

StunnerでLNPをカウント・サイジング・RNA定量しよう

Introduction

脂質ナノ粒子 (LNP) サンプルで最も重要な3つの特徴は、粒子の個数、サイズ、そしてRNA量です。しかし、これらのデータの収集には、多くの障害がありえます。

ナノ粒子濃度は、粒子の各ロットで知っておくべき極めて重要なパラメータですが、現行の方法では、正確度に影響を及ぼす希釈が必要だったり、かなりの時間を要したりするため、ハイスループットでの測定は見込めません。粒子を適切なサイズに保つことは、LNPに対する全員の目標ですが、1つの角度だけ測定しても、サンプル中のすべての凝集体を検出することは不可能です。動的光散乱 (DLS) 装置の多くはサンプルを一度に1個しか測定できないため、各サンプルのサイズデータを集めるだけでも大変です。

RNA、DNA、タンパク質、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、複雑で破壊的なワークフロー、高価な色素、不経済な検量線に依存しています。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は、UV/Vis吸光度が日常的に使用されていますが、ナノ粒子の場合は濁度が高くサンプルが曇るため、ほとんどのUV/Vis分光光度計では正確な測定値を得ることができません。

Stunnerは、ハイスループットのUV/Visと回転角動的光散乱 (RADLS) を組み合わせて、2 μ Lの単一サンプルから総RNA量、ナノ粒子濃度、サイズ、多分散性を測定できる唯一のプラットフォームです。希釈やスタンダード、蛍光色素は必要ありません (図1)。StunnerのRADLSおよびUV/Visデータはすべて、プレートベースのフォーマットを用い、サンプル1個あたり2分未満で、最大96個のサンプルのデータを一度に取得できます。

本アプリケーションノートでは、StunnerでRADLSを用いてLNPのサイズおよび数を測定する方法と、UV/Visにより2つのLNP製剤のRNAペイロードを定量する方法について説明します。RADLSの詳細については、テクニカルノート「Dive deep into Stunner's light scattering (日本語タイトル: Stunnerの光散乱を詳しく)」をご覧ください。

結果

サイジング

StunnerのRADLS測定では、強度、質量、数という3つの異なるサイズ分布を得ることができます。RADLSでこれらの値のそれぞれがユニークなのは、これらが正規化され

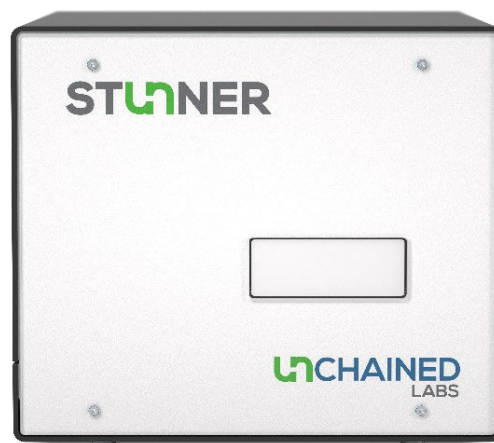


図1: Stunnerは、2 μ Lの同一サンプルからUV/Vis、RADLS、MALSのデータを同時に得ることができる唯一のシステムです。

た値ではなく、サンプル中で測定された、実際の光散乱強度、質量濃度、粒子数の測定値だという点です。

強度分布 (図2A) は各粒子サイズでの光の散乱量を示しますので、わずかしか含まれていないにもかかわらず多くの光を散乱する、まれな大きな凝集体を確認できます。散乱強度は散乱角度 0° ($\theta=0^\circ$) で計算されます。すなわち、これは角度に依存せず、レイリーまたはミーの光散乱挙動が自動調整されます。質量分布 (図2B) は、その名の通り、強度分布を質量濃度対サイズのグラフに変換したものです。数分布 (図2C) は、同じアプローチで粒子濃度対サイズのグラフに変換したものです。1 mLあたりのLNP数が異なる2個のサンプルがある場合は、ここでピークの高さが変化し始めるのを見ることができます。

