

## スケラブルなプラスミド DNA の精製： ワクチン及び遺伝子治療製品に関する戦略及び考慮事項

**Thomas Parker** (トーマス・パーカー)、技術管理部、ワクチン・ウイルス治療製品、工程開発サイエンティスト  
**Youness Cherradi** (ユネス・チェラディ)、技術管理部、シニア工程開発サイエンティスト  
**Nidhivinayak Mishra** (ニディーヴナイヤク・ミシュラ)、技術管理部 - MSAT、工程開発スペシャリスト II

プラスミド DNA (pDNA) はウイルスベクター治療製品の重要な構成要素です。

pDNA は環状の二重らせん DNA 分子で、ウイルスカプシドをコードする治療用導入遺伝子又はワクチン自体として使用されます。DNA ワクチンは動物医薬品として承認されており、この方法は新型コロナウイルス感染症ワクチンにも利用されています。mRNA ワクチンの出発物質としての pDNA の使用もパンデミックへの対応で注目されており、腫瘍など他の領域にも応用されています。さらに、遺伝子治療用のウイルスベクターを作成する際の哺乳類細胞への遺伝子導入にもプラスミド DNA が使用されます。

pDNA の製造にはいくつか課題があります。

微生物発酵は生産性が低いという問題があり、プラスミドは強い負の電荷を帯びていることから精製工程も複雑です。細菌ライセート (溶菌液) には pDNA と性質の類似した混入物が含まれることから、製品と分離が難しく、粘度も非常に高いことがあります。

クロマトグラフィーでは流速を低くしなければならず、最終の

タンジェンシャルフローろ過 (TFF) 工程で望ましい濃度にするのが困難です。

さらに、pDNA はせん断応力に弱くトポロジー構造が変化しやすいという問題もあります。

プラスミドにはスーパーコイル状 (無傷の超らせん構造)、開環状 (DNA2 本鎖のうち 1 本が切断され弛緩した分子) 及び直鎖状 (2 本鎖が両方も切断された直鎖構造) のアイソフォームがあります。

スーパーコイルプラスミドが最も治療効果が高いと考えられており、DNA ワクチンにおける最終製剤のスーパーコイル率が ある程度高いことが規制当局からは期待されます。

