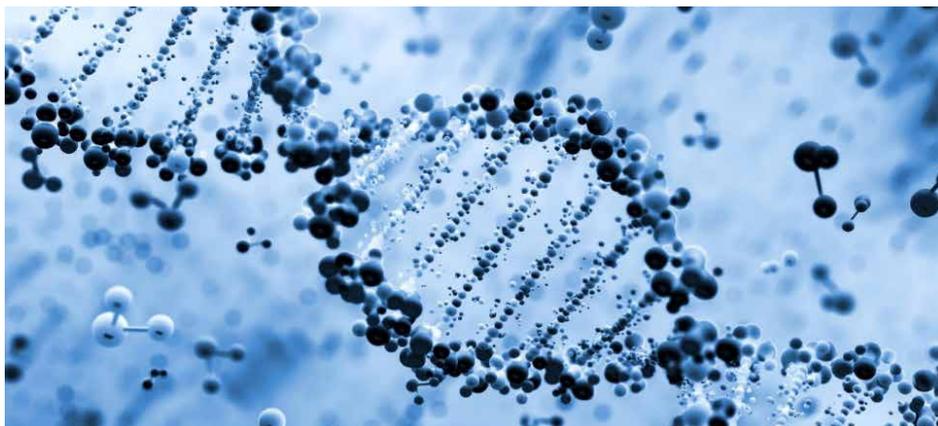


アジレントの高分解能LC/Q-TOF を用いた 包括的な統合ワークフローによる オリゴヌクレオチドの配列確認

合成オリゴヌクレオチドと不純物の堅牢で高感度な配列確認

著者

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



概要

このアプリケーションノートでは、Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアと Agilent 1290 Infinity II LC および Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を用いたオリゴヌクレオチドの配列確認ワークフローを説明します。この自動データ解析ワークフローは高精度、高速（1分未満）で強力です。1回の注入で短いオリゴヌクレオチドを完全かつ高い信頼性で分析できます。

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、治療目的での利用が急速に進んでいます。このような候補物質の開発に伴い、その特性解析の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に対するニーズが高まっています。一般的に求められるオリゴヌクレオチドの特性は、分子量、純度（および存在する不純物の相対量）、配列です。

オリゴヌクレオチドの分子量と関連不純物の特性解析については、すでに説明されています。¹この Target Plus Impurities (TPI) ワークフローでは、Agilent 1290 Infinity II LC と Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF の組み合わせを使用しました。この以前の実験では、TOFモードの取り込みメソッドと Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア 12.0 の自動データ解析メソッドを使用して、オリゴのターゲット、不純物、修飾、分解生成物の同定と相対定量の複数の例を示しました。

このアプリケーションノートでは、同じ分析システムおよびソフトウェアを使用し、MS/MSベースのターゲットメソッドを用いて、1 本鎖および 2 本鎖の RNA と DNA を含むさまざまなオリゴヌクレオチドサンプルに関するフラグメント確認マップを提供する方法を説明します。この配列確認ワークフローは、オリゴの配列から計算されるフラグメントの予測値に対する同位体パターンを照合することにより、MS2 レベルのフラグメント確認を実施します。これらの新しいソフトウェア機能を使用すると、高分解能精密質量システム (HRAM) とターゲット MS/MS データを用いて大量修飾された配列を確認し、特定の化学基の位置を特定できるため、オリゴヌクレオチドを構造的に特性解析できます。



図 1.オリゴヌクレオチド分析の分析コンポーネント – 配列確認ワークフロー

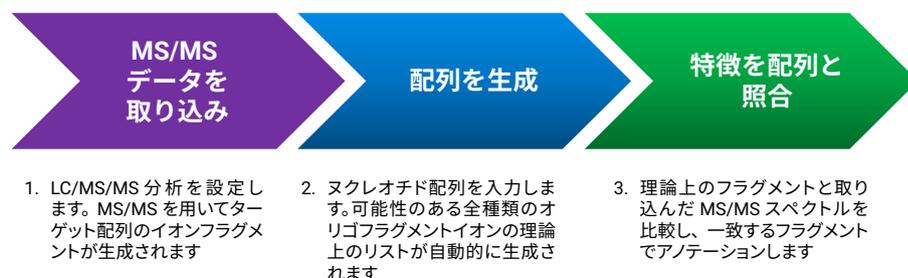


図 2. Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア (バージョン 12.0) でのオリゴヌクレオチドの配列確認のデータ解析ワークフロー

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・テクノロジーから入手しました。
- オリゴヌクレオチド (RNA) 分解能標準 (部品番号 5190-9028) はアジレントから入手しました。
- そのほかの合成オリゴヌクレオチドはすべて、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

- アジレントのオリゴヌクレオチド (RNA) 分解能標準を、使用前に 1 mL の脱イオン (DI) 水で溶解しました。最終濃度は 2 pmol/μL にしました。
- すべての合成オリゴヌクレオチドサンプルも、1 mL の DI 水をそれ以上精製せずに使用して溶解しました。測定サンプルは原液を 0.50 mg/mL に希釈しました。

装置構成

- Agilent 1290 Infinity II LC の構成は次のとおりです。
 - Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
 - Agilent 1290 Infinity II マルチサンプルラ (G7167B) と Agilent Infinity II サンプル冷却器 (オプション #100)
 - Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/QTOF

LC/MS 分析

LC/MS 分析は、1290 Infinity II LC と 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF および Agilent Dual Jet Stream ESI イオン源を組み合わせて実行しました。Agilent MassHunter Acquisition 11.0 ワークステーションソフトウェアは、コンプライアンス機能を有効にして使用しました。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と合成オリゴヌクレオチドサンプルの LC/MS/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) で処理しました。

