

MaxPeak High Performance テクノロジーを使用したオリゴヌクレオチドの SPE-LC-MS 分析の改善

Kathryn Brennan, Mary Trudeau, Michael Donegan, Paul D. Rainville

Waters Corporation

要約

次世代のオリゴヌクレオチド医薬品の研究開発を支援するための、選択性と感度の高い LC-MS バイオ分析法の需要が大幅に増加してきています。ここに記載されている研究では、固相抽出、2 μm 未満の ACQUITY Premier Oligonucleotide C₁₈ カラムを搭載した RP-UPLC、およびタンデム四重極型 MS を使用して、オリゴデオキシチミジンおよび完全にホスホロチオエート化したオリゴヌクレオチドアンチセンス医薬品 GEM91 の検出および定量を行っています (図 1)。

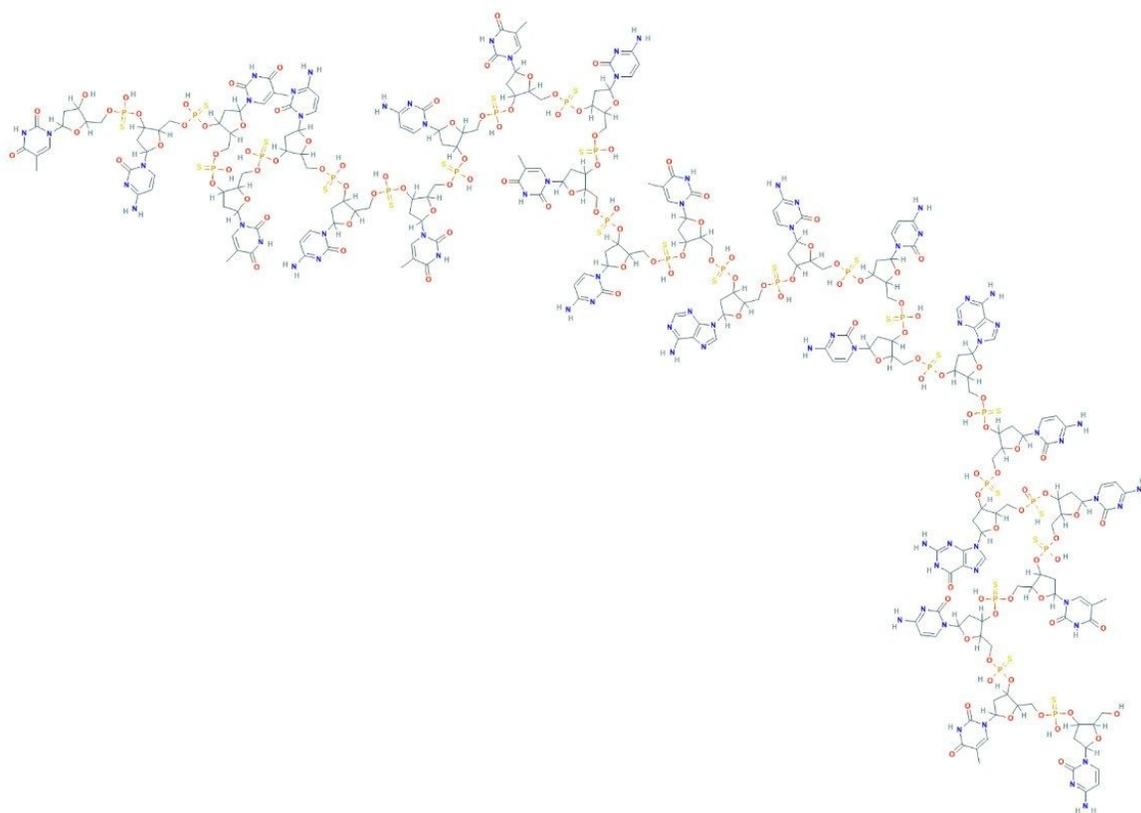


図 1. GEM91 (トレコビルセン) オリゴヌクレオチドの構造¹⁾

アプリケーションのメリット

- ACQUITY Premier Oligonucleotide C₁₈、粒子径 2 μm 未満のカラム、オリゴヌクレオチドクロマトグラフィーの回収率の向上、LLOQ の向上、および長時間のカラムコンディショニング負担の軽減。
- オリゴデオキシチミジンおよび GEM91 (ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド) の検出と定量のためのシンプルなサンプル前処理と UPLC-MS/MS 分析法を開発しました。
- 選択的な RP およびミックスモード固相抽出法が開発され、高いオリゴヌクレオチド回収率が得られました。
- μ Elution フォーマットの 96 ウェル SPE プレートを使用することで、サンプルの蒸発乾固が不要になり、吸着によるオリゴヌクレオチドの損失が低減しました。
- サンプル分析前および分析後の Waters MassPREP OST 標準品によるシステム適合性チェックにより、システム全体の正常性と性能が保証されました。
- LLE-Oasis WAX SPE 抽出後の GEM91 の定量限界は 50 ng/mL (LOD ≤ 2.5 ng/mL) でした。

はじめに

次世代のオリゴヌクレオチド治療薬（ONT）のターゲット特異性と安定性が向上したことで、研究開発を支援する LC-MS バイオ分析法の需要が近年大幅に増加しています。ONT 用の頑健で高感度かつ選択的なサンプル前処理法および LC-MS 分析法の開発は、サイズ、生理化学的多様性、ポリ陰イオン性の性質、およびタンパク質との非特異的吸着（NSB）に関する既知の問題により、引き続き非常に困難な課題となっています。さらに、イオン化/フラグメンテーションの制限、RP クロマトグラフィーの保持の低下、および内因性マトリックス干渉の解消の必要性のために、LC-MS の感度と選択性を得ることが、依然として課題となっています。

ここに記載する実験では、さまざまなオリゴヌクレオチド（15~35T）の抽出および定量のための単一の分析法が提供されています。逆相（RP）およびミックスモードのイオン交換 μ Elution 固相抽出（SPE）サンプル前処理を使用することで、高いオリゴヌクレオチド回収率が得られました。新型の粒子径 2 μ m 未満の ACQUITY Premier カラムを用いた RP UPLC によるクロマトグラフィー分離により、オリゴヌクレオチドの迅速かつ回収率と分離能が高い分析が実現できました。分析成分の非特異的吸着を防ぐために特別に設計された ACQUITY Premier カラムを使用することで、イオン性分析種/表面間の相互作用を最小限に抑え、オリゴヌクレオチド分析種の回収率が大幅に向上します。この SPE-LC-MS（ACQUITY UPLC I-Class PLUS システムと Xevo TQ-XS タンデム四重極質量分析計を搭載）分析法は、高い回収率、選択性、感度を実現し、純サンプルおよび抽出サンプルで ng/mL の低レベルの定量限界（LLOQ）を達成します。

実験方法

オリゴヌクレオチド固相抽出の分析法開発

Waters MassPREP OST 標準品（15-35T：製品番号：186004135 <

<https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/standards--reagents/186004135-massprep-oligonucleotide-standard.html>>）およびホスホロチオエートオリゴヌクレオチド（GEM91）の各溶液を、プロテアーゼ（RNase）を

