

HEK293由来アデノ随伴ウイルス（AAV）の精製：モリスによる商業生産を念頭とする小スケールラボ調製の比較検討



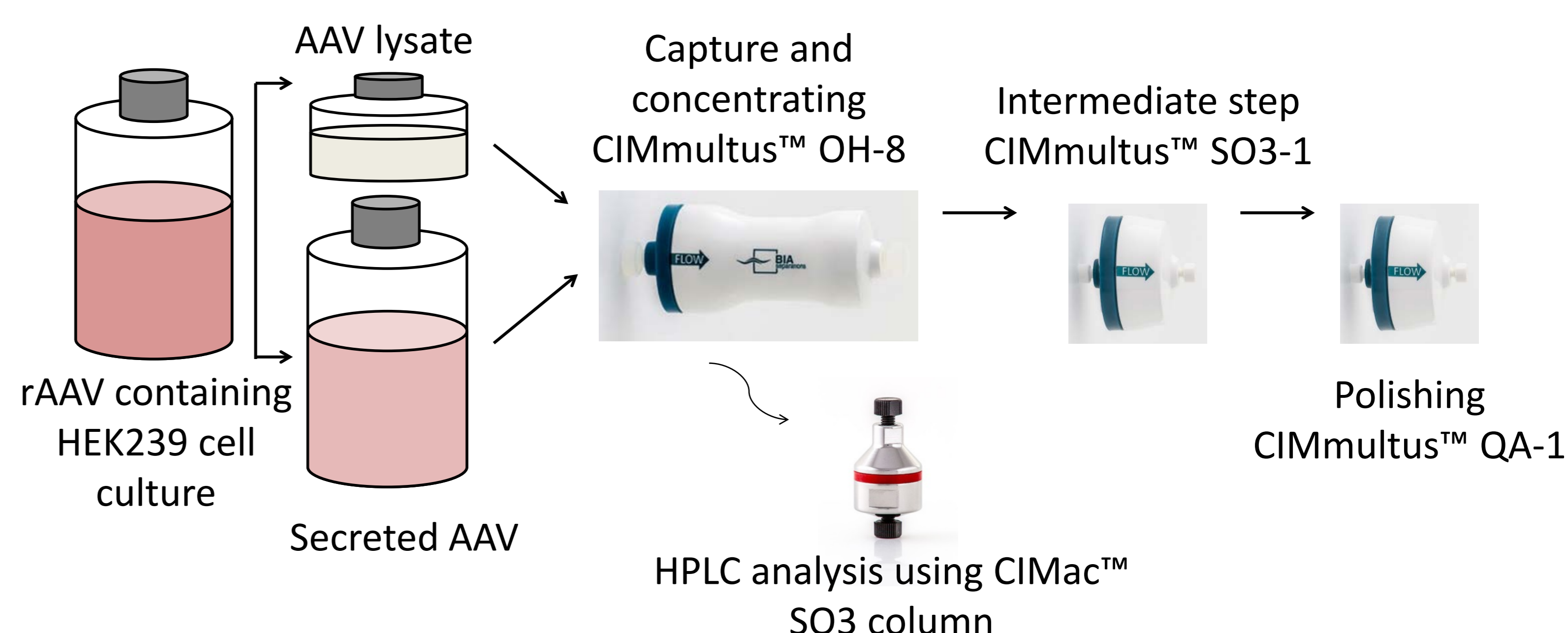
M. Tajnik Sbaizero¹, L. Zentilin², M. Leskovec¹, B. Goričar¹, J. Merkelj Koren¹, P. Gagnon¹, A. Štrancar¹

¹ BIA Separations d.o.o., Mirce 21, SI-5270 Ajdovščina, Slovenia. ² International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Padriciano 99, 34149 Trieste, Italy.

