

プラスミドDNAのGMP製造



企業レポート

村上晶彦*

GMP production of plasmid DNA

Key Words : Plasmid, manufacturing, GMP

はじめに

弊社・アンジェス株式会社は2019年3月、遺伝子治療用製品コラテジェン筋注4mgについて再生医療等製品（遺伝子治療用製品1プラスミドベクター製品）として、条件及び期限付き承認を得た。そこで、医療用プラスミドの製造について、弊社の経験を踏まえ、開発上の留意点等ご紹介したい。

弊社はバイオ医薬品の開発ベンチャーとして2019年12月に創立20周年を迎えたが、これまで自社で製造設備を持つことはなく、プラスミドに限らず、製造開発は基本的にCMOに委託して進めてきた。また、少なくとも、コラテジェンの開発当初は、プラスミドを医薬品レベルで製造するCMOは国内にはなく、海外のCMOに製造委託することになった。

プラスミドの製造では、これを保持する大腸菌を培養し、菌体からプラスミドを抽出して精製する。実験室でプラスミドを調製する操作を日常茶飯事行っておられる方も多いと推察するが、医薬品レベルのプラスミドを工業的に製造する際には、実験室で少量のプラスミドを調製する場合とは、大きく次の点で異なると筆者は考えている。

1つは、医薬品製造では、動物由来成分を含む原材料や有機溶媒等、安全性が懸念される物質の使用を避けなければならない。

もう1つは、小スケールでは遠心分離機等で対応できる操作が、製造スケールが大きくなると対応

が困難となり、製造装置等に工夫が必要となることである。

これらの点を踏まえ、以下、医薬品レベルのプラスミドDNAのGMP製造について述べさせていた

プラスミドDNAの構成要素

プラスミドの製造工程について述べる前に、プラスミドの構造的な構成要素について述べておく。遺伝子治療やDNAワクチンとして用いられるプラスミドには、目的遺伝子（GoI: Gene of Interest）の転写単位その他、プラスミドとしての必須要素として、大腸菌内で機能する複製開始点と菌体内でのプラスミド保持に必要な薬剤耐性遺伝子が搭載されている。複製開始点の種類によって菌体内のプラスミドのコピー数が左右されるので、プラスミドの大量製造のためには、高コピー数が期待できる複製開始点を搭載することが望ましい。プラスミドが大腸菌で維持されるためには薬剤（抗生物質）による選択圧が必要である。選択圧がない培地で培養すると、プラスミドが脱落した大腸菌が出現する懸念があるが、医薬品としてのプラスミドの製造では、最終製品におけるこれらの抗生物質の残存が問題となる。選択圧が存在しない状態でプラスミドが安定に保持される世代数を確認した上で、抗生物質不含の培養液を用いたり、前培養では抗生物質を含む培養液を用いたとしても、本培養では抗生物質を含まない培養液を用いるなどの対応をとる。培養工程の一部でも抗生物質を用いた場合には、最終製品で抗生物質が十分除去されていることを確認しなければならない。

製造工程

プラスミドの製造では、培養工程の後、溶菌工程で宿主DNAとプラスミドDNAを分離し、その後の精製工程でさらに不純物を除去する。



* Akihiko MURAKAMI

1955年6月生まれ
名古屋大学大学院 農学研究科 生化学
制御研究施設 博士後期課程修了
(1978年)
現在、アンジェス株式会社
社長室 担当部長 農学博士
専門/分子生物学、製造開発
TEL: 03-5730-2817
FAX: 03-5730-2737
E-mail: amurakami@anges.co.jp

培養工程

培養工程では、溶存酸素・pH等を適切な値に維持しながら培養を行う。Feb-Batch 培養（培養途中で培地成分を追加する）を行うことにより培養液量当たりの菌体数を上昇させ、プラスミドの収量を上げることができる。

菌体回収

菌体回収は、実験室では通常実験室に備えられているバッチ式の遠心分離機が用いられるが、製造規模が大きくなると、膜濃縮（TFF: Tangential Flow Filtration）や連続遠心機を用いることになる。

