

プラスミド DNA の立体異性体の分析は、これで決まり！

TSKgel DNA-NPR を用いた oc, cc, linear, (および dimer) プラスミド DNA の分離



プラスミド DNA は遺伝子治療用医薬品やワクチン用 mRNA の鋳型 DNA 調製用として、大量利用されています。また米国 FDA からはプラスミド DNA 医薬品としてガイダンス¹が出されるなど、その品質管理や分析法がますます重要になっています。

●プラスミド DNA 医薬品の品質項目、規格およびその分析法

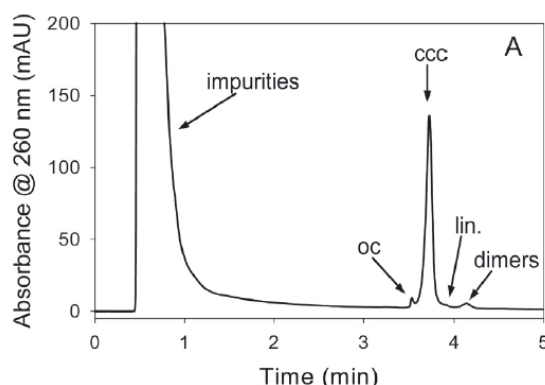
プラスミド DNA の医薬品としての品質項目、分析法および規格例を下表にまとめました²。このうち、アガロースゲル電気泳動で分析されるプラスミド DNA の均一性については、閉環 (sc または ccc) 型の純度が 80 % 以上と規定されています。立体異性体 (topoisomer) についても開環 (oc) 型、直鎖 (linear) 型や二量体・凝集体などをそれぞれ分離して確認する必要があります。これら进行分析する手段の 1 つとして HPLC は有効です。

パラメータ	分析法	規格
外観	目視試験	透明、無色
純度	UV (A260/280)	1.8 - 2.0
濃度	UV (A260)	≧ 1.0 mg/mL
DNA 均一性	アガロースゲル電気泳動	≧ 80 % スーパーコイル体
残留ホスト RNA	アガロースゲル電気泳動 (SYBRGold 染色)	≦ 5 %
残留ホストゲノム DNA	定量 PCR	≦ 5 %
残留ホストたんぱく質	ミクロ BCA	≦ 2 %
エンドトキシン	キネティック比濁法 (カプトガニ血球)	≦ 30 EU [*] /mg
バイオバーデン	バイオバーデン アッセイ, USP <23>	菌体の発育なし
同一性	制限酵素処理分析 (アガロースゲル電気泳動)	標準品と同じパターン
プラスミド同一性	サンガー配列解析	標準品と一致

* EU: エンドトキシンユニット

●プラスミド DNA の立体異性体 (Topoisomer) の分析

培養後、溶菌して得られた粗プラスミド DNA を、TSKgel DNA-NPR を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにて分離したクロマトグラムを図に示します³。プラスミド DNA の立体異性体は oc 型、sc (ccc) 型、linear 型、二量体 (凝集体) の順で溶出しています^{4,6}。なお、linear 型プラスミド DNA は、分析カラムの物性や流速など分析条件により、その溶出位置が変化することが知られています^{5,6}。そのため、これらの立体異性体を正確に同定するには、クロマトグラフィーにて得た分画を、アガロースゲル電気泳動 (分解酵素処理試料の泳動の比較を含む) や電子顕微鏡写真で確認する必要があります^{5,7}。



●核酸分離用の陰イオン交換カラム TSKgel DNA-NPR と TSKgel DNA-STAT の違い

核酸分離用の陰イオン交換カラムとして、TSKgel DNA-NPR (官能基: DEAE 基、2.5 μm , 4.6 mm I.D. x 7.5 cm) と TSKgel DNA-STAT (官能基: 4 級アンモニウム基、5 μm , 4.6 mm I.D. x 10 cm)があります。いずれのカラムも、非多孔性充填剤を用いていますが、充填剤粒子径やカラムサイズが異なっており、分離選択性にもわずかな違いがあります。当社の評価では、プラスミド DNA の分離には TSKgel DNA-NPR、オリゴ核酸や DNA 断片の分析には TSKgel DNA-STAT が優れるという結果が得られています^{6, 8-10}。

