

# Stunner で AAV キャプシドの内部を覗いてみよう

## Introduction

アデノ随伴ウイルス (AAV) の力価を効果的に定量し、Full/Empty 比率を決定することは、遺伝子治療ベクターを開発し、製造するための大きな課題です。現在利用可能なツールには、AUC、TEM、ELISA、PCR ベースのメソッドなどがありますが、どれも迅速、容易かつ少量のサンプルから結果を得ることができません。

TEM や AUC は絶対的基準の測定方法ですが、多くの時間とサンプル、専用の装置を必要とします。ELISA や qPCR は確かな主力技術ですが、時間がかかり、各 AAV ベクターの開発と最適化が必要となります。さらに、qPCR の精度には不満が残る場合があります。1 デジタル PCR (ddPCR) 液滴は、qPCR よりも高精度ですが、ダイナミックレンジが小さく、正確なサンプル希釈が必要となります。

Stunner (スタナー) は、研究者に対してわずか 2  $\mu$ L を使用して約 1 分で AAV キャプシドの力価、Full/Empty 比率および凝集を Full に読み取ることができる、初めてのプラットフォームです (図 1)。Stunner は、高速 UV/Vis 分光法と静的および動的光散乱 (SLS および DLS) 測定を組み合わせ、 $1E12$  vg/mL 以上での力価を測定し、96 サンプルのサイズと凝集をわずか 1 時間でチェックします。さらに高いスループットを実現するために、Stunner はマイクロボリュームの SBS フォーマットのプレートを使用して自動化に対応しています。規制環境のために、Stunner の性能は、21 CFR Part 11 のツールを使用することで、米国と欧州の薬局方のコンプライアンスおよび性能の向上を検証することができます。

Stunner は、サンプルの力価測定を迅速かつ容易にし、キャプシド力価や Full/Empty 比率のチェックをより頻繁に行うことができます。PCR 法を行う前に Stunner の説明を読んでおくと、希釈因子の選択から推測の作業を省くことができます。これらの直前の実験では、サンプルの力価を素早くチェックすることで、結果を台無しにしてしまう凝集体を発見することもできます。

Stunner を使用してキャプシド力価を判定することで、あらゆるキャプシドタイプの ELISA メソッドを最適化するためにかかるアッセイ開発を避けることができます。

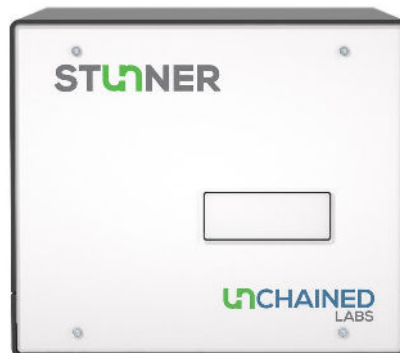


図 1 : Stunner : UV/Vis、動的光散乱 (DLS)、静的光散乱 (SLS) を組み合わせたオンリーワンの製品です。

このアプリノートでは、Stunner の AAV Quant アプリケーションが、UV/Vis 分光法、SLS、DLS を使用して、AAV の Empty/Full 比率、Full なキャプシド力価、Empty のキャプシド力価、遊離/凝集した DNA、遊離および凝集したタンパク質を定量する方法について説明しています。

## メソッド

AAV2-CMV-GFP、AAV5-CMV-LacZ、Empty の AAV5、AAV9-CMV-GFP、および Empty の AAV9 (Virovek) を、0.001%のブルロニック F68 またはクエン酸リン酸緩衝液、150mM の NaCl、pH 4.0 を含む PBS、pH7.0 で  $2E12$ – $2E13$  cp/mL に希釈しました。ストック溶液のキャプシド力価は、適切な血清型 AAV 滴定 ELISA (PROGEN) を使用して決定しました。

キャプシド形成された ssDNA の力価は、SYBR Gold の蛍光アッセイによって決定されました。AAV ストック溶液を 0.25 U/mL の DNaseI および 0.5 U/mL のベンゾナーゼ (Thermo Fisher) を含むトリス緩衝液中で調製し、37°C で 30 分間インキュベートしました。SDS、SYBR Gold、および EDTA を、それぞれ 0.05%、1x、および 1.5mM の最終濃度になるように添加しました。各サンプルの半分を 75 または 90°C に 10 分間加熱した後、室温まで冷却しました

