

Charakterisierung viraler Vektorpartikel unter Verwendung des Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

Autoren

Wendi A. Hale
und Christopher M. Colangelo
Agilent Technologies, Inc.,
Lexington, MA, USA

Roy Hegedus
und Norman Garceau
Lake Pharma,
Worcester, MA, USA

Zusammenfassung

Diese Application Note beschreibt einen Arbeitsablauf zur Charakterisierung und Bestimmung kritischer Qualitätsmerkmale (CQA) intakter adeno-assoziiierter Viren (AAV) sowie zur Identifizierung posttranslationaler Modifikationen (PTM) der Kapsidproteine. Im Arbeitsablauf wurden ein Agilent 1290 Infinity II LC-System gekoppelt an ein Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF sowie die Agilent MassHunter BioConfirm Software Version 10.0 zur Datenanalyse verwendet.

Einleitung

AAV sind die wichtigsten viralen Vektoren für die Gentherapie und werden bereits erfolgreich bei der Therapie von Netzhauterkrankungen und spinaler Muskelatrophie eingesetzt. Ein AAV besteht aus einer ikosaedrischen Proteinhülle mit einem einzelsträngigen Genom von ungefähr 4,7 kb. Intakte AAV dienen als Vehikel zum Schutz und Transport von Oligonukleotid-Therapeutika. Es gibt 13 bekannte Serotypen, die verschiedene Zelltypen transduzieren und damit eine erhöhte Selektivität der Therapeutika ermöglichen. Da AAV weiterhin als Transportplattformen für Therapeutika erforscht werden, ist es entscheidend, sicherzustellen, dass alle kritischen Qualitätsmerkmale des therapeutischen Produkts erfüllt werden. Bei der Charakterisierung viraler Kapsidproteine gibt es mehrere Herausforderungen. Die Proteinhülle besteht aus drei Kapsidproteinen, VP1, VP2 und VP3, die sich zu einer Struktur mit 3,9 Megadalton im Verhältnis von 1:1:10 mit 60 Kapsiden pro Virion zusammensetzen. Neben dem geringen molaren Anteil von VP1 und VP2 haben alle drei Proteine überlappende Sequenzen am C-Terminus. Üblicherweise wird die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Bestimmung des Molekulargewichts des Kapsidproteins eingesetzt. Diese Methode liefert jedoch nur ein ungenaues Molekulargewicht und es kann unter Umständen nicht zwischen verschiedenen Serotypen unterschieden werden. Die Massenspektrometrie (MS) ist eine vielversprechende Methode, die diese Herausforderungen meistern und die kritischen Qualitätsmerkmale der Kapsidproteine bestimmen kann. Diese Application Note beschreibt einen Arbeitsablauf zur Analyse und zum Peptid-Mapping der intakten viralen Kapsidproteine sowie zur Identifizierung posttranslatiionaler Modifikationen. Die für diesen Arbeitsablauf verwendeten Geräte waren ein Agilent 1290 Infinity II LC-System gekoppelt an ein Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF sowie die Agilent MassHunter BioConfirm Software Version 10.0 zur Datenanalyse.

Experimentelles

Geräte

Agilent 1290 Infinity II LC-System, bestehend aus folgenden Komponenten:

- Agilent 1290 Infinity II Hochgeschwindigkeitspumpe (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Mehrfachprobengeber (G7167B) ausgerüstet mit 20- μ l-Schleife für die Analyse der intakten Proteine und mit 40- μ l-Schleife für die Peptid-Mapping-Analyse
- Agilent 1290 Infinity II Säulenthmostat (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

Materialien

AAV8 wurde von Lake Pharma (Worcester, MA, USA) hergestellt. Molekulargewichts-Cutoff-Filter und Tris(2-carboxyethyl) phosphin (TCEP) wurden von Millipore Sigma bezogen. Trypsin und rAsp-N wurden von Promega bezogen.

Probenvorbereitung

Für die Analyse der intakten Proteine wurden die AAV dreimal einem Pufferaustausch bei 10 000 g mit einem Molekulargewichtsfilter (10 kDa) unterzogen. Der Puffer enthielt 5 mM TCEP, 80 % H₂O und 20 % Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (v/v). Nach der Vorbereitung der Probe wurde sie vor der Injektion bei Raumtemperatur inkubiert. Für das Peptid-Mapping wurden die AAV einer Denaturierung, Reduktion, Alkylierung sowie einem Verdau unterworfen. Die in diesem Experiment verwendeten Enzyme waren Trypsin und rAsp-N.

LC/MS-Analyse

Die LC/MS-Analyse wurde auf einem 1290 Infinity II LC-System gekoppelt mit einem 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF-System mit Agilent Dual Jet Stream ESI-Quelle durchgeführt. Die Workstation-Software Agilent MassHunter Acquisition (B.09.00) mit der SWARM Autotune-Funktion für große Moleküle wurde für die Analyse der intakten Proteine verwendet. Das Gerät wurde kalibriert und im Standard-Massenmodus betrieben. Die iterative MS/MS-Funktion wurde für den Arbeitsablauf des Peptid-Mappings verwendet.

