

合成オリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチド類縁物質の分析

合成オリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチド類縁物質の分析は L-column3 にお任せください

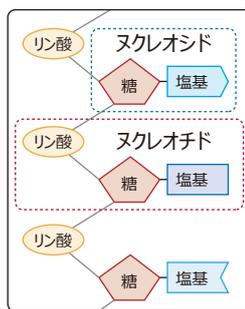
核酸医薬は、低分子医薬、抗体医薬とは作用機序が異なることから、従来の医薬品では治療が困難な疾患に対する新たな治療薬として注目を集めています。化学合成・化学修飾したオリゴヌクレオチドによって核酸医薬の原料ができますが、その合成・修飾過程で不純物が生じます。医薬品として品質を担保するには、不純物の管理が重要です。

ここでは、合成オリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチド類縁物質について、汎用メソッドと、今回開発した新規メソッドによる分析を紹介します。

Keywords オリゴヌクレオチド オリゴヌクレオチド類縁物質 アンチセンスオリゴヌクレオチド ホスホロチオアート 欠損体 脱硫体

オリゴヌクレオチドについて

ヌクレオシド(nucleoside)は「糖」と「塩基」が結合したもので、ヌクレオチド(nucleotide)は「ヌクレオシド」と「リン酸」が結合したものです。ヌクレオチドが鎖状に連なったものがオリゴヌクレオチド(oligonucleotide)です。



オリゴヌクレオチドの分析

オリゴヌクレオチドは親水性です。中性付近ではリン酸基は解離し、核酸塩基は解離していません。逆相クロマトグラフィーでは保持が弱いので、オリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチド類縁物質の分析には、逆相イオン対クロマトグラフィーが用いられます。

逆相イオン対クロマトグラフィーの機構・注意点は、LC Technical Report Vol.23「親水性化合物の分析／逆相イオン対クロマトグラフィー」にまとめています。こちらも参考にしてください。

https://www.cerij.or.jp/service/09_chromatography/technical_report/technical_report_23.pdf

