

mRNA医薬の発現効率を高める 脂質ナノ粒子の製造方法

名古屋市立大学 大学院薬学研究科
薬物送達学分野 講師 小川昂輝

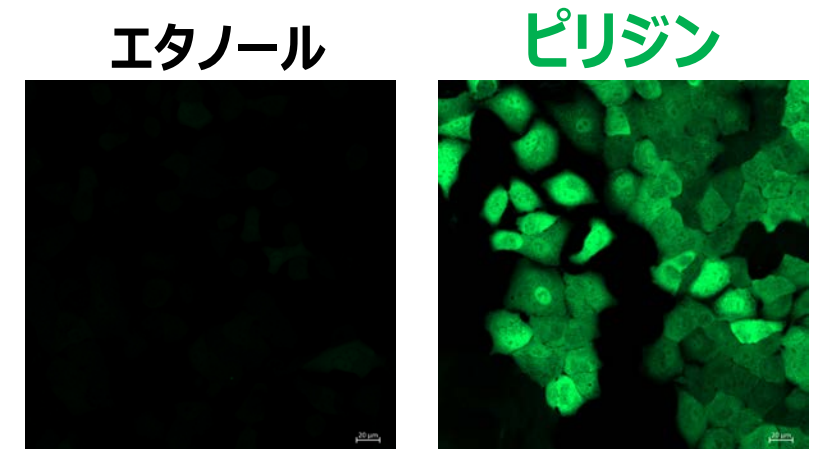
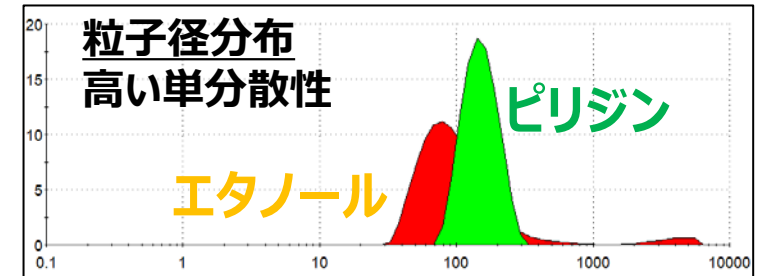
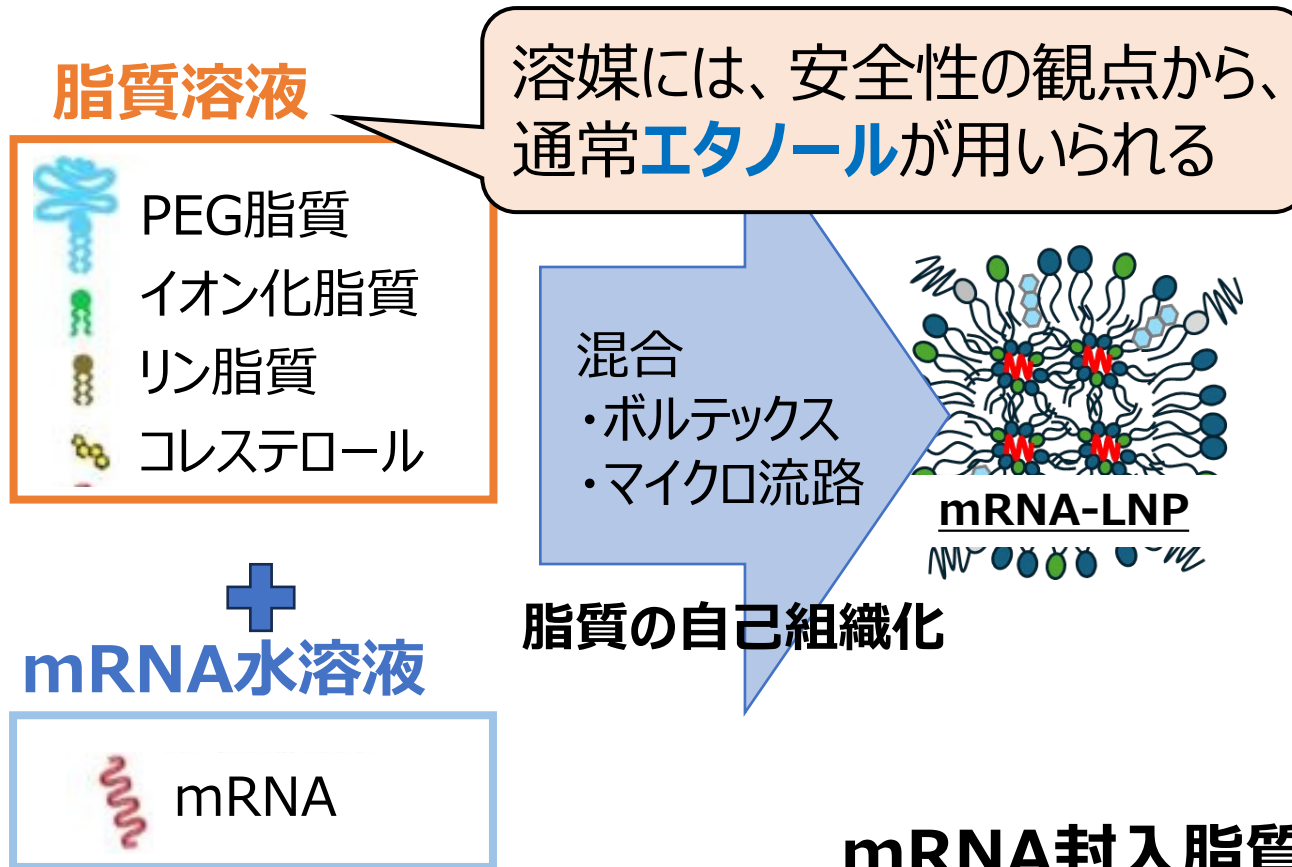
2024年10月29日

概要

製造時の有機溶媒組成を工夫することで、
mRNA封入脂質ナノ粒子の性能を向上できることを見出した。

mRNA封入脂質ナノ粒子の一般的な作製方法 (アルコール希釈法、広義には溶媒希釈法)

