

# 短鎖オリゴ核酸分析に対する超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）の応用

林田 桃香



## ■ 要旨

オリゴ核酸の不純物分析に対する超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）の適用可能性を評価しました。SFCの移動相に用いる二酸化炭素の極性から高極性化合物への適用は難しいとされてきましたが、分析条件の最適化によりペプチドやヌクレオチドなどの極性化合物が分析可能となることが分かってきました。本研究では分析条件の検討を通してオリゴ核酸4-merが分析可能であることを示しました。比較検討の結果、モディファイア（共溶媒）に2-アミノエタノール酢酸を含むメタノールと水の混合液を、カラムにはShim-pack™ UC-Diol IIを用いることで、ホスホロチオアート修飾量の異なるオリゴ核酸4-merを分離できました。これらの結果はオリゴ核酸分析への適用可能性を示します。

本書はJournal of Chromatography Aに掲載された原著論文<sup>1)</sup>を抜粋しています。

## 1. はじめに

核酸医薬はオリゴ核酸が有効成分の医薬品で、低分子医薬と異なる作用機序を持つ治療法であることから注目されている創薬モダリティです。このオリゴ核酸は化学合成によって製造されますが、その過程で不純物が生成されるため、不純物含有量の測定、特性解析が求められます。現在その分析には逆相イオンペアクロマトグラフィーがよく用いられますが、目的物に構造が類似した一部の不純物は分離困難です。そのため既存法と異なる選択性を持つ分離法が求められています。

SFCは温度、圧力共に臨界点以上の二酸化炭素を移動相に用いる分析法です。液体と比べ、二酸化炭素は低粘性かつ高拡散性を示すため、高分離能、特殊な選択性を持つことが報告されています。一方で二酸化炭素を含む移動相は低極性のため、SFCは高極性化合物の分析には不適合とされていました。しかし、近年二酸化炭素と混合するモディファイアの組成や固定相の選択により、ペプチドやヌクレオチドを例とした高極性化合物が分析可能になっています<sup>2)</sup>。

本研究ではオリゴ核酸分析に対するSFCの適用可能性を評価しました。核酸医薬では20-mer前後の一本鎖オリゴ核酸が使用されますが、分子の極性が非常に高く分析難易度が高いため、まず4-merのオリゴ核酸を評価に用い、基本的な保持特性を調べました。

## 2. 実験

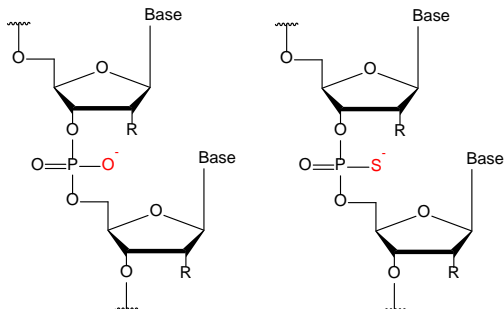
質量分析計（MS）条件を表1に示します。SFC分析条件は本文中に示します。

表1 MS分析条件

System	: LCMS™-9030
Polarity	: Negative
Interface temp	: 350 °C
Nebulizer gas	: 3.0 L/min
Heating gas	: 10.0 L/min
Drying gas	: 10.0 L/min
DL temp	: 250 °C
Heat block temp	: 400 °C
Interface Voltage	: -3.5 kV
TOF-MS	: $m/z$ 150-2000

### 3. 結果・考察

本研究ではホスホロチオアート (PS) 含有量の異なるオリゴ核酸の分離に着目しました。PS修飾はオリゴ核酸のりん酸部の酸素原子の1つを硫黄原子に置換した修飾で、多くの上市医薬品に採用されています (図1)。PS修飾を含むオリゴ核酸の合成過程ではPS修飾の硫黄原子が酸素原子に変換された不純物が生成されるため、PS含有量の異なる配列を分離することは品質管理上重要です。SFCを用いてPS含有量の異なる4-merオリゴ核酸を分離するため、①溶出条件の検証、②固定相の分離能評価、③モディファイア添加剤の最適化の3段階で分析法を開発し、最後にその分析法が適用可能な配列や基本的な保持特性を調べました。