INTRODUCTION and AIMS of the study

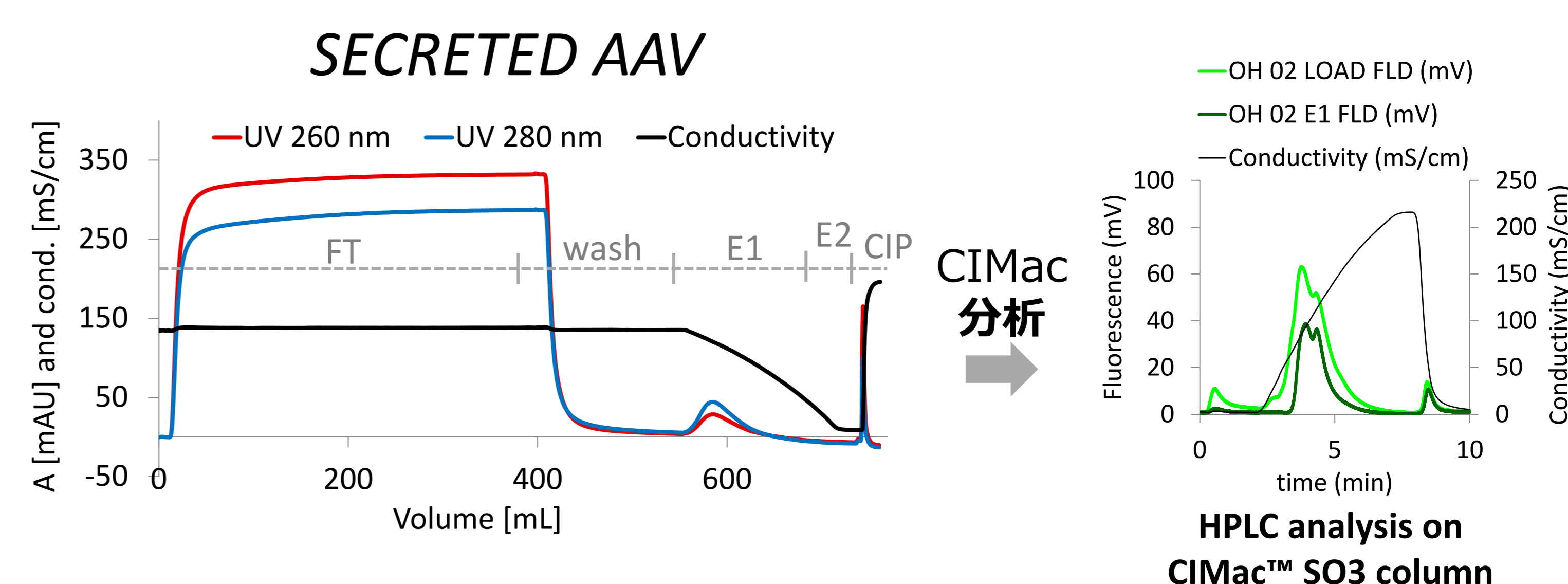
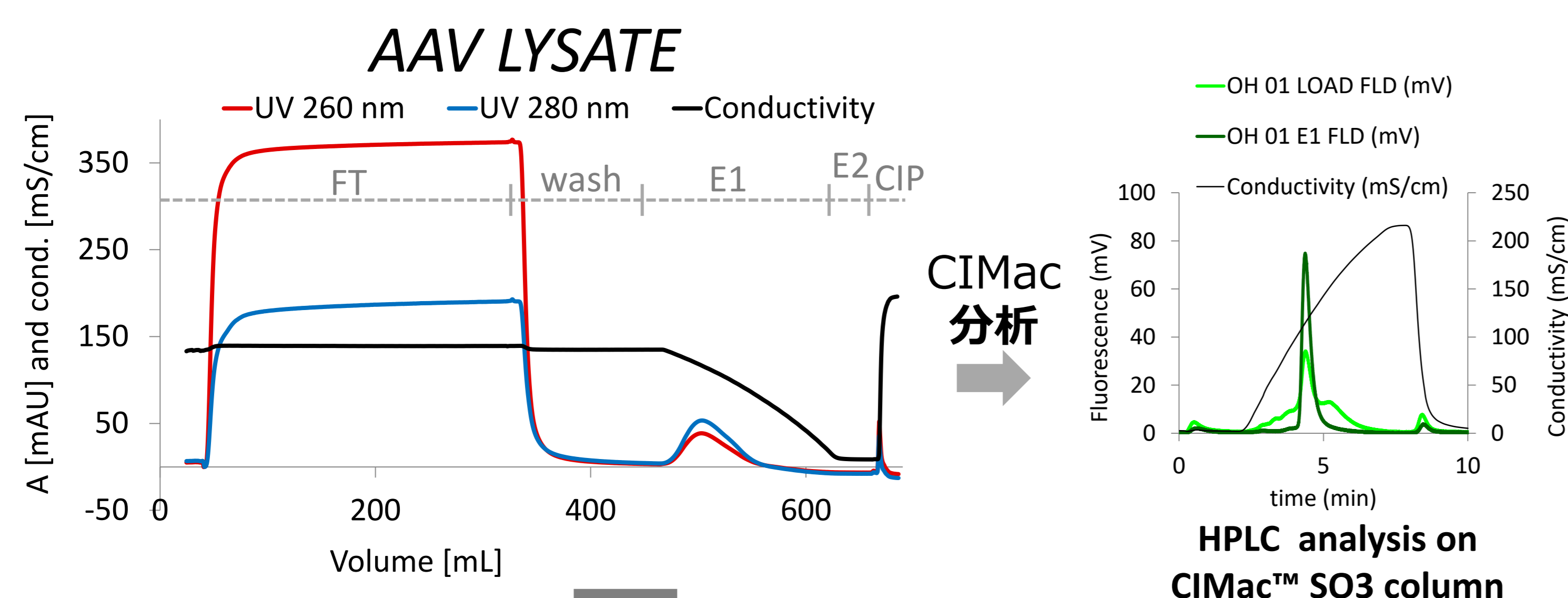
リコンビナントアデノ随伴ウイルス（rAAV）のダウンストリーム工程においては、プロダクトから大量の宿主由来および目的物由来不純物を取り除く必要があります。CsCl精製のように、ラボスケールでは良好な手法でも、大規模な商業生産スケールへの移行を想定する場合はスケール再現性に欠けます。

