

メソッドスカウティングを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによる rAAV完全粒子・空粒子の分離条件最適化

○赤木 美穂¹、Wu Chun-Yi²、寺田英敏¹、飯田順子^{1,2}、山口祐希³、内山進³

¹ 株式会社島津製作所、² 大阪大学大学院工学研究科島津分析イノベーション協働研究所、³ 大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻

1. はじめに

組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）を製造する際、目的遺伝子を含むDNAが封入された完全粒子（Full particle, FP）と、中身のDNAがない空粒子（Empty particle, EP）が產生することが知られている。EPは遺伝子治療薬としての効果がなく、また副作用へつながる可能性が指摘されていることから、rAAV製造の品質管理においてFPとEPの適切なモニターが必須となっている。

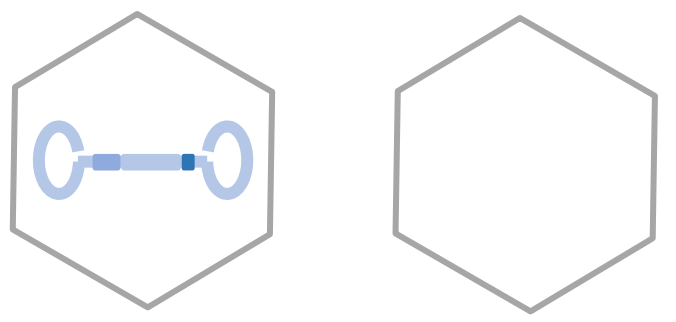


図1 rAAVのFP・EPの模式図

rAAVのFPとEPを評価する手法の一つとして、高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー（AEX）による手法が知られている。この手法は簡便で必要なサンプル量が少なく、rAAVの分子種を分離できる可能性がある点が特徴である。

本研究では、AEXによるAAV9のFP・EPの分離分析において、移動相条件を中心とした各パラメータの最適化を行った。最適化した条件を用いてFP・EP混合サンプルを分析し、フォトダイオードアレイ検出器で得られたスペクトル情報を元に、解析ソフトウェアの*i*-PDeA II 機能を利用したピークデコンボリューションを試みた。さらに、強制劣化させたAAV9を分析し、AEXによる分子種分離の可能性について検討した。

2. 方法

サンプルとして、AAV9ベクターのEPとFP（CMV_EGFP）を使用した。

AEXによる分析にはNexera XS inert（島津製作所）を用い、各パラメータを網羅的に組み合わせたメソッドおよび分析スケジュールはLabSolutions MDにより作成した。

