

LC/MS di proteine capsidiche di virus adeno-associati per la conferma rapida dell'identità del prodotto

Autore

Brian Liau
Agilent Technologies, Inc.

Introduzione

I virus adeno-associati (AAV) sono una nuova promettente classe di farmaci bioterapeutici per il trattamento di numerose malattie genetiche, rare e intrattabili, come l'atrofia muscolare spinale e la degenerazione retinica ereditaria.¹ Gli AAV sono grandi complessi molecolari costituiti da un capsido proteico e DNA incapsulato; ogni AAV richiede tecniche analitiche specifiche per garantire la qualità e la sicurezza del prodotto completo. I capsidi degli AAV sono costituiti da tre proteine capsidiche differenti, comunemente indicate come VP1-3, in un rapporto stechiometrico di 1:1:10 con un totale di 60 copie di proteine per capsido.²

L'agenzia statunitense Food and Drug Administration raccomanda che i capsidi virali e il DNA incapsulato di tutti gli agenti terapeutici AAV siano identificati in modo inequivocabile prima del rilascio, soprattutto in quelle strutture in cui sono prodotti più sierotipi o varianti ingegnerizzate.³ Ad oggi, i metodi basati sull'uso di anticorpi, come ELISA e l'immunoblot, sono le tecniche più diffuse per l'analisi dei capsidi virali. Questi metodi presentano diversi svantaggi: oltre ad essere complicati e soggetti ad errore, i metodi basati su anticorpi richiedono la produzione di anticorpi altamente specifici per ogni tipo di AAV che viene analizzato. Questo può rivelarsi problematico in quanto i capsidi degli AAV di differenti prodotti possono presentare un alto livello di omologia: per esempio, i sierotipi AAV 1 e 6 differiscono solamente in sei aminoacidi (omologia del 99%), rendendone difficoltosa la distinzione mediante il legame dell'anticorpo.⁴

In principio, LC/MS offre la combinazione ideale di velocità e specificità per l'analisi delle proteine capsidiche virali, poiché la misura diretta di masse proteiche ovvia alla necessità di generare anticorpi per ogni tipo di AAV. Gli sforzi fatti finora, tuttavia, hanno condotto a separazioni cromatografiche di proteine capsidiche virali relativamente scarse.⁵ Questo è problematico in quanto la coeluizione può compromettere l'intensità del segnale e l'accuratezza di massa, oltre a impedire la quantificazione accurata della stechiometria del capsido, importante nel determinare l'infettività degli AAV.⁶

La presente nota applicativa dimostra un metodo LC/FLD-MS ottimizzato per l'analisi rapida delle proteine capsidiche degli AAV allo scopo di confermare la sequenza primaria di sette sierotipi differenti. Il metodo prevede una preparazione del campione semplice ed è robusto in presenza di elevate condizioni saline così come del comune additivo detergente non ionico Pluronic F-68.

Condizioni sperimentali

Campioni AAV

I sierotipi AAV 2, 7, 9, 7m8, DJ, rh10 e Anc80 sono stati acquistati da Vector Core @ GIS (A*STAR, Singapore). I campioni AAV sono stati espressi in cellule HEK-293 mediante tripla trasfezione e purificati mediante ultracentrifugazione analitica. I campioni sono stati forniti a una concentrazione di $\sim 1,2 \times 10^{10}$ genomi virali/ μ L in una soluzione tampone fosfato contenente Pluronic F-68 0,001% e utilizzati senza sottoporli a sostituzione del tampone.

Preparazione del campione

Un tampone di denaturazione contenente cloruro di guanidinio 12 M + DTT 40 mM in bicarbonato di ammonio 200 mM (pH $\sim$ 8,0) veniva preparato fresco per ciascuna analisi. Il tampone di denaturazione veniva aggiunto ai campioni AAV in un rapporto di 1:3 per ottenere una concentrazione finale di cloruro di guanidinio di 3 M. I campioni venivano quindi riscaldati a 70 °C per 15 minuti al fine di garantire una denaturazione completa. Per ogni analisi venivano iniettati $1,5 \times 10^{11}$ genomi virali.

LC/FLD-MS per l'analisi di proteine capsidiche intatte

I campioni sono stati analizzati usando la seguente strumentazione:

- Sistema LC Agilent 1290 Infinity II composto da:
 - Pompa High Speed Agilent 1290 Infinity II (G7120A)
 - Multicampionatore Agilent 1290 Infinity II (G7167B)
 - Termostato multicolumna Agilent 1290 Infinity II (G7116B)

- Rivelatore a fluorescenza Agilent 1260 Infinity (G1321B) con cella a flusso da 8 μ L
- Sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio Agilent

Per la separazione, sono state utilizzate le colonne Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond C18 (SB-C18) e SB-difenile con dimensioni di $2,1 \times 100$ mm, 1,8 μ m (codici 858750-902 e 858750-944). La colonna ZORBAX RRHD 300Å SB-C3 (codice 858750-909) è anche stata utilizzata per la fase di sviluppo, ma non per il metodo ottimizzato.

È stata scelta una fase mobile a elevata forza eluotropa costituita da TFA 0,1% + acido formico 0,1% in acqua deionizzata (fm A) e isopropanolo 90% + acqua 9,8% + acido trifluoroacetico 0,1% + acido formico 0,1% (fm B). Combinate a una temperatura elevata, simili condizioni della fase mobile hanno permesso di ottenere un eccellente potere risolutivo su colonne ZORBAX StableBond per l'analisi di anticorpi monoclonali.⁷

