

# Application News

## オリゴヌクレオチドの逆相イオンペアクロマトグラフィーによる最適分離条件探索の効率化

藤崎 真一、鈴木 里沙

### ユーザーベネフィット

- ◆ オリゴヌクレオチド及び関連不純物の最適分離条件探索の一連のワークフローをLabSolutions MDにより効率化できます。
- ◆ オリゴヌクレオチド及び関連不純物ピークをシングル四重極質量分析計LCMS™-2050により正確にトラッキング可能です。
- ◆ イナートUHPLCシステムNexera™ XS inert、Shim-pack Scepter™ Claris (イナートカラム) により、オリゴヌクレオチドの金属配位性吸着を抑制し良好なピーク形状を得られます。

### ■はじめに

アンチセンスオリゴヌクレオチド等に代表される核酸医薬品は、細胞内外の標的(遺伝子、タンパク質等)に作用することで薬効を発揮します。核酸医薬品は化学合成により製造されますが、その合成工程でヌクレオチドの伸長不良や保護基の除去不良等に関連する多くの不純物を生じるため、不純物を含む膨大な数のオリゴヌクレオチドの適切な分離が大きな課題となっています。LC分析の場合、一般に電荷を持った物質を分離する際に用いられる分離モードとして、逆相イオンペアクロマトグラフィー(RP-IP)があります。RP-IPでは、移動相に使用するイオンペア試薬の添加濃度や有機溶媒組成により分離パターンが変化しますが、変化の挙動はオリゴヌクレオチドの鎖長や塩基構成、修飾結合の有無等によって異なるため、対象配列ごとに分離を最適化することが重要です。本稿では、分析法開発支援ソフトウェアであるLabSolutions MDを活用し、鎖長及び修飾結合の異なるオリゴヌクレオチド及び関連不純物に対して、「初期スクリーニング」及び「最適化」の各フェーズにて、最適分離条件探索を効率化した事例についてご紹介します。

### ■分析対象試料

測定試料として用いたオリゴヌクレオチドの配列(計6種)を表1に示します。full length product (FLP)及び、不純物として3'末端と5'末端が1塩基欠損したn-1(3')及びn-1(5')欠損体、5'末端が3塩基欠損もしくは1塩基過剰付加したn-3欠損体及びn+1付加体、5'末端のホスホロチオアート修飾結合がホスホジエステル結合に変化したPS→PO変化体の計6種の混合試料を合成アンチセンスオリゴヌクレオチドのモデル配列として用いました。

表1 分析対象試料

名称	Sequence (5'→3')	Length
FLP	T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	20 mer
n-1(3')	T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*	19 mer
n-1(5')	mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	19 mer
n-3	T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	17 mer
n+1	T*-T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	21 mer
PO	FLP 5'末端のPS→PO変化体	20 mer

Note : \* = 2'-O-methoxyethyl, m = 5-methyl, d = 2'-deoxy, PS(full)

### ■移動相の初期スクリーニング

初期スクリーニング(分析条件:表2)では、保持や分離に大きな影響を及ぼすパラメーターとして、水系移動相中のHFIP及び、イオンペア試薬(トリエチルアミン:TEA)の添加濃度、有機系移動相中のアセトニトリル及びメタノールの混合比率の最適水準を検討しました。具体的には、HFIPの添加濃度を100、200 mmol/L(2水準)、TEAの添加濃度を5、10、15、20 mmol/L(4水準)、有機系移動相中のアセトニトリル比率を0、50、100%(3水準)で変動させた計24(2×4×3)パターンで分析スケジュールを作成し、最適な組み合わせを探索しました。LabSolutions MDは、移動相やカラム等の各種パラメーターを組み合わせた多様な条件で、ミスなく分析スケジュールの自動生成(図1の①~⑤のステップ)が可能です。さらに、HFIPとTEAの添加濃度の変更、及び有機溶媒組成の変更は、移動相ブレンディング機能を用いて自動調製にて実施しました。使用する移動相をクリックして選択するだけ(図1の①)で、選択された添加濃度及び有機溶媒組成にて移動相が自動調製されるため、手動での調製作業の負担を大幅に削減するだけでなく、調製ミスも防げます。

