

# LC/MS-Analyse intakter Kapsidproteine von adeno- assoziierten Viren zur schnellen Bestätigung der Produktidentität

## Autor

Brian Liao  
Agilent Technologies, Inc.

## Einleitung

Bei den adeno-assoziierten Viren (AAV) handelt es sich um eine vielversprechende neue Klasse an Biotherapeutika, mit der eine Reihe seltener und schwer behandelbarer genetischer Krankheiten wie beispielsweise spinale Muskelatrophie und erbliche Netzhautdegeneration behandelt werden kann.<sup>1</sup> AAV sind große Molekülkomplexe, die aus einem Proteinkapsid und einer eingekapselten DNA bestehen, wobei für die Analyse beider Bestandteile jeweils eigene analytische Methoden erforderlich sind, um die Qualität und Sicherheit des Gesamtprodukts zu gewährleisten. AAV-Kapside bestehen aus drei verschiedenen Proteinen, meist mit VP1-3 bezeichnet, in einem stöchiometrischen Verhältnis von annähernd 1:1:10 und mit insgesamt 60 Proteinmolekülen pro Kapsid.<sup>2</sup>

Die US-amerikanische Food and Drug Administration empfiehlt, dass die viralen Kapside und die eingekapselte DNA aller AAV-Therapeutika vor der Freigabe eindeutig identifiziert werden, insbesondere dort, wo mehrere Serotypen oder veränderte Varianten hergestellt werden.<sup>3</sup> Bisher sind antikörperbasierte Methoden wie beispielsweise ELISA und Immunblotting die am häufigsten eingesetzten Methoden für die Analyse viraler Kapside. Diese Methoden haben verschiedene Nachteile: Die antikörperbasierten Methoden sind in der Durchführung mühsam und fehleranfällig und erfordern darüber hinaus, dass für jedes zu untersuchende AAV hochspezifische Antikörper erzeugt werden. Dies ist eine Herausforderung, da AAV-Kapside aus unterschiedlichen Produkten ein hohes Maß an Homologie aufweisen können. Die AAV-Serotypen 1 und 6 unterscheiden sich beispielsweise nur um sechs Aminosäuren (99 % Homologie). Dies macht es schwierig, sie durch die Bindung an Antikörper zu unterscheiden.<sup>4</sup>

Grundsätzlich bietet die LC/MS die ideale Kombination von Geschwindigkeit und Spezifität für die Analyse viraler Kapsidproteine, da die direkte Messung der Proteinmassen die Erzeugung von Antikörpern für jeden AAV-Typ überflüssig macht. Bisherige Ansätze hierzu haben jedoch unter der relativ schlechten chromatographischen Trennung der Virus-Kapsidproteine gelitten.<sup>5</sup> Dies stellt ein Problem dar, da Koelution die Signalintensität und die Massengenauigkeit beeinträchtigen kann und außerdem die genaue Quantifizierung der Kapsidstöchiometrie ausschließt, die aber ein wichtiges Bestimmungsmerkmal der AAV-Infektiosität ist.<sup>6</sup>

Diese Application Note zeigt eine optimierte LC/FLD-MS-Methode für die schnelle Analyse von AAV-Kapsidproteinen zur Bestimmung der primären Sequenz von sieben verschiedenen Serotypen. Diese Methode hat geringe Anforderungen an die Probenvorbereitung und ist gegenüber hohen Salzgehalten sowie dem häufig zugegebenen nicht ionischen Detergens Pluronic F-68 robust.

## Experimentelles

### AAV-Proben

Die AAV-Serotypen 2, 7, 9, 7m8, DJ, rh10 und Anc80 wurden von Vector Core @ GIS (A\*STAR, Singapur) bezogen. Die AAV-Proben wurden in HEK-293-Zellen durch dreifache Transfektion exprimiert und mittels analytischer Ultrazentrifugation aufgereinigt. Die Proben wurden mit einer Konzentration von  $\sim 1,2 \times 10^{10}$  Kopien viralen Genoms/ $\mu\text{l}$  in phosphatgepufferter Salzlösung, die 0,001 % Pluronic F-68 enthielt, zur Verfügung gestellt und wie erhalten ohne Pufferaustausch verwendet.

### Probenvorbereitung

Ein Denaturierungspuffer, der 12 M Guanidin-HCl + 40 mM DTT in 200 mM Ammoniumbicarbonat (pH  $\sim 8,0$ ) enthielt, wurde für jede Analyse frisch hergestellt. Der Denaturierungspuffer wurde in einem Verhältnis von 1:3 zu den AAV-Proben zugegeben, sodass eine Endkonzentration von 3 M Guanidin-HCl erreicht wurde. Die Proben wurden dann 15 Minuten lang auf 70 °C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung zu gewährleisten. Pro Analyse wurden  $1,5 \times 10^{11}$  Kopien viralen Genoms injiziert.

### Analyse des intakten Kapsidproteins mittels LC/FLD-MS

Die Proben wurden mit den folgenden Geräten analysiert:

- Agilent 1290 Infinity II LC-System, bestehend aus folgenden Komponenten:
  - Agilent 1290 Infinity II Hochgeschwindigkeitspumpe (G7120A)
  - Agilent 1290 Infinity II Mehrfachprobengeber (G7167B)
  - Agilent 1290 Infinity II Thermostat für mehrere Säulen (G7116B)

- Agilent 1260 Infinity Fluoreszenzdetektor (G1321B) mit 8- $\mu\text{l}$ -Flusszelle
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

Für die Trennung wurden die folgenden Säulen verwendet: Agilent ZORBAX RRHD 300StableBond C18 (SB-C18) und SB-Diphenyl mit den Säulenabmessungen 2,1 x 100 mm, 1,8  $\mu\text{m}$  (Bestellnummer 858750-902 bzw. 858750-944). Eine ZORBAX RRHD 300Å SB-C3-Säule (Bestellnummer 858750-909) wurde auch für die Methodenentwicklung verwendet, aber nicht für die optimierte Methode.

