アプリケーションノート

バイオ医薬品/医薬品

アジレントの高分解能 LC/（Q-）TOF 質量分析によるオリゴヌクレオチドおよびその不純物分析の統合型ワークフロー

ターゲットオリゴヌクレオチドおよびその不純物の分離、特性解析、相対定量

著者

David L. Wong and Peter Rye
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

オリゴヌクレオチド（低分子干渉 RNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマ、CRISPR ガイドなど）は近年、急速に広がりを見せるモダリティです。これらの候補物質の開発とともに、特性解析するための堅牢な分析メソッドと、使いやすいデータ解析ワークフローのニーズが高まっています。さらに、製品に関連する不純物の特性解析は、新しいバイオ医薬品の開発において重要なタスクです。一般的な不純物には、ホスホロチオエートからリン酸ジエステルへの変換、切断、伸長、脱塩基オリゴヌクレオチドなどがあります。[1,2]

多くの場合に数が多く、アバンダンスが非常に低く、互いに関連して存在するターゲットオリゴヌクレオチドとその不純物の特性解析には、LC/MS 分析などの高度な分析メソッドが不可欠です。したがって、このようなプロファイルの作業を支援し自動化するソフトウェアが非常に有用となります。

これらの障害を克服するために、アジレントは、ターゲットとその不純物の同定のための Find-by-Formula（FBF）および最大エントロピーアルゴリズムに対応した、自動化された新しい Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア、バージョン 12.0 を開発しました。図 2 に Target Plus Impurities（TPI）データ解析ワークフローの詳細を示します。

実験方法

試薬と実験方法

トリエチルアミン（TEA）と 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール（HFIP）は Sigma-Aldrich（セントルイス、ミズーリ州、米国）から購入しました。メタノール（InfinityLab Ultrapure LC/MS グレード、部品番号 5191-4497）はアジレント・テクノロジーで用意しました。

オリゴヌクレオチド（DNA）ラダー標準（部品番号 5190-9029）、オリゴヌクレオチド（RNA）分解能標準（部品番号 5190-9028）、RNA 標準（100-mer）はすべてアジレントで用意しました。

A 21-mer（CAG TCG ATT GTA CTG TAC TTA）および 40-mer（CCA CGA CCA AGT GAC AGC AAT GAA TCG AGT CGA GAT CCA T）オリゴヌクレオチドは、標準の脱塩精製を含め、Integrated DNA Technologies, Inc.（コーラルビル、アイオワ州、米国）から購入しました。

サンプル前処理

- オリゴヌクレオチド（DNA）ラダー標準および（RNA）分解能標準はどちらも使用前に 1 mL 脱イオン（DI）水で溶解しました。最終濃度はどちらも 2 pmol/µL でした。
- 100-mer RNA 標準サンプルの濃度は 0.4 mg/mL でした。
- 21-mer および 40-mer オリゴヌクレオチドサンプルも、さらに精製することなく、1 mL の DI 水で溶解しました。次に、0.50 mg/mL 原液になるまでサンプルを希釈しました。

図 1. オリゴヌクレオチド分析の分析コンポーネント - Target Plus Impurities（TPI）ワークフロー

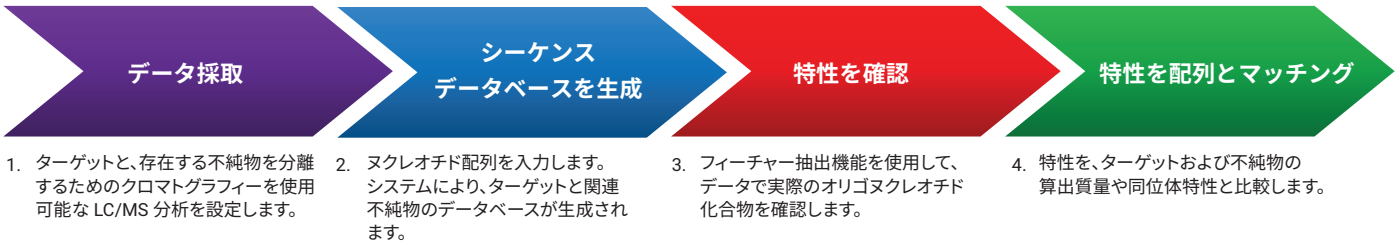

図 2. Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア（バージョン 12.0）の Target Plus Impurities（TPI）データ解析ワークフロー

装置構成

- Agilent 1290 Infinity II LC は以下の構成です。
  - Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ（G7120A）
  - Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ（G7167B）、Agilent Infinity II サンプル冷却システム（オプション #100）を搭載
  - Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116B）
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

LC/MS 分析

LC/MS 分析は、1290 Infinity II LC とデュアル Agilent Jet Stream イオン源搭載 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムを組み合わせて実施しました。コンプライアンス機能を有効にして、Agilent MassHunter Acquisition ワークステーションソフトウェア（バージョン 11.0）を使用しました。LC 分離には Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラム（2.1 × 50 mm、2.7 µm、部品番号 659750-702）を使用しました。

表 1 と表 2 に使用した LC/MS パラメータの詳細を示します。

データ処理

オリゴヌクレオチド標準試料と合成オリゴヌクレオチドサンプルの LC/MS データファイルはすべて、Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア（バージョン 12.0）を使用して処理しました。

