

Caractérisation de particules de vecteur viral à l'aide du LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT

Auteurs

Wendi A. Hale et
Christopher M. Colangelo
Agilent Technologies, Inc.,
Lexington, MA, États-Unis

Roy Hegedus et
Norman Garceau
Lake Pharma,
Worcester, MA, États-Unis

Résumé

Cette note d'application décrit une méthode de caractérisation et de détermination des attributs qualité critiques (CQA) de virus adéno-associés (AAV) intacts, ainsi que d'identification des modifications post-traductionnelles (MPT) des protéines de capsid. Cette méthode a fait appel à un système LC 1290 Infinity II couplé à un LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT, et le logiciel Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 a été utilisé pour le traitement des données.

Introduction

Les AAV sont les principaux vecteurs viraux de la thérapie génique et ont permis de traiter des maladies héréditaires de la rétine et l'amyotrophie spinale. Un AAV est composé d'une enveloppe protéique icosaédrique et d'un génome simple brin d'environ 4,7 kb. Les AAV servent de véhicule pour protéger et administrer des oligonucléotides thérapeutiques. Il existe 13 sérotypes connus transduisant différents types de cellules, offrant ainsi une plus grande sélectivité pour les produits thérapeutiques. Puisque les AAV continuent d'être explorés en tant que plateformes d'administration thérapeutique, il est essentiel de s'assurer que tous les CQA du produit thérapeutique sont maintenus. La caractérisation des protéines de capsid virale présente plusieurs difficultés. L'enveloppe protéique est composée de trois protéines de capsid, VP1, VP2 et VP3, qui s'assemblent pour former une structure de 3,9 MDa dans un rapport de 1:1:10 avec 60 capsides par virion. Outre les faibles rapports molaires de VP1 et VP2, les trois protéines ont des séquences qui se chevauchent au C-terminal. Habituellement, un SDS-PAGE est utilisé pour établir le poids moléculaire des protéines de capsid. Néanmoins, le poids moléculaire déterminé à l'aide de cette technique est approximatif et peut s'avérer insuffisant pour distinguer entre les différents sérotypes. La spectrométrie de masse (MS) est une méthode prometteuse pour surmonter ces difficultés et déterminer les CQA des protéines de capsid. Cette note d'application décrit une méthode d'analyse à l'état intact et de cartographie peptidique, permettant aussi l'identification des MPT des protéines de capsid virale. Les outils utilisés dans cette méthode comprennent un système LC 1290 Infinity II couplé à un LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT, ainsi que le logiciel MassHunter BioConfirm 10.0 pour le traitement des données.

Méthode expérimentale

Instruments

Système LC Agilent 1290 Infinity II avec :

- Pompe à haut débit Agilent 1290 Infinity II (G7120A)
- Multiéchantillonneur 1290 Infinity II (G7167B) équipé d'une boucle de 20 µL pour l'analyse à l'état intact et d'une boucle de 40 µL pour l'analyse par cartographie peptidique
- Compartiment colonne thermostaté Agilent 1290 Infinity II (G7116B)
- Système LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT

Matériel

AAV8 a été produit par Lake Pharma (Worcester, MA, États-Unis). Les filtres de coupure de poids moléculaire et la (*tris*[2-carboxyéthyl]phosphine) (TCEP) ont été achetés auprès de Millipore Sigma. La trypsine et la rAsp-N ont été achetées auprès de Promega.

Préparation d'échantillons

Pour l'analyse à l'état intact, les AAV ont été soumis trois fois à un changement de tampon à 10 000 g avec un filtre de poids moléculaire de 10 kDa. Le tampon contenait 5 mM de TCEP, 80 % d'H₂O et 20 % d'acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique (v/v). Une fois collecté, l'échantillon a été incubé à température ambiante avant l'injection. Pour la cartographie peptidique, les AAV ont été soumis à des étapes de dénaturation, réduction, alkylation et digestion. Les enzymes utilisées dans cette expérience étaient la trypsine et la rAsp-N.

Analyse par LC/MS

L'analyse par LC/MS a été effectuée sur un système LC 1290 Infinity II couplé à un LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT équipé d'une source Dual Agilent Jet Stream. Le logiciel de station de travail Agilent MassHunter Acquisition (B.09.00) avec la fonctionnalité du dispositif d'ajustement autotune SWARM pour les molécules de grande taille a été utilisé pour l'analyse à l'état intact. L'instrument a été étalonné et utilisé en mode de masse standard. La fonctionnalité MS/MS itérative a été utilisée pour la méthode de cartographie peptidique.

Traitement des données

Toutes les données de MS ont été traitées avec le logiciel MassHunter BioConfirm 10.0.

