APPLICATION NOTE

SEC-UV-MALS-dRI を用いたアデノ随伴ウイルス遺伝子治療ベクターの品質特性の定量化

Michelle Chen, Ph.D. and Anatolii Purchel, Ph.D., Wyatt Technology Corporation
日本語訳：昭光サイエンス株式会社

概要

アデノ随伴ウイルス(AAV)は遺伝子治療において、免疫反応は温和で、遺伝子の本体を広範囲の宿主細胞へ運搬する能力を持つ魅力的な運搬体です[1, 2]。FDA が最初に認可した AAV ベースの遺伝子治療のベクターは Spark Therapeutics 社による Luxturna®と Novartis 社による Zolgensma®で、それぞれ稀少な遺伝性眼疾患及び脊椎性筋ジストロフィーの治療のためのものです。これら及び他の多くの AAV を用いた生体内での遺伝子治療薬の治験における候補の認可に関しては、安全性と効率を保証するために、この種の治療産物の性質を理解するための強力で信頼性のある解析ツールを用意する必要があります[3]。

このアプリケーションノートでは、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)法と多角度光散乱検出器(MALS)、UV、示差屈折率(RI)を用いて、AAV の品質特性に重要な次の 3 つの項目 1) ウイルスキャプシド粒子の総数 2) 相対的なキャプシドの含量(例えば、空のキャプシドと DNA が取り込まれたキャプシドの比) 3) モノマーと凝集体の割合、を求める手法を紹介します。

はじめに

AAV は小さな一本鎖 DNA ウイルスで、Parvoviridae 科に属し、分裂中の細胞にも静止期の細胞にも感染することができ、染色体外の状態で存在し、ホストの細胞に対して病原性を持たないため、遺伝子治療のためのウイルスベクターとして知られるようになりました。AAV 生産物は、当局からの強い要請により、全生産過程において、並外れた特性評価をする必要があります。AAV 産物の重要な品質特性(CQAs)の中には、物理的ウイルス濃度、キャプシド含量、生産物の安定性が含まれます[4]。

上で述べた QA—特にウイルス濃度とベクターゲノム濃度—の測定には、通常、ELISA、qPCR、TEM、cryo-EM、超遠心分析(AUC)、または光学密度測定のような方法が用いられます[5, 6]。しかしながら、これらの手法は全て、多くの時間や手間や費用を要します。またデータの不整合性や定量化の際に十分な直線性を得られないものもあります。従って、これらの技術のウイルスベクターの生産プロセス中への導入には、幾つかの課題を生じます。

一方、ここで紹介する SEC-MALS-UV-RI 検出法は、操作が簡便で、1 試料あたり 30 分以内の迅速な試料分析を可能にします。従ってこの手法は、AAV 産物の開発及び製造の全過程を通して、AAV 粒子濃度、キャプシド容量、及び凝集の定量化に容易に用いることができます。

材料及び方法

AAV9 の試料は AAV の大量調製に注力している Virovek 社 (https://www.virovek.com/)から頂戴しました。2 つの試料、すなわち'Empty'と記述される空の AAV(DNA なし)と、'Full（文章内はフル）'と記述される一本鎖 DNA が内包された AAV を本アプリケーションのために使用しました。空の AAV とフルの AAV 試料は、相対的なキャプシドの容量の分析のために 5 つの異なる比率、1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:10[v/v]で混合したものを準備しました。全ての試料は、HPLC に注入する前に大きな凝集物の存在をプレートリーダー型光散乱測定器 DyanPro Plate Reader でスクリーニングしました。

試料測定のシステム構成及び条件は、30 ㎝長の SEC カラム、移動相:生理食塩水、流速 0.5mL/min、各試料の注入量:30μL、検出器は、260 nm と 280 nm の波長を測定可能な UV-Vis 検出器、内蔵式オンライン動的光散乱(DLS)モジュール WyattQELS®を搭載した DAWN® MALS 検出器、Optilab® RI 検出器からなります。

MALS、DLS、UV(両波長)、RI 検出器からのデータは ASTRA®ソフトウェアで収集しました。

結果と考察

空及びフルの AAV 試料の測定によって得られた dRI クロマトグラムを図 1 に示します。ASTRA データ解析により、凝集物とフラグメントは、確認されるピークテーリングもなくメインモノマーピークから十分分離されています。2 回の測定で保持時間とピーク面積の優秀な再現性を確認し、ピーク面積は注入量と直線的に相関していました。これらの観察結果は、2 つの AAV 試料のために検討した SEC の分離条件は最適化され、SEC カラムからの全量の回収を達成できると判断できます。

