

## 使用 LC/MS 实现生物制药中的腺相关病毒定性确认



虽然腺相关病毒 (AAVs) 有自己独特的一组关键质量属性，但许多用于监测较成熟的蛋白质类治疗药物的传统分析方法仍然可用。AAV 衣壳由 VP1、VP2 和 VP3 三种蛋白组成，约含 60 个蛋白质拷贝，其化学计量比约为 1:1:10<sup>[1]</sup>。由于这三种蛋白质都是从相同基因剪接而来，具有高度序列同源性，因此对他们进行色谱分离具有挑战性。历来使用 SDS-PAGE 凝胶银染法或抗体检测类方法（如 ELISA 和免疫印迹法）评估三种衣壳蛋白的比例。然而，这些方法繁琐且容易出错，并可能需要产生针对每种 AAV 的新抗体。考虑到 AAV 血清型之间的高度同源性，产生具有区分所需特异性的抗体可能较为困难。液质联用系统 (LC/MS) 具备更快速度、更高特异性和准确性，可以克服这些难题。安捷伦提供用于完整蛋白质和肽谱分析的工作流程解决方案，可实现翻译后修饰 (PTMs) 的鉴定和定位。

美国食品药品监督管理局 (FDA) 要求 AAV 产品在放行前需明确鉴定，特别是生产多种血清型或基因工程变异体的生产设施<sup>[2]</sup>。肽谱分析是确定蛋白质序列和鉴定 PTMs 的重要方法，因此 ICH、美国 FDA 和其他监管机构要求在较成熟的生物治疗药物监测中采用此方法。同时有关采用 AAVs 的基因治疗产品的法规不断出台，在未来，肽谱分析或许会占有一席之地。

以往使用 LC/MS 确认完整衣壳蛋白种类和相对丰度，该方法的色谱分离度较差。共洗脱蛋白让精确质量数测定更具挑战性，而一些 AAV 衣壳蛋白的相似性（即 AAV1 和 AAV6 相差 6 个氨基酸<sup>[3]</sup>）使得准确测量对于定性确认至关重要。

Agilent ZORBAX RRHD 大孔径色谱柱能够应对完整蛋白质分析的这一挑战，它能提供良好的色谱分离，通过质谱 (MS) 检测实现精确质量数测定。

- 亚 2  $\mu\text{m}$  粒径可提供高分离度
- 大孔径为实现高效分离提供良好的传质性能
- 耐压达 1200 bar，可用于高效的 UHPLC 方法
- 二苯基化学键合相可为复杂分离提供独特选择性

Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱旨在为蛋白质鉴定和翻译后修饰鉴定提供高分离度肽谱分析。

- 表面多孔颗粒填料能够在适当的背压下实现高分离度分离
- 相比含有 TFA 的流动相，以甲酸为流动相时具有出色的峰容量，提高了质谱的灵敏度

## AAV 高效分析的最佳实践

### 样品前处理

- 许多重组蛋白是在非挥发性缓冲液中配制的，其中的盐含量相对较高并且包含稳定的添加剂，例如会干扰质谱检测并迅速污染仪器的泊洛沙姆。LC/MS 分析前样品的缓冲液交换可以显著提高谱图质量，延长质谱仪维护的间隔时间。请注意，缓冲液交换可能会导致样品不稳定，因此请计划在缓冲液交换后直接分析样品
- 建议使用高回收率样品瓶，用于较小的样品量

### 色谱分离

- 将流速变化斜率从默认值降至 1 mL/min<sup>2</sup> 及以下。随着流速的逐渐增大，色谱柱寿命将延长，并有助于防止突然压力过高。在安捷伦软件中，可以在 LC 泵控制的“高级”部分找到此设置
- 在 LC 方法中设置最大压力限值以匹配色谱柱的相应值（AdvanceBio 肽谱分析柱为 600 bar，ZORBAX RRHD 色谱柱为 1200 bar）。这对于 LC 最大耐压能力超过色谱柱的所有情况均至关重要
- 尽可能减少系统死体积以大幅提高分离度。建议使用低压死体积系统，如 Agilent 1290 Infinity II，配备[超低扩散管线](#)<sup>[4]</sup>，以尽可能减少死体积