Datenauswertung

Alle MS-Daten wurden mit der Software Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 verarbeitet.

Tabelle 1: Parameter der Flüssigkeitschromatographie für die Analyse der intakten Proteine.

Parameter	Wert
Säule	Agilent ZORBAX RRHD 300-Diphenyl, 2,1 x 150 mm, 1,8 μ m
Mobile Phase A	Wasser, 0,1 % Ameisensäure
Mobile Phase B	Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure
Flussrate	0,4 ml/min
Injektionsvolumen	20 μ l
Gradient	0–30 min: 30–40 % B; 30–38 min: 40–90 % B; 38–39 min: 90 % B; 39–40 min: 90–30 % B; 40–45 min: 30 % B
Nachlaufzeit	0 Minuten
Säulentemperatur	60 °C

Tabelle 2: Parameter des Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF für die Analyse der intakten Proteine.

Parameter	Wert
Quelle	Dual Agilent Jet Stream
Gastemperatur	325 °C
Gasfluss	13 l/min
Zerstäuber	35 psig
Sheathgas-Temperatur	375 °C
Sheathgas-Fluss	12 l/min
VCap	5000 V
Jet	500 V
Fragmentor	180 V
Akquisitionsrate	1 Spektrum/s
Referenzmasse	922,0098

Tabelle 3: Parameter der Flüssigkeitschromatographie für das Peptid-Mapping.

Parameter	Wert
Säule	Agilent AdvanceBio Peptid-Mapping, 2,1 x 150 mm
Mobile Phase A	Wasser, 0,1 % Ameisensäure
Mobile Phase B	Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure
Flussrate	0,4 ml/min
Injektionsvolumen	40 μ l
Gradient	0–3 min: 3 % B; 3–50 min: 3–35 % B; 50–60 min: 35–97 % B; 60–62 min: 97 % B; 62–62,5 min: 97–3 % B; 62,5–65 min: 3 % B
Nachlaufzeit	5 Minuten
Säulentemperatur	60 °C

Tabelle 4: Parameter des Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF für das Peptid-Mapping.

Parameter	Wert
Quelle	Dual Agilent Jet Stream
Gastemperatur	325 °C
Gasfluss	13 l/min
Zerstäuber	35 psig
Sheathgas-Temperatur	275 °C
Sheathgas-Fluss	12 l/min
VCap	4000 V
Jet	0 V
Fragmentor	170 V
Akquisitionsrate	5 bzw. 3 Spektren/s für MS bzw. MS/MS
Referenzmassen	121,0509; 922,0098

Ergebnisse und Diskussion

Analyse der intakten Proteine mit dem 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

Obwohl die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine schnelle und einfache Methode zur Überprüfung des Molekulargewichts der Kapsidproteine der AAV ist, ist sie nicht spezifisch genug, um verschiedene Proteoformen wie eine acetylierte oder phosphorylierte Form von nicht-modifizierten Formen aufzulösen. Die hochauflösende Quadrupol-Time-of-Flight-MS liefert genügend Empfindlichkeit, löst posttranslationale Modifikationen auf und bestimmt die genaue Molekülmasse der intakten Proteine. Dies wird unterstützt durch die SWARM Autotune-Funktion für große Moleküle des 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF, die eine hervorragende

Empfindlichkeit für die Kapsidproteine bietet, indem sie die Transmission der Proteine durch das Massenspektrometer verbessert. Außerdem ermöglicht das Ultrahochvakuum des Time-of-Flight-Systems (10^{-8} Torr) dank der höheren mittleren freien Weglänge der Proteinmoleküle eine höhere spektrale Reinheit.

Die Probenvorbereitung vor der LC/MS-Analyse ist entscheidend für den Erhalt qualitativ hochwertiger Massenspektren und kann im Rahmen unserer Arbeit mit AAV weiterhin beleuchtet werden. Abbildung 1 zeigt die Totalionen-Chromatogramme (TIC) und die Roh-Massenspektren der Kapsidproteine mit und ohne Probenvorbereitung. Die Puffer der ursprünglichen Lösung tragen Verunreinigungen in das Massenspektrometer ein. Außerdem wird

