

核酸医薬品の熱安定性 (T_m) 解析と熱力学特性評価

川原 和美、平松 崇英

ユーザーベネフィット

- ◆ 核酸医薬品において、二本鎖DNAの50%が一本鎖DNAに解離する温度 (T_m値) が求められます。
- ◆ T_m値を用いて薬物活性の指標であるギブズの自由エネルギーの変化量を求められます。
- ◆ エントロピー変化量やエンタルピー変化量といった熱力学的特性が得られます。

■はじめに

医薬品業界において、約20年前までは比較的安価な低分子医薬品が主流でしたが、2021年には抗体医薬品のような、比較的分子量が大きいバイオ医薬品が全市場売上の30%を超える規模になっています。しかしながら、近年創薬に関する技術やライフサイエンスに関する知見が向上したことから、今後は、バイオ医薬品と同様に安全性や有効性が高く、バイオ医薬品では治療が困難であった疾病に対する新たな医薬品として期待される、核酸医薬品の開発および市場投入が加速されると推測されます。図1には、医薬品の種類とその特長を示します。

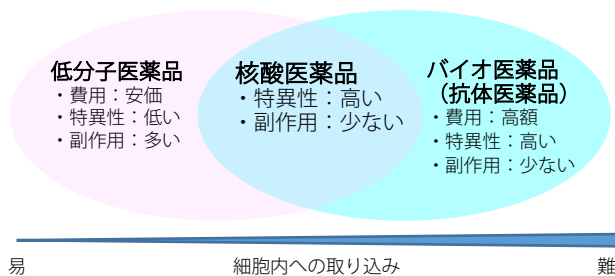


図1 医薬品の種類と特長

■核酸医薬品とは

核酸医薬品とは、RNAやDNAの構成成分であるヌクレオチド（核酸）を基本骨格とする医薬品です。核酸医薬品は、従来の低分子医薬品やバイオ医薬品では標的にできなかったmRNAに対して、特異的に結合し働きを抑えることや、標的となるたんぱく質に結合することで機能を阻害する、もしくは活性化させることで薬効を示します。

さらに近年では、核酸の化学修飾技術が発達した結果、ヌクレアーゼ（酵素）による分解の低減と標的配列との結合性の向上・細胞内への取り込み効率向上が実現し、より実用的な医薬品へと発展しています。¹⁾

■核酸医薬品の熱安定性

核酸医薬品の熱安定性の指標としてT_m値があります。T_m値とは二本鎖DNAの50%が一本鎖DNAに解離する温度であり、この温度が高いほど熱的に安定といえます。

弊社の紫外可視分光光度計にT_m解析システムTMSPC-8を組み合わせることにより、核酸医薬品の熱安定性解析を行うことが可能です。島津アプリケーションニュースNo. A618も併せてご覧ください。

■核酸医薬品の活性指標

前述したT_m値を利用して、核酸医薬品の薬品活性指標を評価することができます。核酸医薬品の活性を確認する上では、ギブズの自由エネルギーが1つの指標になることが知られています。ギブズの自由エネルギーは非膨張仕事量で、これが結合に使われる最大の仕事量を表し、この変化量がマイナスになればなるほど、他の分子に結合する力が強いといえます。

ギブズの自由エネルギー変化量は、熱力学的また統計力学的に以下の式 (1) および (2) で記述されます。

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln K \quad (2)$$

ここで、Kは平衡定数、 ΔG° は標準状態 (1 atm、25 °C) のギブズの自由エネルギー変化量となります。核酸の平衡定数を考える場合、二つの鎖AとBが1:1で会合する2分子間の平衡反応として記述できます (式 (3))。



二本鎖の状態モル分率を α 、核酸の全濃度をCとすると、完全解離したときのAおよびBの濃度 [A]、[B] はC/2になるため、平衡定数は以下の式 (4) で表すことができます。

$$K = \frac{2\alpha}{C(1-\alpha)^2} \quad (4)$$

核酸が50%乖離した平衡状態であるとき、

$$\alpha = \frac{1}{2}, \Delta G = 0 \quad (5)$$

となるため、式 (2) に式 (4) および (5) を代入すると、

$$\Delta G^\circ = -RT_m \ln \frac{4}{C} \quad (6)$$

となります。

結合力の強さを示す ΔG だけでなく、どのような関数が ΔG° において支配的であるかを知ることで、より効果的な創薬開発が可能となります。

式 (1) に式 (6) を代入することで、以下の式 (7) が得られます。

$$\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H^\circ} \ln \frac{C}{4} + \frac{\Delta S^\circ}{\Delta H^\circ} \quad (7)$$

$1/T_m$ と $\ln(C/4)$ の2つの関数として測定値をプロットすると、切片と傾きから標準状態のエンタルピー変化量 ΔH° およびエントロピー変化量 ΔS° が求められ、どのような物理量が支配的であるか判断することが可能です。

