

Phos-tag Tip を用いた核酸医薬品の新規不純物分析法の開発

博士論文

2020 年

広島大学大学院 医歯薬保健学研究科
博士課程後期 薬科学専攻
医薬分子機能科学研究室

常弘 昌弥

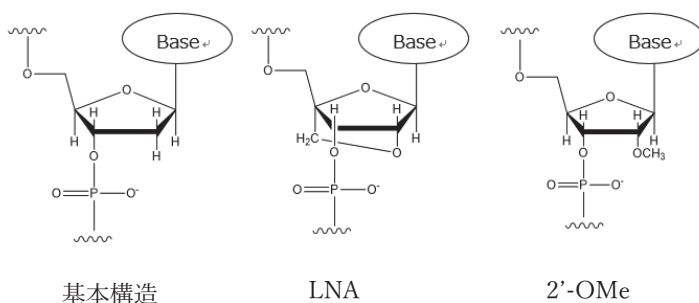
目次

1. 要約.....	3
2. 序論.....	8
3. 実験項.....	20
4. 結果と考察.....	29
5. 結論.....	43
6. 参考文献.....	44
7. 補足資料.....	48

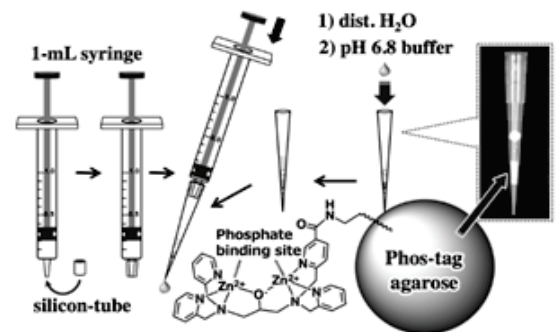
1. 要約

【背景】

核酸医薬品は、これまで治療が難しかった遺伝性疾患や難治性疾患に対する治療効果が期待できることから、アンメットメディカルニーズにこたえるモダリティとして注目を集めている。核酸医薬品は従来の医薬品が標的とするタンパク質とは異なり、その上流の DNA あるいは RNA レベルで生体を制御できる点が大きな特徴である。本研究では、核酸医薬品の中で最も多く実用化され、開発候補品も多い 1 本鎖 DNA/RNA をターゲットに実験を進めた。核酸医薬品は一般的な化学合成医薬品と比較して、不純物の混入率が高い傾向にあり、現在の分析技術では、各類縁物質を個別に管理することは困難であるケースが多い。核酸医薬品の不純物分析法は様々な種類の方法が研究されているが、LC-UV もしくは LC-MS を用いた試験方法が一般的である。オリゴヌクレオチドは負電荷を帯びており、逆相系ではカラムに保持されないため、トリエチルアミン (TEA) などのイオンペア試薬を移動相に添加する IP-HPLC 法がよく用いられている。これまでの試験方法は、末端リン酸基を持つ不純物にフォーカスしておらず、末端にリン酸基がつくとイオン化効率が下がることが想定される。そのため、メインピークに溶出位置が近い場合は、MS での分析で検出が難しいと考えられる。この背景をふまえて、オリゴヌクレオチドの詳細な分析のためには、種々のタイプの不純物を含む試料溶液から末端リン酸化オリゴヌクレオチドの分離を可能にするシンプルで包括的な方法が必要であると考えた。



核酸医薬品の基本構造



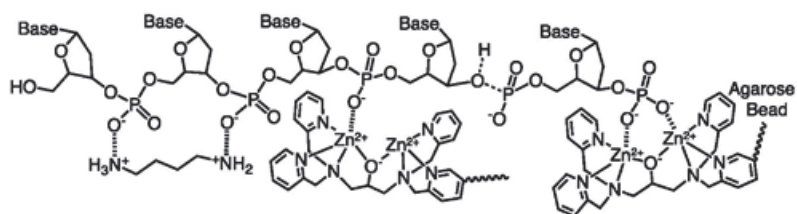
Phos-tag agarose を用いた Phos-tag Tip

筆者が所属する研究室では、アルカリフォスファターゼの活性中心である二核亜鉛錯体をモデル化した低分子がリン酸モノエステルイオン ($R-OPO_3^{2-}$) を優先的に捕捉することを発見し、この亜鉛酵素モデル化低分子を基に二核亜鉛錯体である Phos-tag (1,3bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino] propan-2-olato dizinc(II))が開発された。この Phos-tag は、生理条件下において、二つの亜鉛イオンとリン酸基の二つの酸素アニオンは強固な配位結合を形成するため、リン酸モノエステルを特異的に捕捉することができる。 Zn^{2+} -Phos-tag は、リン酸ジアニオンをカルボン酸アニオンよりも約 16000 倍も強く捕捉する考えられており、生体高分子であるリン酸化タンパク質に対しても、Phos-tag はリン酸化アミノ酸残基の種類にかかわらず、捕捉することができる。本研究では、Phos-tag agarose を 200 μ L マイクロピペットチップにつめた Phos-tag Tip を用いて、非リン酸化オリゴヌクレオチドから末端リン酸化オリゴヌクレオチドを選択的に分離にできないか検討を行った。Phos-tag Tip 内のリン酸結合部位の量は約 30 nmol であり、IP-RPLC-MS 分析用試料の調製が可能である。本研究では、天然オリゴヌクレオチド及び化学修飾オリゴヌクレオチドを含むモデル試料を用いて核酸医薬品の不純物分析のための Phos-tag Tip 法の分離精製条件の検討及び、その活用方法について検討した。

【結果と考察】

1) 分離条件の検討

天然型オリゴヌクレオチド S 1 (15塩基) と 3'末端がリン酸化された N-1不純物 S 2 (14塩基) を等モル量含む試料溶液を用いて、Phos-tag Tip法におけるホスホモノエステル型不純物の優先的な結合に最適な緩衝液の検討を行った。リン酸化オリゴヌクレオチド不純物の効率的な分析のため、非オリゴヌクレオチドは素通り画分へ、非リン酸化オリゴヌクレオチドは洗浄画分へ、リン酸化オリゴヌクレオチドは溶出画分へ分画できる方法が最適であると考えた。最適な緩衝液を検討した



Phos-tag に結合した洗浄工程前のプトレシン結合オリゴヌクレオチドの推定構造

結果、以下の緩衝液を選定した。試料溶液として、50 mM Bis-Tris/ CH₃COOH (pH 6.8) と10 mMプトレシン、洗浄液として0.10 M Bis-Tris / CH₃COOH、10 mM CH₃COONa及び10 mM MgCl₂ (pH 6.8)、溶出液として0.10 M Na₄P₂O₇及び0.10 M CH₃COOH (pH 7.0)。このプロトコールでは、W1画分に対するオリゴヌクレオチドの量に比べてW2及びW3画分の含有量ははるかに少なく、大部分がW1画分に溶出されていた。4頁に、Phos-tagに結合した洗浄工程前のプトレシン結合オリゴヌクレオチドの推定構造を示す。Phos-tag Tipを用いた分離プロトコールは、生理条件下、室温で試料当たり30分未満であり、Phos-tag結合オリゴヌクレオチドS 1及びS 2は室温での結合及び洗浄段階の間に24時間放置した後でも、結果として分離パターンはほとんど変化がなく、Phos-tag結合オリゴヌクレオチドはその期間中安定であることを示した。本分離方法により、大部分の非オリゴヌクレオチドはFT画分へ、非リン酸化オリゴヌクレオチドはW画分へ、リン酸化オリゴヌクレオチドは溶出画分へそれぞれ回収することができるとわかった。また、このバッファー系は各FT溶液、洗浄溶液及び溶出溶液はそのままLC-MS分析に使用することができるため、汎用性が高い方法であると考えられる。

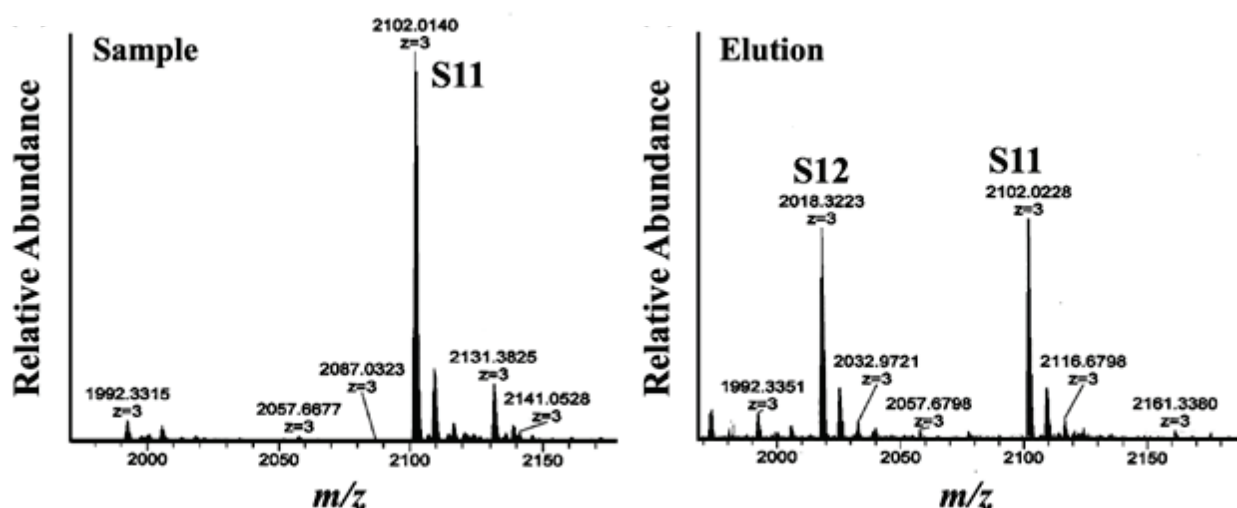
2) 種々サンプルへの適用検証

この基本プロトコールが様々なサンプルに適用可能であるかを検証するために、塩基長が10から20までの種々の塩基配列のサンプルを用いてPhos-tag Tipによる分離を試みた。試料溶液は等モル量の末端リン酸基をもたない親オリゴヌクレオチドとその3'末端がリン酸化されたN-1不純物を用いた。その結果、ほとんどすべての親オリゴヌクレオチドはW画分で回収率78~85%で除去され、3'末端リン酸化体はE画分で回収率86~95%で優先的に回収された。このPhos-tag Tip法の修飾オリゴヌクレオチドへの適合性を確認するために、LNA (2',4'-locked nucleic acid)含有DNAオリゴヌクレオチド (S11及びS12) とOMe (2'-O-methylated nucleic acid)含有RNA/DNAオリゴヌクレオチド (S13及びS14) をそれぞれ0.5 nmolずつ試料溶液に添加した2種類の試料を用いた。S11及びS13はいずれも洗浄画分に回収率82%及び85%で除去され、3'末端リン酸化N-1不純物であるS12及びS14は、それぞれ回収率90%及び89%で溶出画分に選択的に回収された。以上の結果より、Phos-tag Tip法

は、天然型オリゴヌクレオチド及び修飾型オリゴヌクレオチドのいずれも、非リン酸化親オリゴヌクレオチドとの混合物から末端リン酸化オリゴヌクレオチドを分離可能であることを確認した。

3) LC-MS による測定

核酸医薬品に実際に混入する不純物量としては、それぞれ数%以下である。そのため、実際のサンプルを想定し、1%のリン酸化不純物を親オリゴヌクレオチドに添加したサンプルを用い、実験を行った。その結果、試料溶液中では確認できなかったマススペクトルが、Phos-tag Tip により分画した E 画分において、リン酸化された不純物を検出することができた。E 画分でのみ検出できた理由としては、リン酸化不純物を E 画分に分画することで、メインピークによるイオン化抑制を回避でき、非リン酸化体よりイオン化効率が低いリン酸化体を検出することができたと考えられる。また、FT 画分に主に検出されたマススペクトルであれば、非オリゴヌクレオチド、W 画分に主に検出されたマススペクトルであれば、非リン酸化オリゴヌクレオチド、E 画分に主に検出されたマススペクトルであれば、リン酸化オリゴヌクレオチドである可能性が高いと考えられるので、本手法は、構造推定の一助として有用であると考えられる。



試料溶液及び溶出画分の LC-MS 測定結果

【結論】

核酸医薬品の新規不純物分析法として、Phos-tag Tipを用いて、非リン酸化オリゴヌクレオチドからホスホモノエステル型不純物を分離可能なシンプルで効率的な手法を開発した。分離に用いる各バッファー系を検討した結果、ポリアミンであるプトレシンを添加した結合液、洗浄溶液に Mg^{2+} を添加したBis-Tris緩衝液、溶出液にピロリン酸溶液がオリゴヌクレオチドの分離には最適であると分かった。最適化したバッファー系では、Phos-tagが2価のリン酸基を特異的に捕捉可能であることを利用して、非オリゴヌクレオチド、非リン酸化オリゴヌクレオチド、リン酸化オリゴヌクレオチドに分画可能であった。Phos-tag Tip法は、天然型及び化学修飾オリゴヌクレオチドについて、それらの非リン酸化オリゴヌクレオチドからの末端リン酸基を有するオリゴヌクレオチドを分離可能であり、分離した試料は前処理不要で、そのままLC-MSを用いて分析可能である。また、非オリゴヌクレオチド、非リン酸化オリゴヌクレオチド、リン酸化オリゴヌクレオチドに分画可能であるため、構造推定にも有用であると考えられる。

以上より、Phos-tag Tip法とLC-MSの組み合わせた手法は、核酸医薬品開発における種々の合成オリゴヌクレオチド中のホスホモノエステル型不純物を特異的に分離分析することのできる新しいタイプの分析法として有用であると考えられる。この手法を用いた分析を通じて核酸医薬品開発に貢献できることを願っている。

【原著論文】

Masaya Tsunehiro, Kenji Sasaki, Emiko Kinoshita-Kikuta, Eiji Kinoshita, Tohru Koike, "Phos-tag-based micropipette-tip method for analysis of phosphomonoestertype impurities in synthetic oligonucleotides", *Journal of Chromatography B* 1151 (2020) 122198.

