

Sunshineによるナノ粒子開発の柔軟性:合成ナノメディシンのプロセス最適化とスケールアップ

はじめに

ナノメディシンはドラッグ・デリバリーにおいて有望な分野の1つです。なぜならば従来の製剤アプローチの制約を克服し、新たな薬の開発につながるアプリケーションを生み出す可能性があるからです。リポソーム、脂質ナノ粒子(LNP)やポリマー・ナノ粒子などの合成ナノ材料を利用することにより、さまざまな有効成分(API)の溶解性、安定性や生体内での有用性を改善できるでしょう。それにより細胞膜を介したAPI輸送を増やすことができます。またin vivoでの循環時間を長くしAPIの有効性と安全性を高めることも可能になります。

APIは低分子の薬剤化合物から核酸やタンパク質に至るまで複雑な物理化学的性質を示します。対象となるAPIや性質に応じ、異なる種類の粒子を生成するため、ナノ粒子作製プロセスの柔軟性は重要です。Unchained LabsのSunshineは、さまざまな材料や粒子構造に対し、ミリリットル・スケールのナノ粒子合成プロトコルを開発および最適化できます。さらに前臨床試験用に数リットルを連続的に製造できる能力を備えるマイクロ流路に基づいた自動化アプローチも提供します。

過去においては脂質ベースのナノ粒子(リポソーム、リポプレックスやLNPなど)やポリマー、金属および酸化物のナノ粒子(NP)は、薄膜水合法、超音波法やナノ沈殿法などのバッチ法により作製されてきました。しかしながら、これら従来の技術は多大な労力が必要であり、バッチ・ボリュームも大量になることがあります。最終的な薬剤処方の有効性の観点からすると、これらの方法では重要な要因である粒子サイズ、形態や封入効率のバッチ間における一貫性がみられません。

Sunshineのマイクロ流体テクノロジーを利用すれば安定な層流で正確に反応物を混合することにより、化学反応を高度に制御することができます。これにより一貫性が大幅に向上しNPの生成が可能となります。流体力学的フロー・フォーカシング法を利用し、Sunny(マイクロ流路チップ)への流量を変化させるだけでナノ粒子合成の反応時間(粒子サイズ/形態)を正確に再現性高く調整することができます。

近年ではワクチンや高度な治療法を提供するため、LNP粒子などを利用したナノメディシンの研究開発が急速に増加しています。これらの中核となる技術としてマイクロ流体工

学が広く採用されています(図1)。しかしながら、これまでに市販されたマイクロ流体テクノロジーでは合成に多大なる手作業を要しました。さらに大量の試薬や高価な消耗品を利用しなければなりません。

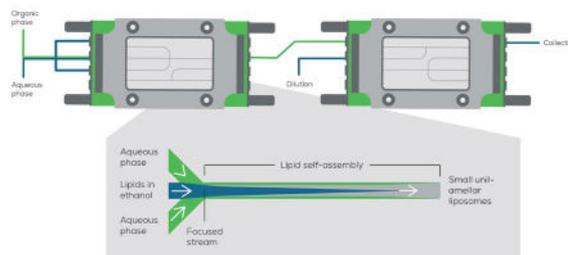


図1: 1つ目のSunnyの接続部にはエタノール内の脂質と水性バッファー内のmRNAが層流により1つに集められます。その結果、流体力学的に集束した試薬のフローが生成されます。試薬は相互拡散することで脂質の溶解度が低下し、自己会合体プロセスが促進されます。この混合方式を利用することで、反応条件を正確に制御できます。つまりは一貫性が高く調整のきくLNPの生成が実現します。2つ目のSunnyはオプションで回収したサンプルのpHを調節したり、溶媒濃度を低くするための希釈液のインライン添加をおこないます。

