

LabSolutions Insight™ Biologicsを用いた オリゴヌクレオチド不純物解析ワークフロー

加藤 紀子、中園 純菜

ユーザーベネフィット

- ◆ LabSolutions Insight Biologicsソフトウェアを用いてシンプルなワークフローでオリゴヌクレオチドおよび不純物の特性評価が可能です。
- ◆ オリゴヌクレオチドの網羅的な不純物同定を行うことが可能です。
- ◆ フラグメントカバレッジ画面で欠損箇所や修飾箇所を分かりやすく確認できます。

■はじめに

近年、核酸医薬品の開発が急速に進み、新たな創薬モダリティとして注目されています。その一方で医薬品としての安全性や有効性の確認のため、不純物の網羅的な検出と同定が必要となります。ここでは四重極飛行時間型質量分析計であるLCMS-9050とLabSolutions Insight Biologicsを使用した不純物解析ワークフローをご紹介します。

■ サンプル

配列はCTG CTA GCC TCT GGA TTT GA、ホスホロチオアート修飾された20-merオリゴヌクレオチドの粗体（以下粗体PS20merとする）を測定に供しました。

■ 分析条件

測定機器はNexera™ XS inertとLCMS-9050を使用し、Data Dependent Acquisition (DDA)モードを使用しました。LC条件を表1、MS条件を表2に示します。

表1 LC条件

[HPLC conditions] (Nexera XS inert)

Column : Shim-pack Scepter™ Claris C18-120,
100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm*1
Mobile Phases : A) 100 mM HFIP/10 mM TEA含有水溶液
B) 50 mM HFIP/5 mM TEA含有50%メタノール

Gradient Program :

時間 (min)	流量 (mL/min)	A.Conc	B.Conc
0.00	0.3	95	5
1.00	0.3	95	5
26.00	0.3	60	40
26.10	0.3	10	90
30.00	0.3	10	90
30.10	0.3	95	5
34.00	0.3	95	5

Column Temp. : 60 °C

Injection Volume : 2 μL

*1: P/N 227-31210-02

表2 MS条件

[MS conditions] (LCMS-9050)

Ionization : ESI (Negative mode)
Mode : MS scan (*m/z*550~2500), DDA
Interface Voltage : -3.0 kV
Nebulizing Gas Flow : 3.0 L/min
Drying Gas Flow : 10.0 L/min
Heating Gas Flow : 10.0 L/min
DL Temp. : 250 °C
Block Heater Temp. : 400 °C
Interface Temp. : 350 °C

■ 解析パラメーター設定

LabSolutions Insight Biologicsはオリゴヌクレオチド及びその不純物の特性を評価するための解析ソフトウェアです。まずパラメーター設定画面であらかじめ登録された核酸塩基やリンカー、リボース、修飾などを選択し配列を作成します。これらの核酸塩基、リンカー、リボースや塩基修飾は自由に追加、編集ができます。配列を入力すると分子式やモノアイソトピック質量、右側には構造式が表示されます（図1）。入力した配列の構造式をリアルタイムに表示することができ、入力間違いを視覚的に確認できます。

構造式の表示は、図2のように核酸塩基部分を分かりやすく色付けしたり、フラグメント位置を表示することもできます。

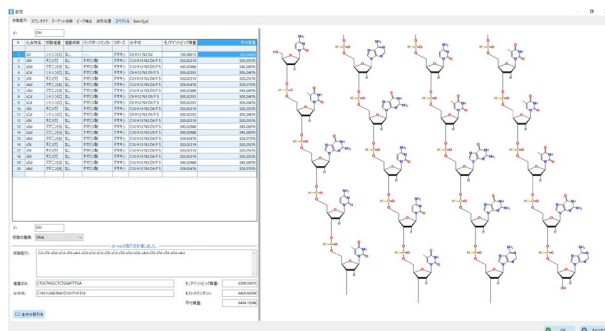


図1 パラメーター設定画面

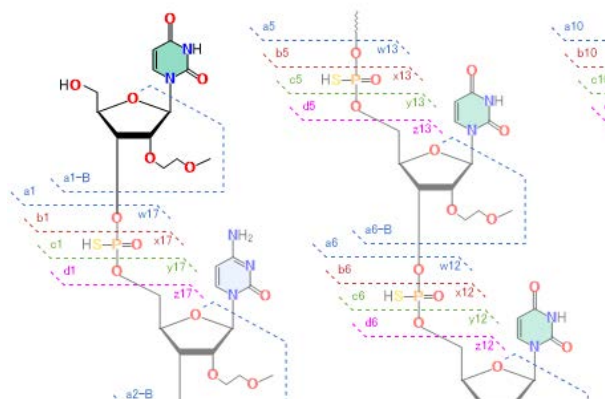


図2 フラグメント部分の表示

ターゲット修飾のタブでは、想定される不純物を選択します。鎖長違い、核酸塩基欠損、脱プリン・ピリミジン化、脱アミノ化、保護残基等の不純物や付加イオン、未知修飾体の他、ユーザーで追加した分子変化に対する探索設定も可能です。