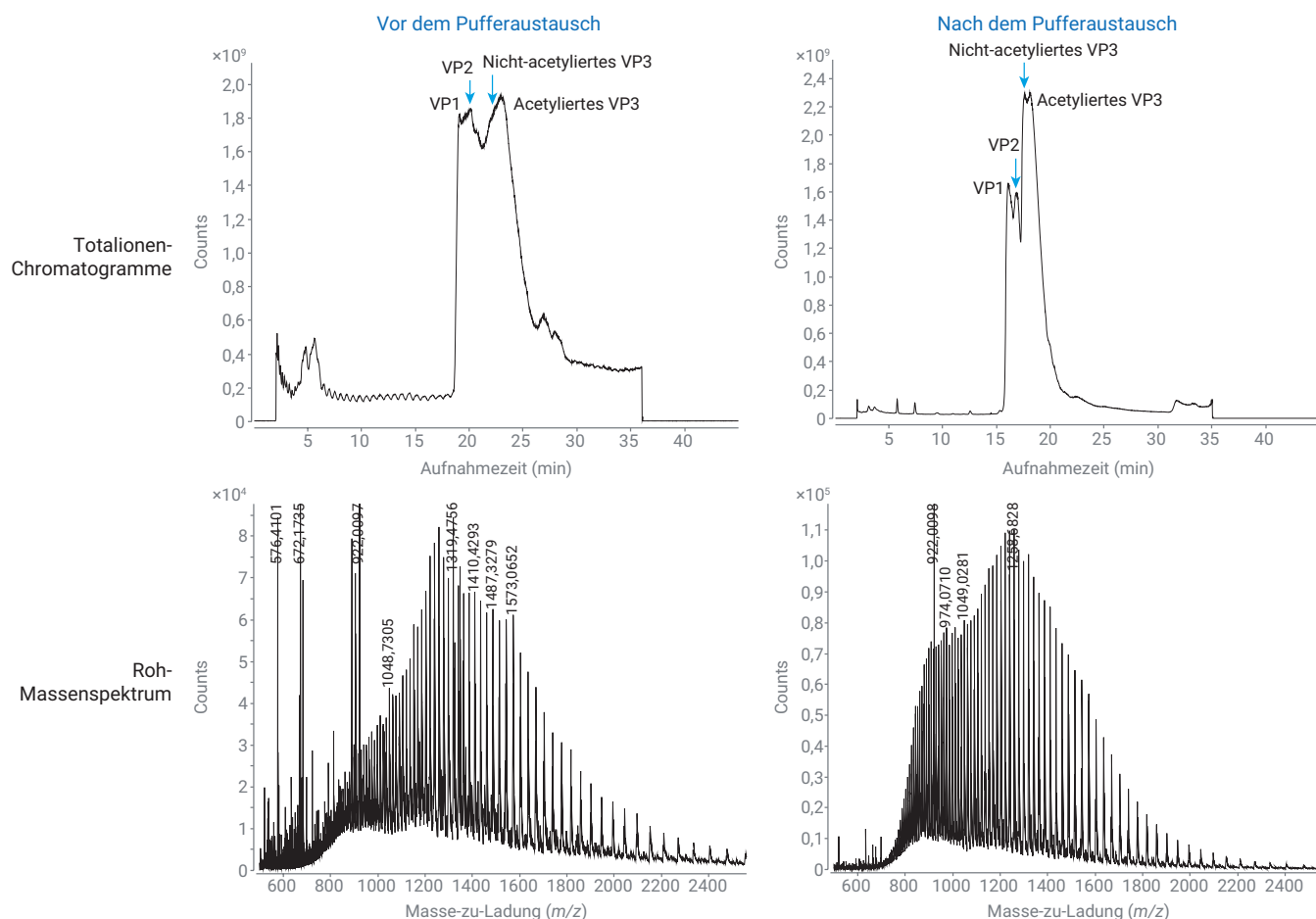


Abbildung 1: Totalionen-Chromatogramme der AAV-Kapsidproteine und Rohspektren von VP1 mit und ohne Probenvorbereitung.

die Trennung der Kapsidproteine durch den Pufferaustausch verbessert. Die Rohdaten zeigen, dass die Abundanz des Proteins auch auf das 1,5-Fache gestiegen ist und das Spektrum viel sauberer ist. Die dekonvolvierten Daten werden hier nicht gezeigt, aber die Spektren sind aufgrund des Fehlens von Natrium- und Kaliumaddukten sauberer und die Interpretation der Daten ist viel einfacher. Darüber hinaus steigert dieses Vorgehen die Robustheit des Arbeitsablaufs und ermöglicht längere Zeitintervalle zwischen den Maßnahmen der Gerätewartung.

Abbildung 2 zeigt das Roh- und das dekonvolvierte Spektrum von VP1. Mit diesem Arbeitsablauf waren wir in der Lage, drei Phosphorylierungsstellen des VP1 mit einem Fehler kleiner als 10 ppm nachzuweisen. Die Daten für die akkurate Masse bestätigten, dass am VP1 die N-terminale Aminosäure fehlt und dass der neue N-Terminus acetyliert

ist. Derzeit gibt es sehr wenige Berichte über die Analyse posttranslationaler Modifikationen von AAV-Kapsidproteinen, einschließlich der Phosphorylierung an VP1. VP2 wurde chromatographisch von VP1 getrennt. Während die Massenspektrometrie diese Proteine aufgrund der Masse trennen kann, ermöglicht die chromatographische Trennung eine geringere Ionensuppression dieser beiden gering abundanten Proteine. Die Daten für die akkurate Masse bestätigen mindestens zwei Phosphorylierungsstellen an VP2 und unter Umständen eine dritte (siehe Abbildung 3). Abbildung 4 zeigt, dass die nicht-modifizierte Form von VP3 größtenteils chromatographisch vom acetylierten VP3 getrennt ist. Auch hier bestätigen die dekonvolvierten Spektren, dass sowohl die acetylierte als auch die nicht-modifizierte Form von VP3 mit hoher Massengenauigkeit vorhanden ist.