物理化学的性質・ in vitro/vivo機能



高いRNAトランスフェクション効率

mRNA封入脂質ナノ粒子の品質・機能を向上
させる有機溶媒としてピリジンを見出した。

mRNA医薬品について

- 人工mRNAに特定のタンパク質をコードした医薬品
- COVID-19ワクチンをはじめとする種々のワクチンや、疾患治療用医薬品として応用されている。

感染症ワクチン

COVID-19、インフルエンザ
サイトメガロウイルス、ジカ熱
狂犬病、HIV、マラリア
結核、EBウイルス

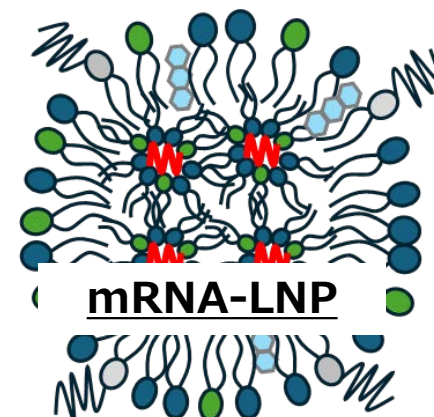
がんワクチン

メラノーマ、肺がん
乳がん、グリオーマ
胃がん、食道がん
肝臓がん

疾患治療用

固形がん、虚血性
血管疾患、嚢胞性
線維症、糖尿病、
自己免疫疾患

- 一般的にRNAは不安定（RNaseで分解される）
- 体内での分解を防ぎ、標的細胞の細胞質まで安定にmRNAを送達するキャリアが必要不可欠
- mRNA封入脂質ナノ粒子（mRNA-LNP）が最も有名（承認、臨床応用されている）



mRNA-LNPの製造方法

一般的な作製方法 (アルコール希釈法、広義には溶媒希釈法)

脂質溶液

- PEG脂質
- イオン化脂質
- リン脂質
- コレステロール



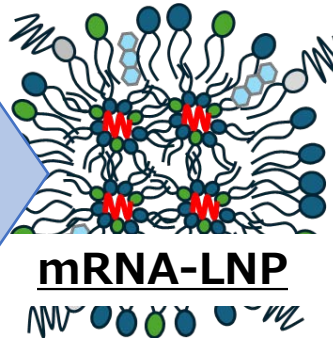
mRNA水溶液



溶媒には、安全性の観点から、通常**エタノール**が用いられる

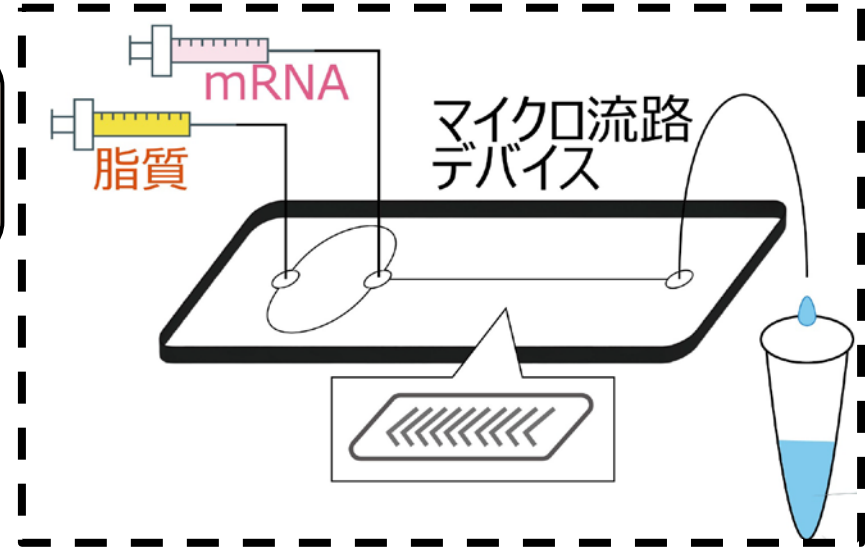
混合
・ボルテックス
・マイクロ流路

脂質の
自己組織化



粒子径：~100 nm
封入率：~100%

* 調製後、有機溶媒は透析、限外濾過で除去



非常に完成された製造技術であるが、**脂質を溶解する溶媒**についての情報は少ない。

溶媒を変更することで、脂質の溶解状態が変わり、mRNA-LNPの性質も変化するのではないか

種々の有機溶媒を用いた mRNA-LNPの製造

溶媒希釈法で用いる有機溶媒に求められる条件

- ① **脂質の溶解性が高い**
- ② **水と容易に混和する**
- ③ **常温で液体**

これらの性質に当てはまる有機溶媒を用いて、mRNA-LNPを作製した。

評価項目

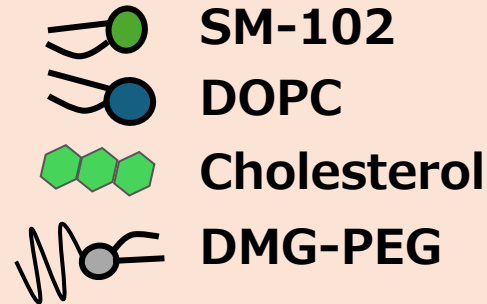
- 物理化学的性質
- In vitro, in vivoでのトランスフェクション効率
- 安全性
- 溶媒の残留性

種々の有機溶媒を用いた mRNA-LNPの製造

有機溶媒候補

- Ethanol
- Methanol
- 2-Propanol
- Acetonitrile
- DMF
- DMSO
- Acetone
- Pyridine
- 1,4-Dioxan
- THF
- 1-Propanol
- t-butanol
- Morpholine
- 4-Methylpyridine
- Pyrrolidine
- Piperidine