ナノメディシンの開発を加速させるためには幅広い材料に柔軟に対応することができ、信頼性が高く低コストで効率的なナノ粒子の作製法が必要です。Sunshineは均一で再現性のあるナノ粒子を作製するためUnchained Labsの革新的なマイクロ流体テクノロジーを利用しています(図2)。Sunshineを利用すれば流量比(FRR)、総流量(TFR)、前駆体量、サンプル回収量およびオプションのインライン希釈を正確に制御することができます。その結果、再現性高く単分散のさまざまなナノ粒子の生成が可能となります。Sunnyは消耗品のコストを抑えるだけでなく、幅広い試薬や溶媒に対応できるシステムを提供します。



図 2: Sunshine

本アプリケーション・ノートではナノメディシンの開発に利用するナノ材料を作製するうえで、Sunshineがさまざまな種類の材料をどのように柔軟に処理できるかについて説明します。まず、PLGA、2つの異なるリポソームと2つのmRNA-LNPを利用し、さまざまなナノ粒子を合成しました。作製した粒子はすべて20~150 nmのサイズ・レンジ内にあり、多分散指数(PDI)は<0.2で封入効率は90%を超えていました。本検討からFRR、TFRや反応物の希釈を正確に制御し、変えることがナノ粒子合成を最適化する鍵であることがわかりました。またSunshineはこれらの要素を厳密に調節するための理想的なツールであることが示されました。

Sunshineを利用したPLGAナノ粒子の合成

ポリ乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)ナノ粒子は、その生体適合性や生体内分解性の観点から薬の送達や放出の分野で利用されています。例えば、PLGA NPは、抗炎症薬であるトリアムシロン・アセトニドなどの眼科用薬の送達に使用されます。これらの薬物をPLGAに封入することで放出プロファイルが延長します。結果的に必要な投与量や薬剤投与の回数を低減し、患者コンプライアンスを高めることができます。またPLGA NPはユニークな表面と機能性という独自の特性をもちます。この特徴からPLGAに封入された薬物は、眼閉門の問題を克服することが可能となります(Jiang et al)¹。

粒子サイズはAPI送達の最終的な有効性を決定するうえで重要です。つまりはナノ粒子のサイズを正確に制御することが求められます。PLGA NP合成のための従来のバッチ法は、反応条件を正確に制御できないため再現性がありません。結果的にさまざまなサイズの粒子が生成されるので、粒子の凝集を制御できなくなる場合もあります。これら

パラメーター	詳細
水相 (A)	脱イオン(DI)水
有機相 (O)	0.5% (w/v) PLGAのアセトン溶液
流量比 (FRR)	可変 (A:O)
総流量 (TFR)	3 mL/分
Sunny	Sunny 275 XT

表1: Sunshineを利用したPLGAナノ粒子の合成パラメーター

が実験結果に悪影響を及ぼし、創薬や開発を妨げることとなります。

SunshineはPLGAナノ粒子の迅速な開発を可能にします。この例では流体力学的フロー・フォーカシング(HFF)法により試薬を混合するSunny 275 XTを利用し、ナノ粒子を合成しました。TFRを3 mL/分に保った状態でFRRを1:1から8:1(水相:有機相)まで変化させました。これによりPLGAナノ粒子のサイズが83~57 nmの範囲で正確かつ再現性よく制御されました(図3)。生成したPLGAナノ粒子の多分散指数(PDI)は平均0.1未満であり、単分散性が示されました。このことは、封入したAPIが一貫した放出プロフィールを示すうえで重要です。

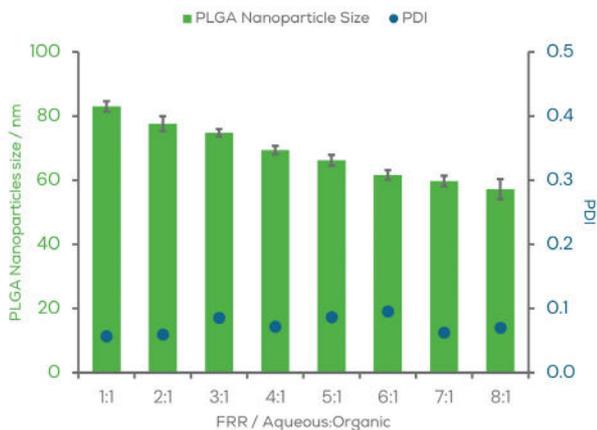


図3: PLGAナノ粒子をTFR 3 mL/分とし、水相:有機相のFRRを変化させて作製しました。粒度分布と多分散指数(PDI)は動的光散乱(DLS)により測定しました。エラーバーは平均(n=3)の標準偏差を表しています。

