

使用Andrew+™移液机器人自动制备负载寡核苷酸的脂质纳米颗粒用于高通量体外筛选

Isabell Kroth, Michael Karimov, Ryan Karongo

BAYER AG



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

LNP制剂技术通常耗时且成本高昂，由于需要使用微流控设备，因此许多样品制备过程难以简化。以下研究为使用Andrew+移液机器人开发一种自动化的高通量方法。

优势

- 自动化制备LNP制剂，实现高通量筛选，可在2小时内制备多达96种制剂
- 在LNP表征参数方面，所得结果与手动移液和微流控方法相当
- 制备LNP时，自动移液操作具有良好的孔间重现性(n = 8)

简介

RNA类疗法进展显著，标志性的成就包括2018年获批的patisiran等开创性治疗药物，以及最近利用脂质纳米颗粒(LNP)制剂成功研发出的COVID-19疫苗¹⁻³。为了优化这些疗法的疗效，研究人员利用了阴离子RNA的静电络合作用，这种方法不仅能促进细胞摄取，还能保护RNA（即，避免了RNA被RNA酶降解）这些LNP通常由阳离子和可电离脂质与磷脂酰胆碱(PC)、胆固醇和聚乙二醇(PEG)脂质组合^{4,5}。颗粒形成过程依靠快速混合程序，精确控制流速对于产生均匀的颗粒至关重要。要提高mRNA递送效率，必须对制剂组分进行全面筛选，通常采用实验设计等方法⁶。借助96孔板的机器人自动化功能，高通量筛选已成为一种有效的方法，在材料消耗方面优于微流控方法⁷⁻⁹。接下来，我们基于Wang等人的移液混合方法，建立了一套自动化制备LNP制剂用于筛选的方案，并采用Andrew+液体处理平台，展示了与当前最先进方法相当的结果¹⁰。

实验

材料

编码绿色荧光蛋白的mRNA (CleanCap EGFP mRNA)购自TriLink Biotechnologies (美国圣地亚哥)。可电离脂质(D-Lin-MC3-DMA)和辅助脂质 (DSPC、胆固醇和DMG-PEG₂₀₀₀) 购自Avanti Polar Lipids (美国伯明翰)。所有脂质均溶于纯乙醇中 (D-Lin-MC3-DMA: 40 mg/mL, 辅助脂质: 各20 mg/mL)。将PBS片剂 (Merck KGaA, 德国达姆施塔特) 溶于无核酸酶的水中，制得磷酸盐缓冲液(PBS)。将27.6 mg二水合柠檬酸钠和174.1 mg柠檬酸溶解于100 mL无核酸酶水中，制得柠檬酸盐缓冲液 (10 mM, pH=3)。制剂中使用的所有化学品均为分析纯级别。

自动化液体处理步骤由配备10 μ L和300 μ L单道移液枪、1200 μ L 8道移液枪和Peltier+加热装置的Andrew+ (沃特世 - Andrew Alliance, 瑞士) 执行。该Domino设置还包括以下实验器皿的相应Domino: 1.5 mL Eppendorf Safe Lock管 (Eppendorf, 汉堡)、购自INTEGRA (Integra Biosciences AG, 瑞士) 的10 mL多通道储液瓶，以及用作目标实验器皿的twin.tec®96孔带裙边LoBi板 (Eppendorf, 汉堡) (图1)。

