

AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムによる リソースの最大化とスケールアップの簡略化

分析からセミ分取精製までの他社製品との比較

著者

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

はじめに

Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチド製品ファミリーは、高効率、高分離能、表面多孔質粒子ケミストリを提供しており、2.7 および 4 μm の粒子サイズを 120 Å のポアサイズでご用意しています。これは、分析から内径 21.2 mm 分取までの寸法の製品を揃えた、完全にスケーラブルなイオンペア逆相カラムケミストリプラットフォームです。イオンペア逆相 (IP-RP) クロマトグラフィーは、オリゴヌクレオチドを小規模スケールで分析および精製するための一般的なメソッドとして卓越しています。オリゴヌクレオチドは、通常、各ヌクレオチドが 1 つのリン酸基を持つ、多数のアニオン性基を含む極性物質です。特性解析のために、密接に関連する不純物から全長の合成オリゴヌクレオチドを高分離能で分離する必要がある場合、AdvanceBio オリゴヌクレオチドは最適な選択肢です。

本研究では、Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチド 4 μm カラムと、他社分取カラムの性能を評価しました。他社 C18 は全多孔質粒子であり、表面多孔質の AdvanceBio 粒子よりも内部表面積が大きいため、結合容量やカラムにロードできるサンプル量に影響を与えます。全多孔質粒子の表面積が増大していることは、同じサイズの表面多孔質粒子と比較して、カラム効率が低下する点で妥協することになります。同じ粗製のオリゴサンプルを精製する場合、Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムでは、他社カラムと比較してより高い分離能が得られ、その結果として収率と純度が向上することがデータにより実証されています。これは、サンプル容量を大きく損なうことなく実現できます。

実験方法

分析カラム

- Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチド、4.6 × 150 mm、2.7 μm (部品番号 653950-702)
- Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチド、4.6 × 150 mm、4 μm (部品番号 693971-702)
- 他社 C18、4.6 × 150 mm、5 μm

セミ分取カラム

- Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチド、10 × 50 mm、4 μm (部品番号 639750-702)
- Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチド、10 × 150 mm、4 μm (部品番号 633750-702)
- 他社カラム、10 × 150 mm、5 μm

機器

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スケールフラクションコレクタ (G5664A)

移動相	
メソッド 1 - アジレントが推奨する条件	
溶出液 A1	100 mL 1M TEAA + 900 mL 水、pH 8.65
溶出液 B1	100 mL 1M TEAA + 900 mL アセトニトリル (ACN)
メソッド 2 - 他社が推奨する条件	
溶出液 A2	100 mL 1M TEAA + 900 mL 水、pH 7.00
溶出液 B2	80 % 溶出液 A + 20 % ACN
グラジエント	表 1、2、および 3 の説明のとおり
流量	分析カラム：1 mL/min セミ分取カラム：2 mL/min
カラム温度	60 °C、Agilent InfinityLab クイックコネクタ熱交換器、内径 0.17 mm (G7116-60500)
注入量	20 mg/mL オリゴヌクレオチドを 4 × 40 μL 注入 (3.2 mg のサンプルをロード)
サンプルループ	サンプルループアセンブリ、ステンレス (G4267-60500)
サンプル	粗製の全 2'-O-メチル化 22-mer

表 1. メソッド 1 を用いたセミ分取分析のグラジエントプロファイル

時間	%A	%B	%ACN	TEAA, M
0	94.5 %	5.5 %	5.0 %	0.10
5	94.5 %	5.5 %	5.0 %	0.10
35	77.8 %	22.2 %	20.0 %	0.10
40	16.7 %	83.3 %	75.0 %	0.10
45	16.7 %	83.3 %	75.0 %	0.10
50	94.5 %	5.5 %	5.0 %	0.10
60	94.5 %	5.5 %	5.0 %	0.10

表 2. メソッド 2 を用いたセミ分取分析のグラジエントプロファイル

時間	%A	%B	%ACN	TEAA, M
0	75.0 %	25.0 %	5.0 %	0.095
5	75.0 %	25.0 %	5.0 %	0.095
35	0.0 %	100.0 %	20.0 %	0.080
40	0.0 %	100.0 %	20.0 %	0.080
45	0.0 %	100.0 %	20.0 %	0.080
50	75.0 %	25.0 %	5.0 %	0.095
60	75.0 %	25.0 %	5.0 %	0.095

