

# Stunnerで手間のかからないナノ粒子の特性評価を

## Introduction

ナノ粒子および脂質ナノ粒子(LNP)の特性評価では多くのパラメータを評価しますが、その中で最も重要な2つのパラメータはペイロード濃度とサイズです。ペイロード濃度を定量することは、どれだけの量の薬物が送達されるかを知るための鍵であり、ペイロードを必要な場所に有効に届けるためには、ナノ粒子が適切なサイズでなければなりません。

RNA、DNA、タンパク質または低分子ペイロードの定量にはさまざまなアッセイが使用されていますが、そのほとんどは、複雑な崩壊ワークフロー、高価な色素および無駄な検量線に依存しています。ナノ粒子の崩壊という余計な作業に加えて、使用する界面活性剤が色素の蛍光や比色シグナルに干渉する可能性もあります。UV/Vis吸光度は精製サンプル中のRNA、DNA、タンパク質および低分子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、ナノ粒子の濁りが強いためにサンプルが曇り、正確な測定値を得ることができません。

動的光散乱(DLS)はナノ粒子のサイジングのために広く用いられている分析技術ですが、多くのDLS機器では、大量のサンプルと長時間の作業が必要です。また、単機能のDLS装置の場合、ペイロードに関する情報は得られず、粒子濃度について多くのことを知ることもできません。ナノ粒子のわずかな種類側の側面を明らかにするために大量の時間を割くことは、生命を救う遺伝子治療、ワクチンおよびバイオ医薬品の開発を遅らせることとなります。

Stunnerは、高ハイスループット・短光路長のUV/Visと高度なUnmix解析技術をDLSと組み合わせ、ペイロードの定量とナノ粒子のサイズ決定を一度に行うことができます(図1)。

LNPサンプルを分析したい場合、StunnerにはRNA-LNP、DNA-LNPまたはタンパク質LNPペイロードに対するアプリケーションが組み込まれていますので、サイジングと定量をシンプルかつ容易に行えます。Stunnerは、Unmix解析でLNPの濁りを排除し、プリセットされた各ペイロードの吸光度を粒子やバッファの吸光度から分離します。



図 1: Stunner: 任意のナノ粒子を特性評価できる、UV/Visと動的光散乱(DLS)の唯一無二の組み合わせ

LNP以外を分析したい場合は、カスタムナノ粒子アプリケーションを使用して、何を対象とするか、それをどのように定量するかをStunnerに正確に指示することができます。カスタム粒子とペイロードを構成するアナライトのスペクトルをStunnerに教えることで、定量への驚くほどシンプルな近道が得られます。

Stunnerは、任意のペイロードを定量し、わずか2  $\mu$ Lのサンプルから1分以下でLNPや他のナノ粒子のサイズを決定できる非破壊的な方法を研究者の皆様に提供します。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は、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、StunnerのUV/Vis性能について米国および欧州薬局方への適合性を検証でき、21 CFR Part 11 ツールで強化することができます。

本アプリケーションノートでは、StunnerがRNA、DNA、タンパク質および薬物負荷LNPのペイロード、粒子サイズ、サイズ分布および脂質吸光度をどのように定量するかについて説明します。

## 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)、2-オレオイル-1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(POPE)、コレステロール(Chol)および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)脂質原液をエタノール中で調製しました。仔ウシ肝RNAと仔ウシ胸腺DNAを10 kD MWCOフィルターでろ過し、保持液をLNP作製に使用しました。

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)のNanoAssemblr® Igniteを用いて、RNA、DNAおよびリゾチームを負荷したLNPを作製しました。すべてのLNPは、DOTAP:POPE:Chol:DMG-PEGを50:10:38.5:1.5のモル比でエタノールに溶解したものとし、全流量(TFR)を12 mL/分、水相と有機相の流量比(FRR)を3:1として作製しました。RNA-LNPとDNA-LNPの作製は、水相(100 mMクエン酸緩衝液、pH 4)に100、50および10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の核酸をそれぞれ添加して窒素対リン比(N/P)を5、10および50とし、最終脂質濃度は4 mMとしました。リゾチームLNPは、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)の水相を用いて作製し、初期リゾチーム濃度は指定どおり、最終脂質濃度は5 mMとしました。作製後、LNPをpH 7.4のPBSにバッファー交換し、残留有機溶媒を除去しました。

Avanti Polar Lipids社(米国、アラバマ州アラバスター)のドキソルピシンを負荷したPEG化リポソームと空のリポソーム(コントロール)を2倍希釈系列で希釈しました。StunnerのStored Spectrum機能を用いてスペクトルを測定し、これを用いてカスタムナノ粒子アプリケーション用アナライタを作製しました。

nanoComposix社(米国、カリフォルニア州サンディエゴ)のUltra Uniform PEG-カルボキシル金ナノ粒子スタンダードを用いて、StunnerのDLSシステムをバリデーションしました。

