

Sunshineを利用した脂質ナノ粒子のプロセス最適化と前臨床用脂質ナノ粒子の作製

はじめに

医薬品開発の領域においてドラッグ・デリバリーの最先端を担うのが脂質ナノ粒子 (LNP)、リポソームやポリマー・ナノ粒子といった「ナノメディシン」です。ナノ粒子は有効成分 (API) を特定の作用部位に送達することができます。同時にAPIを早い段階での酵素分解から保護し、免疫系の過剰な刺激を抑えます。これにより細胞内への浸透や保持時間を改善できます。ナノメディシンの開発を加速させるためには一貫性があり、低コストかつ良い材料で効率良く粒子を合成するソリューションが必要です。Unchained Labsはマイクロ流体工学と自動化を組み合わせたナノ粒子の合成ソリューションを提供しています。スクリーニングや初期の研究開発からプロセスの最適化を経て、最終的には製剤の製造と製品化に至るまで、ナノメディシンを開発するプロセスのすべての段階で利用できるシステムを用意しています。本アプリケーション・ノートでは自動化プロセスの最適化と連続製造能力を単一のシステムで提供するSunshineの使用例を紹介します。

COVID-19 mRNAワクチン(およびそれ以前のhATTRアミロイドーシス治療薬Onpattro)が成功して以降LNPが普及しています。ワクチンや遺伝子療法に比べ、そのほかの疾患の治療のためのmRNA-LNPが急速に開発されています。LNPは確立されたリポソーム技術に由来しています。静電相互作用を介しsiRNA、mRNA、miRNAやDNAなどの負に帯電した遺伝物質を封入するためにイオン化脂質が添加されています。LNPは医療の未来を変えようとしています。その役割は多様です。そのすべてを果たす最適なキャリアとしてLNPが機能するためには、まだ多くの研究が必要です。

ナノ粒子の会合プロセスは複雑で制御が難しく、作製条件を最適化するためには多くの労力と資源が必要であることはよく知られています。例えばmRNA-LNPの合成には一般的にエタノール注入法が利用されており、エタノールに懸濁した脂質をシリンジからmRNA水溶液に滴下します。これには長い時間がかかり、毎回の結果が一貫しないケースもあります。衝突噴流混合(噴流混合チャンバー内で2つの流れを高圧で衝突させる方法)などのプロセスでは粒子に「せん断力」がかかるため、分解が加速し粒子が破裂する可能性もあります。これらの技術はスケールアップが難しくサイズ、形態、脂質の組成やmRNAペイロードの量が均一となるナノ粒子を作製するには苦労します。結果としてmRNA-LNPのin vivoでの挙動にばらつきが生じることがあります。

対照的にマイクロ流体テクノロジーは、流体力学的フロー・フォーカシングと別々のチャンネルから、マイクロ流路チップ、Sunnyに接続された部位における迅速な混合をベースにしています。これにより安定な層流によるナノ粒子の生成を促します(図1)。すなわちマイクロ流体テクノロジーはナノ粒子の一貫した自己会合条件を維持することで、より高度なプロセス管理ができます。このアプローチにより、粒子の重要な品質特性を最適化する製剤の決定が容易になります。

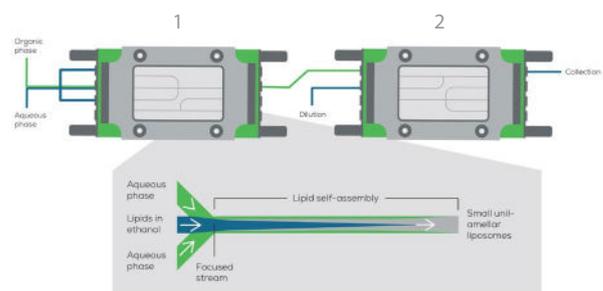


図 1: Sunny (マイクロ流路チップ) のセットアップ事例。Sunny 1はLNPを会合させるため、流体力学的フロー・フォーカシング法により脂質とAPI(mRNAなど)を混合します。Sunny 2はオプションのインライン希釈です。pHをインラインで調節し、回収したサンプルの溶媒濃度を下げることができます。

Sunshineを利用したプロセスの最適化

ナノメディシン開発のプロセスは「ヒット」すなわち、さらなる開発のためのリード候補を探すため、多数の製剤をスクリーニングすることから始まります。このプロセスに対しUnchained Labsでは、さまざまな製剤を96ウェル・プレート・フォーマットにてスクリーニングできる低容量のハイスループット自動化システムであるSunscreenを提供しています。Sunscreenを利用することでイオン化脂質成分または脂質、カーゴや比率をスクリーニングし、より最適な製剤を見つけることができます。その後は、最終生産／製品化に向けてナノ粒子のサイズ、形状や構造を最適化していきます。このプロセスには自動化による高速かつ低コストの粒子作製プラットフォームが必要になります。Sunshine(図2)を利用することで自動的に工程のパラメーターを最適化し、試験サンプルを作製することが可能です。



