

## バイオイナート液体クロマトグラフによる アデノ随伴ウイルス 1 型および 6 型の 血清型の完全/空のカプシド比の分析

Agilent Bio SAX 強アニオン交換カラム付の Agilent 1290  
Infinity II Bio LC が実現する優れた直線性と再現性

### 著者

Brian Liou  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

イオン交換クロマトグラフィーは、アデノ随伴ウイルス（AAV）の精製とその品質特性の分析において非常に有用なツールです。この実験では、Agilent Bio SAX 強アニオン交換カラムを搭載した Agilent 1290 Infinity II Bio LC を使用して、AAV-1 および AAV-6 サンプルの完全/空のカプシド比の測定について実証します。このメソッドは優れた直線性と再現性を示しており、Agilent 1290 Infinity II Bio LC が、業界をリードする性能を備えた高度な液体クロマトグラフィーシステムであることが立証されました。

## はじめに

遺伝子組み換え型 AAV の製造時、大部分のウイルスカプシドには遺伝子ペイロードが含まれていないため、「空」のカプシドと呼ばれています。<sup>1</sup>空のカプシドは AAV 前処理の遺伝子形質導入の効能を低下させるため<sup>2</sup>、規制機関は特性解析が必要な工程内不純物であると考えています。<sup>3</sup>

この実験では、Agilent Bio SAX カラムと Agilent 1290 Infinity II Bio LC を使用して、精製した AAV-1 および AAV-6 サンプルの完全/空のカプシド比を測定しました。Agilent 1290 Infinity II Bio LC には、パイオイナートな流路が備えられています。Agilent 非多孔質ポリスチレン/ジビニルベンゼン (PS/DVB) Bio SAX 強アニオン交換 PEEK カラムと LC を組み合わせて、不要な表面相互作用を最小限に抑えることにより、生体分子の完全性を確保し、高分子アプリケーション向けに最適化します。

## 実験方法

AAV 参照標準は、完全および空を多く含むサンプルとして Vigene Biosciences から購入しました。化学物質はすべて、特に記載がない限り、Sigma-Aldrich から購入しました。

### 装置構成

この実験では、Agilent 1290 Infinity II Bio LC を 2 つの構成で使用しました (図 1)。LC に、クォータナリフレキシブルポンプまたはハイスピードポンプを搭載しました。フレキシブルポンプは一度に 4 本の溶媒ラインに対応することができ、メソッド開発時に前処理する必要のある移動相の数を削減します。ハイスピードポンプは最高のミキシング効率と最小のディレイボリュームを兼ね備えており、優れたレベルの感度と再現性を実現しています。どちらの構成も高塩濃度による腐食に対する耐性を備えており、最大 130 MPa の高背圧に耐える

ことができます。インラインの Agilent 1260 Infinity II 蛍光検出器を使用して、比較的希薄な AAV サンプルの分析に必要な高感度を実現しました。



図 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC

表 1. 移動相の組成

	フレキシブルポンプ	ハイスピードポンプ
ポンプの種類	クォータナリ	バイナリ
移動相の組成	A: 脱イオン水 B: 1 M 塩化テトラメチルアンモニウム C: 0.3 M HCl D: 0.2 M Bis-Tris プロパン A ~ D は 2 mM MgCl <sub>2</sub> を含む	A: 70 mM Bis-Tris プロパン, pH 9.0 B: 70 mM Bis-Tris プロパン + 1 M 塩化テトラメチルアンモニウム, pH 9.0 A および B は 2 mM MgCl <sub>2</sub> を含む

表 2. フレキシブルポンプのグラジエント条件

時間	%A	%B	%C	%D	流量 (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

表 3. ハイスピードポンプのグラジエント条件

時間	%A	%B	流量 (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

## クロマトグラフィー

PEEK ハードウェアの Agilent Bio SAX NP5 カラム (2.1 × 50 mm、5 μm、部品番号 5190-2472) を使用して、完全および空の AAV カプシドを分離しました。表 1 ~ 3 に示す移動相およびグラジエント条件を使用して、塩グラジエント溶出を実行しました。