ペイロードの定量、脂質・バッファーの吸光度、流体力学的サイズおよび多分散性を適切なStunner LNPアプリケーションで評価しました。Stunnerでの測定はすべて4回ずつ繰り返し、2  $\mu\text{L}$ のサンプルを用い、PBSをブランクとして実施しました。20°Cにおけるバッファーの粘度は1.002 cP、屈折率は1.334とし、DLS測定を5秒ずつ4回実施しました。

## 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のペイロードを定量することは困難または不可能です。この強い光散乱は、濁りまたは曇りとして目で見ることができません。Stunnerの一連のLNPアプリケーションは、Unmixアルゴリズムを用いてLNPの吸収スペクトルをデコンボリュートし、全シグナルに対する濁り、ペイロード、脂質およびその他の成分の個々の寄与を決定します。Stunnerに組み込まれているアプリケーションは、それぞれ特定のペイロード分子(RNA、DNAまたはタンパク質)を検出できるように設計されています。カスタムナノ粒子アプリケーションでは、ペイロードを含む各成分の吸光度からナノ粒子の全体像を理解し、それを全吸収スペクトルからデコンボリュートし、定量することが可能です。Unmixによるデコンボリューションはすべて各成分の吸収スペクトルに基づいていますので、空のナノ粒子をブランクとして使用する必要はありません。ナノ粒子の定量でStunnerに必要なものは水のコントロールだけです。

脂質回収アッセイは、通常、複雑な液体クロマトグラフィー(LC)法に依存しています<sup>1</sup>。LNPの成分は紫外線を吸収できますので、Stunnerのナノ粒子アプリケーションの一貫として、それらを定量し、デコンボリュートすることが可能です。これらの吸光度値は従来のLC法を補完し、特に多数のサンプルに対する脂質回収スクリーニングを高速化できる可能性があります。

すべてのナノ粒子において、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で重要となる分析技術です<sup>2</sup>。他のDLS機器で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UV/VisおよびDLS測定を1時間以内に実施でき、サンプルの使用量もわずか2  $\mu\text{L}$ です。

## RNA-LNP

StunnerのRNA-LNPアプリケーションは、粒子の吸収シグナルを分解し、サンプル中の総RNA濃度を定量するとともに、濁度および脂質とバッファーを合わせた成分からの吸光度の寄与を報告します(図2A)。

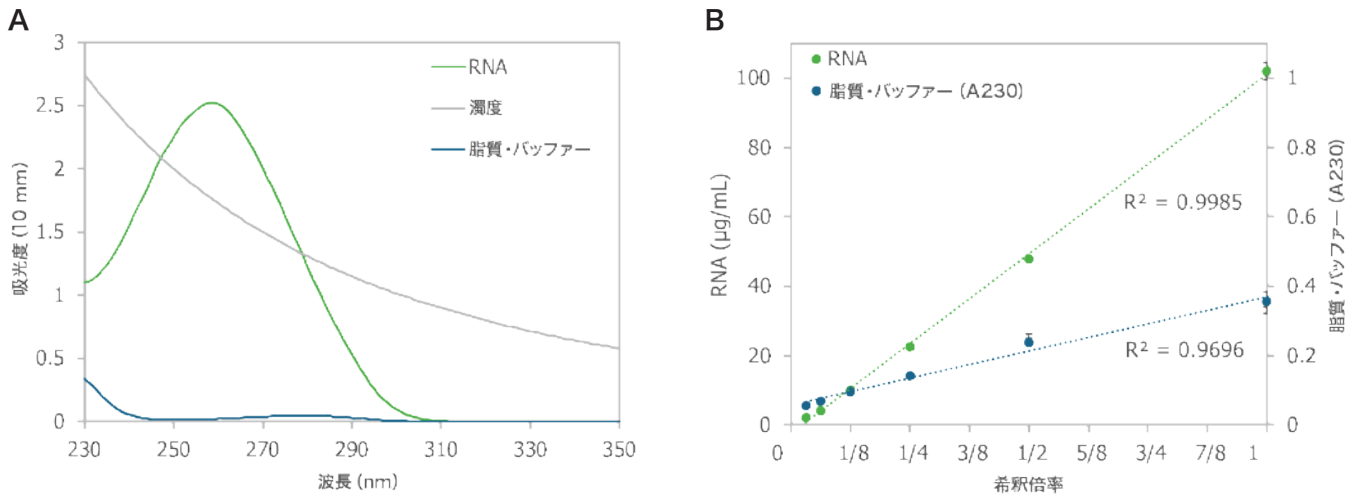


図 2: RNA-LNPアプリケーションは、ナノ粒子のUV/Vis吸収スペクトルをその成分であるRNA、濁りおよび脂質・バッファーにデコンポリュートします(A)。StunnerのRNA定量値および脂質・バッファの吸光度測定値は、N/P=5のRNA負荷LNPの希釈系列について線形でした(B)。エラーバー: ±1標準偏差(SD)