未分離ピークのデコンボリューションは、PDA検出器により取得したUVスペクトル情報を用いて*i*-PDeA II 機能により行った。

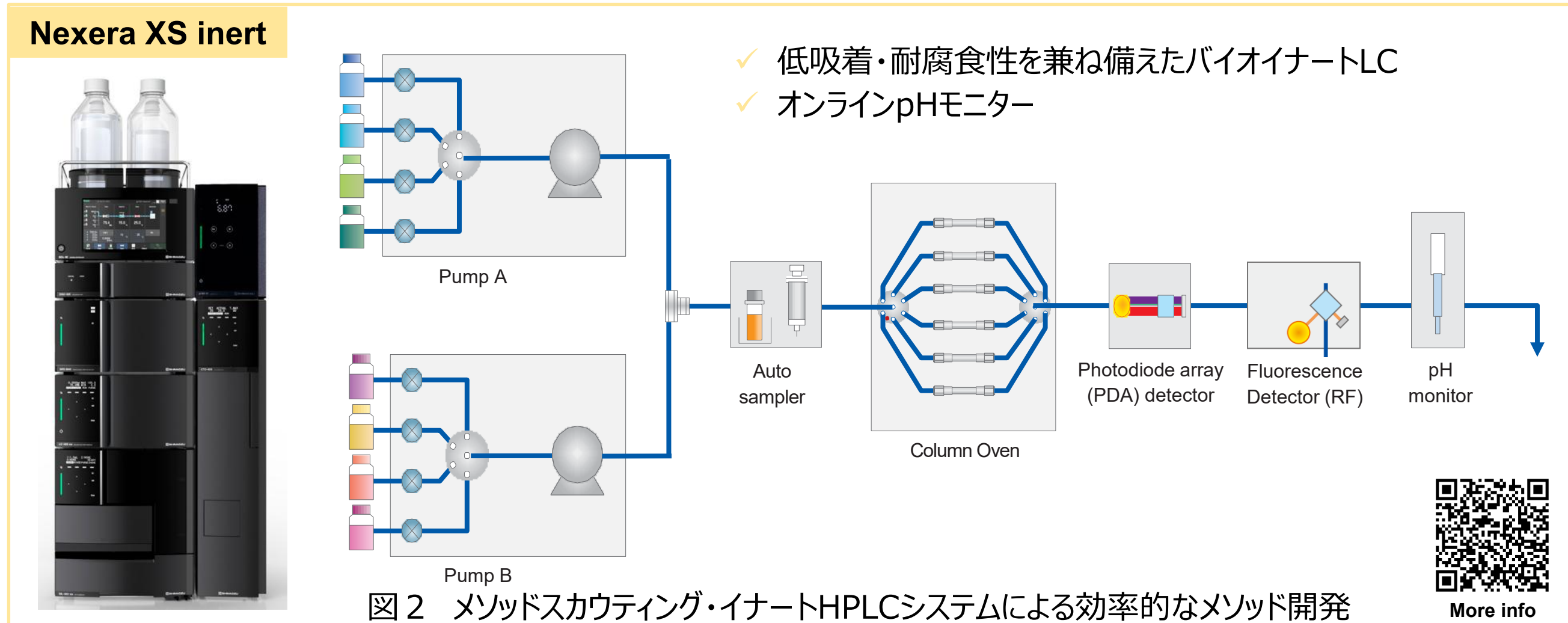


図2 メソッドスカウティング・イナートHPLCシステムによる効率的なメソッド開発



図3 メソッド開発支援ソフトウェアの画面

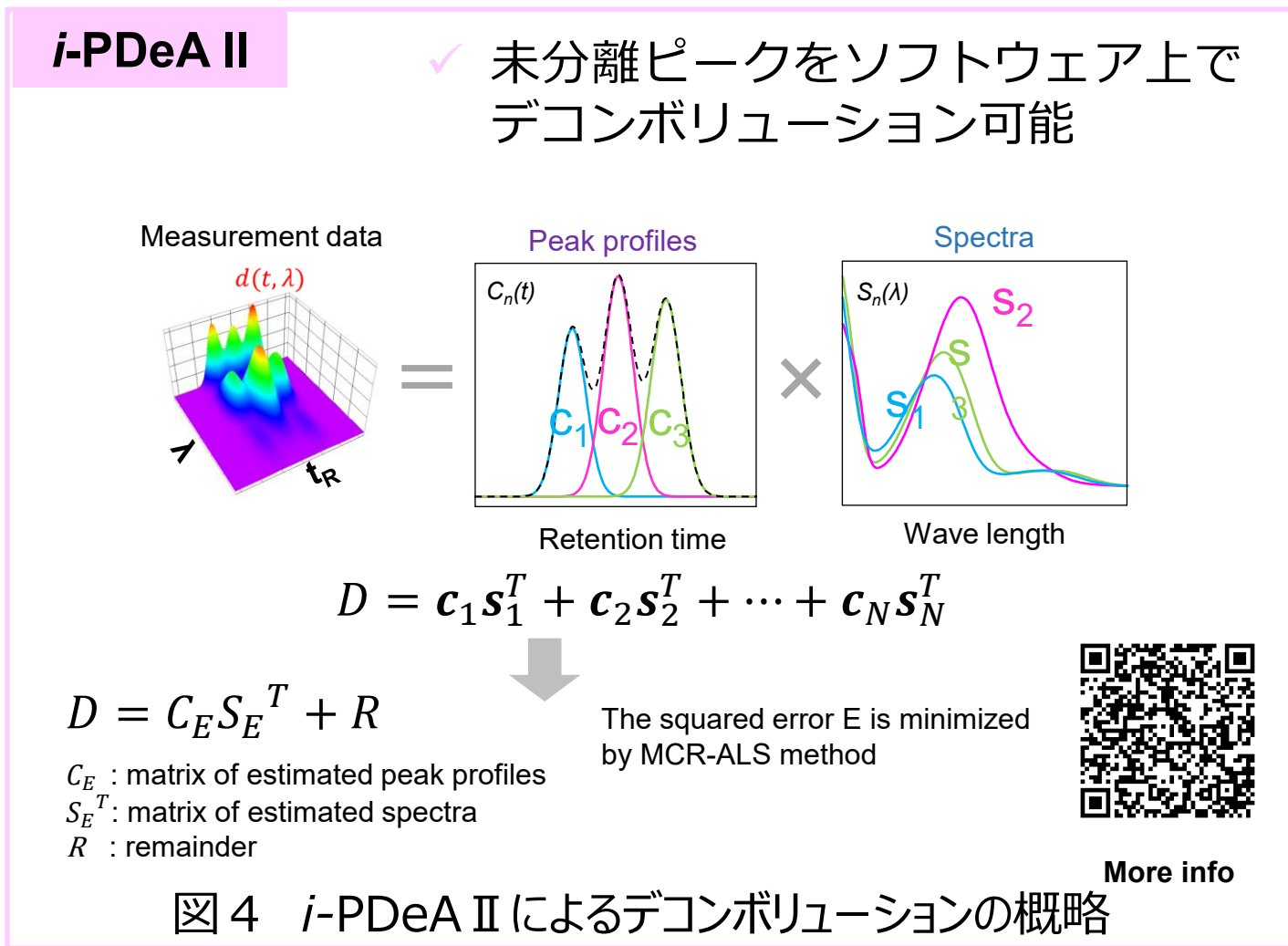


図4 *i*-PDeA II によるデコンボリューションの概略

3. 結果

■溶出塩の種類の検討

- 移動相に添加する溶出塩を8種類検討した。
- NaClを用いた条件が最もFP・EPの分離が良好であった。

表1 AEX分析条件

Column	: CIMac AAV full/empty analytical column
Mobile phase	: A) 20 mM Bis-tris propane-HCl (pH 9) B) 20 mM Bis-tris propane-HCl (pH 9) + 1-2 mol/L Eluting salt
Flow rate	: 1.0 mL/min
Column temp.	: 25 °C
Injection	: 2.5 x 10 ¹² capsid/mL, 1 µL
Detection	: RF (Ex: 280 nm, Em: 348 nm)

