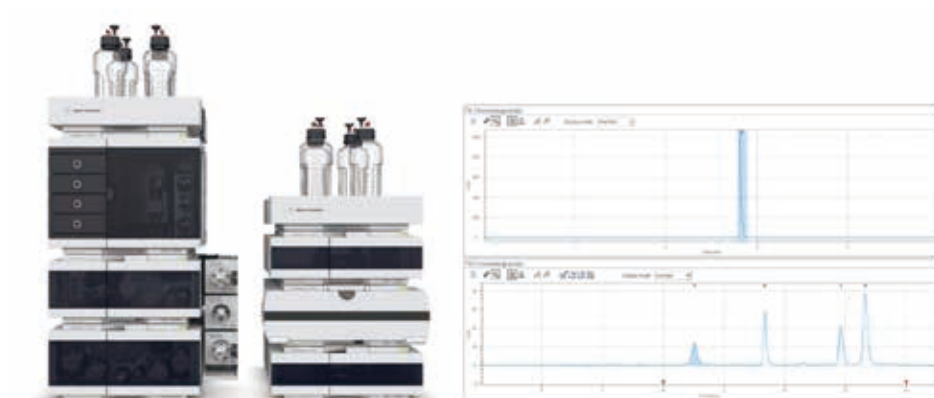


脱塩処理の自動化による オリゴヌクレオチドの 2D-LC 分析

Agilent InfinityLab 2D-LC ソリューションを用いた
オンライン脱塩によるイオンペア逆相 LC 分析



著者

Sonja Krieger and
Clarissa Dickhut
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

ホスホロアミダイト法を用いて合成したオリゴヌクレオチドは通常、イオンペア逆相液体クロマトグラフィー (IP-RPLC) とアニオン交換クロマトグラフィーで分析し、精製します。アニオン交換精製フラクションに含まれる高濃度の塩により、IP-RPLC 分析でイオンペアを形成するオリゴヌクレオチドの能力が低下します。そのため、IP-RPLC 分析の前にサンプルの脱塩が必要となります。この脱塩は通常、遠心式フィルタを用いた手作業で行います。

このアプリケーションノートでは、高塩濃度の溶液中のオリゴヌクレオチドについて、一次元目 (¹D) でオンライン脱塩を行い、二次元目 (²D) で IP-RPLC 分析を行う、ダイレクトな 2D-LC 分析について説明します。この設定では、2D-LC のアプリケーションでワークフローの速度が向上し、手作業によるサンプル前処理の必要がなくなります。

はじめに

分子生物学および分子診断では、標準オリゴヌクレオチドや合成した修飾オリゴヌクレオチドを利用できることが、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、遺伝子サイレンシングおよび関連技術において求められます¹。また、合成オリゴヌクレオチドは、がんやウイルス性疾患などさまざまな疾患の治療薬として、ますます重要になっています²。オリゴヌクレオチドベースの医薬品にはアンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉 RNA (siRNA)、アプタマなどがあります。アンチセンスオリゴヌクレオチドや siRNA はいずれも、mRNA の翻訳を妨げることによって、タンパク質合成を阻害します。アプタマは、アプタマ-タンパク質複合体を生成し、これによりタンパク質の生物学的機能を阻害します³。

オリゴヌクレオチドは通常、ホスホロアミダイト法で合成します^{2,4}。得られる純度は通常、70 % を超えます。合成後の一般的な不純物には、配列の欠失や延長したオリゴヌクレオチド、また不完全な脱保護オリゴヌクレオチド、プリン塩基が欠失したオリゴヌクレオチド、その他の分解生成物などがあります²。合成後の脱保護オリゴヌクレオチドの分離および精製の分析には通常、イオンペア逆相液体クロマトグラフィー (IP-RPLC) とアニオン交換クロマトグラフィーを用います^{2,4}。

アニオン交換精製フラクションには通常、高濃度の塩 (例えば、塩化ナトリウム (NaCl) や臭化ナトリウム (NaBr)) が含まれます。IP-RPLC を用いてこの精製フラクションを分析する場合、高濃度の塩により、イオンペアを形成するオリゴヌクレオチドの能力が低下します。これは、リテンションタイムの変化、ピーク割れ、ブレイクスルーを引き起こす原因になります⁵。アニオン交換精製フラクションの IP-RPLC 分析を成功させるためには、分析前にサンプルを脱塩する必要があります⁵。脱塩は通常、手作業で行います。

このアプリケーションノートでは、オリゴヌクレオチド合成後の精製で得られたアニオン交換精製フラクションに匹敵する高濃度の塩を含む溶液中のオリゴヌクレオチドのダイレクトな 2D-LC 分析について説明します。2D-LC 分析の ¹D でオンライン脱塩し、²D で IP-RPLC 分析を実施します。この設定では、2D-LC のアプリケーションにおいて時間が短縮でき、手作業によるサンプル前処理の必要がなくなります。手作業による工程を省略できると、再現性が向上し、サンプル前処理中のサンプルの損失が防げます。