図 2: Sunshine

Sunshineは「プロトコル・モード」を利用することにより、注入試薬のペアから低容量の実験を連続的に自動で実行できます。1回の実験における必要な試薬量は、1回の注入あたり320 μ Lと少量です。このモードでは数回の実験に十分な量の試薬がシステム内のサンプル・ループに注入されます。プロトコルが実行されると、これらの試薬の一部がバルブ・タイミングで慎重に制御されたサンプル・ループから放出され、選択したSunny(Unchained Labsの再利用可能なマイクロ流路チップ)上で混合されます。これら試薬の一部をシステム内で移動させるため、駆動流体(通常はエタノールとPBSのような溶媒とバッファー)を利用します。試薬はループからSunnyを介し、自動回収システムまで押し出されます。

試薬が回収されるとシステムは、洗浄をおこないます。その後、新しい一連のフロー・パラメーターにより次の実験を開始します。このプロセスは計画された実験がすべて完了するまで繰り返されます。ダウンストリームの精製や分析のため、サンプルを回収できます。

システムに付属のSunny Suiteソフトウェアを利用することで流量比(FRR)、総流量(TFR)、NP前駆体量やサンプル回収量を最適化します。さらにオプションのインライン希釈を実行することにより、再現性の高い単分散のナノ粒子を合成できます。図3のシステム圧力データが示すように一定の試薬ペアをさまざまなFRR、TFRや希釈率の条件で検討したところ、10回の低容量の実験を標準プロトコル・モードで15分以内に自動で実行することができました。

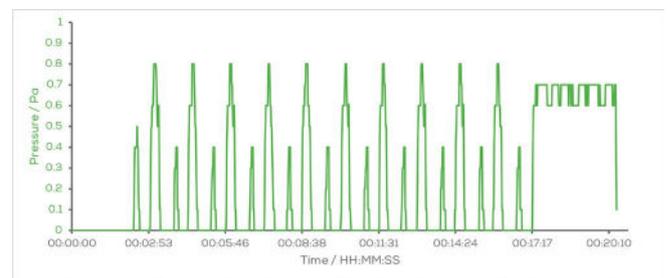


図 3: Sunshine にて10回のリピート実験をおこなった圧力プロファイル。システムの洗浄中と実験中においても圧力は一定しています。

最適な実験条件を特定した後は、連続モードに切り替え前臨床試験および幅広い特性評価に利用できます。このモードでは、数リットルのナノ粒子を作製することができます。このように、Sunshineのユニークな2つの能力により、1つのシステムで製剤スクリーニングと製造スケールとのギャップを埋めます。

本アプリケーション・ノートでは連続的な製造に向けた最適なプロセス条件を特定するため、Sunshineをどのように利用し製剤を最適化できるかを説明します。この検討の出発点としてSunscreenを利用して同定したLNPを最適な「ヒット」製剤の例として使用します。今回のケースでは、イオン化脂質SM-102とルシフェラーゼmRNAを利用しN/P比は6とします(表1参照)。

パラメーター	詳細
水相 (A)	ルシフェラーゼmRNAの酢酸バッファー溶液 (50 mM, 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) のエタノール溶液
N/P 比	6
希釈 (D)	希釈無し
流量比 (FRR)	可変(A:O)
総流量 (TFR)	特に指定しない限り 5 mL/min

表1: Sunshineを用いたmRNA-LNP合成パラメーター。

この製剤で最適な粒子生成のプロセスを特定するため Sunshineを利用し、流量比(FRR)と総流量(TFR)の両方を検討しました。こうした検討の目標は、ターゲットとする製剤を連続的なフローで効率良く製造することです。また最適化した一連のプロセスを特定することでもあります。今回のケースにおける理想的な粒子の基準としては、粒子サイズ60 nm前後、PDI <0.1でEE% >90%が考えられます。Sunshineを利用することで、これらの基準に対しナノ粒子の合成プロセスを最適化することができます。

流量比の最適化

Sunny 190 XTを利用し、さまざまなFRRで一連の実験をおこないLNPのサイズおよび多分散性にどのような影響を及ぼすかを検討しました。図4から総TFRを5 mL/分の一定に保った状態で水相:有機相の流量比を2:1から6:1まで変化させました。この調節により透析後のmRNA-LNPのサイズが68 nmから58 nmに変化したことがわかります。さらに、これらの実験ではPDIも一貫して低く全流量比において平均は0.12でした。

