

インタクトアデノ随伴ウイルスの カプシドタンパク質の LC/MS による 迅速な製品同定

著者

Brian Liu
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、脊髄性筋萎縮症や遺伝性網膜変性などの希少性・難治性の遺伝性疾患を治療できる新しい生物学的療法として期待されています。¹ AAV は、タンパク質カプシドとカプセル化された DNA で構成される大きな分子複合体であり、製品全体の品質と安全性を確保するためには、個々の AAV に専用の分析技術が必要とされます。AAV カプシドは、一般に VP1、VP2 および VP3 と呼ばれる 3 種類のカプシドタンパク質を、約 1:1:10 の化学量論比で含み、カプシドあたり合計 60 コピーのタンパク質で構成されます。²

米国食品医薬品局は、特に複数の血清型変異体や組換え変異体を産生する施設において、リリース前にすべての AAV 治療用タンパク質のウイルスカプシドおよびカプセル化された DNA を明確に特定することを推奨しています。³ これまでウイルスカプシド分析メソッドとしては、ELISA やイムノプロットティングなどの抗体ベースの方法が最も一般的に用いられていました。抗体ベースのメソッドには複数の難点があります。煩雑でエラーが発生しやすいことに加えて、分析する AAV のタイプごとに極めて特異的な抗体を生成する必要があります。異なる製品の AAV カプシドは高度な相同性を有する可能性があるため、これは困難です。例えば、AAV 血清型 1 と 6 は アミノ酸 6 個のみが異なり (99 % の相同性)、抗体結合による区別が困難です。⁴

原則として、LC/MS により、ウイルスカプシドタンパク質分析の速度と特異性の最適な組み合わせが得られます。なぜなら、タンパク質の質量を直接測定することで、AAV の各タイプに対して抗体を生成する必要がなくなるからです。ただし、これまでの検討には、ウイルスカプシドタンパク質のクロマトグラフィー分離が比較的不十分という問題点がありました。⁵ これは、AAV 感染性の重要な決定要因であるカプシドの化学量論を正確に定量できず、さらに共溶出がシグナル強度と質量精度を損なう可能性があるという問題があります。

このアプリケーションノートでは、最適化された LC/FLD-MS メソッドを用いて、AAV カプシドタンパク質を迅速に分析して 7 種類の異なる血清型の一次配列を確認した例について紹介します。このメソッドは、サンプル前処理が簡単で、一般的な非イオン性の洗浄添加剤である PluronicF-68 だけでなく、高塩濃度条件に対しても堅牢です。

実験方法

AAV サンプル

AAV 血清型 2、7、9、7m8、DJ、rh10、および Anc80 は、Vector Core @ GIS (A *STAR、シンガポール) から購入しました。AAV サンプルは、トリプルトランスフェクションによって HEK-293 細胞で発現され、超遠心分析によって精製されたものです。サンプルは、0.001 % Pluronic F-68 を含むリン酸緩衝生理食塩水中で約 1.2×10^{10} ウイルスゲノム/ μL の濃度で提供され、バッファー交換なしで受け取ったままで使用しました。

サンプル前処理

分析ごとに、200 mM 重炭酸アンモニウム (pH ~ 8.0) 中 12 M グアニジン HCl + 40 mM DTT で構成される変性バッファーを新たに調製しました。変性バッファーを AAV サンプルに 1:3 の比率で添加して、最終グアニジン HCl 濃度を 3 M にしました。次に、サンプルを 70 °C で 15 分間加熱して、完全に変性させました。分析ごとに 1.5×10^{11} のウイルスゲノムを注入しました。

インタクトカプシドタンパク質分析用の LC/FLD-MS

サンプルは、次の機器を使用して分析しました。

- Agilent 1290 Infinity II LC システム (次の機器で構成されます)
 - Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
 - Agilent 1290 Infinity II マルチサンプル (G7167B)
 - Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)

- Agilent 1260 Infinity 蛍光検出器 (G1321B)、8 μL フローセル付属
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

分離には、Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18 (SB-C18) および 2.1 x 100 mm、1.8 μm のサイズ (部品番号 858750-902 および 858750-944) の SB-ジフェニルカラムを使用しました。ZORBAX RRHD 300 Å SB-C3 カラム (部品番号 858750-909) も開発に使用しましたが、最適化されたメソッドでは使用しませんでした。

脱イオン水中の 0.1 % TFA + 0.1 % FA (mp A) および 90 % イソプロピルアルコール + 9.8 % 水 + 0.1 % TFA + 0.1 % FA (mp B) からなる溶出強度の高い移動相を選択しました。高温と組み合わせ、同様の移動相条件により、モノクローナル抗体分析用の ZORBAX StableBond カラムで優れた分解能が達成されています。⁷



図 1. このアプリケーションノートで使用された機器と消耗品

蛍光検出には、芳香族残基の発光スペクトルが溶媒暴露の回数と程度によって異なる可能性があるため、単一励起 (280 nm) / 複数発光 (315、330、345、および360 nm) モードで 8 μ L フローセルを使用しました。360 nm での発光が最も強いことがわかったため、すべての分析で使用しました。データ解析はすべて、Agilent BioConfirm 10.0 で実施しました。表 1、2 および 3 に機器と分析ソフトウェア設定を示します。

