

Caracterización de partículas de vector viral mediante el sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio

Autores

Wendi A. Hale y
Christopher M. Colangelo
Agilent Technologies, Inc.,
Lexington, MA, EE. UU.

Roy Hegedus y
Norman Garceau
Lake Pharma,
Worcester, MA, EE. UU.

Resumen

En esta nota de aplicación se describe el flujo de trabajo de caracterización y determinación de los atributos de calidad críticos (CQA) de virus adeno-asociados (AAV) intactos, junto con la identificación de las modificaciones postraduccionales (MPT) de las proteínas de la cápside. El flujo de trabajo englobaba un sistema de LC Agilent 1290 Infinity II acoplado a un sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio; se empleó el software Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 para el análisis de datos.

Introducción

Los AAV son los vectores virales principales que se emplean en la terapia génica y que han conseguido tratar de forma satisfactoria enfermedades hereditarias de la retina y la atrofia muscular espinal. Un AAV se compone de una envoltura proteica icosaédrica con un genoma monocatenario de aproximadamente 4,7 kb. Los AAV intactos funcionan como vehículo que protege y suministra el compuesto terapéutico de oligonucleótidos. Existen 13 serotipos conocidos que transducen diferentes tipos de células, lo que permite que haya una mayor selectividad de los compuestos terapéuticos. A medida que se exploran los AAV como plataformas de suministro de compuestos terapéuticos, es vital garantizar que los CQA del producto terapéutico se conserven. La caracterización de las proteínas de la cápside viral conlleva distintos problemas. La envoltura proteica está compuesta por tres proteínas de la cápside, VP1, VP2 y VP3, que se ensamblan formando una estructura de 3,9 megadaltons en una relación de 1:1:10 con 60 cápsides por virión. Además de las bajas relaciones molares de VP1 y VP2, las tres proteínas tienen secuencias que se solapan en el extremo carboxiterminal. Convencionalmente, SDS-PAGE sirve para determinar el peso molecular de las proteínas de la cápside; no obstante, esta técnica ofrece un peso molecular aproximado y posiblemente no distinga los diferentes serotipos. La espectrometría de masas (MS) es una técnica prometedor que puede solucionar estos problemas y determinar los CQA de las proteínas de la cápside. En esta nota de aplicación se describe un flujo de trabajo para el análisis de virus intactos y el mapeo de péptidos e incorpora la identificación de MPT de las proteínas de la cápside viral. Entre las herramientas que se utilizaron en el flujo de trabajo figuraban un sistema de LC Agilent 1290 Infinity II acoplado a un sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio con el software Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 para el análisis de datos.

Experimento

Instrumentos

Sistema de LC Agilent 1290 Infinity II que contenía:

- Bomba de alta velocidad Agilent 1290 Infinity II (G7120A)
- Muestreador múltiple Agilent 1290 Infinity II (G7167B) equipado con un loop de 20 µl para el análisis de virus intactos y con un loop de 40 µl para el mapeo de péptidos
- Compartimiento de columna termostatzado Agilent 1290 Infinity II (G7116B)
- Sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio

Materiales

Lake Pharma fabricó AAV8 (Worcester, MA, EE. UU.). Los filtros con un peso molecular de corte y (*tris*(2-carboxietil) fosfina) (TCEP) se adquirieron a Millipore Sigma. La tripsina y rAsp-N se adquirieron a Promega.

Preparación de muestras

En el caso del análisis de virus intactos, los AAV se sometieron a tres cambios de tampón a 10.000 g con un filtro de peso molecular de 10 kDa. El tampón contenía TCEP 5 mM, un 80 % de H₂O y un 20 % de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 % (v/v). Una vez recogida la muestra, se incubó a temperatura ambiente antes de su inyección. En el caso del mapeo de péptidos, los AAV se sometieron a desnaturalización, reducción, alquilación y digestión. Las enzimas que se utilizaron en este experimento fueron la tripsina y rAsp-N.

Análisis por LC/MS

El análisis por LC/MS se llevó a cabo mediante un sistema de LC Agilent 1290 Infinity II acoplado a un sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio con una fuente de iones dual con focalización del gradiente térmico. El software de la estación de trabajo Agilent MassHunter Acquisition (B.09.00) con función de sintonía automática con optimización por nube de partículas (SWARM) para moléculas de elevado peso molecular se usó para el análisis de virus intactos. El instrumento se calibró y funcionó en modo de masa estándar. Para el flujo de trabajo del mapeo de péptidos se empleó la función iterativa para MS/MS.

Procesamiento de datos

Todos los datos de MS se procesaron con el software MassHunter BioConfirm 10.0.

