

阴离子交换色谱法测定腺相关病毒中空衣壳和完整衣壳的含量

Hua Yang, Stephan M. Koza, Weibin Chen

Waters Corporation

摘要

本应用纪要展示了在Waters Protein-Pak Hi Res Q AEX色谱柱上分离和定量空衣壳和完整衣壳的应用。

优势

- 使用Protein-Pak Hi Res Q色谱柱分离和定量AAV空衣壳和完整衣壳
 - AEX法分离AAV空衣壳和完整衣壳的方法开发
 - AEX法鉴定AAV血清型
-

简介

重组腺相关病毒(AAV)载体已越来越多地用作基因疗法中传递治疗性基因的载体¹。在AAV的生物制造工艺中，还会产生大量空衣壳，这些衣壳不含所需的DNA，因此不具备治疗作用。有研究称，空衣壳会降低转导效率并诱发不必要的免疫应答²。另一方面，最近有数据表明AAV空衣壳可以增强基因转移³。无论空衣壳是有益还是有害

，都有必要监测它和完整衣壳的配比，确保产品质量和疗效保持一致。

目前已有多种技术被应用于定量AAV样品中的空衣壳。分析型超速离心(AUC)⁴、紫外分光光度法⁵和电子显微镜^{6,7}是广泛用于测量AAV颗粒空衣壳/完整衣壳比(empty/full ratio)的技术。AUC可测量颗粒沉降速率，是该应用领域的黄金标准。但是，AUC方法需要专业分析人员花费数小时来解析数据，而且部署AUC仪器会消耗数百微升的宝贵样品。此外，基于AUC的分析方法很难验证。另一种方法是使用静态分光光度法在260 nm与280 nm处测量，大致区分空衣壳和完整衣壳。这种方法虽然速度较快，但结果准确度可能受样品基质干扰物的影响。此外，需要使用大量样品才能获得足够高的吸光度值。透射电子显微镜(TEM)和低温电子显微镜(Cryo-EM)可直接将空衣壳颗粒和完整衣壳颗粒可视化并进行计数，但这种定量方法很大程度上依赖于图像质量和视野选择。电荷检测质谱(CDMS)法是最近用于此分析的一项技术⁸。这种MS方法可直接测量颗粒的分子量，已被证明能够准确测量AAV空衣壳、部分衣壳和完整衣壳颗粒。目前还没有商用CDMS仪器。

阴离子交换色谱(AEX)法据称具有分离空衣壳和完整衣壳的潜力，并且有研究表明，这种分离是由相对表面电荷的差异驱动的^{9,10}。该技术消耗的样品量小，使用标准LC仪器即可产生稳定且可重现的结果。本应用纪要展示了在Waters Protein-Pak Hi Res Q AEX色谱柱上分离和定量空衣壳和完整衣壳的应用。

实验

样品描述

将包含填充衣壳（完整）或空衣壳（空，没有绿色荧光蛋白[GFP]基因）的AAV8样品直接注入阴离子交换柱，无需稀释。完整AAV8衣壳的浓度为8.5 E12 vg/mL，空衣壳的浓度为1.67 E12衣壳/mL。样品由美国马里兰州罗克维尔的BioReliance Corporation提供。

在一组单独的样品中，AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9均以完整衣壳的形式提供，内含GFP基因（Vigene Biosciences，美国马里兰州罗克维尔）。所有样品均直接注入阴离子交换柱，无需稀释。样品浓度范围为 1.3×10^{13} ~ 6.7×10^{13} GC/mL。

液相色谱条件

系统：ACQUITY UPLC H-Class Bio

样品温度：	10 °C
分析柱柱温：	30 °C
流速：	0.35 mL/min或0.4 mL/min
进样体积：	0.2-6 μL
色谱柱：	Protein-Pak Hi Res Q, 5 μm, 4.6×100 mm (部件号：186004931)
检测：	荧光检测器：激发波长280 nm，发射波长350 nm； 配备5 mm钛流通池的ACQUITY UPLC TUV检测器，双波长：280 nm和260 nm
样品瓶：	聚丙烯材质12×32 mm螺纹口样品瓶，带瓶盖和预切割PTFE/硅胶隔垫，容积300 μL (部件号：186002639)

Auto · Blend Plus方法

流动相A：	100 mM Tris-HCl
流动相B：	100 mM Tris碱
流动相C：	1 M盐 (请参阅文字和图片)
流动相D：	水

时间	流速 (mL/min)	pH	盐 (mM)	盐曲线
0.00	0.4	9.0	0	
2.00	0.4	9.0	150*	11
5.00	0.4	9.0	150*	11
25.00	0.4	9.0	300*	6
26.00	0.4	9.0	700	6
28.00	0.4	9.0	700	6
28.10	0.4	9.0	0	11
36.00	0.0	9.0	0	11

*盐浓度因具体条件而异。

四元泵混合方法

流动相A: 250 mM双三羟基甲氨基丙烷, pH 9或10

流动相B: 20 mM MgCl₂

流动相C: 1 M四甲基氯化铵

流动相D: 水

数据管理: Empower 3 (FR 4)

