

利用毛细管区带电泳和高分辨质谱技术对小核酸抗体偶联药物(AOC)各组分的分离及结构确认

Application of Capillary Zone Electrophoresis (CZE) and High resolution mass spectrometry (HRMS) in the components separation and structures confirmation of Antibody-oligonucleotide conjugates (AOC)

张晓霞¹, 刘冬科¹, 郭琳洁², 罗继¹, 陈泓序¹, 郭立海¹

Zhang Xiaoxia¹, Liu Dongke¹, Guo Linjie², Luo Ji¹, Chen Hongxu¹, Guo Lihai¹

¹ SCIEX, 中国; ² 上海大学

¹ SCIEX, China; ² Shanghai University

Keywords: AOC, CZE, PA 800 Plus, HRMS, X500B QTOF system, Components Separation, Structure confirmation

1. 前言

小核酸药物行业发展迅速, 至今已有15款药物获批, 成为继小分子和抗体药物后的第三波创新药浪潮。然而受限于递送手段的限制, 目前已上市的小核酸药物仅能针对肝脏靶点。小核酸抗体偶联药物 (Antibody-oligonucleotide conjugates, AOC) 利用抗体将治疗性寡核苷酸递送至特定细胞或组织, 将抗体的组织特异性优势, 与小核酸的靶点特异性优势相结合, 拓展了寡核苷酸药物的组织/细胞靶向性。近年来, 诸多公司将注意力和资源集中在开发基于AOC技术的先进药物上, 2021年11月, AOC先驱Avidity Biosciences公司的小核酸抗体偶联物AOC1001的I期临床试验完成首例患者给药, 标志着全球首款AOC药物进入临床试验。

AOC药物作为具有巨大潜力的新型生物药物, 其药物质量的控制对于安全性和有效性至关重要。一方面, 每个部分包括抗体的纯度、特异性、亲和力等, 小核酸的纯度、稳定性, 连接子的稳定性、细胞毒性等需要检测; 另一方面, 完整AOC药物本身的质量包括抗体和小核酸的偶联比例、游离抗体、游离小核酸的比例等都需要严格监测。

毛细管电泳技术是抗体和小核酸等极性大分子药物分析的经典技术, 高分辨质谱(HRMS)也是一种抗体和小核酸表征的利器, 两种技术在抗体药物和小核酸药物结构表征和质量控制中均有广泛的应用。本文着重介绍毛细管电泳技术和高分辨质谱技术在AOC药物组分分离及结构确认中的应用。

本实验展示了CZE和HRMS两种技术联合使用在AOC药物杂质分离、纯度分析以及各组分结构确认中的应用。样品为一款单抗偶联寡核苷酸的AOC药物, 通过CZE方法分离出了3个单抗偶联寡核苷酸相关的峰, 推测是由于单抗上连接了不同数量的寡核苷酸产生的分离。通过HRMS一级精确分子量, 进一步确认了CZE分离出的3个单抗偶联寡核苷酸相关峰为单抗连了1个, 2个和3个分子的寡核苷酸。同时, 两种技术计算的各组分比例结果也非常一致。

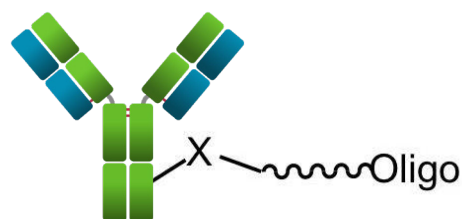


图1. AOC药物的示意图

2. 材料和方法

2.1 试剂和样品

样品：本实验使用的样品为一种单抗偶联寡核苷酸的AOC药物，浓度为40 mg/mL。IgG的理论分子量为147244 Da，寡核苷酸(oligodeoxynucleotide, ODN)的理论分子量为6581Da，与IgG连接前需先对ODN进行修饰，将ODN的5'-端磷酸骨架与HS-C6结构反应，形成HS-C6修饰的ODN(分子量6777Da)。