脂質溶液

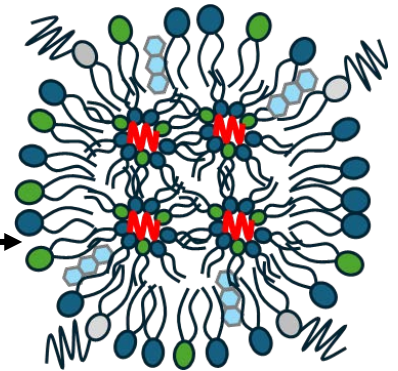


RNA水溶液



Mix

• Vortex



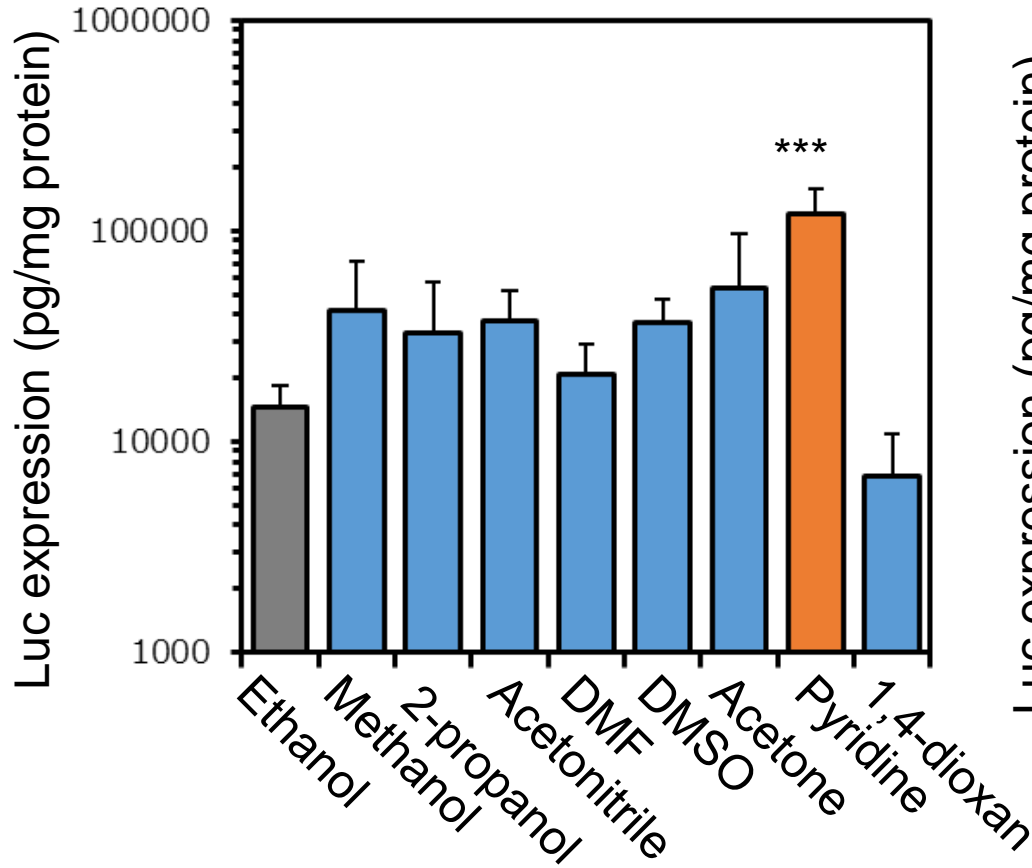
mRNA-LNP

mRNA-LNPの物理化学的性質

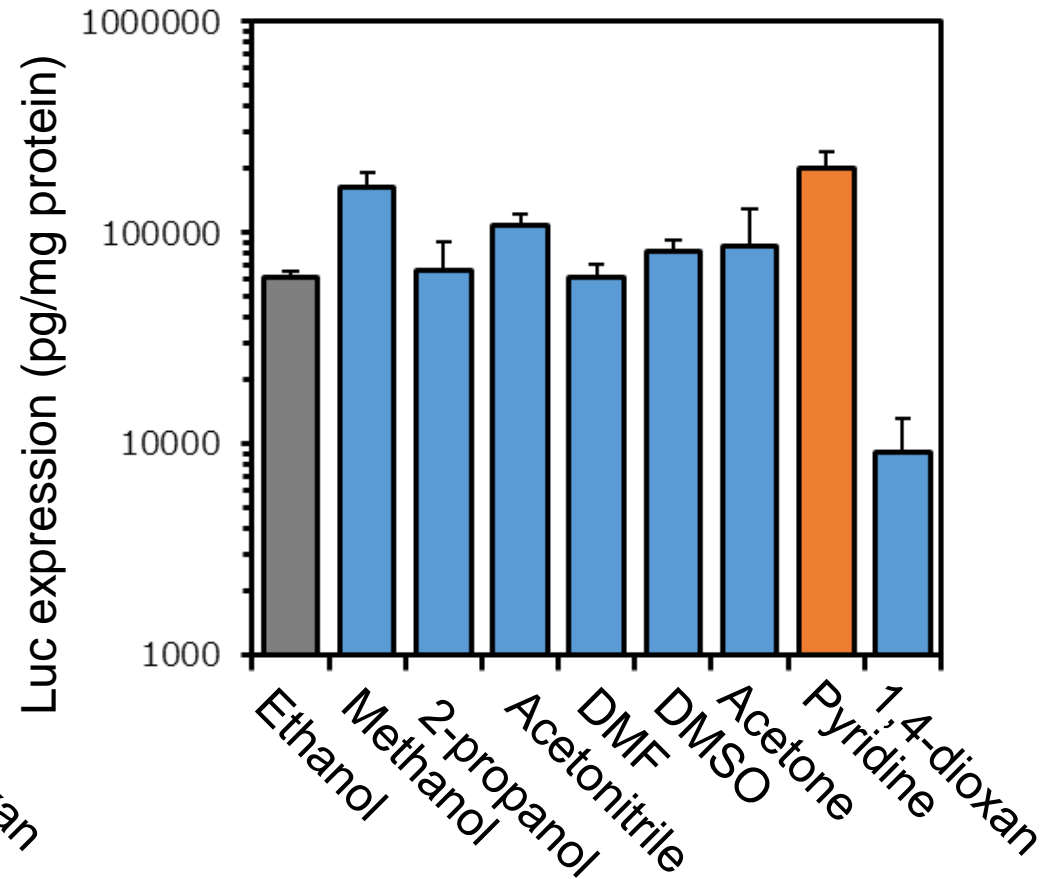
Solvents	Size (nm)	PDI	封入率 (%)	
Ethanol	90.4 ± 8.8	0.24 ± 0.03	99.0 ± 1.7	従来法
Methanol	90.0 ± 11.3	0.26 ± 0.07	96.5 ± 2.2	
2-Propanol	154.2 ± 10.0	0.12 ± 0.02	93.1 ± 1.5	
Acetonitrile	84.5 ± 7.3	0.20 ± 0.02	96.4 ± 3.5	
DMF	83.5 ± 6.1	0.24 ± 0.08	97.8 ± 1.9	
DMSO	95.3 ± 8.7	0.21 ± 0.05	96.3 ± 4.0	
Acetone	91.4 ± 4.6	0.22 ± 0.10	99.0 ± 1.8	
Pyridine	132.9 ± 7.5	0.11 ± 0.02	98.3 ± 0.3	新法
1,4-Dioxan	77.2 ± 8.8	0.27 ± 0.07	99.1 ± 1.2	
THF	409.3 ± 25.6	0.18 ± 0.00	99.7 ± 0.3	
1-Propanol	929.1 ± 154.2	0.62 ± 0.09	6.7 ± 7.6	不適
t-butanol	584.0 ± 128.8	0.44 ± 0.12	11.3 ± 13.5	
Morpholine	84.6 ± 7.1	0.39 ± 0.06	7.0 ± 12.2	
4-Methylpyridine	2215.7 ± 1192.6	0.58 ± 0.42	3.5 ± 6.1	
Pyrrolidine	266.7 ± 97.6	0.17 ± 0.06	3.7 ± 6.4	
Piperidine	394.3 ± 127.5	0.48 ± 0.02	5.4 ± 9.4	

