

## Conferma dell'identità di virus adeno-associati nel settore biofarmaceutico mediante LC/MS



Nonostante i virus adeno-associati (AAV) abbiano il proprio esclusivo insieme di attributi critici per la qualità, possono comunque essere utilizzate molte delle analisi tradizionali utilizzate per monitorare prodotti terapeutici a base di proteine più consolidati. I capsidi di AAV comprendono ~ 60 copie di tre proteine, VP1, VP2 e VP3, in un rapporto stechiometrico rispettivamente di 1:1:10.<sup>1</sup> La separazione cromatografica di queste tre proteine è problematica a causa dell'elevata omologia delle sequenze, in quanto tutte e tre sono sottoposte a splicing da parte dello stesso gene. I gel SDS-PAGE con colorante a base di argento o metodi basati sul rilevamento di anticorpi, come ELISA e immunoblotting, sono stati storicamente utilizzati per valutare il rapporto delle tre proteine dei capsidi. Questi approcci sono tuttavia laboriosi e soggetti a errori. Inoltre possono richiedere la generazione di nuovi anticorpi specifici per ciascun tipo di AAV. Generare anticorpi con la specificità richiesta per distinguerli può essere difficile, dato l'elevato grado di omologia tra sierotipi di AAV. La spettrometria di massa con cromatografia liquida (LC/MS) supera queste difficoltà con velocità, specificità e precisione migliorate. Agilent offre soluzioni di flusso di lavoro sia per proteine intatte che per mappatura dei peptidi per l'identificazione e localizzazione delle modificazioni post-traduzionali (PTM).

La FDA (Food and Drug Administration) degli Stati Uniti richiede che i prodotti a base di AAV siano identificati in modo inequivocabile prima dell'immissione sul mercato, specialmente in caso di impianti in cui vengono prodotti più sierotipi o varianti ingegnerizzate.<sup>2</sup> La mappatura dei peptidi è un metodo essenziale che determina le sequenze di proteine e identifica le PTM e per questo motivo è richiesta dall'ICH, dalla FDA degli Stati Uniti e da altri enti normativi per prodotti bioterapeutici più consolidati. Sebbene le normative riguardanti terapie geniche che utilizzano AAV siano ancora in fase emergente, è possibile che la mappatura dei peptidi sia richiesta in futuro.

Il precedente impiego della tecnica LC/MS per confermare l'identità e l'abbondanza relativa di proteine di capsidi intatte ha risentito della scarsa risoluzione cromatografica. La coeluizione di proteine rende le misurazioni in massa accurata più problematiche e la somiglianza tra alcune proteine dei capsidi di AAV (cioè il fatto che AAV1 e AAV6 differiscono per sei amminoacidi<sup>3</sup>) rende la misurazione accurata fondamentale per la conferma dell'identità.

Le colonne Agilent ZORBAX RRHD con pori di grandi dimensioni risolvono questa problematica dell'analisi di proteine intatte fornendo una buona separazione cromatografica che permette una misura accurata della massa mediante spettrometria di massa (MS).

- La dimensione inferiore a 2 µm delle particelle offre un'elevata risoluzione.
- I pori di grandi dimensioni consentono un buon trasferimento della massa per separazioni efficienti.
- La tolleranza della pressione di 1200 bar permette l'applicazione di metodi UHPLC ad alta efficienza.
- Il riempimento di difenile offre una selettività unica per le separazioni problematiche.

Le colonne Agilent AdvanceBio Peptide Mapping sono progettate per fornire mappe peptidiche ad alta risoluzione per l'identificazione delle proteine e la determinazione delle modificazioni post-traduzionali.

- Le particelle superficialmente porose permettono separazioni ad alta risoluzione con contropressioni modeste.
- La buona capacità di picco con fasi mobili contenenti acido formico migliora la sensibilità di MS rispetto alle fasi mobili contenenti TFA.

## Buone prassi per un'analisi efficace degli AAV

### Preparazione del campione

- Molte proteine ricombinanti sono formulate in tamponi non volatili con un contenuto relativamente elevato di sali e additivi stabilizzanti come i polossameri che interferiscono con la rivelazione mediante MS e sporcano rapidamente lo strumento. La sostituzione del tampone del campione prima dell'analisi di LC/MS può migliorare in modo significativo la qualità spettrale e consentire intervalli più lunghi tra gli interventi di manutenzione del sistema MS. Si tenga conto che la sostituzione del tampone può portare all'instabilità del campione, quindi occorre programmare l'analisi dei campioni immediatamente dopo la sostituzione del tampone.
- Si raccomanda l'uso di vial a elevato recupero pensati per campioni di piccolo volume.

