

利用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 表征病毒载体颗粒

作者

Wendi A. Hale,
Christopher M. Colangelo
安捷伦科技有限公司
Lexington, MA, USA

Roy Hegedus,
Norman Garceau
Lake Pharma
Worcester, MA, USA

摘要

本应用简报介绍了完整腺相关病毒 (AAVs) 关键质量属性 (CQAs) 的表征和测定以及衣壳蛋白的翻译后修饰 (PTM) 鉴定工作流程。该工作流程包括 Agilent 1290 Infinity II LC 与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的联用系统，以及用于数据分析的 Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 软件。

前言

肽 AAVs 是基因治疗的主要病毒载体，已成功应用于治疗遗传性视网膜疾病和脊髓性肌肉萎缩症。AAV 由一个二十面体蛋白质外壳和一个大约 4.7 kb 的单链基因组组成。完整 AAVs 作为保护和递送寡核苷酸治疗药物的载体。已知有 13 种血清型可以转导不同的细胞类型，提高了治疗的选择性。随着对 AAVs 作为治疗药物递送平台的探索不断深入，确保维持治疗产品的所有 CQAs 至关重要。表征病毒衣壳蛋白面临着几个挑战。蛋白质外壳由三种衣壳蛋白 VP1、VP2 和 VP3 组成，它们以 1:1:10 的比例组成一个 3.9 兆道尔顿的结构，其中每个病毒颗粒有 60 个衣壳。除了 VP1 和 VP2 的摩尔比较低外，这三种蛋白质在 C 端都有重叠序列。传统上，使用 SDS-PAGE 确定衣壳蛋白的分子量，然而，这种技术提供的是分子量近似值，可能无法区分不同的血清型。质谱法 (MS) 在克服这些挑战并确定衣壳蛋白的 CQAs 方面非常有前景。本应用简报介绍了完整分析和肽谱分析的工作流程，包括病毒衣壳蛋白的 PTM 鉴定。工作流程中使用的工具包括 1290 Infinity II LC 与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的联用系统，并使用 MassHunter BioConfirm 10.0 软件进行数据分析。

实验部分

仪器

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统包括：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)，配备用于完整分析的 20 μ L 定量环以及用于肽谱分析的 40 μ L 定量环
- Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

材料

AAV8 由 Lake Pharma (Worcester, MA, USA) 生产。分子量截留过滤器和三(2-羧乙基)膦 (TCEP) 购自 Millipore Sigma。胰蛋白酶和 rAsp-N 购自 Promega。

样品前处理

对于完整分析，在 10000 g 下使用 10 kDa 分子量过滤器对 AAVs 进行了 3 次缓冲液交换。缓冲液包含 5 mmol/L TCEP、80% H₂O 以及含 0.1% 甲酸 (v/v) 的 20% 乙腈溶液。样品在采集后经室温孵育后进样。对于肽谱分析，对 AAVs 进行变性、还原、烷基化和酶解处理。本实验使用的酶为胰蛋白酶和 rAsp-N。

LC/MS 分析

在 1290 Infinity II 液相色谱仪和配备双安捷伦喷射流离子源的 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的联用系统上进行 LC/MS 分析。利用具有大分子 SWARM 自动调谐功能的 Agilent MassHunter 采集 (B.09.00) 工作站软件进行完整分析。仪器经过进一步校准并在标准质量模式下运行。在肽谱分析工作流程中使用迭代 MS/MS 功能。

数据处理

使用 MassHunter BioConfirm 10.0 软件处理所有 MS 数据。

表 1. 用于完整分析的液相色谱参数

参数	值
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD 300-Diphenyl, 2.1 × 150 mm, 1.8 µm
流动相 A	0.1% 甲酸水溶液
流动相 B	含 0.1% 甲酸的乙腈
流速	0.4 mL/min
进样量	20 µL
梯度	0–30 min: 30%–40% B; 30–38 min: 40%–90% B; 38–39 min: 90% B; 39–40 min: 90%–30% B; 40–45 min: 30% B
后运行时间	0 分钟
柱温	60 °C

表 2. 用于完整分析的 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 参数

参数	值
离子源	双安捷伦喷射流
气体温度	325 °C
气体流速	13 L/min
雾化器	35 psig
鞘气温度	375 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	5000 V
喷嘴电压	500 V
碎裂电压	180 V
采集速率	1 质谱图/秒
参比质量	922.0098

