

Cromatografía de líquidos/ espectrometría de masas de las proteínas intactas de la cápside de virus adenoasociados para la confirmación rápida de la identidad del producto

Autor

Brian Liao
Agilent Technologies, Inc.

Introducción

Los virus adenoasociados (AAV) son un nuevo tipo de producto bioterapéutico con grandes perspectivas y la capacidad de tratar una serie de enfermedades genéticas poco frecuentes y resistentes al tratamiento, como la atrofia muscular espinal y la degeneración hereditaria de la retina.¹ Los AAV son complejos moleculares de gran tamaño que constan de una cápside proteica y ADN encapsulado, cada uno de los cuales requieren técnicas analíticas especializadas para garantizar la calidad y la seguridad del producto en general. La cápside de los AAV está formada por tres proteínas diferentes, habitualmente denominadas VP1-3, en una relación estequiométrica aproximada de 1:1:10 con un total de 60 copias de proteína por cápside.²

La FDA de EE. UU. recomienda que las cápsides víricas y el ADN encapsulado de todos los productos terapéuticos con AAV se identifiquen de forma inequívoca antes de su comercialización, especialmente en aquellas instalaciones en las que se fabrican varios serotipos o variantes modificadas genéticamente.³ Hasta la fecha, los métodos con anticuerpos, como ELISA y la inmunotransferencia, son las técnicas más habituales para llevar a cabo el análisis de las cápsides víricas. Estos métodos conllevan una serie de inconvenientes: además de ser complejos y propensos a errores, los métodos con anticuerpos precisan generar anticuerpos con un elevado nivel de especificidad frente a cada tipo de AAV que se vaya a analizar. Todo ello resulta problemático, dado que las cápsides de los AAV de diferentes productos pueden poseer un alto grado de homología, como los serotipos 1 y 6 de los AAV, que solo difieren en seis aminoácidos (una homología del 99 %), lo que dificulta su distinción mediante la unión del anticuerpo.⁴

En principio, la cromatografía de líquidos/espectrometría de masas ofrece la combinación perfecta de rapidez y especificidad para el análisis de proteínas de la cápside vírica, dado que el análisis directo de las masas de las proteínas elimina la necesidad de generar anticuerpos para cada tipo de AAV. Sin embargo, en trabajos desarrollados con anterioridad, se ha presentado el inconveniente de obtener una separación cromatográfica relativamente deficiente de las proteínas de la cápside vírica.⁵ Todo ello resulta problemático, ya que la coelución puede afectar a la intensidad de la señal y la exactitud de las masas, además de imposibilitar la cuantificación precisa de la estequiometría de la cápside, que es un factor importante para la determinación de la capacidad de infección de los AAV.⁶

En esta nota de aplicación se presenta un método de LC/FLD-MS optimizado para llevar a cabo el análisis rápido de las proteínas de la cápside vírica a fin de confirmar las secuencias primarias de los siete serotipos diferentes. Este método exige requisitos de preparación de muestras sencillos y es robusto en condiciones de alto contenido en sal, así como en presencia del detergente no iónico Pluronic F-68 como aditivo.

Experimento

Muestras de AAV

Los serotipos AAV 2, 7, 9, 7m8, DJ, rh10 y Anc80 se adquirieron en Vector Core @ GIS (A*STAR, Singapur). La expresión de las muestras de AAV se realizó en células HEK-293 mediante transfección triple y las muestras se purificaron mediante ultracentrifugación analítica. Las muestras se suministraron a una concentración de $\sim 1,2 \times 10^{10}$ genomas víricos/ μ l en solución salina tamponada con fosfato que contenía Pluronic F-68 al 0,001 % y se emplearon tal cual se recibieron, sin cambios de tampón.

Preparación de muestras

Se preparó un tampón de desnaturalización con hidrócloruro de guanidina 12 M y DTT 40 mM en bicarbonato amónico 200 mM (pH $\sim 8,0$) para cada análisis. El tampón de desnaturalización se añadió a las muestras de AAV en una relación de 1:3 hasta una concentración final de hidrócloruro de guanidina 3 M. Las muestras se calentaron a 70 °C durante 15 minutos para garantizar una desnaturalización absoluta. Se inyectaron $1,5 \times 10^{11}$ genomas víricos por análisis.

LC/FLD-MS para el análisis de proteínas de la cápside intactas

Las muestras se analizaron con los siguientes 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)
 - Termostato multicolumna Agilent 1290 Infinity II (G7116B)

- Detector de fluorescencia Agilent 1260 Infinity (G1321B) con celda de flujo de 8 μ l
- Sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio

En la separación se emplearon columnas Agilent ZORBAX StableBond C18 (SB-C18) de 300Å de alta definición y resolución rápida y SB-Diphenyl con dimensiones de 2,1 $\times$ 100 mm, 1,8 μ m (referencias 858750-902 y 858750-944). En el desarrollo, también se utilizó una columna Agilent ZORBAX SB-C3 de 300Å de alta definición y resolución rápida (referencia 858750-909), que no se empleó en el método optimizado.

Se escogió una fase móvil de elevada fuerza eluotrópica con un 0,1 % de TFA + 0,1 % de FA en agua desionizada (DI) (fase móvil A) y un 90 % de isopropanol + 9,8 % de agua + 0,1 % de TFA + 0,1 % de FA (fase móvil B). En combinación con una temperatura elevada, con condiciones de fase móvil equivalentes, se obtuvo un poder de resolución superior en las columnas Agilent ZORBAX StableBond para el análisis de anticuerpos monoclonales.⁷

