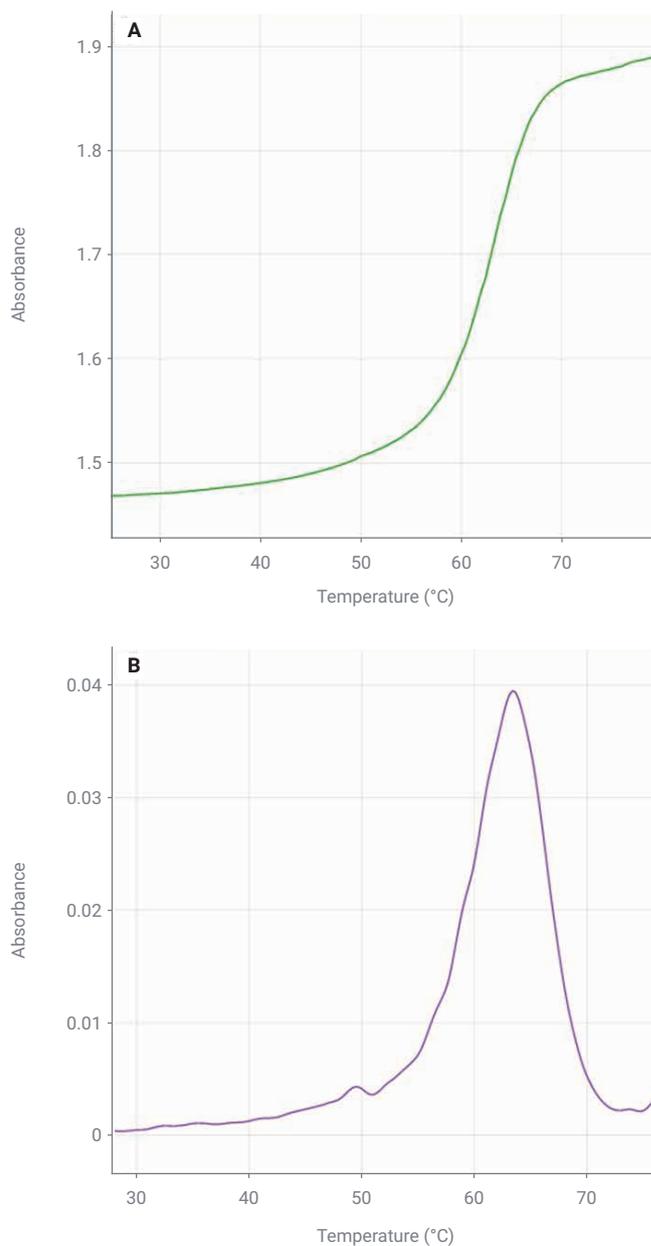


図 6. (A) メソッド 1 の代表的な融解曲線。(B) 平滑化された一次微分プロット

T_m 測定で使用した平滑化

Cary UV ワークステーションソフトウェアには、平滑化と導関数を融解曲線に適用し、干渉とノイズを低減するオプションがあります。平滑化により、生データに存在するノイズが減少します。Cary UV-Vis ワークステーションの平滑化アルゴリズムは Savitzky-Golay 法を使用します。⁵ また、微分の計算でも Savitzky-Golay 法を使用します。

平滑化および微分のためのフィルタと間隔のサイズの値は、T_m 計算の前に手で設定できます。フィルタサイズ値は各出力点を生成するために使用するデータポイントの数を定義します。フィルタサイズを大きくすると、より低いアウトプットになります。Savitzky-Golay 法では均一の間隔が必要です。データは、平滑化、または微分の計算を行う前に、指定された間隔に設定されます。一般的に、入力された間隔は、データ測定の間隔と一致します。2 つの計算は、個別に、または連続して（平滑化の後に微分）使用することができます。⁴

図 7 に、メソッド 5 からの代表的な一次微分を示します。融解曲線の生データで低レベルのノイズ（融解曲線は示さず）が示されている場合も、平滑化と微分の手順が最適化されていないと、一次微分プロットはより高いレベルのノイズを示します。例として図 7A に、平滑化なしで一次微分の最適化もされていない（微分間隔 0.5 °C、フィルタ 5）メソッド 5 のプロットを示します。T_m は 62.5 °C です。図 7B に、最適化済みパラメータ（平滑化および微分間隔 0.1 °C、フィルタ 31）を使用した、適用された平滑化と導関数による同じデータを示します。T_m は同等ですが（62.6 °C）、プロットのノイズが低減しています。