StunnerによるRNA-LNPの定量は極めて高い再現性を有しています。RNA負荷LNPの2倍希釈系列は、RNA濃度に対して高い線形性および精度を示し、 $R^2$ は0.99超、CVは通常5%未満でした(図2B)。230 nmにおける脂質・バッファの吸光度も希釈倍率に対する線形性が高く、 $R^2$ は0.96を超えていました。Stunnerは、界面活性剤や色素を用いずにUV/Vis吸光度およびデコンポリューションを用いてRNA-LNPを定量することにより、総RNAと脂質吸光度(通常、脂質濃度に比例)を非破壊的に定量できます。

RNA量と粒子サイズは、いずれもRNA負荷LNPの評価において重要な特性です<sup>3</sup>。Stunnerは、UV/VisとDLSを組み合わせることにより、1回の実験で同じサンプルから両方の特性を測定します。N/P比が異なり、マイクロ流体パラメータおよび脂質処方と同じRNA-LNPのRNA濃度は異なっていました(図3A)。

N/P=10のサンプルにはN/P=5のサンプルの半分、N/P=50のサンプルにはN/P=5のサンプルの約1/10のRNAが含まれていました。3種類のRNA-LNPのサイズは、ペイロード濃度と同様に変化しました(図3B)。平均流体学直径はN/P=5のサンプルで最大、N/P=50のサンプルで最小でした。N/P=50のサンプルのPDI(0.19)はN/P=5のサンプルのPDI(0.12)よりも高かったことから、RNA濃度が低い小さなサンプルほど多分散性が高いことが示されました。N/P=10のサンプルのサイズは他のサンプルの中間であり、多分散性はN/P=5のサンプルと同程度でした。RNA-LNPのDLSサイズをバリデートするために使用した流体学直径59 nmの金ナノ粒子スタンダードは、StunnerのDLSで測定した平均流体学直径が $57 \pm 2.1$  nm、平均PDIが0.04でした。

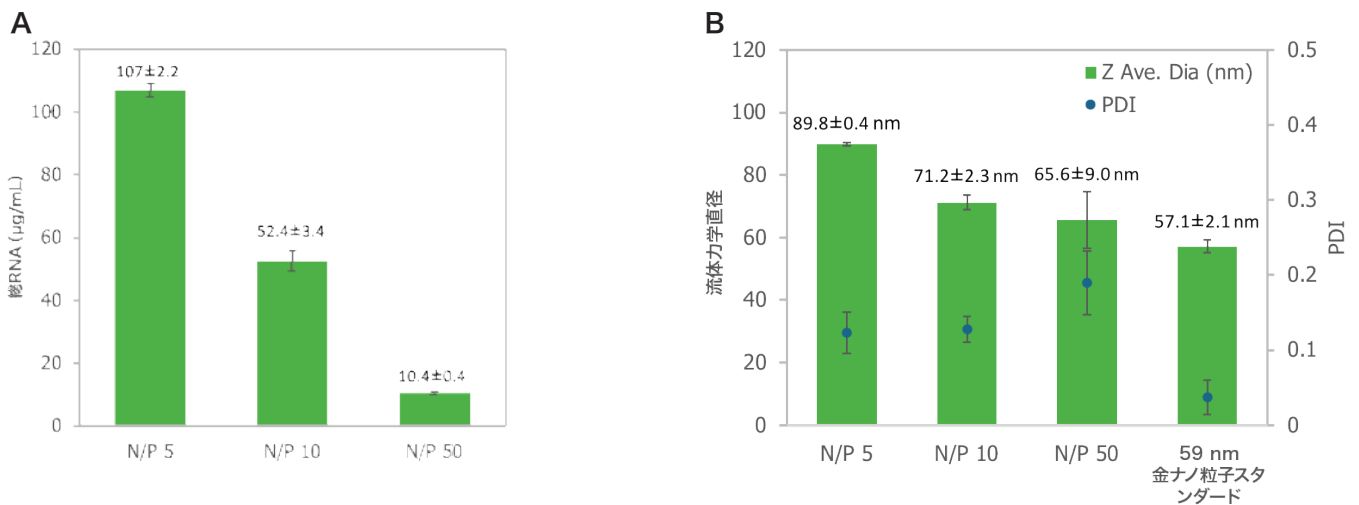


図 3: StunnerによるRNA負荷LNPのRNA定量値(A)およびサイズ・多分散性(B)は、異なるN/P比で高い再現性を示しました。エラーバー: ±1標準偏差(SD)

