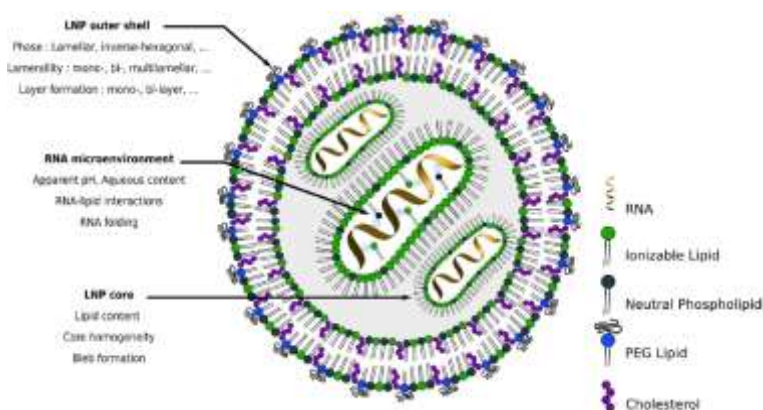


脂質ナノ粒子(LNP)の SEC 分析はこれで決まり！

(文献紹介) TSKgel G6000PW_{XL}-CP カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーによる分離



2018 年に初めて脂質ナノ粒子 (LNP) を用いた siRNA を送達する核酸医薬品が承認されました。そして最近では、新たな脂質成分や製造法などの開発により、SARS-CoV-2 ウイルスに対するワクチンとして mRNA を送達する LNP による医薬品が承認されています。その LNP の模式図、イメージ図を以下に示します。



LNP (脂質二重層型) (引用；S. Daniel ら、文献 1)



Figure 1.
Lipid-based particles such as lipid nanoparticles (LNPs) are the most used delivery method for mRNA therapeutics and vaccines.

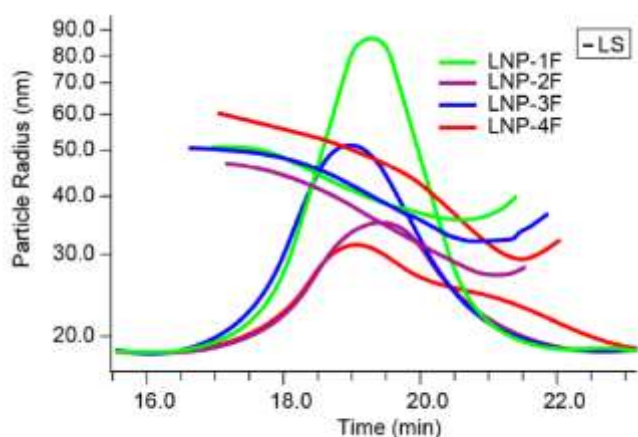
mRNA-LNP (引用；C. Widmann、文献 2)

●文献紹介

X. Jia et al., Enabling on-line determination of the size-dependent RNA content of lipid nanoparticle-based RNA formulations, J. Chromatogr. B, 1186 (2021) 123015, CC BY NC ND,

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123015>

著者らは、LNP の大きさと mRNA 含有量 (payload) が、薬効および副作用を理解するのに重要であると考え、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を用い、紫外 (UV) 吸光度計、示差屈折 (RI) 計、および多角度光散乱検出器 (MALS) に動的光散乱 (DLS) 検出器を直結することにより、オンラインでの LNP の粒子径の分析を行いました。mRNA を送達する LNP は、表面に正電荷を持つカチオン性 LNP であり、カチオン性高分子の分離に適した SEC カラム TSKgel G6000PW_{XL}-CP を用いて、半径 30~70 nm の各種の LNP を良好に分離できました (下図)。また SEC によるオンライン分析はオフライン分析結果と良く一致しており、mRNA 含有量は、LNP の PEG 修飾脂質含量に影響されることがわかりました。



分析条件

カラム ; TSKgel G6000PW_{XL}-CP (7.8 mm I.D. x 30 cm)
 溶離液 ; PBS
 流速 ; 0.5 mL/min
 検出 ; MALS (90°)
 動的光散乱 (DLS) 検出器をMALSに接続し、
 流体力学的半径 (Rh) をオンラインで算出
 温度 ; 35 °C
 試料 ; LNP-1, LNP-2, LNP-3, LNP-4 (~20 µg)
 (LNPはそれぞれ脂質の組成が異なる)
 備考 ; 21分以降の溶出成分については、粒子径が大きく算出されており
 カラムと相互作用をしているLNPが微量含まれることが示唆され、
 LNP中の RNA含量の定量では除外されている
 LNP中のRNA含量はSECのフラクションをオフラインで
 イオンペアー逆相クロマトグラフィー (IP-RPC) で定量した

Fig. 2. Particle radius plots overlaid on the corresponding 90° light scattering chromatogram of the four LNP-RNA samples.

