

# StunnerでLNPに関する情報を得る

## Introduction

動的光散乱(DLS)を用いた粒子のサイジングは、脂質ナノ粒子(LNP)の重要な分析技術の1つですが、多くのDLS機器は一度に一つのサンプルしか測定できず、またサイズに関する答えしか得ることはできません。このことが、生命を救う可能性のある遺伝子治療やmRNAワクチンの開発を遅らせています。

RNA-LNP中のRNA濃度を測定するために使用される色素ベースの蛍光アッセイはどこにでもあります、好んで使用されるツールではありません。LNPを不安定化させるために使用される界面活性剤は蛍光に干渉する可能性があり、アッセイのダイナミックレンジは限られており、色素は時として非常に高価です。UV/Vis吸光度は精製サンプル中のRNAの定量に長い間使用されていますが、ほとんどのUV/Vis分光光度計では、LNPサンプルの濁りにより、正確な測定値を得ることができません。

Stunnerは、高スループットのDLSとインテリジェントな短光路長のUV/Visを組み合わせて、濁りのあるRNA-LNPサンプルでも、サイズと総RNAを定量することができます。

Stunnerは、わずか2  $\mu$ Lのサンプルから1分以下でRNA-LNPのサイズ、サイズ分布、総RNA濃度および濁りを完全に読み取ることができる最初のプラットフォームです(図1)。Stunnerは、最大96個のLNPサンプルのUV/VisとDLSの両方をわずか1時間で読み取ります。さらに高いスループットが必要な場合には、標準のマイクロボリュームSBSフォーマットプレートを用いてStunnerを自動化することができます。規制環境に対しては、21 CFR Part 11ツールでStunnerを強化でき、UV/Vis性能は米国および欧州薬局方への適合性を検証することができます。

Stunnerはより迅速かつ容易にRNA-LNPを評価できますので、より多くのRNAコンストラクト、脂質混合物または処方を検討することが可能です。色素ベースの方法の前にStunnerで測定することで、総RNAを分析する段階が不要になる、または希釈倍率を選択する際の当て推量をなくすることができます。差し迫った課題に関しては、サイズまたは濁度を素早くチェックすることで、結果を台無しにした



図1: Stunner: 核酸定量と粒子サイジングの独自の組み合わせ

可能性のあるサンプルの分解を見つけ出すことができず、Stunnerを用いてRNAまたはLNP粒子の濃度とサイズを判断することで、より迅速、精密かつ完全にサンプルを理解でき、次の実験へと進むことができます。

本アプリケーションノートでは、StunnerがRNA含有脂質ナノ粒子(LNP)の総RNA濃度、粒子サイズ、サイズ分布および濁度をどのように測定するのかについて説明します。

## 方法

Fluc-mRNA-LNPと空のLNPの原液は、RiboGreen®アッセイで測定された粒子濃度およびRNA濃度とともに、Precision NanoSystems社(カナダ、ブリティッシュコロンビア州バンクーバー)から提供を受けました。LNPは、GenVoy-ILM™ Lipid MixおよびルシフェラーゼをコードするmRNAから、NanoAssemblr® Ignite Systemを用いて作製しました。LNPをpH 7.4のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で希釈し、StunnerのRNA-LNPアプリケーションを用いて測定しました。RNA濃度は、260 nmでのRNAによるサンプル中のデコンポリューション後の吸光度に基づき、係数40で測定しました。Stunnerでの測定はすべて6回ずつ、2  $\mu$ Lのサンプルを用いて行いました。20°CにおけるPBSの粘度1.002、屈折率1.334をDLSの計算に用いました。