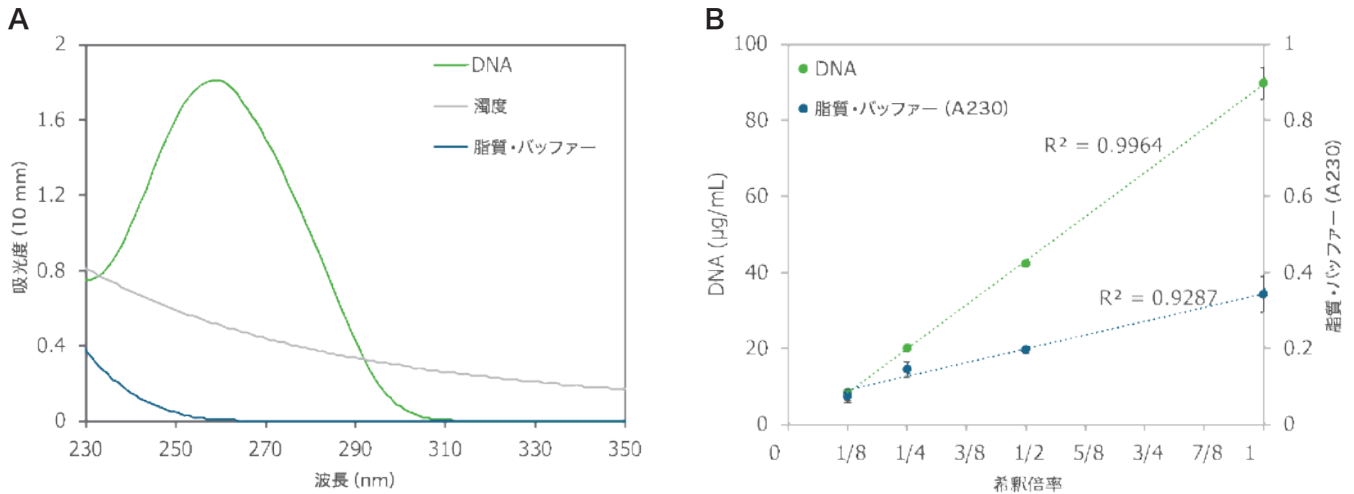


図 4: DNA-LNPアプリケーションは、ナノ粒子のUV/Vis吸収スペクトルをその成分であるDNA、濁りおよび脂質・バッファーにデコンポリュートします (A)。StunnerのDNA定量値および脂質・バッファーの吸光度測定値は、N/P=5のDNA負荷LNPの希釈系列について線形でした (B)。エラーバー: ±1標準偏差 (SD)

## DNA-LNP

StunnerのDNA-LNPアプリケーションは、サンプルの吸収スペクトルをデコンポリュートし、サンプル中のDNAを定量します。また、脂質・バッファーによる吸光度と濁度の寄与についても報告します (図4A)。N/P=5のDNA負荷LNPの2倍希釈系列は、DNA量に対して良好な線形性および精度を示し、R<sup>2</sup>は0.99を超え、CVは5%未満でした (図4B)。230 nmにおける脂質・バッファーの吸光度も線形で、R<sup>2</sup>は0.92を超えていました。

N/P比が異なり、マイクロ流体パラメータおよび脂質処方と同じDNA-LNPのDNA量は異なっていました (図5A)。

N/P=10のサンプルにはN/P=5のサンプルの約半分、N/P=50のサンプルにはN/P=5のサンプルの約1/10のRNAが含まれていました。3種類のRNA-LNPのサイズも変化しました (図5B)。

平均流体力学直径はN/P=5のサンプルで最小、N/P=50のサンプルで最大でしたが、3種類のサンプルはいずれもSDが大きく、差が統計学的に有意であるかどうかを判定することはできませんでした。N/P=50のサンプルのPDIは0.2を超えていたことから、このサンプルは多分散性が高いことが示されました。単分散性のサンプルはPDIが0.1未満となる傾向があります。

## タンパク質-LNP

タンパク質を負荷したリポソームやLNPを作製する場合、通常は、比色色素またはHPLCと粒子崩壊を組み合わせることでペイロードを定量します<sup>4</sup>。これらの方法にはそれぞれ欠点があります。HPLCは時間がかかり、大量のサンプルを使用します。比色アッセイは脂質や界面活性剤による干渉を受けやすく、コントロールおよびスタンダードの一部として空のナノ粒子が必要です。Stunnerの場合、ナノ粒子の定量および特性評価に界面活性剤、検量線および空のコントロールは不要です。

