

Agilent Pro iQ Plus での イオンペア代替メソッドを使用した オリゴヌクレオチドの分析



著者

Lee Bertram and Brian Rivera
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent InfinityLab Pro iQ Plus LC/MS システムを使用した、合成オリゴヌクレオチドの中〜高スループットの分子確認のための実用的な手法を紹介します。従来のイオンペア逆相 LC/MS メソッドは、多くの場合に、専用の機器、毒物、高価な試薬が必要になります。これに対し、ここで説明しているメソッドでは、十分なクロマトグラフ保持と MS 感度を維持しつつ、イオンペアリング剤が不要な、重碳酸アンモニウムベースの手法を使用しています。Agilent OpenLab CDS MS スペクトルデコンボリューションはデータ分析ワークフローを容易化し、最小限の最適化により自動化処理を実現します。この手法は、アンチセンスオリゴヌクレオチドや siRNA など、幅広いオリゴヌクレオチドの種類に対して堅牢な LC/MS 性能を提供します。

はじめに

オリゴヌクレオチドは、mRNA のサイレンシングや劣化により、遺伝子発現を標的として調整する新しい治療法です。mRNA ターゲットを同定したら、薬物動態¹と親和性を向上させ、的外れな効果と不一致を最小限に抑えるために、² アンチセンス配列を戦略的に取り入れた化学修飾により最適化する必要があります。

イオンペア逆相 LC/MS は、ターゲットオリゴ配列の分子量を確認し、適切な合成を確保するためによく使用されています。しかし、イオンペアリング剤としてアルキルアミンを使用するには、多くの場合に専用の機器が必要になります。さらに、最適なクロマトグラフィーによる分離と MS 感度を得るために、毒物のほか、HFIP（ヘキサフルオロイソプロパノール）など、コストのかかるペルフルオロアルコールが必要です。

このアプリケーションでは、代替的な逆相アプローチを使用して、オリゴヌクレオチドの分子確認を行いました。このメソッドでは、イオンペアリングの代わりに重炭酸アンモニウムを使用したものの、十分なクロマトグラフ保持と MS 感度が得られました。メソッドの適用性と再現性を確保するために、3 種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドの 20 回の繰り返し注入、およびシングル siRNA の 5 回の繰り返し測定を実行しました。

実験方法

機器構成

この実験は、以下の機器構成を使用して実施しました。

- Agilent InfinityLab Pro iQ Plus LC/MS システム (G6170A)
- Agilent Infinity II 1290 bio バイナリポンプ (G7120A)
- Agilent Infinity II 1290 bio マルチサンプラ (G7167B)
- Agilent Infinity II 1290 bio カラムコンパートメント (G7116B)
- Agilent Infinity II 1260 ダイオードアレイ検出器 HS (G7117C)

この分析では Infinity II LC 構成を使用したものの、Infinity III LC システムでメソッドパラメータを変更することなく、同程度の結果を得ることができます。

サンプル調製

すべてのサンプルは脱イオン（DI）水で再懸濁して 50 μM の濃度にし、-80 °C で保管しました。サンプルをポリプロピレンバイアルに移して、分析の 2 日前まで温度制御を備えたオートサンプラで保管しました。表 1 にオリゴヌクレオチドサンプルシーケンスを示します。

表 1. オリゴヌクレオチドサンプルシーケンス

オリゴヌクレオチド名	長さ	配列
ASO-1	18	dU/MOErC//MOErA//MOErC/dUdUdU/MOErC//MOErA/dU/MOErA//MOErA/dU/MOErG/CdU/MOErG/G
ASO-2	20	dU/MOErC/dUdU/MOErG/TT/MOErA//MOErC//MOErA//MOErT//MOErG//MOErA//MOErA//MOErA/dU/MOErC//MOErC//MOErC/C
Fomivirsen	21	G*C*G*T*T*T*G*C*T*C*T*T*C*T*T*T*G*C*G
Givosiran	22 S	mC*mA*mGmAmAmAfGmAfGmUfGmUfCmUfCmAmUmCmUmUmA/L96/
	23 AS	mU*mG*mGfUmCfUmUfUfCmUfCfAmCfAmGfAmGfUmAmGfA*fA*mU

コード	説明
/MOErA/	メトキシエトキシ A
/MOErC/	メトキシエトキシ C
/MOErT/	メトキシエトキシ T
/MOErG/	メトキシエトキシ G
dU	デオキシウリジン
fA	2-フルオロアデノシン
fC	2-フルオロシチジン
fG	2-フルオログアニジン
fU	2-フルオロウリジン
*	ホスホロチオエート結合
A	2'-デオキシリボースアデニン
C	2'-デオキシリボースシトシン
G	2'-デオキシリボースグアニン
T	2'-デオキシリボースチミン
mA	2'-O-メチル A
mC	2'-O-メチル C
mG	2'-O-メチル G
mU	2'-O-メチル U
rA	リボースアデニン
rC	リボースシトシン
rG	リボースグアニン
rU	リボースウラシル

