

CIEF方法分析脂质纳米颗粒包裹的mRNA疫苗 (LNP-mRNA) 的等电点

Isoelectric points analysis of LNP encapsulated mRNA by cIEF

张晓霞, 陈泓序, 罗继, 郭立海

Xiaoxia Zhang, Hongxu Chen, Ji Luo, Lihai Guo

SCIEX, 中国;

SCIEX, China;

Keywords: cIEF, Lipid nanoparticles (LNP), mRNA vaccine, Isoelectric point (pI)

1. 前言

脂质纳米颗粒 (LNP) 是一种高效的药物递送系统, 近年来因为新冠疫情的缘故, 随着mRNA疫苗的发展而备受关注。LNP通常由四部分结构脂组成: 1. 阳离子脂质, 药物转染中起到主要作用; 2. 中性脂质, 如胆固醇, 起到稳定纳米颗粒结构的作用; 3. 两性脂质, 辅助性脂质, 能够加快LNP在细胞中的结构转化, 加速药物释放; 4. PEG-脂质, 能够提高纳米颗粒整体的稳定性, 延长纳米颗粒药物在血液中的代谢时间。在酸性介质 (pH~4) 中, LNP中的阳离子脂质体可以通过静电作用与核苷酸形成复合物。在生理pH值7.4, 该制剂会带中性电荷, 从而更隐蔽, 从而抑制与其血液成分的相互作用。当这些LNP被细胞内化时, 这些结构脂质带正电, 从而促进其与带负电的内溶酶体膜的复合。这种与细胞组分的相互作用会破坏脂质体并将核酸释放到胞浆中, 从而发挥作用。

LNP通过自组装工艺形成复杂的球形或圆柱形结构, 根据传递目的不同, 粒径大小在70-110 nm不等。不同的脂质组成、粒径和表面疏水性等会影响LNP的稳定性及传递效率, LNP的表面电荷还可能与细胞毒性相关。因此, 需要对LNP的表面电荷进行分析。“新型冠状病毒预防用mRNA疫苗药理学研究技术指导原则(试行)”建议结合递送系统与mRNA结合物的结构或特性开展必要的质量研究, 其中理化结构特性研究中就强调了等电点检测, 足见其重要性。

由于LNP粒径较大, 因此对于LNP包裹的mRNA (LNP-mRNA) 的等电点评估并非易事。cIEF是一种常用的大分子等电

点分析的方法, 它对分析物的粒径大小没有限制, 可以直接分析LNP颗粒。本文利用cIEF方法检测LNP-mRNA疫苗产品的等电点, 不仅可为工艺优化提供信息, 还可用于LNP-mRNA产品的批次一致性及稳定性研究。

2. 实验部分

2.1. 试剂及样品

试剂: cIEF Gel (SCIEX, 477497), cIEF Peptide Marker Kit (SCIEX, A58481), 两性电解质(Pharmalyte 5-8, Cytiva), 两性电解质(Pharmalyte 3-10, Cytiva), 磷酸(Sigma-Aldrich), 氢氧化钠(Sigma-Aldrich), 醋酸(Sigma-Aldrich), 亚氨基二乙酸(Sigma-Aldrich), 精氨酸(Sigma-Aldrich), 尿素(Sigma-Aldrich)。样品: LNP-mRNA样品 (mRNA浓度为500 µg/ml)。

2.2. 溶液制备

试剂制备: 阳极液 (200 mM 磷酸)、阴极液 (300 mM 氢氧化钠)、化学迁移液 (350 mM 醋酸)、阴极稳定剂 (500 mM 精氨酸)、阳极稳定剂 (200 mM 亚氨基二乙酸)、4.3M 尿素溶液及3.75M 尿素-cIEF胶配置方法请参照《cIEF等电聚焦试剂盒说明书》。

样品溶液: 先将下列试剂混合到0.5 mL离心管中得到样品预混液: 200 µL 3.75 M 尿素-cIEF胶、12.0 µL 两性电解质 (Pharmalyte5-8:3-10=2:1)、20.0 µL 阴极稳定剂、2.0 µL 阳极稳定剂和各2.0 µL的pI标准品(pI 10.0, 9.5, 5.5)。之后取5 µL LNP-mRNA样品 (LNP中阳离子脂质体的浓度推荐在2.0 mg/ml左右, 若浓度低可以

适当增加样品体积)与120 μL 样品预混液混合, 涡旋混匀, 若样品盐浓度高于50 mM, 可脱盐处理。

2.3. 仪器及方法

仪器: SCIEX PA 800 Plus 药物分析系统, 匹配UV检测器, 采集频率: 2Hz, 检测波长: 280 nm; 窗口狭缝: $100 \times 800 \mu\text{m}$, 中性涂层毛细管 (PN. 477441): 20/30.2 cm (有效/总长度), $50 \mu\text{m}$ 内径; 毛细管温度: 20°C ; 样品室温度: 10°C 。