### 质谱

- 在目标保留时间之外，将液相色谱流路切换到废液，特别是对于在方法结束时进行高含量有机溶剂冲洗的过程，如果可能，请在空体积洗脱时这样操作
- 使用 HPLC 级或更高级别的溶剂
- 建立质谱仪离子源的定期清洁程序

## 入门指南 — 完整衣壳蛋白分析

应用简报 5994-2434ZHCN 中更为详细地介绍了完整衣壳蛋白分析，比较了 ZORBAX RRHD 系列产品用于分离 VP1、VP2 和 VP3 衣壳蛋白的不同色谱柱化学键合相<sup>[5]</sup>。工作流程如图 1 所示。

### 色谱柱选择标准 — 完整衣壳蛋白分析

当选择反相色谱柱时，特别是对于 AAV 衣壳蛋白分析，同时考虑将使用的检测方法和有关样品的已知信息非常有用。AAV 样品通常比其他重组蛋白样品稀释程度更高。选择可提供合适灵敏度和分离度的色谱柱，在分离 VP1、VP2 和 VP3 衣壳蛋白时，这两个参数历来是一项挑战。

- **色谱柱直径：**为了保证灵敏度以及与质谱检测的兼容性，建议使用 2.1 mm 色谱柱，而不是更大内径的色谱柱。2.1 mm 色谱柱使用的流速有利于高效电喷雾电离，这也有助于保证灵敏度

- **柱长：**对于反相色谱柱，较长的色谱柱可以实现更高分离度，因此建议长度为 100 或 150 mm
- **孔径：**完整蛋白质在溶液中相对较大，特别是在变性反相条件下。大孔径是必须的，以确保固定相颗粒内外的高效传质，这反过来也会提高分离度。建议使用 300 Å 孔径
- **粒径：**粒径越小，分离度越高，因此建议使用 1.8 μm RRHD 色谱柱
- **固定相化学性质：**分离目标分析物时，固定相的选择性是另一个可以改变的变量。C4 或 C8 等烷基链较短的固定相常用于完整蛋白质分离，但不太显然的是，已证实此类固定相同样有利于 VP1、VP2 和 VP3 分离。另一个复杂的因素是每种 AAV 血清型之间存在差异，导致不同的固定相要求。ZORBAX RRHD SB300-C18 色谱柱对分离 AAV2 和 AAV7 非常有效，而 ZORBAX RRHD 300-Diphenyl 色谱柱对包括 AAV9 在内的其他几种血清型也十分有效



图 1. 定性确认和测量包含完整 AAV 衣壳的单个衣壳蛋白相对含量的过程概述

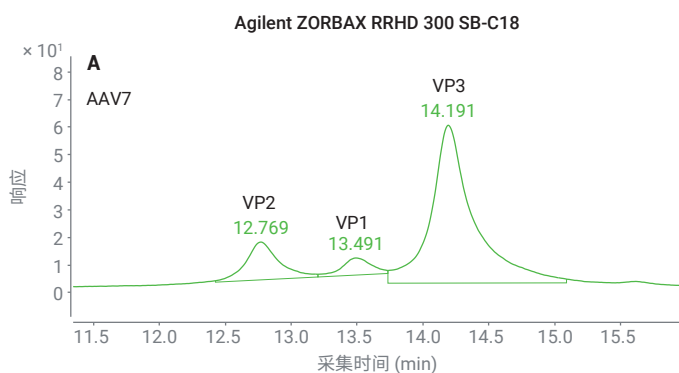


图 2. 用 Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18 分离 AAV7，条件如表 1 所示

参数	值
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 858750-902)
仪器	Agilent 1290 Infinity II
流速	0.4 mL/min
流动相 A	0.1% 甲酸 + 0.1% TFA 水溶液
流动相 B	90% 异丙醇, 9.8% 水, 0.1% 甲酸 + 0.1% TFA
梯度	时间 (min)      %B
	0–5                      28%
	23                      32.5%
	23.5                    80%
	26                      80%
后运行时间	3 分钟
柱温	80 °C

