



Figure 2: Sunshine Single, Sunshine Lite, Sunshineのハードウェア構成。

し、最適な流量条件を見つける一連の実験を設定し、さらにSunny混合チップを最適化すれば、あとはいつでも、ポンプを連続モードで動作させるだけで大量の粒子を生産することができます。使用する流量と流量比は低容量の自動化実験に使用されたものと同じで、1 mLのサンプルから数リットルの製品までを同じ粒子品質で生産できます。

このアプリケーションノートでは、Sunshine、Sunshine Lite、Sunshine SingleのそれぞれでLNPを作製し、システムの性能を比較します。

結果

サイズ

Sunshine、Sunshine Lite、Sunshine Singleのそれぞれを用いて、PolyA-SM-102 LNPを様々な流量で作製しました。3つの装置構成すべてで得られたデータから、粒子のサイズが、テストした最低流量である2 mL/分での約170 nmから、流量12 mL/分での85 nmまでの範囲にあることが示されました。Sunny 190 X(ここに示したすべての実験でこれを使用しました)では、流量を約6 mL/分まで上げると、それに伴って粒子サイズが減少しましたが、それ以上にしても粒子サイズは変わりませんでした。これは、流体の混合状態が6 mL/分までは純粋な層流ですが、6 mL/分を超えるとカオス流に近い状態に変化するためです。テストしたすべての流量で、Sunshine、Sunshine Lite、Sunshine Singleの装置セットアップ間での粒子サイズは標準誤差の範囲内で一致しています。

スループット

再利用可能なSunny混合チップは、すべてのSunshineシステムで各実験後に定置洗浄されます。すなわち、システムを手動で洗浄する時間は不要で、すぐに次の実験に移

ることができますので、特性評価や性能テストのためのサンプルを次々に作製することができます。SunshineとSunshine Liteでは、6つの異なる流量の実験を連続的に自動実施できますので、全ての流量の実験が1回の試薬ローディングステップで行え、1セット、6個のサンプルが10分後には回収できます。Sunshine Singleでの1回の実験にかかる時間は5分未満で、Figure 3に示した計54回の実験を1日で、1枚のSunny 190 Xを用いてSunshineで実施し、Stunnerで特性評価することができました。

封入効率

作製した粒子に標的ペイロードが効果的に封入されていることは、あらゆるナノ粒子作製プロセスで重要です。LNPの場合、ペイロードには通常、核酸を使用しますが、今回の実験では、機能を持ったRNAの代わりにポリアデニル酸(PolyA)を使用しました。実験の自動化と精密工学に基づいて製造されたSunnyチップの両方によって実現された一貫性のある混合状態により、各Sunshineセットアップで合成されたLNPは、一貫して98%超という極めて高い封入効率を示しました(Figure 4)。単一の装置で封入効率、サイズ、PDI、粒子濃度、ペイロード量を測定するには、Stunnerをぜひご活用ください。

サンプル量

できるだけ高い封入効率により、すべての貴重な核酸カーゴ分子を利用できるようにすることに加えて、もう一つ望ましい方法は、下流のテストに必要な量だけ作製することです。このため、Sunshineのすべてのセットアップでは、最小400 μ L(脂質混合物のエタノール溶液100 μ L+RNAのバッファー溶液300 μ L)のサンプル量で実験を実行できるようになっています。SunshineとSunshine Single(Sunshine LiteはSunshineとフローパス長が同じため、ここでは同一として省略します)の粒子サイズとPDIの比較をFigure 5に示します。これは、1000

μLから400 μLまで回収サンプル量を減らし、100 μLのヘッド・テールカットを設定した場合(+)と設定しなかった場合(-)のデータです。このイメージ図をFigure 6に示します。

Sunshineについては、Sunshine Singleと直接比較するために個別に実験を行いました。SunshineまたはSunshine Liteで複数の実験を自動で行う場合、使用する駆動流体によるサンプル分散の影響を最小限にするために、1mL以上のサンプル量を使用します。

生成されたナノ粒子の品質は、SunshineでもSunshine Singleでも全ての使用量で一貫しており、いずれのサンプルでも粒子径は約85 nm、PDIは0.1未満でした。回収量が多い場合、すべての実験で優れた品質の粒子が得られています。最小サンプル量である400 μLでは、粒子サイズが若干増加していますが、これはサンプルが駆動流体により分散された影響によるものと考えられます。データから分かるように、ヘッド・テールカットを設定することにより、この影響は簡単に軽減することができます。

結論

Sunshineシリーズは、開発のあらゆる段階で研究者の皆様にソリューションを提供し、システムの機能を目的に合わせて柔軟に調整することが可能です。Sunshineの各構成は、テストしたすべての流量と容量で同じ高品質のナノ粒子を作製でき、自動化されたフローパスの洗浄、低容量での粒子作製、あらゆるアプリケーションに適した幅広い種類のSunny混合チップなどの特長が共通しています。全てのSunny混合チップは、100%再利用可能で、ランニングコストとプラスチック廃棄物の両方を削減できます。Sunnyだけでなく、ポンプテクノロジーもSunny Suiteのすべてのシステムに共通していますので、プロセスパラメータを簡単に移行し、いつでも一貫した粒子を得ることが可能です。

