

바이오 적합성 액체 크로마토그래피를 이용한 아데노 관련 바이러스 1 및 6 혈청형 내 Full/Empty 캡시드 비율 분석

Agilent Bio SAX 강 음이온 교환 컬럼이 장착된 Agilent 1290 Infinity II Bio LC를 이용한 우수한 직선성 및 반복성

저자

Brian Liao
Agilent Technologies, Inc.

개요

이온 교환 크로마토그래피는 아데노 관련 바이러스(AAV)의 정제 및 품질 속성 분석 모두에 매우 중요한 도구입니다. 이 연구는 Agilent Bio SAX 강 음이온 교환 컬럼이 장착된 Agilent 1290 Infinity II Bio LC를 이용한 AAV-1 및 AAV-6 시료에서 full/empty 캡시드 비율 측정을 보여줍니다. 이 분석법은 우수한 직선성과 반복성을 보여 1290 Infinity II Bio LC를 업계 최고의 성능을 갖춘 첨단 액체 크로마토그래피 시스템으로 구축했습니다.

서론

재조합 AAV의 생산 동안, 상당한 비율의 바이러스 캡시드는 유전적 페이로드를 포함하지 않으며, 따라서 "empty" 캡시드라고 불립니다.¹ Empty 캡시드는 AAV 제제의 유전자 도입 효과를 낮추는 것으로 나타났으며², 따라서 규제 당국은 이를 반드시 특성 규명되어야 하는 공정 관련 불순물로 간주합니다.³

이 연구에서는 Agilent Bio SAX 컬럼이 장착된 Agilent 1290 Infinity II Bio LC를 사용하여 정제된 AAV-1 및 AAV-6 시료의 full/empty 캡시드 비율을 측정했습니다. 1290 Infinity II Bio LC에는 바이오 적합성 유동 경로가 있습니다. Agilent nonporous poly(styrene divinylbenzene) (PS-DVB) Bio SAX 강 음이온 교환 PEEK 컬럼과 함께 사용할 경우, LC는 원치 않는 표면 상호 작용을 최소화하여 생체분자의 무결성을 보장하므로 대규모 분자 응용에 이상적입니다.

실험

AAV 참조 표준물질은 Vigene Biosciences에서 full 농축 시료와 empty 농축 시료로 구입했습니다. 다른 언급이 없는 경우 모든 화학 물질은 Sigma-Aldrich로부터 구입했습니다.

기기

이 연구에서는 1290 Infinity II Bio LC의 두 가지 구성을 사용했습니다(그림 1). LC에는 quaternary Flexible 펌프 또는 binary 고속 펌프가 장착되어 있었습니다. Flexible 펌프는 한 번에 4개의 용매 라인을 수용하여 분석법 개발 중에 준비해야 하는 다양한 이동상의 수를 줄입니다. 고속 펌프는 가장 높은 혼합 효율과 최소 지연량의 특징으로 탁월한 수준의 감도와 반복성을 제공합니다. 두 구성 모두 높은 염분 농도로 인한 부식에 강하고 최대 1,300bar의 높은 역압을 견딜 수 있습니다. 비교적 묽은 AAV

시료 분석에 필요한 높은 감도를 달성하기 위해 인라인 Agilent 1260 Infinity II 형광 검출기가 사용되었습니다.



그림 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC.

표 1. 이동상의 조성.

	Flexible 펌프	고속 펌프
펌프 유형	Quaternary	Binary
이동상 조성	A: 탈이온수 B: 1M tetramethylammonium chloride C: 0.3M HCl D: 0.2M <i>bis</i> -tris propane A~D에는 2mM MgCl ₂ 가 포함됨	A: 70mM <i>bis</i> -tris propane, pH 9.0 B: 70mM <i>bis</i> -tris propane + 1M tetramethylammonium chloride, pH 9.0 A 및 B에는 2mM MgCl ₂ 가 포함됨

표 2. Flexible 펌프 그레디언트 조건.

시간	%A	%B	%C	%D	유속 (mL/min)
0	36.2	15	13.8	35	0.1
40	15.8	35	14.2	35	0.1
40.1	0.6	50	14.4	35	0.3
43	0.6	50	14.4	35	0.3

표 3. 고속 펌프 그레디언트 조건.

