

LC/MS によるバイオ医薬品中の アデノ随伴ウイルスの同定



アデノ随伴ウイルス（AAV）はそれぞれ固有の重要品質特性を有していますが、確立されたタンパク質ベースの医薬品のモニタリングに用いられる従来のアッセイの多くは、AAV にも使用できません。AAV カプシドは、3 種類のタンパク質、VP1、VP2、VP3 を約 1:1:10 の化学量論比で含み、カプシドあたり約 60 コピーのタンパク質で構成されています。¹これら 3 種類のタンパク質は、すべてが同じ遺伝子からスプライシングされており、高い配列相同性のために、クロマトグラフィーによる分離が困難です。カプシドタンパク質 3 種の比率の評価には、従来、SDS-PAGE ゲル銀染色、または ELISA やイムノブロットリングなどの抗体ベースメソッドが用いられてきました。しかし、これらの手法は煩雑でエラーが発生しやすく、AAV のタイプごとに固有の新しい抗体を生成しなければならない場合があります。AAV 血清型間の相同性の高さを考えると、識別に必要な特異性を持つ抗体を生成することは、困難となる可能性があります。液体クロマトグラフィー/質量分析法（LC/MS）は、より優れた速度、特異性、精度により、これらの課題を克服できます。アジレントが提供するワークフローソリューションは、インタクトタンパク質とペプチドマッピングの両方に対応しており、翻訳後修飾（PTM）の同定と部位決定が可能です。

米国食品製品局（FDA）は、特に複数の血清型変異体や組み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 製品を明確に同定するよう求めています。²ペプチドマッピングは、タンパク質配列の解読や PTM の同定において重要なメソッドです。そのため、ICH や米国 FDA などの規制機関が、より確立された生物製剤に対して義務づけています。AAV を用いた遺伝子治療をめぐる規制は、まだ施行されつつあるという段階ですが、今後はペプチドマッピングが必須になる可能性があります。この資料は、具体的な分析種（AAV）の測定方法と必要な消耗品を紹介した資料です。本文に記載がある各消耗品は、文末のリストを参照してください。

従来の LC/MS 分析で、インタクトカプシドタンパク質の同定と相対アバ
ンダンスを確認する場合、クロマトグラフィー分離能の低さが問題となっ
ていました。共溶出するタンパク質のために精密質量測定が難しく、一部
の AAV カプシドタンパク質の類似性（例えば AAV1 と AAV6 の違いは
6 つのアミノ酸³）が原因で、同定確認には精密な測定が不可欠です。

インタクトタンパク質分析に伴うこのような課題には、Agilent ZORBAX
RRHD ワイドポアカラムで対処できます。優れたクロマトグラフィー分離
を通じて、質量分析（MS）検出による精密質量測定を実現します。

- サブ 2 μm 粒子サイズが高分離能を実現
- ワイドポアによる優れた質量移動で効率的な分離が可能
- 120 MPa 圧力耐性で高効率の UHPLC メソッドを実現
- ジフェニル結合相が困難な分離において特異的な選択性を提供

Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラムは、タンパク質同定およ
び翻訳後修飾の特定に役立つ高分離能のペプチドマップが得られるよう
に設計されています。

- 表面多孔性粒子により、適度な背圧で高分離能分離が可能
- ギ酸移動相の優れたピークキャパシティが、TFA 含有移動相で MS
感度を向上

効率的な AAV 分析のベストプラクティス

サンプル前処理

- 多くの遺伝子組み換えタンパク質は、非揮発性バッファで調合されま
す。非揮発性バッファは塩濃度が比較的高く、ポロクサマーなどの安
定化添加剤が含まれているため、MS 検出が妨げられ、機器がすぐ
に汚染されます。LC/MS 分析前にサンプルのバッファ交換を行うこ
とで、スペクトル品質を大幅に改善し、MS メンテナンスの間隔を長く
することができます。バッファ交換によってサンプルが不安定になる可
能性があるため、バッファ交換の直後にサンプルの分析を計画する必
要がある点に注意してください。
- 少量サンプルには高回収率バイアルが推奨されます。