表 3. 用于肽谱分析的液相色谱参数

参数	值
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm
流动相 A	0.1% 甲酸水溶液
流动相 B	含 0.1% 甲酸的乙腈
流速	0.4 mL/min
进样量	40 µL
梯度	0–3 min: 3% B; 3–50 min: 3%–35% B; 50–60 min: 35%–97% B; 60–62 min: 97% B; 62–62.5 min: 97%–3% B; 62.5–65 min: 3% B
后运行时间	5 分钟
柱温	60 °C

表 4. 用于肽谱分析的 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 参数

参数	值
离子源	双安捷伦喷射流
气体温度	325 °C
气体流速	13 L/min
雾化器	35 psig
鞘气温度	275 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	170 V
采集速率	MS 和 MS/MS 分别为 5/3 幅谱图/秒
参比质量	121.0509、922.0098

结果与讨论

使用 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 进行完整分析

虽然 SDS-PAGE 是确认 AAV 衣壳蛋白分子量的一种快速简单方法，但它的特异性不足以分离不同的蛋白质形式，例如乙酰化或磷酸化与未修饰形式。高分辨 Q-TOF MS 则可以提供足够高的灵敏度，可区分不同的 PTMs 并确定完整蛋白质的准确分子量。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的大分子 SWARM 自动调谐功能可进一步助力实现上述目标，其通过提高衣壳蛋白在整个质谱仪中的传输效率，为其提供了出色的灵敏度。此外，超低 TOF 真空 (e^{-8} torr) 通过延长蛋白质分子的平均自由路径，提高了质谱图的清晰度。

LC/MS 分析之前的样品前处理对于获得高质量质谱至关重要，我们在 AAVs 方面的研究进一步突出了这一点。图 1 显示了在进行和未进行样品前处理的条件下衣壳蛋白的总离子流色谱图 (TICs) 和原始质谱图。原始溶液的缓冲液将污染物引入质谱仪。此外，缓冲液交换后衣壳蛋白之间的分离得到改善。原始数据显示，蛋白质的丰度增至原来的 1.5 倍，并且谱图更加清晰。此处未显示解卷积数据，但由于没有钠和钾加合物，谱图更加清晰，使数据的解析更加简单。此外，这将提高工作流程的稳定性，从而延长仪器维护的间隔时间。

