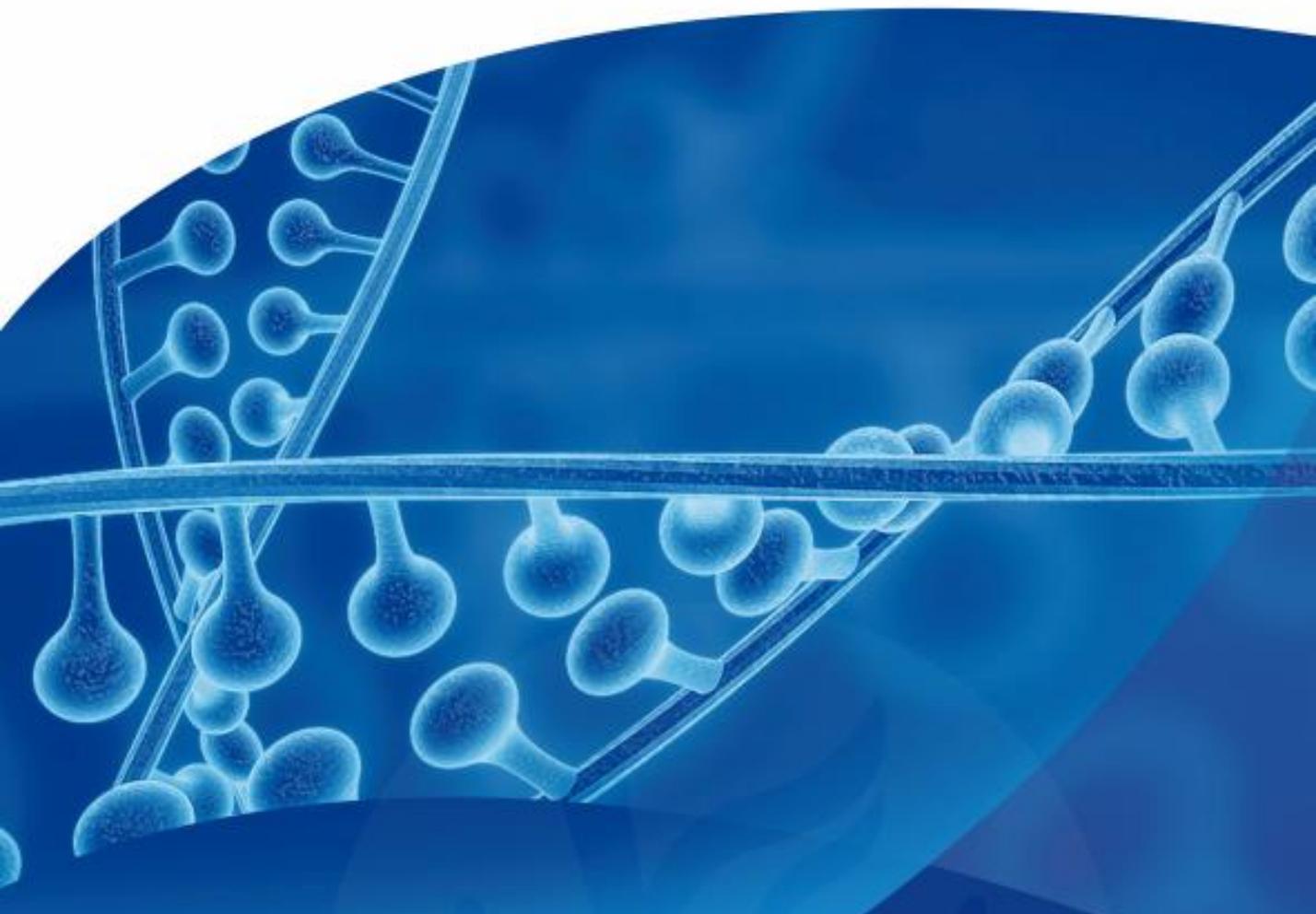


LNP-RNA包封 基础知识手册



咨询电话：133 8033 2910
耀海生物技术(北京)有限公司

扫码
关注



LNP脂质组分及比例

脂质纳米颗粒（LNP）的成功是RNA药物开发的重大突破，LNP主要组分包括可电离阳离子脂质、PEG脂质、磷脂和胆固醇。

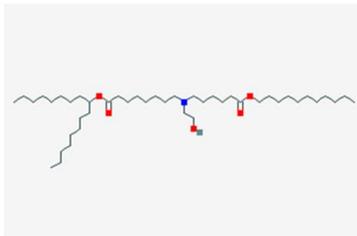
当前获批上市的RNA-LNP产品包括：治疗转甲状腺素蛋白淀粉样变性（hATTR）的小干扰RNA药物Onpattro（patisiran）、COVID-19 mRNA疫苗（以辉瑞和Moderna为代表）、以及Moderna的呼吸道合胞病毒（RSV）疫苗mRNA-1345、Arcturus/CSL开发的1款自复制RNA（saRNA）疫苗。热门RNA-LNP产品的LNP组分如下：

