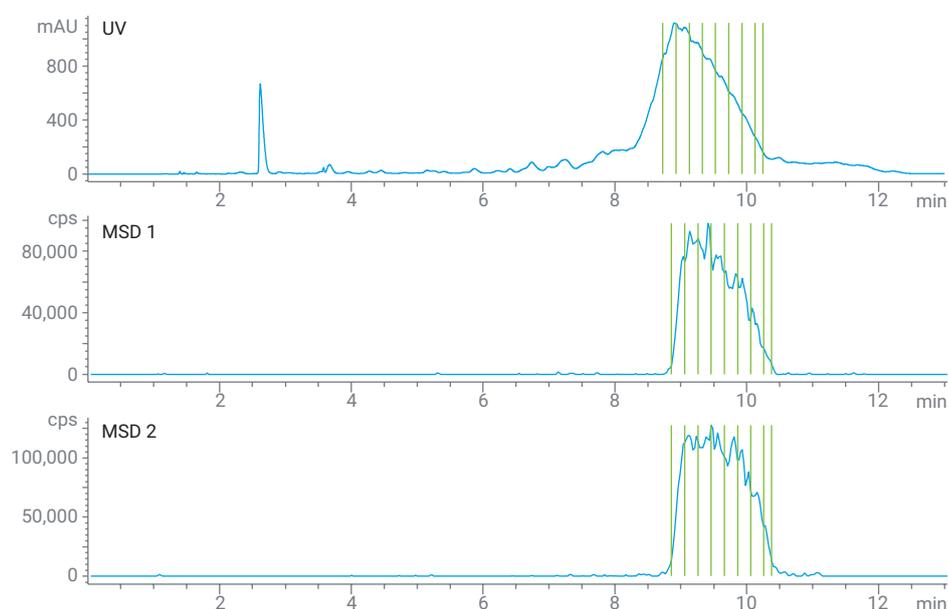


分取用 HPLC/MS とソフトウェアサポートを用いたオリゴヌクレオチドの高速かつ選択的な精製



著者

Florian Rieck
Agilent Technologies, Inc.

概要

100 ヌクレオチド未満の合成オリゴヌクレオチドは通常、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用して分析・精製されます。選択性をさらに向上させるには多くの場合、質量選択検出器 (MSD) が用いられますが、この手法には、ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) などの高純度で高価な試薬が必要とされます。このアプリケーションノートでは、ジブチルアミン (DBA) とトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (TRIS) に基づく精製メソッドについて説明します。このメソッドでは、MSD シグナルによってトリガーされるフラクションコレクションも可能です。ソフトウェアサポートと、表面多孔質粒子が充填された Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムを用いることで、従来のメソッドと比較してターゲット化合物をより迅速かつ高純度で収集できました。

はじめに

近年、アダプター、ガイド RNA、低分子干渉 RNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどの合成オリゴヌクレオチド (ON) が、ライフサイエンスや診断研究で注目されるようになってきました。これらの分子は通常、100 ヌクレオチド未満の鎖長を示すため、イオンペア逆相 (IP-RP) HPLC を使用して分析できます。この技術は ON の精製にも効果的に適用されています。¹質量選択検出器 (MSD) を用いて分析感度を高めたい場合、トリエチルアミン (TEA) および HFIP が標準的なイオンペア試薬として使用されます。ただしメソッドを分取条件にスケールアップする場合、高価な HFIP が大量に必要となり、これが制約になる可能性があります。

このアプリケーションノートでは、イオンペアリングと pH 調整に DBA と TRIS を使用する分取精製メソッドを紹介します。DBA は短鎖 ON で TEA よりも高い分解能を実現できることが既に示されており²、同時に TRIS が高価な HFIP の代替として機能します。

実験方法

装置構成

実験はすべて、次に示すモジュールで構成された Agilent 1290 Infinity II 自動スケールアップ分取 LC/MSD システムで実施しました。

- Agilent 1290 Infinity II 分取バイナリポンプ (G7161B)
- Agilent 1260 Infinity II クォータナリポンプ (G7111B)、アクティブシール洗浄およびアクティブインレットバルブ付属 (オプション 030 および 032)