クロマトグラフィーによる分離

- 流量の増加をデフォルトから 1 mL/min² 以下に下げます。流量を
徐々に増やすとカラム寿命が延び、急激な過圧を防ぐことができます。
この設定は、アジレントの MassHunter ソフトウェアの場合、LC ポ
ンプ制御の [Advanced]（詳細設定）セクションにあります。
- LC メソッドの圧力上限をカラムの圧力上限に合わせます
(AdvanceBio ペプチドマッピングの場合は 60 MPa、ZORBAX
RRHD カラムの場合は 120 MPa)。これは、LC の最大圧力機能が
カラムの最大圧力機能より大きい場合に重要です。
- システムのデッドボリュームを最小限にして、分離能を最大化します。
デッドボリュームを最小化するには、[超低拡散チューブ⁴](#)を取り付けた
Agilent 1290 Infinity II など、低デッドボリュームのシステムが推奨
されます。

質量分析

- 目的のリテンションタイム外で LC ストリームを廃液側に分岐させま
す。これは特に、メソッドの最後の高有機洗浄中や、可能な場合はボ
イドボリュームが溶出している間に推奨されます。
- HPLC グレード以上の溶媒を使用します。
- MS イオン源の定期的なクリーニング手順を確立します。

概要 – インタクトカプシドタンパク質

インタクトカプシドタンパク質の分析については、アプリケーションノート 5994-2434JAJP で詳しく説明しています⁵。同アプリケーションノートでは、VP1、VP2、VP3 カプシドタンパク質の分離において、ZORBAX RRHD シリーズの各種カラム充填剤を比較します。ワークフローを図 1 に示します。

カラムの選択基準 - インタクトカプシドタンパク質

逆相カラムを選択する際、特に AAV カプシドタンパク質用のカラムを選ぶ場合は、使用する検出メソッドと、サンプルに関する既知の情報の両方を検討してみることが有用です。AAV サンプルは多くの場合、他の遺伝子組み換えタンパク質サンプルよりも希薄です。感度と分離能に対処できるカラムを選択する必要があります。この 2 つのパラメータは、VP1、VP2、VP3 カプシドタンパク質の分離において、以前から課題となっています。

– **カラム径**：感度と MS 検出との互換性の両方の理由から、2.1 mm カラムが、内径の大きいカラムよりも推奨されます。2.1 mm カラムで使用される流量が効率的なエレクトロスプレーイオン化を促進し、それによって感度も向上します。

- **カラム長**：逆相カラムの場合、カラム長が長くなるほど分離能が向上します。そのため、100 または 150 mm のカラム長が推奨されます。
- **ポアサイズ**：インタクトタンパク質は、溶液内では比較的大きく、変性逆相条件下では特に大きくなります。固定相粒子の内外で質量移動を効率化するために、大きなポアが必要です。それにより分離能が向上します。300 Å ポアが推奨されます。
- **粒子サイズ**：粒子サイズが小さくなるほど分離能が向上するため、1.8 μm RRHD カラムが推奨されます。
- **固定相の化学的性質**：分析対象物を分離する際、固定相の選択がもう 1 つの変要素となります。インタクトタンパク質には、C4 や C8 など、より短いアルキル鎖の固定相が一般的ですが、VP1、VP2、VP3 には、やや意外な選択肢が有効であることが明らかになっています。複雑化を招くその他の要因としては、各 AAV 血清型の差異により、固定相の要件も異なってくるという点が挙げられます。ZORBAX RRHD SB300-C18 カラムは AAV2 と AAV7 に有効で、ZORBAX RRHD 300-Diphenyl カラムは、AAV9 を含むその他の複数の血清型で良好に機能しました。



図 1. インタクト AAV カプシドに含まれる個々のカプシドタンパク質の同定を確認して相対量を測定するプロセスの概要

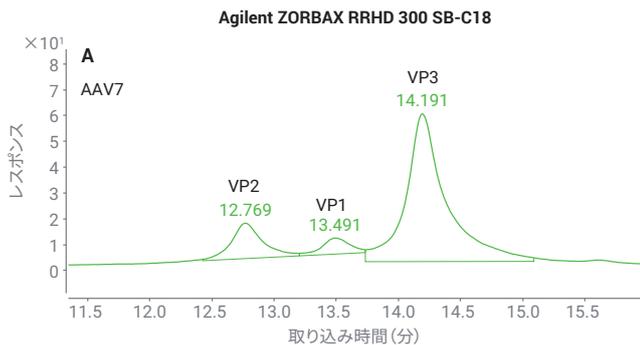


図 2. 表 1 に記載の条件を用いた Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18 での AAV7 の分離

