

オリゴワークフローリソースガイド

# オリゴヌクレオチド分析の包括的な ワークフローソリューション

研究開発から QC/製造まで



合成オリゴヌクレオチドは、研究や遺伝子検査に広く用いられています。このクラスの短鎖核酸ポリマーには、低分子干渉 RNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマ、CRISPR ガイドなどがあります。このような巨大分子に対する需要が増加していることは、特性解析するための堅牢な分析メソッドと、使いやすいデータ解析ワークフローへのニーズが高まりつつあることを意味します。一般的に注目される属性には、特定の不純物の質量、配列、純度、相対的定量などがあります。

### オリゴヌクレオチドの純度分析

合成オリゴヌクレオチドの精製には、他にはない困難さがあります。全長生成物の合成に関連する不純物には、切断、不完全なチオール化、塩基欠損を示す分子が含まれている場合があります。精製メソッドを開発する際には、このような構造を考慮する必要があります。

アジレントは、オリゴの分離を最適化する体系的なアプローチを開発しました (図 1)。このメソッドでは、強アニオン交換 (SAX) またはイオンペア逆相 (IP-RP) クロマトグラフィーを使用しますが、後者は質量分析に適しています。さらに、アジレントは、オリゴヌクレオチドの SAX 分取を実施して、LC/UV または LC/MS メソッドによりサンプル純度を確認するための個別のワークフローを開発しました。

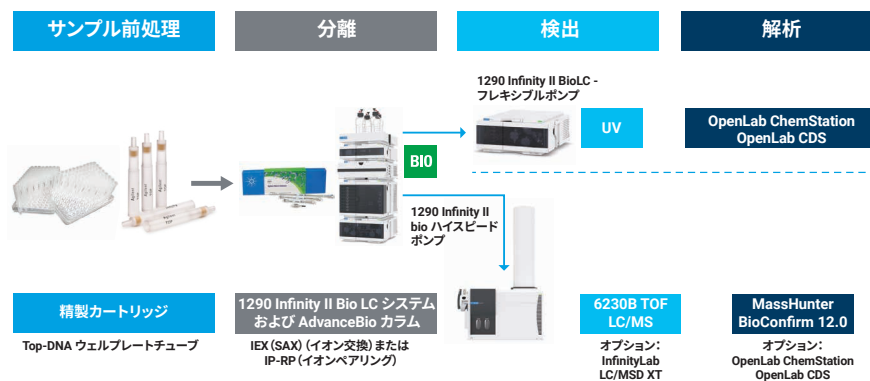


図 1. ワークフロー 1：オリゴヌクレオチドの純度分析

## オリゴヌクレオチドの Target Plus Impurities (TPI) 分析

製品に関連する不純物の特性解析は、新しいバイオ医薬品の開発において重要なタスクです。一般的な不純物の発生源には、ホスホロチオエートからリン酸ジエステルへの変換、切断、伸長、脱塩基オリゴヌクレオチドの形成などがあります。

ターゲットオリゴヌクレオチドとその不純物の特性解析には、LC/MS 分析などの高度な分析メソッドが不可欠です。高度な手法が必要とされるのは、不純物が多数存在し、アバンドンスが非常に低く、互いに組み合わせられて存在する場合があります。不純物の特性解析は困難な場合があります。不純物プロファイリングをサポートし、自動化するソフトウェアが非常に役に立つ場合があります。図 2 と図 3 に、不純物を含む分析用のアジレントのワークフローを示します。

製品に関連する不純物分析用の LC/MS ベースのアプローチ

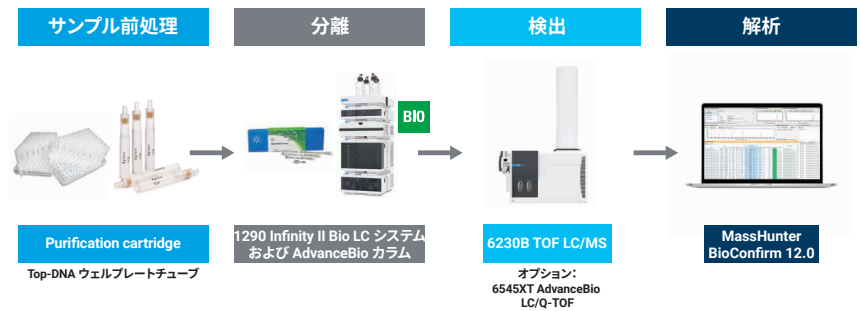


図 2. ワークフロー 2：オリゴヌクレオチドの Target Plus Impurities (TPI) 分析

Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア 12.0 の Target Plus Impurities (TPI) データ解析ワークフロー

