

使用MaxPeak Premier色谱柱技术在非变性UPLC条件下分析siRNA双链体

Pratheeba Yogendrarajah, Willy Verluyten, Evelien Dejaegere, Leslie Napoletano, Jean-Paul Boon, Mario Hellings, Martin Gilar

Analytical Development, Janssen Pharmaceutical Companies of Johnson & Johnson, Waters Corporation

摘要

本文探讨了Waters ACQUITY UPLC H-Class系统结合ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱在非变性条件下分析两种沉默RNA或小分子干扰RNA (siRNA)混合物的应用。分析由两种混合siRNA双链体组成的药物制剂，目的在于分离和定量完整双链体及其单链寡核苷酸污染物。我们开发出采用UV检测的离子对反相(IP-RP) UPLC方法来表征治疗药物。在非变性条件下（柱温20 °C）操作色谱柱，使siRNA物质保持双链体形式，并与单链寡核苷酸达到良好的色谱分离度。结果表明MaxPeak Premier色谱柱技术为siRNA分析提供了优异的样品回收率、分离选择性、定量重现性和线性。

优势

- ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱可准确、可重现地分离siRNA双链体
 - ACQUITY Premier色谱柱可消除金属表面和色谱柱筛板上不良的寡核苷酸吸附。使用该色谱柱时未观察到柱上降解和明显残留
 - siRNA双链体的色谱分离度能够使单个物质实现可靠鉴定和定量。获得双链体摩尔比并实现药品制剂中双链体杂质/变体准确定量
-

- 过量单链寡核苷酸得到准确测定

简介

寡核苷酸和siRNA双链体是一类不断发展的核酸类治疗化合物^{1,2}。IP-RP LC方法适用于在LC-UV和LC-MS设置下对这些新型药物进行高灵敏度分析。siRNA分子较短（约20~25个碱基对），经化学修饰的RNA双链体能够在体内调节蛋白质表达。siRNA可在变性条件下将双链体转化为两个互补的寡核苷酸分析³，也可以在非变性条件下以完整双链体形式分析⁴。例如，需要估计siRNA双链体制剂中单链寡核苷酸过量程度的情况时，即可使用后一种方法。非变性IP-RP LC分析在寡核苷酸合成后退火程序的优化中发挥着关键作用。本应用纪要介绍如何分析含两种siRNA双链体的制剂。复杂混合物的定量测定和表征对于药品制剂的安全性和有效性至关重要。IP-RP LC与MS检测联用是解析复杂分析中样品组分的重要方法。

实验

样品制备

用软化水制备样品参比溶液，两种siRNA双链体的参比溶液浓度为2.0 mg/mL；表示100%标准品。制备相关参比溶液，浓度为参比溶液浓度的70%、100和130%（高浓度）和0.2%、2.0%、4.0%和6.0%（低浓度）。将药物制剂以2.0 mg/mL的标示浓度溶于软化水中。用软化水制备单链寡核苷酸单标和siRNA双链体单标（“双链体1”和“双链体2”），浓度为0.10 mg/mL，用于分离选择性研究。

仪器

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统由四元溶剂管理器QSM、柱温箱模块CM-A、主动预加热器APH、流通针式样品管理器FTN SM和配备分析流通池的光电二极管阵列检测器PDA组成。建议在QSM泵中使用与THF/己烷兼容的单向阀（部件号：[700005273 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/service-parts--kits/700005273-assembly-check-valve-dual-ball--seat.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/service-parts--kits/700005273-assembly-check-valve-dual-ball--seat.html)），以确保使用HFIP溶剂时正常运行。启用色谱柱管理器中的预加热器功能。样品管理器(SM)清洗液为甲醇，SM灌注和密封件清洗液为水/乙腈(90/10, v/v)。

数据管理

采用Empower 3.0版软件进行样品积分和定量分析。

方法条件

色谱柱：ACQUITY Premier BEH C₁₈肽分析专用柱, 300 Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 150 mm（部件号：[186009495 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186009495-acquity-premier-peptide-beh-c18-column-300a-17--m-21-x-150-mm-1-.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186009495-acquity-premier-peptide-beh-c18-column-300a-17--m-21-x-150-mm-1-.html)）。为确保储存后的色谱柱能够可靠地分离双链体，将色谱柱在50 °C的柱温下用乙腈/水/甲酸(90/10, 0.1, v/v)以0.30 mL/min的流速冲洗至少2 h。