2. 序論

核酸医薬品は、癌、心血管及び代謝疾患、神経障害、眼疾患などの広範囲の適応症を治療することができる可能性のある医薬品であり、これまで治療が難しかった遺伝性疾患や難治性疾患に対する治療効果が期待できることから、アンメットメディカルニーズにこたえるモダリティとして注目を集めている。核酸医薬品は従来の医薬品が標的とするタンパク質とは異なり、その上流のDNAあるいはRNAレベルで生体を制御できる点が大きな特徴である。核酸医薬品は、構造や作用機序の異なる多様な核酸医薬品が開発されており、表1に示す通り、現在、臨床開発が行われているものに限定しても、アンチセンス、siRNA、miRNA、デコイ、アプタマー、CpGオリゴの少なくとも6種類が存在しており、表2に示す通り、このうちアンチセンス、siRNA、アプタマー、CpGオリゴの4種類が既に実用化されている。これまでに承認された核酸医薬の多くがアンチセンス医薬品であり、臨床開発段階にある開発候補品においてもアンチセンスが最も開発候補数が多い。疾患分野としては、遺伝性・希少疾患もしくはがんが多く、アンメットメディカルニーズの高い領域で開発が進められている。

表 1. 核酸医薬品の分類

	アンチセンス	siRNA	miRNA	デコイ	アプタマー	CpGオリゴ
構造	1本鎖 DNA/RNA	2本鎖 RNA	2本鎖 RNA	2本鎖 DNA	1本鎖 DNA/RNA	1本鎖 DNA
塩基長	13-30	20程度	20程度	20程度	25-45	20程度
標的	mRNA、 pre-mRNA、 miRNA	mRNA	mRNA	タンパク質 (転写因子)	タンパク質 (細胞外/細胞 表層タンパク)	タンパク質 (TLR9)
作用部位	細胞内	細胞内	細胞内	細胞内	細胞内	細胞外 (エン ドソーム内)

表 2. 承認された核酸医薬品

商品名	分類	塩基長	化学修飾	承認国/年	適応症	投与経路
Vitravene	アンチセンス	21	S 化	US 1998 EU 1999	CMV 性網膜炎	硝子体内
Macugen	アプタマー	28 (PEG)	2'-F、 2'-OMe	US 2004 EU 2006 JP 2008	滲出性 加齢黄斑変性症	硝子体内
Kynamro	アンチセンス	20	S 化、 2'-MOE	US 2013	ホモ接合型家族性 高コレステロール血症	皮下
Exondys51	アンチセンス	30	モルフォリノ核酸	US 2016	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	静脈内
Spinraza	アンチセンス	18	S 化、 2'-MOE	US 2016 EU 2017 JP 2017	脊髄性筋萎縮症	髄腔内
HEPLISAV-B	CpG オリゴ	22	S 化	US 2017	B 型肝炎（予防）	筋肉内
Tegsedi	アンチセンス	20	S 化、 2'-MOE	US 2018 EU 2018	遺伝性 ATTR アミロイドーシス	皮下
Onpattro	siRNA	21 (LNP)	2'-OMe	US 2018 EU 2018 JP 2019	遺伝性 ATTR アミロイドーシス	静脈内
Waylivra	アンチセンス	20	S 化、 2'-MOE	EU 2019	家族性 高カイロミクロン血症	皮下
Viltepso	アンチセンス	21	モルフォリノ核酸	JP 2019	デュシェンヌ型筋ジ ストロフィー	静脈内

本研究では、核酸医薬品の中で最も多く実用化され、開発候補品も多い、アンチセンス (1本鎖 DNA/RNA) をターゲットに実験を進めた。その基本構造は、図 1 に示す、5 炭糖に核酸塩基が結合したヌクレオチドがホスホジエステル結合を介してつながったオリゴヌクレオチドである。天然の核酸合成の際には、5' から 3' 側へ向けて鎖が延長されていく一方で、化学合成の場合にはどちら向きに伸ばすことが原理的に可能であるが、天然とは逆に 3' 側から 5' 側へ鎖を延長していくケースが多い。これは、5' ヒドロキシ基が一級であるために反応性が高く、延長反応が行いやすいためである。オリゴヌクレオチド合成には、速度や操作の簡便さといった観点から、固相合成法が用いられることが一般的である。図 2 に固相合成法の概略図を示す。固相合成法とは、最初の単量体 (アミダイト) を、固体の担体 (ガラスビーズなど) に結合させた上で、反応点の脱保護・単量体導入を必要な回数繰り返す。こうしてヌクレオチド鎖を成長させた上で、最後に全体の脱保護及び担体からの切り出しを行い、目的のオリゴヌクレオチドを得るという方法である。しかし、固相合成法では、全ての反応がビーズ上で進行し、過剰の試薬や反応で生じる副生成物などは洗浄処理によって簡便に除去できるため煩雑な操作は必要なく、迅速かつ少ない手間で目的物が得られるが、精製の機会が限定される。目的物質のオリゴヌクレオチドとその類縁物質の物理化学的性質は似ているため、類縁物質 (不純物) 分離/精製には限界がある。従って、核酸医薬品は一般的な化学合成医薬品と比較して、不純物の混入率が高い傾向にあり、現在の分析技術では、各類縁物質を個別に管理することは困難であるケースが多い。核酸医薬品のオリゴヌクレオチド由来の不純物には N-1 などの鎖長の異なるオリゴヌクレオチド (ヌクレオシド欠損体)、一部の塩基が欠落した脱塩基体、ホスホジエステル結合の開裂体など様々なものが確認されている。この目的オリゴヌクレオチド由来不純物の分析は、新しい有効成分含有医薬品の開発において極めて重要である。この点に関し、現実的な範囲で、開発者は、存在する又は存在する可能性が高いすべての不純物の構造を明らかにするために努力することが各国の規制当局より求められる。そのため、一般的には、合成経路およびその化学変化の詳細な理解、出発物質および出発物質の不純物についての知識、および可能性のある分解経路の理解が必要となる。これらの情報は、不純物特性解析の実験に基づく解析プロセスを導くために用い

られる。その解析プロセスは不純物の単離又は濃縮、化学的及び物理化学的評価、確かな合成による構造確認など、様々な工程から成るため、不純物の完全な構造決定は、医薬品開発において、困難な側面の1つとされている。

また、天然のオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼにより生体内では速やかに分解・排出されてしまうため、ヌクレアーゼ耐性の向上や標的配列との結合性の向上等を目的として、オリゴヌクレオチドの化学修飾や末端への様々な分子の付加などが研究されている。核酸の化学修飾については、糖部の修飾、リン酸部の修飾、塩基部の修飾などが研究されている。糖部の修飾としては、2'-位の修飾と架橋型修飾があり、2'-位の修飾は、2'-F、2'-O-Methyl (2'-OMe)、2'-O-Methoxyethyl (2'-MOE) などがよく知られている。2'-OMe の修飾核酸の構造を図1に示す。架橋型修飾の目的は、揺らぎのある糖部の立体配座を架橋により固定化するためであり、糖部2'-位と4'-位を化学的に架橋することにより、相補鎖との結合力が向上するとともに、立体障害によりヌクレアーゼ耐性も向上する。架橋型核酸としては、一般的にLNA (Locked Nucleic Acid)、ENA (2'-O、4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids) などがよく知られている。LNA の修飾核酸の構造を図1に示す。リン酸部の修飾としては、O (酸素原子) を S (硫黄原子) に置換したホスホロチオエート化 (S 化) がよく知られており、ヌクレアーゼ耐性の向上や脂溶性が増すことから細胞内への取り込み効率も改善すると考えられている。このように多くの化学修飾が研究されており、製薬企業や大学等で様々なオリジナルの修飾核酸が開発されている。この化学修飾に伴う不純物についても、同様に分析する必要があるが、天然型のオリゴヌクレオチドと比較して、より不純物の候補が多くなり複雑になると想定される。

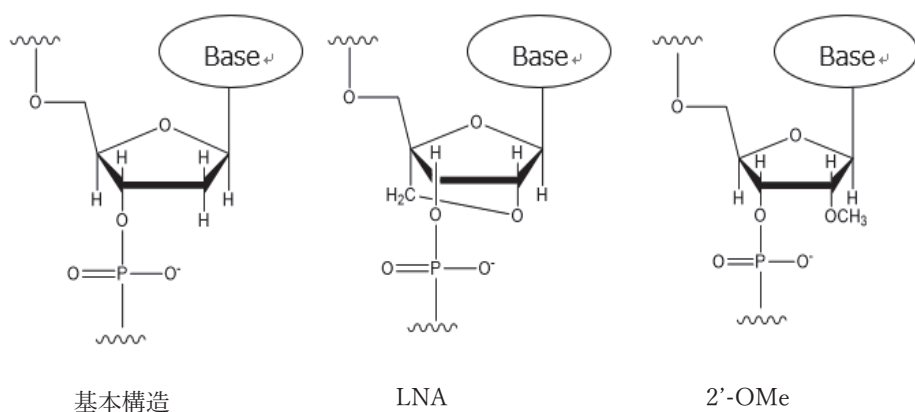


図1 核酸医薬品の基本構造

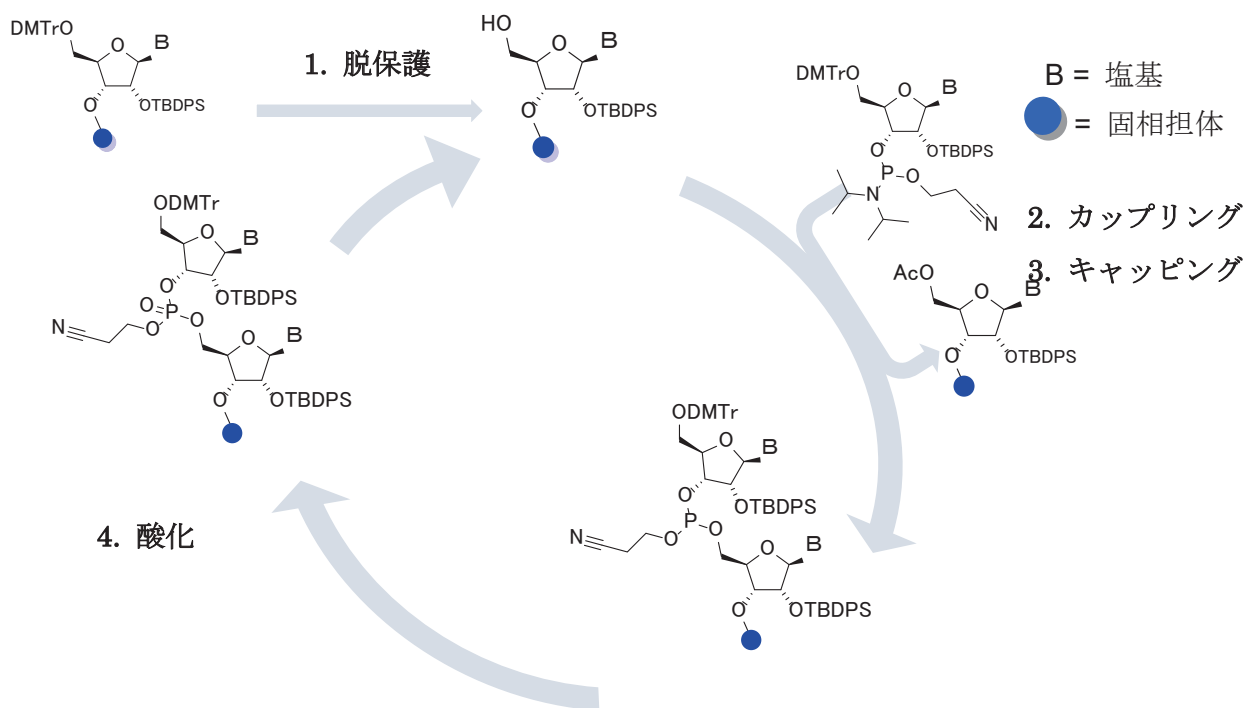


図2 核酸医薬品の固相合成方法

核酸医薬品の開発は国内外で活発になってきているものの、現時点では核酸医薬品の品質や非臨床安全性に関する国際的に調和されたガイドラインは発出されていないことが現状である。このことから、日本においても様々なグループによって核酸医薬品のレギュレーションの制定を目指して議論がなされている。例えば、核酸医薬品の品質担保に関する考え方としては2018年9月に「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（薬生薬審発0927第3号）」が発出されている。この文書は、核酸医薬の製造、不純物の管理、規格及び試験方法に関連する部分に特化しており、核酸医薬に設定すべき試験項目として、「通常必要と考えられる試験項目」や「必要に応じて検討すべき項目」や構造特性の説明に必要な要素などが述べられている。また、海外ではOligonucleotide Safety Working Groupが様々なホワイトペーパーを発表している。2017年には、その中の一つとして核酸医薬品の品質のうち、特に不純物に焦点をあてたホワイトペーパー「Impurities in Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products」が発表されている。このホワイトペーパーは核酸医薬品の不純物に関して化学的特性と安全性の観点の両面から検討されている。最も興味深い内容としては、核酸医薬品における構造決定及び安全性確認の閾値を提案していることである。図3に安全性を確認したレベル（Qualified Level）、規格値（Specification Limit）、安全性確認及び構造決定の必要な閾値（Qualification Threshold）の関係を示す。安全性確認が必要な閾値を超えて設定された不純物の規格値は、安全とみなされる規格値を下回ることで一般的要求事項となる。このホワイトペーパーでは、報告の閾値を0.5%、構造決定の閾値を1.0%、毒性評価の閾値を1.5%と提案している。必ずしもこの通りに閾値を設定する必要はないが、この値を参考にし、試験方法を構築する必要があると考えられている。

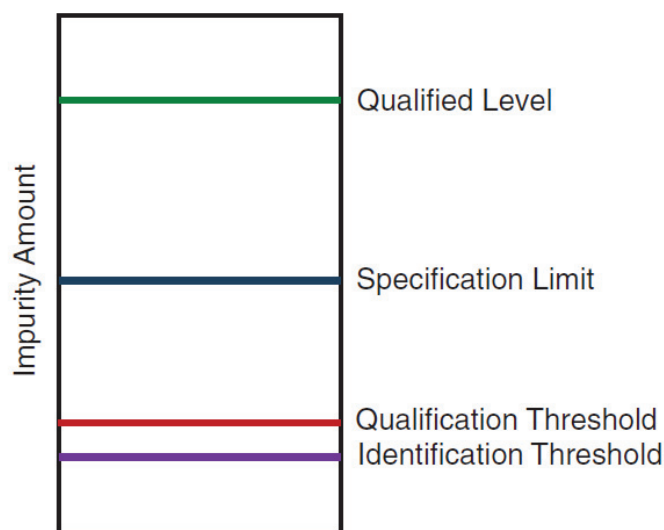


図3 安全性を確認したレベル、規格値、安全性確認及び構造決定の必要な閾値の関係
(Impurities in Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products, Fig.1 より引用)

核酸医薬品の不純物分析法は様々な種類の分析方法が研究されているが、LC-UV もしくは LC-MS を用いた試験方法が一般的である。オリゴヌクレオチドは負電荷を帯びており、逆相系ではカラムに保持されにくいいため、トリエチルアミン (TEA) などのイオンペア試薬を移動相に添加するイオンペアクロマトグラフィー (IP-HPLC) 法がよく用いられている。その他の HPLC での分析方法としては、電荷の違いで分離する陰イオン交換クロマトグラフィー (AEX) や疎水性の違いで分離する疎水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) などの方法がある。現在では、オリゴヌクレオチドに含まれる様々な不純物を適切に分析、管理するために、HPLC に質量分析装置 (MS) を組み合わせた LC-MS での分析が主流となっている。IP-HPLC-MS 法ではイオンペア試薬の他に、MS でのイオン化効率を上げるために、HFIP などのフッ素化アルコールを添加した移動相を用いるのが主流とされている。具体的な試験法検討の流れとしては、イオンペア試薬及びフッ素化アルコールの種類や濃度、有機溶媒を組み合わせ、LC-UV での分離や LC-MS の感度を比較し、最適なイオンペア試薬とその濃度、有機溶媒、グラジエント条件等を選定する。図4に、TEA 及び HFIP の濃度の違いによる影響を調査した結果を示す。この結果より、イオンペア試薬と HFIP の濃度

の違いが分離に影響していることが示されている。IP-HPLC は、N-1 などの鎖長の異なるオリゴヌクレオチドとの分離がいいとされており、MS にそのまま接続して分析できるため汎用性が高く、一番多く用いられている分析法である。ただ、イオンペア試薬による装置汚染が懸念されるため、装置の専有化や洗浄作業などが必要となってくる。次に陰イオン交換クロマトグラフィー (AEX) での分析例を図 5 に示す。AEX は、移動相に緩衝液を用い、塩の濃度をグラジエントで徐々に上げていくことで、分析対象物を溶出させる試験方法である。試験方法の検討については、移動相の緩衝液の種類、塩の種類、グラジエント条件を最適化する。AEX は、脱硫体 (-S) の分離がいいとされており、前述の IP-HPLC とは異なる分離モードのため、分離可能な不純物が異なることもある。そのため、分離対象不純物によっては AEX での分離を選択することもある。ただ、AEX はそのまま MS に接続することができないため、MS に接続するためには 2 次元 LC を使用するなど、なんらかの前処理が必要となることがネックとして挙げられる。次に、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) での分析例を図 6 に示す。HILIC は逆逆相クロマトグラフィーとも言われ、逆相クロマトグラフィーで保持されにくい化合物の分析に適した手法である。移動相には、A 液にギ酸アンモニウムなどの水溶液、B 液にアセトニトリルなどの有機溶媒を用い、B 液を減らしているグラジエントもしくはイソクラティックのいずれかが用いられている。試験方法の検討については、移動相の種類、グラジエント条件を検討する。HILIC は、そのまま MS に接続することができ、装置を汚染させる懸念も低いですが、前述の 2 法と比較して、不純物との分離がよくないことが多く、安定化に時間がかかることなどが懸念点としてあげられており、試験法として採用されることは少ないと考えられる。以上のように分離モードによって長所、短所があり、分離させたい不純物に応じて、最適な分離モードを選択することが良いと考える。