●プラスミド DNA の分離に関する文献、陰イオン交換体 TSKgel DNA-NPR を用いた文献および総説¹¹

- Center for Biologics Evaluation and Research, Guidance for Industry, Considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications, US FDA, November 2007, <https://www.fda.gov/files/vaccines,%20blood%20&%20biologics/published/Guidance-for-Industry--Considerations-for-Plasmid-DNA-Vaccines-for-Infectious-Disease-Indications.pdf>
- J. Whitley et al., Development of mRNA manufacturing for vaccines and therapeutics: mRNA platform requirements and development of a scalable production process to support early phase clinical trials, Volume 242, April 2022, Pages 38-55, <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.11.009>
- J. Urthaler et al., Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy, Acta Biochimica Polonica, 52 (2005) 703-711, https://doi.org/10.18388/abp.2005_3434
- S. G. L. Quaak et al., Naked Plasmid DNA Formulation: Effect of Different Disaccharides on Stability after lyophilization, AAPS PharmSciTech, 11 (2010) 344-350, <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9391-2>
- C. R. Smith et al., Separation of topological forms of plasmid DNA by anion-exchange HPLC; Shifts in elution order of linear DNA, J. Chromatogr. B., 854 (2007) 121-127, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.04.005>
- 東ソー、テクニカルインフォメーション No.205, 陰イオン交換クロマトグラフィーによるプラスミド DNA pBR322 の立体構造異性体の分離 https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/File%20Library/TBJS/Lit_JP/TechInfo/TI-205r.pdf
- M. J. Molloy et al., Effective and robust plasmid topology analysis and the subsequent characterization of plasmid isoforms thereby observed, Nucleic Acids Research, 2004 Vol. 32, No. 16, e129, <https://doi.org/10.1093/nar/gnh124>
- 東ソー、セパレーションレポート No. 90, 核酸分離用イオン交換クロマトグラフィー用カラム TSKgel DNA-NPR による DNA フラグメントの分離、https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/File%20Library/TBJS/Lit_JP/SepaReport/sr090.pdf
- 東ソー、セパレーションレポート No. 109, 高性能イオン交換クロマトグラフィー用カラム TSKgel STAT シリーズについて、https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/File%20Library/TBJS/Lit_JP/SepaReport/SR_No109-STAT-.pdf
- M. Wang et al., Separation of plasmid DNA pBR 322 steric isoforms by HPLC, Nucleic Acids Therapeutics Society of Japan, 2021, poster 100033
- A. Abdulrahman et al., Recent advances in chromatographic purification of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccines: A Review, Analytica Chimica Acta 1025 (2018) 41-57, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.001>

●核酸分離用の陰イオン交換体カラム ; TSKgel DNA-NPR および TSKgel DNA-STAT

品番	品名	粒子径 (μm)	カラムサイズ/容量	備考
0018249	TSKgel DNA-NPR	2.5	4.6 mm I.D. x 7.5 cm	非多孔性、高性能分析用
0021962	TSKgel DNA-STAT	5	4.6 mm I.D. x 10 cm	非多孔性、高性能分析用
0018253	TSKgel guardcolumn DNA-NPR	-	4.6 mm I.D. x 0.5 cm	ガードカラム
0014594	フィルタアッセンブリ	-	-	NPRカラム用*
0006280	フロロポアフィルタ	-	-	フィルタアッセンブリ用、0.45 μm

*フィルタアッセンブリは、ポンプ出口側とサンプルインジェクタの間に装着ください



※ “TSKgel”、“NPR” は日本等における東ソー株式会社の登録商標です

※ 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