

신속한 생성물 확인을 위한 아데노 연관 바이러스 캡시드 단백질 원형 LC/MS 분석

저자

Brian Liao
Agilent Technologies, Inc.

서론

아데노 연관 바이러스(Adeno-Associated Virus, AAV)는 척추성 근위축증 및 유전성 망막 변성과 같은 많은 희귀난치성 유전질환을 치료할 수 있을 것으로 기대를 모으고 있는 새로운 종류의 바이오 치료제입니다.¹ AAV는 단백질인 캡시드와 캡슐화된 DNA로 구성된 거대 분자 복합체로, 각각은 전체 제품의 품질과 안전성을 확보하기 위해 전용 분석 기술을 필요로 합니다. AAV 캡시드는 일반적으로 VP1-3으로 표기되는 세 가지 서로 다른 캡시드 단백질로 구성되는데, 캡시드당 총 60개의 단백질 복사본을 가지고 있으며 화학양론적 비율은 약 1:1:10입니다.²

미국식품의약국(FDA)은 모든 AAV 치료제의 바이러스 캡시드와 캡슐화된 DNA를 출시 전, 특히 여러 혈청형(항원형) 또는 조작된 변이체가 생산되는 시설에서 명확하게 식별하도록 권장하고 있습니다.³ 현재까지는 ELISA 및 면역 블로팅과 같은 항체 기반 분석법이 바이러스 캡시드 분석에 가장 일반적인 기술로 이용되고 있습니다. 이러한 분석법에는 몇 가지 단점이 있습니다. 항체 기반 분석법은 번거롭고 오차가 발생하기 쉬울 뿐만 아니라 분석할 각 AAV 유형에 매우 특이적인 항체를 생성해야 하는데, 이것은 까다로운 일입니다. 왜냐하면, 서로 다른 제품의 AAV 캡시드가 높은 수준의 상동성을 가질 수 있기 때문입니다. 예를 들어, AAV 혈청형 1과 6의 차이는 단 6개의 아미노산에 불과하므로(99% 상동성) 항체 결합으로는 구별하기 어렵습니다.⁴

이론적으로, LC/MS는 바이러스 캡시드 단백질 분석에 속도와 특이성의 이상적인 조합을 제공합니다. 단백질 질량을 직접 측정하면 각 AAV 유형에 대한 항체를 생성할 필요가 없기 때문입니다. 그러나, 이전의 연구들은 바이러스 캡시드 단백질의 상대적으로 낮은 크로마토그래피 분리로 어려움을 겪었습니다.⁵ 동시 용리는 AAV 감염성을 결정하는 중요 인자인 캡시드 화학양론의 정확한 정량을 어렵게 할 뿐만 아니라 신호 강도와 질량 정확도를 손상시킬 수 있기 때문에 문제가 됩니다.⁶

이 응용 자료에서는 7가지 서로 다른 혈청형의 1차 염기서열을 확인하는 AAV캡시드 단백질의 신속한 분석을 위해 최적화된 LC/FLD-MS 분석법을 소개합니다. 이 분석법은 시료 전처리가 간단하며, 고농도 염 조건 뿐만 아니라 일반적인 비이온성 계면활성제 첨가제인 Pluronic F-68에도 견고한 성능을 유지합니다.

실험

AAV 시료

AAV 혈청형 2, 7, 9, 7m8, DJ, rh10 및 Anc80은 Vector Core @ GIS(A*STAR, 싱가포르)에서 구입했습니다. AAV 시료는 삼중 형질주입에 의해 HEK-293 세포에서 발현시키고 분석용 초원심분리로 정제했습니다. 시료는 0.001% Pluronic F-68을 함유한 인산염 완충 식염수에 $\sim 1.2 \times 10^{10}$ 바이러스 게놈/ μL 의 농도로 제공되었으며 완충액 교환 없이 받은 대로 사용했습니다.

시료 전처리

200mM 중탄산암모늄(pH 약 8.0)에 12M guanidine HCl + 40mM DTT로 준비한 변성 완충액을 각 분석 마다 새로 준비했습니다. 변성 완충액을 AAV 시료에 1:3 비율로 첨가하여 최종 농도 3M의 guanidine HCl를 얻었습니다. 그런 다음 시료를 15분간 70°C로 가열하여 완전히 변성되도록 했습니다. 분석당 1.5×10^{11} 바이러스 게놈을 주입했습니다.

원형 캡시드 단백질 분석을 위한 LC/FLD-MS

시료는 다음 기기를 사용하여 분석했습니다.

- Agilent 1290 Infinity II LC 시스템 구성은 다음과 같습니다.
 - Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프 (G7120A)
 - Agilent 1290 Infinity II Multisampler(G7167B)
 - Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B)

- Agilent 1260 Infinity 형광 검출기 (G1321B), 8 μL 플로우 셀
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

분리를 위해 2.1 x 100mm, 1.8 μm 규격의 Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond C18(SB-C18) 및 SB-Diphenyl 컬럼 (부품 번호 858750-902 및 858750-944)을 사용했습니다. ZORBAX RRHD 300Å SB-C3 컬럼(부품 번호 858750-909)도 개발에 사용되었지만 최적화된 분석법은 아니었습니다.

0.1% TFA + 0.1% FA의 탈이온수(mp A) 및 90% 이소프로필 알코올 + 9.8% 물 + 0.1% TFA + 0.1% FA(mp B)로 구성된 높은 용리 세기의 이동상을 선택했습니다. 고온과 함께 유사한 이동상 조건으로 ZORBAX StableBond 컬럼에서 단일 클론 항체 분석을 위한 우수한 분해능을 얻은 바 있습니다.⁷



그림 1. 이 응용 자료에서 사용된 장비 및 소모품.

형광 검출의 경우, 8uL 플로우 셀에서 단파장 여기(280nm)/다파장 방출(315, 330, 345 및 360nm) 모드를 사용했는데, 방향족 잔기의 방출 스펙트럼이 용매 노출의 수와 정도에 따라 달라질 수 있기 때문입니다. 360nm에서의 방출이 가장 강한 것으로 나타나 모든 분석에 사용했습니다. 모든 데이터 분석은 Agilent BioConfirm 10.0에서 수행했습니다. 표 1, 2 및 3은 기기 및 소프트웨어 설정을 보여줍니다.