実験方法

装置

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC システムを次のモジュールで構成しました。

- 2 台の Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)、冷却システム (オプション #100) を搭載
- 2 台の Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- 2 台の Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)、Max-Light カートリッジセル 10 mm (G4212-60008) を搭載
- Agilent 1290 Infinity パルプドライブ (G1170A)、2D-LC パルプ、アクティブ溶媒モジュレーション (G4243A) を搭載
- 2 台の Agilent 1290 Infinity パルプドライブ (G1170A)、40 μ L ループ付きマルチハートカットバルブ (G4242-64000) を搭載

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition、バージョン C.01.08 [210] と 2D-LC ソフトウェア、バージョン A.01.04 SR1

カラム

- Agilent PLRP-S、100 Å、2.1 × 50 mm、3 μ m (p/n PL1912-1300)
- Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 × 50 mm、2.7 μ m (p/n 659750-702)

試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。メタノールは Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。超純水は、Millipak 0.22 µm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipore、Merck (ダルムシュタット、ドイツ)) を備えた Milli-Q Ultrapure Lab Water システムで精製しました。酢酸アンモニウムおよび 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-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。トリエチルアミン (TEA) およびアンモニア溶液は Fluka (シュタインハイム、ドイツ) および VWR (ダルムシュタット、ドイツ) からそれぞれ入手しました。

サンプルとサンプル前処理

オリゴヌクレオチド分離能標準試料、RNA、DNA サンプルを水に溶解しました。水に溶解した原液は、水または 2 M NaCl 溶液で 1:1 に希釈し、水と 1 M NaCl 溶液中に同じ濃度のオリゴヌクレオチドを含む溶液としました。1 M NaCl のオリゴヌクレオチド溶液を調製し、高濃度の塩を含むアニオン交換精製フラクションを再現しました。

次の手順を用いて、3 kDa NMWCO の Microcon YM-3 遠心式フィルタ (Millipore、Merck (ダルムシュタット、ドイツ)) で 1 M NaCl 溶液中のオリゴヌクレオチドを手作業で脱塩しました。

- 1 M NaCl のオリゴヌクレオチド溶液 (200 µL) をサンプルリザーバに添加し、14,000 g で 30 分間遠心分離し、オリゴヌクレオチドを濃縮して、塩を溶出させました。
- 洗浄のため、200 µL の水をサンプルリザーバに添加し、14,000 g で 30 分間遠心分離しました。

- 新しいバイアルにサンプルリザーバを上逆に入れ、1,000 g で 3 分間遠心分離 (逆遠心) しました。
- 濃縮液は約 200 µL になるように水に再溶解しました。

オリゴヌクレオチド分離能標準試料 (p/n 5190-9028):

14 mer: rCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

17 mer: rUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

20 mer: rUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

21 mer: rGrUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

RNA サンプル (RNA/2'-O-メチル 混合物、Agilent NSADで合成):

5'-GuGcCaAcCuGaUgCaGcU-3'、大文字: RNA、小文字: O-メチル

DNA サンプル (完全にチオール化、Agilent NSADで合成):

5'-ugcaCCCTGGATACCauuu-3'、大文字: DNA、小文字: O-メチル

メソッド

一次元分析

パラメータ	設定値	
カラム	AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 × 50 mm、2.7 µm	
溶媒	A) 400 mM HFIP + 15 mM TEA 水溶液 B) 溶媒 A/メタノール (50:50 v:v)	
グラジエント	オリゴヌクレオチド分離能標準試料: 0分 - 16%B 7分 - 30%B 13分 - 34%B 14分 - 100%B ストップタイム: 18分 ポストタイム: 3分	RNA および DNA サンプル: 0分 - 16%B 10分 - 70%B 10.5分 - 100%B ストップタイム: 14.5分 ポストタイム: 3分
流量	0.4 mL/min	
温度	60 °C	
検出	260/4 nm、リファレンス波長 360/100 nm、20 Hz	
注入量	注入量: 5 µL サンプル温度: 10 °C ニードル洗浄: 水: アセトニトリル (90:10) で 3 秒	

