

配体偶联反义寡核苷酸的纯度、 含量和杂质谱测定

使用用于 OpenLab CDS 的安捷伦寡核苷酸分析加速器

作者

James Webster
AstraZeneca
Macclesfield, United Kingdom

Brian Rivera
安捷伦科技有限公司
Santa Clara, CA, United States

摘要

本应用简报展示了用于 OpenLab CDS 的安捷伦寡核苷酸分析加速器 (Oligo Analysis Accelerator, OAA) — Agilent OpenLab CDS 软件的插件，如何在利用现有数据可靠性和合规性架构的同时简化数据分析。本研究对硫代磷酸酯配体偶联反义寡核苷酸 (LICA) 进行了分析，以测定其纯度、含量和杂质谱。结果表明，采用优化的处理方法，每个样品的总数据分析时间不到一小时，具体取决于样品的复杂程度和纯度。

前言

在治疗性合成寡核苷酸的开发过程中，存在与样品纯度、标示量或含量的测定以及杂质的定量分析相关的一些挑战。解决这些难题对后期开发至关重要，并成为支持寡核苷酸质量控制 (QC) 和批次放行的要求。传统的 HPLC 方法可能不具备 QC 检测所需的灵敏度或特异性。使用质谱仪 (MS) 等选择性更高的检测器是满足 QC 检测需求的可行技术。事实上，首选方法是使用 UV 信号定量分析高浓度杂质，同时使用选择性和灵敏度更高的质谱检测来鉴定和定量低浓度杂质。

如 Rentel 等人的研究结果所示，Agilent InfinityLab LC/MSD XT 可用于寡核苷酸的 QC 批次放行，并能通过相关验证。这得益于单四极杆的易用性、在全扫描模式下的灵敏度，以及足够分析较长的共轭寡核苷酸的质量范围。LC/MS 方法使用 UV 和 MS 信号对杂质进行定量分析。UV 检测用于定量分析色谱分离的杂质，而质谱检测则用于定量分析与全长产物 (FLP) 共流出的杂质。此外，该方法中使用的分析方法在某些方面具有独特性。与大多数用于寡核苷酸的离子对反相方法不同，该方法使用的软电离条件使母体寡核苷酸及其杂质的电荷态分布主要集中在 -4 电荷态。这样做可以简化谱图，并提高低浓度杂质的检测灵敏度。此外，为了便于区分 FLP 加合物与杂质峰，进样在严苛的离子源条件下进行，从而消除平均质谱图中由缓冲液加合物产生的峰。虽然研究结果表明分析方法本身非常可靠，但这种独特方法的数据分析具有挑战性且耗时较长。它需要提取多幅提取离子色谱图 (EIC)，手动积分，且必须在 Microsoft Excel 中执行许多计算步骤。

在本应用简报中，我们展示了如何使用用于 OpenLab CDS 的 Agilent OAA 插件分析 LICA，测定其纯度、含量和杂质谱。

实验部分

仪器参数摘自 Rentel 等人于 2022 年在 IONIS (Carlsbad, CA, U.S.) 发表的分析方法^[1]。表 1 列出了相关的 LC/MSD 参数。序列/进样工作列表如表 2 所示。该方法包括 UV 和 MS 信号的四浓度校准。此外，工作流程要求对每个样品采用两种不同的 MS 采集方法 — 标准方法和严苛方法。请注意，特定的 MS 采集方法取决于寡核苷酸序列，因此可能会有所不同，并且应根据经验结果对离子源设置进行优化。

用于分析的样品是由 AstraZeneca 提供的 16-mer 配体偶联反义寡核苷酸，将其制备为约 0.1 mg/mL 的水溶液。

使用 Agilent OpenLab CDS 软件 2.8 版采集数据。使用 Agilent OAA 1.0 版进行数据处理。

表 1. Agilent OAA 的 LC/MSD 方法参数

HPLC 参数	
HPLC	Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统
色谱柱	Hybrid C18, 3.5 µm, 2.1 × 150 mm
流动相	A: 10% ACN、5 mM 乙酸三丁胺、1 µM EDTA B: 80% ACN、5 mM 乙酸三丁胺、1 µM EDTA
流速	0.25 mL/min
柱温	50 °C
梯度	22 min 内 B 从 45% 升至 80%
UV 检测	可变波长检测器，260 nm
质谱参数	
MSD	Agilent InfinityLab LC/MSD XT (产品编号 G6135C)
离子源	电喷雾电离
干燥气流速	13.0 L/min
气体温度	255 °C (标准条件) 350 °C (严苛条件)
雾化器压力	25 psig
毛细管电压	4000 V
模式	负离子
扫描	m/z 1347.3–1847.3
扫描时间	1149 ms (标准条件) 1200 ms (严苛条件)
碎裂电压	100
增益因子	2