### Separazione cromatografica

- Ridurre la velocità di aumento del flusso dal valore predefinito a 1 mL/min<sup>2</sup> o meno. L'aumento graduale del flusso aumenta la durata della colonna e aiuta a prevenire eccessi di pressione improvvisi. L'impostazione è disponibile nella sezione Advanced (Impostazioni avanzate) per il controllo della pompa di LC nel software Agilent.
- Impostare il limite di pressione massimo nel metodo LC in modo che corrisponda a quello della colonna (600 bar per colonne AdvanceBio Peptide Mapping, 1200 bar per colonne ZORBAX RRHD). Ciò è fondamentale per tutti i casi in cui la pressione massima del sistema LC è superiore a quella della colonna.
- Ridurre al minimo il volume morto per massimizzare la risoluzione. Si raccomanda l'impiego di un sistema a basso volume morto come un sistema Agilent 1290 Infinity II equipaggiato con [tubi a dispersione ultra bassa](#)<sup>4</sup> per minimizzare il volume morto.

### Spettrometria di massa

- Deviare il flusso proveniente dal sistema LC verso lo scarico al di fuori del/i tempo/i di ritenzione di interesse, specialmente durante un lavaggio ad alto contenuto di composti organici al termine del metodo, e se possibile durante l'eluizione del volume vuoto.
- Utilizzare solventi di grado per HPLC o superiore.
- Stabilire una routine regolare di pulizia della sorgente del sistema MS.

## Guida introduttiva - Proteine di capsidi intatte

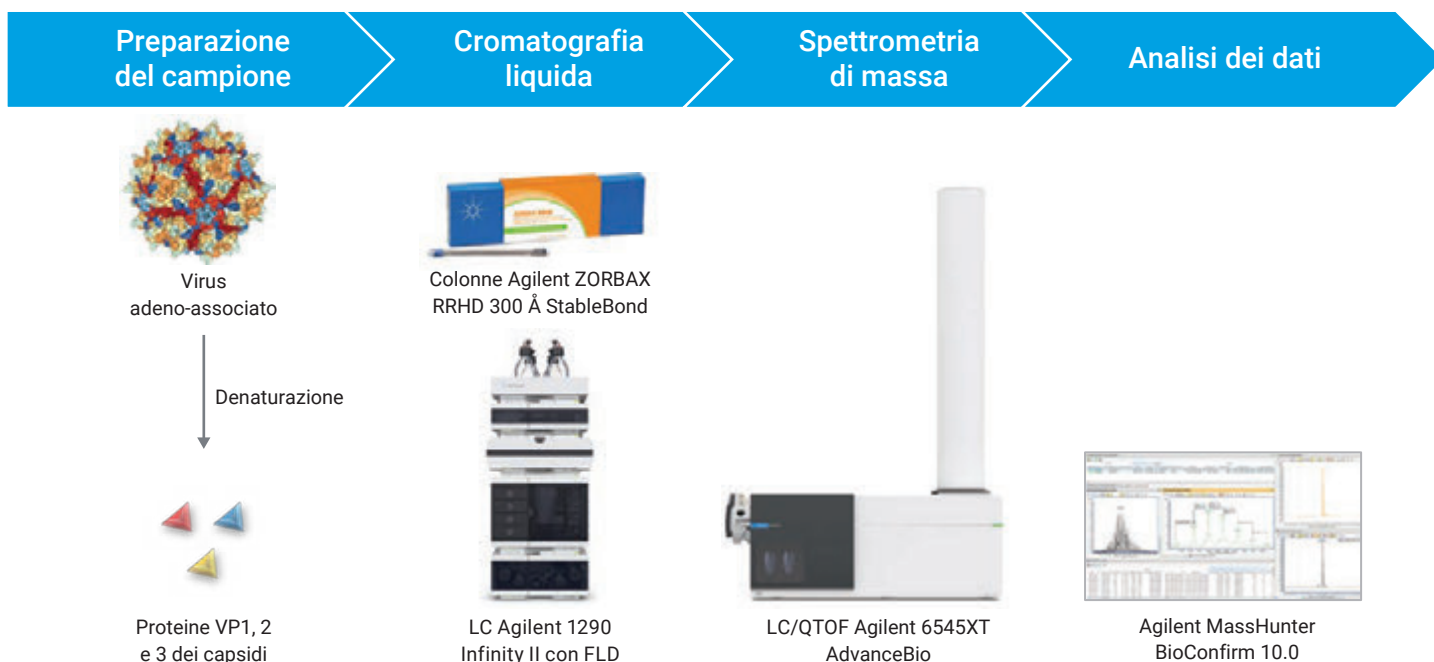
L'analisi di proteine di capsidi intatte è descritta in modo più approfondito nella nota applicativa [5994-2434EN](#), che confronta differenti riempimenti di colonna della famiglia ZORBAX RRHD per la separazione delle proteine VP1, VP2 e VP3 dei capsidi.<sup>5</sup> Il flusso di lavoro è illustrato nella Figura 1.