Tabla 1. Parámetros de la cromatografía de líquidos para el análisis de virus intactos.

Parámetro	Valor
Columna	Agilent ZORBAX RRHD 300-Diphenyl, 2,1 × 150 mm, 1,8 µm
Fase móvil A	Agua, ácido fórmico al 0,1 %
Fase móvil B	Acetonitrilo, ácido fórmico al 0,1 %
Flujo	0,4 ml/min
Volumen de inyección	20 µl
Gradiente	De 0 a 30 min: 30-40 % de B; de 30 a 38 min: 40-90 % de B; de 38 a 39 min: 90 % de B; de 39 a 40 min: 90-30 % de B; de 40 a 45 min: 30 % de B
Tiempo posterior	0 minutos
Temperatura de la columna	60 °C

Tabla 2. Parámetros del sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio para el análisis de virus intactos.

Parámetro	Valor
Fuente	Dual Agilent Jet Stream
Temperatura del gas	325 °C
Flujo de gas	13 l/min
Nebulizador	35 psig
Temperatura del gas de focalización	375 °C
Flujo de gas de focalización	12 l/min
Vcap	5.000 V
Boquilla	500 V
Fragmentador	180 V
Velocidad de adquisición	1 espectro/s
Masa de referencia	922,0098

Tabla 3. Parámetros de la cromatografía de líquidos para el mapeo de péptidos.

Parámetro	Valor
Columna	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 × 150 mm
Fase móvil A	Agua, ácido fórmico al 0,1 %
Fase móvil B	Acetonitrilo, ácido fórmico al 0,1 %
Flujo	0,4 ml/min
Volumen de inyección	40 µl
Gradiente	De 0 a 3 min: 3 % de B; de 3 a 50 min: 3-35 % de B; de 50 a 60 min: 35-97 % de B; de 60 a 62 min: 97 % de B; de 62 a 62,5 min: 97-3 % de B; de 62,5 a 65 min: 3 % B
Tiempo posterior	5 minutos
Temperatura de la columna	60 °C

Tabla 4. Parámetros del sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio para el mapeo de péptidos.

Parámetro	Valor
Fuente	Dual Agilent Jet Stream
Temperatura del gas	325 °C
Flujo de gas	13 l/min
Nebulizador	35 psig
Temperatura del gas de focalización	275 °C
Flujo de gas de focalización	12 l/min
Vcap	4.000 V
Boquilla	0 V
Fragmentador	170 V
Velocidad de adquisición	5/3 espectros/s en MS y en MS/MS
Masas de referencia	121,0509, 922,0098

Resultados y comentarios

Análisis de virus intactos con el sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio

A pesar de que SDS-PAGE resulta un método rápido y sencillo para verificar el peso molecular de las proteínas de la cápside de los AAV, no es lo suficientemente específico para identificar las diferentes isoformas, como las formas fosforiladas o acetiladas frente a las formas no modificadas. El sistema de MS Q-TOF de alta resolución ofrece una gran sensibilidad, detecta las MPT y determina la masa molecular de las proteínas intactas de forma precisa. La función de sintonía automática con optimización por nube de partículas (SWARM) para moléculas de elevado peso molecular

del sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio resulta asimismo útil en este sentido, ya que ofrece una sensibilidad excelente para las proteínas de la cápside gracias a la mejora de la transmisión en todo el espectrómetro de masas. Además, el nivel de vacío ultrabajo del TOF (10^{-8} torr) permite aumentar la claridad espectral gracias al incremento de la trayectoria libre media de las moléculas de la proteína.

La preparación de muestras antes de LC/MS es crucial para obtener espectros de masas de gran calidad y destaca aún más en nuestro trabajo con los AAV. En la Figura 1 se muestran los cromatogramas de corriente iónica total (TIC) y los espectros de masas sin procesar de las proteínas de la cápside con y sin la preparación de muestras. Los tampones de la solución

