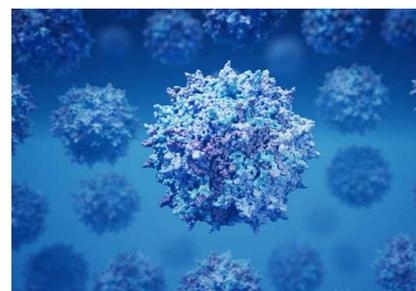


液体クロマトグラフィーによる バイオ医薬品中の アデノ随伴ウイルスおよび ウイルス様粒子の凝集体分析



アデノ随伴ウイルス (AAV) およびウイルス様粒子 (VLP) は、ワクチンや細胞・遺伝子治療の分野で刺激的な可能性を秘めた新しい生物製剤分子です。

AAV は非共有結合の自己集合タンパク質構造体であり、その核にゲノムペイロードを含む場合と含まない場合があります。AAV には、体内のさまざまな器官系を自然に標的とする異なるクラスがいくつかあり、細胞治療や遺伝子治療のための天然の送達ベクターとなっています。AAV 血清型は、AAV の球状の殻を構成するタンパク質の構造と化学的性質が異なります。ただし、そのサイズは直径 20 ~ 25 nm と狭く定義されており、空の場合は約 3.7 MDa、オリゴヌクレオチドペイロードがある場合は約 5.1 MDa です。

VLP は、疾患を予防するワクチンとして機能する 1 つ以上の個別のタンパク質で構成される大きな自己集合構造体です。VLP はウイルスと同じ構造的外観を有していますが、ウイルスを感染性にするゲノム物質と複製機構を欠いています。したがって、感染を引き起こすことなく免疫反応を促進することができます。

他の種類の生物製剤分子と同様に、AAV および VLP は全世界の規制機関から厳しい精査を受けており、生物製剤そのものに加えて製品またはプロセスに関連する不純物の特性解析が求められます。凝集体は製品に関連する不純物であり、通常、重要な品質特性のレベルに達するため、監視を行い注意深く管理する必要があります。AAV と VLP は構造的に類似しているため、それらの分析には共通のアプローチを使用できる可能性があります。

モノクローナル抗体 (mAb) やアデノ随伴ウイルス (AAV) とは異なり、さまざまな種類の VLP が、通常は直径 20 ~ 150 nm の広範囲のサイズで存在します。この多様性のため、汎用メソッドはほぼ非現実的であり、補完的な技術の活用がより重要になります。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は古くから、タンパク質の凝集体をモニタリングするための標準分析法であり、AAV の凝集体分析の一般的なアプローチとなっています。VLP のサイズが多様であるにもかかわらず、SEC は、分析用超遠心分離 (AUC)、電子顕微鏡 (EM)、フィールドフロー分離 (FFF) などの直交型技術と連携して、VLP の凝集体分析において以前から重要な役割を果たしています。

凝集体分析における課題の克服

VLP の凝集体分析における第一の課題はおそらく、VLP モノマーの公称サイズに応じて最も適切な主要手法を選択することです。(ここで、「モノマー」とは、集合した VLP の個々のタンパク質成分ではなく、凝集していない単一の VLP アセンブリを指します。) 従来の SEC カラムで現在入手可能な最大のポアサイズは 2000 Å です。SEC のこれまでの経験則では、ポアサイズは対象分析成分の直径の約 3 倍とすることが望ましいとされています。例えば、2000 Å のポアは、約 670 Å (67 nm) の分析成分の分析に適しています。ただし実際には、多くのユーザーは、SEC が大きな制限を受ける可能性がある閾値として 100 nm (1000 Å) を採用しています。AAV だけでなくより小さな VLP も SEC の適切なサイズ範囲内に十分に収まりますが、一部の VLP は別の手法による分析の方がより適している場合があります。AUC や EM と比較して SEC は、高速かつ安価であるため、使用可能であれば依然として推奨されるアプローチです。

