

Análisis Sensible de Impurezas de las Proteínas de la Cápside AAV por CE usando un Colorante Fluorescente Chromeo P503

Marcia Santos; SCIEX, Brea, California

Introducción

El virus Adeno asociado o AAV (Figura 1) es una clase popular de vehículo de administración de terapia génica utilizada principalmente debido a la no patogenicidad y su alta estabilidad. Estructuralmente, los AAV se componen de una cubierta proteica icosaédrica llamada cápside o proteína viral (VP) que contiene un genoma viral. Hasta ahora, se conocen 13 serotipos humanos y de primates de AAV, en combinación con las diferencias de secuencia primaria, median la especificidad celular y tisular. Por ejemplo, AAV 8 o serotipo 8 es eficiente en la transducción de hepatocitos. Esta estructura tiene la capacidad de transportar hasta 5 Kb de carga útil de una molécula de ADN monocatenario. La cápside o las proteínas virales se traducen a partir del mismo ARNm que codifica secuencias superpuestas de tres proteínas de la cápside, VP1, VP2 y VP3 con aproximadamente 87, 72 y 62 kDa, lo que resulta en un total de 60 monómeros. Además, in vivo, estas proteínas virales se sintetizan aproximadamente en una proporción de 1:1:10 respectivamente.^{1, 2}

A medida que el AAV ocupa un lugar central en el tratamiento de la terapia génica de muchas afecciones genéticas, los ensayos confiables y cuantitativos son críticos para la caracterización adecuada de estas moléculas, así como la cuantificación de las impurezas.

Típicamente, la concentración de AAV utilizada en terapia génica es del orden de 1×10^{10} GC / mL (GC = copias genómicas), lo que equivale a 50 ng/mL y por lo tanto cae muy por debajo del límite de detección o cuantificación de cualquier ensayo basado en absorbancia UV.

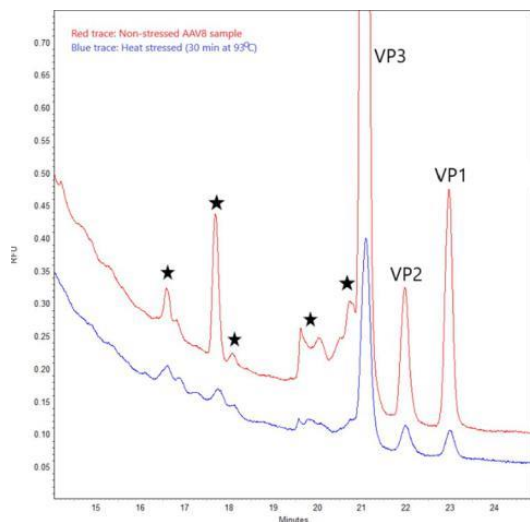


Figura 2 Superposición de muestras AAV8 estresado por calor (línea roja) y no-estresado (línea azul), a 1.1×10^9 GC / mL. Las estrellas indican regiones en el electroferograma sensibles al tratamiento térmico.



Figura 1. Representación pictórica de un virus adenoasociado.

En esta nota técnica, se describe un sencillo esquema de preparación y etiquetado de muestras usando una etiqueta fluorescente disponible en el mercado (Figura 3) que no requiere intercambio de amortiguador ni limpieza de tinte para la detección de bajo nivel de AAV8. La electroforesis capilar (CE) con detección de fluorescencia inducida por láser (LIF) utilizando un kit de comercial con SDS-MW y un cartucho de sílice fundido preensamblado que se utilizó con éxito para separar las impurezas y caracterizar las proteínas de la cápside AAV.

El marcaje fluorescente utilizado en este trabajo es un tipo de colorante de piril llamado Chromeo P503, que reacciona con las aminas primarias. Chromeo P503 tiene fluorescencia muy débil como colorante libre; menos del 1% de rendimiento cuántico en solución. Sin embargo, tras la reacción, el rendimiento cuántico de fluorescencia no solo aumenta al 50%, sino que también sufre un cambio batocromático significativo de 100 nm.³

Ventajas Principales

- Desnaturalización fácil en dos pasos y preparación de muestras de etiquetas.
- No se requiere intercambio de amortiguador ni limpieza de colorante libre.
- Detección sensible de impurezas en el rango de 1×10^9 GC/mL o 5 ng/mL, típico de productos terapéuticos, usando electroforesis capilar con detección LIF y técnicas de apilamiento.
- Use el kit CE-SDS MW sin modificaciones en su química.

