

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์การห่อหุ้มเอ็มอาร์เอ็นเอ ในอนุภาคนาโนไขมันของวัคซีนโควิด 19 โดยวิธีฟลูออเรสเซนซ์

ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์¹ วิภาวี วงศ์ชนะ¹ พุธิตา โชคเหรียญสุขชัย¹ อชิระ นามจันทร์¹ และ สุภาพร ภูมิอมร²

¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

²สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ วัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA มีสาย mRNA ที่ถูกห่อหุ้มในอนุภาคนาโนไขมัน เพื่อป้องกันการเสื่อมสลายของ mRNA เมื่อฉีดเข้าสู่ร่างกายและสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ร้อยละของการห่อหุ้ม mRNA ในอนุภาคนาโนไขมันเป็นวิธีหนึ่งในการควบคุมคุณภาพวัคซีนที่องค์การอนามัยโลกกำหนด ในสถานการณ์ระบาดของโรคโควิด 19 ทำให้ขณะนี้ไม่มีข้อมูลจำเพาะของวิธีทดสอบและไม่มีมาตรฐานจากผู้ผลิตวัคซีนเพื่อนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพ การวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีในการนำ Ribogreen ในชุดน้ำยาสำเร็จรูปซึ่งเป็นสีย้อมเรืองแสง มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ในวัคซีนตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ร้อยละของ mRNA ที่ถูกห่อหุ้มในอนุภาคนาโนไขมัน โดยเติม Triton X-100 ในตัวอย่างวัคซีนเพื่อหาปริมาณ mRNA ทั้งหมด และเมื่อหาปริมาณ mRNA อิสระจะไม่มีการเติมสารดังกล่าว ผลพบว่าวิธีนี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณ RNA มาตรฐานและตรวจติดตาม mRNA ในวัคซีนตัวอย่างได้ โดยสามารถสร้างกราฟมาตรฐานเชิงเส้นตรงและมีช่วงที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณ RNA มาตรฐานความเข้มข้นต่ำและความเข้มข้นสูงได้ที่ 2.5–25 และ 50–500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ทุกสภาวะมีค่า R^2 มากกว่า 0.99 ค่า %RE และ %CV น้อยกว่าร้อยละ 10 ช่วงที่เหมาะสมในการเจือจางตัวอย่างวัคซีนเพื่อหา mRNA อิสระ และ mRNA ทั้งหมดของวัคซีนในการศึกษานี้ น้อยกว่า 1:100 และ 1:1,000 ตามลำดับ เมื่อคำนวณหาร้อยละของ mRNA ที่ถูกห่อหุ้ม พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับผลการทดสอบจากวิธีของผู้ผลิต วิธีนี้จึงมีความเป็นไปได้ในการวิเคราะห์การห่อหุ้ม mRNA ในวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 รวมถึงสามารถนำไปเป็นต้นแบบเพื่อพัฒนาเป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับวัคซีนชนิด mRNA ที่อยู่ในการพัฒนาและการศึกษาทางคลินิกในประเทศไทยต่อไป

คำสำคัญ: วัคซีนโควิด 19, วัคซีนชนิดเอ็มอาร์เอ็นเอ, อนุภาคนาโนไขมัน, การหาปริมาณ mRNA, วิธีฟลูออเรสเซนซ์

Corresponding author E-mail: natthakarn.m@dmsc.mail.go.th

Received: 18 November 2024

Revised: 4 August 2025

Accepted: 4 August 2025

บทนำ

ความก้าวหน้าที่สำคัญของการพัฒนาวัคซีนชนิดเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) คือ ความรวดเร็วในการสร้างและผลิตวัคซีนของผู้ผลิต และความจำเป็นที่ต้องให้ได้วัคซีนเพื่อต่อต้านเชื้อโรคอุบัติใหม่ โดยเฉพาะไวรัสโรคระบบทางเดินหายใจรุนแรงเฉียบพลัน SARS-CoV-2 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) โดยวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA ที่นำเข้ามาใช้ในประเทศไทยและใช้กันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ คือ วัคซีน Comirnaty™ ของบริษัทไฟเซอร์ (Pfizer-BioNTech) และวัคซีน Spikevax™ ของบริษัทโมเดอร์นา (Moderna) รวมทั้งวัคซีน mRNA อื่น ๆ ที่อยู่ในการพัฒนาและการศึกษาทางคลินิกในช่วงเวลาดังกล่าว ทั้งนี้กลไกการทำงานของวัคซีน mRNA คือ การนำส่ง mRNA ที่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนหรือแอนติเจนที่ต้องการให้เข้าสู่เซลล์โดยการห่อหุ้ม mRNA ดังกล่าวในอนุภาคนาโนไขมัน (lipid nanoparticle, LNP) เพื่อป้องกันการเสื่อมสลายของ mRNA และเพื่อช่วยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽¹⁻⁴⁾ อย่างไรก็ตามยังมีความกังวลในเรื่องความปลอดภัย การผลิต และกฎระเบียบที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีใหม่นี้ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้มีคำแนะนำในการประเมินคุณภาพ ความปลอดภัย และประสิทธิภาพของวัคซีน mRNA ที่ใช้ในการป้องกันโรคติดเชื้อในมนุษย์ การประเมินดังกล่าวต้องคำนึงถึง คุณสมบัติทางภูมิคุ้มกัน กายภาพเคมี และโครงสร้างของ mRNA และ LNP ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของวัคซีน เพื่อให้แน่ใจว่ามีความเสถียรและความปลอดภัยในร่างกาย รวมถึงการนำส่งที่มีประสิทธิภาพ⁽⁵⁾

