

采用生物兼容性液相色谱分析腺相关病毒 1 和 6 血清型的完整衣壳/空衣壳比

采用配备 Agilent Bio SAX 强阴离子交换色谱柱的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱实现出色的线性和重现性

作者

Brian Liao
安捷伦科技有限公司

摘要

离子交换色谱法对于腺相关病毒 (AAV) 的纯化及其质量属性分析是一种非常有价值的工具。本研究展示了使用配备 Agilent Bio SAX 强阴离子交换色谱柱的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱测定 AAV-1 和 AAV-6 样品中的完整衣壳/空衣壳比。该方法展现出优异的线性和重现性，表明 1290 Infinity II 生物液相色谱系统是具有出众性能的先进行相色谱系统。

前言

在重组 AAVs 的生产过程中，相当比例的病毒衣壳不含遗传有效载荷，因此被称为“空”衣壳^[1]。空衣壳已被证明会降低 AAV 制剂的基因转导效力^[2]，因此监管机构认为这是一种工艺相关杂质，必须加以表征^[3]。

本研究采用配备 Agilent Bio SAX 色谱柱的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统测定纯化后的 AAV-1 和 AAV-6 样品中的完整衣壳/空衣壳比。1290 Infinity II 生物液相色谱系统具有生物兼容性流路。当该液相色谱与安捷伦非多孔聚苯乙烯二乙烯基苯 (PS-DVB) Bio SAX 强阴离子交换 PEEK 色谱柱配合使用时，可通过尽可能减少不必要的表面相互作用确保生物分子的完整性，使其成为大分子应用的理想选择。

实验部分

AAV 参比标准品购自 Vigene Biosciences，为富含完整衣壳和富含空衣壳的样品。除非另有说明，否则所有化学品均购自 Sigma-Aldrich。

仪器

本研究中使用了两款配置的 1290 Infinity II 生物液相色谱系统（图 1）。液相色谱配备四元全能泵或二元高速泵。全能泵可同时容纳 4 条溶剂管线，减少了方法开发期间必须配制的不同流动相的数量。高速泵可实现超高效混合和超低的延迟体积，提供出色的灵敏度和重现性。两种配置均可耐受高盐浓度的腐蚀，且可承受高

达 1300 bar 的高反压。使用在线 Agilent 1260 Infinity II 荧光检测器实现分析相对稀释的 AAV 样品所需的高灵敏度。



图 1. Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱

表 1. 流动相组成

	全能泵	高速泵
泵类型	四元泵	二元泵
流动相组成	A: 去离子水 B: 1 mol/L 四甲基氯化铵 C: 0.3 mol/L HCl D: 0.2 mol/L bis-tris 丙烷 A–D 含 2 mmol/L MgCl ₂	A: 70 mmol/L bis-tris 丙烷 (pH 9.0) B: 70 mmol/L bis-tris 丙烷 + 1 mol/L 四甲基氯化铵 (pH 9.0) A 和 B 含 2 mmol/L MgCl ₂

表 2. 全能泵梯度条件

时间	%A	%B	%C	%D	流速 (mL/min)
0	36.2	15	13.8	35	0.1
40	15.8	35	14.2	35	0.1
40.1	0.6	50	14.4	35	0.3
43	0.6	50	14.4	35	0.3

表 3. 高速泵梯度条件

时间	%A	%B	流速 (mL/min)
0	85	15	0.1
25	72.5	27.5	0.1
25.1	0	100	0.3
28	0	100	0.3

色谱

使用具有 PEEK 硬件的 Agilent Bio Sax NP5 色谱柱（2.1 × 50 mm, 5 μm, 部件号 5190-2472）分离完整衣壳和空 AAV 衣壳。使用了表 1 至表 3 所示的流动相和梯度条件进行盐梯度洗脱。

对于全能泵方法，使用安捷伦缓冲液顾问软件确定分析过程中达到 70 mmol/L bis-tris 丙烷 (pH 9.0) 所需的各流动相组分的百分比。分析前，将 AAV-1 和 AAV-6 标准品在 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 中进行稀释，分别单独作为富含空衣壳或富含完整衣壳的样品，或作为混合物。采用表 4 所示的积分设置，通过 Agilent OpenLab CDS 软件控制数据采集和分析。