含まない水でさまざまな濃度に調製しました。Waters MassPrep OST 5 nmol 標準品（OST 標準品）の 50 nmol/mL

濃縮原液は、100 μ L の RNase を含まない水をバイアルに加えて調製した後、混合しました。GEM91（2.50 mg/mL）

および GEM132（4.00 mg/mL）の濃縮原液は RNase を含まない水で調製しました。GEM132 を内部標準（IS）として

使用しました。固相抽出法の開発時および最終分析時には、OST 標準液（50 nmol/mL）および GEM91（500 μ

g/mL）の作業用原液を使用して、さまざまなオリゴヌクレオチドサンプルを調製しました。Waters Oasis HLB および

WAX μ Elution 96 ウェル SPE 抽出プレートを使用したさまざまな固相抽出プロトコルを、それぞれ図 2A と 2B に示し

ます。固相抽出のステップはすべて、Waters 加圧マニホールドを使用して実施しました。

オリゴヌクレオチドの固相抽出および LC-MS/MS 定量

キャリブレーターと品質管理 (QC) サンプル: キャリブレーターと QC を調製するために、OST 標準液および GEM91 作業用原液を、水または市販の血漿/血清にさまざまな濃度 (0.0025~50 nmol/mL (OST 標準液) および 0.005~100 µg/mL (GEM91)) で添加しました。GEM132 IS 溶液を、調製した各サンプルに添加しました。IS の最終濃度は 20 µg/mL でした。ヒト血漿 (K2EDTA 処理済み、非働化なし) は、BIOIVT (ニューヨーク州、ニューヨーク) から購入しました。

サンプル抽出

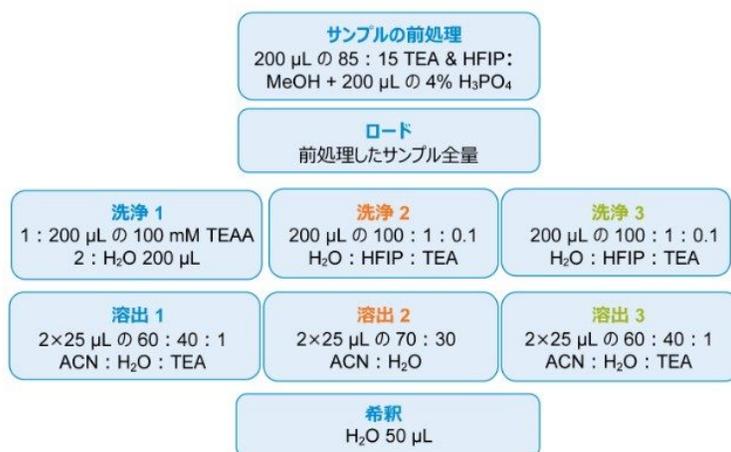
純標準試料:

サンプルは 50 mM 酢酸アンモニウムバッファー (pH 5.5) で調製しました。調製済みサンプルの抽出は、Waters Oasis WAX µElution 96 ウェル SPE プレート (製品番号: [186002500](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186002500) <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186002500>>) および図 2C に示すプロトコルを使用して行いました。タンパク質との結合を防ぐ必要がないため、均一化用バッファーの添加は省略しました。

血漿試料:

フェノール-クロロホルム液-液抽出 (LLE) と、得られた血漿上清の Oasis WAX SPE による抽出の 2 ステップの抽出を行いました。そのために、調製した血漿試料の 400 µL のアリコートに 1000 µL の変性/溶解バッファーで希釈し、ボルテックス混合しました。次に、200 µL のフェノール: クロロホルム: イソアミルアルコール (25: 24: 1) を添加しました。サンプルを 30 分間ボルテックス混合し、14,000 RPM で 10 分間遠心分離しました。コンディショニングおよび平衡化済みの Oasis WAX SPE プレートに LLE 上清の上層 (2 × 650 µL) をロードし、図 2C に示す最適化プロトコルを使用して抽出しました。

- A** コンディショニング：2 × 200 μL アセトニトリル
 平衡化：2 × 200 μL の水（100 : 1 : 0.1 H₂O : HFIP : TEA）



- C** コンディショニング：2×200 μL の MeOH
 平衡化：2×200 μL の 50 mM NH₄OAC（pH 5.5）



図 2. 固相抽出によるサンプル前処理および精製プロトコル：（A）Oasis HLB、（B）Oasis WAX、（C）最終的に最適

化された *LLE-Oasis WAX SPE*。すべての固相抽出は、 μ *Elution 96* ウェルプレートフォーマットを使用して実施しました。

LC 条件

システム:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS、 シングルカラムヒーター付き FTN
検出:	MS
バイアル/プレート:	MaxPeak を採用した QuanRecovery 700 μ L プレート (製品番号: 186009185) および 丸型ポリプロピレンキャップマッ ト (製品番号: 186002483)
カラム:	AQUITY Premier Oligonucleotide C ₁₈ 、1.7 μ m、 2.1 \times 50 mm (製品番号 : 186009484)
カラム温度:	50 $^{\circ}$ C
サンプル温度:	8 $^{\circ}$ C
注入量:	20 μ L
流速:	0.6 mL/分
移動相 A:	150 mM ヘキサフルオロイソプロ パノール (HFIP)、5 mM ヘキシ ルアミン (HA) 水溶液

移動相 B: 150 mM HFIP、5 mM HA メタノール溶液

パージ溶媒: 水/メタノール = 90: 10

洗浄溶媒: 水/メタノール = 90: 10

グラジエント

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	カーブ
初期条件	0.6	90	10	6
1.0	0.6	90	10	6
1.5	0.6	50	50	6
3.0	0.6	45	55	6
3.5	0.6	40	60	6
4.0	0.6	30	70	6
4.1	0.6	5	95	6
4.5	0.6	5	95	6
4.6	0.6	90	10	6
5.0	0.6	90	10	6

MS 条件

システム: Xevo TQ-XS タンデム四重極

イオン化モード: ESI-

取り込み範囲: MRM

キャピラリー電圧: 2.00 kV

脱溶媒温度: 500 °C

脱溶媒流量： 1000 L/時間

コーンガス流量： 150 L/時間

コリジョンガス流量： 0.2 mL/分

ネブライザーガス流量： 7 Bar

コリジョンエネルギー： 表 1 参照

コーン電圧： 表 1 参照

化合物	チャージ	プリカーサー (<i>m/z</i>)	プロダクト	コリジョンエネルギー (eV)	コーン電圧 (V)
15T	(-4)	1123.8	302.8	40	40
			382.6	40	40
			606.8	40	40
20T	(-4)	1504.2	303.2	45	40
			382.9	45	40
			607.2	45	40
25T	(-4)	1884.7	302.6	50	40
			382.8	50	40
			624.7	45	40
			929.4	40	40
30T	(-5)	1811.5	302.5	45	40
			382.8	45	40
			606.7	45	40
			928.4	45	40
35T	(-6)	1762.9	302.7	50	40
			383.1	50	40
			624.5	50	40
			705.1	50	40
GEM 91	(-5)	1553.7	512.8	30	40
			722.0	30	40
GEM 132	(-5)	1319.2	94.5	40	40
			357.3	40	40
			807.6	25	40