- Agilent 1290 Infinity II 分取 Open-Bed サンプラ/フラクションコレクタ (G7158B)、5 mL 分取サンプルループ付属 (オプション 241)
- Agilent 1260 Infinity II 多波長検出器 (G7165A)、0.3 mm 分取用フローセル (オプション 084) 付属
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A)、10 mm 標準フローセル (オプション 018) 付属
- Agilent 1260 Infinity II 分取スケールバルブベースフラクションコレクタ (G7166A)
- Agilent 1290 Infinity II MS フローモジュレータ (G7170B)
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A) および 2 ポジション/14 ポートバルブ (G4738A)
- Agilent 1290 Infinity II 分取カラムコンパートメント (G7163B)
- Agilent 1260 Infinity II デイレイコイルオーガナイザ (G9324A)、15~40 mL/分のデイレイコイル付き (210)
- Agilent LC/MSD XT (G6135B)

カラム

- **分析カラム** : Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18、3.0 × 100 mm、2.7 μm (部品番号 695975-502)
- **分取カラム** : Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチド、21.2 × 150 mm、4 μm (部品番号 671150-702)

ソフトウェア

- LC および LC/MS システム用 Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition、Rev. C.01.10 [287] 以降
- OpenLab ChemStation 用 Agilent Automated Purification ソフトウェア、revision A.01.08 [043] 以降

試薬および溶媒

HPLC グレードのアセトニトリル (ACN) およびトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (TRIS) >99.9 %、分析グレードの塩酸 (37 %)、HPLC グレードのジブチルアミン (DBA)、ヘキサシルアミン (HA) は、VWR (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。分析グレードのヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) は、Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。超純水は、0.22 μm メンブレンカートリッジ (Millipak Sigma, ダルムシュタット、ドイツ) を装着した Milli-Q Integral システムで製造しました。

サンプル

顧客から提供された長さ 30 ~ 50 塩基の 2 つの DNA ON サンプルを用いました。サンプル濃度は、短い ON では 20 mM PBS 中 3.1 mM、長い ON では水中 1.6 mM です。両方のサンプルとも、希釈またはサンプル前処理なしで注入しました。

精製を行う前に、両方のサンプルを HPLC/MS 分離メソッド (HA/HFIP メソッド、表 1 を参照) を使用して分析しました。このメソッドは典型的な品質管理手順であり、合成された製品の純度と精製に使用されるターゲット質量が得られます。Automated Purification ソフトウェアにより最適化されたスケールアップを実現するには、分析メソッドと分取メソッドで同じ移動相とカラムケミストリーを使用する必要があります。この目的のために、精製に高価な HFIP 試薬を高流量で使用する必要のない別のメソッド (DBA-TRIS メソッド、表 2 を参照) を適用しました。TRIS バッファは揮発性ではないため、この 2 番目の方法は質量分析には適合しません。それでも、アクティブスプリットと揮発性メークアップ溶媒を使用して流れのごく一部しか MSD に移送しないため、マスペースフラクションコレクションを使用できます。

100 ナクレオチドまでの ON の分析には、Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドシリーズのカラムが最適です。これらのカラムは、Agilent InfinityLab Poroshell 技術に基づいており、高 pH (HPH) コーティングが施された表面多孔質粒子 (SPP) を用いていることが特徴です。高い pH と温度との適

合性に加えて、AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムのすべてのバッチは、 $n/(n-1)$ 分離を達成するためにオリゴヌクレオチドの分離のための品質管理を受けています。内径 21.2 mm の分析スケールカラムと分取カラムが AdvanceBio オリゴヌクレオチドファミリーに追加されたことにより、高分解能分析メソッド

の分取条件への移行がより簡単になりました。分析スケールと分取スケールの両方で同じ固定相を使用できれば、メソッド調整の必要性が低減され、メソッド移行の信頼性が高まります。

メソッドの設定

表 1. 分析のクロマトグラフィー条件、HA/HFIP メソッド

パラメータ	分析												
移動相	A) ヘキシルアミン 15 mM + HFIP 200 mM 水溶液 (pH 約 8.3) B) メタノール												
流量	0.8 mL/分												
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</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>71</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>9.5</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%B	0	50	7	71	8	100	9	100	9.5	50
時間 (分)	%B												
0	50												
7	71												
8	100												
9	100												
9.5	50												
ストップタイム	11 分												
注入量	2 μ L												
サンプリングメソッドのプリセット	プリセット 1: 極性サンプルマトリックス 180 μ L ループ溶媒												
温度	室温												
UV 検出	260 nm データレート 10 Hz												
MS 検出	ネガティブスキャン m/z 500 ~ 3,000												