パラメータ	設定値
カラム	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18、 2.1 x 100 mm、1.8 μm (部品番号 858750-902)
機器	Agilent 1290 Infinity II
流量	0.4 mL/min
移動相 A	0.1 % 酢酸 + 0.1 % TFA 水溶液
移動相 B	90 % イソプロパノール、9.8 % 水、0.1 % 酢酸 + 0.1 % TFA
グラジエント	時間 (分) %B
	0-5 28 %
	23 32.5 %
	23.5 80 %
	26 80 %
ポストタイム	3 分
カラム温度	80 °C

表 1. インタクトカプシドタンパク質の分析に用いる開始条件。詳細については、参考文献⁵ 5994-2434JAJP を参照してください。

概要 – ペプチドマッピング

AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを用いた AAV カプシドタンパク質のペプチドマッピング分析については、アプリケーションノート 5994-1980JAJP および 5994-2434JAJP で説明されています。



図 3. カプシドタンパク質の一次構造を確認して翻訳後修飾を同定するプロセスの概要

カラムの選択基準 – ペプチドマッピング

インタクトカプシドタンパク質の分析と同様に、サンプルに関する情報と検出メソッドが、カラム選択の指針となります。感度と分離能に関する同様の課題が、AAV 分解物のペプチドマッピング分離にも当てはまります。この場合、カプシドは、関連性が高い 3 つのタンパク質で構成されており、結果として得られるペプチドマッピング分離は、通常の遺伝子組み換えタンパク質分解よりもさらに複雑なものになります。

- **カラム径：**感度と MS 検出との互換性の両方の理由から、2.1 mm カラムが、内径の大きいカラムよりも推奨されます。2.1 mm カラムで使用される流量が効率的なエレクトロスプレーイオン化を促進し、それによって感度も向上します。
- **カラム長：**逆相カラムの場合、カラム長が長くなるほど分離能が向上します。150 mm 以上のカラム長が推奨されます。
- **粒子サイズと種類：**通常、粒子が小さいほど分離能が向上しますが、若干大きな表面多孔性粒子は、ほぼ同じ分離能で、背圧を大幅に低減することができます。2.7 μm の表面多孔性粒子が推奨されます。
- **固定相の化学的性質：**C18 固定相はペプチドマッピングに最もよく用いられていますが、C18 カラムには非常に多様な選択肢があります。ペプチドマッピングの場合、選択すべきカラムと移動相システムの組み合わせは、狭いピークと少ないテーリングによって、ピークキャパシティが最大になるものです。また、小さい親水性ペプチドのリテンションと、長い疎水性ペプチドの適度な溶出とのバランスをとる必要があります。

推奨の AdvanceBio ペプチドマッピングカラムは、これらの条件に適合します。

パラメータ	設定値	
カラム	Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング、 2.1 x 150 mm、2.7 μm (部品番号 653750-902)	
機器	Agilent 1290 Infinity II	
流量	0.4 mL/min	
移動相 A	0.1 % 酢酸水溶液	
移動相 B	0.1 % 酢酸 ACN	
グラジエント	時間 (分)	%B
	0-3	3 %
	50	35 %
	60	97 %
	62	97 %
	62.5	3 %
	65	3 %
ポストタイム	5 分	
カラム温度	60 °C	

表 2. ペプチドマッピングの開始条件。詳細は、[65994-1980JAJP](#) を参照してください。

参考文献

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. 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 ([5994-2434JAJP](#))
6. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF によるウイルスベクター粒子の特性解析 ([5994-1980JAJP](#))

標準品、カラム、消耗品などの情報

List 1 : インタクトタンパク質分析用 Agilent ZORBAX RRHD カラム

説明	部品番号
Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl, 2.1 x 150 mm, 1.8 µm, 300 Å	863750-944
Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl, 2.1 x 100 mm, 1.8 µm, 300 Å	858750-944
Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18, 2.1 x 150 mm, 1.8 µm, 300 Å	863750-902
Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18, 2.1 x 100 mm, 1.8 µm, 300 Å	858750-902

