

WP2612: FFF-MALS を用いた RNA デリバリー用脂質ナノ粒子 (LNP) の特性評価における規制要求への対応

Fanny Caputo, Ph.D., SINTEF Industry and Christian Sieg, Ph.D., Wyatt Technology Europe

日本語訳及び編集：昭光サイエンス株式会社

概要

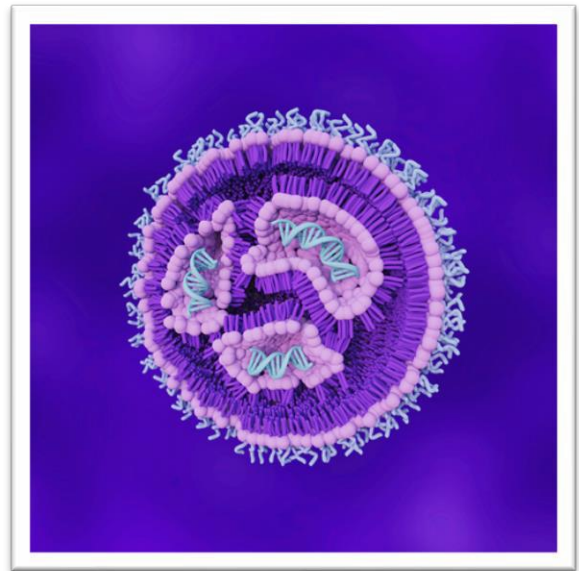
多角度光散乱検出器と組み合わせたフィールドフローフラクシオネーション (FFF-MALS) は、ナノ材料 (サイズ $<1\mu\text{m}$) の高度な特性評価に対する強力な分析アプローチです。サイズ排除クロマトグラフィーとは異なり、分画プロセス中に固定相を必要とせず、最適な分離範囲を測定パラメータに合わせて微調整することができます。この柔軟性により、ナノ医薬品、モノクローナル抗体、ワクチンなどの複雑な医薬品の信頼性の高い測定が可能になります。ただし、品質管理の目的で、FFF-MALS プロトコルは規制当局の要求と認められている基準を満たす必要があります。ここでは、siRNA と mRNA をカプセル化する脂質ベースのナノ粒子 (LNP) の分析のための技術仕様 ISO/TS21362 に沿った検証済みの FFF-MALS メソッドについて説明します。

ドラッグデリバリーのための LNP の分析特性評価

核酸デリバリー用の LNP、特に短干渉性 RNA (siRNA) やメッセンジャー RNA (mRNA) は、近年、非常に注目されており、医療分野に革命を起こすと期待されています。2020 年末には、LNP に封入された mRNA 技術に基づく COVID-19 パンデミックに対する 2 つのワクチン (BioNTech/Pfizer の tozinam-eran と Moderna の mRNA-1273) が米国と欧州の規制当局から承認されるというマイルストーンが達成されました。COVID-19 ワクチン以外にも、免疫調整剤、タンパク質代替療法、再生医療、遺伝子編集複合体など、幅広い用途で核酸ベースの治療法が開発中です。LNP のようなナノキャリアは、医薬品有効成分を保護し、生体利用率を向上させ、新規治療法

の安全性と有効性を改善することができます (1)。

核酸をデリバリーするために脂質ナノキャリアを使用すると、製剤が複雑になり、その結果、安定で安全な医薬品を確認するために高度な分析が必要になります。リボソームの特性評価を含むナノ材料の医薬品のガイドラインによると、以下のパラメータが重要品質特性 (CQA) として考えられます。粒子濃度、粒子の平均粒径と多分散性、核酸負荷レベル、化学的安定性、物理的安定性 (凝集傾向) です。明らかに、規制要件に準拠した CQA 測定のための堅牢な分析法の進歩は、開発および品質管理の合理化のために不可欠です。



フィールドフローフラクシオネーション (FFF) は、異なるサイズ、正確には異なる流体力学的体積を持つ成分を物理的に分離します。図 1 に示すように、まず分離されていないサンプルが分離チャンネルに注入されます。従来型のチャンネルでは、サンプルはチャンネルの長さの約 10% の位置の膜の近くで "フォーカシング" ステップを経てリラックスさせられます。オプションとして、「流体力学的緩和」原理を利用し、フォーカシングステップを必要としない「分散インレット」(「フ

