

Stunner准确获取腺病毒滴度及相关表征

简介

腺病毒载体 (AdV) 的功能极其多样——能够用于病毒疫苗接种、递送治疗基因，并以溶瘤载体的形式直接抗击癌症。由于AdV滴度测量方法可能耗时数小时甚至数日，而且在纯化过程中常见空衣壳等杂质^{①②}，因此快速获取衣壳滴度和AdV空壳率至关重要。

AdV的传统分析方法通常速度慢、成本高、耗费人力，而且每次只能获取单一数据。即便是目前最快速的方法（在260 nm的波长下测量紫外/可见光 (UV/Vis) 的吸光度）仍需要耗费大量的时间，因为检测过程中需要将样品用SDS处理煮沸再冷却^①。文献中A260分析法提出了一条经典法则，即 $1\text{AU}_{260\text{nm}} = 1.1\text{E}12 \text{ vg/mL}$ ^③，但该换算的准确度受到了其他学者的质疑，他们提出的换算公式为 $1\text{AU}_{260\text{nm}} = 1.2\text{E}12$ 或 $1.8\text{E}12 \text{ vg/mL}$ ^{④⑤}。

目前有很多工具可用于检测AdV，但绝大多数要花费大量的时间并消耗昂贵的试剂——甚至需要经过微调来适应特定血清型或转入基因。qPCR是广为人知的序列特异性DNA量化方法，但同样需要花费数小时，步骤繁琐，而且不能获得空衣壳滴度等信息。电子显微镜 (EM) 与阴离子交换高效液相色谱法 (AEX-HPLC) 都能得出空衣壳和完整衣壳滴度。但EM倾向于主观性数据判读，而AEX-HPLC需要经过优化才能用于特定样品且只能逐份进行样品检测^{⑥-⑨}。

Stunner是一款独特的分析系统，它整合了高效UV/Vis分光光谱法与静态和动态光散射 (SLS和DLS) 来测定低至 $1\text{E}9 \text{ cp/mL}$ 的滴度、获取空心率以及粒径和聚集情况 (图1)。无需进行任何的样品准备、稀释、标准曲线、标记或染色处理，Stunner即可读取样品信息。此设备不具有血清特异性，只需要使用 $2 \mu\text{L}$ 的样品就可在1小时内读取最多96份样品。为获得更高通量，该系统全自动化运行并可配备21 CFR Part 11软件工具。



图1: Stunner 整合UV/Vis、动态和静态光散射 (DLS和SLS) 为生物治疗和基因治疗样品提供高精度表征分析。

Stunner 的 Adeno Quant 应用程序将 DLS、SLS 和 UV/Vis 整合在一起，以提供准确的衣壳滴度、空壳率，外加总蛋白和 DNA 定量数据 (图 2)。DLS 是一项可识别样品粒径和粒径分布的强大技术。DLS 光强分布按样品中的衣壳、聚集体和小颗粒来显示散射光的相对强度。DLS 实验期间收集到的 SLS 强度与颗粒浓度成正比，但完整衣壳和空衣壳会因成分不同而散射不同强度的光。因此，除了考察样品中散射的光强度，还需要 DLS 和 SLS 之外的其他检测才能获得准确的颗粒浓度信息——即空心率数据。Stunner 通过 UV/Vis 可以确定样品中的总蛋白和 DNA 浓度信息并据此得出空心率。当 UV/Vis 与 DLS & SLS 数据相结合时，Stunner 便集齐了全部所需的“拼图”，从而计算出 AdV 样品的总衣壳滴度、完整衣壳滴度和空心率 (图 3)。