本書では、シングルユース技術と pDNA 製造のバリデーション及び試験サービスからなるエンドツーエンドのプラットフォームについて記載します (図 1)。

単位工程ごとの概要を精製ワークフローの最適化・合理化戦略とともに以下に説明します。

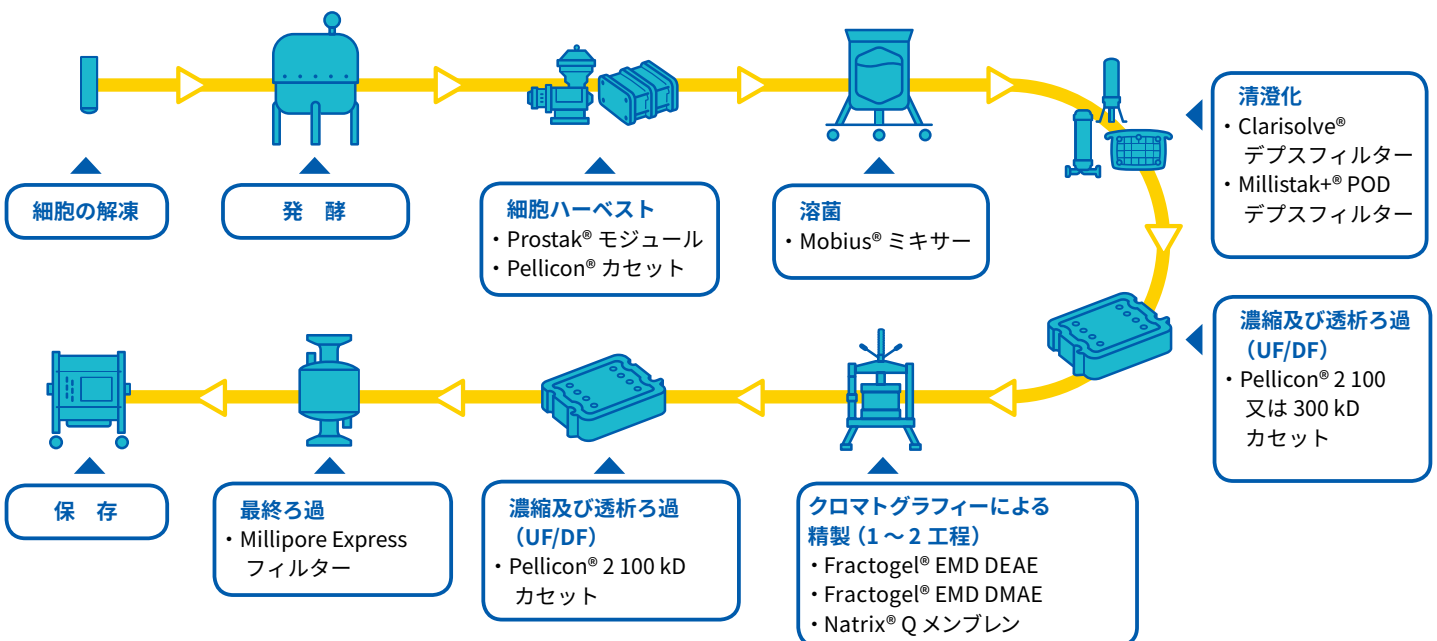


図 1. ハーベストから最終充填までの pDNA 精製の統合ワークフロー

## 細胞のハーベスト、溶菌及び遠心分離

プラスミドはバッチ又はフェドバッチ培養で大腸菌内に産生されるため、pDNA 精製のハーベスト工程では複数の操作が必要となります。

遠心分離又は精密ろ過 TFF (MF-TFF) により大腸菌培養槽から培地を除きますが、pDNA 製造に多い低容量工程では、設備投資コストが低くプロセスが柔軟でスケール調節の容易な MF-TFF の方が適しています (表 1)。

表 1 に示すとおり、MF-TFF 工程を設定する際に、固体含量が多い場合はオープンチャンネルの装置が向いています。

### 遠心分離

- 従来方法は、大規模 (500 L 超) 又は非常に小規模のシングルローター (5 L 未満) で費用対効果が高い。
- 大規模遠心分離では強いせん断力が生じるため特に注意が必要。

### 精密ろ過タンジェンシャルフローろ過 (MF-TFF)

- 固体含量が多い場合はオープンチャンネル式が有利
- このアプリケーションではフラットシート TFF 装置が有効です
  - 線形のスケラビリティ
  - さまざまな様式及び設置オプションあり

### MF-TFF の典型的操作パラメータ

パラメータ	値
装置	Prostak™ モジュール又は Pellicon®2
負荷容量	10 ~ 60 L/m <sup>2</sup>
供給流量	7 ~ 9 L/分/m <sup>2</sup>
TMP	< 0.5 bar
平均流束	20 ~ 30 LMH
容積濃縮係数	2 ~ 5
透析ろ過容積	3 ~ 5 倍

表 1. 遠心分離と MF-TFF の比較及び細菌細胞ハーベストの操作パラメータ

ハーベスト後、アルカリ条件で大腸菌を溶菌しプラスミドを抽出します。

この方法は、溶菌 pH が pDNA の変性 pH に近い場合難しい場合があります。

アルカリ添加速度と混合条件が重要で、フィード液の高粘度も混合工程に影響します。

アルカリ条件と混合せん断力によってスーパーコイル pDNA が損傷する可能性があります。

次の工程は、細胞破片を除去する清澄化もしくは前処理による最初の精製です。

ライセートは固体含量が高く複雑に 2 層分離する非常に扱いにくいフィード液で、上の泡層には細胞破片と gDNA が、下のライセート層には pDNA、RNA 及び宿主細胞由来タンパク質が含まれており、前処理による最初の精製に影響します。

清澄化を改善するためさまざまな方法が試みられていますが、最適なテンプレートは現在まだありません。

清澄化には遠心分離又はろ過が使用できますが、細胞ハーベストに記載したとおり、遠心分離は好ましくありません。

遠心分離は固体含量が高い液に使用できますが二次的な清澄化が必要となる可能性があり、高いせん断速度によってスーパーコイル pDNA が損傷する恐れがあります。

これに対して、通常のろ過はサイズ排除及び吸着機構を利用する頑健な清澄化方法で、多くの設置オプションがありスケールアップ及び工程開発が簡単です。

もう 1 つ重要な点として、正の電荷を帯びたろ過助剤がプラスミドと相互作用する可能性があります。

pDNA の清澄化では、目的物質の結合を軽減するため吸着性の低い素材が推奨されます。

pDNA の清澄化に適することが証明されているフィルターの種類を図 2 に要約します。

これらのデプスフィルターは広範な条件で優れた性能が示されており、プラットフォームのオプションとして使用可能です。

図 3 をみると、調整済みライセートと未調整のライセートの両方で容量が比較的高く、平均容量は多くのフィルターで 150 L/m<sup>2</sup> を超えています。

