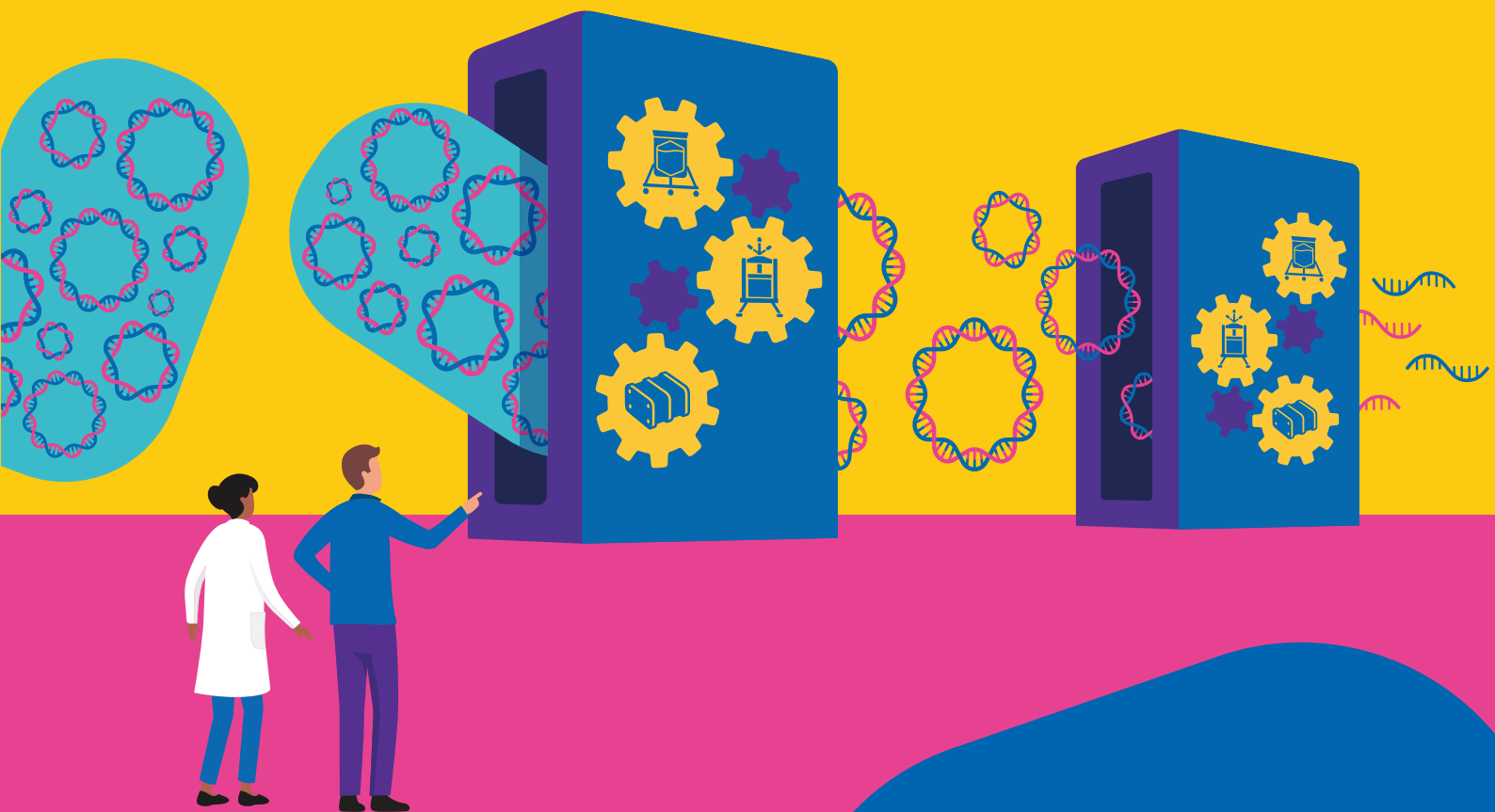


プラスミド DNA ダウンストリーム工程のデザイン

mRNA、プラスミドベースの DNA ワクチン
およびウイルスベクター製品のためのプラスミド DNA 精製



Millipore®

Preparation, Separation,
Filtration & Monitoring Products

はじめに

メルクのミッション

mRNA、プラスミドベース DNA ワクチンおよびウイルスベクターを用いた高度なモダリティは、がん、心血管系疾患、免疫疾患および感染症との闘いの最前線に位置しています。

ただし、これらの可能性を最大限に引き出し、できる限り多くの患者様に治療を届けるには、これらの製造に用いるワークフローをより効率化する必要があります。これら製造工程の重要なステップがプラスミド DNA (pDNA) の製造となりますが、製造では収率が低く、また複雑な精製スキームが必要とされていました。

pDNA は、ウイルスベクター、mRNA およびワクチン治療の製造に不可欠な要素であり、その製造は重要なプロセスです。

pDNA による新たな治療法やワクチンの大きな可能性による、需要の拡大と、さらに製造戦略の改善の必要性が牽引されています。

このような需要の高まりに対応するには、患者様の安全性を確保しながら、上流工程で生産性を高めて収率および効率の目標を達成し、堅牢な不純物除去を確保し、さらに下流工程で回収率を最大限にする必要があります。

pDNA 製造にはいくつかの課題があります。

菌体培養の生産性が低いことと、プラスミドが非常に大きく高い負の電荷を持っていることにより、精製工程が複雑化していることが製造での問題となっています。

細菌のライセートには pDNA に類似した特性を持つ混在物が含まれているため、分画における分離能が低くなり、さらに細菌ライセートは粘度が非常に高くなる場合があります。

そのためクロマトグラフィーの流速を低くする必要があり、最終的なタンジェンシャルフロー過 (TFF) ステップにおいて、目的濃度の達成が難しくなることもあります。

さらに、pDNA は物理的に損傷しやすく、その結果トポロジー型の変化につながる可能性があります。

プラスミドのアイソフォームには、スーパーコイル状 (巻かれた状態の元々の完全型)、開環状 (一方の鎖が壊れ、分子がほどけている)、および線状 (両方の鎖が自由端で破損している) が含まれます。

スーパーコイル状のプラスミドは、治療薬として最も重要と認識されており、規規制当局は、DNA ワクチンの最終原薬におけるスーパーコイル状の比率に規格値を設定しています。

pDNA の製造スキームは 1980 年代半ばに初めて開発され、以降、確立された伝統的な製造工程に依存してきました。これは通常、微生物由来 (多くは大腸菌) を用いた製造です。

工程開発に関する本書では、プラスミド DNA の下流工程開発における指針を示し、さらに代表的なデータとともに、細胞の回収、溶解、中和および清澄化、クロマトグラフィー精製、タンジェンシャルフロー過 (TFF)、そして滅菌ろ過といった各工程について説明します。

本書には、RNA ベースの治療薬および製品の設計と開発に注力しているバイオテクノロジー企業との共同事業によるデータも含まれています。

このガイド全体を通して、ケーススタディの重要点が示されています。

目次

プラスミド製造の概要.....	4
細胞の回収、溶解、中和及びプラスミド DNA の清澄化	4
クロマトグラフィー精製.....	14
プラスミド DNA の限外ろ過 / 透析ろ過 (UF/DF).....	19
プラスミド DNA 製造工程用滅菌グレードろ過の工程.....	21
まとめ.....	23

プラスミド製造の概要

このガイドでは、pDNA 製造用のプラットフォームの全ステップについて説明します（図 1）。また下記に、精製フローの最適化および合理化のための戦略とともに、これらの各ステップについて説明します。下流工程の作業単位については、結果とともに包括的なケーススタディも示しました。

pDNA の精製は、一般に細菌細胞のアルカリ溶解の中和後、清澄化したライセートを出発原料としますが、この組成は複雑であり、また pDNA は内容物の 3% 以下しかなく残りの 97% は不純物であるため、多くの課題が生じることがあります。不純物のほとんどは負電荷を帯び（RNA、ゲノム DNA、エンドトキシン）、サイズも同程度で（開環状 pDNA、ゲノム DNA、高分子量 RNA）、さらに疎水性（エンドトキシン）です。

精製には、TFF、クロマトグラフィーおよび滅菌ろ過などの手法を併用することが必要となります。クロマトグラフィーの方法に、単一または複合型のさまざまなモダリティが用いられることもあります。最終的なバルク pDNA は、規制当局が設定した品質規格を満たす必要があり、また宿主細胞の不純物が含まれないようにしなければなりません。

pDNA 製造プラットフォーム



図 1：pDNA 製造の一般的なプロセスフロー

細胞の回収、溶解、中和およびプラスミド DNA の清澄化

1. 推奨事項

一般にプラスミド DNA (pDNA) は微生物源を用いた培養によって製造されます。

大腸菌培養後の一次下流工程の精製は、細胞の回収、溶解および清澄化から始まります。細胞回収中に細胞を濃縮し、さらに遠心分離または精密ろ過・タンジェンシャルフローろ過 (MF-TFF) により培養液を除去します。

MF-TFF では、精密ろ過用メンブレンの Durapore®0.1 または 0.2 μm を搭載した Prostack™ モジュール、もしくは Ultracel® または Biomax® 1,000 kD 限外ろ過 (UF) 用メンブレンおよび V スクリーンを搭載した Pellicon® 2 カセットなど、オープンチャネルのフラットシート TFF デバイスを推奨します。

その後、回収した大腸菌細胞を破碎し、プラスミド DNA を放出させます。最もよく用いられる溶解法はアルカリ法です。一般に、0.1 ~ 0.2% SDS とともに、0.1 ~ 0.5 N の水酸化ナトリウムによるアルカリ溶解が使用されます。溶解時間および混合を最適化する必要があります。

スーパーコイル状 pDNA を分離する最初のステップは沈殿/凝集です。これは一般に、塩化カルシウム (0.8 ~ 1.5%) 添加または無添加の 0.7 ~ 3 M 酢酸カリウム (pH 5.0 ~ 7.5) を使用し、選択的に不純物 (高分子量 RNA およびゲノム DNA、タンパク質、エンドトキシン) を沈殿させて除去します。

Clarisolve® フィルター、Millistak +® HC、Millistak +® HC Pro フィルターなどのデプスフィルターを使用してライセートを清澄化することで、高いろ過容量と収率を達成できます。

