

## mRNA医薬品の品質評価

大阪ラボラトリー 市田 悠

### 1 mRNA 医薬品に対する品質評価の重要性

mRNA 医薬品とは、DNA を鋳型にして転写合成された mRNA を投与することにより体内で標的タンパク質を産生させ、治療や予防効果を発揮する医薬品です。その有効成分である mRNA は、製造過程においても不純物を生じやすく、不純物のなかには免疫原性を示すものもあり、人体に副作用を及ぼす

ことが知られています。そのため、mRNA における不純物の管理は重要な品質評価項目です (図 1)。しかし、分子内や分子間の架橋などにより高次構造を有する mRNA に対する国際的に調和された評価方法が無く、米国薬局方の mRNA ワクチンの分析法に関するドラフトガイドライン<sup>1)</sup>や厚生労働省の生物学的製剤基準<sup>2)</sup>を参考に評価されています。

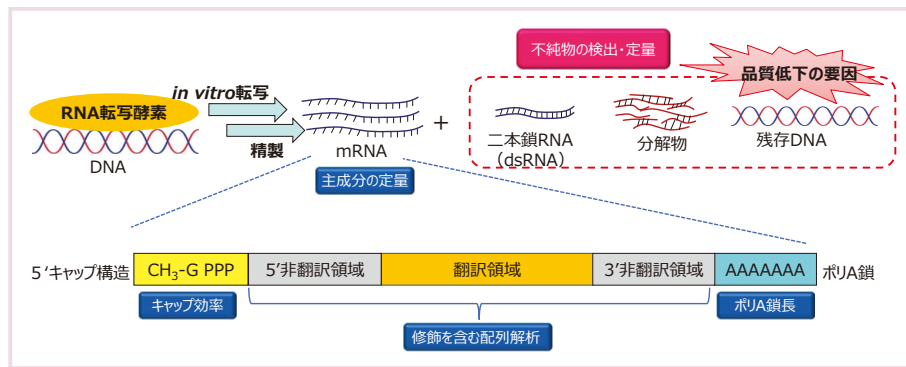


図1 mRNA合成に伴う主成分および不純物の生成

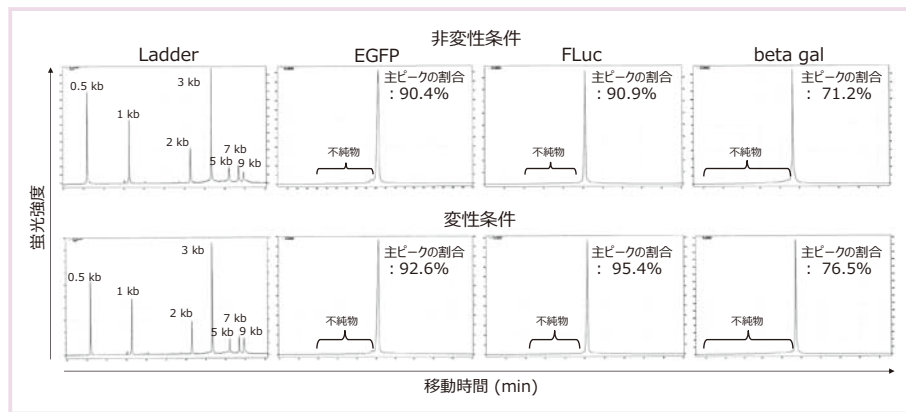


図2 非変性・変性条件におけるキャピラリーゲル電気泳動結果 (全体図)

