

アデノウイルスの分離精製は、これで決まり！



グラフト型陰イオン交換体によるウイルス粒子の分離

（オープンアクセス学術論文等から）

ウイルスを利用した遺伝子治療薬やワクチンがこれまで多数開発、承認されています。中でもアデノウイルスは、サイズの大きな目的遺伝子の導入が可能、遺伝子導入効率が高い、標的細胞に感染してもゲノムへの組み込みが低い、遺伝子発現が一過性であるなどの優れた特長を有しており、がん治療用ウイルス（腫瘍溶解性ウイルス）やウイルスベクターワクチン（抗原提示ウイルス）に応用されています。現在、コロナウイルス感染症（COVID-19）に対するワクチンの早期開発が強く求められており、アデノウイルスを用いたワクチンも候補の1つとして、各国で開発が進められています。以下に COVID-19 に対するワクチンの開発状況をお示しします。

●COVID-19（SARS-CoV-2）に対するワクチンの主な開発状況（臨床試験、P1 試験以上）

企業および研究機関	開発品名	種類	臨床試験*	地域
AstraZeneca, University of Oxford	AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19)	アデノウイルス	P3	欧州、ブラジル、インド
CanSino Biologics, Beijing Institute of Biotechnology	Ad5-nCoV	アデノウイルス5	P2/P3	中国、カナダ/サウジアラビア
Gamaleya Research Institute	Gam-COVID-Vac	アデノウイルス 5, 26	P3	ロシア
Shenzhen Geno-Immune Medical Institute	LV-SMENP-DC	レンチウイルス	P2	中国
Johnson & Johnson/Janssen Pharmaceuticals	Ad26 CoV2-S	アデノウイルス 26	P3	米国
Medicago（田辺三菱子会社）	-	VLP	P1	カナダ
Serum Institute of India, SpyBiotech	RBD-HBsAg VLP	VLP	P3	インド
Sinovac Biotech	PiCoVacc	不活化ウイルス	P2/P3	中国/ブラジル、インドネシア
武漢生物制品研究所, Sinopharm	-	不活化ウイルス	P3	UAE
北京生物制品研究所, Sinopharm	BBIBP-CorV	不活化ウイルス	P3	UAE
Bharat Biotech	BBV152	不活化ウイルス	P2	インド
中国医学科学院 医薬生物技術研究所	-	不活化ウイルス	P2	中国
BioNTech, Fosun Pharma, Pfizer	BNT162	mRNA	P3	米国
Moderna, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)	mRNA-1273	mRNA	P1/P3	韓国/米国
Imperial College London	COVAC1	mRNA	P2	英国
Curevac	CVnCoV	mRNA	P2	ドイツ、ベルギー
Walvax Biotech, 中国人民解放軍軍事科学院	-	mRNA	P1	中国
Arcturus, Duke-NUS	-	mRNA	P1/P2	複数国
Inovio Pharma, International Vaccine Institute	INO-4800	プラスミドDNA	P2/P3	韓国/米国
Genexine Consortium	GX-19	プラスミドDNA	P2	韓国、インドネシア
アンジェス、大阪大学、タカラバイオ	AG0301-COVID19	プラスミドDNA	P2	日本
Cadila Healthcare	-	プラスミドDNA	P2	インド
Symvivo	bacTRL-Spike	プラスミドDNA	P1	カナダ
Novavax	NVX-CoV2373	たんぱく質	P2/P3	豪州/イギリス
Vaxine, Medytox	COVAX-19	たんぱく質	P1	米国、豪州
Clover Biopharm, GSK, Dynavax	SCV-2019	たんぱく質	P2	中国、豪州
Anfui Zhifei Longcom Biopharma, 中国科学院微生物研究所	-	たんぱく質	P2	中国
University of Queensland, CSL, Seqirus	-	たんぱく質	P1	豪州
Kentucky Bioprocessing	-	たんぱく質	P1/P2	-

* 2020年9月25日時点でのデータを集計し作成

Ref.: WHO, Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines, <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>

日本医師会 COVID-19 有識者会議 <https://www.covid19-jma-medical-expert-meeting.jp/topic/2994>

●ウイルスなど巨大分子の分離に適した陰イオン交換クロマトグラフィー（AEC）用分離担体とその特徴

細胞培養液中で増殖したウイルスは、ホスト由来の DNA やたんぱく質などの不純物を分離、除去して精製されます。陰イオン交換体を用いた分離にはモノリス担体、膜や AEC 充填剤等が用いられますが、サイズの大きなウイルスは AEC 充填剤の細孔内に侵入できないため、有効面積に劣る AEC 充填剤は他の 2 種に比較して吸着量がやや低くなります。一方で、AEC 充填剤は、スケールアップが容易でフレキシビリティも高く、繰り返し使用が可能なることから、大量分離精製に適しています。さらに最近では、グラフト型の AEC 充填剤を用いることで、ウイルスの吸着量も改善されています。ウイルス精製におけるイオン交換体のそれぞれの特長を以下の表にまとめました。

陰イオン交換体	吸着量	分離能	使用流速	スケールアップ	生産性	その他特徴
充填剤	やや低い	高い	遅い	容易	やや低い	大量分離、繰り返し利用、品揃え
モノリス	高い	高い	速い	限定的	高い	シングルユース、目詰まり問題
膜	高い	やや低い	速い	限定的	高い	シングルユース、目詰まり問題

