

Catalin E. Doneanu, Jonathan Fox, Emma Harry, Chris Knowles, Ying Qing Yu, Joseph Fredette, Weibin Chen

Waters Corporation

---

## 要約

このアプリケーションノートでは、waters\_connect HUB データ取り込みおよび解析ソフトウェア内の、BioAccord システムを用いたオリゴヌクレオチド分析のための、合理化されたコンプライアンス対応ワークフローを説明します。

## アプリケーションのメリット

- オリゴヌクレオチド（修飾、非修飾）の質量確認および純度分析のためのコンプライアンス対応 LC-MS 自動ワークフロー
- オリゴヌクレオチドの不純物の純度および相対的定量のための LC-UV アッセイ

## はじめに

近年、低分子医薬品およびタンパク質医薬品の強力な代替品として、オリゴヌクレオチド医薬品が注目を集めています<sup>1</sup>。オリゴヌクレオチド医薬品の製造および品質管理には、非常に選択性および感度の高い LC-MS 分析法が求められます。質量分析法ベースのオリゴヌクレオチド分析に最も多く使われている分析法は、様々なイオンペア試薬およびモディファイヤーを使用したネガティブ ESI-MS モードの逆相クロマトグラフィーでした。近年では、四重極および QToF LC-MS プラットホームに、オリゴヌクレオチド分析用の統合 LC-MS ワークフローが導入されてきています<sup>2-4</sup>。

図 1 に示す Waters BioAccord システムは、バイオ医薬品ルーチン分析のための、小型で頑健性が高く、使いやすいプラットフォームとして 2019 年に発表されました。本アプリケーションノートでは、waters\_connect HUB データ取り込

---

みおよび解析ソフトウェア内の、BioAccord システムを用いたオリゴヌクレオチド分析のための、合理化されたコンプライアンス対応ワークフローを説明します。完全統合型の BioAccord LC-MS システムは、ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム、ACQUITY UPLC 可変 UV (TUV) 検出器、および ESI-Tof ベースの ACQUITY RDa 質量検出器で構成されています。このアプリケーションノートに記載されている LC-MS データはすべて、フルスキャン MS モードで取り込み、waters\_connect で解析したもので、これらにより、オリゴヌクレオチドのインタクト質量測定、自動スペクトルデコンボリューションおよびレポート作成、並びに UV ベースの純度分析が行えます。非修飾オリゴヌクレオチドおよび修飾オリゴヌクレオチドの両方を、ここに記載したワークフローで分析しました。



図 1. Waters BioAccord LC-MS およびインフォマティクスプラットフォーム

## 実験方法

### 試薬およびサンプル前処理

トリエチルアミン (TEA、純度 99.5%、カタログ番号 65897-50ML) およびメタノール (LC-MS グレード、カタログ番号 34966-1L) は Honeywell (Charlotte, NC) から入手しました。1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP、純度 99%、カタログ番号 105228-100G) は Sigma Aldrich (St Louis, MO) から購入しました。HPLC グレードの脱イオン水 (DI) は、MilliQ システム (Millipore, Bedford, MA) を使用して精製しました。移動相は試験日に新

たに調製し、使用しました。MassPREP OST (Oligonucleotide Separation Technology) 標準試料 (製品番号: 186004135) を脱イオン水に溶解し、濃度 1 μM、100 nM、10 nM の希釈系列を調製しました。25 mer の完全にホスホロチオエート (PPT) 化したオリゴヌクレオチド (5'-C\*T\*C\*T\*C\* G\*C\*A\*C\*C\* C\*A\*T\*C\*T\* C\*T\*C\*T\*C\* C\*T\*T\*C\*T\*-3') を Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) から購入し、脱イオン水で希釈して 1 μM 溶液を調製しました。100 mer のオリゴヌクレオチド (5'-TGCCA GTTGC AGTTG TTTCC GAGCA GAAAC TCATC TCTGA AGAGG ATCTG GAGCA GAAAC TCATC TCTGA AGAGG ATCTG CACAC GCTGG AGCTG CCGCG-3') を Integrated DNA Technologies から購入し、脱イオン水で希釈して 1 μM 溶液を調製しました。すべてのサンプルで注入量は 10 μL でした。

LC-MS システム: ACQUITY RDa 質量検出器、ACQUITY UPLC I-Class PLUS、および ACQUITY UPLC TUV 検出器を統合した BioAccord

## LC 条件

OST カラム:	2.1 × 50 mm、1.7 μm C <sub>18</sub> パーティクルを充填 (製品番号: 186003949)
カラム温度:	60 °C
流量:	300 μL/分
移動相 A:	80 mM HFIP (ヘキサフルオロイソプロパノール)、7 mM TEA (トリエチルアミン) 含有脱イオン水
移動相 B:	40 mM HFIP、3.5 mM TEA 含有 50% メタノール
サンプル温度:	6 °C
注入量:	10 μL
パージ溶媒:	50% メタノール
サンプルマネージャー洗浄溶媒:	50% メタノール
シール洗浄溶媒:	20% アセトニトリル含有脱イオン水

## グラジエントテーブル:

時間 (分)	流速 ( $\mu$ L/分)	溶媒 A の 組成 (%)	溶媒 B の 組成 (%)	検量線 プロファイル
0.00	300	78	22	初期条件
10.00	300	60	40	6
11.00	300	15	85	6
12.00	300	15	85	6
12.10	300	78	22	6
15.00	300	78	22	6
60.00	300	78	22	6
61.00	20	50	50	6

## MS 条件

イオン化モード:	ESI-
キャピラリー電圧:	0.8 kV
コーン電圧:	40 V
ソース温度:	120 °C
脱溶媒温度:	400 °C
脱溶媒ガス (N <sub>2</sub> ) 圧力:	6.5 bar