시간	%A	%B	유속(mL/min)
0	85	15	0.1
25	72.5	27.5	0.1
25.1	0	100	0.3
28	0	100	0.3

크로마토그래피

PEEK 하드웨어의 Agilent Bio Sax NP5 컬럼(2.1 × 50mm, 5µm, 제품 번호 5190-2472)을 사용하여 full AAV 캡시드와 empty AAV 캡시드를 분리했습니다. 염 그레디언트 용출은 표 1~표 3에 나타난 이동상 및 그레디언트 조건을 이용하여 수행하였습니다.

Flexible 펌프 분석법의 경우, Agilent Buffer Advisor 소프트웨어를 사용하여 분석 중에 70mM *bis*-tris propane(pH 9.0)에 이르는 데 필요한 각 이동상 구성 요소의 백분율을 측정했습니다. AAV-1 및 AAV-6 표준물질은 분석 전에 50mM Tris-HCl, pH 7.4에서 개별적으로 empty 농축 또는 full 농축 또는 혼합물로 희석되었습니다. 데이터 수집 및 분석은 Agilent OpenLab CDS 소프트웨어에 의해 표 4에 나와 있는 통합 설정을 사용하여 제어되었습니다.

표 4. Agilent OpenLab CDS 2.3 소프트웨어 통합 설정.

파라미터	값
기울기 감도	0.02
피크 폭	2
면적 제한	0.05
높이 제한	0.05
솔더 모드	탄젠트
탄젠트 스킴 모드	스트레이트
테일 피크/스킴 높이 비율	0.05
프론트 피크/스킴 높이 비율	0.05
스킴 밸리 비율	20
베이스라인 교정 모드	고전 아형
피크 대 밸리 비율	500
바탕 감산	예

결과 및 토의

AAV-1과 AAV-6의 상대 감응 계수는 먼저 full 또는 empty 농축 시료에서 동일한 수의 캡시드를 주입하여 추산되었습니다. Full 캡시드는 empty 캡시드보다 명확하게 관찰되었으며, 두 혈청형 모두에서 empty 캡시드에 대한 분명한 반응 비율은 약 1.2였습니다. 이 값은 AAV-6.2에 대해 발표된 반응 비율 1.3과 거의 일치합니다.⁴

그림 2와 같이, 혼합 시료에서 full 캡시드와 empty 캡시드의 분리는 Flexible 펌프를 사용하여 허용 범위 내의 분리능(AAV-1의 경우 $R = 1.1$, AAV-6의 경우 $R = 1.3$)으로 달성되었습니다. 시료 회수율은 유속(데이터 미표시)과 마이너스의 관계가 있는 것으로 나타났으며, 이는 문헌에 보고된 관측값과 일치했습니다.⁵ 따라서, 이 분석법의 유속은 분석 그레디언트 동안 0.1mL/min의 낮은 값으로 유지되었습니다.

