

Confirmation par LC/MS de l'identité des virus adéno-associés (AAV) en Biopharma



Bien que les virus adéno-associés (AAV) aient leur propre ensemble d'attributs qualité critiques, il reste possible d'utiliser un grand nombre des analyses traditionnelles permettant de surveiller les produits biothérapeutiques à base de protéines déjà bien établis. Les capsides d'AAV comprennent ~ 60 copies de trois protéines, VP1, VP2 et VP3, selon un rapport stœchiométrique d'environ 1:1:10, respectivement.¹ La séparation chromatographique de ces trois protéines est difficile en raison d'une homologie de séquence élevée, l'épissage s'effectuant pour les trois sur le même gène. Les gels SDS-PAGE avec une coloration à l'argent ou des méthodes de détection par anticorps comme le test ELISA et les techniques de transfert ont été utilisés historiquement pour évaluer le rapport entre les trois protéines de capside. Cependant, ces méthodes sont fastidieuses et sources d'erreurs, et peuvent exiger la production de nouveaux anticorps spécifiques à chaque type d'AAV. La production d'anticorps avec la bonne spécificité pour bien les distinguer peut s'avérer difficile étant donné le degré élevé d'homologie entre les sérotypes AAV. La chromatographie liquide/spectrométrie de masse (LC/MS) permet de dépasser ces difficultés avec de meilleures vitesses, spécificité et précision. Agilent propose des flux de tâches pour les protéines intactes et pour la cartographie peptidique afin d'identifier et localiser les modifications post-traductionnelles.

La FDA (Food and Drug Administration des États-Unis) exige que les produits AAV soient identifiés sans ambiguïté avant leur sortie, en particulier dans les établissements qui produisent de nombreux sérotypes ou variants.² La cartographie peptidique est une méthode essentielle qui détermine les séquences protéiques et identifie les modifications post-traductionnelles. Elle est d'ailleurs exigée par les organismes de réglementation, comme l'ICH ou la FDA états-unienne, pour les biothérapies plus établies. Bien que les réglementations entourant les thérapies géniques reposant sur les AAV n'en sont qu'à l'état d'ébauche, la cartographie peptidique pourrait bien être exigée à l'avenir.

Précédemment, la confirmation par LC/MS de l'identité et de l'abondance relative des protéines de capsides intactes a pâti d'une mauvaise résolution chromatographique. La coélution des protéines rend plus difficile la mesure de la masse précise, or cette dernière est essentielle pour la confirmation d'identité en raison de la similarité entre certaines protéines de capside d'AAV (AAV1 et AAV6 ne diffèrent que par six acides aminés³).

Les colonnes haute définition à résolution rapide (RRHD) Agilent ZORBAX dotées de pores de grande taille relèvent le défi posé par l'analyse des protéines intactes, en offrant une bonne séparation chromatographique qui permet des mesures de la masse précises via la détection par spectrométrie de masse (MS).

- Particule inférieure à 2 µm pour une résolution élevée.
- Les pores larges permettent un bon transfert de masse pour des séparations efficaces.
- Tolérance à la pression de 1 200 bars pour des méthodes UHPLC hautement efficaces.
- La phase diphényle offre une sélectivité unique pour les séparations difficiles.

Les colonnes Agilent AdvanceBio Peptide Mapping sont conçues pour fournir des cartes peptidiques à résolution élevée pour l'identification des protéines et la détermination des modifications post-traductionnelles.

- Les particules superficiellement poreuses permettent de réaliser des séparations à résolution élevée avec des contrepressions réduites.
- Une bonne capacité de pic avec les phases mobiles contenant de l'acide formique, ce qui améliore la sensibilité MS comparativement aux phases mobiles contenant du TFA.

Meilleures pratiques pour des analyses AAV efficaces

Préparation d'échantillons

- De nombreuses protéines recombinantes sont formulées dans des tampons non volatiles relativement riches en sel et contenant des additifs stabilisants comme les poloxamères qui interfèrent avec la détection MS et encrassent l'instrument rapidement. Échanger le tampon de l'échantillon avant l'analyse par LC/MS peut améliorer considérablement la qualité spectrale et allonger les intervalles entre deux maintenances MS. Gardez à l'esprit que l'échange de tampon peut rendre l'échantillon instable, donc prévoyez d'analyser les échantillons directement après l'échange de tampon.
- Il est recommandé d'utiliser des flacons à capacité de récupération élevée prévus pour les petits volumes d'échantillon.