LC/MS ペプチドマッピング分析

AAV 2 の 6.0×10^{11} ウィルスゲノム (約 3.6 μ g のタンパク質) を含む 10 μ L のサンプルを変性させ、760 mg/mL のグアニジン HCl + 3.8 mg/mL TCEP を含む 30 μ L の 150 mM Tris-HCl (pH 8) 中で、60 分間 60 °C で還元しました。室温まで冷却した後、10 μ L の 133 mM ヨードアセトアミドを添加し、室温で 30 分間暗所でインキュベートすることにより、アルキル化を行いました。次に、サンプルを 210 μ L の Tris-HCl で希釈した後、0.2 μ g の Promega 製シーケンスグレード修飾トリプシン (部品番号 V5117) を添加しました。37 °C で 2 時間消化を行った後、さらに 0.2 μ g のトリプシンを加えて 37 °C で一晩消化しました。その翌日、30 μ L の 10 % ギ酸を添加して反応を停止し、Agilent AssayMap Bravo システム (G5542A) を用いて C-18 をクリーンアップしました。

表 2. インタクトカプシドタンパク質の質量分析のパラメータ

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システム	
イオン源	Agilent Dual Jet Stream
ガス温度	350 °C
ガス流量	12 L/分
ネプライザ	35 psig
シーガス温度	350 °C
シーガス流量	11 L/分
Vcap	4 kV
ノズル電圧	2 kV
フラグメンタ	180 V
スキマ電圧	65 V
質量範囲	900 ~ 3,200 m/z
取り込みレート	1 スペクトル/秒
リファレンス質量	922.0098
取り込みモード	ポジティブ、3,200 m/z の質量範囲、拡張ダイナミックレンジ (2 Ghz)

ペプチドマッピングは、6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を組み合わせた 1290 Infinity II LC で実施しました。分離には、2.1 x 150 mm、2.7 μ m のサイズの AdvanceBio ペプチドマッピングカラム (部品番号 653750-902) を用いました。表 4 および 5 に機器設定を示します。

表 3. インタクトカプシドタンパク質デコンボリューションの設定

Agilent MassHunter BioConfirm B.10.0 の設定	
定義されたクロマトグラム	FLD
抽出時積分	あり
遅延時間調整	0.1 分 (MS 検出)
デコンボリューション	最大エントロピー
デコンボリューション m/z 範囲	1,000 ~ 3,200
デコンボリューション質量範囲	55 ~ 85 kDa
質量ステップ	0.5 Da
デコンボリューション減算ベースライン	7.0
一致許容範囲	32 ppm

表 4. ペプチドマッピングのクロマトグラフィーパラメータ

Agilent 1290 Infinity II LC システム	
溶媒 A	0.1 % ギ酸脱イオン水溶液
溶媒 B	0.1 % FA アセトニトリル溶液
グラジエント	0 ~ 15 分、5 ~ 40 % B 15 ~ 18 分、40 ~ 90 % B 18 ~ 20 分、90 % B
カラム温度	60 °C
流量	0.4 mL/分
注入量	20 μ L

表 1. インタクトカプシドタンパク質クロマトグラフィーのパラメータ

Agilent 1290 Infinity II LC システム						
条件	試験	最適化	試験	最適化	試験	最適化
カラム	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18, 2.1 x 100 mm, 1.8 μ m (部品番号 858750-902)	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18, 2.1 x 100 mm, 1.8 μ m (部品番号 858750-902)	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond ジフェニル 2.1 x 100 mm, 1.8 μ m (部品番号 858750-944)	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond ジフェニル 2.1 x 100 mm, 1.8 μ m (部品番号 858750-944)	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C3, 2.1 x 100 mm, 1.8 μ m (部品番号 858750-909)	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C3, 2.1 x 100 mm, 1.8 μ m (部品番号 858750-909)
溶媒 A	0.1 % FA + 0.1 % TFA 脱イオン水溶液	0.1 % FA + 0.1 % TFA 脱イオン水溶液	0.1 % FA + 0.1 % TFA 脱イオン水溶液	0.1 % FA + 0.1 % TFA 脱イオン水溶液	脱イオン水中 0.1 % FA + 0.1 % TFA	-
溶媒 B	80 % IPA + 10 % ACN + 9.8 % 脱イオン水 + 0.1 % FA + 0.1 % TFA	90 % IPA + 9.8 % 脱イオン水 + 0.1 % FA + 0.1 % TFA	80 % IPA + 10 % ACN + 9.8 % 脱イオン水 + 0.1 % FA + 0.1 % TFA	90 % IPA + 9.8 % 脱イオン水 + 0.1 % FA + 0.1 % TFA	80 % IPA + 10 % ACN + 9.8 % 脱イオン水 + 0.1 % FA + 0.1 % TFA	-
グラジエント	0 ~ 2 分、20 % B 42 分、35 % B 42.5 分、80 % B 45 分、80 % B	0 ~ 5 分、28 % B 23 分、32.5 % B 23.5 分、80 % B 26 分、80 % B	0 ~ 2 分、28 % B 42 分、43 % B 42.5 分、80 % B 45 分、80 % B	0 ~ 5 分、33 % B 21 分、37 % B 21.5 分、80 % B 23 分、80 % B	0 ~ 2 分、20 % B 21 分、35 % B 42.5 分、80 % B 45 分、80 % B	-
カラム温度	75 °C	80 °C	75 °C	80 °C	75 °C	-
流量	0.4 mL/分					
サンプル量	1.5 x 10 ¹¹ ウィルスゲノム/インジェクション					

結果と考察

LC/MS メソッド開発

AAV-2 は最もよく研究されている血清型であるため、メソッド開発に使用しました。カプシドタンパク質 VP1、VP2 および VP3 の配列を図 2 に示します。カプシドタンパク質はすべて、Cap 遺伝子の同じ DNA 配列から転写され、mRNA スプライシングとリーキーリボソームスキヤニングにより、高度な相同性を持つ 3 つのタンパク質が得られます。⁶具体的には、VP3 配列は 3 つのタンパク質すべてに共通であり、VP1 と VP2 は N 末端配列のみが異なります。

