Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムと
オリゴヌクレオチド標準試料

信頼性、経済性、柔軟性を向上

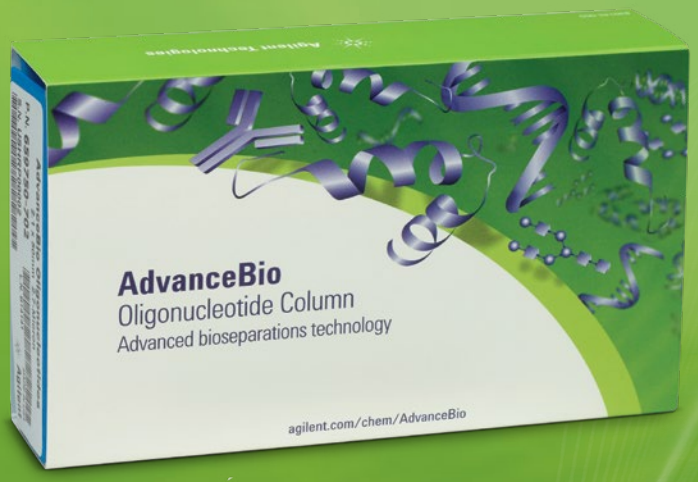
Agilent Technologies

HPLC および UHPLC 分析で、オリゴヌクレオチドの高分離能分析と長寿命を実現するカラムが登場しました。

合成オリゴヌクレオチドは、ウィルス感染症や癌など、さまざまな疾患に対する有望な治療薬として注目されています。治療への応用に向け、アンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉 RNA (siRNA)、アプタマなどの一部の核酸クラスの研究が進んでいます。一方、連結反応時の不完全なキャッピングにより生じる不純物、合成時に生成される不純物、出発物質に含まれる不純物、合成後処理で生じる不純物など、合成の過程で混入する可能性のあるさまざまな不純物を監視・同定し、除去しなければなりません。

すなわち、オリゴヌクレオチド治療薬の開発および製造では、不純物を分離および同定する分析メソッドが重要な課題となります。

- **結果の信頼性の向上** – Poroshell の効率的な粒子形態により高分離能分析を実現
- **コストの削減** – 高 pH に対して優れた耐性を持つ堅牢な化学修飾シリカによりカラムを長寿命化
- **柔軟性の向上** – 直径 2.7 μm の粒子を採用し、HPLC および UHPLC システムにも対応



オリゴヌクレオチドの分離

オリゴヌクレオチドの分離に一般的に使用されている 3 つの UHPLC/HPLC 手法:

- **トリチルオンオリゴのイオンペア逆相分離:** dMT 基が結合したままの全長ターゲットオリゴを、脱保護された不完全配列から分離します。この手順は比較的簡単に実行できますが、得られる分析情報が限られるため、一般には精製メソッドとして考えられています。
- **トリチルオフの脱保護オリゴのイオン交換分離:** このメソッドでは、オリゴの主鎖上の負電荷を利用して分離を促進します。短鎖オリゴは良好に分離しますが、鎖長が長くなるにつれて分離能は低下します。また、この手法では水溶性溶離液を使用しますが、オリゴは高帯電性であり、カラムからの溶出に高濃度の塩を必要とするため、LC/MS には適していません。
- **トリチルオフの脱保護オリゴのイオンペア逆相分離:** この手法では、有機溶媒と、酢酸トリエチルアンモニウム (TEAA) やトリエチルアミンとヘキサフルオロイソプロパノール (TEA-HFIP) などの移動相添加物を使用して、オリゴヌクレオチドの負帯電性リン酸ジエステル主鎖とのイオンペアリングを行います。高性能カラムを使用すれば、非常に明確な分離が可能です。また、移動相に TEA-HFIP などの揮発性成分を用いるメソッドは LC/MS に適しており、オリゴヌクレオチドの構造および配列の特性解析に有効な情報が得られます。

Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムは、TEAA または TEA-HFIP を用いたトリチルオフの脱保護オリゴのイオンペア逆相分離用に設計されています。

アジレントは、その他のオリゴヌクレオチド手法のためのソリューションも用意しています。詳細については、最後のページをご覧ください。

優れた分離能と長寿命を同時に実現

優れた分離能と長寿命に対するニーズに応えるカラム

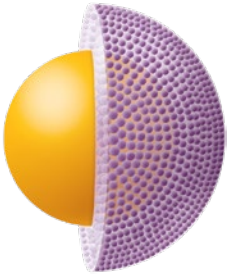
トリチルオフの脱保護オリゴのイオンペア逆相分離には、分離能が高く、比較的過酷な分析条件にも十分耐えられる堅牢性を備えたカラムが必要です。

十分な分離能がないと、測定の真度と精度が低下し、信頼性の低い分析結果につながります。

また、堅牢性に劣るカラムは寿命が短いため、頻繁に交換する必要があります。交換のたびにワークフローを中断しなければならないうえ、コストもかさむことになります。

Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムは、高効率の 2.7 µm 表面多孔質 Poroshell 粒子を採用しています。この粒子は、アジレント独自の技術により化学修飾されており、高 pH の移動相に対してもきわめて高い耐性を示します。また、エンドキャップ処理された C18 結合相を持ち、オリゴヌクレオチドに対して優れた選択性を実現します。
AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムで高い分離能を確保するために、すべてのバッチに対して、アジレントオリゴヌクレオチド分離能標準試料を用いた試験を実施しています。詳細については、6 ページをご覧ください。

Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムで使用されている Poroshell 2.7 µm 粒子は、高 pH に対する優れた耐性を備え、エンドキャップ処理されています。オリゴヌクレオチドを高分離能で分離できるため、信頼性の高い結果が得られます。また、HPLC および UHPLC システムで長いカラム寿命が実現されるため、コストを削減できます。



結合相	ポアサイズ	温度上限	pH 範囲	エンドキャップ
C18	100 Å	65 °C	3.0〜11.0	ダブル

アジレントによる革新: 高 pH で優れた安定性を発揮する、オリゴヌクレオチド分析のための初の表面多孔質粒子による LC カラム

AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムで採用されている直径 2.7 µm の Poroshell 粒子と 600 bar の圧力定格により、HPLC および UHPLC システムにも対応できます。