mRNA-LNPによる RNAトランスフェクション効率

A549 cell



HepG2 cell



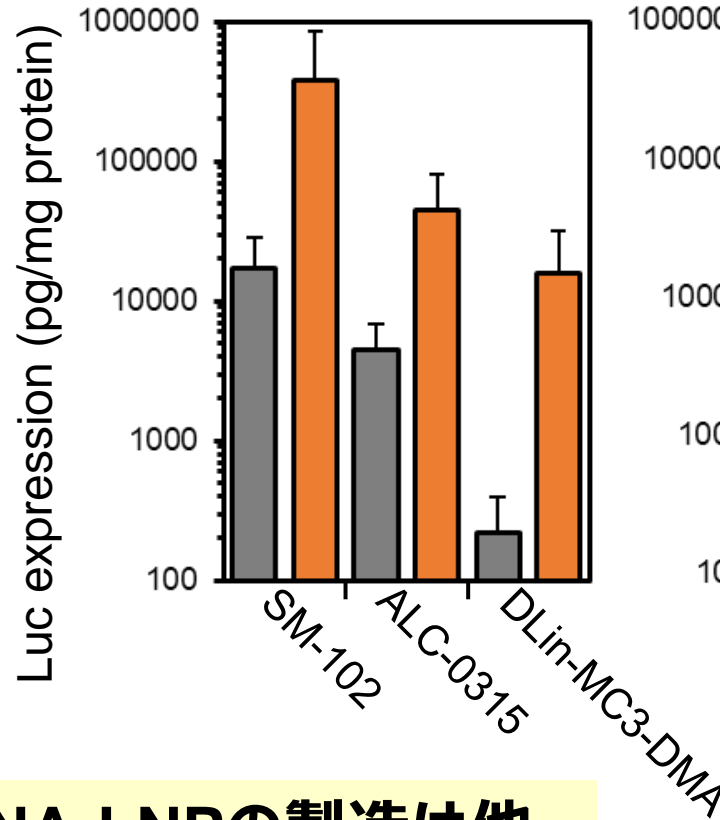
粒子の品質・機能の観点から、ピリジン mRNA-LNP の調製に適している

イオン化脂質の汎用性

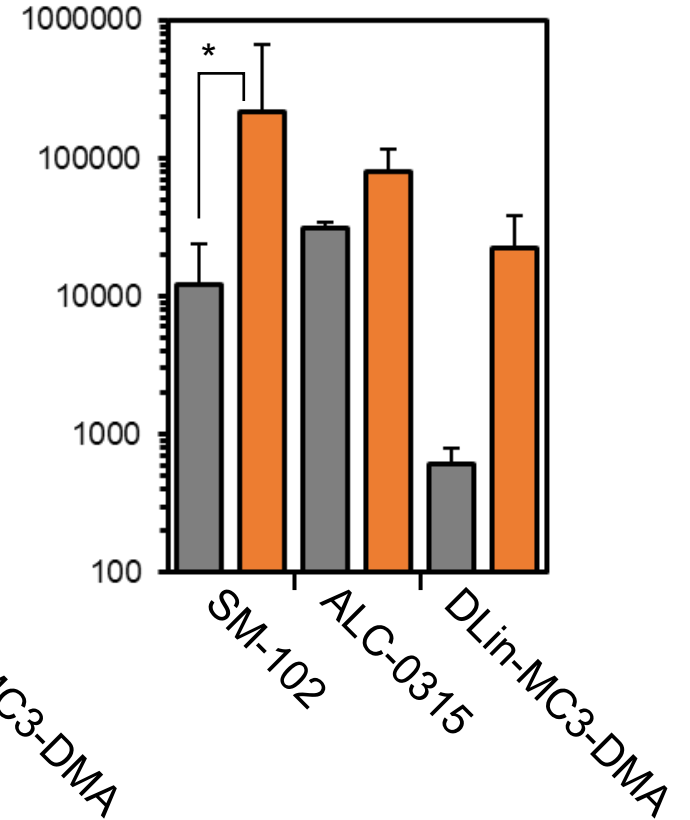
脂質組成

- **イオン化脂質**
 - ✓ SM-102
 - ✓ ALC-0315
 - ✓ Dlin-MCS-DMA
- **DOPC**
- **コレステロール**
- **DMG-PEG**

