

Caratterizzazione di particelle di vettori virali con il sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio Agilent

Autori

Wendi A. Hale e
Christopher M. Colangelo
Agilent Technologies, Inc.,
Lexington, MA, Stati Uniti

Roy Hegedus e
Norman Garceau
Lake Pharma,
Worcester, MA, Stati Uniti

Abstract

La presente nota applicativa descrive un flusso di lavoro per la caratterizzazione e la determinazione degli attributi critici per la qualità (CQA) di virus adeno-associati (AAV) intatti, unitamente all'identificazione di modificazioni post-traduzionali (MPT) delle proteine del capsido. Il flusso di lavoro include un sistema LC Agilent 1290 Infinity II abbinato a un sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio Agilent, e il software Agilent MassHunter BioConfirm versione 10.0 per l'analisi dei dati.

Introduzione

Gli AAV sono i vettori virali principali per la terapia genica; sono utilizzati con successo nel trattamento delle malattie retiniche ereditarie e dell'atrofia muscolare spinale. I singoli AAV sono costituiti da un guscio proteico icosaedrico che racchiude un genoma a singolo filamento di circa 4,7 kb. Gli AAV intatti agiscono come mezzi di protezione e trasferimento degli agenti terapeutici a base di oligonucleotidi. Sono noti 13 sierotipi che trasducono tipi cellulari differenti e aumentano così la scelta per gli agenti terapeutici. Gli AAV continuano ad essere oggetto di studio come possibili piattaforme di trasferimento di terapie; diventa quindi essenziale garantire che tutti gli CQA del prodotto terapeutico siano mantenuti. La caratterizzazione delle proteine dei capsidi virali comporta numerose sfide. Il guscio proteico è costituito da tre proteine capsidiche, VP1, VP2 e VP3, che si assemblano in una struttura di 3,9 megadalton in un rapporto di 1:1:10 con 60 capsidi per virione. Oltre ai bassi rapporti molari tra VP1 e VP2, tutte e tre le proteine presentano una sovrapposizione delle sequenze al C-terminale. Tradizionalmente, l'SDS-PAGE è usato per stabilire il peso molecolare delle proteine capsidiche, tuttavia questa tecnica fornisce valori approssimati e potrebbe non essere in grado di distinguere tra i vari sierotipi. La spettrometria di massa (MS) è un metodo promettente per ovviare a queste difficoltà e determinare gli CQA delle proteine capsidiche. La presente nota applicativa descrive un flusso di lavoro per l'analisi di proteine intatte e la mappatura peptidica, compresa l'identificazione di MPT delle proteine capsidiche virali. Gli strumenti utilizzati per questo flusso di lavoro includono un sistema LC Agilent 1290 Infinity II abbinato al sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio, e il software MassHunter BioConfirm versione 10.0 utilizzato per l'analisi dei dati.

Condizioni sperimentali

Strumentazione

Sistema LC Agilent 1290 Infinity II composto da:

- Pompa High Speed Agilent 1290 Infinity II (G7120A)
- Multicampionatore Agilent 1290 Infinity II (G7167B) dotato di loop da 20 µL per l'analisi di proteine intatte, loop da 40 µL per l'analisi di mappatura peptidica
- Comparto colonna termostato Agilent 1290 Infinity II (G7116B)
- Sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio Agilent

Materiali

AAV8 è stato prodotto da Lake Pharma (Worcester, MA, Stati Uniti). I filtri di cutoff di pesi molecolari e (tris(2-carbossietil)fosfina) (TCEP) sono stati acquistati da Millipore Sigma. Tripsina e rAsp-N sono stati acquistati da Promega.

Preparazione del campione

Per l'analisi di proteine intatte, gli AAV sono stati sottoposti a tre passaggi di sostituzione del tampone a 10.000 g con un filtro di pesi molecolari pari a 10 kDa. Il tampone conteneva TCEP 5 mM, 80% H₂O e 20% acetonitrile con acido formico 0,1% (v/v). Una volta raccolto, il campione è stato incubato a temperatura ambiente prima dell'iniezione. Per la mappatura peptidica, gli AAV sono stati sottoposti a denaturazione, riduzione, alchilazione e digestione. In questo esperimento sono stati utilizzati gli enzimi tripsina e rAsp-N.

Analisi LC/MS

L'analisi LC/MS è stata eseguita su un sistema LC 1290 Infinity II abbinato a un sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio dotato di sorgente Dual Agilent Jet Stream. Per l'analisi di proteine intatte è stato utilizzato il software della workstation Agilent MassHunter Acquisition (B.09.00) dotato della funzione SWARM autotune per grandi molecole. Lo strumento è stato ulteriormente calibrato e utilizzato nella modalità di massa standard. La funzione iterativa MS/MS è stata usata per il

flusso di lavoro di mappatura peptidica.

