

Confirmación de la identidad de virus adenoasociados mediante LC/MS en la industria biofarmacéutica



A pesar de que los virus adenoasociados (AAV) cuentan con su propio conjunto exclusivo de atributos de calidad críticos, es posible seguir utilizando algunos de los ensayos convencionales que sirven para monitorizar productos terapéuticos con proteínas. Las cápsides de AAV contienen alrededor de 60 copias de las tres proteínas, VP1, VP2 y VP3, en una proporción estequiométrica de aproximadamente 1:1:10, respectivamente.¹ La separación cromatográfica de estas tres proteínas resulta compleja dado que existe una elevada homología de secuencia, ya que las tres se empalman a partir del mismo gen. Históricamente, para evaluar la proporción de las tres proteínas de la cápside se emplean geles de SDS-PAGE con tinción de plata o métodos de detección con anticuerpos, como ELISA y la inmunotransferencia. No obstante, estos enfoques son complicados y propensos a errores y puede ser preciso generar nuevos anticuerpos específicos para cada tipo de AAV. La generación de anticuerpos con la especificidad necesaria para distinguirlos puede ser difícil dado el alto grado de homología que existe entre los serotipos de los AAV. La cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC/MS) supera estas dificultades con mayor velocidad, especificidad y precisión. Agilent facilita soluciones de flujo de trabajo para la localización e identificación de modificaciones postraduccionales (MPT) tanto de la proteína intacta como del mapeo de péptidos.

LA FDA exige que los productos de AAV se identifiquen de forma inequívoca antes de su liberación, especialmente en instalaciones donde se produzcan varios serotipos o variantes de diseño.² El mapeo de péptidos es un método fundamental para determinar las secuencias de la proteína e identificar las MPT y, como tal, la ICH, la FDA y otros organismos de regulación lo exigen en los productos bioterapéuticos más asentados. A pesar de que siguen surgiendo normativas en torno a las terapias génicas con AAV, es posible que el mapeo de péptidos sea necesario en el futuro.

Los trabajos previos con LC/MS para confirmar la identidad y la abundancia relativa de las proteínas de la cápside intactas se veían afectados por una deficiente resolución cromatográfica. Las proteínas que coeluyen generan más dificultades en la determinación de la masa con exactitud, mientras que la similitud entre algunas proteínas de la cápside de los AAV (por ejemplo, AAV1 y AAV6 difieren en seis aminoácidos³) hace que la determinación precisa sea crucial para confirmar la identidad.

Las columnas Agilent ZORBAX RRHD de poro ancho abordan estos problemas del análisis de proteínas intactas, permitiendo una separación cromatográfica adecuada que permite una determinación de la masa con exactitud mediante detección por espectrometría de masas (MS).

- El tamaño de partícula inferior a 2 µm ofrece una alta resolución.
- Los poros anchos permiten que la transferencia de masa sea adecuada para que las separaciones sean eficaces.
- La tolerancia a una presión de 1200 bares permite aplicar métodos de UHPLC de alta eficiencia.
- La fase estacionaria de difenilos ofrece una exclusiva selectividad para las separaciones problemáticas.

Las columnas Agilent AdvanceBio Peptide Mapping están diseñadas para proporcionar mapas de péptidos de alta resolución para la identificación de proteínas y la determinación de modificaciones postraduccionales.

- Las partículas superficialmente porosas permiten separaciones de alta resolución a retropresiones moderadas.
- Con las fases móviles con ácido fórmico se consigue una capacidad de picos adecuada, lo que aumenta la sensibilidad en MS con respecto a las fases móviles con ácido trifluoroacético.

Prácticas recomendadas para llevar a cabo análisis de AAV con eficacia

Preparación de muestras

- Algunas proteínas recombinantes se formulan en tampones no volátiles con un contenido relativamente elevado en sales y estabilizantes, como los poloxámeros, que interfieren en la detección por MS y ensucian rápidamente el instrumento. El cambio de tampón de la muestra antes del análisis por LC/MS puede mejorar significativamente la calidad de los espectros y espaciar las operaciones de mantenimiento del sistema de MS. Es necesario ser consciente de que el cambio de tampón puede dar lugar a la inestabilidad de la muestra, de forma que se deben analizar las muestras directamente tras el cambio de tampón.
- Se recomienda el uso de viales de alta recuperación indicados para volúmenes de muestra pequeños.

