

硫代反义寡核苷酸药物 FT19 有关物质的分析*

张宏燕, 鲁丹丹, 吴利霞, 周 喆, 王升启

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要 :为了进行硫代反义寡核苷酸药物 FT19 的质量控制研究,建立了用阴离子交换高效液相色谱 (AX-HPLC) 和毛细管凝胶电泳 (CGE) 分析自行合成的 FT19 有关物质的方法。设计合成了 FT19 的硫代不完全序列 $(P=O)_1$ 和短序列 $(n-x)$ 并将它们作为已知杂质。在 AX-HPLC 上,使用的分析柱为 DNA Pac PA-100 (4 mm $\times$ 250 mm) 流动相 A 为 10 mmol/L NaOH-0.1 mol/L NaCl,流动相 B 为 10 mmol/L NaOH-3 mol/L NaCl 梯度洗脱条件为流动相 B 液在 8 min 内从 60% 升至 100% 流速 1 mL/min 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 检测波长为 260 nm。CGE 所用毛细管规格为内径 100 μm ,总长度为 31 cm,有效长度为 20 cm 电泳缓冲溶液为三羟甲基氨基甲烷 (Tris)-硼酸-7 mol/L 尿素,pH 8.5 采用电动进样,进样电压 -10 kV 分离胶为 250 g/L 的聚丙烯酰胺 检测波长为 254 nm。结果表明,FT19 与硫代不完全的 $(P=O)_1$ 序列在 AX-HPLC 上能够达到基线分离,与短序列 $(n-1)$ 在 CGE 上能够达到基线分离。说明 AX-HPLC 和 CGE 联合应用能够很好地分析 FT19 中的有关物质。

关键词 阴离子交换高效液相色谱 毛细管凝胶电泳 硫代反义寡核苷酸 有关物质

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713 (2008) 05-0540-04 栏目类别 研究论文

Analysis of the related substances in phosphorothioate antisense oligonucleotide FT19

ZHANG Hongyan, LU Dandan, WU Lixia, ZHOU Zhe, WANG Shengqi

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract : A method using anion exchange high performance liquid chromatography (AX-HPLC) and capillary gel electrophoresis (CGE) was established for the analysis of the related substances in phosphorothioate antisense oligonucleotide FT19 for quality control. The FT19 and its analogs of partial phosphodiester compounds $(P=O)_1$ as well as deletion sequences $(n-1)$ were analyzed. AX-HPLC with the DNA Pac PA-100 column (4 mm $\times$ 250 mm) was used for the separation of phosphorothioate modifications. The size of the capillary column used in the CGE was 31 cm $\times$ 100 μm with an effective length of 20 cm. It was found that full phosphorothioate and partial phosphodiester oligonucleotides of the same length were successfully separated, and the deletion sequences $(n-1)$ and the full-length sequence n were successfully separated in CGE. The results demonstrated that the related substances of phosphorothioate oligonucleotides can be well analyzed by AX-HPLC and CGE.

Key words : anion exchange high performance liquid chromatography (AX-HPLC) ; capillary gel electrophoresis (CGE) ; phosphorothioate oligonucleotide ; related substances

反义寡核苷酸是能与特定的脱氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA) 以碱基互补序列配对的方式结合并阻止其转录和翻译的短核酸片段,可用于病毒性、心血管系统、感染性疾病及癌症等许多疾病的治疗^[1]。现已有 3 种反义寡核苷酸药

物上市,十余种反义寡核苷酸药物处于临床试验中^[2-6]。本实验室筛选的硫代反义寡核苷酸药物 FT19 通过抑制宿主凋亡诱导因子 (AIF) 的表达而起到抗流感的作用,其序列为 5'-GGGTTGTCTT-GTGCAGTTG-3'。前期体内外药效学研究表明

收稿日期 2008-02-26

第一作者 张宏燕,硕士研究生. E-mail : zhanghy1423@126.com.

通讯联系人 王升启,研究员,博士生导师. Tel : (010) 66932211, E-mail : sqwang@nic.bmi.ac.cn.

基金项目 国家科技攻关项目 (2004BA519A35).