これらのデプスフィルターは収率も高く、清澄化工程後に設置する最終精製メンブレンの保護も期待できます。

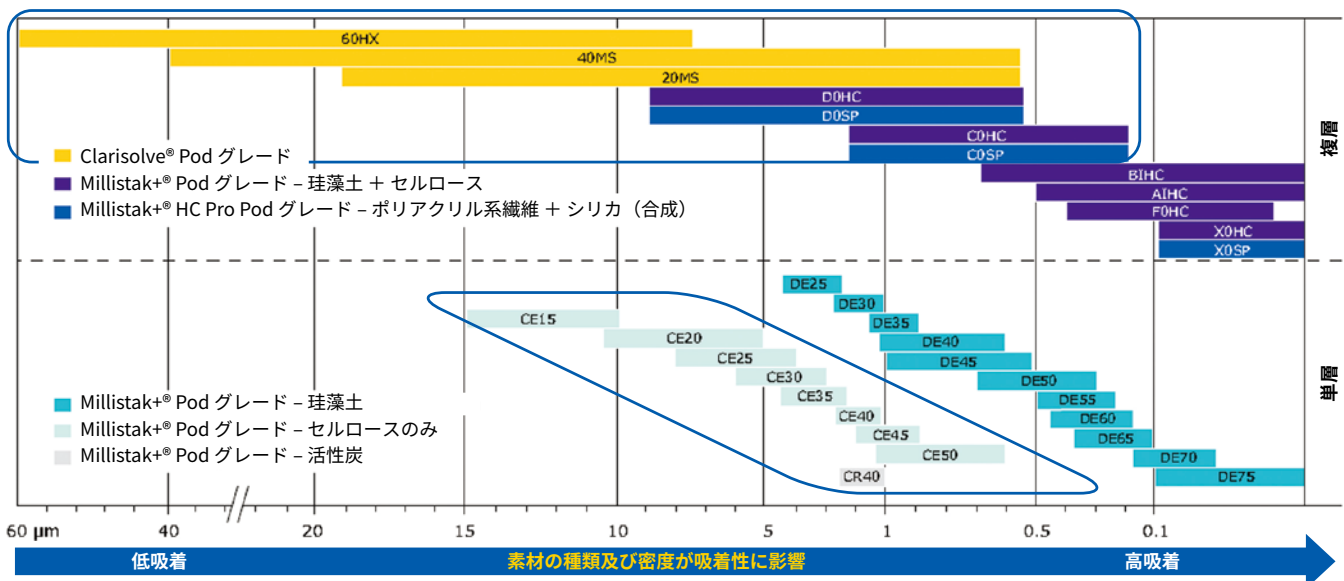


図 2. pDNA 清澄化の確実なオプションとなるデプスフィルター

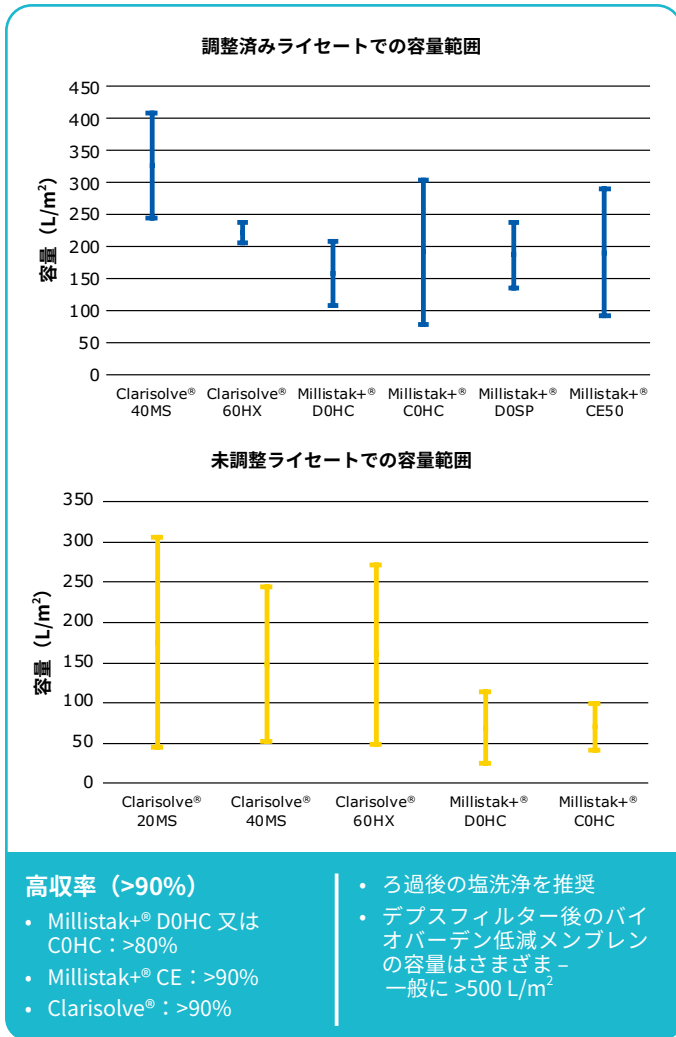


図 3. 調整済み及び未調整ライセートでのデプスフィルター容量範囲

CaCl<sub>2</sub> 沈殿後のライセート及び未処理ライセートの清澄化に異なるデプスフィルターを使用した2つの事例を表2に示します。最初の例では Clarisolve® 60HX を選択し、14 × 0.55 m<sup>2</sup> フィルターの工程スケール pod ラック 2 個を使用した 500 L ロット用の設備で処理できました。未処理ライセートでは、Clarisolve® 60HX よりも目の細かい Millistak+® D0HC が最適であり、ライセート 500 L の清澄化には工程スケール pod ラック 1 個で十分でした。