これらのフィルターはサイズ 0.014 ~ 1.1 m² の幅広い様式で使用できます。

清澄化/前処理がデプスフィルターの容量に大きく影響するため、本ステップを最適化するように工程開発を慎重に検討する必要があります。

通常、清澄化ステップによる収率は 90% を超えます。

表 1 に推奨する清澄化フィルターをまとめました。

オプション	一次フィルター	二次フィルター (必要に応じて)	バイオバーデン用 フィルター
オプション1	Clarisolve® 60HX	Milligard®PES 1.2/0.45 µm	
オプション2	Millistak+® HC D0HC		Millipore Express® SHC 0.5/0.2 µm
オプション3	Millistak+® CE20	Millistak+® CE50 または Polysep™ II 1.0/0.5 µm	

表1：清澄化フィルターの概要

注：フィルターの選択と容量はフィードが前処理済みか未処理かで異なります。前処理がフィルターの性能に大きく影響します。

2. 概要

MF-TFF およびノーマルフローろ過 (NFF) を用いて pDNA を回収する際には、表2に示す特性、パラメータおよび検討事項が重要です。

特性	パラメータ	主な検討事項
ろ過容量	フィルターの選択 (化学的性質および孔径)	pDNA 溶液の粘度
ろ過フラックス	ろ過エンドポイント	
pDNA 収率	駆動力	高 pH の溶解 - pDNA の 変性点付近
不純物 (gDNA、タンパク質、RNA) の低減	フィード処理	発酵タンクからの 大きな固形内容物
バイオバーデンの 防止・低減	混合特性 (pH、導電率、緩衝液成分)	

表2：MF-TFF および NFF ステップの概要

2.1. 細胞の回収

2.1.1. 特性

プラスミドを含む細菌は、一般的には遠心分離またはタンジェンシャルフローろ過 (TFF) で回収されます。少量 (10 L 未満) または多量 (1,000 L 超) のバッチ容量を処理しなければならない場合の回収ステップでは、遠心分離のほうが費用対効果は高くなります。

2.1.2. パラメータ

通常、プラスミドを含む細菌細胞は OD 600 nm に基づき回収されます。回収時の OD 600 nm は、培養時の培地の種類と培養方法によって異なります。

表3に、光学密度 (OD) に基づく回収パラメータの概要を示します。

発酵培地	OD 600 による回収
LB 培地	3-5
スーパーブロス培地	最大 8
グリセロール添加スーパーブロス培地	25-35

表3：各種発酵培地の回収 OD 値
(参照値：業界の入力値に基づく)

大腸菌培養用の高細胞密度培養技術が開発され、生産性が向上し、高い細胞密度が得られています²。

培養の最終目標は、乾細胞重量で細胞密度を約 40 ~ 60 g/L にし、pDNA 力価を約 1 g/L に最大化することです。最適化したベクターを使用して、培養工程を最適化することで、2.2 g/L まで達成できました。

回収ステップで用いた TFF デバイスには、Durapore® (PVDF) 0.1、0.22 または 0.45 µm などの MF メンブレンを搭載した Prostag™モジュール、またはVスクリーン(サスペンドスクリーン)と Biomax® (PES) もしくは Ultracel® (合成再生セルロース) 1,000 kD などのオープングレード UF メンブレンを搭載した Pellicon® 2 カセットが含まれます。

このようなメンブレンによるカットオフを使用する場合は、2 ポンプ (透過制御) TFF システムを使用することが重要です³。1/2 ~ 1/5 量に濃縮した後、使用済み培地成分および細胞外不純物を洗浄するため 3 ~ 5 倍量で透析ろ過してから下流工程で精製します。

一般に TFF 回収は低い膜間差圧 (TMP 3 ~ 5 psi) および Δ P (7 psi 未満) で行われ、透過流束を制御します (表4)。

パラメータ	値
デバイス	0.1、0.22 または 0.45 µm の Durapore® メンブレンを搭載した Prostag™モジュール、もしくは1,000 kD の Biomax® または Ultracel® メンブレンと V スクリーンを搭載した Pellicon® 2 カセット
容量負荷	10-60 L/m ²
フィードフロー	7-9 L/min/m ²
TMP	<0.5 bar
平均フラックス	20-30 L/m ² /h (LMH)
体積濃度係数	2 ~ 5
透析ろ過量	3 ~ 5

表4：MF-TFF の作業パラメータ
(参考値：内部データ)

大腸菌は、4,500 ~ 6,000 g で約 15 ~ 20 分間バッチ遠心分離 (室温または約 4°C) することで、ペレットに回収できます。回収ステップでは、連続フィード、固体放出、ディスクスタック、バッチ放出、デカンタ式など、他の種類の遠心分離法も使用できます。

2.2. 細胞の溶解

2.2.1. 特性

細胞破碎に用いる方法は、化学的方法（アルカリ、界面活性剤、酵素、浸透圧ショック）と物理的方法（熱、せん断、攪拌、超音波、凍結融解）の2つに大別されます。

アルカリ溶解（約 pH 12 の水酸化ナトリウム）をドデシル硫酸ナトリウム（SDS）などの界面活性剤と併用する方法が一般的です。界面活性剤は細胞壁を可溶化し、アルカリ環境はゲノム DNA を変性させます。プラスミド DNA の品質および量に直接影響するため、溶解のインキュベーション時間を最適化することが重要です。インキュベーション時間が長くなると、プラスミド DNA の不可逆的な変性やゲノム DNA のせん断劣化につながるおそれがあります。アルカリ溶解ステップでは、効率的であってもそれほど過激ではない混合法を採用し、プラスミドを不可逆的に変性させたり、過度のせん断による分解を引き起こす極端な pH にならないようにすることが極めて重要です。

細胞溶解の全く別の方法としては、新しく開発された自己分解大腸菌株の使用もあります。pDNA は、わずかに酸性の低塩緩衝条件で自己分解抽出され、低濃度の非イオン性界面活性剤で処理することで回収されます。ゲノム DNA は不溶性の細胞片と結合したままのため、熱凝集を用いた固体液体分離と粗る過によって除去します¹。

2.2.2 パラメータ

アルカリ溶解法では、細胞を特定の狭い範囲の pH（通常は pH 12 付近）で処理します。これにより、ゲノム DNA は不可逆的に変性しますが、二本鎖 pDNA はそのまま変化しません（pH 12.0 ~ 12.5）。pH の最適値はプラスミドの種類と宿主細菌株によって異なります。最適値から 0.1 pH 単位を超えて離れるだけで、収率に影響する可能性があるため、アルカリ溶解中に pH 範囲を厳密に管理することが重要です。すなわち、pH が 12.5 を超えると、pDNA は不可逆的に変性し、また pH が低すぎるとゲノム DNA が完全には変性しなくなるので、さらに下流の精製工程が複雑化する可能性があります。

標準的なアルカリ溶解のインキュベーション時間は短く、本ステップは通常 5 分以内に完了します。溶解の程度は容器内の粘度／滞留時間を測定することで管理できます。

ラボ環境では、混合は手で緩やかに行われることが多いのですが、これは大規模製造工程の場合、実行不可能です。

大量の溶解液を完全かつ緩やかに混合するために、ライセートの粘度の非ニュートン特性を考慮しながら、機械的に攪拌する容器（バッフル、低出力インペラ、フィードラインを利用した専用容器デザイン）でのバッチ混合、および／または連続フロースルーデバイス／インラインスタティックミキサーが使用されています。バッチ溶解にはシングルユースの Mobius[®] ミキサーが非常に効果的です。

2.3. 沈殿／凝集

2.3.1. 特性

沈殿／凝集は、pDNA 製造工程における宿主細胞由来の混在物を除去する最初のステップです。界面活性剤、RNase または塩化カルシウムの有無にかかわらず、酢酸ナトリウムもしくは酢酸カリウムを高濃度で使用して中和できます。このステップにより、高分子量のゲノム DNA を含む界面活性剤可溶性タンパク質が沈殿します。より小さく共有結合で閉じた環状の pDNA は、二本鎖分子に復元しますが、可溶性のままです。中和緩衝液に RNase を添加すると、高分子量の RNA 不純物を分解できます（RNA は少なくとも pDNA の 20 倍量存在する可能性あり）。塩化リチウム、酢酸アンモニウムおよび塩化カルシウムなどの一部のカオトロピック塩には、タンパク質とともに高分子量 RNA を沈殿させる利点があります。ポリエチレングリコール（PEG）およびポリエチレンジアミン（PEI）は、ゲノム DNA の沈殿にも使用できます。

2.3.2. パラメータ

界面活性剤（1% SDS）存在下の高塩濃度の緩衝液（0.8 ~ 1.5% の塩化カルシウム添加または無添加の濃度 0.7 ~ 3.0 M の酢酸ナトリウムや酢酸カリウム [約 pH 5 ~ 7.5 付近] など）を用いると、急速に中和します。

また、本ステップ中に形成する沈殿物の最大 20%（w/v）はゲノム DNA が占めますが、これには低カットオフの PEG 沈殿（4% w/v）も使用できます。pDNA の品質を保持するには、中和時および沈殿時の均質な混合が不可欠です。

メルクの内部データに基づくと、高分子量 RNA やゲノム DNA、タンパク質およびエンドトキシンなどの不純物は、高塩濃度緩衝液、PEG および PEI を使用して選択的に沈殿させることができます。これには適切な最適化が推奨されます。

沈殿した固体の分離には、デカントを伴う沈降法、デブスろ過および遠心分離など、一般的な清澄化法を使用します。ろ過では製品損失がみられることもあるため、吸着性が低いフィルターが推奨されます。

2.4. 清澄化

2.4.1 特性

pDNA の製造工程の清澄化作業により、フィードストリームから固体の内容物を除去できるようにします。フィードストリームは、未処理、処理済み、または清澄化済みのいずれかが可能です。化学的溶解後、酢酸ナトリウムまたは酢酸カリウムを用いて中和することで、大きいサイズの凝集／沈殿物が生じます。

前処理法は、清澄化フィルターの処理量に大きな影響を与えるため、工程のスケールアップを考慮しながら慎重に選択する必要があります。前処理のオプションには、重力による沈降と分離、PEG、PEI、バッグフィルター、ステンレス製スクリーンフィルター、ペーパーろ過および遠心分離などがあります。

2.4.2. パラメータ

目的の特性を達成するために、ライセートの固体負荷を処理する清澄化作業では、適切なフィルターを選択する必要があります。デブスろ過用のデブスフィルターは容量が大きく、ライセートフィードを高塩濃度にする事で吸着相互作用が抑制されるため、高い収率が得られる理想的なフィルターです。フィードフラックスとろ過エンドポイントを最適化することで、最小限のフィルター面積で、高収率の pDNA を確実に達成できます。また、排出や緩衝液洗浄などについても、製品回収作業で検討する必要があります。