■ T_m値と熱力学的指標の算出

核酸の一種であるM13-25merをバッファー（5 M NaCl、66.7 mMリン酸緩衝液）に溶解し、2~60 μMの試料溶液に調整しました。

8連マイクロセルは光路長が10 mmと1 mmの2種類あり、サンプルの吸光度（濃度）に応じて選択が可能です。光路長10 mmのセルは必要最小量が100 μLであるのに対して、光路長1 mmのセルは10 μLと微量であるため、特に得られる試料量が少ない創薬初期段階には非常に有用です。今回は、濃度の低い2、5 μMの試料溶液については光路長10 mmのセルを、残りの9~60 μMの試料溶液は光路長1 mmのセルを用いて測定しました。測定条件を表1に示します。

表1 測定条件

装置	: UV-2600i TMSPC-8 8連マイクロセル 光路長10 mm、1 mm
測定波長	: 260 nm
測定波長（校正用）	: 320 nm
スリット幅	: 5.0 nm
温度範囲	: 15~90 °C
温度間隔	: 1 °C
昇温速度	: 1 °C/分

光路長1 mmのセルを使用した際の温度と吸光度の変化をプロットしたものを図2に示します。

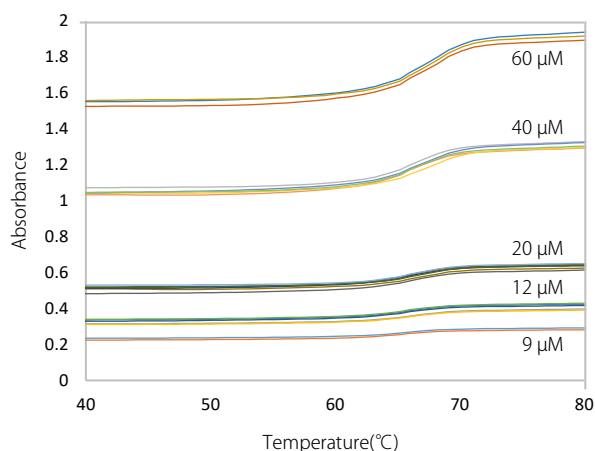


図2 9~60 μMの試料溶液における溶解曲線

この曲線から、TM解析システムTMSPC-8を用い、各濃度におけるT_m値を算出しました（表2参照）。そして、各濃度におけるT_m値の逆数1/T_mとln(C/4)をプロットしたグラフを図3に示します。また、図3における切片と傾きからΔG°、ΔH°、ΔS°を算出した結果を表3に示します。

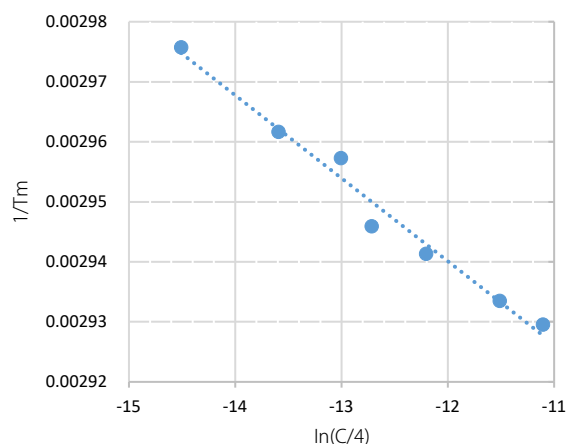


図3 1/T_mとln(C/4)をプロットしたグラフ

表2 各濃度におけるT_m値

濃度C(μM)	T _m 値(°C)
2	62.9
5	64.5
9	65.0
12	66.3
20	66.8
40	67.7
60	68.2

表3 算出したΔG°、ΔH°、ΔS°値

Factor	Value
ΔG°	-107 kJ/mol
ΔH°	-622 kJ/mol
ΔS°	-1792 J/(mol·K)

以上から、M13-25merはT_m値が高く、自由エネルギー変化量ΔG°がマイナスの値を示していることから、この二重鎖が安定に存在でき²⁾、熱的にも安定していることが言えます。

■ まとめ

今回は、紫外可視分光光度計によって得られたT_m値を用い、熱力学的な指標であるエンタルピーやエントロピー、ギブズの自由エネルギーの変化量を算出しました。これらの結果から核酸医薬品の活性の指標が得られ、より効果的な創薬開発の一助になることが期待されます。

<参考文献>

- 1) 井上貴雄, “核酸医薬品の開発動向”, バイオ医薬品の開発と市場2019別冊, p.33~46 (2019)
- 2) 秋田智香, “核酸医薬の化学 総論—修飾拡散と機能評価”, 実験医学, Vol.39 No.17, p.74~80 (2021)

TMSPCIは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00322-JP 初版発行：2022年 3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022