分析条件

カラム：YMC-Triart C18 (1.9 μ m, 12 nm)

50 \times 2.1mm

移動相：A) TEA HFIP 混液, B) メタノール

5-15%B (0-10 min)

流量：0.42 mL/min

温度：60°C

検出波長：260 nm

注入量：1.0 μ L

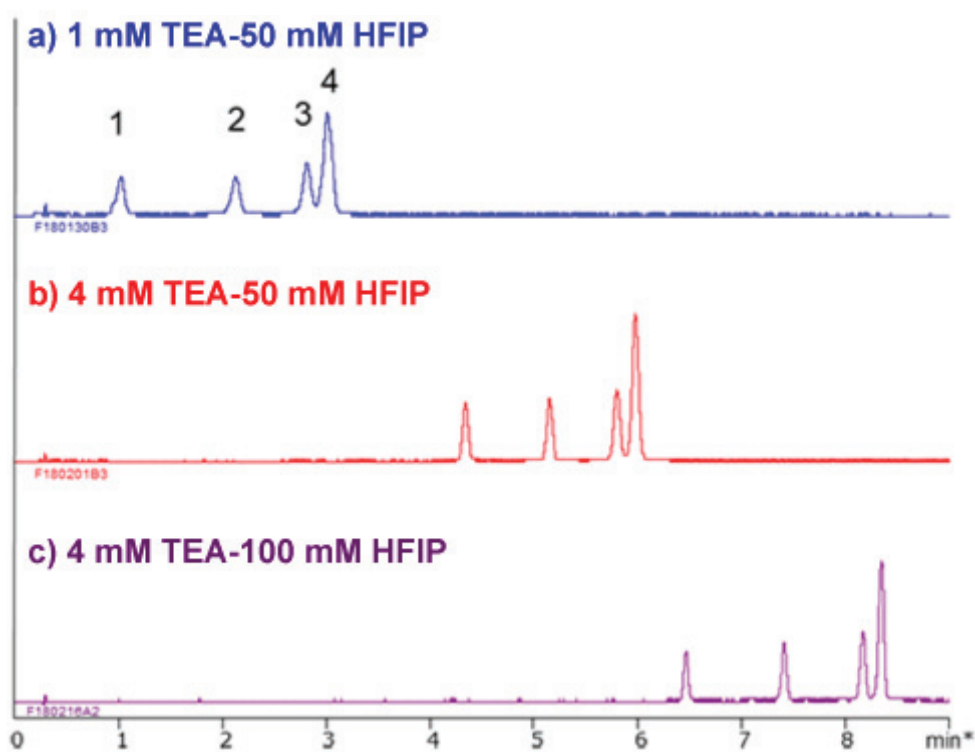


図4 IP-HPLC の分析例

(YMC テクニカルインフォメーションより引用)

http://www.ymc.co.jp/tech/bio/bio_003.html

分析条件

カラム：BioPro IEX QF (5 μ m, 100 \times 4.6 mm)

移動相：A)10 mM NaOH

B)10 mM NaOH, 1.0M NaClO₄

25-55%B (0-15 min), 100%B(15-20 min)

流量：1.0 mL/min

温度：24 $^{\circ}$ C

検出波長：260 nm

注入量：4 μ L

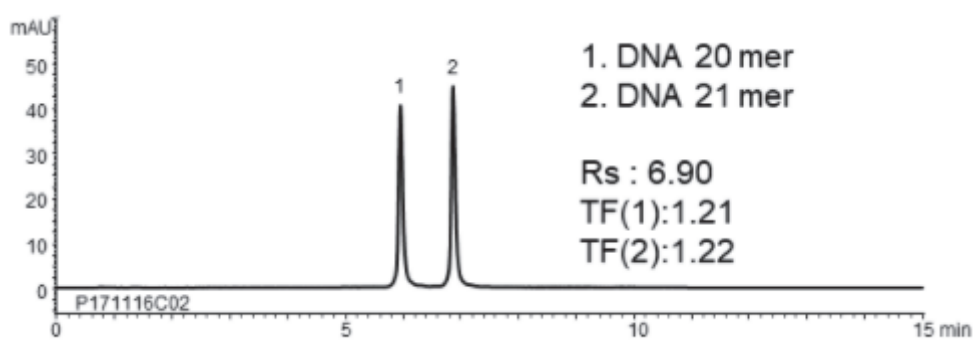


図5 AEX の分析例

(YMC HPLC データシートより引用)

<http://www.ymc.co.jp/uploads/501/P180316A.pdf>

分析条件

カラム：Shodex Hilicpak VN-50 2D (150×2.0 mm)

移動相：A) 50 mM HCOONH₄

B) CH₃CN

60%B (0-10 min), 60-55%B(10-15 min), 60%B (15-20min)

流量：0.2 mL/min

温度：40°C

検出波長：260 nm

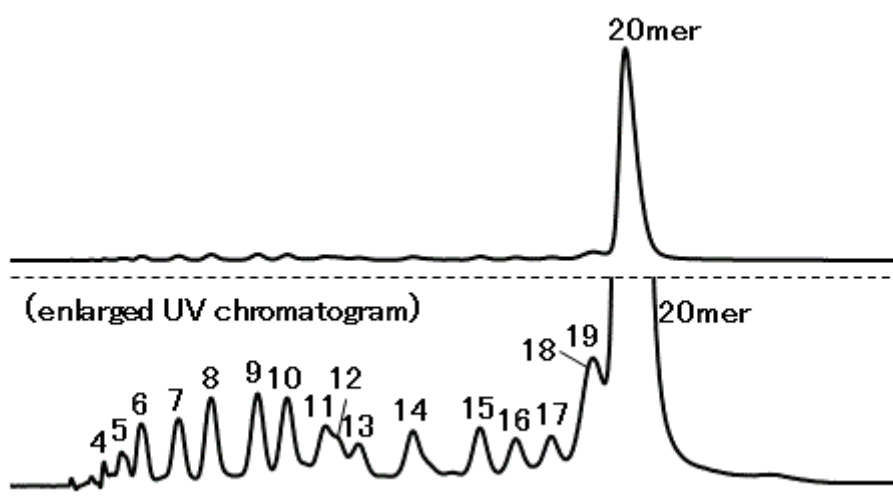


図6 Hilic の分析例

(Shodex テクニカルレポートより引用)

<https://www.shodex.com/ja/dc/02/04/06.html>

これまでの試験方法は、末端リン酸基を持つ不純物にフォーカスしておらず、末端にリン酸基がつくとイオン化効率が下がることが想定されるため、メインピークに溶出位置が近い場合は、MS分析での検出が難しいと考えられる。そのため、オリゴヌクレオチドの詳細な分析のためには、種々のタイプの不純物を含む試料溶液から特異的に末端リン酸化オリゴヌクレオチドの分離を可能にするシンプルで包括的な方法が必要であると考えた。

筆者が所属する研究室では、アルカリフォスファターゼの活性中心である二核亜鉛錯体をモデル化した低分子がリン酸モノエステルイオン ($R-OPO_3^{2-}$) を優先的に捕捉することを発見し、この亜鉛酵素モデル化低分子を基に二核亜鉛錯体である Phos-tag (1,3bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino] propan-2-olato dizinc(II))が開発された。この Phos-tag は、生理条件下において、二つの亜鉛イオンとリン酸基の二つの酸素アニオンは強固な配位結合を形成するため、リン酸モノエステルを特異的に捕捉することができる。 Zn^{2+} -Phos-tag は、リン酸ジアニオンをカルボン酸アニオンよりも約 16000 倍も強く捕捉する考えられており、生体高分子であるリン酸化タンパク質に対しても、Phos-tag はリン酸化アミノ酸残基の種類にかかわらず、捕捉することができる。筆者が所属する研究室では、このような特徴をもつ Phos-tag 誘導体を用いて、Phos-tag SDS-PAGE や Phos-tag agarose beads、Phos-tag magnetic beads などリン酸化プロテオミクスの研究に有用な多くの独自の技術を開発されている。筆者は、修士課程時代に、Phos-tag magnetic beads を用いたリン酸化ペプチドを優先的に捕捉する分離精製条件について研究に取り組んでおり、この Phos-tag 技術を核酸医薬品の分析に適用できないか検討することとした。核酸医薬品の基本構造はヌクレオチドがホスホジエステル結合を介して結合したものであるため、特に分解物は 2 価のリン酸基を持つ可能性が高く、Phos-tag の有用性が活かせると考えた。

本研究では、Phos-tag agarose を 200 μ L マイクロピペットチップにつめた Phos-tag Tip を用いて、非リン酸化オリゴヌクレオチドから末端リン酸化オリゴヌクレオチドを選択的に分離にできないか検討を行った。Phos-tag Tip 内のリン酸結合部位の量は約 30 nmol であり、前処理不要の IP-RPLC-MS 分析用試料の調製が可能である。本研究では、天然オリゴヌクレオチド及び化学修飾オリゴヌクレオチドを含む様々なモデルサンプルを用いて核酸医薬

品の不純物分析のための Phos-tag Tip 法の分離精製条件の検討及びその活用方法について検討した。

3. 実験項

3. 1 試薬

本研究に使用したサンプルを表 3 に示す。本研究に用いたオリゴヌクレオチドは、Sigma-Aldrich Japan (東京、日本) より購入した。S1~S10 はすべて天然の DNA で構成されており、P と記載されているものは末端にリン酸基が付加されている。S11、S12 は天然の DNA と修飾核酸である LNA (2',4'-locked nucleic acid) を両末端に配列したギャップマー構造のオリゴヌクレオチドである。S11 の構造を図 7 に示す。S13、S14 は、天然の DNA と修飾核酸である OMe (2'-*O*-methylated nucleic acid) を両末端に配列したギャップマー構造のオリゴヌクレオチドである。S13 の構造を図 8 に示す。2',4'-locked cytidine は、5 位の C がすべてメチル化されている。1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol (HFIP)、2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1, 3-diol (Bis-Tris; $pK_a = 6.5$ for its protonated species) は、ナカライテスク (京都、日本) より購入した。Phos-tag agarose、メタノール (HPLC-grade)、酢酸ナトリウム、ピロリン酸ナトリウム、プトレシン、スペルミン、塩化マグネシウム、トリエチルアミン (TEA) は、富士フィルム和光純薬 (東京、日本) より購入した。実験にはすべて最高級グレードの試薬及び溶媒のみを使用し、精製することなく、実験に使用した。また、すべての水溶液は MilliQ 水を用いて、調製した。

表3 本研究に用いた一本鎖合成オリゴヌクレオチドの配列を示す。Pは3'-末端リン酸基の有無を示す。Samples S1-S10: 天然型のDNAオリゴヌクレオチド; Samples11及び12: 2',4'-locked nucleic acid (LNA) 含有のDNAオリゴヌクレオチド; Samples13及び14: 2'-O-methylated nucleic acid (OMe) 含有のRNA/DNAオリゴヌクレオチド。LNA含有の核酸及びOMe含有の核酸は、それぞれ上付き文字L及びMで示す。S11及びS12のLNA含有の核酸のシチジン部分はすべてC-5部分がメチル化されている。

Sample No.	配列 (5'-3')	長さ	分子量
S1	CCGTGAGCCTGACAC	15	4538.0
S2	CCGTGAGCCTGACA-P	14	4328.8
S3	GCTCCGTCCACTGGCGATCC	20	6030.0
S4	GCTCCGTCCACTGGCGATC-P	19	5820.8
S5	CCGTGAGCCTG	11	3333.2
S6	CCGTGAGCCT-P	10	3083.9
S7	GCTCCGTCCAC	11	3253.2
S8	GCTCCGTCCA-P	10	3044.0
S9	GCTCCGTCCACTGGC	15	4505.0
S10	GCTCCGTCCACTGG-P	14	4295.7
S11	G ^L C ^L T ^L C ^L -CGTCCACTGGCG-A ^L T ^L C ^L C ^L	20	6310.1
S12	G ^L C ^L T ^L C ^L -CGTCCACTGGCG-A ^L T ^L C ^L -P	19	6058.9
S13	G ^M C ^M U ^M C ^M -CGTCCACTGGCG-A ^M U ^M C ^M C ^M	20	6242.1
S14	G ^M C ^M U ^M C ^M -CGTCCACTGGCG-A ^M U ^M C ^M -P	19	6002.9