STUNNERでLNPに関する情報を得る

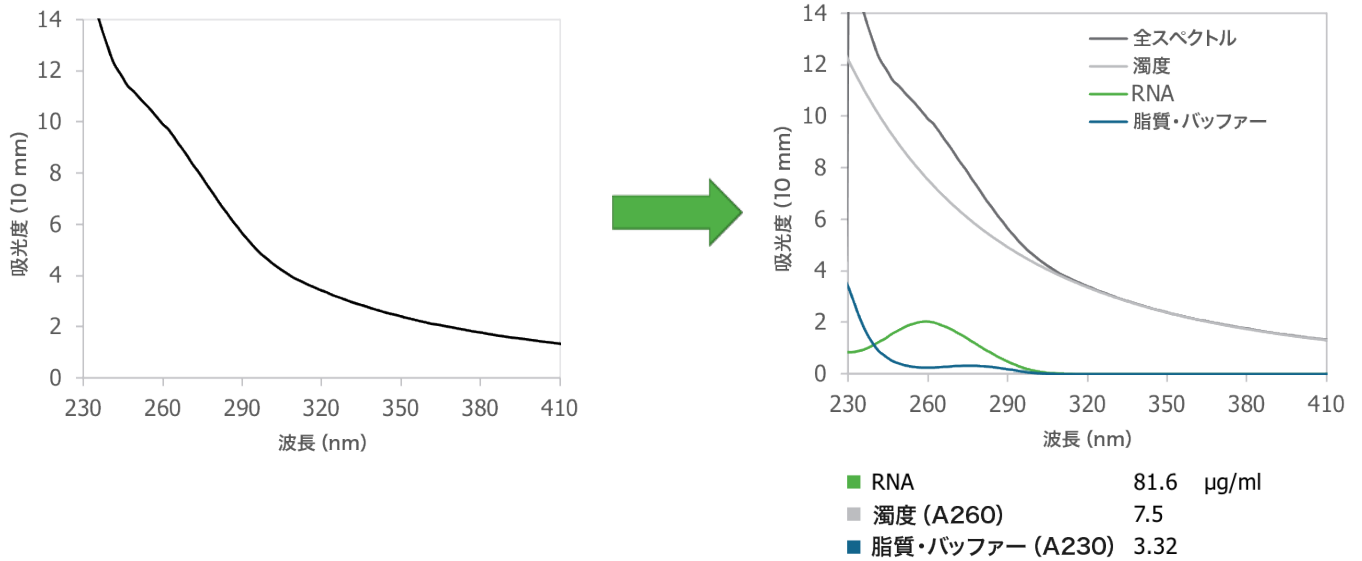


図2: Stunnerは、RNA-LNPの全UV/Vis吸収スペクトルから濁度、RNAおよびその他の成分の寄与を分離し、その情報を用いて2 μLのサンプルから総RNA濃度を定量します。

## 結果

LNPのUV/Vis吸収スペクトルは、紫外線領域および可視光領域全体にわたって光散乱が主体であるため、ほとんどのUV/Vis分光光度計では、こうした難しいサンプルからRNA濃度を測定することは困難または不可能です。これは強い濁りまたは曇りとして目で見ることができます。StunnerはUnmixアルゴリズムを用いてRNA-LNPの吸収スペクトルをデコンボリュートし、この全シグナルに対す

る濁度、RNAおよびその他の成分の個々の寄与を決定します(図2)。スペクトルをデコンボリュートした後、Stunnerはサンプル中の総RNA濃度を定量し、全吸収スペクトルに対する濁度およびその他の成分の寄与を報告します。

色素ベースのRNA定量法でLNPを分析するためには界面活性剤の添加が必要です。これは蛍光の結果に影響を及ぼす可能性があり、サンプルの希釈が必要であるため、誤差をもたらすことがあります。

