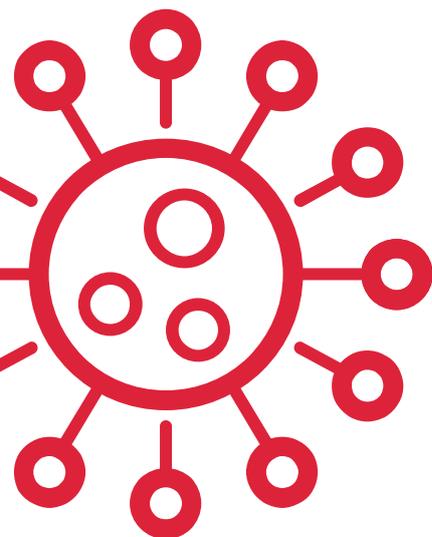


# 高灵敏度定量 AAV 及其杂质



## AAV 分析

### 客户面临的挑战

- ▶ 检测低滴度 AAV
- ▶ 分离 AAV 及其杂质

### 东曹的解决方案

LenS<sub>3</sub><sup>TM</sup> MALS 检测器联用 TSKgel<sup>®</sup> GMPW<sub>XL</sub> 色谱柱

- ▶ 高灵敏度检测器和高可靠性分离

#### 做了什么？

- ▶ 尺寸排阻色谱法与 MALS 联用，分离并检测 AAV5 和 AAV8 样品

#### 结果如何？

- ▶ AAV5 的检测极为  $8 \times 10^9$  vc，宿主细胞杂质被从 AAV 有效分离

混合床 SEC 色谱柱与高灵敏度 MALS 检测器 LenS<sub>3</sub> 联用，能够检测到低至  $8 \times 10^9$  的 AAV 衣壳，并有效分离 AAV 样品中的杂质。

### 客户权益

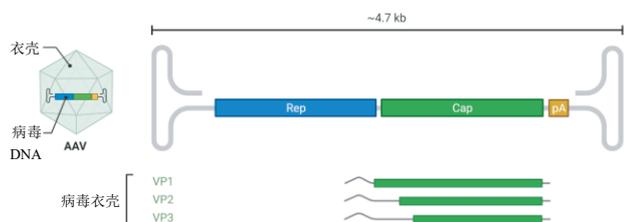
降低样本量并检测超低滴度 AAV



## SEC-MALS 法高灵敏定量腺相关病毒及杂质检测

医学中的细胞和基因治疗主要依赖于向靶细胞高效和特异性递送治疗性遗传物质。这些递送器件称为载体，多数由病毒开发而来<sup>1</sup>。细小病毒家族中的腺相关病毒（AAV），因其优异的组织 and 细胞特异性及其精确的基因组编辑能力，已成为递送治疗性基因的首选载体。AAV 为无包膜病毒，呈二十面体结构，属于细小病毒家族，其基因组为单链 DNA（长约 4.7kb）（图 1）。迄今为止，已发现 13 种 AAV 血清型和超过 100 种具有可变组织取向的变体<sup>2-4</sup>。

图 1. 野生型 AAV 及其基因组的图示



ssDNA 病毒壳内含增殖病毒的复制基因（Rep）、衣壳基因（Cap）和聚腺苷酸尾（pA）。Cap 编码组装衣壳所需的三种结构病毒蛋白 VP1、VP2 和 VP3<sup>3,4</sup>。

该图原始出处为 BioRender.com: <https://www.dynotx.com/introduction-to-aav-as-a-gene-therapy-vector-part-1/>

开发具有最佳基因组设计、临床所需的 AAV 衣壳需快速、准确和稳健的分析方法来评估 AAV 纯度、衣壳滴度、DNA 含量及结构-活性关系<sup>5</sup>。尺寸排阻色谱法（SEC）与多角度光散射（MALS）联用为表征 AAV 提供了一种强大的分析方法。与使用 UV 260/280 nm 吸光率的 AAV 传统分析方法相比，MALS 检测的优势在于其高检测灵敏度，原因是 AAV 可观的衣壳分子量（约 3.7MDa）所带来的固有强光散射响应。本文就使用 SEC-MALS 定量 AAV 衣壳滴度和测定样品杂质进行了介绍。