Tabella 1. Parametri di cromatografia liquida per l'analisi di proteine intatte.

Parametro	Valore
Colonna	ZORBAX RRHD Agilent 300-difenile, 2,1× 150 mm, 1,8 µm
Fase mobile A	Acqua, acido formico 0,1%
Fase mobile B	Acetonitrile, acido formico 0,1%
Flusso	0,4 mL/min
Volume di iniezione	20 µL
Gradiente	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
Tempo post-analisi	0 minuti
Temperatura della colonna	60 °C.

Tabella 2. Parametri del sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio Agilent per l'analisi di proteine intatte.

Parametro	Valore
Sorgente	Dual Agilent Jet Stream
Temperatura del gas	325 °C
Flusso del gas	13 L/min
Nebulizzatore	35 psig
Temperatura dello sheath gas	375 °C
Flusso dello sheath gas	12 L/min
VCap	5.000 V
Ugello	500 V
Fragmentor	180 V
Velocità di acquisizione	1 spettro/secondo
Massa di riferimento	922,0098

Tabella 3. Parametri di cromatografia liquida per l'analisi di mappatura peptidica.

Parametro	Valore
Colonna	AdvanceBio Peptide Mapping Agilent, 2,1× 150 mm
Fase mobile A	Acqua, acido formico 0,1%
Fase mobile B	Acetonitrile, acido formico 0,1%
Flusso	0,4 mL/min
Volume di iniezione	40 µL
Gradiente	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
Tempo post-analisi	5 minuti
Temperatura della colonna	60 °C.

Tabella 4. Parametri del sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio Agilent per l'analisi di mappatura peptidica.

Parametro	Valore
Sorgente	Dual Agilent Jet Stream
Temperatura del gas	325 °C
Flusso del gas	13 L/min
Nebulizzatore	35 psig
Temperatura dello sheath gas	275 °C
Flusso dello sheath gas	12 L/min
VCap	4.000 V
Ugello	0 V
Fragmentor	170 V
Velocità di acquisizione	5/3 spettri/secondo per MS e MS/MS
Masse di riferimento	121,0509, 922,0098

Elaborazione dei dati

I dati MS sono stati elaborati con il software MassHunter BioConfirm versione 10.0.

Risultati e discussione

Analisi di proteine intatte con il sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio

L'SDS-PAGE è un metodo rapido e semplice per verificare il peso molecolare delle proteine capsidiche degli AAV, tuttavia non è sufficientemente specifico per distinguere tra le diverse proteoforme, come forme acetilate o fosforilate rispetto a forme non modificate. Q-TOF MS ad alta risoluzione

offre un'ampia sensibilità, risolve le MPT e determina la massa molecolare intatta accurata delle proteine. Ulteriore aiuto viene fornito dalla funzione Swarm autotune per grandi molecole del sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio, che garantisce eccellente sensibilità per le proteine capsidiche in quanto ne migliora la trasmissione in tutto lo spettrometro di massa. In aggiunta, grazie al vuoto ultra basso del time-of-flight (e^{-8} torr) è possibile ottenere una definizione degli spettri migliore grazie all'aumento del cammino libero medio delle molecole proteiche.

La preparazione del campione prima dell'analisi LC/MS è fondamentale per ottenere spettri di massa di alta qualità:

