

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムによる mRNA カプセル化効率の測定

著者

Aveline Neo, Suresh Babu
C.V., and Zhi Ting Teo
Agilent Technologies, Inc.

Li Zhang and Yi Yan Yang
Bioprocessing Technology
Institute, Agency for Science,
Technology and Research
(A*STAR), Republic of
Singapore

概要

カプセル化は、薬理学的に活性な化合物を体内の特定の作用部位に送達する効果的な方法です。この研究は、通常の RiboGreen アッセイメソッド以外の代替 HPLC メソッドを用いた、F-ルシフェラーゼ mRNA を担持した脂質ナノ粒子 (LNP) のカプセル化効率の測定を説明しています。イオンペア逆相高速液体クロマトグラフィー (IP-RP-HPLC) メソッドは、ダイオードアレイ検出器 (DAD) を搭載した Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを使用して開発されたものです。抽出された mRNA を、酢酸トリエチルアンモニウム (TEAA) をイオンペア試薬として、Agilent PLRP-S カラムで分離しました。これにより、IP-RP-HPLC を使用して、mRNA LNP のカプセル化効率を測定できるようになりました。

はじめに

LNP を用いた in vitro 転写 (IVT) mRNA のカプセル化は、さまざまな疾患の治療の可能性を秘めた有望な治療法です。mRNA LNP 治療薬の開発には、開発プロセス全体に、強固な品質管理メソッドを導入する必要があります。Agilent Fragment Analyzer System は、IVT mRNA 開発のワークフロー全体を確実に成功させるため、純度とサイズの測定に広く採用されています。¹ LNP は、デリケートな RNA 治療薬を保護し、作用部位へ確実に送達するための非ウイルスベクターで、イオン化脂質、ヘルパーリン脂質、ポリエチレングリコール (PEG) 脂質、ステロール、核酸という 5 種類の成分の共集合によって合成されます。² 高流量のマイクロ流体の混合では、水相 (核酸カーゴを含む) と有機相 (脂質混合物を含む) が高速混合され、その結果、多分散度が低く、カプセル化効率の高い LNP が形成されます。³

LNP への mRNA のカプセル化は、開発の初期段階で、RiboGreen アッセイ⁴ を用いて定期的に評価されます。その理由の 1 つは、Agilent BioTek Synergy マルチモードプレートリーダーや Agilent BioTek Cytation マルチモードマイクロプレートリーダーなどの検出プラットフォームを用いたこのメソッドのスループットの高さです。⁵ ただし、このメソッドには、インタクト RNA とその他の RNA 不純物を区別できないという欠点もあります。⁶ 核酸のカプセル化効率の特性解析は、mRNA-LNP 形成の成功の決め手となる重要な品質特性の 1 つです。² 全長のカプセル化とフラグメントのカプセル化を区別する能力により、mRNA-LNP の特性解析が向上します。IP-RP-HPLC は、RNA 分子^{7,8} を分離して定量し、インタクト RNA と RNA 不純物を区別するために用いられる汎用性に優れた分析メソッドです。このメソッドは、ポリアニオン性核酸と正電荷イオンペア試薬との複合体形成に基づく分離の原理を使用します。⁶ その後、RP-HPLC を使用して、中性の複合体と比較的疎水性のある複合体を分離しました。

この研究では、IP-RP-HPLC を用いて LNP から抽出した F-ルシフェラーゼ mRNA を、DAD を搭載した 1290 Infinity II Bio LC システムで分析しました。F-ルシフェラーゼ mRNA の検量線を用いて、抽出した mRNA の濃度を推定し、次に、カプセル化効率を測定しました。

実験方法

機器

F-ルシフェラーゼ mRNA の分析には、以下の構成の 1290 Infinity II Bio LC システムを使用しました。ソフトウェアは、Agilent OpenLab CDS バージョン 2.7 以降を使用しました。

- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンプリング (G7137A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (可変スリット付き) (G7117B)
- Agilent Max-Light カートリッジセル、10 mm、1.0 μ L、6 MPa (G4212-60008)

