

CIMモリスカラムを用いたAAVベクター精製の商業生産プラットフォームの確立



M. Leskovec, S. Primec, P. Gagnon, A. Štrancar
BIA Separations d.o.o., Mirce 21, 5270 Ajdovščina, Slovenia

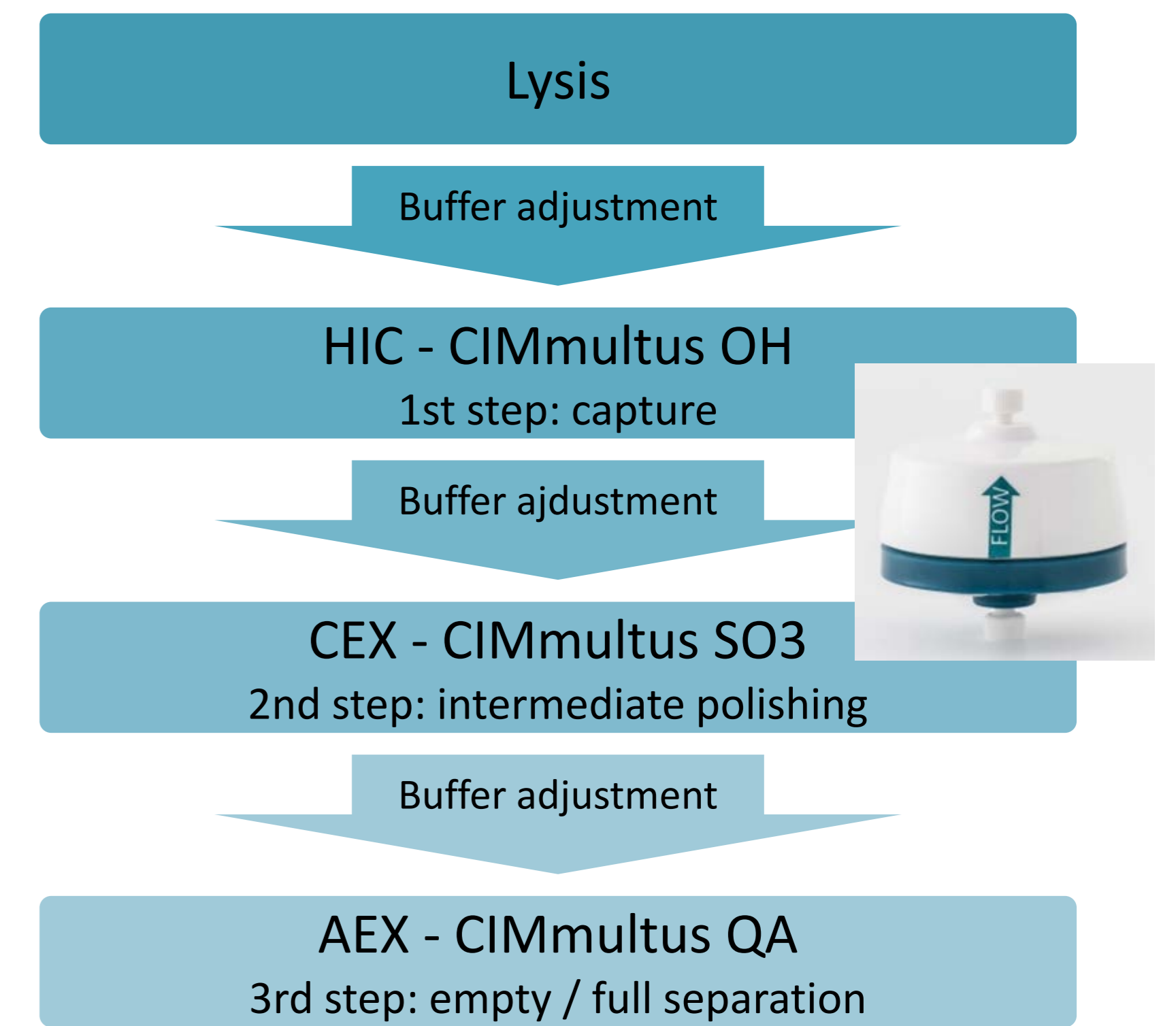
INTRODUCTION

- AAV (アデノ随伴ウイルス) は、既に多くの遺伝子疾患の臨床研究で成果を上げている、遺伝子治療薬分野において最も注目されるウイルスベクタープラットフォームの一つです。
- ここでは、多様なAAVセロタイプに適用可能であり、高価なアフィニティ基材も不要、なおかつスケール性にも優れた効果的なAAV精製の戦略をご紹介します。
- 工程は、3種のCIM®モノリスカラムより成ります。細胞ライセートは、デブリスの除去のみでダイレクトにカラム工程に供することができ、煩雑なTFFによる濃縮は不要です。
- 初段工程は、CIMmultus OHによる疎水性相互作用クロマトグラフィです(Figure 1)。ウイルスの結合には1.0-2.0 Mの塩を用いました。多くの低分子夾雑物・タンパク質等はフロースルーにより除かれ(Figure 4 and Figure 5, OH FT)、少量の残存する不純物とともに溶出されました(Figure 4

and Figure 5, OH E)。なおDNA-タンパク質コンプレックスは強く結合したため、その除去とカラム再生にはNaOHを適用しました。

- 中間精製にはCIMmultus SO3によるカチオン交換を用いました(Figure 2)。初段のAAVフラクションは、ウイルスの結合のためにpHを3.5-5.0に希釈調整しました。さらにチューブや容器へのウイルスの非特異吸着の回避のために、糖類と界面活性剤を添加しています。溶出は塩濃度のグラジエントにて実施しました。

- 最終ポリッシングである、ゲノムを含む/含まないキャプシドの分離はCIMmultus QAアニオン交換により、アルカリ条件下の塩濃度グラジエントで実施しました(Figure 3)。(この工程の詳細はBIA社アプリケーションノートA048を参照ください。)