表 3. メソッド 1 を用いたフラクション分析のグラジエントプロファイル

時間	%A	%B	%ACN	TEAA, M
0	94.5 %	5.5 %	5.0 %	0.10
20	77.8 %	22.2 %	20.0 %	0.10
21	16.7 %	83.3 %	75.0 %	0.10
25	16.7 %	83.3 %	75.0 %	0.10
26	94.5 %	5.5 %	5.0 %	0.10
30	94.5 %	5.5 %	5.0 %	0.10

結果と考察

オリゴヌクレオチド精製の準備をする際、最終的なスケールを考慮することはきわめて重要です。必要なカラムサイズと機器設定は、精製を必要とするオリゴヌクレオチドの量によって決まります。分析カラムからセミ分取カラムまたは分取カラムにスケールアップする場合、サンプルの収率と純度を最大化するために必要な最適条件を決定することが不可欠です。

粗製のサンプルに含まれる化合物関連の不純物を完全に把握することは、分析からより大規模スケールの精製への移行を予想どおりに行うために重要です。より大きいセミ分取カラムと同じ固定相と粒子サイズで充填した分析カラムの比較を行いました。以前の研究 (アジレント資料番号 5994-7478EN) で見つかった最適化されたメソッド条件を使用しました。

図 1A と 1B は、粗製の全 2'-O メチル化 22-mer RNA 分子を両方のカラムで分析した結果、優れた分析分離を示したものです（図 1A、全長分析時間）。図 1B は、AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムを使用した

場合の感度と性能の向上を示す拡大図です。このカラムは表面多孔質の性質を持つため、最も分析困難な不純物、特にターゲット分子に最も近い不純物に対して、より良好な分離を達成することができます。

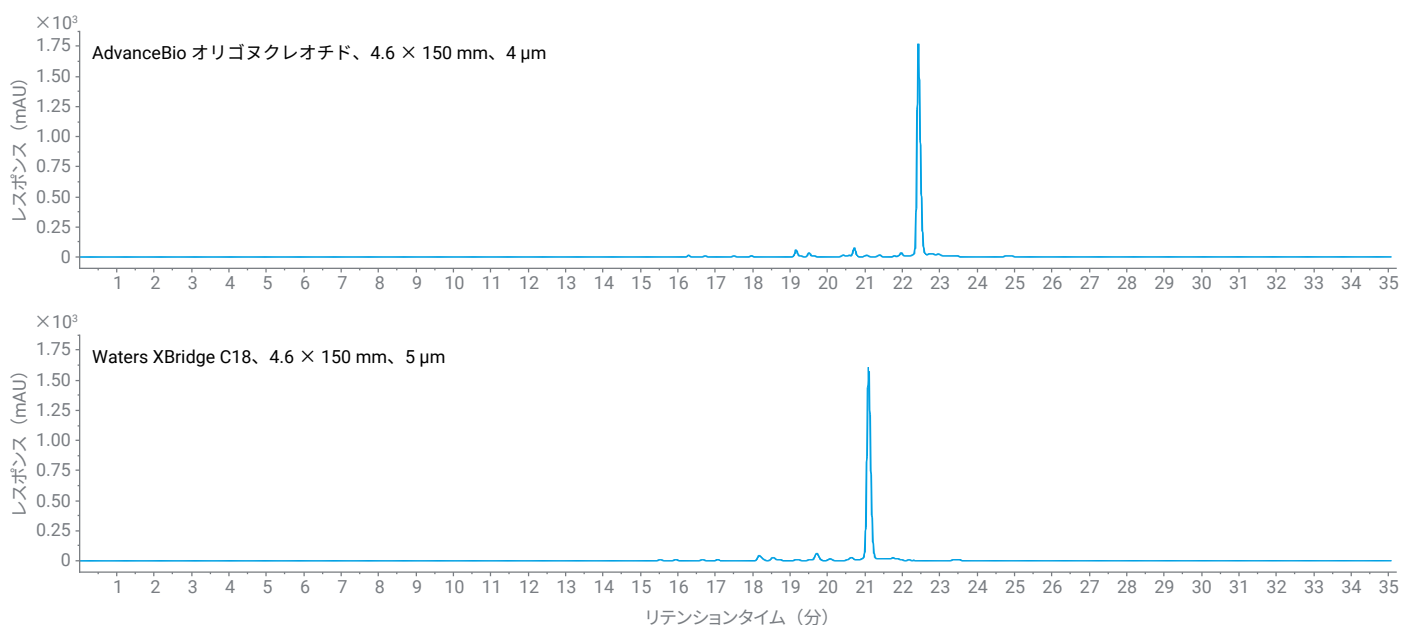


図 1A. 4.6 × 150 mm、4 μ m Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムと、他社カラムにおいて、RNA オリゴヌクレオチドサンプルにメソッド 1 を 1.0 mL/min で使用した場合の分析 LC/UV クロマトグラム（260 nm）

