

应用纪要

脂质纳米颗粒分析：利用MS降低风险

Duanduan Han, Kellen DeLaney, Bonnie A. Alden, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

脂质纳米颗粒(LNP)为在递送方面存在困难的基于基因的治疗药物提供了一种巧妙的解决方案。作为一种由脂质种类组成的多组分生物体，其不同的特性会影响到色谱和检测器的响应，因此需要用新方法对其进行表征和监测。本应用纪要提出了一种基于液相色谱(LC)的光学/质谱(MS)双检测器平台，对于脂质纳米颗粒的工作流程具有更高的灵敏度和更好的诊断能力。本工作流程中，ACQUITY™ QDa™质谱检测器为原材料杂质筛选、基于质谱库的脂质组分确认和稳定性监测提供了补充质量数数据。作为一种基于Empower™软件的方法，所提出的工作流程在不受监管和受监管的环境中均易于部署，同样可实现脂质纳米颗粒工作流程的高效开发和迁移。

优势

- MS为杂质分析提供了更低的检测限和更强的诊断能力
- 补充质量数数据提供了脂质种类的正交检测和确认
- 基于Empower软件的工作流程确保了合规性和简单的方法迁移

简介

基于基因或核酸的治疗药物和疫苗代表了制药行业中增长最迅速的部分。作为新模式，它们已被证明在治疗疾病方面非常有效，最近还被用作COVID-19的疫苗¹。这些模式的一个独特之处在于，它们需要通过一个“递送载体”递送到靶细胞中后才能发挥作用。LNP代表了核酸有效载荷（即活性药物成分(API)）的靶向递送方法之一²。

LNP作为“递送载体”的概念在理论上是简单的；但是，它们的执行却相当复杂。作为一种多组分的递送载体，LNP依赖于四种脂质组分，每一种都有特定的功能且需要特定的比例以有效和安全地递送API有效载荷。这四种组分中的三种占据了LNP成分的50%，它们包括用于颗粒流动性的胆固醇(~38.5%)，用于颗粒结构的辅助脂质(~10%)（特别是磷脂）以及增加颗粒稳定性和亲水性的聚乙二醇化脂质(~1.5%)。这些常见并发挥结构和稳定作用的组分，经常作为原材料从第三方供应商外包。LNP的另一半由阳离子脂质或可离子化脂质组成。除了稳定性和结构，这些脂质是药效的主要动力，有助于结合并保护API载荷。由于其所治疗疾病的作用和特异性，可离子化脂质经常是专有的，并在内部生产以保护知识产权。在任何一种情况下，无论组分是外包还是内部制造，都需要分析技术来确保这些药物产品是安全且有效的³。

基于LC的方法经常被用作LNP分析的主要平台。基于MS的方法往往部署在表征和鉴别目的的上流活动中，而使用蒸发光散射检测器(ELSD)等检测器的基于光学的方法被部署在后期的开发或制造环境中，以作为监测或筛选检测的一部分。然而，从图1所示数据可以明显看出，即使选择的检测器也有细微差别，因为脂质纳米颗粒中使用的组分在不同的检测器类型中响应不一样。这样可能会带来挑战，因为检测限(LOD)会阻碍低丰度种类和/或杂质的定量。本研究的目的是展示MS配置在双检测器工作流程中时，如何用于改善LNP的分析，以降低与这些新模式的生产和制造有关的风险。该工作流程将利用Empower色谱数据系统(CDS)和ACQUITY QDa质谱检测器，以便在下游实验室或生产环境中更容易地部署。