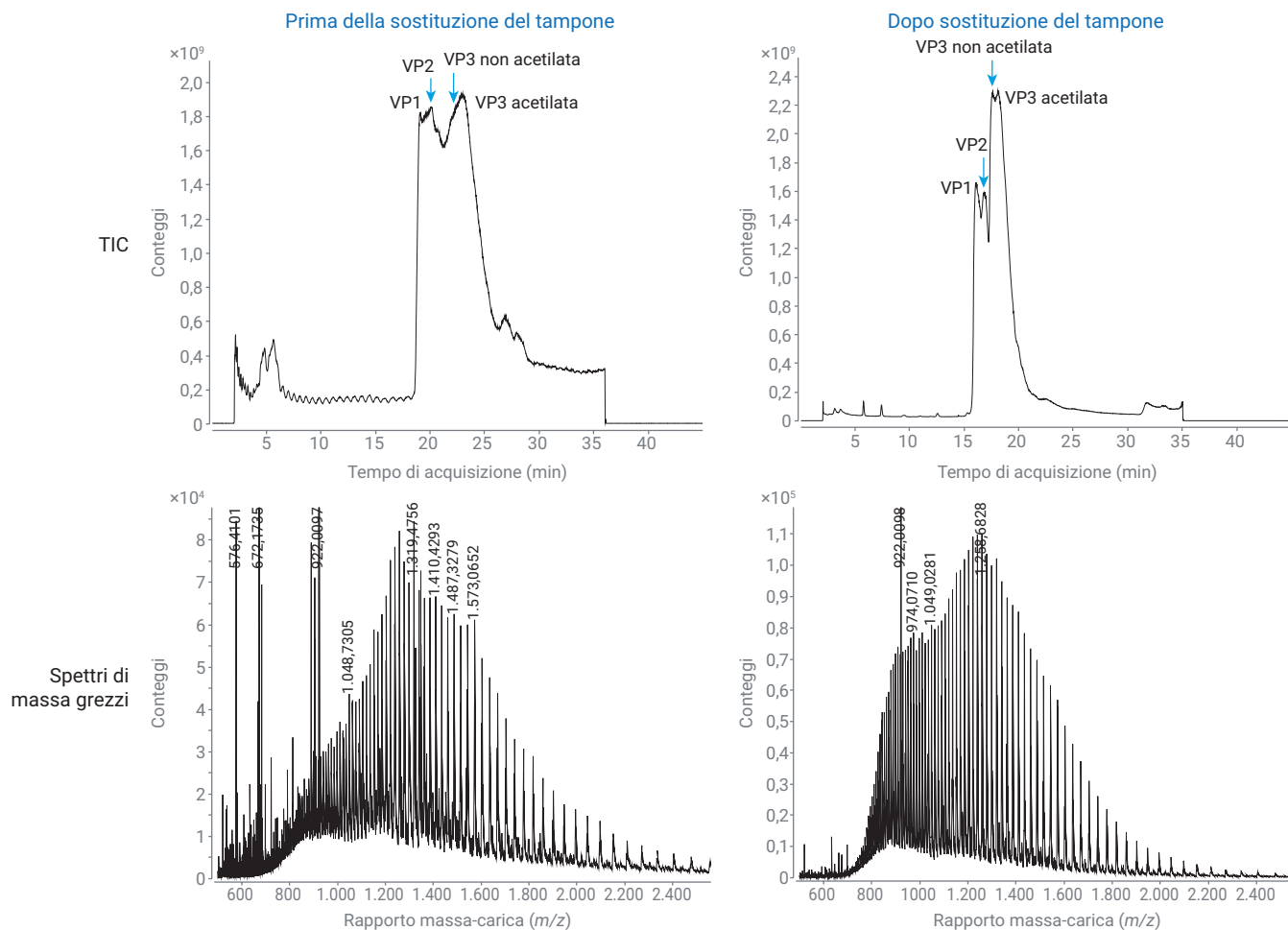


Figura 1. TIC delle proteine capsidiche di AAV e spettri grezzi di VP1 con e senza preparazione del campione.

tales importanza viene ulteriormente evidenziata dal nostro studio sugli AAV. La Figura 1 mostra i cromatogrammi ionici totali (TIC) e gli spettri di massa grezzi delle proteine capsidiche con e senza preparazione del campione. I tamponi della soluzione originale introducono contaminanti nello spettrometro di massa. In aggiunta, la separazione delle proteine capsidiche è migliorata dopo la sostituzione del tampone. I dati grezzi mostrano che anche l'abbondanza della proteina è aumentata di 1,5 volte e che la definizione dello spettro è migliorata di molto. I dati deconvolti non sono mostrati, ma la definizione degli spettri è migliorata grazie all'assenza di addotti con il sodio e il potassio, rendendo così molto più semplice l'interpretazione dei dati. In aggiunta, la preparazione del campione prima dell'analisi LC/MS aumenterà la robustezza del flusso di lavoro, consentendo periodi più lunghi

tra una manutenzione degli strumenti e l'altra.

La Figura 2 presenta gli spettri grezzi e deconvolti di VP1. Con questo flusso di lavoro siamo in grado di rilevare su VP1 tre punti di fosforilazione, con un errore inferiore a 10 ppm. I dati in massa accurata hanno confermato che in VP1 non è presente il residuo aminoacidico N-terminale e che la nuova estremità N-terminale è acetilata. Attualmente sono pochissimi i report di analisi MPT sulle proteine capsidiche degli AAV, compresa la fosforilazione su VP1. VP2 è cromatograficamente separata da VP1. Mentre la spettrometria di massa è in grado di separare queste proteine in base alla massa, grazie alla separazione cromatografica è possibile ridurre la soppressione ionica di queste due proteine a bassa concentrazione. I dati in massa accurata confermano la presenza di almeno due punti di fosforilazione su VP2 con la possibilità di un terzo