表 5. ペプチドマッピング質量分析パラメータ

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システム		選択幅	中程度 (~4 m/z)
イオン源	Agilent Dual Jet Stream	プリカーサ/サイクル	上位 10
ガス温度	290 °C	コリジョンエネルギー	3.6*(m/z)/100 - 4.8
ガス流量	13 L/分	MS/MS のスレッショールド	オン、3 回繰り返して 0.2 分間排除
ネブライザ	35 psig	プリカーサアバンドンスペースのスキヤンスピード	あり
ソースガス温度	275 °C	ターゲット	25,000
ソースガス流量	12 L/分	MS/MS 累積時間制限の使用	あり
Vcap	4 kV	純度	100 % ストリンジェンシー、30 % カットオフ
ノズル電圧	2 kV	同位体モデル	ペプチド
フラグメンタ	175 V	プリカーサでのソート	+2、+3、>+3 のみのアバンドンによる
スキマ電圧	65 V	リファレンス質量	922.0098
質量範囲	100 ~ 1,700 m/z	取り込みモード	ポジティブ、3,200 m/z 質量範囲
取り込みレート	5 スペクトル/秒		
自動 MS/MS 範囲	50 ~ 1,700 m/z		
最小 MS/MS 取り込みレート	3 スペクトル/秒		

A:VP1 Monoisotopic mass: 81804.8749 Average mass: 81856.1324 Molecular formula: C3630H5483N1015O1127S15

```

1 N-term ADAGYLPDWLEDTLSEGIQWKKLPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLPGFNGLDKGEVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPFYLYKNH 94
95 ADAEFQERLKEDTSFGNLRGAVFOAKKRVLEPLGLVEEPVKTAAGKKRPVEHSVPEPDDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDGADSVDPDQPLGQPPAAPSGLG 198
199 TNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSGNGHCDSTWMDRVTITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRLINNN 302
303 WGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPOYGYLTLNNGSQAQVGRSSFYCLEYFPPSOMLRTGN 406
407 NFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQLDRMLNPLIDQYLYLSRNTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLN 510
511 GRDSLVPNPGPAMASHKDDDEEKFFPQSGVLI FGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNVPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDQVYVYLG 614
615 PIWAKIPHDTGDFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVMNVDFTVDTNGV 718
719 YSEPRPIGTRYLTRNL C-term 734
  
```

B:VP2 Monoisotopic mass: 66447.1172 Average mass: 66488.9131 Molecular formula: C2938H4429N8270917S15

```

1 N-term APGKKRPVEHSVPEPDDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDGADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSGNGHCD 94
95 TWMDRVTITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNL 198
199 TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPOYGYLTLNNGSQAQVGRSSFYCLEYFPPSOMLRTGNNTFSTYTFEDVPPFHSSYAHSQLDRMLNPLIDQ 302
303 YLYLSRNTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDDEEKFFPQSGVLI FGK 406
407 QGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNVPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDQVYVYLGPIWAKIPHDTGDFHPSPLMGGFGLKHPPPQILI 510
511 KNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVMNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL C-term 597
  
```

C:VP3 Monoisotopic mass: 59936.8685 Average mass: 59974.6971 Molecular formula: C2661H3984N7400824S14

```

1 N-term ATGSGAPMADNNEGADGVGNSGNGHCDSTWMDRVTITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQ 94
95 RLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPOYGYLTLNNGSQAQVGRSSFYCLEYFPPS 198
199 MLRTGNNTFSTYTFEDVPPFHSSYAHSQLDRMLNPLIDQYLYLSRNTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA 302
303 TKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDDEEKFFPQSGVLI FGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNVPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDR 406
407 DVYVYLGPIWAKIPHDTGDFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVMNVDF 510
511 VDTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL C-term 532
  
```

図 2. AAV-2 カプシドタンパク質の一次アミノ酸配列。Agilent MassHunter シーケンスマネージャソフトウェアに表示される VP1、VP2 および VP3 は、N 末端シーケンスのみが異なります。それぞれに VP3 シーケンスが含まれ、追加の N 末端シーケンスに赤 (VP2) または赤と緑 (VP1) で下線が引かれています。モノアイソトピック質量、平均質量、および分子式は、各タンパク質の上に示されています。

他の研究で発表されているように⁵、これらの翻訳後修飾は予想されたものです。(i) VP1 および VP3 上の開始剤メチオニンの除去、および (ii) 除去されたメチオニンの直後のアミノ酸のアセチル化。アセチル化アミノ酸は、Agilent MassHunter Sequence Manager ソフトウェアで赤のイタリック体の文字で示されます。VP1、VP2 および VP3 の理論上の平均質量はそれぞれ 81,856.13、66,488.91、および 59,974.70 Da です (図 2)。

変性 AAV-2 サンプルは、表 1 に示すテストグラジエントを使用して、ZORBAX RRHD 300 Å SB-C3、SB-ジフェニル、および SB-C18 カラム (図 3A ~ 3C) で分離しました。VP1、VP2 および VP3 は、SB-C3 および SB-ジフェニルカラムで 2 つのピークとして分離され、VP1 と VP3 は単一のピークとして共溶出しました。SB-C18 カラムのみが、各カプシドタンパク質を分離するのに必要な選択性を備えていました。

VP1 + VP3 ピークのデコンボリュートした質量スペクトル (図 3D から 3E) は、VP1 と比較してはるかに強い VP3 シグナルを 59,975.52 Da に示していますが、これはその存在量が桁違いに大きいことを反映しています。VP3 の共溶出はマトリクス効果につながる可能性があり、イオン抑制による VP1 の検出と質量精度を妨げる可能性があります。⁸ 対照的に、SB-C18 カラムでは VP1 の分離が優れているため (図 3F)、VP3 による干渉が大幅に低減され、VP1 の信頼性の高い正確な質量分析が可能となっています。

