

# 核酸医薬品の分離・分析はこれで決まり！

## TSKgel DNA-STAT®による合成オリゴヌクレオチドの分析



核酸医薬品は、抗体の次に期待されている医薬品であり、これまでに 12 品目の医薬品が承認されています。今後も、毎年 3~4 品目が承認されると予測され、2025 年には核酸医薬品の市場規模は推定 1 兆円とも言われています。核酸医薬品は、低分子医薬品とバイオ医薬品の両方の長所を持つといわれる合成オリゴヌクレオチドが主流です。化学合成により、天然型にはない特殊な構造や、官能基を付加させる修飾型核酸が開発されています。例としては、りん酸基部分のホスホロチオエート(PS)型や糖部分のメキシエチル(MOE)型、架橋(LNA)型、モルフォリノ(MO)型などがあります。核酸医薬品は、その作用機序から、細胞内で RNA を標的とするアンチセンスや siRNA、細胞外でたんぱく質と相互作用するアプタマーや、自然免疫を活性化させる CpG オリゴなどがあります。核酸の大きさに関しては 10~30 塩基の低分子核酸から、100 塩基前後の長鎖核酸もあります。

### ●承認された核酸医薬品

核酸医薬品名*	由来	種類	承認年	サイズ、性状
Vitravene® (Fomivirsen)	合成	アンチセンス	1998年 (販売中止)	DNA 21mer
Macugen® (Pegaptanib)	合成	アプタマー	2004年	RNA 28mer+PEGylated
Kynamro® (mipomersen)	合成	アンチセンス	2013年	RNA/DNA 20mer
Exondys 51® (Eteplirsen)	合成	アンチセンス	2016年	DNA 30mer
Spinraza® (Nusinersen)	合成	アンチセンス	2016年	DNA 8mer
Defitelio® (Defibrotide)	天然	オリゴヌクレオチド	2016年	ブタ腸組織由来生成物
Tegsedi® (Inotersen)	合成	アンチセンス	2018年	DNA 18mer
Onpatro® (Patisiran)	合成	siRNA	2018年	RNA 21mer
Heplisav-B®	合成	CpGオリゴ	2018年	RNA 18mer, HBV adjuvant
GIVLAARI® (Givosiran)	合成	siRNA	2019年	RNA 21/23mer
VYONDYS 53® (Golodirsen)	合成	アンチセンス	2019年	DNA 25mer
Viltepso® (Viltolasen)	合成	アンチセンス	2020年	DNA 21mer

\*"Vitravene"はISIS Pharmaceuticals社の、"Macugen"はPfizer社の、"Kynamro"はGenzyme社の、"Exondys 51"はSarepta Therapeutics社の、"Spinraza"はBiogen社の、"Defitelio"はJazz Pharmaceuticals社の、"Tegsedi"はIonis Pharmaceuticals社の、"Onpatro"はAlnylam Pharmaceuticals社の、"Heplisav-B"はDynavax Technologies社の、"GIVLAARI"はAlnylam Pharmaceuticals社の、"VYONDYS 53"はSarepta Therapeutics社の、"Viltepso"は日本新薬の登録商標です。

### ●核酸(合成オリゴヌクレオチド)の分析

化学合成による核酸医薬品の分析、検査には、物性分析、構造分析、不純物分析などがあります。合成核酸の不純物には、工程由来の不純物と、生成物由来の不純物があります。生成物由来の不純物には、精製品の類似物(分子量の違い;塩基数 N-1, N, N+1 など)、りん酸基の S 化などによる不斉化合物、異性体が多く含まれます。

HPLC 分析では、以下の表の分離モードが用いられます。また質量分析計(MS)による検出(LC/MS)も行われます。

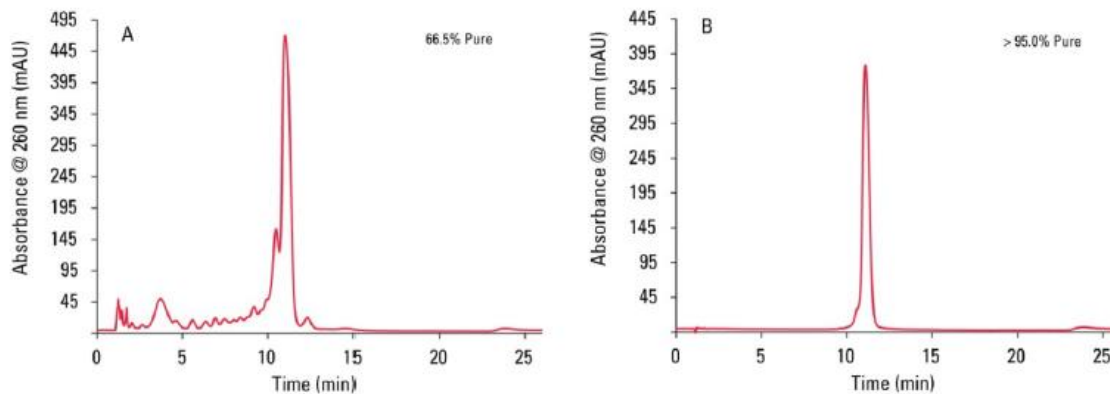
分離モード	分離原理	長所	短所	主な分離条件
逆相クロマトグラフィー (RPC)	疎水性相互作用	・高分離能 ・構造異性体、不斉体の分離 ・選択性の異なる各種RPCカラムが利用できる	・異性体、不斉体ピークが多すぎて分離帯が広がる ・試料負荷量が少ない	・酢酸アンモニウム、酢酸トリエチルアンモニウムなどのイオンペア(IP)試薬を含む溶液 ・有機溶媒によるグラジエント分離
イオン交換クロマトグラフィー (IEC)*	静電相互作用	・試料負荷量が多い ・試料はりん酸基の数に依存した分離ができる (N-1, N, N+1)	・分離前に脱塩、希釈などの処理が必要	・試料の安定性により中性からアルカリ溶液中、塩によるグラジエント分離 ・有機溶媒を添加する場合もある
サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)**	分子サイズ	・塩基数(分子量)に依存した分離 ・生理条件に近い溶離液系で分離できる	・試料負荷量が少ない ・分離能はRPC、IECに比べ低い	・中性付近の溶離液でアイソクラティック分離 ・有機溶媒を添加する場合もある

