



Title	Minimizing Non-Specific Adsorption of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors on Solid Surfaces through the Application of a Polyionic Hydrophilic Complex (AP1) Coating
Author(s)	Salama, Ramy Essameldine Abdelhady
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/98644
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (SALAMA RAMY ESSAMELDINE ABDELHADY)	
Title	Minimizing Non-Specific Adsorption of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors on Solid Surfaces through the Application of a Polyionic Hydrophilic Complex (AP1) Coating (ポリイオン性親水性複合体 (AP1) コーティングによる組換えアデノ随伴ウイルスベクターの固体表面への非特異的吸着の最小化)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Chapter 1: General introduction</p> <p>The basics of genetics paved the way for gene therapy, aiming to treat genetic disorders by supplying intact genes. Viruses emerged as effective delivery vehicles, utilizing their ability to inject nucleic acids into cells. Various viral vectors with unique traits are employed in gene therapy. Adeno-associated virus (AAV), a well-studied viral vector, offers promising potential for gene therapy. With various serotypes and a single-stranded DNA genome, recombinant forms (rAAV) have high transduction efficiency, low immunogenicity, and toxicity. rAAV-based therapies are undergoing extensive clinical trials for diverse diseases. Despite its advantages, manufacturing rAAV faces challenges, such as non-specific adsorption onto surfaces like stainless steel, glass, and plastics, resulting in significant vector particle loss that ranges sometimes from 75% to 90%. Surfactants are commonly used to mitigate this issue but are prone to degradation and lose effectiveness upon dilution. Thus, this study explores preventing rAAV vector loss due to adsorption by evaluating the potential of a polyionic hydrophilic complex (PHC) polymer coating on tools used in rAAV analysis (e.g., pipette tips, cryotube vials, and qPCR plates). This coating, composed of biocompatible polymers containing phosphate and amine groups, exhibits zwitterionic properties.</p> <p>Chapter 2: Investigating the applicability of the PHC coating in minimizing the non-specific adsorption of rAAV</p> <p>In this chapter, tools utilized for storing rAAV and quantifying vector genome (VG), such as cryotube vials, pipetting tips, and qPCR plates, all made of polypropylene, were treated with the PHC coating. Non-coated tools served as controls. Both coated and non-coated tools were employed in storing and preparing samples primarily containing rAAV1, along with rAAV2 and rAAV8. Results of qPCR analyses showed that the PHC coating had an efficient recovery of vector particles from tools with this coating, with up to 95% of vector particle loss being prevented, leading to a higher transduction efficiency in vitro. Additionally, results showed that neither the serotype nor the poloxamer 188 surfactant at different concentrations significantly affected the adsorption reduction capability of the PHC coating. Furthermore, findings from the investigation into surface characteristics suggest that the PHC coating film displayed hydrophilic properties in both water and aqueous solutions. Additionally, the zeta potential of the coated substrate surface changed to nearly zero following coating.</p> <p>Chapter 3: Exploring the mechanism of action of PHC coating in conjunction with the fundamental mechanism of rAAV adsorption</p> <p>By surface charge manipulation of rAAV particles via pH adjustments and by using rAAV1 and rAAV9, both PHC coating mechanism of action and basic AAV adsorption mechanism were investigated respectively. Results showed that at pH 5.6 or 7.4, coated tools resulted in notably higher VG concentrations, indicating the impact of electrostatic charge repulsion between charged AAV1 particles and the zwitterionic PHC polymer coating. On the other hand, by subjecting rAAV9 to both polypropylene (hydrophobic/negatively charged) and glass (hydrophilic/negatively charged) results showed that each of hydrophobic interaction and electrostatic interaction plays a role in AAV non-specific adsorption however, electrostatic interaction predominates in case of charged particles.</p> <p>Chapter 4: Conclusion</p> <p>This study demonstrates that a PHC polymer coating effectively reduces non-specific adsorption of rAAV vectors by utilizing its hydrophilic and zwitterionic properties. It highlights the dominance of electrostatic interactions in rAAV adsorption when particles carry a charge. The coating offers a potential substitute for surfactants,</p>	

displaying consistent effectiveness and overcoming the issue of dilution commonly associated with surfactants. It holds promise for widespread use in rAAV storage, shipment, and quantification, but further research is needed before clinical application.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (SALAMA RAMY ESSAMELDINE ABDELHADY)										
	(職)									
	氏名									
論文審査担当者	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%;">主査</td><td style="width: 15%;">教授</td><td style="width: 70%;">内山 進</td></tr> <tr> <td>副査</td><td>教授</td><td>福崎英一郎</td></tr> <tr> <td>副査</td><td>教授</td><td>渡邊 肇</td></tr> </table>	主査	教授	内山 進	副査	教授	福崎英一郎	副査	教授	渡邊 肇
主査	教授	内山 進								
副査	教授	福崎英一郎								
副査	教授	渡邊 肇								

