

## LC/MS를 이용해 바이오제약의 아데노 관련 바이러스(AAV) ID 확인



AAV(아데노 관련 바이러스)에는 일련의 고유한 중요 품질 속성이 있지만 보다 확립된 단백질 기반 치료제를 모니터링하는 데 사용되는 기존의 많은 분석을 계속해서 사용할 수 있습니다. AAV 캡시드는 각각 약 1:1:10의 화학량론적 비율로 VP1, VP2, VP3 등 3가지 단백질의 복사본 약 60개로 구성됩니다.<sup>1</sup> 3가지 모두 동일한 유전자에서 스플라이싱되어 서열 상동성이 높다는 점 때문에 이들 3가지 단백질의 크로마토그래피 분리에는 어려움이 따릅니다. 실버스테인 또는 ELISA 및 면역블롯팅과 같은 항체 검출 기반 분석법을 사용하는 SDS-PAGE 겔은 세 가지 캡시드 단백질의 비율을 평가하는 데 사용되어 왔습니다. 그러나 이러한 접근 방식은 번거롭고 오류가 발생하기 쉬우며 각 유형의 AAV에 특이적인 새로운 항체 생성이 필요할 수 있습니다. AAV 혈청형 간의 높은 상동성을 감안할 때 분별에 필요한 특이성을 가진 항체를 생성하는 일은 어려울 수 있습니다. 액체 크로마토그래피 질량 분석기(LC/MS)는 향상된 속도, 특이성 및 정밀도로 이러한 문제를 극복합니다. 애질런트는 번역 후 변형(PTM)의 식별 및 위치 파악을 위한 intact 단백질 및 펩타이드 매핑 워크플로 솔루션을 모두 제공합니다.

미국 식품의약국(FDA)은 특히 여러 혈청형 또는 조작된 변이체가 생산되는 시설에서 AAV 제품을 출시하기 전에 명확하게 식별할 것을 요구합니다.<sup>2</sup> 펩타이드 매핑은 단백질 서열을 결정하고 PTM을 식별하는 필수 분석법으로, ICH, 미국 FDA 및 기타 규제 기관에서 보다 확립된 바이오 치료제에 대해 요구하고 있는 사항입니다. AAV를 사용한 유전자 치료법에 새로운 규정들이 속속 등장하고 있는 상황이며 펩타이드 매핑도 앞으로 요구될 가능성이 있습니다.

Intact 캡시드 단백질의 ID와 상대적 존재비를 확인하기 위한 이전의 LC/MS 연구에서는 크로마토그래피 분리능이 좋지 않은 문제가 있었습니다. 동시 용리 단백질은 accurate mass 측정을 더욱 어렵게 만들고 일부 AAV 캡시드 단백질(즉, AAV1 및 AAV6은 6개의 아미노산 차이로 다름<sup>3</sup>)의 유사성 때문에 정확한 측정에 ID 확인이 더욱 중요해집니다.

Agilent ZORBAX RRHD Wide Pore 컬럼은 intact 단백질 분석에 대한 이러한 문제를 해결하여 우수한 크로마토그래피 분리를 제공합니다. 그 결과 질량 분석(MS) 검출을 통해 accurate mass 측정이 가능해집니다.

- 2µm 미만의 입자 크기로 고분리능 제공
- 넓은 기공으로 질량 이동(mass transfer)이 개선되어 효율적인 분리가 가능
- 1200bar 압력 허용 오차로 고효율 UHPLC 분석법 가능
- Diphenyl 케미스트리의 사용으로 까다로운 분리에서 고유한 선택성 제공

Agilent AdvanceBio 펩타이드 매핑 컬럼은 단백질 식별 및 번역 후 변형의 확인을 위해 고분리능 펩타이드 맵을 제공하도록 설계되었습니다.

