

# StunnerのUV/VisとDLSでLNPの大きさとRNA量を迅速に測定

## はじめに

動的光散乱法（DLS）による粒子径の測定は、脂質ナノ粒子（LNP）の主要な分析技術の一つですが、多くのDLS測定器では一度に1つのサンプル測定に留まり、サイズに関する回答しか得られません。これでは、生命を救う可能性のある遺伝子治療やmRNAワクチンの開発のスピードアップに十分貢献しているとは言えません。

RNA-LNP中のRNA濃度を測定するために使用される色素ベースの蛍光アッセイはいくつかありますが、すべての人に好まれるツールではありません。LNPを不安定化させるために使用される界面活性剤は、蛍光を妨害する可能性があり、アッセイはダイナミックレンジが限られており、また色素は非常に高価になります。UV/Vis吸光度は、精製サンプルのRNA定量のために古くから存在しており、LNPサンプルの濁りが原因で、ほとんどのUV/Vis分光光度計では正確な測定値を得ることができませんでした。

Stunnerは、ハイスループットDLSと短い光路長のUV/Visを組み合わせて、濁度の高いRNA-LNPサンプルでもサイズとトータルRNAを定量化することができます。

Stunnerは、わずか2  $\mu$ Lを使用して約1分間でRNA-LNPのサイズ、サイズ分布、トータルRNA濃度、濁度を完全に読み取ることができる初めてのプラットフォームです（図1）。Stunnerは、LNPの最大96サンプルのUV/VisとDLSの両方を、わずか1時間で読み取ることができます。さらに高いスループットが必要な場合は、StunnerはマイクロボリュームのSBSフォーマットプレートで自動化に対応できます。また、規制環境では、Stunnerは21 CFR Part 11ツールを使用してスプアアップすることができ、UV/Visの性能は米国および欧州薬局方のコンプライアンスを検証することができます。

Stunnerは、RNA-LNPの評価をより迅速かつ容易にし、より多くのRNAコンストラクト、脂質混合物または製剤のチェックを可能にします。色素ベースの方法の前にStunnerを確認することで、トータルRNAを探すステップを省くことができ、希釈因子を選択する際の推測作業を省くことができます。差し迫った緊急の質問に対しては、サイズや濁度を素早くチェックすることで、結果を妨害しているであろうサンプルの



図1：Stunner：核酸の定量化と粒子径測定の唯一の組み合わせ。

劣化を発見することができます。Stunnerを使用してRNAまたはLNP粒子濃度と粒子径を判定することで、より速く、より正確で、より詳細なサンプルの画像を得ることができ、次の実験のための時間を確保することができます。

このアプリケーションメモでは、StunnerがRNA含有脂質ナノ粒子（LNP）のトータルRNA濃度、粒子サイズ、サイズ分布、濁度を判定する方法を説明しています。

## 方法

Fluc-mRNA-LNPおよび空のLNPストック溶液は、RiboGreen®アッセイによる粒子濃度およびRNA濃度とともに、業界の共同研究者から提供されました。1 LNPをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、pH7.4に希釈し、StunnerのRNA-LNPアプリを用いて測定しました。RNA濃度は、260 nmでのRNAによるサンプルのデコンボリューションされた吸光度に基づき、濃度係数40で決定しました。すべてのStunnerによる測定は、6回のレプリケートおよび2  $\mu$ Lのサンプルを用いて実施しました。DLSの計算には、PBSの20°Cでの粘度1.002、屈折率1.334を使用しました。

