

使用UPLC和UPLC-MS优化腺相关病毒(AAV)衣壳蛋白分析

Ximo Zhang, Stephan M. Koza, Ying Qing Yu, Weibin Chen

Waters Corporation

摘要

本应用纪要通过开发LC-光学检测方法和LC-MS方法分析AAV完整衣壳蛋白展示BioAccord系统的性能，并将上述方法应用于AAV8血清型分析，作为改善衣壳蛋白表征（包括鉴定、化学计量数和翻译后修饰）的案例研究。然后将开发的方法用于其它rAAV血清型，证明该方法在对AAV载体进行完整蛋白质分析方面的普适性。

优势

- 经过优化的LC-MS解决方案，可有效分离重组AAV载体中的病毒蛋白(VP)并进行完整蛋白质质量数分析，从而促进基因治疗产品的表征和开发
 - 高灵敏度LC-FLR定量方法，可准确测定AAV衣壳蛋白的化学计量数
-

简介

重组腺相关病毒(rAAV)的毒性较低并且能够持久表达，是基因治疗方法开发中使用最广泛的载体¹。目前共分离出

13种具有不同组织嗜性的常见AAV血清型，其中多种血清型已经运用到多种疾病的治疗方法探索中²。AAV衣壳（图1）由蛋白质组成，是病毒基因组的保护结构以及细胞内化媒介，不同血清型之间的衣壳蛋白质具有较高一致性³，因此在基因治疗方法的开发和商业化过程中需要使用可靠且具有高专属性的载体鉴定方法。此外，据报道，AAV衣壳组成是影响病毒感染活性和基因转导的关键因素^{4,5}。为确保药品的安全性和质量，在基因治疗产品的整个开发过程中，需要对AAV衣壳的结构、性质以及其蛋白质组成进行充分表征和监测。传统分析技术如ELISA、免疫印迹法或SDS-PAGE等常用于确定功能和组成信息，但这些技术要么难以部署和验证，要么对AAV血清型检测不灵敏⁶。因此，迫切需要一种耐用并且能够及时提供可靠结果的专属方法来鉴定和表征AAV衣壳蛋白。

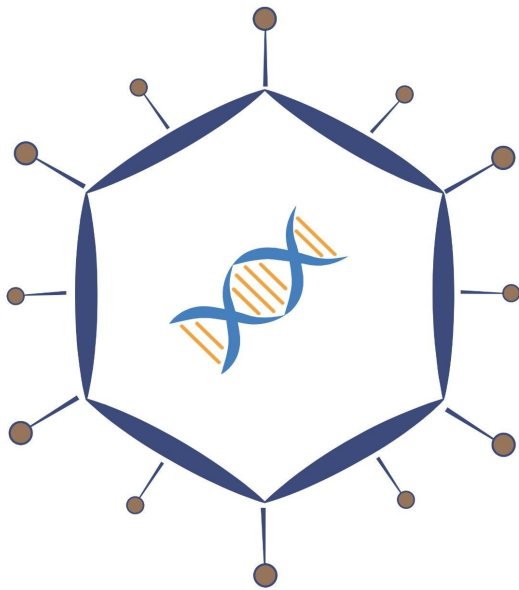


图1. AAV示意图，其结构由蛋白质衣壳和衣壳中包裹的基因组组成。

质谱分析法(MS)由于具有出色的灵敏度和专属性，已被广泛应用于蛋白质结构分析。但在过去，用户需要接受大量培训才能操作MS仪器以及开发方法，极大程度地限制了MS技术在生物制药行业的进一步推广。沃特世开发出一套稳定、易用且体积小巧的LC-MS平台 - BioAccord系统，为过去无法部署LC-MS技术的机构和操作人员提供生物治疗药物专用的MS分析方法。正如此前发布的出版物所示^{7,8,9}，通过结合ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统和ACQUITY RDa质谱检测器，BioAccord系统能够自动完成色谱分离和准确质量数测定并且重现性高。该系统在符合法规要求的waters_connect信息学平台下运行，是基因治疗产品开发和商业化团队获取rAAV衣壳结构、组成和鉴定信息的理想选择。

本应用纪要的目的如下：通过开发LC-光学检测方法和LC-MS方法分析AAV完整衣壳蛋白展示BioAccord系统的性能，并将上述方法应用于AAV8血清型分析，作为改善衣壳蛋白表征（包括鉴定、化学计量数和翻译后修饰）的案例研究。然后将开发的方法用于其它rAAV血清型，证明该方法在对AAV载体进行完整蛋白质分析方面的普适性。

