

2022年12月1日

キーワードまたはフレーズ:

Octet[®]、BLI、抗AAV抗体、AAVXバイオセンサー、アデノ随伴ウイルス、AAV、血清型、カプシド、定量、力価、ELISA

AAVカプシドを迅速かつ直接定量する Octet[®] AAVXバイオセンサー

Yuanyuan Zhang, PhD, Ahmad Kour, Frederik Meierrieks, Nicole Laut, Benjamin Moritz Graf, PhD,
Nazgül Wagner, PhD, Ivan Krylov, PhD, Ling Zhang, PhD, David Apiyo, PhD, Bob Dass, PhD
Sartorius Corporation, 47661 Fremont Blvd, Fremont, CA 94538 USA

要約

Octet[®] AAVXバイオセンサーによる定量アッセイワークフローは、Octet[®] バイオレイヤー干渉 (BLI) プラットフォーム (Octet[®] 生体分子間相互作用解析システム) で用いることで、AAVバイオプロセスワークフローの全体にわたりサンプル中のAAV濃度のハイスループット測定を迅速にリアルタイムで行えるようになります。そのため迅速なプロセス最適化と品質チェックが実現し、生産性が向上します。アデノ随伴ウイルス (AAV) は、遺伝子送達ツールの最適なベクターとして遺伝子治療に使用されてきました。天然型 (野生型) と組み換え型の両方を含む複数のAAV血清型が使用されますが、その理由の1つはAAVの組織特異性 (指向性) です。AAVの生産および製造バイオプロセスワークフローにおいては、ウイルスカプシド (ウイルス粒子) の濃度が重要な品質特性となります。ウイルスカプシド濃度を定量するために現在使用されているELISAなどの方法には、時間と手間がかかりばらつきが大きいという課題があります。本アプリケーションノートでは、AAVカプシド力価測定におけるOctet[®] AAVXバイオセンサーの評価結果をご紹介します。AAVXバイオセンサーは $8.5 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^{13}$ vp/mLの定量ダイナミックレンジ、高精度かつ幅広いAAV血清型結合特異性を備え、10種類の異なる血清型を定量できます。さらに、AAVXバイオセンサーは、アップストリームおよびダウンストリームプロセス中間体に存在するさまざまなサンプルマトリックスに対応できることが示されており、したがってサンプル調製の手間が最小限ですみます。AAVXバイオセンサーは20回まで再生・再使用できるため、測定1回あたりのコストが削減可能です。

詳細はこちら: www.sartorius.com

はじめに

遺伝子操作、編集および遺伝子送達に使用されるテクノロジーの大幅な進歩により、遺伝子治療戦略に基づく実行可能な治療法の開発が急速に進みました。2022年現在、FDAは8つの遺伝子治療製品について臨床使用を承認しています¹。遺伝子治療の対象候補には、がん、血液学的疾患、眼疾患、神経筋疾患、免疫不全が含まれ、また多くの場合、希少疾患または遺伝性疾患が含まれます。

遺伝子治療戦略を成功させる鍵となるのは、目的とする細胞、組織、または器官に遺伝子産物を送達する効率的なプロセスや方法の開発です。さまざまなウイルスベクターの中でも、野生型および組み換え型アデノ随伴ウイルス（それぞれAAV、rAAV）ベクターの使用例が大幅に増加しています。AAVベクターを実生産規模で生産するには、アップストリームおよびダウンストリームのAAVバイオプロセスにおいてウイルスカプシド濃度を正確に測定する必要があります。

本アプリケーションノートでは、Octet® AAVXバイオセンサーをOctet® バイオレイヤー干渉法 (BLI) ラベルフリー検出プラットフォーム上で使用し、シンプルな直接定量アッセイデザインにより複数のAAV血清型を定量する際のワークフローおよびデータを示します (図1)。Octet® AAVXバイオセンサーにはザルトリウス独自のバイオセンサー技術が使用されており、またThermo Fisher Scientific社のThermo Scientific™ CaptureSelect™ ビオチン-抗AAVX抗体複合体でコーティングされています。

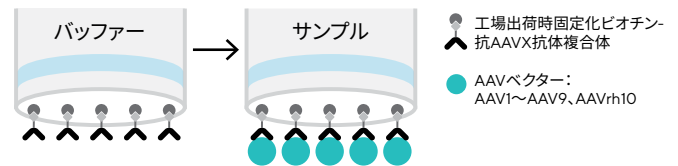
AAVXバイオセンサーは、アッセイ最適化がさらに必要になるOctet® N1モデルを除く、Octet® BLIプラットフォームのすべてのモデルで使用できます。本アプリケーションノートではAAVXバイオセンサーの主な特長と利点について説明します。例として10種類のAAV血清型 (AAV1~9およびAAVrh10) に結合可能なこと、ウイルスの精製サンプルおよび粗サンプルの両者について定量可能なこと、また優れた再生・再使用性により1アッセイあたりのコストが削減されることを取り上げます。

図2にAAVベクター生産の一般的なワークフローと、ザルトリウスが提供する技術ソリューションの図解を示します。個々の製品の詳細を見るには、画像をクリックして製品ウェブサイトにアクセスしてください。

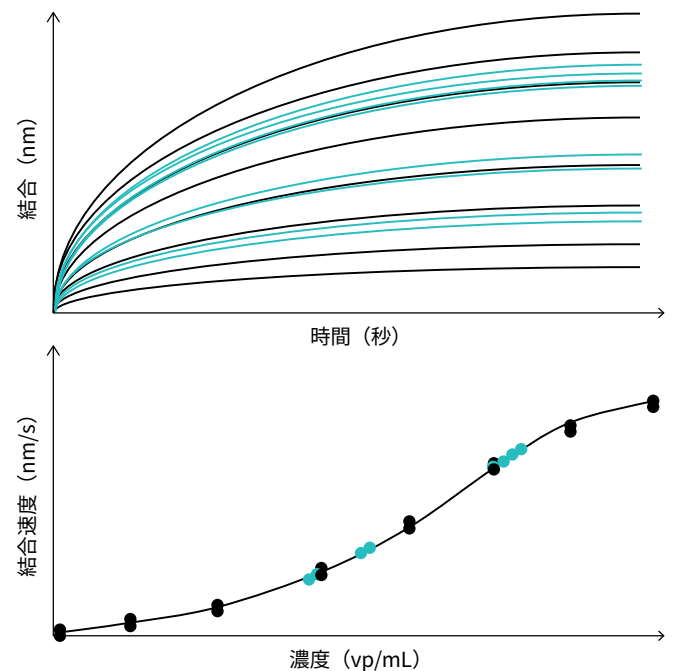
図1

Octet® AAVXバイオセンサーを使用した定量アッセイワークフロー

A.



