

Analyse par LC/MS de protéines capsidiques de virus adéno-associés pour une rapide confirmation de l'identité de produits

Auteur

Brian Liao
Agilent Technologies, Inc.

Introduction

Les virus adéno-associés (AAV) représentent une nouvelle classe prometteuse de produits biothérapeutiques capables de traiter un hôte atteint de maladies génétiques rares et réfractaires telles que l'amyotrophie spinale et la dégénérescence rétinienne héréditaire¹. Les AAV sont de gros complexes moléculaires composés d'une capsidique protéique et d'un ADN encapsulé, chaque élément nécessitant des techniques analytiques spécifiques pour garantir la qualité et la sécurité du produit global. Les capsides d'AAV contiennent trois protéines capsidiques différentes, communément dénommées VP1, 2 et 3, présentes selon un rapport stœchiométrique de 1:1:10 environ, avec un total de 60 copies de protéine par capsidique².

La FDA (Food and Drug Administration, Administration américaine aux produits alimentaires et pharmaceutiques) recommande d'identifier sans ambiguïté les capsides virales et l'ADN encapsulé de tous les produits thérapeutiques à base d'AAV avant leur libération, tout particulièrement dans les installations produisant plusieurs sérotypes ou variants modifiés³. Pour l'instant, les méthodes impliquant des anticorps, telles que le test ELISA et l'immunoblotting, sont les techniques d'analyse de capsides virales les plus courantes. Ces méthodes souffrent cependant de plusieurs inconvénients : en plus de leur lourdeur et du risque d'erreur qu'elles impliquent, les méthodes à base d'anticorps requièrent la production d'anticorps hautement spécifiques pour chaque type d'AAV à analyser. Ceci est compliqué, car les capsides d'AAV correspondant à différents produits peuvent avoir un haut degré d'homologie ; par exemple, les sérotypes d'AAV 1 et 6 ne diffèrent que de six acides aminés (soit une homologie de 99 %), ce qui les rend difficiles à distinguer par liaison à des anticorps⁴.

En principe, la LC/MS est la solution idéale en termes de vitesse et de spécificité pour l'analyse des protéines de capsides virales, car la mesure directe de la masse des protéines permet de s'affranchir du besoin de générer des anticorps pour chaque type d'AAV. Toutefois, les travaux antérieurs se sont heurtés à une mauvaise séparation chromatographique des protéines de capsides virales⁵. Ceci est problématique, car la coélution peut compromettre l'intensité du signal et la précision en masse, en plus d'empêcher la quantification exacte de la stœchiométrie des capsides, un déterminant important de l'infectiosité d'un virus⁶.

Cette note d'application présente une méthode optimisée de LC/FLD-MS permettant d'analyser rapidement les protéines de capsides d'AAV, dans le but de confirmer les séquences primaires de sept sérotypes différents. Cette méthode repose sur une préparation d'échantillons simple et est compatible avec les conditions de salinité élevée ainsi que le Pluronic F-68, un additif détergent non ionique couramment employé.

Méthode expérimentales

Échantillons d'AAV

Les sérotypes d'AAV 2, 7, 9, 7m8, DJ, rh10 et Anc80 ont été achetés auprès de Vector Core @ GIS (A*STAR, Singapour). Les échantillons d'AAV ont été exprimés dans des cellules HEK-293 par triple transfection, puis purifiés par ultracentrifugation analytique. Les échantillons ont été fournis à une concentration de $\sim 1,2 \times 10^{10}$ génomes viraux/ μL dans une solution saline tamponnée au phosphate contenant 0,001 % de Pluronic F-68, et utilisés tels quels sans échange de tampon.

Préparation d'échantillons

Un tampon de dénaturation composé de guanidine HCl 12 M + DTT 40 mM dans du bicarbonate d'ammonium 200 mM (pH $\sim 8,0$) a été fraîchement préparé pour chaque analyse. Le tampon de dénaturation a été ajouté aux échantillons d'AAV selon un rapport de 1/3 afin d'atteindre une concentration finale de guanidine HCl de 3 M. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 70 °C pendant 15 minutes pour garantir une dénaturation complète. $1,5 \times 10^{11}$ génomes viraux ont été injectés pour chaque analyse.

LC/FLD-MS pour l'analyse des protéines capsidiques intactes

Les échantillons ont été analysés avec les instruments suivants :

- Système Agilent LC 1290 Infinity II avec :
 - Pompe à haut débit Agilent 1290 Infinity II (G7120A)
 - Multi-échantillonneur Agilent 1290 Infinity II (G7167B)
 - Thermostat multicolumnes Agilent 1290 Infinity II (G7116B)

- Détecteur à fluorescence Agilent 1260 Infinity (G1321B) avec cellule de 8 μL
- Système LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT

Pour la séparation, des colonnes Agilent ZORBAX RRHD 300StableBond C18 (SB-C18) et SB-diphényle, de dimensions $2,1 \times 100 \text{ mm}$ et $1,8 \mu\text{m}$ (références 858750-902 et 858750-944), ont été utilisées. Une colonne ZORBAX RRHD 300Å SB-C3 (référence 858750-909) a également été employée pour le développement, mais pas pour la méthode optimisée.

Le choix s'est porté sur une phase mobile de force éluotrope élevée contenant 0,1 % de TFA + 0,1 % d'AF dans de l'eau déionisée (phase mobile A) et 90 % d'alcool isopropylique + 9,8 % d'eau + 0,1 % de TFA + 0,1 % d'AF (phase mobile B). Associées à une forte température, des conditions similaires de phase mobile ont donné un meilleur pouvoir de résolution sur les colonnes Agilent ZORBAX StableBond pour l'analyse d'anticorps monoclonaux⁷.