■ 解析結果

粗体PS20merはPDAおよびMSで検出しました。各クロマトグラムを図3に示します。LCクロマトグラムとMSクロマトグラムは上下に表示させてピークを確認できます。

マスクロマトグラムはMS1スペクトルを元に、価数違いや同位体スペクトルをすべて合算した成分クロマトグラムとして表示されます。PS20merの多価イオンマスペクトル

とデコンボリューションスペクトルを図4に示します。不純物のスペクトルも同様にデコンボリューションされ、不純物の検索に用いられます。

MS1データから網羅的な不純物同定を行った結果、鎖長違い、塩基欠損体、イオン付加体など30以上の不純物が確認されました。

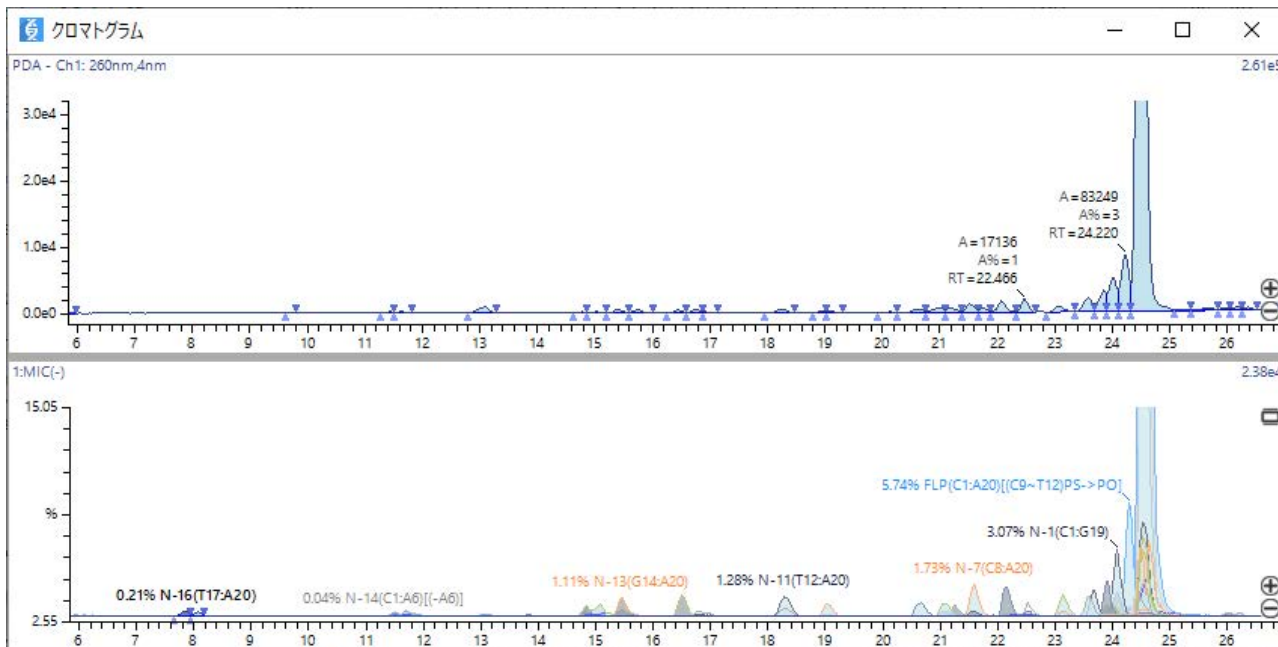