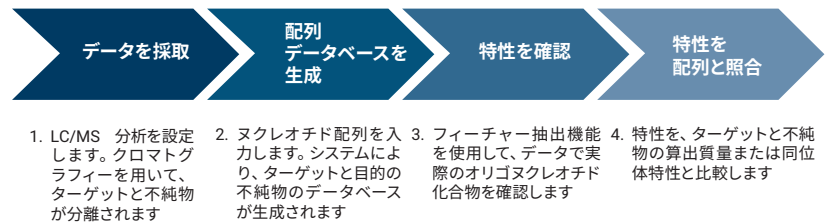


図 3. ワークフロー 2：Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア 12.0 の Target Plus Impurities (TPI) データ解析ワークフロー

## オリゴヌクレオチドの配列確認

この配列確認ワークフローでは、Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムと Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を組み合わせて使用します (図 4 と図 5)。また、このワークフローでは、オリゴの配列から計算されるフラグメントの予測値に対する同位体パターンを照合することにより、MS2 レベルのフラグメント確認を実施します。この照合機能は、BioConfirm ソフトウェアの新機能です。この機能は、高分解能精密質量システムとターゲット MS/MS データとを組み合わせる能力を実証するものです。このアプローチでは、大幅に修飾された配列を確認し、特定の化学物質群の位置を決定することにより、オリゴヌクレオチドを構造的に特性解析します。

全長生成物およびその不純物分析用の LC/MS/MS ベースのアプローチ

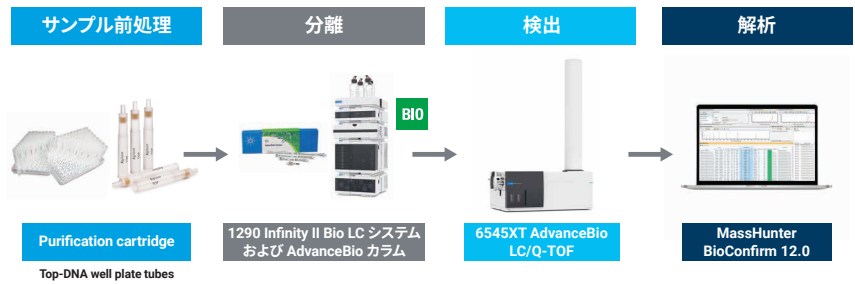


図 4. ワークフロー 3：オリゴヌクレオチドの配列確認

### Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア v12.0 でのオリゴヌクレオチドの配列確認のデータ解析ワークフロー

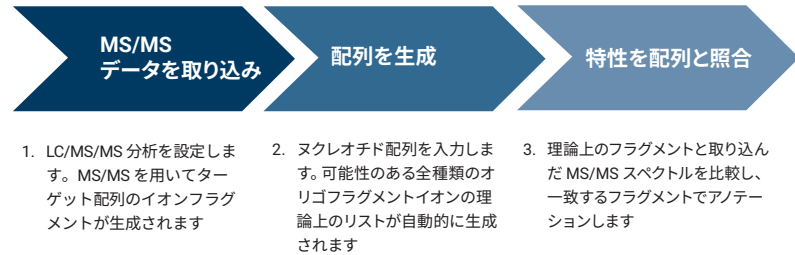


図 5. ワークフロー 3：Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア 12.0 でのオリゴヌクレオチドの配列確認のデータ解析ワークフロー

## オリゴヌクレオチドの精製ソリューション

アジレントは、液体クロマトグラフィーによるサンプル精製の柔軟性と信頼性を高める、非常に幅広いソリューションを提供しています。アジレントはお客様の LC 精製のスケールに合わせて高性能な機器、カラム、ソフトウェア、サービスを提供し、非常に高い純度と回収率を実現します。図 6 は、オリゴヌクレオチド精製用のアジレントのワークフローを示しており、図 7 は、異なるスケールで動作するアジレントシステムの成分量と流量を比較したものです。