平滑化および微分のデータ処理が最適化されていないと、図 7 に示されているように、ノイズが多い曲線と不自然な結果が生成される可能性があります。大き過ぎるフィルタサイズを使用すると、過度に滑らかなプロットとなり、出力が減少します。Cary UV ワークステーションソフトウェアを使用することで、迅速かつ簡単に平滑化と微分パラメータの最適化ができます。パラメータは最適化されると、自動でメソッドの一部として保存され、測定の最後に適用されます。

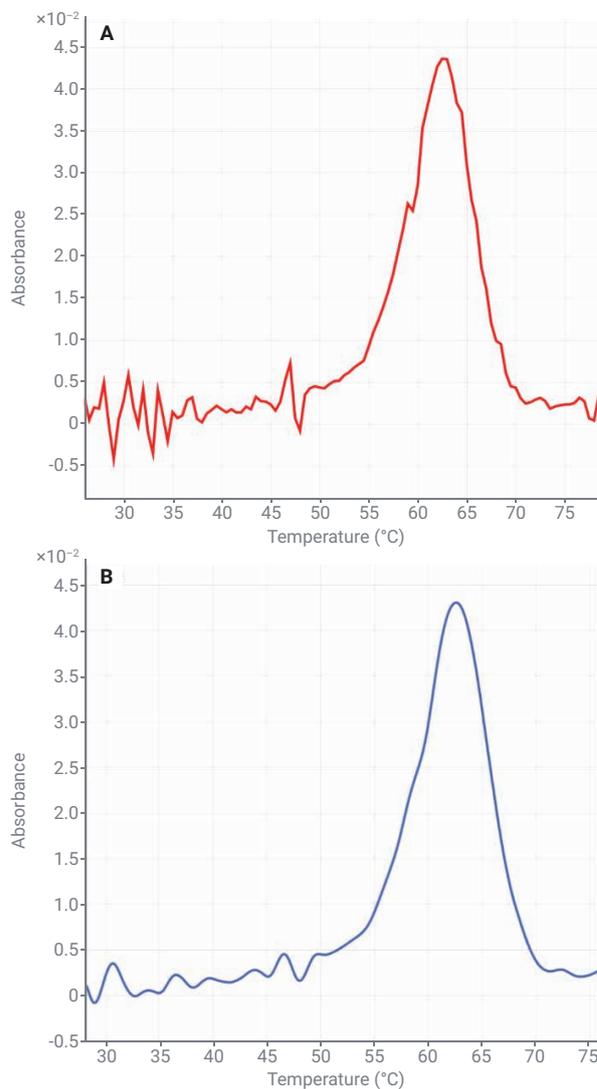


図 7. (A) メソッド 5：平滑化なし、微分パラメータ最適化なしの一次微分プロット（微分間隔 0.5 °C、フィルタ 5）。(B) 平滑化と微分パラメータの最適化された一次微分プロット（平滑化および微分間隔 0.1 °C、フィルタ 31）

結論

機器パラメータを十分に評価した後に、Agilent Cary 3500 マルチセルペルチェ UV-Vis 分光光度計とマルチゾーンソフトウェアアドオンを使用して、シンプルで高速なオリゴヌクレオチド融解温度測定のための信頼性と精度に優れた UV ベースの分光分析メソッドを、Vetter で実施しました。Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアには、融解曲線分析の最適化を実現する平滑化および導関数が搭載されており、オリゴヌクレオチド融解温度の評価を改良できます。

参考文献

1. Capaldi, D.; et al. Strategies for Identity Testing of Therapeutic Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products. *Nucleic Acid Therapeutics* **2020**, 30(5), 249–264. Doi: 10.1089/nat.2020.0878
2. Evaluating an Innovative Analytical ID Testing Strategy for Oligonucleotides, Agilent Technologies/Vetter case study, **2022**.
3. Bonilla, J. V.; Srivatsa, S. *Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products*; CRC Press, Taylor & Francis Group: October 19, **2016**, ISBN 9781138198456.
4. Best Practice for Nucleic Acid Thermal Stability Measurements Using the Cary 3500 UV-Vis Spectrophotometer, Agilent Technologies white paper, publication number 5994-4028EN, **2022**.
5. Savitzky, A.; Golay, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* **1964**, 36(8), 1627–1639. Doi: 10.1021/ac60214a047

詳細情報

- Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計
- Cary UV ワークステーションソフトウェア
- GMP 施設のデータインテグリティ実現のために - Agilent Cary 3500 UV-Vis 向け Cary UV ワークステーションソフトウェア
- UV-Vis 分光分析と分光光度計の基礎サイト

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE09081872

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, August 28, 2024

5994-5145JAJP