B.



注: (A) アッセイ図解: アッセイバッファー中でベースライン平衡化を行い (バッファー)、次にAAV粒子を直接捕捉 (サンプル)。(B) Octet® BLIプラットフォームによるAAV標準サンプルおよび未知サンプルの定量アッセイを示す概略図

図2

AAVベクターの生産とテクノロジーの一般的なワークフロー
AAV生産ワークフローのサポートにザルトリウスが提供するソリューション



注：(A) アップストリームおよびダウンストリームAAVバイオプロセッシングにおける重要なステップとプロセスを示す一般的な概観図 (B) AAV生産ワークフローのさまざまなステップへわたるアプリケーションをサポートするザルトリウスの製品。詳細については個々の製品の写真をクリックしてください。

試薬類および試験手順

試薬類

- Octet® BLI Discovery/Analysis Studioソフトウェア (バージョン13.0.1以降) を搭載したOctet® BLIシステム (R8、RH16、RH96)。
- Octet® AAVXバイオセンサー (ザルトリウス製品番号18-5160)
- AAV標準サンプル: AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8およびAAV9はViroVek社 (CA、USA) から購入しました。AAV7はVigene Biosciences社 (MA、USA) から、AAVrh10はVector Biolabs社 (PA、USA) から購入しました。
- 全Octet® BLIシステムで使用: 96ウェル、黒色、平底マイクロプレート、Greiner Bio-One製品番号655209
- Octet® RH16およびRH96 BLIシステムのオプション品: 384ウェル、黒色、平底ポリプロピレン製マイクロプレート、Greiner Bio-One製品番号781209
- バッファー: このバイオセンサーは幅広いバッファーに対応しています。本アプリケーションノートの定量アッセイはOctet®サンプル希釈バッファー、pH 7.4 (ザルトリウス製品番号18-1104) を使用して実施しました。

試験手順

本アプリケーションノートに示す試験では、AAVバイオセンサーを用いた定量アッセイワークフローの測定実施時間はAAV血清型および試験を行う濃度次第ですが、一般に15～30分程度必要でした。定量アッセイワークフローには以下のステップが含まれます。

- a. バイオセンサーの水和: AAVXバイオセンサーは使用前に10分以上、アッセイバッファーに浸しました。
- b. AAV直接定量アッセイのデザイン:
 - i. 初期ベースラインの平衡化: 水和したAAVXバイオセンサーをアッセイバッファー (サンプル希釈バッファー) に180秒間浸しました。
 - ii. 直接定量: ベースラインの平衡化後、AAVXバイオセンサーをAAV血清型特異的な標準サンプルおよび試験サンプル (AAV濃度不明) を入れたマイクロプレートウェルに900～1,800秒間浸し、AAVX抗体に対するAAVベクターの結合速度を測定しました。
 - iii. 再利用のためのバイオセンサーの再生: バイオセンサーをpH 1.7の10 mMグリシンバッファーに5～10秒間浸した後、アッセイバッファーに5～10秒間浸しました。このプロセスを3サイクル繰り返しました。
 - iv. すべての定量アッセイを、30°Cのサンプルステージにおいて振とう速度1,000 rpmで実施しました。
 - v. 標準サンプルの結合速度をOctet® Analysis Studioソフトウェアの「initial slope」結合速度方程式を用いてフィッティングされ、「4PL weighted Y」フィッティングモデルを適用して検量線を生成しました。

- vi. 試験サンプルの濃度は、結合率を検量線に内挿することで求めました。

ELISA: 簡潔に述べると、ELISAアッセイプロトコルの実施時間はフォーマットに応じて約4～6時間かかり、次のような一般化されたステップが含まれます。

- a. AAV標準サンプルおよび試験サンプルの捕捉: AAV血清型標準サンプルおよび試験サンプルを、抗血清型特異的捕捉抗体をコーティングしたマイクロタイタープレート中でインキュベートしました。その後、アッセイバッファーによる洗浄を複数回行いました。
- b. 検出ステップ1: 捕捉したAAVカプシドをHRP (西洋ワサビペルオキシダーゼ) でタグ付けした血清型特異的抗体で検出し、その後、アッセイバッファーによる洗浄を複数回行いました。
- c. 検出ステップ2: TMB (テトラメチルベンジジン) などの適切な基質とともにインキュベートし、サンプル中のAAVカプシドの濃度に比例する呈色反応を起こさせました。呈色した色をELISAプレートリーダーを用いて推奨の吸光度波長で測定しました。