表 2. 序列/进样工作列表

样品名称	样品类型	标签	进样量 (μL)	采集方法
水空白	空白		25	标准
老化 (标准条件)	N/A		25	标准
老化 (严苛条件)	N/A		25	严苛
水空白	空白		25	标准
水空白	空白		25	标准
水空白	空白		25	标准
工作标准溶液 (WSS), 10 μL	校准标样		10	标准
工作标准溶液 (WSS), 20 μL	校准标样		20	标准
工作标准溶液 (WSS), 25 μL	校准标样	QC	25	标准
工作标准溶液 (WSS), 30 μL	校准标样		30	标准
工作标准溶液 (WSS)	QC	QC	25	标准
样品 (标准条件)	样品	S1	25	标准
空白	空白			
样品 (严苛条件)	样品	H1	25	严苛
空白	空白		25	标准
工作标准溶液 (WSS)	QC	QC	25	标准
清洗	样品		25	标准

结果与讨论

OAA 是一款软件插件，用于处理 OpenLab CDS 数据，作为前端执行完成数据分析工作流程所需的任务。其中包括积分、信号叠加和谐图检测等手动步骤，以及通常在 Excel 等电子表格程序中执行的计算。图 1 所示为从数据采集到报告和批准的每个流程步骤的简要概述。



图 1. 按数据系统划分的纯度、含量和杂质分析工作流程及其包括的步骤。使用 Agilent InfinityLab LC/MSD XT 在 Agilent OpenLab CDS 软件中进行采集。在网页应用程序中进行数据处理。然后在 OpenLab CDS 中进行报告

系统适用性

项目设置和数据选择配置完成后，数据分析工作流程的第一步是确定系统适用性。该分析方法的一个关键步骤是对 QC 标准品的 UV 主峰进行正确的积分。早洗脱杂质 (EEI) 和晚洗脱杂质 (LEI) 的积分和保留时间决定了 UV 色谱图的积分方式。该步骤使用参比标样中预先确定的已知 EEI 和 LEI 的 EIC 来执行。随后，考虑由于流路中的 UV 和 MS 信号延迟而导致的保留时间偏移。该工作流程通常手动执行，色谱数据系统 (CDS) 用户从离子列表中提取已知杂质，对每幅 EIC 进行手动积分，然后确定最早和最晚洗脱的杂质。计算在电子表格中进行。该过程不仅耗时，而且因手动转录数据，容易出错。

相反，OAA 算法可自动对 UV 信号进行 EEI 和 LEI 积分，同时自动对 UV 信号应用保留时间偏移。应用程序还会执行计算以确定系统适用性，用户无需转录数据或生成报告即可了解结果集是否有效。

图 1 显示了用于 UV 积分的用户界面 (UI)。根据 OAA 算法，确定最早洗脱的杂质是 m/z 1617.3 处的离子，对应于 n-p(dMeC) 杂质，或缺少甲基化胞嘧啶的短链杂质。确定最晚洗脱的杂质是 m/z 1646.6 处的离子，对应于 GalNAc + H₂O 丢失。鉴于 FLP 是一种 LICA，糖基丢失会导致分子的疏水性更强，因此在离子对反相色谱中较晚洗脱。

如果用户需要手动更改积分设置，可以直接在网页应用程序 UI 中进行更改。例如，通常使用主峰的第 $n - 2$ 个拐点来代替最早洗脱的杂质。在这种情况下，用户可以单击并拖动界面中的虚线，根据需要进行调整。手动积分会在审计追踪中记录下来，确保完全可追溯性，审计追踪会显示执行手动积分的用户；执行积分的时间；以及执行积分的方式（即通过“DA API”或网页应用程序）。