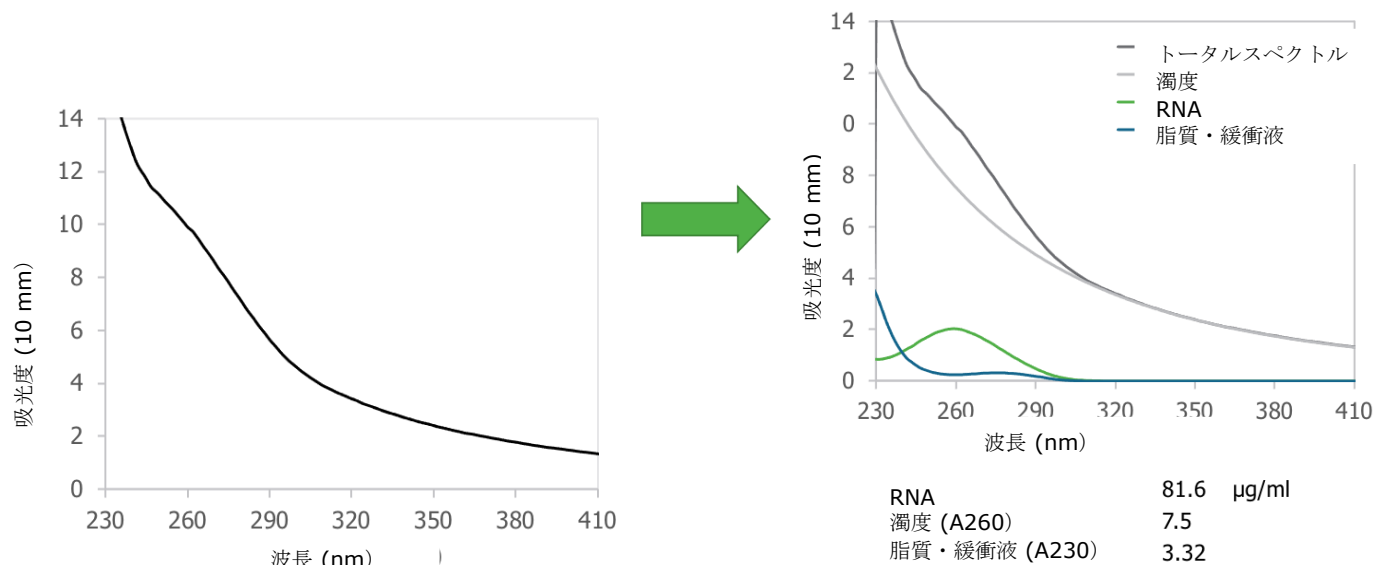


図2：Stunnerは、RNA-LNPsの全UV/Vis吸光スペクトルから濁度、RNAおよびその他の成分の寄与を分離し、その情報を使用してサンプル2μLからのトータルRNA濃度を定量化します。

## 結果

LNPは、紫外および可視域全体にわたる光散乱によって支配されたUV/Vis吸光スペクトルを有するため、ほとんどのUV/Vis分光光度計では、これらの複雑なサンプルからRNAの濃度を決定することが困難または不可能になります。これは、目視では高レベルの濁りまたは曇りとして確認できます。StunnerはUnmixアルゴリズムを使用してRNA-LNPsの吸光スペクトルをデコンボリュートし、この全体的な信号に対する濁度、

RNA、およびその他の成分の個々の寄与を決定します（図2）。スペクトルがデコンボリュートされると、Stunnerはサンプル中のトータルRNA濃度を定量化し、全体の吸光スペクトルに対する濁りやその他の成分の寄与をレポートします。

