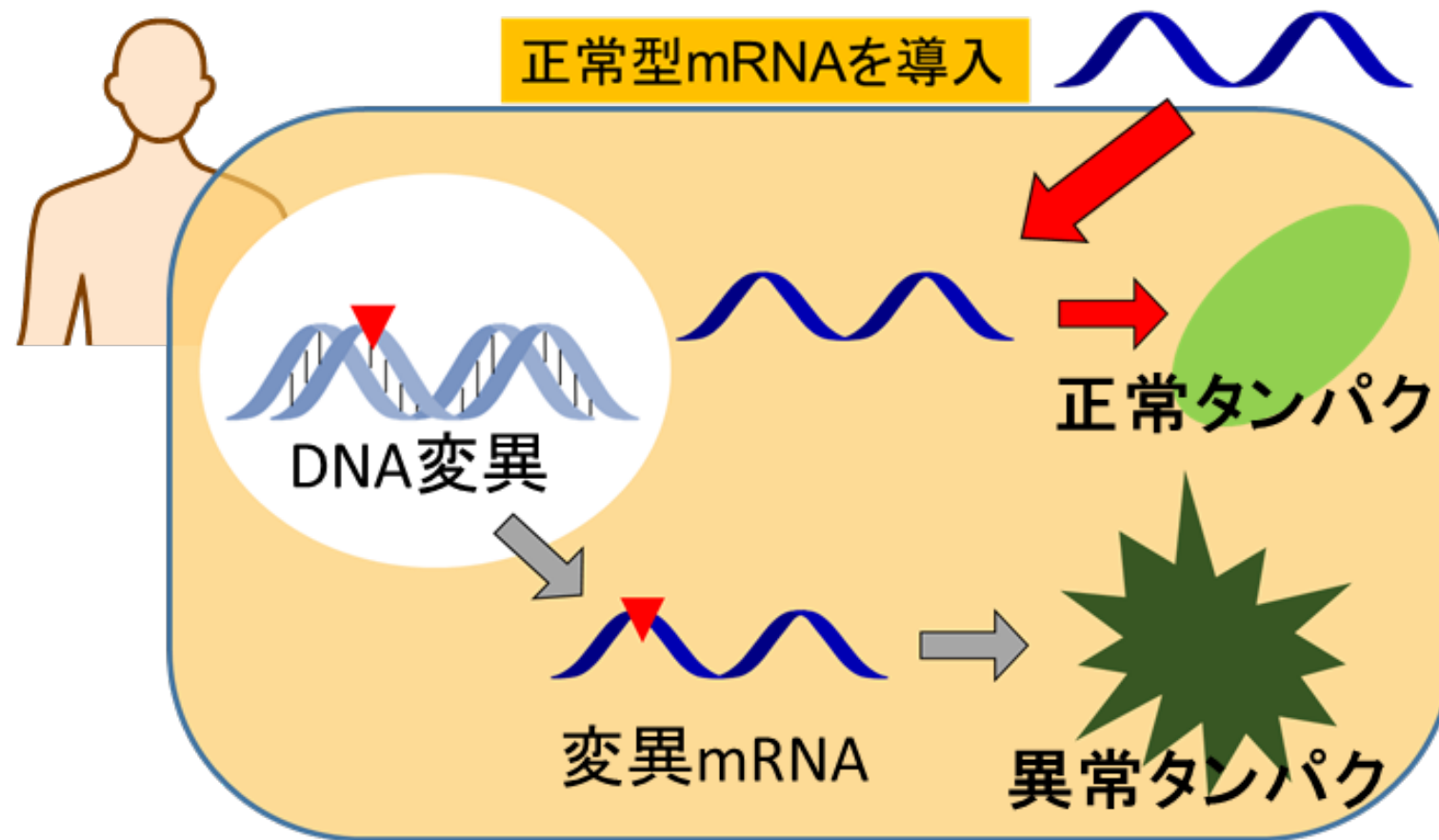


2024年4月18日  
2024年度CPHI JAPAN  
40min

# 化学を基盤とする高純度mRNAの 製造法

名古屋大学大学院理学研究科理学専攻化学

阿部 洋



- 標的疾患
- タンパク質補充法: 筋ジストロフィー、色素性乾皮症
  - ワクチン療法: コロナウイルス (Moderna社)、B型肝炎、癌

# ウイルスを用いないワクチン

3

## DNAワクチン

ウイルス遺伝子のDNA

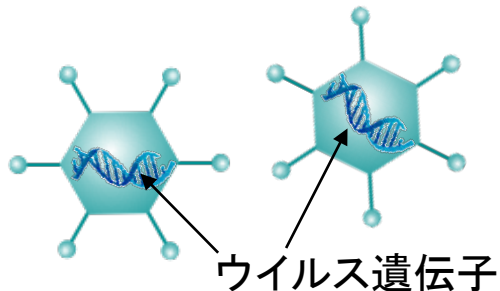


- ・ 安く大量に作れる。
- 細胞の核に届かない。  
← 特殊な器械が必要

ヒトの遺伝子を  
傷つける危険性

## ウイルスベクター ワクチン

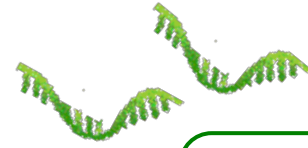
安全なウイルスに新型コロナウイルスの遺伝子を搭載



- ・ 安く大量に作れる。

ウイルスベクターに  
対する抗体ができ、  
繰り返し接種すると  
効果が弱くなる。

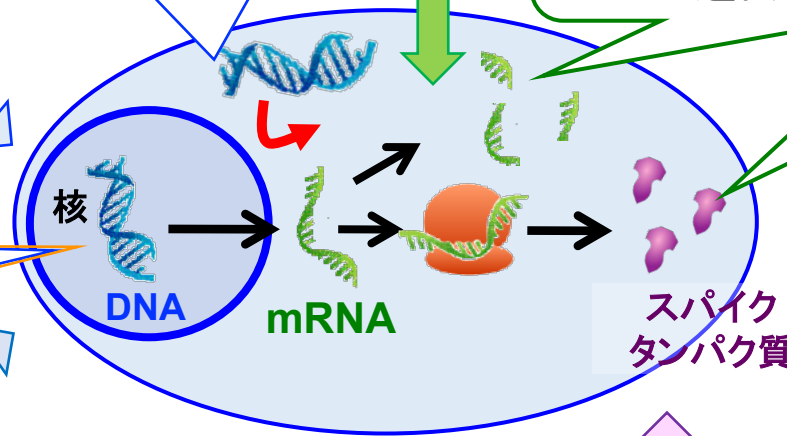
## mRNAワクチン



ウイルスタンパク質を作る  
mRNA

タンパク質を作った後、すぐに分解される。  
→ 体に蓄積しないので安全  
→ ヒトの遺伝子も傷つけない。

免疫細胞の中で効率的に  
スパイクタンパク質を作る。

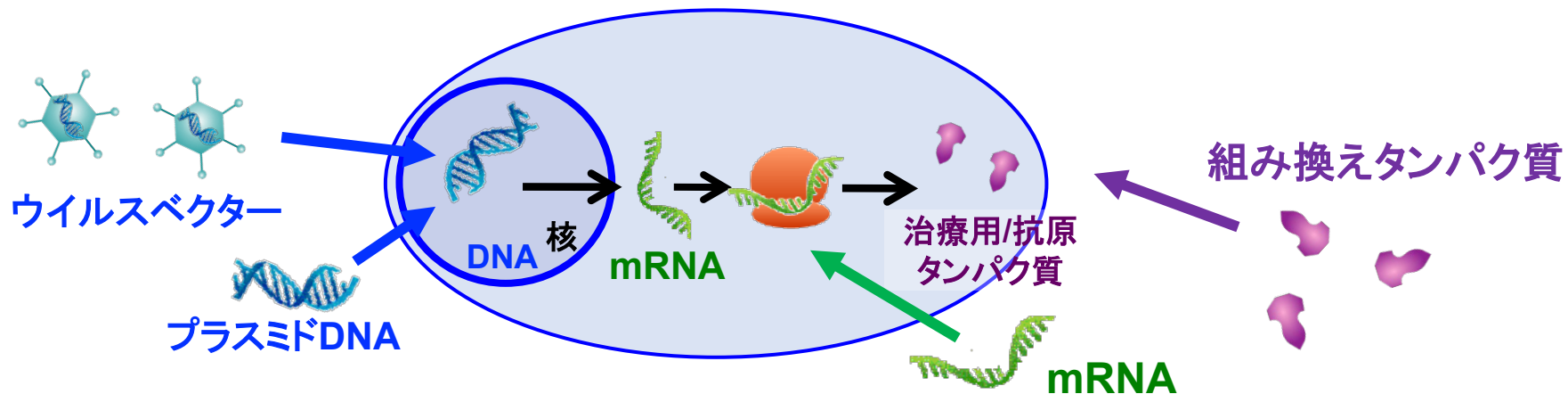


組み換えタンパク質



- ・ 高い安全性
- ・ タンパク質毎に設計が必要

# mRNA医薬の遺伝子治療、ワクチンにおける特長



|    | ウイルスベクター                                                                                                                                             | プラスミドDNA                                                                                                                                | mRNA                                                                                                                                             | 組み換えタンパク質                                                                                     |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 利点 | <ul style="list-style-type: none"> <li>効率的な遺伝子発現</li> <li>AAVでは年単位の遺伝子発現</li> <li>細胞性免疫の誘導</li> </ul>                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>安価に大量製造可能</li> <li>細胞性免疫の誘導</li> </ul>                                                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>核移行不要で非分裂細胞も効率的導入<br/>(抗原提示細胞へも効率的な導入)</li> <li>変異誘発のリスクなし</li> <li>体内への蓄積なし</li> <li>細胞性免疫の誘導</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>高い安全性</li> </ul>                                       |
| 欠点 | <ul style="list-style-type: none"> <li>組織傷害<br/>- AAV治験3名死亡(2020年)</li> <li>変異誘発の潜在的リスク<br/>→ ワクチン忌避の懸念</li> <li>中和抗体による作用減弱<br/>→ 反復投与困難</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>核移行が非効率的<br/>→ 非分裂細胞への導入が非効率的<br/>(抗原提示細胞の分裂は遅い)</li> <li>変異誘発の潜在的リスク<br/>→ ワクチン忌避の懸念</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>免疫原性</li> <li>生体内での酵素分解</li> <li>タンパク質発現が一過的<br/>← 技術開発にて既にある程度克服済み。本研究でも取り組む。</li> </ul>                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>経済的に高価</li> <li>作用が一過的</li> <li>細胞性免疫の誘導が困難</li> </ul> |

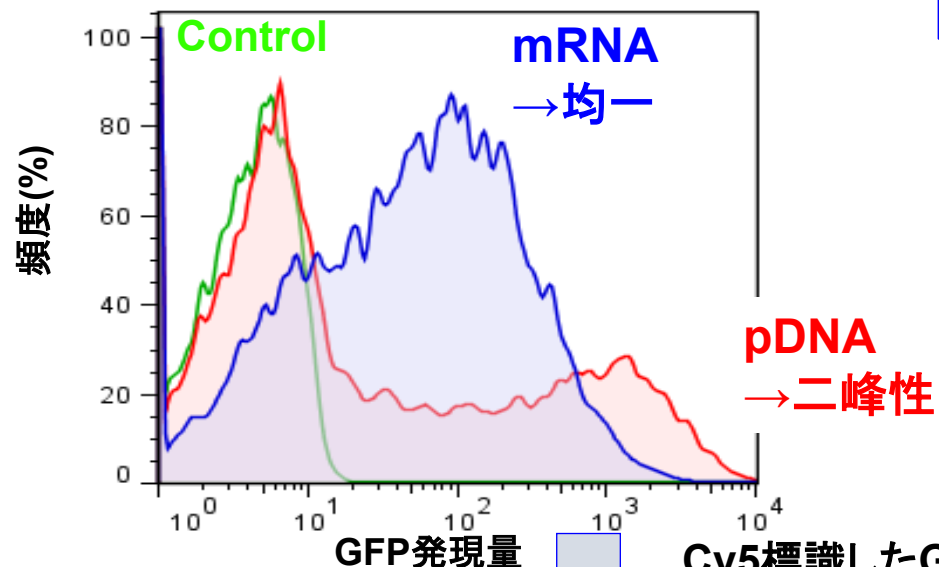
ワクチンのみに関わるものを茶色で表記

有効性、安全性、即効性

# プラスミドDNAとmRNAの比較

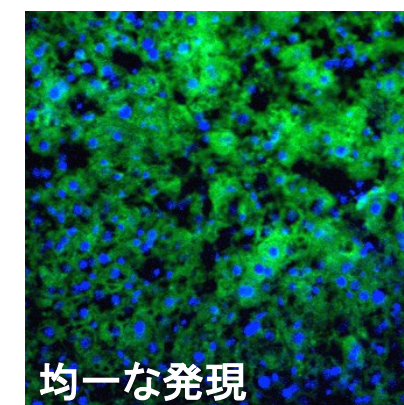
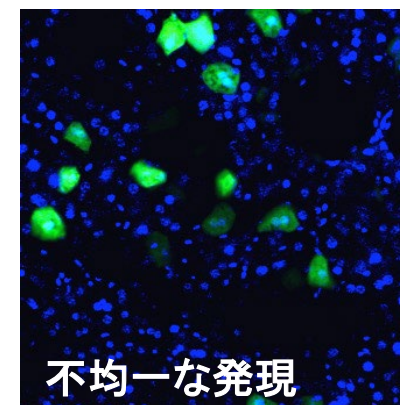
**In vitro**

GFP発現の分布 (HuH-7, FCM)



**In vivo**

GFP発現の分布 (肝臓)

