

## 二次元 LC/MS による合成核酸不純物の分析 分離の改善および定量

### 著者

内藤 厚子  
林 明生  
瀬崎 浩史

アジレント・テクノロジー  
株式会社

### 要旨

核酸医薬品の合成過程ではヌクレオチド欠損および付加体、ホスホロチオアート修飾の脱硫体等の不純物が生成される可能性があり、これらの不純物の特性解析は重要な課題です。一般的に合成核酸の不純物分析には LC/MS が使用されますが、多様かつ類似性の高い不純物を分離し正確に定量することは困難です。

本アプリケーションノートでは、Agilent InfinityLab 2D-LC および Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムを用いてアンチセンスオリゴヌクレオチドとその不純物の分析を行いました。1次元目 (<sup>1</sup>D) では不分離であった不純物を 2次元目 (<sup>2</sup>D) で分離し、各不純物を定量することが可能でした。また、2D-LC の複数ループに貯留した画分を一度に <sup>2</sup>D に移送するマルチインジェクション機能を用いると測定時間を短縮し同様の結果を得ることができました。

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 先生）による支援の成果をもとに構成されています。

## システム

### Agilent InfinityLab 2D-LC システム

Bio フレキシブルポンプ (G7131A, <sup>1</sup>D ポンプ)  
 Bio ハイスピードポンプ (G7132A, <sup>2</sup>D ポンプ)  
 Bio マルチサンプラ (G7137A)  
 マルチカラムサーモスタット (G7116B)  
 ダイオードアレイ検出器 (G7115A, <sup>1</sup>D 検出器)  
 ダイオードアレイ検出器 (G7117B, <sup>2</sup>D 検出器)  
 パルプドライブ (G1170A) ×3  
 + 2D-LC ASM パルプ (G4243A)  
 + マルチハートカットパルプキット

### Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

#### Agilent MassHunter Workstation

LC/MS Data Acquisition 11.0 with 2D-LC add-on,  
 Qualitative Analysis 10.0, BioConfirm Software 12.0

## 試料調製

インテルセン (表 1) FLP (Full Length Product) に 1 塩基および 3 塩基ヌクレオチド欠損体不純物 (n-1 体、n-3 体) をスパイクした試料を測定に用いました。(FLP 濃度 : 0.1 mg/mL)

表 1. インテルセン配列

Sequence (full phosphorothioated, *=2'-MOE)	MW (average)
*T*mC*T*T*G-dG-dT-dT-dA-dmC-dA-dT-dG-dA-dA-*A-*T*mC*mC*mC	7183 Da

## 測定条件

表 2. 測定条件

<sup>1</sup> D Method	
カラム	Agilent PLRP-S 1000A 2.1x50 mm, 5 μm (Parts No. PL1912-1502)
移動相	A; 100 mM TEAA pH 7.0, B; Methanol
流速	0.2 mL/min
注入量	1 μL
グラジエント	20 to 50 %B in 15 min
カラム温度	65 °C
検出	UV 260 nm

<sup>2</sup> D Method	
2D-LC モード	Hi-Res Sampling or Multi-Injection
カラム	Agilent AdvanceBio Oligonucleotides 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (Parts No. 655750-702)
移動相	A; 10 mM TEA 100 mM HFIP B; 10 mM TEA 100 mM HFIP/Methanol=1/1
流速	0.2 mL/min
グラジエント	42 to 48 %B in 20 min
カラム温度	65 °C
検出	UV 260 nm, Q-TOF MS Polarity : Negative Nebulizer : 55 psi Dry Gas : 350 °C, 12 L/min Sheath Gas : 350 °C, 12 L/min VCap : 4000 V Fragmenter : 175 V Nozzle Voltage : 1000 V Mass Range : 400 – 3200 m/z

得られたデータは BioConfirm ソフトウェアで解析しました。得られた 2 次元目のクロマトグラム (フル 2D クロマトグラム) は MassHunter ソフトウェアにより各カットごとのクロマトグラムに分割し解析することも可能です (図 1)。

