



 **片山化学工業株式会社**
Lipid NanoParticle (LNP) のご紹介

LNP (Lipid NanoParticle)

LNPとは

生体内で核酸を細胞内へ導入・作用させるための脂質ナノ粒子。

LNPを構成する脂質には、粒子中に核酸を保持させるため、及び細胞内への導入・エンドソームからの核酸の放出のためにイオン性カチオン脂質 (Ionizable cationic lipid) が使用されている。

代表的なLNP製剤

○ コミナティ (Pfizer-BioNTech社)

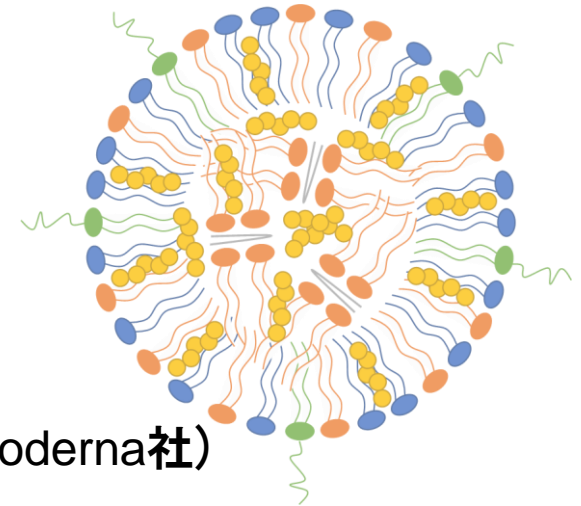
mRNA内包COVID-19ワクチン

○ スパイクバックス (旧COVID-19ワクチンモデルナ)(Moderna社)

mRNA内包COVID-19ワクチン

○ オンパットロ (Alnylam社)

