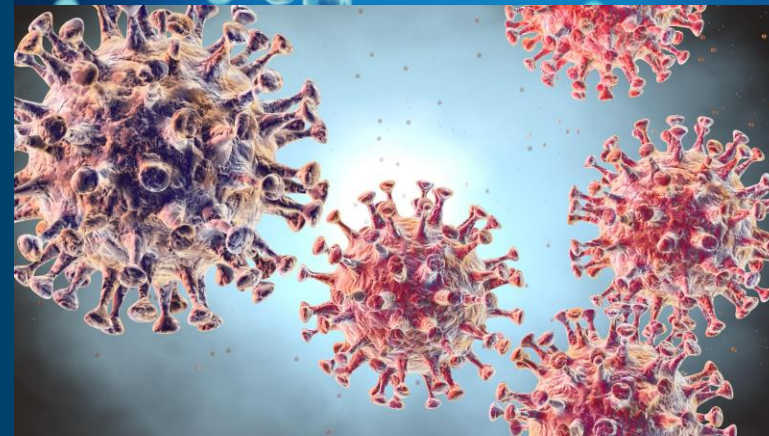
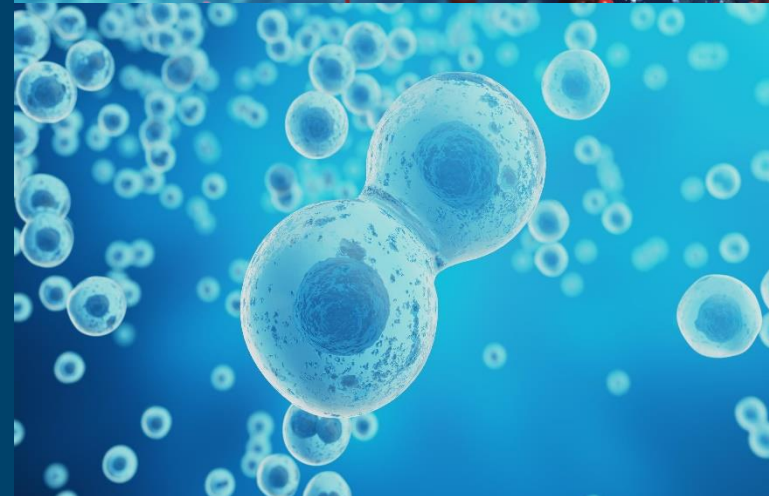
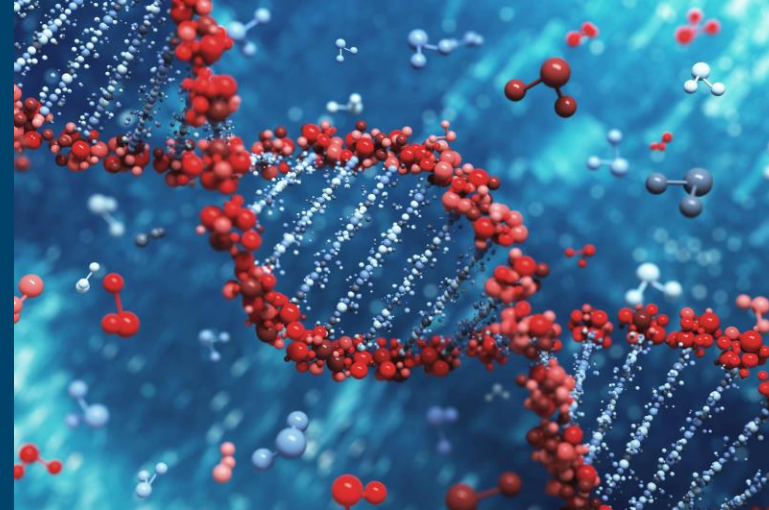


Agilentが提供するmRNAワクチン 特性評価の最新ソリューションについて

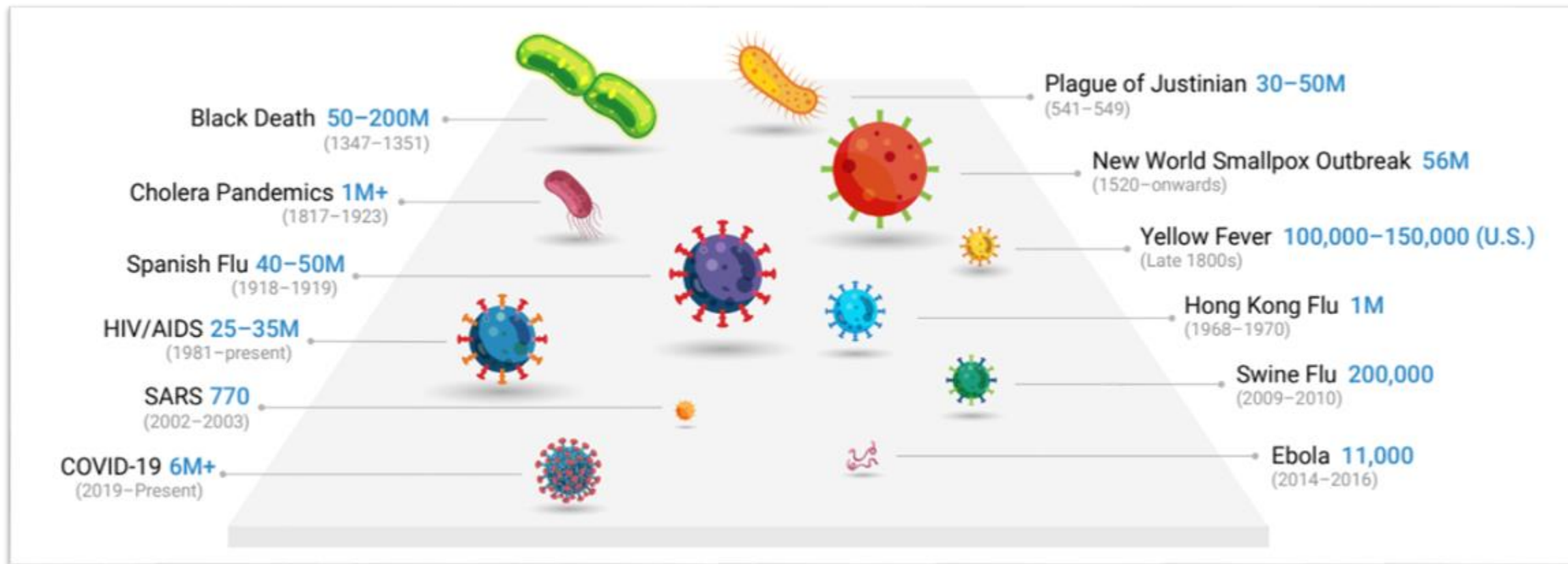
アジレント・テクノロジー株式会社
ラボラトリーソリューション本部
バイオフィーマ営業担当 須澤祥貴



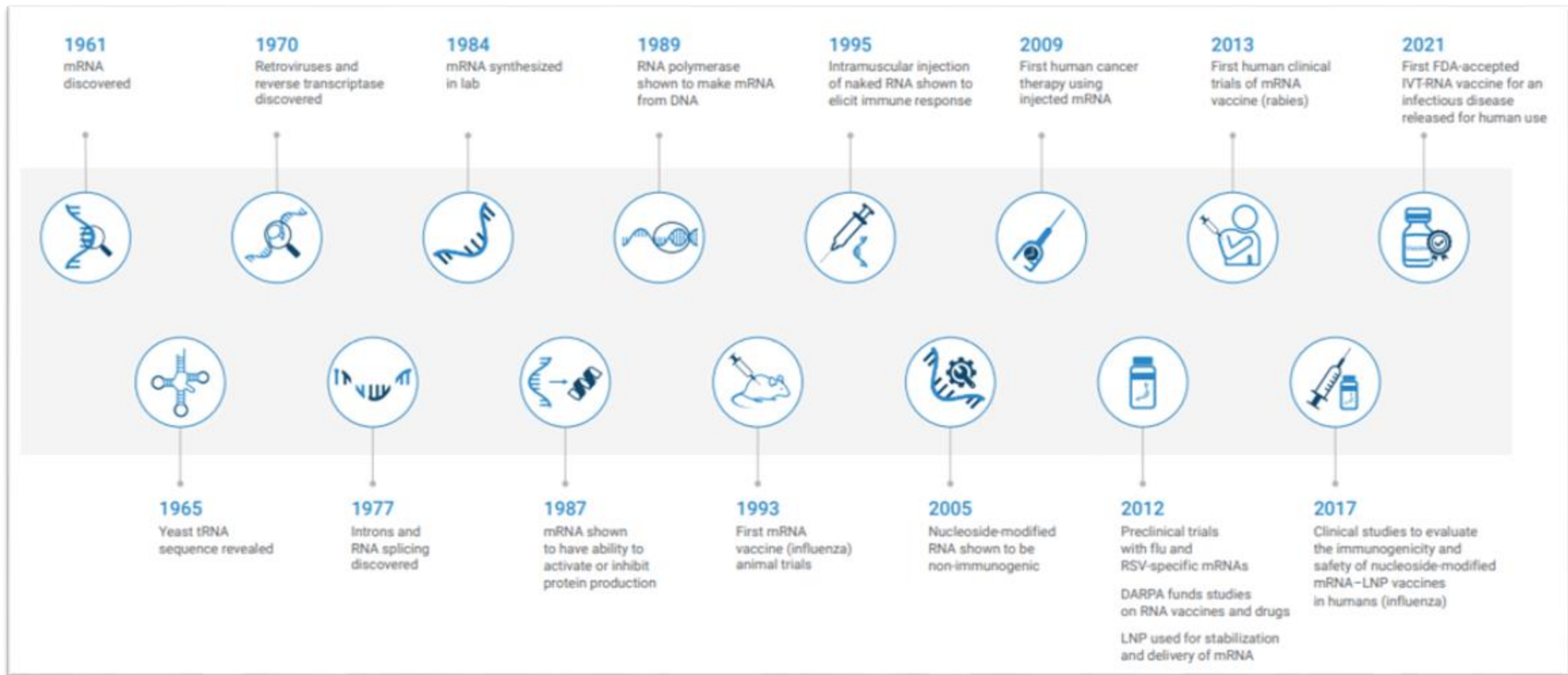
本日のアジェンダ

1. mRNAとは？
2. mRNA分析レギュレーション(USPガイドラインドラフト)
3. 分析事例(AGC様とのコラボレーション)
4. Agilent分析機器ソリューション紹介