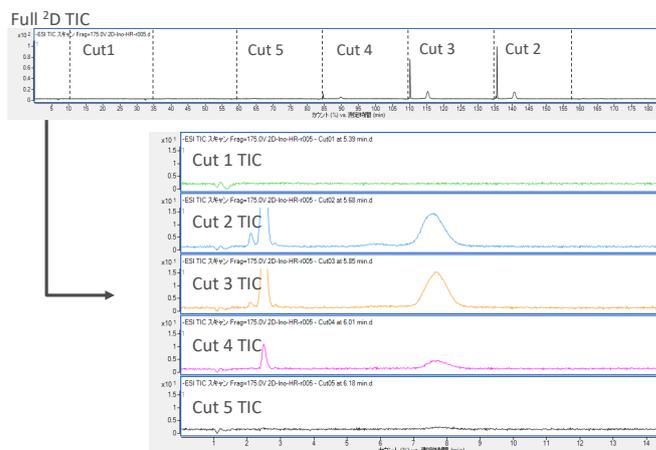


図 1. ハイレゾサンプリングモードにて測定されたフル <sup>2</sup>D クロマトグラムと各カットごとのクロマトグラム

## 結果

1次元目の条件で測定したところ、n-3体は分離し検出されましたが、n-1体とFLPは共溶出しました。図2に1次元目のクロマトグラムと、2次元目に移送したピーク（2次元分離を行ったピーク）を示します。

ハイレゾサンプリング2D-LCにより、n-1体とFLPは2次元目で分離され検出されました（図3）。各cutのピーク面積を合算した面積値を算出したところ、FLPと各不純物のピーク面積比はスパイクした量とほぼ一致していました（表3）。