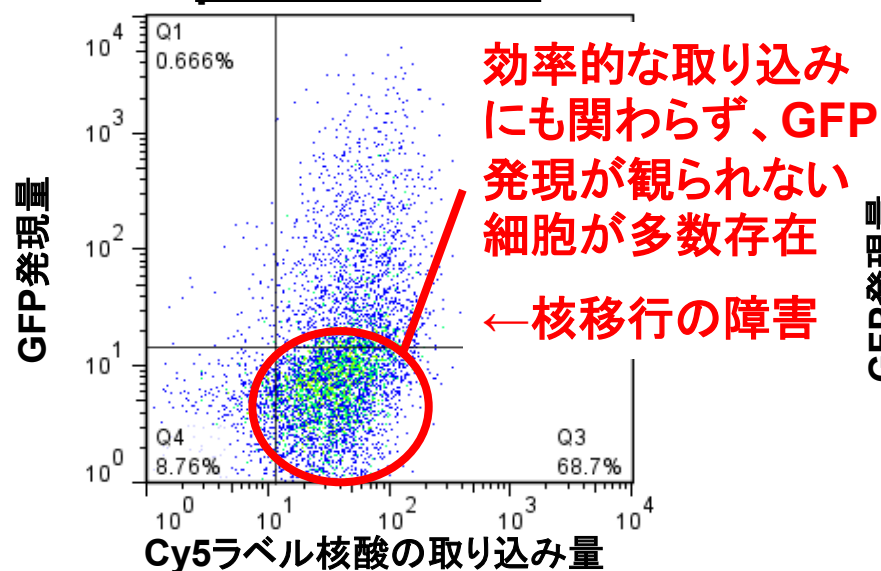


pDNA

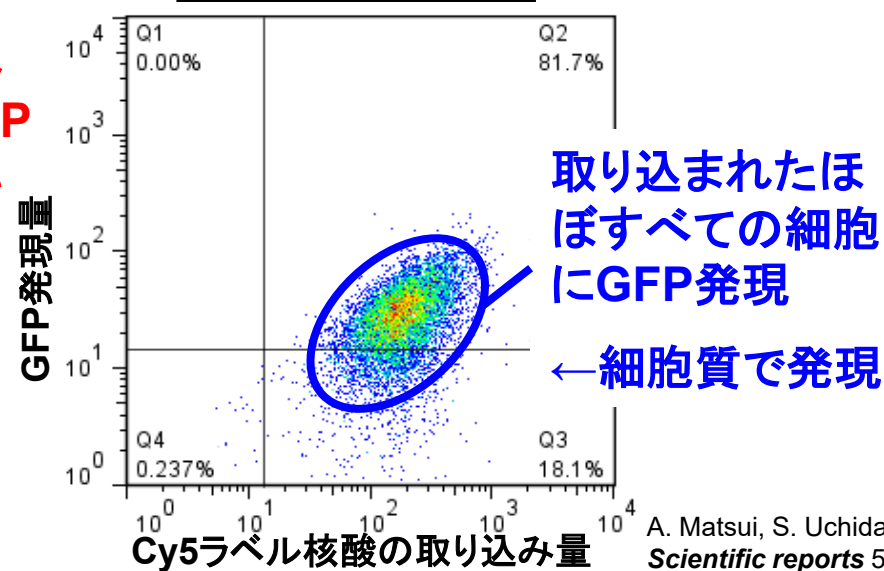
mRNA

Cy5標識したGFP  
発現核酸の導入

pDNAデリバリー

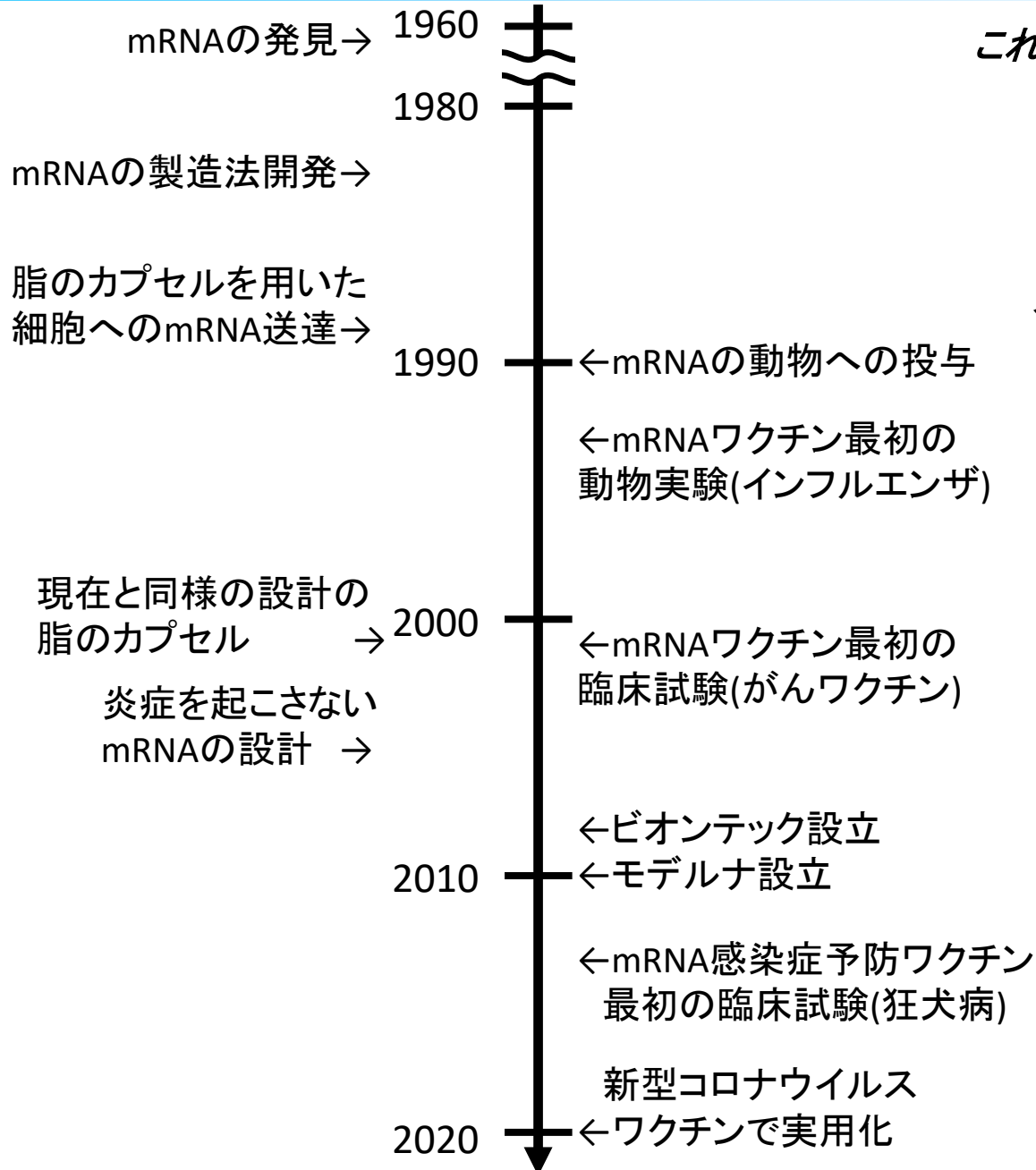


mRNAデリバリー

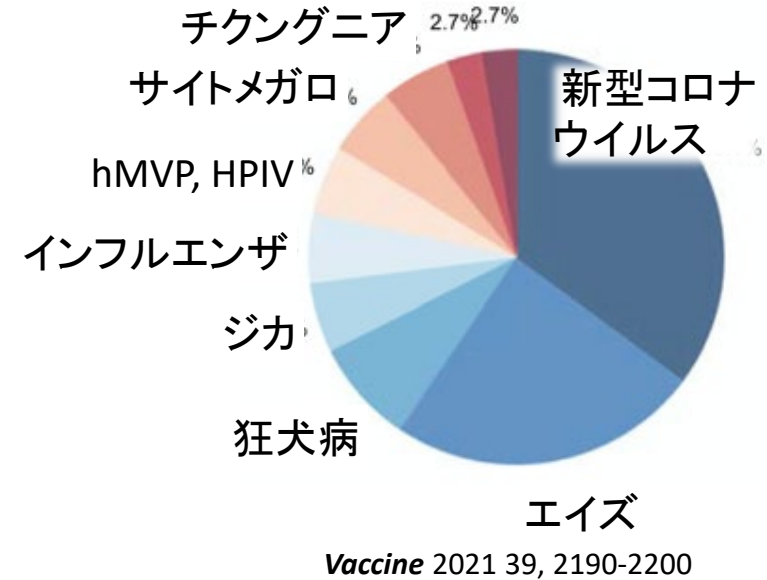


# mRNA ワクチンの発展

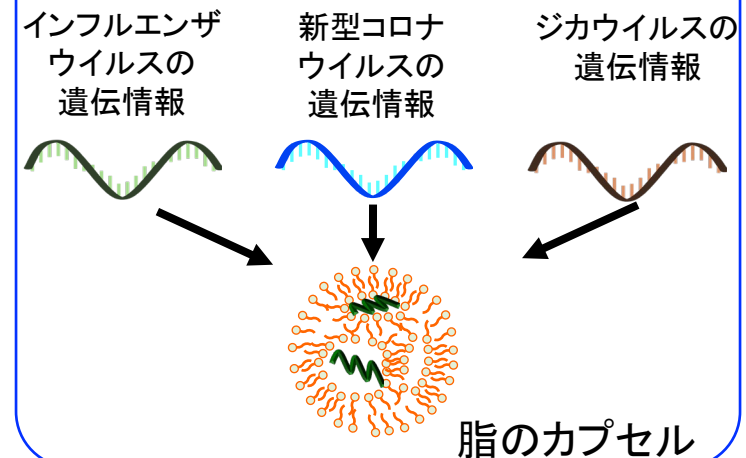
6



これまでの感染症ワクチン臨床試験の標的

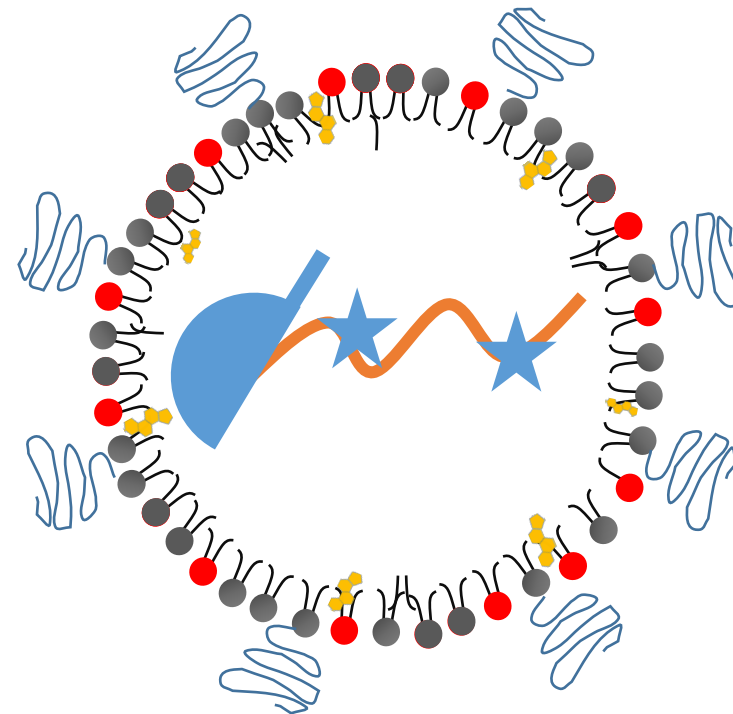


ウイルスが変わっても同様の設計



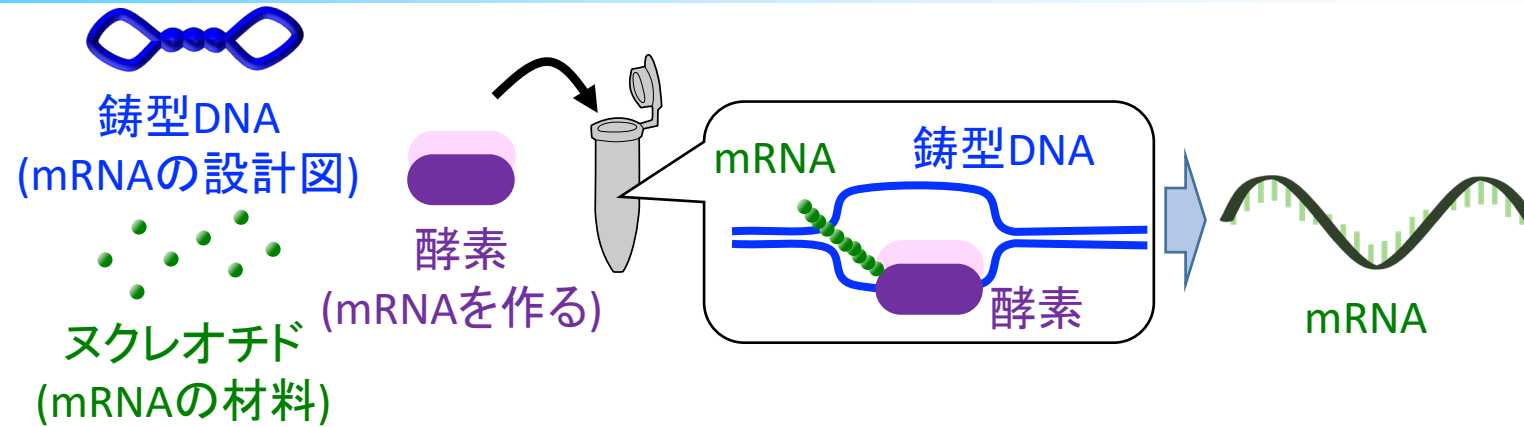
- ・ウリジンのシュードウリジン置換  
免疫原性の低減  
タンパク質合成効率の向上  
(カリコ先生、ヴァイスマン先生)
- ・キャップ構造の発見  
翻訳効率の向上  
タンパク質合成効率の向上  
(古市先生)
- ・脂質ナノ粒子(LNP)の開発  
mRNAの効率的な送達の達成  
(カリス先生)

## COVID19 mRNA ワクチンの開発



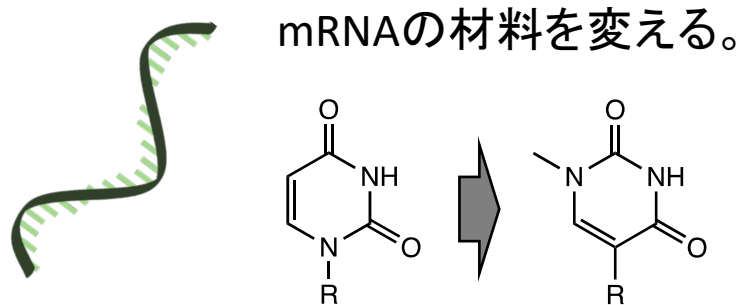
# mRNA ワクチン/医薬品の作り方

8



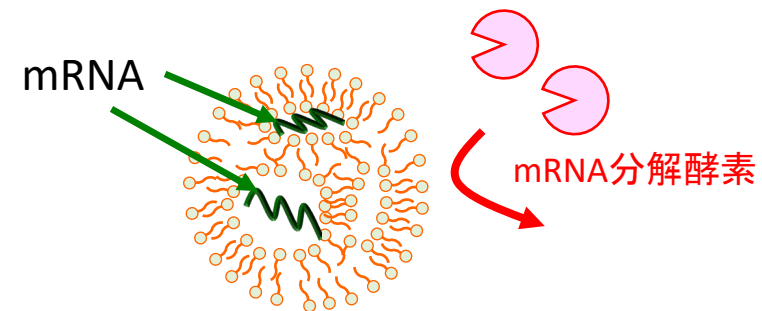
- mRNAは体にとって異物
- ・ 炎症反応を起こす。
  - ・ 体内で分解される。

## mRNAの設計



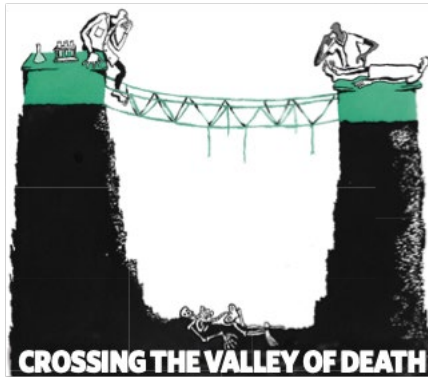
→ 炎症反応の軽減

## 脂のカプセルへ搭載



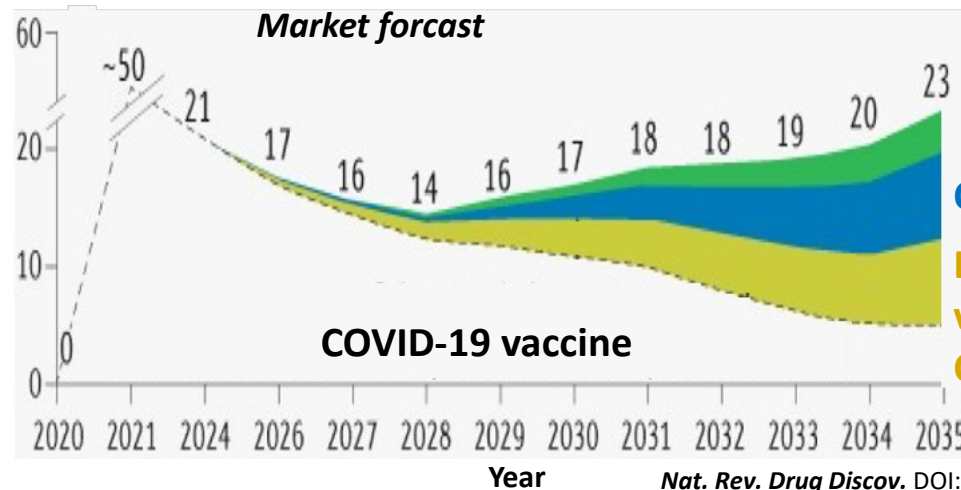
→ mRNAの保護

COVID-19 vaccines  
が死の谷を越えた。



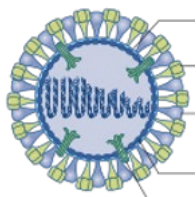
Risk adjusted revenue (US\$ billion)