こうしたPLGA粒子をTFRやSunnyの種類を変えたり、または安定化剤を水相に導入することで最適化していくことも可能です。

また、Sunny Suiteソフトウェアを利用することでFRR、TFR、NP前駆体量やサンプル回収量を最適化していきます。さらにオプションのインライン希釈を実行し、制御可能な再現性のある単分散のナノ粒子を合成できます。プロトコール・モードを利用した10回の低容量実験を例にすると、一定の試薬ペアをさまざまなFRR、TFRや希釈率で15分以内に自動で実行できます。

Sunshineを利用したリポソームの合成

リポソームとは1つ以上のリン脂質二重層で生成された脂質ベースの小胞です。天然の細胞膜に類似する性質のため、リポソームは生体模倣コンパートメントとして機能することができます。リポソームは組成が比較的シンプルであることに加え、生体適合性に優れ有効性も高いことがわかっています。さらに親水性APIと疎水性APIの両方を送達できる柔軟性があることから、さまざまなカーゴの送達システムとして大きな関心を集めています。これらの理由からリポソームは、現在ではFDAによる承認を受けたナノメディシンの中で最も一般的なクラスとなっています。

パラメーター	Description
水相 (A)	1x PBS, pH 7.4
有機相 (O)	Phospholipon 90G (1 mg/mL), DDAB (0.1 mg/mL) のエタノール溶液
希釈	1x PBS pH 7.4
流量比 (FRR)	可変 (A:O:D)
総流量 (TFR)	3 mL/分
Sunny	Sunny 100 XT, 希釈には Sunny 190 XT

表2: Sunshineを利用したphospholiponベースのリポソームの合成パラメーター

最初の例ではphospholipon 90Gとカチオン性脂質であるジメチル・ジオクタデシル・アンモニウム・ブロミド(DDAB)をベースとしたリポソーム合成の結果を紹介します。溶媒としてアセトンが必要なPLGA NP合成とは異なり、このリポソーム製剤は脂質成分をエタノールに懸濁したものを有機相としています。リン酸緩衝生理食塩水(1xPBS, pH 7.4)を水相と希釈相の両方に使用しました。新規の製剤を評価するにはFRRの高速スクリーニングを効率的に利用します。これによりパラメーターを探索し、粒子生成の理想的または非理想的な条件の両方を特定することができます(図4)。

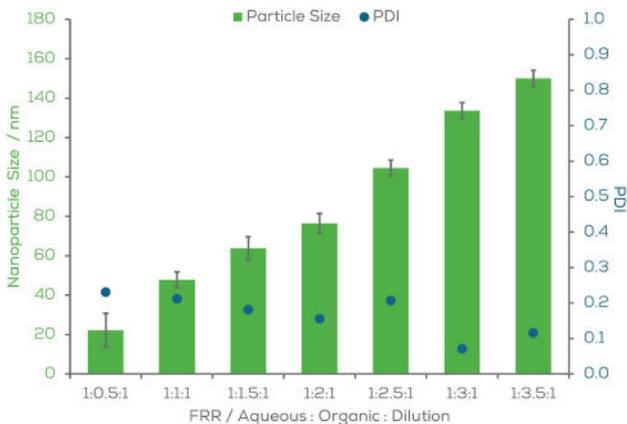


図4: PhospholiponベースのリポソームをTFR 3 mL/分とし、水相：有機相のFRRを変化させて作製しました。リポソームのサイズのレンジは20～150 nmで粒度分布と多分散指数(PDI)は動的光散乱(DLS)により測定しました。エラーバーは平均(n=3)の標準偏差を表しています。