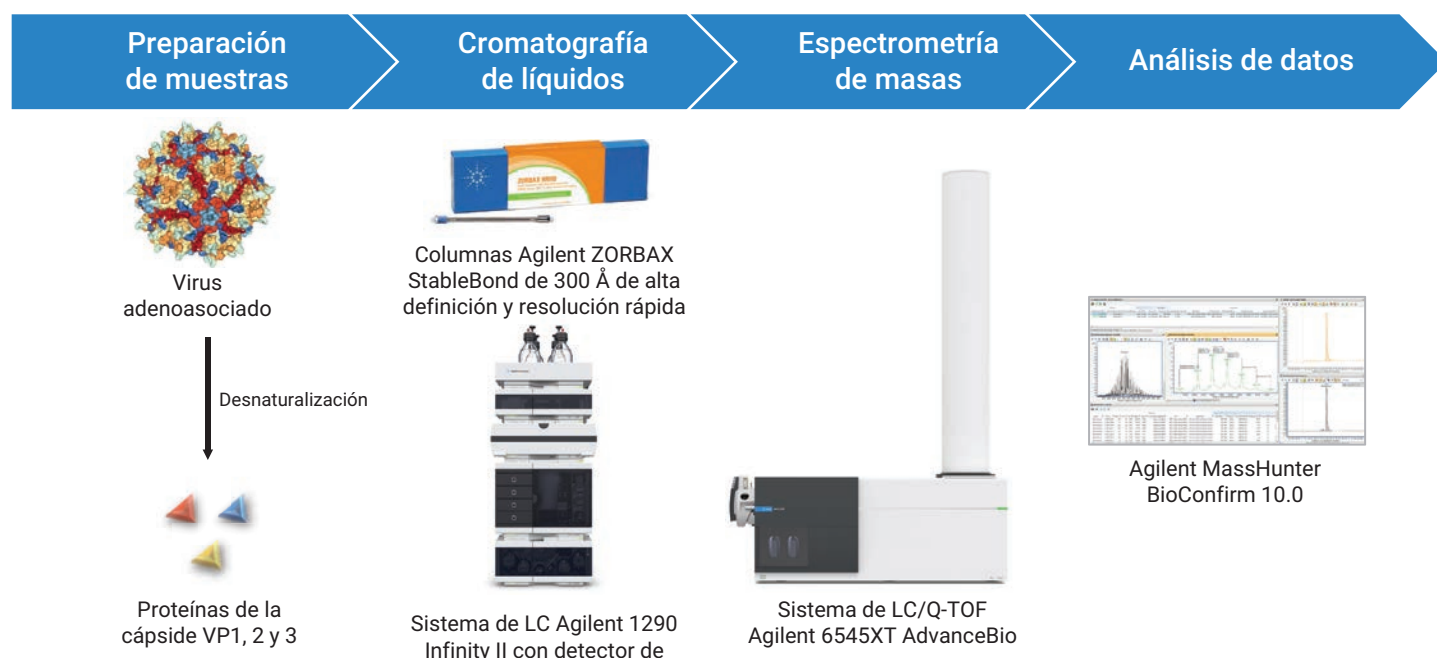


Figura 1. Equipo y consumibles empleados en esta nota de aplicación.

En la detección de fluorescencia, se utilizó una celda de flujo de 8 µl con modo de excitación simple (280 nm)/emisión múltiple (315, 330, 345 y 360 nm), ya que el espectro de emisión de los restos aromáticos puede variar en función de la cantidad y del grado de exposición del disolvente. La emisión más intensa resultó ser a 360 nm y es la que, por consiguiente, se empleó en el análisis. Todos los análisis de datos se llevaron a cabo en el software Agilent BioConfirm 10.0. En las Tablas 1, 2 y 3 se muestran los ajustes del instrumento y del software.

Análisis por LC/MS de mapeo de péptidos

Se desnaturalizó una cantidad de 10 µl de muestra que contenía 6,0 × 10¹¹ genomas víricos de AAV 2 (~3,6 µg de proteína) y se redujo en 30 µl de Tris-HCl 150 mM (pH 8) que contenía 760 mg/ml de clorhidrato de guanidina + 3,8 mg/ml de TCEP durante 60 minutos a 60 °C. Una vez se alcanzó la temperatura ambiente, se llevó a cabo la alquilación mediante la adición de 10 µl de yodoacetamida 133 mM y la incubación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos. Las muestras se diluyeron entonces en 210 µl de Tris-HCl y posteriormente se añadieron 0,2 µg de tripsina modificada de calidad para secuenciación de Promega (referencia V5117). La digestión se llevó a cabo durante 2 horas a 37 °C y posteriormente se añadieron 0,2 µg de tripsina antes de llevar a cabo otra digestión a 37 °C durante la noche. Al día siguiente,

Tabla 2. Parámetros de espectrometría de masas de proteínas de la cápside intactas.

Sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio	
Fuente	Fuente de iones dual Agilent con focalización del gradiente térmico
Temperatura del gas	350 °C
Flujo de gas	12 l/min
Nebulizador	35 psig
Temperatura del gas de focalización	350 °C
Flujo de gas de focalización	11 l/min
Tensión del condensador	4 kV
Tensión de la boquilla	2 kV
Fragmentador	180 V
Skimmer	65 V
Intervalo de masas	De 900 a 3.200 m/z
Velocidad de adquisición	1 espectro/s
Masa de referencia	922,0098
Modo de adquisición	Ionización positiva, intervalo de masas de 3.200 m/z, intervalo analítico ampliado (2 GHz)

la reacción se detuvo mediante la adición de 30 µl de ácido fórmico al 10 % seguida de una limpieza en una columna de C-18 con un sistema Agilent AssayMap Bravo (G5542A). El mapeo de péptidos se llevó a cabo en un sistema de LC 1290 Infinity II con LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio. En la separación se empleó una columna AdvanceBio Peptide Mapping (referencia 653750-902) con las dimensiones 2,1 × 150 mm, 2,7 µm. En las Tablas 4 y 5 se muestra la configuración de los instrumentos.

Tabla 3. Configuración de la deconvolución de proteínas de la cápside intactas.

Configuración del software Agilent MassHunter BioConfirm B10.0	
Cromatogramas definidos	FLD
Integrar al extraer	Sí
Tiempo de retardo del ajuste	0,1 min (detector de MS)
Deconvolución	Entropía máxima
Intervalo de m/z de deconvolución	De 1.000 a 3.200
Intervalo de masas de deconvolución	De 55 a 85 kDa
Incremento de masa	0,5 Da
Línea de base de sustracción de la deconvolución	7,0
Tolerancia de coincidencia	32 ppm

Tabla 4. Parámetros cromatográficos del mapeo de péptidos.

Sistema de LC Agilent 1290 Infinity II	
Disolvente A	0,1% de FA en agua desionizada (DI)
Disolvente B	0,1% de FA en acetonitrilo
Gradiente	De 0 a 15 min, de 5 a 40 % B De 15 a 18 min, de 40 a 90 % B De 18 a 20 min, 90 % B
Temperatura de la columna	60 °C
Flujo	0,4 ml/min
Volumen de inyección	20 µl

Tabla 1. Parámetros de cromatografía de proteínas de la cápside intactas.