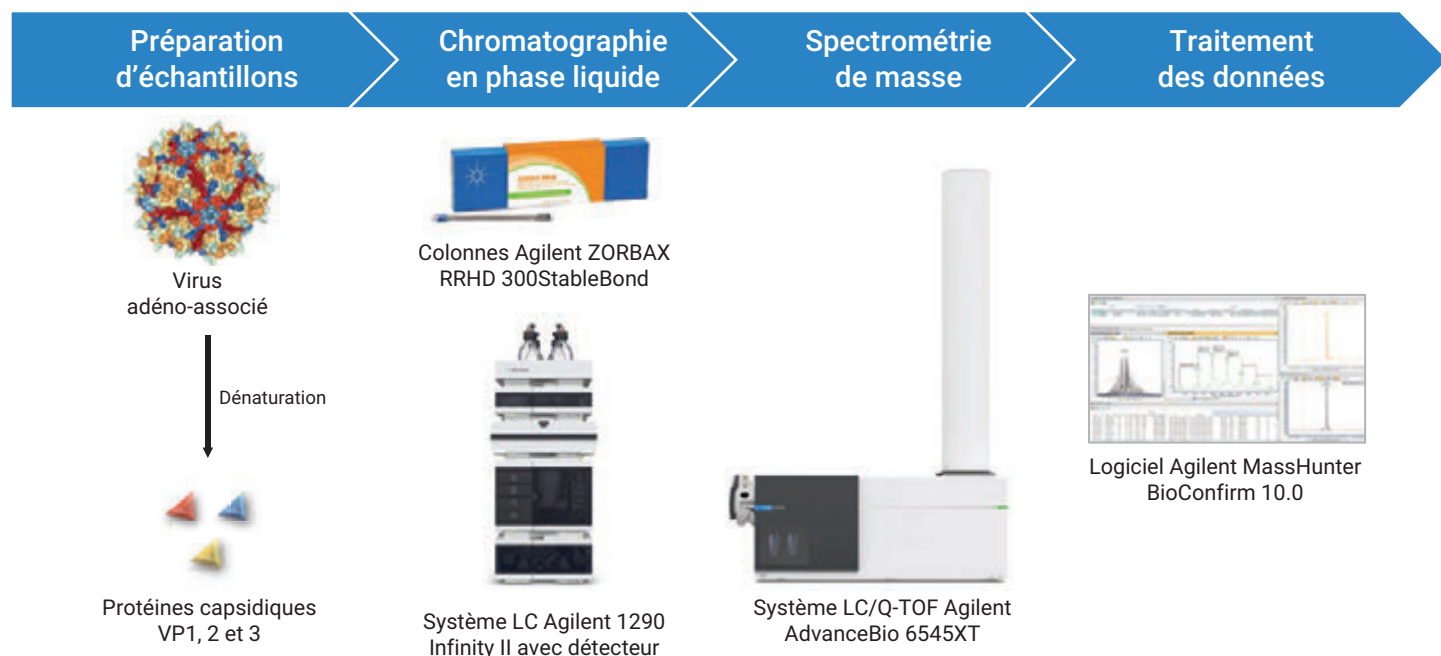


Figure 1. Équipements et consommables utilisés dans cette note d'application.

Pour la détection de fluorescence, une cellule de 8 µL en mode excitation simple (280 nm)/émission multiple (315, 330, 345 et 360 nm) a été utilisée, car les spectres d'émission des résidus aromatiques peuvent varier en fonction du nombre de ces résidus et du degré d'exposition au solvant. L'émission à 360 nm s'est avérée être la plus intense et a donc été choisie pour l'ensemble des analyses. Tout le traitement des données a été effectué dans Agilent BioConfirm 10.0. Le paramétrage de l'instrument et du logiciel figure dans les tableaux 1, 2 et 3.

Analyse par cartographie peptidique en LC/MS

Une quantité d'échantillon de 10 µL, contenant 6,0 × 10¹¹ génomes viraux d'AAV 2 (~3,6 µg de protéine), a été dénaturée et réduite pendant 60 minutes à 60 °C dans 30 µL de Tris-HCl 150 mM (pH 8) contenant 760 mg/mL de guanidine HCl + 3,8 mg/mL de TCEP. Après refroidissement à température ambiante, une alkylation a été réalisée par ajout de 10 µL d'iodoacétamide 133 mM et incubation dans le noir et à température ambiante pendant 30 minutes. L'échantillon a ensuite été dilué avec 210 µL de Tris-HCl, puis additionné de 0,2 µg de trypsine modifiée de qualité séquençage de Promega (référence V5117). La digestion a duré 2 heures à 37 °C, après quoi 0,2 µg de trypsine supplémentaire a été ajouté,

Tableau 2. Paramètres de spectrométrie de masse appliqués aux protéines capsidiques intactes.

Système LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT	
Source	Agilent Dual Jet Stream
Température du gaz	350 °C
Débit du gaz	12 L/min
Nébuliseur	35 psig
Température du gaz de gainage	350 °C
Débit de gaz de gainage	11 L/min
Vcap	4 kV
Tension de la buse	2 kV
Fragmenteur	180 V
Cône écreteur	65 V
Gamme de masse	900 à 3 200 m/z
Fréquence d'acquisition	1 spectre/s
Masse de référence	922,0098
Mode d'acquisition	Positif, gamme de masse de 3 200 m/z, gamme dynamique étendue (2 GHz)

avant digestion toute une nuit à 37 °C. Le jour suivant, la réaction a été stoppée par ajout de 30 µL d'acide formique à 10 %, puis le produit obtenu a été nettoyé sur une colonne C-18 avec un système Agilent AssayMap Bravo (G5542A).

La cartographie peptidique a été réalisée sur un système LC 1290 Infinity II avec LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT. La séparation s'est déroulée sur une colonne AdvanceBio Peptide Mapping (référence 653750-902), de dimensions 2,1 × 150 mm et 2,7 µm. Le paramétrage des instruments est donné dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 3. Paramètres de déconvolution appliqués aux protéines capsidiques intactes.

Paramètres Agilent MassHunter BioConfirm B10.0	
Chromatogrammes définis	FLD
Intégrer après extraction	Oui
Ajuster le délai d'injection	0,1 min (détecteur de masse)
Déconvolution	Entropie maximale
Plage de m/z de déconvolution	1000 à 3200
Gamme de masse de déconvolution	55 à 85 kDa
Paliers de masse	0,5 Da
Ligne de base de soustraction de déconvolution	7,0
Tolérance de correspondance	32 ppm

Tableau 4. Paramètres chromatographiques pour la cartographie peptidique.

Système Agilent LC 1290 Infinity II	
Solvant A	0,1 % d'AF dans de l'eau déionisée
Solvant B	0,1 % d'AF dans de l'acétonitrile
Gradient	de 0 à 15 min, de 5 à 40 % de B de 15 à 18 min, de 40 à 90 % de B de 18 à 20 min, 90 % de B
Température de colonne	60 °C
Débit	0,4 mL/min
Volume d'injection	20 µL

Tableau 1. Paramètres de chromatographie appliqués aux protéines capsidiques intactes.