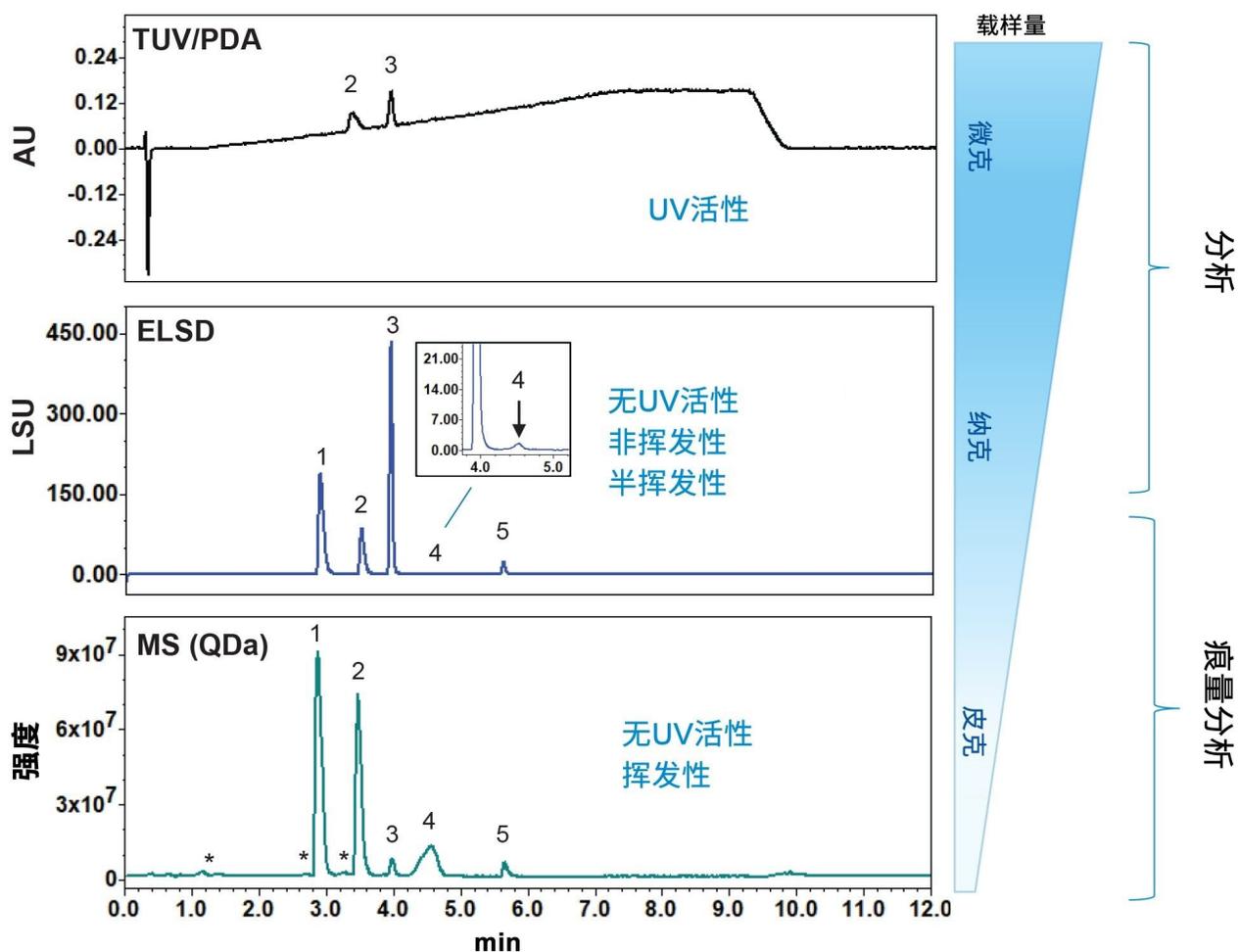


图1.检测器类型及其响应。显示了3种检测器类型中，一组代表脂质纳米颗粒生产中所使用组分的脂质的检测器响应。峰1-5分别是SM102、DOTMA、胆固醇、DMG-PEG2000和DSPC。SM102、胆固醇、DMG-PEG2000和DSPC以50:38.5:1.5:10的摩尔比被制备成配方LNP样品。DOTMA以相对于SM102一半的浓度进行加标。

实验

胆固醇、Dlin-MC3-DMA、PEGDMG-2000、SM-102、DSPC和DOTMA都购自市售来源。使用不同供应商的样品进行了对比研究。所有购买的脂质仅用于研究和演示目的。

使用甲醇制备1 mg/mL的脂质储备液。使用水和甲醇将工作样品稀释至不同浓度。最终组成为10:90 水:甲醇。PDA、ELSD和QDa在实验开始之前进行了维护，以确保两种检测器均在制造商的规格范围内运行。

LC系统条件

液相色谱系统:	ACQUITY™ Premier™系统 (带BSM模块)
检测条件:	ACQUITY™ PDA, FC=Ti 5 mm, 波长范围=190–400 nm
样品瓶:	TruView™最大回收样品瓶(P/N: 186005662CV)
样品瓶盖:	聚乙烯无隔膜螺旋盖(P/N: 186004169)
色谱柱:	ACQUITY Premier CSH™苯己基柱, 1.7 μm, 2.1 × 50 mm (P/N: 186009474)
柱温:	50 °C
样品温度:	室温
进样体积:	3 μL
流速:	0.400 mL/min
流动相A:	水(H ₂ O), 0.4%甲酸(FA) (v/v) (MS级)
流动相B:	25:75 异丙醇(IPA):乙腈(MeCN), 0.6% FA (v/v) (MS级)