ToF 質量範囲:	400~5000
取り込み速度:	2 Hz
ロックマス:	waters_connect ロックマス溶液 (製品番号 : 186009298)
データ取り込みソフトウェア:	waters_connect
データ解析ソフトウェア:	waters_connect

---

## 結果および考察

図 2 に示すように、ACQUITY UPLC OST カラムで、「実験方法」セクションに記載したイオンペア逆相条件を使用することで、polyT オリゴヌクレオチドとこれが切断されて生じた不純物とを 8 分未満で非常によく分離できました。UV クロマトグラムおよび TIC クロマトグラムの両方で、低レベルのオリゴヌクレオチド不純物が複数検出され、ネガティブイオンモードで記録された、対応する ESI-MS スペクトルに基づいて、切断されたオリゴの分子種すべてを容易に割り当てすることができました。全部で 26 種のオリゴヌクレオチド成分が OST MassPREP 標準試料中に確認されました。このサンプルに存在する 5 つの主な成分 (dT15、dT20、dT25、dT30、dT35) の ESI-MS スペクトルを図 3A に示します。すべてのスペクトルにおいて、観察されたチャージ状態は二峰性の分布を示し、各オリゴにおいて、低チャージ状態 (-3~-5) および高チャージ状態 (-7~-15) の 2 つの明確な最大値を示しました。このスペクトルの特徴は、オリゴヌクレオチドのイオンペア逆相分離に典型的に見られるものであり、デコンボリューションにおいて、広い質量範囲 ( $m/z = 600 \sim 3000$ ) と比較的多いチャージ状態数 (6~12) が得られました。図 3B に示すように、ACQUITY RDa 検出器の分解能 (>10,000) は、高いチャージ状態のオリゴヌクレオチドイオンの同位体の分離に十分であり、dT35 オリゴの  $[M-12H]^{-12}$  チャージ状態のモノアイソトピックピークが、はっきりと見分けられることができました。個々のチャージ状態の同位体分離により、BayesSpray デコンボリューションアルゴリズム 5 が、オリゴヌクレオチドのデコンボリューションされた平均質量について、より正確な質量測定に役立っています。

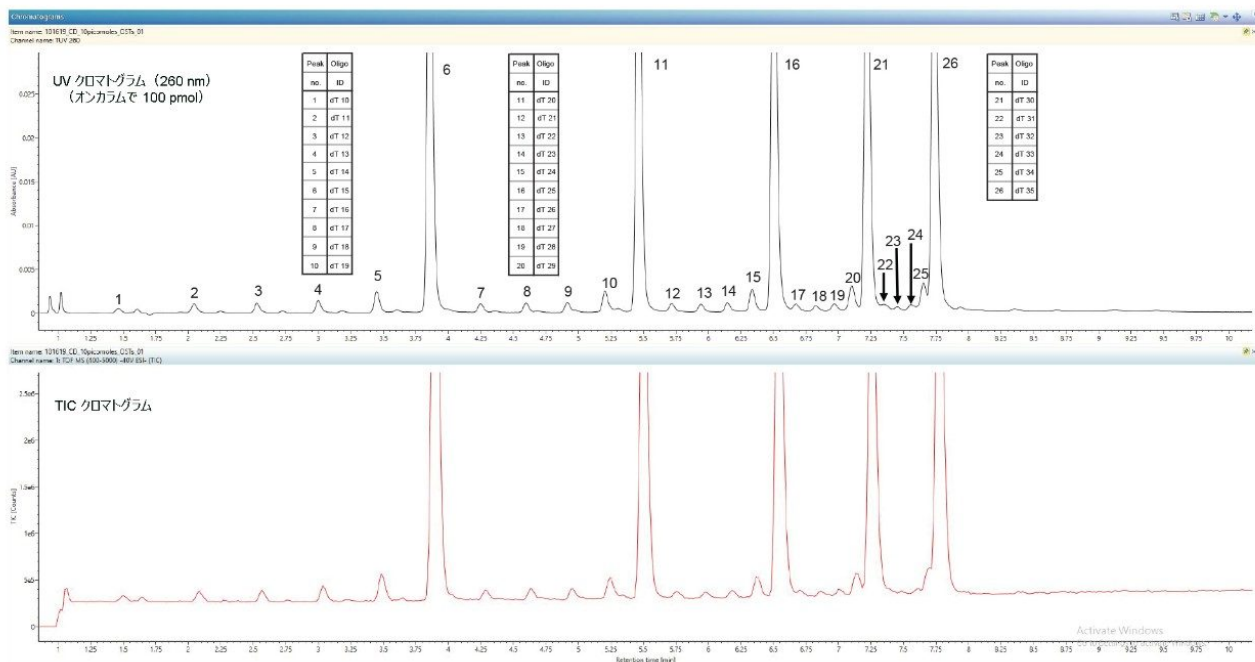
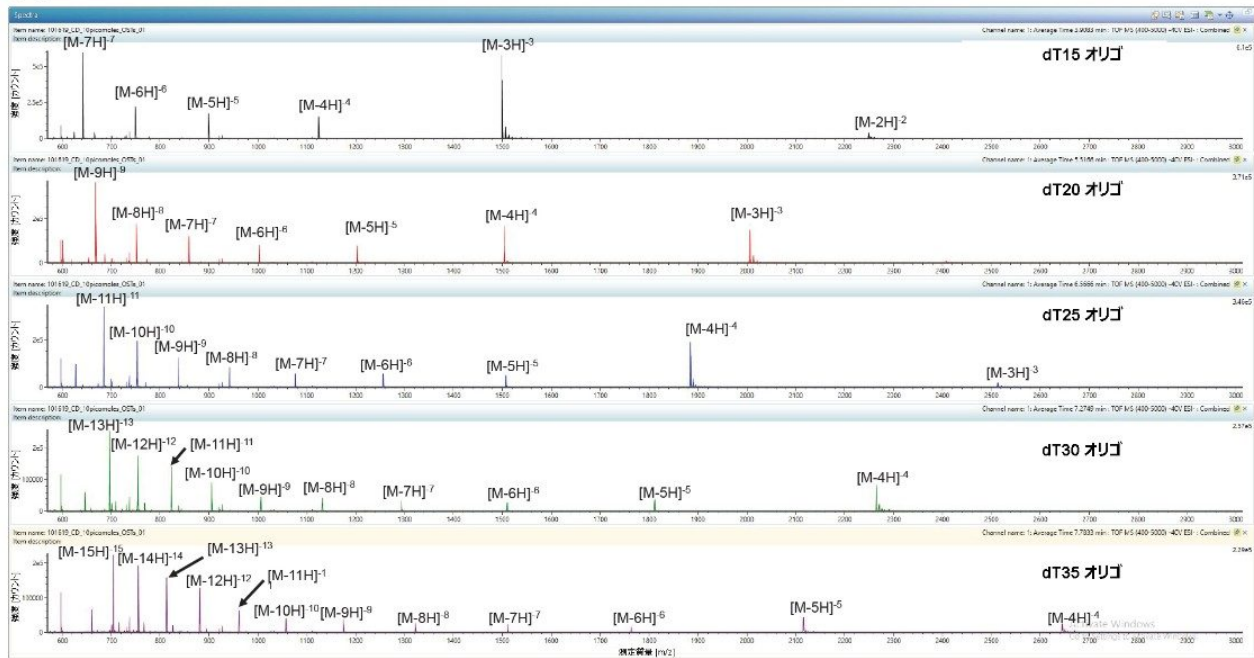