LC/MS 펩타이드 �핑 분석

6.0 x 10¹¹ 의 AAV 2 바이러스 게놈 (약 3.6µg의 단백질)을 포함하는 10µL의 시료를 760mg/mL guanidine HCl + 3.8mg/mL TCEP를 포함한 150mM Tris-HCl(pH 8) 30µL로 60분간 60°C에서 변성 및 환원시켰습니다. 실온으로 냉각한 후, 133mM iodoacetamide 10uL를 첨가하고 실온에서 30분간 차광 상태로 배양하여 알킬화를 수행했습니다. 그런 다음 시료를 210µL의 Tris-HCl로 희석한 후 Promega의 Sequencing Grade Modified Trypsin(부품 번호 V5117) 0.2µg을 첨가했습니다. 37°C에서 2시간 동안 분해를 수행한 후, 0.2µg의 트립신을 더 첨가한 다음 37°C에서 밤새 분해시켰습니다. 다음 날, 30µL의 10% 포름산을 첨가하여 반응을 중단한 다음 Agilent AssayMap Bravo

표 2. 원형(Intact) 캡시드 단백질 질량 분석 파라미터.

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 시스템	
소스	Agilent Dual Jet Stream
가스 온도	350°C
가스 유속	12L/분
Nebulizer	35psig
Sheath 가스 온도	350°C
Sheath 가스 유속	11L/분
Vcap	4kV
노즐 전압	2kV
Fragmentor	180V
스키머	65V
질량 범위	900 ~ 3,200m/z
수집 속도	1스펙트럼/초
기준 질량	922.0098
수집 모드	양이온, 3,200m/z 질량 범위, 확장 동적 범위(2Ghz)

시스템(G5542A)을 사용하여 C-18 클린업을 수행했습니다.

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF를 사용하여 1290 Infinity II LC에서 펩타이드 �핑을 수행했습니다. 크기가 2.1 x 150mm, 2.7µm인 AdvanceBio 펩타이드 �핑 컬럼(부품 번호 653750-902)을 분리에 사용했습니다. 표 4 및 5는 기기 설정을 보여줍니다.

표 3. 원형 캡시드 단백질 디컨볼루션 설정.

Agilent MassHunter BioConfirm B10.0 설정	
지정 크로마토그램	FLD
추출 시 적분	예
지연 시간 조정	0.1분(MS 검출기)
디컨볼루션	최대 엔트로피
디컨볼루션 m/z 범위	1,000~3,200
디컨볼루션 질량 범위	55 ~ 85kDa
질량 단계	0.5Da
디컨볼루션 베이스라인 제거	7.0
매치 허용 오차	32ppm

표 4. 펩타이드 �핑 크로마토그래피 파라미터.

Agilent 1290 Infinity II LC 시스템	
용매 A	0.1% FA 탈이온수 용액
용매 B	0.1% FA 아세트오니트릴 용액
그라데이션	0 ~ 15분, 5 ~ 40% B 15 ~ 18분, 40 ~ 90% B 18 ~ 20분, 90% B
컬럼 온도	60°C
유속	0.4mL/분
주입량	20µL

표 1. 원형 캡시드 단백질 크로마토그래피 파라미터.

Agilent 1290 Infinity II LC 시스템						
조건	테스트	최적화	테스트	최적화	테스트	최적화
컬럼	Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond C18, 2.1 x 100mm, 1.8µm(p/n 858750-902)		Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond Diphenyl, 2.1 x 100mm, 1.8µm(p/n 858750-944)		Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond C3, 2.1 x 100mm, 1.8µm(p/n 858750-909)	
용매 A	0.1% FA + 0.1% TFA 탈이온수 용액	0.1% FA + 0.1% TFA 탈이온수 용액	0.1% FA + 0.1% TFA 탈이온수 용액	0.1% FA + 0.1% TFA 탈이온수 용액	0.1% FA + 0.1% TFA 탈이온수 용액	-
용매 B	80% IPA + 10% ACN + 9.8% 탈이온수 용액 + 0.1% FA + 0.1% TFA	90% IPA + 9.8% 탈이온수 용액 + 0.1% FA + 0.1% TFA	80% IPA + 10% ACN + 9.8% 탈이온수 용액 + 0.1% FA + 0.1% TFA	90% IPA + 9.8% 탈이온수 용액 + 0.1% FA + 0.1% TFA	80% IPA + 10% ACN + 9.8% 탈이온수 용액 + 0.1% FA + 0.1% TFA	-
그라데이션	0 ~ 2분, 20% B 42분, 35% B 42.5분, 80% B 45분, 80% B	0 ~ 5분, 28% B 23분, 32.5% B 23.5분, 80% B 26분, 80% B	0 ~ 2분, 28% B 42분, 43% B 42.5분, 80% B 45분, 80% B	0 ~ 5분, 33% B 21분, 37% B 21.5분, 80% B 23분, 80% B	0 ~ 2분, 20% B 42분, 35% B 42.5분, 80% B 45분, 80% B	-
컬럼 온도	75°C	80°C	75°C	80°C	75°C	-
유속	0.4mL/분					
시료량	1.5 x 10 ¹¹ 바이러스 게놈/주입					

결과 및 토의

LC/MS 분석법 개발

분석법 개발에는 가장 잘 연구된
혈청형인 AAV-2를 사용했습니다. 캡시드
단백질 VP1-3의 염기서열을 그림 2에
나타냈습니다. 모든 캡시드 단백질은 Cap
유전자의 동일한 DNA 서열에서 전사되며
mRNA 스플라이싱 및 누출 리보솜 스캔을
통해 높은 수준의 상동성을 가진 3개의
단백질이 생성됩니다.⁶ 특히, VP3 서열은
세 가지 단백질 모두에 공통적이며 VP1과
VP2는 N-말단 서열만 다릅니다.

표 5. 펩타이드 맵핑 질량 분석 파라미터.

