

遺伝子治療用ナノ粒子及びAAVのキャラクタリゼーション



昭光サイエンス株式会社

昭光サイエンス（株）の紹介



化学品を扱う専門商社
昭光通商の100%子会社



理化学機器専門会社

Shodex®



HPLCカラム



光散乱検出器



ホログラフィック解析式
粒度分布測定器



安定同位体試薬

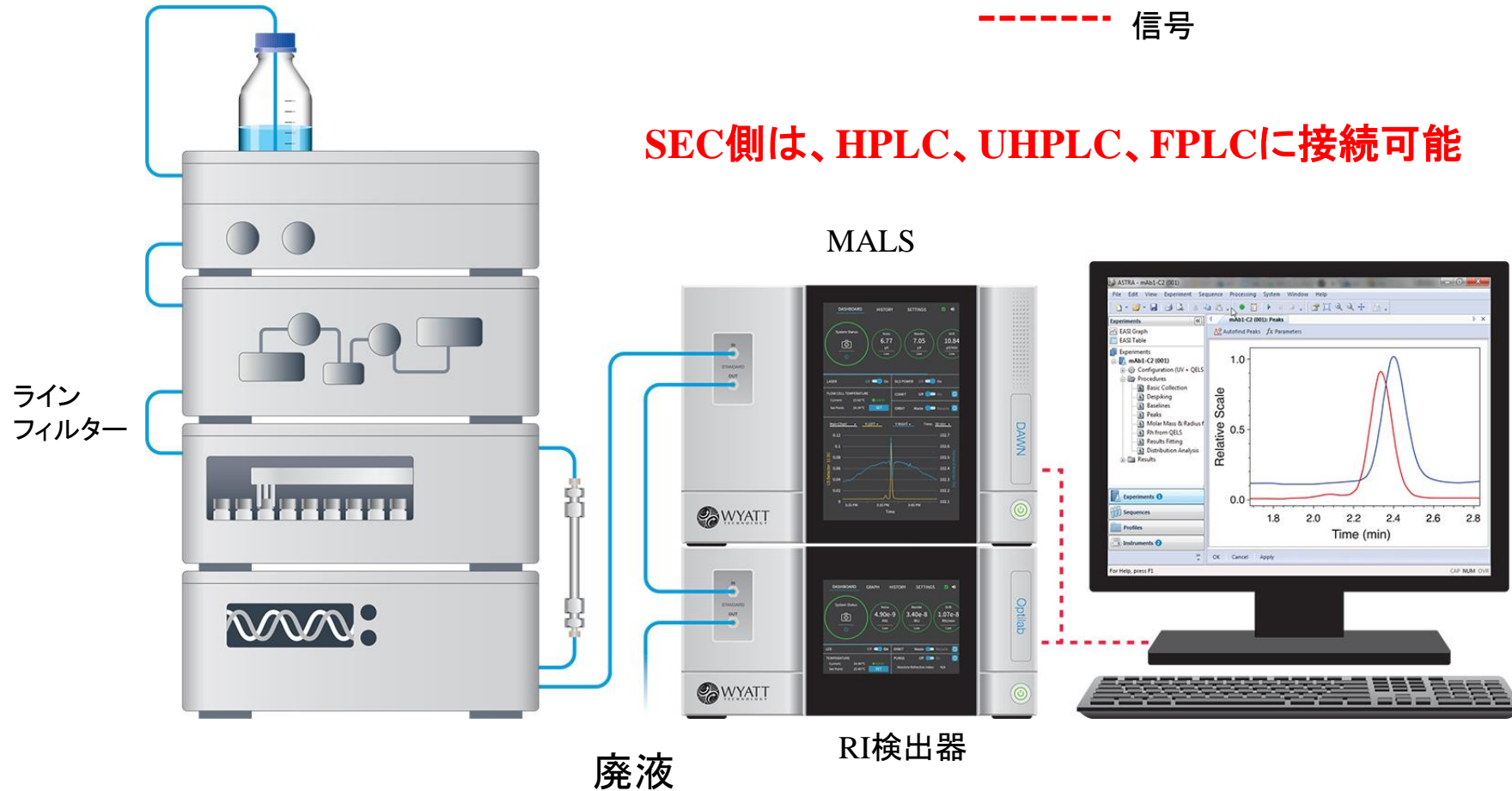
当社取扱いのナノ医療用粒子関連装置



SEC - MALS (Multi Angle Light Scattering) システム

—— 流路

- - - 信号



静的光散乱法の原理

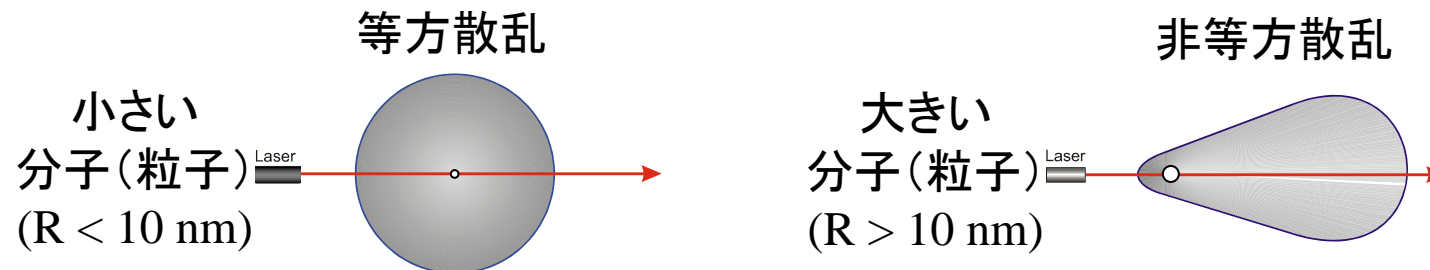
1. 希薄溶液中における高分子の光散乱強度は、角度ゼロ点において、分子量、濃度、 $(dn/dc)^2$ に比例する。