図 2. OST MassPREP 標準試料のオリゴヌクレオチドの主成分および副成分の分離を示す TUV クロマトグラムおよび TIC クロマトグラム。5 つの主なオリゴヌクレオチド成分 (dT15、dT20、dT25、dT30、dT35) のそれぞれについて、カラムに注入したサンプル量は 10 pmol でした。TIC クロマトグラムから、各オリゴヌクレオチドのピークのリゾリューションした平均質量に基づいて、ピーク同定を行いました (図に表示)。

### 3A.



### 3B.

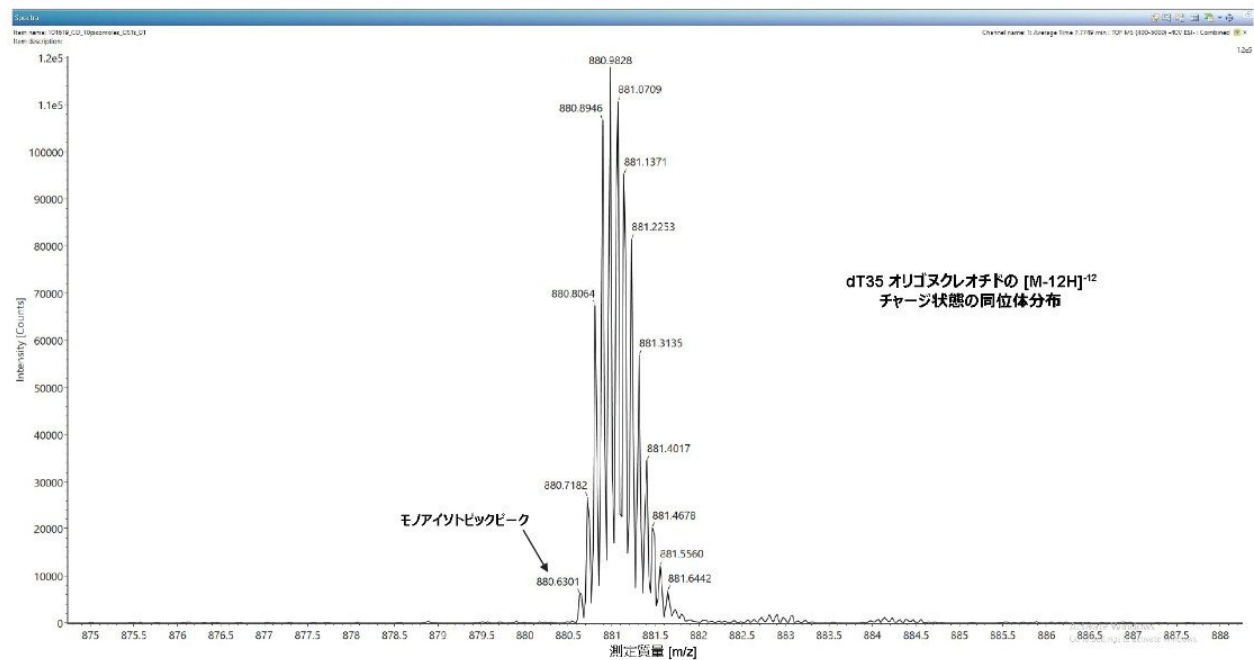


図 3. OST MassPREP 標準試料の 5 つの主なオリゴヌクレオチド成分について記録された ESI-MS スペクトル (A)。すべてのスペクトルで検出されたチャージ状態に、オリゴヌクレオチド混合物の分離に使用したイオンペア逆相条件に典型的な二峰性の分布が含まれていました。dT35 オリゴヌクレオチド (10,585 Da MW) の [M-12H]<sup>12+</sup> チャージ状態の詳細

細図から、 $m/z=880.6301$  にモノアイソトピックピークシグナルが見られます (B)。質量分解能が 10,000 を超える BioAccord システムにより、高いチャージ状態にある中程度の大きさのオリゴヌクレオチドが分離できます。