感染症発生の歴史と死者数



mRNA研究の主な進歩



mRNAドラッグモダリティとは？

mRNA は、さまざまな病状に対するワクチンおよび治療薬としてますます開発されています。



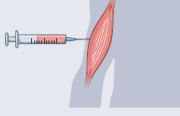
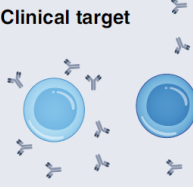
コロナウイルス病 2019 (COVID-19) に対する mRNA ワクチンの驚異的な成功により、治療用タンパク質を送達する手段として mRNA への関心が再燃しています。

mRNA 治療薬の初期の臨床試験には、心不全に対するパラクリン血管内皮増殖因子 (VEGF) mRNA および先天性肝臓特異的蓄積症に対する CRISPR-Cas9 mRNA の研究が含まれます。

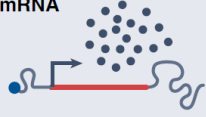
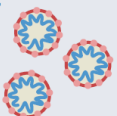
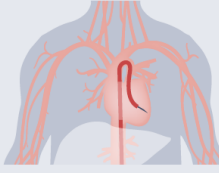

ただし、mRNA が希少疾患と一般疾患の両方に広く関連する一般的な治療法として確立される前に、対処すべき一連の課題が残っています。

これらの課題を克服するために、一連の新しい技術が開発されています。これには、mRNA カargoを最適化するアプローチ、固有の組織向性を備えた脂質キャリア、および in vivo 経皮送達システムが含まれます。

mRNAワクチン

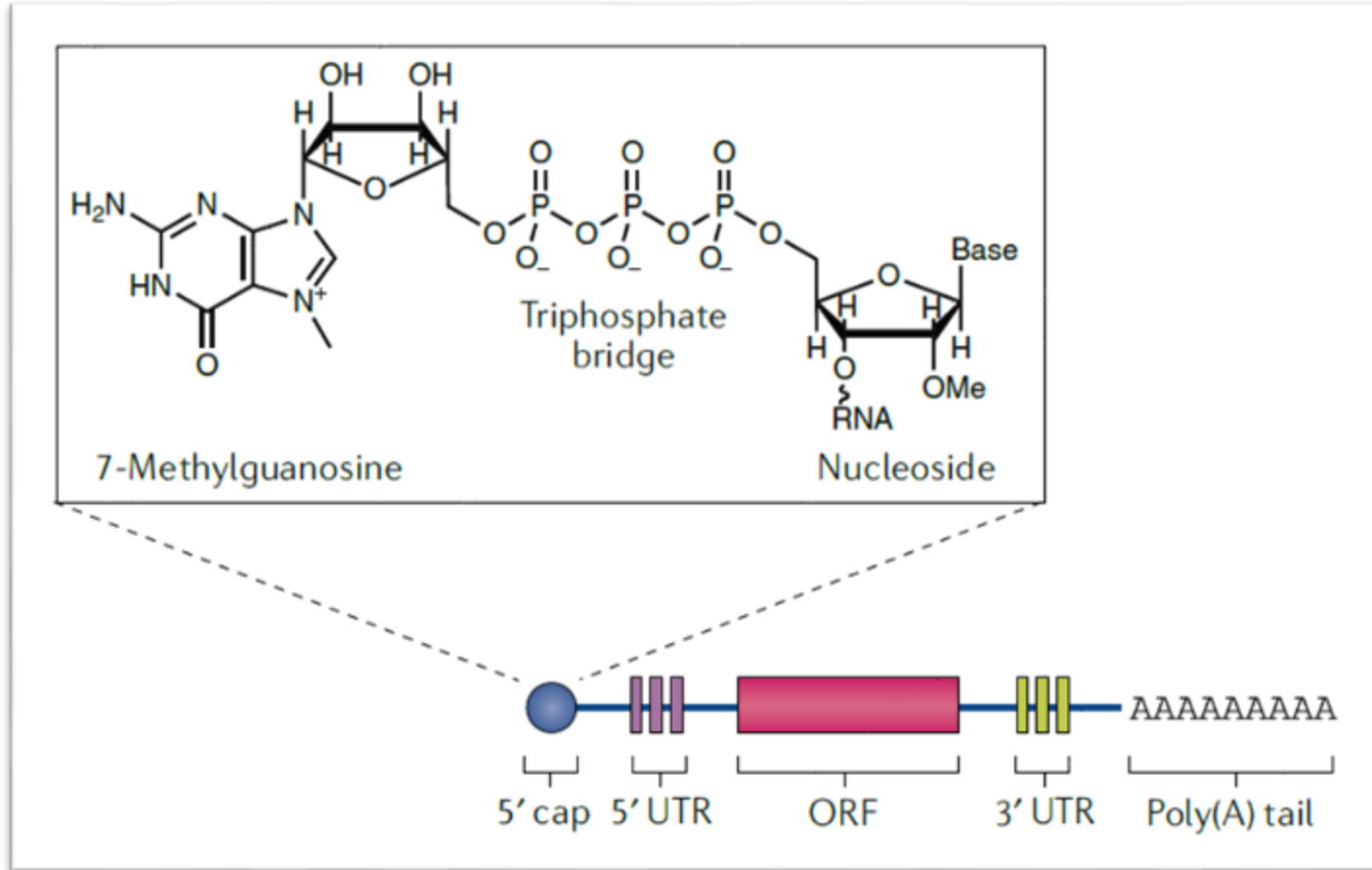
mRNA 	<ul style="list-style-type: none">• Low protein expression• Immunogenicity favorable
Carrier 	<ul style="list-style-type: none">• Protection against RNase• No tropism necessary• Adjuvant immunogenic capacity
In vivo delivery 	<ul style="list-style-type: none">• Local intramuscular delivery• Low mRNA dosage• Low toxicity risks
Clinical target 	<ul style="list-style-type: none">• Immune protection• Circulating antibodies• Immune memory

mRNA治療薬

mRNA 	<ul style="list-style-type: none">• Prolonged mRNA stability• High protein expression• Minimization of immunogenicity
Carrier 	<ul style="list-style-type: none">• Protection against RNase• Cell- or tissue-specific tropism• Immune cloaking
In vivo delivery 	<ul style="list-style-type: none">• Solid organ direct delivery• Systemic delivery (liver)• High mRNA dosage• High delivery efficiency• Higher toxicity risks
Clinical target 	<ul style="list-style-type: none">• Enzyme replacement• Solid cancer• Tissue regeneration• Gene editing• Antibody therapy

