

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF를 이용한 바이러스 벡터 입자의 특성 규명

저자

Wendi A. Hale,
Christopher M. Colangelo
Agilent Technologies, Inc.,
Lexington, MA, USA

Roy Hegedus,
Norman Garceau
Lake Pharma,
Worcester, MA, USA

개요

이 응용 자료에서는 원형(intact) 아데노 연관 바이러스(AAV)의 주요 품질 속성(CQA) 특성 규명 및 측정 워크플로와 함께 캡시드 단백질의 번역 후 변형(PTM) 식별에 대해 설명합니다. 해당 워크플로는 Agilent 1290 Infinity II LC, Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF, 데이터 분석에 사용된 Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 소프트웨어 등으로 구성되어 있습니다.

서론

AAV는 유전자 치료를 위한 주요 바이러스 벡터로서, 유전성 망막질환 및 척수성 근위축증 치료에 성공적으로 이용되고 있습니다. AAV는 대략 4.7kb의 단일가닥 게놈과 20면체(icosahedral) 단백질 껍질로 구성되어 있습니다. 원형 AAV는 올리고뉴클레오타이드 치료제의 보호 및 전달 매개체로 사용됩니다. 여러 다른 세포 유형에 형질도입시키는 13개의 혈청형이 알려져 있으며, 이는 치료제의 선택성을 강화합니다. AAV가 치료제 전달 플랫폼으로 계속 관심을 모으면서 해당 치료제 완제품의 모든 CQA를 유지하는 것이 매우 중요해졌습니다. 바이러스 캡시드 단백질 특성 규명에는 몇 가지 어려운 지점들이 있습니다. 단백질 껍질은 VP1, VP2, VP3의 3개 캡시드 단백질로 구성되어 있으며, 이들은 1:1:10의 비율로 조립되어 비리온당 60개 캡시드를 갖는 3.9 메가달톤의 구조를 이룹니다. VP1, VP2의 낮은 몰비율에 더해 3개의 단백질 모두 C 말단에 겹치는 시퀀스를 가지고 있습니다. 캡시드 단백질의 분자량 측정에는 전통적으로 SDS-PAGE가 사용되었으나, 이 기술은 대략적인 분자량을 제공하여 혈청형 간 구별은 하지 못할 수도 있습니다. 질량 분석(MS)은 이와 같은 난점을 극복하고 캡시드 단백질의 CQA를 결정할 수 있는 유망한 방법입니다. 이 응용 자료에서는 바이러스 캡시드 단백질의 PTM 식별을 포함하여 원형(intact) 분석과 펩타이드 매핑을 위한 워크플로에 대해 설명합니다. 해당 워크플로에서는 Agilent 1290 Infinity II LC-Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF를 포함한 도구를 사용하였으며, 데이터 분석에 Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 소프트웨어를 활용했습니다.

실험

기기

Agilent 1290 Infinity II LC 구성:

- Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II multisampler (G7167B), 원형 분석용 20µL 루프, 펩타이드 맵핑 분석용 40µL 루프 장착
- Agilent 1290 Infinity II 항온 컬럼 장치 (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

재료

AAV8은 Lake Pharma(Worcester, MA, USA)에서 생산하였습니다. 분자량 컷오프 필터 및 (*tris*(2-carboxyethyl)phosphine) (TCEP)는 Millipore Sigma에서 구입하였습니다. 트립신과 rAsp-N은 Promega에서 구입하였습니다.

시료 전처리

원형(intact) 분석의 경우, AAV는 10kDa 분자량 필터로 10,000g에서 3회 완충액 교환 과정을 거쳤습니다. 완충액에는 5mM TCEP, 80% H₂O, 20% 아세트오트릴, 0.1% 포름산 (v/v)이 포함되어 있었습니다. 시료 수집 후 주입 전 실온으로 항온처리 했습니다. 펩타이드 맵핑에서는 AAV의 변성, 환원, 알킬화, 분해를 거쳤습니다. 해당 실험에 사용된 효소는 트립신과 rAsp-N입니다.

LC/MS 분석

Dual Agilent Jet Stream 소스를 장착한 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 시스템에 1290 Infinity II LC 시스템을 연결하여 LC/MS 분석을 진행했습니다. 고분자 SWARM 오토 튜닝 기능을 갖춘 Agilent MassHunter Acquisition(B.09.00) 워크스테이션 소프트웨어를 원형 분석에 사용했습니다. 기기는 추가적인 교정을 거쳐 표준 질량 모드에서 작동하였습니다. Iterative MS/MS 기능은 펩타이드 맵핑 워크플로에서 사용하였습니다.

데이터 처리

모든 MS 데이터는 MassHunter BioConfirm 10.0 소프트웨어를 사용하여 처리했습니다.

표 1. 원형 분석을 위한 액체 크로마토그래피 파라미터.