表 1. 分析完整衣壳蛋白的起始条件。详情请参阅参考文献<sup>[5]</sup> 5994-2434ZHCN

## 入门指南 — 肽谱分析

应用简报 5994-1980ZHCN 和 5994-2434ZHCN 介绍了使用 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱对 AAV 衣壳蛋白进行肽谱分析。



图 3. 确认衣壳蛋白一级结构和鉴定翻译后修饰的过程概览

## 色谱柱选择标准 — 肽谱分析

与完整衣壳蛋白分析一样，色谱柱的选择应根据对样品和检测方法的了解。消解处理的 AAVs 的肽谱分离中也存在同样的灵敏度和分离度挑战。在这种情况下，衣壳由三种高度相关的蛋白质组成，导致肽谱分离甚至比典型的重组蛋白消解更加复杂。

- **色谱柱直径：**为了保证灵敏度以及与质谱检测的兼容性，建议使用 2.1 mm 色谱柱，而不是更大内径的色谱柱。2.1 mm 色谱柱使用的流速有利于高效电喷雾电离，这也有助于保证灵敏度
- **柱长：**对于反相色谱柱，较长的色谱柱可以实现更高分离度。建议使用 150 mm 或更长的色谱柱
- **粒径和类型：**粒径越小，分离度越高；然而，粒径稍大的表面多孔颗粒填料在低得多的背压下可提供几乎相同的分离度。建议使用 2.7 μm 表面多孔颗粒填料
- **固定相化学性质：**肽谱分析常用 C18 固定相，尽管有各种各样的 C18 色谱柱可供选择。对于肽谱分析，您希望选择色谱柱和流动相系统组合，获得低拖尾的窄峰，以大幅提高峰容量。您还需要平衡小的亲水性肽的保留和长疏水性肽的适当洗脱

而在此推荐的 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱正符合这些标准。

参数	值
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm (部件号 653750-902)
仪器	Agilent 1290 Infinity II
流速	0.4 mL/min
流动相 A	0.1% 甲酸水溶液
流动相 B	0.1% 甲酸的乙腈溶液
梯度	时间 (min) %B
	0-3 3%
	50 35%
	60 97%
	62 97%
	62.5 3%
	65 3%
后运行时间	5 分钟
柱温	60 °C

表 2. 用于肽谱分析的起始条件详情请参阅参考文献<sup>[6]</sup> 5994-1980ZHCN

## 参考文献

1. Backovic, A. et al. Capsid Protein Expression and Adeno-Associated Virus like Particles Assembly in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microb. Cell Fact* 2012, 11, 124
2. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) - Guidance for Industry. US Food and Drug Administration 2020
3. Kuck, D.; Kern, A.; Kleinschmidt, J. A. Development of AAV SerotypeSpecific ELISAs Using Novel Monoclonal Antibodies. *Journal of Virological Methods* 2007, 140, 17-24
4. Agilent 1290 Infinity II 超低扩散工具包技术简报
5. 使用 LC/MS 分析完整腺相关病毒 (AAV) 衣壳蛋白实现产品身份验证 (5994-2434ZHCHN)
6. 利用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 表征病毒载体颗粒 (5994-1980ZHCHN)

## 轻松挑选和订购信息

要从安捷伦在线商城订购下表中列出的商品，请单击“我的列表 #”标题链接将商品添加至您的“收藏产品”列表中。然后输入您需要的产品数量，添加至购物车并继续结算。您的列表便会保留在“收藏产品”下，供您将来订购时使用。

如果这是您首次使用“收藏产品”，系统会要求您输入电子邮件地址进行账户验证。如果您已有安捷伦账户，可以直接登录。但是，如果您尚未注册安捷伦账户，则需要注册账户。该功能仅在启用了电子商务功能的地区有效。您也可以通过客户服务中心或经销商渠道订购所有物品。

