

# 核酸医薬品のクロマト精製は、これで決まり！



## 逆相クロマトグラフィーに代わる疎水クロマトグラフィーの応用

核酸医薬品は、既に世界で 12 品目が承認され、今後も毎年 3~4 品目の承認が見込まれています。さらに 2025 年には核酸医薬品の市場規模は 1 兆円に到達するとも言われています。核酸医薬品の主流である合成オリゴヌクレオチドは、固相法または液相法による化学合成工程を経た後、逆相クロマトグラフィー (RPC) やイオン交換クロマトグラフィー (IEC) などを用いて分離、精製されています\*。しかしながら、一般的な RPC 工程では、目的物由来の不純物の除去が不十分な場合があること、また有機溶媒を大量に使用するため廃液処理や防爆設備など、コスト面で不利なことは否めません。そのため RPC に代替可能なクロマトグラフィーとして疎水クロマトグラフィー (HIC) が注目されています。

\* テクニカルノート TSKgel® No. 5

### ●疎水クロマトグラフィーの特長 (RPC との比較)

- ・ 固相合成法の際、固相から切り出された試料の溶液中に含まれる水酸化アンモニウムなど低分子の除去が可能
- ・ 保護基であるジメトキシトリチル (DMT) 基が結合した目的物 (DMT-on 体) と、合成過程で保護基がはずれて生じた DMT-off 体 (不純物) の分離が容易
- ・ 目的物の類縁物質である N-1 体、N+1 体、P=O 体、シアノエチル (CNEt) 化体、脱塩基体などの分離が可能
- ・ 酸性溶出液を用いることにより、カラム上で目的物の脱トリチル化 (DMT 基の脱保護) が可能
- ・ ポリマー基材の充填剤は、アルカリ溶液 (pH 13 まで) が使用でき、NaOH 溶液によるカラムの CIP 洗浄も可能
- ・ 溶離液に有機溶媒をほとんど使用しないため防爆設備が不要で、廃液処理の費用も抑えられる

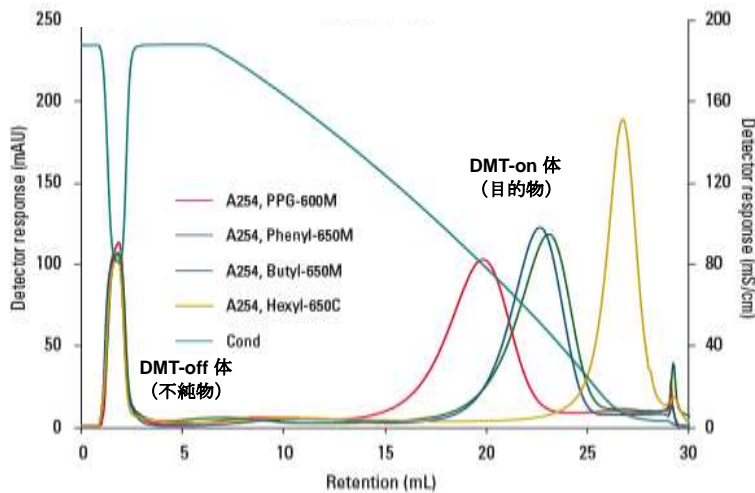
### ●HIC 用充填剤を用いた合成オリゴヌクレオチドの精製プロセス例

既存プロセス	新プロセス	新プロセスの特長	使用可能な充填剤 (例)	
(合成)	(改良合成)	・ 固相合成・液相合成	TOYOPEARL®	TSKgel
↓	↓			
RPC	HIC	・ 水系プロセス ・ RPC と同様な分離	PPG-600M Butyl-650M Phenyl-650M Hexyl-650C	Phenyl-5PW(20) Phenyl-5PW(30)
↓	↓			
脱トリチル化	脱トリチル化	・ HIC 後、脱トリチル化 (カラム上で脱トリチル化)		
↓	↓			
各種沈殿法	IEC	・ ポリッシング ・ 堅牢な精製法	GigaCap Q-650S SuperQ-650S	SuperQ-5PW(20)
↓	↓			
凍結乾燥原薬	UF/DF	・ 連続生産		
	↓			
	溶液原薬	・ 原薬の製剤化が容易 ・ プロセス時間の短縮		