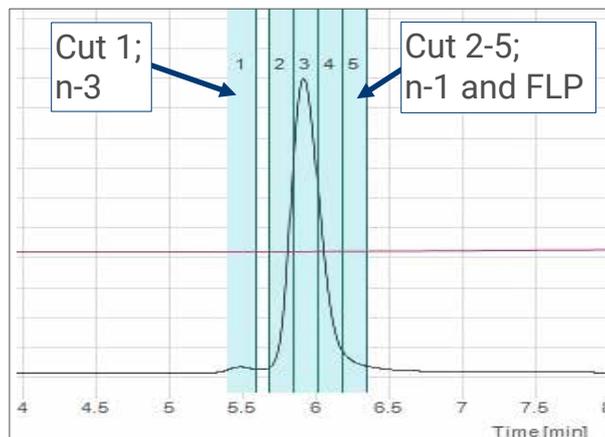


図2. 1次元目のクロマトグラム（UV 260 nm）およびハイレゾサンプリング2D-LC設定

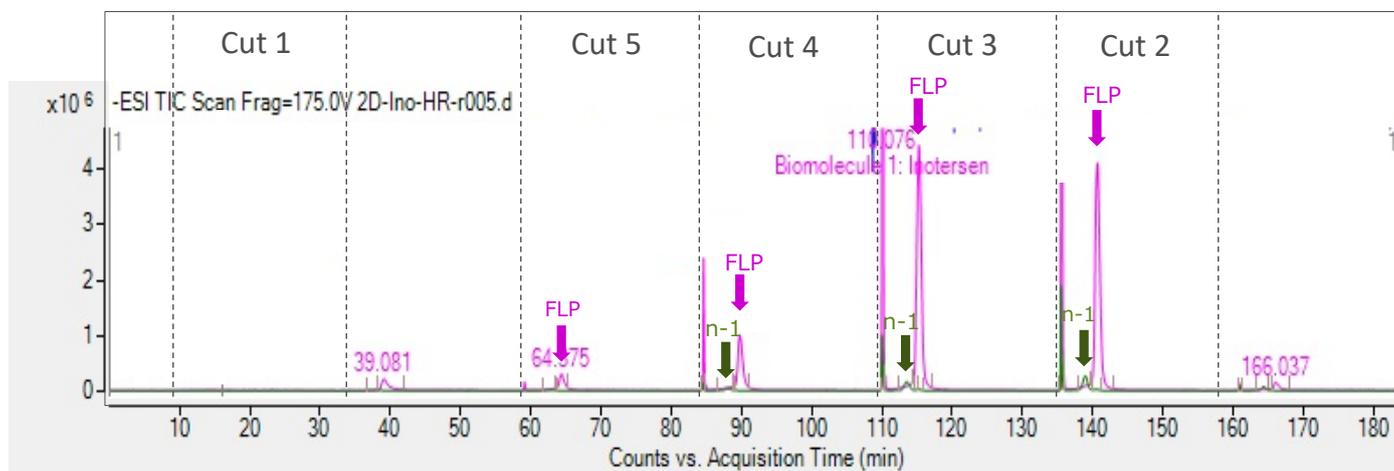


図3. ハイレゾサンプリング2D-LC/MS測定結果（フル<sup>2</sup>Dクロマトグラム）, サンプル; FLPに不純物（n-1体、n-3体）を各5%スパイクした試料

表3. ハイレゾサンプリング2D-LC/MSピーク面積結果, サンプル; FLPに不純物（n-1体、n-3体）を各5%スパイクした試料

	Cut 1	Cut 5	Cut 4	Cut 3	Cut 2	Total (%FLP)
FLP	-	4399753	28598380	96794519	90194893	219987545
n-1	-	-	530171	4559461	5513767	10603399 (4.82)
n-3	10867384	-	-	-	-	10867384 (4.94)

次にハイレゾサンプリングで採取した複数の 1 次元目の画分を一度に 2 次元目に移送する、マルチインジェクションモードを用いて測定を行いました。ハイレゾサンプリングと同等の FLP および不純物のピーク面積比が得られ、測定時間は約 40 % 短縮されました (図 4、表 4)。

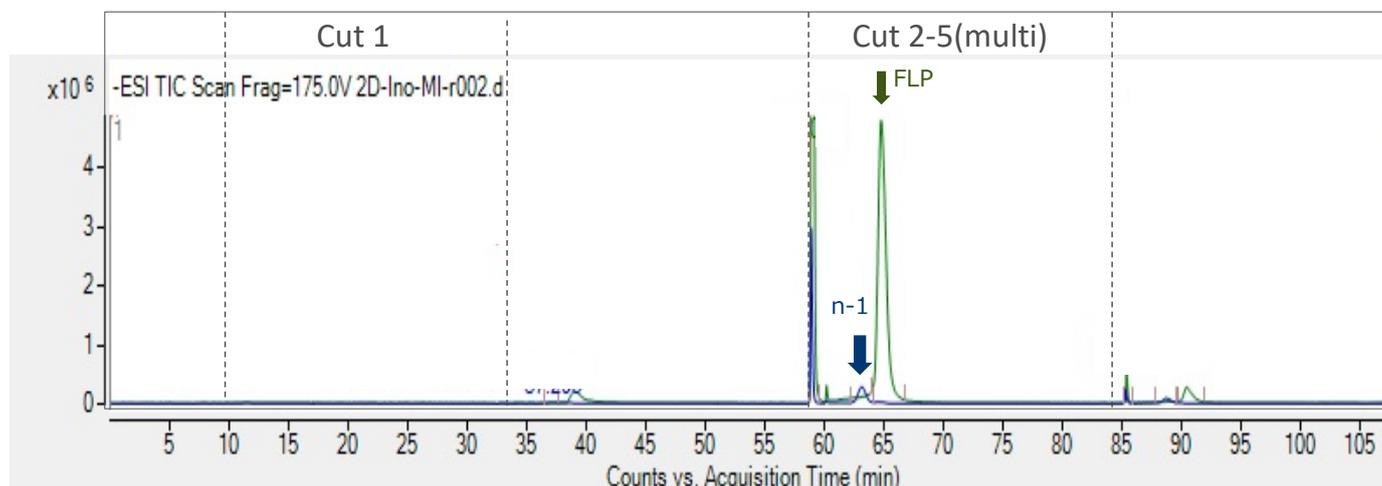


図 4. マルチインジェクション 2D-LC/MS 測定結果 (フル<sup>2</sup>D クロマトグラム), サンプル; FLP に不純物 (n-1 体、n-3 体) を各 5 % スパイクした試料

表 4. マルチインジェクション 2D-LC/MS ピーク面積結果, サンプル; FLP に不純物 (n-1 体、n-3 体) を各 5 % スパイクした試料

	Cut 1	Cut 2-5 (Multi-Injection)	Total (%FLP)
FLP	-	232457858	232457858
n-1	-	11529909	11529909 (4.96)
n-3	11599647	-	11599647 (4.99)