方法

LNPの作製には、Spikevax製剤[SM-102, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)、コレステロール、DMG PEG-2000を50:10:38.5:1.5の割合で含有]を6.2 mg/mLの濃度で使用しました。PolyA (Sigma Aldrich)を50 mM酢酸バッファー (pH4.0)に溶解し、窒素対リン(N/P)比率を6としました。3つの独立した実験で、LNPを3回ずつ合成しました。示されているエラーバーは、3回の実験で

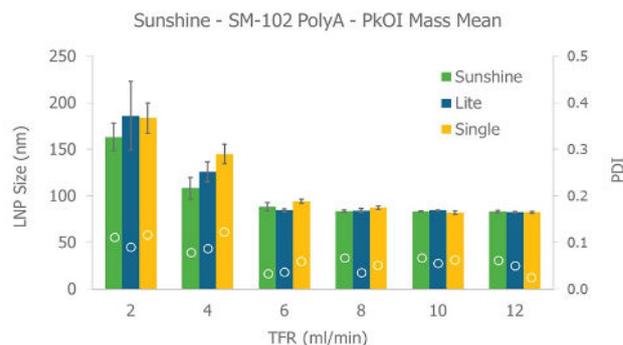


Figure 3: 各Sunshine装置セットアップの流量スクリーニング比較

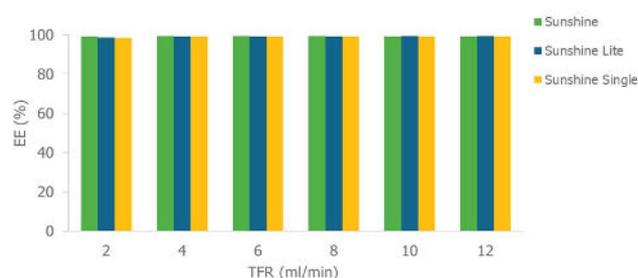


Figure 4: 流量スクリーニング比較で示した各サンプルの平均EE%

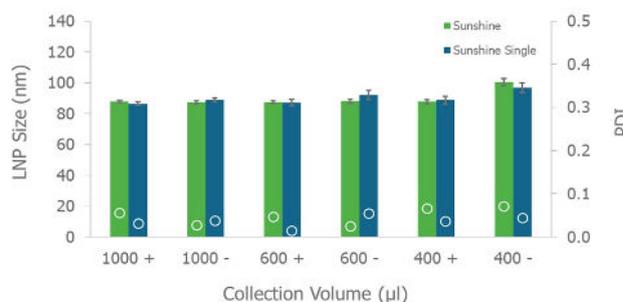


Figure 5: サンプル量を減らし、100 μLのヘッド・テールカットを設定して回収したLNPサンプル(+)

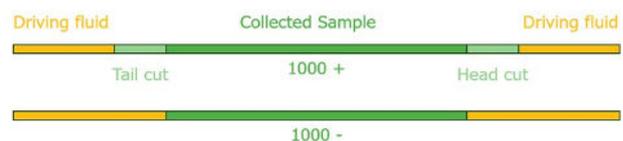


Figure 6: 100 μLのヘッド・テールカットを設定した場合と設定しなかった場合のチューブ中の1000 μLのナノ粒子サンプルのイメージ。1000+の総サンプル量は1200 μLで、そのうち1000 μLを回収しました。

得られたサンプルの粒子サイズの標準偏差を表し、各サイズ測定値はN=3で測定したDLS測定値の平均です。

すべての実験で、流量比(FRR)は3:1(水相対有機相)としました。水相の駆動流体として50 mM酢酸バッファー(pH 4.0)、有機相の駆動流体としてエタノールを使用し、Sunny 190 Xを用いてLNPを作製しました。図3に示したデータは、各LNP実験のサンプル量は1000 μ Lですが、100 μ Lのヘッド・テールカットを設定したことにより、回収量は800 μ Lとなりました。SunshineとSunshine Liteはすべての流量で実験を自動化し、必要量の脂質処方溶液とPolyAを5 mLのサンプルループに一度にロードし、流量の高い条件から低い条件の順番に行った。サンプルループへは10%過剰にロードしました。Sunshine Singleは、各実験を個別に実施しました。図6に示したデータは、SunshineとSunshine Singleの性能を直接比較するために、すべての実験を個別に実施しました。すべての実験で流量は10mL/分としました。

全ての粒子サイズとPDIデータは、Stunnerを用いた回転角DLS(RADLS)測定により、7つの異なる角度で測定して求めました。ここに示したサイズデータは重量平均PkOIです。サンプルは3回ずつ測定しました。総RNAの定量はUV/Visで行い、こちらもStunnerで行いました。

EE%はInvitrogen Quant-it Ribogreenアッセイで、メーカーの取り扱い説明書に従って測定しました。サンプルをそのまま、および1% Triton Xで溶解後に測定し、蛍光をFLUOstar Omegaプレートリーダーで測定しました。

