

アデノ随伴ウイルス(AAV)の HPLC 分析は、これで決まり！

文献紹介; AAV Full および Empty の陰イオン交換体による分離

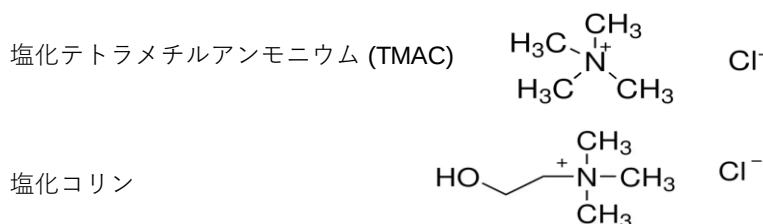


アデノ随伴ウイルス(AAV)は、遺伝子治療用として最も広く開発応用されているベクターです。細胞培養液から精製された AAV 試料には、完全型の遺伝子が内包されているタイプ(Full)のほか、核酸が内包されていないタイプ(Empty)や不完全に内包されているウイルス粒子などがあり、目的物質由来不純物として分離定量する必要があります。これらの不純物の分析は超遠心分析沈降速度法(SV-AUC)が標準法となりますが、簡易分析法として AAV の電荷の違いによる陰イオン交換クロマトグラフィー(AEC)が応用されています^{1,2}。

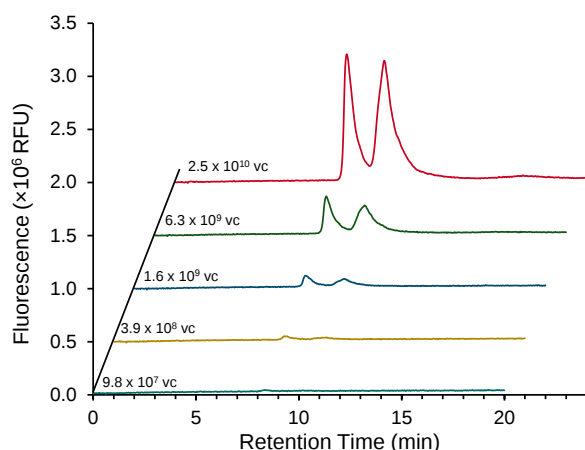
●文献紹介

S. Kurth et al., Separation of full and empty adeno-associated virus capsids by anion-exchange chromatography using choline-type salts, *Analytical Biochemistry* 686 (2024) 115421, CC BY-NC-ND, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115421>

AAV の Full/Empty の AEC 分析においては、イオンペア試薬である塩化テトラメチルアンモニウム(TMAC)を用いることで分離能が向上するという報告がなされています³⁻¹⁰。しかし、TMAC は毒性が強く、分析のみならず分取精製での利用には制約があります。そのため著者らは、TSKgel Q-STAT カラム(7 μm)を用い TMAC 類似化合物の検討を行い、安全性の高いコリン塩化物が AAV の Full/Empty のグラジエント分離に有効であることを見出しました。



●塩化コリンを溶離液に用いた AAV の Full/Empty の異なる試料負荷量での AEC 分離



カラム ; TSKgel Q-STAT (7 μm, 4.6 mm I.D. x 10 cm)
 溶離液 ; Buffer A: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)
 ; Buffer B: Buffer A containing 1 mol/L choline chloride
 ; 20 min linear gradient from Buffer A/B (90/10) to (65/35)
 流速 ; 1.0 mL/min
 検出 ; Fluorescent, excitation at 280 nm, emission at 350 nm
 温度 ; 30 °C
 試料 ; purified AAV5 (5 x 10¹² vc/mL) of empty/full (50/50) was repeatedly diluted to 1/4 for sample preparation

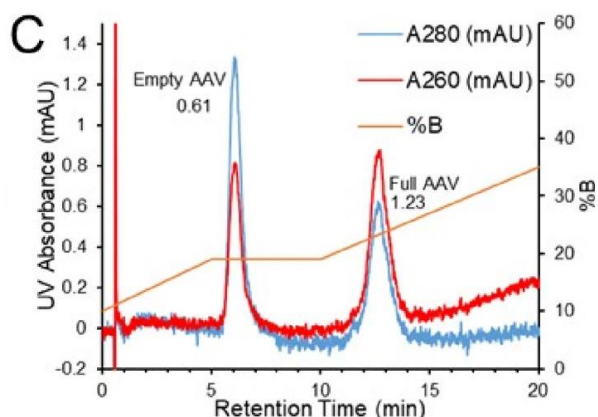
※ データはDr. J. Kervinen氏のご厚意によります

AAV5 の Full/Empty の 50/50 混合物を用いて、定量性について蛍光検出を用いて検討したところ、AAV の viral capsids (vc)*の試料負荷量は 2.5 x 10¹⁰ vc まで直線性の高い検量線が得られ、検出限界は、3.9 x 10⁹ vc でした。また異なるセロタイプの AAV2、AAV6、AAV8 についても同一条件で Full/Empty が良好に分離できることが報告されました。

