ver. 202203

AAV

(Adeno-Associated Virus)

Gene therapy

that's GOOD science!™

- 다양한 목적의 AAV 생산 시스템
  - Standard, CRISPR/Cas9, Tet, CRE, LacZ system
- AAV 추출 및 정제 제품
  - 회수방식별 (추출 용액, Freeze-thaw 방식)
  - 회수샘플별 (packaging cell, 배양 상층액)
- AAV 역가 측정 제품
- 고농도 용액, buffer 교환을 위한 AAV 농축 제품

TaKaRa

What is AAV?
(Adeno-Associated Virus)

AAV (Adeno-Associated virus)는 *in vivo*로 유전자를 도입하기 위해 가장 많이 사용되는 non-enveloped, single stranded DNA virus다. AAV는 면역원성이 낮고, 다양한 세포에 감염 능력이 뛰어나며, 특히 비분열세포에서는 장기간 유전자 발현이 가능하다. 또한 다양한 serotype으로 분류되며, 목적에 따라 serotype을 선택하여 적용할 수 있어, 이를 매개로 한 유전자 도입은 특히 동물 모델을 이용한 질환 연구, 유전자 기능 연구에 많이 활용되고 있다.

AAV 생산 시스템

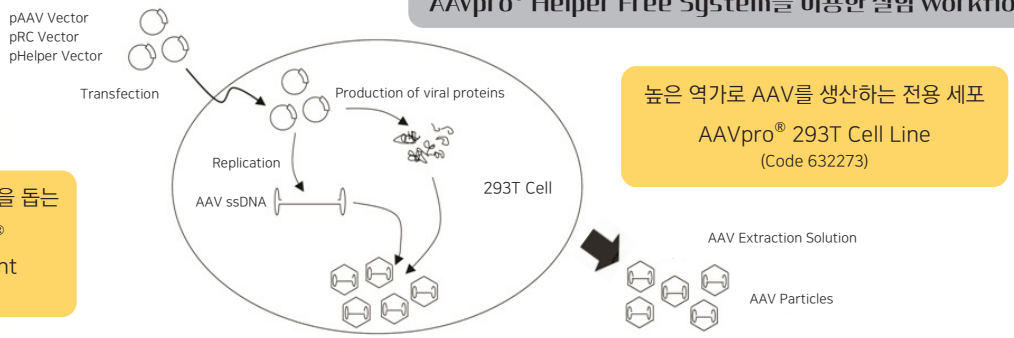
다카라바이오는 AAV의 고역가 생산, 추출, 정제, 역가 측정 및 농축의 전 과정을 진행하는 제품을 보유하고 있다. 일반적으로 AAV는 adenovirus나 herpes virus와 같은 helper virus와 함께 존재할 때만 복제가 가능하나, 당사의 제품은 실험 편리성 및 안전성을 위해 helper vector와 co-transfection하여 AAV를 생산하는 시스템으로 개발되었다.

Code	제품명
6673	AAVpro® Helper Free System (AAV1)
6230	AAVpro® Helper Free System (AAV2)
6650	AAVpro® Helper Free System (AAV5)
6651	AAVpro® Helper Free System (AAV6)

제품 구성

1. pAAV-CMV Vector (1 μg/μℓ)
   : Expression 벡터 (목적 유전자 cloning)
2. pRC Vector (1 μg/μℓ)
   : Serotype 별 Rep gene, Cap gene 발현
3. pHelper Vector (1 μg/μℓ)
   : Helper virus 대신 adenovirus E2A, E4, VA 발현
4. AAV Extraction Solution A, B

AAVpro® Helper Free System을 이용한 실험 workflow



Functional한 AAV의 생산을 돕는
*Trans*IT-VirusGEN® Transfection Reagent
(Code MIR 6700)

높은 역가로 AAV를 생산하는 전용 세포
AAVpro® 293T Cell Line
(Code 632273)