図 2 に示す UV クロマトグラムから収集した情報に基づいて (各オリゴ成分の個別の保持時間を使用)、各オリゴ分子種の含有量を計算するために、waters\_connect で自動データ解析メソッドを作成し、UV クロマトグラムに存在する 26 種のオリゴヌクレオチド成分すべてのピーク解析を実行しました。さらに、同じ成分の生 ESI-MS スペクトル (TIC トレースで収集) に、同じ解析メソッドで BayesSpray デコンボリューションアルゴリズムを適用し、対応する正確な平均デコンボリューション質量を計算しました。解析データのスクリーンショットを図 5 に示します。予想される正確な平均オリゴヌクレオチド質量、実験により測定した質量、対応する質量精度エラーを表示しています。分析した成分すべてについて、含有量にかかわらず、質量精度エラーは 15 ppm 未満であり、26 回の測定すべてについての全体の質量精度エラーは 5.3 ppm でした。

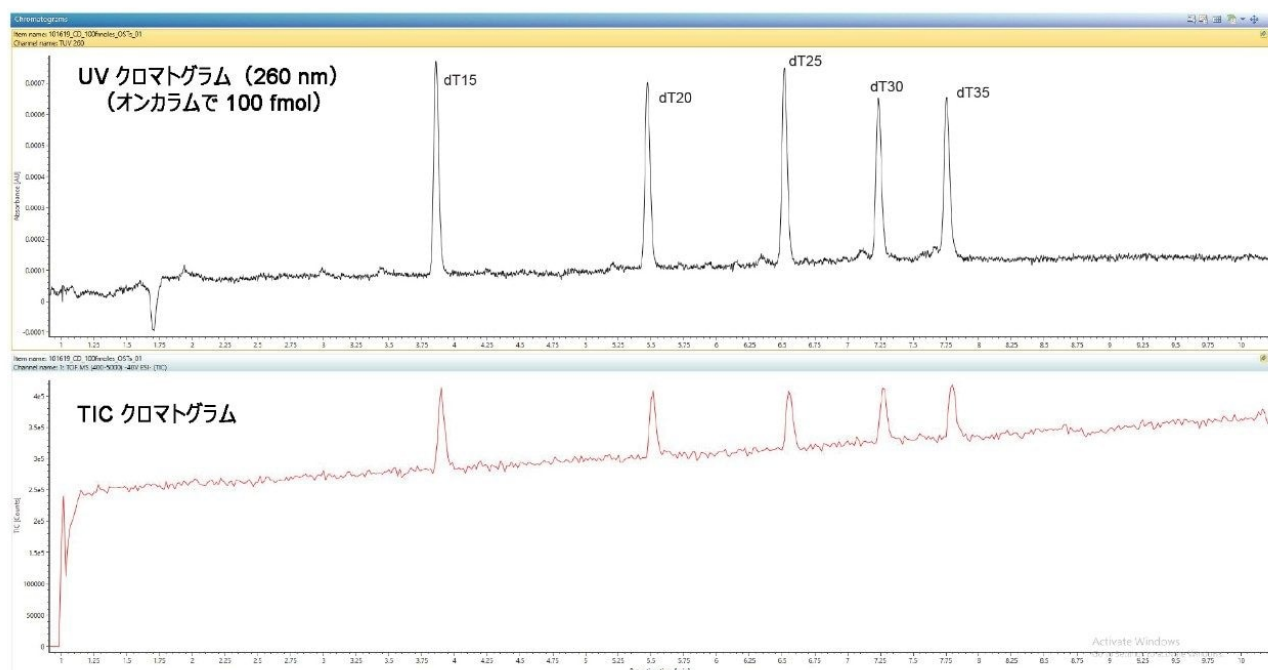


図 4.1  $1 \mu\text{M}$  OST 標準試料を 100 倍希釈 (100 fmol サンプルロード) した場合の BioAccord システムの性能を示す TUV クロマトグラムおよび TIC クロマトグラム。主な 5 種のオリゴすべてが、UV クロマトグラムおよび TIC クロマトグラムの両方で明確に検出されており、LC-MS システムおよび分析法が、低レベルのオリゴ不純物の検出に十分な感度を有することがわかります。



Component Summary ▾									
▲	Protein name	Modifiers	Response	Observed mass (Da)	Expected mass (Da)	Mass error (mDa)	Mass error (ppm)	Observed RT (min)	
6	dT15		7606760	4500.8799	4500.93310	-53.2	-11.8	3.90	
7	dT16		121148	4805.0860	4805.12630	-40.3	-8.4	4.28	
8	dT17		131039	5109.2835	5109.31940	-35.9	-7.0	4.63	
9	dT18		124778	5413.4809	5413.51260	-31.7	-5.9	4.95	
10	dT19		256082	5717.6622	5717.70580	-43.6	-7.6	5.25	
11	dT20		7561908	6021.8424	6021.89900	-56.6	-9.4	5.50	
12	dT21		78630	6326.0595	6326.09220	-32.7	-5.2	5.75	
13	dT23		67818	6934.4747	6934.47850	-3.8	-0.5	6.18	
14	dT24		260808	7238.5879	7238.67170	-83.8	-11.6	6.37	
15	dT25		9023372	7542.8419	7542.86490	-23.0	-3.0	6.53	
16	dT26		60509	7847.0650	7847.05810	6.9	0.9	6.70	
17	dT27		43903	8151.2426	8151.25130	-8.7	-1.1	6.87	
18	dT14		319470	4196.6933	4196.73990	-46.6	-11.1	3.48	
19	dT28		70344	8455.4479	8455.44440	3.5	0.4	7.00	
20	dT29		252132	8759.6296	8759.63760	-8.0	-0.9	7.13	
21	dT30		5854481	9063.8378	9063.83080	7.0	0.8	7.25	
22	dT31		25097	9368.1131	9368.02400	89.1	9.5	7.35	
23	dT32		20615	9672.1540	9672.21720	-63.2	-6.5	7.45	
24	dT33		36178	9976.4639	9976.41030	53.6	5.4	7.57	
25	dT34		242194	10280.6710	10280.60360	67.4	6.6	7.65	
26	dT35		4224434	10584.8940	10584.79670	97.3	9.2	7.77	

