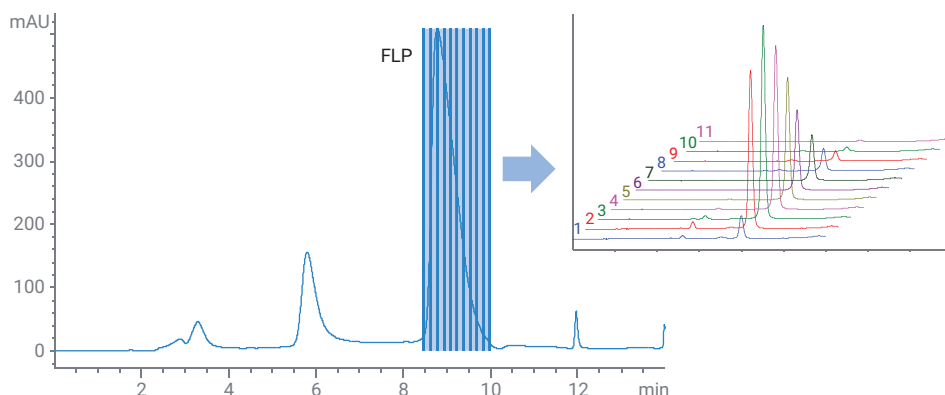


使用高效液相色谱纯化单链 RNA 寡核苷酸



作者

Florian Rieck
安捷伦科技公司

摘要

产品纯化在任何药物生产过程中都是至关重要的一步。由于目标和杂质的高度相似性，寡核苷酸 (ONs) 的纯化极具挑战性。因此，如果需要获得高纯度产品，高效液相色谱 (HPLC) 是理想的方法选择。本应用简报展示了离子对反相 HPLC 纯化单链 RNA ON 的工作流程。我们开发了一种分析型方法，然后将其转移到制备条件下。使用分析型和制备型规格 Agilent PLRP-S 色谱柱有助于放大规模并提高方法重现性。纯化工作是在一台配有钛金属泵头的 Agilent 1290 Infinity II 制备型液相色谱仪上进行的。这些特性确保了与各种溶剂的兼容性以及常使用缓梯度时的重现性。收集纯化后的馏分，产品纯度可以达到 99%，产率可以达到 56%。

前言

由于其在生化研究和制药中的应用，合成寡核苷酸 (ONs) 在过去几年中获得了越来越多的关注^[1]。ONs 的合成过程从 20 世纪 80 年代开始实施到现在，已变得更为高效。然而，即使偶联效率达到 99%，25 mer 的 ON 合成也无法使所需产品达到 80% 的产率。例如，副产物是序列长度为 N-1、N-2 等目标 ON 截短。随着序列长度的增加，从目标分子中分离这些杂质变得更具挑战性。

成熟的 ONs 分离方法是反相 HPLC。这种技术采用粒径 10 μm 或更小的分离柱，可实现分析物的高分离度。通过在洗脱液中加入离子对试剂，可以使极性 ONs 在非极性固定相上保留。离子对试剂与 ONs 的带电磷酸盐骨架相互作用，使它们的极性随序列长度增加而降低。洗脱和分离仍需要斜率 1% 或更小的平缓溶剂梯度，这对 HPLC 仪器构成了挑战。

本应用简报展示了制备型 HPLC 对单链 RNA ON 的分离和纯化。1290 Infinity II 制备型液相色谱系统配备二元泵，即使在高流速下也可实现准确的梯度混合，从而提高了结果的重现性和可信度。钛泵头兼容的 pH 范围和盐浓度范围较广，扩展了仪器可运行应用的范围。

方法开发在分析级别下完成，然后将其转移到制备条件，并增加了馏分收集。所有实验均使用 PLRP-S 色谱柱进行，这款色谱柱具有分析型和制备型两种规格，因此从分析条件转移到制备纯化条件时，易于放大并有高重现性。

实验部分

仪器

Agilent 1290 Infinity II 制备型液相色谱系统由以下模块组成：

- Agilent 1290 Infinity II 制备型二元泵 (G7161B)
- Agilent 1290 Infinity II 制备型 Open-Bed 进样器/收集器 (G7158B)
- Agilent 1260 Infinity II 可变波长检测器 (G7114A)

分析方法开发和馏分再分析在包含以下模块的分析系统上进行：

- Agilent 1260 Infinity II 二元泵 (G7112A)
- Agilent 1260 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129A)
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)

色谱柱

- 分析柱：Agilent PLRP-S 100 \AA , 4.6 \times 150 mm, 8 μm (部件号 PL1512-3800)
- 制备柱：Agilent PLRP-S 100 \AA , 25 \times 150 mm, 8 μm (部件号 PL1212-3800)

软件

Agilent OpenLab CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.10 [239] 或更高版本

化学品

合成用己胺 > 99%、乙酸 > 99%

ReagentPlus、分析级尿素购自 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)。液相色谱级乙腈购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