时间	流速 (mL/min)	%A	%B**	%C	%D	曲线
0.00	0.4	28	0	0	72	
2.00	0.4	28	0	10	62	6
5.00	0.4	28	0	10	62	11
25.00	0.4	28	0	30	42	6
25.10	0.4	28	0	72	0	6
28.10	0.4	28	0	0	72	11
36.00	0.0	28	0	0	72	11

**在某些情况下，使用10% B (2 mM Mg²⁺)。

结果与讨论

在Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上使用上述梯度方法分离AAV8空衣壳和完整衣壳混合物（图1）。与先前报道的结果一致^{9,10}，在强阴离子交换柱上，完整衣壳比空衣壳晚洗脱，表明完整衣壳携带的阴离子电荷比空衣壳多，这可能是因为它们包裹的DNA导致的。

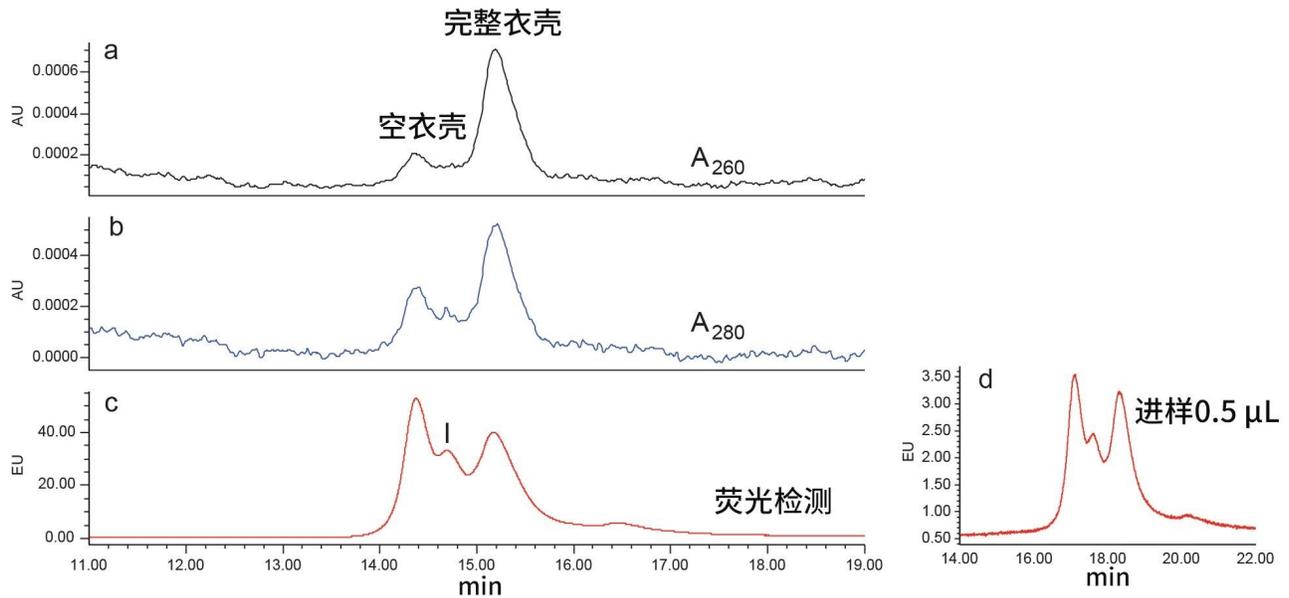


图1.在Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上分离AAV8空衣壳和完整衣壳混合物。20 mM Tris pH 9, NaCl在20 min内从0增加至300 mM, 流速0.4 mL/min。a-c)进样6 µL。a) 260 nm处的TUV。b) 280 nm处的TUV。c) 荧光检测: 激发波长280 nm, 发射波长350 nm。d) 进样0.5 µL的荧光检测结果。20 mM Tris pH 9, NaCl在20 min内从50增加至250 mM, 流速0.4 mL/min。

图1a和1b分别显示了260 nm和280 nm处的UV检测结果。与文献⁹所述一致, 完整衣壳在260 nm处的峰面积大于280 nm处的峰面积; 而空衣壳在260 nm处的峰面积小于280 nm处的峰面积。这是因为, 在280 nm处, 衣壳蛋白的吸光度高于DNA, 而在260 nm处, 病毒DNA的吸光度高于衣壳蛋白。

图1c所示为采用相同分离方法得到的荧光检测信号, 可以看到, 荧光信号远高于UV检测信号, 与之前报告的结果一致⁹。即使进样体积只有0.5 µL (柱上载样量约 4×10^9 vg), 信号也远高于检测限 (图1d)。因此, 本应用纪要的剩余部分仅展示荧光检测数据。