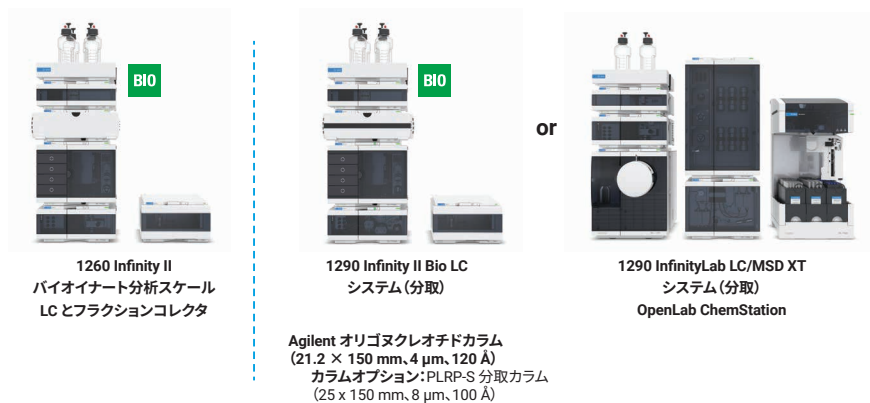


図 6. ワークフロー 4: オリゴヌクレオチドの精製

精製範囲	分析		セミ分取		分取
	マイクログラム (µg)	ミリグラム (mg)			グラム (g)
Agilent 1290 Infinity II 分取 LC システム		1 - 50 mL/min			4 - 200 mL/min
Agilent 1260 Infinity II 分取 LC システム		1 - 50 mL/min			
Agilent 1220/1260/1290 Infinity II 分析スケール LC 精製システム	0.01 - 10 mL/min				
カラム内径 (mm)	4.6	10	20 - 25	30	50
一般的な流量 (mL/min)	1	4.7	20 - 25	42	118

図 7. 異なるスケールでの精製量とアジレントシステムの流量の比較

## 参考文献

### オリゴヌクレオチドの純度分析

1. Hsiao, J.; Apffel, A.; Turner, M. Optimizing Separation of Oligonucleotides with Anion-Exchange Chromatography. Agilent Technologies application note, publication number [5994-4753EN](#), 2022.
2. Schneider, S. 4 種類の LC システムにおけるヌクレオチド分析の比較研究. Agilent Technologies application note, publication number [5994-4392JAJP](#), 2021.
3. Pulliere, F.; Christopher Welsby, C. 市販のオリゴヌクレオチド原材料の容器越しの直接同定. Agilent Technologies application note, publication number [5994-4239JAJP](#), 2021.
4. Cary 3500 UV-Vis 分光光度計による核酸の熱安定性測定のパストラクティクス. Agilent Technologies white paper, publication number [5994-4028JAJP](#), 2022.
5. Boden, J; Meixner, J. Analysis of Oligonucleotides by Capillary Gel Electrophoresis with the Agilent 7100 Capillary Electrophoresis System. Agilent Technologies application note, publication number [5994-3864EN](#), 2021.
6. Feith, A. Analyzing Raw Material for Oligonucleotide Synthesis. Agilent Technologies application note, publication number [5994-3498EN](#), 2021.
3. Rye, P. Agilent RapidFire と四重極飛行時間型質量分析の組み合わせによるイオンペアを用いないオリゴヌクレオチドのハイスループット HILIC 分析. Agilent Technologies application note, publication number [5994-4945JAJP](#), 2022.
4. Wong, D. L.; Rye, P. アジレントの高分解能 LC/ (Q-) TOF 質量分析によるオリゴヌクレオチドおよびその不純物分析の統合型ワークフロー. Agilent Technologies application note, publication number [5994-4817JAJP](#), 2022.
5. Hsiao, J.; Apffel, A.; Turner, M. Optimizing Separation of Oligonucleotides with Anion-Exchange Chromatography. Agilent Technologies application note, publication number [5994-4753EN](#), 2022.
6. Schneider, S. 4 種類の LC システムにおけるヌクレオチド分析の比較研究. Agilent Technologies application note, publication number [5994-4392JAJP](#), 2021.
7. Liao, B. 高分離能 LC/MS を用いた mRNA 5' キャッピングの高速分析. Agilent Technologies application note, publication number [5994-3984JAJP](#), 2021.
8. Rye, P.; Yang, Y. 合成オリゴヌクレオチドのハイスループット質量分析. Agilent Technologies application note, publication number [5994-3753JAJP](#), 2022.