RESULT

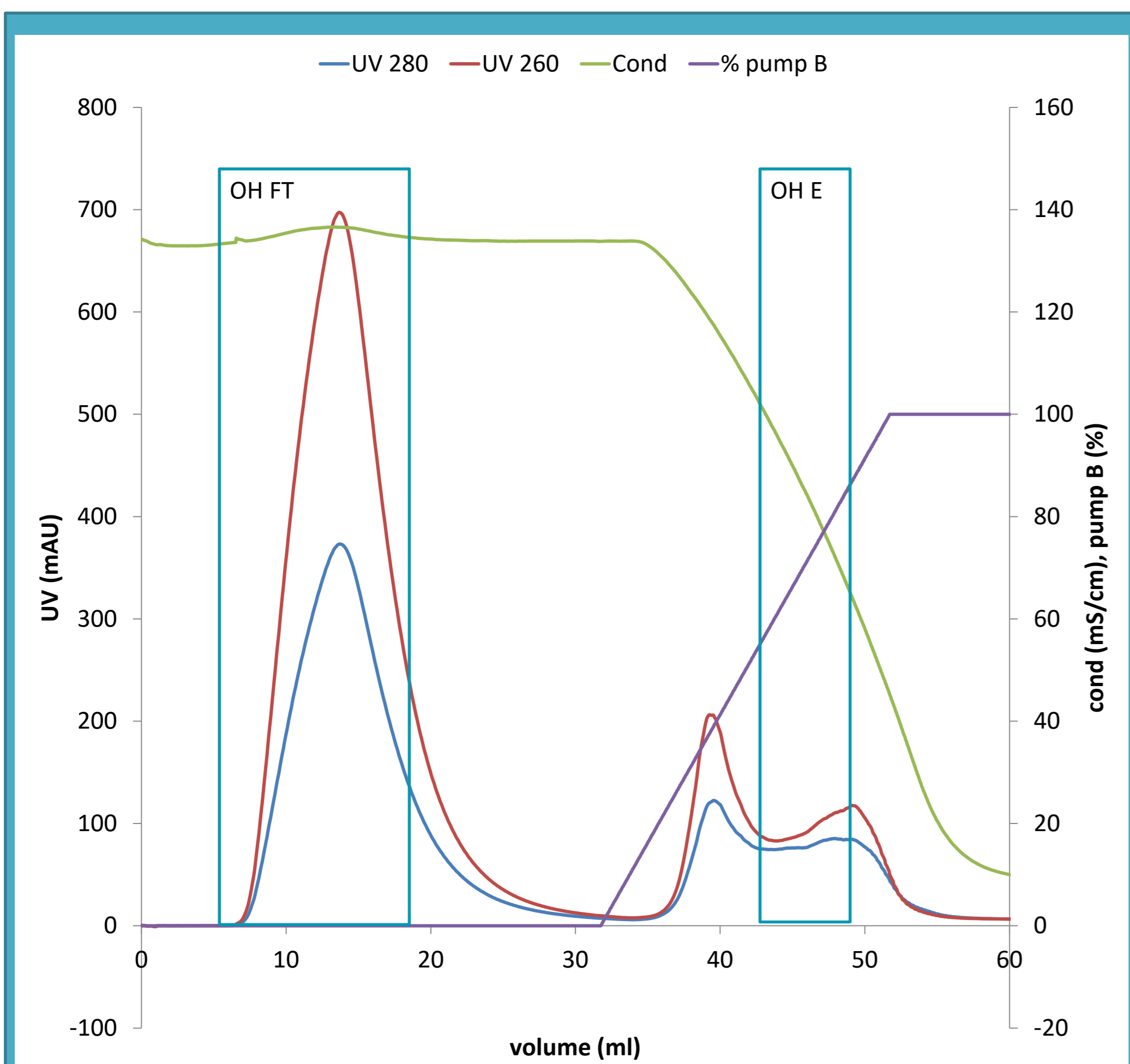


Figure 1: CIMmultus OHによるAAVのキャプチャ工程
Buffer A : 1.5 M リン酸カリウム緩衝液 pH 7.0
Buffer B : 50 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.0
サンプル調製: セルライセートを終濃度1.5 Mとなるようリン酸カリウムと混和。
カラム平衡化: buffer A → ロード → 洗浄: buffer A → 溶出: 0 → 100 % B 20 カラム容積(CV)によるリニアグラジエント。