in Figura 3. La Figura 4 mostra che la forma non modificata di VP3 è quasi del tutto cromatograficamente separata dalla forma acetilata di VP3. In aggiunta, gli spettri deconvolti determinano che entrambe le forme di VP3 acetilata e non modificata sono presenti con elevata accuratezza di massa. L'acetilazione N-terminale è una MPT comune implicata nella stabilità e nel ripiegamento delle proteine, oltre che nelle interazioni con altre proteine. Mentre VP1 era pienamente acetilata, l'acetilazione di VP3 era del 70% circa. Nonostante al momento i motivi della parziale acetilazione di VP3 non siano chiari, si può ipotizzare che tale modificazione potrebbe avere un effetto sull'intera struttura del guscio capsidico del virus. La definizione degli spettri fornita dal migliore vuoto nel sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio abbinato alla funzione SWARM autotune per grandi molecole mostra tutte e tre

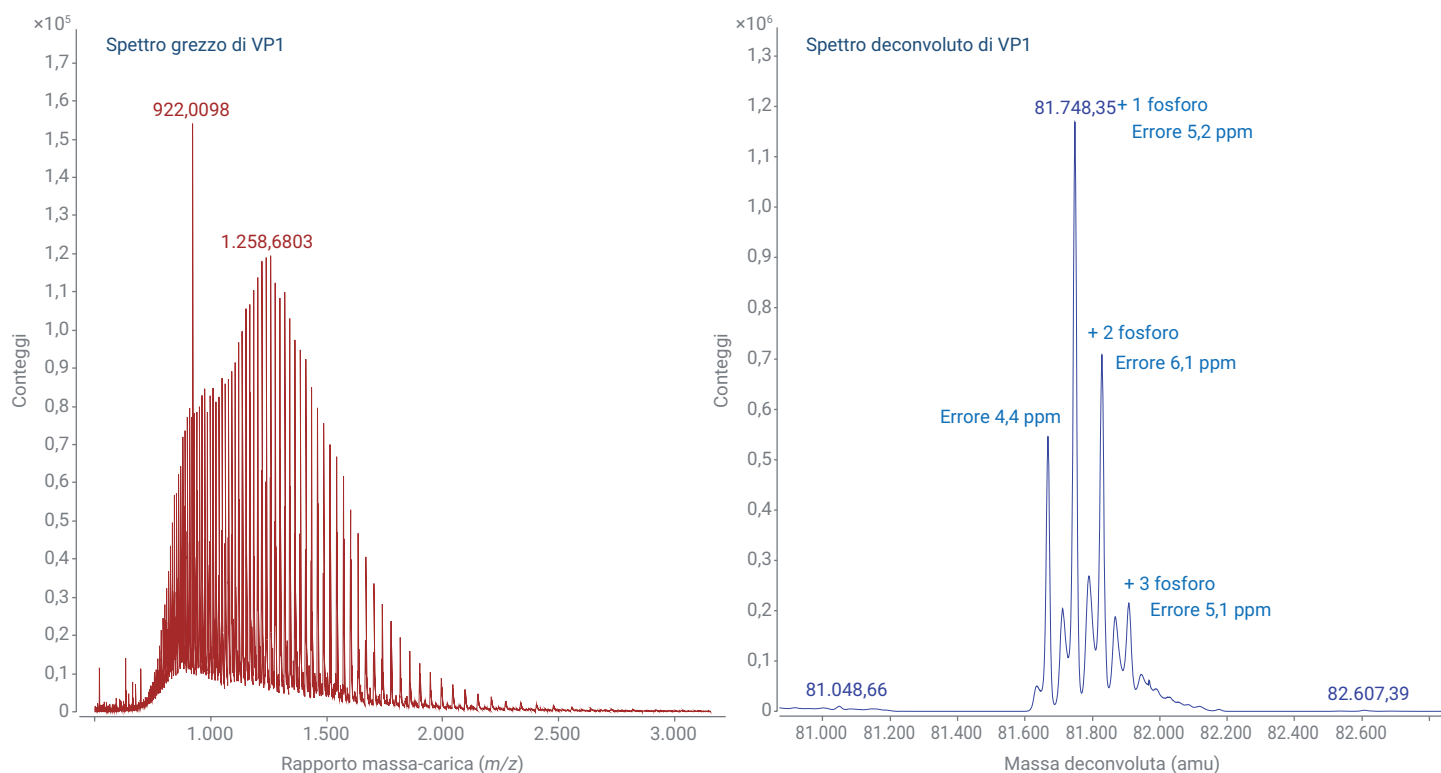


Figura 2. Spettri grezzi e deconvolti della proteina capsidica VP1. La forma nativa e la forma fosforilata della proteina presentano eccellente accuratezza di massa.

