



遺伝子治療におけるバイオプロセッシングを促進する 迅速で自動化されたat-line AAV2ウイルスの定量測定

Hongshan Li, ForteBio, Fremont, CA

Terese Joseph, Benedict Kang, Amanda Rose, Kurt Boenning and Todd Sanderson, Pall Corporation, MA

イントロダクション

遺伝子組み換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) は、増えている臨床試験数とその有望な結果によって示されるように、遺伝性疾患に対する遺伝子治療の分野で最も有望なウイルスベクターの1つです。既に欧州のGlybera (uniQure) と米国のLuxturna (Spark Therapeutics) によって2つの製品が上市されています。それでもAAVのバイオプロセスと製造における分析方法はまだ開発の初期段階にあり、継続的な強化を必要としています (Ref.1)。

AAVウイルス粒子を定量化するための迅速かつat-lineで正確なメソッドは、遺伝子治療のバイオプロセッシングに不可欠です。キャプシド力価は一般的にELISAで測定されますが、空のキャプシド力価と完全なキャプシド力価の区別、および比率は超遠心分析 (AUC) で取得され、ウイルスゲノム力価はddPCR測定されます (Ref.2)。現在用いられているこれらの手法は一般的に時間がかかり、多くの人手を要します。そのためバイオプロセスの開発や製造をモニタリングするために必要な、at-lineで迅速なウイルス力価の測定には実用的ではありません。本資料では、ForteBioのOctetプラットフォームにおけるAAV2の迅速でハイスループットなキャプシドアッセイの開発について報告します。これは、バイオプロセス環境でウイルス力価のat-lineの一般的なアッセイ方法として用いられているELISAやddPCRと比較して、優れた精度と信頼性を示しています。

Octetシステムとバイオレイヤー干渉法

Octet®システムによる濃度測定の原理は、ELISAなどの確立されたイムノアッセイと同様です。しかしながらOctetプラットフォームの定量プロトコルはいくつかのメリットを提供します。Octetは溶液中の検体がバイオセンサー表面へ結合するのをリアルタイムで測定します。ラベル化、二次バインダー、その他の検出試薬は必要ありません。この相互作用リアルタイムモニタリング機能により、特異的および非特異的結合の明確な識別が可能になり、アッセイ開発時間を劇的に短縮できます。

Octetの定量アッセイもはるかに高速です。96ウェルプレートの定量測定は、機器のモデルによりますが5分～60分で測定できます。

Octetシステムは生物学的製剤のR&Dのさまざまな段階でタンパク質の特性評価に日常的に使用され、薬物とターゲットの相互作用における結合親和性や速度論解析、およびバイオプロセスサンプルのタンパク質濃度の測定などに使用されています。タンパク質製剤の定量に使用されているのと同じ原理がAAVウイルス粒子の分析にも適用されます。Octetプラットフォームは、シンプルなDip and Read™アプローチを使用して、96および384ウェルマイクロプレートに分注されたサンプルを迅速に分析します。サンプル中の標的ウイルス粒子の濃度は、直接結合アッセイによって決定されます。リガンドと呼ばれる捕捉分子でコーティングされたバイオセンサーは、結合相互作用を測定するために高度に並列で、かつ自動で、検体を含む溶液に浸されます。典型的な定量分析では、濃度既知の検体を使用して標準曲線が作成され、未知サンプルの濃度が標準曲線から補間されます。濃度は結合の初期勾配に基づく相互作用の初期結合率から、または結合が平衡に達する点から計算可能です。

このアプリケーションノートでは、AAV2ウイルス粒子を定量化するためのアッセイの開発について説明します。このアッセイは、ストレプトアビジンバイオセンサーに固定化されたヘパリンを使用してAAV2ウイルスを捕捉することにより実現されました。私たちはワーキングアッセイを使用して、精製されたAAV2粒子だけでなく複雑なバイオプロセスマトリックスにおいても、ダイナミックレンジが 4.15×10^8 - 2.66×10^{10} gc/mL (ゲノムコピー/mL) で定量化できることを示します。使用するOctet機器に応じて、定量アッセイは30分未満で完了することができ、ELISAおよびddPCRベースの方法と比較して、アッセイのタイムラインを大幅に加速させることができます。Octetアッセイは適切なキャプチャー分子を使用し、ここで説明するアッセイ開発ステップに従うことで、任意のAAV血清型に拡張できます。

