

アデノ随伴ウイルス(AAV)の分離、分析はこれで決まり！

TSKgel および TOYOPEARL を用いた各種クロマトグラフィー分離



アデノ随伴ウイルス (AAV) は安全性に優れた一過性のウイルスベクターとして知られており、遺伝子治療用医薬品への応用研究、開発が活発に行われています。これらの医薬品の開発や製造プロセスにおける AAV の重要品質特性 (CQA) の分析、大量培養におけるダウンストリーム工程での精製にクロマトグラフィーが応用されています。ウイルスベクターのクロマトグラフィー分離については、既に本シリーズのテクニカルノート (TSKgel, TOYOPEARL) No. 15 にも報告していますが、特に AAV の分離に関しては、凝集体や不純物の分析に有用なサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、AAV 粒子の内部にゲノムを含むもの (Full 体) と含まないもの (Empty 体) の分析、あるいは分離精製可能な陰イオン交換クロマトグラフィー (AEC)、さらには陽イオン交換クロマトグラフィー (CEC)、疎水クロマトグラフィー (HIC) およびアフィニティークロマトグラフィー (AFC) なども分離精製に使用されています。以下の表に、AAV の分離に用いられる各種クロマトグラフィーの代表的な溶離液、分離条件を示します。

●AAV の分離に応用されるクロマトグラフィー分離モード

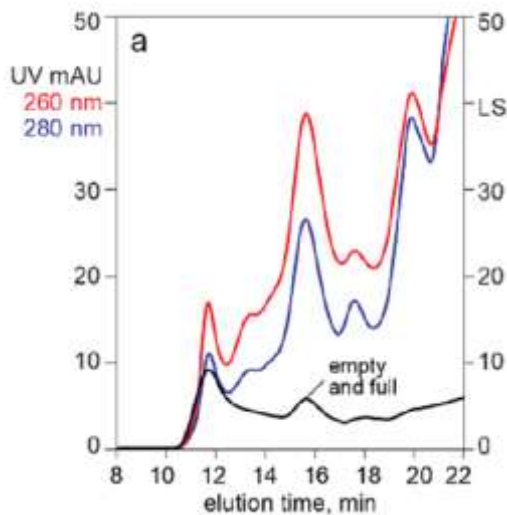
分離モードと応用可能な製品	代表的な溶離液・分離条件 (例) **	備考	文献
サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) TSKgel G4000SWXL TSKgel UltraSW Aggregate, UP-SW Aggregate TSKgel G5000PWXL, G6000PWXL	1) 50 mmol/L 酢酸ナトリウム (pH 6.0) + 0.5 mol/L NaCl + 0.01 % Tween®-80 + 0.01 % Pluronic® F-68 2) 2 x PBS + 10 % ethanol 3) 20 mmol/L リン酸ナトリウム (pH 6.6) + 0.15 mol/L KCl	・溶離液の塩濃度は試料により最適化が必要 ・光散乱検出器を用いる場合には、カラムを事前に十分洗浄し、ノイズ低減を図る ・蛍光検出の場合; Ex. 280 nm, Em. 350 nm	1-3
陰イオン交換クロマトグラフィー (AEC) TSKgel DNA-STAT®, DNA-NPR®, SuperQ-5PW TOYOPEARL GigaCap® Q-650, SuperQ-650 TOYOPEARL NH2-750F	1) 溶離液 A; 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5) + 0.01 % Tween-80 (または + 0.01 % Pluronic F-68) 溶離液 B; 溶離液 A + 0.5 mol/L 酢酸アンモニウム リニアグラジエント; 溶離液 A から 溶離液 B 2) 溶離液 A; 20 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0) 溶離液 B; 溶離液 A + 1.0 mol/L 塩化テトラメチルアンモニウム (TMAC) リニアグラジエント; 溶離液 A から 溶離液 A/B (70/30) 3) 溶離液 A; 20 mmol/L Bis tris-propane (pH 9.0) 溶離液 B; 溶離液 A + 1.0 mol/L TMAC リニアグラジエント; 溶離液 A から 溶離液 A/B (70/30)	・AECでは、Empty体とFull体の分離が可能 (ただし分離困難な AAV セロタイプもある) NaCl よりも TMAC や 酢酸塩 で 分離 が 向上 する ・塩にりん酸三ナトリウムを用いる例もある ・溶離液の pH 8.5 - 9.2 が好ましい ・溶出する TMAC 濃度は 0.1 - 0.3 mol/L ・2 - 20 mmol/L MgCl ₂ の添加で、ピーク形状や回収率が改善する場合もある ・精製例; AFC - AEC, CEC - AEC	1,2,4-7