Die Acetylierung des N-Terminus ist eine häufig auftretende posttranslationale Modifikation und hat Auswirkungen auf die Proteinestabilität und -faltung sowie auf Wechselwirkungen mit anderen Proteinen. Während VP1 vollständig acetyliert war, waren nur 70 % des VP3 acetyliert. Obwohl derzeit noch nicht geklärt ist, warum VP3 nicht vollständig acetyliert war, könnte diese Tatsache die Gesamtstruktur der Kapsidhülle des Virus beeinträchtigen. Die spektrale Reinheit, die durch das verbesserte Vakuum des 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF zusammen mit der SWARM Autotune-Funktion für große Moleküle erzielt wird, zeigt alle drei viralen Kapsidproteine mit ihren posttranslationalen Modifikationen mit hoher Massengenauigkeit und einem Fehler von weniger als 10 ppm für alle Proteoformen.

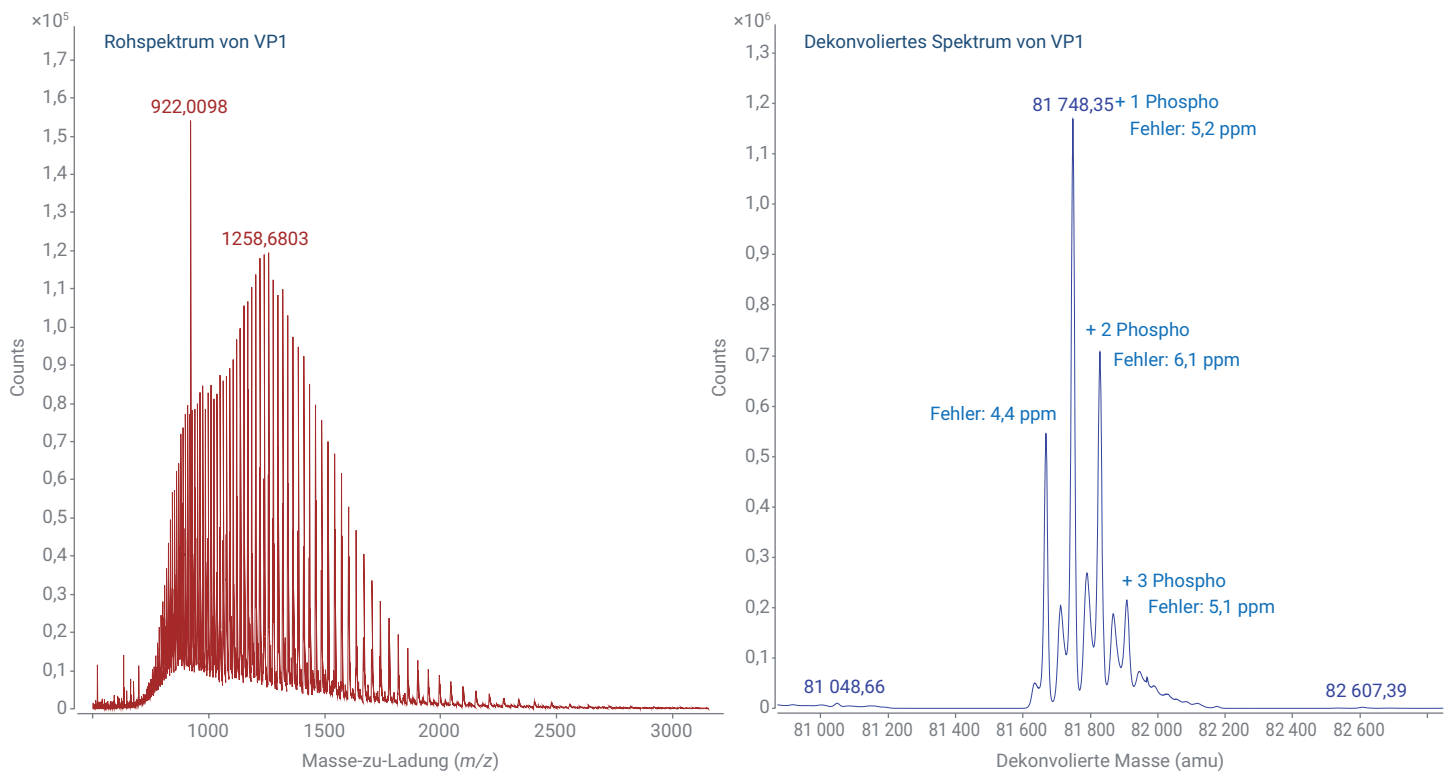


Abbildung 2: Roh- und dekonvolvierte Spektren des Kapsidproteins VP1. Die native und die phosphorylierte Form des Proteins haben jeweils eine hervorragende Massengenauigkeit.

