

# Sunscreenの自動マイクロ流体テクノロジーによるLNP製剤スクリーニングの高速化

## はじめに

脂質ナノ粒子(LNP)は、核酸(NA)アプリケーションのクリニカル・デリバリーのための主要な手法です。臨床試験用のSpikeVaxの初回投与がCOVID-19配列の公表から41日後に開始されました。このことは、概念から臨床に効率的に移行できる可能性を示唆しています。さらにはLNPが医薬品開発プロセスを変革する立場にあることを意味しています。Sunscreenは96回の実験を自動化することにより6時間未満で完了します。そのため製剤スクリーニングを強化し、将来のドラッグ・ディスカバリーを加速させましょう。

LNPテクノロジーの有効性と卓越した安全性プロファイルが証明されたことにより、開発中の製剤が急激に増加しました。現在18を超える製剤が臨床試験の段階にあります。しかしながらLNPは、決してシンプルでプラットフォーム技術ではありません。製剤ごとにRNAを結合させ送達するためのイオン化/カチオン性脂質、構造脂質、コレステロール誘導体やPEG化脂質の選択にくわえ、これらの相対量を慎重に考慮しなければなりません。最近の開発の現場では使われる材料が拡大し、より複雑性が増しています。さらに受動的・能動的ターゲットの両者により、特定の臓器や細胞種を標的にするという選択肢もあります。

脂質成分(エタノール溶液とすることが一般的)と核酸(水性バッファー溶液)の混合も重要なステップであります。さらに材料の総流量(TFR)、材料の比率(流量比またはFRR)にくわえ、流れの種類(層流/カオス流/乱流)が負荷効率、粒子構造や粒子サイズに影響を及ぼします。

これらの要因はいずれもLNPのpKa、膜流動性や安定性を変化させin vivoの複雑な分子環境との相互作用を調節します。結果的に核酸の体内分布、発現や有効性に影響を及ぼす可能性があります。

このため、LNPをデザインするための検討余地は莫大になります。これらの要因をすべてテストするには、数百~数千回の実験を迅速におこなう必要があります。

現在市販されているマイクロ流体システムの多くは、LNPのスクリーニングの際に試薬を個別にアプライしなければなりません。つまりは時間がかかり、場合によっては無駄の多いプロセスとなってしまいます。さらに使い捨ての高価なマイクロ流体混合チップを使うか、または再現性とスケールアップが困難なピペッティングによる混合をおこなう必要があります。

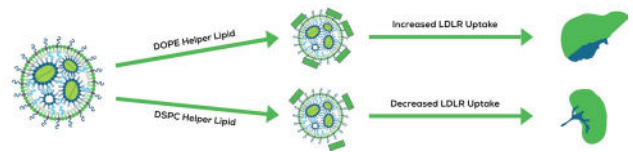


図 1: in vivoの体内分布におけるLNP製剤の影響

Sunscreenはハイスループットの自動化とマイクロ流体工学の精度、拡張性や再現性を組み合わせた初めての製品です。一連の実験において最大96回のそれぞれの実験をオペレーターの介入なく実行することができます。

さらに、マイクロ流体チップ、Sunnyは、滑らかな化学変化を起こさないガラスで構成されています。また自動洗浄ステップが実験プロセスに組み込まれているため、何度でも再利用することができます。



図 2: Sunscreen

Sunscreenは各種Sunnyを利用し、異なる混合速度や種類を設定することができます。そのため、それぞれの実験に柔軟な対応ができます。標準的なSunny 490 Trident Tは、流体力学的フロー・フォーカシング(HFF)法を利用しています。そのため中央のエタノール/脂質の流れを水性バッファーで圧縮し、拡散混合にかかる時間を短縮します。高度に流れは調節され層流となるため、粒子特性を厳密に制御できます。あるいはSunny 50マイクロミキサーで意図的にカオス流を発生させ、低流量で混合時間を短縮する(粒子サイズを減少させる)ことも可能です。

すべてのSunnyは、LNP開発パイプラインのそれぞれのステップへシームレスに移行できるように設計されたSunscreenとSunshine(Unchained Labsのプロセス開発とスケールアップ・システム)の両方に対応しています。

## 方法

1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(塩化物塩)(DOTAP)、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DDAB)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、2-di-(9Z-オクタデセノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-メトキシポリエチレングリコール-2000(DSPE-PEG2000)、1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(DMG-PEG 2000)(Avanti Polar Lipids)およびコレステロール(Chol)(Sigma-Aldrich)のエタノール原液を調製しました。脂質をさまざまな比率で混合し、総濃度は6 mg/mLとしました。