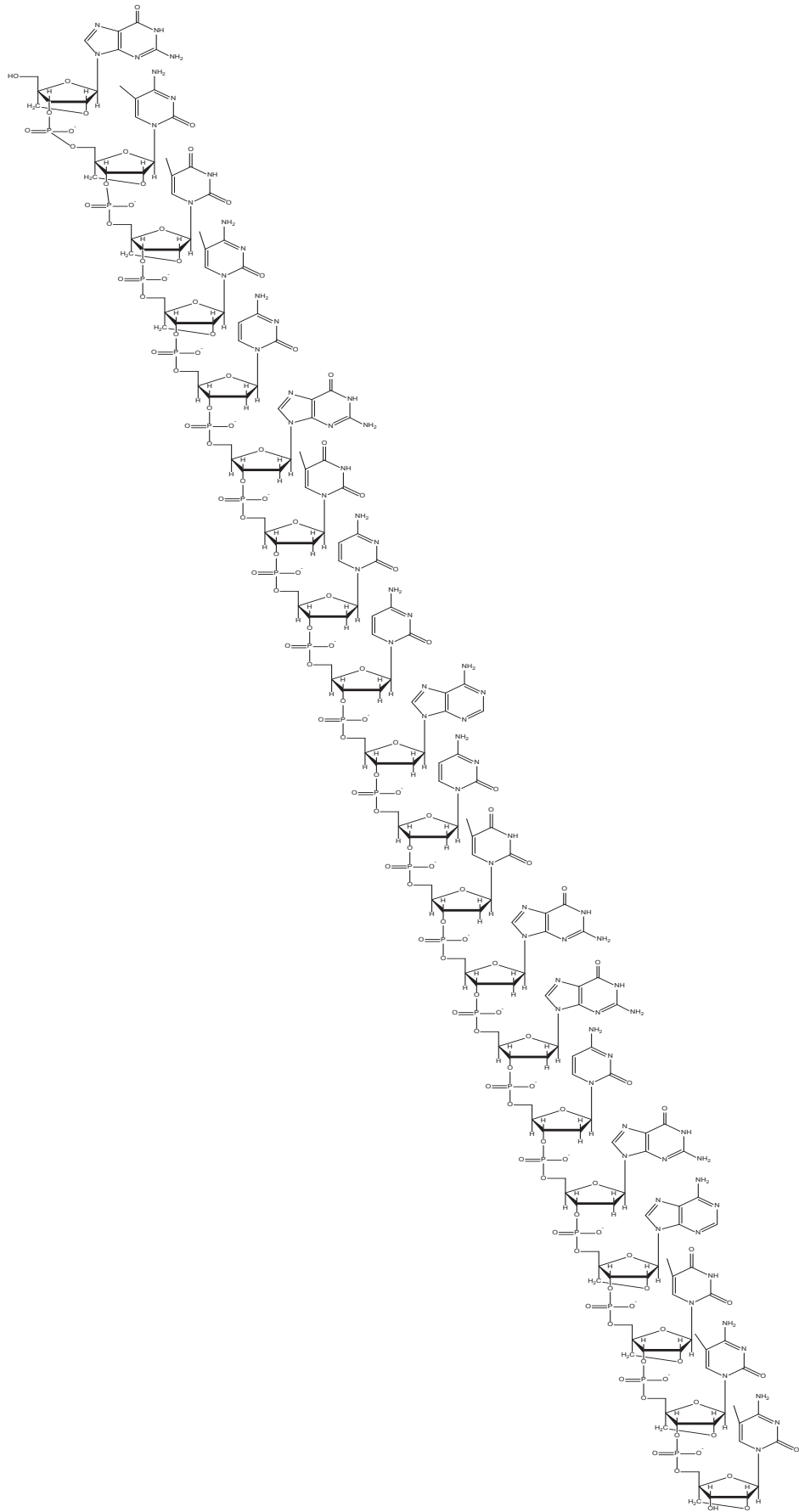


図7 Sample 11 LNA (G¹C¹L¹T¹C¹L¹-CGTCCACTGGCG-A¹T¹C¹L¹C¹L¹)の構造

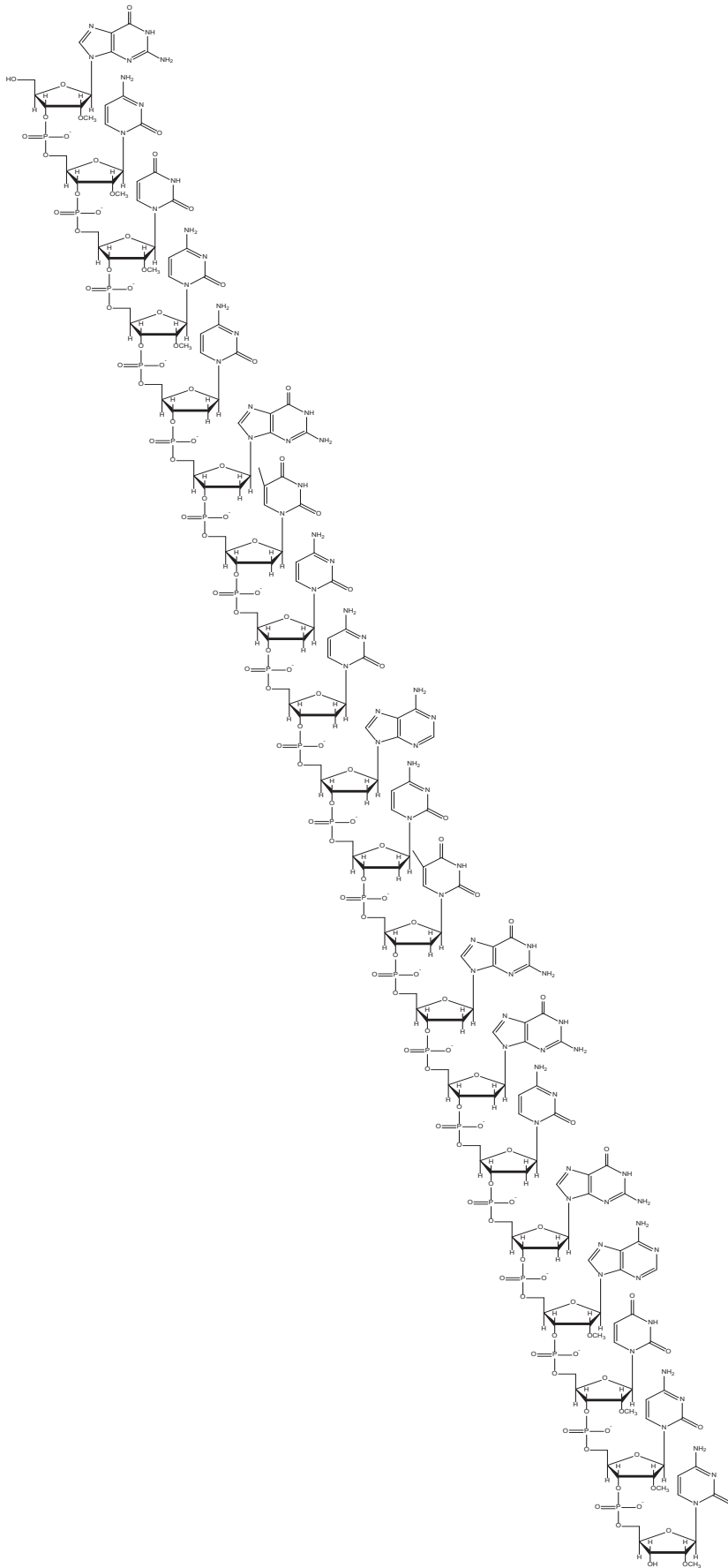


図 8 Sample 13 (G^MC^MU^MC^M-CGTCCACTGGCG-A^MU^MC^MC^M)の構造

3. 2 溶液の調製

本研究に使用した各溶液の調製方法を以下に示す。

- ・ 33.3% (v/v) Phos-tag Gel 懸濁液

上下反転により攪拌して懸濁液とした後、振盪器で沈殿しないよう攪拌を続けながらサンプル (30 μ L) を測り取る。先端を切り取って口を大きくした 200 μ L チップを取り付けた容量可変ピペットを使用する。

- ・ 保存液 : 20%(v/v) 2-Propanol

2-Propanol 20 mL を 100 mL メスシリンダーに添加した後、MilliQ 水で 100 mL とする。

- ・ 洗浄液 : 0.10 mol/l Bis-tris-CH₃COOH, 0.10 mol/l CH₃COONa (pH 6.8, 100 ml)

Bis-tris (10 mmol, 2.1 g : MW=209), 1.0 mol/l 酢酸水溶液 (4.6 mmol, 4.6ml, 4.6g), CH₃COONa (10 mmol, 0.82 g : FW=82) を 10 ml メスシリンダーに添加した後、MilliQ 水を加えて 100 ml とする。pH メーターで pH=6.8 \pm 0.1 を確認する。10 mmol/l の Mg²⁺ を添加する場合は、MgCl₂·6H₂O (1 mmol, 0.2 g, MW=203) を添加して上記と同様に調製する。

- ・ 0.10 mol/l Bis-tris-CH₃COOH, 10 mmol/l (CH₃COO)₂Zn (pH 6.8, 100 ml)

Bis-tris (10 mmol, 2.1 g : MW=209) と 0.10 mol/l 酢酸亜鉛水溶液 (10 ml, 10 g, 1.0 mmol) を小さいスターラーバーを入れた 100 ml メスシリンダーに添加した後、MilliQ 水を加えて約 90 ml とする。攪拌下、適量の 1.0 mol/l 酢酸水溶液を加えて pH を 6.8 \pm 0.1 に調整する。MilliQ 水を加えて 100 ml とする。

- ・ 溶出液 : 0.10 mol/l ピロリン酸四ナトリウム 0.10 mol/l CH₃COOH (pH7.0, 100 ml)

Na₄P₂O₇·10H₂O (10 mmol, 4.46 g : FW=446) と 1.0 mol/l 酢酸水溶液 10 ml (10 mmol, 10 g) を 100 ml メスシリンダーに添加した後、MilliQ 水を加えて 100 ml とする。pH メーターで pH=7.0 \pm 0.1 を確認する。

3. 3 実験機器

オリゴヌクレオチドの測定には、超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) 質量分析装置を使用した。UPLCには、デガッサー、バイナリポンプ、カラムヒーター、オートサンプラー、PDA検出器を備えたACQUITY UPLC system (Waters ; 東京、日本) を用いた。質量分析装置には、精密質量を測定することができる高分解能質量分析装置であるLTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Fisher Scientific ; 横浜、日本) を用いた。UPLCの分析条件は、カラムにACQUITY BEH C18 column (50 × 2.1 mm、1.7 μm particle diameter、130 Å pore size; Waters)、移動相Aには15 mM TEA 0.20 M HFIP水溶液、移動相Bには、15 mM TEA 0.20 M HFIP水溶液、メタノール混液 (1:1) を用いた。TEAはイオンペア試薬として、HFIPは主にMS感度の向上のために添加しているが、それぞれの濃度によって、保持時間が変動するため、各濃度の最適化を行った。オリゴヌクレオチドのピーク形状はメタノールより溶出力の強いアセトニトリルを用いることでよりシャープとなるが、HFIPと混ざり合わず、使用することができないため、メタノールを用いた。検出波長は260 nmを設定した。グラジエント条件は、天然オリゴヌクレオチドには、移動相B% : 15% (v/v) (0 min) ⇒移動相B% : 49% (v/v) (8 min) ⇒90% (v/v) (8.1 minから10 min) を用いた。修飾オリゴヌクレオチドには、移動相B% : 25% (v/v) (0 min) ⇒移動相B% : 70% (v/v) (8 min) ⇒90% (v/v) (8.1 minから10 min) を用いた。グラジエント条件には、分離対象である末端リン酸化体との分離が良い条件を設定した。流量は0.20 mL/min、カラム温度は60°Cとした。カラム温度は、ピーク形状をよりシャープにし、分離度を向上させるために、一般的な液体クロマトグラフィーに比べ高い温度を設定した。質量分析計のイオン化法は、Negativeモードでエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用い、イオン化条件は、heater temperature: 200°C、 voltage: 5 kV、 capillary temperature: 250°C、 capillary voltage: -50 V、 tube lens: -157.27 Vを設定した。オリゴヌクレオチドは負電荷を帯びているため、Negativeモードで測定することが一般的であり、イオン化条件はS1をもとにチューニングを行い、設定した。

3. 4 Phos-tag Tip 法の Basic protocol

Phos-tag Tipとシリコンラバーアダプターを付けたプラスチックシリンジを用いた末端リン酸化のオリゴヌクレオチドの基本的な分離プロトコールを以下及び図9に示す。

●Step1：（Phos-tag Tipの洗浄）

Phos-tag Tipの外側と内側の保存液をMilli Q水1 mLで洗浄する。0.10 M CH₃COONaを含む0.10 M Bis-tris/ CH₃COOH 緩衝液（pH 6.8）0.10 mLをマイクロピペットチップの先端から加え、1 mLシリンジを装着する。マイクロピペットチップ内の液体をシリンジからの空気によって置換する。このゲル洗浄プロセスを2回繰り返す、最終的にPhos-tagアガロースをマイクロピペットチップの下部フィルターに圧縮する。

●Step2：（サンプルの結合）

試料溶液（0.10 mL）は、50 mM Bis-tris/ CH₃COOH 緩衝液（pH 6.8）、10 mMのプトレシン及び適量の合成オリゴヌクレオチドの混合液を1.5 mLマイクロチューブで調製する。末端にリン酸化された化合物の量は5 nmol/tip未満とし、試料溶液のpHは6~8の範囲とする。試料溶液は1 mLシリンジを用いてマイクロピペットチップに静かに吸引し、Phos-tagアガロースを数秒間懸濁させる。全試料溶液が通過したとき、Phos-tagアガロースを通して、液体を上部フィルターの上に移動させる。次に、空気圧により、Phos-tagからの全ての液体を試料調製に用いたマイクロチューブに押し出す。この結合操作を5回繰り返す、マイクロチューブ中に素通り画分（FT）を得る。リン酸化された化合物が多くFT画分に検出される場合は、この結合操作を増やすもしくはサンプルとPhos-tag量の割合を検討する必要がある。

●Step3：（洗浄）

シリンジを取り外した後、上部から0.10 M Bis-tris/ CH₃COOH、10 mM MgCl₂及び0.10 M CH₃COONaからなる洗浄液（0.10 mL、pH 6.8）をマイクロピペットチップに添加する。再度シリンジを装着し、フィルター間に洗浄液を静かに押し込む。シリンジピストンを数回

穏やかに上下させることによりPhos-tagアガロースをマイクロピペットチップに再懸濁させる。次にシリンジからの空気圧を用いて、マイクロピペットチップ内のすべての液体を1.5 mLマイクロチューブに移す。この操作を2回繰り返す、2つの洗浄画分を得る (W1及びW2)。同様にMilli Q水 0.10 mLを用いて3回目の洗浄を行い、最後の洗浄画分 (W3) を得る。

●Step4： (溶出)

シリンジを外した後、溶出緩衝液として0.10 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 及び0.10 M CH_3COOH (pH 7.0)、0.10 mLを上からマイクロピペットチップに添加する。この他に、0.10 mol/L HCl水溶液、2% (v/v) TFA水溶液、5% (w/v) NH_3 水溶液又は0.10 mol/L EDTA/NaOH水溶液 (pH 7.0)などの溶液についても、溶出液として使用することができる。1 mLシリンジを再装着し、溶出液をフィルター間に静かに押し込む。シリンジピストンを2~3回穏やかに上下させることにより、Phos-tagアガロースをマイクロピペットチップに再懸濁させる。シリンジからの空気圧を用いて、マイクロピペットの先端からすべての液体を溶出画分 (E画分) として1.5 mLマイクロチューブに移し、溶出画分を得る。

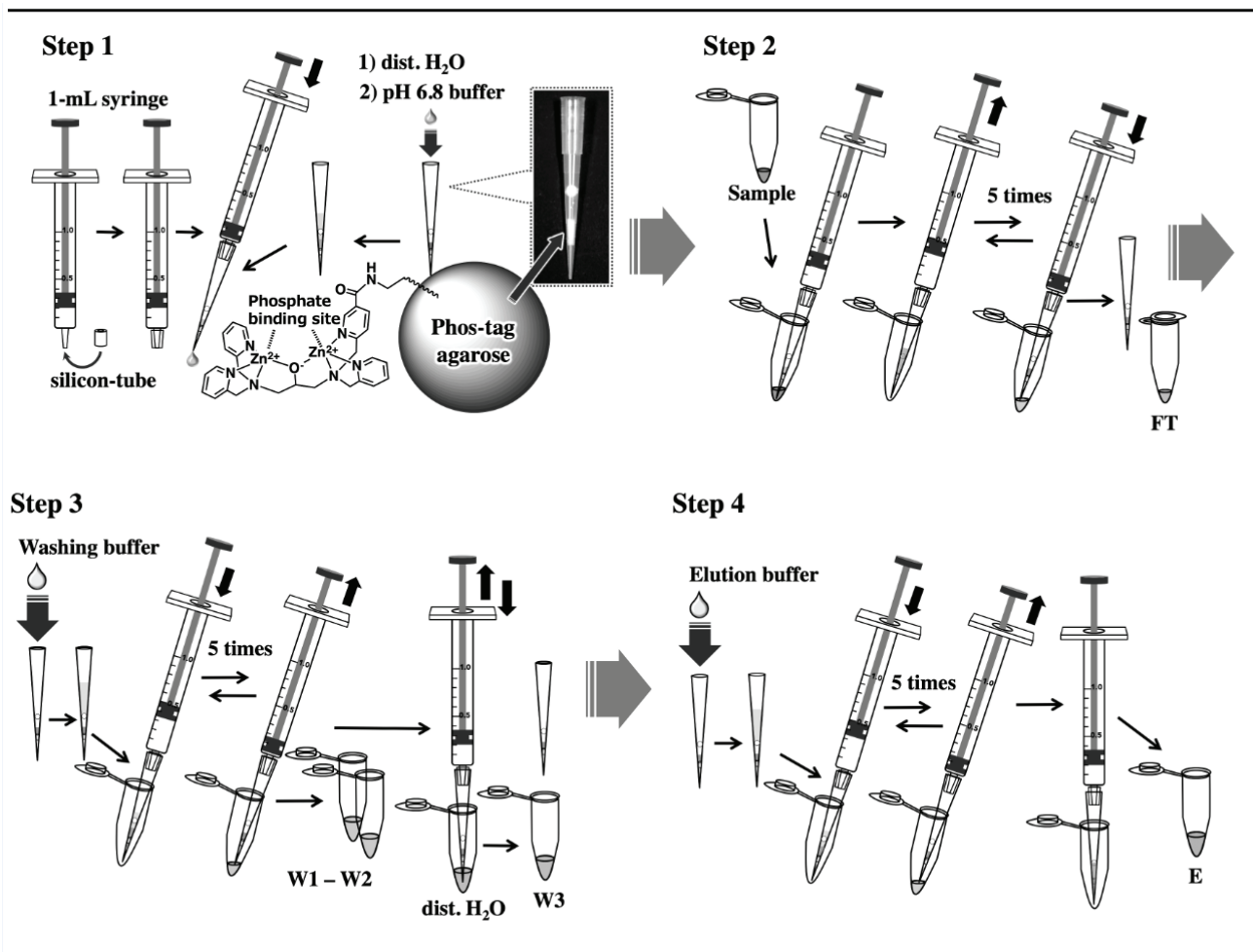


図9 Phos-tag Tip、1 mLシリンジ及び1.5 mLマイクロチューブを用いた末端リン酸化オリゴヌクレオチドの選択的分離のためのStep4の基本プロトコールを示す。