### 实验条件

#### 样品

纯化的 AAV5 ( $2.0 \times 10^{13}$  病毒衣壳(vc)/mL)，购自 Virovek (Hayward, CA)。含 AAV8 的人胚肾 (HEK) 细胞培养上清液（滴度  $1.5 \times 10^{12}$  vc/mL），购自 ExcellGene SA (Monthey, Switzerland)。牛血清白蛋白 (BSA) 标准品，购自 Thermo Science (Rockford, IL)。

#### SEC-MALS 分析

AAV 样品由 TSKgel GMPW<sub>XL</sub> SEC 色谱柱与 LenS<sub>3</sub> MALS 检测器联用分析。分析时，衣壳滴度如下：比较光散射信号（直角、低角度、高角度）于 280 nm 处的 UV 吸光率时，所用的 AAV5 滴度为  $2.0 \times 10^{11}$  vc/mL。测定 LOQ/LOD 时，稀释时所用的 AAV5 滴度为  $1.0 \times 10^{12}$  vc/mL ~  $1.6 \times 10^9$  vc/mL。测试含 AAV8 的上清液时，所用 AAV 滴度为  $1.5 \times 10^{12}$  vc/mL 和  $1.5 \times 10^{11}$  vc/mL。分析样品之前，先使用 BSA 校准 SEC-MALS 系统，以确定检测器偏移、谱带扩张参数和响应因子。然后，使用 SECview 软件处理和分析所有数据。

仪器:	Thermo Fisher Scientific UltiMate™ 3000 U/HPLC
色谱柱:	TSKgel GMPW <sub>XL</sub> (7.8 mm ID × 30 cm, 13 μm, 125-1000Å)
检测器:	(1) 280 nm UltiMate 3000 可变波长检测器 (VWD) (2) 东曹 LenS <sub>3</sub> MALS 检测器
流动相:	50 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, pH 7.1
流速:	0.5 mL/min
温度:	25 °C
进样量:	40-50 μL

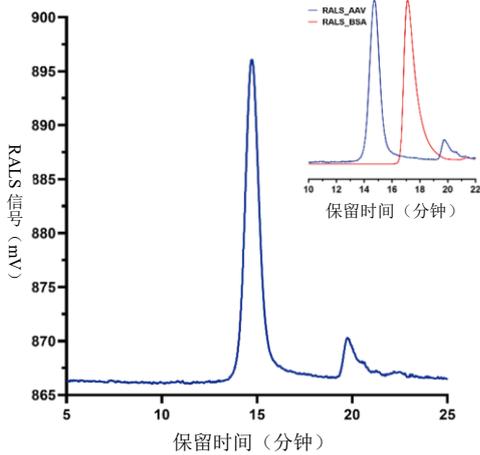
### 结果和讨论

#### SEC-MALS 分析

针对尺寸为 22~25 nm 的 AAV 衣壳，我们选择了 TSKgel GMPW<sub>XL</sub> 分析柱进行分离，其混合孔径分布高达 1000 Å。该 SEC 色谱柱拥有优异的分选度，可用于分析 AAV 并分离其杂质（细胞培养基成分、聚集衣壳或降解衣壳等）。

图2显示了 AAV5 和 BSA 的直角光散射 (RALS) 信号。SEC-MALS 与 TSKgel GMPW<sub>XL</sub> 色谱柱联用表征 AAV5 时, 发现了一个主要的 AAV5 单体峰, AAV6 的已知衣壳尺寸约为 3.7 MDa, 洗脱时的保留时间为 14~15 分钟。在保留时间约 20 分钟左右, 检测到了一些未组装的衣壳蛋白和其他组分。用来系统校准的 BSA (66 kDa), 由于其尺寸相对较小, 洗脱明显晚于 AAV5 (图2 小图)。