파라미터	값
컬럼	Agilent ZORBAX RRHD 300-Diphenyl, 2.1 × 150mm, 1.8µm
이동상 A	물, 0.1% 포름산
이동상 B	아세트오트릴, 0.1% 포름산
유속	0.4mL/min
주입량	20µL
그라디언트	0~30분: 30~40% B; 30~38분: 40~90% B; 38~39분: 90% B; 39~40분: 90~30% B; 40~45분: 30% B
사후 시간	0분
컬럼 온도	60°C

표 2. 원형 분석을 위한 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 파라미터.

파라미터	값
소스	Dual Agilent Jet Stream
가스 온도	325°C
가스 유속	13L/min
Nebulizer	35psig
Sheath 가스 온도	375°C
Sheath 가스 유속	12L/min
VCap	5,000V
노즐	500V
Fragmentor	180V
수집 속도	1스펙트럼/초
기준 질량	922.0098

표 3. 펩타이드 맵핑 분석을 위한 액체 크로마토그래피 파라미터.

파라미터	값
컬럼	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, 2.1 × 150mm
이동상 A	물, 0.1% 포름산
이동상 B	아세트오트릴, 0.1% 포름산
유속	0.4mL/min
주입량	40µL
그라디언트	0~3분: 3% B; 3~50분: 3~35% B; 50~60분: 35~97% B; 60~62분: 97% B; 62~62.5분: 97~3% B; 62.5~65분: 3% B
사후 시간	5분
컬럼 온도	60°C

표 4. 펩타이드 맵핑 분석을 위한 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 파라미터.

파라미터	값
소스	Dual Agilent Jet Stream
가스 온도	325°C
가스 유속	13L/min
Nebulizer	35psig
Sheath 가스 온도	275°C
Sheath 가스 유속	12L/min
VCap	4,000V
노즐	0V
Fragmentor	170V
수집 속도	5/3스펙트럼/초 (MS 및 MS/MS)
기준 질량	121.0509, 922.0098

결과 및 토의

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF에서의 원형 분석

SDS-PAGE는 AAV 캡시드 단백질의 분자량을 확인하기 위한 빠르고 간단한 방법이나, 아세틸화 또는 인산화 형태 대비 비변형 형태와 같이 서로 다른 프로테오폼(proteoform)을 분리해낼 만큼 구체적이지는 않습니다. 고분해능 Q-TOF MS는 충분한 감도를 제공하여 단백질의 정확한 원형(intact) 분자량을 알아내고 PTM을 분리해 낼 수 있습니다. 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF의 고분자 SWARM 오토툰 기능은 이를 더욱 강화하여 캡시드

단백질의 질량 분석기 내 전송을 개선해 뛰어난 감도를 제공합니다. 또한 해당 TOF의 초고진공 상태 단백질 분자의 평균 자유 경로를 증가시켜 스펙트럼 선명도를 향상시켜줍니다.

LC/MS 전의 시료 전처리는 고품질의 질량 스펙트럼을 얻기 위해 매우 중요하며, 이는 AAV에 대한 본 연구에서 더욱 강조될 수 있습니다. 그림 1은 시료 전처리 유무에 따른 캡시드 단백질의 원시 질량 스펙트럼 및 총 이온 크로마토그램(TIC)을 보여줍니다. 원래 용액의 완충액은 질량 분석기에 오염물을 유입시키고 있습니다. 또한 캡시드 단백질의 분리는 완충액 교환 후 개선되었습니다. 원시 데이터는 단백질의 존재비 또한 1.5배