A549 cell



HepG2 cell



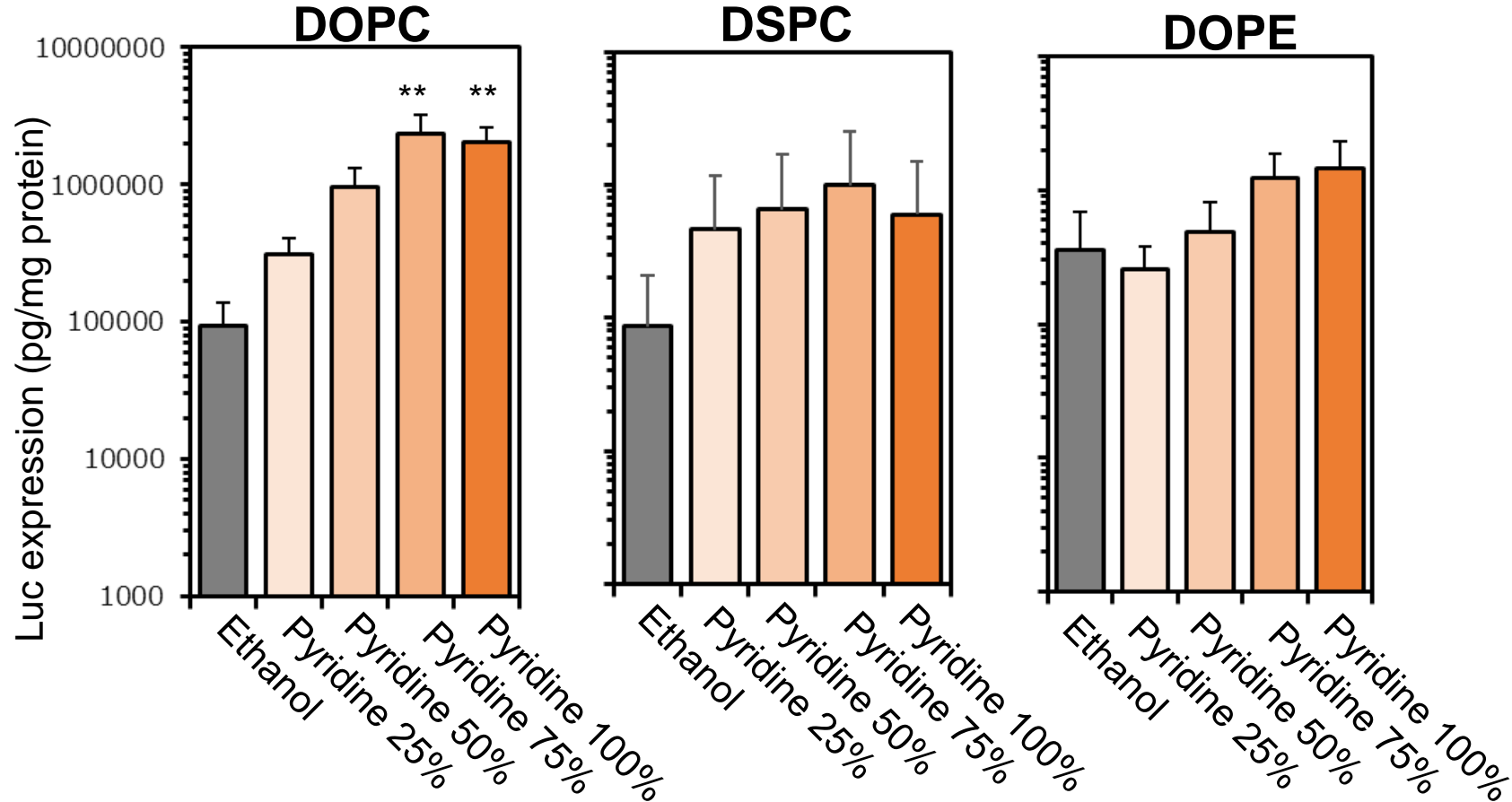
■ エタノール
■ ピリジン

- **ピリジンを用いたmRNA-LNPの製造は他のイオン化脂質でも応用可能**
- **マイクロ流体デバイスを用いた調製でも同様の結果が得られることを確認している**