อย่างไรก็ตามรายละเอียดของการห่อหุ้ม mRNA ใน LNP มีความสำคัญ WHO จึงกำหนดให้การวิเคราะห์ดังกล่าวเป็นหนึ่งในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์วัคซีนสำเร็จรูปชนิด mRNA เพื่อให้แน่ใจว่าระบบนำส่งมีประสิทธิภาพและวัคซีนมีความเสถียร⁽⁵⁾ ทั้งนี้การวิเคราะห์รายละเอียดของ mRNA ที่ถูกห่อหุ้มอยู่ใน LNP นั้นทำได้โดยการหาปริมาณ mRNA อิสระในวัคซีน และนำมาคำนวณอัตราส่วนร้อยละเปรียบเทียบกับปริมาณ mRNA ทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ เมื่อแยก mRNA ที่อยู่ภายใน LNP ด้วย

สารลดแรงตึงผิว (Triton X-100)⁽⁶⁻⁸⁾ อย่างไรก็ตาม ปัญหาของการวิเคราะห์คุณภาพในห้องปฏิบัติการภาครัฐ ในช่วงสถานการณ์ระบาดของโรคโควิด 19 นั้น เกิดจากการที่ไม่มีข้อมูลจำเพาะของวิธีทดสอบและสารมาตรฐานสำคัญจากผู้ผลิต โดยเฉพาะ mRNA มาตรฐานและสารช่วยทางเภสัชกรรม (excipients) ของวัคซีน ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์และประเมินการห่อหุ้ม mRNA ในอนุภาคนาโนไขมัน โดยนำชุดน้ำยาทดสอบ Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent and Kit ที่มีการอ้างอิงและนำมาใช้ในการหาปริมาณ mRNA⁽⁶⁻⁸⁾ ซึ่ง Ribogreen เป็นสีย้อมเรืองแสง (fluorescent dye) ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการหาปริมาณกรดนิวคลีอิกทั้ง RNA และ DNA โดยไม่ถูกรบกวนด้วยโปรตีนหรือสารอื่น ๆ ในระบบ⁽⁹⁾ ทั้งนี้ในการศึกษานี้ได้นำ RNA มาตรฐานที่อยู่ในชุดทดสอบมาทดแทนสารมาตรฐานจากผู้ผลิต รวมถึงวิเคราะห์การรบกวนในการหาปริมาณ mRNA เมื่อมี Triton X-100 ในการทดสอบ และความจำเพาะของชุดน้ำยาทดสอบต่อการหาปริมาณ mRNA ในวัคซีนตัวอย่าง นอกจากนี้ได้ทำการหาช่วงที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ที่อยู่ในวัคซีนตัวอย่าง เพื่อรองรับการพัฒนาสูตรของวัคซีน mRNA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ การศึกษานี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อให้เกิดองค์ความรู้และเป็นแนวทางการควบคุมกำกับทางห้องปฏิบัติการภาครัฐในการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของวัคซีนชนิด mRNA รวมถึงสามารถนำไปเป็นต้นแบบ เพื่อพัฒนาเป็นวิธีวิเคราะห์วัคซีนชนิดนี้ที่อยู่ระหว่างการพัฒนาและการศึกษาทางคลินิกในประเทศต่อไป

วัสดุและวิธีการ

วัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA ตัวอย่าง

วัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA ที่มีการนำเข้ามาทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการระหว่างปี พ.ศ. 2564-2565 ได้แก่ วัคซีน Comirnaty™ ของบริษัทไฟเซอร์ (Pfizer-BioNTech, USA) และวัคซีน Spikevax™ ของบริษัทโมเดอร์นา (Moderna, USA) จำนวน 4 รุ่นการผลิต

สารอ้างอิงมาตรฐานและชุดน้ำยาดตรวจ

สารมาตรฐาน *E. coli* 16S and 23S Ribosomal RNA (Component C) ของชุดน้ำยาดตรวจปริมาณอาร์เอ็นเอ Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent and Kit (Invitrogen, USA)

