

●キャピラリーゲル電気泳動による mRNA 医薬品の純度分析

TN529

Purity Analysis of mRNA Therapeutics by Capillary Gel Electrophoresis

【概要】

当社では、mRNA(messenger RNA)医薬品を対象として、これまでの知見を活かして測定条件の妥当性を検証し、キャピラリーゲル電気泳動による純度分析法を確立しました。以下に本手法を用いて標準化した不純物の品質評価事例を紹介します。なお、本分析サービスは、信頼性基準および GMP(Good Manufacturing Practice)規制下でも実施可能であり、当社は他の分析サービスと合わせて mRNA 医薬品の国内外の製造販売承認申請向けのデータ取得を支援します。

Keywords: 核酸、伝令リボ核酸、メッセンジャーRNA、完全性試験、mRNA 不純物

【背景】

mRNA 医薬品は DNA を鋳型にして転写合成された mRNA を投与することで、標的タンパク質を産生させ、治療や予防効果を発揮します。しかしながら、有効成分である mRNA は不安定であり、合成過程で生成する不純物(mRNA 分子内および分子間架橋による多様な構造など)が免疫原性を示すことで、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 の品質評価が重要になりますが、標準化された評価方法がなく、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¹⁾ および厚生労働省の生物学的製剤基準²⁾ を参考に品質評価が実施されています。

【測定手法】

キャピラリーゲル電気泳動は、分析対象成分の大きさ、形および荷電などの違いから DNA や抗体を含むタンパク質など多様な成分を分離できる手法です。最近では、9000 塩基程度までの RNA の完全性と品質を評価するための測定キットが発売され、mRNA 医薬品を対象とした分析も可能になりました。従来から使用されてきたアガロースゲル電気泳動に比べ、より分解能が高く、再現性の高い分析が可能となります。

【事例】

① 測定条件

キャピラリーゲル電気泳動による純度測定法の開発にあたって、mRNA としては EGFP(996 塩基)、FLuc(1929 塩基)および beta gal(3420 塩基)の市販品を使用しました。また、測定条件の妥当性を検証するため、分子量マーカーとして single strand RNA Ladder(0.5~9 千塩基)を使用しました。変性条件(ホルムアルデヒド(変性剤)添加、70°Cで5分間加熱後、急冷)および非変性条件(変性剤添加なし、70°Cで5分間加熱後に急冷)に付した分子量マーカーと各 mRNA をキャピラリー電気泳動装置で測定し、解析ソフト(32 Karat software)を用いて各 mRNA の主成分(Main)および不純物(Impurities)のピークを同定しました。本測定で検出された不純物は、mRNA の分子内および分子間架橋により生成されたものと考えられます。全体のエレクトロフェログラム(Fig.1)と不純物を拡大したエレクトロフェログラム(Fig.2)を以下に示します。さらに、得られたピークの補正ピーク面積値(corrected peak area %, CPA %)を算出しました(Table 1)。変性ならびに非変性条件ともに Ladder の分離が確認されたことから、測定条件は妥当であると判断しました。

② 測定結果

各 mRNA において、非変性条件と比較して変性条件では不純物の割合が減少し、主成分の割合が増加しました。これは変性条件で分子内および分子間架橋が解離して一本鎖の mRNA の状態になった影響であること

が示唆されます。一方で、EGFP と FLuc と比較して、beta gal については変性条件でも不純物の割合が高いことが示されました。これは mRNA の塩基長が大きいほど高次構造を形成しやすいことを示唆しています。

以上のことから、塩基長の異なる 3 種の mRNA を用いて測定条件の妥当性を検証し、mRNA の主成分と不純物の割合を算出できる純度分析を確立しました。測定条件の検証は知識と経験が必要ですが、当社の確立した手法は様々な種類の mRNA 医薬品の純度評価に適用できます。

