

## 利用RPLC、自体荧光和在线MS分析腺病毒载体蛋白

Matthew A. Lauber, Colette Quinn

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

### 摘要

腺病毒(AdV)是疫苗和基因疗法等制剂的病毒载体，包含相对复杂的蛋白质组。在本研究中，我们利用二氟乙酸(DFA)离子对和2.7  $\mu\text{m}$  450 Å苯基键合固定相快速分离AdV蛋白，并获得了高灵敏度质谱图。这是一种有助于研究蛋白质拷贝率和测量完整蛋白分子量的RPLC方法，为当前和未来表征基于AdV的疫苗和基因疗法提供一个理想起点。

### 优势

- 无需样品前处理步骤即可直接分析制剂样品
- DFA离子对可优化色谱分离度，而不会过度影响MS灵敏度，支持宽动态范围分析
- 2.7  $\mu\text{m}$ 表面多孔颗粒对UPLC和UHPLC分离均适用，可轻松适应不同实验室中的设备

### 简介

在7136种已知的人类疾病中，基因功能失调占80%<sup>1</sup>。其中许多单基因疾病可开发基因疗法予以治疗。同时，SARS-CoV-2病毒载体疫苗的应用正在帮助生物技术行业为进一步推动基因治疗产品的发展做好准备。体内基因治

疗的常用递送方法需要使用病毒载体。在选择病毒载体和血清型时，有几个关键考虑因素：免疫反应、插入突变、病毒嗜性、脱靶效应和转基因容量<sup>1</sup>。借助这些考虑因素，候选病毒载体列表大幅缩短，在剩下的候选病毒载体中，有一种是腺病毒(AdV)。

有数百种疫苗和癌症试验已经使用或正在使用基于人类AdV的载体；某些试验可追溯到40多年前。目前，正在开发或处于临床阶段的AdV研究超过50项<sup>2</sup>。特定的人血清型（例如AdV5）或非人血清型（例如chAdV）用于避免现有的体液免疫<sup>2</sup>。

AdV是一种无包膜病毒，利用双链线性DNA存储基因组信息。它可以构建复制缺陷型载体，与大型转基因一起包装，并递送保留为游离DNA形式的非整合基因有效荷载，因而成为基因治疗中的高效工具<sup>3</sup>。与其他病毒一样，AdV的分子量非常大(150 MDa)，尺寸相当紧凑，直径约90 nm。该直径是典型mAb的6倍，分子量是典型mAb的100倍。衣壳由六邻体蛋白的240个三聚体组成，并且从病毒主体延伸出蛋白质纤维修饰<sup>3</sup>。其蛋白质组相对复杂，蛋白质含量超过六邻体和纤维蛋白。图1所示为蛋白质组和一般结构图。除六邻体和纤维蛋白外，衣壳内还有另一种主要物质：五邻体基质蛋白。除此之外，还含有胶结蛋白发挥将衣壳成分保持在一起的作用；以及另一组蛋白质与基因组DNA一起存在于颗粒核心中（表1）<sup>4-6</sup>。

AdV蛋白分析对于表征以AdV作为载体的先进治疗药物非常重要。在本研究中，我们利用DFA离子对和2.7  $\mu\text{m}$  450 Å苯基键合固定相快速分离AdV蛋白，并获得了高灵敏度质谱图。这是一种有助于研究蛋白质拷贝率和测量完整蛋白分子量的RPLC方法，为当前和未来表征基于AdV的疫苗和基因疗法提供一个理想起点。