Es wurde eine mobile Phase mit hoher Elutionsstärke ausgewählt, die 0,1 % TFA + 0,1 % Ameisensäure in deionisiertem Wasser (mobile Phase A) und 90 % Isopropanol + 9,8 % Wasser + 0,1 % TFA + 0,1 % Ameisensäure (mobile Phase B) enthielt. In Verbindung mit erhöhten Temperaturen haben ähnliche Bedingungen der mobilen Phase auf ZORBAX StableBond-Säulen für die Analyse monoklonaler Antikörper eine bessere Trennleistung erzielt.<sup>7</sup>



**Abbildung 1:** In den Experimenten für diese Application Note verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Für die Fluoreszenzdetektion wurde eine 8-µl-Durchflusszelle verwendet. Die Detektion erfolgte bei einer einzigen Anregungswellenlänge (280 nm) und mehreren Emissionswellenlängen (315, 330, 345 und 360 nm), da die Emissionsspektren je nach Anzahl der aromatischen Reste und dem Ausmaß der Lösemittelexposition eine unterschiedliche Lage des lokalen Maximums aufweisen können. Die Emission bei 360 nm war am intensivsten und wurde daher für alle Analysen verwendet. Alle Datenanalysen wurden mit der Software Agilent BioConfirm 10.0 durchgeführt. Die Tabellen 1, 2 und 3 führen die Geräte und Softwareeinstellungen auf.

### Peptid-Mapping mittels LC/MS

10 µl Probe mit  $6,0 \times 10^{11}$  Kopien viralen Genoms des AAV 2 (~3,6 µg Protein) wurden in 30 µl 150 mM TRIS-HCl (pH 8) mit 760 mg/ml Guanidin-HCl + 3,8 mg/ml TCEP 60 Minuten lang bei 60 °C denaturiert und reduziert. Nach der Abkühlung der Probe auf Raumtemperatur wurde eine Alkylierung durchgeführt, indem 10 µl 133 mM Iodacetamid zugegeben wurden und die Probe 30 Minuten lang in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Probe wurde dann mit 210 µl TRIS-HCl verdünnt. Danach wurden 0,2 µg Trypsin mit Reinheitsgrad für die Sequenzierung von Promega (Bestellnummer V5117) zugegeben. Für den Verdau wurde die Probe 2 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Danach wurden weitere 0,2 µg Trypsin

**Tabelle 2:** Massenspektrometrie-Parameter für die Analyse der intakten Kapsidproteine.

| Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF-System |                                                                                      |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Quelle                                    | Agilent Dual Jet Stream                                                              |
| Gastemperatur                             | 350 °C                                                                               |
| Gasfluss                                  | 12 l/min                                                                             |
| Zerstäuber                                | 35 psig                                                                              |
| Sheathgas-Temperatur                      | 350 °C                                                                               |
| Sheathgas-Fluss                           | 11 l/min                                                                             |
| Vcap                                      | 4 kV                                                                                 |
| Nozzle Voltage                            | 2 kV                                                                                 |
| Fragmentor                                | 180 V                                                                                |
| Skimmer                                   | 65 V                                                                                 |
| Massenbereich                             | 900 bis 3200 <i>m/z</i>                                                              |
| Akquisitionsrate                          | 1 Spektrum/s                                                                         |
| Referenzmasse                             | 922,0098                                                                             |
| Datenerfassungsmodus                      | Positiv, Massenbereich bis 3200 <i>m/z</i> , erweiterter dynamischer Bereich (2 GHz) |

für den Verdau über Nacht bei 37 °C zugegeben. Am folgenden Tag wurde die Reaktion gestoppt, indem 30 µl 10 %ige Ameisensäure zugegeben wurden. Danach wurde eine C-18-Aufreinigung mit dem Agilent AssayMap Bravo-System (G5542A) durchgeführt.

Das Peptid-Mapping wurde auf einem 1290 Infinity II LC-System mit 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF durchgeführt. Eine AdvanceBio Peptide Mapping-Säule (Bestellnummer 653750-902) mit 2,1 x 150 mm, 2,7 µm wurde für die Trennung verwendet. Die Tabellen 4 und 5 führen die Geräteeinstellungen auf.

**Tabelle 3:** Einstellungen für die Dekonvolution der Spektren der intakten Kapsidproteine.

| Einstellungen der Software Agilent MassHunter BioConfirm B10.0 |                       |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Definierte Chromatogramme                                      | FLD                   |
| Integration bei Extraktion                                     | Ja                    |
| Anpassung der Verzögerungszeit                                 | 0,1 min (MS-Detektor) |
| Dekonvolution                                                  | Maximale Entropie     |
| <i>m/z</i> -Bereich für Dekonvolution                          | 1000 bis 3200         |
| Massenbereich für Dekonvolution                                | 55 bis 85 kDa         |
| Massenschrittweite                                             | 0,5 Da                |
| Für Dekonvolution subtrahierte Basislinie                      | 7,0                   |
| Toleranz für Übereinstimmung                                   | 32 ppm                |

**Tabelle 4:** Chromatographische Parameter für das Peptid-Mapping.

| Agilent 1290 Infinity II LC-System |                                                                                     |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Lösemittel A                       | 0,1 % Ameisensäure in deionisiertem Wasser                                          |
| Lösemittel B                       | 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril                                                   |
| Gradient                           | 0 bis 15 min, 5 bis 40 % B<br>15 bis 18 min, 40 bis 90 % B<br>18 bis 20 min, 90 % B |
| Säulentemperatur                   | 60 °C                                                                               |
| Flussrate                          | 0,4 ml/min                                                                          |
| Injektionsvolumen                  | 20 µl                                                                               |