蛍光プレートリーダーと DNA 標準曲線 (NoLimits DNA Fragments, 2500~5000 bp, Thermo Fisher) を用いて、DNA 濃度を決定しました。キャプシド形成された ssDNA の質量濃度は、加熱されたサンプル濃度から非加熱のサンプル濃度を差し引くことによって計算しました。質量濃度をウイルスゲノムの分子量で vg/mL 相当に換算しました。

各サンプルを 2 $\mu$ L、Stunner のプレートに n=4 で装填しました。AAV Quant アプリケーションは、吸水管を使用して 5 秒毎の 4 回の DLS 取得を使用して Stunner Client で選択されました。Stunner は、Full な UV/Vis の吸光スペクトルを測定し、モル吸光係数に基づいてタンパク質と ssDNA の力価を決定し、AAV サンプル中のタンパク質、ssDNA、および一般的な不純物の吸光度の寄与を区別します。公表されているアミノ酸配列をもとに、各 AAV 血清型のモル吸光係数を算出しました。製造者から提供された核酸配列をもとに、各ウイルスゲノムのモル吸光係数を算出しました。総キャプシド力価、Full なキャプシド力価、ssDNA の力価、タンパク質の力価、Empty の割合、および Full の割合を Stunner Analysis により測定しました。

## 結果

Stunner の AAV Quant は、DLS、SLS、UV/Vis 技術を組み合わせてキャプシド力価を測定し、同時に総タンパク質、総 DNA、Full/Empty 比率についての知見を得ることができます (図 2)。DLS は、溶液中の粒子のサイズとサイズ分布を識別するための古典的な光散乱技術です。DLS の強度分布は、AAV サンプルで一般的に見られるキャプシドと凝集体によって散乱された光の相対強度を示しています。DLS の実験中に収集された SLS 強度は、粒子濃度に正比例します。そのため、SLS の強度はキャプシド力価を決定するために使用することができますが、Full なキャプシドと Empty のキャプシドでは、同じ濃度でも光の散乱量が異なります。そのため、サンプルから散乱された光の強度が一定であれば、正確な粒子濃度を得るためには DLS や SLS だけでなく、UV/Vis のデータも必要となります。

UV/Vis 分光法は、サンプル中に存在するタンパク質と DNA の総量を決定しますが、それ自体では、そのタンパク質と DNA の量がどのくらい AAV キャプシドにパッケージ化されているかを知ることができません。2 精製されたサンプルの場合、存在するタンパク質と DNA の比率は、Full/Empty 比率にも関係しています。DLS の情報と組み合わせると、Stunner は総キャプシド力価、Full なキャプシド力価、および AAV サンプルの Full/Empty 比率を計算するのに十分な情報を持っています。Stunner は、約 2E13 cp/mL の AAV5 サンプルのタンパク質価を 2 つの成分に区別しました。

