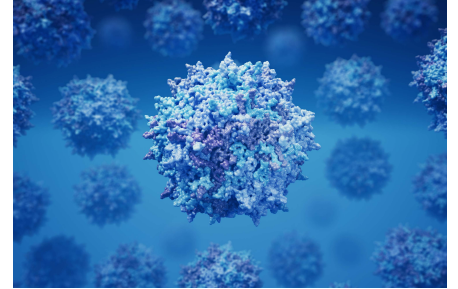


## 利用液相色谱实现生物制药中腺相关病毒和病毒样颗粒的聚集体分析

**腺相关病毒 (AAVs) 和病毒样颗粒 (VLPs) 是新型生物治疗分子，在疫苗、细胞和基因治疗领域潜力无限。**



AAVs 是一种非共价、自组装的蛋白质结构，其核心可能含有或不含有基因组有效载荷。由于存在几类可以靶向体内不同器官系统的 AAVs，使它们成为细胞和基因治疗的天然递送载体。不同的 AAV 血清型在构成 AAV 球形衣壳的蛋白质的结构和化学性质方面有所不同。但它们的直径基本在 20–25 nm，无有效载荷时分子量约为 3.7 MDa，带有寡核苷酸有效载荷时约为 5.1 MDa。

VLPs 是由一种或多种蛋白质组成的大型自组装结构，可用作疾病预防疫苗。VLPs 的结构外观与病毒相同，但缺乏使病毒具有感染特性的基因组物质和复制机制。因此，它们可以在不造成感染的情况下引发免疫反应。

与其他类型的生物治疗分子一样，AAVs 和 VLPs 受到全球监管机构的严格审查，需要对生物治疗药物以及任何产物或工艺相关杂质进行表征。聚集体是一种产品相关杂质，通常会成为一项关键质量属性，因此必须进行监测和严格控制。AAVs 和 VLPs 之间具有结构相似性，因此能够采用通用方法进行分析。

与单克隆抗体 (mAbs) 或腺相关病毒 (AAVs) 不同，不同类型的 VLPs 粒径差异较大，直径通常在 20–150 nm 之间。这种多样性意味着通用方法往往无法全面兼顾，使用互补技术非常重要。体积排阻色谱 (SEC) 长久以来一直是监测蛋白质聚集体的金标准，已成为 AAVs 聚集体分析的常用方法。尽管 VLP 粒径差异较大，SEC 在 VLPs 的聚集体分析中仍发挥着重要作用，常与分析型超速离心 (AUC)、电子显微镜 (EM) 或场流分离 (FFF) 等正交技术配合使用。

## 克服聚集体分析挑战

可以说，VLPs 聚集体分析的第一项挑战是选择合适的技术，这取决于 VLP 单体的标称粒径（此处的“单体”是指未聚集的单个 VLP 组装体，而不是组装的 VLP 的单个蛋白组分）。目前常规 SEC 色谱柱可提供的最大孔径为 2000 Å。SEC 的传统经验法则是孔径应为目标分析物直径的大约 3 倍。例如，2000 Å 的孔径适用于直径约 670 Å（或 67 nm）的分析物。然而在实践中，许多用户将 100 nm (1000 Å) 作为 SEC 可能受到明显限制的阈值。较小的 VLPs 以及 AAVs 都符合 SEC 的粒径范围要求，但其余的 VLPs 则更适合通过另一种技术进行分析。与 AUC 或 EM 相比，SEC 快速且经济，因此在适用的情况下，它仍然是首选方法。

对于 AAVs 或 VLPs 的 SEC 分析，两个最大的挑战是样品体积和浓度不足造成的分离度和灵敏度问题。安捷伦的 Bio SEC-5 色谱柱系列的固定相能够实现高分离度和良好的样品回收率，并提供适用于各种情况的孔径和色谱柱规格，解决了上述挑战。

## 选择合适的 SEC 色谱柱

选择有助于实现分离目标且样品限制条件较少的 SEC 色谱柱规格。选择色谱柱时考虑以下因素：

- 较长的色谱柱，如 300 mm，可提供更高的分离度
- 在分离度符合要求的前提下，如果优先考虑高通量，则建议使用较短的 150 mm 色谱柱
- 虽然一直以来 SEC 色谱柱的内径 (id) 基本在 7.8 mm，但较窄的色谱柱内径（如 4.6 mm）需要的进样量更小，这对于样品量可能有限的 AAVs 和 VLPs 样品来说是理想之选