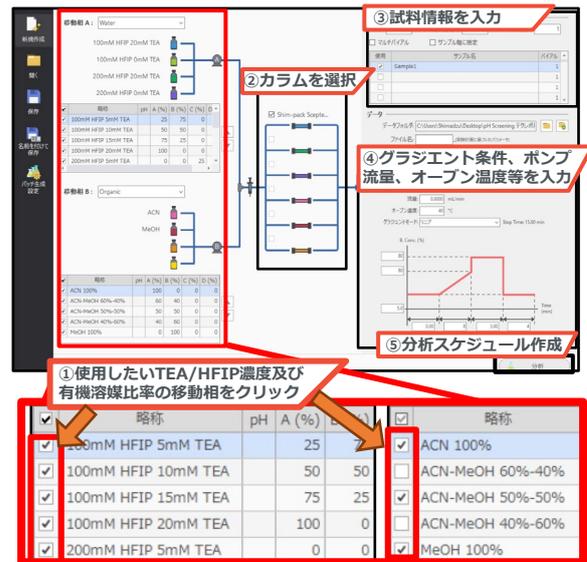


図1 分析スケジュール作成画面

表2 初期スクリーニング条件

System	: Nexera XS inert (Method Scouting System)
Column	: Shim-pack Scepter Claris (100 mm × 2.1 mm I.D., 3 μm) <sup>*1</sup>
Temperature	: 60 °C
Injection volume	: 2 μL
Mobile phases	
Pump A – Line A	: 100 mmol/L HFIP <sup>*2</sup> and 20 mmol/L TEA <sup>*3</sup> in water
– Line B	: 100 mmol/L HFIP in water
– Line C	: 200 mmol/L HFIP and 20 mmol/L TEA in water
– Line D	: 200 mmol/L HFIP in water
Pump B – Line A	: Acetonitrile
– Line B	: Methanol
Flow rate	: 0.4 mL/min
Time program (%B)	: 6% (0 min) → 24% (36 min) → 50% (36-37 min) → 6% (37-46 min)
Detection	: 260 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)

System	: LCMS-2050
Ionization	: ESI/APCI (DUIS™), negative mode
Mode	: SCAN (m/z500-2000)
Nebulizing gas	: 2.0 L/min (N <sub>2</sub> )
Drying gas	: 5.0 L/min (N <sub>2</sub> )
Heating gas	: 7.0 L/min (N <sub>2</sub> )
DL temp.	: 200 °C
Desolvation temp.	: 450 °C
Interface Voltage	: -2.0 kV

\*1 P/N : 227-31210-05 (島津GLC 製品番号)

\*2 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol

\*3 Triethylamine

### ■ 移動相の初期スクリーニング結果

水系移動相中のHFIP及びTEAの添加濃度、有機系移動相中のアセトニトリル及びメタノールの混合比率を変動させた計24パターンのクロマトグラム (FLP及び各不純物の6種) を図2に示します。

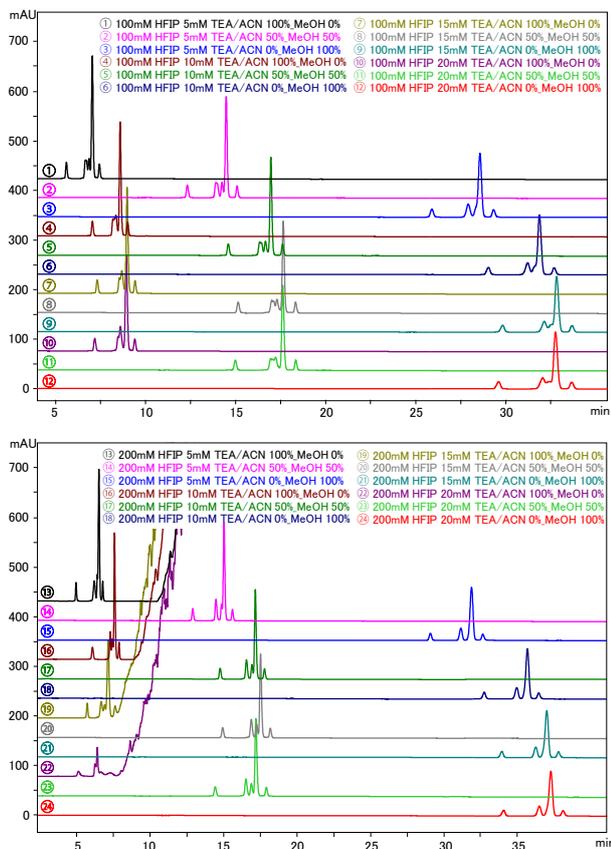


図2 移動相の初期スクリーニングで得られたクロマトグラム  
HFIPの添加濃度100 mmol/L(上)、200 mmol/L(下)

