

生物质谱技术在腺相关病毒(AAV)载体制剂质量控制中的应用

李孟效, 李惠琳*

(中山大学药学院, 广州 510006)

摘要 腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是一种基因治疗中常用的病毒载体。由于其安全性较高且能够靶向多种细胞,在临床前和临床研究中得到了较多的应用。不过在设计和生产的过程中,AAV载体有着诸多会影响其安全性和疗效的关键质量属性。生物质谱技术的发展和应用于生物大分子的研究提供了一个便捷的平台,尤其是在蛋白质序列、结构和相互作用方面。对于AAV载体而言,质谱技术可以实现衣壳蛋白比率、翻译后修饰、血清型、空衣壳比率的测定或表征,从而协助对AAV载体的质量控制。与现有方法相比,质谱技术具有样品需求量少、分析快速灵敏、适用于完整AAV载体的分析和质量分辨率高的优点,并且可以区分空衣壳、满衣壳和部分包封的衣壳。未来,通过将更加高效的蛋白质分离技术与质谱技术联用、开发新的信息处理软件平台和新的质谱检测方法,质谱技术有望在AAV载体的设计和生产中发挥更加重要的作用。

关键词 腺相关病毒;质谱;质量控制;非变性质谱;电荷检测质谱

中图分类号 R392 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2023)06-0682-13

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023062901

引用本文 李孟效,李惠琳.生物质谱技术在腺相关病毒(AAV)载体制剂质量控制中的应用[J].中国药科大学学报,2023,54(6):682-694.

Cite this article as: LI Mengxiao, LI Huilin. Application of biological mass spectrometry in quality control of adeno-associated virus carrier preparations[J]. *J China Pharm Univ*, 2023, 54(6): 682 - 694.

Application of biological mass spectrometry in quality control of adeno-associated virus carrier preparations

LI Mengxiao, LI Huilin*

School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract Adeno-associated virus (AAV) is a common viral vector used in gene therapy. Because of its high safety and its ability to target a variety of cells, it has been widely used in preclinical and clinical studies. However, during the design and production, AAV vectors have many key quality attributes that affect their safety and efficacy. The development and application of biological mass spectrometry technology provides a convenient platform for the research on biological macromolecules, especially in the aspects of protein sequence, structure and interaction. For AAV vectors, mass spectrometry can facilitate the determination or characterization of capsid protein ratio, post-translational modification, serotype, and empty capsid ratio, thus assisting in the quality control of AAV vectors. Compared with the existing methods, mass spectrometry has the advantages of smaller amount of sample size, faster and more sensitive analysis, being more suitable for the analysis of complete AAV vectors with higher mass resolution, and can distinguish empty capsids, full capsids and partial capsids. In the future, mass spectrometry technology is expected to play a more important role in the design and production of AAV vectors through the coupling of more efficient protein separation technology with mass spectrometry, the development of new information processing software platforms and new mass spectrometry detection techniques.

Key words adeno-associated virus (AAV); mass spectrometry (MS); quality control; native MS; charge detection MS

收稿日期 2023-06-29 *通信作者 Tel: 13826214968 E-mail: lihuilin6@mail.sysu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81872836, No. 91953102);广东省自然科学基金资助项目(No. 2019A1515011265)

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81872836, No. 91953102) and the National Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2019A1515011265)

1 腺相关病毒(AAV)概述

基因治疗是指为了治疗目的而修改操纵基因表达或改变活细胞的基因,基因治疗的方式可以划分基因补充和基因编辑,基因补充是指将遗传物质导入需要治疗的靶细胞,基因编辑是指对细胞已有的缺陷基因进行修改和调控,但无论哪种方式都需要依赖特定的递送载体才能完成^[1]。常用的基因治疗载体可以分为病毒载体和非病毒载体,而非病毒载体的转导效力远低于病毒载体,尤其是在体内^[2-3]。病毒载体利用了病毒可以感染细胞的特性,其主要功能是保护被包裹的 RNA 或 DNA 和参与细胞定位和贩运。临床前和临床研究中常用的病毒载体包括腺相关病毒(Adeno-associated

virus, AAV)、逆转录病毒、疱疹病毒、慢病毒和腺病毒^[4-5]。其中,由于 AAV 的非整合性和低免疫原性,能够感染分裂期和非分裂期的细胞,在人体中的风险较低,且在多种靶器官和靶细胞中可有效转导,因此得到了较多研究^[6-7]。

AAV 是一种非包膜单链 DNA 病毒,属于细小病毒科的细小病毒属。AAV 需要辅助病毒(例如:腺病毒和疱疹病毒)的共同感染才能复制,因此其致病性较低^[8]。AAV 在自然界中有许多野生类型,目前已分离到 13 种血清型:AAV1~ AAV13,并被划分为 6 个进化枝:A~F(图 1)。不同的血清型之间的同源性的程度不同(57%~99%),其氨基酸序列的差异导致了不同的组织趋向性、受体亲和性和免疫原性,这会影响最终的转导功效^[9-10]。

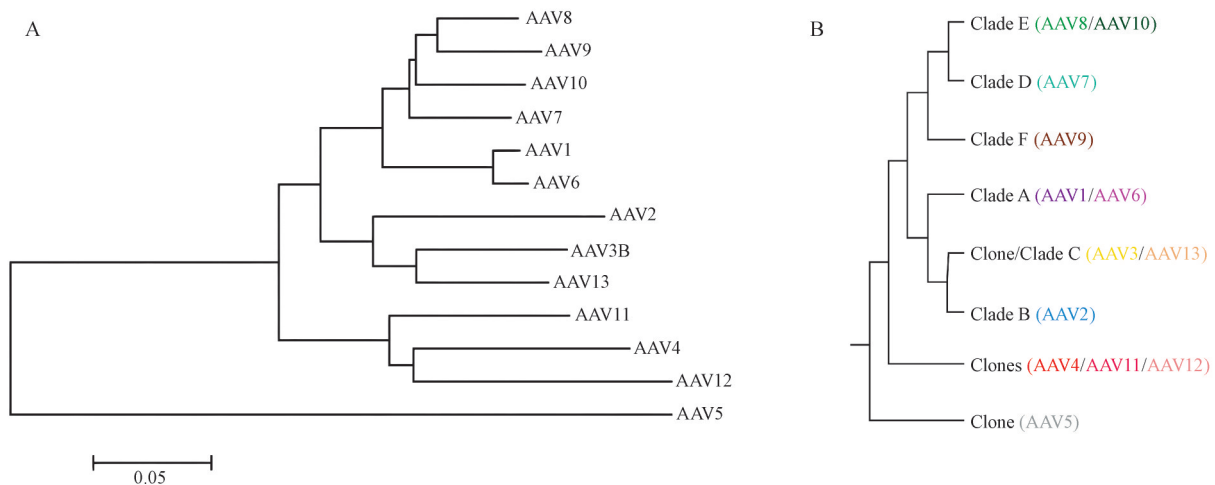


Figure 1 Types of adeno-associated virus (AAV) serotypes^[8] (A) and clades of adeno-associated virus serotypes^[10] (B)

野生型的 AAV 基因大小约为 4 700 bp, AAV 基因组主要由反向重复序列(inverted terminal repeats, ITRs)和 2 个 ITR 之间的 2 个开放阅读框(open reading frame, ORF)组成,左侧的为编码非结构蛋白的 Rep 阅读框,右侧的为编码结构蛋白(VP1、VP2、VP3)的 Cap 阅读框编码,这 3 种基因的主要功能是完成 AAV 的复制与组装^[8]。Rep 基因编码 Rep78、Rep68、Rep52 和 Rep40 蛋白,两种较大的 Rep 蛋白 Rep78 和 Rep68 主要参与基因组的复制,而两个较小的 Rep 蛋白 Rep52 和 Rep40 在病毒粒子的包衣中起重要作用^[3]。其中 ITRs 对于 AAV 的组装是必

须的,因此在保留 AAV 两端 ITRs 的前提下,可以利用基因工程的方式用目的基因替换 Rep 和 Cap 基因,只保留 Rep 和 Cap 蛋白的反式作用元件,重组的 AAV 病毒粒子就能成功组装^[11-12]。此外,在 Cap 基因中还包含了一段与 AAV 组装相关的 AAP (组装激活蛋白)基因,由嵌入 Cap 基因内的重叠阅读框的非规范 CTG 起始密码子表达^[13]。对于 AAV2,在 AAP 中引入终止密码子而不影响 VP2/3 的编码可防止衣壳组装和病毒/载体的产生。虽然衣壳组装可以通过提供反式 AAP 来恢复,但野生型(wt)AAP 的过表达不会增加载体产量,这都说明