陽イオン交換クロマトグラフィー (CEC) TSKgel SP-STAT, SP-NPR, SP-5PW TOYOPEARL GigaCap S-650, SP-650	1) 溶離液 A; 50 mmol/L HEPES (pH 7.5) + 1 mmol/L EDTA + 5 mmol/L MgCl ₂ 溶離液 B; 溶離液 A + 0.5 mol/L NaCl 平衡化; 溶離液 A/B (80/20) リニアグラジエント; 溶離液 A/B (80/20) から 溶離液 B 2) 溶離液 A; 25 mmol/L リン酸ナトリウム (pH 6.5) + 2 mmol/L MgCl ₂ 溶離液 B; 溶離液 A + 0.5 mol/L NaCl 平衡化; 溶離液 A/B (80/20 または 70/30) リニアグラジエント; 溶離液 A/B (80/20 or 70/30) から 溶離液 B CIP; 1.0 mol/L NaOH (または + 1 - 3 mol/L NaCl)	・クロマチン、ヒストン、核酸結合たんぱく質は陽イオン交換体に強固に結合しているため、高濃度のアルカリ洗浄が必要 ・溶離液に 2 % sucrose を添加する場合もある ・精製例; CEC - AEC, CEC - HIC	1, 7-10
疎水クロマトグラフィー (HIC) TSKgel Butyl-NPR TOYOPEARL Butyl-650	1) 溶離液 A; 50 mmol/L HEPES (pH 7.5) + 2 mmol/L MgCl ₂ + 2 % sucrose 溶離液 B; 溶離液 A + 1.5 mol/L 硫酸 リニアグラジエント; 溶離液 B から 溶離液 A	・精製例; CEC - HIC	10, 11
アフィニティークロマトグラフィー (AFC) * TSKgel Heparin-5PW TOYOPEARL Heparin HC-650M	1) 溶離液 A; PBS containing 1 mmol/L MgCl ₂ + 2.5 mmol/L KCl 溶離液 B; 溶離液 A + 0.5 - 1.0 mol/L NaCl ステップまたはリニアグラジエント; 溶離液 A から 溶離液 B 2) 溶離液 A; Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) with Mg ²⁺ , Ca ²⁺ (HyClone) 溶離液; 溶離液 A + 0.4 mol/L NaCl ステップまたはリニアグラジエント; 溶離液 A から 溶離液 B	・ヘパリン AFC では AAV セロタイプ 2, 3, 6, 8 の分離例が報告されている ・精製例; AFC - AEC	12, 13

* V_H抗体を用いた AFC もありますが、弊社に該当製品はありません (文献6, 12等を参照)

**詳細なグラジエント条件、流速、検出等は試料やカラムの種類により異なり、最適化が必要です

非イオン性界面活性剤 (Tween, Pluronic F-68 など) の添加により、疎水性の高い AAV や、凝集しやすい AAV の回収率が向上する場合があります

●TSKgel G4000SWxL による AAV lysate の分離例*



カラム ; TSKgel G4000SWxL (7.8 mm I.D. x 30 cm)
 溶離液 ; 50 mmol/L MES (pH 6.5) + 0.15 mol/L NaCl + 0.05 % Poloxamer 188
 (Poloxamer 188は、Pluronic F-68と同一化合物)
 流速 ; 0.5 mL/min
 検出 ; UV (260 nm、280 nm) および光散乱検出器
 試料 ; AAV filtered lysate