siRNA内包アミロイドーシス治療薬

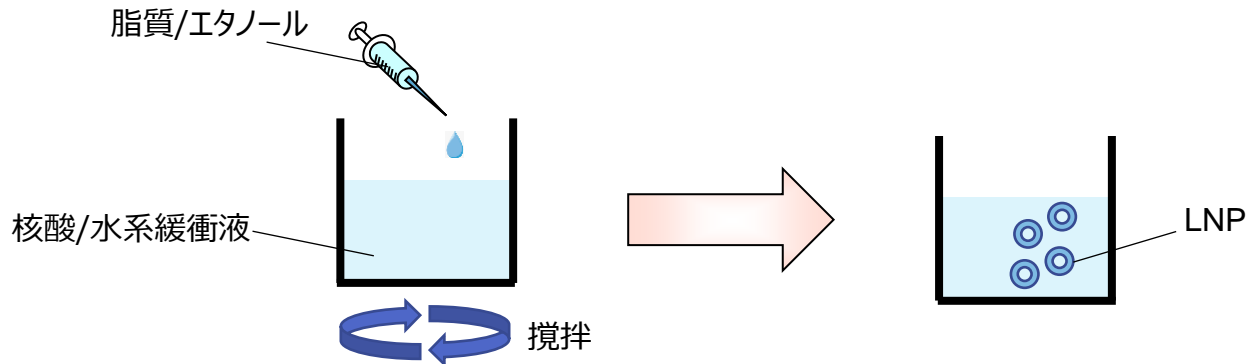


LNPの作製方法

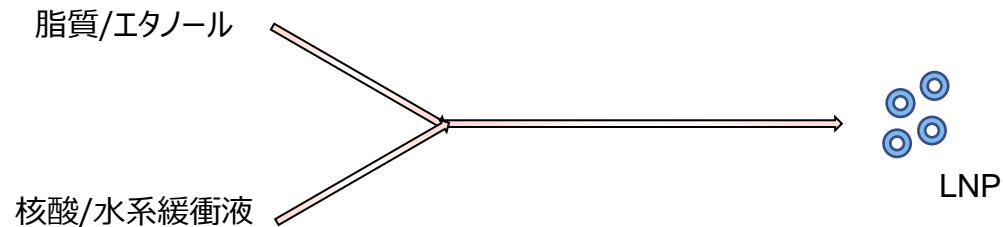
「エタノール希釈法」

脂質/エタノールを核酸/水系緩衝液へ添加・分散させることにより粒子を形成する。

■ バッチタンク内での攪拌による方法



■ マイクロ流路を用いた方法（製法特許）



実施例：作成方法による違い

核酸:ssDNA

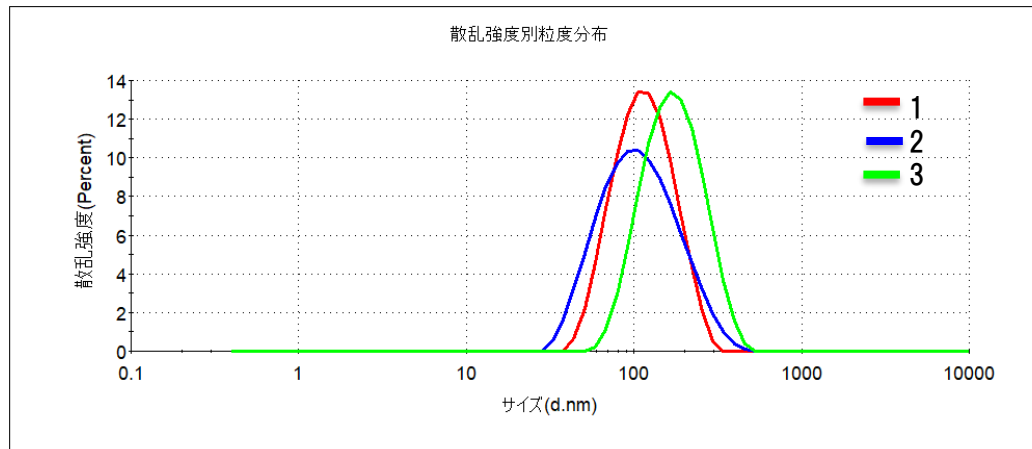
脂質組成

脂質	モル比 (%)
DOTAP	40.0
DMG-PEG ₂₀₀₀	2.0
DSPC	10.0
Chol	48.0





LNP物性データ

No.	作製方法	平均粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)	脂質濃度 (mg/ml)	核酸濃度 (μg/mL)	核酸保持率 [※] (%)
1	スターラーによる攪拌	104	0.142	45	4.0	121	98
2	A社マイクロ流路	95	0.212	41	3.0	113	91
3	B社マイクロ流路	155	0.141	43	2.8	69	56