AAP的表达是完成最大滴度病毒组装的重要条件之一^[14]。不过新的研究发现,某些AAV的血清型(AAV3、AAV9)不需要全长的AAP基因来组装病毒颗粒^[15]。此外AAP也被证明与AAV的核仁定位、VP的稳定性有关^[14-15]。

Ogden等^[16]在建立AAV2 Cap阅读框的单密码子突变病毒库的过程中发现了嵌套在VP1独特结构域中的一个ORF,编码一种新的病毒蛋白。蛋白质与绿色荧光蛋白(GFP)或Flag-tag的C端融合揭示了与细胞膜的关联,于是作者将其命名为“膜相关辅助蛋白”(MAAP)。用灭活MAAP产生的重组病毒是可行的,并且产生的滴度与编码wt-MAAP的AAV相似。然而,除非MAAP以反式形式提供,否则MAAP突变的AAV编码wt-Cap的病毒在表达水平上会更低。Ogden和合作者提出MAAP可能

参与不同血清型AAV基因组之间的竞争性排斥。Galibert等^[17]的研究也证实了上述观点,并认为MAAP是AAV感染的加速因素。rAAV的转导过程极其复杂,首先以rAAV2为例:它通过受体依赖性内吞作用在细胞中摄取,并通过内体途径运输。内体中完整的rAAV经历一系列依赖pH的结构转化,这对于内体逃逸、通过细胞骨架网络和通过细胞质运输至关重要。在核内体逃逸后,rAAV通过核孔复合物进入细胞核,然后进行衣壳脱包,释放基因组并表达转基因^[18]。

传统的rAAV生产通常涉及“三重转染”方法。三联转染组件由一个编码转基因的质粒、一个含有腺病毒5型(Ad5)辅助基因(即E1a/b、E2a、E4和VA RNA)或其等同物的辅助质粒和另一个编码rAAV Rep和Cap蛋白的质粒组成^[7](图2)。然而传

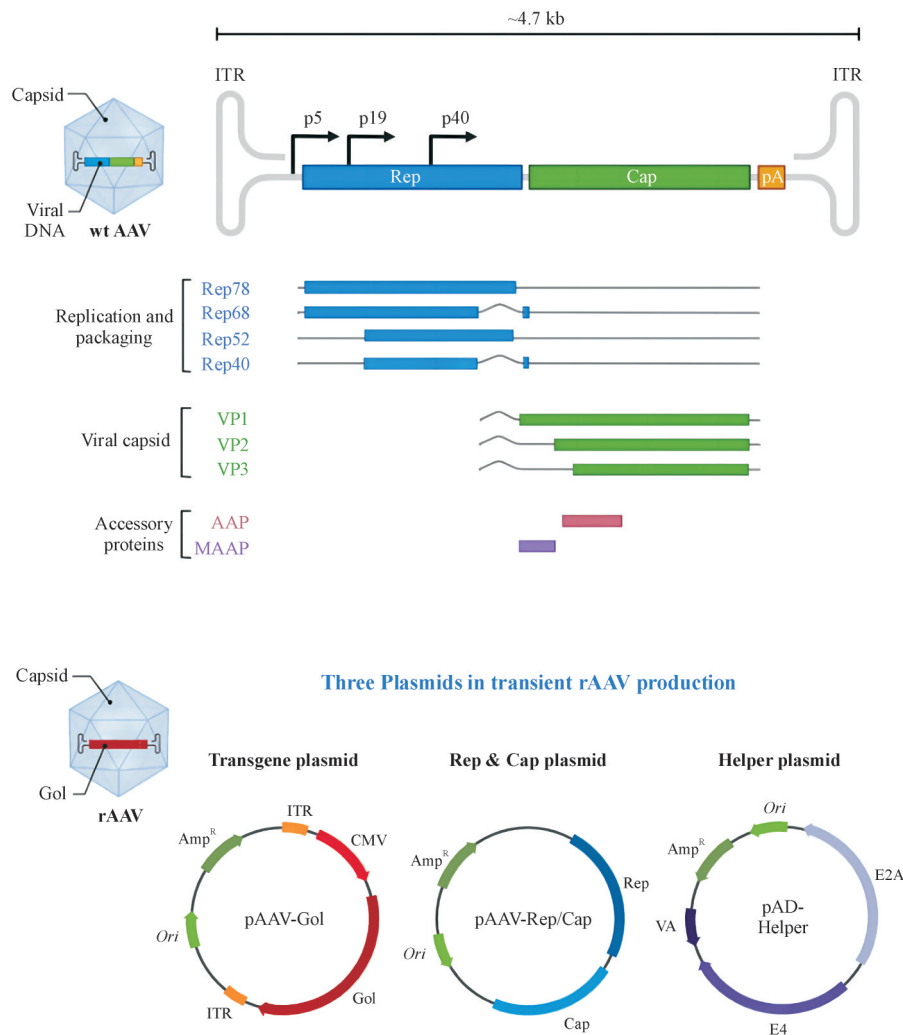


Figure 2 Schematic diagram of AAV gene structure and rAAV production^[3]

统的生产方法不适合 rAAV 大规模生产,主要是因为转染所用的细胞系 HEK293 是贴壁生长的,导致了容器的限制,还有 3 个质粒瞬时转染本身的操作复杂性。此外,转染试剂(PEI)也可能产生毒性^[3]。因此后来开发了替代杆状病毒表达载体(BEV)介导的 rAAV 生产系统(Bac 系统)。高效的 BEV 感染比传统的质粒转染具有优势,此外,昆虫 Sf9 细胞比 HEK293 细胞更适合大规模高密度无血清悬浮培养^[12]。现在基于重组病毒和稳定细胞系的平台开发,仍面临着许多需要改进的地方,例如辅助/感染病毒过程都将是 rAAV 生产的潜在风险,并且需要在下游过程中消除辅助/感染病毒,以避免与最终产品相关的安全问题。此外,在 AAV 衣壳生产过程中,AAV 衣壳可能会包封宿主细胞 DNA,如癌基因的序列(HeLa 的 HPV 序列,HEK293 的 E1 序列)^[3]。

在衣壳结构方面,AAV 是由 60 个衣壳蛋白(VP)单体排列成五聚亚结构组装而成的直径为 20~26 nm 的二十面体衣壳,每个衣壳含有 3 个高度同源的 VP(VP1、VP2 和 VP3),比例为 1:1:10,3 种 VP 具有相同的 C 端,其中 VP2(约 65 kD)包括 VP3(约 60 kD)的整个氨基酸序列,是 VP3 的 N 端延伸,VP1(约 80 kD)则是 VP2 的 N 端延伸^[10]。VP1 和 VP2 的 N 端区域含有 AAV 感染所需的元件,如磷脂酶 A2(PLA2)结构域、钙结合结构域和核定位信号^[10]。细小病毒结构的主要特征包括近端 3 倍突起,其突出程度各不相同,5 倍轴周围有一个大而浅的凹陷,两个 3 倍突起之间的 2 倍轴中心有一个小凹陷^[7](图 3)。3 倍区和 2/5 倍壁(2 倍轴和 5 倍轴之间

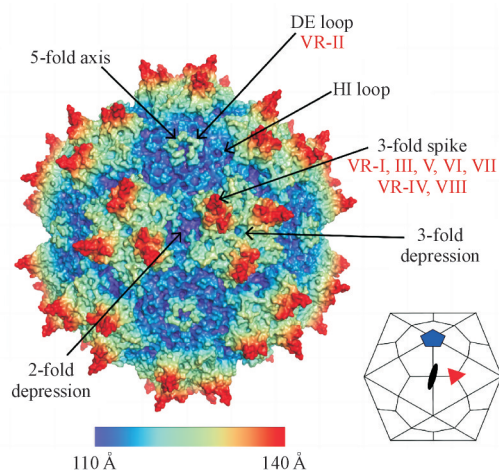


Figure 3 Schematic diagram of the 20-hedron structure of parvovirus ^[7]

突起的区域)已被确定为许多 AAV 血清型的受体结合位点,并作为细胞和组织向性的决定因素。细胞受体包括唾液酸、硫酸肝素蛋白多糖(HSPG)、末端半乳糖、硫酸 N-乙酰乳胺、AAVR、层粘连蛋白、 $\alpha v \beta 1$ 整合素、 $\alpha v \beta 5$ 整合素、肝细胞生长因子受体、成纤维细胞生长因子受体和血小板源性生长因子受体。除了受体结合外,衣壳的表面,包括 5 倍区,显示了宿主免疫反应引起的抗体的抗原位点^[10]。