IgG和ODN的连接方式为Sulfo-SMCC偶联方式，偶联过程见图2，整个偶联过程分为两步，第一步IgG的游离-NH₂与SMCC反应形成马来酰亚胺激活抗体(maleimide-activated IgG)，之后再与连接在HS-C6的ODN反应，得到最终的偶联产物。

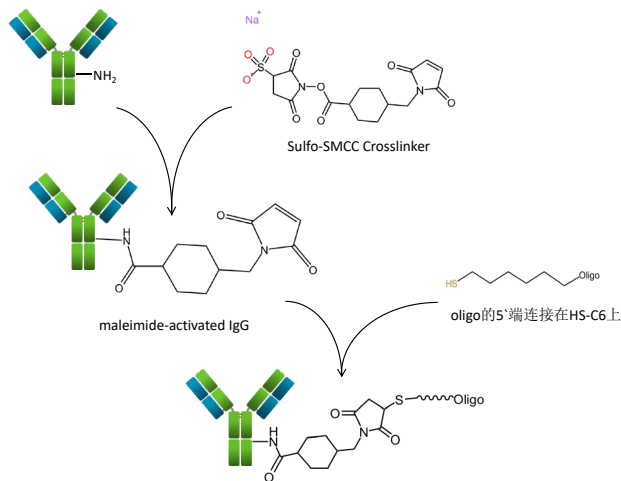


图2. IgG和ODN偶联过程示意图

样品前处理:

CZE方法: 将AOC样品及IgG标准品分别用超纯水稀释至1 mg/ml, ODN标准品用超纯水稀释至0.1mg/ml, 上机检测, 超纯水作为空白对照。

LC-MS方法: 将AOC样品和IgG标准品分别用50 mM NH₄HCO₃溶液稀释至200 ng/μL, 上机检测, AOC样品进样2 μL, IgG标准品进样1 μL。

试剂:

CZE分离缓冲液: 含50mM Na₂B₄O₇, 25mM β-环糊精和10mM SDS的缓冲液, pH约为9.0。

配制方法: 配制200 mM硼砂, 100 mM β-环糊精(20%乙醇溶解), 100 mM SDS 储备液。分别依次取上述溶液 2.5 mL、2.5 mL、1 mL, 加水至总体积10 mL, 混合均匀。

液相流动相: A相, 2%乙腈/水(含0.1%甲酸), B相, 98%乙腈/水(含0.1%甲酸)。

2.2 仪器及方法

毛细管电泳条件:

采用SCIEX PA 800 Plus药物分析系统, 匹配二极管阵列检测器, 全波长扫描, 采集频率: 2 Hz, 窗口狭缝: 100 × 200 μm; 熔融石英毛细管, 50 μm内径, 50/ 60.2 cm (有效长度/总长度); 进样条件: 0.5 psi, 5 s样品, 1 psi, 5s分离缓冲液; 分离电压: 10 kV, 40 min; 毛细管温度: 25 °C, 样品室温度: 15 °C。

毛细管针间冲洗: 0.1 mol/L氢氧化钠溶液在50 psi压力下冲洗3 min, 再用去离子水在50 psi压力下冲洗2 min, 最后用CZE分离缓冲液在50 psi压力下冲洗3 min。

色谱条件:

采用Exion LC™系统, 色谱柱: Waters BEH200 SEC, 150 × 4.6 mm, 1.7 μm, 洗脱程序: 35%的B相等度洗脱, 流速: 0.22 ml/min, 柱温箱: 40 °C。

质谱条件:

采用SCIEX X500B QTOF系统, TOFMS扫描, 质谱参数见表1。

表1. 质谱参数

参数	值
Curtain gas (psi):	35
Collision Gas(psi):	7
IonSpray Voltage(V):	5000
Temperature(°C):	450
Declustering Potential(V):	275
Ion Source Gas1(psi):	45
Ion Source Gas2(psi):	45
TOF start mass (m/z):	600
TOF stop mass (m/z):	5000
Accumulation time (s):	1