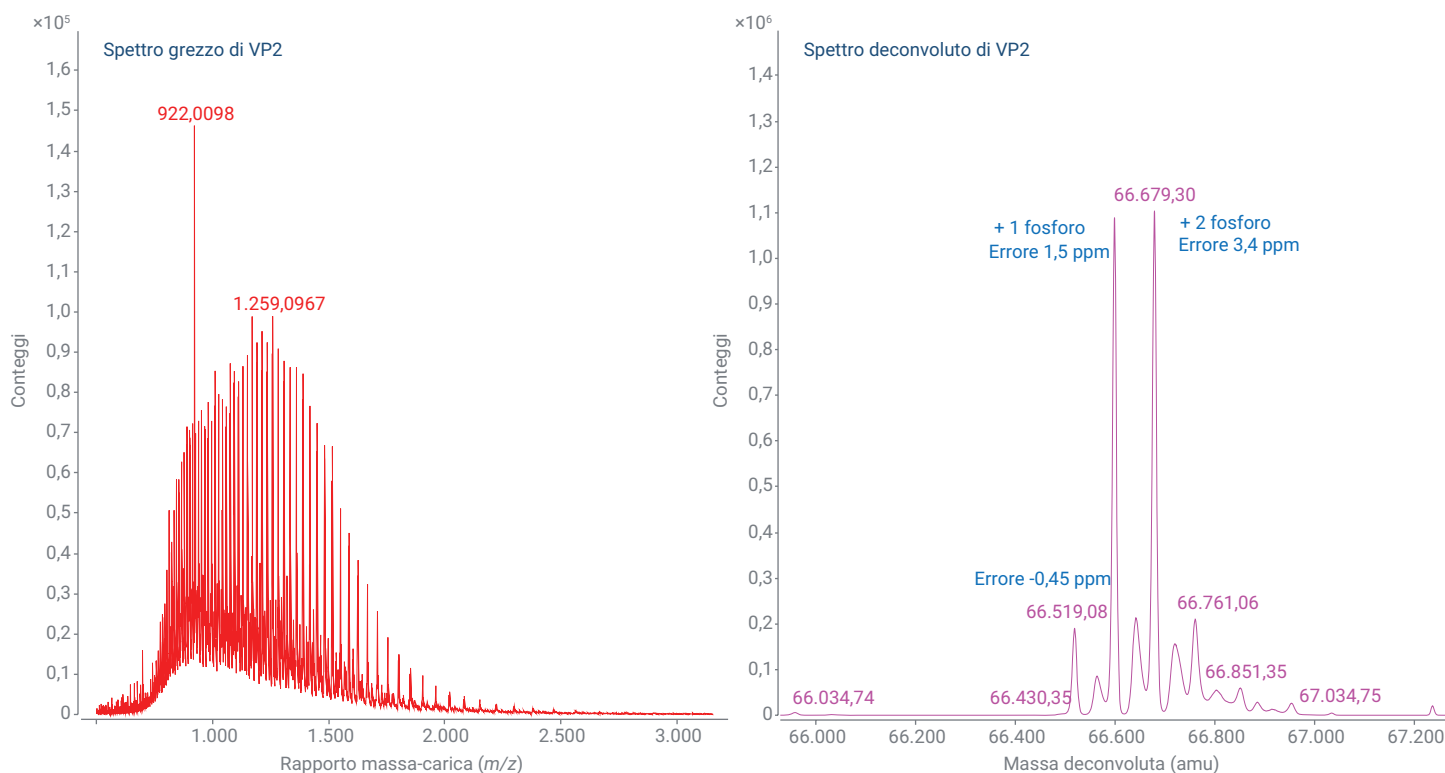


Figura 3. Spettri grezzi e deconvolti della proteina capsidica VP2. La forma nativa e la forma fosforilata della proteina presentano eccellente accuratezza di massa, tutte con errori inferiori a 5 ppm.

