

使用 Unagi 快速提升 LNP 和 AAV 样品制备

简介

缓冲液置换是开发最优载体和有效载荷的关键步骤。与生物制剂相比，脂质纳米颗粒（LNP）和腺相关病毒（AAV）等递送载体的开发属于较新的研究领域，面临着不同的挑战和机遇。

通过缓冲液交对核酸有效载荷进行脱盐是一个基础的样品制备步骤。在制剂完成后，脂质纳米颗粒（LNP）需要进行缓冲液置换，以去除有机溶剂，这一过程对于维持 LNP 的完整性至关重要。尽管透析常用于 LNP 的缓冲液置换，但其速度较慢，并且需要额外的步骤来浓缩稀释后的样品。其他常见的手动置换方法则需要大量的操作时间，并且也可能导致样品回收效率不理想。

AAV、LNP 及相关基因治疗载体需要快速的缓冲液置换和制备方法，这些方法不仅要确保样品的完整性，还需具有较高的回收率。由于 AAV 的复杂性，样品的净化和浓缩往往耗时较长，当涉及多个样品时，这一问题会更加复杂。

为应对这些挑战，Unagi 被开发用于自动化缓冲液置换和样品纯化（图 1），通过优化流程，针对多种样品类型进行定制，以节省用户时间并保持样品完整性。



图 1: Unagi 是一款台式自动化缓冲液置换和浓缩解决方案，可同时处理 8 种不同样品，样品体积范围为 0.5 至 48 mL。

Unagi 采用压力式超滤/透析 (UF/DF) 技术进行缓冲液的去和更换。在基于压力的过滤过程中，板式装置会轻柔地混合样品，确保样品不会在膜表面堆积，同时比死角滤法更能保持流速均匀并提高处理速度。

Unagi 的缓冲液置换过程具有高度的定制性和适应性，能在单次实验处理多达 8 个不同样品和配方的缓冲液置换。Unchained Labs 为此过程开发了一种单样品消耗品——Una (图 2A)。每个 Una 的工作体积范围为 0.5 至 8 mL，可选择具有 10、30 或 100 kDa 分子量限值的再生纤维素膜。在实验开始前，Una 被注入待置换的样品，并置于样品架中 (图 2B)，然后放入置换室。新缓冲液则被放置在 50 mL 锥形管中，置于平台上。在实验过程中，Unagi 通过交替进行过滤、体积测量和新缓冲液添加来完成样品的缓冲液置换 (图 3)。

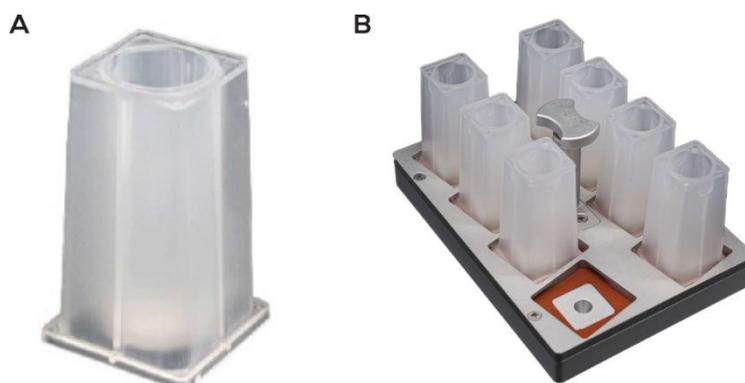


图 2: (A) Unagi 可以同时处理 8 个 Una 中的样品。每个 Una 的工作体积范围为 0.5 至 8 mL，每个样品在平台上还可额外容纳 40 mL。(B) 样品架可容纳 1 至 8 个 Una，用于将样品运送或者运出 Unagi，样品架可锁定在缓冲液置换室中。