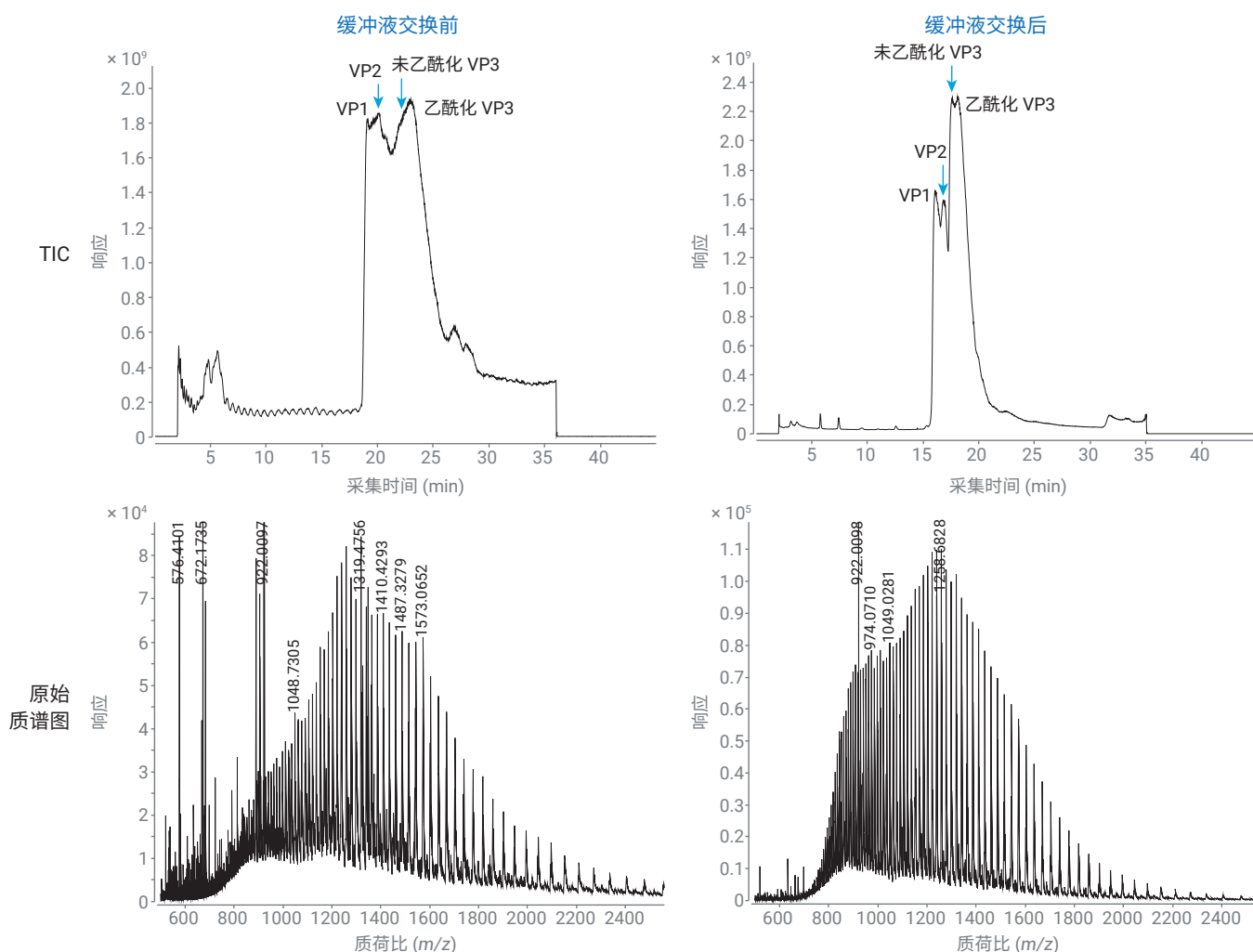


图 1. 在进行和未进行样品前处理的条件下，AAV 衣壳蛋白的 TIC 和 VP1 的原始质谱图

图 2 所示为 VP1 的原始谱图和解卷积谱图。通过这一工作流程，我们能够以低于 10 ppm 的误差检测 VP1 上的三个磷酸化位点。精确质量数据证实，VP1 的 N 端氨基酸残基缺失，并且新的 N 端被乙酰化。目前关于 AAV 衣壳蛋白 PTM 分析（包括 VP1 的磷酸化）的报道很少。VP2 与 VP1 实现了色谱分离。质谱法可以按质量数分离这些蛋白质，而色谱分离则可以减少这两种低丰度蛋白质的离子抑制。精确质量数据证实，VP2 上至少有两个磷酸化位点，图 3 中可能有第三个位点。