형광단백질 (ZsGreen1)이 포함된 AAV expression vector
• Control로 사용 • 별도 Cloning 없이 편리하게 GFP 도입

pAAV-ZsGreen1 Vector (Code 6231)

AAV를 이용한 유전자 편집 시스템

Choice 1. spCas9을 이용한 시스템

AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System
(AAV2) (Code 632608)

- 가장 많이 활용되는 *Streptococcus pyogenes* 유래의 spCas9 (4.1 kb)을 발현하는 2 vector system
- NGG 서열의 PAM 인식
- Guide-it-Up 벡터와 Down 벡터의 1.6 kb homologous region을 이용해 세포 내에서 SP Cas9과 sgRNA가 발현되도록 재조합됨

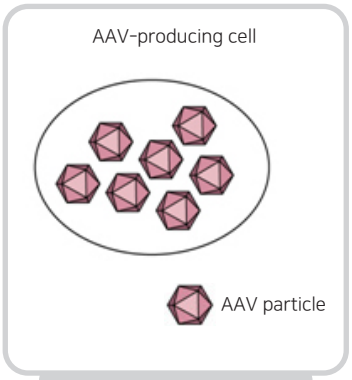
Choice 2. saCas9을 이용한 시스템

AAVpro® CRISPR/SaCas9 Helper Free System
(AAV2) (Code 632619)

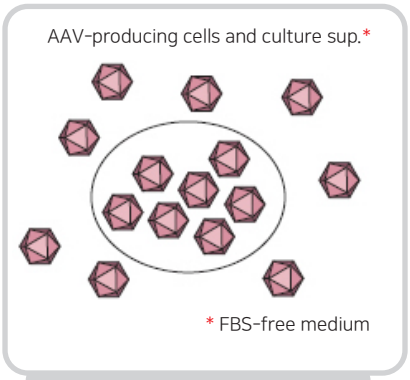
- *Staphylococcus aureus* 유래의 크기가 작은 saCas9 (3.3 kb)을 발현하는 1 vector system
- NNGRR(T) 서열의 PAM 인식
- Single vector 내에서 SaCas9과 sgRNA 모두 발현됨

Clinical grade의 virus 생산을 계획 중이라면?
GMP grade AAV vector 제조 및 생산 서비스
※ 자세한 문의는 support@takara.co.kr로 연락 주세요.

AAV 추출 및 정제



주로 packaging cell 내에서 회수되는 serotype



Packaging cell과 배양상층액 모두에서 회수되는 serotype

다양한 표적 장기, 조직 감염 특이성을 가지는 AAV를 이용한 유전자 치료 연구에 대한 관심과 수요가 증가하면서, 전임상 및 임상 시험을 위한 대량의 AAV 생산에 대한 요구가 증가되고 있다.

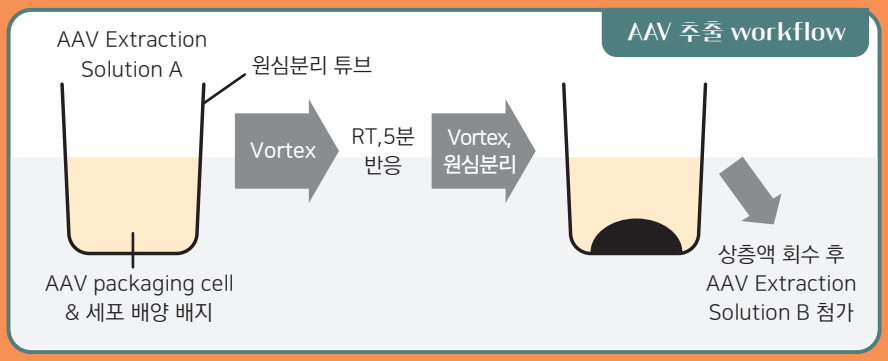
가장 많이 이용되어 왔던 AAV serotype 2는 주로 생산된 AAV가 세포와 강하게 결합된 상태로 남아 있어 packaging cell 내에서 바이러스를 회수하였던 반면, serotype 1, 8, 9 등은 packaging cell은 물론, 배양 배지에서도 많은 바이러스를 회수할 수 있다는 연구 결과가 보고되고 있다 (우측 참고 문헌 참고).

