

应用纪要

使用沃特世分析型馏分收集管理器系统对寡核苷酸进行实验室规模的纯化

Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本应用简报证明，沃特世分析型馏分收集管理器(WFM-A)提供了一种分析级解决方案，适用于从可能影响产品安全性和有效性的工艺相关杂质中分离和富集治疗性寡核苷酸。

优势

沃特世馏分收集管理器(WFM-A)用于从工艺相关杂质中高效分离和富集治疗性寡核苷酸。

简介

通过自动化分步合成方法以高产率生产寡核苷酸的技术已经非常成熟。这项工艺虽然非常高效，每个偶联步骤的产率超过99%，但随着寡核苷酸长度增加，总产率仍然可能低于预期。即使是中等序列长度(21 mer)的寡核苷酸，如果不进行进一步纯化，99%的偶联效率得到的产物纯度最高仅为81%¹。合成产物在使用前必须进行表征，以确保产品特性和纯度²。这在siRNA基因沉默等治疗应用中尤为重要，在这些应用中，合成副产物（如失效序列和生产杂质）可能导致脱靶基因沉默和药物疗效减弱¹。

在实践中，寡核苷酸的商业化合成得到的产物纯度足以满足多种应用的需求；然而，当生产纯度不足时，需要采用高效且易于实施的纯化策略。

结果与讨论

沃特世分析型馏分收集管理器(WFM-A)系统是一种适用于UPLC系统的馏分收集器（图1），可大幅减少馏分损失和残留，以高纯度和高回收率高效收集少量材料³。WFM-A设计为直接集成到现有的UPLC仪器组合中，可以使用图2所示的Waters Empower色谱数据软件进行控制。该仪器可设置为使用时间、斜率或阈值以自动方式收集馏分。本研究使用商业化合成21-mer siRNA的处理后色谱图设置Collection Event Table（收集事件表），以分离亲本siRNA与其杂质（图2，绿色框）。



图1. 沃特世分析型馏分收集管理器(WFM-A)系统WFM-A的特殊设计有助于集成到现有的沃特世UPLC平台中，以高纯度和高回收率高效收集分布窄且邻近洗脱的化合物。

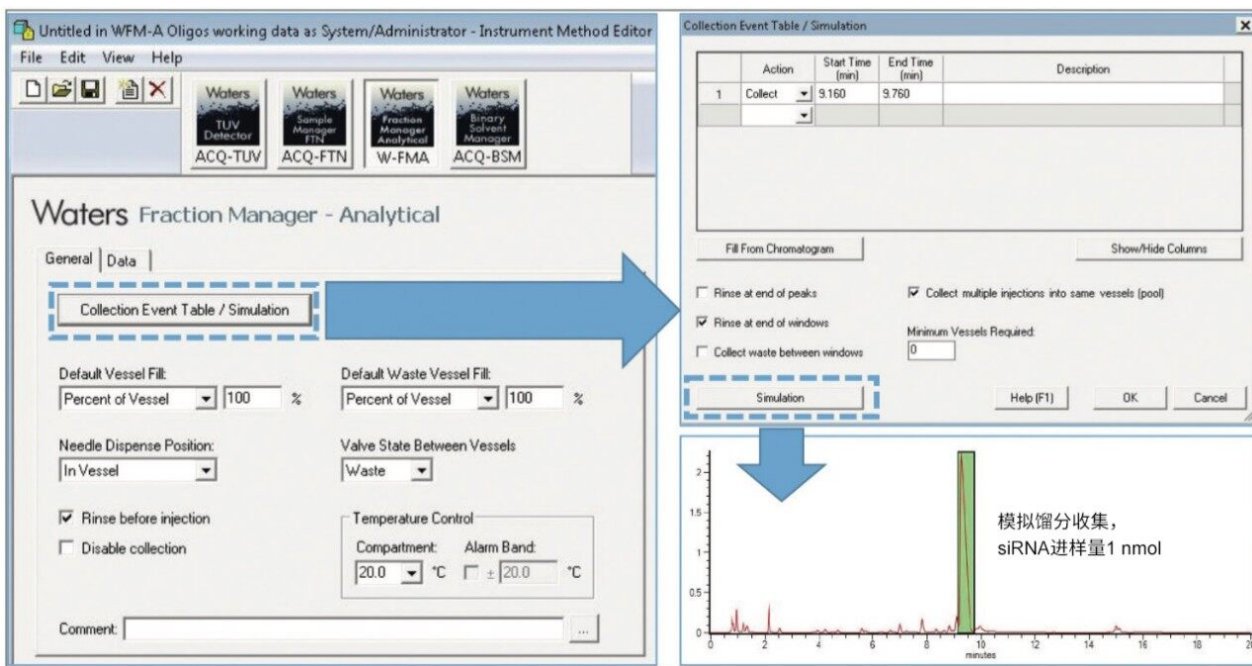


图2.WFM-A仪器控制设置。WFM-A可设置为使用时间、斜率或阈值事件以自动方式收集馏分。在本例中，使用Fill from Chromatogram（从色谱图填充）功能在Collection Event Table（收集事件表）中自动输入9.16~9.76 min的时间窗口，该功能可以从处理后色谱图中提取和模拟收集时间。

使用9.16~9.76 min的收集窗口分离亲本siRNA并连续两次进样1 nmol合成产物后，将收集的馏分通过真空离心机干燥，并按照与初始原料相同的浓度复溶，以方便比较。如图3所示，在父峰具有等效载样量的条件下，使用沃特世馏分收集管理器可将商业化合成的siRNA纯度提高至97%以上，该方法更适合基因沉默实验等治疗应用¹。