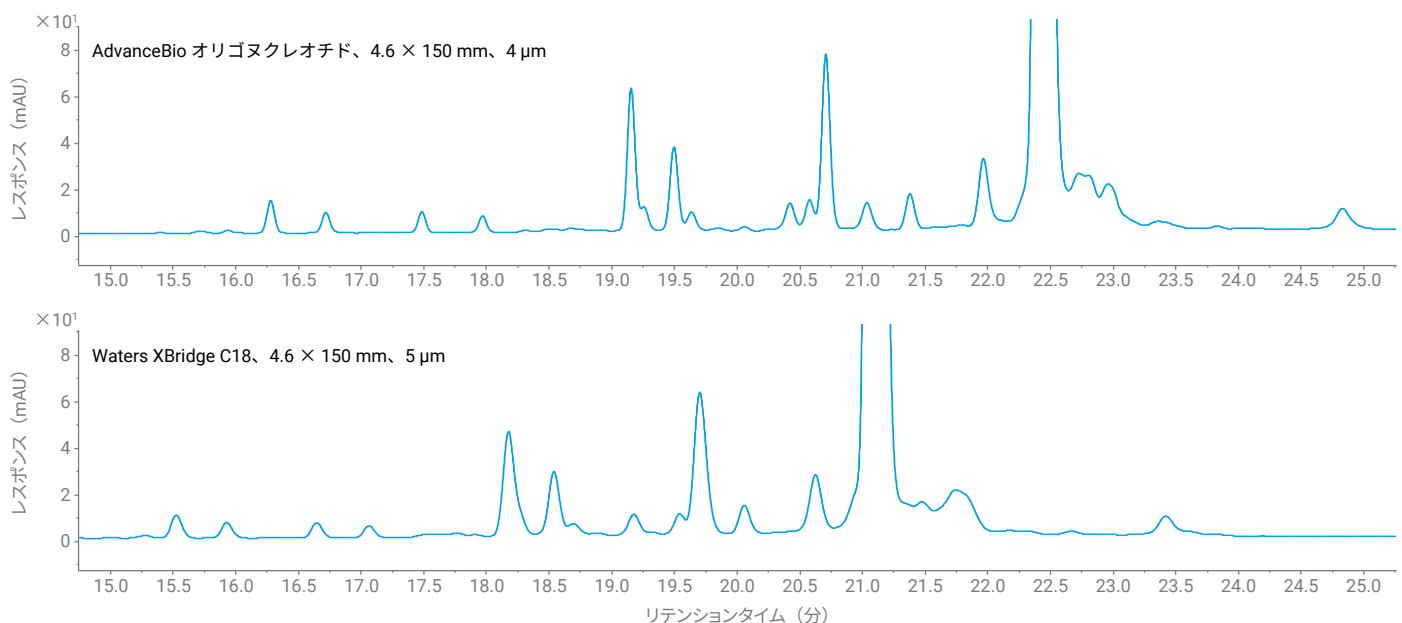


図 1B. 分析クロマトグラム（260 nm）を拡大すると、2 種類のカラムの違いがわかります。これは、調査中のオリゴヌクレオチドに Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドを使用した場合の性能の向上を明確に示しています。

グラジエントを調整して最高の性能を実現

精製分析では、2つのメソッドを比較しました。メソッド1では、それぞれ同じ量のイオンペア試薬を含む2種類の移動相溶液を使用して、グラジエント全体を通してイオンペア試薬の濃度を一定に維持します。さらに、溶出液Bには90% v/v ACNが含まれているため、各分析で使用するグラジエントには、より高濃度の有機溶媒へのより効果的な「クリーンアップ」を含めることができます。これにより、強く保持されている可能性のある不純物がすべてカラムから溶出されるため、分析間のキャリーオーバーが最小限に抑えられます。

