

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：連続生産を用いた核酸脂質ナノ粒子製造の実用化研究

Practical research on nucleic acid lipid nanoparticle production using continuous production

研究開発実施期間：令和3年5月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：松崎 高志

Takashi Matsuzaki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科 特任准教授

Osaka University Graduate School of Medicine・Specially, Appointed Associated Professor

II 研究開発の概要

<研究開発の背景>

昨今の COVID-19 パンデミック禍におけるワクチン開発において、核酸（mRNA）を有効成分とする複数の新規脂質ナノ粒子（Lipid nanoparticle: LNP）製剤が迅速に開発されている。日本国内で核酸 LNP ワクチン製剤を迅速に開発・生産し、新興感染症のパンデミックへ柔軟に対応するためには、初期開発から短期間に生産スケールまでスケールアップ可能で、その後の需要の急増／急減に応じた製造のスケールアップ／ダウンに柔軟に対応できる、「連続生産」を用いた核酸 LNP 製剤の開発・製造が必要不可欠であると考えた。また研究代表者の松崎らは、独自に開発した粒子径制御が可能な脂質ナノ粒子のインライン製造技術“SQUED”を用いて核酸 LNP 製剤の開発を進めており、本 SQUED 技術をベースに連続生産へ最適化することで、核酸 LNP 製剤の他にない「連続生産プラットフォーム」を構築できると着想した。

<研究開発の目標・ねらい>

本研究では、核酸医薬のデリバリー技術として新型コロナウイルス感染症（COVID-19）ワクチンでも大きな注目を集めている核酸 LNP 製剤の製造を、申請者が独自に開発し治験薬製造実績もある脂質ナノ粒子インライン製造技術 SQUED（JPW02019088193A1）を用いて連続生産に最適化し、世界初の「核酸 LNP 連続生産プラットフォーム」として開発することを目的としている。本連続生産プラットフォームは、将来的に LNP に限らず様々な核酸医薬の製剤化基盤技術となることを念頭に開発を進める。また連続生産は、ICH Q10 および Q13 ガイドラインに基づき、開発する連続生産のプロセスが「管理できた状態」にあることを、「製剤品質」および「製造プロセスの稼働性能」のリアルタイムモニタリングにより検証し、製造プロセスを高度化

する。核酸 LNP の連続生産化により、製造時間をバリデートした範囲内で変更することで、高額で時間のかかるプロセスバリデーションの追加を行うことなくロットサイズを自由に変更（スケールアップ／スケールダウン）することが可能となり、開発コストおよび期間の大幅な縮小が可能となる。そのため、需要の急増／急減に応じた柔軟な生産量管理が可能となり、生産後の保管コストの削減にも繋がる。リアルタイムモニタリングには有機溶媒を使用せず、かつ追加のバッチ処理を必要としないフロー分光測定法を活用し、持続可能で低コストでグリーンケミストリーを実践する。更に、本研究期間内に開発する連続生産プラットフォームを用いて核酸 LNP 製剤の製造を実施し、本プラットフォーム技術の有用性と実用性を検証する。

<研究開発の成果>

1) 製造プロセスのリアルタイムモニタリングによる稼働性能評価

@LNP をモデルとして、核酸 LNP 製剤の製造プロセスの工程パラメータ、1) 温度、2) 圧力のそれぞれについてリアルタイムモニタリングシステムを構築し、製剤品質(粒度分布、核酸含量)への影響評価を行なった。その結果、●°C以下の製造では平衡粒子径と多分散指数(PDI)が増大し、規格値を逸脱することが明らかとなった。一方、■°C以上では平衡粒子径が小さく、核酸含量が低下することが明らかとなった。複数ロットの製造結果から、温度パラメータの管理幅は概ね○~□°Cが妥当と考えられた。圧力パラメータについては、バックプレッシャーレギュレータを用いて流速を固定し、X-Z MPa の範囲で検討を行なった。その結果、●MPa 以上では PDI が減少する傾向がみられたが、有意な変化は見られなかった。平衡粒子径についても検討した範囲で有意な差は見られなかった。以上の結果から、圧力パラメータの管理幅は、装置の耐圧およびシステムの安全性を重視し、○~△MPa が妥当と考えられた。

