

mRNA ワクチンおよび mRNA 治療薬の製造戦略

Dr. Nargisse El Hajjami, Associate Director Cell and Gene Therapy Segment EMEA Mag.

Manuel Brantner, Associate Director Vaccine and Plasma Segment EMEA

Anissa Boumlic, Head of Global Vaccine & Plasma Segments

Shiksha Mantri, Global Marketing Manager mRNA Applications

Bahar Cebi, Segment Marketing Manager Novel Modalities & Vaccines

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターなどのウイルスデリバリーシステムは十分に確立されており、ワクチンや遺伝子治療としての使用が認められています。ウイルスデリバリーシステムは広く利用されているものの、免疫原性や副作用をもたらすおそれがあります。さらに、製造プロセスが複雑である場合があるほか、遺伝子治療の用途では高いウイルス価を必要とします。

これに対し、非ウイルスデリバリーシステムは、ウイルスデリバリーシステムよりも安全性プロファイルが良好であるとともに、製造がシンプルかつ低コストであり、プロセスをテンプレート化できる可能性があります。

mRNA 技術は非ウイルスデリバリーシステムを利用するものであり、多様な用途に利用できます。mRNA が細胞の細胞質ゾルにデリバリーされると、目的タンパク質の産生が誘導されます。産生されたタンパク質は、治療薬または予防薬として作用したり、ワクチンとしての使用では抗原として機能して免疫応答を惹起したり、欠陥タンパク質の代替として機能したり、抗腫瘍反応を活性化したりすることができます。

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に対する 3 種類の mRNA ワクチンで好調な初期成績が得られていることは、現在のパンデミックにとどまらない意義をもち、癌、心疾患や、SARS-CoV-2 以外の感染症に対する同様のアプローチにとっても幸先の良いものです。

mRNA 製造に関する考慮事項

治療薬およびワクチンを用途とする mRNA の開発および製造は比較的シンプルで拡張性があり、極めて短期間で行うことができます (図 1)。mRNA 技術は、開発から臨床使用および承認までの期間を短縮できるため、感染症の大流行およびパンデミックへの対策のみならず、アンメットニーズのある疾患の新規治療法の開発にとっても魅力的です。

mRNA は、*in vitro* 合成により、酵素過程を経て製造されます。これは、古典的な *in vivo* タンパク質発現が、時間のかかるクロニングおよび増幅ステップを必要とするのとは大きく異なります。*in vitro* 合成プロセスが使用されるため、細胞または宿主細胞タンパク質を除去する必要がありません。mRNA は製造プロセスがシンプルであり、目的物質にかかわらず、同じ反応材料および容器を使用できるため、GMP 設備で製造する mRNA を新たな目的タンパク質をコードする mRNA に切り替える際、極めて短期間で切り替えが可能であり、プロセスおよび処方をはほとんど変更する必要がありません。

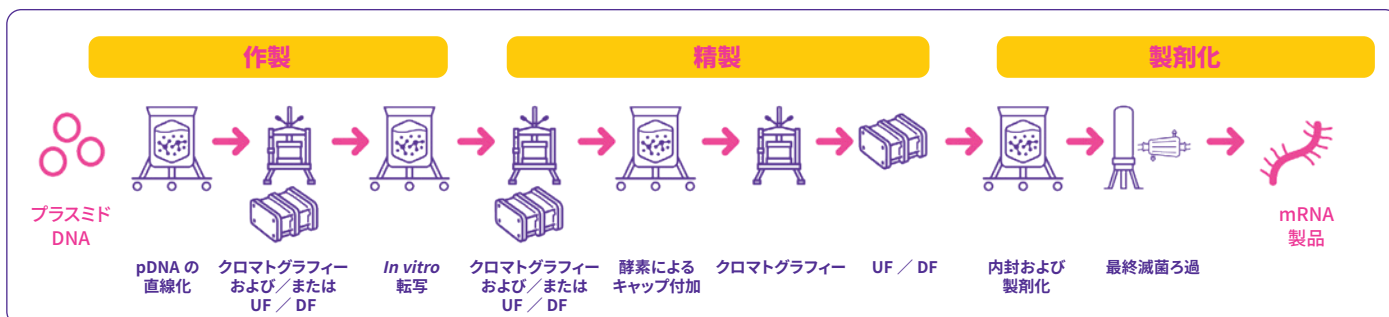


図 1. 一般的な mRNA 製造プロセスの概要

mRNA の作製

mRNA ベースの治療薬およびワクチンを生産する際の出発材料は pDNA 鋳型であり、pDNA 鋳型には、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼプロモーターおよび mRNA 組成物に対応する配列が含まれます。中心的な役割を果たすのは pDNA 組成物であるため、その設計および純度は、生成する mRNA の最適化にとって重要な要因です。pDNA はサイズが大きく、粘度が高く、せん断の影響を受けやすいほか、不純物と類似することから、pDNA の作製および精製にはいくつかの課題があります。これらの課題を克服するための戦略については、弊社のウェビナー「Scalable purification of Plasmid DNA」で説明しています。

