



ウイルスベクターのクロマト分析、分離はこれで決まり！

TSKgel やトヨパール®で、ウイルス関連医薬品の開発を支援

昨今新型コロナウイルス感染症（COVID-19）が世界的な広がりを見せており、コロナウイルス（SARS-CoV-2）の遺伝子情報を利用した治療薬／ワクチンの開発が活発に行われています*。これらに対する新規治療薬の開発には、ウイルスベクター（ウイルス様粒子；VLP も含む）を利用したものがあり、それらの分析、分離精製にはクロマトグラフィーが多用されています。分析用 TSKgel カラム及び分取用充填剤トヨパールが用いられた論文及び技術資料を以下に示します。

*参考文献; C. Scott et al., BioProcess International 18(5)e1 May 2020 E-Book

●ウイルスベクターの分析、分離に使用されるクロマトグラフィー分離モード

分離モード	製品タイプ	実施例*	備考	TSKgel/TOYOPEARL
サイズ排除 クロマトグラフィー (SEC)	細孔径の大きい 充填剤・グレード	アデノウイルス、VLP プラスミド	目的物はポイド容積付近に溶出するため、不純物DNAやたんぱく質の分離、除去が可能	TSKgel G-DNA-PW, G6000PW _{XL} , G5000PW _{XL} , TOYOPEARL HW-75, HW-65
イオン交換 クロマトグラフィー (IEC)	陰イオン交換体	AAV1, AAV5 (Empty/Full体の分離) アデノウイルス、レンチウイルス、プラスミド	充填剤は、第4級アンモニウム（ポリエチレンジアミンなど）を官能基としたものが主流、膜クロマトグラフィーやモノリス型もあり、DNAやHCP除去が可能	TSKgel DNA-STAT®, DNA-NPR® TOYOPEARL GigaCap® Q-650, NH ₂ -750F
	陽イオン交換体	AAV (Empty体の除去も)	-	TSKgel SP-NPR, SP-STAT TOYOPEARL GigaCap S-650
アフィニティー クロマトグラフィー (AFC)	抗体固定化	AAV1, AAV2, AAV3B, AAV5, AAVrh10	リガンドは、低分子人工抗体 (14 kD) など 安定性pH 3-10、(epitope改変でE/F比率変化)	-
	抗体固定化	AAV2, AAV3 AAV8, AAV9, 全タイプ	集合したキャプシドに結合 リガンドは断片化抗体など	-
	ヘパリン（硫酸）など	AAV2, AAV3, AAV6 (プラスミド)	ウイルスたんぱく質（糖受容体）に結合 (アルギニン固定化ゲル)	TSKgel Heparin-5PW TOYOPEARL AF-Heparin HC-650M, (Sulfate-650F)
ハイドロキシアパタイト クロマトグラフィー (HAC)	セラミック型	AAV1, AAV9 (全タイプ)	溶離液にPEG添加、Caイオン添加など	Ca ⁺⁺ Pure-HA TM
疎水クロマトグラフィー(HIC)	ブチル基など	AAV2	-	TOYOPEARL Butyl-650

