

使用MaxPeak Premier色谱柱技术在变性UPLC条件下分析siRNA药物

Irene Suarez Marina, Willy Verluyten, Evelien Dejaegere, Leslie Napoletano, J-P. Boon, Mario Hellings, Martin Gilar

Janssen Pharmaceutical Companies of Johnson & Johnson, Waters Corporation

摘要

本应用纪要展示了ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱在分析小分子干扰RNA (siRNA)类候选治疗化合物领域的适用性。在高温下分析siRNA双链体，确保双链体变性为两个互补的单链寡核苷酸。本应用纪要的目的是定量药物制剂中的siRNA寡核苷酸。鉴于ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱在核酸分析中表现出优于常规不锈钢色谱柱硬件的性能，选择该色谱柱开展研究。采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier色谱柱实现了一致的定量性能，siRNA回收率的波动非常小。与常规ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱相比，寡核苷酸的信号重现性和校准线性得到显著改善。

优势

- 与常规色谱柱相比，ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱提高了分析重现性
- 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
- 采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱无需进行色谱柱老化操作
- 不锈钢色谱柱需要经过色谱柱老化操作才能稳定核酸样品的回收率

简介

过去十年来，寡核苷酸类治疗化合物在制药行业占据了重要地位。新型药物的出现与其治疗各种疾病的能力以及寡核苷酸制造和药物递送方面的技术进步有关。截至2016年，有3种寡核苷酸获得药品监管机构批准，而此后寡核苷酸类治疗药物研究的数量大幅增加^{1,2}。由于进入临床试验阶段的寡核苷酸激增，因此亟需开发出定量和表征这些化合物所适用的分析方法。

一款获批的寡核苷酸类治疗药物从早期开发阶段到后续的质量控制流程，都需要使用有效的表征方法。这些分析方法需要足够稳定、可靠且简便，以便在不同环境中执行，以及在许多情况下由非专家级分析人员执行。这一要求与相当复杂的siRNA分析相冲突。

siRNA药物制剂为双链体形式，由一对互补的化学修饰寡核苷酸组成。siRNA通常在变性液相色谱条件下分析，两个寡核苷酸经过变性产生两个单独的化合物（称为单链）以供分析。siRNA也可以在非变性条件下作为完整双链体分析，以验证双链体未被不需要的过量单链寡核苷酸物质污染。

本应用纪要介绍了在变性条件下使用的离子对反相液相色谱法(IP-RP LC)。使siRNA双链体在高柱温下解链，确保双链体siRNA结构完全解离成相应的单链寡核苷酸。变性IP-RP LC是业界热衷的寡核苷酸LC-UV和LC-MS分析方法。IP-RP LC方法因为能够兼容MS分析，所以适用于对反义寡核苷酸(ASO)和siRNA治疗化合物进行高灵敏度分析。

在方法开发的第一步，我们评价了几种BEH 18色谱柱柱长和吸附剂孔径（130 Å或300 Å）。虽然使用几种色谱柱配置均实现了充分分离，但目标siRNA样品在2.1 mm × 150 mm ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱上获得的分离选择性和分离度更优。

实验

样品制备

将双链体siRNA C溶于Milli-Q水中，制得0.40 mg/mL的溶液。将该浓度的溶液标记为“双链体C”的100%标准品溶液。为创建校准曲线，制得200%溶液；通过稀释该溶液制得其余浓度的溶液（130%、100%、70%、8%、4%、2%和0.2%）。使用另一个具有不同siRNA序列的样品进行方法开发。将相应质量的siRNA样品溶于Milli-Q水中，制得0.40 mg/mL的溶液。将该样品标记为“双链体A”和“双链体B”的100%溶液。

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和配备钛检测池的光电二极管阵列检测器PDA组成。

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1:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 肽分析专用柱, 300 Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 150 mm (部件号186003687)
色谱柱2:	ACQUITY Premier BEH C ₁₈ 肽分析专用柱, 300 Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 150 mm (部件号186009495)
流动相:	流动相1: 含0.07% (v/v) TEA和0.60% (v/v) HFIP的Milli-Q水溶液 (含5 mM TEA和60 mM HFIP的水溶液) 流动相2: 70/30% (v/v) 甲醇/乙腈 流动相3: 流动相1与流动相2的85/15% (v/v) 混合溶液 流动相4: 流动相1与流动相2的30/70% (v/v) 混合溶液
柱温:	75 °C
检测条件(UV):	260 nm PDA, 5 mm钛检测池
进样体积:	3 μL

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%体积)	C (%体积)	D (%体积)	曲线
0	0.30	100	0	0	初始
20	0.30	0	100	0	6
25	0.30	0	0	100	6
26	0.30	0	0	100	6
28	0.30	100	0	0	6
34	0.30	100	0	0	6