用語について

核酸医薬

化学合成されるオリゴヌクレオチド(DNA、RNA 及びそれらの誘導体)及びそのコンジュゲートが有効成分となる医薬品

コンジュゲート

何らかの機能性の獲得を期待して他の分子と共有結合により結合させること、又は結合された医薬品

オリゴヌクレオチド類縁物質

原薬又は製剤中に含まれる有効成分以外のオリゴヌクレオチド

ホスホロチオアート

ホスホジエステル結合を有するオリゴヌクレオチドのリン酸エステルの一つの非架橋酸素原子が硫黄原子によって置換された化合物

引用元: 薬生薬審発0927第3号 平成30年9月27日 核酸医薬品の品質の担保と評価において考慮すべき事項について

上記引用元では、純度試験において考慮すべき不純物に次の5つが挙げられています。

- ①オリゴヌクレオチド類縁物質
- ②有機低分子不純物
- ③残留溶媒
- ④元素不純物
- ⑤その他の不純物

このレポートでは、「①オリゴヌクレオチド類縁物質」をターゲットにしています。

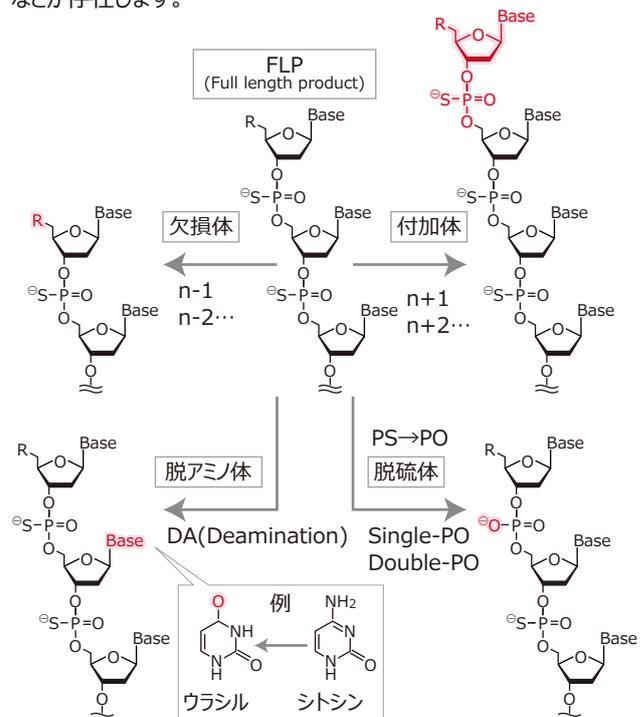
核酸医薬で使われる略語は著者・作成時期によって様々です。例えば、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は「アンチセンスオリゴ核酸」「アンチセンス核酸」「アンチセンス」「アンチセンス医薬」などの表記があります。このレポートはなるべく略語を使わずに表記しました。

アンチセンスオリゴヌクレオチドについて

アンチセンスオリゴヌクレオチド(antisense oligonucleotide, ASO)は化学合成により製造される核酸医薬で、ターゲットとするRNAと相補的な配列を持ちます。

アンチセンスオリゴヌクレオチドはヌクレアーゼによる分解を抑制するため、ホスホロチオアート(phosphorothioate, PS)修飾を施しているものが多くあります。リン酸部分の酸素原子(O)に硫黄原子(S)を導入したもので、ヌクレアーゼ耐性を持つ特徴があります。

ホスホロチオアート修飾したオリゴヌクレオチドの不純物(オリゴヌクレオチド類縁物質)には欠損体、付加体、脱硫体、脱アミノ体などが存在します。

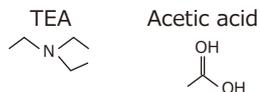


ホスホロチオアート修飾したオリゴヌクレオチドは、リン原子が不斉中心となります。例えば20 merのオリゴヌクレオチドでは、最大2¹⁹通りのジアステレオマーが存在し、主成分と類縁物質のピークをブロードにします。

汎用メソッド(TEAA, HFIP)による分析

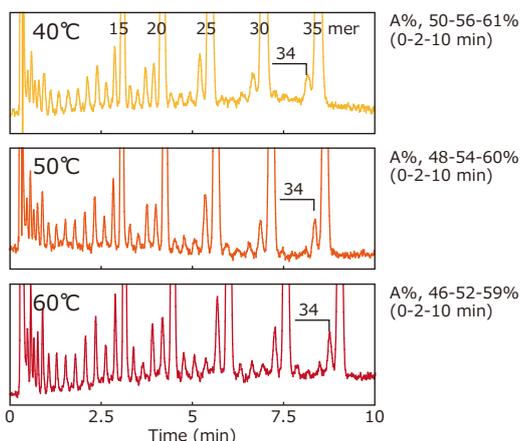
メソッド① TEAA

イオン対試薬にTEA(トリエチルアミン)、対イオンに酢酸を用います。汎用性が高く、調製されたTEAA(トリエチルアミン-酢酸緩衝液 pH 7)が販売されています。オリゴヌクレオチドとTEAはイオン対を形成し、保持が強くなります。



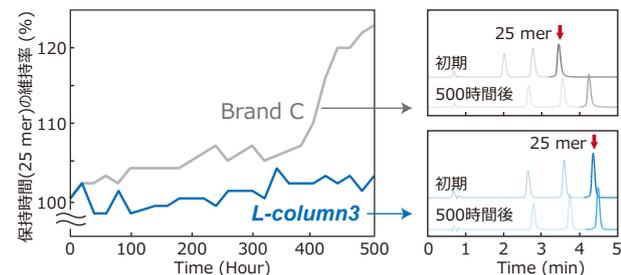
15 merから35 mer^{※1}のオリゴヌクレオチドを分析しました。10分以内に溶出するようにグラジエント勾配を調整しています。

※1 オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの個数を表す単位(量体)、オリゴヌクレオチドの鎖長