RNA Product	mRNA-1273	BNT162b2	ARCT-154	Patisiran
Drug class	mRNA vaccine	mRNA vaccine	Self-amplifying RNA vaccine	RNA Interference (RNAi)
Brand name	Spikevax	Comirnaty	Kostaive	Onpattro
Company	Moderna	BioNTech/Pfizer	CSL/Arcturus/Meiji	Alnylam
Ionized lipid	SM-102	ALC-0315	ATX-126	DLin-MC3-DMA
Phospholipid	DSPC	DSPC	DSPC	DSPC
Cholesterol	Cholesterol	Cholesterol	Cholesterol	Cholesterol
PEG-lipid	PEG2000-DMG	ALC-0159	PEG2000-DMG	PEG2000-DMG
Molar ratio	50:10:38.5:1.5	46.3:9.4:42.7:1.6	50:7:40:3	50:10:38.5:1.5

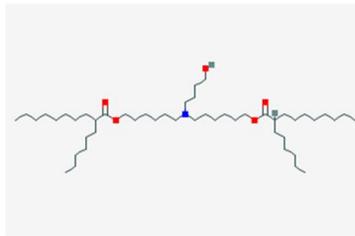
可电离阳离子脂质（Ionizable Cationic Lipid）是LNP的关键组分之一，通过静电作用与带负电荷的RNA结合，形成稳定的复合物。同时，可电离阳离子脂质可以促进LNP释放RNA到细胞质。

阳离子脂质是LNP中占比最大的组分（摩尔比约50%），也是企业关于LNP的主要创新点。几款热门RNA-LNP产品中的阳离子脂质结构如下：

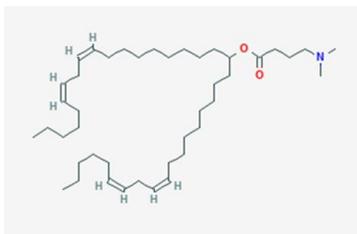
SM-102



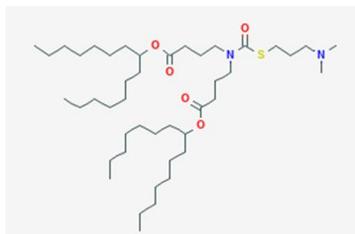
ALC-0315



DLin-MC3-DMA



ATX



自复制mRNA的包封方法

脂质纳米颗粒（LNP）是目前领先的非病毒递送载体，作为COVID-19 mRNA疫苗的一部分，LNP在临床转化方面取得诸多令人兴奋的进展。LNP具有体积小、生物相容性和降解性等特征，可有效助力mRNA在癌症疫苗、传染病疫苗、蛋白质替代疗法、基因编辑和罕见病治疗等方面的广阔前景。

LNP-RNA包封方法

目前实验室主流的制备LNP的方法包括乙醇稀释法、手动混合法、T型混合法和微流控法。

手动混合法

手动混合法，也成为移液器混合法，是实验室制备小批量LNP的最常用方法。手动混合法操作简单、成本低，通常适用于~6/18至~30/90（ $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ ，乙醇/水溶液）规模。手动混合法制备的LNP-RNA可用于体外实验。

操作步骤:

- 1) 脂质和mRNA样品的制备：将脂质组分溶解于乙醇中，mRNA溶解于酸性水溶液中；
- 2) 使用移液器将mRNA缓冲液快速加入脂质混合溶液中，立即上下快速吹打20~30 s，完成手动混合操作；
- 3) 透析去除乙醇、并换液至PBS缓冲液中。



涡旋混合法

涡旋混合法，是在强烈的涡旋作用下快速混合mRNA与脂质溶液以形成纳米颗粒。相比手动混合法，涡旋混合法适用于稍大批量LNP的包封，适用于~20/60至~40/120($\mu\text{L}/\mu\text{L}$ ，乙醇/水溶液)规模。涡旋混合法常用于体外研究样品的制备。