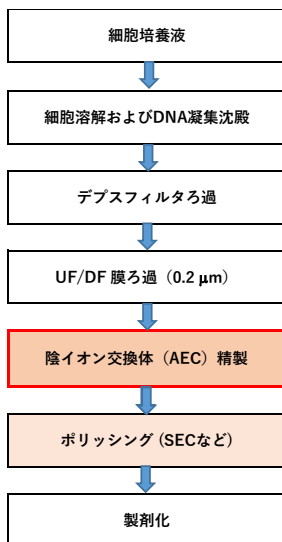
●グラフト型陰イオン交換体によるアデノウイルスの精製

アデノウイルスの精製工程例と、TOYOPEARL® SuperQ-650M等のグラフト型AEC充填剤を用いたアデノウイルス(Ad5等)の分離における溶離液組成の例を以下に示します。アデノウイルスはpH 6.0付近に等電点(pI)をもつため、吸着溶離液にはpH 7.5以上のバッファーを用いることでウイルスの凝集沈殿を防ぎます。宿主由来たんぱく質は、溶離液の初期塩濃度を0.25 mol/L NaCl程度に設定することで、カラムに吸着することなく、フロースルー画分として分離除去することができます。一方、宿主由来DNAはウイルスよりもカラムに強く吸着するため、目的成分であるウイルスを溶出、回収した後、さらに高塩濃度の溶離液にて溶出除去します。

グラフト型陰イオン交換体におけるアデノウイルス(ウイルス粒子; VP)の動的吸着量は、約2 g/L ($2 \times 10^{11} \sim 2 \times 10^{12}$ VP/mL)です。AECにより得られたウイルスの回収率は、約60~90%、宿主由来DNAおよびたんぱく質の対数減少値(LRV)は、それぞれ4~5、および1~2となります(詳細は下記の文献を参照)。

AECに続くポリッシング工程では、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)のほか、疎水クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、マルチモードクロマトグラフィー(ハイドロキシアパタイト含む)、ヘパリン、金属キレートまたは色素系のアフィニティークロマトグラフィーなど、種々な分離モードが用いられます。

アデノウイルスの精製工程例



充填剤	溶離液	NaCl濃度 (mol/L)	
		試料負荷時	溶出時
TOYOPEARL SuperQ-650M	20 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)	0.25	2.0
Fractogel® DEAE-650M	50 mmol/L HEPES (pH 7.5)	0.30	0.6 - 0.7
Fractogel DEAE-650M	50 mmol/L PBS (pH 7.5)	0.26	0.6
SOURCE™ 15Q	50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)	0	0.75
Q Sepharose® XL	50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)	0 - 0.25	1.0

下記文献 2) から引用、一部改変

参考文献

- 1) Patent, US2001-6194191 B1
- 2) E. I. Trilisky et al., J. Chromatogr. A, 1142 (2007) 2-12
- 3) M. N. Eglon et al., J. Gene Medicine, 11 (2009) 978-989
- 4) M. Fitchmun et al., Bio-Rad, Bulletin 6719 (2016)
- 5) P. Nestola et al., Biotech. Bioeng. 112 (2015) 843-857
- 6) H. Bo et al., Eur. J. Pharmaceutical Sciences, 67 (2015) 119-125
- 7) Sartorius Stedium Biotech, Application Note, SL-4079-e171003 (2017)
- 8) Cytiva, Technical Note, KA876140818AN (2018)
- 9) S. Fedosyuk et al., Vaccine 37 (2019) 6951-6961
- 10) H. Abrecht et al., BioProcess International, 17(10), October 2019
- 11) P. P. Aguilar et al., Vaccine 37 (2019) 7070-7080

●主なウイルス分離用充填剤* (主にグラフト型、細孔径の大きい充填剤など)

- ・ **グラフト型イオン交換体** : TOYOPEARL GigaCap® Q-650M, SuperQ-650M, NH₂-750F, TSKgel® SuperQ-5PW(20)
TOYOPEARL GigaCap S-650M, Sulfate-650F, TSKgel SP-5PW(20)
- ・ **疎水クロマトグラフィー用充填剤** : TOYOPEARL Butyl-650M, Phenyl-650M, Ether-650M など
- ・ **マルチモード、アフィニティー用充填剤** : TOYOPEARL MX-Trp-650M, AF-Heparin HC-650M, AF-Chelate-650M, Ca⁺⁺Pure-HA™

* TOYOPEARL、ハイドロキシアパタイトを充填したスクリーニング・簡易精製用カラム SkillPak™ (1 mL, 5 mL) も各種取り揃えております



※「トヨパール」、「TOYOPEARL」、「TOYOPEARL GigaCap」、「TSKgel」は日本等における東ソー株式会社の登録商標です
 ※「Ca⁺⁺Pure-HA」、「SkillPak」は Tosoh Bioscience LLC の製品名です
 ※「Fractogel」はメルク社の、「Sephacrose」は Cytiva 社の登録商標、「SOURCE」は Cytiva 社の製品名です
 ※掲載のデータ等はその数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社営業部 ☎(03) 5427-5180 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2
 大阪支店 バイオサイエンスG ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
 名古屋支店 バイオサイエンスG ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
 福岡支店 ☎(092) 781-0481 〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2
 仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1
 カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>
 HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>
 お問い合わせE-mail hlc@tosoh.co.jp