流动相 A 根据以下方案新鲜配制：准备 450 mL 水，加入 2.86 mL 乙酸和 6.57 mL 己胺。将 pH 调至 7。将溶液转移至 500 mL 容量瓶中，加水定量至刻度。变性条件下，在缓冲液^[2] 中加入 10% (w/v) 尿素，以增强制备级别下的分离效果。

样品

待纯化的样品全-2'-O-甲基化 22 mer 寡核苷酸是由安捷伦 NASD (Boulder, Colorado, USA) 合成的粗产品，序列如下：5'-aaaagcaccgacucggugccac-3'。

样品在发货前经过脱盐及冻干处理。样品在分析前使用流动相 A 新鲜配制成 5 mg/mL 的溶液。

结果与讨论

分析分离

通过使用 2 mg/mL 的样品浓度，在分析系统上优化分离方法。然后使用 HPLC 方法转移计算器将优化后的方法放大到制备条件^[3]。由于制备条件下的流动相和色谱柱不受温度控制，因此在流动相中添加尿素作为离液剂或变性剂。

图 1 显示了制备条件下的分离色谱图。色谱柱总上样量为 20 mg，分离充分。馏分收集设为基于峰，收集时间片段为 9 秒的宽度。这种馏分模式可以根据信号阈值和斜率，对全链长产物 (FLP) 峰进行针对性收集。基于峰的收集与时间片段结合，将 FLP 峰分为 11 个片段。根据纯度和产品含量对这些馏分进行分析，确定哪些馏分需要收集以满足纯化过程的纯度和产率要求。

方法设置

表 1. 纯化的色谱参数

参数	值
流动相	A) 0.1 mol/L 乙酸己胺水溶液, pH = 7.0, + 10% 尿素 B) 乙腈
流速	30 mL/min
梯度	时间 (min) %B 0 32 0.26 32 10.10 42 11.09 100 12.07 100 13.06 32 停止时间: 14 min 后运行时间: 1.5 min
进样量	4000 μ L
温度	室温
UV 检测	260 nm 无参比 数据采集速率 5 Hz
馏分收集	7.0–12.0 min 基于峰的收集, 收集时间片段为 9 s UV 阈值: 5 mAU UV 正斜率: 2 mAU/s UV 负斜率: 1 mAU/s

表 2. 馏分再分析的色谱参数

参数	值
流动相	A) 0.1 mol/L 乙酸己胺水溶液, pH = 7.0 B) 乙腈
流速	1 mL/min
梯度	时间 (min) %B 0 28 8 36 9 100 10 100 11 28 停止时间: 11 min 后运行时间: 6 min
进样量	10 μ L
温度	80 $^{\circ}$ C
UV 检测	260/4 nm 参比波长 360/100 nm 数据采集速率 5 Hz

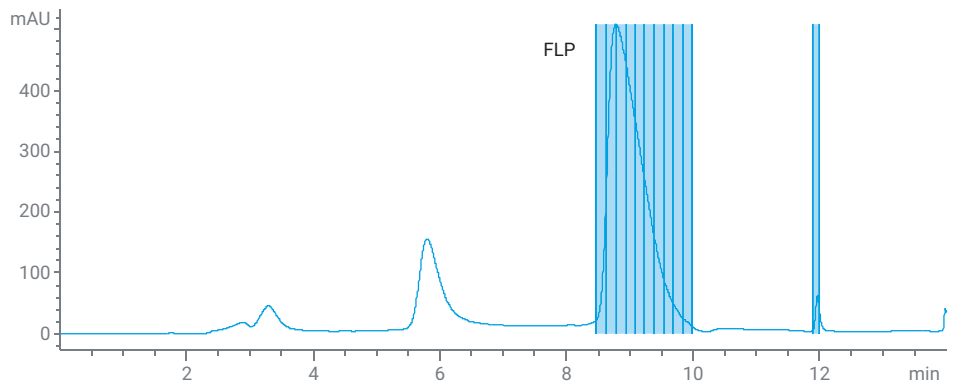


图 1. 制备柱上进样 4 mL (柱上进样 20 mg) 获得的色谱图 (UV 260 nm)。蓝色条表示 9 秒时间片段的馏分收集

在分析型 HPLC 系统上使用相同固定相进行馏分再分析。为提高分离度、分离可能出现的聚集体并加快分析速度，使色谱柱和溶剂保持 80 °C 恒温，并相应调整梯度（见表 2）。在 FLP 洗脱过程中对收集的所有馏分都进行了再分析，并根据纯度（以峰面积百分比表示）进行评估。图 2 显示所有馏分再分析的叠加色谱图。

通过粗品进样，并将馏分再分析中不同稀释程度下的峰面积进行比较，计算出每种馏分中 FLP 的含量。确定了 FLP 的纯度和含量后，即可创建收集示意图和表格，有助于判断需要达到指定 FLP 纯度或产率时，应收集哪些馏分。图 3 显示 FLP 11 种馏分的收集示意图和表格。正如预期，峰中心的纯度最高，FLP 质量向尾部递减。如果需要在达到最低纯度的同时使产率尽可能大，则收集示意图可快速显示应该收集哪些馏分。例如，如果工作流程要求纯度最低 99%，则可以收集 3 到 7 的馏分，从而实现 56.3% 的产率。