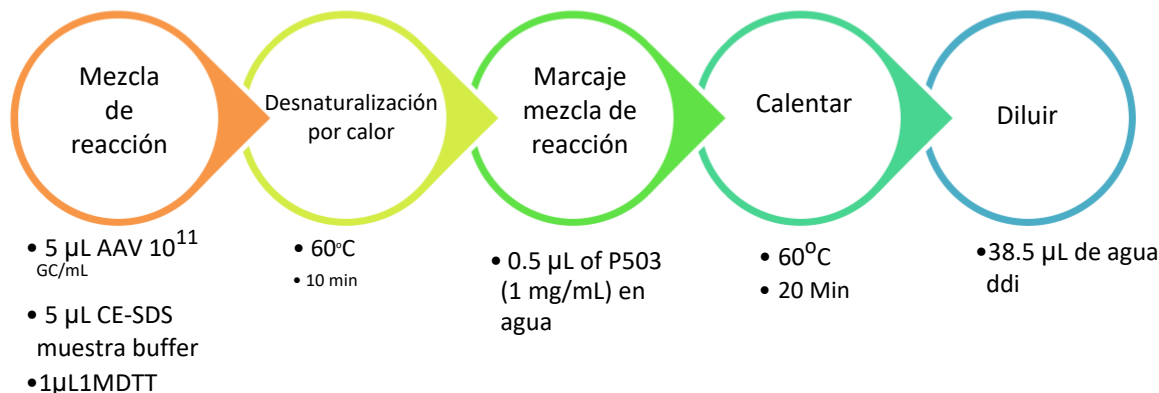


Figura 3: Esquema simple de preparación de muestras de dos pasos "desnaturalización y marcaje" de AAV.

Materiales, Instrumento y Método

Materiales: Los CE-SDS MW kit (PN 390953) y LIF

Performance Test Mix (PN: 726022) SCIEX, Framingham, MA. El AAV8 empaquetado de pAV-CMV-GFP con título a $1,10 \times 10^{13}$ GC / mL (título suministrado por el proveedor) se adquirió de Vigene Biosciences (Rockville, MD, EE. UU.). El amortiguador de formulación de AAV (1X PBS con 0,001% de Pluronic F68) también era de Vigene Biosciences. El colorante Chromeo P503 # 15106, se adquirió de Active Motif (Carlsbad, CA). El biorreactivo salino amortiguado con fosfato adecuado para cultivo celular 10X, Sigma-Aldrich, PN P5493-1L se utilizó como base para el amortiguador de muestra personalizado CE-SDS. Dodecil sulfato de sodio, J. T. Baker, PN 4095-04.

Almacenamiento de la muestra: Al llegar, se almacenaron alícuotas de 5 μL de muestra AAV8 a -80°C en el congelador para evitar múltiples ciclos de congelación-descongelación.

Instrumento y software: un sistema de análisis farmacéutico PA 800 Plus equipado con detector LIF y láser de estado sólido con longitud de onda de excitación a 488 nm de SCIEX (Framingham, MA) y un filtro de emisión de paso de banda de 600 nm de Edmund Optics (Barrington, NJ). La adquisición y el análisis de los datos se realizaron con 32 Karat software™ V10. El método de separación utilizado en este trabajo ya ha sido descrito por Li.⁴ Brevemente, el método de separación CE aprovecha la técnica de apilamiento al introducir un amortiguador de agua (20 psi / 0.6 min) antes de las inyecciones de muestra (-10 kV / 60 segundos).

Calibración LIF: para garantizar una respuesta constante del detector LIF a lo largo de este estudio, el detector LIF se calibró utilizando el Asistente de calibración LIF y la Mezcla de prueba de rendimiento (PN: 726022).