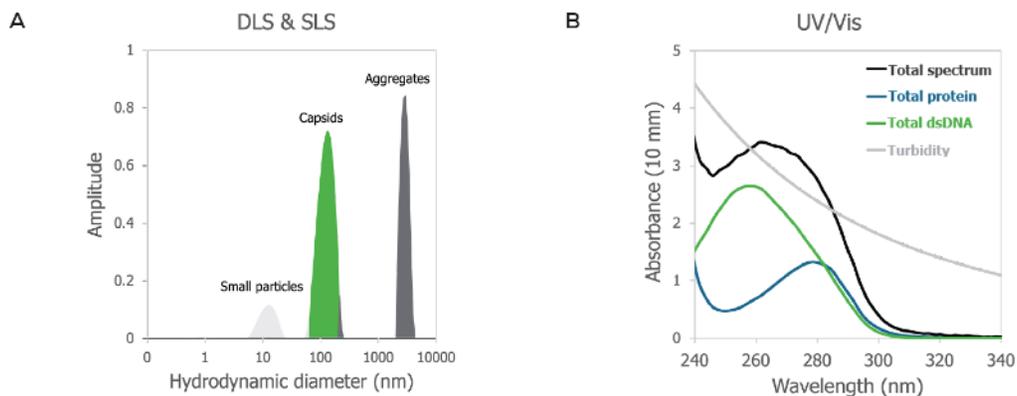


图 2: Stunner 是一款结合了三种技术来确定腺病毒衣壳滴度、空心/实心比等信息的仪器。DLS 光强分布可揭示完整衣壳 (绿色峰) 以及小颗粒 (浅灰色峰) 和聚集体 (深灰色峰)(图 A)。UV/Vis 检测会自动

扣除样品浊度 (浅灰色线), 从而得到总吸光度光谱 (黑色线), 对其解析即可获得 dsDNA 光谱 (绿色线) 和蛋白质光谱 (蓝色线)(图 B)。

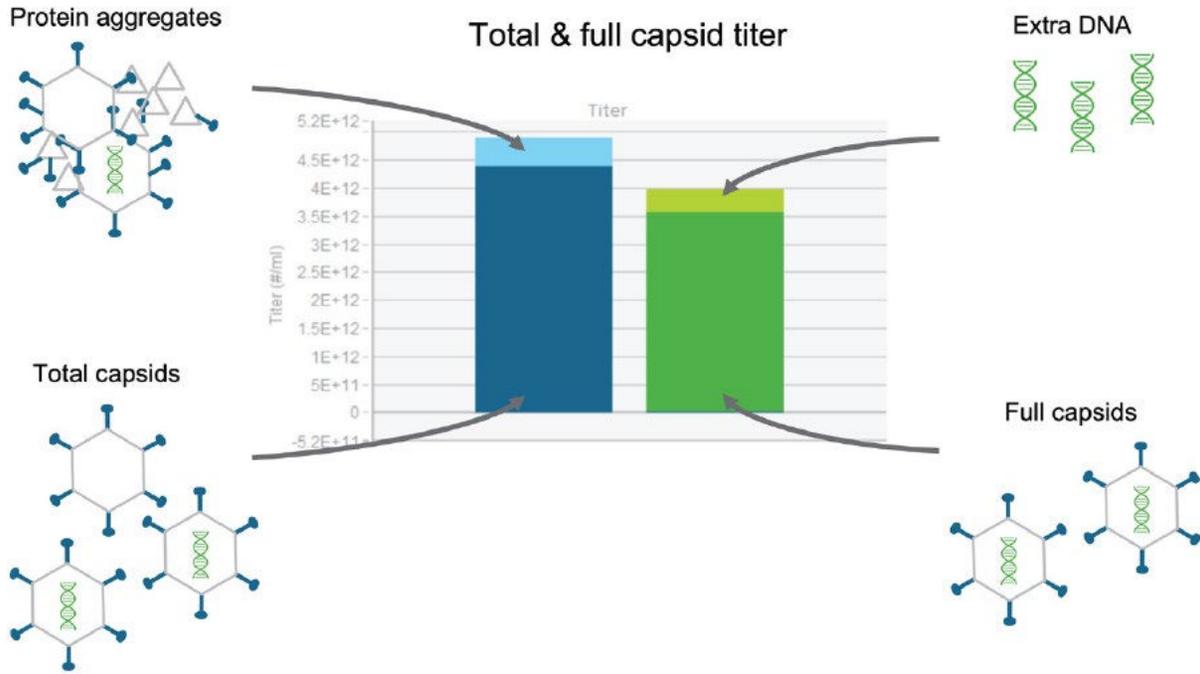


图 3: Stunner 测定出总衣壳数量 (深蓝色)、游离和聚集蛋白质数量 (浅蓝色)、完整衣壳滴度 (深绿色) 和游离/聚集 dsDNA (浅绿色)。

方法

将3家厂商 (厂商1、2、3) 提供的3个批次用CsCl纯化的5型腺病毒载体保存在 -70°C 的温度下。为避免经历冻融循环, 这些载体在首次测量之前进行一次解冻, 然后在4天内进行的各项实验, 期间维持 4°C 的储藏温度。

在Stunner操作软件中选择Adeno Quant应用程序, DLS采集的参数为4次重复每次5秒, 用水作为空白对照。Stunner测量AdV样品完整的UV/Vis吸光度光谱, 区分其蛋白质、dsDNA和常见杂质的吸光度贡献, 并基于内置的摩尔消光系数确定蛋白质和dsDNA滴度。AdV的摩尔消光系数基于已公开发表的氨基酸序列进行计算。病毒基因组的摩尔消光系数则基于制造商所提供的DNA碱基大小进行计算。总衣壳滴度、完整衣壳滴度、dsDNA滴度、蛋白质滴度、空衣壳百分比、完整衣壳百分比、Z-平均粒径和PDI通过 Stunner 分析软件中的Adeno Quant应用程序确定。