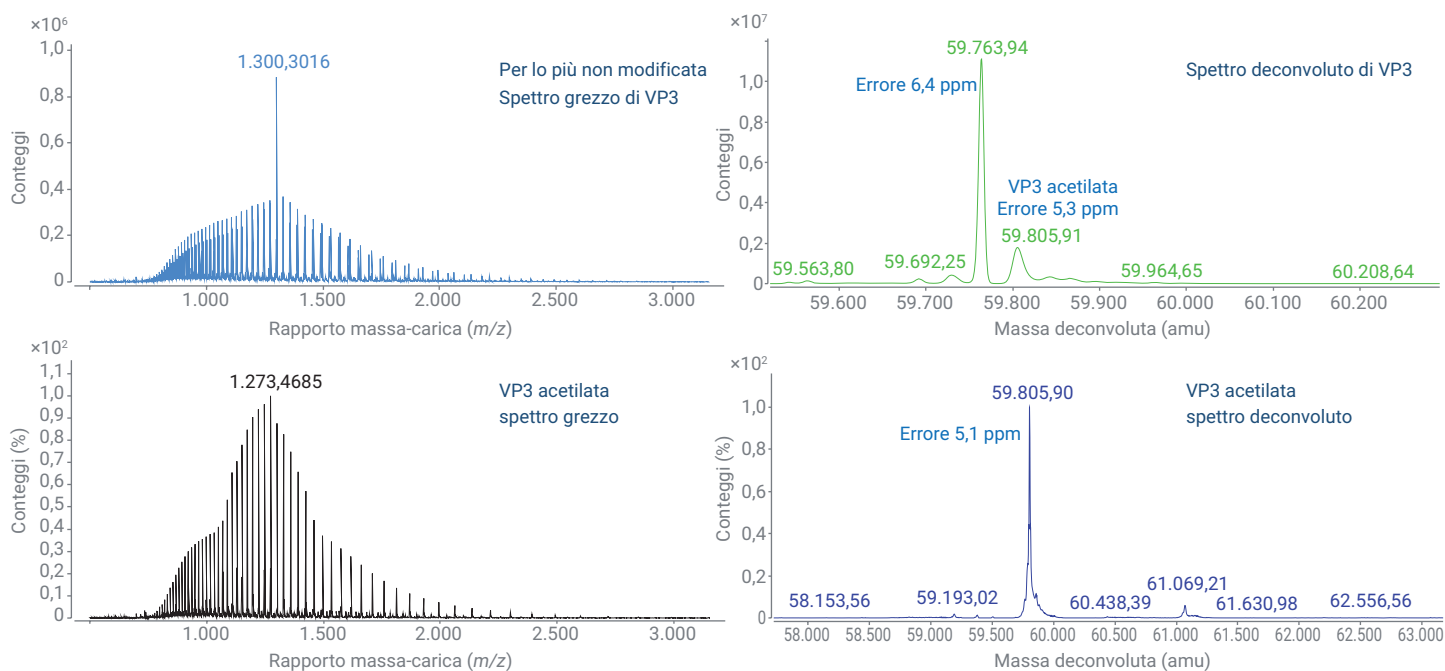


Figura 4. Spettri grezzi e deconvolti della proteina capsidica VP3. Le forme non modificata e acetilata sono per lo più separate cromatograficamente, con eccellente accuratezza di massa per ciascuna proteoforma.

le proteine capsidiche virali e le loro MPT con elevata accuratezza di massa, a livelli inferiori a 10 ppm per tutte le proteoforme.

Mappatura peptidica con il sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio

La mappatura peptidica dei farmaci bioterapeutici è un metodo indispensabile per determinare la sequenza e le MPT delle proteine, richieste da ICH, FDA e altri enti regolatori. Nonostante la terapia genica tramite AAV rappresenti un settore emergente, è ragionevole pensare alla mappatura peptidica delle proteine capsidiche come un futuro requisito. Dal gennaio 2020, la FDA raccomanda di fornire informazioni sulla struttura primaria e secondaria, incluse le MPT, per le sostanze farmaceutiche utilizzate nella terapia genica umana. La funzione iterativa MS/MS del sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio esclude i peptidi derivati da tutte le analisi precedenti per isolamento e frammentazione, consentendo la selezione e il rilevamento di peptidi poco abbondanti. In aggiunta, il software Agilent MassHunter BioConfirm versione 10.0 permette di selezionare analisi multiple per una copertura della sequenza completa. Questa funzione è utile per combinare risultati di analisi MS/MS iterative e quando si desidera utilizzare più di un enzima.

L'identificazione delle MPT, quali ossidazione e deamidazione, è fondamentale nel determinare la stabilità delle proteine. Per essere certi della mappatura peptidica, tutti i peptidi identificati avevano un errore inferiore a 10 ppm e almeno uno spettro MS/MS per confermare la sequenza del peptide e localizzare le MPT. In aggiunta, il tasso di false identificazioni è stato impostato a 1%. La sequenza di AAV8 presenta diverse regioni con residui ripetuti di lisina e arginina, il che rende difficile ottenere la piena sequenza con la sola tripsina. Di conseguenza, si è ricorso a rAsp-N per ottenere la copertura della sequenza completa.