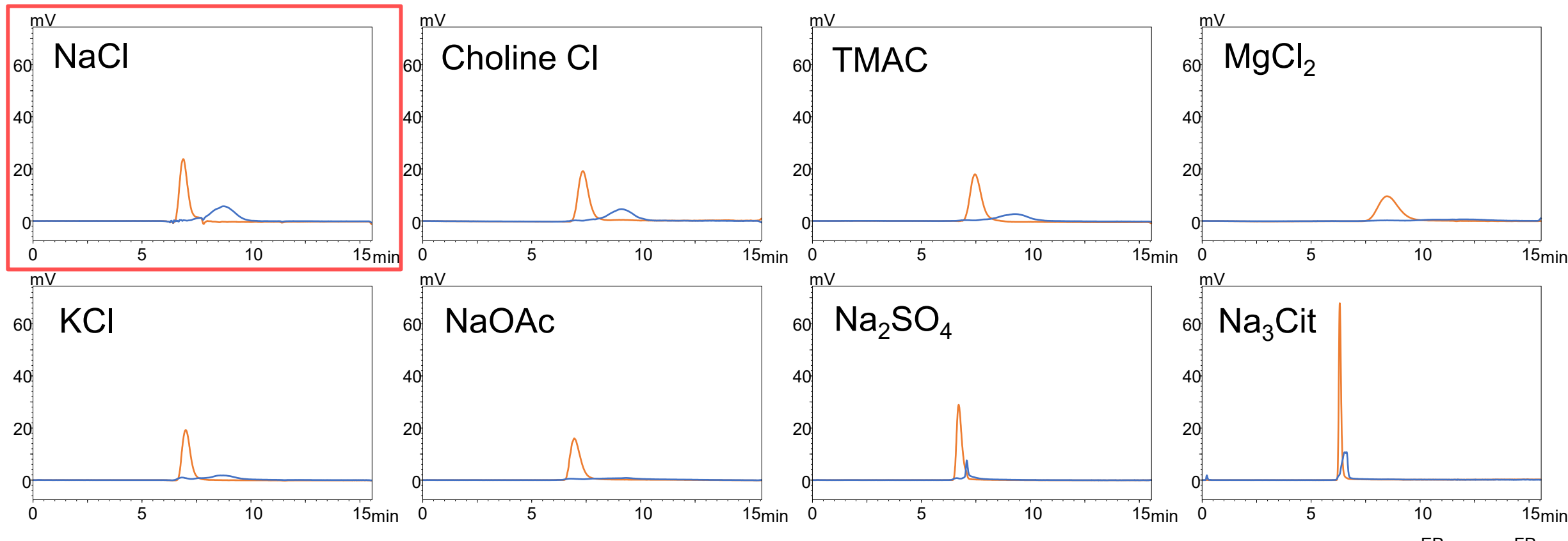


図5 溶出塩の異なる8条件のクロマトグラム比較

■緩衝液濃度とpHの検討

- 移動相の緩衝液濃度3条件、pH5条件を組み合わせ、合計15条件を検討した。
- 40mM BTP-HCl（pH 9）の条件が最もFP・EPの回収率が良好であった。

表2 AEX分析条件

Column	: CIMac AAV full/empty analytical column
Mobile phase	: A) Bis-tris propane-HCl B) Bis-tris propane-HCl + 1M NaCl
Time Program	: 80% (0-5 min) → 30% (15 min) → 90% (15.01-20 min) → 0% (20.01-35 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Column temp.	: 25 °C
Injection	: 2.5 x 10 ¹² capsid/mL, 1 µL
Detection	: RF (Ex: 280 nm, Em: 348 nm)