図 5. *waters\_connect* 自動解析メソッドの結果を示すスクリーンショット。OST サンプルの 26 種のオリゴヌクレオチド成分すべてが検出され、含有量にかかわらず、15 ppm を超える質量精度で測定されています。

表 1 は、各オリゴヌクレオチド成分の元素組成、保持時間、含有量 (%) と、正確なデコンボリューション済み平均質量の計算値および質量エラーをまとめた詳しい表です。図 5 および表 1 に示した結果から、主なオリゴヌクレオチドおよびその不純物についての純度分析およびインタクト質量確認において、*waters\_connect* ワークフローにより、迅速かつ正確な結果が得られることがわかります。

ピーク番号	オリゴ ID	元素組成					保持時間 (分)	含有量 (%)	平均質量 (Da)	質量精度 (ppm)
		炭素	水素	窒素	酸素	リン				
1	dT10	100	131	20	68	9	1.50	0.29	2979.9672	3.5
2	dT11	110	144	22	75	10	2.08	0.28	3284.1604	-2.8
3	dT12	120	157	24	82	11	2.57	0.34	3588.3536	6.2
4	dT13	130	170	26	89	12	3.03	0.45	3892.5467	5.6
5	dT14	140	183	28	96	13	3.48	0.77	4196.7399	-11.1
<b>6</b>	<b>dT15</b>	<b>150</b>	<b>196</b>	<b>30</b>	<b>103</b>	<b>14</b>	<b>3.90</b>	<b>19.76</b>	<b>4500.9331</b>	<b>-11.8</b>
7	dT16	160	209	32	110	15	4.28	0.31	4805.1263	-8.4
8	dT17	170	222	34	117	16	4.63	0.34	5109.3195	-7.2
9	dT18	180	235	36	124	17	4.95	0.36	5413.5126	-5.9
10	dT19	190	248	38	131	18	5.25	0.84	5717.7058	-7.6
<b>11</b>	<b>dT20</b>	<b>200</b>	<b>261</b>	<b>40</b>	<b>138</b>	<b>19</b>	<b>5.50</b>	<b>17.62</b>	<b>6021.8990</b>	<b>-9.4</b>
12	dT21	210	274	42	145	20	5.75	0.29	6326.0922	-5.2
13	dT22	220	287	44	152	21	5.98	0.30	6630.2854	0.0
14	dT23	230	300	46	159	22	6.18	0.34	6934.4785	-0.5
15	dT24	240	313	48	166	23	6.37	0.79	7238.6717	-11.6
<b>16</b>	<b>dT25</b>	<b>250</b>	<b>326</b>	<b>50</b>	<b>173</b>	<b>24</b>	<b>6.53</b>	<b>18.94</b>	<b>7542.8649</b>	<b>-3.0</b>
17	dT26	260	339	52	180	25	6.70	0.19	7847.0581	0.9
18	dT27	270	352	54	187	26	6.87	0.20	8151.2513	-1.1
19	dT28	280	365	56	194	27	7.00	0.27	8455.4444	0.4
20	dT29	290	378	58	201	28	7.13	0.99	8759.6376	-0.9
<b>21</b>	<b>dT30</b>	<b>300</b>	<b>391</b>	<b>60</b>	<b>208</b>	<b>29</b>	<b>7.25</b>	<b>16.69</b>	<b>9063.8308</b>	<b>0.8</b>
22	dT31	310	404	62	215	30	7.35	0.29	9368.0240	9.5
23	dT32	320	417	64	222	31	7.45	0.19	9672.2172	-6.5
24	dT33	330	430	66	229	32	7.56	0.19	9976.4104	5.4
25	dT34	340	443	68	236	33	7.65	0.96	10280.6036	6.6
<b>26</b>	<b>dT35</b>	<b>350</b>	<b>456</b>	<b>70</b>	<b>243</b>	<b>34</b>	<b>7.77</b>	<b>18.01</b>	<b>10584.7967</b>	<b>9.2</b>
									RMS ERROR:	5.3 ppm

表 1. MassPREP OST 標準試料中に同定された 26 種のオリゴヌクレオチド成分。BioAccord LC-MS システムで測定された平均質量についての質量精度エラーは、各オリゴについて 15 ppm より良好でした。

