

合成オリゴヌクレオチドのセミ分取精製用の 表面多孔質カラム

同じ分析 LC 機器を用いたメソッド開発とスケールアップ



著者

Andrea Angelo P. Tripodi and
Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

概要

合成オリゴヌクレオチドは、製造時に使用される各化学反応の効率に限界があるため、必然的に多くの不純物が含まれます。これらの不純物には、欠損配列（1 つ以上のヌクレオチドが欠落している）や、最終的な脱保護または切断の段階で生じることが多い反応副生成物が含まれています。大規模スケールの精製カラムや機器に切り替えることなく、小規模スケールの精製（最大数ミリグラムまで）にイオンペア逆相クロマトグラフィーを使用できることは、多くの場合有利です。最新のカラム開発には、カラムへのロード量を損なうことなく、優れた性能と分離能を実現する表面多孔質粒子を充填したカラムが含まれます。このアプリケーションノートでは、合成オリゴヌクレオチドの精製と、同じ分析 LC 機器を使用して内径 10 mm カラムにスケールアップするための最適なメソッド条件を決定します。

はじめに

アンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉 RNA (siRNA)、アプタマーなどの一部の核酸クラスが治療用アプリケーション向けに研究されています。これらは、リボース糖、プリンまたはピリミジン塩基、およびリン酸結合を含む反復ヌクレオチド単位により形成されています。¹また、酵素分解に対する安定性を向上させるために、2'-O メトキシル化やリン酸化など、さまざまな化学修飾を含む場合があります。

セミ分取精製の前に、サンプルをHPLC で分析して、不純物プロファイルを把握しました。その後、スケールアッププロセスを簡略化するために、セミ分取カラムと同じ固定相を充填した分析カラムを用いて、さまざまなメソッド最適化ステップを実施しました。

このアプリケーションノートで使用しているカラムは、表面多孔質粒子を使用しています。このような粒子は、多孔質外層への拡散経路長が短いため、シャープなピークが得られ高分離能を実現できるという大きな利点があります。ただし、この粒子径によって、固定相全体の結合容量を大幅に低減させることなく、動作圧力を非常に低くすることができます。

また、本研究は、分析、セミ分取精製、フラクション分析に同じ分析 LC 機器とソフトウェアを使用することも明確に示しています。加熱カラムコンパートメントを含む同じ LC 機器を使用することにより、スケールアップ手順が簡略化されます。

実験方法

試薬および調製

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。

サンプル：精製するサンプルは、お客様から提供された粗製の全 2'-O-メチル化 22-mer オリゴヌクレオチドでした。

サンプル調製

異なる濃度の RNA サンプルを、0.1 M TEAA を含む移動相 A で希釈しました。

移動相の前処理

氷酢酸とトリエチルアミンを用いて、1 M TEAA の原液を調製しました。pH は、氷酢酸 (pH 7.0) またはトリエチルアミン (pH 8.65) により、分析に適した値に調整しました。

メソッド条件

HPLC 条件	
カラム	分析カラム： AdvanceBio オリゴヌクレオチド 2.7 μm、4.6 × 150 mm (653950-702) AdvanceBio オリゴヌクレオチド 4 μm、4.6 × 150 mm (693971-702) セミ分取カラム： AdvanceBio オリゴヌクレオチド 4 μm、10 × 50 mm (639750-702) AdvanceBio オリゴヌクレオチド 4 μm、10 × 150 mm (633750-702)
移動相	溶出液 A) 100 mL 1M TEAA + 900 mL 水 溶出液 B) 100 mL 1M TEAA + 900 mL ACN
グラジエント	説明のとおり
流量	説明のとおり
カラム温度	説明のとおり
注入量	説明のとおり

機器と材料

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 分析システムで実施しました。

- 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、サンプルサーモスタット付き (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117C)、10 mm InfinityLab Max-Light カートリッジセル (G7117-60020) を搭載
- Agilent 1260 Infinity バイオイナート分析フラクションコレクタ (G5664A)

