

制御された連続凍結乾燥による mRNA LNPの安定化

White Paper



目次

はじめに	3
従来のライオフィライゼーション(凍結乾燥)の欠点と課題	4
連続的かつ制御されたライオフィライゼーション	5
ライオフィライゼーションを成功させる ための製剤組成の重要性	7
ライオフィライゼーションによる強化された熱安定性は、 トランスフェクション効率を保持	8
結論	9
参考文献	10

はじめに

数十年にわたる広範な研究の結果、メッセンジャーRNA-脂質ナノ粒子(mRNA-LNP)に基づくワクチンは、その幅広い適用性、テラーメイドの特性、迅速かつセルフリーでの製造能力により、従来のワクチンに代わる有望な選択肢として浮上しています。しかし、mRNA-LNPの有効性には、mRNA配列設計の複雑さ、最適な脂質ナノ粒子組成、および長期安定性の確保の課題などに直面しています。

特に後者の問題は、液体状態で冷蔵温度においてmRNAが酸化や加水分解に弱いことから生じます。その結果、適切な保存期間を保证するために、mRNA-LNPを凍結状態で保存する必要があります。

この厳格な超低温保存条件は、mRNA-LNPワクチンの効率的な流通を妨げ、世界の公衆衛生システムに大きな影響を及ぼします。従って、mRNA-LNPの長期安定性を向上させるための革新的な解決策が不可欠となっています。

ライオフィライゼーション(freeze-drying)は、mRNA-LNP製剤を安定化させ、冷蔵あるいは室温での安定性を向上させる最も有望なアプローチの一つと考えられています。現在、mRNA-LNPが成功裏に乾燥された事例は少ししかありません。

Aiらは、凍結乾燥されたSARS-CoV-2 mRNA脂質ナノ粒子ワクチンが、25°Cで6か月以上経過しても物理化学的特性や生物活性に変化がないことを報告しました。さらに、この乾燥ワクチンは、マウス、ウサギ、アカゲザルのいずれにおいても強力な体液性および細胞性免疫を誘発できました。

さらに、ZhaoらやMuramatsuらの研究は、凍結乾燥がmRNA-LNPワクチンの十分な耐熱性を確保するのに適した技術であるという事をさらに裏付けており、ライオフィライゼーションがmRNA-LNPワクチン製造のゴールドスタンダードになると主張することもできます。しかしながら、ライオフィライゼーションは時間がかかり、高価で、制御が難しく、労力を要するプロセスです。その結果、これらがmRNA-LNPワクチンの迅速かつコスト効率の良い開発を妨げています。

このホワイトペーパーでは、連続的かつ制御されたライオフィライゼーションに関連する利点について説明します。

この乾燥技術により、R&DとMSATチームは費用と人員を節約することができます。

また、ライオフィライゼーションプロトコルを再構築する必要なく、スムーズなスケールアウトへが可能となります。

この結果、医薬品やワクチンの市場投入までの時間を短縮される可能性があります。

従来のライオフィライゼーションの欠点と課題

ライオフィライゼーションは、50年以上の経験を経てもなおバッチ式プロセスであり、非常に時間がかかり、非効率的で高コストです。乾燥サイクルは、目標とする残留水分レベルを達成するため数日間続く事が一般的です。このような長い処理時間は、経済的収益に悪影響を及ぼします。

そのため、プロセス規模が大きくなり1回の運転で数十万単位の投与量を乾燥させる凍結乾燥サイクルが発生します。その結果、このような大量の単位投与量の乾燥中にプロセスが失敗すると、莫大な損失が発生します。さらに、このような巨大なバッチサイズは、市場の需要変動に対応しにくいという問題もあります。

ライオフィライゼーションに関連する、もう一つの過小評価されている課題は、凍結乾燥機内の熱伝達の不均一性によるバッチ間、さらにはバイアル間の品質のばらつきです。バイアル間のエネルギー入力の違いが、残留水分含量の変動を引き起こし、その結果、重要な品質特性に変動が生じます。この内在的なばらつきを補うために、研究者は製剤開発時に非常に保守的な温度設定を使用します。その結果、一部の製剤は最適ではない凍結乾燥の経路を辿ることになり、製剤候補リストから除外される可能性があります。

探索段階での初期乾燥サイクルから生産規模へのスケールアップは、主に研究室規模の凍結乾燥機から本格的な生産規模の凍結乾燥機への移行に伴う熱伝達の変動に起因する重要な課題を抱えています。全体として、スケールアッププロセスは時間がかかり、材料を多く消費するものと見なされています。