$$I_{scattered} \propto M \cdot c \cdot \left(\frac{dn}{dc}\right)^2$$

dn/dc : 屈折率の濃度増分

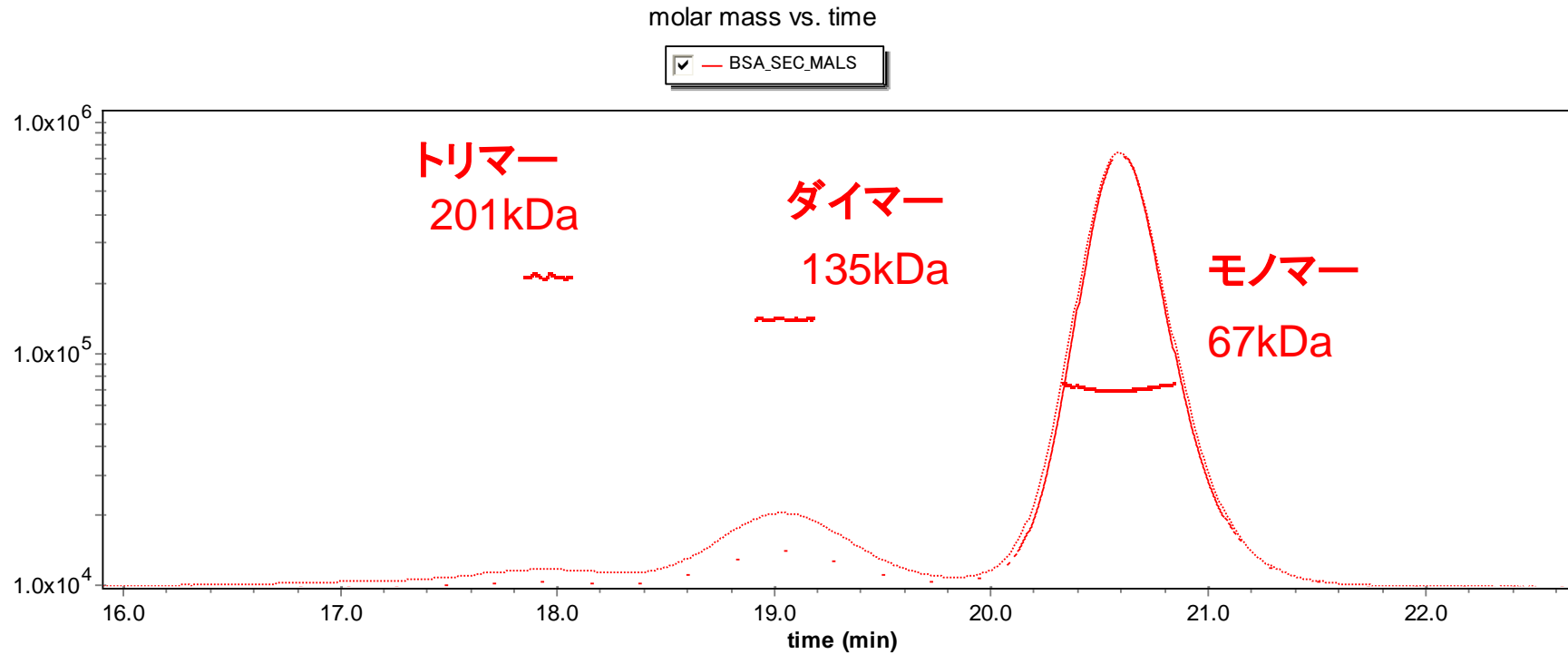
溶液中の高分子の正確な分子量を直接測定

2. 測定対象物の分子サイズが大きくなると、光散乱強度は、高角度(入射光)側の光散乱が弱くなる。



光散乱強度の角度依存性から分子サイズを測定

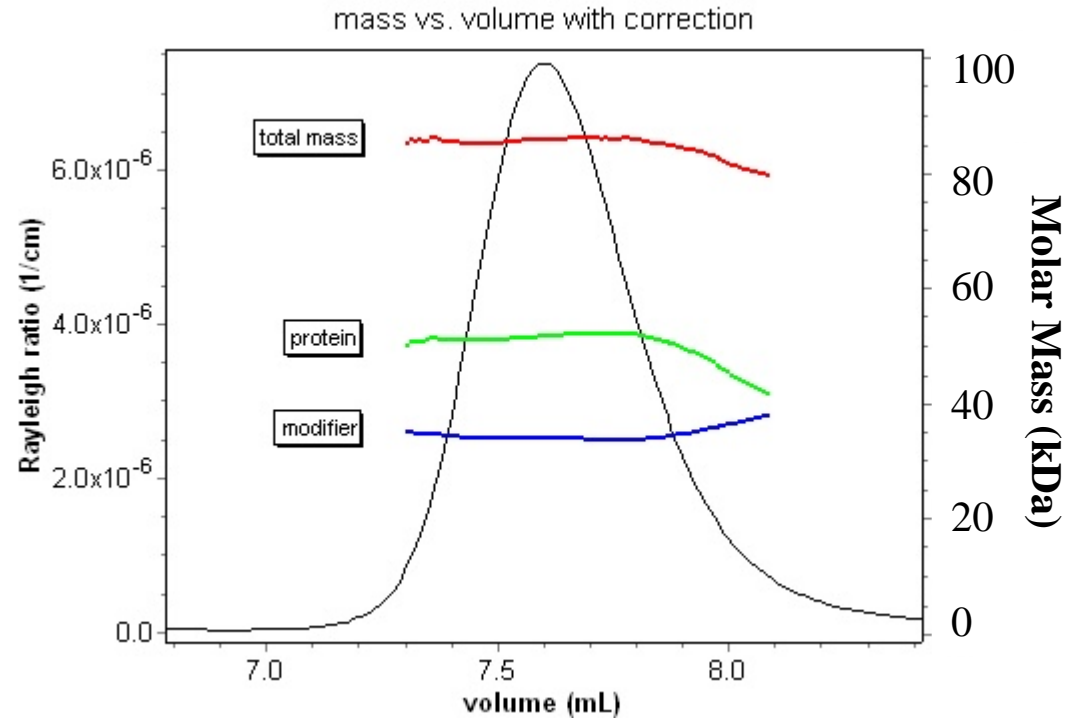
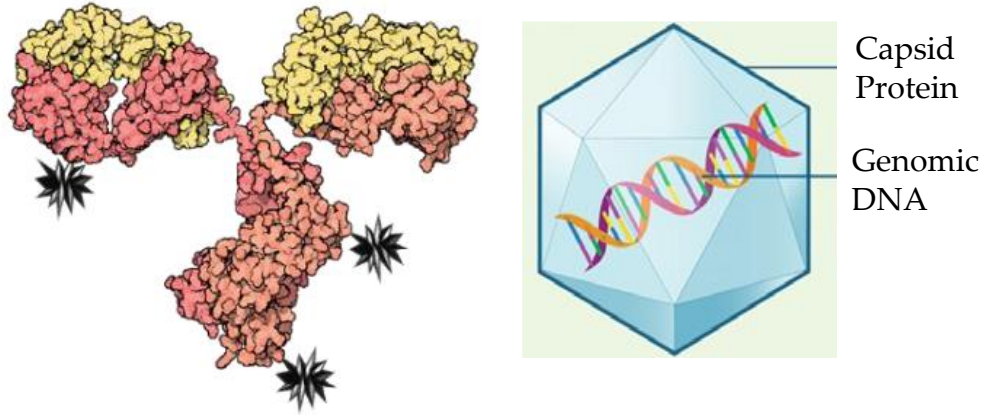
BSAの測定例 (SEC-MALS)