在空衣壳和完整衣壳之间洗脱的中间峰 (图1c, 峰I) 似乎存在于空衣壳样品中; 电子显微镜数据测得空衣壳样品中完整衣壳含量为0.5%, 也可以据此推测该峰主要是空衣壳。此外, 中间峰的 A_{260}/A_{280} UV比率与在空衣壳峰中观察到的值一致 (数据未显示)。基于这些结果, 没有实质性证据表明中间峰代表含有部分DNA含量的衣壳。假设AAV8衣壳的一级结构或构象变化引起的蛋白质电荷异质性对AEX分离的影响程度与ssDNA含量几乎相同。NaCl浓度较高也可能导致空衣壳的构象或结构变化, 进而导致表面电荷发生变化。这些结果与此前发表的AAV-AEX纯化结果一致, 即, 在几种血清型的AEX洗脱过程中观察到AAV空衣壳、完整衣壳和部分完整的衣壳¹¹。

在AEX上分离空衣壳和完整衣壳的方法开发

虽然初始条件表明Protein-Pak Hi Res Q色谱柱能够有效分离空衣壳和完整衣壳，但我们仍进行了方法开发以进一步优化和评价分离的稳定性。

缓冲液pH值、盐类型、缓冲液类型和镁离子浓度的影响

优化时首先考虑的参数通常是流动相pH。初始测试表明，pH 9的Tris缓冲液相比pH 8.5的缓冲液能够更好地分离完整衣壳/空衣壳（数据未显示）。

图2显示了在Tris缓冲液(pH 9)中使用不同类型的盐分离空衣壳和完整衣壳的色谱图。使用不同类型的盐获得了不同的保留时间，空衣壳和完整衣壳之间的分离度也不相同。空衣壳/完整衣壳比也有所不同，这可能是由于空衣壳和完整衣壳之间的分离度不同导致的。在测试的所有盐中，使用四甲基氯化铵时空衣壳和完整衣壳之间的分离度最佳。