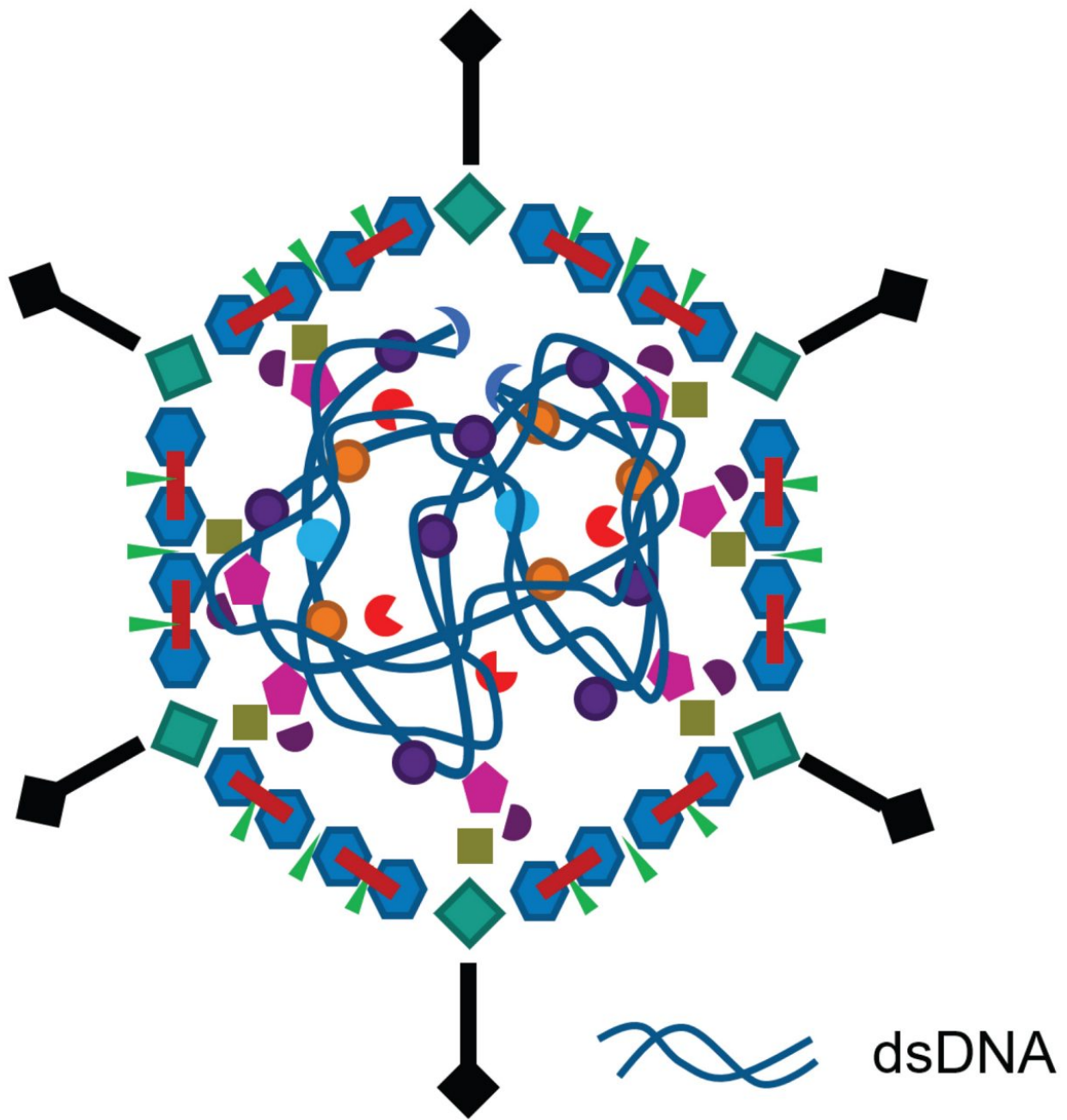


图1.Reddy及共同作者近期概述的人5型腺病毒(HuAdV5)结构图示<sup>4</sup>

## 实验

### 人5型腺病毒(HuAdV5) CMV GFP

---

本研究分析的人5型腺病毒样品购自Applied Biological Materials（加拿大不列颠哥伦比亚省里士满）。它是一种-E1/-E3缺失突变体，因此无法复制。经过巨细胞病毒(CMV)启动子和绿色荧光蛋白(GFP)转基因改造后，制成滴度浓度为每毫升 $1 \times 10^{12}$ 噬菌斑形成单位(pfu)。将样品直接进样至RPLC色谱系统，不进行任何额外的样品前处理步骤。