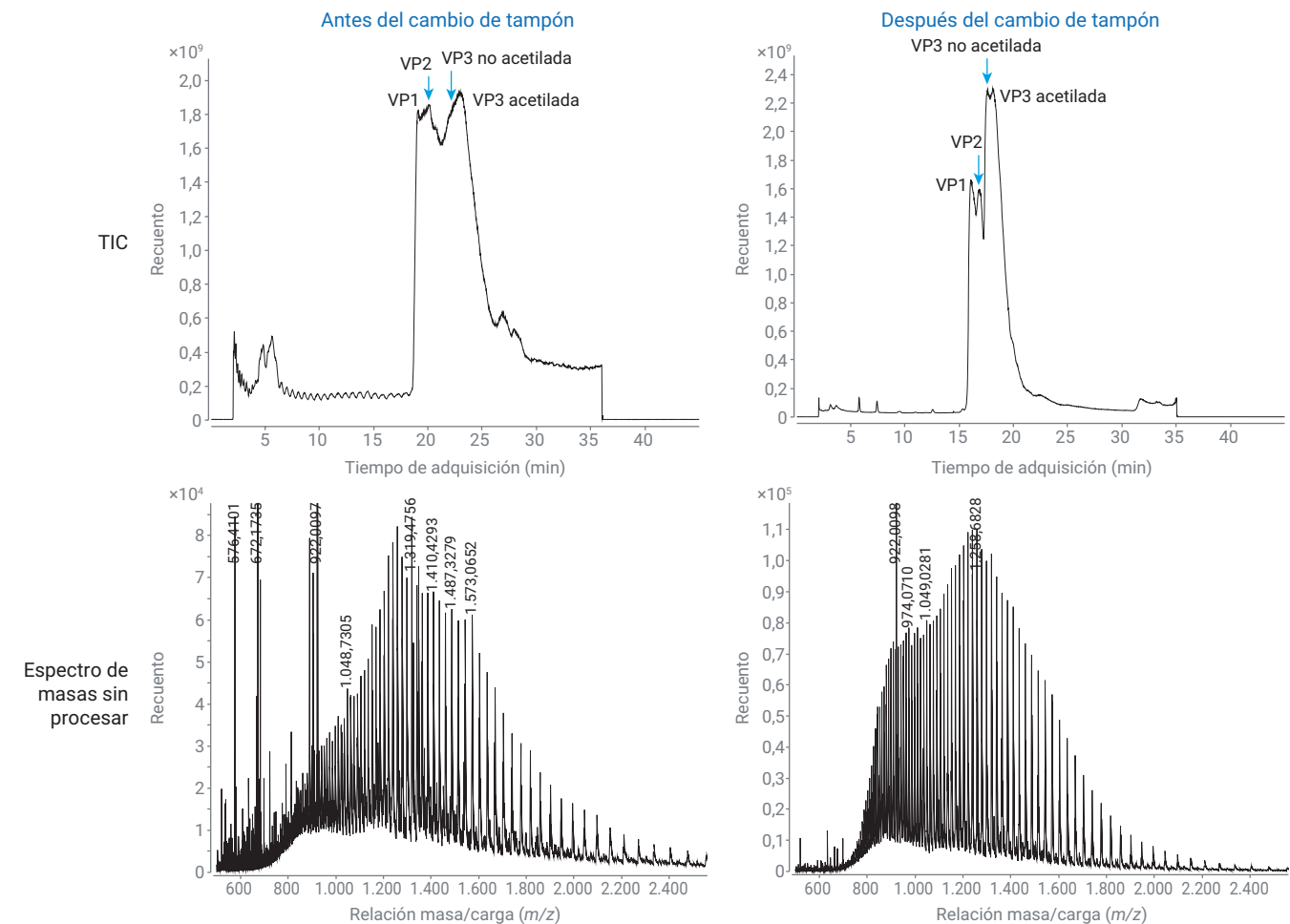


Figura 1. TIC de las proteínas de la cápside del AAV y espectros sin procesar de VP1 con y sin preparación de muestras.

de origen introducen contaminantes en el espectrómetro de masas. Además, la separación entre las proteínas de la cápside mejora tras el cambio de tampón. Los datos sin procesar muestran que ha aumentado 1,5 veces la abundancia de la proteína y que el espectro es mucho más limpio. En este documento no se muestran los datos procesados, pero los espectros son más claros debido a la ausencia de aductos de sodio y de potasio, de forma que la interpretación de los datos es mucho más sencilla. Además, se incrementa la solidez del flujo de trabajo, lo que permite que los plazos entre las tareas de mantenimiento del instrumento sean más espaciados.

En la Figura 2 se presentan los espectros sin procesar y procesado de VP1. Con este flujo de trabajo, se pudieron detectar tres centros de fosforilación en VP1 con un error inferior a 10 ppm. Los datos de masas exactas confirmaron que VP1 no contiene

restos de aminoácidos del extremo aminoterminal y que el nuevo extremo aminoterminal se ha acetilado. En la actualidad existen muy pocos informes de análisis de MPT en las proteínas de la cápside de los AAV, como la fosforilación en VP1. VP2 se separa de VP1 mediante cromatografía. Mientras que la espectrometría de masas puede separar estas proteínas por su masa, la separación cromatográfica permite que la supresión iónica sea menor en estas dos proteínas en baja concentración. Los datos de masas exactas confirman al menos dos centros de fosforilación en VP2 y, probablemente, un tercero, según la Figura 3. En la Figura 4 se muestra cómo la forma sin modificaciones de VP3 se separa por cromatografía casi por completo del VP3 acetilado. Una vez más, el espectro procesado determina que tanto el VP3 acetilado como el VP3 no modificado se encuentran presentes con una elevada exactitud