PolyA(Cytiva)をpH 6の50 mMクエン酸バッファーに溶解し、それぞれ製剤の窒素/リン(N/P)比を8としました。

特に指定がない限りTFRは9 mL/分に設定しFRRは3:1(水相:有機相)としました。駆動流体として水相にはpH 6の50 mMクエン酸バッファーを利用し、有機相にはエタノールを用いました。総サンプル量を1,000  $\mu$ Lとし、ヘッド・カットとテール・カットを100  $\mu$ Lに設定しました。それぞれのサンプルの総回収量が800  $\mu$ Lになるようにしました。

すべての粒子サイズとPDIの測定はDLSでおこないました。すべてのサンプルを1 $\times$ PBSを用いて10倍希釈しました。サンプルは3回測定しました(表とグラフの誤差は、特に指定がない限り3回の測定の標準偏差です)。

EE%はInvitrogen Quant-it Ribogreenアッセイを利用し、製造メーカーの指示に従い測定しました。サンプルは未処理の状態と1% Triton Xで溶解したのち、それぞれ測定しました。蛍光はFLUOstar Omegaプレート・リーダーにて測定しました。

## 結果

Sunscreenは標準的な96ウェルのプレート・フォーマットを採用しています。ロボット・アームがインプット・ウェル・プレートからの試薬の吸引を自動でおこないます。試薬の量は1回の注入でわずか105  $\mu$ Lです。サンプルは、その後サンプル・ループ内に保持されます。

つづいて精密なシリンジ・ポンプが作動し、システム内に定常状態の流れと圧力を加えます。試薬がサンプル・ループからメインのシステムに放出されます。ここで較正されたチューブとバルブのタイミングにより2つの試薬パケットが同時にSunny上で合流し、優れた混合制御が実現します。つづいて生成された粒子は最終サンプル・ループ内に保持され、のちに回収プレートに分注されます。

それぞれの実験中にSunnyとニードルを含むすべての流路が未使用時に自動洗浄され、サンプルのコンタミネーションを防ぎます。

回収されるサンプル量は200  $\mu$ L $\sim$ 2 mLです。総流量は100  $\mu$ L/分 $\sim$ 30 mL/分、流量比は1:1 $\sim$ 5:1と極めて柔軟なスクリーニング・プロセスの実現が可能となります。それぞれのサンプルのヘッド・カットとテール・カットは、カスタマイズ可能です。混合の品質と一貫性が高いサンプル・パケットの中央部を回収すること、またはサンプル・パケット全体を回収することも可能です。サンプル・パケットを駆動流体から保護し試薬の高濃度を維持するため、飛散防止テクノロジー(ADT)が使用されています。

Sunscreenの性能を探索するため、一連の実験をおこないました。まず96回の実験から再現性を検討しました。この再現性は粒子特性の差が製剤と条件のみに基づいており、ピペット混合などによるプロセスのランダム変動から生じたものではないことを確認するために不可欠です。

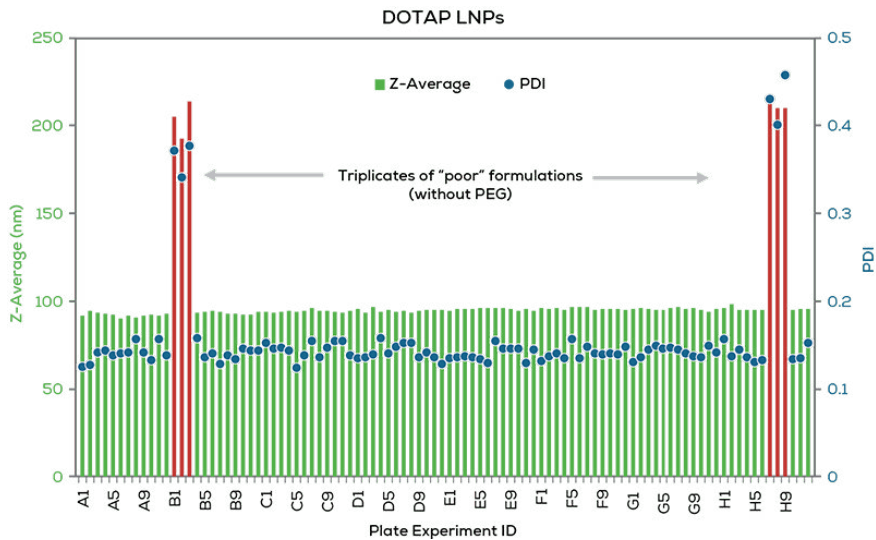


図3: 96回の実験を通じたDOTAP cLNP処方に対するSunscreenの再現性と回復性

| パラメーター | 詳細                 |
|--------|--------------------|
| Z平均    | 94.59 nm ± 0.71 nm |
| PDI    | 0.142 ± 0.01       |
| RSD    | 0.76%              |