结果

A260和其他数据信息

毫无疑问，UV/Vis 分光光谱法是目前读取 AdV 样品滴度的最快速分析技术之一。但 AdV 颗粒太大，会散射出多种不同的光信号，由此形成的浊度会导致经典 A260 法的读数出现极大的波动。借助 SDS 进行变性处理、对颗粒进行热分解并清除散射光可让 UV/Vis 读数具有更高的重复性。但额外的步骤会削弱 UV/Vis 的简易性并拖慢速度^④，将一项快速检测变成了长达 30 分钟的繁杂任务。Stunner 的 Adeno Quant 应用程序能直接测量腺病毒载体且无需进行任何样品变性处理。先进的 Unmix 算法可分析出 AdV 样品的 UV/Vis 总吸光度并区分出来自浊度 (AdV 光散射) 的吸光度和腺病毒载体实际的吸光度。用数学算法扣去浊度意味着 Stunner 可在几秒内得出 A260 结果而无需对颗粒进行处理 (图 4)。

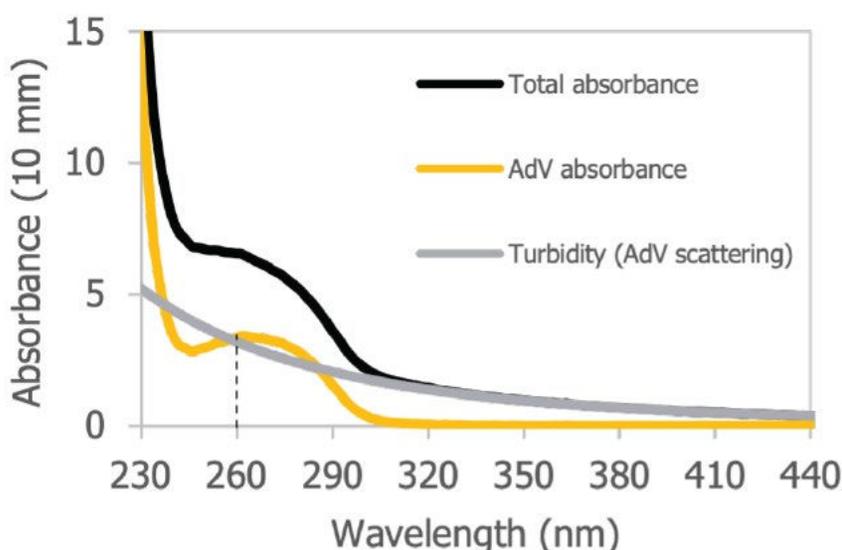


图 4: Stunner 的浊度校正可实现快速的 A260 测量，无需繁琐的 SDS 变性准备。用总吸光度 (黑色) 扣去浊度 (灰色) 即可计算出 AdV 的吸光度 (黄色)。虚线为测定的 A260 数值。

然而样品中任何具有 UV/Vis 光吸收的组分都会对 A260 检测产生极大的影响。在紫外区有光吸收的缓冲液，宿主细胞 DNA 或蛋白将直接影响检测结果——而且 AdV 样品中时常有蛋白质或 DNA 污染。通过整合 UV/Vis 与 DLS 和 SLS 结果，Stunner 的测量会变得更加可靠，不容易受到污染物和培养基的影响。例如，DNA 污染会使 A260 的滴度出现偏差，但 AdV 颗粒的散射光强度不会受多余 DNA 的影响。

了解您的Adeno应用软件

Stunner的Adeno Quant应用程序可为每一份AdV样品提供丰富而多属性的数据。样品检测完成后可立即得出有关总衣壳滴度、完整衣壳滴度、游离/聚集蛋白质、游离/聚集dsDNA的数据，而且还可为每一份AdV样品提供DLS的粒径和聚集信息。从2 μ L样品中收集的DLS数据可将粒径信息转变成可添加到任意步骤当中的质量属性数据。

使用Adeno Quant应用程序进行检测发现，厂商1的腺病毒有着较高的纯度、滴度、较高的完整衣壳百分比以及极好的粒径数据（图5）。总衣壳数量平均值为 4.2×10^{12} cp/mL且%CV=4.9，完整衣壳滴度的平均值为 3.4×10^{12} vg/mL且%CV=4.4。游离/聚集蛋白质和游离/聚集dsDNA在总质量中占比约为13%。完整衣壳百分比平均值为81%。全部4份样品的粒径和粒径分布都表现出了极佳的一致性、无聚集体并有着较佳的多分散性。