流动相A：含0.2% (v/v)己胺(HA)和0.5% (v/v) 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)的Milli-Q水溶液（浓度相当于15 mM HA和47.5 mM HFIP水溶液）。将500 mL水转移至1000 mL容量瓶中，使用移液器加入5.0 mL HFIP，然后加入2.0 mL HA，制得流动相A。用磁力搅拌棒充分混合，直至胺溶解。加入剩余的493 mL水，使总体积达到1000 mL，然后充分混合。

流动相B：80%甲醇/20%乙腈(v/v)。将800 mL甲醇与200 mL乙腈混合，制得流动相B。使用前充分混合。

柱温：	20 °C
自动进样器温度：	10 °C
流速：	0.15 mL/min
检测条件：	UV 260 nm，采样速率5 pt/s
进样体积：	6 μL

表1列出了设置的线性梯度。

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%体积)	B (%体积)	曲线
0	0.15	50	50	初始
30	0.15	20	80	6
31	0.15	50	50	6
40	0.15	50	50	6

数据处理和分析

图1所示为峰面积估算示例。将色谱图中双链体1区域（在21.19 min附近洗脱的峰）和双链体2区域（在23.34 min附近洗脱的峰）的峰面积相加，计算峰面积。利用峰面积总和进行方法认证（见表2）。

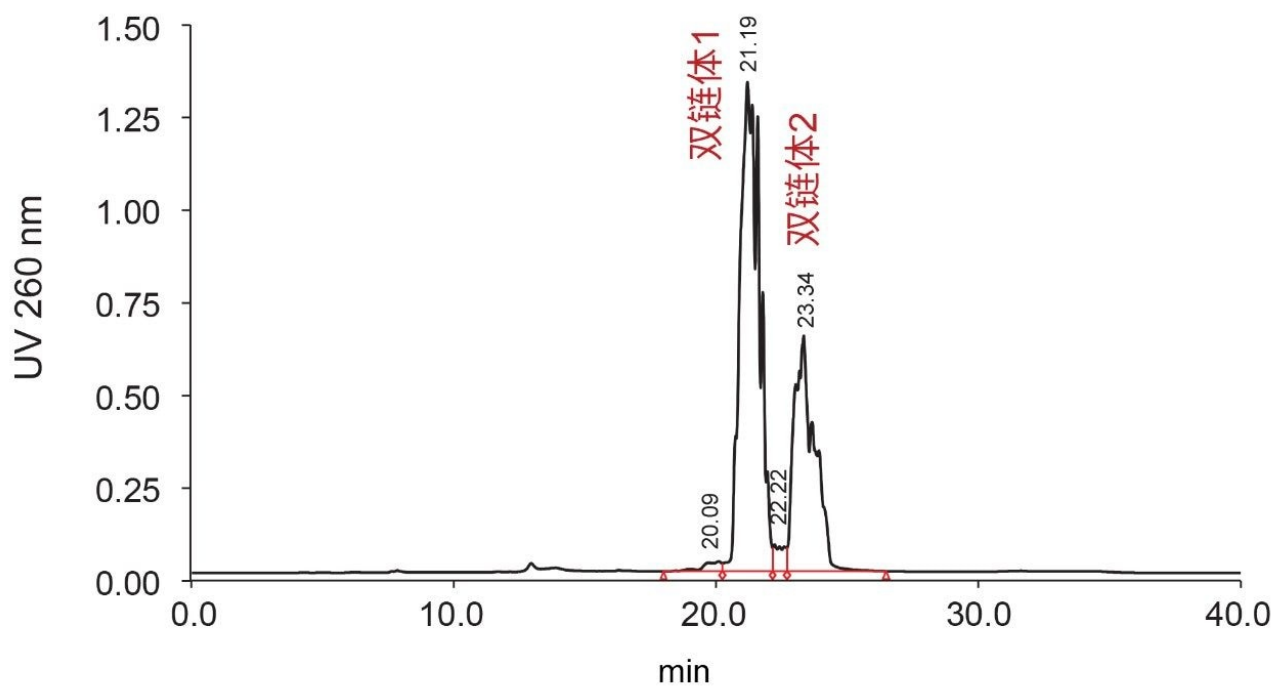


图1.利用非变性 $IP-RP$ LC分析参比溶液（两种 $siRNA$ 双链体的混合物）。 $siRNA$ 物质以双链体形式洗脱。双链体1和双链体2分离成多个峰是因为母体寡核苷酸中存在非对映体。

