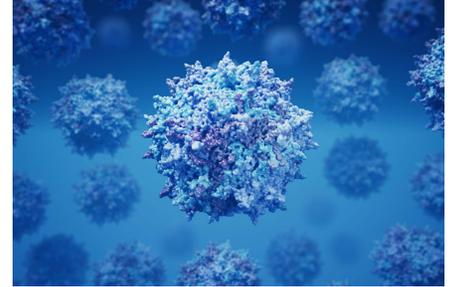


## 액체 크로마토그래피를 통한 바이오제약의 아데노 연관 바이러스 및 바이러스 유사 입자의 응집체 분석



**아데노 연관 바이러스(AAV)와 바이러스 유사 입자(VLP)는 백신, 세포 및 유전자 치료 분야에서 매우 높은 잠재력을 지닌 새로운 바이오치료제 분자입니다.**

AAV는 핵에 유전자 페이로드를 포함하거나 포함하지 않을 수 있는 비공유 자체 조립된 단백질 구조입니다. 신체의 다양한 기관 시스템을 자연적으로 표적으로 삼아 이를 세포 및 유전자 치료를 위한 천연 전달 벡터로 만드는 여러 종류의 AAV가 있습니다. AAV 혈청형은 AAV의 구형 쉘(shell)을 구성하는 단백질의 구조와 화학적 성질에서 차이가 있습니다. 그러나 그 크기는 직경이 20~25nm, 비어 있을 때는 약 3.7MDa, 올리고뉴클레오타이드 페이로드가 있을 때 약 5.1MDa로 좁게 정의됩니다.

VLP는 질병 예방을 위한 백신 역할을 할 수 있는 하나 이상의 개별 단백질로 구성된 대형 자체 조립된 구조입니다. VLP는 바이러스와 동일한 구조적 외관을 가지고 있지만 바이러스를 감염시킬 수 있는 유전자 물질과 복제 기구가 부족합니다. 따라서 감염을 일으키지 않고 면역 반응을 촉진할 수 있습니다.

다른 종류의 바이오치료제 분자와 마찬가지로 AAV 및 VLP는 전 세계 규제 기관에서 엄격한 검사를 진행하는 대상이기 때문에 바이오치료제 자체는 물론 제품 또는 공정 관련 불순물의 특성 규명이 필요합니다. 응집체는 일반적으로 주요 품질 속성 수준까지 이를 수 있는 제품 관련 불순물이므로 모니터링하고 신중하게 제어해야 합니다. AAV와 VLP 간의 구조적 유사성은 분석에 공통적 접근 방식을 이용할 수 있는 가능성을 제시합니다.

단일 클론 항체(mAb)나 아데노 연관 바이러스(AAV)와 달리, 다양한 유형의 VLP는 일반적으로 직경이 20~150nm 사이로 크기 범위가 더 넓습니다. 이러한 다양성은 보편적인 분석법이 종종 비실용적이고 보완적인 기술의 사용이 더 중요하다는 것을 의미합니다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 오랫동안 단백질 응집을 모니터링하는 가장 적합한 표준이었으며 AAV의 응집체 분석을 위한 일반적인 접근 방식으로 자리 잡았습니다. VLP 크기의 다양성에도 불구하고 SEC는 분석용 초원심분리(AUC), 전자 현미경(EM) 또는 장-흐름 분획법(FFF)과 같은 직교 기술과 함께 VLP의 응집체 분석에서 여전히 중요한 역할을 합니다.

## 응집체 분석 문제 극복

VLP의 응집체 분석에서 첫번째 난제는 VLP 모노머의 공극 크기에 따라 가장 적절한 기본 기술을 선택하는 것입니다. (여기서 "모노머"는 조립된 VLP의 개별 단백질 구성 요소가 아니라 응집되지 않은 단일 VLP 조립체를 의미합니다.) 현재 기존 SEC 컬럼에서 사용할 수 있는 가장 큰 공극 크기는 2000Å입니다. SEC에 대한 경험에 비춰 보면 공극 크기는 해당 분석물질 직경의 약 3배여야 합니다. 예를 들어, 2000Å 공극은 약 670Å(또는 67nm)의 분석물질에 적합합니다. 그러나 실제로는 많은 사용자들이 SEC가 크게 제한될 수 있는 임계값으로 100nm(1000Å)를 사용합니다. 더 작은 VLP와 AAV는 SEC에 적합한 크기 범위 내에 충분히 들어오지만 VLP의 일부는 여전히 다른 기술을 사용한 분석에 더 적합합니다. AUC나 EM에 비해 SEC는 빠르고 경제적이므로 가능한 경우에 여전히 선호되는 접근 방식입니다.

