

オリゴヌクレオチド原薬に含まれる不純物の調査研究

関口 光明^{*1}, 岡本 到^{*2}, 寺崎 真樹^{*3}, 廣瀬 賢治^{*3}, 大澤 昂志^{*4}, 山口 卓男^{*4},
吉田 徳幸^{*5}, 内田 安則^{*5}, 石田 和也^{*6}, 川上 純司^{*7}, 井上 貴雄^{*5}, 小比賀 聡^{*4, #}

(受付：令和7年12月11日，受理：令和8年5月26日)

Review of Impurities in Oligonucleotide Therapeutics and Their Formation Mechanisms

Mitsuaki SEKIGUCHI^{*1}, Itaru OKAMOTO^{*2}, Maki TERASAKI^{*3}, Kenji HIROSE^{*3},
Takashi OSAWA^{*4}, Takao YAMAGUCHI^{*4}, Tokuyuki YOSHIDA^{*5}, Yasunori UCHIDA^{*5},
Kazuya ISHIDA^{*6}, Junji KAWAKAMI^{*7}, Takao INOUE^{*5} and Satoshi OBIKA^{*4, #}

Summary

The number of oligonucleotide therapeutics approved in the U. S., Europe, and/or Japan has been steadily increasing, and a clear trend toward increased structural complexity is apparent. For example, various chemically modified nucleotides have been incorporated to enhance in vivo stability, and organ-specific drug delivery system ligands have been introduced into oligonucleotides targeting specific genes. Efficacy and safety are both critical issues for chemically synthesized oligonucleotides, and controlling impurities generated during production is essential for maintaining consistent product quality, minimizing batch-to-batch variation, and ensuring stable therapeutic effects. It is thus imperative to identify and manage impurities, such as products with incomplete sequences and synthetic by-products, necessitating the establishment of more precise quality-control methods.

Here, we aim to deepen understanding of impurities actually or potentially formed during oligonucleotide manufacturing by reviewing the oligonucleotide synthesis workflow and the separation modes used for purification, based on published reports and patents. The structures and formation mechanisms are described, as well as the manufacturing stages with which they are likely to be associated.

-
- *1 塩野義製薬株式会社 大阪府豊中市二葉町3丁目1-1 (〒561-0825)
SHIONOGI & Co., Ltd., 3-1-1 Futaba-cho, Toyonaka, Osaka 561-0825, Japan
 - *2 神戸天然物化学株式会社 兵庫県神戸市中央区港島南町7-1-19 (〒650-0047)
KNC Laboratories Co., Ltd., 7-1-19 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan
 - *3 日本ウォーターズ株式会社 東京都品川区北品川1丁目3-12 (〒140-0001)
Nihon Waters K. K., 1-3-12 Kita-Shinagawa, Shinagawa, Tokyo 140-0001, Japan
 - *4 大阪大学大学院薬学研究科 大阪府吹田市山田丘1-6 (〒565-0871)
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Osaka, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
 - *5 国立医薬品食品衛生研究所 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26 (〒210-9501)
National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan
 - *6 一般財団法人化学物質評価研究機構 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600 (〒345-0043)
Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI), 1600, Shimotakano, Sugito-machi, Kitakatsushika-gun, Saitama 345-0043, Japan
 - *7 甲南大学フロンティアサイエンス学部 (FIRST) 生命化学科 兵庫県神戸市中央区港島南町7-1-20 (〒650-0047)
Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University, 7-1-20 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan
 - # 責任著者 Corresponding author

Key words

Oligonucleotide, Process-related impurity, Product-related impurity, Starting material-related impurity, Analysis method, Chromatography, Mass Spectrometry, ICH guideline, Phosphoramidite, Solid-phase synthesis

1. はじめに

核酸医薬の活性本体はヌクレオシドがリン酸エステル結合を介して直鎖状に連結したオリゴヌクレオチドであり、核酸塩基の相補性を利用して疾患に関連する遺伝子（主としてmRNA）に配列特異的に結合することで、その発現を正あるいは負に制御することが可能になる。これまで特定の遺伝子変異に起因する希少疾患を対象にした開発が活発に行われており、2025年4月現在、日米欧のいずれかで22品目の核酸医薬品が承認に至っている¹⁾。核酸医薬に含まれるオリゴヌクレオチド原薬に注目すると、生体内での安定性向上のために多くの化学修飾ヌクレオチドが導入されている、あるいは標的遺伝子が存在する臓器特異的なDDSリガンド化合物とのコンジュゲート体であるなどオリゴヌクレオチド構造が複雑化していく傾向にある。そのため有効性及び安全性の観点から、高品質かつ高効率でオリゴヌクレオチド原薬を製造する技術の開発及びそれらを評価する分析技術の確立がより一層求められている。

国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業「核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発」プロジェクト（代表：小比賀 聡）では、産学官から33の企業・大学・機関が集まり、製造技術、分析技術、規制科学の観点から核酸医薬の実用化促進に向けた研究を行っている。本研究プロジェクトでは、オリゴヌクレオチド合成装置の開発並びに改良を行うと共に、オリゴヌクレオチドの高効率・高純度製造に向けた最適化研究と分離精製技術開発を行っている。そして液体クロマトグラフィー装置（LC）あるいは液体クロマトグラフィー/質量分析装置（LC/MS）を用いた不純物分析法の開発を行うと共に、オリゴヌクレオチド製造過程で生じる不純物の網羅的な解析を実施する中で見出した新たな不純物の同定及びその生成メカニズム解明に関する研究を推進している。

核酸医薬における不純物の管理基準については

ICHガイドラインには定められていないため、開発者はICHガイドラインの原則に従いながら品目ごとにケースバイケースでの対応が求められる。このような状況の中、国内では2018年に厚生労働省より審査管理課長通知「核酸医薬品の品質の担保と評価について考慮すべき事項について（平成30年9月27日付け薬生薬審発0927第3号）」²⁾並びにその質疑応答集（Q&A）³⁾が世界に先駆けて発出され、核酸医薬の品質確保を考える上で考慮すべき事項が整理されている。また2024年には欧州医薬品庁（EMA）から核酸医薬品の開発及び製造に関するドラフトガイドラインが発出されている⁴⁾。核酸医薬は化学合成にて製造されるため、製造中に生じる不純物を管理することによって製品品質の一貫性を担保すると共に、製造ロット間のばらつきを低減し安定した治療効果を保証することが重要である。また、効果的な品質管理戦略を構築するために、重要品質特性（CQA）の観点から、配列の完全性、二次構造の安定性、化学修飾の影響を考慮した品質管理が重要であり、得られた不純物の評価データを整理することで承認申請時の審査を円滑に進めることが期待できる。

そこで、オリゴヌクレオチド製造工程で生じる不純物について理解を深めるために、本総説ではオリゴヌクレオチド合成の流れ及び分析に用いられている分離モードについて概説すると共に、これまで報告されている論文や特許を中心にオリゴヌクレオチド原薬に含まれる不純物の調査研究を行い、製造工程に沿う形で不純物を分類して構造及びその生成メカニズムについて纏めた。なお、オリゴヌクレオチド原薬に含まれる不純物は、製造工程由来不純物と目的物質由来不純物に大別される。前者はオリゴヌクレオチド製造工程で使用する試薬や溶媒など、主に低分子成分由来の不純物であり、後者は目的物質であるオリゴヌクレオチド構造の一部が変化した不純物である。本総説における不純物とは、特別な言及がない限り、後者のオリゴヌクレオチド（目的物質）由来不純物を指すものとする。

2. オリゴヌクレオチド合成の流れ

本章ではオリゴヌクレオチド原薬に含まれるオリゴヌクレオチド由来不純物が生成する工程の理解を助けるために、その合成法の流れについて概説する。

オリゴヌクレオチド合成には、Fig. 1に示すように固相担体に対して出発原料であるヌクレオシドモノマー（ホスホロアミダイト体）を連続的に反応させるホスホロアミダイト法が汎用されている。ここで用いられる固相担体には、オリゴヌクレオチド3'末端に相当するヌクレオシドがあらかじめ担持されたプレロード担体の他、任意のホスホロアミダイト化合物を3'末端に導入することができるユニバーサル担体がある。前者はオリゴヌクレオチドの構成成分を含むため、オリゴヌクレオチド由来不純物が生成する要因となるヌクレオシド不純物の管理が必要になる。

一般にホスホロアミダイト合成法は固相合成に適用され、デブロック反応 (Detritylation)、カップリング反応 (Coupling)、酸化/硫化反応 (Oxidation/Thiolation)、キャップ化反応 (Capping) の四つの反応で構成される。プレロード担体の場合には、あらかじめ担持されたヌクレオシドの5'位保護基を酸性条件によって脱保護することからスタートする。その後、アミダイト体と活性化剤を混合することで担体上で伸長反応を行い、続いて垂リン酸トリエステル結合を酸化（あるいは硫化）して5'位リン酸エステル（あるいはチオリン酸エステル）結合とする。最後に、未反応となった5'位水酸基をアセチル基により不活化させることで1サイクルが終了する。目的とする配列に沿ったアミダイト体を連続的に投入し、合成サイクルを回すことで直鎖状のオリゴヌクレオチドが生成される。この時、各反応工程は一般的にはおよそ20分以下で完結し、使用する過剰な試薬類は洗浄操作で除去されるが、一連の合成サイ

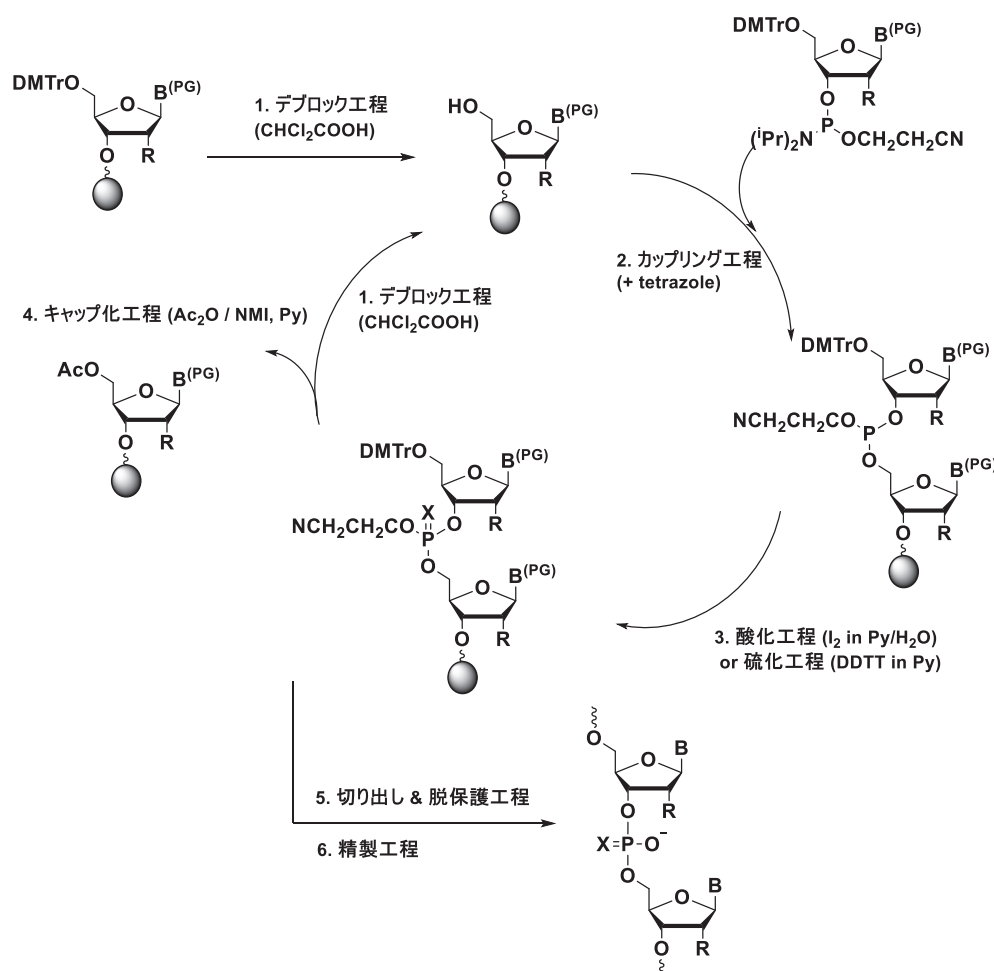


Fig. 1 固相オリゴヌクレオチド合成サイクル（ホスホロアミダイト法）

クル中に生じるオリゴヌクレオチド由来不純物は合成サイクルが終了するまで固相担体上に蓄積していくことになる。

合成サイクルが終了すると、固相担体に濃アンモニア水など塩基性溶液を室温下又は加温下にて通流させることで、オリゴヌクレオチドを担体から切り出すと同時に各保護基が脱保護される。得られた粗オリゴヌクレオチドは、その後の精製工程にて不純物が除去され、オリゴヌクレオチド原薬となる。

このような合成の流れを踏まえると、原薬に含まれるオリゴヌクレオチド由来不純物の生成ポイントはいくつかに分類できる。すなわち、①出発原料に含まれる不純物が反応する、②固相合成サイクルによる伸長反応で蓄積する、③固相担体からの切り出し工程で生成する、④精製工程における液性条件によって生じるケースの四つが考えられる。したがって、各工程の反応効率及び使用する原材料・試薬の品質は、得られるオリゴヌクレオチド原薬の純度に大きく影響することになる。

3. 不純物の分析法概要

オリゴヌクレオチドの分析にはゲル電気泳動やキャピラリー電気泳動、核磁気共鳴（NMR）分光法、ハイブリダイゼーション技術であるELISA、

定量的逆転写PCR、円偏光二色性（CD：Circular Dichroism）、融解温度（ T_m ：Melting Temperature）なども用いられるが^{5,6)}、本総説では化学的な性質によってオリゴヌクレオチドを分離する液体クロマトグラフィー（LC）と特異性高く不純物の質量関連情報を検出可能な質量分析（MS）法を組み合わせたLC/MS法についての概要を述べる。

LCベースの分析法は不純物を分離検出するための一般的な方法である。歴史的には陰イオン交換クロマトグラフィー（AEX）、イオンペア逆相液体クロマトグラフィー（IP-RP）、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、ミックスモードクロマトグラフィー（MMC）など様々な分離モードが報告されており、近年ではMS分析との適合性から親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）や上記の分離モード2種類以上を組み合わせた二次元液体クロマトグラフィー（2D-LC）の開発も増加している⁷⁻⁹⁾。

それぞれの分離モードにおいて親化合物と不純物との分離が検討され、数多くの論文で報告されているが、不純物標品の入手しやすさなどもあり、検討されている主な不純物は欠損体（N-1体）、付加体（N+1体）、ホスホロチオアート（PS）オリゴヌクレオチドにおけるジアステレオマー及びホスホジエステル（PO）置換体などである。まずはそれぞれの

Table 1 核酸医薬の液体クロマトグラフィーで用いられる分離モード

分離モード	分離原理	特徴	MS検出
陰イオン交換クロマトグラフィー（AEX）	電荷	・ PS/PO置換体の分離 ・ 同じ電荷をもった不純物の分離には限界 ・ 移動相に高濃度の塩	原則不可
イオンペア逆相クロマトグラフィー（IP-RP）	電荷・疎水性	・ 逆相カラムを用いるため分離能が高い ・ 揮発性のイオンペア試薬を用いればMS検出可能 ・ イオンペア試薬の選択などには試行錯誤が必要	条件付可
親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）	親水性	・ 不揮発性の塩を用いないのでMS検出可 ・ 有機溶媒の量が多くなるためMS感度が得られる	可
サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）	分子サイズ	・ サイズに応じた分離 ・ ハイブリダイズした二重鎖 siRNA への適用	原則不可
ミックスモードクロマトグラフィー（MMC）	主に電荷と疎水性	・ 単独の分離モードよりも分離を改善できる可能性 ・ 検討パラメータが多くなり、予測が困難	原則不可
二次元液体クロマトグラフィー（2D-LC）	2種類の分離モードの組み合わせ	・ 分離の直交性を利用 ・ 脱塩により AEX 移動相の高濃度の塩を除去することでMS検出が可能 ・ 脱塩により IP-RP 移動相のイオンペア試薬を除去することでMS感度を向上	可

分離モードの特徴について概説する (Table 1)。

3.1 陰イオン交換クロマトグラフィー (AEX)

陰イオン交換クロマトグラフィー (AEX) は局所的な電荷分布の違いに基づいて分離することができ、長年にわたって汎用されている技術である。欠損体の分離¹⁰⁾や、PSオリゴヌクレオチドがPOオリゴヌクレオチドよりも陰イオン交換体に強く保持されることを利用したPS/PO置換体の分離、ジアステレオマーの分離などがさまざまな条件で達成されている¹¹⁻¹³⁾。一方で保持メカニズムが電荷に基づいているため、ジアステレオマーのように同じ電荷をもった不純物に対する分離には限界もある⁷⁾。また、オリゴヌクレオチドはポリアニオン性であるため、溶出の際の移動相に高濃度の塩が必要となり、塩の沈殿を防ぐために有機溶媒を使用しないことも多く、MSと組み合わせる際にはオフライン脱塩や2D-LCでのオンライン脱塩などが必要となる⁸⁾。

3.2 イオンペア逆相クロマトグラフィー (IP-RP)

イオンペア逆相クロマトグラフィー (IP-RP) では、主に疎水性のC18 (ODS) 固定相が使用されるが^{9, 14)}、オリゴヌクレオチドは強い極性と電荷を持ち、ほとんど保持されないため、移動相にイオンペア試薬が用いられる¹⁵⁾。イオンペア試薬を用いた際のカラムへのオリゴヌクレオチドの保持を説明するためにいくつかの理論モデルが提案されている^{16, 17)}。イオンペアモデルではカラムに吸着する前に移動相中でイオンペア試薬の正電荷とオリゴヌクレオチドの負に帯電したホスホジエステル骨格との間でイオンペアが形成され、逆相カラムに保持される。一方、静電的保持モデルではイオンペア試薬の正電荷を帯びた疎水性イオンが逆相カラムの固定相の非極性表面に吸着し、その結果として表面近傍にイオンペア試薬の極性基とカウンターイオンによって過剰な正電荷を持つ電気二重層が形成され、その電気二重層にオリゴヌクレオチドが保持される¹⁸⁾。オリゴヌクレオチドの保持と分離はイオンペア試薬の種類と濃度、カウンターイオン、移動相のpH、カラム温度、固定相などの影響を受け¹⁹⁻²²⁾、溶出はアセトニトリル又はメタノールなどの有機溶媒の濃度を増加させることで行われる。