实验

化学品和试剂

多血清型AAV样品由BioReliance（美国马里兰州罗克维尔）捐赠，或购自Vigene Bioscience（美国马里兰州罗克维尔），包括AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8和AAV9。乙酸购自Sigma-Aldrich（美国密苏里州圣路易斯）。LC-MS级水和乙腈购自Honeywell（美国北卡罗来纳州夏洛特），开封即用，无需其它处理。Waters IonHance二氟乙酸(DFA)（部件号：186009201）用作流动相添加剂。

样品前处理

用Milli-Q水将AAV样品稀释至最终物理滴度 1×10^{13} GC/mL；如果接收的样品浓度低于 1×10^{13} GC/mL，则按原样使用。按照先前的文献报道⁶，先使用浓度10% (v/v)的乙酸处理AAV样品15 min，然后在12,000 rpm下离心5 min。每次进样10 μ L（约1 μ g蛋白质）AAV样品进行LC-MS分析。除非另有说明，否则一般使用1 μ L（约0.1 μ g蛋白质）AAV样品进行LC-荧光(FLR)分析。

系统设置

分析条件

分析系统：	BioAccord，结合ACQUITY UPLC I-Class PLUS、ACQUITY UPLC FLR检测器、ACQUITY RDa MS检测器
LC色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH C ₄ , 1.7 μ m, 300 \AA , 2.1 \times 100 mm蛋白分析专用柱（部件号：186004496）、ACQUITY UPLC BEH C ₈ , 1.7 μ m, 130 \AA , 2.1 \times 100 mm（部件号

: 186002878) 、ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 1.7 μm, 300 Å, 2.1 × 100 mm肽分析专用柱 (部件号 : 186003686)

柱温: 80 °C

样品瓶: 采用MaxPeak HPS技术的QuanRecovery 12 × 32 mm螺纹口样品瓶, 300 μL (部件号 : 186009186)

流动相A: 含0.1% DFA的LC-MS级水溶液

流动相B: 含0.1% DFA的LC-MS级乙腈溶液

梯度表:

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B
Initial	0.200	80.0	20.0
1.00	0.200	68.0	32.0
16.00	0.200	64.0	36.0
20.00	0.200	20.0	80.0
21.50	0.200	20.0	80.0
22.00	0.200	80.0	20.0
30.00	0.200	80.0	20.0

ACQUITY UPLC FLR检测器设置

λ_{激发}: 280 nm

λ_{发射}: 350 nm

采集速率： 2 Hz

ACQUITY RDa质谱检测器设置

质量范围： 400-7000 *m/z*

模式： ESI+

采集速率： 2 Hz

锥孔电压： 65 V（全扫描）

脱溶剂气温度： 550 °C

毛细管电压： 1.5 kV

时时校正标准液： 亮氨酸脑啡肽，50 fmol/ μ L，溶于含0.1%甲酸的50/50水/乙腈中

信息学软件： waters_connect平台和UNIFI v1.9.9完整蛋白质质量数工作流程

结果与讨论

RPLC-MS方法优化

AAV衣壳由3种病毒蛋白（VP1、VP2和VP3）组成，比例约为1:1:10，质量范围介于50~85 kDa之间。由于样品量有限并且蛋白质的相对丰度存在差异，因此传统LC-MS方法难以表征AAV衣壳蛋白⁶。使用甲酸作为流动相改性剂对AAV8蛋白进行反相LC-MS分析时，所有VP蛋白在同一个TIC峰中发生共流出（图2A）。对累加质谱图进行去卷积处理后未得到VP1和VP2的质量数（图2A插图），原因是共流出时丰度更高的VP3离子产生了离子抑制效应。为

改善VP蛋白的分离效果，本研究采用ACQUITY UPLC BEH C₈色谱柱并以二氟乙酸作为流动相添加剂开发了一种新的RPLC-MS方法。相较于甲酸等传统流动相改性剂，各衣壳蛋白的色谱分离度有所提升，同时保持出色的MS灵敏度（图2B）¹⁰。之前共流出的VP1和VP2现可与VP3分离，并且在12.2 min处观察到第三个附加峰。根据完整蛋白质量数结果，判定该附加峰属于VP3蛋白的碎片（标记为“VP3片段”）。为进一步优化VP蛋白的分离效果，本研究评估了采用其它键合相（例如C₄和C₁₈键合配体）的BEH色谱柱。如图2C所示，使用C₄色谱柱时，VP1和VP2得到了进一步分离，这得益于C₄键合相所带来的选择性提升。除了表面填料的选择性，填料颗粒的孔径也有助于提升分离性能。与装填130 Å孔径颗粒的ACQUITY UPLC BEH C₈色谱柱相比，使用孔径更大的(300 Å) C₄色谱柱时峰宽更窄（图2C），MS响应得到进一步提升。