次に図 4 に示すように、AAV-2 サンプルを SB-C18 カラムで表 1 に示す最適化されたグラジエントを使用して分離し、ピーク分離能と形状を改善して、分析時間を短縮しました。総イオン電流のわずかなバックグラウンドのうねりは、残留プルロニック F-68 が原因である可能性が高いことに注意してください。これは分析に大きな影響を与えていません。

重要なことに、VP1 の観測されたデコンボリュートした質量は 81,885.72 Da (図 4E) であり、理論値の 81,856.13 Da よりも +29.6 Da 大きいものでした。対照的に、VP2 と VP3 の観測された質量は、理論値とよく一致していました。したがって、VP1 の N 末端領域で単一のアミノ酸置換が起こったと仮定されます (緑色で下線が引かれた配列、図 2)。

AAV-2 における単一アミノ酸置換の確認

この仮説を検証するために、AAV-2 のトリプシン消化とペプチドマッピングを実施しました。同定は、VP1 配列のアミノ酸 77 でのアラニン & スレオニン置換がその MS/MS スペクトルで確認されている 3 価の 1,102.1864 m/z ペプチドで行われ、実際に N 末端領域に位置していました (図 5)。

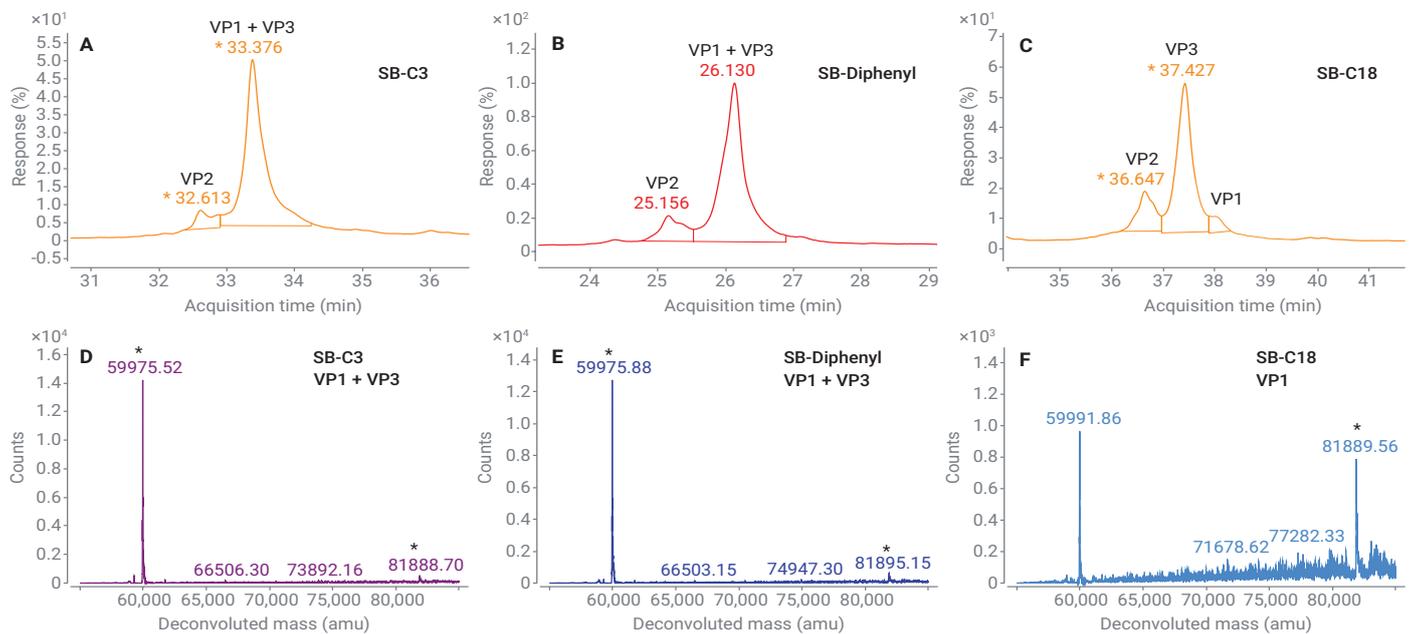


図 3. AAV-2 を用いたメソッド開発。(A) Agilent ZORBAX RRHD 300 Å SB-C3、(B) SB-ジフェニル、および (C) SB-C18 カラムを使用した分離を示す蛍光クロマトグラム。SB-C18 の優れたクロマトグラフィー分離能に注目してください。(D ~ F) VP1 と VP3 の共溶出を示すクロマトグラフィーピークのデコンボリュートした質量スペクトル