質量分布や数分布は、サンプル中に最も多く含まれる粒子サイズを可視化できる優れた方法です。一方、Z平均サイズは、凝集体の存在に対してより敏感であるため、凝集が懸念される場合に使用される一般的な指標です。凝集のあるサンプルでは、質量または数分布が変化し始める前に、Z平均サイズが増加し始めます。RADLSは $\theta=0^\circ$ でサンプルのZ平均直径を計算します。これは角度に依存しないサイズ指標であるため、十分な角度で測定できない場合に見逃される大きな粒子に対しても高感度です。

大型LNPサンプルから逐次ろ過ステップにより大きな粒子を除去したときに、Z平均直径が減少する様子を表1に示しました。予想されたように、使用したフィルター孔径が小さくなるほどZ平均直径は減少します。また、大きな凝集体が除去されるにつれ、Z平均直径のばらつきが減少します。

Stunnerの特性評価のため、2バッチのLNPを調整しました。イオン性脂質SM102とPolyA RNAを含む小型のLNPと、カチオン性脂質DDABと精製仔ウシ肝RNAを用いた大型のLNPを比較しました。大型LNPサンプルは、未ろ過の状態と0.45 μm および0.2 μm のフィルターを用いて順次ろ過した後分析しました。

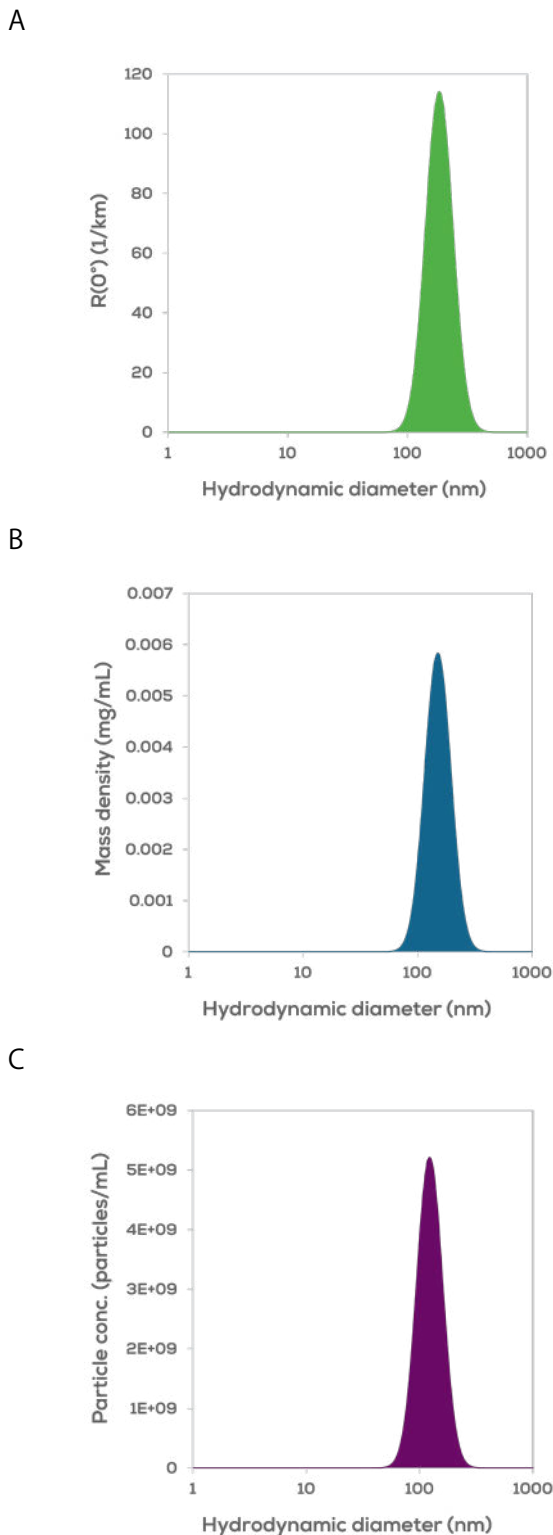


図2: 均一なLNPの強度(A)、質量(B)および数(C)分布。

小型LNPをRADLSで繰り返し測定し、Stunnerの自己最適化光学測定の再現性を検証しました。Stunnerは各サンプルの光散乱の重なりを最適化しますので、繰り返し測定の結果は互いに重なり合って表示されます(図3)。大型LNPの質量分布の平均直径は、5つの装置で4回繰り返し測定した場合159 nmであり、CVは4%でした。小型LNPの測定結果は82 nm、CVは5%でした。