2D-LC 分析

一次元目	
カラム	PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 3 μm
溶媒	A) 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液、アンモニアで pH 7 に調整 B) メタノール
グラジエント	0 分 - 2 %B 2 分 - 2 %B 3 分 - 70 %B 5 分 - 70 %B 5.1 分 - 2 %B このグラジエントはキャリーオーバーを最小限に抑えるために 3 回繰り返し測定 ストップタイム: 19 分 ポストタイム: オフ 2D ポンプのストップタイムとポストタイムを設定し、すべてのカットの 2D 分析が完了するまで、分析時間の延長が可能
流量	0.4 mL/min
温度	60 °C
検出	260/4 nm、リファレンス波長 360/100 nm, 20 Hz バルブの切り替えによる圧力変動からフローセルを保護するために、圧力リリフスキット (G4236-60010) を 1D DAD と 2D-LC バルブの間に設置
注入量	注入量: 5 μL サンプル温度: 10 °C ニードル洗浄: 水 : アセトニトリル (90:10) で 3 秒
二次元目	
カラム	AdvanceBio オリゴヌクレオチド, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm
溶媒	A) 400 mM HFIP + 15 mM TEA 水溶液 B) 溶媒 A/メタノール (50:50 v:v)
温度	60 °C
検出	260/4 nm、リファレンス波長 360/100 nm, 20 Hz
2D-LC	
2D-LC モード	ハートカット
流量	0.4 mL/min
サンプリング表	リファレンスクロマトグラムとして 1D クロマトグラムを用いてタイムベースのハートカットを設定 オリゴヌクレオチド分離能標準試料: 2.79 分 RNA サンプル: 2.88 分 DNA サンプル: 3.04 分
ASM	ASM キャピラリー: 5500~1300 (0.12 × 85 mm) ASM 対応 (ASM 係数: 5) サンプルループのフラッシュ 3.0 回 (1.54 分)
2D グラジエント	オリゴヌクレオチド分離能標準試料: 0.00 分 - 10 %B 1.54 分 - 10 %B 1.55 分 - 16 %B 8.55 分 - 30 %B 14.55 分 - 34 %B 15.55 分 - 100 %B 2D グラジエントストップタイム: 19.55 分 2D サイクルタイム: 22.55 分 RNA および DNA サンプル: 0.00 分 - 10 %B 1.54 分 - 10 %B 1.55 分 - 16 %B 11.55 分 - 70 %B 12.05 分 - 100 %B 2D グラジエントストップタイム: 16.05 分 2D サイクルタイム: 19.05 分

結果と考察

図 1 に、水中 (図 1A) と 1 M NaCl 中 (図 1B) のオリゴヌクレオチド分離能標準試料の一次元 IP-RPLC 分析の結果を示します。図 1B では、注入したオリゴヌクレオチド溶液中の高濃度の塩により、イオンペアを形成するオリゴヌクレオチドの能力が低下していることが明確に示されています。注入ピークが大容量であることからわかるように、ピーク割れやブレイクスルーを引き起こしています。

遠心式フィルタを用いて 1 M NaCl 中のオリゴヌクレオチド分離能標準試料を手作業で脱塩し、ピーク割れやブレイクスルーを引き起こさないようにします。図 2 に脱塩したオリゴヌクレオチド溶液の IP-RPLC 分析の結果を示します。遠心フィルタを用いた手作業の脱塩では、時間と手間がかかり、約 75 分の時間を要します。さらに、手作業では脱塩後にそれぞれのオリゴヌクレオチドの強度の比率が変わります。これは、低分子のオリゴヌクレオチドが一部損失したことによる可能性が高いといえます。

アクティブ溶媒モジュレーション付きの 1290 Infinity II 2D-LC システムを用いたハートカット 2D-LC 分析により、高濃度の塩を含む溶液中のオリゴヌクレオチドを直接分析することができます。2D-LC 分析の 1D でオンライン脱塩し、続いて 2D で IP-RPLC 分析を実施します。