リットインレット」としても知られています) チャンネルもあります。このチャンネルは、フォーカシングステップを必要としないため、局所的な濃縮による好ましくない影響を軽減することができます。放物線状のチャンネル内の流れは、サンプルを流出口へと運びます。小さな粒子は拡散係数が高いので、底部膜から遠く離れ、より高い流速にさらされることとなります。したがって、サイズ排除クロマトグラフィーとは逆に、小さな粒子が最初に溶出し、後でより大きな粒子が溶出します。

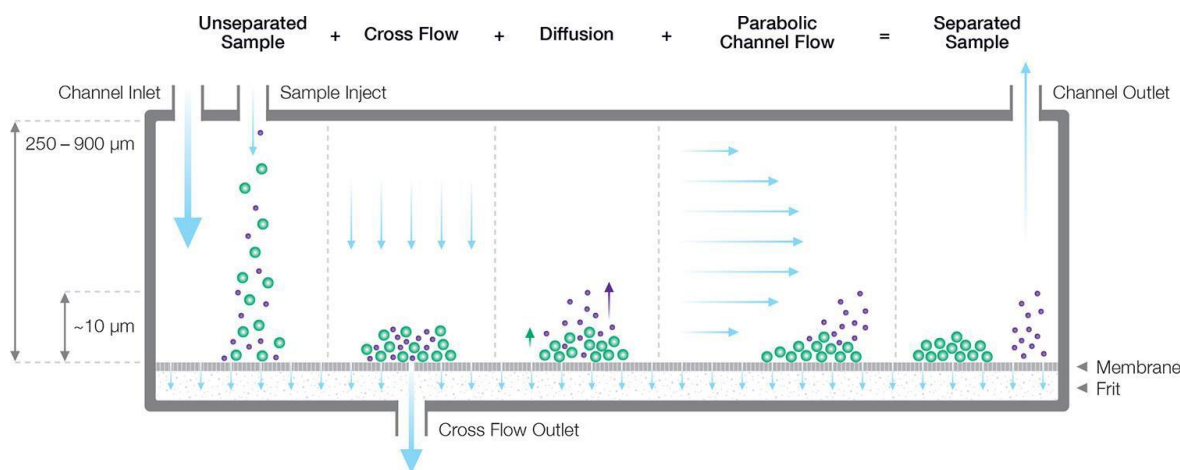


図 1. FFF の分離原理イメージ。固定相を用いずにサイズの異なる成分を分離します。

粒子の保持時間 t_r は、流体力学的半径 (R_h) および調整可能なクロスフロー/チャンネルフロー流量比に正比例します。UV、多角度光散乱 (MALS)、オンライン動的光散乱 (DLS)、示差屈折率 (dRI) 検出器などのマルチ検出器分析により、1 度の測定でいくつかの重要なサンプルパラメータが解明されます。これは最近、リポソーム薬物製剤を含む医薬品で実証されました(2)(3)。Mildner らによる 2021 年の発表 (4) に基づき、ここでは RNA を内包した脂質ナノ粒子 (RNA-LNP) の特性評価のための堅牢な FFF-MALS 法の確立を概説します。FFF-MALS で測定できる主要なパラメータは、平均粒子径、多分散度、分子形態、物理的安定性および粒子濃度です。規制当局要件を満たすために、医薬品の特性評価に使用される分析法の反復性、再現性、頑健性は、整合ガイドラインである ICHQ2R1 に従って対処する必要があります。ICHQ2R1 が主に古典的なクロマトグラフィー法を扱い、FFF-MALS のような粒子径測定の要件を規定していないとしても、ISO/TS 21362 は、以下の基準を満たすことができれば、FFF-MALS 法のバリデーションに適した参考文献として使用することが

できます。:

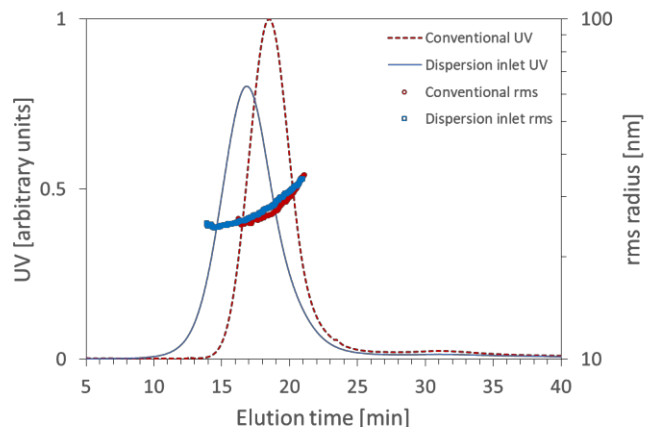
1. 分析対象物の回収率 70%以上 (粒子濃度などの分離性能では回収率 90%以上が要求される)。
2. 保持時間、回収率、粒子径の値について、相対的な標準不確かさが 5%以内。

この記事では、チャンネルの種類を含む FFF メソッド開発について説明し、規制の必要性に応じた siRNA-LNP および mRNA-LNP の特性評価における FFF-MALS のパワーと多様性を実証しています。

測定品質の重要な指標となる高い回収率

サンプル回収率 (R%) は、メソッドの初期最適化で考慮すべき重要なパラメータです。これは、クロスフローとフォーカシングステップを使用した場合と、使用しない場合の結果を比較し、UV のメインピークを積分することによって決定されます。メソッド開発では、標準 FFF ロングチャンネルを用いた従来のセットアップと、サンプルを移動相の流れに直接注入する分散インレットチャンネルを用いた同様のメソッドを比較しました。後者の場合、フォ

一カシングの必要がないため、試料が不安定になるリスクが低く、LNPのようなデリケートな試料の回収率が向上します。図2は、同じ siRNA-LNP 製剤を2つのチャンネルで測定した結果を示しています。両チャンネルとも、サンプルは溶出され、粒子径に応じて分画されます。両チャンネルとも R%の品質基準を満たす構成ですが、LNPの高度な特性評価には、高い回収率と繊細なサンプルに対する利点から、分散インレット方式が使用されました。



	R%	rms radius R_g (nm)	spread (nm)
Conventional long channel	91 ± 1	27 ± 0.5	11 ± 2
Dispersion inlet channel	99 ± 1	26 ± 1	6.5 ± 0.5

図2. 標準チャンネルと分散インレットチャンネルを用いた siRNA 製剤の分離・回収率の比較。上：標準ロングチャンネルと分散チャンネルの UV フラクトグラムに rms 半径分布を重ねたもの。主成分の半径は 26~27nm です。下：回収率 (R%)、サイズ (R_g)、3 回の測定で平均化された spread 値 (spread = (R_g 最大値 - R_g 最小値)、ただしピークの半値幅の範囲で R_g を計算)。

最適化された分散液注入法による粒子径、形態、および粒子濃度の決定

MALS および DLS 検出器をオンラインで使用し、最適化された分画法を使用することで、以下のようにいくつかの LNP の主要な特性を決定することができます。(i) 平均粒子径と多分散性、(ii) 粒子形態、(iii) 粒子濃度などです。コンセプトの実証として、様々な mRNA ペイロードを持つ 3 つの製剤を測定し、試料の粒子径、多分散度、粒子形態を決定しました：空の粒子、低 RNA 含量の粒子 [N/P = 8]、高 RNA 含量の粒子 [N/P = 3]。粒子径と多分散度は mRNA 含量が低いほど大きく、空の粒子ではさらに顕著であり、単分散製剤を得るためには最小量の mRNA が必要であることが示されました。

実際には、mRNA がイオン化可能な脂質と粒子を構成する他の成分とを複合化して LNP が形成されるため、十分な RNA が存在しないと、LNP は構成されないことが知られています。

粒子径と多分散度の違いは、粒子のペイロードの違いに関連するため、形態 (形状、コア密度) の違い、すなわち形状因子 ρ がもう一つの重要なパラメータになります。この値は、FFF-MALS 測定で求めることができます。形状因子 ρ は $R_g : R_h$ と定義され、流体力学的半径に対する回転半径の比です。DLS 検出器を組み込んだ MALS は、 R_g と R_h の両方を同時に決定します。中空球の場合、 ρ は 1 です。しかし、密度の高いコアを持つ球体では、散乱中心が質量中心に近く分布し、 ρ は 0.77 以下になると予想されます。