リン脂質の汎用性

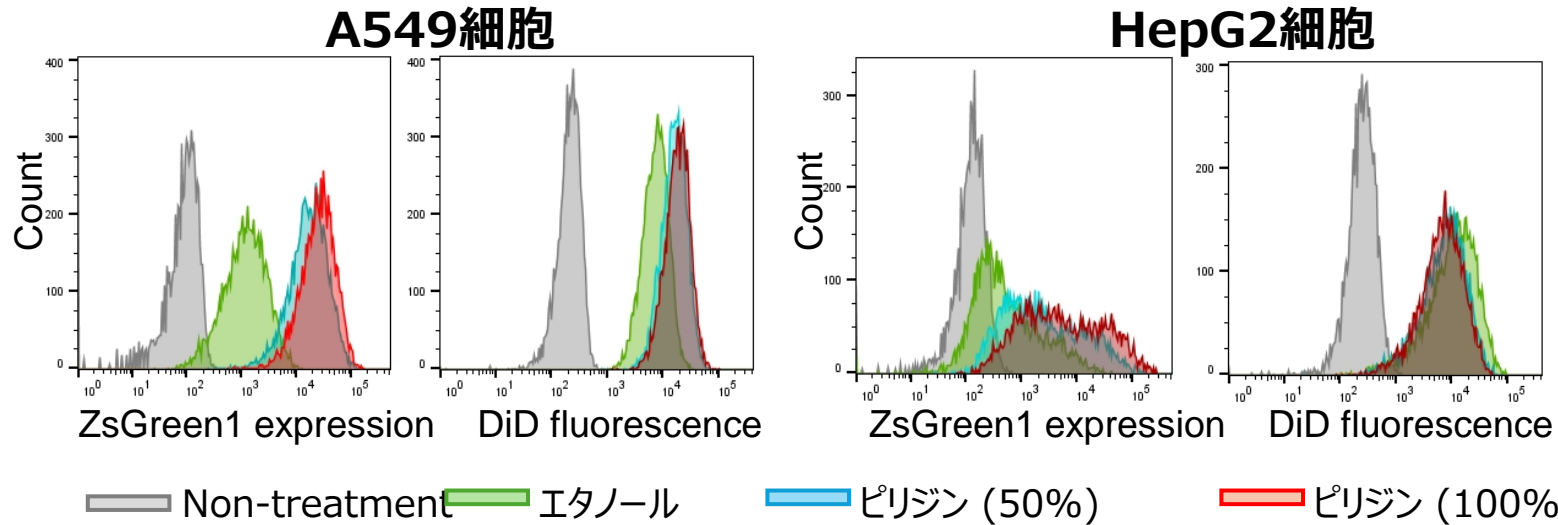
脂質組成

- イオン化脂質
- リン脂質
 - ✓ DOPC
 - ✓ DSPC
 - ✓ DOPE
- コレステロール
- DMG-PEG

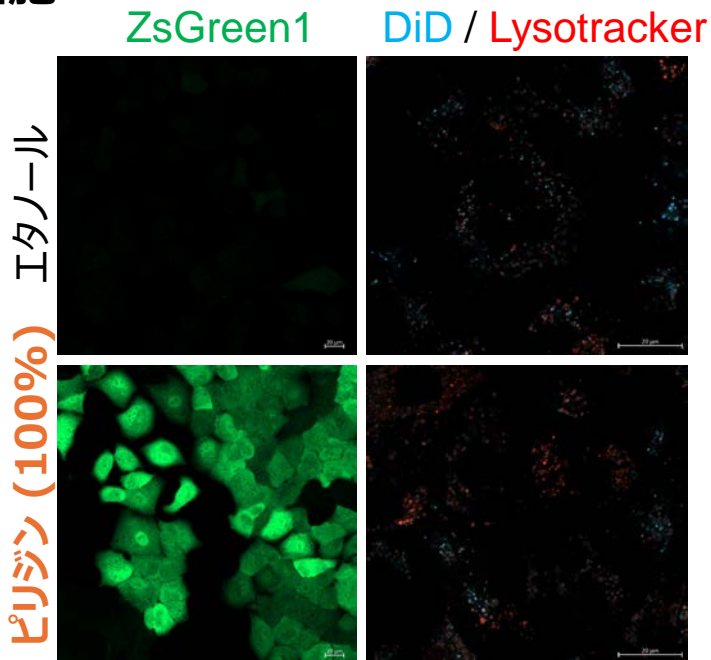


ピリジンを用いたmRNA-LNPの製造は他のリン脂質でも応用可能

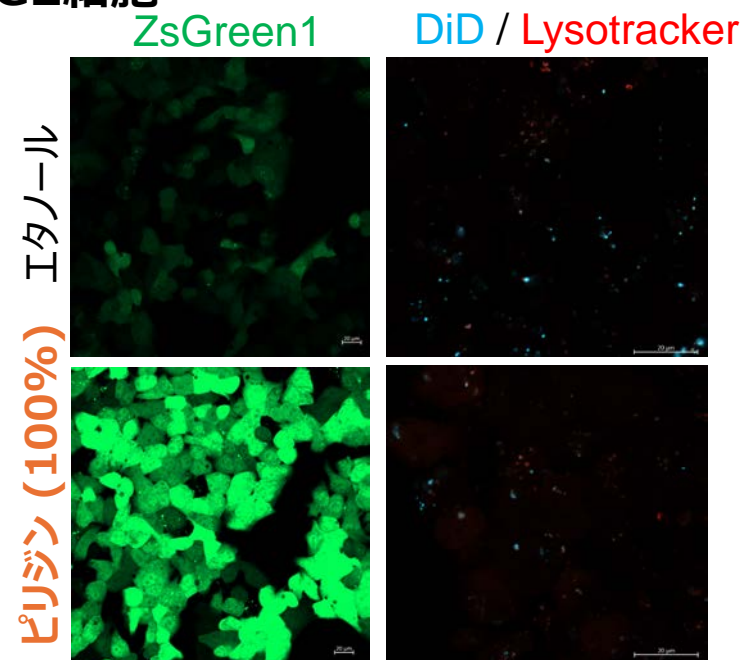
LNPの取り込みと発現の関係



A549細胞



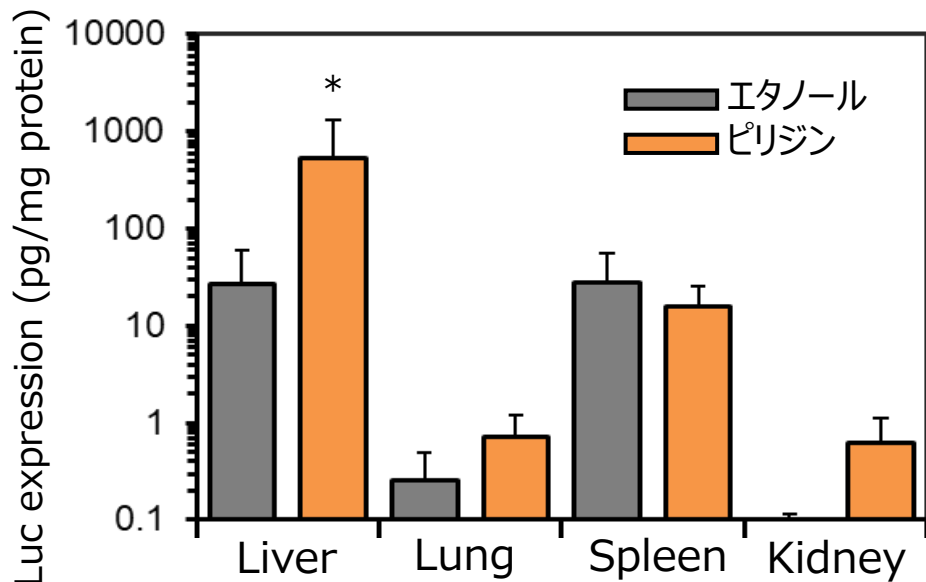