結果および考察

定量アッセイにおけるAAVXバイオセンサーの血清型特異性および性能を、ザルトリウス社内およびお客さまの施設で評価しました。

Octet® AAVXバイオセンサーの血清型特異性およびダイナミックレンジ

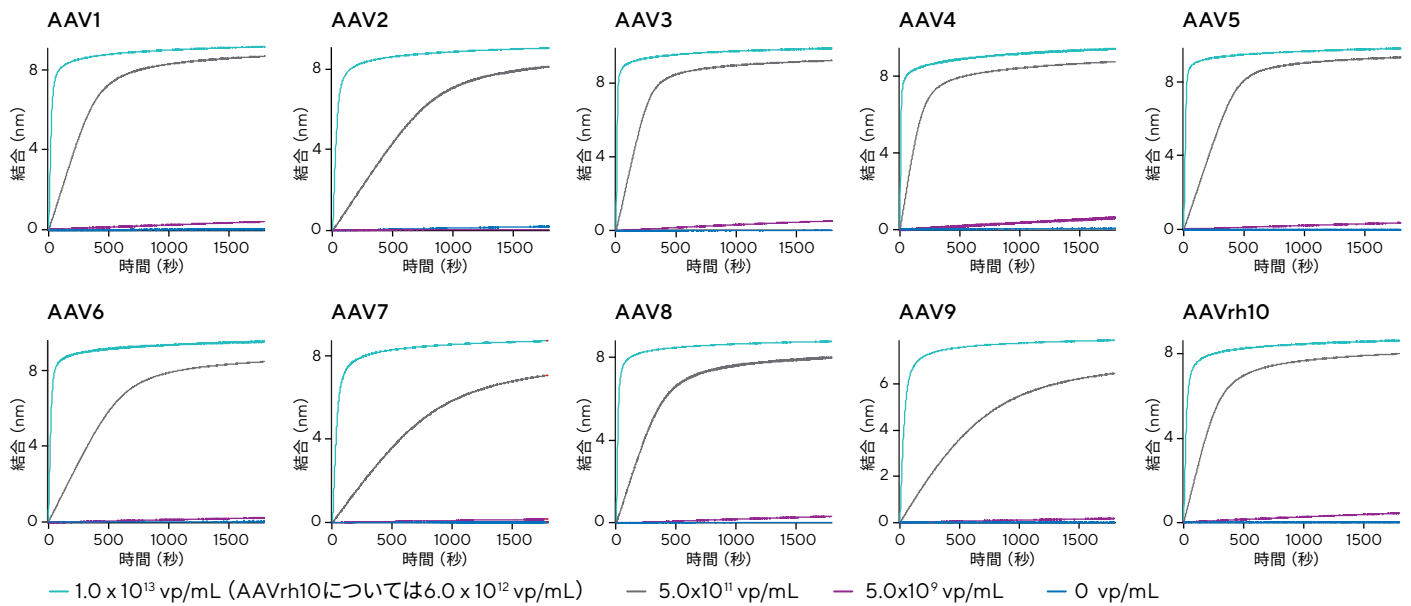
血清型および結合特異性アッセイは、Octet® BLIプラットフォームで使用されている確立された直接定量アッセイデザイン (方法の項に記載) を用いて実施しました。10種類のAAV血清型、すなわちAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9およびAAVrh10の測定を行い、Octet® AAVXバイオセンサーの結合特異性を評価しました。

図3Aに3点の用量反応結合データを示します。この図は、各血清型に対するAAVXバイオセンサーの結合特異性を広範な濃度範囲にわたって示しています。さらに、AAVXバイオセンサーのダイナミックレンジを評価したところ、試験したほとんどの血清型で $8.5 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^{13}$ vp/mLとなりました。この範囲の桁数はおよそ5桁に及び、高力価サンプルと低力価サンプルの両方を正確に測定できます。図3B・Cは、濃度 $7.62 \times 10^8 \sim 1.00 \times 10^{13}$ vp/mLのAAV9の定量を例として、AAVXバイオセンサーで得られたダイナミックレンジを示しています。このダイナミックレンジ内のすべての濃度で、良好な回収率 (80～120%) と精度 (CV<10%) が観察されました (表1)。

図3

Octet® AAVXバイオセンサーの定量ダイナミックレンジ

A.



B.

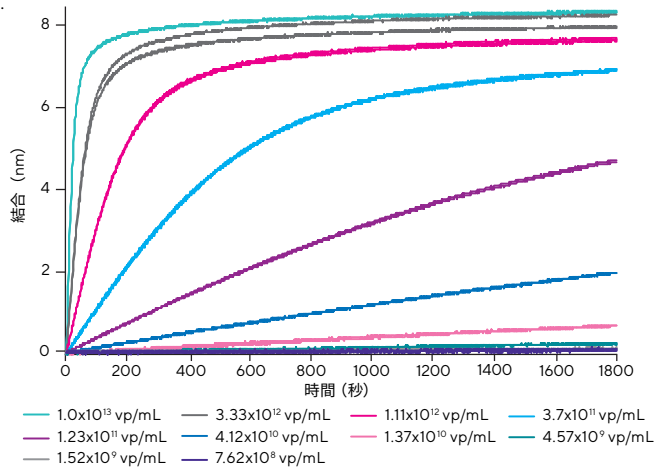
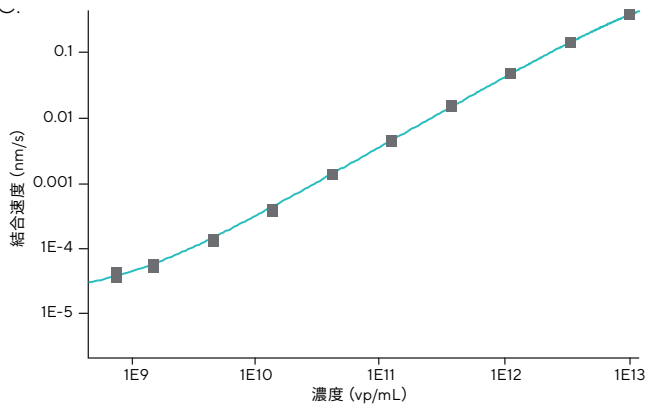


表1

Octet® AAVXバイオセンサーを用いて行ったAAV9カプシド定量アッセイの結果

既知の力価、 vp/mL	平均算出力価(n=3)、 vp/mL	力価%CV (n=3)	回収率(%)
1.00×10^{13}	1.00×10^{13}	1.1%	100%
3.33×10^{12}	3.30×10^{12}	2.2%	99%
1.11×10^{12}	1.13×10^{12}	0.4%	101%
3.70×10^{11}	3.85×10^{11}	0.2%	104%
1.23×10^{11}	1.17×10^{11}	0.6%	95%
4.12×10^{10}	3.90×10^{10}	0.5%	95%
1.37×10^{10}	1.16×10^{10}	2.4%	85%
4.57×10^9	3.95×10^9	4.1%	86%
1.52×10^9	1.32×10^9	8.9%	87%
7.62×10^8	7.62×10^8	8.7%	100%

C.