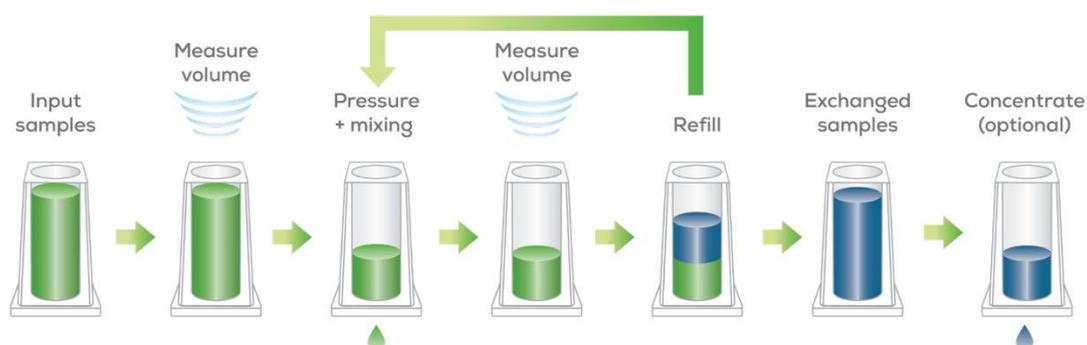


图 3: Unagi 基于压力的自动超滤/透析 (UF/DF) 技术通过超声波体积测量实时监控每个样品的流速，并相应地调整压力循环时间。样品体积的测量确保了精确的目标置换百分比和浓缩值，因为每个步骤中的待处理量都是已知的。

Unagi 有四种用户可选的应用程序，可满足不同的处理需求。每种方法都可以独立运行，也可以连续运行以实现所需结果。

- **缓冲液置换应用**：可自动执行缓冲液置换过程，并在置换完成后进一步浓缩样品。
- **仅浓缩应用**：可在不经过缓冲液置换的情况下，将样品浓缩至新的目标体积。
- **缓冲液置换+浓缩应用**：先进行缓冲液置换，然后再对样品进行浓缩。
- **减少样品量应用**：可并行处理 8 个稀释样品，从 48 mL 至 8 mL (见图 4)。

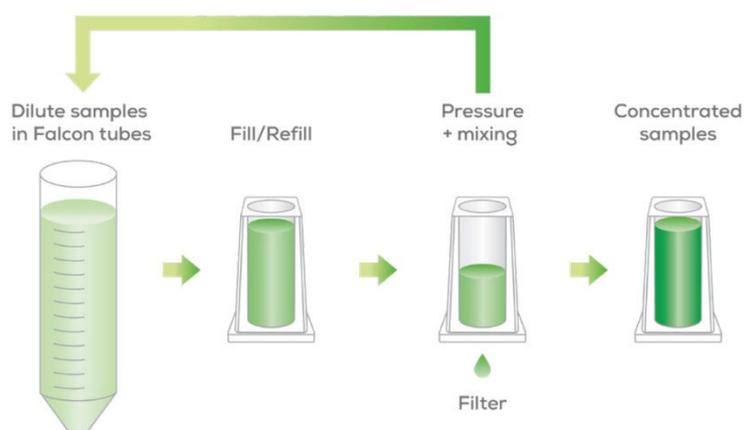


图 4: Unagi 上的“减少样品量”应用利用平台上的 Falcon 管将较大体积的样品（最多 48 mL）在一次运行中浓缩至 8 mL。后续的浓缩实验将进一步将最终体积降低至 0.5 mL，最终达到 96 倍的样品浓缩倍数。

在本应用中，我们将展示如何使用 Unagi 执行病毒载体和 LNP 样品制备与纯化的关键应用，并针对每种分子类型和浓度范围开发的特定预设优化参数。对于 LNP，我们将在置换和浓缩的过程中去除乙醇。稀释后的大体积 AAV 将被浓缩至易于处理的体积。最后，我们将 DNA 进行纯化，去除其中的盐分和 EDTA，以备储存或下游应用。

