

原材料检测：开发寡核苷酸化学合成所用亚磷酰胺的质量控制方法

Brooke M. Koshel, Jennifer M. Nguyen, Matthew A. Lauber, Katrien Donckers, Willy Verluyten, Irene Suarez Marina, Jean-Paul Boon, Mario Hellings

Waters Corporation, Janssen Pharmaceutical Companies of Johnson & Johnson

摘要

高纯度亚磷酰胺对于确保寡核苷酸化学合成的工艺稳定性非常重要。尽管杂质类别已得到充分认识 and 良好控制，但仍然存在与任何杂质（即使以痕量水平存在）相关的风险。由于亚磷酰胺相互偶联形成不断增长的寡核苷酸链，因此每次掺入特定的亚磷酰胺时，各亚磷酰胺所特有的杂质都会在整个合成过程中蔓延。本文重点介绍了一种可用于在合规工作流程中评估亚磷酰胺的鉴定结果和总体产品纯度的单一液相色谱-紫外-质谱(LC-UV-MS)方法。

优势

- 针对合规分析，使用Empower™ 3 CDS进行亚磷酰胺质量控制检测方法开发
- 使用ACQUITY™ QDa™检测器进行鉴定检测，证明对亚磷酰胺的质量数确认
- 评估亚磷酰胺氧化及其对分析型LC方法的影响

简介

随着越来越多的同类型产品在美国和欧盟市场获得批准，核酸类治疗药物在全球范围内持续引发关注¹。寡核苷酸的化学合成已经变得相当常见，并可使用自动化合成仪快速有效地进行。主要合成方案使用亚磷酰胺单体作为组成部分，通过去封闭、偶联、加帽和氧化的重复四步过程依次添加，以形成不断增长的寡核苷酸链。单个亚磷酰胺的结构包含一个核苷酸，该核苷酸经各种有助于提高合成效率的保护基修饰。还可以包括对碱基或糖的额外修饰，以提高最终产品的稳定性和核酸酶耐受性。由于与亚磷酰胺相关的任何杂质都可能在整个合成过程中蔓延，因此这些材料的质量控制至关重要。

由于寡核苷酸的化学合成性质，通常认为其更类似于小分子而非生物制剂。但是，由于两者在生产工艺中的内在差异，因此相关的法规要求规定更少。尽管寡核苷酸不在ICH指导原则的范围内，但其中某些原则仍然适用。ICH Q11包含有关原料药开发和生产的建议，可应用于杂质类别得到充分认识和良好控制的亚磷酰胺原材料^{2,3}。这与ICH Q3（杂质）形成对比，该指导原则普遍认为寡核苷酸的杂质阈值高于小分子的杂质阈值^{2,3}。

由于法规要求缺乏明确性，本研究的目的是评估用于亚磷酰胺原材料检测的LC-UV-MS方法，该方法按照ICH框架进行设计和制定概要，并理解实际上质量标准需要根据具体情况来确定。尽管在确定质量标准时使用了其他分析技术，但通常使用LC检测方法来评估纯度和确认鉴定结果。表1显示了改编自Kiesman等人的LC检测方法的质量标准示例，该质量标准将指导我们在概念验证研究中所用的可接受标准²。首先，评估了用于亚磷酰胺鉴定试验的ACQUITY QDa检测器。然后，在确认ACQUITY QDa检测器能够以一个原子质量单位(amu)的精度提供质量数确认后（如检测的三种亚磷酰胺的可接受标准所述），可扩展同一分析方法，通过使用传统方法来比较样品与参比物质以解决总体产品纯度问题。

测试	方法	接受判据
鉴定	LC-UV-MS	样品与参比标准品的单同位素质量数偏差在一个 amu 限值内
含量测定	LC	NLT 90.0%
杂质分析*	LC	关键杂质NMT 0.20% 任何未指定的关键杂质NMT 0.15% 总关键杂质NMT 0.50%

表1.亚磷酰胺的LC检测方法和质量标准（改编自Kiesman等人）²

*本研究不涉及杂质分析，但可以对LC检测方法进行扩展，从而通过HRMS表征杂质进行纯度评估。

实验

沃特世科学家在Janssen的指导下进行了方法开发和数据采集。本研究所述的LC质量标准改编自Kiesman等人，并且不反映Janssen方法中所用的标准。

样品描述

在用于DNA合成的0.01% (v/v)三乙胺(TEA)的无水乙腈溶液中（含水量低于10 ppm）制备1 mg/mL亚磷酰胺储备液，并用同一稀释剂将其进一步稀释至工作浓度0.1 mg/mL、0.01 mg/mL和0.001 mg/mL。除非另有说明，否则实验中所用的标准品浓度为0.1 mg/mL。亚磷酰胺以粉末形式储存于-20 °C，并在使用前现配现用。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统
检测：	配备分析型流通池的ACQUITY UPLC™ TUV检测器，237 nm
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH™ C ₁₈ 色谱柱, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 × 150 mm（部件号：186002353）
柱温：	24 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	3.3 µL
流动相A：	10 mM NH ₄ HCO ₃ 水溶液，pH 9.0（用20%~22% NH ₄ OH调节pH）
流动相B：	乙腈