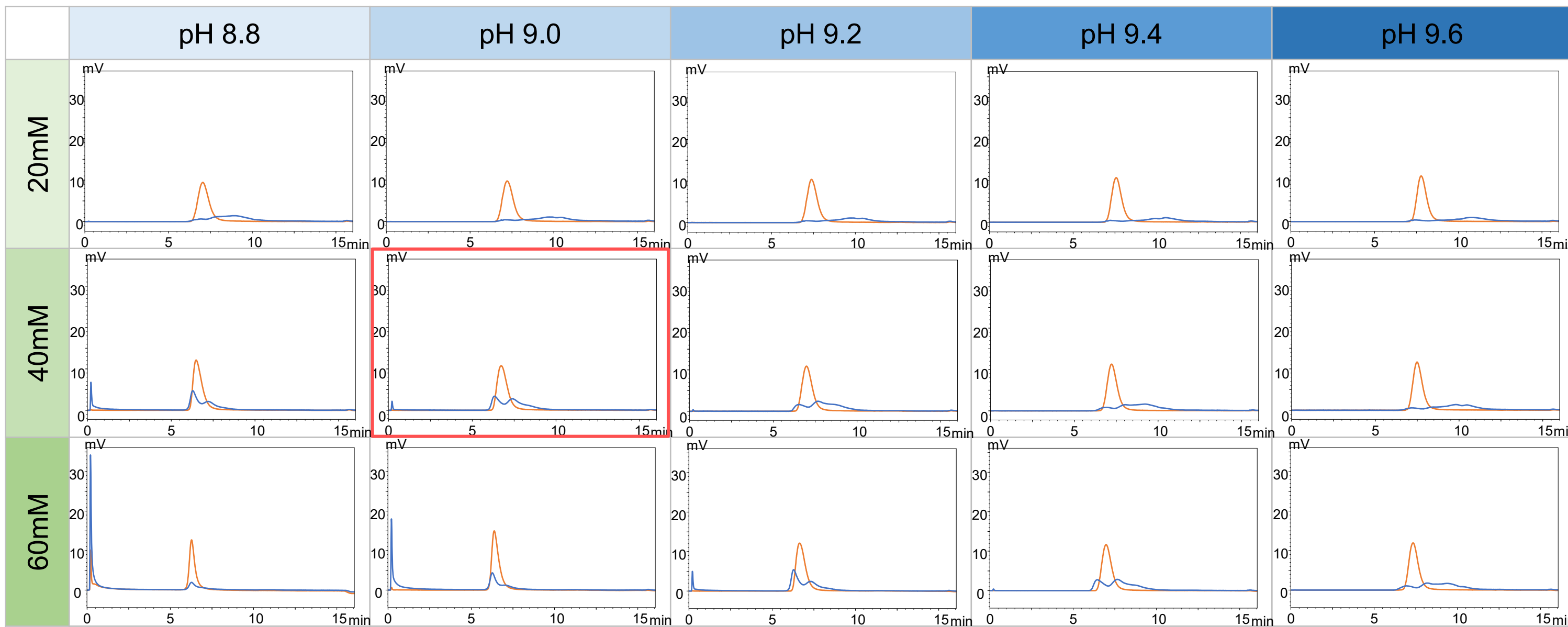


図6 移動相の緩衝液濃度・pHが異なる15条件のクロマトグラム比較

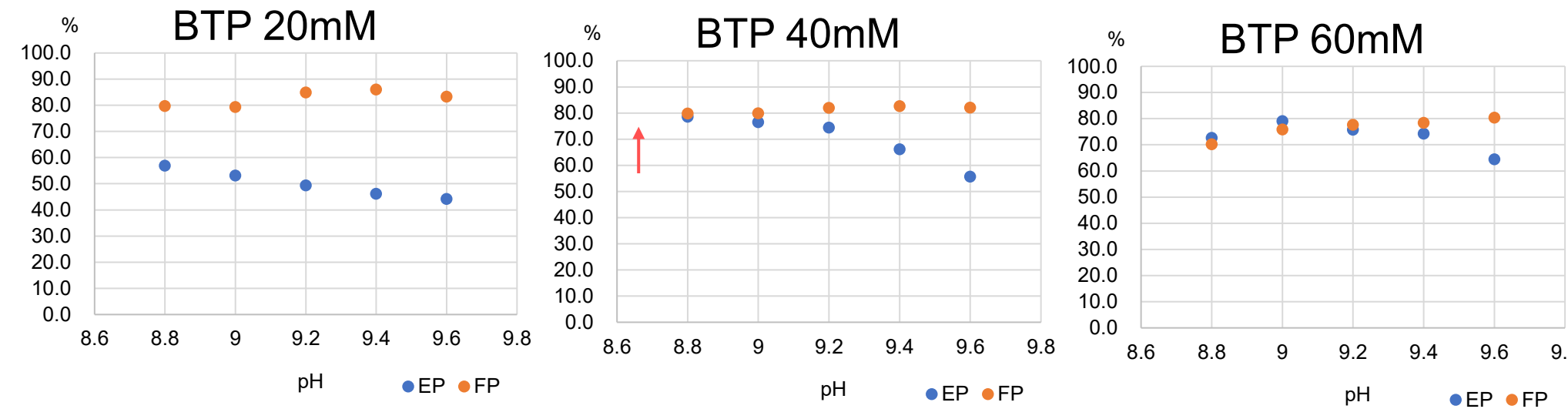


図7 pH依存的なAAV回収率の変化

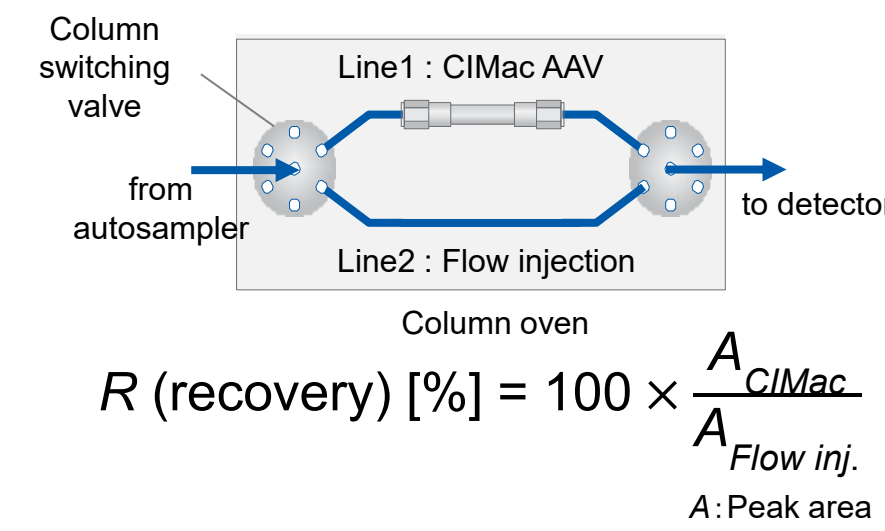


図8 カラムにおける回収率評価

■*i*-PDeA IIを用いたFP・EPのピークデコンボリューション

- FP・EPの混合サンプルを分析した結果、FP・EPのピークはクロマトグラム上では未分離となったが、*i*-PDeA IIにより2本の独立したピークにデコンボリューション可能であった。
- デコンボリューションの結果得られた面積値と吸光係数から、サンプル中のFP比を算出した結果、理論値と比較的よく一致した。