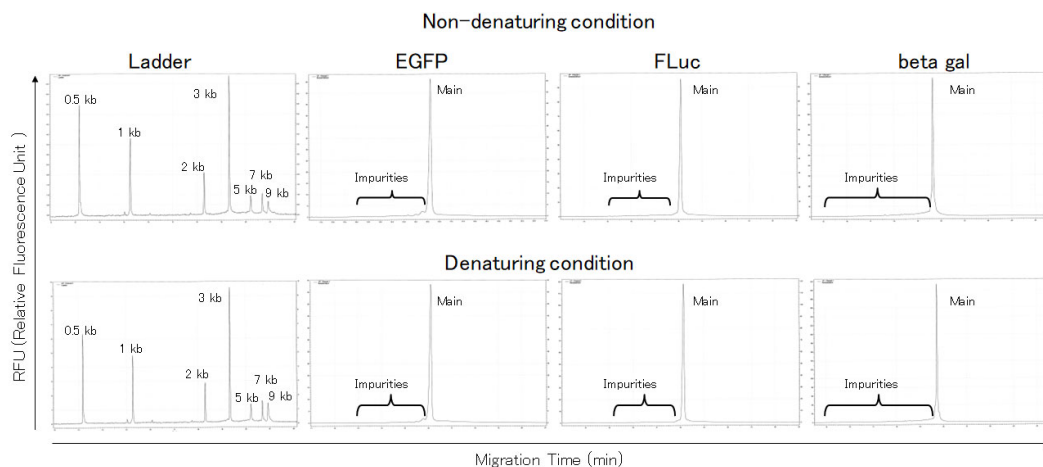


Fig.1 Electropherograms of Ladder, EGFP, FLuc, and beta gal under non-denaturing and denaturing conditions

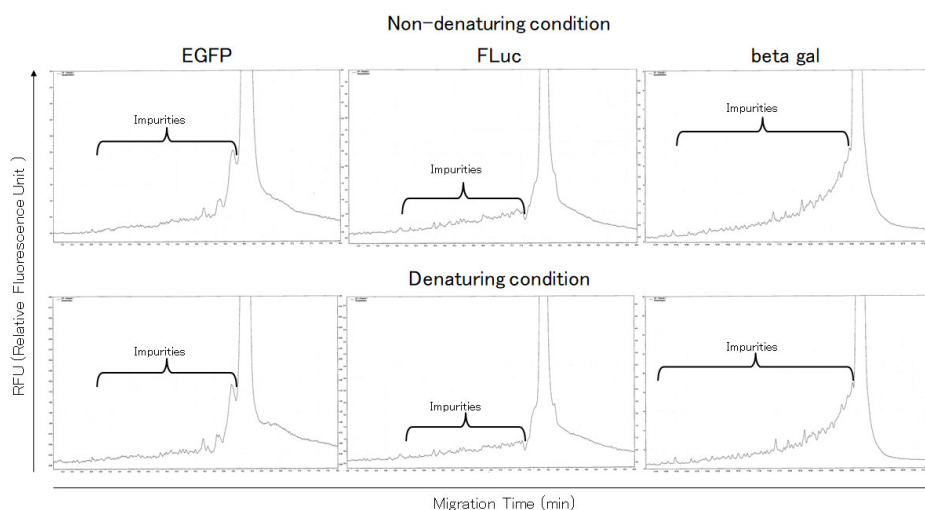


Fig. 2 Enlarged electropherograms of mRNA impurities under non-denaturing and denaturing conditions

Table 1 CPA% of the main mRNA and its impurities under non-denaturing and denaturing conditions

mRNA	Non-denaturing condition		Denaturing condition	
	Main CPA %	Impurity CPA %	Main CPA %	Impurity CPA %
EGFP	90.4	9.5	92.6	7.3
FLuc	90.9	9.1	95.4	4.6
beta gal	71.2	28.8	76.5	23.5

[文 献]

- 1) United States Pharmacopeia: “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).