ELSD设置

增益:	100
-----	-----

采样速率:	5 Hz
喷雾器模式:	加热
功率级:	80%
漂移管温度:	48.0 °C
气体压力:	20.0 psi (1.64 slpm)

QDa设置

电离模式:	ESI+
采集模式:	全扫描
采集范围:	高(150-840 <i>m/z</i>)
扫描速率:	5 Hz
毛细管电压:	1.5 kV
锥孔电压:	15 V
探头温度:	600 °C
色谱软件:	Empower 3, FR4

梯度表

时间	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.400	40.0	60.0	初始
6.00	0.400	10.0	90.0	6
8.00	0.400	10.0	90.0	6
8.50	0.400	40.0	60.0	6
12.00	0.400	40.0	60.0	6

结果与讨论

在脂质纳米颗粒分析中增加MS的优势之一是MS检测提供了更高的灵敏度和专属性。虽然ELSD非常适合检测非挥发性/半挥发性的分析物，其适中的动态范围能够满足大多数分析需求并且能够检测低纳克含量的样品，但ACQUITY QDa质谱检测器将检测限提高了多个数量级，为用户提供了检测极低含量样品的能力。此外，用户还能获得可用于辨别样品和曲线差异的正交质谱数据。下面将讨论如何在LNP工作流程中使用补充性质量数数据的一些关键示例。

原材料筛选

如图2所示，在评估LNP生产和制造的原材料时，获得质量数数据可以发挥至关重要的作用。在这个例子中，常用的组分脂质之一(DSPC)外包自三家不同的市售供应商，并使用相同的方法进行ELS和质谱检测分析。在这个例子中，可观察到ELSD色谱图相对来说没有无关的峰，但在使用ACQUITY QDa质谱检测器时，相同的样品在主峰前显示出了不同程度的半挥发性杂质。在仅有ELSD的工作流程中，需要将载样量增加原来的9倍(0.3 μg vs. 2.7 μg)才能检出主要杂质，否则不能检出(图2A，顶部插图)。除了检测低丰度的种类，启用ACQUITY QDa的工作流程提供了可用于评估多个杂质存在的质谱信息。如图2A中底部插图所示，所发现的三个杂质的总峰面积为6.4%。在这种情况下，由于能够使用质量数数据中的提取离子流色谱图(XIC)以揭示在5.4分钟时的部分共洗脱，才得以辨别存在的杂质数量。用相似的方法评估来自供应商2和3的样品，发现供应商3在ELSD和质量数数据中都没有可检测到的杂质。本示例展示了如何在LNP的生产和制造中使用补充性质量数数据以鉴别合适的原材料。

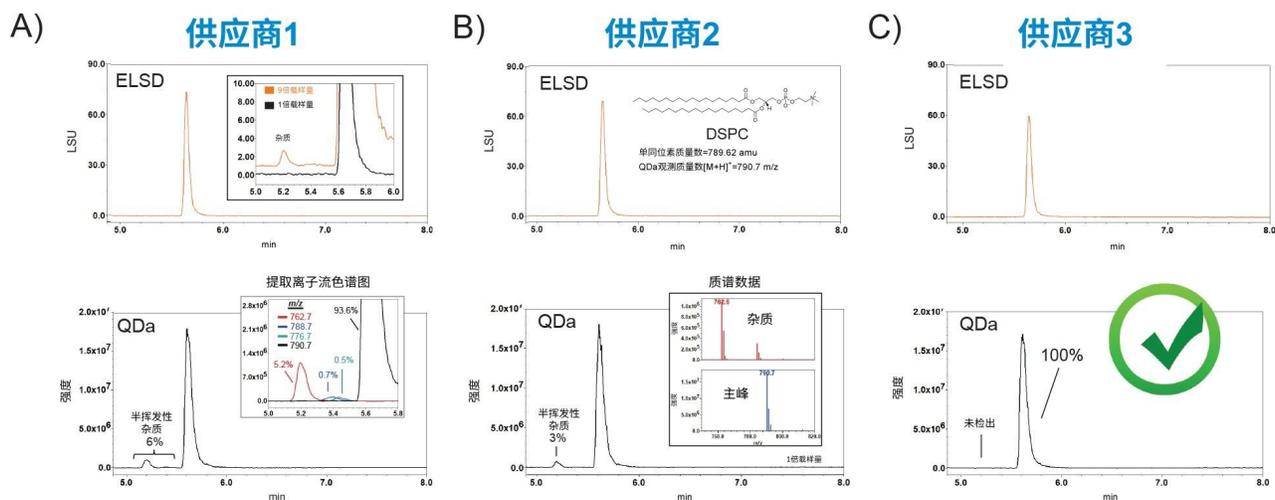


图2.原材料筛选。显示使用ELS和MS检测对3家不同供应商的脂质纳米颗粒组分DSPC进行分析。使用MS数据的提取离子流色谱图评估半挥发性杂质，可观察到供应商1-3的杂质总量分别为A) 6%、B) 3%和C) 0%。