การเตรียมสารมาตรฐาน RNA

นำสารมาตรฐาน *E. coli* 16S and 23S rRNA (Component C) ของชุดน้ำยาดตรวจปริมาณอาร์เอ็นเอ Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent and Kit มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15–20 นาที จากนั้นเจือจาง RNA มาตรฐาน ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลาย 1X TE (Invitrogen, USA) ให้ได้ความเข้มข้น 0–2,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 1X TE (สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ mRNA อิสระ) หรือสารละลาย 1X TE ที่มี 2% Triton X-100 (v/v) (Sigma, USA) (สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ทั้งหมด) ลงในเพลทหลุมทดสอบ (Thermo Fisher Scientific, USA) จากนั้นเติม RNA มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในแต่ละหลุม การทดสอบในอัตราส่วน 1:1 (ความเข้มข้นสุดท้ายของ Triton X-100 (v/v) เป็น 1%) และเติม Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม โดยเจือจางน้ำยา Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent ที่ความเจือจาง 1:200 ด้วยสารละลาย 1X TE สำหรับช่วงการทดสอบปริมาณ RNA ความเข้มข้นสูง 20–1,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และเจือจาง 1:2,000 สำหรับช่วงการทดสอบปริมาณ RNA ความเข้มข้นต่ำ 1–50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ปิดเพลทด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และนำไปวัดค่าความเข้มของการเรืองแสง (Fluorescence emission intensity: FLU) ทันทีด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ไมโครเพลท (SpectraMax® iD5, Molecular Devices, USA) ที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร และ emission ที่ 520 นาโนเมตร

การเตรียมวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA ตัวอย่าง

นำวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA ตัวอย่าง มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ละลายประมาณ 15–20 นาที จากนั้นเจือจางในสารละลาย 1X TE โดยกำหนดให้ช่วงความเจือจางอยู่ระหว่าง 1:100–1:1,000

วิธีการหาปริมาณ mRNA ในวัคซีนตัวอย่างด้วยชุดน้ำยา Quant-iT™ RiboGreen™

เติมสารละลาย 1X TE ลงในหลุมการทดสอบ เติมวัคซีนตัวอย่างที่ความเจือจางต่างๆ ในสารละลาย 1X TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อหาปริมาณ mRNA อิสระในวัคซีน และเติมวัคซีนตัวอย่างที่ความเจือจางต่างๆ ในสารละลาย 1X TE ที่มี 2% Triton X-100 (v/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม ในอัตราส่วน 1:1 ในการหาปริมาณ mRNA ทั้งหมดในวัคซีน จากนั้นเติม Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent ลงในทุกหลุม โดยเจือจาง 1:200 ของน้ำยาสำหรับช่วงการทดสอบปริมาณ mRNA ความเข้มข้นสูง 20–1,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ปิดเพลทด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และนำไปวัดค่าความเข้มของการเรืองแสงทันทีด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร และ emission ที่ 520 นาโนเมตร

การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณ mRNA และการคำนวณหาร้อยละของ mRNA ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไขมันในวัคซีน

สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารมาตรฐาน *E. coli* 16S and 23S rRNA (Component C) ของชุดน้ำยาดตรวจ Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent and Kit สำหรับการหาปริมาณ mRNA อิสระ และสำหรับการหาปริมาณ mRNA ทั้งหมด โดยให้ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานเป็นแกน x และค่าความเข้มของการเรืองแสงของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นเป็นแกน y เพื่อสร้างสมการเส้นตรงของกราฟ $y = ax + b$

จากนั้นแทนค่าความเข้มข้นของการเรืองแสงของวัคซีน
ตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นของ mRNA อิสระ และ
mRNA ทั้งหมดในวัคซีน ในตัวแปร x เพื่อคำนวณหาค่า

ปริมาณของ mRNA อิสระ และ mRNA ทั้งหมดในวัคซีน
โดยหาร้อยละของ mRNA ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโน
ดังสมการ

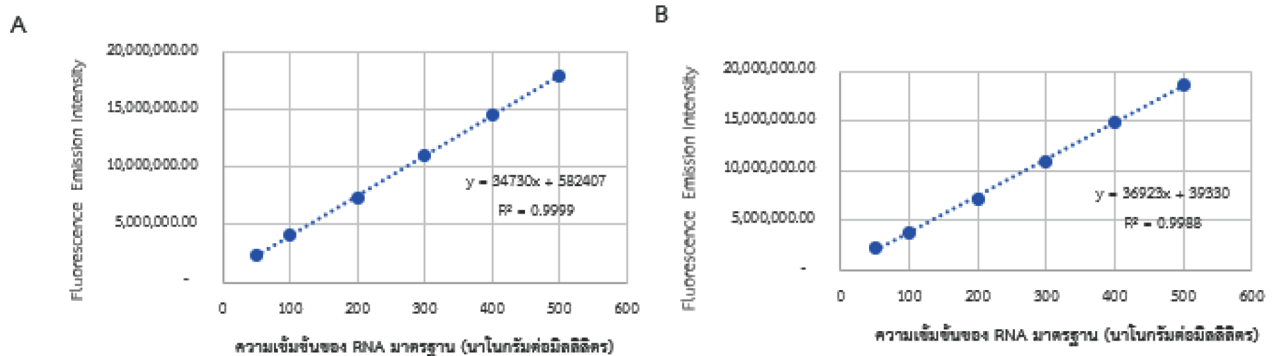
$$\% \text{ ห่อหุ้ม mRNA} = \frac{(\text{mRNA ทั้งหมด} - \text{mRNA อิสระ})}{\text{mRNA ทั้งหมด}} \times 100$$