表 1. オリゴヌクレオチド分析に使用した最終的な MS 条件

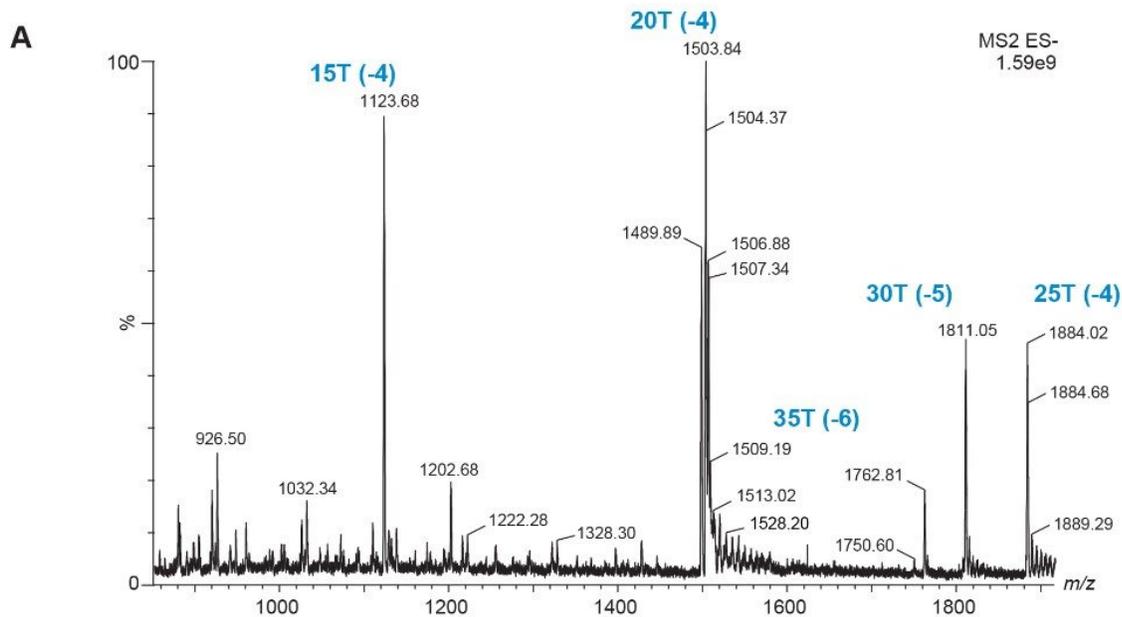
データ管理

装置コントロールソフトウェア: MassLynx、v4.2

定量ソフトウェア: TargetLynx

結果および考察

15、20、25、30、および 35T OST 標準品では、複数の多電荷プリカーサーが観察されました。すべての長さ (mer) の OST、GEM91、および GEM132 について、フルスキャン MS および MS/MS スペクトルを取得しました (データは表示されていません)。図 3A に、OST MassPREP 標準品 (15 - 35T) の主要なプリカーサーチャージ状態を示す代表的なフルスキャン MS スペクトルを示します。図 3B は、OST 35 mer の最も豊富な -6 および -12 のプリカーサーチャージ状態の代表的な MS/MS スペクトルです。OST 15 - 35 mer、GEM91、および GEM132 の検出と定量に使用する最終的な MRM トランジションを表 1 に示します。ほとんどの高分子生物製剤と同様に、多くのフラグメントが生成され、最も強いフラグメントは m/z 200 未満でよく見受けられます。低質量 m/z フラグメントは、特異性が低いために、抽出サンプルのバックグラウンドが高くなることがよくあります。このアッセイでは、 m/z 200 以上の特異性の高いイオンフラグメントを使用することで、特異性が大幅に向上し、よりシンプルな LC および固相抽出法を使用できるようになりました。



B
質量 -6 および -12 のチャージ状態

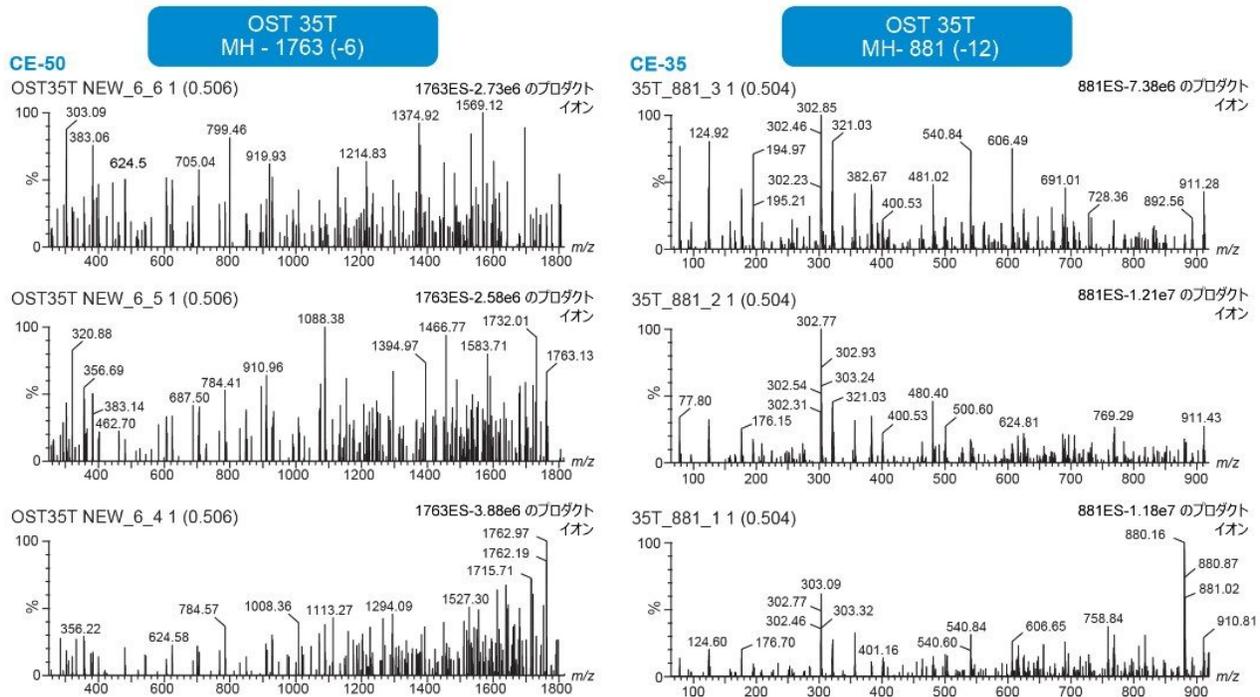


図 3. Waters MassPREP OST 標準品の代表的な MS フルスキャンおよびプロダクトイオンスペクトル (PIS)。パネル

A には、OST 15、20、25、30、および 35 mer の主要なプリカーサーを強調表示しています。パネル B には、35 mer の OST 標準品およびその主要な -6 および -12 のプリカーサーチャージ状態の代表的な PIS スペクトルを示しています。

