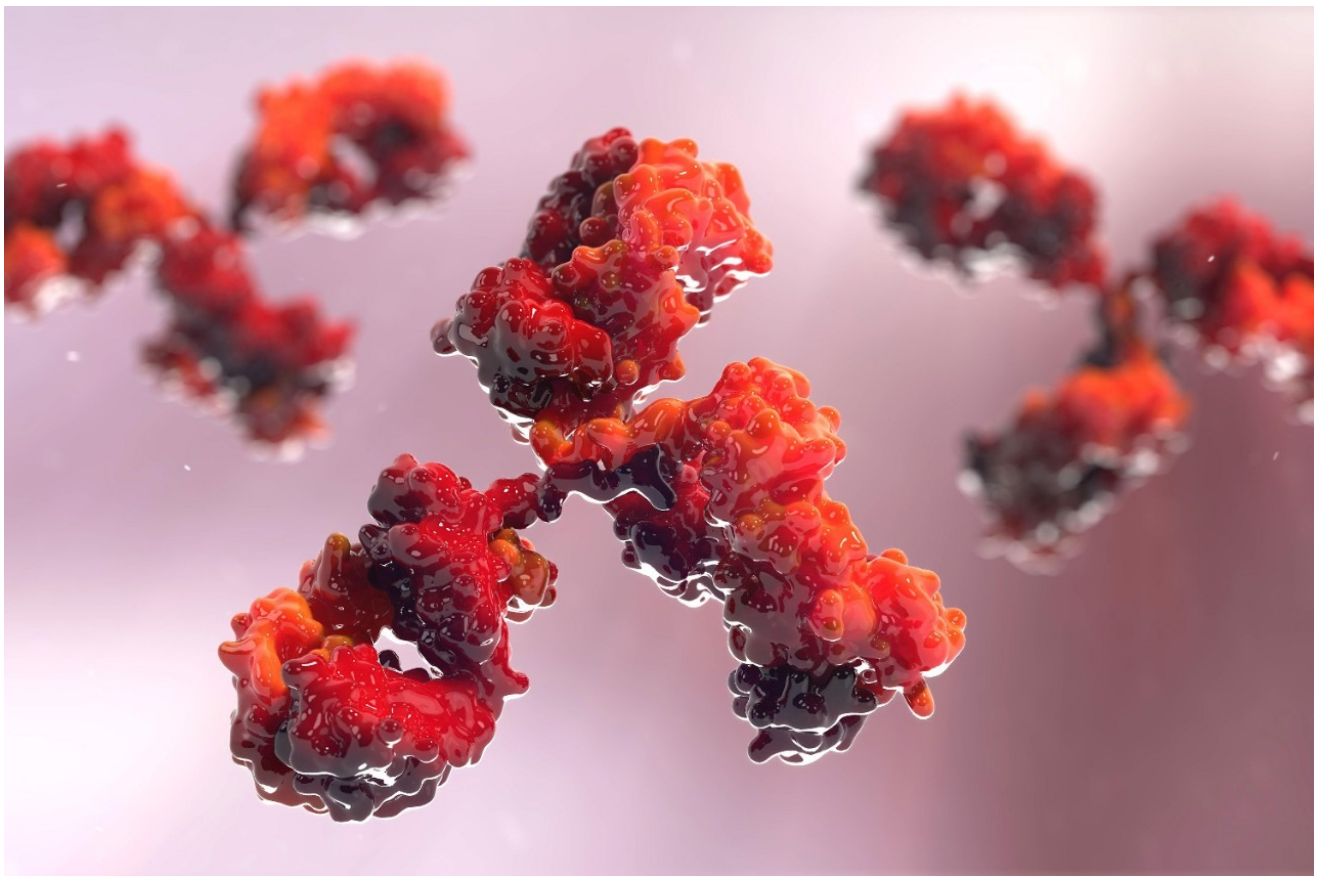


使用BioAccord系统分析抗体siRNA偶联物

Henry Shion, Catalin E. Doneanu, Ed Ha, Ying Qing Yu, Weibin Chen

Waters Corporation, Angiex, Inc.