3. テクニカルデータ

3.1. 回収

Biomax[®]、Ultracel[®] 1,000 kD V スクリーンメンブレンまたは Durapore[®] MF TFF メンブレンは、低 TMP での回収に使用され、透過を制御します。使用後の標準水透過 (NWP) 回収率は 90% を超えています。Biomax[®] 1,000 kD メンブレンで報告されている負荷チャレンジの範囲は、最適透過フラックスが約 10 ~ 30 LMH で、10 ~ 60 L/m² です。

遠心分離は、ラボスケールでの回収に適した方法の 1 つですが、大規模製造工程の場合、遠心分離処理は煩雑になり、収率が低下する可能性があります。ディスクスタック遠心機が高速で動作して、断続的に放出するため、スーパーコイル状プラスミドの収率は、放出中のせん断損傷により低下し、40% ほどになります⁴。

ケーススタディ

タンジェンシャルフローろ過 (TFF) による細胞回収

目的：大腸菌細胞（約 $2 \times 0.5 \mu\text{m}$ ）を保持、濃縮および洗浄します。

材料および方法

デバイス

- 1,000 kD Biomax®（ポリエーテルスルホン）メンブレン、高粘度および微粒子用 V スクリーンを搭載した 0.1 m^2 Pellicon® 2 カセット

メンブレンの準備

- 水洗浄： 20 L/m^2
- 再循環定置洗浄： 0.2 N NaOH 、 20 L/m^2 シングルパス
- 緩衝液洗浄： 20 L/m^2 10 mM Tris 、 1 mM EDTA 、 $\text{pH } 8$ （TE）

臨界フラックス試験

- 透過流束（ポンプ 2）を調節して TMP をモニター

細胞の濃縮

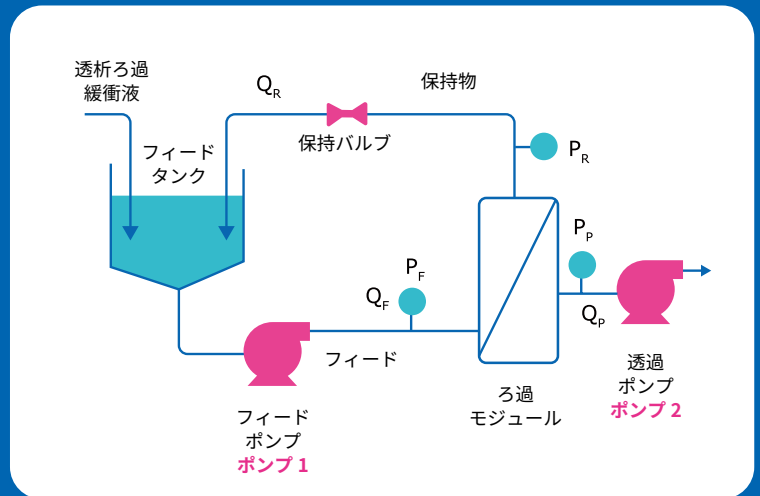
- 透過物を廃棄して細胞を保持し、タンク容量を低減

細胞の洗浄

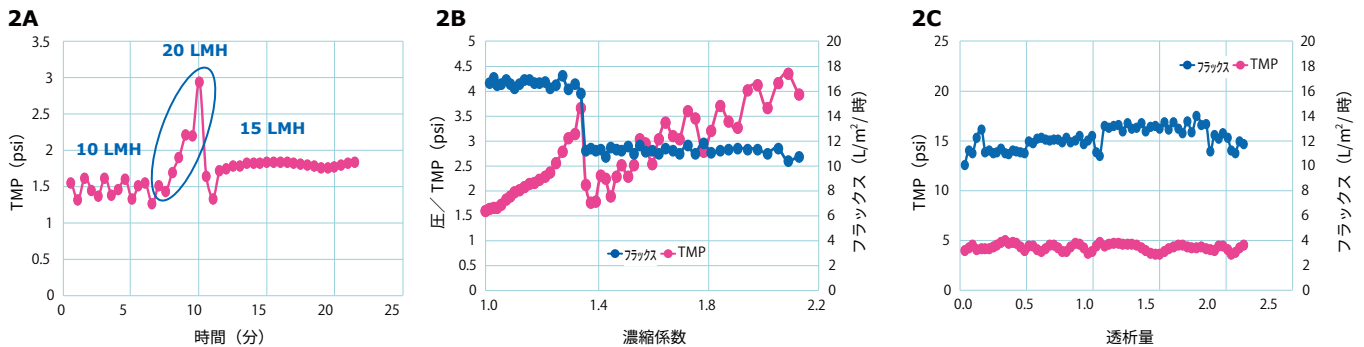
- ダイアフィルトレーションで、透過除去と同じ速度で TE 緩衝液を添加

細胞回収率

- タンクを排出し、保持ラインを洗浄してタンクを洗浄



結果



作業に最適な流速を特定するため、臨界フラックス試験を実施しました。

膜間差圧 (TMP) の不安定性が確認されるまで、透過フラックスが上昇しました (図 2A)。

TMP は約 $10 \text{ L/m}^2/\text{時}$ の低フラックスで安定していましたが、 $20 \text{ L/m}^2/\text{時}$ のフラックス範囲で不安定圧が認められました。これは、本工程がこの値より下で操作されるべきであることを示しています。

操作フラックスには約 $15 \text{ L/m}^2/\text{時}$ の TMP を用いました。

細胞濃縮の過程で、溶液の粘度が上昇することで、結果的に TMP が指数的に増加し、不安定性が示されます。

これに対応するため、フラックスを 11 ないし $12 \text{ L/m}^2/\text{時}$

時に低減しました。

このようにフラックスを低減しても、依然として TMP のわずかな上昇がみられましたが、操作上の予測から制御可能性が向上しました。

この方法により、2.1 倍の細胞濃縮係数が得られました (図 2B)。

細胞洗浄ステップでは、平均 $12 \text{ L/m}^2/\text{時}$ のフラックスで、2 倍の透析量により Tris-EDTA (TE) 緩衝液に交換し (図 2C)、培地成分、HCP (宿主細胞タンパク質) および核酸などの不純物を除去しました。

洗浄ステップ中に低い値 (約 5 psi) を保っていた TMP が示す通り、本工程は安定していました。

3.2. 溶解および中和

細胞溶解は通常 0.2% の SDS を用いて pH 12 ~ 12.5 で実施した後、酢酸カリウム (0.7 ~ 3 M) で中和します。一般に中和は約 5.0 の pH で行います。しかし、pH 6.0 および pH 7.5 でも報告されています。中和中に RNA を沈殿させるため、塩化カルシウムがよく使用されます。

静置インキュベーション後の中和ステップ中に生成する凝集物は、通常液上に浮かび上がってきます。

メルクの内部データベースに報告されている事前清澄化法では、幅広いアプローチを用いた前処理に約 75% もの時間を費やしていましたが、研究の 25% では、処理も事前ろ過も用いられていませんでした (図 3)。

事前清澄化法

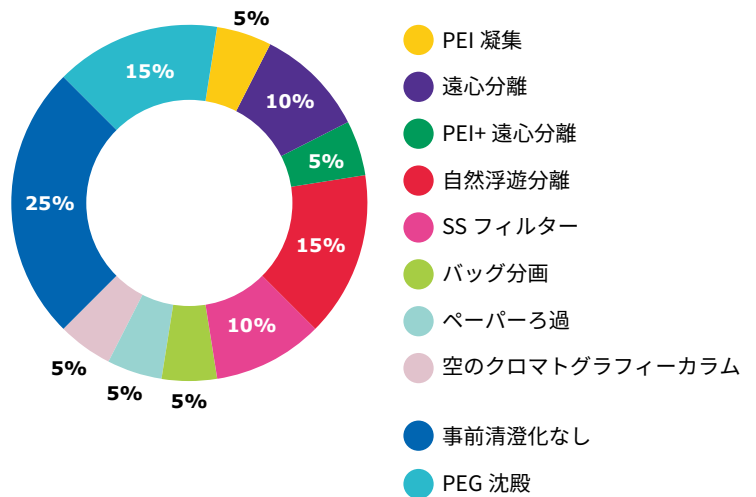


図 3：報告されたさまざまな前処理／前ろ過条件

ケーススタディ

細胞のアルカリ溶解

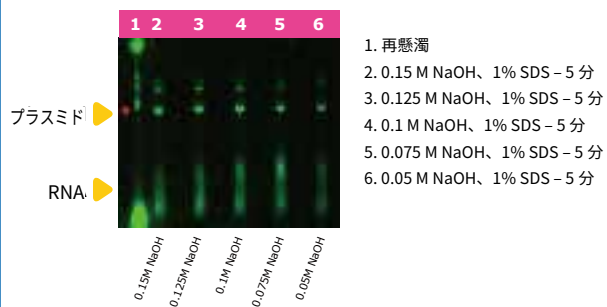
目的：大腸菌溶解に最適な条件を特定し、pDNA 製品を放出させて、得られた溶液を中和します。

材料および方法

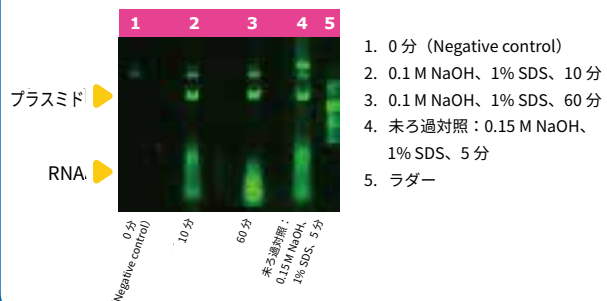
- 湿重量で 125 g/L の細胞を TE 緩衝液 (10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 8) に再懸濁しました。
- 1% SDS および各濃度の水酸化ナトリウム (0.05 ~ 0.15 M) を含む実験用溶解緩衝液を、1:1 の体積比でそれぞれ再懸濁細胞プールに添加しました。1 ~ 60 分の範囲の各評価時点で、溶解を評価しました。
- 中和緩衝液 (3 M 酢酸カリウム、pH 5.5) を 1:1 の体積比で添加し、反応を停止させました。
- この混合物を 12,000 g で 30 分間遠心分離し、ろ過しました (0.45 μm)。
- PAGE または蛍光色素を使用して、最終溶液中の核酸含量を分析評価しました。