### タンジェンシャルフローろ過

pDNA の精製は複雑で、TFF、クロマトグラフィー、滅菌ろ過など複数の操作を組み合わせる必要があります。

詳細	フィルター	流速 (LMH)	15 psi dP での容積スループット (L/m <sup>2</sup> )	安全係数 1.5 倍での 500 L 用の設置
<b>事例研究 1</b> • Clarisolve® 60HX • アルカリ溶菌 + CaCl <sub>2</sub> 沈殿 • gDNA 及び RNA を除去	Clarisolve® 60HX			14 × 0.55 m <sup>2</sup>
<b>事例研究 2</b> • Millistak+® D0HC • アルカリ溶菌、前処理なし • gDNA を除去	Millistak+® D0HC			8 × 1.1 m <sup>2</sup>

表 2. 異なるデプスフィルターによる沈殿後ライセート及び未処理ライセートの清澄化

pDNA では TFF 工程を 1 回又は 2 回実施し、プラスミドの大きさによって分画分子量 30、100 又は 300 kD のメンブレンが使用されます。TFF を清澄化工程とクロマトグラフィー工程の間に実施することにより、透析ろ過で残留不純物を除去し pDNA を濃縮して、クロマトグラフィー工程の前に負荷液量を少なくできます。TFF は最後の精製工程でも使用され、透析ろ過でバッファーに交換し目的の濃度まで濃縮します。

TFF の工程開発では、特に不純物が多い供給液の場合にフィルターの目詰まりを考慮することが重要です。一般に分画分子量の大きいメンブレンは分画分子量の小さいメンブレンよりも早く目詰まりを起こし、目詰まりは透過液流速に依存します。透過液流量を制御するには 2 つの方法が考えられます。

- 2 つのポンプを使用し、供給液と透過液のポンプで流速を完全に制御
- 単一の供給液ポンプと残液バルブによって膜間差圧 (TMP) の制御を行うことにより透過液流速を調節

いずれの操作モードでもフィルターが目詰まりを起こす限界透過流束が存在し、このとき粒子はメンブレンを速く通過しないため操作が安定化せず細孔内に滞留します。TMP 制御操作における限界流束レベルの例を図 4 に示します。TMP 制御では、100 kD 以上のメンブレンでは限界流束を生じる TMP がかなり低く、製造時の TMP 操作許容範囲が非常に狭くなります。したがって、工程のスケールアップで高い一貫性を得るには 2 つのポンプを使った制御の方が望ましいといえます。

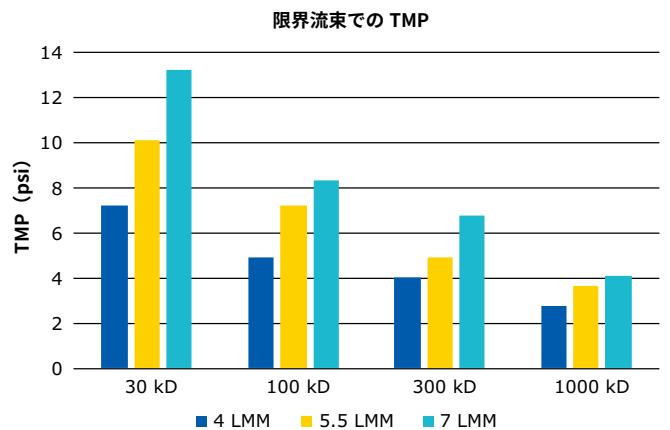


図 4. 限界流束での膜間差圧

典型的な TFF の操作パラメータを表 3 に示します。TFF では、特に濃度の高い液ではせん断と高粘度に注意を払うことが重要です。このアプリケーションには D スクリーンや V スクリーンなどのオープンチャンネルのスクリーンが適しています。さらに、操作パラメータによって保持特性が変化することも認識すべきです。プラスミドの各アイソフォームのふるい係数はろ液流束に依存するため、分画分子量 100 kD のメンブレンではろ液流束に基づいてアイソフォームが分離されます (図 5)。TFF によりプラスミドアイソフォームが分離できることがこの研究で示されていますが、pDNA を確実に濃縮し透析ろ過するには工程を最適化し再現性を確保する必要があります。