沃特世Immerse创新与研究中心(www.waters.com/immerse)的生物制药服务旨在开发新型药物的分析方法。

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

短干扰RNA (siRNA)是一类潜力巨大的新型治疗药物。但这类分子的化学性质使其需要借助递送载体才能将药物负载输送至靶细胞。常用手段是通过化学方法将siRNA连接到单克隆抗体(mAb)分子上, 因为衍生后的抗体siRNA偶联物(ARC)能够有效附着于靶细胞以实现内化。

在本研究的目标ARC中, 含正义链和反义链的药物负载siRNA与载体mAb的FC糖基化修饰位点上经工程处理后所得半胱氨酸残基的巯基偶联。本研究使用BioAccord LC-MS系统¹⁻³为该服务项目开发了两种ARC分子表征方法: 1)使用离子对RPLC-MS方法对siRNA的正义链和反义链进行质量数确认; 2)通过非变性SEC-MS确定最终的ARC分子以计算DAR。两种方法均能够提供产品鉴定和潜在杂质的相关信息。

优势

- BioAccord系统
 - 提供多种应用解决方案 (完整蛋白、肽图分析、MAM、糖基和寡核苷酸分析)
 - 简便易用, 系统间性能稳定
 - 体积小巧
 - 运行环境为符合法规要求的信息学系统waters_connect
- 专为分析抗体siRNA偶联物(ARC)开发的两种方法
 - 一种用于对合成siRNA的正义链和反义链进行质量数确认的IPRP LC-MS方法
 - 一种用于确定DAR (药物抗体偶联比) 的非变性SEC-MS方法

简介

短干扰RNA (siRNA)是一类潜力巨大的新型治疗药物。但这类分子的化学性质使其需要借助递送载体才能将药物负载输送至靶细胞。常用手段是通过化学方法将siRNA连接到单克隆抗体(mAb)分子上, 因为衍生后的抗体siRNA偶联物(ARC)能够有效附着于靶细胞以实现内化。ARC的生产有许多合成路线, 通常涉及在siRNA 3' 端增加连接子以便与mAb分子上的官能团发生偶联反应。

本研究中的目标ARC涉及以下偶联反应：对载体mAb的Fc糖基化修饰位点进行工程处理，增加半胱氨酸残基以便进行偶联反应。药物负载siRNA包含正义链和反义链，正义链的5'端带有荧光染料，而3'端则带有增加的胺基，可通过连接子与载体mAb的Fc结构域上半胱氨酸残基的巯基进行偶联反应（图1）。本服务项目旨在开发两种ARC分子表征方法：1)使用离子对RPLC-MS方法对siRNA的正义链和反义链进行质量数确认；2)通过非变性SEC-MS确定最终的ARC分子以计算DAR。两种方法均基于BioAccord系统（图2）开发，且都能提供产品鉴定和潜在杂质的相关信息。

