

# 修飾オリゴ核酸複合体の AEC 分離は、これで決まり！

陰イオン交換体 TSKgel® SuperQ-5PW(20)等による分離改善と溶離液のポイント

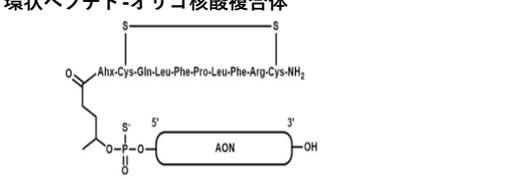
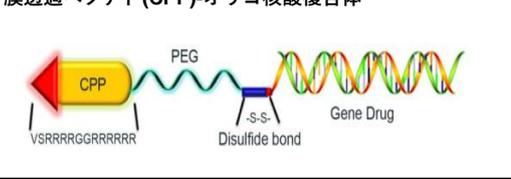


オリゴヌクレオチド（核酸）は、2025年8月22日現在、核酸医薬品として23品目\*が医薬承認を受けています。その多くは、化学修飾が施されたもので、さらに薬物の安定化や標的細胞への到達、細胞膜透過性の向上を目的として、化合物を付加した修飾オリゴ核酸複合体もあります。中でも、*N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を結合させた修飾オリゴ核酸は、核酸医薬品として複数が承認されており、その他にも、抗体オリゴ核酸複合体(AOC)やペプチドオリゴ核酸複合体(PNC)、分子内に高次構造を有するグアノシン(G)リッチなオリゴ核酸なども検討されています。

オリゴ核酸の分離・精製には、陰イオン交換クロマトグラフィー(AEC)が多用されます。しかしながら、修飾オリゴ核酸複合体は疎水性が高く、凝集体や高次構造が形成されることで、分離不良や回収率低下を引き起こすことがあります。その解決法として、溶離液組成などの分離条件を検討した事例が多数報告されています。以下の表に、修飾オリゴ核酸複合体の AEC 分離などクロマトグラフィー分離に用いられる溶離液についてまとめました。

\*国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部ホームページ；<https://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/section2-1.pdf>

表. 修飾オリゴ核酸複合体の陰イオンクロマトグラフィー等における分離と溶離液条件

オリゴ核酸（模式図）	分離、分析条件、主な溶離液系	文献
GalNAc-オリゴ核酸 	TSKgel SuperQ-5PW(20)によるAEC分離（その後、RPCで分離） ・ 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5), 15 % ACN, NaBrのグラジエント	1
脂質-オリゴ核酸複合体 	TSKgel SuperQ-5PW(20)によるAEC分離 ・ 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5), 15 % ACN, NaClのグラジエント	2
抗体-オリゴ核酸複合体(AOC) 	簡易精製による低分子量成分の除去（クロマトグラフィー分離なし） ・ 限外濾過（30 kDa カットオフ）	5
環状ペプチド-オリゴ核酸複合体 	TSKgel Q-STATなどによるAEC分析 （類似カラム； TSKgel Q-STATなど）	6
膜透過ペプチド(CPP)-オリゴ核酸複合体 	TSKgel UP-SW2000によるSEC分析；センス、アンチセンス、二本鎖の分離 ・ 0.1 mol/L 酢酸アンモニウム、25 °C ODSカラムによるIP-RPC分析；センス、アンチセンスの分離 （類似カラム； TSKgel ODS-120H, ODS-100V） ・ 2 mmol/L 炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH 9.81), 15 mmol/L TEA, 50 °C, ACNのグラジエント	8
膜透過ペプチド(CPP)-オリゴ核酸複合体 	弱陰イオン交換体（DEAE型）によるAEC分離 （類似充填剤； TOYOPEARL GigaCap® DEAE-650M） ・ 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2), 10 mmol/L EDTA, NaClのグラジエント	9
グアノシン(G)-リッチオリゴ核酸（高次構造保有） 	ODSカラムによるRPC分離 （類似カラム； TSKgel ODS-120H, ODS-100V） ・ 100 mmol/L 酢酸アンモニウム、ACNのリアグラジエント	10
グアノシン(G)-リッチオリゴ核酸（高次構造保有） 	TSKgel SuperQ-5PW(20)によるAEC分離 分離不良、回収率が低い場合；溶離液組成の変更 ・ 溶離液；塩の変更（NaBrへ変更）、有機溶媒濃度の増加（10%～20%） 高アルカリpH（～pH 11） 1 mol/L 尿素の添加、および上記の組み合わせの溶離液	12

AEC; 陰イオン交換クロマトグラフィー、RPC; 逆相クロマトグラフィー、IP; イオンペア、SEC; サイズ排除クロマトグラフィー、ACN; アセトニトリル、TEA; トリエチルアミン