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 시스템		전구 이온/주기	상위 10
소스	Agilent Dual Jet Stream	충돌 에너지	3.6*(m/z)/100 ~ 4.8
가스 온도	290°C	MS/MS 임계값	켜짐; 3회 반복 후 0.2분 동안 제외
가스 유속	13L/분	전구 이온 존재비 기반 스캔 속도	예
Nebulizer	35psig	타겟	25,000
Sheath 가스 온도	275°C	MS/MS 누적 시간 제한 사용	예
Sheath 가스 유속	12L/분	순도	100% 엄격, 30% 컷오프
Vcap	4kV	동위원소 모델	펩타이드
노즐 전압	2kV	전구 이온 정렬	존재비만 기준; +2, +3, >+3
Fragmentor	175V	기준 질량	922.0098
스키머	65V	수집 모드	양이온, 3,200m/z 질량 범위
질량 범위	100 ~ 1,700m/z		
수집 속도	5스펙트럼/초		
자동 MS/MS 범위	50 ~ 1,700m/z		
최소 MS/MS 수집 속도	3스펙트럼/초		
분리 폭	중간(약 4m/z)		

A : VP1 단일 동위원소 질량: 81804.8749 평균 질량: 81856.1324 분자식: C3630H5483N1015O1127S15

1 N-항 AADGYLPDWLEDTLSEGIQWKKLPKPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEFVNEADAAAEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNH 94

95 ADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKKRVLEPLGLVEEPVKTAAGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLG 198

199 TNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRQDWQRLINNN 302

303 WGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGN 406

407 NTFYSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLOFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLN 510

511 GRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYVQ 614

615 PIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSQRWNPEIQYTSNYNKSVDFTVDTNGV 718

719 YSEPRPIGTRYLTRNL C-항 734

B : VP2 단일 동위원소 질량: 66447.1172 평균 질량: 66488.9131 분자식: C2938H4429N827O917S15

1 N-항 APGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCD 94

95 TWMDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRQDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL 198

199 TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFTSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQ 302

303 YLYLSRTNTPSGTTTQSRLOFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIIFGK 406

407 QGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYVQPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILIK 510

511 KNTFVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSQRWNPEIQYTSNYNKSVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL C-항 597

C : VP3 단일 동위원소 질량: 59936.8685 평균 질량: 59974.6971 분자식: C2661H3984N7400824S14

1 N-항 ATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRQDWQ 94

95 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQ 198

199 MLRTGNNTFTSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLOFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA 302

303 TKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDR 406

407 DVYVQPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSQRWNPEIQYTSNYNKSVDFT 510

511 VDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL C-항 532

그림 2. AAV-2 캡시드 단백질의 1차 아미노산 서열. Agilent MassHunter Sequence Manager 소프트웨어에 표시된 내용으로, VP1-3은 N-말단 서열만 다름. 각각은 VP3 서열을 포함하고 있으며 추가 N-말단 서열에는 빨간색(VP2) 또는 빨간색과 녹색(VP1)으로 밑줄이 그어져 있음. 단일 동위원소 질량, 평균 질량 및 분자식은 각 단백질 위에 나타나 있음.

다른 발행물에서와 같이⁵, 다음과 같은 번역 후 변형(PTM)이 예상되었습니다.

(i) VP1 및 VP3에서 개시자 메티오닌 제거 및 (ii) 제거된 메티오닌 직후 아미노산의 아세틸화. 아세틸화된 아미노산은 Agilent MassHunter Sequence Manager 소프트웨어에서 빨간색의 기울임꼴 문자로 표시되었으며, VP1-3의 이론적 평균 질량은 각각 81,856.13, 66,488.91 및 59,974.70 Da이었습니다(그림 2).

변성 AAV-2 시료는 표 1에 표시된 테스트 그레디언트를 사용하여 ZORBAX RRHD 300Å SB-C3, SB-Diphenyl 및 SB-C18 컬럼(그림 3A ~ 3C)에서 분리했습니다. VP1-3은 SB-C3 및 SB-Diphenyl 컬럼에서 두 개의 피크로 분리되었으며, VP1과 VP3이 단일 피크로 동시 용리되었습니다. SB-C18 컬럼만이 각 캡시드 단백질을 분리하는 데 필요한 선택성을 가졌습니다.

VP1 + VP3 피크의 디컨볼루션 질량 스펙트럼(그림 3D ~ 3E)은 VP1에 비해 59,975.52Da에서 훨씬 더 강한 VP3 신호를 보였으며 이는 훨씬 더 많은 존재비를 나타냅니다. VP3의 동시 용리는 매트릭스 효과를 일으킬 수 있으며, 이온 억제를 통해 VP1의 검출 및 질량 정확도에 잠재적으로 간섭을 일으킬 수 있습니다.⁸ 이와 대조적으로, SB-C18 컬럼에서 VP1의 우수한 분리(그림 3F)는 VP3에 의한 간섭을 크게 줄여 VP1의 질량 분석을 정확한 질량과 신뢰도로 수행할 수 있었습니다.

그림 4에 나타난 바와 같이 AAV-2 시료는 표 1에 나타난 최적화된 그레디언트로 SB-C18 컬럼에서 분리하여 피크 분리능과 모양을 개선하고 분석 시간을 단축했습니다. 총 이온 흐름의 바탕신호에 미세한 파동이 있는 것은 잔류 Pluronic F-68에 의해 발생했을 가능성이 있으며, 분석을 크게 방해하지는 않았습니다.

중요한 것은 VP1에 대하여 관측된 디컨볼루션 질량이 81,885.72Da(그림 4E)으로 이론값인 81,856.13 Da보다 +29.6 Da 컷다는 것입니다. 이와 대조적으로, 관측된 VP2 및 VP3의 질량은 이론값과 잘 일치했습니다. 따라서 VP1의 N-말단 영역에서 단일 아미노산 치환이 발생했다는 가설을 세웠습니다(녹색 밑줄이 그어진 서열, 그림 2).

AAV-2 내 단일 아미노산 치환 확인

이 가설을 테스트하기 위해 AAV-2의 트립신 분해 및 펩타이드 매핑을 수행했습니다. 3가로 하전된 1,102.1864m/z 펩타이드로 ID를 확인했으며, 해당 MS/MS 스펙트럼을 통해 실제로 N-말단 영역에 위치한 VP1 서열의 아미노산 77에서 알라닌 → 트레오닌으로의 치환을 확인했습니다(그림 5).