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	Agilent AdvancedBio オリゴヌクレオチド、2.1 × 50 mm、2.7 μm (p/n 659750-702)								
サーモスタット	4 °C								
溶媒 A	15 mM TEA と 400 mM HFIP 水溶液								
溶媒 B	メタノール								
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 ~ 1</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>1 ~ 10</td> <td>10 ~ 40</td> </tr> <tr> <td>10 ~ 11</td> <td>40 ~ 95</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%B	0 ~ 1	10	1 ~ 10	10 ~ 40	10 ~ 11	40 ~ 95
時間 (分)	%B								
0 ~ 1	10								
1 ~ 10	10 ~ 40								
10 ~ 11	40 ~ 95								
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	
ESI ソース	デュアル AJS
極性	ネガティブ
ガス温度	275 °C
乾燥ガス	12 L/min
ネブライザ	35 psig
シーソガス温度	350 °C
シーソガス流量	12 L/min
VCap	3,500 V
ノズル電圧	2,000 V
フラグメンタ	175 V
スキマ電圧	65
Quad AMU	95
リファレンス質量	966.000725
取り込みモード	標準質量範囲、HiRes (4 GHz)
質量範囲	350 ~ 3,000 m/z
取り込みレート	1 スペクトル/秒
ターゲット MS/MS 範囲	100 ~ 3,000 m/z
最小 MS/MS 取り込みレート	2 スペクトル/秒
選択幅	中程度 (約 4 m/z)
コリジョンエネルギー (CE) (V)	個別に最適化
取り込み時間	500 ms/spec

結果と考察

液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) は、合成オリゴヌクレオチド分析の強力な分析ツールとして使用されてきました。ただし、生成されるデータファイルのサイズが増大しているため、オリゴヌクレオチドサンプルの包括的な特性解析プロセスは、困難で時間がかかる場合があります。最近では、高分解能質量分析 (HRMS) によるターゲットオリゴヌクレオチドとその不純物の分析用に、統合ワークフローが開発されています。¹ この研究では、良好な MS/MS フラグメンテーションデータの取得と正確なデータ解析の実行が、オリゴヌクレオチドの配列確認ワークフローにおいて重要な 2 つの要素であることを示します。

合成オリゴヌクレオチドの HPLC 分離と HRMS 分析

最近の研究では、予想されるオリゴヌクレオチドの良好なクロマトグラフィー分離と質量精度 (ppm 未満) を達成しました。この研究では、最適化した LC/MS ベースの手法を用いてオリゴヌクレオチド標準を分析しました。図 3 に、4 つの配列 (14 mer、17 mer、20 mer、21 mer) を含むアジレントのオリゴヌクレオチド (RNA) 分解能標準の LC/MS 分析を示します。ヌクレオチド塩基が 1 つだけ異なるオリゴヌクレオチドでは、短時間の HPLC 分析でベースライン分離ができました (20 mer と 21 mer、図 3A)。

図 3B と 3C では、Find-by-Formula (FBF) アルゴリズムを用いた場合の、荷電状態 -3 の 21 mer RNA 標準の優れた MS 同位体分解能 (図 3B、挿入図) と高い質量精度 (-1.09 ppm) を示しています。全体的に、最適化した LC/MS 分析では、4 種類の RNA 標準すべてにおいて、質量誤差 1 ppm という優れた MS 結果を得ることができました (表 3)。

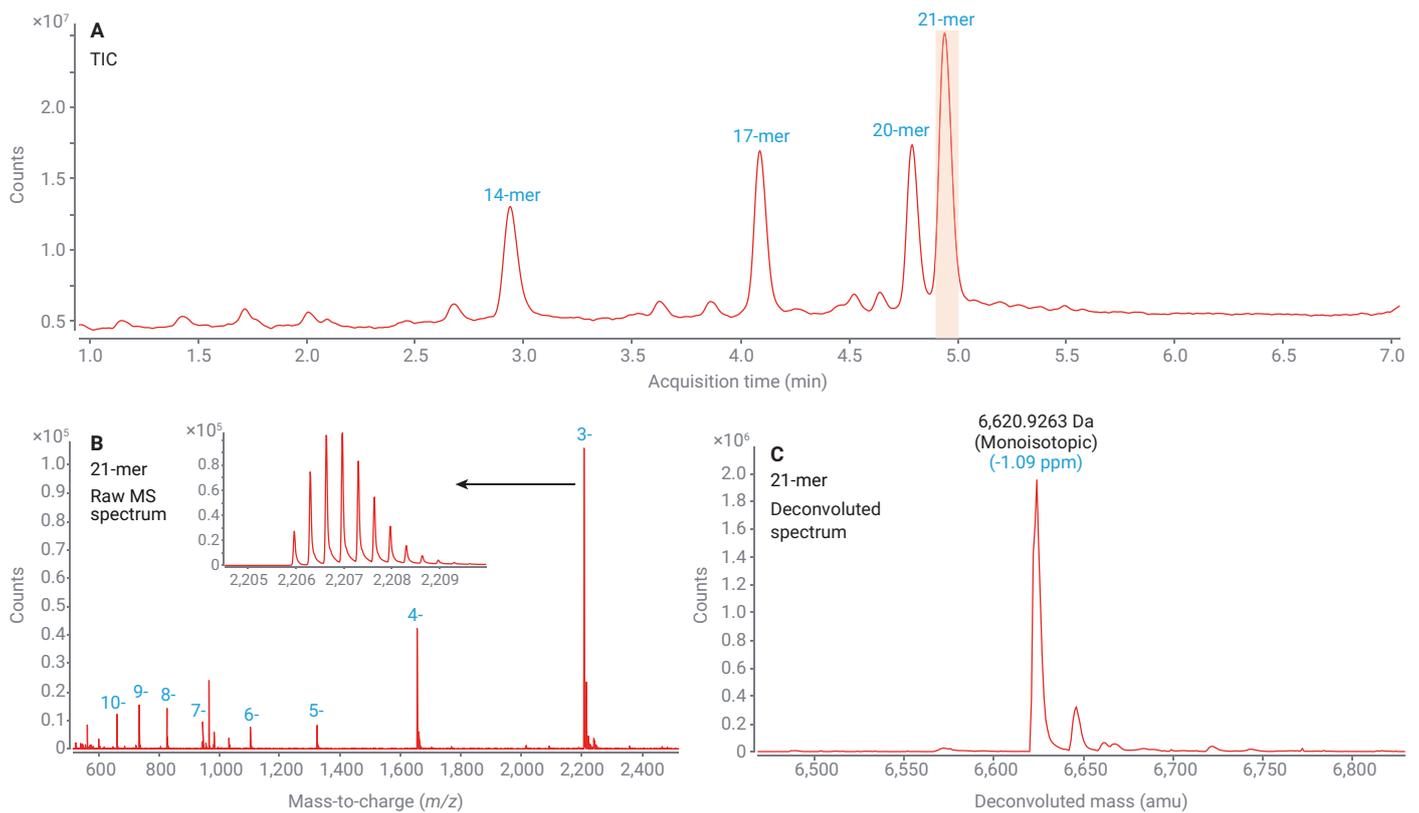


図 3. アジレントのオリゴヌクレオチド (RNA) 分解能標準の LC/MS 分析。(A) 分解能標準のトータルイオンクロマトグラフィー (TIC)。(B) 選択した 21 mer RNA の未加工の MS スペクトル。(C) 21 mer RNA 標準のデコンボリュートした MS スペクトル