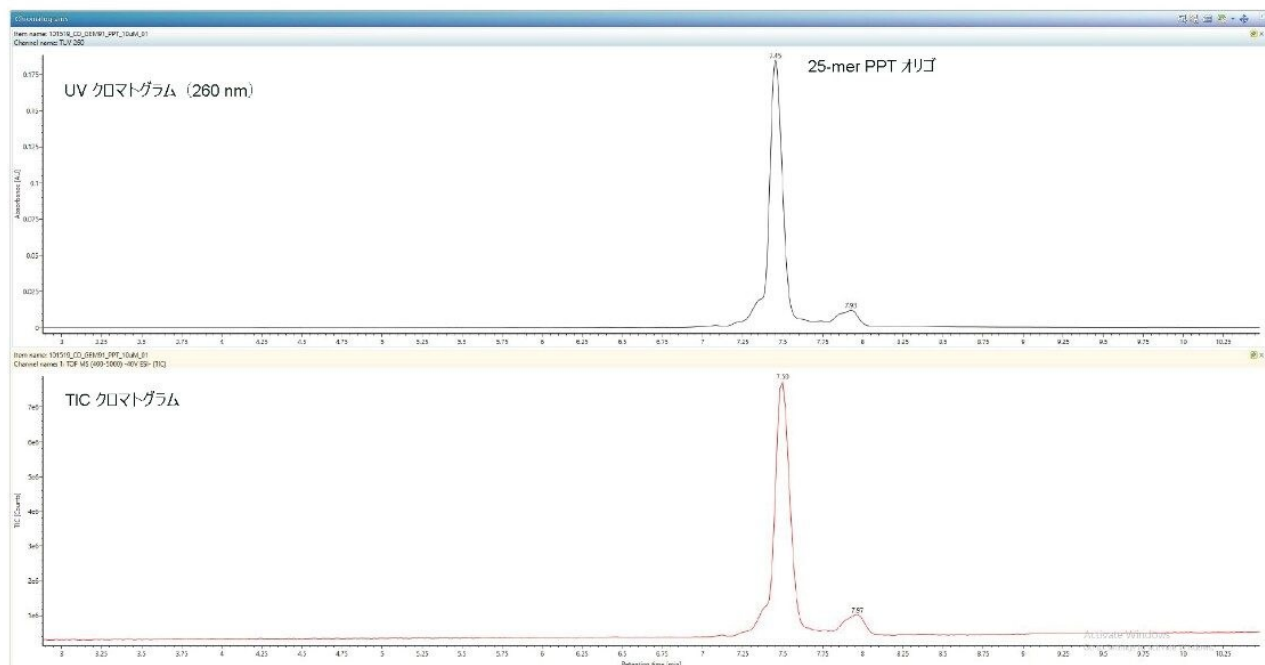
BioAccord LC-MS システムで実施したオリゴヌクレオチド分析の感度を示すため、さらに 100 倍に希釈した OST サンプル (10 nM) を同じ装置で分析しました。このサンプル (5 種の主なオリゴを 100 fmol オンカラムで注入) の UV クロマトグラムおよび TIC クロマトグラムを図 5 に示します。両方のトレースにおいて、5 つの主な成分すべてが明確に認められ、光学検出および質量分析法による検出の両方で、低レベルのオリゴヌクレオチド濃度についての BioAccord システムの検出能の高さが実証されました。

オリゴヌクレオチド医薬品には天然の DNA/RNA 配列が含まれており、これは通常、自然界に存在するヌクレアーゼによる分解に抵抗するように化学修飾を行います。化学修飾には主に、バックボーン、糖、核酸塩基の修飾の 3 種類があります。オリゴヌクレオチド医薬品の大半は、バックボーンおよび糖の構成成分が修飾されていますが、分子診断に使用するオリゴヌクレオチドの場合は核酸塩基の修飾が最も望ましい選択肢となります。最初に導入されたバックボーン修飾のひとつに、リン酸バックボーンの酸素原子を硫黄に置換したホスホチオエート (PPT) 化オリゴヌクレオチド

があります。この種の分子の正確な平均質量を得るには、チャージデコンボリューションについて、固有の同位体モデルが必要となります。PPT オリゴ同位体モデルでは、硫黄同位体の自然含有量を考慮します。PPT オリゴのインタクト質量分析を実証するため、25 mer の完全にホスホロチオエート化したオリゴ（配列 5'-C\*T\*C\*T\*C\* G\*C\*A\*C\*C\* C\*A\*T\*C\*T\* C\*T\*C\*T\*C\* C\*T\*T\*C\*T\*-3'）を、OST オリゴヌクレオチドの分析と同一の実験条件を使用して、BioAccord システムで分析しました。このオリゴについて記録された UV および TIC のトレースを図 6A に示します。元素組成  $C_{237}H_{310}N_{72}O_{131}P_{24}S_{24}$  に基づいて計算したこのオリゴの正確な平均質量は 7,776.3314 Da です。25 mer の PPT オリゴの ESI-MS スペクトル（図 6B に示す）を、BayesSpray および waters\_connect の PPT オリゴヌクレオチド同位体モデルを使用してチャージデコンボリューションし、デコンボリューションした質量を予想される正確な平均質量と比較しました。

waters\_connect からキャプチャーしたスクリーンショット（図 6B の挿入図）に示すように、この測定の質量エラーは 1.5 ppm でした。ホスホロチオエートのデコンボリューションに PPT オリゴ同位体モデルを使用した場合、BioAccord システムで正確な質量測定ができることは明らかです。

6A.



6B.