結果

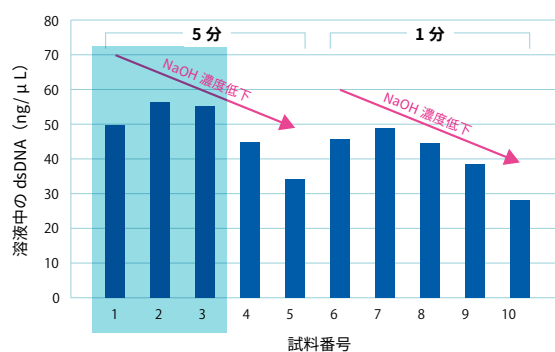
4 A 溶解 5 分間、1% SDS、各濃度 NaOH



4 B 0.1 M NaOH、1% SDS、各溶解時間



4 C Quant-iT dsDNA アッセイによる確認



1. 0.150 M NaOH、1% SDS - 5 分
 2. 0.125 M NaOH、1% SDS - 5 分
 3. 0.100 M NaOH、1% SDS - 5 分
 4. 0.075 M NaOH、1% SDS - 5 分
 5. 0.050 M NaOH、1% SDS - 5 分
 6. 0.150 M NaOH、1% SDS - 1 分
 7. 0.125 M NaOH、1% SDS - 1 分
 8. 0.100 M NaOH、1% SDS - 1 分
 9. 0.075 M NaOH、1% SDS - 1 分
 10. 0.050 M NaOH、1% SDS - 1 分
- 溶解の作業設定時間**
- 5 ~ 10 分
 - 0.1 ~ 0.15 M NaOH
 - 1% SDS

5 分間の連続溶解時間および各濃度の水酸化ナトリウムを用いた各種緩衝液条件および各評価時点での溶解結果を図 4A に示します。ゲル底部のスミアは RNA 不純物を示し、ゲル上部方向の複数バンドは pDNA 製品を表します。水酸化ナトリウム濃度を低下させるにつれ、溶液中の pDNA の強度が低下します。これより、高濃度の水酸化ナトリウムが溶解に適していることが示されました。

下側のゲル (図 4B) は、0.1 M NaOH および各評価時点を表しています。インキュベーションしない Negative control で、レーン 2 は 10 分間およびレーン 3 は 60 分間のインキュベーション時間です。60 分の時点で、pDNA とゲル底部に非常に強いスミアが確認できますが、これは pDNA 製品の分解を示唆している可能性があります。一方、10 分間の時点は理想的に見えます。

Quant-iT 二本鎖 DNA アッセイを用いて直交法を実行し、各試料の DNA 濃度を測定しました (図 4C)。最高濃度 NaOH による 5 分の時点で二本鎖 DNA の濃度は最も高くなり、ゲルで示したデータが確認されました。結果として、溶解ステップの作業設定値は 5 ~ 10 分、0.1 ~ 0.15 M の水酸化ナトリウムおよび 1% SDS と決定しました。

3.3. 清澄化

溶解および中和後のフィードの清澄化ろ過に関する内部データの見直しから、フィードが前処理されているか未処理であるかによって、ろ過容量が大きく変化することがわかりました。

通常、フィードの品質がフローろ過（NFF）作業に影響します。メルクの内部データベースには、前処理済み（フィード濁度 20 ~ 500 NTU）または未処理（フィード濁度 > 1,000 NTU）の 2 種類のフィードがあります。

データベースで報告されている前処理条件は、凝集物と溶液の重力分離でした。凝集物や沈殿物を妨害することなく溶液を慎重にろ過した結果、凝集物中で約 20% の製品損失が報告されています。

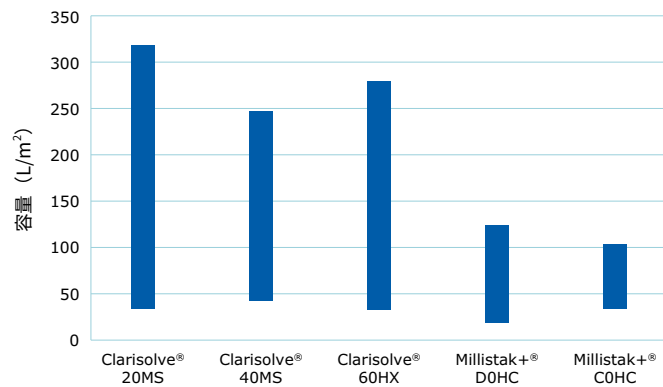
別の前処理方法には、ステンレス製フィルター、バッグフィルター、空のカラム、ペーパーろ過、遠心分離、PEI 凝集および遠心分離、さらに Polygard® CR100 μm / Polygard® CR 50 μm フィルターの使用などがあります。Polygard® CR フィルターの容量は 0.55 ~ 8 L/ インチです。

表 5 に、前処理済みまたは未処理のフィードに一般に使用されるフィルターを示します。また図 5 に、フィルターの平均容量を示します。

フィルター	培地	前処理済み		未処理	
		作業フラックス (L/m ² /時)	平均容量範囲 (L/m ²)	作業フラックス (L/m ² /時)	平均容量範囲 (L/m ²)
Clarisolve® 60HX	ポリプロピレン	100-150	150-300	100-150	50-300
Clarisolve® 40MS	ポリプロピレン + セルロース + 無機フィルター助材	100-150	190-460	100-150	50-250
Millistak+® D0HC	珪藻土およびセルロース	90-150	115-200	90-150	25-100
Millistak+® C0HC	珪藻土およびセルロース	100-150	85-300	100-150	30-100
Millistak+® CE20	セルロース	60-200	100-400	50-100	50-100
Millistak+® CE50	セルロース	60-200	100-285		
Millistak+® HC Pro-D0SP	ポリアクリル + シリカ	100-150	100-275	100-150	150-200

表 5：推奨するフィルター、条件および容量の予想容量範囲

5a. 未処理



5b. 前処理済み

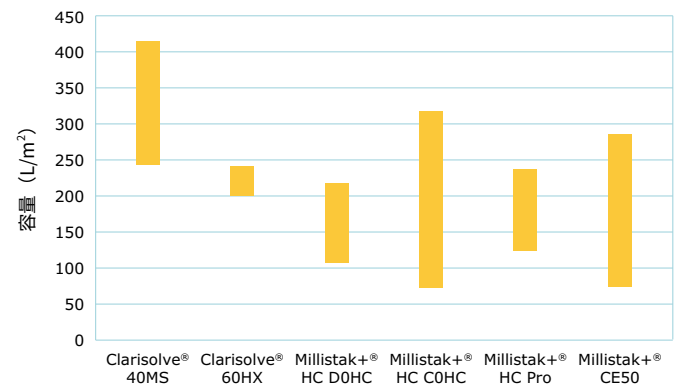


図 5a/b：前処理済みおよび未処理のフィード用 Clarisolve®、Millistak+® HC、Millistak+® HC Pro の各フィルターの平均容量範囲

Milligard® PES 1.2/0.45 μ m フィルターは、Clarisolve® フィルターの二次フィルターとして使用できます。

Clarisolve® フィルター後の Milligard® PES 1.2/0.45 μ m フィルターの容量は 150 L/m² を超えると報告されています。

必要に応じて Millistak+® XOHc および Millistak+® HC Pro XOSP フィルターなどの二次フィルターも評価できますが、回収率をモニターする必要があります。

Millistak+® CE50 フィルターは一般に、フィード条件に基づき一次または二次フィルターとしての使用が報告されています。

Millistak+® CE20、CE30 または CE40 フィルターを一次フィルターとして、Millistak+® CE50 フィルターを二次フィルターとして組み合わせて評価することもできます。

Millistak+® CE20 フィルターの容量は 300 L/m²、Millistak+® CE30 フィルターは 150 L/m²、Millistak+® CE40 フィルターは 100 L/m² を超えると報告されていますが、Millistak+® CE50 フィルターは 80 ~ 320 L/m² と報告されています。

Clarisolve® および Millistak+® フィルターを使用して、90% を超える回収率が報告されています。

Millistak+® フィルターの清澄化回収率は、塩含有緩衝液による追加処理によって上昇させることができます。

フィード粘度を考慮して、清澄化の単位作業を低フラックスで稼働させることがあります。

一般的な作業フローの範囲は 60 ~ 150 L/m²/時でした。

フィード品質に基づく平均容量範囲 400 ~ 650 L/m² での清澄化後のバイオバーデン低減フィルターとして、Millipore Express® SHC フィルターの使用が報告されています。

4. References

1. Xenopoulos A and Pattnaik P. Expert Rev. Vaccines (2014) 13(12), 1537–1551.
2. Hernández OR, et al, Scalable Technology to Produce Pharmaceutical Grade Plasmid DNA for Gene Therapy, Gene Therapy –Developments and Future Perspectives, Intech Open.
3. Raghunath B, et al. Best practices for optimization and scale up of microfiltration TFF processes, BioProcessing Journal (Spring 2012) Volume 11/ Issue 1.
4. Kong S, et al. Large-scale plasmid DNA processing: evidence that cell harvesting, and storage methods affect yield of supercoiled plasmid DNA. Biotechnol Appl Biochem (2008) 51(1):43–51.
5. J Meacle, et. al., “Impact of Engineering Flow Conditions on Plasmid DNA Yield and Purity in Chemical Lysis Conditions”, Biotechnol. Bioeng., 87(2004)

ケーススタディ

清澄化

目的

一連のデブスろ過および滅菌ろ過を使用したライセートの清澄化

材料および方法

アルカリ溶解後、3 M の酢酸カリウムで中和することで、不純物分子（ゲノム DNA および一部の宿主細胞タンパク質）を凝集させ、液上に浮遊させます。プラスミド DNA 製品は中和により再アニールし、底層にとどまります。底部の層をデブスろ過で清澄化し、その後滅菌ろ過します。清澄化ろ過では、複数のオプションを評価しました。

