

LC/TOF-MS による、 オリゴ核酸の不純物スクリーニング



Authors

林 明生

飯室 龍之介

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

天然型オリゴヌクレオチド及び化学修飾型オリゴヌクレオチドを骨格とする核酸医薬は、その高い特異性と化学合成できる特徴により、癌や遺伝子疾患、ウィルス感染に対する次世代の医薬品として注目されています。核酸医薬品は低分子医薬品と異なり、分子量が数千～数万と大きいため、LC/MS で分析するためには測定マスレンジが広く質量分解能の高い TOF 型の装置が使用されます。また、オリゴヌクレオチドの合成は近年では固相合成法の発展により迅速で簡便に行えるようになりましたが、液相合成法とは異なり途中で精製を行う事が出来ないため、最終製品中の不純物の分析を高スループットで行うニーズが存在します。

本アプリケーションノートでは鎖長の異なるオリゴ核酸の混合物をイオンペア逆相 HPLC で分離、TOF-MS で検出し、OligoSearch ソフトウェア(Agilent)を用いて全長配列情報から不純物のリストを作成してスクリーニングを行いました。MassHunter ソフトウェア(Agilent)に実装された Find by Formula 機能と OligoSearch ソフトウェアを組み合わせる事で、全長配列から予想される不純物の分析を高レベルに自動化する事が可能となりました。

Key words: オリゴ核酸、OligoSearch ソフトウェア、LC/TOF-MS

システム

Agilent 1260 InfinityII HPLCシステム

- 1260 Infinity II バイナリポンプ (G7112B)
- 1260 Infinity II バイアルサンプラ (G7129A)
- 1260 Infinity II カラムコンパートメント (G7130A)
- 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7115A)

Agilent 6230 Accurate-Mass TOF (G6230BA)
Agilent MassHunter workstation B07.00

MassHunter BioConfirm B07.00
OligoSearch ver.903.08 (Agilent)

表 1. HPLC のパラメーター

カラム	AdvanceBio Oligonucleotide, 2.1*50 mm, 2.7 μm (Parts#: 659750-702)
移動相A	400 mM HFIP / 16 mM TEA
移動相B	200 mM HFIP / 8 mM TEA / 50% メタノール
流速	0.6 ml/min
グラジエント	t(min): 0 5 7 %B: 40 70 70
カラム温度	65 °C
注入量	1 μl
UV検出波長	260 nm

表 2. MS のパラメーター

イオン源	Agilent Dual JetStream ESI
極性	Negative
乾燥ガス	300 °C, 10 l/min
シースガス	350 °C, 12 l/min
ネブライザーガス圧力	60 psi
キャピラリー電圧	4000 V
ノズル電圧	1000 V
フラグメンター電圧	200 V
m/z 測定レンジ	500-3200
スペクトル取込速度	2.5 spectra/sec

試料の調整と配列情報

Oligonucleotide Resolution Standard (Parts#. 5190-9028)、
Oligonucleotide Ladder Standard (Parts#. 5190-9029) を
それぞれMilli-Qで2 nmol/mlに調製して分析に使用しまし
た。また、配列は下記の通りでした。(表 3,4参照)

表 3. Oligonucleotide Resolution Standard の配列と
分子量

鎖長	配列	平均分子量 (Da)
14 mer	rCrArCrUrGrArArUrArCrCrArU	4398.0
17 mer	rUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArU	5338.6
20 mer	rUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArU	6278.9
21 mer	rGrUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArU	6624.4

表 4. Oligonucleotide Ladder Standard の配列と
分子量

鎖長	配列	平均分子量 (Da)
15 mer	TTTT TTTT TTTT	4500.6
20 mer	TTTT TTTT TTTT TTTT	6020.6
25 mer	TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT	7542.3
30 mer	TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT	9062.8
35 mer	TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT	10584.0
40 mer	TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT	12106.6

結果

MaxEntropyデコンボリューションによる分子量確認
Oligonucleotide Resolution Standardを分析した結果を図
1.に示します。トータルイオンクロマトグラム(TIC)とUV
クロマトグラムを並べると、14 merから21 merまで良好
に分離出来ました。17 merを例にし、得られた多価イオン
スペクトルに対してMaxEntropyデコンボリューションを
行い、分子量の確認を行ったところ平均分子量と一致する
結果が得られました。(図 2,3.参照)