### オリゴヌクレオチドの Target Plus Impurities (TPI) 分析

1. Grossman, J.; Herck, N. V.; Thibaut, F.; Verluyten, W.; Deckers, A.; Boon, J. P. and Hellings, M. Advanced Utilization of the Custom Calculator Tool for OpenLab CDS: An Oligonucleotide Example. Agilent Technologies application note, publication number [5994-5654EN](#), 2023.
2. Rye, P.; Schwarzer, C. MS1 Oligonucleotide Characterization Using LC/Q-TOF with HILIC Chromatography. Agilent Technologies application note, publication number [5994-5631EN](#), 2023.
9. Vanhoenacker, G.; Lecluyse, C.; Debyser, G.; Sandra, P.; Sandra, K.; Schipperges, S.; Schneider, S.; Huber, U. LC/UV および LC/MS によるオリゴヌクレオチド分析のための各種イオンペア試薬の評価. Agilent Technologies application note, publication number [5994-2957JAJP](#), 2021.
10. Wong, D. L. Mass Spectrometric Characterization of Antibody-siRNA Conjugates using the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF. Agilent Technologies application note, publication number [5994-2155EN](#), 2020.

11. Duong, P.; Bidlingmeyer, B. A.; Zhu, A.; Luke, S. Fast and High-Resolution Reversed-Phase Separation of Synthetic Oligonucleotides. Agilent Technologies application note, publication number [5991-6006EN](#), 2017.

### オリゴヌクレオチドの配列確認分析












1. Li, G.; Rye, P. MS/MS Oligonucleotide Sequencing Using LC/Q-TOF with HILIC Chromatography. Agilent Technologies application note, publication number [5994-5632EN](#), 2023.
2. Wong, D. L.; Rye, P. アジレントの高分解能 LC/Q-TOF を用いた包括的な統合ワークフローによるオリゴヌクレオチドの配列確認. Agilent Technologies application note, publication number [5994-5071JAJP](#), 2022.
3. Liao, B. 高分解能 LC/MS を用いた mRNA ポリ A 配列変異体の分析. Agilent Technologies application note, publication number [5994-3005JAJP](#), 2021.

### オリゴヌクレオチドの精製




1. Rieck, F. 分取精製用 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. Coffey, A. オリゴヌクレオチドにおける PLRP-S カラムの動的結合容量. Agilent Technologies technical overview, publication number [5994-4526JAJP](#), 2022.
2. 先進の精製ソリューション: Agilent Lock & Load カラム. Agilent Technologies brochure, publication number [5994-3907JAJP](#), 2021.
3. Rieck, F. 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. Agilent Technologies application note, publication number [5994-3514JAJP](#), 2021.
4. Krieger, S.; Dickhut, C. 脱塩処理の自動化によるオリゴヌクレオチドの 2D-LC 分析. Agilent Technologies application note, publication number [5991-9490JAJP](#), 2018

## 最適化されたワークフロー：構成と詳細情報





### ワークフロー 1：オリゴヌクレオチドの純度分析

バンドル	ワークフロー 1A - LC/UV	ワークフロー 1B - LC/MSD XT	ワークフロー 1C - LC/TOF
サンプル前処理	TOP-DNA ウェルプレートチューブ、1 μmol スケール用、150 mg、96 個 (7572915C)		
カラム	 <p><b>AdvanceBio</b> オリゴヌクレオチド (659750-702) または <b>Agilent PL-SAX</b> (PL1951-1502)</p>	 <p><b>AdvanceBio</b> オリゴヌクレオチド (659750-702) または <b>Agilent PLRP-S</b> (PL1912-1502)</p>	 <p><b>AdvanceBio</b> オリゴヌクレオチド (659750-702) または <b>Agilent PLRP-S</b> (PL1912-1502)</p>
LC	 <p><b>1290 Infinity II Bio LC</b>  <b>必須:</b> G7131A または G7132A、G7137A、および G7116B  <b>オプション:</b> G7114B (VWD) または G7117B (DAD)</p>	 <p><b>1290 Infinity II Bio LC</b>  <b>必須:</b> G7131A または G7132A、G7137A、および G7116B  <b>オプション:</b> G7114B (VWD) または G7117B (DAD)</p>	 <p><b>1290 Infinity II Bio LC</b>  <b>必須:</b> G7131A または G7132A、G7137A、および G7116B  <b>オプション:</b> G7114B (VWD) または G7117B (DAD)</p>
MS		 <p><b>LC/MSD XT:</b>  G6135BA (OpenLab ChemStation 制御) または G6135CA (OpenLab CDS 制御)</p>	 <p><b>6230B LC/TOF:</b>  G6230BA</p>
ソフトウェア	 <p>お客様がサードパーティ CDS をお持ちで、UV のみの場合、下記ソフトウェアはオプションとなります。</p> <p><b>OpenLab CDS:</b>  M8414AA または <b>OpenLab ChemStation:</b>  M8380AA、M8510AA</p>	 <p><b>OpenLab ChemStation</b> (G6135BA) または <b>OpenLab CDS</b> (G6135CA) が付属しています。<b>デコンパリュレーション</b> (M8363AA) を追加します</p>	 <p><b>BioConfirm 12</b> (M6025AA) <b>1 台のワークステーション:</b> M6026AA または M6027AA <b>ネットワークワークステーション用:</b> M6035AA、M6036AA、または M6037AA</p>