ホスホジエステル (PO) 結合      ホスホロチオアート (PS) 結合

図1 オリゴ核酸のりん酸部

#### 3-1. 溶出条件の検証

オリゴ核酸の高極性によりカラムから全く溶出しない可能性を考慮し、まず3種のモディファイアを用いてチミジンが4つ連続したオリゴ核酸T4を分析し、溶出可能か検証しました (図2)。ここではLC条件に近いモディファイア80%で分析しました (表2)。カラムには低極性官能基から高極性官能基まで多様な固定相を持つものを選択しました。モディファイアの基礎溶媒にはオリゴ核酸の溶解性が高いメタノールを選択しました。メタノール・メタノール・水混合液 (95:5) の場合、ピークは検出されませんでした (図2-A, B)、50 mmol/L 塩酸アンモニウムを含むメタノール・水混合液 (95:5) では6本中5本のカラムでシャープなピークが検出できました (図2-C)。これはアンモニウムイオンがオリゴ核酸に作用したためと考えられます<sup>1)</sup>。アミド基が修飾されたカラムは固定相とオリゴ核酸との相互作用が強く、カラムからオリゴ核酸が溶出されていないためピークが検出できていないと考えられます。そのためアミドカラム以外のカラムについて 50 mmol/L 塩酸アンモニウムを含むメタノール・水混合液 (95:5) を用いて次に各固定相の分離能を比較しました。

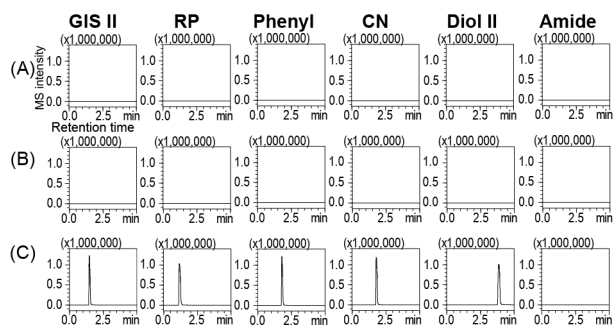


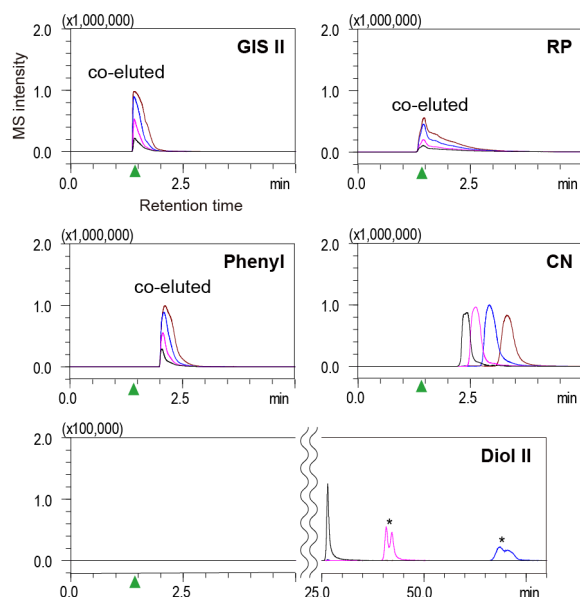
図2 異なるモディファイアを用いたT4の分析 (EIC,  $m/z$  1153.22)  
 (A)メタノール、(B)メタノール・水混合液 (95:5,  $v/v$ )、  
 (C)50 mmol/L 塩酸アンモニウムを含むメタノール・水混合液 (95:5,  $v/v$ )

表2 図2の分析条件

System	: Nexera™ UC
Column	: Shim-pack UC-GIS II/RP/Phenyl/CN/Diol II/ Amide (150 mm×4.6 mm I.D., 3 μm)
Temperature	: 35 °C
Injection volume	: 5 μL of 100 μmol/L oligonucleotide dissolved in methanol and water (95:5, $v/v$ )
Mobile phases	: A) CO <sub>2</sub> , B) modifier, A/B=20:80
Flow rate	: 1.0 mL/min
Back pressure	: 10 MPa, 50 °C
Detection	: MS (Table 1)