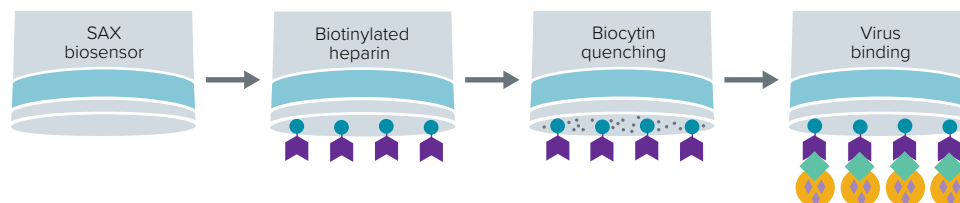


図1: Octet AAV2アッセイのワークフロー。アッセイの方法は、適切なビオチン化捕捉分子を使用して、本資料に記載されているステップに従うことで、任意のAAV血清型に拡張することができます。

メソッド

ForteBioのOctet AAV2ウイルスアッセイは、クルードライセートおよび細胞培養上清中のAAV2ウイルス濃度をモニタリングするために設計されています(図1)。ForteBioが提供するHigh Precision Streptavidin バイオセンサー (SAX) は、始めにビオチン化ヘパリンでコーティングされ、次にビオシチンでブロックされます。ヘパリンでコーティングされたバイオセンサーはあらかじめForteBioのバッチバイオセンサー準備プロトコルを使用してバッチで準備することができます。

必要な備品・試薬

- Octet Data AcquisitionおよびData Analysisソフトウェアを備えたOctetシステム (バージョン11.1以降)
- High Precision Streptavidin (SAX) バイオセンサー (ForteBio: 18-5117)
- サンプルプレート: 96ウェル/黒/平底/ポリプロピレン製マイクロプレート (Greiner Bio-One: 655209, Octet RED96eシステム用) および384ウェル傾斜 (ForteBio: 18-5080) または384ウェル平底の黒/ポリプロピレン製マイクロプレート
- 1x PBS, ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (Sigma: D8662)
- ビオチン-ヘパリン (Creative PEGWorks HP-207)
- EZ-Linkビオシチン (Thermo Scientific: 28022)
- 精製AAV2ウイルスのストック
- sample diluentバッファー (ForteBio: 18-1104) またはユーザーで選択したバッファー。最もよいパフォーマンスを得るためには、バッファーでサンプルを1:100に希釈することをお勧めします。

AAV2アッセイの開発と最適化

実用的なアッセイを開発する最初のステップは、リガンドとしてのこの手順書に記載されている捕捉分子の決定です。リガンドは対象の抗原に特異的に結合し、かつ最適な固定化濃度に調整する必要があります。Octet AAV2アッセイのリガンドを選択する際に、我々はさまざまなリガンドのビオチン化バージョンと抗AAV抗体をAAV2陽性対照サンプルに対してスクリーニングしました(データは示していません)。スクリーニング実験から、AAV2検出感度と定量ダイナミックレンジのパフォーマンスが優れていたため、バイオセンサーに固定化するリガンドとしてビオチン-ヘパリンを選択しました。

また、アッセイのパフォーマンスに最適化された次の条件を評価および決定しました。

- サンプル準備の前に、すべての試薬とサンプルを室温に完全に戻します。凍結サンプルは完全に解凍し、使用前に十分に混ぜます。
- バイオセンサーは使用前に最低10分間1x PBSで水和します。
- 私たちForteBioは30°Cでアッセイを実行することをお勧めします。異なる温度で測定すると、このプロトコルで説明されているアッセイ時間の変更が必要になる場合があります。サンプルプレート温度を設定するには、Octet System Data Acquisitionソフトウェアで [File] > [Experiment] > [Set Plate Temperature] を選択し、目的の温度を入力します。
- 回転数とアッセイ時間は、AAV血清型に応じて最適化する必要があります。AAV2の場合、400 RPMの回転数が選択され、アッセイに使用されました。
- 実験ウィザードでBasic Kineticsを設定します。

SAXバイオセンサー上へのビオチン化ヘパリンの固定化量は、さまざまな濃度のビオチン化ヘパリンを使用したスカウティング実験で最適化する必要があります(図2)。AAV2の場合、25 µg/mLのビオチン化ヘパリンを使用して、5分間のインキュベーションステップでリガンド固定化シグナルの飽和を達成しました。バイオセンサーを使用してAAV2を検出する前に、PBSで調製した25 µg/mLのビオシチンを使用した30秒間のクエンチングステップが続きます。クエンチングステップは非特異的結合 (NSB) の防止に重要です。