LC/MS 分析

Pro iQ Plus システムのソースパラメータを表 2 に、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）のパラメータを表 3 に示します。

表 2. Agilent Pro iQ Plus システムのソースパラメータ

質量分析のパラメータ	
パラメータ	設定値
MS	Agilent Pro iQ Plus
イオン源	Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオン化 (AJS-ESI) ソース
乾燥ガス流量	13.0 L/min
ガス温度	300 °C
ネブライザ圧力	35 psi
キャピラリー電圧	3,000 V
シースガス温度	250 °C
シースガス流量	11 mL/min
ノズル電圧	1,500 V
モード	正
スキャン	m/z 700 ~ 2,800
スキャン時間	1,250 ms
フラグメンタ	180 V
ゲイン係数	5

表 3. 使用した HPLC パラメータ

パラメータ	設定値														
カラム	Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラム、 2.1 × 50 mm, 2.7 µm														
サンブラ温度	8 °C														
UV 検出	260/4 nm (リファレンス 360/20 nm) ピーク幅 > 0.1 分 (2.5 Hz)														
移動相 A	脱イオン水中 20 mM 重炭酸アンモニウム														
移動相 B	メタノール														
流量	0.7 mL/min														
注入量	2 µL														
マルチウォッシュ	20:80 水:メタノール、フラッシュポート、5 秒 90:10 水:メタノール、フラッシュポート、3 秒														
カラム温度	75 °C														
ポストタイム	1.0 分														
グラジエントプログラム	<table> <tr> <td>時間 (分)</td><td>%B</td></tr> <tr> <td>0</td><td>5</td></tr> <tr> <td>0.1</td><td>5</td></tr> <tr> <td>3.0</td><td>40</td></tr> <tr> <td>3.1</td><td>80</td></tr> <tr> <td>3.5</td><td>80</td></tr> <tr> <td>3.6</td><td>5</td></tr> </table>	時間 (分)	%B	0	5	0.1	5	3.0	40	3.1	80	3.5	80	3.6	5
時間 (分)	%B														
0	5														
0.1	5														
3.0	40														
3.1	80														
3.5	80														
3.6	5														

結果と考察

1997 年に確立された、酸性添加剤としてペルフルオロアルコールを含むアルキルアミンイオンペアは、オリゴヌクレオチドの LC/MS 分析のための推奨の移動相となっています。³ その理由は、特に対イオンとして酢酸塩を使用した移動相と比較した場合など、クロマトグラフィー性能とエレクトロスプレー効率によるものです。このパワフルなイオンペアリングシステムを使用し、広範な作業で幅広い実験計画スペースが実証されています。⁴

ただし、LC/MS メソッドのためにアルキルアミンと HFIP を使用した場合には問題があります。最初に、オリゴの修飾と配列はエレクトロスプレー脱着とクロマトグラフィーに影響を及ぼすため、緩衝液成分の最適化が必要です。⁵ 次に、アルキルアミンはイオンソースと LC システムを汚染する可能性があり、極性を切り替えてポジティブモードに戻した場合に、バックグラウンドピークの原因となります。したがって、LC コンポーネントとイオン源の表面の広範な洗浄/不活性化が必要になります。さらに、ラボによっては、LC/MS システムへのアルキルアミンの吸着により、システムをネガティブモード専用にする場合があります。最後に、アルキルアミンを含む移動相は、アルゴンガスの下で封止状態で維持しないと寿命を長く保てません。したがって、一貫性のあるメソッド性能を確保するために、移動相は新しく調製したものでなければなりません（時には 1 日ごとに調製）。

多数のオリゴを分析する、分子量確認ワークフローを手掛けるラボの場合、移動相条件の最適化が実行できないことがあります。さらに、機器メンテナンスと毎日の緩衝液の調製による LC/MS のダウンタイムは未処理サンプルの増加につながり、多くのラボにとって大きな問題となる可能性があります。より実用的なアプローチは、非イオンペア、逆相メソッドを使用することです。

最近の研究では、重炭酸アンモニウム (NH_4HCO_3) 緩衝液と、強溶媒としてメタノールを使用した、イオンペアに対するより実用的で高コスト効率な代替メソッドが実現されています。⁶ このメソッドは、移動相とグラジエントの最小限の最適化でも、十分な ESI 感度とクロマトグラフィー性能を提供するため、分子量確認のための有益な手法となります。さらに、この参照の作業は、二酸化炭素脱ガスが液滴成形を促進し、一方でアンモニアの蒸発がプロトンの付加に寄与することで、ポジティブモードの分析を実現するということを前提としています。そのため、システムをネガティブモード分析専用にする必要がありません。