表 4. Agilent OpenLab CDS 2.3 软件积分设置

参数	值
斜率灵敏度	0.02
峰宽	2
最小峰面积	0.05
最低峰高	0.05
肩峰模式	切向
切线撇去模式	直线
拖尾峰/撇去高度比	0.05
前伸峰/撇去高度比	0.05
撇去峰/谷比	20
基线校正模式	经典
峰谷比	500
空白扣除	是

结果与讨论

首先通过富含完整衣壳或富含空衣壳的样品进样相同数量的衣壳，评估 AAV-1 和 AAV-6 的相对响应因子。对于两种血清型，观察到完整衣壳比空衣壳更亮，且相对于空衣壳的表观响应比约为 1.2。该值与已报道的 AAV-6.2 响应比 1.3 高度一致^[4]。

如图 2 所示，使用全能泵分离混合样品中的完整衣壳和空衣壳，获得了可接受的分离度（AAV-1 的 $R = 1.1$ ，AAV-6 的 $R = 1.3$ ）。结果发现，样品回收率与流速呈负相关（数据未显示），与文献中报道的结果一致^[5]。因此，在分析梯度期间，该方法的流速保持在较低的 0.1 mL/min。

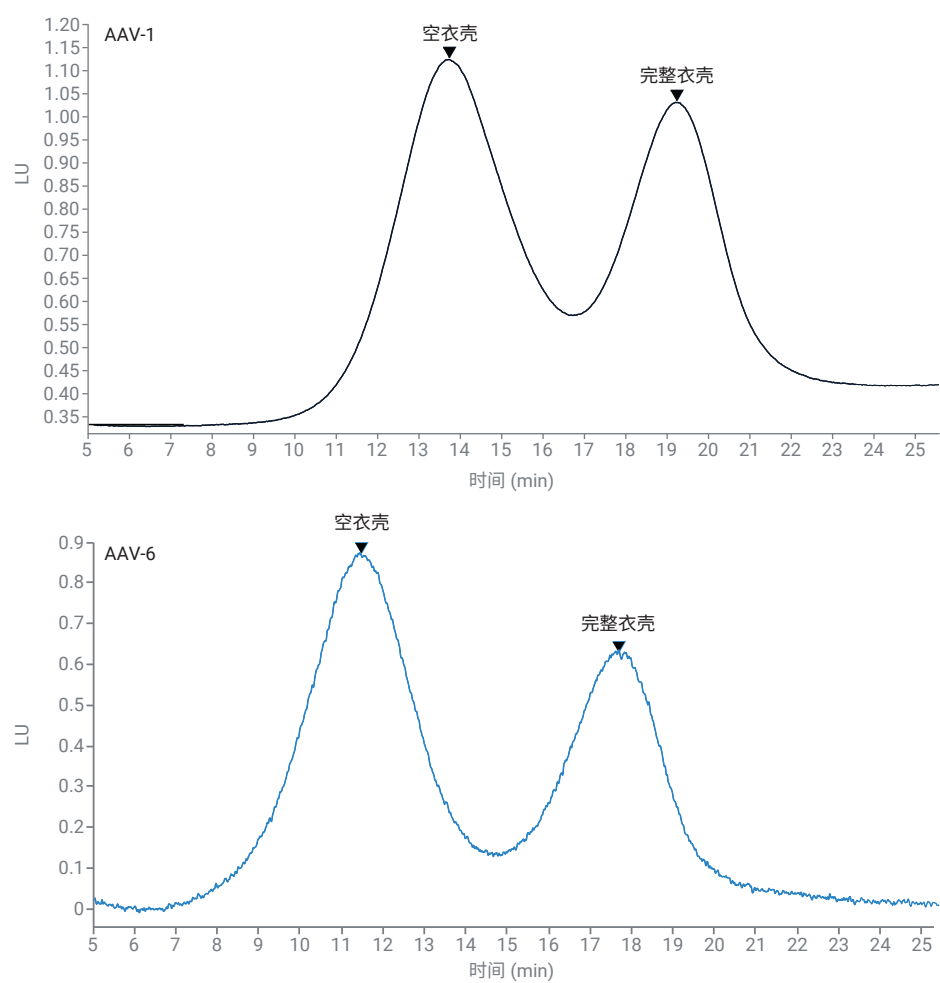


图 2. 使用安捷伦四元全能泵分离完整衣壳和空衣壳的混合物

将方法转移至配备二元高速泵的 1290 Infinity II 生物液相色谱。在 3 天内重复进样不同比例的完整衣壳和空衣壳混合物，以评估该实验的准确性、线性和重现性。如图 3 的叠加色谱图所示，在较宽的衣壳比范围内，完整衣壳和空衣壳峰的保留时间和峰形具有重现性。