* 本文的英文电子版由 Elsevier 出版社在 ScienceDirect 上出版 (<http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722059>).

FT19 具有良好的抗流感活性。对 FT19 做进一步临床前研究,如药代动力学、毒代动力学等以及最终作为药物,都需要对其进行质量控制。质量控制中的检查主要是有关物质的检查。有关物质主要包括氨解脱保护产生的各种脱保护基团、偶联出错时产生的错误序列的寡核苷酸、磷酸二酯键中 x 个非桥基氧原子未被硫代的硫代不完全序列 $(P=O)_x$ 和比全长 n 序列少 x 个碱基的合成失败序列 $(n-x)$ 。其中各种保护基团在离子交换纯化时不被保留,很容易除去。序列通过聚合酶链式反应(PCR)掺入-自动测序法及质谱法(MS)进行检查^[7]。硫代不完全杂质 $(P=O)_2$ 、 $(P=O)_3$ 和合成失败序列 $(n-2)$ 、 $(n-3)$ 所占比例很少,并且在合成后的纯化过程中可以很好地除去。因此,本文主要研究了 $(P=O)_1$ 杂质和 $(n-1)$ 杂质与硫代反义寡核苷酸药物的分离检测方法。本文采用优化的阴离子交换高效液相色谱(AH-HPLC)法和毛细管凝胶电泳(CGE)法分别可以很好地将 FT19 和 $(P=O)_1$ 杂质、FT19 和 $(n-1)$ 杂质进行分离。通过合成以上两类杂质序列作为已知杂质,用 AH-HPLC 和 CGE 方法对 FT19 和已知杂质类似物进行了分析,建立了 FT19 主要有关物质的分析方法,为该硫代反义寡核苷酸药物的质量控制研究奠定了基础。

1 实验部分

1.1 仪器及材料

ÅKTA oligopilot II 合成仪,6.3 mL 合成柱,美国 Amersham pharmacia biotech 公司;Expedite 8909 System DNA 合成仪,美国 ABI 公司。离子交换色谱系统:Delta 600 液相色谱仪,996 二极管阵列检测器,717 自动进样系统,美国 Waters 公司;离子交换 HPLC 分析柱为 DNA Pac PA-100 (4 mm × 250 mm)柱,美国 Dionex 公司。纯化、脱盐用色谱系统:Delta Prep 4000 液相色谱仪,2487 双波长紫外可见光检测仪,纯化、脱盐柱均为 AP-2 柱(4.6 mm × 100 mm),美国 Waters 公司。纯化柱填料为 SOURCE 15Q,瑞典 GE Healthcare 公司;脱盐柱填料为 POROS,德国 Boehringer Mannheim GmbH 公司。P/ACE MDQ 毛细管电泳系统,eCAP ssDNA 100-R 单链 DNA 分离试剂盒,美国 Beckman Coulter 公司。Speed Vac plus SC110A 冻干机,美国 Savant 公司。Mill-Q Biocel 超纯水器,美国 Millipore 公司。

1.2 FT19 的制备

FT19 以 G 树脂为合成载体,用 6.3 mL 柱在 ÅKTA oligopilot II 合成仪上采用循环式亚磷酰胺法合成。合成产物加浓氨水后于 55 ℃ 氨解 12 h。

氨解液温度降至室温后分别用 G3 漏斗和 0.45 μm 滤膜过滤。滤液用 Delta Prep 4000 液相色谱仪进行纯化和脱盐。具体纯化方法见文献[8],在吸收峰最大处开始收集流出液,到吸收峰降至最大吸收的约 1/5 处停止收集。脱盐是从吸收峰上升时就开始收集,到吸收峰下降至基线附近结束。纯化后的产品经旋转蒸发浓缩至 10 mL 左右进行冷冻干燥得到 FT19 纯品。

1.3 $(P=O)_1$ 杂质和 $(n-x)$ 杂质的设计

设计并合成了 3 种不同的 $(P=O)_1$ 杂质,分别是在 FT19 的 3 个不同位置氧代的序列(序列中标有 o 的位置表示被氧代),分别命名为 A1、A2 和 A3。序列如下:

A1 :G o G G T T G T C T T G T G C A G T T G

A2 :G G G T T G T C T T o G T G C A G T T G

A3 :G G G T T G T C T T G T G C A G T T o G

设计并合成了 3 种不同的 $(n-1)$ 杂质,一种 $(n-2)$ 杂质,它们分别是在 FT19 序列的不同位置缺失碱基(标有下划线的碱基表示缺失碱基),分别命名为 A4、A5、A6 和 A7。序列如下:

A4 :G G G T T G T C T T G T G C A G T T G

A5 :G G G T T G T C T T G T G C A G T T G

A6 :G G G T T G T C T T G T G C A G T T G

A7 :G G G T T G T C T T G T G C A G T T G

1.4 $(P=O)_1$ 杂质和 $(n-x)$ 杂质的制备

$(P=O)_1$ 杂质和 $(n-x)$ 杂质均在 Expedite 8909 System DNA 合成仪上采用流过式亚磷酰胺法合成。氨解方法同 FT19。氨解产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、寡核苷酸纯化柱芯(OPC)纯化,冷冻干燥产物作为已知杂质 $(P=O)_1$ 和 $(n-x)$ 。

1.5 AH-HPLC 实验条件

流动相 A 为 10 mmol/L NaOH-0.1 mol/L NaCl,流动相 B 为 10 mmol/L NaOH-3 mol/L NaCl 梯度洗脱条件为 B 液在 8 min 内从 60% 升至 100% 流动相均用 Mill-Q 水配制并用 0.45 μm 滤膜滤过;流速为 1 mL/min。柱温 40 ℃ 检测波长为 260 nm。分析软件为 Millenium 32。

1.6 CGE 实验条件

采用 P/ACE MDQ 毛细管电泳系统及 eCAP ssDNA100-R 单链 DNA 分离试剂盒;毛细管内径 100 μm,总长度为 31 cm,有效长度为 20 cm;电泳缓冲溶液为三羟甲基氨基甲烷(Tris)-硼酸-7 mol/L 尿素,pH 8.5;分离胶为 250 g/L 的聚丙烯酰胺,分离电压为 -15.5 kV,分离温度为 40 ℃;采用电动进样,进样电压 -10 kV;检测波长为 254 nm;分析软件为 Beckman P/ACE system MDQ version 2.3。

2 结果与讨论

2.1 AX-HPLC 的分析结果

图 1-a, b, c 为“1.5”节色谱条件下, 3 种 ($P=O$)₁ 杂质与 FT19 的分离图谱, FT19 和其 ($P=O$)₁ 杂质达到了基线分离, 氧代位置不同的 ($P=O$)₁ 杂质 (A1, A2 和 A3 杂质) 的色谱保留时间一致, 分离图谱相似, 分离度几乎相同。图 1-d 为 ($n-2$) 杂质 A7 与 FT19 的分离图谱, 可以看出, FT19 与 ($n-2$) 杂质能很好地分离。图 1-e 为 ($n-1$) 杂质 A4 与 FT19 的分离图谱, 可以看出, 该分离条件无法将 FT19 和 ($n-1$) 杂质 A4 完全分开。在“1.5”节色谱条件下, 把已知浓度的 ($P=O$)₁ 杂质 A1 逐级稀释