この研究では、新しい ACQUITY Premier Oligonucleotide C₁₈ カラムを分析用に選択しました。このカラムには、オリゴヌクレオチドの保持および十分な分離に必要な、中性から弱塩基性の pH および高温での分離に適した 1.7 μm のハイブリッドシリカ粒子が充填されています。ACQUITY Premier カラムには、オリゴヌクレオチドの回収率向上および分析法の検出限界の低減に不可欠な MaxPeak High Performance Surface (HPS) テクノロジーがカラムハードウェアに組み込まれています。HPS テクノロジーは、オリゴヌクレオチド、リン酸化ペプチド、低分子有機リン酸など金属表面に強い親和性を示すことが分かっている分析種において、金属との相互作用を最小限に抑えるために特別に開発されました。「実験方法」セクションに記載した LC 条件を使用し、OST、GEM91、および GEM132 において、狭いピーク幅が得られました。結果として得られた分離については、図 4A に OST 標準品 (15 ~ 35T)、図 4B に GEM91 および GEM132 (IS) が表示されています。図 5 には、OST 20 mer (A) および GEM91 (B) について、標準的な ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C₁₈ カラムと比較した際に、ACQUITY Premier Oligonucleotide C₁₈ カラムを使用した場合に簡単に実現されるオリゴヌクレオチド分析種の回収率の向上が示されています。オリゴヌクレオチド回収率の向上に加えて、オリゴヌクレオチド標準品を使用した MaxPeak Premier カラムのコンディショニングの必要性が大幅に低減しました (データは示されていません)。これにより、装置アッセイのアップタイムが大幅に増加し、高価な移動相試薬にかかるコストを節約できます。

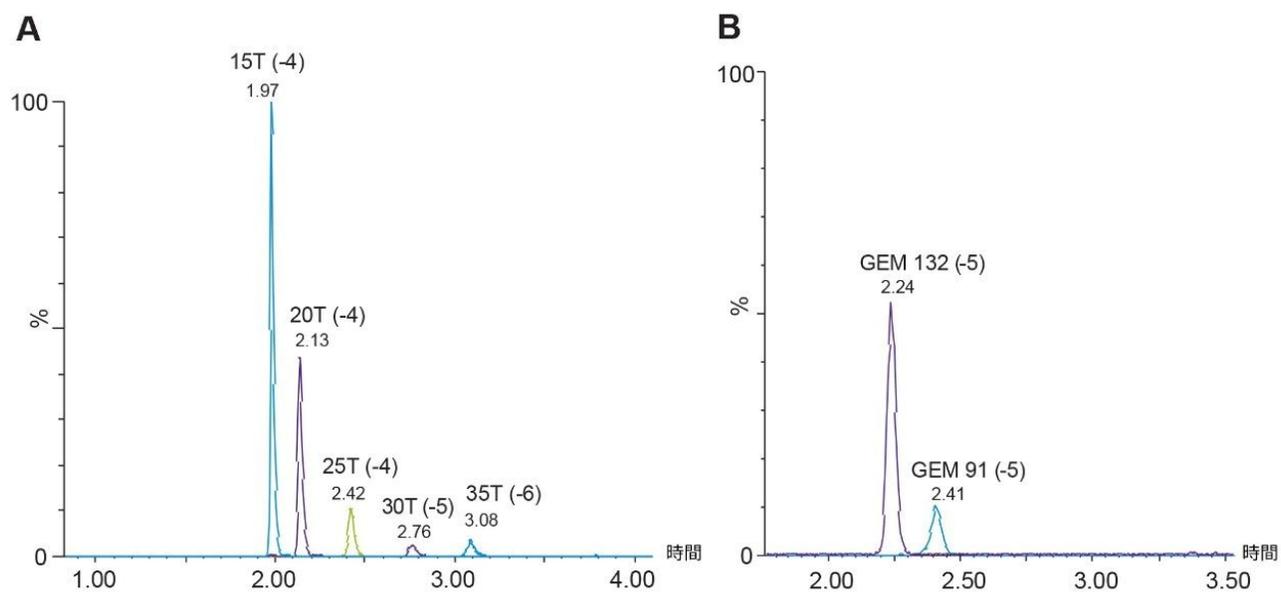


図 4. (A) MassPREP OST 15~35 mer および (B) 完全にホスホロチオエート化したオリゴヌクレオチド *GEM91* および *GEM132* の UPLC クロマトグラフィー分離 (「実験方法」セクションに記載した *AQUITY Premier Oligonucleotide C₁₈*、 $1.7 \mu\text{m}$ 、 $2.1 \times 50 \text{ mm}$ カラムおよび LC 条件を使用)

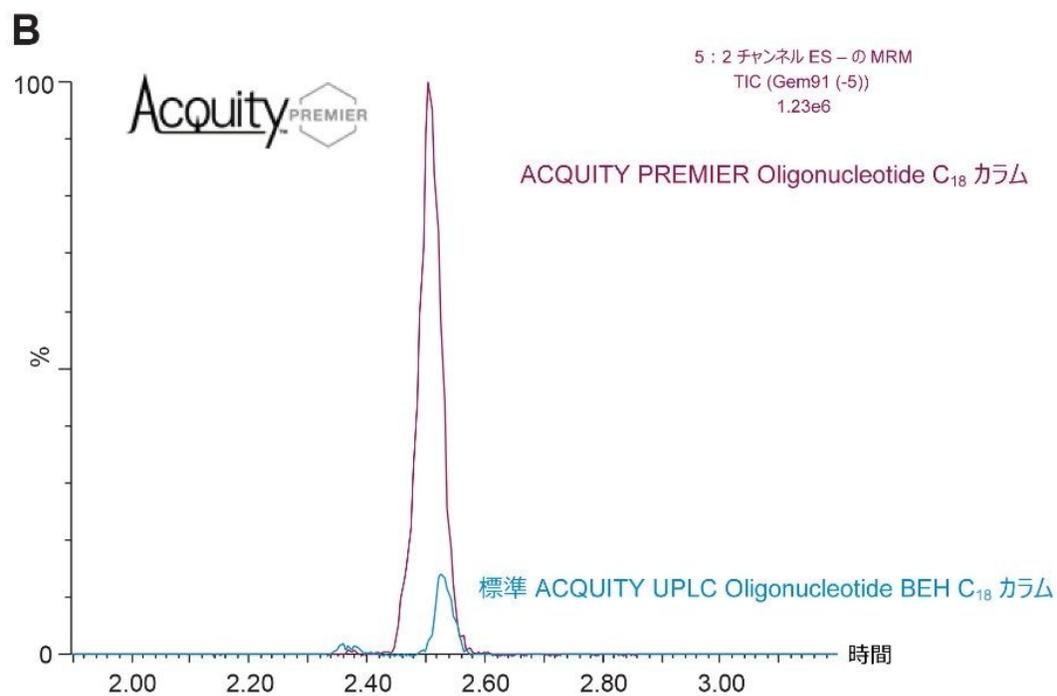
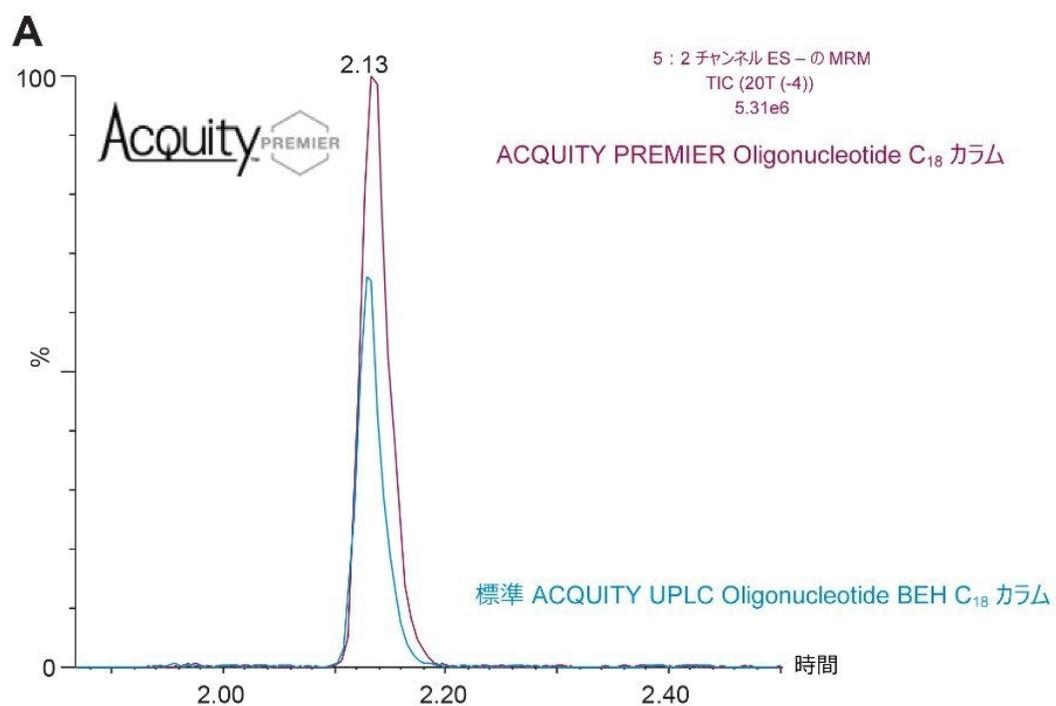