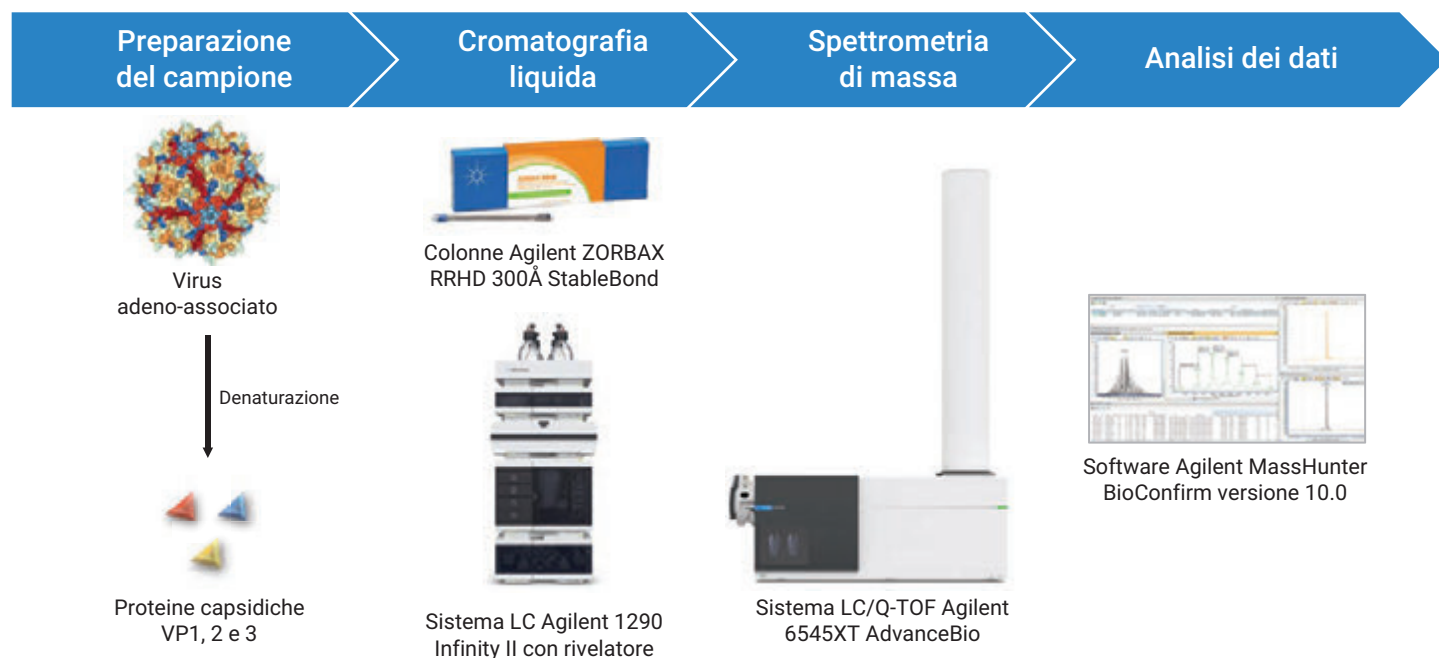


Figura 1. Apparecchiature e prodotti di consumo utilizzati nella presente nota applicativa.

Per la rivelazione a fluorescenza, si è utilizzata una cella a flusso da 8 µL in modalità singola eccitazione (280 nm)/ emissione multipla (315, 330, 345 e 360 nm), in quanto gli spettri di emissione dei residui aromatici possono variare in base al numero e al grado di esposizione ai solventi. L'emissione a 360 nm è risultata essere la più intensa ed è quindi stata utilizzata per tutte le analisi. Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando il software BioConfirm Agilent versione 10.0. Nelle Tabelle 1, 2 e 3 sono riportate le impostazioni degli strumenti e del software.

Analisi di mappatura peptidica mediante LC/MS

10 µL di campione contenenti $6,0 \times 10^{11}$ genomi virali di AAV 2 (~3,6 µg di proteina) sono stati denaturati e ridotti in 30 µL di Tris-HCl 150 mM (pH 8) contenente 760 mg/mL di cloruro di guanidinio + 3,8 mg/mL di TCEP per 60 minuti a 60 °C. Dopo aver fatto raffreddare a temperatura ambiente, è stata eseguita l'alchilazione aggiungendo 10 µL di iodoacetammide 133 mM e incubando a temperatura ambiente al buio per 30 minuti. Il campione è stato quindi diluito con 210 µL di Tris-HCl, dopodiché sono stati aggiunti 0,2 µg di tripsina modificata di grado per sequenziamento di Promega (codice V5117). La digestione è stata condotta per 2 ore a 37 °C, dopodiché sono stati aggiunti altri 0,2 µg di tripsina prima della digestione durante la notte a 37 °C. Il giorno successivo, la reazione

Tabella 2. Parametri di spettrometria di massa per proteine capsidiche intatte.

Sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio Agilent	
Sorgente	Dual Agilent Jet Stream
Temperatura del gas	350 °C
Flusso del gas	12 L/min
Nebulizzatore	35 psig
Temperatura dello sheath gas	350 °C
Flusso dello sheath gas	11 L/min
Vcap	4 kV
Tensione ugello	2 kV
Fragmentor	180 V
Skimmer	65 V
Intervallo di massa	Da 900 a 3.200 m/z
Velocità di acquisizione	1 spettro/s
Massa di riferimento	922,0098
Modalità di acquisizione	Positiva, intervallo di massa 3.200 m/z, range dinamico esteso (2 GHz)

è stata interrotta mediante l'aggiunta di 30 µL di acido formico 10%, seguita da purificazione con C-18 utilizzando un sistema Agilent AssayMap Bravo (G5542A).

La mappatura peptidica è stata eseguita su un sistema LC 1290 Infinity II abbinato al sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio. Per la separazione si è utilizzata una colonna AdvanceBio Peptide Mapping (codice 653750-902), dimensioni 2,1 × 150 mm, 2,7 µm. Nelle Tabelle 4 e 5 sono riportate le impostazioni degli strumenti.

Tabella 3. Impostazioni di deconvoluzione per proteine capsidiche intatte.

Impostazioni del software Agilent MassHunter BioConfirm versione 10.0	
Cromatogrammi definiti	FLD
Integrare quando estratti	Sì
Regolare il tempo di ritardo	0,1 min (Rivelatore a selezione di massa)
Deconvoluzione	Entropia massima
Deconvoluzione Massa m/z	Da 1.000 a 3.200
Deconvoluzione Intervallo di massa	Da 55 a 85 kDa
Fase di massa	0,5 Da
Deconvoluzione Sottrazione linea di base	7,0
Tolleranza abbinamento	32 ppm

Tabella 4. Parametri cromatografici della mappatura peptidica.

Sistema LC Agilent 1290 Infinity II	
Solvente A	Acido formico 0,1% in acqua deionizzata
Solvente B	Acido formico 0,1% in acetonitrile
Gradiente	Da 0 a 15 min, B da 5 a 40% da 15 a 18 min, B da 40 a 90% da 18 a 20 min, B 90%
Temperatura della colonna	60 °C.
Flusso	0,4 mL/min
Volume di iniezione	20 µL

Tabella 1. Parametri cromatografici per proteine capsidiche intatte.

