

Agilent BioTek Synergy Neo2 하이브리드 멀티모드 리더를 사용한 Lipid Nanoparticle Apparent pKa 측정

저자

Suresh Babu C. V. 및
Ravindra Gudihal
Agilent Technologies, Inc.

Li Zhang 및 Yi Yan Yang
싱가포르 과학기술연구청
생물공정기술 연구소

개요

지질 나노입자(LNP)는 다양한 페이로드의 전달 시스템으로 사용되어 왔습니다. 이 응용 자료에서는 Agilent BioTek Synergy Neo2 하이브리드 멀티모드 리더를 사용한 mRNA LNP의 Apparent pKa 측정을 소개합니다.

서론

최근, LNP는 mRNA 전달을 위한 플랫폼으로 엄청난 주목을 받고 있습니다.¹ 이러한 지질 기반 mRNA 나노입자는 이온화 가능한 지질, 보조 지질, 콜레스테롤 및 PEG 지질로 구성됩니다. 이온화 가능한 지질은 LNP 형성에 중요한 역할을 합니다. 이온화 가능한 지질의 pKa는 mRNA LNP의 효능에 영향을 미치는 주요 특성 중 하나입니다. pKa는 조립된 LNP가 이온화 및 표면 전하 측면에서 어떻게 동작하는지를 제어합니다. LNP의 표면 전하는 이온화 가능한 지질과 함께 핵산의 캡슐화뿐만 아니라 세포내 전달에도 영향을 미칩니다.

LNP의 전하 거동을 이해하려면 이온화 가능한 아미노 지질의 전하 상태를 측정하고 pKa를 결정하는 것이 필수적입니다. LNP 또는 지질의 pKa를 결정하기 위해 음이온성 형광 염료 6-(p-Toluidino)-2-naphthalenesulfonic acid (TNS) 어세이를 사용하여 표면 이온화를 측정했습니다.² 이 응용 자료에서는 Synergy Neo2 하이브리드 멀티모드 리더를 사용하여 mRNA LNP pKa를 측정하는 방법을 보여줍니다.

실험

재료 및 분석법

Sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, citric acid, 3-(cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid (CAPSO), sodium chloride, hydrochloric acid, 6-(p-Toluidino)-2-naphthalenesulfonic acid sodium salt (TNS), methanol, 및 dimethylformamide (DMF)는 Sigma-Aldrich에서 구입했습니다. 6-((2-Hexyldecanoyl)oxy)-N-(6-((2-hexyldecanoyl)oxy)hexyl)-N-(4-hydroxybutyl)hexan-1-aminium (ALC-0135), 9-heptadecanyl 8-((2-hydroxyethyl)[6-oxo-6-(undecyloxy)hexyl]amino)octanoate (SM-102), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (DSPC), 1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000 (DMG-PEG 2000), 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), 및 cholesterol은 MedChemExpress에서 구입했습니다. 초순수는 0.22µm의 멤브레인을 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 추출했습니다.

mRNA LNP 생산

mRNA LNP는 Moderna가 개척한 코로나19 백신인 Spikevax와 동일한 조성을 사용하여 생산되었습니다. mRNA는 PCR 증폭 dsDNA 템플릿으로부터 시험관 내에서 전사되고, 스피ن 컬럼 (Monarch RNA 클린업 키트, New England Biolabs)을 사용하여 정제된 다음, 1mM 아세트산나트륨 완충액(pH 4.7)에 용해되어 상수용성 상(Phase)을 형성했습니다.

Spikevax 제형의 경우³ SM-102, DMG-PEG 2000, DSPC 및 콜레스테롤(MedChemExpress에서 구입)을 에탄올에 50:1.5:10:38.5의 분자량 비율로 용해시켜 유기상을 형성했습니다. mRNA를 25mM 나트륨 아세테이트에 분산시켜 상수용성 상(Phase)을 형성했습니다. 벤치탑 미세유체 장치(NanoAssemblr Platform, Precision NanoSystems)를 사용하여 두 상(Phase)을 부피비 3:1로 혼합했으며 총 유량은 12mL/분이었습니다. N:P 비율은 5.67:1이었습니다. 그런 다음, 형성된 mRNA LNP를 20mM tris (pH 7.4)로 완충액 교환하고 4°C, 2,500 x g에서 60분 동안 30kDa의 분자량 컷오프로 초원심분리 튜브에 농축하여 총 지질 농도가 약 4mg/mL가 되도록 했습니다. 형성된 mRNA LNP는 형광 측정 전에 -80°C에서 보관되었습니다.