In vitro 転写(IVT) mRNA とは何ですか？

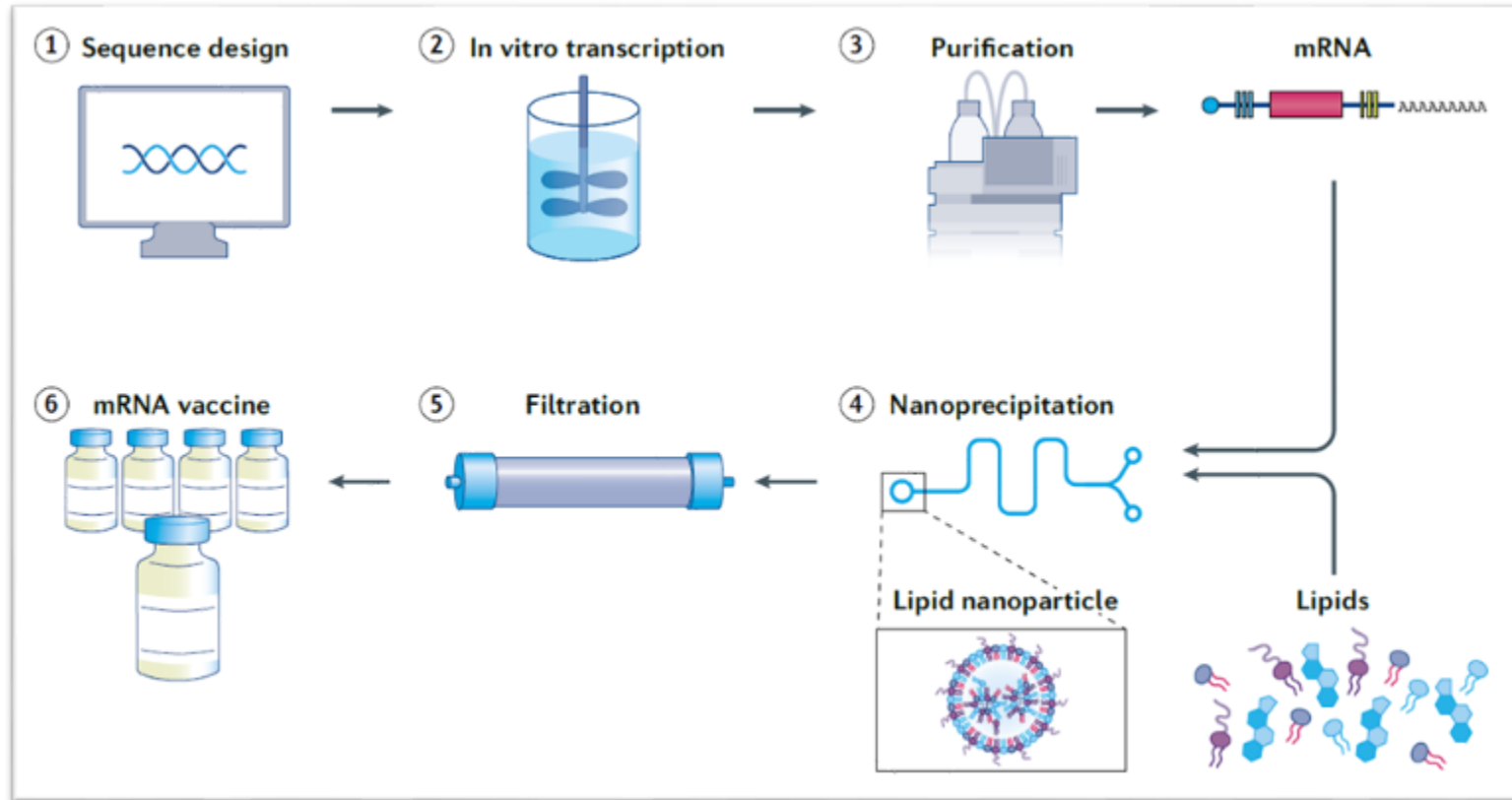
IVT mRNA は、T7、T3、または Sp6 ファージ RNA ポリメラーゼを使用して線形 DNA テンプレートから生成されます。



結果として得られる製品には、5つの構造要素が最適に含まれている必要があります。

- 目的のタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム (ORF)
- 隣接する 5' および 3' 非翻訳領域 (UTR)
- 三リン酸架橋を介して 2'-O-メチル化ヌクレオシドに結合した 7-メチルグアノシンを含む 5' キャップ
- ポリ(A)テール

mRNAの合成とワクチンへの製剤化



- (1) 病原体のゲノムが配列決定されると、標的抗原の配列が設計され、プラスミド DNA 構築物に挿入されます。
- (2) プラスミド DNA は in vitro でバクテリオファージポリメラーゼによって mRNA に転写されます。
- (3) mRNA 転写産物は、夾雑物や反応物を除去するために HPLC で精製されます。
- (4) 精製された mRNA は、マイクロ流体ミキサーで脂質と混合され、脂質ナノ粒子を形成します。急速な混合により、脂質は瞬時に mRNA をカプセル化し、自己組織化ナノ粒子として沈殿します。
- (5) ナノ粒子溶液を透析またはろ過して、非水性溶媒およびカプセル化されていない mRNA を除去します。
- (6) ろ過された mRNA ワクチン溶液は、滅菌バイアルに保存されます。

mRNA 原薬 (API) のリリースおよび特性評価試験に関する主要な CQA

Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality (USP Draft Guidelines 2nd Edition)

Identity	mRNA sequence identity confirmation	HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING (HTS) Sanger sequencing RT-PCR
Content	RNA concentration	qPCR dPCR UV
Integrity	mRNA intactness	CAPILLARY ELECTROPHORESIS CAPILLARY GEL ELECTROPHORESIS AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS
Purity	5' capping efficiency	RP-LC-MS/MS IP-RP-HPLC
	3' poly(A) tail length	IP-RP-HPLC
	Product related impurities - dsRNA	IMMUNOBLOT ELISA
	Product related impurities - aggregate quantitation	SEC-HPLC
	Product related impurities - percentage of fragment mRNA	RP-HPLC
	Process related impurities-residual DNA template	qPCR
	Process related impurities - quantitation of free/ non-incorporated nucleosides	RP-LC-MS/MS
	Process related impurities - residual T7 RNA polymerase content	ELISA
Potency	Expression of target protein	CELL-BASED ASSAY

Quality	Attribute	Method	
Identity	mRNA sequence identity confirmation	High throughput sequencing (HTS)	
		Sanger sequencing	
		Reverse Transcriptase - PCR (RT-PCR)	
Content	RNA concentration	Quantitative PCR (qPCR)	
		Digital PCR (dPCR)	
		Ultraviolet Spectroscopy (UV)	
Integrity	mRNA intactness	Capillary electrophoresis²	
		Capillary gel electrophoresis (CGE)²	
		Agarose gel electrophoresis	
Purity	5' capping efficiency	Reverse-phase liquid chromatography mass spectrometry (RP-LC-MS/MS)²	
		Ion pair reversed-phase high-performance liquid chromatography (IP-RP-HPLC)	
	3' poly(A) tail length	Ion pair reversed-phase high-performance liquid chromatography (IP-RP-HPLC)	
		Immunoblot	
	Product related impurities - dsRNA	Product related impurities - dsRNA	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
			Size exclusion-high-performance liquid chromatography (SEC-HPLC)²
			Reversed-phase HPLC (RP-HPLC)²
			quantitative PCR (qPCR)
Reverse-phase liquid chromatography mass spectrometry (RP-LC-MS/MS)²			
Process related impurities - residual T7 RNA polymerase content	Process related impurities - residual T7 RNA polymerase content	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	
Potency	Expression of target protein	Cell-based assay	
Safety	Endotoxin	USP <85>	
	Bioburden	USP <61>, <62>, <1115>	
Other	Appearance	USP <790>	
	Residual solvents	USP <467>	
	pH	USP <791>	

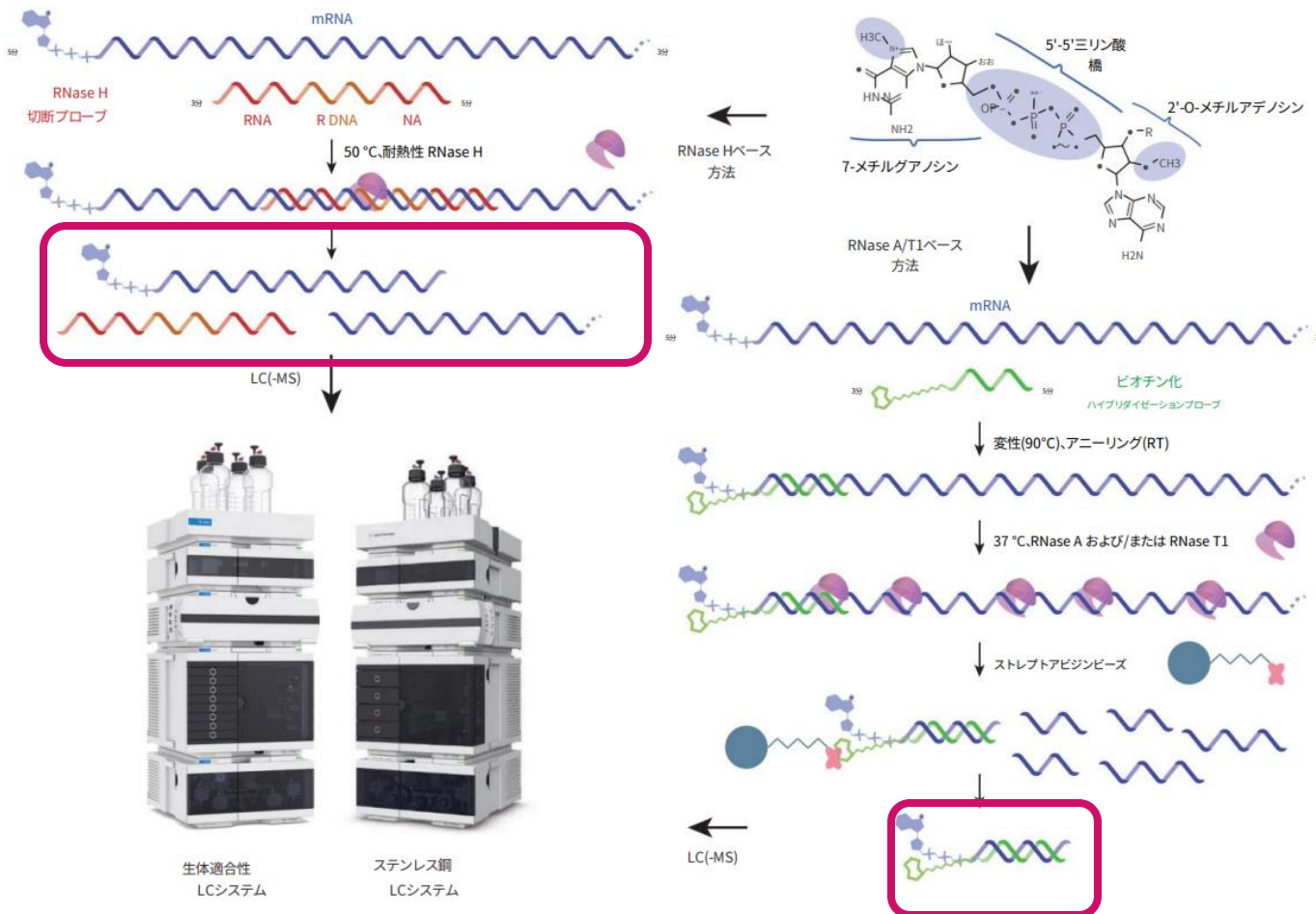
mRNA-LNP 医薬品の放出試験に関する主要な CQA

Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality (USP Draft Guidelines 2nd Edition)