**Tabelle 1:** Chromatographische Parameter für die Analyse der intakten Kapsidproteine.

| Agilent 1290 Infinity II LC-System |                                                                                           |                                                                                |                                                                                           |                                                                                |                                                                                           |                    |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Bedingung                          | Testmethode                                                                               | Optimierte Methode                                                             | Testmethode                                                                               | Optimierte Methode                                                             | Testmethode                                                                               | Optimierte Methode |
| Säule                              | Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond C18, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm (Best.-Nr. 858750-902)      |                                                                                | Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond Diphenyl, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm (Best.-Nr. 858750-944) |                                                                                | Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond C3, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm (Best.-Nr. 858750-909)       |                    |
| Lösemittel A                       | 0,1 % Ameisensäure + 0,1 % TFA in deionisiertem Wasser                                    | 0,1 % Ameisensäure + 0,1 % TFA in deionisiertem Wasser                         | 0,1 % Ameisensäure + 0,1 % TFA in deionisiertem Wasser                                    | 0,1 % Ameisensäure + 0,1 % TFA in deionisiertem Wasser                         | 0,1 % Ameisensäure + 0,1 % TFA in deionisiertem Wasser                                    | –                  |
| Lösemittel B                       | 80 % Isopropanol + 10 % ACN + 9,8 % deionisiertes Wasser + 0,1 % Ameisensäure + 0,1 % TFA | 90 % Isopropanol + 9,8 % deionisiertes Wasser + 0,1 % Ameisensäure + 0,1 % TFA | 80 % Isopropanol + 10 % ACN + 9,8 % deionisiertes Wasser + 0,1 % Ameisensäure + 0,1 % TFA | 90 % Isopropanol + 9,8 % deionisiertes Wasser + 0,1 % Ameisensäure + 0,1 % TFA | 80 % Isopropanol + 10 % ACN + 9,8 % deionisiertes Wasser + 0,1 % Ameisensäure + 0,1 % TFA | –                  |
| Gradient                           | 0 bis 2 min, 20 % B<br>42 min, 35 % B<br>42,5 min, 80 % B<br>45 min, 80 % B               | 0 bis 5 min, 28 % B<br>23 min, 32,5 % B<br>23,5 min, 80 % B<br>26 min, 80 % B  | 0 bis 2 min, 28 % B<br>42 min, 43 % B<br>42,5 min, 80 % B<br>45 min, 80 % B               | 0 bis 5 min, 33 % B<br>21 min, 37 % B<br>21,5 min, 80 % B<br>23 min, 80 % B    | 0 bis 2 min, 20 % B<br>42 min, 35 % B<br>42,5 min, 80 % B<br>45 min, 80 % B               | –                  |
| Säulentemperatur                   | 75 °C                                                                                     | 80 °C                                                                          | 75 °C                                                                                     | 80 °C                                                                          | 75 °C                                                                                     | –                  |
| Flussrate                          | 0,4 ml/min                                                                                |                                                                                |                                                                                           |                                                                                |                                                                                           |                    |
| Probenmenge                        | 1,5 x 10 <sup>11</sup> Kopien des viralen Genoms/Injektion                                |                                                                                |                                                                                           |                                                                                |                                                                                           |                    |

Ergebnisse und Diskussion

LC/MS-Methodenentwicklung

AAV-2 wurde zur Methodenentwicklung verwendet, da es sich hierbei um den am besten untersuchten Serotypen handelt. Die Sequenzen der Kapsidproteine VP1-3 sind in Abbildung 2 gezeigt. Alle Kapsidproteine werden von der gleichen DNA-Sequenz im Kapsidgen transkribiert, wobei das Spleißen der mRNA und das Überlesen bei der ribosomalen Ablesung zu drei Proteinen mit starker Homologie führt.<sup>6</sup> Die VP3-Sequenz ist in allen drei Proteinen enthalten, wobei VP1 und VP2 sich nur in ihren N-terminalen Sequenzen von VP3 unterscheiden.

Tabelle 5: Massenspektrometrie-Parameter für das Peptid-Mapping.

| Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF-System |                         |
|-------------------------------------------|-------------------------|
| Quelle                                    | Agilent Dual Jet Stream |
| Gastemperatur                             | 290 °C                  |
| Gasfluss                                  | 13 l/min                |
| Zerstäuber                                | 35 psig                 |
| Sheathgas-Temperatur                      | 275 °C                  |
| Sheathgas-Fluss                           | 12 l/min                |
| Vcap                                      | 4 kV                    |
| Nozzle Voltage                            | 2 kV                    |
| Fragmentor                                | 175 V                   |
| Skimmer                                   | 65 V                    |
| Massenbereich                             | 100 bis 1700 m/z        |
| Akquisitionsrate                          | 5 Spektren/s            |
| Auto-MS/MS-Bereich                        | 50 bis 1700 m/z         |
| Min. MS/MS-Akquisitionsrate               | 3 Spektren/s            |
| Isolationsbreite                          | Mittel (~ 4 m/z)        |

|                                                    |                                                             |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Vorläufer/Zyklus                                   | Top 10                                                      |
| Kollisionsenergie                                  | 3,6*(m/z)/100 – 4,8                                         |
| Schwellenwert für MS/MS                            | Ein;<br>3 Wiederholungen,<br>dann Ausschluss für<br>0,2 min |
| Abundanzbasierte Scangeschwindigkeit für Vorläufer | Ja                                                          |
| Ziel                                               | 25 000                                                      |
| MS/MS Accumulation Time Limit verwenden            | Ja                                                          |
| Reinheit                                           | 100 % Stringenz,<br>30 % Cutoff                             |
| Isotopenmodell                                     | Peptide                                                     |
| Vorläufersortierung                                | Nur nach Abundanz;<br>+ 2, + 3, > + 3                       |
| Referenzmasse                                      | 922,0098                                                    |
| Datenerfassungsmodus                               | Positiv,<br>Massenbereich bis<br>3200 m/z                   |

A:VP1 Monoisotopische Masse: 81 804,8749 Durchschnittliche Masse: 81 856 1324 Molekularformel: C3630H5483N1015O1127S15

1 N-term AADGYLPDWLEDTLSEGIQWNLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEFVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNFYLYKYNH 94  
95 ADAEFOERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKKRVLEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQOPARKRLNFGQTDGADSVDPDQPLGQPPAAPSGLG 198  
199 TNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQRLINNN 302  
303 WGFRLPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPOYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSCMLRTGN 406  
407 NTFSTYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLN 510  
511 GRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLI FGKQSGSEKTNVDIEKVMITDEEEI RTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDQVYLOG 614  
615 PIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTFPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGV 718  
719 YSEPRPIGTRYLTRNL C-term 734

B:VP2 Monoisotopische Masse: 66 447,1172 Durchschnittliche Masse: 66 488,9131 Molekularformel: C2938H4429N827O917S15

1 N-term APGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQOPARKRLNFGQTDGADSVDPDQPLGQPPAAPSGLG TNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCD 94  
95 TWMGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFRLPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL 198  
199 TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPOYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSCMLRTGNNTFTSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQ 302  
303 YLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLI FGK 406  
407 QGSEKTNVDIEKVMITDEEEI RTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDQVYLOGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILI 510  
511 KNTFPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL C-term 597