[Analytical conditions]
Column: L-column3 C18, 2 μm; Size: 2.1 mm I.D., 50 mm L.
Flow rate: 0.5 mL/min; Temp.: 40°C, 50°C, 60°C
Detection: UV 265 nm; Inj. vol.: 1 μL (10 μmol/L each)
Eluent: A: CH₃CN/100 mmol L⁻¹ TEAA in H₂O pH 7 (20/80)
B: 100 mmol L⁻¹ TEAA in H₂O pH 7

温度が高いほど分離が改善しました。オリゴヌクレオチドは分子量が大きく、温度を高くすると、カラム内での物質移動速度が速くなるので、ピークをよりシャープにすることができます。しかし、高温下でのオリゴヌクレオチドの繰り返し分析は、カラム劣化に起因する保持の遅延が発生します。耐久性の高いL-column3を使うと、安定した分析結果が得られます。



[Durability test conditions]
Column: C18, 3 μm; Size: 2.1 mm I.D., 50 mm L.
Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 60°C
Detection: UV 265 nm; Inj. vol.: 1 μL (20 μmol/L each)
Eluent: A: CH₃CN
B: 100 mmol L⁻¹ TEAA in H₂O pH 7, Gradient elution

Application No.L3038

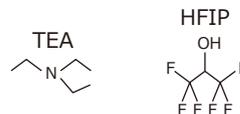
L-column3は卓越した化学的耐久性と低吸着性の両立を実現したオールラウンドカラムなのです。

L-column3って高耐久性ですね。安心して使えます。

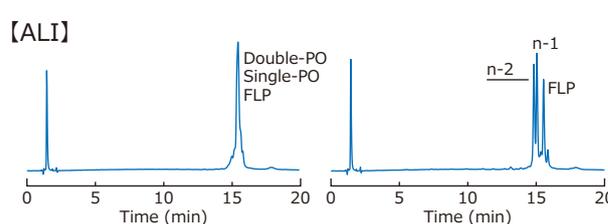
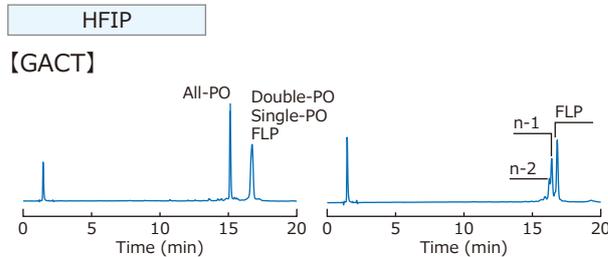
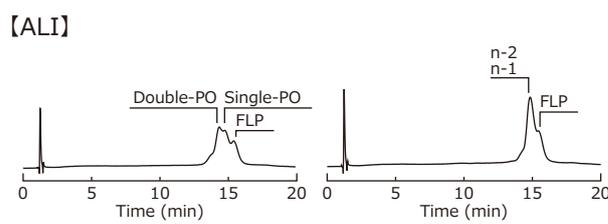
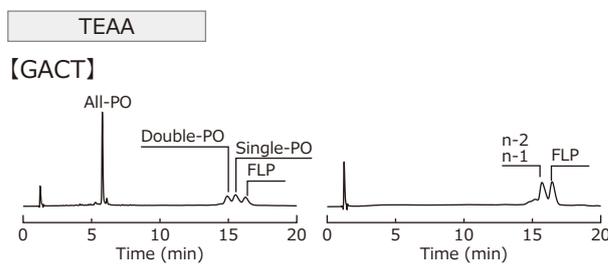
いろいろな分析のファーストチョイスにL-column3をお使いください。

メソッド② HFIP

イオン対試薬にTEA、対イオンにHFIP(1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール)を用います。オリゴヌクレオチドとTEAはイオン対を形成し、保持が強くなります。LC-MSではESIの感度が向上します。