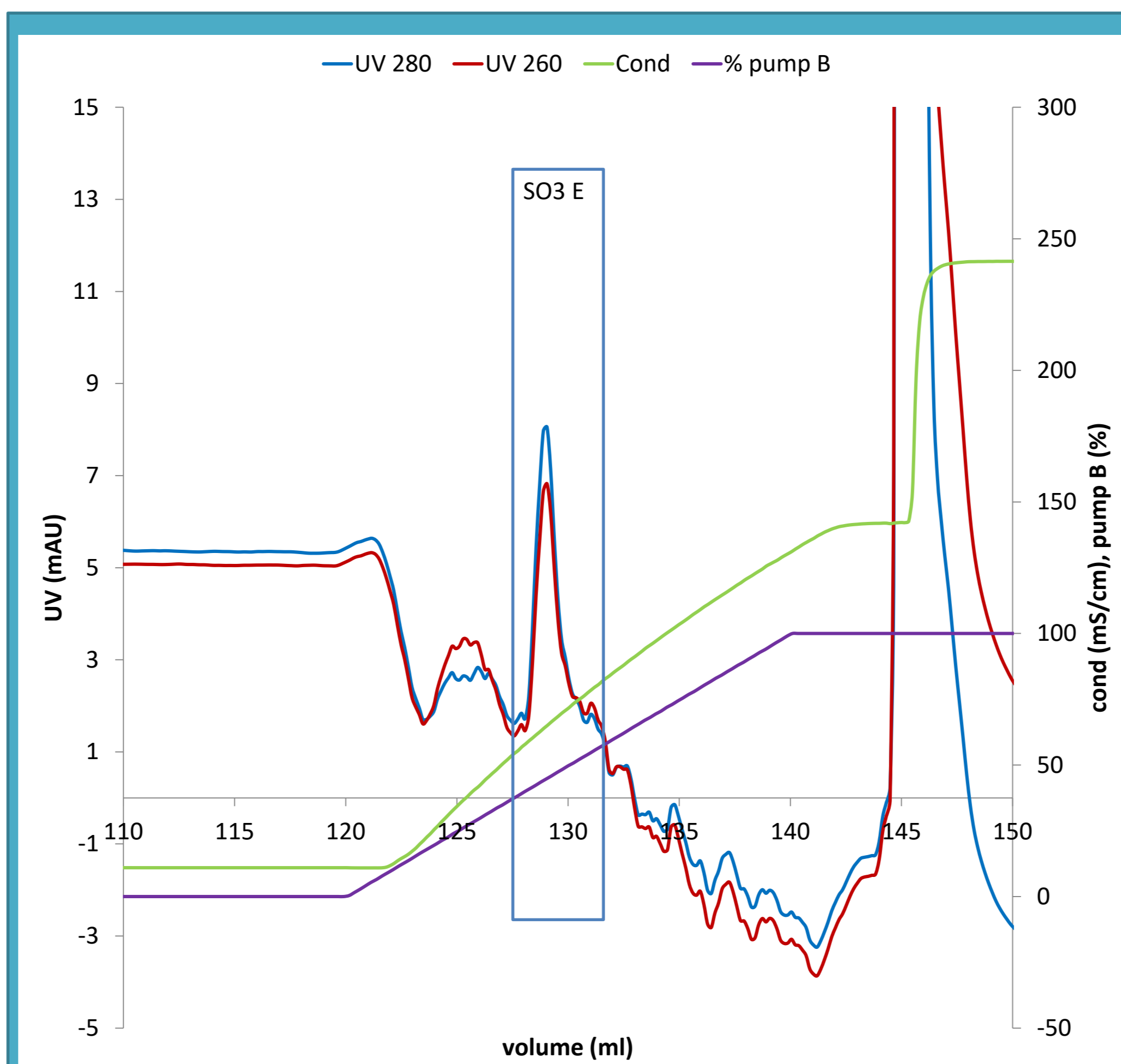


Figure 2: CIMmultus SO3による中間精製工程
Buffer A : 糖・界面活性剤を含む50 mM 酢酸 (酸性)
Buffer B : 2.0 M NaCl・糖・界面活性剤を含む50 mM 酢酸 (酸性)
平衡化: buffer A → ロード → 洗浄: buffer A → 溶出: 0 → 100 % B 20カラム容積(CV)によるリニアグラジエント。