数据处理和分析

在UV 260 nm色谱图中，将所有主要峰面积相加（约15.9 min处的峰组与17.5 min处的峰组），计算峰面积。峰面积总和报告于表1~4中。积分示例见图2。

结果与讨论

常规ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱上的寡核苷酸分析

初步实验评价了ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱在siRNA分析中的性能。将样品进样至未曾接受老化处理的新色谱柱上。图1显示了使用变性IP-RP LC时双链体C初始5次进样的结果。请注意，15.9 min和17.5 min附近的信号是由siRNA双链体C变性产生的单链寡核苷酸。因为寡核苷酸含有一个或多个硫代磷酸酯键，它们存在非对映体，因此被分离为额外的峰。

图1显示，初始进样的UV峰面积低于预期，后续进样的信号增强。这一观察结果与文献(3-7)中描述的现象一致。简言之，酸性寡核苷酸通过离子相互作用吸附到色谱柱金属表面（主要吸附到筛板），由此导致样品回收不完全。重复进样使可用的离子吸附位点达到饱和，因此样品回收率得以提升。这一现象被称为“样品老化”。

双链体C前五次进样得到的峰面积列于表1中。虽然常规不锈钢色谱柱可通过重复进样或其他老化方案进行老化，以获得一致的寡核苷酸回收率，但酸性样品在金属色谱柱表面的离子吸附增大了方法开发和样品定量的难度。因此，我们改用ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱，其金属硬件经过杂化硅胶层改性处理。根据制造商的说明，这种改性操作消除了寡核苷酸在色谱柱硬件上的不良吸附。

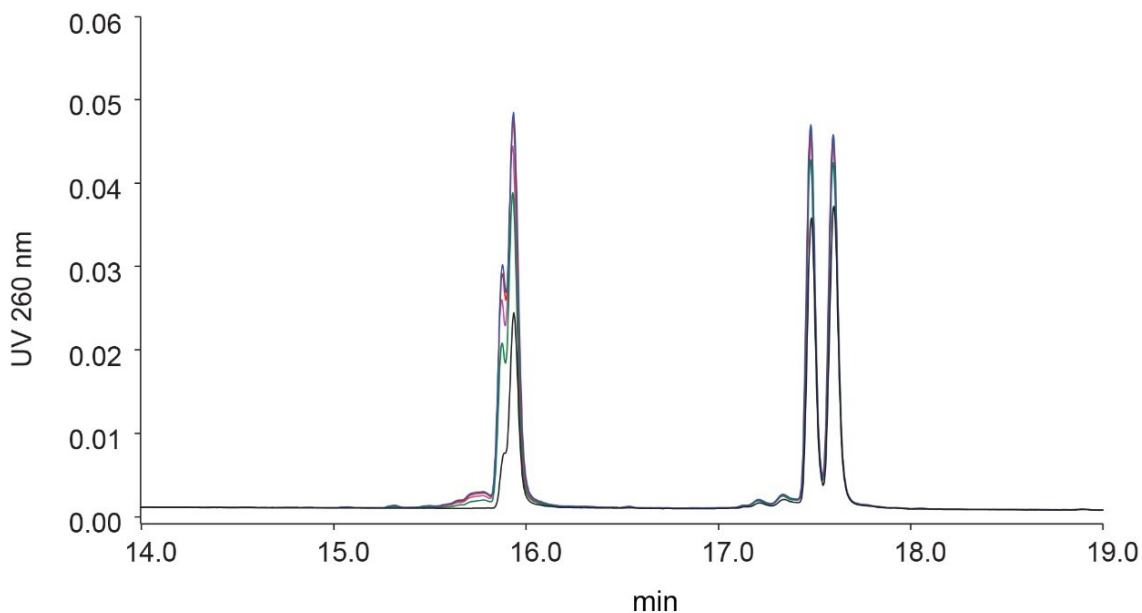


图1.使用ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱连续五次进样3 μL双链体C (0.40 mg/mL)得到的结果。第1次进样 - 黑色迹线, 第2次进样 - 绿色迹线, 第3次进样 - 粉色迹线, 第4次进样 - 红色迹线, 第5次进样 - 蓝色迹线。

重复样(n = 5)	峰面积(AU)
1	335658
2	474897
3	528923
4	559179
5	573862
RSD (%)	19.52

表1.色谱图中的峰面积结果见图1。“峰面积”表示每次重复测定中所有主峰的UV峰面积总和。

ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱上的寡核苷酸分析

图2显示了在与上一节所述的相同LC条件下四次进样相同样品（双链体C）得到的结果。使用ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱进行样品分析。由于该色谱柱填充有与图1所用的常规色谱柱相同的吸附剂，因此预计寡核苷酸的保留和分离结果相似。如预期一样，ACQUITY Premier色谱柱在所有四次进样中表现出一致的回收率（峰面积列于表2中）。信号差异非常小，图2中的四幅色谱图几乎无法区分。结果表明，在ACQUITY Premier色谱柱上没有观察到可检测的样品损失；因此选择ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱开展进一步的siRNA方法开发工作。