HepG2細胞



細胞内取り込み以外にもRNAトランスフェクション効率の増大に寄与する因子があると思われる

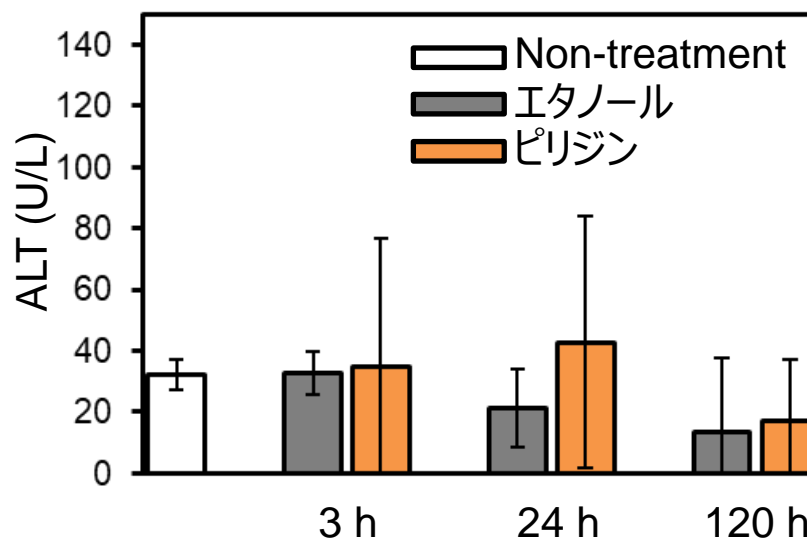
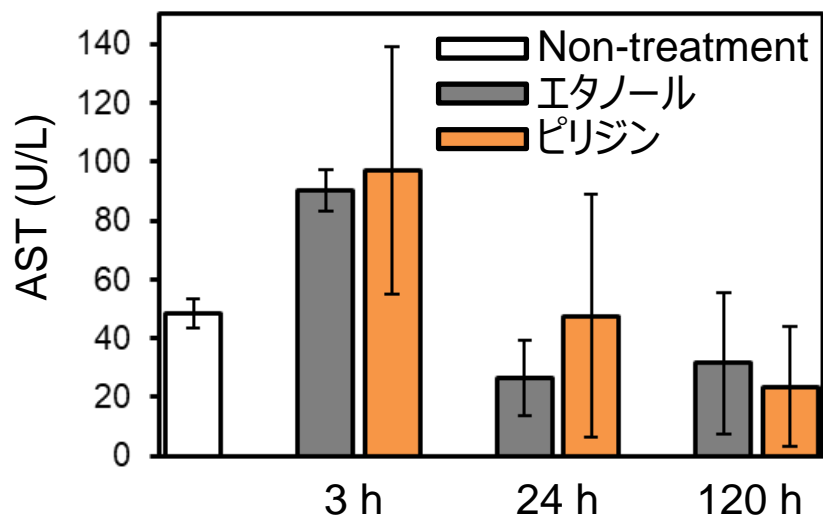
In vivoトランスフェクション効率

マウスに尾静脈後6時間後の各臓器の発現効率を定量した



- 主に肝臓において、ピリジンで作製した mRNA-LNPは高いトランスフェクション効率を示した。
- 肝臓への毒性はエタノールで作製した mRNA-LNPと同等であった。