表 2. 分析および分取のクロマトグラフィー条件、DBA-TRIS メソッド

パラメータ	分析	分取
移動相	A) 7.5 % ACN を含む 75 mM DBA, Tris-HCl, pH 8.3 バッファー B) 80 % ACN を含む 75 mM DBA, Tris-HCl, pH 8.3 バッファー	
流量	0.8 mL/分	25 mL/分
グラジエント	ソフトウェアの計算によるスカウティングおよびフォーカスグラジエント	
注入量	2 μ L	1,000 μ L
サンプリングメソッドのプリセット	プリセット 1: 極性サンプルマトリックス 180 μ L ループ溶媒	プリセット 1: 極性サンプルマトリックス 800 μ L ループ溶媒
温度	室温	室温
UV 検出	260 nm データレート 10 Hz	
MS 検出	ネガティブスキャン m/z 500 ~ 3,000	ネガティブスキャン m/z 500 ~ 3,000 EIC はターゲット質量に基づいてソフトウェアによって選択
MSD に対するスプリット比	フルフロー	500:1 (モード M1) 12 分から 24 分までアクティブ
フラクションコレクション	該当せず	ピークベースのフラクションモード、 UV は MSD シグナルとの組み合わせ (AND) UV スレッシュホールド: 10 mAU UV アップスロープ: 2 mAU/s UV ダウンスロープ: 1 mAU/s MSD スレッシュホールド: 2,000 cps

表 3. MSD スプレーチャンバとフラクションコレクションの設定

パラメータ	設定値
メークアップ溶媒	0.1 % 酢酸メタノール/水混合溶媒 (70/30)
メークアップ流量	1.5 mL/分
イオン源	Agilent エレクトロスプレー (ESI) イオンソース
ネプライザ圧力	40 psig
ドライガス温度	350 °C
ドライガス流量	13.0 L/分
キャピラリー電圧	-3,000 V
スキャン範囲	500 ~ 3,000 m/z
ターゲット質量 (m/z)	短い ON : 2,674.7, 2,139.8 長い ON : 2,718.0, 2,264.1
イオン種	[M-H] ⁻ 、[M-2H] ²⁻ 、[M-3H] ³⁻

結果と考察

両方の ON サンプルとも分析スケールでは、HPLC/MS メソッドと 1290 Infinity II オートスケール分取 LC システムの分析流路を使用して正常に分離されました。最適化した 50 ~ 71 %B のグラジエントにより、不完全な ON フラグメントから全長生成物 (FLP) が分離されました。図 1 は、短い ON 分離の UV クロマトグラムと TIC を示したものです。長い ON 分離は図 2 に示します。長い ON は、短い ON よりも純度が低いように見えます。そうではありますが、両方のサンプルともその分離は、それぞれの FLP の同定には十分なものでした。これらの分析での分離に基づいて、FLP の溶出時の質量スペクトルを抽出しました。OpenLab ChemStation のデコンボリューション ツールを用いて FLP の分子量を計算し、スペクトル内のシグナルを電荷数と結び付けました (図 3 および図 4)。同定された多価イオンを用いて、分取でフラクションコレクションをトリガーすることができます。

2 つの ON を精製するために、DBA をイオンペア試薬、TRIS をバッファとして含む移動相を使用するようにメソッドを変更しました。TRIS は MS に適応性がありませんが、分取で MSD シグナルを用いてターゲット ON を検出・収集することができました。これは、全体のフローをアクティブにスプリットし、MS 互換性のあるメークアップ溶媒を使用してスプリットフローを MS に流すことによって実現しました。流速は、分取カラムの内径と粒子サイズが大きくなったことを反映させて調整し、25 mL/分としました。グラジエントも変更しました。Automated Purificationソフトウェアを用いて、分析スカウティング用のリニアグラジエントを作成しました。同様に、分析結果のターゲットピークの選択に基づいて、分離を最適化するフォーカス分取グラジエントをソフトウェアによって計算しました。