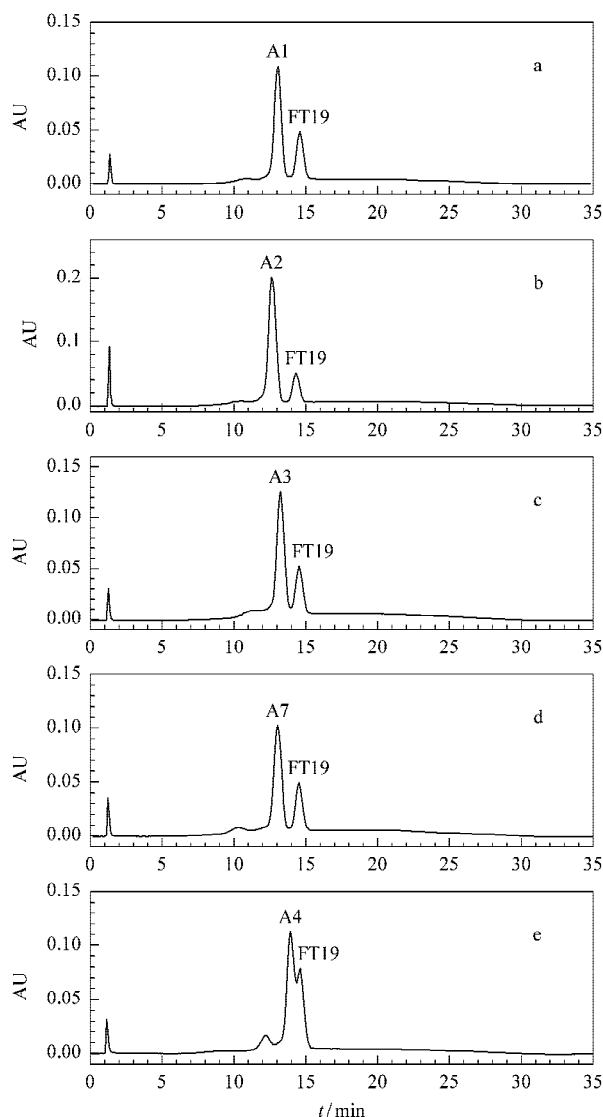


图 1 分别添加 (a) ($P=O$)₁ 杂质 A1、(b) ($P=O$)₁ 杂质 A2、(c) ($P=O$)₁ 杂质 A3、(d) $n-2$ 杂质 A7 与 (e) ($n-1$) 杂质 A4 的 FT19 的色谱图

Fig. 1 AX-HPLC chromatograms of FT19 contained (a) ($P=O$)₁ impurity A1, (b) ($P=O$)₁ impurity A2, (c) ($P=O$)₁ impurity A3, (d) ($n-2$) impurity A7 and (e) ($n-1$) impurity A4, respectively

后进行 AX-HPLC 分析, 得到杂质 A1 的检出限为 $2 \mu\text{g/mL}$ 。

2.2 CGE 的分析结果

在“1.6”节实验条件下, FT19 与其 ($n-1$) 杂质达到基线分离 (见图 2-a, b, c); 且分离度随着杂质碱基数目的减少而提高, 图 2-d 显示 FT19 与其 (n