表1: 再現性実験の全結果。±は、すべての結果を合わせた標準偏差を示しています。

90回のリピート測定から得られた再現性は優れており、平均粒子サイズは $94.59 \pm 0.71$ で全体の相対標準偏差 (RSD)は1%未満でした(図3)。PDIも一貫性が高く全体で $0.142 \pm 0.01$ でした。PEGを含まないサンプルは凝集し、多分散性を示しました。しかしながら、次に作製したサンプルへの影響はなくサンプル間のコンタミネーションがないことが示されました。

つづいて製剤スクリーニングをおこないました。このスクリーニングには安定した製剤で一貫した結果が得られることが確認されている条件を採用しました。それぞれ異なる製剤が粒子特性にどのような影響を及ぼすかを他の変数が存在せず、ランダム誤差を小さくした条件で評価しました。

最後に単一の製剤を利用しTFRのスクリーニングをおこないました。TFRは5 mL/分から12 mL/分まで変化させ、フロー条件を調整することにより生じる粒子サイズとPDIへの影響を評価しました。

## 再現性

Sunscreenのベースライン性能および再現性を確認するため、一連の96回の実験をおこないました。これには単一の製剤(DOTAP:DSPC:Chol:DMG-PEG 2000、モル比40:10:37.5:2.5)から構成される同一の90サンプルと、壊滅的な凝集後にシステムが回復可能なことを示すために設定したPEG化脂質を含まない6サンプルの「不良」製剤が含まれています。

## 製剤スクリーニング

32種類のカチオン性LNP(cLNP)製剤のスクリーニングを3回実施し、カチオン性脂質の同一性(DOTAP対DDAB)、構造脂質の同一性(DSPC対DOPE)、PEG脂質の同一性(DSPE-PEG2000対DMG-PEG 2000)やPEG脂質モル分率(0.5、2.5、5および10モル%)の影響を検討しました。すべての実験は同じ96ウェル・プレートでおこないました。一連の実験をオペレーターの介入や中断なしに5.5時間で完了しました。粒子のZ平均、PDIおよび封入効率(EE%)を分析しました。

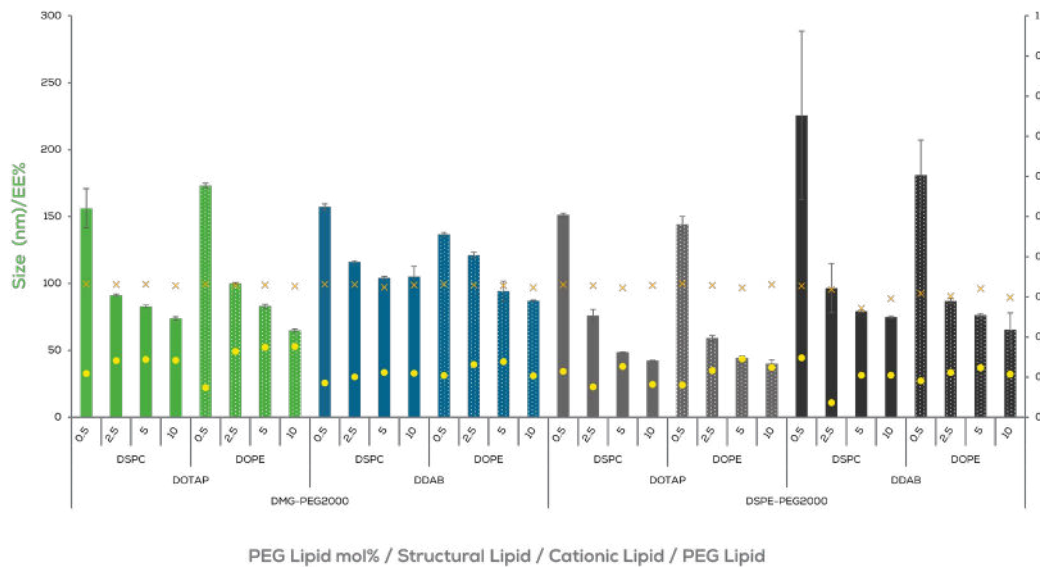


図4: cLNP製剤スクリーニングの結果。Z平均とPDIは、それぞれの結果(n=3)の平均でありエラー・バーは標準偏差を示しています。

上記の図は、得られた一連のデータを製剤グループ別にまとめたものです(図4)。この一連の実験は5.5時間で完了し、より多くのデータが得られました。PEGの濃度が上がると粒子サイズが小さくなるなど、いくつかの顕著な傾向が見られます(図5)。