表 1. 液体クロマトグラフィーのパラメータ

Agilent 1290 Infinity II LC	
カラム	AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 × 50 mm、2.7 µm（部品番号 659750-702）
サーモスタット	4 °C
溶媒 A	15 mM TEA および 400 mM HFIP 水溶液
溶媒 B	メタノール
グラジエント	0 ～ 1 分、10 % B 1 ～ 10 分、10 ～ 40 % B 10 ～ 11 分、40 ～ 95 % B
カラム温度	65 °C
流量	0.5 mL/min
注入量	5.0 µL

表 2. MS データ取り込みパラメータ

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システム	
パラメータ	**設定値**
イオン源	デュアル AJS
極性	ネガティブ
ガス温度	275 °C
ガス流量	12 L/min
ネブライザ	35 psi
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	12 L/min
VCap	3,500 V
ノズル電圧	2,000 V
フラグメンタ電圧	175 V
スキマ電圧	65 V
取り込みモード	HiRes（4 GHz）
質量範囲	300 ～ 3,200 *m/z*
取り込みレート	4 スペクトル/秒

結果と考察

オリゴヌクレオチドサンプルの包括的な特性解析は、困難で時間を要するプロセスとなる場合があります。ターゲットオリゴヌクレオチドをプロファイルするだけでなく、すべての関連不純物を同定し、相対定量を行う必要があるからです。

さまざまなオリゴヌクレオチド標準試料の HPLC 分離

調査を開始するために、優れたクロマトグラフィー分解能と高分解能精密質量（HRAM）検出により、LC/MS ベースのメソッドを最適化しました。図 3 に 2 種類のアジレントのオリゴヌクレオチド標準試料、DNA ラダー標準および RNA 分解能標準の LC/MS 分析を示します。イオンペア逆相クロマトグラフィーを使用して、優れたクロマトグラフィー分離が得られました。メインピークから不純物（小さいピーク）を分離し、検出することもできました。

合成オリゴヌクレオチドの LC/MS 分析

同じメソッドで高感度の質量分離 MS データが生成されました。図 4 に合成オリゴヌクレオチド（40-mer）サンプルの LC/MS 結果を示します。約 2.5 µg の サンプルをカラムに注入し、0.5 mL/min の流量で 11 分のグラジエントを使用しました。40-mer オリゴヌクレオチドの荷電状態の分布は、*m/z* 600 ～ 3,000（−5 ～ −19）の質量範囲でした。図 4B のインサートの拡大表示に、荷電状態が −13 のオリゴヌクレオチドに対する優れた MS 同位体分解能が示されています。

Q-TOF ソース条件を最適化し、質量誤差が低い（3.6 ppm）高品質の MS スペクトルが得られました（表 3）。さらに、低アバンダンスの切断種（約 12,000 Da）と伸長種（約 12,600 Da）が検出されました（図 4C）。

図 5 に示されているように、100-mer RNA 標準サンプルで同様に高品質の MS 結果が得られました。この場合も、優れた質量精度（9.96 ppm）が観察されました。

