

doi: 10.11830/ISSN.1000-5013.201701012



超滤法去除重组腺相关病毒中 内毒素的应用

唐明青¹, 张文豪^{1,2}, 侯莹¹, 成志云¹,
郭思佳¹, 王立振¹, 刘慧¹, 许瑞安¹

(1. 华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021;

2. 福建医科大学 基础医学院, 福建 福州 350108)

摘要: 为探讨超滤法在重组腺相关病毒精制中的可行性, 采用不同截留分子量的超滤管对重组腺相关病毒样品 rAAV9-Kal 进行超滤处理. 利用鲎试剂盒和 qPCR 法定量检测截留液和滤过液中的内毒素和病毒含量, 评价超滤技术对样品中内毒素的去除效果. 结果表明: 在乙二胺四乙酸二钠和脱氧胆酸钠的预处理下, 30 kD 的超滤管对样品的回收率及内毒素去除率分别为 0.912 2, 0.870 6. 因此, 在单一超滤条件下, 30 kD 的超滤管是重组腺相关病毒样品超滤纯化的最佳选择.

关键词: 重组腺相关病毒; 超滤; 截留分子量; 内毒素; 纯化

中图分类号: Q 93

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2017)01-0064-05

Removal of Endotoxin From Recombinant Adeno-Associated Virus by Ultrafiltration

TANG Mingqing¹, ZHANG Wenhao^{1,2}, HOU Ying¹,
CHENG Zhiyun¹, GUO Sijia¹, WANG Lizhen¹,
LIU Hui¹, XU Ruian¹

(1. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

Abstract: To explore the possibility of ultrafiltration technology used in recombinant adeno-associated virus purification, the recombinant adeno-associated virus sample termed rAAV9-Kal was first treated by different molecular weights cut off ultrafiltration devices, then the endotoxin and virus in the retentates and filtrates were assayed with quantitative tachypleus amebocyte lysate regents and real-time PCR respectively, and last the effects of ultrafiltration on endotoxin removal were evaluated. The results showed that the recovery rate and endotoxin removal rate of sample were 0.912 2 and 0.870 6 respectively, under the treatment of EDTA, DOC and 30 kD ultrafiltration devices. Therefore, the 30 kD should be the most suitable ultrafiltration device for sample ultrafiltration and endotoxin removal.

Keywords: recombinant adeno-associated virus; ultrafiltration; molecular weights cut off; endotoxin; purification

收稿日期: 2016-06-29

通信作者: 唐明青(1982-), 男, 副教授, 博士, 主要从事 AAV 基因治疗的研究. E-mail: Tangmingqing2222@163.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(2012AA020810); 福建省中青年教育科研项目(JA14020); 华侨大学科研基金资助项目(14BS111)

重组腺相关病毒(rAAV)属于微小病毒科的单链 DNA 病毒,具有天然非致病性、免疫原性低、宿主范围广、可转染分裂细胞和非分裂细胞及介导外源基因长期表达等特性,是最有前景的基因治疗载体之一^[1]. 目前,基于 rAAV 的基因治疗药物 Glybera 已率先在欧盟上市^[2]. 内毒素(ET)是由革兰氏阴性菌细胞壁裂解释放的脂多糖类物质,极微量(1~5 ng·kg⁻¹)的内毒素作用于机体内的内生致热原生成细胞即可导致机体发热,大剂量可引起血液循环障碍和内毒素休克^[3]. 在 rAAV 制备过程中,一个重要的质控指标就是内毒素,尤其是应用于临床的 rAAV,内毒素安全限量为小于 83.35 μkat·L⁻¹^[4]. 目前常用的内毒素去除手段如活性炭吸附法、阴离子交换层析法和 TritonX-114 液相萃取法普遍存在选择性低的问题,而高选择性的亲和膜色谱法又存在配基选择、介质合成困难、过程繁琐、技术要求高的限制^[5]. 超滤技术是通过膜表面的微孔结构对物质进行选择性的分离,从而实现大、小分子的分离、浓缩、净化的目的. 虽然内毒素单体的相对分子质量仅为 10~20 kD,但由于内毒素通常以聚合态形式存在,其相对分子质量可以高达 1 000 kD 以上. 因此,超滤技术非常适合在小分子量产品中进行内毒素的去除工作,如注射制剂及工程疫苗内毒素的去除^[6],但其在 rAAV 这种超大分子量产品(大于 10 000 kD)中的内毒素去除效应却未见相关报道. 为探讨在 rAAV 制备中应用超滤管进行 rAAV 浓缩与清除内毒素的可行性,本文研究采用不同截留分子量(molecular weight cut off,MWCO)的超滤管,对实验室制备的携带人组织激肽释放酶结合蛋白基因(Kal)的 rAAV9-Kal 样品进行超滤离心处理,收集滤过液和截留液进行内毒素及病毒基因组(viral genome,VG)定量检测和衣壳蛋白定性表征,以综合评价超滤管对 rAAV 浓缩与内毒素去除效果.

