

应用纪要

## 各种长度和修饰的反义寡核苷酸的高灵敏度生物分析

---

Suma Veeramachineni, Mark Wrona

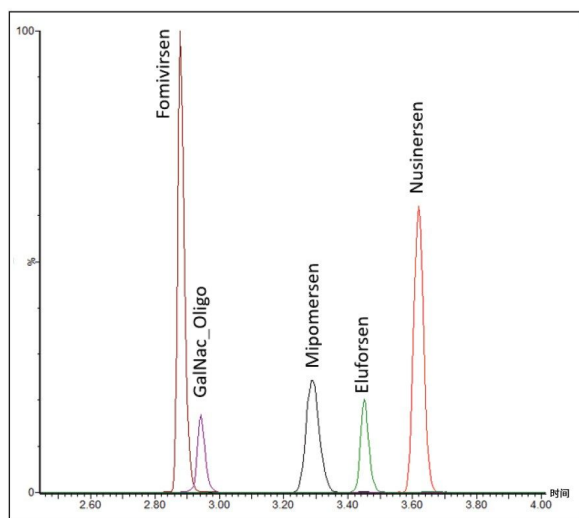
Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

---

### 摘要

本应用简报展示了Xevo™ TQ Absolute三重四极杆质谱仪对人血浆基质中不同长度（18~33个核苷酸）、连接子和修饰的寡核苷酸进行生物分析的灵敏度和适用性。



左图：搭载Waters ACQUITY Premier UPLC的Waters Xevo TQ Absolute系统；

右图：使用LC-MS/MS IP生物分析方法在4分钟内获得的5种ASO化合物的代表性MRM谱图。

## 优势

结合ACQUITY™ Premier UPLC系统和ACQUITY Premier C<sub>18</sub>寡核苷酸分析专用柱，Xevo TQ Absolute质谱仪对寡核苷酸展示出更高的色谱回收率以及优异的（亚ng/mL级）系统灵敏度，有助于完成具有挑战性的LC-MS/MS分析和PK研究。

## 简介

之前的研究使用GEM91/Trecovirsen证明了高灵敏度和五个数量级的动态范围性能<sup>1</sup>。本研究将这种方法扩展运用于不同长度和修饰的反义寡核苷酸(ASO)。

## 实验

向血浆样品中加入浓度为0.1 ng/mL~1000 ng/mL的多种ASO，包括2'-MOE修饰的碱基、GalNAc偶联物或硫代磷酸酯连接子（Eluforsen、Fomivirsen、Mipomersen、Nusinersen和GalNAc偶联寡核苷酸）。使用液-液萃取法提取100  $\mu$ L血浆标准品。使用GEM91 (100 ng/mL)作为内标来定量所有寡核苷酸。100 mM六氟异丙醇(HFIP) + 15mM N, N-二异丙基乙胺(DIPEA)的水溶液和90%乙腈溶液分别用作流动相A和流动相B。

完整的方法详情请参阅Waters™应用纪要720007574ZH。

名称	分子量	大小 (mer)	连接子	修饰	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)
GEM91	7776	25 nt	PO <sub>2</sub> S <sup>3-</sup>	N/A	597.2	319.1
Fomivirsen	6682	21 nt	PO <sub>2</sub> S <sup>3-</sup>	N/A	741.4	319.1
Nusinersen	7127	28 nt	PO <sub>2</sub> S <sup>3-</sup>	2'-MOE	889.8	393.1
Eluforsen	11,469	33 nt	PO <sub>2</sub> S <sup>3-</sup>	2'OMe	673.7	335.2
Mipomersen	7177	20 nt	PO <sub>2</sub> S <sup>3-</sup>	2'-MOE ; 5-Me rC	716.6	319.0
GalNAc_Oligo	~8000	21 nt	PO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	3'-天线 GalNAc	A	B

表1.研究中使用的寡核苷酸的详细信息。

## 结果与讨论

为了证明重现性，将两份校准标准品和ASO组（表1）每个QC浓度六份重复样在三天运行三次。校准曲线呈线性， $r^2$ 值>0.99（ $1/x^2$ 加权），且>75%的非零校准品水平和QC样品在每次运行中都符合可接受标准，即，非零校准品和QC样品应为 $\pm 15\%$ ，LLOQ水平除外，其中每次运行的校准品或QC样品应为标示浓度的 $\pm 20\%$ ，如表2和3所示。

名称	标准浓度 (ng/mL)	Eluforsen		Fomivirsen		Mipomersen		Nusinersen		GalNAc_Oligo	
		准确度 (%)	RSD (%)	准确度 (%)	RSD (%)	准确度 (%)	RSD (%)	准确度 (%)	RSD (%)	准确度 (%)	RSD (%)
标准品 1	0.10	102.0	10.8	100.8	3.6	98.4	10.4	100.1	13.3	-	-
标准品 2	0.20	94.7	12.9	97.3	4.8	100.1	8.7	98.0	6.8	98.3	9.8
标准品 3	0.50	96.0	5.6	100.2	5.4	103.5	7.2	99.6	5.4	102.4	2.4
标准品 4	1.00	101.9	3.7	103.4	3.5	106.0	4.6	105.7	3.7	103.1	7.1
标准品 5	2.00	106.6	6.0	105.9	5.0	105.9	5.2	108.7	3.6	104.1	4.8
标准品 6	10.0	98.8	3.7	102.6	3.3	101.3	4.0	102.2	2.3	103.9	3.6
标准品 7	100	102.9	4.0	102.6	5.3	99.2	6.0	100.1	4.2	100.6	3.5
标准品 8	1000	94.9	2.8	89.3	2.9	89.0	4.5	86.6	1.2	90.1	2.9