TEAA(TEAと酢酸)とHFIP(TEAとHFIP)は、オリゴヌクレオチドの分析で使われる汎用的な溶離液です。これらの溶離液で合成オリゴヌクレオチド(GACT, ALI)とオリゴヌクレオチド類縁物質を分析しました。TEAAはオリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチド類縁物質は分離しますが、ピークがブロードです。HFIPはピークはシャープですが、分離は不十分です。



[Analytical conditions]
Column: L-column3 C18, 2 μm; Size: 2.1 mm I.D., 100 mm L.
Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 60°C
Detection: UV 265 nm; Inj. vol.: 1 μL (10 μmol/L each)
TEAA: A: CH₃CN/100 mmol L⁻¹ TEAA in H₂O pH 7 (20/80)
B: 100 mmol L⁻¹ TEAA in H₂O pH 7
A%, 40-90% (0-20 min)
HFIP: A: CH₃OH
B: 400 mmol L⁻¹ HFIP, 15 mmol L⁻¹ TEA in H₂O
A%, 10-28% (0-20 min) GACT
A%, 10-30% (0-20 min) ALI

2022Pharm

HFIPを用いた溶離液で、分離の最適化を試みました。
グラジエント勾配を少しずつ変えています。



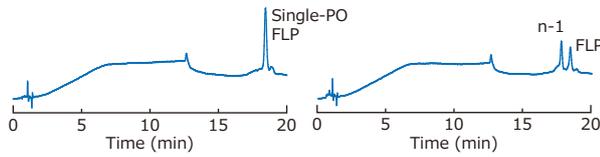
このレポートで使用した、研究用に合成したオリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチド類縁物質の配列です。



HFIP

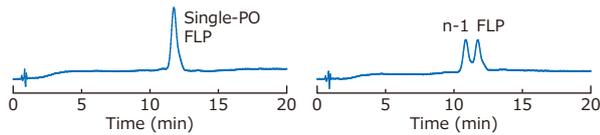
[ALI]

A%, 14-54%(0-20 min)



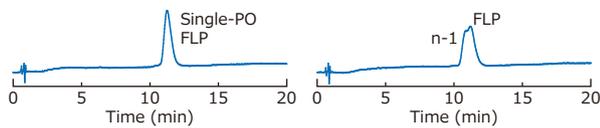
[VOL]

A%, 45-65%(0-20 min)



[NUS]

A%, 50-70%(0-20 min)



[Analytical conditions]

Column: *L-column3 C18*, 2 μm; Size: 2.1 mm I.D., 50 mm L.
Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 60°C
Detection: UV 265 nm; Inj. vol.: 0.2 μL (10 μmol/L each)
HFIP: A: CH₃OH/400 mmol L⁻¹ HFIP, 15 mmol L⁻¹ TEA in H₂O (50/50)
B: 400 mmol L⁻¹ HFIP, 15 mmol L⁻¹ TEA in H₂O

Application No.L3059, No.L3060

GACT: モデルオリゴヌクレオチド

FLP	g ^a c ^a t ^g a ^c t
Single-PO	g ^a c ^a t ^g a ^c t
Double-PO	g ^a c ^a t ^g a ^c t
n-1	g ^a c ^a t ^g a ^c t
n-2	g ^a c ^a t ^g a ^c t
All-PO	g a c t g a c t g a c t g a c t g a c t

ALI: アリカフォルセン(Alicaforsen)と同配列

FLP	g ^a c ^a c ^a a ^a g ^a c ^a t ^g a ^c g ^a c ^a t ^g a ^c c ^a g ^a t ^c a
Single-PO	g ^a c ^a c ^a a ^a g ^a c ^a t ^g a ^c g ^a c ^a t ^g a ^c c ^a g ^a t ^c a
Double-PO	g ^a c ^a c ^a a ^a g ^a c ^a t ^g a ^c g ^a c ^a t ^g a ^c c ^a g ^a t ^c a
n-1	g ^a c ^a c ^a a ^a g ^a c ^a t ^g a ^c g ^a c ^a t ^g a ^c c ^a g ^a t ^c a
n-2	g ^a c ^a c ^a a ^a g ^a c ^a t ^g a ^c g ^a c ^a t ^g a ^c c ^a g ^a t ^c a