Sistema de LC Agilent 1290 Infinity II						
Condiciones	Pruebas	Optimizado	Pruebas	Optimizado	Pruebas	Optimizado
Columna	Agilent ZORBAX StableBond C18 de 300 Å de alta definición y resolución rápida, 2,1 × 100 mm, 1,8 µm (ref. 858750-902)		Agilent ZORBAX StableBond Diphenyl de 300 Å de alta definición y resolución rápida, 2,1 × 100 mm, 1,8 µm (ref. 858750-944)		Agilent ZORBAX StableBond C3 de 300 Å de alta definición y resolución rápida, 2,1 × 100 mm, 1,8 µm (ref. 858750-909)	
Disolvente A	0,1 % de FA + 0,1 % de TFA en agua desionizada (DI)	0,1 % de FA + 0,1 % de TFA en agua desionizada (DI)	0,1 % de FA + 0,1 % de TFA en agua desionizada (DI)	0,1 % de FA + 0,1 % de TFA en agua desionizada (DI)	0,1 % de FA + 0,1 % de TFA en agua desionizada (DI)	–
Disolvente B	80 % de IPA + 10 % de ACN + 9,8 % de agua DI + 0,1 % de FA + 0,1 % de TFA	90 % de IPA + 9,8 % de agua DI + 0,1 % de FA + 0,1 % de TFA	80 % de IPA + 10 % de ACN + 9,8 % de agua DI + 0,1 % de FA + 0,1 % de TFA	90 % de IPA + 9,8 % de agua DI + 0,1 % de FA + 0,1 % de TFA	80 % de IPA + 10 % de ACN + 9,8 % de agua DI + 0,1 % de FA + 0,1 % de TFA	–
Gradiente	De 0 a 2 min, 20 % B 42 min, 35 % B 42,5 min, 80 % B 45 min, 80 % B	De 0 a 5 min, 28 % B 23 min, 32,5 % B 23,5 min, 80 % B 26 min, 80 % B	De 0 a 2 min, 28 % B 42 min, 43 % B 42,5 min, 80 % B 45 min, 80 % B	De 0 a 5 min, 33 % B 21 min, 37 % B 21,5 min, 80 % B 23 min, 80 % B	De 0 a 2 min, 20 % B 42 min, 35 % B 42,5 min, 80 % B 45 min, 80 % B	–
Temperatura de la columna	75 °C	80 °C	75 °C	80 °C	75 °C	–
Flujo	0,4 ml/min					
Cantidad de muestra	1,5 × 10 ¹¹ genomas víricos/inyección					

Resultados y comentarios

Desarrollo del método de LC/MS

En el desarrollo del método se empleó AAV-2, dado que es el serotipo que se ha estudiado más a fondo. Las secuencias de las proteínas VP1-3 de la cápside se presentan en la Figura 2. Todas las proteínas de la cápside se transcriben a partir de la misma secuencia de ADN en el gen Cap, y el empalme del ARNm y el barrido de ribosomas con fugas dan como resultado tres proteínas con un elevado nivel de homología.⁶ En concreto, la secuencia de VP3 es común a las tres proteínas, y VP1 y VP2 únicamente difieren en sus secuencias del extremo aminoterminal.

Tabla 5. Parámetros de espectrometría de masas del mapeo de péptidos.

Sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio		Anchura del aislamiento	Media (~4 m/z)
Fuente	Fuente de iones dual Agilent con focalización del gradiente térmico	Precusores/ciclo	Los 10 primeros
		Energía de colisión	3,6* (m/z)/100 – 4,8
Temperatura del gas	290 °C	Umbral para MS/MS	Activado; 3 repeticiones y luego excluir durante 0,2 minutos
Flujo de gas	13 l/min	Velocidad de barrido atendiendo a la abundancia del precursor	Sí
Nebulizador	35 psig	Diana	25.000
Temperatura del gas de focalización	275 °C	Uso del límite de tiempo de acumulación de MS/MS	Sí
Flujo de gas de focalización	12 l/min	Pureza	Rigurosidad del 100 %, límite del 30 %
Tensión del condensador	4 kV	Modelo isotópico	Péptidos
Tensión de la boquilla	2 kV	Ordenar precursoros	Solo por abundancia; +2, +3, >+3
Fragmentador	175 V	Masa de referencia	922,0098
Skimmer	65 V	Modo de adquisición	Ionización positiva, intervalo de masas 3.200 m/z
Intervalo de masas	De 100 a 1.700 m/z		
Velocidad de adquisición	5 espectros/s		
Intervalo de MS/MS automatizado	De 50 a 1.700 m/z		
Velocidad de adquisición mín. en MS/MS	3 espectros/s		

A:VP1 Masa monoisotópica: 81804,8749 Masa promedio: 81856 1324 Fórmula molecular: C3630H5483N1015O1127S15

1 N-term AADGYLPDWLEDTLSEGIQWVKLKP GPPPKPAERHKDDSRGLVLP GYKYLGP FNL DKGEPVNEADAAA LEHDKAYDRQLD SGDN P YLKYNH 94
95 ADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKKRVLEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDGADSVDPDQPLGQPPAAPSGLG 198
199 TNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVITTTSTRTALPTYNHLYKQISSQSGASNDNHFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRLINNN 302
303 WGRFRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPOQGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGN 406
407 NTFSTYTFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLN 510
511 GRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDQVYLG 614
615 PIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYSKSVNVDFVTDTNGV 718
719 YSEPRPIGTRYLTRNL C-term 734

B:VP2 Masa monoisotópica: 66447,1172 Masa promedio: 66488,9131 Fórmula molecular: C2938H4429N827O917S15

1 N-term APGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDGADSVDPDQPLGQPPAAPSGLG TNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCD 94
95 TWMDRVITTTSTRTALPTYNHLYKQISSQSGASNDNHFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRLINNNWGRFRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL 198
199 TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPOQGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFTSTYTFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNLIDQ 302
303 YLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGK 406
407 QGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDQVYLGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILI 510
511 KNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYSKSVNVDFVTDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL C-term 597

C:VP3 Masa monoisotópica: 59936,8685 Masa promedio: 59974,6971 Fórmula molecular: C2661H3984N740O824S14

1 N-term ATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVITTTSTRTALPTYNHLYKQISSQSGASNDNHFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQ 94
95 RLINNNWGRFRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPOQGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQ 198
199 MLRTGNNTFTSTYTFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA 302
303 TKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDR 406
407 DVYLGQPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYSKSVNVDF 510
511 VDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL C-term 532

Figura 2. Secuencia primaria de aminoácidos de las proteínas de la cápside de AAV-2. Tal y como muestra el software del administrador de secuencias Agilent MassHunter, VP1-3 difiere únicamente en sus secuencias del extremo aminoterminal: cada una contiene la secuencia VP3 con otra secuencia del extremo aminoterminal subrayada en rojo (VP2) o en rojo y verde (VP1). Arriba se muestran la masa monoisotópica, la masa promedio y la fórmula molecular de cada proteína.