目前 rAAV 载体在基因治疗方面得到了较多的研究和应用。基于 rAAV 的基因治疗药物 Glybera 用于治疗脂蛋白脂肪酶缺乏症、Luxturna 用于治疗遗传性视网膜营养不良症和 Zolgensma 用于治疗致命性脊髓性肌萎缩症,分别于 2012 年、2017 年和 2019 年获批上市^[12]。使用腺相关病毒进行基因转移的疗法正在快速获得视网膜疾病、充血性心力衰竭、血友病 A 和 B、X 连锁肌管性肌病、胶质母细胞瘤、胶质瘤和脊髓性肌萎缩症、肌肉系统疾病(肌营养不良症)、关节炎、糖尿病的临床批准^[8-9]。不过 FDA 也召开会议提出了 rAAV 载体的可能出现整合性和肝脏毒性的风险,以及潜在的致癌性、血栓性微血管病和神经毒性风险^[2]。此外载体脱落、空衣壳的免疫原性、中和抗体也对 AAV 载体的质量控制提出了更多的要求^[9,19]。

2 AAV 的关键质量属性

2.1 不同类型衣壳蛋白的比率

据报道,VP1、VP2 和 VP3 的相对表达水平可以受到生产方法的影响,并可能偏离 1:1:10 的比例,在某些情况下可能会导致传染性降低^[20-22]。VP1 的 N 端含有一个磷脂酶 A2(PLA2)结构域,该结构域在病毒的内体逃逸中起重要作用^[23]。此外,在衣壳 VP1 和 VP2 的 N 端有几个核定位信号(NLS)被细胞转运机制识别,以促进核转运^[24]。因此 VP1 比率的降低可能会导致转导效率的降低。Arriaga 等^[21]将 AAV3B 的 VP1/VP2 分别进行了基因敲除,虽然其衣壳能够组装,但是感染的效率与野生型 AAV 相比显著降低。Bosma 等^[22]对重组 AAV5 的 Cap 阅读框中的 VP1 的起始密码子和上下游序列重新编码和修饰,得到了不同 VP 比率的 rAAV5,并由此发现当 VP1 的比率偏低时其效价出现降低,过高的 VP3 占比也会使转导效率下降,而 11 号构建体实现了与野生型类似的 VP 比率和感染效

率。此外,漏扫描导致的VP3不完整片段也会在生产的产生过程中产生,VPs的过程或产品相关降解可能降低载体效力并具有免疫原性风险^[25-26]。此外,有关衣壳组装的随机性导致的AAV异质性已被报道,即AAV不同病毒粒子之间的VP比率会有波动,1:1:10只是一个总体的平均值,因此对于批次的AAV衣壳比率的检查是有必要的^[27]。

2.2 翻译后修饰(PTMs)

蛋白质翻译后修饰是一个或者多个氨基酸残基在酶的作用下,被修饰上了不同的基团,蛋白质的生化性质也会因此变化。对于病毒来说,衣壳蛋白的翻译后修饰可能会改变病毒感染特性和生命周期^[28]。病毒蛋白也会因为生产所用的细胞系不同而产生独特的翻译后修饰。宿主细胞中病毒蛋白合成过程中的PTMs是产生结构和功能多样性/复杂性的重要来源,使病毒能够适应和共同进化各种宿主细胞屏障,如腺病毒、痘苗病毒和多瘤病毒^[29]。Mary等^[29]的研究证明AAV1-rh10存在广泛的PTMs,包括泛素化、磷酸化、糖基化、乙酰化、SUMO化。此外,关于AAV8、AAV9的脱酰胺修饰也引起了很多的关注^[28]。

而且随着PTMs位点的研究不断开展,各种PTMs对于AAV载体用于基因治疗的影响也逐渐被实验阐明。如磷酸化、脱酰胺化、泛素化和SUMO化,被报道会影响转导效率^[28-30]。Zhong等^[30]发现了,衣壳蛋白酪氨酸残基的磷酸化会对AAV2的转导效率产生负面影响,这与AAV衣壳蛋白后续的泛素化有关;Giles等^[28]指出多种血清型的AAV载体存在Asn和Gln的脱酰胺化,并对AAV8的脱酰胺化的影响做了研究,发现脱酰胺化后的转导效率下降,下降的程度与不同的位点有关,其中N57, N94, N263, N305, Q467, N479和N653的转导效率下降为不到原先的10%。Weger等^[31]证明AAV的Rep蛋白Rep68和Rep78通过SUMO化过程修饰,有助于其稳定性;AAV2的K544已经被证实为泛素化的一个位点,而在密码子K544的目标位点从赖氨酸突变为谷氨酸导致蛋白体介导的衣壳降解减少,会导致更高的转导效率^[32]。考虑到K258是一个SUMO化的位点,一项研究通过将AAV2-K258位点修饰为AAV2-K258Q,不仅发现了SUMO化的程度明显减少,而且AAV2-K258Q体外转导实验在玻璃体注射两周后的荧光强度相对于野生

型可以忽略不计,表明了其转导效率的下降^[29]。

2.3 不同的AAV血清型

尽管不同AAV血清型之间的VP序列比较相似,但是不同血清型对组织的趋向性有所不同,清除的半衰期也不同,此外引起的免疫反应、转导效率也有差异^[9,19]。因此对AAV血清型鉴定至关重要。目前已经批准的关于AAV载体的基因治疗有用于视网膜疾病、充血性心力衰竭、血友病A和B、X连锁肌管性肌病、胶质母细胞瘤、胶质瘤和脊髓性肌萎缩。而疗效和安全性有赖于对不同的AAV血清型的选择^[9]。

组织倾向性反映了不同血清型和糖基受体之间特定相互作用。例如,AAV1的 $\alpha 2,3$ 和 $\alpha 2,6$ N-linked唾液酸(SIA);HSPG用于AAV2、AAV3和AAV13等^[33]。更深层次的原因是,不同血清型之间的结构蛋白的序列在同源性上的差异导致了其对宿主细胞的表面受体有了不同的亲和力。许多AAV血清型的初始结合是通过主要受体,包括聚糖和蛋白聚糖,例如,在AAV2中,由带正电荷的R585、R588和R487残基形成的肝素结合位点使病毒粒子与硫酸肝素蛋白聚糖细胞表面受体结合并启动转导过程^[29]。而在NHP的动物实验中,有研究报道了AAV在小鼠肝脏的转导效率,以AAV7和AAV8为基础的载体比以AAV2或AAV5为基础的载体效率高10~100倍^[9]。AAV2/8相较于AAV2/2、AAV2/5和AAV2/9在小鼠视网膜转导的特异性更高^[34]。在大鼠DRG神经元中,AAV9的转导效率明显高于AAV5、AAV6、AAV8^[35]。

AAV在被机体清除后仍有活性,且不同血清型清除所需要的时间不同,例如AAV2/8在2周后就无法在精液中检测到,而AAV5在22周时仍可以在精液中被检测到^[9,36]。

虽然rAAV的免疫原性较低,但是目前关于AAV导致的免疫反应却时常有报道,据报道rAAV给药期间的宿主免疫反应限制了人类长期的转基因表达,而产生的免疫反应与AAV的血清型有着直接关联^[37]。在体液反应方面,通过自然感染暴露于野生型AAV或通过体内基因治疗暴露于rAAV会导致血清中的中和抗体产生并有效地阻断靶细胞转导。自然感染很常见,70%的人类血清含有抗rAAV1和rAAV2的抗体,45%抗rAAV6和rAAV9的抗体,38%抗rAAV8的抗体^[38]。并且抗体

已被证明在 rAAV 血清型之间发生交叉反应^[39]。因此在选择基因治疗所用的 AAV 血清型时就需要尽可能地避免交叉反应,使用抗体滴度少免疫反应更低的治疗方案,这就对 AAV 血清型的准确、高效鉴定提出了要求。