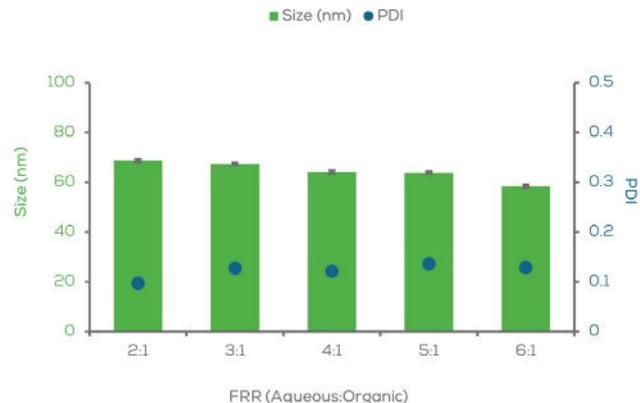


図4: mRNA-LNPをTFR 5 mL/分と一定にし、さまざまなFRR(水相:有機相)で希釈せずに作製しました。透析後のLNPのサイズ・レンジは58~68 nmで平均PDIは0.12でした。粒度分布と多分散指数(PDI)は動的光散乱(DLS)により測定しました。エラー・バーは平均(n=3)の標準偏差を表しています。

RiboGreenアッセイを利用しmRNAの封入効率(EE%)を評価しました。TFRを5 mL/分、N/P比を6と両者を一定に保ちました。図5のデータが示すように封入効率(EE%)は90%を超えました。FRRが6:1(水相:有機相)の比率では、封入効率が96%と最も高くなるのがわかります。

回収したサンプルのエタノール濃度を30%未満、サイズを50~60 nmと設定しました。さらなる探索のため図4と図5に示すデータをベースに流量比を3:1に選択しました。

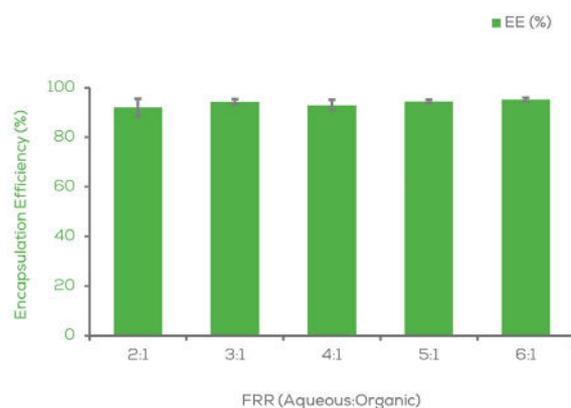


図5: RiboGreenアッセイによりmRNA-LNPの封入効率(EE%)を求めました。mRNA-LNPはSunshineを利用しTFRは5 mL/分の一定とし、さまざまなFRR(水相:有機相)にて希釈せずに作製しました。N/P比は6に固定しました。エラー・バーは平均(n=3)の標準偏差を表しています。

総流量の最適化

TFRがmRNA-LNPの粒子サイズおよびEE%に及ぼす影響を検討しました(図6)。TFRを2.5 mL/分から7.5 mL/分上げるとmRNA-LNPのサイズは94 nmから57 nmに減少しました。さらにPDIも一貫して減少しました。TFRが10 mL/分に達すると、サイズはわずかに大きくなりました。低いPDIと最良の粒子サイズが得られたのはTFRが7.5 mL/分の場合でした。この条件でのサイズは57.7 nm、PDIは0.089でした。封入効率も94.7%と高く、ナノ粒子作製における基準をすべて満たしています。

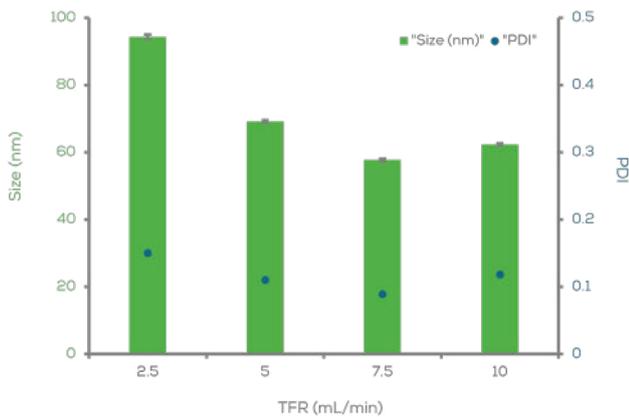


図 6: mRNA-LNPをFRR 3:1(水相:有機相)と一定にし、さまざまなTFRで希釈せずに作製しました。流体力学的サイズの範囲は58~94 nmで平均PDIは0.12でした。エラー・バーは平均(n=3)の標準偏差を表しています。