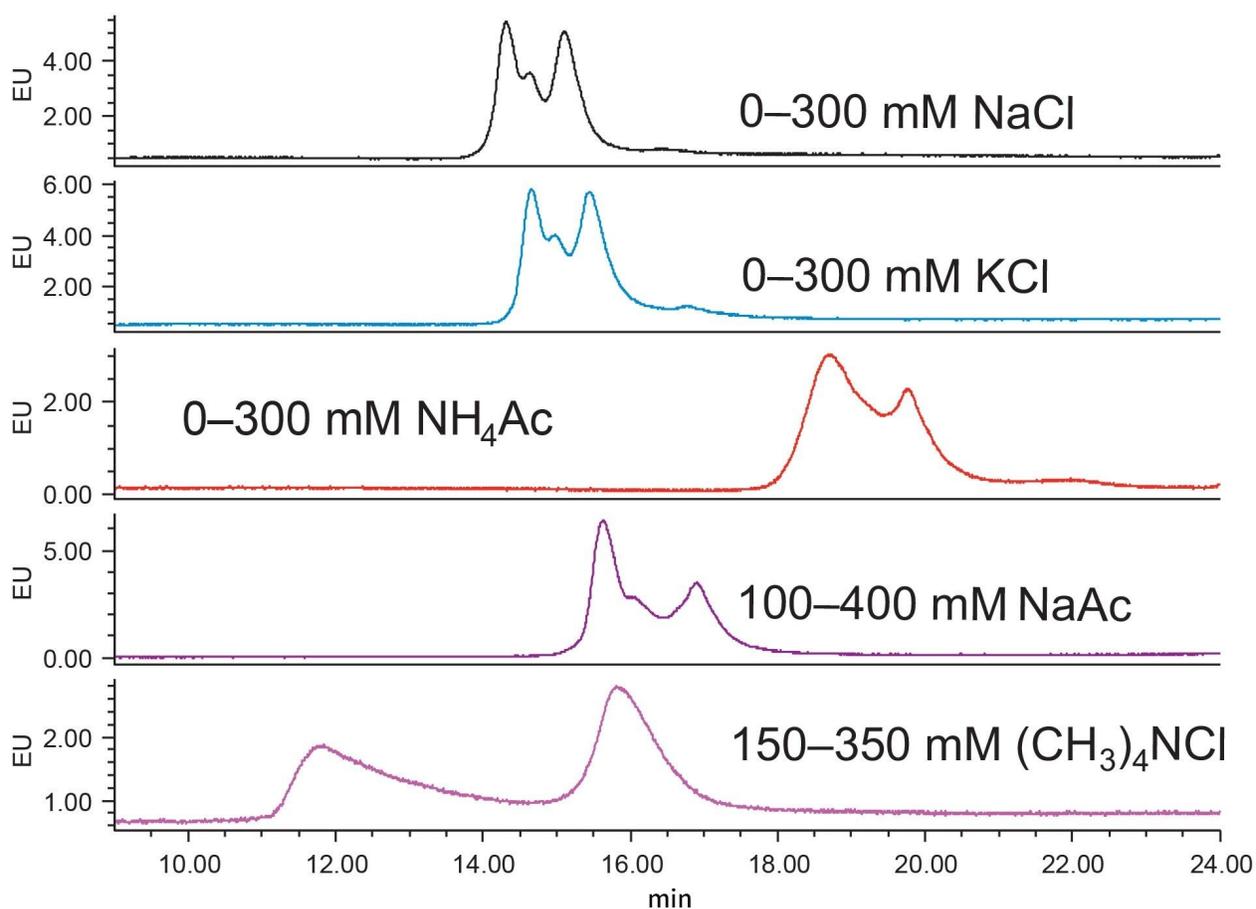


图2.使用各种类型的盐分离AAV8空衣壳和完整衣壳混合物。20 mM Tris pH 9, 20分钟盐梯度, 流速0.4 mL/min。

测试Tris缓冲液和双三羟甲基氨基丙烷缓冲液在pH 9下对分离的影响。两种条件都有效分离了空衣壳和完整衣壳，双三羟甲基氨基丙烷的分离度稍好，基线稳定性更好（数据未显示）。

当使用双三羟甲基氨基丙烷缓冲液比较pH 9和pH 10下的分离时，pH 9产生了更好的分离结果（图3）。

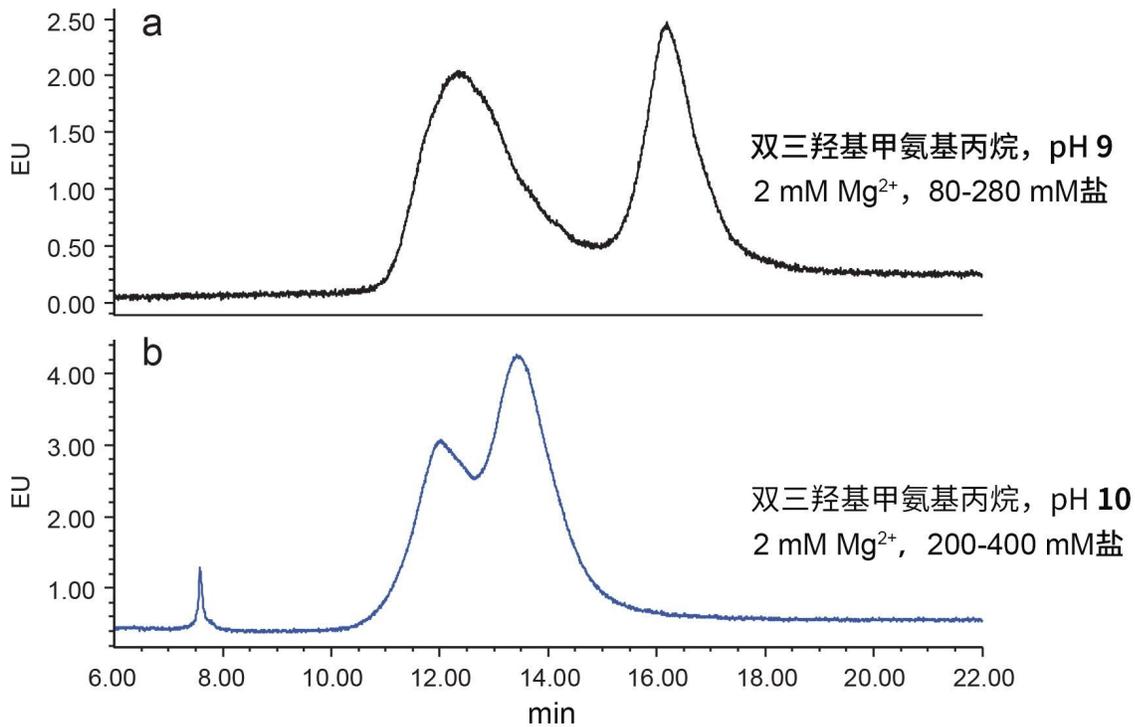


图3.pH值对AAV8空衣壳和完整衣壳分离的影响。a) 70 mM双三羟甲基氨基丙烷pH 9, 2 mM Mg²⁺, 四甲基氯化铵在25 min内从80增至280 mM, 流速0.35 mL/min。b) 70 mM双三羟甲基氨基丙烷pH 10, 2 mM Mg²⁺, 四甲基氯化铵在25 min内从200增至400 mM, 流速0.35 mL/min。

有研究表明, 在AEX流动相中添加2 mM镁(Mg²⁺)可改善不同种类AAV的峰形¹⁰, 但在本应用纪要评估的条件下, 在流动相中添加Mg²⁺ (图4) 并未改善AAV8-GFP的分离结果。不过, 添加低水平镁离子的做法仍然值得考虑, 它在其他AAV血清型的分离中可能有效。