UV Integration

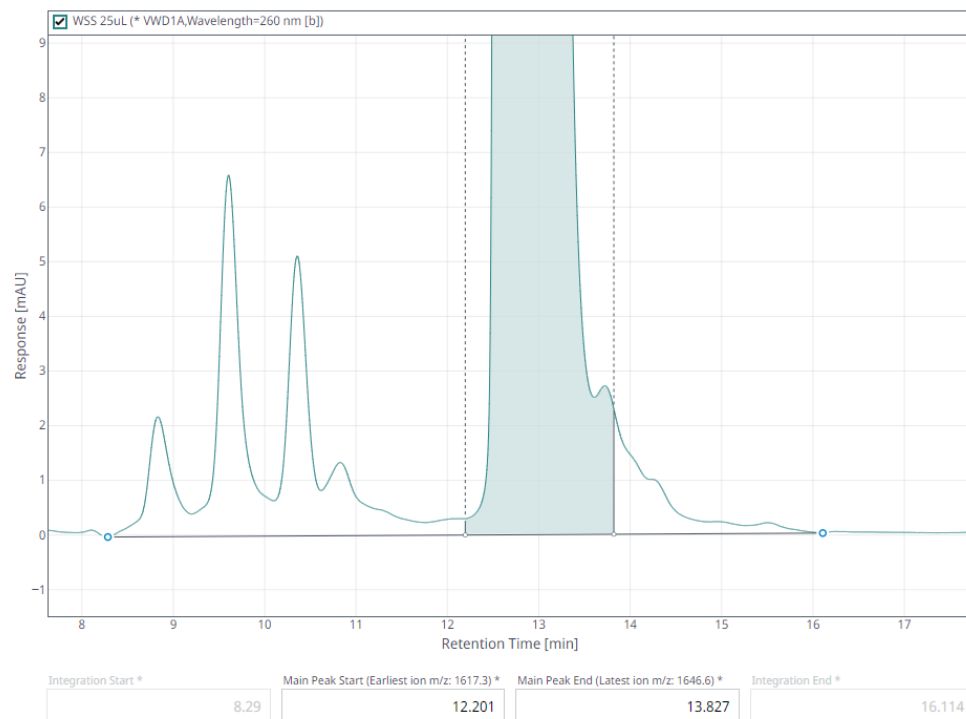


图 2. Agilent OAA 中用于确定系统适用性的 UV 积分。用于积分的杂质显示于色谱图下方的字段中。主峰起点积分由 m/z 1617.3 处的积分起点减去 UV/MS 偏移确定。主峰终点积分由 m/z 1646.6 处的积分终点减去 UV/MS 偏移确定

离子分类

确定系统适用性之后的步骤是对超过阈值的质量峰进行分类。任何 m/z 值小于 FLP 且高度高于 0.2% 的峰，或任何 m/z 值大于 FLP 且高度高于 0.3% 的峰，都必须根据表 3 中所述的标准进行分类。

表 3. Agilent OAA 中用于离子分类步骤的 m/z 值（离子）定义

离子分类名称	定义
已知杂质	离子列表中的已知产物/工艺相关杂质；加合物之间的分辨率足够高（在已知离子的 m/z ± 0.5 范围内）
分离不充分	在 m/z ± 1.0 的范围内，已知杂质和未知杂质之间的质谱峰分辨率
加合物	无叠加的已知加合物（即在 m/z ≥ 0.5 的范围内，未知杂质之间的分辨率）
已知杂质/可能加合物	加合物与杂质之间分离不充分的已知加合物（即在 m/z ≤ 0.5 的范围内，加合物与已知杂质之间的分辨率）；需要叠加标准条件和严苛条件下的谱图进行确认
未知杂质	超过阈值但与离子列表中的任何值都不匹配的离子；需要叠加标准条件和严苛条件下的谱图进行确认
未检出	已知离子低于阈值

离子分类是一个手动过程，因为 CDS 平台通常不具备评估谱图结果是否超过阈值的内置功能。因此，用户需要手动识别超过两个不同阈值的 m/z 值。然后，将任何超过阈值的值与离子列表进行匹配，并适当提取每个离子。为了实现每种已知杂质/可能的加合物和未知杂质的准确鉴定和分类，必须对标准条件和严苛质谱条件下的进样谱图进行叠加，这使得目视检查超过阈值的离子变得越来越困难。

相反，OAA 会自动对这些物质进行分类，并根据测定值报告理论 m/z 值。此外，UI 会自动叠加每个样品在标准和严苛条件下的谱图，以便根据需要进行进一步的检查。然后，用户可以选择与软件算法确定的分类不同的分类（图 3）。这对于全扫描谱图中疑似杂质可能与其他离子发生谱图叠加的区域非常有用。例如，当怀疑样品中含有后峰 n + 1、Na/K+ 加合物（可能叠加）时，即使将标准条件下的谱图结果与严苛条件下的谱图结果进行比较，也可能导致鉴定出错。