分析方法包括condition, separation和shut down的时间程序见图1。

为保证实验时顺利进行, 除了废液瓶中溶液的体积为1.0 ml, 其他缓冲瓶中均装入1.5 ml 的溶液。具体摆放位置见图2。

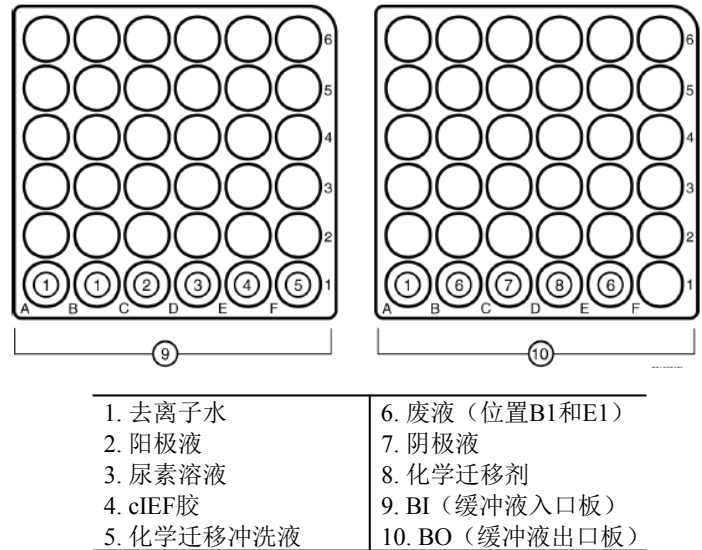


图2. 缓冲液托盘中缓冲液小瓶的摆放位置

3. 结果与讨论

采用cIEF方法分析LNP包裹的mRNA疫苗样品的等电点, 结果如图3。pH 5-8的两性电解质与pH 3-10的两性电解质2:1混合时, LNP-mRNA样品峰型尖锐对称, 等电点值为7.02。

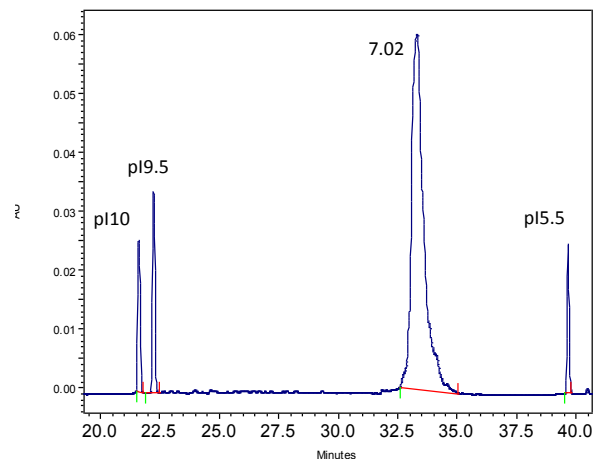


图3. LNP-mRNA样品等电点结果

Condition

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Rinse - Pressure	50.0 psi	8.00 min	BI:F1	BO:B1	forward	Chemical Mobilizer rinse
2	Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	ddH2O rinse
3	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:E1	BO:B1	forward	cIEF Conditioning Gel
4	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1		Idle Position
5							

Separation

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Rinse - Pressure	50.0 psi	3.00 min	BI:D1	BO:E1	forward, In / Out vol inc 6	Capillary Cleaning Solution Rinse
2	Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vol inc 6	Water Rinse
3	Inject - Pressure	25.0 psi	99.0 sec	SI:A1	BO:B1	Overide, forward	Sample injection
4	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vol inc 6	Water Dip
5	Separate - Voltage	25.0 kV	15.00 min	BI:C1	BO:E1	0.17 Min ramp, normal polarity, In / Out vol inc 6	Focusing Step
6	Separate - Voltage	30.0 kV	30.00 min	BI:C1	BO:D1	0.17 Min ramp, normal polarity, In / Out vol inc 6	Chemical Mobilization Step
7	Stop data						Stop cIEF Separation
8	Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vol inc 6	Water rinse
9	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vol inc 6	Water Dip
10							Method End
11							

Shut Down

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	ddH2O rinse
2	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:E1	BO:B1	forward	Gel Rinse
3	Lamp - Off						Turn off lamp
4	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1		Idle Position
5							

图1. 分析方法中的condition, separation和shut down的时间程序

为了进一步评估cIEF方法的稳定性，对LNP-mRNA样品进行3次重复进样，结果如图4。计算得主峰迁移时间的RSD值为1.07%，pI的RSD值为0.3%，结果重复性良好，

本实验结果表明，cIEF方法结果稳定，非常适用于对LNP-mRNA样品的等电点表征。cIEF方法分析LNP等电点，为LNP工艺优化及mRNA疫苗产品的批间一致性及稳定性研究提供了一种有效的分析手段。

表1. LNP-mRNA样品等电点重复性结果 (n=3)

Main peak (LNP-mRNA)		
	迁移时间(min)	pI
Rep-1	32.60	6.99
Rep-2	33.02	7.03
Rep-3	33.30	7.02
RSD%	1.07	0.30

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在英国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14720-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市海珠区广州国际生物岛星岛环北路
1号B2栋5层501、502单元
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：SCIEX-China