mRNA 組成物は、目的遺伝子の効率的な発現を目的として設計されます。安定性、遺伝子発現および効率的なタンパク質翻訳は、いくつかの構造要素により左右されます (図 2)。

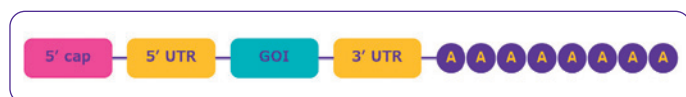


図 2. mRNA の構造

- mRNA 配列の 5' 末端にあるキャップ領域は、mRNA の成熟に不可欠であり、リボソームが mRNA を認識しタンパク質を効率的に翻訳できるようにします。また、キャップ領域は、mRNA をヌクレアーゼによる分解から保護することにより、mRNA を安定化します。
- mRNA コード領域の上流と下流のドメインに位置する非翻訳領域 (UTR) は、mRNA の翻訳効率、局在化および安定性に影響を与えるものであり、効率的なタンパク質発現に利用できます。
- オープン・リーディング・フレームまたはコード配列領域には、目的とする遺伝子 (GOI) が含まれます。
- ポリ A 鎖は、タンパク質への翻訳と、3' エクソヌクレアーゼによる分解からの保護による mRNA の安定性にとって不可欠です。

mRNA 作製に必要な pDNA は、細菌細胞 (通常は大腸菌) 内で増幅させます。その後、精製ステップを経て、高純度で濃縮された環状 pDNA が得られます。得られた pDNA は直線化され、RNA ポリメラーゼの鋳型として目的 mRNA の転写に使用されます。

直線化は、転写時に読み飛ばし (read-through) が発生するのを回避するのに必要です。読み飛ばしが起こると、目的外の mRNA が生成され、除去が必要な不純物が増加する可能性があります。pDNA に制限酵素および反応バッファーを混合後、37°C で 4 時間インキュベーションすると、pDNA が直線化されます。EDTA 添加または 65°C での熱不活化により反応を停止させます。

その後、制限酵素、BSA、DNA 断片、エンドトキシンなどの不純物を除去します。ラボスケールのプロセスのほとんどでは、溶媒抽出法が使用されますが、溶媒抽出法は、その後の GMP 製造環境には適用できません。

この精製ステップでは、溶媒抽出法の代わりに、タンジェンシャルフローフィルトレーション (TFF) およびクロマトグラフィーを用いて不純物を効率的に除去できます。

次のステップは *in vitro* 転写であり、直線化した pDNA を鋳型 DNA として、天然の転写プロセスに必要な要素 (RNA ポリメラーゼ、ヌクレオチド三リン酸など) を用いて、mRNA に転写します。転写後の最終的な mRNA 構造は、その安定性および細胞への効率的な導入のため、5' キャップ構造を必要とします。

キャップは、2 種類の方法、すなわち、共転写的または酵素的に付加できます。共転写的なキャップ付加は、キャップアナログおよびグアノシン三リン酸 (GTP) を、4 : 1 の比率で添加することにより行うことができます。37°C でのインキュベーションステップの後、DNA 分解酵素の添加により鋳型 DNA を分解します。分解により生じた低分子量の DNA 断片は、より分子量の大きい mRNA 分子から、タンジェンシャルフローフィルトレーション (TFF) によって容易に分離できます。

共転写的なキャップ付加は、転写ステップ中に同じ反応混合液で行うことができるため、酵素的なキャップ付加と比較して低コストかつ速やかです。しかし、通常のキャップアナログは mRNA 配列に結合する可能性があるため、酵素的な方法と比較して、効率および収量が低く、キャップが付加されていない不純物が生成することがあります。この点を克服するべく、5' キャップが逆方向に付加されることを阻止し、翻訳効率を向上させることを目的として、anti-reverse cap analog (ARCA) が開発されています。