パラメータ	値
供給液流束 (LMM)	≤ 4
透過液流束 (LMH) - ポンプ 2 個	20-50
TMP (psi) - TFF 制御	<10
負荷容積 (L/m <sup>2</sup> )	70-140
濃縮係数	5x-50x
容積濃縮係数	2~5
透析ろ過容積	3~5 倍

表 3. TFF の典型的操作パラメータ

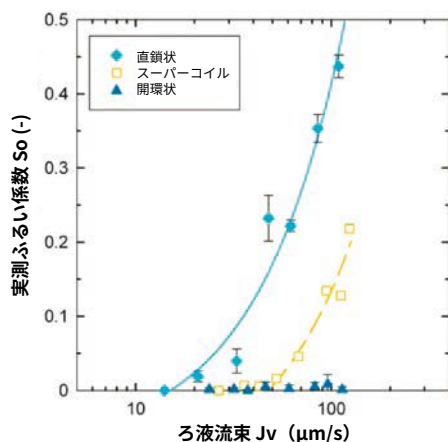


図 5. 操作パラメータによる保持特性の変化

## クロマトグラフィー

pDNA の精製には陰イオン交換クロマトグラフィー (AEX) 及び疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) が一般的に使用されます。AEX は負に荷電した核酸を効果的に結合するため pDNA の精製に広く使用されますが、多くの不純物も負に荷電しており同時に結合するため分離が困難です。このような欠点ではありますが、AEX はタンパク質、RNA、gDNA 及びエンドトキシンを確実に除去することが示されています。一方、プラスミドのアイソフォームをイオン交換で分離するのは非常に困難です。この場合、溶出液の塩濃度が高い AEX の後に HIC を実施することができます。

クロマトグラフィーによる精製には樹脂又はメンブレンが使用されます。

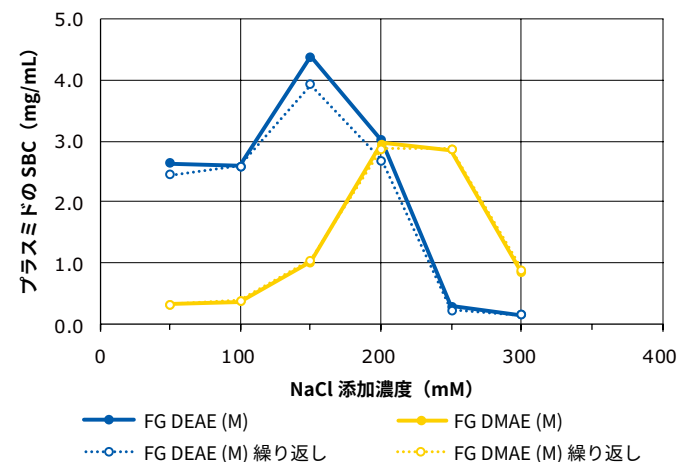
樹脂は設置の柔軟性が高く選択性も良好ですが、プラスミドは大きすぎて樹脂ビーズ内に拡散しないため結合部位へのアクセスが制限され、結合容量は低くなります。また、フィード液が高粘度なため圧力降下が大きくなり、流量が制限され処理時間も長くなります。対照的に、メンブレンは孔径が大きく結合部位へのアクセスが拡散に依存しないため、結合容量及び流速がかなり高くなります。

Fractogel® EMD DEAE 及び EMD DMAE などの弱陰イオン交換樹脂は用途が広くユニークな選択性があり結合容量も最高クラスであることから、中間体の精製に適しています。AEX 樹脂には以下のような利点があります。

- ユニークな結合選択性
- ビーズ表面から結合領域を拡張するテタクル構造による高い結合容量 (2 ~ 4 mg/mL)
- 高い収率：共有結合閉環 (ccc) 型で 80% ~ 95%
- 残留エンドトキシンの除去
- 適度なビーズサイズ (d50 : 48 ~ 60 μm) による良好な分解能
- 適度な流速：滞留時間 4 ~ 8 分

RNA を除去する方法として CaCl<sub>2</sub> 沈殿、RNase 処理、TFF などが検討されていますが、Fractogel® EMD DEAE に対する RNA の結合・干渉を抑え、pDNA の結合を維持する最良の方法は塩を直接添加することです。清澄化したライセートの NaCl 濃度を上げて RNA の同時結合を抑えることにより、pDNA の結合容量が高まります。NaCl 添加量に対して静的結合容量 (SBC) をプロットしたグラフ (図 6) をみると、RNA の結合が抑制されプラスミドの結合は抑制されない最適塩濃度が明確に認められます。pDNA 結合性が高い最適塩濃度では Fractogel® EMD DEAE 溶出液の純度が最も高いことが、電気泳動ゲルでも確認されています。

