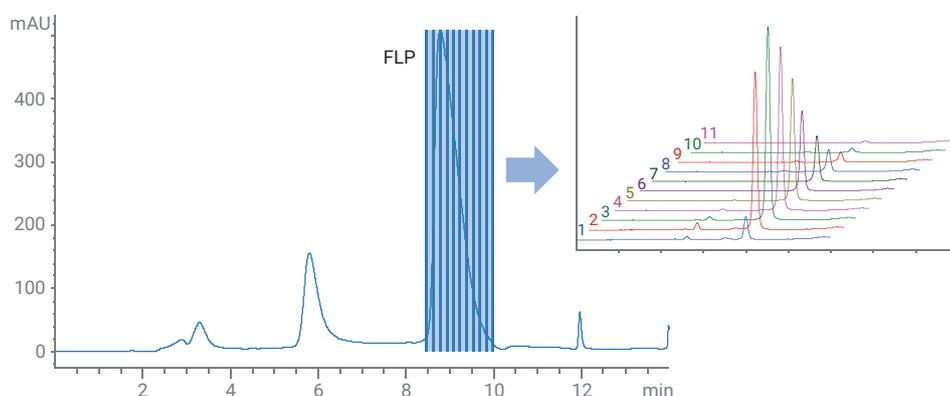


## 高速液体クロマトグラフィーを用いた 1 本鎖 RNA オリゴヌクレオチドの精製



### 著者

Florian Rieck  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

製薬できわめて重要なステップは、製品の精製です。オリゴヌクレオチド (ON) の精製は、ターゲットと不純物が高い類似性を示すため、特に困難な場合があります。このため、高純度の製品が必要な場合、最適なメソッドは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) です。このアプリケーションノートでは、イオンペア逆相 HPLC による 1 本鎖 RNA ON の精製ワークフローについて実証します。メソッドを分析スケールで開発してから、分取条件に移管します。分析および分取段階で Agilent PLRP-S カラムを使用することにより、メソッドのスケールアップを簡単化し、生産性を向上できます。チタン製ヘッドを備えた分取バイナリポンプを含む、Agilent 1290 Infinity II 分取 LC システムで精製を実施します。これらの機能によりさまざまな溶媒に対応し、通常 ON の分離で使用される緩やかなグラジエントにおいて高い再現性を実現します。精製後にフラクションをプールすると、純度 99 % 以上の生成物が 56 % 以上の収率で得られました。

## はじめに

合成した ON は化合物の 1 つであり、生物化学研究で使用されたり、医薬品として使用されたりして、ここ数年で関心が高まりました。<sup>1</sup>ON を合成するプロセスは、1980 年代に導入されてから非常に効率的になりました。ただし、結合効率が 99 % であるにもかかわらず、25mer ON 合成の収率は目的とする製品の 80 % 未満です。例えば、副生成物として、連鎖長 N-1、N-2 などのターゲット ON が切り取られたものが生じます。ターゲット分子からこれらの不純物を分離することは、連鎖長が長くなるとより困難になります。

ON に対して確立されている分離メソッドは逆相 HPLC です。この手法では、直径 10  $\mu\text{m}$  以下の粒子を充填した分離カラムを使用するため、成分に対して高分解能を実現できます。溶出液にイオンペア試薬を加えることにより、非極性固定相での極性 ON のリテンションが可能になります。イオンペア試薬は ON の荷電リン酸塩主鎖と相互作用し、長い連鎖長で ON を極性の小さい状態にします。溶出と分離では、1 % 以下の溶媒グラジエントの緩やかな傾きが必要ですが、これは HPLC 機器で問題を引き起こす可能性があります。

このアプリケーションノートでは、分取 HPLC による 1 本鎖 RNA ON の分離と精製について実証します。1290 Infinity II 分取 LC システムには、高流量でも正確なグラジエント混合が可能なバイナリポンプが搭載されており、結果の再現性と信頼性が向上します。チタン製ポンプヘッドは幅広い pH 範囲と塩濃度に対応しており、機器で実施できるアプリケーションの幅が広がります。

メソッドを分析スケールで開発してから、分取条件に移管してフラクションコレクションを追加します。実験はすべて、分析と分取の両段階で使用できる PLRP-S カラムで実施しているため、分析から分取精製条件において、簡単なスケールアップと高い再現性が実現できます。