## 反相液相色谱(RPLC)条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统
检测器:	ACQUITY UPLC FLR
激发波长:	280 nm
发射波长:	360 nm
扫描速率:	20 Hz
色谱柱:	BioResolve RP色谱柱, 450 Å, 2.7 μm, 2.1 × 150 mm (沃特世部件号: 186008946)
柱温:	80 °C
样品温度:	8 °C
进样:	10 μL $10 \times 10^{12}$ pfu/mL
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	0.1% DFA (v/v) (IonHance DFA, 沃特世部件号: 186009201) 的18.2 MΩ水溶液
流动相B:	0.1% DFA (v/v)的LC-MS级乙腈溶液

## 质谱条件

质谱系统:	Vion IMS QToF离子淌度四极杆飞行时间质谱仪
模式:	ESI+
采集窗口:	1000–4000 <i>m/z</i>
离子源温度:	150 °C
样品锥孔电压:	150 V
补偿:	100 V
碰撞能量:	15 eV
扫描速率:	2 Hz
脱溶剂气温度:	650 °C
脱溶剂气流速:	1200 L/h
锥孔气流速:	300 L/h
仪器控制:	UNIFI v1.9.13

## 结果与讨论

2018年, van Tricht及共同作者针对杨森制药AdVac技术病毒载体中存在的蛋白质报告了一种稳定的液相色谱方法设计<sup>7</sup>。他们通过方法开发研究表明, 该方法可以提高AdV蛋白的分离度, 同时将运行时间从130 min缩短至仅需17 min。为实现此目的, 他们将填充有5 μm 300 Å C<sub>4</sub>键合硅胶的2.1 × 250 mm色谱柱替换为填充有1.7 μm BEH 300 Å C<sub>4</sub>的2.1 × 150 mm色谱柱。然后利用多因素DoE研究AdV 26型和35型候选疫苗以确定理想流动相。结果发现, 采用离子对试剂三氟乙酸(TFA)且浓度为0.175%时的结果较为理想。虽然实现了高分离度、高通量分离, 但由于担心离子抑制效应, 未采用在线MS。而是通过馏分收集辅以肽图分析来促进峰鉴定。本文探讨了RPLC在AdV蛋白质表征中的应用, 但优先考虑与MS直接联用, 因此采用DFA代替TFA。此外, 将DFA与2.7 μm表面多

孔颗粒以及刚性结构、高覆盖率苯基键合固定相配合使用。这种色谱柱技术(BioResolve RP mAb Polphenyl)之前已被发现有助于提高蛋白质回收率并适用于更温和的洗脱条件<sup>8</sup>。

使用该方法分析含有GFP转基因的人5型腺病毒(HuAdV5)样品。通过先实施自体荧光检测后利用飞行时间质谱仪进行ESI-MS的方式连续检测洗脱蛋白，样品被直接注入色谱柱，不提前进行任何样品前处理操作。0.1% DFA流动相配合应用20 min梯度（乙腈从10%增加到50%）。2.1 × 150 mm色谱柱运行的流速为0.4 mL/min，系统压力上限为6700 psi。示例色谱图见图2。荧光检测所具备的灵敏度足以对蛋白质样品提供详细谱图。峰面积分布在宽动态范围内，由此可以预测，AdV样品和病毒颗粒所含蛋白质的拷贝数变化幅度高达三个数量级。观察到50%峰高处的分离峰宽为2.5 s（7.46 min处的峰）或5.8 s（14.46 min处的峰）。对于整个分离过程中选定的峰，估计平均峰容量在200~480的范围内。