$$\text{※ 核酸保持率 (\%)} = \frac{\text{核酸濃度}}{\text{仕込核酸濃度}} \times 100$$

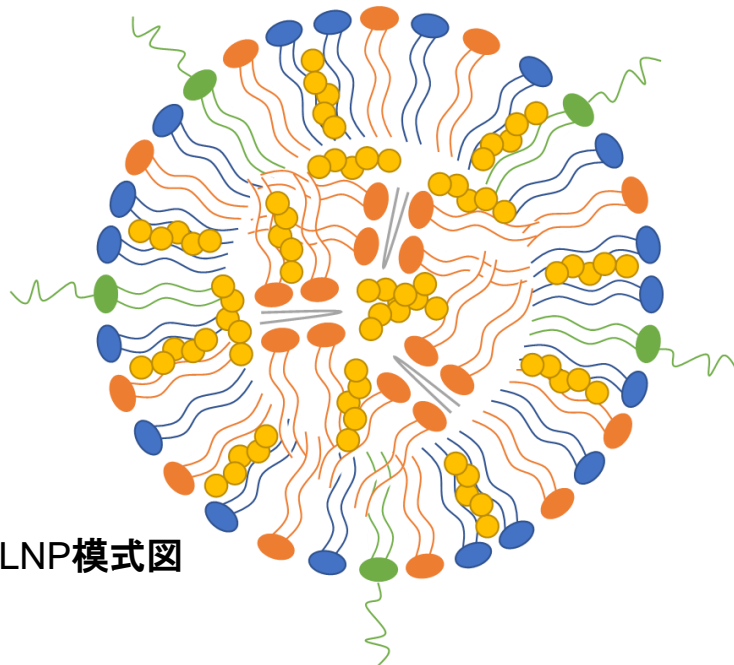


LNPの脂質組成

	コナティ組成		スパイクボックス組成		オンパットロ組成	
	脂質	モル比 (%)	脂質	モル比 (%)	脂質	モル比 (%)
 カチオン脂質	ALC-0315	46.3	SM-102	50.0	D-Lin-MC3-DMA	50.0
 PEG脂質	ALC-0159	1.6	DMG-PEG ₂₀₀₀	1.5	DMG-C-PEG ₂₀₀₀	1.5
 DSPC	DSPC	9.4	DSPC	10.0	DSPC	10.0
 コレステロール	Chol	42.7	Chol	38.5	Chol	38.5

DSPC: ジステアロイルホスファチジルコリン。リポソーム製剤でも使われている脂質。

参考文献: *International Journal of Pharmaceutics*, 601(2021), 120586



LNP模式図

※ LNPの脂質組成比について特許がとられており、各社脂質を変えて独自の製剤としている。

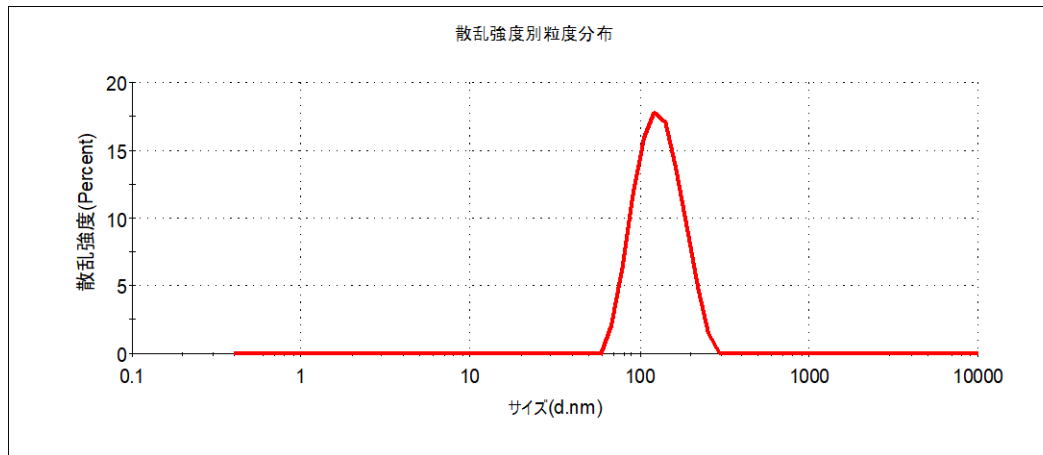
実施例：コミナティ組成

核酸:Fluc-mRNA	脂質組成	脂質	モル比 (%)
		ALC-0315	46.3
		ALC-0159	1.6
		DSPC	9.4
		Chol	42.7

LNP物性データ

平均粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)	脂質濃度 (mg/ml)	核酸濃度 (μg/mL)	仕込核酸濃度 (μg/mL)	核酸保持率 ^{※1} (%)	内包率 ^{※2} (%)
122.6	0.087	-19.7	2.49	96	100	96	83

^{※1} 核酸保持率 (%) = $\frac{\text{核酸濃度}}{\text{仕込核酸濃度}} \times 100$
 ^{※2} 内包率 (%) = $\frac{\text{Triton X100(+)核酸濃度} - \text{Triton X100(-)核酸濃度}}{\text{Triton X100(+)核酸濃度}} \times 100$