## 実験方法

### 装置構成

Agilent 1290 Infinity II 分取 LC システムを、次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1290 Infinity II 分取バイナリポンプ (G71161B)
- Agilent 1290 Infinity II 分取 Open-Bed サンプラ/フラクションコレクタ (G71158B)
- Agilent 1260 Infinity II 可変波長検出器 (G71114A)

分析メソッドの開発とフラクションの再分析は、次のモジュールで構成される分析システムで実施しました。

- Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプ (G71112A)
- Agilent 1260 Infinity II バイアルサンプラ (G71129A)
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G71116A)
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR (G71115A)

### カラム

- 分析カラム：Agilent PLRP-S 100  $\text{\AA}$ 、 $4.6 \times 150 \text{ mm}$ 、 $8 \mu\text{m}$  (p/n PL1512-3800)
- 分取カラム：Agilent PLRP-S 100  $\text{\AA}$ 、 $25 \times 150 \text{ mm}$ 、 $8 \mu\text{m}$  (p/n PL1212-3800)

## 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 [239] 以降のバージョン

## 試薬

合成用ヘキシルアミン > 99 %、酢酸 > 99 % ReagentPlus、および分析グレードの尿素は、Sigma-Aldrich (タウフキルヘン、ドイツ) から購入しました。LC グレードのアセトニトリルは Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。超純水は、 $0.22 \mu\text{m}$  メンブレンカートリッジ (Millipak) を装着した Milli-Q Integral システムで製造しました。

移動相 A は、次のプロトコルに従って毎回新たに調製しました。 $450 \text{ mL}$  の水に、 $2.86 \text{ mL}$  の酢酸と  $6.57 \text{ mL}$  のヘキシルアミンを加えます。pH を 7 に調整します。溶液を  $500 \text{ mL}$  の計量フラスコに移し、一杯になるまで水を充填します。変性条件については、10 % (w/v) の尿素をバッファに加えて<sup>2</sup>、分取スケールでの分離を向上させました。

## サンプル

Agilent NASD (ボルダー、コロラド州、米国) が合成した 2'-O-メチル化 22-mer オリゴヌクレオチドを精製しました。配列は 5'-aaaagcaccgcacucgguccac-3' です。

出荷前にサンプルは脱塩して凍結乾燥されていました。分析の直前に、移動相 A で  $5 \text{ mg/mL}$  用に調製しました。

## 結果と考察

### 分析での分離

サンプル濃度 2 mg/mL を用いて、分析システムで分離メソッドを最適化しました。次に、HPLC メソッド移管カリキュレータを使用して、最適化したメソッドを分取条件にスケールアップしました。<sup>3</sup>分取条件下での移動相とカラムは温度制御に適していなかったため、移動相に尿素をカオトロピック（変性）試薬として添加しました。

図 1 に、分取条件下での分離のクロマトグラムを示します。合計サンプル量 20 mg オンカラムが適切に分離されました。フラクションコレクションを、ピークベースで、収集タイムスライス 9 秒幅に設定しました。このフラクションモードにより、信号のスレッシュホールドと傾きに基づいた、全長生成物 (FLP) のピークをターゲットにする収集が可能になりました。ピークベースの収集とタイムスライスを組み合わせて、FLP ピークを 11 スライスに分割しました。これらを純度と成分に関して分析することにより、精製プロセスの純度と収率の要件を満たすためにプールの必要があるフラクションを判別できます。

## メソッドの設定

表 1. 精製のクロマトグラフィーパラメータ

パラメータ	設定値														
移動相	A) 0.1 M 酢酸ヘキシルアンモニウム水溶液、pH = 7.0、+ 10 % 尿素 B) アセトニトリル														
流量	30 mL/min														
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>32</td></tr> <tr><td>0.26</td><td>32</td></tr> <tr><td>10.10</td><td>42</td></tr> <tr><td>11.09</td><td>100</td></tr> <tr><td>12.07</td><td>100</td></tr> <tr><td>13.06</td><td>32</td></tr> </tbody> </table> ストップタイム：14 分 ポストタイム：1.5 分	時間 (分)	%B	0	32	0.26	32	10.10	42	11.09	100	12.07	100	13.06	32
時間 (分)	%B														
0	32														
0.26	32														
10.10	42														
11.09	100														
12.07	100														
13.06	32														
注入量	4,000 µL														
温度	室温														
UV 検出器	260 nm リファレンスなし データレート 5 Hz														
フラクションコレクション	ピークベース 7.0 ~ 12.0 分、 収集タイムスライス 9 秒 UV スレッシュホールド：5 mAU UV アップスロープ：2 mAU/s UV ダウンスロープ：1 mAU/s														