工艺开发

能够在质谱水平积分样品为用户提供了更有效地了解和调整开发和制造工艺的方法。图3所示为Dlin-MC3-DMA的研究级样品，该样品是patisiran（一种用于治疗遗传性转甲状腺素介导的淀粉样变性的治疗药物）中使用的可离子化脂质。含有胺类和/或不饱和脂肪酸的脂质可能会发生氧化，以及在工艺/产品相关杂质中发生去饱和/饱和事件。在这些情况下，光学色谱图可能没有那么容易解释，因为根据存在的杂质（图3A），每个事件都可能产生一个或一组独特的峰。使用MS数据的提取离子流色谱图，我们可试验性地分配与杂质曲线（图3B）相关的可能途径，以指导使用高分辨率MS平台进行杂质鉴别。考虑到许多可离子化脂质是在内部制造的，这个示例展示了如何使用补充质量数信息以提高各批次的工艺一致性。

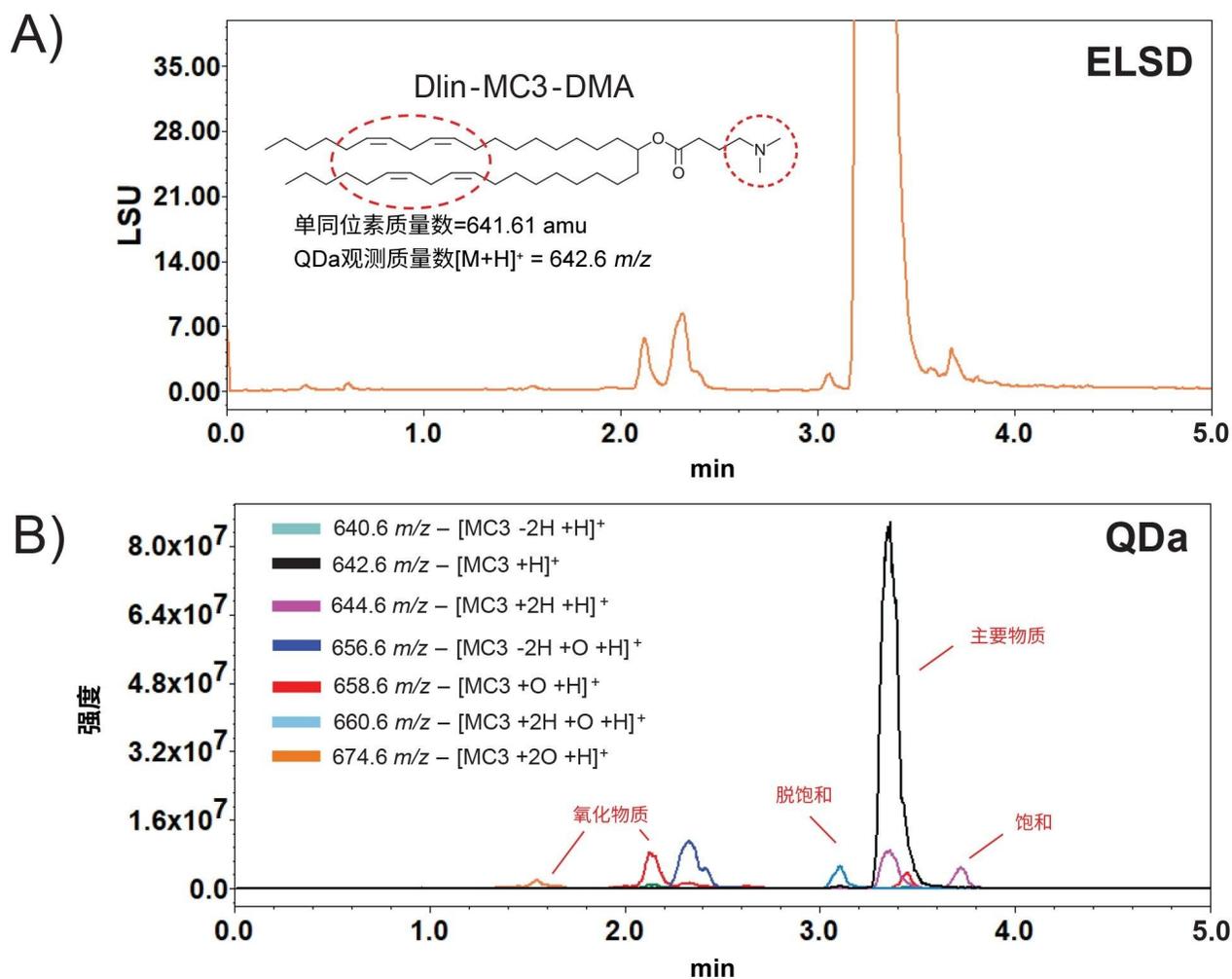


图3.工艺开发。显示了使用A) ELS和B) MS检测对可离子化脂质Dlin-MC3-DMA进行的分析。基于主要成分的饱和、去饱和与氧化事件的计算质量数可用于提取离子流色谱图，以鉴别目标峰。注意：制备MeCN, 0.4% FA (v/v) 的流动相B以增强质谱响应。

配方和稳定性研究

另一方面，在配方和稳定性研究中探讨了补充质量数数据。除了氧化和饱和/去饱和，脂质纳米颗粒的组分可能会发生水解事件，影响脂质纳米颗粒疗法的稳定性和安全。为证明这一点，对磷脂DSPC进行了强制降解研究。如图4中ELSD色谱图所示，当暴露于0.01N NaOH溶液时，DSPC的主峰降解为多个峰。仅从这个数据可得出结论，DSPC对pH很敏感。然而，当查看用ACQUITY QDa质谱检测器采集到的质谱图时，我们可试验性地将0.3分钟和4.2分钟的峰分别归为极性头部基团(258.0 m/z)和甲基化脂肪酸，即硬脂酸甲酯(299.2 m/z)。这一信息试验性地确