表 3. アジレントのオリゴヌクレオチド (RNA) 分解能標準の LC/MS 分析の概要。4 種類のオリゴヌクレオチドの Find-by-Formula (FBF) アルゴリズムを用いた質量精度は、すべて約 1 ppm です。

オリゴヌクレオチド	オリゴの長さ	シーケンス	モノアイソトピック質量 (Da) の計算結果	質量測定値 (Da)	質量精度 (ppm)
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

オリゴヌクレオチドの配列確認のデータ解析ワークフロー

液体クロマトグラフィーとエレクトロスプレーイオン化質量分析 (LC/ESI-MS) の組み合わせによるオリゴヌクレオチドの配列確認は、バイオ医薬品業界において豊富な使用実績のある手法です^{2,3}。しかし、データ処理および結果解析のワークフローが自動化されていないことが、バイオ医薬品分析ラボの高速化の阻害要因となっています。新たに開発された BioConfirm 12.0 ソフトウェアには、Target Plus Impurities (TPI) と配列確認の両方のワークフローが含まれます。TPI ワークフローでは TOF モードのデータを使用して、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リング (同定と相対的定量を提供) します。配列確認ワークフローでは、MS/MS データを使用して、ターゲットオリゴヌクレオチドの配列と関連する修飾を確認します。

BioConfirm 12.0 の配列確認アルゴリズムでは、データ処理にオリゴヌクレオチドフラグメンテーションの標準用語を採用しました。フラグメント確認ラダーの独自のフラグメントイオンアノテーションも開発されました (図 4)。

図 5 に BioConfirm 12.0 ソフトウェアの配列確認ワークフローのユーザーインターフェースを示します。ここではデータ処理用のパラメータを設定できます。生体分子フラグメントスペクトルには、同定された生体分子の個々の MS/MS データとその理論上の同位体分布比

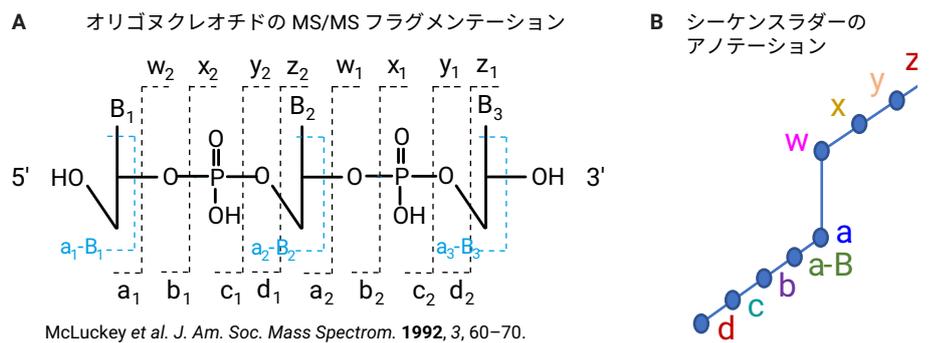


図 4. オリゴヌクレオチドフラグメンテーションの用語 (A) とオリゴヌクレオチドフラグメント確認ラダーのアノテーション (B)。文字の色は、MS/MS スペクトル内で同定およびラベル付けされたフラグメントイオンの種類を表しています。

較、または同定されたすべての生体分子 (フラグメントイオン) の MS/MS スペクトルの組み合わせが表示されます。同定されたオリゴヌクレオチドのフラグメントイオンとそのアブundanceなどの詳細結果は、生体分子の表に表示されます。新しいフラグメント確認ラダーには、同定されたすべてのフラグメントイオンとターゲットオリゴヌクレオチドのシーケンスカバレッジ率が表示されます。

オリゴヌクレオチドの配列確認ワークフローを開発およびテストするため、この研究では多様な配列、長さ、修飾を持つ多くのオリゴヌクレオチドサンプルを調査しました。LC/MS/MS 手法では、最適なフラグメンテーションデータを得るため、これらのオリゴヌクレオチドごとに荷電状態の選択、コリジョンエネルギー (CE)、MS/MS 取り込み時間が最適化されています。また BioConfirm 12.0 アルゴリズム

により、複数の MS/MS スキャンを荷電状態またはコリジョンエネルギーによってグループ化し、データ解析に使用できます。このため多様な荷電状態のイオンに対し、さまざまな CE を使用する単一の LC/MS メソッドを設定して、オリゴヌクレオチドの最適なシーケンスカバレッジを得ることができます。