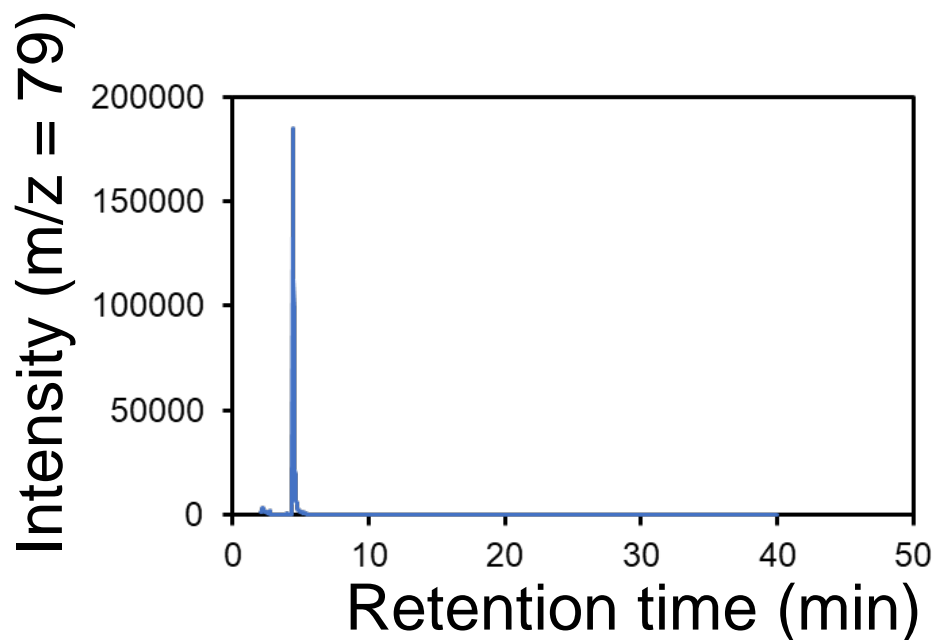
投与後のALS, AST値の変動



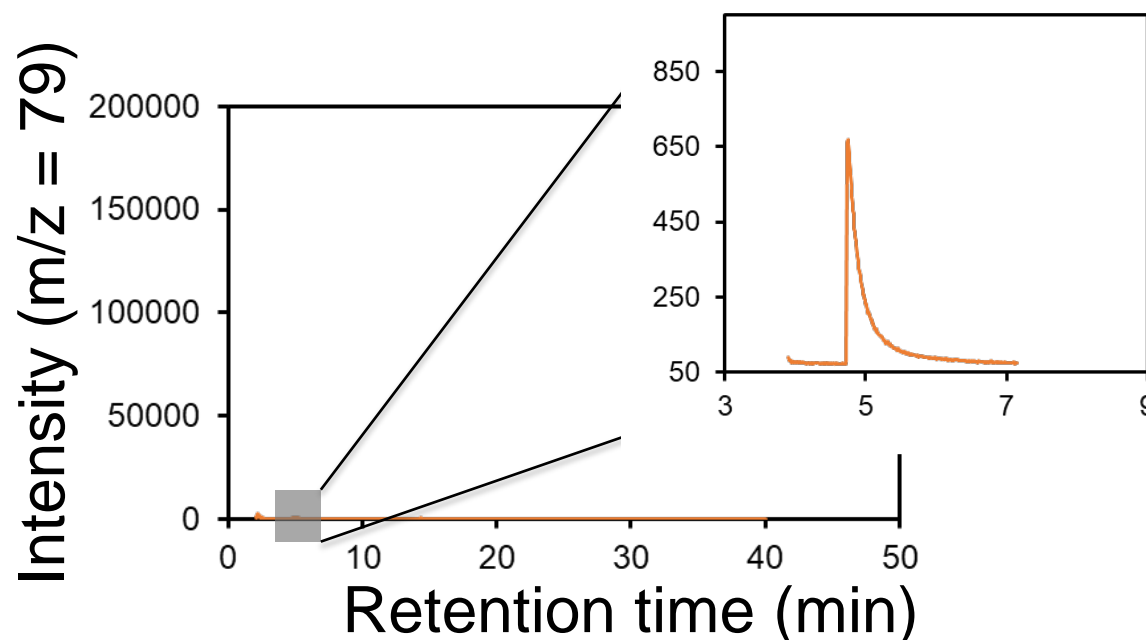
ピリジンの残留性

GC-MSを用いてピリジンの濃度を測定した

200 ppm ピリジン標準液



ピリジンで調製したmRNA-LNP (透析・限外濾過で精製後)



- 残留溶媒ガイドラインでは、残留ピリジン濃度の上限は200 ppm
- 適切に精製することで、医薬品の製造にも応用できることが示された

従来技術とその問題点

mRNA医薬を疾患治療へ応用するためには、**mRNAによるタンパク質発現効率を高める**ことが重要である。

mRNA-LNPの機能性を向上させる方法として、**機能化脂質の合成**や**RNA配列の最適化**などがある。

- 材料を新規に合成する必要がある
- mRNAの配列の再設計が必要

等の問題があり、既存の製品に適応することは難しい。

新技術の特徴・従来技術との比較


- mRNA医薬で重要となる、トランスフェクション効率を、特別な材料開発なしで簡単に向上させることに成功した。
- 様々な組成のLNP製造に汎用的に利用できる
- 従来のLNP製造プロセス（マイクロ流路を使った方法）を踏襲できる。

想定される用途





- 本技術は治療用mRNA-LNPの製造に適応することが有用である。
- 上記以外に、これまでエタノールで溶解できなかった脂質を組み込んだLNPの製造にも応用が期待される（次頁）。
- また、遺伝子機能解析用の研究用試薬への応用も想定される。

疎水性の高い「リガンド結合脂質」 のLNPへの修飾

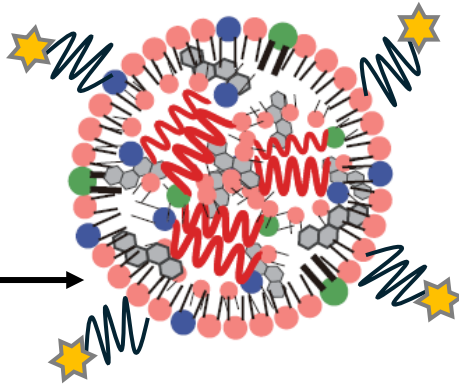

**DSPE-PEG – Ligand
の溶媒への溶解性**

エタノール	ピリジン
	
とけない	とける (>2 mM)

**脂質溶液
(ピリジン溶液)**

-  SM-102
-  DOPC
-  Cholesterol
-  DSPE-PEG – Ligand

mRNA水溶液



**Ligand修飾
mRNA-LNP**

実用化に向けた課題

- ピリジンで調製したmRNA-LNPの毒性は低いことが確認されたものの、ピリジンの残留がどこまで許容されるのかを評価する必要がある。
- 現在、ピリジンがmRNA-LNPの機能を向上させるメカニズムは不明である。脂質の構造と生体作用の関連を調査することでメカニズム解明を行っていく。

企業への期待

- ピリジンを有機溶媒として使ったLNP製造法の確立（最適なマイクロ流体デバイス、スケールアップ法の開発など）。

企業への貢献、PRポイント

- これまでのLNP製造における有機溶媒組成を変更するだけで、LNPの機能を劇的に向上させられる技術
- 特別な装置、材料を必要としないため、迅速に導入可能
- mRNA-LNPの投与量を削減できれば製造コストを低く抑えられる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：核酸封入脂質ナノ粒子の製造方法
- 出願番号：特願2024-012999
- 出願人：公立大学法人名古屋市立大学
- 発明者：小川昂輝、田上辰秋、尾関哲也、三宅慧

お問い合わせ先

名古屋市立大学
産学官共創イノベーションセンター

TEL 052-853-8309

FAX 052-841-0261

e-mail ncu-innovation@sec.nagoya-cu.ac.jp