Identity	mRNA sequence identity confirmation	Sanger sequencing
		RT-PCR
	Identity of lipids	RP-HPLC-CAD
Content	RNA concentration/RNA encapsulation efficiency	Fluorescence-based assay
	Lipid content	RP-HPLC-CAD
Integrity	LNP size and polydispersity	DYNAMIC LIGHT SCATTERING
	RNA size and integrity	CAPILLARY GEL ELECTROPHORESIS
Purity	Product related impurities - aggregate quantitation	SEC-HPLC
	Product related impurities - percentage of fragment mRNA	IP-RP-HPLC
Potency	Expression of target protein	CELL-BASED ASSAY

Quality	Attribute	Method
Identity	mRNA sequence identity confirmation	Sanger sequencing
		Reverse Transcriptase - PCR (RT-PCR)
	Identity of lipids	Reversed-phase high-performance liquid chromatography with charged aerosol detector (RP-HPLC-CAD)
Content	RNA concentration/RNA encapsulation efficiency	Fluorescence-based assay
	Lipid content	Reversed-phase high-performance liquid chromatography with charged aerosol detector (RP-HPLC-CAD)
Integrity	LNP size and polydispersity	Dynamic light scattering (DLS)
	RNA size and integrity	Capillary gel electrophoresis (CGE)²
Purity	Product related impurities - aggregate quantitation	Size exclusion-high-performance liquid chromatography (SEC-HPLC)²
	Product related impurities - percentage of fragment mRNA	Ion pair reversed-phase high-performance liquid chromatography (IP-RP-HPLC)²
Potency	Expression of target protein	Cell-based assay
Safety	Endotoxin	USP <85>
	Sterility	USP <71>
Other	Appearance	USP <790>
	Residual solvents	USP <467>
	Osmolality	USP <785>
	Subvisible particles	USP <787>
	Residual solvents	USP <467>
	Extractable volume	USP <1>, <698>
	Container closure integrity	USP <1207>
	pH	USP <791>

5' capping efficiency LC/Q-TOF分析



mRNA キャップは mRNA の 5' 末端に存在し、三リン酸エステル (m7Gppp) を介して mRNA に 5'-5' 結合した 7 N-メチルグアノシンで構成されています。ただし、小さな修飾により、アデノシンである最初の mRNA ヌクレオチド (m7GpppAm) の追加の 2'-O-メチル化から生じる Cap-1 構造など、代替のキャップ構造が提供される可能性があります。

mRNA のサイズが非常に大きいため、キャッピング効率の決定は通常、5' 末端フラグメントを分析する前にリボヌクレアーゼ (RNase) で mRNA を消化することによって行われます。消化は、RNase A または T1 を使用して一本鎖 mRNA で行われるか、二本鎖特異的 RNase H を使用します。

詳細は5994-7118EN参照

オリゴ核酸分析における注意点

核酸の多くの負に帯電したリン酸部分は、LC/MS で分析する場合、**鉄表面吸着と鉄錯体形成**という少なくとも 2 つの課題を引き起こします。

前者の問題 (LC 流路に存在するステンレス鋼表面への吸着) はピークの広がりや損失を引き起こしますが、後者の問題は MS を使用する場合の検出感度に特に悪影響を及ぼします。

注目すべきことに、多数の金属イオン、特にナトリウムイオンやカリウムイオンが核酸に静電的に引き寄せられるため、MS シグナルは多くの電荷状態や付加物に分散されます。

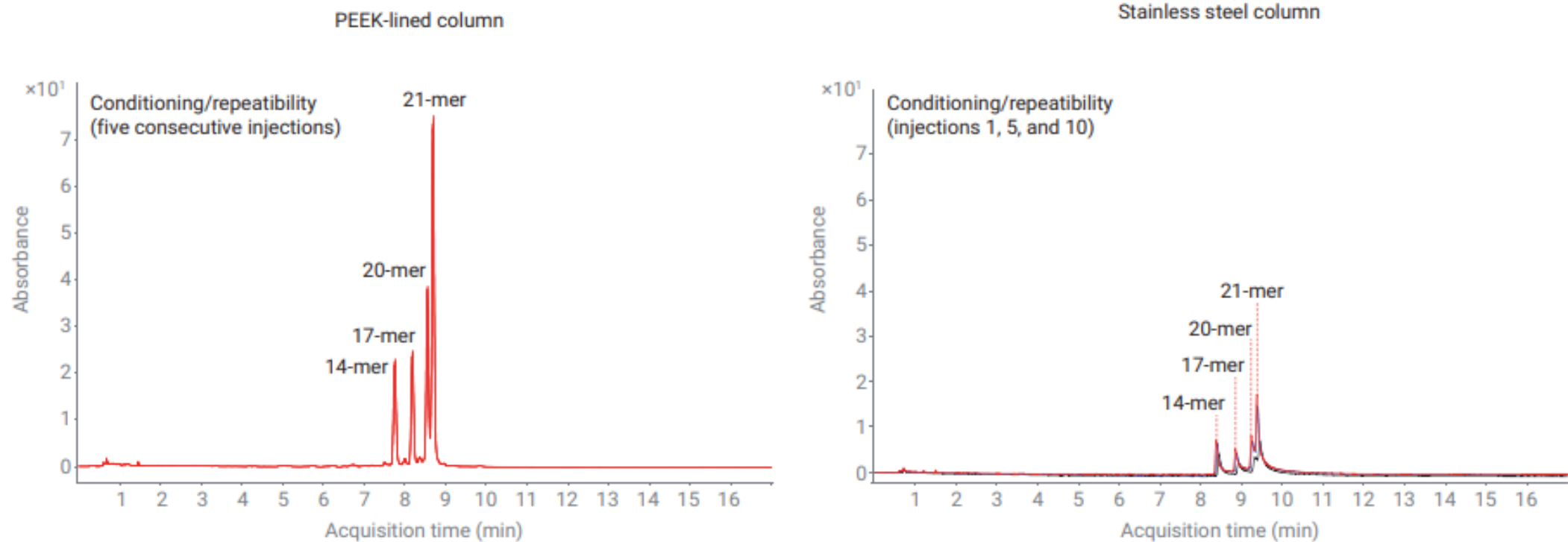
LC/MS 流路を徹底的に洗浄し、**液体クロマトグラフィー中にガラス製品やガラス表面を避ける**ことにより、核酸の分析と取り扱いでは、MS シグナルへの付加物の寄与を部分的に回避できます。

さらに、IPRP-LC/MS で核酸を分析すると、N-アルキルアミンイオン対試薬 (IPR) による核酸の中和により、金属表面への吸着が少なくなります。IPR には無極性固定相によって保持される疎水性部分が含まれているため、このイオン対効果が IPRP の保持メカニズムを推進します。

ただし、金属吸着は **IP-RP LC/MS** によって解決されたように見えますが、他の障害が発生します。LC/MS 機器を汚染して影響を与える高濃度の IPR や対イオンなど、よりクリーンで持続可能な代替手段として、核酸の LC/MS 分析には **HILIC** がますます好まれています。HILIC 分離では、「naked」核酸を無極性移動相と水層の極性固定相の間で分配する必要があるため、相が異なる場合、ステンレス鋼の流路は分離を容易に妨げます。この金属表面の吸着に対処するために、鉄を除去したり、金属表面を不活性化またはPEEKなどで被覆したLC機器やカラムが開発されてきました。

