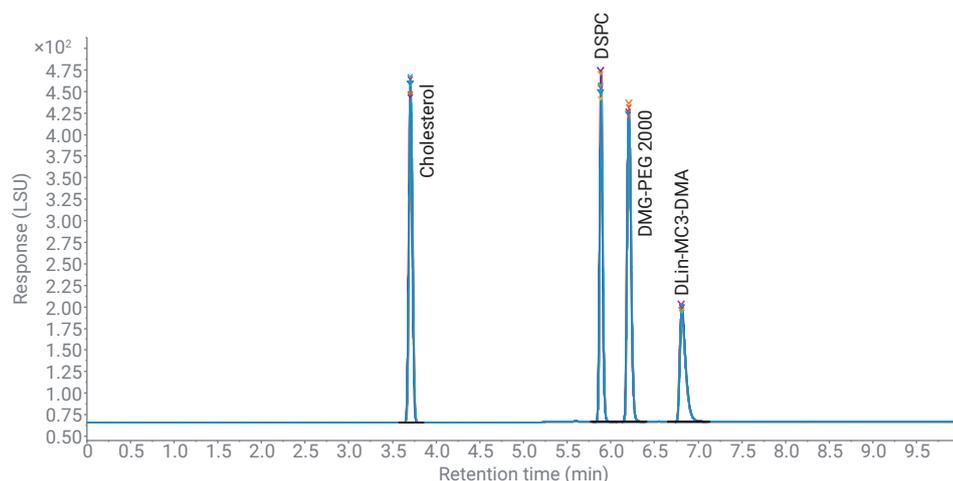


脂質ナノ粒子の分析

蒸発光散乱検出による最高の分離能のための
クォータナリメソッド開発



著者

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

概要

脂質ナノ粒子（LNP）は、製薬業界で核酸の有望な送達媒体として注目されるようになってきました。最終的な医薬品の安全性と有効性を保証するために、脂質成分は、組成および比率、分解について分析による特性解析が求められます。このアプリケーションノートでは、パチシラン（商品名 オンパットロ）の脂質成分を分析するための液体クロマトグラフィーメソッドの開発をクォータナリ設定で示します。メタノール（MeOH）とアセトニトリル（ACN）を組み合わせさせたメソッドにより、4つのLNP成分が最適に分離され、優れたピーク形状、精度、感度が得られました。Agilent 1290 Infinity II ELSDを備えたAgilent 1290 Infinity II Bio LCは、UV吸収のない脂質成分の汎用的な検出を可能にします。さらにAgilent 1290 Infinity II ELSDの高いダイナミックレンジにより、パチシラン様サンプル中の4つの脂質すべてを検出できます。

はじめに

近年、RNA ベースの治療と遺伝子編集技術が有望視されるようになる中、LNP 研究への関心が高まっています。

LNP は安全で効率的な送達媒体として機能し、脂質とオリゴヌクレオチドの組み合わせは特に、製薬業界で大きな成功を収めています。LNP システムにより、安定した薬物負荷と標的作用部位への送達効率の向上が実現できます。製剤化された薬物では、低分子干渉 RNA (siRNA) やメッセンジャー RNA (mRNA) などのオリゴヌクレオチドが LNP でカプセル化され、エンドサイトーシスを介した細胞の取り込みと細胞質ゾルへの送達が進められます。

LNP は球状の小胞であり、通常は 4 つの主要なコンポーネントで構成されています (図 1)。^{1,2}

- コレステロール
- 中性リン脂質 (主に DSPC)
- ポリエチレングリコール (PEG)-脂質
- イオン化可能なカチオン性脂質 (多くの場合、独自仕様)

構造脂質 DSPC およびコレステロール、PEG-脂質の主な目的は、粒子サイズを制御し、粒子の安定性と血液適合性をもたらす、さらに LNP の循環寿命を改善することです。³LNP 製剤の中で最も量の少ない脂質である PEG-脂質は、保管中の凝集を防ぐための立体障壁としても機能します。カチオン性脂質の第 2 世代であるイオン化可能な脂質には、pH 依存性があります。低 pH では、正電荷したイオン化可能なアミン基の働きで、これらの脂質は相互作用を起こします (例えば、LNP-RNA 形成のローディングプロセスで使用されるアニオン性 RNA との相互作用)。血流中の生理学的 pH では実質的に帯電していないので、毒性が最小限に抑えられます。

FDA および EMA によって承認された最初の LNP カプセル化 RNA 薬は、siRNA の LNP 製剤であるパチシラン (商品名 オンパットロ) です。⁴ イオン化可能なカチオン性脂質として DLin-MC3-DMA、DSPC、コレステロール、および DMG-PEG-2000 が含まれます (図 2