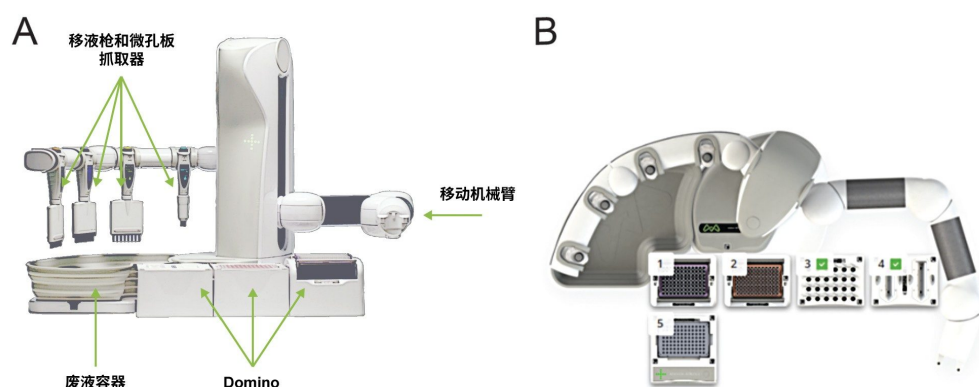


图1 A. Andrew+的正视图, B. 为LNP方案定位的Domino俯视图。

制备负载mRNA的LNP

微流控方法

在乙醇中将适量的脂质混合物（摩尔组成比为50:10:38.5:1.5）与含有mRNA的水相（10 mM柠檬酸缓冲液）使用微流控微混合器(NanoAssemblr® Ignite™)按照1:3的有机相:水相体积比混合，制得LNP。使用Amicon Ultra离心过滤器（Merck Millipore，截留分子量30 kDa）去除乙醇和柠檬酸盐缓冲液。

手动移液方法

该程序涉及使用96孔板制备LNP。首先，将脂质混合物中的每种成分（6.2 μL D-Lin-MC3-DMA、3.1 μL DSPC、5.8 μL 胆固醇、1.5 μL DMG-PEG）加入到一个孔中。在另一个孔中，制备柠檬酸盐缓冲液（58 μL ，10 mM，pH 4）与mRNA（2 μL ，1 mg/mL）的混合物，并充分混合。将获得的mRNA-缓冲稀释液(60 μL)快速移入脂质混合物-乙醇溶液中，水相与乙醇溶液的体积比率为3:1。持续20-30秒快速有力的移液操作对于确保LNP的正确形成至关重要；否则可能会导致LNP的多分散性以及包封率不足。在室温下孵育15分钟后，可以使用透析管（即，Pur-A-Lyzer Midi 3500）和1 \times PBS进行透析，以去除乙醇和酸性缓冲液（可选操作）。然后将溶液转移至无RNA酶的试管中，并使用1 \times PBS将体积调整至200 μL ，使mRNA的最终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。所得溶液可以在4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存数天以备使用。

自动移液方法

最终方案涉及12个LNP制备步骤（表1）。首先将孔板温度设置为20 $^{\circ}\text{C}$ 。脂质组分事先在Eppendorf管(#1)中预混合。另外，将柠檬酸盐缓冲液（48 μL \times 孔数量）转移至另一个Eppendorf管(#2)中，然后加入mRNA（2 μL \times

孔数量)。接下来,向每个孔中加入50 μL 稀释后的mRNA,随后用迅速移取16.6 μL 脂质混合物加入每个孔中,然后立即通过快速上下移液(六次)进行混合。然后将样品板孵育15分钟,然后停止加热。最后向每个孔中加入152 μL PBS,完成LNP的形成过程。

