

Agilent Vaya ラマン分光装置による mRNA 脂質ナノ粒子成分の原料同定



著者

Suresh Babu C.V.
Agilent Technologies, Inc.

概要

ハンドヘルドラマン分光装置は、透明および不透明容器越しに原材料を識別できます。このアプリケーションノートでは、透明ガラス瓶および不透明な白色ポリエチレン製容器越しの mRNA 脂質ナノ粒子 (LNP) 成分の化学同定検証と検査を対象とした、空間オフセット型ラマン分光法 (SORS) に基づくハンドヘルド Agilent Vaya ラマン原料同定検証システムの使用について説明します。

はじめに

脂質ナノ粒子 (LNP) は幅広い治療薬に不可欠です。¹ LNP は、効率的なオンターゲットペイロード送達のための薬物送達システムとして使用されます。最近では、COVID-19 ワクチンのための mRNA 送達ベクターとして使用されています。核酸 LNP 製剤は通常、脂質賦形剤および非脂質賦形剤から構成されています。どちらの賦形剤も、ワクチンの安定性、トランスフェクション効率、安全性において重要な役割を担っています。² したがって、LNP 調製で使用される原材料の化学的組成と純度は、最終製品の品質に直接、影響を及ぼすため、その評価が非常に重要です。必須となっている現行の GMP (Good Laboratory Practice) の原料同定検査や検証を、検査の削減と組み合わせることで、このような品質管理のニーズに効率的に対応できます。

ラマン分光分析は現在、同定検査のための標準的な手法となっています。必要な時点で原料の同定検証を実行できます。SORS は、中身の見えにくい表面や透明な表面の内側にある原料を正確に同定できる特殊な手法で、サンプルボトルや容器を開ける必要をなくします。³ このアプリケーションノートでは、SORS に基づくハンドヘルドラマン分光装置、Vaya ラマンシステムを使用して、mRNA LNP 調製で使用される、複数の市販の脂質および非脂質賦形剤を分析しました。Vaya は、透明および不透明な容器越しに原料を同定できます。

実験

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス)、4- (2-ヒドロキシエチル) -1-ピペラジンエタンスルホン酸 (HEPES)、クエン酸、アセトニトリル、メタノール、エタノール、スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、ソルビトールは Sigma-Aldrich から入手しました。1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (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)、コレステロールは MedChemExpress から入手しました。すべての賦形剤は元の容器内で分析しました (ナノ粒子成分と関連の容器の正確な組み合わせは、図 1 を参照)。すべての脂質に対し、Vaya によりガラスバイアル越しに LNP 成分の識別を実施するための同定検証メソッドを作成しました。メソッドは搭載されたメソッド開発ウィザードを使用して開発しました。ユーザーが指定する容器タイプに関する情報を除き、その他すべての取り込みパラメータは Vaya によって自動的に設定されました。SORS スペクトルの取り込み前に、性能適格性評価試験を実施しました。それぞれの同定検証メソッドを使用して、本アプリケーションノートで示されたスペクトルデータを生成しました。Vaya の標準分析プロトコルに組み込まれている自動ベースライン補正以外には、追加のデータ処理は行いませんでした。

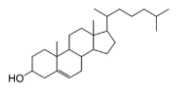
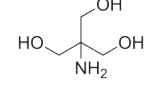
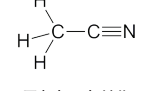
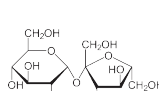
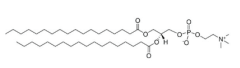
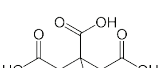
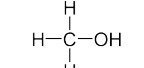
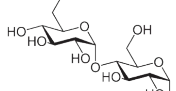
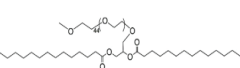
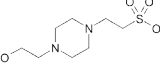
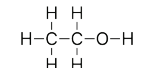
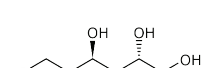
脂質 (透明ガラスおよび茶色バイアル)	バッファ (白色ポリエチレン HDPE)	有機溶媒 (透明ガラスおよび褐色瓶)	耐凍剤 (白色ポリエチレン HDPE)
 コレステロール (透明ガラス)	 トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン	 アセトニトリル (茶色)	 スクロース
 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC) (透明ガラス)	 クエン酸	 メタノール (透明ガラス)	 マルトース
 [3- (2-メトキシエチル) -2-テトラデカノイルオキシプロピル] テトラデカノアート (茶色)	 4- (2-ヒドロキシエチル) -1-ピペラジンエタンスルホン酸 (HEPES)	 エタノール (amber)	 ソルビトール