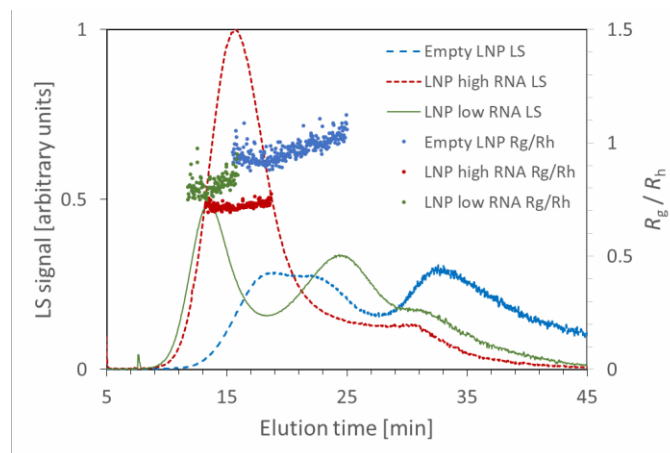


図3. mRNA の含有量が異なる mRNA-LNP サンプルと空の LNP 粒子の比較。MALS 角 90° における LS フラクトグラムを、回転半径と流体力学的半径の比 ρ と重ね合わせて示しています。この比は、RNA の充填率を追跡します。

図3は、RNA 量の異なる mRNA-LNP サンプルと、空の LNP サンプルの ρ vs リテンションタイムを示したものです。興味深いことに、空の粒子の ρ の値は約 1 であり、中空または不規則な球体に典型的な値ですが、mRNA 含有量の増加により比率が減少しています。比較的単分散で mRNA 含量の高い粒子の ρ 値は、高密度の球状粒子の ρ と一致します。空の LNP と mRNA 含有量が少ない LNP は凝集体の割合が多く、安定性が低いことが確認できます。従ってこの結果から、粒子形態、粒度分布が、LNP 製剤の物理的安定性と相関関係があることが判ります。

Mildner ら(4)が示したように、MALS で得られたデータは、粒子形状、構造、粒子と溶媒の屈折率の情報と組み合わせて、粒子濃度を決定するため、数ベースの粒度分布 (PSD) を導き出すために使用することができます。概念実証として、FFF-MALS で得られた PSD をナノ粒子追跡分析 (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) で測定したものと比較したところ、2つの技術は異なるサイズ測定方法を使っているにもかかわらず、ほぼ同等の結果を示しました (図4)。FFF-MALS は、NTA では検出できない半径 30nm 以下の LNP 粒子を検出・定量することができます。

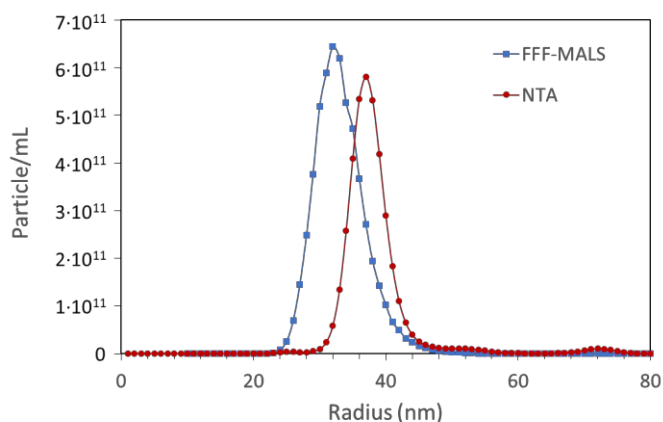
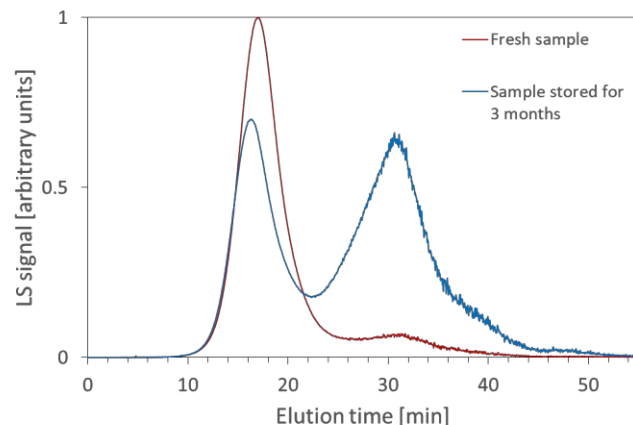