1 材料与方法

1.1 试剂耗材

rAAV9-Kal 样品由分子药物教育部工程研究中心下辖的 rAAV 中试车间提供;Amicon Ultra-4 超滤管(厦门市鹭隆生物公司);快速银染试剂盒(海门市碧云天生物技术研究);显色基质鲎试剂盒(厦门市鲎试剂实验厂有限公司);SYBR Select Master Mix(上海市英潍捷基贸易有限公司);定量 PCR 引物(南京市金斯瑞生物科技有限公司);小鼠抗 VP1/VP2/VP3 单克隆抗体和兔抗小鼠 IgG 单克隆抗体(上海市英潍捷基贸易有限公司);ECL 化学发光试剂盒(厦门市鹭隆生物公司).

1.2 Realtime PCR 引物设计

根据 GenBank 中人 Kallistatin 基因序列(L19684.1),使用 Primer 5.0 软件设计引物序列为
Kal-S: 5'-GCTGTCTGAGTCCGATGTCC-3',
Kal-AS: 5'-TGTCGTAGAAGTTGGTGTGG-3',扩增产物长度 191 bp.

1.3 超滤离心

取 rAAV9-Kal(2.5×10¹² VG·L⁻¹)4 mL,分别加于 MWCO 为 3,10,30,50,100 kD 的 Amicon Ultra-4 超滤管中,以 7 500g,4 ℃,离心 15 min 收集截留液和滤过液.

1.4 内毒素检测

按照 2010 版《中华人民共和国药典》吸光度法内毒素检测要求及显色基质鲎试剂盒使用说明进行标准曲线绘制、可靠性试验、干扰实验及内毒素测定. 提前配制显色基质溶液、偶氮化试剂 1、偶氮化试剂 2、偶氮化试剂 3,用内毒素检查用水配制活性浓度为 0.10,0.25,0.50,16.67 μkat·L⁻¹细菌内毒素标准液. 按标示量,加细菌内毒素检查用水于鲎试剂中,并轻轻振摇使其溶解完全.

在装有 100 μL 加内毒素检查用水、内毒素标准液或经超滤处理后的待测 rAAV9-Kal 样品(截留液和滤过液)的无热原试管中,加入 100 μL 鲎试剂溶液,混匀,在 37 ℃温育 10 min. 接着,加入 100 μL 显色基质溶液,混匀,再次在 37 ℃温育 6 min. 温育结束,依次加入 500 μL 偶氮化试剂 1、偶氮化试剂 2、偶氮化试剂 3,每次加完试剂后均混匀,并在加入偶氮化试剂 3 混匀后室温静置 5 min,于 545 nm 波长处测吸光度值,每个检测反应设 3 个平行管.

1.5 定量检测

分别取 2 μL 的截留液及超滤液、10 μL 的 2×SYBR Select Master Mix、0.5 μL 的引物 Kal-S 及 Kal-AS,7 μL 的纯水,在 StepOne Plus 定量 PCR 仪上运行. 95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 15 s,60 ℃退

火 30 s,72 ℃延伸 30 s,40 个循环. 最后,进行相对定量计算,即

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT},$$
$$\Delta\Delta CT = \Delta\Delta(CT_{\text{实验组}} - CT_{\text{阴性对照}})_{\text{实验组}} - (CT_{\text{阳性对照}} - CT_{\text{阴性对照}})_{\text{对照组}}.$$

1.6 病毒鉴定

配制质量分数为 10%的分离胶和质量分数为 4.5%的浓缩胶,分别取截留液及超滤液 25 μL,加入 5 μL 蛋白上样缓冲液. 煮沸变性 5 min,每孔上样 28 μL,60 V 恒压电泳分离;电泳结束后进行 PVDF 膜转膜,条件为 250 mA,2 h;随后小鼠抗 VP1/VP2/VP3 单克隆抗体 4℃孵育过夜,兔抗小鼠 IgG 单克隆抗体室温孵育 2 h,ECL 显色,置于凝胶成像系统中显影、定影.

