

## 使用XBridge™ Premier GTx BEH™ SEC 450 Å 2.5 µm色谱柱改进腺相关病毒(AAV)的体积排阻色谱分析

---

Mateusz Imiolek, Szabolcs Fekete, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

---

### 摘要

本应用纪要讨论了使用XBridge™ Premier GTx BEH™ SEC 450 Å 2.5 µm色谱柱改进腺相关病毒(AAV)载体基因疗法的体积排阻色谱(SEC)分析的方法。我们必须开发稳定的SEC方法，以确保这些方法能够准确反映药品的聚集特征，并且必须能够及时提供可重现的结果。本文介绍了一款经过专门设计和研究的色谱柱，该色谱柱可确保改善基因治疗药物(GTx)和AAV药物的分析。这些色谱柱的平均颗粒孔径为450 Å，并采用了MaxPeak™高性能表面(HPS)，专为AAV分析量身定制。这些技术可大幅减少吸附损失，确保对高分子量和低分子量分子大小的异构体进行有效分离，并在更广泛的流动相条件下提高样品回收率。借助该技术，我们仅需10 mM磷酸盐和200 mM KCl的流动相条件即可进行不依赖于血清型的AAV分析。此外，我们还发现，使用2.5 µm颗粒可以显著提高分离度。另外，与目前应用的5 µm色谱柱相比，这些2.5 µm颗粒可用于缩短分析时间，并且不会损失任何分离质量。最后，我们测试了XBridge™ Premier GTx BEH™ SEC 450 Å 2.5 µm色谱柱在配备保护柱的配置中的色谱性能，以证明其可以在保护分析柱使用寿命的同时实现高分离度分离。

### 优势

- 更快、通量更高的聚集体分析
  - 次级（非特异性）静电相互作用减少，使高分子量物质(HMWS)分析更可靠
-

- 使用单一平台方法和配备保护柱的色谱柱获得良好的色谱柱稳定性和分析可靠性

---

## 简介

体积排阻色谱(SEC)是一项历史悠久的技术,已广泛应用于生物制药行业的聚集体和四级结构测量<sup>1</sup>。意料之中的是,该技术还用于新基因治疗产品的开发和表征,其中包括将聚集体视为关键质量属性的AAV载体<sup>2</sup>。作为一种复杂的蛋白质集合体,AAV衣壳可以表现出多样化的聚集特征,一小部分自缔合形式的波长达到100 nm以上的亚可见光范围。分析这种大小的颗粒需要使用专门的分析工具<sup>3</sup>。但是,填充颗粒通常会聚集成较小的可溶性二聚体和三聚体低聚物,可以使用SEC对此进行常规分析<sup>3</sup>。因此,颗粒孔径约为450–500 Å的SEC色谱柱可以很好地有效分离单体病毒颗粒与较小的杂质和高阶多聚体<sup>4</sup>。

我们之前已经证明,使用填充3.5 μm颗粒的Waters XBridge BEH SEC 450 Å蛋白分析专用柱可实现对AAV聚集体的高灵敏度定量<sup>3</sup>。然而,本研究显示,要确保二聚体和三聚体低聚物的回收率最高,我们必须单独优化流动相盐浓度。

已知蛋白质通过静电相互作用与金属表面发生相互作用。这会导致不必要的吸附和峰畸变,并且需要通过采取特殊措施(例如使用高离子强度流动相)来克服这些问题。就在最近,有研究人员通过使用亲水性MaxPeak™高性能表面(hHPS)对色谱柱硬件进行改进,成功解决了单克隆抗体的这一问题<sup>3</sup>。使用此类低吸附色谱柱硬件可显著提高方法稳定性和通用性。我们预测,在BEH 450 Å SEC色谱柱中使用hHPS硬件进行AAV SEC分析可以获得类似的优势。本应用纪要通过实验证明了这种色谱柱硬件的优势。