注: (A) 3点 (高、中、低濃度のAAV力価) 用量反応曲線を用いて個々のAAV血清型について試験したAAVXバイオセンサーの結合特異性 (B) $7.62 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^{13}$ vp/mLのダイナミックレンジにわたって測定したAAV9カプシドの用量反応結合曲線 (C) 4PL (weighted Y) フィッティングモデルを用いて算出したAAV9カプシド力価検量線。X軸とY軸に対数スケールを適用。

マトリックス干渉試験

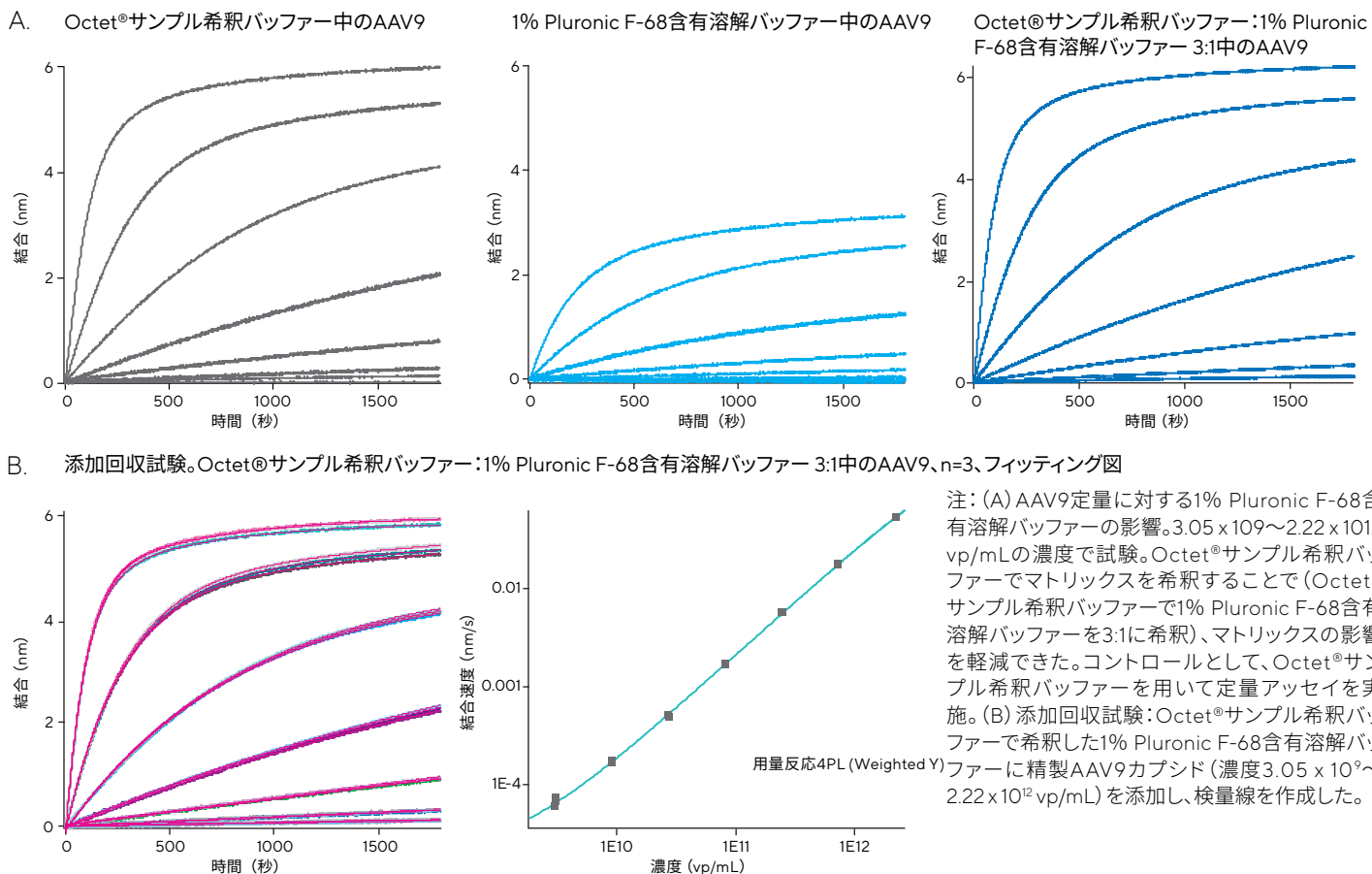
Octet® BLIプラットフォームの主な利点は、精製サンプルと粗サンプルの両方を用いて測定できることです。AAV生産ワークフロー全体にわたり、アップストリームとダウンストリームのバイオプロセッシングにはさまざまなマトリックス（バッファーおよび培地）が使用されています。サンプルマトリックスの影響を軽減する一般的でシンプルな方法は、粗サンプルを適切なアッセイバッファーで希釈し、アッセイ性能に影響を及ぼすマトリックス成分の濃度を低減することです。マトリックスの影響を低減するために、Octet®サンプル希釈バッファーで4～10倍に希釈することを推奨します。アッセイ最適化プロセスの一環として、ニート（未希釈）サンプルとともに、数段階希釈したサンプル（例：4倍、8倍、16倍、32倍、またはそれ以上の希釈率）を試験することを推奨します。さらに、サンプルを希釈することで、AAV力価が高いサンプルを検量線のダイナミックレンジ内に収めることができます。マトリックス干渉の影響を試験するために、試験方法の項に記載した通りに定量アッセイを実施しました。簡潔に述べると、精製AAVサンプルを異なるマトリックス（未希釈および希釈）に添加し、 $3.05 \times 10^9 \sim 2.22 \times 10^{12}$ vp/mLの濃度系列を得ました。これらの条件でAAVバイオセンサーに対するAAVの結合速度および反応の変化を評価しました。希

釈した溶解バッファー（Octet®サンプル希釈バッファーで1% Pluronic F-68含有溶解バッファーを3:1に希釈）を用いて実施した添加回収試験の結果を表2に示します。