ผล

การหาปริมาณ RNA ที่สภาวะต่างๆ โดยใช้ชุดน้ำยา Quant-iT™ RiboGreen™

ในสภาวะที่ RNA มาตรฐานอยู่ในสารละลาย
1X TE หรือในสารละลาย 1X TE ที่มี 1% Triton
X-100 สามารถหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง
ปริมาณ RNA ที่ความเข้มข้นต่างๆ (นาโนกรัม/มิลลิลิตร)
กับค่าความเข้มข้นของ Fluorescence Emission

Intensity ได้ ดังแสดงในภาพที่ 1 และพบว่าน้ำยา
Quant-iT™ RiboGreen™ สามารถตรวจ mRNA
ในวัคซีนตัวอย่างได้ โดยพบว่าค่า Fluorescence
Emission Intensity ลดลงแปรผกผันกับการความ
เจือจางที่เพิ่มขึ้นของตัวอย่างวัคซีน ในขณะที่ตัวอย่าง
วัคซีนที่ไม่มีการเติมน้ำยา Quant-iT™ RiboGreen™
ไม่มีความแตกต่างของค่า Fluorescence Emission
Intensity ในทุกค่าการเจือจาง ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 1 RNA มาตรฐานที่ถูกเจือจางด้วย A. สารละลาย 1X TE (ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA อิสระ)
หรือ B. สารละลาย 1X TE ที่มี 1% Triton X-100 (ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ทั้งหมด)
ก่อนการเติมน้ำยา Quant-iT™ Ribogreen™ เพื่อวิเคราะห์การเรืองแสง โดย RNA มาตรฐานมี
ความเข้มข้นระหว่าง 50-500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 1 การตรวจติดตาม mRNA ในวัคซีนตัวอย่างที่เจือจางในสภาวะต่างๆ โดยใช้ Quant-iT™ RiboGreen™

สภาวะ	ความเจือจาง ของตัวอย่างวัคซีน	ค่าเฉลี่ย Fluorescence Emission Intensity (FLU) (n = 2)	
		มี Ribogreen	ไม่มี Ribogreen
ไม่มี Triton X-100	200x	1,282,479	74,027
มี Triton X-100	400x	9,928,958	71,348
	800x	5,152,459	71,221
	1,600x	2,814,004	71,599

ช่วงความเป็นเส้นตรงของการหาปริมาณ **RNA** มาตรฐาน และช่วงการเจือจางตัวอย่างวัคซีนที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ช่วงความเป็นเส้นตรงของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ RNA มาตรฐานกับความเข้มข้นต่างๆ กับค่า Fluorescence Emission Intensity (FLU) เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ในสถานะที่ไม่มีและมี Triton X-100 ผลพบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ได้ 2 ระดับ คือ ในระดับ mRNA ปริมาณน้อย และระดับ mRNA ปริมาณมาก โดยในสถานะที่ไม่มี Triton X-100 สามารถวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ได้ระหว่าง 5.0-25 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ 50-500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ใน

สถานะที่มี Triton X-100 ระหว่าง 2.5 - 25 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ 50-500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และทุกสถานะมี R^2 ที่มากกว่า 0.99 ดังแสดงในตารางที่ 2 และช่วงการเจือจางตัวอย่างวัคซีน พบว่าสามารถคำนวณหาปริมาณ mRNA อิสระจากตัวอย่างวัคซีนได้ เมื่อตัวอย่างวัคซีนเจือจางในสารละลาย 1X TE ที่การเจือจางน้อยกว่า 1:100 และสามารถหาปริมาณ mRNA ทั้งหมดจากตัวอย่างวัคซีน เมื่อตัวอย่างวัคซีนถูกเจือจางในสารละลาย 1X TE ที่มี 1% Triton X-100 โดยมีการเจือจางน้อยกว่า 1:1,000 ดังแสดงในตารางที่ 2 ทั้งนี้ตัวอย่างวัคซีนต้องมีระดับความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ค่า cut-off กำหนดจากค่า FLU ของ RNA มาตรฐานของแต่ละการทดสอบ

ตารางที่ 2 ช่วงความเป็นเส้นตรงของการหาปริมาณ RNA มาตรฐาน และช่วงการเจือจางตัวอย่างวัคซีนที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

ชนิด RNA	ช่วง RNA มาตรฐาน (นาโนกรัม/มิลลิลิตร)				ช่วงการเจือจาง วัคซีนตัวอย่าง
	สำหรับ RNA ปริมาณน้อย		สำหรับ RNA ปริมาณมาก		
	R ²		R ²		
RNA มาตรฐานในสภาวะที่ไม่มี Triton X-100	5.0-25	0.9989	50-500	0.9999	-
RNA มาตรฐานในสภาวะที่มี Triton X-100	2.5-25	1	50-500	0.9988	-
ตัวอย่างวัคซีน mRNA ในสภาวะที่ไม่มี Triton X-100	-	-	-	-	< 1:100
ตัวอย่างวัคซีน mRNA ในสภาวะที่มี Triton X-100	-	-	-	-	'< 1,000x
FLU cut-off (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	5.0		100.0		100**