本应用纪要还展示了2.5 μm粒径的应用。预计粒径减小将提高分析效率,并通过更好地分离聚集体实现更可靠的定量。此外,我们可以通过使用效率更高的较小粒径来提高通量和灵敏度<sup>4</sup>。然而,研究人员尚未将现代亚3 μm颗粒应用于AAV的分析,这可能是出于对潜在的剪切和筛分效应的担忧<sup>9</sup>。在本应用纪要中,我们证明填充2.5 μm颗粒的XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å色谱柱比我们既往经验中的色谱柱更适合执行AAV聚集体分析。最重要的是,这些色谱柱具有与生俱来的效率优势,能够实现更高通量的测定,并提高大小异构体的分离度,使表征工作更加全面。

---

## 实验

### 样品和流动相制备

---

将一份AAV (AAV2、AAV5或AAV9, 1E+13 vg/mL, Virovek, 含CMV-GFP基因的完整衣壳样品或空衣壳样品) 转移至样品瓶中, 然后直接进样至SEC色谱柱。

注意: 进样高度聚集样品时应谨慎操作。建议在进样至SEC色谱柱之前对此类样品离心去除颗粒物和/或使用针式过滤器过滤。

## 液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY™ H-Class Bio Plus (四元)
检测:	荧光检测器: 激发波长: 280 nm, 发射波长: 350 nm (2个数据点/秒); 配备5 mm钛合金流通池的ACQUITY UPLC TUV检测器, 260 nm和230 nm (2个数据点/秒)
样品瓶:	采用MaxPeak HPS技术的QuanRecovery™ 12 × 32 mm螺纹口样品瓶, 300 µL, 100个/包 (P/N: 186009186)
色谱柱:	分析柱: XBridge Premier GTx BEH SEC色谱柱, 450 Å 2.5 µm 4.6 x 150 mm (P/N: 186010584) 保护柱: MaxPeak Premier GTx BEH SEC保护柱, 450 Å 2.5 µm 4.6 x 30 mm (P/N: 186010583)
柱温:	25°C
样品温度:	6 °C
进样体积:	1.0 µL
流速:	0.25 mL/min
流动相:	10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 用HCl调节至pH 7.4, 200 mM