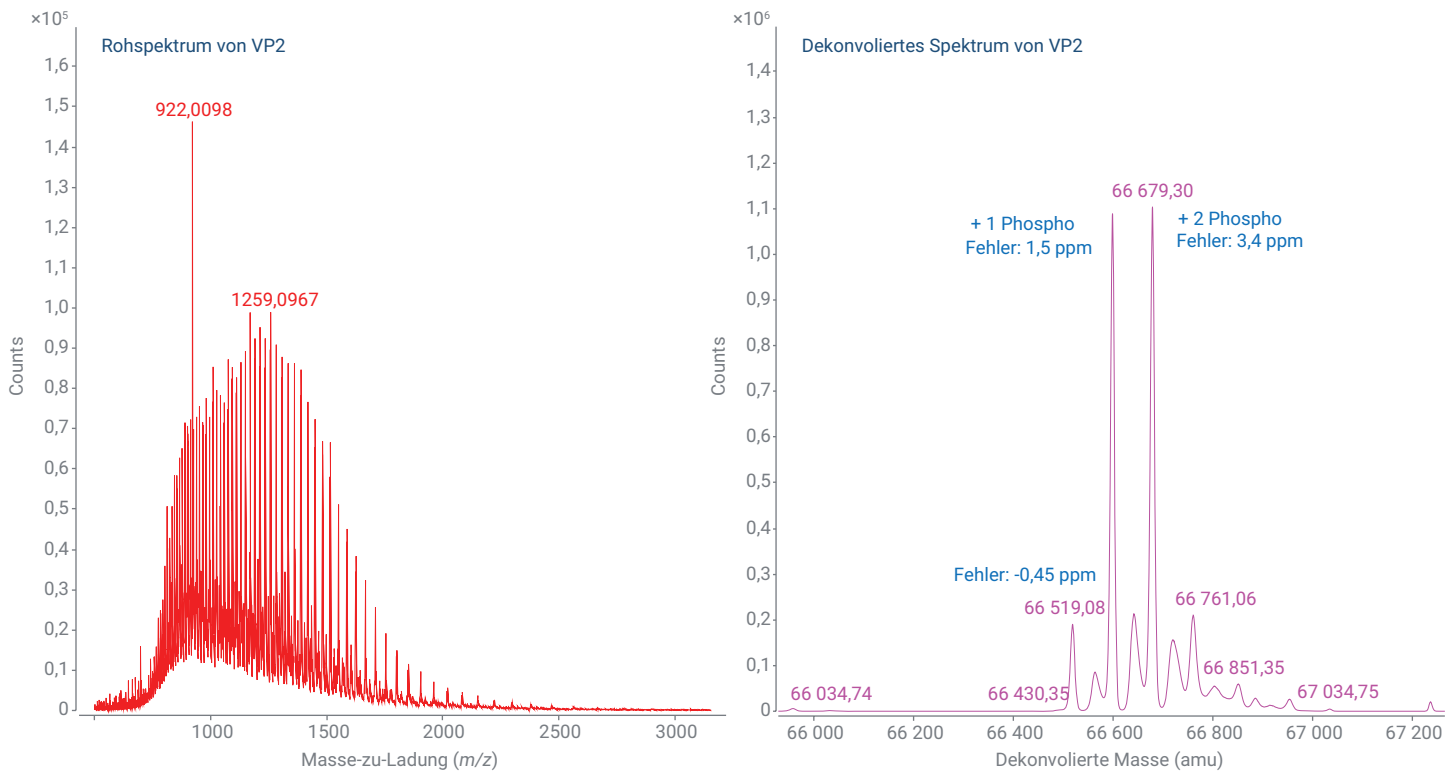


Abbildung 3: Roh- und dekonvolierte Spektren des Kapsidproteins VP2. Die native und phosphorylierte Form des Proteins haben jeweils eine hervorragende Massengenauigkeit, jeweils mit einem Fehler kleiner 5 ppm.