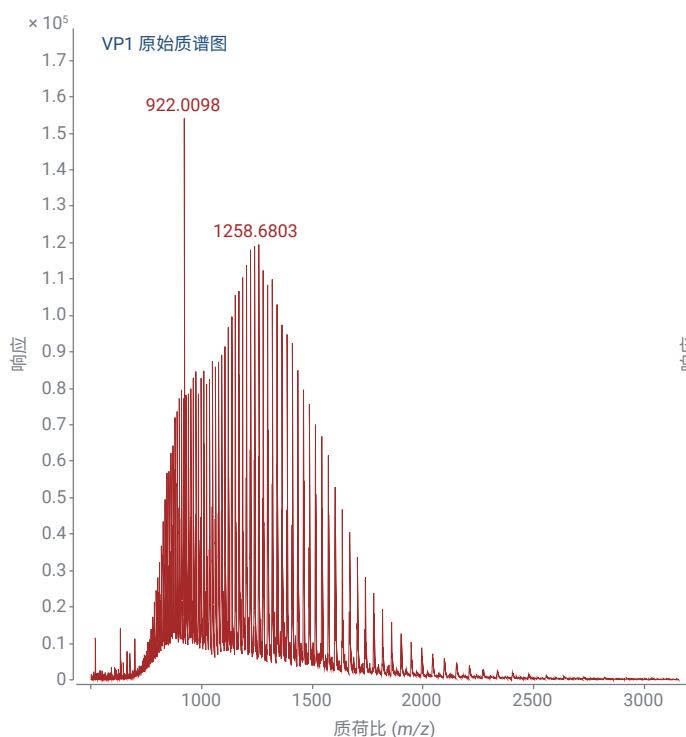
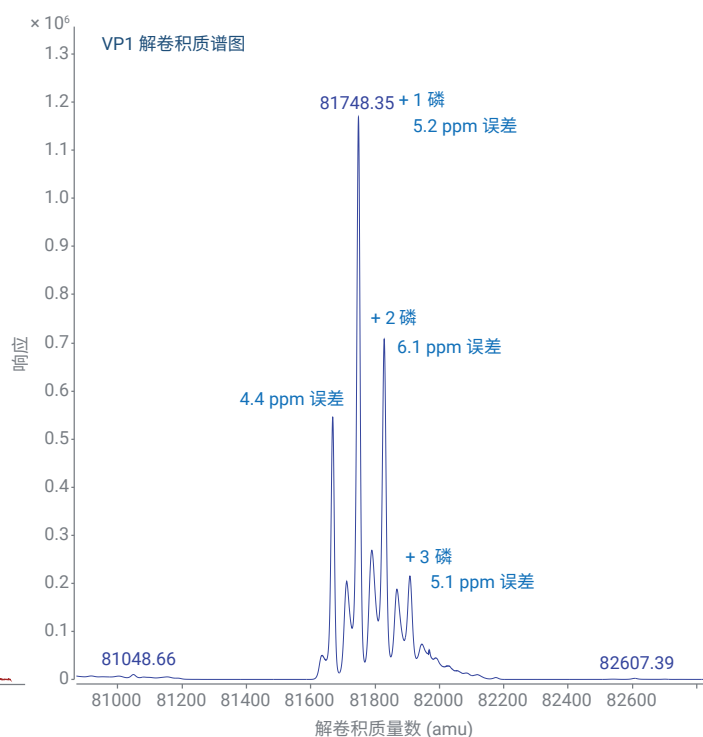


图 2. VP1 衣壳蛋白的原始谱图和解卷积谱图。蛋白质的天然形式和磷酸化形式具有出色的质量准确度

图 4 表明 VP3 的大部分未修饰形式与乙酰化 VP3 色谱分离。同样，解卷积谱图表明乙酰化 VP3 和未修饰 VP3 均具有较高的质量准确度。蛋白质的 N 端乙酰化是一种常见的 PTM，涉及蛋白质的稳定性、折叠以及与其他蛋白质的相互作用。VP1 被完全乙酰化，而 VP3 则约 70% 被乙酰化。虽然目前尚不清楚为什么 VP3 没有被完全乙酰化，但这可能会影响病毒衣壳的整体结构。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 改进的真空设计结合大分子 SWARM 自动调谐功能提高了谱图清晰度，三种病毒衣壳蛋白及其 PTM 均获得了较高的质量准确度，所有蛋白质形式的误差均小于 10 ppm。