Separación cromatográfica

- Reduzca la velocidad de la rampa del flujo desde el valor predeterminado hasta 1 ml/min² o menos. El incremento gradual del flujo prolonga la vida útil de la columna y contribuye a evitar la sobrepresión repentina. El ajuste se encuentra en la sección Advanced del control de la bomba para LC en el software de Agilent.
- Ajuste el límite de presión máxima del método de LC para que coincida con el de la columna (600 bares en el caso de AdvanceBio Peptide Mapping y 1200 bares para las columnas ZORBAX RRHD). Esto es esencial si las capacidades de presión máximas del sistema de LC superan las de la columna.
- Reduzca al mínimo el volumen muerto del sistema para maximizar la resolución. Se recomienda un sistema con bajo volumen muerto, como Agilent 1290 Infinity II equipado con [tubos de dispersión ultrabaja](#)⁴ para minimizar el volumen muerto.

Espectrometría de masas

- Desvíe el flujo de LC a los residuos fuera de los tiempos de retención de interés, especialmente durante un lavado con un contenido elevado de disolventes orgánicos al final del método y, si fuera posible, cuando eluye el volumen básico.
- Utilice disolventes de calidad para HPLC o superior.
- Establezca una rutina periódica de limpieza de la fuente de MS.

Primeros pasos: proteínas de la cápside intactas

El análisis de proteínas de la cápside intactas se describe con mayor profundidad en la nota de aplicación [5994-2434EN](#), que compara las diferentes fases estacionarias de la gama ZORBAX RRHD para la separación de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3.⁵ El flujo de trabajo se ilustra en la Figura 1.

Criterios de selección de columnas: proteínas de la cápside intactas

Para elegir una columna de fase inversa, especialmente para las proteínas de la cápside de AAV, resulta muy útil tener en cuenta tanto el método de detección que se va a utilizar como los aspectos que se conocen de la muestra. Las muestras de AAV se encuentran, a menudo, más diluidas que otras muestras de proteínas recombinantes. Elija columnas que satisfagan las necesidades de sensibilidad y resolución, dos parámetros que, históricamente, han resultado problemáticos al separar las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3.

– **Diámetro de la columna:** Se recomienda una columna de 2,1 mm en lugar de columnas de mayor diámetro interno, tanto por la sensibilidad como por la compatibilidad con la detección mediante MS. El flujo que se emplea con las columnas de 2,1 mm favorece una ionización por electrospray eficaz, que contribuye a aumentar la sensibilidad.

- **Longitud de la columna:** En las columnas de fase inversa, las columnas más largas pueden conseguir mayor resolución, por lo que se recomiendan las longitudes de 100 o 150 mm.
- **Tamaño de poro:** Las proteínas intactas son relativamente grandes en disolución, en especial en condiciones de desnaturalización por la fase inversa. Los poros grandes son necesarios para garantizar una transferencia de masa eficaz dentro y fuera de las partículas de la fase estacionaria, lo que, a su vez, aumenta la resolución. Se recomiendan poros de 300 Å.
- **Tamaño de partícula:** Los tamaños de partícula pequeños aumentan la resolución, por lo que es recomendable el uso de columnas RRHD con un tamaño de partícula de 1,8 µm.
- **Composición química de la fase estacionaria:** Cuando se trata de separar los analitos de interés, la selectividad de la fase estacionaria es otra variable que puede modificarse. Las fases estacionarias de cadenas alquílicas más cortas, como C4 o C8, son habituales en el análisis de proteínas intactas, pero existen otras opciones menos intuitivas que han demostrado ser beneficiosas para VP1, VP2 y VP3. Un factor adicional que complica la situación es que las diferencias entre cada serotipo de AAV dan lugar a distintos requisitos de fase estacionaria. La columna ZORBAX RRHD SB300-C18 funciona bien con AAV2 y AAV7, mientras que la columna ZORBAX RRHD 300-Diphenyl funciona bien con otros serotipos, como AAV9.