Séparation chromatographique

- Abaissez la vitesse de montée du débit depuis sa valeur par défaut jusqu'à 1 mL/min² ou moins. L'augmentation graduelle du débit prolongera la durée de vie de la colonne et permettra d'éviter des suppressions soudaines. Le réglage se trouve dans la section Avancée sur le contrôle de la pompe LC dans le logiciel Agilent.
- Réglez la limite de pression maximale dans la méthode LC pour qu'elle corresponde à celle de la colonne (600 bars pour AdvanceBio Peptide Mapping, 1 200 bars pour les colonnes RRHD ZORBAX). Cela est essentiel pour tous les cas où les capacités de pression maximale de la LC dépassent celles de la colonne.
- Minimisez le volume mort du système pour maximiser la résolution. Il est recommandé d'utiliser un système à faible volume mort comme le LC Agilent 1290 Infinity II équipé d'un [tube de dispersion ultra basse](#)⁴ pour minimiser le volume mort.

Spectrométrie de masse

- Redirigez le flux LC en dehors du ou des temps de rétention d'intérêt vers la collecte des déchets, en particulier au cours d'un rinçage riche en molécules organiques à la fin de la méthode et, si possible, lors de l'élution du volume mort.
- Utilisez des solvants de qualité HPLC ou supérieure.
- Effectuez régulièrement un nettoyage de routine de la source MS.

Prise en main – Protéines de capsides intactes

L'analyse des protéines intactes des capsides est décrite de manière plus approfondie dans la note d'application [5994-2434EN](#), qui compare différents greffages des colonnes de la famille ZORBAX RRHD pour la séparation des protéines de capside VP1, VP2 et VP3.⁵ Le flux de tâches est illustré à la figure 1.

Critère de sélection de colonne – Protéines de capsides intactes

Au moment de choisir une colonne en phase inverse, en particulier pour les protéines de capsides AAV, il est utile de tenir compte à la fois de la méthode de détection qui sera utilisée et de ce que l'on sait de l'échantillon. Les échantillons AAV sont souvent plus dilués que d'autres échantillons de protéine recombinante. Choisissez des colonnes qui répondent à la sensibilité et à la résolution, deux paramètres historiquement difficiles durant la séparation des protéines de capside VP1, VP2 et VP3.

- **Diamètre de la colonne** : il est recommandé d'utiliser des colonnes de diamètre interne de 2,1 mm plutôt que des colonnes de diamètres plus grands pour des raisons de sensibilité et de compatibilité avec la détection MS. Le débit utilisé avec les colonnes de 2,1 mm est propice à une ionisation electrospray efficace, ce qui favorise aussi la sensibilité.
- **Longueur de colonne** : pour les colonnes en phase inverse, il est recommandé d'utiliser des colonnes plus longues, de 100 ou 150 mm, car elles permettent d'obtenir une meilleure résolution.
- **Porosité** : les protéines intactes sont relativement volumineuses en solution, particulièrement dans des conditions dénaturantes en phase inverse. Les pores de grands diamètres sont nécessaires pour que le transfert de masse soit efficace dans et hors des particules de la phase stationnaire, ce qui à son tour améliore la résolution. Nous recommandons des pores de 300 Å.
- **Granulométrie** : les particules de plus petites tailles augmentent la résolution, donc les colonnes RRHD de 1,8 µm sont recommandées.
- **Greffage de la phase stationnaire** : lorsqu'on cherche à séparer les composés d'intérêt, la sélectivité de la phase stationnaire est une autre variable qui peut être changée. Les phases stationnaires à chaînes alkyles plus courtes, comme C4 ou C8, sont courantes pour les protéines intactes mais des options moins intuitives se sont révélées utiles pour VP1, VP2 et VP3. Un facteur supplémentaire vient compliquer la situation : les différences entre chaque résultat de sérotype AAV selon les exigences des différentes phases stationnaires. La colonne ZORBAX RRHD SB300-C18 convient bien pour AAV2 et AAV7, tandis que la colonne ZORBAX RRHD 300-Diphenyl est mieux adaptée à d'autres sérotypes, dont AAV9.