図4Aには例として、AAV9定量に対する1% Pluronic F-68含有溶解バッファーの影響を示します。結合反応の低下で示されるように、アッセイの感度およびダイナミックレンジに大幅な干渉が認められました。さらに、希釈したサンプルマトリックスに添加した精製AAV9カプシドを用いて添加回収試験を実施し、マトリックス希釈によるアッセイ堅牢性の向上を評価しました（図4Bおよび表2）。サンプル回収率は95%～105%で、試験した濃度において良好な精度（CV<10%）が認められました。したがって、アッセイの堅牢性は非常に良好であり、希釈によりマトリックスの影響は軽減され、複合マトリックスを用いることでAAVXバイオセンサーが広範囲のサンプルに対応できることが示されました。BridgeBio Pharma社が実施したダウンストリームバイオプロセスサンプル中のAAV5を定量する追加試験では、サンプルを1:10～1:20に希釈するとAAV5力価が正確に測定されることが示されました（注：サンプルは1:20に希釈され、試験サンプル中のAAV5力価は検量線のダイナミックレンジ内に収められました）。

図4

AAVX定量アッセイの堅牢性および感度に対するサンプルマトリックスおよびアッセイバッファーの影響



定量アッセイに対するマトリックスの影響はAAV血清型依存的であることが明らかになり、試験したほとんどのサンプルにおいてマトリックスをサンプル希釈バッファーで4倍～10倍に希釈することで、その影響が大幅に軽減されました(表3)。

表2
AAV9添加回収試験

既知のAAV9 力価 (vp/mL)	結合速度	結合速度 CV	算出濃度	濃度CV	回収率
2.22x10 ¹²	0.05313	0.4%	2.22x10 ¹²	0.4%	100%
7.41x10 ¹¹	0.01777	1.1%	7.38x10 ¹¹	1.1%	100%
2.47x10 ¹¹	0.00568	0.3%	2.51x10 ¹¹	0.2%	102%
8.23x10 ¹⁰	0.00171	0.7%	8.22x10 ¹⁰	0.6%	100%
2.74x10 ¹⁰	0.00051	2.2%	2.61x10 ¹⁰	2.1%	95%
9.14x10 ⁹	0.00017	2.6%	9.11x10 ⁹	2.7%	100%
3.05x10 ⁹	0.00007	8.8%	3.05x10 ⁹	11.3%	100%

注：Octet®サンプル希釈バッファーで希釈したPluronic-F68マトリックス(3:1)に添加した精製AAV9カプシド

表3
AAVX定量アッセイの堅牢性を評価するために使用したマトリックスの種類

マトリックスの種類	AAV血清型	Octet®サンプル希釈 バッファーによる最小 希釈率
Octet®サンプル希釈バッ ファー	AAV2/5/8/9	未希釈
溶解バッファー + 1% Pluronic F68	AAV8/9	10倍/4倍
溶解バッファー + 0.5 mg/mL HEK293細胞ライセート	AAV2/5	4倍
培地 (DMEM + 10% FBS)	AAV8/9	5倍
製剤*	AAV5	10倍
濃縮ライセート*	AAV5	10倍
清澄化ライセート*	AAV5	10倍
アフィニティー中和溶出液*	AAV5	20倍#
細胞ライセート†	AAV2/5/8	未希釈
精密ろ過により清澄化した ライセート†	AAV2/5/8	未希釈
アフィニティー精製したサンプ ル†	AAV2/5/8	未希釈
細胞上清†	AAV8	未希釈
清澄ろ過上清†	AAV8	未希釈
未希釈Pel 15% PEG †	AAV8	10倍
精製AAV (pH 6.5, 1M NaCl) †	AAV8	未希釈
精製AAV (pH 8.5, 1M NaCl) †	AAV8	10倍

*BridgeBio Pharma社によるデータ

† Lab Essentials Applicationsグループ (ザルトリウス) によるデータ

#AAV5力価を検量線のダイナミックレンジに入れるために20倍に希釈したサンプル

Octet® AAVXアッセイとELISAの相関性

ELISAはAAVウイルスカプシド力価の定量に従来から使用されており、多くの場合、AAV力価測定に最適な方法と考えられています。Octet® AAVXアッセイは、ELISA技術に関連する限界のいくつか(たとえば、相当の時間と手間を要することが多いエンドポイントアッセイであること)に対する実行可能な解決策となります。Octet® BLIシステムは、迅速なアッセイセットアップと分析、ならびにリアルタイムのデータ表示が可能な設計になっているため、アッセイの各ステップをモニタリングし最適化することができます。図5A・Bに示す散布図および対応するデータは、Octet® AAVXアッセイとELISAによるAAV8およびAAV9定量を比較したもので、良好な相関性(R²>0.99)が認められます。表4には、トランスフェクション96時間後にAmbr15 (ザルトリウス) マイクロバイオリアクター容器6個から採取した細胞ライセートサンプル中のAAV2の力価を示します。Octet® AAVXアッセイを用いて測定した濃度は、ELISAと良好な相関関係を示しました。

表4
細胞ライセートサンプル中のAAV2の定量

サン プルID	Octet® AAVX バイオセンサー (vp/mL)	AAVXバイオ センサーで測 定した濃度 CV (%)	ELISA (vp/mL)	ELISAで測定 した濃度CV (%)
NE	0	0	0	6.06
V1	1.01x10 ¹²	2.13	1.10x10 ¹²	6.06
V2	1.26x10 ¹²	6.21	1.11x10 ¹²	8.99
V3	5.67x10 ¹¹	0.68	5.54x10 ¹¹	1.68
V4	6.01x10 ¹¹	1.15	5.58x10 ¹¹	5.20
V5	8.87x10 ¹¹	1.29	8.30x10 ¹¹	4.69
V6	5.80x10 ¹¹	0.17	5.35x10 ¹¹	5.69

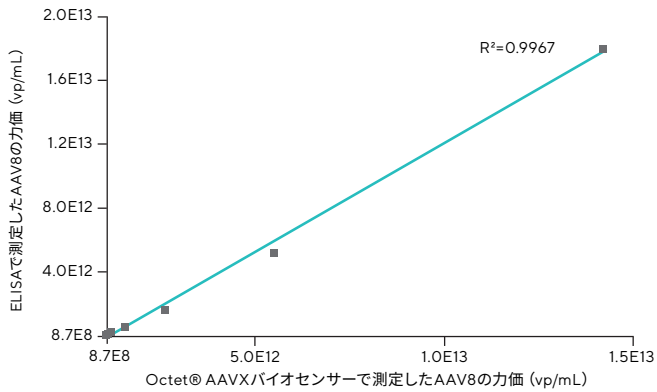
注：Octet® AAVXアッセイとELISA法の比較。サンプル (V1～V6) は、トランスフェクション96時間後にザルトリウス Ambr® 15自動バイオリアクターシステムの容器6個から採取した。NEサンプルは非トランスフェクションHEK293細胞から採取した。データはSartorius Stedim Biotech社による。