C:VP3 Monoisotopische Masse: 59 936,8685 Durchschnittliche Masse: 59 974,6971 Molekularformel: C2661H3984N740O824S14

1 N-term ATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQ 94  
95 RLINNNWGFRLPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPOYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP 198  
199 MLRTGNNTFTSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA 302  
303 TKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLI FGKQSGSEKTNVDIEKVMITDEEEI RTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDR 406  
407 DVYLOGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTFPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDF 510  
511 VDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL C-term 532

Abbildung 2: Primäre Aminosäuresequenz der AAV-2-Kapsidproteine. Wie in der Agilent MassHunter Sequenzmanager-Software gezeigt, unterscheiden sich VP1-3 nur in ihren Sequenzen am N-Terminus: Jedes Protein enthält die VP3-Sequenz und hat zusätzlich eine N-terminale Sequenz, die für VP2 rot unterstrichen und für VP1 rot und grün unterstrichen ist. Für jedes Protein sind oben angegeben: die monoisotopische Masse, die durchschnittliche Masse und die Molekularformel.

Entsprechend der an anderer Stelle veröffentlichten Informationen<sup>5</sup> wurden folgende posttranslationale Modifikationen erwartet: (i) Entfernung des Initiator-Methionins von VP1 und VP3 und (ii) Acetylierung der Aminosäure, die direkt auf das entfernte Methionin folgt. Auf acetylierte Aminosäuren wurde im Sequenzmanager der Agilent MassHunter-Software durch rote, kursiv gedruckte Buchstaben hingewiesen. Die theoretische durchschnittliche Masse von VP1-3 betrug 81 856,13, 66 488,91 bzw. 59 974,70 Da (Abbildung 2).

Die denaturierten AAV-2-Proben wurden auf ZORBAX RRHD 300Å SB-C3-, SB-Diphenyl- und SB-C18-Säulen (Abbildungen 3A bis 3C) mit dem in Tabelle 1 beschriebenen Gradienten der Testmethode getrennt. VP1-3 wurden auf der SB-C3- und der SB-Diphenyl-Säule in zwei Peaks getrennt, wobei VP1 und VP3 als ein Peak koeluierten. Nur die SB-C18-Säule besaß die erforderliche Selektivität, um alle Kapsidproteine zu trennen.

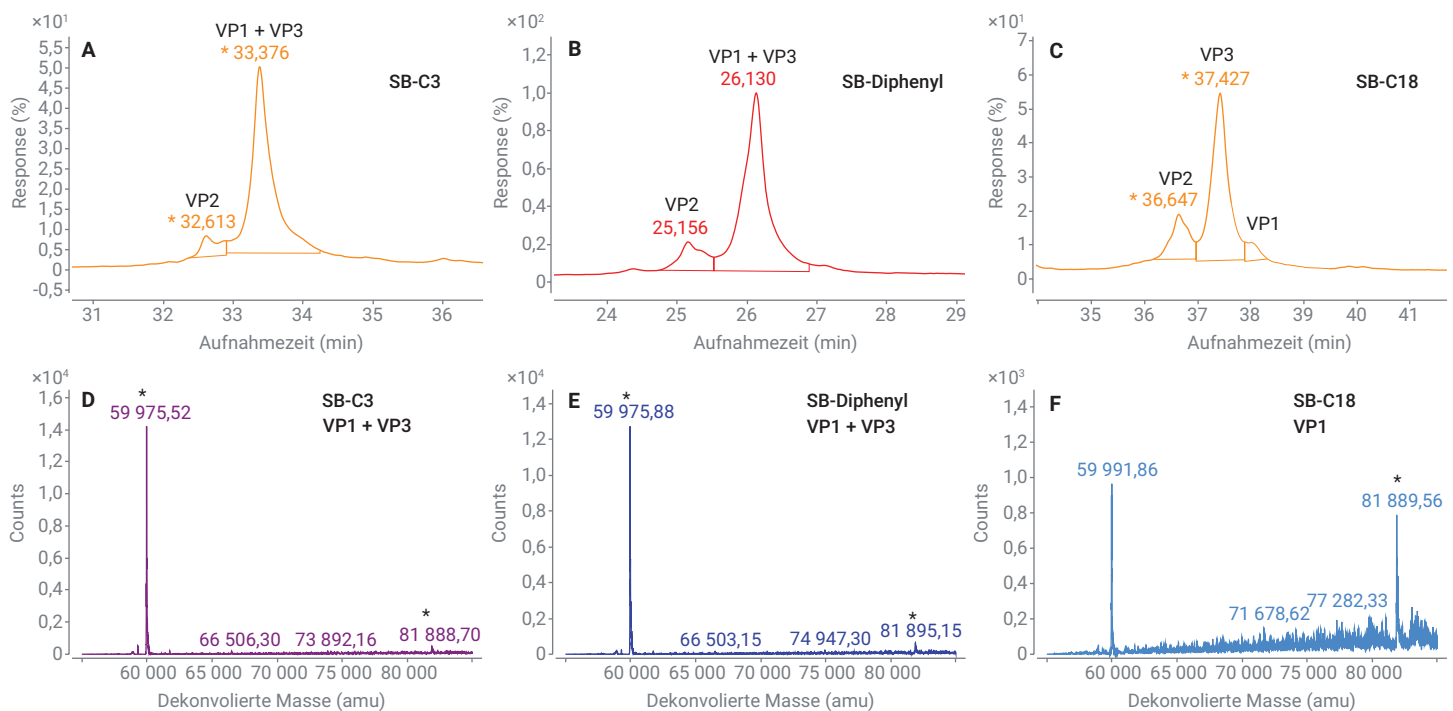
Die dekonvolvierten Massenspektren der Peaks von VP1 und VP3 (Abbildungen 3D bis 3F) zeigten eine weitaus höhere Signalintensität für VP3 bei 59 975,52 Da im Vergleich zu VP1, was eine um eine Größenordnung größere Abundanz für dieses Protein widerspiegelt. Die Koelution von VP3 könnte einen Matrixeffekt darstellen, der unter Umständen durch Ionensuppression die Detektion und Massengenauigkeit von VP1 beeinträchtigt.<sup>8</sup> Dagegen reduzierte die bessere Abtrennung von VP1 auf der SB-C18-Säule (Abbildung 3F) die Störung durch VP3 erheblich und ermöglichte eine zuverlässige und genaue massenspektrometrische Analyse von VP1.

