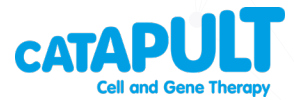


浸透圧の最適化によるAAV製造・生産の力価、品質、効率の改善。

Adrien Soula¹, Kendal Studd²

¹Cell and Gene Therapy Catapult, London, UK

²Advanced Instruments, Horsham, UK



Abstract

細胞・遺伝子治療における技術革新のスピードは驚異的であり、新しい手法が開発されるにつれ、指数関数的なスピードで成長し続けることとなります。斬新な技術とともに、求められる治療法の製造手順も改善され、新しくなっています。ウイルスベクターの使用は現在、この分野では一般的なアプローチですが、バイオプロセスのスケールアップにはまだ課題があります。例えば、回収率は5-30%であり、製造プロセスにおいて最適な結果とはいいがたい状況です。



プロセス開発担当者に話を聞くと、製造・生産プロセスにおける3つの主要なペインポイントは、歩留まりの低さ、歩留まりの質、ワークフロー全体の効率であることが明らかになりました。製造能力を向上させ、歩留まりを改善し、サプライチェーン・ロジスティクスを改善することで、より多くの患者集団がこれらの治療法にアクセスできるようになり、そのすべてができればコストの面でも満足できるものになります。では、すべての領域を改善する鍵は何でしょうか？その答えは、高品質なプロセス設計の導入と、ワークフロー内のすべてのポイントで頑健性と再現性を確保するためのプロセスパラメーターを含めることです。溶質濃度の指標である浸透圧は、細胞治療や遺伝子治療のプロセス全体を通して、多くのことに応用することが可能です。そして最近、この重要なプロセス・パラメーターを操作することで、全体

的な成果がどのように改善されるかを示す明確なエビデンスが得られてきました。ここで紹介する研究は、Cell and Gene Therapy Catapult が行ったもので、供給ステップの有無にかかわらず、浸透圧を時間差で変化させることによって、アデノ随伴ウイルス 1 (AAV) の全体的な収量と品質に影響を与えるという予備的なエビデンスを提示しており、その結果、AAVの収量と品質が改善されることが明らかになりました。

それだけでなく、このシフトによって、相対的な細胞内力価対細胞外力価にも影響が及び、その結果、上清中の細胞外遺伝物質のリリースが著しく増加しました。この発見は、収量と品質の向上と並んで、上流工程だけでなく下流工程にも大きな影響を及ぼす可能性があること示唆されます。この研究により、浸透圧の最適化が、ウイルスベクターの製造・生産に必要な時間、労力、コストを削減する可能性があることが実証されました。

Introduction

浸透圧は、ウイルスベクター生産を含むバイオ製造ワークフローのあらゆる側面において重要なパラメータです。定義上、浸透圧は水1キログラムあたりのミリモル単位で溶液の濃度を表し、この測定はバイオプロセス内の複数の工程（QC、細胞モニタリング、緩衝液交換の確認など）に重要な情報をもたらします。アットライン浸透圧計は現在、多くの製薬会社で利用されており、ワークフロー全体を通じて迅速な測定が可能で、医薬品製造を通じて使用される様々な溶液について迅速かつ効率的な洞察を得ることができます。Advanced Instruments社は、水溶液と粘性溶液の浸透圧を測定できる凝固点降下浸透圧計を製造しています。この機能によって、浸透圧試験を多くのモダリティに統合することができるようになりましたが、ここではウイルスベクターの生産と製造について解説します。

プロセス開発は、上流と下流の両方のワークフローにおいて重要な役割を担っています。近年では、浸透圧が遺伝子治療バイオ製造プロセス全体に強く関与していることが示されています。

現在では、例えば上流のベクター生産において、浸透圧が様々な形で大きな影響を与えることが明らかになっており²、また下流の処理ワークフロー全体にわたってもその可能性があること期待されています。ここでの一つの提案は、AAV2精製における凝集の可能性の減少です³。また、ウイルス生産においてトランスフェクション後の浸透圧を変化させることで、特定のウイルスベクターの力価を上昇させることも以前示唆されています。その一例がShenの研究で、高浸透圧条件下で培養した細胞がアデノウイルス産生に有利な生理的状态を引き起こしたというものです⁴。この研究をエビデンスとして、浸透圧の変化とAAV上流産生への影響をさらに調べることが有利であると思われました。その結果、AAV1産生時に浸透圧を操作することの全体的な影響を評価する目的で、Advanced Instruments社とCell and Gene Therapy Catapultで共同研究が行われることになりました。