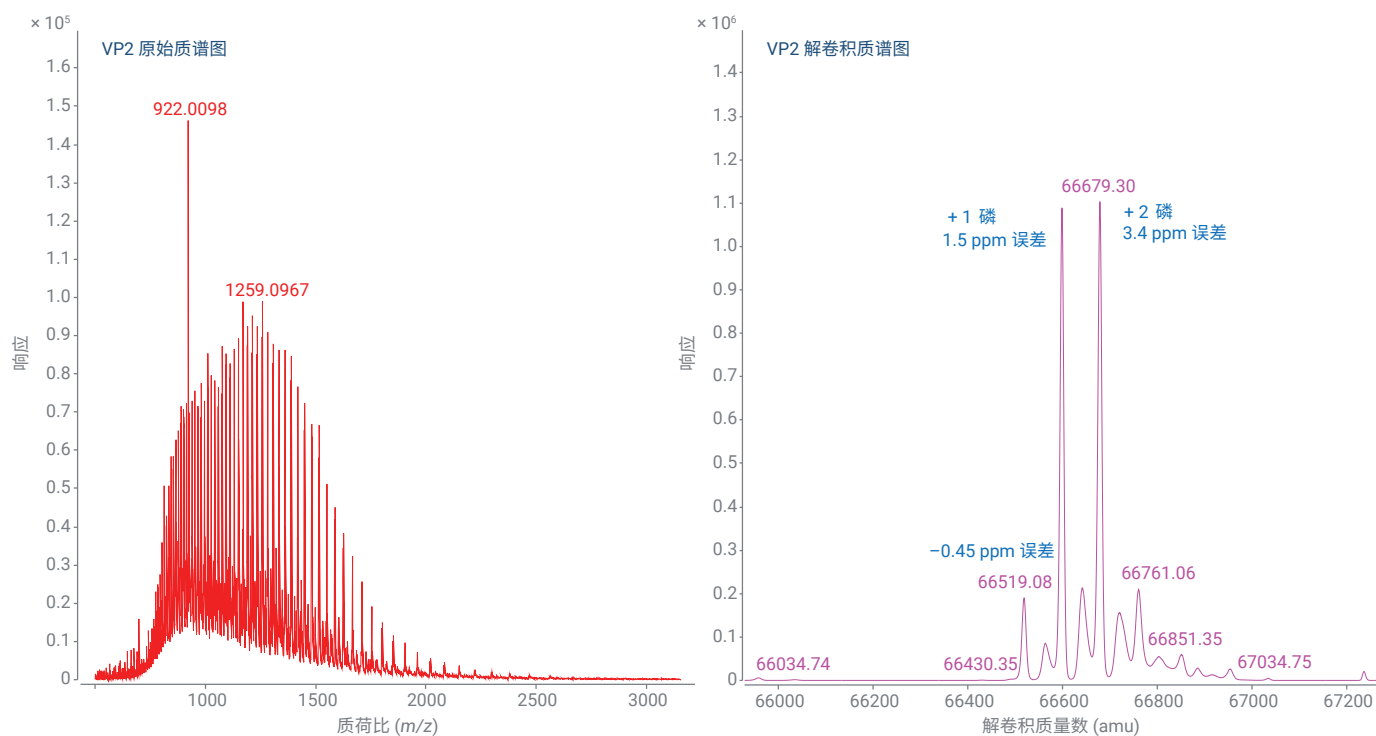


图 3. VP2 衣壳蛋白的原始谱图和解卷积谱图。蛋白质的天然形式和磷酸化形式具有出色的质量准确度，误差均小于 5 ppm

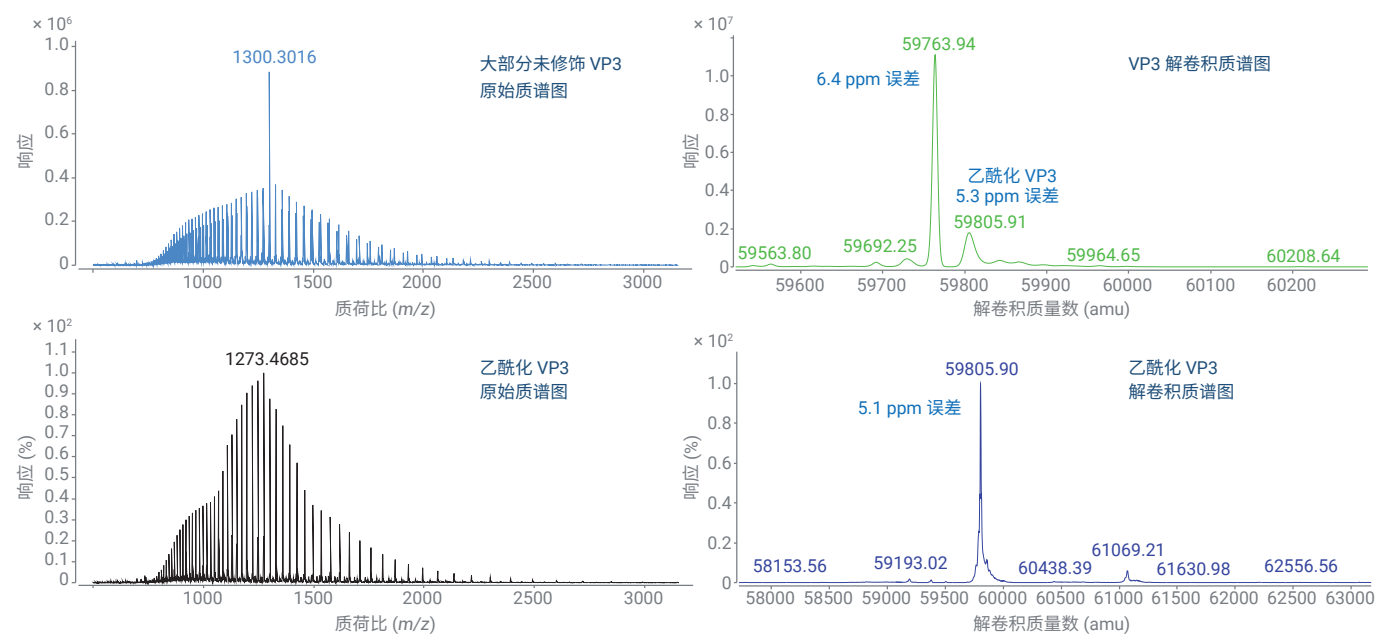


图 4. VP3 衣壳蛋白的原始谱图和解卷积谱图。大部分未修饰形式和乙酰化形式实现色谱分离，每种蛋白质形式均具有出色的质量准确度

使用 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 进行肽谱分析

生物治疗药物的肽谱分析是 ICH、FDA 和其他监管机构要求用于确定蛋白质序列和 PTM 的重要方法。虽然通过 AAV 进行基因治疗是一个新领域，但可以想象未来对于衣壳蛋白肽谱分析的需求。自 2020 年 1 月起，FDA 建议提供关于人类基因治疗药物的一级和二级结构信息（包括 PTMs）。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的迭代 MS/MS 功能排除了之前所有运行中进行分离和碎裂的肽段，从而可以选择和检测低丰度肽段。此外，MassHunter BioConfirm 10.0 可以选择多次运行，以实现整体序列覆盖。此功能对于结合迭代 MS/MS 运行的结果以及使用多种酶非常有用。