マーケットは拡大を予想

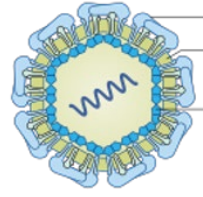


## Clinical trials

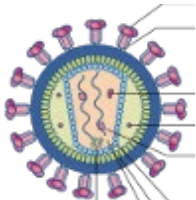
### Infectious disease vaccines



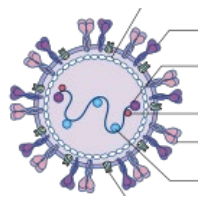
Influenza virus



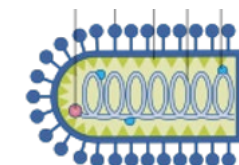
Zika virus



HIV



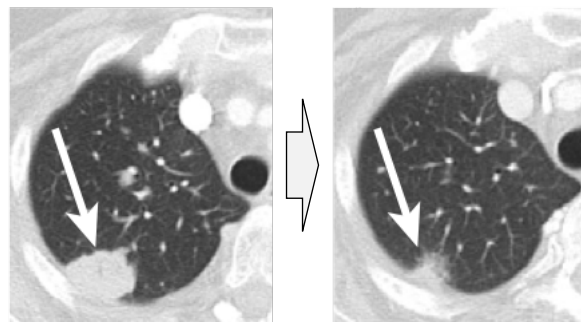
RS virus



Rabies virus

### Cancer vaccines

- Tumor-associated antigens
- Neoantigens

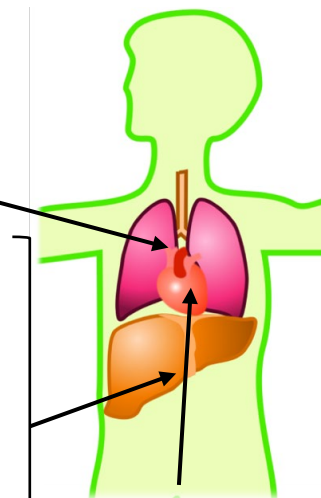


Nature 585 107-112 (2020)

### Protein replacement therapy

#### Single gene disorders

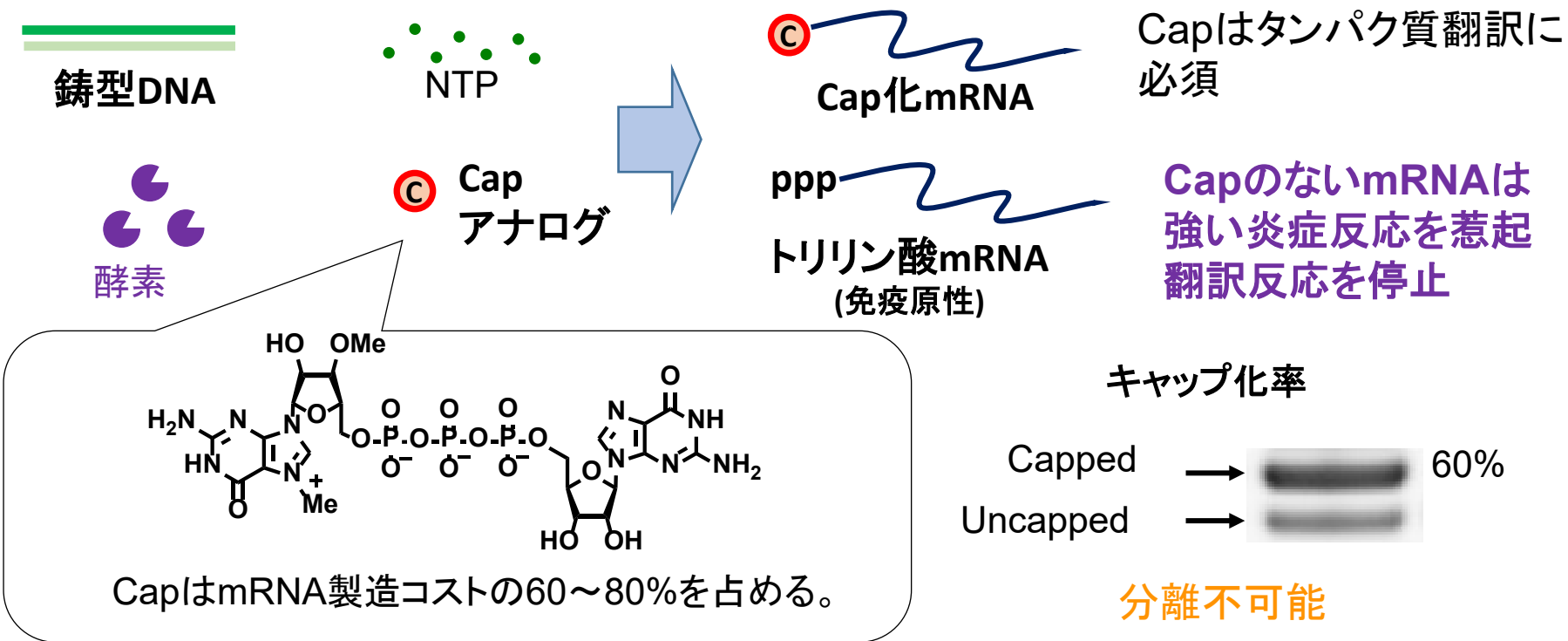
- Cystic fibrosis
- Methylmalonic acidemia
- Propionic acidemia
- Ornithine transcarbamylase deficiency
- Glycogen storage disease
- **Transthyretin amyloidosis (in vivo genome editing)**



Regenerative therapy  
Heart failure

# 現状のmRNAの課題

## In vitro転写



### INVESTIGATION

*British Medical Journal, 2021, 372, n627*

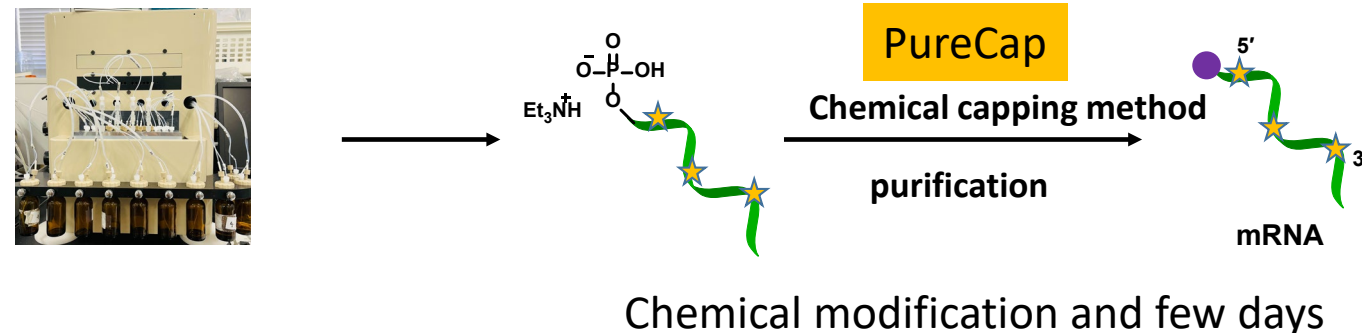
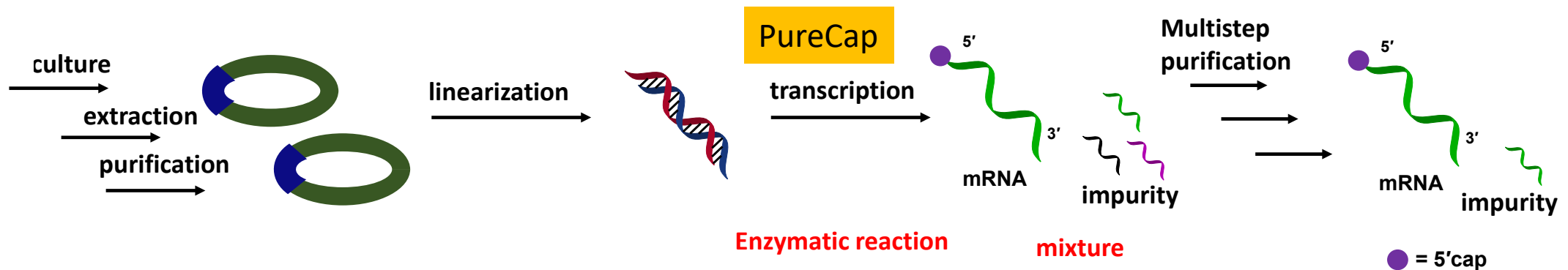
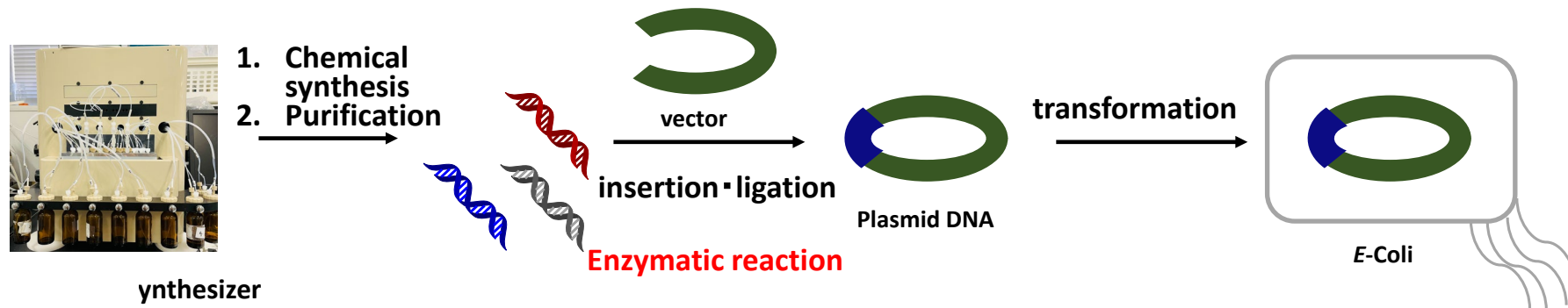
The EMA covid-19 data leak, and what it tells us about mRNA instability

Leaked documents show that some early commercial batches of Pfizer-BioNTech's covid-19 vaccine had lower than expected levels of intact mRNA, prompting wider questions about how to assess this novel vaccine platform, writes **Serena Tinari**