アルキルアンモニウム塩は優れたイオンペア試薬であり、従来から酢酸トリエチルアンモニウム (TEAA) が一般的な試薬であったが、TEAAはエレクトロスプレーイオン化を抑制しLC/MS分析には理想的ではない²³⁾。そのため揮発性が高くpKaが高いために、通常使用される高いpH下でイオン化し、カウンターイオンとして機能する^{24, 25)}弱酸性のヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) の導入につながり^{26, 27, 32)}、TEA/HFIPがオリゴヌクレオチドのLC/MS分析に広く使用されるようになった。

その後も20年以上にわたり、核酸の分離におけるイオンペア試薬の有用性が研究され、クロマトグラフィー分離能の向上とMS感度の向上が目指された。その過程では、PSオリゴヌクレオチドのように、ジアステレオマーの存在によって分離が複雑になる化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドに特別な注意が払われた^{14, 33, 34, 35)}。一方で、数多くの報告があるにもかかわらず、イオンペア試薬の選択などは依然として試行錯誤のプロセスである。これには最適化の目標の違い^{14, 34)}、移動相のpHや有機溶媒の違い^{19, 23, 30)}、使用されたオリゴヌクレオチドの配列や化学修飾の違い^{15, 21, 28, 29, 31, 37, 38)}などの複数の要因によって、結果を比較することが困難となっていることも原因である。そのため、様々なイオンペア試薬の性質と濃度がオリゴヌクレオチドの分離に与える影響を系統的に検討した報告も行われているが³⁹⁾、依然として個別の不純物の分離の最適化には詳細な検討が必要となる。

3.3 親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)

親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) は、順相クロマトグラフィーのバリエーションで極性分子の分析のために用いられる技術である。イオンペア試薬を使用せず、移動相中の揮発性有機溶媒の量が多くなるためIP-RPと比べて高いMS感度が得られるという利点がある⁴⁰⁾。HILICをオリゴヌクレオチドの分離に応用したのは1990年のAlpertである⁴¹⁾。近年までイオンペア逆相モードと比較するとオリゴヌクレオチド分離への利用は限られていたが^{42, 43)}、そのMSとの適合性とイオンペア逆相モードとは疎水性に基づく溶出順が逆になることや、PS/PO置換体の選択性がイオンペア逆相モード・イ

オン交換モードとは異なることなどから、2D-LCへの応用も含めて利用が増加してきている^{7, 44, 51)}。

3.4 サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、相互作用を介したプロセスではなく、理論的には流体力学的半径の違いに基づいたサイズに応じて分離する。そのため、SECは主にハイブリダイズした二重鎖 siRNA に含まれるハイブリダイズしていない一本鎖の定量に用いられてきた^{44, 45)}。IP-RPとも比較されており、測定された一本鎖の相対量が二つのLCモードの間でよい一致が見られたと報告されているが、IP-RPは変性条件を使用するため、一本鎖の割合が多くなる可能性があることにも注意が必要である⁹⁾。更にPSオリゴヌクレオチドの構造を分離するために利用された例もある⁴⁶⁾。

3.5 ミックスモードクロマトグラフィー (MMC)

ミックスモードクロマトグラフィーは、固定相と分析対象物の間に複数の相互作用モードが存在するタイプの分離法である^{10, 47, 48)}。この分離法では、固定相は二つ以上の相互作用部位を持つ。オリゴヌクレオチド分析では逆相分離モードとイオン交換分離モードが使用され、電荷、極性、疎水性に基づく複数の保持メカニズムを提供できるため、単独の分離モードよりも分離を改善できる可能性があるが、検討するパラメータも多くなり、溶出順序の予測も困難となることが注意点としてあげられる¹⁰⁾。

ミックスモードを用いた不純物の解析例としては、一箇所塩基が入れ替わったオリゴヌクレオチドや一塩基が置換されたオリゴヌクレオチドの分離を実証した例や^{10, 48)}、二つのPS修飾を持つGalNAcコンジュゲートRNAに適用され、コンジュゲートの部分的なジアステレオマー分離を達成した例があげられる⁴⁷⁾。

3.6 二次元液体クロマトグラフィー (2D-LC)

2D-LCはAEX, IP-RP, HILIC, SECなどの2種類の分離モードを組み合わせたもので、個別の分離モードでは選択性が十分でなく近縁のオリゴヌクレオチドが共溶出するため、直交分離を利用して、ピークキャパシティーと分離能を向上させてい

る⁴⁹⁾。実際のオリゴヌクレオチドの分離への応用や、その基礎となる分離モード間の分離の直交性を評価した報告も増加している。また、オンライン脱塩によりAEX移動相の高濃度の塩を除去することでMS内部への流入による汚染を防ぎMS検出を可能にする。IP-RP移動相のイオンペア試薬を除去する場合には、MS感度を向上させることが期待できる。更にHILICが親水性核酸塩基と修飾に対する保持やPS/PO不純物に対する選択性の違いからAEX又はIP-RPと高い直交性を提供するため、AEXとHILIC, IP-RPとHILICの組み合わせでの開発が増加していくと予想されている⁹⁾。

3.7 個別の製品関連不純物の分離

上述したいずれの分離モードの報告も、製品関連不純物をファミリーレベルで分離することに集中しており、特定の不純物ファミリーのメンバーを区別している報告は比較的少ない。先にあげたミックスモードを用いた分析と^{10, 47, 48)}、IP-RPでPOオリゴヌクレオチド中の不純物の分離を改善するために様々なアルキルアミンをスクリーニングした結果、CNET (N^3 -(2-cyanoethyl)thymine), OPC (3-(2-oxopropyl)imidazo[1,2-*c*]-5-methylpyrimidin-6*H*-one), 脱アミノ化, N-1体の位置異性体を分離できた例などがあげられる²⁹⁾。IP-RPの例では低級アミンの使用によって分離の向上を達成しているが、PSオリゴヌクレオチドの分析ではホスホロチオアート結合に由来するジアステレオマーが多く含まれるためピークがブロードとなり、同じ手法を適用できない。そのため、前処理でヨウ素を加えて脱硫を行い、POオリゴヌクレオチドにすることで適用可能となるとしている²⁹⁾。

3.8 MSで生じるアーティファクトとしての不純物

合成工程や保存過程ではなくLC/MS分析中に生成され、分析アーティファクトとみなされる生成物関連不純物もある。溶液中におけるPSオリゴヌクレオチドの脱硫すなわちPS結合のPOへの変換はよく知られているが、脱硫はMS分析中にも起こる可能性があり、不純物の過大評価につながる⁵⁰⁾。ホスホロチオアート骨格は、エレクトロスプレーイオン化の際にコロナ放電によって生成するヒドロキシ

ラジカルなどの活性酸素種と反応する可能性がある。これにより、ホスホレン中間体を介してPSがPOに変換される。脱硫の程度は、ホスホロチオアートとヒドロキシラジカルのモル比に依存する。LCの流速を上げる、注入するオリゴヌクレオチドの量を増やす、エレクトロスプレーの電圧を下げるなど、イオン化の際に発生する脱硫が減少することから、MS分析中に起こっているかを確認することができる^{32, 51)}。

気相での脱プリン化もまた分析中に発生するアーティファクトである。高いエレクトロスプレー電圧を印加すると、グリコシド結合を切断するために十分なエネルギーを分子に与えてしまう。検出される脱プリンのレベルはエレクトロスプレー電圧に比例する。気相中の脱プリン化は、水と反応しないため溶媒和されないで、溶液中での脱プリン化よりも分子量が18 Da小さい⁵²⁾。そのため、例えばアデノシンの気相での脱プリン化（質量は親化合物より135 Da小さい）が溶液中のグアノシンの脱プリン化（質量は親化合物より133 Da小さい）に近い質量を示すことにも注意することが重要である⁵¹⁾。

また、アーティファクトではないが、エレクトロスプレーイオン化はオリゴヌクレオチドの全イオンシグナルを分散させる電荷状態のエンベロープを作り出し、それはまた同位体分布に細分化される。更に、オリゴヌクレオチドのようなポリアニオンは、オリゴヌクレオチド骨格のリン酸基又はホスホロチオアート基のH⁺をNa⁺やK⁺に交換する傾向がある。H⁺とアルカリ金属⁺の交換の結果、多価のオリゴヌクレオチドイオンは、ナトリウム交換では m/z 22/nの差、カリウム交換では m/z 38/nの差（nはイオンの電荷状態）を持つ複数の陽イオン含有種の間で更に分散する。複数の電荷、同位体分布、アルカリ交換を合わせると、MSシグナルが少なくとも50以上のチャンネルに分散していることになり、これらは検出感度や不純物との質量分離に影響を与える²⁵⁾。そのため、LC/MS分析の際にはガラス器具などからのアルカリ金属の混入にも注意が必要となる。

4. 各工程由来の不純物について

本章ではオリゴヌクレオチド原薬中に含まれる不

純物について、一連のオリゴヌクレオチド合成サイクルの各工程で発生する代表的な不純物について取り上げ、生成機構や低減策、分析例が知られているものについてあわせて解説する。なお本章で取り上げた不純物をはじめ関連する不純物について構造及び親化合物からの質量差についての一覧表（Table 2）を附した。

4.1 デブロック工程

4.1.1 脱プリンに関連する一連の副反応（entry 12, 13）

酸性、塩基性及び酸化ストレス下においてゲノムDNAのプリン塩基が脱離してabasic部位を生成することはよく知られている。核酸医薬の製造においては、合成サイクル中に含まれるデブロック工程はDMTr基を脱離させるために酸性条件を使用しているため、（特にDNA中の）アデニン塩基あるいはグアニン塩基が脱プリン反応を起こし、abasic部位を形成する可能性がある^{53, 54)}。

デプリネーションとして知られるこの脱プリン反応は、酸性条件下でデオキシグアノシン及びデオキシアデノシンでグリコシル結合の切断が引き起こされることで生じる。すなわちプリン塩基の7位のプロトン化が引き金となりプリン塩基の脱離が起こり、生じたオキソカルベニウムイオンに水が攻撃することでデオキシリボースとなる（Fig. 2）。

酸性条件下で促進される反応であることから、DMTr基を脱離させるために使用されるジクロロ酢酸やトリクロロ酢酸を数パーセント含むデブロック試薬とオリゴヌクレオチドの長時間の接触や、長鎖のオリゴヌクレオチド合成では脱プリン反応については特に注意が必要である⁵⁴⁾。また3'末端側にリン酸基を持たず固相担体に導入された状態のデオキシアデノシン残基は脱プリン反応を引き起こしやすい事も知られている⁵⁵⁾。

なお脱プリン反応により生じたabasic部位は開環型と閉環型の互変異性体の状態をとりうるが、開環型のアルデヒド型でsyn型のβ脱離反応により鎖の切断が起こり、5'末端にリン酸基が残った断片を生じさせることとなる⁵⁶⁾。また鎖切断後に生じた3'末端側にα、β不飽和アルデヒドをもつもう一方の断片は、δ脱離反応を経由して3'末端にリン酸基をもつ断片と4-オキソ-2-ペンテナールが生じる（Fig.

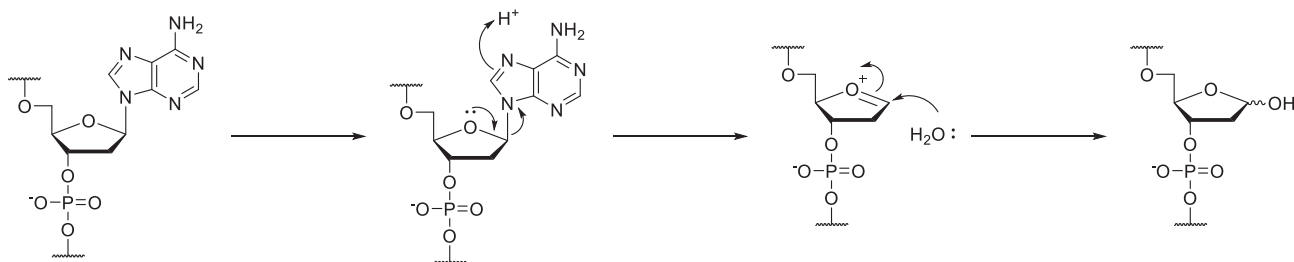


Fig. 2 酸性条件下での脱プリン反応

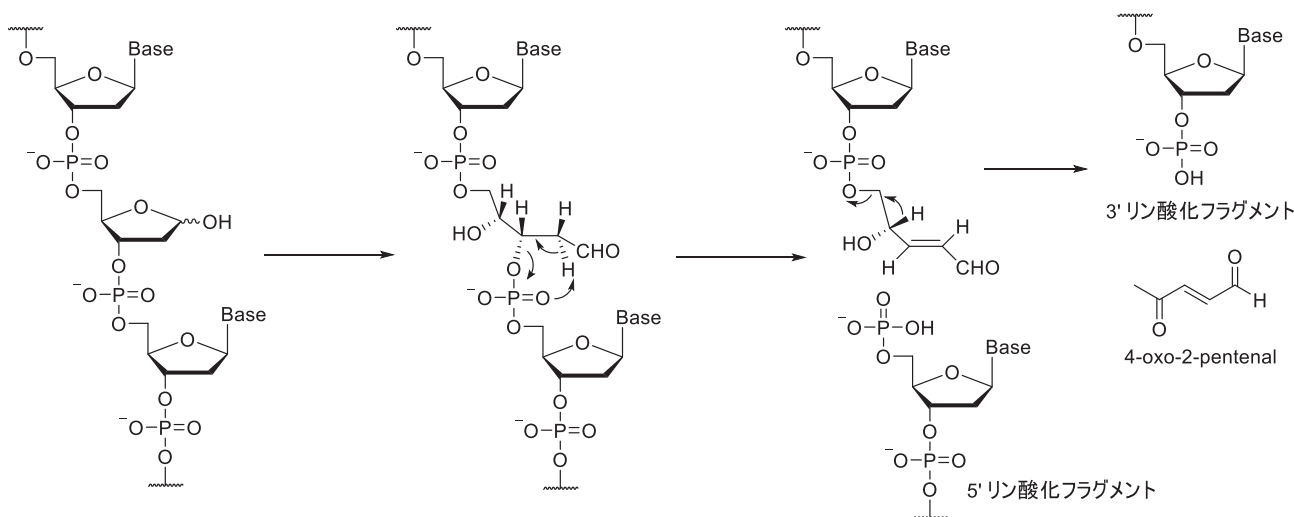


Fig. 3 Abasic部位の分解と鎖切断

3). これらの一連の反応は、塩基性条件や加熱により引き起こされることから、鎖切断された断片は切り出し脱保護時に生じると推測される。α, β不飽和アルデヒドをもつ断片や4-オキソ-2-ペンテナルは核酸塩基部への反応性を有しており、これら由来の不純物が生じる要因となるがそれらについては後述する。

なおアデニン塩基の脱プリン反応は6位の環外アミノ基の電子求引性が強いと促進されることから⁵⁷⁾、デオキシアデノシンの保護基として良く使用されるアシル型の保護基を、電子供与性のアミジン型保護基へと変更することで抑制できることが報告されている。またアシル型の保護基であるが*tert*-ブチルフェノキシアセチル基は一般的に使用されているベンゾイル基よりも脱プリン反応に抵抗性を示し、アミジン型の*N,N*-ジメチルホルムアミジル基(dmf基)に匹敵する脱プリン反応の抑制効果をもつことが報告されており⁵⁸⁾、この副反応を抑制する選択肢の一つと考えられる。

デブロック試薬への接触時間の増加は脱プリン反応を引き起こすため、この副反応を抑えるには、デブロック反応を完全に進行させつつ、接触時間を出来る限り最小化する必要があると考えられる。しかしながらデブロック工程中に酸性試薬がオリゴヌクレオチドに結合する上に⁵⁹⁾、配列長や塩基組成などもデブロック反応に影響するなど複数の要素が反応に関連するため、一定したデブロック条件を合成の最初から最後まで適用することは難しい。デブロック工程に使用する酸性試薬であるジクロロ酢酸やトリクロロ酢酸のジクロロメタン溶液について、デブロック反応及び脱プリン反応に及ぼすそれぞれの濃度の影響が調べられており、トリクロロ酢酸より弱いジクロロ酢酸を高濃度(15%)で使用するほうが、薄い濃度(3%)でそれらの酸を使用するより効果的であることが報告されている⁵⁵⁾。また製造に使用されるデブロック試薬はジクロロ酢酸のトルエン溶液であるが、トルエン溶液中でも高濃度のジクロロ酢酸を使用する方が効果的であるとされてい

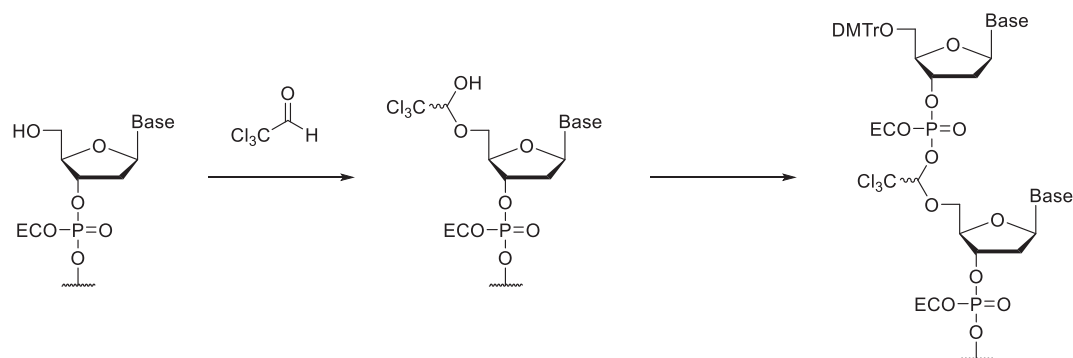


Fig. 4 クロラル挿入体の生成

る⁶⁰⁾。

4.1.2 トリクロロアセトアルデヒド修飾体 (entry 28)