## A.



**B. 各種 NaCl 添加濃度のライセートから得られた Fractogel® EMD DEAE 捕捉溶出液の純度**

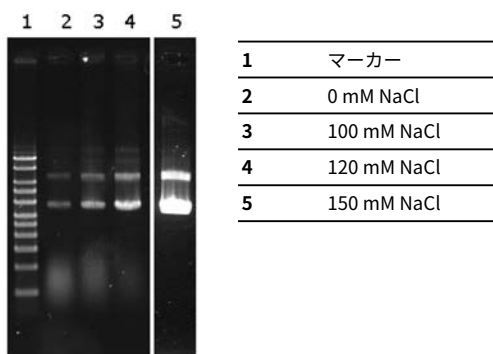


図 6. ライセートの pDNA 結合性 (A) 及び各種 NaCl 添加濃度のライセートから得られた捕捉溶出液の純度 (B)

塩添加法の利点を踏まえ、pDNA 精製では NaCl を添加した清澄化ライセートを AEX に直接負荷して RNA、エンドトキシン、gDNA 及び宿主細胞由来タンパク質を除去することが推奨されます。

AEX で直接捕捉する方法では RNA が 95% 以上除去され、95% を超える pDNA 純度と 90% を超える pDNA 収率が得られます (図 7)。

重要な点として、クロマトグラフィー前に前処理や TFF 工程を実施すると複合体が生成する可能性があるのに対し、直接捕捉する方法では複合体が生成しないという大きな利点があります。

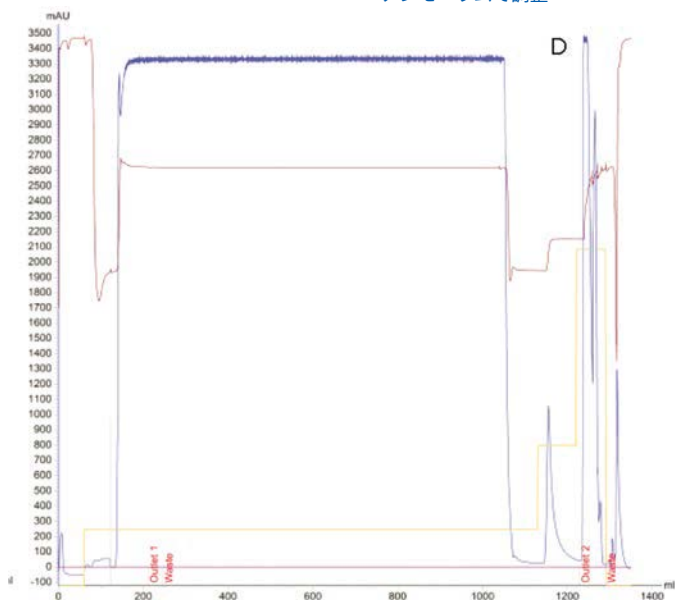
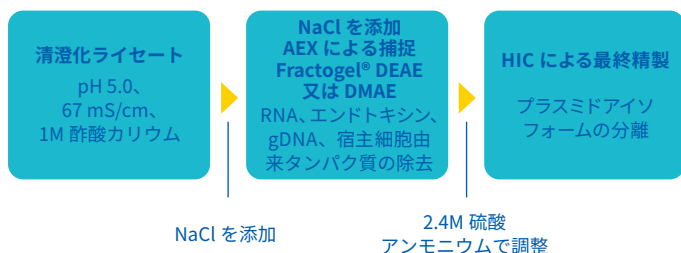


図 7. 塩を添加し AEX で直接捕捉する方法では前処理及び TFF が不要

AEX で直接捕捉する代わりに、HIC で捕捉してから Fractogel® 弱陰イオン交換樹脂で精製を行う方法もあります。HIC 結合条件に合わせてライセートを調整する際に沈殿が精製する可能性があるため推奨されませんが、この方法は効果的です。

これらの陰イオン交換樹脂は硫酸アンモニウム濃度が高くても pDNA 結合性が維持されるため (図 8)、HIC と AEX の間では供給液の調整がほとんど必要ありません。

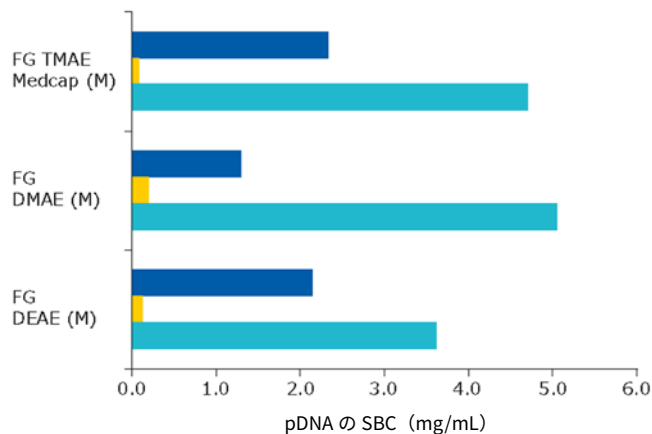


図 8. Fractogel® AEX 樹脂の pDNA 結合性は高濃度の硫酸アンモニウムにも耐える

Natrix® Q クロマトグラフィーメンブレンは生産性に優れたシングルユースの陰イオン交換膜で、20 kbp 未満の比較的小さいプラスミドの捕捉に適しており、高い機械的強度と水透過性を有する複合膜です。

