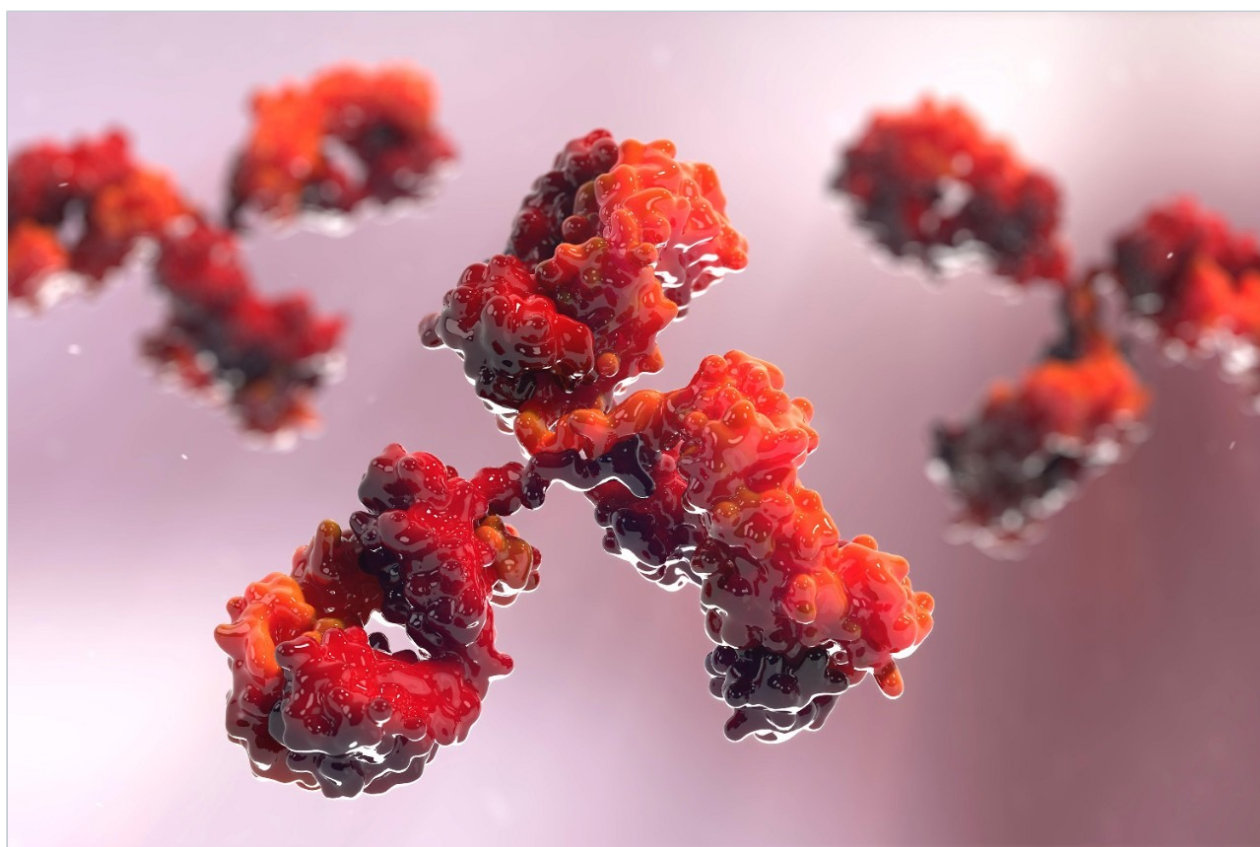


BioAccord システムを用いた抗体 siRNA 複合体の解析

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

Waters Corporation, Angiex, Inc.