de masa. La acetilación del extremo aminoterminal de las proteínas es una MPT habitual y está implicada en la estabilidad de las proteínas, en su plegamiento y en las interacciones con otras proteínas. Si bien la acetilación de VP1 es completa, en el caso de VP3 la acetilación es, aproximadamente, del 70 %. Aunque no está claro actualmente el motivo por el que no hay acetilación completa en VP3, ello podría afectar a la estructura general de la envoltura de la cápside del virus. La claridad espectral que ofreció el vacío perfeccionado en el sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio, junto con la función de sintonía automática con optimización por nube de partículas (SWARM) para moléculas de elevado peso molecular, pone de manifiesto las tres proteínas de la cápside del virus con sus MPT y elevada exactitud de la masa, inferior a 10 ppm en todas las isoformas.

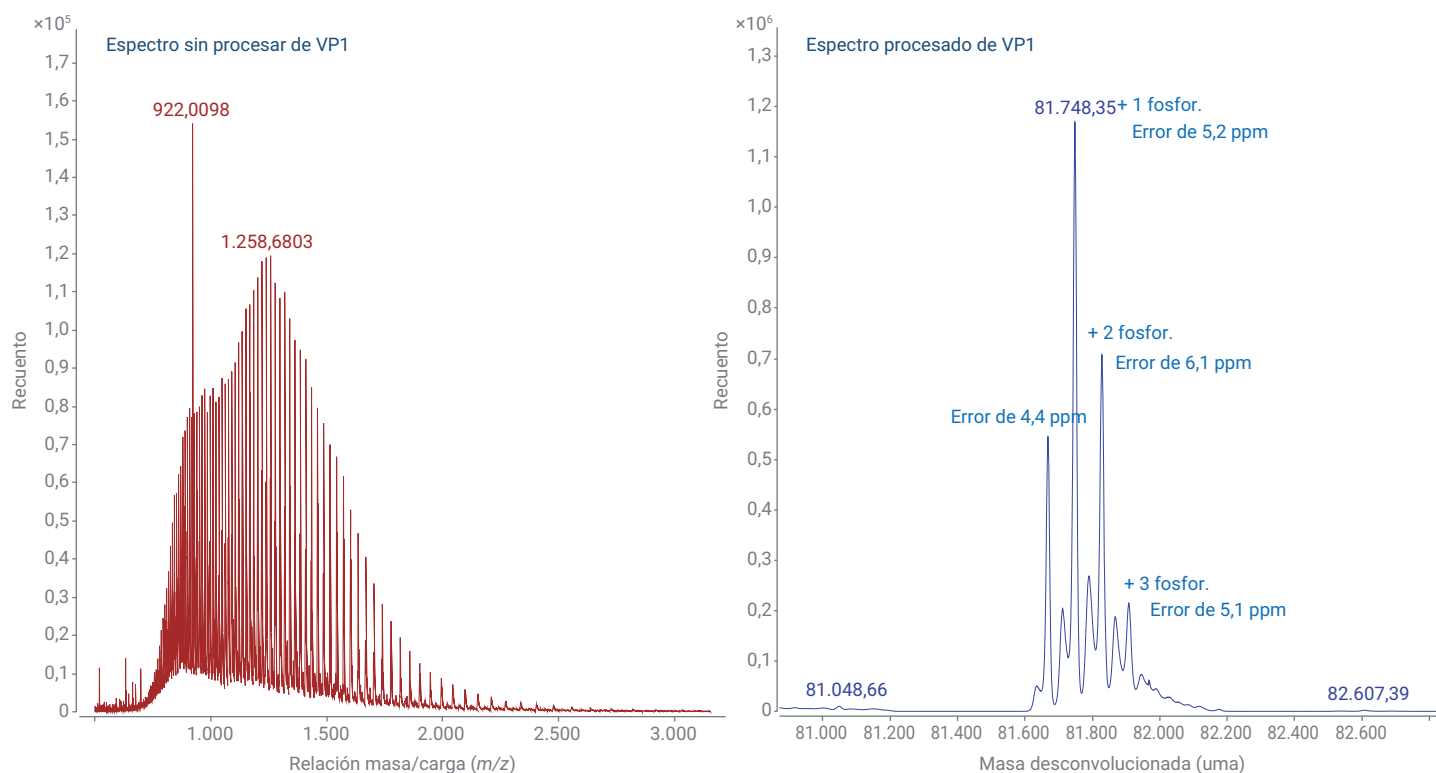


Figura 2. Espectros sin procesar y procesado de la proteína de la cápside de VP1. Las formas nativa y fosforilada de la proteína presentan una exactitud de masa excelente.