図 5. (A) Waters MassPREP OST 標準品 20 mer および (B) GEM91 について、標準的な ACQUITY UPLC

Oligonucleotide BEH C₁₈ カラムと比較して、ACQUITY Premier Oligonucleotide C₁₈ を使用した場合、クロマトグラフィ性能（オリゴヌクレオチド回収率）が大幅に向上（注入 2）

サンプル前処理法の開発中に、オリゴヌクレオチドの回収率および再現性の問題は、ほとんどの高分子に共通する問題である非特異的吸着、タンパク質結合、溶解度に関連していることが判明しました。さまざまな前処理のオプション、並びに固相抽出での洗浄および溶出用の溶液の慎重で体系的な評価を行うことが、この分析法での固相抽出の回収率および特異性を向上させるために不可欠でした。図 2 には、サンプル前処理法の開発で使用した固相抽出プロトコルを、Waters Oasis HLB (A) および WAX (B) 固相抽出吸着剤について示しています。各プロトコルについて、標準溶液を使用してオリゴヌクレオチドの回収率を評価しました。ロード、洗浄、溶出の各ステップで、さまざまな固相抽出条件をスクリーニングしました。オリゴヌクレオチド固相抽出の回収率の結果を、図 6A (HLB) および 6B (WAX) に示しています。Oasis HLB および WAX 吸着剤のいずれの場合も、すべてのプロトコル (HLB および WAX) で、固相抽出の回収率が一般にオリゴヌクレオチドサイズのサイズとともに低下していました。サンプルを TEA: HFIP: MeOH 溶液で前処理し、H₃PO₄ 吸着剤で希釈し、H₂O: HFIP: TEA 溶液で洗浄した後、ACN: H₂O: TEA 溶液で溶出すると、HLB 固相抽出の全体的な回収率が最も高くなりました。オリゴヌクレオチド精製では、その強力な陰イオン性により、ミックスモード固相抽出と、RP および陰イオン交換分離の組み合わせが最適です。Oasis WAX SPE を使用することで、十分な回収率が得られるだけでなく、一般に選択性が向上し、固相抽出精製中に中性の干渉物質を洗い流すことができます。また、逆相で LC 分離を行うため、分析全体に直交性が得られます。Oasis WAX SPE を使用した場合、溶出溶液に 50 mM TEA と 50 % ACN または MeOH の組み合わせを含んでいる場合に、全体的に最適な回収率が実現できました。

