

## 使用450 Å二醇基键合BEH色谱柱和荧光检测以体积排阻色谱法分析腺相关病毒(AAV)制剂

---

Stephan M. Koza, Weibin Chen

Waters Corporation

---

### 摘要

本应用纪要介绍了一种优化的体积排阻色谱(SEC)方法，可以在非变性条件下分离几种CMV-GFP对照AAV血清型的可溶性AAV自缔合形式和片段，包括AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8和AAV9。

### 优势

- 优化几种AAV血清型的SEC分离
- 分离低价多聚体和二聚体AAV HMWS和AAV LMWS
- 使用内在荧光检测提高信噪比，AAV上样量和浓度要求低

### 简介

随着基因治疗产品的研发速度加快，开发稳定高效的分析策略，为生产工艺的开发和临床用腺相关病毒(AAV)载体的质量评估提供指导变得越来越重要。在诸多关键质量属性中，可能有必要监测高分子量物质(HMWS)所代表的潜在AAV聚集体和低分子量物质(LMWS)所代表的AAV片段水平<sup>1</sup>。本文介绍了一种优化的体积排阻色谱(SEC)方法，可以在非变性条件下分离几种CMV-GFP对照AAV血清型的可溶性AAV自缔合形式和片段，包括AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8和AAV9<sup>2</sup>。



---

配备ACQUITY FLR检测器的ACQUITY UPLC H-Class Bio系统和XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱

---

## 实验

散装AAV8-Null和AAV8-GFP对照样品由BioReliance（马里兰州罗克维尔）提供。各种AAV血清型样品购自Vigene Biosciences（马里兰州罗克维尔），使用PBS配制溶液。BEH450 SEC蛋白质混标使用500  $\mu$ L含有10  $\mu$ g/mL L-色氨酸(Sigma)的PBS重悬。

## 方法条件（除非另有说明）

## 液相色谱条件

系统:	ACQUITY UPLC H-Class Bio
检测:	配备FLR检测器（分析型流通池）的ACQUITY UPLC系统，（除非另有说明）。 波长：激发波长为280 nm，发射波长为350 nm Wyatt microDAWN MALS检测器（加利福尼亚州圣巴巴拉） Waters ACQUITY RI检测器
色谱柱:	XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱, 450 Å, 3.5 μm, 7.8 mm × 300 mm, 套装内含BEH450 SEC蛋白质混标（部件号：176003599）
柱温:	25 °C
样品温度:	6 °C
流动相:	A: 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 、10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ，pH 6.6 (HCl); B: 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 、10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 、500 mM KCl, pH 6.6 (HCl); 全都经过0.1 μm无菌过滤（除非另有说明）
流速:	0.6 mL/min（除非另有说明）
样品瓶:	聚丙烯材质12 × 32 mm螺纹口样品瓶，带瓶盖和PTFE/硅胶隔垫，容积为300 μL（部件号：186002640）

## 数据管理

色谱软件：

Empower 3

---

## 结果与讨论

在开发AAV的SEC分离方法时，识别SEC的分析物大小上限非常重要，该值低于亚可见范围，可检测的粒径上限约为100 nm。当聚集体大小超过100 nm时，可能会在SEC条件下发生破坏，或被筛板或色谱柱的填充床捕集。因此，筛分100 nm以上的物质通常需要使用一些补充方法，例如动态光散射和纳米颗粒跟踪分析(NTA)等<sup>3,4</sup>。还需要注意的是，亚可见聚集体形式水平显著增加与SEC图谱观察到的低价聚集体（如二聚体和三聚体）增加可能并不是同时发生的。

考虑到这些因素，我们利用平均孔径为450 Å (45 nm)的二醇基键合BEH SEC色谱柱评估了AAV单体、二聚体、低价多聚体以及低分子量形式的SEC分离。平均孔径为450 Å的SEC颗粒通常不足以对分子量近4000 KDa的蛋白质以及分子量约1500 KDa的ssDNA分析物进行SEC分离。然而，由于直径为25 nm的AAV结构紧凑，预测这种具有较大孔隙体积的高效SEC颗粒可提供所需的分离，颗粒孔径大于平均孔径，使大部分HMWS都可以穿过该空隙体积。此外，虽然最初的方法开发使用的是填充2.5 μm粒径颗粒、内径为4.6 mm的色谱柱，但为了尽量减少潜在的样品筛分效应，最终方法选择了更大的3.5 μm粒径、7.8 mm内径的色谱柱。