表3 AEX分析条件

Column	: CIMac AAV full/empty analytical column
Mobile phase	: A) 40 mM Bis-tris propane-HCl (pH 9) B) 40 mM Bis-tris propane-HCl (pH 9) + 1 mol/L NaCl
Flow rate	: 1.0 mL/min
Column temp.	: 25 °C
Injection	: 1.0 x 10 ¹² capsid/mL, 10 µL
Detection	: RF (Ex: 280 nm, Em: 348 nm), PDA (260 nm, 280 nm)

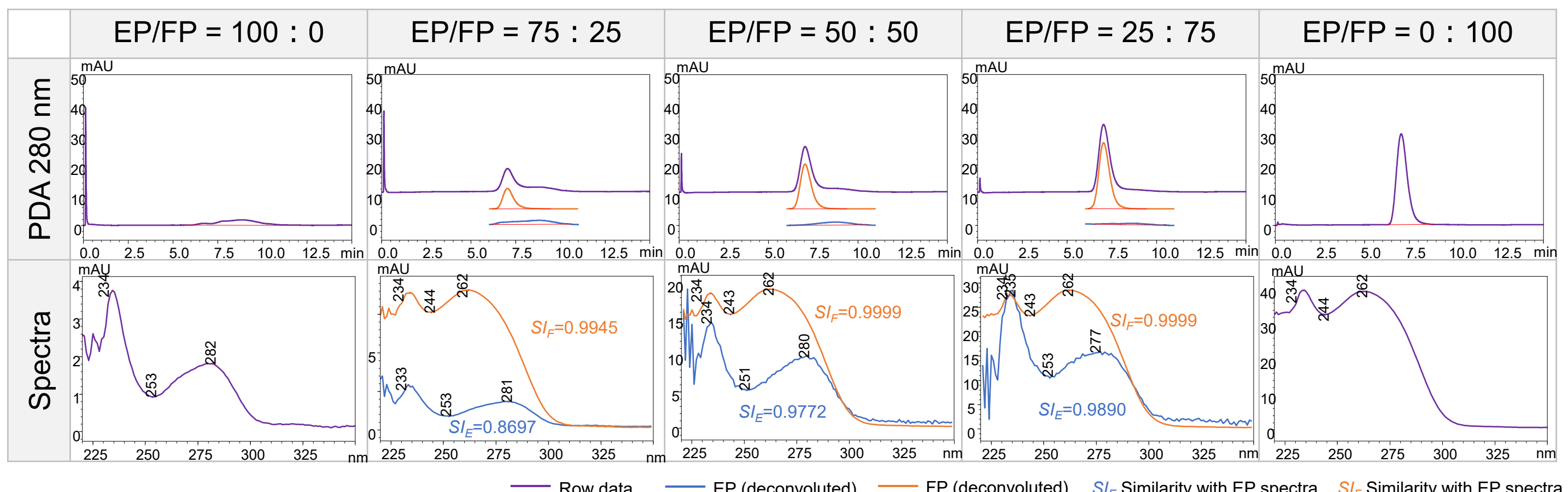


図9 FP・EP混合サンプルのクロマトグラム・デコンボリューション結果

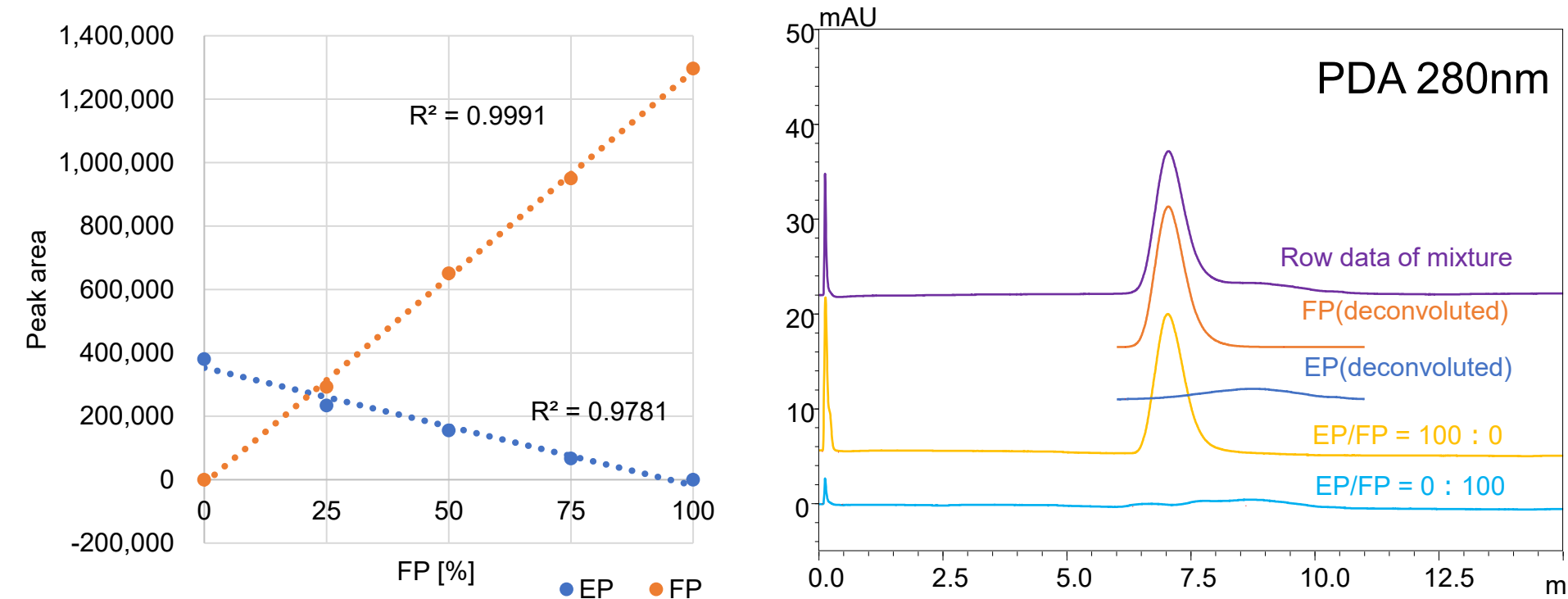


図10 FP比率に対するデコンボリューション後の面積値の直線性

図11 デコンボリューション結果と実測のクロマトグラム比較

表4 デコンボリューション結果と実測の面積値比較

Peak area	EP	FP
Deconvoluted	127,918	651,248
Single sample	126,452	643,723
Error [%]	+1.2	+1.2

式1・2 表5の計算に使用した数式

$$1) M [\text{nmol}] = \frac{A \cdot f}{\epsilon_{280} \cdot l}$$
$$2) F [\%] = 100 \times \frac{M_{\text{FP}} / R}{M_{\text{EP}} / R + M_{\text{FP}} / R}$$

表6 表5の計算に使用した数値

A	Area of deconvoluted peaks [µAU · sec]	Peak area in table 5
ϵ_{280}	Molar extinction coefficient [AU · µL · mol ⁻¹ · cm ⁻¹]	EP: 8,320 FP: 19,79 ^[1]
f	Flow rate [mL/sec]	1 mL / 60 sec
l	Optical path length [cm]	8.5 cm
R	Recovery on column	EP: 0.66 FP: 0.85

[1] Y.Yamaguchi et al./Journal of Pharmaceutical Sciences115(2006)104150

■強制劣化サンプルの分析

- FP、EP、FP:EP=1:1混合サンプルを40℃で0,1,3,7日間保管したものをAEXで分析した。
- 40℃で保管した期間が長いほど保持時間が長くなる傾向が見られた。
- FPについては、Day0:Day7=1:1混合サンプルのピークトップ分離が可能であった。