操作步骤:

- 1) 脂质和mRNA样品的制备：将脂质组分溶解于乙醇中，mRNA溶解于酸性水溶液中；
- 2) 将含mRNA的水相在旋涡混合器上以中速旋转，然后将含脂质-乙醇混合液添加到涡旋中的水相中，将混合液继续旋转20~30s；
- 3) 透析去除乙醇、并换液至PBS缓冲液中。



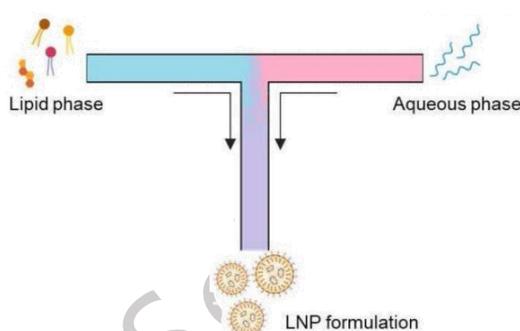
T型混合法

相比实验室常用的移液器混合和涡旋混合法，T型混合器更适合较大规模的LNP-RNA包封。T型混合器可以稳定控制脂质相和水相的流速，工艺流程较为可控。

然而，T型混合器通道较短，混合时间短，易形成不均匀的纳米颗粒脂质和脂质聚集体。

操作步骤：

- 1) 制备含脂质组分的乙醇、含mRNA的水相；
- 2) 将两相溶液连接至单一蠕动泵的双泵头；
- 3) 设置泵流速，将两相溶液按一定比例泵入T型混合器的入口；
- 4) 收集的样品经透析去除乙醇，最终保存在PBS缓冲液中。



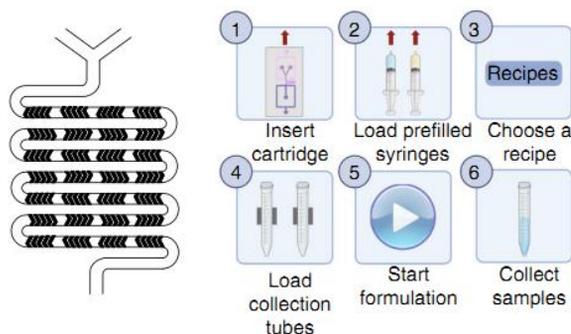
微流控混合法

实验室通常使用自制的定制微流控混合装置或商业混合系统（如NanoAssemblr）。有机相和水相被泵入两个入口，由人字形结构引起的混沌湍流导致两相快速混合，从而产生具有高度均匀的纳米颗粒。

微流控包封适用于1-20mL（如NanoAssemblr Ignite）至0.01-1L（如NanoAssemblr Blaze）的实验室规模以及中试生产规模。使用微流控制备LNP的最大优势为质量可控、且重现性高。微流控制备的LNP-RNA样品适用于动物体内研究和临床研究。

操作步骤：

- 1) 制备含脂质组分的乙醇、含mRNA的水相；
- 2) 将两相溶液分别转移至注射器中，去除气泡后接通至微流控设备；
- 3) 设置微流控参数：总进样量、乙醇相和水相的流速、排废体积；
- 4) 收集的样品经透析去除乙醇，最终保存在PBS缓冲液中。



不同LNP-RNA包封方法的比较

包封方法	优势	劣势
乙醇稀释法 (移液器或涡旋混合)	<ul style="list-style-type: none">◆ 操作简单◆ 成本低	<ul style="list-style-type: none">◆ 重复性差◆ 包封效率较低◆ 粒径不可控◆ 仅适合实验室规模
T型混合器	<ul style="list-style-type: none">◆ 重复性较高◆ 包封效率较高◆ 粒径相对可控	<ul style="list-style-type: none">◆ 流速高混合时间短◆ 不适合实验室规模◆ 粒径分布适中
微流控混合	<ul style="list-style-type: none">◆ 重复性较高◆ 包封效率较高◆ 粒径相对可控◆ 分散系数低◆ 适用于实验室和工业化规模	<ul style="list-style-type: none">◆ 成本较高

耀海生

微流控包封前的样品处理

脂质-乙醇溶液配制

阳离子脂质 ALC-0315 (BioNTech BNT-162b2)

名称	摩尔比%	分子量	1 mM投放量 (mg/L)
ALC-0315	46.3	766.3	354.80
DSPC	9	790.1	71.11
Cholesterol	42.7	386.7	165.12
ALC-0159	1.6	2464.2	39.43
无水乙醇		1000 ml*	