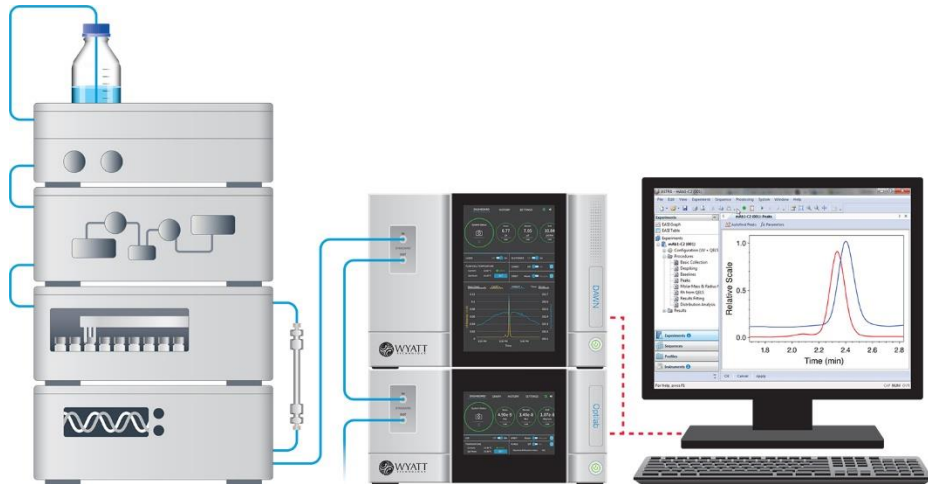
点線は光散乱、実線はUV検出器

溶液中の蛋白質会合体を検出し、正確な分子量を測定可能

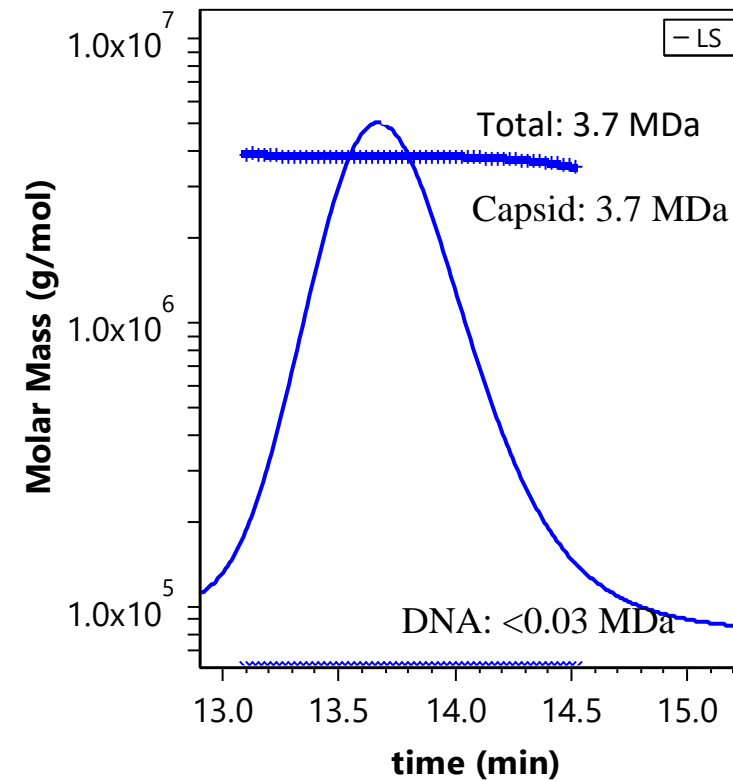
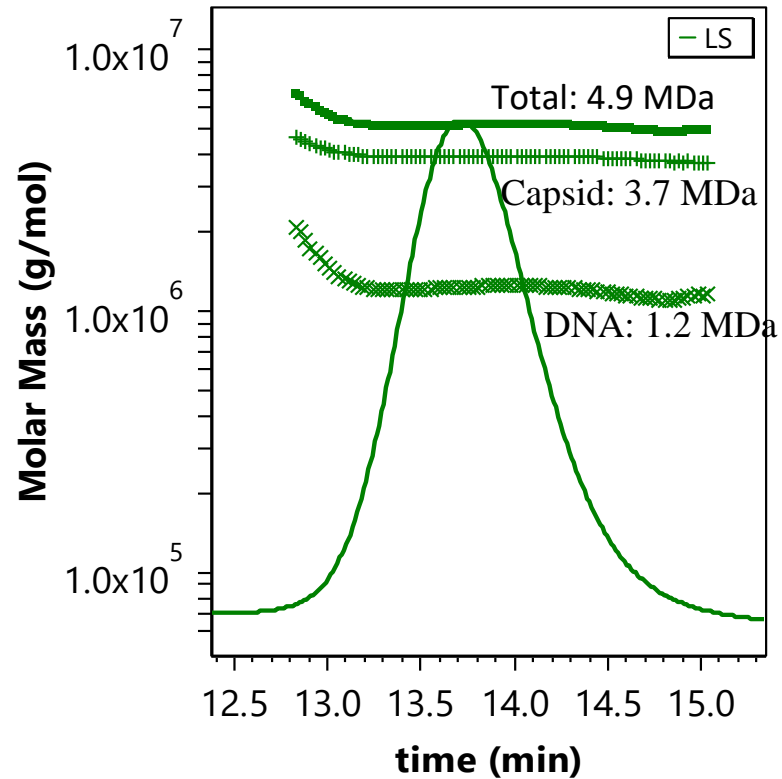
SEC-MALS-UV-RI検出法による蛋白質複合体の解析



MALS-UV-RI検出を行うことで蛋白質複合体の正確な分子量とその組成比を知ることができる



蛋白質複合体分析: AAV (protein-DNA conjugate)



- カプシド、カプセル化されたDNA、AAV粒子全体の分子量を決定できます。

AAV 粒子個数濃度の計算

$$C_{\text{capsid}} \text{ [個数/mL]} = m_{\text{capsid}} \text{ [g]} \times N_A \text{ [個数/mol]} / (M_{\text{capsid}} \text{ [g/mol]} \times v \text{ [mL]})$$

$$C_{\text{full}} \text{ [個数/mL]} = m_{\text{DNA}} \text{ [g]} \times N_A \text{ [個数/mol]} / (M_{\text{DNA}} \text{ [g/mol]} \times v \text{ [mL]})$$

C_{capsid} Total AAV capsid particle concentration (個数/mL)

m_{capsid} capsid mass

M_{capsid} capsid molar mass

C_{full} Full capsid particle concentration (個数/mL)

m_{DNA} DNA mass

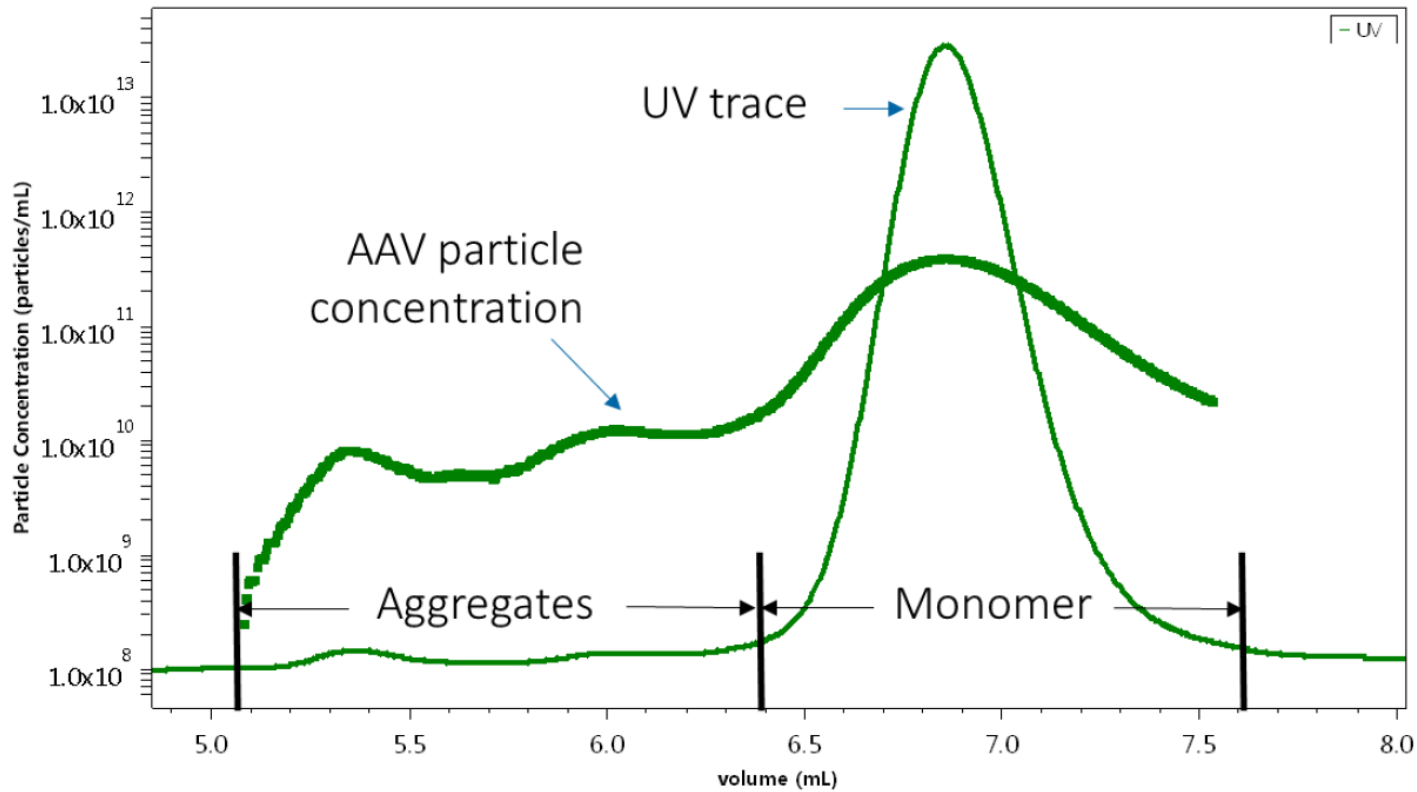
M_{DNA} DNA molar mass

v Injection volume

N_A Avogadro's number

Assumption: 100% mass recovery.