試薬と試料

試薬：すべての溶媒は LC グレードを使用しました。アセトニトリルとイソプロパノールは JT Baker (米国ニュージャージー州フィリップスバーク) から、メタノールと TEAA は Sigma-Aldrich (米国ミズーリ州セントルイス) から購入しました。超純水は、0.22 μ m メンブレンフィルターを装着した Milli-Q Integral システム (Millipak, Merck-Millipore、米国マサチューセッツ州ビレリカ) で製造しました。

mRNA-LNP の調製: mRNA-LNP は、Moderna 社が開発した COVID-19 ワクチン、Spikevax と同一成分を用いて作製しました。mRNA は、PCR 増幅 dsDNA テンプレートから in vitro で転写し、スピナカラムを用いて精製した後、1 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.7) に溶解して、原液にしました。Spikevax 製剤については、MedChemExpressから供給されたヘプタデカン-9-イル 8-((2-ヒドロキシエチル)(6-オキソ-6-(ウンデシレノイル)ヘキシル)アミノ)オクタン酸 (SM-102)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ[1]-3-ホスホコリン (DSPC)、1,2-ジミリスチル-rac-グリセロ[1]-3-メトキシポリエチレングリコール-2000 (DMG-PEG 2K)、およびコレステロールを 50:1.5:10:38.5 のモル比でエタノールに溶解し、有機相にしました。mRNA は、25 mM 酢酸ナトリウムに分散させ、水性相にしました。この 2 相を、ベンチトップマイクロ流体デバイスを用いて、容積比 3:1 で混合しました。全流量 (TFR) は 12 mL/min、N/P 比は 5.67:1 でした。次に、形成された mRNA LNP を 20 mM トリス (pH 7.4) でバッファ交換し、分子量カットオフ 30 kDa の超遠心分離チューブを用いて、4 °C、2,500 x g で 60 分間濃縮し、総脂質濃度を約 4 mg/mL としました。形成された mRNA-LNP は、マンニトールやトレハロースなどの耐凍剤の有無にかかわらず、凍結乾燥にしました。

F-ルシフェラーゼ mRNA の調製: F-ルシフェラーゼ mRNA は、New England BioLabs (米国マサチューセッツ州イプスウィッチ) の mRNA 合成用 HiScribe T7 High Yield RNA 合成キットを使用して、合成しました。

F-ルシフェラーゼ mRNA の濃度: 合成された F-ルシフェラーゼ mRNA の濃度は、Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計 (部品番号 G6860A) を用いて測定しました。mRNA の濃度計算には、ランベルト・ベールの法則を使用しました。F-ルシフェラーゼ mRNA の検量線は、4.35、8.7、13、34.8、43.5 µg/mL の濃度で作成しました。

mRNA LNP から mRNA を抽出: mRNA LNP から mRNA を抽出するには、イソプロパノール沈殿メソッドを用いました。⁹ 凍結乾燥されていないサンプルについては、20 µL のサンプルに、酢酸アンモニウム (60 mM) 含有イソプロパノールを 180 µL 加え、10 倍に希釈しました。凍結乾燥サンプルについては、ヌクレアーゼフリー水 30µL を加えてから、溶解したサンプル 20µL を取り、酢酸アンモニウム (60 mM) 含有イソプロパノールを 180 µL 加え、10 倍に希釈しました。サンプルを短時間ボルテックスし、14,000 x g、4 °C で 15 分間遠心分離しました。次に上澄みを捨てて、ペレットをイソプロパノール 1 mL で洗浄し、ボルテックスしてから、4 °C で遠心分離しました。その後、ペレットを乾燥させ、室温で 100 µL のヌクレアーゼフリー水に懸濁しました。

LC 分析

表 1. mRNA 分析用 IP-RP-HPLC メソッド

パラメータ	設定値
カラム	Agilent PLRP-S カラム、4000 Å、2.1 × 150 mm、8 µm (p/n PL1912-3803)
移動相	A) 100 mM TEAA、pH 7 B) 100 mM TEAA、アセトニトリル中 pH 7
グラジエント	時間 (分) %B
	0.0 10
	1.5 10
	7.5 15
	9.5 15
	16 25
	20 25
	25 90
	27 90
	27.1 10
ストップタイム:30 分 ポストタイム:3 分	
流量	0.3 mL/min
温度	50 °C
検出 (DAD)	260 nm、4 nm バンド幅、およびリファレンス波長 360 nm、40 nm バンド幅
ピーク幅	> 0.013 分 (0.25 秒のレスポンス時間) (20 Hz)
注入量	5 µL、バイアルボトムセンシング使用 吸引速度 100 µL/min、 吐出速度 400 µL/min
ニードル洗浄	フラッシュポート、5 秒 50 % メタノール (50:50; v:v)

カプセル化効率の計算

LNP から抽出した mRNA の濃度は、F-ルシフェラーゼ mRNA で作成した検量線を基準に測定しました。mRNA を担持した LNP サンプルのカプセル化効率の計算には式 1 を使用しました。⁴

カプセル化効率 = $\frac{\text{LNP の濃度} - \text{抽出された mRNA}}{\text{カプセル化に使用された mRNA の濃度}} \times 100 \%$

式 1.