Sistema LC Agilent 1290 Infinity II						
Condizione	Test	Ottimizzata	Test	Ottimizzata	Test	Ottimizzata
Colonna	Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond C18, 2,1 × 100 mm, 1,8 µm (codice 858750-902)		Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond difenile, 2,1 × 100 mm, 1,8 µm (codice 858750-944)		Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond C3, 2,1 × 100 mm, 1,8 µm (codice 858750-909)	
Solvente A	Acido formico 0,1% + acido trifluoroacetico 0,1% in acqua deionizzata	Acido formico 0,1% + acido trifluoroacetico 0,1% in acqua deionizzata	Acido formico 0,1% + acido trifluoroacetico 0,1% in acqua deionizzata	Acido formico 0,1% + acido trifluoroacetico 0,1% in acqua deionizzata	Acido formico 0,1% + acido trifluoroacetico 0,1% in acqua deionizzata	–
Solvente B	Isopropanolo 80% + acetonitrile 10% + acqua deionizzata 9,8% + acido formico 0,1% + acido trifluoroacetico 0,1%	Isopropanolo 90% + acqua deionizzata 9,8% + acido formico 0,1% + acido trifluoroacetico 0,1%	Isopropanolo 80% + acetonitrile 10% + acqua deionizzata 9,8% + acido formico 0,1% + acido trifluoroacetico 0,1%	Isopropanolo 90% + acqua deionizzata 9,8% + acido formico 0,1% + acido trifluoroacetico 0,1%	Isopropanolo 80% + acetonitrile 10% + acqua deionizzata 9,8% + acido formico 0,1% + acido trifluoroacetico 0,1%	–
Gradiente	Da 0 a 2 min, B 20% 42 min, B 35% 42,5 min, B 80% 45 min, B 80%	Da 0 a 5 min, B 28% 23 min, B 32,5% 23,5 min, B 80% 26 min, B 80%	Da 0 a 2 min, B 28% 42 min, B 43% 42,5 min, B 80% 45 min, B 80%	Da 0 a 5 min, B 33% 21 min, B 37% 21,5 min, B 80% 23 min, B 80%	Da 0 a 2 min, B 20% 42 min, B 35% 42,5 min, B 80% 45 min, B 80%	–
Temperatura della colonna	75 °C.	80 °C	75 °C	80 °C	75 °C	–
Flusso	0,4 mL/min					
Quantità di campione	1,5 × 10 ¹¹ genomi virali/iniezione					

Risultati e discussione

Sviluppo di metodi LC/MS

Per lo sviluppo di metodi, si è utilizzato AAV-2, in quanto è il sierotipo meglio studiato. Le sequenze delle proteine capsidiche VP1-3 sono mostrate nella Figura 2. Tutte le proteine capsidiche sono trascritte dalla stessa sequenza di DNA nel gene Cap, con splicing dell'mRNA e leaky scanning dei ribosomi e conseguente formazione di tre proteine con un elevato grado di omologia.⁶ Nello specifico, la sequenza di VP3 è comune a tutte e tre le proteine, mentre VP1 e VP2 differiscono solo nelle sequenze N-terminali.

Tabella 5. Parametri di spettrometria di massa per la mappatura peptidica.

Sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio Agilent	
Sorgente	Dual Agilent Jet Stream
Temperatura del gas	290 °C
Flusso del gas	13 L/min
Nebulizzatore	35 psig
Temperatura dello sheath gas	275 °C
Flusso dello sheath gas	12 L/min
Vcap	4 kV
Tensione ugello	2 kV
Fragmentor	175 V
Skimmer	65 V
Intervallo di massa	Da 100 a 1.700 m/z
Velocità di acquisizione	5 spettri/secondo
Intervallo MS/MS automatizzato	Da 50 a 1.700 m/z

Velocità di acquisizione MS/MS minima	3 spettri/secondo
Larghezza di isolamento	Media (~4 m/z)
Precursori/Ciclo	Top 10
Energia di collisione	3,6* (m/z)/100-4,8
Soglia per MS/MS	On; ripeti 3 quindi escludi per 0,2 minuti
Velocità di scansione basata sull'abbondanza dei precursori	Si
Target	25.000
Usare limite tempo di accumulo MS/MS	Si
Purezza	100% rigore; 30% valore soglia
Modello isotopico	Peptidi
Ordinare precursori	Solo per abbondanza; +2, +3, >+3
Massa di riferimento	922,0098
Modalità di acquisizione	Positiva, Intervallo di massa 3.200 m/z

A:VP1 Massa monoisotopica: 81.804,8749 Massa media: 81.856,1324 Formula molecolare: C3630H5483N1015O1127S15

1 N-term AADGYLPDWLEDTLSEGIQWNLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEFVNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLYKYNH 94
95 ADAEFOERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKKRVLEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQOPARKRLNFGQTDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLG 198
199 TMTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLINNN 302
303 WGFRLPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPOYGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGN 406
407 NTFSTYTFEDVFPFHSSYAHSQSLDRLMNLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLN 510
511 GRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVQDRDVYLOG 614
615 PIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTFPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYSKSVNVDFVTDTNGV 718
719 YSEPRPIGTRYLTRNL C-term 734

B:VP2 Massa monoisotopica: 66.447,1172 Massa media: 66.488,9131 Formula molecolare: C2938H4429N827O917S15

1 N-term APGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQOPARKRLNFGQTDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTTMTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCD 94
95 TWMGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRLPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL 198
199 TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPOYGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNTFTSYTFEDVFPFHSSYAHSQSLDRLMNLIDQ 302
303 YLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGK 406
407 QGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVQDRDVYLOGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILIK 510
511 KNTFPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYSKSVNVDFVTDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL C-term 597

C:VP3 Massa monoisotopica: 59.936,8685 Massa media: 59.974,6971 Formula molecolare: C2661H3984N740O824S14

1 N-term ATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQ 94
95 RLINNNWGFRLPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPOYGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQ 198
199 MLRTGNNTFTSYTFEDVFPFHSSYAHSQSLDRLMNLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA 302
303 TKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVQDR 406
407 DVYLOGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTFPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYSKSVNVDF 510
511 VDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL C-term 532

Figura 2. Sequenza aminoacidica primaria delle proteine capsidiche AAV-2. Mostrate nel software del gestore di sequenza MassHunter Agilent, VP1-3 mostrano differenze solo nelle sequenze N-terminali: tutti e tre contengono la sequenza di VP3, con una sequenza N-terminale aggiuntiva sottolineata in rosso (VP2) o in rosso e verde (VP1). La massa monoisotopica, la massa media e la formula molecolare sono riportate sopra ciascuna proteina.