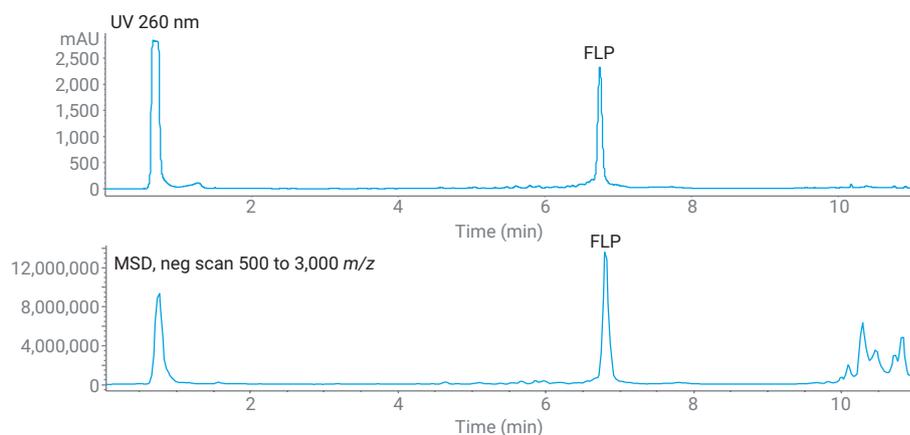


図 1. HA/HFIP と最適化されたグラジエントを使用した短い ON の分離

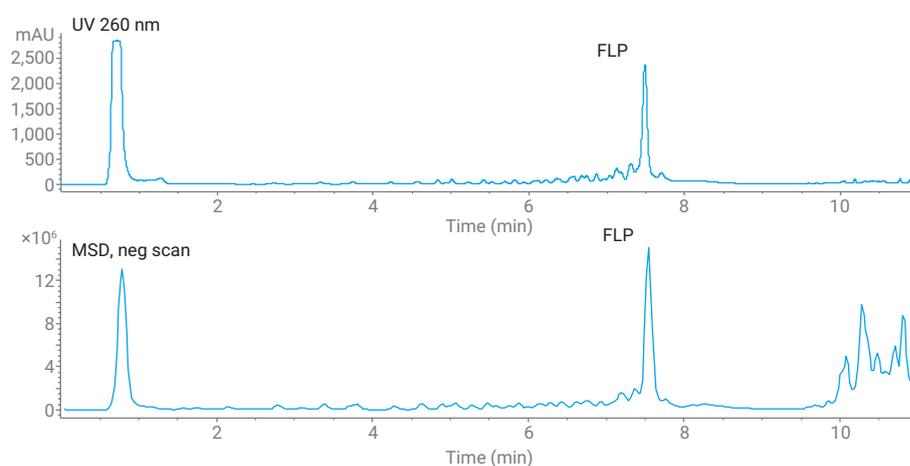


図 2. HA/HFIP と最適化されたグラジエントを使用した長い ON の分離

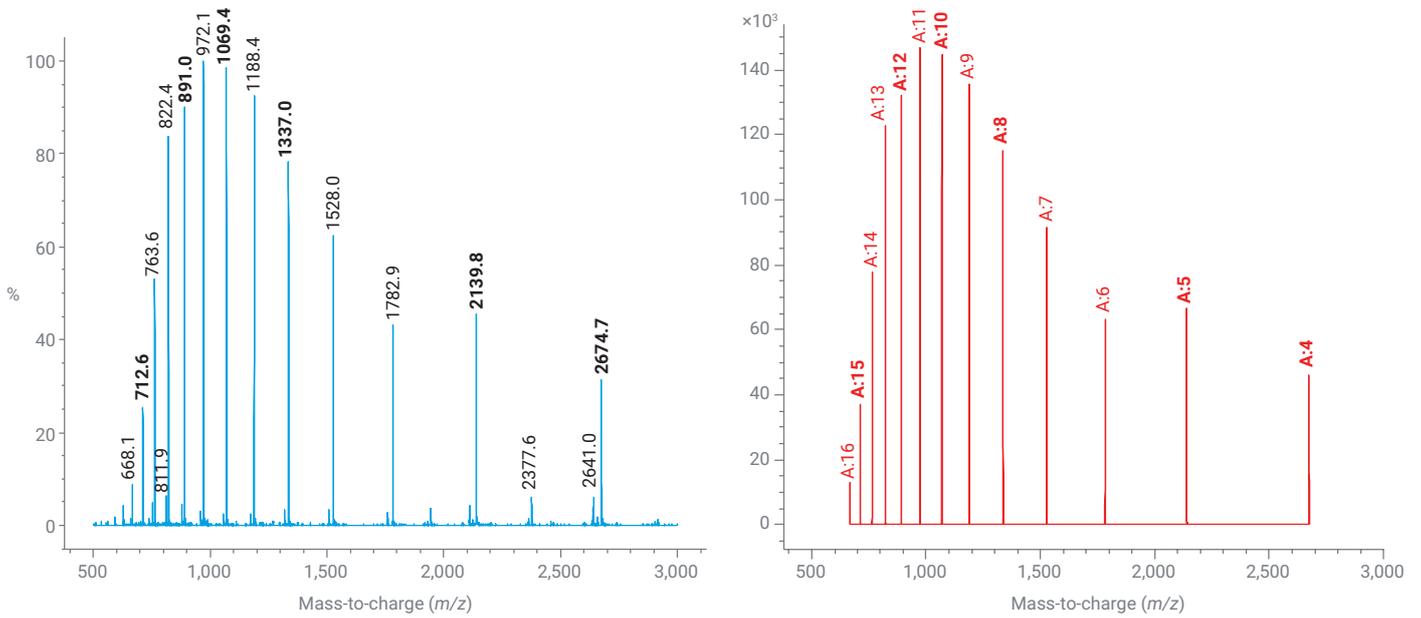