この共同研究は、生産性と製品品質の向上の可能性だけでなく、プロセスを容易にするためのユニット操作の変更の実現可能性にも焦点を当てました。力価およびフル対エンptyキャップシドの比率を維持または増加させることが目的である一方、細胞外力価対細胞内力価の比率も検討対象に含められました。細胞外物質の量を増やすことは、現在必要とされている溶解ステップの排除につながる可能性があり、その結果、下流工程を経る物質に影響を与えることになります。



2 Advanced Instruments

Materials and Methods

1. Cell Line and Media

本研究では、HEK 293F 細胞株の誘導体である Gibco™ Viral Production Cells (Thermo Fisher Scientific, A35347) を用いました。Viral Production Cellsは、4 mM GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, 35050061) を添加したBalanCD®培地 (富士フィルム, 94137) で融解し、37°C、5 % CO₂ 大気圧、130 rpm攪拌のインキュベーターシェーカー内でシェイクフラスコ中で培養しました。BalanCD培地は、炭酸水素ナトリウムの添加を除き、製品のデータシートに詳述されているように、水和によって粉末から調製したものを使用しました。培地は、アンモニア溶液 (Merck Millipore, 543830) を用いてpHを7.3に調整し、pHメーターで測定した後、塩化ナトリウム (Thermo Fisher Scientific, AM9759) を添加し、OsmoTECH®PROで測定する浸透圧が目的の値になるようにしました。最後に培地を0.2µmで無菌ろ過し、4°Cで1ヶ月間保存しました。

2. AAV Production in Stirred-Tank Bioreactors

本研究では、小規模、シングルユース、自動バイオリアクタープラットフォームを使用しました: Ambr® 15 と Ambr® 250 modular (Sartorius). バイオリアクターは、インキュベーター・シェーカーで2週間のシードトレインを行った後、植菌しました。細胞は、温度、pH、溶存酸素、攪拌を一定に制御。接種後24時間、無血清培地中で、Polyplus社のトランスフェクション試薬を用いて、repとcap、ヘルパー、eGFPをコードするゲノムで細胞をトランジェントにトランスフェクトしました。ハーベストの前に、界面活性剤とデオキシリボヌクレアーゼを含むバッファーで、細胞をその場で溶解しました。

3. Process Analytics

日々のサンプル分析は、NucleoCounter NC-200 (Chemometec) で細胞数と生存率を、OsmoTECH PRO (Advanced Instruments) で浸透圧を、BioProfile FLEX 2 (Nova) で代謝物とオフラインpH測定を行いました。トランスフェクションから24時間後、GFP発現をMacquant (Miltenyi Biotec) の社内フローサイトメトリーパネルで測定し、トランスフェクション効率を評価しました。ウイルスゲノムの力価は、AAV2 ITRを標的とする社内qPCRアッセイを用いて決定し、カプシドの力価は市販のAAV1 ELISAキット (Progen社、PRAAVI) を用いて評価しました。

4. Determination of AAV Full/Empty Capsids Ratio

ELISAは全粒子 (完全、空、部分) の定量に使用し、qPCRは完全粒子のみの定量に使用しました。フル/エンプティキャプシドの比率は、qPCRとELISAの力価に基づいて以下のように計算できる重要な品質指標となります：

$$\text{Full vs empty ratio (\%)} = \frac{\text{Viral genome titre} \left(\frac{\text{vg}}{\text{mL}} \right)}{\text{Capsid titre} \left(\frac{\text{vp}}{\text{mL}} \right)}$$

5. Determination of Extracellular AAV Ratio

qPCRの結果は、上清中のウイルス粒子の割合を示す細胞外AAV比率の測定に使用され、以下のように計算されました：

$$\text{Extracellular ratio (\%)} = \frac{\text{Supernatant titre} \left(\frac{\text{vg}}{\text{mL}} \right)}{\left(\text{Supernatant titre} \left(\frac{\text{vg}}{\text{mL}} \right) + \text{Pellet titre} \left(\frac{\text{vg}}{\text{mL}} \right) \right)}$$