형광 검출

형광 측정은 Agilent BioTek Gen5 소프트웨어 버전 3.12.08을 사용하는 BioTek Synergy Neo2 하이브리드 멀티모드 리더에서 수행되었습니다. 방출 스펙트럼 스캔은 여기를 321nm(5nm 대역폭)로 고정하고 방출 파장을 1nm 증분으로 변화시키는 식으로 수행했습니다. 리더를 기본 대역폭 놓고 여기 파장 321nm 및 방출 파장 445nm를 사용하여 모노크로매터 기반 엔드포인트 평가 방법으로 수행했습니다. 데이터는 플레이트 이동 후 0ms 지연을 두고 상단에서 수집되었습니다.

TNS 어세이

이온화 가능한 지질의 pKa는 SM-102/DSPC/cholesterol/DMG-PEG(50:10:38.5:1.5 분자량 비율) 조성의 mRNA LNP에서 결정되었습니다. TNS는 증류수에 용해된 100µM 원액으로 제조되었습니다. 20mM 인산나트륨, 20mM 구연산염, 20mM CAPSO 및 150mM NaCl 용액을 pH 3.0에서 10.0까지 0.5단위씩 변화하는 pH 값으로 적정하고 96-well 플레이트에 배분했습니다. LNP와 TNS는 각각 30µM과 6µM의 최종 농도를 얻기 위해 이상 용액에 희석했습니다. 형광 강도는 각각 321nm와 445nm의 여기 파장과 방출 파장에서 Synergy Neo2로 측정했습니다. 정규화된 형광 데이터에 S자형 최적 적합 분석을 적용하고, pKa를 최대 형광 강도의 절반을 발생시키는 pH로 측정했습니다.

결과 및 토의

TNS는 수용액에서는 형광성이 없고 유기 용매에서는 높은 양자 수율을 나타냅니다. 그림 1은 DMF에서 TNS의 방출 스펙트럼을 보여주며 426nm에서 방출 피크를 보여줍니다. 높은 형광 강도 신호를 얻기 위해 DMF 용매가 선택되었습니다. 일반적으로, 용매 극성이 증가하면 방출 스펙트럼이 더 긴 파장으로 이동합니다.

LNP의 pH 영향과 표면 전하를 분석하는 표준 분석법은 지질-TNS 결합에 의해 생성된 형광을 측정하는 것입니다. TNS의 형광은 양이온성 지질과 상호 작용할 때 크게 강화됩니다. 낮은 pH는 TNS와 양이온 표면 사이의 상호 작용을 증가시켜 형광을 증가시킵니다. 모든 이온화 가능한 그룹이 특정 pH에서 하전되면 형광이 최대에 도달합니다. 더 높은 pH에서는 LNP가 하전되지 않습니다. 형광 수준은 LNP 양성자화 정도와 직접적으로 연관되어 있으며, 가장 낮은 수준과 가장 높은 수준은 각각 LNP의 0% 및 100% 양성자화에 해당합니다. TNS로부터 결정된 Apparent pKa 값은 LNP 표면에서 이온화 가능한 지질의 pKa 특성을 나타냅니다.

ALC-0135 및 SM-102는 LNP 제형에 사용되는 이온화 가능한 지질입니다. 먼저, pKa 값을 결정하기 위해 이러한 지질을 사용하여 TNS 어세이를 검증했습니다. 그림 2는 ALC-0135 및 SM-102에 대한 TNS 형광 적정 곡선을 보여줍니다. ALC-0135 및 SM-102 지질은 모두 이온화 가능한 것으로 나타났으며 pKa 값은 각각 6.09와 6.55였습니다.⁴

개별 이온화 가능 지질은 이온화 가능 지질의 전자 밀도 변화뿐만 아니라 이온화 불가능한 지질의 존재로 인해 LNP와 다른 표면 전하를 갖습니다. 다음으로, mRNA가 로딩된 LNP에 포함된 이온화 가능한 지질의 표면 pKa를 조사했습니다. LNP 지질 조성은 각각 대략 50:10:38.5:1.5의 분자량 비율에서 SM-102/DSPC/cholesterol/DMG-PEG 2000으로 구성되었습니다. 그림 3은 다양한 pH 값에서 mRNA LNP에 대한 TNS 형광 적정 곡선을 보여줍니다. 예상한 대로 낮은 pH에서 SM-102 LNP는 이온화 가능한 그룹을 포함하고 양전하를 띠므로 TNS 자체 소멸을 억제하고 강한 형광 신호를 생성합니다. 높은 pH에서는 SM-102 LNP가 하전되지 않습니다. mRNA LNP 표면 pKa 값은 약 6.75로 밝혀졌으며 이는 문헌과 일치합니다.⁵ DOTAP은 양이온성 지질이고 영구적으로 하전된 그룹을 포함하므로 모든 pH 수준에서 높은 형광이 예상됩니다.