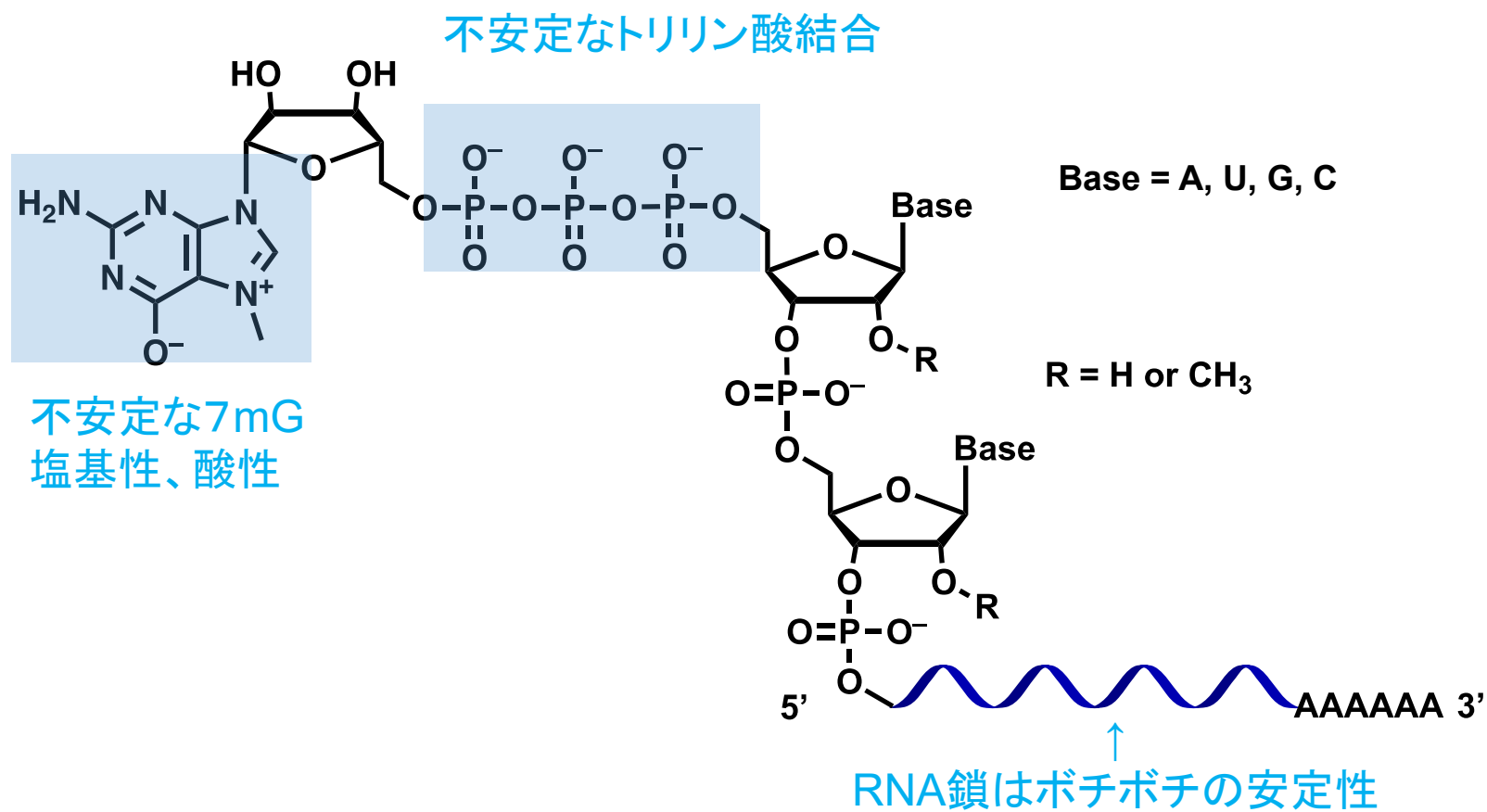
COVID-19ワクチンの純度は低い。  
ロット間で純度に差が生じる。

治験用: 78%, 商業生産: 55%

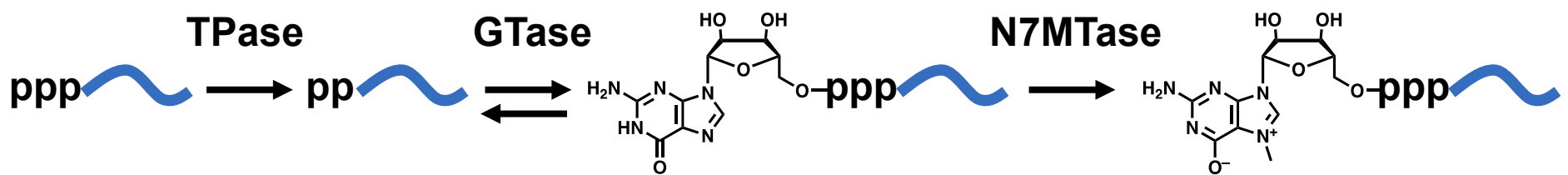
# mRNA synthesis



# mRNAの化学構造

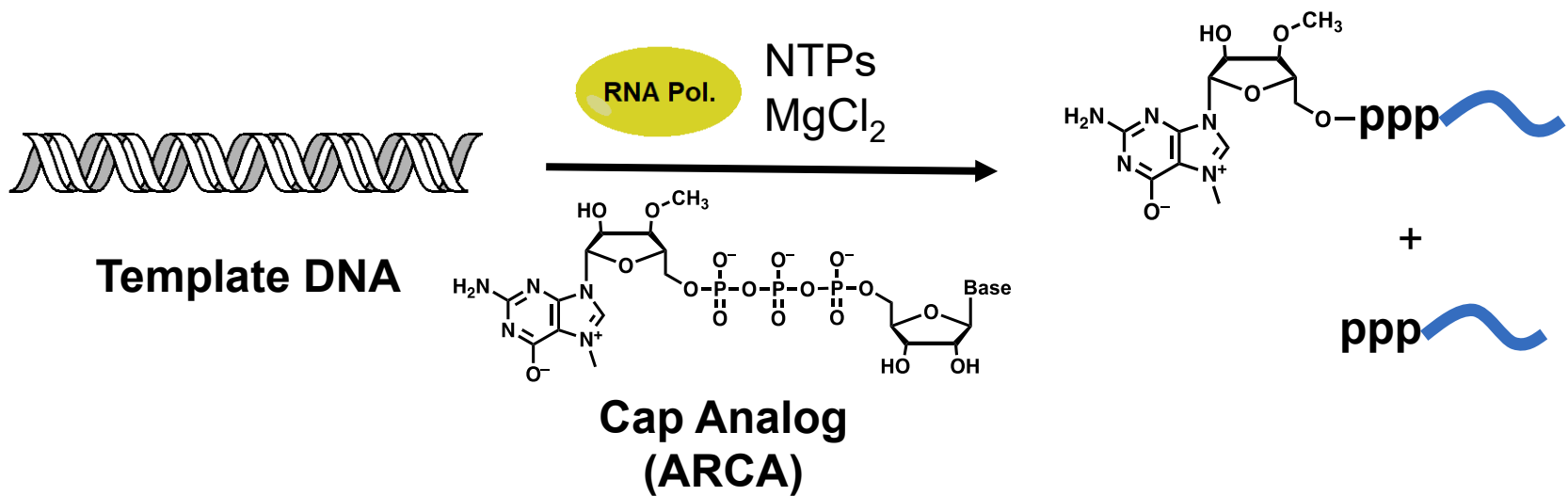


## ■ Enzymatic Capping (Vaccinia Capping System)



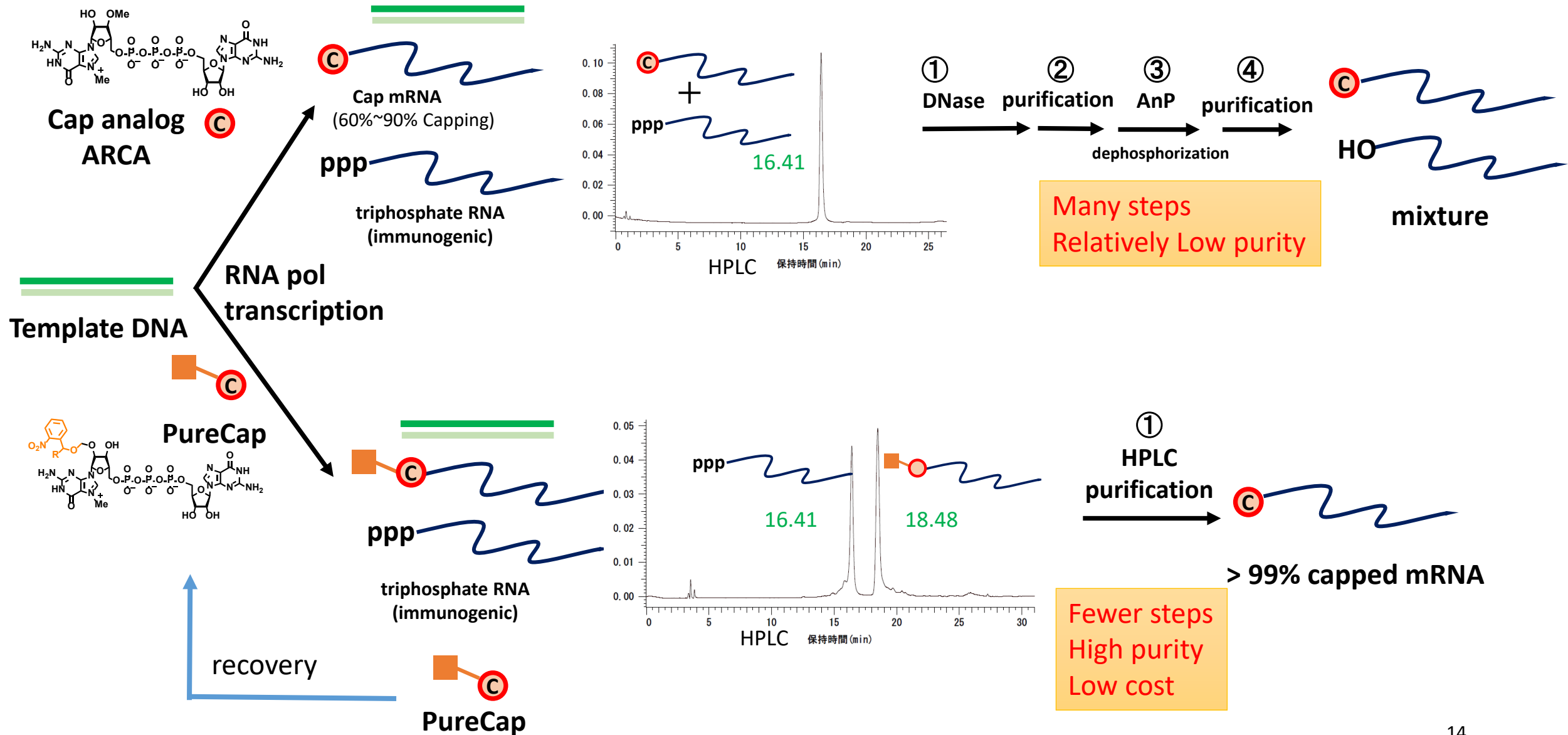
A. Ramanathan, et al., *Nucleic Acids Res.*, **2016**, 44(16), 7511–7526

## ■ Co-Transcriptional Capping



J. M. Henderson, et al., *Curr. Protocols*, **2021**, 1, e39

# mRNA Production: Conventional method and PureCap Method

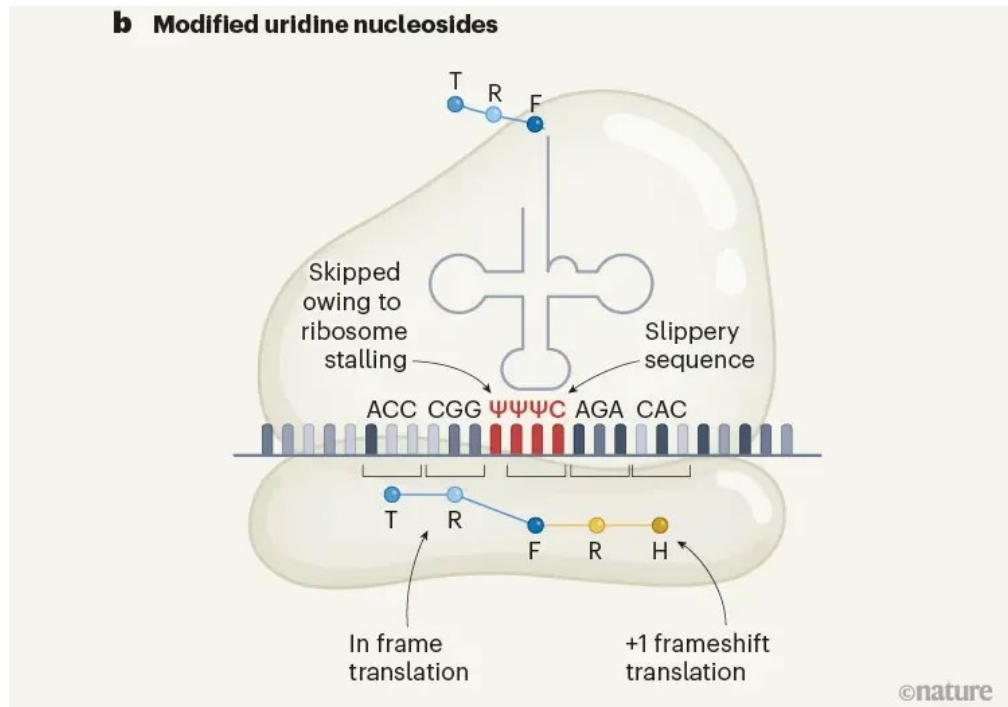


シュードウリジンは読み枠をずらす

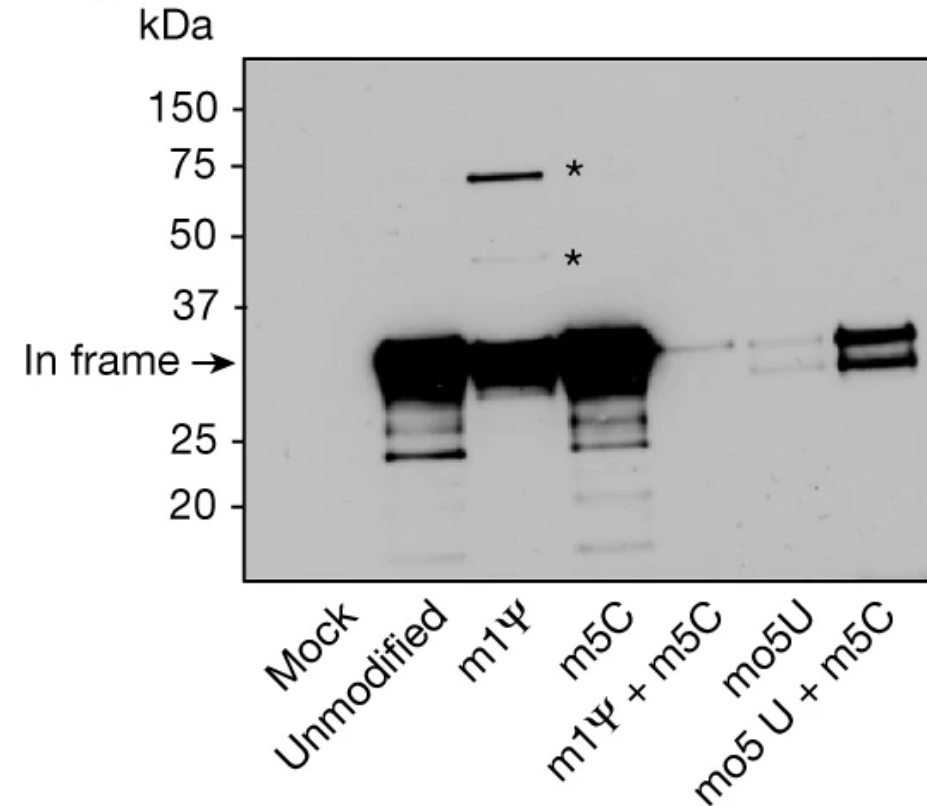
# ***N*<sup>1</sup>-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting**

James E. D. Thaventhiran & Anne E. Willis, *et. al.*

Nature | Vol 625 | 4 January 2024 | 189

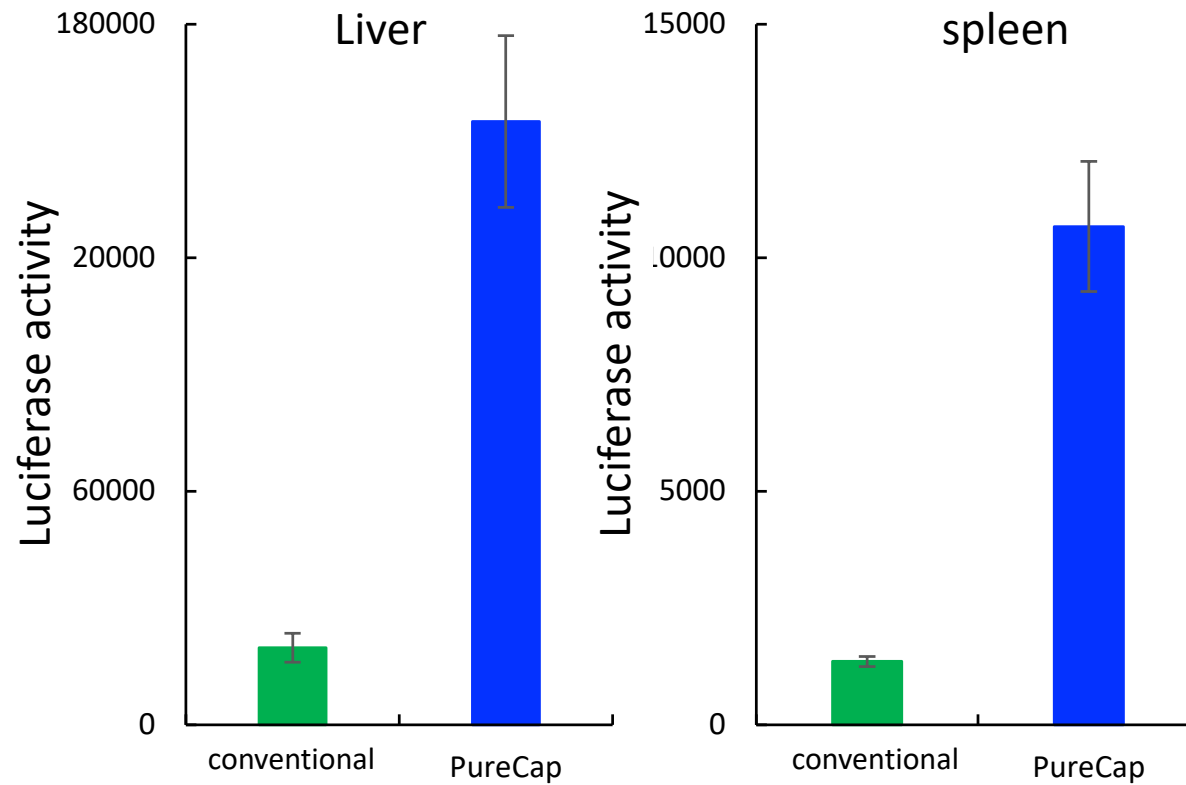
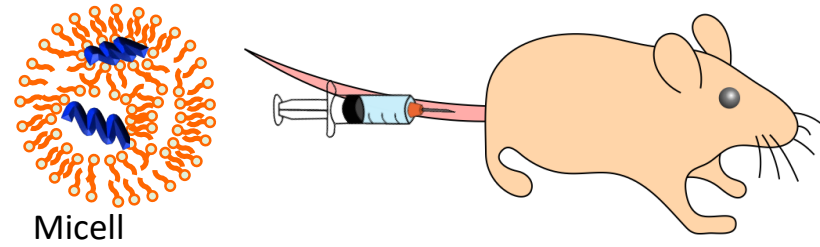


*N*<sup>1</sup>-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting

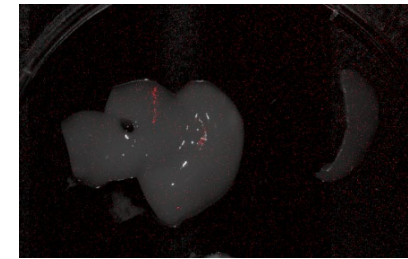


This reached a level of approximately 8% of the corresponding amount of in-frame protein.