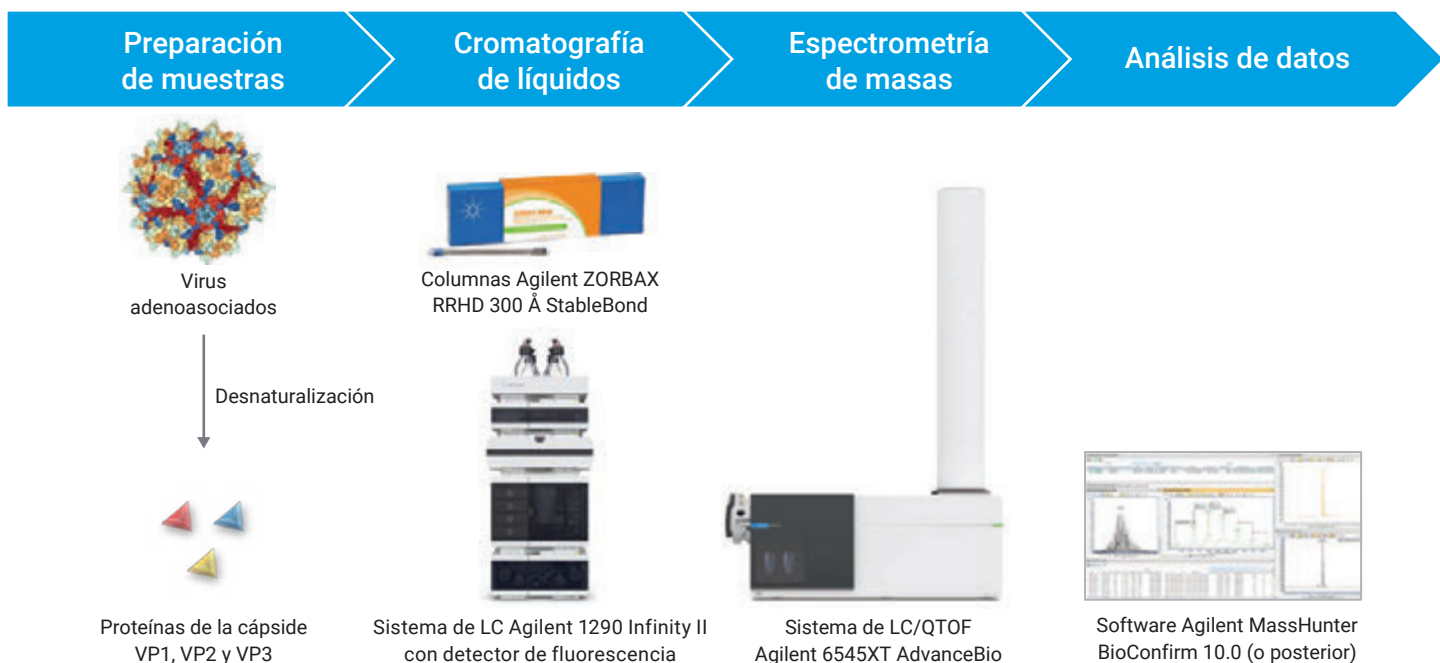


Figura 1. Descripción general del proceso para confirmar la identidad y medir cantidades relativas de proteínas individuales de la cápside que contienen la cápside de AAV intacta.

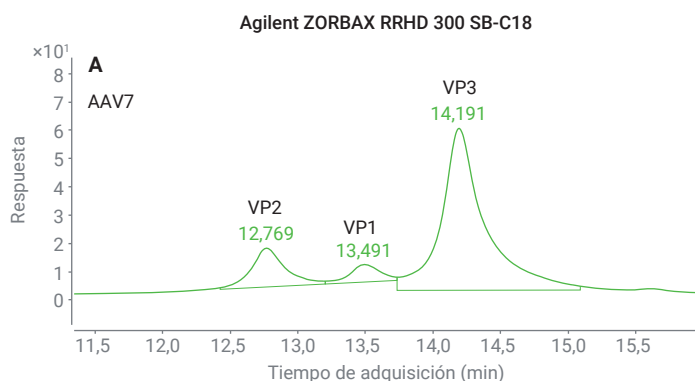


Figura 2. Separación de AAV7 en una columna Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18 con las condiciones que se describen en la Tabla 1.