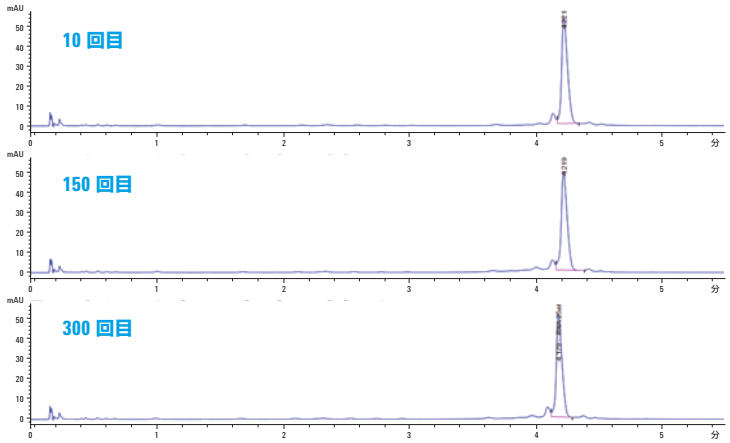
Agilent 1260 Infinity LC システム

Agilent 1260 Infinity Bio-inert クォータナリ LC システム

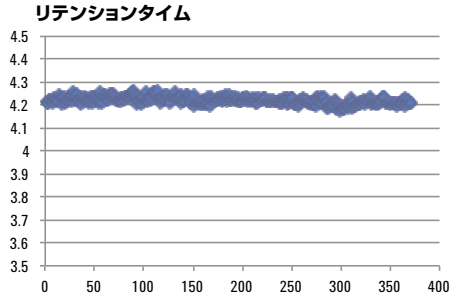
Agilent 1290 Infinity II LC システム

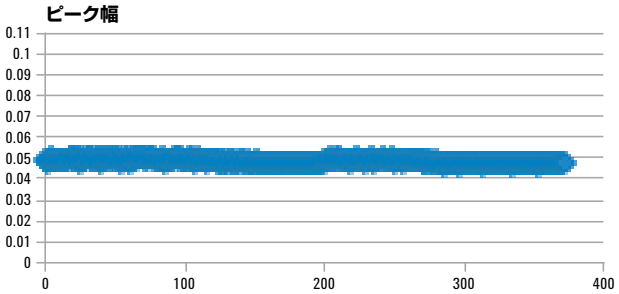
酢酸トリメチルアンモニウム (TEAA) を用いた オリゴヌクレオチドの分離

未修飾シリカ粒子は塩基性の移動相中で溶解が起こりやすく、カラム寿命が短くなる傾向にあります。AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムは、TEAA を含む高 pH 移動相でもきわめて高い安定性を発揮します。



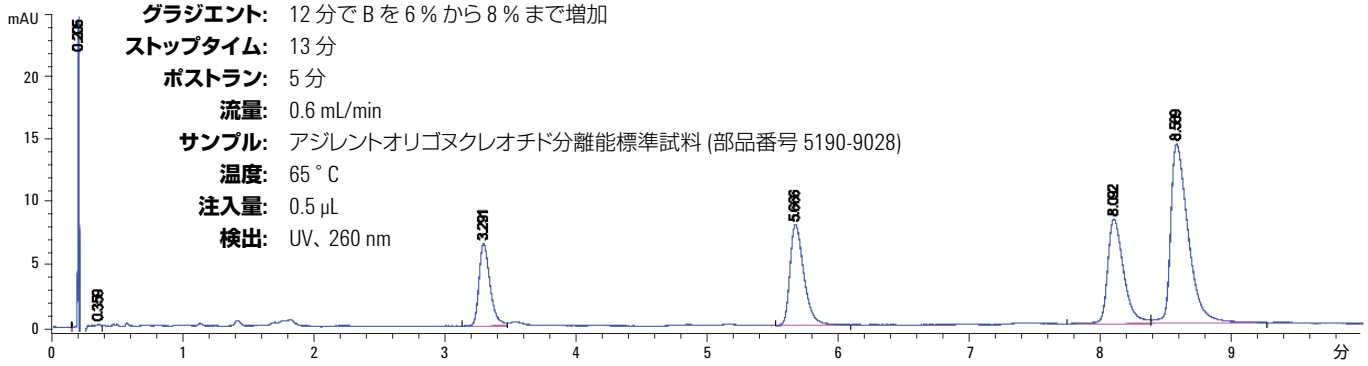
カラム: AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 x 50 mm (部品番号 659750-702)
移動相 A: 100 mM TEAA 水溶液
移動相 B: 100 mM TEAA アセトニトリル溶液
流量: 0.69 mL/min
グラジエント: 5 分で B を 7 % から 11 % まで増加
5.01 分で B を 11 % から 80 % まで増加
B を 80 % で 5.50 分間維持
5.56 分で B を 80 % から 7 % まで減少
総分析時間 8.5 分
サンプル: 25 mer DNA
注入量: 0.5mg/mL を 1 µL
温度: 65 °C
検出: UV、260 nm