メソッド2は、オリゴヌクレオチド分離でよく使用される条件に基づいており、ACNの量が大幅に削減されています。ただし、溶出液Bの組成(80% 溶出液A + 20% ACN)は、グラジエントの間にイオンペア試薬濃度が変化すること、およびACNの量がわずか20%に制限されることも意味しています。このため、分析ごとにカラムが厳密に洗浄されず、強く保持された不純物が蓄積する可能性があります。

分析スケールでの調査に続いて、粗製のオリゴヌクレオチドのクロマトグラフィープロファイルをレビューした後、セミ分取スケールの精製実験を実施しました。同じ分子を、20 mg/mLの濃度で溶出液Aに溶解しました(メソッド1)。図3Aと3Bは、両カラムのクロマトグラフィーを比較したものです。クロマトグラム3Aは、同じ条件下でAdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムを使用した場合、より高い分離能が得られ、感度と製品回収率が向上していることを明確に示しています。

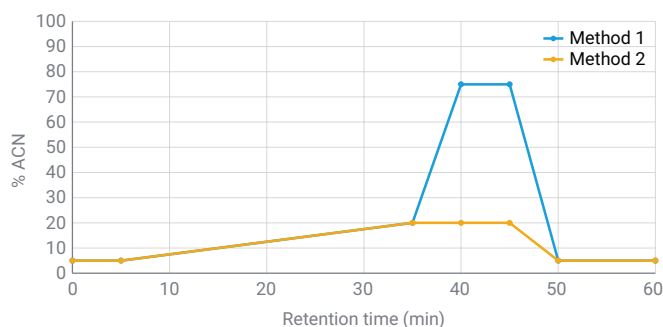


図 2A. 精製分析のグラジエントプロファイル。ACN 量 (%) を示しています。

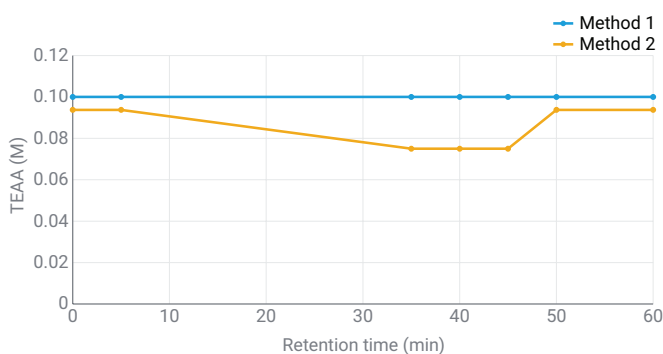


図 2B. 精製分析のグラジエントプロファイル。TEAA 濃度を示しています。

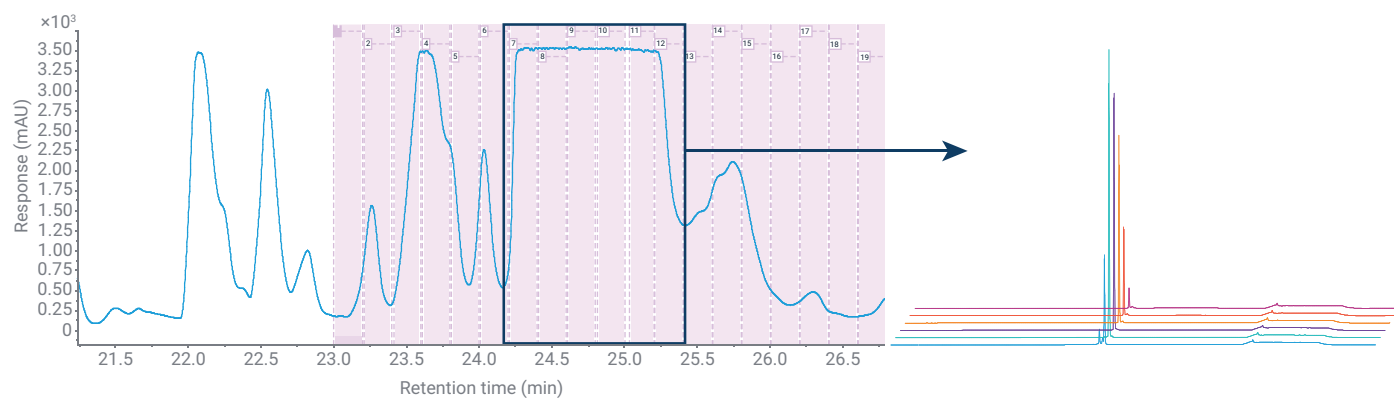


図 3A. Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドセミ分取カラムでの 160 μL (3.2 mg オンカラム) 注入のクロマトグラム (UV 260 nm)。分離は、メソッド 1 (表 1) を用いて、2.0 mL/min で行いました。個々のフラクションの分析は、メソッド 1 の条件下で、より高速のグラジエントで行いました (表 3)。