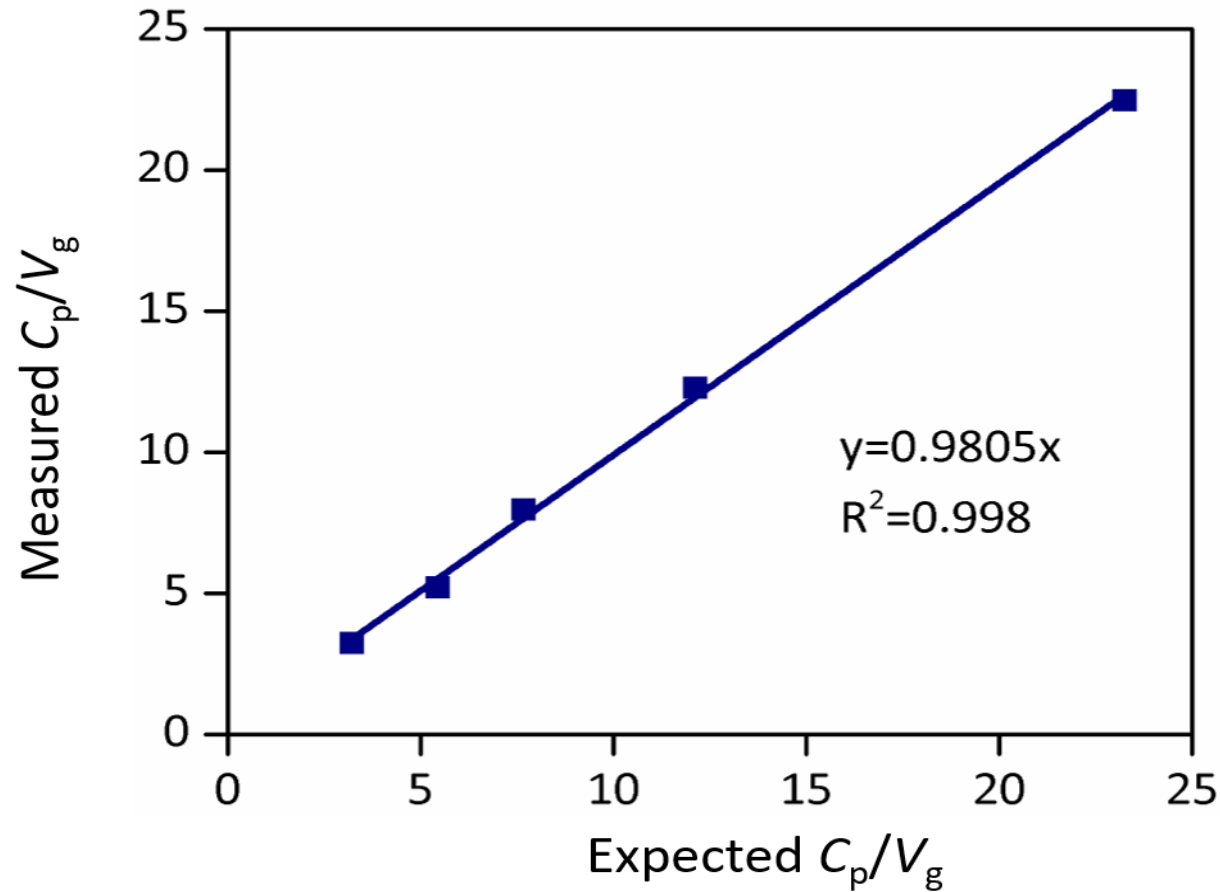
AAV 凝集体の定量



	Concentration [particles/mL]	Content [%]
Monomer	4.22×10^{13}	94.6
Aggregates	0.24×10^{13}	5.4
Total	4.46×10^{13}	100

- MALSの光散乱強度と角度依存性から各スライスごとの粒子個数を計算.
- モノマーと凝集体を定量
- より大きな凝集体には、FFF-MALS がより有効.

AAV 核酸内包率 (C_p/V_g or total/full)



C_p : capsid particle concentration
(total AAV)

V_g : viral genome particle concentration
(full AAV alone)

- ・ 理論的な数値に近い結果が得られた。
- ・ AUCの結果とも相関が得られた

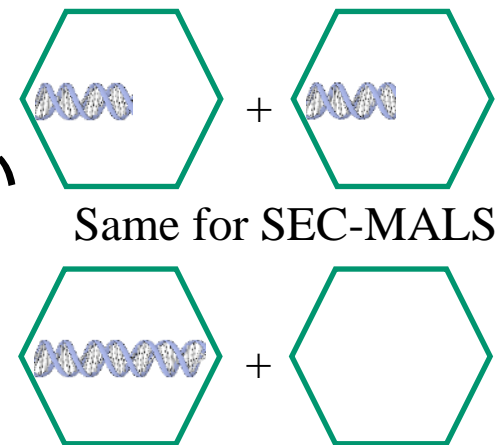
SEC-MALSによるAAVの重要品質特性（まとめ）

利点

- ✓ 試薬&ラベルフリー、非破壊、簡便、迅速 (5-30 minutes), 自動化が可能
- ✓ 校正不要、全ての血清型に同じ分析法を使用可能
- ✓ 粒子個数濃度、カプシド含有量、凝集体の定量、分子量、分子サイズを一度の測定で得られる
- ✓ 高い正確性と再現性、感度： 10^{11} particles/mL

課題

- 空とフルのAAV混合品と部分的なAAVを区別できない
- SECカラムからの回収率が100%と仮定



scientific reports

 Check for updates

OPEN

Comprehensive characterization and quantification of adeno associated vectors by size exclusion chromatography and multi angle light scattering

Nicole L. McIntosh, Geoffrey Y. Berguig, Omair A. Karim, Christa L. Cortesio, Rolando De Angelis, Ayesha A. Khan, Daniel Gold, John A. Maga & Vikas S. Bhat[✉]

Adeno associated virus (AAV) capsids are a leading modality for in vivo gene delivery. Complete and precise characterization of capsid particles, including capsid and vector genome concentration, is necessary to safely and efficaciously dose patients. Size exclusion chromatography (SEC) coupled to multiangle light scattering (MALS) offers a straightforward approach to comprehensively characterize AAV capsids. The current study demonstrates that this method provides detailed AAV characterization information, including but not limited to aggregation profile, size-distribution, capsid content, capsid molar mass, encapsidated DNA molar mass, and total capsid and vector genome titer. Currently, multiple techniques are required to generate this information, with varying accuracy and precision. In the current study, a new series of equations for SEC-MALS are used in tandem with intrinsic properties

FFF - MALS - DLSシステム

送液ポンプ、
脱気装置

オートサンプラー

UV/VIS検出器

FFF分離チャンネル



多角度光散乱検出器

DAWN

DLSモジュールQELS

(内蔵型)