製造工程パラメータのリアルタイムモニタリング値からのフィードバック制御システムとして、流路に設置した温度センサを用いたフィードバック制御システムを構築した。圧力については、通常運転範囲で製剤品質に大きな変化をもたらさないことが明らかとなったため、フィードバック制御は異常過大圧発生時のポンプの緊急停止用として制御システムを構築した。

製造プロセスの工程管理パラメータ(圧力、温度、流量)のリアルタイムモニタリングとフィードバック制御(温度および流量)を用いて、@LNP を 50ml スケールで 3 ロット製造した。各ロットの製造中のリアルタイムモニタリング値の変動幅が圧力、温度、流量に関して、管理幅内で定常状態であり、製造プロセスが「管理された状態」であることを確認した。

2) 製剤品質のリアルタイムモニタリングによる評価法の開発

① 核酸 LNP 製剤の粒度分布のリアルタイムモニタリングシステムの開発

レーザー回折装置とフローセルを用い、測定パラメータの最適化により、既存の動的光散乱法(DLS)と同等の粒度分布の測定結果を流速下で得ることに成功した。流速 Xml/min での@LNP のリアルタイム測定値は安定しており、変動幅は製剤の規格および規格幅の内側で定常状態であった。本システムを用いて@LNP のインライン製造時の粒度分布のリアルタイムモニタリングを行った結果、測定値は製剤規格幅内で安定しており、粒度分布の変動が「管理された状態」にあることを明らかにした。また、製造時のエタノールと水系溶媒の混合によって生じる気泡由来のノイズを除去するため、脱気システムを構築した。さらに、ソフトウェアを改良し、最大 1 万回の連続測定とリアルタイムのデータ出力機能を追加した。また、既存フローセルの耐圧とデットボリュームを大幅に改善した新型フローセルを独自に開発した。

② 核酸 LNP 製剤の核酸含量のリアルタイムモニタリングシステムの開発

@LNP 中の核酸 N の定量について、既存の逆相イオンペア高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法による測定と、@LNP 分散液の直接 A260 吸光度測定法を比較した。その結果、LNP を構成する脂質に A がない場合、直接 A260 吸光度測定法は HPLC とほぼ同等の値を示し、かつ高濃度域でも十分な直線性を示すことが明らかとなった。次に、フローセルを用いた直接 A260 吸光度測定によるリアルタイムにモニタリングシステムを構築するため、HPLC 用のフォトダイオードアレイ検出装置を用いて検討した。その結果、製造時に想定される高濃度の B (~mg/ml) を含む @LNP 分散溶液を、希釈することなく Xml/min の流速下でリアルタイムに定量可能であることが明らかとなった。本法による測定時間は約 ▲min と極めて短時間であり、既存の HPLC 法による測定時間から劇的に短縮することに成功した。また、A260 と A▽の吸光度測定を比較したところ、A▽でも A260 と同等の精度で @LNP 分散液の直接吸光度測定が可能であることが明らかとなった。そのため、③の▽nm の○○測定時の A▽値を用いて核酸 N 濃度を定量することとした。

本法を用いて、@LNP のインライン製造時に核酸 N 量を測定した結果、製剤の規格および規格幅の内側で定常状態となり、製剤中の核酸量の変動が「管理された状態」であることを明らかにした。

③ 核酸 LNP 製剤の核酸・脂質結合状態のリアルタイムモニタリングシステムの開発

@LNP 製剤中の核酸 N とカチオン性脂質 D の分子結合状態について、初めにフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) を用いた解析を行った。その結果、溶媒に含まれる高濃度のエタノール (v/v%) に起因した妨害吸収ピークのため、N と D の結合に特異的な赤外吸収ピークを検出することができなかった。次に、ラマン分光測定法を用いた測定を検討したが、FT-IR と同様に溶媒および脂質由来の妨害ピークのため、N と D の結合特異的な赤外吸収ピークを検出することはできなかった。そこで鋭意検討を重ねた結果、○○測定により、高濃度のエタノールおよび脂質存在下で核酸 N とカチオン性脂質 D の結合特異的に、▽nm および▼nm に～効果を得ることに成功した。○○を利用し、フローセルを用いた核酸・脂質結合状態のリアルタイムモニタリングシステムを構築した。流速 Fml/min でのインライン製造時の▽リアルタイムモニタリング値は G-H で安定し、変動幅が規格幅の内側で定常状態であり、核酸と脂質の結合状態が「管理された状態」にあることを確認した。