製品品質のばらつきとスケールアップ段階での消費材料の変動は、高コストかつ貴重なmRNA-LNPワクチンとは相容れないものです。カスタマイズされた遺伝子療法に使用される単位あたりのmRNA-LNPの高い価値は、バッチ式のライオフィライゼーションによる品質と変動の制約とはうまく一致しません。連続的かつ制御されたライオフィライゼーションの導入は、上記の多くの懸念を解決することができます。

連続的かつ制御された凍結乾燥

連続的かつ制御された凍結乾燥は、バイアルレベルでのプロセス制御によって高品質の製品を確保する新しい乾燥技術です。この乾燥技術は、スピンドリングによって可能にされる短い乾燥時間(数時間)が特徴です。

スピンドリングの段階では、液体製剤を含むバイアルがその長軸を中心に高速で回転します。このため、液体製剤はバイアル壁全体に広がります。冷却ガスの適用により、液体成分が凍結し、内部バイアル壁に薄い凍結物質の層が形成されます。その結果、この薄い製品層は数日ではなく数時間で乾燥することができます。

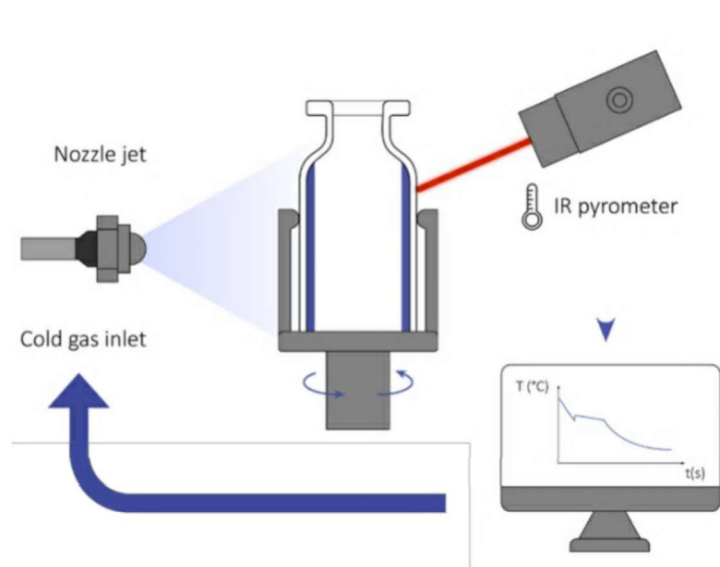


図1: 冷凍・乾燥時の閉ループPIDアルゴリズムの図解

スピンドリングプロセスでは、図1に示すように、リアルタイムの赤外線温度計測を利用したフィードバック制御ループにより、バイアルの精密な温度制御が実現されます。具体的には、冷却は回転するバイアルに対して冷たいガスを吹き付けることで行われ、バイアルの温度は赤外線(IR)温度センサーで監視します。初期の液体冷却段階では、閉ループ制御により事前に設定された冷却速度が達成されます。連続的なリアルタイムの赤外線温度計測に基づき、冷たいガスの流量が動的に調整され、指定された速度でバイアルが冷却されるようにします。氷核形成が開始されると、冷たいガスの温度を変化させながら一定の質量流量を保ち、冷たいガスとバイアルの間の一貫した温度差を維持しながら凍結速度を調整します。結晶化後は、形成された氷層のさらなる冷却も液体冷却時と同様の閉ループ制御手順によって行われます。最終的に、凍結した薄い製品層が得られ、その温度は凍結製品のガラス転移温度を大幅に下回ります。

次に乾燥段階は、凍結製品の平衡圧力以下に圧力を下げることで開始されます。乾燥段階の主な特徴は、独自のクローズループ制御アルゴリズムと短い乾燥時間です。クローズループ制御乾燥の原理は、乾燥段階中のエネルギー投入を制御することにより一定のバイアル温度を維持します。乾燥に使用されるエネルギーは、乾燥チャンバーユニットの外に設置された赤外線ヒーターから供給され、サファイア窓を通してバイアルに放射されることで必要なエネルギーを提供します。IRヒーターの電力入力は、バイアル温度に基づいて変更され、バイアル温度を一定に保ちます。なお、IR温度計はバイアルの外側の温度を測定し、凝固面ではないことに留意してください。バイアルの外側の温度を使用することで、製品の内部温度が常に外側の温度よりも低いため、余分な安全マージンが設けられます。