1.7 统计学分析

采用 SPSS21.0 统计学软件进行数据统计分析,不同实验组间病毒及内毒素水平用 x 表示.

2 实验结果

2.1 rAAV9-Kal 的回收率

收集不同规格超滤管超滤后的滤过液(3kD-P,10kD-P,30kD-P,50kD-P,100kD-P)、截留液(3kD-R,10kD-R,30kD-R,50kD-R,100kD-R)、原液(rAAV9-Kal)并统一稀释至 4 mL 初始体积,通过 qPCR 仪进行滴度相对定量. 在统一体积条件下,定量计算 rAAV9-Kal 的回收效率,如表 1 所示.

由表 1 可知:MWCO 为 3,10,30,50,100 kD 的超滤管对 rAAV9-Kal 进行超滤(7 500g,4 ℃,15 min)后的产品回收率分别为 0.957 0,0.941 3,0.919 9,0.842 0,0.642 5. 鉴于前 3 者对产品的损伤率均小于 10%,因此,单纯考虑产品回收率时,在实际 rAAV 超滤中,以选择 MWCO 为 3,10,30 kD 的超滤管为佳.

表 1 rAAV9-Kal 的回收率测定
Tab.1 Recovery rate of rAAV9-Kal samples

样本	靶点	CT	ΔCT	ΔΔCT	RQ
3kD-R	Kal	24.665 361	−8.044 263	0.063 357	0.957 035
3kD-P	Kal	32.314 513	−0.395 111	7.712 509	0.004 767
10kD-R	Kal	24.689 218	−8.020 406	0.087 214	0.941 339
10kD-P	Kal	30.950 793	−1.758 831	6.348 789	0.012 269
30kD-R	Kal	24.723 574	−7.986 050	0.121 570	0.919 868
30kD-P	Kal	29.116 722	−3.592 902	4.514 718	0.043 746
50kD-R	Kal	24.850 171	−7.859 453	0.248 167	0.841 965
50kD-P	Kal	27.851 721	−4.857 903	3.249 717	0.105 132
100kD-R	Kal	25.240 245	−7.469 379	0.638 241	0.642 496
100kD-P	Kal	26.306 743	−6.402 881	1.704 739	0.306 777
rAAV9-Kal	Kal	24.609 110	−8.100 514	0	1.000 000
NTC	Kal	32.709 624	0	—	—

2.2 rAAV9-Kal 的内毒素去除率

超滤管超滤后,收集不同规格的滤过液、截留液、原液,并统一稀释至 4 mL 的初始体积,通过鲎试剂盒测定各自内毒素活力,发现超滤前样品的内毒素活力为 31.006 nkat · mL^{−1},经 MWCO 为 3,10,30,50,100 kD 的超滤管超滤后截留液的内毒素活力分别为 30.173,30.006,28.893,24.005,17.504 μkat · L^{−1},其对应的截留率分别为 0.998 7,0.987 7,0.982 263,0.944 1,0.785 8,0.573 0,而滤过液的内毒素活力分别为 1.000,3.501,4.501,6.001,10.169 nkat · mL^{−1},其对应的滤过率分别为 0.032 8,0.114 6,0.147 3,0.196 5,0.332 9,如图 1 所示.

图 1 中:管号 1~10 分别为 3k-R,10k-R,30k-R,50k-R,100k-R,30k-P,10k-P,50k-P,100k-P,3k-P. 由图 1 可知:内毒素的滤过率虽然随着 MWCO 增大而增大,但基本不能透过 MWCO 小于 30 kD 的超滤管,去除效率并不理想,超滤工艺有待进一步优化.