Secondo quanto pubblicato altrove,⁵ si prevedevano le seguenti modificazioni post-traduzionali: (i) rimozione della metionina dell'iniziatore su VP1 e VP3 e (ii) acetilazione dell'aminoacido nella posizione immediatamente successiva alla metionina rimossa. Nel software del gestore di sequenza MassHunter Agilent, gli aminoacidi acetilati erano indicati in rosso e in corsivo e le masse medie teoriche di VP1-3 erano 81.856,13, 66.488,91 e 59.974,70 Da, rispettivamente (Figura 2).

I campioni AAV-2 denaturati venivano separati su colonne ZORBAX RRHD 300Å SB-C3, SB-difenile e SB-C18 (Figure da 3A a 3C) usando i gradienti di test mostrati nella Tabella 1. VP1-3 si separavano in due picchi sulle colonne SB-C3 e SB-difenile, con VP1 e VP3 coeluenti in un singolo picco. Solo la colonna SB-C18 possedeva la selettività necessaria per separare ciascuna proteina capsidica.

Gli spettri di massa deconvolti del picco VP1 + VP3 (Figure da 3D a 3E) mostravano un segnale VP3 molto più intenso a 59.975,52 Da rispetto a VP1, coerentemente con la sua maggiore abbondanza in ordine di grandezza. La coeluizione di VP3 potrebbe costituire un effetto matrice e interferire potenzialmente con la rivelazione e l'accuratezza di massa di VP1 dovuta alla soppressione ionica.⁸ Al contrario, l'eccellente separazione di VP1 sulla colonna SB-C18 (Figura 3F) riduceva fortemente l'interferenza causata da VP3, rendendo possibile un'analisi di VP1 in spettrometria di massa affidabile e accurata.

Come mostrato nella Figura 4, i campioni AAV-2 venivano quindi separati su una colonna SB-C18 usando il gradiente ottimizzato mostrato nella Tabella 1, migliorando così la risoluzione e la forma dei picchi e riducendo il tempo di analisi. Si noti che la lieve ondulazione di fondo nella corrente ionica totale era probabilmente causata da Pluronic F-68 residuale, che non ha interferito in modo significativo nell'analisi.

Soprattutto, la massa deconvoluta osservata di VP1 era 81.889,56 Da (Figura 4E), maggiore di +29,6 Da rispetto al valore teorico di 81.856,13 Da. Al contrario, le masse osservate di VP2 e VP3 mostravano una buona corrispondenza con i rispettivi valori teorici. Si è pertanto ipotizzato che fosse avvenuta una sostituzione di un singolo aminoacido nella regione N-terminale di VP1 (sequenza sottolineata in verde, Figura 2).

Conferma della sostituzione di un singolo aminoacido in AAV-2

Per verificare tale ipotesi, sono state eseguite una digestione triptica e la mappatura peptidica di AAV-2. È stato identificato un peptide a carica tripla di 1.102,1864 m/z , il cui spettro MS/MS ha confermato una sostituzione alanina → treonina all'aminoacido 77 della sequenza di VP1, che era effettivamente localizzato nella regione N-terminale (Figura 5).

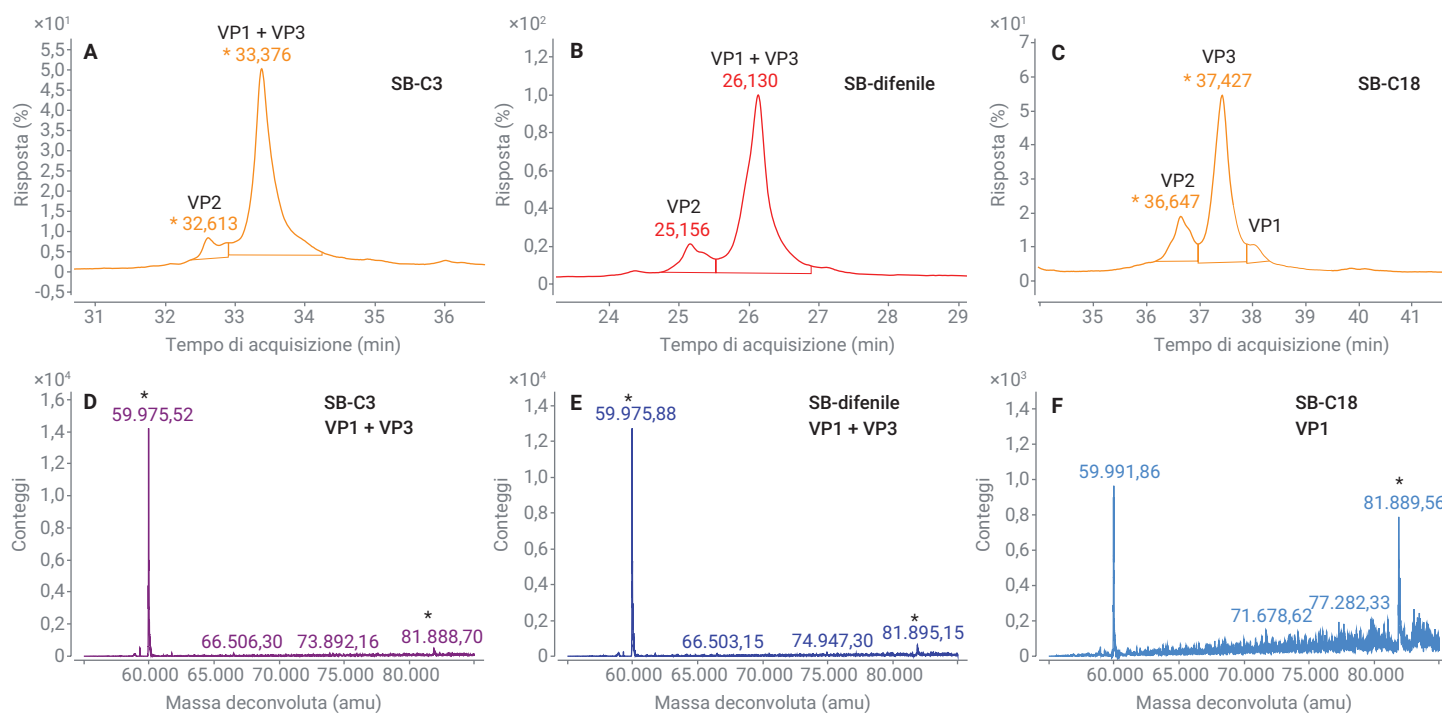


Figura 3. Sviluppo di metodi con AAV-2. Cromatogrammi a fluorescenza che illustrano la separazione usando colonne Agilent (A) ZORBAX-RRHD 300Å SB-C3, (B) SB-difenile e (C) SB-C18. Si noti l'eccellente risoluzione cromatografica di SB-C18. (Da D a F) Spettri di massa deconvolti di picchi cromatografici che mostrano la coeluizione di VP1 e VP3.