阳离子脂质 SM-102 (Moderna mRNA-1273)

名称	摩尔比%	分子量	1 mM投放量 (mg/L)
SM-102	50	710.2	355.10
DSPC	10	790.1	79.01
Cholesterol	38.5	386.7	148.86
PEG2000	1.5	2509.2	37.64
无水乙醇		1000 ml*	

阳离子脂质 D-LIN-MC3 (Alynam Onpattro)

名称	摩尔比%	分子量	1 mM投放量 (mg/L)
D-LIN-MC3	50	642.1	321.05
DSPC	10	790.1	79.01
Cholesterol	38.5	386.7	148.86
PEG2000	1.5	2509.2	37.64
无水乙醇		1000 ml*	

备注：* 总体积1000ml供参考，通常实验室实际配液体积较少，现用现配【阳离子脂质易氧化，建议分装后冻存，现用现配。其它脂质可用乙醇配置为高浓度母液，保存在4℃或者-20℃】。

LNP包封常用的脂质浓度为8 mM、12 mM和16 mM。

RNA浓度计算

氮磷比（N/P）是RNA-LNP包封中的常用参数，用来计算核酸和脂质的浓度比。

- ◆ 每个碱基含有一个磷酸根，1 mol的核糖核苷酸包含1 mol的磷酸基团。核糖核苷酸的平均分子量为339.5，形成RNA脱水聚合后计算均值为320.5 g/mol。
- ◆ 脂质中以可电离脂质比例计算氮原子数，每个可电离脂质包含1个氮原子（D-LIN-MC3、ALC-0315、SM-102）。以可电离脂质占比50%计算，每摩尔总脂质中包含0.5 mol的氮原子。

$$N/P = \frac{0.5 \times \text{脂质摩尔数}}{\text{RNA摩尔数}}$$

N/P=6

每摩尔（mol）总脂质包封的RNA量为： $\frac{0.5 \times 1}{6} \times 320.5 = 26.71 \text{ g}$

每毫摩尔（mmol）总脂质包封的RNA量为：26.71 mg

考虑到水相与乙醇相的流速比为3:1，每mM总脂质对应使用的RNA浓度为： $\frac{26.71}{3} \text{ mg/l} = 8.90 \text{ ng/}\mu\text{l}$ ；

根据实际使用的脂质浓度（mM）即可换算得到对应的RNA浓度。

常用的脂质-RNA浓度表

碳氮比（N/P）		6			8	
脂质浓度（mM）	8	12	16	8	12	16
流速比	3	3	3	3	3	3
RNA浓度（ng/μl）	71.23	106.84	142.45	53.42	80.12	106.83

微流控包封流程

我们以Ignit为例描述LNP-RNA包封的详细流程，Ignit是Precision NanoSystems（PNI）的Nanoassembler平台推出的微流控混合仪，适用于LNP、脂质体等纳米药物的制备。

PNI微流控设备可以实现纳米颗粒组分在纳升水平以毫秒混合，高效保证混合效果。通过结合优化、精确的泵送和独特的微流体混合特性，能够快速制备纳米药物。



耀海生物RNASci平台微流控包封设备

微流控包封流程：

- 1) 料液准备：按一定用量配置水相和有机相；水相包含缓冲液和RNA，有机相为一定比例的脂质混合物：阳离子脂质、中性脂质、胆固醇和PEG脂质；
- 2) 分别将水相溶液和有机相溶液吸入3 ml注射器中，并排出注射器中的空气。将注射器出口和样品导入管连接，并固定在注射泵上；
- 3) 仪器设置，设置总流速（TFR）、总体积、水相/有机相流速比（FRR）、排废体积；
- 4) 运行仪器，并用收集管收集样品；
- 5) 通过超滤或透析经LNP-RNA换液至特定缓冲液。