酵素的なキャップ付加は、*in vitro* 転写混合物から mRNA を精製した後に行います。この反応では通常、ワクシニアウイルス由来のキャップ付加酵素を用いて、mRNA 構造にキャップ構造を付加します。酵素的なキャップ付加は、キャップ付加効率が極めて高いですが、その一方、共転写的なキャップ付加よりも高コストであり、より多くの単位操作を必要とします。

mRNA の精製

in vitro 転写工程の後、不純物およびエンドトキシン、免疫原性のある二本鎖 RNA (dsRNA)、残存する鋳型 DNA、RNA ポリメラーゼ、元素不純物などを含有する先行工程で使用した材料から mRNA を精製します。mRNA 精製にはいくつかの選択肢を利用できます。

TFF は、メンブレンに保持されない低分子の不純物から mRNA を効率的に分離できます。mRNA のサイズに基づき、30 ~ 300 kDa の範囲の分子量カットオフ値を使用できます。TFF を使用すると、同一の操作内で目的物質の精製、濃縮およびダイアフィルトレーションが可能です。この段階では、mRNA は酵素によるキャップ付加またはクロマトグラフィーに適したバッファーに溶解されている必要があります。しかし、TFF を使用する際に考慮すべき重要な点は、低分子の DNA 断片が mRNA とハイブリダイズし、新たな不純物が生成する可能性があることです。

TFF の代わりに、いくつかのクロマトグラフィー法、具体的には、逆相イオン対クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ポリ dT をキャプチャー用分子として用いるアフィニティークロマトグラフィーなどを使用することができます (表 1)。



表 1. 逆相イオン対、陰イオン交換およびアフィニティークロマトグラフィーによる mRNA 精製の比較
DBC：動的結合容量

クロマトグラフィーにより鋳型 DNA を効率的に除去することで、限外ろ過／ダイアフィルトレーション中にハイブリダイゼーションが発生するリスクを排除します。しかし、クロマトグラフィーはコストが比較的高く、培地交換や後続ステップのための前処理として、TFF が依然として必要と考えられます。

クロマトグラフィーは、酵素によるキャップ付加のステップ後にも、前段の各酵素反応ステップで生成される不要な物質やオリゴヌクレオチド不純物の除去に使用されます。

逆相イオン対クロマトグラフィーは一般に小規模生産に使用されます。この手法は、極めて効率的かつ迅速に RNA を精製でき、DNA、二本鎖 RNA (dsRNA) や短い転写産物から一本鎖 RNA (ssRNA) を良好に分離できます。ただし、溶媒を使用するため、GMP 製造設備での生産には向いていません。また、この手法はイオン対試薬を必要とし、mRNA との複合体が形成されるため、その除去に大量のダイアフィルトレーションが必要となる場合があります。さらに、タンパク質や凝集体によるファウリングが生じやすいため、キャプチャーよりもポリッシングの目的に適しています。

陰イオン交換クロマトグラフィーは、動的結合容量が大きく、免疫原性のある不純物 (dsRNA、キャップ付加されていない RNA、RNA-DNA ハイブリッド、その他の RNA 構造など) を極めて高い効率で除去できます。この手法には水溶液を使用する必要がありますが、高分子量の mRNA はレジンに強固に結合するため、その溶出には、毒性のあるカオトロピック剤の使用または昇温（通常 50 ～ 70°C）が必要となる場合があります。常温での操作で溶出するのは通常、500 塩基未満の mRNA 種です。

ポリ dT をキャプチャー用分子として用いるアフィニティークロマトグラフィーには、完全長転写産物のポリ A 鎖を特異的にキャプチャーするレジンを使用します。このプロセスにより、DNA、ヌクレオチド、酵素、バッファー成分およびポリ A 鎖を持たない他のあらゆる不純物が効率的に除去されます。

この手法の短所は、逆相クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーと異なり、dsRNA と ssRNA を区別できないことです。さらに、目的物質関連のポリ dT は、mRNA とハイブリダイ

ズした DNA 断片などのようなその他の目的物質関連不純物の除去効率を低下させます。このため、最初のクロマトグラフィーステップに続いて、ポリッシングのため、陰イオン交換クロマトグラフィー（アフィニティークロマトグラフィー）ステップがもう 1 ステップ設けられるのが一般的です。