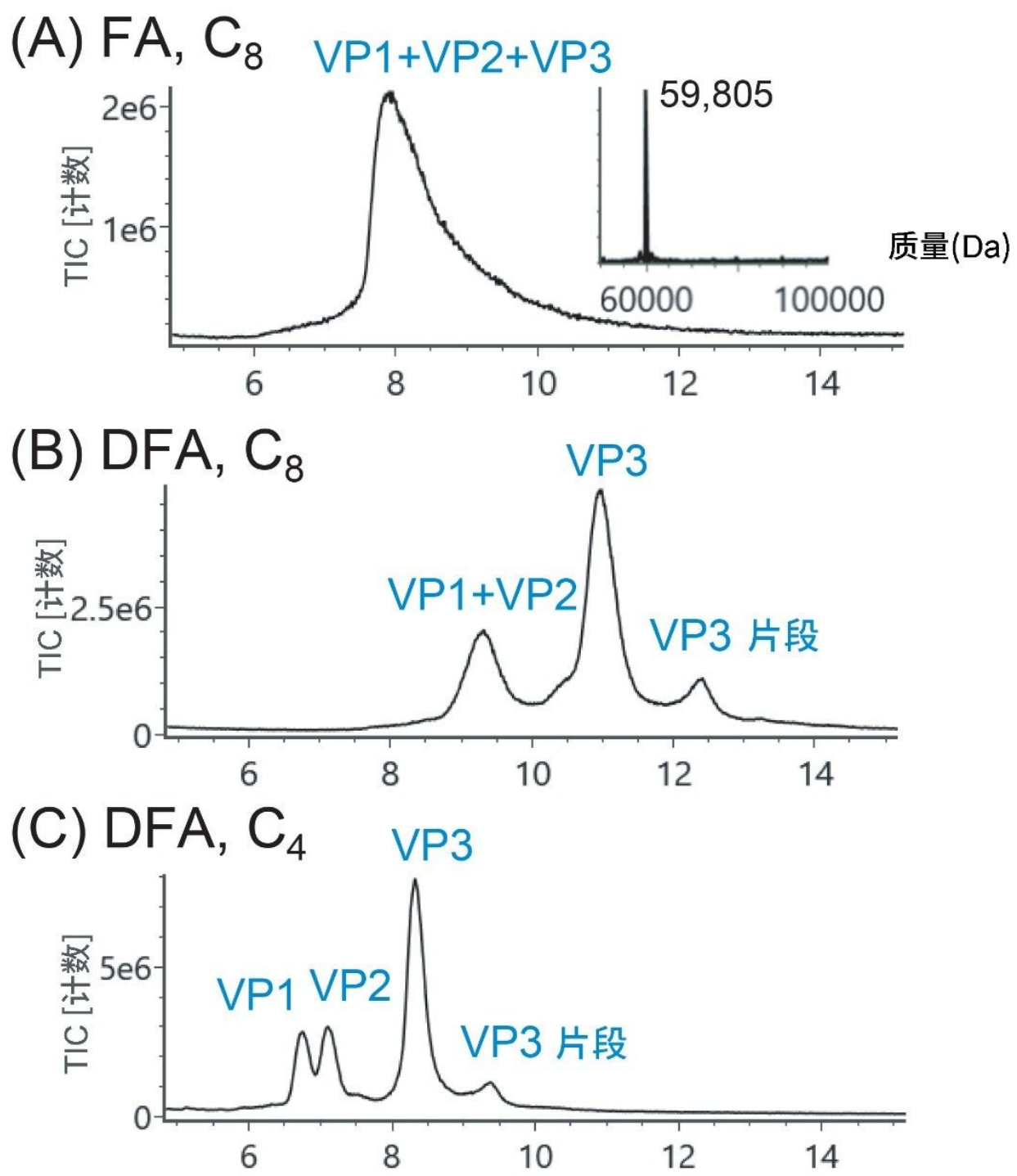


图2. AAV8衣壳蛋白分析方法开发(A) 使用ACQUITY UPLC BEH C₈色谱柱并以甲酸作为流动相改性剂得到的分离结

果；(B) 使用相同的ACQUITY UPLC BEH C₈色谱柱，以DFA作为流动相改性剂得到的分离结果；(C) 使用ACQUITY UPLC BEH C₄色谱柱并以DFA作为流动相改性剂，分离度有所提升。梯度：(A) 流动相A在32 min内从70%降至62%；(B) 流动相A在16 min内从67%降至63%；(C) 流动相A在16 min内从68%降至64%。流速：0.2 mL/min。

