

应用纪要

定量分析九价疫苗GARDASIL 9中的人乳头瘤病毒(HPV)抗原

Caitlin Dunning, Mark Wrona

Waters Corporation



摘要

定量分析和鉴定测试是疫苗原料及成品批次放行的重要组成部分。传统方法可能缺乏选择性，开发耗时，且多重分析能力不佳。GARDASIL 9是一种九价疫苗，由九种不同的HPV L1蛋白质抗原组成，可预防多种导致宫颈癌和生殖器疣风险增加的HPV亚型。本研究利用完整的样品前处理工作流程（包括佐剂解吸、胰蛋白酶酶解和LC-MS/MS定量监测），通过特征性肽段分析方法测定GARDASIL 9组分。执行一次LC-MS/MS分析即可同时定量10~200 µg/mL浓度范围内所有九种HPV病毒株特异性L1蛋白，并获得出色的重现性。

优势

- ACQUITY UPLC I-Class PLUS与Xevo TQ-S micro相结合，使分析人员使用一种方法即可对所有九种HPV L1蛋白进行高重现性定量分析，总分析时间仅7分钟
- ACQUITY PREMIER BEH C₁₈肽分析专用柱能够缩短色谱柱钝化时间，增加肽的峰面积
- 使用简单快速的样品前处理方案在正式分析之前有效去除疫苗佐剂

简介

GARDASIL 9是由HPV L1蛋白抗原组成的九价疫苗，这些蛋白抗原形成病毒样颗粒(VLPs)，能够防御九种HPV病毒株，从而预防80~90%的宫颈癌和90%的生殖器疣^{1,2}。疫苗生产过程中的重要一步是疫苗原料及成品批次的质量控制。批次放行测试包括无菌性、效价、纯度、抗原定量和鉴定等内容。传统的定量分析和鉴定测试方法有总蛋白测定和酶联免疫吸附试验(ELISA)。这些分析方法存在局限性，例如没有专属性（或者专属性或交叉反应性不明）、开发耗时且多重分析能力不佳。因此，考虑使用质谱法作为抗原定量分析和鉴定测试的工具。质谱法可同时选择性测定和定量特定类型的L1蛋白。本研究开发出一套完整的样品前处理流程，包括从铝佐剂中解吸HPV L1蛋白以及蛋白质的胰蛋白酶酶解，从而通过特征性肽段分析方法定量GARDASIL 9 HPV L1抗原。此工作流程包括质谱分析，能够以高重现性定量10~200 µg/mL范围内的肽段，该范围完全涵盖GARDASIL 9疫苗产品中预期的HPV L1蛋白浓度范围(40~120 µg/mL)。

实验

样品前处理

制备肽图分析样品

将各种HPV L1蛋白稀释至750 µg/mL (30 µg)，用RapiGest SF表面活性剂（沃特世，部件号186001861 <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186001861-rapigest-sf-1-mg--5-pk.html>>) 进行变性处理, 然后用二巯基苏糖醇还原, 再用碘乙酰胺烷基化。使用胰蛋白酶 (Promega, 部件号V5111) 按照1:10胰蛋白酶:蛋白质(w/w)的比率酶解样品, 并用甲酸淬灭。取10 µL样品注入与Xevo G2-XS QToF质谱仪联用的ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统, 使用LC-MS^E方法进行肽图分析。