따라서, 다카라바이오는 다양한 serotype의 AAV 실험을 위해 cell pellet과 배양 배지 (supernatant) 중 원하는 샘플로부터 바이러스를 추출 및 정제할 수 있는 다양한 제품을 개발하였다.

독자적인 방식의 초 간단 추출 시약

AAVpro® Extraction Solution (Code 6235)

- 다양한 serotype에 적용 가능한 간편한 AAV 추출법
- 원심분리를 이용해 추출 과정이 굉장히 짧고 단순
- 특수한 장비나 복잡한 실험 과정 불필요
  - 기존의 freeze/thaw, sonication, 초원심분리 방식 대체
- Cell 유래 단백질이나 핵산의 혼입이 낮은 AAV solution 획득



※ 정제 kit 내 포함되어 있는 시약은 AAVpro® Extraction Solution과 동일한 추출 원리를 사용하고 있으나, 다른 조성의 시약으로 구성되어 있음

AAV packaging cell에서 AAV 추출

AAVpro® Purification Kit
Midi / Maxi (All Serotypes)
(Code 6675 / 6666)

AAV packaging cell과 배양 상층액에서 모두 AAV 추출

AAVpro® Cell & Sup. Purification Kit
Maxi (All Serotypes)
(Code 6676)

동결된 샘플을 위한 추출 & 정제

4시간 내 완료

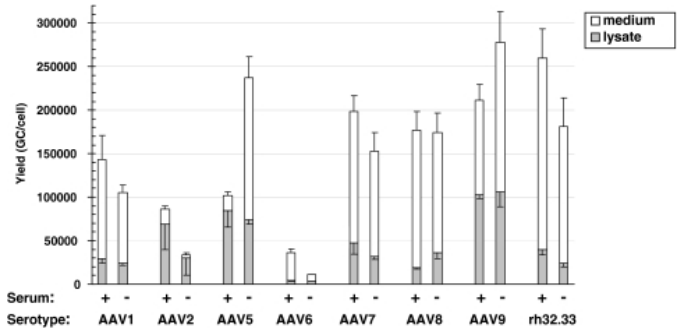
AAVpro® Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes) (Code 6679)

- 다양한 serotype에 적용 가능한 고수율 AAV 추출법
- 동결 보관된 packaging cell에서도 AAV 획득 가능
- 단 한번의 freeze-thaw 만으로 AAV 추출 완료

AAVpro® Purification Pack Maxi (All Serotypes) (Code 6678)

- 다양한 serotype AAV 정제에 사용 가능
- Maxi (5개의 T225 flask) 수준의 정제
- 정제에 사용되는 모든 시약, 구성품 포함
  - Ultracentrifuge와 같은 특수 장비, 복잡한 과정 불필요

참고 문헌

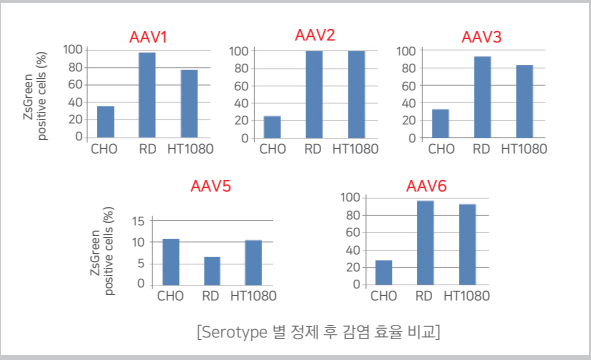


Efficient serotype-dependent release of functional vector into the culture medium during adeno-associated virus manufacturing (DOI: 10.1089/hum.2010.107)

Fig 1. Serotype-dependent particle distribution in vector production cultures. Vector particle distribution was evaluated by quantitative PCR for DNase-resistant vector genomes in "cell" and "medium" fractions from small-scale production cultures 72 hr after transfection by the $CaCl_2$ method, followed by incubation in the absence or presence of fetal bovine serum. Columns represent total yield of vector from *n=3* preparations, and columns are subdivided between the proportions of vector retrieved from the medium versus the cellular fraction. GC, genome copies.