2.4 产品中的空壳率

在 AAV 载体生产的过程中还会产生未包裹目标 DNA 的空衣壳病毒颗粒和包裹部分截断或者非目标基因的病毒颗粒,通过透射电子显微镜(TEM)可以看到,空衣壳的水平可以在 10% ~ 90% 之间变化,这可能是由衣壳组装的随机性导致的^[40]。不含基因组的 AAV 衣壳被视为 AAV 载体生产过程中的一个主要副产物^[41]。因为空衣壳和那些含有截断基因或非转基因序列的衣壳会引发不必要的免疫反应,降低转导效率和效果^[42]。未包裹治疗基因的空衣壳会导致所需要的治疗剂量增加。研究发现,随着载体剂量的增加,观察到明显的炎症毒性,包括补体活化、细胞减少和严重的肝毒性^[19]。据推测,空 AAV 病毒粒子增加衣壳剂量可以增加衣壳抗原在主要组织相容性复合体 I 类上的呈递,从而触发衣壳特异性 CD8⁺T 细胞反应^[43]。例如, Gao 等^[44]合成了部分空的和完全空的 AAV8 病毒粒子,完全包装的 rAAV8,以及空的和完全包装的病毒粒子可变比例的混合物。将上述注射到两种不同的小鼠品系中,然后分析不同时间点的转基因表达和血清丙氨酸转氨酶(ALT)水平。结果发现,空衣壳比例的增加不仅导致了目标蛋白表达的抑制,而且增加了肝转氨酶水平,这表明其产生了不良反应,因此有必要对 AAV 产品的空壳率实施质量控制。

3 不同质谱检测方法在 AAV 质量属性检测上的应用

目前,MS(质谱)法在生物制药和蛋白质等大分子分析上已经得到了广泛的应用^[45]。在生物制剂检测方面主要涉及在氨基酸序列、糖基化、二硫键和翻译后修饰(PTMs)的表征,以及蛋白质鉴定、表位定位、高阶结构测定、宿主细胞蛋白(HCP)监测及蛋白质定量质量控制测试^[46-49]。MS 法在获取蛋白质序列、3D 结构和相互作用之间的信息越来越重要。在蛋白质结构分析上,MS 已经成为经典的核磁共振光谱和 X 射线晶体学蛋白质结构方法的

补充方法,而且克服了核磁共振光谱需要的蛋白质浓度较高和 X 射线衍射结晶法在一些柔性蛋白质无法结晶方面的局限^[50]。此外,MS 技术也在得到不断的发展,目前 MS 与多种技术的联用使得质谱在表征蛋白质的结构和相互作用之间有了更加进一步的发展,例如 MS 联用于化学交联(XL)^[51-52]、氢/氘交换(HDX)^[53]、羟基自由基蛋白质足迹(HRPF)^[54-55]、限制性蛋白酶解^[56]和细胞热转移(CETSA)^[57-58]。XL-MS 可以用于研究近端残基的相互作用,推断或者验证蛋白质的 3D 结构。质谱结合 HDX、HRPF 或有限蛋白水解技术可用于识别在复合物形成时表面可及性发生改变的残基,从而提供分子间互作界面和复合物构象动力学的信息。而细胞热转移技术可以用于研究小分子配体的结合程度。

本文侧重于现有质谱方法在 AAV 载体制剂的衣壳比率、翻译后修饰、AAV 血清型表征和空白衣壳比率上的应用。目前用于检测衣壳比率的常用方法为凝胶电泳法,但是固有的伪影、染色差异以及染色的条带强度与衣壳蛋白之间关系尚未阐明限制了该方法的准确性^[59-60]。AAV 血清型的表征主要采用酶联免疫吸附实验 ELISA,但是应用上受到不同血清型特异性抗体开发的限制^[61]。空白衣壳比率的检测目前已经有 qPCR 法、光密度法、分析型超速离心(AUC)法和 TEM 法,但是这些方法中 qPCR 法会受到部分包封的衣壳的影响导致结果出现偏差;光密度法较为简便但是准确性不高;AUC 法的操作较为复杂,检测耗时久;TEM 法也无法区分部分包封的衣壳^[62]。而 MS 由于其较高的质量分辨率和质量检测范围,可以实现对 AAV 载体的完整衣壳蛋白、不同类型的 VP 蛋白、肽段和氨基酸序列的表征,使得 MS 在分析 VP 蛋白及其片段、PTMs 和 AAV 载体血清型中有着独特的优势,并且检测需要的样品数量少、检测时间短,可以与不同的分离技术联用。此外,非变性质谱和电荷检测质谱(CDMS)的应用有望克服现有方法在衣壳蛋白比率和空白衣壳比率不够准确的难题。

3.1 衣壳比率(衣壳的化学计量)

目前对 VP 化学计量的评价主要采用电泳方法,尤其是十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),采用 SYPRO Ruby 染料进行银染或荧光染色可提高 VP 条带检测的灵敏度^[59-60]。虽然

用染料染色和条带强度与实际蛋白质量之间的关系是阐明化学计量学所必需的,但与VPs的关系尚未确定。毛细管凝胶电泳(CGE)对VP具有良好的灵敏度和分离能力,已成为生物制药质量控制的主要方法^[63-64]。分离出的蛋白质是通过肽键或芳香族氨基酸残基的吸收来检测的,无需染色,因此可以实现对VP的直接定量。

MS在估计AAV中VP比率方面的效用已被证明与基于LC的分离和基于CGE的技术相结合^[25,65]。Oyama等^[25]报道了基于SDS-PAGE、CGE以及LC-UV-MS的检测VP3变体的结果。通过SDS-PAGE中条带的亮度密度、CGE中电泳图谱的峰面积、LC-UV色谱图谱的峰面积计算AAV衣壳的VP比值。其中,CGE与LC-UV-MS的检测结果基本一致,SDS-PAGE中对于VP2的检测值偏低,这可能是由于染料与VP结合的定量关系不同导致的。此外,LC-UV-MS的检测过程中会产生VP3片段,这也应该计算到VP3的定量中,除了VP的定量外,LC-UV-MS还可以明确地鉴定所有VP成分的氨基酸长度。对于AAV1、AAV2、AAV6,在SDS-PAGE图中VP1、VP2、VP3蛋白都被清晰地检测出来,但是相较于SDS-PAGE,CGE具有更好的分辨率和灵敏度,在CGE中VP3的一个小峰也被检测出来。经过LC-UV-MS在完整蛋白和MS/MS在肽段水平的分析,确认了该小峰属于VP3基因漏扫描产生的不完整片段而该片段会导致在LC-UV-MS中对VP3成分的检测结果偏高。

亲水作用色谱(HILIC)是反相色谱(RPLC)的一种补充方法,已经被广泛应用于极性物质的分析^[66]。HILIC可以有效地分离极性较大的物质,克服了RPLC对于强极性物质的分离弱和正相色谱(NPLC)在流动相溶解量不足的问题^[67]。在生物制药实验室中,基于HILIC的分离经常被应用于研究糖蛋白生物制药中释放的聚糖或糖肽。近年来,越来越多的报道表明,使用宽孔酰胺基柱的HILIC分离也可以成功应用于完整的蛋白质^[68-70]。Liu等^[71]利用亲水作用色谱与质谱联用的方法,通过增大进样量到20 μL 或者在启动洗脱之前重复给样增大了柱子的装载量,再通过脱溶性气体改善TFA的离子抑制提高了分辨率。该检测在完整蛋白水平上成功实现了对于VP1、VP2和VP3的分离,质谱的质量偏差2 D以内。此外,利用色氨酸

自带的荧光可以实现对于VP的化学计量,但这也导致了化学计量会偏向于色氨酸偏多的VP。此外,由于HILIC分离可以进一步分离出不同VP的蛋白形态,不同VP的蛋白形态可能发生共洗脱,导致峰整合不准确。最后,尚不清楚不同VP的回收率是否会因HILIC柱上吸附的不同而有所不同。尽管如此,该方法仍可用于半定量比较不同批次或工艺中3个VP的相对表达量,并且可以用于AAV不同批次间的比较。

非变性质谱(native MS)是研究大分子和蛋白质及其配体复合物的重要手段,因为它保留了相互作用之间的非共价作用力^[72]。使用非变性质谱可以确定完整大分子复合物的质量、化学计量、组分之间的直接相互作用,并且在多亚基组装的情况下,识别稳定的亚配合物并分配亚基的相对位置^[73-74]。Snijder等^[75]利用Orbitrap质谱仪获得了不同病毒组装体的高分辨率非变性质谱图,能分析相对分子质量高达4.5 MD病毒颗粒,并且由此对AAV1的3种VP的化学计量学做了检测,得到了共8个匹配的化学计量(图4),由此提出VP的组装是随机的。Wörner等^[27]通过使用Orbitrap UHMR提高了有效转移和检测高质量离子的能力,提高了非变性质谱的分辨率。使用模拟的非变性质谱与样品的非变性质谱做了比较,可以计算化学计量。为了模拟非变性质谱,开发了一个python类的程序,能够创建复杂样品的理论质谱,对1 891(基于 $n = 3$ 个不同的VP,总共 $k = 60$ 个子单位,给出 $\frac{(k+n-1)!}{k! \times (n-1)!}$ 唯一的组合/质量^[3])可能存在的理论质谱做了模拟。分析的结果与LC-UV-MS检测的结果基本一致。并且提出了VP在不同的血清型和批次之间存在异质性,即使是同一批次内的样品,其VP的组装也具有随机性,说明了VP的比率1:1:10只是一个总体分布的平均值,在实际生产中部分VP的拷贝数可能会偏离这个比例,而这对于VP1与VP2来说变化程度较大,例如:AAV8_2中VP1的产生量是AAV8_1的2倍。

