

# mRNA 医薬の製造と課題

峰野 純一\*<sup>1</sup>, 辻畑 茂朝\*<sup>2, \*3</sup>

Manufacturing Process and Its Issues of mRNA Therapeutics

Junichi MINENO\*<sup>1</sup> and Shigetomo TSUJIHATA\*<sup>2, \*3</sup>

## 1. はじめに

COVID-19 パンデミックにより, mRNA ワクチンは開発期間の短さと液性免疫/細胞性免疫を誘導できる有効性が認められ, ジカ熱やサイトメガロウイルス感染症など他の感染症に対するワクチンや, がん免疫治療のプラットフォームとして研究開発が加速している<sup>1, 2)</sup>.

実用化に関しては, 細胞における Toll Like Receptor 応答による炎症反応の抑制のためのウリジンの置換, 並びに生体内での分解からの保護や細胞への侵入効率の向上のための脂質ナノ粒子への封入等のデリバリー技術の開発が大きく寄与しており, それぞれ原薬と製剤に応用されており, 最も新しいモダリティとして製造手法の開発も盛んに行われている.

本稿では mRNA 医薬の原薬と製剤, それぞれの基本技術や製造方法, 課題に関して述べる.

## 2. mRNA 原薬の製造と課題

### 2.1 mRNA の構造

細胞内で効率良く抗原タンパクを発現させるために mRNA の構造は重要で, コドン最適化, 5' 並び

に 3'UTR 配列, poly A 鎖長とその下流配列など, 開発時に十分検討する必要がある.

例として, 3'UTR 配列を変えて蛍光タンパク ZsGreen1-DR 遺伝子を搭載する mRNA を作製し, 正常ヒト樹状細胞に導入した際の発現量の差に関する実験結果を Fig. 1 に示す. タンパク発現量は 3'UTR 配列に依存するが, 他の細胞や他の遺伝子では異なる結果となったため, 開発段階で相性の良い 3'UTR 配列を検討しておかなければならない.

### 2.2 mRNA 原薬の製造

Fig. 2 に mRNA 原薬製造工程の模式図を示す.

鋳型プラスミド DNA の直鎖化, *in vitro* 転写合成, キャッピング, 及び各工程の後の精製工程からなり, 精製工程はイオン交換, アフィニティー, 分子ふるい等のクロマトグラフィーと Tangential Flow Filtration (TFF) を組み合わせて実施する.

#### 2.2.1 鋳型プラスミド DNA の直鎖化

poly A 鎖配列の下流を制限酵素で切断して, 環状プラスミド DNA の直鎖化を行う. 制限酵素 BspQ1 など Type IIS 制限酵素を使用することで, poly A 下流の残存塩基数をゼロにすることが可能になり発現量は最も高くなるが, 3~5 塩基が残存

\*1 タカラバイオ株式会社 滋賀県草津市野路東7丁目4番38号 (〒525-0058)

Takara Bio Inc., 7-4-38, Nojihigashi, Kusatsu-city, Shiga 525-0058, Japan

\*2 富士フイルム株式会社 バイオサイエンス&エンジニアリング研究所 神奈川県足柄上郡開成町牛島577 (〒258-8577)

FUJIFILM Corporation, Bio Science & Engineering Laboratories, 577, Ushijima, Kaisei-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa 258-8577, Japan

\*3 富士フイルム富山化学株式会社 東京都中央区京橋2-14-1 (〒104-0031)

FUJIFILM Toyama Chemical Co., Ltd., 2-14-1, Kyobashi, Chuo-ku, Tokyo 104-0031, Japan