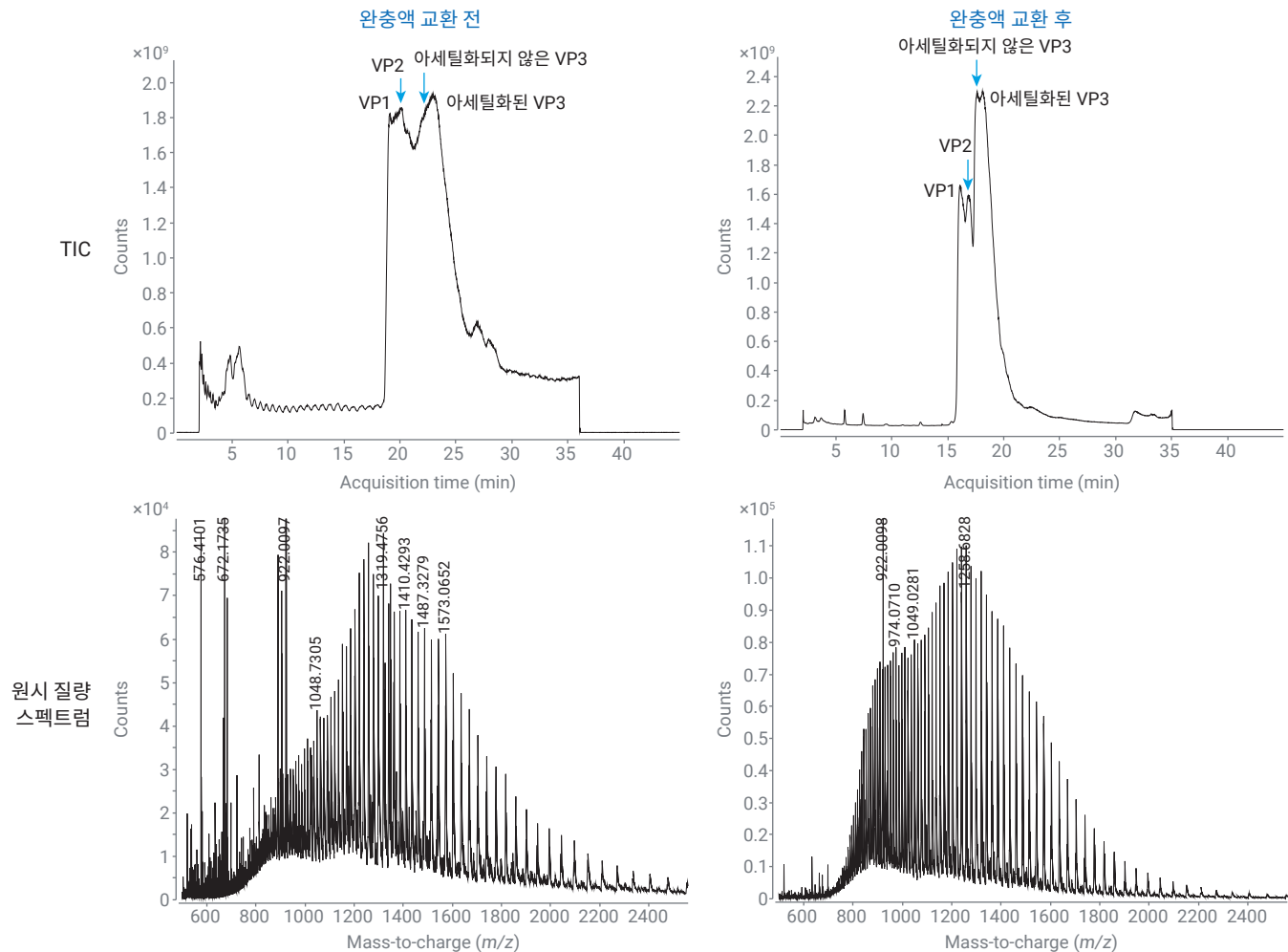


그림 1. 시료 전처리 수행 및 미수행 시 VP1의 AAV 캡시드 단백질 TIC 및 원시 스펙트럼.

항상되었음을 나타내며, 스펙트럼은 훨씬 선명하게 보입니다. 디콘볼루션을 거친 데이터는 여기에 나타나지 않았으나, 낮아진 염과 포타슘 부가물 농도로 인해 스펙트럼이 더 깨끗해져 데이터 해석이 더욱 쉬워졌습니다. 또한 이는 워크플로의 견고성을 높여 기기 유지보수 주기를 연장할 수 있습니다.

그림 2는 VP1의 원시 스펙트럼 및 디콘볼루션 스펙트럼을 보여줍니다. 이 워크플로에서는 3개의 VP1 인산화 부위를 10ppm 미만의 오차로 검출할 수 있었습니다. Accurate mass 데이터는 VP1에서 N-말단 아미노산 잔기가 사라지고 새로운 N-말단이 아세틸화되었음을 확인해주었습니다. 현재 VP1의 인산화를 포함해 AAV 캡시드 단백질의 PTM 분석에 대한 보고서는 매우 적습니다. VP2는 VP1

과 크로마토그래피에서 분리됩니다. 질량 분석으로 이들 단백질을 분리할 수 있지만, 크로마토그래피 분리는 존재비가 낮은 이 2가지 단백질에서 보다 낮은 이온 억제력을 보입니다. Accurate mass 데이터는 VP2에서 최소 2곳의 인산화 부위를 확인해주었으며, 그림 3에서 3번째 부위를 확인할 수 있습니다. 그림 4는 VP3의 비변형 형태가 아세틸화된 VP3과 크로마토그래피적으로 거의 분리되었음을 보여줍니다. 또한 디콘볼루션을 거친 스펙트럼은 아세틸화된 VP3과 비변형 VP3 모두가 존재함을 높은 질량 정확도로 밝혀냅니다. 단백질의 N-말단 아세틸화는 흔한 PTM이며, 단백질 안정성, 접힘, 기타 단백질과의 상호작용과 관련되어 있습니다. VP1은 완전한 아세틸화를 거쳤으나, VP3은 대략 70%가 아세틸화되었습니다.