了解 PTMs 的类型（例如氧化和脱酰胺基化）对于确定蛋白质稳定性至关重要。为了获得可靠的肽谱分析结果，所有鉴定得到的肽段误差均小于 10 ppm，并且至少有一张 MS/MS 谱图可以确认肽段序列并定位 PTMs。此外，将假阳性率设置为 1%。AAV8 的序列中有几个区域常常存在赖氨酸和精氨酸残基，仅用胰蛋白酶难以获得完整序列。因此，使用 rAsp-N 实现完整序列覆盖。

最大的蛋白质 VP1 的总序列覆盖率为 97.7%，如图 5 所示。实线表示通过 MS/MS 鉴定的肽段。蓝色线和绿色线来自胰蛋白酶酶解的两次迭代运行，而黑色线和红色线则来自 rAsp-N 酶解的两次迭代运行。MS/MS 数据证实了位点特异性磷酸化，如图 6 所示。红色标注显示了含有磷酸化丝氨酸的肽段。如预期一样，存在其他常见的 PTM（例如天冬酰胺脱酰胺基化和甲硫氨酸氧化），但丰度较低。图 7 显示了使用 BioConfirm 10.0 中的相对定量功能测得的这些低浓度修饰的示例。VP2 和 VP3 的序列覆盖率分别为 98.5% 和 100.0%。虽然有关于 AAV8 中 N-糖基化的报告，但未发现 N-糖基化。这种差异可能是由于载体表达系统的不同。