制备方法验证研究样品

取2 µL空白样、标准品、质量控制样品或疫苗产品样品分别加入16 µL 100 µg/mL的牛血清白蛋白水溶液 (Sigma, 部件号05470) 中。除空白样外, 向所有其他样品中加入2 µL内标。向每个样品中加入20 µL用100 mM Tris HCl (pH 10.0)配制的0.1% (w/v) *RapiGest SF*表面活性剂 (沃特世, 部件号[186001861 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186001861-rapigest-sf-1-mg--5-pk.html](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186001861-rapigest-sf-1-mg--5-pk.html)>)。将样品置于80 °C下温育10分钟, 然后以2000 x g的离心力离心5分钟, 使佐剂形成颗粒。从沉淀的佐剂中小心移取32 µL样品, 并用1.2 µL 10%盐酸(v/v)中和至pH 8.0。用0.3 µg胰蛋白酶 (Promega, 部件号V5111) 按照1:10胰蛋白酶:蛋白质(w/w)的比率在37 °C下过夜酶解样品。在37 °C下用2 µL 20%甲酸水溶液(v/v)处理15分钟, 使酶解反应淬灭, 并使*RapiGest*发生沉淀。将样品在10 °C下以1800 x g离心15分钟, 使*RapiGest*形成颗粒。每个样品各取30 µL转移至QuanRecovery 96孔板中, 并取5 µL注入与Xevo TQ-S micro质谱仪联用的ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统, 进行LC-MS/MS分析。

肽图分析的LC-MS/MS方法条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS (固定定量环)
质谱系统:	Xevo G2-XS QToF质谱仪, ESI+
样品板:	具有MaxPeak高性能表面的QuanRecovery样品瓶
色谱柱:	ACQUITY UPLC PREMIER BEH C ₁₈ 肽分析专用柱, 300 Å, 1.7 µm, 2.1 × 100 mm
柱温:	60 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	10 µL
流速:	0.2 mL/min

流动相A:	0.1%甲酸的水溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度:	流动相B在50分钟内由1%增加至35%，流速0.2 mL/min，然后进行色谱柱清洗和平衡
电离模式:	ESI+
毛细管电压:	1.2 kV
锥孔电压:	40 V
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	350 °C
锥孔气流速:	20 L/h
脱溶剂气流速:	600 L/h
用于数据采集和处理的信息学软件系统	UNIFI (v.1.9.4)

方法验证 – LC-MS/MS方法条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS（固定定量环）
质谱系统:	Waters Xevo TQ-S micro质谱仪，ESI+
样品板:	具有MaxPeak高性能表面的QuanRecovery 96孔板
色谱柱:	ACQUITY UPLC PREMIER BEH C ₁₈ 肽分析专用柱, 300 Å, 1.7 µm, 2.1 × 100 mm

柱温：	60 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	5 µL
流速：	0.4 mL/min
流动相A：	0.1%甲酸的水溶液
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度：	流动相B在1分钟内由10%增加至15%，随后在3分钟内由15%增加至30%，然后进行色谱柱清洗和平衡。运行时间7分钟。
电离模式：	ESI+
毛细管电压：	1.2 kV
锥孔电压：	20 V
离子源温度：	150 °C
脱溶剂气温度：	600 °C
锥孔气流速：	100 L/h
脱溶剂气流速：	1000 L/h
MS数据采集：	MassLynx 4.2版
用于数据处理的信息学软件：	TargetLynx XS v4.2

结果与讨论

用于鉴定特征性肽段的肽图分析

利用肽图分析方法表征HPV L1蛋白有助于选择合适的候选肽段进行定量，还可以鉴定出是否存在蛋白质骨架修饰（例如脱酰胺和氧化）。之前已在应用纪要[720006969EN](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006969en.pdf) <

<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006969en.pdf>> 中介绍了用于分析和定量含Fc片段的蛋白质的完整工作流程，本研究将该工作流程略作调整后加以使用³。针对GARDASIL 9中存在的所有九种HPV L1蛋白进行肽图分析实验。如图1所示，优异的碎片离子数据确认了HPV 18型肽段FSLDLDQYPLGR的存在。由于这种肽段具有较高的信号强度、较低的修饰可能性和良好的定量重现性，因此选作HPV 18的特征性肽段。通过MassLynx-Skyline Interface工作流程鉴定并优化各种特征性肽段的MRM通道⁴。