Capaldiらのグループは、市販のジクロロ酢酸をジクロロメタン又はトルエンに溶解させたデブロック試薬は、ジクロロ酢酸由来の低濃度のトリクロロアセトアルデヒド（クロラル）を含んでいることがあり、このクロラルが原因となり+147 Daの不純物が生じることを報告している⁶¹⁾。クロラルはデブロック工程で生じるオリゴヌクレオチド5'末端の遊離ヒドロキシル基と反応し、ヘミアセタールを形成する。デブロック工程の次の工程はカップリング工程であることから、ヘミアセタールの水酸基に対して、アミダイトユニットがカップリングするとクロラル挿入体が形成され+147 Da相当の不純物となる (Fig. 4)。

300 ppmのクロラルを含む3%ジクロロ酢酸/トルエン溶液を使用すると約2%のM+147 Daの不純物が生じ、クロラル濃度が100 ppmでは1%以下に減少することが報告されている。したがって副反応を抑えるにはクロラルの含量を低く保つことが重要であり、蒸留精製したジクロロ酢酸を使用することが解決策の一つとされている。また10%ジクロロ酢酸/トルエン溶液のようなより高濃度なデブロック試薬により、デブロック工程の時間を短時間にすることも副生を抑えることができると考えられている。

4.1.3 DMTr-Cホスホネート体の副生 (entry 29, 30)

カップリング反応後の垂リン酸トリエステルの酸化又は硫化が不完全な場合、デブロック工程でDMTr-Cホスホネートエステルが発生することが

報告されている⁶²⁾。デブロック工程で生成する遊離のDMTrカチオンは、不完全な酸化又は硫化によって残存しているホスファイトトリエステル中間体と反応し、DMTr-Cホスホニウムイオンを生じる (Fig. 5)。このホスホニウムイオンは、トリエステル部位の結合がアルブゾフ型の反応により切断を受けることで、3種類の不純物を生じさせる (Fig. 6)。すなわちN-1量体、DMTr-Cホスホネートを主鎖骨格にもつ不純物、5'末端にDMTr-Cホスホネートをもつ断片がそれぞれ発生する。DMTr-Cホスホネート構造が組み込まれたオリゴ不純物は、DMTr基の脂溶性の性質から逆相HPLC上では目的物より保持時間が遅く溶出される傾向があることが示されている。

4.1.4 デブロック剤由来のPS/PO変換体 (entry 27)

デブロック剤として使用されるトリクロロ酢酸溶液に微量含まれるホスゲンがホスホロチオアート結合と反応し、ホスホロチオアート結合からホスホジエステル結合へと変化する機構が報告されている⁶³⁾。合成サイクル中にキャッピング剤由来の塩基性成分によって一部脱シアノエチル化されたホスホロチオアート結合の硫黄原子に対して、ホスゲンが反応しクロロチオホルマートを形成、続いて生じるリン酸クロリド体の加水分解によりホスホジエステル結合へと変換されるというものである (Fig. 7)。長期保存されたトリクロロ酢酸溶液の使用を避けることで回避することができる。

4.2 カップリング工程

もっとも一般的な不純物の一つであるN-1量体は目的物質と一残基のみ欠損した配列で構成され

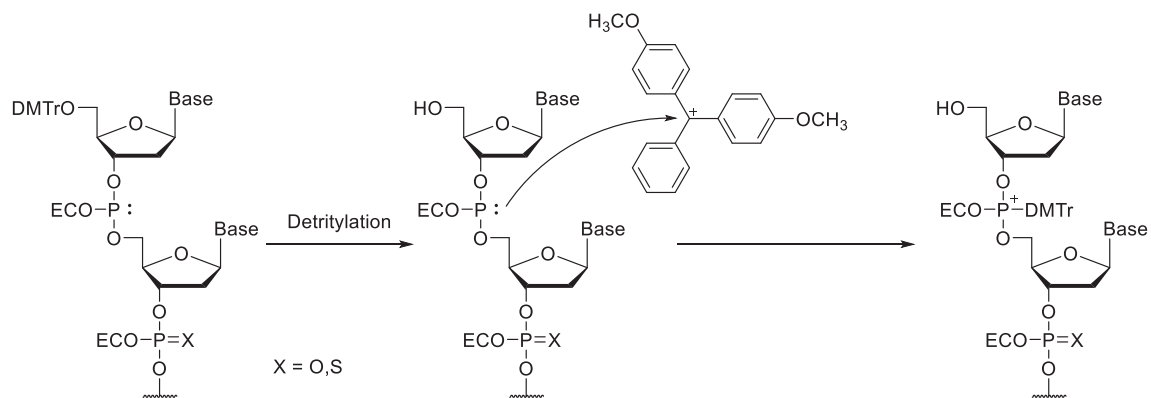


Fig. 5 DMTr-Cホスホネートの生成

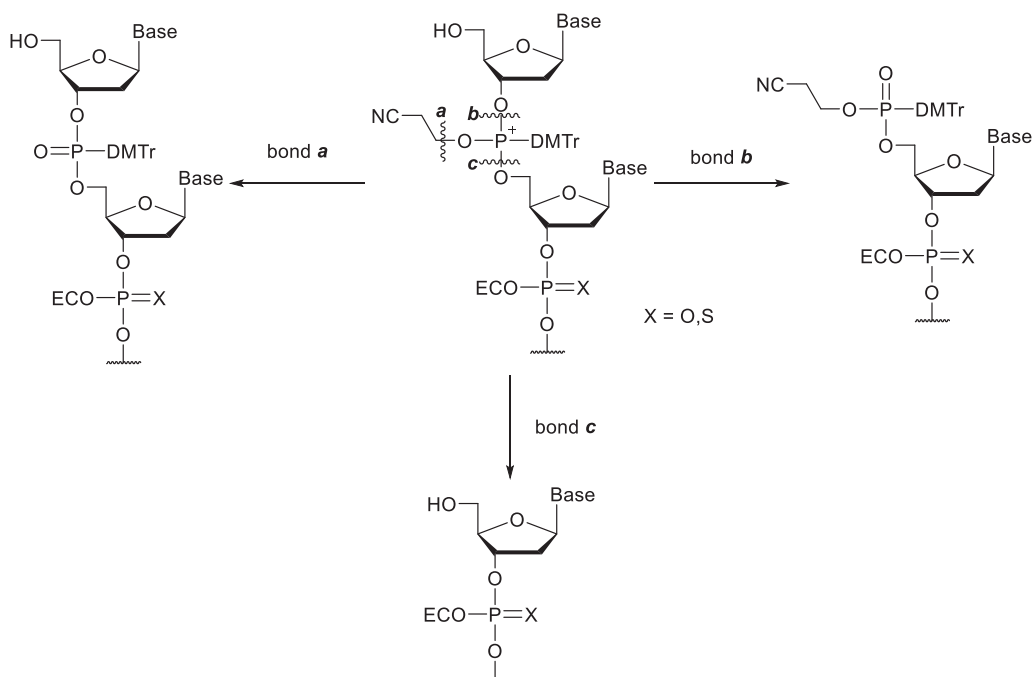


Fig. 6 DMTr-Cホスホネートの分解

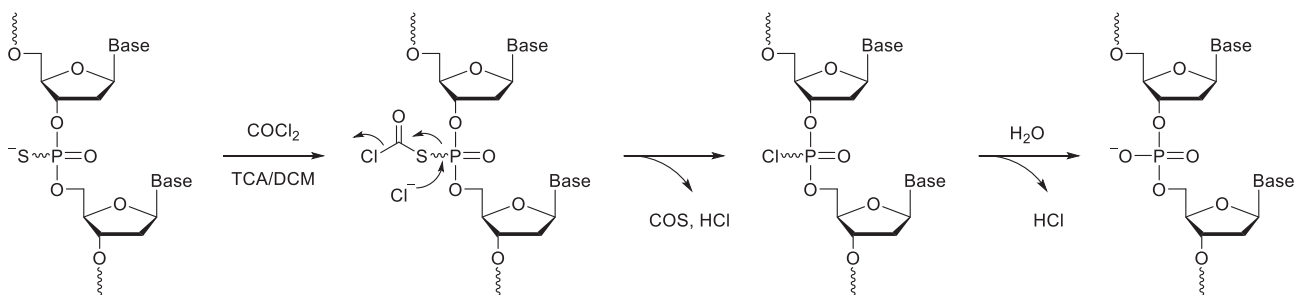


Fig. 7 TCA由来のホスゲンによる脱硫反応

る。物理化学的な特徴が目的物質とN-1量体は類似することから、分離・精製が困難な不純物である。そのため、合成サイクルの最適化により極力抑制すべき対象であり、その発生要因を理解することは重要である。N-1量体はカップリング不良によって発生することよりむしろデブロック、カップリング、酸化・硫化、キャップ化の各工程にまたがって発生要因が複数存在する不純物である。また使用する固相担体にも発生要因が存在する。N-1量体及びN+1量体について、カップリング工程が関与する不純物という扱いでこの項で取り上げるが、特にN-1量体については、上述したように合成サイクル中の各工程にまたがって要因が存在することから、工程ごとのN-1量体の生成要因についてもこの項目で説明する。

4.2.1 デブロック工程由来N-1量体

オリゴヌクレオチドの合成サイクルはデブロック工程から開始されるが、デブロック反応が完全に進行していないと、一部のオリゴヌクレオチドはDMTr基によって5'水酸基が保護されたままの状態となる。このDMTr保護されたオリゴヌクレオチドは次のカップリング工程でアミダイトユニットとの反応ができないため、鎖伸長が起こらないまま一連の合成サイクルを経て、次のサイクルを迎える。次のサイクルのデブロック工程でDMTr基が除去されると、鎖伸長が可能となり、結果としてデブロック工程が不十分であったサイクルに由来するN-1量体が生成する。

4.2.2 カップリング工程由来N-1量体

ホスホロアミダイト法のカップリングは一般には99%以上の高い効率で進行するとされるが、カップリングが進行しなかった一部のオリゴヌクレオチドはカップリング工程の直後には未反応の5'水酸基を有している。この水酸基に対して次の鎖伸長サイクルでのカップリングを防止するため、通常は合成サイクルの最後に水酸基をキャップ化する反応が行われる。キャップ化が不十分である場合、カップリング不良によるN-1量体が生じることとなる。またDMTr-OFF合成を行う場合、完全長のオリゴヌクレオチドに対して、最後のアミダイトユニットの導入時のカップリング不良で生じる5'末端のヌクレオチド残基が欠落したN-1量体は分離しにくい不純物として混入する可能性が高い事にも留意が必要で

ある。

4.2.3 酸化・硫化工程由来のN-1量体

カップリング後に形成されるホスファイトトリエステル部分の酸化・硫化が不十分な場合、次のデブロック工程でDMTr-Cホスホネートが生じることが既に紹介したが、DMTr-Cホスホネートが分解する際に、N-1量体が発生しうる経路が存在する。すなわちFig. 6で図示したbond *c*が切断された場合、上流側の残基が欠損して5'水酸基が生じ、次のサイクルで鎖伸長が可能な形となるため結果としてN-1量体が生じることとなる。

4.2.4 キャップ化工程由来のN-1量体

既にカップリング工程由来のN-1量体の項でも述べたが(4.2.2)、カップリングによる鎖伸長が起こらなかった場合、未反応の5'水酸基が残る。この水酸基のキャップ化が不十分な場合、次の合成サイクルでの反応点となり結果的にN-1量体が発生する。

4.2.5 固相担体由来のN-1量体

ここまで紹介してきた合成サイクル由来のN-1量体とは異なるが、固相担体の性質が原因で3'末端の残基が欠損した二通りのN-1量体が発生することがある。3'末端のヌクレオシドが欠落し3'末端にリン酸又はチオリン酸をもつN-1量体が生じる場合と、3'末端の残基がヌクレオチドとして欠落したN-1量体が生じる場合である (Fig. 8 B, C)。

3'側に導入されるヌクレオシドがプレロードされた担体では、3'末端側が1残基欠損し、3'末端にリン酸又はチオリン酸が結合したN-1量体が発生することがある。固相担体の表面の反応性残基が十分にキャップ化されていないとアミダイトユニットがリンカーを介して導入されたヌクレオシドの5'水酸基ではなく、固相担体表面に存在する水酸基やシラノールに対しても反応し、3'末端側が1残基欠損したN-1量体がホスホジエステル結合又はホスホロチオアート結合を介して担体上に形成される。その後の切り出し時にリン酸と固相担体間の結合が切断されることで3'末端にリン酸又はチオリン酸が結合したN-1量体として遊離してくる。ポリスチレン系の固相担体では、プレロード担体を調製した際に、アミノ基や水酸基は無水酢酸等で容易にキャップ化されるため、このようなN-1量体の発生の可能性は低い。一方、Controlled Pore Glass (CPG) を担体として使用する場合はシラノール基のキャップ

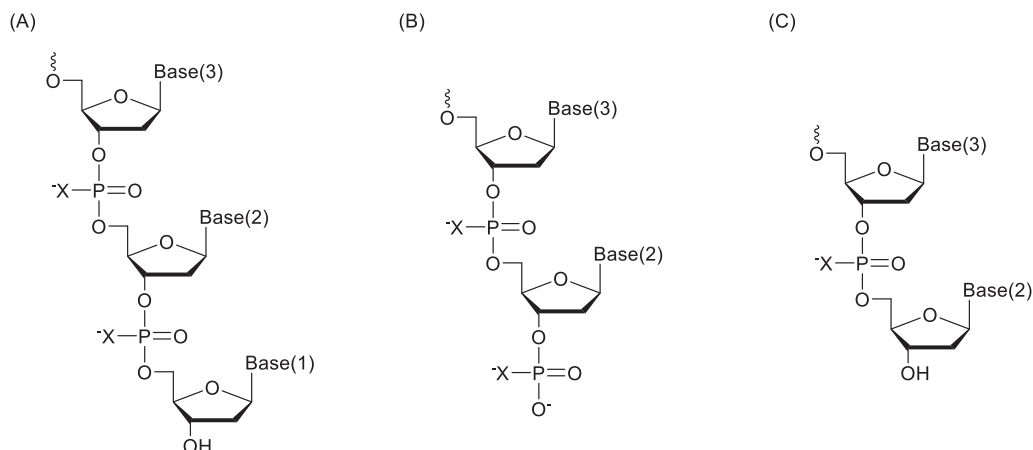


Fig. 8 (A) 完全長の3'末端構造 (B) 3'末端のヌクレオシド欠損体 (C) 3'末端のヌクレオチド欠損体

化が難しく、核酸合成で使用される一般的なキャップ化剤ではキャップ化されにくいいため、このようなN-1量体が発生しやすい。シラノール基をキャップ化するためにアミダイト型のキャッピング剤を使用することでN-1量体を低減する方法が報告されている^{64, 65)}。

また、ユニバーサルサポート担体を使用する際には、UnyLinker™に導入されたDMTr基のデブロック反応が不十分な場合、3'末端が欠損したN-1量体が生じる。UnyLinker™のジオール部に導入されたDMTr基は二級水酸基に導入されている形であるため、プレロードされたヌクレオシドやアミダイトユニットの5'水酸基のDMTr基より除去されにくい。UnyLinker™に対して最初のアミダイトユニットを導入する前にはDMTr基を完全に脱保護する必要がある。またデブロック工程後に生じたUnyLinker™上の二級水酸基は、アミダイトユニットやキャップ剤に対しても5'水酸基よりも反応性が劣るため、より長い反応時間などが必要である。このようにUnyLinker™を使用する際にはカップリングやキャップ化の条件によってはN-1量体が発生する要因となることに留意する必要がある。

また、デオキシアデノシンやデオキシグアノシンが導入されたプレロード担体を使用する場合、3'末端プリン塩基が脱プリン反応を起こすことによって3'末端が欠損したN-1量体が生じる。デブロック工程由来不純物の項でも触れたが、3'末端側にリン酸基を持たず固相担体に導入された状態のデオキシアデノシン残基は脱プリン反応を引き起こしやすいこ

とと、3'末端はデブロック試薬に接触する累積時間が最も長いことに注意が必要である。アデニン塩基のアミノ基を介して固相担体と結合した担体を使用することでこのN-1量体の発生を回避する方法が提案されている⁶⁶⁾。

4.2.6 N+1量体

カップリング工程では本来1残基のみ伸長されなければならないが、さらなるカップリングが発生し、目的とする鎖長より長いロングマー(N+1, N+2量体など)が生じることが知られている⁶⁷⁾。カップリング工程ではアミダイトユニットと活性化剤として酸性物質が使用されるが、アミダイトユニットは酸性条件で脱保護されるDMTr基をもつため、活性化剤によりカップリング反応中に一部のDMTr基が脱落する可能性がある。DMTr基の脱落により生じた5'水酸基に対して更にカップリング反応が進行するとN+1量体となる。この副反応は活性剤の酸性度やアミダイトユニットのDMTr基の外れやすさ、カップリング時間などに依存すると考えられる。Krotzらはエチルチオテトラゾール(pKa=4.28)を使用するとテトラゾール(pKa=4.89)よりN+1量体が増加する事を報告している⁶⁷⁾。また彼らは配列の組成にN+1量体の生成が依存していることも示しており、DMTr基の除去されやすい塩基ほどN+1量体の発生が多くなることを見出している。

4.3 酸化・硫化工程 (entry 27)