质谱条件

质谱系统：	ACQUITY QDa检测器
电离模式：	ESI+
采集范围：	150-1250 m/z
毛细管电压：	0.8 kV
锥孔电压：	10 V
探头温度：	300 °C

数据管理

Empower 3 FR4色谱数据软件

结果与讨论

使用ACQUITY QDa检测器进行亚磷酰胺鉴定检测

LC-UV-MS是用于检验亚磷酰胺原材料鉴定的传统方法。尽管可接受标准可能会发生变化，但预计样品将处于参比物质的一个amu报告限内。为评价ACQUITY QDa检测器是否适用于鉴定检测，对三种不同的亚磷酰胺进行了评估：DMT-dG(ib)亚磷酰胺(dG)、DMT-dA(bz)亚磷酰胺(dA)和DMT-2'-氟-dA(bz)亚磷酰胺(2'F-dA)。亚磷酰胺结构及对应的质量数信息如图1所示。由于ACQUITY QDa检测器是单四极杆检测器，其中大多数小分子的基峰对应于 $[M+H]^+$ 单同位素离子，因此报告的单同位素质量数由MassLynx™ MS软件计算得出。

将亚磷酰胺溶于0.01% (v/v)三乙胺的无水乙腈溶液中，并使用ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(130 Å, 1.7 μm, 2.1 × 150 mm)以及由碳酸氢铵和乙腈组成的梯度进行分离。控制柱温和流动相pH是确保亚磷酰胺稳定性和方法

稳定性的两个关键参数。对于本研究中使用的每种亚磷酰胺，均采用通用的55 min LC方法，但需要注意的是，针对每种独特的亚磷酰胺的杂质分析，可能需要进一步优化方法，因为采用该通用方法可能难以将共流出的杂质与亚磷酰胺产物峰分离。从图2可以看出，所得各种亚磷酰胺的光谱图显示出两个产物峰，这是磷原子处的两种非对映体的结果。相应的TIC显示出类似的模式，但由于非对映体电离相似，因此在TUV与TIC数据之间观察到微小的峰强度差异。原始数据插图展示了各种亚磷酰胺的同位素模式，其中基峰对应于 $[M+H]^+$ 。将实验数据与计算出的参比质量数进行比较，显示出良好的一致性，并且很容易满足改编自Kiesman等人的一个amu范围的质量标准指南（表2）²。

在进样系列和不同浓度下观察亚磷酰胺氧化

已知亚磷酰胺易于由P(III)氧化为P(V)，其类似于主产物峰，由于非对映体的存在，在色谱图上表现为双峰。氧化亚磷酰胺峰在图2的色谱图中用箭头标记，在相应的TIC中更明显。由于亚磷酰胺容易氧化，因此通常将其储存于惰性气体中，并用无水乙腈制备，以尽量减少与水的接触。在评估产品纯度时，人们期望尽量减少这些类型的杂质，因为它们会导致错误地评估总体产品纯度。为研究在LC分析中随着时间推移特征性地观察到的氧化增加，在约40 h内使用一系列进样（40次进样）来监测氧化。使用同一样品瓶完成dA的进样，其中第1次进样表现出的总氧化率为1.14%，而第40次进样的总氧化率为5.48%（图3）。虽然可以在光谱图中观察和定量氧化峰，但是也可以结合ACQUITY QDa检测器，为监测氧化提供补充数据。从图3的插图中可以看出，dA的组合谱图与对应的氧化峰(Ox)确认氧化峰的质量数等于874.39 Da或dA + 16。

即使从单独的样品瓶中进样，由于样品制备过程会向样品瓶中引入一定含量的水，预计仍然会发生氧化，因此非常有必要使用高品质无水乙腈。2'-F-dA亚磷酰胺公认比dA更容易氧化，使用2'-F-dA亚磷酰胺在20 h内进样，以监测这段时间内氧化的增加幅度。图4绘制了与每次进样相关的总氧化百分比，其中在进样系列中观察到氧化率增加了大约1%。虽然本研究未考察导致氧化的其他原因，但有数据表明将还原剂加入样品或流动相或实施LC系统钝化步骤可能有助于缓解这一现象。