Preparación de la solución de trabajo Chromeo P503: un vial de colorante Chromeo P503 viene en 1 mg de polvo liofilizado. El polvo liofilizado se reconstituyó añadiendo 1 mL de metanol. Haciendo alícuotas de 10 μL para evitar la contaminación debido al manejo excesivo. Después de la reconstitución, el colorante se puede almacenar a 2-8 °C durante seis meses de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Procedimiento de dilución de la muestra antes del marcaje: Se extrajo una parte alícuota de 5 μL de muestra de AAV8 del congelador y se diluyó de la siguiente manera: Para preparar $1,10 \times 10^{11}$ GC/m: se añadió 1 microlitro de AAV8 $1,10 \times 10^{13}$ GC/mL a 99 μL de 50 solución amortiguadora de fosfato mM pH 8. Para preparar $1,10 \times 10^{10}$ GC/ml: se añadió 1 microlitro de AAV8 $1,10 \times 10^{13}$ GC/ml a 9 μL de solución amortiguadora de fosfato 50 mM pH 8.

Procedimiento de desnaturalización de la muestra antes del marcaje: se mezclaron 5 μL de AAV8 diluido como en la sesión anterior con 5 μL de tampón de muestra Tris y 1 μL de DTT 1M. Ambas mezclas de reacción se agitaron brevemente en vórtex para una mezcla adecuada y se calentaron a 60 °C durante 10 minutos. Después, los tubos de reacción se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Procedimiento de marcaje de muestra: En este protocolo, se utiliza la menor cantidad de muestra posible, lo que puede generar desafíos al pipetear un volumen muy pequeño. Es posible ampliar la preparación de la muestra y debe usarse si el volumen de la muestra no es un problema.

Se añadieron 0,5 μL de 1 mg / mL de solución de trabajo de colorante Chromeo P503 a cada tubo de reacción y se agitó brevemente. Una vez más, ambos tubos se calentaron a 60 °C durante 20 minutos. Luego, ambos tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y luego se agregaron 38.5 μL de agua DDI a cualquiera de los tubos de reacción. Después del marcaje y la dilución, las concentraciones finales son AAV8 $1,1 \times 10^{10}$ y $1,1 \times 10^9$ GC/mL respectivamente.

Resultados y Discusiones

Proceso de AAV e impurezas relacionadas con el producto⁵:

Similar a la producción terapéutica de anticuerpos monoclonales, existen requisitos estrictos de fabricación para la eliminación de impurezas relacionadas con el producto y el proceso. Además, técnicas analíticas sensibles para la detección y cuantificación de impurezas para la seguridad del producto. Este trabajo se centra en las impurezas de la cápside.

CE-SDS se ha utilizado como el estándar de oro para la caracterización de proteínas terapéuticas desde la fabricación hasta la liberación de lotes. Combinando la reproducibilidad y especificidad típicas de CE-SDS con la sensibilidad de la detección de LIF y la preparación de la muestra fácil de marcar, la pureza de la proteína de la cápside de AAV se puede determinar fácilmente.

La Figura 4 muestra un perfil típico de AAV8 marcado con P503 a la concentración objetivo (10^{10} GC/mL) de formulación clínica en comparación con una absorbancia UV. El marcaje mejora drásticamente la sensibilidad.