3.2 翻译后修饰(PTMs)

MS对于完整蛋白和肽段水平的分析都可以用于分析AAV衣壳蛋白的翻译后修饰^[65]。Zhang等^[65]利用优化过后的RPLC-MS对AAV的衣壳蛋白进行了分析,利用二氟乙酸(DFA)作为流动相,很

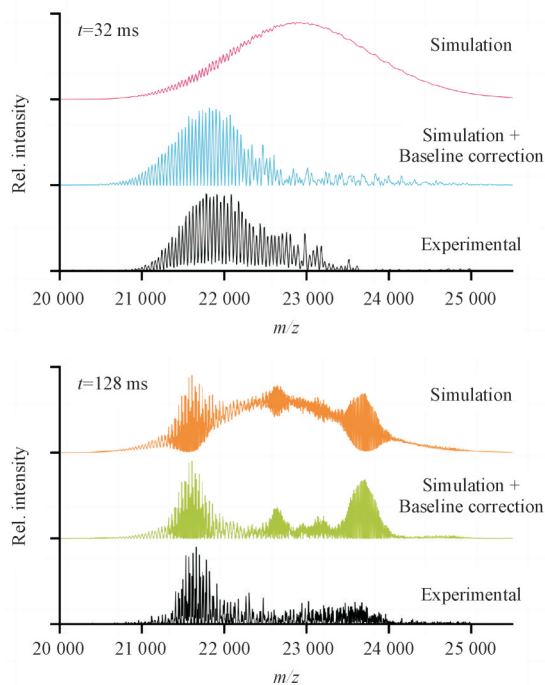


Figure 4 Simulated mass spectra for AAV9, showing the convoluted ion signals of the 69 967 different ion species shown in a) at resolutions, corresponding to transient times of 32 ms and 128 ms. Each plot shows (top to bottom) the simulated mass spectra before and after baseline correction with their experimental counterpart. Experimental data was recorded by transient averaging, thereby removing the unresolved regions presented in the non-baseline corrected^[27]

好地改善了之前氟乙酸(FA)无法分离VP蛋白的问题。精准的质量检测使得在完整蛋白水平可以分析潜在的PTMs,例如,VP1和VP3的实测质量与理论质量相差89 D,说明N端蛋氨酸截断,加入了N端乙酰化为潜在的分子形式;VP1和VP2的反卷积谱中检测到80 D的质量位移,并确定为磷酸化。并且开发了一种新的酶解方法,对于AAV5的序列覆盖率达到了98%,检测到了包括N-乙酰化、脱酰胺化、氧化、甲基化和磷酸化在内的多种PTMs。Jin等^[45]用LC-MS直接分析AAV衣壳蛋白,完整质谱测量结合肽图谱结果显示,VP1和VP3中N端蛋氨酸残基被裂解,下一个丙氨酸残基被乙酰化,而多种AAV血清型(AAV1、AAV2、AAV5、AAV7、AAV9和AAVrh10)的VP2中没有乙酰化。

利用CE(毛细管电泳)分离技术,Zhang等^[76]报道了一种基于微流体的CE-MS鉴定AAV2衣壳蛋白的方法。其中3个VP在MS检测之前几乎已经基线分离,VP1与VP2的分离优于之前报道的RPLC-MS法^[45]。最后,完整蛋白质量分析也可以

潜在地识别由PTMs形成引起的衣壳蛋白变异,如乙酰化的+42 D。上文提到的Oyama等^[25]和Liu等^[71]也实现了对PTMs的鉴定。作者等基于CGE和LC的分离后,在肽段水平的分析上检测出了VP上的N-乙酰化,VP1、VP2的磷酸化和VP上天冬酰胺的脱酰胺。作者利用亲水作用色谱与质谱耦合的方法,质谱分析证实了在所有血清型中VP1和VP3中N端蛋氨酸的去除和后续丙氨酸的乙酰化,以及VP2中N端苏氨酸的去除。此外,还有氧化和磷酸化的变体也被检测到(图5)。

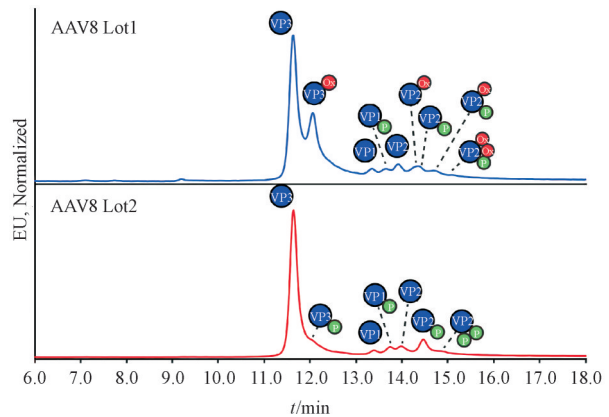


Figure 5 PTMs between different batches of AAV8^[71]

除此之外,基于PTMs的研究结果,通过蛋白质工程来设计改善AAV衣壳蛋白,可以使得AAV的转导效率得到提高,半衰期得到延长。Giles等^[28]对AAV的脱酰胺进行了研究,影响脱酰胺率的最重要因素之一是N+1氨基酸(天冬酰胺后的氨基酸残基)的主酰胺作为亲核试剂攻击天冬酰胺残基侧链羰基碳形成琥珀酰亚胺的能力,以及肽主链的柔韧性。N+1残基对肽骨架的局部柔韧性至关重要,因此严重影响天冬酰胺的脱酰胺率。甘氨酸(G)在N+1位置形成一个NG基序,对脱酰胺的影响最大,其次是组氨酸(H)和丝氨酸(S)^[77]。该研究为AAV8 NG位点突变体制作了小规模载体,分别将每个N+1残基转化为丙氨酸或丝氨酸。在丝氨酸的方案中,涉及N263的两种配对组合(G264A/G515A和G264A/G541A)都提高了体外转导效率(分别是wt AAV8的2.0倍和2.6倍),而滴度没有损失。

3.3 血清型的鉴定

AAV血清型鉴定通常通过酶联免疫吸附试验(ELISA)或Western blot方法进行。然而,这些方法

受到血清型特异性抗体可用性的限制,可能不足以区分具有高序列同源性的血清型,这一问题将不可避免地因工程化 AAV 血清型数量的迅速增长而复杂化^[61]。最近, Bennett 等^[78]报道了基于 AAV1 到 AAV9 和 AAVrh 特异融化温度的差示扫描荧光法(DSF)在 AAV 血清型鉴别中的应用,可以确定 AAV 不同血清型的融化温度,但是该方法的分辨率不高。

基于质谱(MS)的方法在 AAV 血清型鉴定中的应用越来越多,它们可用于分析完整蛋白或 VP 的肽图谱。后者能够明确区分衣壳蛋白氨基酸序列,它在氨基酸序列水平上提供了高可信度的衣壳鉴别。这是目前区分 VPs 相对分子质量差异小于 10 D 的血清型所必需的。例如, AAV1 和 AAV6 的 VP2 和 VP3 氨基酸序列高度相似,相对分子质量差仅为 2 D^[79]。在胶上酶切或溶液酶切后进行的基于 LC-MS 的肽图谱分析,不仅可以提供每个衣壳蛋白的识别,而且还可以检索位点特异性 PTMs 的信息^[45,80]。相比之下,完整蛋白质量分析通常是在色谱或电泳分离后在高分辨率精确的质谱(HRAM)质谱系统上进行,是一种基于精确质量测量和最小样本处理的直接快速识别 AAV 血清型特异性衣壳蛋白的技术。Lam 等^[81]基于 LC-MS/MS 的肽图谱分析对 AAV 的 VP 序列实现了高效的鉴定,其中尽管 VP1、VP2 的含量偏低,序列覆盖率也能达到 93%,由此对 AAV2、AAV5、AAV8、AAV9 实现了鉴别。Jin 等^[45]使用反相液相色谱(RPLC)耦合质谱法对 AAV2 衣壳蛋白进行了鉴定。此外, Liu 等^[71]报道了一种基于亲水相互作用液相色谱(HILIC)-MS 的完整 VP 分析方法。在具有高分离效率的同时也能够检测不同 PTMs 后的 VP。2D 液相色谱(2DLC)和毛细管电泳(CE),也已为此目的而开发,并展示了不同的方法,通过这些方法可以在 MS 分析之前有效地分离 VP 成分,表征 VP 的序列^[76,82]。