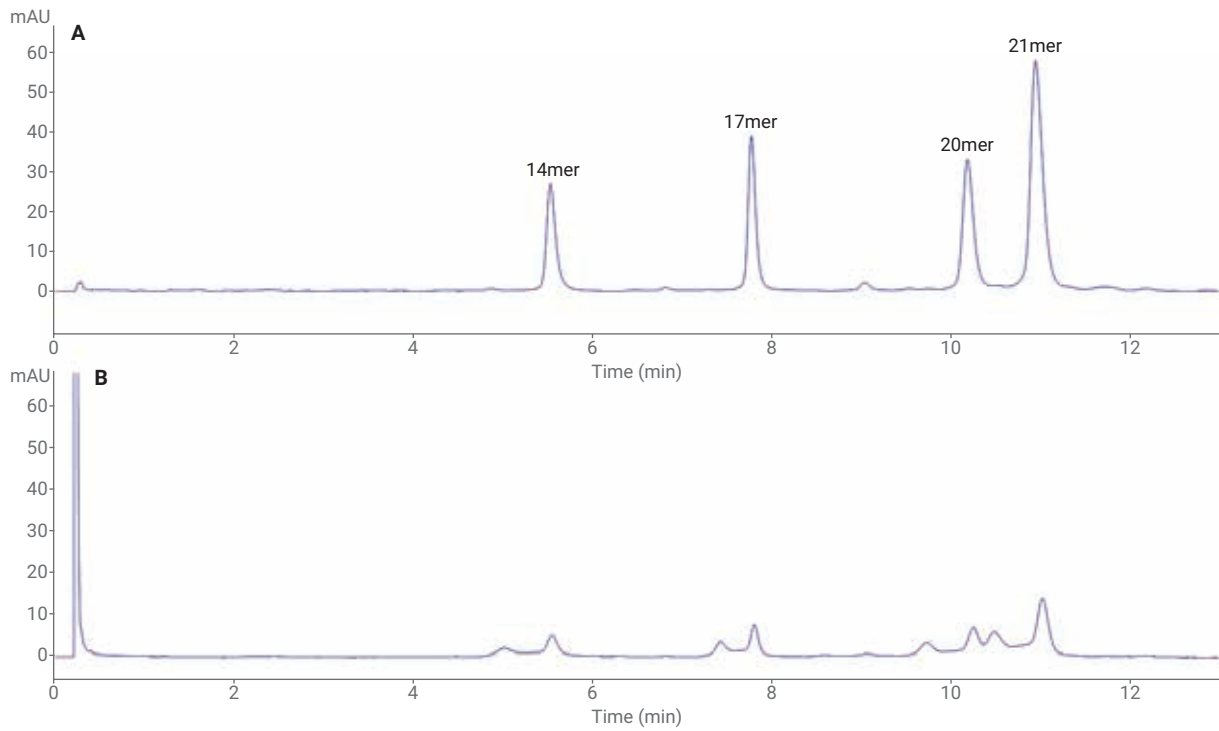


図 1. オリゴヌクレオチド分離標準試料の一次元 IP-RPLC 分析。(A) 水中のオリゴヌクレオチド分離標準試料、(B) 1 M NaCl 中のオリゴヌクレオチド分離標準試料、ブランク分析を差し引いた後のクロマトグラム

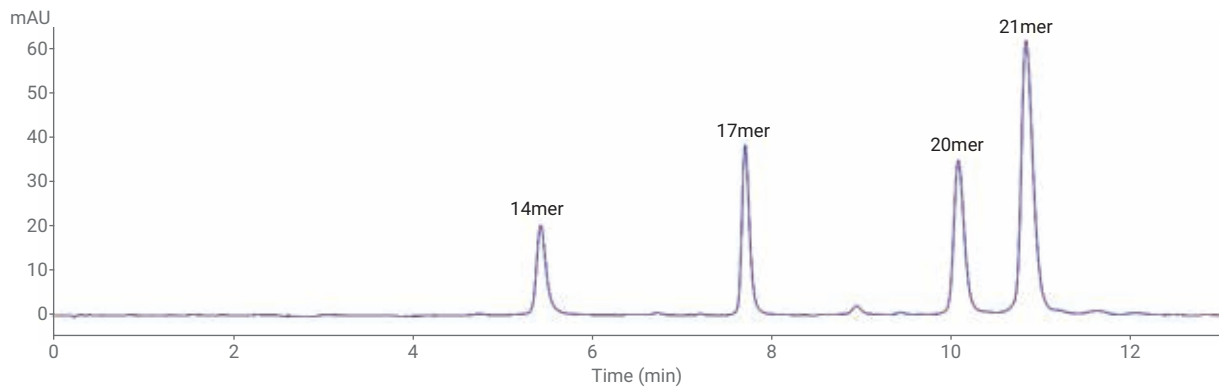


図 2. 遠心式フィルタを用いた手作業による脱塩後の 1 M NaCl 中のオリゴヌクレオチド分離標準試料の一次元 IP-RPLC 分析、ブランク分析を差し引いた後のクロマトグラム

図3および4に水中と1 M NaCl 中のオリゴヌクレオチド分離能標準試料の分析の結果を示します。¹Dでは、塩が廃液に流れ、PLRP-Sカラムにオリゴヌクレオチドが効果的に保持されます。次にオリゴヌクレオチドはシングル

ピークとして¹Dから溶出され、²D IP-RPLC分析に送られます。²Dで、オリゴヌクレオチドのIP-RPLC分析が成功します。図3および4の挿入図(6回連続分析のリテンションタイムと面積精度)に示したように、2D-LC分析は