- 표면 다공성 입자로 적당한 역압에서 고분리능 분리 가능
- 포름산 이동상은 TFA 포함 이동상에 비해 MS 감도를 개선하며 우수한 피크 용량 제공

## 효과적인 AAV 분석을 위한 모범 사례

### 시료 전처리

- 많은 재조합 단백질은 MS 검출을 방해하고 기기를 빠르게 오염시키는 폴록사머와 같은 상대적으로 높은 염과 안정화 첨가제를 포함하는 비휘발성 완충액으로 제조됩니다. LC/MS 분석 전에 시료의 완충액을 교환하면 스펙트럼 품질이 크게 개선되고 MS 유지보수 빈도를 줄일 수 있습니다. 완충액을 교환하면 시료가 불안정해질 수 있으므로 완충액 교환 직후 시료 분석 계획을 세우는 것을 잊지 않아야 합니다
- 소량 시료에 적합한 고 회수율 바이알을 사용하는 것이 좋습니다

### 크로마토그래피 분리

- 유속 램핑 속도를 기본값에서 1mL/분<sup>2</sup> 이하로 낮춥니다. 유량을 점진적으로 증가시키면 컬럼 수명이 연장되고 갑작스러운 과도 압력을 방지하는 데 도움이 됩니다. 설정은 애질런트 소프트웨어의 LC 펌프 제어에 대한 고급 색션에서 찾을 수 있습니다
- 컬럼의 압력 한계와 일치하도록 LC 분석법의 최대 압력 한계를 설정합니다(AdvanceBio Peptide Mapping의 경우 600bar, ZORBAX RRHD 컬럼의 경우 1200bar). 이것은 LC의 최대 압력 범위가 컬럼의 최대 압력 범위를 초과하는 모든 경우에 중요합니다
- 시스템 dead volume을 최소화하여 분리능을 최대화합니다. Dead volume을 최소화하려면 [초저분산 튜빙](#)<sup>4</sup>이 장착된 Agilent 1290 Infinity II와 같은 low-dead-volume 시스템을 사용하는 것이 좋습니다

### 질량 분석

- 분석이 끝나고 관심성분의 머무름 시간 이후에는 특히 높은 유기용매 세척으로 가능하면 void volume이 용출될 때까지 LC 흐름을 waste로 전환하여 폐기시킵니다
- HPLC 등급 이상의 용매를 사용합니다
- MS 소스에 대해 정기적인 세척 작업을 마련합니다

## 시작하기 - Intact 캡시드 단백질

Intact 캡시드 단백질 분석은 응용 자료 5994-2434KO에 자세히 설명되어 있습니다. 이 응용 자료에서는 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질의 분리를 위한 ZORBAX RRHD 제품군의 다양한 컬럼 케미스트리를 비교합니다.<sup>5</sup> 그림 1에 워크플로가 묘사되어 있습니다.

### 컬럼 선택 기준 - Intact 캡시드 단백질

특히 AAV 캡시드 단백질의 경우 역상 컬럼을 선택할 때, 사용될 검출 분석법과 시료에 대해 알려진 정보를 모두 고려하는 것이 유용합니다. AAV 시료는 종종 다른 재조합 단백질 시료보다 더 많이 희석합니다. VP1, VP2, VP3 캡시드 단백질을 분리할 때 지금까지 어려웠던 두 가지 파라미터인 감도와 분리능을 다룰 수 있는 컬럼을 선택합니다.

- **컬럼 직경:** 2.1mm 컬럼은 감도와 MS 검출 호환성을 위해 더 큰 내경 컬럼보다 권장됩니다. 2.1mm 컬럼을 사용할 때의 유량은 효율적인 전자분무 이온화에 도움이 되며, 이는 또한 감도에도 도움이 됩니다