#### 3-2. 各固定相の分離能評価

保持を強めるためモディファイアを50%に下げて、PS含有量の異なるT4を分析しました (図3、表3)。低極性官能基が修飾されたGIS IIカラムやRPカラム、Phenylカラムでは全て共溶出しました。保持時間が短いですが、保持を強めるために更にモディファイア比を下げるとテーリングが顕著に見られたため、これらのカラムでは分離が困難であると判断しました。ピークが分離できたのはCN、Diol IIカラムで、特にDiol IIカラムでは全ての配列で完全分離することが可能でした。なおT4+3PSは80分以降に溶出しました (データ未掲載)。この結果からDiol IIカラムに保持特性が似たカラム<sup>3)</sup>を用意し、分離に有効な官能基を調べました。



Name	Sequence (5'-3')	$m/z$ , [M-H] <sup>-</sup>
■ T4	T <sub>o</sub> T <sub>o</sub> T <sub>o</sub> T <sub>o</sub>	1153.22
■ T4+1PS	T <sub>s</sub> T <sub>o</sub> T <sub>o</sub> T <sub>o</sub>	1169.20
■ T4+2PS	T <sub>s</sub> T <sub>s</sub> T <sub>o</sub> T <sub>o</sub>	1185.18
■ T4+3PS	T <sub>s</sub> T <sub>s</sub> T <sub>s</sub> T <sub>o</sub>	1201.15

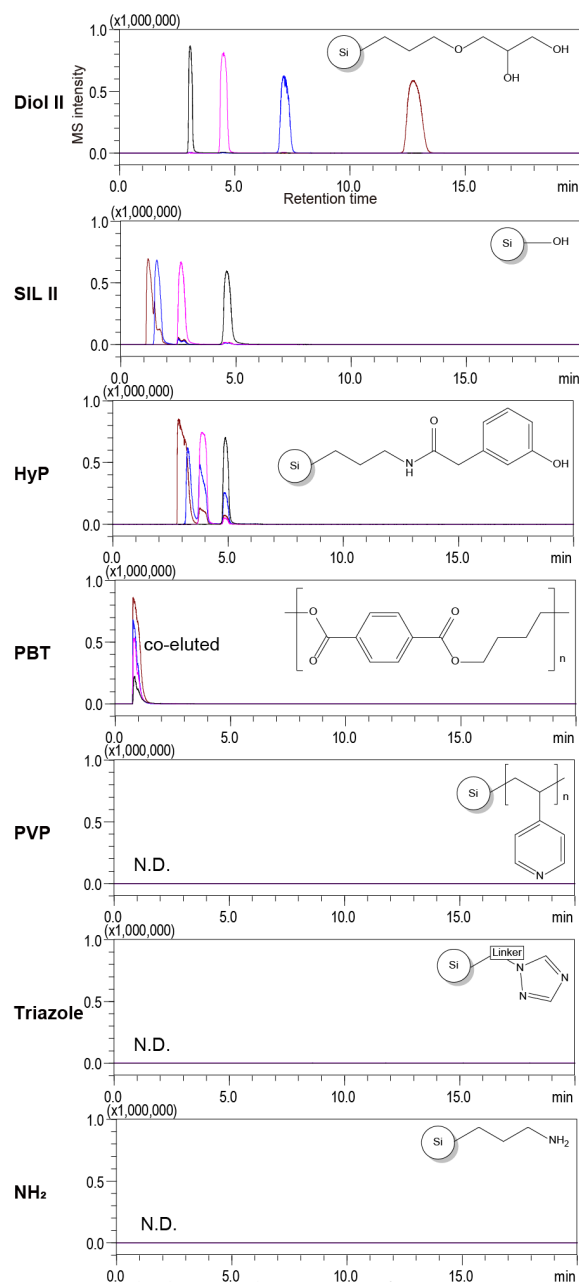
Thymidine (T), PO linkage (o), PS linkage (s), PS diastereomers (\*), hold-up time (▲)

図3 PS含有量の異なるT4混合液の分析 (EIC重ね書き)