上述の結果からFRRに対応する形式で作製したリポソームのサイズが20 nmから150 nmまで変化したことがわかります。この実験では水相成分と希釈剤成分を一定に保った状態で有機相成分を増やしました。水相：有機相：希釈剤の比率を1:0.5:1から1:3.5:1まで変化させました。TFRは、すべての実験で3 mL/分に保ちました。

有機相の比率が低い条件ではPDIが高い値になりました。一方で比率を1:3:1とした場合ではPDIは最も低い値となりました。しかしながら、粒子サイズは求めている値よりも大きくなりました。比率を1:2:1とした場合では約80 nmの適切な粒子サイズが得られました。PDIは0.2未満で再現性がみられました。この最適化した流量比でTFRやSunnyの形状など、その他の条件をさらに検討しPDIや性能基準をさらに最適化することが可能です。

リポソーム合成のもう1つの例として1,2-ジミリスチール-sn-グリセロール-3-ホスホコリン(DMPC)、コレステロールおよび1,2-ジミリスチール-rac-グリセロール-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(DSPE-PEG 2000)をそれぞれ2:1:0.05のモル比で含む製剤を利用した結果を示します。本検討ではTFRがリポソームのサイズに及ぼす影響を検討しました。Sunshineのプロトコール・モードを利用しFRRを3:1:1(水相：有機相：希釈相)に保った状態でTFRの値を2 mL/分から5 mL/分に上げる実験をおこないました。

パラメーター	Description
有機相 (O)	DMPC: コレステロール DMG-PEG 2000 (2:1:0.05 モル) のエタノール溶液
水相 (A)	PBS (Phosphate Buffered Saline) (1X, pH 7.4)
希釈相 (D)	PBS (Phosphate Buffered Saline) (1X, pH 7.4)
流量比 (FRR)	3:1:1 (A:O:D)
総流量 (TFR)	可変

表3: Sunshineを利用してFRRを3:1:1(A:O:D)としたリポソーム・ベースのDMPC:コレステロール:DMG-PEG 2000の作製条件

図5に示したデータからTFRの値を上げるとリポソームの流体力学的サイズが133 nmから109 nmに18%ほど減少したことがわかります。TFRの値が上がることで、粒子のPDIも低下し改善されました。このことから幅広いプロセスの条件に対し、製剤の反応を評価することが重要であることがわかります。

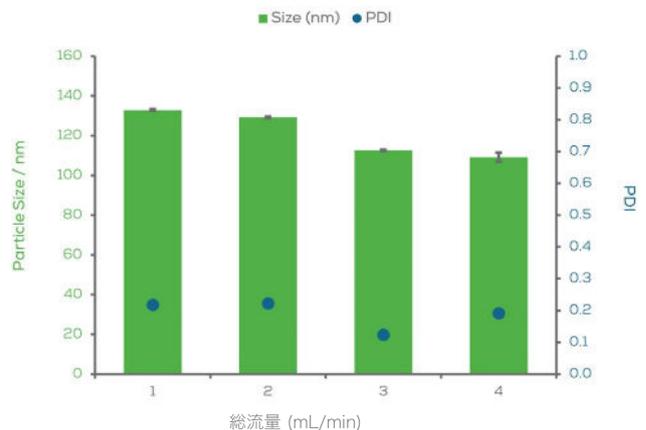


図5: Sunshineを利用しFRRを3:1:1(A:O:D)と一定にし、さまざまなTFRでDMPC、コレステロールやDMG-PEG 2000ベースのリポソームを作製した条件。粒度分布と多分散指数(PDI)は動的光散乱(DLS)により測定しました。エラーバーは平均(n=3)の標準偏差を表しています。