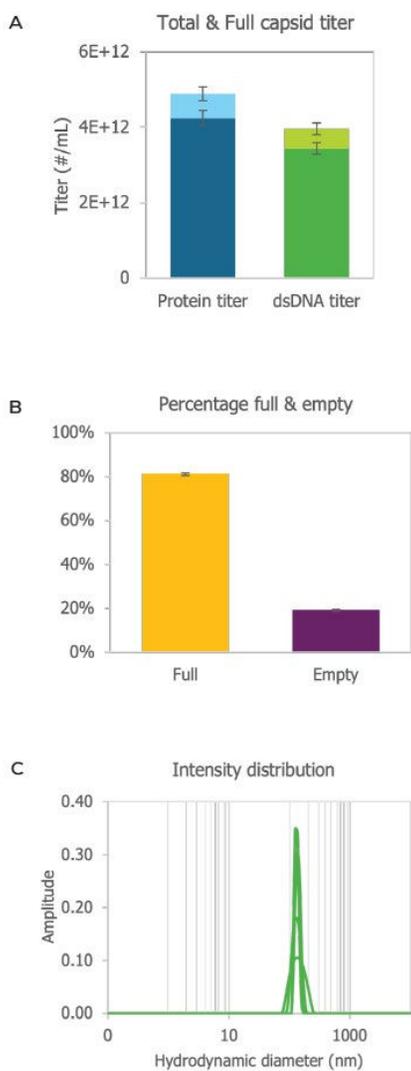


图 5：厂商 1 的 AdV 使用 Stunner 的 Adeno Quant 应用程序进行了四次测量。总衣壳的数量表示为测

定的总蛋白的量 (灰色柱), 而完整衣壳滴度则为测定的 dsDNA 总量 (绿色柱)(图 A)。完整衣壳滴度和总衣壳滴度与完整衣壳百分比 (黄色) 和空衣壳百分比 (紫色) 数据相关。蛋白质滴度单位为 cp/mL, DNA 滴度单位为 vg/mL (图 B)。DLS 用光强分布展示 (图 C)。误差线代表标准差。

如果您的样品Z平均粒径介于100–200 nm之间的单分散颗粒, 即可确定其中不存在聚集的问题。厂商2的腺病毒样品看似不存在聚集问题, Z平均粒径为122.6 nm且PDI <0.1 (图6A, 右图)。但在全面检查后, Adeno Quant应用程序会让您发现其中存在大量额外的DNA (图6A, 左图)。额外的DNA指向潜在的宿主DNA污染, 而且可能会被其他分析技术所遗漏。

厂商3的腺病毒样品中总蛋白和DNA之间的平衡与您对理想样品的预期完全一致 (图6B, 左图), 但DLS & SLS检测会立即发现该样品中存在大量的聚集 (图6B, 右图)。Stunner甚至可以将所有蛋白质和DNA数据绘制成浅蓝色和浅绿色图来合成分析所有这些信息——指出蛋白质和DNA的“游离和聚集”状态并确定其不属于任何腺病毒衣壳的组成部分。将所有这些信息片段整合之后可以看出, 此处较差的病毒稳定性可能有错误——因为蛋白质与DNA之间的平衡似是而非, 但完整的腺病毒并没有正确的粒径可言。