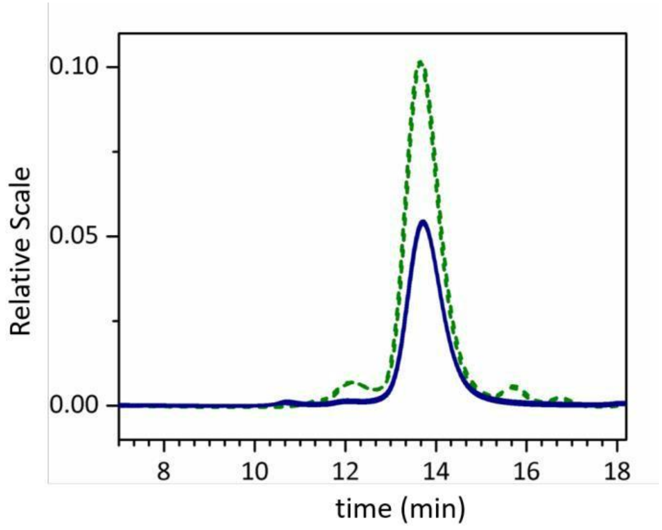


図 1. 空(緑の破線)及びフル(青の実線)の試料の 2 つの注入によって得られた dRI クロマトグラムを重ね書きしています。

キャプシド蛋白質及び DNA ペイロードの UV 吸光係数は、キャプシドの蛋白質シェル(dn/dc=0.185 mL/g)およびカプセルに内包された DNA(dn/dc=0.170 mL/g)に加えて、空及びフルの AAV 試料を用いて dRI 及び UV のシグナルから決定しました。260 nm での吸光係数は蛋白質と DNA で各々1.3 mL/(mg・cm)及び 25 mL/(mg・cm)であるとわかりました。280 nm での吸光係数は蛋白質と DNA で各々2.1 mL/(mg・cm)及び 15 mL/(mg・cm)であるとわかりました。異なる血清型及び変異を導入したキャプシド蛋白質では、対応するキャプシドの UV 吸光係数がわずかに異なるかもしれないことは注意すべき点です。

AAV 試料の多くの重要な生物物理学的パラメーターは ASTRA の「蛋白質コンジュゲート解析」により得られます。これらのパラメーターはキャプシドや DNA の分子量、根自乗平均半径(回転半径)Rg や流体力学的半径 Rh を含み、その結果全てを表 1 に示します。溶出時間におけるフルの AAV 試料の分子量測定結果を図 2 に示します。ここでは、フルの AAV の総分子量だけではなく、蛋白質キャプシドとカプセル化された全長の DNA の分子量も示しています。

表 1. 空及びフルの AAV の分子量及び半径の結果

Sample/ injection	M_{capsid} [MDa]	M_{DNA} [MDa]	R_g [nm]	R_h [nm]
Empty/1	3.76±0.01	0	10.6±0.1	13.3±0.4
Empty/2	3.77±0.01	0	10.6±0.1	13.3±0.4
Full/1	3.77±0.01	1.16±0.01	9.8±0.1	13.4±0.3
Full/2	3.77±0.01	1.16±0.01	9.8±0.1	13.3±0.3

キャプシド蛋白質と DNA 双方の溶出量もまた蛋白質コンジュゲート解析で測定できます。溶出量と測定した、または理論上の分子量と組み合わせると、AAV 試料の 3 つの重要な性質：全粒子濃度、キャプシドの相対内容量、凝集の含有率に変換できます。

全粒子濃度

粒子濃度やキャプシド濃度として参照される全 AAV 粒子の濃度は式(1)を用いて計算されます。

$$C_{AAV} = m_P \times N_A / (M_{Capsid} \times v) \quad (1)$$

ここで C_{AAV} は全 AAV 粒子濃度、m_P は全溶出蛋白量、N_A はアボガドロ数、M_{Capsid} はウイルスキャプシドの分子量、v は AAV 試料の注入量です。本実験で用いた空及びフルの試料について、全粒子濃度はそれぞれ 8.9×10^{13} 個/mL、4.0×10^{13} 個/mL です。

