

BigTuna と Uncle によるAAVバッファーと安定性の探索

Introduction

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、精製プロセスにおいて、バッファー塩、pH、およびイオン強度を探索する際に多くのストレスにさらされ、AAVとしての機能を低下させます。

適切なバッファーの選択と安定性の特徴付けは、非常に重要であるが、ほとんどのワークフローは、多くのサンプル量が必要であり、またバッファー交換・濃縮には多くの時間がかかります。

透析および遠心分離装置などを用いた従来のバッファー交換・濃縮方法は、労働集約的であり、より多くの数を管理することが困難である。BigTunaは、手動では達成できない均一なサンプル処理と自動プロセス制御を可能にした、ハイスループット自動バッファ交換システムとして開発されました(図1A)。

AAVの安定性は、新しいプロセスバッファーごとに特徴付ける必要があります。しかしながら、これらの試験は、関連するアッセイの難しさのために、めったに実施されません。形質導入アッセイまたは感染性アッセイなどの機能的アッセイは、高価で高感度のセットアップで数日を要します。電子顕微鏡および他の構造特性評価ツールは、低スループットであり、高度に熟練したオペレータを必要とします。プロセス開発において、すべてのバッファーの安定性を効果的にスクリーニングするには、どれも十分ではありません。

Uncleは、ウイルスの熱安定性を迅速にプロファイルするために、フルスペクトル蛍光、静的光散乱(SLS)、および動的光散乱(DLS)の3つの検出方法を備えたマルチモード安定性プラットフォームです(図1B)。蛍光、凝集、サイジング、およびサイズ分布のような複数のパラメーターは、たった1回の測定で得ることができます。Uncleは最大48個のサンプルを同時に測定することができ、必要なサンプルはわずか9 μ Lです。

A



B



図1:(A) Big Tunaは、最大96個の独特なサンプルのバッファ交換および濃縮を自動化します
(B) Uncle:ワンストップAAV安定プラットフォーム。

AAVの熱変性には、ゲノム放出とキャプシド破壊の2つの経路があります。Uncleのウイルスツールボックスは、SYBR GoldのようなDNA結合蛍光色素を用いてゲノム放出を追跡し、融解温度(T_m)を測定することができます。キャプシド破壊は、ウイルスのキャプシドが構造的完全性を失ったときに起こりますが、キャプシドタンパク質の固有の蛍光をモニターすることによって、アンフォールディング挙動を調べることができます

このアプリケーションノートでは、異なるバッファでAAV安定性スクリーニングを実行するために、BigTunaとUncleを組み合わせて使用しました。AAV9を5つのバッファに変え、得られた試料を2倍に濃縮しました。Uncleは、異なるバッファ中のゲノム放出、キャプシド破壊、および凝集をモニターすることにより、AAVベクターの熱安定性を測定しました。さらに、Uncleは、熱処理の前後でDLSによるAAV粒子のサイズを測定しました。

方法

AAVおよびバッファの調製

0.001% Pluronic F68を含むpH 7.4のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中のAAV9-CMV-GFP(Virovek)を、製造業者のプロトコルに従ってAAV9滴定ELISA(Progen)により測定した、7E11 cp/mLに調製しました。5つのバッファ(表1)を調製し、0.2µmフィルターに通しました。PBS、pH 7.4、0.001% Pluronic F68を、初期および最終バッファが同じであるプロセスコントロールとして使用しました。他の4つのバッファは、公表されたクロマトグラフィーバッファです。pH 4.0のクエン酸-リン酸バッファはAAV9の安定性にマイナスの影響を与えることが示されており、ここではpositive controlとして使用しました。3 バッファをバッファ交換前にBigTunaのデッキ上に置き、AAV9を10 kDaのUnifilter 96(380µL/ウェル)の10ウェルにピペットしました。

バッファ交換

BigTunaは、バッファを除去および置換するために、圧力ベースの限外濾過/透析濾過(UF/DF)法を使用しています。プレートは穏やかに混合され、溶液を均一に保ちつつ、AAVが膜表面に蓄積しないように機能し、これは

dead-end filtration methods.よりも速く完了します。このセットアップは様々な条件に適応可能であり、1サンプルあたりわずか100µLの単一実験において最大96個のユニークなベクターおよび製剤のバッファ交換が可能です。