を参照)。規制当局によるオンパットロの承認により、ナノ粒子送達によって可能となった数多くの核酸ベースの治療法の開発への道が開かれました。

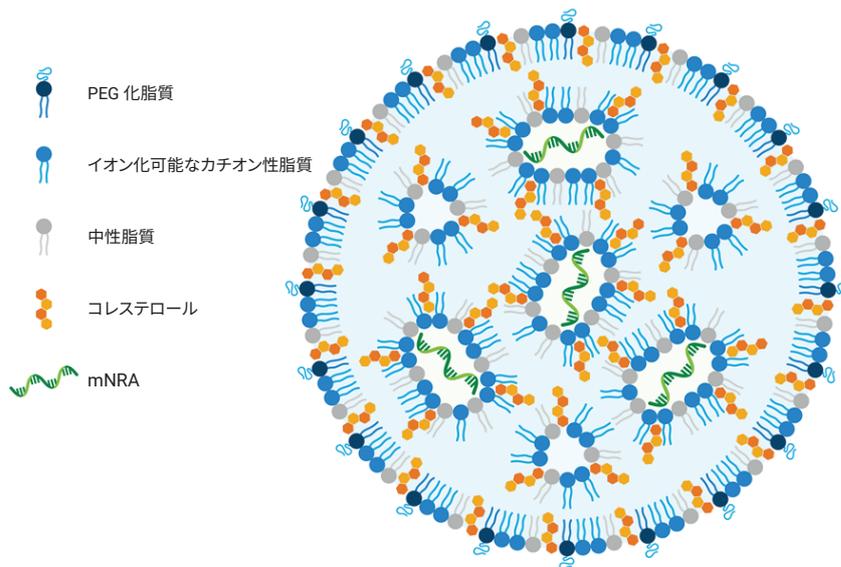


図 1. Schoenmakers ら¹ および Eversetal ら² を参考にした mRNA または siRNA-LNP 構造の概略図

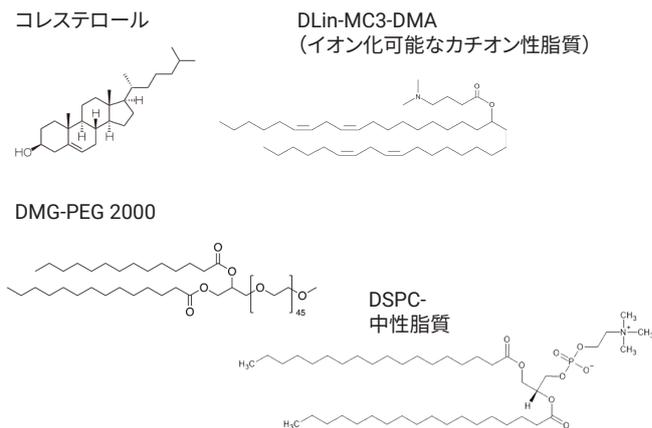


図 2. オンパットロ パチシラン LNP の主成分

薬物全体の安全性と有効性を確保するために、RNA がロードされた LNP 部分の分析に加えて、脂質成分も分析による特性解析を必要とします。医薬品および製剤の設計プロセスでは、完成した医薬品の in vivo での性能と品質管理のために、広範な分析が必要です。⁵ 規制要件には、siRNA カプセル化や粒子サイズなどの物理的パラメータのテスト、および個々の脂質成分のアッセイ（組成、同一性、純度など）が含まれます。⁵

分析の前に、リポソームと LNP は通常、メタノールやイソプロパノールなどの有機溶媒で希釈することによって壊されます。

通常、組成や分解に関する LNP 分析は、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) によって実施されます。⁶ クロマトグラフィー分離後、UV 吸収のない脂質などの分子の検出手法として理想的なのは、蒸発光散乱検出 (ELSD) です。Agilent 1290 Infinity II ELSD は、優れた再現性と高い感度で脂質を検出するのに最適です。⁷ その汎用的な検出機能に加えて、大きな利点として (示差屈折率検出 (RID) とは対照的に)、グラジエントを使用できる柔軟性があります。

このアプリケーションノートでは、オンパットロの LNP 組成の 4 つの成分を分析するための UHPLC メソッドの開発について紹介します。4 つの成分 (疎水性 DSPC、イオン化脂質、PEG 化脂質を含む) の化学的性質が異なるため、1 つの固定相と移動相の組み合わせの中ですべての成分に対して対称的で鋭いピーク形状を得るのは非常に困難です。Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを使用すると、クォータナリポンプの柔軟性を活用でき、さまざまな溶媒とバッファの組み合わせをテストするメソッド開発が容易になります。

実験方法

機器

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システムは、次のモジュールで構成されています。

- Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ (G7137A)、サンプルサーモスタット付き (オプション #101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、イナート仕様の標準フロー熱交換器 (G7116-60071) 付き
- Agilent 1290 Infinity II ELSD (G7102A)

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS バージョン 2.6 以降

カラム

InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl、2.1 × 50 mm、1.9 μm (部品番号 699675-912)

