

Inclisiran (英克司兰) 的IPRP分析

陆珺

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

概述

Inclisiran是一种小干扰RNA(siRNA), 以干扰前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶Kexin-9(PCSK9)信使RNA表达为主要作用, 从而持续降低PCSK9和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平, 具有良好的有效性及安全性。Inclisiran是由21~23个核苷酸系列组成的新型双链siRNA, 其分子是由两条互补的核糖核苷酸链组成的, 分别为一条正义链和一条反义链, 正义链包含21个核苷酸, 反义链包含23个核苷酸, 反义链包含目标基因的识别信息。而正义链中3'末端通过共轭结合N-乙酰半乳糖胺(GalNAc), N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)与肝细胞表面的唾液酸糖蛋白受体结合, 迅速被肝细胞摄取, 因此能够被精准的作用于靶向器官^[1]。

由于合成反应效率和原料纯度等多个因素的影响, 合成中会产生序列截短/延长等工艺杂质, 其中特别是n-1、n+1、氧化异构体均与全长药物的相似度较高, 给产品纯化和杂质分析工作带来了很大的困难^[2]。此外Inclisiran是一种经过硫代磷酸酯修饰的siRNA, 这种修饰能够增强siRNA对核酸酶的抵抗力, 从而提高其在体内的稳定性。这种修饰会在磷酸基团中引入手性中心, 导致形成2ⁿ个非对映体(其中n是硫代磷酸酯修饰的数量)。由于理化性质上存在的细微差异会导致非对映异构体在色谱柱固定相上得到部分分离, 所以硫代磷酸酯寡核苷酸的色谱峰比其天然(磷酸二酯)对应物的色谱峰宽^[3]。

针对上述问题, 急需开发一种色谱条件能够抑制硫代磷酸酯寡核苷酸非对映异构体的峰展宽, 同时使全长硫代磷酸酯寡核苷酸(n)和其序列长短异构体(n+1和n-1)以及硫代不完全异构体得到良好的分离。

关键词

Inclisiran; 英克司兰; 硫代寡核苷酸; 序列延长/缩短异

构体; 硫代不完全异构体; UPLC; IPRP; Biozen Oligo;

实验部分

3.1 仪器、试剂与材料

3.1.1 主要仪器设备

Water H-class 超高效液相色谱;

3.1.2 试剂材料

实验用水为屈臣氏蒸馏水, 甲醇、乙腈为色谱纯, HFIP(六氟异丙醇)、HA(正己胺);

3.1.3 样品

样品分别为AS和SS链以及其截短(n-1)/延长(n+1)、硫代不完全(PO)杂质;

3.2 仪器检测条件

3.2.1 色谱条件

色谱柱1: Biozen Oligo (2.1×150mm, 1.7μm, 100Å) P/N:00F-4791-AN

流动相: **A相:** 20 mM HA + 100 mM HFIP (pH 9.0);

B相: MPA: 乙腈=1: 1;

流速1: 0.25mL/min;

柱温: 60 °C;

上样量: 0.2μL;

梯度程序见表1

表1. 流动相1梯度条件

时间(min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.25	75	25
20	0.25	35	65
20.1	0.25	75	25
30	0.25	75	25



3.3结果与讨论

3.3.1 色谱柱选择

寡核苷酸因其磷酸二酯骨架和带负电荷的特性，具有高度的极性，这在传统的反相色谱中难以有效保留。离子对反相色谱是分析分离寡核苷酸的主要分离模式之一。其保留机制较为复杂，可理解为带正电的离子对试剂（即烷基胺）和带负电的磷酸基团之间的相互作用，形成中性复合物，离子对试剂在疏水固定相表面的吸附导致复合物被保留。所以在色谱柱的选择方面，考虑到需要在碱性流动相和较高柱温的环境下运行，传统的硅胶色谱柱会存在寿命问题，所以必须选择有机杂化硅胶的色谱柱。

Phenomenex的bioZen Oligo 是一种专为寡核苷酸分析设计的色谱柱，除了采用了先进的核-壳颗粒技术和有机硅胶杂化工艺，还引入了BioTi生物兼容性硬件，提高了色谱柱在低进样量分析时的灵敏度和稳定性，特别是在处理生物样品中寡核苷酸的表征和定量时。这种硬件改进有助于改善回收率，对于治疗性寡核苷酸药物的研发和质量控制至关重要。

3.3.2 流动相选择

被广泛使用的离子对系统包括用乙酸缓冲的烷基胺体系或者HFIP缓冲的烷基胺体系。HFIP体系也可以适用于LC-MS，因为它在降低胺浓度的情况下提供了有效的分离能力，不会抑制MS信号，并且HFIP还可以提高电离效率。

根据离子对反相色谱柱的原理，目标物保留随着离子对（烷基胺）疏水性的增加而增加。本文分析的是一种硫代寡核苷酸样品，在流动相筛选中发现疏水性较弱的烷基胺（如三乙胺）对非对映异构体有一定的分离能力，从而使色谱峰更为复杂，从而掩盖或者影响了序列长短等异构体的分离。而疏水性较强的烷基胺则可以有效的抑制非对映异构体的分离，从而改善序列长短等异构体的分离。通过对比，本文最终筛选了正己胺的体系，可以有效的对n-1、n+1的失败序列实现分离，硫代不完全序列容易和n-1共流出，在该条件下也可以实现分离。参见图1-4。并且AS链和SS链以及主要序列异质体在该条件下均可以实现分离。参见图5。