図 3. デコンボリューションで計算した短い ON のスペクトルと多価イオン (A: 電荷数)。FLP の計算分子量は 10,704 Da でした。フラクショントリガーとして使用するイオンは、太字で強調表示されています。

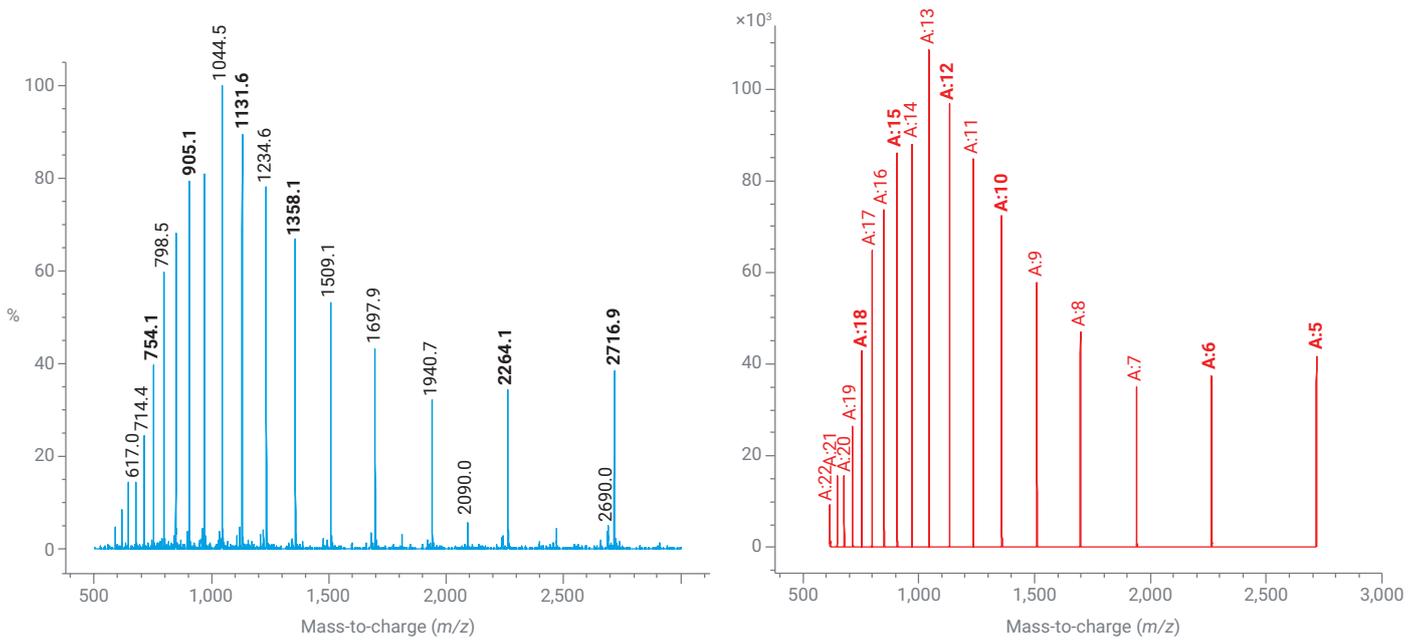


図 4. デコンボリューションで計算した長い ON のスペクトルと多価イオン (A: 電荷数)。FLP の計算分子量は 13,592 Da でした。フラクショントリガーとして使用するイオンは、太字で強調表示されています。