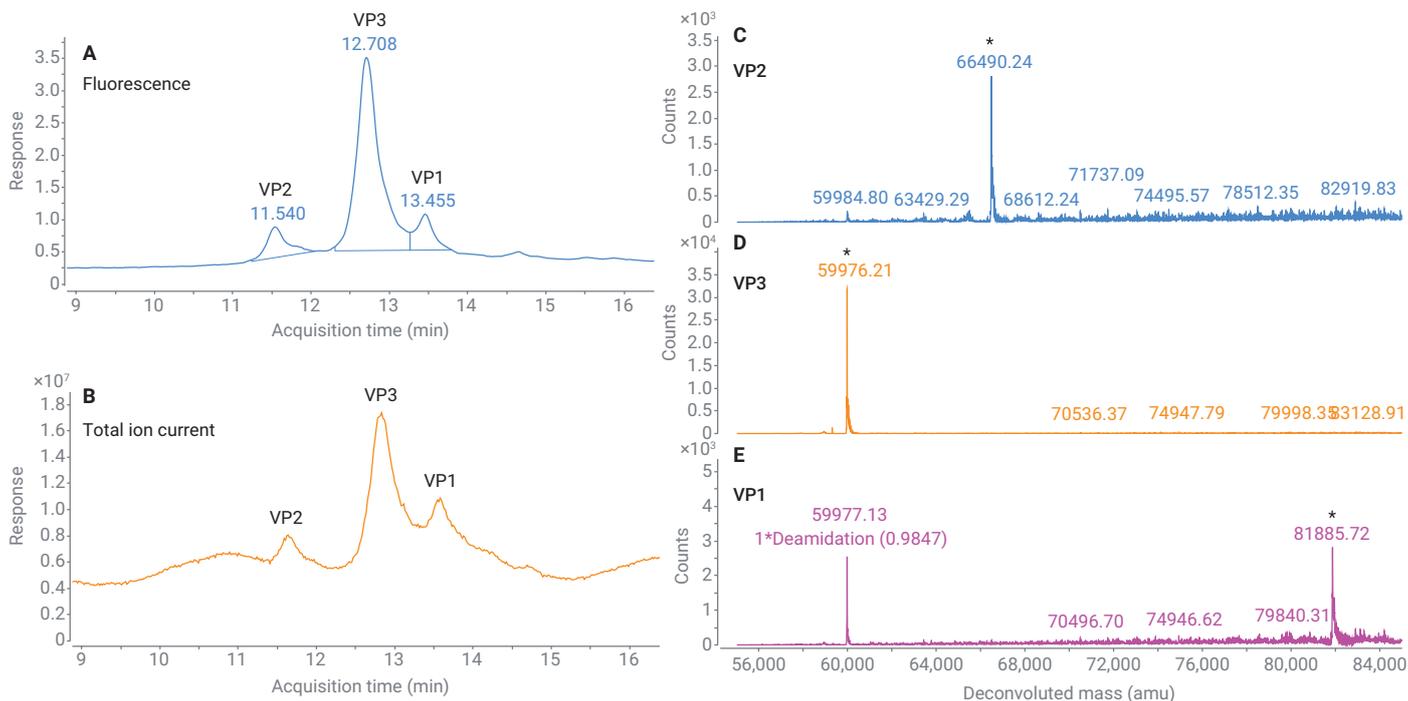


図 4. Agilent ZORBAX RRHD 300 Å SB-C18 カラムで最適化されたメソッドを使用した変性 AAV-2 カプシドタンパク質の LC/MS の結果。(A) 3つのカプシドタンパク質を示す蛍光クロマトグラム。(B) 総イオン電流。(C~E) 3つのカプシドタンパク質のデコンボリュートした質量スペクトル。関連する質量ピークはアスタリスクでマークされています。

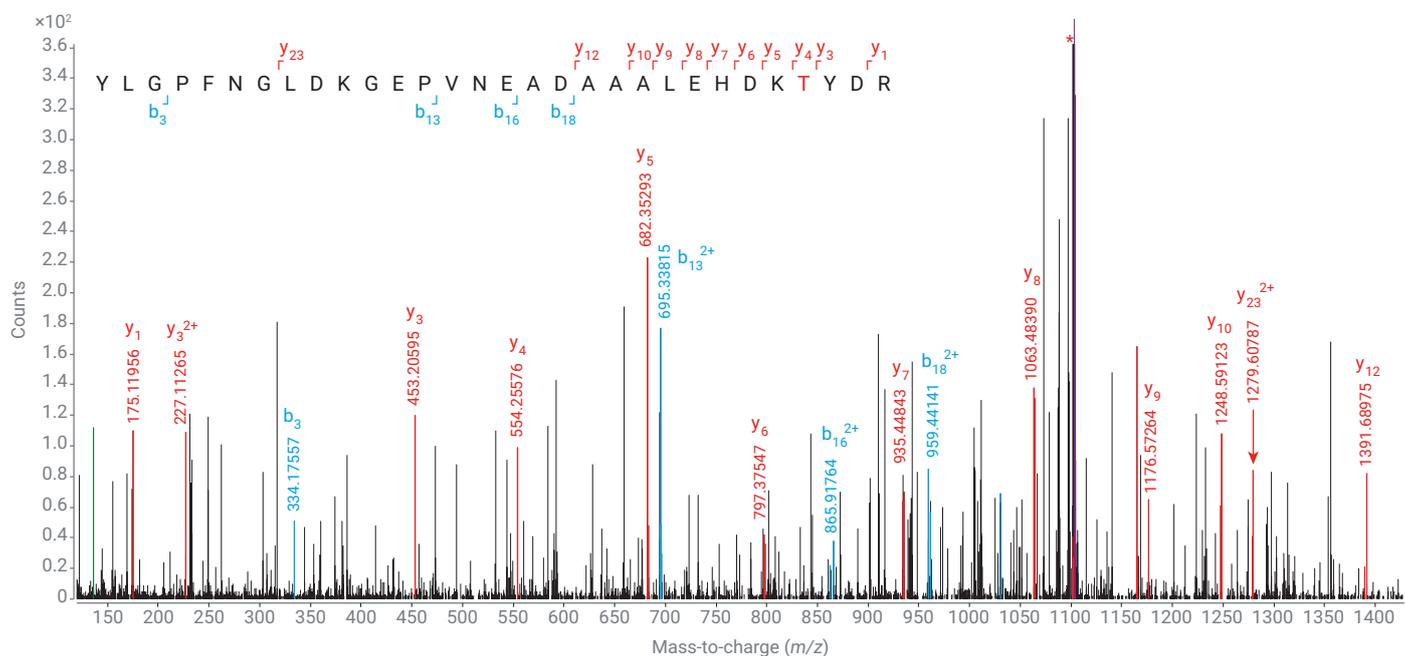


図 5. MS/MS による VP1 のアラニン & スレオニン置換の確認。置換されたアミノ酸は赤いフォントで示され、プリカーサイオンは赤いアスタリスクでマークされています。