論文審査の結果の要旨

現在、遺伝性疾患の新しい治療法として遺伝子組換えウイルスを利用した遺伝子治療が注目され、世界中で研究開発が進められている。ウイルスは、特定の組織の細胞内に核酸を導入する能力が高いことから、病原性を低減した、または、病原性がない、組換えウイルスをベクターとして利用するアプローチが利用されている。なかでも、アデノ随伴ウイルス (AAV) は、病原性が知られておらず、インビボ遺伝子治療の中心的なプラットフォームとなっており、承認された組換え AAV(rAAV または AAV ベクター) 医薬品が米国では複数登場し、我が国においても研究開発が進められている。しかしながら、遺伝子治療用ベクターにおける大きな課題として製造法が十分に確立していない点がある。たとえば、rAAV も抗体医薬品と同様に動物細胞を使ったバイオテクノロジー技術により製造されるが、製造技術には確立していない部分が多く、たとえば、細胞あたりの産生量が抗体医薬品などと比べて 1/1000 以下であり、さらに、品質特性と有効性・安全性の関係が十分には特定されていない。そのため、ベクターの製造コストが高額となっているのが現状で、製造や品質管理、さらには規制に関する発展が望まれている。このような高価な rAAV であるが、製造や保管さらには患者への投与の際に、ステンレス、ガラス、プラスティックなどの固体表面に rAAV の吸着が起こり、量が減少する課題が認識されるようになってきた。例えば、場合によっては液中に含まれる 75% の rAAV 粒子が吸着するといった報告もあり、経済面での損失は当然ながら、患者に投与された rAAV の正確な量の算定が難しいという有効性と安全性の面での懸念が生じている。現時点では、界面活性剤を rAAV 製剤に添加することで吸着を抑制する対策が取られているが、界面活性剤では吸着を完全には抑制できず、界面活性剤は保管中に分解するため可能な限り添加を避けたい、という課題がある。

以上の背景から本研究では rAAV の固体表面への吸着低減を目指し、rAAV の取扱や分析の際に使用するピペットチップ、クライオチューブバイアル、qPCR プレートといった容器やチップ表面に、ポリイオン性親水性複合体 (PHC) ポリマーをコーティングし、吸着による rAAV ベクターの損失を効果的に防ぐための研究を行った。また、溶媒条件を変化させた条件での吸着量定量を行うことで、rAAV の吸着および吸着低減メカニズムの理解を行った。

本研究ではまず、rAAV の、保管、計測、取扱いの際に一般的に利用されているポリプロピレン製のクライオチューブバイアル、ピペッティングチップ、および qPCR (定量的ポリメラーゼ連鎖反応) プレート、の表面が PHC ポリマーコーティング塗布処理された道具を準備し、コーティングされていない道具を対照として実験を行った。試料として、表面特性の違いに基づく組織指向性が異なる rAAV1、rAAV2、rAAV8、の 3 種類の血清型の rAAV を用い、pH7.4 のリン酸緩衝液を溶媒として用いた。rAAV 溶液をクライオチューブバイアルに保管後、ピペッティングチップにより溶液を qPCR プレートに移動し、qPCR 分析を行ったところ、PHC ポリマーコーティング処理を行った道具を用いた場合、最大 95% の rAAV の損失を防ぐ効果が確認され、細胞を用いた感染実験により高い導入効率へつながることが示された。また、PHC ポリマーコーティングによる吸着抑制は、rAAV の血清型には依存しないことが示された。

次に、PHC ポリマーコーティングによる吸着抑制の機構を理解するため、材料表面の特性について計測を行った。pH7.4 リン酸緩衝液中では rAAV の総電荷は、表面電荷計算および過去の研究から負であることが知られている。測定の結果、PHC ポリマーコーティングされていないポリプロピレン表面は-49mV と大きな負電荷であるところ PHC ポリマーコーティングされたポリプロピレン表面は-4mV とほぼ電荷を持たない表面状態となっていた。さらに、材料表面の接触角を水中気泡法により測定したところ、PHC ポリマーコーティングされていないポリプロピレン表面は 96° であったところ、PHC ポリマーコーティングされたポリプロピレン表面は 28° と親水性となっていることが確認された。さらに、重要なことに、PHC ポリマーコーティングされたクライオチュープバイアルで rAAV 溶液を保管した場合、溶液に界面活性剤添加を添加すると、さらに高い吸着抑制力が発揮されることが見出された。以上の結果から、rAAV のポリプロピレン表面への吸着は、rAAV と表面の静電的相互作用と疎水相互作用を介して起こっていることが明らかとなり、表面の電荷低減と疎水性から親水性への転換が吸着抑制に効果的であることが示された。

本研究で示された、ポリイオン性親水性複合体ポリマーによる遺伝子治療用ベクターの吸着抑制は、高価で貴重な遺伝子治療薬の損失を防ぐことに貢献し、遺伝子治療および関連産業の発展に新たな戦略を与えると期待され、よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。