

AF4-MALSを用いた熱ストレス下におけるアデノ随伴ウイルス血清型の安定性の研究

一般情報

ID0066

アプリケーション： タンパク質、ウイルス、遺伝子治療

テクノロジー： AF4-MALS-UV

機器構成： Postnova AF2000, PN3621 MALS, PN3241 UV-DAD

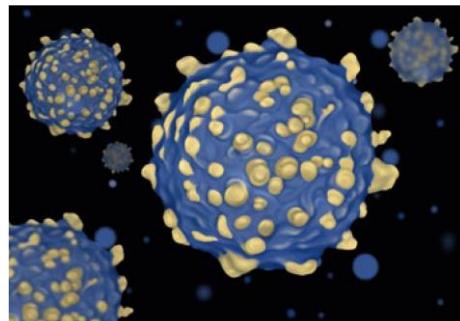
キーワード： 非対称FFF、ウイルス、AAV、アデノ随伴ウイルス、AAV1、AAV5、アグリゲーション、血清型

はじめに

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、平均直径25 nmの小さな一本鎖DNA含有タンパク質カプシドです。

AAVは遺伝子治療の有力な候補として浮上してきています[1,2]。安全で効果的なAAV製品を開発するためには、その安定性を定量化する必要があります。

このアプリケーションノートでは、多角度光散乱(MALS)検出器とUV/Visダイオードアレイ検出器を組み合わせた非対称FFF(AF4)を用いて、二種類のAAV血清型が熱ストレスを受けた時の凝集について研究しています。



実験項

この研究では、原液濃度粒子2x10¹³個/mLの2つのAAV血清型、AAV1とAAV5を使用しました。分析前に、サンプルを製剤バッファー（1x PBSバッファーおよび0.001% (v/v) 10%Pluronic F-68）で5倍に希釀しました。

サンプルに60°Cと75°Cで35分間熱ストレスをかけました。

MALS (Postnova PN3621) およびUV-DAD検出器 (Postnova PN3241) と接続したAF4 (Postnova AF2000 Multiflow) システムを使用し、製剤バッファーをAF4移動相としてAAVサンプルを分析しました。各分析は注入量50 μLで行いました。

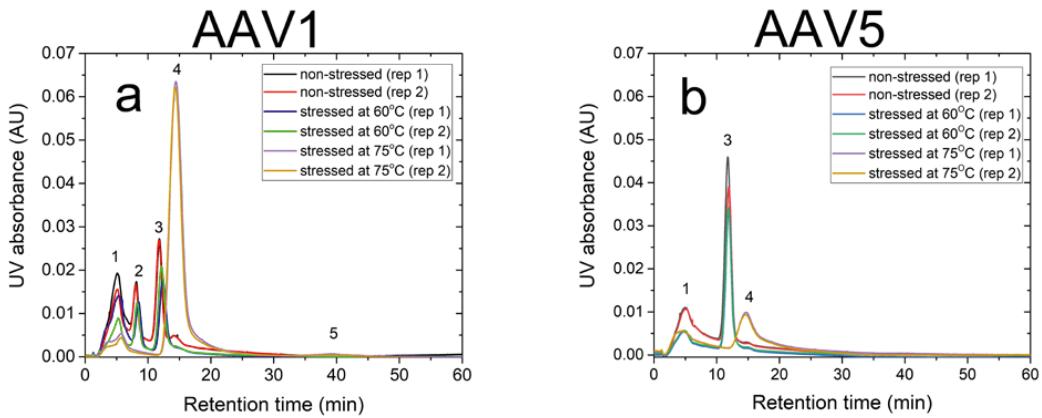


図 1: $\lambda = 219 \text{ nm}$ での UV 吸光度と 2 つの血清型 AAV サンプルの室温、および 60° C と 75° C での保持時間

a) AAV1; b) AAV5、数字は異なる成分を表します。1 と 2 : フラグメント、3 : モノマー、4 : オリゴマー、5 : より大きな凝集体。

分離結果

熱ストレスを受けていない AAV5 サンプルには、AAV1 よりも多くのモノマーが含まれ、43% がモノマー型、5% がオリゴマー型でした。

データは、両方の血清型が 60° C まで安定していることを示しています。ただし、 75° C で熱ストレスを受けた場合、サイズ分布に大きな変化はありませんでした。