KCl, 0.2  $\mu\text{m}$  无菌过滤

(流动相只能使用2天, 或者用叠氮化物制备流动相以阻止细菌生长)。

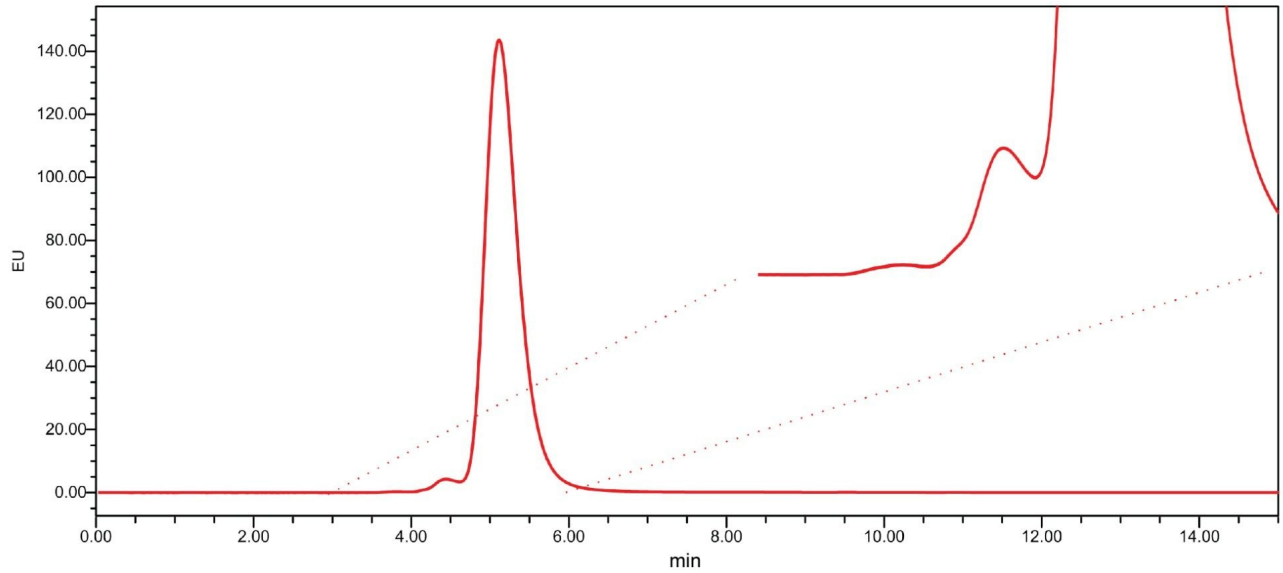
---

## 结果与讨论

### 粒径和动力学性能

为了解典型AAV分析的性能, 我们首先选择使用5  $\mu\text{m}$  硅胶填料以考察分离情况。我们使用PEEK硬件获得AAV2样品的示例分离结果, 如图1A所示。使用0.25 mL/min的流速得到了合理的 $t_0$ 时间, < 10 min。但是, HMWS峰只能部分分离。在这些条件下, 利用 $N = 630$  USP塔板数洗脱主峰, 分析效率不理想。需要更长的运行时间才能达到所需的分离度(即运行更长的色谱柱或更低的流速)。接下来, 使用相同尺寸的XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5  $\mu\text{m}$  色谱柱重新运行分离(图1B)。该分析显著改善了低聚物的分离,  $t_0$ 时间相似, 均< 10 min, 主峰的塔板数明显更高( $N = 2760$ )。也就是说, XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5  $\mu\text{m}$  色谱柱的AAV分离效率是5  $\mu\text{m}$  颗粒色谱柱的四倍。改变粒径有望将柱效提高一倍。柱效的额外提升可能是色谱柱填料质量差异的结果。