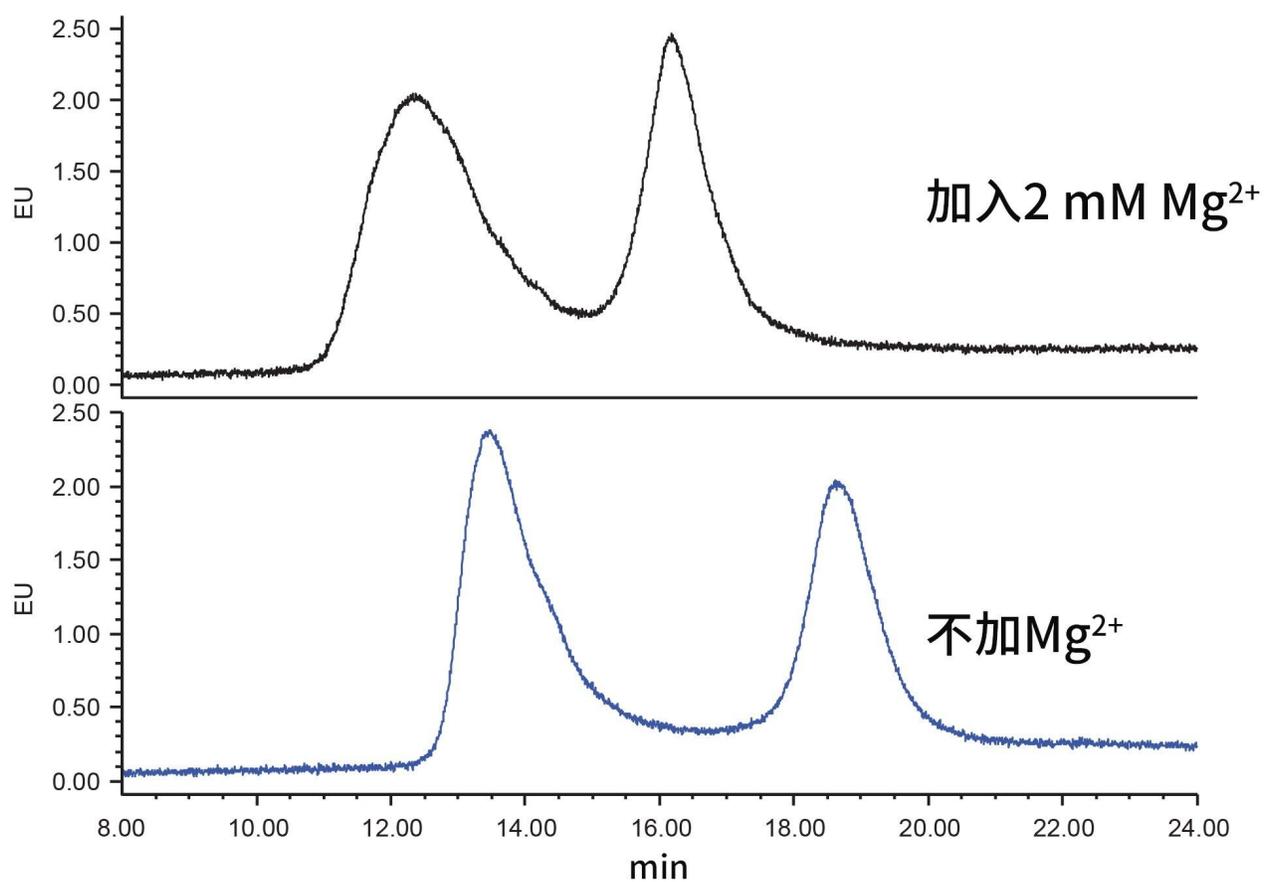


图4. Mg^{2+} 对AAV8空衣壳和完整衣壳分离的影响。70 mM双三羟基氨基丙烷pH 9，四甲基氯化铵在25 min内从80增至280 mM，流速0.35 mL/min。