Tableau 1. Paramètres de chromatographie en phase liquide pour l'analyse à l'état intact.

Paramètre	Valeur
Colonne	Agilent ZORBAX-RRHD 300-Diphenyl, 2,1 × 150 mm, 1,8 µm
Phase mobile A	Eau, acide formique à 0,1 %
Phase mobile B	Acétonitrile, acide formique à 0,1 %
Débit	0,4 mL/min
Volume d'injection	20 µL
Gradient	0–30 min : 30–40 % de B ; 30–38 min : 40–90 % de B ; 38–39 min : 90 % de B ; 39–40 min : 90–30 % de B ; 40–45 min : 30 % de B
Durée postanalyse	0 minute
Température de colonne	60 °C

Tableau 2. Paramètres du LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT pour l'analyse à l'état intact.

Paramètre	Valeur
Source	Dual Agilent Jet Stream
Température du gaz	325 °C
Débit du gaz	13 L/min
Nébuliseur	35 psig
Température du gaz de gainage	375 °C
Débit de gaz de gainage	12 L/min
VCap	5 000 V
Buse	500 V
Fragmenteur	180 V
Fréquence d'acquisition	1 spec./s
Masse de référence	922,0098

Tableau 3. Paramètres de chromatographie en phase liquide pour l'analyse par cartographie peptidique.

Paramètre	Valeur
Colonne	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 × 150 mm
Phase mobile A	Eau, acide formique à 0,1 %
Phase mobile B	Acétonitrile, acide formique à 0,1 %
Débit	0,4 mL/min
Volume d'injection	40 µL
Gradient	0–3 min : 3 % de B ; 3–50 min : 3–35 % de B ; 50–60 min : 35–97 % de B ; 60–62 min : 97 % de B ; 62–62,5 min : 97–3 % de B ; 62,5–65 min : 3 % de B
Durée postanalyse	5 minutes
Température de colonne	60 °C

Tableau 4. Paramètres du LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT pour l'analyse par cartographie peptidique.

Paramètre	Valeur
Source	Dual Agilent Jet Stream
Température du gaz	325 °C
Débit du gaz	13 L/min
Nébuliseur	35 psig
Température du gaz de gainage	275 °C
Débit de gaz de gainage	12 L/min
VCap	4 000 V
Buse	0 V
Fragmenteur	170 V
Fréquence d'acquisition	5/3 spec./s pour MS et MS/MS
Masses de référence	121,0509, 922,0098

Résultats et discussion

Analyse à l'état intact sur le LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT

Bien que la technique SDS-PAGE constitue un moyen simple et rapide de vérifier le poids moléculaire des protéines de capsid des AAV, elle n'est pas suffisamment spécifique pour résoudre les différentes protéoformes, par exemple pour distinguer entre les formes acétylées ou phosphorylées et les formes non modifiées. La MS Q-TOF en haute résolution offre assez de sensibilité pour résoudre les MPT et permet de déterminer la masse moléculaire exacte des protéines intactes. À cela s'ajoute la fonctionnalité du dispositif d'ajustement autotune SWARM pour les molécules de grande taille du LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT,

qui offre une excellente sensibilité pour les protéines de capsid en améliorant leur transmission dans le spectromètre de masse. De plus, le vide du TOF (E^{-8} torr) permet d'augmenter la définition spectrale en raison de l'augmentation du libre parcours moyen des molécules protéiques.

La préparation d'échantillons avant la LC/MS est essentielle à l'obtention de spectres de masse de haute qualité, comme le démontre notre étude sur les AAV. La figure 1 présente les chromatogrammes d'ions totaux (TIC) et les spectres de masse bruts des protéines de capsid avec et sans préparation d'échantillons. Les tampons de la solution d'origine introduisent des contaminants dans le spectromètre de masse. En outre, la séparation entre les protéines de capsid est de meilleure qualité après