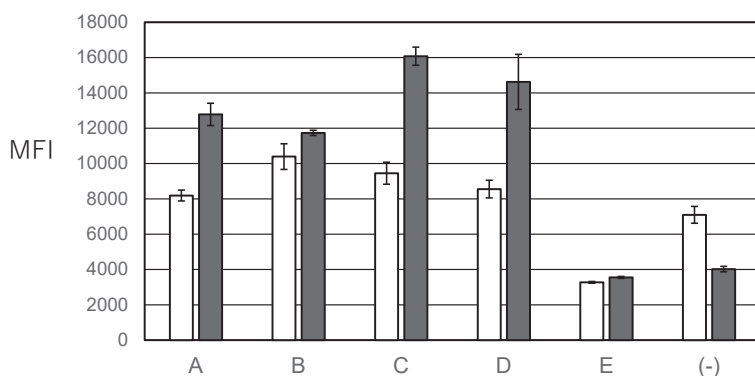


Fig. 1 3'UTRによるタンパク発現量の差

3'UTR配列を変えて蛍光タンパク ZsGreen 遺伝子を搭載する mRNA を作製し、正常ヒト樹状細胞に導入、24時間後並びに48時間後の蛍光強度をフローサイトメーターで測定した。

Cap, 5'UTR 配列並びに poly A 鎖長は全て同一。

A~E: 各種3'UTR 配列, (-): 3'UTR 配列なし, MFI: 平均蛍光強度

24時間後 (白バー), 48時間後 (黒バー) の平均蛍光強度をそれぞれ示す。

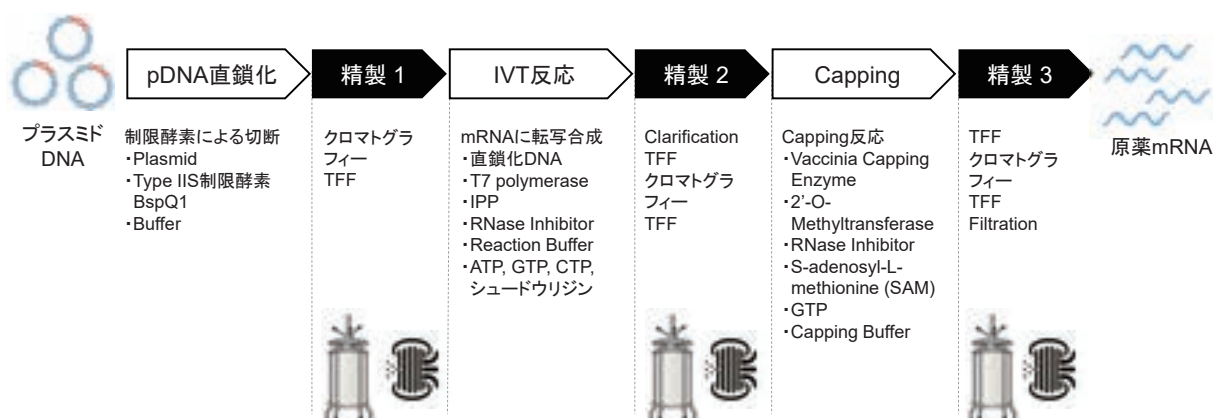


Fig. 2 mRNA原薬製造工程

しても発現量が大きく下がることはないことを我々は確認している。

### 2.2.2 *in vitro* 転写合成 (*in vitro* transcription : IVT)

直鎖化したプラスミドDNAを精製1工程(クロマトグラフィー, TFF濃縮・バッファー交換)を実施して鋳型とし, T7 RNAポリメラーゼなどを用いた *in vitro* 転写で一本鎖mRNAを合成する。IVT反応で生じるピロリン酸による反応阻害やピロリン酸とマグネシウムイオンによる沈殿を防ぐために, 反応系にピロホスファターゼを加え, RNaseインヒビターを加えてRNAの分解を防ぐ。

また, mRNAワクチンを投与した時の細胞における Toll Like Receptor 応答抑制のため, 基質に

UTPの代わりにシュードウリジンを使用する<sup>3)</sup>。IVT反応終了後DNase I処理を行い, 不要となった鋳型プラスミドDNAを分解する。

### 2.2.3 キャッピング

真核生物のmRNA分子の5'末端は, リン酸結合を介してグアノシンが結びついて5'-5'結合した5'-Cap構造になっており, 細胞内でのExonucleaseからの分解回避やタンパク合成時のRibosomeによる認識に寄与する。グアノシンのグアニン塩基の7位がメチル化したものをCap0, 更にmRNAの最初の塩基一つがメチル化したものをCap1と呼び, 真核細胞ではCap0は外来RNAと認識されやすく, Cap1は真核生物mRNAとして認識されるため, mRNA原薬の製造ではCap1キャッピングを行う<sup>4)</sup>。IVT反応