Parámetro	Valor	
Columna	Columna Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm (ref. 858750-902)	
Instrumento	Agilent 1290 Infinity II	
Flujo	0,4 ml/min	
Fase móvil A	Ácido fórmico al 0,1 % + ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua	
Fase móvil B	Isopropanol al 90 %, agua al 9,8 %, ácido fórmico al 0,1 % + ácido trifluoroacético al 0,1 %	
Gradiente	Tiempo (min)	% de B
	0-5	28 %
	23	32,5 %
	23,5	80 %
	26	80 %
Tiempo posterior	3 minutos	
Temperatura de la columna	80 °C	

Tabla 1. Condiciones iniciales empleadas en el análisis de proteínas de la cápside intactas. Consulte la referencia⁵ [5994-2434EN](#) para obtener más información.

Primeros pasos: mapeo de péptidos

El análisis de mapeo de péptidos para las proteínas de la cápside de AAV con la columna AdvanceBio Peptide Mapping se describe en las notas de aplicación [5994-1980EN](#) y [5994-2434EN](#).

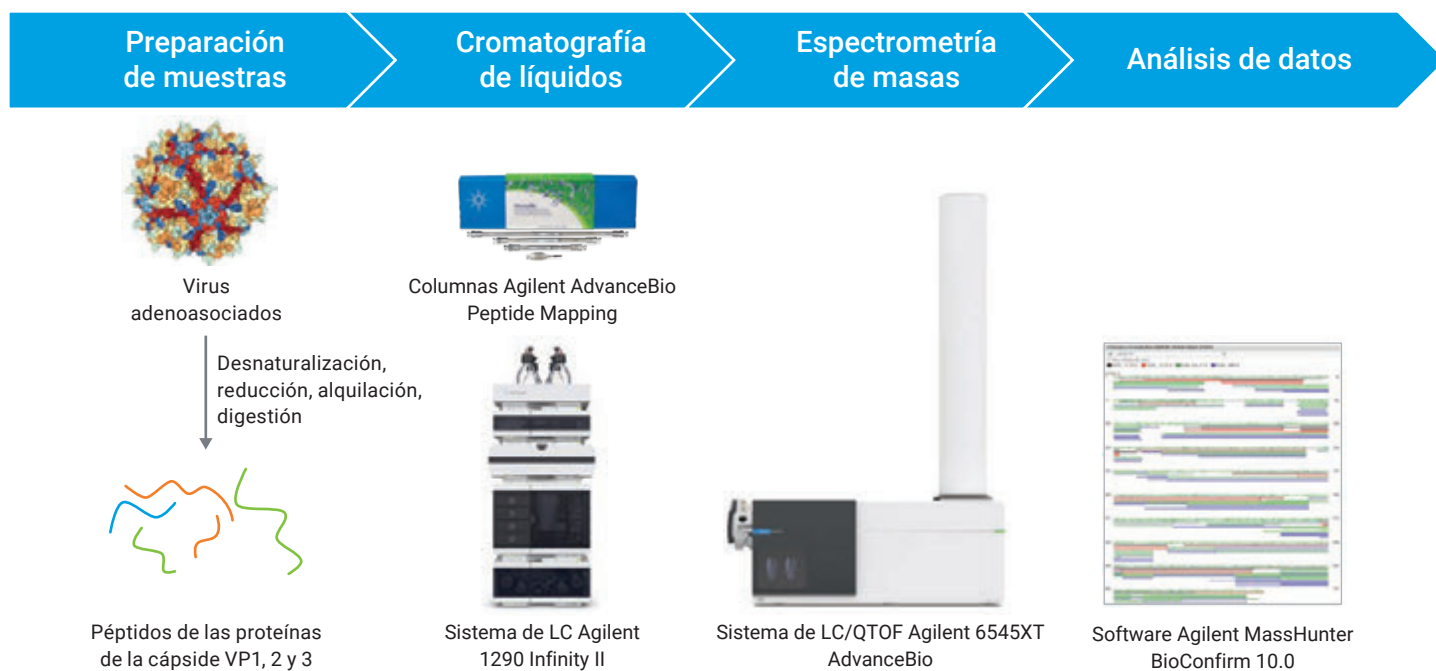


Figura 3. Descripción general del proceso para confirmar la estructura primaria de una proteína de la cápside e identificar las modificaciones postraduccionales.

Criterios para la selección de columnas: mapeo de péptidos

Como sucede en el análisis de proteínas de la cápside intactas, el conocimiento sobre la muestra y el método de detección deberían determinar la selección de la columna. Las dificultades que plantean la sensibilidad y la resolución son las mismas en las separaciones para el mapeo de péptidos de AAV digeridos. En este caso, en el que la cápside está formada por tres proteínas con componentes estrechamente relacionados, la separación para el mapeo de péptidos que se obtiene es todavía más complicada que la digestión de una proteína recombinante típica.