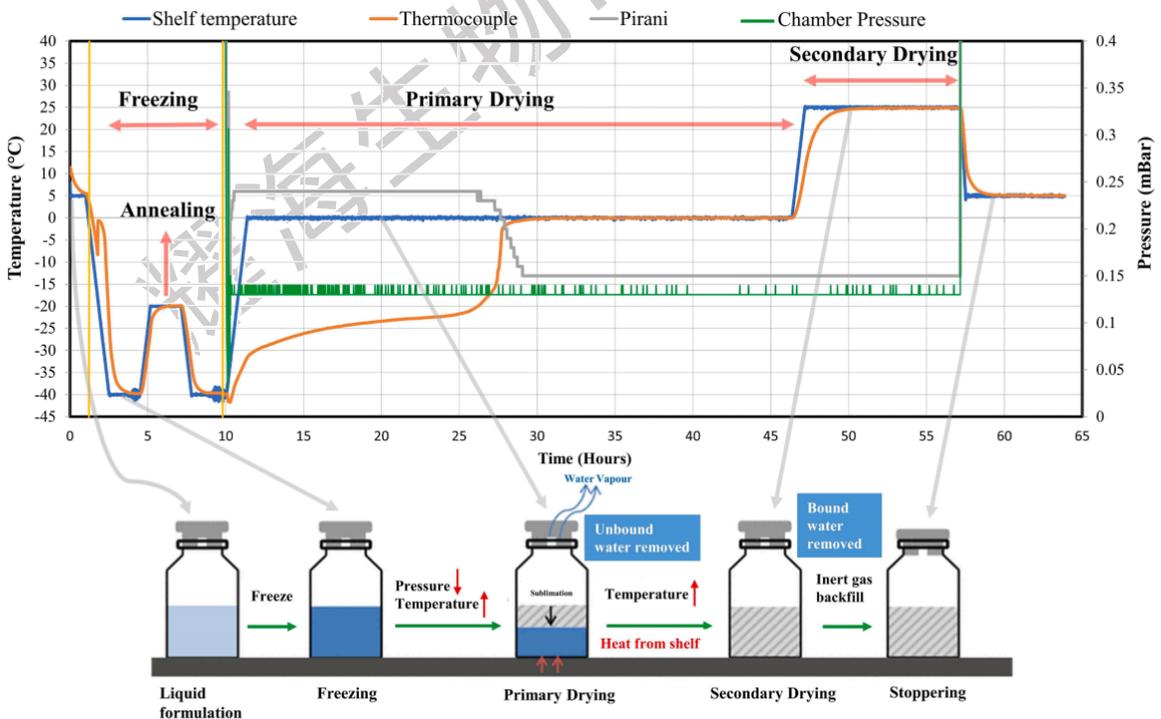
RNA-LNP冻干工艺

冷冻储存是当前mRNA-LNP疫苗的劣势。大多类型的疫苗通常在2°C~8°C的条件下储存，而mRNA-LNP疫苗需在-20°C或以下冷冻储存。例如，辉瑞/BioNTech疫苗BNT162b2的推荐储存温度是-80°C~ -60°C，Moderna疫苗mRNA-1273是-20°C，这无疑增加了疫苗的运输和储存成本。

制药行业常通过冷冻干燥（冻干）的方法提高药品的稳定性和保质期。开发mRNA-LNP的冷冻干燥工艺，有助于降低其运输和储存成本。

冷冻干燥通常包括三个过程：预冻、一次干燥和二次干燥。

- **预冻**：通常在-40°C至-60°C的超低温下进行，以确保结晶成分在低于共晶点（ T_m , eutectic temperature）的温度下凝固、或者在玻璃化转变温度（ T_g' , glass transition temperature）以下形成无定型结构。在预冻工艺过程中，温度、速度和时间是重要的控制参数。
- **一次干燥**（升华干燥），在超低压下将冷直接转化成水蒸气，这一过程主要去除自由水。一次温度范围常设置为-40°C至20°C，时间从几小时到几天。
- **二次干燥**（解析干燥），这一阶段会进一步去除结合水，有效去除残留的水分。二次干燥的温度通常高于环境温度。



DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.121115.