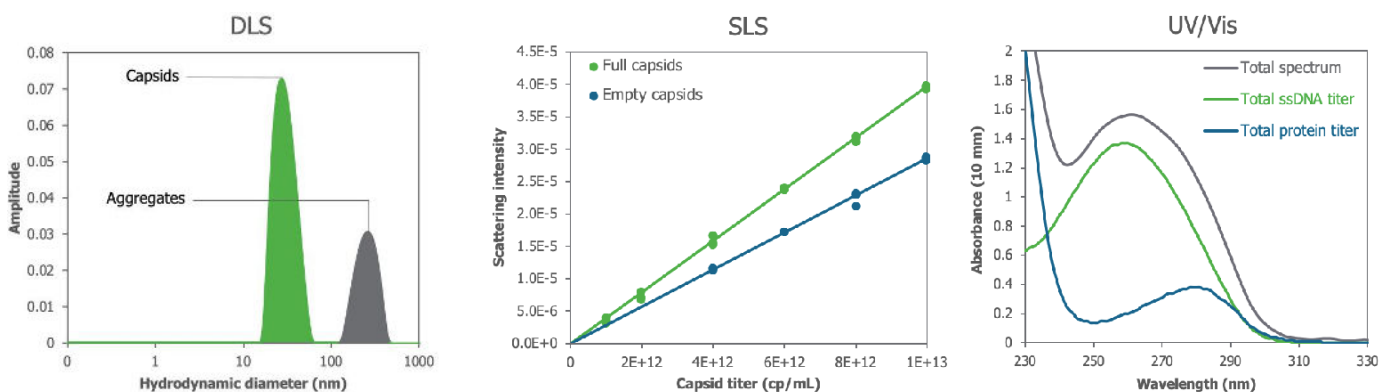


図 2 : DLS の強度分布は、 intact なキャプシドと凝集したキャプシドによって散乱された光の相対的な強度を示しています。DLS と同時に収集された SLS 散乱強度は、キャプシド力価に正比例しますが、Full なキャプシドと Empty のキャプシドでは、同じ力価でも異なる強度の光を散乱します。UV/Vis 分光法は、精製された AAV サンプルに存在する ssDNA とタンパク質の量を定量化することができ、これは Empty/Full 比率に関係しています。Stunner は 3 つの検出方法を組み合わせて、キャプシド価、Full な力価、Full/Empty 比率を決定しますが、より詳細な情報を明らかにすることもできます。

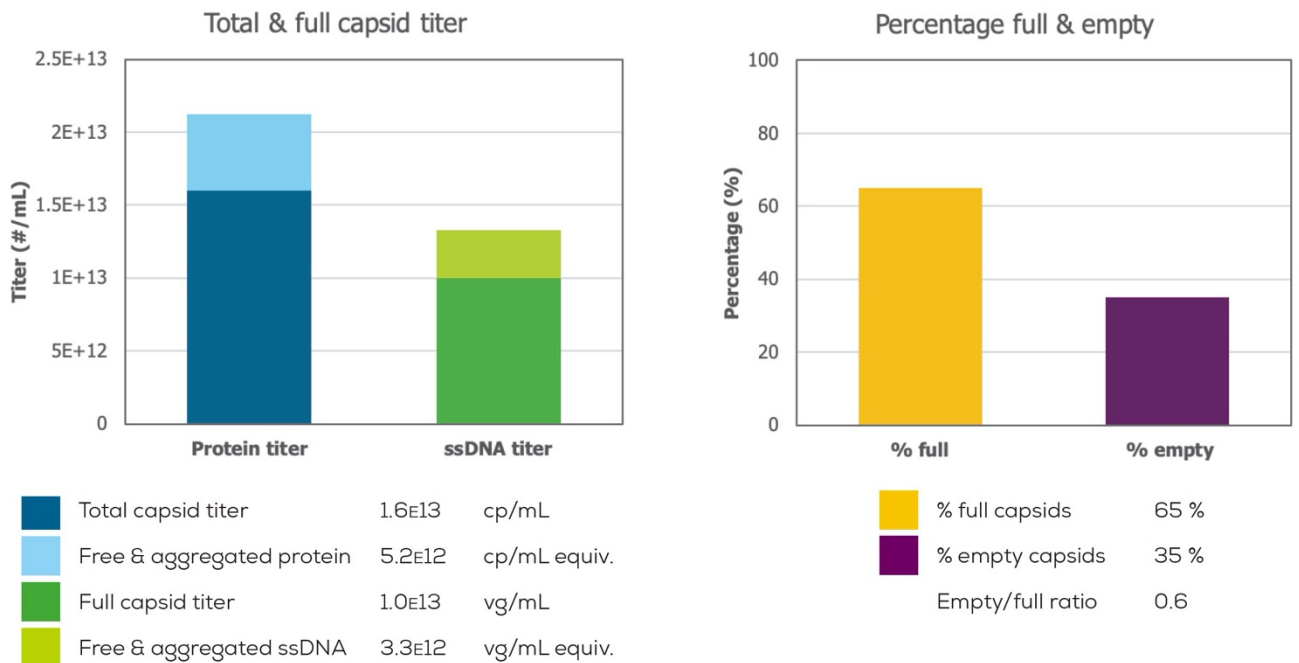


図 3 : UV/Vis 吸光度、DLS、および SLS を組み合わせることで、Stunner は AAV の総キャプシド力価、Full なキャプシド力価、遊離および凝集したタンパク質、遊離および凝集した ssDNA、Full の割合、Empty の割合、および Full/Empty 比率をレポートすることができます。

遊離および凝集したタンパク質（水色）と、Full なキャプシドや Empty のキャプシドを含むインタクトな総キャプシド力価（紺色）です（図 3）。タンパク質の力価は、UV/Vis 吸光度によって測定される、サンプル中のタンパク質から組み立てられる可能性のあるキャプシドの最大数です。Stunner は、タンパク質の力価を cp/mL 換算で表しています。ssDNA の力価は、UV/Vis で測定されたすべての DNA が、ssDNA ゲノムである場合に可能となるウイルスゲノムの最大数です。Stunner は、この値を vg/mL 換算でレポートされる遊離および凝集した ssDNA（薄緑色）と、vg/mL 換算でレポートされる Full なキャプシド力価（深緑色）に分離しています。