# In vivo evaluation of PureCap mRNA

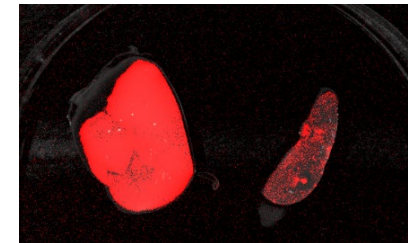


conventional



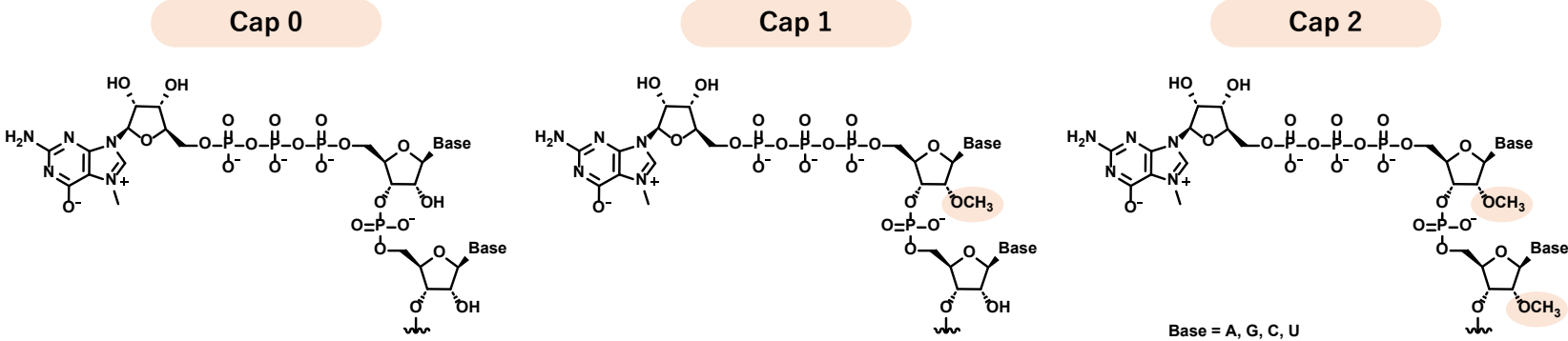
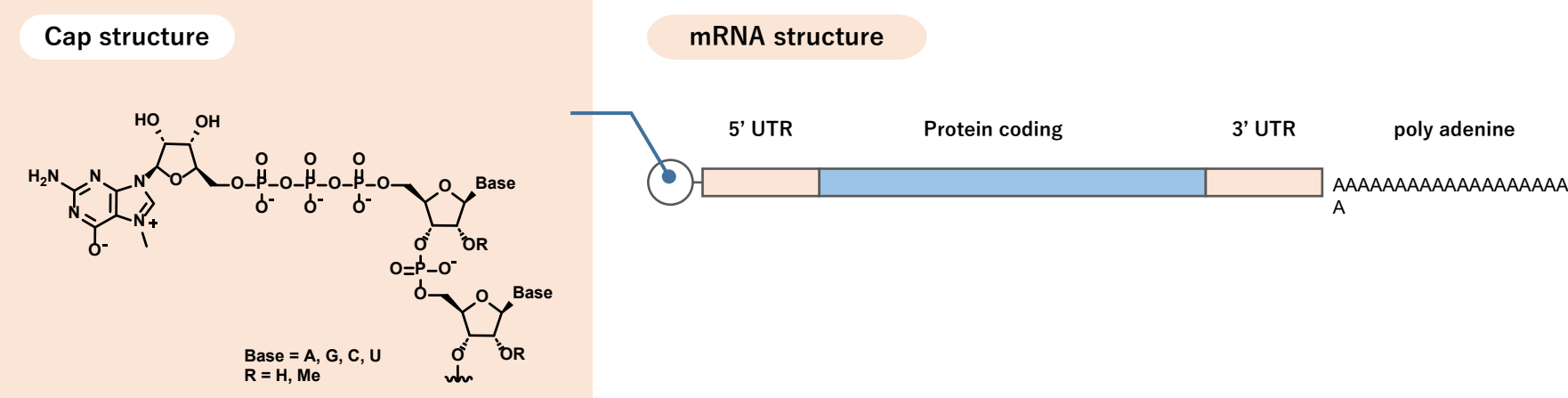
Liver spleen

**PureCap**



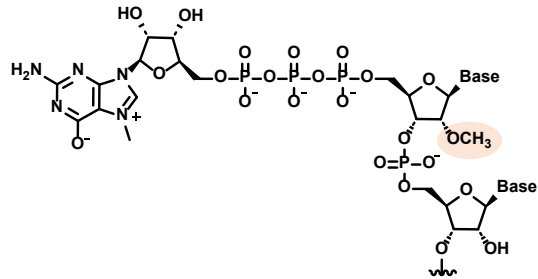
Liver spleen

# Cap structures exist in Eukaryotic cells

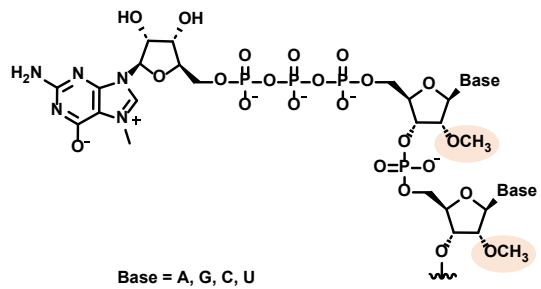


# Cap2構造の重要性

Cap 1



Cap 2



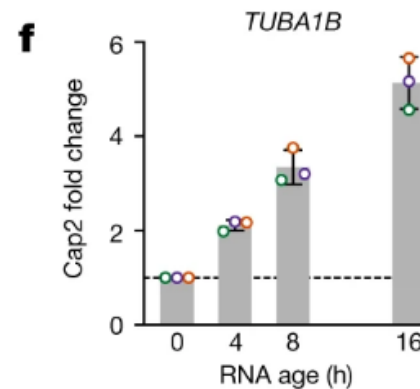
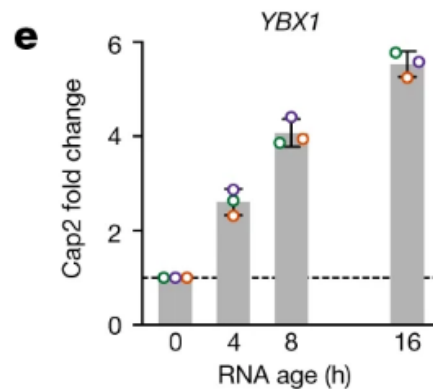
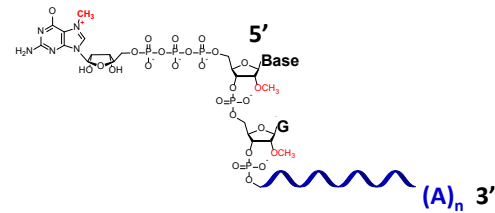
Base = A, G, C, U

## mRNA ageing shapes the Cap2 methylome in mammalian mRNA

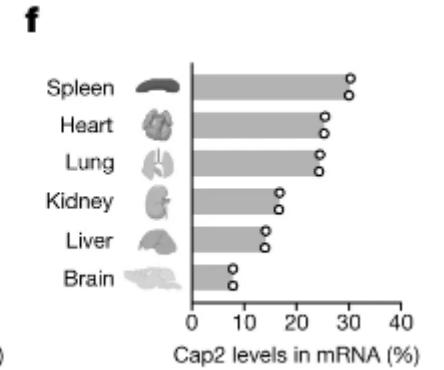
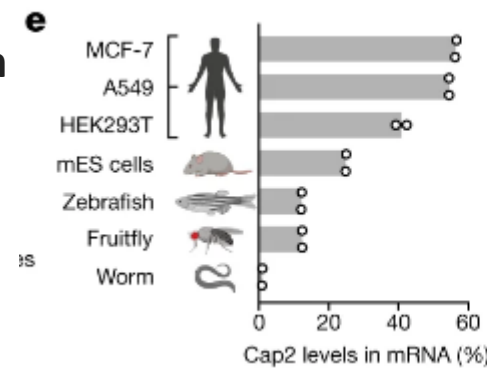
• [Vladimir Despic](#) &

• [Samie R. Jaffrey](#)

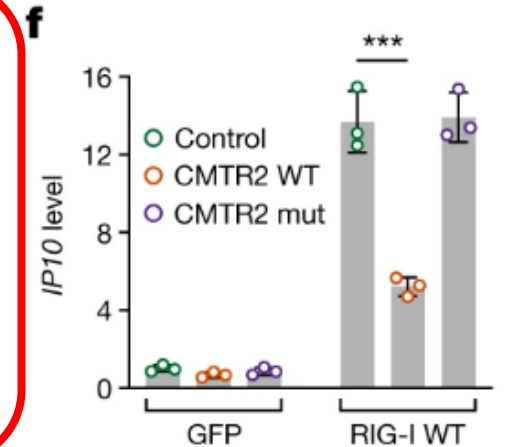
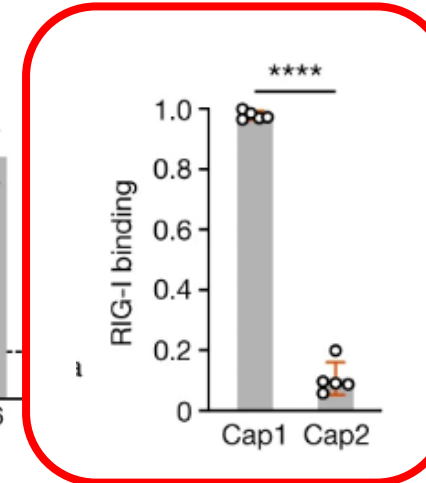
[Nature](#) volume 614, pages358–366 (2023)



Cap2 levels increase with mRNA age



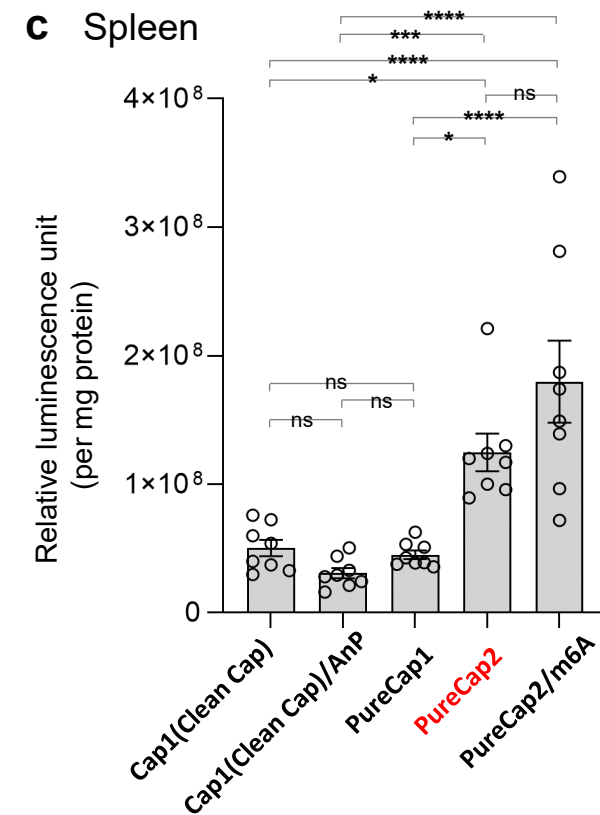
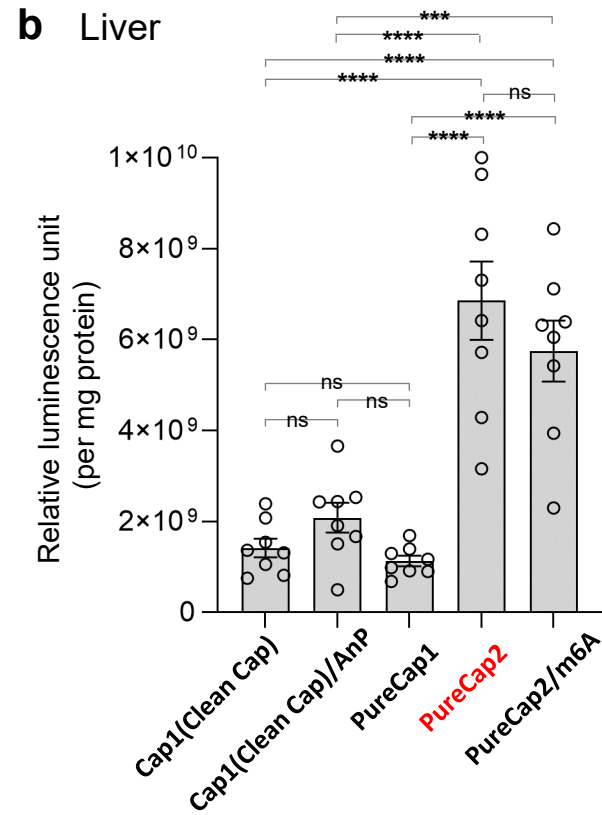
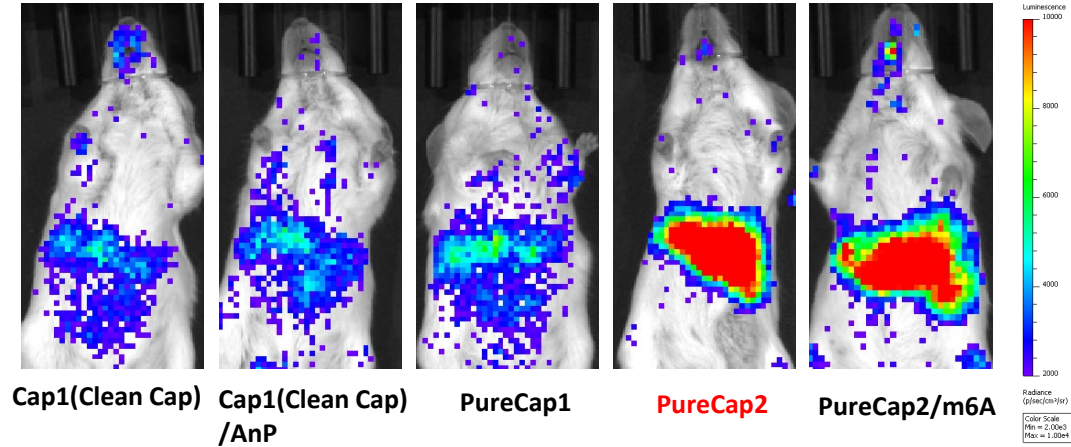
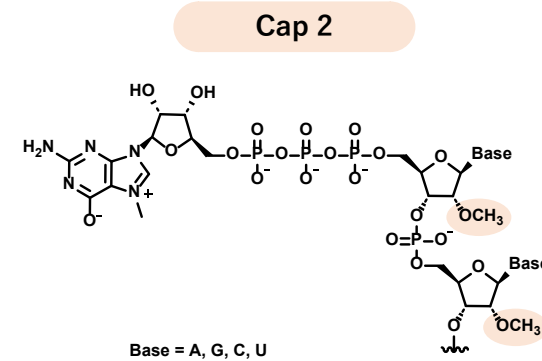
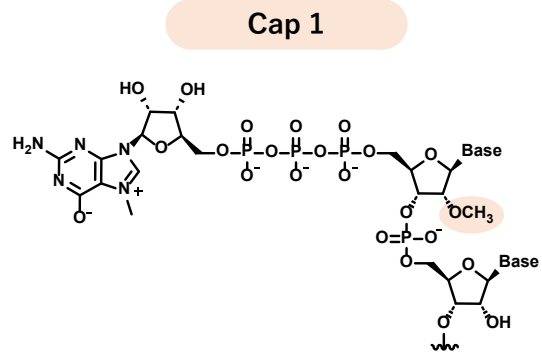
Cap2 levels in bulk mRNA from different organisms and mammalian cell types