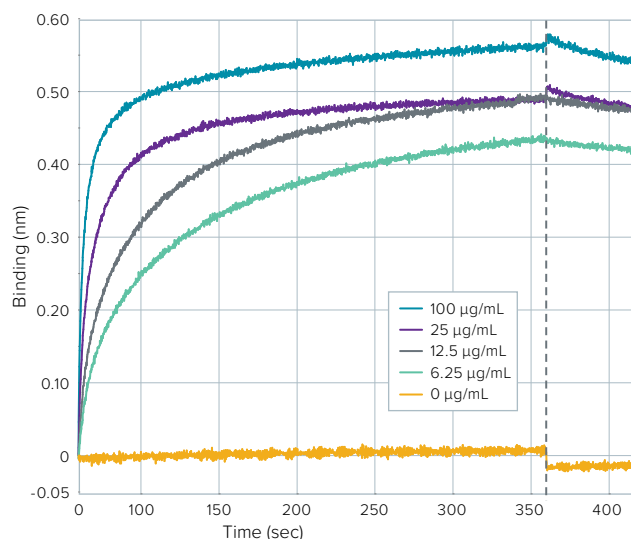


図2: ビオチン-ヘパリン固定化濃度スカウティングアッセイ

AAV2標準曲線の準備

AAV2標準曲線は、濃度既知の精製AAV2を使用して作成されます。精製されたAAV2の一連の標準希釈液は、ダイナミックレンジ決定のための実験に使用されます。ストック溶液を適量のサンプル希釈液で希釈して、各濃度の標準サンプル1 mLを準備します。標準サンプル濃度は、作成したい標準曲線の範囲を反映するように調整します。典型的なプレートマップを図3に示し、図4および5は、ダイナミックレンジとアッセイワークフローデザインを決定するために、推奨されるキャリブレーターサンプルの希釈を示しています。