在将所有离子归类为已知或未知后，将对每个 m/z 值执行 EIC。

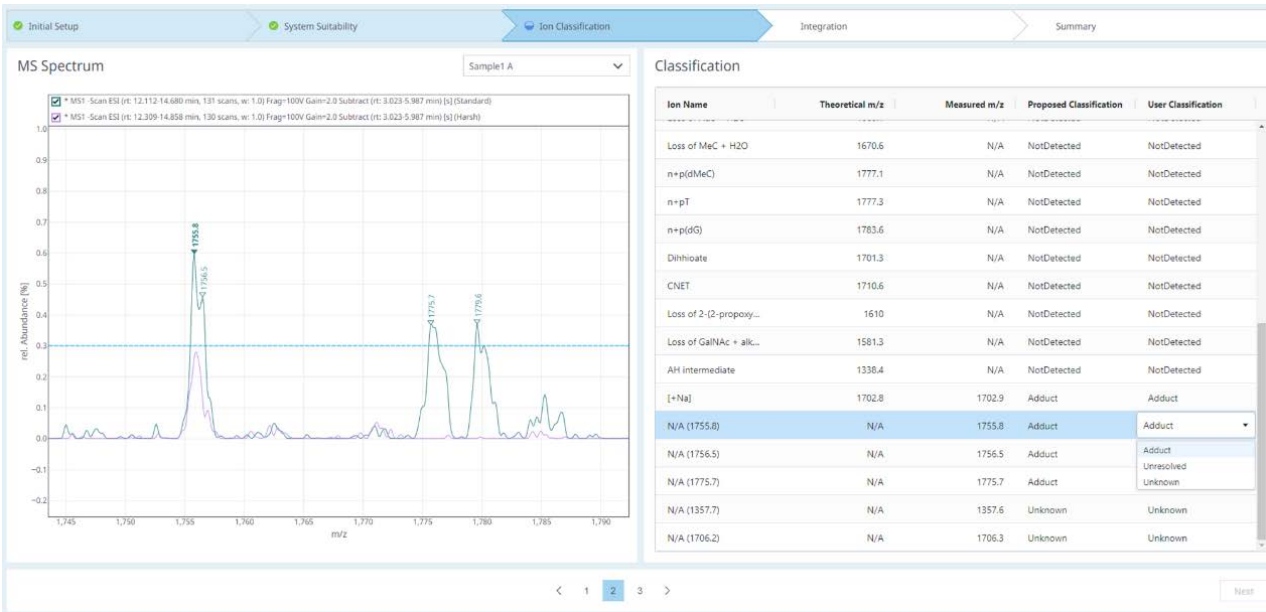


图 3. 在离子分类工作流程中，用户查看软件建议的分类。提供两种 MS 条件下的叠加谱图，以便确认加合物。如果需要，用户还可以手动调整分类

积分

积分步骤对每幅 EIC 进行评估，确保正确定量。然后使用超过 0.2% 相对定量阈值的结果区域来确定 UV 主峰的 MS 纯度，从而确定样品的总体纯度。由于样品的复杂性以及密切相关杂质的色谱分离度不足，需要对 EIC 进行手动积分。

为了促进这一工作流程，OAA 将在图形 UI 中生成三种叠加图：FLP、EIC 标准和 EIC 严苛，如图 4 所示。最晚洗脱的杂质仍然是疏水性更强的 FLP，其中 GalNAc 和水丢失，导致峰形不清晰。这种情况可能是由于物质的相对含量较低（相对峰

面积 $\leq 1.0\%$ ），也可能是由于单位质量分辨率的限制导致出现共萃取杂质。无论是哪种情况，色谱分离度低都导致需要对峰进行手动积分。

所有样品的 EIC 峰积分完成后，OAA 将应用 EEI 和 LEI 设置进行 UV 主峰积分，类似于系统适用性主峰积分。即将 EEI 峰积分起点用于主峰积分的起点，将 LEI 峰积分终点用于主峰积分的终点；UV 和 MS 信号偏移自动发生。图 5 表明，主峰积分根据 EEI 和 LEI 积分自动进行。