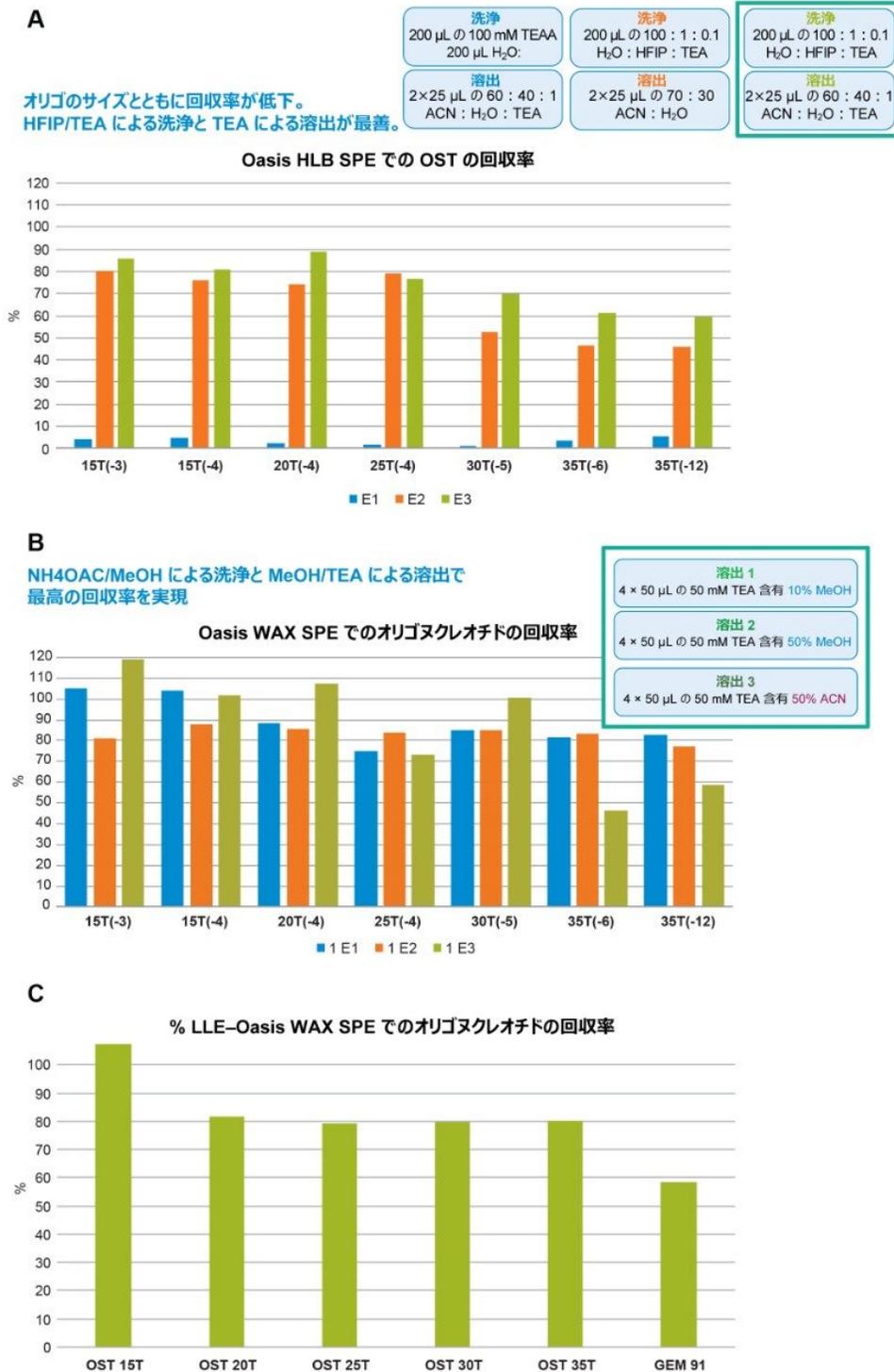


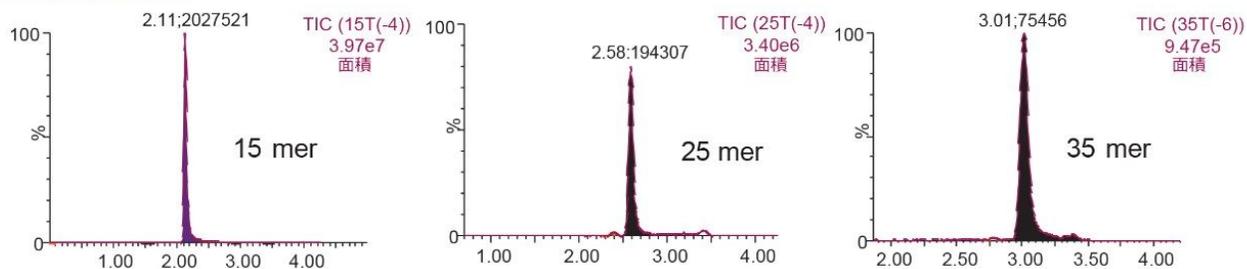
図 6. 96 ウェル μ Elution フォーマットの (A) Oasis HLB SPE、(B) Oasis Wax SPE、(C) LLE-Wax SPE を使用し

た場合のオリゴヌクレオチドのサンプル前処理の回収率。HFIP/TEA による洗浄および ACN/TEA による溶出を使用した場合、HLB で得られたオリゴヌクレオチド回収率が最も高くなった一方で、酢酸アンモニウム/MeOH による洗浄および MeOH/TEA による溶出を使用した場合、WAX で得られた OST および GEM91 のオリゴヌクレオチド回収率が最も高くなりました。LLE と WAX SPE を組み合わせることで、確実に血漿中のオリゴヌクレオチド/血漿の結合を効率的に防ぐことができます。

オリゴヌクレオチドは血漿タンパク質に非常に強く結合するため、この結合を効果的に防止することが、血清/血漿中の回収において不可欠です。このため、固相抽出の前に、前処理したオリゴヌクレオチド血漿/血清サンプルの液-液抽出 (LLE) を実施しました。「実験方法」セクションに記載した LLE プロトコルを使用した場合、回収率は評価したすべてのオリゴヌクレオチドについて 80% を超えていました (データは示されていません)。最終的な LLE-SPE の条件を図 2C に示します。この抽出法 (溶解/中和前処理、LLE、および Oasis WAX SPE) を全体的に使用することで、血漿タンパク質との結合が効果的に防止され、回収率と選択性が向上しました。最終的な LLE-WAX SPE での OST 標準品および GEM91 の回収率を図 6C に示します。回収率を全体的に向上させるために、80% 50 mM TEA: 20% MeOH (pH 9) 溶液、および 1% のキレート剤 (pH 11) を含む 80% H₂O: 20% MeOH 溶液による順次溶出を行いました。μ Elution フォーマットの固相抽出を使用することで、高い回収率に加えて、MS に適合しない変性/溶解バッファーを排除し、サンプルの濃縮が容易になりました。結果的に分析の感度が向上し、システムの頑健性が確保されました。個々の分析についての LC-MS システムの性能の検証 (保持時間/ピーク面積) は、Waters MassPREP OST 標準品を使用して、サンプル分析前および分析後に実施しました。OST 標準品の 15、25、および 35 mer についての性能を図 7 に示しています。

4 回目の注入

UPLC-MS MassPREP OST 標準システムの性能の検証



96 回目の注入

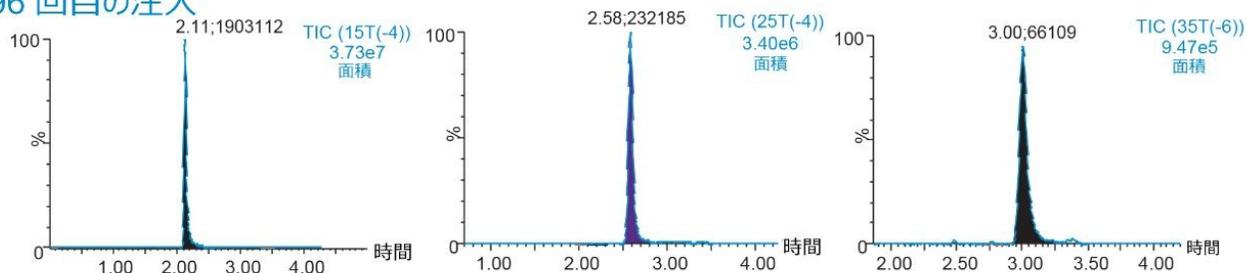


図 7. Waters MassPREP OST 標準品 (2 nmol/mL) を使用した UPLC-MS システム性能の検証。4 回目と 96 回目の注入の比較。分析全体を通して保持時間/ピーク面積 (15、25、35 mer) が維持されていることが分かります。

適切な MS フラグメント選択の組み合わせにより、ACQUITY Premier Oligonucleotide C₁₈ カラムでの回収率が向上し、選択的な固相抽出クリーンアップにより、純サンプルおよびスパイク後の LLE-WAX SPE 前処理済みのサンプルで、0.0025 nmol/mL (OST 15 mer) および 50 ng/mL (GEM91) の定量限界が達成できました。15 mer について、この OST の定量性能 (リニアダイナミックレンジおよび LOQ) の代表的な図を、図 8 (純標準溶液) および図 9 (スパイク済み抽出血漿) のパネル A および B にそれぞれ示します。GEM91 では、検出限界は 2.5 ng/mL でした (図 10)。GEM91 の定量性能 (リニアダイナミックレンジおよび LOQ) の代表的な図を、図 11 (純標準溶液) および 12 (スパイク済み抽出血漿) のパネル A および B にそれぞれ示します。