优化流动相和色谱柱后，色谱分离度明显提升，有利于对各VP蛋白进行详细的MS分析（图3A）。上样0.5 μg AAV8时，测得了全部衣壳蛋白及其变体的MS数据（图3B-E）。6.74 min、7.10 min和8.32 min处洗脱峰的去卷积质量数实测值分别为81,668 Da、66,518 Da和59,805 Da。如表1所示，上述蛋白质的实测质量数与VP1、VP2和VP3的理论质量数一致⁶，证明所开发的方法适用于病毒蛋白质量数测定。此外，测定变体的准确质量数有助于对VP上潜在的翻译后修饰（PTM，包括乙酰化和磷酸化）进行归属，同时也能够证明VP1和VP3上去除了N-端甲硫氨酸。结果表明，9.38 min处后流出峰的质量数为50,592 Da，与VP3上不稳定的Asp659-Pro660键水解后所产生碎片的MW匹配¹¹。上述结果共同证明了该方法在AAV相关产品的开发性表征方面的能力。

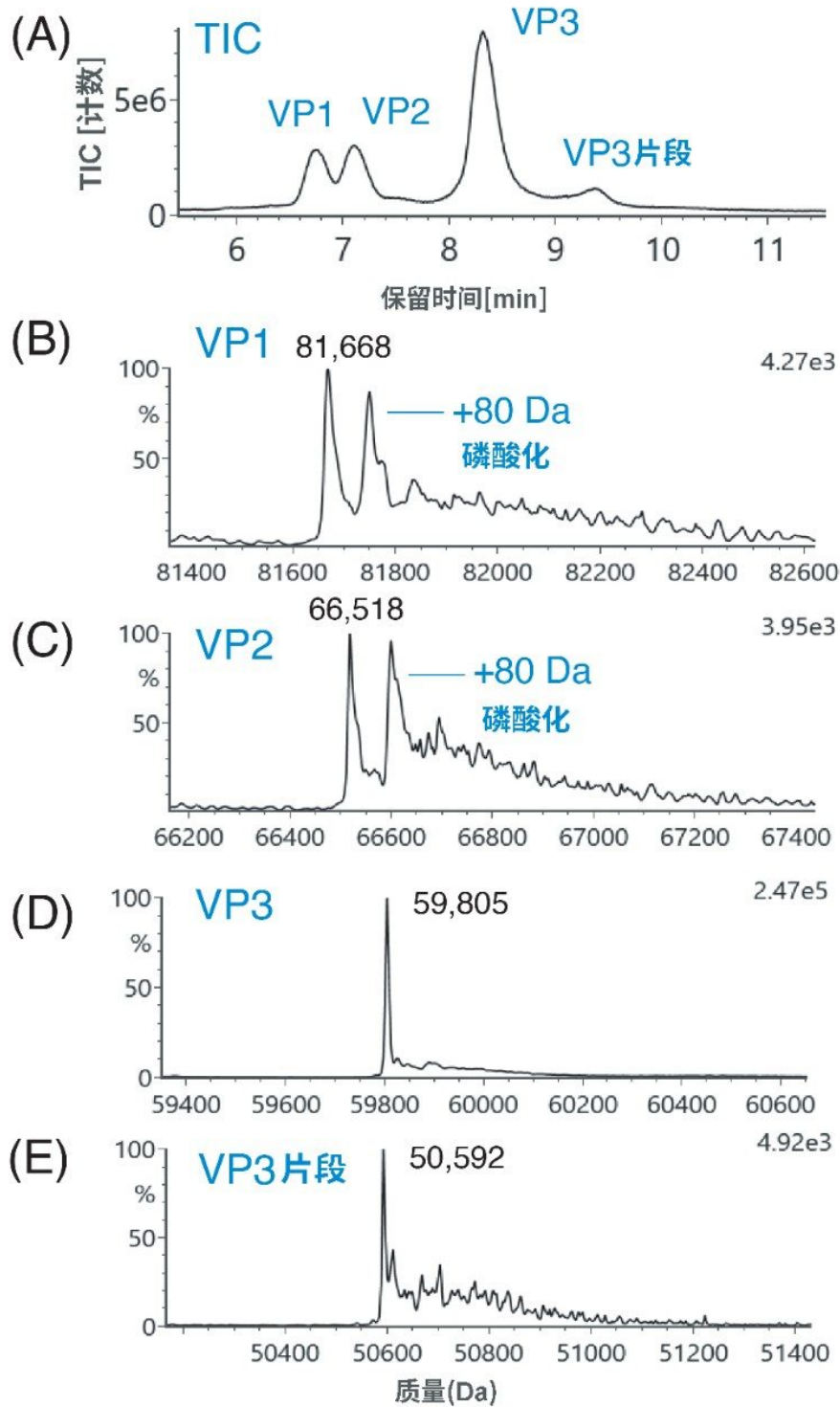


图3. 优化条件下AAV衣壳蛋白的RPLC-MS分析结果，包括(A) TIC色谱图以及(B) VP1、(C) VP2、(D) VP3和(E) VP3

变体（Asp-Pro键断裂产生，标记为“VP3片段”）的去卷积质谱图。VP1和VP2中检出了磷酸化形式。色谱柱：ACQUITY BEH C₄, 300 Å, 2.1 × 100 mm, 1.7 μm。