3. 结果与讨论

3.1 CZE结果分析

在CZE条件下可有效分离游离IgG, AOC及游离ODN分子。标准品和样品的分离结果见图3。

在CZE中, 样品的分离基于分子在电场作用下荷质比的差异。在碱性缓冲液条件下, 由于样品中的IgG、ODN以及AOC都带负电荷, 在正电场下荷质比越大的分子迁移速度越慢。荷质比主要由电荷数和分子量决定, 游离IgG分子量最大, 带的负电荷数量比较少, 荷质比小, 因此会最先出峰。游离ODN由于分子量最小, 电荷数最高, 因此荷质比最大, 会最后出峰。对于AOC来说, 其分子量与IgG相比变化不大, 而电荷数随着ODN的偶联而增大, 因此迁移速度会慢于IgG, 且偶联的ODN数目越多, 电荷增加越多, 迁移速度越慢。迁移时间顺序为, IgG < IgG-(n)ODN < ODN。在本次实验中, IgG标准品的迁移时间在6.25 min, ODN标准品的迁移时间在20.95 min, 与上述理论推导出峰顺序一致。

AOC样品各峰指认: 峰1迁移时间与IgG标准品的一致, 推测为游离IgG的峰。峰2,3,4迁移时间6.97-8.52 min, 在IgG和ODN之间, 根据前述理论推导, 推测为IgG上偶联了不同数量ODN分子的峰, 且峰2偶联的ODN分子数量最少, 峰4偶联的ODN分子数量最多。峰7迁移时间与ODN标准品的一致, 推测为游离ODN的峰。峰5和峰6迁移时间比峰7略早, 但是紫外吸收光谱图与ODN标准品的一致, 推测分别为HS-C6修饰的ODN及其二聚体。

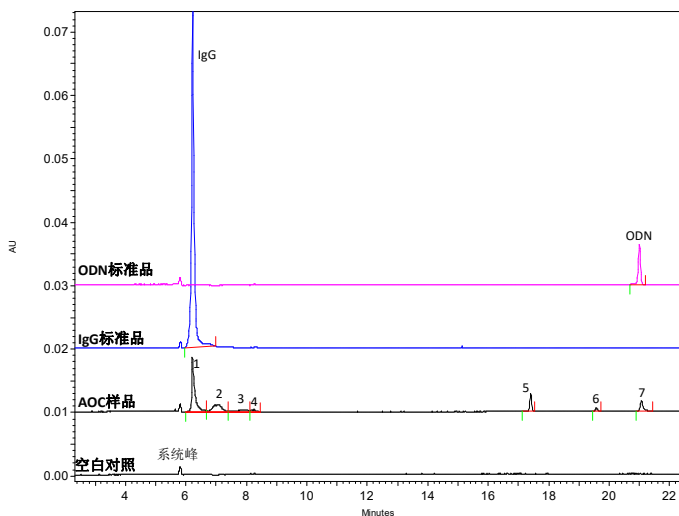


图3. CZE条件下空白对照、AOC样品, IgG标准品及ODN标准品的电泳图。

3.2 LC-MS结果分析

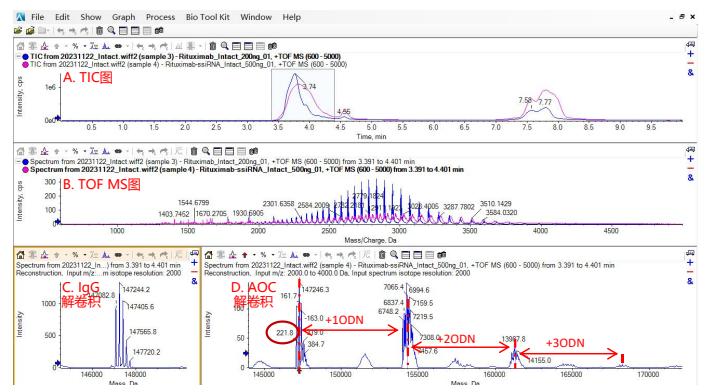
为了验证CZE中推断的峰2、3、4是否为IgG偶联了不同数量ODN的峰, 并确认偶联的数量, 我们尝试了HRMS的方法。通过HRMS分别检测了IgG标准品和AOC样品, MS结果见图4。在SCIEX OS软件中对IgG标准品TOF MS图谱进行解卷积, 确认IgG的分子量为147244.2Da, 在AOC样品TOF MS图谱的解卷积结果中也检测到分子量为147246.3Da的一簇峰, 推断是游离IgG的峰, 与IgG标准品相比多的2Da可能是由于AOC样品异质性较强导致的解卷积后分子量差异。在AOC解卷积图谱中还检测到比游离IgG分子量多6994.6Da, 13987.8Da以及20847.4Da的峰, 鉴定为IgG连接1个ODN(IgG-1ODN), 2个ODN(IgG-2ODN)和3个ODN(IgG-3ODN)的峰。增加的6994.6Da为IgG上连接了SMCC linker及HS-C6修饰的ODN分子产生的分子量。