この変異は、AAV-2 発現に使用されるプラスミドのサンガーシーケンシングによって直交的に確認されました。すなわち、G & A 置換により GCC コドンが ACC に置き換わっていることが示されました（データは示していません）。

6 つの AAV 血清型の追加分析

この LC/MS メソッドが他の AAV 血清型の分析に一般化できるかを評価するために、上記の最適化された SB-C18 メソッドを使用して AAV-7、7m8、DJ、9、rh10、および Anc80 を分析しました。AAV-7、7m8、および DJ は

このメソッドを使用して十分に分離されましたが（図 6A ~ 6C）、AAV-9、rh10、および Anc80 は 2 つのピークとしてのみ分離され、VP1 と VP3 は単一のピークとして共溶出しました。

アジレントのジフェニル固定相は、C3、C8、C18 などのアルキル鎖固定相と比較して選択性が変化しています。フェニル基は、芳香族アミノ酸および二重結合に対する追加の親和性を備えた π - π 相互作用に基づく分離を可能にします。最適化された SB-ジフェニル法（表

1) は、AAV-9、rh10、および Anc80 の分離を実現するために開発されました（図 6D ~ 6F）。各カプシドタンパク質の同一性は、デコンボリュートした各ピークからのマススペクトルを使用して BioConfirm ソフトウェアによって自動的に照合されました。各ピークのマススペクトルは、隣接するピークからの干渉が最小限に抑えられています（図 7 および 8）。

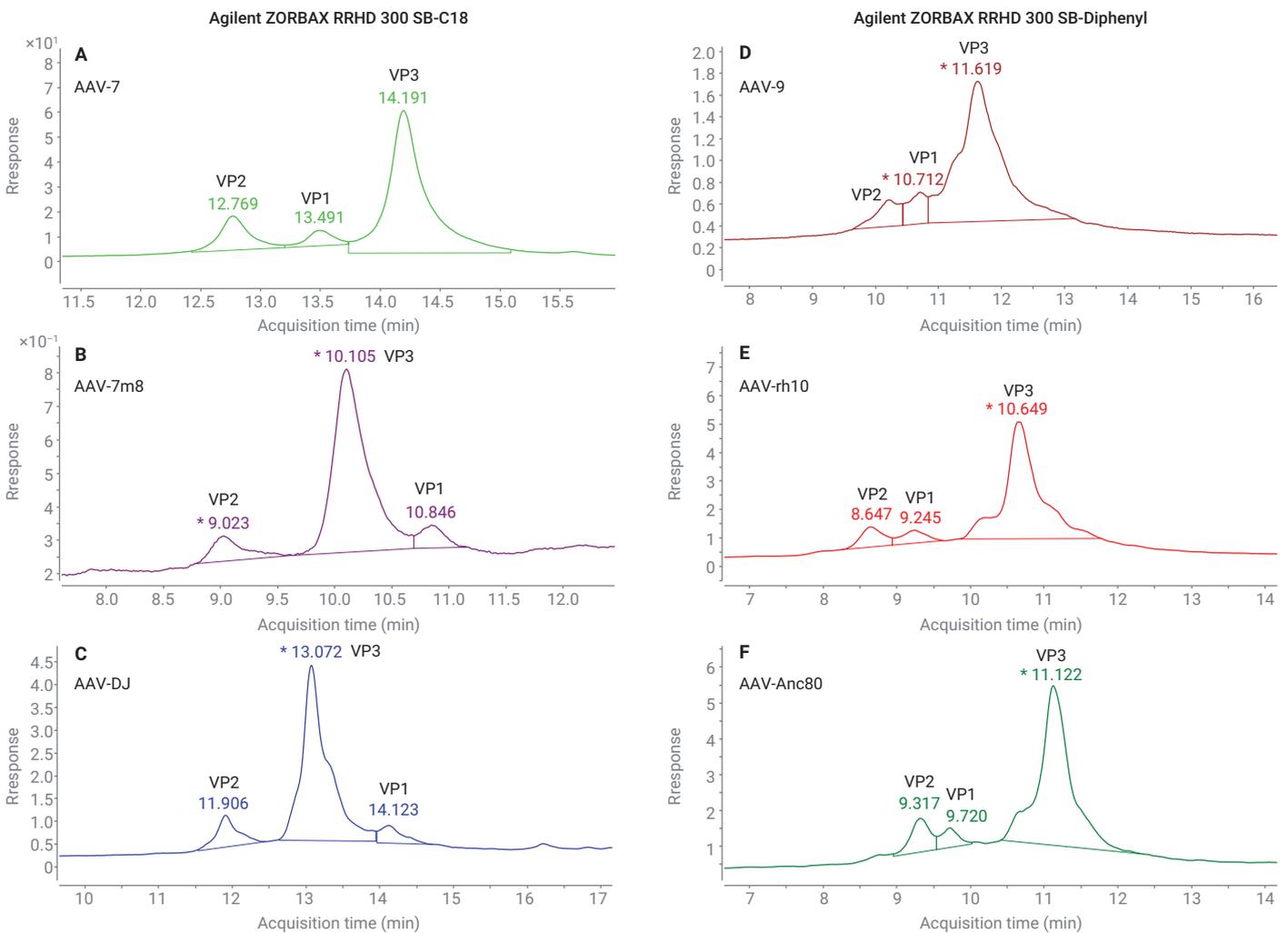


図 6. (A ~ C) Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18、および (D ~ F) AgilentSB-ジフェニルカラムにおける 6 種類の異なる血清型の変異 AAV カプシドタンパク質の LC/MS の結果