方 法

LNP 缓冲液置换和浓缩

PolyA-LNPs 采用聚腺苷酸 (Polyadenylic acid, polyA, Sigma Aldrich, GE27-4110-01) 和含 SM-102 的脂质纳米颗粒 (LNP-102) 探索试剂盒 (Cayman Chemical, 产品编号 35425) 配制, N:P 比为 8, FRR 为 3:1, TFR 为 15 mL/min。将 12.5%乙醇 (EtOH) 的 PolyA-LNP 储存溶液，稀释 4 倍至 6.25%乙醇的 1x

PBS 中，初始浓度为 30.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。4 mL 稀释后的 LNP 被转移至 100 kDa 的 Una 中。

关键的缓冲液置换参数见表 1。缓冲液置换协议设置为每个样品总置换率 98%，每个循环去除的目标体积为 25%，操作压力为 30 psi。为达到最终目标浓度 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，最终样品体积设定为 1 mL。

Parameter	LNP settings
Target exchange	98%
Target removal per cycle	25%
Initial concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	30.99 \pm 0.02
Initial well volume (mL)	4
Target final concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	120
Target final well volume (mL)	1

表 1: LNP 在 100 kDa Una 中进行的缓冲置换和浓缩的关键参数

采用 Unagi 软件进行实验设计和执行。软件报告总处理时间、初始和最终样品体积，以及最终的置换百分比。

Stunner (图 5) 用于测量 polyA-LNPs 的浓度、大小和多分散性。RiboGreen[®] (ThermoFisher) 使用 SpectraMax i3 平板读取仪 (Molecular Devices) 测定置换前后包封率。

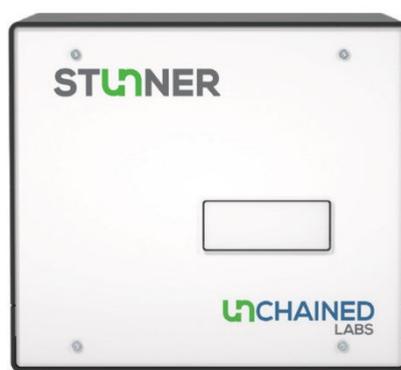


图 5: Stunner 仅需 2 μL 样品, 即可通过紫外可见光定量、动态光散射 (DLS) 和静态光散射 (SLS) 将数据整合在一起。

AAV 缓冲液置换和浓缩

将 $2.86\text{E}13$ cp/mL 的 AAV9-CMV-GFP (Virovek) 在 pH 7.0 的 PBS 缓冲液中 (含 0.001% Pluronic F-68) 被稀释到 $5\text{E}12$ cp/mL。随后, 稀释后的 AAVs 被手动移液至 30 kDa 的 Una 中进行缓冲液置换, 置换至 pH 7.0 的 PBS (含 0.001% Pluronic F-68), 并将其浓缩 2 倍。

具体的实验设置和参数见表 2。实验中使用了 AAV 预设的缓冲液置换参数, 置换协议设定每个样品的总置换率达到 96%, 目标去除量为 33%, 操作压力为 15 psi。

使用 Stunner AAV 定量应用程序分析了置换和浓缩前后样品的浓度变化及衣壳空/实心率。

Parameter	AAV settings
Target exchange	96%
Target removal per cycle	33%
Initial concentration (cp/mL)	$5.00\text{E}12$
Initial volume (mL)	2
Target final concentration (cp/mL)	$1.00\text{E}13$
Target final volume (mL)	1

表 2: AAV 在 30 kDa Una 中进行的缓冲液置换和浓缩的关键参数

稀释 AAV: 减少样品体积

AAV9-CMV-GFP (Virovek) 在 pH 7.0、含 0.001% Pluronic F-68 的 PBS 中稀释至 $5\text{E}11$ cp/mL。12 mL 的稀释 AAV9 被手动移液至 30 kDa 的 Una 中。通过两步, 将稀释后的 AAV 从 12 mL 缩减至最终的 1 mL。首先, 使用 Unagi

上的 Reduce Sample Volume 应用将 12 mL 的稀释 AAV9 体积减少至 8 mL。随后，使用同一 Una 进行 Concentrate Only 实验，将每个样品浓缩至 1 mL，最终实现了从原始 12 mL 溶液的 12 倍浓缩。