Step 1 : Phos-tag Tipのコンディショニング

Step 2: オリゴヌクレオチドの結合（末端リン酸基の有無にかかわらず結合させる）

Step 3: 非リン酸化オリゴヌクレオチドの選択的除去のための洗浄

Step 4: リン酸化されたオリゴヌクレオチドの溶出

4. 結果と考察

4. 1 Phos-tag Tip法の使用バッファの最適化

天然型オリゴヌクレオチドS 1 (15塩基) と3'末端がリン酸化したN-1不純物S 2 (14塩基) を等モル量 (0.5 nmol) 含む試料溶液 (0.10 mL) を用いて、Phos-tag Tip法におけるホスホモノエステル型不純物の優先的な結合に最適な緩衝液の検討を行った。

本研究に用いたオリゴヌクレオチド配列は表3に示すとおりである。製品保証資料に添付されている各オリゴヌクレオチドのHPLCパターン (主要単一ピーク) は、実験で得られたものとほぼ同じであった。このことは、LC分析において試料の劣化がないことを示している。Phos-tag Tipは、200 μ Lのマイクロピペットチップから成り、リボフラビンリン酸の様な低分子のリン酸化モノエステル体であれば、約30 nmol捕捉することができるPhos-tagアガロース(10 μ L)を含んでいる。

まず、試料は、50 mM Bis-tris / CH₃COOH (pH 6.8) を用いて希釈した (0.10 mL)。洗浄溶液には、0.10 mol/L Bis-tris / CH₃COOH 及び0.10 mol/L CH₃COONa (pH 6.8) を用いた (0.10 mL)。溶出液には0.10 mol/L Na₄P₂O₇、0.10 mol/L CH₃COOH (pH 7.0) を用いた (0.10 mL)。各水溶液は、Phos-tag Tipを用いたリン酸化ペプチドの分離に使用するものと同様の方法で分離を行い、素通り画分 (以下、FT画分)、3つの洗浄画分 (以下、W 1~W 3画分) 及び溶出画分 (以下、E画分) を得た。洗浄緩衝液中の添加剤としての酢酸ナトリウムは、Phos-tag部分への非選択的アニオン結合を低減するためのブロッキング塩として有用であると考えていた。3回目の洗浄工程は、W 3画分としてMilli Q水 0.10 mLを用いて無機塩を除去した。各画分に存在するオリゴヌクレオチドの定量分析はIP-RPLC-UVにより実施し、S 1及びS 2の保持時間(tR)はそれぞれ7.5及び8.0分であった。このPhos-tag Tipを用いた分離実験は繰り返し3回行った。図10aは、FT、W及びE画分の回収率 (%) の典型的な結果を示しており、データのばらつきは推定90%信頼区間のエラーバーとして表している。上記の溶液条件を用いたPhos-tag Tipによる分離結果は、オリゴヌクレオチドS 1及びS 2はいずれも溶出画分に溶出したため、末端リン酸基に対する選択性は認

められなかった。

この結果より、オリゴヌクレオチドのポリホスホジエステルアニオンが協調的にPhos-tag部分に結合することがわかった。図11aにPhos-tagアガロースと末端にリン酸基を有するオリゴヌクレオチド及び末端にリン酸基を有さないオリゴヌクレオチドとの想定される結合の様子を示す。本研究の目的としては、末端にリン酸基を有するオリゴヌクレオチドを特異的に分画することであり、末端にリン酸基を有さないオリゴヌクレオチドの非選択的な結合を解消するために、バッファー条件の検討を行った。

まず、S1の非選択的な結合をなくすために、試料及び洗浄液中にミリモル濃度の塩化マグネシウムを添加し、その効果を検証した。2価イオンである Mg^{2+} は、オリゴヌクレオチドの構造のフォールディングに効率的な役割を果たすホスホジエステルのカウンターカチオンとしてよく知られている。 Mg^{2+} の静電相互作用は、ホスホジエステルアニオンとPhos-tag部分との間の分子間相互作用を妨害することができるのではないかと考えた。 Mg^{2+} を洗浄液に添加した分離結果を図10bに示す。 Mg^{2+} を含まない洗浄フラクションにおけるS1の回収率と比べて、10 mM $MgCl_2$ を含む洗浄フラクション中では、有意に大きなS1の回収率が得られた。回収されたS1のほぼすべて（84%）がW1画分に存在したのに対し、W2画分及びW3画分ではいずれも1%未満であった。さらに、リン酸化されたN-1類縁体であるS2の97%がE画分に溶出した。この結果より、 Mg^{2+} の存在下では、リン酸モノエステルアニオンよりも末端のホスホモノエステルジアニオンに優先的にPhos-tag部分が結合することがわかった。Phos-tagアガロースにより捕捉される Mg^{2+} 結合オリゴヌクレオチドの推定構造を図11bに示す。次に、洗浄液だけでなく、試料溶液に2.0又は5.0 mMの $MgCl_2$ を添加し、洗浄液に10 mMの $MgCl_2$ を添加して、その効果を検討した。結果は図10c及び図10dに示す通り、いずれもFTとW画分の合計でのS1の溶出量が若干増加し、同様にS2もFTとW画分での溶出量が若干増加した。FT及びW画分におけるS2の漏出は、末端リン酸基及びホスホジエステル基の両方での Mg^{2+} がS2に結合したことが原因として考えられる。結合反応は2分間実施したが、試料溶液中に Mg^{2+} を添加した場合、Phos-tag部分と末端リン酸との間の結合をより確実にするためには、結合時間を長くすることで改善される可能性があると考えられる。

また、合成オリゴヌクレオチドは化学合成で製造されるため、合成試薬が残留する可能性があり、これらは不純物として管理しなければならない。ほとんどの合成試薬由来の不純物は、Phos-tagには結合しないと考えられるため、主にFT画分に溶出する可能性が高い。このことから、オリゴヌクレオチド由来不純物の効率的な分析のために、S1が選択的に洗浄画分で回収され、S2は溶出画分に選択的に回収される分離方法がよりよいと考えた。また、 Mg^{2+} を添加する本手法では、S1の各画分での検出量に試験実施日間でのばらつきが確認され、再現性に少し課題がみられた。そのため、さらに再現性の良い結合、洗浄条件を再度検討することとした。オリゴヌクレオチドをPhos-tagに結合させる段階で、FT画分中で部分的に溶出することなく、Phos-tag部分への結合を維持する目的で、試料溶液中に添加する Mg^{2+} の代替添加物としてポリアミン（10 mM）を検討することとした。ポリアミンには、スペルミンとプトレシンを検討した。トリスアンモニウムイオンを形成するスペルミンやビスアンモニウムイオンを形成するプトレシンは、ホスホジエステルアニオンとのイオン結合の形成を介してDNAの安定化に役割を果たすと言われている。10 mMのスペルミン又は10 mMのプトレシンを含む試料溶液、10 mMの $MgCl_2$ を添加した洗浄液を用いた分離結果をそれぞれ図10e及び図10fに示す。いずれの場合も、溶出画分中のS2の回収率はほぼ同じであったが、プトレシン10 mMを使用した場合、S1は洗浄中に優先的に回収され、FT画分では確認されなかった。図10c及び図10dの通り、FT及びW画分中のS2の回収量は、試料溶液中で Mg^{2+} を用いた場合より少なかったことから、プトレシンの添加がより最適であると考えた。図11cに、洗浄工程前のプトレシン結合オリゴヌクレオチドの推定構造を示す。また、試料溶液にポリアミンを含む試料溶液を用い、洗浄溶液に $MgCl_2$ を添加しなかった場合は、S1はW画分に溶出されなかった。

以上の結果より、最適な緩衝液を検討した結果、基本プロトコル（3.4項参照）で記述した通りの以下の緩衝液を選定した。試料溶液には、50 mM Bis-Tris/ CH_3COOH (pH 6.8) と 10 mMプトレシン、洗浄液には、0.10 M Bis-Tris / CH_3COOH 、 10 mM CH_3COONa 、及び10 mM $MgCl_2$ (pH 6.8)、溶出液には、0.10 M $Na_4P_2O_7$ 及び0.10 M CH_3COOH (pH 7.0)を選定した。このプロトコルでは、W1画分に対するオリゴヌクレオチドの量に比べてW2

及びW3画分の含有量ははるかに少なく、大部分がW1画分に溶出されていた。Phos-tag Tipを用いた分離プロトコールは、生理条件下、室温で試料当たり30分未満であり、Phos-tag結合オリゴヌクレオチドS1及びS2は室温での結合及び洗浄段階の間に24時間放置した後でも、結果として分離パターンはほとんど変化がなく、Phos-tag結合オリゴヌクレオチドはその期間中安定であることを示した。本分離方法により、非オリゴヌクレオチドはFT画分へ、非リン酸化オリゴヌクレオチドはW画分へ、リン酸化オリゴヌクレオチドは溶出画分へそれぞれ明らかに回収することできるとわかった。また、このバッファー系は各FT溶液、洗浄溶液及び溶出溶液はそのままLC-MS分析に使用することができるため、汎用性が高い方法であると考えられる。次に本Phos-tag Tip法が、より汎用的な方法であることを確認するために、このバッファー系が様々な塩基長、配列、化学修飾の有無にかかわらず、適用可能か検討することとした。

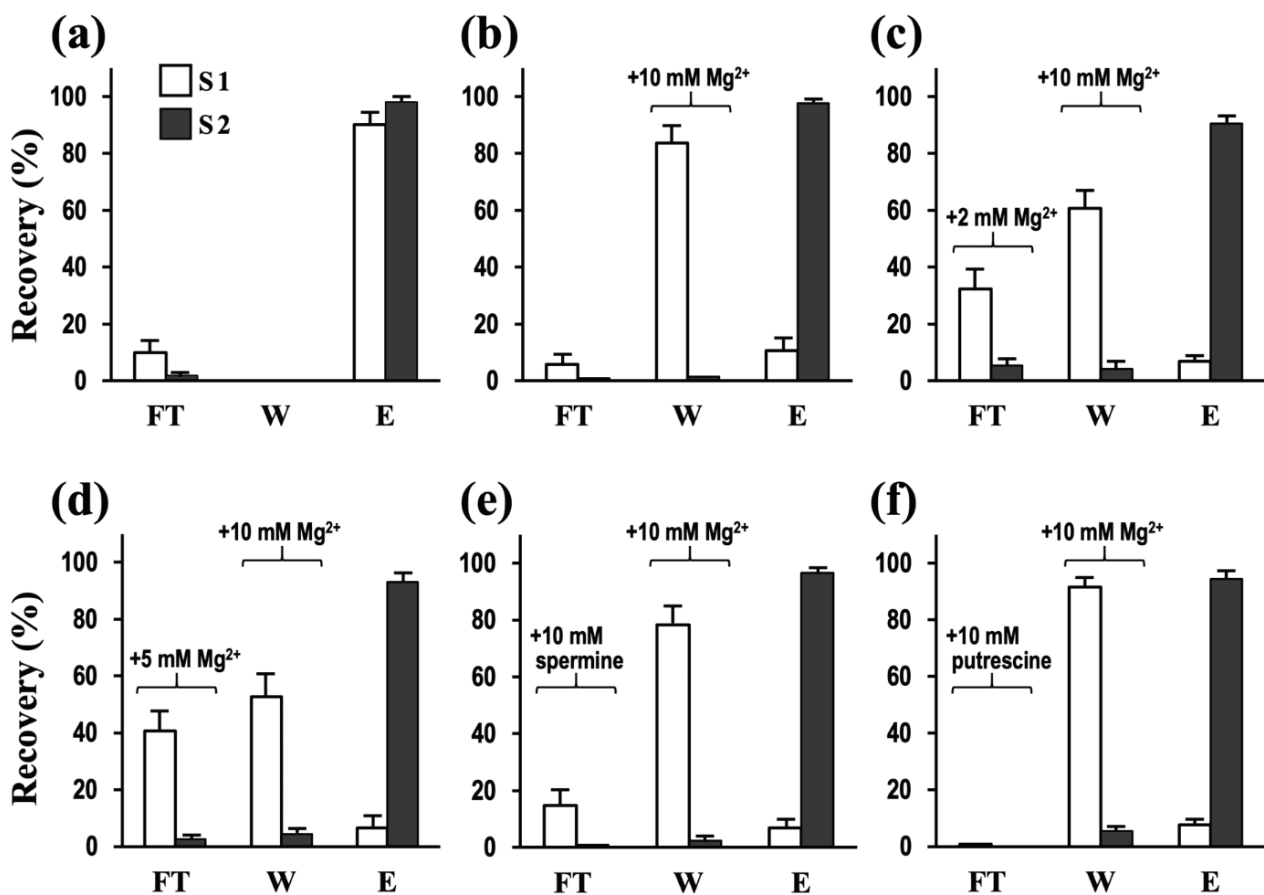


図10 天然型オリゴヌクレオチドである S1 (白色円柱) 及び S2 (黒色円柱) の回収率を示す。試料溶液には、50 mM の Bis-Tris/CH₃COOH 中に等量のオリゴヌクレオチド (0.5 nmol/L) を含む溶液を用いた。洗浄液は 0.10 M CH₃COONa 含有の 0.10 M の Bis-Tris/CH₃COOH を用いた。溶出緩衝液は 0.10 M CH₃COOH 含有の 0.10 M Na₄P₂O₇ をもちいた。図中に各画分における添加物を記載した。