DBA/TRIS 分離の分析クロマトグラムを図 5 および 図 6 に示します。分析グラジエントの目的は、最高の分解能を実現することではなく、ターゲットピークのリテンションタイムにおける溶媒条件を決定することであることに注意してください。この計算を開始するには、クロマトグラムでピークを選択し、**Assign As Target** をクリックします。すると Automated Purification ソフトウェアは、ターゲットピークの溶出点を計算するだけでなく、ターゲットの分離を最適化するための全グラジエントを生成します。このグラジエントは微調整できます。例えば、ターゲットをフォーカスグラジエントの中央で溶出させるか、それとも最後に溶出させるかを制御して、早期に溶出させる不純物により多くの時間を与えることもできます。短い ON を精製するために適用したグラジエントを、図 7 に示します。

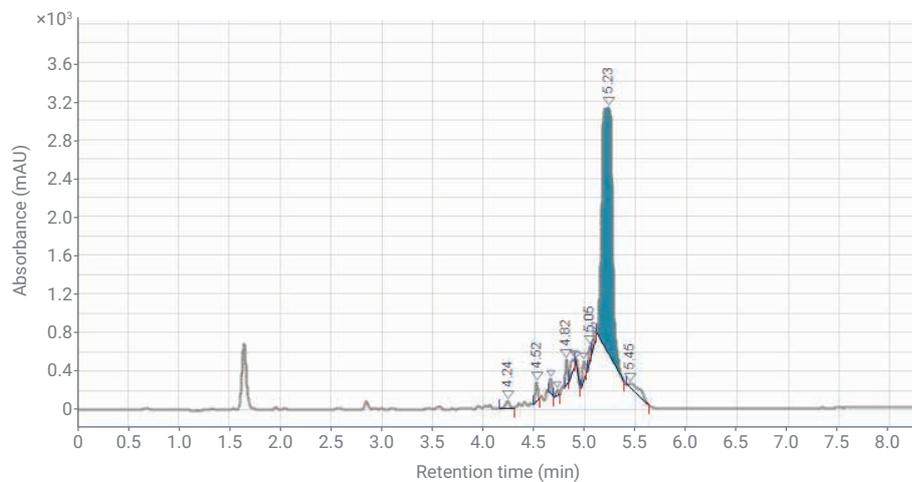


図 5. DBA/TRIS とジェネリックグラジエントを使用した短い ON の分離。FLP は青色で強調表示されています。

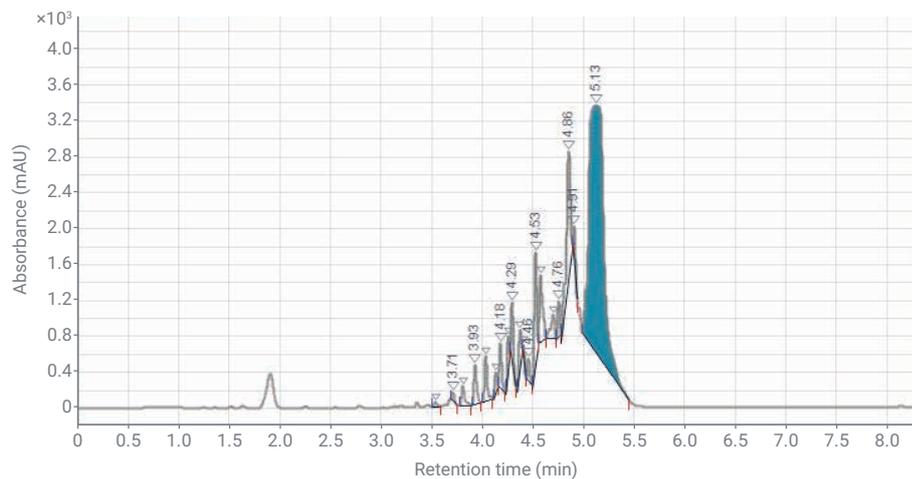


図 6. DBA/TRIS とジェネリックグラジエントを使用した長い ON の分離。FLP は青色で強調表示されています。

フォーカスグラジエントを用いて精製分析を開始する前に、フラクシオンコレクションをトリガーするターゲット質量を定義する必要があります。ON ごとに 2 つのターゲット質量を選択しました。これらは、短い ON では [M-4H]⁴ と [M-5H]⁵ に対応し、長い ON では [M-5H]⁵ と [M-6H]⁶ に対応します (図 3 および図 4 を参照)。2 価および 3 価のターゲット質量による自動トリガーをアクティブにすることにより、コレクションは短い ON では [M-8H]⁸、[M-10H]¹⁰、[M-12H]¹²、および [M-15H]¹⁵ で、長い ON では [M-10H]¹⁰、[M-12H]¹²、[M-15H]¹⁵、[M-18H]¹⁸ でもトリガーされます。図 8 に短い ON の分取分離とフラクシオンコレクションを示します。8 つのタイムスライスがコレクションされ、MSD シグナルによって正常にトリガーされています。UV シグナルとの重ね表示 (フラクシオンの目盛りはデレイタイムにより補正) は、MSD による選択性の向上を示しています。フラクシオンのトリガーに UV シグナルのみを使用していたら、コレクションの開始が早すぎて、多くの不純物がコレクションされてしまったことになります。MSD シグナルに基づいてトリガーすると、スクリーニングやプール、乾燥フラクシオンの数が減少し、より純度の高い分画が得られ、全体的な精製プロセスが高速化されます。長い ON の精製分析でも同様の結果が得られ、この場合 10 個のフラクシオンスライスでコレクションが行われました (図示せず)。コレクションを、事前定義された時間または量のスライスに分離することにより、単一の分画を再分析して製品を含む分画をプールすれば、純度要件を満たすことができます。³