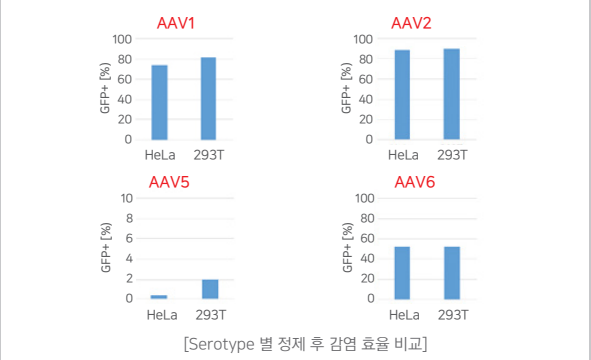
회수샘플에 따른 추출 & 정제 제품

- 주로 packaging cell 내에서 AAV를 회수하는 serotype에 적용
- 초원심분리 (ultracentrifuge) 없이 4시간 내 정제 가능
- 배양 scale에 따라 midi / maxi 제품 선택 가능
- AAV 추출부터 정제에 필요한 모든 구성 포함



[Serotype 별 정제 후 감염 효율 비교]

- Packaging cell 뿐 아니라 배양 상층액에서도 AAV가 회수되는 serotype에 적용
- 초원심분리 (ultracentrifuge) 없이 7시간 내 정제 가능
- AAV 추출부터 정제에 필요한 모든 구성품 포함
  - 추출/농축, 정제 과정 제품 별도 구매 가능



[Serotype 별 정제 후 감염 효율 비교]

Functional AAV 생산용

TransIT-VirusGEN® Transfection Reagent (Code MIR 6700)

- Adherent / suspension 배양된 packaging cell에 모두 적용 가능
- Virus 역가를 높여줄 뿐만 아니라 감염 능력이 높은 AAV 생산에 도움

AAV 추출 효율 증진

Cryonase™ Cold-active Nuclease (Code 2670A)

- 낮은 온도에서 모든 형태의 RNA, DNA (single / double strand, linear, circular) 분해
- 바이러스 정제 전처리 시 사용
- 단백질 등 열에 불안정한 물질을 포함한 샘플 내 혼입된 핵산 처리 시 유용

특수 목적의 AAV 생산 시스템

목적 유전자의 발현 조절이 가능한

AAVpro® Tet-One™ Inducible Expression System (AAV2) (Code 634310)

- AAV를 이용한 유전자 도입 효율 증가 및 *in vivo*에 최적
- Doxycycline 처리를 통해 목적 유전자 발현 조절
- Tet-One™ 기술로 간편한 실험 과정
  - Tet-on® 3G transactivator와 목적 유전자를 하나의 expression vector에서 발현

형질전환 마우스 제작 및 스크리닝을 위한

AAVpro® Helper Free System (AAV-CRE Recombinase) (Code 6652 외)

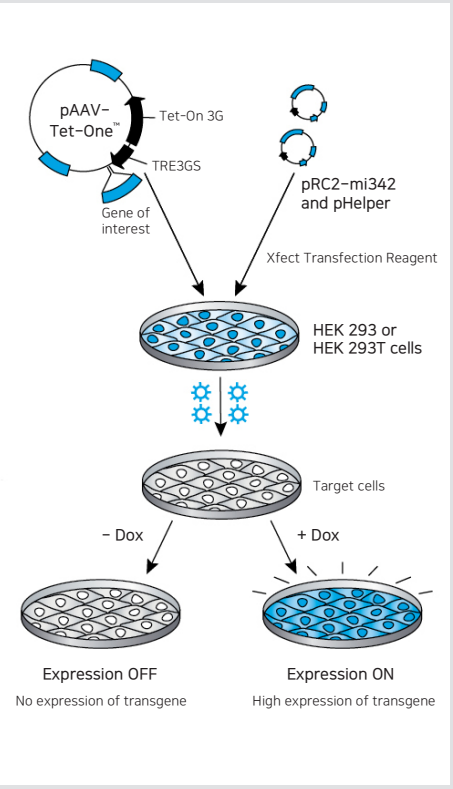
- *LoxP* 의존적인 CRE recombinase 유전자가 미리 cloning 되어 있어, 편리하게 AAV 제작 가능
- AAV serotype 별 제품 선택 가능

