

ユーザーインストラクション: LNP-mRNA (In Vivo用)

メッセンジャーRNA (mRNA) は、様々な疾患を予防あるいは治療するための、新たな医薬品として注目されています。mRNAを生体内で適切に機能させるためには、mRNAを分解から保護し、細胞に取り込ませ、細胞内に放出させる、安全で効果的かつ安定したデリバリーシステムが必要です。これらの課題を克服するために開発された、脂質ナノ粒子(LNP)-mRNA製剤は、mRNA分子がLNPの内部コアにカプセル化され、静電相互作用によって細胞膜脂質と会合します。LNP-mRNA製剤の生体内投与には、適切な安全対策と取り扱い技術が必要です。

保存と取り扱い

LNP-mRNA製剤の長期安定性は、保存条件に影響を受けます。当社製品はスクロース(凍結保護剤)を添加し、ドライアイス出荷しております。受け取り後は-80°Cで保存し、凍結融解の繰り返しは避けてください。

融解および希釈の手順

1. LNP-mRNA は冷蔵庫(2°C~8°C)または氷上で解凍してください。
 2. In vivoで使用する場合、LNP-mRNA は室温に戻してから使用してください。希釈前であれば、このまま1時間室温で保存できます。
 3. LNP-mRNA が室温になったら、バイアルを静かに数回転倒させて下さい。振とうはしないでください。
- 注: 溶解した LNP-mRNA は無色からわずかに白色です。**
4. 必要に応じてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈してください。

投与経路

投与経路はLNP-mRNA製剤の生体内分布、発現、および治療成績に大きく影響します。ヒト試験では、筋肉内投与(i.m.)や皮下投与(s.c.)などの局所投与経路、および静脈内投与(i.v.)の両方において、高忍容性用量で、強力な免疫応答を誘導することが報告されています。投与経路は、期待する治療効果に合わせて選択する必要がありますが、例えば、LNP-mRNA製剤のi.v.投与では、血液疾患で欠乏しているタンパク質を補ったり、血液中に存在する病原体に対する中和抗体を生成することができます。

マウス筋肉内注射 (i.m.) プロトコール

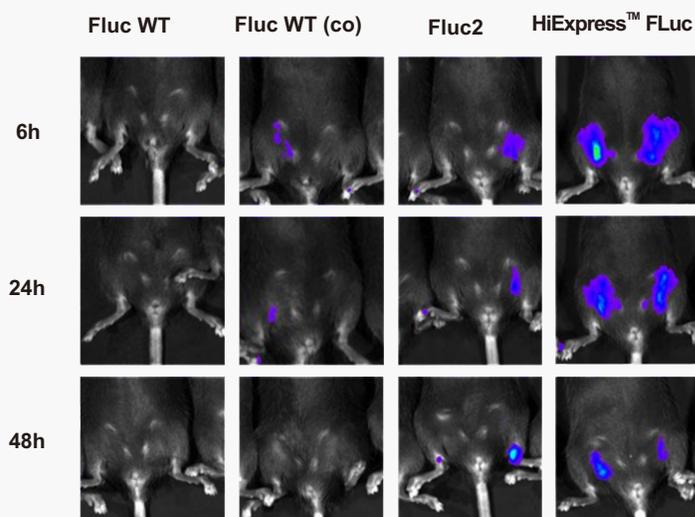
実験器具

22-25ゲージ(1/2インチ) 針付き0.5mlシリンジ

手順

1. 利き手でない方の手で背中中の皮膚をつかみマウスを保定します。
 2. 坐骨神経を避けながら、大腿骨にあたらないよう、針を後肢の大腿筋に刺します。
- 注:** 注射前に70%エタノールで注射部位を消毒する必要はありません。注射針とシリンジは動物ごとに新しいものを使用してください。
3. プランジャーを引いてシリンジを吸引します。血液が見られた場合は、注射針の位置が不適切であるため、注射針の位置を変更する必要があります。
 4. LNP-mRNA 製剤をゆっくり、着実に投与します。
- 注:** マウス大腿部筋肉注射の場合、1部位あたりの注射量は 100 μ l 未満が理想的です。