図 4. siRNA を内包した LNP の製剤について、数による粒度分布 (上) と FFF-MALS および NTA によって得られた全粒子濃度値 (下)。NTA は流体力学的半径 R_h を決定し、MALS は質量加重有効球形半径を決定します。

LNP の安定性評価

RNA-LNPs にとって重要なパラメータは、その安定性です。FFF-MALS は、サイズ、形態、濃度を高分解能で測定できるため、粒子の物理的安定性や凝集傾向を評価するのに適した方法の 1 つです。ここでは、siRNA を保持した調製したばかりの LNP サンプルと、3ヶ月前に調製し 4°C で保存した同様のサンプルとを比較しました。調製したばかりのサンプルでは、1つの目に主要な粒子種 (ピーク 1: $R_t = 17$ min) と 2つ目に少数の大きな粒子種 (ピーク 2: $R_t = 31$ min) が溶出されました。3ヶ月前保管後の試料では、主粒子種のサイズがわずかに減少し、より大きな粒子および/または凝集にのピーク強度は著しく

高くなりました (図 5)。サンプルの多分散性の大幅な増加に伴う粒度分布の変化は、オストワルド熟成と呼ばれ、脂質や粒子成分の小さい粒子から大きい粒子への移動によって引き起こされるものです。合成直後の試料の多分散度が高いほど、オストワルド熟成が早く進み、粒子が大きく不安定になることに対応します。このように、FFF-MALS は LNP 製剤のサイズ、多分散性、濃度の経時変化を研究するのに有効であることが明らかになりました。



	Peak 1 rms radius (nm)	Peak 1 total particle concentration (mL^{-1})	Peak 2 total particle concentration (mL^{-1})
Fresh Sample	26.4	5.55×10^{12}	2.24×10^9
Stored Sample	24.7	5.85×10^{12}	2.01×10^{10}

図 5. 調製したばかりのサンプル (赤) と 3ヶ月間保存したサンプル (青) の凝集体含有量。上: 散乱角 90° の光散乱フラクトグラム。ピーク 1 は 17 分付近、ピーク 2 は 31 分付近のピークです。凝集体のピーク (ピーク 2) の相対的な大きさは、保存したサンプルで著しく大きくなっています。下: 全粒子濃度。ピーク 2 の、保存したサンプルの粒子数は、調整したばかりのサンプルの 10 倍以上検出されています。