Système Agilent LC 1290 Infinity II						
Condition	Tests	Optimisation	Tests	Optimisation	Tests	Optimisation
Colonne	Agilent ZORBAX RRHD 300StableBond C18, 2,1 × 100 mm, 1,8 µm (réf. 858750-902)		Agilent ZORBAX RRHD 300StableBond diphenyle, 2,1 × 100 mm, 1,8 µm (réf. 858750-944)		Agilent ZORBAX RRHD 300StableBond C3, 2,1 × 100 mm, 1,8 µm (réf. 858750-909)	
Solvant A	0,1 % AF + 0,1 % TFA dans de l'eau déionisée	0,1 % AF + 0,1 % TFA dans de l'eau déionisée	0,1 % AF + 0,1 % TFA dans de l'eau déionisée	0,1 % AF + 0,1 % TFA dans de l'eau déionisée	0,1 % AF + 0,1 % TFA dans de l'eau déionisée	–
Solvant B	80 % IPA + 10 % ACN + 9,8 % eau déionisée + 0,1 % AF + 0,1 % TFA	90 % IPA + 9,8 % eau déionisée + 0,1 % AF + 0,1 % TFA	80 % IPA + 10 % ACN + 9,8 % eau déionisée + 0,1 % AF + 0,1 % TFA	90 % IPA + 9,8 % eau déionisée + 0,1 % AF + 0,1 % TFA	80 % IPA + 10 % ACN + 9,8 % eau déionisée + 0,1 % AF + 0,1 % TFA	–
Gradient	de 0 à 2 min, 20 % de B 42 min, 35 % de B 42,5 min, 80 % de B 45 min, 80 % de B	de 0 à 5 min, 28 % de B 23 min, 32,5 % de B 23,5 min, 80 % de B 26 min, 80 % de B	de 0 à 2 min, 28 % de B 42 min, 43 % de B 42,5 min, 80 % de B 45 min, 80 % de B	de 0 à 5 min, 33 % de B 21 min, 37 % de B 21,5 min, 80 % de B 23 min, 80 % de B	de 0 à 2 min, 20 % de B 42 min, 35 % de B 42,5 min, 80 % de B 45 min, 80 % de B	–
Température de colonne	75 °C	80 °C	75 °C	80 °C	75 °C	–
Débit	0,4 mL/min					
Quantité d'échantillon	1,5 × 10 ¹¹ génomes viraux/injection					

Résultats et discussion

Développement de la méthode LC/MS

La méthode a été développée avec l'AAV-2, car c'est le sérotype le plus étudié. Les séquences des protéines capsidiques VP1 à 3 sont présentées à la figure 2. Toutes les protéines capsidiques sont transcrites à partir de la même séquence d'ADN dans le gène Cap, l'épissage de l'ARNm et le leaky scanning ribosomique donnant trois protéines à fort degré d'homologie⁶. Plus précisément, la séquence VP3 est commune aux trois protéines, VP1 et VP2 ne se distinguant que par leurs séquences N-terminales.

Tableau 5. Paramètres de spectrométrie de masse pour la cartographie peptidique.

Système LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT		Fréquence d'acquisition MS/MS min.	3 spectres/s
Source	Agilent Dual Jet Stream	Largeur d'isolement	Moyenne (~ 4 m/z)
Température du gaz	290 °C	Précurseurs/cycle	Top 10
Débit du gaz	13 L/min	Énergie de collision	3,6*(m/z)/100 – 4,8
Nébuliseur	35 psig	Seuil en MS/MS	Activé ; 3 répétitions, puis exclusion pendant 0,2 minute
Température du gaz de gainage	275 °C	Vitesse de balayage basée sur l'abondance des précurseurs	Oui
Débit de gaz de gainage	12 L/min	Cible	25 000
Vcap	4 kV	Utiliser la limite de temps d'accumulation en MS/MS	Oui
Tension de la buse	2 kV	Pureté	Rigueur 100 %, seuil 30 %
Fragmenteur	175 V	Modèle isotopique	Peptides
Cône écreteur	65 V	Précurseurs courts	Par abondance uniquement ; +2, +3, >+3
Gamme de masse	900 à 1 700 m/z	Masse de référence	922,0098
Fréquence d'acquisition	5 spectres/s	Mode d'acquisition	Positif, gamme de masse de 3 200 m/z
Gamme MS/MS auto	900 à 1 700 m/z		

A : VP1 Masse monoisotopique : 81 804,8749 Masse moyenne : 81 856,1324 Formule moléculaire : C3630H5483N1015O1127S15

1 N-term AADGYLPDWLEDTLSEGIQWVKLKPFPFPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEFVNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNDPYLKYNH 94

95 ADAEFQERLKEDTSPGGNLGRAVFOAKKRVLEPLGLVEEPVKTAAGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLG 198

199 TMTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLINNN 302

303 WGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPFPFADVFMVPOYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPPSOMLRTGN 406

407 NTFSTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLOFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLN 510

511 GRDSLVNPGPAMASHKDDDEEKFFPQSGVLI FGKQSGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRCNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDYYLQ 614

615 PIWAKIPHDTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPPQILIKNTFVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVMVDFTVDITNGV 718

719 YSEPRPIGTRYLTRNL C-term 734

B : VP2 Masse monoisotopique : 66 447,1172 Masse moyenne : 66 488,9131 Formule moléculaire : C2938H4429N827O917S15

1 N-term APGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTMTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCD 94

95 TWMDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL 198

199 TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPFPFADVFMVPOYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPPSOMLRTGNNTFTSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPIDQ 302

303 YLYLSRTNTPSGTTTQSRLOFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDDEEKFFPQSGVLI FGK 406

407 QGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRCNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDYYLQGPWAKIPHDTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPPQILI 510

511 KNTFVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVMVDFTVDITNGVYSEPRPIGTRYLTRNL C-term 597

C : VP3 Masse monoisotopique : 59 936 8685 Masse moyenne : 59 974,6971 Formule moléculaire : C2661H3984N740O824S14

1 N-term ATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQ 94

95 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPFPFADVFMVPOYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPPSQ 198

199 MLRTGNNTFTSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLOFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA 302

303 TKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDDEEKFFPQSGVLI FGKQSGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRCNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDR 406

407 DYYLQGPWAKIPHDTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPPQILIKNTFVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVMVDFT 510

511 VDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL C-term 532

Figure 2. Séquence primaire d'acides aminés des protéines capsidiques d'AAV-2. Comme indiqué dans le logiciel de l'éditeur de séquence Agilent MassHunter, les protéines VP1 à 3 diffèrent uniquement par leurs séquences N-terminales : chacune contient la séquence de VP3, avec une séquence N-terminale supplémentaire soulignée en rouge (VP2) ou en rouge et vert (VP1). La masse monoisotopique, la masse moyenne et la formule moléculaire sont indiquées ci-dessus pour chaque protéine.