バッファ交換プロトコルは、1サイクル当たりの総交換量を96% (1サイクル当たりの除去量を33%) に設定しました。軌道攪拌サイクルは100%に設定し、バッファ交換後に各サンプルを2倍濃縮するために、最終ウェル容積を190µLに目標としました。バッファ交換および濃度後、ELISAによりキャプシド力価を3回測定しました。予想力価は、初期容量、最終容量、および開始キャプシド力価を用いて決定しました。

キャプシド破壊

すべてのUncle測定について、蛍光をモニターしながら、9µLの各AAV試料を3回繰り返して、0.4°C/分の速度で15~95°Cから加熱しました。キャプシド蛋白質のア unfoldsingを、UncleのDLSアプリケーションを用いて、 T_m および内在性蛋白質蛍光を266nmレーザーで励起し、 T_{agg} を測定した。DLSは、昇温前後にそれぞれ測定しました。Uncle分析ソフトウェアは、315~430nmの蛍光強度曲線の重心平均(BCM)に基づいて T_m を決定しました。

ゲノム放出

DMSO(Thermo Fisher Scientific)中の10,000x SYBR Goldを、各バッファ中の400xのストックに希釈しました。AAV9サンプルおよび処方検討を、ウイルスツールボックスの一部であるUncleのCapsid Stabilityアプリケーションを用いて20x SYBR Goldで試験しました。SYBR Goldを473nmレーザーで励起し、Uncle分析ソフトウェアで500~650nmの蛍光強度曲線下面積でゲノム放出 T_m を測定し、 T_{agg} 473はSLS強度に基づいて測定しました。

Treatment	Buffers
Concentrated only	PBS, pH 7.4, 0.001% Pluronic F68
Buffer exchanged & concentrated	25 mM Na ₂ HPO ₄ , 100 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , pH 6.5 ⁴
Buffer exchanged & concentrated	20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.0 ⁵
Buffer exchanged & concentrated	100 mM NaAcetate, 500 mM NaCl, pH 5.0 ⁵
Buffer exchanged & concentrated; Positive control for AAV stability	61 mM citric acid, 78 mM Na ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl, pH 4.0 ³

表1: Big Tunaバッファは、pH 7.4のPBS中7E11 cp/mL AAV9を0.001% Pluronic F68と交換し、次いで2倍濃度としました。

Buffer	Expected titer (cp/mL)	Measured titer (cp/mL)	% Recovery
PBS, pH 7.4	1.62E12	1.63E12	101 ± 0.8
Na ₂ HPO ₄ , pH 6.5	1.59E12	1.54E12	96 ± 2.5
Tris, pH 8.0	1.64E12	1.61E12	98 ± 2.0
NaAcetate, pH 5.0	1.57E12	1.43E12	91 ± 1.3
Citrate-phosphate, pH 4.0	1.58E12	1.12E12	71 ± 7.4

表2: ELISAで測定したバッファ交換後の予想キャプシドカ価、測定したキャプシドカ価およびAAV9の回収率

結果

バッファー交換

BigTunaは、2時間以内に10ウェルすべてのバッファー交換および濃縮を完了しました。バッファー交換および濃縮後の予想されるAAV9キャプシドカ価および測定されたAAV9キャプシドカ価を%回収率と共に測定しました(表2)。PBS、pH 7.4プロセス制御および3つのバッファーは90~100%の回収率を示しています。ELISA法では、クエン酸-リン酸バッファー対照のキャプシドカ価が予想よりも顕著に低く、さらなる特性評価が必要となりました。

凝集は、完全なキャプシド上で起こることもあれば、キャプシドタンパク質の折りたたみがほどこけることでも起こり、バッファーの条件によって強く影響を受けます。Uncleでは、SLSはサーマルランプ中の凝集を監視し、使用されます。

凝集温度(T_{agg})を同定する一方、DLSは粒径および粒度分布を報告することにより凝集を検出します。

バッファー交換前、交換後、および3つのクロマトグラフィーバッファー中のPBS中のAAV9のUncleDLS測定は、約25nmで単一の明確な強度ピークを示しました(図2)。これは、これらの試料が無傷であったことを示しています。クエン酸-リン酸バッファー(図2、赤線)におけるAAV9は、~120nmに第二のピークを有し、凝集体の存在を示しました。この結果は、AAV凝集体がELISA法によって効率的に捕捉されず、定量化されないため、測定された回収率が低いことと一致していました。Uncleの初期のDLS測定は、プロセス開発の一環として、AAV凝集およびサンプル品質を評価するのに最適です。