シングルステージおよびデュアルステージのデブスろ過オプション

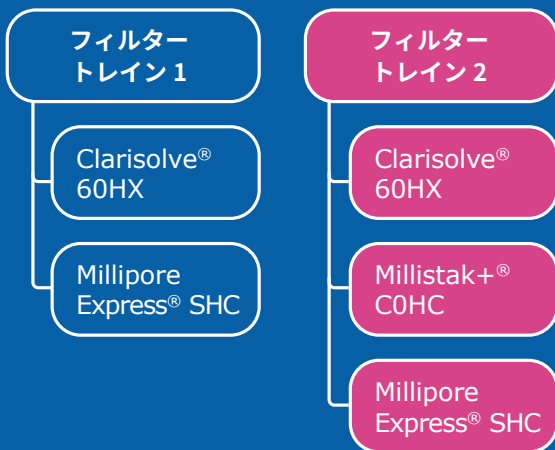
- Clarisolve® 60HX：低結合性のポリプロピレン+セルロース素材で作られたオープン孔径フィルター
- Millistak+® C0HC：珪藻土で作られたより細かい孔径のフィルターで、正電荷を帯びているため、負電荷を帯びた pDNA の収率に影響する可能性があります

滅菌ろ過

- Millipore Express® SHC – Cast PES メンブレン、滅菌グレード、使い捨て

フィルタートレイン 1 は Clarisolve® 60HX と続く Express® SHC で構成されます。フィルタートレイン 2 は Clarisolve® 60HX と Millistak® C0HC デブスフィルターの両方を使用し、続いて Millipore Express® SHC を使用しています。

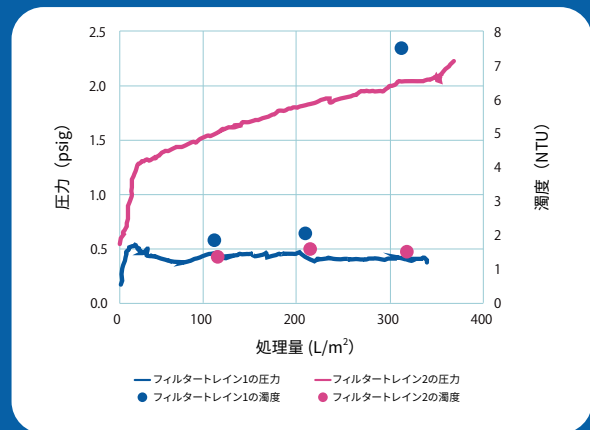
結果



デブスフィルターのサイズデータから、フィルタートレイン 1 では、この実験過程でわずかな圧力降下が発生したこと示されましたが、濁度の急速な変化は 200 ~ 300 L/m² の負荷で確認されました。より厳しいフィルタートレイン 2 では、厳密なデブスフィルターで予想されるように高い圧力が観測されましたが、濁度の急速変化はありませんでした（図 6A）。フィルタートレイン 2 による低濁度の原料のため、フラックス減衰データでみられるように、結果的にフィルタートレイン 1 と比較して滅菌フィルターの処理量がより多くなっています（図 6B）。フィルタートレイン 1 では、結果的に 98% と高い収率が示されましたが、フィルタートレイン 2 の製品収率は 82% でした。これは C0HC フィルターに、製品収率の損失に寄与する電荷をある程度持った珪藻土が含まれていることが原因です。これらの結果に基づき、本ステップの収率を最大にするため、工程にはフィルタートレイン 1 を取り入れました。

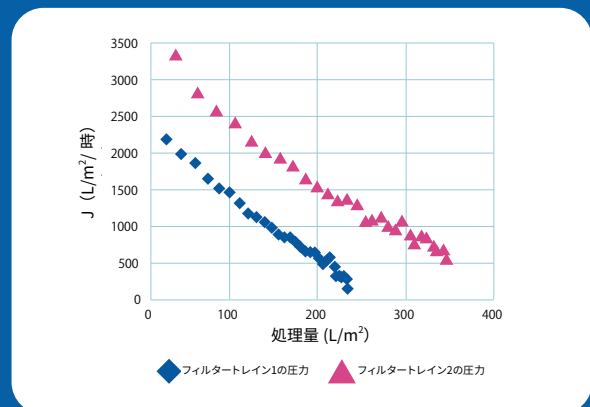
6A

デブスフィルターのサイズ設定
定流試験 (Pmax™, Tmax)
圧力上昇と濁度のモニター



6B

滅菌フィルターのサイズ設定
定圧試験 (Vmax™)
フラックス減衰のモニター



プラスミド DNA の クロマトグラフィー精製

1. 課題

ワクチンや遺伝子治療薬に幅広く応用される pDNA の需要が増大していますが、それに応えるには、プラスミド製造の効率を高めて生産性を向上させる必要があります。この需要に応えるため、クロマトグラフィーステップの強化が役立ちます。

pDNA の精製は困難です。重要な不純物の多くは負電荷を帯び、サイズがほぼ同じで、疎水性のレベルも類似しているためです。最終的なバルク pDNA は、規制当局が純度について設定した品質規格を満たし、スーパーコイル状の pDNA アイソフォームが 90% を超えて含まれている必要があります。

プラスミドの精製に最もよく使用されている技法は、陰イオン交換クロマトグラフィー (AEX) と疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) です。どちらの技法も、捕捉または中間精製／ポリッシングで実施されており、多くの場合併用されます^{1,4}。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) が下流工程スキームの一部に含まれることがありますが、処理量が低く、時間がかかるという欠点があるため、通常は最終ステップで選択されます^{1,3}。

HIC では、元のスーパーコイル状 pDNA を、他の pDNA アイソ

フォーム、より疎水性が高い核酸不純物 (RNA、ゲノム DNA、変性 pDNA)、およびエンドトキシンから分離できます³。AEC はタンパク質、低分子量 RNA、エンドトキシンを除去できませんが、その効率は試料の組成に大きく依存します。

pDNA の捕捉を最大化するには、負荷中の塩濃度を高める必要があります。

従来のクロマトグラフィー樹脂では、樹脂が対象となったタンパク質よりも pDNA はかなり大きいため、精製が課題となっていました。pDNA のサイズによっては樹脂ビーズの細孔構造に入らず、結合容量が少なくなり、物質移動が遅くなります。さらに、サイズが大きくなると、フィード粘度、アイソフォーム分画の低下、および潜在的な汚染により、圧力降下が増え、処理時間も長くなります。このような欠点にもかかわらず、多くの既存の大規模製造工程では、分離能が比較的高いため、クロマトグラフィー樹脂が使用されてきました。しかし、pDNA メーカーは、生産性の向上と全体的な生産量の増加を目的として、大流ベース (メンブレン、モノリスおよびファイバーベースの技術など) を使用したクロマトグラフィーステップの強化に取り組んでいます。

2. 陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた高処理捕捉

2.1. Natrix® Q クロマトグラフィーメンブレン

Natrix® Q クロマトグラフィーメンブレンデバイスは、従来の樹脂と比較して大幅な性能向上を実現しています。マクロ多孔性ポリマー構造により形成された対流チャンネルには、高密度の第四級アミン結合部位があり、物質移動も速く、生産性 (g/L/時) が劇的に向上しています。これらの結合部位は、pDNA のような非常に大きな標的分子にも速い流速で近づき、かつ GMP 適合製造に必要な精製目標を維持します。

最大 10 mg/mL の一次捕捉結合容量をもつ Natrix® Q クロマトグラフィーメンブレンは、塩化ナトリウムを添加した清澄化済みライセートから初期の大きな RNA を 95% 以上除去できます。例えば、Natrix® Q クロマトグラフィーメンブレンでは純度 80% 以上の pDNA が達成され、残留 RNA は約 10% (A260 ベース) となり、わずか 30 分の稼働で約 80% の収率が得られました。

また、設置が簡単でスケールアップも可能、かつシングルユースのカプセルデザインにより、セットアップ時間と施設設置面積が削減されるため、あらゆる製造環境での作業および迅速な実施が可能になります。Natrix® デバイスの作業は、過度な充填、バリデーションまたは保管が不要で、簡単に操作できます。すなわち、バッチ単位での製造のセットアップや変更が簡単です。全体的に、生産性の向上と操作の簡素化により、Natrix® Q クロマトグラフィーメンブレンは、pDNA メーカーにとって魅力的なソリューションとなっています。

3. 推奨事項

3.1. 陰イオン交換精製用フィードとしての塩添加ライセート

精製工程の出発原料として使用する標準フィードは、遠心分離と続くデプスろ過により清澄化した大腸菌ライセートで⁷、さらに塩化ナトリウムが直接添加されています。

陰イオン交換クロマトグラフィーに先立ち、清澄化したフィードへの塩の添加は、RNase 不要で RNA 不純物を除去するのに特に有用なアプローチです。RNA 分子種は、より強く電荷を帯びた pDNA よりも陰イオン交換媒体にはそれほど強く結合しません。このため、塩を添加して導電率を最適化することで、RNA 不純物は AEX の吸着材に結合せずに通過しますが、一方 pDNA は結合して、その後高純度で溶出できます。

精製工程前に、各樹脂／メンブレン吸着材用の添加に最適な塩濃度を事前に決定しておく必要があります。これは、塩化ナトリウム濃度を上昇させて、プラスミドの結合容量を測定することで行います。この原理について、**図 7** に、Fractogel® EMD DEAE (M) および Fractogel® EMD DMAE (M) 樹脂による例で示します。

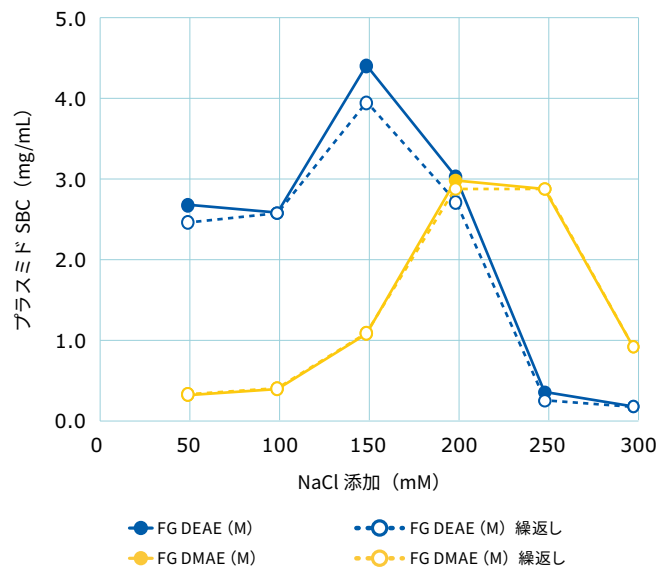


図 7：ライセートに添加する最適な NaCl 濃度を測定するバッチアッセイ
静的結合容量 (SBC) を 96 ウェルフィルタープレート (1 ウェルあたり 1 mL)
で測定しました。
プラスミドフィードは元々の清澄化済みライセート (pH 5.0、67 mS/cm) に、
塩化ナトリウム濃度を上昇させながら添加しています。
FG = Fractogel® EMD 樹脂