3.4 空壳率

有多种方法可以确定满 AAV 衣壳和空 AAV 衣壳之间的比率。其中一种方法是通过用现有 qPCR 数据得到的基因组载体数除以 ELISA 数据得到的总衣壳数来确定完整衣壳在总衣壳中的百分比但是,这种方法缺乏足够的准确性和精密度^[41]。另一种方法是利用 AAV 样品在 260 和 280 nm 的吸收度,用分光光度法测定样品中的蛋白质

和 DNA 含量。该方法简单、快速、易于操作。但 AAV 样品纯度要求高,才能最大限度地减少杂质对 260 和 280 nm 紫外光吸收度的干扰。AUC 可以完整分离不同的衣壳蛋白,但是操作上复杂、分析时间长、成本高,需要大量的样本量,数据解释需要专业知识^[62]。利用 TEM 也可以实现对于 AAV 空衣壳和满衣壳的区分,但是操作时间长,且无法分辨部分装载的衣壳。

电荷检测质谱(CDMS)是一种单粒子方法,它同时测量单个离子的 m/z 和电荷(z),以直接确定其相对分子质量。带电粒子的通过会产生一个信号,然后由电荷敏感放大器检测到。典型的分析包括对数千个粒子的单独测量,然后绘制成质量直方图,显示样品的相对分子质量分布和各自的丰度^[83]。质谱法测量 DNA 和 RNA 的相对分子质量分布时,由于反离子的存在而导致异质性。非均质性反过来又限制了传统 MS 可以测量的寡核苷酸的大小,CDMS 通过直接测量每个离子的质量电荷比(m/z)和电荷克服了这一限制^[84]。Barnes 等^[84]利用 CDMS 对 AAV8 的空满衣壳进行了测定(图 6),空衣壳为 3.7 MD,满衣壳为 5.4 MD,成功测量了其比率。并且能够检测到部分 DNA 被截断,从而可以用于筛查这部分包裹了不完整 DNA 的衣壳。

4 总结与展望

正如前文所述,质谱正在成为生物制药行业分析 AAV 基因治疗产品的关键表征技术之一。MS 在分析 AAV 载体的衣壳比率、翻译后修饰、血清型、空壳率方面展现出了其独特的优势,不仅能在完整蛋白的水平上分析 AAV 载体,也能在肽段水平上分析 AAV 的衣壳。随着新的质谱电离技术和上游分离技术的发展,CDMS 等先进技术将在 AAV 分析中发挥越来越重要的作用。MS 仪器和数据分析软件的性能的增强,也能实现对于 AAV 组装规律的揭示、批次间的快速比较和高通量的载体质量检测。而将 MS 技术和众多的分离技术正交可以实现对于 AAV 蛋白质氨基酸序列的高分辨表征。未来随着 AAV 生产工艺和应用的发展,MS 技术有望在生产过程的各个阶段实现对于 AAV 载体质量的实时监控。同时作为一种表征技术,可以用于指导 AAV 载体的设计过程。AAV 载体在转导过程中面临着适应性免疫的限制,其免

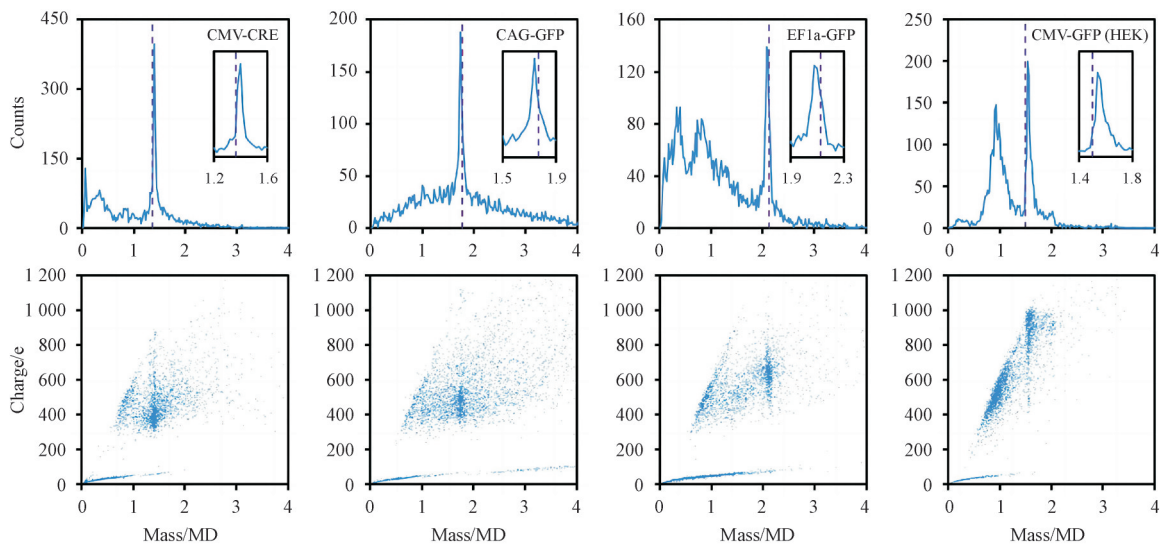


Figure 6 Representative mass distribution and charge-to-mass scatter plots recorded after incubation at 80 °C for 15 min^[84]

疫原性也会增加治疗过程中的不良反应^[9,19]。PTMs 也会 AAV 的转导效率产生影响。因此如何设计更加具有优势的 AAV 载体也得到了较多的关注^[16,85]。而通过 MS 技术对 VP 序列和相关蛋白的表征可以很好地指导 AAV 载体的设计。例如,通过对于 PTMs 的研究,确认不同血清型的不同位点氨基酸序列的变化对于 AAV 载体质量有何影响,从而可以通过蛋白质工程对 AAV 进行改良,提高治疗过程中的安全性^[77]。

References

- [1] Zhang AZ, Zhang JX, Zhang JF. Application and prospect of gene therapy for fundus vascular diseases[J]. *Int Eye Sci* (国际眼科杂志), 2023, **23**(3): 400-406.
- [2] Li MQ, Wei LP, Tao QY, et al. Application status and research progress on safety of gene therapy delivery vectors[J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2022, **53**(12): 1671-1682.
- [3] Fu Q., Polanco A., Lee Y. S., et al. Critical challenges and advances in recombinant adeno-associated virus (rAAV) bio-manufacturing[J/OL]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2023 [2023-06-16]. <https://www.webofscience.com/wos/alldb/fullrecord/WOS:000978645100001>.
- [4] Xu YY. Current status and challenges of gene therapy products [J]. *China Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2020, **40**(12): 95-103.
- [5] Zhu LF, Wang ZJ. Analysis of global gene therapy drug development status[J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2022, **46**(5): 325-338.
- [6] Li YH, Li W. Advances in gene therapy for rare diseases[J]. *J Rare Uncommon Dis* (罕见疾病杂志), 2023, **30**(3): 109-112.
- [7] Large EE, Silveria MA, Zane GM, et al. Adeno-associated virus (AAV) gene delivery: dissecting molecular interactions upon cell entry[J]. *Viruses*, 2021, **13**(7): 1336.
- [8] Chen P, Zhang LJ, Li N. Progress in research on adeno-associated virus vectors[J]. *Chin J Biol* (中国生物制品学杂志), 2022, **35**(4): 500-507.
- [9] Pipe S, Leebeek FWG, Ferreira V, et al. Clinical considerations for capsid choice in the development of liver-targeted AAV-based gene transfer[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, **15**: 170-178.
- [10] Mietzsch M, Jose A, Chipman P, et al. Completion of the AAV structural atlas: serotype capsid structures reveals clade-specific features[J]. *Viruses*, 2021, **13**(1): 101.
- [11] Zhao LQ, Xi B, Peng HS. Advances on research of adeno-associated virus vectors[J]. *Curr Biotechnol* (生物技术进展), 2012, **2**(2): 110-115.
- [12] Wu Y, Mei T, Jiang LY, et al. Development of versatile and flexible Sf9 packaging cell line-dependent OneBac system for large-scale recombinant adeno-associated virus production[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2019, **30**(5): 172-183.
- [13] Maurer AC, Pacouret S, Cepeda Diaz AK, et al. The assembly-activating protein promotes stability and interactions between AAV's viral proteins to nucleate capsid assembly[J]. *Cell Rep*, 2018, **23**(6): 1817-1830.
- [14] Tse LV, Moller-Tank S, Meganck RM, et al. Mapping and engineering functional domains of the assembly-activating protein of adeno-associated viruses[J]. *J Virol*, 2018, **92**(14): e00393-e00318.
- [15] Maurer AC, Cepeda Diaz AK, Vandenberghe LH. Residues on adeno-associated virus capsid lumen dictate interactions and compatibility with the assembly-activating protein[J]. *J Virol*, 2019, **93**(7): e02013-e02018.