현재로서는 왜 VP3에서 완전한 아세틸화가 일어나지 않았는지 분명하지 않으나, 이는 바이러스 캡시드 껍질의 전체 구조에 영향을 미칠 수 있습니다. 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF의 향상된 진공과 고분자 SWARM 오토튠 기능의 조합으로 얻어진 스펙트럼 선명도는 3개 바이러스 캡시드 단백질과 이들의 PTM을 모두 높은 질량 정확도로 보여줍니다(모든 프로테오폼에 대해 10ppm 미만).

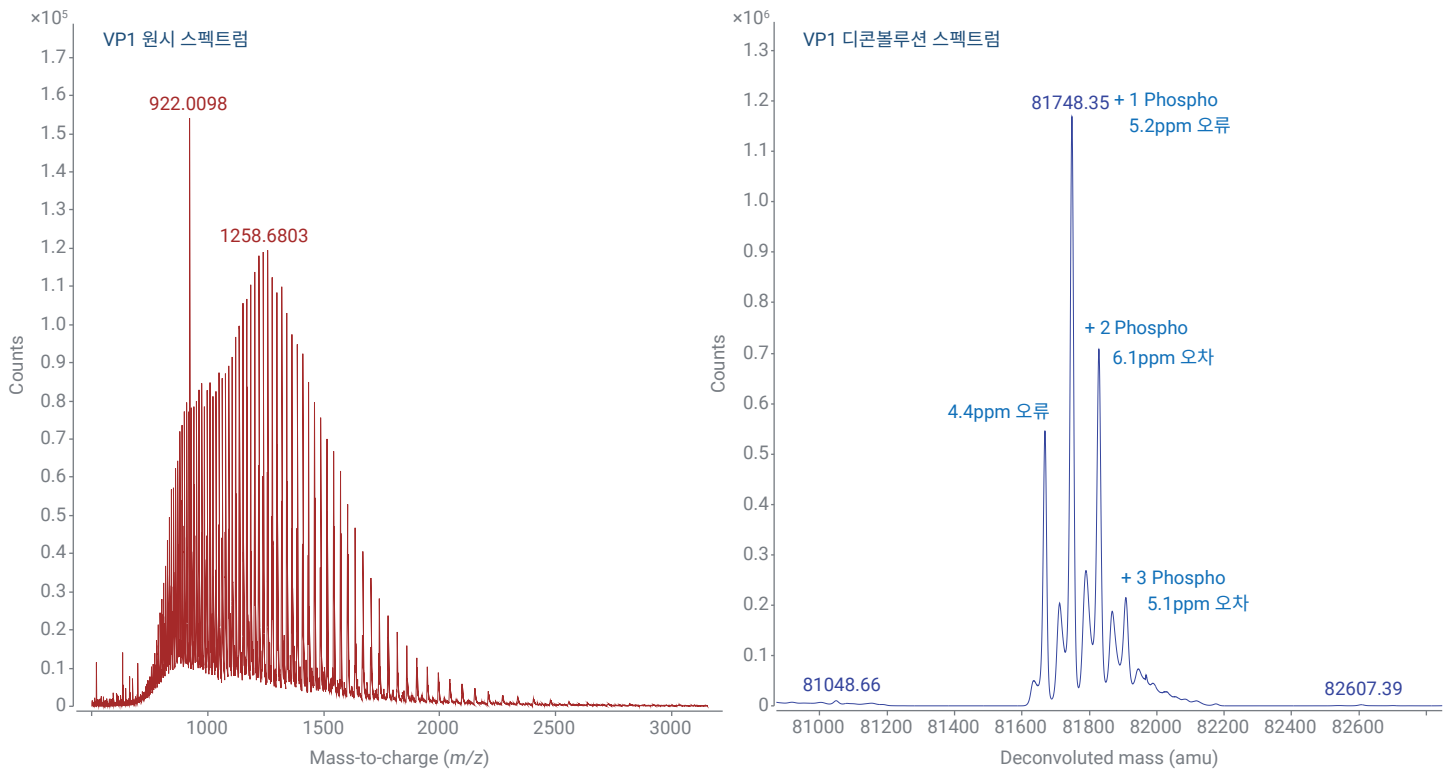


그림 2. VP1 캡시드 단백질의 원시 스펙트럼 및 디콘볼루션 스펙트럼. 해당 단백질의 비변형 형태 및 인산화된 형태에서 뛰어난 질량 정확도를 보임.