A OST (15T) のダイナミックレンジ : 0.0025-0.5 nmol/mL $R^2 = 0.997$ **B** OST (15T) LLOQ 0.0025 nmol/mL 0.05 nmol オンカラム

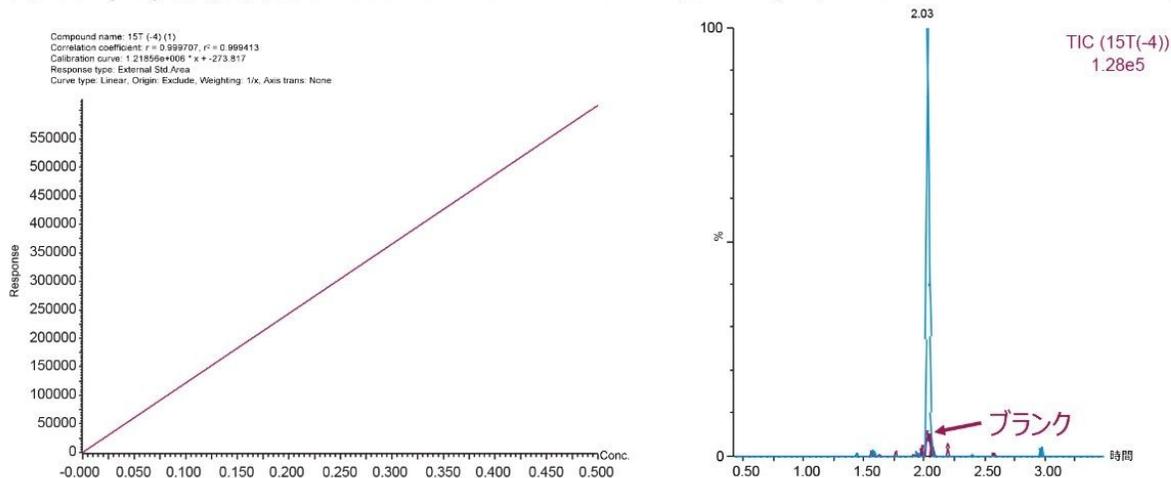


図 8. 固相抽出溶離液にスパイクした (A) OST 15T 標準品および (B) LLOQ 標準品の代表的な検量線 (0.025~0.5 nmol/mL)

A OST (15T) のダイナミックレンジ : 0.0025-0.5 nmol/mL $R^2 = 0.998$ **B** OST (15T) LLOQ 0.0025 nmol/mL 0.02 pmol オンカラム

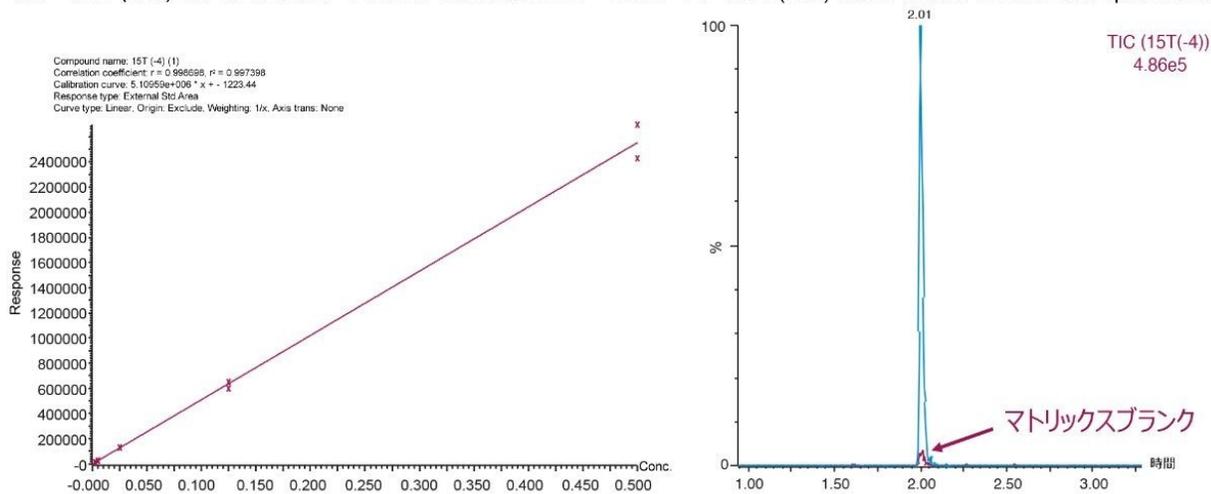


図 9. LLE-SPE 抽出後血漿にスパイクした (A) OST 15T 標準品および (B) LLOQ 標準試料の代表的な検量線 (0.025~0.5 nmol/mL)

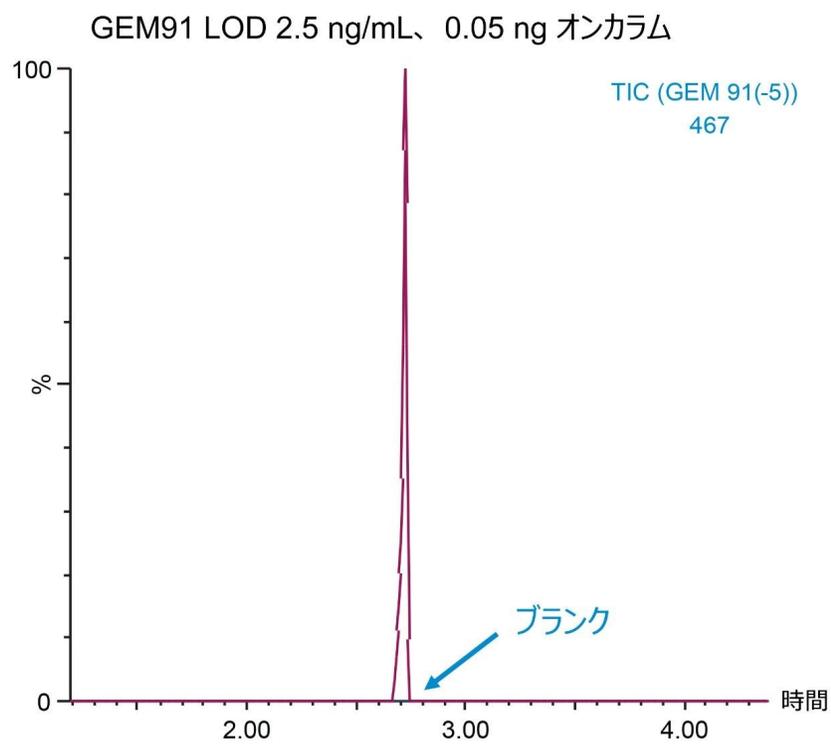
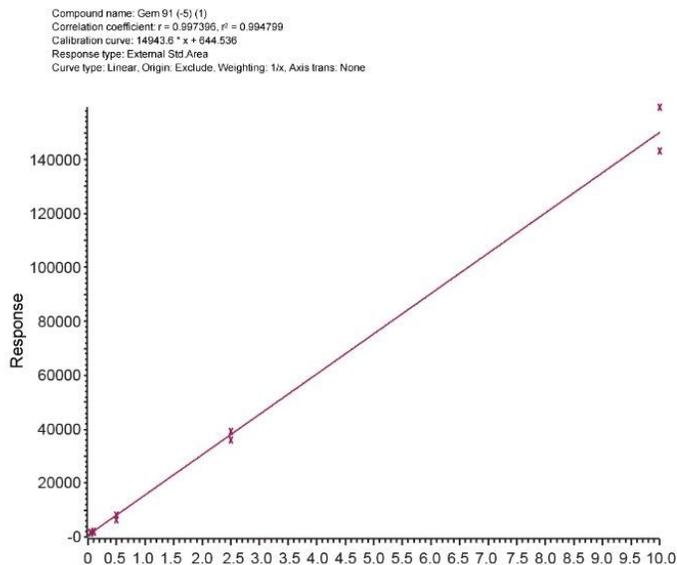