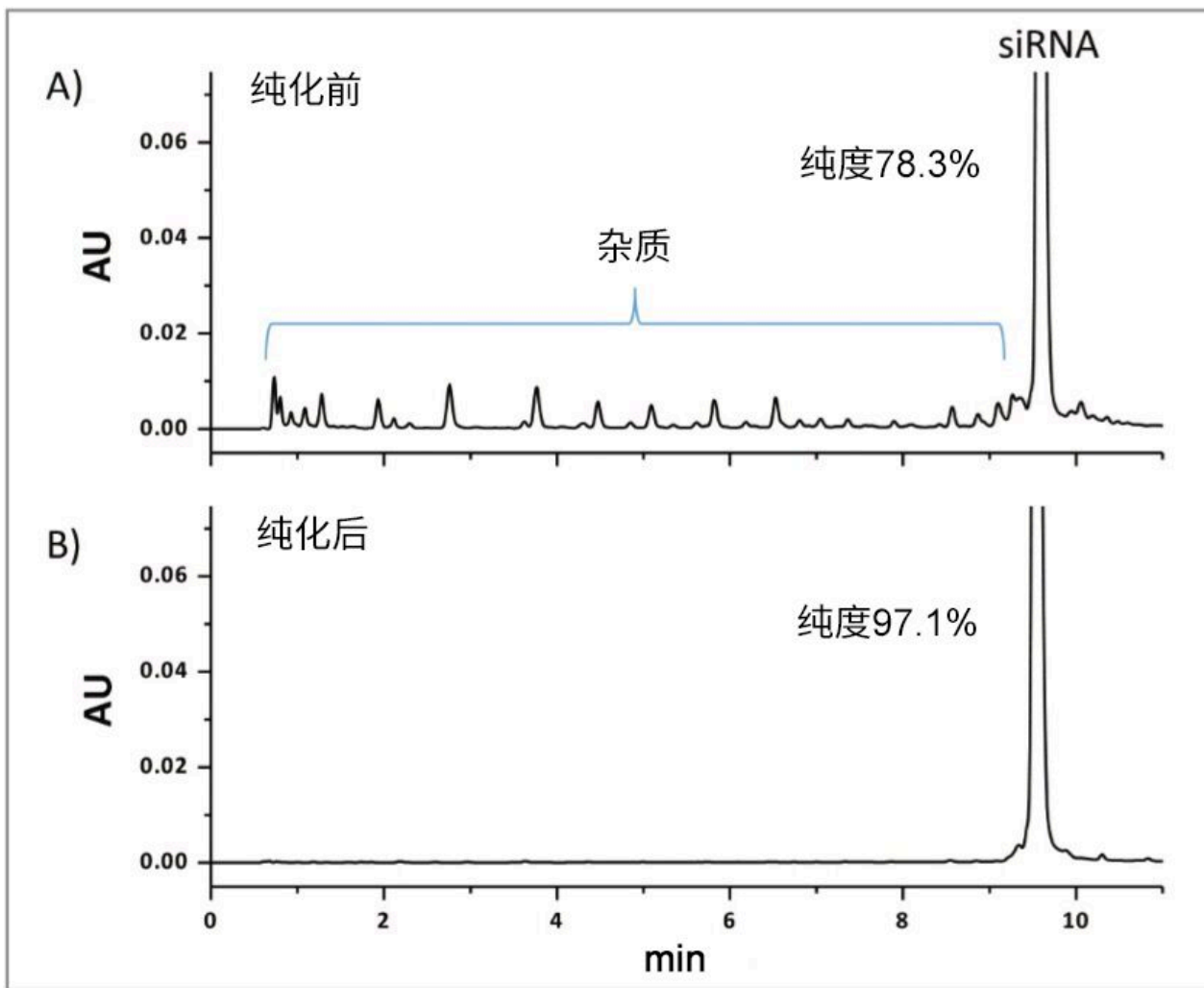


图3.WFM-A评价：A)使用Waters OST BEH C₁₈色谱柱(130 Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm)，将流动相B在10 min梯度时间内从5%增加到13%，将商业化合成的21-mer siRNA (5'-TTCCUUGUAAUCGCUUGACGA-3')与其杂质分离。流动相A为含15 mM丁胺:50 mmHFIP的水溶液。流动相B为含15 mM丁胺:50 mmHFIP的甲醇溶液。B)使用WFM-A纯化后，在相同的条件下分离相同的商业化合成21-mer，将载样量归一化至目标峰面积。

结论

沃特世分析型馏分收集管理器(WFM-A)提供了一种分析级解决方案，适用于从可能影响药品安全性和有效性的工艺相关杂质中分离和富集治疗性寡核苷酸。WFM-A的紧凑设计容易与沃特世低扩散UPLC系统集成，便于实施小规模工作流程，提高回收率并尽量降低残留。WFM-A是有助于提升工作流程效率的馏分收集解决方案，非常适合分析级纯化、富集和杂质分离应用。

参考资料

1. McCarthy, S., Gilar, M., Gebler, J. Reversed-phase ion-pair liquid chromatography analysis and purification of small interfering RNA. *Analytical Biochemistry* 2009; 390: 181-188.
2. Birdsall, R., Yu, YQ. High-throughput Screening of Oligonucleotides for Identity and Purity Assesment Using the ACQUITY QDa Detector and ProMass for MassLynx. 2016; 720005681EN.
3. Aubin, A., Jablonski, J. Small Scale Peptide and Impurity Isolation Using the ACQUITY UPLC H-Class and Waters Fraction Manager – Analytical Systems. 2015; 720005500EN.

特色产品

沃特世分析型馏分收集管理器 <<https://www.waters.com/134782878>>

Empower 3 色谱数据软件 <<https://www.waters.com/10190669>>

720005923ZH, 2017年2月