Wie in Abbildung 4 gezeigt, wurden die AAV-2-Proben dann mit dem in Tabelle 1 angegebenen optimierten Gradienten auf einer SB-C18-Säule getrennt. Dies verbesserte die Auflösung und die Form der Peaks und verkürzte die Analysendauer. Der leicht gewellte Hintergrund des Gesamtionenstroms wurde vermutlich von Resten von Pluronic F-68 verursacht, was die Analyse aber nicht nennenswert gestört hat.

Eine wichtige Beobachtung ist, dass die dekonvolvierte Masse von VP1 81 889,72 Da betrug (Abbildung 4E). Das ist ein um 29,6 Da größerer Wert als der theoretische Wert von 81 856,13 Da. Dagegen lagen die beobachteten Massen von VP2 und VP3 in guter Übereinstimmung mit ihren theoretischen Werten. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Austausch einer Aminosäure im Bereich des N-Terminus von VP1 aufgetreten war (grün unterstrichene Sequenz in Abbildung 2).

### Bestätigung der Substitution einer Aminosäure in AAV-2

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden ein tryptischer Verdau und ein Peptid-Mapping von AAV-2 durchgeführt. Die Identifizierung erfolgte über ein dreifach geladenes Peptid mit  $m/z$  1102,1864, dessen MS/MS-Spektrum eine Substitution von Alanin → Threonin an Position 77 der VP1-Sequenz bestätigte. Diese Aminosäureposition befindet sich tatsächlich im Bereich des N-Terminus (Abbildung 5).



**Abbildung 3:** Methodenentwicklung für AAV-2. Fluoreszenzchromatogramme der Trennung unter Verwendung einer (A) Agilent ZORBAX RRHD 300Å SB-C3-, (B) SB-Diphenyl- und (C) SB-C18-Säule. Die SB-C18-Säule weist die beste chromatographische Auflösung auf. (D bis F): Dekonvolvierte Massenspektren der chromatographischen Peaks zeigen die Koelution von VP1 und VP3.



Eine orthogonale Bestätigung dieser Mutation wurde durch eine Sequenzierung des Plasmids, das für die AAV-2-Expression verwendet wurde, nach Sanger erhalten. Sie zeigte, dass eine Substitution von G → A ein GCC-Codon in ACC verändert hatte (Daten nicht gezeigt).

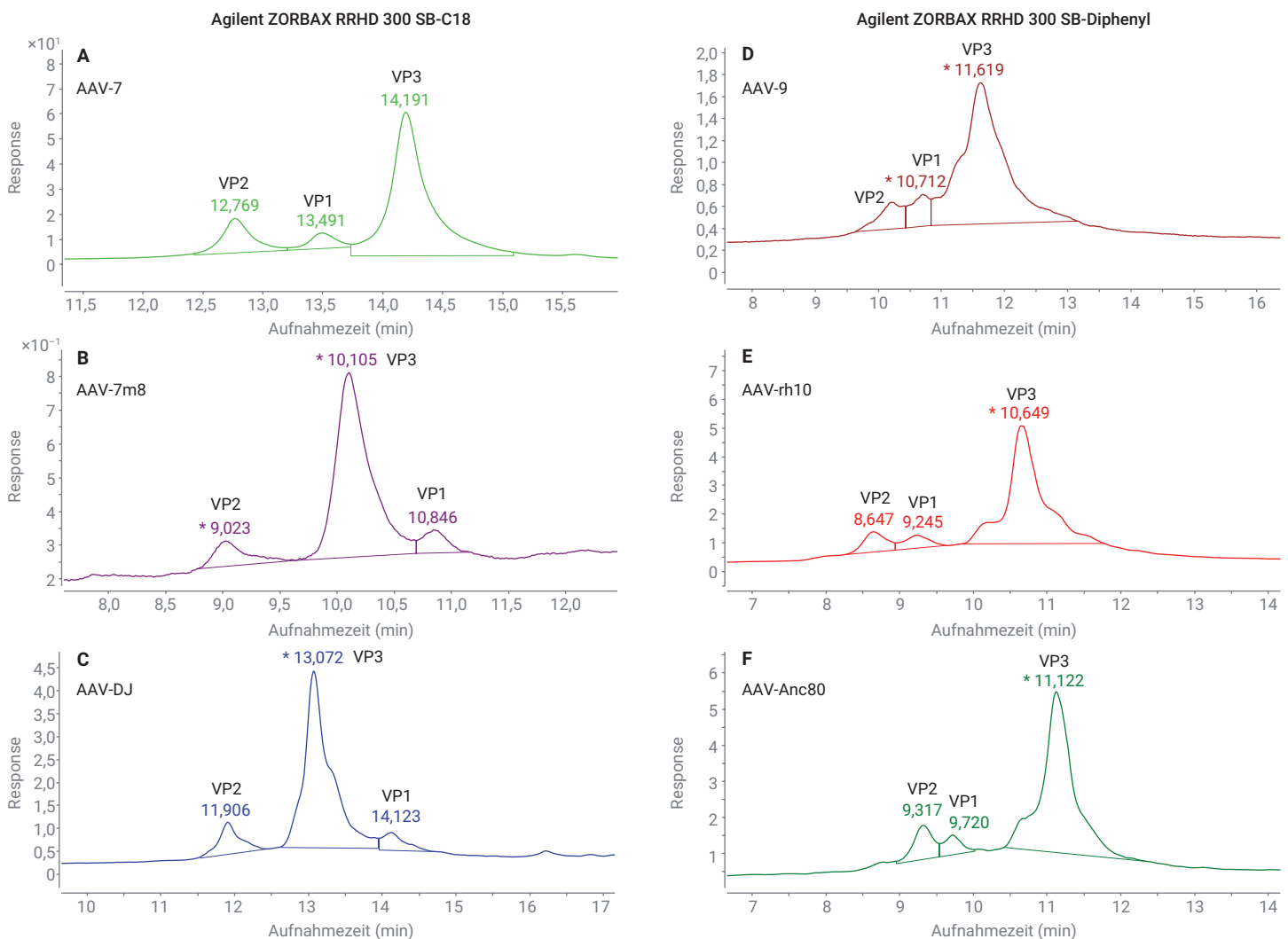
### Analyse sechs weiterer AAV-Serotypen