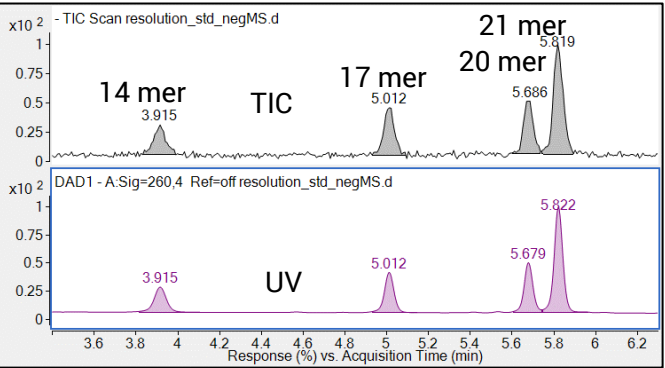


図 1. Oligonucleotide Resolution Standard の TIC
及び UV クロマトグラム

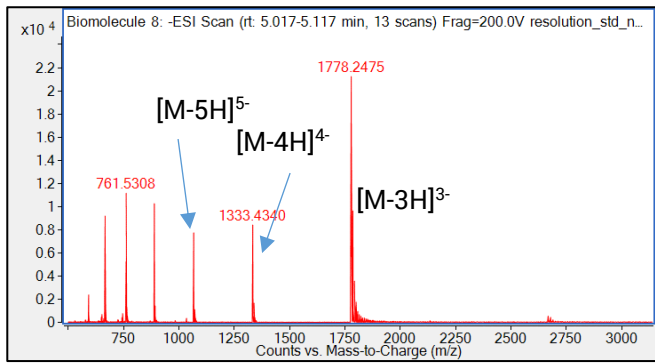


図 2. 17 mer の MS スペクトル

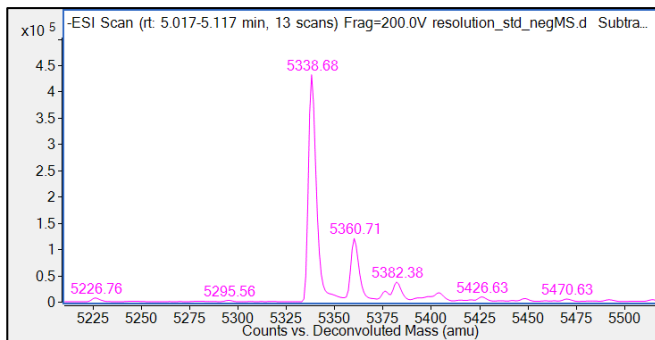


図 3. 17 mer のデコンボリューションスペクトル

核酸医薬品不純物の分析ワークフロー

合成されたオリゴ核酸の不純物を分析するワークフローを下記に示します。OligoSearchソフトウェアはユーザーが入力した全長配列に対して修飾や欠損の選択を行い(図 4. 参照)、選択された修飾や脱離によって生じる組成差を反映した.csvデータベースを出力します。この際に選択する修飾・置換のリストや、非天然型ヌクレオシドもユーザーで編集する事が可能となっており、核酸分解酵素に対して耐性を持たせるためのホスホロチオエート結合も登録する事が可能です。(図 5.参照)

出力された.csvファイルはMassHunterソフトウェアで行う、Find by Formula機能によるスクリーニングの際の参照データベースとなります。.csvファイルには、配列と修飾や欠損による名前の他に組成式が記述されており、Find by Formula機能は、.csvファイルに記述された組成式を基に同位体イオン強度によるMSスペクトルマッチングや抽出イオンクロマトグラムの表示・積分を行います。