フレキシブルポンプメソッドでは、Agilent Buffer Advisor ソフトウェアを使用して、分析時に 70 mM Bis-Tris プロパン、pH 9.0 を実現するのに必要な各移動相成分のパーセンテージを測定しました。分析前に、AAV-1 および AAV-6 標準を、空を多く含むものまたは完全を多く含むものとして個別に、または混合物として 50 mM Tris-HCl、pH 7.4 で希釈しました。データの取り込みと分析は、表 4 に示す積分設定を使用して Agilent OpenLab CDS ソフトウェアにより制御しました。

表 4. Agilent OpenLab CDS 2.3 ソフトウェアの積分設定

パラメータ	設定値
スロープ感度	0.02
ピーク幅	2
面積リジェクト	0.05
高さリジェクト	0.05
ショルダーモード	タンジェント
タンジェントスキムモード	ストレート
テールピーク/スキム高さ比	0.05
フロントピーク/スキム高さ比	0.05
スキム谷比	20
ベースライン補正モード	クラシック
ピーク/谷比	500
ブランク減算	適合

## 結果と考察

最初に、完全または空を多く含むサンプルから同じ数のカプシドを注入することにより、AAV-1と AAV-6 の相対レスポンス係数を推定しました。両方の血清型について、空のカプシドに対する見かけのレスポンス比が約 1.2 となっており、完全なカプシドが空のカプシドより明るいことがわかりました。この値は、AAV-6.2 について公表されているレスポンス比 1.3 とよく一致しています。<sup>4</sup>

図 2 に示すように、フレキシブルポンプを使用して、許容できる分解能 (AAV-1 では  $R = 1.1$ 、AAV-6 では  $R = 1.3$ ) により、混合サンプル中の完全および空のカプシドを分離しました。サンプル回収率は流量と負の相関があることがわかりましたが (データは示していません)、これは文献で報告された結果と一致していました。<sup>5</sup>したがって、分析グラジエント時には、このメソッドでの流量を  $0.1 \text{ mL/min}$  という低い値に維持しました。