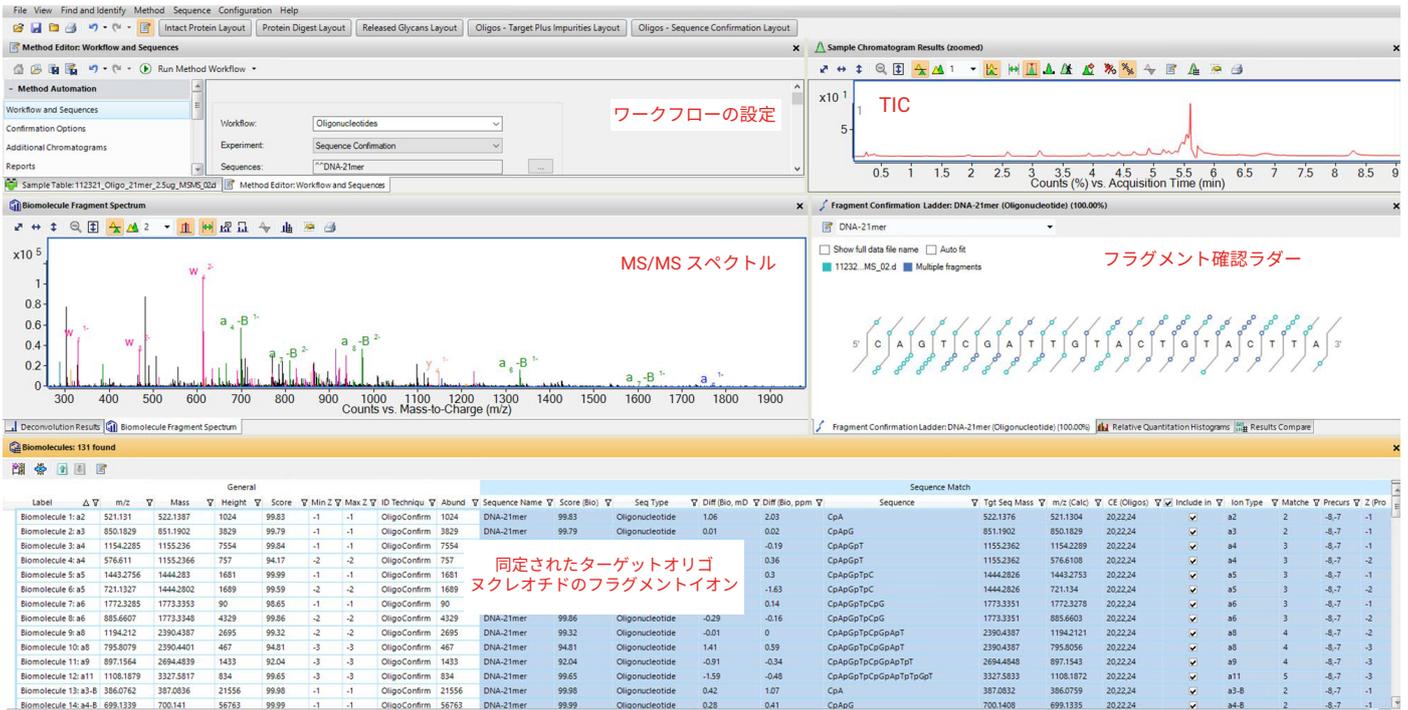


図 5. Agilent BioConfirm ソフトウェア (バージョン 12.0) と配列確認ワークフローの概要

各種オリゴヌクレオチドでの配列確認の実験の詳細を次に示します。

合成 RNA 標準の MS/MS フラグメンテーション (20 mer と 21 mer の比較)

質量精度 1 ppm 以内の RNA 分解能標準で精密質量が取得されても (表 3)、20 mer と 21mer の RNA 標準で良好な MS/MS データが生成されました (図 6)。21 mer のフラグメントイオン a、a-B、b、c、d のいずれを使用しても、5' 末端でさらに rG を測定できました。いずれのオリゴヌクレオチドの配列も、それぞれ 1 回のみ注入で、100% のシーケンスカバレッジを確認しました。

異性体 21 mer オリゴヌクレオチドの配列確認

BioConfirm 12.0 のオリゴヌクレオチドの配列確認ワークフローでは、異性体オリゴヌクレオチドの正確な配列が測定できます。精密質量を持つ (ただし 2 つの塩基が置換されている) オリゴヌクレオチドのペア (21 mer と 21 mer BS) もテストしました。図 7 に、両方のオリゴヌクレオチドの LC/MS/MS 分析を示します。上のパネルのとおり、いずれの分子もリテンションタイムと質量は同じです。したがって、配列中の異性体特性の確認に使用できるのは MS/MS データのみです。

図 8 に、a₅ (-1) フラグメントイオンの MS/MS スペクトルの拡大図を示します。同定の信頼レベル (バイオスコア) を測定するために、質量差分布 (ピークを囲む赤色のボックス) が適用されています。同様に、すべての w、x、y、z イオン (5 個以上) で、ポジション 17 での塩基置換が確認されました。

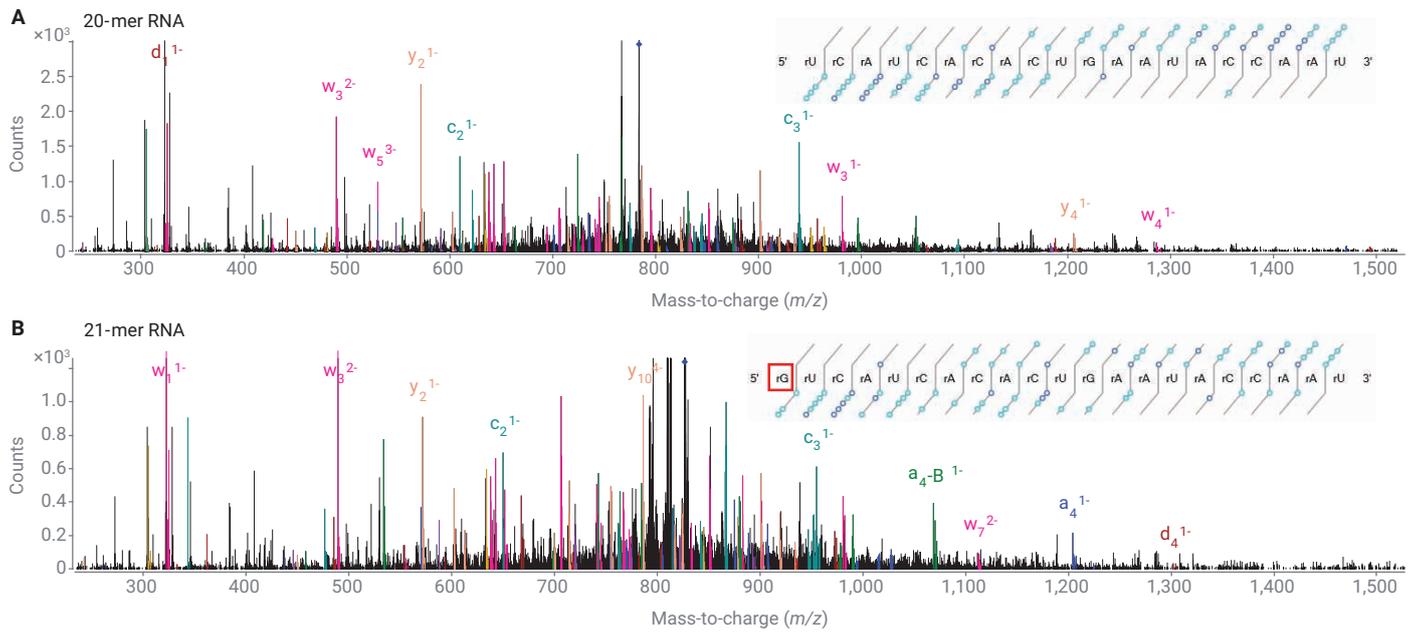


図 6. アジレントのオリゴヌクレオチド (RNA) 分解能標準 (20 mer および 21 mer) の LC/MS/MS 分析。20 mer および 21 mer RNA の MS/MS スペクトルとフラグメント確認ラダーが表示されています。