HFIP及びTEAの添加濃度及び、有機溶媒組成が異なることで、FLPと各不純物の保持や分離が大きく変わることが確認できます。また、HFIPが200 mmol/Lかつアセトニトリルが100%の条件 (図2中の⑬、⑯、⑲、⑳) では、ベースラインの変動が観察されました。このことは、各試料のピーク形状および定量に影響を与える恐れがあると考えられます。

### ■ スクリーニング結果から最適条件を迅速に探索

初期スクリーニングでは検討した条件の数だけクロマトグラムが得られるため、どの条件で目的の分離が得られているかを評価する必要がありますが、これはクロマトグラフィに対する知見と、多大な労力を要する作業です。LabSolutions MDは、各条件における分離の状態を以下の式1を用いて定量的に評価し順位付けできるため、分析者の勤や経験に依存せず、誰でも素早く簡単に最適条件を探索できます。

$$(\text{評価値}) = P \times (Rs_1 + Rs_2 + \dots + Rs_{P-1}) \dots \quad (\text{式1})$$

評価値はピーク検出数 (P) と分離度 (Rs) の総和の積により算出されます。初期スクリーニングで得られた評価値を高い順に表示した結果を図3に示します。HFIPの添加濃度は100 mmol/L、TEAの添加濃度は10 mmol/L、有機系移動相にはアセトニトリル/メタノール = 50 : 50を用いた場合に最も高い評価値が得られており、FLP及び各不純物の分離に対して最適条件であることが確認できました (図2中⑤) のクロマトグラム、同クロマトグラムを図4に拡大表示)。また、各不純物においては、n-1(5)とn-1(3)の分離度が最も小さくなっており、これは、n-1(5)とn-1(3)は鎖長が同じで構造も類似しているためと考えられます。

続いて、最適化フェーズとして、カラムオープン温度やグラジエントプログラム等の各種LCパラメーターの最適水準を検討することで、さらなる分離の改善及び、高い頑健性を有する条件の探索を行いました。

移動相A 略称	移動相B 略称	応答	評価値
100mM HFIP 10mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	54.074	54.074
100mM HFIP 15mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	53.777	53.777
100mM HFIP 5mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	52.477	52.477
100mM HFIP 20mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	51.919	51.919
200mM HFIP 20mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	47.016	47.016
200mM HFIP 15mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	46.926	46.926
200mM HFIP 10mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	46.836	46.836
200mM HFIP 5mM TEA	ACN 50%_MeOH 50%	45.719	45.719
100mM HFIP 10mM TEA	ACN 100%_MeOH 0%	38.822	38.822
200mM HFIP 10mM TEA	ACN 100%_MeOH 0%	37.732	37.732

図3 各条件の評価値による順位付け  
(評価値が高い順に上位10条件を表示)

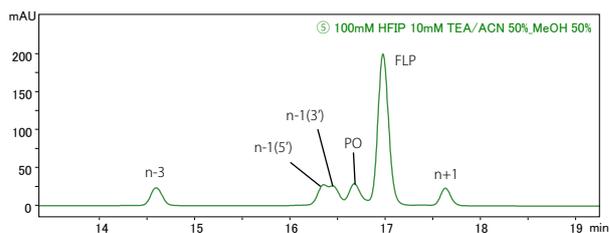


図4 最も評価値が高いクロマトグラム  
(図2中⑤)のクロマトグラムを拡大)

## ■ 各種LCパラメーターの最適化

初期スクリーニングで最適分離が得られた水系移動相及び有機系移動相に対して、有機系移動相中のアセトニトリル比率を40、50、60%（3水準）、カラムオープン温度を55、60、65℃（3水準）、グラジエント初期濃度を6、7、8%（3水準）で変動させ、FLP及び各不純物の分離を最適化しました。得られたクロマトグラムを図5~7に示します。有機系移動相中のアセトニトリル比率が高いほど、カラムオープン温度が高いほど、グラジエント初期濃度が高いほど各ピークの見分けが向上する傾向が見られました。次に、分離度をデザインスペースにて網羅的に視覚化するために、FLP及び各不純物に対してピークトラッキングを実施しました。