AAV または VLP に SEC を用いる場合に遭遇する 2 つの最大の課題は、量と濃度の両方においてサンプルが十分に得られないことから生じる分離能と感度の問題です。Agilent Bio SEC-5 カラムの製品ラインは、あらゆる状況に適するようにポアサイズとカラム寸法のオプションを備えた固定相を取り揃えてこれらの問題に対処し、高分離能と良好なサンプル回収を実現します。

適切なサイズ排除クロマトグラフィーカラムの選択

SEC カラム寸法の選択により、分離目標の達成、サンプルの制約の軽減に役立ててください。カラム寸法を選択するときは、次の点を考慮してください。

- 300 mm などの長いカラムを選べば、より高い分離能が得られます。
- 高スループットが優先される場合には、分離能が許せばより短い 150 mm カラムをお勧めします。
- SEC では長い間 7.8 mm が標準的な内径 (id) でしたが、4.6 mm などのより細かいカラム直径では注用量が少なくて済むため、サンプルの入手が難しい AAV や VLP には理想的です。

新しいクラスの生物製剤に最適なポアサイズを予測することは、溶液中の構造が生物学的 SEC や GPC の従来のターゲットと異なるというだけの理由で、困難な場合があります。ポアサイズは分子量との相関関係から、排除限界と浸透限界点を定義するのに用いられることがよくあります。ただし、最適なポアサイズを決定するのは、最終的には分析成分の流体力学半径です。分子量相関は、その相関を確立するために使用される標準と分析成分が類似した溶液中での構造を持つ場合、かなりうまく機能します。これらの標準は歴史的に、生物学的 SEC の場合は球状タンパク質、GPC の場合は比較的線状のポリマーが使われてきました。AAV と VLP は、球状タンパク質や線状ポリマーのいずれとも構造が異なり、VLP の種類によっても大きく異なる場合があります。したがって、分子量相関の信頼性は低くなり、追加の情報も考慮する必要があります。ポアサイズを選択するときは、次の点を考慮してください。

- 分子量に応じた推奨ポアサイズを表 1 に示します。
- 経験則では、分析成分の直径の 3 倍のポアサイズを使用します。これは、おおよそのサンプルサイズが既知の場合に役立つ目安です。
- 類似の分子についての報告例も、有用な参照ポイントです。

カラム	排除限界	トータルインクルージョンポイント	ターゲット化合物
Bio SEC-5, 5 µm, 500 Å	5 MDa	5 kDa	AAV, 小径 VLP
Bio SEC-5, 5 µm, 1000 Å	7.5 MDa	50 kDa	AAV, VLP, 大型オリゴ
Bio SEC-5, 5 µm, 2000 Å	> 10 MDa	150 kDa	VLP, 大型オリゴ

表 1. Agilent Bio SEC-5 カラムの分子量範囲

狭い範囲で定義されたサイズを持つ AAV で、ポアサイズを選択する際の課題を考えてみます (図 1)。AAV の分子量は、ゲノムペイロードがある場合は約 5.1 MDa、ない場合は約 3.8 MDa です。表 1 は、500 Å または 1000 Å の Bio SEC-5 カラムが最適であることを示しています。AAV の直径は 20 ~ 25 nm であり、経験則によれば 600 ~ 750 Å のポアが最適です。しかし実際には、さまざまなベンダーの 450 ~ 1000 Å の範囲の SEC カラムを AAV に使用していることが報告されています。ポアが小さすぎると、凝集状態の分析が不完全になるリスクがあります。一方、

ポアが大きすぎると、モノマーとダイマー、またはモノマーとフラグメントの分離が不十分になるおそれがあります。実証研究を通じてアジレントは、AAV の凝集体分析には 1000 Å の Bio SEC-5 カラムを推奨しています。AAV 凝集体分析の代表的なサンプルクロマトグラムとメソッド条件をそれぞれ図 2 と表 2 に示します。詳細については、Agilent アプリケーション概要 [5994-4270JAJP¹](#) を参照ください。