実施例：スパイクバックス組成

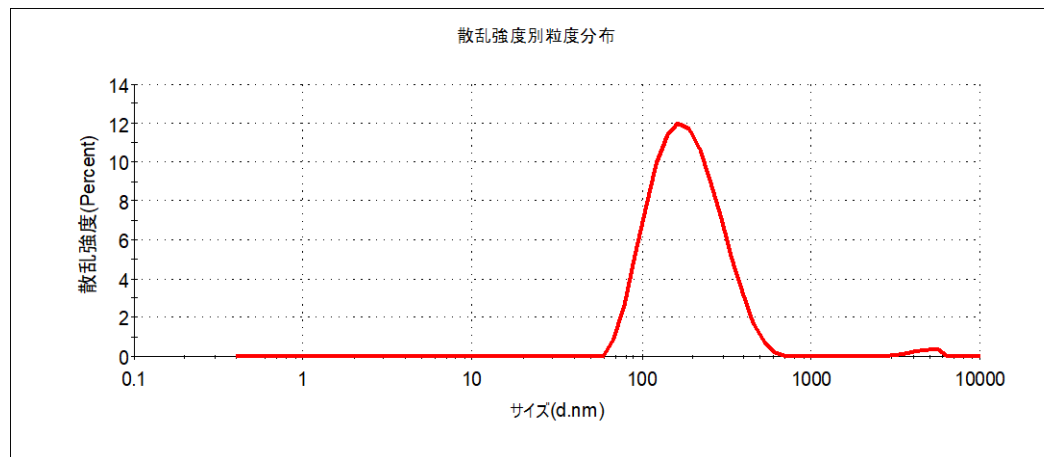
核酸:Fluc-mRNA	脂質組成	脂質	モル比 (%)
		SM-102	50.0
		DMG-PEG ₂₀₀₀	1.5
		DSPC	10.0
		Chol	38.5

LNP物性データ

平均粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)	脂質濃度 (mg/ml)	核酸濃度 (μg/mL)	仕込核酸濃度 (μg/mL)	核酸保持率 ^{※1} (%)	内包率 ^{※2} (%)
166.4	0.187	0.417	1.29	77	100	77	93

$$\text{※1 核酸保持率 (\%)} = \frac{\text{核酸濃度}}{\text{仕込核酸濃度}} \times 100$$

$$\text{※2 内包率 (\%)} = \frac{\text{Triton X100(+)}\text{核酸濃度} - \text{Triton X100(-)}\text{核酸濃度}}{\text{Triton X100(+)}\text{核酸濃度}} \times 100$$



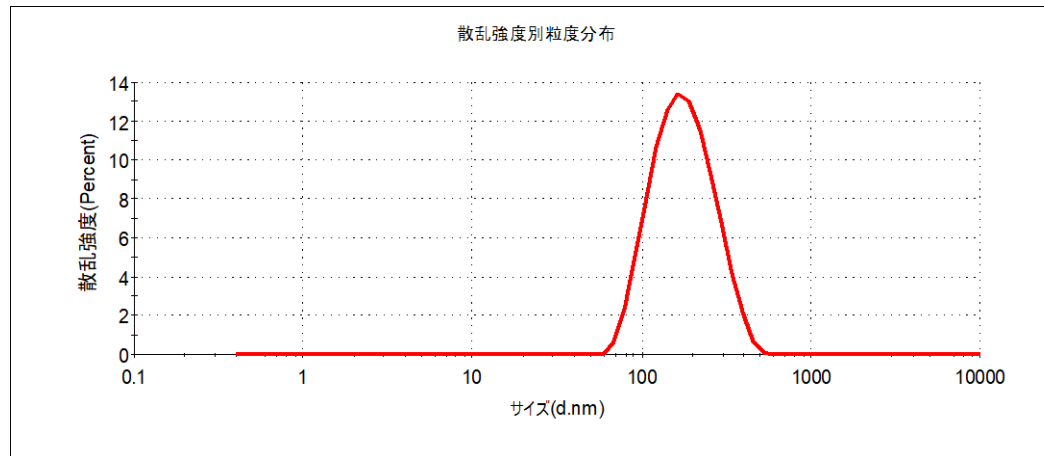
実施例: オンパットロ組成

核酸: Fluc-mRNA	脂質組成	脂質	モル比 (%)
		D-Lin-MC3-DMA	50.0
		DMG-C-PEG ₂₀₀₀	1.5
		DSPC	10.0
		Chol	38.5