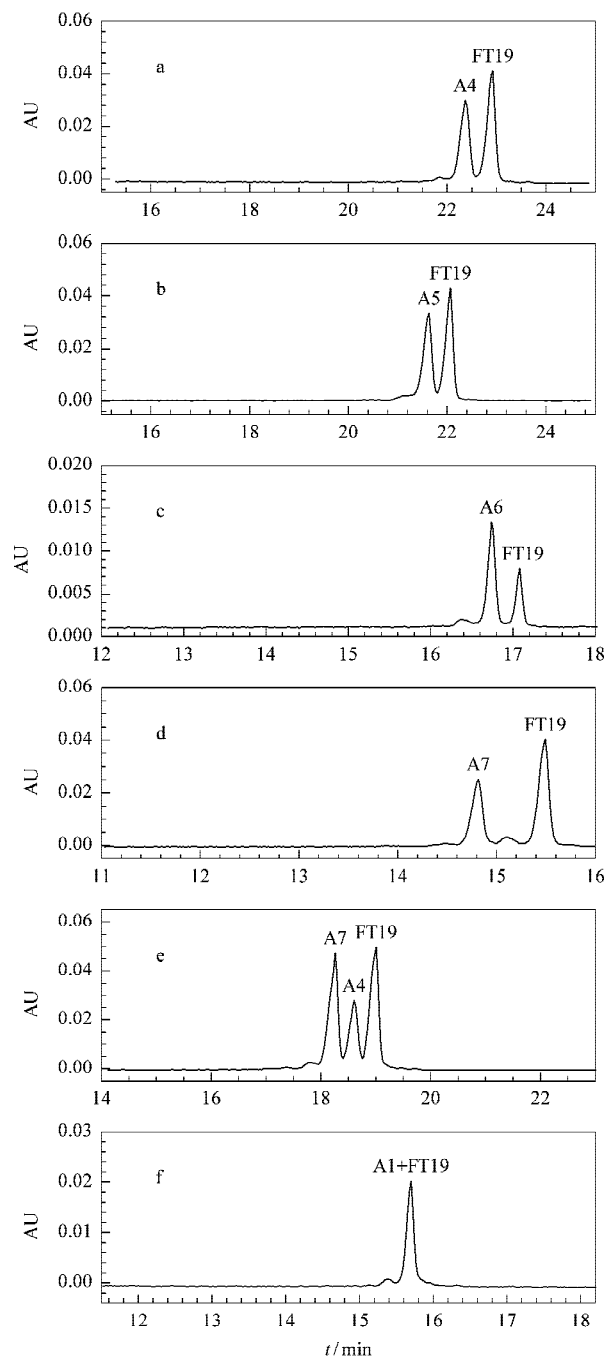


图 2 分别添加 (a) ($n-1$) 杂质 A4、(b) ($n-1$) 杂质 A5、(c) ($n-1$) 杂质 A6、(d) ($n-2$) 杂质 A7、(e) ($n-1$) 杂质 A4、($n-2$) 杂质 A7 及 (f) ($P=O$)₁ 杂质 A1 的 FT19 的 CGE 图谱

Fig. 2 CGE electropherograms of FT19 contained (a) ($n-1$) impurity A4, (b) ($n-1$) impurity A5, (c) ($n-1$) impurity A6, (d) ($n-2$) impurity A7, (e) ($n-1$) impurity A4, ($n-2$) impurity A7 and (f) ($P=O$)₁ impurity A1, respectively

-2) 杂质的分离度明显优于 FT19 与其 $(n-1)$ 杂质的分离度;图 2-e 为添加 A4 和 A7 的 FT19 的 CGE 图谱,说明 CGE 能够分离碱基数目不同的杂质。但是 FT19 和 $(P=O)_1$ 杂质采用 CGE 分离则完全无法分开,见图 2-f。在上述条件下,把已知浓度的 $(n-1)$ 杂质 A4 逐级稀释后进行 CGE 分析,得到杂质 A4 的检出限为 $0.220 \mu\text{g/mL}$ 。

2.3 中试规模 FT19 的纯度

在“1.5”节 AX-HPLC 分析条件下,测得中试规模生产的 FT19 药物 (30 mmol) 的纯度大于 98% (见图 3-a);在“1.6”节 CGE 分析条件下,测得其纯度大于 95% (见图 3-b)。

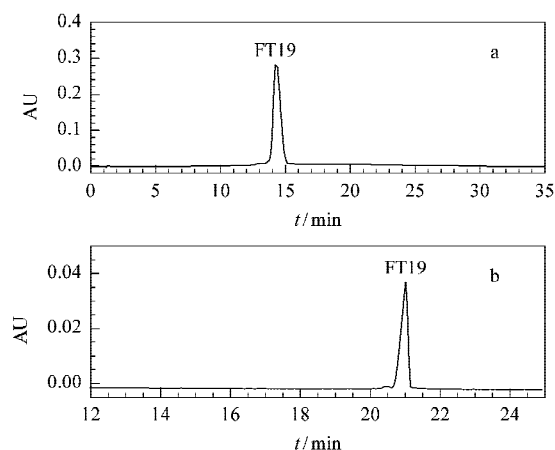


图3 FT19 的(a)HPLC 图谱与(b)CGE 图谱
Fig. 3 (a) HPLC chromatogram and (b) CGE electropherogram of FT19

中试产品的杂质主要为 $(n-1)$ 和 $(P=O)_1$ 杂质,因此实验中首先运用 CGE 确定寡核苷酸全长主成分的含量,再减去 AX-HPLC 法测定的硫代不完全序列 $(P=O)_1$ 的含量,得到产物的纯度。故此,AX-HPLC 法和 CGE 法的结合使用可以很好地完成 FT19 的有关物质分析,成为 FT19 定量分析、纯度测定及质量控制的有力工具。