认了DSPC的酯键容易水解，这可以为确定配方产品的稳定基质提供更多的指导。

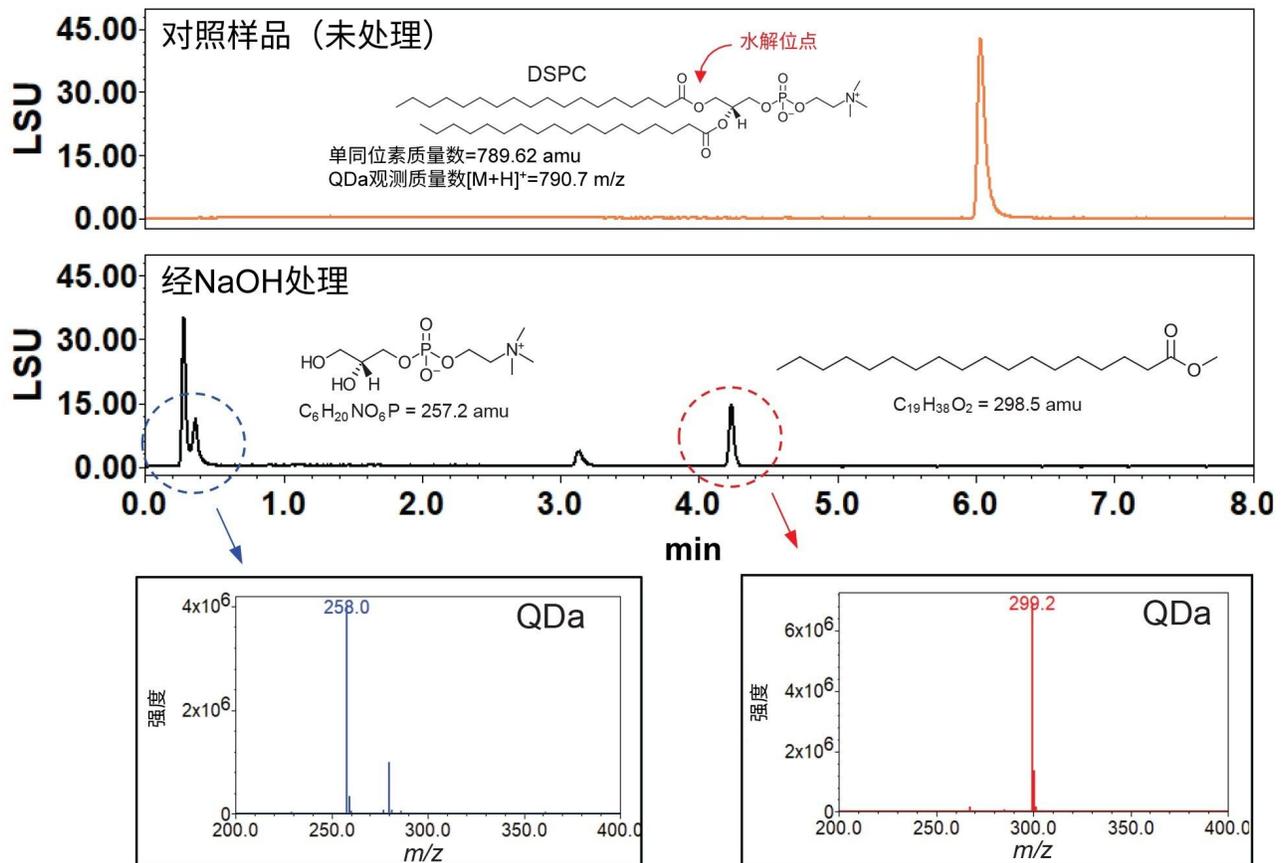


图4.配方和稳定性研究。使用0.01N NaOH溶液对脂质纳米颗粒组分DSPC进行强制降解研究。ELSD数据和用QDa采集到的相应的MS谱图信息显示了代表假定的降解种类的目标峰。注意：制备MeCN, 0.4% FA (v/v)的流动相B以增强质谱响应。

管理MS数据

随着建立了质量数数据作为调查工具以帮助更好地了解LNP组分及其相关杂质的价值，关于如何以实用的方式将质量数信息引入现有的工作流程仍然有问题，以帮助降低脂质纳米颗粒开发和制造的风险。在系统设计中，将ACQUITY QDa质谱检测器与Empower 2 (FR5)和Empower 3 CDS软件完全集成。这种集成使方法容易迁移到下游实验室，以便更广泛地部署，也使用户能够利用Empower CDS中基于MS的功能。这些功能包括访问质谱库以管理和编录质谱信息，以及“杂质”和“限值”处理工作流程，使用户能够根据监管指南和/或效率研究定义结果

的接受阈值。

质谱库支持

图5显示了Empower中质谱库功能的一个示例。在这个例子中，ELSD和ACQUITY QDa质谱检测器被配置为双检测器工作流程，来自色谱柱的洗脱液在检测器之间分流。当以这种方式采集时，质谱信息会自动与光学数据相联系，允许用户将质谱数据作为正交确认LNP种类或鉴别杂质的手段。在这种情况下，会在磷脂DSPC的原材料筛选库中创建一个质谱库。当在处理方法中选择DSPC时（图5A），与ELSD结果相关的质谱信息将与该库进行交叉引用。每个峰的最佳“质谱匹配”显示在处理数据的表格结果中（图5B）。超过基于监管指南定义的杂质阈值（例如，NMT 0.1%（峰面积%））的表格结果会自动用红色编码，以通知用户超出规格的结果。这样，所提出的基于Empower的双检测器工作流程使用户能够使用集成的杂质处理工作流程快速评估LNP样品中的杂质，同时利用质谱信息确认峰身份，以及根据存储在质谱库中的质谱潜在地鉴别新的杂质。