オリゴヌクレオチドは極性であり、負電荷を帯びているため、イオンペアリングなしでは、これらの成分はクロマトグラフィーにより保持や分離がされないという懸念があるかもしれません。しかし、重炭酸アンモニウムベースのメソッドでは幅広いオリゴヌクレオチドを保持し、特にアンチセンスオリゴなどの修飾オリゴに良好に適合します (ASO、図 1)。ここで紹介するメソッドは、中〜高スループットの分析を対象とした概念実証となります。したがって、グラジエントは 3 分間にわたる 5 % ~ 40 % 移動相 B です。この比較的「急激な」グラジエントは優れた保持能とピーク形状を提供し、0.7 mL/min の流量はスペクトルの品質や感度に悪影響を及ぼしません。

複数のイオン化可能な官能基をもつほとんどの高分子と同じように、ESI-MS で分析した場合にオリゴは多価イオンとして観察されます。重要なのは、アルキルアミンイオンペアとソースパラメータに応じて、オリゴの電荷状態分布は変化する可能性があるという点です。⁷ これにより、より高い電荷状態が生じる傾向があり、加熱イオンソースで問題となる可能性があります。つまり、スペクトルのデコンボリューションは、アーチファクトと誤同定の可能性につながります。一方で、重炭酸アンモニウム (ABC) は、低い電荷状態のオリゴを生成する傾向があります (図 2)。より高い m/z 値では、マトリックス干渉、不純物、その他の成分によるスペクトル干渉が減少するため、デコンボリューションされたデータの信頼性が向上します。