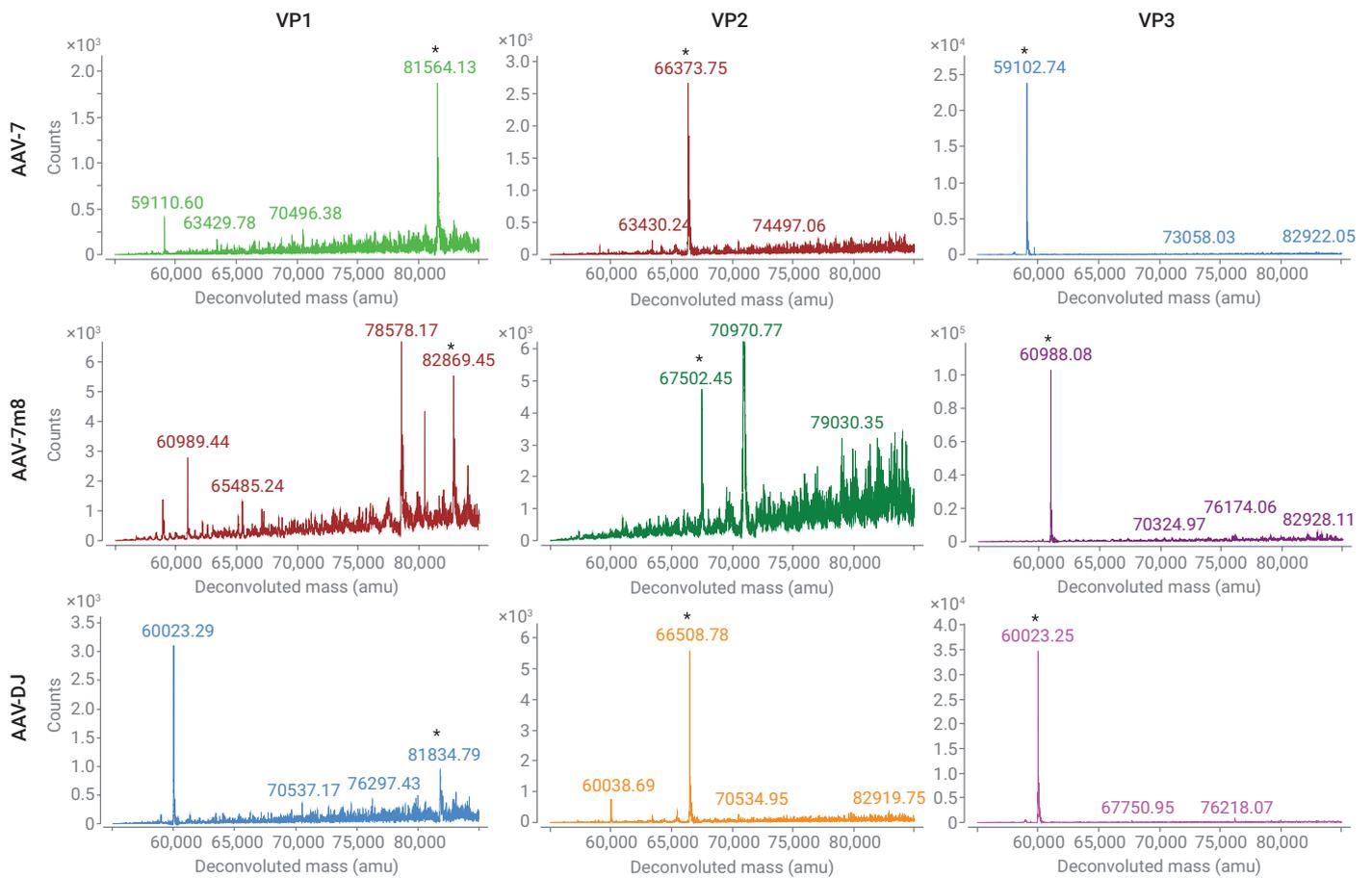


図 7. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18 カラムで分離された AAV カプシドタンパク質のデコンボリュートした質量スペクトル。共溶出する宿主細胞タンパク質からの干渉が AAV-7m8 (70971.71、78578.01、および80495.10 Da) で見られました。