Full の割合（黄色）の値は、Full なキャプシド力価（深緑色）を総キャプシド力価（濃い青色）で割ったものです。一方で、Empty の割合（紫色）は、Full の割合と 100%の差です。また、Stunner は Full/Empty 比率をレポートするので、利用者にとって最も便利な指標を活用できます。

### キャプシド力価、ssDNA の力価、および Full の割合

サンドイッチ ELISA は、AAV キャプシド力価を決定することができますが、対象となる AAV 血清型および高品質の標準をターゲットとする抗体が必要で、これらは常に利用できるとは限りません。

Stunner のキャプシド力価を ELISA と比較して、 $2E12 \sim 2E13$  cp/mL の Empty および Full な AAV9 の希釈系列を調べました（図 4A）。Stunner と ELISA のキャプシド力価間の線形回帰は、 $R^2$  値  $> 0.98$ 、および 1 に近い傾きを有し、AAV キャプシド力価を決定する、これらの 2 つの方法間で高いレベルの一致を示しました。

総キャプシド力価とともに、Stunner は、UV/Vis 吸光度によって決定された ssDNA およびタンパク質の比率と、DLS および SLS によって決定されたインタクトなキャプシドの数を組み合わせることによって、AAV9 希釈系列の Full なキャプシド力価を計算しました（図 4B）この Full なキャプシド力価は、サンプル中のキャプシド形成された ssDNA の量に相当します。また、総キャプシド化された ssDNA は、上記のように AAV キャプシドが破壊された後の SYBR Gold の蛍光増加によって定量化されました。Stunner と SYBR Gold アッセイの両方とも配列特異的で、プライマーによって標的とされていない DNA を定量化しない PCR 法とは対照的に、キャプシド形成された ssDNA の総量を定量化します。

また、Stunner は Empty および Full な AAV9 希釈シリーズの Full の割合をレポートしました。この結果は、SYBR Gold アッセイからキャプシド形成された

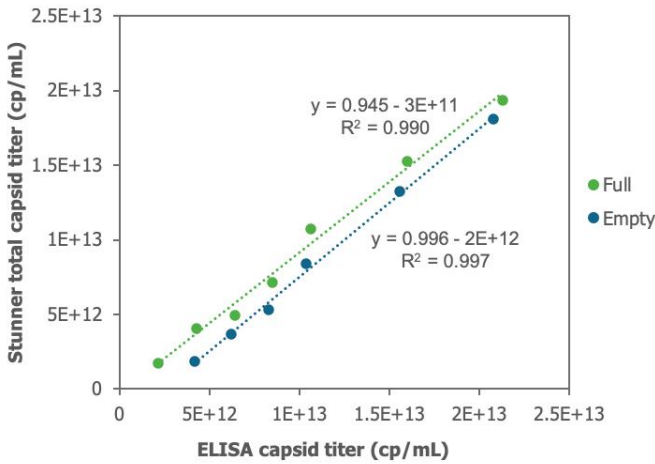
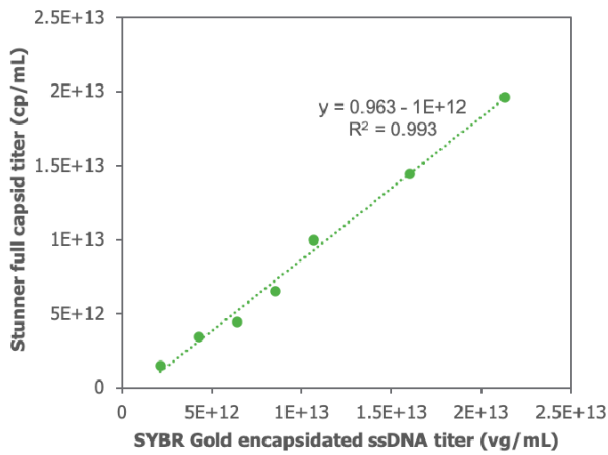
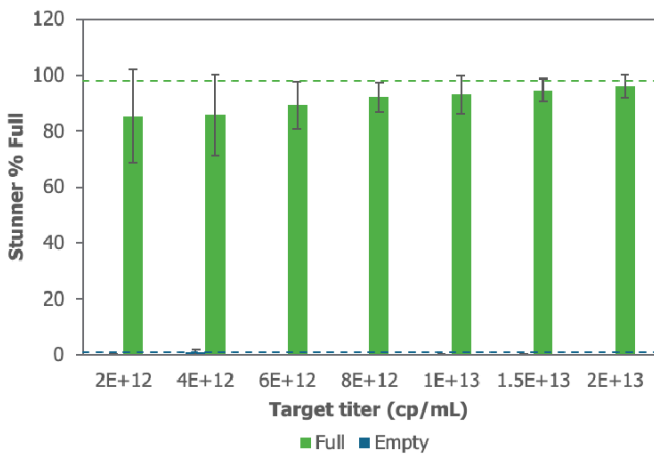
**A****B****C**