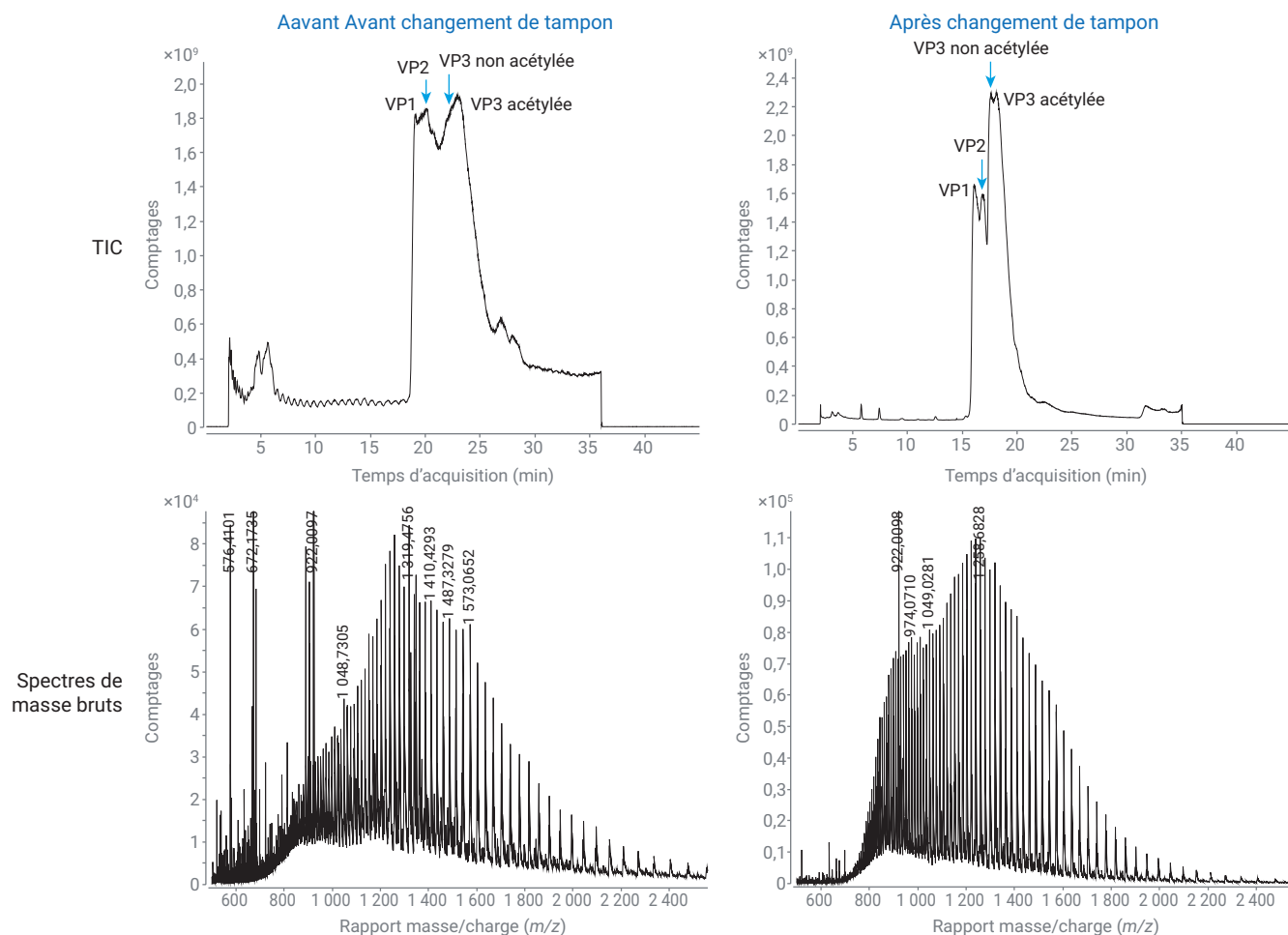


Figure 1. TIC des protéines de capsid et spectres bruts de VP1 avec et sans préparation d'échantillons.

le changement de tampon. Les données brutes démontrent que la protéine est 1,5 fois plus abondante, et le spectre est beaucoup mieux défini. Les données déconvoluées ne sont pas représentées, mais les spectres sont mieux définis en raison de l'absence d'adduits de sodium et de potassium, simplifiant grandement l'interprétation des données. De surcroît, cela améliore la robustesse de la méthode, allongeant les intervalles de maintenance d'instrument.

La figure 2 présente les spectres bruts et déconvolués de VP1. Grâce à cette méthode, nous avons pu détecter trois sites de phosphorylation sur VP1 avec une erreur inférieure à 10 ppm. Les données de masse exacte ont confirmé l'absence du résidu d'acides aminés en N-terminal et l'acétylation du nouveau N-terminal de VP1. Il n'existe actuellement que très peu de publications rapportant l'analyse des MPT des protéines de capsid d'AAV,