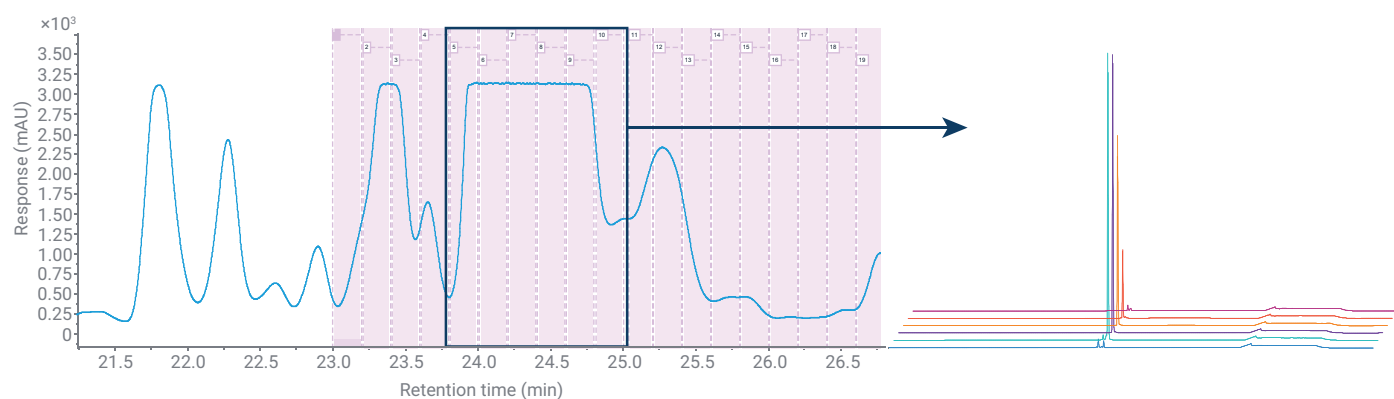


図 3B. 他社セミ分取カラムでの 160 μL (3.2 mg オンカラム) 注入のクロマトグラム (UV 260 nm)。分離は、メソッド 1 (表 1) を用いて、2.0 mL/min で行いました。個々のフラクションの分析は、メソッド 1 の条件下で、より高速のグラジエントで行いました (表 3)。

メソッド 1 を用いた両セミ分取カラムの調査後、同じオリゴヌクレオチドサンプルと精製量を用いて、メソッド 2 の条件で精製分析を拡張しました（グラジエントプロファイルは、表 2 を参照）。図 4A と 4B は、2 種類のカラムでの分離を比較したものです。詳細に観察してみると、AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムを用いた分離の方が、いくつかの

不純物ピークに対して良好な分離能を示しています（図 4A）が、いずれのカラムもメソッド 1 のアプローチと比較して、選択性にわずかな違いが見られます。これは、グラジエントの間にイオンペア試薬の濃度が変化するためです。