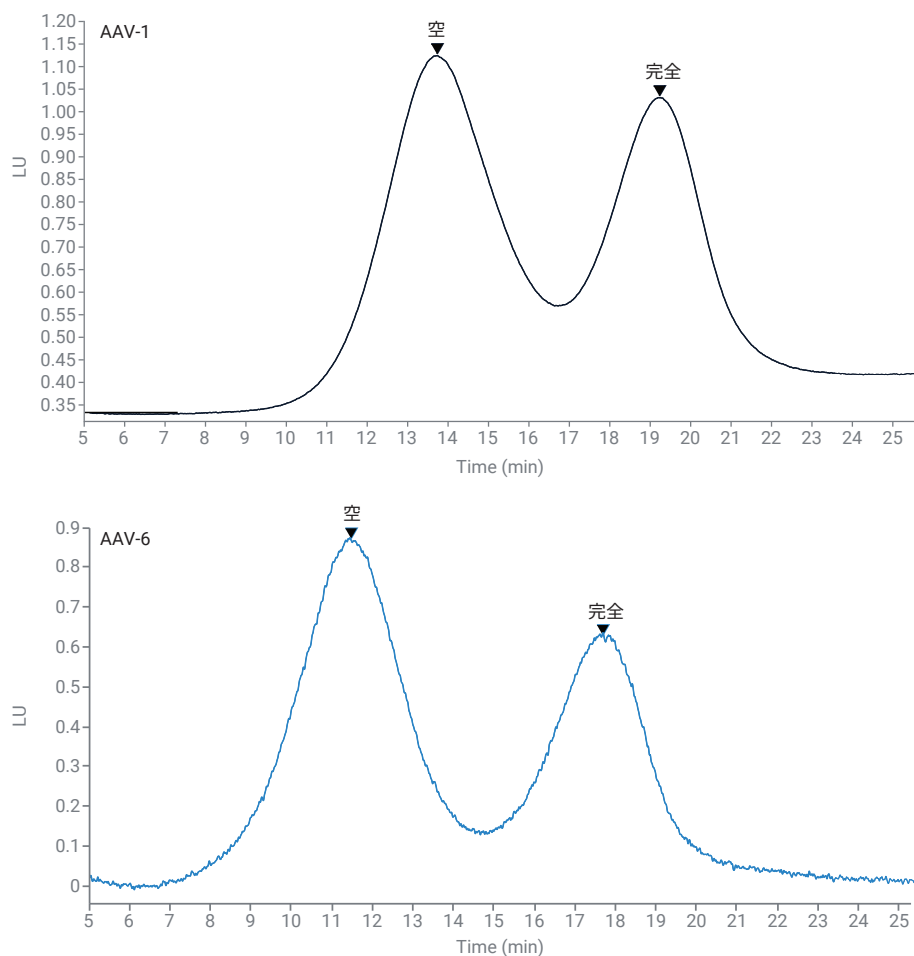


図 2. Agilent コォータナリフレキシブルポンプを使用した、完全および空のカプシドの混合物の分離

このメソッドを、バイナリハイスピードポンプを搭載した Agilent 1290 Infinity II Bio LC に転送しました。比が異なる完全および空のカプシドの混合物を、3 日間にわたって繰り返し注入することにより、分析の精度、直線性、および再現性を評価しました。図 3 のクロマトグラムの重ね表示に示されているように、完全および空のカプシドピークのリテンションタイムとピーク形状は、さまざまなカプシド比において高い再現性を示しました。

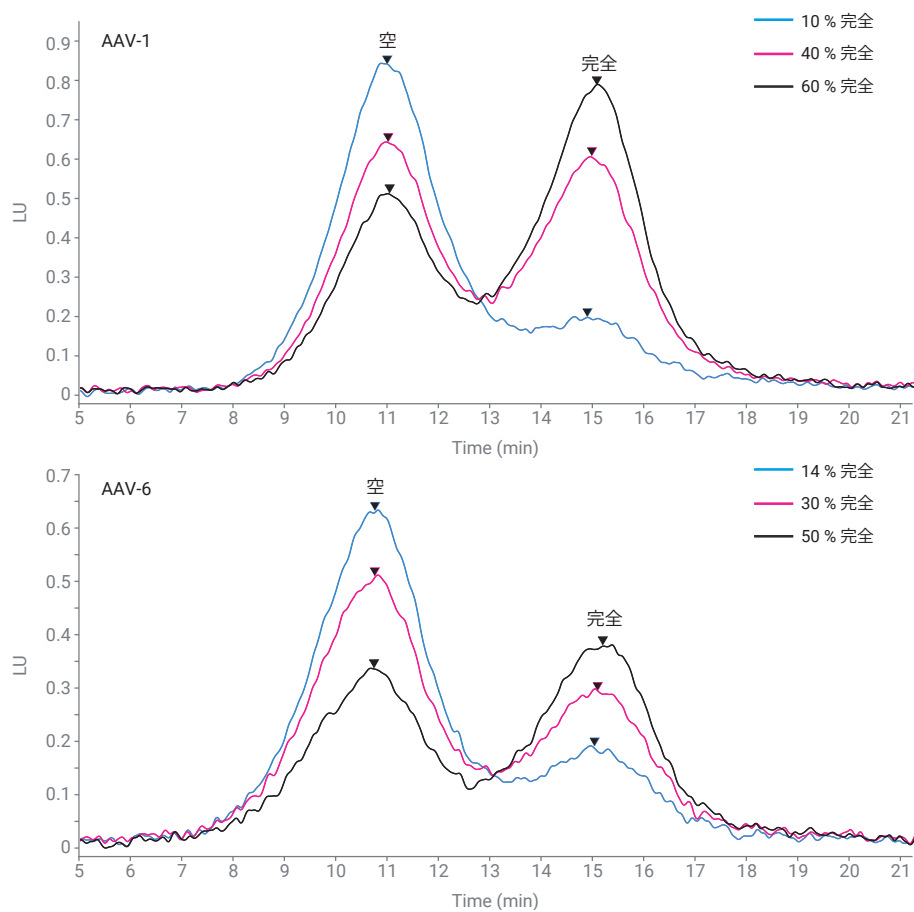


図 3. Agilent バイナリハイスピードポンプを使用した、完全/空のカプシド比が異なる AAV-1 および AAV-6 サンプルの分離

前に示したように<sup>6</sup>、相対ピーク高は、相対ピーク面積と比較して、完全/空のカプシド比を正確かつ堅牢に推定していることが示されました。このような結果が得られたのは、ピークにある