AAV 또는 VLP에 대한 SEC의 경우에 가장 큰 두 가지 난제는 부피와 농도 모두에서 시료의 희소성과 관련된 분리능과 감도입니다. Agilent Bio SEC-5 컬럼 라인은 모든 상황에 적합한 공극 크기 및 컬럼 규격 옵션과 함께 높은 분리능과 우수한 시료 회수율을 가능하게 하는 고정상을 통해 이러한 문제를 해결합니다.

## 올바른 SEC 컬럼 선택

분리 목표를 달성하고 시료 제약 조건을 완화하는 데 도움이 되는 SEC 컬럼 규격을 선택하세요. 컬럼 규격을 선택할 때는 다음을 고려하세요.

- 300mm와 같은 긴 컬럼은 높은 분리능을 제공합니다.
- 높은 처리량이 더 중요한 경우, 분리능이 허용된다면 더 짧은 150mm 컬럼이 권장됩니다.
- 7.8mm는 오랫동안 SEC에 전형적으로 사용된 내경이었지만 4.6mm와 같은 더 좁은 컬럼 직경에는 주입량이 덜 필요하므로 시료량이 제한될 수 있는 AAV 및 VLP에 이상적입니다.

새로운 종류의 바이오치료제에 가장 적합한 공극 크기를 예측하는 일은 어려울 수 있습니다. 용액 내 구조가 생물학적 SEC 및 GPC의 기존 표적과 다르기 때문입니다. 공극 크기는 배제 한계와 총 투과 지점을 정의하기 위해 분자량과 상관관계가 있는 경우가 많습니다. 그러나 최적의 공극 크기를 결정하는 것은 궁극적으로 분석물질의 유체역학적 반경입니다. 분자량 상관관계는 분석물질이 이 상관관계를 확립하는 데 사용된 표준물질과 유사한 용액 내 구조를 가질 때 합리적 수준에서 잘 작동합니다. 지금까지 이러한 표준물질은 생물학적 SEC를 위한 구상 단백질이거나 GPC를 위한 상대 선형 폴리머였습니다. AAV 및 VLP는 구상 단백질 및 선형 폴리머와 구조가 다르며 VLP 유형에 따라 크게 다를 수 있습니다. 따라서 분자량 상관관계는 신뢰성이 떨어지며 추가 정보도 고려해야 합니다. 공극 크기를 선택할 때는 다음을 고려하세요.

- 분자량에 따른 권장 공극 크기는 표 1에 나와 있습니다.
- 경험에 비춰 보면 분석물질 직경의 3배인 공극 크기를 사용하는 것이 좋습니다. 이는 대략적인 시료 크기가 이미 알려진 경우에 유용한 지침입니다.
- 유사한 분자에 대해 보고된 사례도 참조할 만한 또 다른 지표입니다.

컬럼	배제 한계	총 포함 지점	표적 분석물질
Bio SEC-5, 5µm, 500Å	5MDa	5kDa	AAV, 소형 VLP
Bio SEC-5, 5µm, 1000Å	7.5MDa	50kDa	AAV, VLP, 대형 올리고
Bio SEC-5, 5µm, 2000Å	>10MDa	150kDa	VLP, 대형 올리고

표 1. Agilent Bio SEC-5 컬럼의 분자량 범위.

크기가 좁게 정의된 AAV는 공극 크기를 선택할 때 어려움을 제기합니다(그림 1). AAV는 각각 유전자 페이로드가 있거나 없는 약 5.1 또는 3.8MDa의 분자량을 갖습니다. 표 1은 500Å 또는 1000Å Bio SEC-5 컬럼이 가장 적합함을 나타냅니다. AAV는 직경이 20~25nm이므로 경험에 비취 보면 600~750Å의 공극이 가장 좋습니다. 그러나 실제로 과학자들은 AAV에 여러 공급업체의 450~1000Å SEC 컬럼을 사용한다고 보고했습니다. 공극이 너무 작을 때는 응집 상태가 불완전하게 분석될 위험이

있고, 너무 큰 공극을 사용하면 모노머와 이합체 또는 모노머와 조각이 적절하게 분해되지 않을 수 있습니다. 실증적 연구를 통해 애질런트는 AAV의 응집체 분석에 1000Å Bio SEC-5 컬럼을 권장합니다. AAV 응집체 분석을 위한 대표적인 크로마토그램과 분석법 조건이 각각 그림 2와 표 2에 나와 있습니다. 자세한 내용은 애질런트 응용 개요 [5994-4270KO](#)에서 확인할 수 있습니다.<sup>1</sup>