LNP物性データ

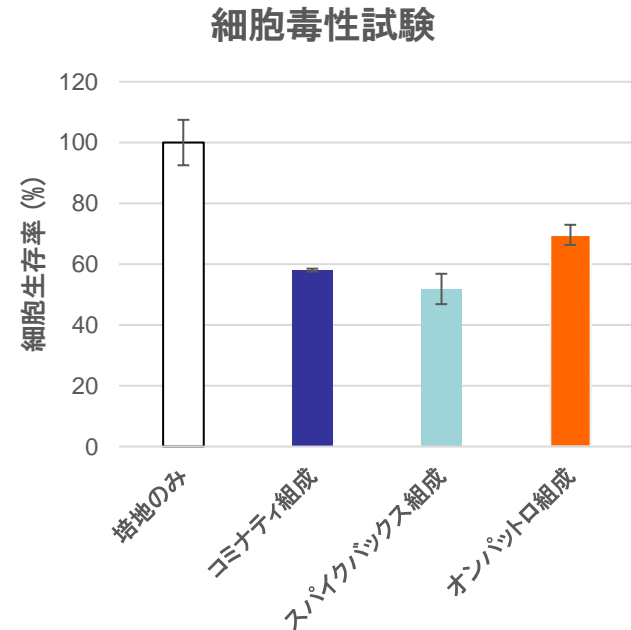
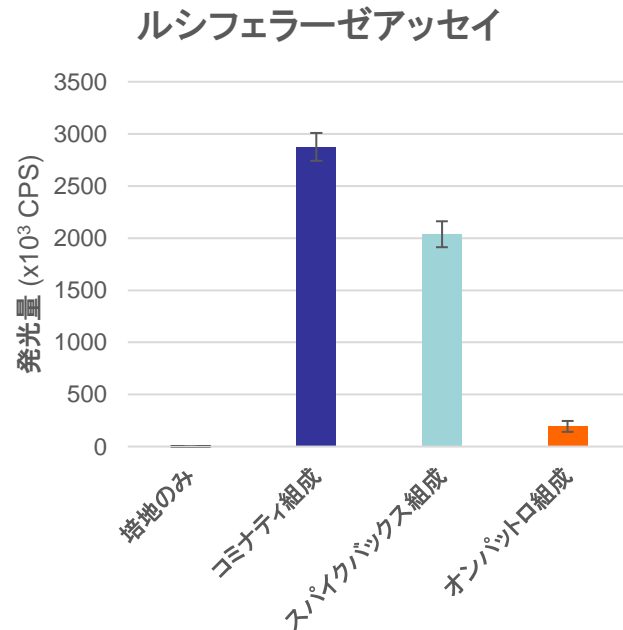
平均粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)	脂質濃度 (mg/ml)	核酸濃度 (μg/mL)	仕込核酸濃度 (μg/mL)	核酸保持率 ^{※1} (%)	内包率 ^{※2} (%)
162.5	0.143	9.38	1.38	64	100	64	87

^{※1} 核酸保持率 (%) = $\frac{\text{核酸濃度}}{\text{仕込核酸濃度}} \times 100$
^{※2} 内包率 (%) = $\frac{\text{Triton X100(+)}\text{核酸濃度} - \text{Triton X100(-)}\text{核酸濃度}}{\text{Triton X100(+)}\text{核酸濃度}} \times 100$