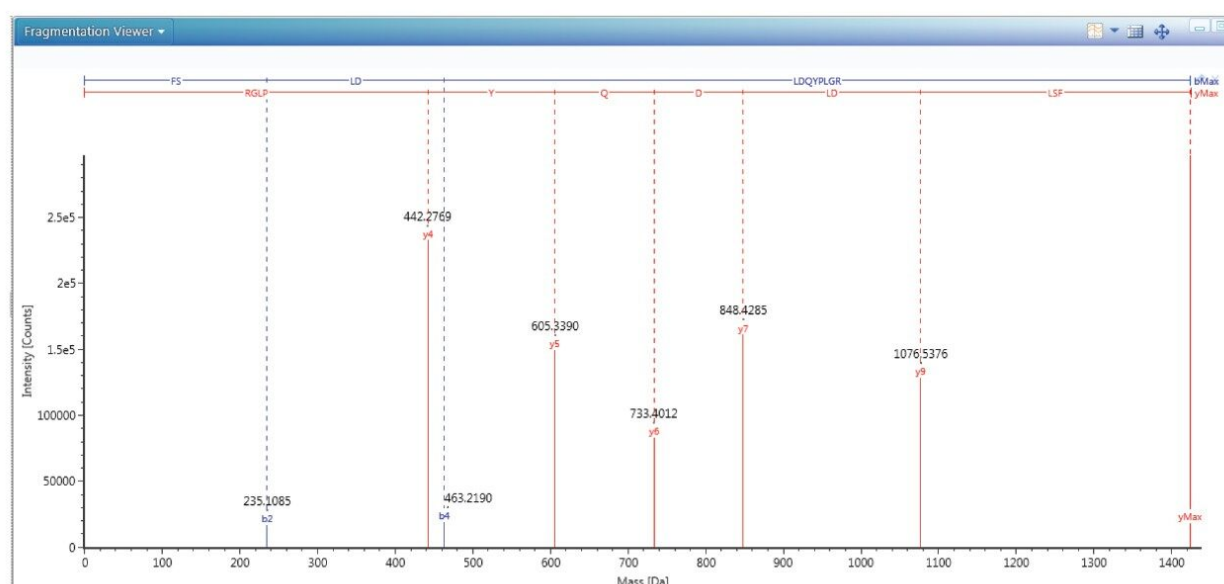


图1.在 MS^E 高能碎片离子谱图中观察到HPV 18 FSLDLDQYPLGR肽段的八个主要的b碎片和y碎片

LC-MS/MS优化

简而言之，在通过肽图分析实验鉴定出特征性肽段后，使用优化的色谱方法，通过监测每种肽段的母离子质量数鉴定这些肽段的保留时间。对每种肽段母离子选择强度最高的电荷态，全面检查所选肽段的所有b子离子和y子离子，以鉴定强度最高的MRM通道。进一步优化该最强MRM通道的碰撞能量，并使用这些优化参数得到最终的MS方法。用于定量分析的MRM通道可参见表1。

质谱参数				
肽段	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
HPV 6 - FSSELDQYPLGR	706.35	848.43	35	25
HPV 11 - FSSELDQFPLGR	698.35	832.43	35	22
HPV 16 - AGAVGENVPDDLYIK	780.90	863.45	35	25
HPV 18 - FSLDLQYPLGR	712.36	605.34	35	22
HPV 31 - SGTVGESVPTDLYIK	783.41	849.47	35	28
HPV 33 - AGTLGEAVPDDLYIK	781.41	1033.56	35	25
HPV 45 - FSSDLQYPLGR	699.34	848.43	35	25
HPV 52 - LLTVGHPYFSIK	458.93	631.35	35	12
HPV 58 - LGEAVPDDLYIK	666.86	863.45	35	18

表1.用于九种HPV L1蛋白特征性肽段的MRM通道和质谱参数

选择合适的色谱柱是液相色谱方法开发过程的重要组成部分。研究发现，采用HPS（高性能表面）技术的ACQUITY PREMIER BEH C₁₈ 300 Å肽分析专用柱是定量HPV L1蛋白的理想选择。图2展示了标准色谱柱与PREMIER色谱柱的比较结果⁵。两种色谱柱均通过进样10次用于钝化的高浓度样品进行钝化，然后将分析物进样分析5次。采用MaxPeak HPS技术的PREMIER色谱柱能够缩短色谱柱钝化时间，得到的峰面积是标准色谱柱的2倍。峰面积增加可实现更低的定量限，并提高肽段测量的重现性。