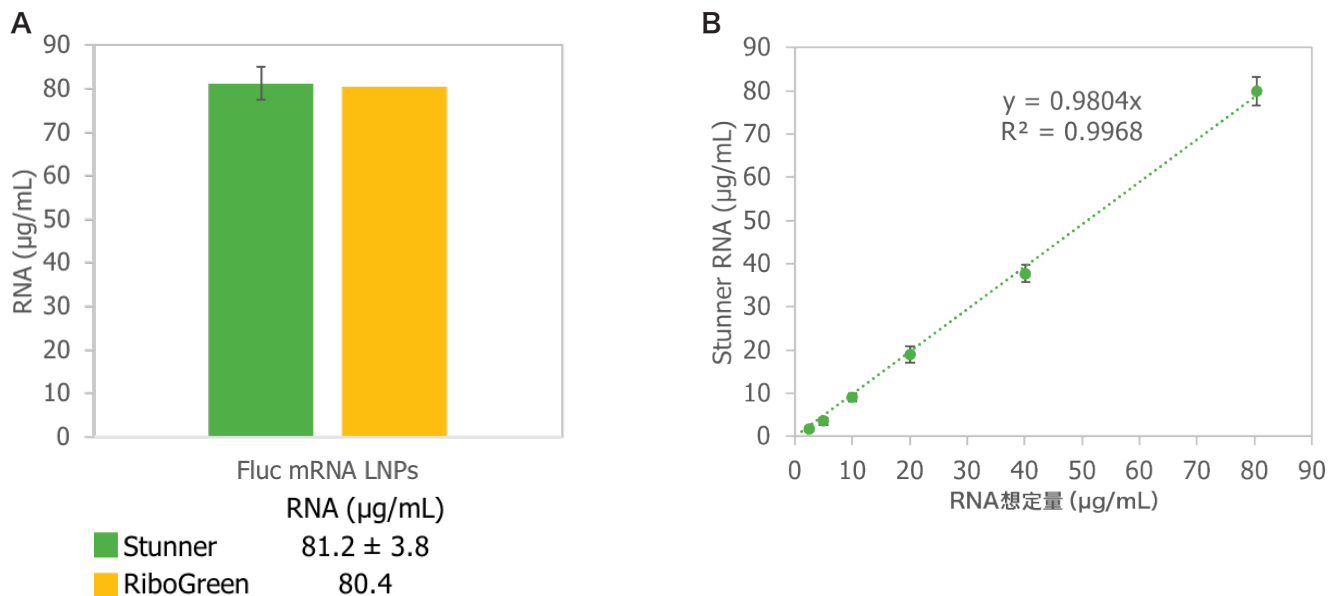


図3: Stunnerで測定したRNA濃度とRiboGreen®で測定された総mRNA濃度との間に高い一致がみられています(A)。Fluc-mRNA-LNPの2倍希釈系列は、1.2 μg/mLまで高い線形性を示しました(B)。エラーバー: ± 1標準偏差(SD)

Stunnerは、総RNA濃度をRiboGreen®アッセイと同じくらい良好に測定できる、希釈フリー、試薬フリーの定量法です(図3A)。低濃度のサンプルを測定する場合、Stunnerは広範囲のRNA-LNP濃度を高精度で定量します。Fluc-mRNA-LNPの2倍希釈系列は高い線形性を示し、想定されるRNA濃度との高い相関がみられ、R2は0.99超、傾きはほぼ1でした(図3B)。

脂質ナノ粒子の場合、DLSによる粒子サイズの検証は、特に処方および安定性試験において重要な分析技術です2。他のDLS機器は大量のサンプルが必要であるか、一度に一つのサンプルしか測定できないため、多数の処方またはLNPをスクリーニングすることは困難です。Stunnerは最大96個のサンプルのDLS測定を1時間以内で実施でき、結果はまとめて表示されますので、平均サイズやサイズ分布を目視で素早く比較することが可能です(図4)。Stunnerは、さらなる解析のため、数値結果をExcelにエクスポートしたり、PDFレポートとして保存したりすることもできますので、複雑な実験ワークフローやデータ管理も容易です。



図4: StunnerのDLSは、96個のLNPサンプルのサイズおよびサイズ分布をおよそ1時間で測定します。

Fluc-mRNA-LNPを6回繰り返し測定したときの平均流体力学直径は79 nm、CVは1%、多分散指数(PDI)は0.14、SDは0.02でした(図5)。単分散性のLNPサンプルはPDIが0.1以下であるのに対し、高度に多分散したサンプルのPDIは0.2以上となる傾向があります。中間のPDIおよび単一の強度分布ピークは、このLNPの粒子サイズの不均一性が中程度であることを示しています。Stunnerは一貫したDLS結果を提供しますので、自信を持ってLNPの品質を評価することができます。