示差屈折率検出器

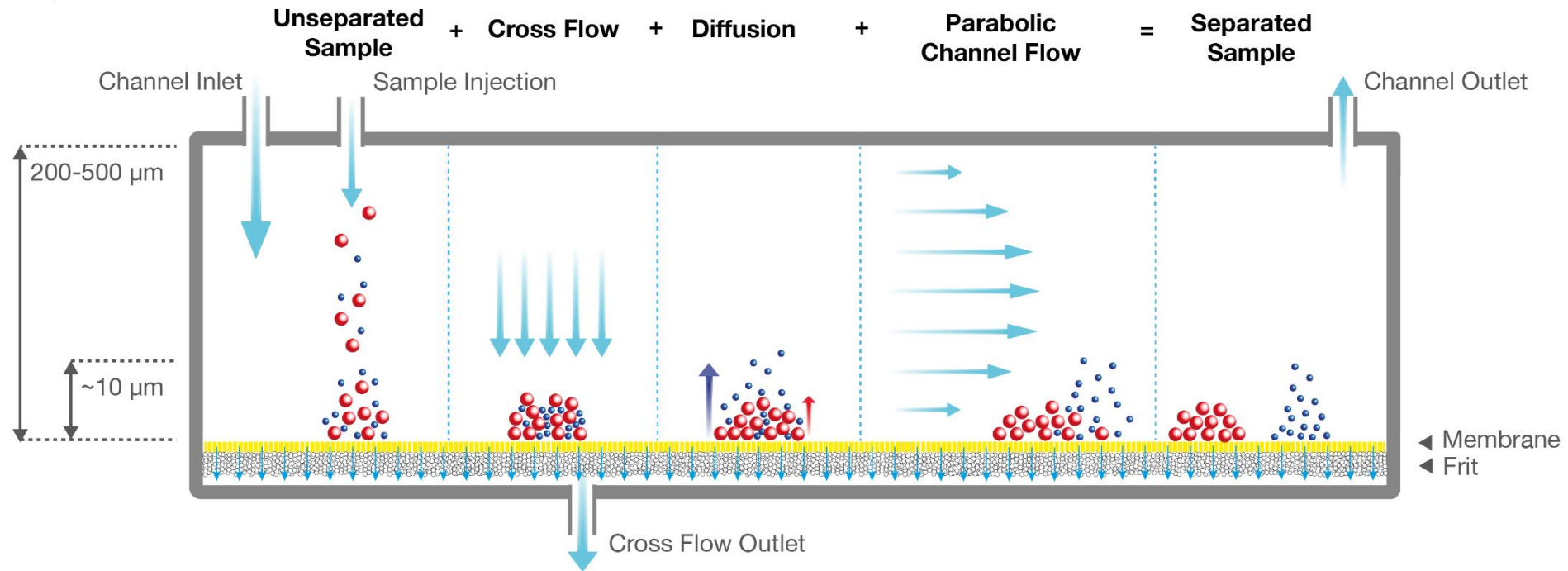
Optilab

FFF本体

Eclipse

SECとの切り替えも可能

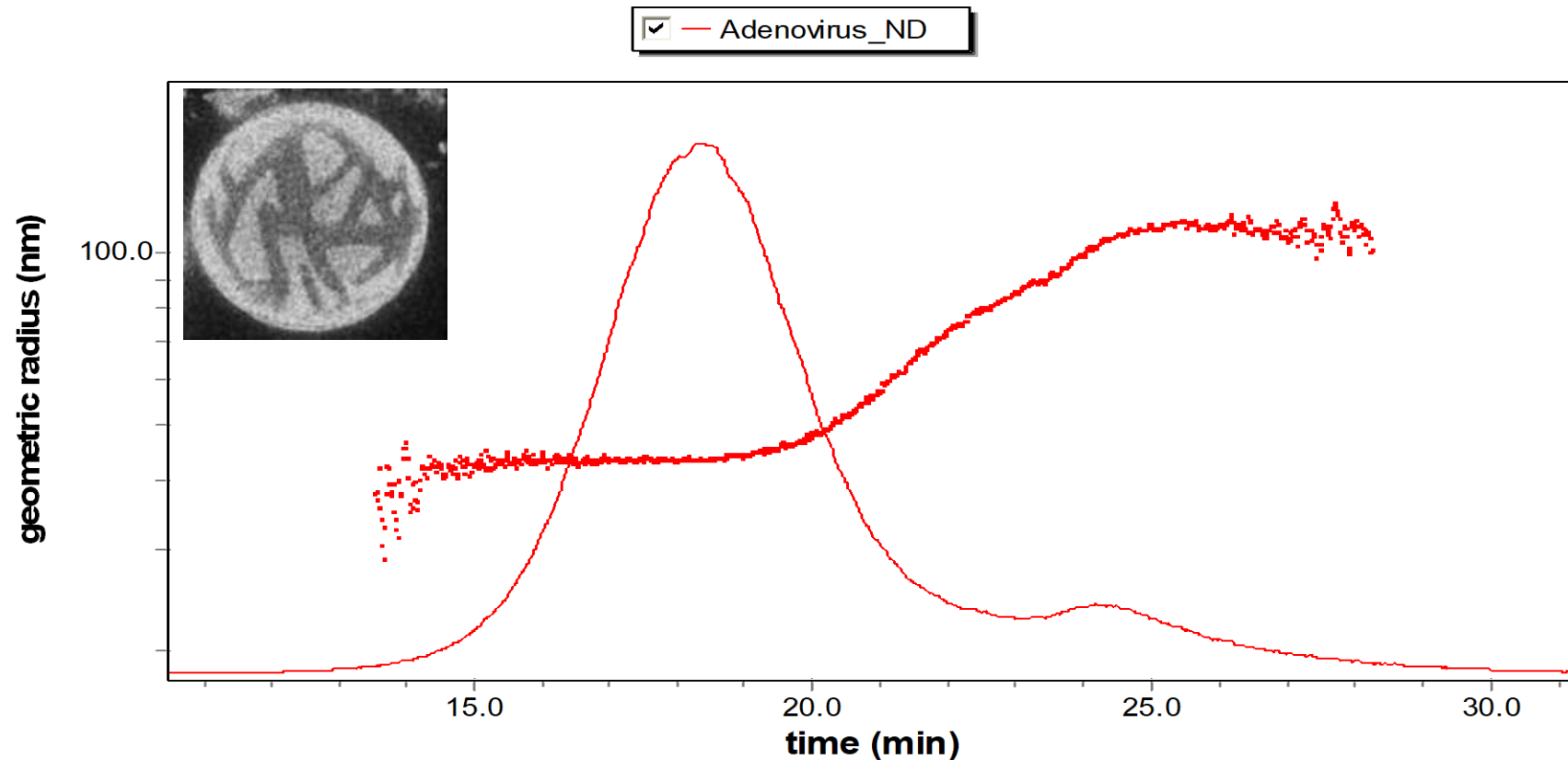
How does FFF work?



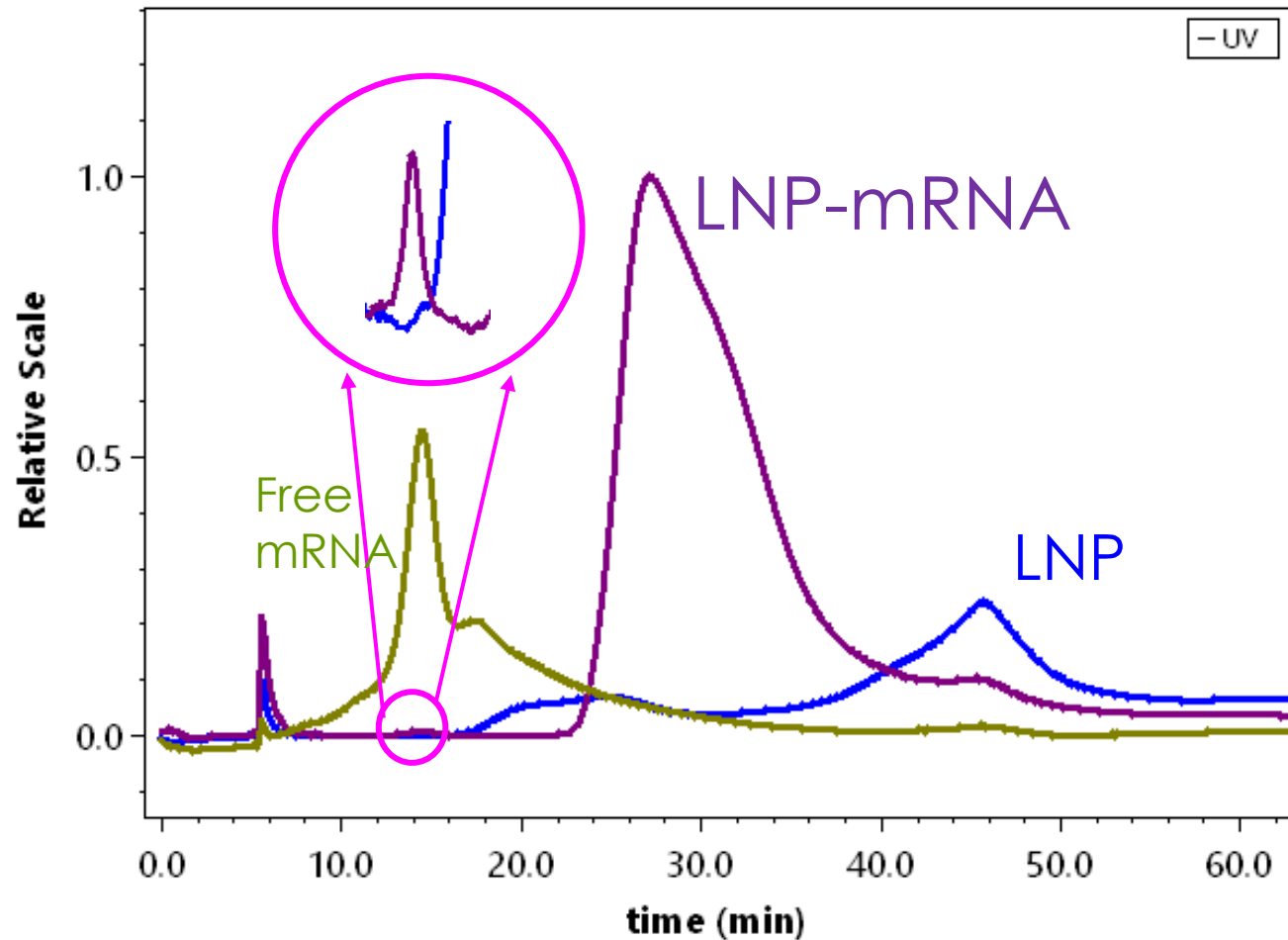
アデノウイルスの粒子径および粒子個数測定

Parameter	Actual	Measured	% Error
Total Particle Count	2.9×10^{10}	2.79×10^{10}	1.9
Average Radius	43.0	45.0	4.7