各成分のピーク面積 (ハイレゾサンプリングモードでは各 cut の面積の合計) を表 5、表 6 に示します。ハイレゾサンプリング、マルチインジェクションの両モードにおいてスパイクした不純物量とピーク面積は比例関係を示しました。

表 5. ハイレゾサンプリング 2D-LC/MS ピーク面積結果, サンプル; FLP に 0.1 - 10 % の不純物をスパイクした試料

Hi-Res Sampling	10 %	5 %	2 %	1 %	0.5 %	0.2 %	0.1 %
	Area (%FLP)	Area (%FLP)	Area (%FLP)	Area (%FLP)	Area (%FLP)	Area (%FLP)	Area (%FLP)
FLP	221487881	219987545	220584241	219887571	220587542	221116894	219577198
n-1	21897895 (9.89)	10603399 (4.82)	3992574 (1.81)	1956999 (0.89)	683821 (0.31)	331675 (0.15)	142725 (0.06)
n-3	22578471 (10.19)	10867384 (4.94)	4235217 (1.92)	2088931 (0.95)	1058820 (0.48)	420122 (0.19)	197619 (0.09)

表 6. マルチインジェクション 2D-LC/MS ピーク面積結果, サンプル; FLP に 0.1 - 10 % の不純物をスパイクした試料

Multi-Injection	10 %	5 %	2 %	1 %	0.5 %	0.2 %	0.1 %
	Area (%FLP)	Area (%FLP)	Area (%FLP)	Area (%FLP)	Area (%FLP)	Area (%FLP)	Area (%FLP)
FLP	232811918	232457858	232485121	232489758	232658645	232555478	232461591
n-1	23094942 (9.92)	11529909 (4.96)	4463714 (1.92)	2045909 (0.88)	1000432 (0.43)	348833 (0.15)	185969 (0.08)
n-3	23188067 (9.96)	11599647 (4.99)	4579956 (1.97)	2185403 (0.94)	1116761 (0.48)	418599 (0.18)	209215 (0.09)

おわりに、合成されたインテルセンサンプル（ロット A, B）を測定し、実際の n-1 体含有量を評価しました。結果を表 7 に示します。ハイレゾサンプリングモードの 2D-LC/MS、マルチインジェクションモードの 2D-LC/MS のいずれにおいても同様の結果が得られました。2D-LC/MS により、合成オリゴ核酸の不純物定量が可能であることが示されました。

表 7. 合成サンプル（ロット A, B）中の n-1 体不純物の定量結果

サンプル：合成ロット A

モード	FLP Area	n-1 体 Area	% FLP
ハイレゾサンプリング 2D-LC/MS	478333818	15692730	3.28
マルチインジェクション 2D-LC/MS	478788614	16380233	3.42

サンプル：合成ロット B

モード	FLP Area	n-1 体 Area	% FLP
ハイレゾサンプリング 2D-LC/MS	488173286	7173019	1.46
マルチインジェクション 2D-LC/MS	489902263	7510398	1.53

## まとめ

2D-LC/MS を用いた合成オリゴ核酸の不純物分析を実施しました。通常の 1 次元 LC/MS では分離されなかった FLP および n-1 体不純物を、2D-LC により分離し、MS 検出することが可能でした。2D-LC のハイレゾサンプリングモード、マルチインジェクションモードは、1 次元目の目的ピーク全体を 2 次元目に移送し分離検出することができるため、2D-LC (/MS) を用いた定量が可能です。

Agilent InfinityLab 2D-LC および Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF MS は、ハイレゾサンプリングやマルチインジェクションモード等の 2D-LC/MS の多彩なメソッドを簡単に構築でき、オリゴ核酸のような複雑な組成のサンプルの分析に最適なソリューションです。

ステンレス製システムへのサンプルの非特異的吸着が懸念される場合は、バルブやループ部を含めた 2D-LC 全体をバイオコンパチブル仕様 (MP35N<sup>®</sup> を用いた仕様) とする Bio 2D-LC/MS を構築することも可能です。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://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](mailto: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いません。  
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。

DE56128157

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, October 27, 2023

5994-6900JAJP