溶菌工程

得られた菌体からプラスミドを抽出する方法は、原理的には、実験室で通常行われるアルカリ・SDS 法¹⁾と同じである。回収した菌体を適当な容量の緩衝液に懸濁し、等容のアルカリ・SDS 溶液（水酸化ナトリウムと SDS の混合液）と混合する。SDS によって溶菌した大腸菌から宿主 DNA とプラスミド DNA が溶け出し、粘稠な液体となる。アルカリ条件に曝された DNA は 2 本鎖構造が乖離した状態になっている。ここに、酸性の溶液（具体的には酢酸カリウム溶液など）を混合して中和すると、比較的分子量が小さいプラスミドは 2 本鎖構造を回復することができ、溶解した状態を保つが、高分子量の宿主 DNA は、急激に pH が変化することにより、元の構造に戻ることができず、溶解した状態を維持できず凝集体となる。この原理によって、プラスミド DNA を宿主 DNA から分離することができる。

実験室で数 mL～数 L の培養液からプラスミドを調整する際には、扱う液体の量はそれほど多くなく、菌体懸濁液とアルカリ・SDS 溶液の混合はほぼ瞬間的に完了し、後は数回転倒混和する手順になっている。しかし、数 100L 以上の培養液の場合には、瞬間的な混合は困難で、混合後均一化しようとして粘稠な溶液を無理に攪拌すると、高分子量の宿主 DNA が剪断力を受けて断片化し、中和後も凝集することなくプラスミド画分に混入してしまう。これを避けるためには、剪断力を与えない機構で両液が速やかに均一になるように混合することが必要である。

次に、中和により宿主 DNA を変性させ凝集体として分離する工程になるが、これには、pH を急激に変化させることが必要であり、ここでも、両液を

速やかに均一化できる機構が必要である。

こうしてできた宿主 DNA の凝集体は、小スケールのプラスミド調製では遠心分離機を用いて沈殿させ、プラスミドを上清画分に回収する。しかし、製造規模が拡大するとバッチ式の遠心分離機での対応には限界があり、Depth Filter の利用等、各 CMO では様々な工夫をしている。

既存の CMO で、大腸菌等での組換えタンパク質の製造の経験と設備があったとしても、この溶菌工程に対応するためには、ある程度の試行錯誤による装置開発が必要だと考える。各 CMO ではそれぞれ独自の装置を設計しているようであるが、各社のノウハウに触れるので、ここで詳しく述べることは控えたい。

精製工程

今日では、実験室でプラスミドを調製する際には、市販のキットを用いることが多いと思う。このキットには上述の菌体懸濁用の緩衝液や、アルカリ・SDS 溶液、酢酸カリウムなどの試薬と共に、吸着カラムやその溶出緩衝液などがセットされており、手軽にプラスミドの調製が行える。30 年以上も前の話になるが、筆者は、遺伝子組み換え実験のバイブルとも言える“Molecular Cloning -A Laboratory Manual”²⁾などを参考に、自ら試薬を調製して実験を行っていた。

当時のプロトコルでは、リゾチームや RNase など、動物由来の酵素を用いていた。また、タンパク質を除くためには、フェノール抽出が行われていた。

しかし、医療用のプラスミドの製造には、安全性の観点から動物由来の酵素類や有機溶媒は使用しないことが望ましい。

ある程度精製されたプラスミドの濃縮やバッファー置換には、エタノール沈殿等が行われるが、これらも有機溶媒の使用を避けるために医療用プラスミドの製造では採用されない。また、沈殿を回収するための遠心分離機はスケールアップが困難で、さらに、沈殿を乾固させた後の再溶解が意外と困難で、溶解後、無菌ろ過をする際に、溶解しきれていないプラスミドの凝集物によってフィルターが詰まるなどのトラブルが発生することがある。

従って、アルカリ・SDS 法で得られた溶菌液からプラスミド以外の不純物を除いたり、濃縮・バッファー交換のためには、上記のような操作の代わり

に、硫安沈殿やカラムクロマトグラフィー、限外ろ過が行われる。これらの操作はタンパク質の精製技術を持つ CMO であれば、スケールアップ可能な工程が実装可能である。プラスミドの物性はタンパク質ほどバラエティに富んでいる訳ではないので、基本的には、どのプラスミドでも同様の精製工程で処理できる。疎水クロマトグラフィーや陰イオン交換クロマトグラフィー等を組み合わせ、各 CMO はそれぞれプラスミドの精製プラットフォームを有している。