使用DFA离子对进行蛋白质RPLC分析的价值在于能够优化色谱分离度，而不会引入使用TFA时可能产生的离子抑制和气相加合物形成<sup>9</sup>。分析中在线MS检测的灵敏度说明了使用DFA执行LC-MS分析的潜力。图2B和2C展示了HuAdV5样品的总离子计数(TIC)色谱图和基峰强度(BPI)色谱图。从图中可以看出，总离子计数接近 $2 \times 10^7$ ，可轻松去卷积以得到分子量信息的原始质谱图也是如此。前两个分离峰的分子量分别为1.3 kDa和3.6 kDa，根据电荷态、同位素分辨率和单同位素分子量确认它们为肽段分析物。此类物质存在于AdV蛋白质组中，因此这是一个可预测结果。粗略观察保留性更强的峰，发现存在分子量为10 kDa至高达约110 kDa的蛋白质。我们详细研究了其中一些物质及其分子量。

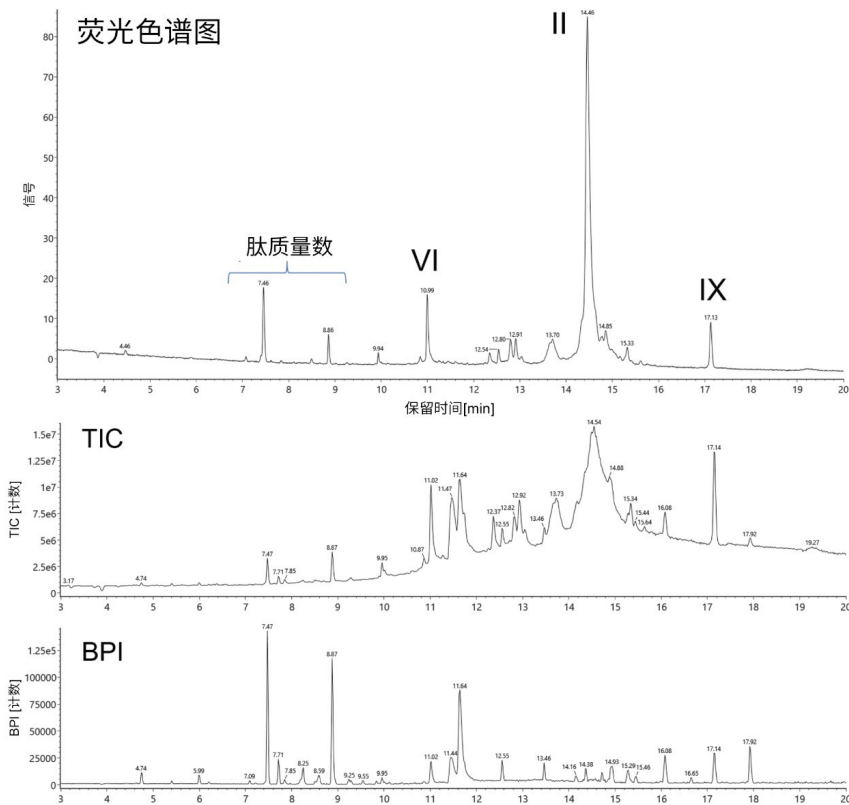


图2.使用2.1 × 150 mm BioResolve RP色谱柱(450 Å, 2.7 μm)和二氟乙酸(DFA)改性的水/乙腈流动相获得的HuAdV5 GFP腺病毒载体蛋白LC-MS色谱图。分离采用ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统，进样10 μL 10 × 10<sup>12</sup> pfu/mL样品，流速为0.4 mL/min，柱温为80 °C。荧光检测与使用Tof质谱仪的完整蛋白分子量分析一起进行。

在10.99 min处洗脱的峰产生了图3A所示的累加质谱图。通过MaxEnt 1去卷积后，得到分子量为22,100 Da。此分子量只与HuAdV5的蛋白质VI匹配，该分配结果的质量数误差为0.0 Da。也就是说，它与标注为UniProt KB登录号P24937的序列完全匹配。这种蛋白也称为内体裂解蛋白，是AdV颗粒中拷贝数最高的胶结蛋白。另一种潜在的蛋白质鉴定可通过分析17.13 min处的液相色谱峰来说明。该峰的累加质谱图见图3B。插图显示了相应的去卷积质谱图，其中实测质量数为14,369.2 Da。预计只有一种AdV蛋白处于该分子量范围内，即蛋白质IX。它也是一种胶结蛋白。蛋白质IX在AdV衣壳结构的一些主要成分之间起交织作用。蛋白质IX的实测分子量与UniProt P0328预测值不一致，为14,327.0 Da。质量数误差为42.2 Da，可能是由乙酰化或序列变异造成的。比对其他UniProt提交项的结果表明，AdV蛋白质IX表现出序列变异性，同样可以解释这种质量数误差，例如丙氨酸被亮氨酸或异亮氨酸取代。