หมายเหตุ: เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่มีข้อมูล

** กำหนดจากค่า FLU cut-off ตาม RNA มาตรฐาน

ผลการหาปริมาณ **RNA มาตรฐานและ mRNA** ในวัคซีนตัวอย่างโดยใช้น้ำยา **Quant-iT™ Ribo-Green™**

เมื่อวัดปริมาณ RNA มาตรฐาน ที่มีเข้มข้น 200, 300 และ 400 นาโนกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณ mRNA จริงในวัคซีนตัวอย่างได้จากการคำนวณโดยใช้กราฟมาตรฐานในสถานะที่ไม่มีและ มี Triton X-100 ในการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ปริมาณมาก มีค่า %RE และ %CV ที่คำนวณได้น้อยกว่า

10% ดังแสดงในตารางที่ 3 และเมื่อนำวัคซีนตัวอย่างมาเจือจางที่ระดับการเจือจางต่างๆ ในสารละลาย 1X TE (สำหรับการหาปริมาณ mRNA อิสระ) และ 1X TE ที่มี Triton X-100 (สำหรับการหาปริมาณ mRNA ทั้งหมด) พบว่าสามารถคำนวณหาปริมาณ mRNA และคำนวณกลับเพื่อหาความเข้มข้นของ mRNA ตั้งต้นได้ โดยพบว่าปริมาณ mRNA อิสระ ที่ความเจือจาง 1:40 และ 1:67 มีค่าเฉลี่ยเป็น 7,823 และ 7,748 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณ mRNA ทั้งหมด

ที่ความเจือจาง 1:80, 1:200, 1:400 และ 1:800 มีค่าเฉลี่ย มิลลิลิตรตามลำดับ (ตัวอย่างวัคซีนมีระดับความเข้มข้น เป็น 104,178, 103,585, 95,148 และ 82,141 นาโนกรัม/ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ RNA มาตรฐาน ในสภาวะที่มีและไม่มี Triton X-100

ปริมาณ RNA มาตรฐาน (นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ในสภาวะที่ไม่มี Triton X-100	ปริมาณ RNA ที่คำนวณได้ (นาโนกรัม/มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD	%CV	%RE
	1	2	3				
200	196.07	190.81	194.32	193.74	2.68	1.38	3.13
300	299.43	286.97	294.55	293.65	6.28	2.14	2.12
400	400.33	397.83	394.68	397.62	2.83	0.71	0.60

ปริมาณ RNA มาตรฐาน (นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ในสภาวะที่มี Triton X-100	ปริมาณ RNA ที่คำนวณได้ (นาโนกรัม/มิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ย	SD	%CV	%RE
	1	2	3				
200	190.93	201.07	199.21	197.07	5.40	2.74	1.47
300	295.00	297.90	299.57	297.49	2.31	0.78	0.84
400	402.77	410.37	401.34	404.83	4.85	1.20	-1.21

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA อิสระ และ mRNA ทั้งหมด ในตัวอย่างวัคซีนที่ค่าการเจือจางต่างๆ

การเจือจาง วัคซีนตัวอย่าง	ปริมาณ mRNA อิสระ (นาโนกรัม/มิลลิลิตร)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
1:40	7,879	7,833	7,757	7,823
1:67	7,801	7,668	7,776	7,748
1:100*	-	-	-	-

การเจือจาง วัคซีนตัวอย่าง	ปริมาณ mRNA ทั้งหมด (นาโนกรัม/มิลลิลิตร)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
1:80	103,884	103,510	105,142	104,178
1:200	105,725	99,276	105,755	103,585
1:400	93,064	93,859	98,520	95,148
1:800	80,208	82,079	84,136	82,141
1:1,000	-	-	-	-

หมายเหตุ: เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่สามารถคำนวณหาปริมาณ mRNA ได้เนื่องจากค่า FLU อยู่นอกช่วงค่า cut-off

เปรียบเทียบวิธีหาลอยละของ mRNA ที่ถูกห่อหุ้ม
ด้วยอนุภาคนาโนไขมันจากการศึกษานี้กับผลของ
ผู้ผลิตวัคซีน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณ mRNA ในวัคซีน
ตัวอย่าง ทั้งปริมาณ mRNA อิสระ และปริมาณ mRNA

ทั้งหมด (RNA content) สามารถนำมาคำนวณหา
ร้อยละของ mRNA ที่ถูกห่อหุ้มได้โดยมีค่าใกล้เคียง
กับผลการทดสอบจากวิธีของผู้ผลิตวัคซีน ดังแสดง
ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณ RNA (RNA content) และร้อยละของ RNA ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไขมัน (% Encapsulation) จากการศึกษาเกี่ยวกับรายงานผลการวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่ระบุใน Certification of Analysis (COA) ของผู้ผลิตวัคซีน Comirnaty™ ของบริษัทไฟเซอร์ (Pfizer-BioNTech) และวัคซีน Spikevax™ ของบริษัทโมเดอร์นา (Moderna)