乾燥段階の制御により、構造の崩壊による製品の損失のリスクが低減されます。これは、製品温度が間接的にのみ制御されるバッチ凍結乾燥と比較して著しい利点です。さらに、乾燥は最初から最適な方法で即座に実施されるため、プロセス最適化のための追加実験は不要です。したがって、この乾燥技術は、実験負荷と材料消費を最小限に抑えつつ、高品質の製品を得ることができます。また、バイアルレベルでの制御により、スケーリングアップではなく、スケーリングアウトの可能性が開かれ、初期の乾燥サイクルと生産時のプロセス特性と設定が同一のまま維持されます。

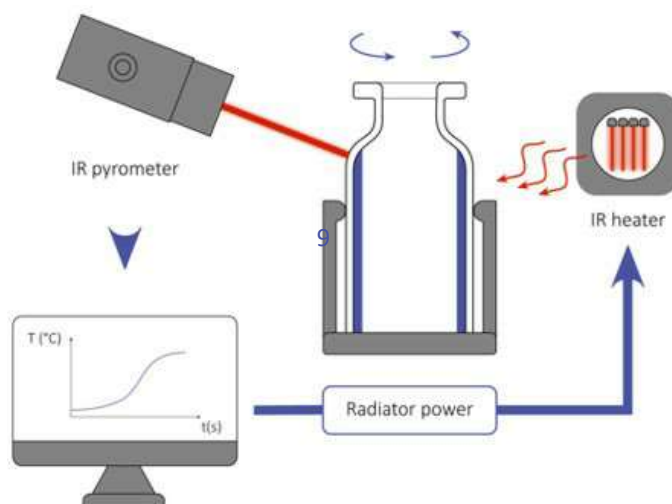


図2:冷凍・乾燥時の閉ループPIDアルゴリズムの図解

ライオフィライゼーションを成功させる製剤組成の重要性

Meulewaeterらによる研究は、この新しい乾燥技術の可能性を探り、古典的なバッチ凍結乾燥と比較しました。研究者らは、mRNAの凍結乾燥中の漏出を防ぐために、十分に高いイオン性脂質対mRNA重量比が必要であることを見出しました。また、リン酸塩やTrisは適切な緩衝剤であり、PBSは不適であることも示されました。この研究からのデータによれば、12.5 m/V%のスクロースを含む製剤において、C12-200 mRNA LNPsの成功したライオフィライゼーションが実現されました。これは、C12-200重量比を10から20に増やし、PBSの代わりにTrisまたは、リン酸塩緩衝液を使用することによって実現しました。さらに、Tris 20 mM中に懸濁されたC12-200の重量比が10のLNPsの凍結速度が変化しました。その結果、休息凍結がこの状況において優れた効果を示すことが明らかになりました。

クライオ電子顕微鏡(Cry-EM)分析では、ダイアライシスバッファと凍結乾燥プロセスがmRNA-LNPの形態に影響を与えることが示され、図3に示されています。TrisでダイアライシスされたmRNA LNPsは、以前の報告と一致する固体アモルファスなコアを示しました。