### ワークフロー 2：オリゴヌクレオチドの Target Plus Impurities (TPI) 分析

バンドル	ワークフロー 2A - LC/TOF	ワークフロー 2B - LC/Q-TOF
サンプル前処理	TOP-DNA ウェルプレートチューブ、1 μmol スケール用、150 mg、96 個 (7572915C)	
カラム	 <p><b>AdvanceBio</b> オリゴヌクレオチド (659750-702) または <b>Agilent PLRP-S</b> (PL1912-1502)</p>	 <p><b>AdvanceBio</b> オリゴヌクレオチド (659750-702) または <b>Agilent PLRP-S</b> (PL1912-1502)</p>
LC	 <p><b>1290 Infinity II Bio LC</b>  <b>必須:</b> G7131A または G7132A、G7137A、および G7116B  <b>オプション:</b> G7114B (VWD) または G7117B (DAD)</p>	 <p><b>1290 Infinity II Bio LC</b>  <b>必須:</b> G7131A または G7132A、G7137A、および G7116B  <b>オプション:</b> G7114B (VWD) または G7117B (DAD)</p>
MS	 <p><b>6230B LC/TOF:</b> G6230BA</p>	 <p><b>6545XT LC/Q-TOF:</b> G6549AA</p>
ソフトウェア	 <p><b>BioConfirm 12</b> (M6025AA) <b>1 台のワークステーション:</b> M6026AA または M6027AA <b>ネットワークワークステーション用:</b> M6035AA、M6036AA、または M6037AA</p>	 <p><b>BioConfirm 12</b> (M6025AA) <b>1 台のワークステーション:</b> M6026AA または M6027AA <b>ネットワークワークステーション用:</b> M6035AA、M6036AA、または M6037AA</p>

### ワークフロー 3：オリゴヌクレオチドの配列確認

バンドル		ワークフロー 3 - LC/Q-TOF
サンプル前処理		TOP-DNA ウェルプレートチューブ、1 μmol スケール用、150 mg、96 個 (7572915C)
カラム		AdvanceBio オリゴヌクレオチド (659750-702) または Agilent PLRP-S (PL1912-1502)
LC		<b>BIO</b> 1290 Infinity II Bio LC 必須: G7132A, G7137A, および G7116B オプション: G7114B (VWD) または G7117B (DAD)
MS		6545XT LC/Q-TOF: G6549AA
ソフトウェア		BioConfirm 12 (M6025AA) 1 台のワークステーション: M6026AA または M6027AA ネットワークワークステーション用: M6035AA、M6036AA、 または M6037AA

### ワークフロー 4：オリゴヌクレオチドの分析および分取スケールの精製

バンドル	ワークフロー 4A - 分析 LC/UV	ワークフロー 4B - 分取 LC/UV	ワークフロー 4C - 分取 LC/MSD XT
カラム	 AdvanceBio オリゴヌクレオチド (659750-702)	 AdvanceBio オリゴヌクレオチド (671150-702) または PLRP-S 分取カラム (PL1212-3800)	 AdvanceBio オリゴヌクレオチド (671150-702) または PLRP-S 分取カラム (PL1212-3800)
LC	 <b>BIO</b> 1260 Infinity II バイオイナート分析スケール LC 精製システムとフラクションコレクタ G5654 と G5664B	 <b>BIO</b> 1290 Infinity II 分取 LC G7161B, G7158B, G7114A, G7163B, G7166A (オプション)	 <b>BIO</b> 1290 Infinity II 分取 LC G7161B, G7111B, G7158B, G7114A, G7115A, G7170B, G9324A, G1170A, G4738A, G7163B, G7166A (オプション)
MS			 <b>LC/MSD XT:</b> G6135BA (OpenLab ChemStation 制御)
ソフトウェア	 OpenLab ChemStation M8380AA と M8510AA	 OpenLab ChemStation 用自動精製ソフトウェア M8368AA	 OpenLab ChemStation 用自動精製ソフトウェア M8368AA

ホームページ

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

カスタマコンタクトセンタ

**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。

DE73547804

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, December 1, 2023

5994-5790JAJP