- [16] Ogden PJ, Kelsic ED, Sinai S, *et al.* Comprehensive AAV capsid fitness landscape reveals a viral gene and enables machine-guided design[J]. *Science*, 2019, **366**(6469): 1139-1143.
- [17] Galibert L, Hyvönen A, Eriksson RAE, *et al.* Functional roles of the membrane-associated AAV protein MAAP[J]. *Sci Rep*, 2021, **11**(1): 21698.
- [18] Huang XP, Wang X, Ren YX, *et al.* Reactive oxygen species enhance rAAV transduction by promoting its escape from late endosomes[J]. *Virol J*, 2023, **20**(1): 2.
- [19] Hamilton BA, Wright JF. Challenges posed by immune responses to AAV vectors: addressing root causes[J]. *Front Immunol*, 2021, **12**: 675897.
- [20] Urabe M, Ding CT, Kotin RM. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors[J]. *Hum Gene Ther*, 2002, **13**(16): 1935-1943.
- [21] Arriaga I, Navarro A, Etxabe A, *et al.* Cellular and structural characterization of VP1 and VP2 knockout mutants of AAV3B serotype and implications for AAV manufacturing[J]. *Hum Gene Ther*, 2022, **33**(21/22): 1142-1156.
- [22] Bosma B, du Plessis F, Ehlert E, *et al.* Optimization of viral protein ratios for production of rAAV serotype 5 in the baculovirus system[J]. *Gene Ther*, 2018, **25**(6): 415-424.
- [23] Salganik M, Venkatakrishnan B, Bennett A, *et al.* Evidence for pH-dependent protease activity in the adeno-associated virus capsid[J]. *J Virol*, 2012, **86**(21): 11877-11885.
- [24] Grieger JC, Snowdy S, Samulski RJ. Separate basic region motifs within the adeno-associated virus capsid proteins are essential for infectivity and assembly[J]. *J Virol*, 2006, **80**(11): 5199-5210.
- [25] Oyama H, Ishii K, Maruno T, *et al.* Characterization of adeno-associated virus capsid proteins with two types of VP3-related components by capillary gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. *Hum Gene Ther*, 2021, **32**(21/22): 1403-1416.
- [26] Eon-Duval A, Broly H, Gleixner R. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach[J]. *Biotechnol Prog*, 2012, **28**(3): 608-622.
- [27] Wörner TP, Bennett A, Habka S, *et al.* Adeno-associated virus capsid assembly is divergent and stochastic[J]. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 1642.
- [28] Giles AR, Sims JJ, Turner KB, *et al.* Deamidation of amino acids on the surface of adeno-associated virus capsids leads to charge heterogeneity and altered vector function[J]. *Mol Ther*, 2018, **26**(12): 2848-2862.
- [29] Mary B, Maurya S, Arumugam S, *et al.* Post-translational modifications in capsid proteins of recombinant adeno-associated virus (AAV) 1-rh10 serotypes[J]. *FEBS J*, 2019, **286**(24): 4964-4981.
- [30] Zhong L, Li BZ, Jayandharan G, *et al.* Tyrosine-phosphorylation of AAV2 vectors and its consequences on viral intracellular trafficking and transgene expression[J]. *Virology*, 2008, **381**(2): 194-202.
- [31] Weger S, Hammer E, Heilbronn R. SUMO-1 modification regulates the protein stability of the large regulatory protein Rep78 of adeno associated virus type 2 (AAV-2)[J]. *Virology*, 2004, **330**(1): 284-294.
- [32] Gabriel N, Hareendran S, Sen D, *et al.* Bioengineering of AAV2 capsid at specific serine, threonine, or lysine residues improves its transduction efficiency *in vitro* and *in vivo*[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2013, **24**(2): 80-93.
- [33] Srivastava A. *In vivo* tissue-tropism of adeno-associated viral vectors[J]. *Curr Opin Virol*, 2016, **21**: 75-80.
- [34] Hu S, Yang LP. Expression pattern of different serotypes of adeno-associated viral vectors in mouse retina[J]. *J Peking Univ Health Sci* (北京大学学报 医学版), 2020, **52**(5): 845-850.
- [35] Yang F, Yang Y, Wang XL, *et al.* Comparison of the transfection effect of different AAV serotypes in rat DRG neurons[J]. *Lab Anim Sci* (实验动物科学), 2020, **37**(6): 66-69.
- [36] Farraha M, Kizana E. Assessing recombinant AAV shedding after cardiac gene therapy[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, **2573**: 333-344.
- [37] Hakim CH, Kumar SRP, Pérez-López D, *et al.* Assessment of the gene therapy immune response in the canine muscular dystrophy model[J]. *Methods Mol Biol*, 2023, **2587**: 353-375.
- [38] Boutin S, Monteilhet V, Veron P, *et al.* Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors[J]. *Hum Gene Ther*, 2010, **21**(6): 704-712.
- [39] Kruzik A, Fetahagic D, Hartlieb B, *et al.* Prevalence of anti-adeno-associated virus immune responses in international cohorts of healthy donors[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, **14**: 126-133.
- [40] Heldt CL, Areo O, Joshi PU, *et al.* Empty and full AAV capsid charge and hydrophobicity differences measured with single-particle AFM[J]. *Langmuir*, 2023, **39**(16): 5641-5648.
- [41] Wang CL, Mulagapati SHR, Chen ZY, *et al.* Developing an anion exchange chromatography assay for determining empty and full capsid contents in AAV_{6,2}[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, **15**: 257-263.
- [42] Serrano MAC, Furman R, Chen GD, *et al.* Mass spectrometry in gene therapy: challenges and opportunities for AAV analysis[J]. *Drug Discov Today*, 2023, **28**(1): 103442.
- [43] Mingozzi F, Anguela XM, Pavani G, *et al.* Overcoming preexisting humoral immunity to AAV using capsid decoys[J]. *Sci Transl Med*, 2013, **5**(194): 194ra92.
- [44] Gao K, Li MX, Zhong L, *et al.* Empty virions in AAV8 vector preparations reduce transduction efficiency and may cause total viral particle dose-limiting side-effects[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2014, **1**(9): 20139.