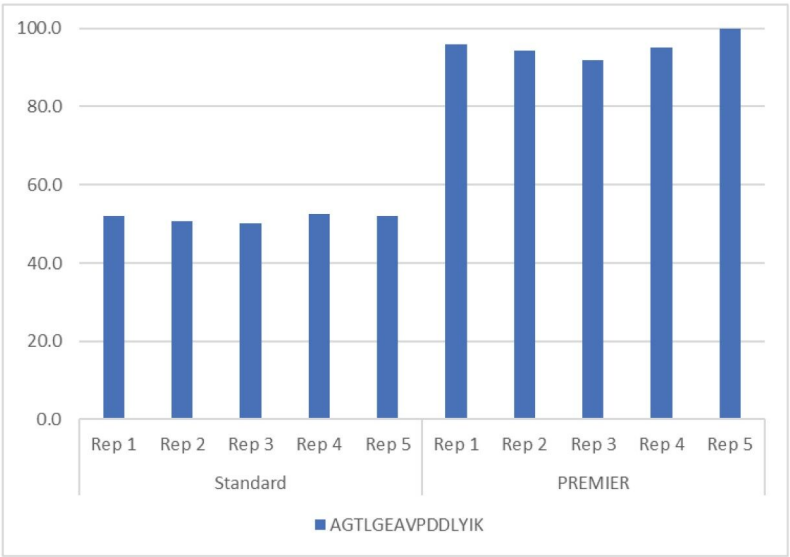


图2.通过进样10次高浓度标准品钝化色谱柱，然后进行5次测试进样。与标准ACQUITY肽分析专用柱相比，ACQUITY PREMIER肽分析专用柱可实现快速钝化，肽段的峰面积增加至2倍。

佐剂解吸

高效佐剂解吸是成功定量佐剂疫苗产品中抗原浓度的关键所在。蛋白质可通过静电力、疏水相互作用、氢交换（由范德华力推动）以及配体交换与铝佐剂结合⁶。配体交换会产生最紧密的蛋白质结合，这是佐剂的表面羟基与蛋白质抗原磷酸基团之间相互作用的结果。GARDASIL 9采用的佐剂为专有的无定形羟基磷酸铝硫酸盐(AAHS)，具有表面羟基和磷酸基团⁷。该疫苗在大约pH 7.0下配制，AAHS在此pH下具有零电荷点⁸。抗原HPV L1蛋白VLPs的等电点范围为8.1~8.6，因此在配制的疫苗产品中带正电^{9,10}。

我们已经通过实验确定，要破坏这种吸附作用，需要采用表面活性剂和高pH条件，使蛋白质从AAHS佐剂中完全解吸，并使VLPs自身开始解离¹¹。我们使用兼容MS系统的表面活性剂*RapiGest*对HPV L1蛋白进行变性处理，这是实现完全解吸的必要步骤。该佐剂解吸方案还利用高pH条件，将HPV L1蛋白的电荷从正电荷完全转换为负电荷。如图3所示，在pH 10.0的条件下，佐剂中的蛋白质解吸达到最高水平。需要注意的是，在pH 8.0下仅有非常少的蛋白质解吸，预期蛋白质在该pH下带正电。该结果表明，需要借助静电排斥作用充分破坏结合，使蛋白质解吸。