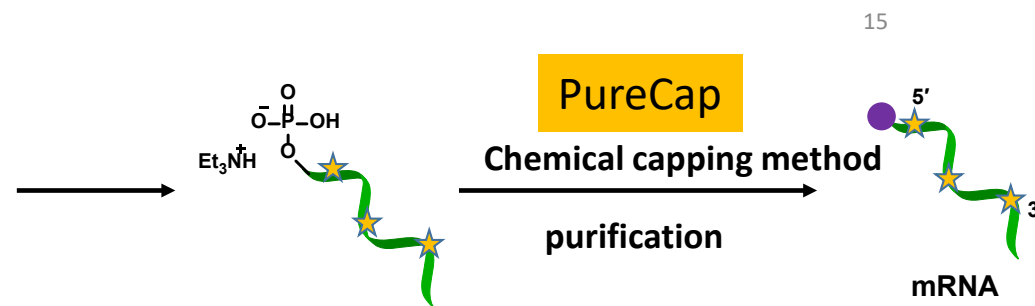
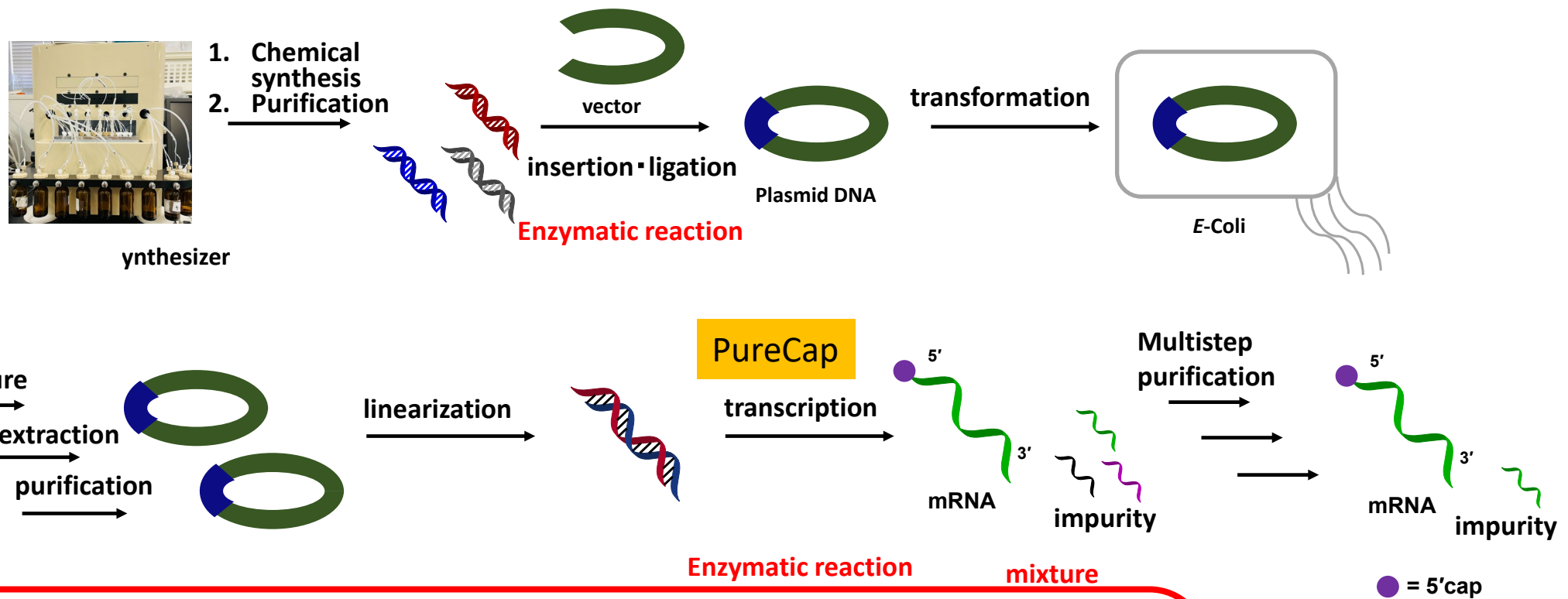
Cap2 methylation suppresses RIG-I activation and virus-induced innate immune response.

The Cap2 structure is used to distinguish self from non-self.

## PureCap2 provided efficient protein production



# mRNA synthesis



化学修飾自在・3日でmRNAを合成

## 1. Delivery of mRNA

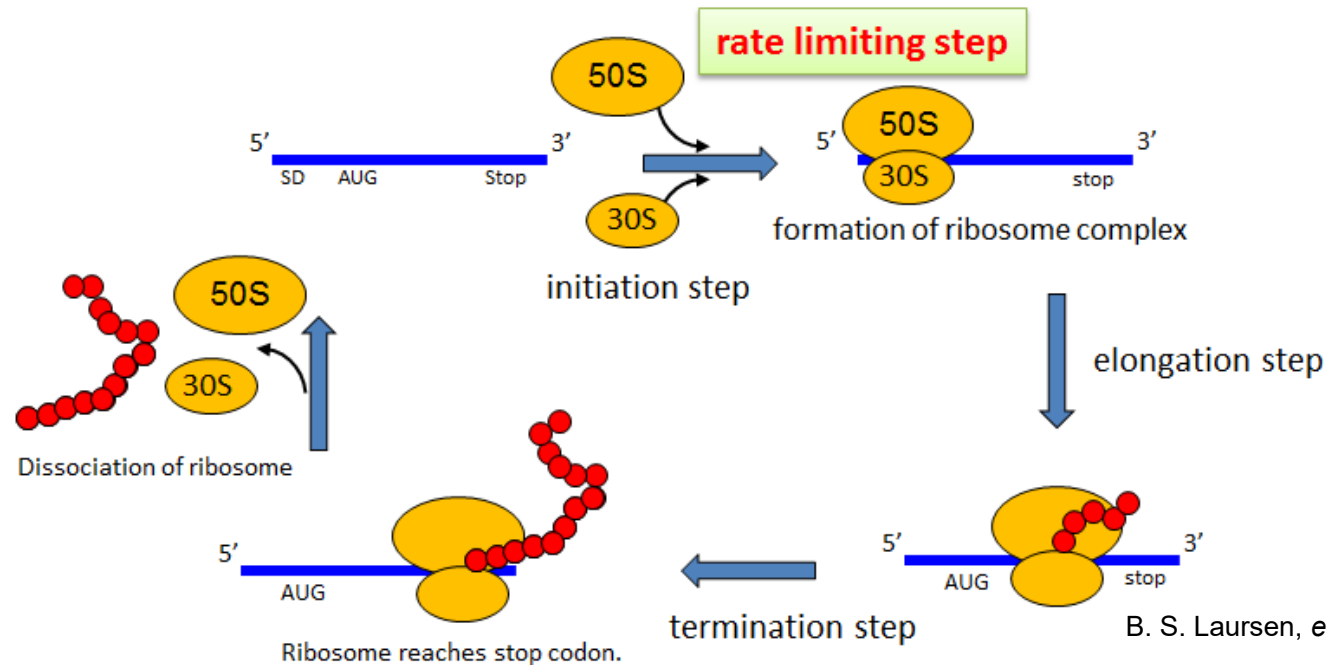
## 2. Instability of mRNA

## 3. Inefficient translation

The introduction of chemical modification increases the stability but often decreases the translation efficiency.

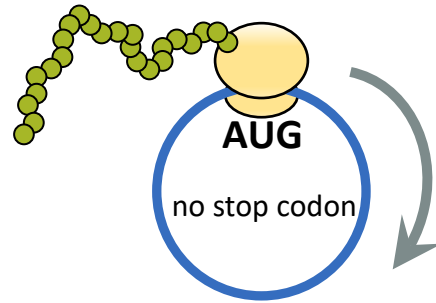
How to design mRNA molecules to enhance both the stability and the translation efficiency

### Translation mechanism on linear mRNA template

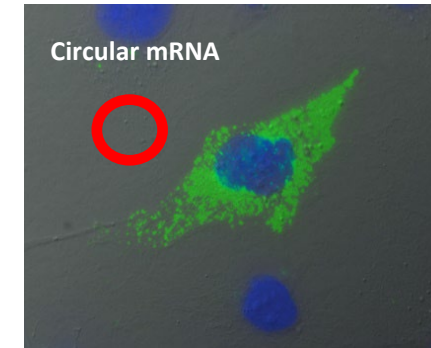
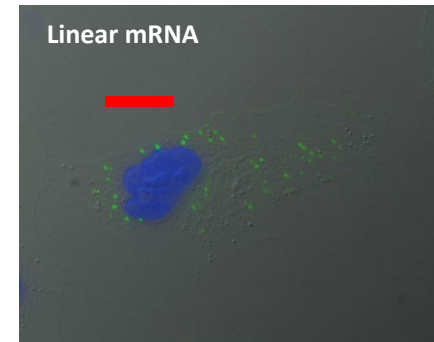


# mRNAの安定性と翻訳効率を同時に向上する分子デザイン

## Rolling circle translation



**Skip the initiation step  
(rate-limiting step)**

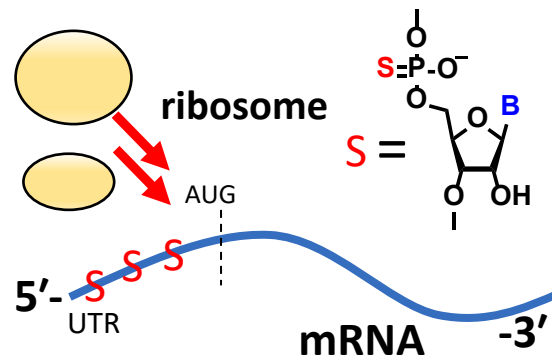


Green : protein, Blue : nucleus (DAPI)

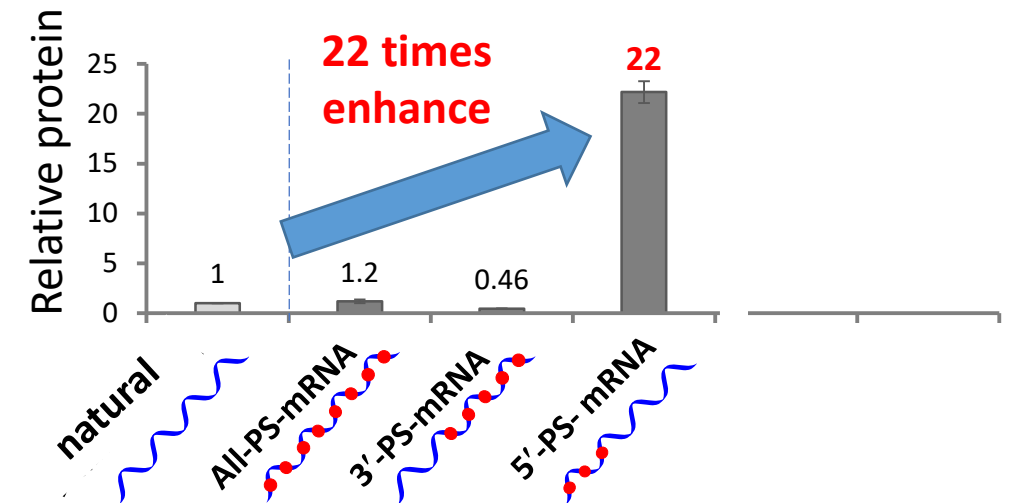
**200 times enhancement**

*Chem Comm* 2020; *Sci Rep* 2015; *ACIE* 2013; JP6284181

## PS modification enhances translation

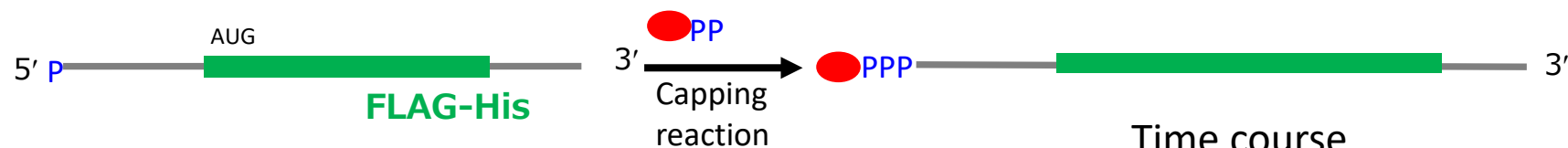
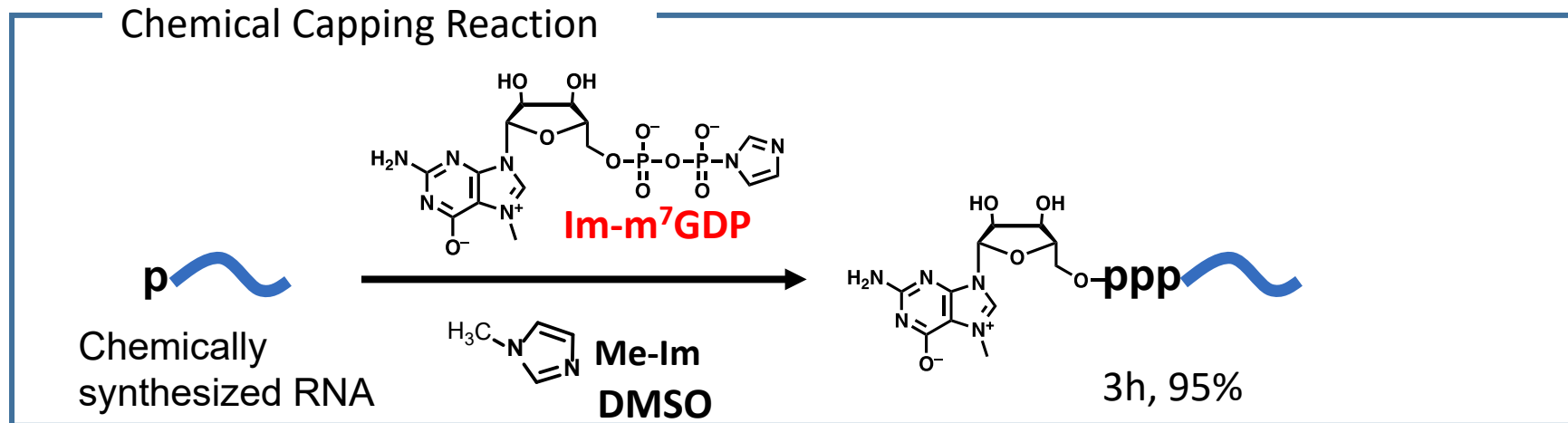