同じ細胞培養サンプルから採取した上清とペレットの力価：遠心後、上清をデオキシリボヌクレアーゼ酵素で処理し、ペレットを新鮮な培地に懸濁し、デオキシリボヌクレアーゼ酵素と界面活性剤を含む溶解バッファーでインキュベーターシェーカーで溶解しました。

Results and Discussion

この研究では、特にAAVの浸透圧を操作し最適化することで、ウイルスペクターの生産と製造のワークフローをどのように大幅に改善できるかを検討しました。血清型であるAAV1は、採取時に50%の細胞外比率を達成した過去の実証例から、この研究のプラットフォームとして特別に選びました。このパラメータに対する浸透圧の影響を評価するためには、ほとんど細胞外または細胞内にある血清型を避けることが最良の戦略であると考えられました。

遺伝子治療分野における最大の課題のひとつは、ウイルスペクター生産における収率の低さであり、そのため生産性を向上させる手段を検討する必要があります。小規模 (ambr 15) で行われたこの研究の第一部では、トランスフェクション後48時間以内に浸透圧を500mOsmに移行させるとともに、塩化ナトリウムを添加することで、コントロール (浸透圧300mOsm) と比較して約25%の特異的力価の増加が達成されました。最初にイオン性薬剤と非イオン性薬剤の両方をスクリーニングし、どちらが力価に大きな影響を与えるかを調べました。たとえばレトロウイルスの産生率とその安定性を高めるために細胞培養液の浸透圧を変化させる目的でソルビトールを使用するなど⁵、非イオン性薬剤はこれまでの研究で成功裏に使用されてきましたが、Figure1に示すように、この特定の研究では塩化ナトリウムがより大きな影響を与えました。

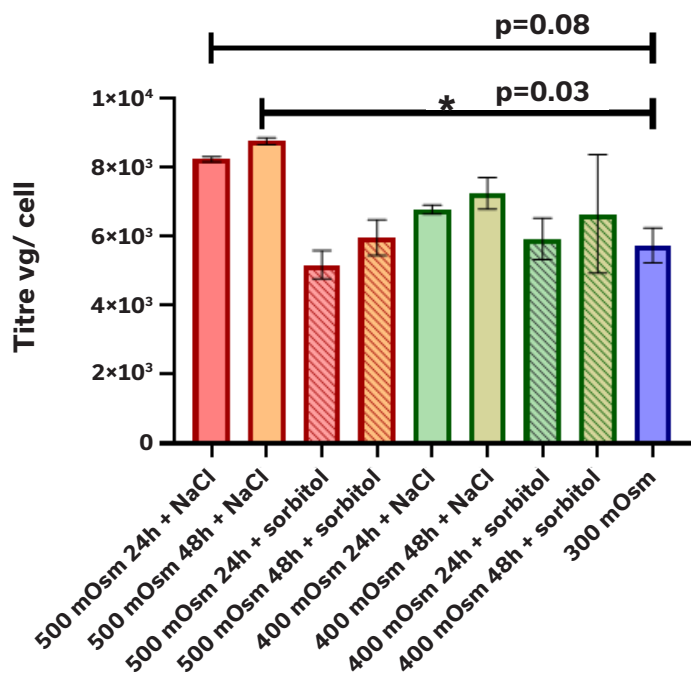


Figure 1. NaClとソルビトールをタイミングを変えてスクリーニング添加したときの比力価。トランスフェクション後48時間で、NaClを介して500mOsm/Kgに浸透圧をシフトさせると、AAVの特異的力価はコントロールに対して25%有意に増加した。本研究の続きはこの条件を選択した。

浸透圧の時間的なシフトは収量増加の可能性を示していますが、生成される産物の品質について考慮する必要がありました。トランスフェクション後48時間で、浸透圧を500mOsmにシフトさせたところ、Figure 2に示すように、コントロールと比較して、フル/エンプティキャプシド比が同レベルに維持されました。浸透圧のシフトがより遅い時点で起こった場合、フル/エンプティキャプシド比の増加傾向が見られました。この最初の結果は、上流工程におけるAAV収量の量と質の両面で、さらなる改善への扉を開くことを示しています。