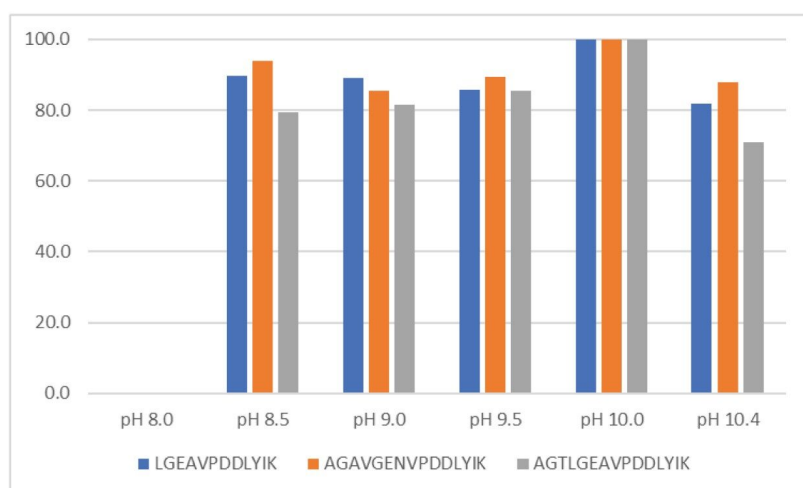


图3.需要增加*TRIS HCl*缓冲液的pH，使蛋白质从无定形羟基磷酸铝硫酸盐佐剂中完全解吸。在pH 10.0下观察到完全解吸。

酶解优化

蛋白质的完全酶解对于通过特征性肽段分析方法实现准确、灵敏、可重现的定量至关重要。为确保完全酶解，必须检查并优化酶:底物比和酶解时间等酶解参数。为测量酶解的完全性，对包含一个漏切位点的肽段FSLDLDQYPLGR和EKFSLDLDQYPLGR进行监测与定量。

胰蛋白酶与蛋白质的比率基于在不同酶:底物比率下过夜酶解的结果进行优化。实验结果见图4中的A图。在胰

蛋白酶:蛋白质比率为1:10和1:5的情况下, 获得了最高强度的肽段FSLDLDQYPLGR和最低强度的肽段EKFSLDLDQYPLGR, 表明HPV L1蛋白实现了比较完全的酶解。其余实验由于需要高浓度, 因此选择1:10的比率以减少胰蛋白酶的自溶。如图4中的B图所示, 对酶解时间进行了评估。8小时至过夜的酶解时间使HPV L1蛋白的酶解非常完全。考虑到酶解完全性和工作日便利性, 选择过夜酶解。