## Criteri di scelta della colonna - Proteine di capsidi intatte

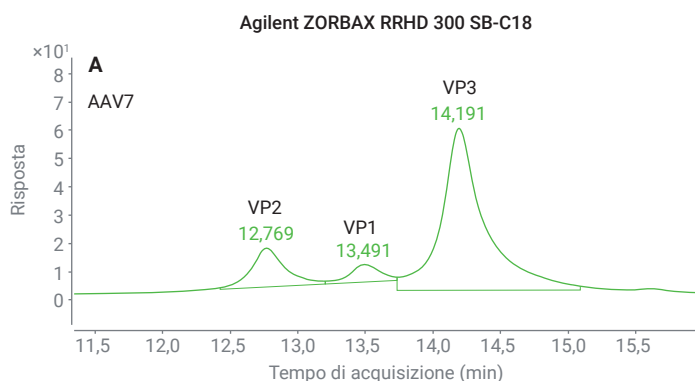
Quando si sceglie una colonna a fase inversa, in particolare per le proteine dei capsidi di AAV, è utile tenere conto sia del metodo di rivelazione che verrà utilizzato, sia di ciò che è noto riguardo al campione. I campioni di AAV sono spesso maggiormente diluiti rispetto ad altri campioni di proteine ricombinanti. Si raccomanda di scegliere colonne che rispondano alle esigenze di sensibilità e risoluzione, due parametri storicamente problematici nella separazione delle proteine VP1, VP2 e VP3 dei capsidi.

- **Diametro della colonna:** si raccomanda una colonna da 2,1 mm piuttosto che colonne con diametro interno maggiore, sia dal punto di vista della sensibilità che da quello della compatibilità con la rivelazione mediante MS. Il flusso che viene utilizzato con le colonne da 2,1 mm comporta un'efficiente ionizzazione elettrospray, il che favorisce anche la sensibilità.

- **Lunghezza della colonna:** per le colonne a fase inversa, una maggiore lunghezza della colonna può comportare una maggiore risoluzione, quindi si raccomandano lunghezze di 100 o 150 mm.
- **Dimensione dei pori:** le proteine intatte in soluzione sono relativamente grandi, specialmente in condizioni di denaturazione in fase inversa. Pori di grandi dimensioni sono necessari per assicurare un trasferimento efficiente della massa dentro e fuori dalle particelle della fase stazionaria, il che a sua volta migliora la risoluzione. Raccomandiamo pori di 300 Å.
- **Dimensione delle particelle:** particelle di dimensioni più piccole comportano un aumento della risoluzione, quindi si raccomandano colonne con RRHD di 1,8 µm.
- **Riempimento della fase stazionaria:** quando l'intento è risolvere analiti di interesse, la selettività della fase stazionaria è un'altra variabile che può essere modificata. Fasi stazionarie a catena alchilica più corta, come C4 o C8 sono usuali per le proteine intatte, ma opzioni meno ovvie si sono dimostrate vantaggiose per VP1, VP2 e VP3. Un ulteriore elemento di complicazione è che le differenze tra i vari sierotipi di AAV si traducono in differenti requisiti per la fase stazionaria. La colonna ZORBAX RRHD SB300-C18 funziona bene per AAV2 e AAV7, mentre la colonna ZORBAX RRHD 300-Diphenyl funziona bene per vari altri sierotipi, incluso AAV9.



**Figura 1.** Panoramica del procedimento per confermare l'identità e misurare le quantità relative di singole proteine di capsidi che costituiscono il capsido di AAV intatto.