Como ya se ha afirmado en otra publicación,⁵ se anticiparon estas modificaciones postraduccionales: (i) eliminación del iniciador metionina en VP1 y VP3; y (ii) acetilación del aminoácido inmediatamente después de la metionina eliminada. Los aminoácidos acetilados se indicaban en el software administrador de secuencias Agilent MassHunter en rojo con letras en cursiva y las masas promedio teóricas de VP1-3 fueron de 81.856,13, 66.488,91 y 59.974,70 Da, respectivamente (Figura 2).

Las muestras desnaturalizadas de AAV-2 se separaron en columnas Agilent ZORBAX SB-C3 de 300Å de alta definición y resolución rápida, SB-Diphenyl y SB-C18 (Figuras de la 3A a la 3C) con los gradientes que se muestran en la Tabla 1. VP1-3 se separaron en dos picos en las columnas SB-C3 y SB-Diphenyl y VP1 y VP3 coeluyeron en un solo pico. Solo la columna SB-C18 presentó la selectividad necesaria para separar cada una de las proteínas de la cápside.

El espectro de masas procesado del pico de VP1 + VP3 (Figuras 3D a 3E) presentó una intensidad de señal de VP3 mucho más elevada a 59.975,52 Da en comparación con VP1, lo que refleja su orden de magnitud de mayor abundancia. La coelución de VP3 puede constituir un efecto de la matriz, lo que interferiría posiblemente con la detección y la exactitud de la masa de VP1 a través de la supresión iónica.⁸ Por el contrario, la superior separación de VP1 en la columna SB-C18 (Figura 3F) redujo en gran medida la interferencia de VP3, lo que permitió un análisis preciso de VP1 por espectrometría de masas.

Tal y como se muestra en la Figura 4, las muestras de AAV-2 se separaron posteriormente en una columna SB-C18 con el gradiente optimizado que aparece en la Tabla 1, lo que aumentó la forma y la resolución de los picos y redujo el tiempo de análisis. Cabe destacar que la ligera ondulación de fondo en la corriente iónica total se produjo probablemente por la presencia de residuos de Pluronic F-68, que no interfirieron de forma significativa en el análisis.

Como factor importante, la masa procesada experimental de VP1 fue de 81.885,72 Da (Figura 4E), superior en +29,6 Da a su valor teórico de 81.856,13 Da. Por el contrario, las masas experimentales de VP2 y VP3 concordaron en gran medida con sus valores teóricos. Por tanto, se elaboró la hipótesis de que se había producido una sola sustitución de aminoácidos en la región del extremo aminoterminal de VP1 (secuencia que se subraya en verde en la Figura 2).

Confirmación de la sustitución única de aminoácidos en AAV-2

Para demostrar la hipótesis se llevaron a cabo una digestión con tripsina y un mapeo de péptidos de AAV-2. Se llevó a cabo la identificación de un péptido de triple carga con una m/z de 1.102,1864, cuyo espectro de MS/MS confirmó una sustitución de alanina por treonina en el aminoácido 77 de la secuencia de VP1, que estaba localizado, efectivamente, en la región del extremo aminoterminal (Figura 5).

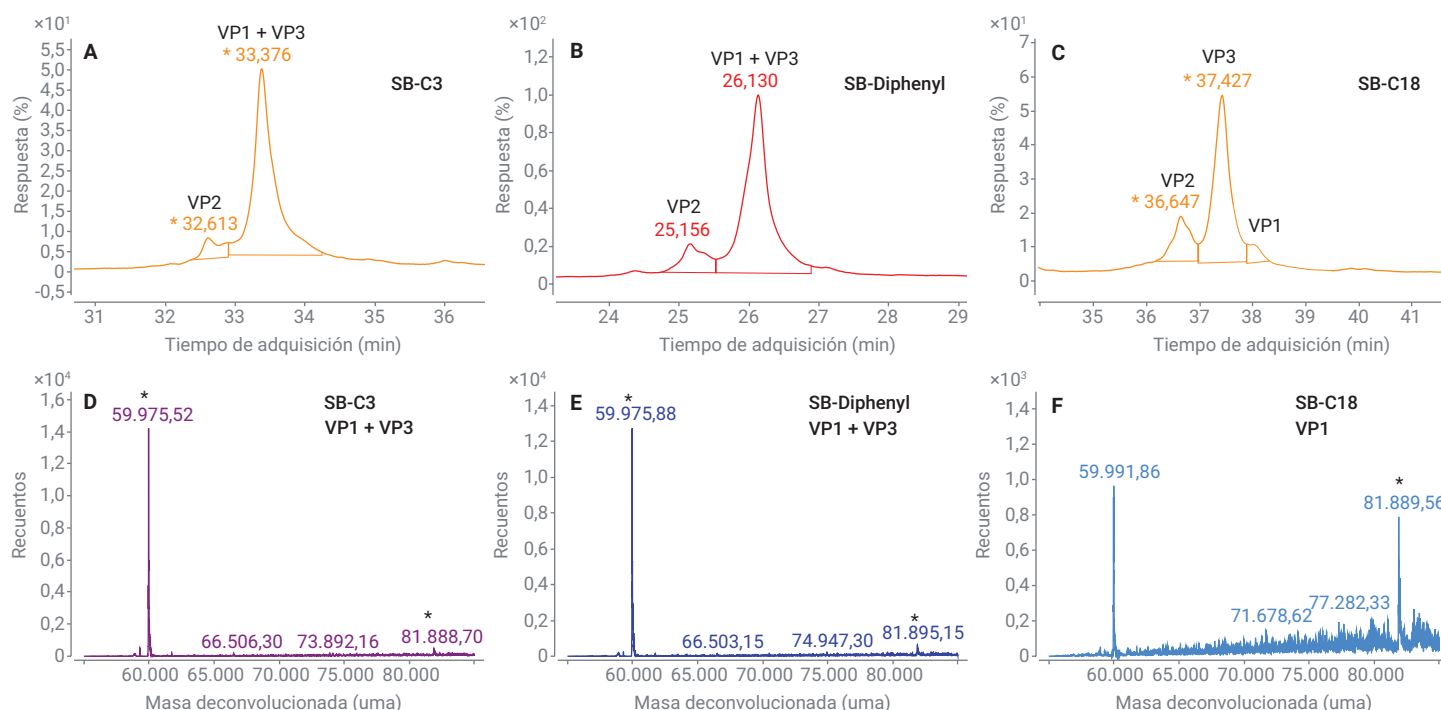


Figura 3. Desarrollo de métodos con AAV-2. Cromatogramas de fluorescencia que ilustran la separación mediante columnas (A) Agilent ZORBAX SB-C3 de 300 Å de alta definición y resolución rápida, (B) SB-Diphenyl y (C) SB-C18. Cabe destacar la mayor resolución cromatográfica de SB-C18. (De D a F) Espectro de masas deconvolucionado de los picos cromatográficos, donde se aprecia la coelución de VP1 y VP3.