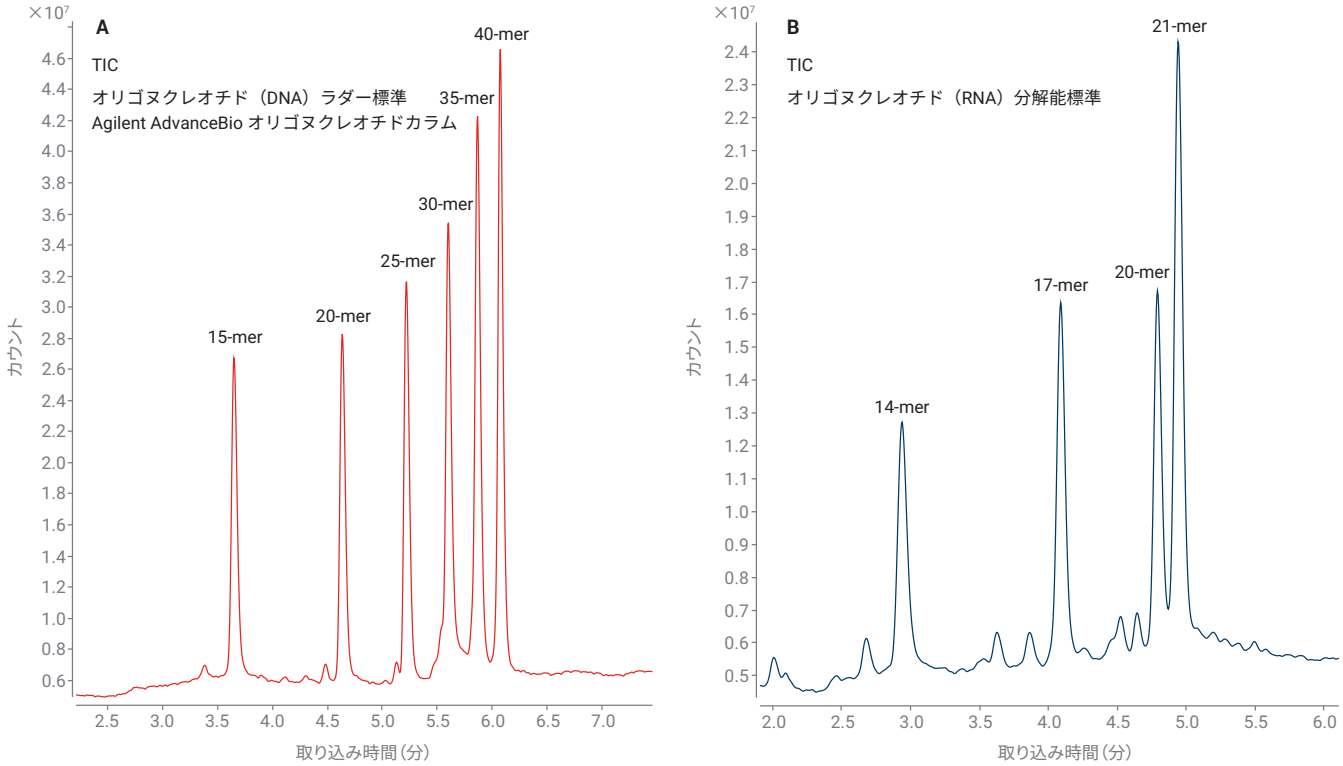

図 3. アジレントのオリゴヌクレオチドラダー標準（DNA）およびアジレントの分解能標準（RNA）の LC/MS 分析

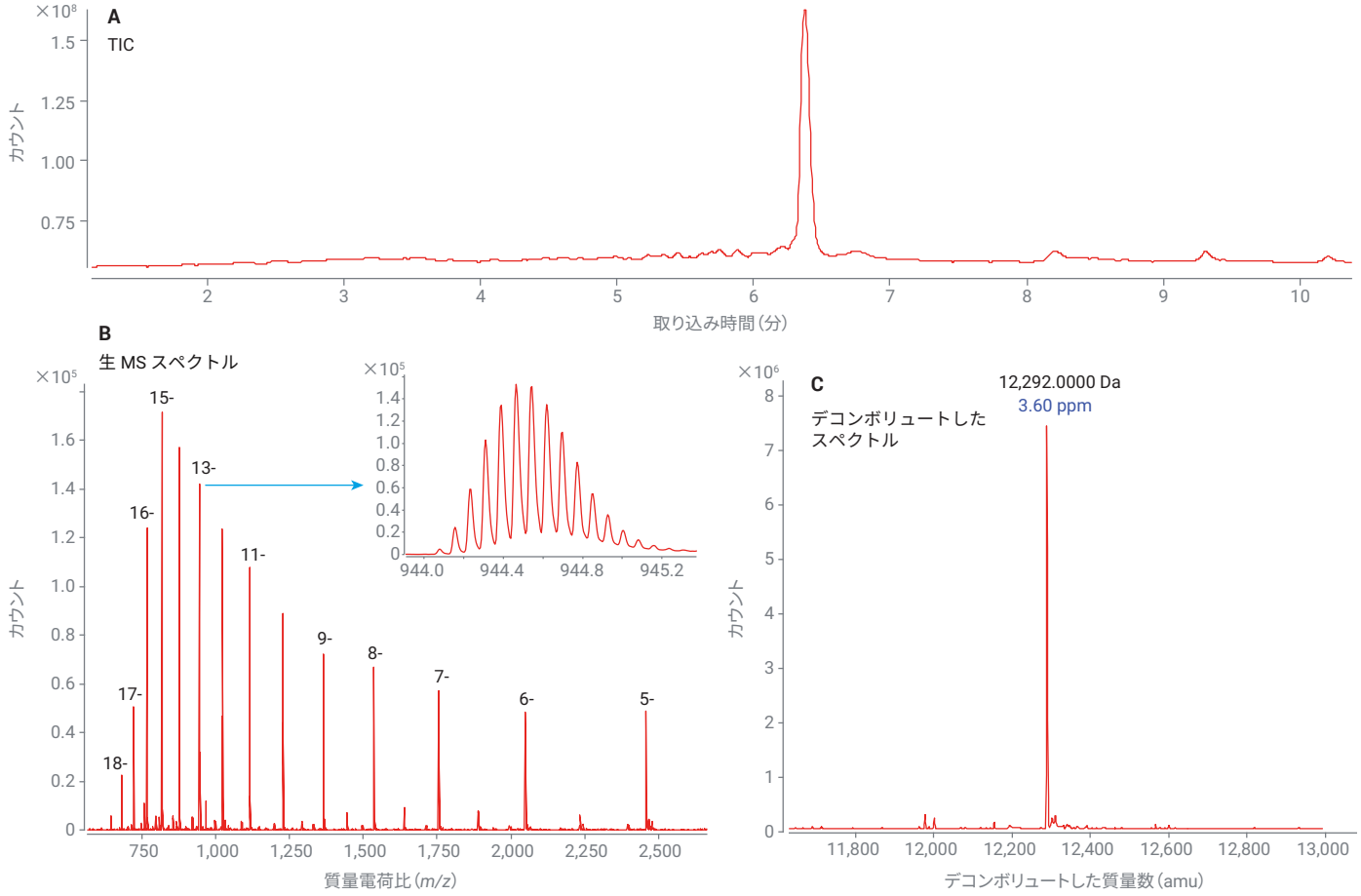

図 4. 合成オリゴヌクレオチド（40-mer）の LC/MS 分析。(A) 40-mer オリゴヌクレオチドのトータルイオンクロマトグラフィー（TIC）。(B) 40-mer の生 MS スペクトル。(C) デコンボリュートした 40-mer の MS スペクトル

