

Agilent BioTek Synergy Neo2 ハイブリッド マルチモード・プレートリーダーによる 脂質ナノ粒子（LNP）の見かけ pKa の測定

著者

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

Li Zhang and Yi Yan Yang
Bioprocessing Technology
Institute, Agency for Science,
Technology and Research,
Singapore

概要

脂質ナノ粒子（LNP）は mRNA ワクチンをはじめとしたさまざまな薬物送達システムとして使用されてきました。このアプリケーションノートでは、mRNA LNP の見かけの pKa 測定における Agilent BioTek Synergy Neo2 ハイブリッドマルチモード・プレートリーダーの有用性を示しました。

はじめに

近年、LNP は mRNA 送達のプラットフォームとして、大きな注目を集めています。¹ このような脂質をベースとした mRNA ナノ粒子は、イオン化脂質、補助脂質、コレステロール、PEG 脂質で構成されています。イオン化脂質は LNP の形成で重要な役割を果たします。イオン化脂質の pKa は mRNA LNP の効能に影響する重要な特性の 1 つです。pKa は、集合した LNP のイオン化と表面電荷に関する挙動を制御します。LNP の表面電荷は、イオン化脂質とともに、核酸のカプセル化だけでなく、細胞内伝達にも影響を与えます。

LNP の電荷挙動を理解するには、イオン化アミノ脂質の荷電状態と pKa の測定が不可欠です。LNP や脂質の pKa を測定するため、アニオン性蛍光色素 6- (p-トルイジノ) -2-ナフタリンスルホン酸 (TNS) アッセイを使用し、表面イオン化能を測定しました。² このアプリケーションノートでは、Synergy Neo2 ハイブリッドマルチモード・プレートリーダーを用いて mRNA LNP pKa の測定を実証します。

実験

試薬と実験方法

リン酸二ナトリウム、リン酸一ナトリウム、クエン酸、3- (シクロヘキシルアミノ) -2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸 (CAPSO)、塩化ナトリウム、塩酸、6- (p-トルイジノ) -2-ナフタリンスルホン酸ナトリウム塩 (TNS)、メタノール、およびジメチルホルムアミド (DMF) は Sigma-Aldrich から購入しました。6- ((2-ヘキシルデカノイル) オキシ) -N- (6- ((2-ヘキシルデカノイル) オキシ) ヘキシル) -N- (4-ヒドロキシブチル) ヘキサ-1-アミニウム (ALC-0135)、9-ヘプタデカニル 8- {(2-ヒドロキシエチル) [6-オキシ-6- (ウンデシルオキシ) ヘキシル] アミノ} オクタン酸塩 (SM-102)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン (DSPC)、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 2000)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (DOTAP)、およびコレステロールは MedChemExpress から購入しました。超純水は、0.22 μm メンブレンを備えた Milli-Q Integral システムで生成しました。

mRNA LNP の作成

mRNA LNP は、Moderna 社が開発した COVID-19 ワクチンである Spikevax と同一成分を使って作製しました。mRNA は、PCR 増幅 dsDNA テンプレートから in vitro で転写し、スピンカラム (New England Biolabs の Monarch RNA クリーンアップキット) を用いて精製した後、1 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.7) に溶解して水性相にしました。

Spikevax 製剤については³、SM-102、DMG-PEG 2000、DSPC、およびコレステロール (MedChemExpress から購入) 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 (Precision NanoSystems の NanoAssemblr Platform) を使って、容積比 3:1 で混合しました。Total Flow Rate (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使い、4 °C、2,500 × g で 60 分間濃縮し、総脂質濃度を約 4 mg/mL としました。蛍光測定前に、形成された mRNA LNP を -80 °C で保存しました。

蛍光検出器

蛍光測定は、BioTek Synergy Neo2 ハイブリッドマルチモード・プレートリーダーで、Agilent BioTek Gen5 ソフトウェア (バージョン 3.12.08) を使って行いました。蛍光スペクトルスキャンでは、励起を 321 nm (幅 5 nm) に固定し、蛍光波長を 1 nm 刻みで変化させました。モノクロメータベースのエンドポイント測定は、リーダーのデフォルト幅にして、励起波長 321 nm、蛍光波長 445 nm で行いました。データはプレート移動後のデレイ 0 ms で、上方測定により取得しました。

TNS アッセイ

イオン化脂質の pKa は、SM-102/DSPC/コレステロール/DMG-PEG (モル比 50:10:38.5:1.5) で構成された mRNA LNP で測定しました。TNS は蒸留水中に 100 μM の原液として調製しました。リン酸ナトリウム 20 mM、クエン酸塩 20 mM、CAPSO 20 mM、および NaCl 150 mM の溶液を、pH 3.0 から 10.0 まで 0.5 単位ずつ異なる pH 値となるように滴定し、96 ウェルプレートに分注しました。LNP は最終濃度が 30 μM、TNS は 6 μM になるように、これらの溶液に希釈しました。蛍光強度の測定は Synergy Neo2 を使って、励起波長 321 nm、蛍光波長 445 nm で実施しました。正規化後の蛍光データに最もフィットするシグモイド関数の回帰分析を適用し、蛍光強度を最大値の半分にする pH として pKa を測定しました。

結果と考察

TNS は水溶液中では非蛍光で、有機溶媒中では高い量子収率を示します。図 1 は、DMF 中の TNS の蛍光スペクトルを示しており、蛍光ピークが 426 nm にあることがわかります。DMF 溶媒は、高い蛍光強度のシグナルを得るために選択しました。一般に、蛍光スペクトルは溶媒極性が高くなるにつれて、長波長の方向にシフトします。

