

Agilent Bio SEC-5 によるアデノ随伴ウイルスベクター凝集体および断片の分離能

著者

Drs. Brian Liao,
Anne Blackwell, and
Matthew L. Turner
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、多くの実証済みの用途がある有望で新しいクラスの生物製剤です。¹ AAV は、一本鎖 DNA ゲノムをカプセル化するカプシドタンパク質の約 60 コピーからなる大きな分子複合体です。個々の AAV ビリオンは 5 MDa を超える場合があり¹、サイズは約 250 Å です。したがって AAV 凝集体は、ポアサイズが通常は 300 Å 以下の標準的なサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) カラムを使用して分離するのは困難です。これまでの知見から、SEC では目的の分子よりも少なくとも 3 倍大きいポアサイズを選択する必要があるとされているため、この場合のポアサイズは 750 Å 以上となります。

このアプリケーションノートでは、ポアサイズ 1,000 Å の Agilent Bio SEC-5 カラムで AAV 凝集体および断片を分離する際のクロマトグラフィー分離能について説明します。Bio SEC-5 カラムには、効率と安定性のために独自の親水性層でコーティングされた 5 μm のシリカ粒子が充填されているため、ウイルス粒子などの大きくて複雑な生体分子の分析に適しています。

メソッド

血清型 2 型および 9 型の AAV サンプルは Vigene Biosciences から購入しました。ELISA で測定した粒子濃度はそれぞれ 1.27×10^{12} および 1.76×10^{12} VP/mL でした。Agilent AdvanceBio SEC 300 Å タンパク質標準 (部品番号 5190-9417) を、各 AAV 血清型の相対質量のキャリブレーションと確認に使用しました。

サイズ排除クロマトグラフィーは、バイナリポンプおよび、Ex = 280 nm、Em = 340 nm に設定した Agilent 1260 Infinity II 蛍光検出器を搭載した Agilent 1290 Infinity II Bio LC で実施しました。移動相の構成は、50 mM リン酸緩衝液 + 400 mM NaCl、pH 7.4 でした。Agilent Bio SEC-5 カラム (4.6 × 300 mm, 5 μm, 1000 Å) を選択し、流量は 0.4 mL/分で一定としました。

分析の前に、15 μL のストレスを受けていない AAV-2 または AAV-9 を 100 mM リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4 で最終容量 65 μL に希釈しました。その後、20 μL の測定を 3 回行いました。

既報の文献によると、AAV の凝集は主に静電相互作用によって引き起こされ、低いイオン強度と残留 DNA の存在によって促進されることが示されています。²0.5 mL Eppendorf Protein LoBind チューブで 15 μL の AAV-9 を脱イオン水で最終容量 65 μL に希釈することにより、凝集を起こしました。次に、2 マイクロリットルの PCR 増幅 dsDNA (長さ = 3,800 nt、濃度 = 0.2 μg/μL) を加え、サンプルを 37 °C で一晩インキュベートしました。翌日、20 μL を 3 回測定しました。

結果

サイログロブリン単量体の流体力学的半径の報告値³ (85.8 Å) に基づくと、AAV ビリオンはサイログロブリン単量体とその凝集体の間で溶出することが予想されましたが、実際にそのとおりに観察されました (図 1)。

ストレスを受けていない AAV-2 と AAV-9 の純度は、それぞれ 98.7 % と 98.8 % で、それぞれ 1.2 ~ 1.3 % の凝集体を含んでいました。

対照的に、ストレスを受けた AAV-9 は、広範な凝集体の形成とかなりのレベルの分解が認められました。ストレスを受けた AAV-9 の純度は 83.6 % で、7.5 % の凝集体と 8.8 % の断片を含んでいました。特に、ストレスを受けたサンプルの総ピーク面積は、ストレスを受けていないサンプルの約 60 % にすぎず、この結果はおそらく不溶性の凝集体の形成を示すものと考えられます (図 2)。