**A** PEEK硬件  
5  $\mu\text{m}$ 硅胶500 Å颗粒色谱柱



**B** XBridge Premier GTx  
BEH SEC 450 Å 2.5  $\mu\text{m}$ 颗粒色谱柱

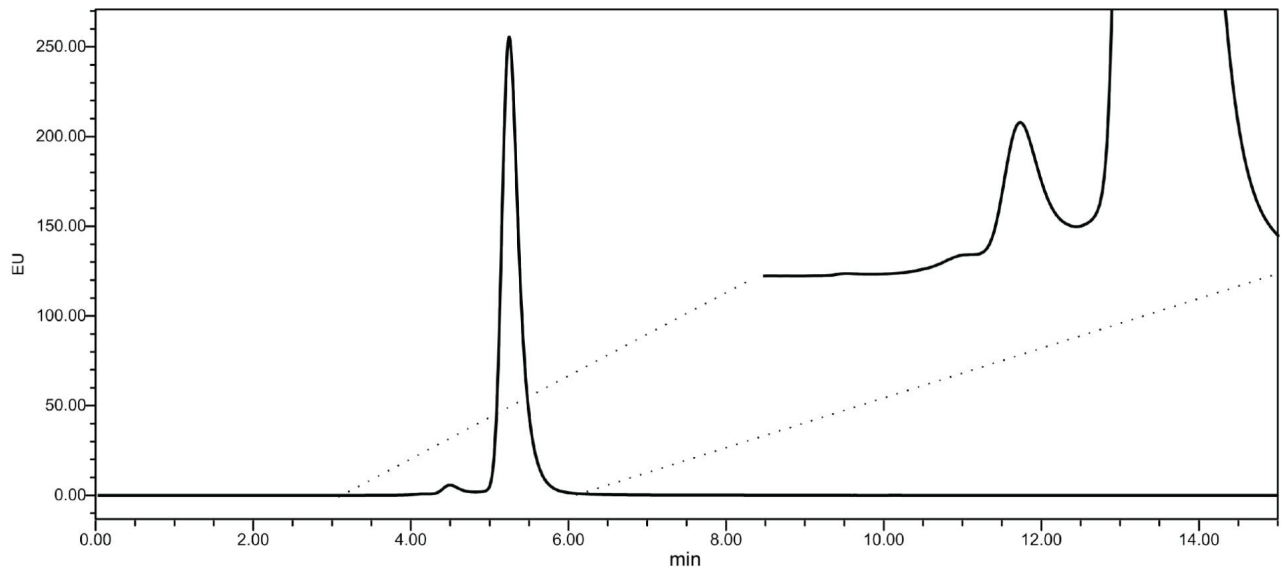


图1. 使用以下色谱柱对AAV2样品进行SEC分离: A) PEEK硬件4.6 x 150 mm色谱柱, 填充5  $\mu\text{m}$  500 Å硅胶颗粒, B) XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm色谱柱。图中放大了色谱图的HMWS区域, 以显示比较分离的差异。

## 色谱柱硬件的影响

大多数市售色谱柱由不锈钢硬件制成，已知这种硬件容易与分析物发生不必要的次级相互作用。为评估该效应对病毒载体分析的影响，我们使用AAV2样品比较了两种色谱柱硬件，即硅胶5  $\mu\text{m}$ 不锈钢色谱柱与亲水性HPS 2.5  $\mu\text{m}$ 色谱柱（XBridge Premier色谱柱）。流动相由浓度为200 mM的标准盐组成，pH为7.4。在这些条件下，使用不锈钢色谱柱几乎未检测到聚集体，表明HMWS在金属表面发生了损失（图2）。相比之下，XBridge Premier色谱柱的HMWS峰表观回收率较高。要想在两种色谱柱上观察到相当的聚集体水平，我们需要在方法开发上面下大功夫。