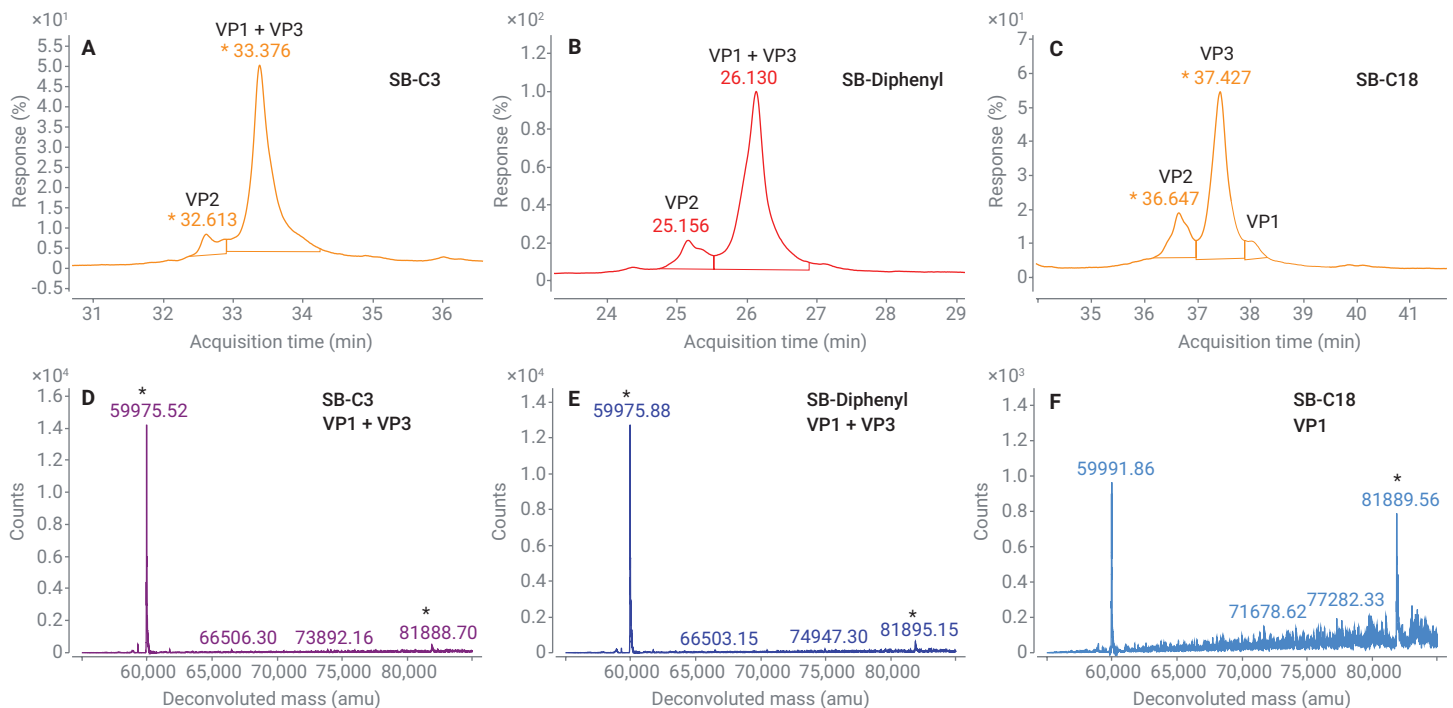


그림 3. AAV-2를 사용한 분석법 개발. (A) Agilent ZORBAX RRHD 300Å SB-C3, (B) SB-Diphenyl 및 (C) SB-C18 컬럼을 사용한 분리를 나타내는 형광 크로마토그램. SB-C18의 우수한 크로마토그래피 분리능에 주목. (D ~ F) VP1 과 VP3의 동시 용리를 보여주는 크로마토그래피 피크의 디컨볼루션 질량 스펙트럼.