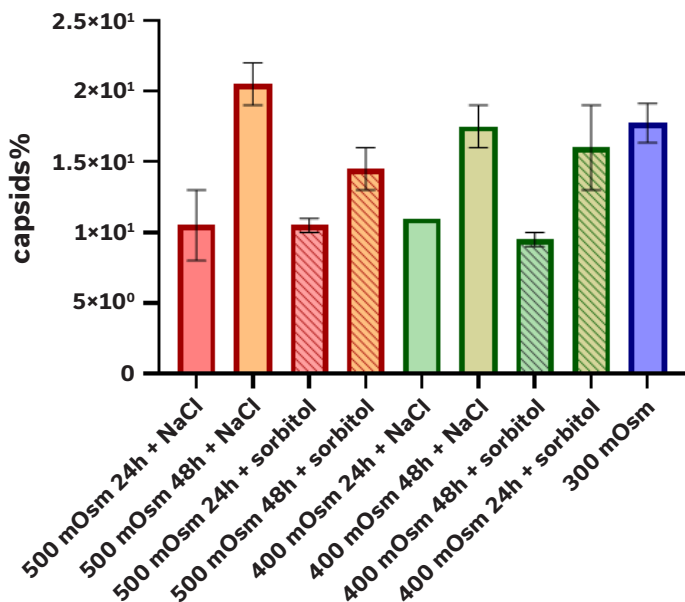


Figure 2. ENaClとソルビトールの添加をタイミングを変えてスクリーニングしたときに得られたエンプティ/フル比。

浸透圧をプロセスの後半にシフトさせると、 capsids%が増加する傾向が見られました。トランスフェクション後48時間目にNaClを介して浸透圧を500mOsm/Kgに変化させると、フル/エンプティの capsids%が増加した。

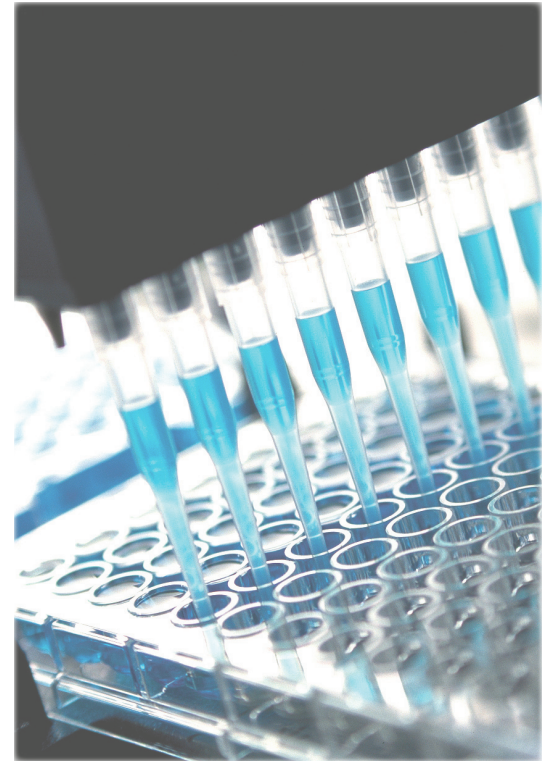
研究の第二段階は中間スケール (ambr 250) で行われ、容積を大きくすることで、より頻繁なサンプリングと細胞外AAV比率の測定が可能になりました。塩化ナトリウムの添加は、浸透圧を最適化して力価と品質を改善する可能性を示した一方で、高浸透圧ショックのために細胞の生存率が低下することが指摘されました。この問題に対処するため、トランスフェクション後6時間目にフィードを添加する条件を導入し、細胞の健全性を維持しながら凝集を抑え、AAV産生を高めることを目指しました。



2つの条件を実施、フィードありとフィードなし；浸透圧を最終300mOsm に維持したコントロールと、トランスフェクション後 48時間で浸透圧を 500mOsm にシフトしたもの（以前、最適なタイムポイントとして特定されていた）。各条件はまた、トリPLICATE（フィードあり）とデュPLICATE（フィードなし）でレPLICATEしました。細胞外AAV比率を測定するためのサンプリングは、トランスフェクション後48時間、72時間、96時間の3つのタイミングで実施しました。