3) リアルタイムモニタリングシステムの統合と製剤品質への影響評価

開発した工程管理パラメーターと品質管理パラメーターのリアルタイムモニタリングを統合し、連続生産中にすべての測定とフィードバック制御等ができるように製造回路を構築した。また、分析機器である□□装置を Process Analytical Technology (PAT) 機器として利用するため、粒度分布のリアルタイムモニタリング値をリアルタイムに解析する制御ソフトウェアを XXX を用いて開発した。これにより、モニタリング値が管理幅より逸脱した際に、YYY および ZZZ を介してリアルタイムに流路中に設置したバルブを切り替え系外排出するシステムを構築した。さらに、リアルタイムモニタリングで製造したロットと、それバッチ製造のロットについて品質および安定性の比較を行なった。その結果、@LNP の品質 (含量、類縁物質および粒度分布) は、製造直後と T°C M ヶ月後で全て規格内であり、同等の品質と安定性を有すると考えられた。

4) 連続生産プラットフォームの評価

実生産機を用いて開発したリアルタイムモニタリングシステムを構築し、@LNP の連続生産が「管理された状態」にあることを検証した。また、核酸溶液および脂質溶液の各送液ポンプの長時間作動精度評価の結果、t 時間以上の連続運転で●●に L や S が堆積し、固着によって●●不良 (●●不良) を引き起こすことが明らかとなった。そのため連続生産のロットサイズは m 時間程度に設定した。さらに、原料の核

酸溶液の安定性評価により、●●に希釈した核酸は、n 時間で類縁物質が増加し始めることが明らかとなった。連続生産時の核酸溶液の逐次投入バッチサイズが p 時間分と小さくなるため、N と B の混合を○○を用いた□□で行うことで、この問題を大幅に改善することに成功した。現在、本生産機を用いた小スケールの試作製造を進めている。

In recent vaccine development for the COVID-19 disaster, several novel lipid nanoparticle (LNP) formulations with nucleic acid (mRNA) as the active ingredient have been rapidly developed. In order to develop and produce nucleic acid LNP vaccine products quickly in Japan and to respond flexibly to emerging infectious disease pandemics, it is necessary to develop and produce nucleic acid LNP vaccine products using continuous production, which can be scaled up from initial development to production scale in a short time and can be scaled up or down flexibly according to the subsequent rapid increase or decrease in demand. The development and production of nucleic acid LNP formulations using continuous production is essential to respond flexibly to the rapid increase/decrease in production scale from initial development to production scale in a short period of time. On the other hand, the applicants have been developing nucleic acid LNP formulations using SQUED, an in-line production technology for lipid nanoparticles with controllable particle size that they have independently developed, and by optimizing continuous production based on this SQUED technology, they are able to construct a unique continuous production platform for nucleic acid LNP formulations. The company has been developing nucleic acid LNP formulations using SQUED, an in-line manufacturing technology.

In this study, We have developed and successfully integrated into an production system a real-time monitoring and feedback control system for process parameters of the manufacturing process and a real-time monitoring system for formulation quality, respectively. We also verified that continuous production is in a "*state of control*" by manufacturing model LNP using this integrated system. A real-time monitoring system for process control parameters (pressure, temperature, and flow rate), a real-time monitoring system for quality control parameters (particle size, content, and nucleic acid/lipid binding status), and a feedback control system (temperature and flow rate) of the manufacturing process were integrated to produce three lots of LNP at 50 ml Three lots of LNP were manufactured on a 50 ml scale. It was confirmed that all fluctuation ranges of real-time monitoring values of process control parameters and quality control parameters during the production of each lot were stable within the control range and were in a steady state. Based on the above, we confirmed that the manufacturing process of this LNP is in a "*state of control*".