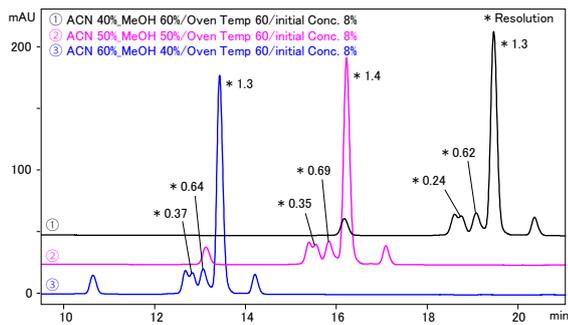


図5 アセトニトリル比率を変動させたクロマトグラム  
40%①、50%②、60%③

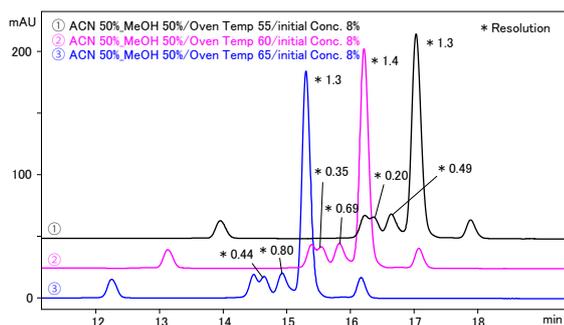


図6 カラムオープン温度を変動させたクロマトグラム  
55℃①、60℃②、65℃③

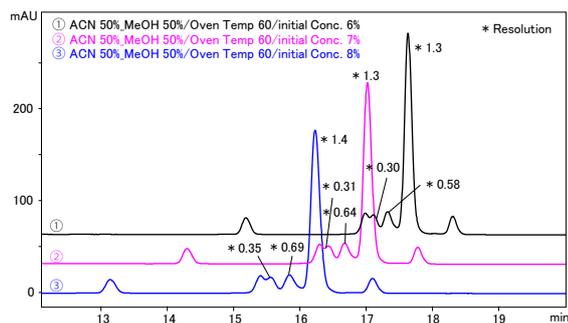


図7 グラジエント初期濃度を変動させたクロマトグラム  
6%①、7%②、8%③

## ■ 不純物ピークのMSトラッキング

LabSolutions MDIは、ピークトラッキングに使用するパラメータをプルダウン（図8赤枠内）で選択するだけで、全データに亘って自動でピークを同定するため、ピークトラッキングの手間を大幅に削減できます。溶出順序、面積値、分子量（MSスペクトルのデコンボリューションにより推定）といった複数のパラメータを組み合わせることで、より正確なトラッキングも可能です。

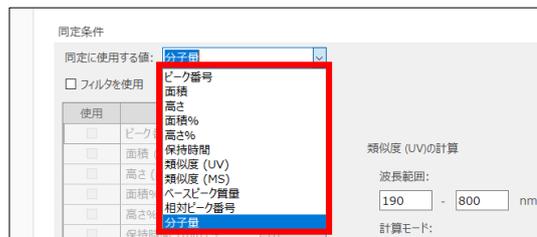


図8 LabSolutions MDのピークトラッキング設定画面

カラムオープン温度が60℃、グラジエント初期濃度が8%、有機系移動相中のアセトニトリル比率が50%及び60%の条件で得られたLCクロマトグラム及び各不純物の分子量を図9に、また、各不純物のUVスペクトルを図10に示します。オリゴヌクレオチドの不純物であるn-3、n-1(5)、n-1(3)、PO、n+1はUVスペクトルの類似度が共に0.99以上で非常に類似しており、UVスペクトルによるピークトラッキングが困難なことが示唆されています。一方、LabSolutions MDは、LCMS-2050の質量情報から算出した分子量を用いたピークトラッキングが可能のため、UVスペクトルが類似している不純物に対しても、正確な同定を可能とします（図9）。デコンボリューションにより推定された分子量は、FLP：7167（理論分子量：7168）、n-3：5985（理論分子量：5986）、n-1(5)：6772（理論分子量：6774）、n-1(3)：6773（理論分子量：6775）、PO：7151（理論分子量：7152）、n+1：7561（理論分子量：7563）となり、理論分子量と誤差の小さい結果が得られました。また、デコンボリューションにより、分子量を簡単に推定できるため、既知化合物の確認や未知不純物の簡易的な分子量推定としても活用できます。