表 2. フラクション再分析のクロマトグラフィーパラメータ

パラメータ	設定値												
移動相	A) 0.1 M 酢酸ヘキシルアンモニウム水溶液、pH = 7.0 B) アセトニトリル												
流量	1 mL/min												
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>28</td></tr> <tr><td>8</td><td>36</td></tr> <tr><td>9</td><td>100</td></tr> <tr><td>10</td><td>100</td></tr> <tr><td>11</td><td>28</td></tr> </tbody> </table> ストップタイム：11 分 ポストタイム：6 分	時間 (分)	%B	0	28	8	36	9	100	10	100	11	28
時間 (分)	%B												
0	28												
8	36												
9	100												
10	100												
11	28												
注入量	10 µL												
温度	80 °C												
UV 検出器	260/4 nm リファレンス 360/100 nm データレート 5 Hz												

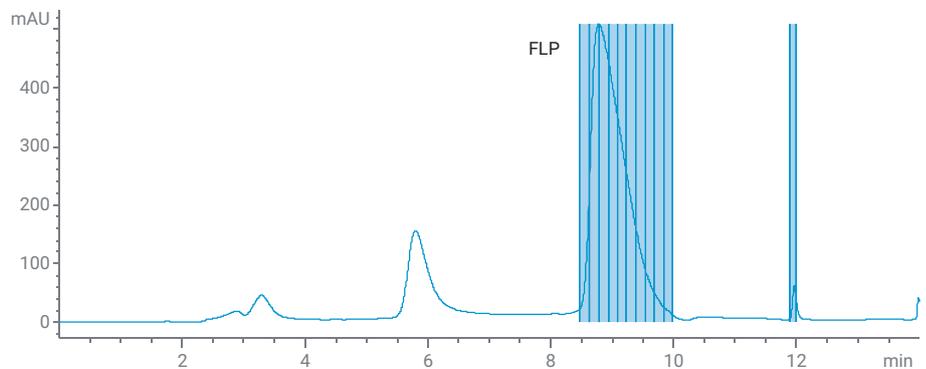


図 1. 分取カラムでの 4 mL (20 mg オンカラム) 注入のクロマトグラム (UV 260 nm)。青色のバーは、9 秒タイムスライスのフラクションコレクションを表しています。

HPLC 分析システムで同じ固定相を使用して、フラクションを再分析しました。分解能を向上させるために、存在する可能性のある不純物を分離して分析を高速化し、カラムと溶媒を 80 °C に温度制御して、それに応じてグラジエントを調整しました (表 2 を参照)。FLP の溶出で収集したすべてのフラクションを、ピーク面積パーセントで測定した純度に関して再分析して評価しました。図 2 に、すべてのフラクション再分析のクロマトグラムの重ね表示を示します。

フラクション再分析では精製前のサンプルを注入して複数の希釈でピーク面積を比較することにより、各フラクションの FLP 含有量を計算しました。測定した FLP の純度と含有量を使用してプーリング図と表を作成できますが、これは FLP の希望する純度または収率を達成する必要がある際にプールのべきフラクションを判断するのに役に立ちます。図 3 に、FLP の 11 フラクションのプーリング図と表を示します。予想したとおり、純度はピークの中で最高となるのに対して、FLP 収量はテールに向けて減少しています。プーリングの表から、純度を最小化して収率を最大化する必要がある場合にプールのできるフラクションが即座に判別できます。例えば、ワークフローで最低 99 % の純度が必要な場合、フラクション 3 ~ 7 をプールのして、56.3 % の収率を達成できます。