实验的关键设置和参数见表 3。两个步骤均采用了 AAV 预设的缓冲液置换参数。在实验过程中，使用 Stunner AAV Quant 应用程序分析了浓缩前后样品的浓度变化以及衣壳空/实心率。

Parameter	AAV settings
Initial concentration (cp/mL)	5.00E11
Initial volume (mL)	12
Target final concentration (cp/mL)	6.0E12
Target final volume (mL)	1

表 3: 稀释后的 AAV 在 30 kDa Una 中浓缩至 12 倍的目标初始浓度、最终浓度和体积。

DNA 脱盐

将 Invitroge 超纯鲑鱼精子 DNA 溶液 (ThermoFisher) 在 pH 8.0 的 Tris-EDTA 缓冲液中被稀释至 2 mg/mL。稀释后的 DNA 被手动移液至 30 kDa 的 Una 中。样品经过缓冲液置换，换至无酶水，然后浓缩 3 倍。

具体实验设置和参数见表 4。实验使用了核酸预设的置换参数。缓冲液置换协议设定为每个样品的总置换率为 96%，目标去除量为每个样品 50%，操作压力为 60 psi。

使用 Stunner (Unchained Labs) 上的 UV/Vis 应用程序，在置换和浓缩前后对 DNA 浓度进行了定量分析。

Parameter	DNA settings
Target exchange	96%
Target removal per cycle	50%
Initial concentration (mg/mL)	2
Initial volume (mL)	3
Target final concentration (mg/mL)	6
Target final volume (mL)	1

表 4: DNA 在 30 kDa una 中进行缓冲液置换和浓缩的关键参数

结果

LNP 缓冲液置换和浓缩

每个样品的目标缓冲液置换率设定为 98%，通过预先稀释，乙醇浓度降低至 0.1%。浓缩步骤后的最终体积通过称量测得为 0.88 ± 0.03 mL。最终的 LNP 浓度通过 Stunner 测量，结果为 137.68 ± 9.73 $\mu\text{g/mL}$ ，而目标浓度为 120 $\mu\text{g/mL}$ (表 5)。Stunner 测得实验前的粒径为 76.76 ± 0.49 nm (PDI 0.09 ± 0.02)，实验后的粒径为 80.78 ± 1.62 nm (PDI 0.06 ± 0.01)。使用 RiboGreen® 检测试剂盒测定了 LNP 在缓冲液置换和浓缩过程前后的包封率。置换后的每个样品均进行了重复测量，平均包封率为 $99.21 \pm 0.37\%$ 。通过称量和 Stunner 测量的结合，确定样品回收率为 $98.41 \pm 3.01\%$ 。所有实验在 Unagi 上完成，时间约为 2 小时。乙醇已从 LNP 溶液中去除，浓缩目标已达到，且缓冲液置换和浓缩前后的包封率保持一致。

LNP parameter	Initial	Final
Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	30.99 ± 0.02	137.68 ± 9.73
Size (nm)	76.76 ± 0.49	80.78 ± 1.62
PDI	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.01
Encapsulation efficiency (%)	-	99.21 ± 0.37
Recovery (%)	-	98.41 ± 3.01

表 5: LNP 溶液浓度、粒径、PDI、包封率和在 100 kDa Una 中的回收率。

AAV 缓冲液置换和浓缩

每个样品的目标缓冲液置换率设定为 96%，实际置换率为 $96.5 \pm 0.1\%$ ，此结果基于每个 Una 中添加的透析体积倍数（表 6）。每个样品的最终体积通过超声测量为 0.98 ± 0.03 mL，接近目标体积 1 mL。最终 AAV 浓度通过 Stunner 测量为 $1.2\text{E}13 \pm 3.6\text{E}11$ cp/mL，目标浓度为 $9.85\text{E}12$ cp/mL。AAV 的空/实心率也通过 Stunner 测定。在缓冲液置换前，AAV 的衣壳空/实心率为 21/79；置换后，该比率测得为 18/82。观察到衣壳空/实心率有轻微下降，可能是由于置换过程中去除了游离的 DNA。