- **Diámetro de la columna:** Se recomienda una columna de 2,1 mm en lugar de columnas de mayor diámetro interno, tanto por la sensibilidad como por la compatibilidad con la detección mediante MS. El flujo que se emplea con las columnas de 2,1 mm favorece una ionización por electrospray eficaz, que contribuye a aumentar la sensibilidad.
- **Longitud de la columna:** En las columnas de fase inversa, las columnas largas pueden conseguir una mayor resolución. Se recomienda una columna con una longitud de 150 mm o superior.
- **Tamaño de partícula y tipo:** Las partículas pequeñas, por lo general, dan lugar a una mayor resolución; no obstante, las partículas superficialmente porosas ligeramente más grandes ofrecen casi la misma resolución a una retropresión mucho más baja. Se recomienda una partícula superficialmente porosa de 2,7 µm.
- **Composición química de la fase estacionaria:** Las fases estacionarias de C18 son la opción más usada en el mapeo de péptidos, aunque se encuentra disponible una amplia variedad de columnas de C18. En el mapeo de péptidos, se debe elegir una combinación de sistema de columna y fase móvil que genere picos estrechos con colas reducidas para maximizar la capacidad de picos. También es importante llegar a un compromiso entre la retención de péptidos hidrófilos de bajo peso molecular y una elución razonable de péptidos hidrófobos de elevado peso molecular.

La columna que se recomienda en este caso es AdvanceBio Peptide Mapping, dado que cumple los criterios necesarios.

Parámetro	Valor
Columna	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 x 150 mm, 2,7 µm (ref. 653750-902)
Instrumento	Agilent 1290 Infinity II
Flujo	0,4 ml/min
Fase móvil A	Ácido fórmico al 0,1 % en agua
Fase móvil B	Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo
Gradiente	Tiempo (min) % de B
	0-3 3 %
	50 35 %
	60 97 %
	62 97 %
	62,5 3 %
	65 3 %
Tiempo posterior	5 minutos
Temperatura de la columna	60 °C

Tabla 2. Condiciones iniciales empleadas para el mapeo de péptidos. Consulte la referencia⁶ [5994-1980EN](#) para obtener más información.

Referencias

1. Backovic, A. et al. Capsid Protein Expression and Adeno-Associated Virus like Particles Assembly in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microb. Cell Fact* 2012, 11, 124.
2. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) - Guidance for Industry. US Food and Drug Administration (FDA) 2020.
3. 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.
4. [Nota técnica sobre el kit de dispersión ultrabaja Agilent 1290 Infinity II](#)
5. LC/MS of Intact Adeno-Associated Virus (AAV) Capsid Proteins for Product Identity ([5994-2434EN](#))
6. Characterization of Viral Vector Particles Using the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF ([5994-1980EN](#))

Selección sencilla e información para pedidos

Para encargar los artículos que se indican en las tablas que aparecen a continuación en la tienda en línea de Agilent, añada los artículos a la lista de Productos favoritos haciendo clic en los enlaces de cada encabezado de Mi lista n.º.

A continuación, introduzca las cantidades que necesita de cada producto, pulse Añadir a la cesta y proceda al pago.

Su lista permanecerá guardada en Productos favoritos para que pueda usarla para futuros pedidos.

Si es la primera vez que utiliza los Productos favoritos, se le pedirá que introduzca su dirección de correo electrónico para verificar la cuenta. Si ya tiene cuenta de Agilent, podrá iniciar sesión. En cambio, si no tiene una cuenta registrada de Agilent, deberá registrarse para hacerse una. Esta función solo es válida en las regiones que tengan habilitado el comercio electrónico. Todos los artículos se pueden pedir también a través de sus canales habituales de venta y distribución.