表3 図3の分析条件

System	: Nexera UC
Column	: Shim-pack UC-GIS II, RP, Phenyl, CN, Diol II (150 mm×4.6 mm I.D., 3 μm)
Temperature	: 35 °C
Injection volume	: 5 μL of 100 μmol/L oligonucleotide dissolved in methanol and water (95:5, $v/v$ )
Mobile phases	: A) CO <sub>2</sub> , B) 50 mmol/L ammonium formate in methanol and water (95:5, $v/v$ ), A/B=50:50
Flow rate	: 1.0 ml/min
Back pressure	: 10 MPa, 50 °C
Detection	: MS (Table 1)

Diol IIカラムに似た保持特性を持つカラム7本を用いて、PS含有量の異なるT4を分析しました(図4、表4)。Diol II、SIL II、HyPカラムによって分離、又は部分的に分離しました。PBTカラムはオリゴ核酸を保持せず、PVP、Triazole、NH<sub>2</sub>カラムは全ての配列が一定時間内に溶出しませんでした。分離したカラムは全てヒドロキシ基を持つことから、ヒドロキシ基がPS含有量の差異を分離するのに重要であることが示されました。最も良好な分離だったのはDiol IIカラムでした。Diol IIカラムではPS含量が増えるに従い保持時間が長くなりました(図4-Diol II)。一般的にジオールカラムは親水性相互作用に基づいた保持挙動を示すと言われていいます。PO結合はPS結合より高極性なことから全てPO結合の配列が強く保持されるはずですが、逆の溶出順でした。このことからDiol IIIはPS結合に特殊な選択性を持つことが示されました。以上の結果よりDiol IIカラムを分離カラムとして選択しました。



Name	Sequence (5'-3')	m/z, [M-H]
■ T4	T <sub>o</sub> T <sub>o</sub> T <sub>o</sub> T	1153.22
■ T4+1PS	T <sub>s</sub> T <sub>o</sub> T <sub>o</sub> T	1169.20
■ T4+2PS	T <sub>s</sub> T <sub>o</sub> T <sub>s</sub> T	1185.18
■ T4+3PS	T <sub>s</sub> T <sub>s</sub> T <sub>s</sub> T	1201.15

Thymidine (T), PO linkage (o), PS linkage (s), hold-up time (▲)

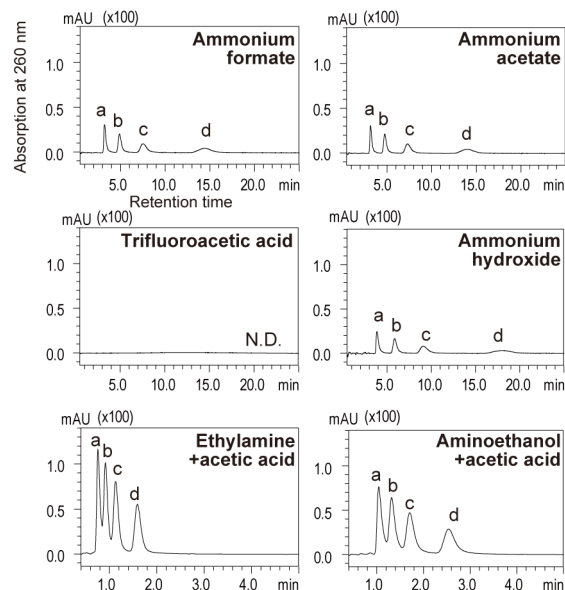
図4 PS含有量の異なるT4混合液の分析 (EIC重ね書き)

表4 図4の分析条件

System	: Nexera UC
Column	: Shim-pack UC-Diol II, SIL II, HyP, Triazole and NH <sub>2</sub> (150 mm × 2.1 mm I.D., 3 μm) Shim-pack UC-PBT and PVP (150 mm × 3.0 mm I.D., 3 μm)
Temperature	: 35 °C
Injection volume	: 5 μL
Mobile phases	: A) CO <sub>2</sub> , B) 50 mmol/L ammonium formate in methanol and water (95:5, v/v) A/B=50:50
Flow rate	: 1.0 ml/min
Detection	: MS (Table 1)