图2. 使用 SEC MALS (RALS) 检测 AAV5 和 BSA



### MALS 检测与 UV 280 nm 检测对比

由于 AAV 的分子量 (MW) 较高, 光散射的 MW 依赖性响应拥有的灵敏度远高于 280 nm 常规 UV 吸光率, 如图3 所示。分析浓度为  $2 \times 10^{11}$  vc/mL 的 AAV5 时 (进样量 40  $\mu$ L, 总载量  $8 \times 10^9$  vc), 280 nm 波长下未检测到 UV 信号, 而其他三种不同的光散射角度下均发现了强 MALS 信号 (信噪比为 10 至 60): RALS ( $90^\circ$ )、LALS ( $10^\circ$ )、HALS ( $170^\circ$ )。

图3. 分析 AAV5 时 RALS、LALS 和 HALS 信号与 UV @ 280 nm 信号对比

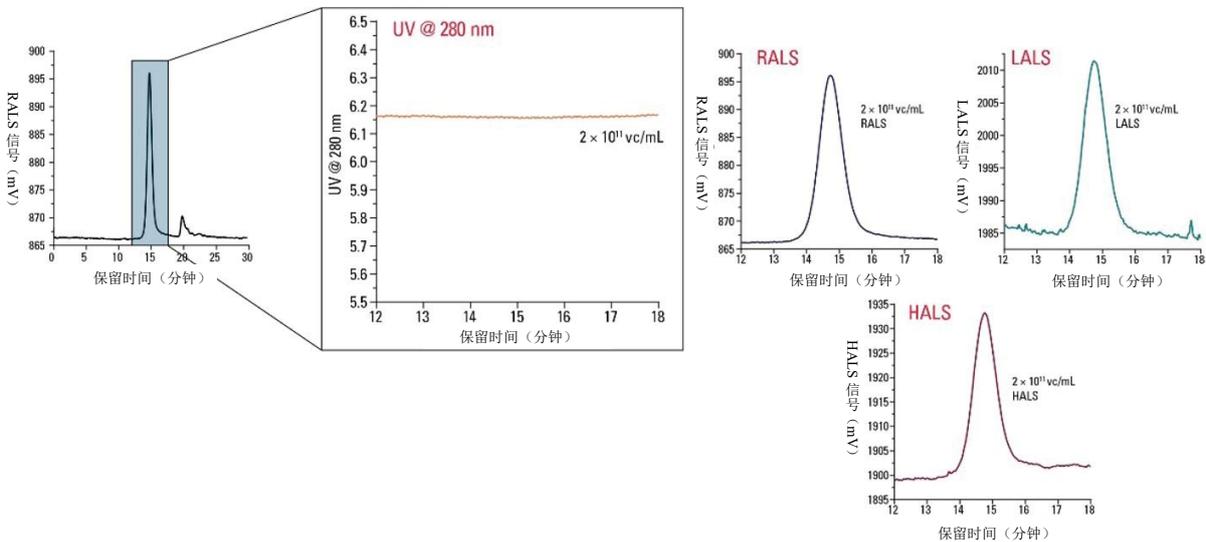
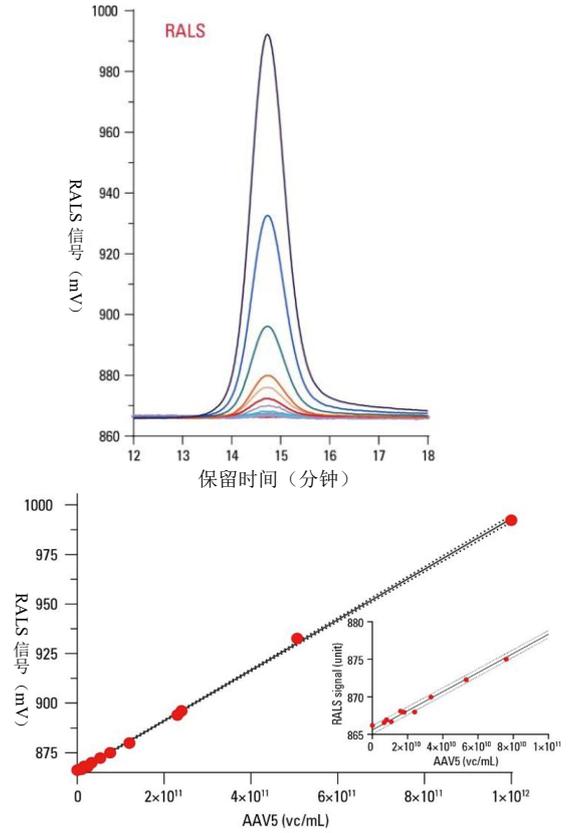