図. TSKgel G6000PW_{XL}-CP による mRNA-LNP の分離 (引用；X. Jia ら、文献 3)

●主な SEC カラムと LNP やリポソームの SEC 分析での分画範囲

カチオン性 LNP

	分画範囲 (推定値)
TSKgel G6000PW _{XL} -CP	; 直径 60~140 nm までの LNP
TSKgel G5000PW _{XL} -CP	; 直径 20~100 nm までの LNP

非カチオン性 (中性、アニオン性) の LNP、リポソーム

	分画範囲 (推定値)
TSKgel G-DNA-PW*、G6000PW _{XL}	; 直径 60~140 nm (最大 200 nm**) までの LNP
TSKgel G5000PW _{XL}	; 直径 20~100 nm までの LNP

* TSKgel G-DNA-PW (10 μm) は、TSKgel G6000PW_{XL} (13 μm) の微粒子充填剤を使用したカラムです

**TSKgel G6000PW によるリポソーム分析に関する総説: C. Grabielle-Madelmont et al., Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography, J. Biochem. Biophys. Methods 56 (2003) 189-217, [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(03\)00059-9](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(03)00059-9)

●TSKgel G6000PW_{XL}-CP を用いた LNP の分析、ウイルス様粒子 (VLP) 分離に関する文献、技術資料

1. S. Daniel et al., Quality by design for enabling RNA platform production processes, Trends in Biotechnology, 2022, ISSN 0167-7799, CC BY <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.03.012>
2. C. Widmann [white paper] Regulatory consideration for excipients used in lipid nanoparticles, Bioprocess International, by BPI contributor, Thursday June 9, 2022
3. X. Jia et al., Enabling online determination of the size-dependent RNA content of lipid nanoparticle-based RNA formulations, J. Chromatography B, 1186 (2021) 123015, CC BY NC ND, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123015>
4. J. Zhang et al., Polydispersity characterization of lipid nanoparticles for siRNA delivery using multiple detection size-exclusion chromatography, Anal. Chem., 84 (2012) 6088-6096, <https://doi.org/10.1021/ac3007768>
5. 東ソー、セパレーションレポート No. 106、カチオン性ポリマー用水系 SEC カラム TSKgel PW_{XL}-CP シリーズについて
6. 東ソー、テクニカルノート (TSKgel®, TOYOPEARL®) No. 14、ウイルス関連医薬品のクロマト分析・分離はこれで決まり!
7. 東ソー、テクニカルノート (TSKgel®, TOYOPEARL®) No. 15、ウイルスベクターのクロマト分析・分離はこれで決まり!
8. 東ソー、テクニカルノート (TSKgel®) No. 22、細胞外小胞 (EVs) の SEC 分離はこれで決まり!

※たんぱく質、ペプチド、核酸等の SEC 分析に関する技術資料は、弊社ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/litjp> からアクセスできます

●TSKgel PW_{XL}-CP カラムシリーズ一覧表

品番	品名	粒子径	カラムサイズ	排除限界分子量*
0021873	TSKgel G3000PW _{XL} -CP	7 μm	7.8 mm I.D. x 30 cm	9 x 10 ⁴
0021874	TSKgel G5000PW _{XL} -CP	10 μm	7.8 mm I.D. x 30 cm	1 x 10 ⁶
0021875	TSKgel G6000PW _{XL} -CP	13 μm	7.8 mm I.D. x 30 cm	2 x 10 ⁷ (推定)
0021876	TSKgel guardcolumn PW _{XL} -CP	-	6.0 mm I.D. x 4 cm	-

出荷時溶媒: 0.1 mol/L 硝酸ナトリウム

*ポリエチレンオキシド



※ “TSKgel”、“TOYOPEARL” 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