Um die allgemeine Anwendbarkeit dieser LC/MS-Methode für die Analyse anderer AAV-Serotypen zu überprüfen, wurden

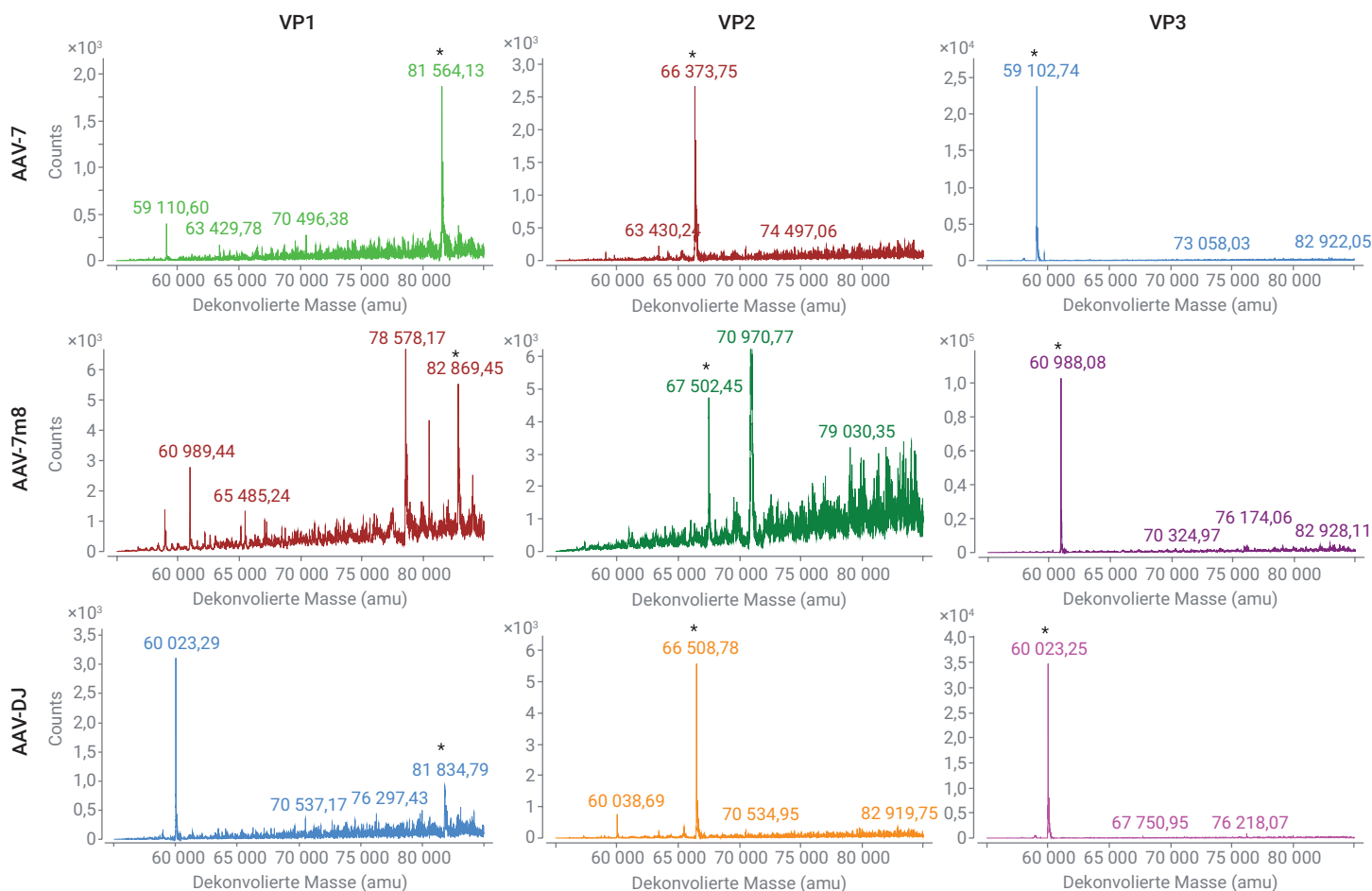
AAV-7, 7m8, DJ, 9, rh10 und Anc80 mit der optimierten SB-C18-Methode, wie oben beschrieben, analysiert. AAV-7, 7m8 und DJ ließen sich mit dieser Methode gut trennen (Abbildungen 6A bis 6C), aber für AAV-9, rh10 und Anc80 ergaben sich nur zwei Peaks, wobei VP1 und VP3 als ein einzelner Peak koeluierten.

Stationäre Diphenyl-Phasen von Agilent haben im Vergleich zu stationären Phasen mit Alkylketten wie beispielsweise C3, C8 oder C18 eine andere Selektivität. Die Phenylgruppen ermöglichen eine Trennung auf Basis der