Waters Immerse イノベーション・研究センター (www.waters.com/immerse <<http://www.waters.com/immerse>>) が提供するバイオ医薬品サービスは、新しいモダリティ分析のためのメソッド開発を目指しています。

本書はアプリケーションブリーフであり、詳細な実験方法のセクションは含まれていません。

要約

短鎖干渉 RNA (siRNA) は、大きな期待が寄せられている治療薬の一種です。ただし、この分子の化学的性質上、ターゲット細胞に薬物を送達するには担体が必要です。その一般的なアプローチとして、モノクローナル抗体 (mAb) 分子に siRNA を化学的に結合させる方法があります。誘導体化した抗体 siRNA 複合体 (ARC) は、ターゲット細胞に効果的に結合して内在化するためです。

本研究の対象である ARC の場合、センス鎖とアンチセンス鎖を含む siRNA の本体は、キャリア mAb の Fc グリコシル化部位の改変されたシステイン残基のチオール基と結合しています。このサーブスプロジェクトでは、BioAccord LC-MS システムを用いて¹⁻³、1) イオンペア RPLC-MS法を用いた siRNA のセンス鎖とアンチセンス鎖の質量確認、2) ネイティブ SEC-MS を用いた最終的な ARC 分子の DAR 計算、という 2 つの ARC 特性解析法を開発しました。いずれのメソッドでも、製品の同定および潜在的な不純物に関する情報が得られます。

アプリケーションのメリット

- BioAccord システム
 - 広範なアプリケーションソリューション (インタクトプロテイン、ペプチドマッピング、MAM、糖鎖、およびオリゴヌクレオチドの分析) を提供
 - 使いやすく頑健なシステム間性能を実現
 - 設置面積が小さい
 - コンプライアンス対応のインフォマティクスシステム waters_connect で操作可能
- 抗体 siRNA 複合体 (ARC) の分析用に開発された 2 つのメソッド
 - 合成 siRNA のセンス鎖およびアンチセンス鎖の質量確認用の IPRP LC-MS メソッド
 - DAR (薬物抗体比) 測定用のネイティブ SEC-MS メソッド

はじめに

短鎖干渉 RNA (siRNA) は、大きな期待が寄せられている治療薬の一種です。ただし、この分子の化学的性質上、ターゲット細胞に薬物を送達するには担体が必要です。その一般的なアプローチとして、モノクローナル抗体 (mAb) 分子に siRNA を化学的に結合させる方法があります。誘導体化した抗体 siRNA 複合体 (ARC) は、ターゲット細胞に効果的に結合して内在化するためです。ARC 生成には多くの合成経路があり、通常は、siRNA 3' 末端に付加するリンカーを介して、mAb 分子の官能基と共役反応で結合します。

本研究の対象である ARC の共役反応のために、キャリア mAb の Fc グリコシル化部位のシステイン残基を改変しています。siRNA 本体にはセンス鎖とアンチセンス鎖が含まれ、センス鎖では、5' 末端に蛍光色素が結合し、3' 末端にリンカーを介してキャリア mAb の Fc ドメインに組み込まれたシステイン残基のチオール基との共役反応のためのアミン基が付加されています (図 1)。このサービスプロジェクトの目的は、ARC 分子の特性解析のための、1) イオン対 RPLC-MS メソッドを用いた siRNA のセンス鎖とアンチセンス鎖の質量確認、2) ネイティブ SEC-MS を用いた最終的な ARC 分子の DAR の計算の 2 つのメソッドを開発することです。いずれのメソッドも BioAccord システムで開発されており (図 2)、製品の同定および可能性のある不純物に関する情報が得られます。