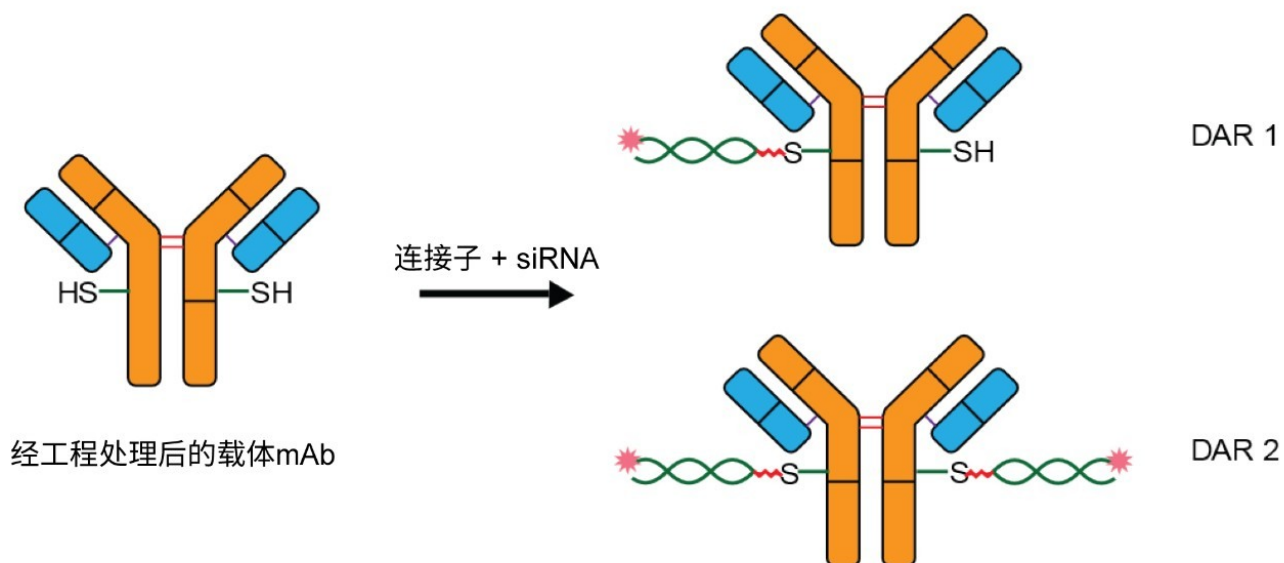


图1.ARC（抗体siRNA偶联物）



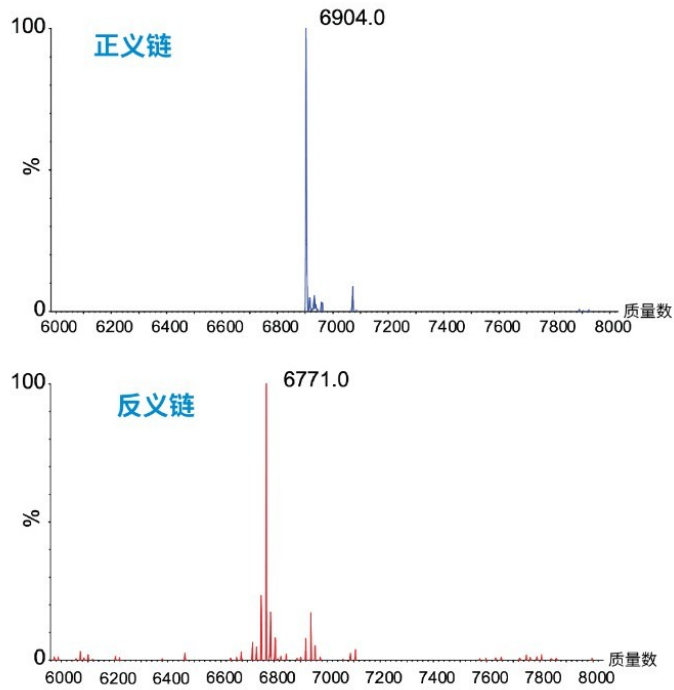
图2. BioAccord LC-MS系统

结果与讨论

本研究报告了两种针对siRNA或ARC的质量数确认进行了优化的LC-MS方法。这些方法均基于BioAccord系统开发，该系统包括一套ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统、一台可变波长紫外检测器以及一台体积小巧的飞行时间(ToF)质谱仪ACQUITY RDa质谱检测器。本系统的控制和运行环境均为符合法规要求的waters_connect信息学系统(图2)。BioAccord系统是多种基于高分辨率质谱仪的生物制药分析的“主力研究工具”，其范围涵盖完整蛋白质质量数分析和亚基质量数分析、基于电荷和分子大小的MS分析、肽图分析以及寡核苷酸的多属性监测(MAM)和游离寡糖分析。