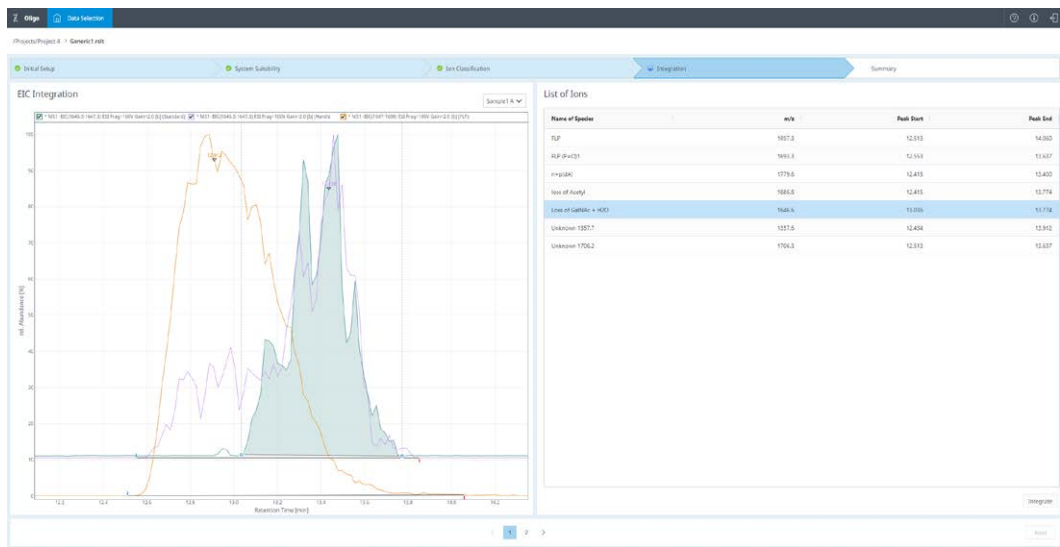


图 4. 全长产物和标准/严苛条件下“GalNAc + H2O 丢失”（即 LEI）的 EIC 叠加图。叠加图在 UI 中自动生成，用户可以直接在应用程序中对峰进行手动积分

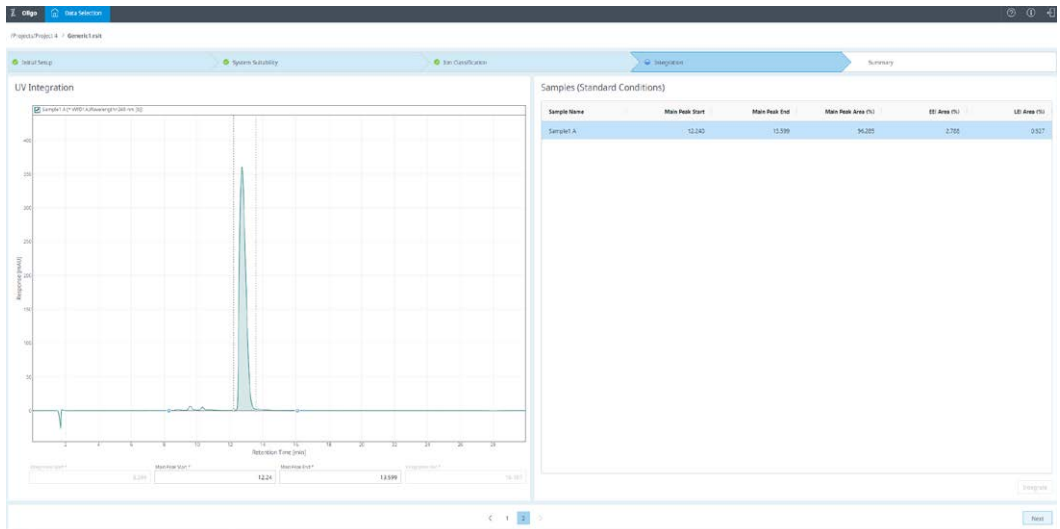


图 5. 执行 EIC 积分后，将根据 EEI 和 LEI 自动生成样品 UV 积分。如果需要，用户还可以调整积分起点和终点

数据汇总和报告

工作流程的最后一步是审查初始纯度和含量/标示量结果 (图 6)。其中包括前面步骤中显示的系统适用性结果。需要注意的是，汇总结果本身并不是报告。仍要使用 OpenLab CDS 报告模板来报告待审查的结果。此外，任何电子签名和批准均在 OpenLab 报告工具中进行，而不是 OAA 中。同样，这是因为 OAA 利用的是 OpenLab CDS 平台中已经存在的数据合规性引擎。