峰	初步鉴定结果	AA序列	实测质量数(Da)	理论质量数(Da)
1	VP1	2(Ac)-738	81,668	81,667
2	VP2	139-738	66,518	66,519
3	VP3	205(Ac)-738	59,805	59,805
4	VP3片段	205(Ac)-659	50,592	50,593

表1. 根据图3A中分离峰的理论平均质量数确定的AAV8衣壳蛋白归属结果

VP1:VP2:VP3的理论比率为1:1:10，但有报道指出，生产过程会影响VP蛋白的相对丰度¹²。VP蛋白的化学计量比会影响载体有效性¹³，因此必须开发一种可靠的常规分析方法，在AAV相关药物的生产过程中测定相应比率。本研究开发的RPLC方法实现了分离度提升，从而可利用光学检测信号（例如UV或荧光(FLR)）直接测定各VP的丰度并根据积分峰面积计算VP1:VP2:VP3比率。

图4展示了各分离色谱峰的相对丰度计算结果。选择蛋白质内源性荧光响应（λ_{激发}：280 nm，λ_{发射}：350 nm）作为检测信号可以提升方法的灵敏度。采用FLR检测时（图4B），VP3的信噪比相较于UV检测（图4A）提升了近50倍。运用荧光检测有助于AAV衣壳蛋白分析实现高灵敏度(50 ng)和可靠的峰积分。因此，本研究开发的LC-FLR方法可用于低浓度rAAV样品，以检查样品纯度或用作产品放行的血清型鉴定试验。