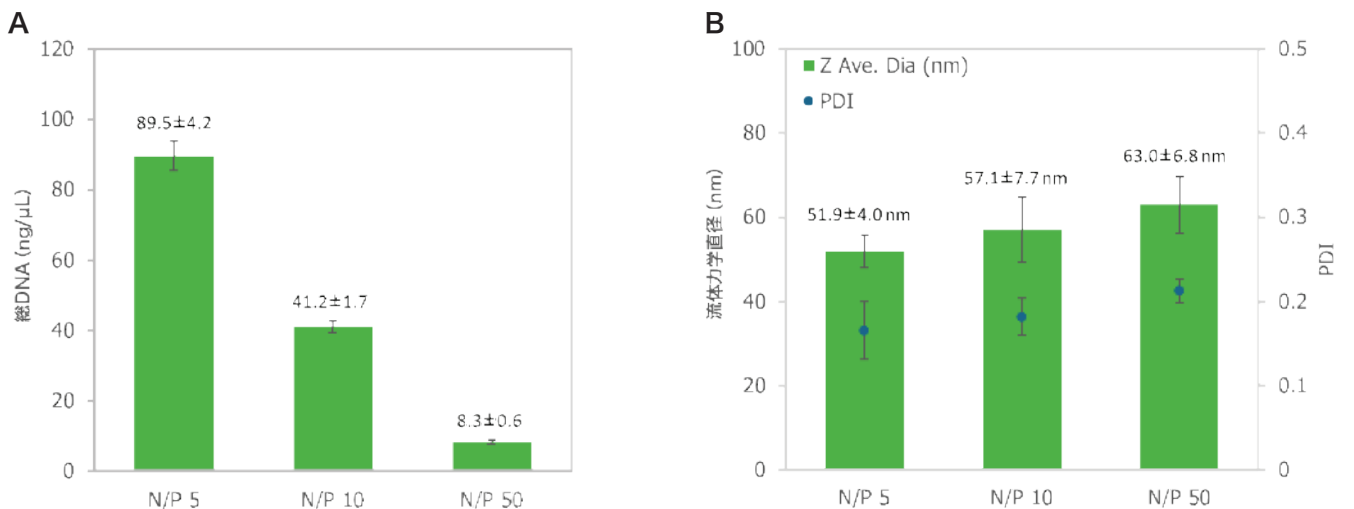


図 5: StunnerによるDNA負荷LNPのDNA定量値 (A)およびサイズ・多分散性 (B)は、異なるN/P比で再現可能でした。エラーバー: ±1標準偏差 (SD)

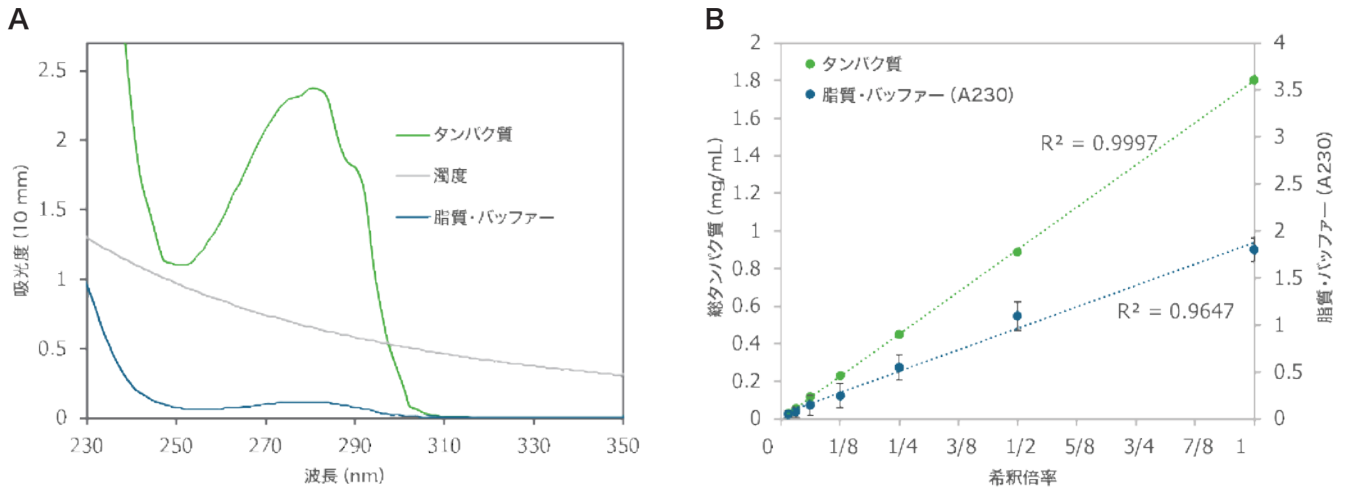


図 6: タンパク質-LNPアプリケーションは、ナノ粒子のUV/Vis吸収スペクトルをその成分であるタンパク質、濁りおよび脂質・バッファーにデコンボリュートします (A)。Stunnerによるタンパク質定量値および脂質・バッファーの吸光度測定値は、初期リゾチーム濃度が3.5 mg/mLのタンパク質負荷LNPの希釈系列について線形でした (B)。エラーバー: ±1 標準偏差 (SD)