Sunshineを利用した脂質ナノ粒子の合成

脂質ナノ粒子(LNP)が近年、脂質ベースのナノキャリアの中で重要視されていることは間違いないでしょう。LNPはすでに確立されたリポソーム技術に由来し、静電相互作用を介することでsiRNA、mRNA、miRNAやDNAなどの負に荷電したオリゴヌクレオチドを封入することができます。そこにはカチオン性または、イオン化カチオン性脂質が添加されています。研究領域は飛躍的に拡大しておりCRISPR療法からmRNAワクチンに至ります。さまざまなペイロードを効率良くターゲットのみに送達することが求められています。そのため製剤、組成、サイズ、表面化学や多くのパラメータの意味を理解するための研究が進められています。

パラメーター	Description
水相 (A)	ルシフェラーゼmRNA (4basebio PLC) の酢酸バッファー溶液, pH 4
有機相 (O)	SM-102: DSPC: コレステロール: DMG-PEG 2000 (50:10:38.5:1.5 モル比) のエタノール溶液
希釈 (D)	希釈無し
流量比 (FRR)	可変 (A:O)
総流量 (TFR)	5 mL/分
N/P	6
Sunny	Sunny 190 XT

表4: Sunshineを利用したmRNA-LNPの合成パラメーター

ここではイオン化カチオン性脂質であるSM102、DSPC、コレステロールとDMG-PEG 2000を50:10:38.5:1.5のモル比で含む製剤を調製しました。mRNAのリン酸負電荷に対するカチオン性脂質電荷の比率(N/P比)を6とし、ルシフェラーゼmRNA(4basebio PLC)を封入しました。低容量のLNPを自動で作製するためにSunshineを利用しTFRを5 mL/分に保ち、それぞれ異なるFRRでおこないました。

図6からFRRを2:1から6:1(水相:有機相)に上げるとmRNA-LNPのサイズが68 nmから58 nmに14.7%減少したことがわかります。粒子サイズとPDIは透析後にDLSにより評価しました。検討したすべての条件において、一貫して低いPDIの値となりました。

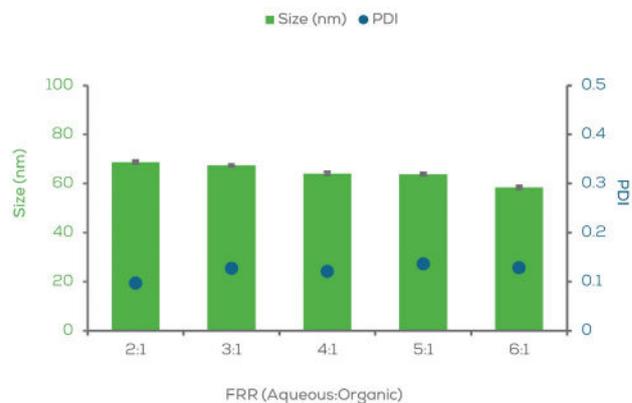


図6: mRNA-LNPをTFR 5 mL/分と一定にし、さまざまなFRR(水相:有機相)で希釈せずに作製しました。透析後のLNPのサイズ・レンジは58~68 nmで平均PDIは0.12でした。粒度分布と多分散指数(PDI)は動的光散乱(DLS)により測定しました。エラーバーは平均(n=3)の標準偏差を表しています。

Quant-it™ RiboGreen RNA Assay Kit(Thermo Fisher Scientific、以下「RiboGreen」)を利用しmRNA封入効率(EE%)を検討しました。TFRを5 mL/分に保ちN/P比は6と一定に保ちました。図7のデータから検討したすべてのFRRで封入効率(EE)が90%を超えました。FRRが6:1(水相:有機相)では、封入効率が96%と最も高くなることがわかります。