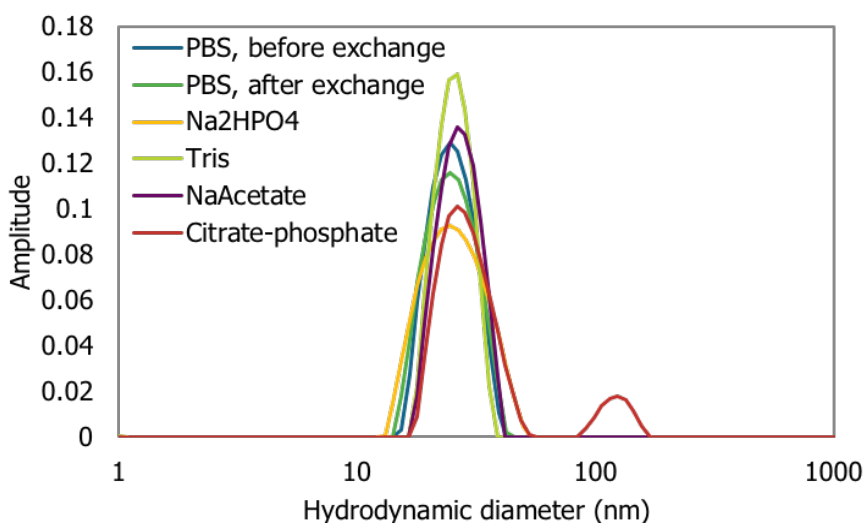


図2: 交換前のAAV9の代表的な初期DLS強度分布(青色)および全5種類の濃縮サンプル

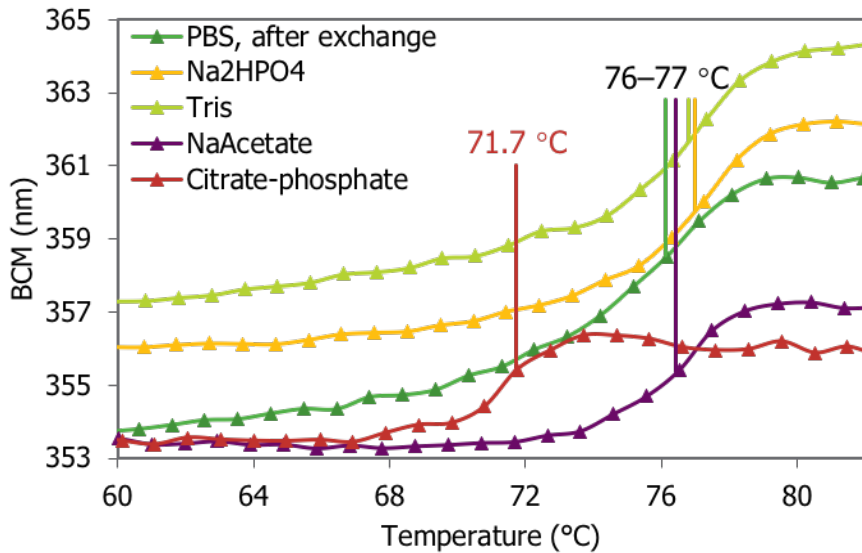


図3:キャプシド融解温度 T_m (実線)を有する5つの濃縮試料のキャプシド破壊融解曲線。

熱安定性

5つの濃縮サンプルのうち4つの平均キャプシド融解温度 T_m は76 ~ 77°Cでした(図3)。クエン酸-リン酸バッファー中のAAV9は71.7°Cのキャプシド融解温度 T_m が有意に低く、これらの結果は、AAV9キャプシドは試験した5つの条件のうち4つで同様の熱安定性を有し、クエン酸-リン酸塩pH4.0 バッファーの安定性が有意に悪かったことを示しています。

PBS (コントロール) およびクエン酸-リン酸バッファーにおけるAAV9は、熱安定性において最大の差を示しました(図4)。これら2試料間のキャプシド融解温度 T_m の差は4.4°Cでしたが、ゲノム放出 T_m の差は11.9°Cでした。