Ref.;

- 1) Hybridon Inc., Patent WO 96/01268 (1996)
- 2) K. Ruanjaikaen et al., presentation by BioProcess International West (2017), San Francisco, USA
- 3) Biogen MA Inc., Patent WO 2017/218454 A1 (2017)

## ●HIC 用充填剤を用いた合成オリゴヌクレオチドの分離



Column; TOYOPEARL PPG-600M, Phenyl-650M, Butyl-650M, Hexyl-650C  
 Column size; 5 mm I.D. x 5 cm (1 mL)  
 Elution; Buffer A: 20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 1.5 mol/L ammonium sulfate (pH 7.5)  
 Buffer B: 20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA (pH 7.5)  
 Linear gradient from Buffer A to Buffer B (20 CV)  
 Washing; Buffer B (4 CV), 30 % isopropyl alcohol (5 CV)  
 Flow rate; 1.0 mL/min (1 min residence time)  
 Detection; UV (254 nm), conductivity (mS/cm)  
 Temperature; ambient  
 Sample; crude DMT-oligonucleotide (20 mer), 5'-GAA TTC ATC GGT TCA GAG AC-3'  
 (AEX-HPLC purified, purity ca. 55 % from TriLink Biotechnologies)  
 Sample loading; 1 mL (0.1 g/L)

各種 HIC 充填剤を用いて粗精製オリゴヌクレオチドを分離した結果、不純物の DMT-off 体は、すべての HIC 充填剤に吸着されず、フロースルーに溶出されました。また目的物の溶出位置、不純物との分離能の点を考慮すると、本試料には TOYOPEARL Phenyl-650M および Butyl-650M が適していると考えられます。

## ●HIC 用充填剤を用いた合成オリゴヌクレオチドの分離 (カラム上での DMT 基の脱保護処理)

TOYOPEARL Phenyl-650M を用いた分離では、粗精製オリゴヌクレオチド (DMT-on 体) をカラムに負荷、吸着させ、まず不純物の DMT-off 体を洗浄、除去します。その後、溶出液に 50 mmol/L 酢酸、1 mol/L 硫酸溶液を用いることで、カラム上で目的物から DMT 基を脱保護 (脱トリチル化) し、DMT-off 体となった目的物を溶出することが可能です。尚、脱保護された DMT 基は、カラムに吸着されたままであり、CIP 工程 (蒸留水、および 30 % イソプロピルアルコールによる洗浄) で溶出除去されます。この精製で得られた目的物の回収率は 99 %、また RPC カラムによる純度検定では純度 99 % 以上であることが確認できました。このように粗精製オリゴヌクレオチドは、HIC 充填剤を用いることで効率良く精製することが可能です\*。

\* Simple and Effective Method for Purification of DMT-on Oligonucleotides using Hydrophobic Interaction Chromatography Resins, Application Note No. 117 (2020), Tosoh Bioscience LLC を参照



※ "TOYOPEARL"、"TOYOPEARL GigaCap"、"トヨパール"、"TSKgel"は日本等における東ソー株式会社の登録商標です  
 ※ 掲載のデータ等はその数値を保証するものではありません お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください

## 東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部	☎ (03) 5427-5180	〒105-8623	東京都港区芝3-8-2
大阪支店 バイオサイエンスG	☎ (06) 6209-1948	〒541-0043	大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオサイエンスG	☎ (052) 211-5730	〒460-0008	名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店	☎ (092) 781-0481	〒810-0001	福岡市中央区天神1-13-2
仙台支店	☎ (022) 266-2341	〒980-0014	仙台市青葉区本町1-11-1
カスタマーサポートセンター	☎ (0467) 76-5384	〒252-1123	神奈川県綾瀬市早川12743-1

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>  
 HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>  
 お問い合わせE-mail [hlc@tosoh.co.jp](mailto:hlc@tosoh.co.jp)