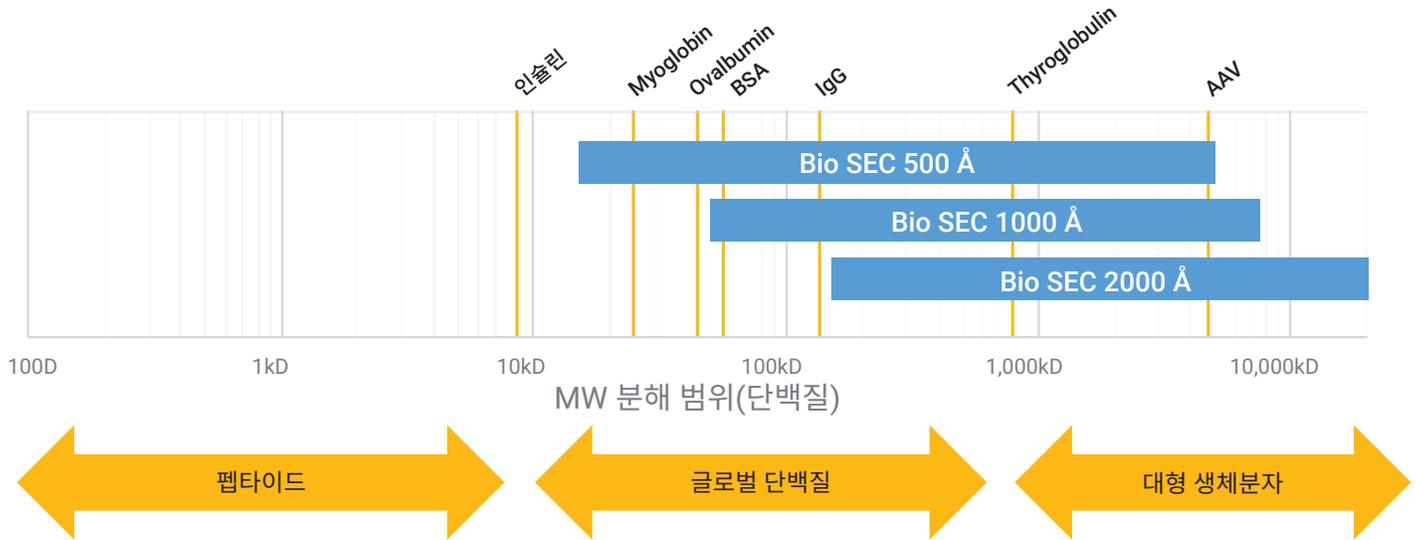


그림 1. 단백질 분자량을 기준으로 SEC 공극 크기 선택.