Stunnerのタンパク質LNPアプリケーションは、280 nmに吸収ピークを有するタンパク質のUV/Vis吸収スペクトルを用いて、タンパク質負荷LNPの全UV/Vis吸光度を、タンパク質、濁りおよびその他の成分からの寄与にデコンボリュートします (図6A)。Stunnerは、デコンボリューション後のスペクトルとタンパク質のE1%または吸光係数に基づいてLNP中の全タンパク質ペイロード濃度を定量します。

また、粒子およびバッファー成分による吸光度も報告します。

初期タンパク質濃度3.5 mg/mLのリゾチーム負荷LNPの2倍希釈系列は、タンパク質量に対して良好な線形性および精度を示し、R<sup>2</sup>は0.99超、CVは5%未満でした (図6B) 230 nmにおける脂質・バッファーの吸光度も線形で、R<sup>2</sup>は0.96を超えていました。

初期濃度が異なりますが、マイクロ流体パラメータおよび脂質処方が同じリゾチーム負荷LNPのタンパク質量はその初期濃度に比例していました (図7A)。

35 mg/mLのサンプルと比較して、17.5 mg/mLのサンプルには約半分のタンパク質が含まれており、3.5 mg/mLのサンプルには約1/10のタンパク質が含まれていました。LNPの最終的な総濃度は、それぞれ初期濃度のおよそ50%でした。3種類のLNPのサイズは、サンプルによって90~100 nmの間で変化しました (図7B)。

3つのサンプルのPDIはいずれも0.2を超えており、すべて高い多分散性を有することが示されました。タンパク質LNPのDLSサイズをバリデートするために使用した流体力学直径106 nmの金ナノ粒子スタンダードは、StunnerのDLSで測定した平均流体力学直径が104±3.3 nm、平均PDIが0.08でした。

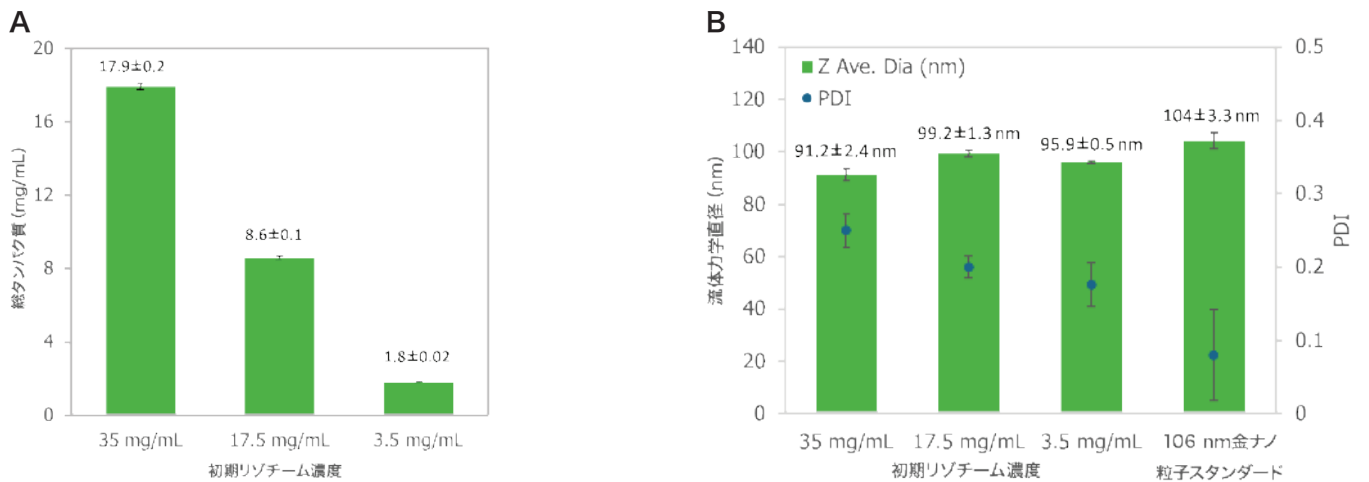


図 7: Stunnerによるリゾチーム負荷LNPの総タンパク質定量値 (A) およびサイズ・多分散性 (B) は、異なる初期リゾチーム濃度で高い再現性を示しました。エラーバー: ±1 標準偏差 (SD)

## カスタムナノ粒子

ナノ粒子は、複数の特殊な成分および低分子や他の薬物などの多様なペイロードにより、極めて複雑になることがあります。Stored Spectra機能を使用すれば、新たなスペクトルを認識し、理解するようStunnerに教えることも簡単です。希釈系列を作製するだけで、残りはStunnerが処理してくれます。ペイロードスペクトルがデータベースに登録されると、カスタムナノ粒子アプリケーションはそれを使用して、Stunnerに組み込まれているLNPアプリケーションと同様に、生の吸収スペクトルをペイロード、濁りおよび粒子・バッファー成分からの寄与にデコンボリュートできます(図8)。