Octet® AAVXアッセイとELISAとの相関を調べる試験がBridgeBio Pharma社およびREGENXBIO社でも実施され、両社のAAVバイオプロセスワークフローのさまざまなステップで採取した種々のAAV血清型のサンプルについて試験が行われました。REGENXBIO社が実施した試験では、AAV8およびAAV9試験サンプル(精製サンプルおよびプロセス中間体)をOctet® AAVXアッセイおよびELISAで定量され、良好な相関性が認められました(表5)。BridgeBio Pharma社は、さまざまなダウンストリームプロセス中間体を用いて6.73 x 10⁹～9.59 x 10¹³ vp/mLのAAV5の力価を試験し、その結果、Octet® AAVXアッセイとELISAの間に良好な相関が認められました(図6)。

図5

Octet® BLIプラットフォームにて用いたOctet® AAVXバイオセンサーならびにELISAによる複数のAAV血清型の定量

A.

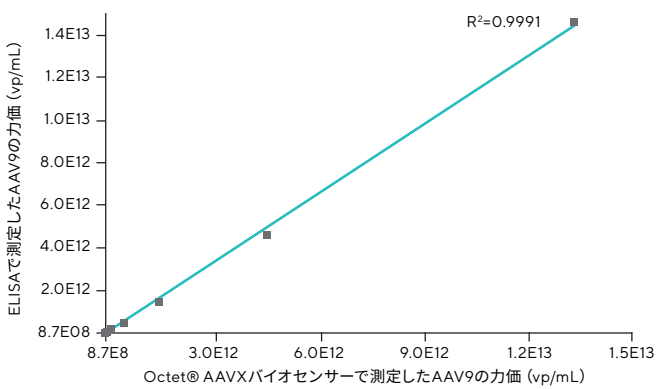


注：Octet® AAVXバイオセンサーのダイナミックレンジの濃度においてOctet® BLIにて用いたOctet® AAVXバイオセンサーおよびELISAで測定したAAV8標準品の力価相関

AAV8	Octet® AAVX バイオセンサー (vp/mL)	ELISA (vp/mL)
Sample 1	1.31x10 ¹³	1.79x10 ¹³
Sample 2	4.43x10 ¹²	5.08x10 ¹²
Sample 3	1.58x10 ¹²	1.62x10 ¹²
Sample 4	5.37x10 ¹¹	5.16x10 ¹¹
Sample 5	1.66x10 ¹¹	1.77x10 ¹¹
Sample 6	4.59x10 ¹⁰	6.07x10 ¹⁰
Sample 7	1.59x10 ¹⁰	2.12x10 ¹⁰
Sample 8	4.52x10 ⁹	7.67x10 ⁹
Sample 9	1.45x10 ⁹	2.25x10 ⁹

注：Octet® AAVXバイオセンサーとELISAによるAAV8定量アッセイ結果の比較

B.



注：Octet® AAVXバイオセンサーのダイナミックレンジの濃度においてOctet® BLIにて用いたOctet® AAVXバイオセンサーおよびELISAで測定したAAV9標準品の力価相関

AAV9	Octet® AAVX バイオセンサー (vp/mL)	ELISA (vp/mL)
Sample 1	1.33x10 ¹³	1.46x10 ¹³
Sample 2	4.61x10 ¹²	4.61x10 ¹²
Sample 3	1.53x10 ¹²	1.47x10 ¹²
Sample 4	5.18x10 ¹¹	5.02x10 ¹¹
Sample 5	1.64x10 ¹¹	1.74x10 ¹¹
Sample 6	4.83x10 ¹⁰	5.98x10 ¹⁰
Sample 7	1.75x10 ¹⁰	2.07x10 ¹⁰
Sample 8	4.57x10 ⁹	6.76x10 ⁹
Sample 9	8.28x10 ⁸	1.05x10 ⁹

注：Octet® AAVXバイオセンサーとELISAによるAAV9定量アッセイ結果の比較

C.