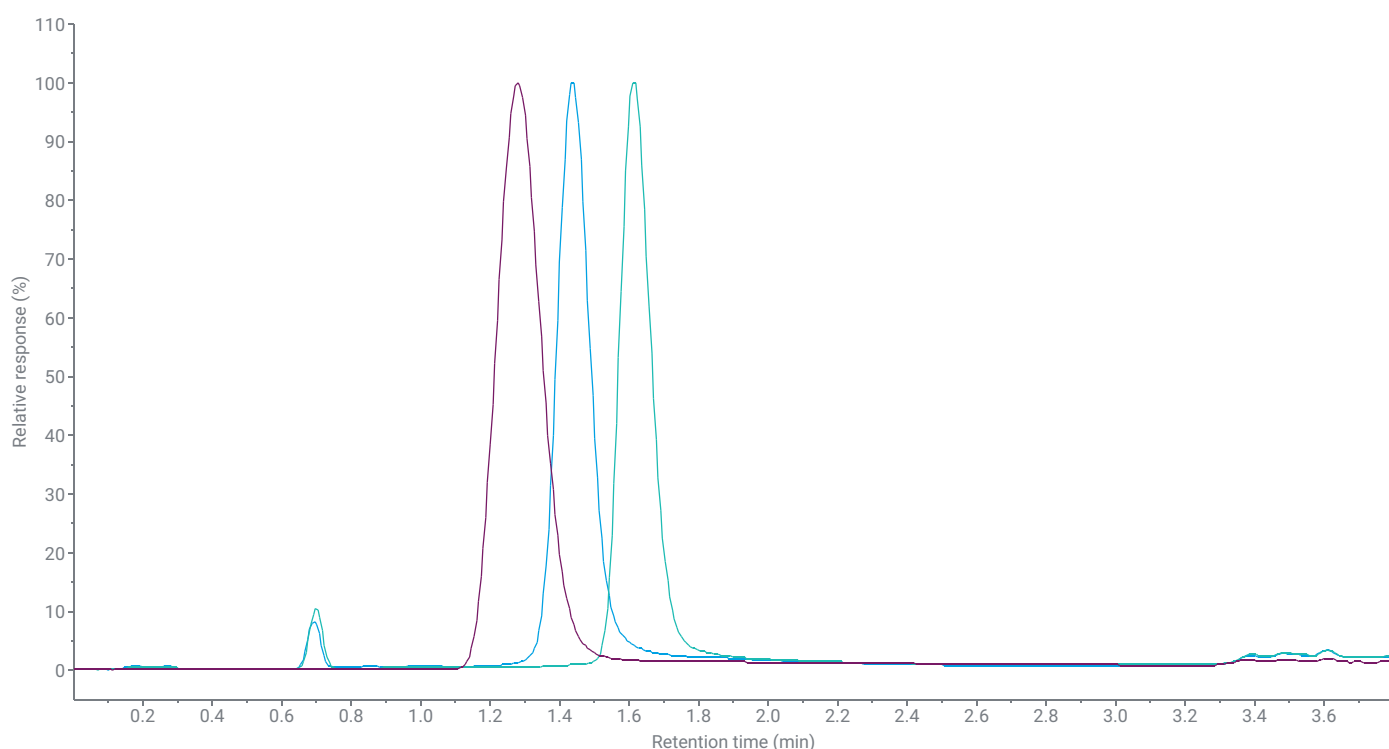


図 1. 3 種類のアンチセンスオリゴ (ASO) の UV クロマトグラム。Fomivirsen は 2'-修飾なしの 21mer の ASO です。したがって、2 つの短い、完全にチオール化された 2'-修飾型 ASO よりも早く溶出します。

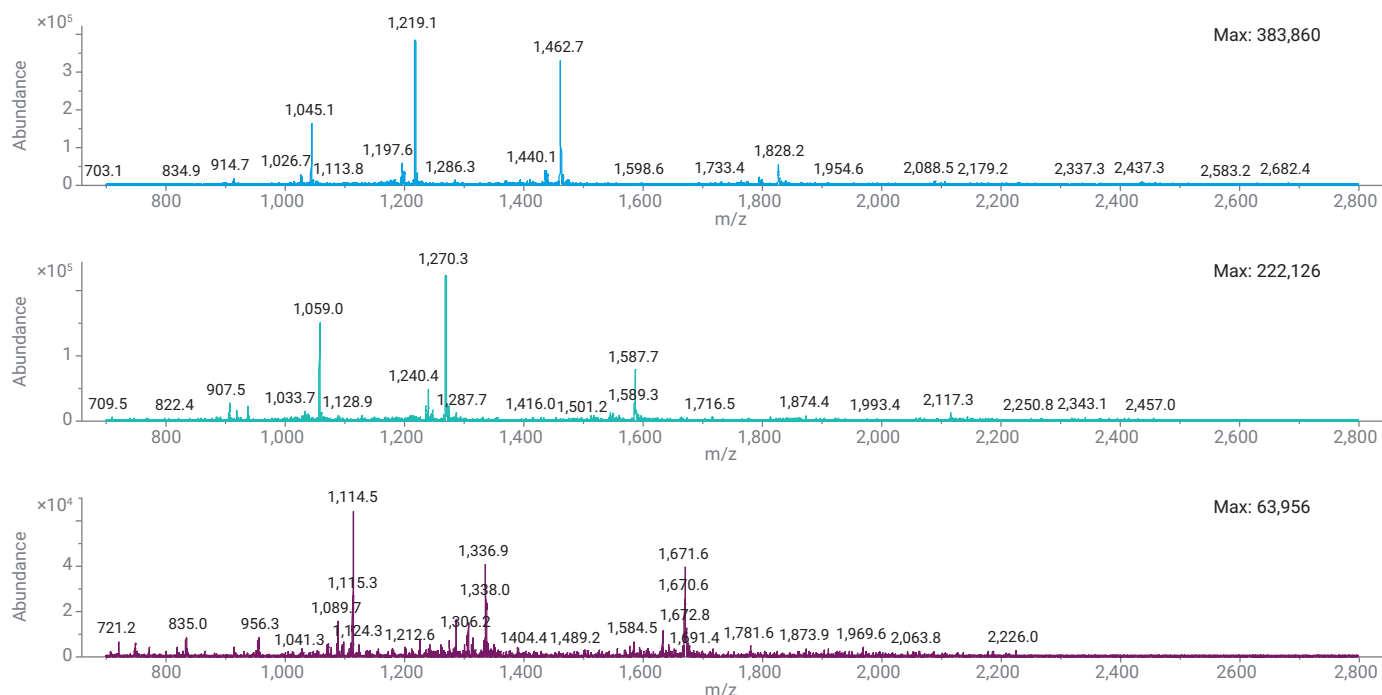


図 2. サンプルのフルスキャンスペクトル。4 ～ 6 の電荷状態は各 ASO で優勢です。

Agilent OpenLab CDS は、ユニット質量検出器に最適化された独自のスペクトルデコンボリューションを採用しています。最大エントロピーにより、ノイズを最小限に抑制しつつ主要な要素を増加させることで、スペクトルから最も可能性が高い質量を計算します。これに対し、OpenLab CDS スペクトルデコンボリューションでは、単純にスペクトルのイオンを同定し、ユーザーの入力に基づきそれらをターゲット質量に適合させます。次に、これら値を直線回帰またはセントロイドに適合させ、分子量の平均を計算します。このようなシンプルな手法により、最小限の最適化により完全に自動化可能な汎用処理メソッドを使用し、分子量確認を簡単に実行できます。各サンプルの 3 回の注入では、0.1 % 未満の相対標準偏差 (% RSD) で、ほぼ同じ結果が得られます。取り込みのためにサンプル配列で使用した自動デコンボリューション設定を表 4 に、デコンボリューション結果の概要を表 5 に示します。