y compris la phosphorylation de VP1. VP2 est chromatographiquement séparée de VP1. Bien que la spectrométrie de masse puisse séparer ces protéines en fonction de leur masse, la séparation chromatographique atténue la suppression d'ions de ces deux protéines peu abondantes. Les données de masse exacte confirment au moins deux sites de phosphorylation sur VP2, ainsi qu'un troisième site probable dans la figure 3. La figure 4 démontre que la forme non modifiée de VP3 est en majeure partie chromatographiquement séparée de sa forme acétylée. De nouveau, les spectres déconvolués révèlent que les formes acétylée et non modifiée de VP3 sont toutes deux présentes avec une haute précision en masse. L'acétylation N-terminale des protéines est une MPT courante, qui est impliquée dans la stabilité des protéines, dans leur repliement et dans leurs interactions

avec d'autres protéines. Tandis que VP1 était entièrement acétylée, VP3 était acétylée à 70 % environ. Bien que l'on ne sache pas encore pourquoi VP3 n'était pas complètement acétylée, cela peut affecter la structure globale de la capsid du virus. L'excellente définition spectrale offerte par l'amélioration du vide sur le LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT associée à la fonction autotune SWARM pour les molécules de grande taille illustre les trois protéines de capsid virale et leurs MPT avec une haute précision en masse, avec une erreur inférieure à 10 ppm pour toutes les protéoformes.

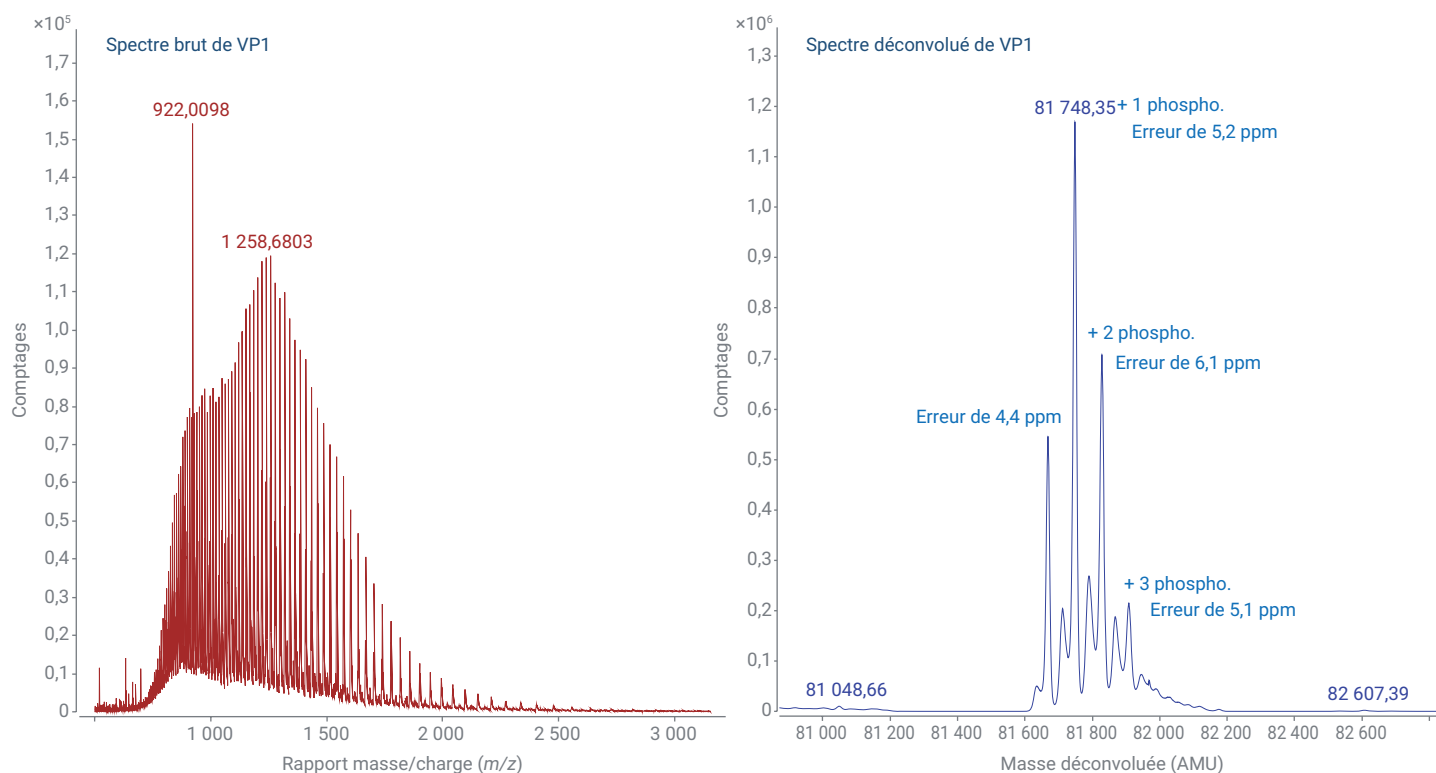


Figure 2. Spectres bruts et déconvolués de la protéine de capsid VP1. Les formes natives et phosphorylées de la protéine présentent une excellente précision en masse.