Mi lista 1: Columnas Agilent ZORBAX RRHD para análisis de proteínas intactas

Descripción	Referencia
Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl, 2,1 x 150 mm, 1,8 µm, 300 Å	863750-944
Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm, 300 Å	858750-944
Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18, 2,1 x 150 mm, 1,8 µm, 300 Å	863750-902
Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm, 300 Å	858750-902

Mi lista 2: Columnas Agilent AdvanceBio Peptide Mapping para el análisis de péptidos

Descripción	Referencia
AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 x 150 mm, 2,7 µm	653750-902
AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 x 250 mm, 2,7 µm	651750-902
Precolumna AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 x 5 mm, 2,7 µm, 3/paq.	851725-911

Mi lista 3: Patrones

Descripción	Referencia
Agilent NIST mAb, 25 µl	5191-5744
Agilent NIST mAb, 4 x 25 µl	5191-5745
Patrón de diez péptidos, 71 µg, liofilizado	5190-0583
Patrón de péptidos HSA	G2455-85001

Mi lista 4: Consumibles y disolventes

Descripción	Referencia
Tubos y conexiones	
Conjunto de conector de conexión rápida Agilent InfinityLab con capilar de 0,12 x 105 mm prefijado (para su conexión en el inyector de la columna)	5067-5957
Conector de giro rápido Agilent InfinityLab (para conexión en la salida de la columna)	5067-5966
Capilar de giro rápido de acero inoxidable 0,12 x 280 (para conector de giro rápido)	5500-1191
Herramienta de montaje para conectores de giro rápido	5043-0915
Kit de válvula de seguridad en línea (para su uso con otro detector si se emplea en serie después de la celda de flujo de fluorescencia)	G4212-68001
Kit de tubos de dispersión ultrabaja para el sistema Agilent 1290 Infinity II	5067-5963
Kit de tubos de dispersión ultrabaja para el sistema Agilent 1290 Infinity II Bio	5004-0007
Recipientes para muestras	
Vial de alta recuperación, tapón de rosca, inserto fijo, transparente, volumen de inserto de 300 µl, 100/paq. Tamaño del vial: 12 x 32 mm (tapón de 12 mm)	5188-6591
Tapón de rosca, azul, séptum de PTFE/silicona roja, 100/paq. Tamaño del tapón: 12 mm	5182-0717
Vial, tapón de encapsulado/a presión, de polipropileno, 250 µl, 1.000/paq. Tamaño del vial: 12 x 32 mm (tapón de 11 mm)*	5190-3155
Tapón a presión, transparente, séptum de PTFE/silicona/PTFE, 100/paq. Tamaño del tapón: 11 mm (para 5190-3155)	5182-0566
Placa de 96 pocillos InfinityLab, 0,5 ml, 30/paq.	5043-9310
Almohadilla de sellado para placa de 96 pocillos InfinityLab, 50/paq.	5042-1389
Disolventes y aditivos	
Agua ultrapura InfinityLab para LC/MS, 1 l	5191-4498
Acetonitrilo ultrapuro InfinityLab para LC/MS, 1 l	5191-4496
Ácido fórmico, 5 ml	G2453-85060
Filtración de disolventes	
Dispositivo de filtración de disolventes InfinityLab	5191-6776
Matraz de filtración de disolventes InfinityLab, vidrio, 2 l	5191-6781
Membrana de filtro, 47 mm, de nailon, tamaño de poro de 0,2 µm, 100/paq.	5191-4341
Membrana de filtro, 47 mm, de celulosa regenerada, tamaño de poro de 0,2 µm, 100/paq.	5191-4340
Filtro de vidrio para botella de disolvente, entrada de disolvente, 20 µm	5041-2168
Manejo de disolventes	
Kit de inicio de tapas InfinityLab Stay Safe	5043-1222
Botella de disolvente InfinityLab, transparente, 1 l	9301-6524
Botella de disolvente InfinityLab, ámbar, 1 l	9301-6526
Botella de disolvente, transparente, 2 l	9301-6342
Botella de disolvente, ámbar, 2 l	9301-6341
Botella de purga InfinityLab Stay Safe	5043-1339
Depósito de residuos InfinityLab, GL45, 6 l con tapa Stay Safe	5043-1221
Filtro de carbón InfinityLab con lector de tiempo, 58 g	5043-1193

* Los viales de polipropileno tienen resistencia a productos químicos y son perfectos para las muestras sensibles al pH.

Más información:

www.agilent.com/chem/aav-analysis

Encuentre un centro de atención al cliente
de Agilent en su país:

www.agilent.com/chem/contactus

España

901 11 68 90

customercare_spain@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asia y Pacífico

inquiry_lsca@agilent.com

RA44707.6978009259

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Impreso en EE. UU., 8 de junio de 2022
5994-4829ES