图4. RALS 信号的检测限



### 线性度和灵敏度

使用 TSKgel GMPW<sub>XL</sub> 色谱柱, 通过注入 40  $\mu$ L AAV5 的系列稀释液 (起始浓度  $1.0 \times 10^{12}$  vc/mL) 确定检测限 / 定量限 (LOD/LOQ), 可表征 MALS 检测 AAV 时的线性度和灵敏度 (图4)。

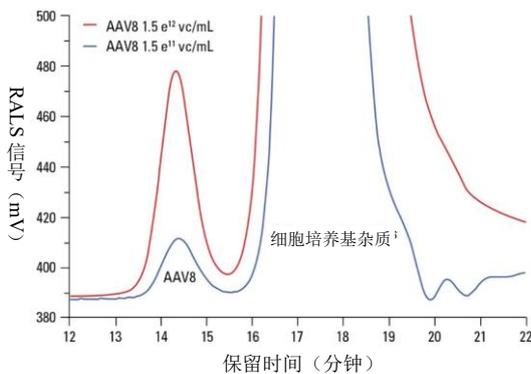
左侧图例显示的是,注入 40  $\mu\text{L}$  系列稀释样品(从  $1.0 \times 10^{12}$  vc/mL (负载  $4.0 \times 10^{10}$  vc) 到  $1.6 \times 10^9$  vc/mL (负载  $6.4 \times 10^7$  vc)) 时的分析结果。右侧图示显示的是,相同稀释率下 RALS 信号的线性度。右侧面板中的小图显示的是, AAV5 下限浓度时的局部放大图。使用 LenS<sub>3</sub> MALS 检测器信号 (RALS) 时, SEC-MALS 可检测到低至  $7.0 \times 10^9$  vc/mL 的 AAV5 样品 ( $2.8 \times 10^8$  vc 总负载)。然后,根据 LOD 可计算出 LOQ 为  $2.3 \times 10^{10}$  vc/mL (总负载  $9.2 \times 10^8$  vc)。另外, LenS<sub>3</sub> 上的 RALS 检测能够在高浓度范围内提供强的线性响应,实现衣壳滴度测定。

### 含细胞培养上清液的 AAV8 分析

AAV 分析时面临的另一个挑战是有效分离 AAV 与残留杂质,以定量 AAV 衣壳。为了测试分离性能,我们未使用 TSKgel GMPW<sub>XL</sub> 色谱柱事先纯化 AAV8,而是从 HEK 细胞培养基中直接进行分析。

图 5 显示的是 AAV8 衣壳的色谱分离结果。其洗脱峰洗脱时的保留时间为  $\sim 14.5$  分钟, HEK 细胞培养基杂质大部分的洗脱时间为 16~20 分钟,使用更高负载浓度后,可见额外尾峰。进样两种不同负载量的 AAV8 衣壳 ( $50 \mu\text{L}$  为  $1.5 \times 10^{12}$  vc/mL 和  $50 \mu\text{L}$  为  $1.5 \times 10^{11}$  vc/mL) 进样分析,可发现 RALS 信号响应的浓度依赖性,允许从更复杂的样品基质中分离并定量 AAV。两种浓度的 AAV8 色谱图上均出现明显的峰,其中细胞培养基杂质已超出 RALS 信号极限 (上部未显示)。