試薬

すべての ELSD 分析には、Agilent InfinityLab 超高純度 LC/MS メタノール (5191-4497) および Agilent InfinityLab 超高純度 LC/MS アセトニトリル (5191-4496) を使用しました。イソプロパノールは Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。超純水は、0.22 μm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak、Merck-Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) を装着した Milli-Q Integral システムで精製しました。酢酸アンモニウムは Sigma-Aldrich (シュタインハイム、ドイツ) から入手しました。

サンプル

コレステロールおよび 1,2- ジステアロイル -sn-グリセロ -3- ホスホコリン (18:0 PC または DSPC) は、Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から入手しました。DLin-MC3-DMA (4- (ジメチルアミノ) -ブタン酸、(10Z、13Z) -1- (9Z、12Z) -9,12- オクタデカジエン -1- イル -10,13- ノナデカジエン -1- イルエステル) は、Cayman Chemical (ミシガン州、米国) から入手しました。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) は、Avanti Polar Lipids (アラバマ州、米国) から入手しました。

サンプルは 2 つの異なる濃度で溶解しました。完全に溶解させるために、使用前にチューブを 35 °C に 3 ~ 4 分間温めました。

表 1 に示すように、メソッド開発用の混合サンプルは、すべての成分でほぼ同じピーク高さと同面積となるように、1,220 μL の MeOH で構成しました。

オンパットロ LNP の成分比を模倣したサンプルの成分を次のように混合しました。脂質を MeOH に溶解して、濃度を 3.89 mM としました。コレステロール、DLin-MC3-DMA、DMG-PEG、および DSPC は、3.89 mM の等モル濃度から 38.5:50:1.5:10 の比率で溶解しました。

この混合物から、直線性分析用に 972.5 μM から 0.44 μM までの範囲の 1:3 の段階希釈ステップで希釈系列を調製しました (5 μL の注入で 4.8625 nmol から 2.22 pmol)。

表 1. メソッド開発用のサンプル組成

脂質	分子量 [Da]	濃度 [mM]	質量 [μg]
DMG-PEG 2000	2,509.20 (PEG の多分散性による平均分子量)	0.0984	300
DLin-MC3-DMA	642.09	0.6380	500
コレステロール	386.67	0.1060	50
DSPC	790.15	0.1670	150

バッファの調製

500 mM 酢酸アンモニウム (～ pH 7、追加の pH 調整なし) を調製し、0.2 μm メンブレンフィルターを使用してろ過しました。バイナリメソッドでは、酢酸アンモニウム原液を水で 100 mM に希釈し、このバッファ 100 mL をメタノール 900 mL (チャンネルA) またはアセトニトリル 900 mL (チャンネルB) のいずれかと混合しました。

結果と考察

成分の分析に水 + 10 mM 酢酸アンモニウム (チャンネル A) および MeOH + 10 mM 酢酸アンモニウム (チャンネルB) を使用した初期バイナリグラジエントセットアップ⁷ (5 分間で 82 % から 100 % B までのグラジエント、5 分間保持) は、図 3 に示すような結果となりました。他のパラメータはすべて、実験のセクションで説明したものと同じものを使用しました。最初の 3 つの中性脂質ピークは、良好なピーク形状と分離度を示しました。最後のイオン化可能な脂質 DLin-MC3-DMA は、広い (したがって浅い) ピークで溶出しました。温度の変更やグラジエントスロープなどのメソッド開発オプションを用いても、イオン化可能な脂質のピーク形状は改善されませんでした。したがって、溶媒の組み合わせの変更を主な改良点としました。水と MeOH の代わりに水と ACN (両方とも 0.1 % ギ酸を使用) を用いてさらに実験を行いました。良好な分離能やピーク形状は得られませんでした (データは示していません)。

溶媒の組み合わせに関するメソッド開発を可能にするための基礎として、1290 Infinity II バイオフレキシブルポンプを用いたクォータリ Agilent 1290 Infinity II バイオ LC システムを使用しました。水、ACN、MeOH、および 500 mM 酢酸アンモニウムを 4 つのチャンネルにそれぞれ個別に供給し、チャンネル D から 2 % 酢酸アンモニウムを連続的に供給して、10 mM の緩衝液の濃度を一定にしなが、さまざまな溶媒の組み合わせをテストしました。