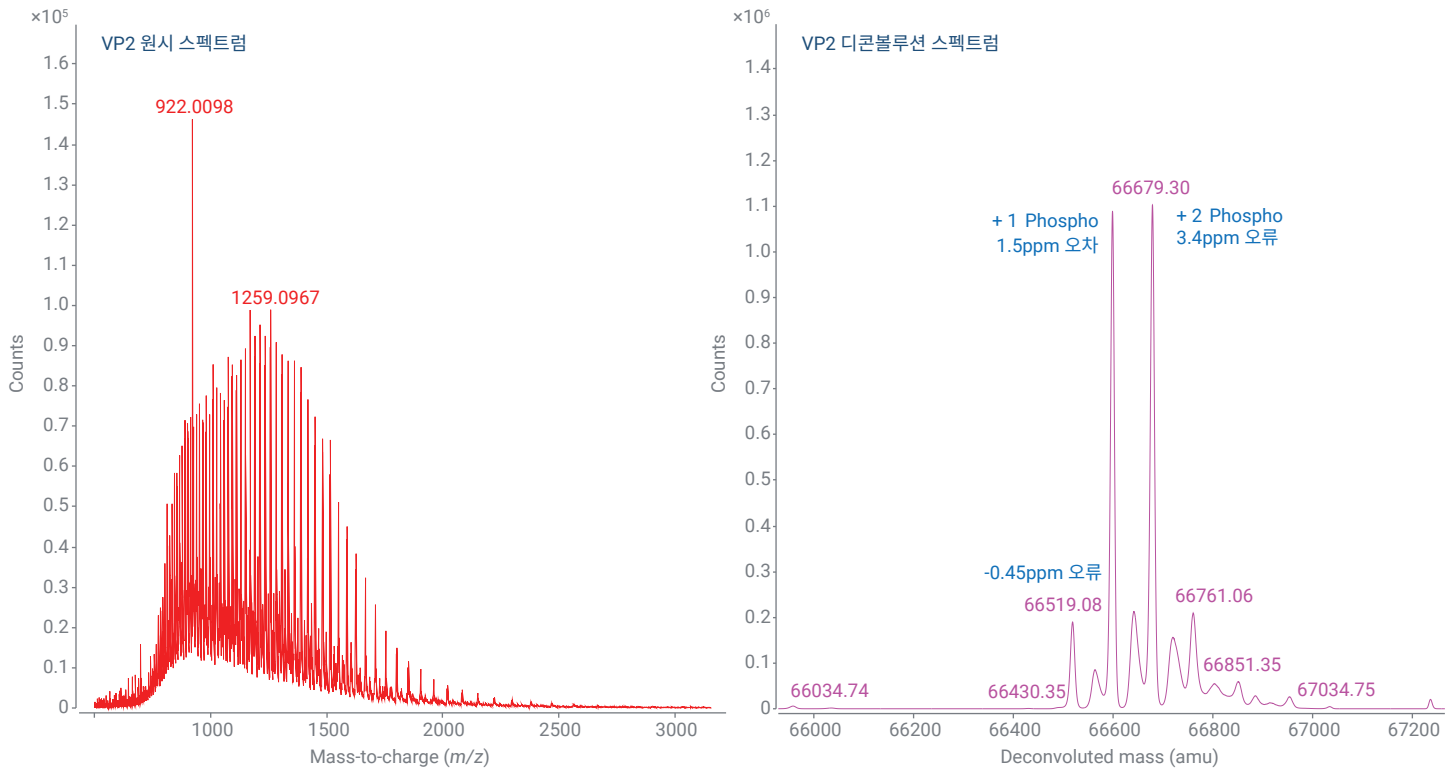


그림 3. VP2 캡시드 단백질의 원시 스펙트럼 및 디콘볼루션 스펙트럼. 단백질의 비변성 형태 및 인산화된 형태에서 뛰어난 질량 정확도를 보임(모두 오차 5ppm 미만).