方法认证总结

检测/浓度水平*	可接受范围	观测值	结果
0.2%	回收率50-150%	92.8%	合格
2%	回收率70-130%	97.3%	合格
4%	回收率80-120%	99.9%	合格
6%	回收率80-120%	101.1%	合格
70%	回收率95-105%	103.6%	合格
100%	回收率95-105%	102.5%	合格
130%	回收率95-105%	101.8%	合格
精密度100%	重复性: $\leq 5.0\%$	0.1-0.2%	合格
线性0.2-130%	$R \geq 0.99$; $RSD \leq 10.0\%$	1.00; 3.6%	合格
检测限0.1%	可检测	$S/N \geq 3$	合格

表2.利用 $IP-RP$ LC方法得到的 $siRNA$ 双链体分析结果

结果与讨论

解决LC中的非特异性siRNA损失问题

有研究表明，寡核苷酸和双链体核酸对带正电荷的金属表面具有高亲和力⁵⁻⁹。我们的实验室在使用常规ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱或通常由不锈钢材料制成的色谱柱时，观察到寡核苷酸样品损失^{3,6,7}。最近的报告指出，样品损失主要发生在液相色谱柱结构中所用的不锈钢（和未改性钛）筛板上；这是由于筛板可用于样品吸附的表面积多⁶。低浓度酸性样品（如核酸）的样品损失最为明显。我们开发出MaxPeak Premier新型色谱柱技术以减少样品损失，该技术采用杂化硅胶，旨在减少色谱柱硬件（或液相色谱系统）内的不良样品吸附^{5,8,9}。与多个厂家的常规色谱柱相比，ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱提高了样品回收率，因此我们选择该色谱柱开展进一步的方法开发³。

siRNA双链体与单链寡核苷酸杂质的分离

图2显示了为分离单链寡核苷酸和两种siRNA双链体而开发的优化方法（见实验部分）。一般来说，与单链寡核苷酸相比，双链体DNA或RNA在IP-RP LC中的保留性更强⁴。单链物质在色谱图早期洗脱，并与双链体完全分离。但是，由于制剂中存在两种单独的siRNA双链体，我们的分离任务也变得更复杂。分离双链体1与双链体2是一项公认的挑战。在所有被测色谱柱中，填充1.7 μm吸附剂的150（柱长）× 2.1 mm ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱提供了出色的分离结果。请注意，双链体1和2（见图2中的棕色和深蓝色色谱图）均部分分离成多个峰。siRNA双链体洗脱区域内的所有峰都具有其预期质量数。显然，这种分离是由于双链体物质中存在光学异构体（非对映体）^{10,11}。单链寡核苷酸母体含有产生光学异构体的核苷酸间硫代磷酸酯键。由于存在非对映体，单链物质的“峰展宽”也很明显，其中双链体2的反义峰较为显著。