メソッド

表 2. クロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値				
溶媒	A: 水 B: ACN C: MeOH D: 500 mM 酢酸アンモニウム				
流量	0.4 mL/分				
クォータリグラジエント最終	時間	チャンネル A %	チャンネル B %	チャンネル C %	チャンネル D %
	0 分	16	0	82	2
	3 分	8	0	90	2
	5 分	8	90	0	2
ストップタイム: 10 分 ポストタイム: 5 分					
クォータリグラジエント最終ショート	時間	チャンネル A %	チャンネル B %	チャンネル C %	チャンネル D %
	0 分	8	0	90	2
	3 分	8	90	0	2
	ストップタイム: 5 分 ポストタイム: 5 分				
グラジエント バイナリ	時間	チャンネル A %	チャンネル B %		
	0 分	90 % メタノール、10 % 水、 10 mM 酢酸アンモニウム	90 % アセトニトリル、10 % 水、 10 mM 酢酸アンモニウム		
	4 分	100	0		
	4 分	0	100		
ストップタイム: 7 分 ポストタイム: 5 分					
温度	30 °C				
検出 ELSD	エバポレータ温度: 40 °C				
	ネプライザ温度: 40 °C				
	ガス流量: 1.6 SLM				
	データレート: 80 Hz スムージング: 10 (1.0 秒)				
注入	注入量: 2 および 5 μL サンプル温度: 25 °C ニードル洗浄: 50 % イソプロパノール水中で 3 秒				

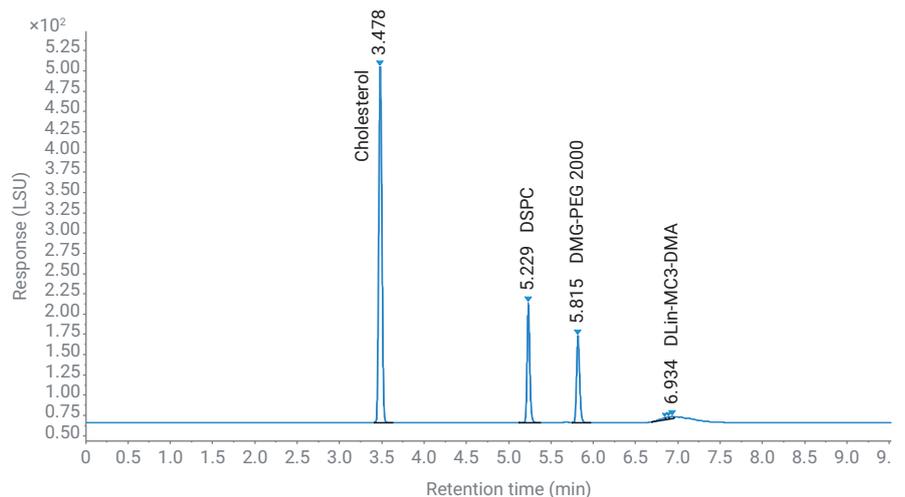


図 3. 4 つの LNP 成分の分析用に、水と MeOH、10 mM 酢酸アンモニウムを使用したバイナリグラジエント

MeOH を使用したグラジエント

クォータナリ設定で MeOH を使用すると、4 つの脂質すべてを溶出することはできませんでした (図 4)。完全に溶出するにはおそらく、より長いホールド時間で 100 % の MeOH が必要になると考えられます。クォータナリ設定では、最大 90 % の MeOH を実現できましたが、それでも酢酸アンモニウムのバッファ機能と結晶化を防ぐための水が含まれていました。図 4 は、80 ~ 90 % MeOH を用いた場合の 3 成分分離の結果を示しています。MeOH を 5 分間 90 % 保持した場合でもカラムから溶出したのは 2 つのピークだけでした。次の実験では、ACN をより強力な溶出液として使用して、4 つの脂質成分すべての完全な溶出ができるかをテストしました。

ACN を使用したグラジエント

図 5 は、溶出液として ACN を使用した 3 成分グラジエントの結果を示しています。グラジエントは、5 分間で 50 ~ 90 % B、5 分間保持に設定しました。ACN を使用すると、4 つのピークすべてを完全に溶出させることができました。ただし、3 つの脂質のピーク形状は最適ではなく、コレステロール (最初のピーク) のみがガウスピーク形状を示していました。

さらに速い溶出と高い分離能を目指したメソッド開発を、開始条件の有機溶媒比率を高くすること、グラジエントを浅くすることで開始しました。溶出は速くなりましたが、より平坦なグラジエントでは最初の 2 つのピークの分離能は改善しませんでした。図 6A ~ 6C を参照してください。