表 4. MS スペクトル デコンボリューション設定

パラメータ	設定値
自動デコンボリューション設定	
自動デコンボリューションの実行	有効化
RT ウィンドウ	1 ～ 2.7 分
TIC ピークタイプ	すべてのピーク
TIC Top (n) ピーク	3
基本設定	
使用 m/z 範囲	無効
低/高分子量	3,000 ～ 10,000
最大電荷	10
セット中の最小ピーク	3
高度な設定	
MW の一致度 (0.01 %)	10
絶対ノイズスレッショールド	100
相対アバダンススレッショールド	10
MW アルゴリズム	曲線近似
MW アルゴリズムスレッショールド (%)	40
エンベロープスレッショールド (%)	50

図 3 に、デコンボリユートした ASO-1、18mer の 2'-MOE 修飾型ホスホロチオエートのスペクトルを示します。成分 A は全長生成物で、算出質量と良好な一致を示しています。成分 B は脱プリンであると考えられます（グアニンの損失）。成分 C はナトリウム付加体であると考えられます。ここで示されるように、単位質量精度にシンプルなデコンボリューションを組み合わせた InfinityLab Pro iQ Plus では、オリゴヌクレオチドをモニタリングし、予想外の不純物や成分を同定することが可能です。高分解能 MS により、さらなる特性解析を実行できます。

表 5. 各 ASO の 20 回の繰り返し測定でのデコンボリューション結果

オリゴヌクレオチド名	算出質量 (Da)	平均測定質量 (Da)	デルタ質量 (Da)
ASO-1	6,348.3	6,347.9	-0.4
ASO-2	7,309.2	7,308.8	-0.4
Fomivirsen	6,682.4	6,681.8	-0.6

また、このメソッドの幅広い適合性を実証するために、2 本鎖、3 本鎖 GalNAc-結合 siRNA (Givosiran) も分析しました。二重鎖結合では、LC/MS パラメータを若干調整する必要がありました。具体的には、グラジエントプログラムを少し調整し（3 分間で 5 % ~ 45 %）、センス鎖とアンチセンス鎖のベースライン分離を確保しました。さらに、フラグメンテーション電圧を 120 V にまで下げて、脆弱なオリゴ糖複合体のインソースフラグメンテーションを最小限に抑制しました。図 4 は Givosiran の 5 回注入の UV クロマトグラムを重ね表示したものです。

イオンペアを使用していないものの、ABC 移動相では、センス鎖とアンチセンス鎖のベースライン分離が実現されています（図 5）。スペクトル干渉はデコンボリューションにおける誤同定につながる可能性があるため、このような分離が必要です。図 5 にスペクトルを示します。前述の ASO に類似の電荷状態分布となっています。各ピークに対するデコンボリユートしたスペクトルの分析では、センス鎖よりも早く溶出しているアンチセンス鎖が示されています。興味深い点は、センス鎖が GalNAc の損失を示している可能性があるということです（図 6）。表 6 に Givosiran の結果の概要を示します。

表 6. Givosiran の各注入のデコンボリューション結果

オリゴヌクレオチド名	算出質量 (Da)	平均測定質量 (Da)	デルタ質量 (Da)
Givosiran、アンチセンス	7,563.8	7,563.1	0.7
Givosiran、センス	8,736.5	8,735.6	0.9