*データは P. Gagnon et al., *Pharmaceutics*, 2021, 13, 113 (CC BY), <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010113> より転記

●AAV のクロマトグラフィー分離に関する文献、技術資料

- 1) P. Gagnon et al., *Pharmaceutics*, 2021, 13, 113, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010113>, Multiple-Monitor HPLC Assays for Rapid Process Development, In-Process Monitoring, and Validation of AAV Production and Purification
- 2) N. L. McIntosh et al., *Scientific Reports*, (2021) 11:3012, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82599-1>, Comprehensive characterization and quantification of adeno associated vectors by size exclusion chromatography and multi angle light scattering
- 3) Waters Application Notes, https://www.waters.com/waters/library.htm?locale=en_US&lid=135051172, Anion-Exchange Chromatography for Determining Empty and Full Capsid Contents in Adeno-Associated Virus
- 4) S. L. Khatwani et al., *Mol. Ther. Methods, Clin. Dev.* 2021, Apr 9;21:548-558, DOI: 10.1016/j.omtm.2021.04.003, Anion-exchange HPLC assay for separation and quantification of empty and full capsids in multiple adeno-associated virus serotypes
- 5) X. Fu et al., *Hum Gene Ther Methods* 2019 Aug;30(4):144-152, DOI: 10.1089/hgtb.2019.088, Analytical Strategies for Quantification of Adeno-Associated Virus Empty Capsids to Support Process Development
- 6) P. R. H. Joshi et al., *Human Gene Therapy*, <https://doi.org/10.1089/hum.2020.317>, Development and Validation of an Anion Exchange High-Performance Liquid Chromatography Method for Analysis of Empty Capsids and Capsids Encapsidating Genetic Material in a Purified Preparation of Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 5
- 7) P. Gagnon et al., *BioProcess International*, 18(11-12)s, Nov.-Dec. 2020, Streamlining Industrial Purification of Adeno Associated Virus
- 8) D. Debelak et al., *J. Chromatogr., B*, 740 (2000) 195-202, DOI: 10.1016/s0378-4347(00)00100-6, Cation-exchange high-performance liquid chromatography of recombinant adeno-associated virus type 2
- 9) N. Brument et al., *Mol. Therapy*, 6(5) (2002) 678-686, DOI: 10.1006/mthe.2002.0719, A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and -5
- 10) P. S. Chahal et al., *J. Virol. Methods*, 139 (2007) 61-70, DOI: 10.1016/j.jviromet.2006.09.011, Primary recovery and chromatographic purification of adeno-associated virus type 2 produced by baculovirus/insect cell system
- 11) W. Shao et al., *In. J. Nanomedicine*, 2012;7, 1575-1586, DOI: 10.2147/IJN.S26891, A novel polyethyleneimine-coated adeno-associated virus-like particle formulation for efficient delivery of siRNA in breast cancer therapy: preparation and in vitro analysis
- 12) L. P. V. Lieshout et al., *Gene Therapy*, 2020 Oct 7;10.1038/s41434-020-00198-7, DOI: 10.1038/s41434-020-00198-7, Engineered AAV8 capsid acquires heparin and AVB sepharose binding capacity but has altered in vivo transduction efficiency
- 13) S. Zolotukhin et al., *Methods* 28 (2002) 158-167, DOI: 10.1016/s1046-2023(02)00220-7, Production and purification of serotype 1, 2 and 5 recombinant adeno-associated viral vectors



※ “TSKgel”、“TSKgel STAT”、“NPR”、“TOYOPEARL”、“TOYOPEARL GigaCap”は日本等における東ソー株式会社の登録商標です
 ※ “Tween”は Croda International 社の “Pluronic”は BASF 社の登録商標です
 ※ 掲載のデータ等はその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 ☎(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 ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
 福岡支店 ☎(092) 781-0481 〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2
 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>
 お問い合わせE-mail hlc@tosoh.co.jp