Comme publié ailleurs⁵, ces modifications post-traductionnelles ont été anticipées : (i) retrait de la méthionine initiatrice sur VP1 et VP3, et (ii) acétylation de l'acide aminé situé immédiatement après la méthionine retirée. Dans le logiciel de l'éditeur de séquence Agilent MassHunter, les acides aminés acétylés ont été affichés en rouge et en italique, et les masses moyennes théoriques de VP1 à 3 étaient respectivement de 81 856,13 ; 66 488,91 et 59 974,70 Da (figure 2).

Les échantillons d'AAV-2 dénaturés ont été séparés sur des colonnes ZORBAX RRHD 300Å SB-C3, SB-diphényle et SB-C18 (figures 3A à 3C) à l'aide des gradients d'analyse du tableau 1. Les protéines VP1 à 3 ont été séparées sous forme de deux pics sur les colonnes SB-C3 et SB-diphényle, VP1 et VP3 coéluant en un seul et même pic. Seule la colonne SB-C18 présentait la sélectivité nécessaire pour séparer chaque protéine capsidique.

Les spectres de masse déconvolués du pic de VP1 + VP3 (figures 3D et 3E) ont montré un signal de VP3 bien plus intense à 59 975,52 Da que VP1, reflétant sa plus grande abondance (d'un ordre de grandeur). La coélution de VP3 peut constituer un effet-matrice, interférant potentiellement avec la détection et la précision en masse de VP1 par suppression d'ions⁸. En revanche, la meilleure séparation de VP1 sur la colonne SB-C18 (figure 3F) a grandement réduit l'interférence due à VP3, permettant ainsi d'analyser VP1 de manière fiable et exacte par spectrométrie de masse.

Comme le montre la figure 4, les échantillons d'AAV-2 ont ensuite été séparés sur une colonne SB-C18 avec le gradient optimisé figurant dans la table 1, améliorant ainsi la résolution et la forme des pics et réduisant le temps d'analyse. Il est à noter que la légère ondulation du bruit de fond apparaissant dans le courant ionique total était probablement due à des traces résiduelles de Pluronic F-68, qui n'a pas interféré de manière significative avec l'analyse.

Point important, la masse déconvoluée observée pour VP1 était de 81 885,72 Da (figure 4E), un résultat supérieur de +29,6 Da à la valeur théorique de 81 856,13 Da. En revanche, les masses observées pour VP2 et VP3 correspondaient bien à leurs valeurs théoriques. Il a donc été supposé qu'un unique acide aminé avait été substitué dans la région N-terminale de VP1 (séquence soulignée en vert à la figure 2).

Confirmation de la substitution d'un unique acide aminé dans l'AAV-2

Une digestion tryptique et une cartographie peptidique de l'AAV-2 ont été effectuées afin de tester cette hypothèse. L'identification a été menée sur un peptide de 1 102,1864 m/z triplement chargé, dont le spectre de MS/MS a confirmé une substitution alanine \ thréonine au niveau de l'acide aminé 77 de la séquence de VP1, effectivement situé dans la région N-terminale (figure 5).

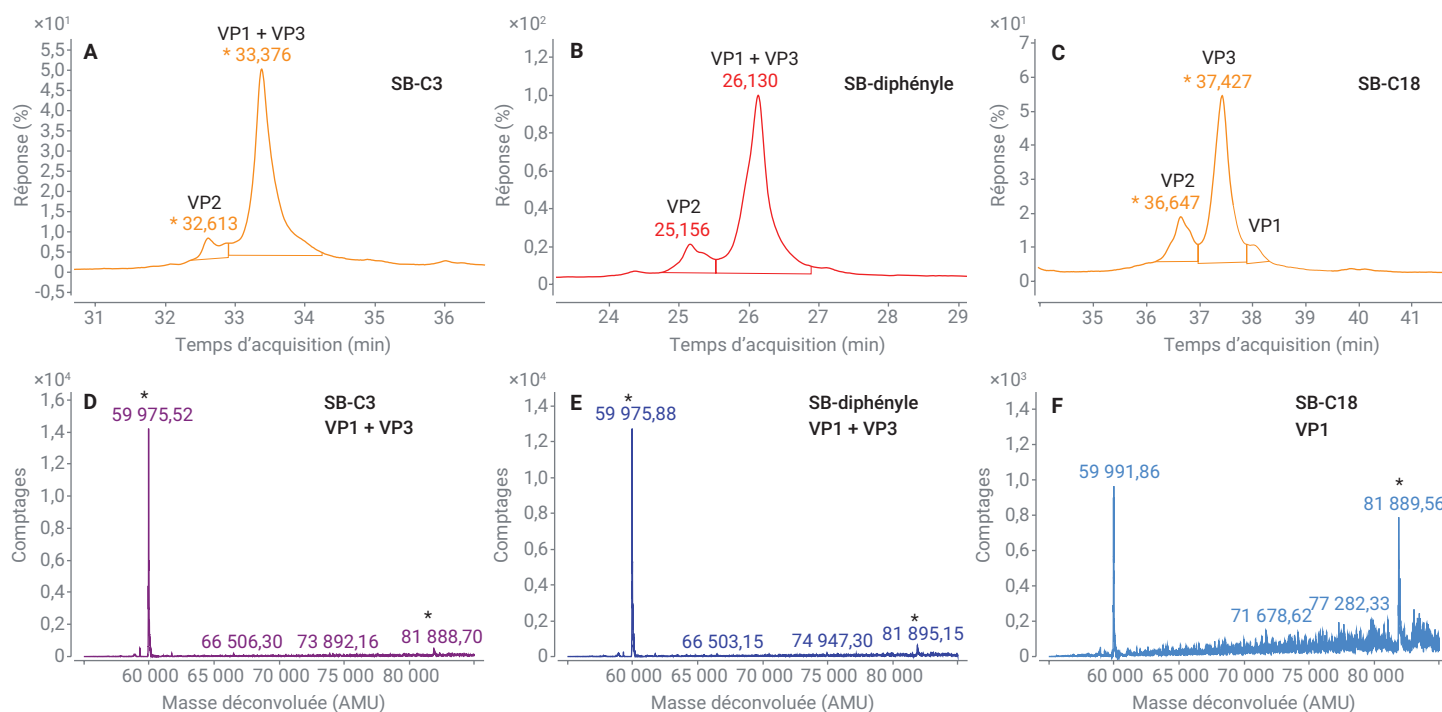


Figure 3. Développement de la méthode avec l'AAV-2. Chromatogrammes en fluorescence représentant la séparation avec les colonnes (A) Agilent ZORBAX RRHD 300Å SB-C3, (B) SB-diphényle et (C) SB-C18. On peut noter la résolution chromatographique supérieure de SB-C18. (D à F) Spectres de masse déconvolués des pics chromatographiques montrant la coélution de VP1 et VP3.