- [45] Jin XY, Liu L, Nass S, *et al.* Direct liquid chromatography/mass spectrometry analysis for complete characterization of recombinant adeno-associated virus capsid proteins[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2017, **28**(5): 255-267.
- [46] Rogstad S, Faustino A, Ruth A, *et al.* A retrospective evaluation of the use of mass spectrometry in FDA biologics license applications[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2017, **28**(5): 786-794.
- [47] Chen GD, Tao L, Li ZJ. Recent advancements in mass spectrometry for higher order structure characterization of protein therapeutics[J]. *Drug Discov Today*, 2022, **27**(1): 196-206.
- [48] Liu XR, Huang RYC, Zhao FF, *et al.* Advances in mass spectrometry-based epitope mapping of protein therapeutics[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, **215**: 114754.
- [49] Boeri Erba E, Signor L, Petosa C. Exploring the structure and dynamics of macromolecular complexes by native mass spectrometry[J]. *J Proteomics*, 2020, **222**: 103799.
- [50] Lee K, O'Reilly FJ. Cross-linking mass spectrometry for mapping protein complex topologies *in situ*[J]. *Essays Biochem*, 2023, **67**(2): 215-228.
- [51] Pepelnjak M, de Souza N, Picotti P. Detecting protein-small molecule interactions using limited proteolysis-mass spectrometry (LiP-MS)[J]. *Trends Biochem Sci*, 2020, **45**(10): 919-920.
- [52] Jurga, V, Kodicek M. Limited and pulse proteolysis of human hemoglobin[J]. *Chemické Listy*, 2010, **104**(4): 232-235.
- [53] Garcia NK, Sreedhara A, Deperalta G, *et al.* Optimizing hydroxyl radical footprinting analysis of biotherapeutics using internal standard dosimetry[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2020, **31**(7): 1563-1571.
- [54] Espino JA, Jones LM. *In vivo* hydroxyl radical protein footprinting for the study of protein interactions in *Caenorhabditis elegans*[J]. *J Vis Exp*, 2020(158): 10. 3791/60910.
- [55] Tran MH, Schoeder CT, Schey KL, *et al.* Computational structure prediction for antibody-antigen complexes from hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry: challenges and outlook [J]. *Front Immunol*, 2022, **13**: 859964.
- [56] Piotrowski C, Sinz A. Structural investigation of proteins and protein complexes by chemical cross-linking/mass spectrometry [M]//*Advances in Experimental Medicine and Biology*. Singapore: Springer Singapore, 2018: 101-121.
- [57] Kurt LU, Clasen MA, Santos MDM, *et al.* Characterizing protein conformers by cross-linking mass spectrometry and pattern recognition[J]. *Bioinformatics*, 2021, **37**(18): 3035-3037.
- [58] Prabhu N, Dai LY, Nordlund P. CETSA in integrated proteomics studies of cellular processes[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, **54**: 54-62.
- [59] Su Q, Sena-Estevés M, Gao GP. Analysis of recombinant adeno-associated virus (rAAV) purity using silver-stained SDS-PAGE [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020, **2020**(8): 095679.
- [60] Penaud-Budloo M, Broucque F, Harrouet K, *et al.* Stability of the adeno-associated virus 8 reference standard material[J]. *Gene Ther*, 2019, **26**(5): 211-215.
- [61] Gurda BL, DiMattia MA, Miller EB, *et al.* Capsid antibodies to different adeno-associated virus serotypes bind common regions [J]. *J Virol*, 2013, **87**(16): 9111-9124.
- [62] Savelyev A, Gorbet GE, Henrickson A, *et al.* Moving analytical ultracentrifugation software to a good manufacturing practices (GMP) environment[J]. *PLoS Comput Biol*, 2020, **16**(6): e1007942.
- [63] Lechner A, Giorgetti J, Gahoual R, *et al.* Insights from capillary electrophoresis approaches for characterization of monoclonal antibodies and antibody drug conjugates in the period 2016-2018[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, **1122/1123**: 1-17.
- [64] Zhang CX, Meagher MM. Highly sensitive SDS capillary gel electrophoresis with sample stacking requiring only nanograms of adeno-associated virus capsid proteins[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, **1972**: 263-270.
- [65] Zhang XM, Jin XY, Liu L, *et al.* Optimized reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry methods for intact protein analysis and peptide mapping of adeno-associated virus proteins[J]. *Hum Gene Ther*, 2021, **32**(23/24): 1501-1511.
- [66] Zhu QF, Zhang TY, Qin LL, *et al.* Method to calculate the retention index in hydrophilic interaction liquid chromatography using normal fatty acid derivatives as calibrants[J]. *Anal Chem*, 2019, **91**(9): 6057-6063.
- [67] Wang F. *Study on the retention mechanism in hydrophilic interaction chromatography using stoichiometric displacement theory (应用计量置换理论对亲水相互作用色谱中溶质保留机理的研究)*[D]. Xi'an: Northwest University, 2015.
- [68] D'Atri V, Nováková L, Fekete S, *et al.* Orthogonal middle-up approaches for characterization of the glycan heterogeneity of etanercept by hydrophilic interaction chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2019, **91**(1): 873-880.
- [69] Gargano AFG, Schouten O, van Schaick G, *et al.* Profiling of a high mannose-type N-glycosylated lipase using hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry[J]. *Anal Chim Acta*, 2020, **1109**: 69-77.
- [70] Ikegami T. Hydrophilic interaction chromatography for the analysis of biopharmaceutical drugs and therapeutic peptides: a review based on the separation characteristics of the hydrophilic interaction chromatography phases[J]. *J Sep Sci*, 2019, **42**(1): 130-213.
- [71] Liu AP, Patel SK, Xing T, *et al.* Characterization of adeno-associated virus capsid proteins using hydrophilic interaction chromatography coupled with mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, **189**: 113481.
- [72] Allison TM, Bechara C. Structural mass spectrometry comes of age: new insight into protein structure, function and interactions [J]. *Biochem Soc Trans*, 2019, **47**(1): 317-327.

- [73] Boeri Erba E, Signor L, Oliva MF, *et al.* Characterizing intact macromolecular complexes using native mass spectrometry[M]// *Protein Complex Assembly*. New York, NY: Springer New York, 2018: 133-151.
- [74] Lössl P, Brunner AM, Liu F, *et al.* Deciphering the interplay among multisite phosphorylation, interaction dynamics, and conformational transitions in a tripartite protein system[J]. *ACS Cent Sci*, 2016, **2**(7): 445-455.
- [75] Snijder J, van de Waterbeemd M, Damoc E, *et al.* Defining the stoichiometry and cargo load of viral and bacterial nanoparticles by Orbitrap mass spectrometry[J]. *J Am Chem Soc*, 2014, **136**(20): 7295-7299.
- [76] Zhang Y, Wang Y, Sosic Z, *et al.* Identification of adeno-associated virus capsid proteins using ZipChip CE/MS[J]. *Anal Biochem*, 2018, **555**: 22-25.
- [77] Zhou Y, Wang YJ. Direct deamidation analysis of intact adeno-associated virus serotype 9 capsid proteins using reversed-phase liquid chromatography[J]. *Anal Biochem*, 2023, **668**: 115099.
- [78] Bennett A, Patel S, Mietzsch M, *et al.* Thermal stability as a determinant of AAV serotype identity[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2017, **6**: 171-182.
- [79] Zarei M, Wang P, Jonveaux J, *et al.* A novel protocol for in-depth analysis of recombinant adeno-associated virus capsid proteins using UHPLC-MS/MS[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2022, **36**(6): e9247.
- [80] Murray S, Nilsson CL, Hare JT, *et al.* Characterization of the capsid protein glycosylation of adeno-associated virus type 2 by high-resolution mass spectrometry[J]. *J Virol*, 2006, **80**(12): 6171-6176.
- [81] Lam AK, Zhang JP, Frabutt D, *et al.* Fast and high-throughput LC-MS characterization, and peptide mapping of engineered AAV capsids using LC-MS/MS[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2022, **27**: 185-194.
- [82] Wu ZJ, Wang HX, Tustian A, *et al.* Development of a two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry platform for simultaneous multi-attribute characterization of adeno-associated viruses[J]. *Anal Chem*, 2022, **94**(7): 3219-3226.
- [83] Antoine R. Weighing synthetic polymers of ultra-high molar mass and polymeric nanomaterials: what can we learn from charge detection mass spectrometry[J]? *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2020, **34**(Suppl 2): e8539.
- [84] Barnes LF, Draper BE, Kurian J, *et al.* Analysis of AAV-extracted DNA by charge detection mass spectrometry reveals genome truncations[J]. *Anal Chem*, 2023, **95**(9): 4310-4316.
- [85] Lee EJ, Guenther CM, Suh J. Adeno-associated virus (AAV) vectors: rational design strategies for capsid engineering[J]. *Curr Opin Biomed Eng*, 2018, **7**: 58-63.



[专家介绍] 李惠琳, 中山大学药学院教授, 博士生导师。2013年于英国华威大学(University of Warwick)获得博士学位; 2013—2017年分别在美国加州大学洛杉矶分校(UCLA)和法国遗传与分子细胞生物学研究所(IGBMC)从事博士后研究; 2017年12月经中山大学“百人计划”引进入药学院工作。主要从事生物质谱新技术的开发及应用: (1)开发整合结构质谱技术(包括 native top-down MS, HDX-MS, cross-linking MS等技术), 用于研究药物作用/副作用分子机制、蛋白复合物结构分析; (2) Middle-down/top-down 蛋白质组学新技术的开发及在生物大分子动态修饰调控机制研究中的应用。2014年获得 American Society of Mass Spectrometry Postdoctoral Career Development Award, 2019年获得“珠江人才计划”青年拔尖人才, 2021年 Rising Stars in Proteomics and Metabolomics (JPR)。现任中国蛋白质组学会理事、中国化学会质谱分析专业委员会委员、Consortium for Top-down Proteomics (CTDP) Early Career Researcher (ECR) Committee 委员。