結果と考察

IP-RP-HPLC メソッドは PLRP-S カラムを用いました。グラジエント分離条件は、F-ルシフェラーゼ mRNA と微小な不純物を分離するために、最適化しました。図 1 は、43.5 $\mu\text{g/mL}$ の F-ルシフェラーゼ mRNA のクロマトグラムです。F-ルシフェラーゼ mRNA のピークがリテンションタイム 13.2 分の時点でうまく溶出したことを明確に示しています。さらに、10.6 分の時点にある小さなピークが、mRNA フラグメントが存在する可能性を示唆しています。

F-ルシフェラーゼ mRNA の検量線は、高い精度と正確性を持つ信頼性の高い分析メソッドであることを示しています。濃度 4.35 ~ 43.5 $\mu\text{g/mL}$ は、定量に適した範囲をカバーしています。また、定量下限は 5 $\mu\text{g/mL}$ 未満で、大半の実験ニーズに十分な感度です。分析の精度 ($n = 6$) は良好で、リテンションタイム %RSD は 1 % 未満、面積 %RSD も 10 % 未満と、結果の再現性と信頼性は保証されています。さらに、検量線の直線性は R^2 値が 0.997 を超え、F-ルシフェラーゼ mRNA の濃度と検出器の応答との間に強い直接的な関係があることを示しています。指定された範囲全体で正確な定量を行うには、このレベルの直線性が不可欠です。図 2A に示すように、検量線は分析メソッドのバリデーションに重要な要素であり、データの完全性をサポートします。図 2B は、さまざまな検量線レベルでの F-ルシフェラーゼ mRNA のクロマトグラムを重ね表示したものです。

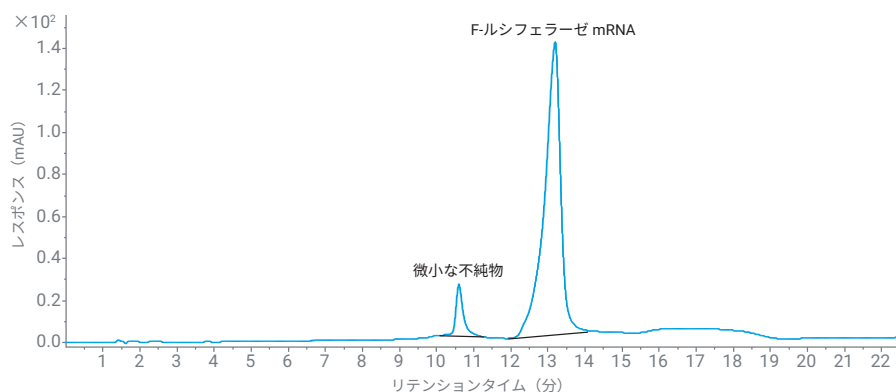


図 1. Agilent PLRP-S カラム、50 °C で分析された F-ルシフェラーゼ mRNA (43.5 $\mu\text{g/mL}$) の代表的な HPLC クロマトグラム