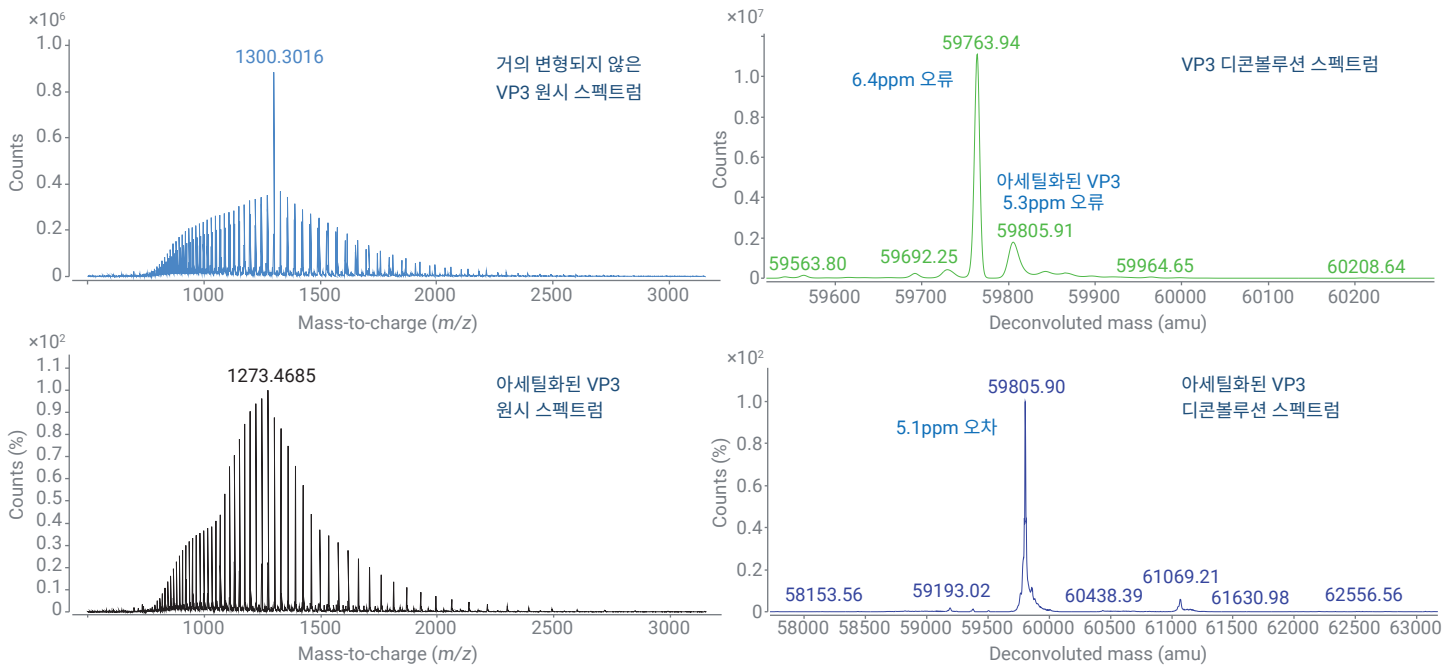


그림 4. VP3 캡시드 단백질의 원시 스펙트럼 및 디콘볼루션 스펙트럼. 비변성 형태와 아세틸화 형태가 크로마토그래피에서 대부분 분리되었으며, 각 프로테옴에서 뛰어난 질량 정확도를 나타냄.

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF에서의 펩타이드 맵핑

바이오횰약품의 펩타이드 맵핑은 단백질 시퀀스, PTM을 결정하는 필수적인 분석법으로, ICH, FDA 및 기타 규제 기관에서 요구하는 방법입니다. AAV를 통한 유전자 치료는 이제 막 떠오르는 분야이지만, 캡시드 단백질에 대한 펩타이드 맵핑의 향후 요구사항을 예상해 볼 수는 있습니다. 2020년 1월부터 FDA는 인간 유전자 치료 약물에 대해 PTM을 포함한 1차 및 2차 구조 관련 정보 제공을 권장하고 있습니다. 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF의 iterative MS/MS 기능은 분리 및 조각화에 있어 모든 이전 실행의 펩타이드를 제외하여, 낮은 존재비의 펩타이드 선택과 검출을 가능케 합니다. 뿐만 아니라, MassHunter BioConfirm 10.0을 통해 다중 실행 선택을 가능하게 하여 총 시퀀스 커버리지를 성취합니다. 이 기능은 iterative MS/MS 실행의 결과를 결합하거나 여러 개의 효소를 사용하는 데 유용합니다.

산화와 탈아미드화 같은 PTM의 정체를 식별하는 것은 단백질 안정성 측정에서 필수적입니다. 확산할 수 있는 펩타이드 맵핑을 위해서는 식별된 모든 펩타이드가 10ppm 미만의 오차와 최소 1개의 MS/MS 스펙트럼을 가져야 펩타이드 시퀀스가 확인되고 PTM의 위치를 특정할 수 있습니다. 또한 위발견율(FDR)은 1%로 설정되었습니다. AAV8의 시퀀스에는 리신 및 아르기닌 잔기가 자주 발견되는 여러 부위가 포함되어 있어, 트립신만으로는 완전한 전체 시퀀스를 얻기 어렵습니다. 따라서 완벽한 시퀀스 커버리지를 성취하기 위해 rAsp-N을 사용하였습니다.

가장 큰 단백질인 VP1은 그림 5에 나타난 것과 같이 97.7%의 총 시퀀스 커버리지를 보였습니다. 직선은 MS/MS로 식별된 펩타이드를 나타냅니다. 파란색과 녹색 선은 트립신 분해물에 대한 2회의 iterative 실행에서 비롯된 것이며, 검정색과 빨간색 선은 rAsp-N 분해물에 대한 2회의 iterative 실행에서 나온 것입니다. 그림 6에 나타난 것과 같이, MS/MS 데이터는 부위 특이적인 인산화를 확인해줍니다. 빨간색 주석은 인산화된 세린을 포함한 펩타이드 조각을

표현합니다. 다른 아스파라긴 탈아미드화 및 메티오닌 산화와 같은 일반적인 PTM도 낮은 존재비이지만 예상대로 나타나 있습니다. 그림 7은 BioConfirm 10.0의 상대 정량 기능을 이용한 이와 같은 저농도 변형의 예를 보여줍니다. VP2 및 VP3은 각각 98.5%와 100%의 시퀀스 커버리지를 가졌습니다. AAV8의 N-글리코실화에 대한 보고가 있어왔으나, N-글리코실화는 발견되지 않았습니다. 이는 벡터 발현 시스템의 차이로 인한 것일 수 있습니다.