HRMS的结果验证了CZE中峰2, 峰3和峰4确实是IgG偶联了不同数量寡核苷酸, 而且确认峰2,3,4分别为IgG-1ODN, IgG-2ODN和IgG-3ODN。

在游离IgG的峰簇中还看到分子量加221.8Da的异构体峰, 为IgG连上了一个linker, 与图2中的AOC偶联过程相符合, 偶联物从图2虚线处断开即为IgG加221Da的分子量。

进一步将原始数据上传至SCIEX Biologics Explorer软件进行完整分子量分析, 计算IgG, IgG-1ODN, IgG-2ODN及IgG-3ODN各峰的峰面积见图5(Volume), 通过峰面积计算各峰的比例分别为32.90%, 44.54%, 20.52%及2.03%。

CZE与HRMS两种结果计算的各组分比例比较如表2。从表2可以看出, CZE和HRMS两种技术计算的不同组分的比例比较一致。



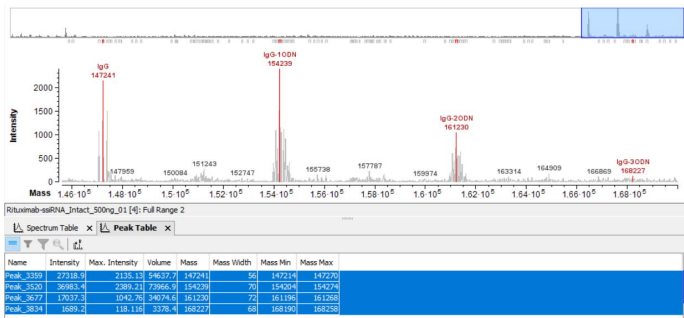


图5. SCIEX Biologics Explorer分析AOC完整分子量

表2. AOC药物中各组分比例

	IgG %	(IgG-1ODN) %	(IgG-2ODN) %	(IgG-3ODN) %
CZE*	39.22	41.33	16.99	2.46
HRMS	32.90	44.54	20.52	2.03

*注：CZE条件也可以分离检测到游离ODN及ODN与连接肽相连的峰，因为HRMS条件下无法检测到游离的ODN，因此，在与HRMS计算的组分对比时CZE也没有考虑ODN的比例

4. 结论

- 利用PA800 Plus，采用CZE方法有效分离了AOC药物中的游离IgG，不同ODN偶联数量的AOC以及游离ODN等不同形态的分子，实现AOC药物与游离杂质之间的分离。
- 利用X500B高分辨质谱，进一步验证了CZE分离得到3个IgG-ODN偶联物相关的峰分别是IgG-1ODN，IgG-2ODN和IgG-3ODN。
- CZE和LC-MS两种方法计算的各组分比例高度一致，说明两种方法在对AOC药物进行组分分离和结构确认时可以相互佐证，得到更为准确可信的结果。

5. 参考文献

- Lin Shen, et al. Chemical Biology Approaches toward Precise Structure Control of IgG-Based Antibody-Oligonucleotide Conjugates. *ChemBiochem*.2023 May 2;24(9)

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-02-MKT-15953-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：SCIEX-China