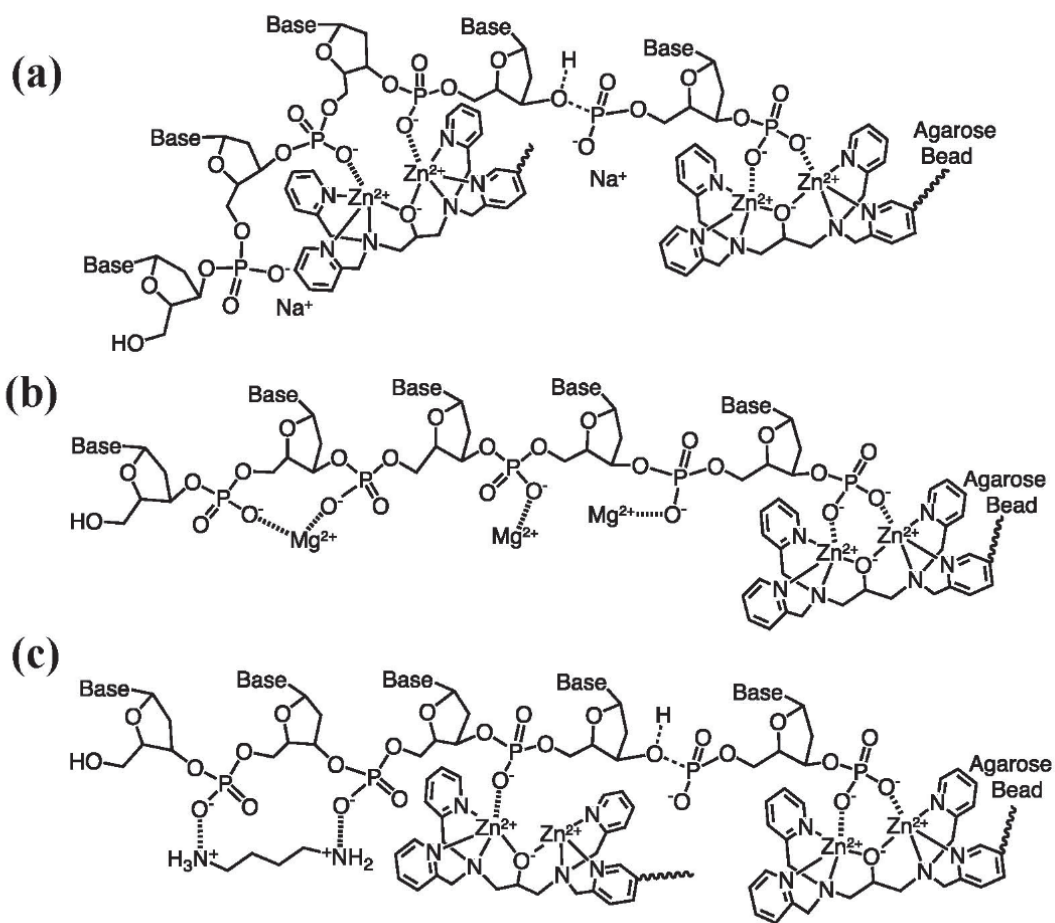


図11 オリゴヌクレオチドの Phos-tag アガロースに対しての各条件における想定される結合の様子を示す。(a) 添加物を含まない試料溶液を用いる洗浄工程の前; (b) 10 mM MgCl₂ を含む洗浄液で洗浄した後; (c) 10 mM のプトレシンを含む試料溶液を用いた洗浄段階の前。

4. 2 天然型オリゴヌクレオチド及び修飾型オリゴヌクレオチドの分離

天然型オリゴヌクレオチドS3~S10（表3参照）を用い、上述の基本プロトコール（3.4項参照）が様々なサンプルに適用可能であることを検証するために、塩基長が10から20までの種々の塩基配列のサンプルを用いてPhos-tag Tipでの分離を試みた。試料溶液（0.10 mL）は等モル量（0.5 nmol/L）の末端リン酸をもたない親オリゴヌクレオチド（奇数番号）とその3'末端リン酸化N-1対応物（偶数番号）を用いた。各画分中の含量の定量分析は以下の方法で行った。IP-RPLC-UV を用いた場合:保持時間（tR）（min）はS 3が8.5、S 4が8.8、S 5が5.9、S 6が6.6、S 7が6.2、S 8が6.9、S 9が7.5、S 10が8.0であった。図12a~dにFT、W、及びEの典型的な回収率を示す。ほとんどすべての親オリゴヌクレオチドはW画分で回収率78~85%で回収され、3'末端リン酸化体はE画分で回収率86~95%で優先的に回収された。洗浄液中に10 mMのMg²⁺イオンが存在しない場合、W画分中にオリゴヌクレオチドのいずれも溶出しなかった。このPhos-tag Tip法の化学修飾オリゴヌクレオチドへの適合性を確認するために、LNA (2', 4'-locked nucleic acid)含有DNAオリゴヌクレオチド（S11及びS12）とOMe (2'-O-methylated nucleic acid)含有RNA/DNAオリゴヌクレオチド（S13及びS14）をそれぞれ0.5 nmolずつ試料溶液（0.10 mL）に添加した2種類の試料を用いた。いずれの合成オリゴヌクレオチドも一般的によく知られた化学修飾であり、どちらもギャップマー構造のオリゴヌクレオチドである。これらは天然型のオリゴヌクレオチドと比較してより疎水性が高く、より安定であるとされている。

S3~S10と同様に、基本プロトコール（3.4項参照）に従い、分離を行った。IP-RPLC :tR値（min）はS11で5.9、S12で5.8、S13で5.8、及びS14で5.9を用いて各画分の含量を定量分析したところ、オリゴヌクレオチドの相対保持時間の約0.1分のわずかな差であっても、2%以上の回収率で各試料を定量できた。図12e及び図12fにFT、W及びE画分の代表的な回収率を示す。S11及びS13はいずれも洗浄画分に回収率82%及び85%で回収され、3'リン酸化N-1類似体であるS 12及びS 14は、それぞれ回収率90%及び89%で溶出画分に選択的に回収された。以上の結果より、Phos-tag Tip法を用いた分離では、天然型オリゴヌクレオチド及び修飾型オリゴヌクレオチドのいずれにおいても、非リン酸化親化合物との混合物から末端リン

酸化オリゴヌクレオチドを分離可能であることを確認した。

次に、核酸医薬品の分析法開発においては、すべて不純物を主成分と分離することは難しく、主成分と重なる不純物はMSでの分析が必須である。そのため、本法を用いて、MS分析時に非リン酸化親オリゴヌクレオチドに対するホスホモノエステル型不純物のシグナル比を増加させることができるか検討した。LC分析時だけでなく、MS分析時にもPhos-tag Tipを用いた簡単で迅速なマイクロピペットチップ法が有用であり、汎用技術として使用できることを検証する。

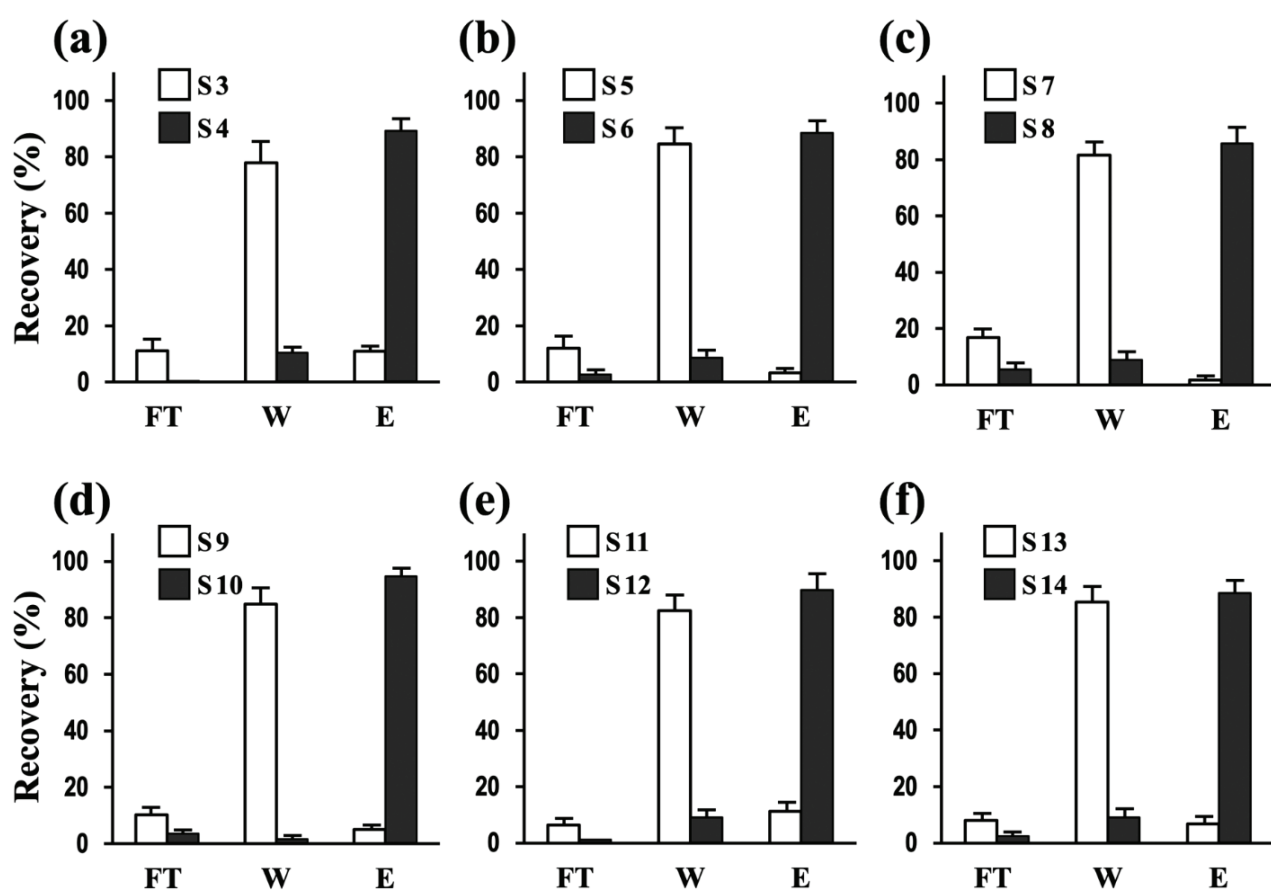


図 12 天然型 (S 3~S 10) 及び化学修飾 (S 11~S 14) オリゴヌクレオチドの回収率を示す。白と黒のカラムはそれぞれ末端3'-リン酸のないオリゴヌクレオチドと3'-リン酸のあるオリゴヌクレオチドである。溶液系は基本プロトコールで使用したのと同じものを用いた。

4. 3 LC/MSを用いた不純物分析のモデル実験

一般的に、核酸医薬品に実際に混入する不純物量としては、それぞれ数%以下であるため、実際のサンプルを想定し、1%のリン酸化不純物を親オリゴヌクレオチドに添加したサンプルを用い、実験を行った。LNAギャップマー型のオリゴヌクレオチドであるS11 (0.5 nmol) にS11の3'末端がリン酸化されたN-1類縁物質であるS12を約1% (5 pmol) 添加した混合物 (0.10 mL) をモデル試料溶液とした。この試料溶液に対して、Phos-tag Tip法の基本プロトコル (3.4項参照) を用いて、FT、W1、W2、W3、E画分を調製した。図13aに試料溶液、FT、W1、E画分のIP-RPLCのクロマトグラムを示す。試料溶液におけるS12のピークは非常に小さく、S11と保持時間が近いいため、S11の大きなシグナルに埋もれてしまい、S12のピークを検出することができなかった。Phos-tag Tip法で得られた各フラクションでは期待した通り、FTではほとんどピークが検出されず、W1では大部分のS11 (保持時間約5.9分) が検出され、EではS12 (保持時間約5.8分) と考えられるピークが検出された。試料溶液及び各フラクションについて、IP-RPLC/UVだけでなく、MSでの評価を同時に実施した。図13aの右側に試料溶液及びE画分のTIC (total ion current) クロマトグラムを示す。MSのTICクロマトグラムは、横軸に保持時間、縦軸にイオン強度の合計をプロットしたもので、特定の保持時間におけるマススペクトルの m/z を表示させるか、特定の m/z を抽出してスペクトルを描くことができる。図13bに試料溶液、図13cにE画分について、保持時間5.8-5.9分におけるマススペクトルを示す。ESI (Electrospray ionization) でイオン化した場合、オリゴヌクレオチドは多価イオンとして検出されるが、今回は1番強いシグナルであった3価 ($z=3$) のマススペクトルにて評価することとした。図13bにて1番強いシグナルとして検出されている $m/z=2102.0$ ($z=3$) は、図13cでも検出されており、その m/z よりこのピークはS11であると推定される。図13cにて検出されているS12のピークと考えられる $m/z=2018.3$ ($z=3$) のピークは、E画分のみで検出されており、試料溶液では検出されていない。一般的に末端がリン酸化されたオリゴヌクレオチドは非リン酸化体と比較するとイオン化効率が落ちると考えられている。そのため、S11、S12のイオン化効率を相対的に比較するために、S11

及びS12（各0.25 μ Mずつ）を移動相に近い環境を想定して、15mM TEA 0.20M HFIPを含む50%メタノールで等量希釈した溶液を、ダイレクトにMSにインフュージョンして分析を行った。S11、S12のピークをそれぞれdeconvolutionした結果、S12のイオン化効率はいくともS11のイオン化効率の約半分であることが確認された（測定結果は、7. 補足資料の図S1参照）。この結果より、試料溶液中でS12のMSシグナルが確認できなかった理由として、リン酸基の付加によりS12のイオン化効率が低いこと、S11のシグナルが大きく、S12のイオン化抑制が起こったことが原因として考えられる。

次に、2'-OMe化含有RNA/DNAオリゴヌクレオチドであるS13（0.5 nmol）に3'末端がリン酸化されたN-1類縁物質であるS14を約1%（5 pmol）添加した混合物（0.10 mL）をモデル試料溶液とした。この試料溶液に対して、Phos-tag Tip法の基本プロトコル（3.4項参照）を用いて、FT、W1、W2、W3、E画分を調製した。図14aに試料溶液、FT、W1、E画分のLCのクロマトグラムを示す。試料溶液中に含まれる保持時間5.9分のS14のピークはとて小小さく、保持時間5.8分のS13のピークがとて大きいため、そのシグナルが隠れてしまっている。洗浄画分では、大部分のS13が検出され、溶出画分でのS13のピークはかなり小さくなっており、溶出画分におけるS14のピークはS13のテーリング部分に確認できた。図13aと同様に図14aの右側に試料溶液及びE画分のTIC（total ion current）クロマトグラムを示す。図14bに試料溶液、図14cにE画分について、保持時間5.8-5.9分におけるマススペクトルを示す。S13、S14についてもシグナルが1番強かった3価（ $z=3$ ）で評価を実施した。

$m/z=2079.4$ （ $z=3$ ）は、S13のシグナルと推定され、試料溶液で強いシグナルが確認でき、溶出画分でも検出されている。 $m/z=1999.7$ （ $z=3$ ）は、S14のシグナルと想定され、試料溶液では検出されず、E画分でのみ検出された。また、 $m/z=2106.4$ （ $z=3$ ）は、E画分の保持時間5.8-5.9分におけるマススペクトルでは、3番目に大きなシグナルとして検出された。この不純物は、本試験では意図的に添加していた不純物ではないS13の末端がリン酸化されたものと推定され、Phos-tag Tip法で各画分に分画したことによって、試料溶液中に含まれていることがわかった。図15aに示す通り、このピークは保持時間5.9-6.0分におけるマススペクトルでは、S13、S14より大きいシグナルとして検出された。さらに、図15bに示すW1画

分の保持時間5.4-5.5分におけるマススペクトルで検出された $m/z=1866.7$ ($z=3$) のピークは、S13の3'末端から2塩基 ($C^M C^M$) 欠損したN-2と推定され、図15cに示すE画分の保持時間5.4-5.5分におけるマススペクトルで検出された $m/z=1672.3$ ($z=3$) のピークは、S13の3'末端から4塩基 ($A^M U^M C^M C^M$) 欠損したN-4にリン酸基が付加したものと推定された。