色谱图中高丰度物质的分析值得注意。图3C的质谱图中检出了这种标记14.46 min保留时间的蛋白质。对该信号进行去卷积，得到实测分子量为107,899.1 Da。预测分子量接近实测质量数的唯一AdV蛋白是蛋白质II或六邻体蛋白

质。Uniprot KB登录号P04133预测该蛋白质的分子量低约23 Da，质量数为107,875.9 Da。尽管实测质量数与理论质量数之间存在差异，但将这种蛋白质鉴定为六邻体蛋白是相当可靠的，因为它是AdV颗粒中丰度最高的蛋白质，估计每个病毒颗粒含有720个拷贝数。对替代UniProt AdV5序列的分析表明存在许多常见的六邻体蛋白序列变体。一个或多个序列变体及相应的氨基酸取代可以解释该样品中测得的六邻体蛋白分子量。需要在肽水平上开展额外研究，以确认实测质量数偏差。

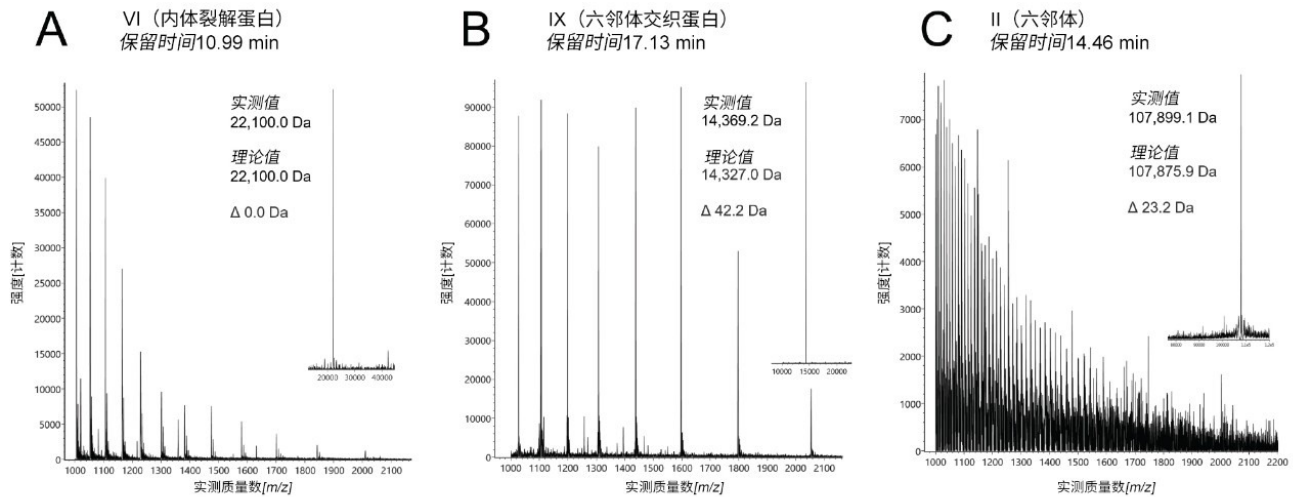


图3.HuAdV5 GFP样品中3种高丰度物质的ESI-MS飞行时间质谱图。(A) 10.99 min、(B) 17.13 min和(C) 14.46 min出色谱峰的原始质谱图及Max Ent 1去卷积质量数（插图）。根据测得的MS数据提出了推断性鉴定结果。