ตัวอย่างวัคซีน	ผลจากผู้ผลิต		ผลจากวิธีที่พัฒนาขึ้น	
	RNA content (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	% Encapsulation	RNA content (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	% encapsulation
วัคซีนยี่ห้อ A	0.096	98%	0.097	92.62%
วัคซีนยี่ห้อ B	0.190	91%	0.184	86.27%

หมายเหตุ: วัคซีนยี่ห้อ A คือ วัคซีน Comirnaty™ (Pfizer-BioNTech, USA) วัคซีนยี่ห้อ B คือ วัคซีน Spikevax™ (Moderna, USA)

วิจารณ์

งานวิจัยนี้มีแนวคิดมาจากความพยายามในการหาวิธีวิเคราะห์คุณภาพวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไขมัน (LNP) เพื่อให้สามารถประเมินคุณภาพและความปลอดภัยสำหรับวัคซีนรูปแบบใหม่ ที่มีการนำมาใช้ในสถานการณ์ระบาดโรคโควิด 19 ซึ่งในขณะนั้นมีข้อจำกัดของข้อมูลของวิธีทดสอบและสารมาตรฐานเพื่อใช้ในการพัฒนาวิธี ทั้งนี้การห่อหุ้มของ mRNA ที่ถูกห่อหุ้มด้วย LNP จะต้องพัฒนาวิธีในการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA เพื่อใช้ในการคำนวณค่าดังกล่าว โดยการหาปริมาณ mRNA สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวัดค่าด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร^(10,11) หรือการใช้ยา Quant-iT™ RNA ตัวไป⁽¹²⁾ ทั้งนี้วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัด เช่น ความไว รวมถึงมีความเสี่ยงต่อวิธีต่อการวัดปริมาณ mRNA ต่ำ เป็นต้น และเนื่องจากในวัคซีนดังกล่าว mRNA ถูกห่อหุ้มใน LNP การหาปริมาณ mRNA ทั้งหมดในวัคซีนจะต้องใช้ Triton X-100 ซึ่งสามารถรบกวนการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง fluorescent และ UV ได้⁽¹³⁾ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีการนำชุดน้ำยา Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent and Kit มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ที่ถูกห่อหุ้มด้วย LNP เมื่อทำการศึกษาวิจัยได้ใช้ ribosomal RNA จาก *E.coli* ที่อยู่ในชุดน้ำยาเป็น RNA มาตรฐาน ทดแทนการใช้ mRNA มาตรฐานจากผู้ผลิต

และมีการเติม 2% Triton X-100 เพื่อดูการรบกวนของ Triton X-100 ต่อการวัดปริมาณ mRNA พบว่ากราฟมาตรฐานที่ได้เป็นเส้นตรงและสามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นของ mRNA มาตรฐานได้ในสภาวะที่มี Triton X-100 เช่นเดียวกับในสภาวะที่ไม่มี Triton X-100 พบว่าค่า FLU สัมพันธ์กับปริมาณ mRNA ตามรายงานก่อนหน้า^(14,15) แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการใช้ชุดน้ำยา Quant-iT™ RiboGreen™ ตรวจหาปริมาณ mRNA ในสภาวะที่มี Triton X-100 โดยไม่มีการรบกวนการวิเคราะห์ผล และเนื่องจาก pKa มีผลต่อการปลดปล่อย mRNA จาก LNP อาจมีการพัฒนาการใช้สารละลายที่มีค่า pH ที่เหมาะสมในการทดแทนการใช้ Triton X-100⁽¹⁶⁾ และทำการตรวจติดตาม mRNA ในวัคซีนตัวอย่างต่อไป

เมื่อทำการวิเคราะห์แนวโน้ม (Trend Analysis) คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์จากข้อมูลผู้ผลิต พบว่าวัคซีนชนิด mRNA มีปริมาณ mRNA และร้อยละของ mRNA ที่ถูกห่อหุ้มด้วย LNP สม่่าเสมอในทุกขั้นตอนการผลิต โดยมีปริมาณ mRNA อิสระ เฉลี่ยประมาณ 10% ของปริมาณ mRNA ทั้งหมด เมื่อผู้วิจัยทำการคำนวณเบื้องต้น เพื่อพิจารณาเลือกช่วงการวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับปริมาณ RNA มาตรฐานที่ใช้พบว่าช่วงที่เหมาะสมคือช่วงวิเคราะห์ RNA ปริมาณมาก (50–500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งการหาปริมาณ mRNA อิสระ และปริมาณ mRNA ทั้งหมดในวัคซีนตัวอย่าง