鉴于许多AAV制剂样品的浓度较低，且现阶段开发的生产工艺产量较低，导致SEC所需的进样量较小，因此我们还采用了内在蛋白荧光检测以尽可能提高灵敏度。与紫外吸收相比，内在蛋白荧光还有一个额外优势：AAV的DNA含量变化不会对响应因子造成太大影响<sup>5</sup>。

基于可用性考虑，方法开发最初使用的是AAV8-Null对照样品。空白对照样品是不含DNA的AAV衣壳。使用Wyatt microDAWN多角度光散射检测器(MALS)和ACQUITY RI（示差折光）检测器评估了通过磷酸盐缓冲液流动相（PBS，含有10 mM磷酸钠和150 mM NaCl）完成的分离（图1）。SEC-MALS数据证实，二聚体和单体AAV形式之间实现分离。此外，使用FLR也在二聚体之前观察到假定的多聚体形式，但由于丰度较低，无法通过MALS分配分子量。

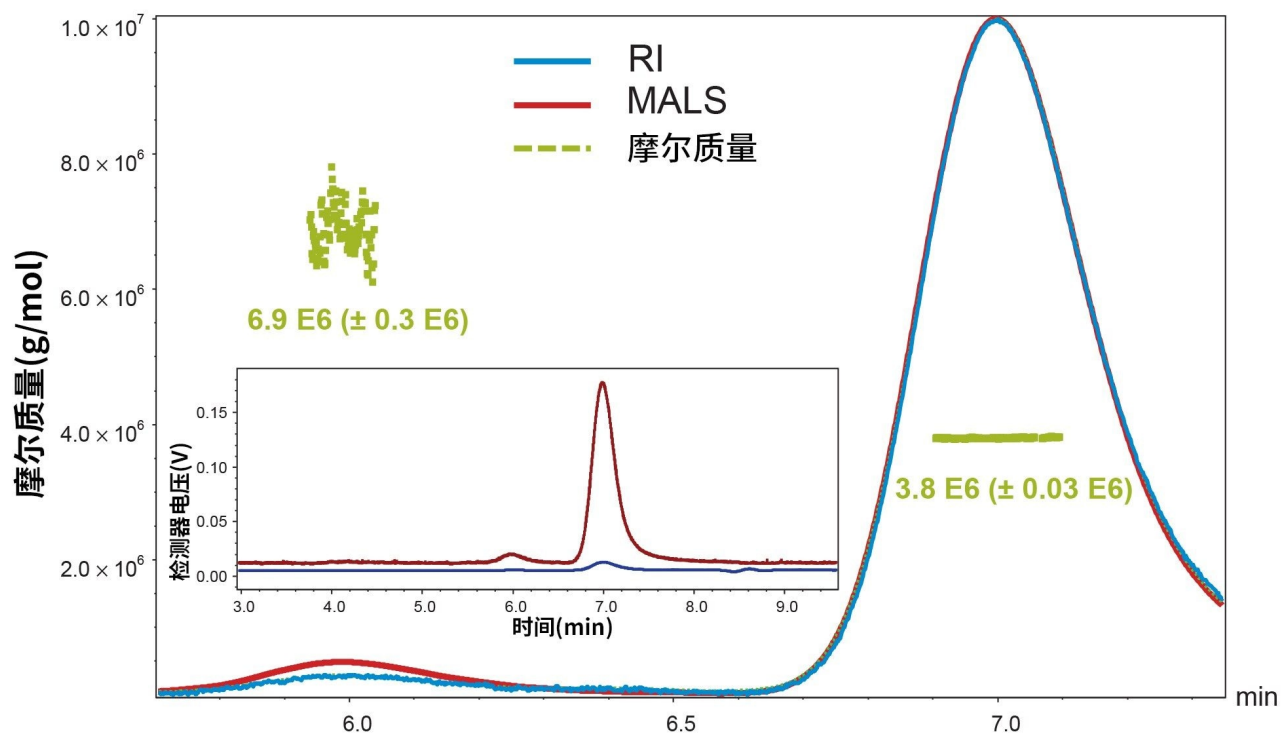


图1.使用示差折光(RI)检测器进行AAV8-Null样品 (约 $1 \times 10^{12}$ 衣壳/mL) 浓度测定的SEC-MALS图。使用Wyatt Astra (v. 7.3.1.9), 基于 $dn/dc$ 值0.185, 并使用二十面体AAV的“球体”模型, 对MALS (红色) 和RI (蓝色) 信号进行归一化, 并确定摩尔质量 (绿色) 的平均值和分布。实验详情见正文。