以上の結果より、試料溶液中では確認できなかったマススペクトルが、Phos-tag Tipにより分画したE画分において、リン酸化された不純物を検出することができた。E画分でのみ検出できた理由としては、リン酸化不純物をE画分に分画することで、メインピークによるイオン化抑制を回避でき、非リン酸化体よりイオン化効率が低いリン酸化体を検出することができたと考えられる。また、FT画分に主に検出されたマススペクトルであれば、非オリゴヌクレオチドであり、W画分に主に検出されたマススペクトルであれば、非リン酸化オリゴヌクレオチドであり、E画分に主に検出されたマススペクトルであれば、リン酸化オリゴヌクレオチドと考えられるので、本手法は、構造推定の一助として有用であると考えられる。オリゴヌクレオチドの構造推定のソフトウェアについては、いくつか市販化されているものはあるが、未だ開発段階にあり、オリジナルの修飾核酸の場合はこれらのソフトウェアでの対応は難しいと想定される。そのため、精密質量のデータまたは、MS/MSのデータ等から、自ら計算して構造推定をする必要がある。核酸医薬品には多様な不純物が含まれているため、非オリゴヌクレオチドなのか、非リン酸化オリゴヌクレオチドなのか、リン酸化オリゴヌクレオチドなのか、わかっていれば、構造推定に役立つ情報の1つになると考えた。

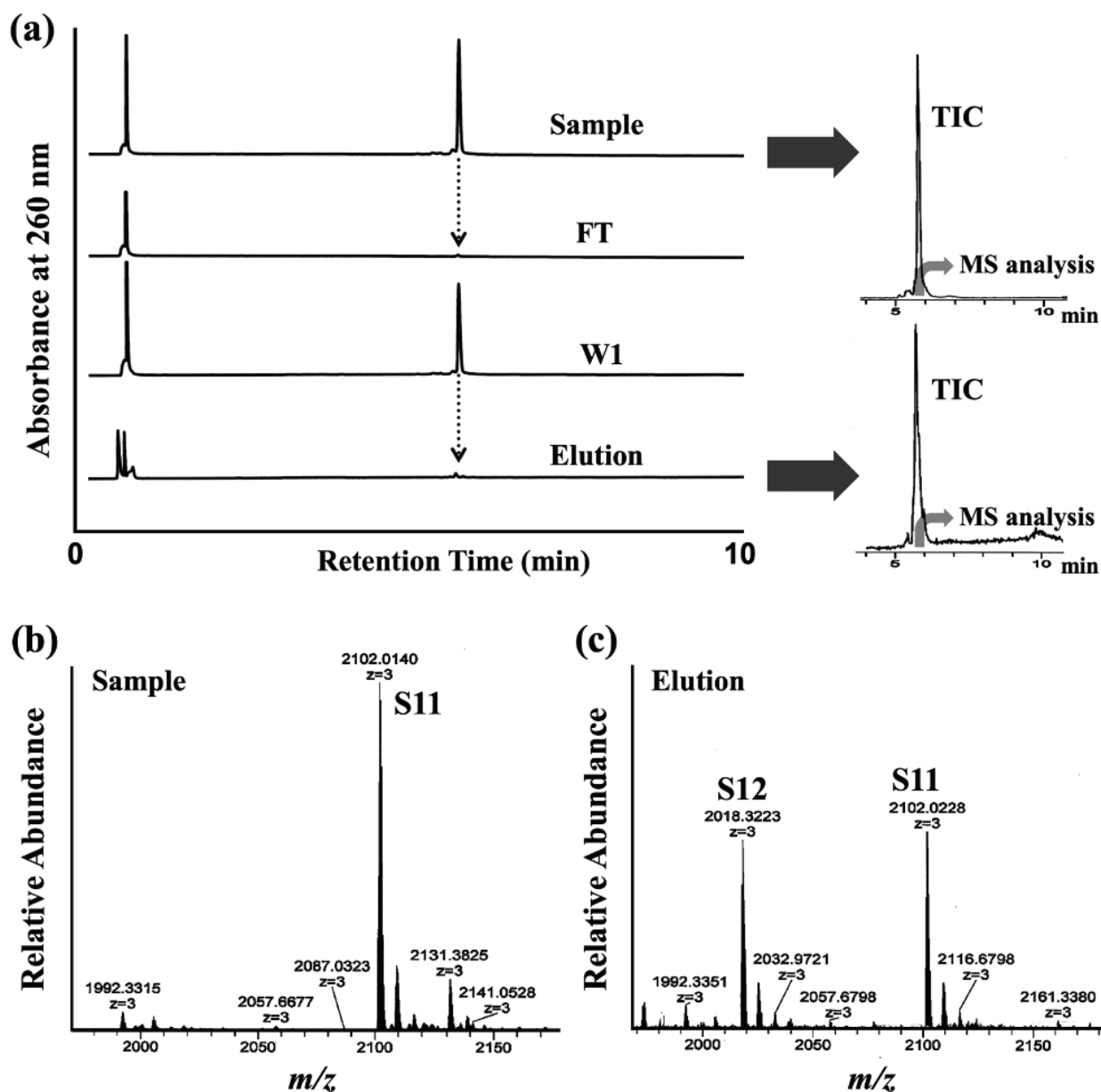


図 13 (a:左) S11 の試料溶液の LC クロマトグラム (a:右) 試料及び溶出画分のトータルイオンカレントクロマトグラム (TIC) (b) 試料溶液の保持時間 5.8 から 5.9 分における平均 MS スペクトル (z=3) (c) 溶出画分の保持時間 5.8 から 5.9 分における平均 MS スペクトル (z=3)。

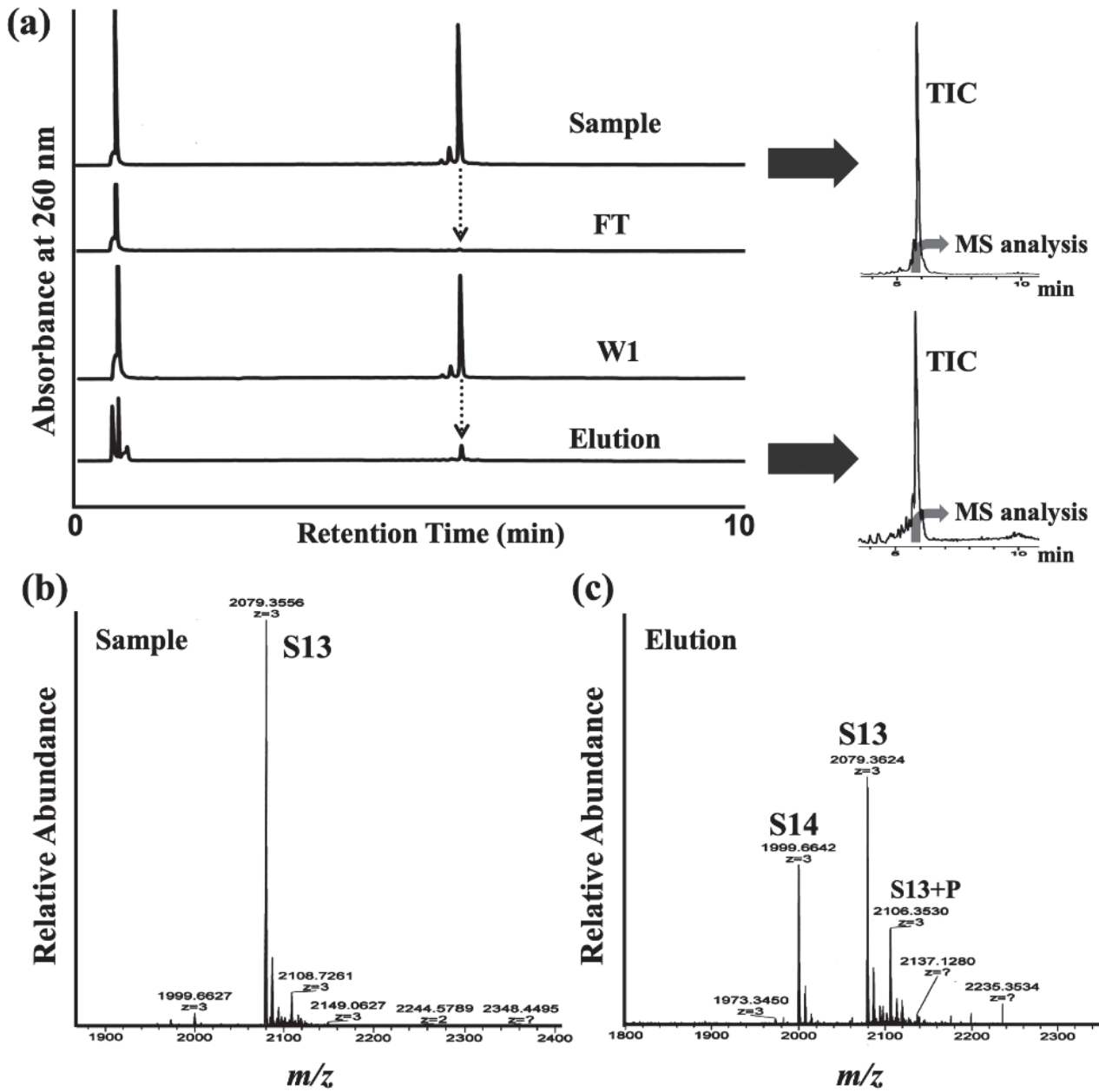


図 14 (a:左) S13 の試料溶液の LC クロマトグラム (a:右) 試料及び溶出画分のトータルイオンクロマトグラム (TIC) (b) 試料溶液の保持時間 5.8 から 5.9 分における平均 MS スペクトル ($z=3$) (c) 溶出画分の保持時間 5.8 から 5.9 分における平均 MS スペクトル ($z=3$) m/z 2106 のシグナルは、末端にリン酸塩を有する N+1 不純物と推定される。

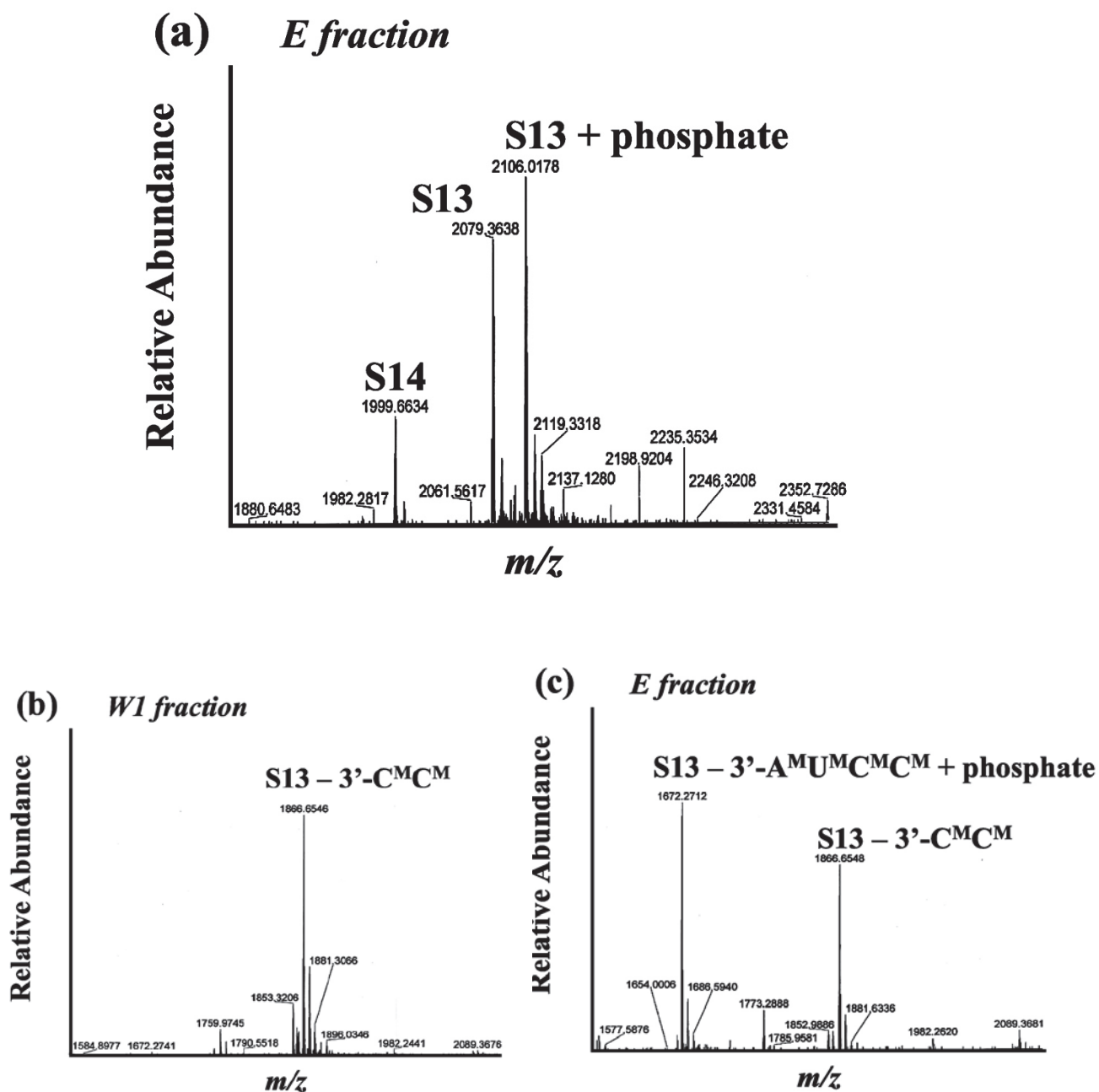


図 15 (a) 保持時間 5.9 分から 6.0 分における S 13 と S 14 の 100:1 の混合物の E 画分の平均 MS スペクトル ($z=3$)、(b) 保持時間 5.4 分から 5.5 分における S 13 と S 14 の 100:1 の混合物の W 1 画分の平均 MS スペクトル ($z=3$)、(c) 保持時間 5.4 分から 5.5 分における S 13 と S 14 の 100:1 の混合物の E 画分の平均 MS スペクトル ($z=3$)。

5. 結論

核酸医薬品の新規不純物分析法として、10 μ LのPhos-tagアガロースと1 mLシリンジを含むPhos-tag Tipを用いて、非リン酸化オリゴヌクレオチドからホスホモノエステル型不純物の簡単で効率的な分離手法を開発した。本法は、水溶液中でPhos-tagの亜鉛錯体が高いリン酸基親和性をもつことを利用した方法である。分離に用いる各バッファー系を検討した結果、試料溶液には、ポリアミンであるプトレシンを添加した溶液、洗浄溶液には、 Mg^{2+} を添加したBis-Tris 緩衝液、溶出液には、ピロリン酸溶液がオリゴヌクレオチドの分離には最適であると分かった。最適化したバッファー系では、Phos-tagが2価のリン酸基を特異的に捕捉可能であることを利用して、非オリゴヌクレオチド、非リン酸化オリゴヌクレオチド、リン酸化オリゴヌクレオチドを分画可能であった。Phos-tag分子の亜鉛イオン上でのホスホモノエステルジアニオンの交換反応は非常に速いため、結合工程、3つの洗浄工程及び溶出工程の所要時間は合計で2分未満となり、最適な条件であることが確認された。FT画分、3つの洗浄画分、及び溶出画分を得るための合計所要時間は、試料あたり30分未満であった。Phos-tag Tip法は、天然型及び化学修飾オリゴヌクレオチドについて、それらの非リン酸化オリゴヌクレオチドからの末端リン酸基を有するオリゴヌクレオチドを分離可能であり、分離した試料は液体クロマトグラフィーと質量分析の組合せを用いて、前処理不要でそのまま分析可能である。また、本法は、非オリゴヌクレオチド、非リン酸化オリゴヌクレオチド、リン酸化オリゴヌクレオチドを分画可能であるため、構造推定にも有用であると考えられる。以上より、Phos-tag Tip法とLC-MSを組み合わせた手法は、核酸医薬品開発における種々の合成オリゴヌクレオチド中のホスホモノエステル型不純物を特異的に分離分析することのできる新しいタイプの分析法として有用であると考えられる。この手法を用いた分析を通じて、核酸医薬品開発に貢献できることを願っている。