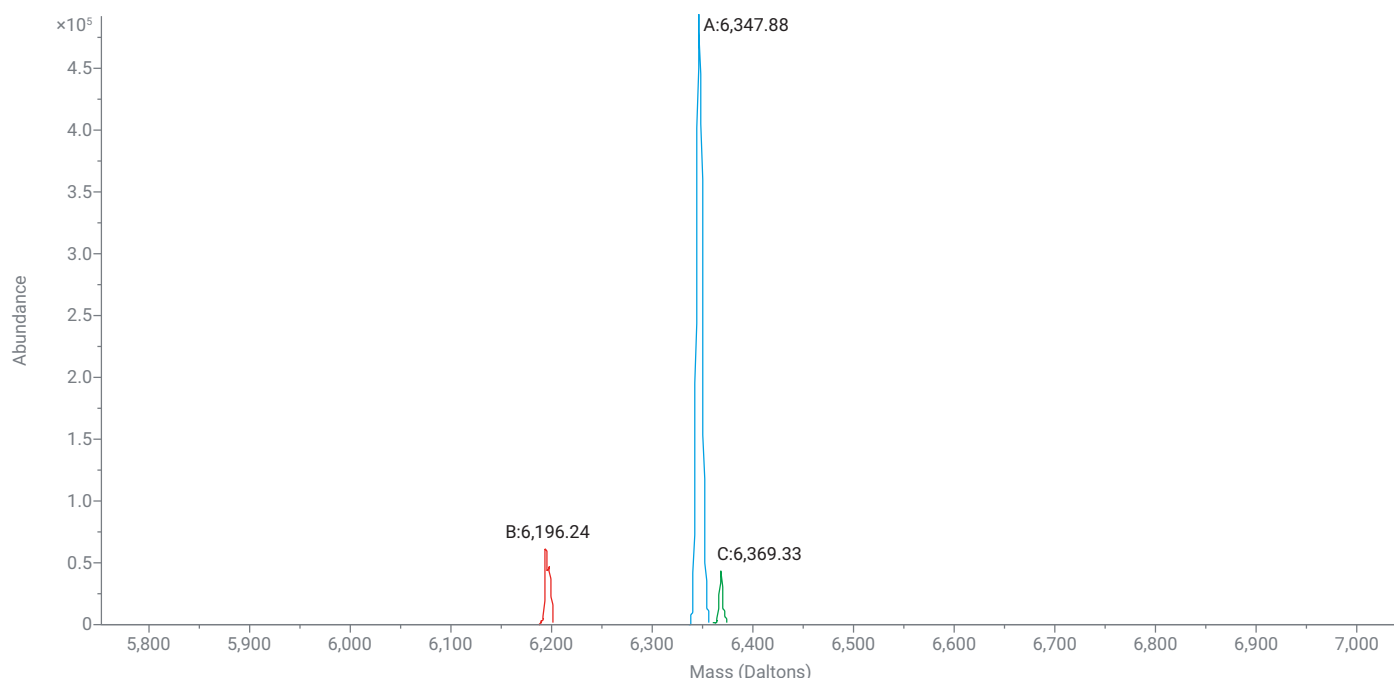


図 3. デコンボリユートした ASO-1 のスペクトル

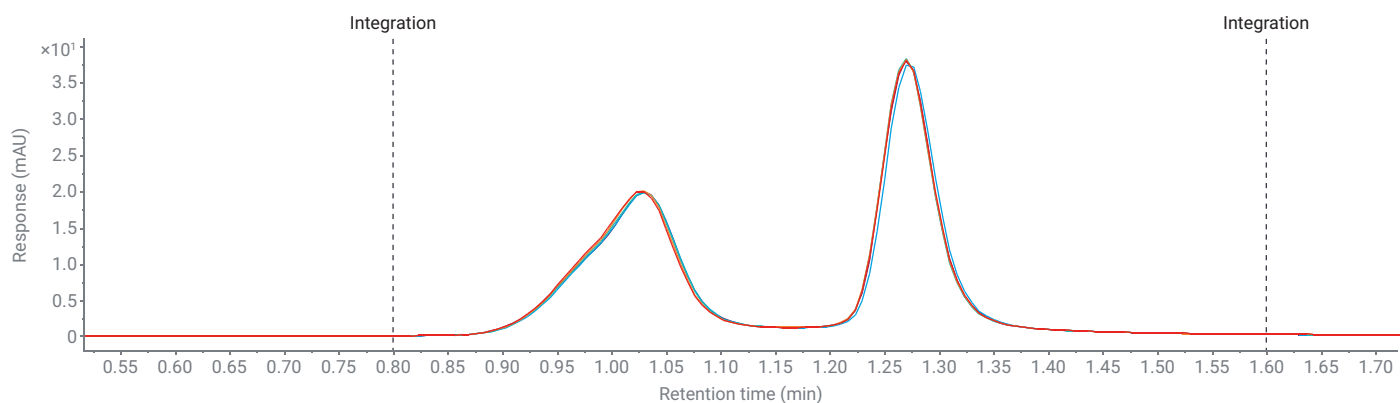


図 4. Givosiran の 5 回注入の UV クロマトグラムの重ね表示