¹Dと²Dの分離でいずれもリテンションタイムと面積精度が良好であることを示しています。

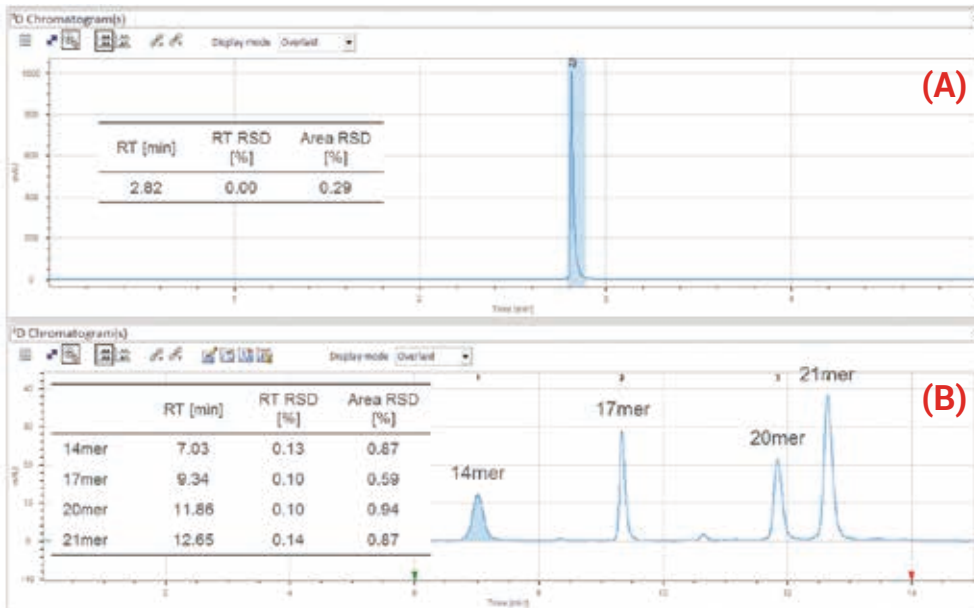


図3. 水中のオリゴヌクレオチド分離能標準試料の2D-LC分析。A) ¹Dクロマトグラム、B) ²Dクロマトグラム、6回連続分析のリテンションタイムと面積精度、ブランク分析を差し引いた後のクロマトグラム

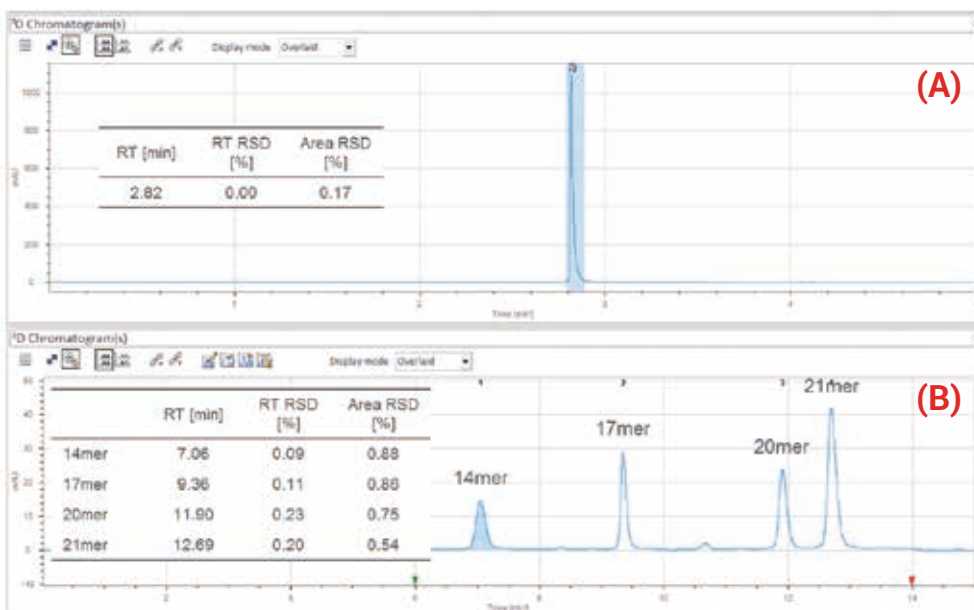


図4. 1 M NaCl 中のオリゴヌクレオチド分離能標準試料の2D-LC分析。A) ¹Dクロマトグラム、B) ²Dクロマトグラム、6回連続分析のリテンションタイムと面積精度、ブランク分析を差し引いた後のクロマトグラム

一次元 IP-RPLC メソッドと比較して、¹D のオンライン脱塩と ²D の IP-RPLC 分析を組み合わせた 2D-LC メソッドは、約 4.5 分長くなりますが、サンプルの前処理の必要がありません。これに対し、一次元 IP-RPLC 分析に必要な手作業による遠心フィルターを用いた脱塩は約 75 分かかります。サンプル前処理とサンプルの分析にかかる時間を合わせると、このプロトコルの 2D-LC メソッドに必要な時間は、約 96 分から 26 分に短縮されます。つまり、ワークフローの速度が 3 倍以上短縮されることに

なります。さらに、2D-LC メソッドはサンプル前処理が不要になり、手作業を減らすことになります。

図 5 と 6 に、RNA サンプルと DNA サンプルの一次元 IP-RPLC 分析の結果を示します。1 M NaCl 中の RNA サンプルを注入すると、高濃度の塩により、イオンペアを形成するオリゴヌクレオチドの能力が低下します。このことは、図 5B のピーク割れやブレイクスルーからもわかります。1 M NaCl 中の RNA サンプルを手作業で脱塩すると、IP-RPLC 分析が成功

しました (図 5C)。1 M NaCl 中の DNA サンプルの場合、注入溶媒の高濃度の塩の影響はあまり受けません。図 6B に示すように、ほんのわずかなブレイクスルーピークが見られるだけです。