SHOKO SCIENCE WYATT TECHNOLOGY

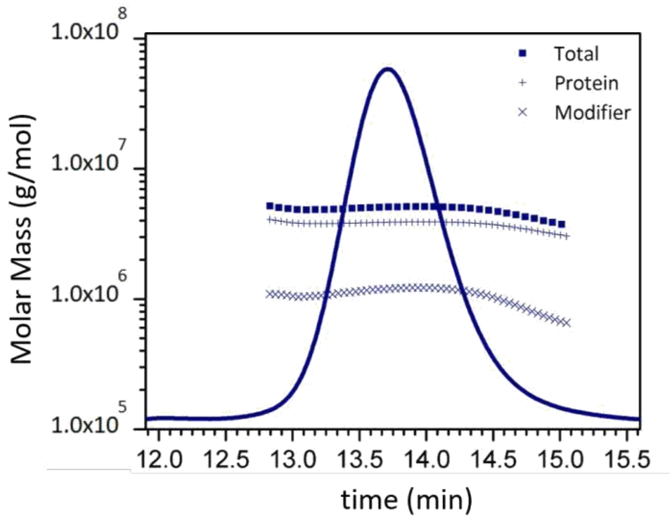


図 2. フルの AAV 試料(■)、蛋白質(+)、DNA(×)の分子量を dRI クロマトグラムと重ね合わせて示します。

キャプシドの内容量

調製中の AAV 試料にはしばしば、空及びフルの AAV の両方を含んでいます。最終的な AAV 標品のスペックとともに、標品を生産と精製の目標に合致させるために、空及びフルの AAV 粒子の割合、すなわち試料中のキャプシドの内容量を高い信頼性で決定することは重要です。AAV 全濃度は式(1)を用いて計算できます。AAV 試料中のフルの AAV 粒子の濃度 C_{full} は、式(2)に示されるように、全溶出 DNA 容量 m_{DNA} 及び全長の DNA 分子の分子量 M_{Full} を用いて、同様の方法で計算できます。

$$C_{full} = m_{DNA} \times N_A / (M_{Full} \times v) \quad (2)$$

全キャプシド及びフルの AAV 粒子の濃度が分かれば、空のキャプシドの濃度 C_{empty} は単純にそれらの差になります。

$$C_{empty} = C_{AAV} - C_{full} \quad (3)$$

C_{AAV}、C_{full}、C_{empty} 由来の複数の項を用いて AAV キャプシドの内容量を表現できます。これらの項は空の AAV%、フルの AAV%、フル/空および空/フルの比 C_p/V_g または V_g/C_p を含みます。ここで C_p はキャプシド粒子の濃度を、V_g はウイルスキャプシド濃度を意味します。

C_p/V_g の有効性のテストは、図 3 に示すように空及びフルの AAV 試料の 5 つの混合物を異なる比率で使用して行いました。プロットからわかるように、測定値と予測値の間に高度な一致が得られました。

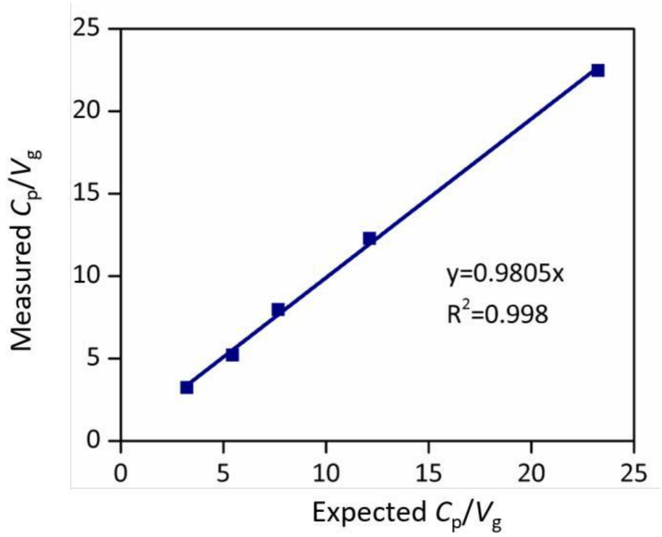


図 3. 空及びフルの試料の比率の異なる 5 つの混合物から作成した、予測される C_p/V_g の値に対する測定された C_p/V_g のプロット。

AAV の凝集

前節の式を用いて、空及びフルの AAV 試料の両方について、モノマーピーク及び全 AAV ピークにおけるキャプシドの濃度を計算し、モノマー及び凝集物の割合を得ました。空及びフルの試料におけるモノマーの割合はそれぞれ 92%及び 99%です。

凝集物は SEC カラムの分離機構よって解離させたり除いたりできます。大きな凝集物が含まれる AAV 試料の解析には、AAV 試料との相互作用や、試料を損傷させたりする固定相のない、フィールドサービス・フロー・フラクショネーション（FFF）法を採用した Eclipse システムも、凝集物の分離及び定量のための別方法として使用されています。