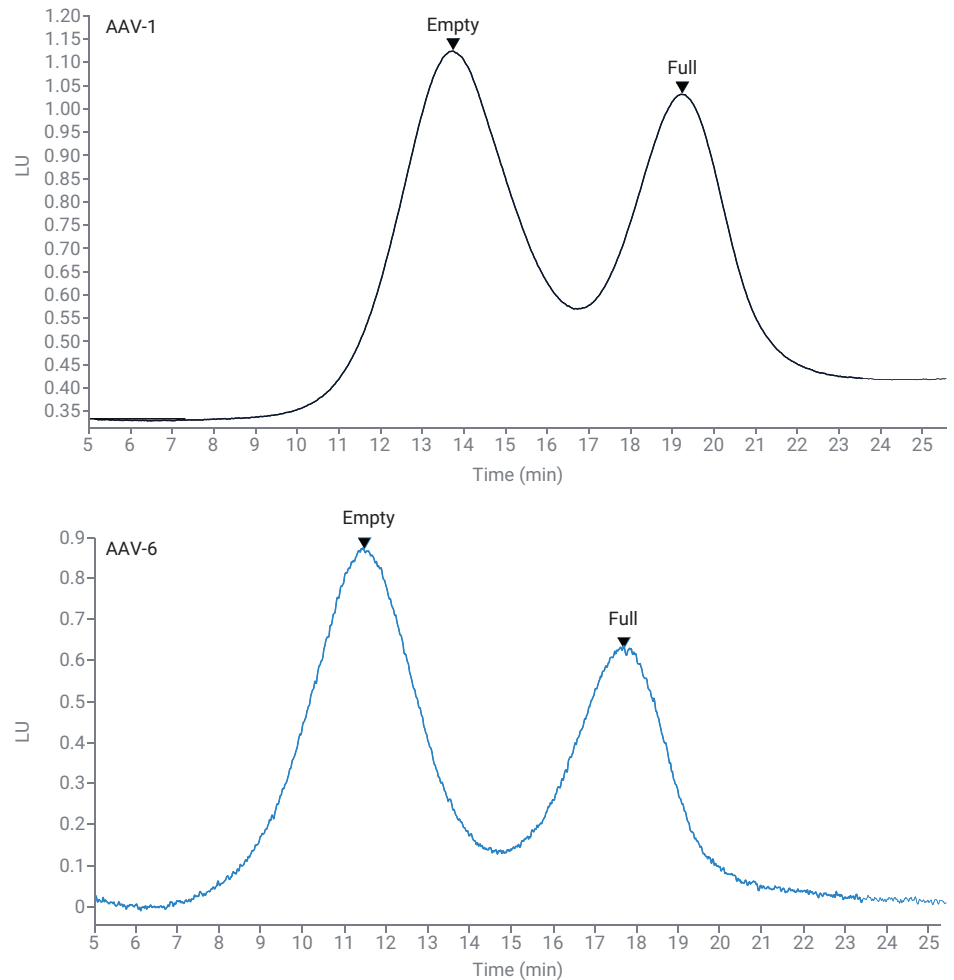


그림 2. 애질런트 quaternary Flexible 펌프를 이용한 full 캡시드와 empty 캡시드의 혼합물 분리.

이 분석법은 binary 고속 펌프가 장착된 1290 Infinity II Bio LC로 이전되었습니다. 분석의 정확성, 직선성 및 반복성을 평가하기 위해 서로 다른 비율의 full 캡시드와 empty 캡시드의 혼합물을 3일에 걸쳐 반복적으로 주입했습니다. 그림 3의 중첩된 크로마토그램에서 알 수 있듯이, full 캡시드와 empty 캡시드 피크의 머무름 시간 및 피크 형태는 광범위한 캡시드 비율에 걸쳐 재현 가능했습니다.