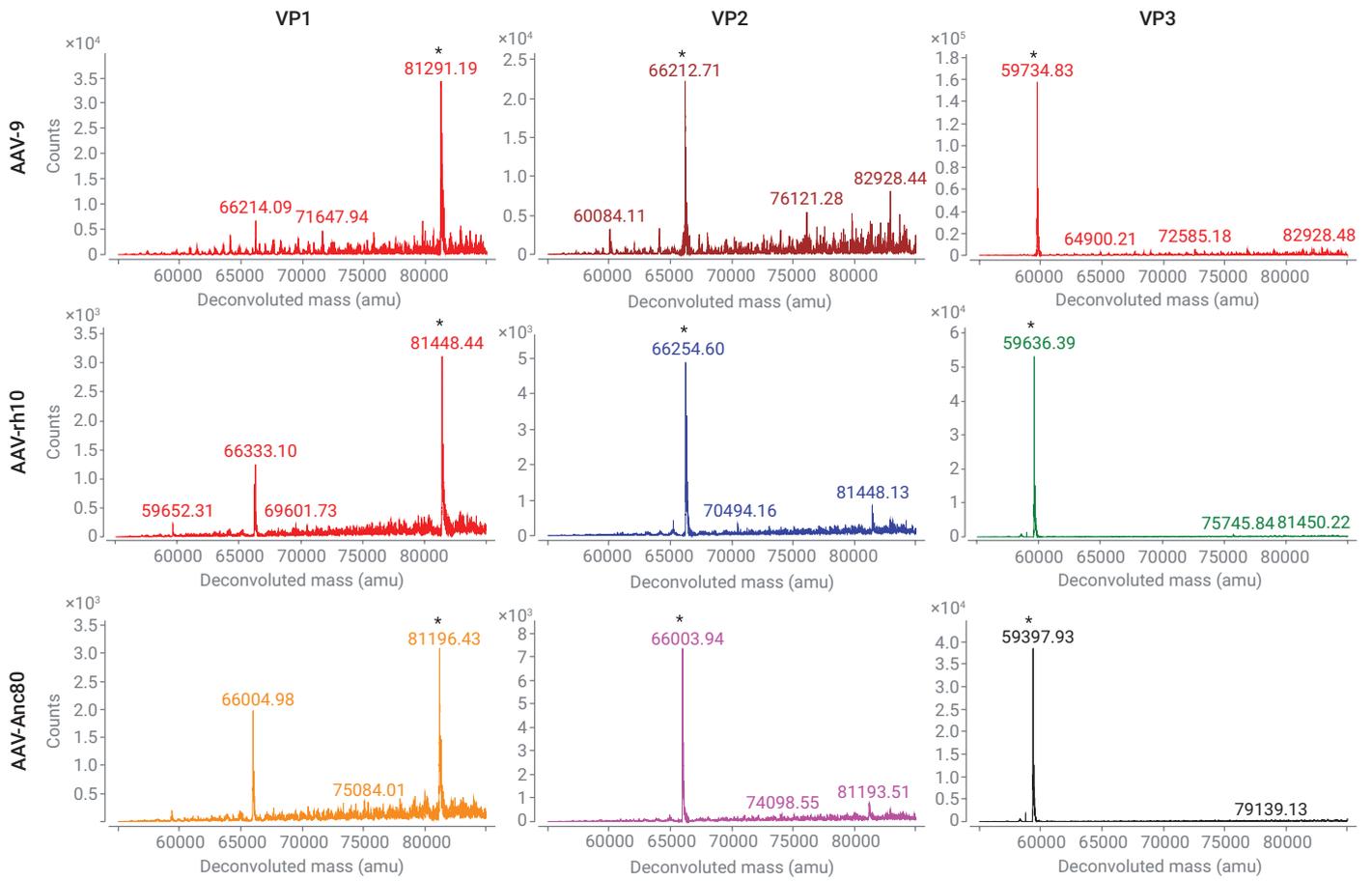


図 8. Agilent ZORBAX RRHD 300SB- ジフェニル カラムで分離された AAV カプシドタンパク質のデコンボリュートした質量スペクトル

脱アミド化は、AAV-DJ および rh10 の VP1 タンパク質に割り当てられたと推定されます。これは、細胞培養条件が原因であるか、サンプル前処理中の加熱により不自然な結果が生じた可能性があります。AAV-2 を除いて、各カプシドタンパク質の理論質量と観測質量（表 6）の差は、3 Da 以下であり、これは 32ppm 以下に相当します。

表 7 の VP1、VP2 および VP3 の相対量は、各カプシドタンパク質に対応する蛍光クロマトグラム（図 6）を積分することによって測定されたものです。これらの結果は概ね、1:1:10 の予想される VP1:2:3 化学量論に一致しましたが、VP1 のアバンドンスは、テストしたさまざまなサンプルでは VP2 よりも変動が大きいようでした。VP1 は重要な核局在化

因子であることが知られているため¹⁰、一部のサンプルで VP1 のアバンドンスが少ないことが、感染力の違いを部分的に説明している可能性があります。

表 6. カプシドタンパク質のデコンボリュートした質量

AAV カプシドタンパク質の質量									
血清型	VP1			VP2			VP3		
	理論値	観測値	質量精度 (ppm)	理論値	観測値	質量精度 (ppm)	理論値	観測値	質量精度 (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

表 7. カプシドタンパク質の相対量

カプシドタンパク質の定量 (FLD %)			
血清型	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

結論

このアプリケーションノートでは、1290 Infinity II LC を ZORBAX RRHD 300 Å SB-C18 または SB-ジフェニルカラムと組み合わせて使用し、インタクト AAV カプシドタンパク質を効率的に分離する方法の開発と、それに続く 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF と連携した 1260 Infinity II 蛍光検出器を用いた検出・分析について説明しました。また、7 種類の異なる AAV 血清型を対象に、このメソッドの性能を実証しました。サンプル前処理には比較的短い変性ステップが必要とされるだけです。このメソッドは高塩濃度条件および一般的な洗浄添加剤である Pluronic F-68 に対して堅牢であるため、バッファー交換は必要ありません。

このメソッドはクロマトグラフィー分離に関して、最近公開された研究結果⁹を大幅に上回り、AAV カプシドタンパク質を効率的に分離するためのより一般的なアプローチを代表するものです。これはあるカラム充填剤と共溶出する可能性があります。別のカラム充填剤では適切に分離します。同様の分析に対して ZipChip CE/MS システムを使用した最近の別の分析¹¹と比較すると、このアプローチは、ZipChip の 60 ppm 以下と比較して、32 ppm 以下の質量精度を達成しています。さらに、液体クロマトグラフィーで比較的長いリテンションタイム差が達成されたため、再現性のある正確な質量スペクトルデータのデコンボリューションが容易になり、蛍光検出器を含めることで、カプシドタンパク質のアバUNDANCEの高感度で正確な相対定量が可能になりました。一方、ZipChip では、カプシドタンパク質は 0.1 分という狭い時間枠内で溶出することが示されましたが、実験で使用した質量分析計のスキャン速度が比較的遅いため、正確な定量ができませんでした。

このメソッドは、リリース前の AAV 製品の同一性の迅速な確認、および探索/開発ラボにおける AAV 変異体ライブラリーのスクリーニングに有用であることが期待されます。

参考文献

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.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2021
Printed in Japan, April 7, 2021
5994-2434JAJP
RA.5878472222