图 5. 使用 SEC MALS 分析含 AAV8 的细胞培养上清液



产品货号	产品名称	规格
0008025	TSKgel GMPW <sub>XL</sub>	7.8 mm ID $\times$ 30 cm, 13 $\mu\text{m}$ , 12.5~100 nm
0040000	LenS <sub>3</sub> MALS 检测器	

### 结论

快速、可重复的分析方法对于及时开发高质量的细胞和基因治疗工具至关重要。本应用说明介绍了一种强大的 SEC-MALS 分析技术,通过 LenS<sub>3</sub> MALS 检测器和 TSKgel GMPW<sub>XL</sub> 色谱柱联用,能够以极高的灵敏度检测 AAV。该方法的检测限 (LOD) 经确定可低至  $7.0 \times 10^9$  vc/mL ( $40 \mu\text{L}$ , 负载  $2.8 \times 10^8$  vc)。SEC-MALS 检测拥有超高灵敏度,能够分析极低浓度的 AAV 样品,这在材料可用性受限的早期开发阶段很受欢迎。另外,由于可直接从 HEK 细胞培养上清液中分离 AAV,因此无需事先纯化 AAV,即可直接进行 MALS 检测。总的来说,本文所述 SEC-MALS 分析法为产品开发、病毒载体生产及整个质量控制期间的 AAV 检测提供了一款灵敏、强大、稳健的分析工具。基于 SEC-MALS 数据的分析表征 (病毒大小、分子量、占 / 空比) 将在其他应用说明中进行完整介绍。

### 参考文献

- Zhao, Z, Anselmo, A.C, Mitragotri, S. Viral vector-based gene therapies in the clinic. *Bioeng. Transl. Med.* 7, e10258. DOI:10.1002/btm2.10258 (2022)
- Bijlani, S, Pang, K.M, Sivanandam, V, Singh, A, Chatterjee, S. The role of recombinant AAV in precise genome editing. *Front. Genome Ed.* 3, 799722. DOI:10.3389/fgeed.2021.799722 (2022)
- Pupo, A, Fernández, A, Low, S.H, François, A, Suárez-Amarán, L, Samulski, R.J. AAV vectors: The Rubik's cube of human gene therapy. *Mol. Ther.* 30:3515-3541. DOI:10.1016/j.ymthe.2022.09.015 (2022)
- Kang, L, Jin, S, Wang, J, Lv, Z, Xin, C, Tan, C, Zhao, M, Wang, L, Liu, J. AAV vectors applied to the treatment of CNS disorders: Clinical status and challenges. *J. Cont. Release* 355:458-473. DOI:10.1016/j.jconrel.2023.01.067 (2023)
- Gimpel, A.L, Katsikis, G, Sha, S, Maloney, A.J, Hong, M.S, Nguyen, T.N.T, Wolfrum, J, Springs, S.L, Sinskey, A.J, Manalis, S.R, Barone, P.W, Braatz, R.D. Analytical methods for process and product characterization of recombinant adeno-associated virus-based gene therapies. *Mol. Therapy: Methods Clin. Dev.* 20:740-754. DOI:10.1016/j.omtm.2021.02.010 (2021)
- Serrano, M.A.C, Furman, R, Chen, G, Tao, L. Mass spectrometry in gene therapy: Challenges and opportunities for AAV analysis. *Drug Discov. Today* 28:103442. DOI:10.1016/j.drudis.2022.103442 (2023)

Tosoh Bioscience 和 TSKgel 是 Tosoh Corporation 的注册商标。

LenS 是 Tosoh Bioscience LLC 的商标。

UltiMate 是 Thermo Fisher Scientific 的商标。