トランスフェクション後72時間から96時間まで、全体的な力価の変化は観察されませんでした。Figure 3に示すように、細胞内と細胞外の力価の変化が観察されました。フィードを与えた条件では、トランスフェクション後48時間、浸透圧シフト後の1時間においてのみ、細胞外AAV比率の増加がみられました。フィードを与えなかった条件では、トランスフェクション後96時間まで同様の細胞外AAV比率を示し、その比率は94%に達しました。

プロセス開発と製造の両方を改善するために効率を上げる必要があるため、細胞外物質の増加は多少の助けになる可能性があります。培地の浸透圧シフトの効果で、ほとんどの物質を細胞外で得ることができ、理想的には溶解ステップの排除を示唆することができます。その上、塩化ナトリウムの使用は低コストでスケラブルなソリューションであり、溶解を排除することは、このステップで発生するすべての不純物を排除することでもあります。これらはすべて、下流の精製に大きな影響を与える可能性があり、回収率が向上することが期待され、より複雑でないスタート材料のおかげで、精製を必要としない直接的なキャプチャステップも想定することができます。これは、商品原価 (COGS) にも直接影響することになります。先に見たように、トランスフェクション後72時間から96時間まで、全体的な力価は増加しないということは、生産が1日延長されることと、溶解や精製に必要な試薬や材料を排除することによるコスト削減とを比較検討しなければならないことを意味します。これは、製造プロセスにおいて溶解ステップがコスト効率的であるか否かのカットオフ値の決定につながる可能性を示唆しています。最も重要なことは、患者にとって救命となる医薬品や治療法の提供時期を早めることです。このような将来の変化の可能性の影響を評価するために、上澄に多くの生産物を回収するために製造時間を延長することと、精製を容易にすることのバランスを、COGS分析の対象とすることができます。



このデータから、プロジェクトの再現を行うことは有意義であると考えています。浸透圧がウイルスベクターの生産と製造プロセスを最適化する際の鍵であることは明白になりましたが、これはまだ予備的なデータです。AAVの生産と精製において、力価、品質、効率を向上させるために最も有利な条件を完全に特定し、特徴付けるためには、同様の操作によるさらなる研究が必要です。

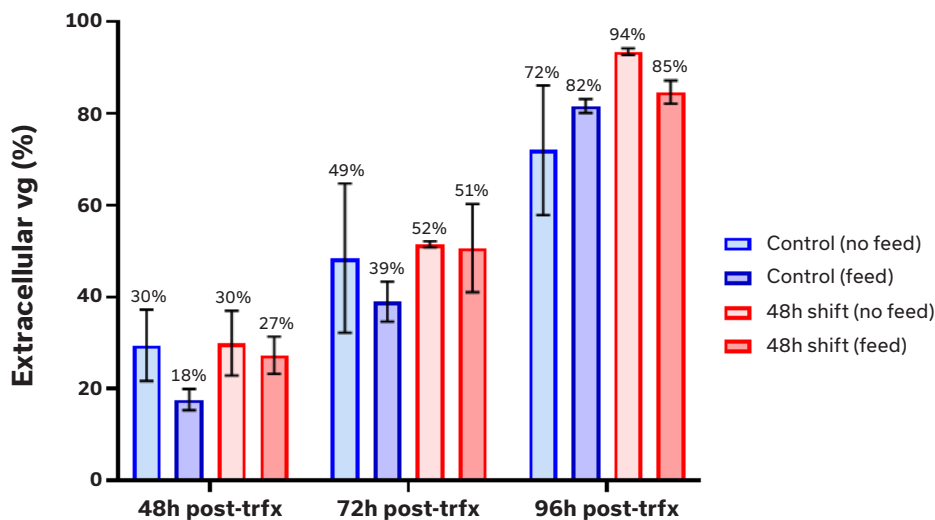


Figure 3. 500mOsmで培地をシフトさせたときの細胞外ウイルスゲノムの経時変化。最後に、培地を500mOsmにシフトした後、トランスフェクション後96時間で採取した場合、フィードなしで細胞外ウイルスゲノムを最大限増殖させる能力が観察された。