大小のLNPの数分布の重ね合わせにより、数平均直径の差を見ることができます。(図4)に示した2つの測定での数平均直径は47.8 nmおよび127 nmとなっています。これらの分布の曲線下面積は、両サンプルに含まれる粒子濃度を示しています。

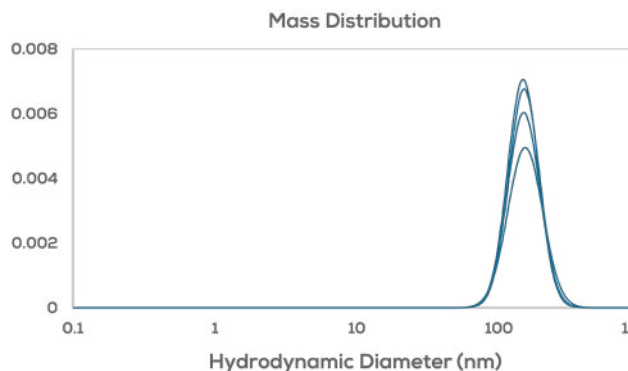


図3: 大型LNPを4回繰り返し測定したときの質量分布の重ね合わせ。

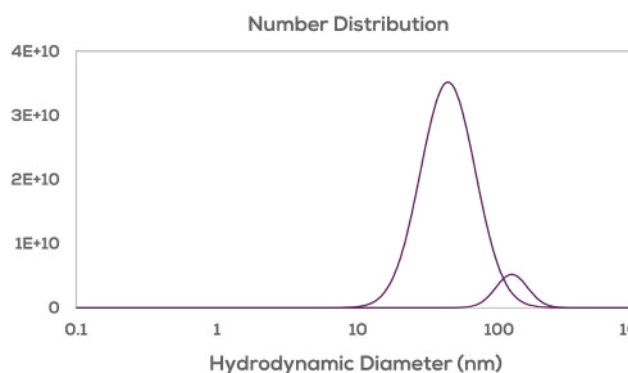


図4: 小型LNP(左ピーク)と大型LNP(右ピーク)の数分布の比較。

表に示されているように、Z平均直径は大きな凝集体に敏感であるため、通常、数分布の主ピークよりも平均サイズが大きく測定されます。サンプル中に最も多く含まれる粒子サイズを確認するには、数平均直径の方が適しています。

カウント

サンプル中に含まれるLNPの数が増加すると、光散乱の強度も増加することは容易に予測できます。ただし、散乱強度はLNPが大きくなった場合にも増加し、また散乱強度は各装置の測定角度によって変化します。RADLS測定の一環として多角度光散乱(MALS)強度測定を行うことで、角度に依存しないサイズと強度を計算でき、より正確なナノ粒子濃度を得ることができます。

上記の大小のLNPサンプルのサイズ測定と同時に、粒子濃度の測定を行いました。Stunnerの推定粒子濃度測定法を用いて、数分布で予想されるLNPピークから粒子濃度を測定しました。小型(SM102)LNPの平均粒子濃度は 7.5×10^{11} 個/mL、CVは30%でした(図5A)。一方、大型(DDAB)LNPの平均粒子濃度は 8.5×10^{10} 個/mL、CVは28%でした。粒子濃度の約8.8倍の差は、図4に示した数分布の曲線下面積によっても確認することが可能です。

粒子濃度測定の室内再現精度を5つの装置で評価しました(図5B)。すべての装置の平均は、全測定値の平均の30%以内でした。粒子サイズの均一性は、粒子濃度の測定精度において重要な役割を担っています。大型LNPサンプルは0.2 μm フィルターでろ過しましたが、同じサンプルで未ろ過の状態と0.45 μm フィルターでろ過後の状態でも試験を行いました。大きな粒子の除去は、粒子濃度の測定精度を向上させる上で有効でした。