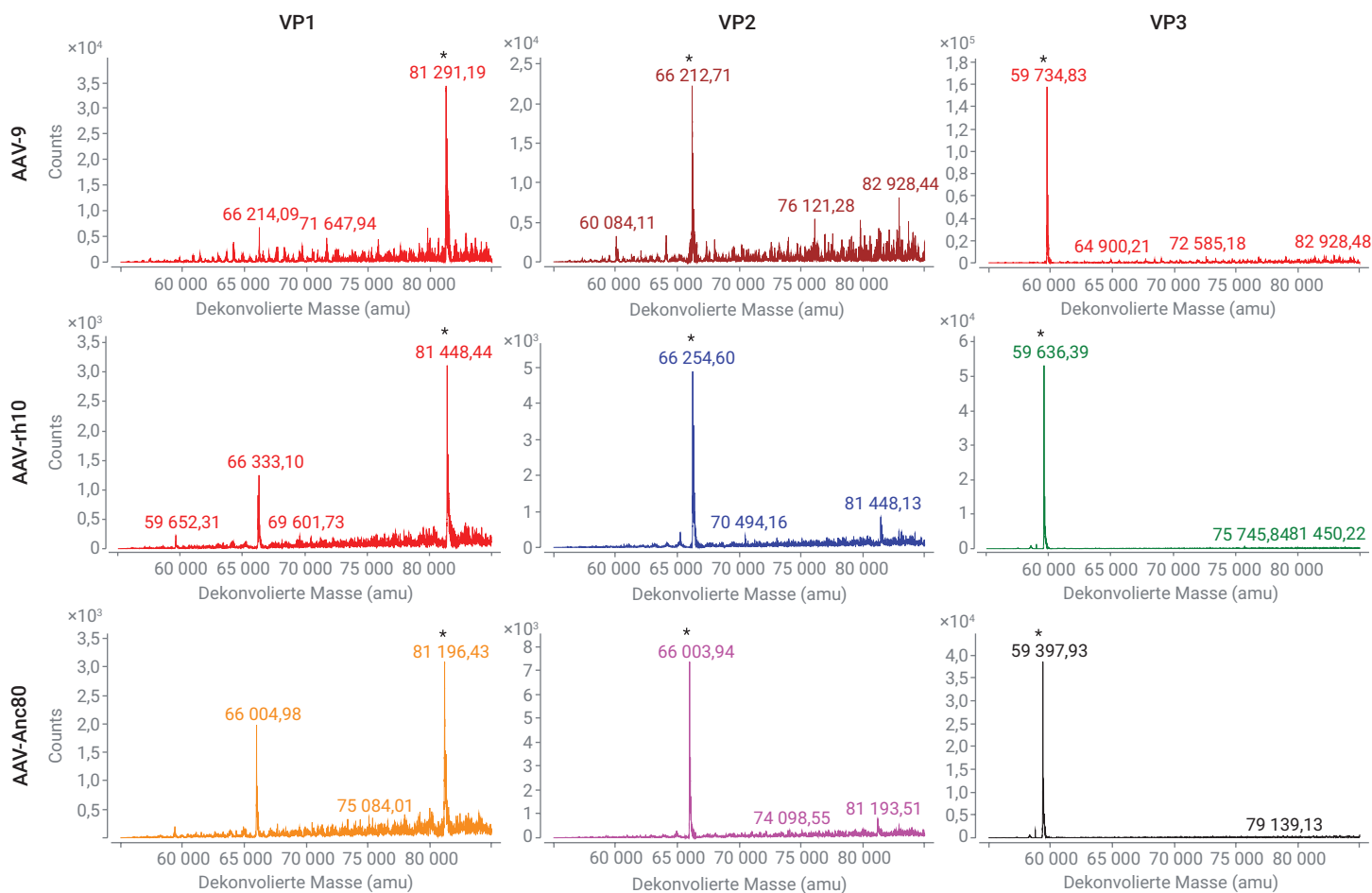
$\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit zusätzlicher Affinität für aromatische Aminosäuren und Doppelbindungen.<sup>9</sup> Eine optimierte Methode mit SB-Diphenyl-Phase (Tabelle 1) wurde entwickelt, um eine erfolgreiche Trennung von AAV-9, rh10 und Anc80 zu erreichen (Abbildungen 6D bis 6F). Die Identität jedes Kapsidproteins wurde von der Software BioConfirm automatisch mit Hilfe des dekonvolierten Massenspektrums jedes Peaks bestätigt. Es zeigten sich nur geringe Störungen von benachbarten Peaks (Abbildungen 7 und 8).



**Abbildung 6:** LC/MS-Analyse der denaturierten AAV-Kapsidproteine von sechs unterschiedlichen Serotypen. (A bis C): auf einer Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18-Säule und (D bis F): auf einer Agilent SB-Diphenyl-Säule.



**Abbildung 7:** Dekonvolierte Massenspektren von AAV-Kapsidproteinen, die auf einer Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18-Säule getrennt wurden. Für AAV-7m8 wurden geringe Störungen (70 971,71, 78 578,01 und 80 495,10 Da) von koelutierenden Wirtszellproteinen beobachtet.



**Abbildung 8:** Dekonvolierte Massenspektren von AAV-Kapsidproteinen, die auf einer Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-Diphenyl-Säule getrennt wurden.

Für die VP1-Proteine von AAV-DJ und rh10 wurden Deamidierungen vermutet, die auf Zellkulturbedingungen zurückzuführen sein könnten oder unter Umständen während der Probenvorbereitung als Artefakte der Erhitzung aufgetreten sein könnten. Außer für AAV-2 lagen die Unterschiede der theoretischen und beobachteten Massen für jedes Kapsidprotein (Tabelle 6) bei  $\leq 3$  Da, was  $\leq 32$  ppm entspricht.

Die relativen Anteile von VP1-3 in Tabelle 7 wurden mit Hilfe der Integration der Peaks des Fluoreszenzchromatogramms (Abbildung 6) entsprechend für jedes Kapsidprotein berechnet. Diese Ergebnisse entsprachen im Großen und Ganzen der erwarteten Stöchiometrie von VP1:2:3 von 1:1:10. Allerdings schien die Abundanz von VP1 über

die unterschiedlichen untersuchten Proben hinweg einer größeren Varianz zu unterliegen. Da bekannt ist, dass VP1 ein entscheidender nuklearer Lokalisationsfaktor ist,<sup>10</sup> kann die geringere Abundanz von VP1 möglicherweise die Unterschiede der Infektiosität teilweise erklären.

**Tabelle 6:** Dekonvolvierte Massen von Kapsidproteinen.

| Massen der AAV-Kapsidproteine |             |            |                         |             |            |                         |             |            |                         |
|-------------------------------|-------------|------------|-------------------------|-------------|------------|-------------------------|-------------|------------|-------------------------|
| Serotyp                       | VP1         |            |                         | VP2         |            |                         | VP3         |            |                         |
|                               | Theoretisch | Beobachtet | Massengenauigkeit (ppm) | Theoretisch | Beobachtet | Massengenauigkeit (ppm) | Theoretisch | Beobachtet | Massengenauigkeit (ppm) |
| 2                             | 81 886,16   | 81 885,72  | 5,37                    | 66 488,91   | 66 490,24  | 20,00                   | 59 974,70   | 59 976,21  | 25,18                   |
| 7                             | 81 564,08   | 81 564,13  | 0,61                    | 66 372,17   | 66 373,75  | 23,81                   | 59 101,05   | 59 102,74  | 28,60                   |
| 9                             | 81 291,57   | 81 291,19  | 4,67                    | 66 210,77   | 66 212,71  | 29,30                   | 59 733,54   | 59 734,83  | 21,60                   |
| 7m8                           | 82 868,27   | 82 869,45  | 14,24                   | 67 501,05   | 67 502,45  | 20,74                   | 60 986,83   | 60 988,08  | 20,50                   |
| DJ                            | 81 835,21   | 81 834,79  | 5,13                    | 66 508,06   | 66 508,78  | 10,83                   | 60 021,86   | 60 023,25  | 23,16                   |
| rh10                          | 81 445,85   | 81 448,44  | 31,80                   | 66 252,96   | 66 254,60  | 24,75                   | 59 634,58   | 59 636,39  | 30,35                   |
| Anc80                         | 81 195,42   | 81 196,68  | 15,52                   | 66 002,53   | 66 003,80  | 19,24                   | 59 396,22   | 59 397,97  | 29,46                   |