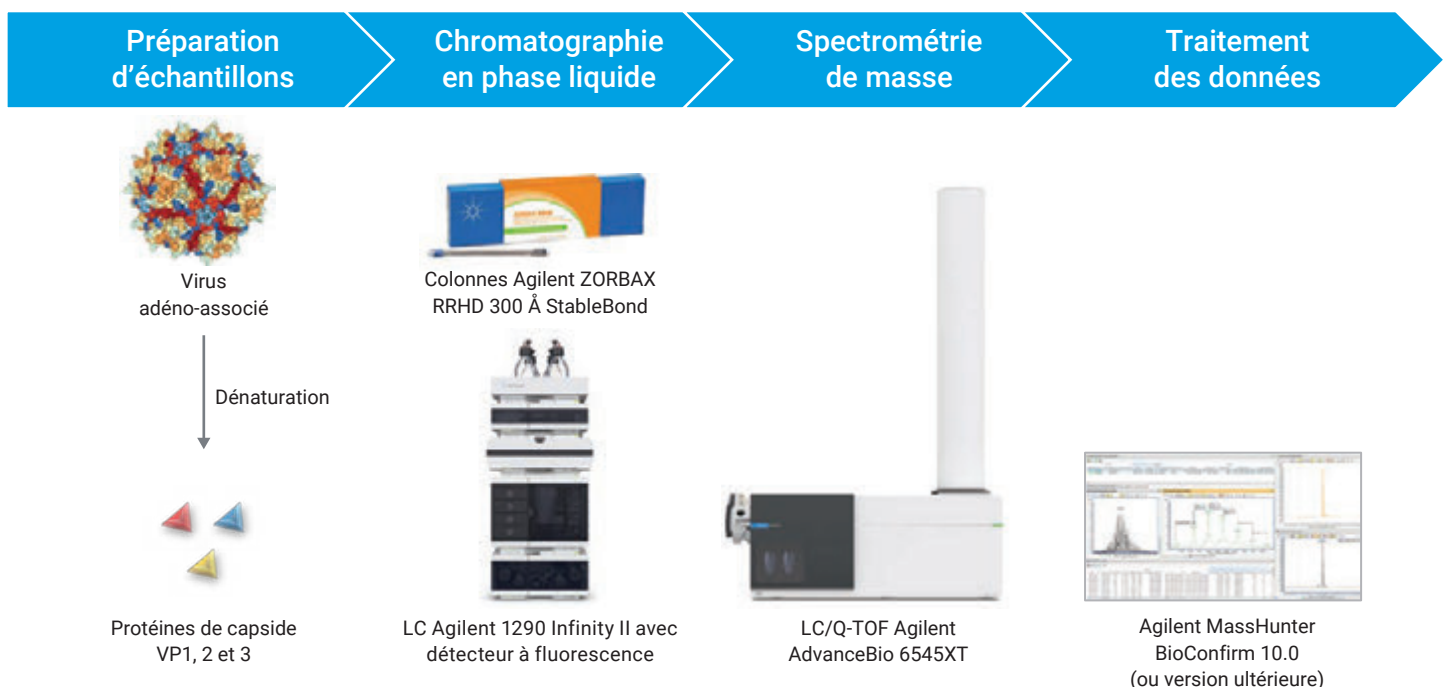


Figure 1. Vue d'ensemble du processus de confirmation d'identité et de mesure des quantités relatives des protéines individuelles constituant la capsid du AAV intacte.

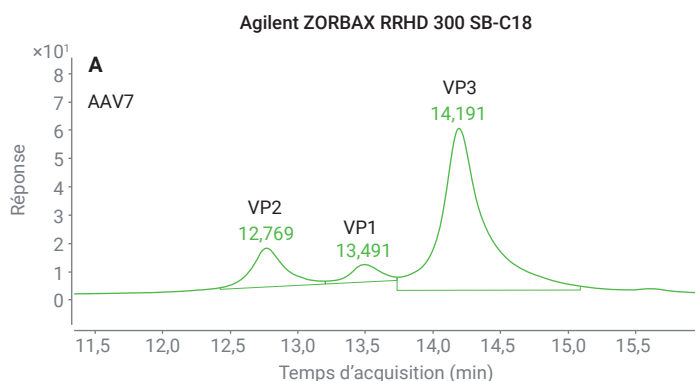


Figure 2. Séparation de AAV7 sur la colonne Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18 dans les conditions décrites dans le tableau 1.