3.4实验谱图

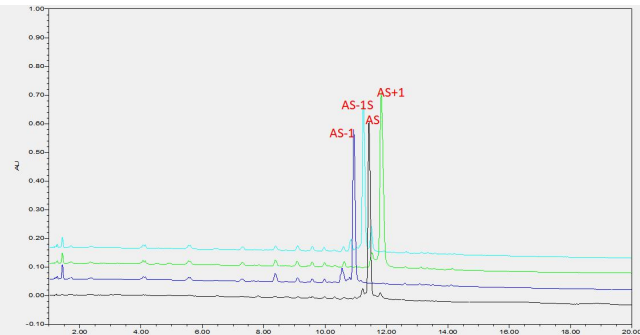


图1. AS链以及其失败序列的单标叠图（深蓝色：AS-1nt； 浅蓝色：AS-1S； 黑色：AS； 绿色：AS+1nt）

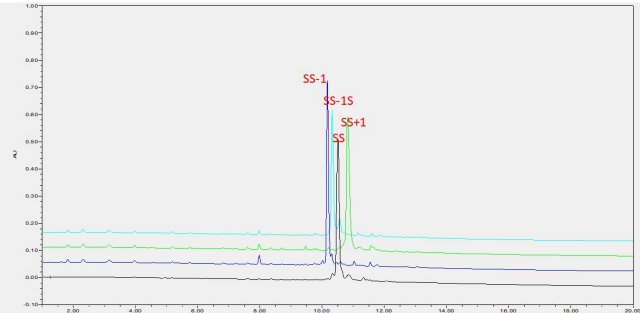


图2. SS链以及其失败序列的单标叠图（深蓝色：SS-1nt； 浅蓝色：SS-1S； 黑色：SS； 绿色：SS+1nt）

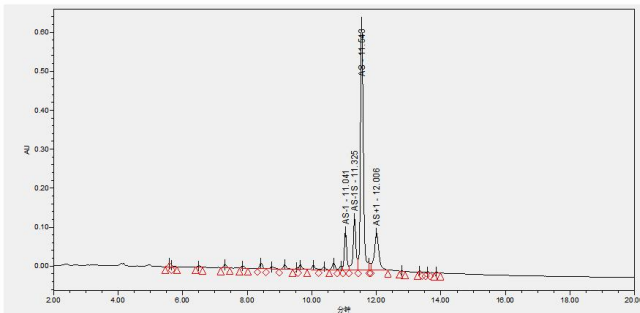


图3. 将AS链的失败序列按照10%加标到AS链中的结果

表2. 图3的积分结果

组分	保留时间 (min)	理论塔板数	分离度
AS-1	11.041	116064	-
AS-1S	11.325	101734	2.03
AS	11.543	89476	1.44
AS+1	12.006	40761	>1.5



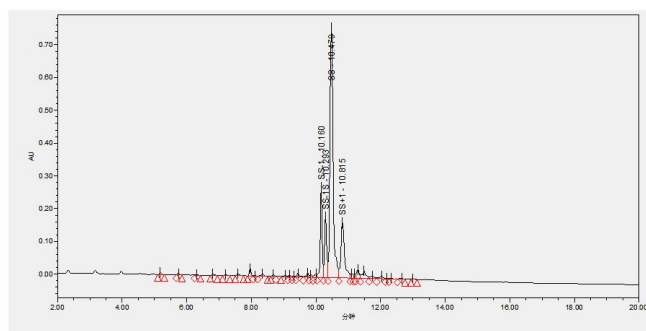


图4. 将SS链的失败序列按照10%加标到SS链中的结果

表3. 图4的积分结果

组分	保留时间 (min)	理论塔板数	分离度
SS-1	10.160	181895	-
SS-1S	10.293	116190	1.18
SS	10.479	63753	1.28
SS+1	10.815	61878	1.95

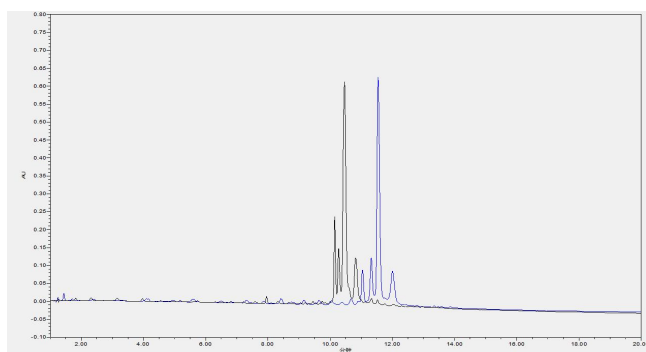


图5. SS链加标（黑）和AS链加标（蓝）的叠图

结论

本文开发了一种离子对反相色谱条件，该条件下 Inclisirna的AS和SS链的序列长短异构体和硫代不完全序列均可以和目标序列得到分离。

参考文献：

- [1] https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/214012lbl.pdf
- [2] Capaldi D, Teasdale A, Henry S, Akhtar N, den Besten C, Gao-Sheridan S, Kretschmer M, Sharpe N, Andrews B, Burm B, Foy J. Impurities in Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products. *Nucleic Acid Ther.* 2017 Dec;27(6):309-322.
- [3] Z. Kadlecova, K. Kalíková, E. Tesarova, M. Gilar, Phosphorothioate oligonucleotides separation in ion-pairing reversed-phase liquid chromatography: effect of ion-pairing system, *J. Chromatogr. A* 1676 (2022) 463201, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463201>.



方法开发服务

探索分离, 使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中, 抢占先机越来越多被大家提及, 同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此, 我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心, 为客户加快项目进度提供支持。

方法开发服务以客户为中心, 以色谱技术为中心, 为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

三大研发中心

中国天津

地址: 天津市开发区西区南大街179号

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址: 上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址: 411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的, 不可用于临床诊断程序。

© 2025 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题, 或想要了解更多信息, 请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家, 我们很乐意为您提供帮助!