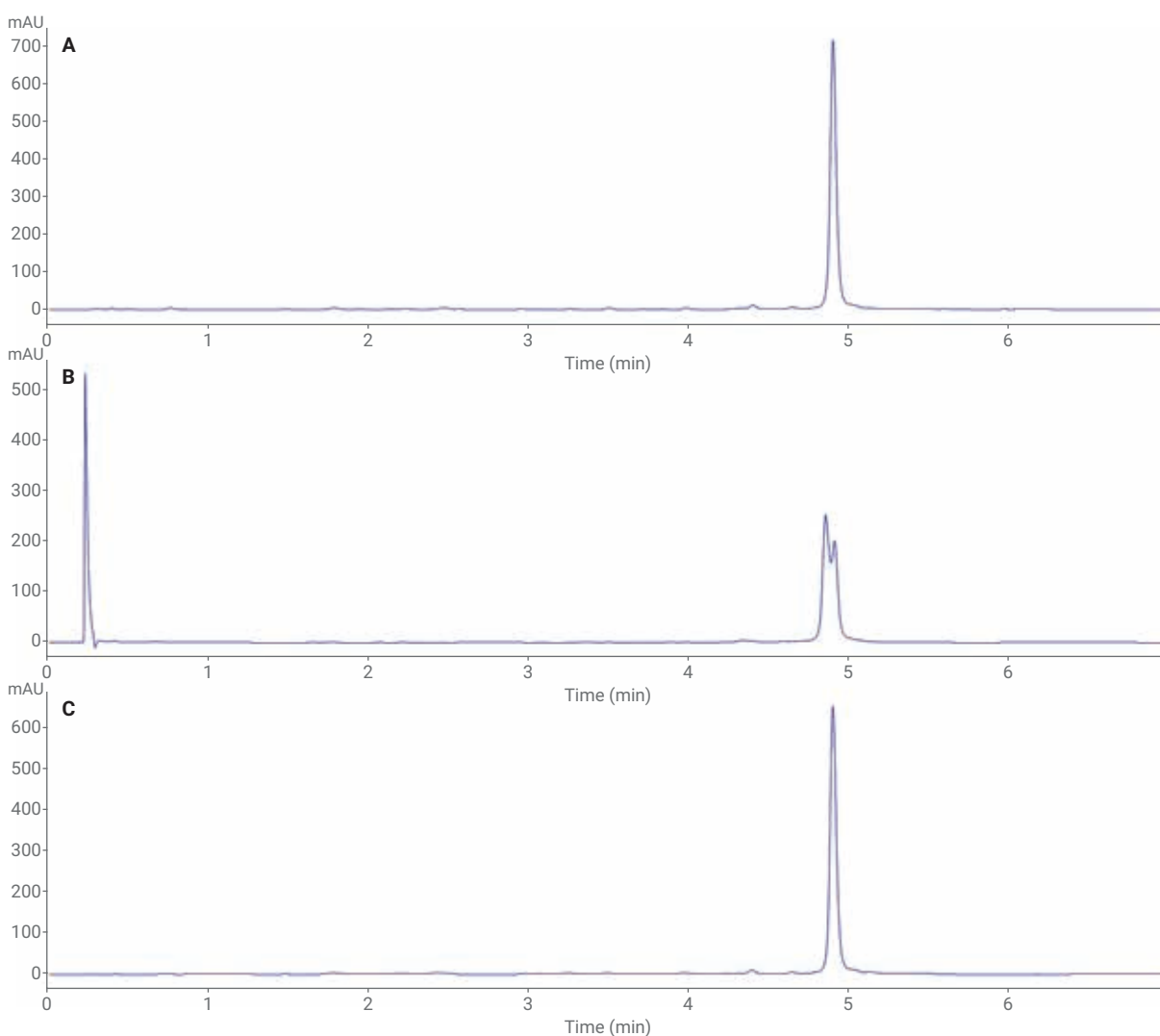


図 5. RNA サンプルの一次元 IP-RPLC 分析。A) 水中の RNA サンプル、B) 1 M NaCl 中の RNA サンプル、C) 遠心式フィルターを用いて手作業で脱塩後の 1 M NaCl 中の RNA サンプル、ブランク分析を差し引いた後のクロマトグラム