程度のテーリングが存在したために、完全には分離されなかったからです。図 4 は、推定量として相対ピーク高またはピーク面積を使用した際の AAV-1 および AAV-6 の直線性と

精度の違いを示しています。相対ピーク高の直線傾向線は原点に近づいており、R<sup>2</sup> 値が高くなっていました。

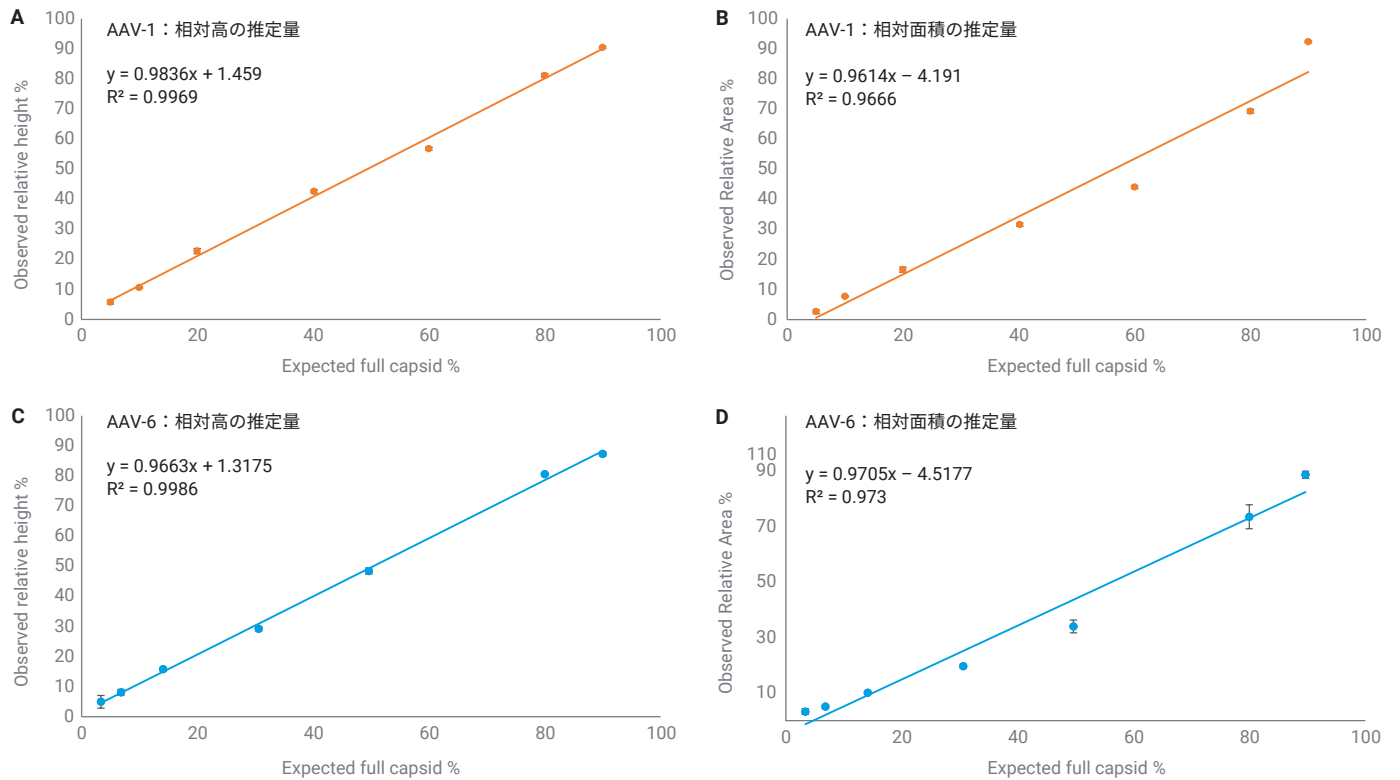


図 4. 完全/空のカプシド比の推定量としての相対ピーク高および相対ピーク面積の比較。相対ピーク高 (A および C) は、相対ピーク面積 (B および D) と比較して、優れた精度と直線性を示しています。