後の反応液を精製工程2(清澄化, TFF濃縮, クロマトグラフィー, TFF濃縮・バッファー交換)を行った後, GTPと*S*-adenosyl-L-methionine (SAM) 存在下でVaccinia Capping Enzyme (VCE) によるCap0付加と, 2'-*O*-Methyltransferase (2'-*O*-MTase) によるCap1変換を行う<sup>5)</sup>。

キャッピングには2種類の方法があり, 先に示した反応はEnzymatic cappingであるが, IVT反応時にキャッピングを同時に行うCo-transcriptional cappingという方法も用いられている。後者は, IVT反応液にAnti-Reverse Cap Analogを加えてCap0を付加しSAMと2'-*O*-MTaseによりCap1変換を行う方法と, IVT反応時にTrilink社のCleanCap<sup>®</sup> Reagent AGを加えてCap1付加を行う方法がある。SARS-CoV-2ワクチンでは, Pfizer/BioNTech (BNT162b2) はCleanCap<sup>®</sup>を用いたCo-transcriptional cappingで, Moderna (mRNA-1273) はEnzymatic cappingでそれぞれ製造されている。

#### 2.2.4 品質試験

キャッピングを行ったmRNAを精製工程3(TFF濃縮, クロマトグラフィー, TFFバッファー交換, 無菌ろ過, 濃度調整)を実施して原薬とし, 品質試験を実施する。Pfizer/BioNTechとModernaのSARS-CoV-2 mRNAワクチン原薬の品質試験項目はほぼ同じで, 試験方法や純度試験の項目が異なる。詳細はこれらの審査報告書を参照されたい。mRNA特有の試験項目としては, キャッピング効率, poly A鎖長, RNA完全性, 二本鎖RNA含量, 等が挙げられる。

### 2.3 原薬製造における課題

以下に, 原薬製造における課題を列挙する。

- ・分解：mRNAは物理的に分解されやすい。TFFによる濃縮・バッファー交換工程は原理的にシェアストレスがかかるので分解の要因になり得るため, バッファー組成・温度・濃縮度などの条件を検討し, 分解を最低限に抑える必要がある。
- ・酵素・資材：mRNA原薬を製造するための酵素や資材の供給元が海外メーカーに依存しているため, 調達には十分気を付けなければならない。我々はmRNA製造用のGMP酵素に関して, 国産品として提供すべく開発を進めている。
- ・標準品：品質試験においてキャッピング効率やpoly A鎖長など, mRNA特有の標準品がまだな

いため, 品質試験に関しては工夫が必要である。

## 3. mRNA製剤の製造と課題

### 3.1 脂質ナノ粒子 (LNP) の設計

mRNAの製剤としては, 封入するmRNA, 標的とする臓器や細胞, 投与方法を踏まえて, 様々な技術開発がなされてきた。その中でも, 新型コロナウイルスに対するワクチンにも応用されたLNPが第一選択肢となる。

LNPは, 主にpH応答性カチオン脂質(pH応答脂質, イオン化脂質), 中性リン脂質(ヘルパー脂質), コレステロール, ポリエチレングリコール(PEG)脂質から構成される。これらの脂質の中でもpH応答脂質は, LNPの性能を特徴づける成分である。pH応答脂質は特定のpH域においてカチオン化することで, 粒子形成時はmRNAのLNPへの封入, 細胞内ではエンドソーム脱出に寄与する。その基本構造は3級アミノ基を有するヘッドと炭化水素鎖からなる嵩高いテールから構成され, pKaやcLogP値, 更には生分解性等を考慮して分子設計されている。LNPの新規開発においては, これらのpH応答脂質に関する数多くの特許が存在していることに留意が必要である。