詳細は5994 – 7118EN参照

PEEK ライニングカラム (左) およびステンレススチールカラム (右) でのRNA 分解能スタンダードの HILIC-DAD 分析



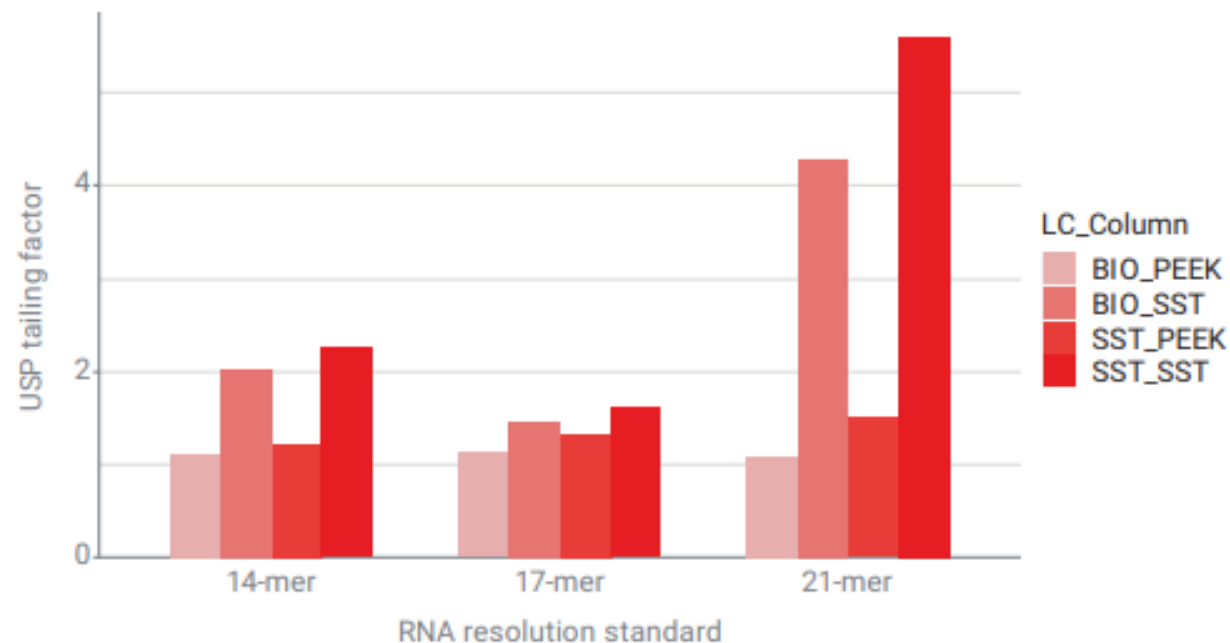
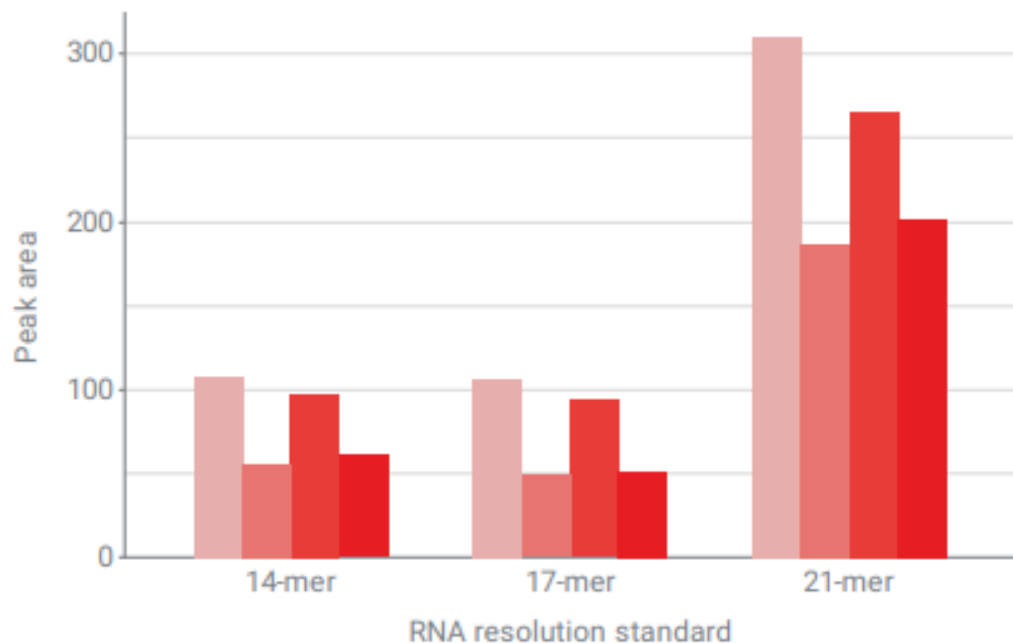
核酸の LC/MS 分析には IPRPに比べ機器を汚さないHILIC がますます好まれています。

金属表面の吸着を抑制するためにカラム、LCの選択に注意が必要になります。

詳細は5994 – 7118EN参照

LCとカラムの組合せの評価

ピーク面積およびUSPテーリングファクタ

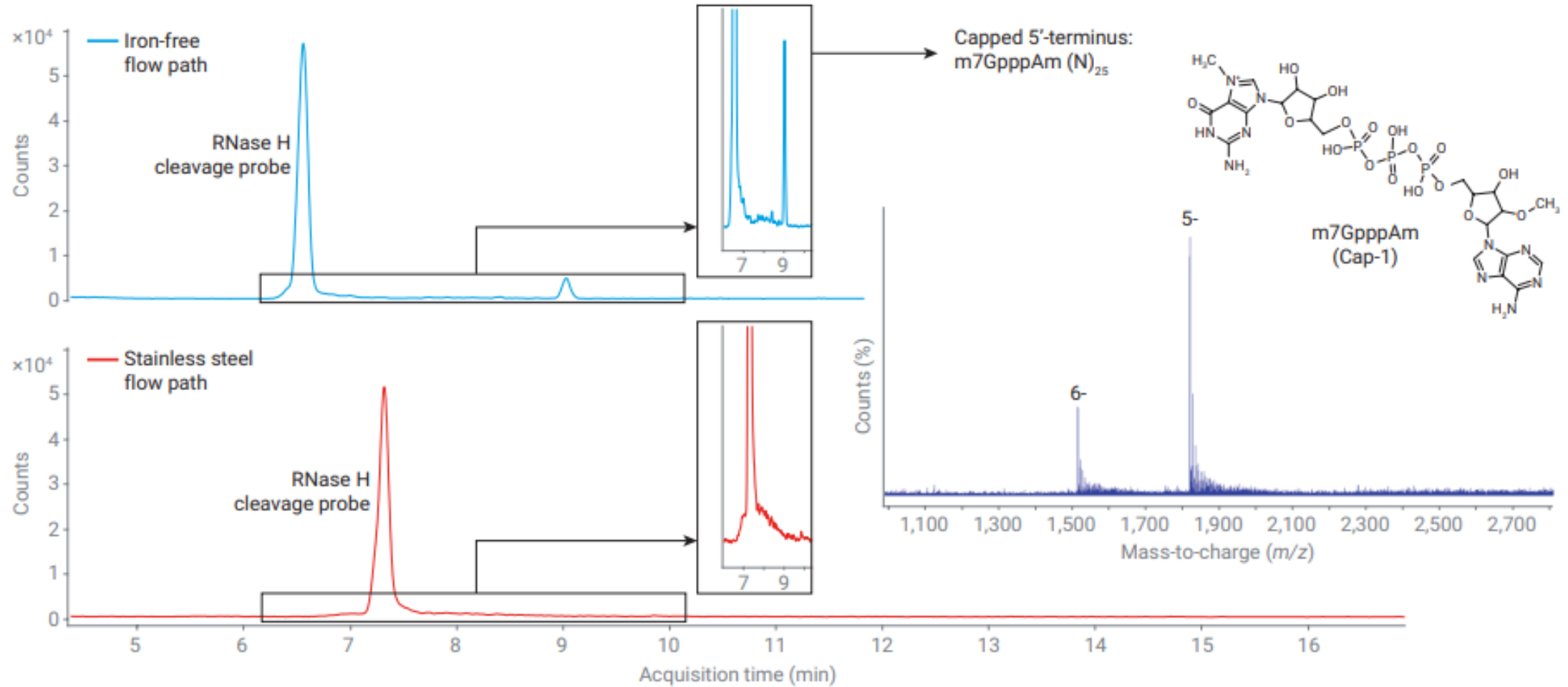


実験の結果からカラムハードウェアの影響が最も大きいことが分かりました。

クロマトグラフィーの性能を最大化するには、サンプル流路に鉄成分を含まない構成（つまり、PEEKライニングカラムと 1290 Infinity II Bio LC）を選択することをお勧めします。