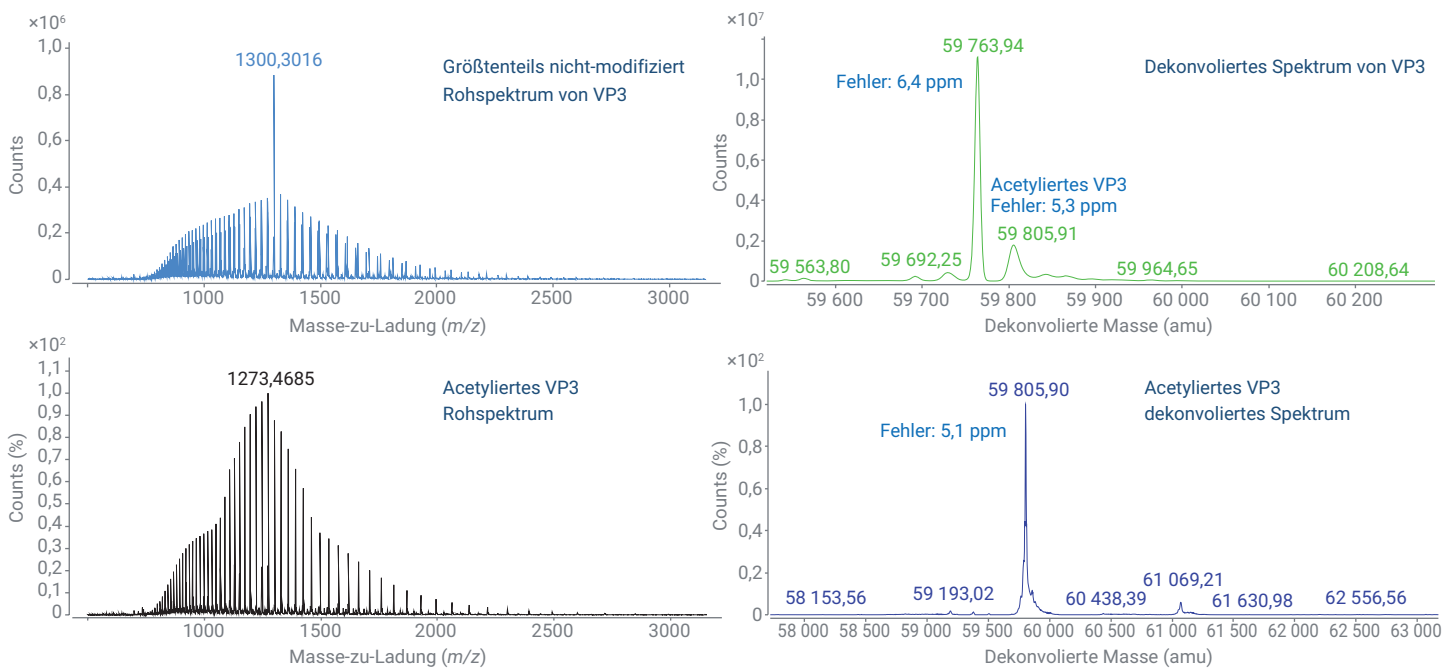


Abbildung 4: Roh- und dekonvolierte Spektren des Kapsidproteins VP3. Die nicht-modifizierten und acetylierten Formen sind größtenteils chromatographisch getrennt, mit einer hervorragenden Massengenauigkeit für jede Proteoform.

Peptid-Mapping mit dem 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

Das Peptid-Mapping von Biotherapeutika ist eine wichtige Methode zur Bestimmung von Proteinsequenzen und posttranslationalen Modifikationen, deren Durchführung von der ICH, der FDA und anderen Aufsichtsbehörden gefordert wird. Obwohl die Gentherapie mithilfe von AAV noch am Beginn steht, ist es vorstellbar, dass in Zukunft ein Peptid-Mapping der Kapsidproteine erforderlich sein wird. Seit Januar 2020 empfiehlt die FDA, dass für Arzneimittelsubstanzen für die humane Gentherapie Informationen zur Primär- und Sekundärstruktur einschließlich posttranslationaler Modifikationen zur Verfügung gestellt werden. Die iterative MS/MS-Funktion des 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF schließt Peptide aus allen vorherigen Läufen für die Isolierung und Fragmentierung aus, was die Auswahl und Detektion von gering abundanten Peptiden ermöglicht. Weiterhin ermöglicht die Software MassHunter BioConfirm Version 10.0 die Auswahl mehrerer Läufe, um die gesamte Sequenz abzudecken. Diese Funktion ist für die Kombination der Ergebnisse von iterativen MS/MS-Läufen als auch der Verwendung mehrerer Enzyme nützlich.

Die Identitätsbestimmung posttranslationaler Modifikationen wie beispielsweise Oxidation und Deamidierung ist entscheidend für die Bestimmung der Proteinestabilität. Das Peptid-Mapping ist eine zuverlässige Methode, da alle identifizierten Peptide einen geringeren Fehler als 10 ppm aufwiesen und mindestens ein MS/MS-Spektrum zur Bestätigung der Peptidsequenz und zur Lokalisierung der posttranslationalen Modifikationen vorlag. Darüber hinaus wurde die Rate für falsche Treffer auf 1 % festgelegt. Die AAV8-Sequenz hat mehrere Regionen, in denen Lysin und Arginin häufig auftreten. Dies macht es schwierig, nur mit Trypsin eine vollständige Sequenz zu erhalten. Daher wurde rAsp-N verwendet, um die vollständige Sequenz zu erhalten.

Das größte Protein, VP1, hatte eine gesamte Sequenzabdeckung von 97,7 %, wie in Abbildung 5 gezeigt. Die durchgezogenen Linien stellen die Identifizierung des Peptids mittels MS/MS dar. Die blaue und die grüne Linie stammen von zwei iterativen Durchführungen des tryptischen Verdaus, während die schwarze und die rote Linie von zwei iterativen Durchführungen eines Verdaus mit rAsp-N stammen. MS/MS-Daten bestätigen die stellenspezifische Phosphorylierung wie in Abbildung 6 gezeigt. Die roten Markierungen zeigen Peptidfragmente, die das phosphorylierte Serin enthalten. Weitere häufig

vorkommende posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise die Deamidierung von Asparagin und die Oxidation von Methionin treten auf, sind jedoch, wie erwartet, gering abundant. Abbildung 7 zeigt Beispiele dieser seltenen Modifikationen mit der relativen Quantifizierung in BioConfirm 10.0. VP2 und VP3 hatten eine Sequenzabdeckung von 98,5 bzw. 100,0 %. Obwohl es Berichte über eine N-Glykosylierung in AAV8 gibt, wurde keine N-Glykosylierung gefunden. Diese Diskrepanz könnte auf die Unterschiede der Vektorexpressionssysteme zurückzuführen sein.

