

使用BioAccord LC-MS系统对各种经过大量修饰的寡核苷酸进行完整质量数确认分析

Catalin E. Doneanu, Jonathan Fox, Emma Harry, Chris Knowles, Ying Qing Yu, Joseph Fredette, Weibin Chen

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

本应用纪要介绍一种符合法规要求的自动化LC-MS工作流程，用于对未经修饰和经过大量修饰的寡核苷酸进行质量数确认分析。

优势

- 利用符合法规要求的自动化LC-MS工作流程对未经修饰和经过大量修饰的寡核苷酸进行质量数确认
- waters_connect内置的Bayes Spray算法能够为经过高度修饰的寡核苷酸提供准确的电荷去卷积结果

简介

近年来，寡核苷酸类药物开始作为小分子及治疗性蛋白药物的有力补充¹。寡核苷酸类药物的生产和质量控制需要

使用高选择性、高灵敏度的LC-MS方法。寡核苷酸的质谱分析方法通常是采用多种离子对试剂和改性剂在负离子ESI-MS模式下进行反相色谱分析。近年来，寡核苷酸分析的集成式LC-MS工作流程已成功应用于四极杆和QTof LC-MS平台²⁻⁴。

图1展示的BioAccord LC-MS系统是沃特世于2019年推出的一套紧凑、稳定、简便易用的平台，可用于生物药物常规分析。这套完全集成的BioAccord LC-MS系统包含一套ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统、一台可变波长紫外(TUV)检测器以及采用ESI-ToF技术的ACQUITY RDa质谱检测器，如图1所示。针对使用BioAccord系统进行的寡核苷酸分析，近期推出了一种简化的合规工作流程⁵。waters_connect集成数据采集和处理功能，是近期推出的合规信息学平台。



图1. BioAccord LC-MS平台

本文评估该LC-MS平台对经过大量修饰的寡核苷酸的分析能力。与常规（未修饰）寡核苷酸不同，经过修饰的寡

核苷酸由于疏水性增强、在有机溶剂中的溶解度差或在电喷雾质谱中的响应较弱，因此采用LC-MS法难以表征。本研究考察了多种寡核苷酸修饰。以离子对反相色谱法分析所有寡核苷酸，采用同一套LC-MS系统结合标准2.1×50 mm C₁₈ OST（寡核苷酸分离技术）色谱柱和相同的流动相（参见“实验”部分）进行分析。分析的寡核苷酸混合物包含未经修饰的寡核苷酸序列（标记为CTRL-对照）以及1~3种经过大量修饰的寡核苷酸（标记为TEST-待测化合物）。本应用纪要提供的所有LC-MS数据均在全扫描MS模式下采集，并用waters_connect进行处理。对未经修饰和经过修饰的寡核苷酸的组合ESI-MS谱图同时进行去卷积处理，获得每种化合物的完整寡核苷酸质量数测定结果。

实验

试剂和样品前处理

三乙胺（TEA，纯度99.5%，产品目录号65897-50ML）和甲醇（LC-MS级，产品目录号34966-1L）购自Honeywell（美国卡罗来纳州夏洛特），1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇（HFIP，纯度99%，产品目录号105228-100G）购自Sigma Aldrich（美国密苏里州圣路易斯）。HPLC级去离子(DI)水使用MilliQ系统（密理博公司，美国马萨诸塞州贝德福德）净化。流动相现配现用。考察了七种不同类型的寡核苷酸修饰。有关每种寡核苷酸序列的详细说明，请参见“结果”部分。除经修饰的寡核苷酸序列（标记为TEST化合物）以外，还从同一家寡核苷酸制造商（ATDBio，英国南安普敦）购买了具有相同序列但未经修饰的寡核苷酸（标记为CTRL化合物）。在同一样品瓶中使用去离子水溶解TEST和CTRL寡核苷酸样品，使浓度达到1 μM，从中取10 μL进样。

LC-MS系统

BioAccord系统，包含ACQUITY RDa检测器、ACQUITY UPLC I-Class Plus和ACQUITY UPLC TUV

LC条件

色谱柱： OST色谱柱, 2.1 x
50 mm, 装填1.7 μ
m C₁₈颗粒（部件
号： 186003949）

柱温:	60 °C或75 °C, 如 “结果”部分所示
流速:	300 µL/min
流动相:	溶剂A: 80 mM HFIP (六氟异丙醇) , 7 mM TEA (三 乙胺) , 溶于去离 子水中 溶剂B: 40 mM HFIP, 3.5 mM TEA, 溶于50%甲 醇/50%去离子水中
梯度表:	对于每种类型的寡 核苷酸修饰, 优化 的梯度条件请参见 “结果”部分
样品温度:	6 °C
样品瓶:	QuanRecovery Max Peak, 300 µL 样品瓶 (部件号 : 186009186)
进样体积:	10 µL
清洗溶剂:	50%甲醇
样品管理器清洗溶	50%甲醇