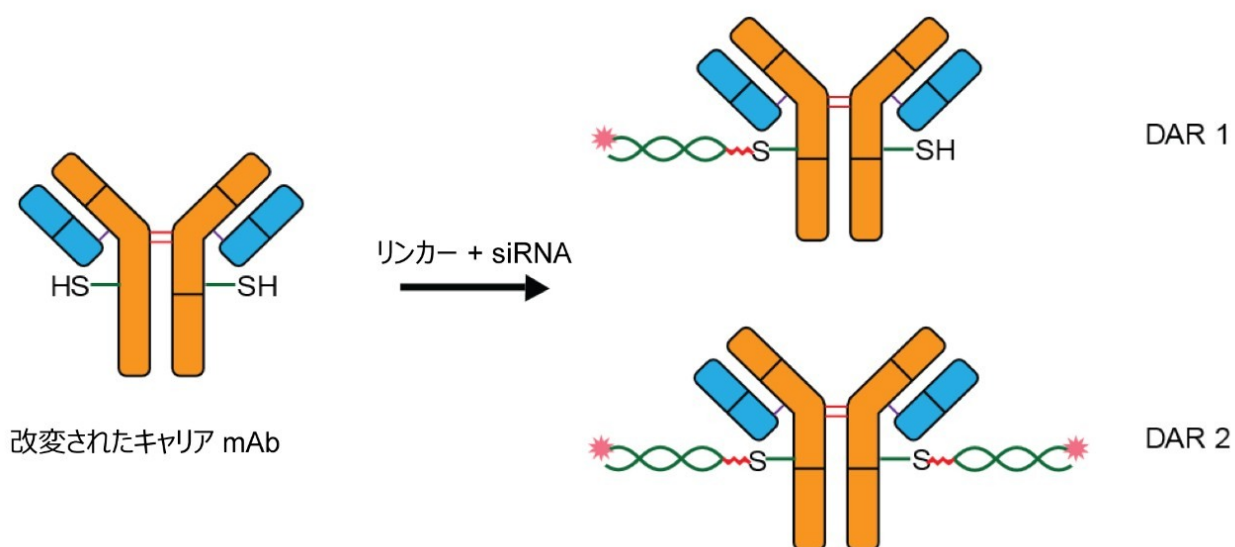


図 1. ARC (抗体 siRNA 複合体)



図 2. BioAccord LC-MS システム

結果および考察

本研究では、siRNA または ARC の質量確認に最適化した 2 つの LC-MS メソッドを報告しました。これらのメソッドは、ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム、チューナブル UV 検出器、および設置面積の小さい飛行時間型（ToF）質量分析計である ACQUITY RDa 検出器で構成される BioAccord システム上で開発されています。このシステムは、規制対応の waters_connect インフォマティクスシステム（図 2）で制御され、操作されます。

BioAccord システムは、バイオ医薬品向けの様々な高分解能質量分析計ベースのアッセイに最適です。この範囲は、インタクトおよびサブユニットの質量分析から、電荷およびサイズベースの MS 分析、ペプチドマッピング、マルチ特性モニタリング（MAM）、オリゴヌクレオチドや遊離糖鎖のアッセイまで多岐にわたります。

ターゲット siRNA（センス鎖およびアンチセンス鎖）の質量確認

逆相イオン対クロマトグラフィー（IPRP LC-MS）をネガティブイオンモードで実施することで siRNA のセンス鎖

とアンチセンス鎖の両方について精密質量を確認しました。図3には、waters_connectでのMaxEnt 1解析によってチャージデコンボリューションした質量を示します。実測質量は理論質量と一致していました。