図3 粗体PS20merのUVクロマトグラム（上）と成分クロマトグラム（下）

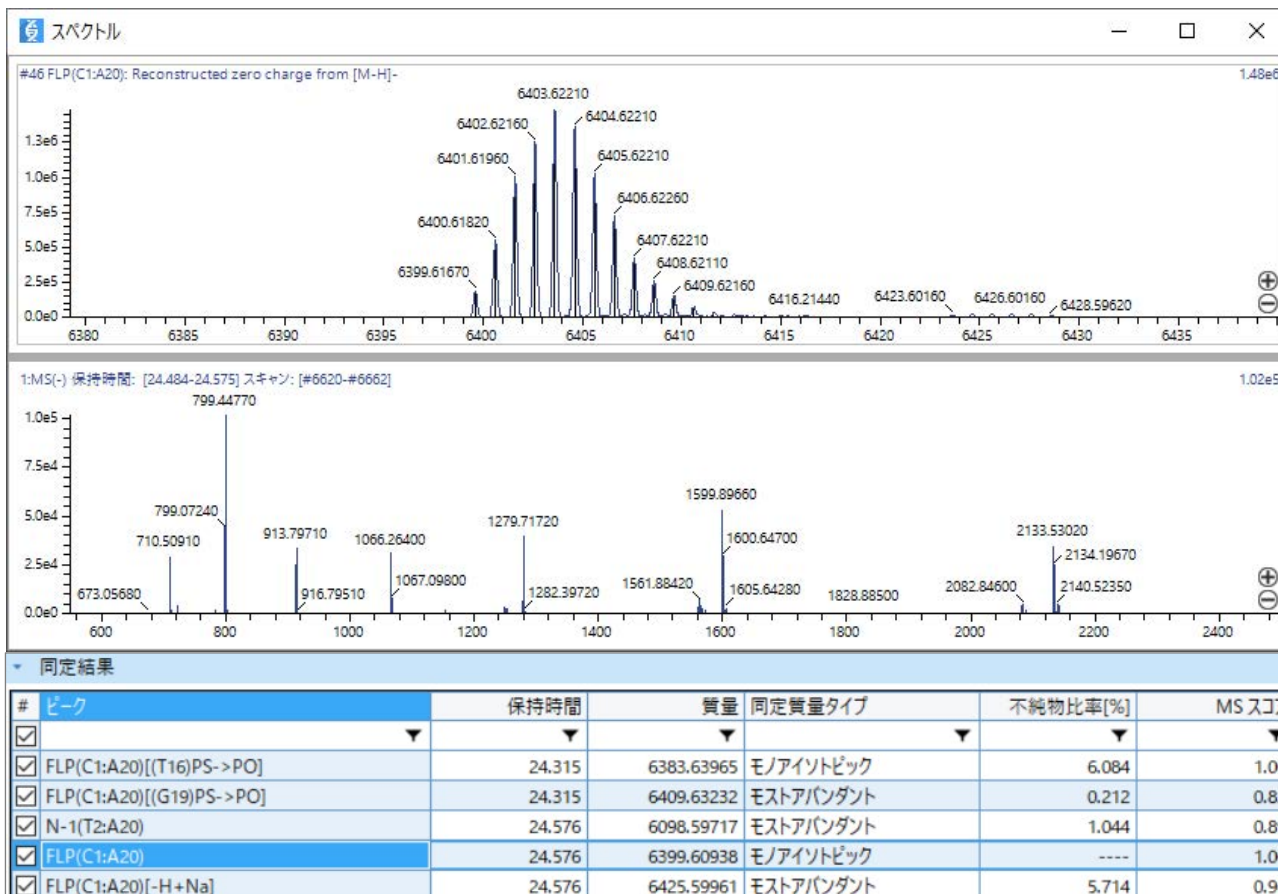


図4 PS20merのマスペクトル（下）とデコンボリューションスペクトル（上）

さらにMS2データのフラグメントスペクトルから、配列カバレッジを表示できます。

PS20merの配列にアサインした結果を図5、6に示します。すべての位置の核酸塩基が切断されたフラグメントイオンが生成されており、配列と一致しています。

カバレッジ表示は、アサインされたイオンの強度情報や網羅性を確認できるフィルモードと、フラグメント系列の種類を確認できるブランチモードの2つのモードが搭載されており、確認したい項目に合わせて切り替えられます。