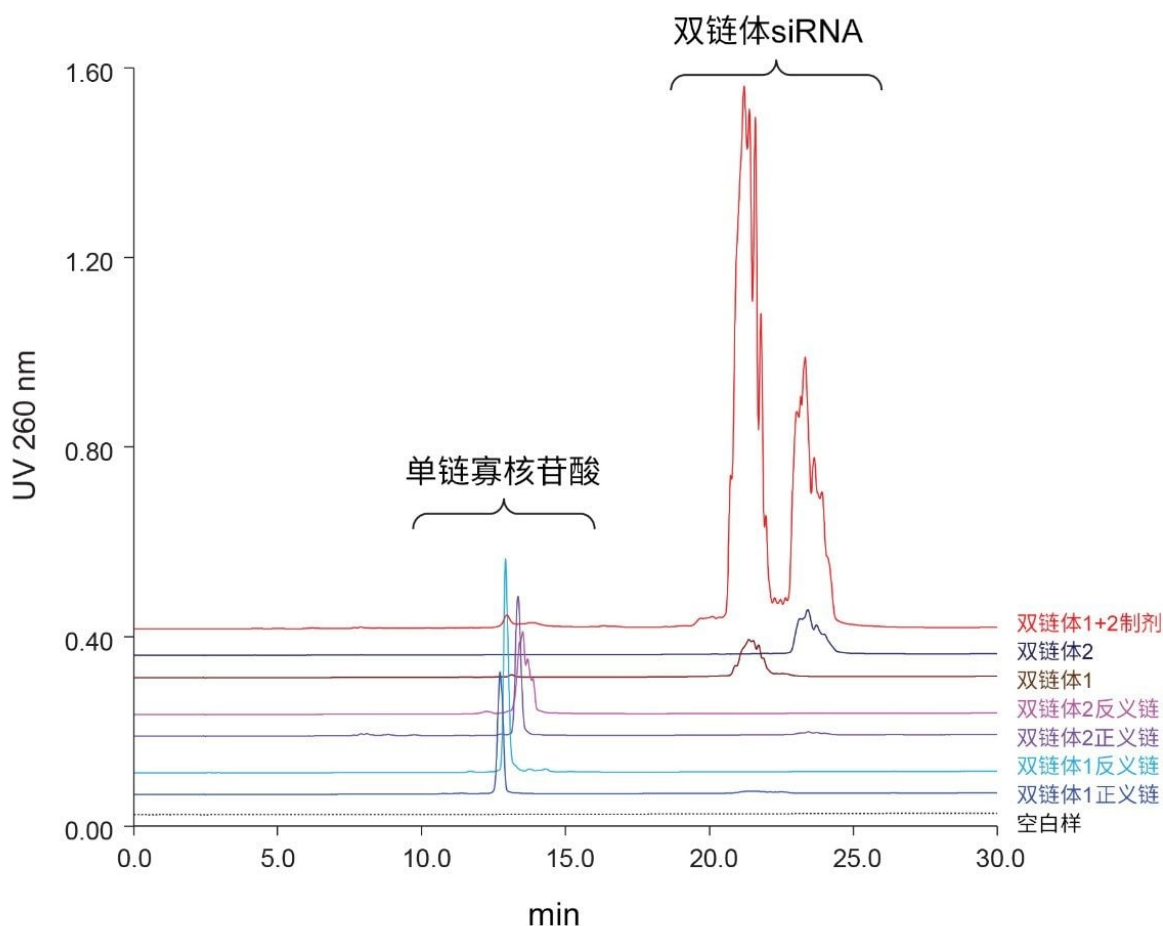


图2.单链和双链体siRNA成分的IP-RP LC保留研究

siRNA残留研究

样品在金属液相色谱系统硬件和标准不锈钢色谱柱上的吸附是造成核酸液相色谱分析中样品残留升高的一个疑似影响因素⁶。我们使用优化方法评价了ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱的样品残留性能。图3显示，空白样色谱图不包含任何显著的系统峰；观察到因梯度程序导致的适度基线漂移。接下来进样0.2%定量限标准品（LOQ样品水平）用于比较；可接受的残留应明显低于LOQ样品信号。随后进样100%样品标准品（数据未显示）；主要siRNA信号响应分别为1.2 AU和0.6 AU（参见图2中的红色色谱图），然后再执行一次空白进样（图3中的红色色谱图）。图3显示，残留低于噪音水平。该结果可确证，残留不会影响定量结果。