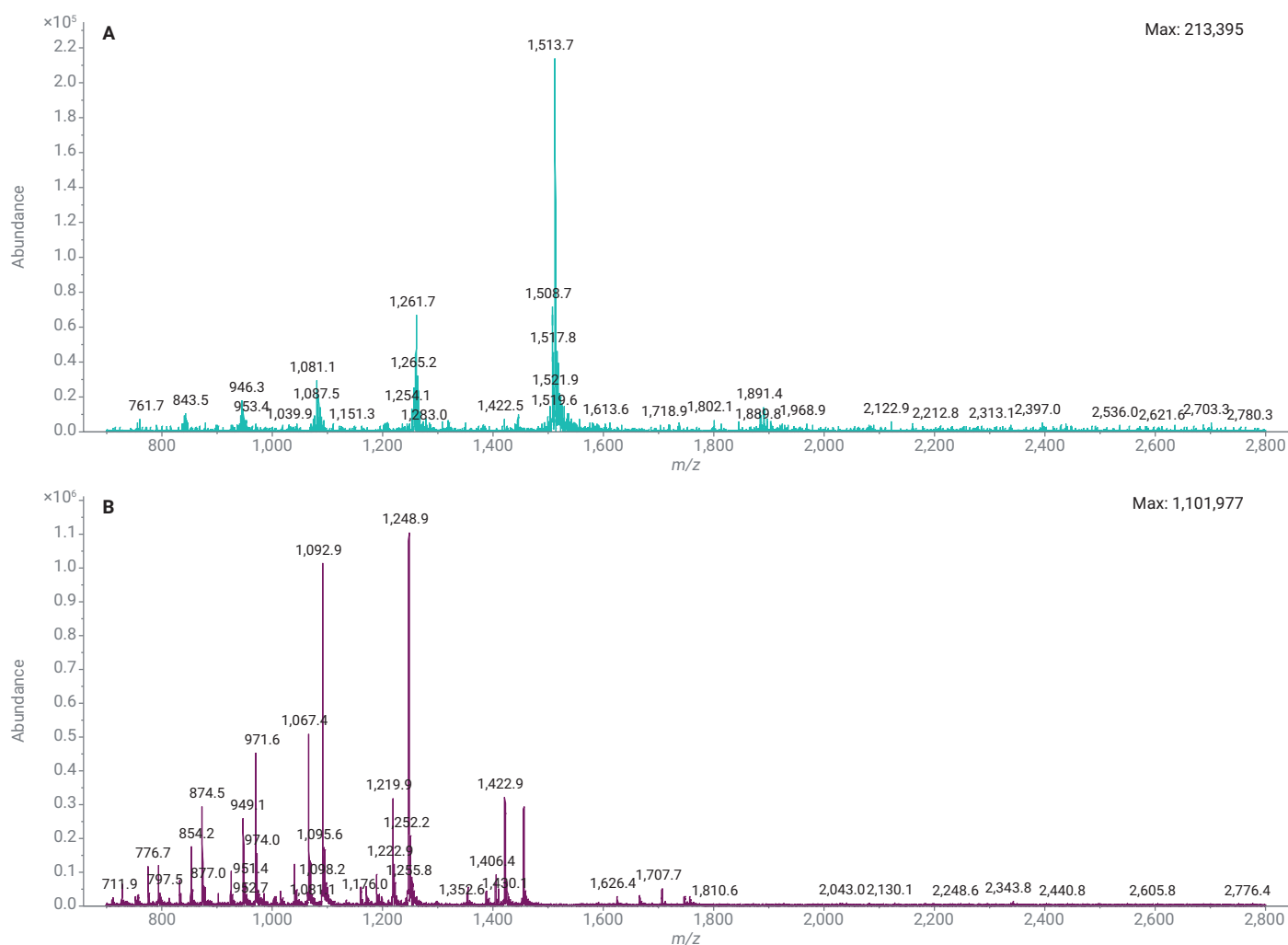


図 5. アンチセンス (A) およびセンス (B) RNA 鎖のスペクトル。電荷状態分布は、同様のメソッドにより分析したアンチセンスオリゴのものと類似しています。5- 電荷状態はアンチセンスで最もアバンダンスが高く、6- 電荷状態は GalNAc-結合センス鎖で最もアバンダンスが高くなっています。