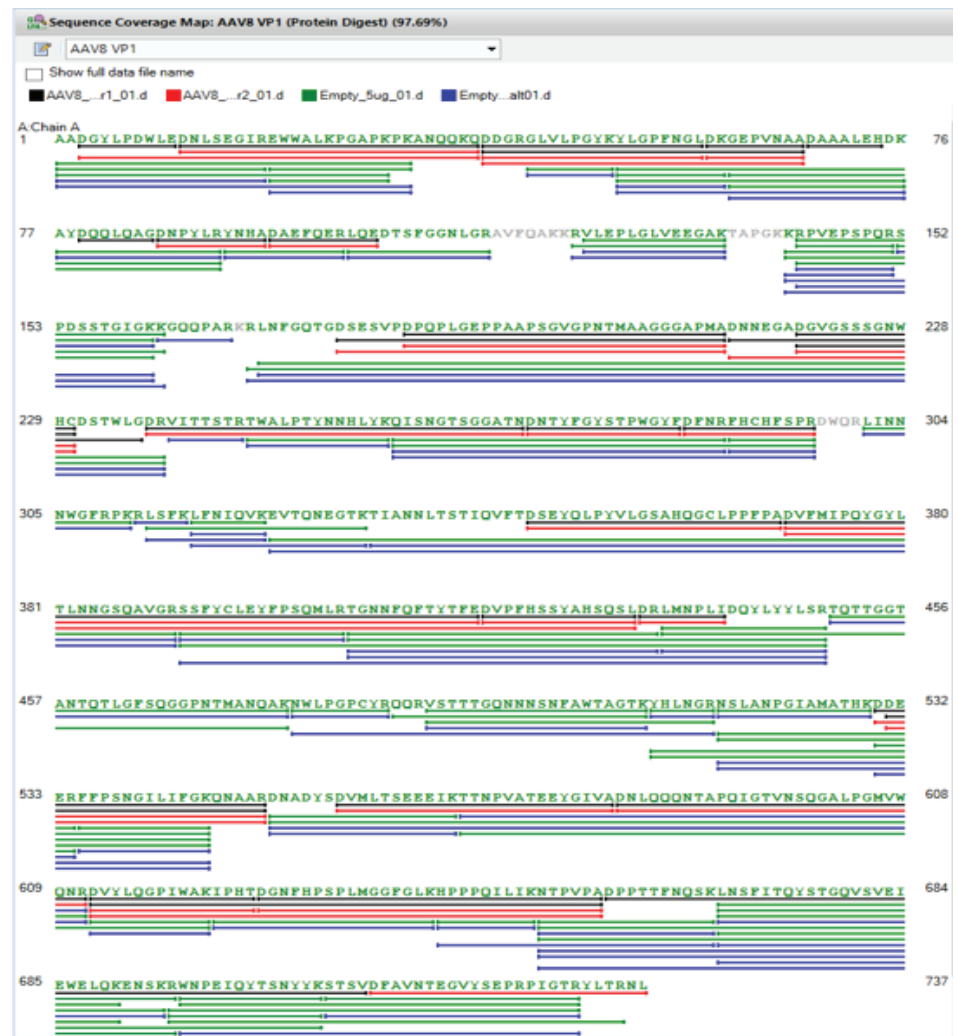


Abbildung 5: Screenshot der Software Agilent MassHunter BioConfirm 10.0, der die Sequenzabdeckung von VP1 mit iterativer MS/MS unter Verwendung von Trypsin und rAsp-N als komplementäre Enzyme zeigt. Dieses Protein hat eine Sequenzabdeckung von 97,7 %.