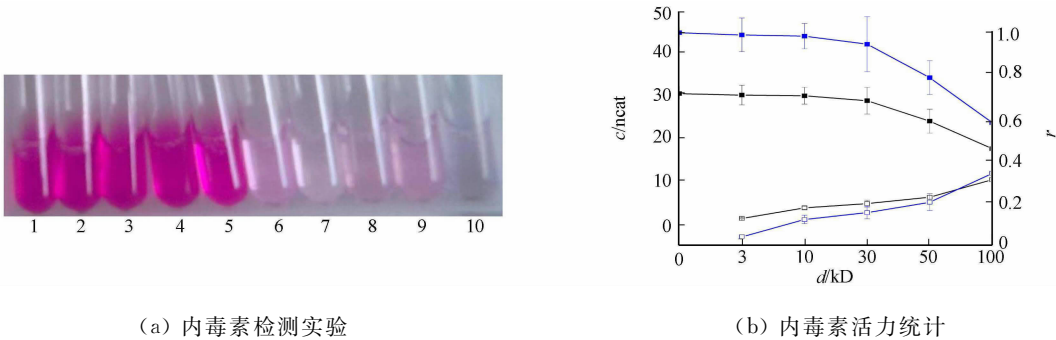


图 1 rAAV9-Kal 的内毒素检测

Fig. 1 Endotoxin analysis of rAAV9-Kal samples

2.3 超滤工艺的优化及效果

用质量浓度为 $0.2\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的乙二胺四乙酸二钠(EDTA)和质量浓度为 $5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的脱氧胆酸钠(DOC)预处理 rAAV9-Kal 样品 30 min(冰浴搅拌),再用 3,10,30 kD 的超滤管进行超滤处理,分析滤过液和截留液中 rAAV9-Kal 的滴度及内毒素的活力变化.结果发现,样品预处理后,超滤管对 rAAV9-Kal 的滤过性有轻微增加,但对内毒素的滤过性则有显著性增大.

rAAV9-Kal 回收率及内毒素去除率测定,如表 2 所示.由表 2 可知:3,10,30 kD 的超滤管对样品的回收率分别为 0.953 0,0.938 5 和 0.9122,对内毒素的去除率分别为 0.772 3,0.831 4 和 0.870 6.综合考虑超滤时间、回收率、内毒素去除率等因素,30 kD 超滤管可以作为 rAAV9-Kal 样品超滤纯化的基本选择.其纯化效果还可以通过进一步优化样品预处理的条件实现进一步优化.

表 2 rAAV9-Kal 回收率及内毒素去除率测定

Tab. 2 Recovery rate of rAAV9-Kal and removal rate of endotoxin in samples

样本	VG(rAAV9-Kal)	RQ(rAAV9-Kal)	c/nkat	RQ(内毒素)
3kD-R	9.53×10^{11}	0.953 015	8.502	0.227 680
3kD-P	6.57×10^9	0.006 568	27.506	0.736 611
10kD-R	9.39×10^{11}	0.938 527	6.335	0.169 644
10kD-P	1.92×10^{10}	0.019 214	29.173	0.781 252
30kD-R	9.12×10^{11}	0.912 151	4.834	0.129 465
30kD-P	5.20×10^{10}	0.051 964	32.340	0.866 071

2.4 超滤纯化后 rAAV 的鉴定

收集不同规格超滤管超滤后的滤过液、截留液、原液并统一稀释至 4 mL 初始体积,通过 WB 对各组分进行定性鉴定,如图 2 所示.图 2 中:泳道 1~3 分别为 3kD-R,10kD-R,30kD-R.由图 2 可知:在超滤条件优化后,MWCO 为 3,10,30 kD 的超滤管超滤后截留液中 rAAV9-Kal 的目的条带完整(VP1,VP2,VP3)且比例正确(1 : 1 : 10);优化后的超滤处理并不影响回收对象 rAAV9-Kal 的物理性质.

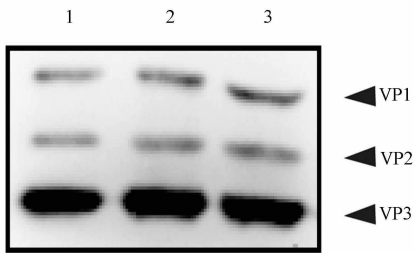


图 2 rAAV9-Kal 的衣壳蛋白检测

Fig. 2 Capsid protein analysis of rAAV9-Kal samples

3 讨论

超滤离心的原理是以特定孔径的微孔滤膜为过滤介质,在一定的离心力作用下,使待处理液体经过超滤管,迫使小分子物质和溶剂经过膜面进入下部的收集管,而大分子物质被截留从而达到浓缩和分离的目的^[7].由于此类方法操作简便,对设备要求不高,加上超滤管经再生处理后可重复使用,在注射制剂中内毒素的去除上已初见成效,但尚未有关其在 rAAV 产品纯化与内毒素去除方面的研究报道.

通过选用不同截留分子量的超滤管对 rAAV9-Kal 样品进行超滤离心处理,以期获得一种能够实现产品纯化与内毒素去除的超滤条件.实验结果表明:在 $7\,500g, 4\text{ }^{\circ}\text{C}, 15\text{ min}$ 超滤条件下,MWCO 小于 30 kD 的超滤管对 rAAV 样品具有较高的回收率,最低为 0.919 9,但此时内毒素去除率并不理想,最高

仅为 0.017 8,超滤工艺有待进一步优化.