La proteina più grande, VP1, presentava una copertura della sequenza totale del 97,7%, come mostrato in Figura 5. Le linee continue rappresentano l'identificazione del peptide con MS/MS. Le linee blu e verdi derivano da due analisi iterative del digerito triptico, mentre le linee nere e rosse da due analisi iterative del digerito con rAsp-N. I dati MS/MS confermano la fosforilazione sito-specifica come mostrato in Figura 6. Le annotazioni in rosso visualizzano i frammenti peptidici che contengono la serina fosforilata. Sono presenti altre MPT comuni,

come la deamidazione dell'asparagina e l'ossidazione della metionina, ma risultano meno abbondanti, come previsto. Nella Figura 7 sono mostrati esempi di queste modificazioni meno frequenti con le relative caratteristiche di quantificazione ottenute con BioConfirm 10.0. VP2 e VP3 presentavano una copertura della sequenza del 98,5 e 100,0%, rispettivamente. Nonostante esistano report di N-glicosilazione in AAV8, non è stata trovata alcuna N-glicosilazione. Tale discrepanza potrebbe essere dovuta a differenze nei sistemi di espressione dei vettori.

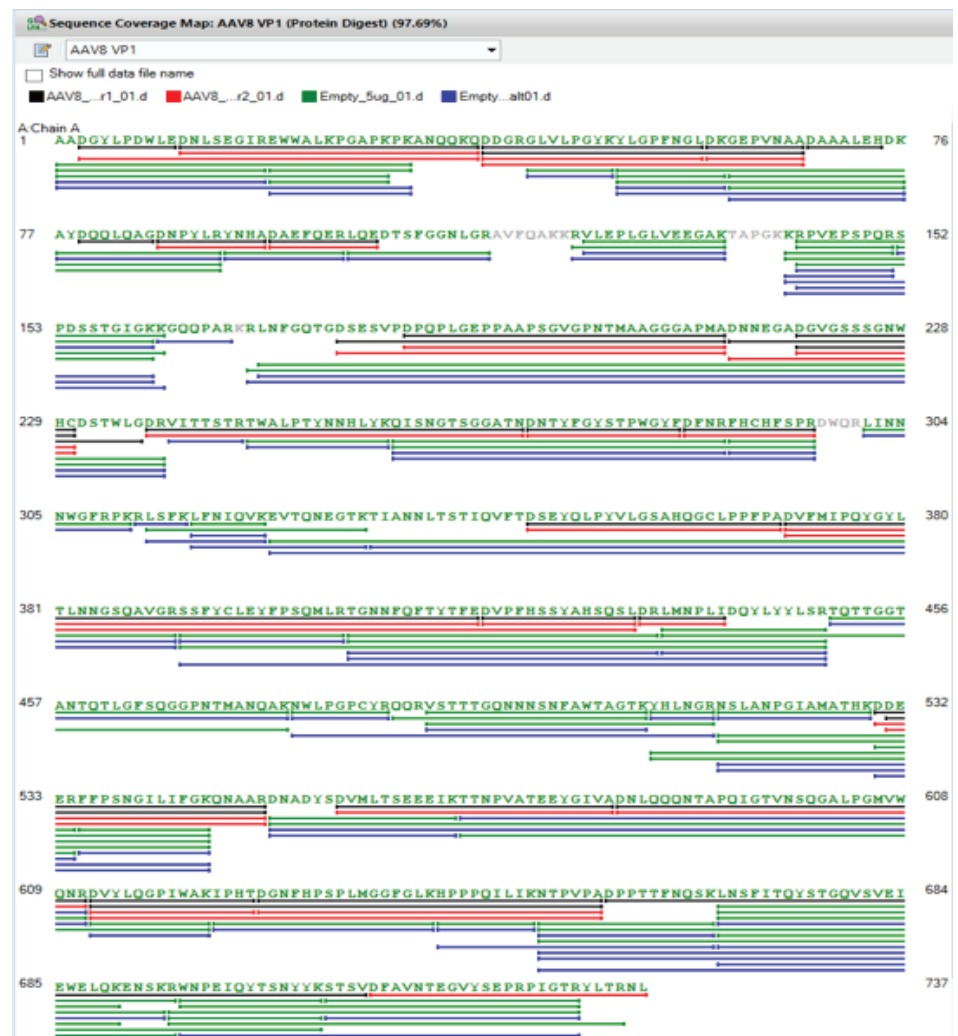


Figura 5. Screenshot del software Agilent MassHunter BioConfirm versione 10.0 che mostra la copertura della sequenza di VP1 con MS/MS iterativa e l'uso di tripsina e rAsp-N come enzimi complementari. Questa proteina presenta una copertura della sequenza del 97,7%.