AAV parameter	Initial	Final
Conc. (cp/mL)	$4.93\text{E}12 \pm 2.9\text{E}11$	$1.2\text{E}13 \pm 3.6\text{E}11$
Volume (mL)	2.2 ± 0.03	0.98 ± 0.03
% exchanged	-	96.5 ± 0.1
Capsid empty/full ratio	21/79	18/82

表 6: AAV 在 30 kDa Una 中进行缓冲液置换和浓缩前后的浓度和空/实心率

稀释 AAV：减少样品体积

在本实验中,我们首先使用“减少样品量”应用将 12 mL 的 AAV9 浓缩至 8 mL。然后,使用“仅浓缩”应用在同一 Una 中将稀释后的样品进一步浓缩至 1 mL,最终实现了 12 倍浓缩。

最终通过“减少样品量”应用, 12 mL 的样品被浓缩至 8.1 ± 0.02 mL。随后,使用“仅浓缩”应用进一步浓缩样品,最终体积为 1.02 ± 0.02 mL (表 7)。最终 AAV 浓度通过 Stunner 测量为 $5.9E12$ cp/mL, 而目标浓度为 $6.0E12$ cp/mL。浓缩前的 AAV 衣壳空/实心率为 10/90, 浓缩后测得的空/实心率为 15/85。未观察到衣壳空/实心率的显著差异。

AAV parameter	Initial	Final
Conc. (cp/mL)	$5.00E11$	$5.9E12 \pm 1.6E11$
Volume (mL)	8.1 ± 0.03	1.02 ± 0.02
Capsid empty/full ratio	10/90	15/85

表 7: AAV 样品体积在 30kda Una 中浓缩 12 倍

DNA 脱盐

每个样品的目标缓冲液置换率设定为 96%, 实际置换率为 $96.7 \pm 0.2\%$ (表 8)。每个样品的最终体积通过超声测量为 1 ± 0.02 mL, 接近目标体积 1 mL。最终的 DNA 浓度通过 Stunner 测量为 6.7 ± 0.2 mg/mL, 目标浓度为 6.3 mg/mL。

DNA Parameter	Initial	Final
Conc. (mg/mL)	2.1 ± 0.006	6.7 ± 0.2
Volume (mL)	3.3 ± 0.03	1 ± 0.02
% exchanged	-	96.7 ± 0.2

表 8: DNA 在 30 kDa Una 中脱盐并浓缩至无酶水中

结 论

AAV、LNP、核酸和蛋白质在大小和复杂性上各不相同。此外，工作浓度和缓冲液条件在不同样品类型之间也存在差异，这些差异会显著影响过滤速率以及缓冲液置换和浓缩方法的效率。Unagi 的处理参数会根据特定分子类型及其浓度，调整超滤/透析 (UF/DF) 条件，即压力和样品去除速率，并且用户可以根据需要进行修改，以获得最佳结果，同时保证样品的完整性。

对于 AAV 和 LNP 等分子来说，置换过程需要快速，而且必须保持有效载荷的完整性。AAV 可以在较低压力下进行置换，因为它们流动速度较快，较低的压力可确保其在浓缩时保持一致的目标浓度。较大的分子如 LNP，以及高浓度的核酸，则在较高的压力和置换速率下进行置换，以提高处理速度。Unagi 的灵活性使其能够处理较大的生物分子以及较小的蛋白质和核酸，这使得它成为一种基因治疗样品制备工作流程的理想工具。



Unchained Labs
4747 Willow Road
Pleasanton, CA 94588
Phone: 1.925.635.4654
Toll-free: 1.800.815.6384
Email: info@unchainedlabs.com

© 2024 Unchained Labs. All rights reserved. Unagi and Stunner are trademarks and Unchained Labs is a registered trademark of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.

Rev B