薬物を負荷したナノ粒子を作製するには、製造条件を慎重に最適化する必要があります<sup>5</sup>。製品の特性評価は、特に薬物含有量とナノ粒子サイズを別々に測定する場合、時間がかかります。Stunnerは、あらゆる試験条件で総薬物含

有量とナノ粒子サイズを同時に定量できる、迅速かつ正確で精密な方法を提供します。

ドキシソルビシン(DXR)を負荷したリポソームと空のリポソーム(コントロール)の混合物は、脂質対DXR比とDXR濃度が異なります。測定したDXRを製造業者の試験成績書に基づくTarget DXRに線形回帰した結果、 $R^2$ は0.99超、傾きは1に近く、y切片はほぼ0で、StunnerのDXR定量値は再現性があり、正確であることが示されました(図9A)。

DXRを負荷したリポソームは、コントロールのリポソームよりもわずかに大きく、PDIが低いことが確認されました(図9B)。DXR負荷リポソームに対するコントロールの割合を増加させると、Stunnerの平均流体力学直径は減少し、PDIは増加しました。これらの結果には再現性があり、粒子サイズのCVは通常2%未満、PDIのSDは0.02未満でした。

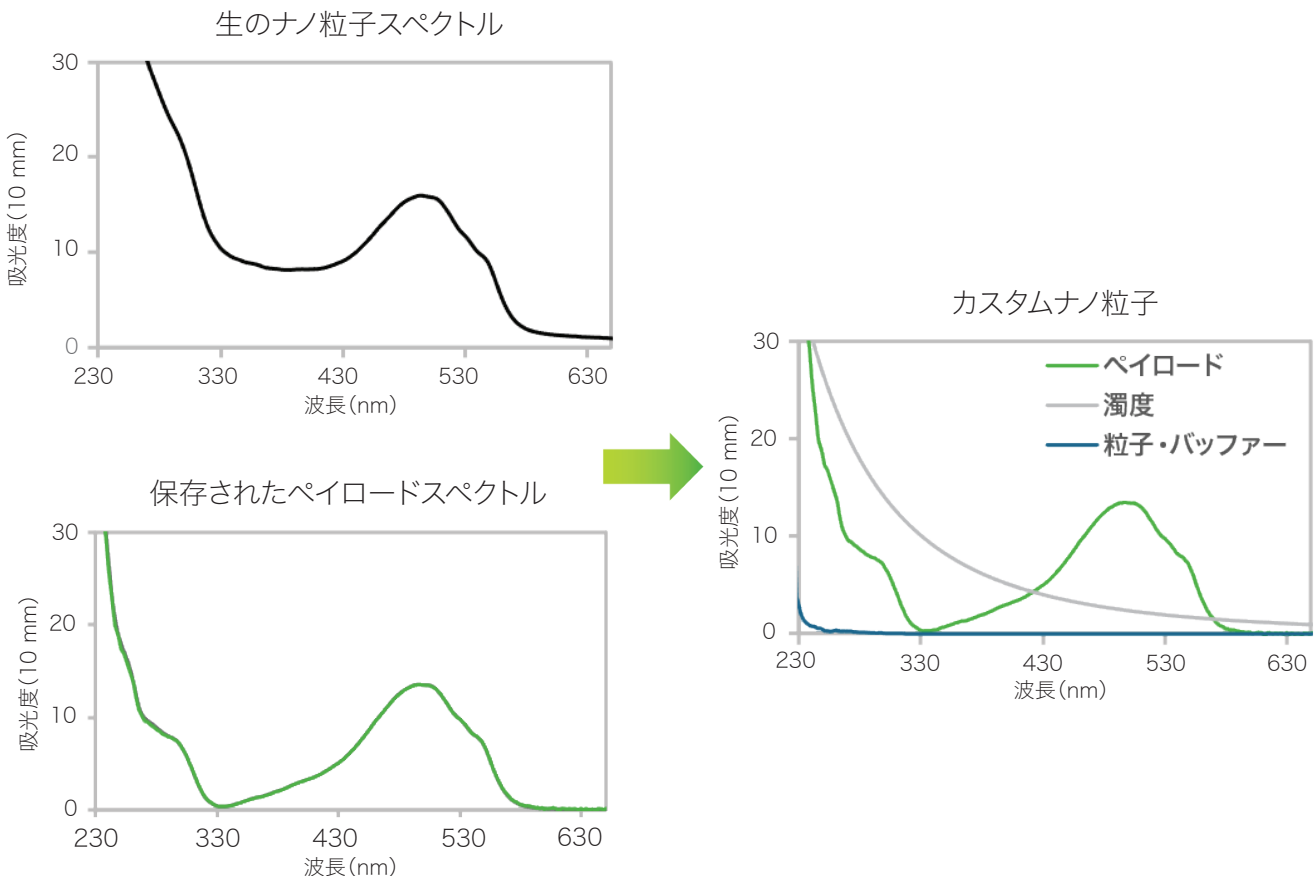


図 8: スペクトルをStunnerのデータベースに保存することで、参照アナライトを設定できます。カスタムナノ粒子アプリケーションは、これらの参照アナライトを用いて、生の吸収スペクトルをペイロード、濁りおよび粒子・バッファー成分にデコンボリュートします。ペイロードの吸光度から、複雑なワークフローや粒子の崩壊を伴わずに、LNPペイロードを直接定量できます。