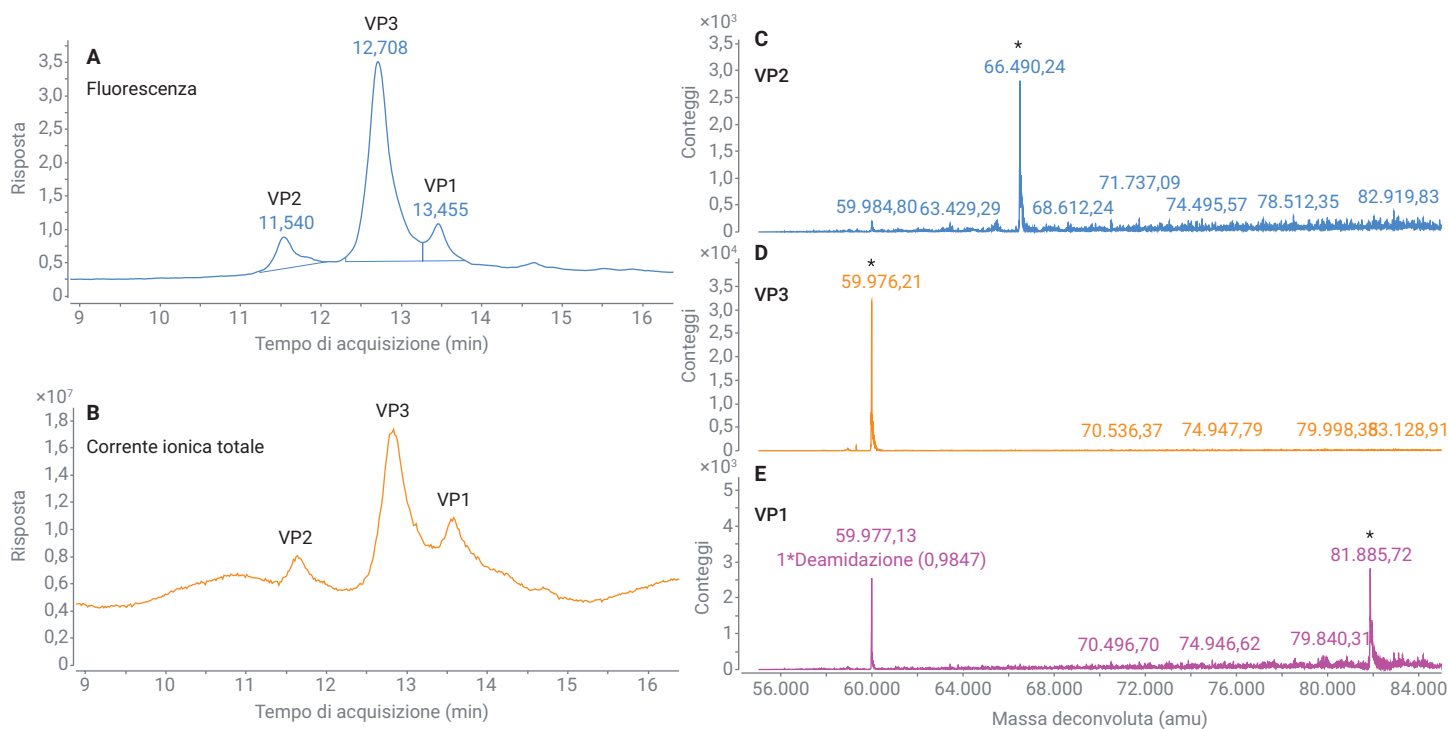


Figura 4. LC/MS di proteine capsidiche denaturate AAV-2 usando il metodo ottimizzato su una colonna Agilent ZORBAX-RRHD 300Å SB-C18. (A) Cromatogramma a fluorescenza che illustra le tre proteine capsidiche. (B) Corrente ionica totale. (Da C a E) Spettri di massa deconvoluti delle tre proteine capsidiche, con i picchi di massa rilevanti contrassegnati da asterischi.