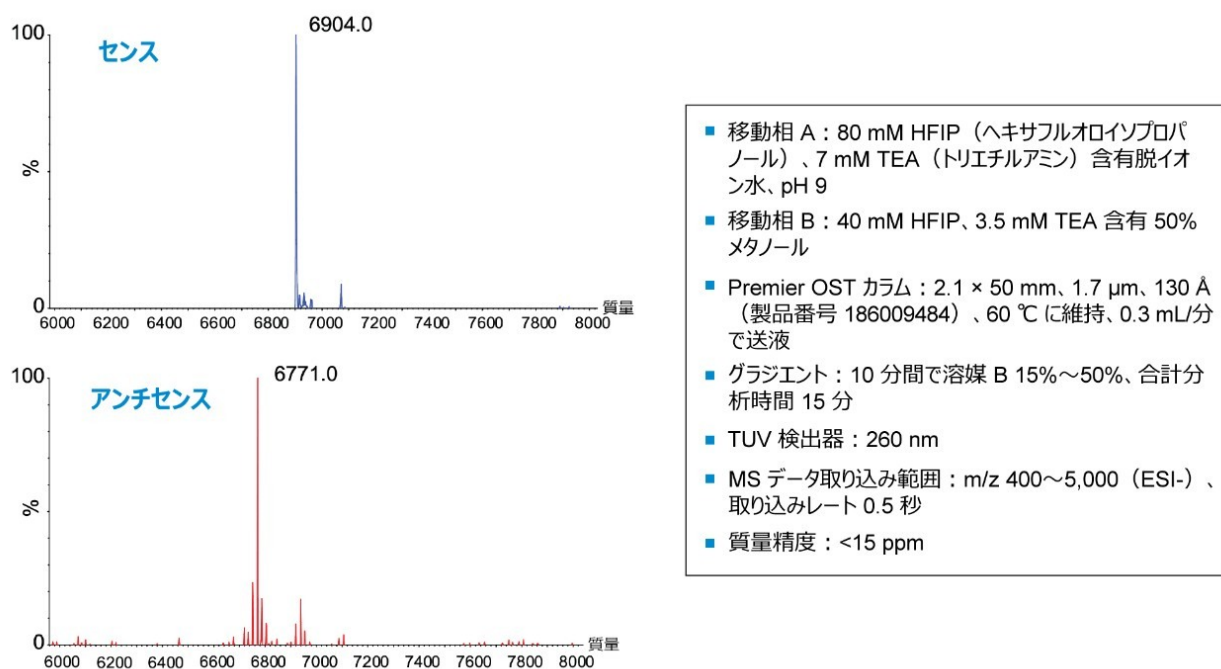
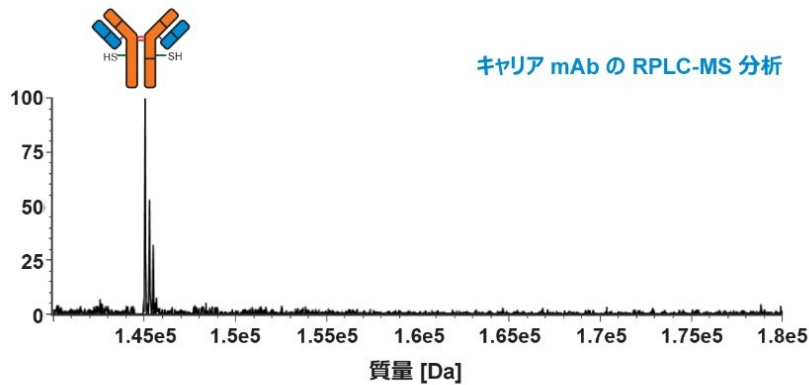


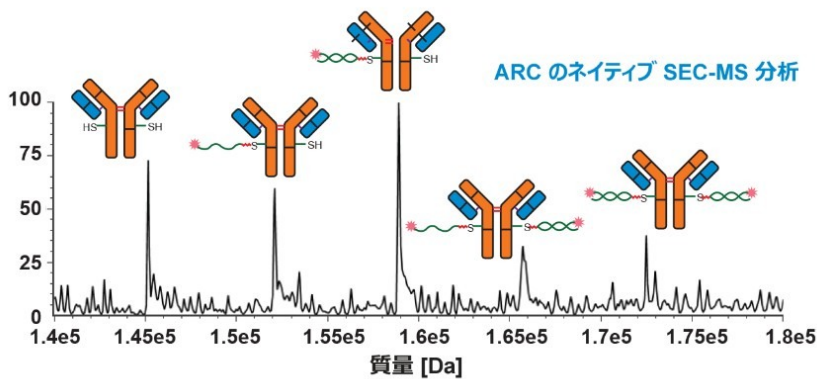
図3. センス鎖およびアンチセンス鎖のインタクト質量。MaxEnt 1 チャージデコンボリューションを使用して質量を取得しました。