El amortiguador de formulación y el impacto en la sensibilidad

del ensayo: el tipo de inyección que se usa típicamente en los ensayos CE-SDS es la electrocinética, donde se aplica un voltaje bajo para conducir los iones cargados al capilar. Sin embargo, existe un sesgo hereditario hacia los iones pequeños altamente cargados en la inyección electrocinética. La combinación de una gran molécula de proteína de interés, como las proteínas de la cápside, presente en el amortiguador de formulación con alto contenido de sal disminuirá la sensibilidad del ensayo, debido a la dramática diferencia en las movilidades. Los iones más pequeños se mueven más rápido durante la inyección electrocinética que sus contrapartes proteicas más grandes. La Figura 5 muestra una comparación del electroferograma de AAV8 en el límite de detección (1.1×10^9 GC / mL) en 2 amortiguadores de formulación diferentes. La línea roja es AAV8 en 1X PBS que tiene un contenido de sal mucho más alto, por lo tanto, una altura de pico más baja, en comparación con AAV8 en amortiguador de fosfato 50 mM. Además, el pH más alto del amortiguador de fosfato promueve la reacción de marcado. En esta figura, la relación señal / ruido fue: 31, 3 y 7 para VP3, VP2 y VP1, respectivamente. Esto está dentro del S / N aceptable de 3 para el límite de detección. Además, las proporciones relativas entre las cápsides VP3, 2 y 1 fueron 10.8:1:1.8 respectivamente. Si bien demostramos una separación de pequeñas cantidades de AAV con buena señal de ruido, esto se logró con una mayor cantidad de colorante por proteína que la recomendada por el fabricante.³ Encontramos esto necesario para promover el etiquetado. Sin embargo, observamos un efecto de coeleo significativo (Figura 5). Esta condición puede mitigarse con el intercambio de amortiguador y la concentración de la muestra inicial de AAV a 10^{11} o más GC / mL.

Cuando se trabaja con moléculas de proteínas marcadas, es importante ejecutar un espacio en blanco para garantizar la asignación de picos adecuada.

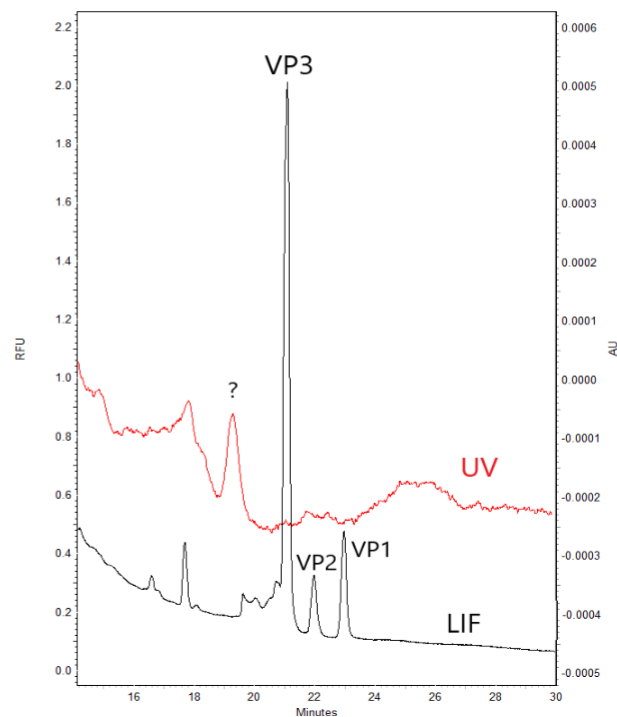


Figura 4. Comparación entre AAV8 1.1×10^{10} utilizando absorción UV (línea roja) y LIF (línea negra). El eje Y izquierdo muestra las unidades RFU y el eje Y derecho muestra la absorbancia. Denota un pico desconocido.

Aunque el colorante P503 utiliza en este trabajo tiene un rendimiento cuántico muy bajo cuando no está unido (<1%)³, es reactivo frente a grupos amino primarios y gel de separación CE-SDS en un amortiguador de muestra Tris 100 mM. Por esta razón, se utiliza un blanco compuesto de amortiguador diluyente AAV, de formulación y de muestra CE-SDS. La Figura 6 muestra una superposición de los electroferogramas de Blank y AAV8 a 1.1×10^9 y 10^{10} análisis de muestra.

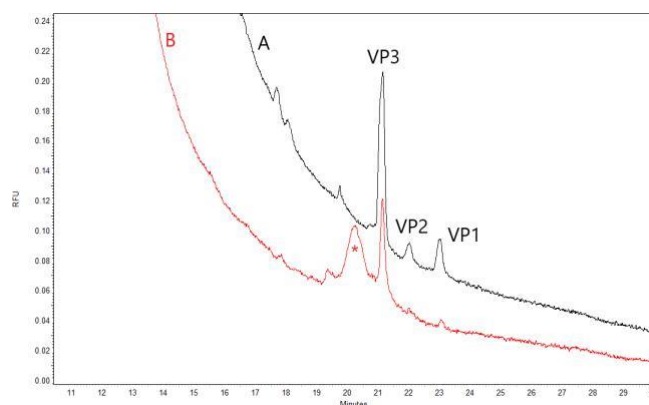


Figura 5. Comparación entre diferentes niveles de sal en el amortiguador de formulación de AAV8 a niveles de traza bajos 1.1×10^9 GC/mL. (Rojo) 1X PBS; (Línea negra) 50 mM de amortiguador fosfato pH 8. * marca un artefacto del blanco