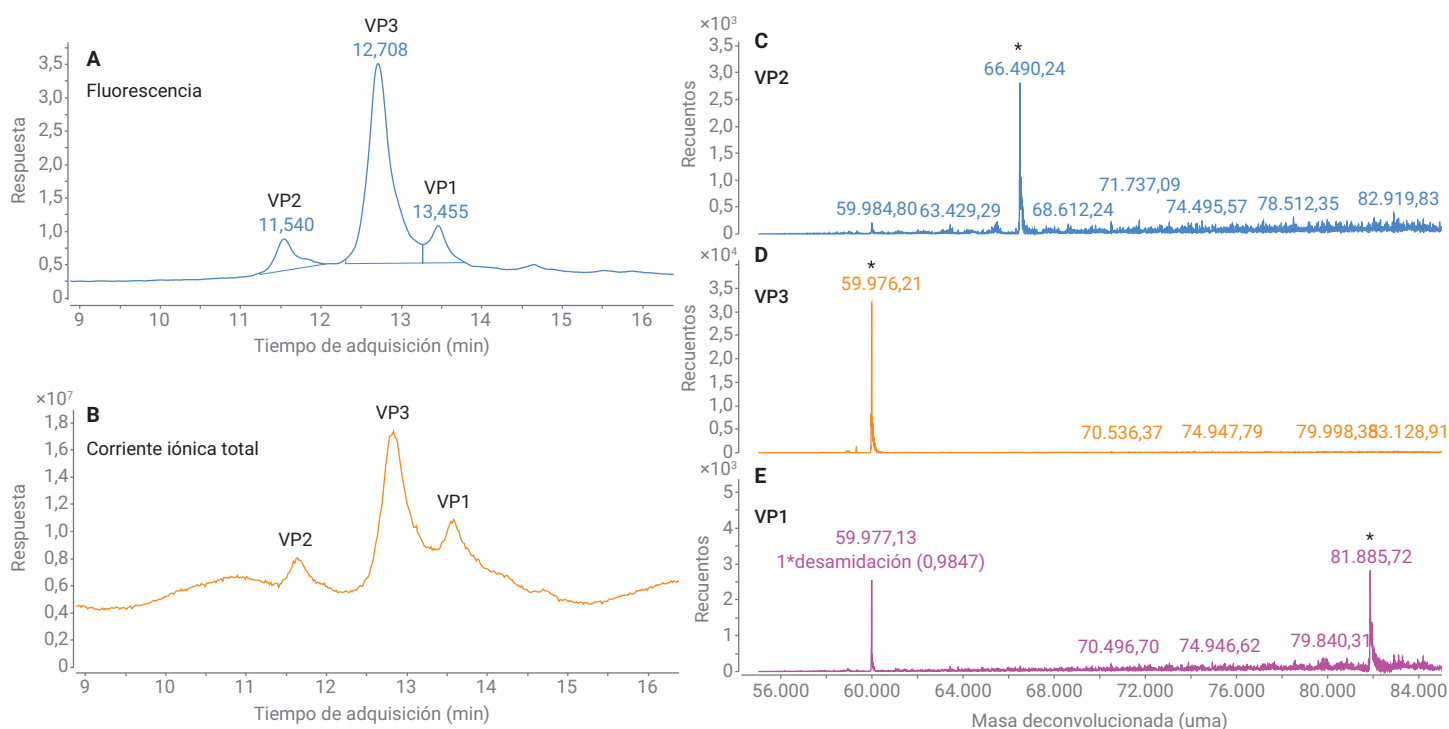


Figura 4. Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de las proteínas de la cápside de AAV-2 desnaturalizadas mediante el método optimizado en una columna Agilent ZORBAX SB-C18 de 300 Å de alta definición y resolución rápida. (A) Cromatograma de fluorescencia que ilustra las tres proteínas de la cápside. (B) Corriente iónica total. (De C a E) Espectro de masas deconvolucionado de las tres proteínas de la cápside con los picos de masa pertinentes marcados con asteriscos.