(注) *viral capsids (vc)は viral particle (vp)と同義

●AAV Full/Empty の完全分離および分取クロマトグラフィーへの応用

AAV の Full/Empty の精密分離を目的として塩化コリンを用いたグラジエント分離にアイソクラティック分離を併用し最適化を図りました。その結果、下図のように AAV8 の Full/Empty は完全に分離されました。



カラム ; TSKgel Q-STAT (7 μ m, 4.6 mm I.D. x 10 cm)
溶離液 ; Buffer A: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)
; Buffer B: Buffer A containing 1 mol/L choline chloride
; 5 min linear gradient from Buffer A/B (90/10) to (81/19)
; followed by 5 min hold and 10 min linear gradient to (65/35)
流速 ; 1.0 mL/min
検出 ; UV (260 nm), (280 nm)
温度 ; 30 $^{\circ}$ C
試料 ; purified AAV8 (5×10^{11} vc) of empty/full (84/16)

※ データはDr. J. Kervinen氏のご厚意によります

この条件を参考に、分取用 AEC 充填剤 TOYOPEARL GigaCap[®] Q-650S を用いて AAV8 の Empty を塩化コリン濃度を 140 mmol/L までのリニアグラジエント分離、AAV8 の Full を 400 mmol/L でのステップグラジエント分離で良好に分離することができました¹¹。

●参考文献、関連資料

1. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 15、ウイルスベクターの分離、分析はこれで決まり！
2. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 20、アデノ随伴ウイルス (AAV) の分離、分析はこれで決まり！
3. R. Rieser et al., Comparison of different liquid chromatography-based purification strategies for adeno-associated virus vectors, *Pharmaceutics*, 13 (2021) 748, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050748>
4. K. Richter et al., Purity and DNA content of AAV capsids assessed by analytical ultracentrifugation and orthogonal biophysical techniques, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 189 (2023) 68-83, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.05.011>
5. Z. Wu et al., Development of a two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry platform for simultaneous multi-attribute characterization of adeno-associated viruses, *Anal. Chem.* 24 (2022) 3219-3226, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04873>
6. M. K. Aebischer et al., Anion-exchange chromatography at the service of gene therapy: baseline separation of full/empty adeno-associated virus capsids by screening of conditions and gradient elution mode, *J. Mol. Sci.*, 23 (2022) 12332, <https://doi.org/10.3390/jms232012332>
7. P. L. R. H. Joshi et al., Development of a scalable and robust AEX method for enriched rAAV preparations in genome-containing VCs of serotypes 5, 6, 8, and 9, *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*, 21 (2021) 341, <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.03.016>
8. S. L. Khatwani et al., Anion-exchange HPLC assay for separation and quantification of empty and full capsids in multiple adeno-associated virus serotypes, *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development* 21 (2021) 548-558, <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.04.003>
9. C. Wang et al., Developing an Anion Exchange Chromatography Assay for Determining Empty and Full Capsid Contents in AAV6.2, *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*, 15 (2019) 257-263, <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.09.006>
10. M. Mietzsch et al., Production and characterization of an AAV1-VP3-only capsid: An analytical benchmark standard, *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*, 29 (2023) 460-472, <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2023.05.002>
11. J. Kervinen, Anion-exchange chromatography separation of full and empty capsids using non-toxic choline-type salts, BPN Conference, Australia, 2023

※東ソー技術資料は、弊社ホームページの「関連資料」から閲覧、ダウンロードが可能です。<https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/litjp>



※ “TSKgel”、“TSKgel STAT”、“TOYOPEARL”、“TOYOPEARL GigaCap”は東ソー株式会社の登録商標です
※ 掲載のデータ等は数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社営業部 ☎(03) 5427-5180 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2
大阪支店 バイオサイエンスG ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオサイエンスG ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店 ☎(092) 710-6694 〒812-0011 福岡市博多区博多駅前3-8-10
仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1
カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1
バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>
HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>
お問合わせE-mail ●製品全般、カタログに関するお問い合わせ hlc@tosoh.co.jp
●カラム、分離に関するお問い合わせ tskgel@tosoh.co.jp
●装置の技術相談に関するお問い合わせ csc@tosoh.co.jp