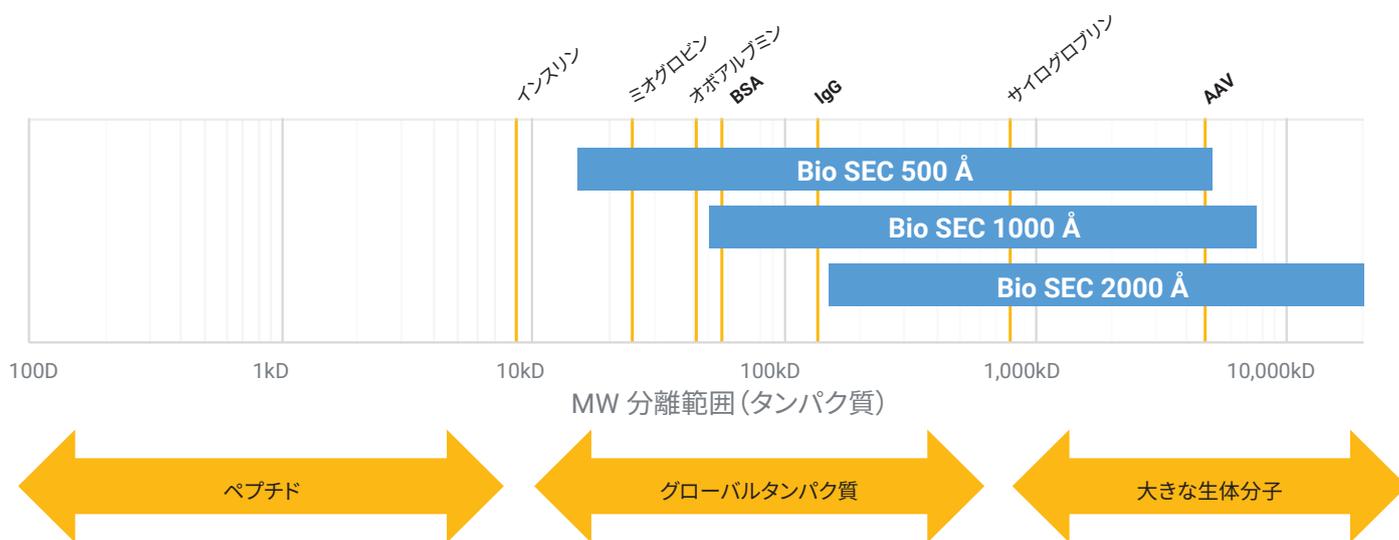


図 1. タンパク質の分子量に基づいた SEC ポアサイズを選択

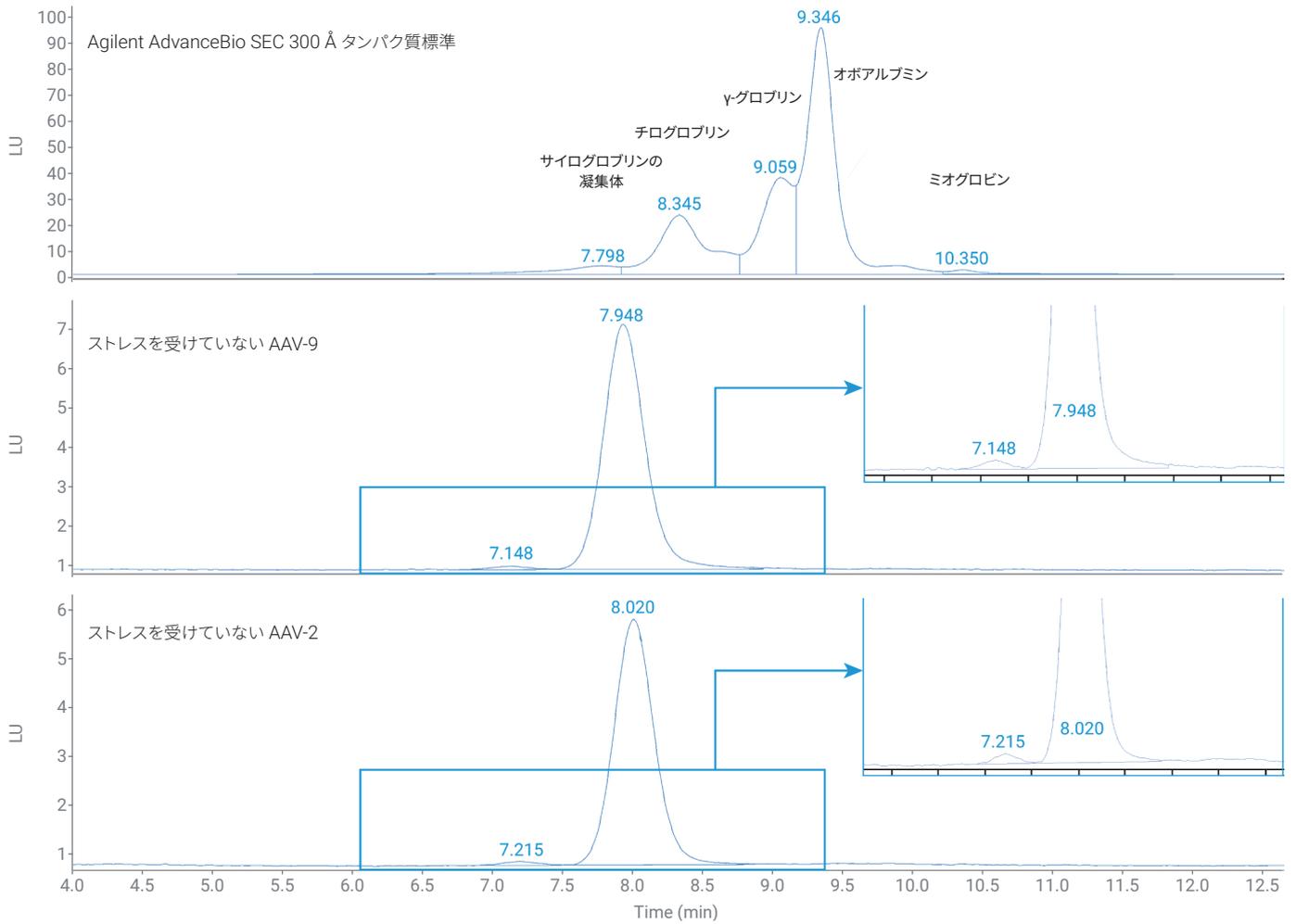


図 2. Agilent Bio SEC-5を使用した、Agilent AdvanceBio SEC 300 Å タンパク質標準とストレスのない AAV-9 および AAV-2 の蛍光クロマトグラム

パラメータ	設定値
カラム	Agilent Bio SEC-5、1000 Å、4.6 x 300 mm
流量	0.4 mL/min
移動相	50 mM リン酸緩衝液 + 400 mM NaCl、pH 7.4
カラム温度	室温
サンプル量	20 μL
蛍光検出	λ _{ex} = 280、λ _{em} = 340 nm

表 2. AAV 凝集体とフラグメントを分離するための Agilent Bio SEC-5 カラムを使用したサンプル SEC メソッド条件

場合によっては、最適なポアサイズは経験的評価によって決定するのが最善であることがあります。²例えば図 3 は、1000 Å および 2000 Å Bio SEC-5 カラムを使用した VLP の SEC サンプルクロマトグラムを示したものです (SEC 条件は表 3 に示されています)。本検討では、VLP は約 40 nm でした。経験則に従えば、適切なポアサイズは 120 nm、つまり 1200 Å になります。1000 Å と 2000 Å の両方の Bio SEC-5 カラムを評価したところ、この場合は 2000 Å の方が分離能が高いという結果になりました。詳細については、アプリケーションブリーフ [5994-4227JAJP](#)² をご覧ください。