図 4 : 2E12–2E13 cp/mL からの Full および Empty の AAV9 の希釈系列に関して、Stunner により決定された力価を、既知の ELISA 力価 (A) または SYBR Gold アッセイ (B) によって決定した、キャプシド形成された ssDNA の力価と比較しました。Stunner による両希釈系列 (C) の Full の割合は、Full (緑の破線) および Empty (青の破線) のストックに関して、SYBR Gold アッセイおよび ELISA による Full の割合と比較しています。エラーバーは、 $\pm 1$  の標準偏差 (SD) です。

ssDNA と ELISA の総力価を組み合わせることで決定された割合の Full 値と密接に一致しています (図 4C)。Stunner は、標準品、ラベル、追加の試薬を使用せず、代わりにタンパク質や核酸のよく知られた生物物理学的特性に依存しています。

Stunner は、サンプルの前処理が不要で、必要な結果を迅速に得ることができる単一の定量化ツールです。

AAV の生産で最も困難な問題の一つは、単一ロットで生産された AAV キャプシドのほとんどが DNA を含まないため、収量が低いということです。キャプシドの混合物中の Full/Empty 比率を定量化するためには、2 つの別々のアッセイ (PCR ベースの方法と ELISA) を行うか、時間のかかるアッセイや容量の多いアッセイ (TEM または AUC) を選択する必要があります。

Stunner は、わずか 2  $\mu$ L のサンプルを使用して、1E13 cp/mL および 2E13 cp/mL での Empty の AAV9 の Full の割合および Empty の割合と既知の混合物を数分間で決定した (図 5)。このアッセイの精度は、ほとんどの場合で標準偏差が 5% 未満となり、非常に精度が高い結果でした。

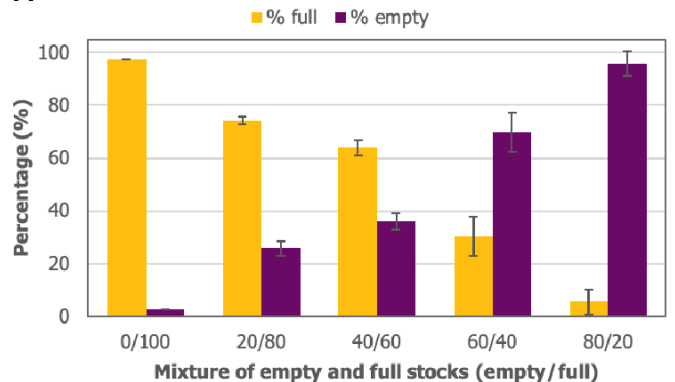
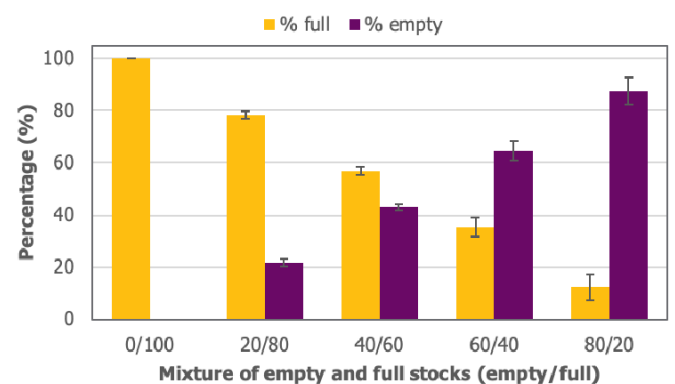
**A****B**

図 5 : 1E13 (A) および 2E13 (B) cp/mL で 4 重にした、AAV9 の既知の混合物の Full (黄色) と Empty (紫色) の割合。エラーバーは  $\pm 1$  の SD です