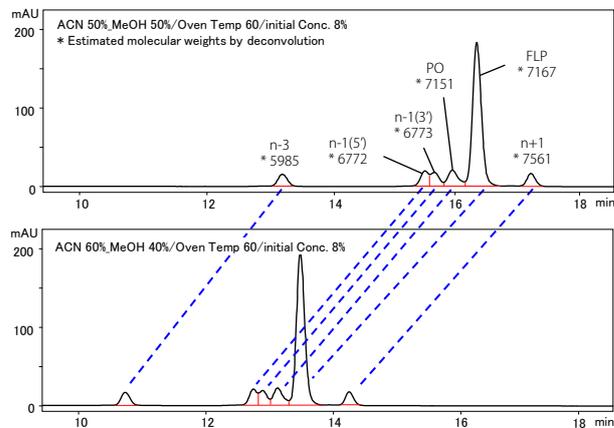


図9 カラムオープン温度60℃、初期濃度8%、アセトニトリル比率50%（上）及び60%（下）のLCクロマトグラム  
（点線は分子量による不純物のトラッキングを示す）

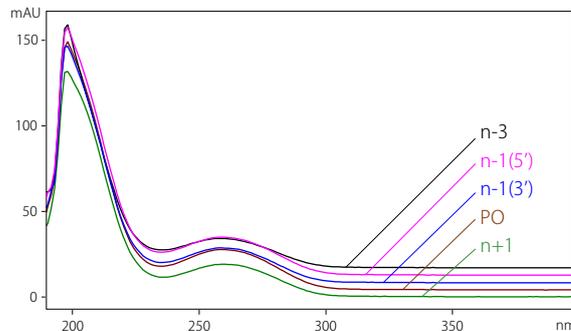


図10 オリゴヌクレオチドの不純物のUVスペクトル

続いて、FLP及び各不純物の分離度をデザインスペースにより視覚化することで、良好な分離かつ高い頑健性を有する最適分離条件の探索を行いました。

## ■ デザインスペースによる最適分析条件探索

FLP及び各不純物の分離度のデザインスペースを、縦軸を有機系移動相中のアセトニトリル比率、横軸をカラムオープン温度とし、図11にそれぞれ示しました。図中の赤色領域は分離度が大きく、青色領域は分離度が小さい領域を示します。デザインスペースの描画により、カラムオープン温度が高いほど、良好な分離が得られることが分かりましたが、最適なアセトニトリル比率の水準は、FLP及び各不純物において異なることが示唆されました。

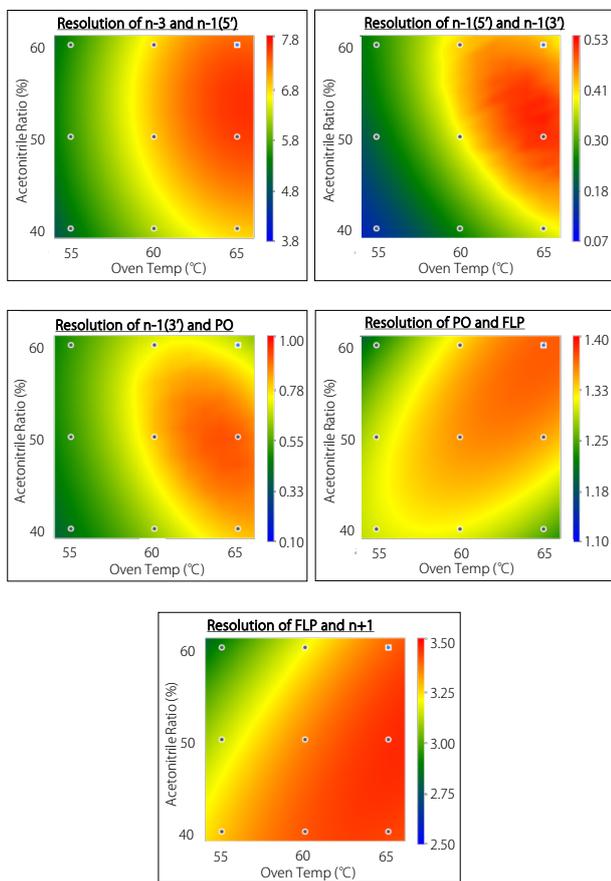


図11 FLP及び各不純物の分離度のデザインスペース (グラジエント初期濃度：8%)