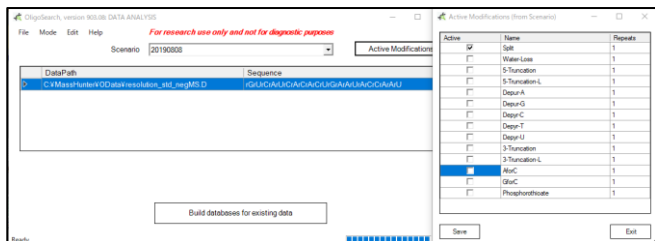


図 4. OligoSearch ソフトウェアの全長配列入力と修飾・置換の設定

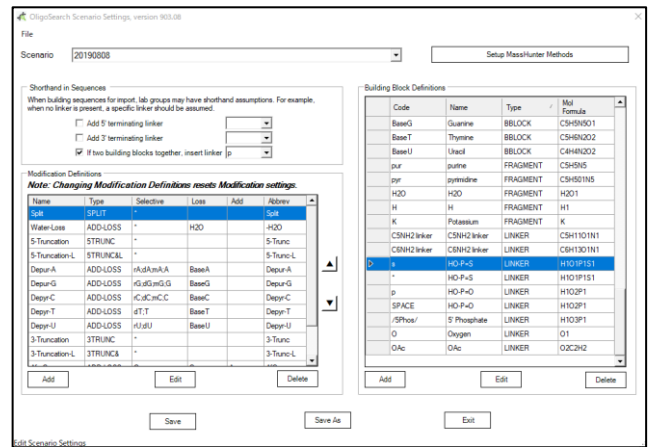


図 5. OligoSearch ソフトウェアにおける修飾・置換、非天然型ヌクレオシドの編集

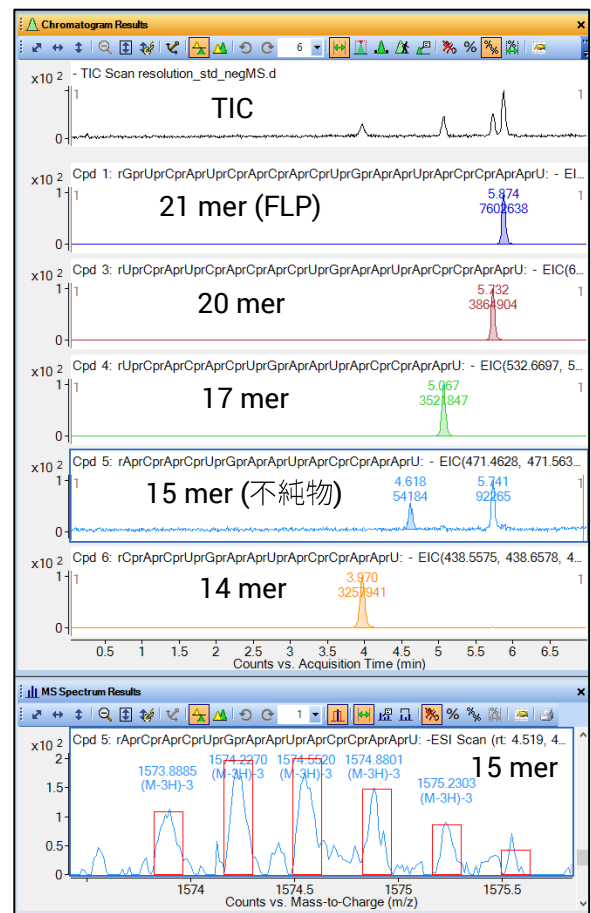


図 6. Find by Formula 機能による、全長配列(FLP)からの欠損体のスクリーニング結果

Oligonucleotide Resolution Standardの分析データに対し、OligoSearchによって出力された.csvデータベースを基にスクリーニングを行った結果を図 6.に示します。表 3.の配列情報より、14 mer, 17 mer, 20 merはいずれも21 merの欠損体である事がわかりますが、その他に15 merが不純物として検出されました。15 merと考えられるシグナルは抽出イオンクロマトグラムの結果よりRT 4.58 minに溶出していることから、イオン化の過程でFLPより脱離して生じたのではなくサンプル中に存在した、と考えられます。Find by Formula機能は、多価イオンスペクトル上に15 merの同位体イオン強度の理論的パターンを重ね書き表示するため、得られた結果のレビューを行う事が可能です。

表 5. Oligonucleotide Ladder Standard に対するスクリーニングで検出された化合物

RT	Mass	Formula	Name	Notes	Diff (Tgt. ppm)	Score	Flag Severity (Tgt)
1.033	3586.5867	C120 H157 N24 O82 P11	12 mer	ladder_std_negMS(3'-Split:56)	-2.78	93.06	Pass
1.466	3890.6361	C130 H170 N26 O89 P12	13 mer	ladder_std_negMS(3'-Split:54)	-1.7	90.42	Pass
2.081	4194.6755	C140 H183 N28 O96 P13	14 mer	ladder_std_negMS(3'-Split:52)	-3.15	89.27	Pass
2.588	4498.7232	C150 H196 N30 O103 P14	15 mer	ladder_std_negMS(3'-Split:50)	-2.57	95.99	Pass
3.686	6018.9511	C200 H261 N40 O138 P19	20 mer	ladder_std_negMS(3'-Split:40)	-2.31	96.59	Pass
4.176	7539.1747	C250 H326 N50 O173 P24	25 mer	ladder_std_negMS(3'-Split:30)	-2.72	96.91	Pass
4.434	8755.3499	C290 H378 N58 O201 P28	29 mer	ladder_std_negMS(3'-Split:22)	-3.36	83.54	Pass
4.484	9059.3959	C300 H391 N60 O208 P29	30 mer	ladder_std_negMS(3'-Split:20)	-3.25	90.1	Pass
4.7	10579.6157	C350 H456 N70 O243 P34	35 mer	ladder_std_negMS(3'-Split:10)	-3.76	87.3	Pass
4.858	12099.836	C400 H521 N80 O278 P39	40 mer	ladder_std_negMS	-4.11	86.42	Pass