氧化还表现出浓度依赖性，可以观察到在较低浓度下制备的亚磷酰胺的氧化有所增加。在图5中，报告了0.001、0.01、0.1和1 mg/mL dG的总氧化率。除含水量以外，核苷特性也影响降解速率，其中dG更容易受到影响⁴。在评估的最低浓度(0.001 mg/mL)下，总氧化率约为20%。所有样品均在同一天使用相同的试剂制备，以便在制备过程中使影响氧化的所有变量保持不变。如果假设所有样品制备中的含水量相当，则可以推断出浓度较低的样品

的氧化程度将会更高。这表明以较高浓度制备的样品较少受到样品制备引起的降解干扰的影响。制备高达1 mg/mL的样品可能有利于杂质分析，但必须在尽量减少降解与防止检测器在较高浓度下达到饱和之间取得平衡。

设定质量控制检测的分析标准

在确定分析方法的可接受标准时，应当进一步考虑有关亚磷酰胺氧化和降解的知识以及如何尽量减少这一现象。由于以低浓度制备的亚磷酰胺会严重氧化，因此使用灵敏度标准品来评估报告阈值下的回收率。首先，用0.01% (v/v) TEA制备无水乙腈的稀释溶液。利用该稀释溶液制备1 mg/mL (100%水平) 参比溶液。将该参比溶液进一步稀释以制备1000x稀释液，将该稀释液用作灵敏度标准品，以0.05%的定量限进行评估。然后生成一个样品组，其中包括：空白、灵敏度标准品、参比溶液、样品和对照标准品。为评估峰面积精密度，参比溶液的每次进样均从单独的样品瓶中进行。还使用1 mg/mL参比溶液作为样品组结束时的对照标准品，并且同样从单独的样品瓶中进样。

表3列出了改编自Kiesman等人的可接受标准以及所得到的2' F-dA的结果²。总而言之，参比标准品显示出0.4% RSD的峰面积重现性，且对照标准品的平均响应为参比溶液的104%以内。按照定量限0.05%对参比溶液响应进行计算，得到灵敏度标准品回收率为78%，轻松满足可接受标准(50%~150%)。制备0.1 mg/mL的样品，其报告峰面积为94%，也符合质量标准。虽然本研究涉及总体产品纯度，但它也可以扩展至杂质分析，尽管需要对杂质进行进一步表征。

样品组	接受判据	实验结果	结果
空白 (稀释溶剂)	无干扰峰	-	通过
灵敏度标准品	回收率50-150%	78%	通过
参比溶液	峰面积RSD ≤ 5%	0.4%	通过
样品 (N = 1~12)	NLT 90.0%	94.5%	通过
对照标准品	回收率95-105%	104%	通过

表3.改编自Kiesman等人²的2'F-dA亚磷酰胺的分析检测。制备1 mg/mL的参比溶液（对照标准品），并进一步稀释以制得0.001 mg/mL的灵敏度标准品。在0.05%的定量限下对灵敏度标准品的回收率进行评估。制备0.1 mg/mL的样品。

结论

严格控制亚磷酰胺原材料的质量对于获得高品质寡核苷酸成品非常重要。在本研究中，使用单一反相液相色谱法对三种不同的亚磷酰胺进行分析和鉴定检测。鉴于亚磷酰胺的不稳定性，通过分析方法评估其纯度的难度也随之增加，亚磷酰胺在暴露于水中时容易氧化并产生额外的降解产物，由此可能导致错误地评估总体产品纯度。本研究发现，制备较高浓度的样品（约0.1–1.0 mg/mL）并从单独的样品瓶中进样可以减少通常在样品制备过程中引入的氧化。在建立分析可接受标准时，考虑到在较低浓度下增加的氧化，利用灵敏度标准品确保了方法稳定性。在以后的工作中，将会考察影响氧化的因素以及其他缓解步骤。

参考资料

1. Kulkarni, J. A., Witzigmann, D., Thomson, S. B., Chen, S., Leavitt, B. R., Cullis, P. R., van der Meel, R. (2021). The Current Landscape of Nucleic Acid Therapeutics. *Nature Nanotechnology*, 16, 630–643.
2. 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. (2021). Perspectives on the Designation of Oligonucleotide Starting Materials. *Nucleic Acid Therapeutics*, 31, 93–113.
3. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), available: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> <
<https://www.ich.org/page/quality-guidelines>> .
4. Hargreaves, J. S., Kaiser, R., Wolber, P. K. (2015). The Degradation of dG Phosphoramidites in Solution. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 34, 691–707.

致谢

Katrien Donckers、Willy Verluyten、Irene Suarez Marina、Jean-Paul Boon和Mario Hellings是强生旗下杨森制药公司的员工。

特色产品

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

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

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

720007597ZH, 2022年4月

© 2022 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