図 1. この研究で使用された脂質および非脂質賦形剤と容器の詳細

結果と考察

脂質および非脂質賦形剤の種類

バッファ成分や耐凍剤などの脂質賦形剤および非脂質賦形剤は、核酸ベースのLNP製品で使用されています。図1に、4つのカテゴリの化学物質（脂質、バッファ、溶媒、糖ベースの耐凍剤）とともに、この研究で使用されたそれぞれの容器の種類を示します。

脂質

脂質はLNPの構成要素です。図2に、ラマンスpekトルの重ね合わせ表示と、VayaがPEG化、イオン性、ステロール脂質を簡単に識別する様子を示します。ラマンバンドの割り当てにより、脂質に長い炭化水素鎖があることが確認されます。⁴ 1,440 cm⁻¹におけるバンドはCH₂とCH₃の変角振動に帰属し、1,673 cm⁻¹におけるバンドはコレステロールに存在するC=Cの伸縮振動の結果です。DSPCでは、949 cm⁻¹におけるバンドはPO伸縮に相当します。DSPCおよびDMG-PEG 2000脂質の両方で、1,700 cm⁻¹に現れているバンドはC=O伸縮に帰属しています。

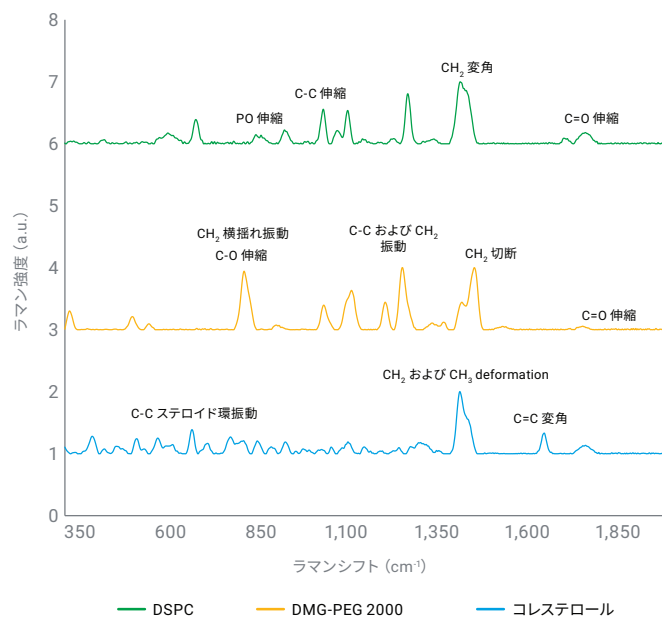


図2. 透明ガラス（コレステロール、DSPC）および茶色（DMG-PEG 2000）バイアル越しの脂質のAgilent Vayaラマンスpekトル

バッファ

LNP調製では多様な種類のバッファが使用されます。図3に、3種類の生物学用バッファに対するラマンスpekトルの重ね合わせ表示と、該当する割り当てを示します。3つすべてのpekトルに示されている異なるラマンバンドに基づき、LNP調製の前にこれらのバッファを確認できます。トリスのpekトルで、1,500 ~ 1,700 cm⁻¹の領域に現れているバンドはN-H変角に関連しています。HEPESの場合、1,046 cm⁻¹のバンドはSO₃伸縮に帰属しています。クエン酸で1,700 cm⁻¹におけるバンドはC=O伸縮に由来しています。