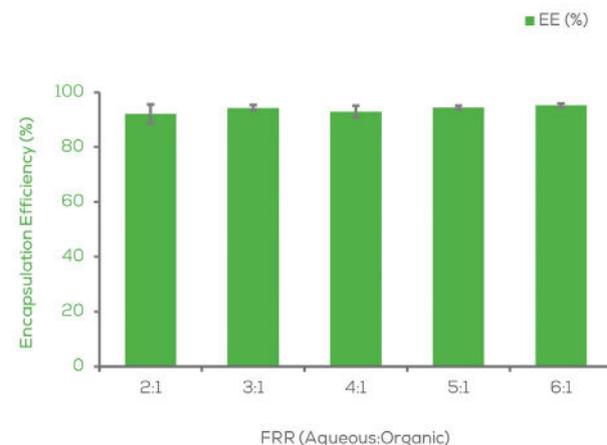


図7: 作製したLNPのmRNA封入効率(EE%)をRiboGreenアッセイで求めました。mRNA-LNPはSunshineを利用しTFRを5 mL/分の一定とし、さまざまなFRR(水相:有機相)で希釈せずに作製しました。N/P比は6に固定しました。エラーバーは平均(n=3)の標準偏差を表しています。

2つ目のLNP製剤として、カチオン性脂質であるDOTAP(1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン)ベースのLNP製剤を以下の表5に示すとおり調製しました。本検討のペイロードにはアデニン・ヌクレオチドの一本鎖RNAホモポリマーで、平均鎖長が>200ヌクレオチドのポリアデニル酸(Poly(A)、Merck、カタログ番号GE27-4110-01)を利用しました。Poly(A)は粒子合成の実験に適したmRNAの類似体であることが示されています(データは要請に応じて提供)。

パラメーター	Description
水相 (A)	Poly(A) のクエン酸, pH 6
有機相 (O)	DOTAP: DSPC: コレステロール: DMG-PEG 2000 (40:10:47.5:2.5 モル) のエタノール溶液
希釈 (D)	1x PBS, pH 7.4
流量比 (FRR)	3:1 (A:O)
総流量 (TFR)	可変
N/P	8
Sunny	Sunny 490 Trident T

表5: Sunshineを利用したDOTAPベースのPoly(A)-LNPの合成パラメーター

SunshineとSunny 490 Trident Tを組み合わせ、Poly(A)を搭載するDOTAPベースのLNPを作製しました。FRRを3:1(水相:有機相)に保った状態でTFRを5 mL/分から12 mL/分まで変化させ、TFRがナノ粒子のサイズおよび多分散性に及ぼす影響を探索しました。図9に示すようにPoly(A)を搭載したDOTAPベースのLNPをサイズ・レンジ128~66 nmでPDI約0.13と一貫して高い再現性のもと合成できました。

それぞれのTFRについて3回のリピート測定をおこないました。作製したすべてのLNPのサイズは一貫しており、PDIは0.2未満で相対標準偏差(RSD)は4%未満であったことから、再現性があると考えられます。

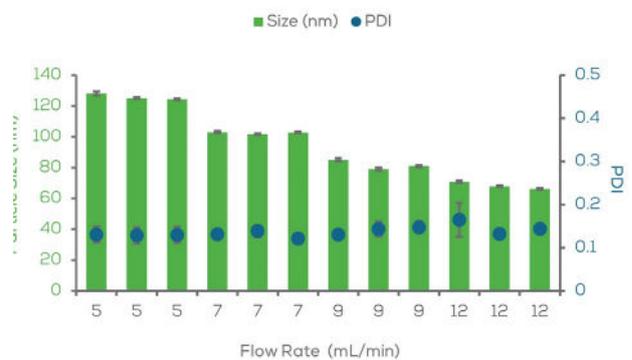


図9: Poly(A)を封入したDOTAPベースのLNPをFRR 3:1(水相:有機相)と一定にし、さまざまなTFRで作製しました。LNPのサイズ・レンジは66~128 nmで多分散指数(PDI)の値は約0.13でした。粒度分布とPDIは動的光散乱(DLS)により測定しました。エラーバーは平均(n=3)の標準偏差を表しています。