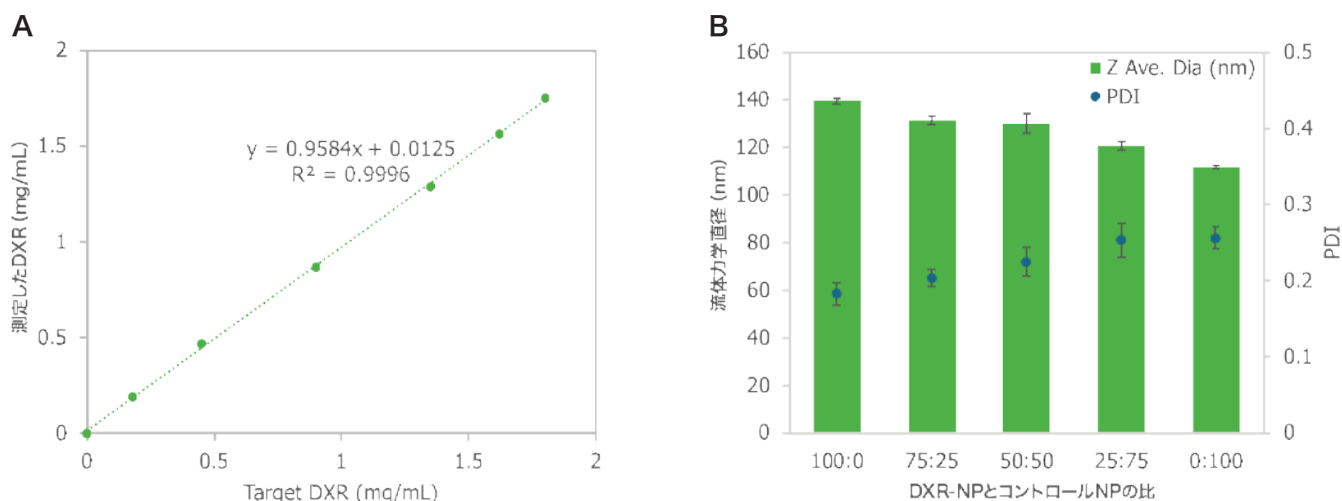


図 9: DXR負荷NPと空のNP(コントロール)の混合物をStunnerで定量した結果、Target DXR濃度と測定したDXR濃度間に高い一致がみられました(A)。Stunnerで測定したサイズのCVは通常2%未満、多分散性の標準偏差は0.02未満でした(B)。エラーバー: ±1標準偏差(SD)

## 結論

Stunnerは、UV/VisとDLSを組み合わせ、ナノ粒子のサイジングと同時にペイロードおよび脂質濃度を高スループットで非破壊的に定量できる唯一無二のプラットフォームです。驚くほどシンプルなUV/Vis測定により、試薬フリー、スタンダードフリーの手間のかからない定量が可能です。一連のLNPアプリケーションとカスタムナノ粒子アプリケーションを用いて、RNA、DNA、タンパク質、低分子など、何が負荷されているかにかかわらず、お持ちのナノ粒子を分析する手助けとなります。

ナノ粒子の吸収スペクトルをその成分にデコンボリュートすることで、濁度の強い、または脂質・バッファーによる吸収の強いサンプルでもペイロード濃度を直接測定することができます。Stunnerの低容量、ハイスループットのナノ粒子特性評価を用いて、複雑な崩壊ワークフロー、高価な色素、無駄な検量線、1サンプルずつのDLSサイジングから解放されましょう。

## 参考文献

1. Rapid quantification and validation of lipid concentrations within liposomes, C. Roces, et al., *Pharmaceutics*, 2016; 8(3).
2. Manufacturing considerations for the development of lipid nanoparticles using microfluidics, C. Roces, 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.
4. Comparative analysis of protein quantification methods for the rapid determination of protein loading in liposomal formulations, M. Hussain, et al., *Pharmaceutics*, 2019; 11(1).
5. Preparation of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for drug delivery and the effects of preparation parameters of solvent injection method, V. Duong, et al., *Molecules*, 2020; 25(20), 4781.



### 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

© 禁無断複製・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。