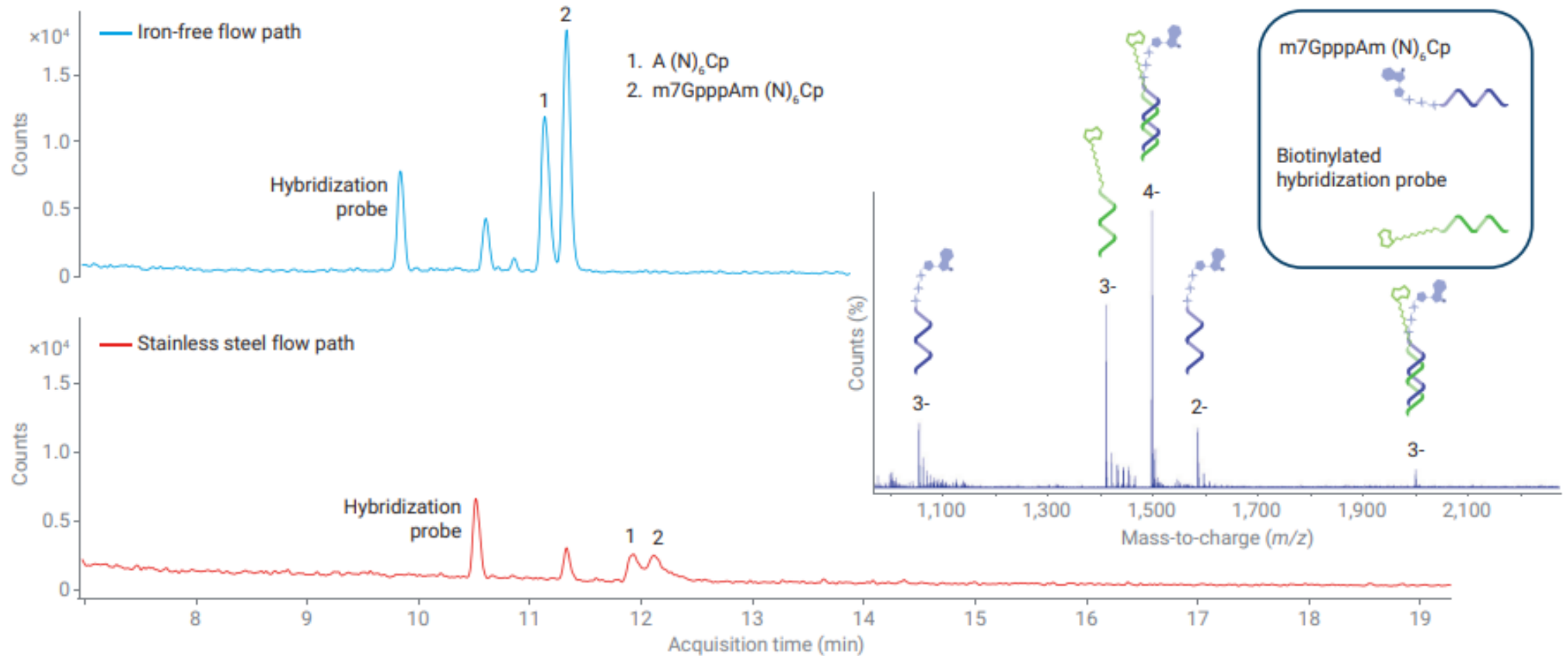
詳細は5994-7118EN参照

RNase H ベースの方法によって生成された 5' 末端 Fluc mRNA フラグメントの HILIC-MS ベース ピーク クロマトグラム



詳細は5994-7118EN参照

RNase A ベースの方法によって生成された 5' 末端 mRNA フラグメントの HILIC-MS プロファイリング



詳細は5994-7118EN参照

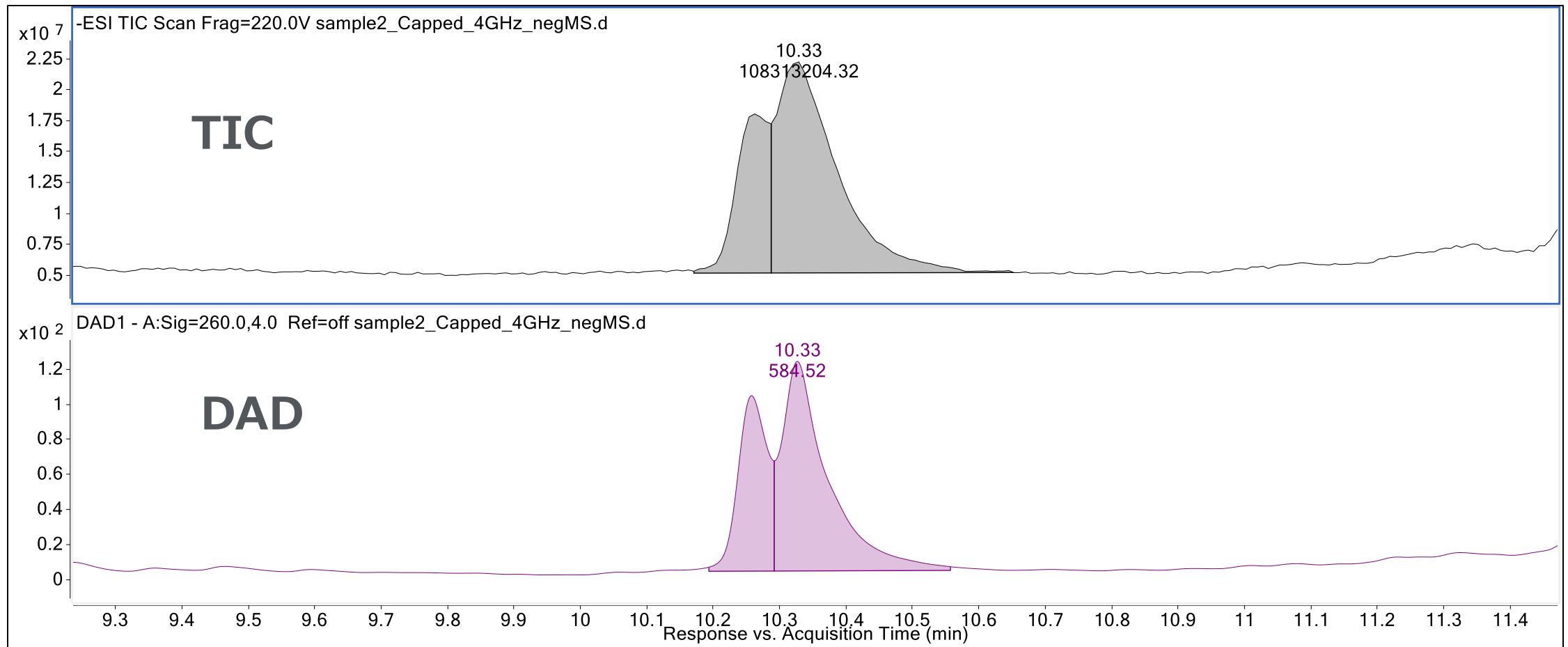
AGC様とのコラボレーション

Table 1 UHPLC/MS analytical condition

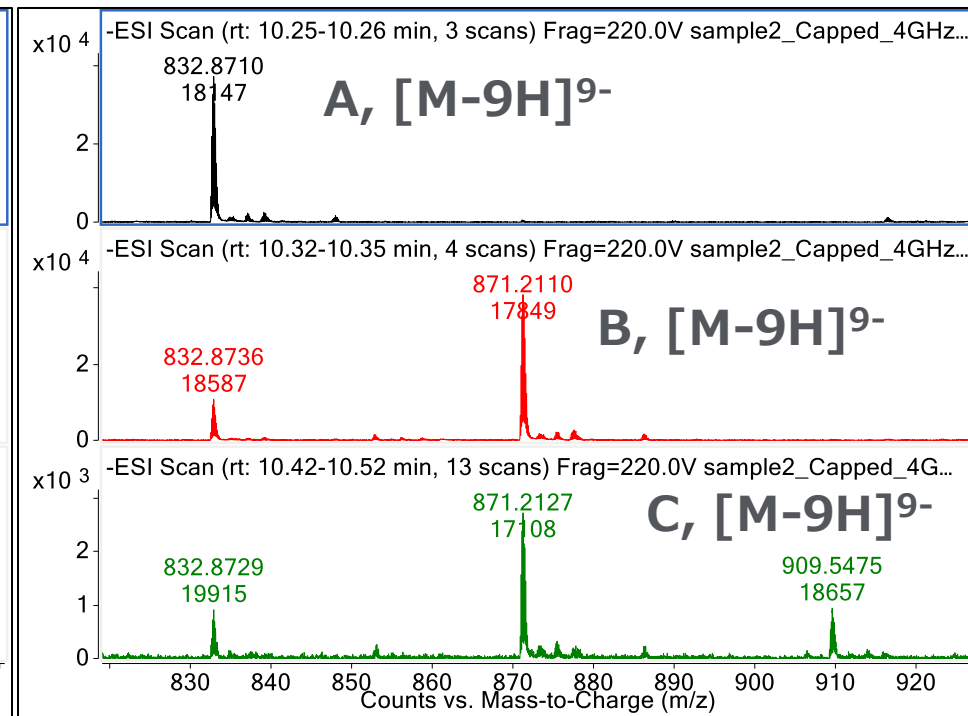
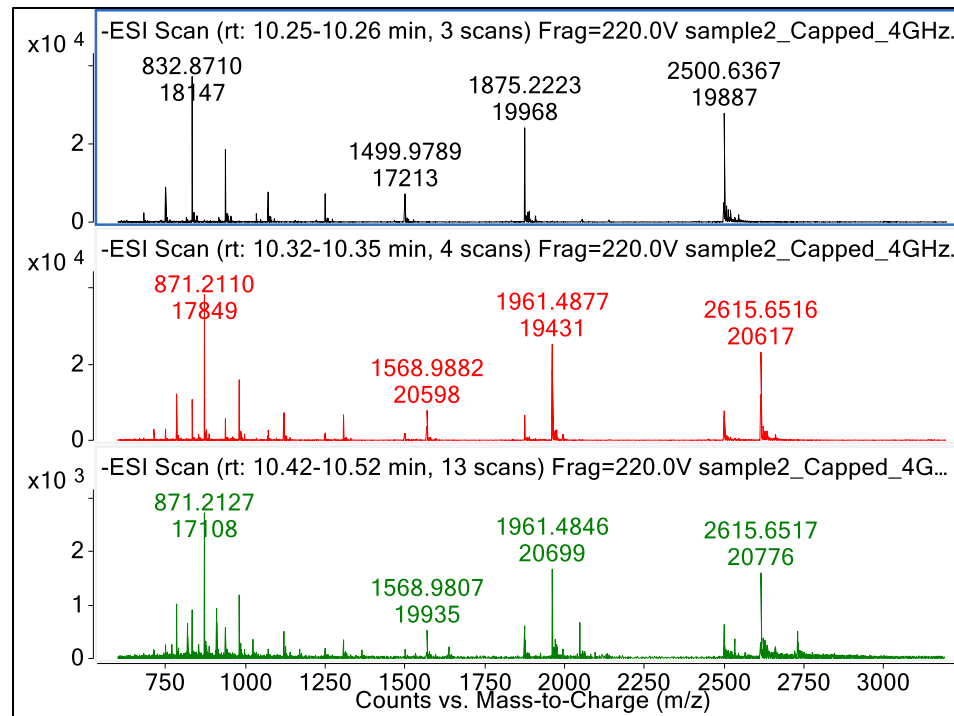
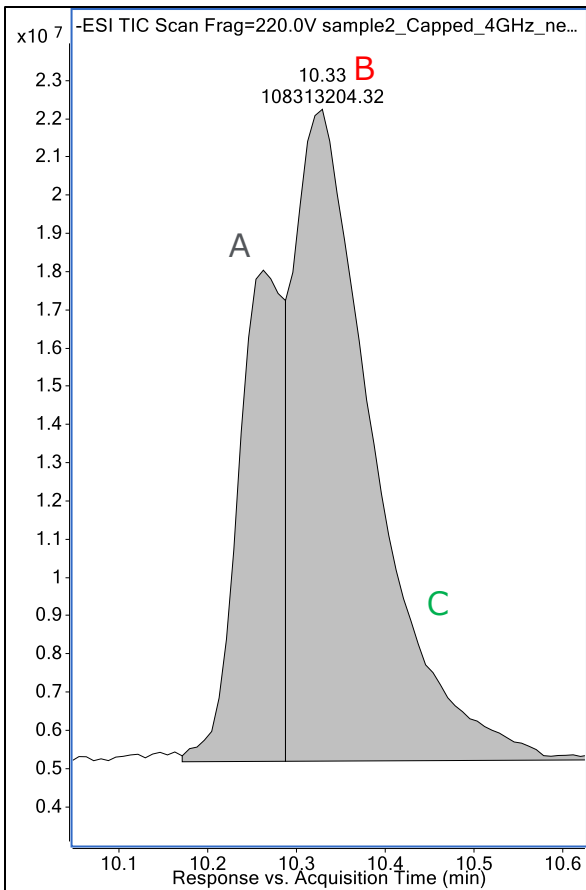
UHPLC	MS
<p>Instrument : 1290 Infinity II Bio LC HiSpeed Pump (G7132A) MultiSampler (G7167B) 1290 MCT (G7116B) 1290 DAD FS (G7117A), 60 mm cell 1260 Isocratic pump (G7110B, for reference ion)</p> <p>Column : AdvanceBio Oligonucleotide (2.1*150mm, 2.7 μm, Agilent)</p> <p>Mobile phase : A: 200 mM HFIP, 8.15 mM TEA B: MeOH</p> <p>Flow rate : 0.3 mL/min</p> <p>Gradient : t(min) 0 1 12 12.1 13 13.1 18 %B 5 5 25 90 90 5 5</p> <p>Column temp. : 60 °C</p> <p>Injection vol. : 20 μL</p> <p>Needle wash : MeOH, 15 sec</p> <p>DAD wavelength : 260 nm, BW 4 nm</p> <p>Pressure : 24-30 Mpa</p>	<p>Instrument : 6230 TOF</p> <p>Polarity : Neg</p> <p>Ionization : Dual AJS ESI</p> <p>Drying gas : N₂ (10 L/min)</p> <p>Drying gas temp. : 300 °C</p> <p>Nebulizer : 60 psi</p> <p>Sheath gas : 350 °C, 12 L/min</p> <p>Fragmentor (V) : 220 V</p> <p>Capillary voltage : 4500 V</p> <p>Nozzle voltage : 1500 V</p> <p>Mass range : <i>m/z</i> 600 – 3200</p> <p>Acquisition rate : 2 spectra/sec</p> <p>Reference ion : 1033.988109, 2533.892301</p> <p>ADC : 4 GHz Hi-Resolution</p> <p>Data type : Profile</p>