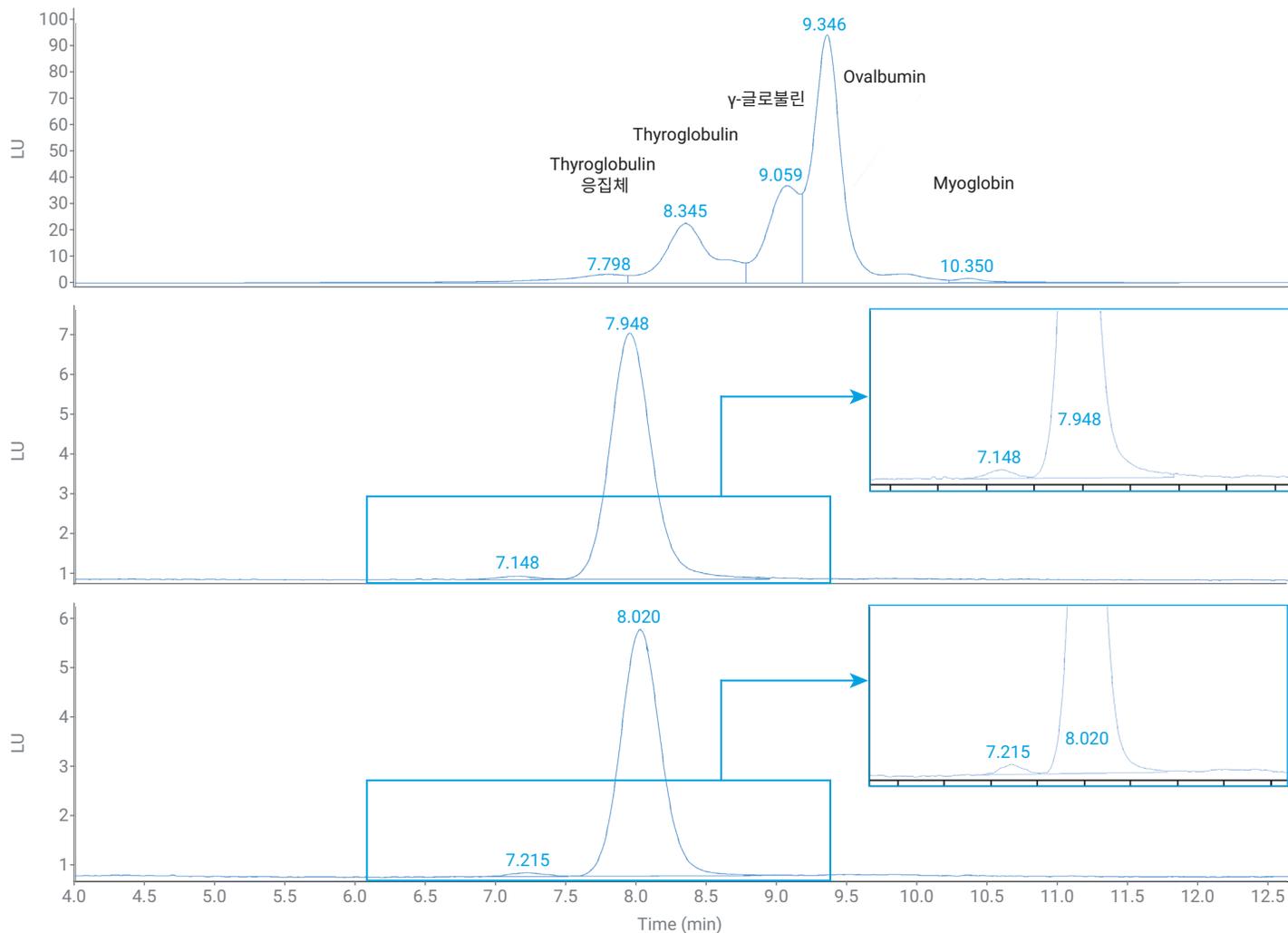


그림 2. Agilent Bio SEC-5 1000Å 컬럼을 사용하는 Agilent AdvanceBio SEC 300Å 표준 컬럼을 사용한 AAV-9 및 AAV-2의 SEC 크로마토그램.

파라미터	값
컬럼	Agilent Bio SEC-5 1000Å, 4.6 x 300mm
유속	0.4mL/분
이동상	50mM 인산염 완충액 + 400mM NaCl, pH 7.4
컬럼 온도	실온
시료량	20μL
형광 검출	$\lambda_{ex} = 280, \lambda_{em} = 340nm$

표 2. AAV 응집체와 조각을 분리하기 위해 Agilent Bio SEC-5 컬럼을 사용한 시료 SEC 분석법 조건.

때로 최적의 공극 크기는 경험적 평가를 통해 가장 잘 결정할 수 있습니다.<sup>2</sup> 예를 들어, 그림 3은 1000 및 2000Å Bio SEC-5 컬럼을 사용한 VLP의 SEC 크로마토그램을 보여줍니다(SEC 조건은 표 3에 표시됨). 이 연구에서 VLP는 약 40nm인 것으로 보고되었습니다. 경험에 비춰 보면 적절한 공극 크기는 120nm 또는 1200Å입니다. 1000Å 및 2000Å Bio SEC-5 컬럼을 모두 평가한 결과, 이 경우에는 2000Å이 더 나은 분리능을 제공하는 것으로 확인되었습니다. 자세한 내용은 애질런트 응용 개요 5994-4227KO를 참조하세요.<sup>2</sup>

### 최적의 SEC 수행방법

다음 목록은 몇 가지 최적의 SEC 수행방법으로 구성됩니다.