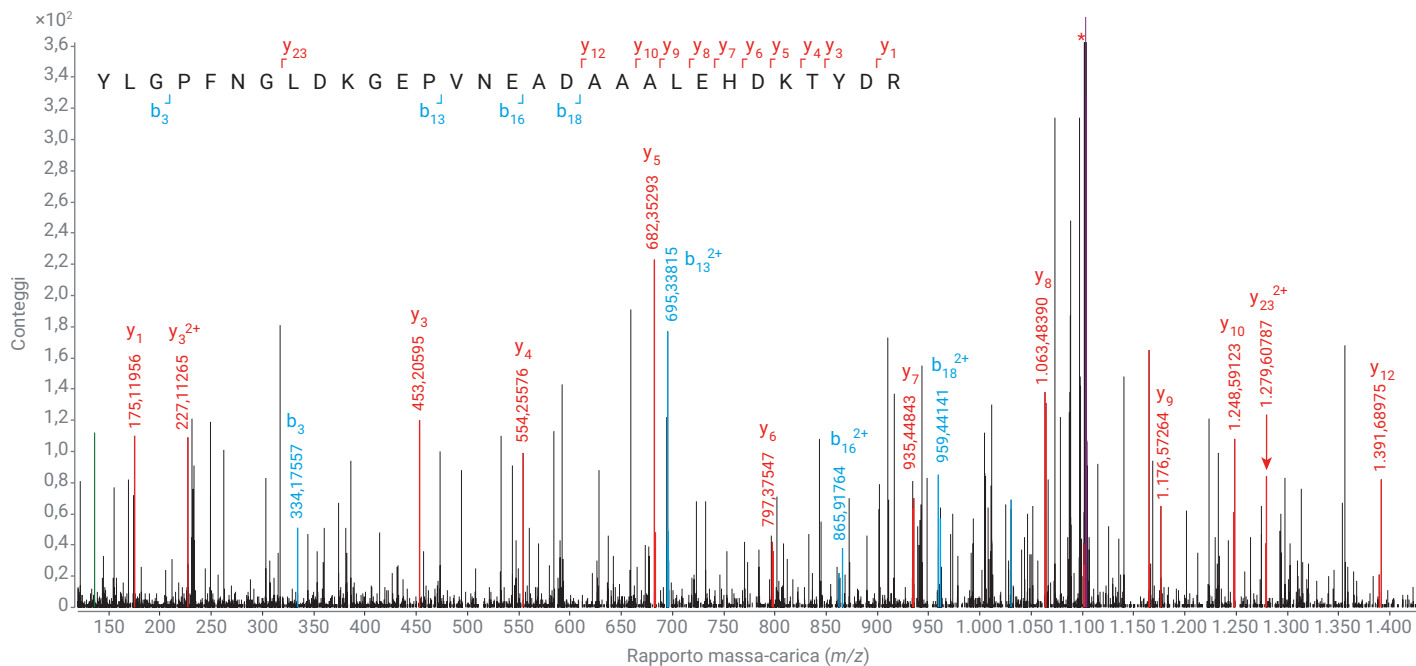


Figura 5. Conferma della sostituzione alanina → treonina in VP1 mediante MS/MS. L'aminoacido sostituito è mostrato in rosso, mentre lo ione precursore è contrassegnato da un asterisco rosso.

La conferma ortogonale di questa mutazione è stata ottenuta mediante sequenziamento Sanger del plasmide usato per l'espressione di AAV-2, che ha dimostrato come una sostituzione G → A aveva alterato un codone GCC in ACC (dati non mostrati).

Analisi di sei sierotipi AAV aggiuntivi

Per valutare se il metodo LC/MS fosse generalizzabile all'analisi di altri sierotipi AAV, AAV-7, 7m8, DJ, 9, rh10 e Anc80 sono stati analizzati con il metodo

ottimizzato SB-C18 descritto sopra. Con questo metodo si otteneva una buona separazione di AAV-7, 7m8 e DJ (Figure da 6A a 6C), mentre AAV-9, rh10 e Anc80 si separavano solo in due picchi, con VP1 e VP3 coeluenti in picchi singoli.

Le fasi stazionarie con difenile mostravano una selettività alterata rispetto alle fasi stazionarie con catene alchiliche come C3, C8 e C18. I gruppi fenilici permettevano separazioni basate su interazioni π - π con ulteriore

affinità per aminoacidi aromatici e doppi legami.⁹ Un metodo ottimizzato SB-difenile (Tabella 1) è stato sviluppato allo scopo di ottenere separazioni efficaci di AAV-9, rh10 e Anc80 (Figure da 6D a 6F). L'identità di ciascuna proteina capsidica è stata abbinata automaticamente con il software BioConfirm usando lo spettro di massa deconvoluto di ogni picco, che mostrava una ridotta interferenza da parte dei picchi vicini (Figure 7 e 8).

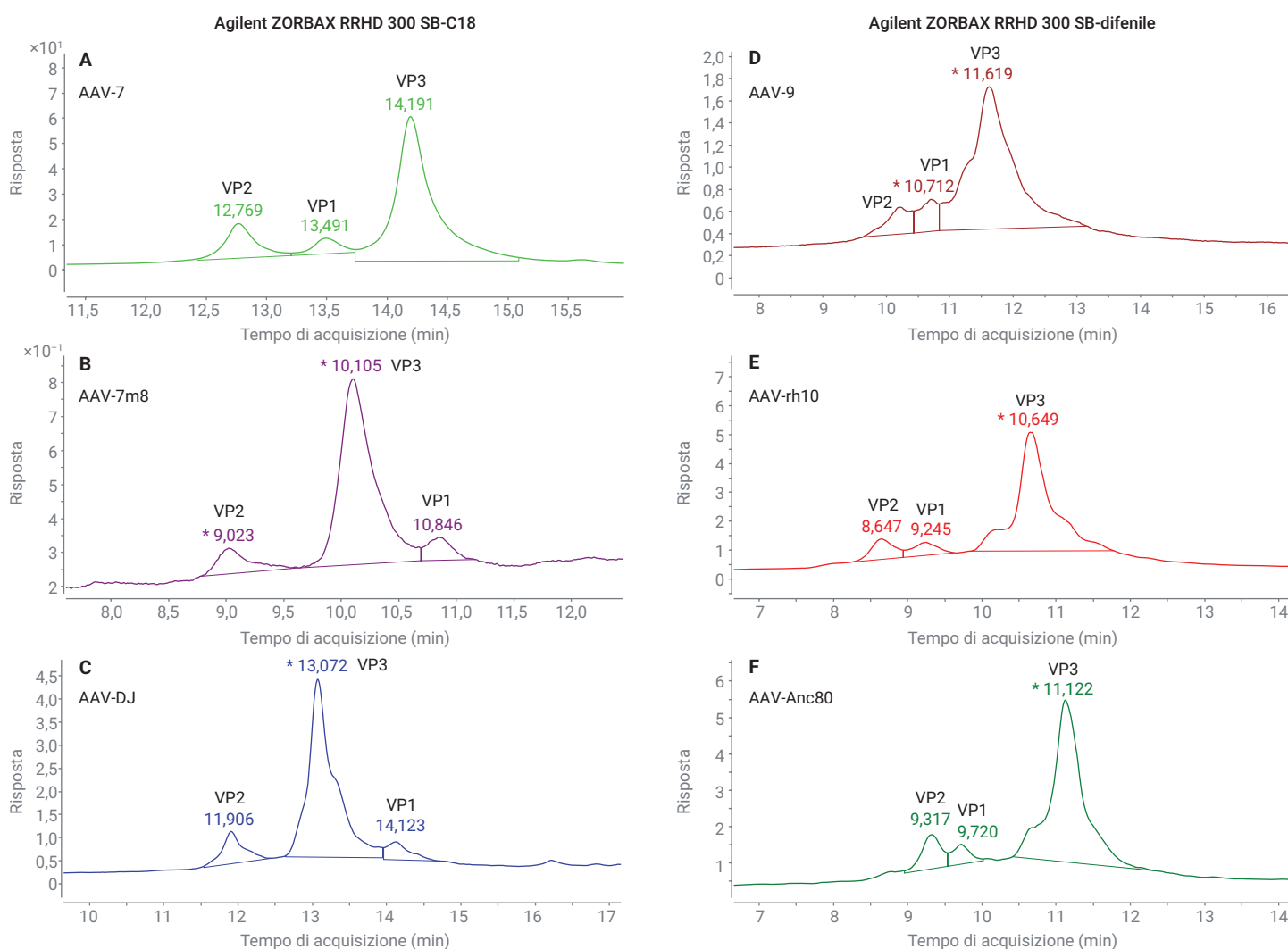


Figura 6. LC/MS di proteine capsidiche denaturate di AAV di sei differenti sierotipi su colonne Agilent (da A a C) ZORBAX RRHD 300 SB-C18 e (da D a F) Agilent SB-difenile.