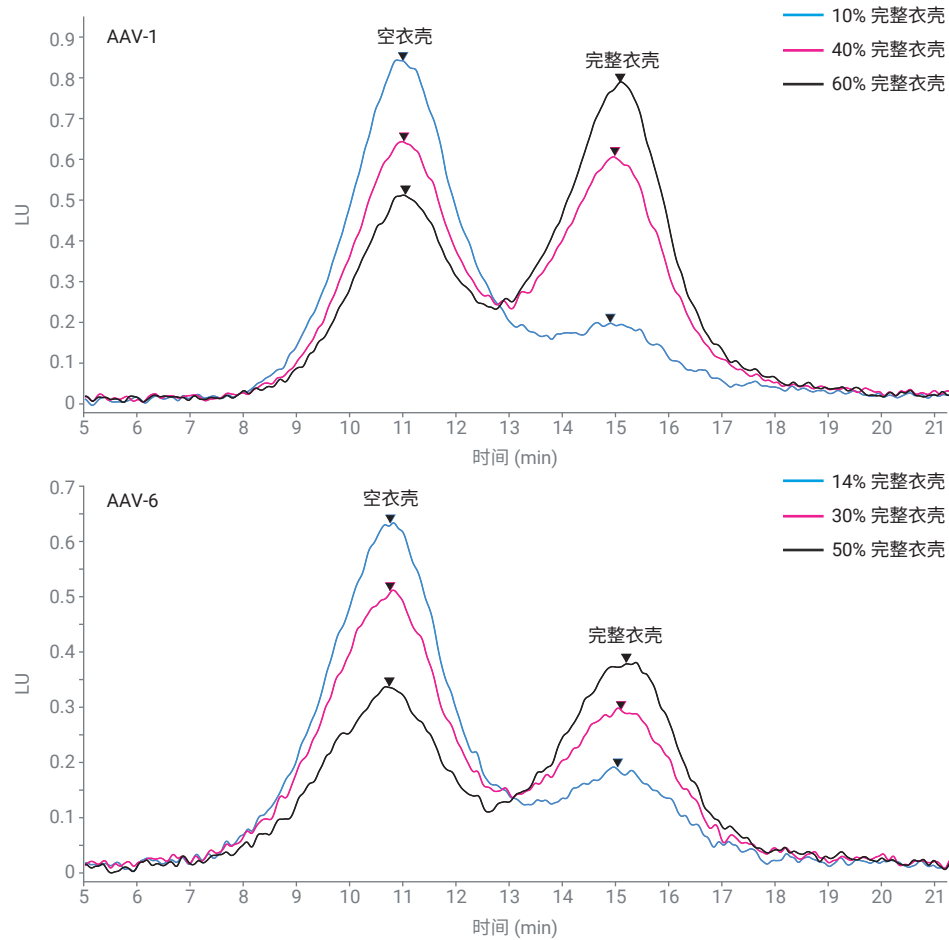


图 3. 使用安捷伦二元高速泵分离具有不同完整衣壳/空衣壳比的 AAV-1 和 AAV-6 样品

如之前的文献所述^[6]，与相对峰面积相比，相对峰高可提供更准确、更可靠的完整衣壳/空衣壳比估计值。这是因为峰存在一定程度的拖尾，未实现完全分离。图 4 显示了用相对峰高或峰面积作为估计量，AAV-1 和 AAV-6 的线性性和准确性差异。相对峰高的线性趋势线更接近原点，R² 值更高。