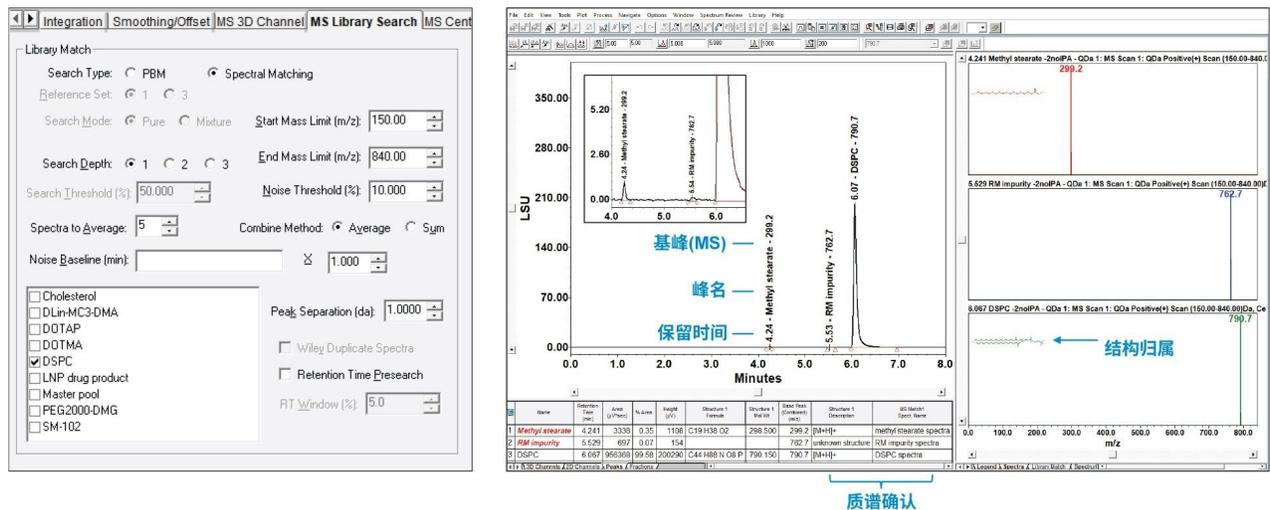


图5.质谱库支持。A)关于Empower处理方法的“质谱库搜索”功能及如何定义参数以执行MS数据的质谱搜索的一个示例。B)ELSD对存在于脂质纳米颗粒组分DSPC中的原材料杂质进行分析及其相应的质谱结果。“最佳”质谱匹配显示在结果表的右边两列。红色的结果表示根据Empower处理方法的杂质选项卡中设定的标准，超过ICH杂质阈值（报告：0.05，鉴别：0.10，鉴定：0.15）的峰面积百分比的杂质。

放行检测

随着方法向下游迁移，用户可能需要评估质量数数据以定义作为方法认证的接受阈值。除了“杂质”处理流程，

Empower为用户提供了定义不同字段类型阈值的能力。图6中的一个示例显示了代表配方药物结果的一组脂质。如图6A所示，根据每种脂质的[M+1H]⁺ m/z值，使用±1 m/z的接受标准作为质量数容差阈值。