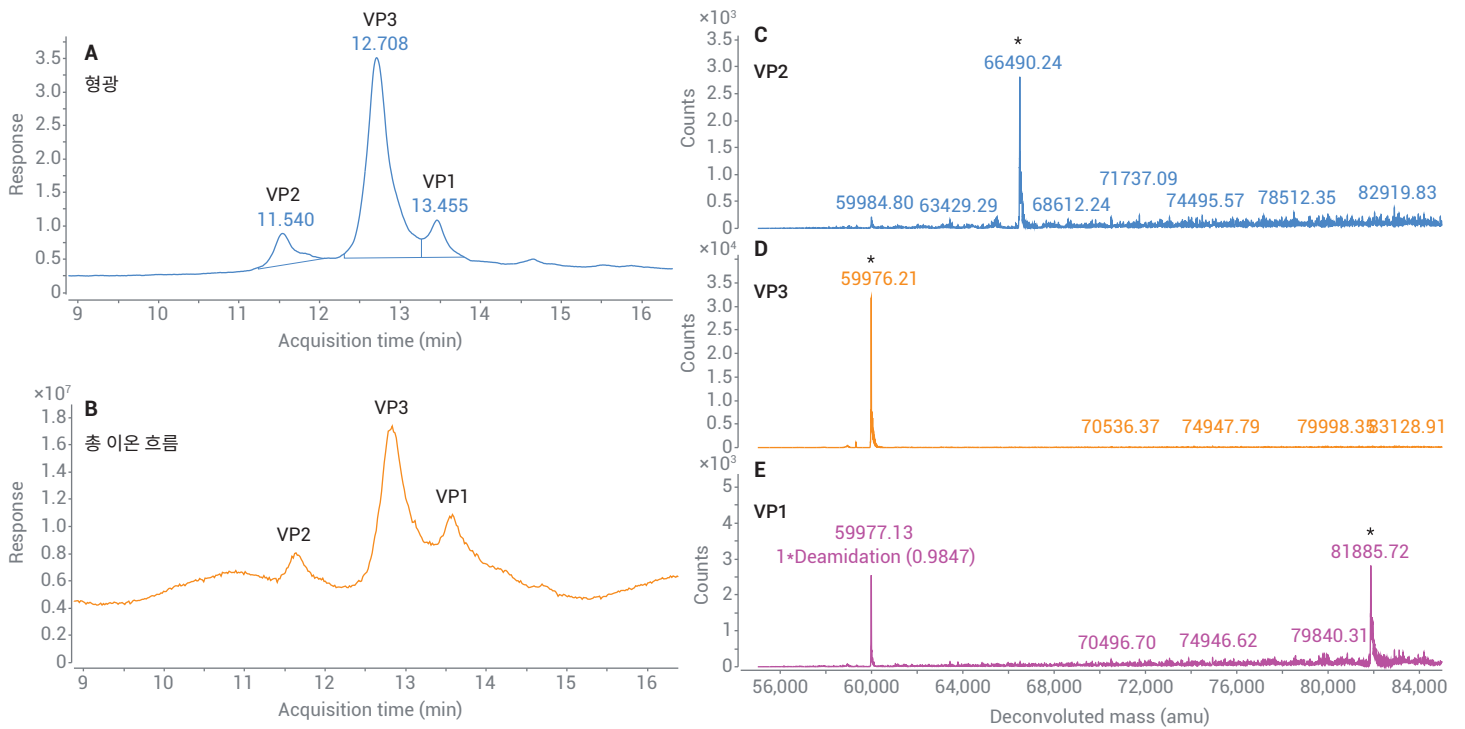


그림 4. Agilent ZORBAX RRHD 300Å SB-C18 컬럼에서 최적화된 분석법을 사용한 변성 AAV-2 캡시드 단백질의 LC/MS. (A) 3개의 캡시드 단백질을 나타내는 형광 크로마토그램. (B) 총 이온 흐름. (C ~ E) 3개의 캡시드 단백질의 디컨볼루션 질량 스펙트럼(관련 질량 피크 별표로 표시).

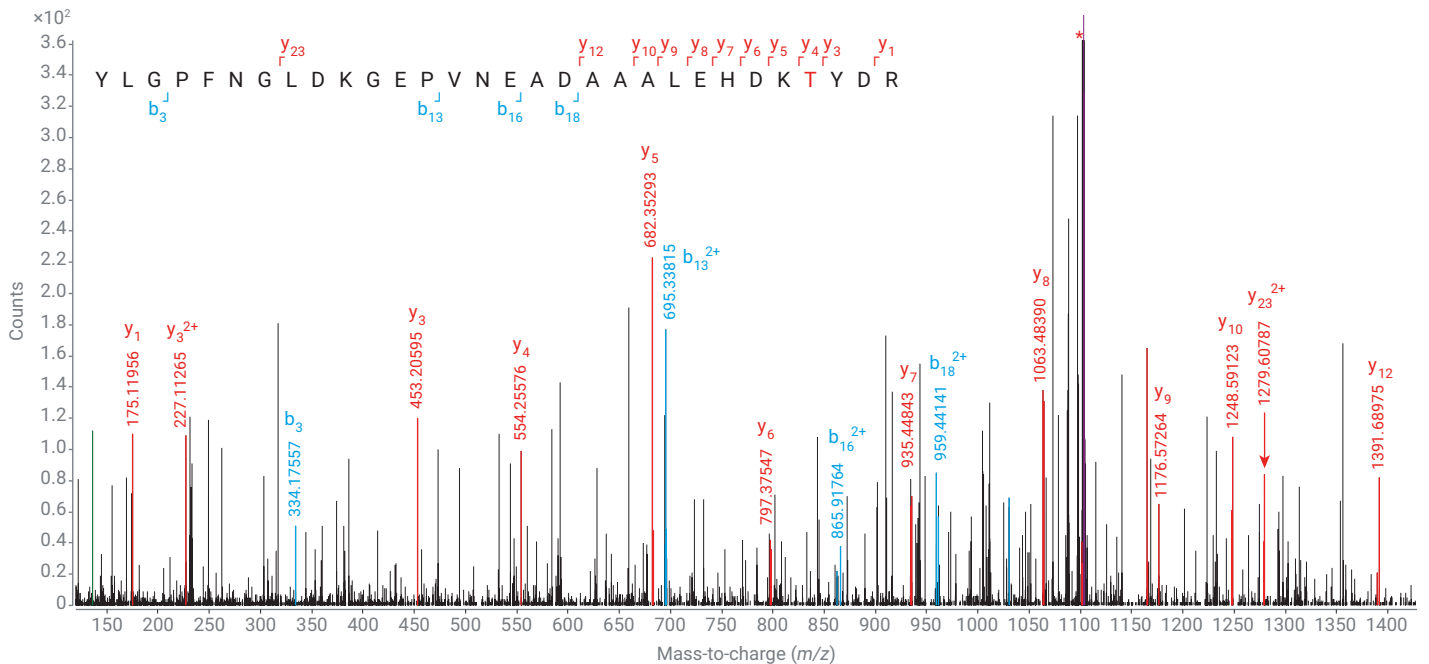


그림 5. MS/MS에 의한 VP1의 알라닌 → 트레오닌 치환 확인. 치환된 아미노산은 빨간색 글꼴로, 전구 이온은 빨간색 별표로 표시.

이 돌연변이는 AAV-2 발현에 사용된 플라스미드의 Sanger 시퀀싱을 사용하여 직교적으로 확인하였으며, 이는 G → A 치환으로 GCC 코돈이 ACC로 변경되었음을 보여주었습니다(데이터는 표시되지 않음).

6개 추가 AAV 혈청형 분석

다른 AAV 혈청형 분석에 대한 해당 LC/MS 분석법의 일반화 가능성을 평가하기 위해, 위에서 기술한 최적화된 SB-C18 분석법을 사용하여 AAV-7, 7m8, DJ, 9, rh10 및

Anc80을 분석했습니다. AAV-7, 7m8 및 DJ는 이 분석법을 사용하여 잘 분리되었지만 (그림 6A ~ 6C), AAV-9, rh10 및 Anc80은 두 개의 피크로만 분리되고 VP1와 VP3이 단일 피크로 동시 용리되었습니다.

애질런트 디페닐 고정상은 C3, C8 및 C18과 같은 알킬 사슬 고정상에 비해 선택성이 변경되어 있습니다. Phenyl 작용기는 방향족 아미노산 및 이중 결합에 대한 추가적인 친화력과 함께 π - π 상호 작용을 기반으로 한

분리가 가능합니다.⁹ AAV-9, rh10 및 Anc80을 성공적으로 분리하기 위해 최적화된 SB-Diphenyl 분석법(표 1)을 개발했습니다 (그림 6D ~ 6F). 각 캡시드 단백질의 ID는 각 피크의 디컨볼루션 질량 스펙트럼을 사용하여 BioConfirm 소프트웨어에 의해 자동으로 매칭되었으며, 각 피크는 인접 피크의 간섭을 최소화했습니다(그림 7 및 8).