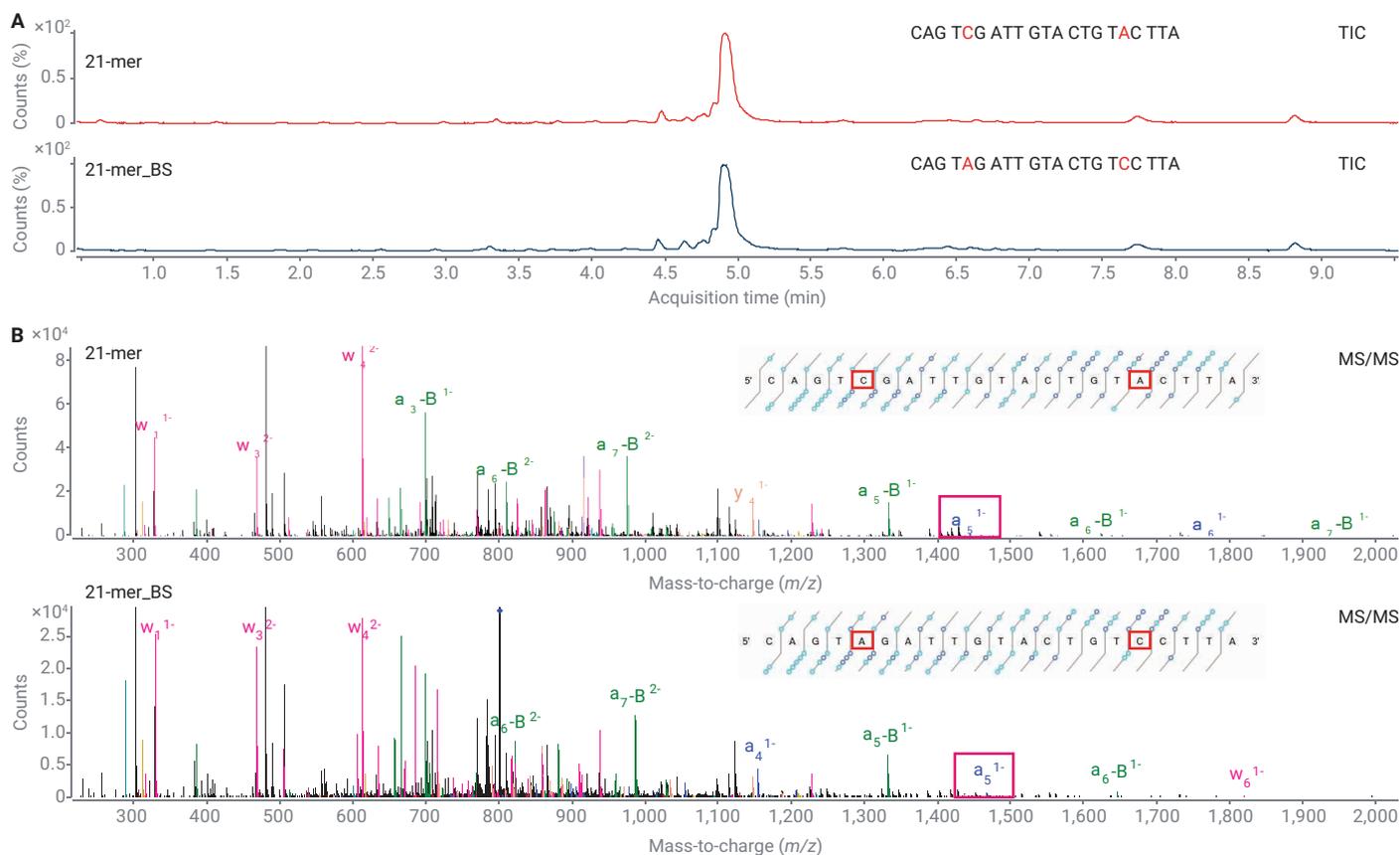


図 7.合成オリゴヌクレオチド (21 mer と 21 mer BS) の LC/MS/MS 分析。上の 2 つのパネル：21 mer および 21 mer BS (塩基置換) オリゴヌクレオチドのトータルイオンクロマトグラフィー (TIC)。下の 2 つのパネル：21 mer および 21 mer BS オリゴヌクレオチドの MS/MS スペクトル