VOL: ボラネソルセン(Volanesorsen)と同配列

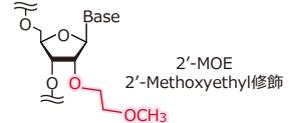
FLP	A ^g C ^a C ^a A ^a g ^a c ^a t ^g a ^c g ^a c ^a t ^g a ^c c ^a g ^a t ^c a
Single-PO	A ^g C ^a C ^a A ^a g ^a c ^a t ^g a ^c g ^a c ^a t ^g a ^c c ^a g ^a t ^c a
n-1	A ^g C ^a C ^a A ^a g ^a c ^a t ^g a ^c g ^a c ^a t ^g a ^c c ^a g ^a t ^c a

NUS: ヌシネルセン(Nusinersen)と同配列

FLP	M ^e U ^a M ^e C ^a A ^a M ^e C ^a M ^e U ^a M ^e U ^a M ^e U ^a M ^e C ^a A ^a M ^e U ^a A ^a M ^e U ^a g ^a M ^e C ^a M ^e U ^a G ^a G
Single-PO	M ^e U ^a M ^e C ^a A ^a M ^e C ^a M ^e U ^a M ^e U ^a M ^e U ^a M ^e C ^a A ^a M ^e U ^a A ^a M ^e U ^a g ^a M ^e C ^a M ^e U ^a G ^a G
n-1	M ^e U ^a M ^e C ^a A ^a M ^e C ^a M ^e U ^a M ^e U ^a M ^e U ^a M ^e C ^a A ^a M ^e U ^a A ^a M ^e U ^a g ^a M ^e C ^a M ^e U ^a G ^a G
n+1	M ^e U ^a M ^e C ^a A ^a M ^e C ^a M ^e U ^a M ^e U ^a M ^e U ^a M ^e C ^a A ^a M ^e U ^a A ^a M ^e U ^a g ^a M ^e C ^a M ^e U ^a G ^a G
DA	M ^e U ^a M ^e U ^a A ^a M ^e C ^a M ^e U ^a M ^e U ^a M ^e U ^a M ^e C ^a A ^a M ^e U ^a A ^a M ^e U ^a g ^a M ^e C ^a M ^e U ^a G ^a G

^: ホスホロチオアート修飾, A a: アデニン, G g: グアニン, C c: シトシン, T t: チミン
(大文字: RNA, 小文字: DNA)

M^eC: 5-メチルシトシン, M^eU: 5-メチルウラシル,
—: 2'-MOE



2'-MOEは疎水性を
高める官能基です。



オリゴヌクレオチドと欠損体の分離を優先するとピークがブロードになりました。脱硫酸との分離はできませんでした。何にでも使える汎用性の高い分析メソッドがあれば、便利なのに…

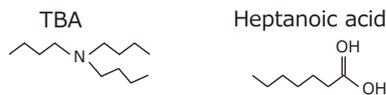
新規分析メソッド(CERI開発メソッド)による分析



新規分析メソッド開発の経緯

TEAA、HFIPを用いた分析は、ピーク形状・分離状態に一長一短があり、目的に応じて使い分けなければいけません。またオリゴヌクレオチドの長さ・疎水性が異なると、分離が不十分になる場合があり、一つ一つのオリゴヌクレオチドに対して分析条件を見直さなければいけません。

今回開発した新規分析メソッド(IPシステム^{※2})は、イオン対試薬にトリブチルアミン(TBA)、対イオンにヘプタン酸を用います。この溶離液と高耐久性の *L-column3* を使い、ホスホロチオアート修飾したオリゴヌクレオチドの不純物(オリゴヌクレオチド類縁物質)のジアステレオマーの影響によるピークのブロードを抑え、オリゴヌクレオチド類縁物質との分離を向上させることができました。