これらの品質特性は、2 人の異なる測定者により異なる SEC-MALS を用いても測定されました。その結果は、この方法が SEC 条件を最適化したときに、非常に強固で一致しているが確認できました。

結論

SEC-UV-MALS-dRI 法を用いることにより、AAV を基礎とした遺伝子治療ベクターの粒子濃度、相対キャプシド含量、凝集含有率、及び他の特性を再現性よく矛盾なく測定できます。また分析時には、AAV の構造や含量の事前の知識は必要としません。本手法は有効性を評価され、他のバイオ医薬品の規制当局への申請、製造、品質管理に使用されています。

結果として、この手法はAAVの製造プロセスに実装され、異なる製造ロットのための市販アッセイに用いられると考えられます。

謝辞

本研究に用いた AAV 試料について、Virovek 社に感謝致します。

参考文献

1. Bak, R. O. & Porteus, M. H. CRISPR-Mediated Integration of Large Gene Cassettes Using AAV Donor Vectors. *Cell Rep.* **20**, 750–756 (2017).

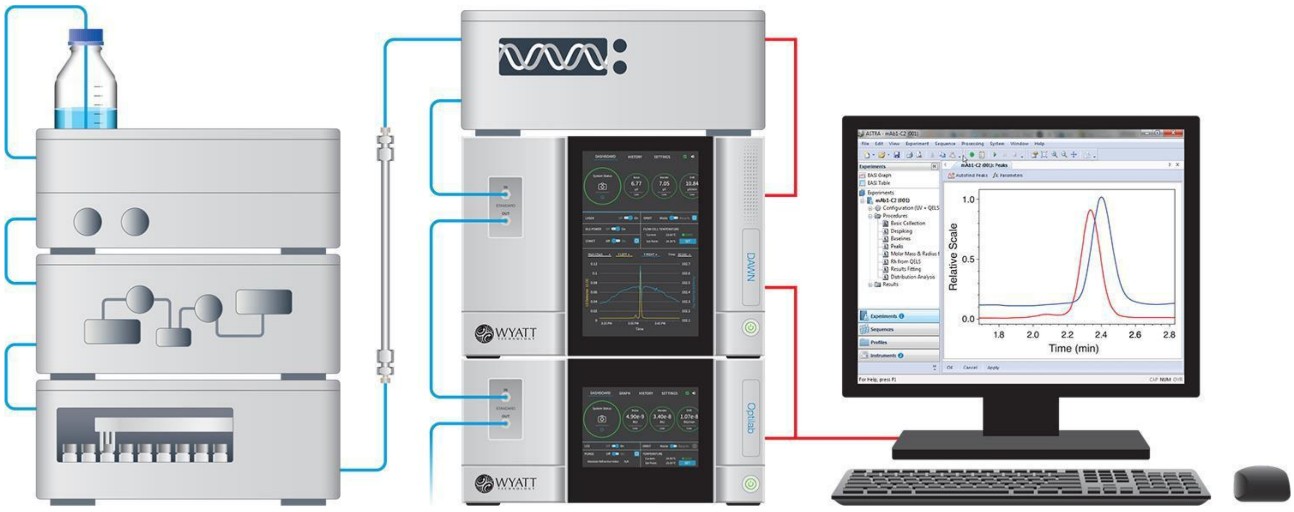
2. Hastie, Eric, and R. Jude Samulski. "Adeno-associated virus at 50: a golden anniversary of discovery, research, and gene therapy success—a personal perspective." Human gene therapy 26, no. 5 (2015): 257-265.

3. Gavin, D. K. FDA statement regarding the use of adeno-associated virus reference standard materials. *Hum. Gene Ther. Methods* **26**, 3 (2015).

4. Naso, Michael F., Brian Tomkowicz, William L. Perry, and William R. Strohl. "Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy." BioDrugs 31, no. 4 (2017): 317-334.

5. Wright, J. F. "Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies." Gene therapy 15, no. 11 (2008): 840.

6. Smith, Peter H., Sumathy Parthasarathy, Jesse Isaacs, Sharmila Vijay, Jane Kieran, Sharon K. Powell, Alan McClelland, and J. Fraser Wright. "Quantification of adeno-associated virus particles and empty capsids by optical density measurement." Molecular Therapy 7, no. 1 (2003): 122-128.



本アプリケーションノートは、Wyatt Technology Corporation が全著作権所有しています。Wyatt Technology 社による書面での事前許可なく、電子的、機械的、コピー、記録、またはいかなる手段を問わず、本アプリケーションノートの一部を複製したり、検索システムに保存したり、変換することはできません。