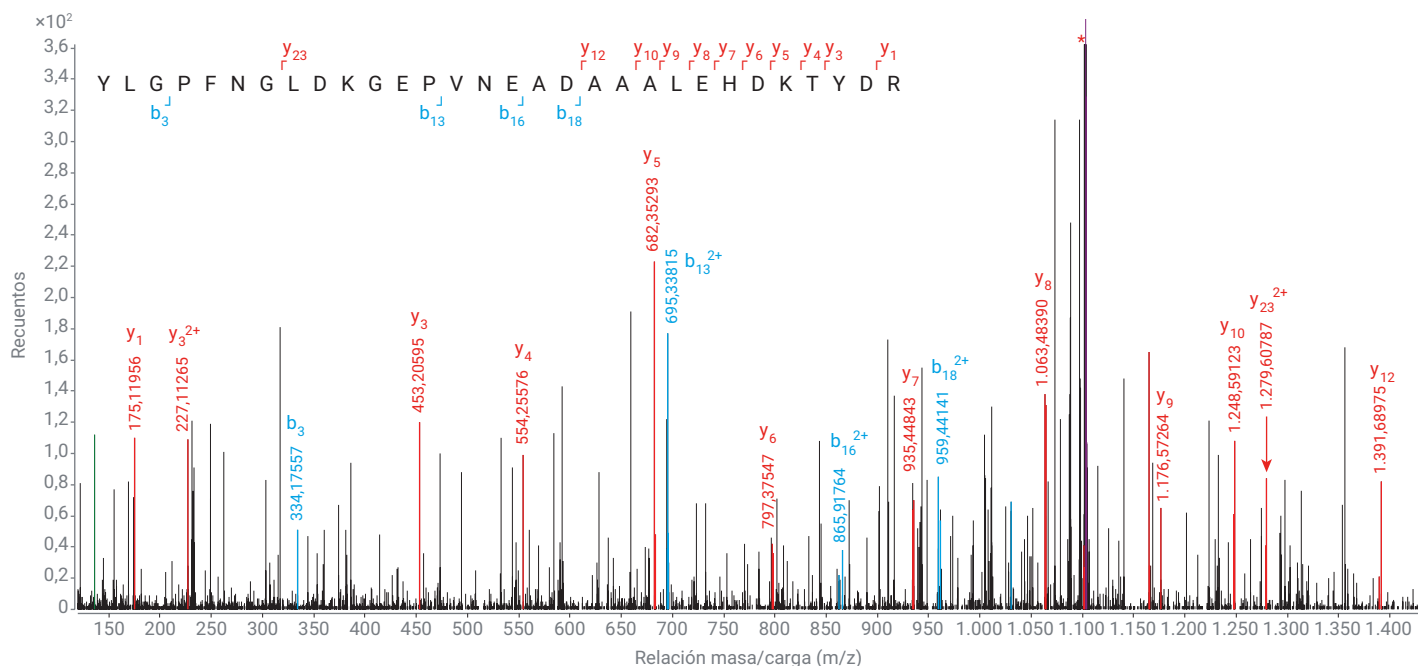


Figura 5. Confirmación de la sustitución de alanina por treonina en VP1 mediante MS/MS. El aminoácido sustituido se muestra en color rojo y el ion precursor se ha marcado con un asterisco rojo.

La confirmación ortogonal de esta mutación se obtuvo mediante secuenciación de Sanger del plásmido empleado en la expresión de AAV-2, que mostró que una sustitución de G por A había alterado un codón GCC para convertirlo en ACC (no se muestran los datos correspondientes).

Análisis de otros seis serotipos de AAV

Para evaluar la generalización de este método de LC/MS en el análisis de otros serotipos de AAV, se analizaron los serotipos de AAV-7, 7m8, DJ, 9, rh10

y Anc80 mediante el método SB-C18 optimizado descrito anteriormente. La separación de AAV-7, 7m8 y DJ se produjo correctamente a través de este método (Figuras 6A a 6C), pero la separación de AAV-9, rh10 y Anc80 se produjo en dos picos, con la coelución de VP1 y VP3 como picos simples.

Las fases estacionarias de difenilo de Agilent habían alterado la selectividad en comparación con las fases estacionarias con cadenas alquílicas, como C3, C8 y C18. Los grupos fenilo

permiten la separación en función de las interacciones π - π con afinidad adicional por los aminoácidos aromáticos y enlaces dobles.⁹ Se desarrolló un método optimizado SB-Diphenyl (Tabla 1) para conseguir una separación correcta de AAV-9, rh10 y Anc80 (Figuras 6D a 6F). La identidad de cada una de las proteínas de la cápside obtuvo una coincidencia automática con el software BioConfirm mediante el espectro de masas procesado de cada pico, que mostraba una interferencia mínima de los picos adyacentes (Figuras 7 y 8).

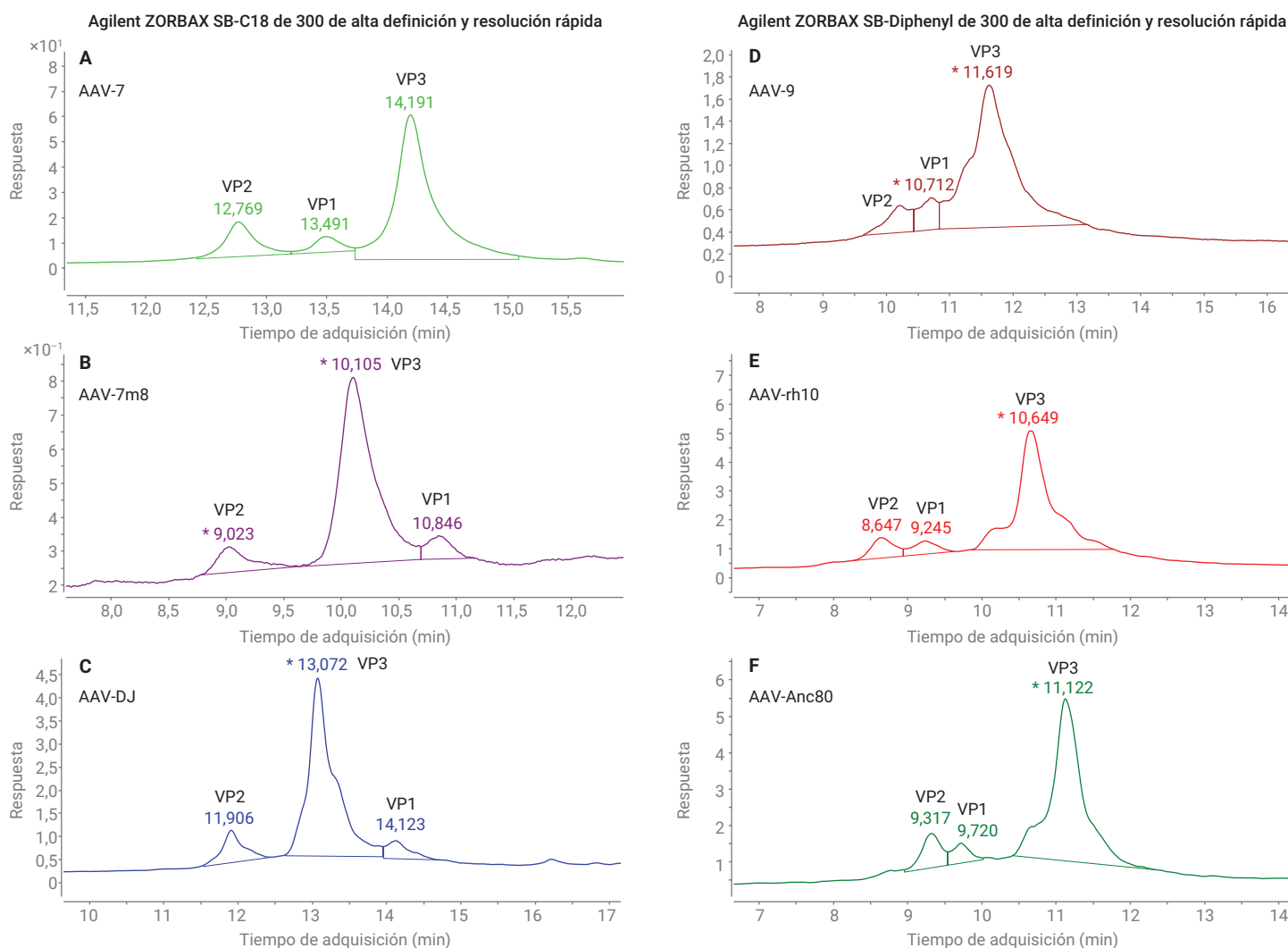


Figura 6. Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de las proteínas de la cápside de AAV desnaturalizadas de seis serotipos diferentes en columnas (de A a C) Agilent ZORBAX SB-C18 de 300 Å de alta definición y resolución rápida y (de D a F) Agilent SB-Diphenyl.