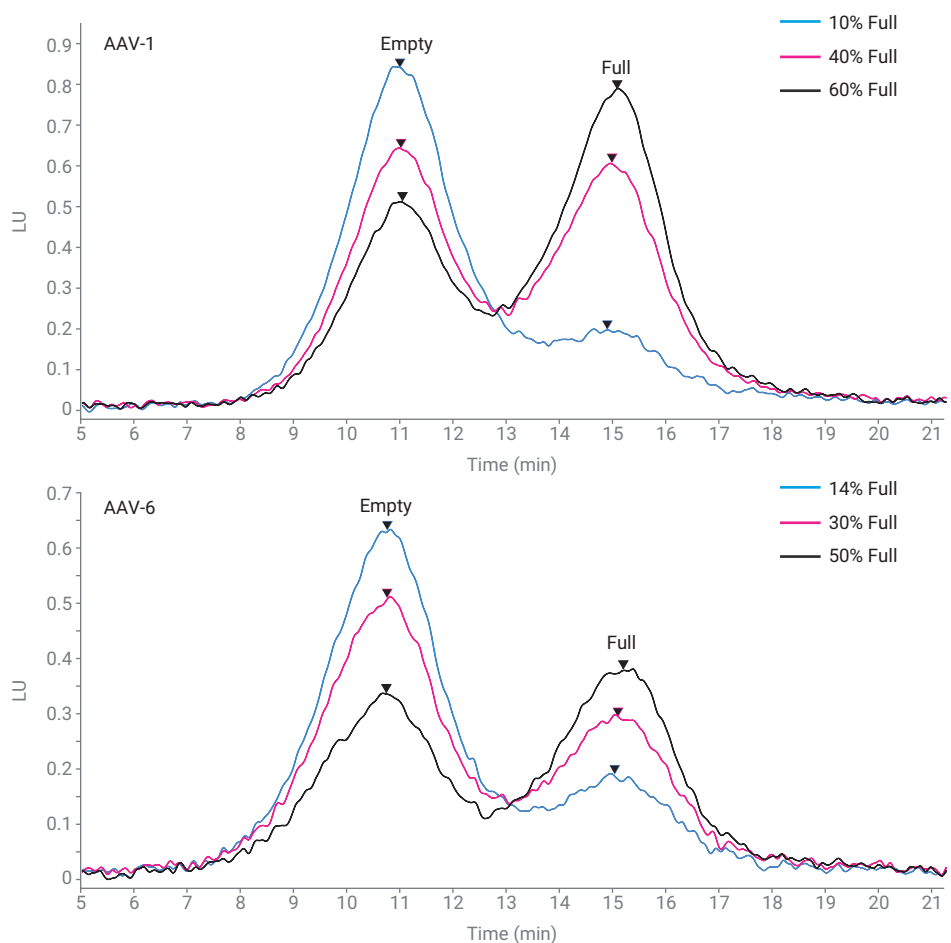


그림 3. 애질런트 binary 고속 펌프를 이용한 서로 다른 full/empty 캡시드 비율의 AAV-1 및 AAV-6 시료 분리.

이전에 입증되었듯이⁶, 상대 피크 높이는 상대 피크 면적에 비해 full/empty 캡시드 비율에 대한 더 정확하고 강력한 추정값을 제공하는 것으로 밝혀졌습니다.

이는 피크들이 어느 정도의 테일링을 가지고 있어서 완전히 분리되지 않았기 때문입니다. 그림 4는 상대 피크 높이 또는 피크 면적을 추정값으로 사용하여 AAV-1과 AAV-6

모두에 대한 직선성과 정확도의 차이를 보여줍니다. 상대 피크 높이의 직선 추세선은 원점에 가까웠고 R² 값이 더 높았습니다.