List 2 : ペプチドレベル分析用 AdvanceBio ペプチドマッピングカラム

説明	部品番号
AdvanceBio ペプチドマッピング, 2.1 x 150 mm, 2.7 µm	653750-902
AdvanceBio ペプチドマッピング, 2.1 x 250 mm, 2.7 µm	651750-902
AdvanceBio ペプチドマッピングガードカラム, 2.1 x 5 mm, 2.7 µm, 3 個	851725-911

List 3 : 標準溶液

説明	部品番号
Agilent NIST mAb, 25 µL	5191-5744
Agilent NIST mAb, 4 x 25 µL	5191-5745
10 ペプチド標準試料, 71 µg, 凍結乾燥済み	5190-0583
HSA ペプチド標準	G2455-85001

List 4 : 消耗品および溶媒

説明	部品番号
接続部品およびチューブ	
Agilent InfinityLab クイックコネクティングアセンブリ、固定 0.12 x 105 mm キャピラリー付き (カラム注入口接続用)	5067-5957
Agilent InfinityLab クイックターンフィッティング (カラム出口での接続用) ※別途クイックコネクティングが必要	5067-5966
クイックターンキャピラリー SST 0.12 x 280 (クイックターンフィッティング用)	5500-1191
クイックターンフィッティング用取り付けツール	5043-0915
インライン圧カリリーフバルブキット	
(蛍光フローセルの後に連続して他の検出器を使用する場合に使用)	G4212-68001
Agilent 1290 Infinity II 用超低拡散チューブキット	5067-5963
Agilent 1290 Infinity II Bio 用超低拡散チューブキット	5004-0007
サンプル容器	
高回収率バイアル、スクリュートップ、固定インサート付、透明、300 µL インサート容量、100 個バイアルサイズ：12 x 32 mm (12 mm キャップ)	5188-6591
キャップ、スクリュ、青、PTFE/赤シリコンセパタム、100 個 キャップサイズ：12 mm	5182-0717
バイアル、クリンプ/スナップトップ、ポリプロピレン、250 µL、1,000 個バイアルサイズ：12 x 32 mm (11 mm キャップ) *	5190-3155
キャップ、スナップ、透明、PTFE/シリコン/PTFEセパタム、100 個 キャップサイズ：11 mm (5190-3155 用)	5182-0566
InfinityLab 96 ウェルプレート、0.5 mL、30 個	5043-9310
InfinityLab 96 ウェルプレート、クロージングマット、50 個	5042-1389
溶媒および添加物	
InfinityLab Ultrapure LC/MS 純水、1 L	5191-4498
InfinityLab Ultrapure LC/MS アセトニトリル、1 L	5191-4496
ギ酸、5 mL	G2453-85060
溶媒ろ過	
InfinityLab 溶媒ろ過アセンブリ	5191-6776
InfinityLab 溶媒ろ過フラスコ、ガラス、2 L	5191-6781
メンブレンフィルタ、ナイロン 47 mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 個	5191-4341
メンブレンフィルタ、再生セルロース 47 mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 個	5191-4340
溶媒ボトルガラスフィルタ、溶媒インレット、20 µm	5041-2168
溶媒取り扱い	
InfinityLab セーフティキャップスターターキット	5043-1222
InfinityLab 溶媒ボトル、透明、1 L	9301-6524
InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1 L	9301-6526
溶媒ボトル、透明、2 L	9301-6342
溶媒ボトル、茶色、2 L	9301-6341
InfinityLab セーフティバーズボトル ※キャップ仕様：GL45	5043-1339
InfinityLab 廃液ボトル、GL45、6 L、セーフティキャップ付き	5043-1221
タイムストリップ付き InfinityLab チャコールフィルタ、58 g	5043-1193

*ポリプロピレンバイアルは化学耐性が高く、pH の影響を受けやすいサンプルに最適です。

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。

RA44707.6978009259

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, June 8, 2022

5994-4829JAJP