X-gal staining을 위한

AAVpro® Helper Free System (AAV-*LacZ*) (Code 6655 외)

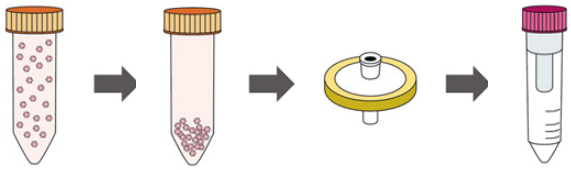
- *LacZ* 유전자 (β-galactosidase를 산물로 생산)가 미리 cloning 되어 있어, 편리하게 AAV 제작 가능
- AAV serotype 별 제품 선택 가능

Tet 유전자 발현 유도 과정



목적 유전자 cloning → Transfection → AAV 회수 → 목적 세포 감염 → 유전자 발현 조절 확인

고농축 AAV 획득



AAVpro® Concentrator (Code 6674)

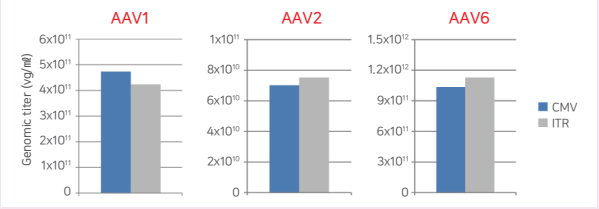
- 다양한 serotype의 AAV 용액을 편리하게 농축
- 간단한 mix & spin 방식으로, 1시간 이내 완료
  - Ultracentrifuge 과정 불필요
- *In vivo* 적용을 위한 buffer 교환, 고농도의 AAV solution이 요구되는 실험에 최적
- 혈청 유무에 상관 없이 적용 가능

정확한 AAV 역가 측정

AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) (Code 6233)

- AAV2 ITR 기반의 다양한 serotype의 AAV를 정확하게 정량
- qPCR을 이용해 빠르고 간편하게 약 2.5시간 만에 역가 확인
- Packaging cell 내 AAV 추출 시약과 역가 측정에 필요한 모든 구성품 포함