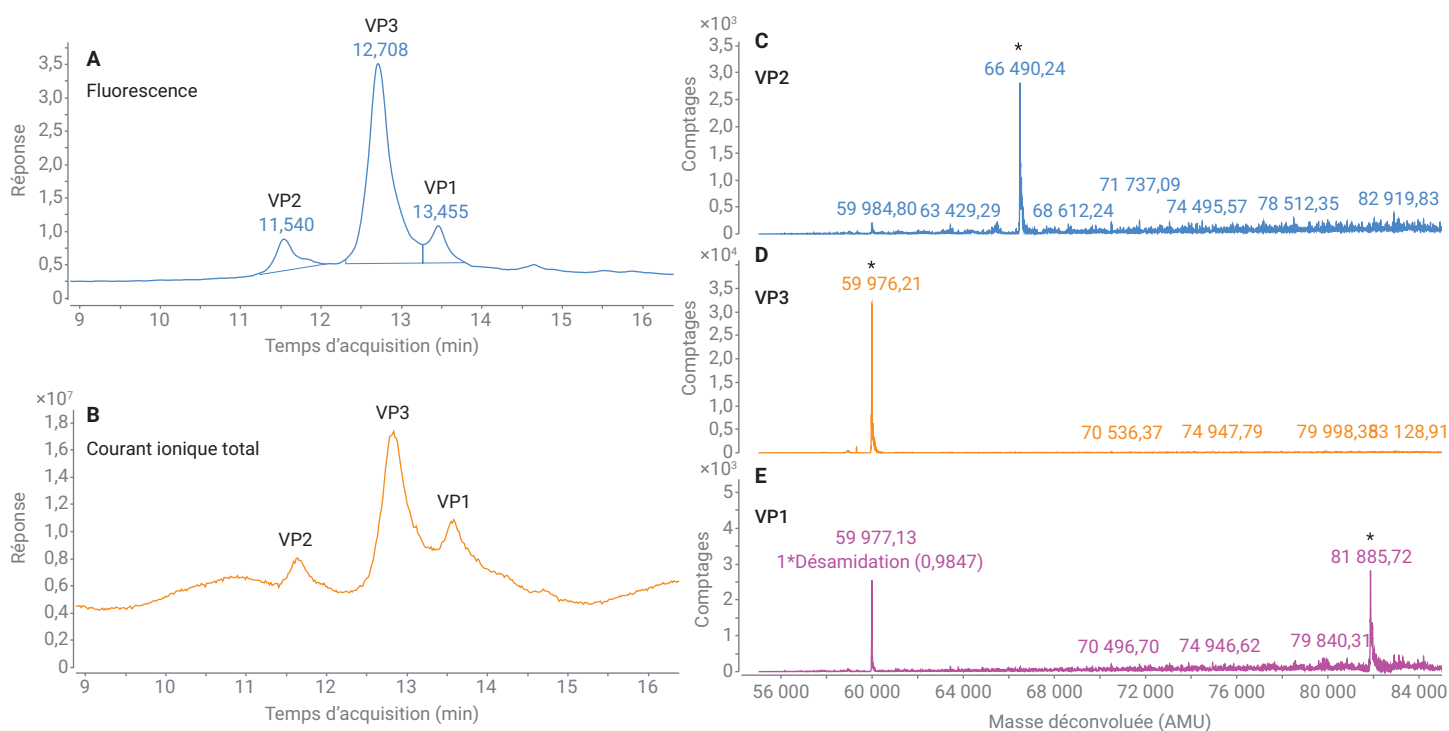


Figure 4. Analyse par LC/MS des protéines capsidiques d'AAV-2 dénaturées avec la méthode optimisée sur une colonne Agilent ZORBAX RRHD 300Å SB-C18. (A) Chromatogramme en fluorescence représentant les trois protéines capsidiques. (B) Courant ionique total. (C à E) Spectres de masse déconvolués des trois protéines capsidiques, avec les pics de masse concernés marqués par un astérisque.