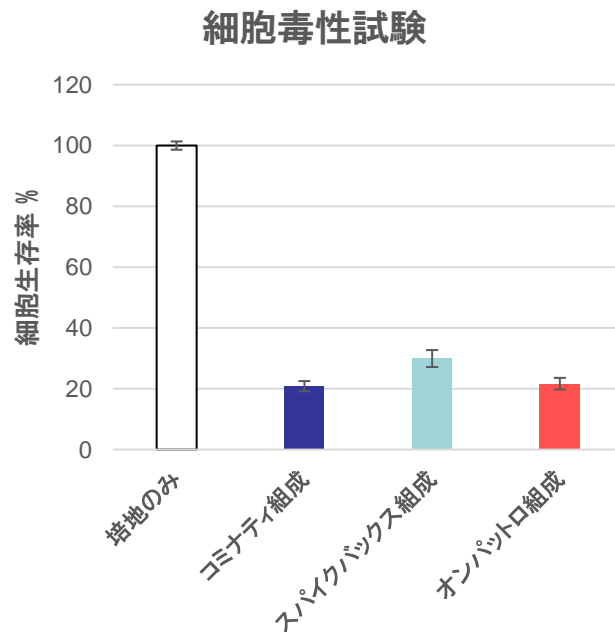
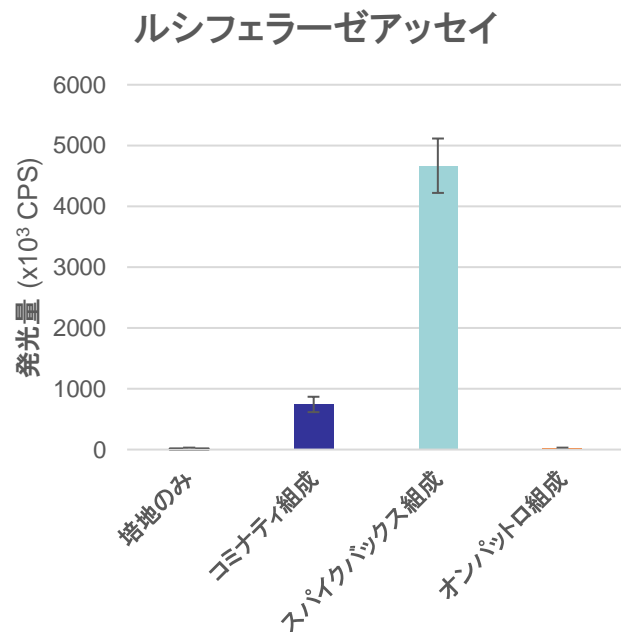
実施例：各組成LNPでのmRNA導入効率比較2

- Day 0 1.4 × 10⁴個のマウス腹水由来マクロファージ様細胞(RAW264.7)を96 well plateで培養。
- Day 1 0.025 μg mRNA相当量のmRNA-LNPを細胞に添加。
↓ 48時間後
- Day 3 PBS洗浄後、細胞を溶解して溶液中のルシフェラーゼ活性を測定。
細胞毒性試験では、4時間前に10 μLのWST-8を添加し450 nmの吸光度を測定。



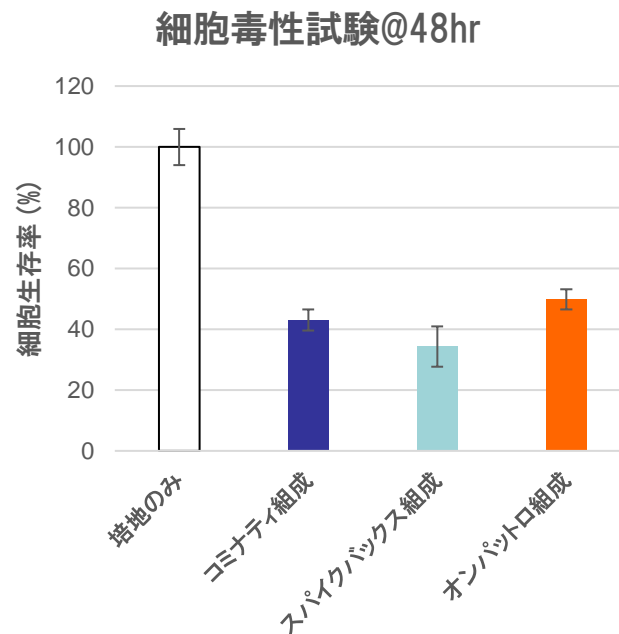
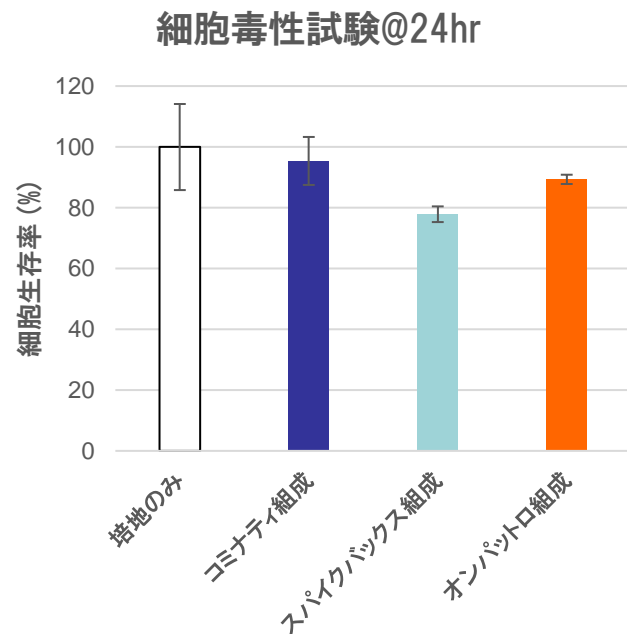
実施例：各組成LNPでのmRNA導入効率比較