ケーススタディ

陰イオン交換（AEX）メンブレン捕捉クロマトグラフィー

A. AEX 負荷の最適化

目的： 負荷物中の塩化ナトリウム濃度を最適化して pDNA 製品の捕捉を促進し、RNA 不純物を通過させることで除去します。

材料および方法

デバイス - Matrix® Q Micro 0.2 mL メンブレン容量 (MV) 試験ごとに新しい Matrix® Q デバイスを使用しました。

清澄化ライセート条件

- 6.5 kbp pDNA、24 µg/mL 力価 1.5 M 酢酸カリウム緩衝液 pH 5.3、86.9 ms/cm
- 核酸含量：3.8% pDNA、96.2% RNA
エンドトキシン含量：380,000 EU/mg pDNA

- 清澄化済みライセートを、3 種類の異なる負荷導電率で、11 mg pDNA/mL メンブレンで負荷しました。最初の試験では塩を添加しませんでした。2 回目の試験では、清澄化済みライセートに 35 mM 塩化ナトリウムを添加し、3 回目の試験では 75 mM 塩化ナトリウムを添加しました。

負荷導電の調整

ステップ	移動相	メンブレン容量	流速
平衡化	1 M 酢酸カリウム +150 mM NaCl、pH 5.0 (75 mS/cm)	50 MV	10 MV/min
負荷	清澄化・滅菌ろ過済みライセート	11 mg pDNA/mL × メンブレン	10 MV/min
洗浄	1 M 酢酸カリウム +150 mM NaCl、pH 5.0 (75 mS/cm)	20 MV	10 MV/min
溶出	100 mM Tris, pH 9 + 1 M NaCl	50 MV	5 MV/min
CIP	1 M NaOH + 2 M NaCl	20 MV	10 MV/min



分析

- HPLC による DNA および RNA 含量の評価 (東ソー社 DNA-NPR 法)
- Charles River 社の Endosafe アッセイによるエンドトキシン含量の評価

結果

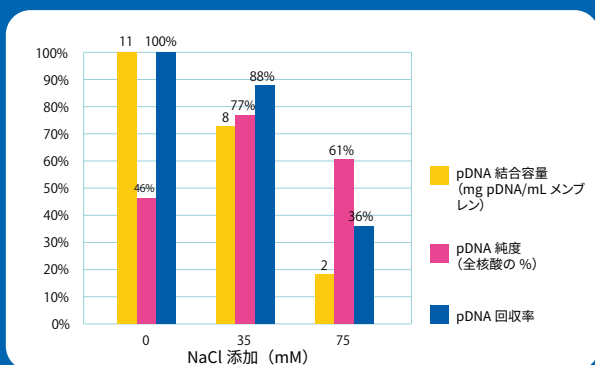


図 8：塩添加による容量、純度、回収率への影響

フィードに塩化ナトリウムを添加しないと、メンブレン 1 mL あたりプラスミド 11 mg で高い結合容量が得られました。しかしこの条件では、溶出された pDNA の純度はきわめて低く、pDNA は溶出された核酸中のわずか 46% でしかなく、残りは RNA でした。つまり、

このような負荷条件下では、メンブレンに結合した RNA の割合が高いことを示しています。

塩濃度が 35 mM に上昇すると、結合容量がわずかに低下してメンブレン 1 mL あたりプラスミド 8 mg になりました。しかしこの高い導電率では、RNA 不純物のほとんどがメンブレンを通過し、結果的に純度が向上しました (溶出された核酸の 77% が pDNA)。また、溶出プールでも 88% の高い収率が示されました。さらに、エンドトキシン除去もこの戦略によって達成されました。溶出プールにはプラスミド 1 mg あたり 3,100 エンドトキシン単位が含まれていました。

塩化ナトリウム濃度がさらに 75 mM に上昇すると、結合容量が大幅に低下します。この高い濃度では、RNA および pDNA 製品のいずれも、陰イオン交換メンブレンに十分に結合できません (図 8)。そこで、ライセートへ 35 mM の塩化ナトリウムを添加することによって、Matrix® Q メンブレンにおける最適な容量、純度、回収率のバランスが得られると判断しました。

B. AEX 洗浄の最適化

目的: 界面活性剤および EDTA 洗浄緩衝液の能力を評価し、Natrix® Q による RNA およびエンドトキシン除去をさらに向上させます。

材料および方法

デバイス - Natrix® Q Micro 0.2 mL メンブレン容量 (MV) 試験ごとに新しい Natrix® Q デバイスを使用しました。

フィード - 清澄化・滅菌ろ過済み pDNA ライセート、35 mM 塩化ナトリウム添加

対照溶液による洗浄

ステップ	移動相
平衡化	1 M 酢酸カリウム +150 mM NaCl、pH 5.0 (75 mS/cm)
負荷	清澄化・滅菌ろ過済みライセート
洗浄	1 M 酢酸カリウム +150 mM NaCl、pH 5.0 (75 mS/cm)
溶出	100 mM Tris、pH 9 + 1 M NaCl
CIP	1 M NaOH + 2 M NaCl

界面活性剤による洗浄

ステップ	移動相
平衡化	1 M 酢酸カリウム +150 mM NaCl、pH 5.0 (75 mS/cm)
負荷	清澄化・滅菌ろ過済みライセート
洗浄	1 M 酢酸カリウム +150 mM NaCl、pH 5.0 (75 mS/cm)
界面活性剤による洗浄	0.1 M Tris、10 mM NaCl、+0.5% 界面活性剤、pH 7.5
EDTA による洗浄	0.1 M Tris、10 mM NaCl、+2 mM EDTA、pH 7.5
EDTA を用いた溶出	100 mM Tris、1 M NaCl、+2 mM EDTA、pH 9
CIP	1 M NaOH + 2 M NaCl

結果

	核酸含量	エンドトキシン含量	サイクル時間
フィード	4% DNA, 96% RNA	380,000 EU/mg	
対照溶液による洗浄 (溶出プールから測定)	77% DNA, 23% RNA	3,100 EU/mg	55 分
界面活性剤による洗浄 (溶出プールから測定)	95% DNA, 5% RNA	500 EU/mg	65 分

陰イオン交換捕捉ステップの洗浄を最適化するために、対照溶液による洗浄条件を実験用の界面活性剤による洗浄と比較しました。後者は、洗浄および溶出緩衝液に、2 mM EDTA だけでなく、低濃度の界面活性剤が添加されています。この方法により、核酸純度は 77% から 95% に向上し、エンドトキシン濃度はプラスミド 1 mg あたり 500 エンドトキシン単位に減少しました。

3.2. 陰イオン交換製品の性能の概要

推奨する工程ステップ	樹脂/メンブレン吸着材	動的結合容量 (mg/mL)	滞留時間、10 cm BH (分)	CV/分	RNA 除去率	CCC 型の収率	純度 (A260 ベース)
高処理捕捉	Natrix® Q クロマトグラフィーメンブレン	~10	0.1-0.03	10-33	>95%	≥80%	>80% pDNA
	中間精製/研磨	~2.5	3-0.3	0.3-3.3	>95%	~75%	>95% pDNA
Eshmun® Q 樹脂	Fractogel® EMD DEAE 樹脂	~2.5	4-2	0.25-0.5	>95%	≥80%	>95% pDNA
	Fractogel® EMD DMAE 樹脂	~3	4-2	0.25-0.5	>95%	≥95%	>95% pDNA

表 6 : pDNA 精製の陰イオン交換樹脂およびメンブレン吸着材の性能

ケーススタディ (続き)

C. AEX の生産性の比較：樹脂 vs メンブレン

目的：Natrix® メンブレンクロマトグラフィーで観測された生産性をクロマトグラフィー樹脂の参照データと比較します。

材料および方法

- 吸着材：Natrix® Q クロマトグラフィーメンブレンの性能を Fractogel® DMAE 樹脂の参照データと比較（樹脂クロマトグラフィー参照データについては表 6 参照）
- フィードの基準：7.1 g の pDNA を含む清澄化済みライセートの 300 L バッチを検討

メンブレンクロマトグラフィー

バッチサイズ	300	L
pDNA 質量	7.1	g
力価	0.024	g/L
結合容量	8	g/L
最小メンブレン容量	885	mL
1 サイクルあたりの容量	442.5	mL
推奨デバイス	460	mL
サイクル負荷	7.7	g/L
流速	4.6	L/min
全ステップ時間 (2 サイクル)	2.12	hr
生産性	7.26	g pDNA/L/hr

樹脂クロマトグラフィー

バッチサイズ	300	L
pDNA 質量	7.1	g
力価	0.024	g/L
結合容量	3	g/L
最小樹脂容量	2.36	L
1 サイクルあたりの容量	150	L
推奨 CV	2.36	L
サイクル負荷	3	g/L
流速	0.59	L/min
全ステップ時間 (1 サイクル)	9.9	hr
生産性	0.30	g pDNA/L/hr

結果

Natrix® Q クロマトグラフィーメンブレンを使用することで、クロマトグラフィーステップの生産性が 0.30 g pDNA/L/時から 7.3 g pDNA/L/時に向の上し 24 倍となりました。これらは、次の 2 つの要因による可能性があります。

- メンブレンの pDNA の結合容量は、従来の樹脂ではわずか 3 g/L であるのに対して 8 g/L です。
- メンブレンクロマトグラフィーは、オープンな細孔構造のため非常に高速です。これにより、サイクル時間がちょうど 1 時間を超えるほどになります。一方、樹脂による処理は速度が遅いため、1 サイクルあたり約 10 時間を要することもあります。これを活用して、メンブレンクロマトグラフィーでは高速サイクルアプローチによって数サイクル稼働できます。