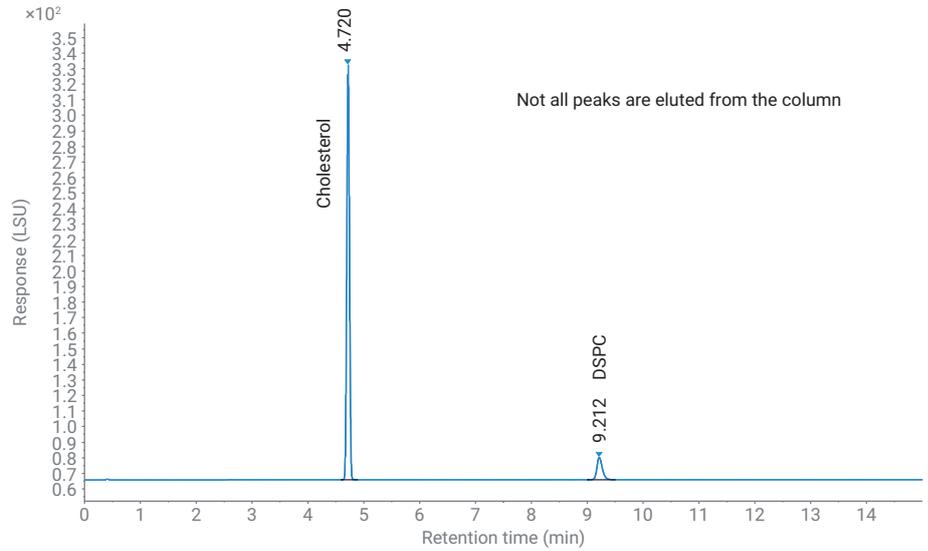


図 4. 5 分間保持、5 分間で 80 ~ 90 % MeOH の 3 成分グラジエント

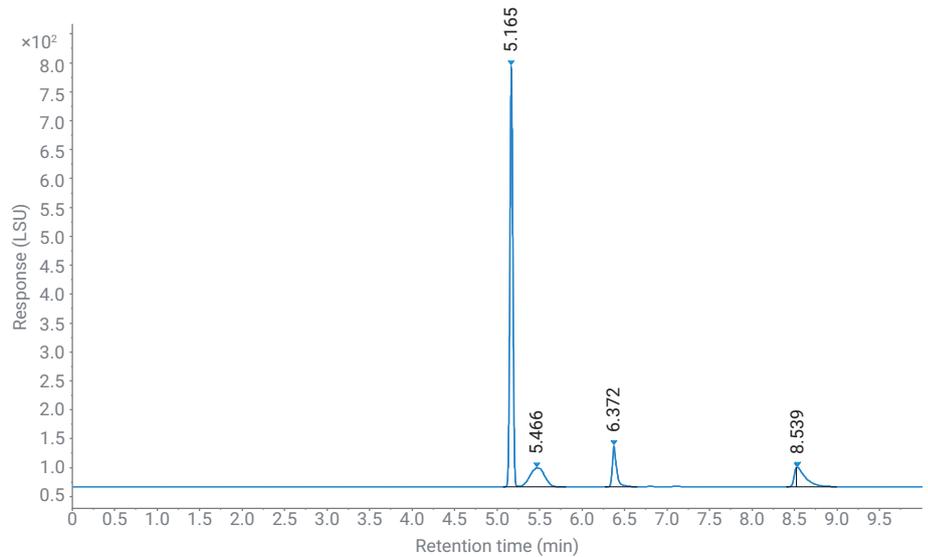


図 5. 5 分間保持、5 分間で 50 ~ 90 % B (ACN) の 3 成分グラジエント

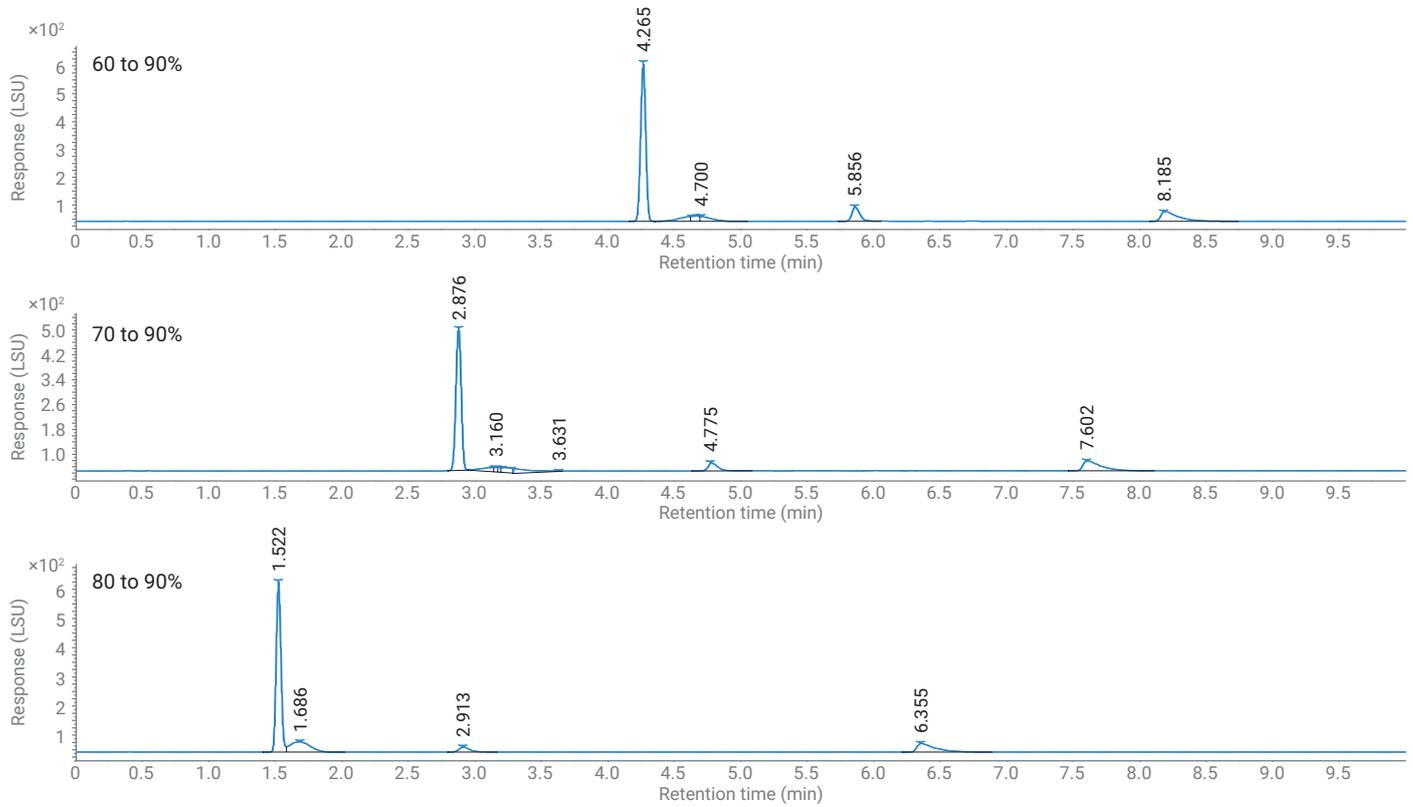


図 6. ACN を使って 4 つの LNP 成分を溶出させる異なるグラジエントスロープ

MeOH と ACN を組み合わせたクォータナリグラジエント

ピーク形状を改善して完全な溶出を実現するために、ACN と MeOH を組み合わせたクォータナリグラジエントを評価しました。実験条件については表 2 を参照してください。82 % MeOH から 90 % MeOH、90 % ACN までのクォータナリグラジエントにより、イオン化可能な脂質も含め、すべての LNP 成分に対して優れたピーク形状を持つベースラインクロマトグラフィー分離を実現できました。7 回の連続分析の重ね表示でも、リテンションタイム (RT) の優れた精度と良好なエリア精度が示されました (図 7 および表 3)。

