

非対称フローFFFを使用した アデノ随伴ウイルス凝集の定量化

一般情報

ID0063

アプリケーション： ウイルス、バイオ薬剤

テクノロジー： AF4-MALS-UV

機器構成： AF2000、PN3621 MALS、PN3211 UV/Vis

キーワード： 非対称フローFFF、AF4、アデノ随伴ウイルス、AAV、凝集体

はじめに

アデノ随伴ウイルス(AAV)はその多様性と安全性により、遺伝子治療に広く利用されています。DNAまたはRNAを注入して特定の細胞タイプに送達することができ、疾患の治療に利用されています[1]。均一なAAV懸濁液を製造するための懸念は、ウイルス凝集体の存在で、これは、形質導入効率、生体内分布、および免疫原性の問題を引き起こす可能性があります[2]。直径が100 nmを超えることが多いため、AAV凝集体は、サイズ排除クロマトグラフィーなどのカラムベースのクロマトグラフィー技術で分離および特性評価するのが困難です。このアプリケーションノートでは非対称フローFFF(AF4)を用いたAAVとその凝集体の分離、および慣性半径(R_g またはRMS半径)の測定について、多角度光散乱(MALS)によるデータを示しています。AF4チャンネルの概略図を図1に示します。クロスフローとチャンネルフローの組み合わせにより、分析の過程でサイズが分離し、凝集体を含む大きな粒子の前に小さな粒子が溶出し、接続された検出器を順次通過します。

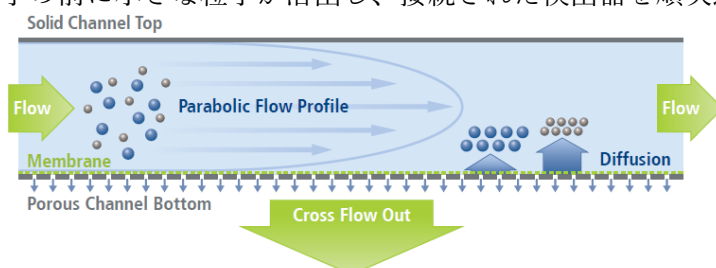


図1：非対称フローFFFの原理

実験詳細と結果

AAVサンプルをアリコートにしました。1つのアリコートにストレスを加えて凝集を誘発し、「ストレス無」と「ストレス有」の凝集の程度が異なる2つのサンプルを作成しました。AAVとその凝集体を評価するために、AF4システム(Postnova AF2000)を用いてサイズで分離し、2つの検出器で溶出サンプルをモニタリングしました。Postnova 21角度MALSでAAVとその凝集体の R_g を測定し、UV / Vis検出器で、AAVとその凝集体の相対量を測定しました。実験では、リン酸バッファー生理食塩水を使用しました。

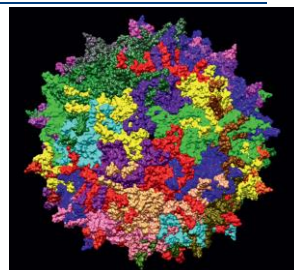


図2：アデノ随伴ウイルスの構造

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Adeno-associated_virus_serotype_AAV2.jpg

2つのAAVサンプルのUVシグナルを図3に示します。AAVモノマーが最初に溶出し（約

5～10分)、凝集体は遅れて(約30～35分)溶出します。凝集体の相対量は、ピーク面積の積分により算出されます。ストレスを受けていないサンプルの場合、凝集体は6.1%存在し、ストレスを受けたサンプルの場合、凝集体は23.7%存在しています。

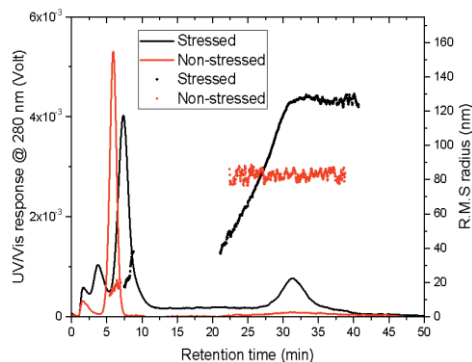


図3：2つのAAVサンプルのRg値(黒と赤のドット)を重ねた
UVのフラクトグラム(黒と赤のトレース)

図4ではMALSのシグナルは黒と赤のトレースとしてプロットされ、Rgは各時点で計算され、黒と赤のドットとしてプロットされています。モノマーの測定サイズはAAVと酷似しており、半径は約15～30 nmです。ストレスを受けていないAAVサンプルの凝集体は単分散で、Rgは約80 nmです。ストレスを受けたAAVの場合、凝集体のサイズには多分散性があり、半径は約40 nm～120 nmです。

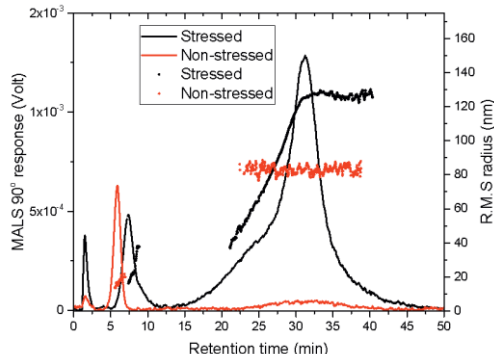


図4：AF4-MALSを使用してAAVのフラクトグラム全体にプロットされた慣性半径(RMS)

まとめ

AF4-MALS-UVは大きなAAV凝集体を分離およびサイズの測定ができ、ストレスプロトコルによる凝集体濃度の違いを評価できることがわかりました。サイズ排除クロマトグラフィーカラムは、この大きな凝集体の一部、またはすべてがフィルターで除去されるため、凝集体の含有量を誤って評価する場合があります。

参考文献

- [1] M.F. Naso, B. Tomkowicz, W.L. Perry III, W.R. Strohl, BioDrugs, 2017; 31(4), 317–334.
- [2] J.F. Wright, T. Le, J. Prado, J. Bahr-Davidson, P.H. Smith, Z. Zhen, J.M. Sommer, G.F. Pierce, G. Qu, Molecular Therapy, 2005, 12(1), 171-178.