## 结论

本研究针对AdV蛋白提出一种RPLC分析技术，可同时执行光学和在线MS检测，因此能够研究蛋白质拷贝率并确认分子量信息。该方法利用DFA离子对和2.7  $\mu\text{m}$  450  $\text{\AA}$ 苯基键合固定相高效分离AdV蛋白，并获得了高灵敏度质谱图

该方法为当前和未来表征基于AdV的疫苗和基因疗法提供一个理想起点。随着人们对疫苗和基因疗法的需求不断增加，预计该领域将持续增长，且深入的分析理解将有助于克服公众认可和采用的障碍。AdV病毒载体具有高滴度、高效转导和大包装容量的能力，非常适合作为更先进治疗药品的递送载体。

## 参考资料

1. Goswami, R.; Gayatri Subramanian, G.; Silayeva, L.; Newkirk, I.; Doctor, D.; Chawla, K.;



- Chattopadhyay, S.; Chandra, D.; Chilukuri, N.; Betapudi, V. Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle. *Frontiers in Oncology*.19(297), 2019.
2. Mennechet, F.J.D.; Paris, O.; Raissa Ouoba, A.; Arenas, S.; Sirima, S.B; Takoudjou Dzomo, G.R.; Diarra, A.; Traore, I.T.; Kania, D.; Eichholz, K.; Weaver, E.A.; Tuillon, E.; Kremer, E.J. A Review of 65 Years of Human Adenovirus Seroprevalence. *Expert Review of Vaccines*, 18:6, 597–613.2019.
  3. Lee, C.S.; Bishop, E.S.; Zhang, R.; Yu, X.; Farina, E.M.; Yan, S.; Zhao, C.; Zeng, Z.; Shu, Y.; Wu, X.; Lei, J.; Li, Y.; Zhang, W.; Yang, C.; Wu, K.; Wu, Y.; Ho, S.; Athiviraham, A.; Lee, M.J.; Moriatis Wolf, J.; Reid, R.R.; He, T.C. Adeno Virus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine. *Genes & Disease*.4(2), 43–63, 2017.
  4. Reddy, V. S.; Nemerow, G. R. Structures and Organization of Adenovirus Cement Proteins Provide Insights Into the Role of Capsid Maturation in Virus Entry and Infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (32), 11715–11720 2014.
  5. Reddy, Vijay S.; Barry, Michael A. Structural Organization and Protein-Protein Interactions in Human Adenovirus Capsid. *Subcellular Biochemistry*. Springer Science and Business Media B.V, 503–518, 2021.
  6. Ahi YS, Mittal SK. Components of Adenovirus Genome Packaging. *Front Microbiol*.7:1503. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01503, 2016.
  7. Van Tricht, E., de Raadt, P., Verwilligen, A., Schenning, M., Backus, H., Germano, M., Somsen, G. W., & Sanger-van de Griend, C. E. Fast, Selective and Quantitative Protein Profiling of Adenovirus-Vector Based Vaccines by Ultra-performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*. A 1581-1582, 25–32, 2018.
  8. Bobaly, B.; D'Atri, V.; Lauber, M.; Beck, A.; Guillaume, D.; Fekete, S. Characterizing Various Monoclonal Antibodies With Milder Reversed Phase Chromatography Conditions. *Journal of Chromatography B* 1096. DOI: [10.1016/j.jchromb.2018.07.039](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.07.039) <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.07.039>> ; 2018.
  9. Nguyen, J.M.; Smith, J.; Rzewuski, S.; Legido-Quigley, C.; Lauber, M.A. High Sensitivity LC-MS Profiling of Antibody-Drug Conjugates With Difluoroacetic Acid Ion Pairing. *mAbs* 11(8), 1358–1366, 2019.

## 特色产品

- 
- [ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <https://www.waters.com/10166246>](https://www.waters.com/10166246)

- [ACQUITY UPLC FLR检测器 <https://www.waters.com/514222>](https://www.waters.com/514222)
- [Vion IMS QToF离子淌度四极杆飞行时间质谱仪 <https://www.waters.com/134845751>](https://www.waters.com/134845751)

720007403ZH, 2021年10月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.