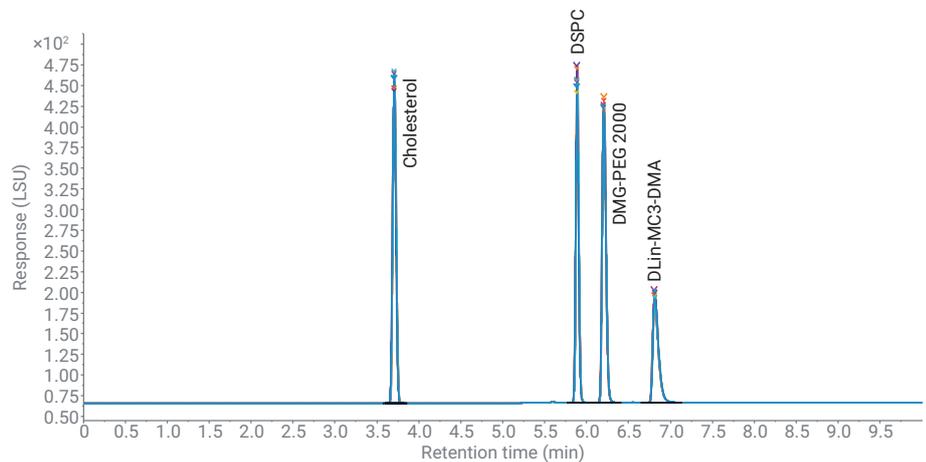


図 7. MeOH と ACN を使用したクォータナリグラジエントで 7 回の連続分析の重ね表示

表 3. 図 7 ピーク RSD 情報

ピーク	RSD RT (%)	RSD 面積 (%)
コレステロール	0.1	1.875
DSPC	0.054	3.236
DMG-PEG 2000	0.055	1.172
DLin-MC3-DMA	0.061	0.998

このメソッドを使用して、4つの脂質すべての等モル混合物をカラムで分析しました。これらは、4.8625 nmol から 2.22 pmol までの範囲で連続的に 1:3 で希釈されました。検出限界 (LOD) は極めて優れていることがわかり、信号対雑音 (S/N) 比が 3 のカラムで 0.46 ~ 8.1 pmol でした。S/N = 10 のカラムでは、定量限界 (LOQ) は 1.6 ~ 27 pmol でした。ノイズは、すべてのピークについて P2P で計算したものです。相関曲線はすべて 2 次曲線モデルに対して優れた値を示し、決定係数 (R^2) は 0.995 の DSPC を除いて 0.999 を超える結果となりました (表 4)。