- **컬럼 길이:** 역상 컬럼의 경우, 컬럼이 길수록 분리능이 높아질 수 있으므로 100 또는 150mm 길이가 권장됩니다
- **공극 크기:** intact 단백질은 특히 변성 역상 조건의 용액에서 상대적으로 큼니다. 고정상 입자 안팎으로 효율적인 질량 이동 (mass transfer)을 보장하기 위해 큰 공극이 필요하며, 이는 다시 분리능 향상으로 이어집니다. 300Å 공극을 권장합니다
- **입자 크기:** 입자 크기가 작을수록 분리능이 증가하므로 1.8µm RRHD 컬럼이 권장됩니다
- **고정상 케미스트리:** 관심 분석물질을 분석하기 위해 작업할 때 고정상의 선택도는 변화할 수 있는 또 다른 변수입니다. C4 또는 C8과 같은 짧은 알킬 사슬 고정상은 intact 단백질에 일반적이지만 VP1, VP2, VP3 분리의 잇점 면에서는 첫번째 선택이 아닐 수 있습니다. 복잡성을 초래하는 또 다른 요인은 각 AAV 혈청형 간의 차이로 인해 고정상 요구 사항이 달라진다는 것입니다. ZORBAX RRHD SB300-C18 컬럼은 AAV2 및 AAV7에서 잘 작동되는 반면 ZORBAX RRHD 300-Diphenyl 컬럼은 AAV9를 비롯한 다른 여러 혈청형에서 잘 작동했습니다



그림 1. Intact AAV 캡시드를 포함하는 개별 캡시드 단백질의 ID를 확인하고 상대적인 양을 측정하는 프로세스의 개요.

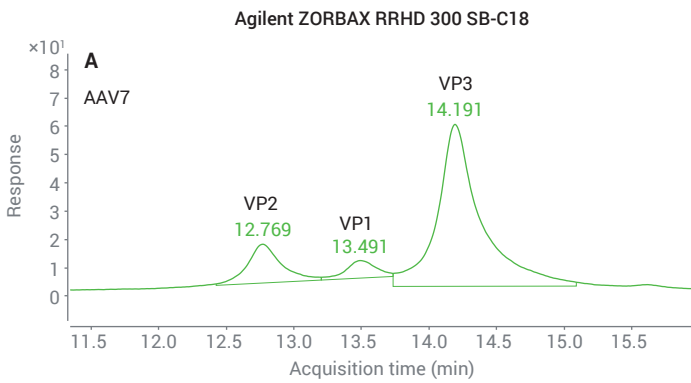


그림 2. 표 1에 설명된 조건을 사용하여 Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18에서 AAV7 분리.

파라미터	값	
컬럼	Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond C18, 2.1 x 100mm, 1.8µm(품번 858750-902)	
기기	Agilent 1290 Infinity II	
유속	0.4mL/분	
이동상 A	0.1% 포름산 + 0.1% TFA 수용액	
이동상 B	90% 이소프로판올, 9.8% 물, 0.1% 포름산 + 0.1% TFA	
그레디언트	시간(분)	%B
	0-5	28%
	23	32.5%
	23.5	80%
	26	80%
사후 시간	3분	
컬럼 온도	80°C	

표 1. Intact 캡시드 단백질 분석에 사용되는 시작 조건. 자세한 내용은 5994-2434KO 문서를 참조하십시오.

## 시작하기 - 펩타이드 매핑

AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼을 사용한 AAV 캡시드 단백질에 대한 펩타이드 매핑 분석은 응용 자료 5994-1980EN 및 5994-2434KO에 설명되어 있습니다.



그림 3. 캡시드 단백질 1차 구조를 확인하고 변형 후 변형을 식별하는 과정에 대한 개요.

## 컬럼 선택 기준 - 펩타이드 매핑

Intact 캡시드 단백질 분석과 마찬가지로 시료 및 검출 방법에 대한 지식을 바탕으로 컬럼을 선택해야 합니다. 분해된 AAV의 펩타이드 매핑 분리에도 동일한 감도 및 분리능 문제가 적용됩니다. 이 경우, 캡시드가 관련성이 높은 3가지 원소 단백질로 구성되며 결과적인 펩타이드 매핑 분리는 일반적인 재조합 단백질 분해보다 훨씬 더 복잡합니다.