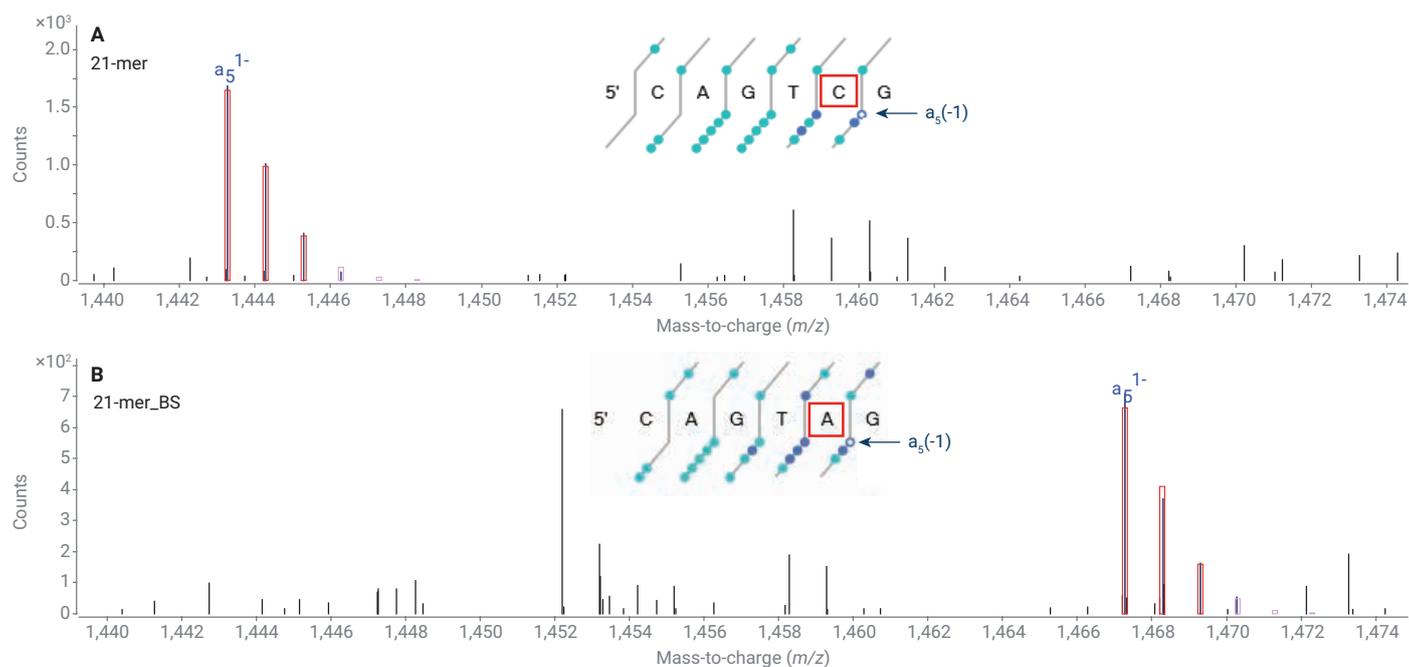


図 8.オリゴヌクレオチド (21 mer と 21 mer BS) の $a_5(-1)$ フラグメントイオンの MS/MS スペクトルの拡大図

2 本鎖オリゴヌクレオチドの配列確認 (21 mer DNA とその相補鎖)

非共有の 2 本鎖オリゴヌクレオチドの LC/MS ベースの分析と配列確認は、バイオ医薬品業界で大きな注目を浴びています。2 本鎖オリゴヌクレオチドの分析に関する BioConfirm 12.0 の配列確認ワークフローをテストするため、21 mer DNA の相補鎖 (21 mer 相補 DNA) を合成して混合しました。次に、非

共有 2 本鎖 DNA を LC/MS/MS で分析しました。図 9A に示すとおり、有機溶媒とイオンペアリング試薬を用いた従来の LC/MS 条件では、いずれの DNA 鎖も同じリテンションタイムで共溶出しました。ただし、それらの同定は BioConfirm 12.0 の Target Plus Impurities (TPI) ワークフローの Find by Formula アルゴリズムで確認されました。いずれの DNA 鎖の配列も、MS/MS データを用いた配列確

認ワークフローによってさらに確認されました。どちらのオリゴヌクレオチドでも、それぞれ 1 回だけのサンプル注入で完全なシーケンスカバレッジ (100 %) を達成しました。