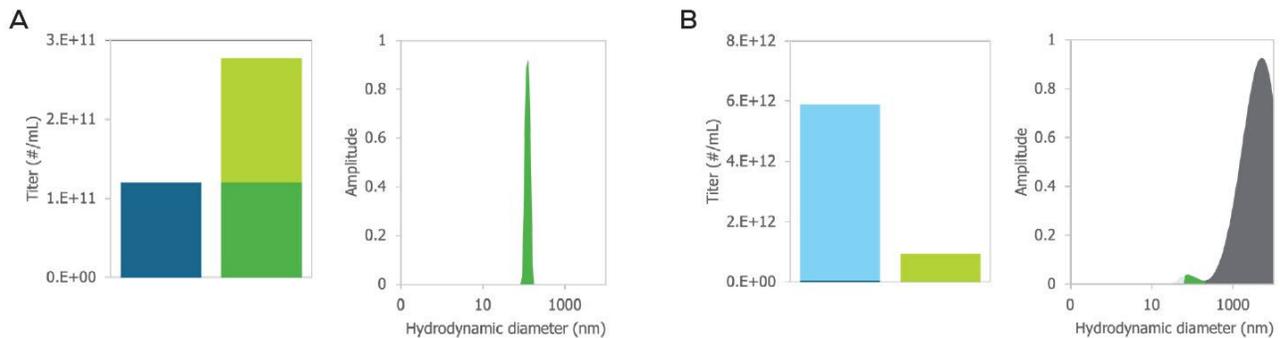


图 6: Adeno Quant 让您全面了解您的样品。厂商 2 的腺病毒样品在 DLS 检测中有着较佳的流体力学粒径和单分散性, 但 DNA 过量 (图 A)。厂商 3 的样品中有着您所期待的总蛋白质和 DNA 数量, 但通过 DLS 快速检查会发现大量的聚集 (图 B)。各颜色代表信息与图 2 相同。

结论

AdV的快速在线表征分析是监控生产工艺过程并成功生产出批次药物的关键环节之一。现有方法费时费力而且会得出高度可变的结果。所幸, Stunner的Adeno Quant应用程序能够快速轻松地获取准确的AdV表征分析数据而无需任何额外繁琐的工作流程、染色处理或标准曲线。

Stunner是一款将上述三种技术整合起来，可得出详细结果从而了解样品全貌的工具。在正确信息的帮助下，生产或纯化的优化变得比以往更快，而且可以通过快速在线试验来确立KPI或CQA，随时指明AdV生产批次是否可以推进到下一个步骤。

参考文献

1. Wang, D.L., Wang, C.J., Tan, C.Y., Hsu, D., and Jr, J.P.H. (2006). A Robust Approach for the Quantitation of Viral Concentration in an Adenoviral Vector-Based Human Immunodeficiency Virus Vaccine by Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2006.17.728>
<https://home.liebertpub.com/hum.10.1089/hum.2006.17.728>.
2. Sutjipto, S., Ravindran, S., Cornell, D., Liu, Y.-H., Horn, M., Schlupe, T., Hutchins, B., and Vellekamp, G. (2005). Characterization of Empty Capsids from a Conditionally Replicating Adenovirus for Gene Therapy. *Human Gene Therapy* 16, 109–125. [10.1089/hum.2005.16.109](https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.109).
3. Maizel, J.V., White, D.O., and Scharff, M.D. (1968). The polypeptides of adenovirus: I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* 36, 115–125. [10.1016/0042-6822\(68\)90121-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(68)90121-9).
4. Berkowitz, S.A. (2008). Determining the concentration and the absorptivity factor at 260 nm in sodium dodecyl sulfate of the adenovirus reference material using analytical ultracentrifugation. *Analytical Biochemistry* 380, 152–154. [10.1016/j.ab.2008.05.014](https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.05.014).
5. Sweeney, J.A., and Hennessey, J.P. (2002). Evaluation of Accuracy and Precision of Adenovirus Absorptivity at 260 nm under Conditions of Complete DNA Disruption. *Virology* 295, 284–288. [10.1006/viro.2002.1406](https://doi.org/10.1006/viro.2002.1406).
6. Heider, S., and Metzner, C. (2014). Quantitative real-time single particle analysis of virions. *Virology* 462–463, 199–206. [10.1016/j.virol.2014.06.005](https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.06.005).
7. Vellinga, J., Smith, J.P., Lipiec, A., Majhen, D., Lemckert, A., van Ooij, M., Ives, P., Yallop, C., Custers, J., and Havenga, M. (2014). Challenges in Manufacturing Adenoviral Vectors for

Global Vaccine Product Deployment. Human Gene Therapy 25, 318–327.
10.1089/hum.2014.007.

8. Pinteric, L., and Taylor, J. (1962). The lowered drop method for the preparation of specimens of partially purified virus lysates for quantitative electron micrographic analysis. Virology 18, 359–371. 10.1016/0042–6822(62)90027–2.
9. Shabram, P.W., Giroux, D.D., Goudreau, A.M., Gregory, R.J., Horn, M.T., Huyghe, B.G., Liu, X., Nunnally, M.H., Sugarman, B.J., and Sutjipto, S. (1997). Analytical Anion–Exchange HPLC of Recombinant Type–5 Adenoviral Particles. Human Gene Therapy 8, 453–465. 10.1089/hum.1997.8.4–453.



Unchained Labs
6870 Koll Center Parkway
Pleasanton, CA 94566
Phone: 1.925.587.9800
Toll-free: 1.800.815.6384
Email: info@unchainedlabs.com

© 2023 Unchained Labs. All rights reserved. The Unchained Labs logo, Stunner the Stunner logo are trademarks and/or registered trademarks of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.

Rev A