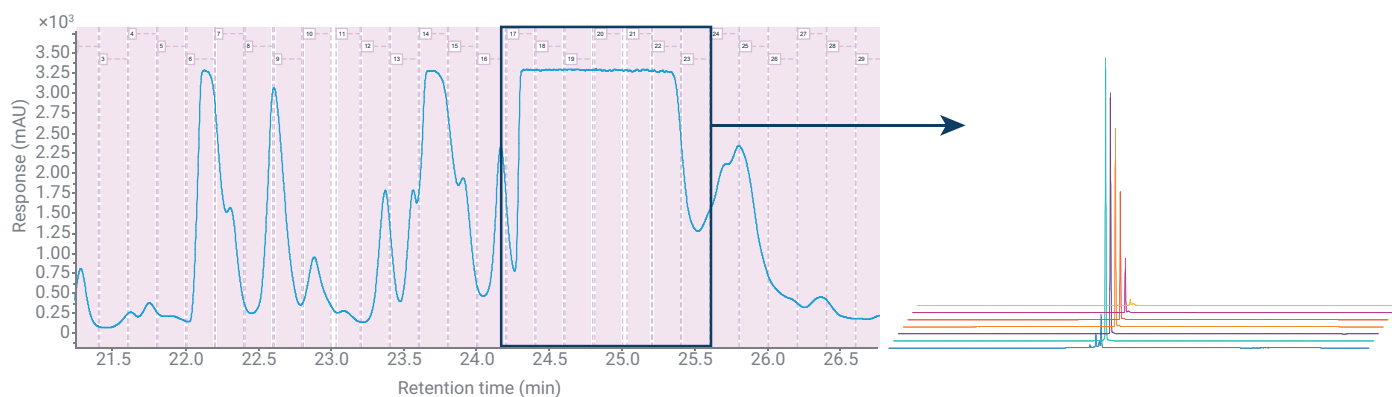


図 4A. Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドセミ分取カラムでの 160 μL (3.2 mg オンカラム) 注入のクロマトグラム (UV 260 nm)。分離は、メソッド 2 (表 2) を用いて、2.0 mL/min で行いました。個々のフラクションの分析は、メソッド 1 の条件下で、より高速のグラジエントで行いました (表 3)。

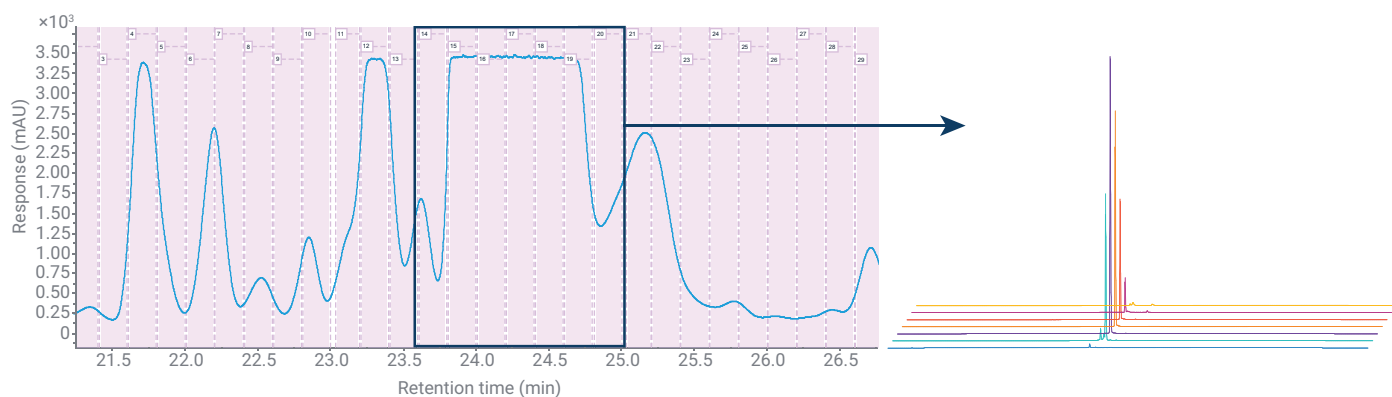


図 4B. 他社セミ分取カラムでの 160 μL (3.2 mg オンカラム) 注入のクロマトグラム (UV 260 nm)。分離は、メソッド 2 (表 2) を用いて、2.0 mL/min で行いました。個々のフラクションの分析は、メソッド 1 の条件下で、より高速のグラジエントで行いました (表 3)。

個々のフラクションの分析結果から、AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムを使用した場合、他社カラムを使用した場合よりも純度の高いフラクションが多く存在し（図 5）、精製生成物の収率が高いことがわかります。