除了这条标准，使用“主池”质谱库处理结果并启用“保留时间预搜索”以提高专属性。如图6B的处理结果所示，根据RT和质谱，LNP混合物的所有成分都被正确鉴别。然而，胆固醇被红色编码，表明相关的质量数信息不匹配“限值”处理参数中定义的接受标准(369.3 m/z vs. 387.6±1 m/z)。在这种情况下，差异(Δ 18.3 m/z)在0.3 Da以内，这可能是在电离过程中发生的水损失。与之前的例子相似，这个例子展示了在双检测器工作流程中如何使用质量数信息以加快数据审查，并在方法迁移到下游实验室时增强对结果的信心。此外，如图7所示，用户可以利用Empower内的综合报告能力，使用光学和质谱数据定制和格式化结果，在脂质纳米颗粒工作流程中有效开发和迁移方法。

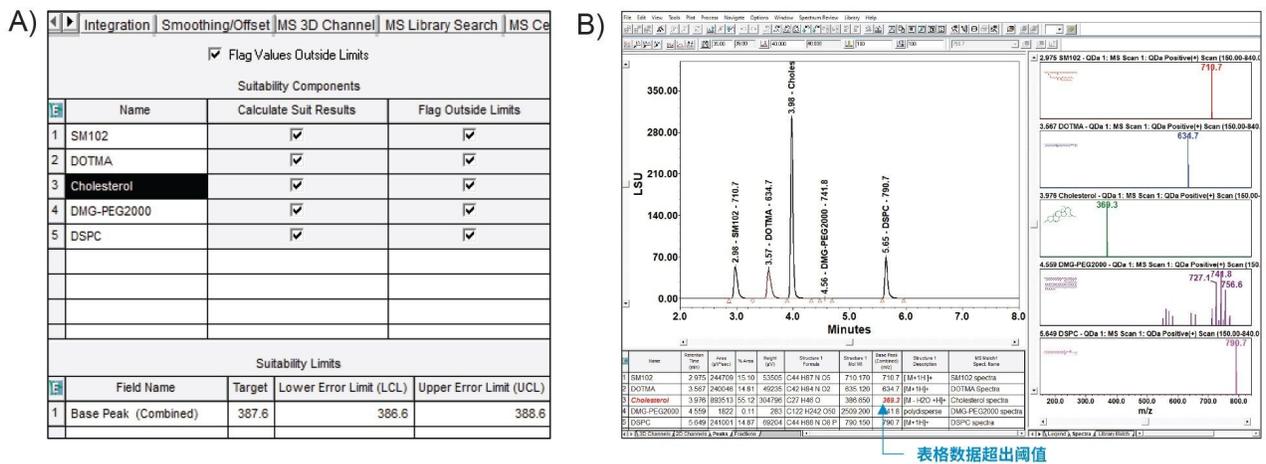
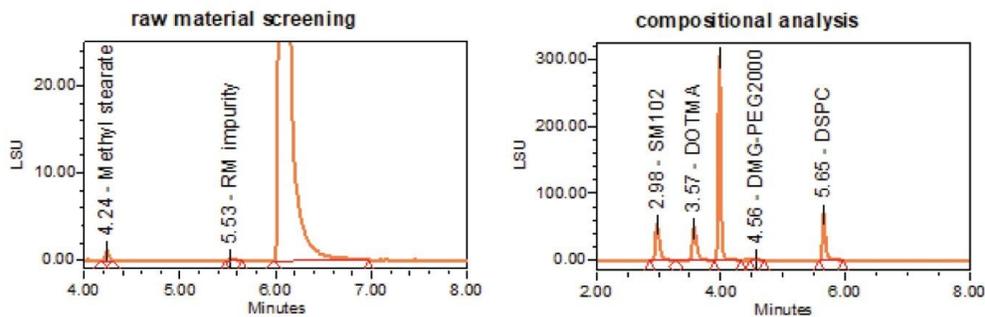