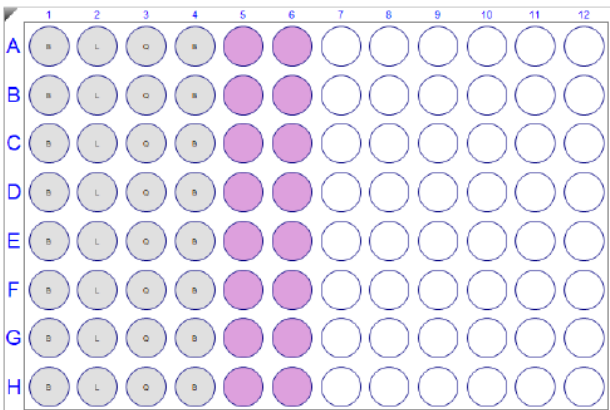


図3: 標準サンプルを含むプレートマップ。サンプルウェルはピンク色で表示されています (B: バッファー、L: 固定化サンプル、Q: クエンチ)。

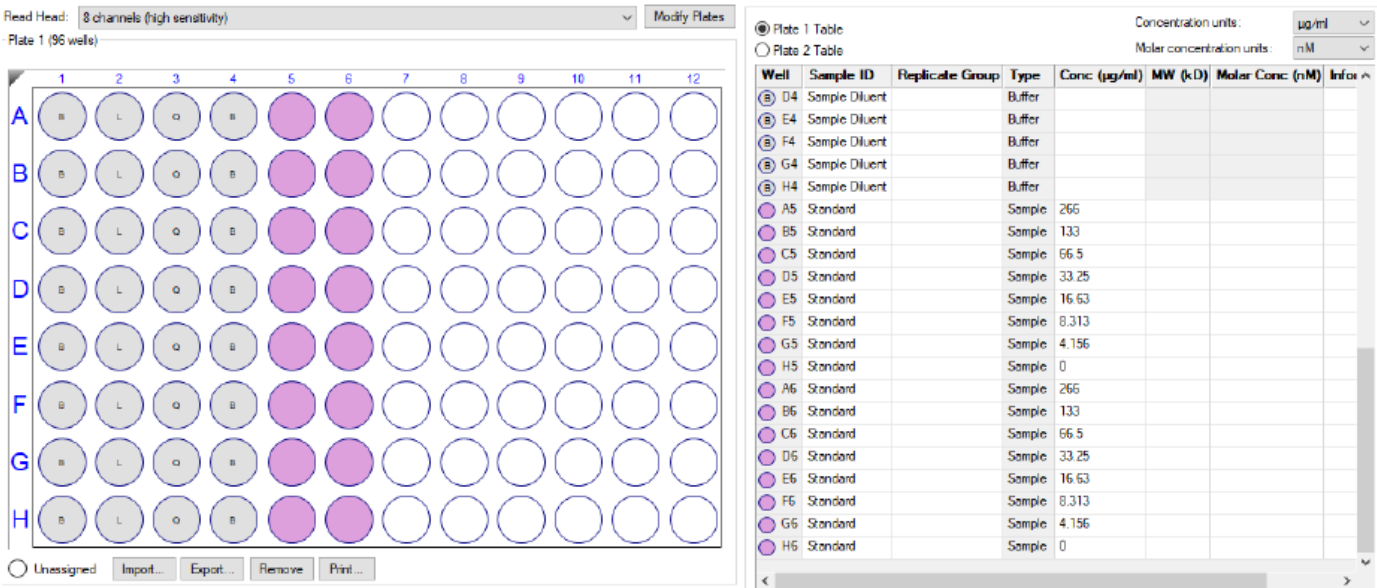


図4: AAV2ウイルス定量実験の設定。図は既知サンプルのプレートマップと濃度を示しています。

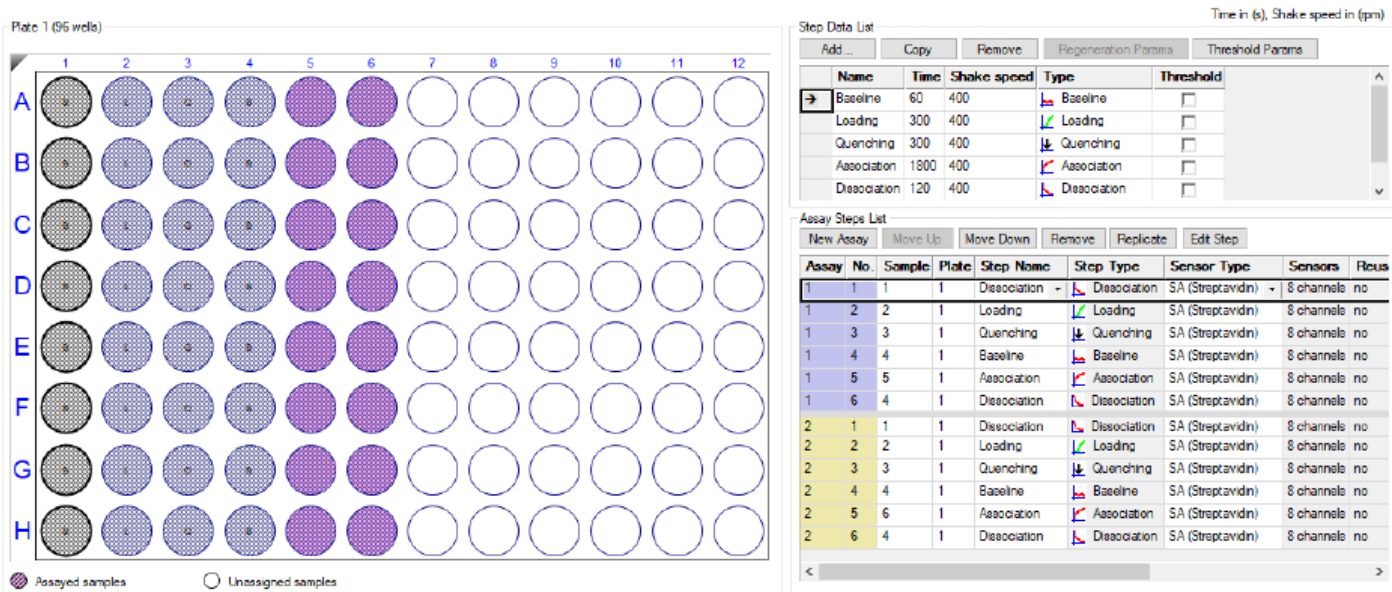


図5: AAV2ウイルス定量実験用に設定されたOctetソフトウェア。図はプレートの設計とアッセイステップのシーケンスとパラメーターを示しています。

AAV2ウイルスの結合と標準曲線の生成

記述されたアッセイセットアップと標準のバイオセンサー水和プロトコル（アッセイバッファーで10分間水和）を使用して、AAV2ウイルス結合アッセイを回転数400RPMで実行します。各ステップのアッセイ時間を図4に示します。ゼロgc/mL（サンプル希釈バッファーのみ）のサンプルウェルをネガティブコントロールとして使用します。キャリブレーションまたはテストサンプルの結合生データを図6に示します。