名目孔径 0.4 µm で高い流速が得られ、苛性アルカリで効果的に洗浄しながら短いサイクルで再利用することによりコストが低減されます。

Natrix® Q は pDNA の結合容量が 5 ~ 10 mg/mL と高く、RNA は 95% 以上除去され、サイクル時間も短く 35 分程度です。

上述した同じ塩添加法で Natrix® Q を用いたとき、小 (5.7 kbp) 及び中 (13 kbp) サイズのプラスミドでそれぞれ 10 及び 4 mg/mL と非常に高い結合容量が得られます (表 4)。

高い結合容量に加え、Natrix® Q による純度と収率も非常に良好です。

ただし 20 kb ほどの大きなプラスミドでは膜孔径に近いため性能が低下します。

膜透過性の低下が認められ、結合容量及び工程性能が低下しています。

#### 使用した供給液：

- アルカリ溶菌で得られた大腸菌ライセート、遠心分離／デプスろ過により清澄化し、RNA の干渉を抑えるため NaCl を最適濃度で添加、pH 5.0、0.22 μm フィルターでろ過
- 各種サイズのプラスミド
- 最初の pDNA 純度は 0.7% ～ 4%

プラスミドのサイズ	プラスミド濃度 (μg/mL)	最初の pDNA 純度 (A260 測定)	最初のライセート伝導度 (mS/cm)	最適 NaCl 添加濃度 (mM)	最終のライセート伝導度 (mS/cm)	滞留時間 (分)	操作容量 (mg/mL MV)	収率 (%)	溶出液の pDNA 純度 (A260 測定)
5.7 kb	45	4.0%	69	160	82	0.1	~10	≥80	≥80% pDNA
13 kb	33	2.4%	72	130	82	0.1	~4	≥77	≥90% pDNA
20 kb	25	0.7%	79	100	86	0.2	~1	≥65	≥62% pDNA

表 4. Natrix® Q クロマトグラフィーメンブレンを使用した pDNA の精製

表 5 に示すとおり、塩を直接添加した Natrix® Q による高スルーット捕捉で高い pDNA の結合容量が得られます。別の方法として、結合容量、選択性、収率の高い HIC で捕捉してから Fractogel® EMD DEAE 又は EMD DMAE で最終精製することも可能です。

#### 使用した供給液：

- 大腸菌ライセート、遠心分離に続くデプスフィルターにより清澄化し、RNA の干渉を抑えるため NaCl を直接添加（樹脂又はメンブレンによって 120 ～ 250 mM）、pH 5.0、74 ～ 82 mS/cm
- pDNA サイズは 5.7 kbp、pDNA 濃度は 45 μg/mL

推奨される工程	樹脂／メンブレン吸着剤	動的容量 (mg/mL)	サイクル時間 (分)	滞留時間 (分)	RNA 除去率	収率 (ccc 型)	純度 (A260 測定)
高スルーット捕捉	Natrix® Q	~10	~0.5 h	0.1-0.03	>95%	≥80%	>80% pDNA
最終精製	Fractogel® EMD DEAE (M)	~2.5	~3 h	4	>95%	≥80%	>95% pDNA
	Fractogel® EMD DMAE (M)	~3	~3 h	4	>95%	≥95%	>95% pDNA

表 5. pDNA 精製に関する Natrix® Q 及び Fractogel® EMD DEAE/EMD DMAE の性能

## 滅菌ろ過

精製した pDNA は、無菌性と患者の安全性を保証するために滅菌ろ過を行います。この工程は比較的単純な操作のようですが、プラスミドサイズの大きさ、液の高粘性、アジュバント製剤の細菌保持によって pDNA のろ過は難しくなります。

滅菌ろ過の単位操作を最適化する際には多くの工程パラメータを検討しなければならず、特に塩濃度及びプラスミドの純度と濃度が重要です（表 6）。ろ過終点、膜の種類、運転パラメーターも単位操作の品質特性に影響する可能性があります。また、緩衝液のイオン濃度を調整することにより効果的な pDNA サイズを変えられます。

この他に、pDNA の滅菌ろ過ではプラスミドサイズも考慮する必要があります。10 kbp 未満の小さなプラスミドは、滅菌ろ過工程で収率やろ過容量の制限はほとんどありませんが、特に 20 kbp 以上の大きなプラスミドでは収率やろ過容量が問題となります。この場合、工程開発を慎重に行う必要があります。