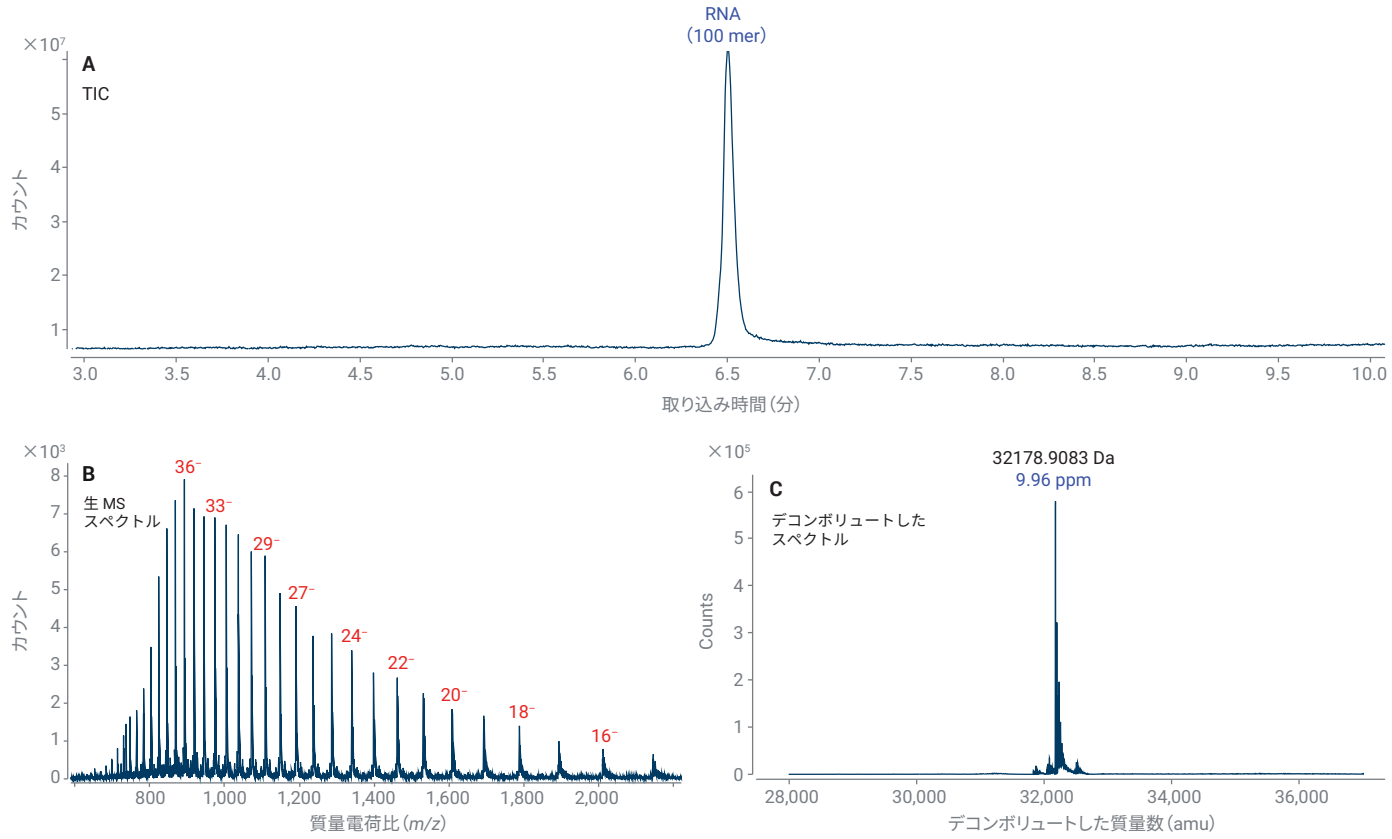

図 5. 合成オリゴヌクレオチド（RNA、100-mer）の LC/MS 分析

表 3. 分析されたオリゴヌクレオチドのリスト。緑色で表示された算出質量値は（FBF を用いてマッチングされた）モノアイソトピック質量、青色で表示された数字は（最大エントロピーデコンボリューションを用いてマッチングされた）平均質量です。全般的に、分析したすべてのオリゴヌクレオチドサンプルで優れた質量精度が得られました。

オリゴヌクレオチド	オリゴ長	シーケンス	算出質量（Da）	測定質量（Da）	質量精度（ppm）
オリゴヌクレオチド（DNA）ラダー標準	15	TTTTT TTTTT TTTTT	4,498.7348	4,498.7319	-0.64
	20	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	6,018.9650	6,018.9635	-0.25
	25	TTTTT TTTTT TTTTTTTTTT TTTTT	7,539.1952	7,539.1989	0.50
	30	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	9,063.8431	9,063.7988	-4.89
	35	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	10,584.8111	10,584.8065	-0.43
	40	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	12,105.7790	12,105.8295	4.17
オリゴヌクレオチド（RNA）分解能標準	14	rCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	4,395.6479	4,395.6429	-1.14
	17	rUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	5,335.7670	5,335.7623	-0.88
	20	rUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	6,275.8861	6,275.8800	-0.97
	21	rGrUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	6,620.9335	6,620.9263	-1.09
DNA-21	21	CAGTCGATTGTACTGTACTTA	6408.0961	6408.0952	-0.14
DNA-40	40	CCACGACCAAGTGACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT	12291.9558	12292.0000	3.60
RNA 標準（長鎖）	100	AACACCACCAUACAGUGCAGGUUUUAGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU	32178.5878	32178.9083	9.96