剂：

密封清洗液： 20%乙腈的去离子
水溶液

MS条件

电离模式： ESI(-)

毛细管电压： 0.8 kV

锥孔电压： 40 V

离子源温度： 120 °C

脱溶剂气温度： 400 °C

脱溶剂气体(N₂)压力： 6.5 bar

TOF质量范围： 400~5000

采集速率： 2 Hz

时时校正标准液： waters_connect实时校正标准
液（部件号：186009298）

IDC设置： 开

数据采集和处理软件： waters_connect

结果与讨论

寡核苷酸类药物通常会掺入化学修饰的核苷酸，以防止被天然存在的核酸酶降解。主要有三种类型的化学修饰，包括骨架修饰、糖修饰和核酸碱基修饰。寡核苷酸类药物最常使用骨架修饰和糖基修饰，但对于分子诊断用途的寡核苷酸，则首选核酸碱基修饰。本研究分析了七种常见修饰类型的寡核苷酸，包括2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、N-乙酰半乳糖胺(GalNac)、2'-O-甲基(OMe)、2'-氟(F)、硫代磷酸酯(PPT)、6-荧光素酰胺(FAM)以及锁定核酸结构(LNA)。提及硫代磷酸化寡核苷酸时，虽然科学文献中经常使用缩写词PS，但本应用纪要和waters_connect中用于此类化合物的同位素模型使用缩写词PPT。图2展示了通过R1、R2和R3官能团连接寡核苷酸化学结构进行修饰的位点。其中有三个官能团（通常标记为R1）是制药行业采用的典型修饰，被引入核糖结构的2'位。另外两种修饰（R3: GalNac或FAM）被选作连接寡核苷酸5'端的典型基团。最后考察了骨架（PPT, R2）或核糖基团(LNA)的两种修饰。总体而言，这七种不同类型的修饰涵盖了制药行业当前采用的各种常见修饰。