図6のウイルスキャプチャステップは、ForteBioデータアナリシスソフトウェアを使用して分析され、図7に示すように検量線が生成されます。分析ソフトウェアは、確定された検量線を使用してテストサンプル濃度を生成します。

表1に、最高 2.66×10^{10} gc/mLまでの精度でAAV2ウイルス定量アッセイ例を示します。標準曲線は、未知サンプルの範囲をカバーする必要があります。最も正確な結果を得るには、1つの標準サンプルがアッセイで検出された定量範囲を超えている必要があります。このAAV2の例では、最高の精度と正確性を実現するための推奨範囲は 4.15×10^8 - 2.66×10^{10} gc/mLです。一部のAAVウイルス血清型はダイナミックレンジが制限されている場合がありますが、より広いダイナミックレンジが適切な場合もあります。ダイナミックレンジは、AAV2ウイルスサンプルの性質によっても影響を受ける場合があります。一般に実際のダイナミックレンジは対象のウイルスによって異なります。

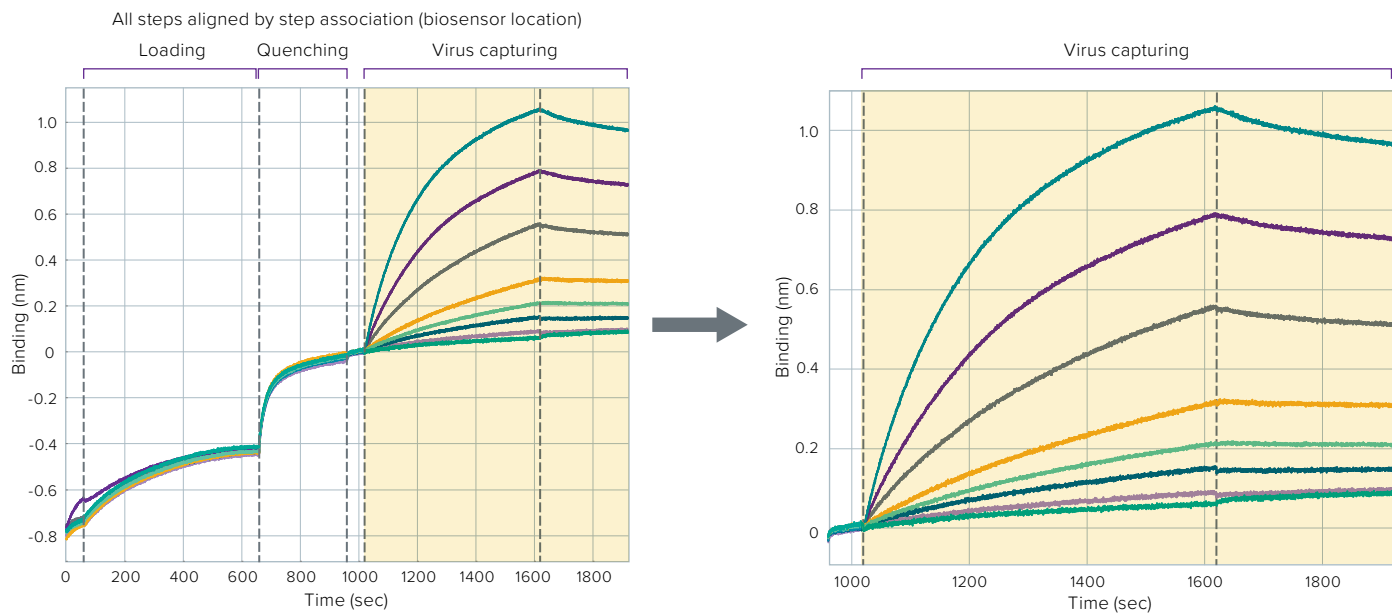


図6: SAXバイオセンサーでのAAV2検出の全体の結合センサーグラム:SAXバイオセンサーは、最初にビオチン化ヘパリンで固定化され、ビオチンでクエンチされ、さまざまな濃度のAAV2サンプルと結合しました。Octetアッセイは30分以内に完了します。