AEX法分析空衣壳

使用优化方法分离空衣壳与完整衣壳的结果见图5，图6显示了具有不同空衣壳/完整衣壳比的AAV8样品的一系列色谱图。

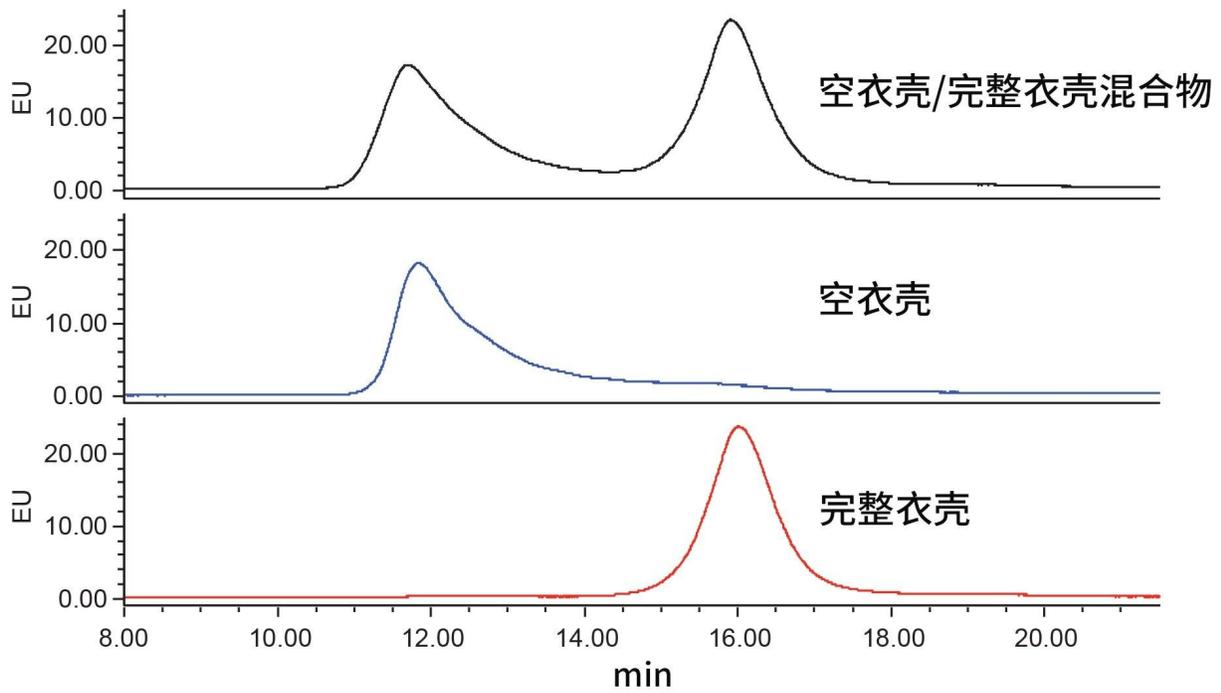


图5.使用优化的AEX方法分离AAV8空衣壳和完整衣壳：70 mM双三羟基氨基丙烷pH 9，四甲基氯化铵在20 min内从100增至300 mM，流速0.4 mL/min。

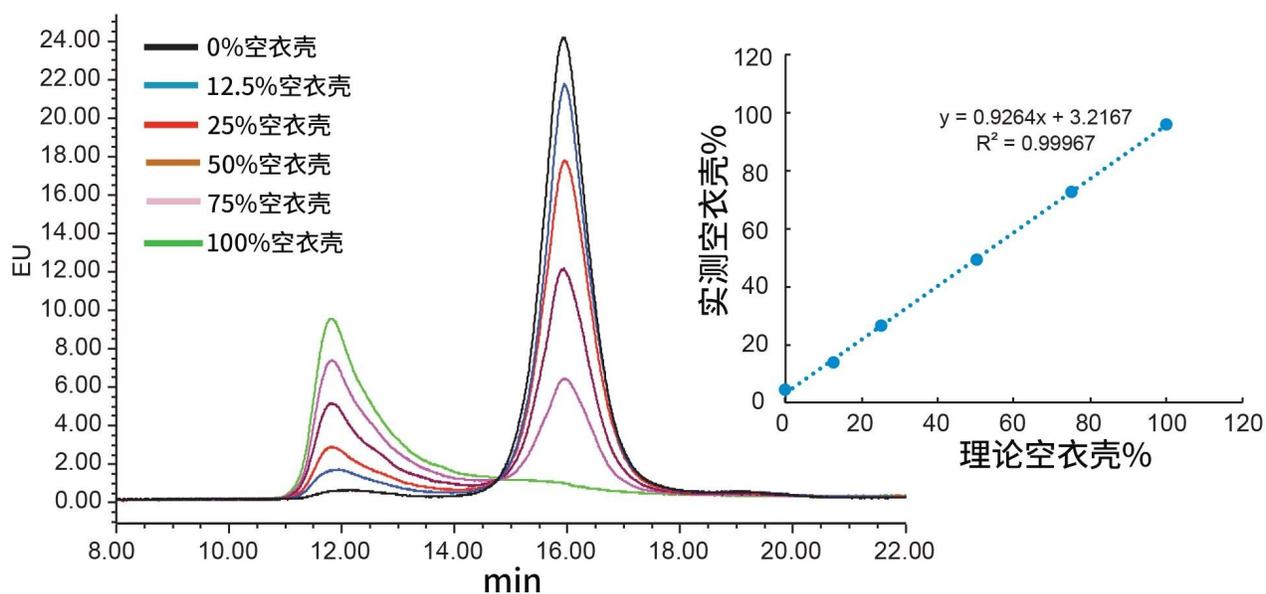


图6.使用优化的AEX方法定量各种AAV8空衣壳和完整衣壳混合物中的空衣壳百分比。

我们将主要由空衣壳或完整衣壳组成的两个标样以不同体积混合，得到一系列评价样品，分析数据见图6。为确保制得的混合物具有适当的浓度和比例，采用体积排阻色谱(SEC)法结合内在蛋白荧光(FLR)检测对AAV空衣壳和完整衣壳样品的衣壳浓度进行归一化（数据未显示）。这种浓度归一化是基于AAV空衣壳和完整衣壳标样测得的峰面积实现的，假设这些标样为纯品，功能正常，并且接受完整衣壳和空衣壳之间的FLR响应因子为 1.3^{10} 。该响应因子是先前在AAV6血清型中报告的，考虑到衣壳蛋白同源性，故被用作AAV8衣壳的合理估计值。尽管我们认为该近似值足以满足本研究的演示目的，但必须指出的是，在方法开发过程中必须尽职尽责地考虑分配AAV空衣壳和完整衣壳标样的纯度和含量。