しかし、プラスミドのサイズや塩基配列によって、クロマトグラフにおける挙動はそれぞれ微妙に異なるので、溶出条件などの細かい条件は、目的のプラスミドに応じて最適化する必要がある。

従って、我々がプラスミド製造を業とする CMO に製造委託する際には、その CMO が有しているプラスミド製造のプラットフォーム技術が、製造しようとするプラスミドに対して適用可能か、プラスミドごとに確認する Feasibility Study が行われる。その確認の後、詳細な製造条件を最適化する試験製造を実施した上で、GMP 製造に取りかかることになる。

不純物の制御

プラスミド製造の際に考慮すべき不純物の内、工程由来不純物としては、宿主由来 DNA、宿主由来 RNA、宿主由来タンパク質のほか、大腸菌の細胞壁の成分であるエンドトキシンがある。また、培地成分にもタンパク質成分は含まれており、工程由来不純物となり得る。さらに、工程で用いる原材料として、SDS や培養工程で用いる抗生物質、消泡剤なども考慮しなければならない。大部分は溶菌後中和の際に出る凝集体を除く工程までに除去されるが、残存する不純物をさらに除いて、医療用のプラスミドとするには、その後の精製工程によるところが大きい。各工程でのそれぞれの不純物の除去状況は製造販売承認申請の際に、申請資料として提出する必要がある。

目的物質由来不純物としては、プラスミドの分解物が挙げられる。プラスミドは環状の DNA 分子だが、細胞内ではトポイソメラーゼの働きで CCC 体 (covalently closed circle, coiled-coil, super coil などとも言う) の状態になっている。二本鎖のうち片方の DNA 鎖のホスホジエステル結合が切断されると、残った DNA 鎖のホスホジエステル結合が自

由回転し、開環状 (open circle, OC 体) になる。切断点の近傍でもう片方が切断されると直鎖 DNA (Linear 体) になる。弊社のプラスミド製品の様に、プラスミドを直接患者に投与する場合には、OC 体や Linear 体は、CCC 体に匹敵する薬効が期待できないことから、目的物質由来不純物とみなされるため、その残留量を規制しなければならない。これらの分解物を精製工程で除去するために、個々のプラスミドに対して、各クロマトグラフィー工程の最適化が必要となる。また、これらの分解物は、ラジカル反応によっても生成するので、長時間の室内散光の暴露は避けなければならない。従って、剪断力を避けることのみならず、製造プロセス全体として、温度、pH、工程時間等を管理することが必要となる。

おわりに

実験室でのプラスミド調製と対比しながら、医療用のプラスミド製造について述べてきた。現在国内には、治験薬 GMP でのプラスミド製造の委託先はいくつかあるが、製造業として GMP 下でプラスミド製造を受託する CMO はないのが現状で、結果的に海外 CMO に委託することになる。微生物を用いて組換えタンパク質を医療用として GMP 下で製造する CMO はあるが、プラスミドの製造に対応するには、前述のように、それなりの技術開発と設備の整備が必要となる。これまで、医療用のプラスミドの需要があまり見込めない中では、各 CMO でプラスミド製造に対応する整備が進まないのは当然と思われる。しかし、今後、AAV やレンチウイルスなど遺伝子治療用ウイルスベクターを製造するための原材料や DNA ワクチンの原薬として、プラスミドの需要も高まってくるものと思われる。

今般の COVID-19 対応の中で、DNA ワクチンの製造拠点として、国内でもプラスミド製造に参入しようとする CMO が現れてきており、これを契機に、国内の医療用のプラスミド製造の委託先が増えることを願っている。

参考文献

- 1) Birnboim, H. C. and Doly, J.: Nucleic Acids Res., 7, 1513 (1979).
- 2) Maniatis, T. et al.: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory (1982).