Paramètre	Valeur	
Colonne	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm (réf. 858750-902)	
Instrument	Agilent 1290 Infinity II	
Débit	0,4 mL/min	
Phase mobile A	Acide formique à 0,1 % + TFA à 0,1 % dans l'eau	
Phase mobile B	90 % d'isopropanol, 9,8 % d'eau, 0,1 % d'acide formique + 0,1 % de TFA	
Gradient	Temps (min)	%B
	0-5	28 %
	23	32,5%
	23,5	80%
26	80%	
Durée postanalyse	3 minutes	
Température de colonne	80 °C	

Tableau 1. Conditions au démarrage de l'analyse des protéines de capsides intactes. Pour en savoir plus, consultez la référence⁵ [5994-2434EN](#).

Prise en main – Cartographie peptidique

L'analyse de cartographie peptidique des protéines de la capside d'AAV à l'aide de la colonne AdvanceBio Peptide Mapping est décrite dans les notes d'application [5994-1980EN](#) et [5994-2434EN](#).

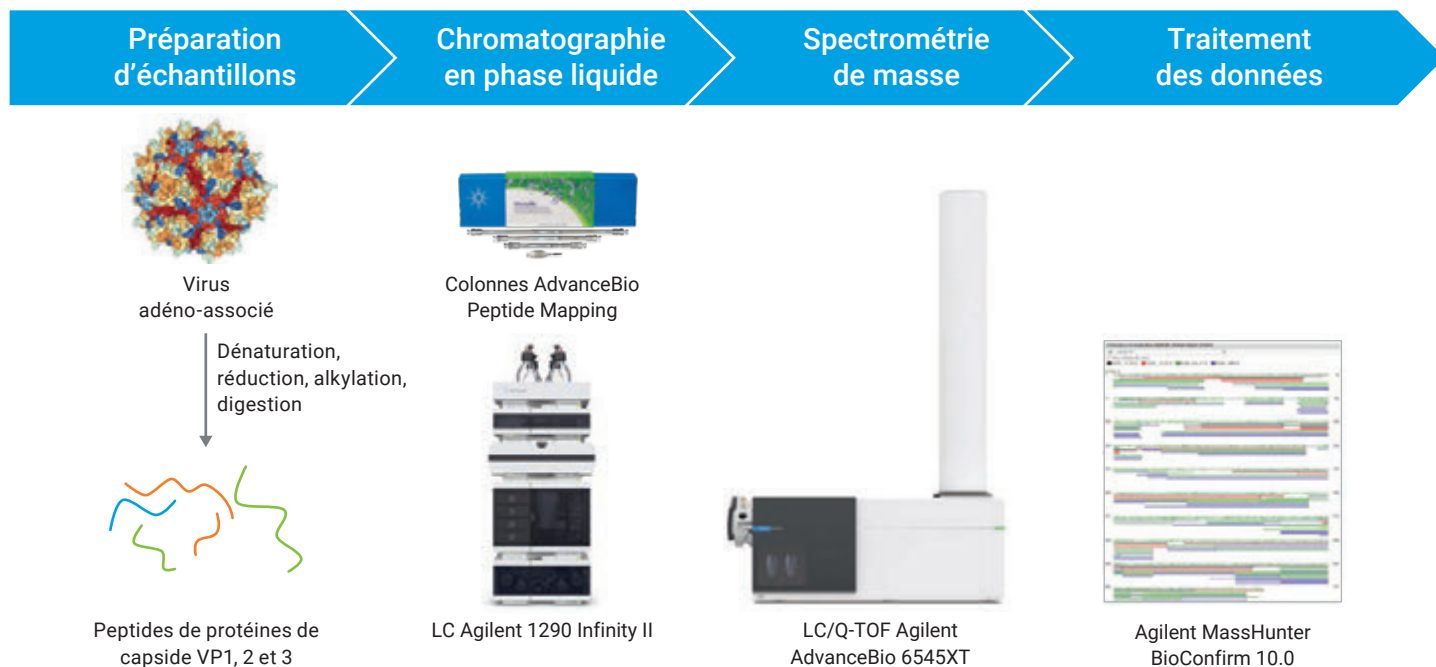


Figure 3. Vue d'ensemble du processus de confirmation de la structure primaire des protéines de capside et d'identification des modifications post-traductionnelles.