### 3.2 LNPの製造プロセス

LNPの製造工程は, 粒子形成, 精製・濃縮, 滅菌, 充填の各工程からなる。まず, pH応答脂質を含む複数の脂質をエタノールなどの溶媒に溶解した後, mRNAを含有する酸性のバッファーと速やかに混合することで, LNPが形成される。そのメカニズムとしては, 負電荷を有するmRNAと酸性条件下で正電荷を帯びたpH応答脂質のイオンコンプレックスが形成されるとともに, エタノール濃度の低下により, コレステロール等の脂質が析出し, これらの成長による自己組織化で, LNPの一次粒子が形成される。その後, 中性のバッファーを添加することで, 酸性条件下で正電荷を帯びていた粒子は電荷を失って粒子の合一が進行する。最終的に表面がPEG脂質で安定化されることで, LNPが形成されると考えられている (Fig. 3)<sup>6)</sup>。

粒子形成の過程は, 前述のとおり速度論的な自己組織化現象であり, これを再現性良く製造すること

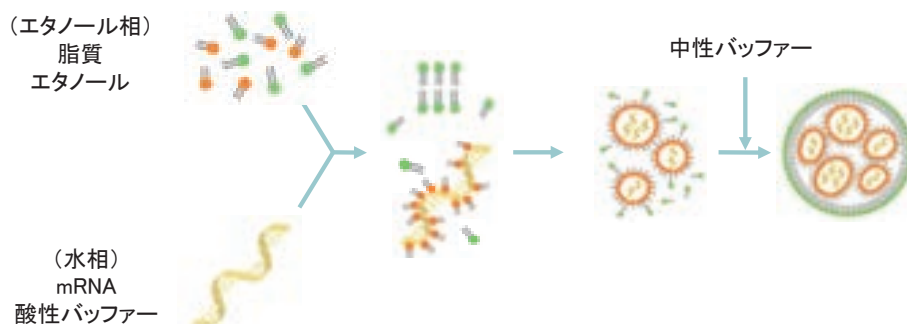


Fig. 3 LNP形成過程の模式図

がプロセス設計上の課題である。粒子径分布を制御するには、粒子の成長する時間を制御する、すなわちpH及び脂質の溶媒（エタノール）濃度を制御しなければならない。そのため、粒子形成にはマイクロ流路等を用いて水相とエタノール相の混合速度を精密に制御することが求められ、T-junction mixerに加え、Staggered herring bone mixer (SHM) や Toroidal mixer, Baffle mixerなどが設計されている<sup>7)</sup>。いずれも流路形状の工夫により、マイクロ流路内で対流を強制的に発生させ、流体の接触面積を増加させることでLNPの製造に適した精密混合を実現させている。更に、ジェット流によりマクロでの迅速混合が可能なImpingement jet mixer, Turbulent jet mixerなども開発されている。これらの中から、製造スケールや粒子物性に応じて最適なミキサーが選択される。

精製・濃縮工程に関して、処方検討段階における実験室レベルの調製では、カセット型の透析キットや遠心式の限外濾過キットなどを用いて、バッファ交換や濃縮を行うのが一般的である。一方で、GMP製造の場合はTFFによる限外濾過により、連続的に精製・濃縮を実施する。したがって、精製・濃縮のプロセス開発では、探索段階の処方とのギャップが生じやすい。TFFのプロセス設計においては、使用する限外濾過膜の形状や材質、分画分子量や膜面積を考慮し、最適な循環流速や膜間差圧などの条件設定が必要となる。LNPの場合は特に、粒子濃度やバッファ組成、pHが工程の進行とともに変動するため、プロセス設計が不適切な場合、膜の目詰まりだけでなく、粒子の凝集が発生し、安定製造を実現できない。

滅菌工程に関して、mRNA及びLNPはともに熱

安定性が低いため、孔径 $0.2\mu\text{m}$ のフィルターを用いた濾過滅菌が用いられる。そのため、濾過工程に供するLNPの粒子径分布の管理と、粒子によるフィルターへの吸着や閉塞挙動を考慮して、最適な濾過条件を設定しなければならない。

更に、LNPは激しい攪拌などでせん断力が加わることで、粒子が凝集する現象が認められている<sup>8)</sup>。このことは、全ての製造工程を通じても留意すべき点である。製造工程中の攪拌や送液、キャピテーションの発生についても注意深く観察し、製造プロセスを仕上げていくことが肝要である。