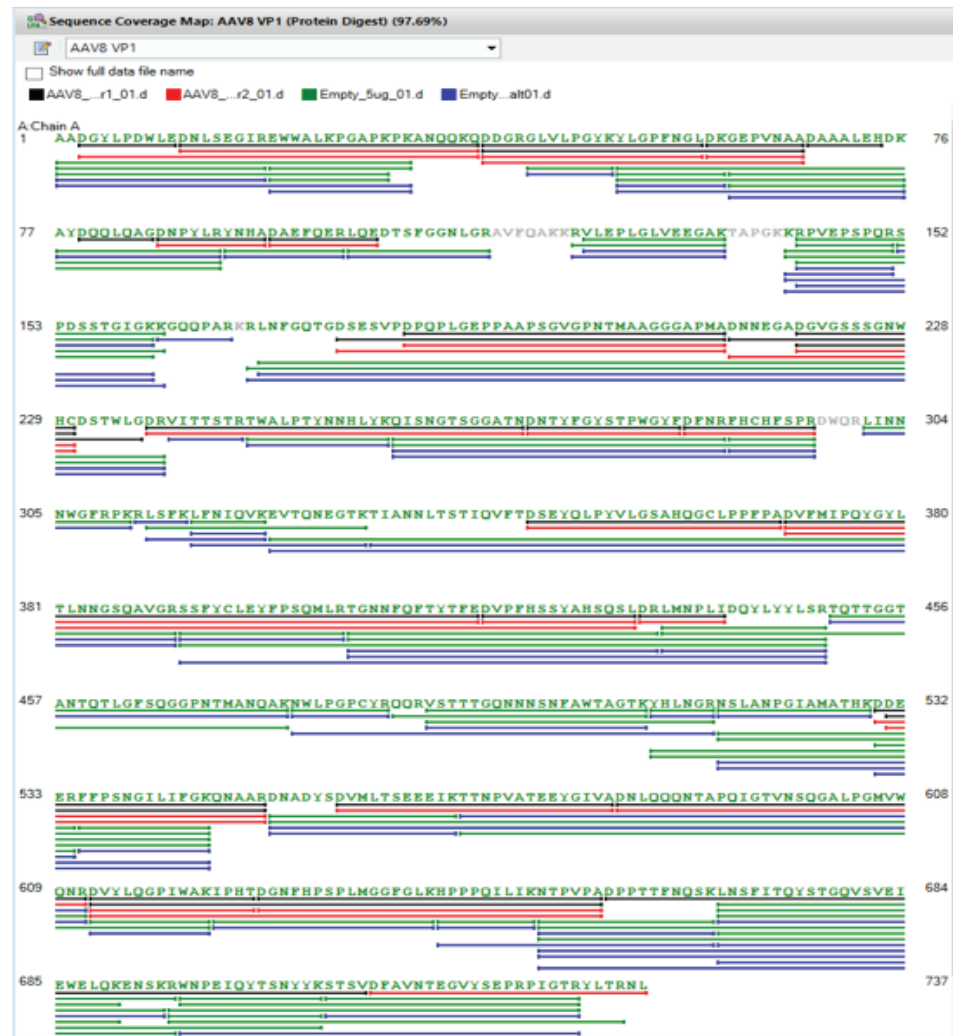


그림 5. Iterative MS/MS를 사용한 VP1의 시퀀스 커버리지를 보여주는 Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 스크린샷(트립신 및 rAsp-N을 상보적 효소로 사용). 이 단백질은 97.7%의 시퀀스 커버리지를 보임.

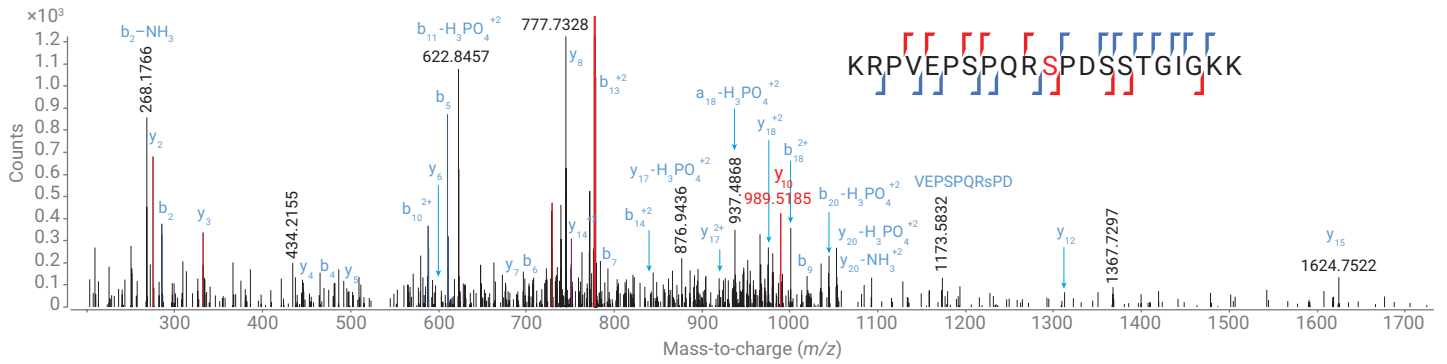


그림 6. MS/MS로 확인된 부위 특이적 인산화 사례. 주석 처리된 펩타이드에 인산화된 세린 잔기가 포함되었을 경우 빨간색으로 표시됨.