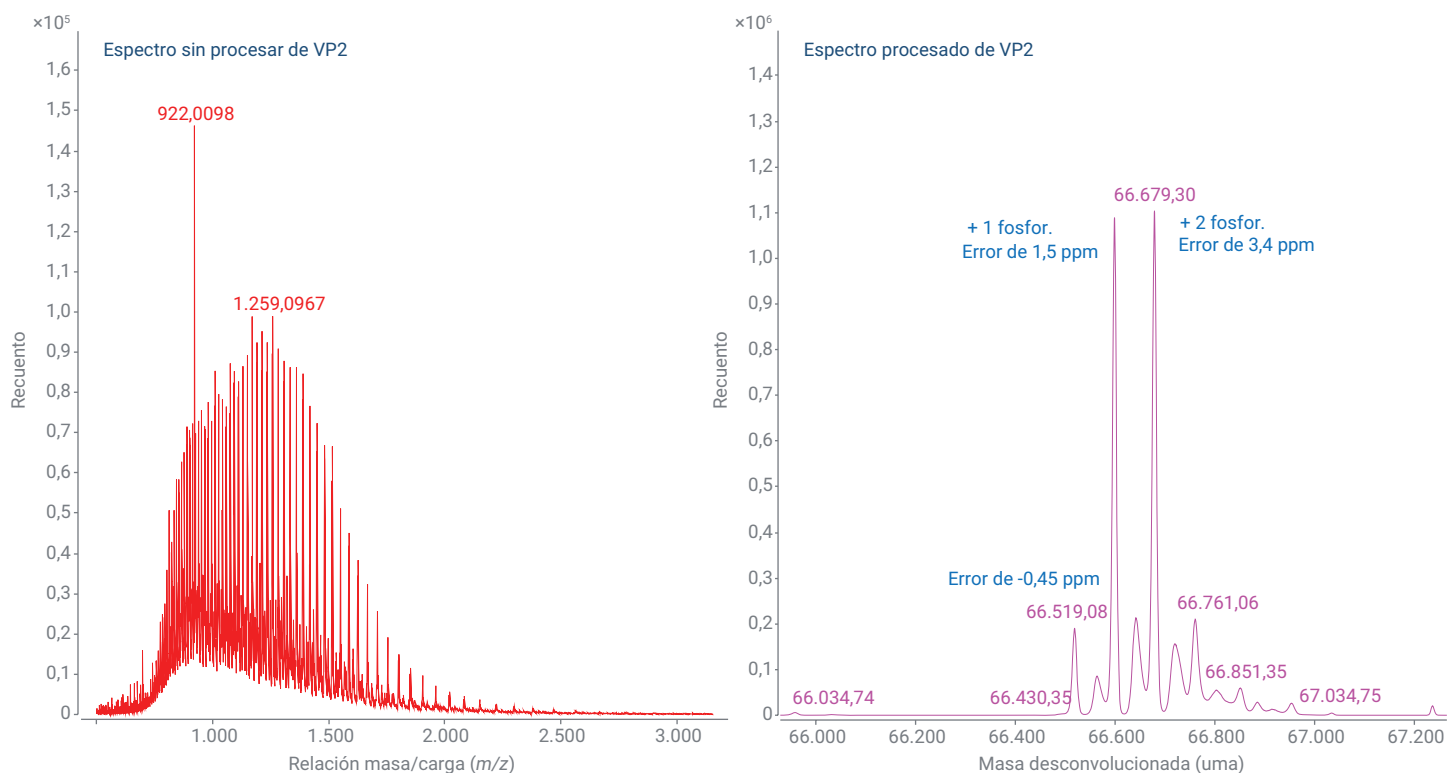


Figura 3. Espectros sin procesar y procesado de la proteína de la cápside de VP2. Las formas nativa y fosforilada de la proteína presentan una exactitud de masa excelente, todas con un error inferior a 5 ppm.