- 새로운 이동상 완충액을 준비하고 0.2 또는 0.45µm 필터를 통해 필터링하여 미립자를 제거하고 컬럼이나 LC 시스템을 손상시킬 수 있는 미생물 성장 위험을 줄입니다.
- 유속 램프 속도를 기본값에서 1mL/분<sup>2</sup> 이하로 낮춥니다. 유속의 점진적인 증가는 컬럼 수명을 연장합니다. 애질런트 소프트웨어에서 이러한 설정은 LC 펌프 제어의 고급 섹션에서 확인할 수 있습니다.
- LC 분석법의 최대 압력 한계를 컬럼과 일치하도록 설정합니다 (Bio SEC-5 컬럼의 경우 240bar). 이는 LC 최대 압력이 컬럼의 압력을 초과하는 모든 경우에 있어 중요합니다.
- 적절한 SEC 표준물질을 사용하여 정기적으로 시스템 성능을 확인합니다.
- 가능하면 시료 주입량을 최소화하여 크로마토그래피 분리능을 최대화합니다. 5~10µL의 시료 주입량이 권장되며, 최대 주입량은 컬럼 부피의 1%가 적당합니다.
- 세척이 필요한 경우, 컬럼에 완충액 염이 침전되는 것을 방지하기 위해 최소 20배 컬럼 부피의 세척액으로 플러싱하기 전후에 최소 5배 컬럼 부피의 초순수로 헹굽니다. 자세한 내용은 Bio SEC-5 컬럼 사용자 가이드<sup>3</sup>를 참조하세요.

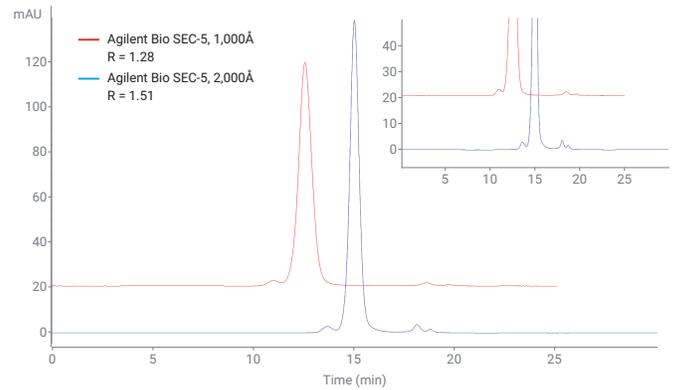


그림 3. 1000 및 2000Å Agilent Bio SEC-5 컬럼을 사용한 VLP의 SEC 크로마토그램. 2000Å 컬럼은 모노머와 응집체 사이의 더 나은 분리능을 제공했습니다.

파라미터	값
컬럼	Agilent Bio SEC-5, 7.8 × 300mm, 5µm, 2000Å (품번 5190-2541)
Agilent Bio SEC-5, 7.8 × 300mm, 5µm, 1000Å (품번 5190-2536)	0.4mL/분
유속	0.6mL/분
이동상	50mM 인산염 완충액(pH 7.4) 및 400mM 염화나트륨
컬럼 온도	실온
시료량	5µL
검출 파장	220nm
분석 시간	30분
HPLC 시스템	Quaternary 펌프가 장착된 Agilent 1260 Infinity II LC 시스템

표 3. 약 40nm VLP에 대한 시료 SEC 분석법 조건.

### 참고 문헌

1. Liao, B.; Blackwell, A., and Turner, M.L. Agilent Bio SEC-5에 의한 아데노 연관 바이러스(AAV) 벡터 응집체 및 조각의 분리능, *Agilent Technologies 응용 개요*, 발행 번호 5994-4270KO, 2021
2. Mi, J. 바이러스 유사 입자(VLP) 분석을 위한 Agilent Bio SEC-5, *Agilent Technologies 응용 개요*, 발행 번호 5994-4227KO, 2021
3. Agilent Bio SEC-5 Columns, *Agilent Technologies data sheet*, publication number 5973-1743, 2021

## 간편한 선택 및 주문 정보

다음 표에 나열된 품목을 주문하려면 헤더의 MyList 링크를 클릭하여 즐겨찾기 목록에 품목을 추가하세요. 향후 주문에 사용할 수 있도록 목록은 내 즐겨찾기에 저장되어 있습니다. 즐겨찾기를 처음 사용하는 경우 계정 확인을 위해 이메일 주소를 입력하라는 메시지가 표시됩니다. 애질런트 계정이 있다면 바로 로그인할 수 있으며, 등록된 애질런트 계정이 없다면 계정을 등록하여 주세요. 이 기능은 전자상거래가 가능한 지역에서만 유효합니다.

품목 번호 링크를 클릭하여 애질런트 온라인 스토어에서, 또는 일반 판매 및 대리점 채널을 통해 개별 품목을 주문할 수도 있습니다.