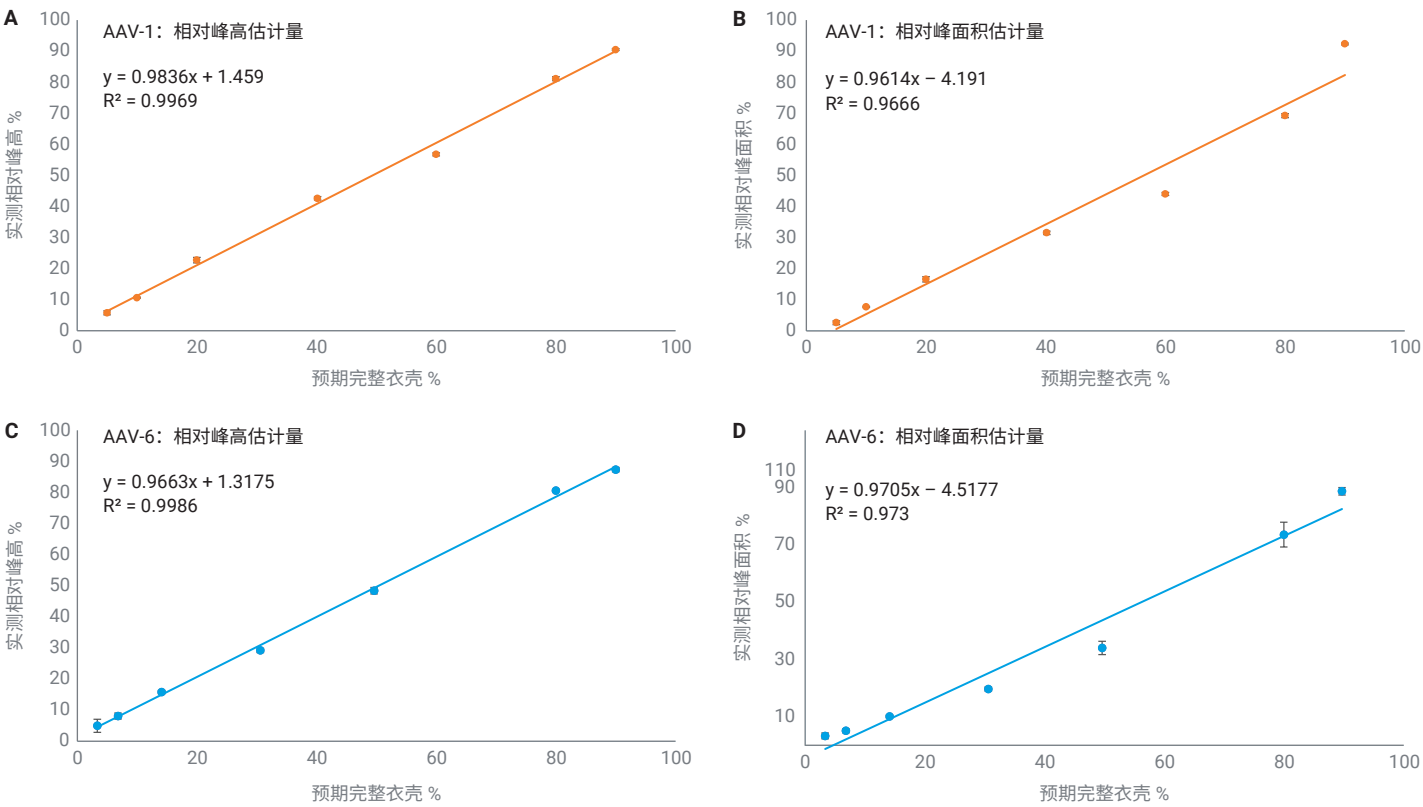


图 4. 相对峰高和相对峰面积作为完整/空衣壳比的估计量的比较。相对峰高（A 和 C）的准确性和线性优于相对峰面积（B 和 D）

图 5 显示了方法的日间重现性。对于约含 5%–90% 完整衣壳的样品，AAV-1 和 AAV-6 完整/空衣壳比的相对标准偏差 (RSD) 分别为 $\leq 10.1\%$ 和 $\leq 11.2\%$ 。结果表明，该方法具有较宽的线性范围。假设可接受的 RSD 为低于 15%，则两种血清型的定量下限均为 $\leq 5\%$ 完整衣壳。完整和空衣壳峰的保留时间也具有高度重现性，对于所有测试样品，两种血清型的 RSD 均 $\leq 2.4\%$ 。