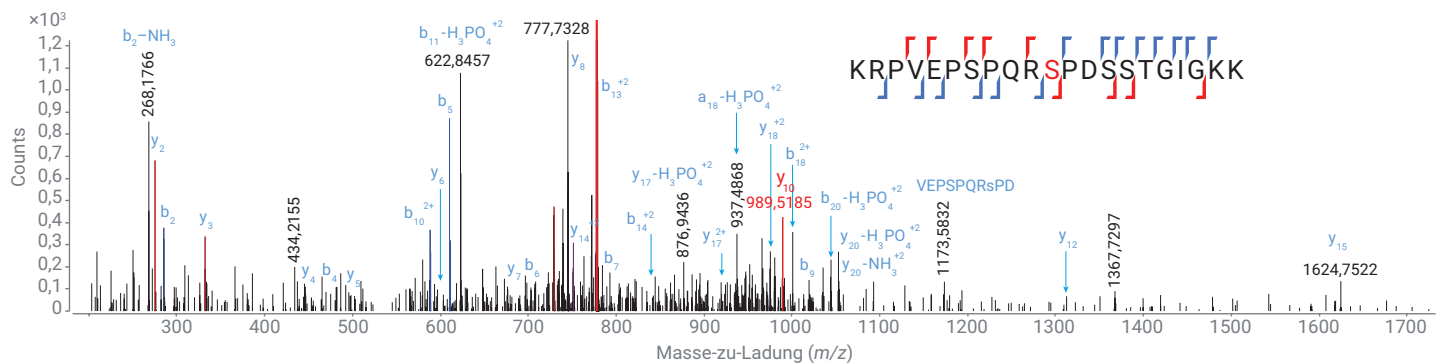


Abbildung 6: Ein Beispiel der stellenspezifischen Phosphorylierung mit MS/MS-Bestätigung. Peptide sind rot markiert, wenn sie phosphoryliertes Serin enthalten.

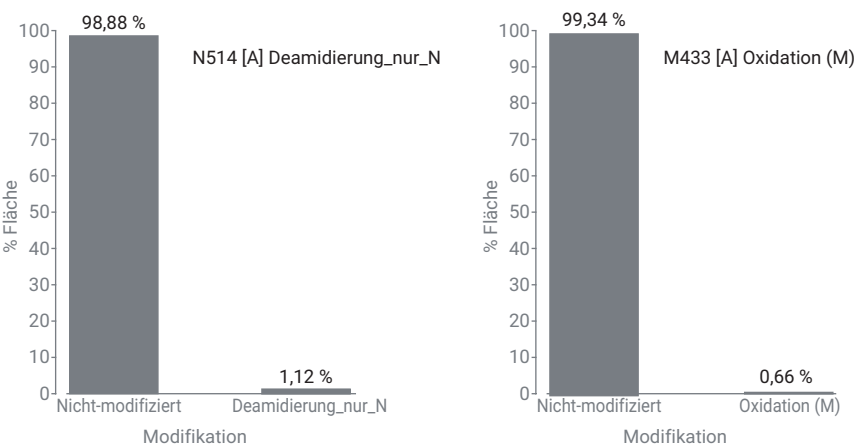


Abbildung 7: Beispiele häufig auftretender posttranslationaler Modifikationen in Proteinen: Oxidation von Methionin und Deamidierung von Asparagin. Beide Peptide sind, wie erwartet, minimal modifiziert.

Schlussfolgerung

Die Verwendung von AAV-Partikeln als Vehikel für die Gentherapie ist vielversprechend. Daher ist die Charakterisierung der Kapsidproteine ein kritisches Qualitätsmerkmal, das für das Zulassungsverfahren als Arzneimittel eine wichtige Rolle spielt. Hier zeigen wir einen Arbeitsablauf von der Probenvorbereitung bis zur Datenanalyse, der die akkurate Masse der Kapsidproteine bestimmt und die posttranslationalen Modifikationen identifiziert. Ein 1290 Infinity II LC gekoppelt an ein 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF mit der Software MassHunter BioConfirm Version 10.0 bietet eine zuverlässige und genaue Lösung für die Analyse der AAV-Kapsidproteine.

Literatur

1. Dalkara, D. *et al.* *In vivo*–Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous. *Sci. Transl. Med.* **2013**, 5(189), 189ra76–189ra76.
2. Xie, Q. *et al.* The Atomic Structure of Adeno-Associated Virus (AAV-2), a Vector for Human Gene Therapy. **2002**, 99(16), 10405–10410.
3. Wu, Z.; Asokan, A.; Samulski, R. J. Adeno-Associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol. Ther.* **2006**, 14(3), 316–327.
4. Bui, H. *et al.* (2014) ASMS Poster WP-681.
5. Jin, X. *et al.* Direct Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis for Complete Characterization of Recombinant Adeno-Associated Virus Capsid Proteins. *Hum. Gene Ther. Methods* **2017**, 28(5), 255–267.
6. Giles, A. R. *et al.* Deamidation of Amino Acids on the Surface of Adeno-Associated Virus Capsids Leads to Charge Heterogeneity and Altered Vector Function. *Mol. Ther.* **2018**, 26(12), 2848–2862.
7. Van Vliet, K. *et al.* Adeno-associated virus capsid serotype identification: Analytical methods development and application. *J. Virol. Methods* **2009**, 159(2), 167–177.
8. Arruda, V. R. *et al.* It's All About the Clothing: Capsid Domination in the Adeno-Associated Viral Vector World. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, 5(1), 12–15.
9. Office of Medical Products and Tobacco, Center for Biologics Evaluation and Research. *Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)*. Silver Spring, MD. **2020**, 28–29.

Danksagungen

Agilent bedankt sich bei Dominique Garceau, Tristan Cano, Caitlin Jaeger und William Hermans von Lake Pharma für die Mitarbeit bei der Herstellung der Proben. Ein weiterer Dank geht an Brian Liao und Ravindra Gudihal von Agilent Singapore für anregende Diskussionen.

www.agilent.com

Ausschließlich zu Forschungszwecken.
Nicht für Diagnoseverfahren geeignet.

DE.4113541667

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
Gedruckt in den USA, 23. Juli 2020
5994-1980DEE