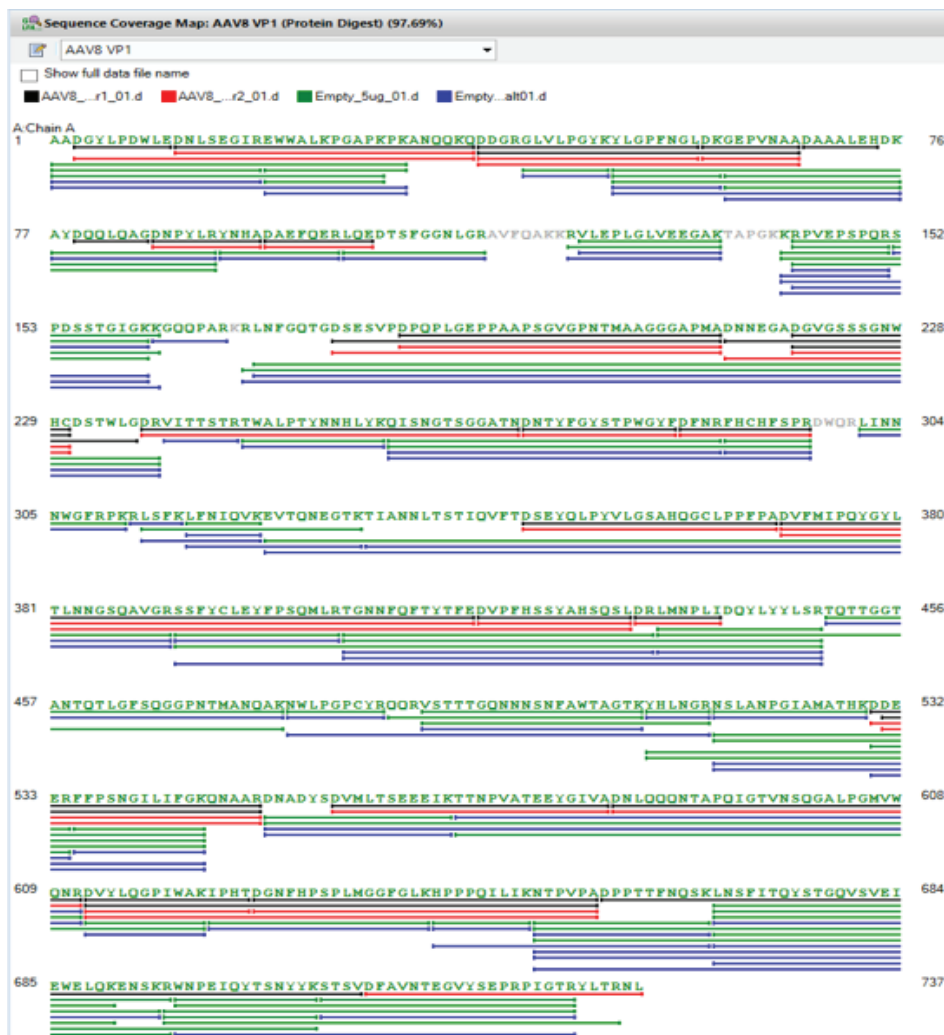


图 5. Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 屏幕截图，显示了借助迭代 MS/MS 并使用胰蛋白酶和 rAsp-N 作为互补酶获得的 VP1 的序列覆盖。该蛋白质的序列覆盖率为 97.7%。