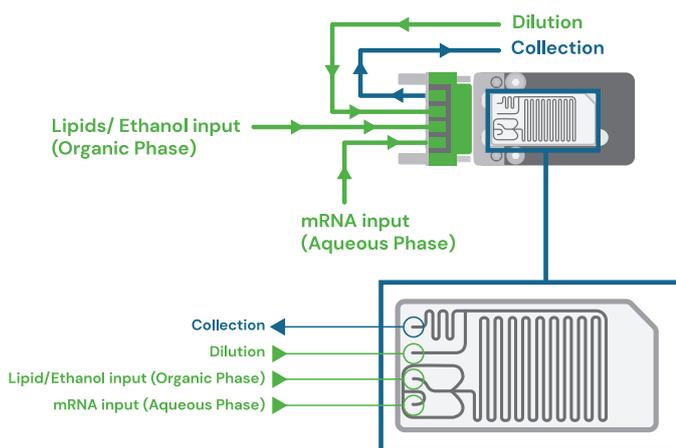


図8: Sunny 490 Trident T。有機溶媒中のDOTAP脂質と水性バッファ中のペイロードPoly(A)を注入します。流体力学的フロー・フォーカシング法を適用し、その後に混合することでPoly(A)-LNPを会合させます。オプションでインライン希釈をおこないます。Sunnyの上面にリニア・コネクタを取り付けることにより注入したmRNAをチップ上で2本の流れに分岐させ、三叉接続部で合流させることで注入した脂質/エタノールと混合することができます。

結論

ナノ粒子合成には、さまざまな材料が利用されます。しかしながら、それぞれの製剤の特性が異なるため最適化プロセスを決めることは困難です。そのため、さまざまなナノマテリアルからナノ粒子の作製を最適化できるプロセス・パラメーターを迅速に組み合わせ、効率良くスクリーニングできる”all-in-one”システムの需要が高まっています。また従来のバルク合成法では、不均一または予測不可能なナノ粒子が生成されることが多くあります。有効な薬物の送達には粒子を正確に制御し、高い再現性で作製する必要があります。それゆえにバッチ法で作製した粒子は、製薬業界にとって魅力的な選択肢とはいえません。

従来のバッチ合成法とは異なり、マイクロ流体工学はTFR、FRRおよび／またはチップ形状を調節し粒子サイズを操作することができます。例えば水相：有機相の流量比を上げると、ほとんどの製剤でナノ粒子のサイズが減少します。

本書に示したナノ粒子の合成ではFRRを調節し有機成分を増加させることで、多くのケースにおいて粒子のサイズが大きくなることが確認できました。単位容積あたりの脂質／ポリマーの濃度を高くし拡散／混合時間を長くすれば、より大きな粒子の生成が誘導されます。

同じようにTFRも粒子のサイズを決定するうえで重要な役割を果たしています。混合形状を通じTFR（すなわち流速とレイノルズ数も）を上げると混合時間が短縮します。その結果、得られるナノ粒子のサイズが小さくなります。

Sunshineは精密なマイクロ流体工学と自動化を組み合わせ、任意の製剤およびナノ粒子の種類に最適なプロセス条件を迅速にスクリーニングすることで特定します。すなわちSunshineは、ナノ粒子開発のための独自のプラットフォームを提供することができます。マイクロ流体工学で得られるナノ粒子は、他の合成方法と比べサイズ分布がとても狭い傾向にあります。そのため粒子サイズを容易に操作することができます。

Sunshineを利用すればPLGAナノ粒子、リポソーム、イオン化LNPやカチオン性LNPなどの多様なナノ粒子の生成を迅速に最適化できます。一連の実験（それぞれTFRとFRRが異なる）を定義し自動で実行できるため、ナノ粒子の合成に最適な条件を決定できます。その後Sunshineはこれらの条件を利用し、1日最大数十リットルのナノ粒子を連続モードで作製できます。