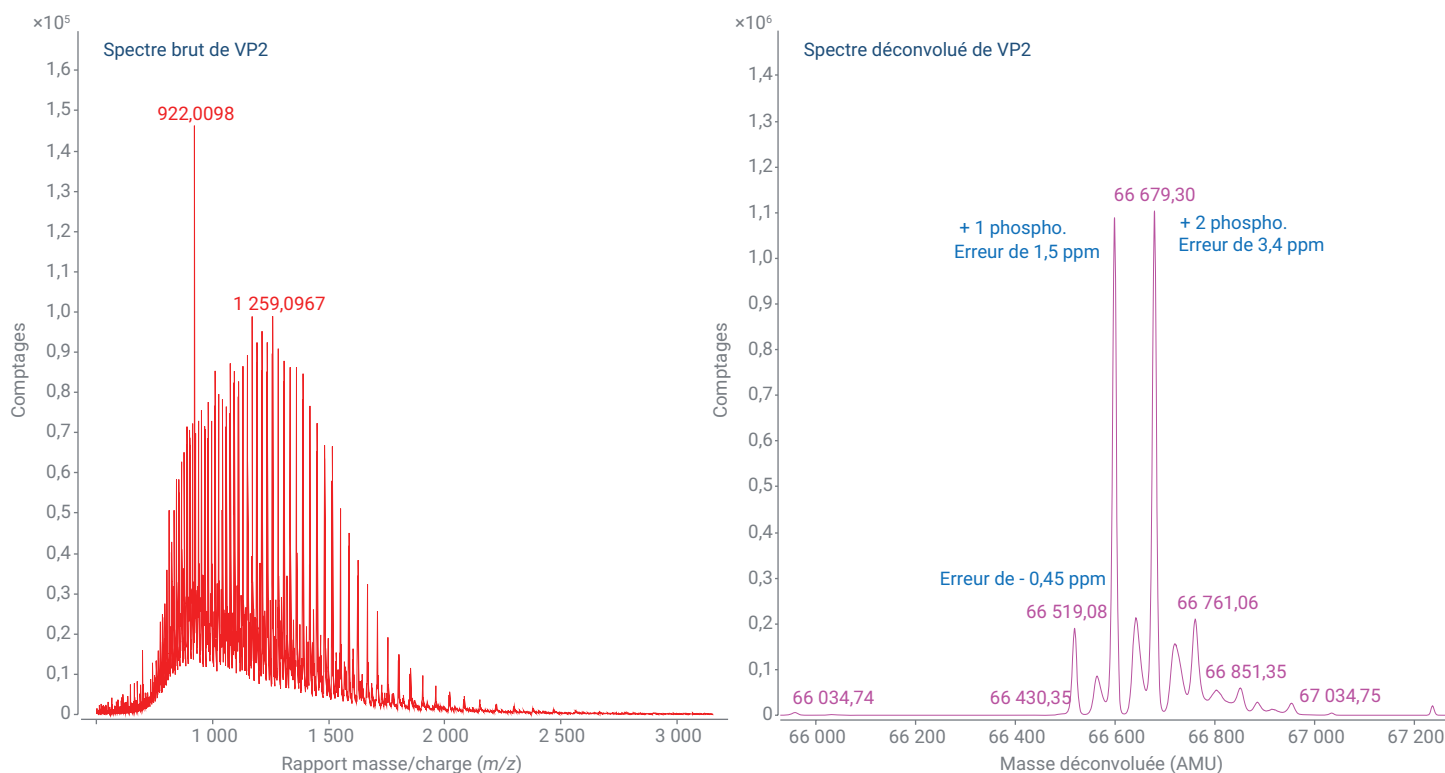


Figure 3. Spectres bruts et déconvolués de la protéine de capsid VP2. Les formes natives et phosphorylées de la protéine présentent une excellente précision en masse, avec une erreur inférieure à 5 ppm.