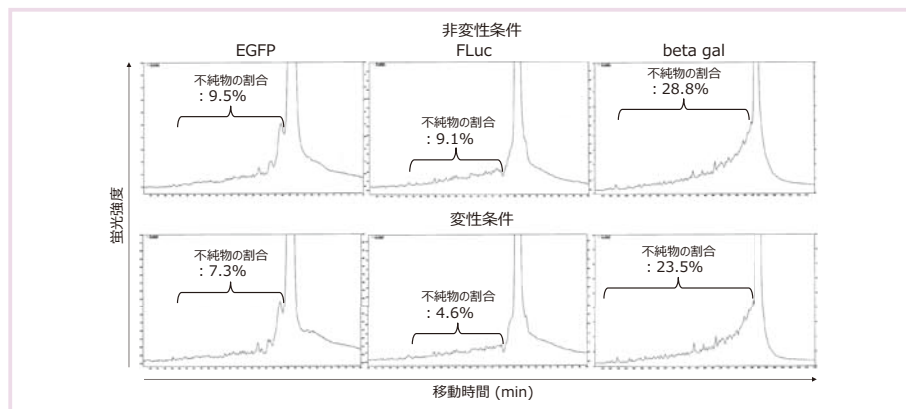


図3 非変性・変性条件におけるキャピラリーゲル電気泳動結果 (不純物領域の拡大図)

このたび当社は、お客様のあらゆる開発ステージに対応すべく、これまでの知見を活かして分析法を標準化しました。塩基長の異なる3種のmRNA (モデル原薬) を用い、製造時に生成された mRNA 断片 (目的物質由来不純物) のキャピラリーゲル電気泳動による純度分析法の開発に加え、同様に製造時に生成が懸念される dsRNA (double-stranded RNA, 炎症を惹起する可能性があるもの) の免疫プロット (Dot blot 法) による定性分析法と ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) による定量分析法を確立しましたので、紹介します。

### 2 mRNA 医薬品の品質評価事例

#### 2.1 キャピラリーゲル電気泳動による mRNA 医薬品の純度分析

EGFP (分子量: 約 30 万), FLuc (約 58 万) および beta gal (約 108 万) の3種の mRNA の変性条件 (変性剤添加) に付したものとそうでないものを用いて、キャピラリー電気泳動条件を検討し、各 mRNA の主成分と不純物が良好に分離する条件を見出しました。主ピークの割合を含む全体のエレクトロフェログラムを図 2 に、不純物の割合を含む不純物を拡大したエレクトロフェログラムを図 3 に示します。各 mRNA において、非変性品と比較して変性品では不純物の割合が減少し、主成分の割合が増加していることがわかりました。このように、当社では変性条件の設定や分離条件の検討により、各種 mRNA の