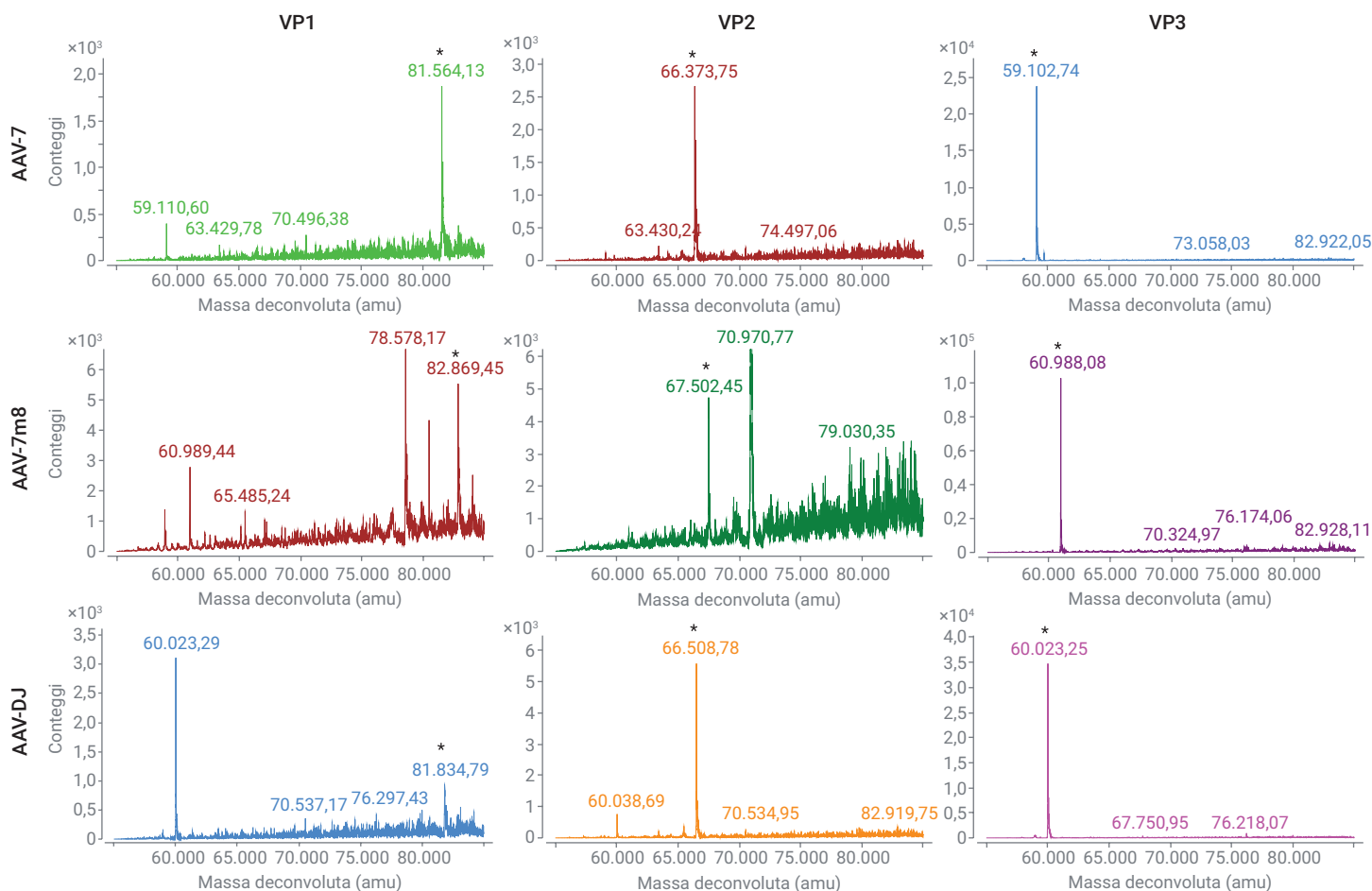


Figura 7. Spettri di massa deconvoluti di proteine capsidiche di AAV separate su una colonna Agilent ZORBAX-RRHD 300 SB-C18. Qualche interferenza da proteine della cellula ospite coeluenti è stata osservata in AAV-7m8 (70.971,71, 78.578,01 e 80.495,10 Da).