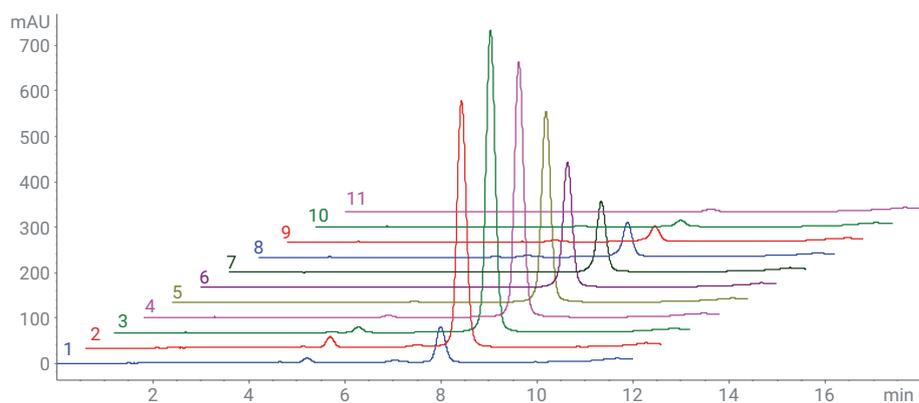
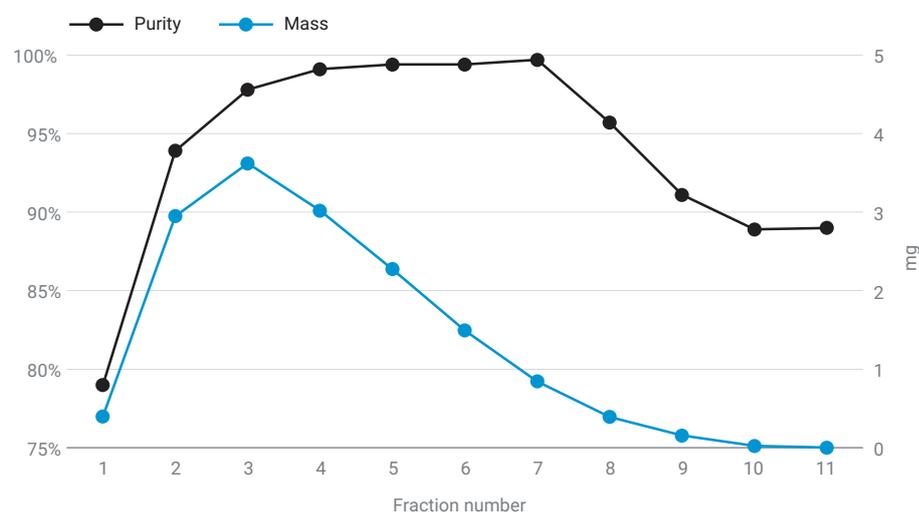


図 2. FLP を収集した 11 フラクションの再分析のクロマトグラムの重ね表示 (UV 260 nm)



フラクション	プール純度	プール収率
7	99.7 %	4.2%
6 ~ 7	99.6 %	11.7 %
5 ~ 7	99.5 %	23.1%
4 ~ 7	99.4 %	33.9%
3 ~ 7	99.1 %	56.3%
3 ~ 8	98.5 %	58.2%
2 ~ 8	97.9 %	72.9%
2 ~ 9	97.0 %	73.7%
2 ~ 10	96.1 %	73.8%
2 ~ 11	95.4 %	73.8%
1 ~ 11	93.9 %	75.8%

図 3. FLP の 11 フラクションのプーリング図と表。フラクションを純度で並び替えることにより、指定した純度で最高の収率を達成しているプールの簡単に判別できます。

## 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による短い1本鎖RNAオリゴヌクレオチドの精製について実証しています。高サンプルロードが可能な内径25 mmのカラムを使用して、分離条件を分析から分取スケールにスケールアップしました。オートサンブラ/フラクションコレクタを組み合わせたAgilent 1290 Infinity II分取LCシステムは、大量注入およびさまざまなサイズのチューブへの柔軟なフラクションコレクションに最適なツールであることが実証されました。タイムスライスでターゲットピークを収集することにより、フラクションを純度によって個別にプーリングしてワークフローの要件を満たすことができました。この手法を使用することにより、収率 > 56 % で純度 > 99 % のフラクションサンプルを作成できました。

## 参考文献

1. Roberts, T. C.; Langer, R.; Wood, M. J. A. *Advances in Oligonucleotide Drug Delivery*. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 673–694
2. Fueangfung, S.; Yuan, Y.; Fang, S. *Denaturing Reversed-Phase HPLC Using a Mobile Phase Containing Urea for Oligodeoxynucleotide Analysis*. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2014**, *33(7)*, 481–488.
3. Guillaume, D. *et al.* *Method Transfer for Fast Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analysis: Application to Short Columns Packed with Small Particle*. Part II: Gradient Experiments. *Eur. J. Pharma. Biopharm.* **2008**, *68(2)*, 430–440.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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. 2021  
Printed in Japan, May 6, 2021  
5994-3514JAJP  
DE44307.0178935185