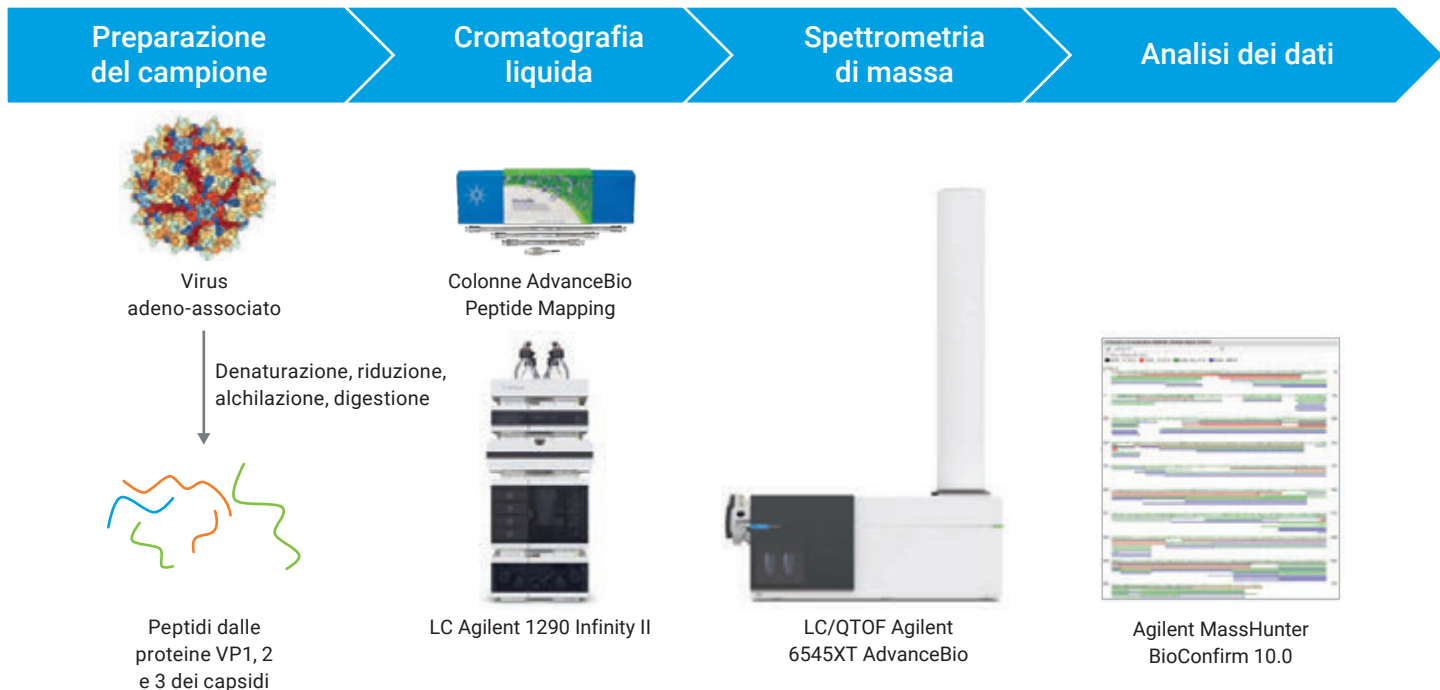
**Figura 2.** Separazione di AAV7 mediante Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18 usando le condizioni descritte nella Tabella 1.

Parametro	Valore	
Colonna	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm (codice 858750-902)	
Strumento	Agilent 1290 Infinity II	
Flusso	0,4 mL/min	
Fase mobile A	0,1% di acido formico + 0,1% di TFA in acqua	
Fase mobile B	90% di isopropanolo, 9,8% di acqua, 0,1% di acido formico + 0,1% di TFA	
Gradiente	Tempo (min)	%B
	0-5	28%
	23	32,5%
	23,5	80%
26	80%	
Tempo post analisi	3 minuti	
Temperatura della colonna	80 °C	

**Tabella 1.** Condizioni iniziali utilizzate per l'analisi di proteine di capsidi intatte. Fare riferimento al documento<sup>5</sup> [5994-2434EN](#) per i dettagli.

## Guida introduttiva - Mappatura dei peptidi

L'analisi di mappatura dei peptidi per le proteine dei capsidi di AAV mediante la colonna AdvanceBio Peptide Mapping è descritta nelle note applicative [5994-1980EN](#) e [5994-2434EN](#).



**Figura 3.** Panoramica del procedimento per confermare la struttura primaria delle proteine dei capsidi e identificare le modificazioni post-traduzionali.