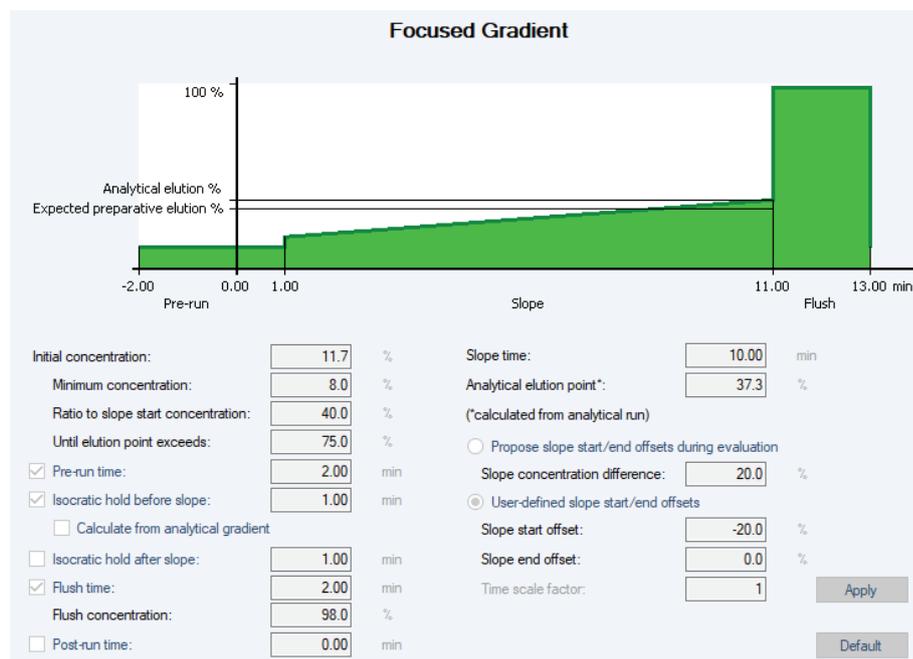


図 7. ファインチューニングのオプションを使用して、短い ON に対して計算されたフォーカスグラジエントプロファイル

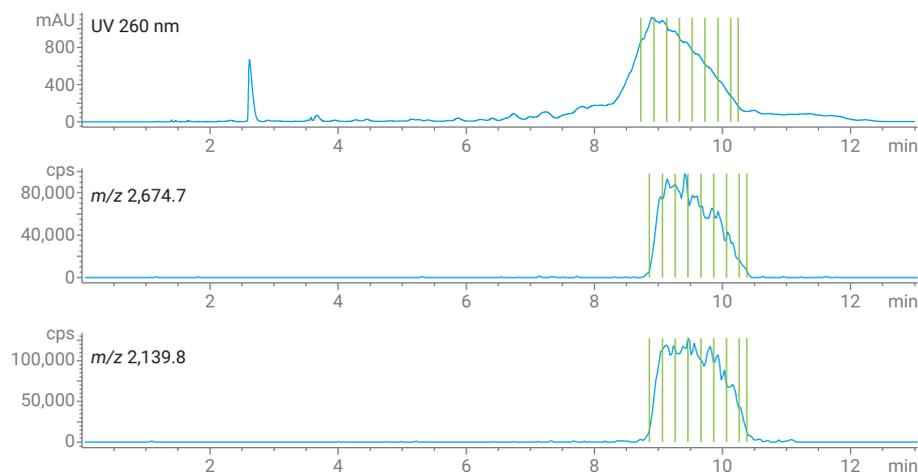


図 8. DBA/TRIS とフォーカスグラジエントを使用した短い ON の分取精製分析。緑色の線は、フラクシオンコレクションのタイムスライスを表します。

短い ON の精製分析中に収集された 8 つのスライスのフラクションの再分析結果を図 9 に示します。第 1 のスライス (青色のトレース) には不純物が含まれていますが、これはピークの割れで確認できます。他のスライスはすべて純度が 99 % を超えており、最終製品プールに使用できます。長い ON の精製分析中に収集された 10 個のスライスも同様に再分析を行い、同様の図が得られました。最初のスライスは不純物で部分的に汚染されていたが、他のスライスの純度は 99 % を超えていました (図示せず)。製品の回収率を最大化するには、より短い時間間隔でスライスを増やして収集することが考えられます。定量再分析メソッドを適用する場合、純度と製品含有量を一覧表示するプーリング表を作成し、特定の純度要件の収量を最大化するために使用できます。³

結論

30 ~ 50 ヌクレオチドの 2 つの ON サンプルに対して分取 HPLC を使用し、MSD シグナルでトリガーするフラクションコレクションにより精製を実現しました。両方のサンプルを、MS 互換メソッド (HA/HFIP) を使用して分析し、フラクションコレクションを選択的にトリガーするのに必要な質量スペクトルを得ました。分取精製には、高価な HFIP 試薬を使用せずに、DBA/TRIS を使用する別のメソッドを使用しました。TRIS は MS に対応していませんが、MSD へのスプリットフロー中で適切なメークアップ溶媒を使用することにより、高い選択性と信頼性のあるマスベースのフラクションコレクションが可能になりました。Automated Purification ソフトウェアを用いて、ジェネリック分析グラジエントを最適化されたフォーカス

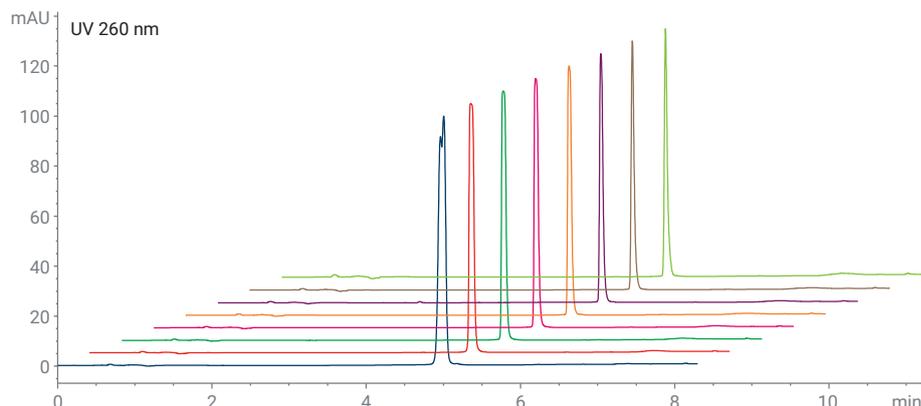


図 9. 短い ON の精製分析で収集された 8 つのフラクションの分析のクロマトグラム重ね表示