表 4. LNP 成分の LOD、LOQ、および相関

ピーク	脂質	LOD [pmol]	LOQ [pmol]	R^2
1	コレステロール	8.1	27	0.99913
2	DSPC	2.3	7.8	0.99524
3	DMG-PEG 2000	0.46	1.6	0.99988
4	DLin-MC3-DMA	5.31	17.7	0.99963

優れたピーク形状と分離度を維持しながら、メソッドをより短くするためにメソッド開発を継続しました。その結果、MeOH/ACN 溶媒の組み合わせを変える別のバリエーションに至りました。82% から 90% MeOH への線形 MeOH グラジエントステップを省略し、2 分間保持、3 分間で 90% MeOH から 90% ACN へというグラジエントを使用しました (表 2)。図 8 は、この短いグラジエントを使用した 4 つの LNP 成分の分離を示しています。表 5 に、図 8 のピークの RSD 値を示します。この短いメソッドを使用して、すべての脂質成分について優れた分離能、ピーク形状、および再現性が得られました。面積精度は、2 μ L の代わりに 5 μ L を注入することで向上させることができました (長いメソッド)。短いメソッドには、バイナリポンプで実行できるという追加の利点があり、LC/MS やその他の分析で役立ちます。

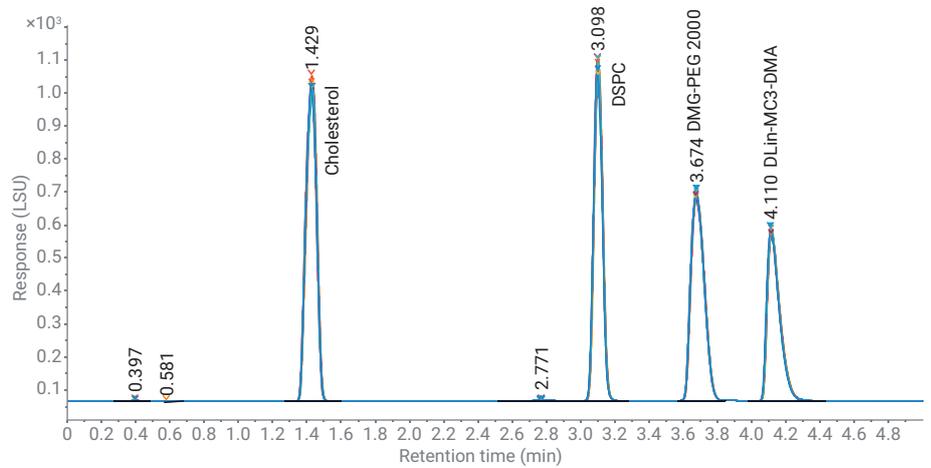


図 8. 90% MeOH から 90% ACN への短いクォータナリグラジエント - 7 回の連続分析の重ね表示

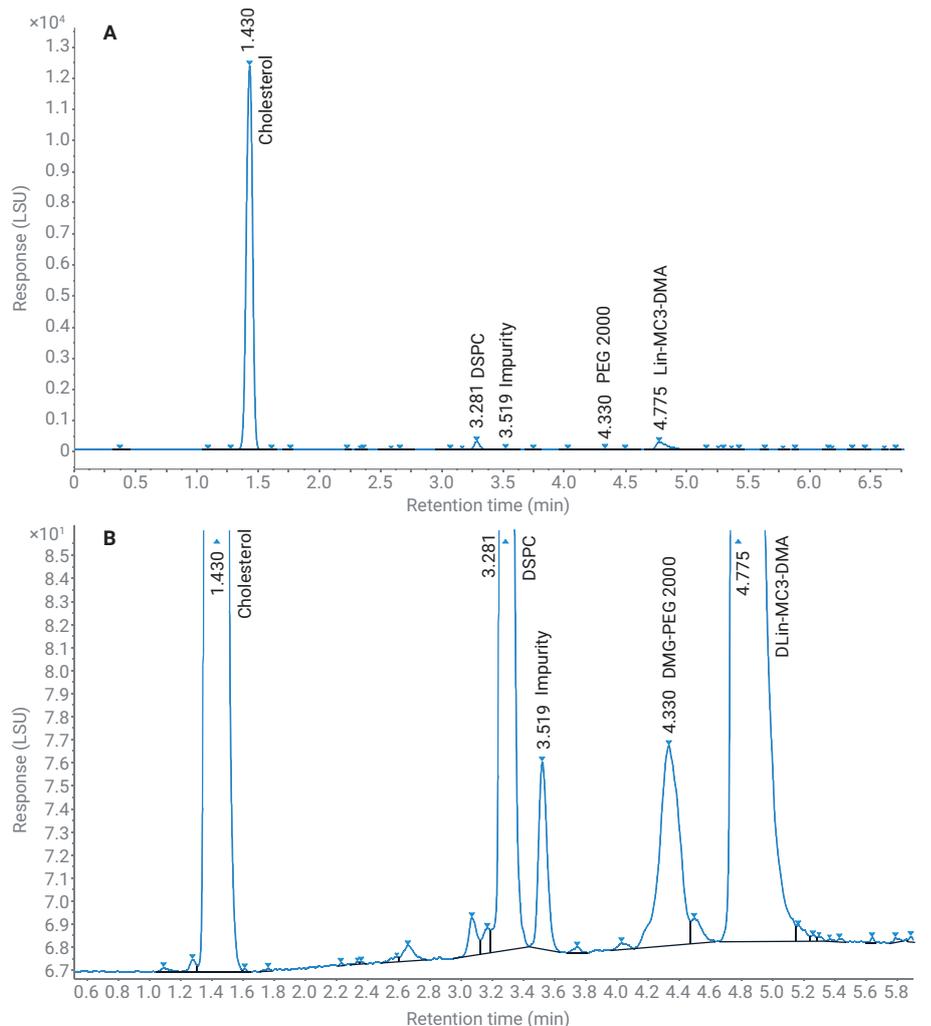


図 9. (A) パチシラン様 LNP サンプルの分析、(B) 拡大図

表 5. 図 8 ピーク RSD 情報

ピーク	RSD RT (%)	RSD 面積 (%)
コレステロール	0.148	0.428
DSPC	0.090	1.807
DMG-PEG 2000	0.040	0.788
DLin-MC3-DMA	0.032	0.759

クォータナリメソッドをバイナリメソッドに移行し、パチシラン¹と DMG-PEG 2,000、DLin-MC3-DMA、コレステロール、および DSPC の LNP 比が 1.5:50:38.5:10 である LNP を模倣した 4 成分のサンプル混合物に適用しました。図 9 に示すように、広いダイナミックレンジにわたって検出と定量化を実現する必要がありますを示しています。

結論

1290 Infinity II Bio LC のクォータナリセットアップでの利用は、溶媒メソッドの開発に理想的であることが示されました。InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl の化学的な特性は、表面が多孔質のベース粒子であることから優れた流れのダイナミクスを形成し、LNP に見られる疎水性の強い脂質と相互作用するときには従来の C18 よりも疎水性がわずかに低くなります。カラムとともに、溶媒の組み合わせがピーク形状と分離度に影響を与える最も重要な要素であることが示されました。強力な移動相として MeOH または ACN のみを使用する単独の有機溶媒セットアップでは、脂質成分の不完全な溶出 (MeOH)、または 4 つのピークすべてで最適ではないピーク形状と分離度 (ACN) となることが観察されました。クォータナリセットアップでは、有機溶媒 MeOH と ACN の両方を使用する高分離能メソッドが開発されました。