推奨されるのは Millipore Express® SHC (PES) で、工程パラメータを最適化すれば滅菌ろ過で最良の性能が得られます。メルクのデータベースではサイズによって 20 ～ 200 L/m<sup>2</sup> の平均容量が報告されています。

バイオバーデンを管理するため、清澄後、UF/DF 後、クロマトグラフィー後などの中間工程でも滅菌ろ過を行う場合があります。Millipore Express® SHC フィルターを清澄後のバイオバーデン低減フィルターとして使用したとき、供給液の品質により 400 ～ 650 L/m<sup>2</sup> の平均容量が報告されています。

最適化パラメータ	収率	容量	製品の完全性
塩濃度	X	X	
スーパーコイル pDNA 含量 (純度)	X	X	
ろ過終点	X		
膜の種類 - PVDF 又は PES	X-PES		X-PES
pDNA 濃度	X	X	
供給流速又は圧力			X

表 6. 収率、容量及び製品完全性に及ぼす最適化パラメータの影響

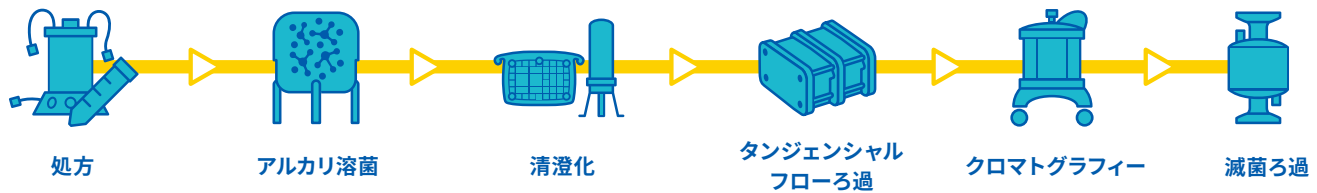
## pDNA 精製の最適化プラットフォーム

pDNA は DNA ワクチンとして、また RNA ワクチンや遺伝子治療ベクター治療薬の原材料として重要なモダリティとなっています。

これらの生物学的製剤は比較的短い期間で作製することができ、DNA は非常に安定なため低温で保存する必要がありません。

ただし、ワクチンとして使用される pDNA の精製にはいくつか課題があります。

幸い、メルクでは統合的な一連の技術を提供しており、溶菌から滅菌ろ過までのワークフロー全体を最適化し、頑健でスケラブルな pDNA の製造が可能です (表 7)。



溶菌	Mobius® Mix	DNA の抽出、gDNA の変性、時に RNA の沈殿又は分解
清澄化	Clarisolve® 60HX 又は Millistak+® POD デブスフィルター	細胞破片の除去、不純物 (gDNA、RNA) の沈殿
TFF	Pellicon® 30 kD、100 kD、300 kD	低分子不純物の濃縮と除去
クロマトグラフィー	Natrix® Q 又は Fractogel® EMD DEAE 又は EMD DMAE	RNA、gDNA、宿主細胞由来タンパク質及びエンドトキシンを除去
滅菌ろ過	Millipore Express® SHC	無菌性の保証

表 7. pDNA 精製の統合ソリューション

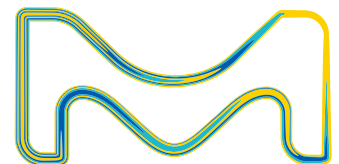
### References

1. D.R. Latulippe, A.L. Zydney. Separation of plasmid DNA isoforms by highly converging flow through small membrane pores. *Journal of Colloid and Interface Science*. 357 (2011) 548–553.
2. Cell Harvest, Lysis, Neutralization and Clarification of Plasmid DNA. Millipore Application Note MS\_AN7049EN.
3. Chromatographic Purification of Plasmid DNA. Millipore Tech Note MS\_AN6573EN.
4. Sterilizing Grade Filtration Unit Operations for Plasmid DNA Processes. Millipore Tech Note MS\_AN6587EN.

Facebookもチェック

最新の技術情報やWebinar・イベント情報を配信!

メルク プロセスソリューションズ



本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Merck KGaA の登録商標もしくは商標です。本紙記載の内容は 2022 年 2 月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Millipore are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2021 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original is Lit. No. MK\_WP7159EN Ver 1.0

## メルク株式会社

ライフサイエンス プロセスソリューションズ事業本部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら [www.merckmillipore.jp](http://www.merckmillipore.jp)

製品・技術に関するお問合せ: PStechservice\_JP@merckgroup.com

注文に関するお問合せ: PScommercialservice\_JP@merckgroup.com

Tel: 03-4531-1143

PSM265-2202-PDF-MA