## 集計と力価

多くの場合、AAV サンプルはインタクトなウイルス、遊離したタンパク質、遊離した DNA、および凝集したウイルスの混合物を含んでいます。これらの不純物を特定して定量化することは、サンプル中に何が含まれているかを正確に理解し、AAV 製造プロセスを最適化するための意思決定を行う上で非常に重要です。UV/Vis、DLS、SLS を組み合わせた場合にのみ、これらの見識を得ることができます。一つの例で言えば、Stunner は、Empty の AAV5 の株が、3.4% の CV の精度でほとんどインタクトなキャプシドを含み、サンプルが少量の凝集したタンパク質不純物を含むことを発見しました（図 6A）。しかし、同等のキャプシド力価での精製された「Full な」AAV5 の株には、かなり多くの凝集したタンパク質および DNA が含まれ、70% の Full なキャプシドのみを含んでいました（図 6B）。集約されたサンプルでも、Stunner は 1.6% から 15% の CV の精度を示しました。サンプルがどれほどきれいか、またはサンプルに含まれる Full なキャプシドの数に関係なく、Stunner はサンプルに何が含まれているかを正確に把握する際に役立ちます。

AAV の保存条件の評価は時間のかかるプロセスですが、使用している分析ツールが機能的なアッセイのみの場合は、さらに時間がかかります。AAV 血清型の中には、他の血清型よりも凝集しやすいものがあるため、保存実験はより複雑になります。2 機能的アッセイでは、感染性粒子が失われた状況は分かる場合がありますが、その理由については分かりません。Stunner の DLS は、サンプルが凝集しているかどうかを示しているため、細胞ベースのアッセイで時間を無駄にすることなく、AAV のサンプルが不良になっているかどうかを知ることができます。

4°C で 2 週間保存した AAV2 と AAV9 の Stunner の DLS 強度分布は、AAV2 が AAV9 よりもはるかに大きな流体力学的直径にピークを有していたことを示しており、有意な凝集を示しています（図 7）。AAV2 サンプルの大きな水色のバーは、保存された誘起凝集の程度を示しています。一方で、AAV9 のグラフを支配する濃い青色と緑色のバーは、サンプルのほとんどがインタクトで Full なキャプシドであることを示しています。