結果と考察

オリゴヌクレオチドが、逆相 HPLC カラムに確実に結合するためには、適切なイオンペア試薬を使用する必要があります。酢酸トリエチルアミン (TEAA) がよく用いられますが、文献にはさまざまなメソッドが記載されています。1M TEAA の原液を用いて水性相と有機移動相を調製し、グラジエントの間、イオンペア試薬の濃度を一定にすることが重要です (詳細は、「実験方法」を参照)。1 mol の酢酸を水に溶解させてから、1 mol のトリエチルアミンを添加して完全に溶解させることにより、原液の pH を必要に応じて調整することができます。

図 1 は、4.0 μm 粒子を充填した 4.6 $\times$ 150 mm 分析カラムを用いて、10 mg/mL の濃度に調製した、粗製のオリゴヌクレオチドサンプルのグラジエント溶出を示しています。分離は、移動相 pH 7.0 と移動相 pH 8.65 を用いて行いました。使用したグラジエントは、30 分で 5 ~ 35 % B でした。

詳しく調査したところ、pH 8.65 での分離は、いくつかの不純物ピークの不純物が明らかに良好であり、最適な移動相組成として選択しました。

オリゴヌクレオチド分析では、分子間および分子内の二次的相互作用を克服して、よりシャープなピークを得ることができるため、多くの場合高温が用いられます。これは図 2 に示されており、25 $^{\circ}\text{C}$ と 60 $^{\circ}\text{C}$ での分離を、30 分で 5 ~ 22 % B の最終グラジエントを用いて比較したものです。高温では移動相の粘度も低下するため、動作圧力を下げながら分離能をさらに向上させることができます。AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムは、高 pH、高温での使用に適していますが、すべての逆相カラムが、このような過酷な条件に耐えられるわけではありません。

同じ LC 機器で、内径 4.6 mm 分析カラムから内径 10 mm セミ分取カラムにスケールアップするために、LC 機器で分析キャピラリーを使用することによる背圧の問題を回避する

ために、より低い流速で分離を行うことにしました。

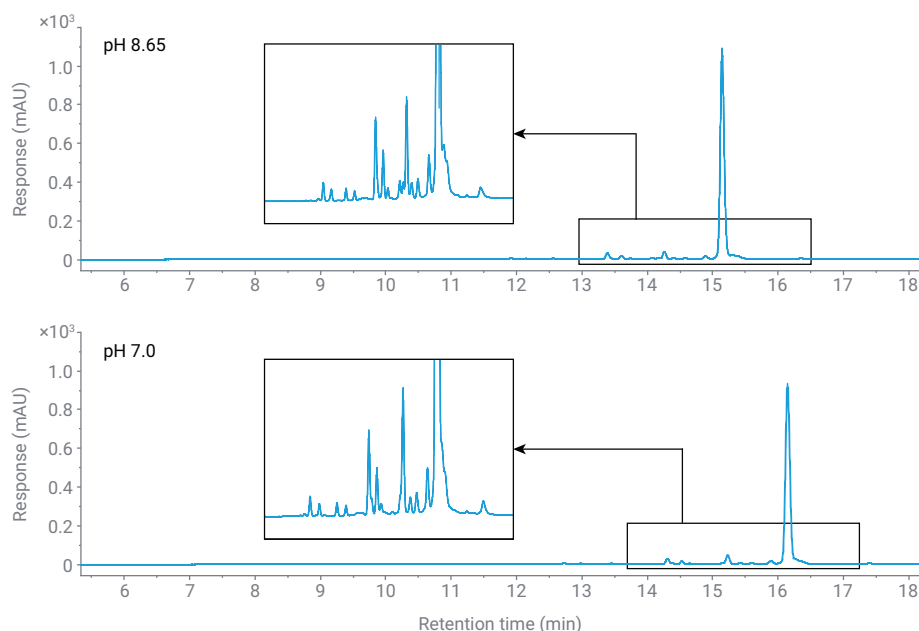


図 1. 4.6 $\times$ 150 mm, 4 μm Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムでの RNA オリゴヌクレオチドサンプルの pH 最適化を示す分析 LC-UV クロマトグラム (260 nm)