### 3.3 LNPの品質管理

mRNA内包LNPの品質管理には、有効性と安全性に影響を与える重要品質特性を明らかにし、それらの品質特性を評価するための試験法を設定する必要がある。品質管理項目としては、無菌注射剤に求められる試験項目及びmRNA原薬に由来する試験項目に加え、mRNA内包LNPに特徴的な試験項目がある。例えば、粒子径・粒子径分布、RNA封入率、RNA完全性（完全長RNAの割合）などである。

粒子径・粒子径分布は一般に動的光散乱法により測定され、ナノ医薬品の品質管理として標準的な手法である。開発段階においては、動的光散乱のみでは差異を検出できない粒子径分布が生じることがあり、この場合はクライオTEMによる形態観察やフィールドフローフラクシオネーション (FFF) を組み合わせることが有効である。特に、FFFではより詳細に異なる流体力学的体積を持つ成分を物理的に分離することができ、製造プロセス上の潜在課題を検出することができる。

RNA完全性試験には、主にキャピラリー電気泳

動が用いられる。LNP製剤化の過程で、mRNAの低分子画分の増加が認められることがあり、製造プロセスによりその程度も異なる。特に、分子量の大きいmRNAでその傾向は顕著になる。製造工程中の温度や時間の影響を受けるため、RNA完全性試験は製造再現性の指標となりうる。

## 4. 終わりに

mRNA医薬は、感染症ワクチンに留まらず、がんワクチンや遺伝子疾患の治療薬、更にはゲノム編集などへの応用が広がっていくと期待される。

この広がりにより、製造に対してもスケールを含めて様々なニーズが生じると考えられる。mRNA医薬の開発スピードに対して、mRNA及びLNPの製造のプロセス設計はノウハウや専用の製造設備が多く、新規に立ち上げるには時間を要する。ただし、これらの製造技術はmRNAの配列に依らず共通する要素も多いことから、汎用展開できるプラットフォーム技術となりえる。そのため、mRNAやLNPに特化した技術と設備を有する医薬品受託開発製造企業（CDMO）を活用した、水平分業体制による開発が重要な選択肢となってくる。国内でも複数のCDMOが立ち上がっており、今後これらのCDMOが、国内発のmRNA医薬の開発を支援する役割を担うことと期待される。

### 文献

- 1) Rojas, L.A., *et al.* Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer. *Nature*. 2023, **618**, p.144-150. doi: 10.1038/s41586-023-06063-y.
- 2) Lorentzen, C.L.; Haanen, J.B.; Met, Ö.; Svane, I.M. Clinical advances and ongoing trials on mRNA vaccines for cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2022, **23** (10), e450-e458. doi: 10.1016/S1470-2045(22)00372-2.
- 3) Karikó, K.; Buckstein, M.; Ni, H.; Weissman, D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*. 2005, **23** (2), p.165-175. doi: 10.1016/j.immuni.2005.06.008.
- 4) Hyde, J.L.; Diamond, M.S. Innate immune restriction and antagonism of viral RNA lacking 2'-O methylation. *Virology*. 2015, **479-480**, p.66-74. doi: 10.1016/j.virol.2015.01.019.
- 5) Fernández, S.L.; Lacroix, C.; Exposito, J.Y.; Verrier, B. Tailoring mRNA vaccine to balance innate/adaptive immune response. *Trends Mol Med.* 2020, **26**(3), p.311-323. doi: 10.1016/j.molmed.2019.10.002.
- 6) Buschmann, M.D.; Carrasco, M.J.; Alishetty, S.; Paige, M.; Alameh, M.G.; Weissman, D. Nanomaterial delivery systems for mRNA vaccines. *Vaccines*. 2021, **9**, 65. doi:10.3390/vaccines9010065.
- 7) Shepherd, S.J.; Issadore, D.; Mitchell, M.J. Microfluidic formulation of nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2021, **274**, 120826. doi:10.1016/j.biomaterials.2021.120826.
- 8) Kamiya, M.; Matsumoto, M.; Yamashita, K.; Izumi, T.; Kawaguchi, M.; Mizukami, S.; Tsurumar, M.; Mukai, H.; Kawakami, S. Stability study of mRNA-lipid nanoparticles exposed to various conditions based on the evaluation between physicochemical properties and their relation with protein expression ability. *Pharmaceutics*. 2022, **14**, 2357. doi:10.3390/pharmaceutics14112357.