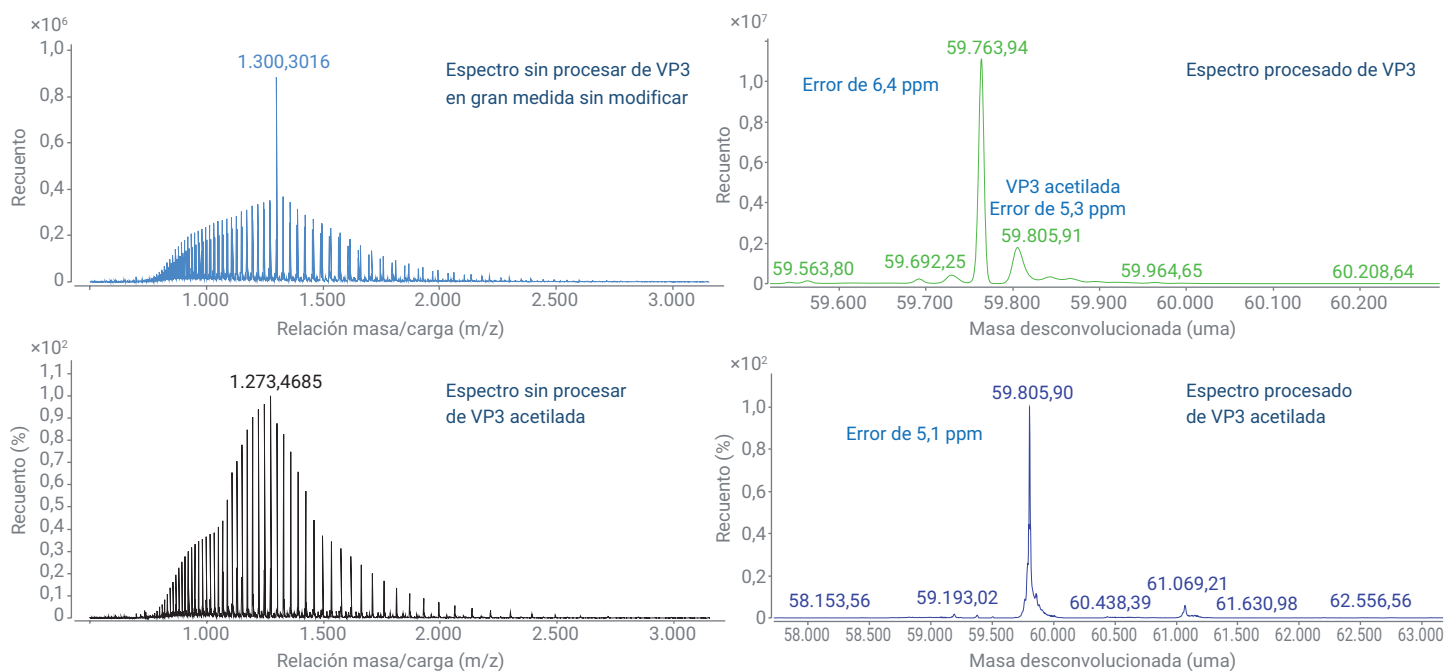


Figura 4. Espectros sin procesar y procesado de la proteína de la cápside de VP3. Las formas sin modificar y acetilada se separan bastante bien por cromatografía, con una exactitud de masa excelente en cada isoforma.

Mapeo de péptidos con el sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio

El mapeo de péptidos de productos bioterapéuticos es un método esencial para determinar la secuencia de proteínas y las MPT que exigen la ICH, la FDA y otros organismos de regulación. A pesar de que la terapia génica a través de los AAV es un campo emergente, es viable imaginar que se impondrán requisitos en el futuro para el mapeo de péptidos de las proteínas de la cápside. Desde enero de 2020, la FDA recomienda facilitar información sobre las estructuras primaria y secundaria, incluidas las MPT, en las sustancias farmacológicas para terapias génicas. La función iterativa para MS/MS del sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio excluye los péptidos de todos los análisis anteriores de fragmentación y aislamiento, lo que permite la selección y detección de péptidos en bajas concentraciones. Además, el software MassHunter BioConfirm 10.0 ofrece la posibilidad de seleccionar varios análisis para obtener una cobertura total de la secuencia. Esta función resulta muy útil para la combinación de resultados de análisis de MS/MS iterativos, así como el uso de varias enzimas.

La identificación de la MPT, como la oxidación y la desamidación, es crucial a la hora de establecer la estabilidad de la proteína. Para que el mapeo de péptidos fuera fiable, todos los péptidos identificados tenían un error inferior a 10 ppm y, al menos, un espectro MS/MS que confirmaba la secuencia de péptidos y localizaba las MPT. Además, el índice de hallazgos falsos se estableció en el 1 %. La secuencia de AAV8 contiene varias regiones en las que se presentan con frecuencia restos de lisina y arginina, lo que complica la obtención de una secuencia completa solo con la tripsina. Por tanto, se empleó rAsp-N para que la cobertura de la secuencia fuese completa.