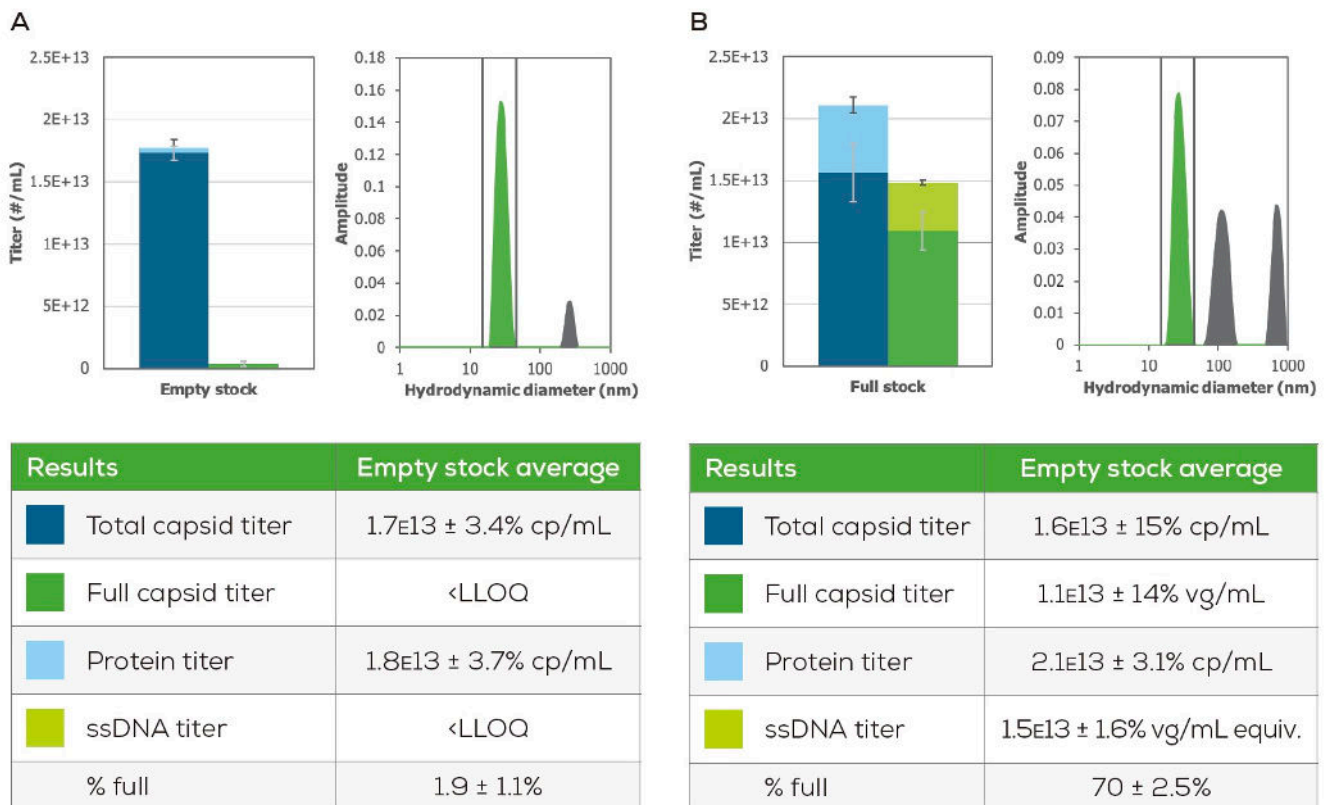


図 6 : Stunner は、総量と Full なキャプシド力価、タンパク質の力価、ssDNA の力価、および Full (A) と Empty (B) の AAV5 の株の凝集と Full の割合を、2E13 cp/mL で 4 重という状況下で決定しました。強度分布の緑色の領域は、インタクトなウイルスキャプシドによる散乱強度を示し、灰色の領域は、凝集体の散乱とサイズを示しています。垂直方向の灰色の線は、インタクトなキャプシドのサイズの上限および下限を示しています。

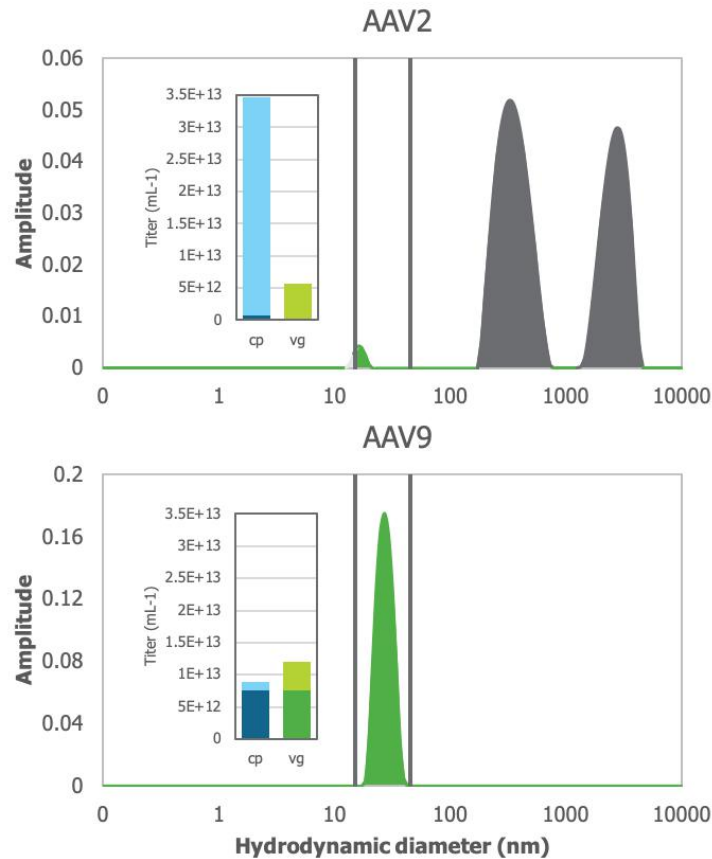


図 7：両方のサンプルを 4℃で 2 週間保存した後、DLS 強度分布は、AAV2 が AAV9 よりも凝集が多く、AAV9 がより Full でインтактなキャプシドを有していたことを示しています。

細胞ベースのアッセイでは機能しないことが分かっているサンプルを素早く除外することで、時間を節約し、機能することが分かっているサンプルに集中することができます。

特に pH に関しては、AAV ベクターの製剤化研究において、適切な緩衝液を選択することが絶対に必要です。3AAV を特性化するために使用するツールが時間がかかり過ぎたり、サンプル量が多すぎたりすると、最適な緩衝液を逃してしまう可能性があります。Stunner は 2 $\mu$ L を使用して、わずか 1 時間でストレス後の凝集について最大 96 サンプルをスクリーニングするため、最も保護的な緩衝液を識別することができます。