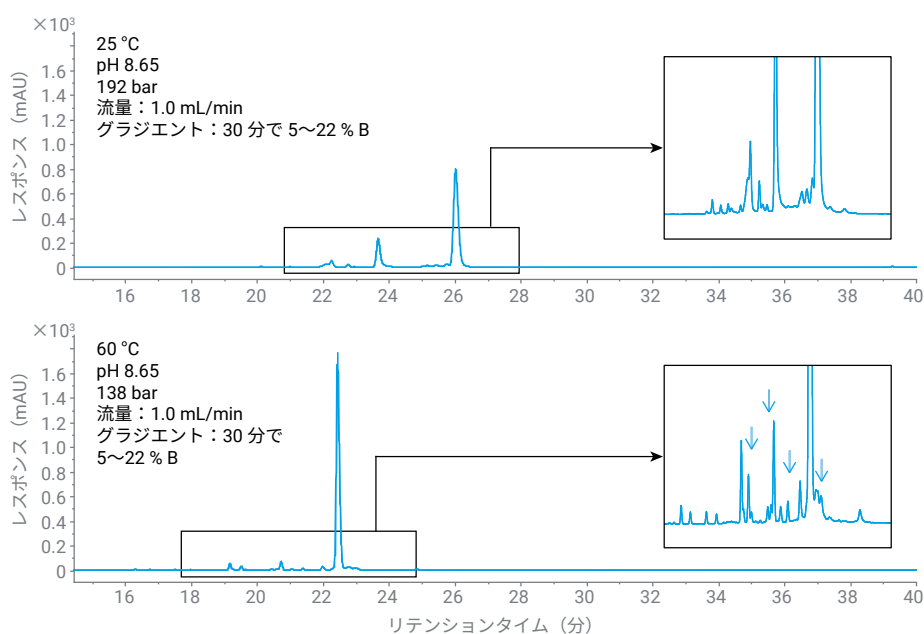


図 2. 4.6 $\times$ 150 mm, 4 μm Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムでの RNA オリゴヌクレオチドサンプルの温度最適化を示す分析 LC-UV クロマトグラム (260 nm)

図3は、内径4.6 mm分析カラム（4 μ m 粒子を充填）を0.42 mL/min で動作させた場合の分離を、内径10 mm セミ分取カラムを2.0 mL/min で動作させた場合（つまり、いずれのカラムも同じ直線速度約150 cm/hr で

動作させた場合）の分離と比較して示しています。

10 $\times$ 150 mm カラムでセミ分取分離を行う前に、10 $\times$ 50 mm カラムでも分離を行いました。図4に示す結果は、分離がカラムの長さ

ではなくグラジエントプロファイルにより制御され、同等の結果が得られたことを明確に示しています。動作圧力から、プレカラム熱交換器に変更を加えただけで、カラムと機器は2.0 mL/min で良好に機能していることが判明