開発されたメソッドにより、RT と面積が高精度で、優れたピーク形状と高分離度を実現し、4 つの LNP 成分すべてで完全な溶出が可能になりました。高い決定係数の優れた二次相関に加えて、1290 Infinity II ELSD はその高いダイナミックレンジにより、パチシランサンプルの元来の比率で 4 つの脂質成分すべての検出と定量が可能になりました。したがって、1290 Infinity II Bio LC は、1290 Infinity II ELSD と組み合わせることで、LNP 成分の分析に強く推奨できます。

参考文献

1. Schoenmaker, L. et al. mRNA-lipid Nanoparticle COVID-19 Vaccines: Structure and Stability Int. J. Pharm. **2021**, 601.
2. Evers, M. et al. Small Methods **2018**, 2.
3. Kim, J. et al. Self-assembled mRNA Vaccines Adv. Drug Deliv. Rev. **2021**, 170, 83-112.
4. Akinc, A. et al. The Onpatro Story and the Clinical Translation of Nanomedicines Containing Nucleic Acid-Based Drugs Nat. Nanotechnol. **2019**, 12, 1084-1087.
5. NDA 210922 ONPATTRO (patisiran) Lipid Complex Injection Addendum to Drug Product Quality Review – Quality Assessment **2018**.
6. Fan, Y.; Marioli, M.; Zhang K.; Analytical Characterization of Liposomes and Other Lipid Nanoparticles for Drug Delivery. J. Pharm. Biomed. Anal. **2021**, 5.
7. A Sensitive Detection Technique for Analysis of Lipids in Liposomal Formulations Using an Agilent 1290 Infinity II ELSD. Agilent Technologies application note, publication number 5994-0965EN, **2019**.

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。

RA44620.0930902778

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, July 27, 2022

5994-4709JAJP