小型LNPサンプルを625倍まで5倍ずつ段階希釈した結果、粒子濃度測定に関して直線性と広いダイナミックレンジ

が示されました(図6)。開始濃度は 1.0×10^{12} 個/mL、最終希釈は 1.2×10^9 個/mLで測定されました。希釈範囲全体で、重みなしの線形回帰の結果 R^2 値は0.9983でした。最低濃度でCVがわずかに32%であったことから、下限には達していないと考えられます。LNP粒子濃度の定量下限は、平均サイズ、組成およびバッファーに依存しますので、粒子間やサンプル間で異なることに注意することが重要です。例えば、81 nmのポリスチレンビーズでは、6 logのダイナミックレンジ($10^7 \sim 10^{13}$ 個/mL)が観察されています(データ非提示)。

RNA定量

RNA-LNP、DNA-LNP、タンパク質-LNPペイロードに対するStunnerの内蔵アプリケーションにより、LNPサンプルをシンプルかつ容易に定量できます。Stunnerは、Unmix解析を用いてLNPの濁度を分析し、各ペイロードの吸光度を任意の粒子やバッファーの吸光度から分離します。あらゆる種類のRNAが封入されたLNPに対して、RNA-LNPアプリケーションにより、サンプル中に含まれるRNAの総量を定量できます(図7)。サンプルの前処理もスタンダードも試薬も必要ありません。Stunnerで測定されるRNAの総量は、LNP中に含まれるRNAと粒子外にあるRNAの和です。

StunnerのRNA-LNPアプリケーションを、上記と同じ大小のLNPサンプルでテストしました。粒子濃度およびサイズを測定すると同時に、大型LNPサンプルの平均ペイロード濃度が26.5 ng/ μL でCVが2.5%で、小型LNPサンプルの平均ペイロード濃度が32.7 ng/ μL でCVが1.7%であったという結果を得ました(図8A)。これらの値を5つの装置間で比較すると(図8B)、平均からの差は、大型LNPサンプルで1.5%未満、小型LNPサンプルで1.1%未満でした。

Sample	Average of Z-Avg Dia. (0°) (nm)	%CV	Number Mean Dia (nm)	%CV
Unfiltered	206	27%	136	5%
0.45 μm filtered	189	7%	129	4%
0.2 μm filtered	161	5%	124	4%

表1:未ろ過、0.45 μm フィルターろ過後、0.2 μm フィルターろ過後の大型LNPでの、0°におけるZ平均直径の数平均直径に対する平均値と精度の比較。%CVは5つの装置を用いた4回繰り返し測定により求めました。

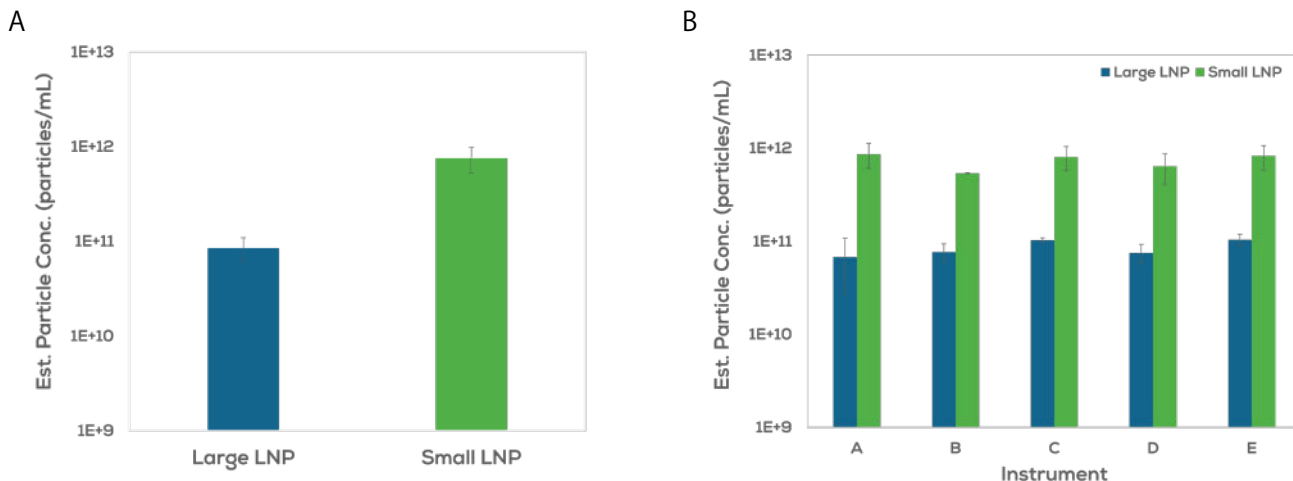


図5:大型および小型LNPサンプルの粒子濃度。エラーバーは、5つの装置でそれぞれ4回繰り返し測定したときの標準偏差です(A)。同じ2つのサンプルに対する装置ごとの粒子濃度。エラーバーは、それぞれ4回繰り返し測定したときの標準偏差です。5つすべての装置の平均は、各粒子の平均濃度値の20%以内です(B)。