预测新型生物治疗药物所适合的孔径可能具有挑战性，因为它们在溶液中的结构与生物 SEC 和 GPC 历来的目标分析物不同。孔径通常与分子量相关，以确定排阻极限和总渗透点；然而，最终决定最佳孔径的参数是分析物的流体力学半径。当分析物在溶液中的结构与用于建立相关性的标准品相似时，分子量相关性就能很好地发挥作用。这些标准品历来都采用球蛋白（用于生物 SEC）或相对线性聚合物（用于 GPC）。AAVs 和 VLPs 的结构不同于球蛋白和线性聚合物，并且不同类型的 VLP 之间可能存在显著差异。因此，分子量相关性不完全可靠，还应考虑其他信息。选择孔径时考虑以下因素：

- 根据分子量推荐的孔径如表 1 所示
- 经验法则是使用的孔径应为分析物直径的 3 倍。如果已知样品的大概直径，这会是一条有用的指导原则
- 报道的类似分子例子是另一种有用的参考

色谱柱	排阻极限	总纳入点	目标分析物
Bio SEC-5, 5 μm, 500 Å	5 MDa	5 kDa	AAVs, 小型 VLPs
Bio SEC-5, 5 μm, 1000 Å	7.5 MDa	50 kDa	AAVs, VLPs, 大寡核苷酸
Bio SEC-5, 5 μm, 2000 Å	> 10 MDa	150 kDa	VLPs, 大寡核苷酸

表 1. Agilent Bio SEC-5 色谱柱的分子量范围

AAVs 的粒径范围较窄，表明在选择孔径时具有挑战性 (图 1)。AAVs 的分子量约为 5.1 MDa (含基因组有效载荷) 或 3.8 MDa (不含基因组有效载荷)。表 1 表明，500 Å 或 1000 Å Bio SEC-5 色谱柱都是非常合适的选择。AAVs 直径为 20–25 nm，根据经验法则，600–750 Å 的孔径最适合。然而在实践中，科学家使用了来自不同供应商的 450–1000 Å

的 SEC 色谱柱分析 AAVs。孔径太小可能无法全面分析聚集体状态，而孔径太大可能会导致单体和二聚体或单体与片段之间的分离度不足。通过实证研究，安捷伦推荐使用 1000 Å Bio SEC-5 色谱柱开展 AAVs 的聚集体分析。AAV 聚集体分析的代表性色谱图和方法条件分别如图 2 和表 2 所示。更多信息，请参见安捷伦应用简报 [5994-4270ZHCHN<sup>\[1\]</sup>](#)。