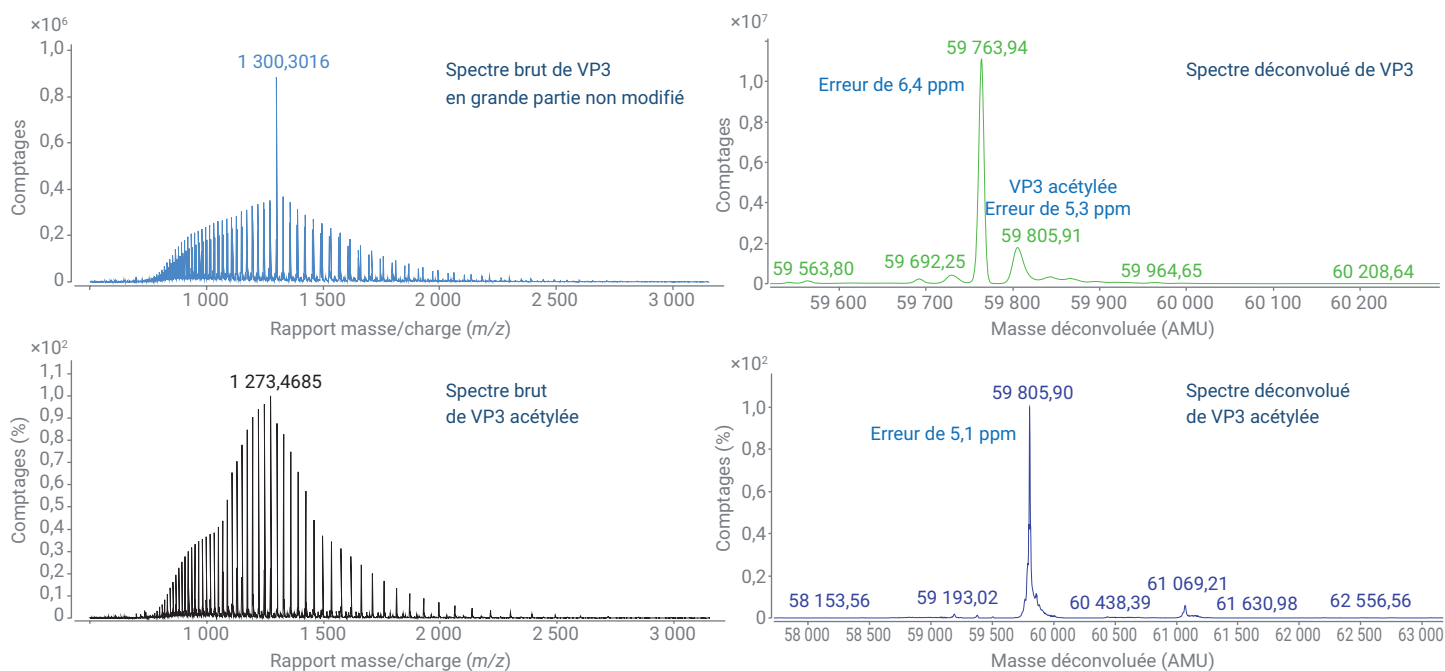


Figure 4. Spectres bruts et déconvolués de la protéine de capsid VP3. Les formes non modifiée et acétylée sont en majeure partie chromatographiquement séparées, avec une excellente précision en masse pour chaque protéoforme.

Cartographie peptidique sur le LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT

La cartographie peptidique des biothérapies est une méthode essentielle à la détermination de la séquence et des MPT des protéines, comme exigé par l'ICH, la FDA et d'autres organismes de réglementation. Bien que la thérapie génique par l'intermédiaire d'AAV ne soit encore qu'un domaine émergent, on peut imaginer que la cartographie peptidique des protéines de capsid sera exigée à l'avenir. Depuis janvier 2020, la FDA recommande de fournir des informations sur les structures primaire et secondaire comprenant les MPT pour les substances médicamenteuses utilisées dans la thérapie génique humaine. La fonctionnalité MS/MS itérative du LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT exclut les peptides de toutes les analyses précédentes pour l'isolement et la fragmentation, permettant ainsi la sélection et la détection des peptides peu abondants. De plus, MassHunter BioConfirm 10.0 permet de sélectionner plusieurs analyses pour obtenir une couverture totale de la séquence. Cette fonctionnalité est utile pour la combinaison des résultats d'analyses par MS/MS itératives, ainsi que pour l'utilisation de plusieurs enzymes.

La détermination de la nature des MPT, telles que l'oxydation et la déamidation, est essentielle à l'étude de la stabilité des protéines. Pour une meilleure fiabilité de la cartographie peptidique, tous les peptides identifiés présentaient une erreur inférieure à 10 ppm et au moins un spectre de MS/MS pour confirmer la séquence peptidique et localiser les MPT. En outre, le taux de fausses découvertes était fixé à 1 %. La séquence d'AAV8 comporte plusieurs régions dans lesquelles les résidus lysine et arginine sont fréquents, compliquant l'obtention de la séquence complète à l'aide de la seule trypsine. Par conséquent, rAsp-N a été utilisée pour compléter la couverture de la séquence.