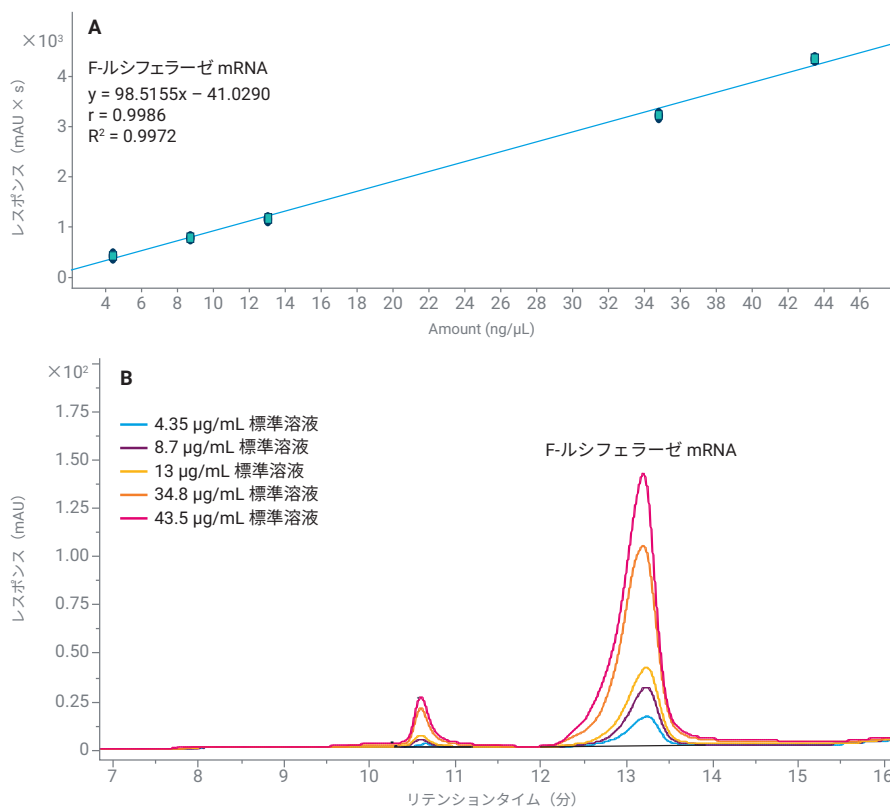


図 2. (A) 遊離 F-ルシフェラーゼ mRNA の検量線 (4.35 ~ 43.5 $\mu\text{g/mL}$)。 (B) さまざまな検量線レベルでのピークを示すクロマトグラムの重ね表示

図 3 は、耐凍剤を用いずに (NIL) 凍結乾燥した mRNA LNP から抽出された mRNA と、遊離した F-ルシフェラーゼ mRNA のクロマトグラムの重ね表示です。LNP から抽出された F-ルシフェラーゼ mRNA のピークは、遊離 mRNA と同じリテンションタイムで溶出しています。これにより、F-ルシフェラーゼ mRNA のサイズ、および mRNA の濃度測定にこのメソッドが適用できることを確認できました。

F-ルシフェラーゼ mRNA 担持した LNP のカプセル化効率を推定するには、LNP から抽出した mRNA の濃度を、カプセル化に使用した mRNA の濃度に対するパーセンテージで表す必要がありました。LNP から抽出した mRNA の濃度は検量線から推定しました。凍結乾燥したかどうか、また耐凍剤を使用しているかどうかに関係なく、LNP のカプセル化効率を計算しました。

図 4 は、カプセル化効率を、耐凍剤の有無、および凍結乾燥されたものとされていないものに分けて、棒グラフにプロットしたものです。凍結乾燥された LNP は、凍結乾燥されていない LNP よりも高いカプセル化効率を示しました。カプセル化効率も、耐凍剤を使用した方が、使用しない場合よりも高くなっています。したがって、耐凍剤を使用し、凍結乾燥した LNP の mRNA は、耐凍剤を使用せず、凍結乾燥もしていない LNP に比べて、保存がより安定するでしょう。

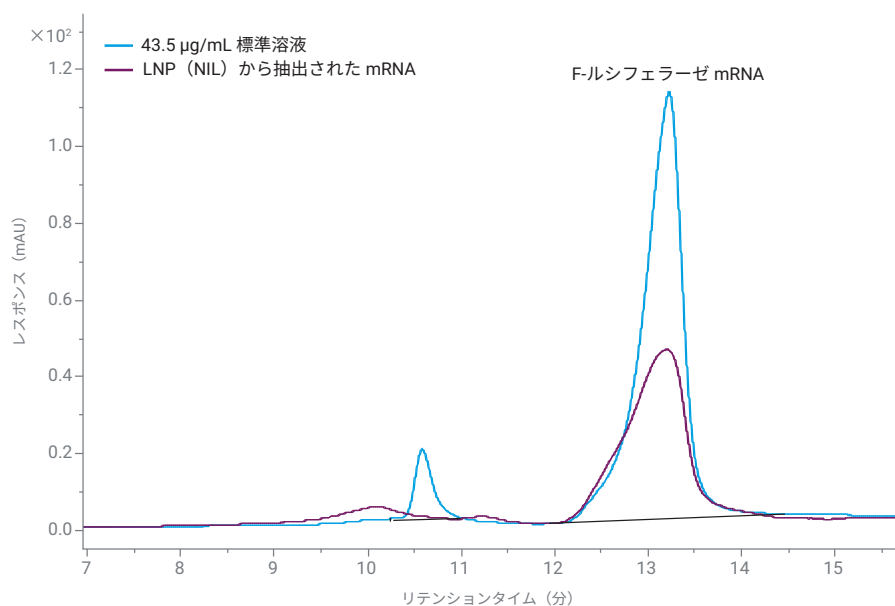


図 3. 43.5 µg/mL の標準溶液のクロマトグラムと、耐凍剤を用いずに (NIL) 凍結乾燥した mRNA LNP から抽出した F-ルシフェラーゼ mRNA のクロマトグラムの重ね表示