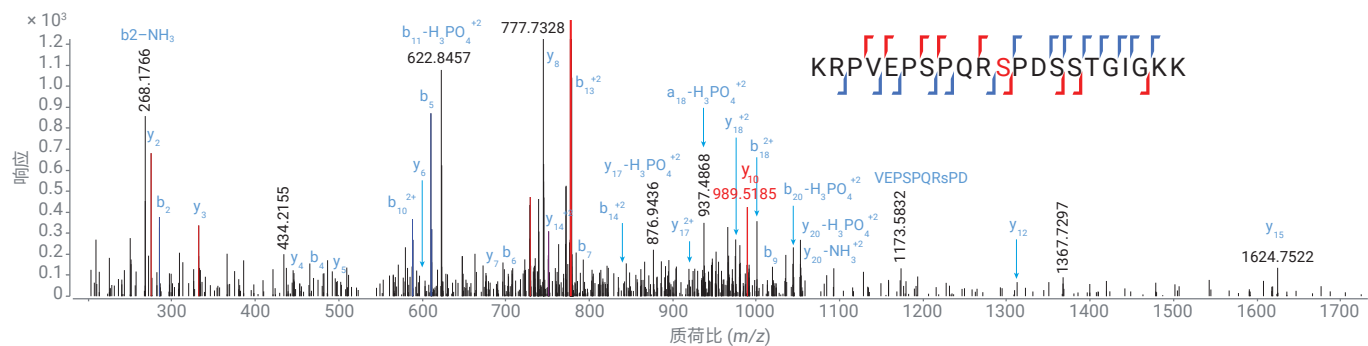


图 6. 使用 MS/MS 确认位点特异性磷酸化的示例。当标注肽段包含磷酸化的丝氨酸残基时带有红色标记

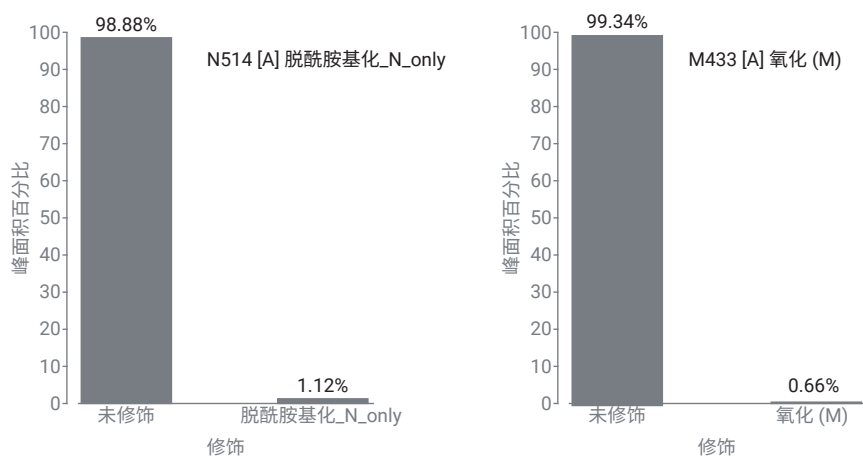


图 7. 蛋白质中常见 PTMs 示例：甲硫氨酸氧化和天冬酰胺脱酰胺基化。如预期一样，两种肽段均经过极低程度的修饰

结论

AAV 颗粒作为基因治疗的载体显示出巨大的潜力，因此衣壳蛋白 CQA 的表征对于药物批准流程至关重要。本研究展示了从样品前处理到数据分析的工作流程，可用于确定衣壳蛋白的精确质量并鉴定 PTMs。1290 Infinity II LC 联用 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF，同时搭配 MassHunter BioConfirm 10.0，为分析 AAV 衣壳蛋白提供了准确、可靠的解决方案。

参考文献

1. Dalkara, D. *et al.* *In vivo*–Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous. *Sci. Transl. Med.* **2013**, 5(189), 189ra76–189ra76
2. Xie, Q. *et al.* The Atomic Structure of Adeno-Associated Virus (AAV-2), a Vector for Human Gene Therapy. **2002**, 99(16), 10405–10410
3. Wu, Z.; Asokan, A.; Samulski, R. J. Adeno-Associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol. Ther.* **2006**, 14(3), 316–327
4. Bui, H. *et al.* (2014) ASMS Poster WP-681
5. Jin, X. *et al.* Direct Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis for Complete Characterization of Recombinant Adeno-Associated Virus Capsid Proteins. *Hum. Gene Ther. Methods* **2017**, 28(5), 255–267
6. Giles, A. R. *et al.* Deamidation of Amino Acids on the Surface of Adeno-Associated Virus Capsids Leads to Charge Heterogeneity and Altered Vector Function. *Mol. Ther.* **2018**, 26(12), 2848–2862
7. Van Vliet, K. *et al.* Adeno-associated virus capsid serotype identification: Analytical methods development and application. *J. Virol. Methods* **2009**, 159(2), 167–177
8. Arruda, V. R. *et al.* It's All About the Clothing: Capsid Domination in the Adeno-Associated Viral Vector World. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, 5(1), 12–15
9. Office of Medical Products and Tobacco, Center for Biologics Evaluation and Research. *Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)*. Silver Spring, MD. **2020**, 28–29

致谢

安捷伦感谢 Lake Pharma 的 Dominique Garceau、Tristan Cano、Caitlin Jaeger 和 William Hermans 在样品生产方面所做的工作。同时感谢安捷伦新加坡公司的 Brian Liao 和 Ravindra Gudihal 分享想法。

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

DE.4113541667

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2020
2020 年 7 月 23 日，中国出版
5994-1980ZHCN

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