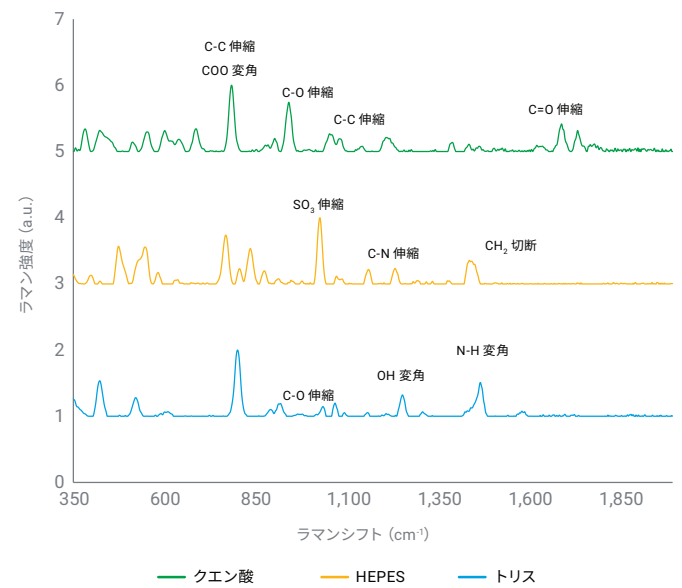


図3. 白色ポリエチレンHDPE越しの生物学用バッファのAgilent Vayaラマンスpekトル

有機溶媒

LNP 調製において有機溶媒は重要な役割を果たします。図 4 に、3 種類の溶媒のラマンスpekトルの重ね合わせ表示と、該当する割り当てを示します。これらの溶媒のpekトルは、それぞれのバンドの違いを明確に表しています。メタノールの $1,035\text{ cm}^{-1}$ における強いバンドは C-O 伸縮に相当します。エタノールのpekトルは、 882 cm^{-1} で C-C 伸縮に由来する 1 つの強いバンドと、 $1,050$ および $1,096\text{ cm}^{-1}$ でそれぞれ C-O 伸縮と CH_3 横揺れ振動に由来する 2 つの小さなバンドを示しています。アセトニトリルは 921 cm^{-1} に強いバンドがあり、これは C-C 骨格振動モードを示しています。

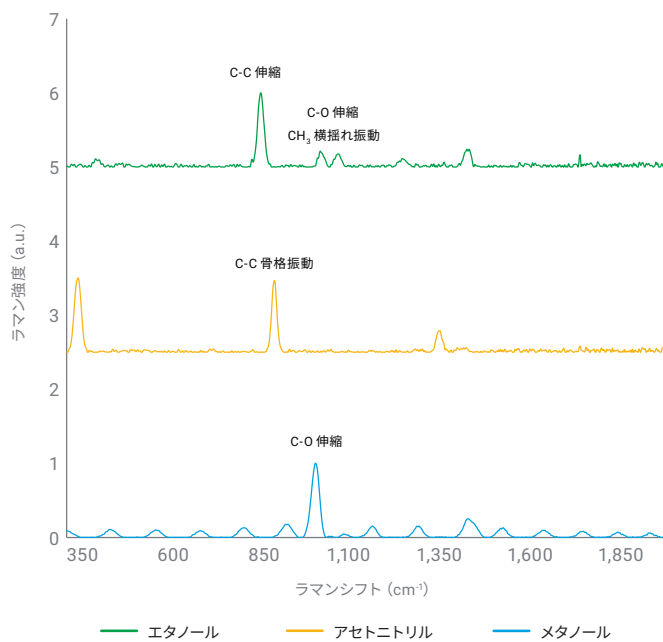


図 4. 透明ガラス (メタノール) および褐色瓶 (アセトニトリル、エタノール) 越しの有機溶媒の Agilent Vaya ラマンスpekトル

耐凍剤

耐凍剤は、mRNA LNP 消費期限を延長するために、製剤ステップ中に使用されます。図 5 に、糖の範囲のラマンスpekトルとそれぞれの割り当てを示します。重ね表示は、すべての糖に、どのように相互を隔てる個別のpekトルがあるのかを示しています。スクロースpekトルで、 641.42 および 849.57 cm^{-1} の信号は、それぞれねじれ CH_2 および C-C 伸縮の結果です。マルトースの 850.96 cm^{-1} における信号は CH 変角振動に関連しています。トレハロースでは、 841.25 cm^{-1} (C-O-C 変角)、 910.63 cm^{-1} (C-O 伸縮)、 $1,121.57\text{ cm}^{-1}$ (C-C 伸縮)、 $1,454.82\text{ cm}^{-1}$ (CH_2 縦揺れ振動および C-C 伸縮) にバンドが現れています。マンニトールおよびソルビトールで、同位相 C-C-O 伸縮 (878 cm^{-1}) と位相外 C-C-O 伸縮 ($1,050\text{ cm}^{-1}$) は、それぞれ 878 と $1,050\text{ cm}^{-1}$ で確認されました。