サンプル1個あたり2分未満の1回の測定で、Stunnerはサンプル中の粒子濃度とRNAの総ペイロード濃度を知ることができます。Stunner測定のセットアップの過程で、サンプル中に含まれるRNAに関する情報をいくつか与えておけば、RNA濃度を総分子数に換算することができます。そうした情報をすべて用いて、Stunnerは粒子1個あたりの平均RNA分子数を自動計算します。

Sunscreenを用いて、6~12 mL/分の異なる総流量(TFR)で様々なLNPを作製し、Stunnerでサンプルの特性評価を行いました。流量が増加するにつれて、LNPの平均直径は徐々に減少しました(図9A)。TFRが高くなるほど混合中のせん断速度が増加しますので、これは予想される結果です。一定の脂質濃度と流量比(FRR)を用いたこのスクリーニングにおいて、高TFRで生成さ

れるLNPの直径減少は、粒子濃度の上昇とも相関しています(図9B)。TFRはRNA濃度とは相関していません(図9C)、これはFRRと水相中のRNA濃度が両方とも一定である限り、予想される結果です。最後に、異なるLNP処方と製造条件の影響を可視化するため、TFRによらず一定のRNA濃度と、TFR依存に高くなる粒子濃度のデータとともに、Stunnerで粒子1個あたりのRNA分子数を求めました。(図9D)。

結論

Stunnerは、各サンプルのRADLSとUV/Visのデータを用いて、粒子濃度、サイズ、PDIおよび総RNAペイロード

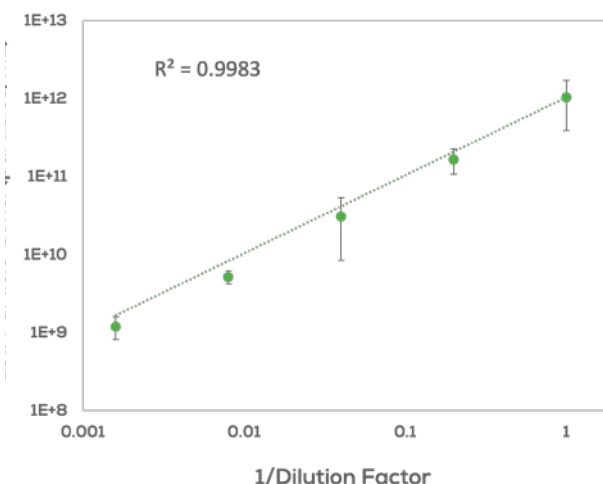


図6:小型LNPサンプルを625倍まで5倍ずつ段階希釈したときの推定粒子濃度。エラーバーは、5つの装置でそれぞれ4回繰り返し測定したときの標準偏差です。

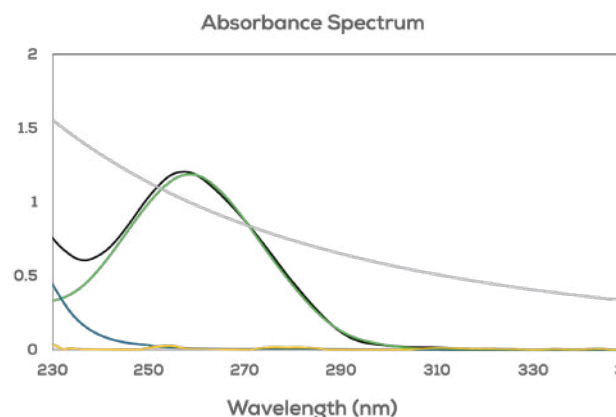


図7:StunnerのRNA-LNPアプリケーションは、RNA、脂質、濁度、その他の要因からなるUV/Visシグナルを分離することが可能です。このRNA-LNPサンプルでは、RNA吸光度(緑色)によりLNPサンプル中に含まれるRNAの総濃度を算出しています。濁度は灰色、濁度を除いた総吸光度は黒色、粒子およびバッファー成分の吸光度は青色、残りの誤差と判断されたものは黄色で示しています。