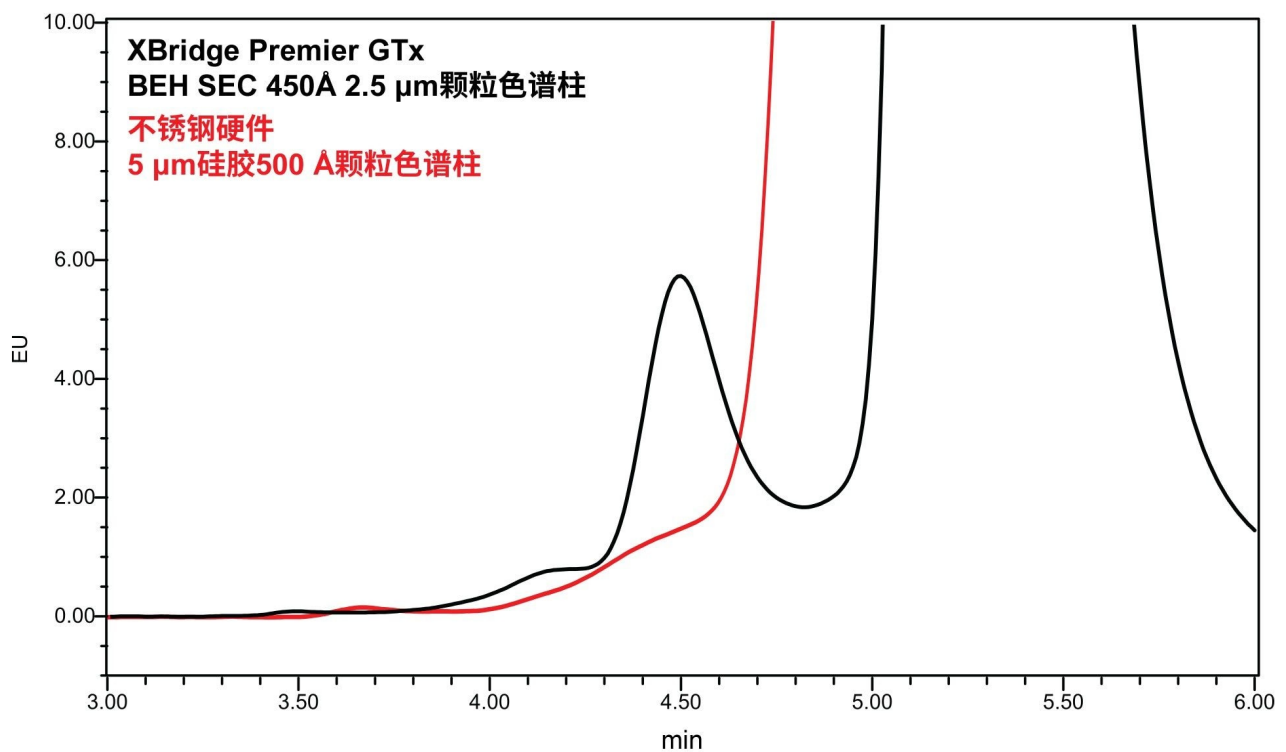


图2.AAV2色谱图的放大图，分别使用不锈钢硬件（4.6 x 150 mm，5  $\mu\text{m}$ 颗粒，红色迹线）和hHPS硬件（XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5  $\mu\text{m}$  4.6 x 150 mm色谱柱，黑色迹线）。分离使用了含有标准离子强度缓冲液（10 mM磷酸盐pH 7.4 + 200 mM KCl）的流动相。

## 加快分析速度，实现快速分离

接下来，我们需要证明XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5  $\mu\text{m}$ 色谱柱能够在明显更短的时间内生成各种

AAV血清型的SEC色谱图。我们选择以推荐的最大流速0.6 mL/min运行色谱柱，此时分析时间为5 min（图3）。在这些条件下，我们能够定量聚集体，并且其定量水平证明与参比5  $\mu\text{m}$  PEEK硬件色谱柱在低流速下运行的数据一致（差异<15%，表1）。为了获得与参比色谱柱相当的分度度，需要以0.05 mL/min的流速运行分离，从而将分析时间延长10倍（50分钟）。

流速 (mL/min)	色谱柱	HMWS定量结果(%)			
		AAV2	AAV9	AAV5 - 空	AAV5 - 完整
0.60	XBridge Premier GTx BEH SEC 450Å 2.5 $\mu\text{m}$ 色谱柱	2.2	9.5	2.7	3.6
0.25		2.4	9.0	2.2	4.4
0.25	PEEK硬件500 Å 5 $\mu\text{m}$ 硅胶色谱柱	2.1	8.3	2.3	3.3
0.05		2.5	10.6	2.8	4.2

表1.使用GTx BEH和标准色谱柱在不同流速下对HMWS的定量结果(%)