カップリングに引き続いて行われるリン酸部位の酸化・硫化工程では、反応が十分でない場合、デブ

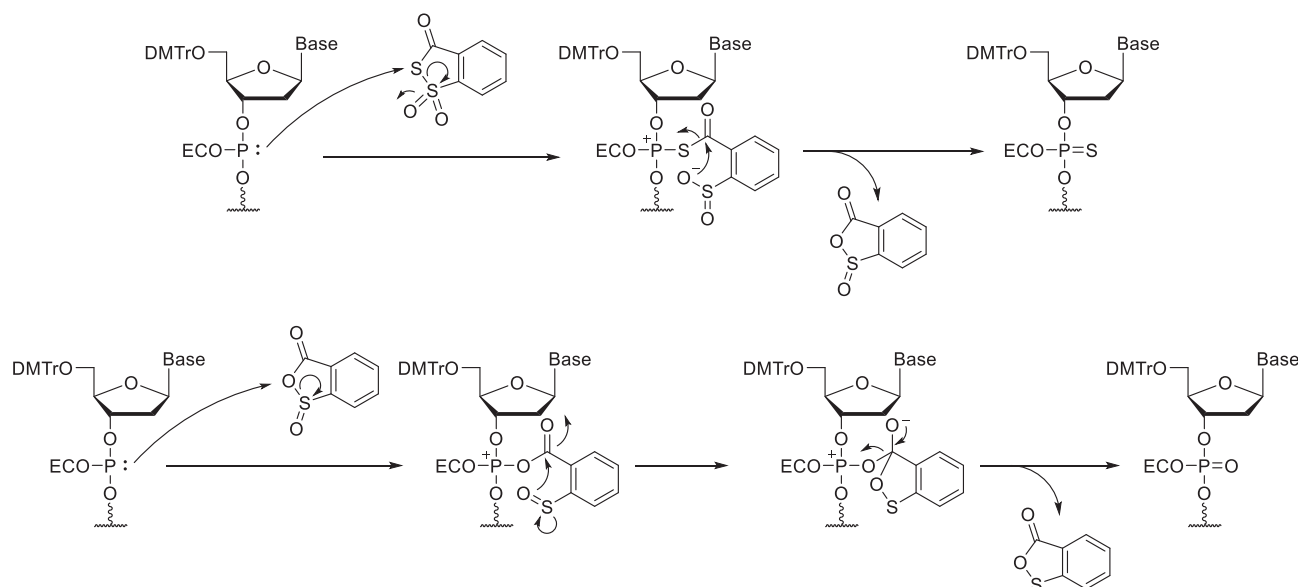


Fig. 9 Beaucage Reagentによる硫化反応（上段）と副成物による酸化反応（下段）の推定反応機構

ロック工程の段階でDMTr-Cホスホネートが生じることが知られており、この副反応については既述した。この工程、特に硫化の際に生じる可能性がある代表的な不純物としては、DMTr-Cホスホネートを除くとホスホジエステル体が挙げられる。ホスホロチオアートオリゴを合成する際に使用される硫化剤は多数報告されてきているが、かつてホスホロチオアートオリゴの合成や製造に最も良く使用されてきた硫化剤であるBeaucage試薬^{68, 69)}は硫化反応後に生じる副成物によりホスホジエステル体が生じる（Fig. 9）。実際にBeaucageらはこの副成物がトリメチルホスファイトと反応し、対応するトリメチルリン酸を与えることを確認しており、ホスホジエステル体副生の要因であることが示されている⁶⁹⁾。

上記のような問題があるためBeaucage試薬に代わり、製造で使用可能な硫化剤の開発がすすめられ、現在のオリゴヌクレオチド製造ではビス（フェニルアセチル）ジスルフィド（PADS）や5-アミノ-3H-1,2,4-ジチアゾール-3-チオン（ADTT）といった硫化剤の使用が主流である^{70, 71)}。なおPADSについては、十分な硫化効率を得るには試薬の調製後にエイジングを行う事が必要で、調製したての試薬溶液を使用するとホスホジエステル体やDMTr-Cホスホネート体の副生が多くなることが報告されている⁷²⁾。

4.4 キャップ化工程

4.4.1 グアニン塩基の保護基の交換反応 (entry 3)

グアニン塩基のN2位はイソブチリル基が保護基として汎用されているが、無水酢酸が含まれるキャップ剤により、アセチル基へと保護基が交換されアセチル保護体となることが知られている（Fig. 10）。このアセチル保護体は通常の脱保護条件に対してイソブチリル保護体より安定であることが知られており、+42 Daの不純物の発生要因となる。イソ酪酸無水物をキャップ化剤として使用することで、保護基のアセチル基への交換を防止し+42 Daの不純物を抑えることができるとされている⁷³⁾。

4.4.2 グアニン塩基から2,6-ジアミノプリン誘導体への変換 (entry 4, 5, 6)

Rodriguezらはオリゴヌクレオチド合成のキャッピング工程で汎用されるアセチルキャッピング剤（無水酢酸、N-メチルイミダゾール）の影響により、グアニン塩基特異的に分子量が41 Da大きい不純物に変換されることを報告している。不純物のMSフラグメント解析からアセトアミドの存在が示唆され、標品合成による比較からグアニン塩基がN²-アセチル-2,6-ジアミノプリン体（ADP）に変換されたとしている⁷⁴⁾。前項で触れたようにグアニン塩基N2位のイソブチリル保護基はアセチルキャッピング剤によりアセチル基に変換される。保護基の交換反応に加えて、6位カルボニル基がキャッピング剤に

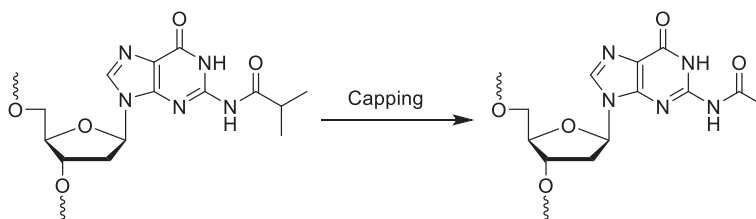


Fig. 10 グアニン塩基の保護基の交換反応

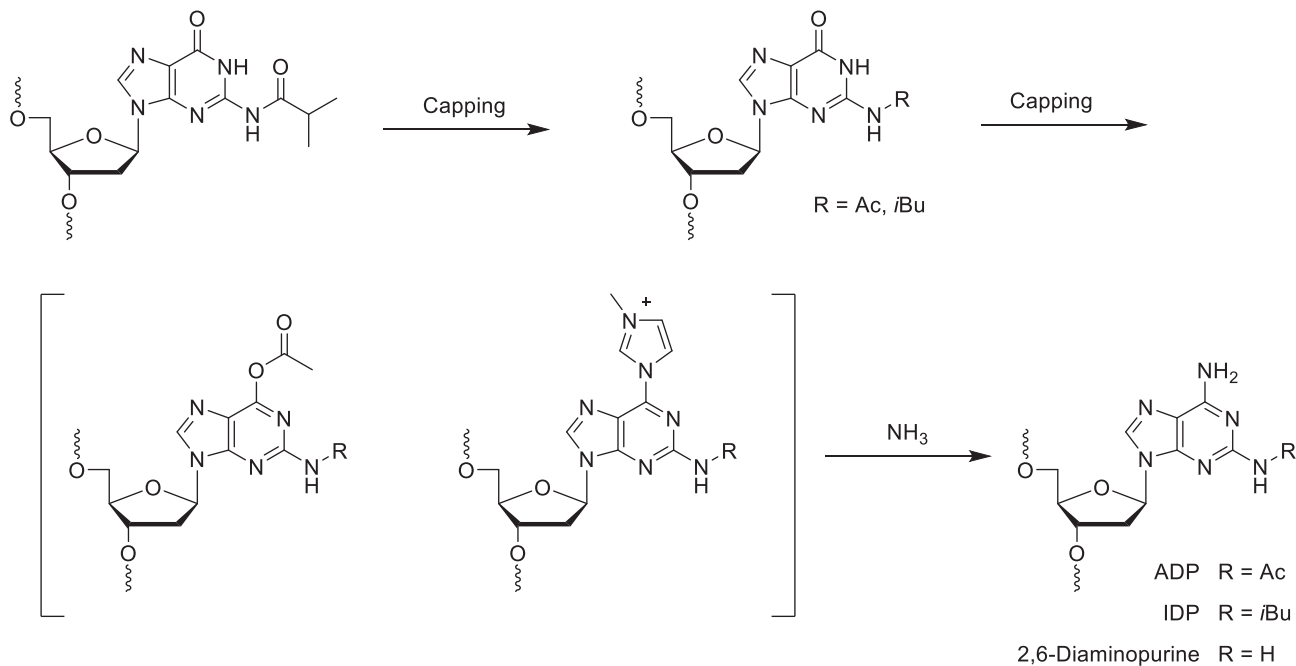


Fig. 11 グアニン塩基の2,6-ジアミノプリン誘導体への変換

より活性化され、最終脱保護工程でアミノ基に変換される生成メカニズムを提唱している (Fig. 11)。

同様の反応が、アセチル保護体への保護基の置換を受けていないイソブチリル保護体の場合で起こると+69 Da分子量が増加した不純物が生じると考えられることから、オリゴヌクレオチドで見られる+69 Daの不純物としてイソブチリルジアミノプリン (IDP)の構造が提案されている⁷⁵⁾。ADPやIDPのアセチル基やイソブチリル基が脱保護されると2,6-ジアミノプリンとなる⁷⁶⁾。グアニン塩基から2,6-ジアミノプリンへの変化は質量差がわずか1 Daの減少であるため通常のLC/MS測定では見分けることは難しく、2D-LC/MSなどの活用が必要と思われる。

また正木らは次世代シーケンサーを活用し、オリゴ合成中に生じる副反応による塩基置換率を精査した結果、GからAへの置換が他の塩基に比べて高く、キャップ剤によるグアニン塩基からジアミノプ

リン塩基への変換反応が要因となっていることを報告している⁷⁷⁾。ジアミノプリンへの変換がキャッピング剤により比較的生じやすい副反応であることが示唆される結果である。キャップ剤としてフェノキシ酢酸無水物を使用すると、置換が促進されることもあわせて示されており、キャッピング剤の反応性も副反応をコントロールする上で重要な要因と考えられる。

4.4.3 アデニン塩基の5-アミノ-4-ピリミジリミダゾールへの変換 (entry 16)

Rodriguezらはアデニン塩基に対してキャッピング試薬が反応することで生じる不純物について報告している⁷⁸⁾。意図的にキャッピング工程の試薬量及び反応時間を増やすことで、親化合物から+98 Da分子量が増加した不純物が観測されることを見出している。デオキシオリゴヌクレオチドの酸分解によって得た核酸塩基 (プリン塩基) のLC/MS解析

からアデニン塩基に特異的に変異が生じていることを明らかにしている。更にポリデオキシアデニル酸に対して過剰なキャップ化反応を行ったのちに、酵素分解を行い+98 Daの不純物に相当するヌクレオシドを単離し、NMR及びX線結晶構造解析から構造を確認している。

その発生機構は以下のように推測されている。まず、キャッピング試薬に含まれる無水酢酸によってアデニン塩基N6位の保護基がトランスアセチル化されN⁶-アセチルアデニンとなる。つぎにこのアセチル基のα炭素へ更に連続したC-アセチル化反応が生じることでジアセチルアセテート体に変換された塩基が中間体として生成する。末端アセチル基へのさらなるO-アセチル化により生じた、求電子的なアルケンに対してアデニンN1位からの環化反応を経て三環性構造が形成される。切り出し時のアンモニア水処理によりC2位の加水分解が引き起こされ最終的に二環性の5-アミノ-4-ピリミジリイミダゾール誘導体となると考えられている (Fig. 12)。この副反応は使用するキャップ化剤の当量を減少さ

せることで抑制することが可能とされている。

4.4.4 キャップ剤に含まれる不純物による塩基への副反応 (entry 18, 19)

キャッピング工程で使用されるキャッピング剤に含まれるN-メチルイミダゾールには少量の1,3,5-トリメチルヘキサヒドロ-1,3,5-トリアジンが含まれていることがあり、85 Da質量が増加した不純物を生じさせる要因となる⁷⁹⁾。トリアジンから生じるイミンと無水酢酸によりβ-N-メチルアミノアセトアミド (MAM) が核酸塩基部に付加した構造となっていると考えられている。チミン塩基に反応した場合の推定構造を図示した (Fig. 13)。トリアジンの混入が低減された試薬を使用することでこの不純物の発生を抑えることができるとされており、Honeywell社よりトリアジンを低減した状態のキャップ剤が販売されている。

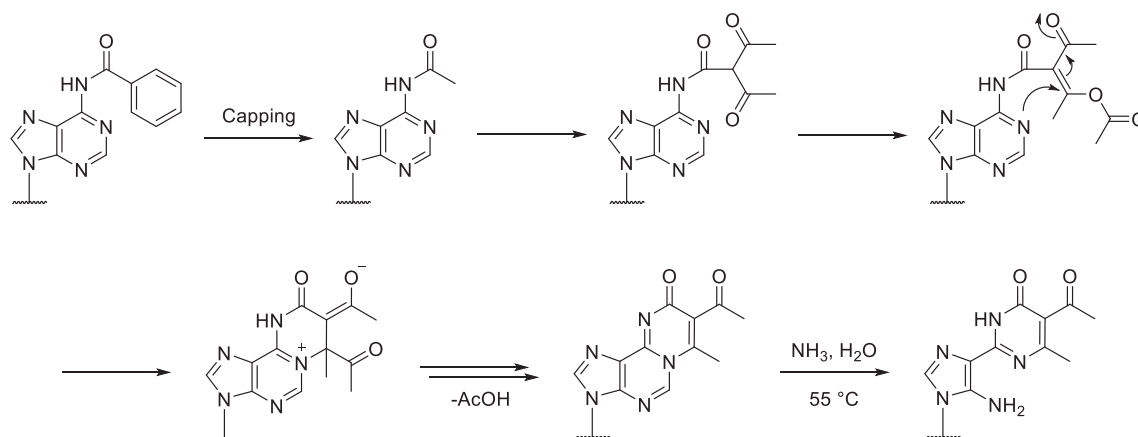


Fig. 12 アデニン塩基にキャップ化試薬により生じる+98 Daの不純物の生成機構

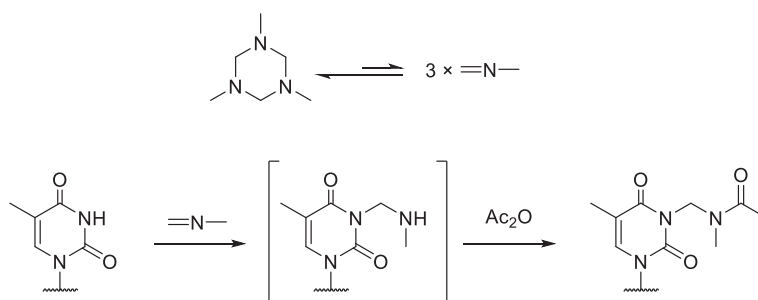


Fig. 13 +85 Daの推定不純物構造

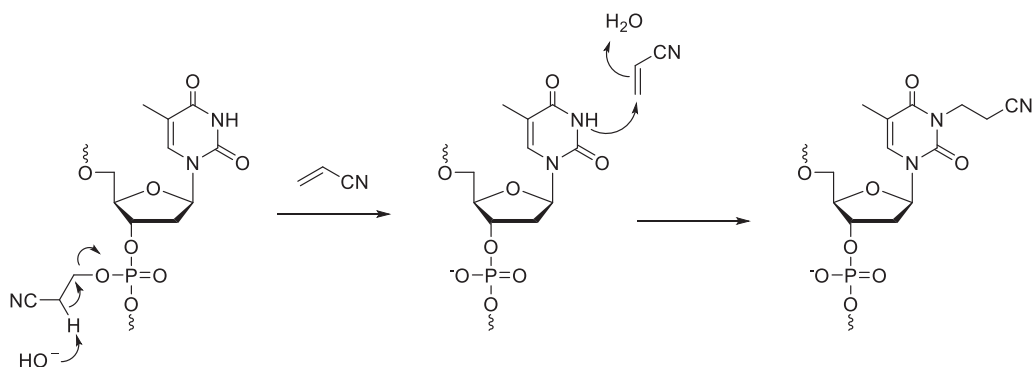


Fig. 14 チミン塩基のシアノエチル化反応

4.5 切り出し・脱保護工程

4.5.1 チミン、ウラシル塩基のN3位シアノエチル化 (entry 9)

通常ホスホロアミダイト法ではリン酸部位の保護基としてシアノエチル基が採用され、固相合成後のオリゴヌクレオチドのリン酸部位はシアノエチル基により保護されている。このシアノエチル基は塩基性条件下で脱保護され、アクリロニトリルとして遊離してくる。Capaldiらは合成オリゴヌクレオチド中に分子量が53 Da増加した不純物が発生しており、その発生量が配列中のチミン塩基の数と相関（チミン残基当たり約0.5%）していることを見出している。詳細な検討からその構造を明らかにし、チミン塩基3位Nがアクリロニトリルによりシアノエチル化された不純物であることを報告している⁸⁰⁾。塩基性条件下β脱離によりシアノエチル基が脱保護されることでアクリロニトリルが遊離し、チミン塩基3位Nに対してアクリロニトリルがマイケル付加反応を起こすことでシアノエチル化されたチミン塩基を生じさせる (Fig. 14)。

この不純物の低減方法については、切り出し脱保護時にスカベンジャーを共存させる方法、合成後のオリゴヌクレオチドの切り出しに先立って弱い塩基でシアノエチル基を除去しつつアクリロニトリルをカラムから洗い流す方法などいくつか提案されている^{81~84)}。またアクリロニトリルの付加は、反応性の違いや核酸塩基部の保護基の有無などにより通常のオリゴヌクレオチド合成においてはチミン（又はウラシル）塩基で優位にみられるが、他の核酸塩基でも同様の反応が知られている^{80, 81, 85, 86)}。

4.5.2 シトシン4位及びアデニン6位アミノ基のデアミネーション (entry 1)