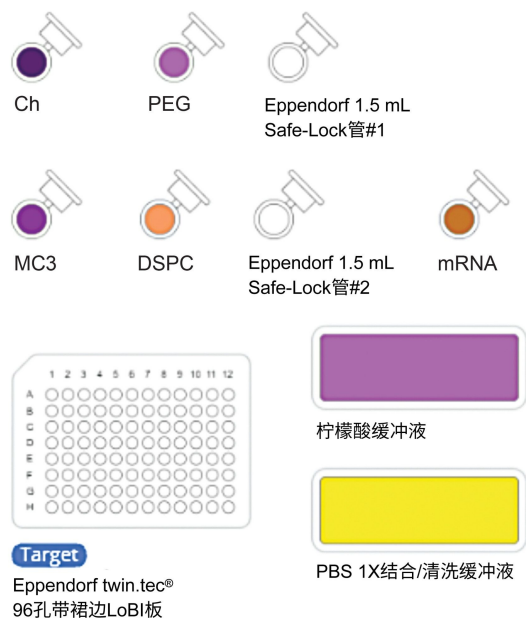


图2.方案开始时OneLab™工作台的截图。

步骤	设备	操作	体积 [μL]	来源	目标位置	其他操作
1	Peltier +	开始加热	-	-	-	20 °C
2	单道, 10~300 μL	移液	124	MC3	Eppendorf管1.5 mL #1	移液: 正向, 吹出 气垫: 气底垫
3	单道, 10~300 μL	移液	62	DSPC	Eppendorf管1.5 mL #1	枪头位置: 来源 - 根据液体, 目标位置 - 移动中
4	单道, 10~300 μL	移液	116	CH	Eppendorf管1.5 mL #1	枪头选择: 在开始时更换枪头, 在移液步骤之间更换枪头
5	单道, 10~300 μL	移液	30	PEG	Eppendorf管1.5 mL #1	混合: 3次, 正常, 30 μL
6	单道, 50~1200 μL	移液	960	柠檬酸缓冲液	Eppendorf管1.5 mL #2	气垫: 无气垫 枪头位置: 来源 - 根据液体, 目标位置 - 根据液体 混合: 无
7	单道, 10~300 μL	移液	40	mRNA	Eppendorf管1.5 mL #2	气垫: 气底垫 混合: 3次, 正常, 300 μL
8	单道, 10~300 μL	移液	50	1.5 mL管#2	96孔板, A:H1, A:H2	气垫: 无气垫 混合: 无
9	单道, 10~300 μL	移液	16.6	1.5 mL管#1	96孔板, A:H1, A:H2	气垫: 无气垫 混合: 6次, 快速, 60 μL
10	计时器	-	-	-	-	15分钟
11	Peltier +	停止加热	-	-	-	20 °C
12	8道, 10~300 μL	移液	133.4	1× PBS	96孔板, A:H1, A:H2	混合: 1次, 慢速, 133.4 μL

表1.方案的分步说明。

对于所有移液目标, 枪头都根据所有源中的液体定位, 而在目标位置则是根据液体定位或者在移动中定位。对于低粘度溶液, 即脂质和mRNA, 使用了气底垫。混合步骤如表1所示。每次分液后均执行了“吹出”(Blowout)处理。除有一次混合mRNA与脂质应用了快速混合以外, 方案中将抽吸和分配的速度均设置为正常速度。

LNP表征和高通量体外筛选

LNP表征

利用1× PBS中的动态光散射检测 (Zetasizer, Malvern Instrument) 测定纳米颗粒的流体动力学粒径和多分散性指数(PDI)。直径报告为最大强度平均峰值, 代表了样品中超过95%的纳米颗粒。为计算核酸包封效率, 根据制造商的说明使用Quant-iT RiboGreen RNA定量试剂盒(Invitrogen)。

体外转染效率

在37 °C和5% CO₂的条件下, 使用含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的高糖杜尔贝科改良伊格尔培养基 (含GlutaMAX补充剂, ThermoFisher) 对HepG2细胞 (美国典型培养物保藏中心, 美国) 进行培养。对于体外转染, 在转染前一天接种10,000细胞/孔到96孔板中。次日, 以100 ng mRNA/孔的最终颗粒浓度将颗粒移取到细胞中(

n = 8)。将手动制备的纳米颗粒用作阳性对照。孵育24小时后，使用流式细胞仪（MACSQuant Analyzer 16; Miltenyi Biotec, 德国）定量eGFP的荧光强度。

结果与讨论

自动制备负载mRNA的LNP

本研究的主要目标是，在Wang等人提出的移液枪混合方法的基础上，开发一种使用Andrew+移液机器人的自动化高通量方法¹⁰。方法和LNP组成经过修改，以适配Andrew+移液机器人，并适用于筛选各种LNP制剂。

最初，我们进行了初步实验，实现了手动移液程序的自动化。然而，含脂质的乙醇溶液会迅速蒸发，不利于精确的方案转换。接下来，我们通过重量分析评估了乙醇的蒸发速率，结果表明，乙醇蒸发速率对室温有显著的依赖性，而这反过来限制了体积损失的计算和校正。随后我们修改了移液顺序。与其在每个孔中单独制备的脂质混合物中引入稀释后的mRNA，不如提前在Eppendorf管中预先制备脂质混合物，尽量减少蒸发的总液体表面积。然后将这种预先制备的脂质混合物引入含有稀释mRNA的每个孔中。此外，96孔板在整个过程中保持在20 °C，以确保达到制剂所需的理想温度。将整个方案中的机械臂运动速度设置为快速，以减少整个方案的持续时间并尽量减少溶剂蒸发。