3. References

- Xenopoulos, A. and Pattnaik, P. (2014) Production and purification of plasmid DNA vaccines: is there scope for further innovation? *Expert Rev. Vaccines* 13, 1537–1551
- Stadler, J., Lemmens, R. and Nyhammar, T. (2004) Plasmid DNA purification. *J. Gene Med.* 6, S54–S66
- Diogo, M.M., Queiroz, J.A. and Prazeres, D.M.F. (2005) Chromatography of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A* 1069, 3–22
- Urthaler, J., Buchinger, W. and Necina, R. (2005) Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy. *Acta Biochim. Pol.* 52(3), 703–11
- Tarmann, C. and Jungbauer, A. (2008) Adsorption of plasmid DNA on anion exchange chromatography media. *J. Sep. Sci.* 31, 2605–2618
- Eon-Duval, A. and Burke, G. (2004) Purification of pharmaceutical grade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process. *J. Chromatogr. B* 804, 327–335
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523
- M Gagnon, Purification of nucleic acids, BIA separations, Slovenia, 2020
- RW Field, et. al., "Critical flux concept for microfiltration fouling", *J Membr Sci*, 100(1995)259-72

プラスミド DNA の 限外ろ過／透析ろ過 (UF/DF)

4.1 推奨事項

Biomax® または Ultracel® の各メンブレンと C スクリーンまたは V スクリーンを搭載した Pellicon® 2 カセットは、pDNA の濃縮と透析ろ過に使用可能で、高い負荷と収率を示します。高濃度または高粘度のフィードストリームには、V スクリーンを含めた構成が特に推奨されます。

選択した分子量カットオフ (MWCO) は pDNA 構造によって異なり、30 ~ 300 kD の範囲になります。標準的経験則から、目的の製品の直径より孔径が 3 ~ 5 倍厳しいメンブレンカットオフを使用することです。5 ~ 20 kbp の一般的なプラスミドサイズの場合、100 kD が選択されることが多いです。

4.2 概要

特性

沈殿させたプラスミドを分離し、濃縮・洗浄して、適切な緩衝液に再懸濁します。この方法は規模を拡大しやすく、選択性および費用対効果も高いので、通常はタンジェンシャルフロー過 (TFF) を使用して達成できます。

一般にプラスミドの開始濃度は、典型的な抗体または組換えタンパク質の濃度よりもはるかに低いため、クロマトグラフィー前の TFF の使用は、下流精製工程をさらに向上させる濃縮ステップとしても機能します。

プラスミドの完全性を損なうことなく高いパフォーマンスを達成するために、メンブレンベースの分離および濃縮ステップを最適化する必要があります。TFF は、pDNA と、線状 DNA、RNA およびエンドキシンなどのライセートに存在する混在物とのサイズ差に依存しています。そのため、TFF メンブレンには pDNA を保持して、混在物および最初の緩衝液をふるい落とせる適切な分子量カットオフ (MWCO) が必要です。

これらの保持および精製性能に加えて、TFF は、工程ステップ全体を通して増加する粘度を管理し、規模拡大による設置面積を許容できる高容量に対応する必要があります。

パラメータ

TFF ステップの性能は、フィード条件、MWCO、フィードおよびろ過／透過フラックス、そしてシステム圧に依存します。これらの水圧パラメータを最適化することで、製品損傷を与えることなく、目的のプラスミドの純度、薬液の置換および濃度の規格を達成できます。

課題

プラスミドはその構造から、見た目の分子量よりも小さい孔を通過することがあります。このようなふるいの通過は、フラックスの増加によってより顕著になる可能性があります。このような条件で観測される有効なプラスミドサイズが低下するため、イオン強度が高くなると、ふるい係数も上昇します¹。

また、空気液体間相がプラスミドの完全性に影響を与える可能性があるため、空気の導入を常に避ける必要があります¹。

4.3 テクニカルデータ

透過液中の pDNA 損失は、透過ラインを排出に向けた TFF 稼働を開始する前に、メンブレンを分極させることで対応できる場合があります (フィードタンクに透過させる全再循環モードを使用)。これにより、保持力を向上させる安定した分極層が形成されます。

さらに、緩衝液の塩濃度、pDNA の濃度、RNA の存在、膜間差圧 (TMP) および ΔP を最適化して、製品を効果的に保持する必要があります。より高い塩濃度で、プラスミドの半径が小さくなること示されています¹。このような条件では、プラスミド構造がより強くねじれているようで、密な有効サイズが示されます。

パラメータに関しては、より低い TMP が有効です。100 kD 以上の MWCO では、2 ポンプの透過制御システムの使用が推奨されます²。使用するメンブレンの特定の形状に応じて、本ステップは通常、約 20 ~ 50 L/m²/時の透過フラックスに対して 10 psi 以下の TMP で稼働します。プラスミドは通常、低ろ過フラックスで完全に保持され、高ろ液フラックスでは通過することもあります³。

一般的には、濃縮および透析ろ過用を選択するフィードフラックスの範囲を 4 ~ 6 L/分/m² にして、最終的に DNA 分解につながる可能性があるメカニカルストレスを低減します。これらの圧力およびフラックスパラメータが正しいメンブレンとともに最適化されていれば、70 ~ 140 L/m² の範囲で高負荷を達成できます。

また、10 mg/mL 付近および 10 mg/mL を超える濃度では粘度が上昇するため、より厳しいスクリーンはお勧めしません。中 (5 ~ 10 倍) から高濃度 (30 ~ 50 倍) の稼働では、粗 C スクリーンまたはサスペンド式 V スクリーンによる TFF デバイス構成を適用すべきです。ただし、TFF 工程の最適化が必要です。

これらの一般的な作業パラメータを表 7 にまとめます。

パラメータ	値
メンブレン	100 もしくは 300 kD Biomax® または Ultracel®
容量負荷	70-140 L/m ²
フィードフラックス	4-6 L/min/m ²
透過平均フラックス	20-50 L/m ² /h
TMP	≤10 psi
体積濃度係数 (VCF)	3-50
透析ろ過量 (DV)	3-10

表 7 : pDNA の UF/DF の一般的な操作パラメータ

References

1. Latulippe, D.R. and Zydney, A.L. (2010), Radius of gyration of plasmid DNA isoforms from static light scattering. *Biotechnol. Bioeng.*, 107: 134142. doi:10.1002/bit.22787.
2. Raghunath B, et al. Best practices for optimization and scale up of microfiltration TFF processes, *BioProcessing Journal* (Spring 2012) Volume 11/Issue 1.
3. Latulippe, D.R. and Zydney, A.L. (2008), Saltinduced changes in plasmid DNA transmission through ultrafiltration membranes. *Biotechnol. Bioeng.*, 99: 390398. doi:10.1002/bit.21575.

ケーススタディ

プラスミド DNA の限外ろ過／透析ろ過 (UF/DF)

緩衝液の交換

目的：タンジェンシャルフローろ過 (TFF) を使用した緩衝液の交換

材料

デバイス - Pellicon® カセット、サイズ 88 cm²

メンブレン - 300 kD Ultracel® (合成再生セルロース) メンブレンで、約 10 kD の DNA を保持しながら、水、イオン、低分子量不純物を通過させます。

フィードスクリーンを中粘度用に選択しました。

メンブレンの準備

- 水洗浄：20 L/m²
- 再循環定置洗浄：0.2 N NaOH、20 L/m² シングルパス
- 緩衝液洗浄：20 L/m² 10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 8 (TE)

濃縮ステップ

- 透過物を廃棄して、タンク容量を低減します。

透析ろ過ステップ

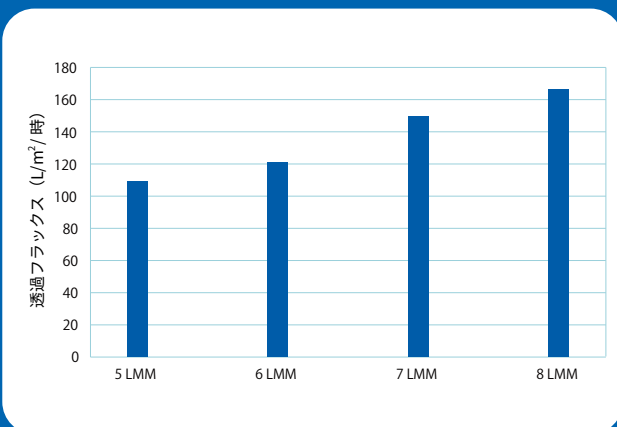
- 定量透析ろ過：透過物の除去と同じ速度で TE 緩衝液を添加します。

回収ステップ

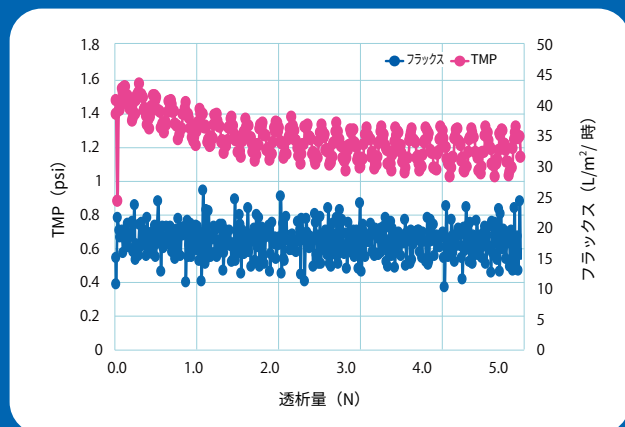
- タンクを排出し、保持ラインおよびタンクを洗浄します。

結果

臨界フラックス



臨界フラックス



透析ろ過用緩衝液の交換では、300 kD Ultracel® メンブレンを使用して pDNA を保持し、水と低分子量不純物を通過させました。4 L/分/m² のクロスフローでの臨界フラックス試験から、80 ~ 125 L/m²/時の高フラックスが汚染もなく許容されることが示されました。5 倍の透析ろ過量 (DV) 用に 4 L/分/m² で TE 緩衝液による定量透析ろ過を実施すると、膜間差圧 (TMP) が低下することが示されました (汚染なし)。保持物の洗浄から 96% の収率が示されました。

プラスミド DNA 製造

工程用滅菌グレードろ過工程

5.1 推奨事項

Millipore Express® SHC を使用すれば、0.014 ~ 3.0 m² のサイズ範囲の滅菌済みカプセルなどのさまざまな様式において、プラスミド DNA (pDNA) ろ過で高いろ過容量、フラックスおよび収率の達成が可能です。本単位作業の容量および収率は大きく変化することがあります。特に大型のプラスミド (約 10 kbp 以上) の場合は、工程開発を慎重に検討してステップを最適化する必要があります。

5.2 概要

特性

pDNA 工程用滅菌グレードろ過の単位作業には以下が含まれます。

- フィードストリームからバイオバーデンを除去できるメンブレン
- バイオバーデンの導入を防止するデバイスおよびろ過システム
- 微粒子を低減でき、大容量と高フラックスを提供し、さらに pDNA を通過させるメンブレン