geometric radius vs. time



フリーRNAと脂質ナノ粒子-RNA複合体の分離測定から RNA取り込み率を計算

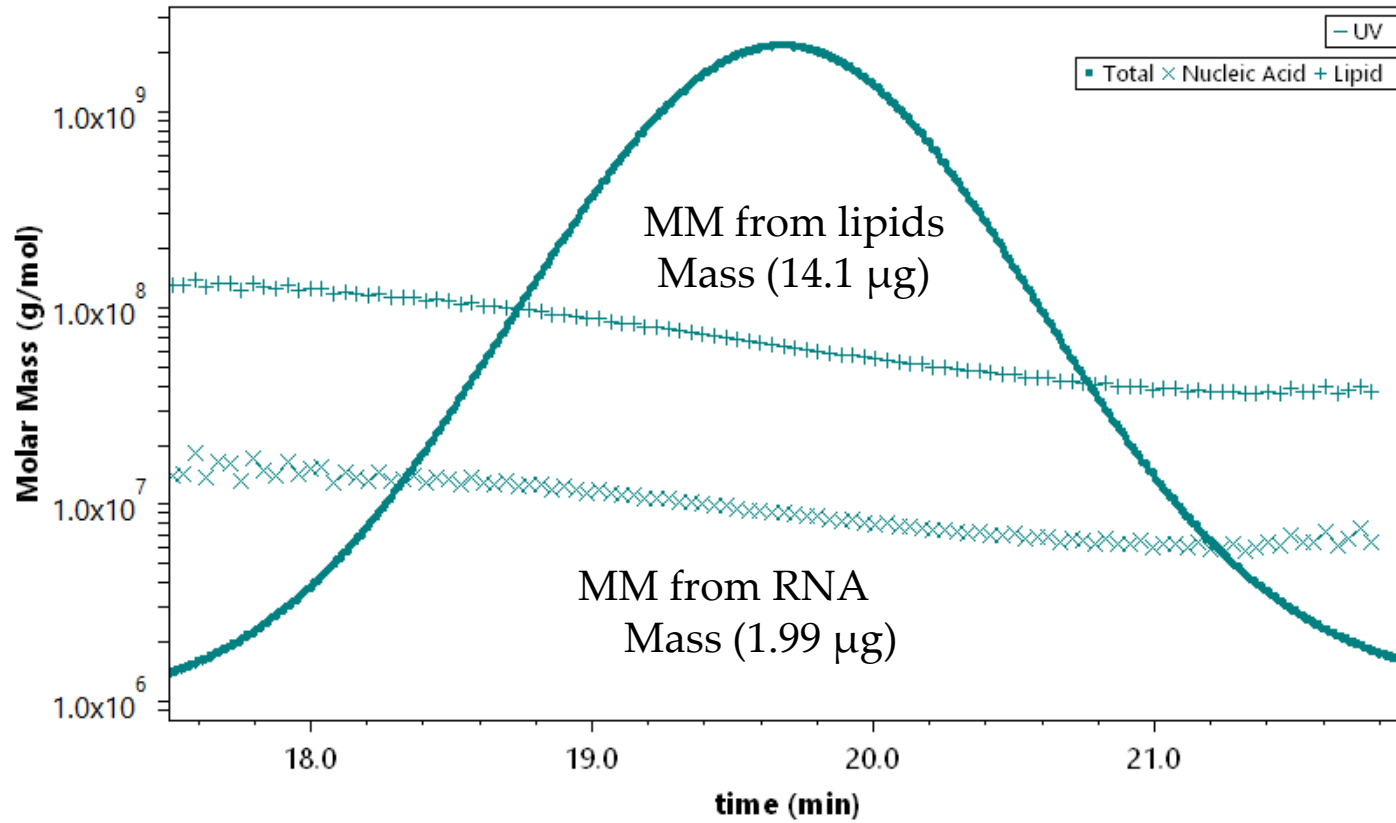


Encapsulation efficiency (EE)