本研究采用了单因素优化方案, 以PBS为起始流动相, 尽可能提高聚集体的回收率并减少单体衣壳的峰拖尾。该方案先在保持离子强度恒定(150 mM NaCl)的情况下评估pH值, 然后使用Auto · Blend Plus技术在观察到的最佳pH值下评估离子强度<sup>6</sup>。最后评估了盐类型 (NaCl、KCl和高氯酸钠) 和其他添加剂 (精氨酸和异丙醇)。最终发现由20 mM磷酸钠(pH 6.6)和150 mM KCl组成的流动相可为AAV8-Null对照样品提供出色的分离。为节省样品, 我们选择这种单因素优化方案来代替更严格的全因素方法开发方案。但应注意, 在确定最佳方法条件时通常首选全因素优化方案, 因为单因素优化方案也许只能提供局部优化。在部署本研究所述方法分析含有DNA的AAV血清型(CMV-GFP)时, 观察到在不同血清型中, 使二聚体和多聚体回收率获得大幅提升的最佳KCl浓度各不相同。血清型AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8和AAV9的最终方法条件和色谱图见图2。

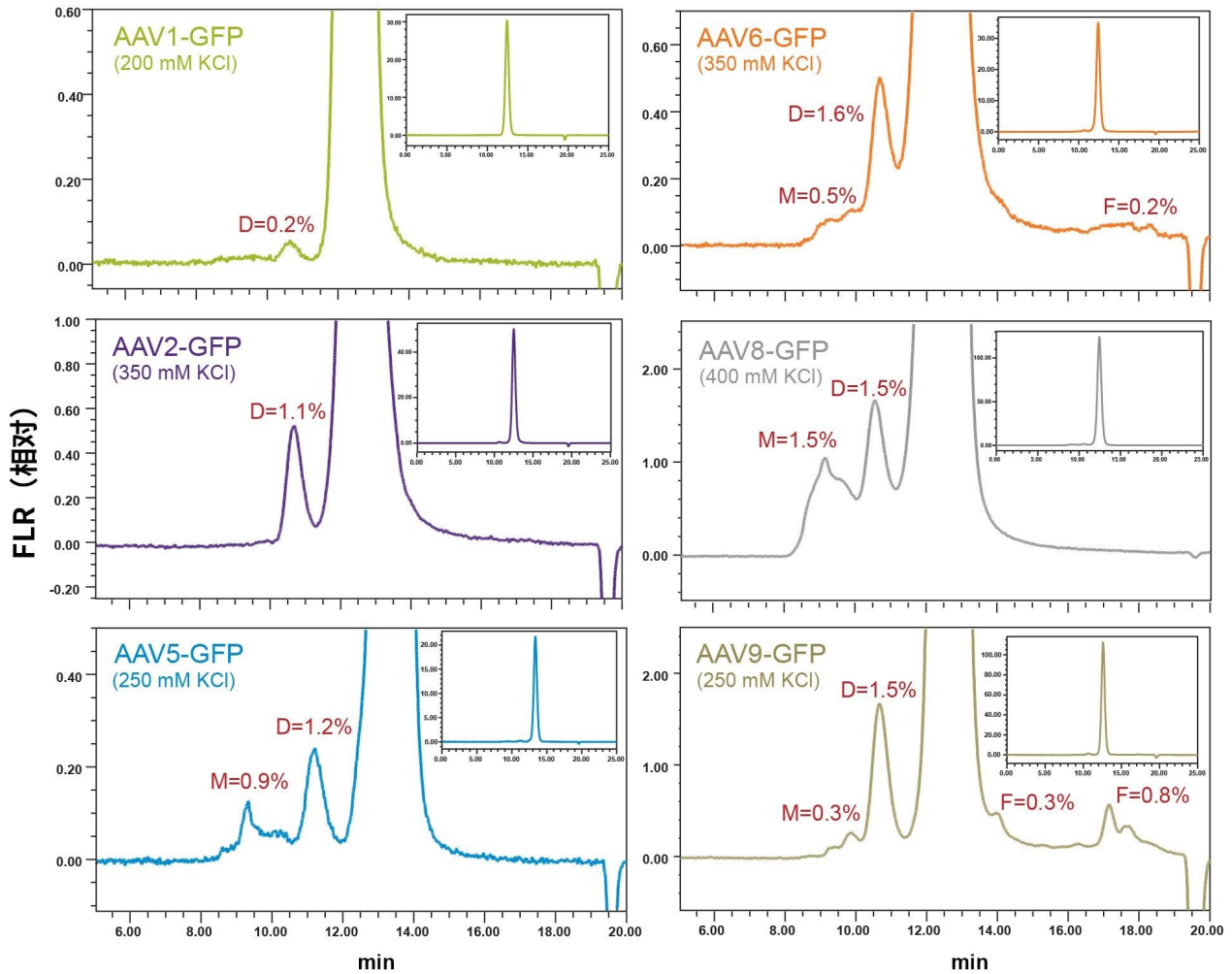


图2.一系列AAV血清型对照样品（包含带绿色荧光蛋白(GFP)编码的ssDNA）的SEC分离结果。图中显示了二聚体(D)、多聚体(M)和片段(F)的峰值百分比。色谱图基线放大约50倍，全尺寸色谱图见插图。实验详情见正文。样品浓度约为 $1 \times 10^{12}$ ~ $5 \times 10^{12}$ 衣壳/mL。

我们观察到，二聚体HMWS和单体AAV形式的峰形对称，并且适当地返回基线。此外，可检测水平的HMWS的保留时间与在几种血清型中观察到的AAV多聚体形式一致。仅在AAV9血清型中观察到大量LMW形式，在AAV6中含量更低。如前所述，为提高该方法对低丰度高分子量和低分子量形式的灵敏度，我们使用了内在蛋白荧光检测。然而，在评估SEC蛋白质混标时，由于量子产率较低，未能观察到小分子总渗透体积标记物（尿嘧啶）。能够跟踪SEC色谱柱的总渗透体积在SEC方法开发中非常有用，因为在这种情况下，总渗透体积后持续存在的任何FLR信号均表明蛋白质被过度保留在色谱柱上。因此，建议向标准品中添加10  $\mu$ g/mL的L-色氨酸标记总渗透体积，该氨基酸是