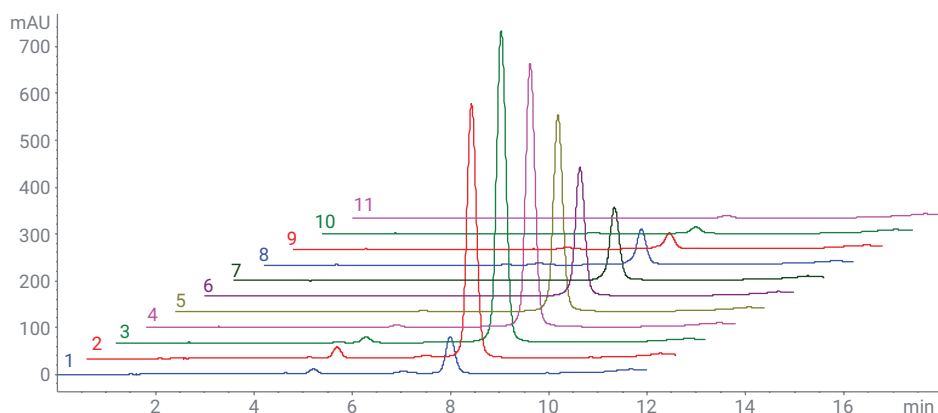
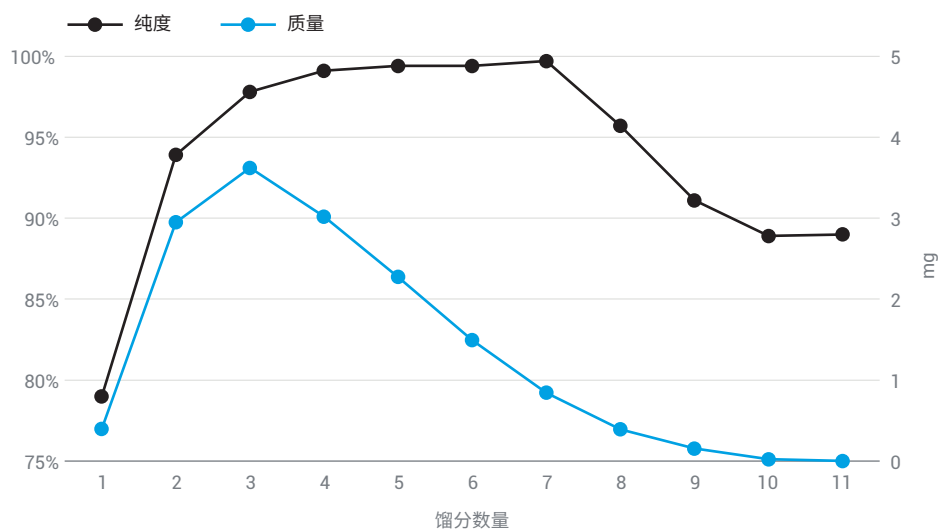


图 2. FLP 中收集的 11 种馏分的再分析叠加色谱图 (UV 260 nm)



馏分	收集纯度	收集产率
7	99.7%	4.2%
6-7	99.6%	11.7%
5-7	99.5%	23.1%
4-7	99.4%	33.9%
3-7	99.1%	56.3%
3-8	98.5%	58.2%
2-8	97.9%	72.9%
2-9	97.0%	73.7%
2-10	96.1%	73.8%
2-11	95.4%	73.8%
1-11	93.9%	75.8%

图 3. FLP 11 种馏分的收集示意图和表格。根据纯度对馏分进行分类，可轻松确定在指定纯度下获得最高产率的收集

结论

本应用简报展示了离子对反相色谱对短单链 RNA 寡核苷酸的纯化。使用可实现高载样量的 25 mm 内径色谱柱，让分离条件从分析级放大到制备级。Agilent 1290 Infinity II 制备型液相色谱包括一个组合式自动进样器/馏分收集器，是大规模进样和将馏分灵活收集至不同尺寸试管的理想工具。收集时间片段中的目标峰可以按纯度对馏分进行特定收集，以满足不同工作流程需求。使用这种技术，可实现纯度 > 99%、产率 > 56% 的馏分收集。

参考文献

1. Roberts, T. C.; Langer, R.; Wood, M. J. A. Advances in Oligonucleotide Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 673–694
2. Fueangfung, S.; Yuan, Y.; Fang, S. Denaturing Reversed-Phase HPLC Using a Mobile Phase Containing Urea for Oligodeoxynucleotide Analysis. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2014**, *33*(7), 481–488
3. Guillarme, D. *et al.* Method Transfer for Fast Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analysis: Application to Short Columns Packed with Small Particle. Part II: Gradient Experiments. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*(2), 430–440

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

www.agilent.com

DE44307.0178935185

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，2021
2021 年 5 月 6 日，中国出版
5994-3514ZHCN