### 3-3. 高極性配列へ適用可能なモディファイア条件の検討

チミン塩基は核酸塩基の中でも極性が低く、SFCで分析しやすい傾向があります。そこでT4より高極性かつ複雑な配列(5'-TAGC-3')に適用したところ顕著なピークテーリングが見られたため、モディファイアの添加剤を検討しました(図5、表5)。酢酸アンモニウム、水酸化アンモニウムを用いましたが、ピークのテーリングに改善は見られず、トリフルオロ酢酸を添加した場合はオリゴ核酸が溶出されずピークが検出されませんでした。そこで逆相LCで用いられるイオンペア剤に着目し、エチルアミンやアミノエタノールを用いたところピーク形状が改善しました。これはオリゴ核酸のりん酸部でイオンペアを形成し、分子の極性が低下したため移動相への親和性が向上したからと考えられます。この結果から、高極性配列にSFCを適用するにあたり、イオンペア剤が有効であることが分かりました。



Peak	Name	Sequence (5'-3')
a	TAGC	T <sub>o</sub> A <sub>o</sub> G <sub>o</sub> C
b	TAGC+1PS	T <sub>s</sub> A <sub>o</sub> G <sub>o</sub> C
c	TAGC+2PS	T <sub>s</sub> A <sub>s</sub> G <sub>o</sub> C
d	TAGC+3PS	T <sub>s</sub> A <sub>s</sub> G <sub>s</sub> C

Thymidine (T), deoxyadenosine (A), deoxyguanosine (G), deoxycytidine (C), PO linkage (o), PS linkage (s)

図5 PS含有量の異なるTAGC混合液の分析 (EIC重ね書き)

表5 図5の分析条件

System	: Nexera UC
Column	: Shim-pack UC-Diol II (100 mm × 2.0 mm I.D., 3 μm)
Temperature	: 35 °C
Injection volume	: 1 μL
Mobile phases	: A) CO <sub>2</sub> , B) 50 mmol/L or 0.1% (v/v) additive in methanol and water (95:5, v/v), A/B=50:50
Flow rate	: 1.5 ml/min
Detection	: 260 nm (PDA coupled to a high-pressure cell)

### 3-4. 異なる配列への適用

T4とTAGCでピーク形状が大きく変化したため、塩基配列の異なる計14配列のオリゴ核酸（全てPO結合）について分析し、そのピーク形状を比較しました（図6、表6）。なおモディファイア塩濃度を比較した結果から、最も分離、ピーク形状が良好だった40 mMを採用しました<sup>1)</sup>。

G、Cが2塩基以下の配列では良好なピーク形状であることが分かりました（図6-A、B）。G、CはA、Tと比べ極性が高いことから配列の極性がピーク形状に影響していると考え、配列の分子構造から計算したオクタノール/水分配係数 ( $\log P$ ) とピークの理論段数をプロットしました。結果、正に相関、つまり低極性の配列ほどシャープなピークになることが分かりました（図6-C）。

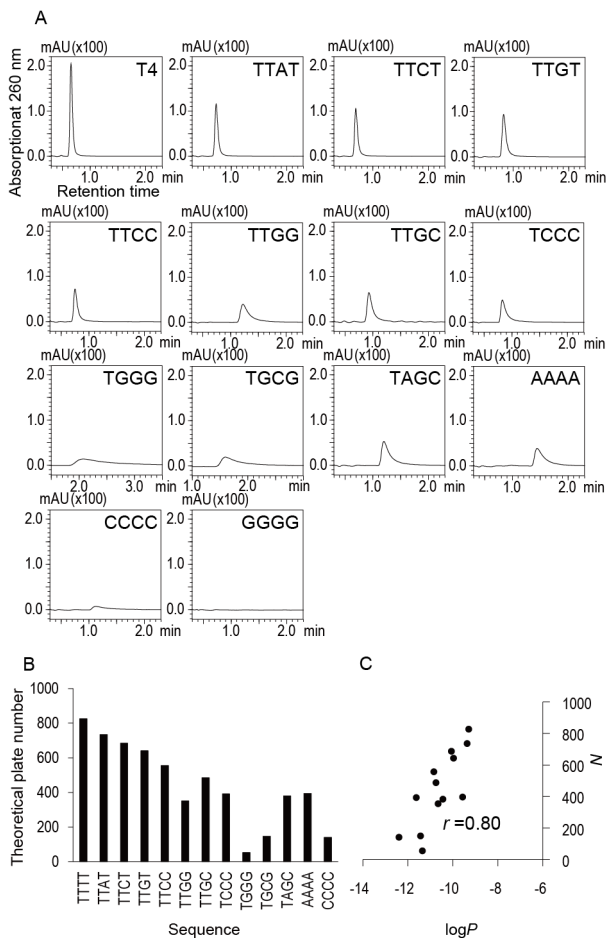


図6 14配列のクロマトグラム (A)、各ピークの理論段数 (B) と理論段数対 $\log P$ のプロット (C)