- **컬럼 직경:** 2.1mm 컬럼은 감도와 MS 검출 호환성을 위해 더 큰 내경 컬럼보다 권장됩니다. 2.1mm 컬럼을 사용할 때의 유량은 효율적인 전자분무 이온화에 도움이 되며, 이는 또한 감도에도 도움이 됩니다
- **컬럼 길이:** 역상 컬럼의 경우, 컬럼이 길수록 분리능이 높아질 수 있습니다. 150mm 길이 이상의 컬럼이 권장됩니다
- **입자 크기 및 유형:** 일반적으로 입자가 작을수록 분리능이 높아집니다. 그러나 약간 더 큰 표면 다공성 입자는 훨씬 더 낮은 역압에서 거의 동일한 분리능을 제공합니다. 2.7µm 표면 다공성 입자가 권장됩니다
- **고정상 케미스트리:** C18 고정상은 펩타이드 매핑에 가장 많이 사용되는 옵션이지만 이용할 수 있는 C18 컬럼 옵션은 매우 다양합니다. 펩타이드 매핑의 경우, 피크 용량을 최대화하기 위해 테일링이 적고 좁은 피크가 얻어지는 컬럼 및 이동상 시스템 조합을 선택해야 합니다. 또한 작은 친수성 펩타이드의 머무름과 긴 소수성 펩타이드의 합리적인 용리 사이에서 균형을 유지해야 합니다

여기에서 권장하는 AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼은 이러한 기준에 맞습니다.

파라미터	값	
컬럼	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, 2.1 x 150mm, 2.7µm(품번 653750-902)	
기기	Agilent 1290 Infinity II	
유속	0.4mL/분	
이동상 A	0.1% 포름산 수용액	
이동상 B	0.1% formic acid in acetonitrile	
그레디언트	시간(분)	%B
	0-3	3%
	50	35%
	60	97%
	62	97%
	62.5	3%
	65	3%
사후 시간	5분	
컬럼 온도	60 °C	

**표 2.** 펩타이드 매핑에 사용되는 시작 조건. 자세한 내용은 [5994-1980EN](#) 문서를 참조하세요.

## 참고 문헌

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. [Agilent 1290 Infinity II Ultra Low Dispersion Kit Technical Note](#)
5. LC/MS of Intact Adeno-Associated Virus (AAV) Capsid Proteins for Product Identity ([5994-2434KO](#))
6. Characterization of Viral Vector Particles Using the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF ([5994-1980EN](#))

## 간편한 선택 및 주문 정보

애질런트 온라인 스토어에서 다음 표에 나열된 제품을 주문하려면 MyList # 헤더 링크를 클릭하여 즐겨찾기 목록에 품목을 추가하세요. 그 후 필요한 제품의 수량을 기입하고 장바구니에 추가한 후 결제를 진행하세요. 향후 주문에 사용할 수 있도록 목록은 내 즐겨찾기에 저장되어 있습니다.

즐거찾기를 처음 사용하는 경우 계정 확인을 위해 이메일 주소를 입력하라는 메시지가 표시됩니다. 애질런트 계정이 있는 경우 바로 로그인할 수 있습니다. 등록된 애질런트 계정이 없는 경우 등록해 주세요. 이 기능은 전자상거래가 가능한 지역에서만 유효합니다. 모든 품목은 영업 담당자 및 대리점 채널을 통해 주문할 수도 있습니다.