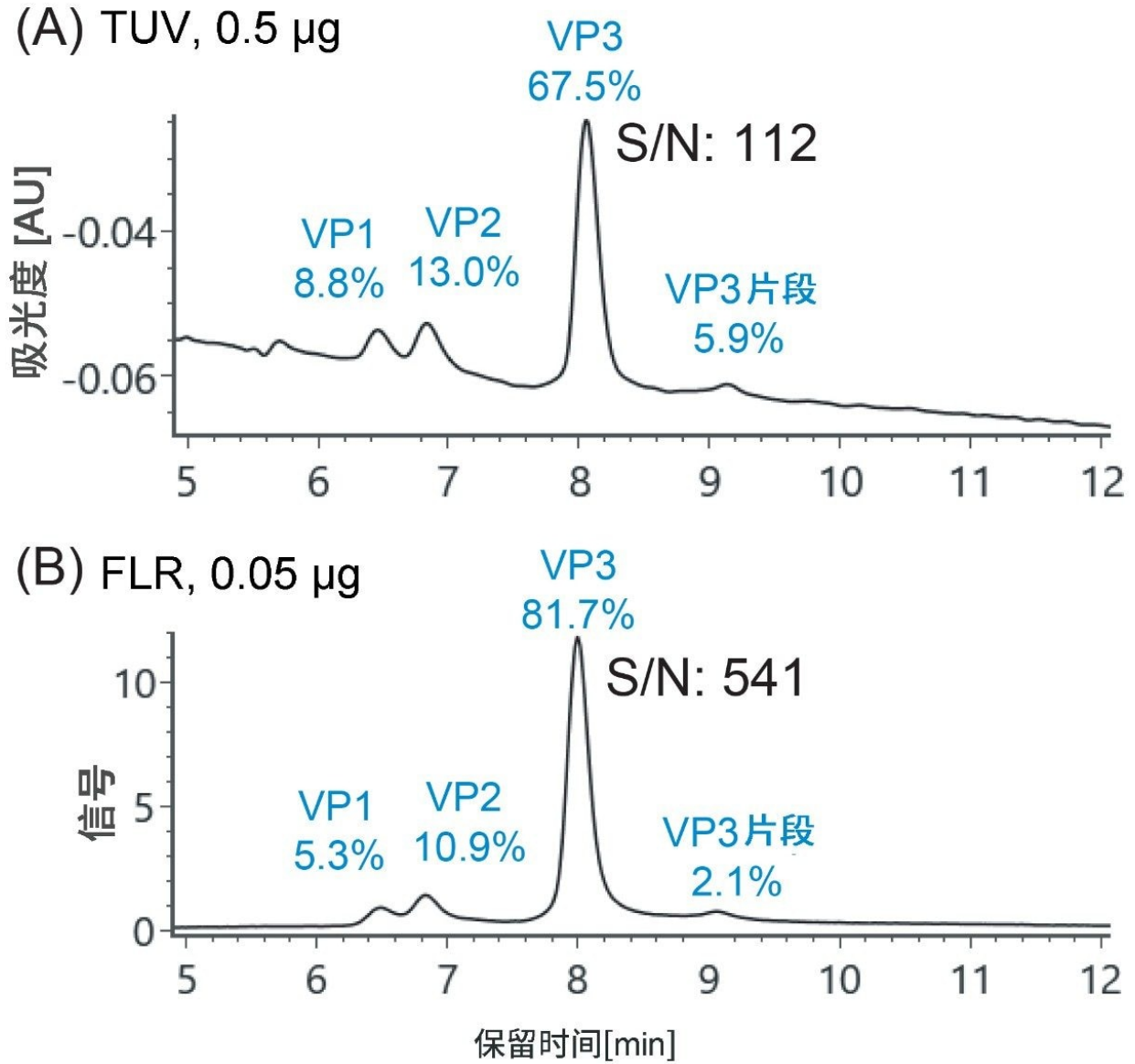


图4. 采用(A) UV和(B) 荧光(FLR)两种光学检测方法测定VP蛋白的相对定量结果。峰注释为所检出成分的归属判定结果以及相对丰度计算结果。采用FLR检测时，VP3的S/N几乎是采用UV检测的5倍，由于UV检测的载样量是FLR的10倍，所以FLR检测使灵敏度得到近50倍的提升。

将开发的方法应用于其它rAAV血清型

为评估所开发方法在其它rAAV血清型的完整蛋白质量数和化学计量比测定方面是否具有更广泛的适用性，本研究

分析了六种来自不同供应商的AAV血清型（1、2、5、6、8和9）。图5表明，上述AAV血清型中多数（AAV1、AAV6、AAV8和AAV9）具有相当的色谱图。此外，还观察到VP3峰出现前延肩峰，且质量数与VP3相同（峰注释为*），可能是VP3的结构异构体。在所有AAV血清型中均观察到VP1和VP2发生磷酸化，VP1和VP3发生乙酰化。表2列出了VP蛋白的实测质量数和理论质量数，以及通过匹配上述值得出的归属结果。这些数据表明开发的方法在对不同AAV血清型的VP进行有效分离和质量数测定方面拥有更加广泛的适用性。