通过对内毒素自身性质的分析可以发现,内毒素具有化学异源性,来源不同的内毒素形态和相对分子质量均不确定,相对分子质量变化范围可从几千到几万,而且在水溶液中存在多种分散形态,如胶束和缔合体,尤其是缔合体的分子质量可达 1 000 kD,直径达 10 nm^[8].

由于 rAAV 是经过氯化铯梯度离心后的半成品,此时样品中所含内毒素的分子量及物理尺寸与分离对象 rAAV 极为相似,因此,样品中残留的内毒素主要以缔合体形式存在^[9],进而可能导致本实验中内毒素与 rAAV 样品的分离效果差.其次,内毒素在 Ga^{2+} 等二价阳离子的存在下极容易聚合,而 rAAV 在制备过程中正好需要使用一定质量浓度的 GaCl_2 及 MgCl_2 .因此,在超滤优化中尝试采用去污剂 DOC 及螯合剂 EDTA 预处理样品,以实现将聚合态内毒素解聚,从而降低其分子量.最终优化后超滤效果表明:样品预处理后,超滤管对 rAAV9-Kal 的滤过性有轻微增加,但对内毒素的滤过性则有显著性增大.30 kD 的超滤管对样品的回收率及内毒素去除率分别为 0.912 2 和 0.870 6,优化效果明显,可以作为 rAAV9-Kal 样品超滤纯化的基本选择.

4 结束语

虽然建立了 rAAV 超滤纯化的初步工艺,但鉴于不同超滤材质的超滤效果存在明显差异^[10-11],离心型和泵驱动型超滤装置在膜分离动力学方面存在差异^[12],溶液中蛋白质量浓度和去污剂的质量分数都可能影响到实际的内毒素清除效果^[13].在接下来的研究中,将重点开展相关条件的系统优化,以求实现 rAAV 样品纯化与内毒素清除的快捷、简单化,为规模化临床级 rAAV 的制备奠定基础.

参考文献:

- [1] 肖桂清,杨会勇,刁勇.重组腺相关病毒质量控制的 qPCR 技术研究进展[J].华侨大学学报(自然科学版),2014,35(2):191-195.
- [2] MORRISON C. \$ 1-million price tag set for Glybera gene therapy[J]. Nature Biotechnology,2015,33(3):217-218.
- [3] ROURKE K S, MAYER C A, MACFARLANE P M. A critical postnatal period of heightened vulnerability to lipopolysaccharide[J]. Respiratory Physiology and Neurobiology,2016,232:26-34.
- [4] WRIGHT J F, ZELENIAIA O. Vector characterization methods for quality control testing of recombinant adeno-associated viruses[J]. Methods in Molecular Biology,2011,737(1):247-249.
- [5] MAGALHAES P O, LOPES A M, MAZZOLA P G, *et al.* Methods of endotoxin removal from biological preparations: A review[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences,2007,10(3):388-404.
- [6] HASHEMI H, POUYANFARD S, BANDEHPOUR M, *et al.* Efficient endotoxin removal from T7 phage preparations by a mild detergent treatment followed by ultrafiltration[J]. Aacta Virologica,2013,57(3):373-374.
- [7] CLEVER M, JORDT F, KNAUF R, *et al.* Process water production from river water by ultrafiltration and reverse osmosis[J]. Desalination,2000,131(1/2/3):325-336.
- [8] KULP A, KUEHN M J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles[J]. Annual Review of Microbiology,2010,64(1):163-184.
- [9] 许瑞安,唐明青,刁勇,等.腺相关病毒:从病毒到临床[M].北京:科学出版社,2015:1-8.
- [10] NESTOLA P, MARTINS D L, PEIXOTO C, *et al.* Evaluation of novel large cut-off ultrafiltration membranes for adenovirus serotype 5 (Ad5) concentration[J]. PLoS One,2014,9(12):e115802.
- [11] 刘芸,周骏,王冬英,等.混合材质超滤膜去除丹参滴注液中细菌内毒素的应用研究[J].南京中医药大学学报,2011,27(6):558-560.
- [12] MATTIASSION B. Isolation and purification of proteins[M]. New York:Marcel Dekker Inc,2003:194-204.
- [13] JANG H, KIM H S, MOON S C, *et al.* Effects of protein concentration and detergent on endotoxin reduction by ultrafiltration[J]. BMB Reports,2009,42(7):462-466.

(责任编辑:陈志贤

英文审校:刘源岗)