### 我的列表 1：用于完整蛋白质分析的 Agilent ZORBAX RRHD 色谱柱

描述	部件号
Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm, 300 Å	863750-944
Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm, 300 Å	858750-944
Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm, 300 Å	863750-902
Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm, 300 Å	858750-902

### 我的列表 2：用于多肽水平分析的 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱

描述	部件号
AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm	653750-902
AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 250 mm, 2.7 μm	651750-902
AdvanceBio 肽谱分析保护柱, 2.1 × 5 mm, 2.7 μm, 3/包	851725-911

### 我的列表 3：标准品

描述	部件号
Agilent NIST mAb, 25 μL	5191-5744
Agilent NIST mAb, 4 × 25 μL	5191-5745
十肽标准品, 71 μg, 冻干	5190-0583
HSA 肽标准品	G2455-85001

## 我的列表 4：备件和溶剂

描述	部件号
<b>连接件和管线</b>	
Agilent InfinityLab 快速连接接头组件, 带预先固定的 0.12 × 105 mm 毛细管 (用于色谱柱入口连接)	5067-5957
Agilent InfinityLab Quick Turn 接头 (用于色谱柱出口连接)	5067-5966
Quick Turn 毛细管, SST, 0.12 × 280 (用于 Quick Turn 接头)	5500-1191
用于 Quick Turn 接头的安装工具	5043-0915
<b>在线压力释放阀工具包</b>	
(当另一个检测器在荧光流通池后串联使用时使用)	G4212-68001
用于 Agilent 1290 Infinity II 的超低扩散管线工具包	5067-5963
用于 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的超低扩散管线工具包	5004-0007
<b>样品容器</b>	
高回收率样品瓶, 螺口, 带固定内插管, 透明, 300 μL 内插管体积, 100/包。样品瓶规格: 12 × 32 mm (12 mm 瓶盖)	5188-6591
瓶盖, 螺口, 蓝色, PTFE/红色硅橡胶隔垫, 100/包。瓶盖尺寸: 12 mm	5182-0717
样品瓶, 钳口/卡口, 聚丙烯, 250 μL, 1000/包。样品瓶规格: 12 × 32 mm (11 mm 瓶盖) *	5190-3155
瓶盖, 卡口, 透明, PTFE/硅橡胶/PTFE 隔垫, 100/包。瓶盖尺寸: 11 mm (用于 5190-3155)	5182-0566
InfinityLab 96 孔板, 0.5 mL, 30/包	5043-9310
InfinityLab 96 孔板密封垫, 50/包	5042-1389
<b>溶剂和添加剂</b>	
InfinityLab 超纯 LC/MS 水, 1 L	5191-4498
InfinityLab 超纯 LC/MS 乙腈, 1 L	5191-4496
甲酸, 5 mL	G2453-85060
<b>溶剂过滤</b>	
InfinityLab 溶剂过滤组件	5191-6776
InfinityLab 溶剂过滤烧瓶, 玻璃, 2 L	5191-6781
尼龙滤膜, 47 mm, 孔径 0.2 μm, 100/包	5191-4341
再生纤维素滤膜, 47 mm, 孔径 0.2 μm, 100/包	5191-4340
溶剂瓶玻璃过滤器, 溶剂入口, 20 μm	5041-2168
<b>溶剂处理</b>	
InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖起始工具包	5043-1222
InfinityLab 溶剂瓶, 透明, 1 L	9301-6524
InfinityLab 溶剂瓶, 棕色, 1 L	9301-6526
溶剂瓶, 透明, 2 L	9301-6342
溶剂瓶, 棕色, 2 L	9301-6341
InfinityLab Stay Safe 吹扫瓶	5043-1339
InfinityLab 废液瓶, GL45, 6 L, 带 Stay Safe 安全盖	5043-1221
带时间标签的 InfinityLab 活性炭过滤器, 58 g	5043-1193

\*聚丙烯样品瓶耐化学腐蚀, 是对 pH 敏感样品的理想选择

了解更多信息：

[www.agilent.com/chem/aav-analysis](http://www.agilent.com/chem/aav-analysis)

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

RA44707.6978009259

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，2022  
2022年6月8日，中国出版  
5994-4829ZHCN