## Criteri di scelta della colonna - Mappatura dei peptidi

Come nell'analisi di proteine di capsidi intatte, la conoscenza del campione e il metodo di rivelazione devono guidare nella scelta della colonna. Le stesse problematiche relative a sensibilità e risoluzione si applicano per separazioni di mappatura dei peptidi di AAV digeriti. In questo caso, laddove il capsido è costituito da tre proteine componenti altamente correlate, la separazione di mappatura dei peptidi risultante è ancora più complicata rispetto alla tipica digestione di proteine ricombinanti.

- **Diametro della colonna:** si raccomanda una colonna da 2,1 mm piuttosto che colonne con diametro interno maggiore, sia dal punto di vista della sensibilità che da quello della compatibilità con la rivelazione mediante MS. Il flusso che viene utilizzato con le colonne da 2,1 mm comporta un'efficiente ionizzazione elettrospray, il che favorisce anche la sensibilità.
- **Lunghezza della colonna:** per le colonne a fase inversa, una maggiore lunghezza della colonna può comportare una maggiore risoluzione. Si raccomanda una lunghezza della colonna di 150 mm o più.
- **Dimensione e tipo delle particelle:** particelle più piccole generalmente comportano una risoluzione maggiore; particelle superficialmente porose leggermente più grandi offrono tuttavia quasi la stessa risoluzione con una contropressione molto minore. Si raccomanda una particella superficialmente porosa di 2,7 µm.
- **Riempimento della fase stazionaria:** le fasi stazionarie C18 rappresentano l'opzione maggiormente utilizzata per la mappatura dei peptidi, ma la varietà di possibili colonne C18 disponibili è ampia. Per la mappatura dei peptidi, è consigliabile scegliere per il sistema una combinazione di colonna e fase mobile che comporti picchi stretti con basso scodamento per massimizzare la capacità di picco. È inoltre consigliabile trovare un equilibrio tra la ritenzione di piccoli peptidi idrofili e un'eluizione ragionevole di lunghi peptidi idrofobi.

La colonna AdvanceBio Peptide Mapping qui raccomandata soddisfa questi criteri.

Parametro	Valore	
Colonna	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 x 150 mm, 2,7 µm (codice 653750-902)	
Strumento	Agilent 1290 Infinity II	
Flusso	0,4 mL/min	
Fase mobile A	0,1% di acido formico in acqua	
Fase mobile B	0,1% di acido formico in acetonitrile	
Gradiente	Tempo (min)	%B
	0-3	3%
	50	35%
	60	97%
	62	97%
	62,5	3%
	65	3%
Tempo post analisi	5 minuti	
Temperatura della colonna	60 °C	

**Tabella 2.** Condizioni iniziali utilizzate per la mappatura dei peptidi. Fare riferimento al documento<sup>6</sup> [5994-1980EN](#) per i dettagli.

## Bibliografia

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 Serotype Specific ELISAs Using Novel Monoclonal Antibodies. *Journal of Virological Methods* 2007, 140, 17–24.
4. [Nota tecnica Agilent 1290 Infinity II Ultra Low Dispersion Kit](#)
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](#))

## Informazioni per scegliere e ordinare facilmente

Per ordinare gli articoli elencati nelle tabelle riportate di seguito su Agilent Online Store, aggiungere gli articoli al proprio elenco Prodotti preferiti facendo clic sui collegamenti presenti nelle intestazioni delle tabelle Il mio elenco #. Inserire quindi le quantità dei prodotti richieste, aggiungere al carrello e procedere al pagamento. L'elenco rimarrà tra i Prodotti preferiti in modo che sia possibile disporre per gli ordini futuri.

Se questa è la prima volta che usi i Prodotti preferiti, ti verrà chiesto di inserire il tuo indirizzo e-mail per la verifica dell'account. Se sei titolare di un account Agilent esistente, potrai eseguire l'accesso. Tuttavia, se ancora non disponi di un account Agilent registrato, dovrai registrarne uno. Questa funzione è disponibile soltanto nelle regioni in cui è abilitato l'e-commerce. Tutti gli articoli possono essere ordinati anche tramite i normali canali di vendita e distribuzione.