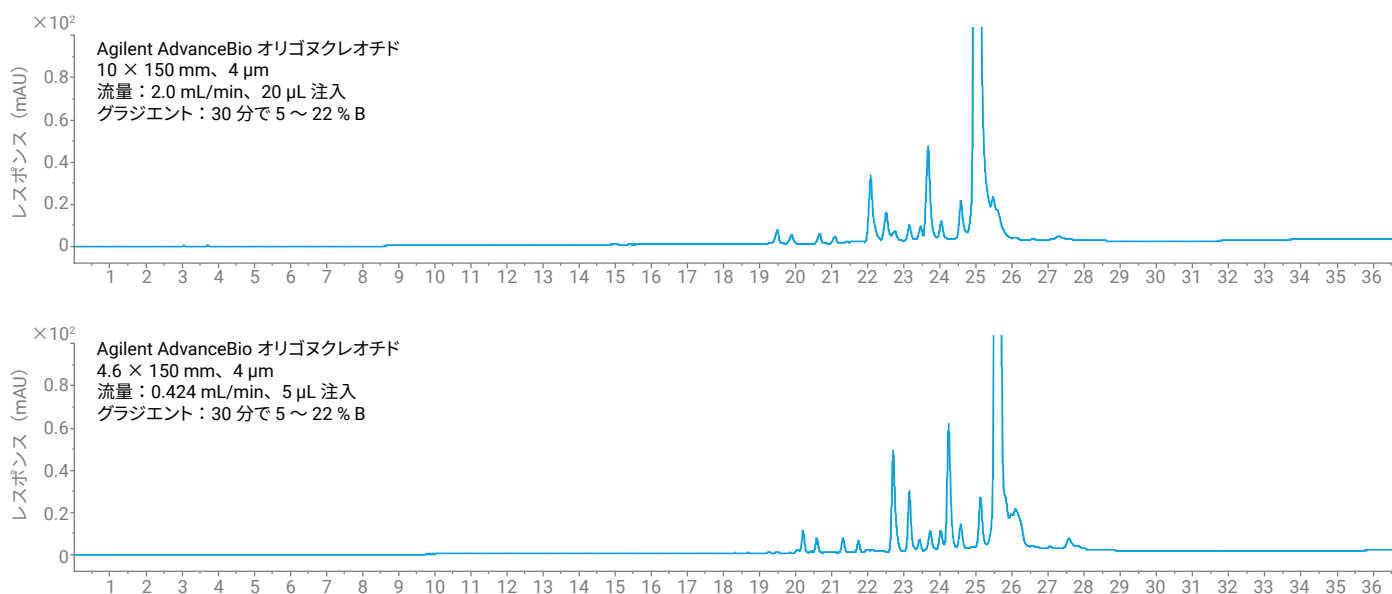


図3. RNA オリゴヌクレオチドサンプルに対して同じ直線速度分離を示す分析およびセミ分取 LC-UV クロマトグラム

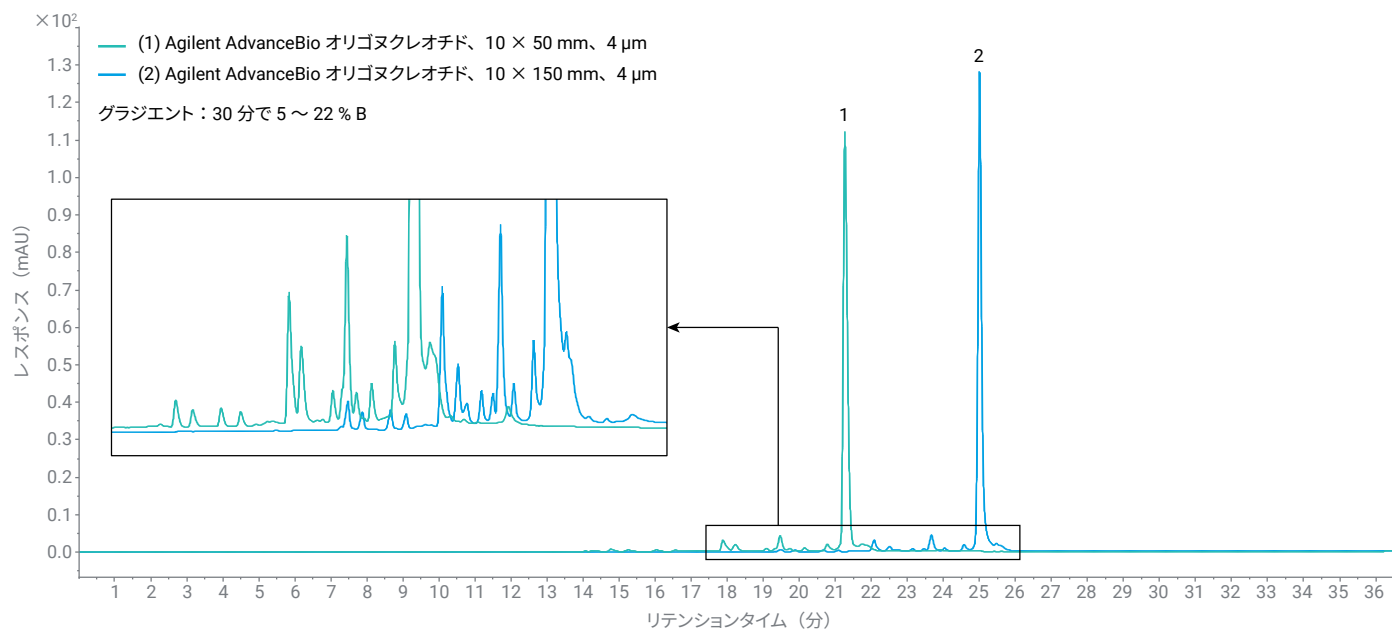


図4. セミ分取 LC-UV クロマトグラム（260 nm）の比較。同じグラジエントプロファイルを使用した場合、高い再現性を示します。

しました。これは、移動相が問題なく 60 °C まで加熱できるように、高流量型に変更されました。より長い 150 mm カラムは容量が増加しており、さらなる分析に使用しました。

この機器のデフォルトの最大注入量は 20 μ L です。より大容量のサンプルを注入するために、標準の注入ループをより大きいサイズのものに交換して、40 μ L (1 回の注入あたり) を注入できるようにしました。より大量の注入を行うために機器を再設定するのではなく (分析分

離の性能を損なうため)、分離グラジエントを開始する前にカラムに繰り返し注入を行いました (2 $\times$ 40 μ L または 4 $\times$ 40 μ L)。図 5 は、セミ分取分離と、機器の再設定を行わずにその後の分析用に収集された時間ベースのフラクションを示しています。