**Accelerate initiation step  
(rate-limiting step)**

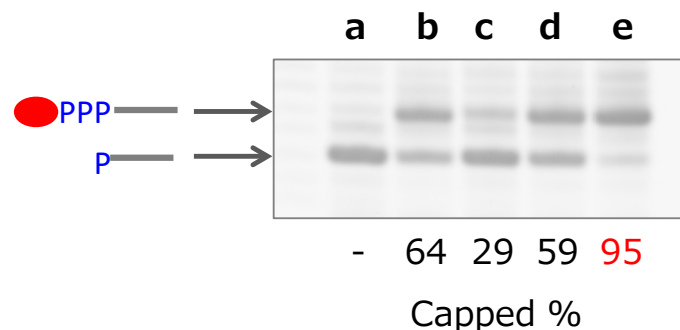


*ACIE* 2020; PCT/JP2020/037706

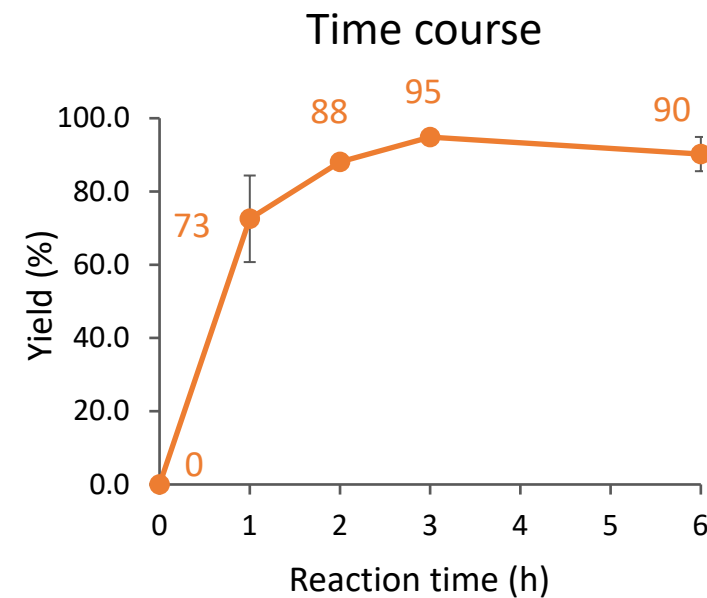
# 世界初のmRNAの完全化学合成



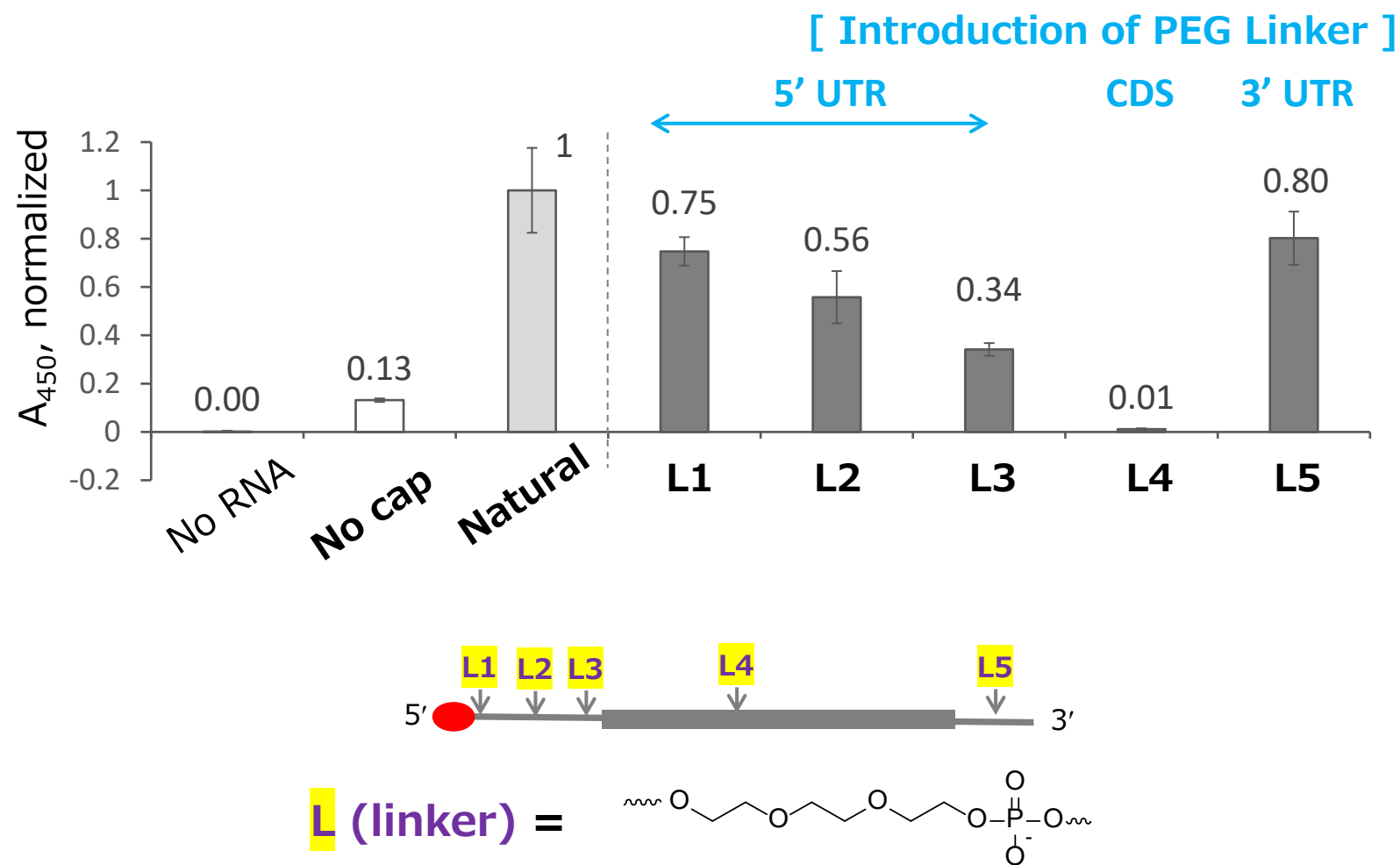
|                         |   |    |    |     |     |
|-------------------------|---|----|----|-----|-----|
| Capping reaction        | - | +  | +  | +   | +   |
| 10 mM CaCl <sub>2</sub> |   | +  | -  | +   | -   |
| Counter ion of RNA      |   | Na | Na | TEA | TEA |



10  $\mu$ M RNA , 10 mM Im-m<sup>7</sup>GDP, **1 M MeIm**,  
DMSO, 55  $^{\circ}$ C, 3 h

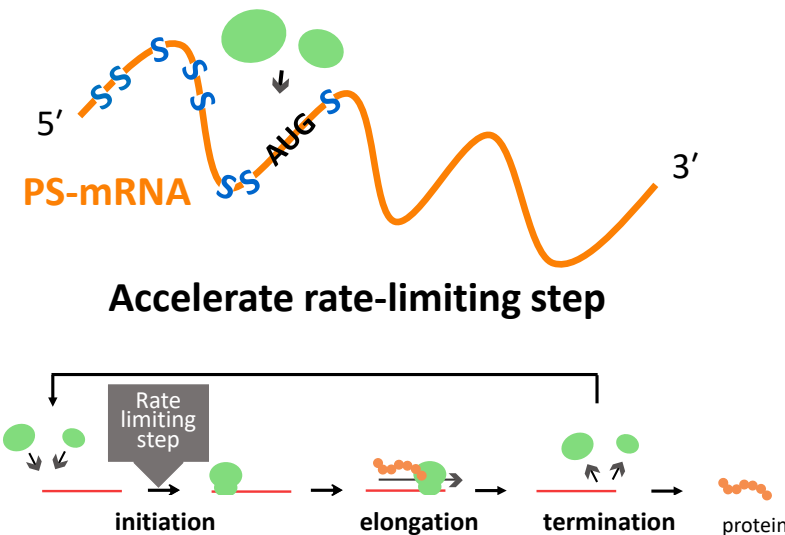
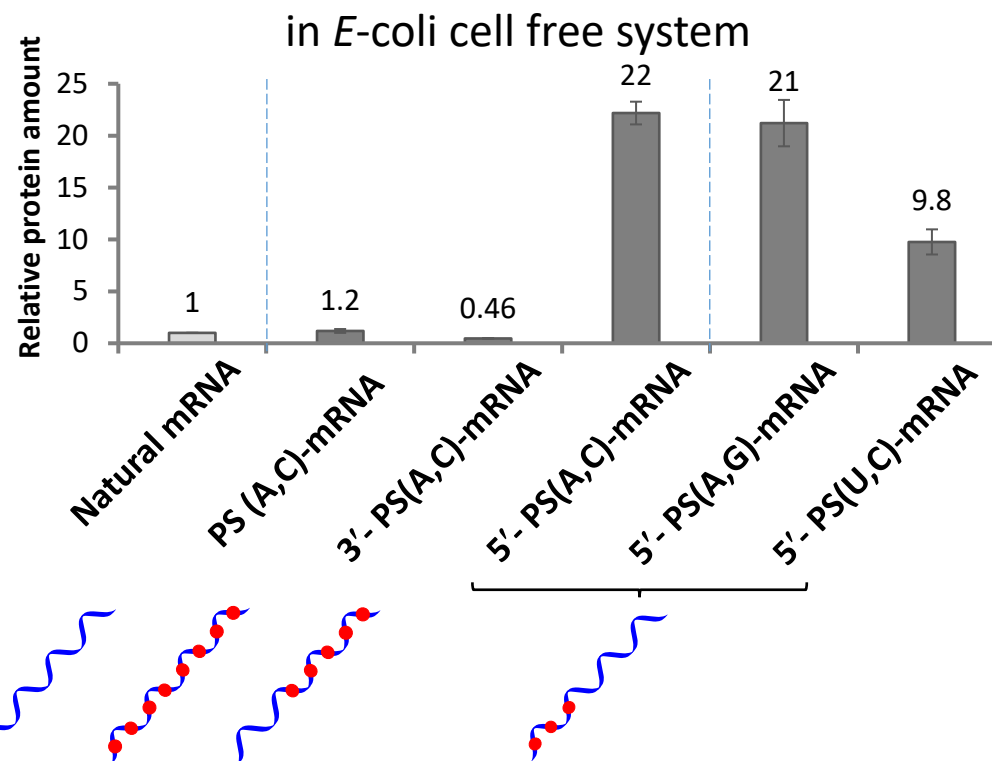
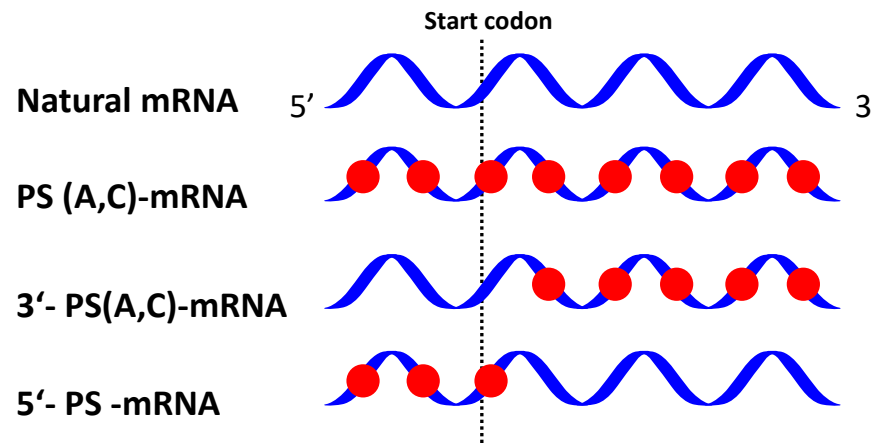
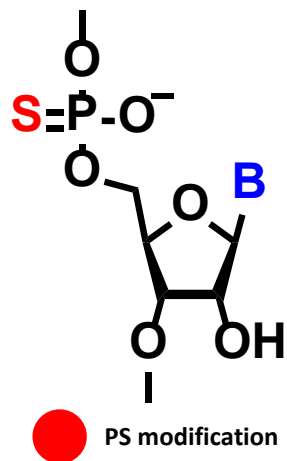


# Effect of chemical modification on mRNA



2  $\mu$ g RNA was transfected into HeLa cells ( $5 \times 10^4$  cells/well in a 12-well plate) using Lipofectamine MessengerMax. After 7-h incubation, the cells were lysed and the translation product was quantified by an ELISA assay using anti-HisTag/anti-FLAG antibodies.