Target Plus Impurities（TPI）データ解析ワークフロー

優れた MS 結果を得ることが必要であると同時に、結果を解釈するための高性能なソフトウェアプログラムも不可欠です。アジレントは、存在する種の同定のための、Find-by-Formula および最大エントロピーアルゴリズムの両方に対応した、自動化された新しい MassHunter BioConfirm 12.0 ソフトウェアを開発しました。これらの Target Plus Impurities（TPI）ワークフローは、MS/MS データを使用した配列確認ワークフローとともに、BioConfirm 12.0 で作成されました。本アプリケーションノートでは TPI ワークフローのユニークな特徴について説明しています。シーケンスワークフローについては、別のアプリケーションノートで説明しています。

BioConfirm 12.0 の TPI ワークフローでは、オリゴヌクレオチド MS データを使用して、ターゲットオリゴヌクレオチドと関連不純物をプロファイル（つまり、同定および相対定量）します。図 6 に TPI ワークフローのユーザーインタフェースを示します。ユーザーは、データ処理のために、ターゲットオリゴ配列、潜在的な修飾、マッチングルール（5' または 3' 切断、欠失、または分割）を定義します。同定されたターゲットやそのオリゴヌクレオチド不純物など、詳細な結果を複数のウィンドウ/表フォーマットで表示できます。

TPI ワークフローの 2 つのオプション

TPI ワークフローでは、FBF（ターゲットアプローチ）または最大エントロピーデコンボリューション（ノンターゲットアプローチ）のいずれかを使用することができ、ワークフロートランジション質量機能によってそれぞれのサンプルに使用されるアルゴリズムが決定されます。FBF は、サンプルシーケンスの質量がワークフロートランジション質量によりも小さい場合に使用されます。最大エントロピーデコンボリューションは、サンプルシーケンスの質量がワークフロートランジション質量と同じ（または上回る）場合に使用されます。このユーザー定義の値は、MS 機器の分解能、ターゲットおよび不純物の質量、ノンターゲット分析に対するターゲット分析の優先度、質量精度の要件など、複数の要素によって通知されます。

表 3 に、測定質量および質量精度とともに、さまざまなインタクトオリゴヌクレオチドサンプルの LC/MS 分析の概要を示します。FBF アルゴリズムを使用し、30-mer よりも短い多数のオリゴヌクレオチド配列に対して ppm 以下の質量精度を達成できました。より大きなオリゴサンプルに対しては、最大エントロピーアルゴリズムにより、低 ppm レベルの質量誤差も達成されました。