使用内在蛋白质荧光检测时，蛋白质的主要荧光基团（图3）。

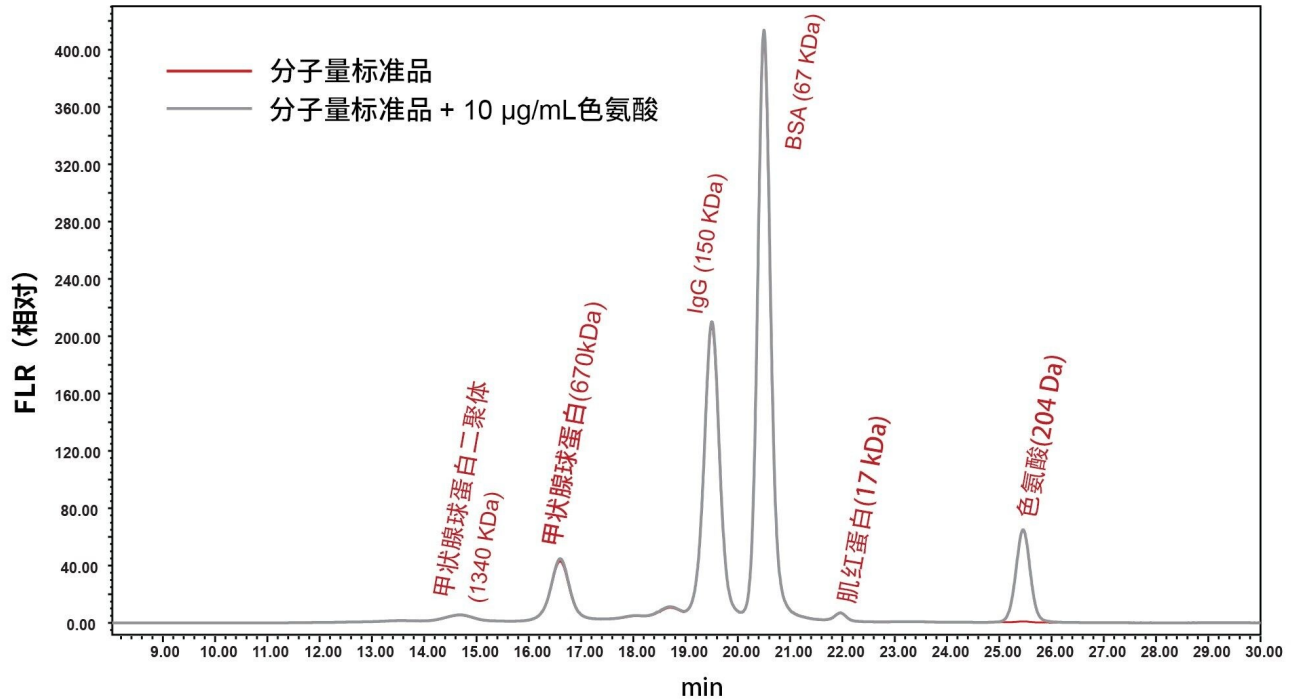


图3. Waters BEH450 SEC蛋白质混标的SEC分离结果。将标准品复溶于500 µL含有10 µg/mL L-色氨酸的PBS中，柱上进样一次，流速为0.5 mL/min。实验详情见正文。

## 结论

本研究证明，平均孔径为450 Å、粒径为3.5 µm的BEH-SEC色谱柱能有效分离AAV单体与它的HMW二聚体、低价多聚体和LMW片段。不同血清型获得最佳峰形和回收率所需的最小离子强度(KCl)不同，本研究报告了血清型AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8和AAV9的水平。虽然450 Å平均孔径可能被认为达不到理想的分析物分离效果，但结果表明，这些颗粒的大孔径和高效率能够有效分离分析物。有人提出，AAV HMWS分离主要是由孔径450 Å以上的颗粒分布驱动的。此外，可以使用内在蛋白荧光检测提升AAV样品的方法灵敏度。

---

## 参考资料

1. Wright, J. F. Manufacturing and Characterizing AAV-Based Vectors for Use in Clinical Studies. *Gene Therapy*. 2008, 15, 840-848.
2. Vernon, S.; Stasny, J.; Neurath, A.; Rubin, B. Electron Microscopy of DNA from Adeno-Associated Virus Type I. *Journal of General Virology*. 1971, 10, 267-272.
3. Carpenter, J.F.; Randolph, T. W.; Jiskoot, W.; Crommelin, D. J.; Middaugh, C. R.; Winter, G.; et al. Overlooking Subvisible Particles in Therapeutic Protein Products: Gaps that May Compromise Product Quality. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009, 98, 1201-1205.
4. Slutter, B.; Jiskoot, W. Sizing the Optimal Dimensions of a Vaccine Delivery System: a Particulate Matter. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2016, 13, 167-170.
5. Wang, C.; Mulagapati, S. H. R.; Chen, Z.; Du, J.; Zhao, X.; Xi, G.; et al. Developing an Anion Exchange Chromatography Assay for Determining Empty and Full Capsid Contents in AAV6.2. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*. 2019, 15, 257-263.
6. Warren, W.; Astephen, N. E.; Wheat, T. E. Systematic Optimization of Protein Separations on High-Performance Ion-Exchange Chromatographic Media. *J. Chromatogr.A*. 1990, 512, 13-22.

## 致谢

本文作者由衷感谢BioReliance提供AAV-8 null样品和AAV-8 GFP样品。

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY UPLC FLR检测器 <<https://www.waters.com/514222>>

Empower 3色谱数据软件 <<https://www.waters.com/10190669>>

Auto · Blend Plus <<https://www.waters.com/134623262>>



720006812ZH, 2020年3月



©2019 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](#)