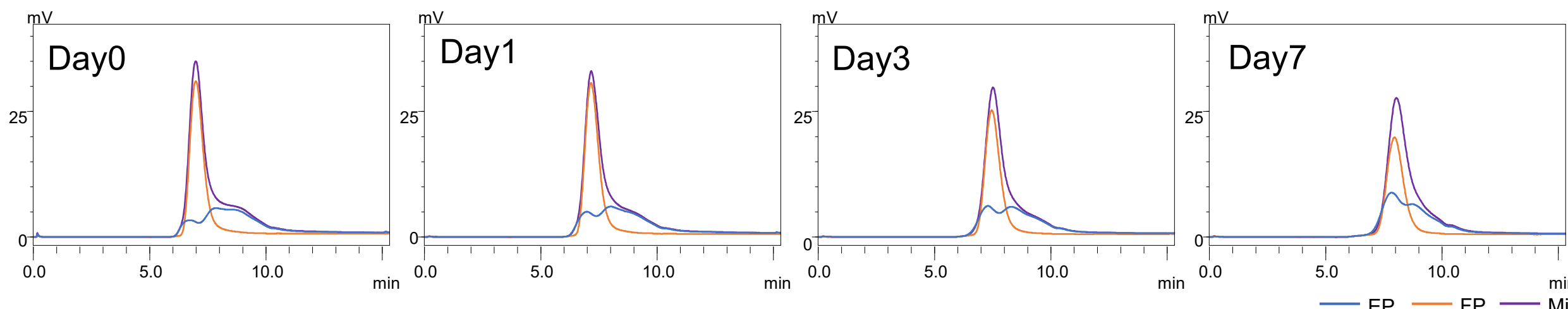


図12 強制劣化サンプルのクロマトグラム（経過日数ごと）

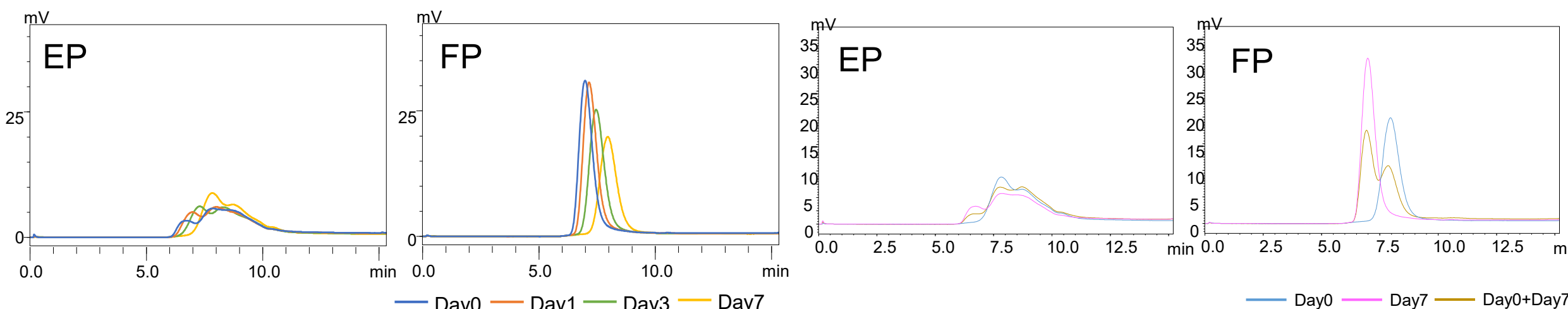


図13 強制劣化サンプルのクロマトグラム（サンプル種類ごと）

図14 Day0・Day7混合サンプルのクロマトグラム

4. まとめ

- AAV9のFP・EPの分析において、メソッドスカウティングを用いたAEX移動相条件の網羅的検討が有効であった。
- i*-PDeA II 機能を用いることで、FP・EPの未分離ピークをデコンボリューション可能であった。
- デコンボリューションにより得られたピーク面積値と吸光係数を用いてサンプル中のFP比率を算出した結果、理論値と比較的よく一致することを確認した。
- 強制劣化サンプルを分析した結果、保持時間が長くなる傾向が見られたことから、AEXを用いて熱ストレスによる劣化をモニタできる可能性が示唆された。今後、rAAVの品質変化との関連を確認し、強制劣化試験や安定性試験における品質評価手法としての有効性を検証する。

5. 謝辞

本研究を進めるにあたり、Jonathan Mitano氏（大阪大学、株式会社ユー・メディコ）、Zhouyun Yang氏（大阪大学）には様々な助言をいただきました。Xiaofang Lyu氏（大阪大学）には、サンプルをご提供いただきました。また、伊東有沙氏（大阪大学-島津分析イノベーション協働研究所）にはサンプル調製にご協力いただきました。厚く御礼申し上げます。