总而言之，图6证明，这种优化的AEX分离方法可监测AAV8样品中的空衣壳/完整衣壳比。图6还显示了响应的线性。分别排除在大约16分钟（绿色迹线）和12分钟（黑色迹线）达到顶点的小峰面积后，测量了空衣壳标样和完整衣壳标样的峰面积，得到此响应曲线。使用完整衣壳与空衣壳的实测峰面积之比确定相对FLR响应因子($RF_{F/E}$)为1.9。然后用完整衣壳峰的峰面积除以该值，将完整衣壳峰的响应值相对于空衣壳峰的响应值进行归一化，再用公式1计算空衣壳和完整衣壳的相对丰度。

公式1

$$\%空衣壳 = 100 * \frac{\text{峰面积}_{空衣壳}}{(\text{峰面积}_{空衣壳} + \frac{\text{峰面积}_{完整衣壳}}{RF_{F/E}})}$$

此处确定的AEX响应因子(1.9)与在SEC-FLR法中观察到的响应因子(1.3)之间的差异可能是由于各实验中使用的流动相和柱温不同引起的，这进一步强调了在确立AAV样品中空衣壳和完整衣壳的相对丰度时，确定二者特定FLR响应因子的重要性。

AEX对不同AAV血清型的效果

在Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上以相同的分离条件单独运行了几种AAV血清型样品（图7）。为便于比较，还在图7a（底部色谱图）中加入了具有空衣壳和完整衣壳的AAV8样品的色谱图。AAV8在上述方法开发工作之后实现了分离。如图所示，不同AAV血清型的AAV衣壳的保留时间也不同。虽然AAV2、AAV5和AAV8几乎同时洗脱，但AAV1和AAV6较晚洗脱，AAV9较早洗脱（图7a）。降低起始梯度的盐浓度后，AAV9在色谱柱上的保留性更好（图7b）。