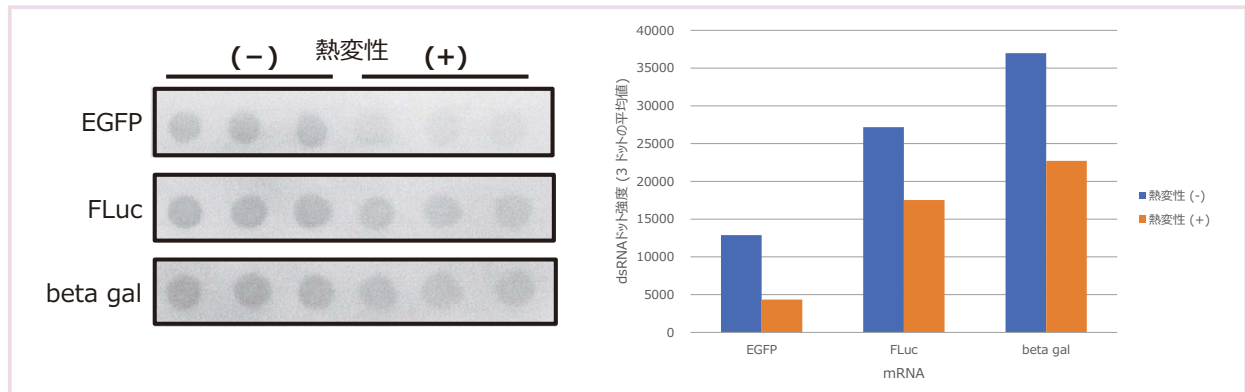


図4 mRNA (EGFP, FLuc, beta gal) のドット画像と強度

キャピラリーゲル電気泳動による純度分析法を開発することが可能です。

## 2.2 Dot blot 法を用いた dsRNA の定性分析

Dot blot 法は mRNA 医薬品中の不純物である dsRNA を抗体と反応させ、発色基質を添加し化学発光させてドット強度を可視化することで、その dsRNA を測定する方法です。前述の3種の mRNA を熱変性 (95 °C で 5 分間処理) させて、本法で検出したところ、各 mRNA で dsRNA が検出され、熱変性によってその強度は減少しました。図 4 に各 mRNA における撮影した画像とドットの強度を示します。このように、Dot blot 法により不純物の dsRNA の有無を確認できました。

## 2.3 ELISA 法による dsRNA の定量分析

ELISA は、dsRNA を認識する一次抗体を固相化してさらに dsRNA を認識する別の二次抗体を反応させるサンドイッチ法により、mRNA 中の不純物を定量する方法です。3 種の mRNA における dsRNA の吸光度を測定し、濃度換算した結果を図 5 に示します。EGFP では 3.9 µg/mL、FLuc では 4.3 µg/mL、beta gal では 5.3 µg/mL でした。

これらの方法を適宜組み合わせることにより、様々な種類の mRNA 医薬品中の不純物を評価できますので、お客様の開発品目の構造特性にあわせ、前処理や機器分析の手法も含めて提案させていただきます。

## 3 おわりに

mRNA は分子量が数十万と大きく、多様な高次構造を形成するため、その不純物も多様になります。キャピラリーゲル電気泳動による mRNA 断片の評価、酵素消化と LC/MS 法によるポリ A 鎖および 5' キャップ部分の評価など、品質評価には適切な前処理と複数の分析手法の組み合わせが必要です<sup>3)</sup>。また、免疫プロットを用いた dsRNA、定量 PCR を用いた鋳型 DNA など、特定の不純物の管理も不可欠です。さらに、mRNA が脂質ナノ粒子 (LNP: lipid nanoparticle) に封入された製剤では LC/CAD 法による

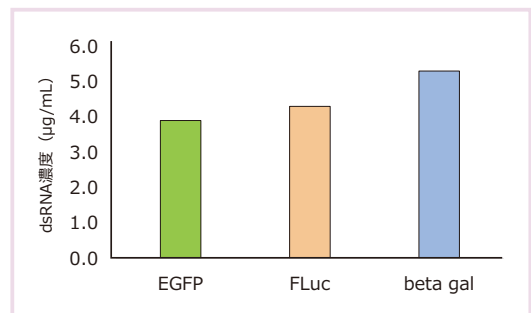


図5 mRNA (EGFP, FLuc, beta gal) の dsRNA 濃度

脂質の定量のほか、セルベースアッセイによるタンパク産生を確認する力価試験など、多様な評価が求められます。当社はいずれの試験に対してもお客様の研究開発ステージで必要とされる GMP (Good Manufacturing Practice) などの規制要件にあわせて、分析法開発、分析法バリデーション、品質・安定性試験が可能です。さらに、当社では mRNA 医薬品の国際的な品質評価基準策定の流れに従う提案型のサービスに努め、今後、新たな測定手法として期待される次世代シーケンサーや高次構造解析にも取り組み、お客様の多様なニーズに最大限応えてまいります。

## 文献

- 1) 米国薬局方 (USP): "Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality (Draft Guidelines) - 2nd Edition" <<https://go.usp.org/mRNAVaccineQuality>>. (accessed 2023-12-23) .
- 2) 厚生労働省: 厚生労働省告示第277号, "生物学的製剤基準 (令和5年9月25日)" (2023年) .
- 3) 山本武範, 内田恵理子, 井上貴雄: 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, PMDRS, **54**, 300 (2023) .

市田 悠  
(いちだ ゆう)  
大阪ラボトリー