Critères de sélection de colonne – Cartographie peptidique

Comme pour l'analyse des protéines de la capsid intactes, la connaissance de l'échantillon et la méthode de détection doivent guider la sélection de la colonne. Les séparations d'AAV digérés pour cartographie peptidique rencontrent les mêmes problèmes de résolution et de sensibilité. Alors que la capsid est composée de trois protéines fortement apparentées, le résultat de la séparation pour cartographie peptidique est encore plus compliqué qu'une digestion typique de protéines recombinantes.

- **Diamètre de la colonne** : il est recommandé d'utiliser des colonnes de diamètre interne de 2,1 mm plutôt que des colonnes de diamètres plus grands pour des raisons de sensibilité et de compatibilité avec la détection MS. Le débit utilisé avec les colonnes de 2,1 mm est propice à une ionisation electrospray efficace, ce qui favorise aussi la sensibilité.
- **Longueur de colonne** : les plus grandes longueurs de colonnes en phase inverse peuvent augmenter la résolution. Il est recommandé d'utiliser une longueur de colonne de 150 mm ou plus.
- **Granulométrie et type de particules** : les granulométries plus fines permettent généralement d'obtenir une meilleure résolution ; cependant, les particules superficiellement poreuses légèrement plus grandes offrent quasiment la même résolution aux contrepressions beaucoup plus faibles. Il est recommandé d'utiliser des particules superficiellement poreuses de 2,7 µm.
- **Greffage de la phase stationnaire** : les phases stationnaires C18 sont les plus utilisées pour la cartographie peptidique et il y a une grande variété de colonnes C18 disponibles. Pour la cartographie peptidique, il faut choisir une combinaison de colonne et de phase mobile permettant d'obtenir des pics étroits avec une faible traînée de pics pour maximiser la capacité de pics. Il faut également équilibrer la rétention des petits peptides hydrophiles et l'élution appropriée des longs peptides hydrophobes.

Les colonnes AdvanceBio Peptide Mapping recommandées ici satisfont tous ces critères.

Paramètre	Valeur
Colonne	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 x 150 mm, 2,7 µm (réf. 653750-902)
Instrument	Agilent 1290 Infinity II
Débit	0,4 mL/min
Phase mobile A	Acide formique à 0,1 % dans l'eau
Phase mobile B	Acide formique à 0,1 % dans l'acétonitrile
Gradient	Temps (min) %B
	0-3 3 %
	50 35%
	60 97%
	62 97%
	62,5 3%
	65 3%
Durée postanalyse	5 minutes
Température de colonne	60 °C

Tableau 2. Conditions au démarrage pour la cartographie peptidique. Pour en savoir plus, consultez la référence⁶ [5994-1980EN](#).

Références

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 2020.
3. Kuck, D.; Kern, A.; Kleinschmidt, J. A. Development of AAV SerotypeSpecific ELISAs Using Novel Monoclonal Antibodies. *Journal of Virological Methods* 2007, 140, 17–24.
4. [Note technique du kit de dispersion ultra basse 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](#))

Sélection facile et informations pour commander

Pour commander les articles indiqués dans les tableaux ci-dessous dans la boutique en ligne d'Agilent, ajoutez ces articles dans votre liste de Produits favoris en cliquant sur les liens d'en-tête « MaListe ». Puis entrez les quantités de produits dont vous avez besoin ajoutez-les au panier et passez à la validation. Votre liste d'articles sera disponible dans la rubrique Produits favoris pour faciliter vos futures commandes.

Si c'est la première fois que vous utilisez les Produits favoris, il vous sera demandé d'entrer votre adresse e-mail pour la vérification de votre compte. Si vous possédez un compte Agilent, vous pourrez vous connecter. Toutefois, si vous n'avez pas de compte Agilent enregistré, vous devrez en créer un. Cette fonctionnalité n'est valide que dans les régions où le commerce en ligne est disponible. Tous les articles peuvent aussi être commandés auprès de vos circuits de vente et de distribution habituels.