**XBridge Premier GTx  
BEH SEC 450Å 2.5 μm颗粒色谱柱  
流速 = 0.6 mL/min  
分析时间 = 5 min**

**PEEK硬件  
5 μm硅胶500 Å颗粒色谱柱  
流速 = 0.05 mL/min  
分析时间 = 50 min**

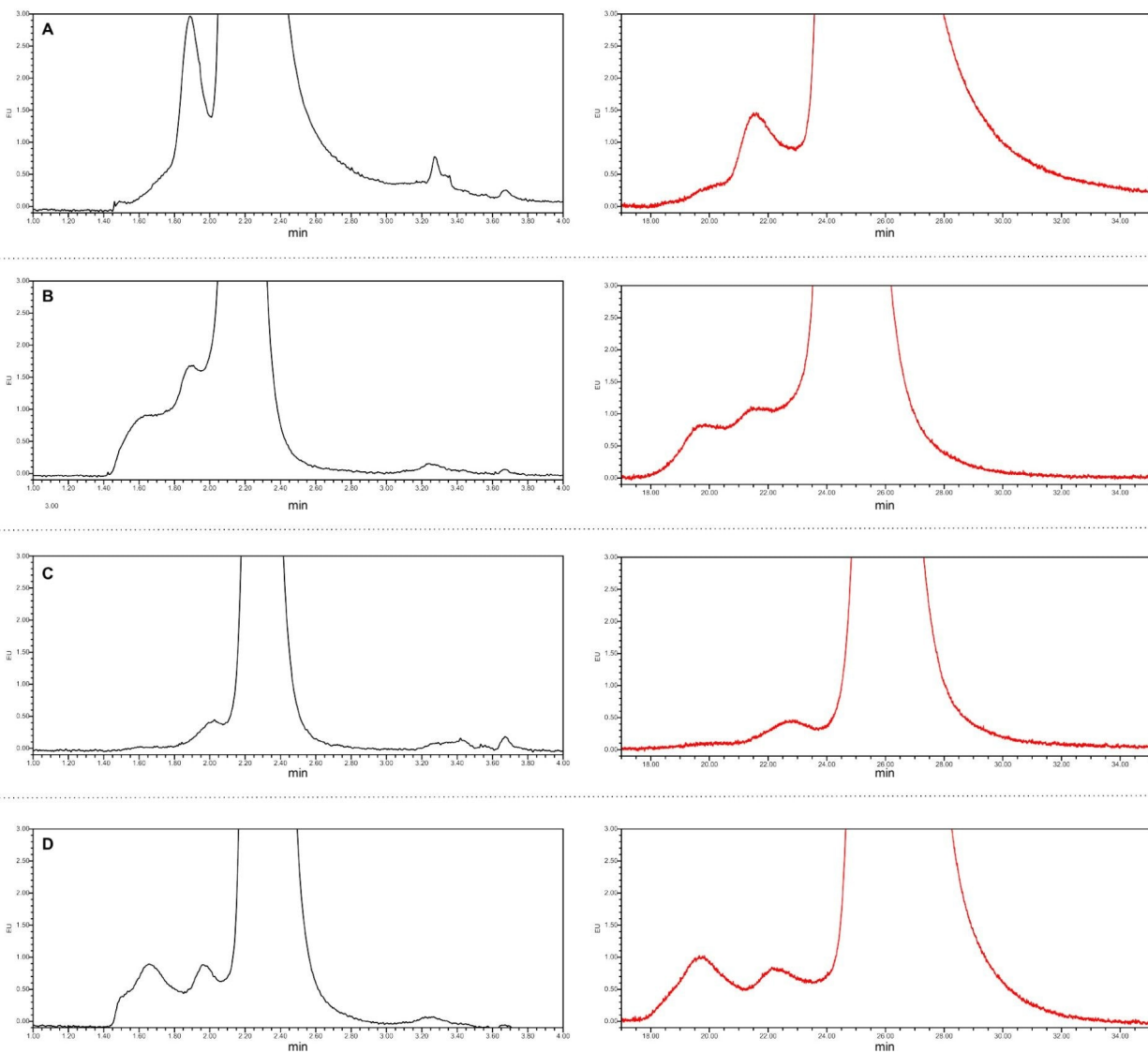


图3. SEC色谱图的放大图: A) AAV2, B) AAV9, C) AAV5 - 空衣壳样品, D) AAV5 - 完整衣壳样品, 分别使用 XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5 μm 色谱柱在 0.6 mL/min (2.5 μm 颗粒, 5 min 分析时间, 黑色迹线) 下运行, 使用参比 500 Å 色谱柱在 0.05 mL/min (5 μm 颗粒, 50 min 分析时间, 红色迹线) 下运行。



## 关于保护柱的使用

要对AAV进行可靠且可重现的分析，要求分析柱的性能在长期使用中始终保持不变。考虑到病毒颗粒的复杂性，可以设想，进样高度聚集的样品花费的时间较长，可能会导致色谱柱入口受到污染。分析的整体性能也会随之逐渐下降。因此，建议使用较短的保护柱，以延长分析柱的使用寿命。我们比较了几种AAV在XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5 μm色谱柱上单独使用与配备保护柱时的分离效率（图4）。在分析时间略微延长(20%)的同时，分析分离度也有所提高( $R_s$  2.1 vs 1.9)，与使用更长的色谱柱（30 mm保护柱加150 mm分析柱）进行SEC分离的预期一致。需要注意的是，该保护柱同时适用于内径4.6 mm和7.8 mm的分析柱。