抽出イオンクロマトグラム(EIC)の抽出幅は全て±0.01 *m/z*で行っています。

RNase H ベースの方法によって生成された 5' cap mRNAフラグメント IP-RP UV及びTOF クロマトグラフィー



RNase H ベースの方法によって生成された 5' cap mRNAフラグメント LC/TOF 同定



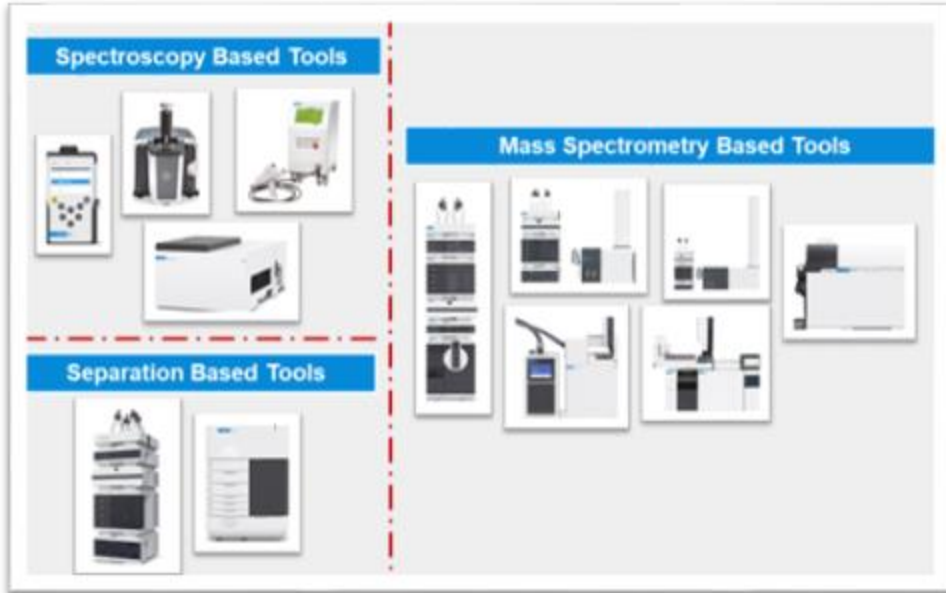
今後もAGC様と共同でmRNAの分析法の開発を実施して行きます

mRNA分析機器ソリューション紹介

mRNAの特性解析のための分析ソリューション

特性解析と分取精製のためのツール

原料やオリゴ核酸(FLP)の純度と不純物分析



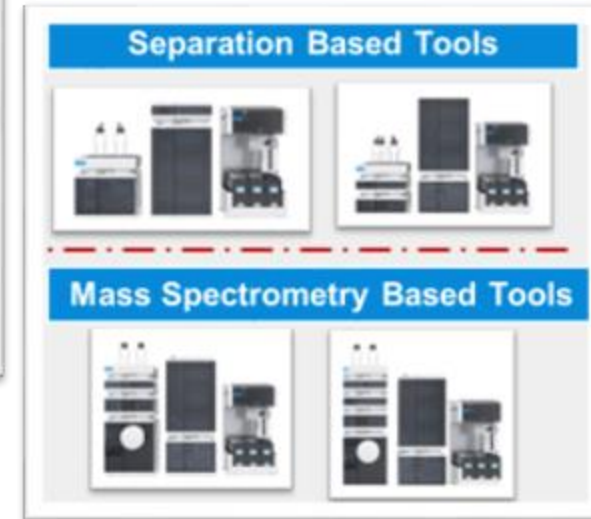
1. 原材料の識別および純度分析
2. オリゴ核酸純度分析
3. オリゴ核酸不純物分析
4. プロセス関連 - 残留溶媒不純物分析
5. プロセス関連 - 元素分析

オリゴ核酸の分子量確認と配列確認



6. 分子量測定
7. 配列および配列バリエーションの決定

オリゴ核酸の分取精製



8. 精製
9. 品質試験

Columns, Consumables, Accessories, Compliant SW, Services & Support

mRNAの特性解析に適した分析装置

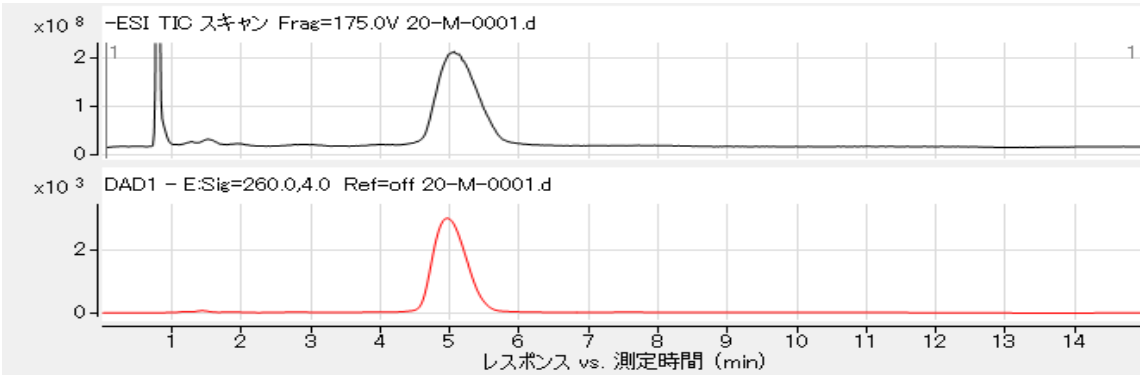


- Bio LC（バイオコンパチブル素材）は、流路全体でオリゴ核酸の分析中の**非特異的吸着**を軽減します
- TOF/Q-TOFによりオリゴ核酸の**不純物スクリーニング**が可能です
- 得られたスクリーニング結果よりMSMS測定による**配列確認**が可能です
- UHPLCでの高速分析実行時でも、すぐれたMS分解能を示します