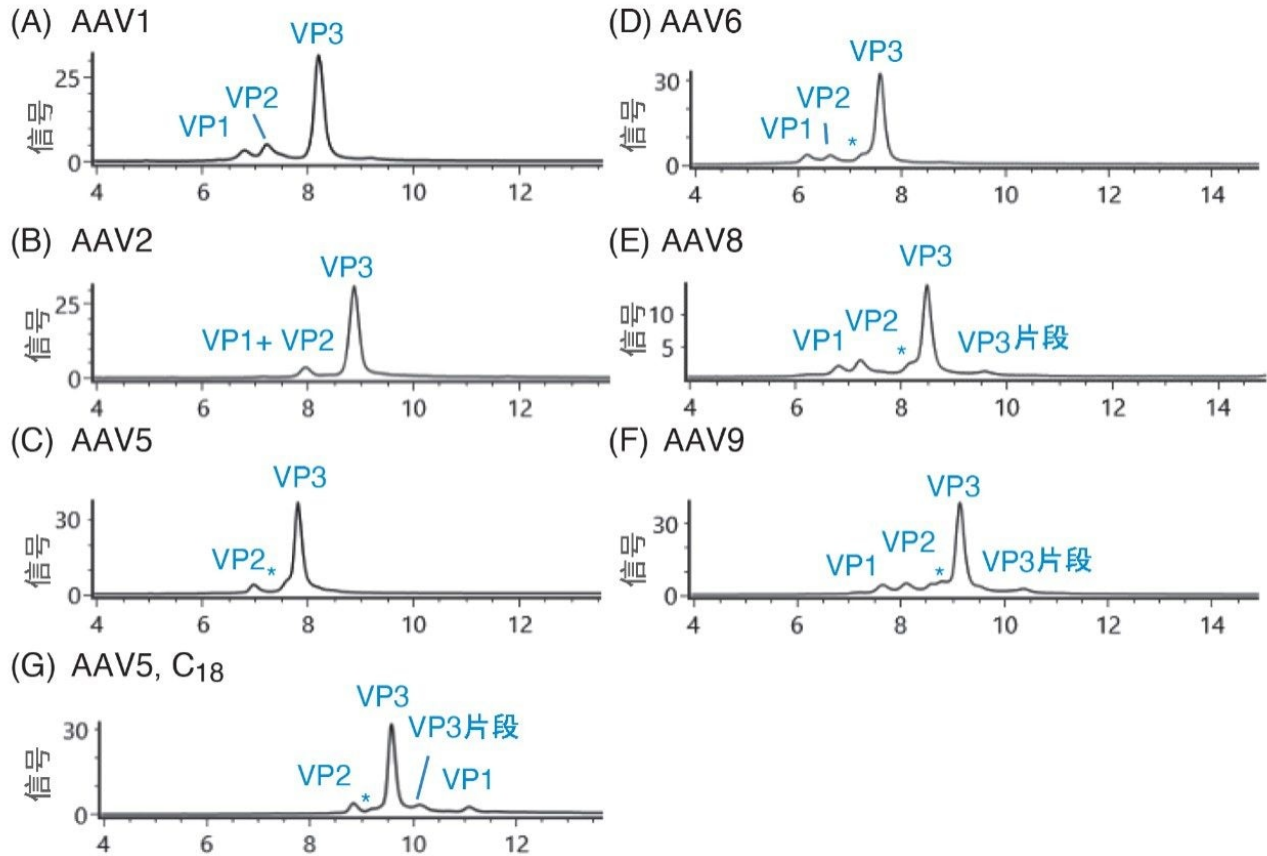


图5. 6种AAV血清型的分离结果，包括(A) TIC色谱图以及(B) VP1、(C) VP2、(D) VP3和(E) VP3片段的去卷积质谱图。各AAV样品中用*标注的峰是观察到的VP3变体，且质量数与之相同。

血清型	VP1			VP2			VP3		
	实测质量数(Da)	AA序列	理论质量数(Da)	实测质量数(Da)	AA序列	理论质量数(Da)	实测质量数(Da)	AA序列	理论质量数(Da)
AAV1	81,289	2(Ac)-736	81,286	66,096	139-736	66,093	59,517	204(Ac)-736	59,517
AAV2	81,854	2(Ac)-735	81,856	66,486	139-735	66,488	59,974	204(Ac)-735	59,974
AAV5	80,336	2(Ac)-724	80,336	65,283	139-724	65,283	59,463	199(Ac)-724	59,463
AAV6	81,324	2(Ac)-736	81,322	66,094	139-736	66,096	59,518	204(Ac)-736	59,519
AAV8	81,668	2(Ac)-738	81,667	66,519	139-738	66,519	59,805	205(Ac)-738	59,805
AAV9	81,292	2(Ac)-736	81,291	66,210	139-736	66,210	59,732	204(Ac)-736	59,733