表6 図6の分析条件

System	: Nexera UC
Column	: Shim-pack UC-Diol II (100 mm × 2.0 mm I.D., 3 μm)
Temperature	: 35 °C
Injection volume	: 5 μL
Mobile phases	: A) CO <sub>2</sub> B) 40 mmol/L aminoethanol + 40 mmol/L acetic acid in methanol and water (95:5, v/v), A/B=50:50
Flow rate	: 1.5 ml/min
Detection	: 260 nm (PDA coupled to a high-pressure cell)

NexeraおよびShim-pack、LCMS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：2024年9月

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」、「®」を明記していない場合があります。

また図4でDiol IIカラムではPS修飾に対して特殊な保持挙動を示すことが分かりました。そこで14配列の保持時間から塩基に対する保持挙動を考察し、りん酸部に対する保持挙動と比較することにしました。14配列の保持時間に対して極性表面積<sup>\*1</sup>をプロットしたところ（図7-A）、高い正の相関が見られ、その相関係数は $\log P$ や分子量とプロットしたときのものより高い値でした。これはジオールカラムのヒドロキシ基とオリゴ核酸の極性基の親水性相互作用に起因すると考えられます。一方PS含有量の異なるT4についても同様にその保持時間と極性表面積をプロットしたところ（図7-B）、負の相関が見られました。塩基に対する保持挙動と逆の傾向が見られたことから、りん酸部に対して特殊な保持挙動を示すことが分かりました。

\*1 極性表面積は極性を帯びている分子表面面積を指します。

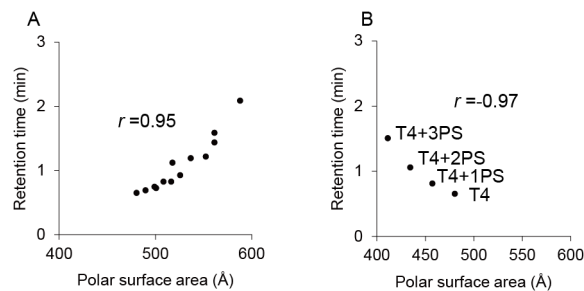


図7 14配列 (A) とPS含有量の異なるT4 (B) の保持時間対極性表面積プロット

### 4. まとめ

オリゴ核酸分析におけるSFCの適用可能性を評価するため、PS含有量の異なる4-merオリゴ核酸をモデル化合物として分離法を開発し、その基本的な保持特性を調べました。まずオリゴ核酸を溶出可能な条件を調べたところ、50 mmol/L 酸アンモニウムを含む、メタノールと水の混合液を用いることでカラムから溶出し、ピークが検出できることが分かりました。この条件を用いて12本のカラムでPS含有量の異なるT4を分析したところ、Diol IIカラムで良好な分離が得られることが分かりました。この手法をより極性の高い配列に適用するためにモディファイア条件を再度検討し、アミノエタノールを添加することでピーク形状を改善できることを見出しました。開発した分析手法を14配列のオリゴ核酸に適用したところ、G、Cが4塩基中2塩基以下の配列は本分析法が適用可能なることが分かりました。また14配列では極性が高い配列ほど保持が強い一方、PS含有量の異なるオリゴ核酸については極性が高い配列ほど保持が弱いことが分かり、本分析法ではPS修飾に対して特殊な保持挙動を示すことが明らかになりました。

### 5. 謝辞

ご指導頂いた大阪大学大学院薬学研究所 小比賀聡教授、山口卓男講師に厚く御礼申し上げます。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す。

<参考文献>

- 1) M. Hayashida *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **2023**, 464333
- 2) J. Molineau *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2021**, 193, 113736
- 3) Q. Gros *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **2021**, 1639, 461923