$$EE = (C_{\text{Total RNA}} - C_{\text{Free RNA}}) / C_{\text{Total RNA}}$$

各々を分離し、MALSで検出することにより、
分子量、分子サイズ、分子形状を求められます

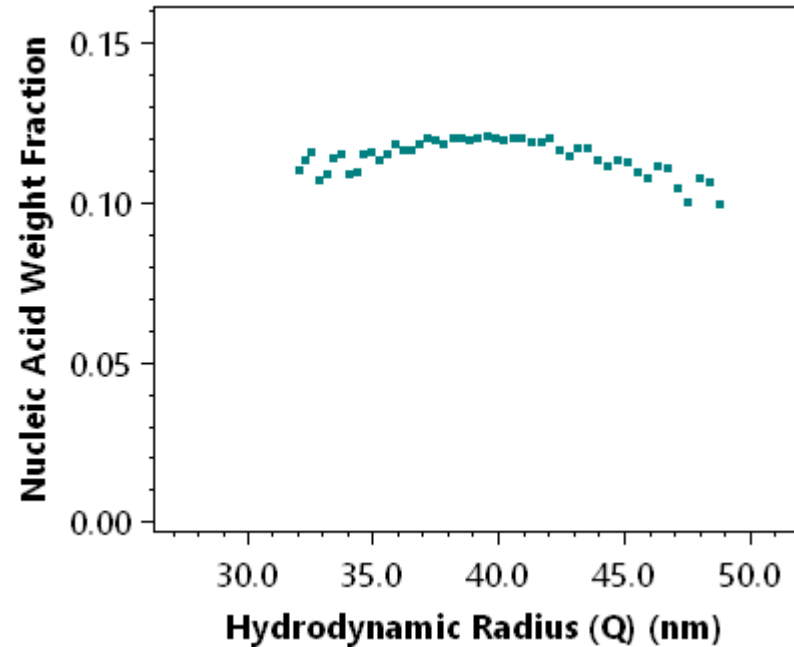
新LNP解析ソフトウェアによる核酸が内包されたLNPの測定



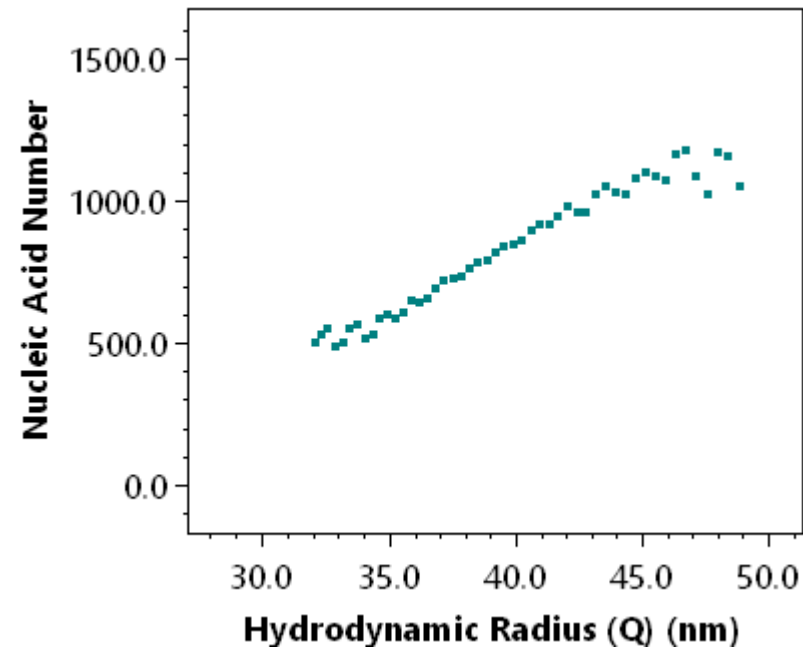
脂質とRNAの重量濃度だけでなく、
分子量、粒子径も得られます

新LNP解析ソフトウェアによる核酸が内包されたLNPの測定 2

流体力学的半径 vs. 核酸の重量分率



流体力学的半径 vs. 核酸の数



	Mw (Nucleic Acid) (kDa)	Lipid Concentration (mg/ml)	Nucleic Acid Concentration (mg/ml)	Encapsulation Efficiency (%)	Nucleic Acid Number
F1a)	12778.2 ($\pm 0.5\%$)	10.67	1.42	97.8	819.1 ($\pm 0.5\%$)
F2a)	8805.0 ($\pm 1.3\%$)	7.36	0.97	96.8	564.4 ($\pm 1.3\%$)
F3a)	13180.6 ($\pm 0.9\%$)	7.95	1.07	97.5	844.9 ($\pm 0.9\%$)

LNP分析参考論文

• PMID: 34741934

• DOI: [10.1016/j.jchromb.2021.123015](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123015)

Journal of Chromatography B 1186 (2021) 123015



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jchromb



Enabling online determination of the size-dependent RNA content of lipid nanoparticle-based RNA formulations



Xiujuan Jia^{a,*}, Yong Liu^a, Angela M. Wagner^b, Michelle Chen^c, Yuejie Zhao^a,
Katelyn J. Smith^d, Dan Some^c, Andreas M. Abend^a, Justin Pennington^a

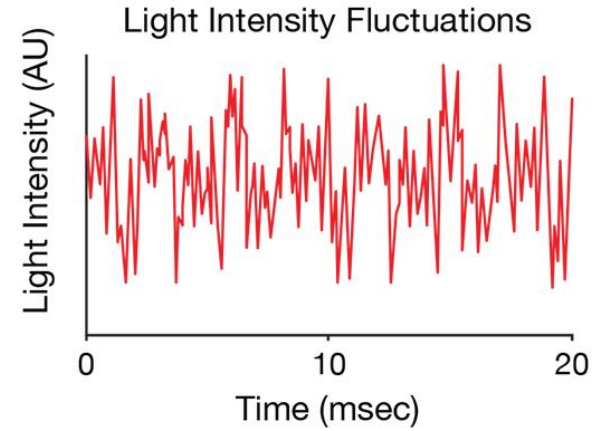
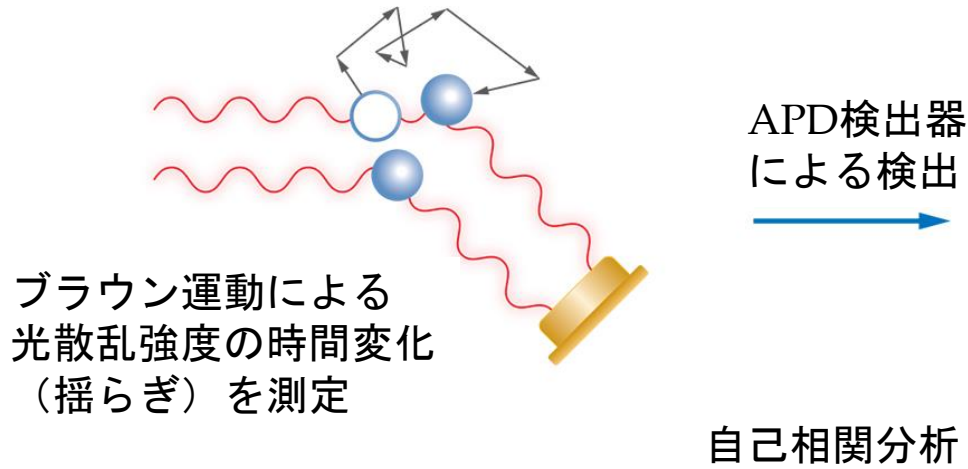
^a Analytical Sciences, Analytical Research and Development, MRL, Merck & CO., Inc., Rahway, NJ, USA

^b Sterile and Specialty Products, Pharmaceutical Sciences, MRL, Merck & CO., Inc., Kenilworth, NJ, USA

^c Wyatt Technology Corporation, Goleta, CA, USA

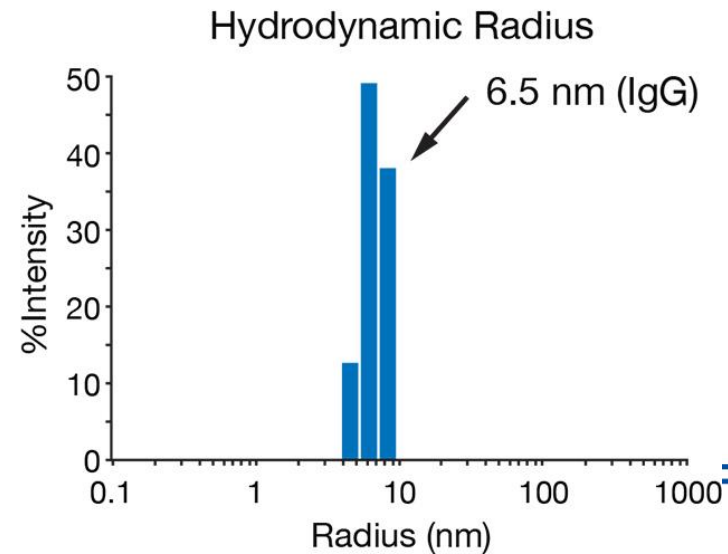
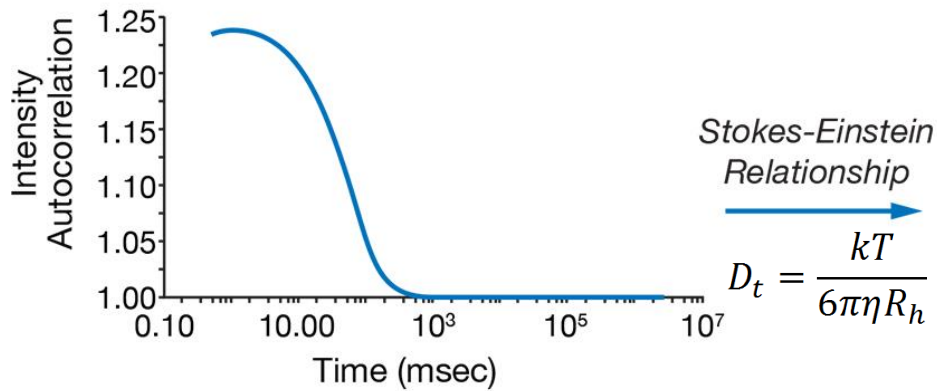
^d Preformulation, Analytical Research and Development, MRL, Merck & CO., Inc., Kenilworth, NJ, USA