La proteína más grande, VP1, obtuvo una cobertura total de la secuencia del 97,7 %, tal y como se muestra en la Figura 5. Las líneas de un solo color representan la identificación del péptido mediante MS/MS. Las líneas verdes y azules proceden de dos análisis iterativos de la digestión triptica, mientras que las líneas negras y rojas provienen de dos análisis iterativos de la digestión con rAsp-N. Los datos de MS/MS confirman la fosforilación específica en el sitio, tal y como se muestra en la Figura 6. Las anotaciones en rojo muestran los fragmentos de péptidos que contienen la serina

fosforilada. Se observan otras MPT habituales, como la desamidación de la asparagina y la oxidación de la metionina, pero en concentraciones bajas, tal y como estaba previsto. En la Figura 7 se presentan ejemplos de estas modificaciones de nivel bajo con la función de cuantificación relativa en BioConfirm 10.0. VP2 y VP3 obtuvieron una cobertura de secuencia del 98,5 y del 100,0 %, respectivamente. A pesar de que existen informes en los que se observa N-glicosilación en AAV8, no se observó en este caso. Esta discrepancia puede deberse a las diferencias en los sistemas de expresión del vector.

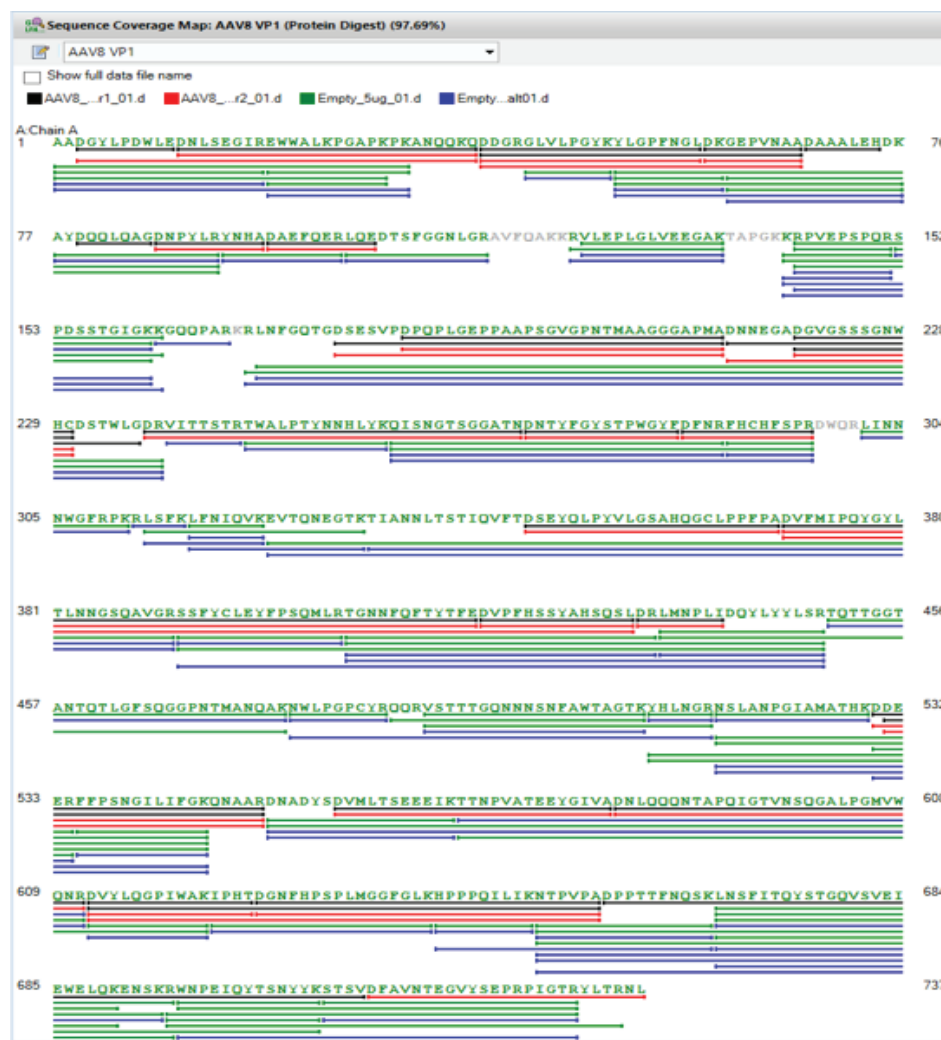


Figura 5. Captura de pantalla de Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 que muestra la cobertura de la secuencia del VP1 con MS/MS iterativa y con el uso de la tripsina y rAsp-N como enzimas complementarias. Esta proteína tiene una cobertura de secuencia del 97,7 %.