アデニン塩基6位やシトシン塩基4位のアミノ基がカルボニル基へと置換されるデアミネーション反応は生理的条件下では核酸塩基を基質とする脱アミノ化酵素により引き起こされる。一方、非酵素的にこれらの反応を促進するには加熱や塩基性条件が必要とされている。デアミネーションの速度についてはアデニン塩基の場合、シトシンや5-メチルシトシン塩基と比較して生理的条件下では50倍近く遅いことが知られている⁸⁷⁾。

Lindhahlらは大腸菌DNA、オリゴヌクレオチド（一本鎖dC、二重鎖dG/dC）及びdCMPを用いて、種々の温度及びpHにおけるシトシン塩基のデアミネーションについて報告している⁸⁸⁾。液性がpH8~8.5の範囲が最も安定であり、pH9.5より塩基性に偏るとデアミネーション生成速度が加速されること、65~95℃の範囲において温度上昇に伴いデアミネーション体の生成率が上昇することが報告されている。DNA、あるいは二重鎖構造よりも自由度が高い一本鎖状態のほうが加水分解を受けやすいことも示されている。更にEhlichらは5-メチルデオキシシチジン、デオキシシチジン、N⁴-メチルデオキシシチジンの生理的pHにおいて加熱によるデアミネーションの促進について調べており、5-メチルデオキシシチジンのデアミネーションはシチジンやN⁴-メチルデオキシシチジンよりも進行しやすいことを明らかにしている⁸⁹⁾。オリゴヌクレオチド合成後の切り出し脱保護にはデアミネーションを促進する塩基性かつ加熱条件が使用され、核酸医薬へ5-メチルデオキシシチジンを組み込むことも多いため、デアミネーションには注意が必要と考えられ

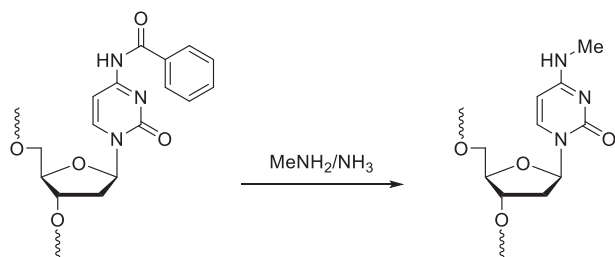


Fig. 15 メチルアミンによるBz保護シトシンのトランスアミネーション

る。デアミネーションは分子量の変化が1 Daの増加であるため通常のLC/MS測定では見分けることが難しいことが予期され、高分解能のLC/MSでの検出法の報告もあるが⁹⁰⁾、グアニン塩基の2,6-ジアミノプリンへの置換と同様に2D-LC/MSなどの活用も必要と思われる。

4.5.3 シトシン4位のトランスアミネーション (entry 2)

Reddyらは迅速なオリゴヌクレオチドの切り出し/脱保護方法と副生物の低減方法について報告している⁹¹⁾。一般的に用いられるアンモニア水による切り出し脱保護のかわりにメチルアミンとアンモニア混液を使用すると脱保護時間を1/20以下に短縮できるが、ベンゾイル保護されたシトシン塩基にトランスアミネーション体が生じることが知られている。これはアンモニアより求核性が高いメチルアミンがピリミジン塩基と直接反応することで生成する (Fig. 15)。

ベンゾイル基からアルキルカルボニル保護基へと変更するとカルボニル部位の求電子性があり、ピリミジン部位での副反応を低減させることができる。実際に、シトシンの保護基をベンゾイル基からアセチル基とするとメチルアミンによるトランスアミネーション体の生成が10%から0%に減少することが報告されている。

4.5.4 シトシン塩基のオキソプロピルイミダゾピリミジン誘導体への変換 (entry 17)

脱プリン塩基より生じるabasic部位は加熱によりさらなる分解を受けてバックボーンの切断とフラノース環由来化合物 (4-オキソ-2-ペンテナール, Fig. 3) が共に遊離してくることは既述したが、Rentelらはシトシン塩基のN1位、N4位と4-オキソ-2-ペンテナールが反応することでエテノシチジ

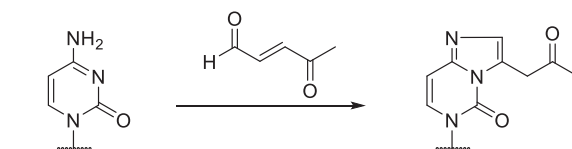


Fig. 16 4-オキソ-2-ペンテナールによるエテノシチジン誘導体の生成

ン誘導体である分子量が80 Da大きい二環性化合物 (オキソプロピルイミダゾピリミジノン) が形成されることを報告している (Fig. 16)⁹²⁾。4-オキソ-2-ペンテナールとシチジンのみの反応からは20℃付近では+98 Daの生成物が主生成物であったが、この反応系を40℃に加熱すると+80 Daの化合物に収束したことから、多くのエテノ誘導体の合成で見られるように脱水を伴って+80 Daの不純物を生じていると考えられる。なお二つの異なる位置異性体が生じる可能性があるが、得られたヌクレオシドのNMR解析から片方の異性体のみ生じていることを明らかにしている。

4.5.5 ピリミジン環の分解 (entry 7, 8)

切り出し脱保護に使用される塩基性条件下で、シチジン及びウリジンの分解により脱ピリミジン化が進行することがある。この現象は通常のアンモニア処理ではあまり観察されないが、メチルアミンを使用すると顕著に発生する。反応機構についてウラシル塩基を例に図示した (Fig. 17)⁹³⁾。ピリミジン塩基6位へのメチルアミンのマイケル付加を引き金として、エノラート体を経由してピリミジン環の分解が起こる。 α 、 β -不飽和アミド部位に対するメチルアミンによるアミド交換反応によりウレア構造をもつ残基へと変化し-52 Daの不純物を与える。ウレア部分がメチルアミンにより更に分解を受けることで-95 Daに相当する不純物としてリボースのアノマー位がアミノ化されたアミノフランが生じる。

4.5.6 2'-アラビノフラノシル体の副生 (entry 20, 21)

siRNA中に組み込まれることが多い2'-フルオロウリジン及びシチジンは、加熱と塩基性条件下で、2'位のフッ素が抜けることで2位と2'位で環化した2,2'-O-アンヒドロ体となり-20 Daの副生成物を与える⁹⁴⁻⁹⁷⁾。なお2'-フルオロシチジンは2'-フルオロウリジンと比較して約29倍の速さで環化体の形成が起きることが報告されている⁹⁶⁾。この環化体は更

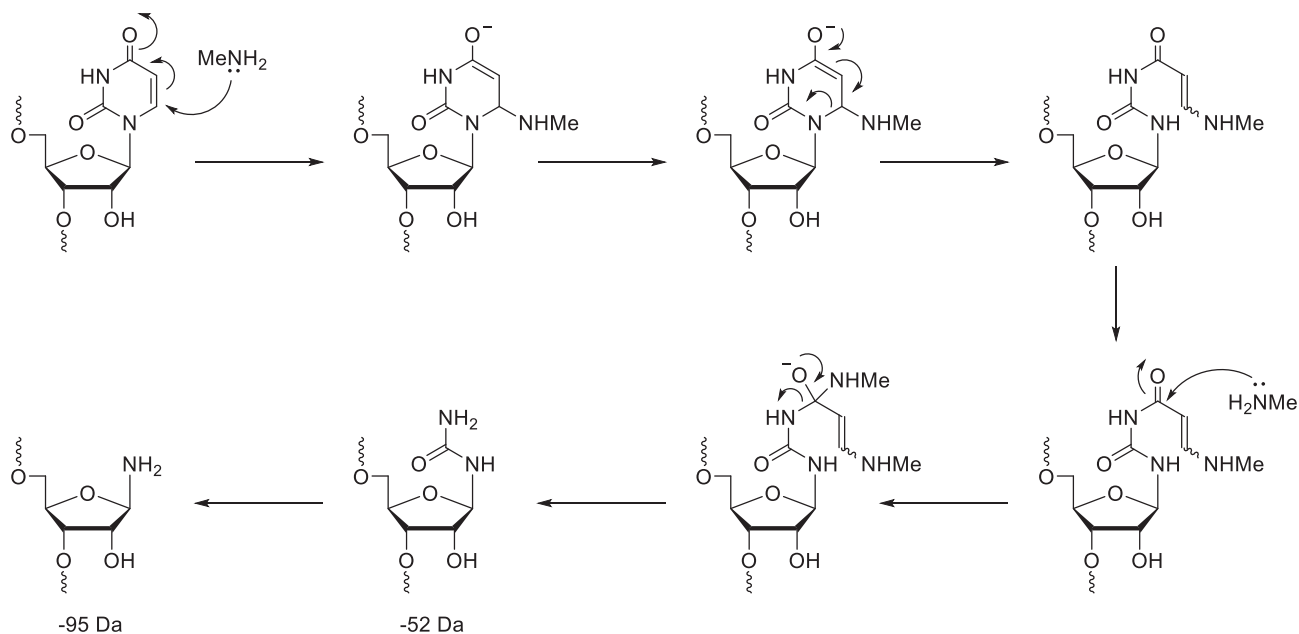


Fig. 17 メチルアミンによるウラシル塩基の分解

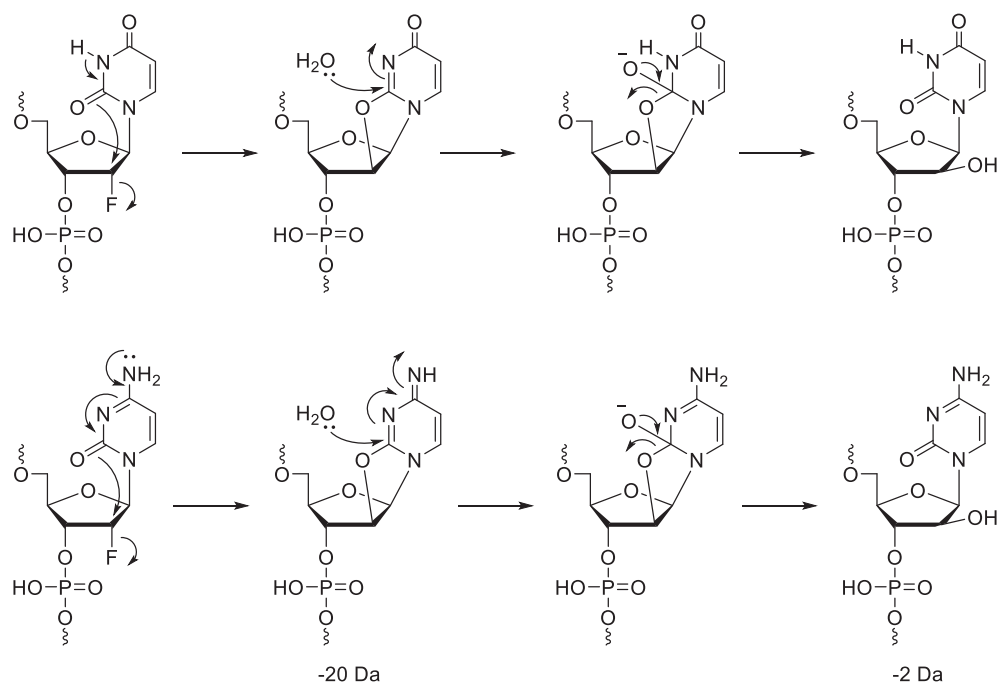


Fig. 18 ピリミジン型ヌクレオシドで見られる2'-アラビノフラノシル体の副生

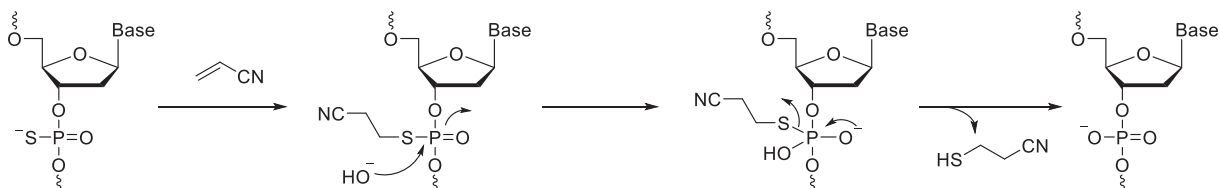


Fig. 19 アクリロニトリルによるホスホロチオアート結合の脱硫機構

に加水分解をうけ、親化合物から−2 Daに相当するアラビノフラノシル体となる (Fig. 18). siRNAの液相及び気相での強制劣化試験の結果から、環化体の加水分解は加熱や窒素ガス雰囲気下でも進行したことから、低湿度でも進行しうることが示されている⁹⁴⁾.

4.5.7 切り出し脱保護工程由来のPSからPOへの変化 (entry 27)

切り出し脱保護条件で汎用されるアンモニア処理によりホスホロチオアート結合で脱硫が起これ、ホスホジエステル結合へと変化する例が知られており、対処法も報告されている⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾. Kodraらは金属イオンの存在により脱硫が促進されることを見出し、EDTAを10 mM加えることで脱硫を大幅に抑制できることを報告している. Reeseらはメルカプトエタノールをアンモニアと共存させて脱保護することで、脱硫が完全に抑えられると報告している. またリン酸部を保護しているシアノエチル基より生じるアクリロニトリルが関与する脱硫機構も提唱されている¹⁰¹⁾. アクリロニトリルがホスホロチオアート結合の硫黄原子と反応しS-シアノエチル化された状態となり、水酸化物イオンによる求核攻撃を経て3-メルカプトプロピオニトリルとして脱硫が生じるというものである (Fig. 19).

4.5.8 UnyLinker™の残存 (entry 32, 33)

合成オリゴヌクレオチドの3'末端に修飾核酸残基を組み込むにあたって、プレロード担体を調製しない場合はUnyLinker™の導入されたユニバーサル担体を使用される¹⁰²⁾. UnyLinker™はジオール部に導入されたコハク酸リンカーが切断されたのち、環状リン酸の形成を経てオリゴヌクレオチドが切り出されるが、切り出し脱保護時の加熱時間などが不十分な場合、環状リン酸の形成がおこらずオリゴヌクレオチドの3'末端にホスホジエステル/ホスホロチオアート基を介してUnyLinker™が結合した構造の不純物が生じる¹⁰¹⁾. なお脱保護溶液としてアンモニアを使用するかメチルアミンを使用するかによって、261 Da又は275 Da大きい質量をもった不純物となる. またUnyLinker™との結合がホスホロチオアートの場合、不純物の質量は更に16 Da大きくなり、277 Da又は291 Daとなる (Fig. 20A). その他、マレイミド部分が、アンモニアやメチルアミンで開環した状態の構造をとった不純物が観察さ

れる可能性もあることにも留意が必要である (Fig. 20B). この種の不純物は、マレイミド部分の窒素を介してUnyLinker™が固相担体に導入されているタイプのものを用いれば、環状リン酸の形成が起これていないものは固相担体から切り出されないため、不純物の混入が回避できる (Fig. 20C). UnyLinker™からの切り出しが不完全であれば収率が多少低下するだけであり、切り出し脱保護時間を長くするなどすれば収率の低下も最小限に抑えることができる.

4.6 リガンド由来不純物 (entry 36-41)

核酸医薬を標的部位へと送達するためにオリゴヌクレオチドにDDS機能をもつリガンドが導入されるようになってきているが、siRNAのリガンドとして多用されているGalNAcリガンドに関連する不純物について報告例を紹介する.

Rodriguezらは、液相合成によるポストコンジュゲーションでのGalNAcリガンドの導入時と、ホスホロアミダイト法による固相合成でのGalNAcリガンドの導入時、それぞれの不純物プロファイルと比較検討し報告している¹⁰³⁾. 固相合成での導入はオリゴヌクレオチドの精製や凍結乾燥が一回で済み、液相合成よりシンプルな製造工程であることが利点であるが、収量 (58% vs 47%, 液相vs固相, 以下同様) やUV純度 (97.7% vs 96.6%) の点では液相合成によるリガンド導入の方が良い結果を示している. GalNAcリガンドに由来する不純物としては固相合成での場合、−42 Daのアセチル基欠損体 (2.1% vs 0.45%), −203 DaのGalNAc欠損体 (1.4% vs 0.33%), +80 Daのリン酸化された不純物 (0.43% vs 0.12%) が液相合成による導入時より増加していた. 一方、PO体に関しては固相合成でリガンドを導入する方が低く抑えられていた (3.0% vs 1.9%). 固相合成でアセチル欠損体が増加するのは、最終脱保護工程で使用される塩基性条件によりGalNAcリガンドのアセチル基が一部脱落するためと考えられる. また、GalNAcが欠損したものは、GalNAcアミダイトユニットのカップリング前のデブロック工程で使用されたジクロロ酢酸が十分に担体から除去されておらず、GalNAcアミダイトユニットのカップリング中にグリコシド結合の加水分解が引き起こされることで生じると推測されている. リン酸化さ