LNP表征和高通量体外筛选

为了进行比较，我们使用手动移液方法或微流控技术手动制备新鲜D-Lin-MC3-DMA颗粒。制备包含mRNA编码绿色荧光蛋白(GFP)的制剂后，首先表征了粒径、多分散性指数(PDI)和包封效率。观察到Andrew+制备的颗粒的平均粒径（约200 nm）略大于手动制备的制剂（约160~180 nm）。与手动混合方法相比，相对较慢混合速率可能产生较大的颗粒。然而，观察到两种方法都观察到较低的PDI（低于0.2），表明粒径范围一致，与制备方法无关。更重要的是，无论采用哪种制备方法，两种方法都显示出较高的mRNA包封效率（高于97%）（表2）。

	微流控	手动移液	自动移液(Andrew+)
大小[nm]	90 +/- 2.3	176.1 +/- 1.5	207.08 +/- 18.88
PDI	0.08 +/- 0.01	0.11 +/- 0.01	0.17 +/- 0.04
mRNA包封效率[%]	>97	>97	>97

表2.LNP表征及不同制备方法的比较。

为评估两种方法的转染效率，以100 ng/孔的最终浓度转染HepG2细胞。两种制剂均展现出优异的生物相容性，并在转染后24小时表现出较高的转染效率（图3）。最后，我们还注意到，使用Andrew+的高通量移液方法表现出足够高的孔间重现性(n = 8)，表明所研究的表征参数具有较高的精密度。这些结果表明，Andrew+颗粒的制剂非常适合多个样品的制备，因此可用于各种LNP的高通量筛选。

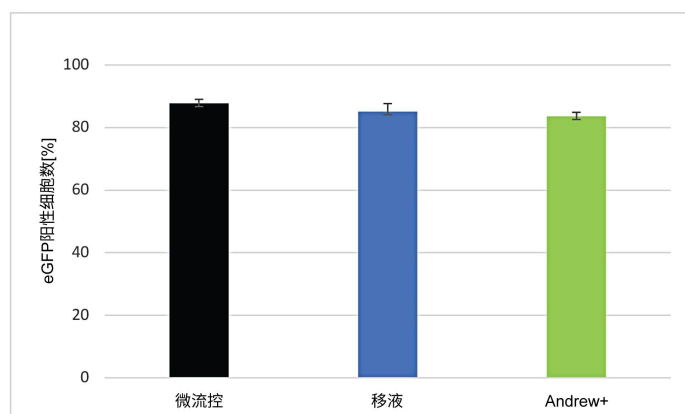


图3. 使用不同方法制备的LNP对HepG2细胞的转染效率比较。

结论

本研究从手动制备程序出发，使用Andrew+移液机器人开发了一种自动化的LNP制剂方法，能够实现各种脂质纳米颗粒制剂的高通量筛选。通过在Eppendorf管中预先制备脂质混合物并保持恒定温度，克服了最初的障碍（包括含脂质乙醇溶液的快速蒸发，以及蒸发速率对室温的依赖性），从而显著提高了该方案的精密度。虽然我们观

观察到与微流控技术和手动移液制剂相比粒径略有增加，但所有方法中粒径的一致性和高mRNA包封效率均保持一致。此外，HepG2细胞转染效率与手动移液方法和微流控技术LNP制备方法相当。本研究从本质上证明了使用Andrew+简化LNP制剂的可行性，从而推动了mRNA疗法的发展。