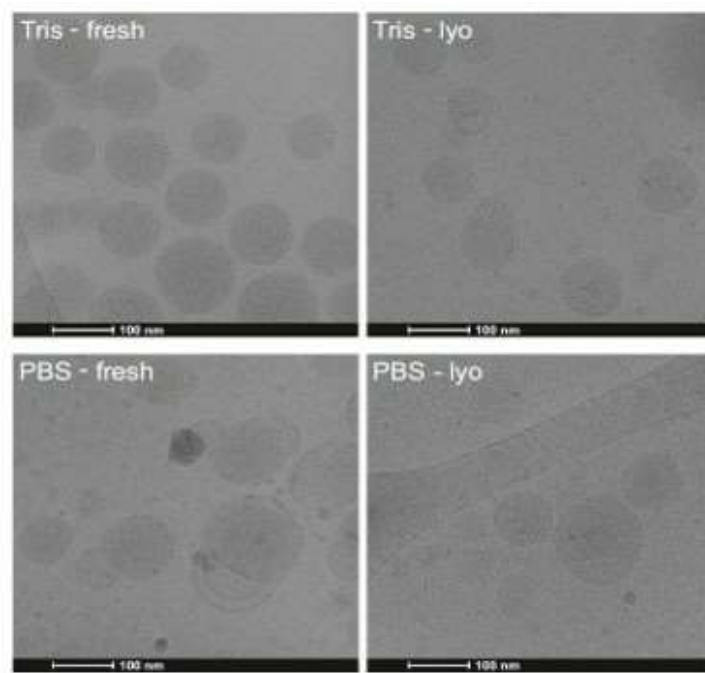


図3: TrisまたはPBS中で透析および凍結乾燥したmRNA LNPの形態。

特筆すべきは、PBSでのダイアライシスが、mRNA-LNPに異なる形態を持つものを生成したことです。

これには、mRNAを封入すると思われる水性コンパートメントを含むLNPs(「ブレブ」とラベル付けされたもの)が含まれています。さらに、これらのブレブの一部は、完全にLNPから分離してリポソーム構造を形成しました。これらの異なる形態は、ライオフィライゼーションプロセスに異なる反応を示しました。Tris中に懸濁されたLNPsのライオフィライゼーションでは、物理的ストレスによって誘発された相分離により、ブレブが形成されました。一方、PBS中に懸濁されたmRNA LNPsのライオフィライゼーションでは、主に水性ポケットが観察された新鮮なLNPsに欠ける多層構造(multilamellar)が形成されました。

ライオフィライゼーションによる強化された熱安定性は、トランスフェクション効率を保持

この研究の目的は、ライオフィライゼーションがmRNA-LNPの安定性を向上させるかどうかを評価することであり、室温(22°C)または高温(37°C)で保存した場合の影響を調査しました。mRNA-LNPsは、C12-200重量比を20とし、Tris 20 mM(pH 7.4)中に12.5%のショ糖を凍結乾燥保護剤として配合されました。その結果、mRNA-LNPsは水性状態で22°Cで、また凍結乾燥した状態で22°Cおよび37°Cで12週間保存されました。

室温(22°C)で保存された水性mRNA-LNP分散液では、トランスフェクトされた細胞数と平均蛍光強度(MFI)の両方で30%から40%の顕著な減少が観察されました(図4AおよびB)。

一方、凍結乾燥サンプルは、22°Cまたは37

°Cで保存しても12週間以上の間トランスフェクション効率を維持し、ライオフィライゼーションの明らかな利点を示しています。

ただし、ライオフィライゼーションされたmRNA LNPsを37 °Cで保存した場合、粒子サイズが80nmから150 nmに増加したことが報告されました(図4EおよびF)。また、22°Cおよび37°Cでの保存は、水性および凍結乾燥条件の両方でmRNA-LNPsの封入効率にわずかな低下をもたらしました(図4CおよびD)。