DLSは室温でクエン酸-リン酸バッファー中でいくぶん凝集しましたが、 $T_{agg}=43.5^\circ\text{C}$ で顕著な凝集を示し、ゲノム放出と密接に一致しました。ベクターがPBSにあるとき、 T_{agg} はキャプシド融解温度 T_m に近い結果となりました。

製剤処方、AAVゲノムの放出、キャプシドの安定性および凝集に大きく異なる影響を及ぼす可能性があります。Undelは、これら3つのイベントすべてを単一の使いやすいプラットフォームで測定可能です。

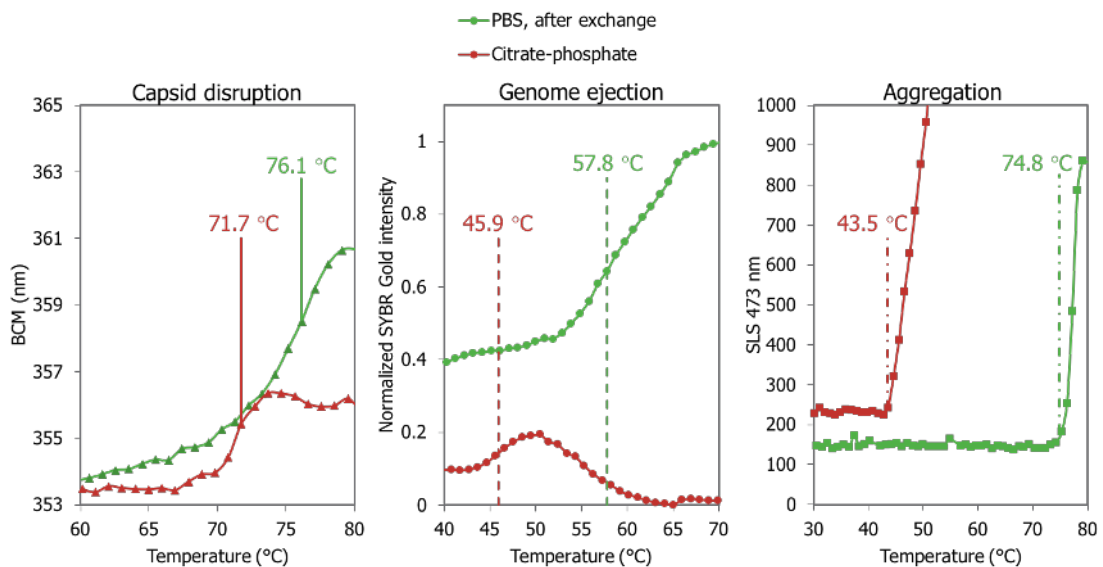


図4: Big Tunaによる濃縮後のPBS(緑)およびクエン酸-リン酸(赤)におけるAAV9のキャプシド破壊(左)、ゲノム放出(中央)およびSLS 473強度(右)曲線。未決定のキャプシド融解温度 T_m (実線)、ゲノム放出 T_m (破線)および T_{agg} (破線)。

結論

AAVプロセスの開発と安定性の特徴付けは、低いアッセイ・スループット性および多くのサンプル量を要求するため、十分に検討されていない分野です。BigTunaはバッファーの交換を低容量で自動化し、AAVサンプルを並行して異なるバッファーまたは製剤処方に迅速に濃縮します。そしてUncleのウイルス・ツールボックスと固有蛍光検出はAAVの安定性と凝集を測定します。Big TunaとUncleにより、バッファー交換と濃度と多面的な安定性評価測定の組み合わせは、AAV安定性評価を飛躍的に向上させます。

References

1. Structural characterization of a novel human adeno- associated virus capsid with neurotropic properties, H Hsu, et al., Nature Communications, 2020; 11(1):3279.
2. Characterization of AAV vector particle stability at the single capsid level, J Bernaud, et al., Journal of Biological Physics, 2018; 44 (2):181–94.
3. A simplified purification protocol for recombinant adeno- associated virus vectors, M Potter, et al., Molecular Therapy - Methods and Clinical Development, 2014; 1:14034.
4. A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and -5, N Brument, et al., Molecular Therapy, 2002; 6(5):678–86.
5. Affinity Chromatography Handbook Vol. 3: Specific Groups of Biomolecules, G Healthcare, 1962.