参考资料

1. J.H. Erasmus, A.P. Khandhar, J. Guderian, B. Granger, J. Archer, M. Archer, E. Gage, J. Fuerte-Stone, E. Larson, S. Lin, R. Kramer, R.N. Coler, C.B. Fox, D.T. Stinchcomb, S.G. Reed, N. Van Hoeven, A Nanostructured Lipid Carrier for Delivery of a Replicating Viral RNA Provides Single, Low-Dose Protection against Zika, *Molecular Therapy* 26(10) (2018) 2507–2522. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.010> <<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.010>> .
2. D. Adams, A. Gonzalez-Duarte, W.D. O' Riordan, C.-C. Yang, M. Ueda, A.V. Kristen, I. Tournev, H.H. Schmidt, T. Coelho, J.L. Berk, K.-P. Lin, G. Vita, S. Attarian, V. Planté-Bordeneuve, M.M. Mezei, J.M. Campistol, J. Buades, T.H. Brannagan, B.J. Kim, J. Oh, Y. Parman, Y. Sekijima, P.N. Hawkins, S.D. Solomon, M. Polydefkis, P.J. Dyck, P.J. Gandhi, S. Goyal, J. Chen, A.L. Strahs, S.V. Nochur, M.T. Sweetser, P.P. Garg, A.K. Vaishnav, J.A. Gollob, O.B. Suhr, Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis, *New England Journal of Medicine* 379(1) (2018) 11–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716153> <<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1716153>> .
3. K.S. Park, X. Sun, M.E. Aikins, J.J. Moon, Non-viral COVID-19 vaccine delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews* 169 (2021) 137–151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.008> <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X20302799?via%3Dihub>> .
4. A.K. Blakney, P.F. McKay, B.I. Yus, Y. Aldon, R.J. Shattock, Inside out: optimization of lipid nanoparticle formulations for exterior complexation and in vivo delivery of saRNA, *Gene Therapy* 26(9) (2019) 363–372. <https://doi.org/10.1038/s41434-019-0095-2> <<https://www.nature.com/articles/s41434-019-0095-2>> .
5. J.A. Kulkarni, S.B. Thomson, J. Zaifman, J. Leung, P.K. Wagner, A. Hill, Y.Y.C. Tam, P.R. Cullis, T.L. Petkau, B.R. Leavitt, Spontaneous, solvent-free entrapment of siRNA within lipid nanoparticles, *Nanoscale* 12(47) (2020) 23959–23966. <https://doi.org/10.1039/D0NR06816K> <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/NR/D0NR06816K>> .

6. Y. Fan, Z. Shi, S. Ma, S.Z.A. Razvi, Y. Fu, T. Chen, J. Gruenhagen, K. Zhang, Spectroscopy-Based Local Modeling Method for High-Throughput Quantification of Nucleic Acid Loading in Lipid Nanoparticles, *Analytical Chemistry* 94(25) (2022) 9081–9090. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01346> <
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.2c01346>> .
7. Y. Fan, C.-W. Yen, H.-C. Lin, W. Hou, A. Estevez, A. Sarode, A. Goyon, J. Bian, J. Lin, S.G. Koenig, D. Leung, K. Nagapudi, K. Zhang, Automated high-throughput preparation and characterization of oligonucleotide-loaded lipid nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics* 599 (2021) 120392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120392> <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517321001964?via%3Dihub>> .
8. V. Francisco, C. Rebelo, A.F. Rodrigues, J. Blersch, H. Fernandes, L. Ferreira, A high-throughput screening platform to identify nanocarriers for efficient delivery of RNA-based therapies, *Methods* 190 (2021) 13–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.12.002> <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202320302644?via%3Dihub>> .
9. D. Ulkoski, M.J. Munson, M.E. Jacobson, C.R. Palmer, C.S. Carson, A. Sabirsh, J.T. Wilson, V.R. Krishnamurthy, High-Throughput Automation of Endosomolytic Polymers for mRNA Delivery, *ACS Applied Bio Materials* 4(2) (2021) 1640–1654. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01463> <
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsabm.0c01463>> .
10. X. Wang, S. Liu, Y. Sun, X. Yu, S.M. Lee, Q. Cheng, T. Wei, J. Gong, J. Robinson, D. Zhang, X. Lian, P. Basak, D.J. Siegwart, Preparation of selective organ-targeting (SORT) lipid nanoparticles (LNPs) using multiple technical methods for tissue-specific mRNA delivery, *Nature Protocols* 18(1) (2023) 265–291. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00755-x> <<https://www.nature.com/articles/s41596-022-00755-x>> .

特色产品

[Andrew+移液机器人 <https://www.waters.com/labautomation>](https://www.waters.com/labautomation)

<https://www.onelab.com>

[OneLab软件 >](#)

720008090ZH, 2023年11月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)