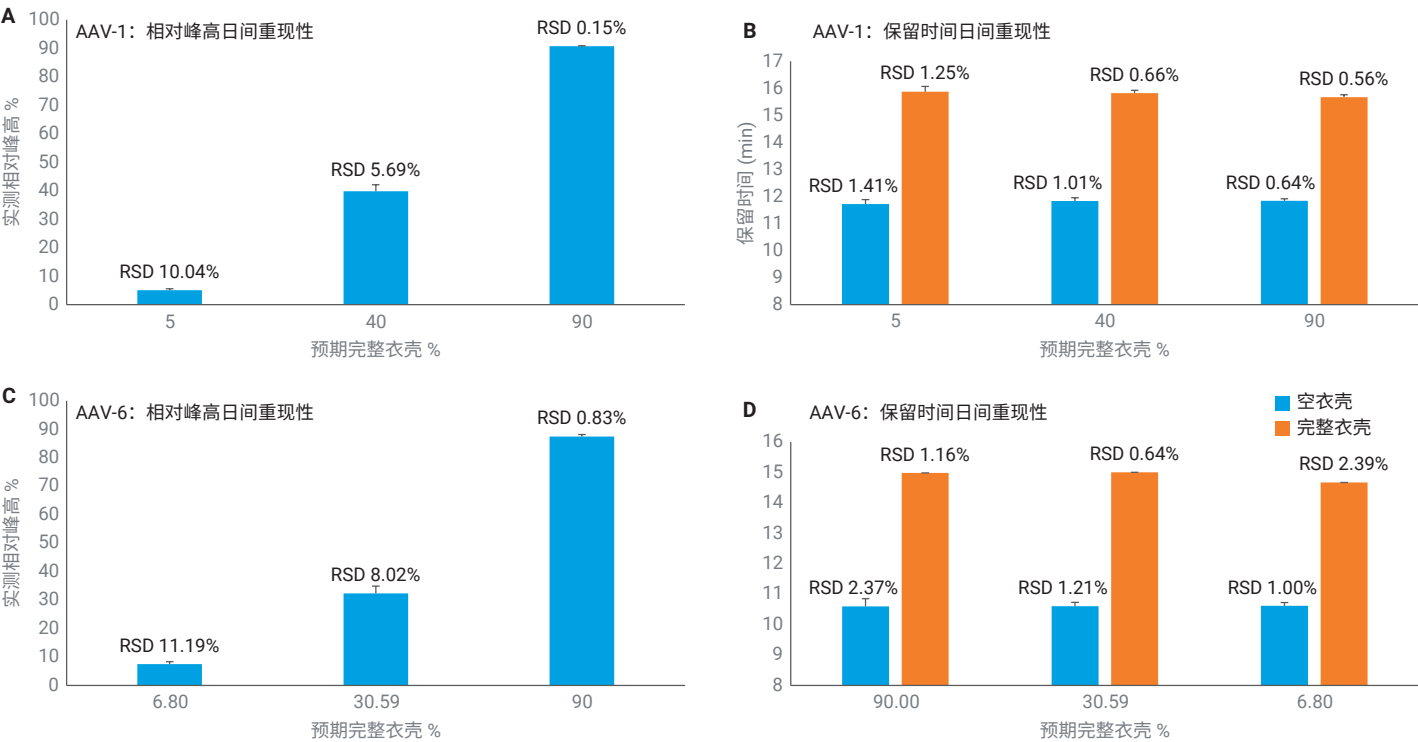


图 5. 相对峰高估计量和峰保留时间的日间重现性

结论

本研究表明, 使用配备 Agilent Bio SAX 强阴离子交换色谱柱的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱可准确且可重现地测定 AAV-1 和 AAV-6 血清型的完整衣壳/空衣壳比。

参考文献

1. Clark, K. R. *et al.* Highly Purified Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors are Biologically Active and Free of Detectable Helper and Wild-Type Viruses. *Hum. Gene Ther.* **1999**, *10*, 1031-1039
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
3. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) - Guidance for Industry. *US Food and Drug Administration* **2020**
4. Wang, C. *et al.* Developing an Anion Exchange Chromatography Assay for Determining Empty and Full Capsid Contents in AAV6.2. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **2019**, *15*, 257-263
5. Trilisky, E. I.; Lenhoff, A. M. Flow-Dependent Entrapment of Large Bioparticles in Porous Process Media. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *104*, 127-133
6. McCoy, R. W. *et al.* Results of a Cooperative Study Comparing the Precision of Peak Height and Area Measurements in Liquid Chromatography*. *J. Chromatogr. Sci.* **1984**, *22*, 425-431

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

DE10415602

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2022
2022年2月16日, 中国出版
5994-4589ZHCN