溶液中のナノ粒子の粒度分布測定に、一般的に使用されている手法： 動的散乱測定法の測定原理



自己相関分析

自己相関関数から拡散係数を算出



動的光散乱測定器



バッチ測定モデル：DynaPro NanoStar II

- ✓ タッチパネルによる簡単操作
- ✓ 使い捨て微量（4 μ L容量）セルを使用可能
- ✓ 分子量、粒子個数濃度、濁度測定にも対応



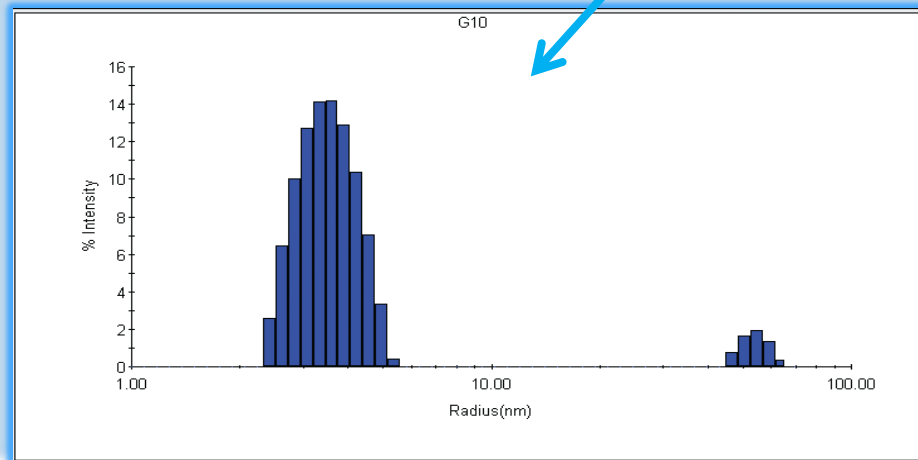
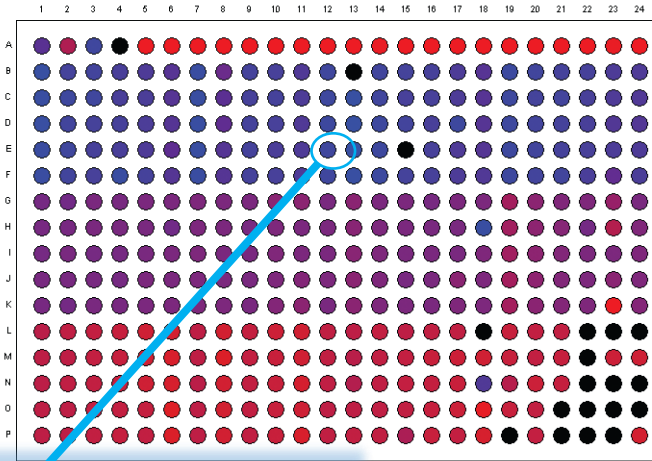
プレートリーダーモデル：DynaPro PlateReader III

- ✓ 市販のマイクロプレートを使用可能
- ✓ ハイスループット測定を実現
- ✓ 測定ウェルの状態をカメラで撮影

プレートリーダー型光散乱測定器 DynaPro PlateReader III の特徴 全自動かつハイスループットスクリーニング

384 wells (25 μ L):

- 5 candidates x
- 5 pH x
- 5 ionic strength x
- 3 replicates +
- 9 controls

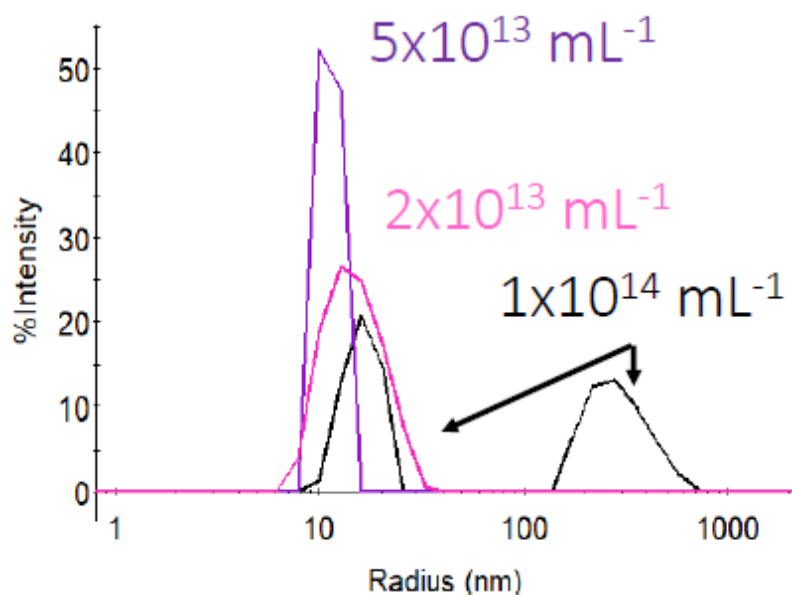


384 wells @ 10 s/well +
motion:
< 1.5 hour!

- Size
- Polydispersity
- Aggregation profile

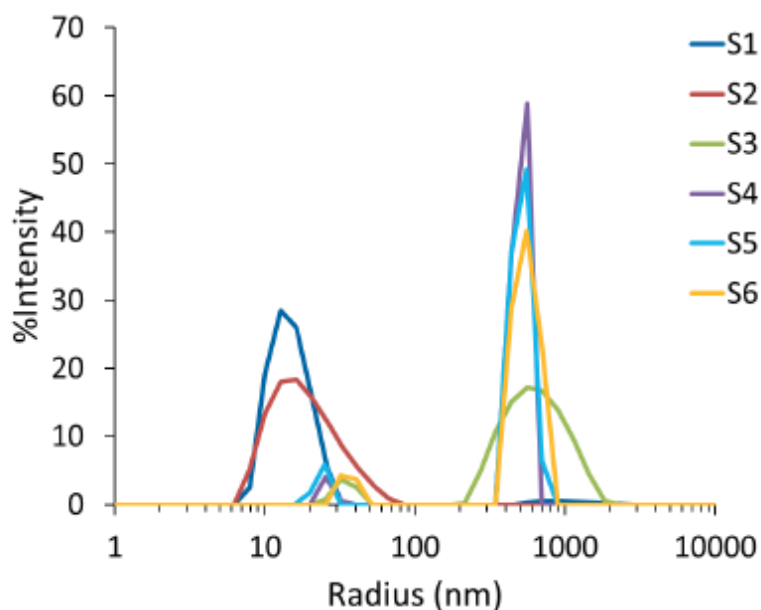
AAV安定性のスクリーニング

Concentration



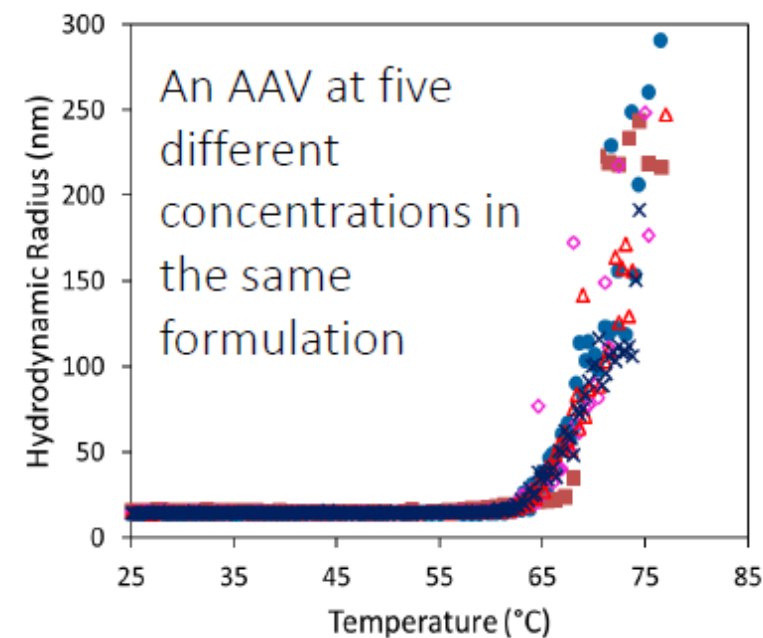
Aggregates appear to dissociate with decrease in concentration.

Buffer additive



Buffer additives affect aggregate size and content.

Temperature



Similar thermal stability:

$$T_{\text{onset}} = 62.5 \pm 0.5 \text{ } ^\circ\text{C}$$

まとめ

- MALS検出器は、SECもしくは、FFFと組み合わせることで、**非破壊で、特別な前処理をすることなく**、LNP及びAAVの分子量分布、粒子径分布、凝集体の検出、核酸内包率、個数濃度を測定できます。
- プレートリーダー型光散乱測定器DynaPro PlateReaderIIIは、ハイスループット光散乱測定を実現し、製剤開発に役立ちます。

ご清聴ありがとうございました。
 ご紹介した装置は、弊社展示ブース
 (39-34) にて、ご覧いただけます。