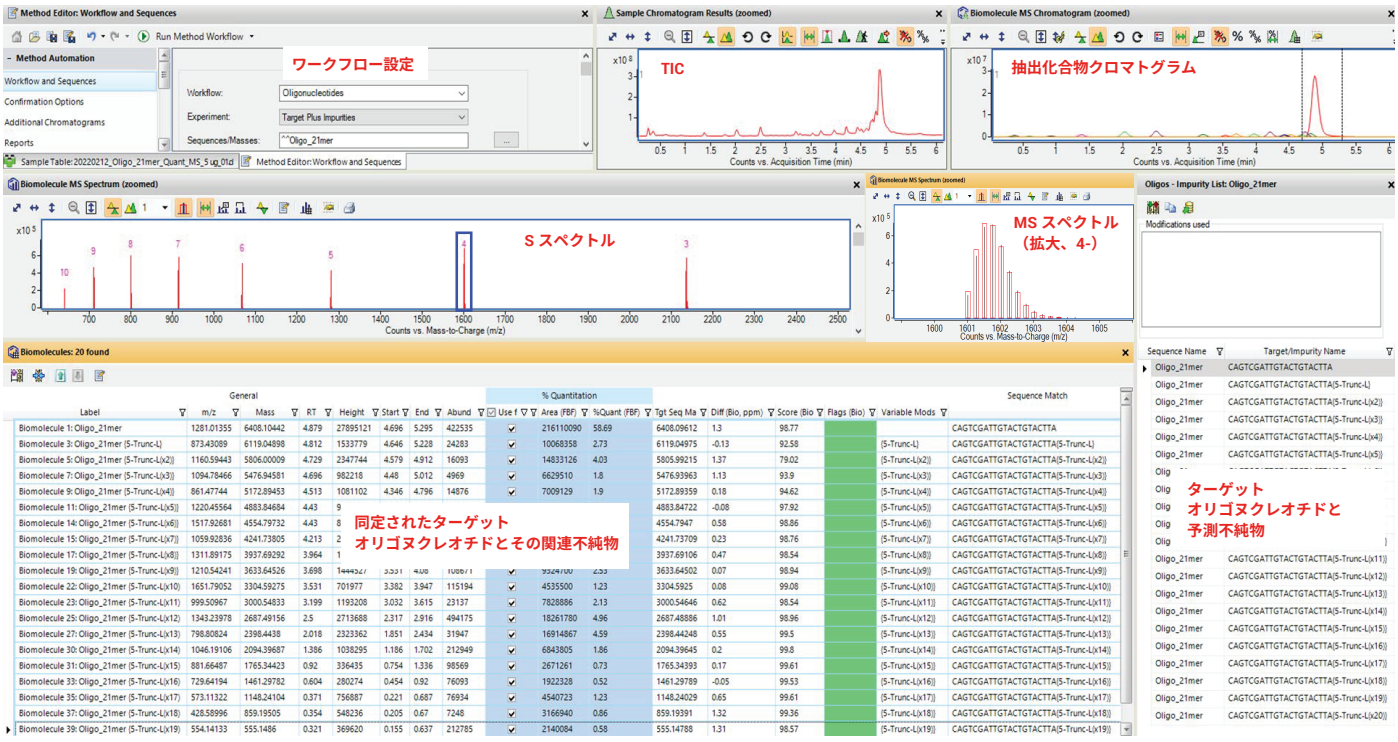

図 6. Target Plus Impurities（TPI）ワークフローを搭載した Agilent BioConfirm ソフトウェア、バージョン 12.0 の概要

オリゴヌクレオチド不純物分析

オリゴヌクレオチド不純物分析は、合成オリゴヌクレオチドの製品関連の不純物を特性解析するために、非常に重要なタスクです。オリゴヌクレオチド合成における不十分な化学結合効率により、切断、付加、脱塩基オリゴヌクレオチドなど、多数の種類の不純物が報告されています。[2]すべての製品関連の不純物の包括的なプロファイルを維持するにあたっては、分析上の課題があります。低濃度の不純物を検出するためには、クロマトグラフィーによる分離と優れた MS 感度が必要です。

この研究では、全長オリゴヌクレオチドターゲットとその不純物の特性解析のための高速 LC/MS メソッドを開発しました。図 7 に、FBF を使用して測定された 21-mer 合成オリゴヌクレオチドと一連の関連不純物の LC/MS プロファイルを示します。この 21-mer の 5' 切断不純物のほとんどは、11 分の短い LC グラジエントで良好に分離されました。実際のところ、これらの不純物とターゲットは、6 分以内に溶出されました（図 7A）。図 7B に示されているように、BioConfirm 12.0 Find-by-Formula アルゴリズムを使用したデータ解析により、正確なモノアイソトピック質量と、すべてのターゲット不純物の相対定量結果が得られました。最初の脱塩プロセスの後、この 21-mer 合成オリゴヌクレオチドサンプルはさらなる精製はされなかったため、ターゲットオリゴヌクレオチドの可能性のあるほとんどすべての 5' 切断不純物は、相対定量において、0.5 % 未満で同定されました。

表 4 に、デコンボリュートした優れた質量精度（ほとんどが ppm 以下のレベル）と、相対定量の再現性により、ターゲットとして検出された 19 のすべてのオリゴヌクレオチド不純物をまとめます。5' リンカー切断や 3' 切断（リンカーあり、またはリンカーなし）など、多数の他の種類のターゲット関連不純物も、非常に低いアバンダンスレベルで検出されました（データは示していません）。

40-mer オリゴヌクレオチドで一連の 5' 切断を同定するために、最大エントロピーデコンボリューションを使用しました。40-mer オリゴヌクレオチドサンプルのほとんどの 5' 切断不純物が同定されました。図 8 に上位 10 の不純物（および 40-mer ターゲット）を示します。表 5 には、最大エントロピー手法を用いた相対定量分析の詳細を示します。

FBF の結果と同様に、より大きなオリゴヌクレオチド分子（40-mer）に対して、高い質量精度と、正確な相対定量の結果が得られました。結果はまた、低濃度のオリゴヌクレオチド不純物の検出において優れた感度も示しています。40-mer オリゴヌクレオチドサンプルの上位 15 の不純物において、0.65 % もの低い相対定量が達成されています（表 5）。説明したように、多数の他の種類のターゲット関連不純物も非常に低いアバンダンスレベルで検出されました（データは示していません）。