ARC の特性解析

ARC 質量分析の目的として、DAR1 および DAR 2 の分子種を同定することに重点を置いています。従来の光学検出器 (UV または FLR) を用いるクロマトグラフィーメソッドだけでは、確実な同定を行うのに十分ではありません。更に、LC-MS ベースのアッセイは、DAR の測定に最適です。mAb 分子の完全性をチェックするために、キャリア mAb の RPLC-MS 分析を最初に行いました (Fc 領域のアスパラギン (N) 残基をシステイン (C) 残基に置換)。図 4A のチャージデコンボリューションしたスペクトルの主要ピークは、改変された mAb の計算質量とマッチする質量を示しています。サンプルに DAR 1 および DAR 2 の分子種が存在するかどうかを確認するために、ネイティブの SEC-MS 実験を行いました。非変性移動相は、ESI+MS プロセスにおいて二本鎖 siRNA をインタクトのまま維持するのに役立ちます。MaxEn1 でデコンボリューションしたスペクトルから、DAR 1 と DAR 2 の分子種が両方認められました。更に、アンチセンス鎖のない DAR1 と DAR2 が認められました (図 4b)。



- 移動相 A : 0.1% 酢酸水溶液
- 移動相 B : 0.1% 酢酸アセトニトリル溶液
- BioResolve RP mAb Polyphenyl カラム (450 Å, 2.7 μm, 2.1 mm × 50 mm, Waters 製品番号 = 186008944) 、80 °C に維持、0.4 mL/分で送液
- グラジエント : 2.5 分で溶媒 B 5% ~ 85%、合計分析時間 7 分
- TUV 検出器 : 280 nm
- MS データ取り込み範囲 : m/z 400~7,000 (ESI+)、取り込みレート 0.5 秒



- 移動相 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液
- ACQUITY UPLC Protein BEH SEC カラム, 200 Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 150 mm (製品番号 = 186008471) 、25 °C に維持、0.065 mL/分で送液
- グラジエント : アイソクラティック、合計分析時間 8 分
- TUV 検出器 : 280 nm
- MS データ取り込み範囲 : m/z 400~7,000 (ESI+)、取り込みレート 0.5 秒

図 4. 上: キャリアタンパク質のチャージデコンボリューションしたインタクト質量。データは RPLC-MS から取得しました。キャリアタンパク質の実測質量精度は 10 ppm です。下: ネイティブ SEC-MS 分析からチャージデコンボリューションした DAR 分子種。DAR1 および DAR2 に相当するピークが認められました。また、一本鎖 (センス)) DAR 分子種も主要副生成物として検出されました。

結論

1) siRNA の同定 (センス鎖およびアンチセンス鎖) の確認、および 2) ネイティブ SEC-MS によるサンプル中の抗体-siRNA 分子の分布の確認を行うために、2 種類の LC-MS メソッドを開発しました。分析スケールの ACQUITY UPLC I-Class PLUS とベンチトップ型 ToF 質量検出器 (ACQUITY RDa) を使用して、メソッドとワークフローの両方を開発し、最適化しました。いずれのメソッドも BioAccord システムでわずかな最適化により、簡単に実行できます。メソッド開発に使用するコンプライアンス対応のソフトウェアには、効率の向上や、開発ラボから QC ラボへのメソッド移管のサポートなど、更なる利点が追加されています。

参考文献

1. Shion H, Yu Y, Chen W. Enabling Routine and Reproducible Intact Mass Analysis When Data Integrity Matters. Waters Application Note 720006472EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/enabling-routine-and-reproducible-intact-mass-analysis.html>> .2020 October (Revised).
2. Shion H, Yu Y, Chen W. Analysis of Antibody Drug Conjugates (ADCs) by Native Mass Spectrometry on the BioAccord System. Waters Application Brief 720006570EN <<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 May.
3. Doneanu C, Fox J, Harry E, Knowles C, Yu Y, Fredette J, Chen W. Intact Mass Confirmation Analysis on the BioAccord LC-MS System for a Variety of Extensively Modified Oligonucleotides. Waters Application Note 720007028EN <<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 October.

謝辞

Henry Shion, Catalin E. Doneanu, Ying Qing Yu, Weibin Chen - Waters Corporation
Ed Ha - Angiex, Inc.

ソリューション提供製品

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

ACQUITY UPLC チューナブル UV 検出器 <<https://www.waters.com/514228>>

バイオ医薬品のための BioAccord LC-MS システム <

<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

UNIFI バイオ医薬品プラットフォームソリューション <

<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10195515>>

720007212JA、2021 年 3 月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.