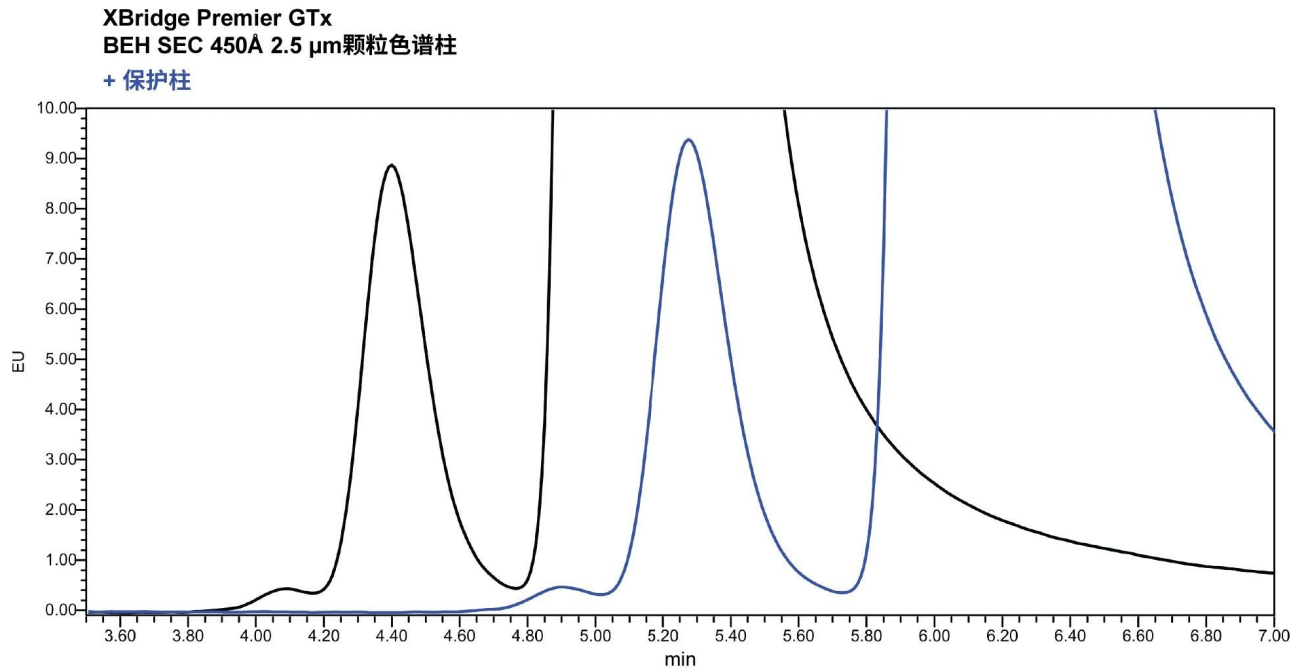


图4. AAV2的SEC色谱图放大图，分别使用配备（蓝色迹线）和未配备（黑色迹线）4.6 x 30 mm保护柱的XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5 μm色谱柱获得。两种情况下HMWS的含量测定结果均为1.7%。在AAV进样超过40次以后移除保护柱，仅使用分析柱重复分析并获得黑色迹线色谱图。

## 结论

本应用纪要展示了XBridge Premier GTx BEH 450 Å 2.5 µm色谱柱在AAV颗粒分析及其自缔合低聚物聚集体定量方面的实用性。与参比5 µm颗粒色谱柱相比，该色谱柱表现出优异的动力学效率。在XBridge色谱柱中应用MaxPeak Premier HPS技术可显著减少次级相互作用，并能够在相同的条件下高效分离各种AAV血清型。由于HMWS峰的回收率不佳，此类实验条件不适用于标准不锈钢色谱柱。重要的是，我们发现减小粒径和提高流速对聚集特征的测量没有影响。此外，通过提高方法流速，可以在不损失分离度的前提下，将分析速度提高10倍。最后，本研究证实保护柱与AAV分析兼容。