7.5 mL/分では高い封入効率に比べ、粒子サイズとPDIが共に低いことを確認しました(図7)。このようなTFR、FRR、チップや製剤の組み合わせは、前臨床試験や臨床試験のような大規模な連続生産においても検討できることが明らかになりました。Sunshineを利用し、上記で探索した条件のさらなる最適化のため、注入試薬の濃度または製剤のN/P比を変化させた時の影響を検討できます。

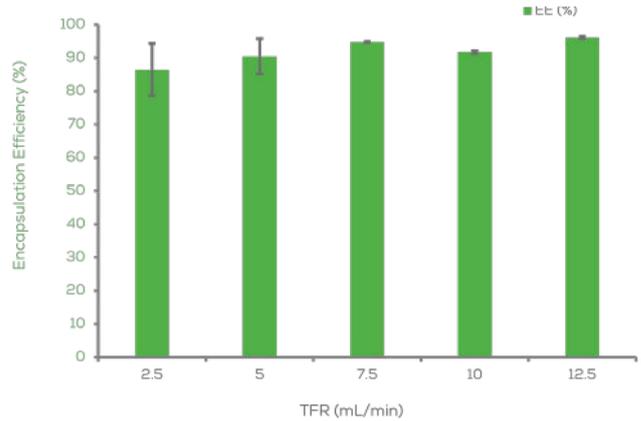


図 7: RiboGreenアッセイによりmRNA-LNPの封入効率(EE%)を求めました。mRNA-LNPはSunshineを利用しFRRを3:1と一定にし、さまざまなTFRにて希釈せずに作製しました。N/P比は6に固定しました。エラー・バーは平均(n=3)の標準偏差を表しています。

連続生産への移行

Sunshineのプロトコル・モードを利用し製剤を最適化した後、連続システム・オペレーション・モードに切り替えることができます。連続モードでは1日に最大で数十リットルのサンプルを作製することが可能です(利用条件に依存します)。プロトコル・モードから連続モードへの移行が簡潔であることを示すため、Sunshineの両方のオペレーション・モードで複数の流量比でリポソーム製剤を調製しました。

パラメーター	詳細
水相(A)	1 x PBS pH 7.4
有機相(O)	Phospholipon 90G (1 mg/mL), DBAB (0.1 mg/mL) のエタノール溶液
希釈(D)	1 x PBS pH 7.4
流量比(FRR)	2:1:2, 2:2:2, 2:3:2 (A:O:D)
総流量(TFR)	3 mL/min