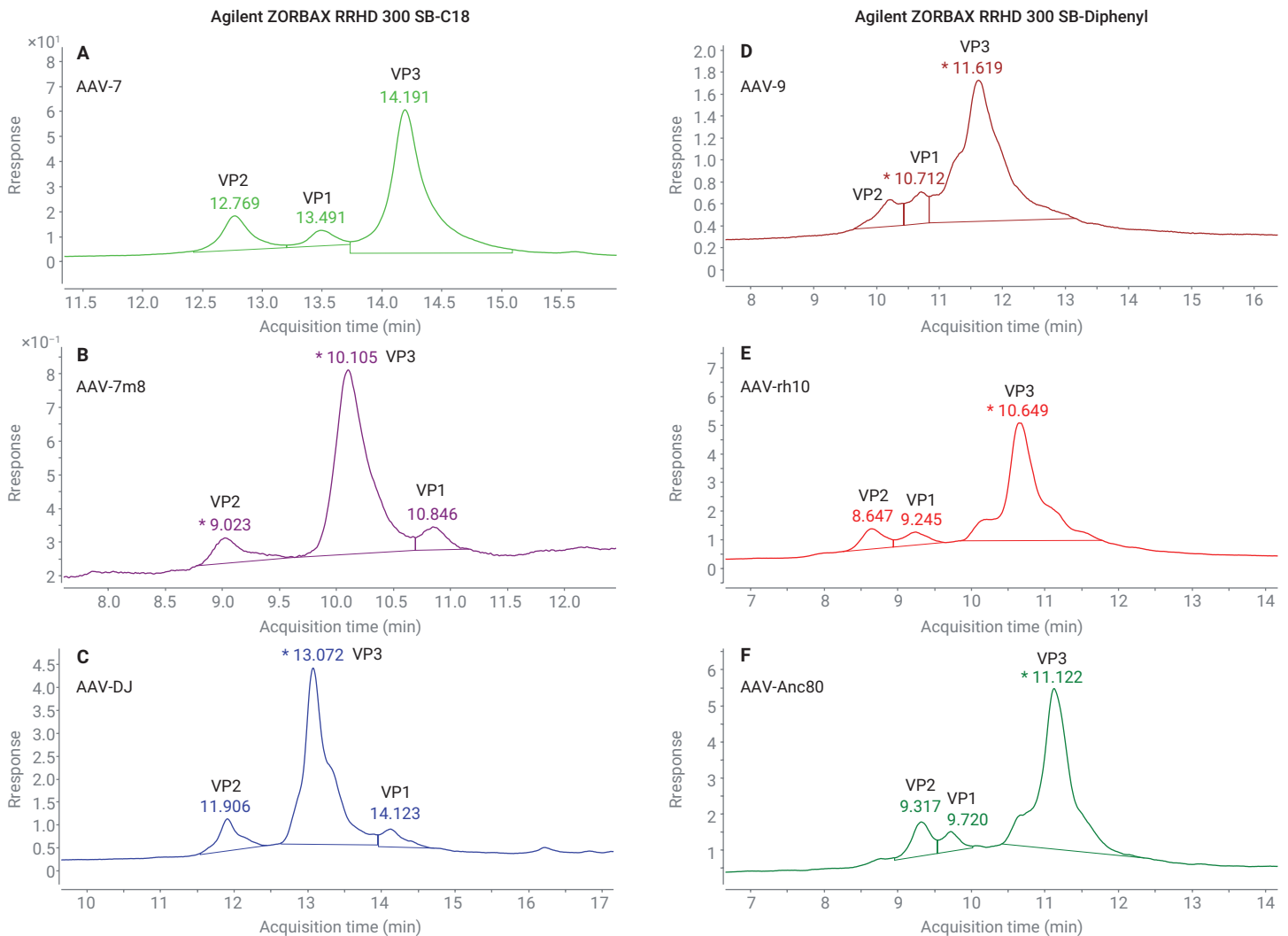


그림 6. (A ~ C) Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18 및 (D ~ F) Agilent SB-Diphenyl 컬럼에서 6가지 혈청형의 변성 AAV 캡시드 단백질에 대한 LC/MS.