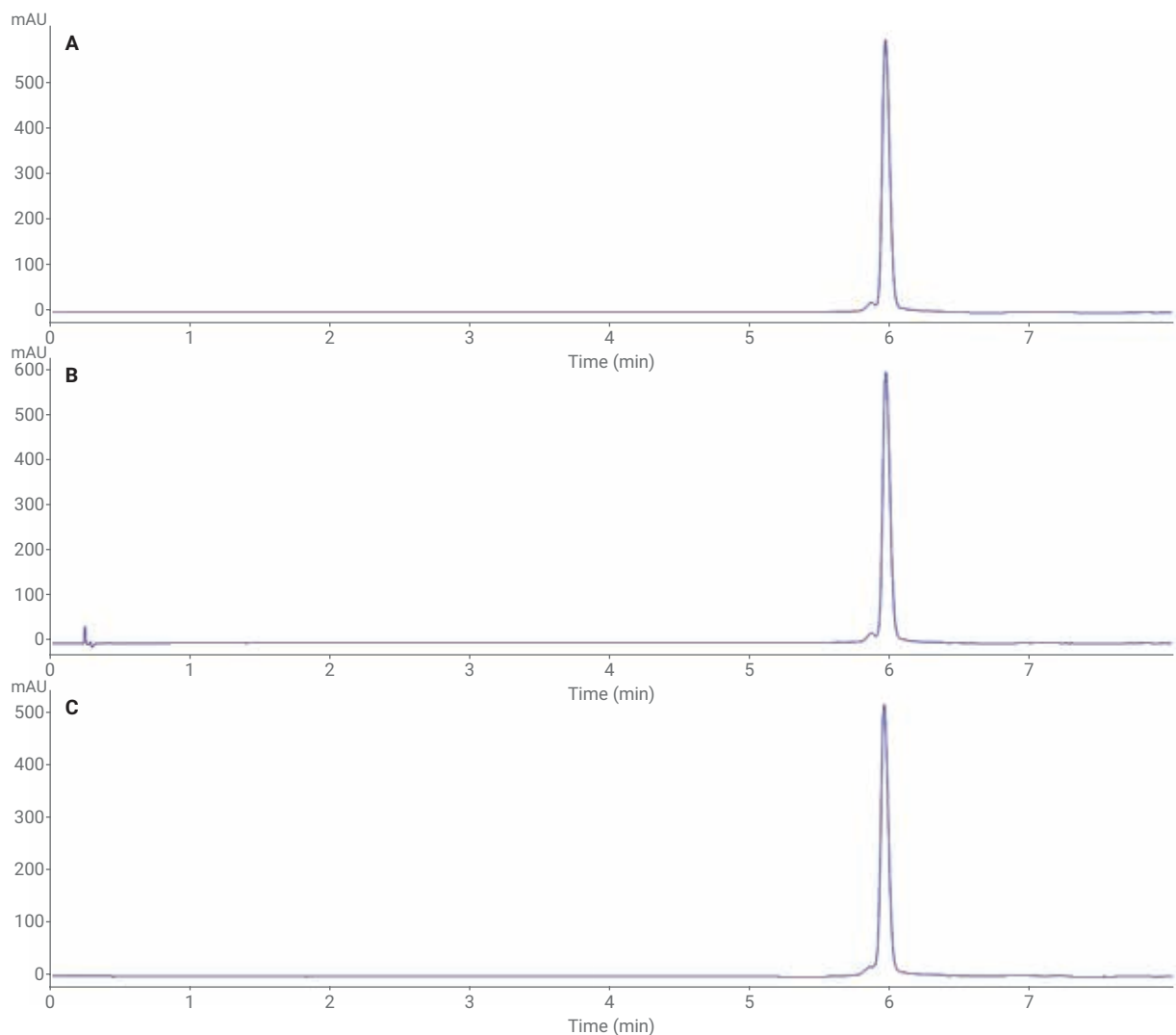


図 6. DNA サンプルの一次元 IP-RPLC 分析。A) 水中の DNA サンプル、B) 1 M NaCl 中の DNA サンプル、C) 遠心式フィルタを用いて手作業で脱塩後の 1 M NaCl 中の DNA サンプル、ブランク分析を差し引いた後のクロマトグラム

図 7 と 8 にそれぞれ、1 M NaCl 中の RNA サンプルと DNA サンプルの 2D-LC 分析の結果を示します。RNA および DNA の効果的な保持と脱塩により、¹D 後に ²D での優れた IP-RPLC 分析が可能になりました。²D では、主要化合物から不純物がいくつか分離されており、これは、図 7 と 8 の ²D クロマトグラム

の挿入図 (ベースラインの拡大図) からわかります。1 M NaCl 中の RNA と DNA サンプルの 2D-LC 分析後に得られたメインピークのピーク面積および検出された不純物に基づいて、両方のサンプルの純度は約 96 % と計算されました。この値は、遠心式フィルタを用いて手作業で脱塩した後の一次元分析の結果に