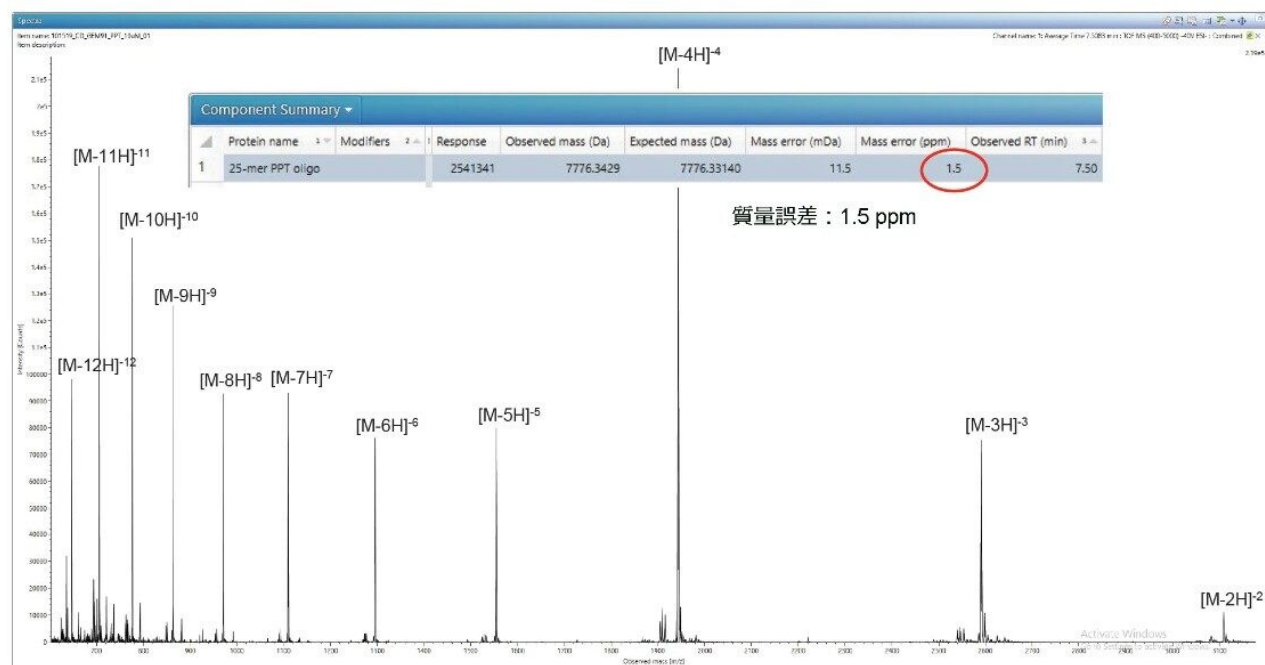


図 6. 25 mer の完全にホスホロチオエート (PPT) 化したオリゴヌクレオチドの TUV クロマトグラムおよび TIC クロマトグラム (A)、および 25 mer の PPT オリゴヌクレオチドの ESI-MS スペクトル (B)。この図の挿入図には、

---

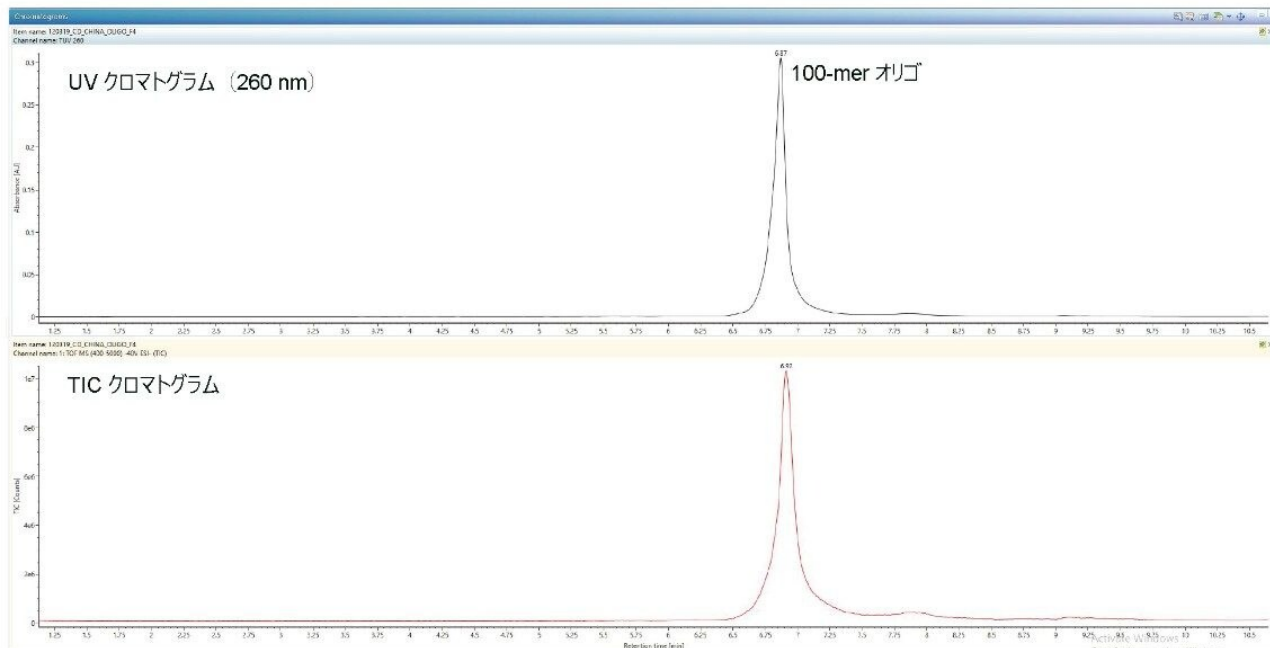
waters\_connect 解析メソッドのスクリーンショットが含まれており、デコンボリューションした測定質量が、計算分子量からわずか 1.5 ppm しか外れていないことを示しています。

通常 CRISPR のアプリケーションで使用されるより大きいオリゴヌクレオチドの分析については、次の実験で記載しています。100 mer のオリゴヌクレオチド（配列 5'- TGCCA GTTGC AGTTG TTTCC GAGCA GAAAC TCATC TCTGA AGAGG ATCTG GAGCA GAAAC TCATC TCTGA AGAGG ATCTG CACAC GCTGG AGCTG CCGCG-3'）を、溶離液 B（3.5 mM TEA、40 mM HFIP 含有 50% メタノール）35% から開始して 45% で終了する変更した 10 分間のグラジエントを使用して、BioAccord システムで分析しました。図 7A の対応する UV クロマトグラムおよび TIC クロマトグラムで、6.9 分で主なオリゴヌクレオチドが溶出していることがわかります。

この 100 mer (C<sub>975</sub> H<sub>1223</sub> N<sub>384</sub> O<sub>595</sub> P<sub>99</sub>) の元素組成によると、正確な平均質量の計算値は 30,907.7613 Da となります。このオリゴの ESI-MS スペクトル（図 7B に示す）は、waters\_connect の BayesSpray チャージデコンボリューションアルゴリズムを使用して自動的にデコンボリューションされており、実験により測定したデコンボリューションした質量は、予想質量から 26.9 ppm 外れていました（図 7B のスクリーンショットに示す）。この結果から、BioAccord システムにより、大きなオリゴヌクレオチド（100 mer を超えるオリゴマー）でも、非常に正確な質量確認結果が得られることが実証されました。