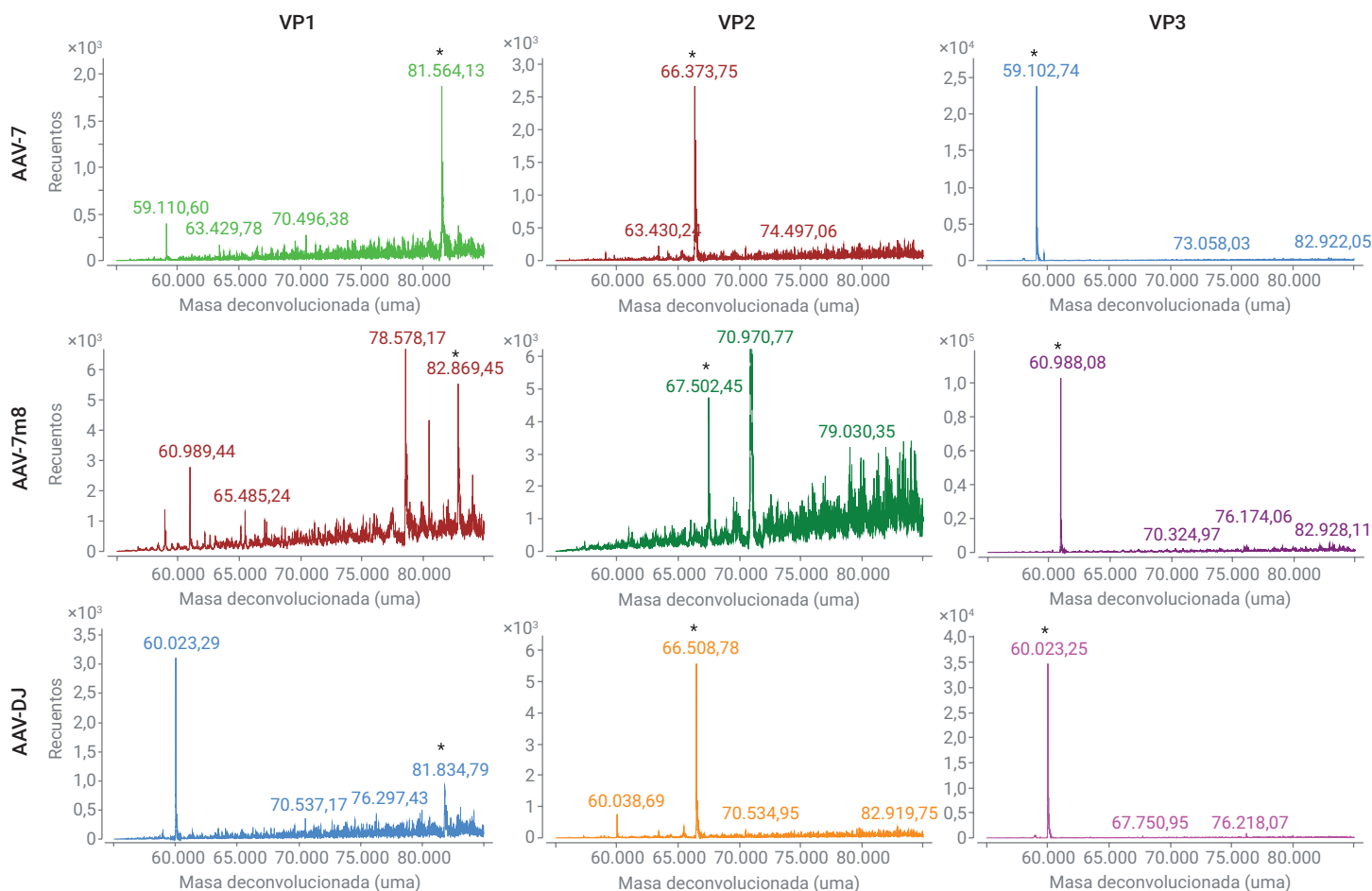


Figura 7. Espectros de masas deconvolucionados de las proteínas de la cápside de AAV separadas en una columna Agilent ZORBAX SB-C18 de 300 Å de alta definición y resolución rápida. Se observó cierta interferencia de las proteínas de la célula hospedadora coeluyentes en AAV-7m8 (70971,71, 78578,01 y 80495,10 Da).