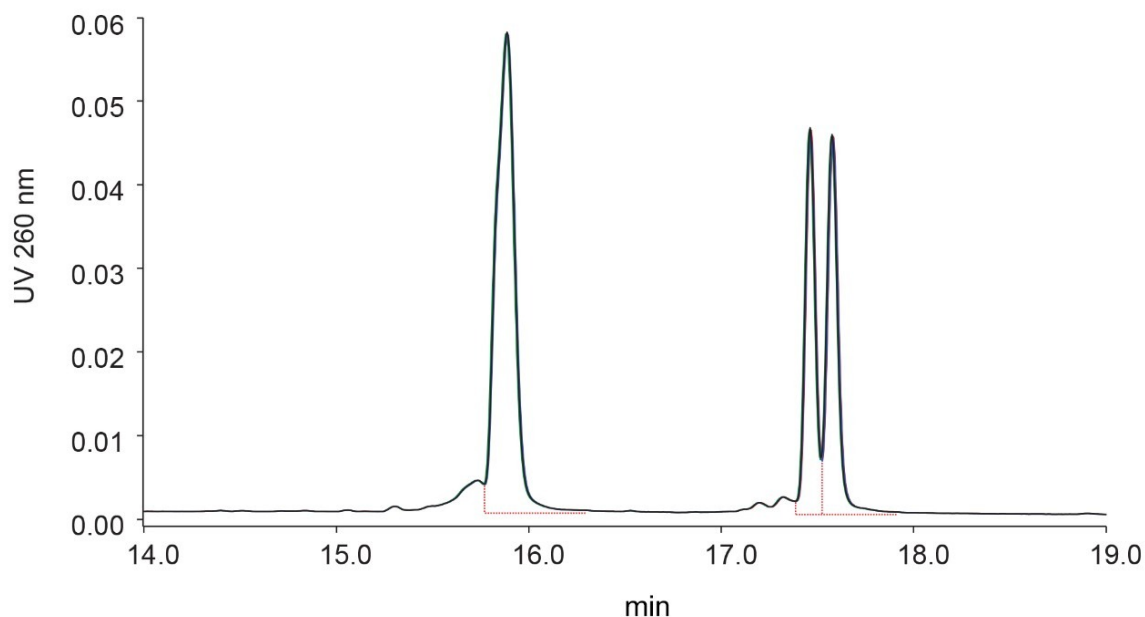


图2.使用ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱连续四次进样3 μL双链体C (0.40 mg/mL)得到的结果

重复样(n = 4)	峰面积(AU)
1	724961
2	726678
3	723674
4	724691
RSD (%)	0.17

表2. 色谱图中的峰面积结果见图2。“峰面积”表示每次重复测定中所有主峰的UV峰面积总和。

ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱上寡核苷酸双链体的线性、回收率、重现性和准确度

进一步认证使用ACQUITY Premier Peptide BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱开发的分析方法，评价该方法是否适用于siRNA纯度分析。研究的参数为校准线性、分析物回收率以及质量控制应用所需浓度水平下的定量准确度。所需浓度范围内双链体C的准确度和回收率数据列于表3中。所有结果完全符合可接受标准。

标示浓度(%)	实测回收率(%)
0.20	100.25
2.0	96.92
4.0	97.04
8.0	97.46
70.0	99.89
100.0	100.00*
130.0	100.02

表3.以100.0%溶液作为归一化水平，不同标示浓度下双链体C的单个回收率。

*利用100%标准品的值进行数据归一化。

使用未曾接受老化处理的色谱柱进行的初始进样中，双链体C在最低标示浓度0.20下的相对回收率为99.88%；在表3中所有标示标准品进样之后的额外进样中，对照参比溶液在标示浓度100%下的回收率为100.07%。对于寡核苷酸化合物而言，这些数据非常出色，表明样品残留的影响很小。在单独的研究中更详细地研究了残留；结果参见相应的应用纪要⁸。

双链体C的0.20%溶液重复测定3次和100%溶液重复测定5次得到的相对标准偏差(%)数据见表4。结果完全符合可接受标准（标示浓度0.20%的样品重复测定三次得到的RSD≤15.0%；标示浓度100%的样品重复测定三次得到的RSD≤2.0%）。

标示浓度(%)	峰面积(AU)	% RSD
重复样1 - 0.20%	5536	
重复样2 - 0.20%	5769	
重复样3 - 0.20%	5686	2.09 (n=3)
重复样1 - 100%	2618322	
重复样2 - 100%	2619747	
重复样3 - 100%	2619513	
重复样4 - 100%	2618797	
重复样5 - 100%	2611356	0.13 (n=5)