目标siRNA（正义链和反义链）的质量数确认

利用在负离子模式下执行的反相离子对(IPRP LC-MS)分析确定siRNA（正义链和反义链）的精确质量数（通过waters_connect中的MaxEnt 1处理得到的电荷去卷积质量数见图3）。实验质量数与理论质量数高度吻合。



- 流动相A: 80 mM HFIP (六氟异丙醇), 7 mM TEA (三乙胺), 溶于去离子水, pH 9
- 流动相B: 40 mM HFIP, 3.5 mM TEA, 溶于50% 甲醇
- Premier OST色谱柱: 2.1 x 50 mm, 1.7 μm, 130 Å (部件号186009484), 保持在60 °C, 以0.3 mL/min 的流速运行
- 梯度: 溶剂B在10 min内从15%升至50%, 总运行时间为15 min
- TUV检测器: 260 nm
- MS采集范围: 400~5000 m/z (ESI-), 0.5 s采集速率
- 质量精度: <15 ppm

图3.正义链和反义链的完整质量数。利用MaxEnt 1电荷去卷积获取质量数。

ARC表征

ARC质量数分析的重点目标是鉴定DAR 1和DAR 2物质，仅凭传统色谱方法和光学检测器（UV或FLR）无法确认这些物质的鉴定结果。此外，LC-MS分析方法也非常适用于DAR测定。载体mAb的RPLC-MS分析最初用于检查mAb分子的完整性（在将Fc区的天冬酰胺(N)残基替换为半胱氨酸(C)残基之后）。图4A中电荷去卷积谱图的主峰表明质量数符合工程处理后mAb的质量数计算值。非变性SEC-MS实验旨在判断样品中是否存在DAR 1和DAR 2物质，非变性流动相有助于双链siRNA在ESI+ MS处理期间保持完整。在MaxEn1去卷积谱图中观察到DAR 1和DAR 2物质，此外，还观察到没有反义链的DAR 1和DAR 2（图4b）。