表2. 根据理论平均质量数和标注的修饰对6种AAV血清型的衣壳蛋白进行归属

虽然本研究开发的方法能够有效分离多数AAV血清型，但AAV2和AAV5样品的分离色谱图出现差异。观察到AAV2的VP1和VP2发生了共流出（图5B），此时可能需要采用更加平缓的梯度才能使色谱峰完全分离。血清型AAV 5（图5C）的VP色谱图与AAV2类似，但是6.95 min处色谱峰的去卷积质谱图中未显示VP1。该异常现象提示我们需要尝试其它实验条件以改善分析效果。随后评估了其它色谱柱（ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱）是否能带来更加理想的结果。图5H展示了使用ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱在经过优化的梯度条件下对AAV5样品进行分析所得到的总离子流色谱图。使用ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱后，VP1蛋白的回收率明显提升，VP1现在于VP3后流出（图5H）。流出顺序的这一变化表明AAV5中VP1的疏水性较高，这一点也通过其氨基酸组成中疏水残基（例如脯氨酸和苯丙氨酸）数量较多得到证实。综上所述，上述结果证明所开发的LC-FLR/MS方法能够对基因治疗方法开发过程中多种常见AAV血清型的rAAV衣壳蛋白进行有效测定。

结论

本研究使用DFA作为流动相改性剂开发了一种优化的RPLC方法，旨在改善AAV衣壳蛋白的分离效果，同时保留出色的质谱分析灵敏度。将流动相与适合的色谱柱填料相结合，使色谱分离有助于准确测定各种VP异构体及其变体的完整蛋白质量数。本研究开发的方法还能够通过亚微克水平的LC-光学检测响应定量测定VP的化学计量比。总而言之，BioAccord系统所采集的结果表明该平台能够在基因治疗产品的整个开发和商业化过程中提供结构信息，进而深入了解该产品。

参考文献

1. Finer, M.; Glorioso, J. A Brief Account of Viral Vectors and Their Promise for Gene Therapy. *Gene Ther*, 2017; 24: 1–2.
2. Lisowski, L.; Tay, S.S.; Alexander, I.E. Adeno- Associated Virus Serotypes for Gene Therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*, 2015, 24: 59–67.
3. Van Vliet, K.; Mohiuddin, Y.; McClung, S. et al. Adeno-Associated Virus Capsid Serotype Identification: Analytical Methods Development and Application. *J Virol Methods*, 2009, 159: 167–177.
4. Girod, A.; Wobus, C.E.; Zadori, Z. et al. The VP1 Capsid Protein of Adeno-Associated Virus Type 2 is Carrying a Phospholipase A2 Domain Required for Virus Infectivity. *J Gen Virol*, 2002, 83: 973–978.
5. Popa-Wagner, R.; Porwal, M.; Kann, M. et al. Impact of VP1-Specific Protein Sequence Motifs on Adeno Associated Virus Type 2 Intracellular Trafficking and Nuclear Entry. *J Virol*, 2012, 86: 9163–9174.
6. Jin, X.; Liu, L.; Nass, S.; O'Riordan, C.; Pastor, E.; Zhang, K. Direct Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis for Complete Characterization of Recombinant Adeno-Associated Virus Capsid Proteins Human Gene Therapy Methods. *Hum Gene Ther Methods*, 2017, 255–267.
7. Shion, H. et al. Enabling Routine and Reproducible Intact Mass Analysis When Data Integrity Matters. Waters Application Note, 720006472EN, 2019.
8. Ranbaduge, N. et al. Routine Peptide Mapping Analysis Using the BioAccord System. Waters Application Note, 720006466EN, 2019.
9. Zhang, X. et al. Released N-linked Glycan Analysis Using the BioAccord System. Waters Application Note, 720006474EN, 2019.
10. Kellett, J. et al. Application of Difluoroacetic Acid to Improve Optical and MS Performance in Peptide LC-UV/MS. Waters Application Note, 720006482EN, 2019.
11. Vlasak, J.; Ionescu, R. Fragmentation of Monoclonal Antibodies. *MAbs*, 2011; 3(3): 253–263.
12. Snijder, J.; van de Waterbeemd, M.; Damoc, E. et al. Defining the Stoichiometry and Cargo Load of Viral and Bacterial Nanoparticles by Orbitrap Mass Spectrometry. *J Am Chem Soc*, 2014, 136:

7295-7299.

13. Bosma, B.; Plessis, F.; Ehlert, E.; Nijmeijer, B.; Haan, M.; Petry, H.; Lubelski, J. Optimization of Viral Protein Ratios for Production of rAAV Serotype 5 in the Baculovirus System. *Gene Ther*, 2018, 25: 415-424.

特色产品

生物制药专用BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

720006869ZH, 2020年5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