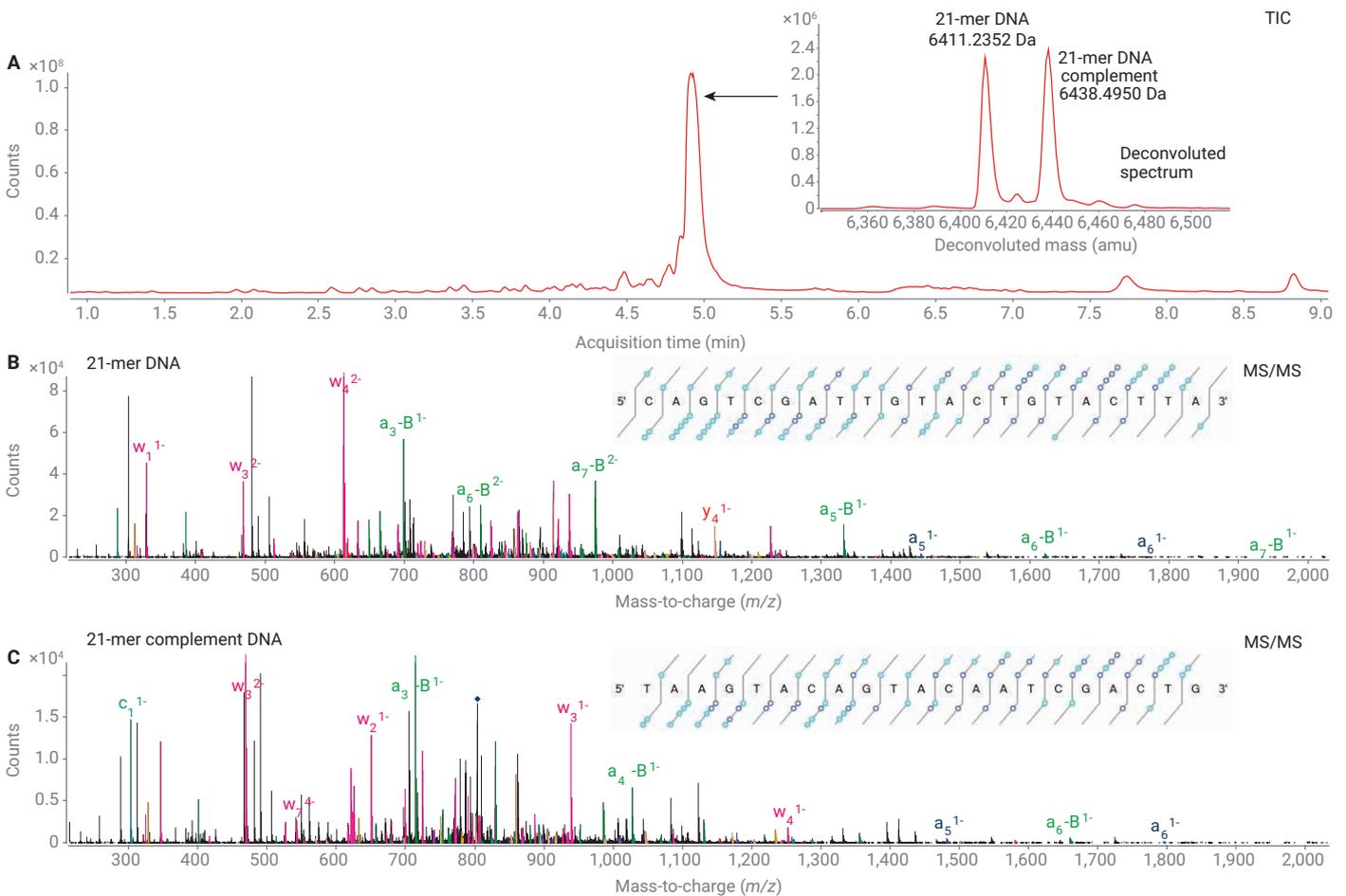


図 9. 2 鎖 DNA (21 mer と 21 mer 相補) の LC/MS/MS 分析 (A) 2 鎖 DNA (21 mer と 21 mer 相補) のトータルイオンクロマトグラフィー (TIC) と (C) 2 鎖 DNA (21 mer と 21 mer 相補) の MS/MS スペクトル

大量修飾されたオリゴヌクレオチドの MS/MS フラグメンテーション

アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) などの化学修飾されたオリゴヌクレオチドは近年、多くのバイオ医薬品アプリケーションに利用できる可能性があることがわかってきました。その理由はターゲット細胞において、翻訳を阻害したり、遺伝子やタンパク質の発現を抑制したりする作用が期待できるためです。⁴

この研究では、大量修飾された 18 mer ASO を使用して、配列確認テスト用の MS/MS データを生成しました。合成時には、化学基「2-メトキシエトキシ (2'-MOE)」をオリゴヌクレオチドの各塩基に組み込みました。図 10 に、この ASO サンプルの LC/MS/MS 分析を示します。MS/MS データの取り込み中に、さまざまな CE を用いて、その後のフ

ラグメンテーション用に荷電状態 -8 のターゲット ASO を選択しました。ASO の良好な MS/MS スペクトルが生成されました。また BioConfirm 12.0 ソフトウェアプログラムにより、100 % のシーケンスカバレッジを達成できました (図 10C)。

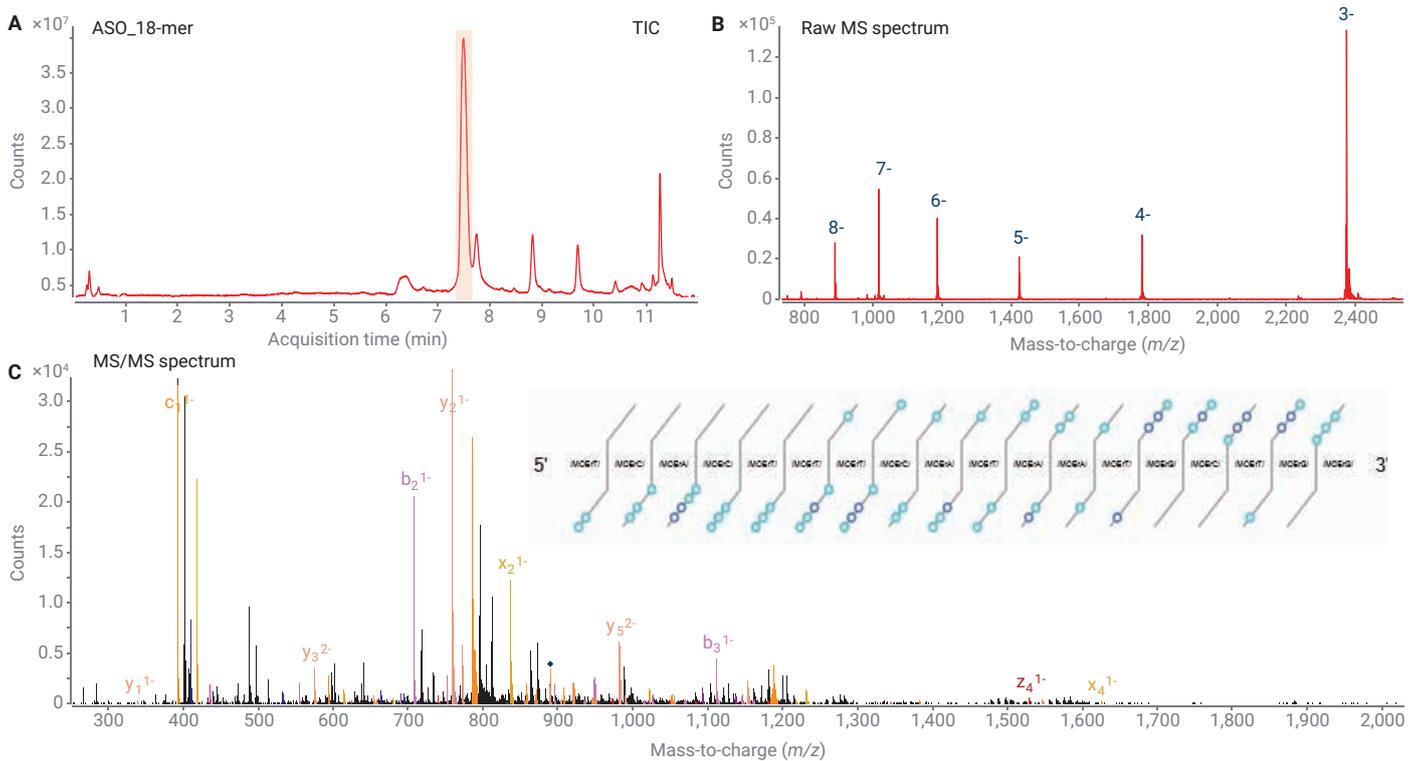


図 10. 特異的に修飾されたオリゴヌクレオチド (ASO_18 mer) の LC/MS/MS 分析。(A) ASO_18 mer のトータルイオンクロマトグラフィー (TIC)。(B) ASO_18 mer の未加工 MS スペクトル。(C) ASO_18 mer の MS/MS スペクトルとフラグメント確認ラダーを表示