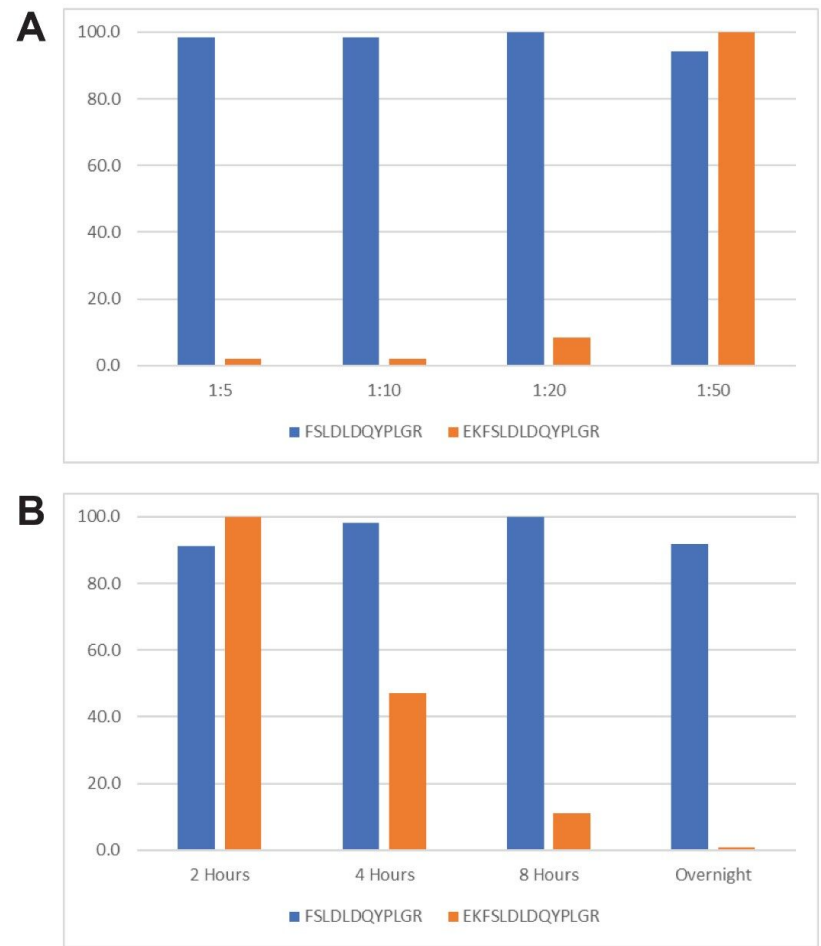


图4.使用不同的胰蛋白酶:蛋白质比率进行胰蛋白酶酶解, 监测肽段FSLDLDQYPLGR和EKFSLDLDQYPLGR (1个漏切位点) 的峰面积。选择1:10的胰蛋白酶:蛋白质比率, 因为此比率下获得的峰面积高且漏切位点少 (A图)。采用2小时至过夜 (约16小时) 的酶解时间, 监测相同肽段的酶解情况。需要用1:10胰蛋白酶:蛋白质过夜温育才能实现完全酶解 (B图)。

方法验证结果

在三天内制备标准曲线标样、QC样品和疫苗产品样品, 验证日间及日内分析精密度和准确度。HPV 16的标准

曲线在20~200 µg/mL的范围内呈线性。其余HPV蛋白在10~100 µg/mL的范围内呈线性（表2）。制备低、中、高浓度QC样品，QC样品分析的准确度和精密度CV小于8%（表3）。如表4所示，三种制剂中所有九种HPV L1蛋白的测量具有高重现性，三天测量结果的CV小于8%。在大多数情况下，本研究中的LC-MS/MS实测值与标示值大体一致（尽管某些值偏高）。这些结果表明，该分析方法适用于定量GARDASIL 9中的HPV L1蛋白。

标准曲线统计数据				
肽段	统计数据	第1天	第2天	第3天
HPV 16 - AGAVGENVPDDLYIK	线性拟合结果(R ²)	0.996	0.996	0.997
	准确度范围(%)	97.3–104.9	96.1–104.1	96.9–102.9
HPV 18 - FSLDLDQYPLGR	线性拟合结果(R ²)	0.995	0.994	0.991
	准确度范围(%)	94.3–106.7	96.9–103.0	94.7–110.4

表2.在三天的方法验证制剂研究中，HPV 16和18型病毒株的标准曲线统计数据

QC统计数据						
肽段	QC水平	统计数据	第1天 (N=6)	第2天 (N=6)	第3天 (N=6)	日间 (N=18)
HPV 16 AGAVGENVPDDLYIK	LQC (60 µg/mL)	准确度(%)	106.1	104.0	105.0	105.0
		% RSD	4.0	2.7	3.9	3.5
	MQC (100 µg/mL)	准确度(%)	102.4	107.4	102.8	104.2
		% RSD	6.5	6.4	2.9	5.7
	HQC (160 µg/mL)	准确度(%)	103.1	105.8	105.9	104.9
		% RSD	4.3	3.4	3.7	3.8
HPV 18 FSLDLDQYPLGR	LQC (30 µg/mL)	准确度(%)	103.4	107.3	108.6	106.4
		% RSD	3.5	3.5	7.1	5.2
	MQC (50 µg/mL)	准确度(%)	101.5	107.6	101.0	103.3
		% RSD	5.1	5.4	1.8	5.2
	HQC (80 µg/mL)	准确度(%)	102.8	103.6	96.6	101.0
		% RSD	5.6	3.4	6.1	5.7

表3.在三天的方法验证制剂研究中，HPV 16和18型病毒株的QC定量性能

疫苗产品定量			
肽段	预期浓度 (µg/mL)	实测浓度 (µg/mL)	实测浓度 %RSD (n=18)
HPV 6 - FSSELDQYPLGR	60	72.7	5.9
HPV 11 - FSSELDQFPLGR	80	96.5	5.3
HPV 16 - AGAVGENVPDDLYIK	120	198.3	3.7
HPV 18 - FSLDLQYPLGR	80	74.2	7.4
HPV 31 - SGTVGESVPTDLYIK	40	67.5	4.3
HPV 33 - AGTLGEAVPDDLYIK	40	64.2	4.7
HPV 45 - FSSDLQYPLGR	40	43.5	5.5
HPV 52 - LLTVGHPYFSIK	40	64.4	5.2
HPV 58 - LGEAVPDDLYIK	40	64.2	4.4