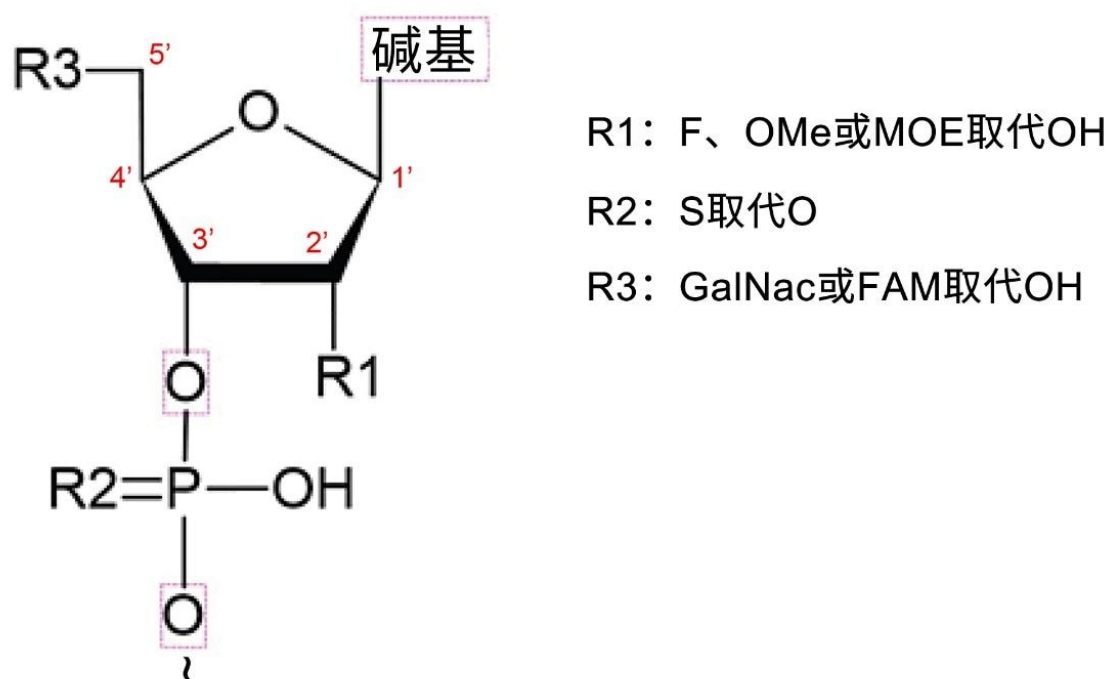


图2.寡核苷酸化学结构，展示了本研究考察的六种修饰。此外，还分析了包含LNA（锁定核酸）构型的寡核苷酸结构，该结构包含一个额外的亚甲基，将2'位与4'位连接。

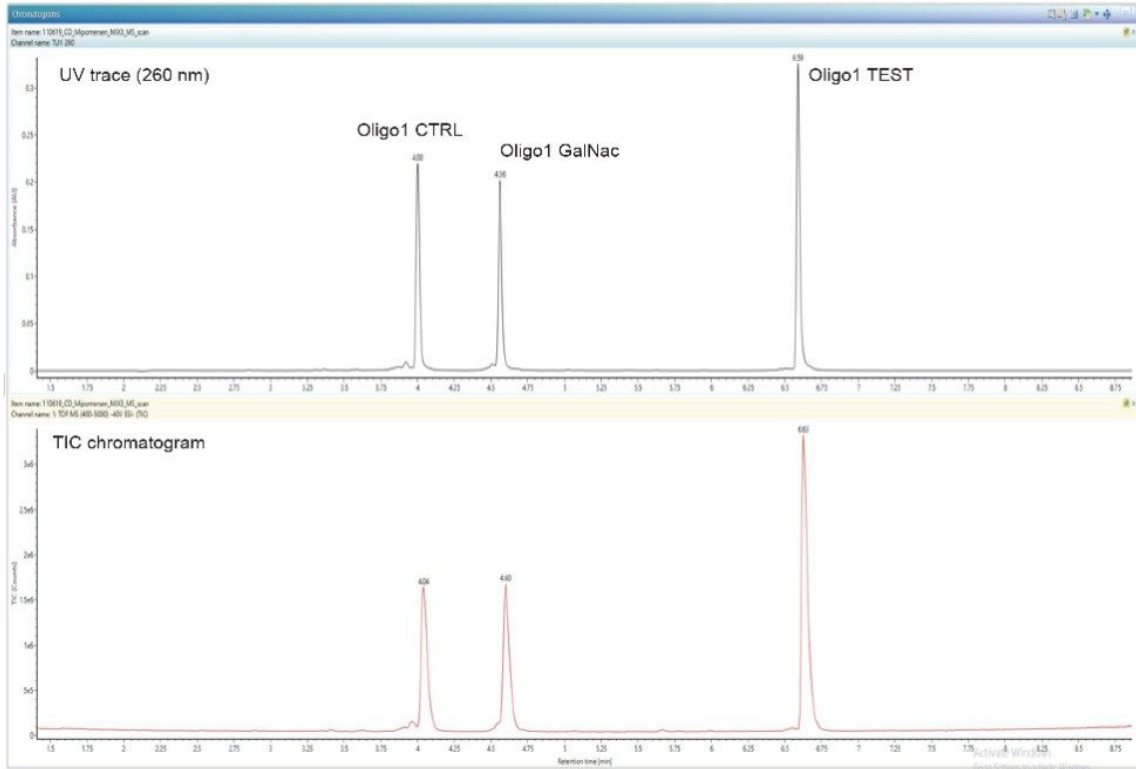
分析的第一个寡核苷酸样品是一种三组分混合物，包含一个20-mer未经修饰的寡核苷酸（序列为5'-GCC TCA GTC TGC TTC CAC CT-3'，标记为Oligo1 CTRL）以及两种经过修饰的寡核苷酸。第一种修饰的寡核苷酸含有GalNAc修饰，通过C3连接子与Oligo1 CTRL的5'端连接（标记为Oligo1 GalNAc）。第二种修饰的寡核苷酸（21-mer，标记为Oligo1 TEST）由原始序列中8个未经修饰的核苷酸和13个经修饰的核苷酸组成。这些修饰包括六个胞苷(C)、两个鸟苷(G)、一个腺苷(A)、一个5-Me尿嘧啶(5-Me U)和三个5-Me脱氧胞苷(dC)上的2'-MOE修饰。表I显示了每种Oligo1寡核苷酸的详细序列及其元素组成、计算的平均质量数以及每次完整质量数测定中记录的质量精度。通常将GalNAc基团与寡核苷酸类药物偶联来增强这些经过修饰的寡核苷酸穿透细胞膜的能力¹。2'-MOE衍生化通常用于反义寡核苷酸(ASO)、适体和siRNA寡核苷酸，以增强其对核酸酶降解的抵抗力、减少非特异性蛋白质结合并增加与靶向互补DNA的结合亲和力¹。图3A展示了使用5 min初始梯度（洗脱液B由10%升至30%），随后使用另一种线性梯度（洗脱液B在4.9 min内由30%升至60%），分离三种寡核苷酸混合物所记录的UV和TIC色谱图。该混合物中三种Oligo1化合物的ESI-MS谱图见图3B。所有谱图中的电荷态均呈双峰分布，且每种寡核苷酸的低电荷态（-3~-5）和高电荷态（-6~-10）均达到了各自的最大值。这是经过修饰和未经修饰的寡核苷酸离子对反相分离的典型谱图特征，能够提供广泛的质量范围（ $m/z = 600 \sim 3000$ ）以及数量相对较多的电荷态（6~12）供去卷积使用。使用标准寡核苷酸同位素模型，借助waters_connect软件的Bayes Spray去卷积算法⁶自动处理所有三种寡核苷酸的组合ESI-MS谱图，结果参见图3B的屏幕截图。对于所有分析的组分，无论其修饰和大小如何，质量精度均达到15 ppm或更高，能够实现快速、准确的完整质量数确认。