La plus grande protéine, VP1, présentait une couverture de séquence totale de 97,7 %, comme indiqué dans la figure 5. Les lignes continues représentent l'identification du peptide par MS/MS. Les lignes bleues et vertes proviennent de deux analyses itératives de la digestion trypsique, tandis que les lignes noires et rouges proviennent de deux analyses itératives de la digestion par rAsp-N. Les données de MS/MS confirment la phosphorylation spécifique au site, comme le montre la figure 6. Les annotations en rouge soulignent les fragments peptidiques contenant une sérine phosphorylée. D'autres MPT courantes telles que

la déamidation de l'asparagine et l'oxydation de la méthionine sont présentes, mais en faible abondance, comme prévu. Des exemples de ces modifications peu abondantes sont illustrés dans la figure 7 avec la fonctionnalité de quantification relative dans BioConfirm 10.0. VP2 et VP3 avaient une couverture de séquence de respectivement 98,5 et 100,0 %. Bien que des publications aient rapporté une N-glycosylation dans AAV8, aucune N-glycosylation n'a été détectée. Cette divergence peut être due à des différences dans les systèmes d'expression du vecteur.

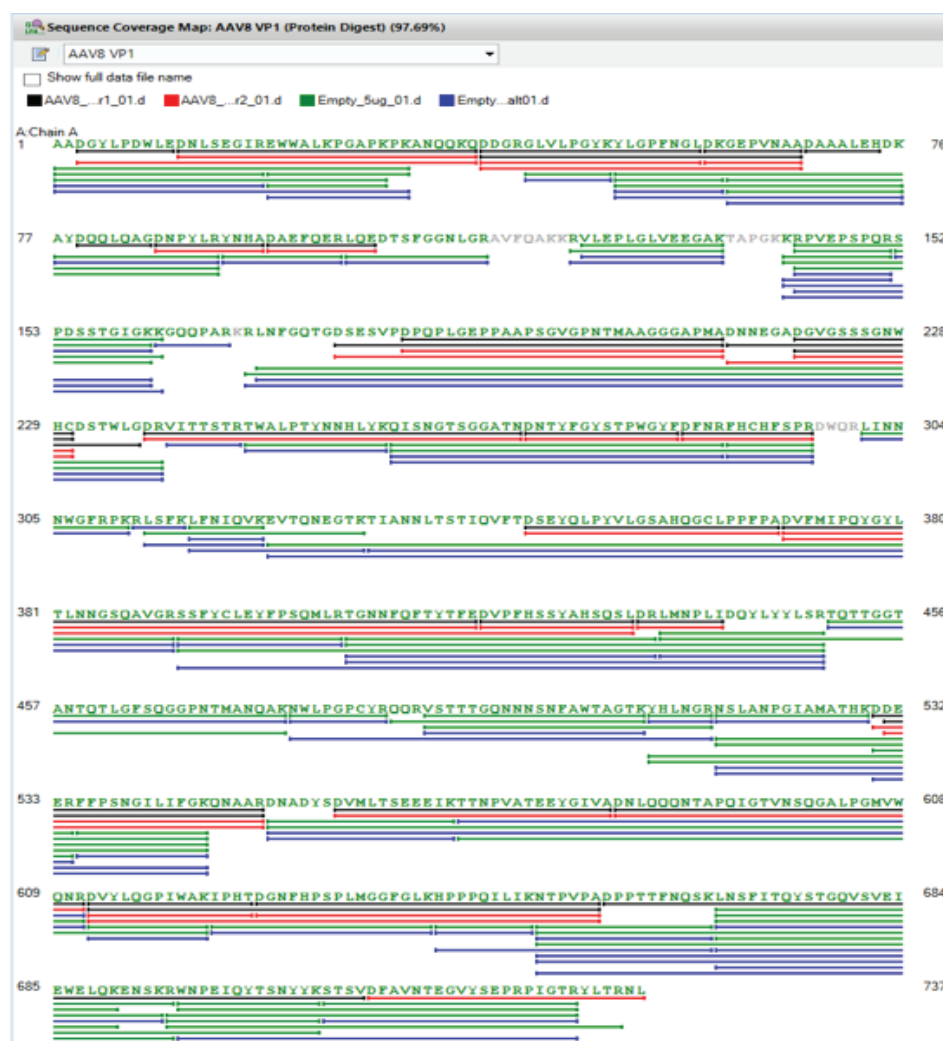


Figure 5. Capture d'écran d'Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 présentant la couverture de séquence de VP1 avec la MS/MS itérative et l'utilisation de trypsine et de rAsp-N comme enzymes complémentaires. Cette protéine présente une couverture de séquence de 97,7 %.