### Il mio elenco 1: Colonne Agilent ZORBAX RRHD per l'analisi di proteine intatte

Descrizione	Codice
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

### Il mio elenco 2: Colonne AdvanceBio Peptide Mapping per l'analisi a livello di peptidi

Descrizione	Codice
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
Precolonna AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 x 5 mm, 2,7 µm, 3/conf.	851725-911

### Il mio elenco 3: Standard

Descrizione	Codice
mAb NIST Agilent, 25 µL	5191-5744
mAb NIST Agilent, 4 x 25 µL	5191-5745
Standard di dieci peptidi, 71 µg, liofilizzato	5190-0583
Standard di peptidi HSA	G2455-85001

## Il mio elenco 4: Materiali di consumo e solventi

Descrizione	Codice
<b>Connessioni e tubi</b>	
Gruppo di raccordo Agilent InfinityLab Quick Connect con capillare prefissato da 0,12 x 105 mm (per il collegamento all'iniettore della colonna)	5067-5957
Raccordo Quick Turn Agilent InfinityLab (per il collegamento all'uscita della colonna)	5067-5966
Capillare Quick Turn in acciaio inossidabile da 0,12 x 280 (per raccordo Quick Turn)	5500-1191
Utensile di montaggio per raccordi Quick Turn	5043-0915
Kit valvola di regolazione della pressione in linea (da usare quando un altro rivelatore viene utilizzato in serie dopo la cella di flusso a fluorescenza)	G4212-68001
Kit di tubi a dispersione ultra bassa per Agilent 1290 Infinity II	5067-5963
Kit di tubi a dispersione ultra bassa per Agilent 1290 Infinity II Bio	5004-0007
<b>Contenitori per campioni</b>	
Vial a elevato recupero, chiusura a vite, con inserto fisso, trasparente, volume dell'inserto 300 µL, 100/conf. Dimensioni vial: 12 x 32 mm (tappo 12 mm)	5188-6591
Tappo, a vite, blu, setti in PTFE/silicone rosso, 100/conf. Dimensione tappo: 12 mm	5182-0717
Vial, chiusura meccanica/a scatto, polipropilene, 250 µL, 1.000/conf. Dimensioni vial: 12 x 32 mm (tappo 11 mm)*	5190-3155
Tappo, a scatto, trasparente, setti in PTFE/silicone/PTFE, 100/conf. Dimensione tappo: 11 mm (per 5190-3155)	5182-0566
Piastra a 96 pozzetti InfinityLab, 0,5 mL, 30/conf.	5043-9310
Coperchio di chiusura per piastra a 96 pozzetti InfinityLab, 50/conf.	5042-1389
<b>Solventi e additivi</b>	
Acqua ultra pura per LC/MS InfinityLab, 1 L	5191-4498
Acetonitrile ultra puro per LC/MS InfinityLab, 1 L	5191-4496
Acido formico, 5 mL	G2453-85060
<b>Filtrazione del solvente</b>	
Gruppo di filtrazione del solvente InfinityLab	5191-6776
Matraccio di filtrazione del solvente InfinityLab, vetro, 2 L	5191-6781
Membrana filtro, nylon 47 mm, dimensione dei pori 0,2 µm, 100/conf.	5191-4341
Membrana filtro, cellulosa rigenerata 47 mm, dimensione dei pori 0,2 µm, 100/conf.	5191-4340
Filtro in vetro per bottiglie di solvente, ingresso solvente, 20 µm	5041-2168
<b>Manipolazione dei solventi</b>	
Kit di avvio tappo InfinityLab Stay Safe	5043-1222
Bottiglia per solvente InfinityLab, trasparente, 1 L	9301-6524
Bottiglia per solvente InfinityLab, ambrata, 1 L	9301-6526
Bottiglia per solvente, trasparente, 2 L	9301-6342
Bottiglia per solvente, ambrata, 2 L	9301-6341
Bottiglia di spurgo InfinityLab Stay Safe	5043-1339
Contenitore di scarico InfinityLab, GL45, 6 L, con tappo Stay Safe	5043-1221
Filtro al carbone InfinityLab con striscia time strip, 58 g	5043-1193

\*I vial in polipropilene sono chimicamente resistenti e ideali per campioni sensibili al pH.

Per maggiori informazioni:

[www.agilent.com/chem/aav-analysis](http://www.agilent.com/chem/aav-analysis)

Per trovare un centro assistenza  
clienti Agilent nel proprio paese:

[www.agilent.com/chem/contactus](http://www.agilent.com/chem/contactus)

Italia

numero verde 800 012 575

[customercare\\_italy@agilent.com](mailto:customercare_italy@agilent.com)

Europa

[info\\_agilent@agilent.com](mailto:info_agilent@agilent.com)

RA44707.6978009259

Le informazioni fornite potrebbero variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022  
Stampato negli Stati Uniti, 8 giugno 2022  
5994-4829ITE