此外，OpenLab 报告工具还能提供更广泛的样品信息，包括在样品中鉴定得到的每种杂质的相对定量数据。所检测寡核苷酸的结果如表 4 所示。

OpenLab 报告工具允许轻松修改报告模板，自定义要报告的数据。这使得审查人员能够查看并确认网页应用程序工作流程中未显示的数据。例如，选择 m/z 值作为 EEI/LEI，从而对 UV 信号及其相应的 EIC 进行积分。

除了纯度、含量和标示量计算外，报告还可以提供离子类别的计算，如 n - 1 和碱基切除的杂质。此外，还会报告广泛的杂质谱，包括高于检出限或定量限的离子（表 4）。

表 4. 样品的杂质谱

名称	测定值	峰面积	结果 (%)
FLP	1697.3	87402126.09	89.835
FLP (P=O)1	1693.1	501650.387	0.516
n+ p(dA)	1779.6	295681.246	0.248
乙酰基丢失	1686.8	1343267.863	1.13
GalNAc + H2O 丢失	1646.4	560489.353	0.471
未知 1706.2	1706.2	378111.8885	0.317

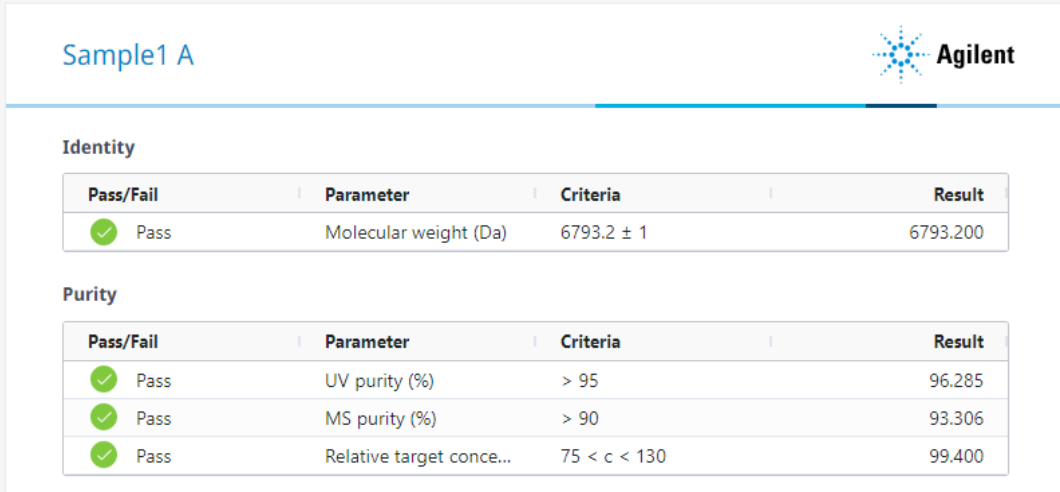


图 6. 报告生成之前的结果汇总页面。报告特性和纯度结果，并提供系统适用性结果以供审查

结论

LC/MS 分析是测定配体偶联反义寡核苷酸 (LICA) 等单链寡核苷酸治疗药物的特性、纯度、含量和杂质谱的金标准。Agilent InfinityLab LC/MSD XT 对该分析方法具有极佳的选择性和灵敏度。然而，由于工作流程复杂（传统上需要多个手动步骤），数据分析具有挑战性。在本应用简报中，我们展示了如何使用用于 OpenLab CDS 的安捷伦寡核苷酸分析加速器来简化数据分析，并测定 LICA 的纯度、含量和标示量。

参考文献

1. Rentel, C.; Gaus, H.; Bradley, K.; Luu, N.; Kolkey, K.; Mai, B.; Madsen, M.; Pearce, M.; Bock, B.; and Capaldi, D. Assay, purity, and impurity profile of phosphorothioate oligonucleotide therapeutics by ion pair-HPLC-MS. *Nucleic Acid Ther.* **2022**, 32(3), 206–220. <https://doi.org/10.1089/nat.2021.0056>

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

如需了解有关 OpenLab CDS 寡核苷酸分析加速器的更多信息，请访问：

www.agilent.com/biopharma/oligo-analysis-accelerator

DE-003153

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2024
2024 年 12 月 11 日，中国出版
5994-7993ZHCN