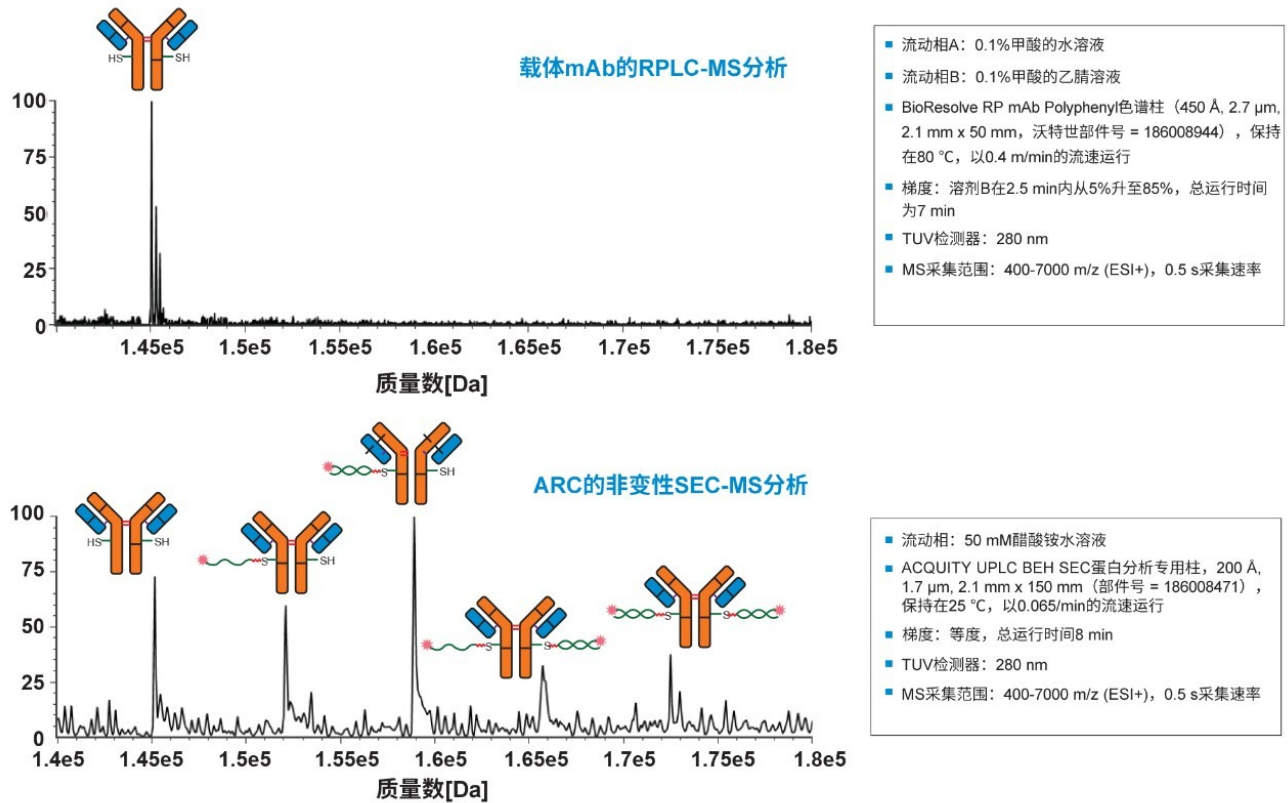


图4.上图: 载体蛋白的电荷去卷积完整质量数。数据来自RPLC-MS分析。实测载体蛋白的质量精度为10 ppm。下图: 非变性SEC-MS分析检出的电荷去卷积DAR物质。观察到代表DAR 1和DAR 2的峰。此外, 还检出了主要副产物单链 (正义链) DAR物质。

结论

本研究开发了两种LC-MS方法, 用于确认1) siRNA (正义链和反义链) 的鉴定结果, 以及2) 抗体-siRNA分子在样品中的分布 (采用非变性SEC-MS条件)。使用分析级ACQUITY UPLC I-Class PLUS和台式ToF质谱检测器 (ACQUITY RDa) 开发并优化方法和工作流程。两种方法均易于操作且无需对BioAccord系统做过多优化。此外, 采用符合法规要求的软件也对方法开发有所助益, 例如可提升效率, 还有可能支持从开发实验室到QC实验室的方法转移。

参考资料

1. Shion H, Yu Y, Chen W. 在数据完整性环境下进行可重现的完整蛋白质量数例行分析. 沃特世应用纪要

[720006472ZH <https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/enabling-routine-and-reproducible-intact-mass-analysis.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/enabling-routine-and-reproducible-intact-mass-analysis.html).2020年10月 (修订版).

2. Shion H, Yu Y, Chen W. 利用BioAccord系统通过非变性质谱法分析抗体偶联药物(ADC).沃特世应用简报 [720006570ZH <https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/analysis-of-antibody-drug-conjugates-adcs-by-native-mass-spectrometry-on-the-bioaccord-system.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/analysis-of-antibody-drug-conjugates-adcs-by-native-mass-spectrometry-on-the-bioaccord-system.html).2019年5月.
3. Doneanu C, Fox J, Harry E, Knowles C, Yu Y, Fredette J, Chen W. 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.沃特世应用纪要 [720007028ZH <https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/intact-mass-confirmation-analysis-on-the-bioaccord-lc-ms-system-for-a-variety-of-extensively-modified-oligonucleotides.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/intact-mass-confirmation-analysis-on-the-bioaccord-lc-ms-system-for-a-variety-of-extensively-modified-oligonucleotides.html).2020年10月.

致谢

Henry Shion、Catalin E. Doneanu、Ying Qing Yu、Weibin Chen - 沃特世公司
Ed Ha - Angiex, Inc.

特色产品

- [ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)
- [ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)
- [生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818)
- [waters connect <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165)
- [UNIFI生物制药平台解决方案 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10195515>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10195515)

720007212ZH, 2021年3月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.