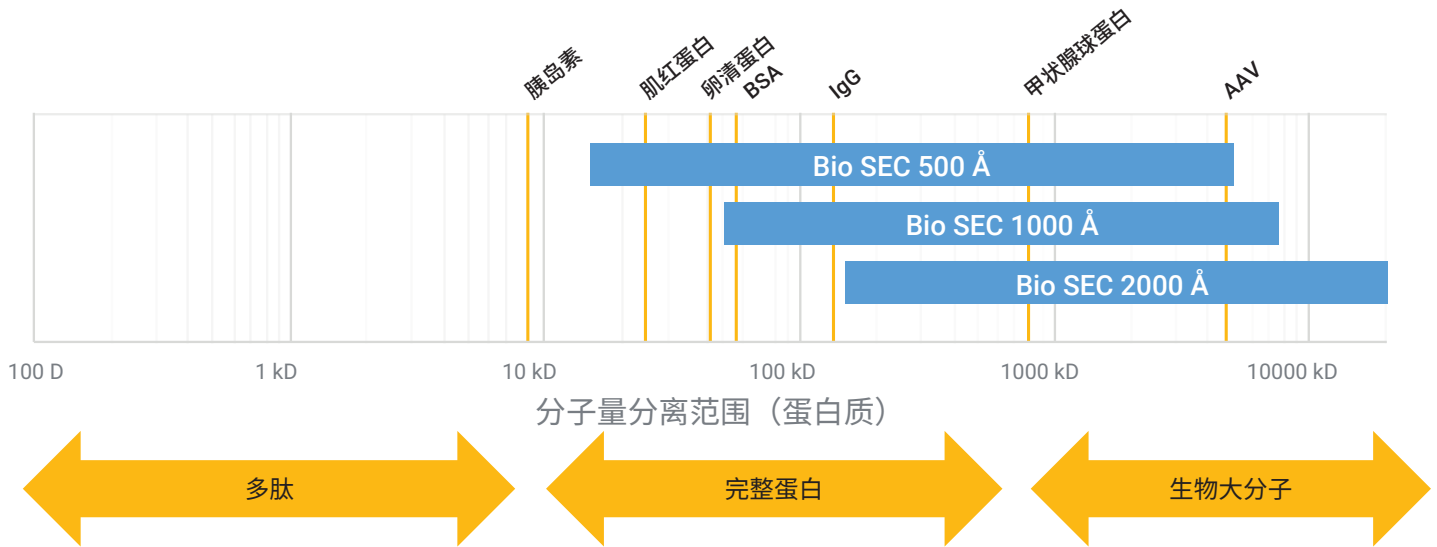


图 1. 基于蛋白质分子量的 SEC 孔径选择

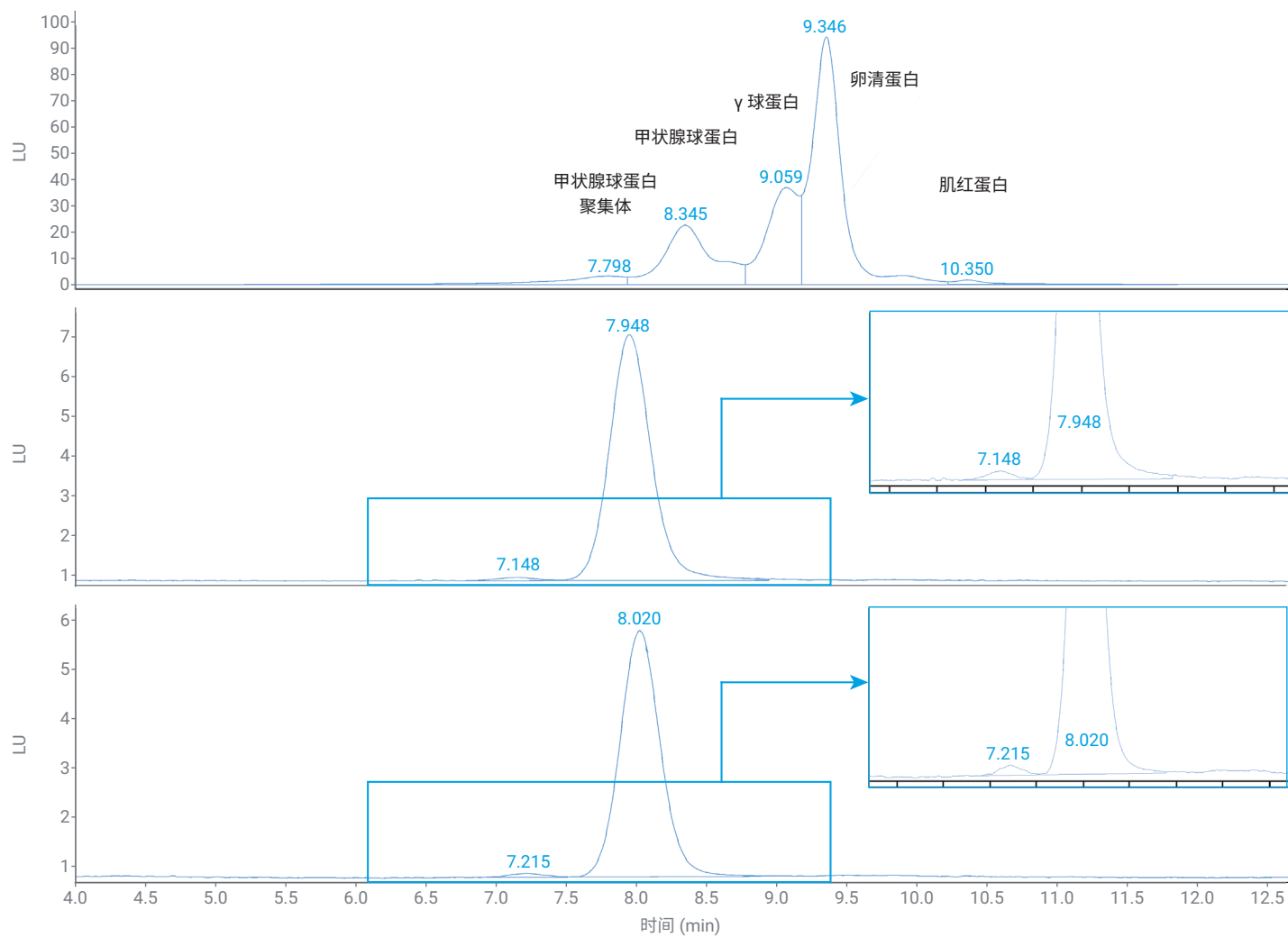


图 2. AAV-9 和 AAV-2 的 SEC 色谱图，采用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 标准色谱柱和 Agilent Bio SEC-5 1000 Å 色谱柱