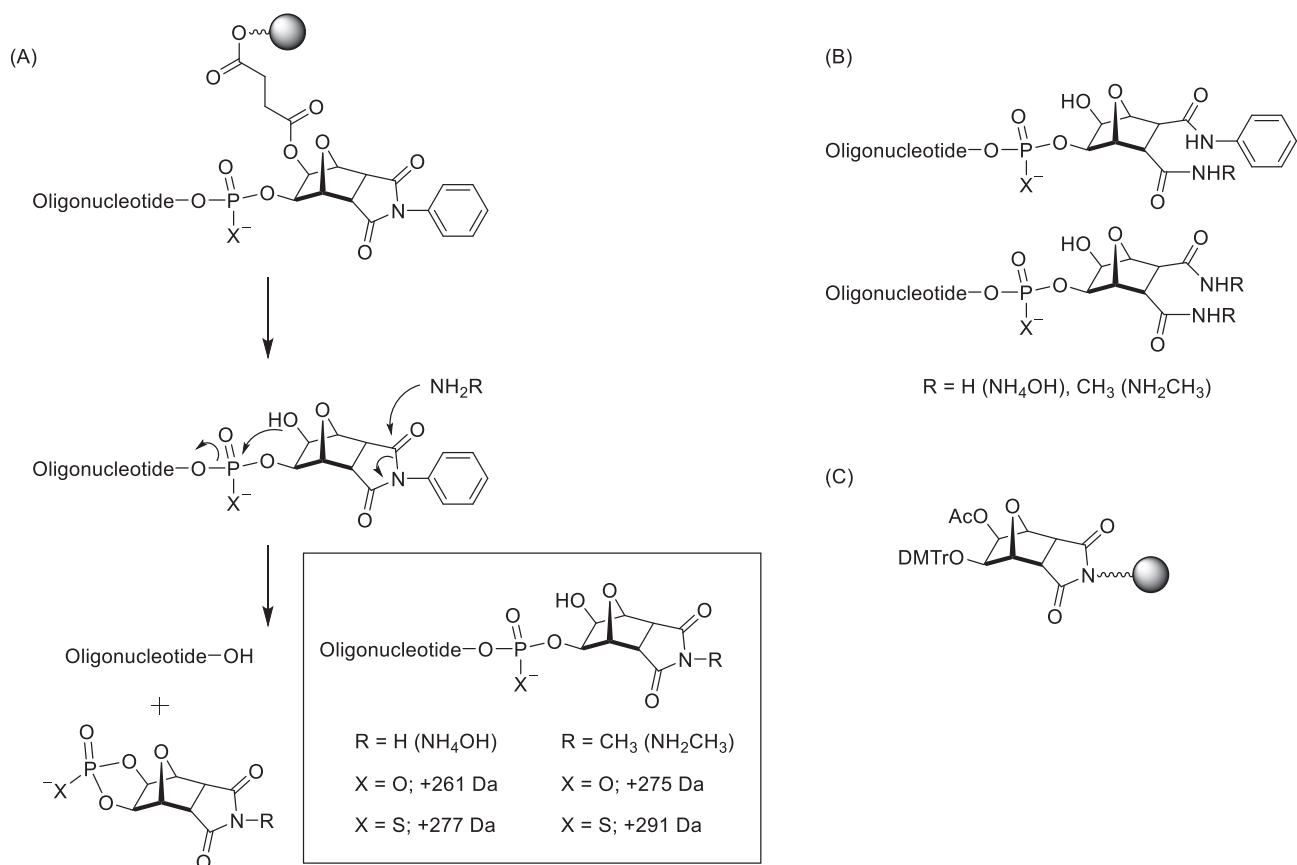


Fig. 20 (A) UnyLinker™の残存による不純物, (B) UnyLinker™が開環した構造, (C) マレイミドを介して固相に導入されたユニバーサルサポート担体

れたと思われる +80 Da の不純物も観察されているが、これは GalNAc ユニットの水酸基の一部がアミダイト化され、bis アミダイト体となった不純物が原料となる GalNAc アミダイトユニットに含まれていたことから生じるものと考察されている。固相合成では、液相合成で見られない不純物として、GalNAc ユニットに対してオリゴが2ヶ所導入されたブランチ体が観察されており、これが液相合成と固相合成での純度の大きな違いをもたらしている。このブランチ体は bis アミダイト体となったユニットから生じると考えられている。GalNAc リガンドの導入に伴って観察される不純物の構造を図示した (Fig. 21)。

5. まとめ

核酸医薬品は毎年1~2品目が承認されており、今後ますます重要な治療選択肢の一つとなることが期待される。本総説では、核酸医薬で用いられてい

る分析法やこれまでに報告されている不純物の構造及びその生成メカニズムについて整理してきた。合成工程由来の不完全な配列や精製プロセス由来の残存物は、製品品質の一貫性や有効性に大きな影響を与える。核酸医薬品の品質を担保するためには不純物の特定と管理が不可欠であり、より高精度な管理手法の確立が求められる。また、核酸医薬の商用生産を成功させるためには、開発期間を通してスケールアップ製造時の不純物制御が鍵となる。核酸医薬品に関する規制は進化し続けており、日米欧で不純物管理に関する議論が進んできている。今後の研究開発の進展によって、より安全で効果的な核酸医薬品の実用化が加速することが期待される。

文 献

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 Web サイト 参照. <https://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/section2-1.pdf> (accessed 2026-04-27).
- 2) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長. 核酸

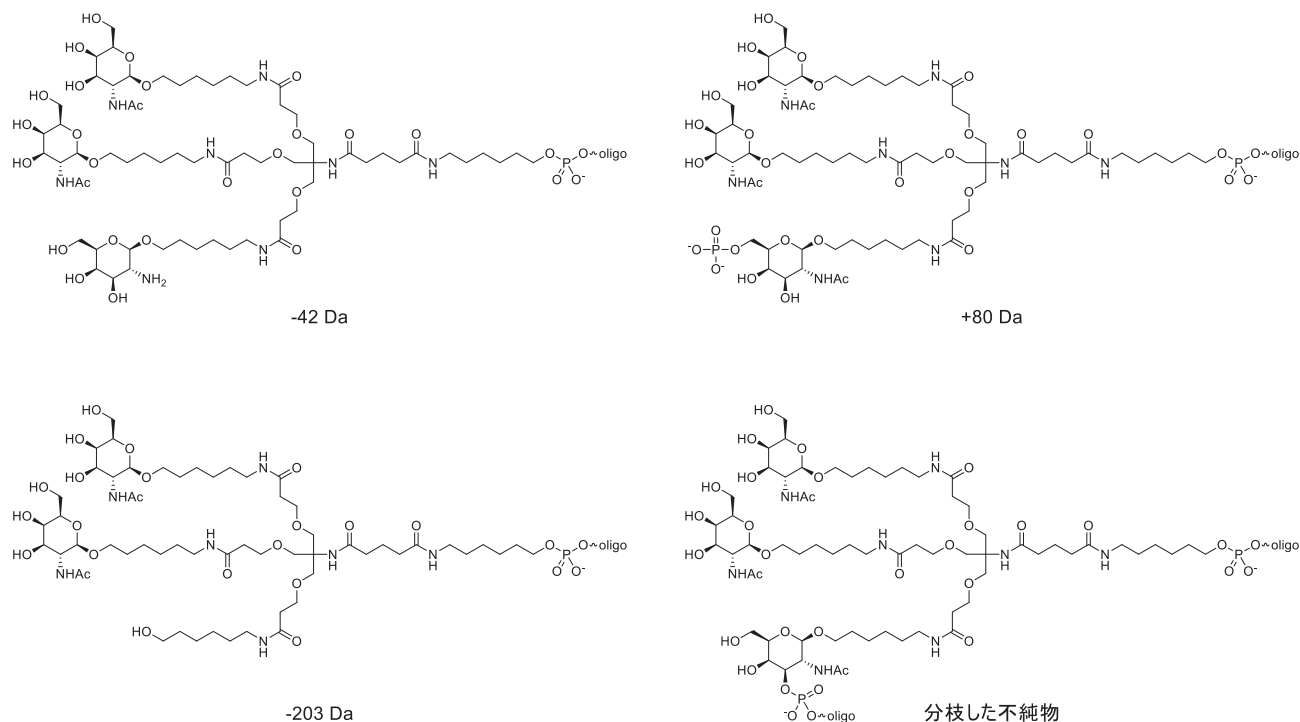


Fig. 21 GalNAc コンジュゲートで見られる不純物の例

医薬品の品質の担保と評価において考慮すべき事項について。薬生薬審発0927第3号, 平成30年9月27日。

- 3) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課。「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について」に関する質疑応答集 (Q&A) について。事務連絡, 令和4年6月9日。
- 4) CHMP/CVMP. "Guideline on the development and manufacture of oligonucleotides (Draft)". 17 July 2024. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-development-manufacture-oligonucleotides_en.pdf (accessed 2025-10-14)
- 5) Talap, J.; Zhao, J.; Shen, M.; Song, Z.; Zhou, H.; Kang, Y.; Sun, L.; Yu, L.; Zeng, S.; Cai, S. Recent advances in therapeutic nucleic acids and their analytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2021, **206**, 114368. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114368.
- 6) Tsuji, G.; Misawa, T.; Demizu, Y. The application of microsampling disks in circular dichroism spectroscopy for peptide and nucleic acid drugs. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 2024, **72**(7), p.658-663. doi: 10.1248/cpb.c24-00244.
- 7) Sorensen, M. J.; Paulines, M. J.; Maloney, T. D. Evaluating orthogonality between ion-pair reversed phase, anion exchange, and hydrophilic interaction liquid chromatography for the separation of synthetic oligonucleotides. *J. Chromatogr. A*. 2023, **1705**, 464184.

doi: 10.1016/j.chroma.2023.464184.

- 8) Li, F.; Su, X.; Bäurer, S.; Lämmerhofer, M. Multiple heart-cutting mixed-mode chromatography-reversed-phase 2D-liquid chromatography method for separation and mass spectrometric characterization of synthetic oligonucleotides. *J. Chromatogr. A*. 2020, **1625**, 461338. doi: 10.1016/j.chroma.2020.461338.
- 9) Goyon, A.; Yehl, P.; Zhang, K. Characterization of therapeutic oligonucleotides by liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2020, **182**, 113105. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113105.
- 10) Biba, M.; Jiang, E.; Mao, B.; Zewge, D.; Foley, J. P.; Welch, C. J. Factors influencing the separation of oligonucleotides using reversed-phase/ion-exchange mixed-mode high performance liquid chromatography columns. *J. Chromatogr. A*. 2013, **1304**, p.69-77. doi: 10.1016/j.chroma.2013.06.050.
- 11) Thayer, J. R.; Flook, K. J.; Woodruff, A.; Rao, S.; Pohl, C. A. New monolith technology for automated anion-exchange purification of nucleic acids. *J. Chromatogr. B*. 2010, **878**(13-14), p.933-941. doi: 10.1016/j.jchromb.2010.01.030.
- 12) Thayer, J. R.; Wu, Y.; Hansen, E.; Angelino, M. D.; Rao, S. Separation of oligonucleotide phosphorothioate diastereoisomers by pellicular anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A*. 2011, **1218**(6),

Table 2 これまでに報告例があるオリゴヌクレオチド不純物

entry	部位	生成工程 記載箇所	不純物の種類 不純物の生成メカニズム	不純物の構造 (左：親化合物, 右：不純物)	分子量変化 (Da)	文献
1	塩基	切り出し・脱保護工程 4-5-2	シトシン4位アミノ基のデアミネーション 塩基性条件下、5-メチルシトシン又はシトシン4位アミノ基の加水分解によりチミン又はウラシル塩基に変換される		+1	88, 89
2	塩基	切り出し・脱保護工程 4-5-3	シトシン4位アミノ基のアルキル化 主にBz基保護シトシンをメチルアミンにて脱保護する場合、求核性が高いメチルアミンがピリミジン環と反応する(トランスアミネーション)ことで生じる 生成比率: dCBz(10%) vs dCac(0%)		+14	91
3	塩基	キャップ化工程 4-4-1	グアニン塩基のN-アセチル体の発生 グアニン塩基に汎用されるイソブチリル基がキャッピング剤によるアセチル基へと交換される。アセチル基が脱保護不完全となるとグアニン塩基のN-アセチル体が生じる		+42	73
4	塩基	キャップ化工程 4-4-2	グアニン塩基から2,6-ジアミノプリン体へ変換 キャッピング剤(無水酢酸, NMI)により、グアニン塩基の2位保護基がアセチル基に変換されるとともに(トランスアミドーション)、6位カルボニル基が活性化され(アミネーション)、最終脱保護工程でアミノ基へ変換される		+41	74
5	塩基	キャップ化工程 4-4-2	グアニン塩基から2,6-ジアミノプリン体へ変換 キャッピング剤に含まれる求核触媒によりグアニン塩基6位カルボニル基が活性化され(アミネーション)、最終脱保護工程でジアミノプリン体へ変換される		-1	76
6	塩基	キャップ化工程 4-4-2	グアニン塩基から2,6-ジアミノプリン体(イソブチリル保護)へ変換 キャッピング剤に含まれる求核触媒によりグアニン塩基6位カルボニル基が活性化され、最終脱保護工程でアミノ基へ変換されるとともに、2位イソブチリル基が未脱離である		+69	75
7	塩基	切り出し・脱保護工程 4-5-5	ウラシル塩基の加水分解 脱保護液に含まれるメチルアミンがウラシル塩基とマイケル付加反応して加水分解を引き起こす		-52	93
8	塩基	切り出し・脱保護工程 4-5-5	ウラシル塩基の加水分解 脱保護液に含まれるメチルアミンがウラシル塩基とマイケル付加反応して加水分解を引き起こす		-95	93
9	塩基	切り出し・脱保護工程 4-5-1	チミン又はウラシル塩基のシアノエチル化 リン酸部位保護基(シアノエチル基)のβ脱離により生じるアクリロニトリルがチミン塩基の3位アミノ基にマイケル付加反応することで生じる		+53	80
10	塩基	切り出し・脱保護工程 -	グアニン塩基のイソブチリル基の脱保護不完全 グアニン塩基のN2位イソブチリル基はアンモニア水条件下では脱離しにくく、残存した場合は不純物となる		+70	25, 104
11	塩基	切り出し・脱保護工程 -	アデニン塩基のベンゾイル基の脱保護不完全 アデニン塩基のN4位ベンゾイル基が残存した場合は不純物となる		+104	25
12	塩基	デブロック工程 4-1-1	脱プリン(アデニン塩基) Deblockの工程の酸性条件下にて脱プリン反応が発生、特にDNAで起こりやすい		-117	51, 53, 54
13	塩基	デブロック工程 4-1-1	脱プリン(グアニン塩基) Deblockの工程の酸性条件下にて脱プリン反応が発生、特にDNAで起こりやすい		-133	51, 53, 54
14	塩基	酸化ストレス -	グアニン塩基8位の酸化体 酸化ストレスによりGの8位が酸化される		+16	105

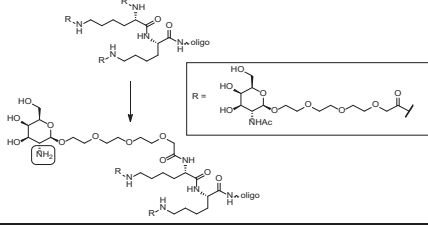
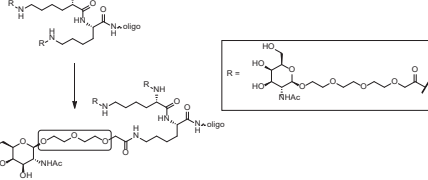
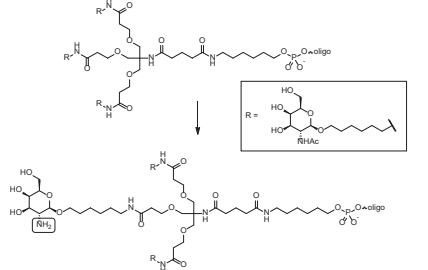
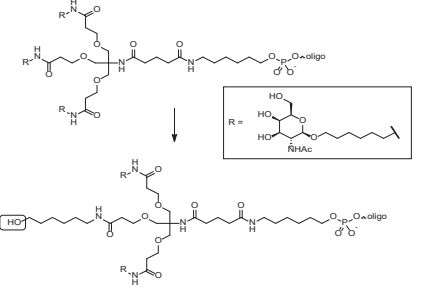
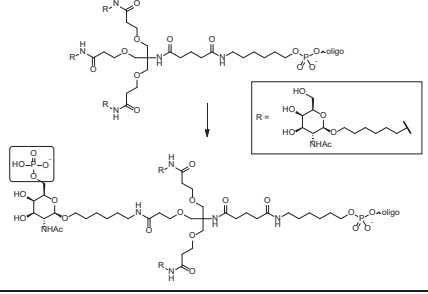
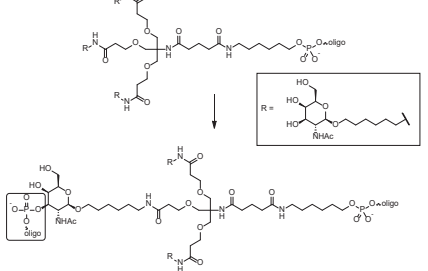
Table 2 つづき

entry	部位	生成工程 記載箇所	不純物の種類 不純物の生成メカニズム	不純物の構造（左：親化合物，右：不純物）	分子量変化 (Da)	文献
15	塩基	酸化ストレス —	グアニン塩基の酸化より引き起こされる損傷塩基 グアニン塩基の8位酸化を経て、弱酸性条件下ではセグティン構造に分解される		—	105
16	塩基	キャップ化工程 4-4-3	アデニン塩基が5-アミノ-4-ピリミジリミダゾールへ変換 アデニン塩基へのキャップ剤（無水酢酸）の副反応を経て、アンモニア処理工程でM+98Da不純物を最終的に生じる		+98	78
17	塩基	切り出し・脱保護工程 4-5-4	シトシン塩基がオキソプロピルイミダゾリジミジン誘導体へ変換される 脱プリン後、加熱過程（脱保護切り出し）を経て生じる4-oxo-2-pentalenalがシトシン塩基と反応しエテノシトシン誘導体を生じる		+80	92
18	塩基	キャップ化工程 4-4-4	キャップ剤に含まれる不純物によるチミン・ウラシル塩基への副反応 キャップ剤に使用されるNMIに含まれる不純物および無水酢酸より生じる反応性中間体がチミン（ウラシル）塩基のN3位と反応する 反応機構の記載はないがおそらくNMI不純物由来と考えられる		+85	79
19	塩基	キャップ化工程 4-4-4	キャップ剤に含まれる不純物によるオリゴアミノ基への副反応		+85	79
20	糖部	切り出し・脱保護工程 4-5-6	2'F体からarabino体変換 下記環化体(2,2'-anhydro)体を経由して、加水分解によりアラビノ体に変換された不純物が生じる シチジン、ウリジンとともにこの反応は起きるがシチジンにおいてウリジンより顕著（約29倍）に生じるとされる なおエタノールアンモニアによる切り出し脱保護で低減される		-2	94, 95, 96, 97
21	糖部	切り出し・脱保護工程 4-5-6	2'F体から2,2'-anhydro体に変換 塩基性条件下、ピリミジン塩基2位酸素から2'位Fへの求核攻撃により環化体(2,2'-anhydro)体が生じる。さらに加水分解を受けると開環しアラビノ体へと変換される		-20	94, 95, 96, 97
22	糖部	出発物質由来 —	出発物質由来不純物 MOEを含むオリゴの場合、出発物質となるアミダイトに含まれているアルキル鎖の異なる不純物によって、MOE基以外が糖部に組み込まれた類縁物質が生じる		—	106
23	糖部	切り出し・脱保護工程 —	TBDSM基の残存 RNAの2'水酸基保護基であるTBDSM基の脱保護が不十分であることにより生じる		+114	104
24	糖部	切り出し・脱保護工程 —	脱プリン部位で断片化し生じる 脱プリンから切り出し脱保護を経て発生		オリゴ核酸 の分子量 に依存	45, 104
25	リン酸	切り出し・脱保護工程 —	RNA鎖の切断 RNAのリン酸基の転移による2'-5'結合の生成又は鎖切断		—	107, 108
26	リン酸	切り出し・脱保護工程 —	2',3'のリン酸基の転移 RNAのリン酸基の転移による2'-5'結合の生成又は鎖切断		—	108