予想とは異なりDMG-PEG 2000よりもDSPE-PEG2000で粒子サイズの反応性が高いことに加え、DMG-PEG 2000に対する反応性はDDAB cLNPの粒子サイズの方が低いことが分かります。

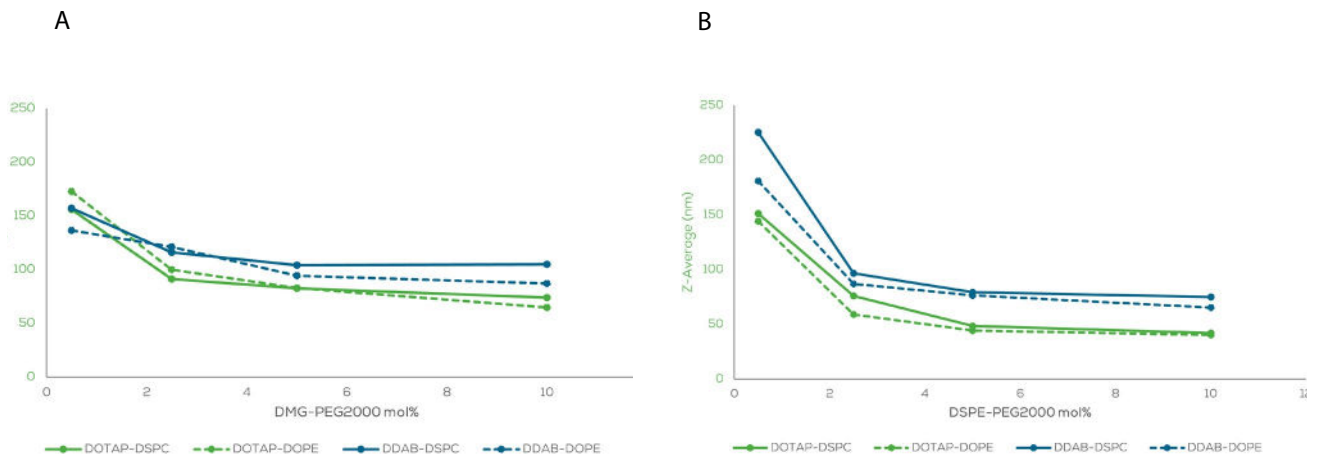


図5: A: DMG-PEG 2000脂質モル分率がcLNPの粒子サイズに及ぼす影響、B: DSPE-PEG2000がcLNPの粒子サイズに及ぼす影響。

0.5% PEG脂質を利用した製剤ではPDIが低い傾向でしたが、サイズの標準偏差が高く、ある程度の予測不可能性/不安定性が示唆されました。しかしながら、これらの製剤を除いた構造脂質がPDIに及ぼす影響(いずれもDOPEの方