Full な AAV9 を中性 (pH 7) 緩衝液中で 25 分間 45℃ に加熱すると、ある程度の凝集を引き起こしましたが、酸性 (pH 4) 緩衝液中で加熱すると、ほぼ Full な凝集を引き起こしました (図 8)。Stunner は、DLS を超高速で読み取ることで、従来の方よりも多くの緩衝液やストレス条件を簡単に評価できると同時に、力価の測定結果を提供してくれます。

## 結論

AAV の力価と Full/Empty 比率の定量化は困難な作業です。他の方法では時間がかかり、かなりの量のサンプルを必要とします。Stunner は、少量のサンプルからキャプシド力価、ssDNA の力価、Full/Empty 比率をハイスループット測定することで、処理を高速化します。正確な力価に加えて、Stunner の UV/Vis と DLS の組み合わせにより、AAV の品質をより深く調べることが容易になり、凝集体、問題のあるサンプルの特定や、ストレス状態をわずか数分でテストすることができます。ベクターが研究、開発、製造のいずれにあるかは関係なく、Stunner は必要なデータを提供しキャプシドの内部を把握するのに役立ちます

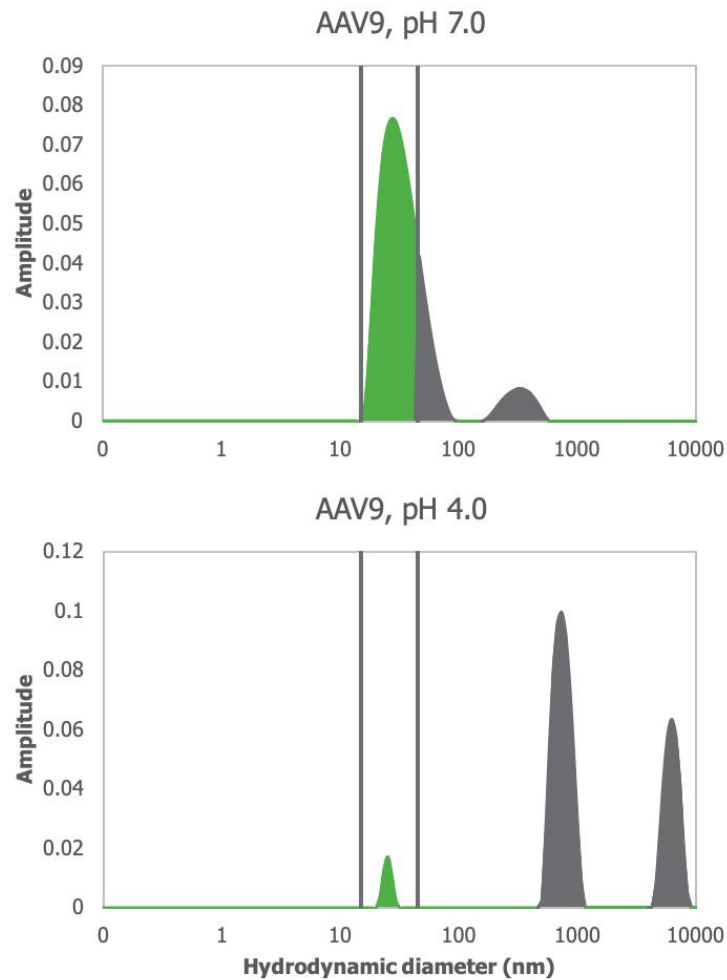


図 8 : pH 7.0 および 4.0 の緩衝液中の 1E13 vg/mL の Full な AAV9 を 45℃ で 25 分間加熱した後、Stunner で測定しました。

## 参照

1. Accurate quantification and characterization of adeno-associated viral vectors, D. Dobnik, et al., *Frontiers in Microbiology*, 2019; 10(JULY):1570.
2. Quantification of adeno-associated virus particles and empty capsids by optical density measurement, JM Sommer, et al., *Molecular Therapy*, 2003; 7(1):122-8.
3. Pharmaceutical Development of AAV-Based Gene Therapy Products for the Eye, G. Rodrigues, et al., *Pharmaceutical Research*, 2019; 36:29.