表4.GARDASIL 9疫苗产品中所有HPV L1蛋白抗原的测量结果

结论

本研究开发出一种同时定量GARDASIL 9中多种HPV L1蛋白抗原的质谱分析方法。将LC-MS/MS与优化的样品前处理方案相结合，实现了高准确度和高精度的蛋白质定量。

- 利用肽图分析实验表征HPV L1蛋白并鉴定适合定量的特征性肽段列表
- 使用MassLynx Skyline Interface快速开发用于九种特征性肽段的MRM分析方法
- ACQUITY PREMIER色谱柱能够实现快速的色谱柱钝化并增加肽段的峰面积，从而实现更加灵敏且可重现的肽段测量
- 高效的佐剂解吸和优化的胰蛋白酶酶解对于准确、可重现的定量分析必不可少
- 本研究对10~200 µg/mL范围内的GARDASIL 9 HPV L1蛋白实现了高精密密度、高准确度定量

参考资料

1. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV Type Distribution in High-Grade Cervical Lesions and Cervical Cancer: A Meta-Analysis.*Br J Cancer*.2003;89(1):101–5.
2. NIH National Cancer Institute, Human Papillomavirus (HPV) Vaccines.Accessed October 2020 from

<https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents> <
<https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents>> .

3. Dunning CM, Wrona MD. Developing a Quantitative Surrogate Peptide Assay – Peptide mapping through MRM Optimization for Measuring Dulaglutide in a Rat PK Study. Waters Application Note 720006969EN <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006969en.pdf>> .
4. Tanna N, Dunning CM, Molloy B. MassLynx-Skyline Interface (MSI) – A New Automated Tool to Streamline MRM Method Development and Optimization for Large Molecule Quantification. Waters Application Note 720006813EN <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006813en.pdf>> .
5. Lauber M, Walter TH, Gilar M, DeLano M, Boissel C, Smith K, Birdsall R, Rainville P, Belanger J, Wyndham K. Low Adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces. Waters White Paper 720006930EN <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf>> .
6. Hem SL, Hogenesch H. Relationship Between Physical and Chemical Properties of Aluminum-Containing Adjuvants and Immunopotentiality. *Expert Rev Vaccines*. 2007;6(5):685-98.
7. Food and Drug Administration GARDASIL 9 Package Insert. Accessed October 2020 from <https://www.fda.gov/media/90064/download> <<https://www.fda.gov/media/90064/download>> .
8. Caulfield MJ, Shi L, Wang S, Wang B, Tobery TW, Mach H, Ahl PL, Cannon JL, Cook JC, Heinrichs JH, Sitrin RD. Effect of Alternative Aluminum Adjuvants on the Absorption and Immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in Mice. *Hum Vaccin*. 2007;3(4):139–45.
9. Wibom C, Department of Virology, Umeå University, pI Predictor. Accessed October 2020 from http://www.acc.umu.se/~wibom/virology/cgi-bin/pi_predictor.cgi <
http://www.acc.umu.se/~wibom/virology/cgi-bin/pi_predictor.cgi> .
10. Mistry N, Wibom C, Evander M. Cutaneous and Mucosal Human Papillomaviruses Differ in Net Surface Charge, Potential Impact on Tropism. *Virol J*. 2008;5:118.
11. McCarthy MP, White WI, Palmer-Hill F, Koenig S, Suzich JA. Quantitative Disassembly and Reassembly of Human Papillomavirus Type 11 Viruslike Particles *In Vitro*. *Virol J*. 1998;72(1):32–41.

特色产品

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

720007103ZH, 2020年12月