クロマトグラフィーステップの後、目的 mRNA の純度を最大限に高め、mRNA を製剤化または保存に適したバッファーにするため、最終濃縮およびダイアフィルトレーションステップを設けます。この段階で、同じ単位操作内で mRNA をさらに精製・濃縮・ダイアフィルトレーションすることができます。この TFF ステップの後、滅菌ろ過ステップを設けることができます。ただし、注意すべき点として、孔径 0.2 μm のフィルターを用いて分子量 5000 kDa 以上の mRNA を滅菌グレードでろ過することは難しい場合があります。

mRNA の製剤化

mRNA デリバリーツールは、mRNA ワクチンおよび mRNA 治療薬の有効性にとって、mRNA 分子と等しく重要です。最後の mRNA 精製ステップの次に考慮すべき事項は、デリバリーのメカニズムです（図 3）。最先端のデリバリーシステムの一つは、脂質およびポリマーとの複合体です。これらのデリバリーシステムには、オリゴヌクレオチドと脂質の結合により形成される複合体（リポプレックス）や、ポリエチレンイミン (PEI) などの正電荷ポリマーとの結合により形成される複合体（ポリプレックス）などがあります。

mRNA デリバリーに最もよく使用されているのは、脂質ナノ粒子 (LNP) です。各脂質ナノ粒子は 4 種類の脂質で構成されており、mRNA を内封し分解から保護します。

静電的相互作用による RNA 内封には、**カチオン性脂質**または **pH 応答性**（イオン化）脂質が必要です。肝細胞へのデリバリー（タンパク質発現の刺激またはサイレンシングを目的とするデリバリー）には、pH 応答性脂質（受動的ターゲティング、エンドソームからの脱出）が必要である一方、免疫細胞による取り込みははるかに容易であり、強カチオン性脂質も使用されます。



図3. 複数の mRNA デリバリーシステムが利用可能である

これらの脂質は、細胞質への効率的な RNA 放出も担います。カチオン性脂質の構造は、LNP の活性、毒性および生体内分布に大きな影響を与え、ひいては体内での潜在的な毒性作用に影響を及ぼします。

ポリエチレングリコール (PEG) 脂質は、コロイド安定性をもたらし、粒子へのタンパク質の結合を阻止することにより、粒子を免疫系から保護し、血中滞留性を高めます。PEG 鎖および脂肪酸鎖の長さは、血中滞留性および膜融合性、すなわち粒子と LNP のエンドソーム膜との融合の程度を決定付けます。血中滞留性を高めるためには、DSG PEG 2000 (ポリエチレングリコールジステアロイルグリセロール) などの長い脂肪酸鎖を使用することができます。

中性／アニオン性脂質は構造的安定性をもたらし、膜融合性および生体内分布を決定付ける一因となります。例えば、最近の研究 (1) では、エンドソーム脱出に重要な役割を果たす 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE, 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン) を含有する LNP は、1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC, 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン) を含有する LNP と比較して、肝臓への mRNA デリバリー性が高いことが示されました。これらのヘルパー脂質は、RNA の安定的な内封にも役立つことが、最近の複数の研究 (2) から示唆されています。

コレステロールは、LNP の二重膜の密度、流動性および取り込み（ラフト形成）の調整に使用されます。動物由来および合成コレステロールには市販品がありますが、合成コレステロールは動物由来コレステロールと比較して、純度が高い、動物由来分子（プリオンなど）を含有しない、大量生産可能、品質の均一性が高いなどのいくつかの利点があります。

脂質を選択する際の考慮事項 脂質は、最大限の効果および最適な生体内分布が得られるデリバリー経路を考慮し、それに基づき選択する必要があります。脂質の選択に加えて、個々の脂質の比率も、二重膜の流動性および LNP の膜融合性に直接影響を与えるため、微調整を行ううえで重要な要素です。

脂質を選択する際には、いくつかの極めて重要な側面を考慮しなければなりません。脂質の種類、由来および品質は、最終処方

の製剤（プロファイルなど）に直接影響を与えます。最終処方の製剤で再現性の高い結果を得るためには、脂質の品質が均一である必要があります。脂質の品質の均一性は、脂質の合成に使用される原材料の品質および脂質自体の適切な材料特性によって左右されます。

精製 mRNA をデリバリー粒子に内封する手法には、様々なものがあります。一般に使用される有機溶媒注入法では、脂質をエタノールなどの溶媒に溶解した後、クロスフロー混合またはマイクロ流体混合を用いて、mRNA を含有する低 pH の水性バッファーと速やかに混合し、LNP を作製します。その後、低 pH バッファーを中性バッファー中にダイアフィルトレーションし、限外ろ過により粒子を濃縮します。

脂質が低 pH で加水分解されると、脂質二重膜構造、製剤の安定性や、薬物放出性に影響を及ぼしうる過酸化脂質（脂肪酸ヒドロペルオキシド）などの不純物が生成する可能性があるため、TFF ステップは速やかに実行しなければなりません。脂質が分解されると、粒子サイズが増加し凝集する可能性もあります。