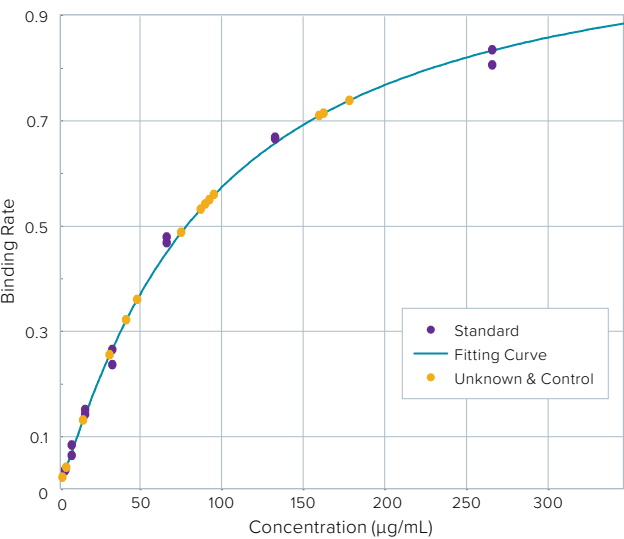


図7: AAV2 検量線

Sample ID	Known conc. (*10 ⁸ gc/mL)	Conc. avg (*10 ⁸ gc/mL)	Conc. CV (n=2)
Standard 1	266	206.5	0.8
Standard 2	133	133.1	1.7
Standard 3	66.5	71.4	1.1
Standard 4	33.2	30.5	8.7
Standard 5	16.6	17.6	3.3
Standard 6	8.3	8.4	9.5
Standard 7	4.3	4.3	5.4
Neg Control	0	0	0

表1: クアドリプレケート作成したキャリブレーター (4.15×10^8 - 2.66×10^{10} gc/mL) から計算された平均濃度、%CVを示しています。

また、各標準サンプルのポイント間に十分な分離があること、およびそれらが重複しないことを確認することも重要です。

Note: 定量したい未知のウイルスサンプルがバイオリアクター AAV2ウイルスであり、バイオリアクターの実行全体を通じてメディアマトリックスが変化している場合（たとえば、培地補充を行ったなど）、サンプルを1:100に希釈してマトリックスの干渉を排除します。

データ分析

- 1 Octet Data Analysisソフトウェアを開きます。Data Selection/Sensor-Assayから列を選択し、Processingをクリックします。associationステップをクリックし、[Quantitate Selected Step]を選択します。次に、ポップアップウィンドウで[Yes]をクリックすると、定量ウィンドウが表示されます。結果をクリックし、標準曲線方程式に[4PLweighted (Y2)]を選択します。結合率方程式に[R equilibrium]を使用し、[Calculate Binding Rate!]を押します。最後にレポートを保存します。
- 2 データテーブルをMicrosoft®Excel®にコピーし、キャリブレーション計算の%CVを決定します。 $\%CV = (\text{標準偏差} / \text{平均}) * 100$ 。CVはアッセイのセットアップ中にレプリケートグループの情報が入力されたときに、データ分析ソフトウェアによって自動的に計算することもできます。
- 3 AAV2ウイルスアッセイのダイナミックレンジは、定量の%CVが $\leq 10\%$ である連続範囲に設定してください。
- 4 検量線を調べて、グラフ上の複製データポイントが重複していないことを確認します。データポイントの重複は、キャリブレーションが明確に区別できないことを示します。
- 5 前述した基準に従って、またはアッセイ基準に基づいてダイナミックレンジを選択します。最高の望ましい範囲で正しく定量するために、次に高いデータポイントを検量線に追加します。
- 6 未知のAAV2ウイルスサンプルは、確立されたアッセイ範囲に希釈する必要があります(図2を参照)。

添加回収試験

さまざまなマトリックスの効果をテストするために、AAV2サンプルをさまざまなバッファーで希釈しました。対照試料は最初に異なるバッファーで1:5に希釈し、次に出発物質としてSample Diluentで1:20に再び希釈しました。サンプル希釈バッファーを使用して、添加および回収試験を実施しました。 6.25×10^8 gc/mL以上、低いCV (<15%) で良好な回収率 (>90%) (表2) が異なるバッファーシステム全体で得られ、アッセイが異なるバイオプロセスバッファーシステムで適切に機能することを示しています (図8)。