## MyList 1: Agilent Bio SEC-5 컬럼

설명	제품 번호
<b>500Å 컬럼</b>	
Bio SEC-5, 5µm, 500Å, 4.6 x 300mm	5190-2533
Bio SEC-5, 5µm, 500Å, 4.6 x 150mm	5190-2534
Bio SEC-5, 5µm, 500Å, 4.6 x 50mm, guard	5190-6860
Bio SEC-5, 5µm, 500Å, 7.8 x 300mm	5190-2531
Bio SEC-5, 5µm, 500Å, 7.8 x 150mm	5190-2532
Bio SEC-5, 5µm, 500Å, 7.8 x 50mm, guard	5190-2535
<b>1000Å 컬럼</b>	
Bio SEC-5, 5µm, 1000Å, 4.6 x 300mm	5190-2538
Bio SEC-5, 5µm, 1000Å, 4.6 x 150mm	5190-2539
Bio SEC-5, 5µm, 1000Å, 4.6 x 50mm, guard	5190-6861
Bio SEC-5, 5µm, 1000Å, 7.8 x 300mm	5190-2536
Bio SEC-5, 5µm, 1000Å, 7.8 x 150mm	5190-2537
Bio SEC-5, 5µm, 1000Å, 7.8 x 50mm, guard	5190-2540
<b>2000Å 컬럼</b>	
Agilent Bio SEC-5, 5µm, 2000Å, 4.6 x 300mm	5190-2543
Agilent Bio SEC-5, 5µm, 2000Å, 4.6 x 150mm	5190-2544
Agilent Bio SEC-5, 5µm, 2000Å, 4.6 x 50mm, guard	5190-6862
Agilent Bio SEC-5, 5µm, 2000Å, 7.8 x 300mm	5190-2541
Agilent Bio SEC-5, 5µm, 2000Å, 7.8 x 150mm	5190-2542
Agilent Bio SEC-5, 5µm, 2000Å, 7.8 x 50mm, guard	5190-2545

## MyList 2: 공급품 및 시료 용기

설명	제품 번호
<b>커넥터 및 튜브</b>	
Mounting tool for quick turn fittings	5043-0915
InfinityLab Quick Connect LC fitting	5067-5965
Quick Connect Capillary MP35N 0.12 x 105mm. for use with Quick Connect Fitting	5500-1578
Quick Turn Capillary MP35N 0.12 x 280mm	5500-1596
<b>인라인 필터</b>	
InfinityLab Quick Change inline filter assembly, for UHPLC*	5067-1603
InfinityLab Quick Change filter disc, 2.1mm id, 0.2µm pore size, 5/pk	5067-1610
<b>시료 용기</b>	
High recovery vial, screw top, with fixed insert, clear, 300µL insert volume, Vial size: 12 x 32mm (12mm cap), 100/pk.	5188-6591
Cap, screw, blue, PTFE/red silicone septa, 100/pk. Cap size: 12mm	5182-0717
Vial, crimp/snap top, polypropylene, 250µL, 1,000/pk. Vial size: 12 x 32mm (11mm cap)*	5190-3155
Cap, snap, clear, PTFE/silicone/PTFE septa, 100/pk. Cap size: 11mm, (for 5190-3155)	5182-0566
InfinityLab Well-plate 96/0.5mL, 30/pk	5043-9310
InfinityLab Well-plate closing mat, 50/pk	5042-1389

## MyList 3: 표준물질, 용매 및 용매 공급품

설명	제품 번호
<b>표준물질 및 용매</b>	
300Å AdvanceBio SEC calibration standard	5190-9417
Agilent NIST mAb, 25µL	5191-5744
Agilent NIST mAb, 4 x 25µL	5191-5745
InfinityLab Ultrapure LC/MS Water, 1L	5191-4498
InfinityLab Water for LC/MS, 6 x 1L*	5191-5121
<b>용매 여과 공급품</b>	
InfinityLab Solvent filtration assembly	5191-6776
InfinityLab solvent filtration flask, glass, 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 (Charcoal filter 5043-1193 not included)	5043-1221
InfinityLab charcoal filter with time strip, 58g (use with 5043-1221)	5043-1193

\*일부 국가에서만 사용 가능.

‡이 표에 나열된 것 이외의 용매를 사용하는 경우.

추가 정보:

<https://explore.agilent.com/advancebio-aav-kr>

국가별 애질런트 고객 센터 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)

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

DE03781718

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2023  
2023년 10월 15일 한국에서 발행  
5994-6785KO

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)