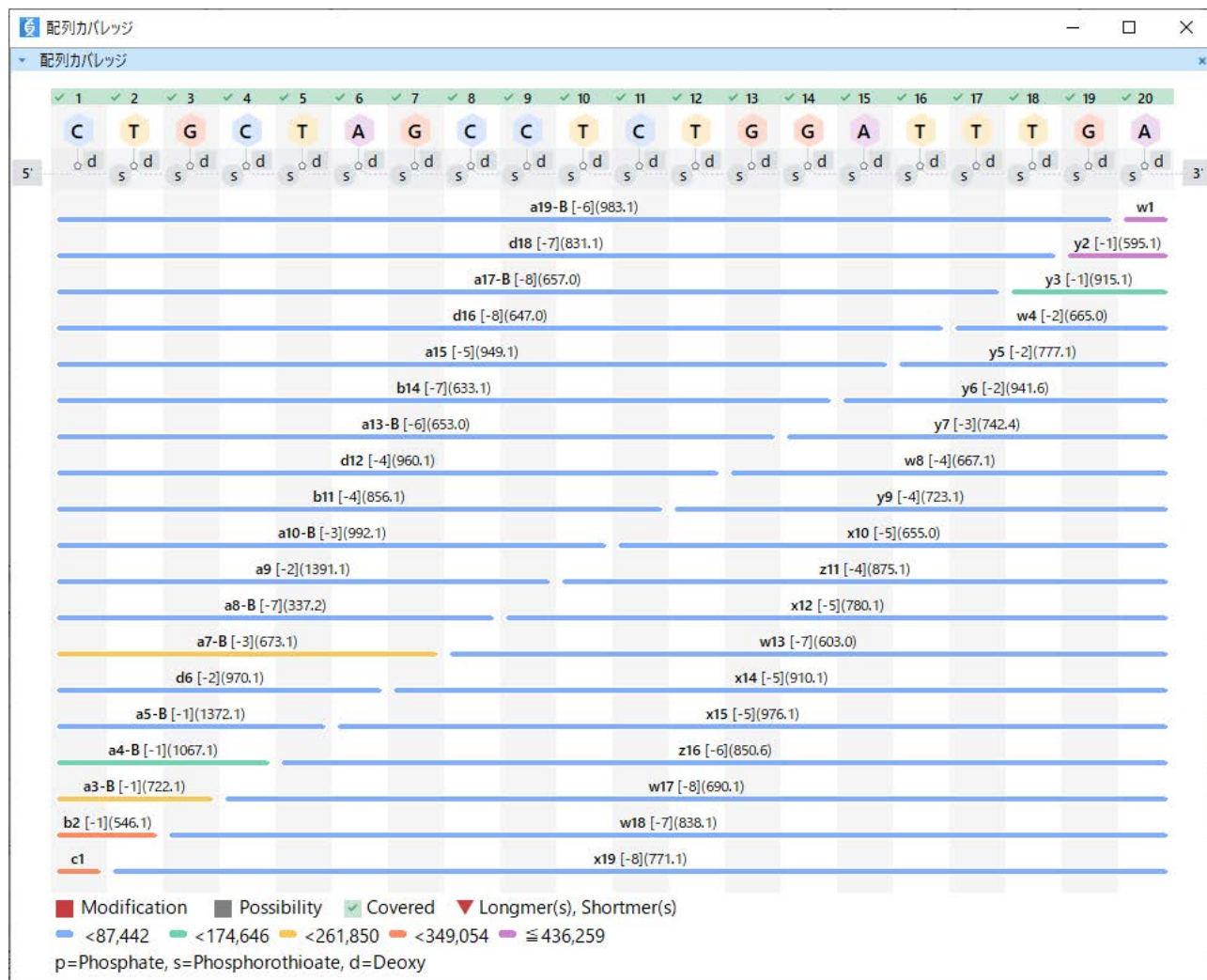


図5 PS20mer配列カバレッジ (フィルモード)