参数	值
色谱柱	Agilent Bio SEC-5 1000 Å, 4.6 × 300 mm
流速	0.4 mL/min
流动相	50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 + 400 mmol/L NaCl, pH 7.4
柱温	室温
样品量	20 μL
荧光检测	$\lambda_{\text{激发}} = 280 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{发射}} = 340 \text{ nm}$

表 2. SEC 方法条件示例，使用 Agilent Bio SEC-5 色谱柱分离 AAV 聚集体和片段

有时，可能会通过经验评估来确定最佳孔径<sup>[2]</sup>。例如，图 3 显示了使用 1000 Å 和 2000 Å Bio SEC-5 色谱柱分析 VLP 获得的 SEC 色谱图（SEC 条件见表 3）。在本研究中，报告的 VLP 约为 40 nm。根据经验法则，合适的孔径为 120 nm 或 1200 Å。在本研究中，同时评估了 1000 Å 和 2000 Å Bio SEC-5 色谱柱，结果表明 2000 Å 提供了更好的分离度。如需了解更多信息，请参见安捷伦应用简报 5994-4227ZHCHN<sup>[2]</sup>。

## SEC 最佳实践

以下列举了部分 SEC 最佳实践：

- 新鲜配制流动相缓冲液，并通过 0.2 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤，以除去颗粒，并避免微生物生长，降低色谱柱或 LC 系统损坏风险
- 将流速变化斜率从默认值降至 1 mL/min<sup>2</sup> 及以下。逐渐增加流速有助于延长色谱柱寿命。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最大限值（Bio SEC-5 色谱柱为 240 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
- 定期使用合适的 SEC 标准品验证系统性能
- 在可能的情况下，通过尽可能减少进样量来提高色谱分离度。推荐的进样量为 5–10 μL，最大进样量为柱体积的 1%
- 务必清洗色谱柱，在用清洗液（至少 20 倍柱体积）冲洗色谱柱之前和之后，使用至少 5 倍柱体积的超纯水进行冲洗，避免缓冲盐沉淀在色谱柱上。如需了解更多详细信息，请参见 Bio SEC-5 色谱柱用户指南<sup>[3]</sup>

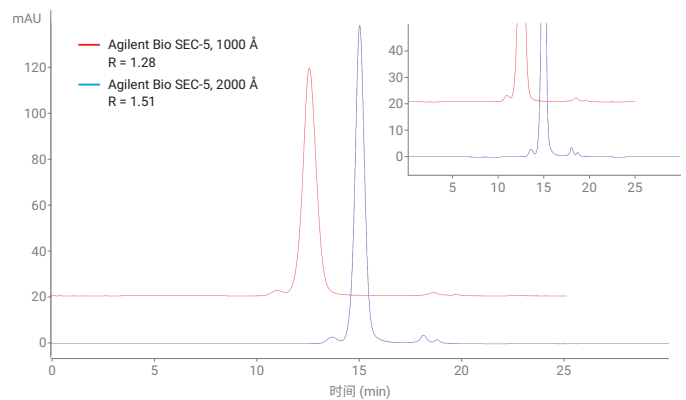


图 3. VLP 的 SEC 色谱图，使用 1000 Å 和 2000 Å Agilent Bio SEC-5 色谱柱。2000 Å 色谱柱能够为单体和聚集体提供更出色的分离度

参数	值
色谱柱	Agilent Bio SEC-5, 7.8 × 300 mm, 5 μm, 2000 Å (货号 5190-2541)
Agilent Bio SEC-5, 7.8 × 300 mm, 5 μm, 1000 Å (货号 5190-2536)	0.4 mL/min
流速	0.6 mL/min
流动相	含 400 mmol/L 氯化钠的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)
柱温	室温
样品量	5 μL
检测波长	220 nm
运行时间	30 min
HPLC 系统	配备四元泵的 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统

表 3. 针对约 40 nm VLP 的 SEC 方法条件示例

## 参考文献

1. Liao, B., Blackwell, A. 和 Turner, M.L. 利用 Agilent Bio SEC-5 色谱柱分离腺相关病毒载体聚集体和片段，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-4270ZHCHN，2021
2. Mi, J. 使用 Agilent Bio SEC-5 分析病毒样颗粒 (VLP)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-4227ZHCHN，2021
3. Agilent Bio SEC-5 色谱柱，安捷伦科技公司技术规格书，出版号 5973-1743，2021