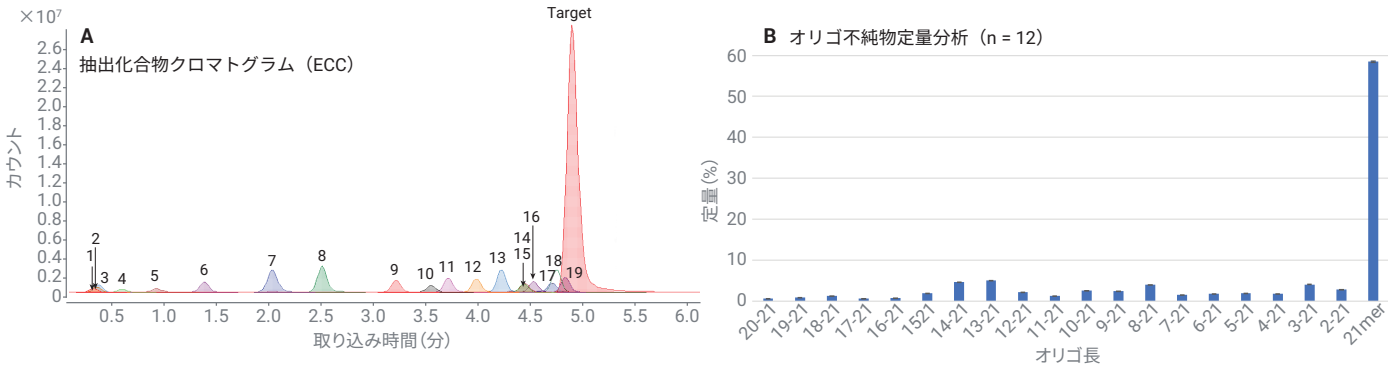

図 7. Agilent BioConfirm ソフトウェアの Find-by-Formula アルゴリズムによる、合成オリゴヌクレオチド（21-mer）およびターゲット不純物の相対定量分析。(A) 21-mer オリゴヌクレオチドとその不純物の、抽出化合物のクロマトグラフィー。(B) 21-mer オリゴヌクレオチド とその不純物の相対定量分析の結果。合計 12 のサンプル注入で、非常に低い RSD（3 % 未満）により優れた再現性が得られました。

表 4. 21-mer 合成オリゴヌクレオチドの 19 のオリゴヌクレオチド不純物の分析の概要（n = 12）

不純物ピーク	オリゴ長	RT（分）	算出モノアイソトピック質量	測定質量	平均質量精度（ppm）（n = 12）	平均 % 定量（n = 12）	標準偏差	RSD（%）	シーケンス
1	20 ～ 21	0.321	555.1479	555.1486	1.21	0.57	0.01	2.39	TpA
2	19 ～ 21	0.354	859.1939	859.1950	1.09	0.89	0.02	1.76	TpTpA
3	18 ～ 21	0.371	1148.2403	1148.2410	0.81	1.28	0.02	1.44	CpTpTpA
4	17 ～ 21	0.604	1461.2979	1461.2978	0.15	0.53	0.01	1.18	ApCpTpTpA
5	16 ～ 21	0.920	1765.3439	1765.3442	0.57	0.72	0.01	1.72	TpApCpTpTpA
6	15 ～ 21	1.386	2094.3964	2094.3969	0.65	1.86	0.01	0.66	GpTpApCpTpTpA
7	14 ～ 21	2.018	2398.4425	2398.4438	0.69	4.61	0.04	0.91	TpGpTpApCpTpTpA
8	13 ～ 21	2.500	2687.4889	2687.4916	0.73	4.98	0.04	0.72	CpTpGpTpApCpTpTpA
9	12 ～ 21	3.199	3000.5465	3000.5483	0.33	2.14	0.02	0.75	ApCpTpGpTpApCpTpTpA
10	11 ～ 21	3.531	3304.5925	3304.5928	0.04	1.23	0.01	1.05	TpApCpTpGpTpApCpTpTpA
11	10 ～ 21	3.698	3633.6450	3633.6453	0.21	2.55	0.02	0.93	GpTpApCpTpGpTpApCpTpTpA
12	9 ～ 21	3.964	3937.6911	3937.6929	0.15	2.45	0.02	0.76	TpGpTpApCpTpGpTpApCpTpTpA
13	8 ～ 21	4.213	4241.7371	4241.7380	0.47	3.97	0.03	0.70	TpTpGpTpApCpTpGpTpApCpTpTpA
14	7 ～ 21	4.430	4554.7947	4554.7973	0.33	1.49	0.01	0.97	ApTpTpGpTpApCpTpGpTpApCpTpTpA
15	6 ～ 21	4.430	4883.8472	4883.8468	-0.23	1.74	0.01	0.85	GpApTpTpGpTpApCpTpGpTpApCpTpTpA
16	5 ～ 21	4.513	5172.8936	5172.8945	0.05	1.91	0.02	0.80	CpGpApTpTpGpTpApCpTpGpTpApCpTpTpA
17	4 ～ 21	4.696	5476.9396	5476.9458	1.22	1.81	0.01	0.79	TpCpGpApTpTpGpTpApCpTpGpTpApCpTpTpA
18	3 ～ 21	4.729	5805.9921	5806.0001	1.51	4.04	0.04	0.99	GpTpCpGpApTpTpGpTpApCpTpGpTpApCpTpTpA
19	2 ～ 21	4.812	6119.0498	6119.0490	-0.32	2.75	0.05	1.92	ApGpTpCpGpApTpTpGpTpApCpTpGpTpApCpTpTpA
ターゲット	21-mer	4.879	6408.0961	6408.1044	1.29	58.49	0.20	0.34	CpApGpTpCpGpApTpTpGpTpApCpTpGpTpApCpTpTpA