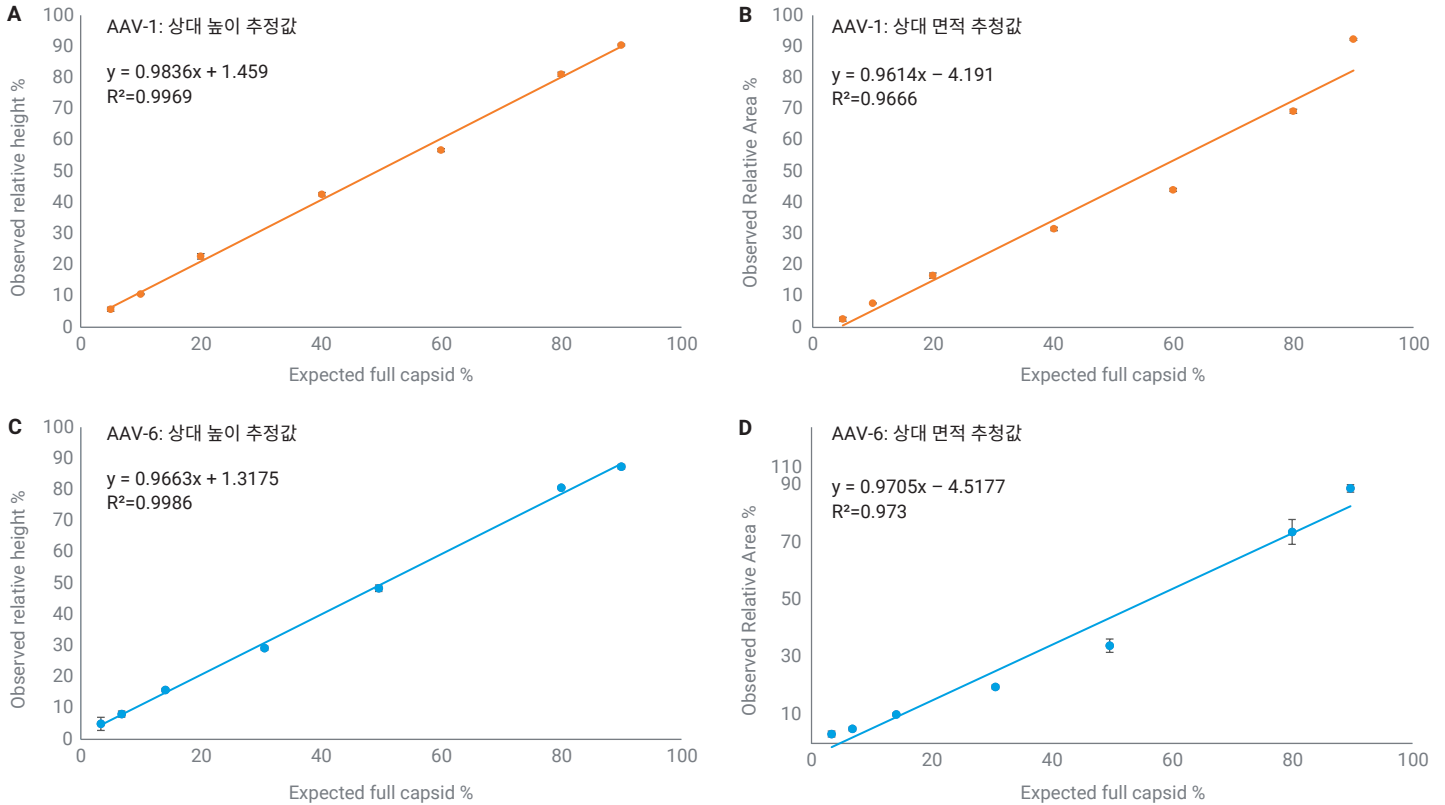


그림 4. Full/empty 캡시드 비율의 추정값으로서 상대 피크 높이와 상대 피크 면적의 비교. 상대 피크 높이(A 및 C)는 상대 피크 면적(B 및 D)에 비해 우수한 정확도와 직선성을 제공합니다.

그림 5는 이 분석법의 일중(interday) 반복성을 보여줍니다. 5~90%의 full 캡시드를 포함하는 시료의 경우 full/empty 캡시드 비율의 상대 표준 편차(RSD)는 AAV-1의 경우 $\leq 10.1\%$, AAV-6의 경우 $\leq 11.2\%$ 였습니다. 결과는 이 분석법이 광범위한 직선 범위를 가지고 있음을 보여줍니다. 허용 가능한 RSD가 15%

미만이라고 가정했을 때 두 혈청형 모두에 대한 최저 정량 한계는 $\leq 5\%$ full 캡시드였습니다. Full 캡시드 피크와 empty 캡시드 피크 모두에 대한 머무름 시간 또한 매우 재현성이 높았으며, RSD는 모든 테스트된 시료에 대해 두 혈청형 모두 $\leq 2.4\%$ 였습니다.