サイズ排除クロマトグラフィーのベストプラクティス

SEC のベストプラクティスのいくつかを次に挙げます。

- 新しい移動相バッファを準備し、0.2 または 0.45 μm のフィルタでろ過して微粒子を除去し、カラムや LC システムに損傷を与えるおそれのある微生物の増殖のリスクを軽減します。
- 流量を増加させる速さをデフォルトから 1 mL/min² 以下に下げます。流量を徐々に上げることで、カラム寿命が延びます。アジレントのソフトウェアでは、この設定は LC ランプ制御の [詳細設定] セクションにあります。
- カラムに適合するように、LC メソッドの圧力上限を設定します (Bio SEC-5 カラムでは 240 bar)。これは、LC の最大圧力機能がカラムの最大圧力機能を超える場合は常に重要です。
- 適切な SEC 標準で定期的にシステム性能を検証してください。
- 可能であればサンプル注入量を最小化することにより、クロマトグラフィー分離能が最大化します。最大注入量をカラム容量の 1 % とし、サンプル注入量を 5 ~ 10 μL にすることを推奨します。
- 洗浄が必要な場合は、カラム上での緩衝液塩の析出を避けるために、少なくとも 20 カラム容量の洗浄液でフラッシュする前後に、少なくとも 5 カラム容量の超純水ですすいでください。詳細については [Bio SEC-5 カラムのユーザーガイド](#)³ を参照ください。

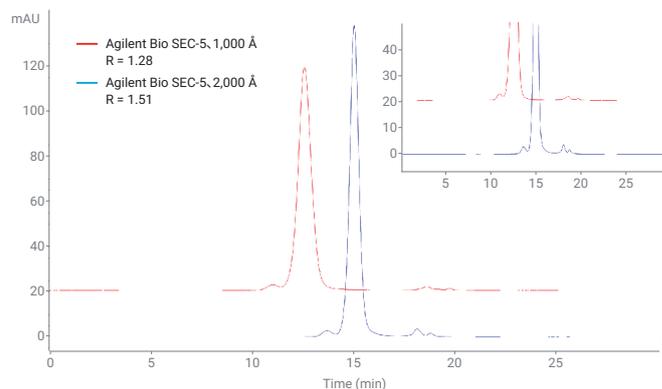


図 3. 1000 Å および 2000 Å Agilent Bio SEC-5 カラムを使用した VLP の SEC サンプルクロマトグラム。2000 Å カラムでは、モノマーと凝集体の分離が向上しました。

パラメータ	設定値
カラム	Agilent Bio SEC-5、7.8 × 300 mm、5 μm、2000 Å (部品番号 5190-2541)
Agilent Bio SEC-5、7.8 × 300 mm、5 μm、1000 Å (部品番号 5190-2536)	0.4 mL/min
流量	0.6 mL/min
移動相	50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、400 mM 塩化ナトリウム
カラム温度	室温
サンプル量	5 μL
検出波長	220 nm
分析時間	30 分
HPLC システム	Agilent 1260 Infinity II LC システム、クォータナリポンプ付

表 3. 約 40 nm の VLP に対するサンプル SEC メソッドの条件

参考文献

1. Liao, B.; Blackwell, A., and Turner, M.L. 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, *Agilent Technologies application brief*, publication number [5994-4270JAJP](#), **2021**
2. Mi, J. Agilent Bio SEC-5 によるウイルス様粒子 (VLP) の分析, *Agilent Technologies application brief*, publication number [5994-4227JAJP](#), **2021**
3. Agilent Bio SEC-5 Columns, *Agilent Technologies data sheet*, publication number [5973-1743](#), **2021**