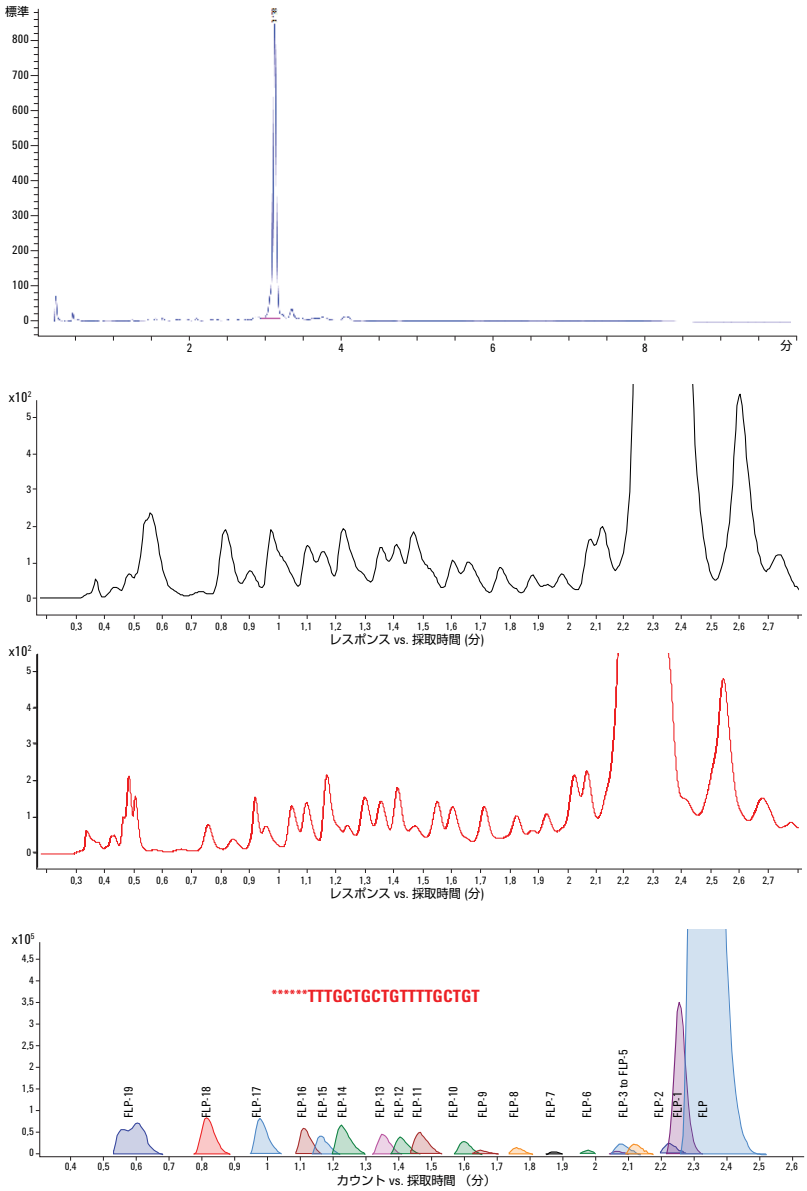
正確な特性解析を行うには、ヌクレオチドが 1 つ異なるオリゴヌクレオチドを分離できることが重要になります。AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムは、アジレントのオリゴヌクレオチド分離能標準試料 (14、17、20、および 21 mer) による分析において N と N-1 を分離することができることを示しています。

カラム: AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 x 50 mm (部品番号 659750-702)
移動相 A: 100 mM TEAA 水溶液
移動相 B: 100 mM TEAA アセトニトリル溶液
グラジエント: 12 分で B を 6 % から 8 % まで増加
ストップタイム: 13 分
ポストラン: 5 分
流量: 0.6 mL/min
サンプル: アジレントオリゴヌクレオチド分離能標準試料 (部品番号 5190-9028)
温度: 65 ° C
注入量: 0.5 µL
検出: UV、260 nm



トリエチルアミンとヘキサフルオロイソプロパノール (TEA-HFIP) を用いたオリゴヌクレオチドの分離

HFIP を含む移動相は MS での分析に使用できます。AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムの優れたクロマトグラフィー分離能と精密質量 MS を組み合わせることにより、オリゴヌクレオチドの構造と配列の特性解析を行えます。



AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムは、TEA と HFIP を含む移動相でもきわめて高い安定性を示します。