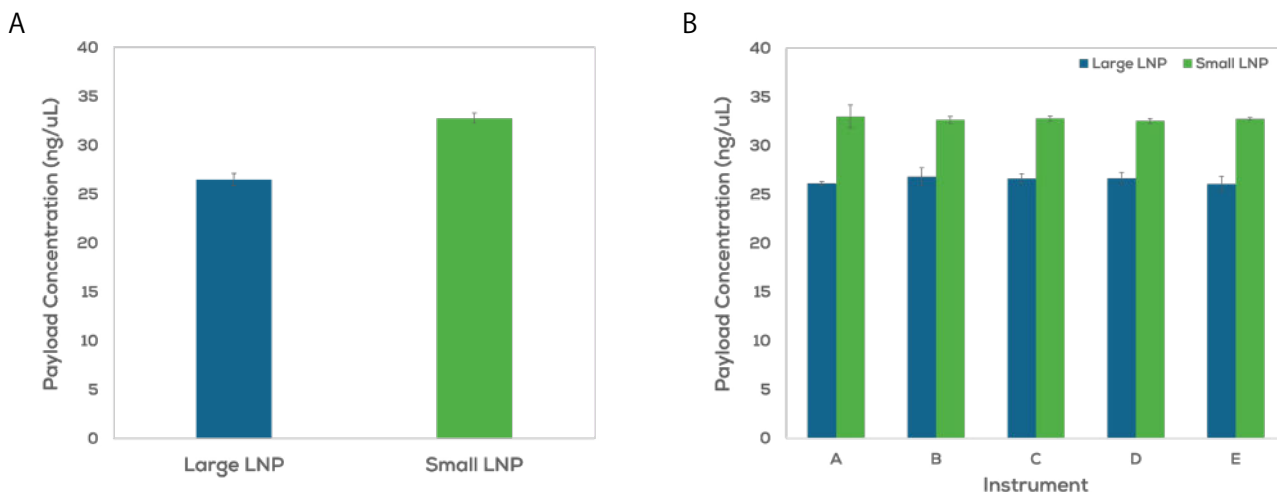


図8: 大小のLNPサンプルの総RNA濃度。エラーバーは、5つの装置でそれぞれ4回繰り返し測定したときの標準偏差です (A)。同じ2つのサンプルに対する装置ごとのRNA濃度。エラーバーは、それぞれ4回繰り返し測定したときの標準偏差です (B)。

に関するハイスループットな情報をすべて一度に提供します。サンプルを1個ずつ測定しなければならない、あるいは大型のサンプルに対して1つの角度からしかデータを取得できないDLSはもう必要ありません。極めてシンプルな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を実施できます。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により、RNA、DNA、タンパク質、低分子など中に何が封入されているかにかかわらず、ナノ粒子の分析が可能です。複雑で破壊的なワークフロー、高価な色素、不経済な検量線、一度に一回しか実施できないDLSサイズ測定から解放されて、Stunnerの色素フリー、ラベルフリー、スタンダードフリーの手間のかからないナノ粒子特性評価をご活用ください。

材料・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。

LNPはUnchained LabsのSunscreenを用いて作製しました。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で構成し、総流量(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。

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。

StunnerのRNA-LNPアプリケーションを用いて、LNP粒子濃度、RNAペイロード量、流体力学的サイズおよび多分散性を評価しました。ブランクにはPBSを使用しました。ソフトウェアの自動角度選択で2つ以上の角度が除外された場合、または数分布測定法を用いた解析中に2つ以上のピークが認められた場合は、外れ値として除外しました。RADLSでは、20°Cにおけるバッファーの粘度を1.002 cP、屈折率を1.334とし、7角度、5回測定、各1秒のデフォルト設定を使用しました。