グラジエントに変換して分取を短縮し、純粋な化合物をより迅速に取得しました。両方の ON ともフラクションスライスを正常に収集し、純度要件を満たすフラクションの再分析と選択的プールに成功しました。分析はすべて、Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムを使用して実施しました。このカラムを用いれば、分析アプリケーションから分取アプリケーションへのスケールアップが迅速かつ簡単に実現できます。

謝辞

本研究は、KKS SYNERGY プロジェクト「デジタルツールを使用したプロセスおよび品質管理の改善メソッド」(認可番号 20210021) を通じて、スウェーデン知識財団の支援を受けました。オリゴヌクレオチドサンプルを提供いただいた、著者である Qiagen DNA Synthesis の Olle Ståhlberg 博士に感謝します。

参考文献

1. Catani, M. et al. Oligonucleotides: Current Trends and Innovative Applications in the Synthesis, Characterization, and Purification. *Biotechnology Journal* **2020**, 15, 8.
2. Evaluation of Different Ion-Pairing Reagents for LC/UV and LC/MS Analysis of Oligonucleotides. Agilent Technologies application note, publication number 5994-2957EN, **2021**.
3. 高速液体クロマトグラフィーを用いた 1 本鎖 RNA オリゴヌクレオチドの精製. Agilent Technologies application note, publication number 5994-3514JAJP, **2021**.

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。

DE68918377

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, December 6, 2022

5994-4877JAJP