本検討は、多様なインサート、複数セロタイプのAAVに適用可能な、ロバストかつ迅速で効果的なrAAV精製の基盤技術の開発を目的としました。rAAV9のライセートまたは上清をまずCIMmultus OHカラムでキャプチャ・濃縮し、CIMmultus SO3を中間精製として、さらにCIMmultus QAでポリッシングしました。商業スケールのモリス生成物の純度を、既存のラボスケール精製法と比較しました。

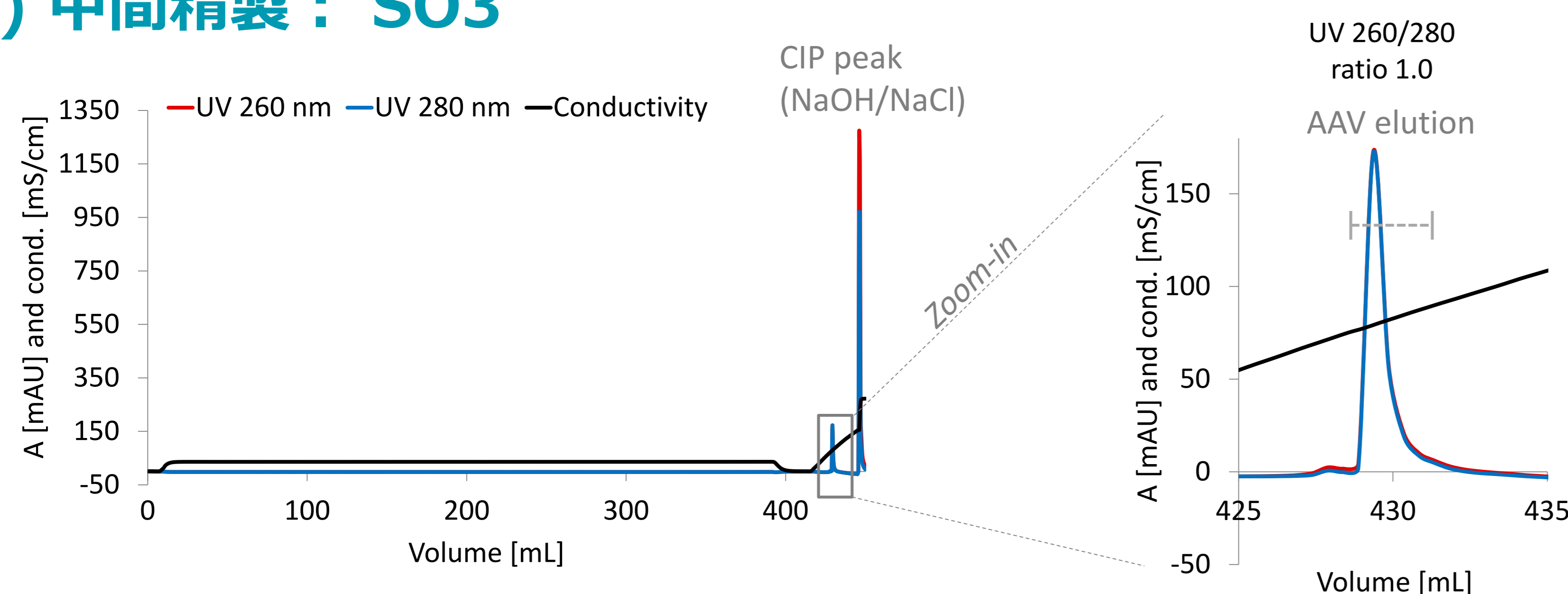


RESULTS

1) キャプチャと濃縮：OH



2) 中間精製：SO3



Conditions:

<カラム> OH CIMmultus 8 mL, チャネルサイズ 2 μ m; SO3 CIMmultus 1 mL, チャネルサイズ 2 μ m; QA CIMmultus 1 mL, チャネルサイズ 2 μ m

• OH工程： 両サンプルを中性 3M リン酸Na緩衝液で1:1希釈 → 遠心 3500 rpm 5 or 10 min → 濾過 Minisart CA 1.2 μ m → ロード 292 mL (ライセートAAV) または 397 mL (分泌AAV)

• SO3工程： OH溶出フラクションE1を希釈、酸性に調整

• QA工程： バッファ交換したSO3溶出フラクション

<移動相>

• OH ステップ A : 1.5 M リン酸Na 中性 B : 50 mM リン酸Na 中性

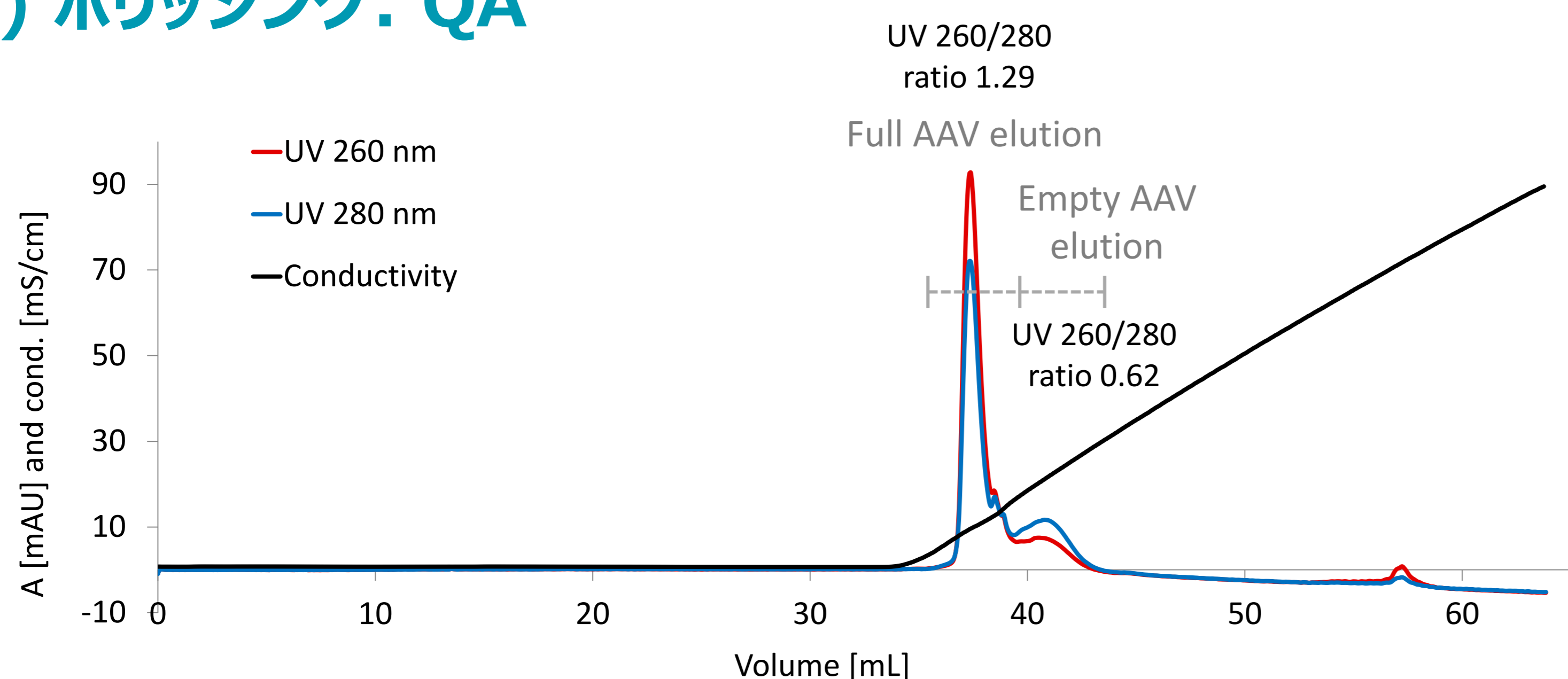
• SO3ステップ 酢酸緩衝液 酸性

• QAステップ BTP緩衝液 アルカリ性

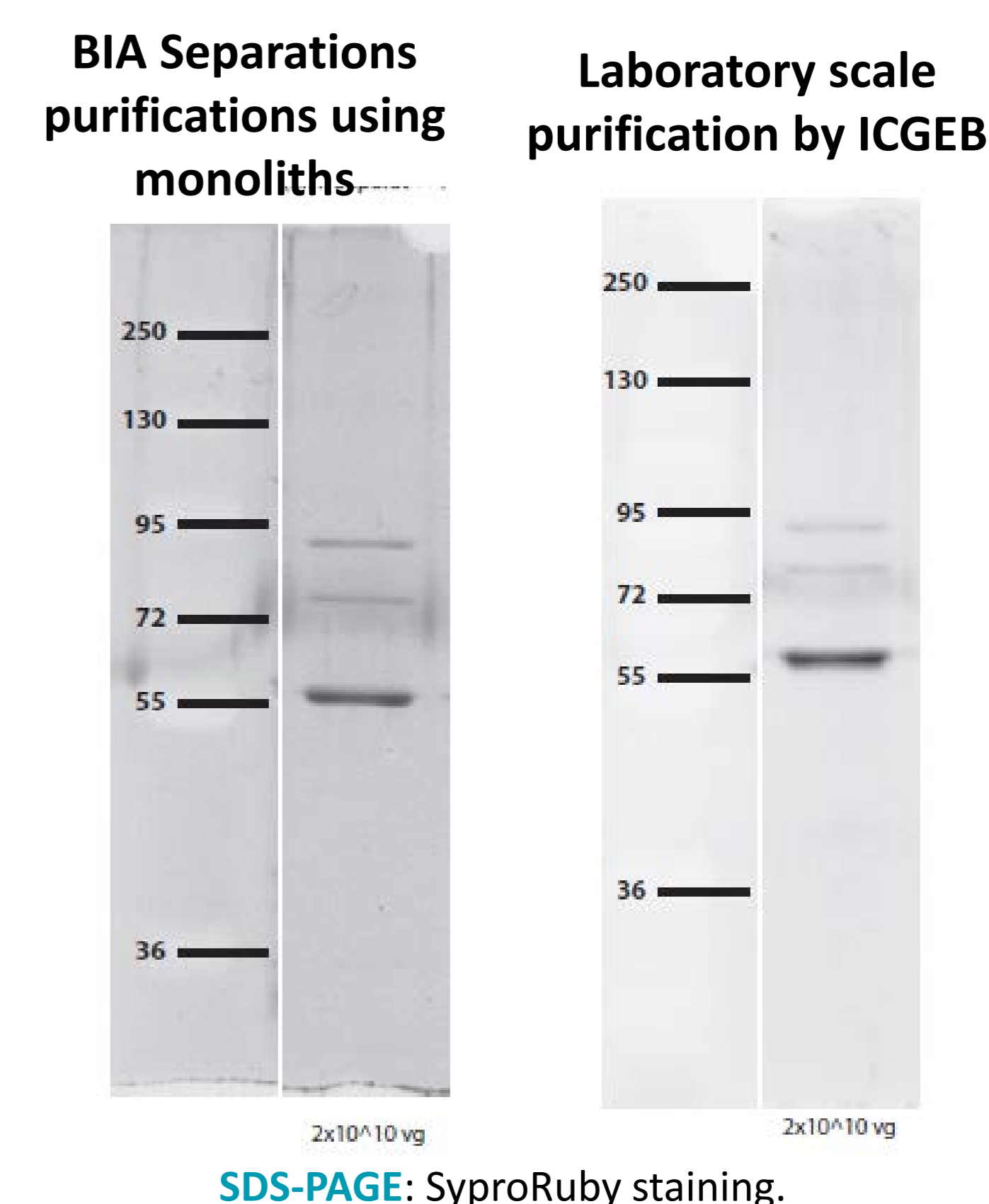
• すべてのステップでリニア塩グラジエントを適用

<分析法> CIMac SO3によるHPLC、SDS-PAGE、リアルタイムPCRによる総AAV分析

3) ポリッシング：QA



Comparable purity profile of laboratory scale purification and purification using monolith technology



SDS-PAGE: SyproRuby staining.

CONCLUSIONS

- CIMmultus OHカラムによるキャプチャ工程はライセート・分泌の双方のrAAV9に対し良好なウイルス回収率を示しましたが、ライセートのSO3カラムによるHPLC溶出がより優れたピーク分離状態を示したため、中間精製・ポリッシングに供しました。
- 中間精製ではさらに不純物が低減され、AAVキャプシドはQAポリッシング工程で良好に分離されました。

- ポリッシング工程では良好なempty/full分離が得られました。
- BIAセパレーションズのモリス精製で得られたプロダクトは、ICGEBで実施されたラボスケール精製物と同等の純度を示しました。

© 2018, BIA Separations, all rights reserved.