다양한 serotype의 AAV 역가 측정 확인



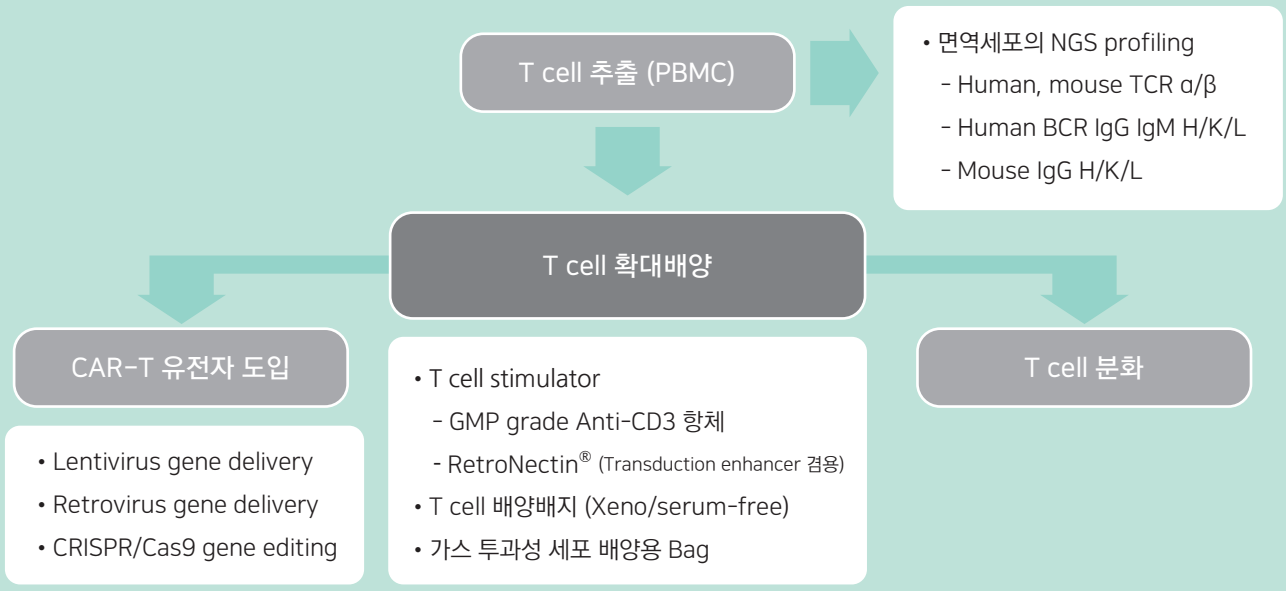
CMV와 ITR 서열 (본 제품 타겟 서열)을 각각 타겟 하여 qPCR을 통한 정량 값을 비교하였으며, AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) (Code 6233)가 다양한 serotype의 AAV에 적용 가능함을 확인하였다.

NEW

4 / 6 channels을 지원하는 stand-alone qPCR 기기

CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System

AAV 관련 제품군

사용 목적	Code	제품명
AAV 생산 시스템	6673	AAVpro® Helper Free System (AAV1)
	6230	AAVpro® Helper Free System (AAV2)
	6650	AAVpro® Helper Free System (AAV5)
	6651	AAVpro® Helper Free System (AAV6)
AAV를 이용한 유전자 편집 시스템	632608	AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2)
	632619	AAVpro® CRISPR/SaCas9 Helper Free System (AAV2)
AAV를 이용한 유전자 발현 조절 시스템	634310	AAVpro® Tet-One™ Inducible Expression System (AAV2)
CRE 유전자를 포함한 AAV 생산 시스템	6668	AAVpro® Helper Free System(AAV1-CRE Recombinase)
	6652	AAVpro® Helper Free System(AAV2-CRE Recombinase)
	6653	AAVpro® Helper Free System(AAV5-CRE Recombinase)
	6654	AAVpro® Helper Free System(AAV6-CRE Recombinase)
LacZ 유전자를 포함한 AAV 생산 시스템	6669	AAVpro® Helper Free System (AAV1-*LacZ*)
	6655	AAVpro® Helper Free System (AAV2-*LacZ*)
	6656	AAVpro® Helper Free System (AAV5-*LacZ*)
	6657	AAVpro® Helper Free System (AAV6-*LacZ*)
GFP 발현 AAV expression vector (Control)	6231	pAAV-ZsGreen1 Vector
독자적인 초간단 AAV 추출 시약	6235	AAVpro® Extraction Solution
단 한번의 Freeze/thaw 과정의 AAV 추출 시약	6679	AAVpro® Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes)
Packaging cell 내 AAV 추출 및 정제	6675	AAVpro® Purification Kit Midi (All Serotypes)
	6666	AAVpro® Purification Kit Maxi (All Serotypes)
Packaging cell 및 배양 상등액의 AAV 추출 및 정제	6676	AAVpro® Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes)
Packaging cell 내 AAV2 추출 및 정제	6232	AAVpro® Purification Kit (AAV2)
AAV 용액 고농축 혹은 buffer 교환 시약	6674	AAVpro® Concentrator
qPCR을 이용한 AAV 역가 측정 시약	6233	AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR)

T cell therapy도 다카라와 함께 !