Assay buffers	Spiked conc. (*10 ⁸ gc/mL)	Calculated conc. (*10 ⁸ gc/mL)	Recovery (%)
Sample diluent	Assay buffers	99.1	99.1
TE 0.1% pluronic	100	104.6	104.6
Medium	100	103.6	103.6
Lysis buffer	100	92.7	92.7
Sample diluent	50	49.9	99.8
TE 0.1% pluronic	50	51.7	103.4
Medium	50	51.5	103.0
Lysis buffer	50	47	94.0
Sample diluent	25	23.2	92.8
TE 0.1% pluronic	25	29	116.0
Medium	25	22.3	89.2
Lysis buffer	25	25.4	101.6
Sample diluent	12.5	11.9	95.2
TE 0.1% pluronic	12.5	14.1	112.8
Medium	12.5	10.6	84.8
Lysis buffer	12.5	13.8	110.4
Sample diluent	6.25	6.41	102.6
TE 0.1% pluronic	6.25	6.12	97.9
Medium	6.25	4.83	77.3
Lysis Buffer	6.25	8.28	132.5
Sample diluent	3.13	2.75	87.9
TE 0.1% pluronic	3.13	3.09	98.7
Medium	3.13	3.1	99.0
Lysis buffer	3.13	4.72	150.8

表2: さまざまなマトリックスでのAAV2添加回収試験

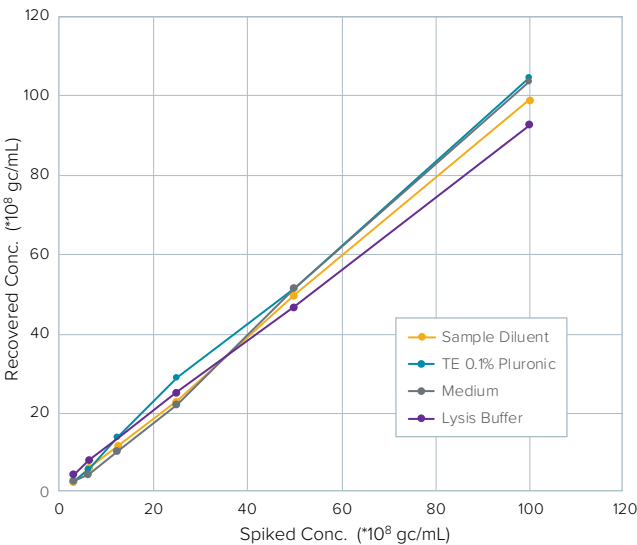


図8: AAV2添加回収試験の比較

AAV2ウイルス定量の再現性評価

再現性の評価のために、ろ過濃縮前 (サンプルA) と後 (サンプルB) の2つのサンプルをn=2で分析しました。表3の結果は、R2値が0.99で10%未満のCVで良好な一貫性を示しています。

Octetアッセイ、ddPCR、ELISAの比較を図9に示します。データは、3つの技術間で非常に類似した結果を示しています。サンプルA (ろ過濃縮前) とサンプルB (ろ過濃縮後) の両方について、ddPCR、ELISA、およびOctet法を使用して同様の傾向が得られました。結果はさらに、濃縮によりAAVベクター力価が向上することを示しています。

バイオプロセス最適化の主要なアプリケーションは、ウイルス精製中の回収量のモニタリングです。Octetアッセイを使用してAAV2の精製プロファイルを評価できるかどうかをテストするために、さまざまな精製ステップから7つの異なるサンプルをサンプル希釈液で100倍に希釈し、同一の測定条件で分析しました。図10は、さまざまなバイオプロセスサンプルを30分未満で同時に検出できることを示しています。このアッセイ時間は、バイオプロセスのat-lineモニタリング用にさらに最適化できます。

Sample	Binding rate	Calc conc. (*10 ⁸ gc/mL)	Dilution factor	Conc. (*10 ¹² gc/mL)	Avg. conc. (*10 ¹² gc/mL)	%CV
S2-1	0.5554	41.0	200	0.82	0.88	9.64
S2-2	0.5928	47.0	200	0.94		
S5-1	0.7609	82.7	200	1.65	1.75	7.69
S5-2	0.7942	92.3	200	1.84		