冻干周期示意图

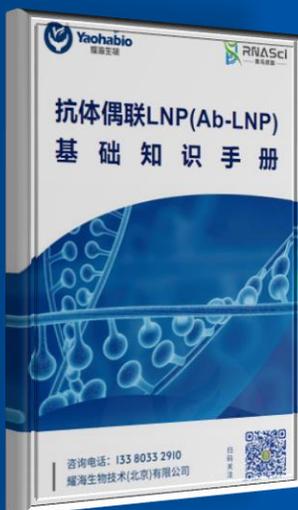
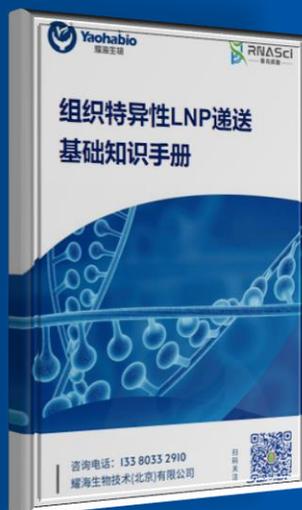
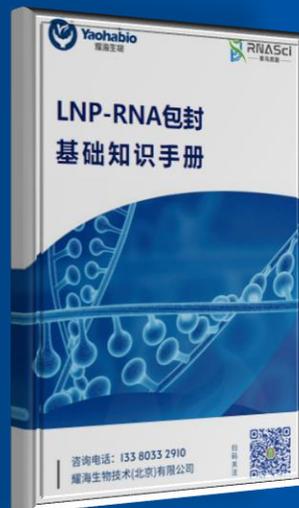
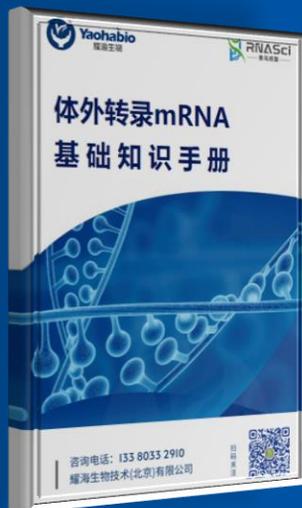
LNP分批冻干工艺

RNA类型	缓冲液	冻干保护剂	冻干工艺	研究单位	参考文献
mRNA	5 mM Tris, pH 8.0	10%蔗糖+10%麦芽糖	预冻: -45°C 3h 一次干燥: -45°C, 84h 二次干燥: 30°C, 5h	宾夕法尼亚大学	PMID: 35131437
mRNA	20 mM Tris, pH 7.5	16%蔗糖	预冻: -40°C 4h 一次干燥: -40°C, 45h 二次干燥: 10°C, 66h	日本卫材制药	PMID: 36187052
mRNA	Opti-MEM或SPM CG	10%蔗糖	预冻: -40°C 一次干燥: -30°C 二次干燥: 20°C	兰州大学第二医院	PMID: 35814615
circRNA	未知	甘露糖修饰LNP	预冻: -45°C 2h 一次干燥: -25°C, 45h 二次干燥: 25°C, 4h	华中农业大学	PMID: 38078742
mRNA	无酶水	20%蔗糖	预冻: -40°C 2h 一次干燥: -35°C, 24h 二次干燥: 25°C, 5h	比利时根特大学	PMID: 37073472
mRNA	PBS	8.8%蔗糖 + 2%海藻糖 + 0.04%甘露醇	预冻: 4h 一次干燥: 2h 二次干燥: 2h 未知温度	天津科技大学 & 康希诺	PMID: 37813912
saRNA	PBS	10%蔗糖	初始冷冻: -20°C, 24h 冻干温度: -60°C, 24h	麻省理工	PMID: 36414195
mRNA	未知	未知	预冻: -40°C 干燥: 25°C, 40h	深圳瑞吉生物 & 武汉大学	PMID: 36683074
mRNA	5 mM Tris	20%麦芽糖	预冻: -50°C, 5h 一次干燥: -15°C, 12h 二次干燥: 30°C, 7h	西班牙CerTest生物技术公司	PMID: 39408932
mRNA	Tris或乙酸缓冲液	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)	预冻: -50°C 一次干燥: -40°C 二次干燥: 25°C 未知时间	罗氏旗下Genentech	PMID: 39059500
mRNA/gRNA	无酶水	10%蔗糖+10%麦芽糖	预冻: -80°C, 1h 干燥: -25°C, 24h	山东大学	PMID: 38266942
mRNA	PBS	8.7%蔗糖	预冻: -30°C, 3h 一次干燥: -25°C, 16-18h 二次干燥: 22-27°C, 5h	温州医科大学	PMID: 39067550
mRNA/gRNA	PBS	蔗糖	未知	日本千叶大学	PMID: 36719091

LNP连续冻干工艺

mRNA	20 mM Tris 或 10 mM磷酸缓冲液, pH 7.4	12.5%蔗糖	旋转冷冻, -60°C 真空干燥	比利时根特大学	PMID: 36958400
mRNA	无酶水	20%蔗糖	旋转冷冻, -60°C 真空干燥	比利时根特大学	PMID: 37073472

IVT RNA & LNP 系列手册



联系方式

电话: 133 8033 2910

邮箱: CRO@yaohaibio.cn

网站: www.yaohaibio-pharma.com

地址: 北京市大兴区生物医药基地好景象科技园C座4楼