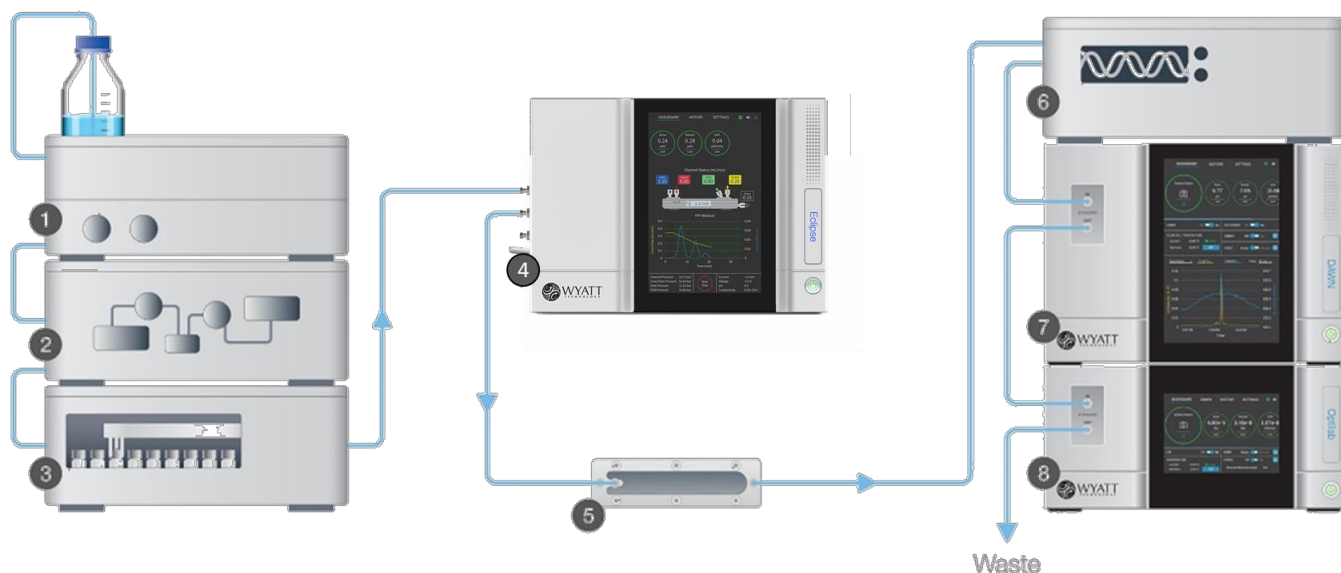
まとめ

FFF-MALS をナノ医療分野の標準的な QC 手順に移行させる上で、徹底したメソッド開発とバリデーションが重要です。ここでは、ISO/TS 21362 の技術仕様に従ったメソッド開発を実証し、RNA-LNP の結果を示しました。私達は、製薬業界が薬剤開発中および品質管理目的で核酸ベースのナノ治療薬の特性を評価するために使用できる堅牢な FFF-MALS アプローチを提示しました。最も重要なことは、FFF-MALS は mRNA または siRNA をカプセル化した LNP ナノ粒子の粒度分布、粒子形態、粒子濃度、さらに物理的安定性および凝集傾向など、複数の CQA を測定できることです。

実験手法

実験手順については、文献(3)に詳しく記載されています。手短かに述べると、サンプルは、1260 Infinity II シリーズ (Agilent Technologies) のアイソクラティックポンプ、デガッサー、オートサンプラー、UV 検出器を備えた Eclipse FFF 装置 (Wyatt Technology) を使用して分析されました。サンプル分離は、Eclipse 従来型ロングチャンネルおよび分散インレットチャンネルで実施しました。UV 吸収は波長 260nm で測定し、サンプル回収率は、各サンプルのメイン UV ピーク面積を、クロスフローとフォーカシングステップを適用した場合と適用しない場合で積分し、その面積の比率を取ることによって算出しました。

検出は、WyattQELS DLS モジュール (Wyatt Technology 社) を組み込んだ DAWN® MALS 装置によって行われました。データは ASTRA®ソフトウェア (Wyatt Technology 社) で収集・分析され、粒子径と濃度が決定されました。さらにデータ処理により、2 nm のビンサイズについて粒子径分布を粒子数/mL/nm で算出しました(4)。



引用文献

1. Gómez-Aguado, I. et al. Nanomedicines to Deliver mRNA: State of the Art and Future Perspectives. *J. Nanomat.* 10,364 (2020).
2. Parot, J. et al. Physical characterization of liposomal drug formulations using multi-detector asymmetrical-flow field flow fractionation. *J. Control. Release* 320, 495-510 (2020).
3. Caputo, F. et al. Asymmetric-flow field-flow fractionation for measuring particle size, drug loading and (in)stability of nanopharmaceuticals. The joint view of European Union Nanomedicine Characterization Laboratory and National Cancer Institute- Nanotechnology Characterization Laboratory. *J. Chromatogr. A* 1635, 461767 (2021).
4. Mildner, R. et al. Improved multidetector-asymmetrical flow field flow fractionation method for particle sizing and concentration measurements of lipid-based nanocarriers for RNA delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 163, 252-265 (2021).



© Wyatt Technology Corporation. 本書の無断転載を禁じます。本書のいかなる部分も、Wyatt Technology Corporation の書面による事前の許可なく、電子的、機械的、複写、記録、その他のいかなる手段によっても、複製、検索システムへの保存、または送信することを禁じます。

本書には、Wyatt Technology Corporation の商標またはサービスマークが 1 つ以上表示されている場合があります。Wyatt Technology Corporation の商標およびサービスマークの一覧は、<https://www.wyatt.com/about/trademarks> を参照してください。