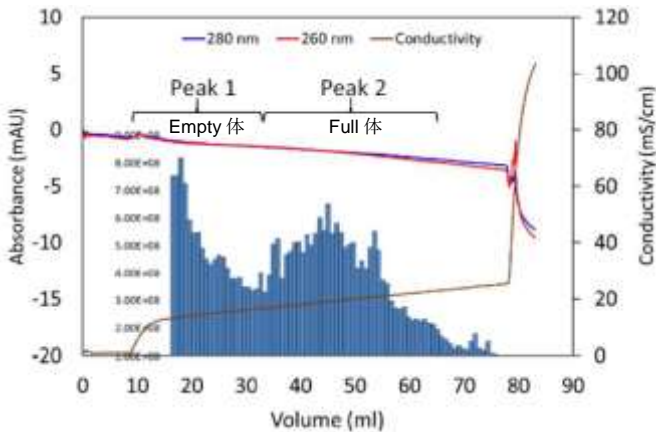
*VLP；ウイルス様粒子、AAV；アデノ随伴ウイルス

●TSKgel 及びトヨパールを用いたウイルスベクターの分析、分離例（文献）

年	分離モード	カラム	ターゲット、キーワード	論文タイトル	ウェブサイト
2017	SEC	TSKgel G5000PW _{XL}	ウイルス様粒子 (VLP)	Quantification and characterization of virus-like particles by size-exclusion chromatography and nanoparticle tracking analysis	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967316317514
2016	SEC	TSKgel G6000PW _{XL} , G5000PW _{XL}	ウイルス様粒子 (VLP) HPV, MuPyV, HBV, EV71, Parvovirus B19	High-throughput characterization of virus-like particles by interlacedsize-exclusion chromatography	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X16000797?via%3Dihub
2015	SEC	TSKgel G5000PW _{XL} , G4000SW _{XL}	ウイルス様粒子 (VLP) FMDV, HbcAg-VLP	Size-exclusion HPLC provides a simple, rapid, and versatile alternative method for quality control of vaccines by characterizing the assembly of antigens	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X1500050X?via%3Dihub
2013	SEC	TSKgel G5000PW _{XL} -CP	ロタウイルス	A Gel Filtration-Based Method for the Purification of Infectious Rotavirus Particles for Environmental Research Applications	https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12560-013-9122-4
2013	HIC	TSKgel Butyl-NPR	DNAワクチン	Antibiotic-free production of a herpes simplex virus 2 DNA vaccine in a high yield cGMP process	https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/hv.25048
2005	IEC	TSKgel SP-NPR	アデノウイルス アデノ随伴ウイルス	Chromatographic purification of recombinant adenoviral and adeno-associated viral vectors: methods and implications	https://www.nature.com/articles/3302611
2000	IEC	TSKgel SP-NPR	アデノ随伴ウイルス	Cation-exchange high-performance liquid chromatography of recombinant adeno-associated virus type 2	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843470001006?via%3Dihub
2013	IEC	DEAE-650M	B型肝炎ウイルス(HBV)-VLP	Purification of hepatitis B surface antigen virus-like particles from recombinant Pichia pastoris and in vivo analysis of their immunogenic properties	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023213005126?via%3Dihub
2012	HIC	Butyl-650M	ウイルス様粒子(VLP)	A novel polyethyleneimine-coated adeno-associated virus-like particle formulation for efficient siRNA delivery in breast cancer therapy: preparation and in vitro analysis	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22619514
2011	IEC	DEAE-650M	レンチウイルス	Large-Scale Manufacture and Characterization of a Lentiviral Vector Produced for Clinical Ex Vivo Gene Therapy Application	https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2010.060
2008	IEC	DEAE-650C	HIV	Development of HIV-1 derived gene transfer technology; Optimization of vector safety, processing and production	https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/bitstream/2440/42907/8/02whole.pdf
2007	HIC	Butyl-650M	アデノ随伴ウイルス	Primary recovery and chromatographic purification of adeno-associated virus type 2 produced by baculovirus/insect cell system	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093406003375?via%3Dihub
2004	IEC	DEAE-650M	レンチウイルス	Lentiviral vectors pseudotyped with baculovirus gp64 efficiently transduce mouse cells in vivo and show tropism restriction against hematopoietic cell types in vitro	https://www.nature.com/articles/3302170
2004	IEC	DEAE-650M	アデノウイルス	Development and optimization of an adenovirus production process	https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jgm.503

※ 弊社のカラムや充填剤に関する技術資料「セパレーションレポート」、「テクニカルインフォメーション」、「テクニカルノート」並びに子会社 (Tosoh Bioscience LLC/GmbH) の技術資料も多数ございます。技術資料を弊社ウェブサイトより入手できない場合は、担当営業員にご連絡ください。

●TSKgel カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィー (IEC) によるウイルスベクターの分離例



カラム : TSKgel DNA-STAT (5 μ m, 4.6 mm I.D. x 10 cm)
 溶離液 : バッファーA: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)
 バッファーB: 1 mol/L NaCl, 100 mmol/L MgCl₂を含むバッファーA
 溶出 : バッファーB : 9% で 5 CV、
 その後バッファーB: 18.5%まで 36 CV のリニアグラジエント
 流速 : 1 mL/min
 検出 : UV (260 nm, 280 nm),
 フラクション中の CP は ELISA、VG は qPCR で定量
 試料 : アデノ随伴ウイルス (総粒子数 1.7×10^{11} 、Full 体数 3.57×10^{10})

ウイルスベクターの精製では、夾雑 DNA やたんぱく質のほか、ウイルス粒子 (Capsid particle; CP) にも、目的の遺伝子 (Virus-genome; VG) を含むもの (Full 体) と、含まないもの (Empty 体) が存在しており、ベクターの効率を高めるためには Full 体のみを精製する必要があります。図中の Peak 2 の分画には Full 体が多く含まれており、全 CP 粒子中に占める VG 粒子の割合 (VG/CP) は、分離前の試料の 21.0% から Peak 2 分画では 73.1% まで向上しました。

●ウイルスベクターの分離精製例



Ref.; M. Fuerstenau et al., BioProcess International, 15 (2017) 7, data modified

https://www.researchgate.net/publication/32227728_Scalable_Purification_of_Viral_Vectors_for_Gene_Therapy_An_Appraisal_of_Downstream_Processing_Approaches



※ "TSKgel", "TSKgel STAT", "NPR", "TOYOPEARL", "TOYOPEARL GigaCap", "トヨパール"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"は日本等における Tosoh Bioscience LLC 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 ☎(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 ☎(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