表4.双链体C在定量限(0.20%)以及100%溶液浓度下的重现性(%RSD)。

“峰面积”表示每次重复测定中所有主峰的UV峰面积总和。

我们在后续研究中评价了两种siRNA分子的混合物（以双链体A + 双链体B作为测试分析物）的定量线性。使用ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱和ACQUITY BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱评价了线性（见图3）。

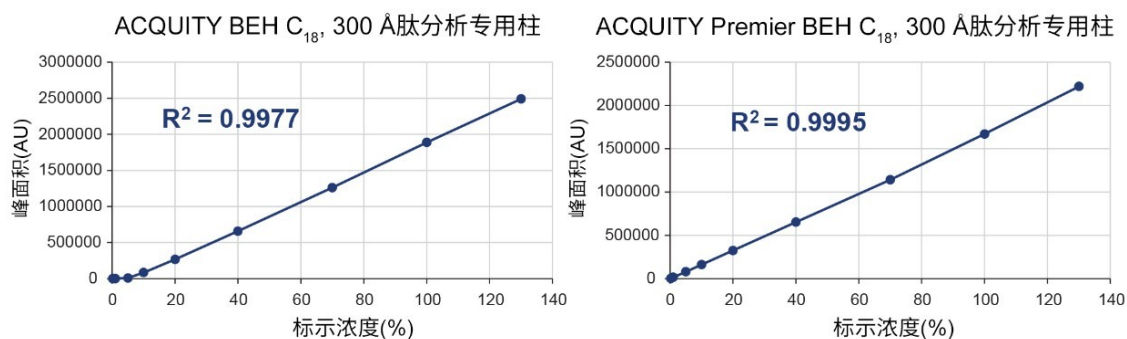


图3.使用常规ACQUITY BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱或ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱获得的双链体A + B混合物的校准曲线。在低标示浓度下，常规色谱柱表现出样品损失。

虽然采用两种色谱柱所得到的校准曲线线性拟合结果都具有可接受的相关系数（分别为0.9977和0.9995），但常规不锈钢色谱柱在标示浓度为0.2%和1.0%时的信号等于0。由于具有非特异性吸附的性质，低浓度下的样品损失更明显，从而导致校准的动态范围缩小。换言之，采用常规色谱柱时，无法可靠定量分析低标示浓度的寡核苷酸。观察到ACQUITY Premier色谱柱的线性损失很小；回收率值见表5。其少量样品损失与UPLC系统中存在的金属吸附位点有关（进样针、管路和检测池）。

标示浓度 (%)	常规色谱柱样品回收率(%)	ACQUITY Premier色谱柱样品回收率(%)
0.2	0	75.4
1.0	0	87.6
5.0	8.5	94.6
10.0	44.5	96.3
20.0	70.4	97.2
40.0	87.1	97.6
70.0	95.4	97.5
100.0	归一化水平	归一化水平
130.0	101.5	102.2

表5.在双链体A + B样品的线性研究中，进样不同标示浓度的样品所得到的回收率值。校准曲线见图3。

结论

离子对反相变性LC方法适用于siRNA的分析和质量控制。变性寡核苷酸以单链形式分离和定量。ACQUITY Premier色谱柱采用经杂化硅胶层改性的MaxPeak高性能表面色谱柱硬件，与填充相同吸附剂的常规不锈钢色谱柱相比，使寡核苷酸样品获得了更优异的回收率。研究表明，ACQUITY Premier BEH C₁₈, 300 Å肽分析专用柱适用于对siRNA进行稳定的分析，分析结果不受影响，也无需进行长时间的色谱柱老化操作。ACQUITY Premier色谱柱使分析人员对定量结果准确度更有把握；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. 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.

4. M. Gilar, M. DeLano, F. Gritti (2021), Mitigation of analyte loss on metal surfaces in liquid chromatography, *J. Chromatogr.A*, 1650: 462247.
5. R. Tuytten, F. Lemière, 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.
6. 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>](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf).
7. 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.
8. P. Yogendrarajah, W. Verluyten^a, E. Dejaegere, L. Napoletano, J-P. Boon^a, M. Hellings^a, M. Gilar.(2021).使用MaxPeak Premier色谱柱技术在非变性UPLC条件下分析siRNA双链体.沃特世应用纪要, [720007361ZH](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720007361ZH.pdf).

致谢

Irene Suarez Marina、Willy Verluyten、J-P. Boon和Mario Hellings（强生旗下杨森制药公司）；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>](https://www.waters.com/10166246)
- [ACQUITY UPLC PDA检测器 <https://www.waters.com/514225>](https://www.waters.com/514225)
- [Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720007362ZH, 2021年9月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.