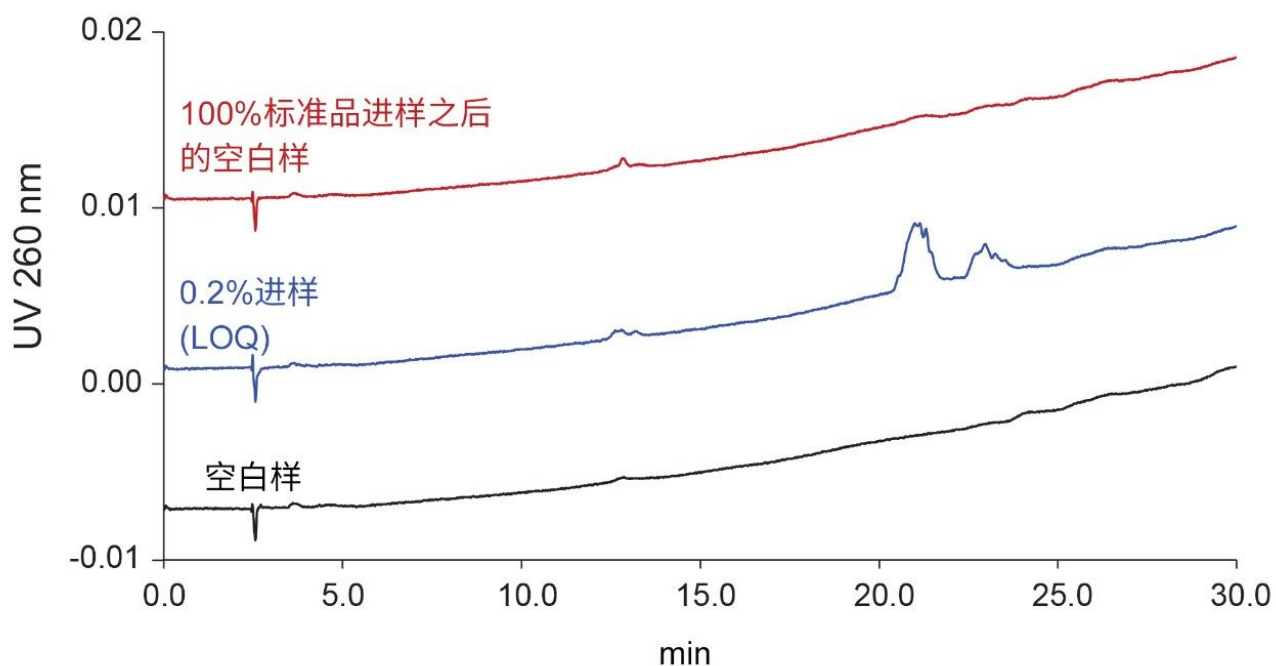


图3.IP-RP LC残留研究

结论

离子对反相非变性IP-RP LC方法适用于分离单链杂质与siRNA双链体。经过优化的离子对体系可分离和表征药物制剂中存在的两种siRNA双链体。所用流动相能够兼容MS检测，以便根据分子量确证洗脱物质。本研究证明，ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱适用于对siRNA双链体进行稳定的定量分析，分析结果不受残留影响。ACQUITY Premier色谱柱使分析人员对定量准确度更有把握；其性能满足回收率、重现性和线性等认证参数的质量要求。

参考资料

1. K. E. Lundin, O. Gissberg, C. I. E. Smith.(2015).*Oligonucleotide Therapies: The Past and*

*Present.Hum.Gene.Ther.*26: 475–485.DOI: 10.1089/hum.2015.070.

2. A. Khvorova, J. K. Watts.(2017).The Chemical Evolution of Oligonucleotide Therapies in Clinical Utility.*Nat Biotechnology* 35:238–248.
3. I. Suarez Marina, W. Verluyten, E. Dejaegere, L. Napoletano, M. Gilar, J-P. Boon, M. Hellings (2021).使用MaxPeak Premier色谱柱技术在变性UPLC条件下分析siRNA药物.沃特世应用纪要, [720007362ZH](#), 2021.
4. S. M. McCarthy, M. Gilar, J. Gebler.(2009).Reversed-Phase Ion-Pair Liquid Chromatography Analysis and Purification of Small Interfering RNA. *Anal.Biochem.*390: 181-188.
5. M. DeLano, T. H. Walter, M. A. Lauber, M. Gilar, M. C. Jung, J. M. Nguyen, C. Boissel, A. V. Patel, A. Bates-Harrison, K. D. Wyndham (2021).Using Hybrid Organic–Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC, *Anal.Chem.*, 93:5773–5781.doi: 10.1021/acs.analchem.0c05203.
6. M. Gilar, M. DeLano, F. Gritti (2021), Mitigation of Analyte Loss on Metal Surfaces in Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.A*, 1650: 462247.
7. R. Tuytten, F. Lemièrre, E. Witters, W. Van Dongen, H. Slegers, R.P. Newton, H. Van Onckelen, E.L. Esmans, (2006).Stainless-Steel Electrospray Probe: A Dead End for Phosphorylated Organic Compounds? *J. Chromatogr.A* 1104:209–221.
8. M. A. Lauber, T. H. Walter, M. Gilar, M. DeLano, C. Boissel, K. Smith, R. Birdsall, P. Rainville, J. Belanger, K. Wyndham.(2021).Low Adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces.Waters White Paper, [720006930EN](#) <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf>> , 2021.
9. T. H. Walter, B. J. Murphy, M. C. Jung, M. Gilar, R. E. Birdsall and J. Kellett.(2021).Faster Time to Results for Ultra-Performance Liquid Chromatographic Separations of Metal-Sensitive Analytes; *Chromatography Today*, February/March, 40–44.
10. W. J. Stec, G. Zon, B. Uznanski.(1985).Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Diastereomeric Phosphorothioate Analogues of Oligodeoxyribonucleotides and Other Backbone-Modified Congeners of DNA. *J. Chromatogr.*326:263–280.
11. M. Gilar, K. J. Fountain, Y. Budman, J. L. Holyoke, H. Davoudi, J. C. Gebler.(2003).Characterization of

Therapeutic Oligonucleotides Using Liquid Chromatography with On-line Mass Spectrometry
Detection. *Oligonucleotides*.13: 229-243.

致谢

Pratheeba Yogendrarajah、Willy Verluyten、Jean-Paul Boon和Mario Hellings - 强生旗下杨森制药公司分析
开发部

Evelien Dejaegere、Leslie Napoletano和Martin Gilar - 沃特世公司

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY UPLC PDA检测器 <<https://www.waters.com/514225>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007361ZH, 2021年9月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号