## ●陰イオン交換クロマトグラフィー(AEC)における溶離液の選択<sup>2, 12</sup>

AEC 分離における分離不良、回収率が低い場合の溶離液の選択のポイントを以下に示します。

- 1) **緩衝液**；目標 pH で緩衝能力のある緩衝液を選択します。一般的に pH 8～pH 11 を用います。高アルカリ pH では NaOH 溶液を用います。pH 11 の溶離液、または pH 8～pH 11 の pH グラジエント分離で試料は変性し、二本鎖(Duplex)構造や G-リッチオリゴ核酸の高次(quadruplexes)構造が解消され、核酸は一本鎖構造となり吸着が弱まり溶出します。
- 2) **塩**；NaCl が一般的ですが、溶出力が強くカオトロピック効果の高い NaBr、または NaClO<sub>4</sub>（分析のみ、分取精製には不向き）を用いる場合があります。
- 3) **有機溶媒**；一般的に 10%～15%のアセトニトリル(ACN)を含む溶離液を用います。試料の疎水性が高い場合、有機溶媒濃度を 15%～30%に上げますが、溶離液中の塩が析出しない濃度で使用します。
- 4) **変性剤**；試料の変性には、1 mol/L 尿素を含む溶離液が効果的です。
- 5) **温度**；分析時の温度を、50 °C以上に設定することでオリゴ核酸は変性し一本鎖構造を取りやすくなります。

上記の溶離液条件を組み合わせて、修飾オリゴ核酸の分離や回収率を改善できる場合があります。

## ●参考文献、技術情報

1. M. Yu et al., Evaluating the oral delivery of GalNAc-conjugated siRNAs in rodents and non-human primates, *Nucleic Acids Res.*, 2024, 52, 5423-5437 <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf350>
2. A. A. Kazarian et al., Purification of N-acetylgalactosamine-modified-oligonucleotides using orthogonal anion-exchange and mixed-mode chromatography approaches, *J. Chromatogr. A*, 1661 (2022) 462679, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462679>
3. J. Hu et al., Modulation of TTR gene expression in the eye using modified duplex RNAs, *Nucleic Acids Res.*, 53 (2025) gkaf409, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf409>
4. J. Dugal-Tessier et al., Antibody-oligonucleotide conjugates: A twist to antibody-drug conjugates, *J. Clin. Med.*, 10 (2021) 838, <https://doi.org/10.3390/jcm10040838>
5. A. R. Nanna et al., Generation and validation of structurally defined antibody-siRNA conjugates, *Nucleic Acids Res.* 48 (2020) 5281-5293, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa286>
6. J. Wiener et al., Preparation of single- and double-oligonucleotide antibody conjugates and their application for protein analytics, *Scientific Reports*, 10 (2020) 1457, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58238-6>
7. S. M. G. Jirka et al., Cyclic peptides to improve delivery and exon skipping of antisense oligonucleotides in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy, *Molecular Therapy*, 26 (2018) 132, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.10.004>
8. S. G. Roussis et al., SEC x IP two-dimensional LCMS for the analysis of non-denatured and denatured cyclic peptide-siRNA in a single step, *J. Chromatogr. A*, 1740 (2025) 465552, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465552>
9. J. Ye et al., High-yield synthesis of monomeric LMWP(CPP)-siRNA covalent conjugate for effective cytosolic delivery of siRNA, *Theranostics*, 7 (2017) 2495, <https://doi.org/10.7150/thno.19863>
10. C. K. Schissel et al., Cell-penetrating D-peptides retain antisense morpholino oligomer delivery activity, *ACS Bio Med Chem Au*, 2 (2022) 150-160, <https://doi.org/10.1021/acsbiochemau.1c00053>
11. M.-A. Turcotte et al., RNA G-quadruplex reprogramming with guanine-rich antisense oligonucleotides inhibits monoamine oxidase B's translation, *ACS Bio Med Chem Au*, 5 (2005) 403-414, <https://doi.org/10.1021/acsbiochemau.5c00004>
12. B. Verheyen et al., Identification and impact of on-column higher-order structure formation during anion exchange purification of oligonucleotide, *Org. Process Res. Dev.* 2024, 28, 3248-3256, <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.4c00125>
13. 東ソー、テクニカルノート（トヨパール） No. 10 「核酸医薬品のクロマト精製は、これで決まり！」  
<https://separations.asia.tosohbioscience.com/lijip/%E3%83%86%E3%82%AF%E3%83%8B%E3%82%AB%E3%83%AB%E3%83%8E%E3%83%BC%E3%83%88/%E3%83%86%E3%82%AF%E3%83%8B%E3%82%AB%E3%83%AB%E3%83%8E%E3%83%BC%E3%83%88-toyopearl%E5%88%86%E5%8F%96%E7%94%A8%E5%85%85%E5%A1%AB%E5%89%A4>



TOSOH

※「トヨパール」、「TOYOPEARL」、「TOYOPEARL GigaCap」、「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) 6636-3733 〒104-0028 東京都中央区八重洲2-2-1  
大阪支店 人材担当 ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9  
名古屋支店 人材担当 ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7  
福岡支店 ☎(092) 710-6694 〒812-0011 福岡市博多区博多駅前3-8-10  
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2743-1

お問い合わせe-mail [tskgel@tosoh.co.jp](mailto:tskgel@tosoh.co.jp)

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>