### 내 리스트 1: Intact 단백질 분석을 위한 Agilent ZORBAX RRHD 컬럼

설명	품번
Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl, 2.1 x 150mm, 1.8µm, 300Å	863750-944
Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl, 2.1 x 100mm, 1.8µm, 300Å	858750-944
Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18, 2.1 x 150mm, 1.8µm, 300Å	863750-902
Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18, 2.1 x 100mm, 1.8µm, 300Å	858750-902

### 내 리스트 2: 펩타이드 수준 분석용 AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼

설명	품번
AdvanceBio Peptide Mapping, 2.1 x 150mm, 2.7µm	653750-902
AdvanceBio Peptide Mapping, 2.1 x 250mm, 2.7µm	651750-902
AdvanceBio Peptide Mapping guard column, 2.1 x 5mm, 2.7µm, 3/pk	851725-911

### 내 리스트 3: 표준 용액

설명	품번
Agilent NIST mAb, 25µL	5191-5744
Agilent NIST mAb, 4 x 25µL	5191-5745
Ten peptide standard, 71µg, lyophilized	5190-0583
HSA peptide standard	G2455-85001

## 내 리스트 4: 공급품 및 용매

설명	품번
<b>연결 및 튜브</b>	
Agilent InfinityLab Quick Connect Fitting assembly with prefixed 0.12 x 105mm capillary(컬럼 주입구 연결용)	5067-5957
Agilent InfinityLab Quick Turn Fitting(컬럼 배출구 연결용)	5067-5966
Quick Turn Capillary SST 0.12 x 280(Quick Turn 피팅용)	5500-1191
Mounting tool for quick turn fittings	5043-0915
Inline pressure relief valve kit	
(다른 검출기를 직렬로 사용할 때 형광 플로우 셀 후단측에 사용)	G4212-68001
Ultralow dispersion tubing kit for Agilent 1290 Infinity II	5067-5963
Ultralow dispersion tubing kit for Agilent 1290 Infinity II Bio	5004-0007
<b>시료 용기</b>	
High recovery vial, screw top, with fixed insert, clear, 300µL insert volume, 100/pk. 바이알 크기: 12 x 32mm (12mm 캡)	5188-6591
Cap, screw, blue, PTFE/red silicone septa, 100/pk. 캡 크기: 12mm	5182-0717
Vial, crimp/snap top, polypropylene, 250µL, 1,000/pk. 바이알 크기: 12 x 32mm (11mm cap)*	5190-3155
Cap, snap, clear, PTFE/silicone/PTFE septa, 100/pk. 캡 크기: 11mm(5190-3155용)	5182-0566
InfinityLab 96-well plate, 0.5mL, 30/pk	5043-9310
InfinityLab 96-well plate closing mat, 50/pk	5042-1389
<b>용매 및 첨가제</b>	
InfinityLab Ultrapure LC/MS Water, 1L	5191-4498
InfinityLab Ultrapure LC/MS Acetonitrile, 1L	5191-4496
Formic acid, 5mL	G2453-85060
<b>용매 여과</b>	
InfinityLab 용매 여과 어셈블리	5191-6776
InfinityLab 용매 필터 플라스크, 유리, 2L	5191-6781
Filter membrane, Nylon 47mm, pore size 0.2µm, 100/pk	5191-4341
Filter membrane, Regenerated Cellulose 47mm, pore size 0.2µm, 100/pk	5191-4340
Solvent bottle glass filter, solvent inlet, 20µm	5041-2168
<b>용매 관리</b>	
InfinityLab Stay Safe cap starter kit	5043-1222
InfinityLab solvent bottle, clear, 1L	9301-6524
InfinityLab solvent bottle, amber, 1L	9301-6526
Solvent bottle, clear, 2L	9301-6342
Solvent bottle, amber, 2L	9301-6341
InfinityLab Stay Safe purging bottle	5043-1339
InfinityLab waste can, GL45, 6L with Stay Safe cap	5043-1221
InfinityLab charcoal filter with time strip, 58g	5043-1193

\* 폴리프로필렌 바이알은 내화학성이며 pH에 민감한 샘플에 이상적입니다.

자세히 알아보기:

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

국가별 애질런트 고객센터 찾기

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

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

[agilent\\_inquiries@agilent.com](mailto:agilent_inquiries@agilent.com)

유럽

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

아시아 태평양

[inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:inquiry_lsca@agilent.com)

RA44707.6978009259

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2022  
2022년 6월 8일 한국에서 인쇄  
5994-4829KO

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](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)