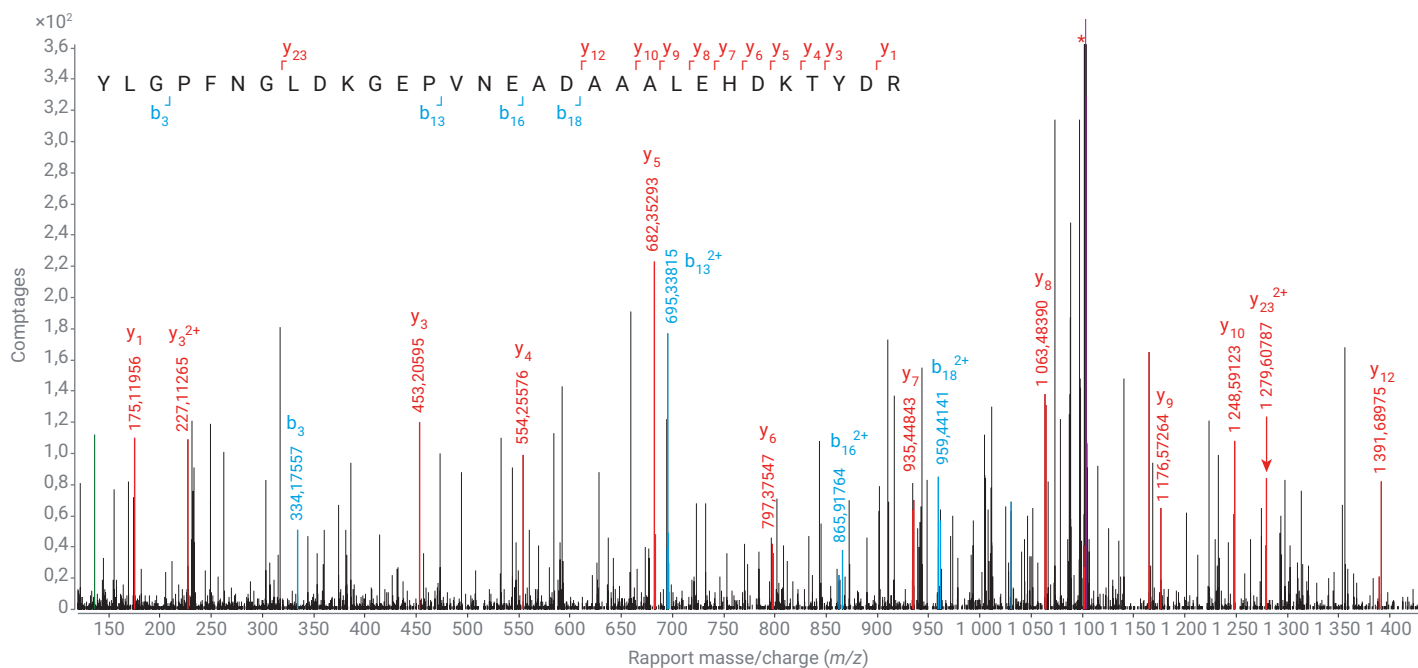


Figure 5. Confirmation par MS/MS de la substitution alanine (thréonine dans VP1). L'acide aminé substitué apparaît en rouge, et l'ion précurseur est indiqué par un astérisque rouge.

Une confirmation orthogonale de cette mutation a été obtenue par un séquençage de Sanger du plasmide utilisé pour l'expression de l'AAV-2 : ceci a montré qu'une substitution G/A avait altéré un codon GCC en le remplaçant par ACC (données non présentées).

Analyse de six sérotypes d'AAV supplémentaires

Pour évaluer le potentiel de généralisation de cette méthode LC/MS à l'analyse d'autres sérotypes d'AAV, les sérotypes AAV-7, 7m8, DJ, 9, rh10

et Anc80 ont été analysés avec la méthode SB-C18 optimisée décrite ci-dessus. Cette méthode a permis de séparer avec succès les sérotypes AAV-7, 7m8 et DJ (figures 6A à 6C), mais les sérotypes AAV-9, rh10 et Anc80 n'ont pu être séparés qu'en deux pics, VP1 et VP3 coéluant en un seul et même pic.

Les phases stationnaires diphenyle Agilent ont altéré la sélectivité, comparativement aux phases stationnaires à chaîne alkyle du type C3, C8 et C18. Les groupes phényle assurent une séparation basée sur

les interactions π - π , avec une affinité supplémentaire pour les acides aminés aromatiques et les doubles liaisons⁹. Une méthode SB-diphényle optimisée (tableau 1) a été développée afin de séparer avec succès les sérotypes AAV-9, rh10 et Anc80 (figures 6D à 6F). L'identité de chaque protéine capsidique a été automatiquement confirmée par le logiciel BioConfirm à l'aide du spectre de masse déconvolué de chaque pic, ce qui a mis en évidence un degré minimal d'interférence par les pics environnants (figures 7 et 8).

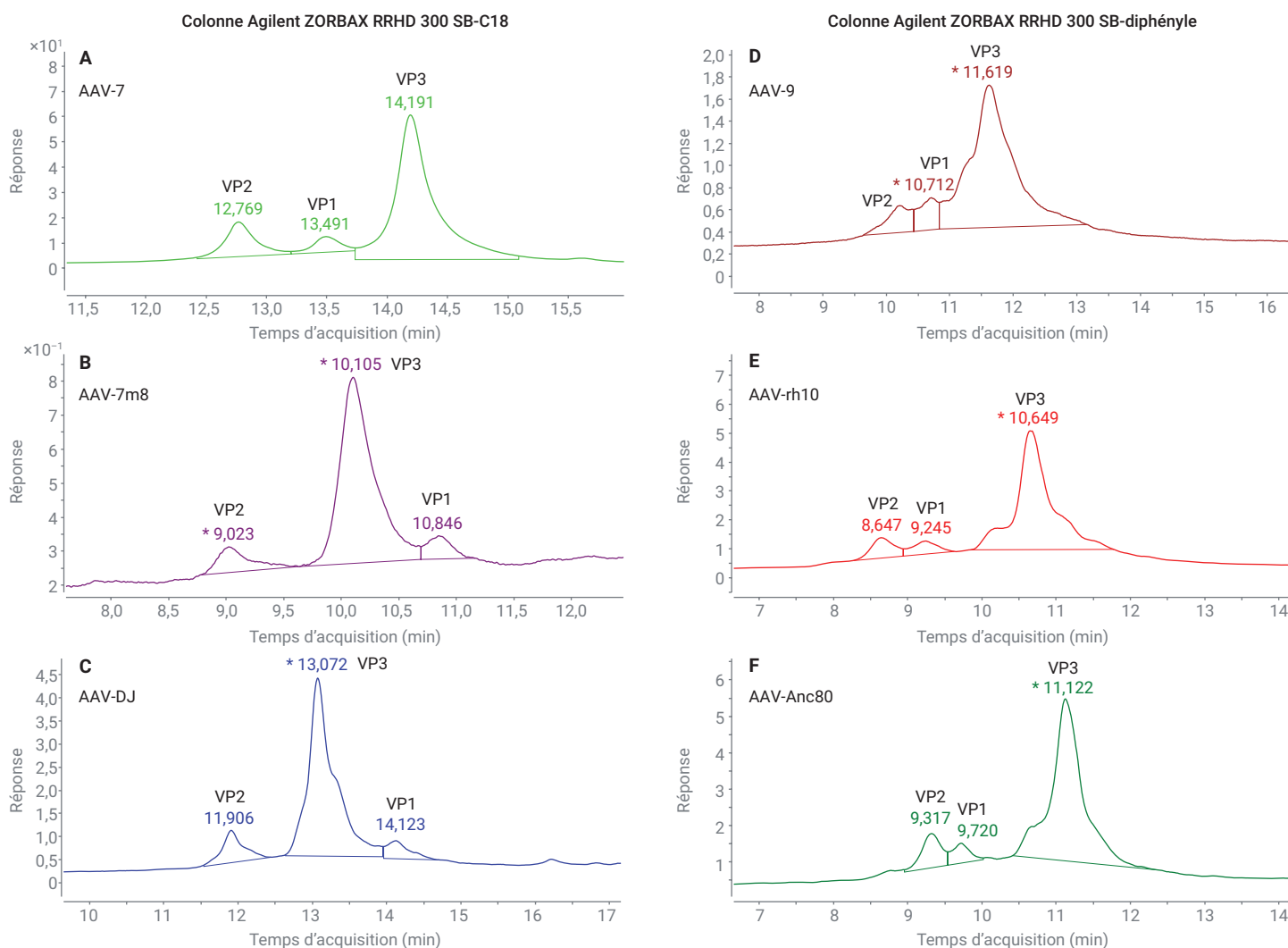


Figure 6. Analyse par LC/MS des protéines capsidiques d'AAV dénatuées de six sérotypes différents sur des colonnes (A à C) Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18 et (D à F) Agilent SB-diphényle.