寡核苷酸 ID	寡核苷酸长度	RT (min)	寡核苷酸序列	元素组成	平均质量数 (Da)	质量精度(ppm)	
						寡核苷酸模型	PPT/PS寡核苷酸模型
Oligo1 CTRL	20-mer	4.04	GCC TCA GTC TGC TTC CAC CT	C191 H247 N64 O122 P19	5979.8619	1.6	-
Oligo1 GalNAc	20-mer	4.60	XGCC TCA GTC TGC TTC CAC CT	C216 H291 N67 O134 P19	6589.4655	-3.9	-
Oligo1 TEST	21-mer	6.63	GmCmC mUmCA GTmDC TGmDC TTmDC GmCA mCmCT	C241 H341 N69 O147 P20	7176.1356	-15.2	-
Oligo2 CTRL	28-mer	2.18	CGG AAT CAG TGA ATG CTT ATA CAT CCG T	C274 H345 N104 O166 P27	8587.5598	6.5	-
Oligo2 TEST	28-mer	3.13	5'-FAM -CGG AAT CAG TGA ATG CTT ATA CAT CCG T	C318 H384 N108 O178 P28 F13	9681.3129	-11.8	-
Oligo3 CTRL	16-mer	2.83	TGG CAA GCA TCC TGT A	C156 H197 N60 O94 P15	4881.1854	-0.2	-
Oligo3 TEST	16-mer	3.18	TGG CAA GCA TCC TGT A	C162 H197 N60 O100 P15	5049.2460	-4.0	-
Oligo3 PPT CTRL	16-mer	5.40	T*G*G* C*A*A* G*C*A* T*C*C* T*G*T* A*	C156 H197 N60 O79 P15 S15	5122.1694	-38.1	1.3
Oligo3 PPT TEST	16-mer	5.82	T*G*G* C*A*A* G*C*A* T*C*C* T*G*T* A*	C162 H197 N60 O85 P15 S15	5290.2300	-38.7	7.2

表I. 本研究中分析的经过修饰和未经修饰的化合物的寡核苷酸序列及其保留时间、分子式、预期的准确平均质量数和质量精度（均在BioAccord LC-MS平台上测量相应的完整质量数后得出）。