จากช่วงความเป็นเส้นตรงของการหาปริมาณ RNA ดังกล่าว พบว่าสามารถกำหนดค่า FLU cut-off เบื้องต้นจากค่า FLU ที่วัดจากปริมาณ RNA มาตรฐาน เท่ากับ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยการพิจารณาจาก ค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RE) อย่างไรก็ตามค่า FLU cut-off จะสามารถกำหนดเป็นค่าคงตัวสำหรับการควบคุมการทดสอบได้เมื่อมีข้อมูลเพิ่มมากขึ้น สำหรับการเตรียมตัวอย่างวัคซีน นอกจากค่า FLU cut-off ปริมาณ mRNA ตั้งต้นในวัคซีนยังมีความสำคัญต่อการเจือจาง เพื่อเตรียมตัวอย่างวัคซีนในการวิเคราะห์หาปริมาณ mRNA อิสระ และปริมาณ mRNA ทั้งหมด ทั้งนี้งานวิจัยนี้ดำเนินการโดยใช้วัคซีนชนิด mRNA ที่มีความเข้มข้นของ mRNA เริ่มต้นที่ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นช่วงของการเจือจางอาจแตกต่างกันไปในวัคซีนที่มีสูตรแตกต่างกัน สุดท้ายเมื่อสามารถวิเคราะห์หาปริมาณ mRNA ในวัคซีนตัวอย่างได้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการคำนวณร้อยละของ mRNA ที่ถูกห่อหุ้ม พบว่าให้ค่าสอดคล้องกับการวิเคราะห์ของผู้ผลิตที่ใช้วิธี Fluorescence Assay ที่ผู้ผลิตแสดงในเอกสารผลิตภัณฑ์ เพื่อให้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ มีการใช้สารมาตรฐานของผู้ผลิตเอง และผ่านการตรวจสอบวิธีเป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยเกณฑ์กำหนดค่าการห่อหุ้ม mRNA ของผลิตภัณฑ์ทั้งสองยี่ห้อกำหนดที่ไม่ต่ำกว่า 85% แสดงให้เห็นว่าวิธีดำเนินการนั้นมีความเป็นไปได้ในการประเมินการห่อหุ้ม mRNA ใน LNP ของวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA ได้ ทั้งนี้ในอนาคตสามารถนำมาตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยต้องแสดงคุณลักษณะของวิธีซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ในการหาปริมาณ mRNA และการห่อหุ้ม mRNA ใน LNP ของวัคซีนตัวอย่าง

ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีสามารถทำได้ตามแนวทาง ของ ICH Q2 (R1) เช่นการประเมินความแม่นยำหรือ Precision (Repeatability และ Intermediate Precision) การทดสอบค่าความเที่ยง (Accuracy) การหาความเป็นเส้นตรง (Linearity) โดยการหา Linear plot ระหว่างปริมาณ mRNA ที่คำนวณได้

(Back calculation concentration) กับปริมาณ mRNA ที่คาดหวัง (Nominal concentration) รวมทั้งหาความทนของวิธี (Robustness) ได้แก่ ระยะเวลาในการอ่านผลการทดสอบ ปริมาณ Triton-X ซึ่งอาจมีความแตกต่างระหว่างผลิตภัณฑ์ รวมทั้งความแรงในการผสม เนื่องจากอาจมีผลต่อสภาวะของ mRNA ได้ เป็นต้น ทั้งนี้การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีสามารถบ่งชี้ได้ว่าวิธีมีมาตรฐานและสามารถใช้สำหรับหาปริมาณ mRNA รวมถึงวิเคราะห์ร้อยละของ mRNA ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนไขมันได้ต่อไป อย่างไรก็ตามจากวัตถุประสงค์ของการพัฒนาวิธี เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์แนวโน้มและความสม่ำเสมอของปริมาณ mRNA และร้อยละการห่อหุ้ม mRNA ใน LNP ของวัคซีน ซึ่งจะสะท้อนคุณภาพของผลิตภัณฑ์และกระบวนการผลิต เมื่อไม่สามารถหาสารมาตรฐานเฉพาะสำหรับผลิตภัณฑ์หรือสารมาตรฐานระดับสากลได้นั้น วิธีนี้ยังสามารถต่อยอดและนำมาเป็นวิธีอ้างอิงหรือวิธีมาตรฐานสำหรับหน่วยงานควบคุมกำกับและผู้ผลิต mRNA วัคซีนได้ เมื่อมีการศึกษาและสอบเทียบสารมาตรฐานร่วมกับผู้ผลิตหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมประเมินวัคซีนให้มีคุณภาพสอดคล้องกับหลักสากลต่อไป