が高い)やDDAB/DSPE-PEG2000製剤の封入効率の低さ、その他の関連性がいくつか確認されました(図6)。

B

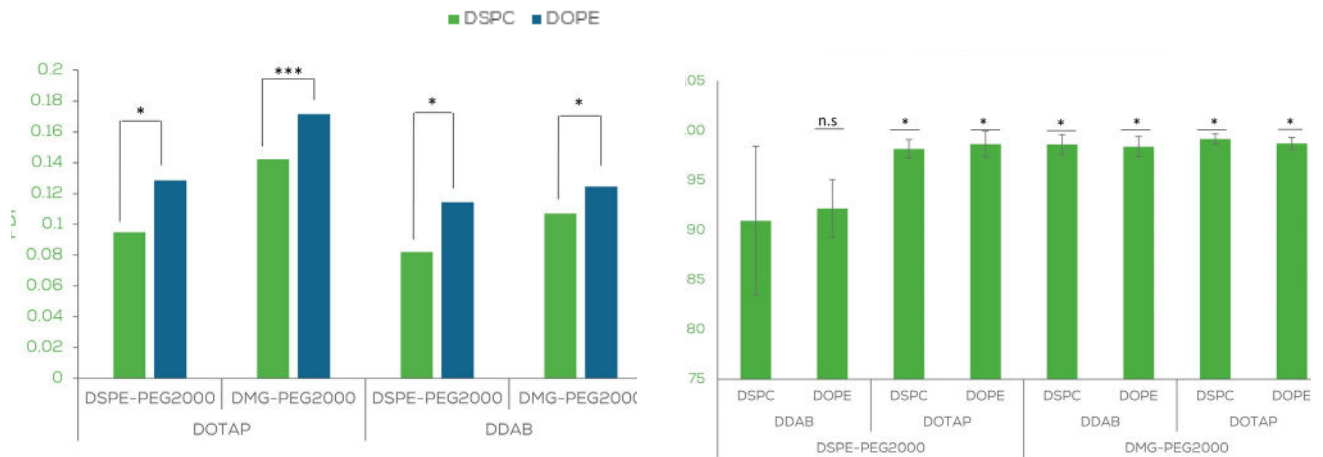


図6: A: 構造脂質がcLNPのPDIに及ぼす影響。有意水準は両側Student t検定により算出しました。B: cLNP製剤の封入効率。有意水準はDDAB/DSPC/Chol/DSPE-PEG2000製剤に対するDunnet検定により算出しました。

## 流量スクリーニング

最後の実験では設定した組成 (DOTAP: DSPC: Chol: DMG-PEG 2000、モル比40:10:37.5:2.5) を用い、粒子サイズを調節するために流量の条件を変えました。粒子は5、7、9および12 mL/分で生成しました。予想どおり流量が上がると中央のエタノールの流れの集束がより速く起こり、混合時間が短縮されるため粒子サイズは小さくなりました。

データではこのことが明らかに示唆されています。各流量間で粒子サイズに統計学的な有意差がみられ、Sun-screenにより作製されたLNPの厳密な制御と再現性が確認されました(図7)。

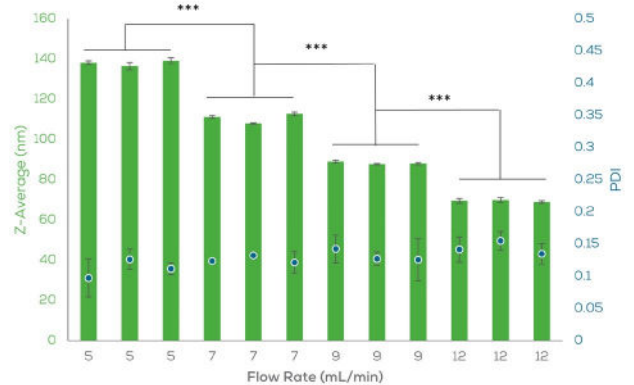


図7: TFRがDOTAP cLNPのサイズとPDIに及ぼす影響。エラー・バーは3回の測定の標準偏差を表しています。有意水準は2 tailed Student t検定により算出しました。有意水準は\*p=0.05、\*\*p=0.01で示しています。

| TFR (mL/分) | Z平均 (nm)    | PDI        |
|------------|-------------|------------|
| 5          | 137.9 ±1.11 | 0.11 ±0.01 |
| 7          | 110.6 ±1.96 | 0.13 ±0.00 |
| 9          | 88.24 ±0.52 | 0.13 ±0.00 |
| 12         | 69.48 ±0.38 | 0.14 ±0.00 |

表2: TFRがDOTAP cLNPの平均サイズとPDIに及ぼす影響。誤差は標準偏差(n=3)で示しています。

## 結論

Sunscreenの自動化システムとマイクロ流体工学の組み合わせは、LNP開発に携わるラボに必要な不可欠なツールであることを証明しました。弊社のStunnerと組み合わせると粒子サイズ分析をおこなえば、96種類の製剤をその日のうちに合成し特性評価することができます。しかも、すべて1つのSunnyで可能です。

精密なマイクロ流路混合により得られる一貫性は、高品質で再現性のある粒子を保証します。さらに自動化は複雑な並行ワークフローへの統合を可能にし、スループットを大幅に向上させます。スクリーニングの対象がカーゴ、新規脂質、製剤組成や作製パラメーターのいずれであるかに関わらず、SunscreenはあなたのLNP開発になくてはならないシステムとなるでしょう！



### Unchained Labs

東京都千代田区神田須田町 2-9-2

PMO神田岩本町 3F

Phone: 03-3526-2811

Email: info@unchainedlabs.com

© 2023 Unchained Labs. 禁無断複写・転載。Unchained Labsのロゴ、SunscreenおよびSunshineはUnchained Labsの商標および/または登録商標です。掲載されている他のすべてのブランドや製品名は、各社が所有する商標です。

Rev A