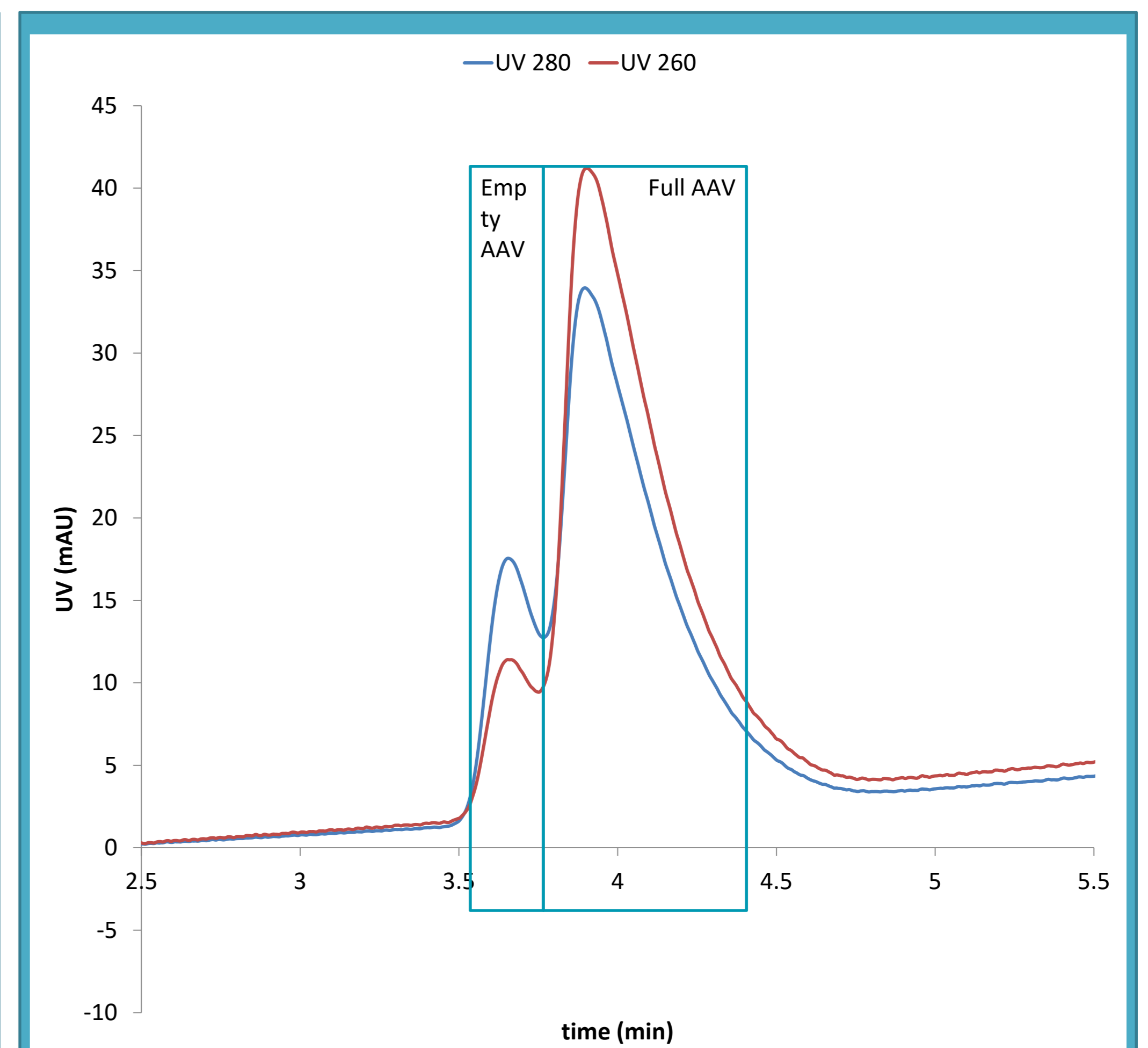


Figure 3: CIMmultus QAによる、空ベクターの除去
Buffer A : 20 mM Bis-Tris-Propane(BTP) + 35 mM NaCl, pH 9.0
Buffer B : 20 mM BTP + 400 mM NaCl, pH 9.0
平衡化: buffer A → ロード → 洗浄: buffer A → 溶出: 0 → 40% B 50カラム容積(CV)によるリニアグラジエント。



Figure 4. SDS PAGE
キャプチャステップでは、ウイルスをロスすることなく、フロースルーで夾雑タンパク質を効果的に除去できました。ウイルスはフラクションOH-Eに溶出し、これをSO3工程に供しました。