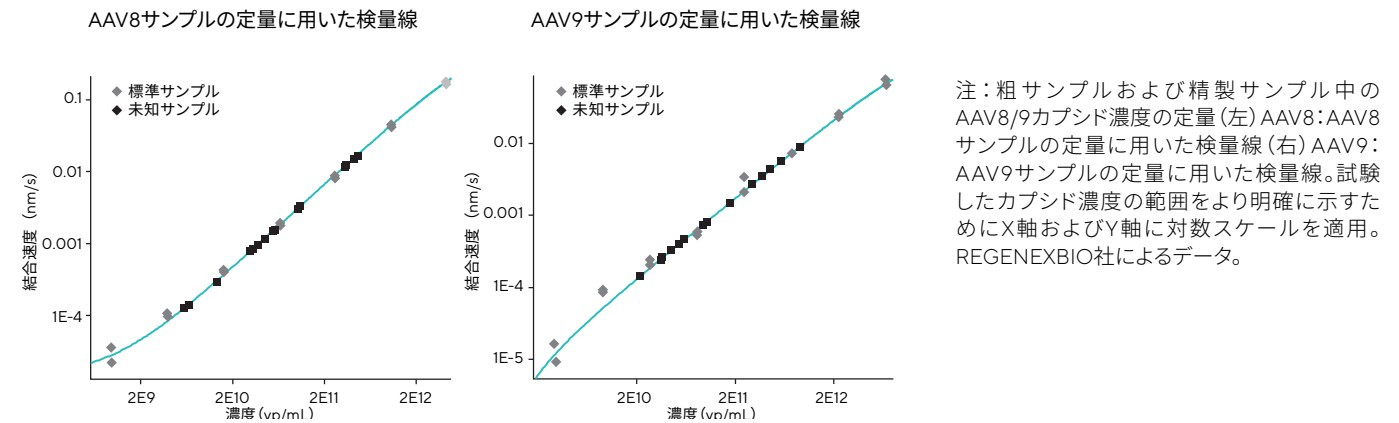


表5

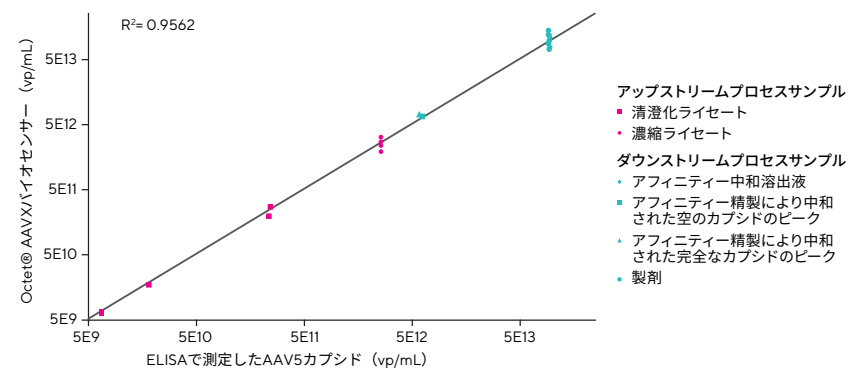
Octet® AAVXバイオセンサーおよびELISAによる精製サンプルと粗サンプル(バイオプロセス中間体)中のAAV8およびAAV9の定量

血清型	サンプル番号	Octet® AAVX バイオセンサー (vp/mL)	市販 ELISA (vp/mL)
AAV8	1(粗)	5.86x10 ¹¹	5.10x10 ¹¹
	2(粗)	1.15x10 ¹²	1.13x10 ¹²
	3(精製)	3.20x10 ¹⁴	2.91x10 ¹⁴
	4(精製)	4.11x10 ¹⁴	4.42x10 ¹⁴
AAV9	5(粗)	3.63x10 ¹²	2.36x10 ¹²
	6(粗)	6.95x10 ¹¹	5.49x10 ¹¹
	7(精製)	7.39x10 ¹⁴	6.58x10 ¹⁴
	8(精製)	4.19x10 ¹⁴	4.02x10 ¹⁴

注：表に示すAAV8/9濃度は、上に示すAAV8/9検量線から外挿して求めた。試験したカプシド濃度の範囲をより明確に示すためにX軸およびY軸に対数スケールを適用。REGENXBIO社によるデータ。

図6

Octet® BLIプラットフォームにて用いたOctet® AAVXバイオセンサーならびにELISAを用いたAAV5血清型の定量



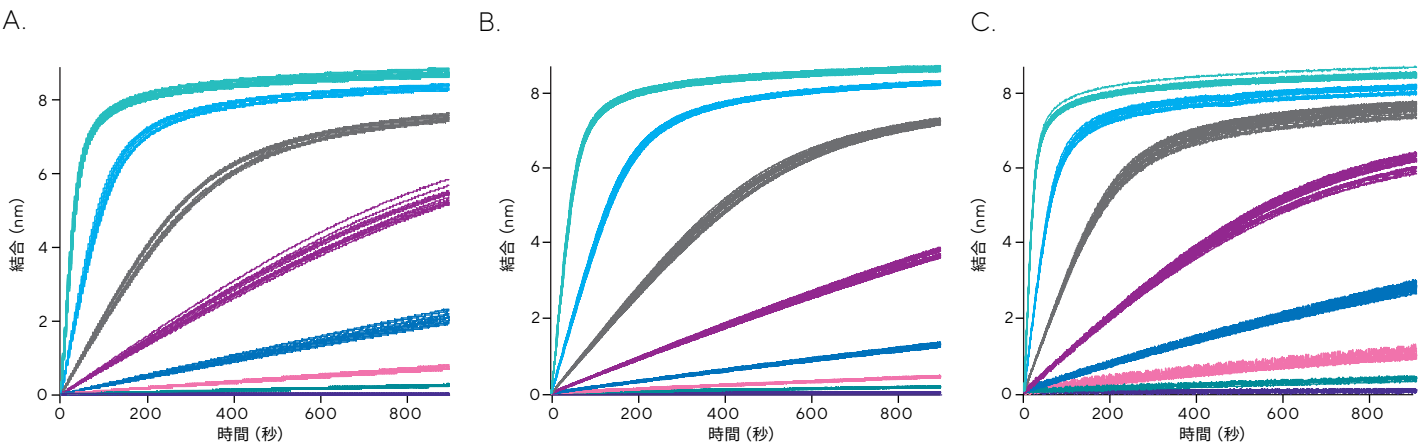
注：Octet® BLIプラットフォームにて用いたOctet® AAVXバイオセンサーならびにELISAを用いたAAV5血清型の定量。ELISAとOctet® BLIで測定したAAV5カプシドの比較。バイオプロセス中間体のAAV5カプシド力価の定量。X軸とY軸に対数スケールを適用。BridgeBio Pharma社によるデータ。

ハイスループットAAV力価分析

ハイスループットな力価測定は、アッセイを迅速に最適化し、多数のサンプルを同時に試験することが可能です、そのため年間で多くのプロジェクトを完了させることができます。Octet® BLIのポートフォリオにはさまざまなスループットの自動システムがラインアップされており、96または384ウェルサンプルプレートを使用することで、それぞれ8、16、および96サンプルの同時力価測定を行うことができる8チャンネル、16チャンネル、および96チャンネルシステムがあります。ハイスループットAAVXアッセイがAAV力価測定用にセットアッ

プされ、3つの機器モデルを用いて、 $3.05 \times 10^9 \sim 2.22 \times 10^{12}$ vp/mLの濃度範囲でAAV8血清型96サンプルの試験が行われました。試験の結果を図7A～Cに、総アッセイ時間を図7Dに示します。従来のELISAでは96サンプルの測定に4～6時間を要するのに対し、Octet®の3つのモデルはいずれも所要時間が大幅に短縮され、Octet® RH96 BLIシステムではわずか15分程度でした。Octet® RH96 BLIシステムは、1回あたりに測定可能な総サンプル数と96サンプル同時測定が可能という両面で、最高のスループットを発揮します。