パラメータ

pDNA 工程用滅菌グレードろ過の単位作業は、以下を変更することで最適化できます。

- 滅菌ろ過に用いるメンブレン
- 使用するろ過デバイスおよびシステム
- 駆動力 (流速または圧力)
- pDNA 溶液の製剤化
- pDNA 溶液の純度
- pDNA の立体構造 (スーパーコイル状、線状、開環状など)
- ろ過のエンドポイント

主な検討事項

大型の pDNA はフィルターに保持されるため、滅菌ろ過の単位作業には困難を伴うことがあり、これが収率およびろ過容量が低下する原因となります。滅菌ろ過ステップの流速が粘性物質のため下がる可能性があるため、粘度についても検討する必要があります。最後に、滅菌フィルターが細菌を保持できることを証明する必要がありますが、これがアジュバントを含む pDNA ワクチンで問題となる可能性があります。主な検討事項を表 8 にまとめます。

特性	パラメータ	パラメータ
無菌性の保証	メンブレン孔径	大型の pDNA
微粒子の低減	メンブレンの化学的性質	
ろ過容量およびフラックス	駆動力	pDNA 溶液の粘度
pDNA 収率	処方	アジュバント添加 pDNA 溶液の細菌保持
	ろ過エンドポイント	

表 8 : pDNA 溶液の滅菌ろ過に関する主な検討事項

5.3 テクニカルデータ

最高の滅菌グレードのろ過性能を得るには、工程パラメータを最適化する必要があります。一部のプラスミドには、ろ過に関して独自の課題がありますが、10 kbp 未満の多くの小さなプラスミドでは、Vmax™ または Pmax™ 手法を使用してフィルターサイズを確認するだけで、堅牢な単位作業を開発できます¹。

pDNA フィードの滅菌グレードろ過に関するデータベースの見直しから、プラスミドのサイズに応じて、ろ過容量、フラックスおよび収率は大幅に変化し、プラスミドサイズが大きくなるほど、ろ過の課題がより困難になることが示されています。プラスミドサイズが大きくなると、ろ過性能が低下することは、他の研究者からも報告されています。ろ過に関する最も重大な課題は、pDNA が 20 kbp 以上である場合に発生します。ただし 10 ~ 20 kbp の pDNA でも、ろ過の問題が発生することがよくあります^{2,3}。表 9 に、見直したデータと公表されている研究をまとめます。

プラスミド DNA のサイズ (kbp)	予想される滅菌グレードろ過収率 (%)	予想される滅菌グレードろ過容量 (L/m ²)
<10	>90	>50
10-20	>80	変動
>20	<80	<20

表 9 : 内部研究と文献検索による精製 pDNA の滅菌グレードろ過の予測性能

pDNA のサイズは滅菌グレードのろ過性能に影響を与えますが、データベースと公開された研究の両方で、緩衝液の組成によってプラスミドの立体構造やそれによる回転半径が変化することが示されています。

具体的には、塩濃度が pDNA の回転半径および拡散係数の両方に直接影響することが示されています (表 10)^{4,5,6}。

NaCl 濃度 ^a (mM)	RS ^b (nM)	D ^c (m ² /秒)
10	6.9	4.0 × 10 ⁻¹²
40	5.8	5.2 × 10 ⁻¹²
100-300	4.5	5.5 × 10 ⁻¹²

表 10 : プラスミド DNA の特性

^a TE 緩衝液中。^b 2.69 kbp のプラスミドに関する Hammermann ら (1998 年) の報告。^c 3.0 kbp のプラスミドに関する Nguyen と Elimelech (2007 年) の報告では、緩衝液中の TE 分子種を考慮するように値を調整しています (詳細は本文参照)。

塩濃度を変化させることで殺菌グレードのろ過容量および収率が 2 倍を超えて上昇することが、メルクのデータベースおよび公表されている研究において経験的に実証されています³。

限外ろ過にメンブレンを使用した研究では、塩濃度の変化に伴って pDNA のふるい通過が大きく変化し、塩濃度が pDNA のメンブレンろ過に極めて大きく影響することが示されています⁷。

pDNA サイズの影響に加えて、スーパーコイル状のプラスミドは開環状よりもろ過性能が優れていることが研究により示されています。そのためスーパーコイル状 pDNA の純度が、滅菌グレードろ過ステップの単位作業の結果に大きな影響を与える可能性があります。ある研究では、ろ過容量が約 10 倍増加すると、スーパーコイル状の含有率が 90% から 95% に増加しました²。

ろ過エンドポイントが重要であることがメルクの検証で示されています。定圧下では、ろ液中のプラスミド濃度は高いフラックス減衰時に低下しますが、定流速操作では、圧力降下が閾値を超えて大きくなる場合に収率が低下しました。どちらの所見もプラスミドの収率はメンブレンの汚染と相関することを示唆していますが、作用メカニズムを調査するには詳細な研究が必要です。

PVDF メンブレンと PES メンブレンはともに pDNA 溶液のろ過に適しています。PES は PVDF よりも容量およびフラックスが高い傾向があり、大型プラスミドへの損傷が少なくなるため推奨されます³。メルクの検証では PES フィルターの収率がより高くなっていますが、この所見を確認するにはさらに詳細な研究が必要です。

メルクおよび公開されている研究で得られたデータでは、pDNA 濃度を変化させると、収率およびキャパシティーに影響を与える可能性があることが示唆されています。公開されているデータの中には、pDNA 濃度が高くなると、大量処理が向上しているものもあります²。しかしメルクのデータからは、これが必ずしも正しいわけではないことが示唆されています。濃度が上昇すると、緩衝液および純度に応じて pDNA 分子が自己結合してしまう可能性があり、その結果、ろ過容量と収率が低下する可能性があります。pDNA の濃度は重要な作業パラメータですが、希釈または濃縮を用いて性能を最適化するため、具体的なアプローチを明確にする必要があります。

滅菌グレードろ過の作業条件を確認したところ、フィードフラックスや圧力には、ろ過容量や収率に与える影響がほとんどまたは全くないことが示されました（表 11）。ただし、特に大型のプラスミドの場合、高い駆動力によるメカニカルストレスのためプラスミドの完全性が損われる可能性があります³。

パラメータの最適化	収率	容量	製品の完全性
塩濃度	X	X	
スーパーコイル状 pDNA 含量 (純度)	X	X	
ろ過エンドポイント			
メンブレンの種類 - PVDF または PES	X - PES	X - PES	
pDNA 濃度	X	X	
フィードフラックスまたは圧力			X

表 11: プラスミド DNA の滅菌グレードろ過の単位作業を最適化する重要パラメータ

公開されているデータおよびメルクのデータをさらに見直した後、重要パラメータが既定され、工程開発作業に適用できるようになりました。収率、容量および製品の完全性に関する重要品質特性は、さまざまなパラメータによって最適化できます。

- 収率については、塩濃度や pDNA の純度を高め、ろ過エンドポイントを設定して極端な汚染を回避し、メンブレンをスクリーニングし、さらにさまざまな pDNA 濃度を探索することで最適化できます。
- 容量については、塩濃度や pDNA 純度を高め、またはさまざまな pDNA 濃度で試験を実施することで最適化できます。
- 滅菌グレードろ過による製品の完全性は、メンブレンの種類とフィードフラックスまたは圧力の影響を受ける可能性があります。

References

1. "Filter Sizing Methods" Application Note – Lit. No. AN1512EN00 rev – 3/00. Printed in U.S.A. © 2000 Millipore Corporation.
2. Watson MP, Winters MA, Sagar SL, Konz JO. (2006) Sterilizing filtration of plasmid DNA: effects of plasmid concentration, molecular weight, and conformation. *Biotechnol Prog.* 22(2):465–470. doi:10.1021/bp050280s.
3. Kong S, Titchener-Hooker N, Levy MS. (2006) Plasmid DNA processing for gene therapy and vaccination: Studies on the membrane sterilisation filtration step, *Journal of Membrane Science*, Volume 280, Issues 1–2, Pages 824–831, ISSN 0376-7388, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.03.003>.
4. Latulippe DR and Zydney AL. (2010) Radius of gyration of plasmid DNA isoforms from static light scattering. *Biotechnol. Bioeng.*, 107:134–142. doi:10.1002/bit.22787.
5. Hammermann M, Steinmaier C, Merlitz H, Kapp U, Waldeck W, Chirico G, Langowski. (1997) Salt effects on the structure and internal dynamics of superhelical DNAs studied by light scattering and Brownian dynamics. *Biophys J* 73:2674–2687.
6. Nguyen TH, Elimelech M. (2007) Adsorption of plasmid DNA to a natural organic matter-coated silica surface: Kinetics, conformation and reversibility *Langmuir* 23:3273–3279.
7. Latulippe DR and Zydney AL. (2008), Salt-induced changes in plasmid DNA transmission through ultrafiltration membranes. *Biotechnol. Bioeng.*, 99:390–398. doi:10.1002/bit.21575.

まとめ

pDNA は、ウイルスベクターの製造、mRNA の製造および生体内遺伝子治療といった急速に成長している新しい治療法で使用されます。最近のワクチンへの応用は、酵素分解を防ぎ半減期を延長するカプセル製剤化技術によって可能となってきました。

このガイド文書では、ラボスケールの pDNA 製造工程の実現可能性について示しました。本工程には、MF-TFF、アルカリ溶解、デプスフィルターによる清澄化、メンブレンクロマトグラフィーおよび限外ろ過による処方が含まれます。

シングルユースの採用により、堅牢かつ簡単なスケールアップの基盤が提供されます。大規模製造の実施では、溶解、混合・凝集沈殿、メンブレンモジュールのマニホールド化などのワークフロー作業の性能を検証する研究も必要になります。必要に応じて、粗凝集沈殿ろ過、塩化カルシウム添加、アイソフォーム分離および最終製品の濃縮を用いて、性能（純度、堅牢性、コスト、収率など）を向上させるために、追加の精製ステップも検討する可能性があります。

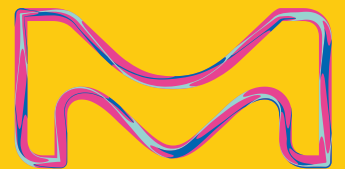
謝辞

著者らは、ケーススタディに具体的に關係する有益な考察、情報源、アッセイの提供に協力して下さった Greenlight BioSciences 社に感謝します。

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8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_WP9367EN 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

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

PSM290-2208-PDF-MA