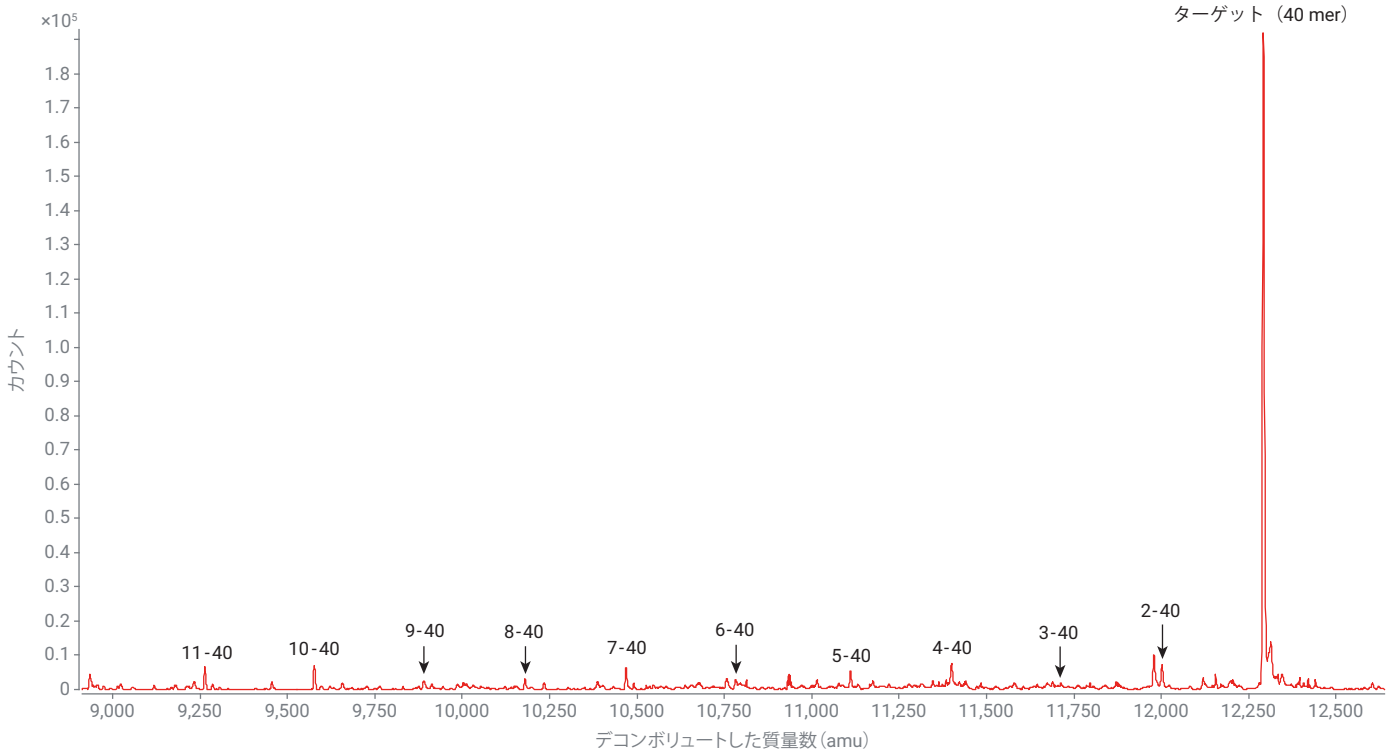

図 8. 最大エントロピー MS デコンボリューション手法を用いた、40-mer とその 5' 切断（2-40 ～ 11-40）の相対定量

表 5. 40-mer 合成オリゴヌクレオチドの上位 15 のオリゴヌクレオチド不純物の分析の概要

オリゴ長	RT（分）	測定質量	% 定量	シーケンス
16 ～ 40	5.861	7699.0915	2.08	AGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
15 ～ 40	5.878	7988.2299	2.26	CAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
14 ～ 40	5.994	8301.3760	1.24	ACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
13 ～ 40	5.990	8631.0440	1.35	GACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
12 ～ 40	6.048	8935.0245	1.60	TGACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
11 ～ 40	6.073	9263.8039	2.39	GTGACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
10 ～ 40	6.148	9577.3536	2.54	AGTGACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
9 ～ 40	6.193	9891.1191	0.94	AAGTGACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
8 ～ 40	6.185	10179.5068	1.18	CAAGTGACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
7 ～ 40	6.214	10468.9206	2.36	CCAAGTGACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
6 ～ 40	6.289	10782.0017	1.08	ACCAAGTGACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
5 ～ 40	6.276	11111.0793	2.03	GACCAAGTGACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
4 ～ 40	6.280	11400.2121	2.82	CGACCAAGTGACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
3 ～ 40	6.334	11712.5835	0.65	ACGACCAAGTGACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
2 ～ 40	6.339	12002.3602	2.68	CACGACCAAGTGACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT
ターゲット	6.384	12292.1749	72.80	CCACGACCAAGTGACAGCAATGAATCGAGTCGAGATCCAT

結論

HRAM MS データを使用したターゲットオリゴヌクレオチドとその関連不純物の特性解析のために、2 つの新しい統合型の自動オリゴヌクレオチドデータ解析手法が開発されました。分析結果は、対象のオリゴヌクレオチドについて、優れたクロマトグラフィー分離と質量精度（ppm 以下）が得られたことを示しています。LC/MS 結果はまた、観察対象のオリゴヌクレオチドとその不純物について、優れた再現性とともに、高精度の相対定量が達成されたことを示しています。新たに開発された Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア（バージョン 12.0）は、高スループットでの自動 TPI データ処理を実現し、データ解析の時間を大幅に短縮します。

参考文献

1. Capaldi, D. *et al.*Impurities in Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products.*Nucleic Acid Ther.***2017**, *27*, 309–322.
2. Okafo, G.; Elder, D.; Webb, M. Analysis of Oligonucleotides and Their Related Substances.*ILM Publications* **2012**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ

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。

DE29613125

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, May 13, 2022

5994-4817JAJP

Agilent

Trusted Answers