2.4 讨论

对寡核苷酸药物的全面质量控制除了 AX-HPLC 和 CGE^[9,10] 方法外,还可以借助核磁共振 (NMR) 和质谱^[11,12] 等方法对不同杂质进行定性和定量分析。但这些方法也有其局限性,如仪器要求高,不普及。³¹P-NMR 可以有效地检测纯品中的微量不完全硫代寡核苷酸。质谱可以用于杂质检测,但主要用于寡核苷酸药物的精确相对分子质量和序列测定。当失败序列的丰度小于主峰面积的 2% 时质谱的检测能力小于 CGE 法,因此 CGE 仍然是首选方法^[13]。近几年有报道认为使用反相 HPLC 也能分离 n 和 $(n-1)$ 杂质,分离效果与 CGE 类似,但检出限高于 CGE^[14-16]。综合运用上述方法可以用

于硫代寡核苷酸药物的杂质检查,但只能孤立地控制某项指标。AX-HPLC 法和 CGE 法也各有其局限性,今后可以尝试 CGE-MS 和 HPLC-MS 等快速简便的方法用于寡核苷酸药物的有关物质检查。

3 结论

AX-HPLC 对寡核苷酸骨架上磷酸基团的差异非常敏感,可以很好地分离 FT19 及其 $(P=O)_1$ 杂质,但氧代位置不同、氧代数相同的 $(P=O)_1$ 杂质在 AX-HPLC 上分不开。此外,FT19 和 $(n-1)$ 杂质在 AX-HPLC 上也不能达到基线分离。 $(P=O)_1$ 杂质与 $(n-2)$ 杂质在 AX-HPLC 上的出峰位置相同。CGE 分离的基础是各种长度的寡核苷酸由电泳驱动,通过毛细管中的凝胶基质时被过筛而达到分离。CGE 法可以很好地分离 FT19 及其 $(n-x)$ 杂质,并且随着缺失碱基数量 x 的增加,分离度增大,分离效果提高;但是 CGE 法不能分离 FT19 及其 $(P=O)_1$ 杂质。在 CGE 分离图谱上, $(P=O)_1$ 杂质包含在 FT19 主峰里。

参考文献:

- [1] Fu X H, Zhang J S, Zhang N, et al. World J Gastroenterol, 2005, 11 (6) : 785
- [2] Kurreck J. Eur J Biochem, 2003, 270 (8) : 1 628
- [3] Morris M J, Tong W P, Cordon-Cardo C, et al. Clin Cancer Res, 2002, 8 (3) : 679
- [4] Cunningham C C, Holmlund J T, Geary R S, et al. Cancer, 2001, 92 (5) : 1 265
- [5] Rudin C M, Holmlund J, Fleming G F, et al. Clin Cancer Res, 2001, 7 (5) : 1 214
- [6] Geary R S, Watanabe T A, Truong L, et al. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 296 (3) : 890
- [7] Lu D D, Chen S H, Zhang W, et al. Anal Biochem, 2005, 345 (1) : 81
- [8] Zhang W, Yang B H, Liang Q D, et al. Chinese Journal of Chromatography (张崑, 杨秉呼, 梁乾德, 等. 色谱), 2005, 23 (4) : 374
- [9] Srivatsa G S, Batt M, Schuette J, et al. J Chromatogr A, 1994, 680 (2) : 469
- [10] DeDionisio L A, Lloyd D H. J Chromatogr A, 1996, 735 (1/2) : 191
- [11] Cristoni S, Bernardi L R. Mass Spectrom Rev, 2003, 22 (6) : 369
- [12] Yang B H, Wang S Q. Prog Biochem Biophys, 2000, 27 (4) : 444
- [13] Ding C, Cantor C R. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100 (6) : 3 059
- [14] Gilar M. Anal Biochem, 2001, 298 (2) : 196
- [15] Gilar M, Fountain K J, Budman Y, et al. J Chromatogr A, 2002, 958 (1/2) : 167
- [16] Gilar M, Fountain K J, Budman Y, et al. Oligonucleotides, 2003, 13 (4) : 229