次に、Oligonucleotide Ladder Standardに対しても同様に FLP (表 4.より40 mer) の情報からOligoSearchソフトウェアを使用し、欠損体の.csvデータベースを出力し、スクリーニングを実行しました。検出された化合物を表 5.に示します。この標準試料に含まれているオリゴ核酸は15, 20, 25, 30, 35, 40 merですが、スクリーニングの結果、それ以外に12, 13, 14, 29 merが不純物として検出されました。表 5. にまとめられた検出化合物の抽出イオンクロマトグラムを図 7. に示します。イオンペア逆相HPLCでの分離なので、オリゴ核酸は鎖長が短くなるに従って保持時間が小さくなります。

また、25 merのMSスペクトルを図 8.に示します。TOF型の質量分析計は四重極型の装置に比べ、 m/z 分解能が高いため10個イオンの同位体シグナルも分離する事が可能です。OligoSearchソフトウェアによる不純物のリストの出力と、MassHunterソフトウェアに搭載されたFind by Formula機能の組み合わせにより、ユーザーは全長配列情報の入力からオリゴ核酸の不純物スクリーニングを容易な操作で実行する事が出来る様になりました。

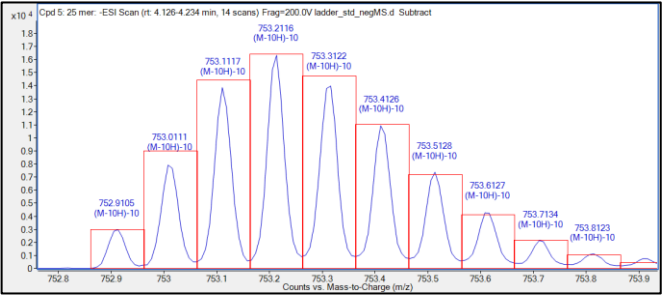


図 8. 25 mer の 10 個イオンスペクトル

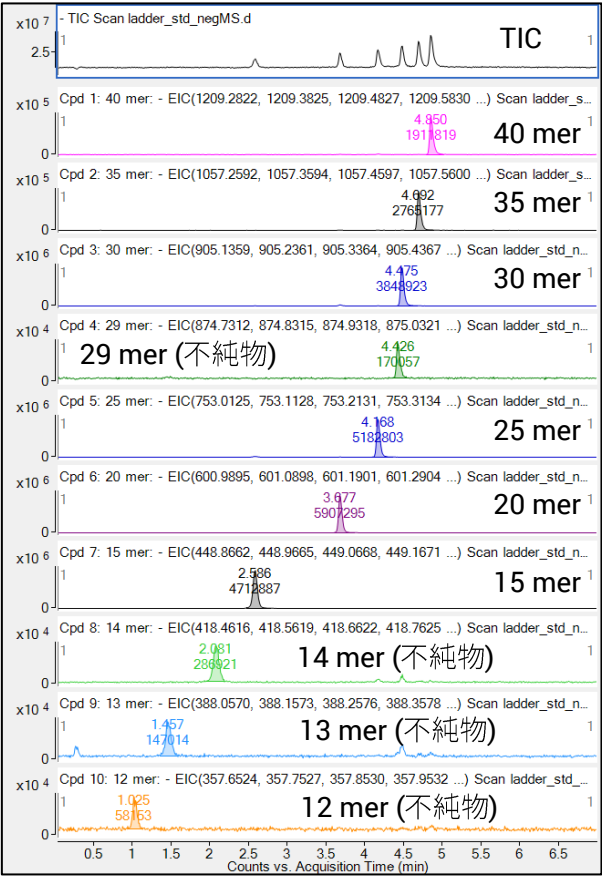


図 7. Oligonucleotide Ladder Standard から検出された化合物の抽出イオンクロマトグラム

ホームページ
www.agilent.com/chem/jp
カスタムコンタクトセンタ
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。