注：硫代磷酸化寡核苷酸的常用首字母缩写是PS，但本应用纪要使用的首字母缩写是PPT。

3A



3B

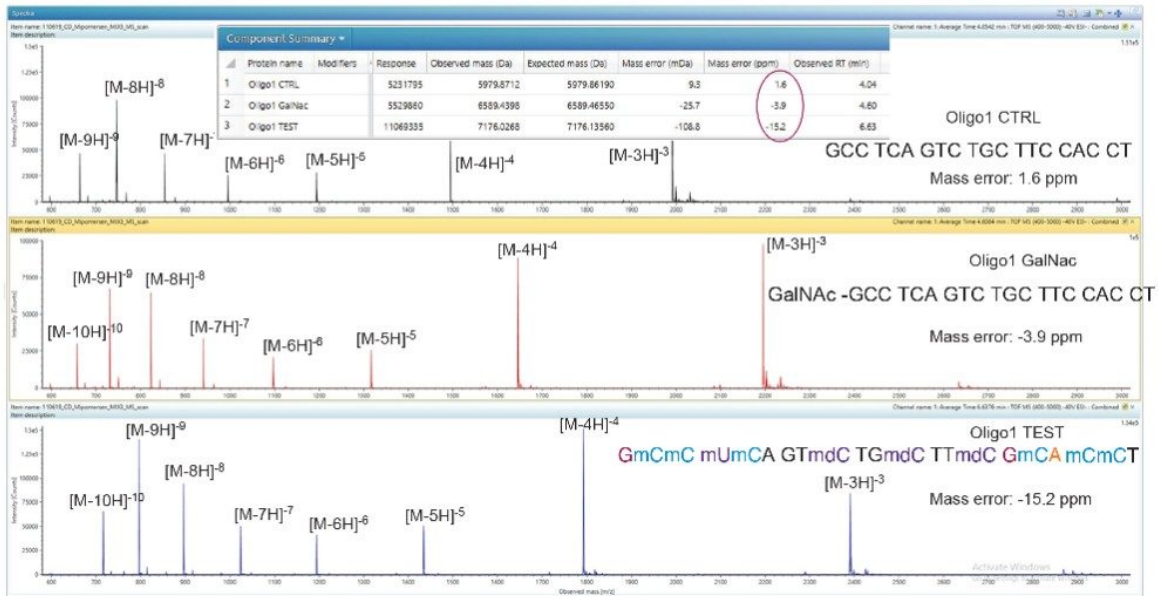
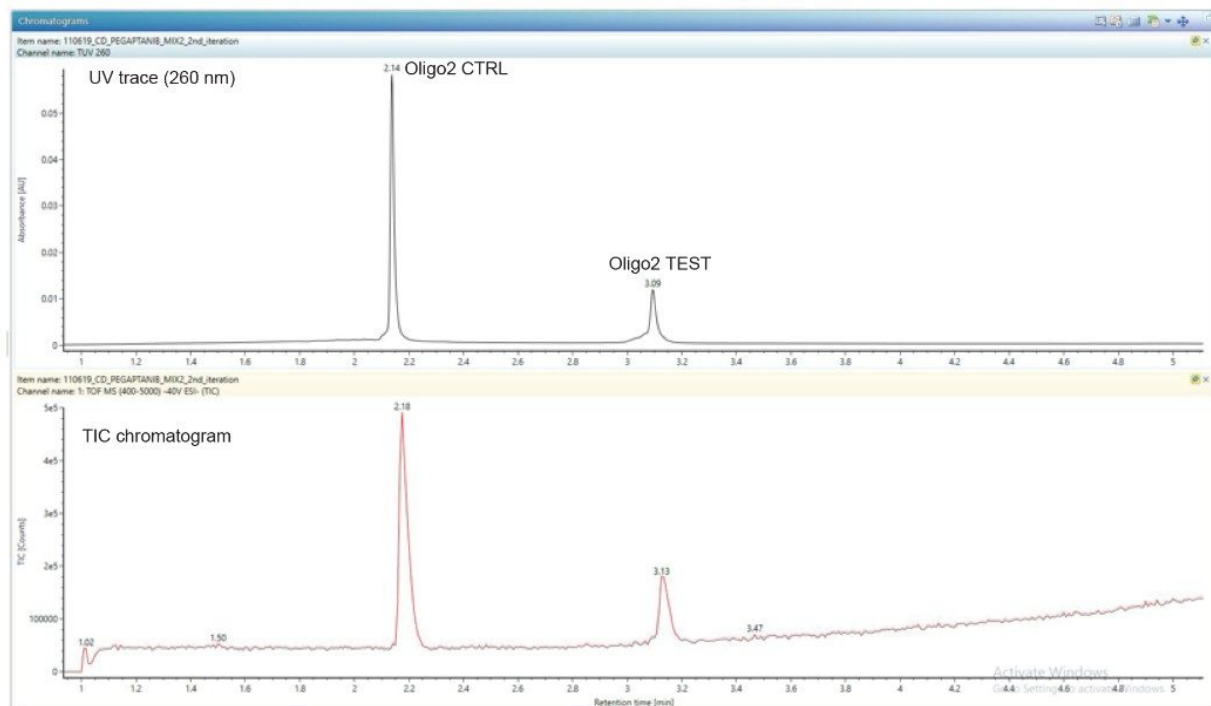


图3.(A) 展示Oligo1混合物分离结果的TUV和TIC色谱图；(B) Oligo1混合物中三种组分的ESI-MS谱图记录。插图所

示为处理三个ESI-MS谱图后产生的waters_connect结果。所有三种化合物的质量精度均优于15 ppm。

在BioAccord LC-MS平台上分析的第二种寡核苷酸混合物包含两个28-mer寡核苷酸。将未经修饰的寡核苷酸（序列为5'-CGG AAT CAG TGA ATG CTT ATA CAT CCG T-3'）标记为Oligo2 CTRL。另一种组分是经过大量修饰的寡核苷酸，标记为Oligo2 TEST，其中包含27个经修饰的核苷酸。除连接至Oligo2 TEST 5'端的6-荧光素亚酰胺(FAM)基团外，核酸碱基的2'-位掺入另外两种常见修饰：2'-O-甲基(2'-OMe)或2'-氟。表I和图4B展示了详细的寡核苷酸结构，其包含八个2'-OMe腺苷、六个2'-OMe腺苷、六个2'-F胞嘧啶以及七个2'-F尿苷。