**Tabelle 7:** Relative Mengen von Kapsidproteinen.

| Quantifizierung der Kapsidproteine (FLD %) |       |       |       |
|--------------------------------------------|-------|-------|-------|
| Serotyp                                    | VP1   | VP2   | VP3   |
| 2                                          | 10,67 | 10,61 | 78,72 |
| 7                                          | 7,16  | 9,81  | 83,03 |
| 9                                          | 8,75  | 8,04  | 83,21 |
| 7m8                                        | 7,62  | 9,70  | 82,68 |
| DJ                                         | 8,62  | 11,72 | 79,66 |
| rh10                                       | 6,58  | 9,18  | 84,24 |
| Anc80                                      | 5,64  | 10,62 | 83,74 |

## Schlussfolgerung

Diese Application Note zeigt die Methodenentwicklung für die effiziente Trennung intakter AAV-Kapsidproteine unter Verwendung eines 1290 Infinity II LC-Systems in Verbindung mit einer ZORBAX RRHD 300Å SB-C18 oder einer SB-Diphenyl-Säule, gefolgt von anschließender Detektion und Analyse unter Verwendung eines 1260 Infinity II Fluoreszenzdetektors in Kombination mit der Analyse durch ein 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF-System. Diese Application Note zeigt die Möglichkeiten dieser Methode bei sieben unterschiedlichen AAV-Serotypen. Für die Probenvorbereitung wurde nur ein relativ kurzer Denaturierungsschritt benötigt. Ein Pufferaustausch war nicht erforderlich, da die Methode gegenüber hohem Salzgehalt sowie gegenüber dem häufig zugegebenen Detergens Pluronic F-68 robust war.

Diese Methode erbrachte in Bezug auf die chromatographische Trennung eine deutlich bessere Leistungsfähigkeit als kürzlich veröffentlichte Daten.<sup>5</sup> Sie stellt außerdem einen allgemeineren Ansatz für die effiziente Trennung von AAV-Kapsidproteinen dar, die unter Umständen auf einem Säulentyp koeluieren, aber auf einer Säule mit anderem Phasentyp aufgelöst werden. Im Vergleich mit einem anderen kürzlich veröffentlichten Ansatz, der ein ZipChip-CE/MS-System für eine ähnliche Analyse verwendet,<sup>11</sup> erzielt dieser Ansatz eine Massengenauigkeit von  $\leq 32$  ppm verglichen mit  $\leq 60$  ppm für das ZipChip-System. Zusätzlich erleichterten die durch die Flüssigkeitschromatographie erzielten relativ großen Retentionszeitunterschiede eine genaue und reproduzierbare Dekonvolution der Massenspektren und die Verwendung eines Fluoreszenzdetektors erlaubte eine empfindliche und genaue relative Quantifizierung der Abundanz der Kapsidproteine. Im Gegensatz dazu eluierten die Kapsidproteine im ZipChip-System innerhalb eines engen Zeitfensters von 0,1 Minute. Dies schließt bei der relativ langsamen Scanrate des im Experiment verwendeten Massenspektrometers eine genaue Quantifizierung aus.

Wir gehen davon aus, dass diese Methode für die schnelle Identitätsbestätigung von AAV-Produkten vor der Freigabe sowie für das Screening von AAV-Mutantenbibliotheken in Forschungs- und Entwicklungslaboratorien nützlich sein wird.

## Literatur

1. Keeler, A. M.; Flotte, T. R. Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here? *Annu. Rev. Virol.* **2019**, *6*, 601-621.
2. Backovic, A. et al. Capsid Protein Expression and Adeno-Associated Virus like Particles Assembly in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microb. Cell Fact* **2012**, *11*, 124.
3. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) - Guidance for Industry. *US Food and Drug Administration* **2020**.
4. Kuck, D.; Kern, A.; Kleinschmidt, J. A. Development of AAV Serotype-Specific ELISAs Using Novel Monoclonal Antibodies. *Journal of Virological Methods* **2007**, *140*, 17-24.
5. Jin, X. et al. Direct Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis for Complete Characterization of Recombinant Adeno-Associated Virus Capsid Proteins. *Human Gene Therapy Methods* **2017**, *28*, 255-267.
6. Bosma, B. et al. Optimization of Viral Protein Ratios for Production of RAAV Serotype 5 in the Baculovirus System. *Gene Therapy* **2018**, *25*(6), 415-424.
7. Rehder, D. S. et al. Reversed-Phase Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Reduced Monoclonal Antibodies in Pharmaceuticals. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1102*(1-2), 164-175.
8. Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC- MS/MS. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*(13), 3019-3030.
9. Long, W. J.; Mack, A. E. Comparison of Selectivity Differences Among Different Agilent ZORBAX Phenyl Columns Using Acetonitrile or Methanol. *Application Note von Agilent Technologies*, Publikationsnummer 5990-4711EN, **2009**.
10. Popa-Wagner, R. et al. Impact of VP1-Specific Protein Sequence Motifs on Adeno-Associated Virus Type 2 Intracellular Trafficking and Nuclear Entry. *Journal of Virology* **2012**, *86*, 9163-9174.
11. Zhang, Y. et al. Identification of Adeno-Associated Virus Capsid Proteins Using ZipChip CE/MS. *Analytical Biochemistry* **2018**, *555*, 22-25.

**[www.agilent.com](http://www.agilent.com)**

RA.5878472222

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2021  
Gedruckt in den USA, 7. April 2021  
5994-2434DEE