LNPsのための色素ベースのRNA定量法では、蛍光結果に影響を与える界面活性剤の添加や、サンプルの希釈が必要となり、誤差が生じる可能性があります。

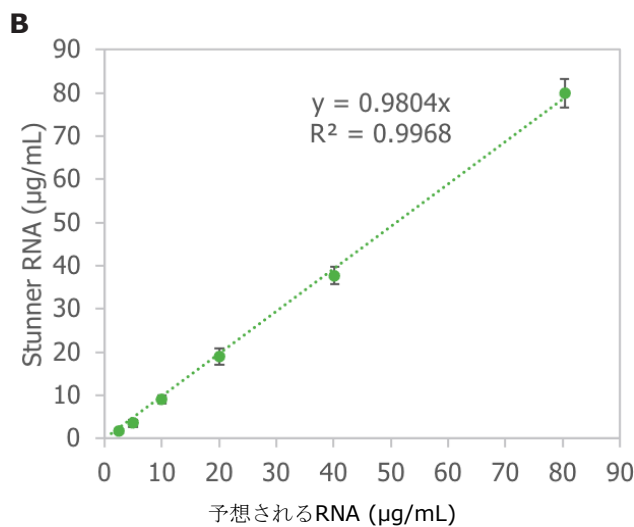
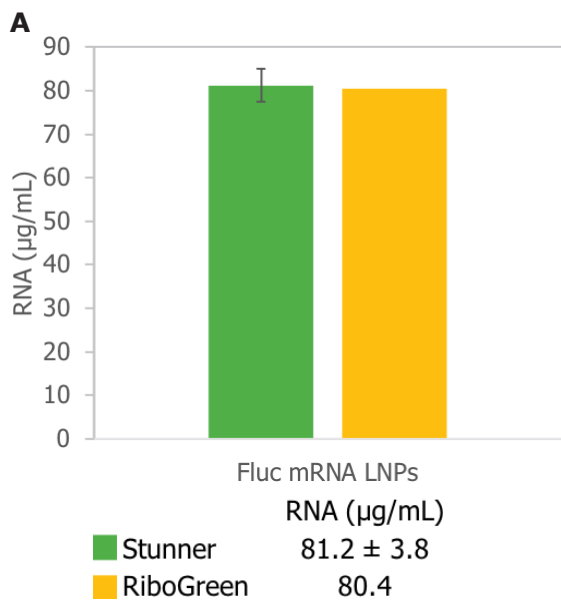


図3：StunnerのRNA濃度は、RiboGreen®によって決定されたトータルmRNA濃度と厳密に一致しています（A）。Fluc-mRNA-LNPの2倍希釈系列は、1.2 μg/mLまで非常に直線的な結果を示しました（B）。エラーバーは±1の標準偏差（SD）。

Stunnerは希釈や試薬不要の定量法で、トータルRNA濃度についてはRiboGreen®アッセイと比較して良好な結果が得られました(図3A)。低濃度のサンプルを測定する場合、Stunnerは幅広い範囲のRNA-LNP濃度を高精度で定量化します。

Fluc-mRNA-LNPの2倍希釈系列は、高い直線性を示し、 $R^2 > 0.99$ と予想されるRNA濃度と一致し、1に近い傾きを示しました(図3B)。

DLSを用いた粒子径の検証は、脂質ナノ粒子、特に製剤化と安定性の研究のための重要な分析技術です。他のDLS測定器では、大量のサンプルを必要としたり、一度に1つのサンプルしか測定できないため、大量の製剤やLNPをスクリーニングすることが困難です。Stunnerは、最大96サンプルのDLS測定を1時間以内に行い、結果を概要として表示するため、平均サイズおよびサイズ分布を眼で見て素早く比較することができます(図4)。また、数値結果をExcelにエクスポートして分析したり、PDFレポートとして保存することで、複雑な実験のワークフローやデータ管理を簡素化することができます。



図4: StunnerのDLSは、約1時間で96サンプルのLNPサイズおよびサイズ分布を決定します。

Fluc-mRNA-LNPは、6つのレプリケーションに基づいて、平均流体力学的直径が79nm、多分散性指数(PDI)が0.14、SDが0.02で、CVが1%でした(図5)。単分散LNPサンプルでは $PDI \leq 0.1$ を有し、高度に多分散したサンプルでは $PDI \geq 0.2$ を有する傾向があります。中間的なPDIと単一強度分布のピークは、このLNPが中程度の粒径の不均一性を有していることを示しています。Stunnerは一貫したDLS測定の結果を提供するため、LNPの品質を自信を持って評価することができます。

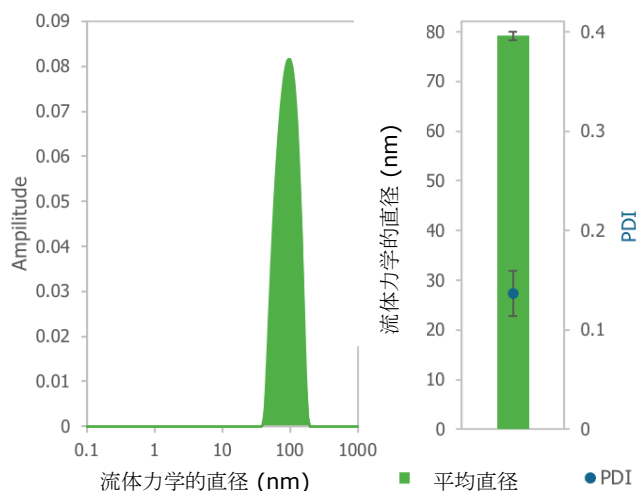


図5: これらのFluc-mRNA-LNPは、 $79 \text{ nm} \pm 1\%$ の流体力学的直径と $0.14 \pm 0.02$ のPDIを有していました。