LNP における pH の影響と表面電荷を分析する標準的な方法は、脂質と TNS の結合によって生じる蛍光を測定することです。TNS の蛍光は、カチオン性脂質と相互作用したときに、大きく増強されます。pH が低いと、TNS とカチオン性の表面との相互作用が高まり、蛍光が増大します。イオン化可能な基をすべて、特定の pH で荷電すると、蛍光は最大になります。高い pH では、LNP は荷電しません。蛍光のレベルは LNP のプロトン化度に直結していて、最低レベルはプロトン化度 0%、最高レベルは 100% に対応します。TNS から求められる見かけの pKa の値は、LNP 表面におけるイオン化脂質の pKa の特性によって決まります。

ALC-0135 と SM-102 は LNP 製剤で使用されるイオン化脂質です。まず、これらの脂質を用いて TNS アッセイを検証し、pKa 値を決定しました。図 2 は、ALC-0135 と SM-102 の TNS 蛍光滴定曲線です。脂質の pKa 値は、ALC-0135 が 6.09、SM-102 が 6.55 で、どちらもイオン化可能であることがわかりました。⁴

非イオン化脂質の存在、およびイオン化脂質の電子密度の変化により、個々のイオン化脂質の表面電荷は、LNP とは異なります。次に、mRNA を内包した LNP に含まれるイオン化脂質の表面 pKa を調査しました。LNP の脂質の組成は、SM-102/DSPC/コレステロール/DMG-PEG 2000 で、おおよそのモル比は 50:10:38.5:1.5 でした。図 3 に、さまざまな pH 値における mRNA LNP の TNS 蛍光滴定曲線を示します。予想どおり、低い pH では、SM-102 LNP はイオン化可能な基を含み、プラスに荷電するため、TNS の自己クエンチングが抑制され、強い蛍光シグナルが発せられます。高い pH では、SM-102 LNP は荷電しません。mRNA の LNP 表面 pKa 値が約 6.75 になることがわかりました。これは文献と一致します。⁵ DOTAP はカチオン性脂質で、永久荷電基を含むため、どの pH レベルでも高い蛍光が期待されます。

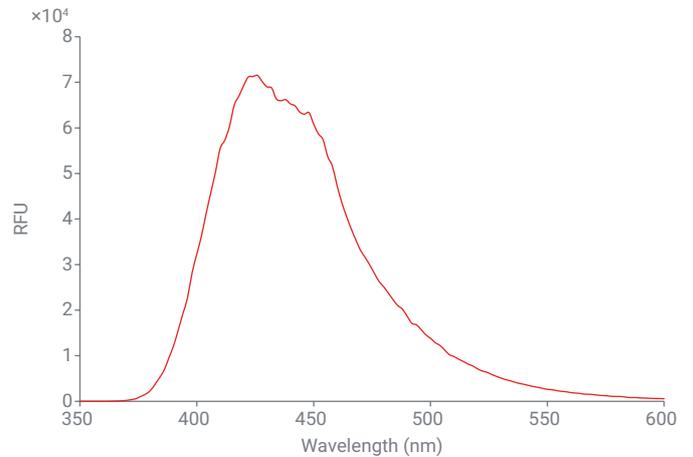


図 1. DMF 中の TNS の蛍光スペクトル

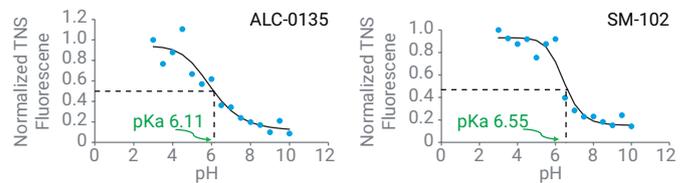


図 2. イオン化脂質の TNS 蛍光滴定曲線

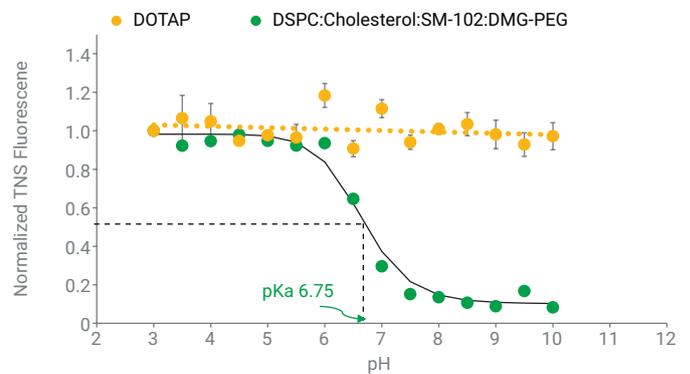


図 3. さまざまな pH 値での TNS 蛍光滴定曲線。緑色の点：ホタルルシフェラーゼ mRNA をカプセル化した LNP、黄色の点：DOTAP。データは平均値 ± 標準偏差 (n = 3) を表します。

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent BioTek Synergy Neo2 ハイブリッドマルチモード・プレートリーダーを用いた mRNA LNP の表面 pKa の測定について説明しました。Synergy Neo2 により、表面 pKa を簡単に測定することができました。また、得られた結果は過去の文献との強い一致を示しました。

参考文献

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.; Sugijara, 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

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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いません。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。

DE67998072

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, January 31, 2024

5994-7054JAJP