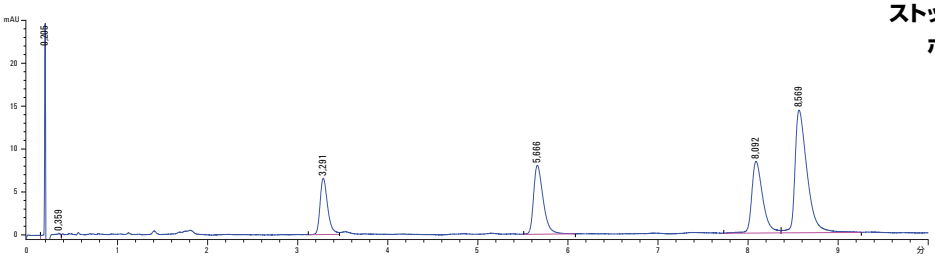
カラム: AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 x 50 mm (部品番号 659750-702)
移動相 A: HFIP:TEA (400 mM:15 mM) 水溶液
移動相 B: MeOH:移動相 A (50:50)
流量: 0.4 mL/min
グラジエント: 0.5 分で B を 30 % から 40 % まで増加、5 分で B を 40 % から 70 % まで増加
サンプル: 25 mer DNA
温度: 65 °C
検出: UV、260 nm
検出: MS
最小範囲: 400 m/z
最大範囲: 1,700 m/z
スキャン速度: 3.00 スペクトル/秒
イオン極性: -ve
VCap: 3,500
ノズル電圧: 1,000 V
フラグメンタ: 200

ピーク	レスポンス	%
FLP	5089897	44.33 %
FLP-1	1656225	14.42 %
FLP-2	304129	2.65 %
FLP-3	303848	2.65 %
FLP-4	218243	1.90 %
FLP-5	113062	0.98 %
FLP-6	104555	0.91 %
FLP-7	110327	0.96 %
FLP-8	134341	1.17 %
FLP-9	134080	1.17%
FLP-10	186947	1.63 %
FLP-11	358833	3.12 %
FLP-12	251690	2.19 %
FLP-13	272844	2.38 %
FLP-14	416306	3.63 %
FLP-15	238205	2.07 %
FLP-16	304333	2.65 %
FLP-17	403038	3.51 %
FLP-18	459344	4.00 %
FLP-19	422518	3.68 %
合計	**11482765**	**100%**

確かな性能

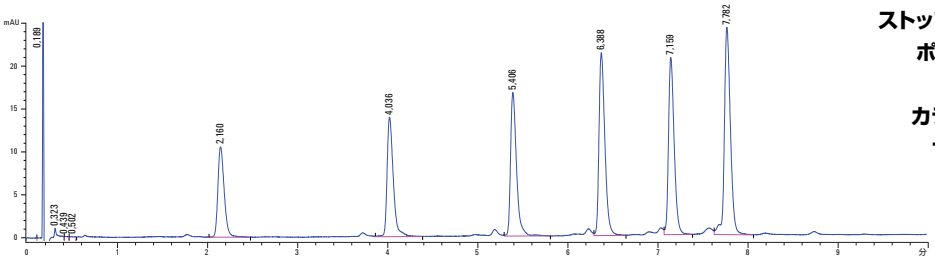
AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムで高い分離能を確保するために、すべてのバッチに対して、アジレントオリゴヌクレオチド分離能標準試料を用いた試験を実施しています。

オリゴヌクレオチド分離能試験標準試料には 14、17、20、および 21 mer の合成ヌクレオチドが含まれ、N/N-1 分離能を実証できるよう設計されています。



カラム: AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 x 50 mm (部品番号 659750-702)
移動相 A: 100 mM TEAA 水溶液
移動相 B: 100 mM TEAA アセトニトリル溶液
グラジエント: 10 分で B を 10 % から 14 % まで増加
ストップタイム: 11 分
ポストラン: 5 分
流量: 0.6 mL/min
サンプル: アジレントオリゴヌクレオチド分離能標準試料 (部品番号 5190-9028)
温度: 65 °C
注入量: 10 µL
検出: UV、260 nm