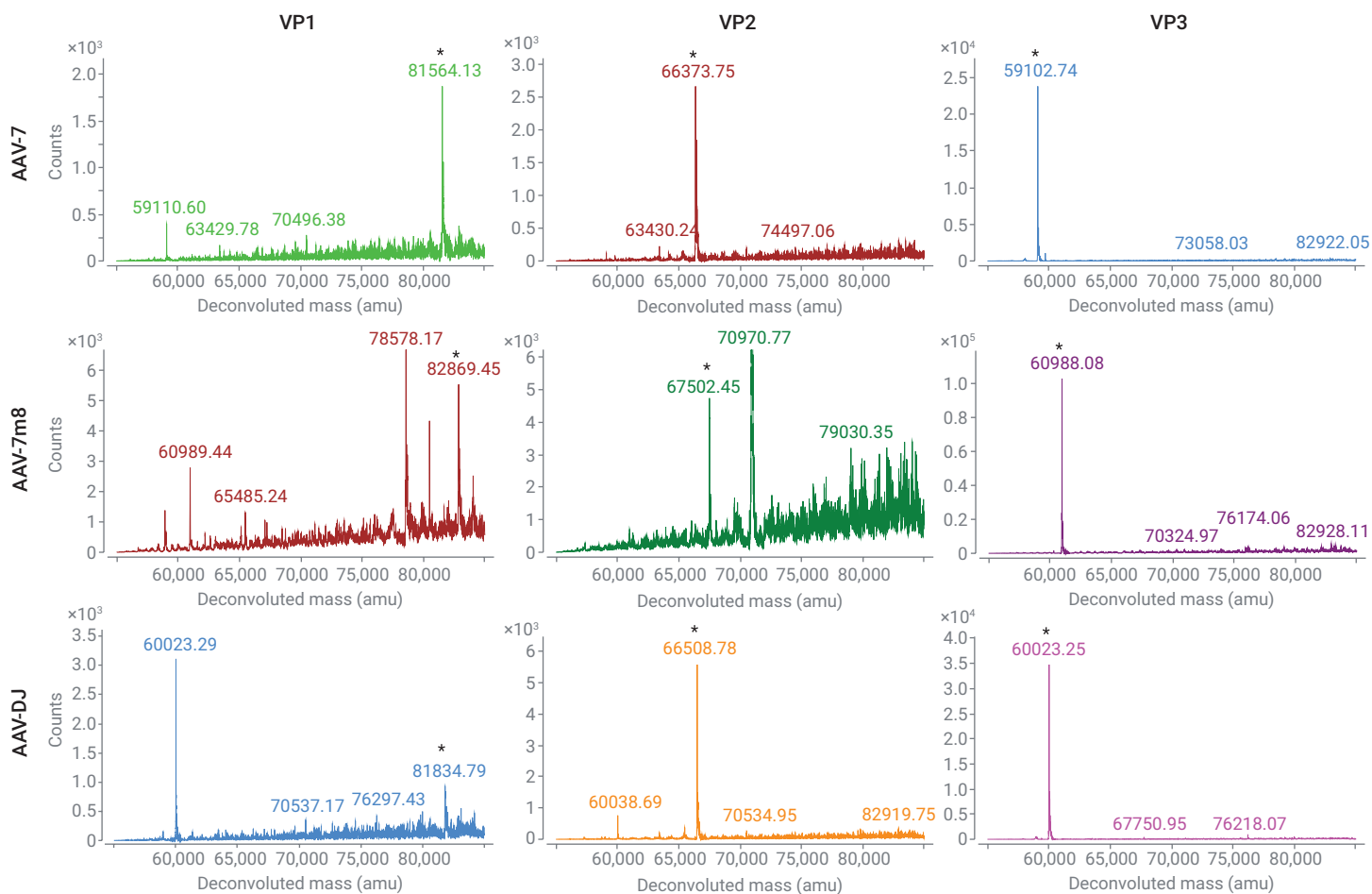


그림 7. Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18 컬럼에서 분리된 AAV 캡시드 단백질의 디컨볼루션 질량 스펙트럼. AAV-7m8(70971.71, 78578.01 및 80495.10Da)에서 동시에 분리된 숙주 세포 단백질의 일부 간섭이 관찰되었음.

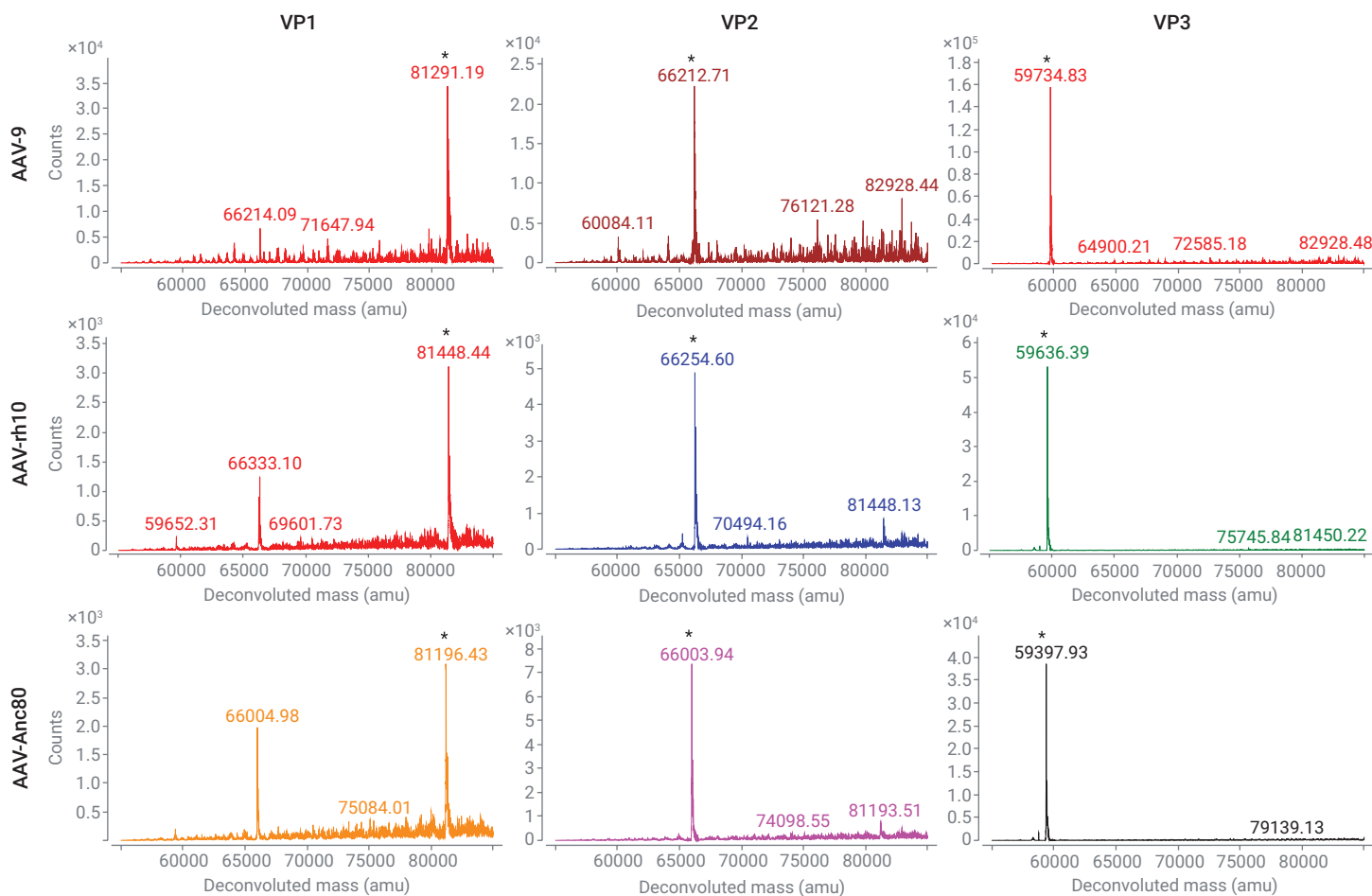


그림 8. Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-Diphenyl 컬럼에서 분리된 AAV 캡시드 단백질의 디컨볼루션 질량 스펙트럼.

AAV-DJ 및 rh10의 VP1 단백질에 탈아미드화가 추정적으로 할당되었는데, 이는 세포 배양 조건으로 인해 발생했거나 가열로 인한 결함으로서 시료 전처리 중에 생겨날 수 있습니다. AAV-2를 제외하고 각 캡시드 단백질(표 6)에 대한 이론 질량과 관측된 질량은 ≤ 3 Da의 차이를 보였는데, 이는 ≤ 32 ppm에 해당합니다.