詳しくは論文をご覧ください。

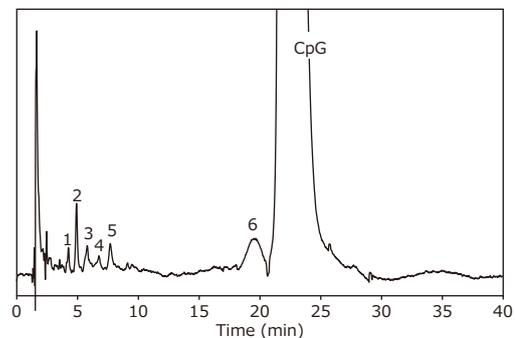
※2 本機構職員によるオリゴヌクレオチドの不純物分析に関わる論文に掲載しています。
Y. Obata, H. Sakamaki, J. Chromatogr. A 1750 (2025) 465915.
タイトル: Improving the chromatographic separation of phosphorothioate oligonucleotide from impurities by optimizing selectivity through mobile-phase conditions in Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography

不純物

核酸医薬(CpG ODN K3)と同じ配列の合成オリゴヌクレオチド(CpG)を高負荷条件で分析したところ、多数の不純物が検出されました。

[CpG]

CpG A^aT^gA^cG^aA^cA^cT^gA^cT^gA^cG^aA^cA^cG^aT^gA^cT^gA^c



ピークNo.	1	2	3	4	5	6	CpG
保持時間(分)	4.29	4.95	5.83	6.79	7.72	19.68	21.96
ピーク面積(%)	0.14	0.39	0.30	0.20	0.38	1.38	94.10

[Analytical conditions]

Column: *L-column3 C18*, 3 μm; Size: 2.0 mm I.D., 250 mm L., Metal-free
Flow rate: 0.2 mL/min
Eluent: CH₃CN/10 mmol L⁻¹ TBA, Heptanoic acid in H₂O pH 7 (45/55)
Sample: CpG ODN K3; Inj. vol.: 1 μL (1 mg/mL)

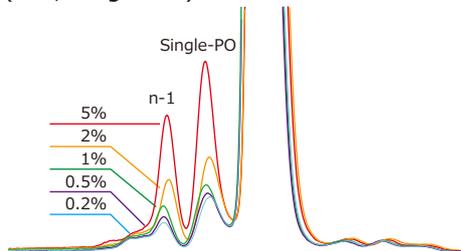
2023NATS / CERI News No.98

新規分析メソッド(CERI開発メソッド)による分析

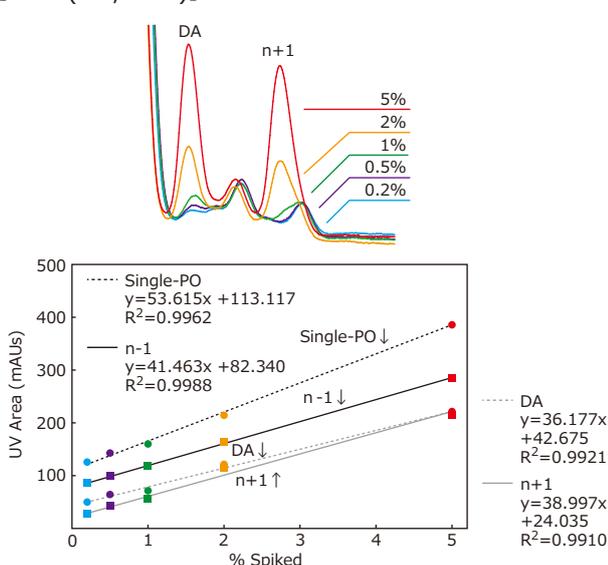
スパイク不純物の分析

新規分析メソッドで、合成オリゴヌクレオチド(NUS)に微量のオリゴヌクレオチド類縁物質をスパイクして分析しました。ここでは吸着を防ぐため、メタルフリーカラムを使用しています。