切断オリゴヌクレオチド不純物の同定と配列確認

Target Plus Impurities のアプリケーションノート¹では、完全なターゲット (21 mer) とその 5' 切断不純物が同定され、相対定量が正確に測定されました。ただし、すべての不純物の配列が確認されたわけではありません。

この研究では、N-1 (2-21) と N-2 (3-21) の両方の不純物で、イオン強度が低くても (5% 未満) 高品質な MS/MS データを取り込むことができました。

図 11 に、全長ターゲット (21 mer) と N-1 (2-21) および N-2 (3-21) 不純物の MS/MS スペクトルとフラグメント確認ラダーを示します。

3 種類のオリゴヌクレオチドの配列が100% のカバレッジで確認されました。

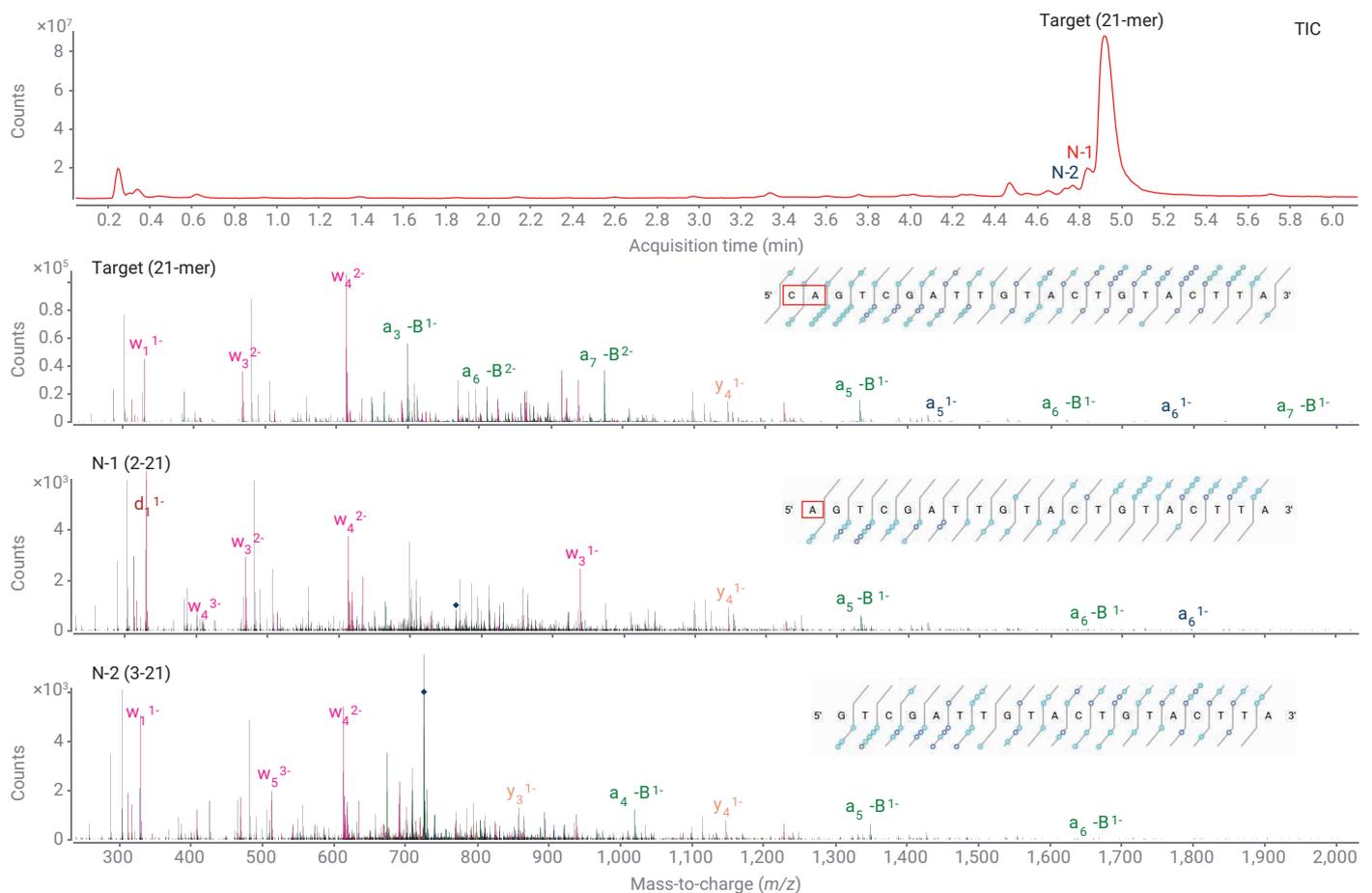


図 11. 全長ターゲット (21 mer) と N-1 (2-21) および N-2 (3-21) 不純物のオリゴヌクレオチドの配列確認

結論

時間のかかるデータ処理を自動的な統合データ解析に転換する、オリゴヌクレオチドの配列確認ワークフローが開発されました。この新しい Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアバージョン 12.0 では、予測同位体分布プログラムを使用して、オリゴヌクレオチドのフラグメントイオンを確認します。このため、同定の精度と信頼性が大幅に向上します。また、Agilent 1290 Infinity II LC と Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を組み合わせることで優れた HRAM MS/MS データが生成されます。この結果、すべての分析対象オリゴヌクレオチドについて、それぞれ 1 回の注入だけで 100 % のシーケンスカバレッジを実現できました。

参考文献

1. Wong, D.; Rye, P. 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 .*Agilent Technologies application note*, publication number 5994-4817JAJP, **2022**.
2. McLuckey, S. *et al.* Tandem Mass Spectrometry of Small, Multiply Charged Oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3(1)*, 60–70.
3. McCloskey, J. *et al.* Interpretation of Oligonucleotide Mass Spectra for Determination of Sequence Using Electrospray Ionization and Tandem Mass Spectrometry. *Anal.Chem.* **1996**, *68(1)*, 1989–1999.
4. Bahal, R. *et al.* Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *J. Clin.Med.* **2020**, *9*, 2004.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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。

DE15315662

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2022
Printed in Japan, July 13, 2022
5994-5071JAJP