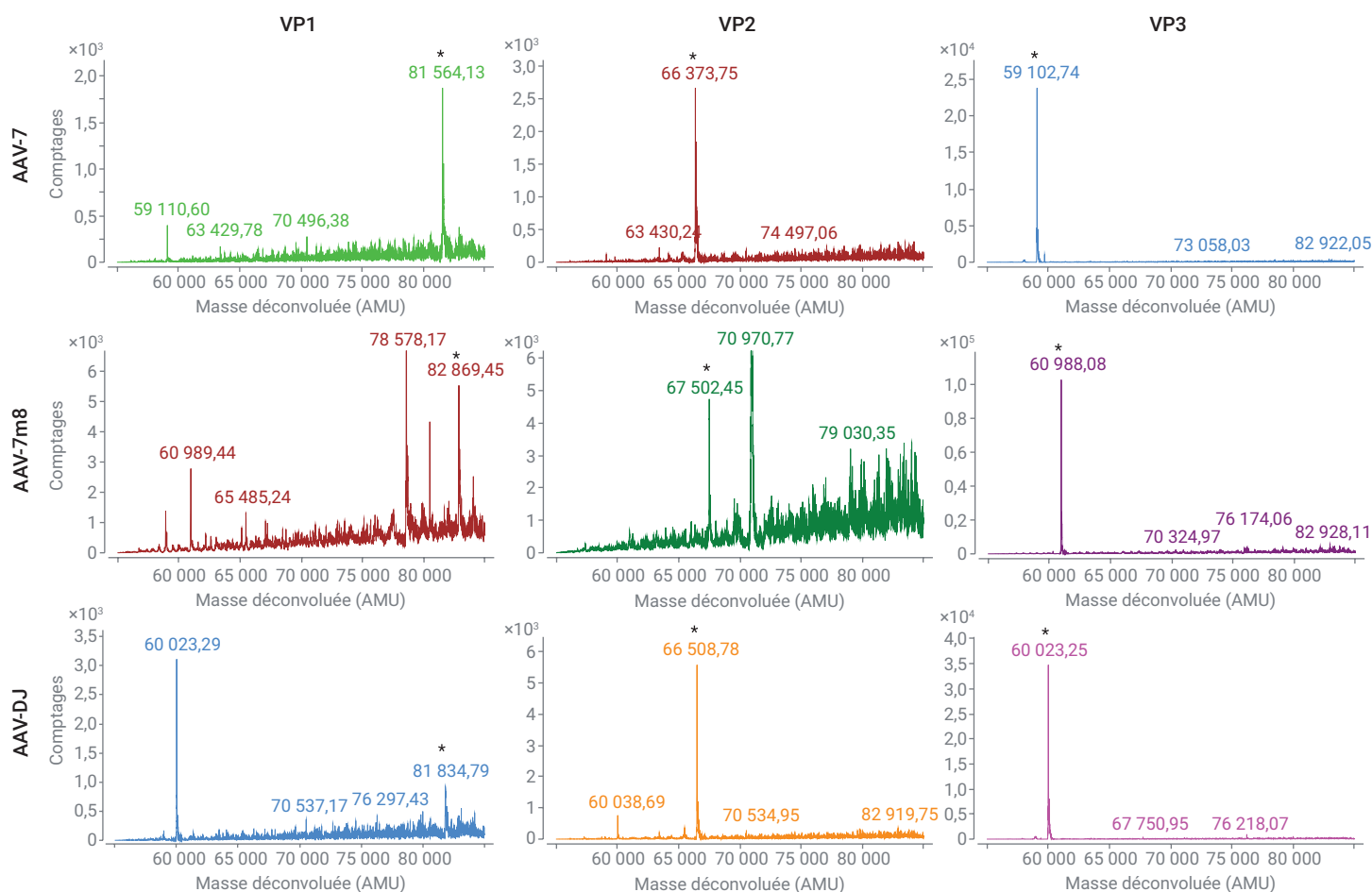


Figure 7. Spectres de masse déconvolués des protéines capsidiques d'AAV séparées sur une colonne Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18. Un certain degré d'interférence dû aux protéines des cellules hôtes coéluant a été observé avec l'AAV-7m8 (70 971,71 ; 78 578,01 et 80 495,10 Da).