图6.放行检测。A)在Empower处理方法中设置阈值以及如何为一个指定字段定义误差下限和上限的示例。B)使用一组由脂质纳米颗粒生产中常用的脂质组成的样品进行分析，得到的ELS数据和相应的质谱结果。红色的结果表示超过处理方法“限值”窗口中定义的质量数容差(±1 m/z)的组分。注意：需要“系统适用性”许可才能访问“限值”处理选项。

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	DSPC1 0.45mg/ml	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	7/18/2022 5:43:02 PM EDT,
Vial:	1:A,6	Acq. Method Set:	12min 100 gain cn 10 150to840
Injection #:	1	Date Processed:	8/11/2022 4:30:40 PM EDT,
Injection Volume:	4.00, 3.00 ul	Processing Method:	marketing RM mix library,
Run Time:	12.0 Minutes	Channel Name:	ELSD Signal
Sample Set Name:	lipid lib1	Proc. Chnl. Descr.:	ELSD Signal, Smoothed by 5



LNP:Raw Material Screening Results

	RT	Name	Component Type	Area	% Area	Impurity Response	ICH Threshold
1	4.241	Methyl stearate	Degradation Product	3338	0.35	0.348	Above Qualification Threshold
2	5.529	RM impurity	Unidentified Impurity	697	0.07	0.073	Above Reporting Threshold
3	6.067	DSPC	Main Component	956368	99.58		

LNP: Composition Analysis Results

	RT	Component Type	Name	Area (μV*sec)	% Area	Base Peak (Combined) (m/z)
1	2.975	Main Component	SM102	244709	15.10	710.68
2	3.567	Related Substance	DOTMA	240046	14.81	634.68
3	3.976	Main Component	Cholesterol	893513	55.12	369.33
4	4.559	Main Component	DMG-PEG2000	1822	0.11	741.84
5	5.649	Main Component	DSPC	241001	14.87	790.74

图7.报告。Empower报告示例，显示了使用双ELS和质谱检测对脂质纳米颗粒进行的分析。超过处理方法中定义的

阈值或限值的表格结果被自动用红色标注。

结论

基于基因的治疗药物代表了制药发展的一个令人兴奋的新篇章，并为治疗和预防疾病带来了巨大的希望。作为“递送载体”的脂质纳米颗粒是最终药物产品的一部分，并反映了与这些新模式有关的额外复杂性和分析挑战。本研究展示了如何在双检测器配置中使用ACQUITY QDa质谱检测器采集到的补充质量数数据，以提高LNP工作流程的分析灵敏度和诊断能力。作为一种基于Empower的方法，所提出的工作流程在非监管和监管环境中易于部署，以便在脂质纳米颗粒疗法和疫苗的开发和制造中进行高效的方法开发和方法迁移。

参考资料

1. Schoenmaker, L. *et al*, mRNA-Lipid Nanoparticle COVID-19 Vaccines: Structure and Stability. *International Journal of Pharmaceutics* 601 (2021): 120586.
2. Evers, M. *et al*, State - of - the - Art Design and Rapid - Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Small Methods* 2, no.9 (2018): 1700375.
3. Packer, M. *et al*, A Novel Mechanism for the Loss of mRNA Activity in Lipid Nanoparticle Delivery Systems. *Nature communications* 12, no.1 (2021): 1-11.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

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

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

720007716ZH, 2022年9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