LabSolutions MDは、複数のデザインスペースを重ね書きすることで、複数のクライテリアを満たす最適条件を自動探索することが可能です。例えば、最も分離が厳しいn-1(5')とn-1(3')の分離度が最大、2番目に分離が厳しいn-1(3')とPOの分離度が0.7以上、最終ピーク(n+1)の保持時間が16分以下をクライテリアとし、これらを満たす条件領域をデザインスペースの重ね書きにより探索し、分離の最適化を実施しました(図12)。図12の緑線内の領域は、n-1(3')とPOの分離度が0.7未満の領域、橙線内は最終ピークの保持時間が16分より長い領域を表しており、これら以外の領域(黒線ハッチング)内において、赤丸内の点Aが、n-1(5')とn-1(3')の分離度が最大となる条件(アセトニトリル比率が54%、カラムオープン温度が65℃、初期濃度が8%)であると自動探索されました。このように、デザインスペースの重ね書きにより、複数ピークに対して任意に設定したクライテリアを満たす条件を簡単かつ迅速に探索可能です。

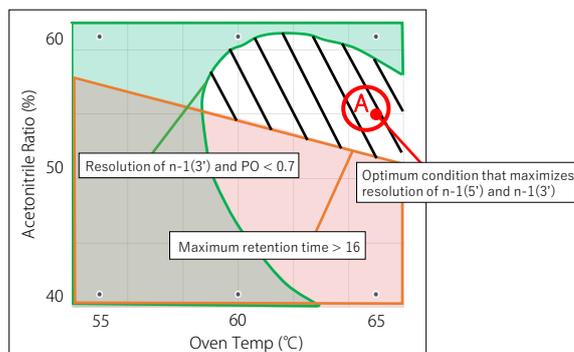


図12 デザインスペースの重ね書きによる最適条件探索

## ■ 最適分離条件でのクロマトグラム

デザインスペースにより探索された最適条件(点A)でのクロマトグラムを図13に示します。n-1(3')とPOの分離度が0.7以上、最終ピーク(n+1)の保持時間が16分以内となっており、分析時間の短縮も考慮して、分離を最適化することができました。n-1(5')とn-1(3')は鎖長が同じで構造も類似していますが、デザインスペースにて分離度を網羅的に視覚化することで、分析者の勘と経験に依存することなく、分離の最適化が可能です。

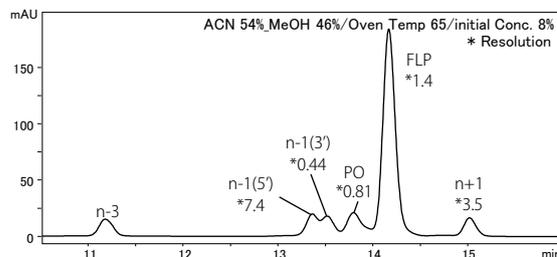


図13 最適化条件でのクロマトグラム (HFIPの添加濃度 100 mmol/L、TEAの添加濃度 10 mmol/L)

## ■ まとめ

オリゴヌクレオチドの分析においては、移動相に添加するHFIP及びイオンペア試薬の濃度や有機溶媒組成、さらにはカラムオープン温度やグラジエントプログラム等の各種LCパラメーターの変動により分離パターンが変化します。また、変化の挙動はオリゴヌクレオチドの鎖長や塩基構成、修飾結合の有無等によっても異なるため、対象配列ごとに分離を最適化することが求められます。一方で、対象配列ごとに網羅的な分析を実施することや、得られた膨大なデータを解析し、最適条件を探索することは非常に手間がかかります。LabSolutions MDを用いることで、分析スケジュール作成や移動相調製を自動化でき、また、解析面ではピークトラッキングの自動化やデザインスペースによる効率的な最適条件の探索が可能です。本稿でご紹介したように、LabSolutions MDに加えて、イナートUHPLCシステム Nexera XS inert、Shim-pack Scepter Claris (イナートカラム)、シングル四重極質量分析計LCMS-2050を組み合わせることで、オリゴヌクレオチドの分析法開発の一連のワークフローの効率化を実現可能です。

## ■ 謝辞

本アプリケーションニュースは 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す。

LabSolutions、LCMS、Nexera、Shim-pack ScepterおよびDUI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。

## ＞ アンケート

**関連製品** 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



### ＞ 分析法開発支援システム

分析法開発支援ソフトウェア



### ＞ Nexera XS inert

超高速液体クロマトグラフ



Shim-pack  
Scepter LC Columns

### ＞ Shim-pack Scepter シリーズ



### ＞ LCMS-2050

シングル四重極質量分析計

## 関連分野

＞ 医薬・バイオ医薬品

＞ 核酸医薬品・分離分析

＞ 核酸医薬品

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