重要なことに、封入効率は凍結乾燥および水性mRNA LNPsの両方で8週間安定していました。

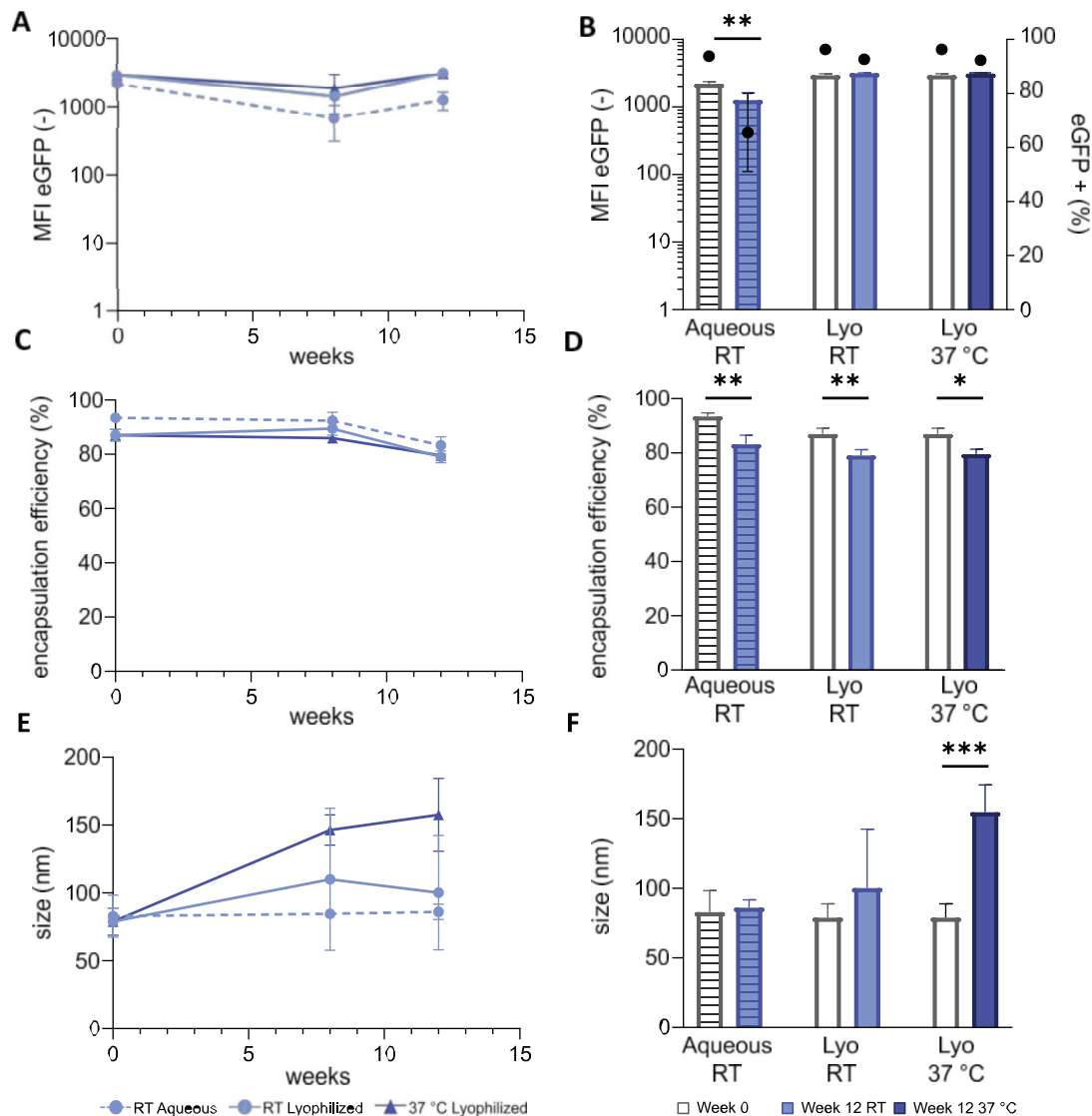


図4: 室温と37 °Cにおける水性および凍結乾燥状態でのmRNA-LNPsの安定性。

eGFPをコードするmRNAを含むmRNA LNPsは、C12-200 重量比を20として準備し、その後、pH 7.4のTris20mMでダイアライシスされました。mRNA LNPsは、水性状態で(破線と棒で示される)または12.5m/V%のショ糖存在下で凍結乾燥状態で(実線で示される)を、22 °Cおよび37 °Cで保存されました。

(A, B) HEK293T細胞におけるトランスフェクション効率は、生存細胞中のeGFPの平均蛍光強度(MFI)として表され、時間の経過に伴う変化が(A)に、週0(灰色)および週12(カラー)の特定の時点でのデータが(B)に示されています。

(C, D) カプセル化効率はRiboGreenアッセイを用いて測定され、時間の経過に伴う変化が(C)に、週0および週12の特定の時点でのデータが(D)に示されています。

(E, F) 粒子サイズは動的光散乱(DLS)を用いて測定され、時間の経過に伴う変化が(E)に、週0および週12の特定の時点でのデータが(F)に示されています。

結論

最適な高イオン化脂質/mRNA重量比と最適な添加剤を使用した場合、mRNA-LNPの特性とトランスフェクション効率は、連続的かつ制御されたライオフィライゼーション後も維持されました。

ライオフィライゼーションしたLNPを室温で12週間保存した後も、トランスフェクション効率は維持されました。結論として、連続的かつ制御されたライオフィライゼーションは、mRNA LNPを迅速かつ制御された方法で乾燥させる機会を提供することが証明されました。

参考文献

- Addressing the Cold Reality of mRNA Vaccine Stability, Daan J.A. Crommelin et al., Journal of Pharmaceutical Sciences 110 (2021) 997-1001
- Targeting cancer with mRNA–lipid nanoparticles: key considerations and future prospects, Kon et al., Nature Reviews Clinical Oncology ,Volume 20 , November 2023 ,739–754
- Lyophilized mRNA-lipid nanoparticle vaccines with long-term stability and high antigenicity against SARS-CoV-2, L. Ai et al., Cell Discovery 9 (2023)
- Lyophilization provides long-term stability for a lipid nanoparticle-formulated, nucleoside-modified mRNA vaccine, Muramatsu et al., Molecular Therapy Vol. 30 No 5 May 2022
- Evaluation of a PAT-based in-line control system for a continuous spin freeze-drying process, Leys et al, International Journal of Pharmaceutics 641 (2023) 123062
- Continuous freeze-drying of messenger RNA lipid nanoparticles enables storage at higher temperatures, S. Meulewaeter et al., Journal of Controlled Release 357 (2023) 149–160



Rheavita.com

Poortakkersstraat 9C
9051 Ghent, Belgium

info@rheavita.com