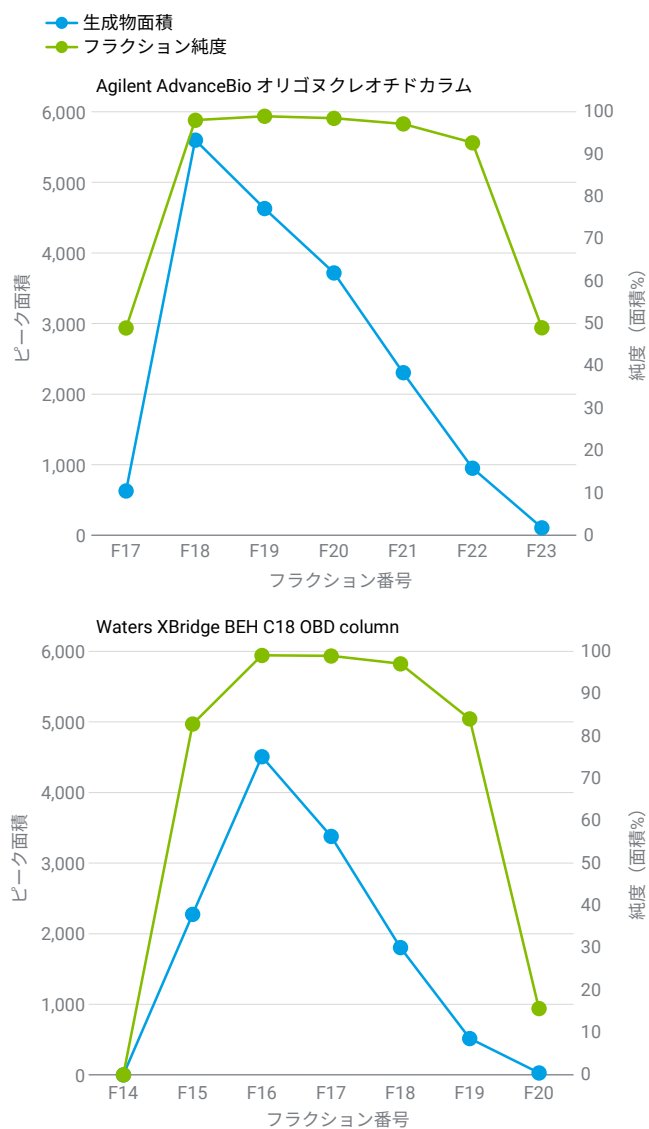


図 5. メソッド 2 を用いたフラクション分析の詳細。個々のフラクションのピーク面積と %ピーク面積を示します。

結論

フラクションコレクタを追加した Agilent 1290 Infinity II 分析スケール LC 精製システムは、合成オリゴヌクレオチドの大規模スケールのセミ分取精製に最適なツールであることが証明されました。オートサンブラにわずかな変更を加えるだけで、大容量の注入が可能になり、柔軟性の高いフラクションコレクション（1.5 mL ガラスバイアルにフラクションを保存）を組み込むことにより、3.2 mg の粗製のオリゴヌクレオチドの精製が達成されました。今回の研究により、表面多孔質 AdvanceBio オリゴヌクレオチド 4 μm カラムは、他社カラムと比較して、ターゲット分子の精製に必要な高分離能、高感度、高選択性を実現していることも明らかになりました。最後に、同じ HPLC 分析システムを使用して、分析からセミ分取および分取スケールまで同じ粒子サイズを使用することの利点は、粗製のオリゴヌクレオチドサンプルを用いてより高スケールの精製プロセスに移行する際に、最小限のリスクでより正確なアプローチを可能にすることです。

製品情報

Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラム	
製品名	部品番号
分析	
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 × 50 mm、2.7 μm	659750-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 × 100 mm、2.7 μm	655750-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 × 150 mm、2.7 μm	653750-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、4.6 × 50 mm、2.7 μm	659950-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、4.6 × 100 mm、2.7 μm	655950-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、4.6 × 150 mm、2.7 μm	653950-702
Scalar	
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、4.6 mm、ガード、4 μm	820750-941
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、4.6 × 50 mm、4 μm	699971-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、4.6 × 100 mm、4 μm	695971-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、4.6 × 150 mm、4 μm	693971-702
セミ分取	
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、10 × 50 mm、2.7 μm	639950-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、10 × 100 mm、2.7 μm	635950-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、10 × 150 mm、2.7 μm	633950-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、10 × 50 mm、4 μm	639750-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、10 × 100 mm、4 μm	635750-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、10 × 150 mm、4 μm	633750-702
分取	
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、21.2 × 50 mm、4 μm	671050-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、21.2 × 150 mm、4 μm	671150-702
Fast Guard	
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 mm、Fast Guard	821725-921
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、4.6 mm、Fast Guard	820750-921

表面多孔質粒子およびスケールアップする方法の詳細

以下のリソースをダウンロードして、AdvanceBio オリゴヌクレオチドの高い能力をご覧ください。

- 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, Agilent Technologies application note, publication number 5994-7478JAJP, **2024**.
- 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, Agilent Technologies application note, publication number 5994-4877JAJP, **2022**.

補足情報：Agilent 分取 LC スケーリングカリキュレータ

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。

DE90677664

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, July 26, 2024

5994-7591JAJP