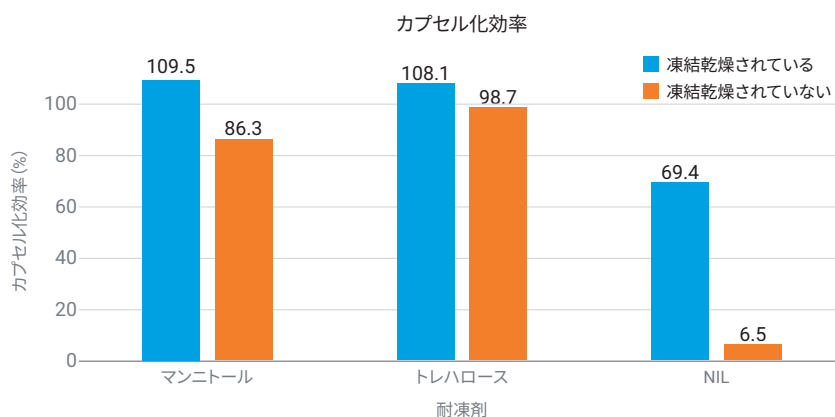


図 4. 凍結乾燥した mRNA-LNP と凍結乾燥していない mRNA-LNP のカプセル化効率

結論

この研究では、F-ルシフェラーゼ mRNA を検出するための IP-RP-HPLC メソッドと、脂質ナノ粒子 (LNP) のイソプロパノール抽出を使用した mRNA 分析を紹介しました。このメソッドは Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムと Agilent PLRP-S カラムを使用してカプセル化効率を測定する新しいアプローチで、標準的に用いられる RiboGreen アッセイの代替メソッドとなります。このメソッドは、mRNA-脂質反応や mRNA 合成中に形成される不純物の同定にも有効です。このような分析技法の進歩は、ナノメディシンの向上、特に治療用途における mRNA 送達システムの最適化において、極めて重要です。

参考文献

1. Best Practices for Analysis of In Vitro Transcribed (IVT) mRNA Using the Agilent Fragment Analyzer Systems. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5994-5927EN, **2023**.
2. Schober, G. B.; Story, S.; Arya, D. P. A Careful Look at Lipid Nanoparticle Characterization: Analysis of Benchmark Formulations for Encapsulation of RNA Cargo Size Gradient. *Sci.Rep* **2024**, *14*(1), 2403.
3. Maeki, M.; Uno, S.; Niwa, A.; Okada, Y.; Tokeshi, M. Microfluidic Technologies and Devices for Lipid Nanoparticle-Based RNA Delivery. *JCR*. **2022**, *344*, 80-96.
4. USP. Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality, **2022**. Accessed May 10, 2022. <https://www.usp.org/mrna>
5. Carrasco, M. J.; Alishetty, S.; Alameh, M. G.; Said, H.; Wright, L.; Paige, M.; Soliman, O.; Weissman, D.; Cleveland IV, T.E.; Grishaev, A.; *et al.* Ionization and Structural Properties of mRNA Lipid Nanoparticles Influence Expression in Intramuscular and Intravascular Administration. *Commun.Biol.* **2021**, *4*(1), 956.
6. Lokras, A.; Chakravarty, A.; Rades, T.; Christensen, D.; Franzyk, H.; Thakur, A.; Foged, C. Simultaneous Quantification of Multiple RNA Cargos Co-Loaded into Nanoparticle-Based Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* **2022**, *626*, 122171.
7. Currie, J.; Dahlberg, J. R.; Lundberg, E.; Thunberg, L.; Eriksson, J.; Schweikart, F.; Nilsson, G. A.; Oernskov, E. Stability Indicating Ion-Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography Method for Modified mRNA. *JPBA*. **2024**, *1*(245), 116144.
8. Azarani, A.; Hecker, K. H. RNA Analysis by Ion-Pair Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. *Nucleic Acids Res.* **2001** Jan 15, *29*(2), e7-.
9. Packer, M.; Gyawali, D.; Yerabolu, R.; Schariter, J.; White, P. A Novel Mechanism for the Loss of mRNA Activity in Lipid Nanoparticle Delivery Systems. *Nat. Commun.* **2021**, Nov. 22, *12*(1), 6777.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE-000788

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, September 13, 2024

5994-7778JAJP