ここに記載したワークフローを使用することで、BioAccord LC-MS システムにより、様々な修飾オリゴヌクレオチドおよび非修飾オリゴヌクレオチドの、迅速かつ正確なインタクト質量確認と純度分析が可能になります。

### 7A.



### 7B.

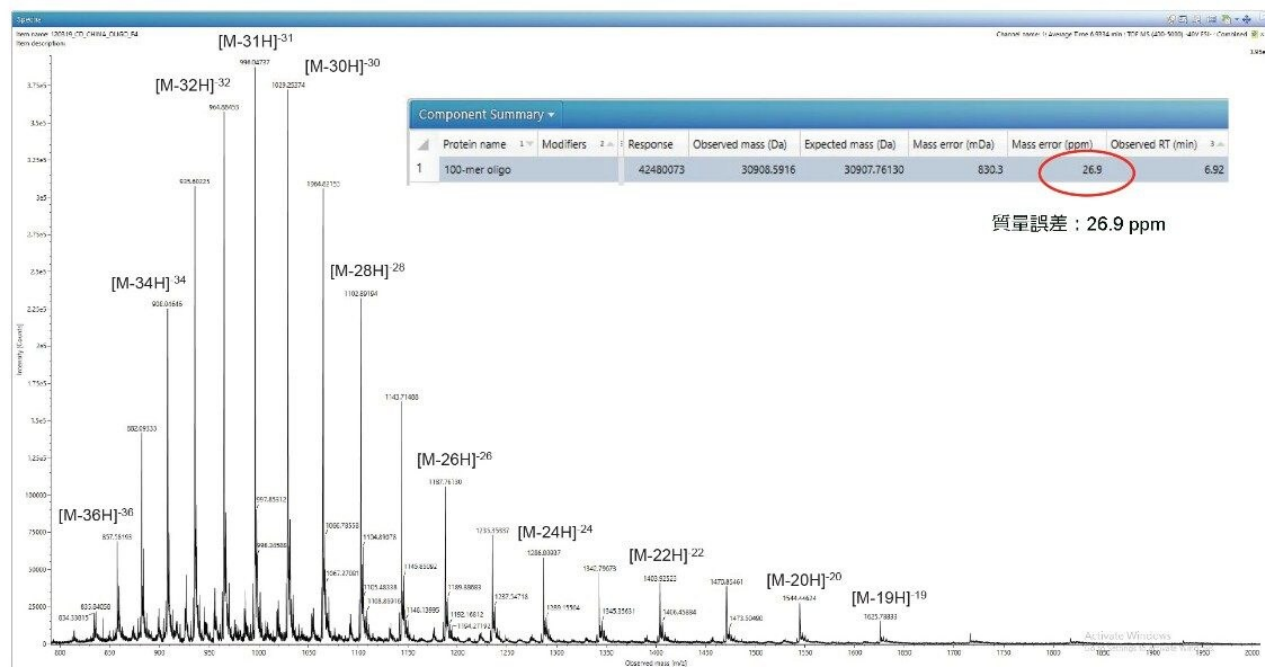


図 7. 100 mer のオリゴヌクレオチドの TUV クロマトグラムと TIC クロマトグラム (A) 、および 100 mer のオリゴヌクレオチドの ESI-MS スペクトル (B) 。この図の挿入図には、waters\_connect 解析メソッドのスクリーンショットが含まれており、このオリゴのデコンボリューションした測定質量が、正確な平均質量の計算値から 26.9 ppm 外れてい

---

たことを示しています。

---

## まとめ

- waters\_connect ワークフローにより、様々な長さ（10～35 mer）のオリゴヌクレオチドおよびホスホロチオエー  
ト化オリゴにおいて、インタクト質量確認で良好な質量精度（5～15 ppm）が得られることが分かりました。
- さらに、開発した自動解析メソッドにより、イオンペア逆相クロマトグラフィーで分離されたすべてのオリゴサン  
プル成分についての純度情報が得られました。
- この自動化されたコンプライアンス対応 LC-MS ワークフローにより、オリゴヌクレオチドの迅速な質量確認と純度  
分析のための頑健で使いやすいソリューションが得られます。

---

## 参考文献

1. Sharma, V.K., Watts J.K. Oligonucleotide therapeutics: Chemistry, delivery and clinical progress. *Future Med Chem*, 2015, 7(16), 2221–2242.
2. Birdsall, R. *et al.* High-throughput screening of Oligonucleotides for Identity and Purity Assignment Using the ACQUITY QDa Detector and ProMass for MassLynx. Waters Application Note, [720005681](#), 2016.
3. Birdsall, R. *et al.* Adding Mass Detection to Synthetic Oligonucleotide Analysis with the ACQUITY QDa Detector. Waters Application Note, [720005632](#), 2016.
4. Shion, H. *et al.* Developing a Novel, Integrated LC-MS Workflow for High-resolution Monitoring and characterization of Oligonucleotides. Waters Application Note, [720005821](#), 2016.
5. Skilling, J. *et al.* Beyond MaxEnt Deconvolution: Increasing the Fidelity and Universal Applicability of Mass Spectral Deconvolution Routines for Biomolecules with the Application of Bayesian Probability Theory, poster presented at the PAMS Conference (Practical Applications of Mass Spectrometry in the Biopharmaceutical Industry), 2010, 720003756.

---

## ソリューション提供製品

バイオ医薬品のための BioAccord LC-MS システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY UPLC チューナブル UV 検出器 <<https://www.waters.com/514228>>

720006820JA、2020 年 4 月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)