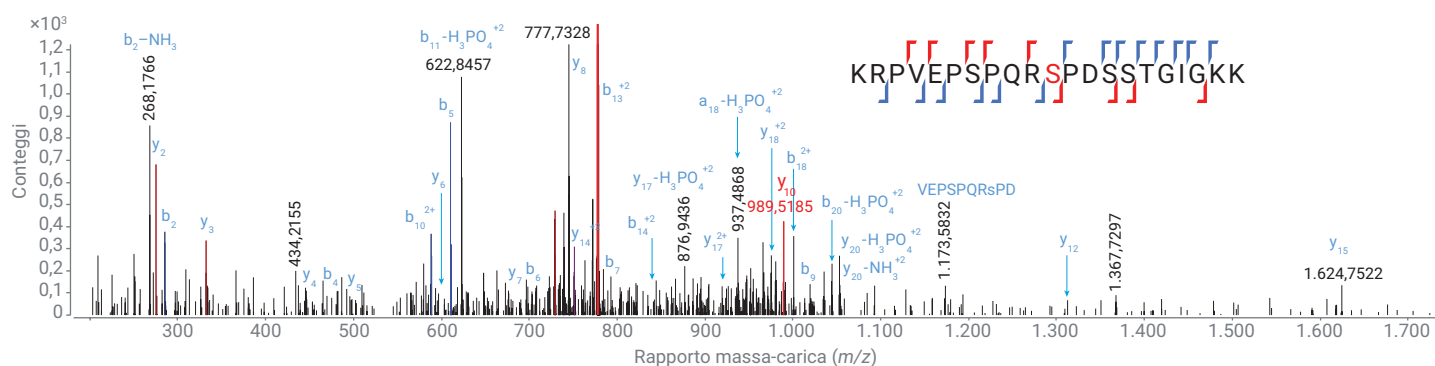


Figura 6. Esempio di fosforilazione sito-specifica con conferma MS/MS. Il peptide nell'annotazione è marcato in rosso nelle regioni con residui di serina fosforilati.

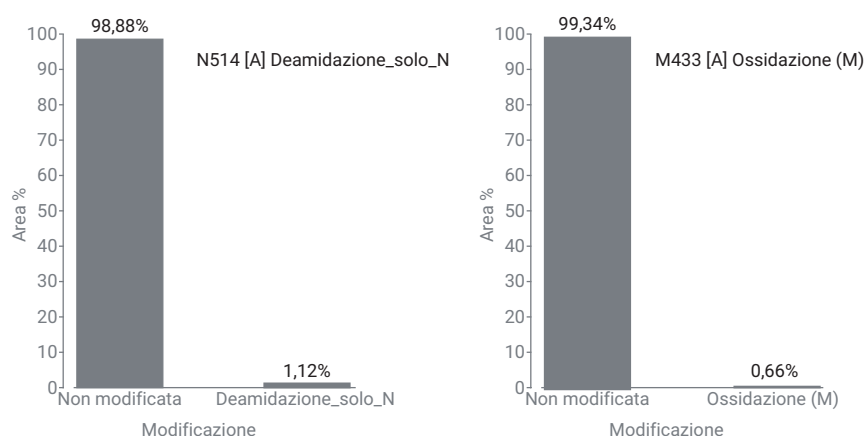


Figura 7. Esempi di MPT comuni nelle proteine: ossidazione della metionina e deamidazione dell'asparagina. Entrambi i peptidi sono minimamente modificati, come previsto.

Conclusione

L'uso delle particelle degli AAV come mezzi per la terapia genica si è dimostrato molto promettente, facendo della caratterizzazione degli CQA delle proteine capsidiche un aspetto essenziale nel processo di approvazione dei farmaci. Nella presente nota applicativa, mostriamo un flusso di lavoro dalla preparazione del campione fino all'analisi dei dati, che determina la massa accurata misurata delle proteine capsidiche e identifica le MPT. Il sistema LC 1290 Infinity II, abbinato al sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio e al software MassHunter BioConfirm versione 10.0, fornisce una soluzione affidabile e accurata per l'analisi delle proteine capsidiche degli AAV.

Bibliografia

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. Ufficio dei prodotti medici e del tabacco, Centro per la valutazione e la ricerca sui prodotti biologici. *Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)*. Silver Spring, MD. **2020**, 28–29.

Riconoscimenti

Agilent desidera ringraziare Dominique Garceau, Tristan Cano, Caitlin Jaeger e William Hermans di Lake Pharma per la loro collaborazione nella produzione dei campioni. Ulteriori ringraziamenti vanno a Brian Liao e Ravindra Gudihal di Agilent in Singapore per aver condiviso le proprie idee.

www.agilent.com

Solo per scopi di ricerca. Non utilizzabile per procedure diagnostiche.

DE.4113541667

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
Stampato negli Stati Uniti, 23 luglio 2020
5994-1980ITE