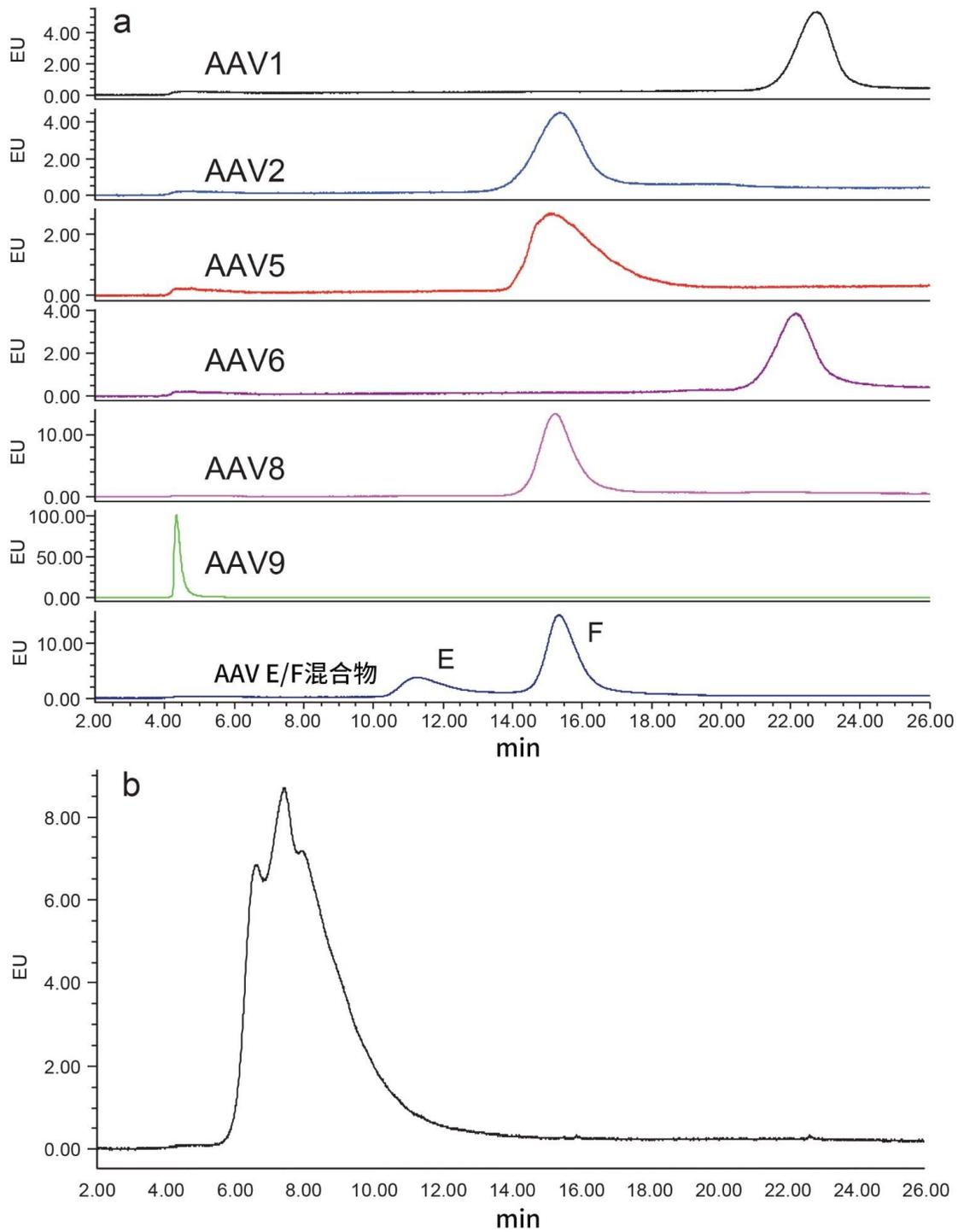


图7.a) Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上各种AAV血清型（完整衣壳）的色谱图。为便于比较，底部色谱图显示了在

之前的方法开发中分离的AAV8空衣壳和完整衣壳。70 mM双三羟基甲氨基丙烷,pH 9, 四甲基氯化铵在20 min内从100增至300 mM, 流速0.4 mL/min。b) 降低初始盐浓度后, AAV9在色谱柱上的保留性更好。70 mM双三羟基甲氨基丙烷,pH 9, 四甲基氯化铵在20 min内从0增至200 mM, 流速0.4 mL/min。

上述结果表明可能需要进一步开发方法来分离不同AAV血清型的空衣壳和完整衣壳。由于未获得这些血清型的空衣壳, 本研究没有对此进行评估。不过, 由于这些血清型的峰形与AAV8非常相似, 因此当前优化的AEX方法应作为其他AAV血清型AEX方法开发的有用起点。

结论

评价空衣壳和完整衣壳的含量非常重要, 有助于确保产品质量以及确定药物的适当剂量。

本研究证明, 使用Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱, 经过适当的方法开发, 可以分离AAV8空衣壳和完整衣壳并测定相对丰度。

由于衣壳蛋白表面的差异, 在分离其他AAV血清型的空衣壳和完整衣壳时, 可能需要进行方法评价和一些方法优化, 本应用纪要中的AEX方法可以作为一个有用的起点。

参考资料

1. Li, C.; Samulski, R. J. Engineering Adeno-Associated Virus Vectors for Gene Therapy. *Nature Reviews Genetics*. Epub 2020 Feb 10.
2. Gao, K.; et al. Empty Virions in AAV8 Vector Preparations Reduce Transduction Efficiency and May Cause Total Viral Particle Dose-Limiting Side Effects. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2014, 1(9), 20139.
3. Flotte, T. R. Empty Adeno-Associated Virus Capsids: Contaminant or Natural Decoy? *Hum. Gene Ther.* 2017, 28(2), 147.
4. Burnham, B.; et al. Analytical Ultracentrifugation as an Approach to Characterize Recombinant Adeno-

Associated Viral Vectors.*Hum.Gene.Ther.Methods.*2015, 26(6), 228.

5. Sommer, J. M. Quantification of Adeno-Associated Virus Particles and Empty Capsids by Optical Density Measurement.*Mol.Ther.* 2003, 7(1), 122.
6. Horowitz, E. D.; et al.Biophysical and Ultrastructural Characterization of Adeno-Associated Virus Capsid and Genome Release.*J. Virol.*2013, 87(6), 2994–3002.
7. Subramanian, S.; et al.Filling AAV Capsids: Estimating Success by Cryo-EM.*Hum.Gene.Ther.*2019, 30(12), 1449.
8. Pierson, E. E.; et al.Resolving Adeno-Associated Viral Particle Diversity with Charge Detection Mass Spectrometry.*Anal.Chem.*2016, 88, 6718.
9. Fu, X.; et al.Analytical Strategies for Quantification of Adeno-Associated Virus Empty Capsids to Support Process Development.*Hum.Gene.Ther.Methods.*2019, 30(4), 144.
10. Wang, C.; et al.Developing an Anion Exchange Chromatography (AEX) Assay for Determining Empty and Full Capsid Contents in AAV6.2. *Mol.Ther.Methods Clin.Dev.*2019, 15, 257–263.
11. Nass, S. A.; et al.Universal Method for the Purification of Recombinant AAV Vectors of Differing Serotypes.*Mol.Ther.Methods Clin.Dev.*2017, 9, 33-46.

特色产品

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

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

720006825ZH, 2020年4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