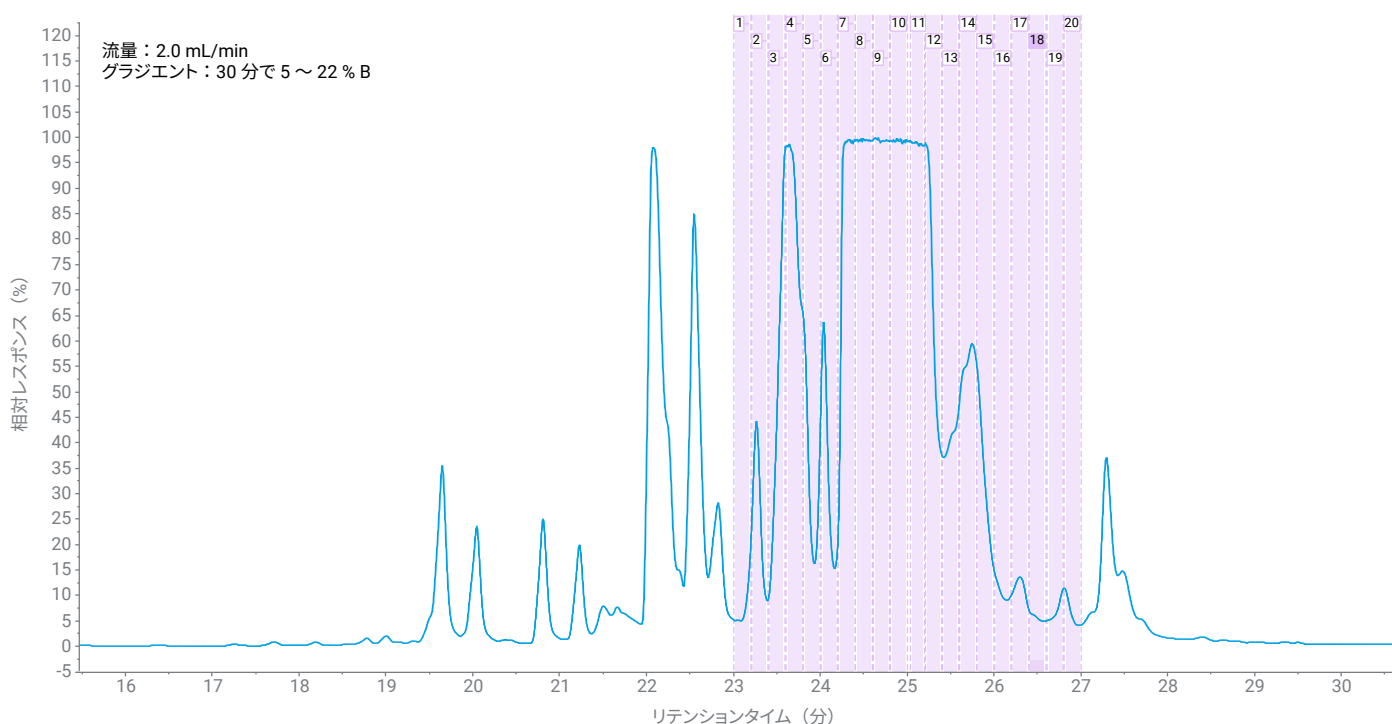


図 5. セミ分取カラムでの 160 μ L (3.2 mg オンカラム) 注入のクロマトグラム (UV 260 nm)。紫色のバーは、0.2 分タイムスライスのフラクションコレクションを表しています。

セミ分取カラムを 2.7 μm 、4.6 $\times$ 150 mm 分析カラムに交換した後、個々のフラクションを分析しました。図 6 は、メインピークをカバーする 6 種類のフラクションを重ね表示したものであり、フラクションの組み合わせによる効果を