図7
さまざまなOctet® BLIシステムでOctet® AAVXバイオセンサーを用いて実施したAAV8カプシドの力価測定



注：濃度範囲 $3.05 \times 10^9 \sim 2.22 \times 10^{12}$ vp/mL（オーバーレイされたセンサーグラムを表示）のAAV8血清型96サンプルをOctet® R8 BLIシステム (A) Octet® RH16 BLIシステム (B) およびOctet® RH96 BLIシステム (C) で試験 (D) 96サンプルの測定に要した定量アッセイの総実施時間を示す表

まとめ

Octet® AAVXバイオセンサーは、Octet® BLIプラットフォームで用いることで複数のAAV血清型についてカプシド定量を行えるように開発されました。Octet® AAVXアッセイはセットアップが簡単なアッセイフォーマットのため、バイオプロセスサンプル中のAAVを直接定量することができます。AAVXバイオセンサーの性能を評価するために、ザルトリウス社内とお客さまの施設のチームで一連の実験が実施されました。本アプリケーションノートでは、これらの試験の結果を示し、得られる利点について論じています。AAVXバイオセンサーは、10の異なるAAV血清型に対する幅広い血清型結合特異性を示し、定量実験では桁数がおおよそ5桁に及ぶ広いダイナミックレンジを示しました。血清型特異性の範囲が広いことから、1種類のバイオセンサーのみで複数のAAV血清型を評価・試験できるという利点があります。さらにAAVXバイオセンサーを用いて、バイオプロセスワークフローのさまざまなステップで採取したAAVサンプルを定量しました。ここに示した結果は、ライセート、培養上清、クロマトグラフィー溶出液などの粗サンプル中のAAVを高精度で正確に定量できるというAAVXバイオセンサーの堅牢性を示しています。

現在のAAV定量ワークフローでは、通常、手間と時間を要するELISA法が最適な方法として採用されています。しかし、Octet® AAVXアッセイは、それに代わる効率的な定量ワークフローとなります。Octet® AAVXアッセイは容易に行える迅速な直接定量アッセイで、ELISAで限界となるような、高い正確性と精度を持ち、幅広い血清型特異性を示します。本アプリケーションノートに試験結果を発表されたお客さまからのフィードバックは、上記の利点を裏付けるものです。発表された試験の結果から、さまざまなAAV血清型について、AAVXバイオセンサーのダイナミックレンジに対応する広範囲のAAV力価($10^8 \sim 10^{13}$ vp/mL)にわたり、Octet® BLIプラットフォームとELISAで測定したAAV濃度の間に良好な相関($R^2 = 0.99$)が認められました。

さらに、Octet® BLIプラットフォームは、スループットが異なる多くの機器モデルを選択していただけます。これには、8、16、96サンプルのAAV濃度を同時測定可能な8、16、96チャネルモデルがあります。Octet® AAVXバイオセンサーはすべてのOctet® BLIシステムで使用でき、ここに示したデータから、試験を行った3つのモデルの間で良好な相関性が認められること、スループットの拡張性が良好なことがわかります。試験によって示された特性の中でも重要なものの1つは、AAVXバイオセンサーの再生可能性でした。結果として、AAVXバイオセンサーは10～20回まで再生して再使用でき、アッセイ1回あたりのコストが大幅に削減されることが示されました。AAVXバイオセンサーの再生に関する詳細については、Technical Note、Octet® AAVX Biosensors for AAV Capsid Titer Quantitationを参照してください。

本アプリケーションノートではOctet® AAVXバイオセンサーとOctet® BLIプラットフォームを組み合わせることで得られる特長および利点を考察しました。このような特長・利点により、AAVバイオプロセッシングに取り組んでいるお客さまがアップストリームおよびダウンストリームのワークフローにわたり、サンプルを正確かつ迅速に定量できるようになることに貢献します。

謝辞

ザルトリウスは、Octet® AAVXバイオセンサーの性能に関する貴重なデータと知見を提供してくださった以下の方々に感謝の意を表します。BridgeBio Pharma社 (Palo Alto, CA, USA) のSrivatsan Ramesh, R. Ashton Lavoie, Taylor McCoy, Jacob Irwin, Michael Guerrero, REGENXBIO社 (Rockville, MD, USA) のAmanda Zhang, Lisa Breen (敬称略)

参考文献

1. FDA www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products
2. Sartorius Application Note: Rapid, Automated, At-Line AAV2 Virus Quantitation Advances Bioprocessing in Gene Therapy.
3. Sartorius Technical Note: Octet® AAVX Biosensors for Quantitation of AAV Capsids.
4. Accelerated Development, Manufacturing and Monitoring of Viral Vectors. Report, BioProcess International. September 2018 16(9). www.bioprocessintl.com/wp-content/uploads/2018/08/16-8-Sartorius.pdf
5. Downstream bioprocessing of AAV vectors: industrial challenges & regulatory requirements. Hebben M. Cell and Gene Therapy Insights, 2018, Mar 14, pp. 131-146.
6. Analytical methods for process and product characterization of recombinant adeno-associated virus-based gene therapies. Gimpel AL, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2021 Feb 17;20:740-754. doi: 10.1016/j.omtm.2021.02.010. PMID: 33738328; PMCID: PMC7940698.
7. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. Bulcha, J.T. et. Sig Transduct Target Ther 6, 53 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>.

ザルトリウス・ジャパン株式会社
東京本社
〒140-0001
東京都品川区北品川 1-8-11
Daiwa 品川 North ビル 4 階
Phone: 03-6478-5200
Fax: 03-6478-5494
Email: hp.info@sartorius.com

名古屋営業所
〒450-6411
名古屋市中村区名駅 3-28-12
大名古屋ビルヂング 11F
Phone: 03-6478-5200

大阪営業所
〒532-0003
大阪市淀川区宮原 4-3-39
Phone: 03-6478-5203
Fax: 03-6478-5496



詳細はこちら：www.sartorius.com