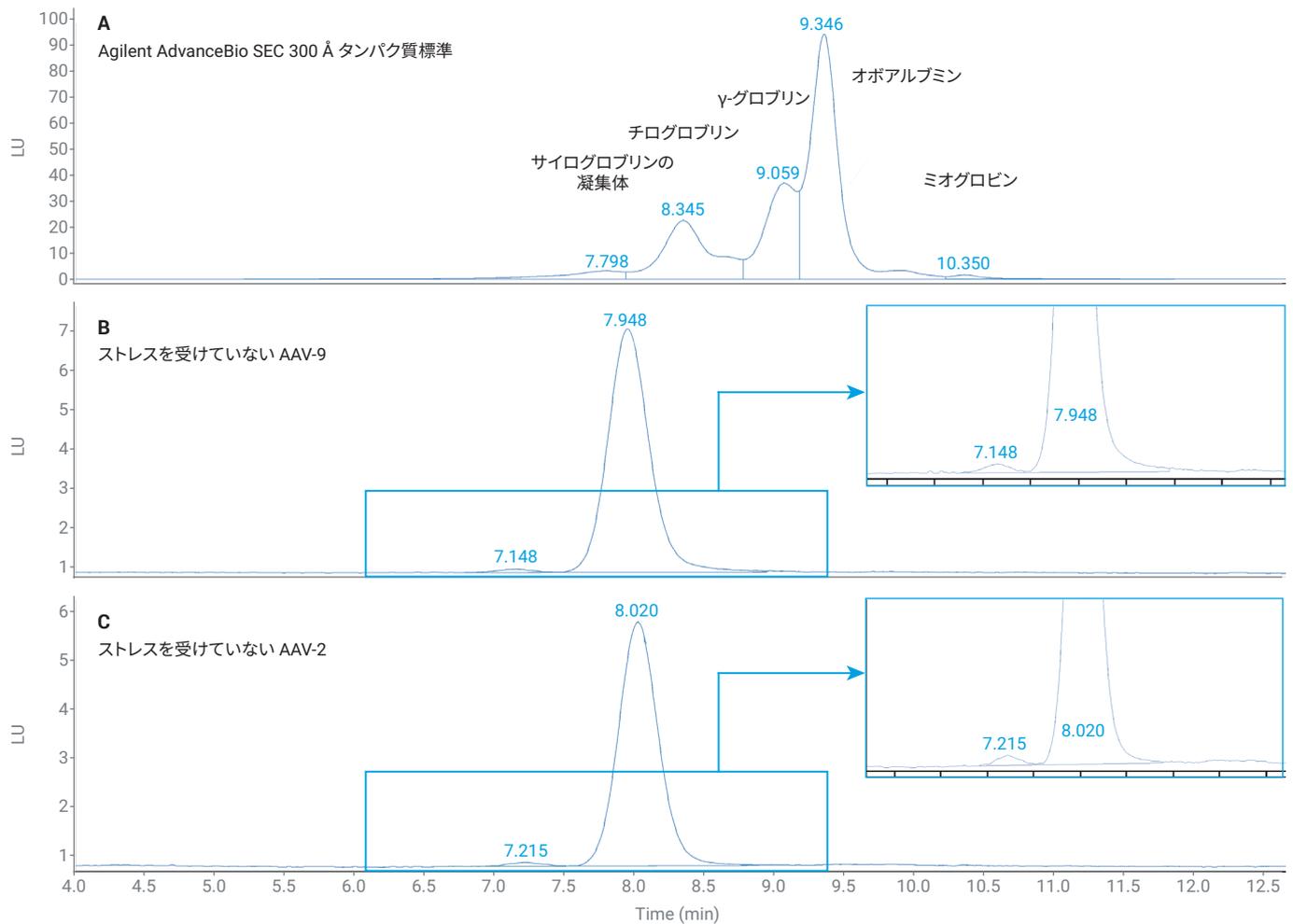


図 1. Agilent AdvanceBio SEC 300 Å タンパク質標準とストレスのない AAV-9 および AAV-2 の蛍光クロマトグラム。タンパク質標準にはインスリンも含まれていることに注意してください。インスリンにはトリプトファン アミノ酸が含まれていないため表示されていません。したがって、選択した励起および発光設定では非蛍光です。