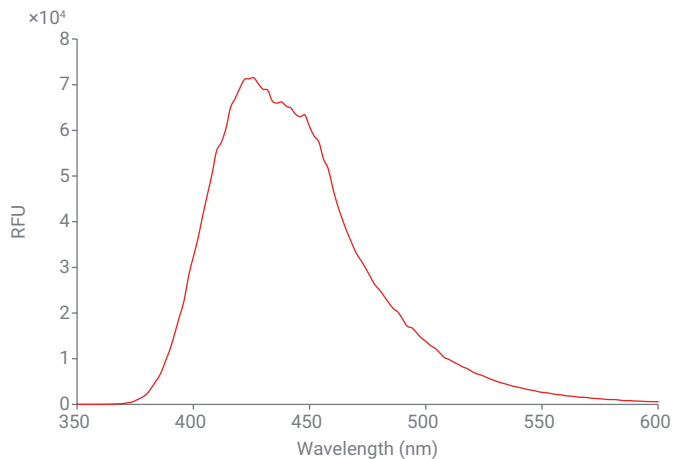


그림 1. DMF에서 TNS의 형광 방출 스펙트럼.

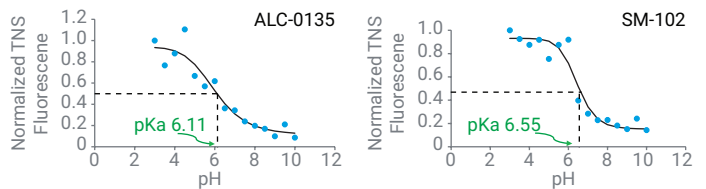


그림 2. 이온화 가능한 지질의 TNS 형광 적정 곡선.

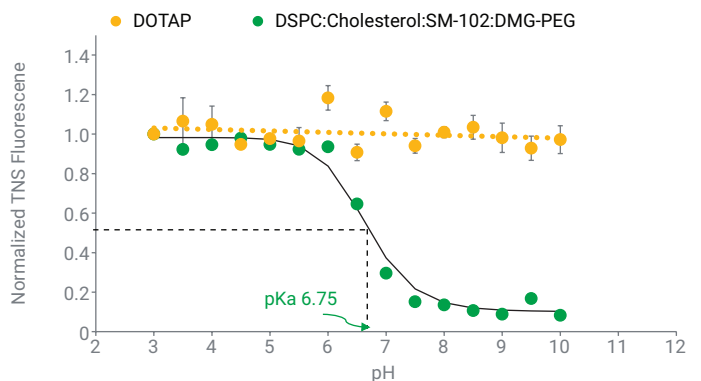


그림 3. 다양한 pH 값에서 TNS 형광 적정 곡선. 녹색 원: firefly luciferase mRNA를 캡슐화하는 LNP; 노란색 원: DOTAP. 데이터는 평균 ± 표준 편차(n = 3)를 나타냅니다.

결론

이 응용 자료에서는 mRNA LNP의 표면 pKa 측정을 위해 Agilent BioTek Synergy Neo2 하이브리드 멀티모드 리더를 사용하는 방법을 시연했습니다. Synergy Neo2로 표면 pKa 측정을 간단하게 수행할 수 있었으며, 얻어진 결과는 이전 문헌과 매우 일치했습니다.

참고 문헌

1. Hou, X.; Zaks, T.; Langer, R.; Dong, Y. Lipid Nanoparticles for mRNA Delivery. *Nature Reviews Materials* **2021**, *6*, 1078–1094. DOI: 10.1038/nature01096
2. Patel P.; Ibrahim, N. M.; Cheng, K. The Importance of Apparent pKa in the Development of Nanoparticles Encapsulating siRNA and mRNA. *Trends Pharmacol Sci.* **2021**, *42(6)*, 448–460. DOI: 10.1016/j.tips.2021.03.002
3. Hassett, K. J.; Benenato, K. E.; Jacquinet, E.; Lee, A.; Woods, A.; Yuzhakov, O.; Himansu, S.; Deterling, J.; Geilich, B.M.; Ketova, T., et al. Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Molecular Therapy Nucleic Acids* **2019**, *15*, 1–11. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.01.013
4. Maeki, M.; Okada, Y.; Uno, S.; Sugiara, K.; Suzuki, Y.; Okuda, K.; Sato, Y.; Ando, M.; Yamazaki, H.; Takeuchi, M., et al. Mass Production System for RNA-loaded Lipid Nanoparticles Using Piling Up Microfluidic Devices. *Applied Materials Today* **2023**, *31*, 1–11. DOI: 10.1016/j.apmt.2023.101754
5. Suzuki, Y.; Ishihara, H. Difference in the Lipid Nanoparticle Technology Employed in Three Approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 Vaccine) Drugs. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2021**, *41*, 100424. DOI: 10.1016/j.dmpk.2021.100424

www.agilent.com

DE67998072

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 1월 31일, 한국에서 발행
5994-7054KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com