LNP は安定性が極めて高く、構造的柔軟性に優れ、他のデリバリーシステムよりも高い遺伝子デリバリー効率を有します。LNP を利用すると、裸の mRNA を用いるよりも遺伝子導入率が高まり、静脈内投与しても血中の RNA 分解酵素により分解されるリスクがありません。また、特異的リガンドを搭載すれば、能動的ターゲティングが可能になります。

LNP の短所は、低温輸送を必要とする場合があることなどです。さらに、LNP は滅菌ろ過が必ずしも可能でなく、滅菌ろ過できない場合には、ガンマ線照射、加熱滅菌、高圧滅菌、閉鎖系での操作といった代替手段を検討しなければなりません。

mRNA 製剤と mRNA 製剤に関連する重要なパラメータおよび考慮事項に関する詳細は、弊社のウェビナー「Key to Successful Formulation Development for Lipid Based RNA Delivery (脂質ベースの RNA デリバリー製剤の開発を成功させるための鍵)」をご覧ください。

スケールアップする際の懸案事項

mRNA 製造プロセスをスケールアップする際には、いくつかの懸案事項に留意すべきであり、これらの懸案事項については、小規模スケールでのプロセス開発段階で最も重要視すべきです。

- 溶媒抽出法および沈殿法による mRNA 精製はスケールアップが難しく、GMP 環境に適さない有害な溶媒が使用されます。これらの精製法の代わりに使用できるのは、TFF またはクロマトグラフィーです。
- mRNA はエンドヌクレアーゼにより数秒以内に分解されるため、目的 mRNA と接触するすべての原材料、溶液および装置が、エンドヌクレアーゼフリーでなければなりません。
- 適切なデリバリーシステムは、ワクチンまたは治療薬の効率を高める効果が期待できるため、デリバリーシステムは慎重に選択する必要があります。
- 最終製品が粒径の大きい mRNA 複合体である場合、滅菌ろ過に代わる手段を評価する必要があります。
- 特別なサプライチェーン（低温輸送など）を必要とする場合、コストが大幅に増加します。したがって、医薬品の安定性を慎重に評価する必要があります。

輝かしい未来

mRNA 技術により、かつてないスピードでの COVID-19 ワクチン候補品の開発および優れた有効率が実現しています。今後、mRNA 技術は、疾患の大流行に対する迅速な対応の実現によりワクチン開発の分野を激変させるにとどまらず、アンメットメディカルニーズのある疾患への遺伝子治療法による対処にも資するものと予想されます。

mRNA は、迅速かつ柔軟なワクチンプラットフォームとなる可能性があります。ワクチン開発は今や、科学的課題ではなく、プロセス開発に重点的に取り組む段階にあります。企業は、病原体の遺伝子配列が判明した後、比較的速やかに mRNA ワクチンを設計することができます。しかし、mRNA ワクチンの可能性を最大限に引き出すためには、革新的なソリューション、専門知識および創意工夫を集約させ、生産規模のシンプルかつ強固なプラットフォームを構築する必要があります。開発された mRNA 組成物およびデリバリーシステムの安全性、有効性、品質および製造可能性に関連する懸案事項も、評価する必要があります。

これらの懸案事項への対処後には、mRNA ベースのワクチンおよび治療薬は、全世界の患者さんに目覚ましい成果をもたらす最新の医療手段の一つになるものと期待されます。

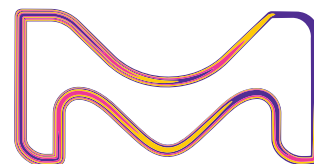
References:

1. Miao L, Li L, Huang Y, Delcassian D, Chahal J, Han J, et al. Delivery of mRNA vaccines with heterocyclic lipids increases anti-tumor efficacy by STING-mediated immune cell activation. Nature Biotechnology. 201
2. Kulkarni JA, Witzigmann D, Leung J, Tam YYC, Cullis PR. On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA. Nanoscale. 2019;11 (45) :21733-9

Facebookもチェック 

最新の技術情報やWebinar・イベント情報を配信!

メルク プロセスソリューションズ 



本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Merck KGaA の登録商標もしくは商標です。本紙記載の内容は 2021 年 4 月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Millipore are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2021 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original is Lit. No. MK_WP7261EN Ver. 1.0

メルク株式会社

ライフサイエンス プロセスソリューションズ事業本部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.jp

製品・技術に関するお問合せ : PStechservice_JP@merckgroup.com

注文に関するお問合せ : PScommercialservice_JP@merckgroup.com

Tel: 03-4531-1143