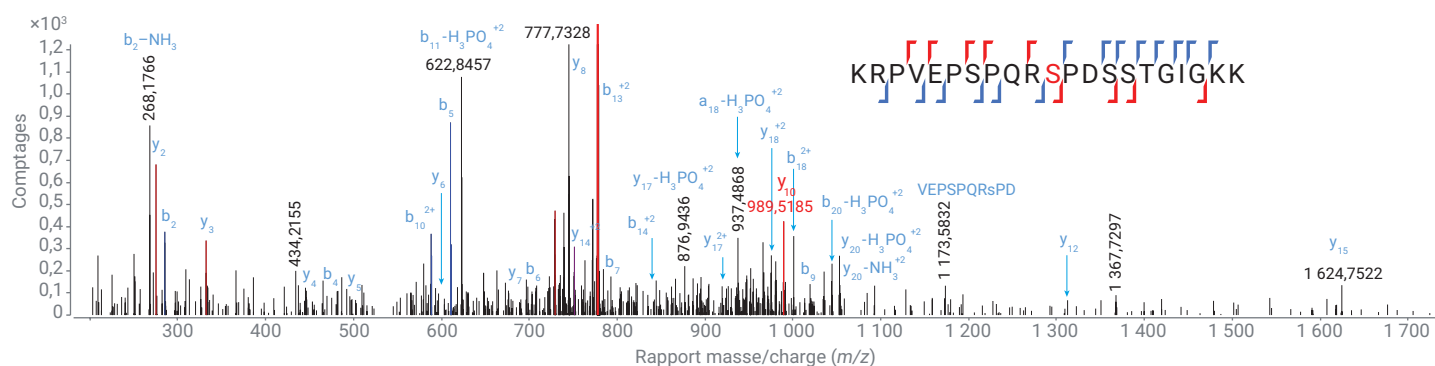


Figure 6. Exemple de phosphorylation spécifique au site avec confirmation par MS/MS. Le peptide annoté présente des annotations en rouge lorsqu'il contient un résidu sérine phosphorylé.

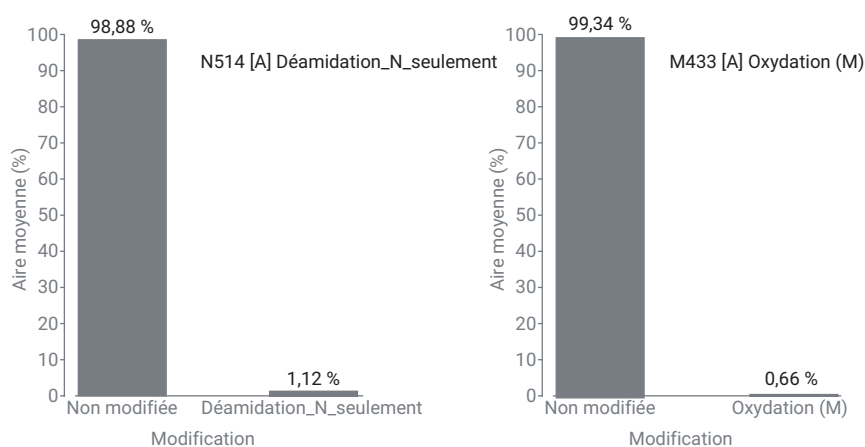


Figure 7. Exemples de MPT courantes dans les protéines : oxydation de la méthionine et déamidation de l'asparagine. Comme prévu, les deux peptides ne sont que légèrement modifiés.

Conclusion

L'utilisation des particules d'AAV comme véhicules pour la thérapie génique s'est avérée très prometteuse, rendant essentielle la caractérisation des CQA des protéines de capsid dans le processus d'approbation des médicaments. Cette note d'application présente une méthode couvrant toutes les étapes de la préparation d'échantillons au traitement des données pour déterminer la masse exacte des protéines de capsid et identifier les MPT. Un LC 1290 Infinity II couplé à un LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT et MassHunter BioConfirm 10.0 offre une solution fiable et exacte pour l'analyse des protéines de capsid d'AAV.

Références

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.

Remerciements

Agilent remercie Dominique Garceau, Tristan Cano, Caitlin Jaeger et William Hermans de Lake Pharma de leur implication dans la production d'échantillons. Nous remercions également Brian Liao et Ravindra Gudihal d'Agilent Singapore de nous avoir fait profiter de leurs idées.

www.agilent.com

Pour la recherche uniquement.
Ne pas utiliser à des fins de diagnostic.

DE.4113541667

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
Imprimé aux États-Unis, le 23 juillet 2020
5994-1980FR