4A



4B

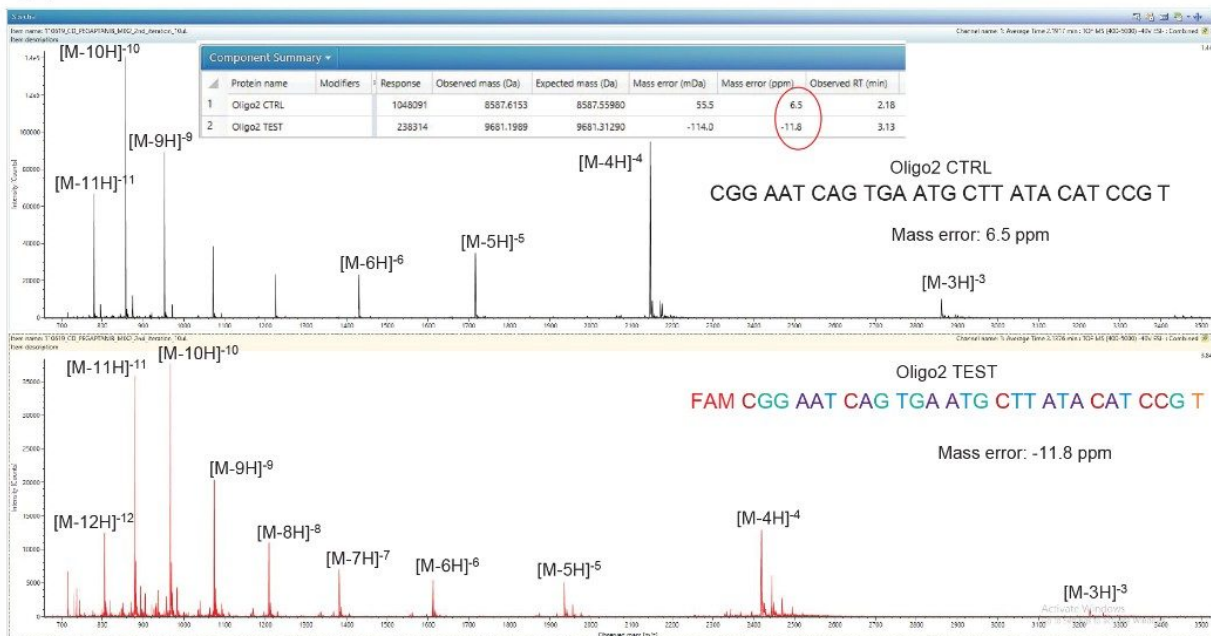


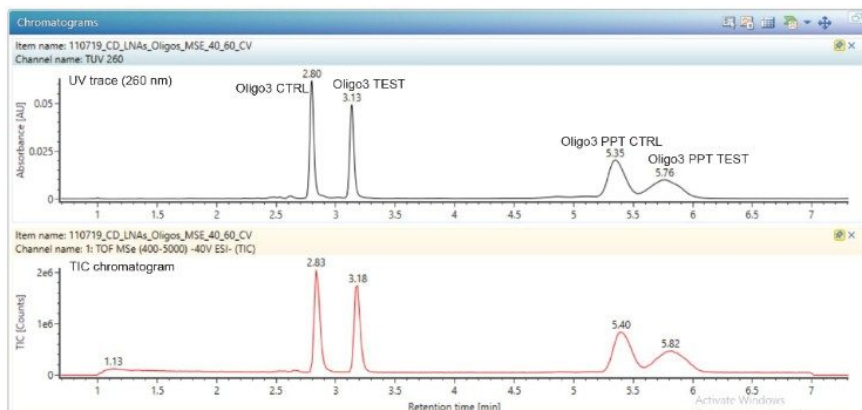
图4.(A) 展示Oligo2寡核苷酸分离结果的TUV和TIC色谱图；(B) Oligo2混合物中两种组分的ESI-MS谱图记录；屏幕