示す収率と純度の情報も一緒に示しています。図 7 は、この情報をグラフで示したものです。セミ分取クロマトグラムのメインピークは、フラクション全体を通して同じ濃度のように見えますが、これは検出器が飽和しているためです。

個々のフラクションを見てみると、予想されるようにピーク全体の濃度は均一ではありません。

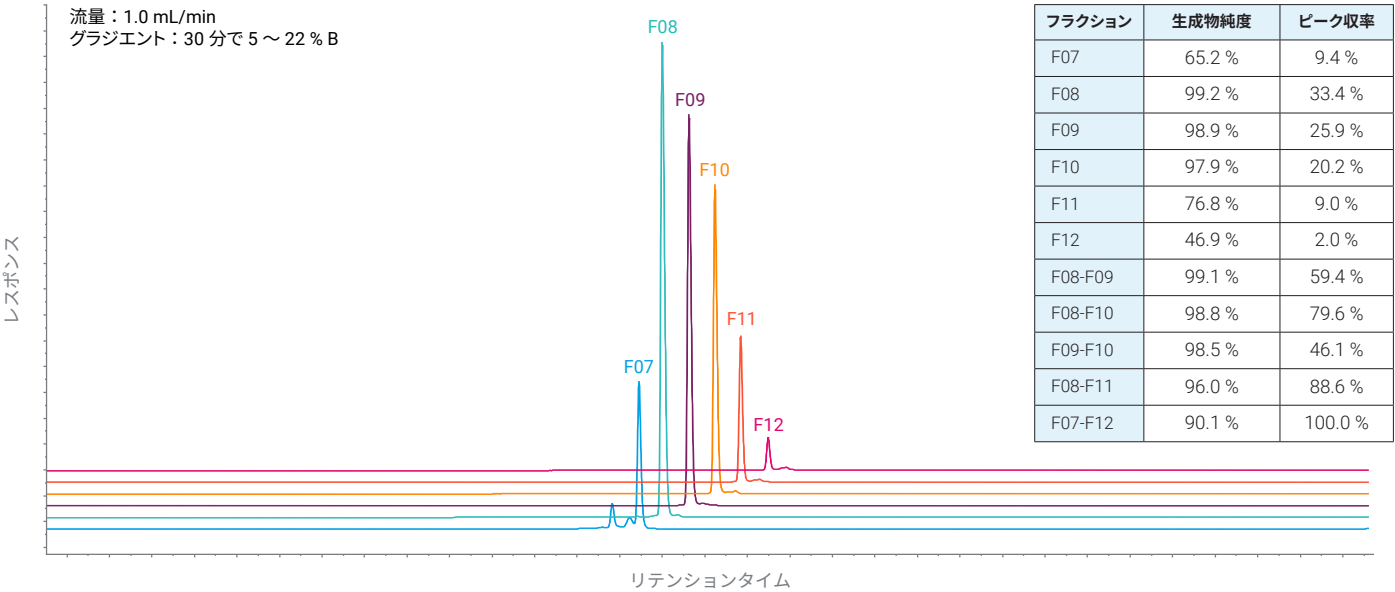


図 6. フラクションコレクタから収集した 6 フラクションの再分析のクロマトグラムの重ね表示（UV 260 nm）。表（挿入図）は、異なるフラクションをプーリングした場合の効果を含む、メインピークの純度と収率を示しています。