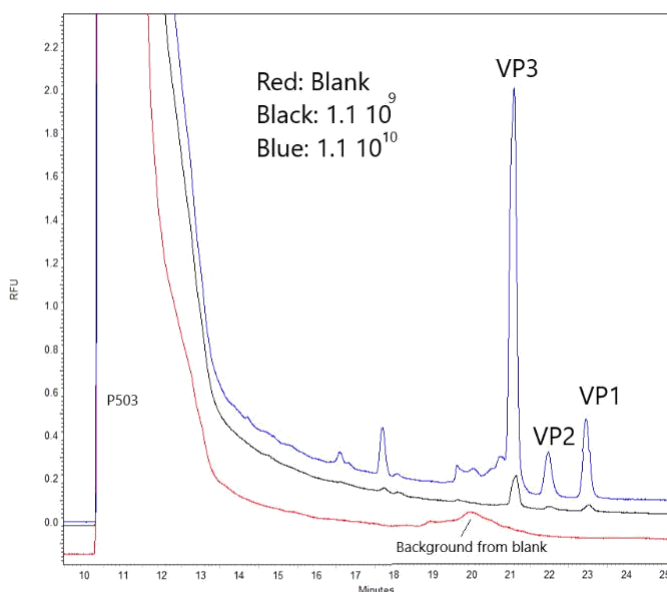


Figura 6. Superposición de blanco (línea rojo) y AAV8 a 1.1×10^9 (línea negra) y 1.1×10^{10} (línea azul). Tenga en cuenta el aumento en la ejecución en blanco que significa un producto marcado que no puede atribuirse a una impureza en el AAV.

Aunque los AAV son estables, la degradación es motivo de gran preocupación en cualquier producto biofarmacéutico. La Figura 2 (vea la página principal) muestra la comparación entre el estrés generado a 93 °C durante 30 minutos y las muestras de AAV8 no estresado a la misma concentración 1.1×10^{10} GC/mL. En general, hay una disminución significativa en la intensidad máxima global para las muestras estresadas por calor. Vale la pena mencionar el cambio considerable en el perfil del electroferograma en las muestras estresadas por calor, especialmente para los picos de menor peso molecular, presuntamente atribuidos a posibles impurezas en la muestra original, son sensibles al calor. Demostrando que el esquema de marcado propuesto es adecuado para evaluar la pureza de las proteínas de la cápside AAV8.

Conclusiones

- El kit CE-SDS MW cuando se combina con la detección LIF puede lograr con éxito la detección de niveles de trazas de proteínas de la cápside AAV8, analizando con éxito AAV8 en el límite de detección a 1.1×10^9 GC/mL.
- El marcaje fácil de 2 pasos con colorante P503 no requiere intercambio de amortiguador antes del análisis.
- Al usar un amortiguador de formulación con baja concentración de sal y un pH ligeramente más alto, manteniendo la estabilidad AAV8, permite una mejor sensibilidad debido a las condiciones favorables de inyección electrocinética y una sensibilidad mejorada debido al entorno de marcaje.

Referencias

1. M.Agbandjie-McKenna *et al.*; *Molecular Therapy; Methods & clinical Development*, (2017), **6**, 171-182.
2. B. Bothner *et al.*; *Journal of Virology*, (2013), **87-24**, 13150-13160.
3. Chromeo P503 product insert, <https://www.activemotif.com/documents/1641.pdf>
4. Purity Analysis of Adeno-Associated Virus (AAV) Capsid Proteins using CE-LIF Technology; SCIEX Technical Note RUO-MKT-02-10086-A.
5. J. Fraser Wright, *Biomedicines* (2014), **2**, 80-97.