- Day 0 1.4 × 10⁴個のマウス腹水由来マクロファージ様細胞(RAW264.7)を96 well plateで培養。
- Day 1 0.2 μg mRNA相当量のmRNA-LNPを細胞に添加。
↓ 48時間後
- Day 3 PBS洗浄後、細胞を溶解して溶液中のルシフェラーゼ活性を測定。
細胞毒性試験では、4時間前に10 μLのWST-8を添加し450 nmの吸光度を測定。



実施例：時間によるmRNA導入効率比較

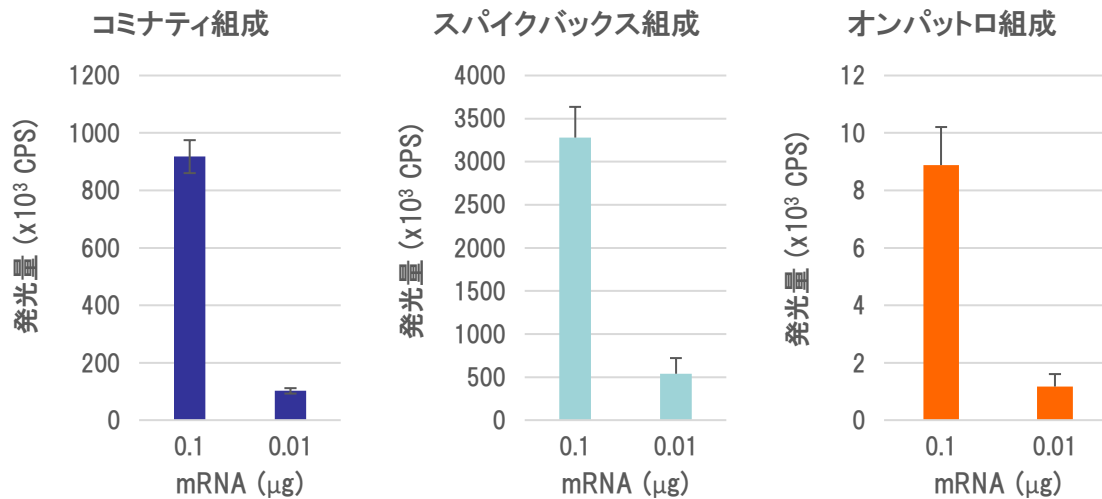
- Day 0 1.4×10^4 個のマウス腹水由来マクロファージ様細胞(RAW264.7)を96 well plateで培養。
Day 1 $0.1 \mu\text{g}$ mRNA相当量のmRNA-LNPを細胞に添加。
↓ 24または48時間後
Day 2, 3 $10 \mu\text{L}$ のWST-8を添加し4時間前に450 nmの吸光度を測定。



実施例: mRNA量による導入効率比較

- Day 0 1.4 × 10⁴個のマウス腹水由来マクロファージ様細胞(RAW264.7)を96 well plateで培養。
Day 1 0.1または0.01 μg mRNA相当量のmRNA-LNPを細胞に添加。
↓ 24時間後
Day 2 10 μLのWST-8を添加し4時間前に450 nmの吸光度を測定。

ルシフェラーゼアッセイ



細胞毒性試験