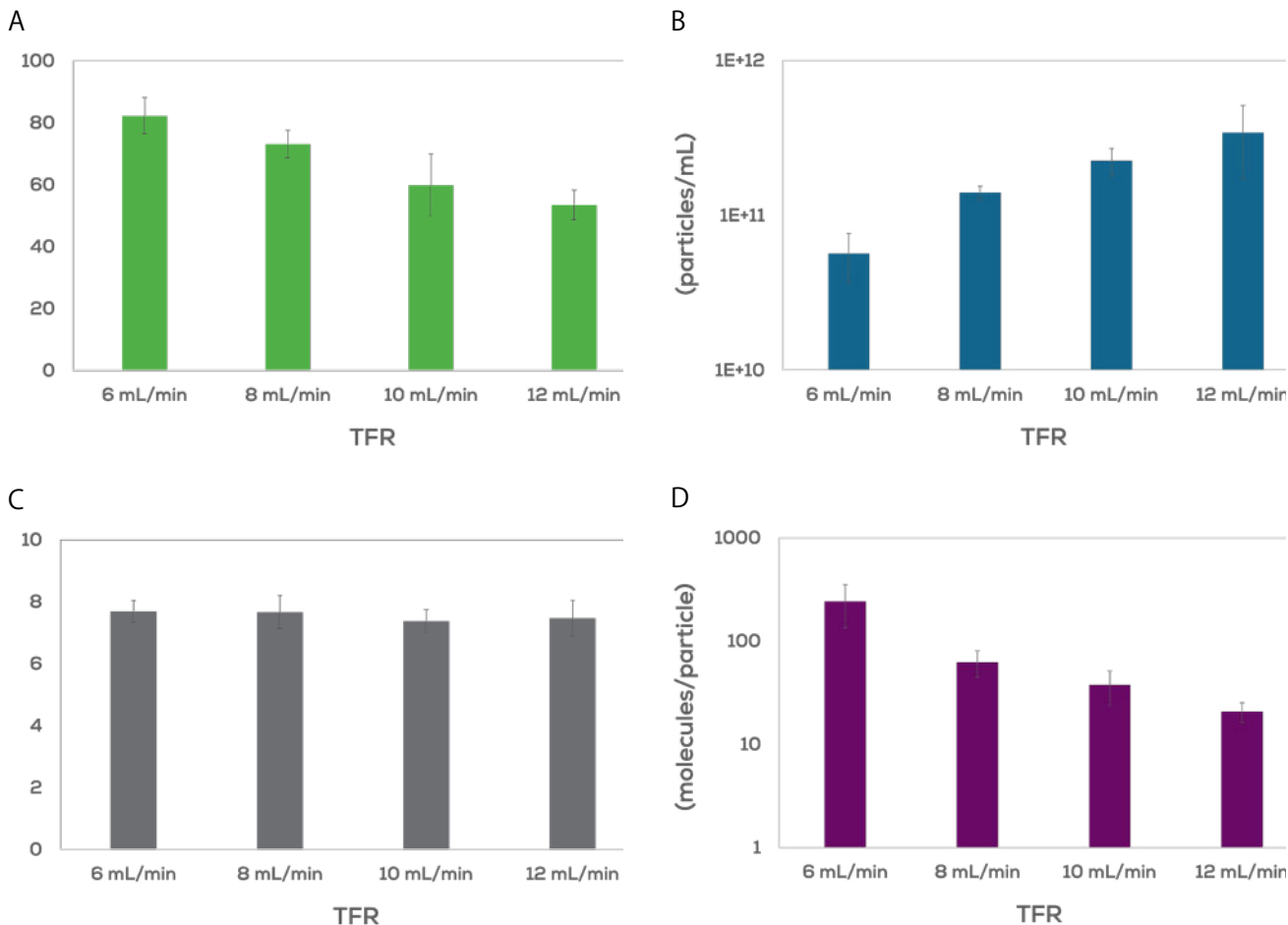


図9: Sunscreenを用いて複数の総流量 (TFR) でLNPを作製しました。Stunnerは、各サンプルのサイズ (A)、粒子濃度 (B) および総RNA濃度 (C) を同時に測定し、封入効率を100%と仮定して粒子1個あたりの平均RNA分子数 (D) を算出します。



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: unchained.labsjp@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。