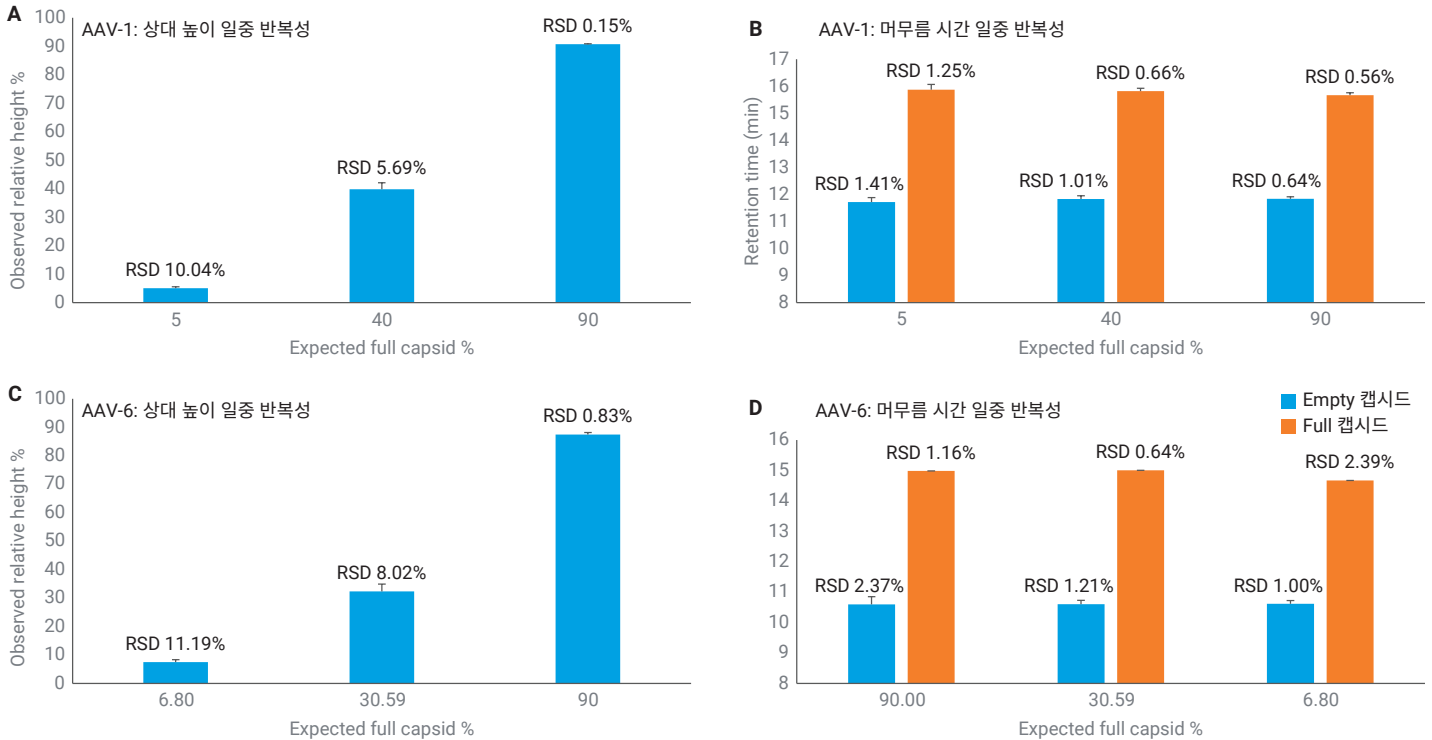


그림 5. 상대 높이 추정값 및 피크 머무름 시간의 일중 반복성.

결론

이 연구는 Agilent Bio SAX 강 음이온 교환 컬럼이 장착된 Agilent 1290 Infinity II Bio LC를 사용하여 AAV-1 및 AAV-6 혈청형에 대해 정확하고 재현 가능한 full/empty 캡시드 비율을 측정할 수 있음을 보여줍니다.

참고 문헌

1. Clark, K. R. *et al.* Highly Purified Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors are Biologically Active and Free of Detectable Helper and Wild-Type Viruses. *Hum. Gene Ther.* **1999**, 10, 1031-1039.
2. Gao, K. *et al.* Empty Virions in AAV8 Vector Preparations Reduce Transduction Efficiency and May Cause Total Viral Particle-Dose-Limiting Side Effects. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **2014**, 1, 9.
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. Wang, C. *et al.* Developing an Anion Exchange Chromatography Assay for Determining Empty and Full Capsid Contents in AAV6.2. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **2019**, 15, 257-263.
5. Trilisky, E. I.; Lenhoff, A. M. Flow-Dependent Entrapment of Large Bioparticles in Porous Process Media. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, 104, 127-133.
6. McCoy, R. W. *et al.* Results of a Cooperative Study Comparing the Precision of Peak Height and Area Measurements in Liquid Chromatography*. *J. Chromatogr. Sci.* **1984**, 22, 425-431.

www.agilent.com

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

DE10415602

© Agilent Technologies, Inc. 2022
2022년 2월 16일 한국에서 인쇄
5994-4589KO

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