アジレントは、15、20、25、30、35、および 40 mer の合成オリゴデオキシチミジンを含むオリゴヌクレオチドラダー標準試料も用意しています。この標準試料を使用することで、カラムの選択性と再現性を実証できます。



カラム: AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 x 50 mm (部品番号 659750-702)
移動相 A: 100 mM TEAA 水溶液
移動相 B: 100 mM TEAA アセトニトリル溶液
グラジエント: 12 分で B を 6 % から 8 % まで増加
ストップタイム: 13 分
ポストラン: 5 分
流量: 0.6 mL/min
カラム温度: 65 °C
サンプル: アジレントオリゴヌクレオチドラダー標準試料 (部品番号 5190-9029)
注入量: 0.5 µL
検出: UV、260 nm

アジレントオリゴヌクレオチドラダー標準試料の詳細情報については、最後のページをご覧ください。

詳細情報

Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムと
オリゴヌクレオチド標準試料

説明	部品番号
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 x 50 mm、2.7 µm	659750-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 x 100 mm、2.7 µm	655750-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 x 150 mm、2.7 µm	653750-702
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 x 50 mm、2.7 µm	659950-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、4.6 x 100 mm、2.7 µm	655950-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、4.6 x 150 mm、2.7 µm	653950-702
AdvanceBio オリゴヌクレオチド、4.6 mm Fast Guard	820750-921
オリゴヌクレオチド分離能標準試料	5190-9028
オリゴヌクレオチドラダー標準試料	5190-9029

アジレントのオリゴヌクレオチド用ソリューション

オリゴヌクレオチドの精製

Agilent PLRP-S および PL-SAX

オリゴヌクレオチドの精製において、許容できるカラム寿命で高純度を達成するには、化学的および熱的に安定性の高いポリマー性 HPLC カラムが必要です。PLRP-S カラムは、トリチルオンオリゴとトリチルオフオリゴを分離するために TEA などのイオンペアリング剤を用いて 80 ° C で使用しても性能が劣化しません。一方、PL-SAX 1000Å カラムは、高 pH の変性条件下で脱保護オリゴを分離できます。ポリマー性粒子の 4 級アミン機能により高 pH でイオン交換分離を行えるため、自己相補的配列についてより正確なクロマトグラフィー分析を実施できます。

TOP-DNA および TOP-RNA 精製カートリッジ

Agilent TOP-DNA および TOP-RNA 精製カートリッジは、トリチル基の付いた合成オリゴ DNA および RNA の精製をハイスループットで行う専用カートリッジです。干渉する塩類、不完全な合成物質や不純物を簡単に除去できるため、高い純度の合成 DNA および RNA オリゴヌクレオチドを提供します。96 ウェルプレートで 96 本までの同時処理が可能であり、スループットを高く保つことができます。

核酸ソリューション

柔軟な治療用オリゴの製造および開発サービス

アジレントの核酸ソリューション部門では、患者の健康および安全という共通の目標を掲げ、オリゴ候補物質を臨床段階から市場へと効率的に導く業界最高のサービスを提供しています。あらゆるクラスのオリゴ API に関する知識を駆使し、毒物学研究から商品化まで、お客様を幅広くサポートします。コロラド州ボールダーにあるアジレントの GMP 施設には、多様な合成および精製機器が設置されています。毒物学研究や前臨床試験に使用する数グラムのオリゴから、後期臨床試験および商品化のための数十キログラムのオリゴまで、さまざまな要件にお応えします。

ホームページ
www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ
0120-477-111
email_japan@agilent.com

本資料掲載の製品は、すべて研究用です。診断目的では使用できません。
本資料記載の情報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. 2016, 2018
Published in Japan, April 1, 2018
5991-5845JAJP

Agilent Technologies