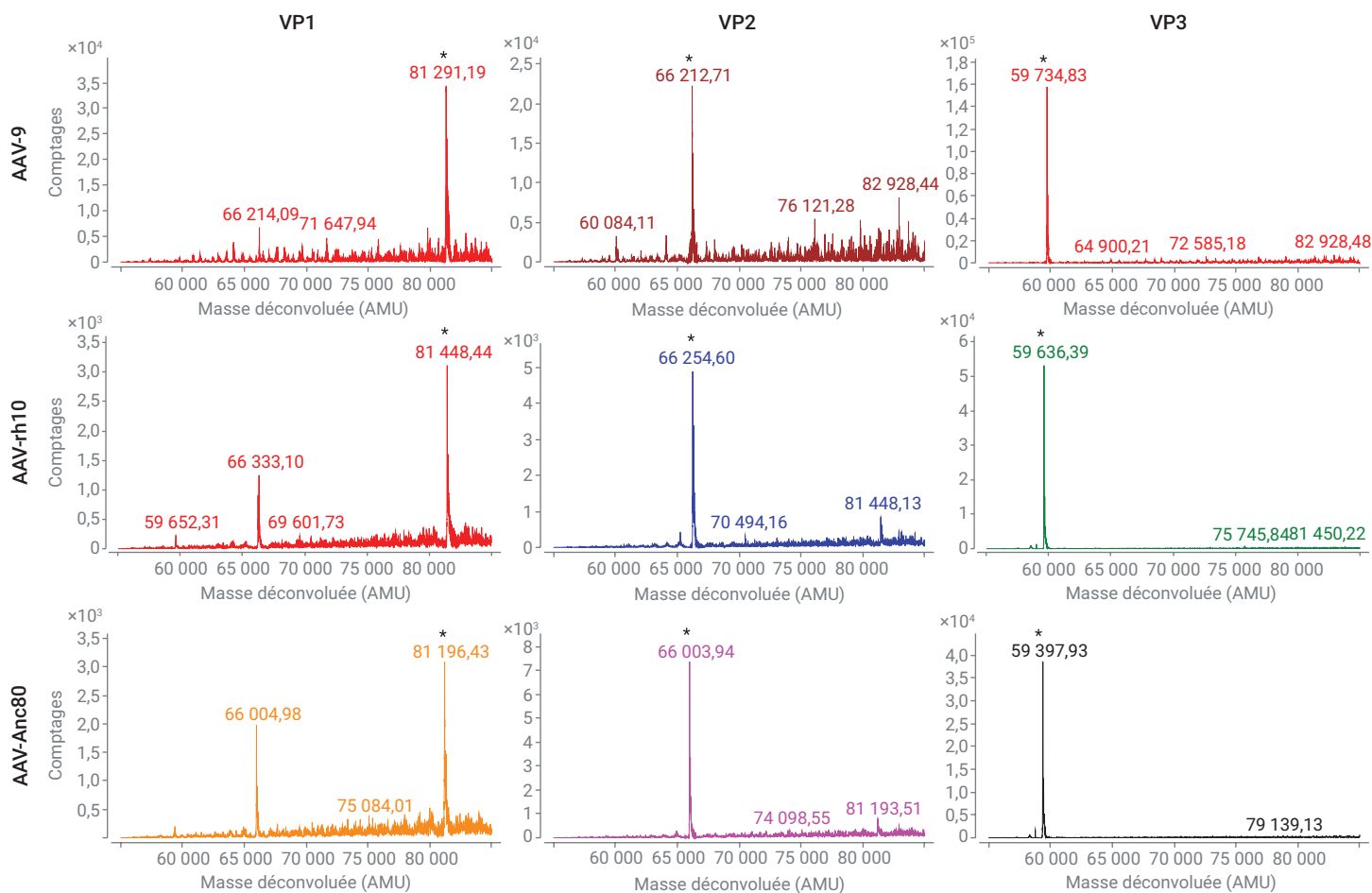


Figure 8. Spectres de masse déconvolués des protéines capsidiques d'AAV séparées sur une colonne Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-diphényle.

Des désamidations supposées ont été attribuées aux protéines VP1 des AAV-DJ et rh10, lesquelles pourraient être dues aux conditions de culture cellulaire ou auraient pu être générées durant la préparation des échantillons en tant qu'artéfacts causés par le chauffage. À l'exception de l'AAV-2, la différence entre la masse théorique et la masse observée pour chaque protéine capsidique (tableau 6) s'est avérée ≤ 3 Da, ce qui correspond à ≤ 32 ppm.

Les quantités relatives de VP1 à 3 dans le tableau 7 ont été mesurées par intégration des pics des chromatogrammes en fluorescence (figure 6) correspondant à chaque protéine capsidique. Même si ces résultats se sont révélés généralement conformes à la stœchiométrie attendue de 1:1:10 pour VP1/2/3, l'abondance de

VP1 s'est avérée plus variable que celle de VP2 dans les différents échantillons testés. Comme la protéine VP1 est connue pour être un facteur de localisation nucléaire critique¹⁰, la faible abondance de VP1 dans certains échantillons pourrait partiellement expliquer les différences d'infectiosité.

Tableau 6. Masses déconvoluées des protéines capsidiques.

Masse des protéines capsidiques d'AAV									
Sérotype	VP1			VP2			VP3		
	Théorique	Observée	Précision en masse (ppm)	Théorique	Observée	Précision en masse (ppm)	Théorique	Observée	Précision en masse (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

Tableau 7. Quantités relatives des protéines capsidiques.

Quantification des protéines capsidiques (% FLD)			
Sérotype	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

Conclusion

Cette note d'application détaille le développement de la méthode permettant de séparer efficacement des protéines capsidiques d'AAV intactes avec le système LC 1290 Infinity II équipé de colonnes ZORBAX RRHD 300Å SB-C18 ou SB-diphényle, suivi d'une détection et d'une analyse avec un détecteur à fluorescence 1260 Infinity II en tandem avec un système LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT. Cette note d'application démontre les capacités de cette méthode sur sept sérotypes d'AAV différents. Seule une étape de dénaturation relativement courte s'est avérée nécessaire pour la préparation des échantillons, et aucun échange de tampon n'a été requis du fait de la bonne compatibilité de la méthode avec les conditions de salinité élevée et avec le Pluronic F-68, un additif détergent courant.

Cette méthode a nettement surpassé les travaux récemment publiés⁵ en termes de séparation chromatographique, et représente une approche plus générale de la séparation efficace des protéines capsidiques d'AAV, qui peuvent coéluer sur une phase de colonne donnée, mais bien se séparer sur une autre. Comparativement à d'autres travaux récents utilisant un système CE/MS ZipChip pour une analyse similaire¹¹, cette approche permet d'atteindre une précision en masse ≤ 32 ppm comparée à ≤ 60 ppm pour la méthode ZipChip. De plus, les différences de temps de rétention relativement longues obtenues en chromatographie en phase liquide ont facilité la déconvolution exacte et reproductible des spectres de masse, et l'inclusion d'un détecteur à fluorescence a permis d'assurer une quantification relative exacte de l'abondance des protéines capsidiques. En revanche, les protéines capsidiques se sont avérées éluer dans une fenêtre temporelle étroite de 0,1 minute sur le système ZipChip, le taux de balayage relativement faible utilisé sur le spectromètre de masse lors de l'expérience empêchant l'obtention d'une quantification exacte.

Cette méthode devrait être utile pour confirmer rapidement l'identité des produits à base d'AAV avant leur libération, ainsi que pour cribler les bibliothèques de mutants d'AAV dans les laboratoires de découverte/développement.

Références

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. *Note d'application d'Agilent Technologies*, numéro de publication 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

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2021
Imprimé aux États-Unis, le 7 avril 2021
5994-2434FR