Table 2 つづき

entry	部位	生成工程 記載箇所	不純物の種類 不純物の生成メカニズム	不純物の構造 (左：親化合物, 右：不純物)	分子量変化 (Da)	文献
27	リン酸	デブロック工程 酸化・硫化工程 切り出し・脱保護工程 4-1-4 4-3 4-5-7	PS結合がPO結合に変化 硫化剤残渣による副反応 (Beaucage Reagent)、硫化剤中の水分、硫化不足、脱保護工程、キャップ化工程など複数の要因がある		-16	63, 68, 69, 98, 99, 100
28	リン酸	デブロック工程 4-1-2	リン酸ジエステル結合にクロラル体が挿入 デブロック試薬(ジクロロ酢酸)中にごく少量含まれるトリクロロアセトアルデヒド(クロラル)が5'水酸基と反応した後にアミダイト体と縮合することで形成される		+147	61
29	リン酸	デブロック工程 4-1-3	DMT基によるC-ホスホネート体形成 亜リン酸体の酸化又は硫化が不十分なまま脱DMT反応を行うと、DMTカチオンが亜リン酸と反応し、C-ホスホネート体を生成する		+286	62
30	リン酸	デブロック工程 4-1-3	DMT基によるC-ホスホネート体形成 亜リン酸体の酸化又は硫化が不十分なまま脱DMT反応を行うと、DMTカチオンが亜リン酸と反応し、C-ホスホネート体を生成する		(n-1), (n-2), etc. +366Da	62
31	リン酸	酸化・硫化工程 4-3	バックボーンの切断、短鎖オリゴヌクレオチドの生成 亜リン酸トリエステルはH-ホスホン酸につながり、鎖伸長が続ける。H-ホスホン酸結合は切断・脱保護ステップで分解され、失敗配列として現れる分解物を生成する		オリゴ核酸 の分子量 に依存	93
32	その他	切り出し・脱保護工程 4-5-8	UnyLinkerユニットの残留 切り出し時のアンモニア(又はメチルアミン)による加熱時間が短い場合、UnyLinker脱離が不十分		+261Da +275Da (O->S) +277Da +291Da)	101, 102
33	その他	切り出し・脱保護工程 4-5-8	UnyLinkerユニットの残留 UnyLinkerの合成時に生じる二量体由来不純物が固相担体にロードされることで生じる		+442Da +460Da +478Da (O->S) +458Da +476Da +494Da)	109
34	その他	出発物質由来 -	Inverted型結合 出発物質(アミダイト体)にInverted型不純物(3'-DMTr, 5'-amidite)が含まれている場合に生成する可能性がある		-	-
35	その他	出発物質由来 -	分岐型オリゴヌクレオチド 保存中や合成中に核酸塩基の保護基が失われると、分岐した不純物が形成される。保護されていない外環式アミノ基は、入ってくるホスホロアミダイトと反応して2つの分岐鎖を形成する		オリゴ核酸 の分子量 に依存	110

Table 2 つづき

entry	部位	生成工程 記載箇所	不純物の種類 不純物の生成メカニズム	不純物の構造 (左: 親化合物, 右: 不純物)	分子量変化 (Da)	文献
36	リガンド 部位	切り出し・脱保護工程 4 - 6	<i>N</i> -アセチルガラクトサミンの脱アセチル体 リガンド部位のエチレンジリコールリンカーの欠損体		-42	103
37	リガンド 部位	切り出し・脱保護工程 4 - 6	5'にポストコンジュゲーションするGalNAcユニットを合成した際に生じた出発物質由来の不純物がコンジュゲーションによりオリゴ中に組み込まれ、リガンドの構造の一部が欠損した不純物が生じると予測されている		-44	103
38	リガンド 部位	切り出し・脱保護工程 4 - 6	<i>N</i> -アセチルガラクトサミンの脱アセチル体 アミダイト法でGalNAcリガンドを組み込んだ際に、最終脱保護で使用する塩基によって、 <i>N</i> -アセチル基が加水分解され生じる		-42	103
39	リガンド 部位	カップリング工程 4 - 6	GalNAcの欠損体 脱トリチル工程で使用したジクロロ酢酸がカップリング工程にトレース量残留しており、GalNAcアミダイトのカップリング中に、残留した酸成分によってグリコシル結合の加水分解が引き起こされることで生じる		-203	103
40	リガンド 部位	出発物質由来 4 - 6	リン酸基の付加 GalNAcアミダイトに9か所存在する糖部水酸基の一部がアミダイト化された出発物質に含まれる不純物 (bisアミダイト体) に由来する		+80	103
41	リガンド 部位	出発物質由来 4 - 6	分岐延長(ブランチ)体の生成 GalNAcアミダイトに9か所存在する糖部水酸基の一部がアミダイト化された出発物質に含まれる不純物 (bisアミダイト体) に由来する。カップリング中にオリゴの5'末端水酸基がそれぞれのアミダイト部分と反応することで生じる		オリゴ核酸 の分子量 に依存	103

- p.802–808. doi: 10.1016/j.chroma.2010.12.051.
- 13) Cook, K.; Thayer, J. Advantages of ion-exchange chromatography for oligonucleotide analysis. *Bioanalysis*. 2011, **3**(10), p.1109–1120. doi: 10.4155/bio.11.66.
- 14) Gilar, M.; Fountain, K. J.; Budman, Y.; Holyoke, J. L.; Davoudi, H.; Gebler, J. C. Characterization of therapeutic oligonucleotides using liquid chromatography with on-line mass spectrometry detection. *Oligonucleotides*. 2003, **13**(4), p.229–243. doi: 10.1089/154545703322460612.
- 15) Levin, D. S.; Shepperd, B. T.; Gruenloh, C. J. Combining ion pairing agents for enhanced analysis of oligonucleotide therapeutics by reversed phase-ion pairing ultra performance liquid chromatography (UPLC). *J. Chromatogr. B*. 2011, **879**(19), p.1587–1595. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.03.051.
- 16) Horvath, C.; Melander, W.; Molnar, I.; Molnar, P. Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *Anal. Chem.* 1977, **49**(14), p.2295–2305. doi: 10.1021/ac50022a048.
- 17) Bidlingmeyer, B. A. Separation of ionic compounds by reversed-phase liquid chromatography an update of ion-pairing techniques. *J. Chromatogr. Sci.* 1980, **18**(10), p.525–539. doi: 10.1093/chromsci/18.10.525.
- 18) Bartha, Á.; Ståhlberg, J. Electrostatic retention model of reversed-phase ion-pair chromatography. *J. Chromatogr. A*. 1994, **668**(2), p.255–284. doi: 10.1016/0021-9673(94) 80116-9.
- 19) Huber, C. G.; Krajete, A. Analysis of nucleic acids by capillary ion-pair reversed-phase HPLC coupled to negative-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1999, **71**(17), p.3730–3739. doi: 10.1021/ac990378j.
- 20) Li, S.; Lu, D. D.; Zhang, Y. L.; Wang, S. Q. An improved ion-pair reversed phase LC method for analysis of major impurities of phosphorothioate oligonucleotide candidate. *Chromatographia*. 2010, **72**(3), p.215–223. doi: 10.1365/s10337-010-1655-1.
- 21) Gong, L.; McCullagh, J. S. Comparing ion-pairing reagents and sample dissolution solvents for ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry analysis of oligonucleotides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2014, **28**(4), p.339–350. doi: 10.1002/rcm.6773.
- 22) Gong, L. Comparing ion-pairing reagents and counter anions for ion-pair reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry analysis of synthetic oligonucleotides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2015, **29**(24), p.2402–2410. doi: 10.1002/rcm.7409.
- 23) Bleicher, K.; Bayer, E. Various factors influencing the signal intensity of oligonucleotides in electrospray mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* 1994, **23**(6), p.320–322. doi: 10.1002/bms.1200230604.
- 24) Basiri, B.; van Hattum, H.; van Dongen, W. D.; Murph, M. M.; Bartlett, M. G. The role of fluorinated alcohols as mobile phase modifiers for LC-MS analysis of oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2017, **28**(1), p.190–199. doi: 10.1007/s13361-016-1500-3.
- 25) Sutton, J. M.; Guimaraes, G. J.; Annavarapu, V.; van Dongen, W. D.; Bartlett, M. G. Current state of oligonucleotide characterization using liquid chromatography-mass spectrometry: insight into critical issues. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2020, **31**(9), p.1775–1782. doi: 10.1021/jasms.0c00179.
- 26) Apffel, A.; Chakel, J. A.; Fischer, S.; Lichtenwalter, K.; Hancock, W. S. New procedure for the use of high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of nucleotides and oligonucleotides. *J. Chromatogr. A*. 1997, **777**(1), p.3–21. doi: 10.1016/S0021-9673(97) 00256-2.
- 27) Apffel, A.; Chakel, J. A.; Fischer, S.; Lichtenwalter, K.; Hancock, W. S. Analysis of oligonucleotides by HPLC-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1997, **69**(7), p.1320–1325. doi: 10.1021/ac960916h.
- 28) Li, N.; El Zahar, N. M.; Saad, J. G.; van der Hage, E. R. E.; Bartlett, M. G. Alkylamine ion-pairing reagents and the chromatographic separation of oligonucleotides. *J. Chromatogr. A*. 2018, **1580**, p.110–119. doi: 10.1016/j.chroma.2018.10.040.
- 29) Roussis, S. G.; Pearce, M.; Rentel, C. Small alkyl amines as ion-pair reagents for the separation of positional isomers of impurities in phosphate diester oligonucleotides. *J. Chromatogr. A*. 2019, **1594**, p.105–111. doi: 10.1016/j.chroma.2019.02.026.
- 30) Erb, R.; Oberacher, H. Comparison of mobile-phase systems commonly applied in liquid chromatography-mass spectrometry of nucleic acids. *Electrophoresis*. 2014, **35**(9), p.1226–1235. doi: 10.1002/elps.201300269.
- 31) McGinnis, A. C.; Grubb, E. C.; Bartlett, M. G. Systematic optimization of ion-pairing agents and hexafluoroisopropanol for enhanced electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2013, **27**(23), p.2655–2664.

- doi: 10.1002/rcm.6733.
- 32) Fountain, K. J.; Gilar, M.; Gebler, J. C. Analysis of native and chemically modified oligonucleotides by tandem ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, **17**(7), p.646–653. doi: 10.1002/rcm.959.
- 33) Li, L.; Leone, T.; Foley, J. P.; Welch, C. J. Separation of small interfering RNA stereoisomers using reversed-phase ion-pairing chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2017, **1500**, p.84–88. doi: 10.1016/j.chroma.2017.04.008.
- 34) Enmark, M.; Rova, M.; Samuelsson, J.; Örnkvist, E.; Schweikart, F.; Fornstedt, T. Investigation of factors influencing the separation of diastereomers of phosphorothioated oligonucleotides. *Anal. Bioanal. Chem.* 2019, **411**(15), p.3383–3394. doi: 10.1007/s00216-019-01813-2.
- 35) Enmark, M.; Bagge, J.; Samuelsson, J.; Thunberg, L.; Örnkvist, E.; Leek, H.; Limé, F.; Fornstedt, T. Analytical and preparative separation of phosphorothioated oligonucleotides: columns and ion-pair reagents. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020, **412**(2), p.299–309. doi: 10.1007/s00216-019-02236-9.
- 36) Chen, B.; Bartlett, M. G. Evaluation of mobile phase composition for enhancing sensitivity of targeted quantification of oligonucleotides using ultra-high performance liquid chromatography and mass spectrometry: Application to phosphorothioate deoxyribonucleic acid. *J. Chromatogr. A.* 2013, **1288**, p.73–81. doi: 10.1016/j.chroma.2013.03.003.
- 37) Anacleto, C.; Ouyé, R.; Schoenbrunner, N. Orthogonal ion pairing reversed phase liquid chromatography purification of oligonucleotides with bulky fluorophores. *J. Chromatogr. A.* 2014, **1329**, p.78–82. doi: 10.1016/j.chroma.2013.12.072.
- 38) Null, A. P.; Nepomuceno, A. I.; Muddiman, D. C. Implications of hydrophobicity and free energy of solvation for characterization of nucleic acids by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2003, **75**(6), p.1331–1339. doi: 10.1021/ac026217o.
- 39) Donegan, M.; Nguyen, J. M.; Gilar, M. Effect of ion-pairing reagent hydrophobicity on liquid chromatography and mass spectrometry analysis of oligonucleotides. *J. Chromatogr. A.* 2022, **1666**, 462860. doi: 10.1016/j.chroma.2022.462860.
- 40) Huang, M.; Xu, X.; Qiu, H.; Li, N. Analytical characterization of DNA and RNA oligonucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2021, **1648**, 462184. doi: 10.1016/j.chroma.2021.462184.
- 41) Alpert, A. J. Hydrophilic–interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr. A.* 1990, **499**, p.177–196. doi: 10.1016/s0021-9673(00)96972-3.
- 42) Lobue, P. A.; Jora, M.; Addepalli, B.; Limbach, P. A. Oligonucleotide analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry in the absence of ion-pair reagents. *J. Chromatogr. A.* 2019, **1595**, p.39–48. doi: 10.1016/j.chroma.2019.02.016.
- 43) Demellenne, A.; Gou, M. J.; Nys, G.; Parulski, C.; Crommen, J.; Servais, A. C.; Fillet, M. Evaluation of hydrophilic interaction liquid chromatography, capillary zone electrophoresis and drift tube ion-mobility quadrupole time of flight mass spectrometry for the characterization of phosphodiester and phosphorothioate oligonucleotides. *J. Chromatogr. A.* 2020, **1614**, 460716. doi: 10.1016/j.chroma.2019.460716.
- 44) Noll, B.; Seiffert, S.; Vornlocher, H. P.; Roehl, I. Characterization of small interfering RNA by non-denaturing ion-pair reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2011, **1218**(33), p.5609–5617. doi: 10.1016/j.chroma.2011.06.057.
- 45) Seiffert, S.; Debelak, H.; Hadwiger, P.; Jahn–Hofmann, K.; Roehl, I.; Vornlocher, H. P.; Noll, B. Characterization of side reactions during the annealing of small interfering RNAs. *Anal. Biochem.* 2011, **414**(1), p.47–57. doi: 10.1016/j.ab.2011.02.040.
- 46) Shimoyama, A.; Fujisaka, A.; Obika, S. Evaluation of size-exclusion chromatography for the analysis of phosphorothioate oligonucleotides. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017, **136**, p.55–65. doi: 10.1016/j.jpba.2016.12.036.
- 47) Kazarian, A. A.; Barnhart, W.; Long, J.; Sham, K.; Wu, B.; Murray, J. K. Purification of N-acetylgalactosamine-modified-oligonucleotides using orthogonal anion-exchange and mixed-mode chromatography approaches. *J. Chromatogr. A.* 2022, **1661**, 462679. doi: 10.1016/j.chroma.2021.462679.
- 48) Zimmermann, A.; Greco, R.; Walker, I.; Horak, J.; Cavazzini, A.; Lämmerhofer, M. Synthetic oligonucleotide separations by mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2014, **1354**, p.43–55. doi: 10.1016/j.chroma.2014.05.048.
- 49) Vanhinsbergh, C.; Hook, E. C.; Oxby, N.; Dickman, M. J. Optimization of orthogonal separations for the analysis of oligonucleotides using 2D-LC. *J. Chromatogr. B.* 2023, **1227**, 123812. doi: 10.1016/j.jchromb.2023.123812.
- 50) Wu, L.; White, D. E.; Ye, C.; Vogt, F. G.; Terfloth, G. J.;