表2: Sunshineを利用したリポソーム合成のパラメーター

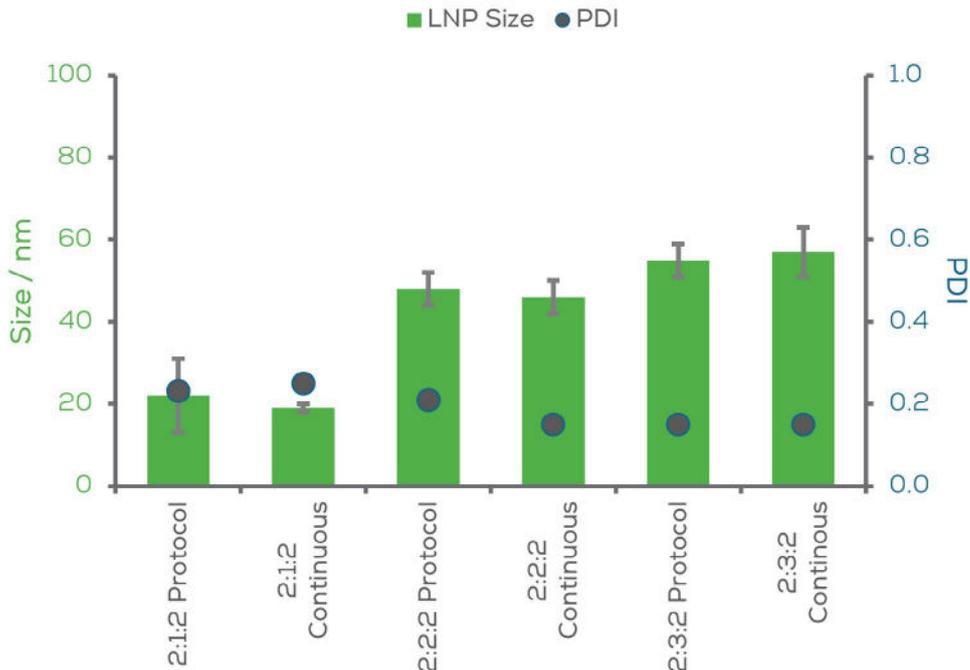


図 8: TFRを3 mL/分とし、さまざまなFRRでリポソームを連続的に作製しました。ナノ粒子のサイズ・レンジは平均で19~57 nmでした(n=3)。エラー・バーは平均の標準偏差を表しています。PDIは0.15~0.2で標準偏差は0.01と操作間で一貫していました。

図8は、TFRを3 mL/分の一定とし、さまざまなFRR(水相:有機相:希釈相)でプロトコル・モードまたは連続生産モードのいずれかでphospholipon 90Gベースのリポソームを作製した結果を示しています。ナノ粒子のサイズ・レンジは19~57 nmであり、プロトコル・モードと連続モードとの差は7 nm未満でした。PDIは0.15~0.2でした。予想どおり水相に対する有機相の割合が上がると、サイズが大きくなることが分かりました。プロセス最適化の観点からは、流量比が2:3:2の場合に低いPDIを達成できたことが分かります。

結論

ナノ粒子ベースのドラッグ・デリバリー製品の開発では、正しい性能や特性をもつナノメディシンの製造を成功させるためには、正しい製剤と最良のプロセス条件の両方を特定することが重要です。粒子の性能はナノ粒子のサイズ、形状や構造などの特性によって決まります。つまりは有効性と安全性が高いナノメディシンを確保するためには、合成プロセスと混合条件が重要になります。

Sunshineはリード候補の製剤の生成プロセスを最適化するのに理想的です。さらには臨床試験に向けた連続製造への

シームレスな移行も可能にします。ここに示したデータはサイズ、PDIや封入効率などの主要な性能指標をターゲットとし、製剤を最適化する基本的な原則を示したものです。

これらのデータはSunshineを利用し総流量と流量比を調整したものです。検討したすべての条件はn=3の一貫したデータ・セットであり、自動化したハンズ・フリーによる方法で迅速に遂行できるものです。これらのパラメーターに限られることではありません。より高収率のプロセスをつくるため、試薬濃度の検討もできます。粒子1個あたりのmRNAの送達量を増やすため、N/P比を調整することも可能です。またUnchained Labsが提供する各種Sunnyをテストし、理想的なマイクロ流路の混合形状を評価することも可能です。

最適な粒子の生成プロセスが見つかれば、同じシステムをセットアップし短時間で同一のプロセス条件で連続生産できます。さらには前臨床試験または、より広いダウンストリームの特性評価に利用する数リットルのナノ粒子を作製することが可能です。

この方法で作製された粒子はプロトコル・モードで作製された粒子と一貫性があるため、連続製造への移行がより簡単になります。それゆえに必要なプロセスの検証も最小限に抑えられます。

材料と方法

mRNA-LNPの生成には1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC) (Avanti、英国)、1,2-ジミリスチル-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、英国)、コレステロール (Sigma Aldrich、英国) およびSM-102 (BroadPharm、米国サンディエゴ) をエタノール (試薬グレード99%、Sigma Aldrich、英国) に溶解しました。10 mM脂質製剤の溶液はエタノールにSM-102、DSPC、コレステロールおよびDMG-PEG 2000を相対モル比50:10:38.5:1.5%で含む溶液としました。水相には89.44 µg/mLのルシフェラーゼ mRNAをpH 4の50 mM酢酸バッファー (ヌクレース非含有) に溶解したものを利用しました。

連続生産の比較のため、リポソーム粒子を作製するための phospholipon と DDAB は phospholipon 90G (Lipoid、スイス) と ジメチル・ジオクタデシル・アンモニウムブロミド (DDAB) (Fischer Scientific、英国) をそれぞれ 1 mg/mL および 0.1 mg/mL 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×リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いました。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。有機相と水相は Sunshine のプロトコールにより自動で混合しました。

Sunny 190 XT 上で Sunshine のプロトコールにより有機相と水相を自動で混合しました。脂質ナノ粒子の透析は、透析キット (Pur-A-lyzer™ Midi Dialysis Kit, Sigma、英国) を利用し 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てバッファーを交換するために 3 時間おこない、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。

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 回作製し、平均と標準偏差 (SD) を報告しました。

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 Triton X-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