カラム、消耗品などの情報

Agilent Bio SEC-5 カラム

説明	部品番号
500 Å カラム	
Bio SEC-5、5 µm、500 Å、4.6 x 300 mm	5190-2533
Bio SEC-5、5 µm、500 Å、4.6 x 150 mm	5190-2534
Bio SEC-5、5 µm、500 Å、4.6 x 50 mm、ガード	5190-6860
Bio SEC-5、5 µm、500 Å、7.8 x 300 mm	5190-2531
Bio SEC-5、5 µm、500 Å、7.8 x 150 mm	5190-2532
Bio SEC-5、5 µm、500 Å、7.8 x 50 mm、ガード	5190-2535
1000 Å カラム	
Bio SEC-5、5 µm、1000 Å、4.6 x 300 mm	5190-2538
Bio SEC-5、5 µm、1000 Å、4.6 x 150 mm	5190-2539
Bio SEC-5、5 µm、1000 Å、4.6 x 50 mm、ガード	5190-6861
Bio SEC-5、5 µm、1000 Å、7.8 x 300 mm	5190-2536
Bio SEC-5、5 µm、1000 Å、7.8 x 150 mm	5190-2537
Bio SEC-5、5 µm、1000 Å、7.8 x 50 mm、ガード	5190-2540
2000 Å カラム	
Agilent Bio SEC-5、5 µm、2000 Å、4.6 x 300 mm	5190-2543
Agilent Bio SEC-5、5 µm、2000 Å、4.6 x 150 mm	5190-2544
Agilent Bio SEC-5、5 µm、2000 Å、4.6 x 50 mm、ガード	5190-6862
Agilent Bio SEC-5、5 µm、2000 Å、7.8 x 300 mm	5190-2541
Agilent Bio SEC-5、5 µm、2000 Å、7.8 x 150 mm	5190-2542
Agilent Bio SEC-5、5 µm、2000 Å、7.8 x 50 mm、ガード	5190-2545

消耗品およびサンプル容器

説明	部品番号
コネクタとチューブ	
クイックターンフィッティング用取り付けツール	5043-0915
InfinityLab クイックコネク LC フィッティング	5067-5965
クイックコネクキャピラリー MP35N 0.12 x 105 mm、クイックコネク フィッティング用	5500-1578
クイックターンキャピラリー MP35N 0.12 x 280 mm	5500-1596
インラインフィルタ	
InfinityLab クイックチェンジインラインフィルタアセンブリ、UHPLC 用*	5067-1603
InfinityLab クイックチェンジフィルタディスク、内径 2.1 mm、 ポアサイズ 0.2 µm、5 個	5067-1610
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、インサート 容量 300 µL、バイアルサイズ：12 x 32 mm (12 mm キャップ)、100 個	5188-6591
キャップ、スクリュウ、青、PTFE/赤シリコンセプタム、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、 1000 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 セプタム、 100 個キャップサイズ：11 mm、(5190-3155 用)	5182-0566
InfinityLab ウェルプレート 96/0.5 mL、30 枚	5043-9310
InfinityLab ウェルプレートクロージングマット、50 個	5042-1389

標準、溶媒および溶媒供給

説明	部品番号
標準と溶媒	
AdvanceBio SEC 300 Å 用キャリブレーション標準	5190-9417
Agilent NIST mAb、25 µL	5191-5744
Agilent NIST mAb、4 x 25 µL	5191-5745
InfinityLab Ultrapure LC/MS 純水、1 L	5191-4498
LC/MS 用 InfinityLab 水、6 x 1 L *	5191-5121
溶媒ろ過消耗品 †	
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 枚	5191-4341
メンブレンフィルタ、再生セルローズ 47 mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 枚	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
溶媒処理	
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 セーフティパーズボトル	5043-1339
InfinityLab 廃液ボトル、GL45、6 L、セーフティキャップ付き (活性炭フィルタ 5043-1193 は含まれていません)	5043-1221
InfinityLab 活性炭フィルタ、タイムストリップ付き、58 g (5043-1221 で使用)	5043-1193

*一部、対象外の国や地域もあります。

† この表に記載されている製品以外の溶媒を使用する場合

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。

DE03781718

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, October 15, 2023

5994-6785JAJP