截图插图展示了 *waters_connect* 处理结果。两种化合物的质量精度均优于15 ppm。

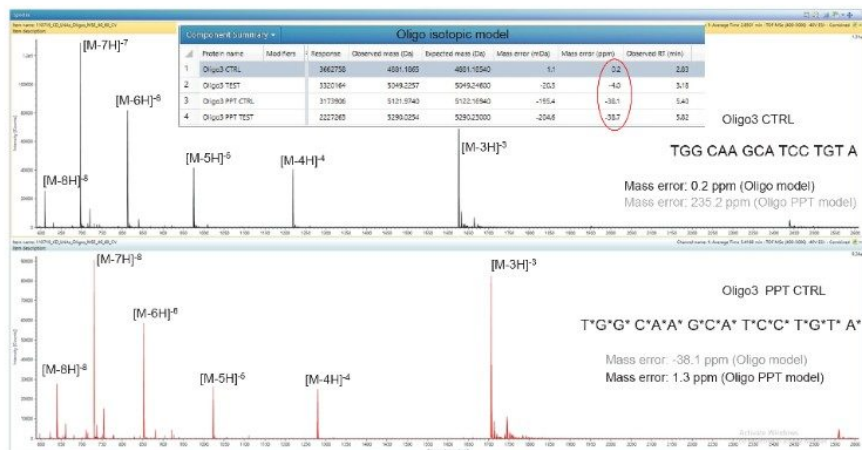
也就是说，每个C和U核苷酸均被2'-F修饰，每个G和A核苷酸均被2'-OMe修饰。唯一未被修饰的核苷酸位于3'末端，为反向脱氧嘧啶。Oligo2 TEST化合物是呱加他尼(Macugen)药物的类似物，该药物于2004年获得FDA批准，并由OSI Pharmaceuticals和Pfizer销售。呱加他尼为5'-PEG修饰，而Oligo2 TEST寡核苷酸为5'-FAM修饰。6-FAM偶联常用于涉及各种寡核苷酸底物的实时PCR应用。在开发治疗或诊断用寡核苷酸时经常使用2'-OMe和2'-F核酸碱基，以便核苷能够抵抗降解，或使底物与靶标实现更快结合¹。此外，两种修饰都与其药物类似物的良好安全性相关¹。使用OST色谱柱很容易分离Oligo2混合物，如图4A的UV和TIC色谱图所示。对于50-mer以下的寡核苷酸，相应的ESI-MS谱图遵循典型的双峰电荷态分布，如图4B所示。使用 *waters_connect* 处理该数据集得到的结果见图4B的屏幕截图和表I。如上一个示例（见表I）所示，分析这组未经修饰和经过修饰的寡核苷酸得到的质量精度优于15 ppm。

在另一个实验中，使用同一BioAccord平台分析四个结构密切相关的16-mer寡核苷酸混合物。其中一对寡核苷酸为未经修饰的序列5'-TGG CAA GCA TCC TGT A-3'（标记为Oligo3 CTRL）和具有相同序列的完全硫代磷酸化(PPT)衍生物（标记为Oligo3 PPT CTRL）。硫代磷酸化寡核苷酸的常用首字母缩写是PS，但本应用纪要使用的首字母缩写是PPT。第二对寡核苷酸为经过修饰的16-mer化合物（带有多个锁定核酸(LNA)结构，标记为Oligo3 TEST）及其相应的完全硫代磷酸化衍生物（5'-T*G*G* C*A*A* G*C*A* T*C*C* T*G*T* A*-3'，标记为Oligo3 PPT TEST）。表I中列出了所有四种寡核苷酸的完整序列及其分子式和预期的准确平均分子量。首先介绍的寡核苷酸骨架修饰是以硫原子取代磷酸骨架中的氧原子，从而得到硫代磷酸化寡核苷酸。这种修饰使ASO底物对核酸酶降解的抵抗力明显提高¹，从而延长药物类似物的组织消除半衰期。已知ASO的LNA构象异构体对特定的DNA/RNA靶标具有出色的结合亲和力¹。使用3 min线性梯度（洗脱液B由20%升至28%），然后使用3 min缓梯度（洗脱液B由28%升至30%）和2 min固定流动相组成（设定洗脱液B在6 min和8 min之间维持30%），以经过优化的梯度分离该寡核苷酸混合物。图5A的UV和TIC色谱图表明，两种PPT寡核苷酸（Oligo3 PPT CTRL和Oligo3 PPT TEST）与其非PPT类似物（Oligo3 CTRL和Oligo3 TEST）相比，得到的色谱峰明显更宽，这可能是由于磷酸酯骨架中的氧被硫取代后，存在多种非对映异构结构。图5B和5C并排比较了所有Oligo3化合物相应的ESI-MS谱图记录。由于硫同位素具有独特的丰度分布，因此在对PPT分子生成的数据进行电荷去卷积处理时，需要采用与非PPT寡核苷酸不同的同位素模型，以便获得准确的去卷积结果。PPT寡核苷酸同位素模型考虑了硫同位素的天然丰度，与实验数据更吻合。使用常规寡核苷酸同位素模型或PPT寡核苷酸同位素模型，通过Waters Bayes Spray去卷积算法对Oligo3数据集进行去卷积处理，比较结果见图5B、图4C和表I。显然，仅在选择合适的同位素模型对PPT和非PPT（常规）寡核苷酸进行去卷积处理的情况下，才能实现精确质量数测量。当使用合适的同位素模型时，对于经过修饰的寡核苷酸和未经修饰的寡核苷酸，获得的质量精度均优于15 ppm。