MaListe 1 : Colonnes Agilent ZORBAX RRHD pour l'analyse des protéines intactes

Description	Référence
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

MaListe 2 : Colonnes AdvanceBio Peptide Mapping pour l'analyse au niveau peptidique

Description	Référence
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
Colonne de garde AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 x 5 mm, 2,7 µm, 3/pqt	851725-911

MaListe 3 : Étalons

Description	Référence
Agilent NIST mAb, 25 µL	5191-5744
Agilent NIST mAb, 4 x 25 µL	5191-5745
Étalon de dix peptides, 71 µg, lyophilisé	5190-0583
Étalon de peptide HSA	G2455-85001

MaListe 4 : Fournitures et solvants

Description	Référence
Connexions et tubes	
Ensemble de raccord rapide Quick Connect InfinityLab Agilent avec capillaire 0,12 x 105 mm préfixé (à raccorder sur la tête de colonne)	5067-5957
Raccord rapide Quick Turn Agilent InfinityLab (à raccorder à la sortie de colonne)	5067-5966
Capillaire Quick Turn SST 0,12 x 280 (pour raccord Quick Turn)	5500-1191
Outil de montage pour raccords rapides Quick Turn	5043-0915
Kit de soupape de décompression en ligne (À utiliser lorsqu'un autre détecteur est utilisé en série après la cellule à fluorescence)	G4212-68001
Kit de tube de dispersion ultra basse pour Agilent 1290 Infinity II	5067-5963
Kit de tube de dispersion ultra basse pour Agilent 1290 Infinity II Bio	5004-0007
Contenant	
Flacon à capacité de récupération élevée, capsule à visser, avec insert fixe, transparent, volume d'insert de 300 µL, 100/pqt. Taille de flacon : 12 x 32 mm (capsule de 12 mm)	5188-6591
Capsule, à visser, bleue, septum en PTFE/silicone rouge, 100/pqt. Taille de capsule : 12 mm	5182-0717
Flacon, à sertir/à capsule-pression, polypropylène, 250 µL, 1 000/pqt. Taille de flacon : 12 x 32 mm (capsule de 11 mm)*	5190-3155
Capsule, à pression, transparente, septum en PTFE/silicone/PTFE, 100/pqt. Taille de capsule : 11 mm (pour 5190-3155)	5182-0566
Plaque à 96 puits InfinityLab, 0,5 mL, 30/pqt	5043-9310
Tapis de fermeture pour plaque à 96 puits InfinityLab, 50/pqt	5042-1389
Solvants et additifs	
Eau ultrapure pour LC/MS InfinityLab, 1 L	5191-4498
Acétonitrile ultrapur pour LC/MS InfinityLab, 1 L	5191-4496
Acide formique, 5 mL	G2453-85060
Filtration des solvants	
Ensemble de filtration de solvants InfinityLab	5191-6776
Flacon de filtration de solvants InfinityLab, en verre, 2 L	5191-6781
Membrane filtrante, en nylon, 47 mm, porosité 0,2 µm, 100/pqt	5191-4341
Membrane filtrante, en cellulose régénérée 47 mm, diamètre de pore 0,2 µm, 100/pqt	5191-4340
Filtre en verre pour flacon pour solvant, entrée de solvant, 20 µm	5041-2168
Manipulation des solvants	
Kit de démarrage, bouchons Stay Safe InfinityLab	5043-1222
Flacon pour solvant InfinityLab, transparent, 1 L	9301-6524
Flacon pour solvant InfinityLab, ambré, 1 L	9301-6526
Flacon pour solvant, transparent, 2 L	9301-6342
Flacon pour solvant, ambré, 2 L	9301-6341
Flacon de purge Stay Safe InfinityLab	5043-1339
Bidon de collecte de déchets InfinityLab, GL45, 6 L avec bouchon Stay Safe	5043-1221
Filtre à charbon InfinityLab avec indicateur de date, 58 g	5043-1193

*Les flacons en polypropylène sont chimiquement résistants et conviennent parfaitement aux échantillons sensibles au pH.

Pour en savoir plus :

www.agilent.com/chem/aav-analysis

Pour trouver un centre de service client Agilent dans votre pays, rendez-vous sur :

www.agilent.com/chem/contactus

France

0810 446 446

customercare_france@agilent.com

États-Unis et Canada

agilent_inquiries@agilent.com

Europe

info_agilent@agilent.com

Asie et Pacifique

inquiry_lsca@agilent.com

RA44707.6978009259

Ces informations sont susceptibles d'être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Imprimé aux États-Unis, le 8 juin 2022
5994-4829FR