สรุป

วิธีการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาร้อยละการห่อหุ้ม mRNA ในอนุภาคนาโนไขมัน (LNP) ของวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA ด้วยวิธี Fluorescence โดยใช้ยาตรวจวิเคราะห์ปริมาณอาร์เอ็นเอ Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent and Kit สามารถให้ผลการวิเคราะห์ร้อยละการห่อหุ้ม mRNA ใน LNP ในตัวอย่างวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA ได้ แสดงว่าวิธีการทดสอบเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้และผู้ทดสอบของห้องปฏิบัติการนี้สามารถดำเนินการดังกล่าวได้ เป็นการเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการในประเทศไทยให้สูงขึ้นเพื่อรองรับวัคซีนชนิด mRNA-LNP อื่นๆ ได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวรุฬ จตุรกิตตินันท์ ผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุ ที่ให้คำปรึกษา นางสาวสกาลิน ไตรศิริวานิชย์ หัวหน้ากลุ่มวัคซีนไวรัส และขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Centers for Disease Control and Prevention. Understanding mRNA COVID-19 vaccines. [online]. 2022; [cited 2024 May 14]; [3 screens]. Available from: URL: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/119428>.
- วิภากรักษ์ รัตนวิภาณนท์, จิรพงศ์ สุขสิริวรพงศ์. เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับ mRNA COVID-19 vaccine. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 2564 พ.ค. 14]; [7 หน้า]. Available from: URL: <https://pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/575>.
- Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, Verbeke R, Kersten G, Jiskoot W, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: structure and stability. *Int J Pharm* 2021; 601: 120586. (14 pages).
- Hou X, Zaks T, Langer R, Dong Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater* 2021; 6(12): 1078-94.
- World Health Organization. Evaluation of the quality, safety and efficacy of RNA-based prophylactic vaccines for infectious diseases: regulatory considerations (WHO/RNA/DRAFT/22 December 2020). Geneva: WHO; 2020.
- Goswami R, O'Hagan DT, Adamo R, Baudner BC. Conjugation of mannans to enhance the potency of liposome nanoparticles for the delivery of RNA vaccines. *Pharmaceutics* 2021; 13(2): 240. (13 pages).
- Carrasco MJ, Alishetty S, Alameh MG, Said H, Wright L, Paige M, et al. Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration. *Commun Biol* 2021; 4(1): 956. (15 pages).
- Goswami R, Chatzikleanthous D, Lou G, Giusti F, Bonci A, Taccone M, et al. Mannosylation of LNP results in improved potency for self-amplifying RNA (SAM) vaccines. *ACS Infect Dis* 2019; 5(9): 1546-58.
- Jones LJ, Yue ST, Cheung CY, Singer VL. RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Anal Biochem* 1998; 265(2): 368-74.
- Okamoto T, Okabe S. Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. *Int J Mol Med* 2000; 5(6): 657-9.
- Faraldi M, Mangiavini L, Conte C, Banfi G, Napoli N, Lombardi G. A novel methodological approach to simultaneously extract high-quality total RNA and proteins from cortical and trabecular bone. *Open Biol* 2022; 12(5): 210387. (11 pages).
- Bizmark N, Nayagam S, Kim B, Amelemah DF, Zhang D, Datta SS, et al. Ribogreen fluorescent assay kinetics to measure ribonucleic acid loading into lipid nanoparticle carriers. *Adv Mater Interfaces* 2024; 11(17): 2301083. (8 pages).
- Bhowmik BB, Ganguly P. Photophysical studies of some dyes in aqueous solution of Triton X-100. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2005; 62(4-5): 808-13.

14. Hassett KJ, Higgins J, Woods A, Levy B, Xia Y, Hsiao CJ, et al. Impact of lipid nanoparticle size on mRNA vaccine immunogenicity. *J Control Release* 2021; 335: 237-46.
 15. Schober GB, Story S, Arya DP. A careful look at lipid nanoparticle characterization: analysis of benchmark formulations for encapsulation of RNA cargo size gradient. *Sci Rep* 2024; 14(1): 2403. (10 pages).
 16. Patel P, Ibrahim NM, Cheng K. The importance of apparent pKa in the development of nanoparticles encapsulating siRNA and mRNA. *Trends Pharmacol Sci* 2021; 42(6): 448-60.
-

Development of Determination of mRNA Encapsulation in Lipid Nanoparticles of COVID-19 Vaccines using Fluorescence Assay

Natthakarn Mingngamsup¹, Wipawee Wongchana¹, Puthita Chokreansukchai¹, Achira Namjan¹, and Supaporn Phumiamorn²

¹*Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

²*Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

ABSTRACT The mRNA COVID-19 vaccine contains mRNA strands encapsulated in lipid nanoparticles to prevent degradation of the mRNA when injected into the body, and it can effectively induce immunity. The percentage of mRNA encapsulated in lipid nanoparticles is one of the quality control guidelines for vaccine quality established by the World Health Organization. During the pandemic, the manufacturer had not yet revealed the specifications for the relevant test method and standard substances. This study, therefore, explored development of the method using Ribogreen, a fluorescent dye available in commercial kits, to analyze the amount of mRNA in the lipid nanoparticle-encapsulated mRNA COVID-19 vaccine and examine the percentage of mRNA encapsulated. Triton X-100 was added to the vaccine to determine the total mRNA while quantifying the free mRNA; however, Triton X-100 was not necessary. The results showed that the method could be used to analyze the standard RNA amount and monitor the mRNA in the vaccine samples. The linear standard curve was obtained, and the detection ranges were established at 2.5–25 and 50–500 ng/mL for the amounts of low and high mRNA, respectively. All conditions had R^2 values greater than 0.99, and %RE and %CV were less than 10%. The appropriate ranges to dilute the vaccine samples in determining the free mRNA and total mRNA were less than 1:100 and 1:1,000, respectively. The percentage of encapsulated mRNA calculated was found to be close to the results of the manufacturer's method. The method in this study has been proven to have the potential to determine the encapsulated mRNA COVID-19 vaccines, which may be useful for the mRNA vaccines under development, and in clinical studies in Thailand.

Keywords: Covid-19 vaccine, mRNA vaccine, Lipid nanoparticles, Determination of mRNA, Fluorescence assay