ついて、同じ方法で計算した純度と一致しています。

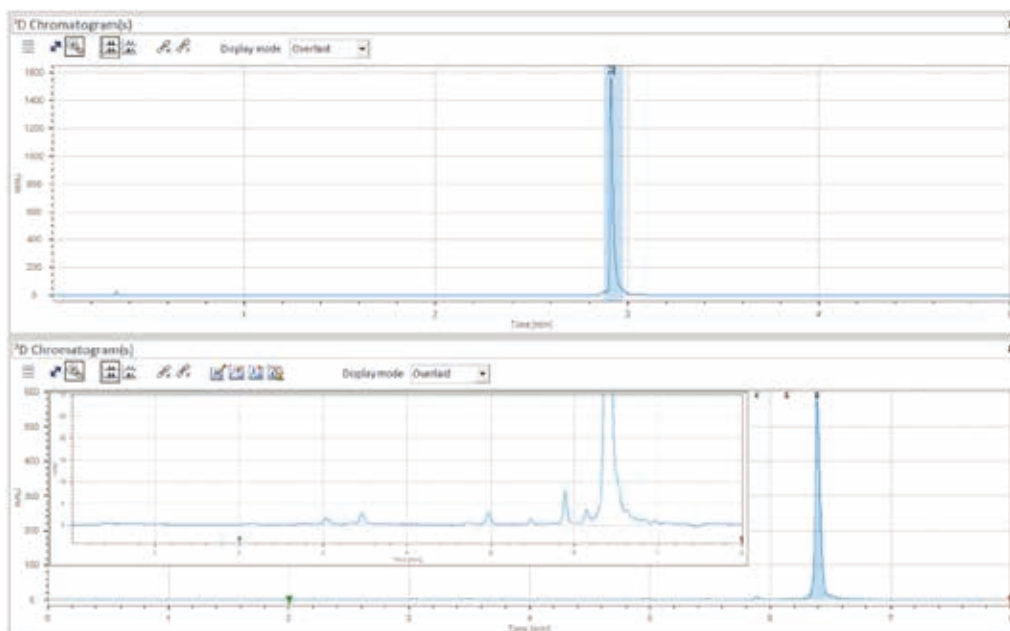


図 7. 1 M NaCl 中の RNA サンプルの 2D-LC 分析。A) ^1D クロマトグラム、
B) ^2D クロマトグラム、 ^2D クロマトグラムの挿入図はベースラインの拡大図、ブランク分析を差し引いた後のクロマトグラム

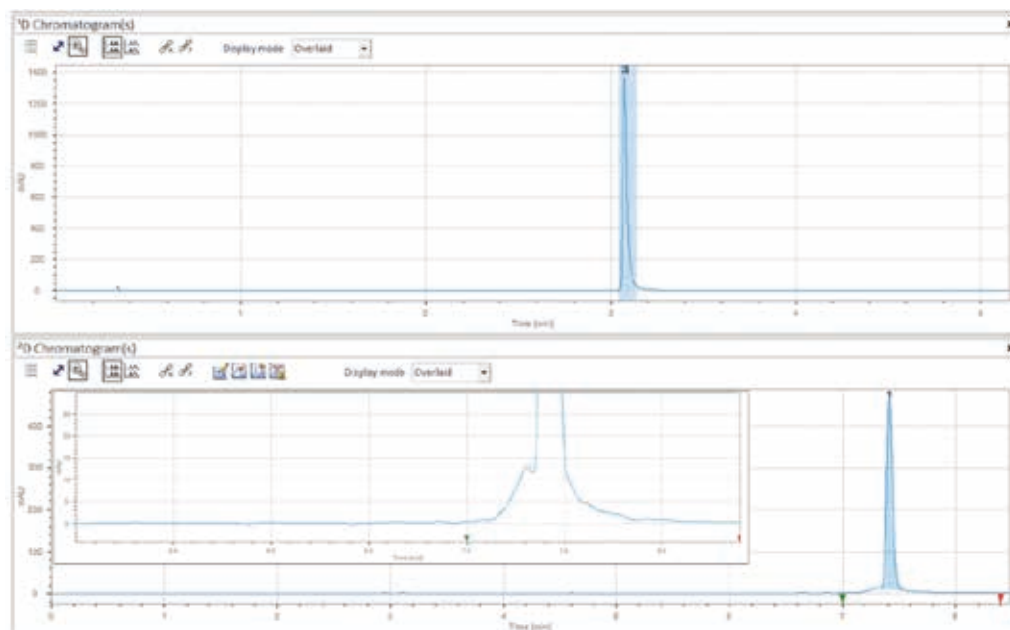


図 8. 1 M NaCl 中の DNA サンプルの 2D-LC 分析。A) ^1D クロマトグラム、
B) ^2D クロマトグラム、 ^2D クロマトグラムの挿入図はベースラインの拡大図、ブランク分析を差し引いた後のクロマトグラム

結論

アクティブ溶媒モジュール付きの 1290 Infinity II 2D-LC システムを用いたハートカット 2D-LC 分析により、オリゴヌクレオチド合成後のアニオン交換精製フラクションのような高濃度の塩を含む溶液中のオリゴヌクレオチドを直接分析することができます。¹D で効果的なオンライン脱塩を行うことにより、続く²D での IP-RPLC 分析が可能になります。遠心式フィルタを用いた手作業による脱塩後の一次元 IP-RPLC 分析と比べて、2D-LC メソッドはワークフローの速度を 3 倍以上短縮できます。さらに、サンプル前処理が不要になるため、手作業による工程を減らすことができます。

参考文献

1. Mangano; *et al.* Composition dependent separation of oligonucleotides by capillary electrophoresis in acidic buffers with application to the quality control of synthetic oligonucleotides. *Journal of Chromatography A*, **1999**, *848*, 435–442.
2. Zimmermann; *et al.* Synthetic oligonucleotide separations by mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **2014**, *1354*, 43–55.
3. Mustonen; *et al.* Oligonucleotide-based pharmaceuticals: Non-clinical and clinical safety signals and non-clinical testing strategies, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **2017**, *90*, 328–341.
4. Shanagar. Purification of a synthetic oligonucleotide by anion exchange chromatography: Method optimization and scale-up, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2005**, *64*, 216–225.
5. Cramer, F.; Herzberg. Purity Analysis and Impurities Determination by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, In: *Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products*; Bonilla and Srivatsa, eds.; CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, **2011**, 28–34.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマ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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2018
Printed in Japan, June 1, 2018
5991-9490JAJP