両方の熱ストレスサンプルで、モノマー（ピーク 3）は完全に消失し、オリゴマーピーク（ピーク 4）は大幅に増加しました（AAV1 では 66%、AAV5 では 26%）。

これは、ウイルス粒子が熱ストレスを受けてオリゴマーを形成することを示唆しています。

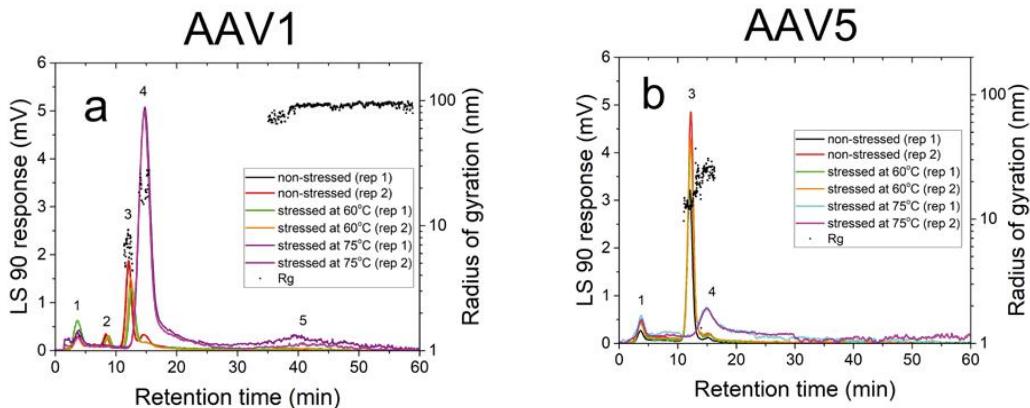


図 2 : MALS 90° 信号トレースと室温、 60° C と 75° C での熱ストレスでの 2 つの血清型 AAV サンプルの慣性半径 (R_g) プロファイル、

a) AAV1, b) AAV5、1 と 2 : フラグメント、3 : モノマー、4 : オリゴマー、5 : より大きな凝集体。

サイズ測定

熱ストレスを受けていないサンプルと熱ストレスを受けたサンプルのAAVの慣性半径(R_g)は、さまざまな角度でのMALS信号強度より算出されました。熱ストレスを受けていないサンプル、熱ストレスを受けたAAV1およびAAV5サンプルの R_g データポイント（黒丸）は、それぞれ図2aおよび2bに示されています。各ポイントは、MALSフローセルを通過するサンプルの体積のサイズを表しています。平均して、ウイルスのモノマー（ピーク3）は半径8~10 nmでした。オリゴマーのピークは半径10~30 nmで変化します。大きな凝集体（ピーク5）は、熱ストレスを受けたAAV1サンプルにのみ存在し、半径が約100 nmで、全体の約2%でした。

まとめ

AAV1とAAV5は、どちらも60°C未満の製剤バッファーで安定です。データは、サンプルを75°Cに加熱すると熱ストレスがオリゴマー化を引き起こすことを示唆しています。MALSとUV検出器を組み合わせたAF4は、ウイルスやウイルスのような粒子が熱ストレスに曝されたときの凝集の研究に有用です。

参考文献

- [1] E. Hastie & R.J. Samulski, 2015, Human Gene Therapy, 26(5), 257–265.
- [2] M.F. Naso, B. Tomkowicz, W.L. Perry III & W.R. Strohl, 2017, BioDrugs, 31, 317–334.