材料と方法

PLGAナノ粒子の作製ではポリ乳酸グリコール酸共重合体(Sigma Aldrich、英国)をアセトン(Sigma Aldrich、英国)に0.5% (w/v)の濃度で溶解しました。水相にはイオン交換水を利用しました。製剤溶液はすべて0.2 μmのフィルターを通しました。すべての実験でSunny 275 XTを利用しました。

PhospholiponおよびDDABベースのリポソームの作製ではphospholipon 90G(Lipoid、スイス)およびDDAB(Fisher Scientific、英国)をそれぞれ1 mg/mLおよび0.1 mg/mLの濃度でエタノール(試薬グレード99%、Sigma Aldrich、英国)に溶解しました。水相と希釈相にはpH 7.4の1×PBSを利用しました。調製した溶液は、すべて0.2 μmのフィルターを通してから利用しました。粒子はSunny 100 XTと希釈剤のインライン添加のため、直列に配置した2つ目のSunnyであるSunny 190 XTを利用して生成しました。

2つ目のリポソーム製剤はDMPC(Avanti、米国)、コレステロール(Sigma Aldrich、英国)およびDMG-PEG 2000(Avanti、米国)をそれぞれモル比2:1:0.05で無水エタノール(Sigma Aldrich、英国)に溶解して調製しました。水相および希釈バッファーにはpH 7.4の1×PBSを利用しました。これらのリポソームについてはSunny 190 XTを合成とインライン希釈の両方に利用しました。

SM-102ベースのmRNA-LNPはDSPC(Avanti、米国)、DMG-PEG 2000(Avanti、米国)とコレステロール(Sigma Aldrich、英国)をエタノールに溶解し最終濃度を10 mg/mLとして合成しました。SM-102(BroadPharm、米国サンディエゴ)は100 mg/mLのエタノール溶液として供給され、最初の脂質溶液と混合してSM-102、DSPC、コレステロールおよびDMG-PEG 2000をそれぞれ50:10:38.5:1.5の相対モル比で含む総濃度10mMの混合液を調製しました。水相には89.44 μg/mLのmRNA(ルシフェラーゼ)をpH 4の50 mM酢酸バッファー(ヌクレアーゼ非含有)に溶解したものを利用しました。LNPの合成にはSunny 100 XTを利用しました。

DOTAPベースのLNPは、DOTAP(Avanti、米国)、DSPC(Avanti、米国)、DMG-PEG 2000(Avanti、米国)とコレステロール(Sigma Aldrich、米国)を用いて作製しました。脂質成分をエタノールに溶解しDOTAP、DSPC、コレステロールおよびDMG-PEG 2000をそれぞれ40:10:47.5:2.5のモル比で含む10mMの溶液を調製しました。水相には64 μg/mLのPoly(A)をpH 6.0の50 mMクエン酸バッファー(ヌクレアーゼ非含有)に溶解したものを利用しました。LNPの合成にはSunny 490 Trident Tを利用しました。

調製したすべてのナノ粒子についてSunshineを利用し有機（エタノールまたはアセトン）溶液と水溶液をマイクロ流路で自動混合し、さまざまな総流量および流量比で一連の実験をおこないました。

粒度分布と多分散指数(PDI)はDLSにより測定しました。すべてのサンプルは3回分析し、それらの平均サイズおよび標準偏差(SD)を報告しました。

生成したナノ粒子の透析は、透析キット(Pur-A-lyzer™ Midi Dialysis Kit, Sigma, 英国)にてpH 7.4の1×PBSが1L入ったビーカーにておこないました。透析はエタノールを除去し、バッファーを交換するために3時間おこないました。透析後のナノ粒子溶液は、さらなる検討のために冷蔵庫で保管しました。

mRNA-LNPの封入効率(EE%)はRiboGreenアッセイにより測定しました。Triton X-100を利用しLNPを破壊した後にサンプル中の総mRNA濃度を測定しました。この値をTritonX-100の非存在下で測定した遊離mRNA濃度と比較しました。RiboGreenの蛍光強度は、マイクロプレートリーダー(FLUORostar, BMG, ドイツ)で測定しました。



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。掲載されているその他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