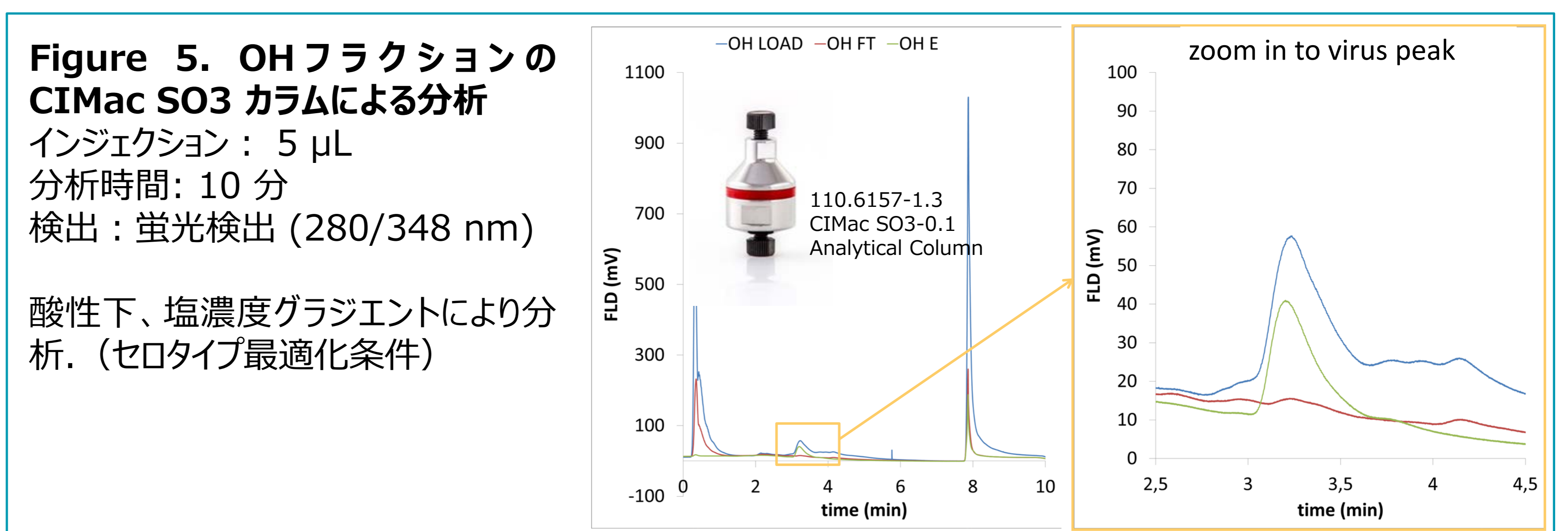


Figure 5. OHフラクションのCIMac SO3カラムによる分析
インジェクション: 5 µL
分析時間: 10 分
検出: 蛍光検出 (280/348 nm)
酸性下、塩濃度グラジエントにより分析。(セロタイプ最適化条件)

CONCLUSIONS

- CIM®モノリスHICおよびIEXカラムの効果的なコンビネーションにより、超遠心はもとより、煩雑かつ収率低下のもととなるTFF濃縮工程や、高価なメディアによるアフィニティ工程をもなくした、AAVの培養液からのクロマトグラフィー貫精製工程を構築することができました。
- さらに、CIM®モノリスの元来持つ、固体メディア・プレパックカラムとしてのロバスト性・簡便さと、優れたスケールアップ再現性は、メソッド開発負担の低減とデータの一貫性の観点から、特に製法変更にシビアな医薬品研究開発のステージアップに大いに貢献すると考えられます。

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge for providing samples to Stephen M. Kaminsky and Hyunmi Lee, Belfer Gene Therapy Core Facility, Department of Genetic Medicine, Weill Medical College of Cornell University, New York and Nicole Brument, INSERM UMR 1089, Translational gene therapy for genetic diseases, Université de Nantes, France