Conclusions

ここで議論されたデータは、ウイルスベクターの上流プロセスにおける浸透圧の利用および制御の必要性を意味し、またその必要性を再確認するものです。この研究では、AAVの力価だけでなく、エンブティカプシドに対するフルカプシドの比率で特徴づけられる品質も向上する可能性があります。さらに、データに見られる3つ目の、そして最後の利点は、細胞外物質の増加でした。この増加により、ユニットオペレーション削減の可能性に大きな意味があることが示唆されます。細胞内物質が全体の力価の10%未満しか占めていないため、細胞破碎ステップが削除されれば、精製ステップが削除される可能性が出てきます。

この研究は特にAAV1に焦点を当てていますが、浸透圧の操作と制御は、他の様々なウイルスベクターワークフローに組み込むことができると示唆されており、レンチウイルスもその選択肢の一つです。重要なことは、細胞株、血清タイプ、ワークフローによって方法論が異なる可能性があるため、これらの提案についてさらに研究を進めることが推奨されるということです。浸透圧シフトの利点はマトリックスに依存するようで、異なるタイムポイントと浸透圧値の調査が必要です。しかし、様々なペインポイントやボトルネックを改善するために、浸透圧を複数のバイオプロセスに取り入れるという展望は、非常に前向きなものであり、したがって、上流プロセスだけでなく下流プロセスにとっても、ゲームチェンジをもたらす可能性を秘めています。



この研究を実施するために使用された機器

OsmoTECH® PRO Multi-Sample Micro-Osmometer

OsmoTECH PROマルチサンプル微量浸透圧計は、多忙なバイオプロセスおよびバイオ製造ラボでのサンプルスルーットの増大、規制遵守（21 CFR part 11を含む）、データ管理のニーズに対応するよう設計されており、使いやすさと正確で精密な浸透圧測定を兼ね備え、信頼性と再現性の高い結果を提供します。



OsmoTECH® HT Automated Micro-Osmometer

The Next Gen High-Throughput
Osmolality Solution

OsmoTECH HTは、バイオプロセスにおける自動化とハイスルーputのニーズの高まりに対応する、現在入手可能な唯一のプレート型微量浸透圧計です。96ウェルフォーマットで設計されたこの自動化に適した装置は、細胞株開発、クローン・スクリーニング、初期プロセス、製剤開発における浸透圧検査の効率化と迅速化を確実にします。

References

1. United States Pharmacopoeia 42. General Chapters: 785 Osmolality and Osmolarity. Rockville, Maryland, USA: 2016.
2. K. Wright, 8 Ways That Osmolality Testing Improves Cell And Gene Therapy Processing. Advanced Instruments, Boston, USA: 2019.
3. J. Fraser Wright, Tannie Le, Joseph Prado, Jennifer Bahr-Davidson, Peter H. Smith, Zhu Zhen, Jurg M. Sommer, Glenn F. Pierce, Guang Qu. Identification of factors that contribute to recombinant AAV2 particle aggregation and methods to prevent its occurrence during vector purification and formulation, *Molecular Therapy*, Volume 12, Issue 1, 2005, Pages 171-178.
4. Chun Fang Shen, Amine Kamen. Hyperosmotic pressure on HEK 293 cells during the growth phase, but not the production phase, improves adenovirus production. *Journal of Biotechnology*, Volume 157, Issue 1, 2012.
5. Coroadinha AS, Silva AC, Pires E, Coelho A, Alves PM, Carrondo MJ. Effect of osmotic pressure on the production of retroviral vectors: Enhancement in vector stability. *Biotechnol Bioeng*. 2006 Jun 5;94(2):322-9. doi: 10.1002/bit.20847. PMID: 16528756.

輸入販売元

 **KIKO·TECH**
キコーテック株式会社 事業開発部

本社 大阪府箕面市船場西三丁目10番3号
〒562-0036 TEL 072(730)6790 FAX 072(730)6795
東京支社 神奈川県川崎市中原区新丸子東三丁目1200番地 KDX武蔵小杉ビル
〒211-0004 TEL 044(430)3245 FAX 044(433)4390

<https://www.kiko-tech.co.jp/>