表3: 異なるウイルス精製プロセスからの2つのサンプルをn=2で分析しました。

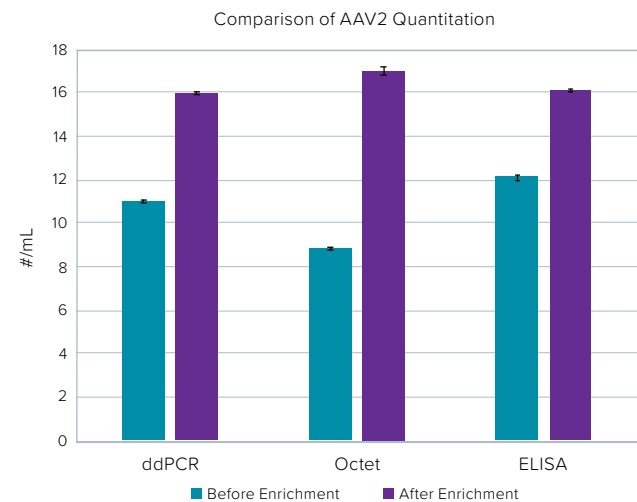


図9: ddPCR、ELISA、およびオクテットプラットフォームの比較 [#/mL: gc/mL (ddPCR and Octet) ; capsids/mL (ELISA)]。

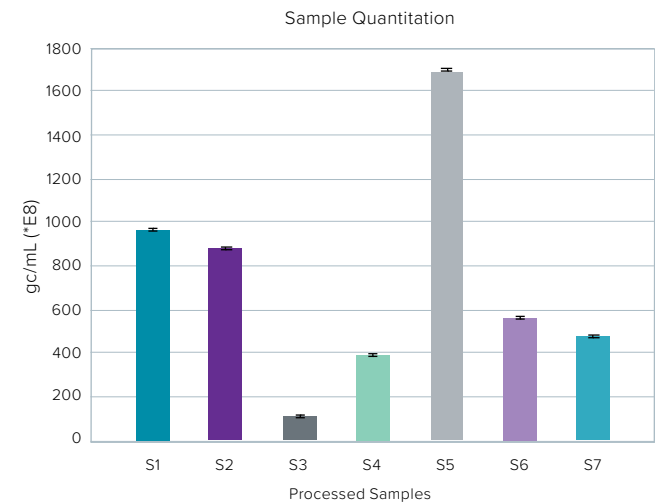


図10: バイオプロセッシングサンプルのOctet AAV2力価測定。異なる精製ステップからサンプルを取得し、同時にアッセイしました。

ディスカッション

Octetシステムの操作手順はシンプルで簡単です。マイクロタイタープレートにサンプルを配置するDip and Read方式であるため、サンプルの精製が不要で、サンプルの前処理時間を大幅に節約できます。このテクノロジーは非常に用途が広く、複数のAAV血清型の特異的力価アッセイを設計するために広く使用できます。ここではOctetプラットフォームを使用して、高速、高スループットで堅牢なAAV2キャプシド定量法を開発しました。Octetアッセイによって測定された力価は、ELISAおよびddPCRから得られた結果とよく相関しています。Octetアッセイでは、約2-logのダイナミックレンジが得られました。このアッセイは、プロセス関連のサンプルを定量化できます。ELISAでは約5時間、同数のサンプルではddPCRでは約8時間と比較して、サンプルは1時間未満で定量できます。Octet定量アッセイは、バイオセンサーに適切な捕獲リガンドをコーティングすることにより、様々なウイルス粒子の力価を測定するための堅牢な分析方法です。私たちは迅速かつ簡単に測定できるウイルス力価をat-lineで測定すると、バイオプロセスに関するほぼリアルタイムのフィードバックが可能になり、ウイルス製造に必要なリソースと時間を大幅に節約できると考えています。

References

- 1 Downstream bioprocessing of AAV vectors: industrial challenges & regulatory requirements, Hebben, M, *Cell and Gene Therapy Insights*, 2018, Mar 14, pp. 131-146.
- 2 Accurate Quantification and Characterization of Adeno-Associated Viral Vectors, Dobnik D et al., *Microbiol.*, 2019, 10:1570. doi: 10.3389/fmicb.2019.01570.