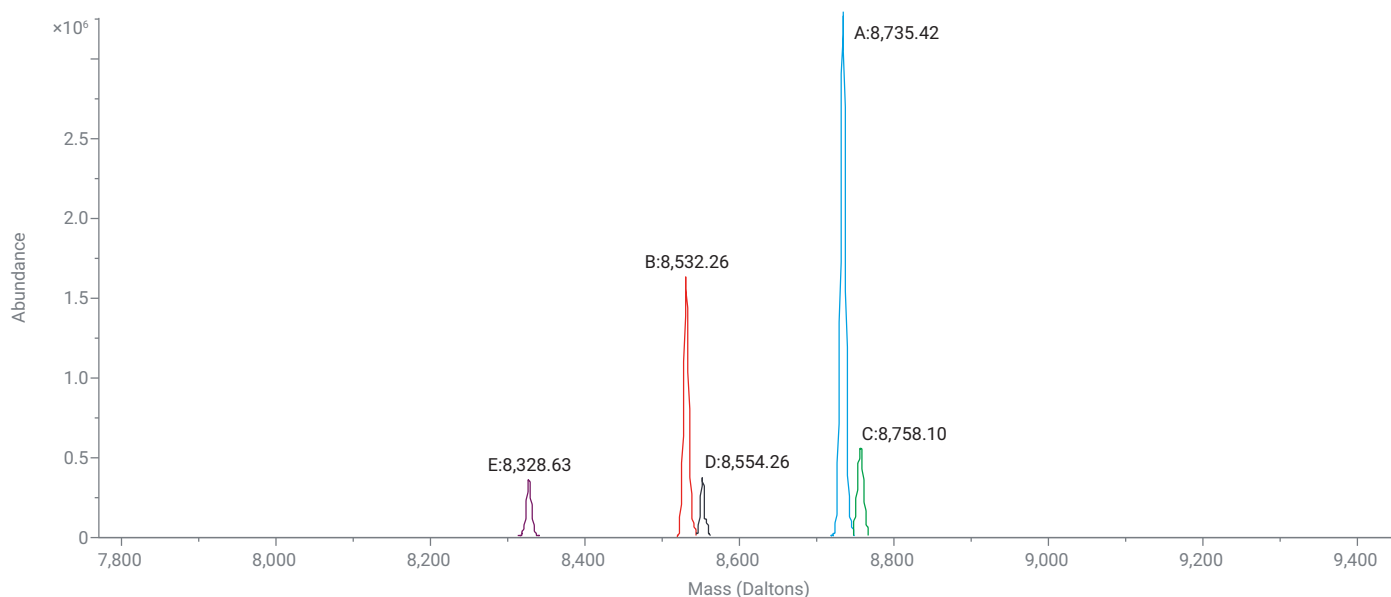


図 6. デコンボリュートした Givosiran センス鎖のスペクトル。観察された約 200 Da は GalNAc 損失の可能性があり得ます。

結論

このアプリケーションノートで説明したメソッドは、合成オリゴヌクレオチドの分子確認のための中〜高スループットに対する実用的なアプローチとなります。Agilent Pro iQ Plus は、多数のシングル四重極検出器の性能を超える高い m/z 範囲においても、ユニット質量検出器のために優れた分離能と感度を示します。このメソッドは、新しい重炭酸アンモニウム移動相を使用して、アンチセンスオリゴヌクレオチドや siRNAs を含む多数の種類のオリゴの分析を手掛けるラボを対象に、十分な LC/MS 性能を提供します。このアプリケーションノートで紹介された LC および MS の結果は再現可能です。最小限の最適化で無人処理メソッドによる自動化に対応する、Agilent OpenLab CDS MS スペクトルデコンボリューションを使用して、データ分析ワークフローを簡易化できます。

参考文献

1. Herkt, M.; Thum, T. Pharmacokinetics and Proceedings in Clinical Application of Nucleic Acid Therapeutics. *Mol. Ther.* **2021**, 29(2), 521–539. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.11.008.
2. Watts, J. K.; Corey, D. R. Silencing Disease Genes in the Laboratory and the Clinic. *J. Pathol.* **2012**, 226(2), 365–379. DOI: 10.1002/path.2993.
3. Apffel, A.; Chakel, J. A.; Fischer, S.; Lichtenwalter, K.; Hancock, W. S. Analysis of Oligonucleotides by HPLC–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1997**, 69(7), 1320–1325. DOI: 10.1021/ac960916h.
4. Guimaraes, G. J.; Bartlett, M. G. The Critical Role of Mobile Phase pH in the Performance of Oligonucleotide Ion-Pair Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Methods. *Future Sci. OA* **2021**, 7(10), FSO753. DOI: 10.2144/fsoa-2021-0084.
5. Basiri, B.; Murph, M. M.; Bartlett, M. G. Assessing the Interplay Between the Physicochemical Parameters of Ion-Pairing Reagents and the Analyte Sequence on the Electrospray Desorption Process for Oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, 28(8), 1647–1656. DOI: 10.1007/s13361-017-1671-6.
6. Hayashi, Y.; Sun, Y. Overcoming Challenges in Oligonucleotide Therapeutics Analysis: A Novel Nonion Pair Approach. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2024**, 35(9), 2034–2037. DOI: 10.1021/jasms.4c00270.
7. Chen, B.; Mason, S. F.; Bartlett, M. G. The Effect of Organic Modifiers on Electrospray Ionization Charge-State Distribution and Desorption Efficiency for Oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2013**, 24(2), 257–264. DOI: 10.1007/s13361-012-0509-5.

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。

DE-006128

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, May 6, 2025

5994-8337JAJP