5A



5B



5C

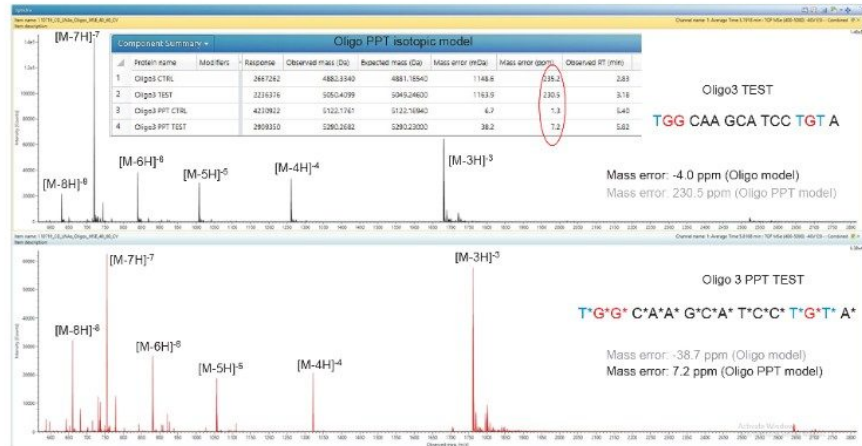


图5.(A) 展示Oligo3混合物分离结果的TUV和TIC色谱图；(B) Oligo3 CTRL和Oligo3 PPT CTRL寡核苷酸的ESI-MS谱

图记录。插图显示了使用常规寡核苷酸的同位素模型获得的四种*Oligo3*化合物的处理结果；(C) *Oligo3 TEST*和 *Oligo3 PPT TEST*寡核苷酸的ESI-MS谱图记录；插图显示了使用PPT（硫代磷酸化）寡核苷酸的同位素模型获得的处理结果。如本文所述，PPT寡核苷酸同位素模型对于获得准确的PPT寡核苷酸完整质量数分析结果至关重要。当使用正确的同位素模型进行去卷积处理时，所有*Oligo3*化合物的质量精度均优于15 ppm。

如本文所述，使用BioAccord LC-MS系统结合OST C₁₈色谱柱和离子对流动相（含7 mM TEA和80 mM HFIP（作为洗脱液A））开发出的RP-LC/MS方法在分析各种经过高度修饰的寡核苷酸中表现出非常令人满意的性能。BioAccord LC-MS系统使用户能够对各种寡核苷酸进行快速、准确的完整质量数确认。

结论

- 本文介绍了waters_connect信息学软件内的自动化完整质量数分析工作流程，该工作流程在对具有七种不同化学修饰的寡核苷酸进行完整质量数确认时，能够提供良好的质量精度（优于15 ppm）
- waters_connect内置的Bayes Spray算法能够为经过高度修饰的寡核苷酸提供准确的去卷积结果

参考文献

1. Sharma VK, Watts JK Oligonucleotide Therapeutics: Chemistry, Delivery and Clinical Progress, *Future Med Chem*, 2015, 7(16), 2221–2242.
2. High-throughput Screening of Oligonucleotides for Identity and Purity Assignment Using the ACQUITY QDa Detector and ProMass for MassLynx, 2016, Waters Application Note, P/N 720005681EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2016/high-throughput-screening-of-oligonucleotides-for-identity-and-purity-assessment-using-the-acquity-qda-detector-and-promass-for-masslynx.html>> .
3. Adding Mass Detection to Synthetic Oligonucleotide Analysis with the ACQUITY QDa Detector, 2016, Waters application note, P/N 720005632EN <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2016/adding-mass-detection-to-synthetic-oligonucleotide-analyses-with-acquity-qda-detector.html> .

4. Developing a Novel, Integrated LC-MS Workflow for High-Resolution Monitoring and Characterization of Oligonucleotides, 2016, Waters application note, P/N 720005821EN <
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2016/lc-ms-workflow-for-high-resolution-monitoring-and-characterization-of-oligonucleotides.html>> .
5. An Automated Compliance-Ready LC-MS Workflow for Intact Mass Confirmation and Purity Analysis of Oligonucleotides, 2020, Waters application note, P/N 720006820EN <
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/an-automated-compliance-ready-lc-ms-workflow-for-intact-mass-confirmation-and-purity-analysis-of-oligonucleotides.html>> .
6. Beyond MaxEnt Deconvolution: Increasing the Fidelity and Universal Applicability of Mass Spectral Deconvolution Routines for Biomolecules with the Application of Bayesian Probability Theory, poster presented at the PAMS Conference (Practical Applications of Mass Spectrometry in the Biopharmaceutical Industry), Marina del Rey, CA, Sept 8–12 2010, P/N 720003756EN <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003756en.pdf>> .

特色产品

生物制药专用BioAccord LC-MS系统 <https://www.waters.com/waters/en_IN/BioAccord-LC-MS-System-for-Biopharmaceuticals/nav.htm?cid=135005818&locale=en_IN>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

720007028ZH, 2020年10月

© 2022 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