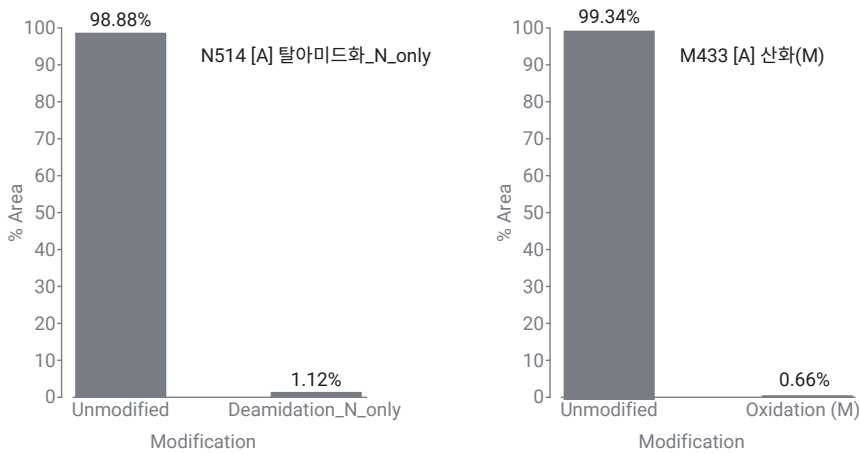


그림 7. 단백질 내 일반적 PTM의 예: 메티오닌 산화 및 아스파라긴 탈아미드화. 두 펩타이드는 예상대로 최소한의 변형을 보였음.

결론

유전자 치료를 위한 전달체로서의 AAV 입자 사용은 우수한 가능성을 보였으며, 결과적으로 캡시드 단백질 CQA의 특성 규명이 신약 허가 절차에서 필수적이게 되었습니다. 이 자료에서는 캡시드 단백질의 accurate mass를 측정하고 PTM을 식별하는, 시료 전처리부터 데이터 분석까지의 워크플로를 시연하였습니다. 1290 Infinity II LC/6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF를 MassHunter BioConfirm 10.0과 함께 사용하여 AAV 캡시드 단백질 분석을 위한 정확하고 신뢰할 수 있는 솔루션을 제공하였습니다.

참고 문헌

1. Dalkara, D. *et al.* *In vivo*-Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous. *Sci. Transl. Med.* **2013**, 5(189), 189ra76-189ra76.
2. Xie, Q. *et al.* The Atomic Structure of Adeno-Associated Virus (AAV-2), a Vector for Human Gene Therapy. **2002**, 99(16), 10405-10410.
3. Wu, Z.; Asokan, A.; Samulski, R. J. Adeno-Associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol. Ther.* **2006**, 14(3), 316-327.
4. Bui, H. *et al.* (2014) ASMS Poster WP-681.
5. Jin, X. *et al.* Direct Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis for Complete Characterization of Recombinant Adeno-Associated Virus Capsid Proteins. *Hum. Gene Ther. Methods* **2017**, 28(5), 255-267.
6. Giles, A. R. *et al.* Deamidation of Amino Acids on the Surface of Adeno-Associated Virus Capsids Leads to Charge Heterogeneity and Altered Vector Function. *Mol. Ther.* **2018**, 26(12), 2848-2862.
7. Van Vliet, K. *et al.* Adeno-associated virus capsid serotype identification: Analytical methods development and application. *J. Virol. Methods* **2009**, 159(2), 167-177.
8. Arruda, V. R. *et al.* It's All About the Clothing: Capsid Domination in the Adeno-Associated Viral Vector World. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, 5(1), 12-15.
9. Office of Medical Products and Tobacco, Center for Biologics Evaluation and Research. *Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)*. Silver Spring, MD. **2020**, 28-29.

감사의 말

애질런트는 시료 생산에 도움을 주신 Lake Pharma의 Dominique Garceau, Tristan Cano, Caitlin Jaeger, William Hermans에게 감사를 포함합니다. 또한 아이디어를 공유해주신 애질런트 싱가포르의 Brian Liao, Ravindra Gudihal에게도 감사드립니다.

www.agilent.com

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

DE.4113541667

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
2020년 7월 23일, 한국에서 인쇄
5994-1980KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com