---

## 参考资料

1. P. Hong, S. Koza, E.S.P. Bouvier, A Review, Size Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and Their Aggregates, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 35 (2012) 2923–2950. <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.743724> <<https://doi.org/10.1080/10826076.2012.743724>> .
2. Gimpel AL, Katsikis G, Sha S, *et al.* Analytical Methods for Process and Product Characterization of Recombinant Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapies. *Mol Ther Methods Clin Dev.* (2021);20:740–754. <https://doi:10.1016/j.omtm.2021.02.010> <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33738328/>> .
3. Deng C. AN2003: Quantifying AAV Aggregation and Quality Attributes by FFF-MALS, Wyatt Technology Application Note, [https://wyattfiles.s3-us-west-2.amazonaws.com/literature/app-notes/fff-mals/AN2003-quantifying-AAV-aggregation-and-CQAs-by-FFF-MALS\\_CDeng.pdf](https://wyattfiles.s3-us-west-2.amazonaws.com/literature/app-notes/fff-mals/AN2003-quantifying-AAV-aggregation-and-CQAs-by-FFF-MALS_CDeng.pdf) <[https://wyattfiles.s3-us-west-2.amazonaws.com/literature/app-notes/fff-mals/AN2003-quantifying-AAV-aggregation-and-CQAs-by-FFF-MALS\\_CDeng.pdf](https://wyattfiles.s3-us-west-2.amazonaws.com/literature/app-notes/fff-mals/AN2003-quantifying-AAV-aggregation-and-CQAs-by-FFF-MALS_CDeng.pdf)>
4. Bartalis J, Chen M., AN2004: Why and How to Quantify Aav Aggregates by Fff-Mals, [https://wyattfiles.s3.us-west-2.amazonaws.com/literature/app-notes/fff-mals/AN2004-How\\_to\\_quantify\\_AAV+aggregates\\_by\\_FFF-MALS.pdf](https://wyattfiles.s3.us-west-2.amazonaws.com/literature/app-notes/fff-mals/AN2004-How_to_quantify_AAV+aggregates_by_FFF-MALS.pdf) <[https://wyattfiles.s3.us-west-2.amazonaws.com/literature/app-notes/fff-mals/AN2004-How\\_to\\_quantify\\_AAV+aggregates\\_by\\_FFF-MALS.pdf](https://wyattfiles.s3.us-west-2.amazonaws.com/literature/app-notes/fff-mals/AN2004-How_to_quantify_AAV+aggregates_by_FFF-MALS.pdf)>
5. McIntosh, N.L., Berguig, G.Y., Karim, O.A. *et al.* Comprehensive Characterization and Quantification of Adeno Associated Vectors by Size Exclusion Chromatography and Multi Angle Light Scattering. *Sci Rep* 11, 3012 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82599-1>. <

<https://www.nature.com/articles/s41598-021-82599-1>>

6. Koza MK, Chen W. 使用450 Å二醇基键合BEH色谱柱和荧光检测以体积排阻色谱法分析腺相关病毒(AAV)制剂. 沃特世应用纪要: [720006812ZH](#), 2020年3月.
7. Kizekai L, Shiner S, Lauber MA. Waters ACQUITY和XBridge Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱: 惰性SEC色谱柱设计的新基准. 沃特世应用纪要: [720007463ZH](#), 2022年.
8. Goyon A, Beck A, Colas O, Sandra K, Guillarme D, Fekete S. Evaluation of Size Exclusion Chromatography Columns Packed With Sub-3µm Particles for the Analysis of Biopharmaceutical Proteins. *J Chromatogr A*. 2017 May 19;1498:80–89. doi: [10.1016/j.chroma.2016.11.056](#) <  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27262372/>> .
9. [Meng H, Sorrentino M, Woodcock D, O'Riordan C, Dhawan V, Verhagen M, Davies C. Size Exclusion Chromatography with Dual Wavelength Detection as a Sensitive and Accurate Method for Determining the Empty and Full Capsids of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors. *Hum Gene Ther*. 2022 Feb;33(3-4):202–212. <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2021.123> <  
<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2021.123>> . <  
<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2021.123>>

---

## 特色产品

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

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007961ZH, 2023年6月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)