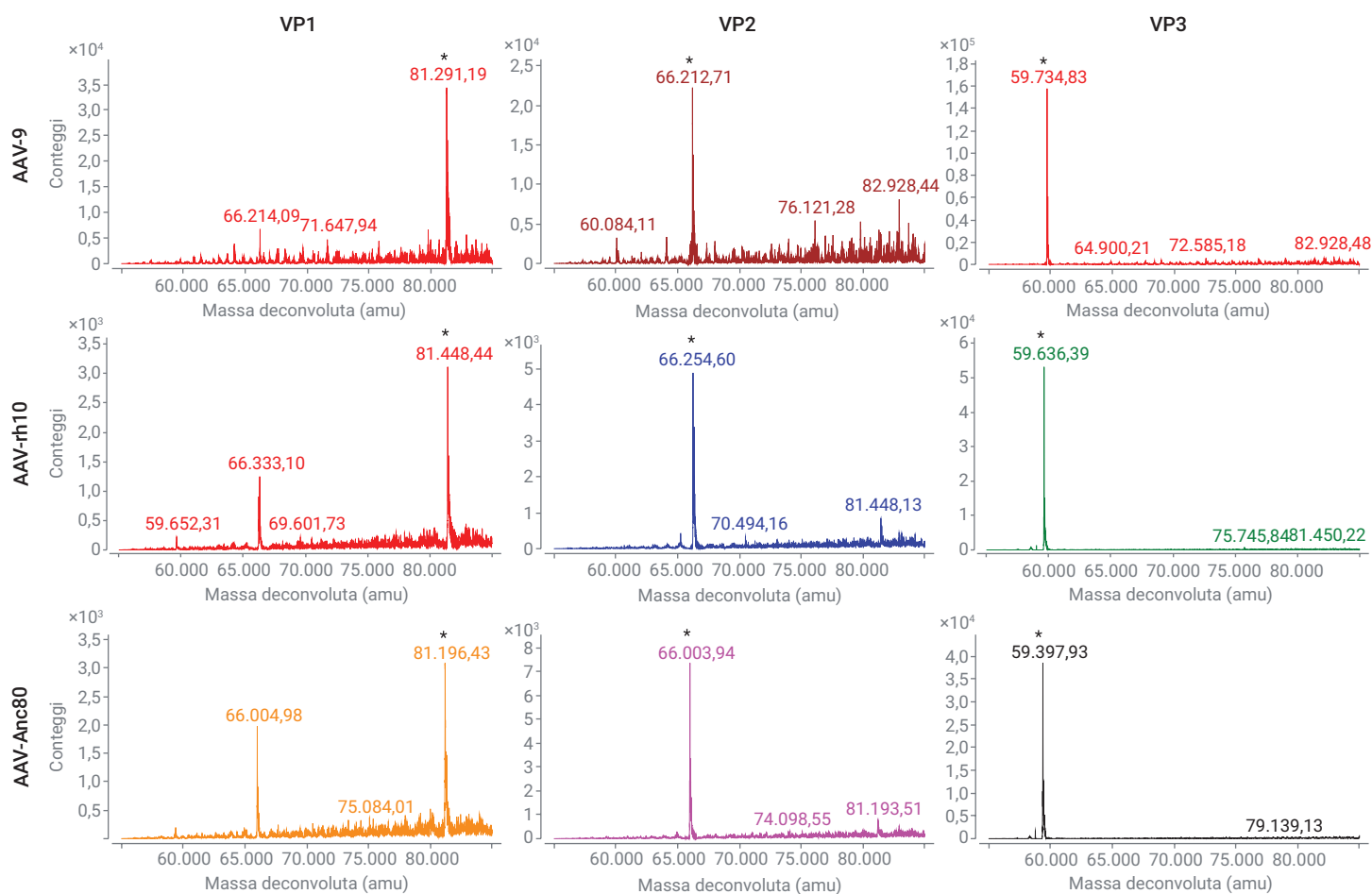


Figura 8. Spettri di massa deconvoluti di proteine capsidiche di AAV separate su una colonna Agilent ZORBAX-RRHD 300 SB-difenile.

Le deamidazioni sono state putativamente assegnate alle proteine VP1 di AAV-DJ e rh10; ciò potrebbe essere dovuto alle condizioni delle colture cellulari o essere generato durante la preparazione del campione come artefatti dovuti al riscaldamento. Ad eccezione di AAV-2, le masse teoriche e osservate per ciascuna proteina capsidica (Tabella 6) differivano di ≤ 3 Da, pari a ≤ 32 ppm.

Le quantità relative di VP1-3 nella Tabella 7 sono state misurate integrando i picchi dei cromatogrammi a fluorescenza (Figura 6) corrispondenti a ciascuna proteina capsidica. Mentre questi risultati in genere confermavano la stechiometria VP1:2:3 attesa di 1:1:10, l'abbondanza di

VP1 sembrava più variabile di VP2 in tutti i diversi campioni testati. Dal momento che VP1 è noto per essere un fattore critico di localizzazione nucleare,¹⁰ la minore abbondanza di VP1 in alcuni campioni spiegherebbe almeno in parte le differenze in infettività.

Tabella 6. Masse deconvolute di proteine capsidiche.

Masse di proteine capsidiche di AAV									
Sierotipo	VP1			VP2			VP3		
	Teoretica	Osservata	Accuratezza di massa (ppm)	Teoretica	Osservata	Accuratezza di massa (ppm)	Teoretica	Osservata	Accuratezza di massa (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

Tabella 7. Quantità relative di proteine capsidiche.

Quantificazione delle proteine capsidiche (rivelatore a fluorescenza %)			
Sierotipo	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

Conclusione

Nella presente nota applicativa viene descritto lo sviluppo del metodo per l'efficiente separazione di proteine capsidiche intatte di AAV utilizzando il sistema LC 1290 Infinity II abbinato alle colonne ZORBAX RRHD 300Å SB-C18 o SB-difenile, a cui seguono successive rivelazione e analisi mediante un rivelatore a fluorescenza serie 1260 Infinity II in abbinamento con un sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio. La nota applicativa dimostra le capacità di questo metodo con sette sierotipi AAV differenti. La preparazione del campione prevedeva solo una fase di denaturazione relativamente breve, senza sostituzione del tampone, in quanto il metodo era robusto in presenza di elevate condizioni saline e del comune additivo detergente Pluronic F-68.

Le prestazioni del metodo erano significativamente superiori rispetto a quelle riportate in recenti lavori pubblicati⁵ in termini di separazione cromatografica; rappresenta inoltre un approccio più generico alla separazione efficiente di proteine capsidiche degli AAV, che possono coeluire con un riempimento della colonna, ma ben risolvere su un altro. Confrontando un altro recente lavoro che utilizza un sistema CE/MS ZipChip per un simile tipo di analisi,¹¹ grazie al presente approccio è possibile ottenere un'accuratezza di massa di ≤ 32 ppm rispetto a ≤ 60 ppm di ZipChip. In aggiunta, le differenze nei tempi di ritenzione relativamente lunghe ottenute mediante cromatografia liquida facilitavano la deconvoluzione accurata e riproducibile degli spettri di massa; la presenza, inoltre, di un rivelatore a fluorescenza garantiva sensibilità e accuratezza della quantificazione relativa dell'abbondanza delle proteine capsidiche. Al contrario, le proteine capsidiche hanno dimostrato di eluire entro una stretta finestra temporale di 0,1 minuti con il sistema ZipChip, con una relativamente bassa velocità di scansione dello spettrometro di massa utilizzato nell'esperimento, impedendo un'accurata quantificazione.

Si prevede che il metodo sarà d'aiuto nella rapida conferma dell'identità dei prodotti AAV prima del rilascio, oltre che nello screening di librerie di mutanti degli AAV nei laboratori per la ricerca e lo sviluppo.

Bibliografia

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 applicativa Agilent Technologies*, codice pubblicazione 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

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2021
Stampato negli Stati Uniti, 7 aprile 2021
5994-2434ITE