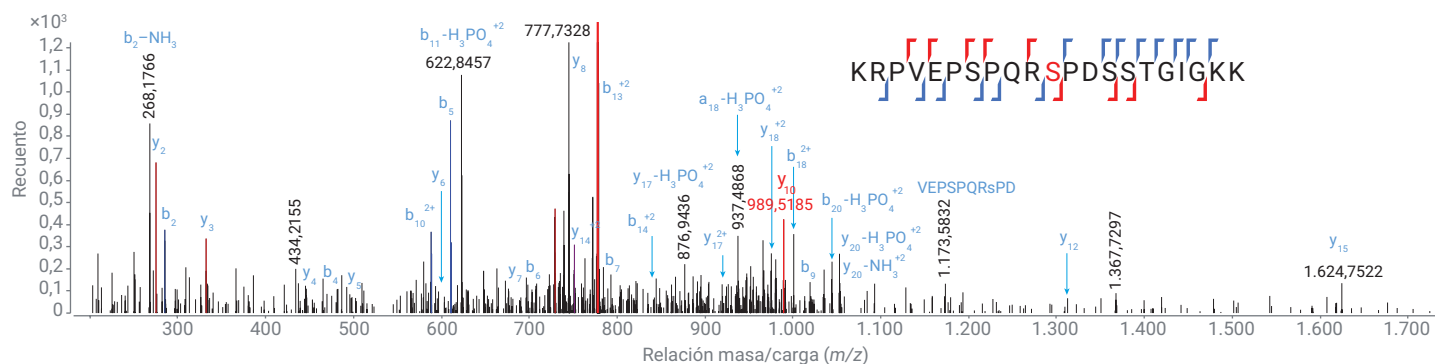


Figura 6. Un ejemplo de la fosforilación específica en el sitio con confirmación mediante MS/MS. El péptido anotado cuenta con marcas rojas cuando contiene residuos de serina fosforilada.

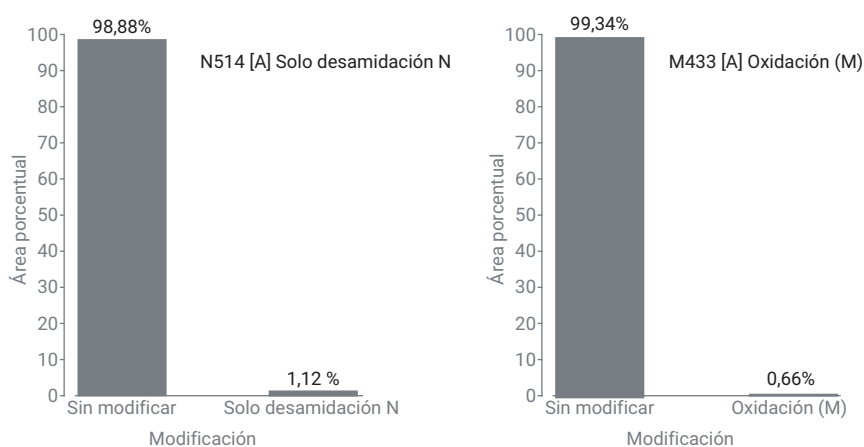


Figura 7. Ejemplos de las modificaciones postraduccionales (MPT) habituales en las proteínas: oxidación de la metionina y desamidación de la asparagina. Ambos péptidos apenas se han modificado, tal y como estaba previsto.

Conclusión

El uso de partículas de AAV como vehículos para la terapia génica ha generado interesantes expectativas, de forma que la caracterización de los CQA de las proteínas de la cápside ha pasado a ser crucial en el proceso de aprobación de un fármaco. En este documento se muestra un flujo de trabajo desde la preparación de muestras hasta el análisis de datos que determina la masa exacta de las proteínas de la cápside e identifica las MPT. Un sistema de LC 1290 Infinity II, junto con un sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio y el software MassHunter BioConfirm 10.0 ofrecen una solución fiable y precisa para el análisis de las proteínas de la cápside de los AAV.

Referencias

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.

Agradecimientos

Agilent quiere mostrar su agradecimiento a Dominique Garceau, Tristan Cano, Caitlin Jaeger y William Hermans de Lake Pharma por haberse implicado en la producción de muestras. También quiere agradecer a Brian Liao y Ravindra Gudihal, de Agilent Singapur, por compartir sus ideas.

www.agilent.com

Solo para uso en investigación.
Prohibido su uso en procedimientos diagnósticos.

DE.4113541667

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
Impreso en EE. UU., 23 de julio de 2020
5994-1980ES