## 轻松挑选和订购信息

如需订购下表中列出的商品，请通过单击标题中的“我的列表”链接将商品添加至您的“收藏产品”列表中。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。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。

您也可以单击货号超链接从安捷伦在线商城订购，或通过客户服务中心或经销商渠道订购单个产品。

### 我的列表 1: Agilent Bio SEC-5 色谱柱

描述	货号
<b>500 Å 色谱柱</b>	
Bio SEC-5, 5 µm, 500 Å, 4.6 × 300 mm	5190-2533
Bio SEC-5, 5 µm, 500 Å, 4.6 × 150 mm	5190-2534
Bio SEC-5, 5 µm, 500 Å, 4.6 × 50 mm, 保护柱	5190-6860
Bio SEC-5, 5 µm, 500 Å, 7.8 × 300 mm	5190-2531
Bio SEC-5, 5 µm, 500 Å, 7.8 × 150 mm	5190-2532
Bio SEC-5, 5 µm, 500 Å, 7.8 × 50 mm, 保护柱	5190-2535
<b>1000 Å 色谱柱</b>	
Bio SEC-5, 5 µm, 1000 Å, 4.6 × 300 mm	5190-2538
Bio SEC-5, 5 µm, 1000 Å, 4.6 × 150 mm	5190-2539
Bio SEC-5, 5 µm, 1000 Å, 4.6 × 50 mm, 保护柱	5190-6861
Bio SEC-5, 5 µm, 1000 Å, 7.8 × 300 mm	5190-2536
Bio SEC-5, 5 µm, 1000 Å, 7.8 × 150 mm	5190-2537
Bio SEC-5, 5 µm, 1000 Å, 7.8 × 50 mm, 保护柱	5190-2540
<b>2000 Å 色谱柱</b>	
Agilent Bio SEC-5, 5 µm, 2000 Å, 4.6 × 300 mm	5190-2543
Agilent Bio SEC-5, 5 µm, 2000 Å, 4.6 × 150 mm	5190-2544
Agilent Bio SEC-5, 5 µm, 2000 Å, 4.6 × 50 mm, 保护柱	5190-6862
Agilent Bio SEC-5, 5 µm, 2000 Å, 7.8 × 300 mm	5190-2541
Agilent Bio SEC-5, 5 µm, 2000 Å, 7.8 × 150 mm	5190-2542
Agilent Bio SEC-5, 5 µm, 2000 Å, 7.8 × 50 mm, 保护柱	5190-2545

## 我的列表 2: 备件和样品容器

描述	货号
<b>接头和管线</b>	
用于 Quick Turn 接头的安装工具	5043-0915
InfinityLab Quick Connect 快速连接液相色谱接头	5067-5965
Quick Connect 快速连接毛细管, MP35N, 0.12 × 105 mm, 用于 Quick Connect 快速连接接头	5500-1578
Quick Turn 毛细管, MP35N, 0.12 × 280 mm	5500-1596
<b>在线过滤器</b>	
InfinityLab Quick Change 在线过滤器组件, 用于 UHPLC*	5067-1603
InfinityLab Quick Change 滤盘, 直径 2.1 mm, 孔径 0.2 µm, 5/包	5067-1610
<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, 样品瓶规格: 12 × 32 mm (12 mm 瓶盖), 100/包。	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 微孔板密封垫, 50/包	5042-1389

### 我的列表 3: 标准品、溶剂和溶剂备件

描述	货号
<b>标准品与溶剂</b>	
300 Å AdvanceBio SEC 校准标样	5190-9417
Agilent NIST mAb, 25 µL	5191-5744
Agilent NIST mAb, 4 × 25 µL	5191-5745
InfinityLab LC/MS 级超纯水, 1 L	5191-4498
InfinityLab 水, 用于 LC/MS, 6 × 1 L*	5191-5121
<b>溶剂过滤备件†</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 (不包括活性炭过滤器 5043-1193)	5043-1221
带时间标签的 InfinityLab 活性炭过滤器, 58 g (适用于 5043-1221)	5043-1193

\* 仅针对部分国家/地区提供

† 如果使用本表中未列出的溶剂

了解更多信息：

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

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)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE03781718

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，2023  
2023 年 10 月 15 日，中国出版  
5994-6785ZHCN