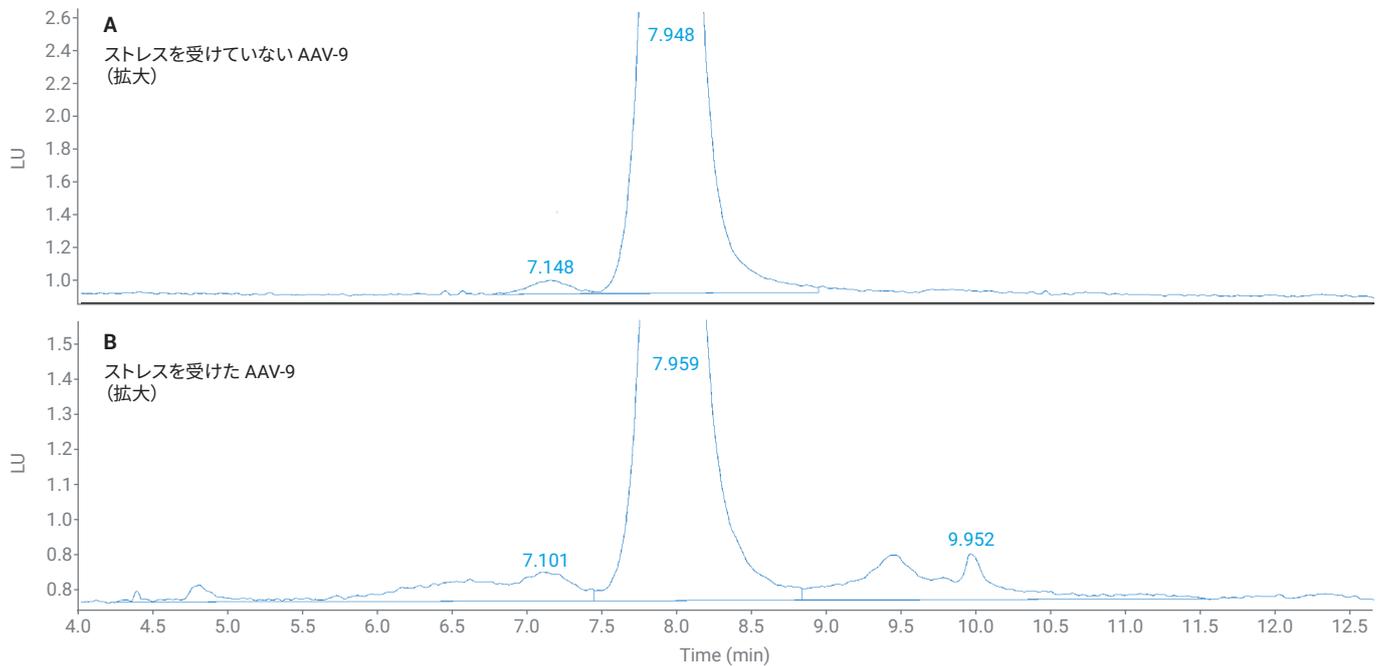


図 2. ストレスを受けていない AAV-9 とストレスを受けた AAV-9 の蛍光クロマトグラム

結論

Agilent Bio SEC-5 カラムにはポアサイズが 1,000 Å の粒子が含まれているため、AAV の凝集および断片の分析に適しています。これは、AAV の精製およびその後の製剤安定性試験に不可欠です。バルク動的光散乱法や分析用超遠心分離法などの直交型のメソッドを用いれば、ストレス条件下では必ず形成される大きな不溶性凝集体を効果的に取り扱うことができます。

参考文献

1. Pierson, E. E. *et al.* Resolving Adeno-Associated Viral Particle Diversity with Charge Detection Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry* **2016**.
2. Wright, J. F. *et al.* Identification of Factors That Contribute to Recombinant AAV2 Particle Aggregation and Methods to Prevent Its Occurrence During Vector Purification and Formulation. *Molecular Therapy* **2005**.
3. Nobuo, Ui. Electrophoretic Mobility and Isoelectric Point of Hog Thyroglobulin. *BBA* **1972**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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おりません。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。

DE44481.5262962963

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2021

Printed in Japan, October 27, 2021

5994-4270JAJP