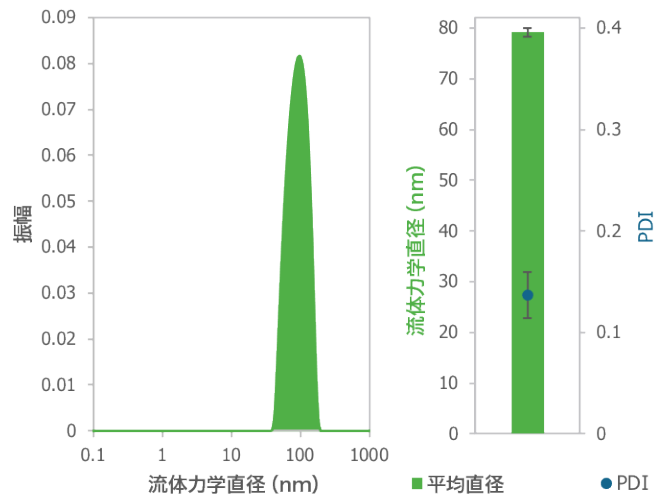


図5: これらのFluc-mRNA-LNPの流体力学直径は79 nm ± 1%、PDIは0.14 ± 0.02でした。

粒子濃度はLNPの評価において重要なもう一つの特性です3。LNPのUV/Vis吸収スペクトルに対するデコンボリューションの一環として、Stunnerは濁度によるサンプルのODを測定し、それを「濁度(A260)」として表示します。コロイド系の濁りは、懸濁液中の粒子のサイズと数の両方によって決定され、想定されるEmpty LNPとFull LNPの粒子濃度と直線的に相関します(図6)。明確に定義されたスタンダードがあれば、Stunnerによる濁度の測定を、LNP懸濁液中の粒子濃度を決定する方法として使用できる可能性があります。

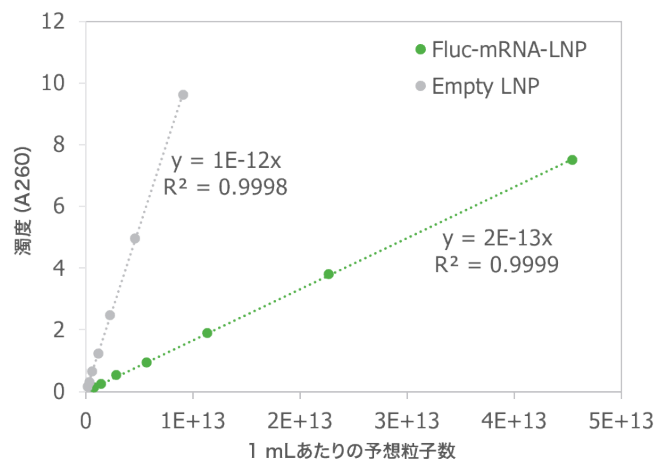


図6: LNPでは、濁度と想定される粒子濃度が高く相関しますが、その傾きはLNPのサイズおよび組成(核酸の存在を含む)に応じて異なります。

## 結論

一度に一サンプルずつのDLS分析は、重要なRNA-LNP実験を減速させ、ナノ粒子に凝集や分解が生じたかどうか知ることを困難にします。このことが、生命を救う遺伝子治療やRNAワクチンの進歩を遅らせています。Stunnerは、一度に最大96個のサンプルに対して微量、ハイスループットにDLSを実施でき、平均サイズとサイズ分布を1時間で測定できます。Stunnerは、再現性の高いDLS結果が得られることに加え、色素、界面活性剤、スタンダードの必要がなく、試薬フリーの総RNA定量が可能です。

濁度の結果は、スタンダードと組み合わせることで、粒子濃度を得ることができます。RNA-LNPが研究、開発、製造のいずれの段階にあるかにかかわらず、Stunnerは必要なデータを迅速に提供し、サンプルの複雑さを解明するための手助けとなるでしょう。

## 参考文献

1. RiboGreen assay protocol, C. Walsh, et al. Precision NanoSystems User Guide PNI-SOP-S9-001-EXT, 2016.
2. Manufacturing considerations for the development of lipid nanoparticles using microfluidics, C. Rocas, et al., *Pharmaceutics*, 2020; 12(11):1–19.
3. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids, L. Ribeiro, et al., *Scientific Reports*, 2018; 8(1):1–8.



### 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

© 禁無断複写・転載。Unchained Labsのロゴ、StunnerおよびStunnerのロゴは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