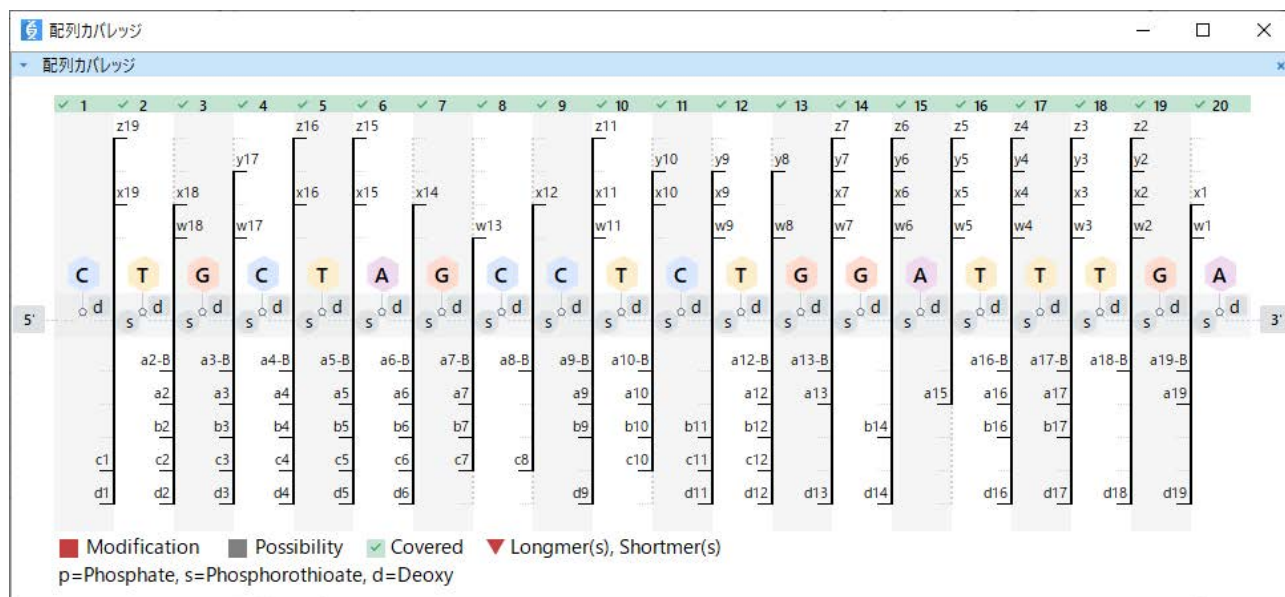


図6 PS20mer配列カバレッジ (ブランチモード)

■ 不純物の配列確認

主成分に対して0.5%の存在比である、5'末端から14ヌクレオチドが欠損した不純物（以下N-14とする）の配列確認を行いました。図7では確認された核酸塩基の上部に緑の✓マークが表示されているように、高いカバー率により解析結果の妥当性が確認できました。

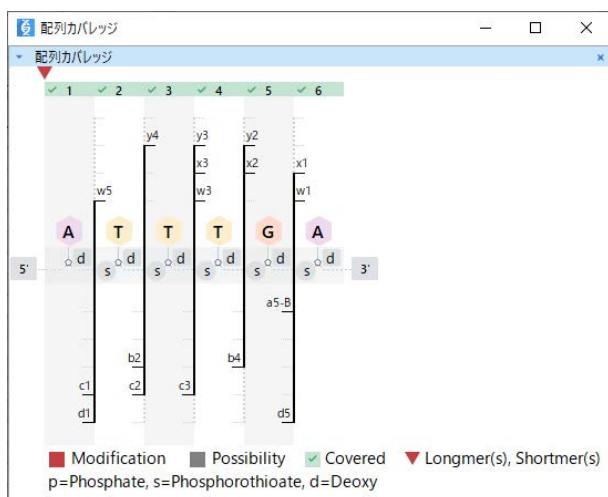
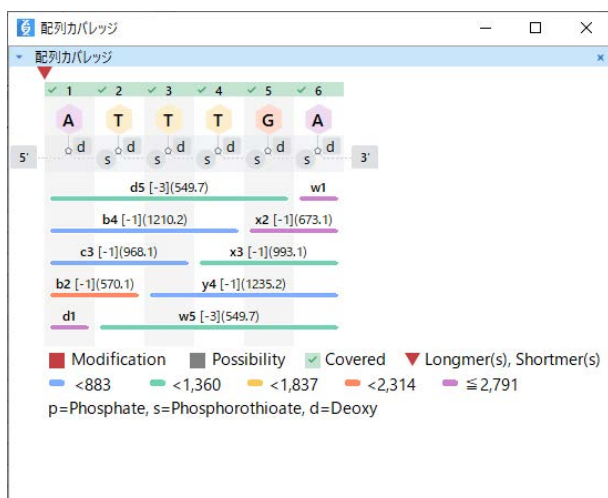


図7 N-14の配列カバレッジ

■ まとめ

LabSolutions Insight Biologicsソフトウェアを用いてオリゴヌクレオチドの不純物の網羅的な同定、配列の確認が可能です。

完全な配列カバレッジは主成分だけでなく、0.5%の存在比である不純物に対しても、高い配列カバー率が得られました。

<謝辞>

本稿でご紹介しました測定試料はペプチスター株式会社様よりご提供いただきました。ご協力に厚く感謝申し上げます。

LCMS、LabSolutions Insight、NexeraおよびShim-pack Scepter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
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行：2023年6月
01-00595A-JP A改訂版発行：2023年10月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

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。
本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していません。