\* IECでは、非多孔性充填剤(NPR®)を用いたカラムで、分離能を向上させることが可能です。

TSKgel DNA-NPR(粒子径2.5 μm)やTSKgel DNA-STAT(粒子径5 μm)は、非多孔性充填剤カラムです。

\*\* SECでは、シリカ系SWカラムで核酸塩基数、りん酸基の違いによる分子量の違いを分析します。天然型DNAのDefitelioはTSKgel G2000SW<sub>XL</sub>などSECによる品質分析が行われています。

## ●粗精製および精製ホスホロチオエート型(PS化)オリゴヌクレオチドの IEC 分離



カラム ; TSKgel DNA-STAT 4.6 mm I.D. x 10 cm

溶離液 ; バッファー A) : 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) + 10 % アセトニトリル

バッファー B) : 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) + 2 mol/L NaCl + 10 % アセトニトリル

グラジエント : 0 min (30 % B), 20 min (100 % B)

流速 ; 0.5 mL/min 温度 ; 60 °C 検出 ; UV (260 nm)

試料 ; 合成ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド (24mer) , 10 μL

A: 精製前試料、B: 精製後試料

## ● 核酸分析のポイント

核酸の安定性が高い場合は、アルカリ溶液(NaOH, pH 12)、高温(60 °C)にすることで、分離能を向上させます。安定性が低い場合は、中性(pH 7~8)、40 °Cで分離します。試料の吸着が強すぎる場合は、塩にNaClやNaBrより溶出力の強いNaClO<sub>4</sub>を用いることがあります。(参照; T. Kamichika et al., TIDES 2020 in Kyoto, ポスター発表)

## ● 核酸の分析から分取クロマトグラフィーへ

合成オリゴヌクレオチドを大量に分取するためには、試料負荷量の多い多孔性充填剤を使用します。

TSKgel SuperQ-5PW (20)、TOYOPEARL® SuperQ-650S、TOYOPEARL GigaCap® Q-650Sなどが大量精製に適しています。

## ● 核酸分離用 TSKgel IEC カラムおよび分取用バルク充填剤 TSKgel および TOYOPEARL 一覧表

品番	品名	粒子径 (μm)	カラムサイズ/容量	備考
0018249	TSKgel DNA-NPR	2.5	4.6 mm I.D. x 7.5 cm	非多孔性、高性能分析用
0021962	TSKgel DNA-STAT	5	4.6 mm I.D. x 10 cm	非多孔性、高性能分析用
0018253	TSKgel guardcolumn DNA-NPR	-	4.6 mm I.D. x 0.5 cm	ガードカラム
0014594	フィルタアッセムブリ	-	-	インラインフィルタ (カラム用)
0006280	フロロポアフィルタ	-	-	インラインフィルタ用
0018257	TSKgel SuperQ-5PW	10	7.5 mm I.D. x 7.5 cm	多孔性、分析用
0018387	TSKgel SuperQ-5PW	13	21.5 mm I.D. x 15 cm	多孔性、分取用
0018388	TSKguardgel SuperQ-5PW	-	-	ガードゲルキット
0043383	TSKgel SuperQ-5PW(20)	15~25	25 mL	分取用バルク充填剤
0043283	TSKgel SuperQ-5PW(30)	20~40	25 mL	分取用バルク充填剤
0017223	TOYOPEARL SuperQ-650S	20~50	250 mL	分取用バルク充填剤
0022882	TOYOPEARL GigaCap Q-650S	20~50	250 mL	分取用バルク充填剤

\*分取用バルク充填剤には、充填カラム (SkillPak™) や異なる容量の荷姿もございます



※ "TSKgel", "TSKgel STAT", "NPR", "TOYOPEARL", "TOYOPEARL GigaCap", "トヨパール"は日本等における東ソー株式会社の登録商標です。

※ "SkillPak"は Tosoh Bioscience LLC の製品名です。

※ 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)