図 5 に、メソッドの日内再現性を示します。完全/空のカプシド比の相対標準偏差 (RSD) は、およそ 5 ~ 90 % の完全カプシドを含むサンプルについて、AAV-1 で  $\leq 10.1\%$ 、AAV-6 で  $\leq 11.2\%$  でした。この結果は、メソッドが幅広い直線範囲に対応していることを示しています。許容できる RSD が 15 % 未満であると仮定した場合、両方の血清型の定量下限は

完全なカプシドの  $\leq 5\%$  でした。完全および空のカプシドピーク両方のリテンションタイムも非常に再現性が高く、テストしたすべてのサンプルの両方の血清型について  $RSD \leq 2.4\%$  でした。

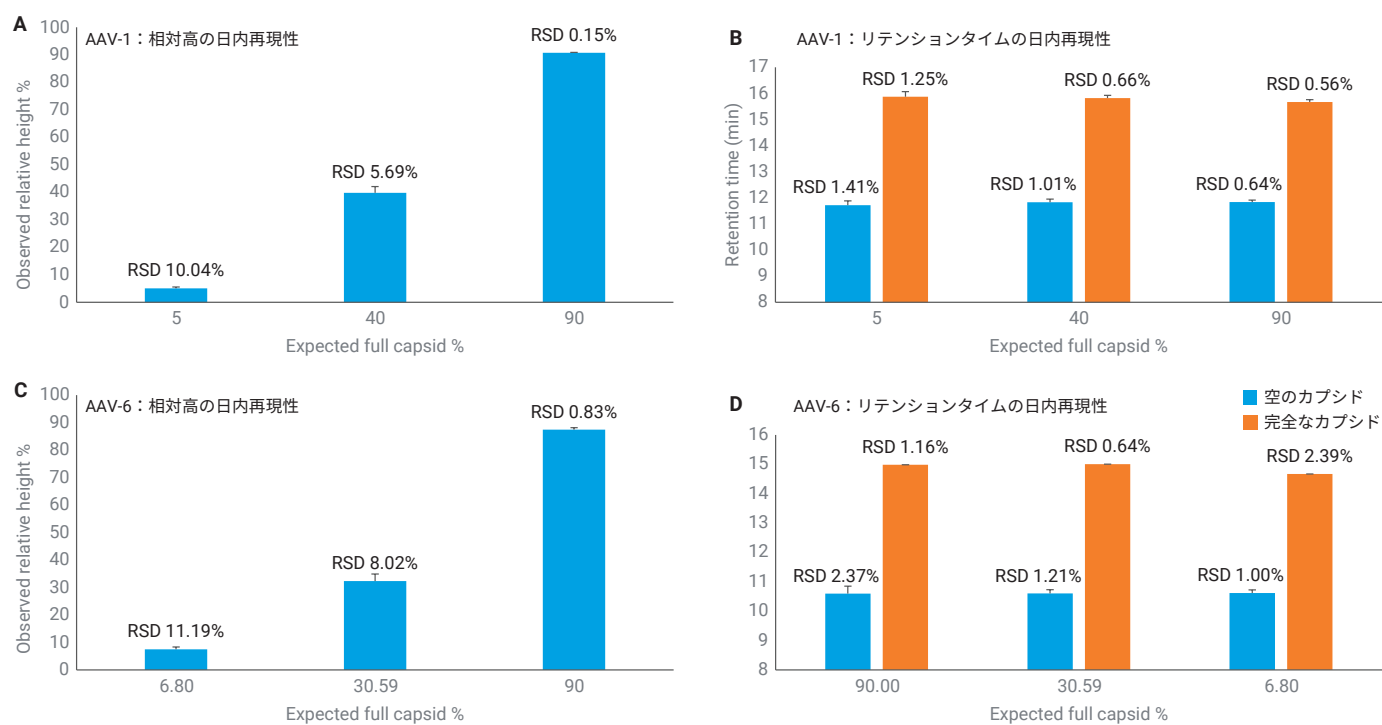


図 5. 相対高の推定量およびピークのリテンションタイムの日内再現性

## 結論

この実験は、Agilent Bio SAX 強アニオン交換カラムを搭載した Agilent 1290 Infinity II Bio LC を使用して、AAV-1 および AAV-6 血清型の完全/空のカプシド比を正確に高い再現性で測定できることを示しています。

## 参考文献

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.

ホームページ

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

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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。

DE10415602

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, February 16, 2022

5994-4589JAJP