6. 参考文献

- [1] A. Khvorova, J.K. Watts, The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility, *Nat. Biotech.* 35 (2017) 238–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.3765>.
- [2] A.M. Krichevsky, E.J. Uhlmann, Oligonucleotide therapeutics as a new class of drugs for malignant brain tumors: Targeting mRNAs, regulatory RNAs, mutations, combinations, and beyond, *Neurotherapeutics* 16 (2019) 319–347. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00702-3>.
- [3] C.A. Stein, D. Castanotto, FDA-approved oligonucleotide therapies in 2017, *Mol. Ther.* 25 (2017) 1069–1075. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.023>.
- [4] J.B. Opalinska, A.M. Gewirtz, Nucleic-acid therapeutics: Basic principles and recent applications, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 503–514. <https://doi.10.1038/nrd837>.
- [5] D. Capaldi, A. Teasdale, S. Henry, N. Akhtar, C. den Besten, S. Gao-Sheridan, M. Kretschmer, N. Sharpe, B. Andrews, B. Burm, J. Foy, Impurities in oligonucleotide drug substances and drug products, *Nucleic Acid Ther.* 27 (2017) 309–322. <https://doi.10.1089/nat.2017.0691>.
- [6] N.M. El Zahar, N. Magdy, A.M. El - Kosasy, M.G. Bartlett, 2018. Chromatographic approaches for the characterization and quality control of therapeutic oligonucleotide impurities, *Biomed. Chromatogr.* 32, e4088. <https://doi.org/10.1002/bmc.4088>.
- [7] R. Juliano, J. Bauman, H. Kang, X. Ming, Biological barriers to therapy with antisense and siRNA oligonucleotides, *Mol. Pharmaceutics* 6 (2009) 686–695. <https://doi.10.1021/mp900093r>.
- [8] Q. Zhang, H. Lv, L. Wang, M. Chen, F. Li, C. Liang, Y. Yu, F. Jiang, A. Lu, G. Zhang, Recent methods for purification and structure determination of oligonucleotides, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 2134–2149. <https://doi.org/10.3390/ijms17122134>.
- [9] A. Pinto, S. X. Chen, D. Y. Zhang, Simultaneous and stoichiometric purification of hundreds of oligonucleotides, *Nat. Commun.* 9 (2018) 2467. <https://doi.10.1038/s41467-018-04870-w>.
- [10] K.J. Fountain, M. Gilar, J.C. Gebler, Analysis of natural-type and chemically modified oligonucleotides by tandem ion-pair reversed-phase high-performance liquid

- chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 646–653. <https://doi.org/10.1002/rcm.959>.
- [11] N. Li, N.M. El Zahar, J.G. Saad, E.R.E. van der Hage, M.G. Bartlett, Alkylamine ion-pairing reagents and the chromatographic separation of oligonucleotides, *J. Chromatogr. A* 1580 (2018) 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.10.040>.
- [12] M. Biba, C.J. Welch, J.P. Foley, Investigation of a new core–shell particle column for ion-pair reversed-phase liquid chromatography analysis of oligonucleotides, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 96 (2014) 54–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.03.029>.
- [13] S.G. Roussis, I. Cedillo, C. Rentel, Semi-quantitative determination of co-eluting impurities in oligonucleotide drugs using ion-pair reversed-phase liquid chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1584 (2019) 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.034>.
- [14] N.M. Elzahar, N. Magdy, A.M. El-Kosasy, M.G. Bartlett, Degradation product characterization of therapeutic oligonucleotides using liquid chromatography mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 3375–3384. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1032-8>.
- [15] J.R. Thayer, V. Barreto, S. Rao, C. Pohl, Control of oligonucleotide retention on a pH-stabilized strong anion exchange column, *Anal. Biochem.* 338 (2005) 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.11.013>.
- [16] R.N. Easter, K.K. Kröning, J.A. Caruso, P.A. Limbach, Separation and identification of oligonucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)–inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS), *Analyst* 135 (2010) 2560–2565. <https://doi.org/10.1039/c0an00399a>.
- [17] L. Gong, J.S.O. McCullagh, Analysis of oligonucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to negative ion electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5480–5486. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.044>.
- [18] A. Shimoyama, A. Fujisaka, S. Obika, Evaluation of size-exclusion chromatography for the analysis of phosphorothioate oligonucleotides, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 136 (2017) 55–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.12.036>.
- [19] S.G. Roussis, C. Koch, D. Capaldi, C. Rentel, Rapid oligonucleotide drug impurity

- determination by direct spectral comparison of ion - pair reversed - phase high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry data, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 32 (2018) 1099–1106.
<https://doi.org/10.1002/rcm.8125>.
- [20] M. Smith, T. Beck, Quantitation of a low level coeluting impurity present in a modified oligonucleotide by both LC–MS and NMR, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 118 (2016) 34–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.10.019>.
- [21] E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, K. Takiyama, T. Koike, Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins, *Mol. Cell. Proteomics* 5 (2006) 749–757.
<https://doi.org/10.1074/mcp.T500024-MCP200>.
- [22] E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, Y. Kubota, M. Takekawa, T. Koike, A Phos-tag SDS-PAGE method that effectively uses phosphoproteomic data for profiling the phosphorylation dynamics of MEK1, *Proteomics* 16 (2016) 1825–1836.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201500494>.
- [23] E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, H. Nakashima, T. Koike, Genotyping and mapping assay of single-nucleotide polymorphisms in CYP3A5 using DND-binding zinc(II) complexes, *Clin. Biochem.* 43 (2010) 302–306.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.09.007>.
- [24] E. Kinoshita, M. Takahashi, H. Takeda, M. Shiro, T. Koike, Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) complex, *Dalton Trans.* (2004) 1189–1193. <https://doi.org/10.1039/b400269e>.
- [25] E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, A. Yamada, M. Endo, T. Koike. Enrichment of phosphorylated proteins from cell lysate using a novel phosphate-affinity chromatography at physiological pH, *Proteomics* 6 (2006) 5088–5095.
<https://doi.org/10.1002/pmic.200600252>.
- [26] E.T. Yuan, Y. Ino, M. Kawaguchi, Y. Kimura, H. Hirano, E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, T. Koike, A Phos-tag-based micropipette-tip method for rapid and selective enrichment of phosphopeptides, *Electrophoresis* 38 (2017) 2447–2455.
<https://doi.org/10.1002/elps.201700175>.
- [27] M. Tsunehiro, Y. Meki, K. Matsuoka, E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, T. Koike, A Phos-tag-based magnetic-bead method for rapid and selective separation of

phosphorylated biomolecules, *J. Chromatogr. B* 925 (2013) 86–94.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.02.039>.

[28] K. Xi, F.-H. Wang, G. Xiong, Z.-L. Zhang, Z.-J. Tan, Competitive binding of Mg^{2+} and Na^+ ions to nucleic acids: From helices to tertiary structures, *Biophys. J.* 114 (2018) 1776–1790. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.03.001>.

[29] E. Bignon, C.-H. Chan, C. Morell, A. Monari, J.-L. Ravanat, E. Dumont, Molecular dynamics insights into polyamine–DNA binding modes: Implications for cross-link selectivity, *Chem. Eur. J.* 23 (2017) 12845–12852.

<https://doi.org/10.1002/chem.201702065>.

7. 補足資料

図 S1a

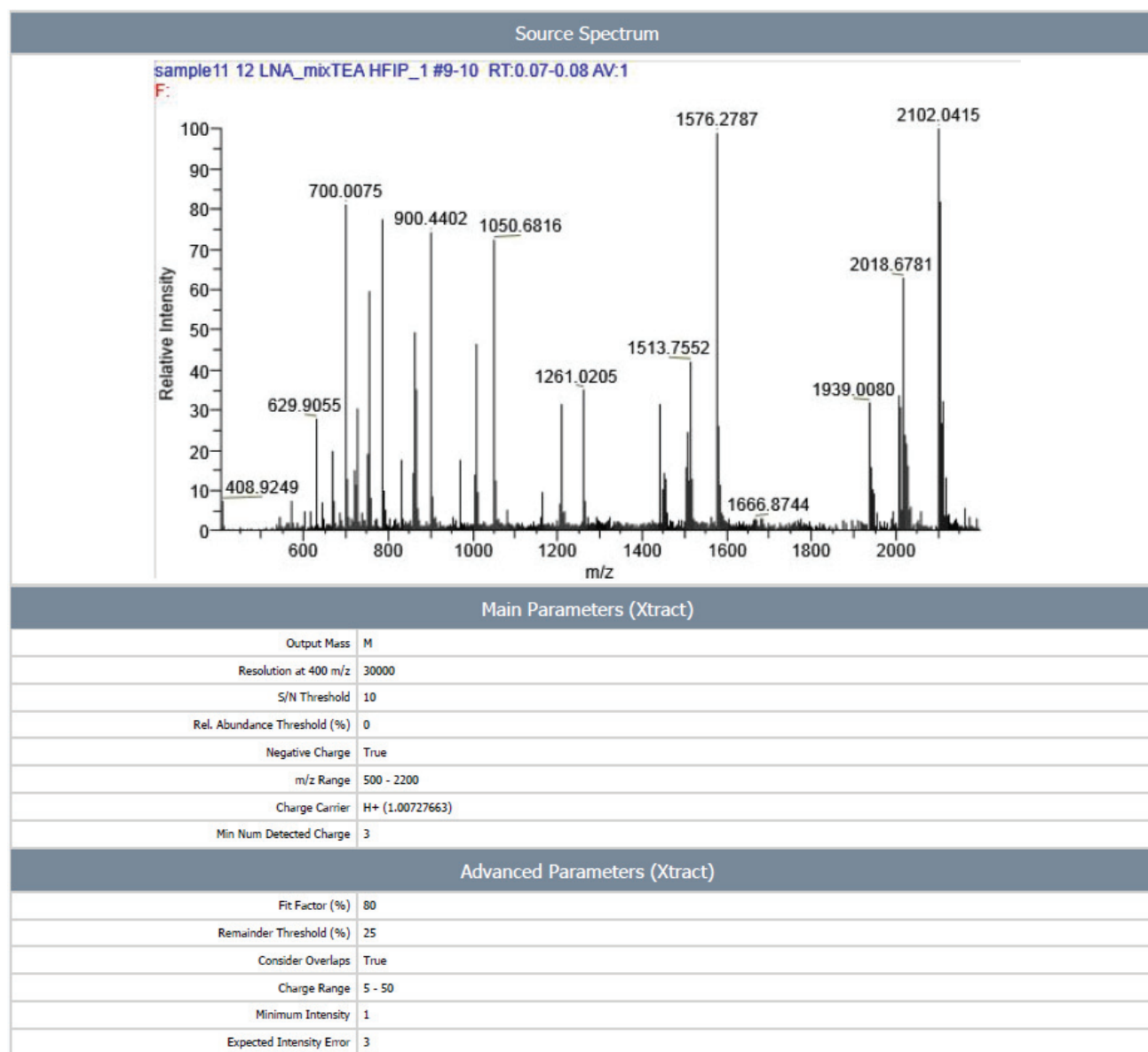


図 S1a Sample11 及び Sample12(各 0.25 μ M)を 15mM TEA 0.20M HFIP 含有の 50%(v/v) MeOH に溶解し、direct infusion MS での分析結果 (m/z Range : 500-2200) を示す。各 Sample の多価イオンのマススペクトルが確認された。

図 S1b

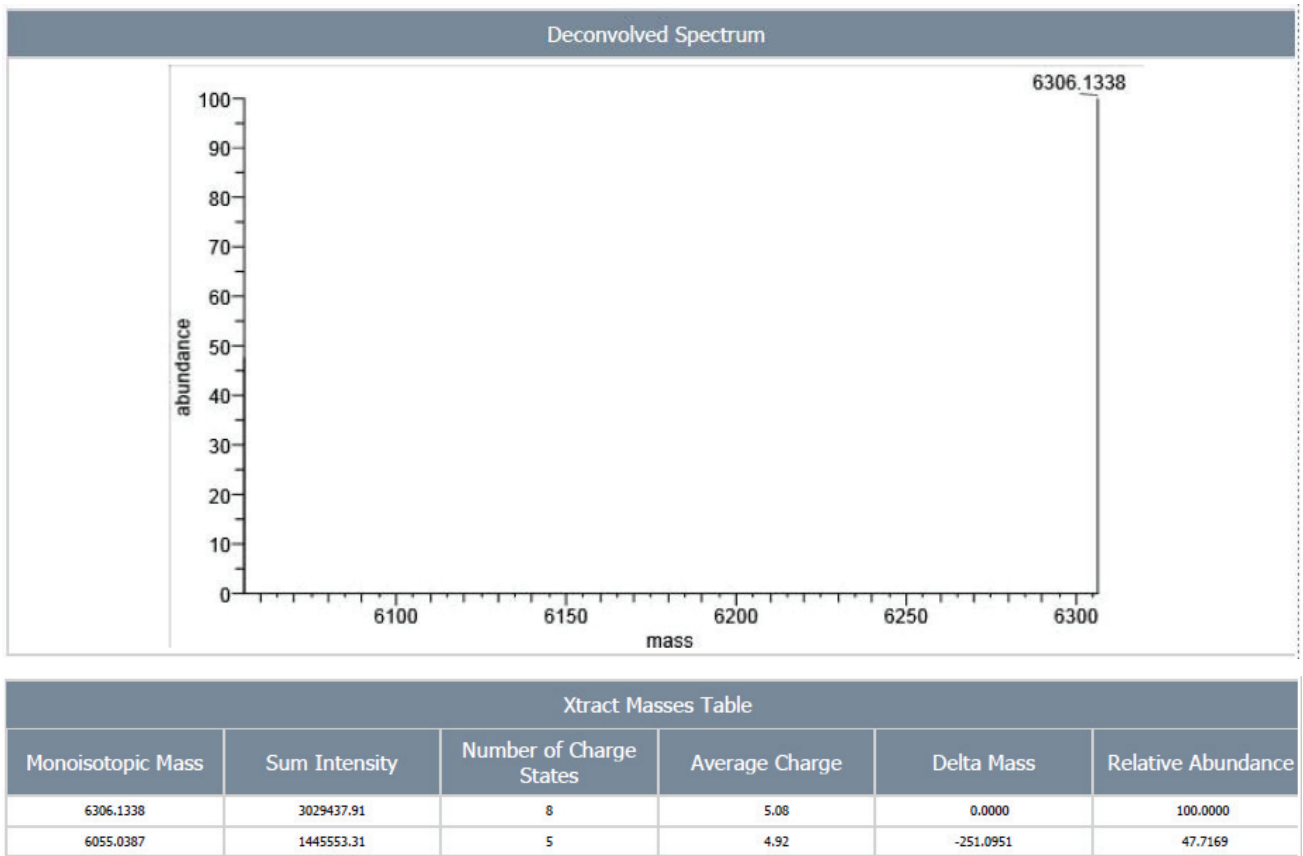


図 S1b Sample11 及び Sample12 の等量 (各 0.25 μ M) 混合した溶液の direct infusion MS での分析結果を deconvolute した結果を示す。この結果より、sample 12 (monoisotopic mass : 6055.0387) のイオン化効率は、sample11 (monoisotopic mass : 6306.1338) と比べて、約半分であることがわかった。