図 10. GEM91 のクロマトグラム。純標準溶液（オンカラムで 0.05 ng）で 2.5 ng/mL の LOD を示しています。

A GEM91 のダイナミックレンジ : 0.05-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $R^2 = 0.997$



B GEM91 LLOQ 0.05/mL、1 ng オンカラム

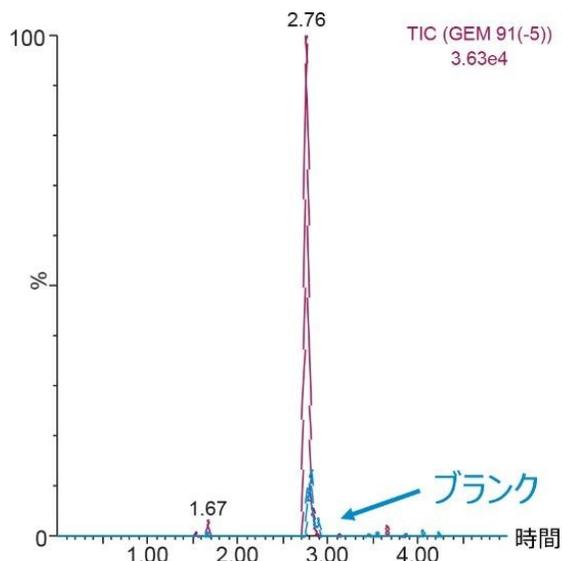
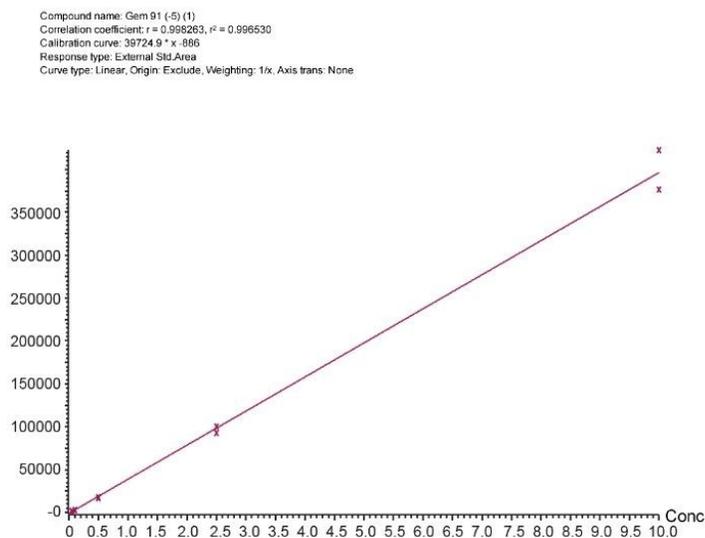


図 11. 固相抽出溶離液にスパイクした (A) GEM91 および (B) LLOQ 標準品の代表的な検量線 (0.05~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

A GEM91 のダイナミックレンジ : 0.05-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $R^2 = 0.998$



B GEM91 LLOQ 0.05/mL、4 ng オンカラム

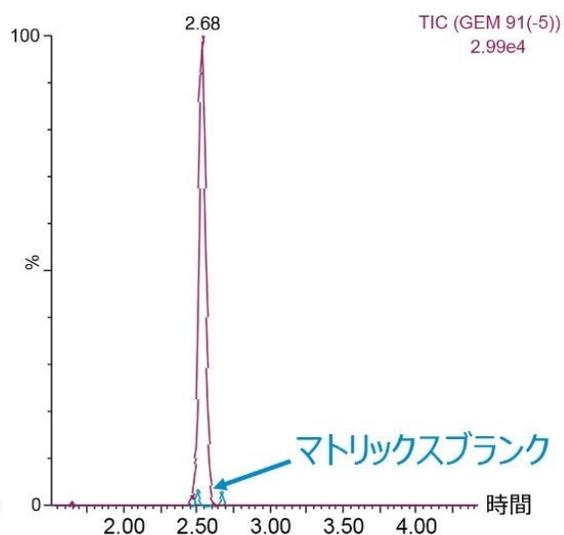


図 12. LLE-SPE 抽出後血漿にスパイクした (A) GEM91 および (B) LLOQ 標準試料の代表的な検量線 (0.05 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

結論

このアプリケーションは、純標準溶液および抽出血漿からのオリゴヌクレオチドの抽出および定量に成功したことに焦点を当てています。開発した分析法では、選択的で高感度の UPLC-MS/MS 分析と、 μ Elution プレートフォーマットの Oasis WAX SPE を使用した LLE-SPE サンプル抽出の組み合わせにより、サンプル濃縮と高い回収率を実現しています。ACQUITY Premier Oligonucleotide C₁₈ カラムを使用することで、クロマトグラフィー回収率が大幅に向上し、検討したオリゴ dT およびアンチセンスオリゴヌクレオチドの LOD および LLOQ が下がりました。この開発法の分析感度では、デオキシチミジン 15T OST 標準品について 0.05 pmol のオンカラム LLOQ、完全にホスホロチオエート化したオリゴヌクレオチドである GEM91 について 0.05 ng のオンカラム LOD を達成しました。

参考文献

1. GEM91 の画像 (2020 年 9 月 18 日にアクセス)。<https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fpubchem.ncbi.nlm.nih.gov%2Fimage%2Fimgsrv.fcgi%3Fcid%3D16204535%26t%3Dl&imgrefurl=https%3A%2F%2Fpubchem.ncbi.nlm.nih.gov%2Fcompound%2FTrecovirsensodium&tbid=zslKeidmEWSzsM&vet=12ahUKEwj8066Bj_XrAhXLAN8KHQf5B6oQMygGegUIARCaAQ..i&docid=Y1Clm0B2xVZv6M&w=300&h=300&itg=1&q>

ソリューション提供製品

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

Xevo TQ-XS タンデム四重極型質量分析計 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007019JA、2020 年 9 月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#)
[環境設定](#)

[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](#)