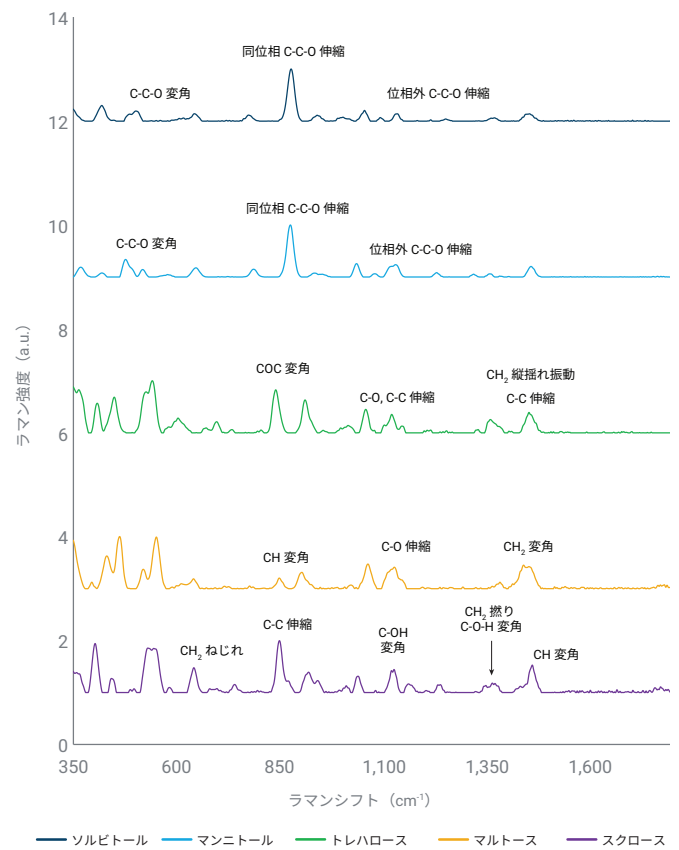


図 5. 白色ポリエチレン HDPE 越しの耐凍剤の Agilent Vaya ラマンスpekトル

結論

このアプリケーションノートでは、ハンドヘルド Agilent Vaya ラマンシステムを使用して、mRNA LNP 製剤で使用される脂質および非脂質賦形剤を分析し、同定できることが実証されました。本書で使用されている手法により、さまざまな容器（透明および褐色ガラス瓶、ポリエチレン）に入った原料を直接的に測定できました。Vaya により、バイオ医薬品の原料同定検査が効率化され、倉庫の隔離エリアで直接実行することが可能です。Vaya を使用することで、サンプリングやサンプリング室が不要になり、一次または二次容器を開ける必要がなくなります。

参考文献

1. Bulbake, U.; Doppalapudi, S.; Kommineni, N.; Khan, W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* **2017**, *9*(2), 12. DOI: 10.3390/pharmaceutics9020012
2. Challener, C. Excipients Impact Stability in mRNA-LNP Formulations. *Pharmaceutical Technology* **2023**, *47*(3), 20–22, 32. Excipients Impact Stability in mRNA-LNP Formulations (pharmtech.com)
3. Prullière, F.; Presly, O. Identifying Raw Materials Inside Containers Using a Handheld Raman Spectrometer, *Agilent Technologies white paper*, publication number 5994-2091EN, **2020**.
4. Czamara, K.; Majzner, M. Z.; Pacia, K.; Kochan, A.; Baranska, M. Raman Spectroscopy of Lipids: A Review. *J. Raman Spectrosc.* **2015**, *46*(1), 4–20. DOI: 10.1002/jrs.4607

【お問い合わせ先】

Agilent ラマン製品に関する販売およびサポートは、
ジャパンマシナリー株式会社に委託しております。
お問い合わせはジャパンマシナリー株式会社までお願いいたします。

ジャパンマシナリー株式会社

電話番号：

03-3730-4891

お問い合わせフォーム：

<https://www.japanmachinery.com/contact/>

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。

DE62815832

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, January 19, 2024

5994-7068JAJP