【NUS (n-1, Single-PO)】



【NUS (DA, n+1)】



[Analytical conditions]
 Column: L-column3 C18, 2 μm; Size: 2.0 mm I.D., 150 mm L., Metal-free
 Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 60°C
 Detection: UV 265 nm
 Inj. vol.: 1 μL (NUS 100 μmol/L)
 Eluent: A: CH₃CN/10 mmol L⁻¹ TBA, Heptanoic acid in H₂O pH 7 (50/50)
 B: 10 mmol L⁻¹ TBA, Heptanoic acid in H₂O pH 7
 A%, 88-94% (0-30 min)

Application No.L3062 / 2025NATS

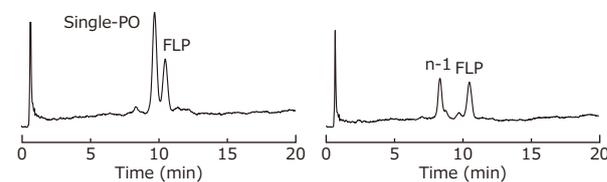
NUSに対して0.2%から5%の比率で欠損体と脱硫体(上)を、NUSに対して0.2%から5%の比率で脱アミノ体と付加体(下)をスパイクし分析した結果、FLPと良好に分離することができ、優れた定量性を示しました。



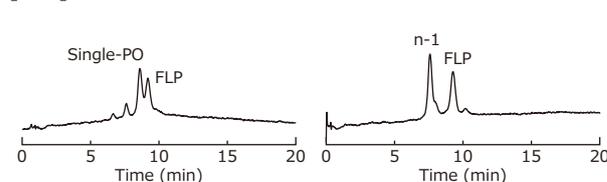
等モル不純物の分析

新規分析メソッドで、合成オリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチド類縁物質を分析しました。疎水性・鎖長の異なるオリゴヌクレオチドとその欠損体・脱硫体が、同じ分析条件で分離できました。

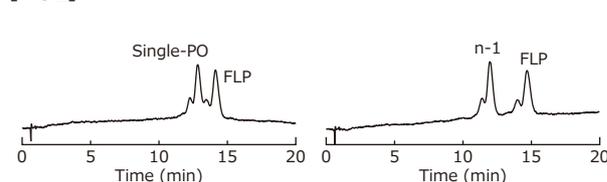
【GACT】



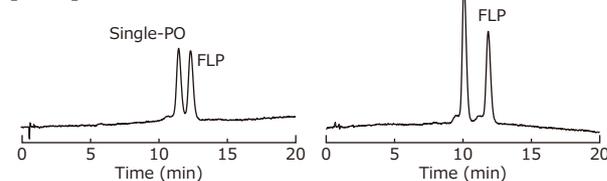
【ALI】



【VOL】



【NUS】



[Analytical conditions]
 Column: L-column3 C18, 2 μm; Size: 2.1 mm I.D., 50 mm L.
 Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 60°C
 Detection: UV 265 nm; Inj. vol.: 0.2 μL (10 μmol/L each)
 Eluent: A: CH₃CN
 B: 10 mmol L⁻¹ TBA, Heptanoic acid in H₂O pH 7
 A%, 43-45% (0-20 min)

2023NATS(GACT) / Application No.L3061

LC Technical Report Vol.28では、核酸医薬の中でも、ホスホロチオアート化したアンチセンスオリゴヌクレオチドに着目して、逆相イオン対クロマトグラフィーによる分析法の開発の一部を紹介しました。核酸医薬の進歩に伴い、これからも様々な分析法も開発されるでしょう。このレポートが核酸医薬の品質管理などの一助を担えれば幸いです。

リーフレット内容に関してのお問合せは、東京事業所クロマト技術部又は最寄りの代理店までご連絡ください。

CERI 一般財団法人 化学物質評価研究機構
 Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan
<https://www.cerij.or.jp>



東京事業所 クロマト技術部
 e-mail chromato@cerij.jp

TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521
 〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地