표 7에서 VP1-3의 상대량은 각 캡시드 단백질에 해당하는 형광 크로마토그램 피크 (그림 6)를 적분하여 측정했습니다. 이러한 결과는 일반적으로 예상되는 VP1:2:3의 화학 양론적 비율인 1:1:10에 부합했지만, VP1의 존재비는 테스트한 여러 시료에 걸쳐 VP2보다 더욱 가변적인 것으로 나타났습니다. VP1은 중요 핵 국재화

(nuclear localization) 인자로 알려져 있기 때문에¹⁰ 일부 시료에서 VP1의 존재비가 낮은 것으로 감염력의 차이를 일부 설명할 수 있습니다.

표 6. 캡시드 단백질의 디컨볼루션 질량.

AAV 캡시드 단백질 질량									
혈청형	VP1			VP2			VP3		
	이론	관측	질량 정확도(ppm)	이론	관측	질량 정확도(ppm)	이론	관측	질량 정확도(ppm)
2	81886.16	81885.72	5.37	66488.91	66490.24	20.00	59974.70	59976.21	25.18
7	81564.08	81564.13	0.61	66372.17	66373.75	23.81	59101.05	59102.74	28.60
9	81291.57	81291.19	4.67	66210.77	66212.71	29.30	59733.54	59734.83	21.60
7m8	82868.27	82869.45	14.24	67501.05	67502.45	20.74	60986.83	60988.08	20.50
DJ	81835.21	81834.79	5.13	66508.06	66508.78	10.83	60021.86	60023.25	23.16
rh10	81445.85	81448.44	31.80	66252.96	66254.60	24.75	59634.58	59636.39	30.35
Anc80	81195.42	81196.68	15.52	66002.53	66003.80	19.24	59396.22	59397.97	29.46

표 7. 캡시드 단백질의 상대량.

캡시드 단백질 정량(FLD %)			
혈청형	VP1	VP2	VP3
2	10.67	10.61	78.72
7	7.16	9.81	83.03
9	8.75	8.04	83.21
7m8	7.62	9.70	82.68
DJ	8.62	11.72	79.66
rh10	6.58	9.18	84.24
Anc80	5.64	10.62	83.74

결론

이 응용 자료는 ZORBAX RRHD 300Å SB-C18 또는 SB-Diphenyl 컬럼과 함께 1290 Infinity II LC를 사용하여 원형 AAV 캡시드 단백질을 효율적으로 분리한 후, 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF와 직렬로 연결된 1260 Infinity II 형광 검출기를 사용하여 후속 검출과 분석을 수행하는 분석법 개발을 보여줍니다. 이 응용 자료에서는 7가지 서로 다른 AAV 혈청형을 이용해 이 분석법의 능력을 입증했습니다. 이 분석법에서 시료 전처리는 비교적 짧은 변성 단계만 필요했고, 일반적인 계면활성제 첨가제인 Pluronic F-68뿐만 아니라 고농도 염 조건에도 견고했기 때문에 완충액 변경이 필요하지 않았습니다.

이 분석법은 크로마토그래피 분리 측면에서 최근에 발표된 연구⁵보다 훨씬 우수한 성과를 나타냈으며, 어떤 컬럼 화학반응에서는 동시 용리될 수 있지만 다른 컬럼 케미스트리에서는 잘 분리되는 AAV 캡시드 단백질의 효율적인 분리에 대한 보다 일반적인 접근 방식을 제시합니다. 유사한 분석으로 ZipChip CE/MS 시스템을 사용한 최근의 또 다른 연구와 비교할 경우¹¹, 이 접근 방식은 ZipChip의 ≤60ppm에 비해 ≤32ppm의 질량 정확도를 보여줍니다. 또한, 액체 크로마토그래피에서 비교적 먼 머무름 시간의 차이를 얻었기 때문에 정확하고 재현성 있는 질량 스펙트럼 디컨볼루션이 원활했고, 형광 검출기를 포함함으로써 캡시드 단백질 존재비의 민감하고 정확한 상대적 정량이 가능했습니다. 이와 대조적으로, ZipChip에서는 캡시드 단백질이 0.1분의 좁은 시간 범위 내에서 용출되는 것으로 나타났으며, 실험에 사용된 질량 분석기의 스캔 속도가 상대적으로 느렸던 부분이 정확한 정량을 어렵게 했습니다.

본 분석법은 AAV 제품 ID를 출시 전에 빠르게 확인하는 것 뿐만 아니라 신약 발견/개발 실험실에서 AAV 돌연변이 라이브러리를 스크리닝하는 데 유용할 것으로 예상됩니다.

참고 문헌

1. Keeler, A. M.; Flotte, T. R. Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here? *Annu. Rev. Virol.* **2019**, *6*, 601-621.
2. Backovic, A. et al. Capsid Protein Expression and Adeno-Associated Virus like Particles Assembly in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microb. Cell Fact* **2012**, *11*, 124.
3. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) - Guidance for Industry. *US Food and Drug Administration* **2020**.
4. 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.
5. Jin, X. et al. Direct Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis for Complete Characterization of Recombinant Adeno-Associated Virus Capsid Proteins. *Human Gene Therapy Methods* **2017**, *28*, 255-267.
6. Bosma, B. et al. Optimization of Viral Protein Ratios for Production of RAAV Serotype 5 in the Baculovirus System. *Gene Therapy* **2018**, *25*(6), 415-424.
7. Rehder, D. S. et al. Reversed-Phase Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Reduced Monoclonal Antibodies in Pharmaceuticals. *J. Chromatog. A* **2006**, *1102*(1-2), 164-175.
8. Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*(13), 3019-3030.
9. Long, W. J.; Mack, A. E. Comparison of Selectivity Differences Among Different Agilent ZORBAX Phenyl Columns Using Acetonitrile or Methanol. *Agilent Technologies application note*, publication number 5990-4711EN, **2009**.
10. Popa-Wagner, R. et al. Impact of VP1-Specific Protein Sequence Motifs on Adeno-Associated Virus Type 2 Intracellular Trafficking and Nuclear Entry. *Journal of Virology* **2012**, *86*, 9163-9174.
11. Zhang, Y. et al. Identification of Adeno-Associated Virus Capsid Proteins Using ZipChip CE/MS. *Analytical Biochemistry* **2018**, *555*, 22-25.

www.agilent.com/chem

RA.5878472222

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2021
2021년 4월 7일 한국에서 인쇄
5994-2434KO

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