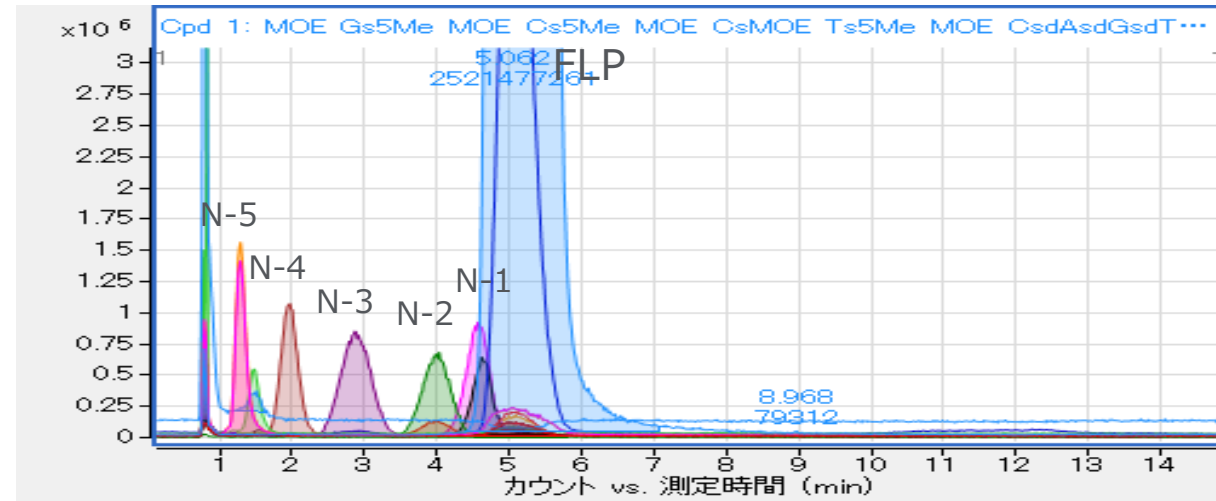
LC/MS を使用した不純物スクリーニング

BioConfirmソフトを使用したターゲット(FLP)と不純物のスクリーニング

・ ミポメルセン IP-RP 測定 クロマトグラム



・ FLPおよび不純物の確認



・ FLPおよび不純物のリスト

表示	化合物	名前	式	フラグ重要度 (Tol)	RT
☑	1	20-M-0001.d FBF MOE Gs5Me MOE Cs5Me MOE CsMOE Ts5Me MOE CsdAdGsdTs5Me dCsdTsdGs5Me dCsdTsdTs5Me dCsMOE Gs5Me MOE CsMOE Aa5Me MOE Cs5Me MOE C	C230 H324 N67 O122 P18 S19		5
☑	2	20-M-0001.d FBF MOE Gs5Me MOE Cs5Me MOE CsMOE Ts5Me MOE CsdAdGsdTs5Me dCsdTsdGs5Me dCsdTsdTs5Me dCsMOE Gs5Me MOE CsMOE Aa5Me MOE Cs5Me MOE C-BaseG	C225 H319 N62 O121 P19 S19		5
☑	3	20-M-0001.d FBF MOE Gs5Me MOE Cs5Me MOE CsMOE Ts5Me MOE CsdAdGsdTs5Me dCsdTsdGs5Me dCsdTsdTs5Me dCsMOE Gs5Me MOE CsMOE Aa5Me MOE COH	C217 H303 N64 O115 P18 S18		4
☑	4	20-M-0001.d FBF 5Me MOE Cs5Me MOE CsMOE Ts5Me MOE CsdAdGsdTs5Me dCsdTsdGs5Me dCsdTsdTs5Me dCsMOE Gs5Me MOE CsMOE Aa5Me MOE Cs5Me MOE C	C217 H306 N62 O115 P18 S18		4
☑	6	20-M-0001.d FBF 5Me MOE CsMOE Ts5Me MOE CsdAdGsdTs5Me dCsdTsdGs5Me dCsdTsdTs5Me dCsMOE Gs5Me MOE CsMOE Aa5Me MOE Cs5Me MOE C	C204 H286 N59 O108 P17 S17		4
☑	8	20-M-0001.d FBF MOE Ts5Me MOE CsdAdGsdTs5Me dCsdTsdGs5Me dCsdTsdTs5Me dCsMOE Gs5Me MOE CsMOE Aa5Me MOE Cs5Me MOE C	C191 H266 N56 O101 P16 S16		2
☑	9	20-M-0001.d FBF 5Me MOE CsdAdGsdTs5Me dCsdTsdGs5Me dCsdTsdTs5Me dCsMOE Gs5Me MOE CsMOE Aa5Me MOE Cs5Me MOE C	C178 H247 N54 O93 P15 S15		1
☑	10	20-M-0001.d FBF dAdGsdTs5Me dCsdTsdGs5Me dCsdTsdTs5Me dCsMOE Gs5Me MOE CsMOE Aa5Me MOE Cs5Me MOE C	C165 H227 N51 O86 P14 S14		1
☑	11	20-M-0001.d FBF sdGsdTs5Me dCsdTsdGs5Me dCsdTsdTs5Me dCsMOE Gs5Me MOE CsMOE Aa5Me MOE Cs5Me MOE C	C155 H216 N46 O83 P14 S14		1
☑	12	20-M-0001.d FBF dGsdTs5Me dCsdTsdGs5Me dCsdTsdTs5Me dCsMOE Gs5Me MOE CsMOE Aa5Me MOE Cs5Me MOE C	C155 H215 N46 O82 P13 S13		1
☑	13	20-M-0001.d FBF MOE Gs5Me MOE Cs5Me MOE CsMOE Ts5Me MOE CsdAdGsdTs5Me dCsdTsdGs5Me dCsdTsdTOH	C155 H213 N45 O83 P13 S13		1
☑	16	20-M-0001.d FBF MOE Gs5Me MOE CsMOE Aa5Me MOE Cs5Me MOE C	C65 H97 N19 O33 P4 S4		5

- ・ FLPと不純物生成条件に基づいて不純物種類を予測リストを作成
- ・ ターゲット分析により不純物（5'脱離）を検出

BIO

サンプル流路には鉄は含まれていない。
バイオコンパチブルな素材のみが含まれる。

接液部分の素材：

- MP35N
- チタン
- PEEK など

MP35Nとは？

- ニッケル、コバルト、クロム、モリブデンの合金
(Ni-Co-Cr-Mo → 35%, 35%, 20%, 10%)
- 鉄を使用していないのでUHPLCのバイオコンパチブルな素材として使用されている
- スーパーアロイ（超合金）の一つで溶媒耐性にも優れている

BIO INERT

サンプル流路内には
金属が含まれていない。

1260 Infinity II バイオイナート LC で使用されている材質

サンプルフローパスの材質	
ニードルシート	PEEK
ニードル	セラミック
サンプルループ	金属（外側） PEEK（内側）
注入バルブ	PEEK、セラミック、FFKM
キャピラリー	チタン
その他	PTFE

生体適合性を実現するPEEK ライニング カラム ハードウェア

- UHPLC PEEK ライニングカラムは、ステンレススチールカラム関連のアーティファクト（酸化、金属相互作用など）などの潜在的な問題を排除します。
- カラム ID が2.1mmなので、特に MS 検出に適しています。
- タンパク質およびペプチドの回収率の向上（一貫したピーク面積、キャリーオーバーの減少）。
- ネイティブ モード SEC (または SEC-MS)、および断片化または酵素消化されたタンパク質の逆相クロマトグラフィーにおいて、最大限のパフォーマンスを実現します。



アジレントのPEEK Linedステンレスカラムのラインナップ例

P/N	カラム名 ※ポリマー充填剤
PL1912-1502PKPLRP-S 1000A, 5um, 2.1x50mm, PEEK Lined	
PL1912-2502PKPLRP-S 1000A, 5um, 2.1x100mm, PEEK Lined	

P/N	カラム名 ※コアシェル充填剤
675775-902	AdvanceBio EC-C18, 2.1x100mm,2.7um, PEEK Lined
679775-902	AdvanceBio EC-C18, 2.1x50mm,2.7um, PEEK Lined

P/N	カラム名
675775-942	Poroshell 120 CS-C18, 2.1x100mm,2.7um, PEEK Lined
679775-942	Poroshell 120 CS-C18, 2.1x50mm,2.7um, PEEK Lined

P/N	カラム名 ※双性イオンの固定相
679775-924	Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1x50mm,2.7um, PEEK Lined
675775-924	Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1x100mm,2.7um, PEEK Lined
673775-924	Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1x150mm,2.7um, PEEK Lined

P/N	カラム名
PL1980-1201PKAdvanceBio SEC 200A, 1.9um, 2.1x50mm, PEEK Lined	
PL1980-1250PKAdvanceBio SEC 120A, 1.9um, 2.1x50mm, PEEK Lined	
PL1980-3201PKAdvanceBio SEC 200A, 1.9um 2.1x150mm, PEEK Lined	
PL1980-3250PKAdvanceBio SEC 120A, 1.9um 2.1x150mm, PEEK Lined	

逆相カラム

HILICカラム

SECカラム



※その他、PEEKハウジングのイオン交換カラムもございます

オリゴ核酸分析メディアルームのご紹介

<https://explore.agilent.com/oligonucleotide-chromatography-solutions-jp>



アジレントのオリゴヌクレオチドクロマトグラフィーソリューション
ラボベンチからプロセススケール、QA/QC から製造まで



特性解析

イオンペア逆相精製

アニオン交換精製

ツールとリソース

分離と精製の多様なニーズに対応：siRNA から mRNA まで

アジレントはオリゴヌクレオチド分析の多様性を理解しており、優れた分離能、再現性、カラムの寿命化を実現する最適な結合相を提供しています。



Agilent

Trusted Answers

DE58722495