粒子濃度は、LNPsの評価においてもう1つの重要な属性です。LNPsのUV/Vis吸光スペクトルのデコンボリューションの一部として、Stunnerは、濁度によるサンプルのODを決定し、濁度(A260)として提示します。コロイド系の濁度は、懸濁液中の粒子のサイズと数の両方により決定され、空のLNPと完全なLNPの予想される粒子濃度に直線的に相関します(図6)。基準が十分に設定されていれば、LNP懸濁液中の粒子濃度を判定する方法として、Stunnerの濁度判定を利用することも可能かもしれません。

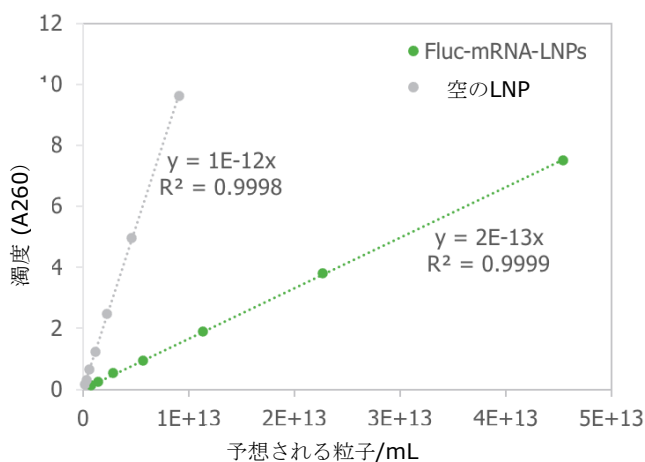


図6: 濁度はLNPの予想される粒子濃度とよく相関していますが、その傾きは核酸の存在を含むLNPのサイズや組成によって変化します。

## 結論

その都度DLS分析を行うと、重要なRNA-LNP実験が遅くなってしまう、ナノ粒子が凝集したのか分解したのかが分かりにくくなります。このような状況は、生命を救う遺伝子治療やRNAワクチンの進歩を遅らせてしまいます。

Stunnerは、一度に最大96サンプルまでのDLSを少量、高スループットで提供し、1時間で平均サイズとサイズ分布を得ることができます。Stunnerは、再現性の高いDLS結果に加えて、試薬不要のトータルRNAの定量化により、色素、界面活性剤、標準物質の必要性を軽減します。濁度の結果は、標準物質と組み合わせることで粒子の濃度を知ることができます。RNA-LNPが研究、開発、製造のいずれであっても、Stunnerは必要なデータを迅速に提供し、サンプルの複雑さを解明するのに役立ちます。

## 参考文献

1. RiboGreen assay protocol, C. Walsh, et al. *Precision NanoSystems User Guide* PNI-SOP-S9-001-EXT、2016年
2. Manufacturing considerations for the development of lipid nanoparticles using microfluidics, C. Roces, et al., *Pharmaceutics*, 2020年、12(11):1-19。
3. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids, L. Ribeiro, et al., *Scientific Reports*, 2018年、8(1):1-8。



### Unchained Labs

6870 Koll Center Parkway  
Pleasanton, CA 94566  
電話番号 : 1.925.587.9800  
フリーダイヤル : 1.800.815.6384  
メール :  
info@unchainedlabs.com

© 2021 Unchained Labs. 不許複製・禁無断転載 Unchained Labsのロゴ、Stunner the StunnerロゴはUnchained Labsの商標および/または登録商標です。記載されている他のすべてのブランドまたは製品名は、それぞれの組織が所有する商標です。