表2.校准标准品的统计数据。

名称	标准浓度 (ng/mL)	Eluforsen		Fomivirsen		Mipomersen		Nusinersen		GalNAc_Oligo	
		准确度 (%)	RSD (%)	准确度 (%)	RSD (%)	准确度 (%)	RSD (%)	准确度 (%)	RSD (%)	准确度 (%)	RSD (%)
QC1	0.10	94.4	14.6	94.5	12.2	99.9	11.4	92.8	6.9	-	-
QC2	0.20	94.8	7.9	99.3	7.0	100.5	9.7	98.4	7.8	110.2	6.9
QC3	0.50	104.4	5.8	104.1	6.5	102.8	6.3	104.3	4.4	103.0	7.5
QC4	50.0	101.2	2.9	102.1	3.7	98.9	4.3	99.7	2.5	100.1	2.5
QC5	800	97.9	2.1	91.4	3.7	89.0	3.5	87.3	2.1	93.8	2.2

表3.QC样品的统计数据。

方法开发使用了优化后的离子通道，这些离子通道在多种母离子电荷态和产生的碎片离子质量数中进行了评估。负离子模式检测能力增强能够改善分析的离子计数、S/N和检测限。在人血浆中0.1~1000 ng/mL的校准范围内实现了0.1 ng/mL (GalNAc寡核苷酸为0.2 ng/mL) 的定量下限(LLOQ)，如图1所示，该图显示了所有寡核苷酸最低浓度校准标准品的代表性色谱图。

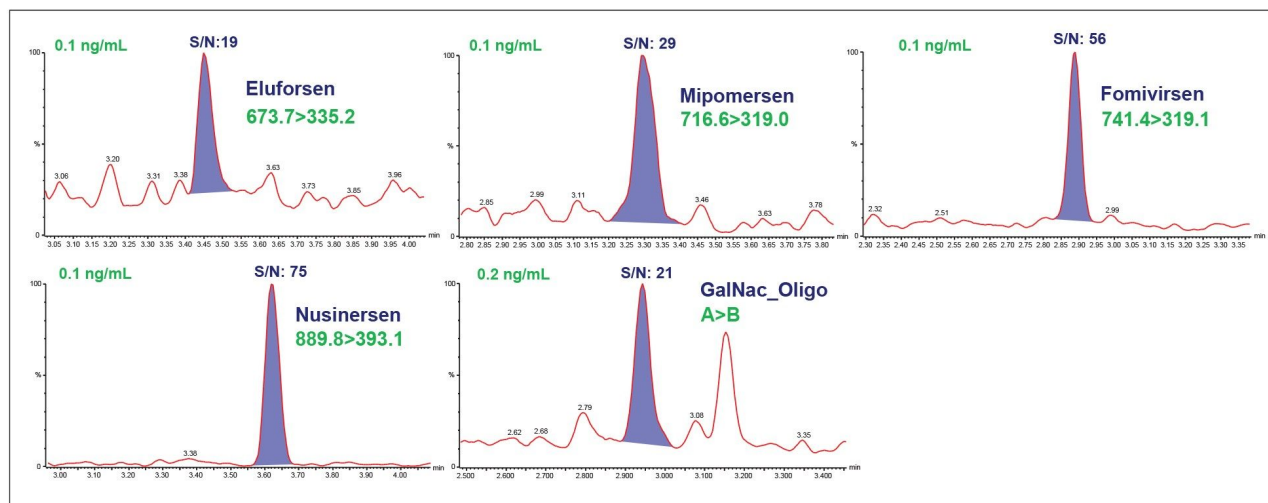


图1.LLOQ水平下峰的代表性色谱图。

## 结论

- 对于不同长度(18~33 nt)以及具有各种连接子和修饰的反义寡核苷酸，在人血浆中观察到亚ng/ml水平的灵敏度和良好的动态范围性能。
- MaxPeak™ HPS技术减少了非特异性结合、金属吸收，并实现了出色的灵敏度和低浓度检测。
- Xevo TQ Absolute串联质谱仪对棘手的负电离化合物具有非常高的灵敏度，能够为基于LC-MS/MS定量生物基质中反义寡核苷酸的常规应用生成高质量数据。

## 致谢

本文作者由衷感谢Greg Jones和Alnylam Pharmaceuticals为我们的实验无偿提供21 mer GalNac寡核苷酸。这与Mary Trudeau的应用纪要720007418ZH相同。

## 参考资料

1. Suma Veeramachineni, Mark D Wrona, 反义寡核苷酸的高灵敏度LC-MS/MS生物分析定量, 沃特世, 应用纪要, [720007574ZH](#), 2022年3月.

---

## 特色产品

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

[Xevo TQ Absolute三重四极杆质谱仪 </nextgen/cn/zh/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>](/nextgen/cn/zh/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html)

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

[TargetLynx <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)

720007809ZH, 2022年12月

© 2023 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](#)