- Matsuhashi, H. Desulfurization of phosphorothioate oligonucleotides via the sulfur-by-oxygen replacement induced by the hydroxyl radical during negative electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2012, **47**(7), p.836-844. doi: 10.1002/jms.3022.
- 51) Pourshahian, S. Therapeutic oligonucleotides, impurities, degradants, and their characterization by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 2021, **40**(2), p.75-109. doi: 10.1002/mas.21615.
- 52) Gut, I. G. Depurination of DNA and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes.* 1997, **169-170**, p.313-322. doi: 10.1016/S0168-1176(97)00208-5.
- 53) Horn, T.; Urdea, M. S. Solid supported hydrolysis of apurinic sites in synthetic oligonucleotides for rapid and efficient purification on reverse-phase cartridges. *Nucleic Acids Res.* 1988, **16**(24), p.11559-11571. doi: 10.1093/nar/16.24.11559.
- 54) Efcavitch, J. W.; Heiner, C. Depurination as a yield decreasing mechanism in oligodeoxynucleotide synthesis. *Nucleosides and Nucleotides.* 1985, **4**(1-2), p.267-267. doi: 10.1080/07328318508077883.
- 55) Septak, M. Kinetic studies on depurination and detritylation of CPG-bound intermediates during oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Res.* 1996, **24**(15), p.3053-3058. doi: 10.1093/nar/24.15.3053.
- 56) Sugiyama, H.; Fujiwara, T.; Ura, A.; Tashiro, T.; Yamamoto, K.; Kawanishi, S.; Saito, I. Chemistry of thermal degradation of abasic sites in DNA. Mechanistic investigation on thermal DNA strand cleavage of alkylated DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 1994, **7**(5), p.673-683. doi: 10.1021/tx00041a013.
- 57) Froehler, B. C.; Matteucci, M. D. Dialkylformamidines: Depurination resistant N6-protecting group for deoxyadenosine. *Nucleic Acids Res.* 1983, **11**(22), p.8031-8036. doi: 10.1093/nar/11.22.8031.
- 58) Sinha, N. D.; Davis, P.; Usman, N.; Pérez, J.; Hodge, R.; Kremsky, J.; Casale, R. Labile exocyclic amine protection of nucleosides in DNA, RNA and oligonucleotide analog synthesis facilitating N-deacylation, minimizing depurination and chain degradation. *Biochimie.* 1993, **75**(1), p.13-23. doi:10.1016/0300-9084(93)90019-O.
- 59) Paul, C. H.; Royappa, A. T. Acid binding and detritylation during oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Res.* 1996, **24**(15), p.3048-3052. doi: 10.1093/nar/24.15.3048.
- 60) Cheruvallath, Z. S.; Carty, R. L.; Andrade, M.; Moore, M. N.; Song, Q.; Rentel, C.; Cole, D. L.; Ravikumar, V. T. Efficient synthesis of antisense phosphorothioate oligonucleotides: Evaluation of dichloroacetic acid at higher concentration to reduce cycle time. *Org. Process Res. Dev.* 2003, **7**(6), p.917-920. doi: 10.1021/op030006j.
- 61) Gaus, H.; Olsen, P.; Sooy, K. V.; Rentel, C.; Turney, B.; Walker, K. L.; McArdle, J. V.; Capaldi, D. C. Trichloroacetaldehyde modified oligonucleotides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, **15**(18), p.4118-4124. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.06.018.
- 62) Capaldi, D. C.; Gaus, H. J.; Carty, R. L.; Moore, M. N.; Turney, B. J.; Decottignies, S. D.; McArdle, J. V.; Scozzari, A. N.; Ravikumar, V. T.; Krotz, A. H. Formation of 4, 4'-dimethoxytrityl-C-phosphonate oligonucleotides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, **14**(18), p.4683-4690. doi: 10.1016/j.bmcl.2004.06.088.
- 63) Cieślak, J.; Ausin, C.; Chmielewski, M. K.; Kauffman, J. S.; Snyder, J.; Del-Grosso, A.; Beaucage, S. L. ³¹P NMR study of the desulfurization of oligonucleoside phosphorothioates effected by "Aged" trichloroacetic acid solutions. *J. Org. Chem.* 2005, **70**(8), p.3303-3306. doi: 10.1021/jo050035n.
- 64) Cvetovich, R. J. Hydrogen peroxide oxidation of phosphite triesters in oligonucleotide syntheses. *Org. Process Res. Dev.* 2010, **14**(1), p.295-297. doi: 10.1021/op900044z.
- 65) Yu, D.; Tang, J.; Iyer, R. P.; Agrawal, S. Diethoxy N, N-diisopropyl phosphoramidite as an improved capping reagent in the synthesis of oligonucleotides using phosphoramidite chemistry. *Tetrahedron Lett.* 1994, **35**(46), p.8565-8568. doi: 10.1016/S0040-4039(00)78437-1.
- 66) Ravikumar, V. T.; Kumar, R. K.; Capaldi, D. C.; Turney, B.; Rentel, C.; Cole, D. L. Antisense phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide targeted against ICAM-1: Use of I-linker to eliminate 3'-terminal phosphorothioate monoester formation. *Org. Process Res. Dev.* 2003, **7**(3), p.259-266. doi: 10.1021/op020098x.
- 67) Krotz, A. H.; Klopchin, P. G.; Walker, K. L.; Srivatsa, G. S.; Cole, D. L.; Ravikumar, V. T. On the formation of longmers in phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 1997, **38**(22), p.3875-3878. doi: 10.1016/S0040-4039(97) 00798-3.
- 68) Iyer, R. P.; Egan, W.; Regan, J. B.; Beaucage, S. L. 3H-1, 2-benzodithiole-3-one 1,1-dioxide as an improved sulfurizing reagent in the solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, **112**(3), p.1253-1254. doi: 10.1021/ja00159a059.

- 69) Iyer, R. P.; Phillips, L. R.; Egan, W.; Regan, J. B.; Beaucage, S. L. The automated synthesis of sulfur-containing oligodeoxyribonucleotides using 3H-1,2-benzodithiol-3-one 1,1-dioxide as a sulfur-transfer reagent. *J. Org. Chem.* 1990, **55**(15), p.4693-4699. doi: 10.1021/jo00302a039.
- 70) Cheruvallath, Z. S.; Carty, R. L.; Moore, M. N.; Capaldi, D. C.; Krotz, A. H.; Wheeler, P. D.; Turney, B. J.; Craig, S. R.; Gaus, H. J.; Scozzari, A. N.; Cole, D. L.; Ravikumar, V. T. Synthesis of antisense oligonucleotides: Replacement of 3H-1,2-benzodithiol-3-one 1,1-dioxide (beaucage reagent) with phenylacetyl disulfide (PADS) as efficient sulfurization reagent: From bench to bulk manufacture of active pharmaceutical ingredient. *Org. Process Res. Dev.* 2000, **4**(3), p.199-204. doi: 10.1021/op990077b.
- 71) Tang, J. -Y.; Han, Y.; Tang, J. X.; Zhang, Z. Large-scale synthesis of oligonucleotide phosphorothioates using 3-amino-1,2,4-dithiazole-5-thione as an efficient sulfur-transfer reagent. *Org. Process Res. Dev.* 2000, **4**(3), p.194-198. doi: 10.1021/op990092g.
- 72) Krotz, A. H.; Gorman, D.; Mataruse, P.; Foster, C.; Godbout, J. D.; Coffin, C. C.; Scozzari, A. N. Phosphorothioate oligonucleotides with low phosphate diester content: Greater than 99.9% sulfurization efficiency with "Aged" solutions of phenylacetyl disulfide (PADS). *Org. Process Res. Dev.* 2004, **8**(6), p.852-858. doi: 10.1021/op040208v.
- 73) Sinha, N. D.; Kuchimanchi, S. N.; Miranda, G.; Shaikh, S. Manufacture of therapeutic oligonucleotides: Development of new reagents and processes. *Indian J. Chem.* 2006, **45B**, p.2297-2304.
- 74) Rodriguez, A. A.; Cedillo, I.; Mowery, B. P.; Gaus, H. J.; Krishnamoorthy, S. S.; McPherson, A. K. Formation of the N²-acetyl-2,6-diaminopurine oligonucleotide impurity caused by acetyl capping. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, **24**(15), p.3243-3246. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.06.025.
- 75) Rentel, C.; Gaus, H.; Bradley, K.; Luu, N.; Kolkey, K.; Mai, B.; Madsen, M.; Pearce, M.; Bock, B.; Capaldi, D. Assay, purity, and impurity profile of phosphorothioate oligonucleotide therapeutics by ion pair-HPLC-MS. *Nucleic Acid Thera.* 2022, **32**(3), p.206-220. doi: 10.1089/nat.2021.0056.
- 76) Eadie, J. S.; Davidson, D. S. Guanine modification during chemical DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* 1987, **15**(20), p.8333-8349. doi: 10.1093/nar/15.20.8333.
- 77) Masaki, Y.; Onishi, Y.; Seio, K. Quantification of synthetic errors during chemical synthesis of DNA and its suppression by non-canonical nucleosides. *Sci. Rep.* 2022, **12**(1), p.12095. doi: 10.1038/s41598-022-16222-2.
- 78) Rodriguez, A. A.; Cedillo, I.; McPherson, A. K. Conversion of adenine to 5-amino-4-pyrimidinylimidazole caused by acetyl capping during solid phase oligonucleotide synthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016, **26**(15), p.3468-3471. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.06.042.
- 79) Lorenz, S.; Przybytek, J.; Snoble, K. Synthesis of oligonucleotides or phosphorothioate oligonucleotide with a capping agent of N-methylimidazole free of 1,3,5-trimethylhexahydro-1,3,5-triazine. WO2009052034A1.
- 80) Capaldi, D. C.; Gaus, H.; Krotz, A. H.; Arnold, J.; Carty, R. L.; Moore, M. N.; Scozzari, A. N.; Lowery, K.; Cole, D. L.; Ravikumar, V. T. Synthesis of high-quality antisense drugs. addition of acrylonitrile to phosphorothioate oligonucleotides: Adduct characterization and avoidance. *Org. Process Res. Dev.* 2003, **7**(6), p.832-838. doi: 10.1021/op020090n.
- 81) Eritja, R.; Robles, J.; Aviñó, A.; Alberico, F.; Pedroso, E. A synthetic procedure for the preparation of oligonucleotides without using ammonia and its application for the synthesis of oligonucleotides containing O-4-alkyl thymidines. *Tetrahedron.* 1992, **48**(20), p.4171-4182. doi: 10.1016/S0040-4020(01) 92195-7.
- 82) Umemoto, T.; Wada, T. Nitromethane as a scavenger of acrylonitrile in the deprotection of synthetic oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* 2005, **46**(24), p.4251-4253. doi: 10.1016/j.tetlet.2005.04.066.
- 83) Ravikumar, V. T.; Manoharan, M.; Capaldi, D. C.; Krotz, A.; Cole, D. L.; Guzaev, A. Process for the synthesis of oligomeric compounds. US6465628.
- 84) Sinha, N. D. Method of preventing modification of synthetic oligonucleotides. US7038027B2.
- 85) Solomon, J. J.; Cote, I. L.; Wortman, M.; Decker, K.; Segal, A. In vitro alkylation of calf thymus DNA by acrylonitrile. Isolation of cyanoethyl-adducts of guanine and thymine and carboxyethyl-adducts of adenine and cytosine. *Chem. Biol. Interact.* 1984, **51**(2), p.167-190. doi: 10.1016/0009-2797(84) 90028-0.
- 86) Solomon, J. J.; Segal, A. Direct alkylation of calf thymus DNA by acrylonitrile. Isolation of cyanoethyl adducts of guanine and thymine and carboxyethyl adducts of adenine and cytosine. *Environ. Health Perspect.* 1985, **62**, p.227-230. doi: 10.1289/ehp.8562227.
- 87) Karran, P.; Lindahl, T. Hypoxanthine in deoxyribonucleic acid: Generation by heat-induced hydrolysis of adenine residues and release in free form

- by a deoxyribonucleic acid glycosylase from calf thymus. *Biochemistry*. 1980, **19**(26), p.6005–6011. doi: 10.1021/bi00567a010.
- 88) Lindahl, T.; Nyberg, B. Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*. 1974, **13**(16), p.3405–3410. doi: 10.1021/bi00713a035.
- 89) Ehrlich, M.; Norris, K. F.; Wang, R. Y.; Kuo, K. C.; Gehrke, C. W. DNA cytosine methylation and heat-induced deamination. *Biosci. Rep.* 1986, **6**(4), p.387–393. doi: 10.1007/BF01116426.
- 90) Rentel, C.; DaCosta, J.; Roussis, S.; Chan, J.; Capaldi, D.; Mai, B. Determination of oligonucleotide deamination by high resolution mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019, **173**, p.56–61. doi: 10.1016/j.jpba.2019.05.012.
- 91) Reddy, M. P.; Hanna, N. B.; Farooqui, F. Fast cleavage and deprotection of oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* 1994, **35**(25), p.4311–4314. doi: 10.1016/S0040-4039(00)73341-7.
- 92) Rentel, C.; Wang, X.; Batt, M.; Kurata, C.; Oliver, J.; Gaus, H.; Krotz, A. H.; McArdle, J. V.; Capaldi, D. C. Formation of modified cytosine residues in the presence of depurinated DNA. *J. Org. Chem.* 2005, **70**(20), p.7841–7845. doi: 10.1021/jo050767f.
- 93) Cramer, H.; Finn, K. J.; Sinha, N. D. “Analysis of Oligonucleotides and Their Related Substances; ChromSoc separation science series” Chapter 2—oligonucleotide impurities and their origin. ILM Publications, 2013.
- 94) Calvitt, C. J.; Levin, D. S.; Shepperd, B. T.; Gruenloh, C. J. Chemistry at the 2' position of constituent nucleotides controls degradation pathways of highly modified oligonucleotide molecules. *Oligonucleotides*. 2010, **20**(5), p.239–251. doi: 10.1089/oli.2010.0250.
- 95) Seiffert, S.; Debelak, H.; Hadwiger, P.; Jahn-Hofmann, K.; Roehl, I.; Vornlocher, H. -P.; Noll, B. Characterization of side reactions during the annealing of small interfering RNAs. *Anal. Biochem.* 2011, **414**(1), p.47–57. doi: 10.1016/j.ab.2011.02.040.
- 96) Doerr, I. L.; Fox, J. J. Nucleosides. XXXIX. 2'-deoxy-2'-fluorocytidine, 1-beta-D-arabinofuranosyl-2-amino-1,4(2H)-4-iminopyrimidine, and related derivatives. *J. Org. Chem.* 1967, **32**(5), p.1462–1471. doi: 10.1021/jo01280a035.
- 97) Krug, A.; Oretskaya, T. S.; Volkov, E. M.; Cech, D.; Shabarova, Z. A.; Rosenthal, A. The behaviour of 2'-deoxy-2'-fluorouridine incorporated into oligonucleotides by the phosphoramidite approach. *Nucleosides and Nucleotides*. 1989, **8**(8), p.1473–1483. doi: 10.1080/07328318908048855.
- 98) Kodra, J. T.; Kehler, J.; Dahl, O. Stability of oligodeoxynucleoside phosphorodithioates and phosphorothioates in aqueous ammonia. *Nucleic Acids Res.* 1995, **23**(16), p.3349–3350. doi: 10.1093/nar/23.16.3349.
- 99) Reese, C. Avoidance of sulfur loss during ammonia treatment of oligonucleotide phosphorothioates. *Nucleic Acids Res.* 1997, **25**(14), p.2943–2944. doi: 10.1093/nar/25.14.2943.
- 100) Turney, B. J.; Cheruvallath, Z. S.; Andrade, M.; Cole, D. L.; Ravikumar, V. T. Stability of phosphorothioate oligonucleotides in aqueous ammonia in presence of stainless steel. *Nucleosides and Nucleotides*. 1999, **18**(1), p.89–93. doi: 10.1080/07328319908045596.
- 101) Paredes, E.; Aduda, V.; Ackley, K. L.; Cramer, H. “Comprehensive Medicinal Chemistry III” 6.11—Manufacturing of Oligonucleotides. Chackalamannil, S., Rotella, D., Ward, S. E., Eds.; Elsevier: Oxford, 2017; pp 233–279. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.12423-0.
- 102) Ravikumar, V. T.; Kumar, R. K.; Olsen, P.; Moore, M. N.; Carty, R. L.; Andrade, M.; Gorman, D.; Zhu, X.; Cedillo, I.; Wang, Z.; Mendez, L.; Scozzari, A. N.; Aguirre, G.; Somanathan, R.; Berneès, S. UnyLinker: An efficient and scaleable synthesis of oligonucleotides utilizing a universal linker molecule: A novel approach to enhance the purity of Drugs. *Org. Process Res. Dev.* 2008, **12**(3), p.399–410. doi: 10.1021/op8000178.
- 103) Cedillo, I.; Chreng, D.; Engle, E.; Chen, L.; McPherson, A.; Rodriguez, A. Synthesis of 5'-GalNAc-conjugated oligonucleotides: A comparison of solid and solution-phase conjugation strategies. *Molecules*. 2017, **22**(8), p.1356. doi: 10.3390/molecules22081356.
- 104) Krotz, A. H.; Carty, R. L.; Moore, M. N.; Scozzari, A. N.; Cole, S. D.; Ravikumar, V. T. Synthesis of antisense oligonucleotides. *Green Chemistry*. 1999, **1**(6), p.277–281. doi: 10.1039/A907685L.
- 105) Fleming, A. M.; Muller, J. G.; Dlouhy, A. C.; Burrows, C. J. Structural context effects in the oxidation of 8-oxo-7,8-dehydro-2'-deoxyguanosine to hydrantion products: electrostatics, base stacking, and base pairing. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, **134**(36), p.15091–15102. doi: 10.1021/ja306077b.
- 106) Kiesman, W. F.; McPherson, A. K.; Diorazio, L. J.; Van den Bergh, L.; Smith, P. D.; Northall, J. M.; Fettes, A.; Wang, T.; Mehlmann, M.; Raza, S.; Held, G. Perspectives on designation of oligonucleotide starting materials. *Nucleic Acid Ther.* 2021, **31**(2), p.93–113. doi:

- 10.1089/nat.2020.0909.
- 107) Kupfer, P. A.; Leumann, C. J. The chemical stability of abasic RNA compared to abasic DNA. *Nucleic Acids Res.* 2007, **35**(1), p.58–68. doi: 10.1093/nar/gkl948.
- 108) Oivanen, M.; Kuusela, S.; Lonnberg, H. Kinetics and mechanisms for the cleavage and isomerization of the phosphodiester bonds of RNA by brønsted acids and bases. *Chem. Rev.* 1998, **98**(3), p.961–990. doi: 10.1021/cr960425x.
- 109) Brooks, J. L.; Olsen, P.; Chen, L.; Rodriguez, A. A. UnyLinker dimer impurity characterization and process improvement. *Tetrahedron Lett.* 2017, **58**(11), p.1050–1052. doi: 10.1016/j.tetlet.2017.01.101.
- 110) Cazenave, C.; Bathany, K.; Rayner, B. Formation of *N*-branched oligonucleotides as by-product in solid-phase oligonucleotides synthesis. *Oligonucleotides.* 2006, **16**(2), p.181–185. doi: 10.1089/oli.2006.16.181.