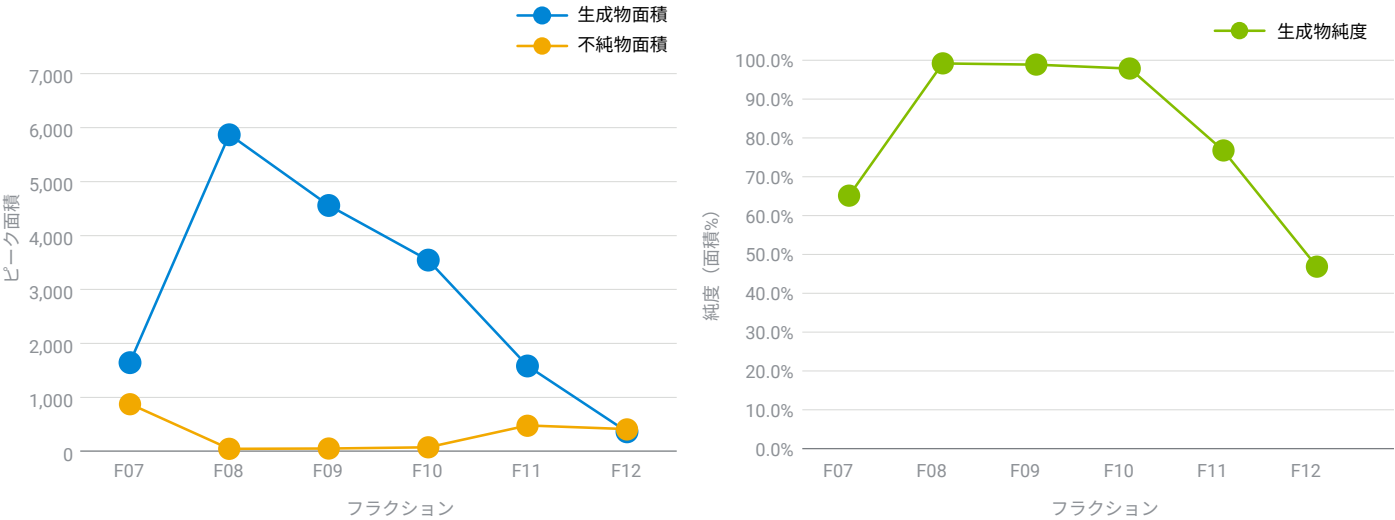


図 7. フラクション組成のグラフ

結論

このアプリケーションノートでは、イオンペア逆相クロマトグラフィー下での RNA サンプルの精製について、最適化されたメソッド条件を実証しました。さらに、内径 10 mm カラムを使用することにより、分析スケールからセミ分取スケールへの高速かつ容易なスケールアップメソッドを確立して、より高いサンプルロード量を可能にしました。最後に、全体を通して同じ Agilent 1290 Infinity II 分析 LC システムを、オートサンプラ/フラクションコレクタと組み合わせて使用することにより、タイムスライスでターゲットピークを収集して、フラクションプールの純度を再分析することができました。

参考文献

1. Goyon, A.; Fan, Y.; Zhang, K. Chapter 10 - Analysis of Oligonucleotides by Liquid Chromatography. In Handbooks in Separation Science, Liquid Chromatography (Third Edition); v2; Fanali, S.; et al. ed.; 2023; pp. 357–380.

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。

DE79816005

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2024
Printed in Japan, May 31, 2024
5994-7478JAJP