LNP-mRNA筋肉内注射の検証

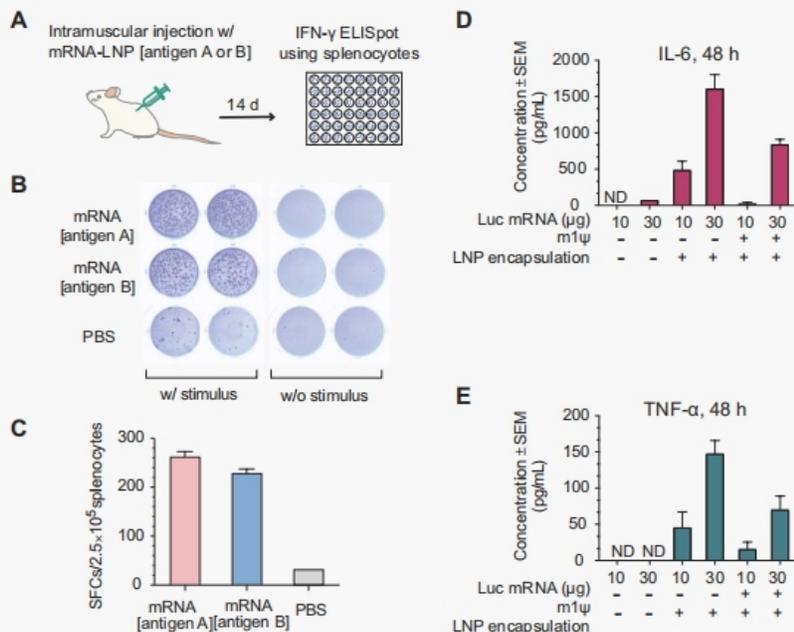


HiExpress™ Firefly Luciferase IVT mRNAのin vivo発現。成体C57BL/6マウスに30 μ gのLNPカプセル化mRNAを筋肉内注射し、注射6時間、24時間、48時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。FLuc WTは野生型ホタルルシフェラーゼ、FLuc WT (co)はコドン最適化した野生型ホタルルシフェラーゼ、FLuc2はLuc2ホタルルシフェラーゼを示す。

安全上の注意

LNP-mRNA製剤の脂質成分は、宿主の免疫反応を活性化する可能性があります。細胞性免疫や液性免疫の誘導はワクチン接種においては有利ですが、その免疫原性については注意が必要です。また、カチオン性・イオン化性脂質は、炎症性サイトカインの分泌を促進することが報告されており、LNP-mRNA製剤の投与により、不要な炎症が生じる可能性があります。このため、LNP-mRNA製剤は、炎症や臓器障害などの副作用の可能性について、スクリーニングをする必要があります。また、LNP-mRNA製剤投与後には、特定の脂質に対する抗体が産生されることがあります。これはその後投与されるLNP-mRNAの全身クリアランスを早め、LNPにカプセル化された薬物の活性を低下させる可能性があるため注意が必要です。このようなリスクを回避するため、LNP-mRNAの生体内分布および免疫原性の評価試験が必要となります。

免疫原性スクリーニング例



LNP-mRNA投与時の免疫原性スクリーニング。(A) 8週齢のBalb/Cマウスに、ウイルス抗原A、およびウイルス抗原BをコードするmRNA、またはコントロールとしてPBSをLNPカプセル化したもの各30 μ gを筋肉内注射した。筋肉内注射の14日後に、脾臓細胞でIFN- γ ELISpotアッセイを行った。(BおよびC)スポット形成細胞(SFC)は、mRNA-LNP注入が脾臓細胞のIFN- γ 分泌を刺激したことを示す。(CおよびE)注入48時間後の血清中で、2つの炎症性サイトカイン、IL-6およびTNF- α 定量した。エラーバーは標準誤差を示す。