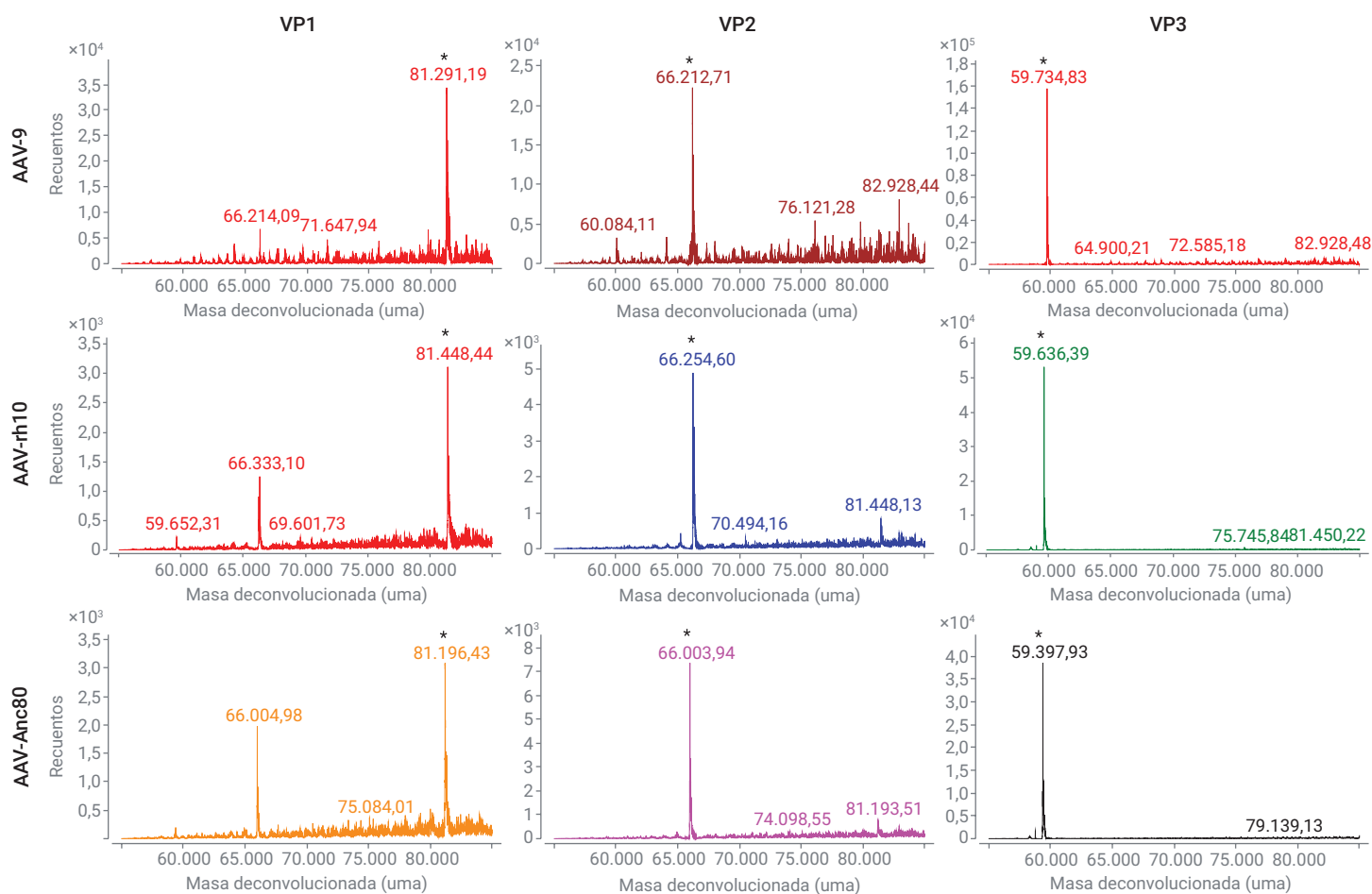


Figura 8. Espectros de masas deconvolucionados de las proteínas de la cápside de AAV separadas en una columna Agilent ZORBAX SB-Diphenyl de 300 Å de alta definición y resolución rápida.

Las desamidaciones se asignaron por hipótesis a las proteínas VP1 de AAV-DJ y rh10, que podrían deberse a las condiciones de cultivo celular o generarse durante la preparación de la muestra como artefactos del calentamiento. Excepto en el caso de AAV-2, las masas teóricas y experimentales de cada proteína de la cápside (Tabla 6) difirieron en ≤ 3 Da, cifra que corresponde a ≤ 32 ppm.

Las cantidades relativas de VP1-3 de la Tabla 7 se midieron mediante la integración de los picos del cromatograma de fluorescencia (Figura 6) correspondientes a cada proteína de la cápside. A pesar de que estos resultados coincidían por lo general con la estequiometría prevista de VP1:2:3 de 1:1:10, la abundancia de VP1 parecía más variable que la de VP2 en las diferentes muestras que

se analizaron. Dado que se sabe a ciencia cierta que VP1 es un factor de localización nuclear fundamental,¹⁰ una menor abundancia de VP1 en ciertas muestras podría explicar, en parte, las diferencias en la capacidad de infección.

Tabla 6. Masas deconvolucionadas de las proteínas de la cápside.

Masas de las proteínas de la cápside de AAV									
Serotipo	VP1			VP2			VP3		
	Teórica	Experimental	Exactitud de las masas (ppm)	Teórica	Experimental	Exactitud de las masas (ppm)	Teórica	Experimental	Exactitud de las masas (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

Tabla 7. Cantidades relativas de las proteínas de la cápside.

Cuantificación de proteínas de la cápside (% FLD)			
Serotipo	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

Conclusión

En esta nota de aplicación se muestra el desarrollo del método para llevar a cabo una separación adecuada de las proteínas de la cápside de AAV intactas mediante el sistema de LC 1290 Infinity II junto con las columnas Agilent ZORBAX de alta definición y resolución rápida de 300 Å SB-C18 o SB-Diphenyl, seguido de una detección y un análisis posteriores con un detector de fluorescencia 1260 Infinity II acoplado a un sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio. En esta nota de aplicación se demuestran las capacidades de este método con siete tipos diferentes de AAV. Solo es necesario un breve paso de desnaturalización en la preparación de muestras y no hay necesidad de llevar a cabo un cambio de tampón, dado que el método demuestra robustez en condiciones de alto contenido en sal, así como en presencia del detergente Pluronic F-68 como aditivo.

Este método superó de forma significativa los trabajos publicados recientemente⁵ en cuanto a la separación cromatográfica y representa un método más general para la separación eficaz de las proteínas de la cápside de los AAV, que pueden coeluir con una fase estacionaria pero tener una buena resolución en otra. En comparación con otro trabajo reciente con un sistema de CE/MS ZipChip en un análisis parecido,¹¹ este método ofrece una exactitud de las masas ≤ 32 ppm frente a ≤ 60 ppm con ZipChip. Además, las diferencias de tiempo de retención, relativamente prolongado, que se consiguieron con la cromatografía de líquidos facilitó una deconvolución de los espectros de masas precisa y reproducible y la incorporación de un detector de fluorescencia permitió una cuantificación relativa sensible y precisa de la abundancia de las proteínas de la cápside. Por el contrario, se demostró que las proteínas de la cápside eluyen en un intervalo muy estrecho de 0,1 minutos en el sistema ZipChip, con la velocidad de barrido relativamente lenta del espectrómetro de masas que se utilizó en el experimento, lo que impidió una cuantificación precisa.

Se prevé que este método sea útil gracias a la rápida confirmación de la identidad del producto de AAV antes de su comercialización, así como para el cribado de bibliotecas de AAV con mutaciones de los laboratorios de investigación y desarrollo.

Referencias

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. Chromatog. 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. *Nota de aplicación de Agilent Technologies*, número de publicación 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

RA.5878472222

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2021
Impreso en EE. UU., 7 de abril de 2021
5994-2434ES