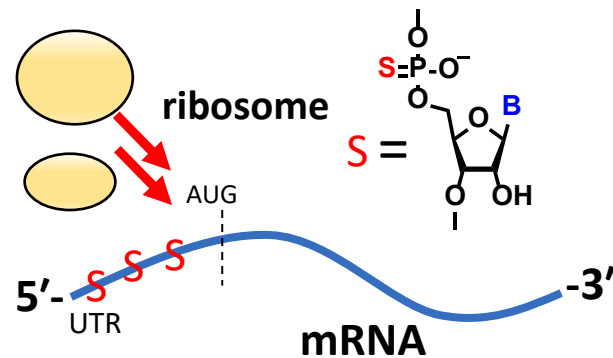
# 部位特異的PS化学修飾による翻訳反応の加速



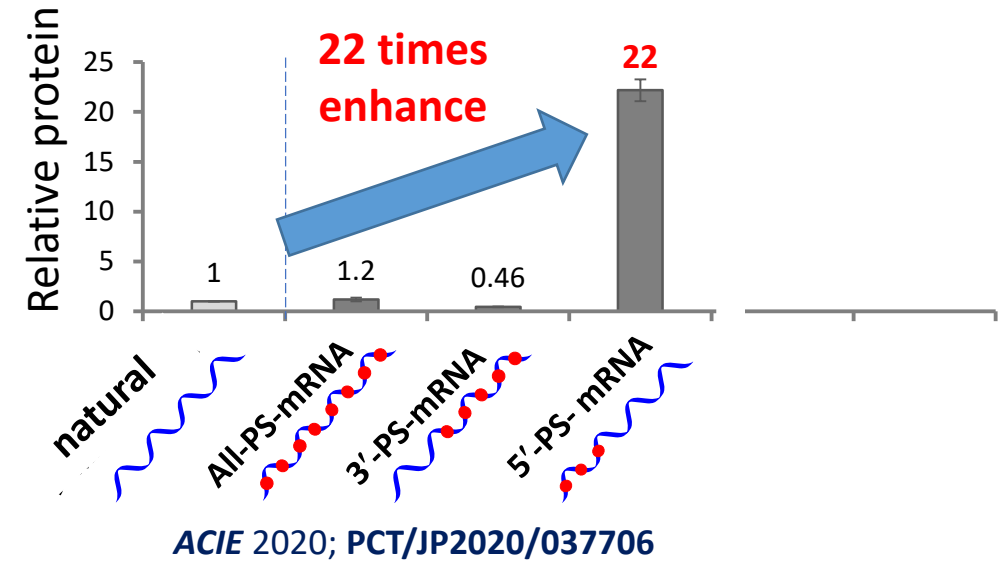
部位特異的に化学修飾導入には、  
mRNAの化学合成技術が必要

# Site specific chemical modification of mRNA

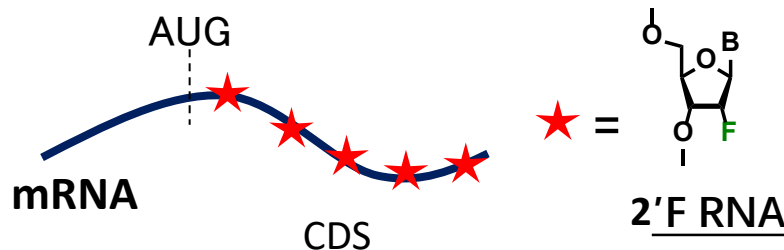
## Modification of 5' UTR



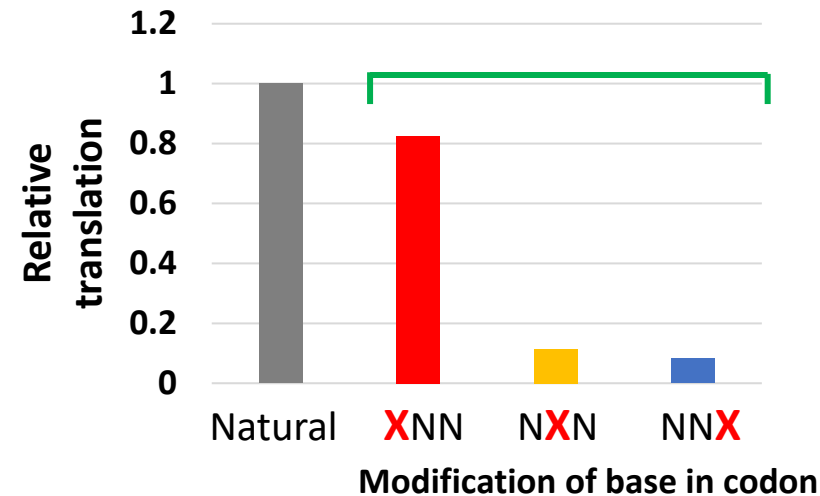
**Accelerate initiation step**

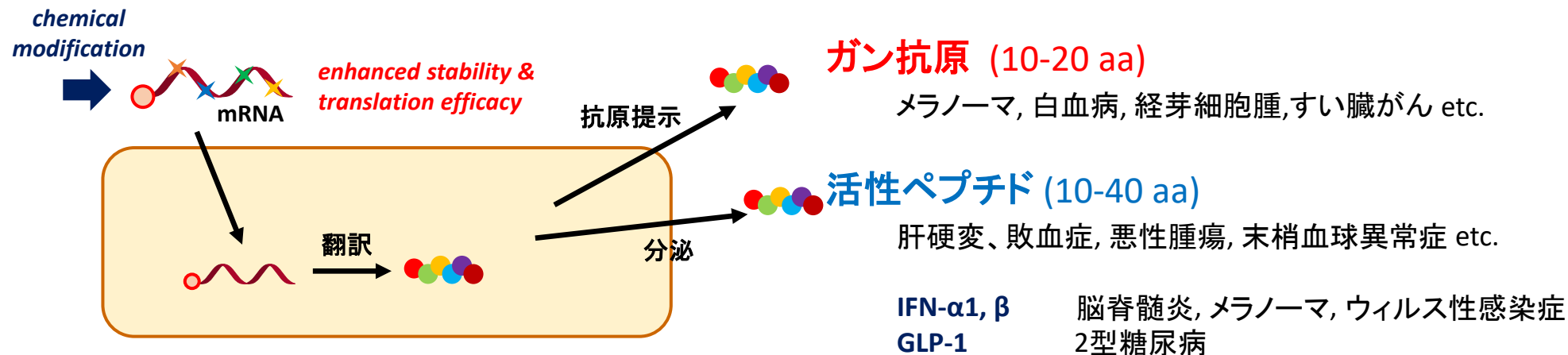


## Modification of coding region



**Modification of first base in codon is accepted**

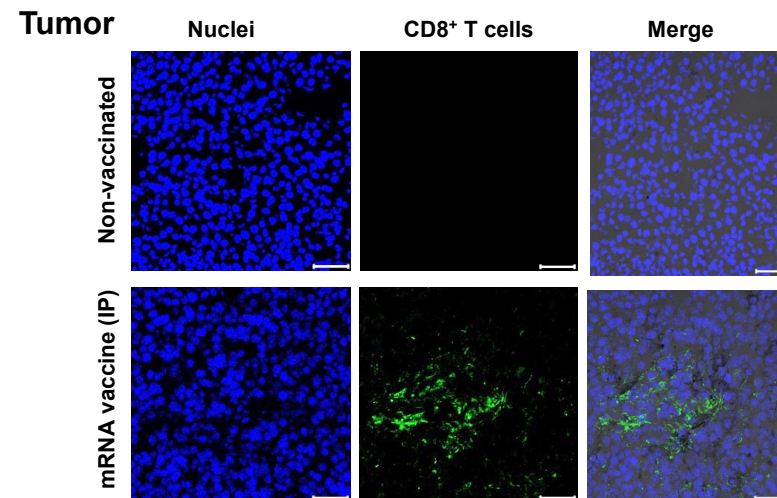
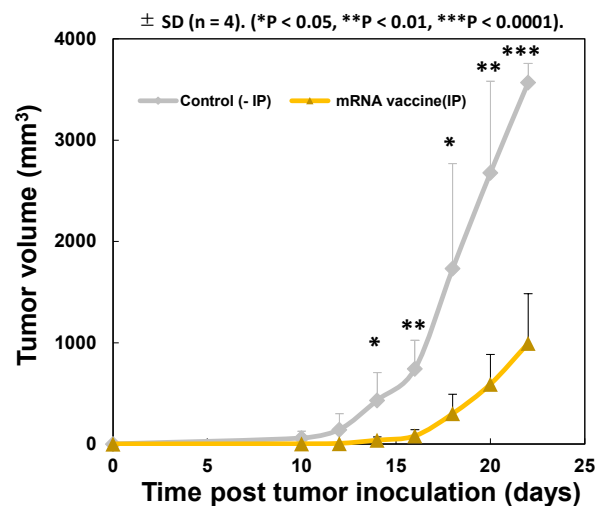




## 化学合成mRNAをイオントフォレシスにより直接経皮デリバリー

がん抗原ペプチド

m<sup>7</sup>Gppp-Gm-Gm-AGCCACC**AUG**AAGGUGCCCCGGAACCAGGACUGGCUG**UGA**AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
2' OMe



徳島大学  
小暮健太郎 教授  
との共同研究

化学合成mRNAの癌ワクチン効果を確認

•Perspective **npj** | vaccines

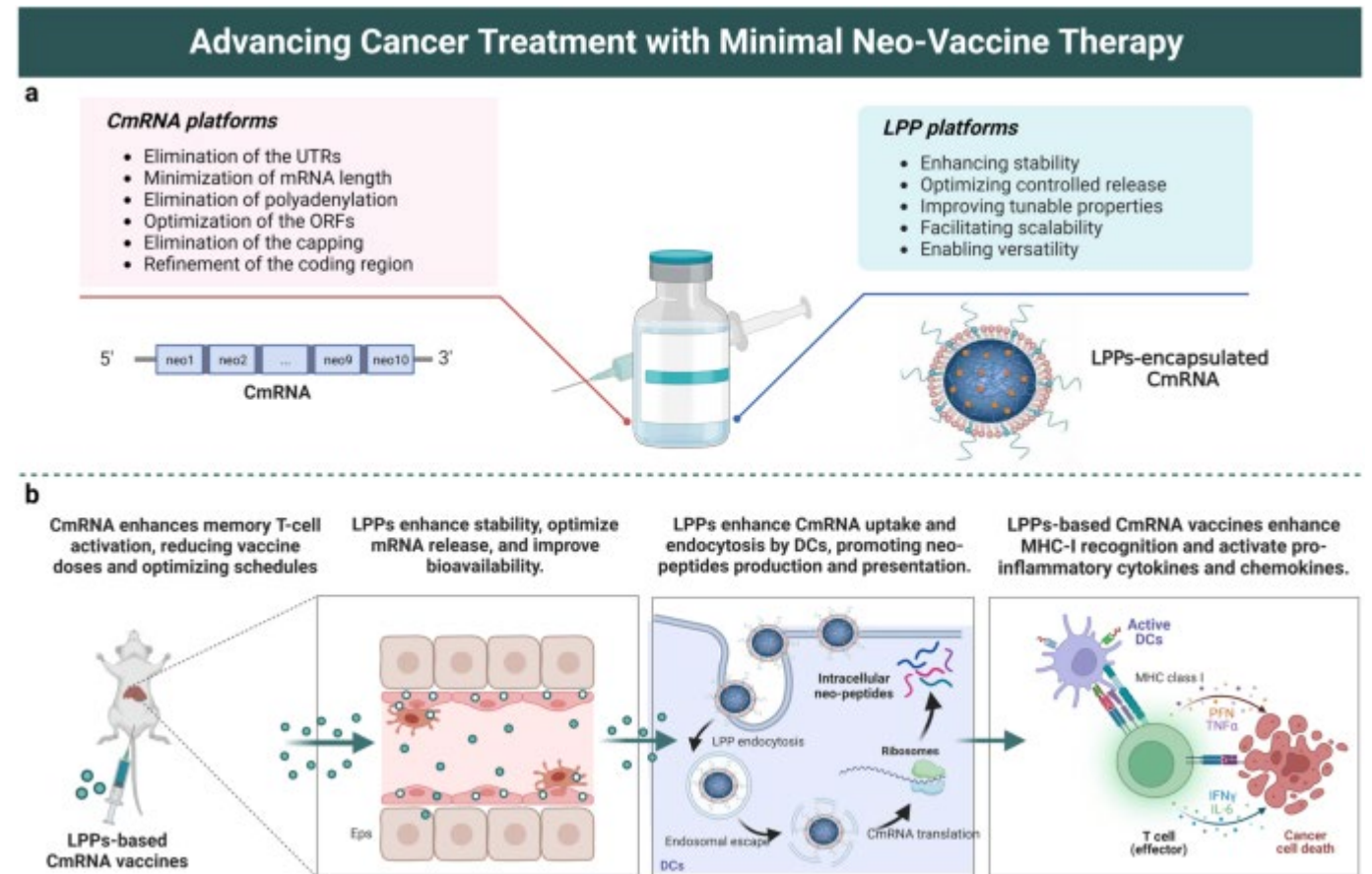
•[Open access](#)

•[Published: 18 January 2024](#)

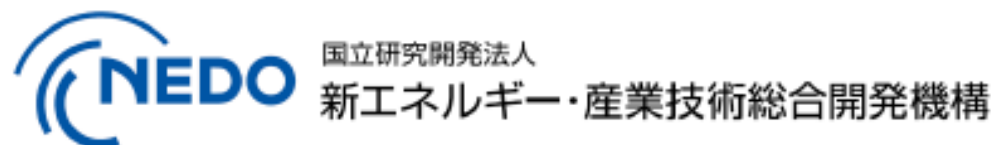
## Neoantigen vaccine nanoformulations based on Chemically synthesized minimal mRNA (CmRNA): small molecules, big impact

[npj Vaccines](#) volume 9, Article number: 14 (2024)

Recently, chemically synthesized minimal mRNA (CmRNA) has emerged as a promising alternative to in vitro transcribed mRNA (IVT-mRNA) for cancer therapy and immunotherapy. CmRNA lacking the untranslated regions and polyadenylation exhibits enhanced stability and efficiency. Encapsulation of CmRNA within lipid-polymer hybrid nanoparticles (LPPs) offers an effective approach for personalized neoantigen mRNA vaccines with improved control over tumor growth. LPP-based delivery systems provide superior pharmacokinetics, stability, and lower toxicity compared to viral vectors, naked mRNA, or lipid nanoparticles that are commonly used for mRNA delivery. Precise customization of LPPs in terms of size, surface charge, and composition allows for optimized cellular uptake, target specificity, and immune stimulation. CmRNA-encoded neo-antigens demonstrate high translational efficiency, enabling immune recognition by CD8<sup>+</sup> T cells upon processing and presentation. This perspective highlights the potential benefits, challenges, and future directions of CmRNA neoantigen vaccines in cancer therapy compared to Circular RNAs and IVT-mRNA. Further research is needed to optimize vaccine design, delivery, and safety assessment in clinical trials. Nevertheless, personalized LPP-CmRNA vaccines hold great potential for advancing cancer immunotherapy, paving the way for personalized medicine.



## NEDO DTSU STS 採択内容について



事業名称 : 完全化学合成型mRNAを基盤にした創薬探索システムの整備

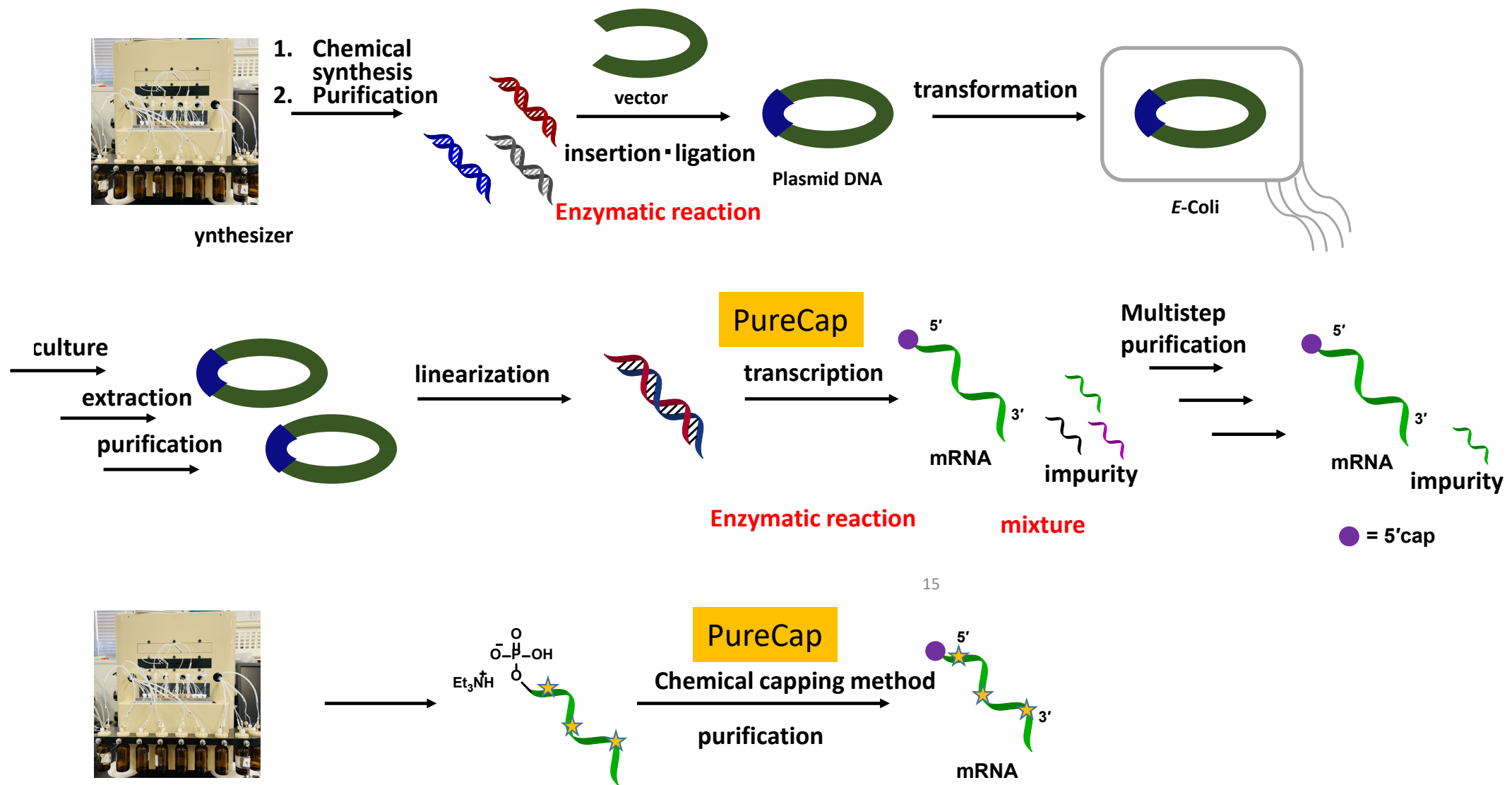
パートナーVC : 株式会社みらい創造機構 (代表取締役: 岡田祐之、URL: <https://miraisozo.co.jp/>)

mRNA医薬品はcovid-19を契機に新たなモダリティとして広く認知され、世界中で開発が展開されるようになりました。一方で、デリバリー技術、安定性、免疫制御など、解決すべき課題が山積しているのも事実です。

とりわけ完全化学合成型mRNAは、従来の生物学的手法を用いずに製造されるmRNAであり、精密修飾が可能であることや製造プロセスが短いことなどから医療応用が非常に期待されている技術領域です。しかし、効率的に合成することや精製が困難であるなどの問題により実用化が全く進展していません。今回のプロジェクトは、この完全化学合成型mRNAの技術開発と事業化を進めることです。この採択を受けて我々は名古屋大学をはじめとした様々な機関と連携し、実用化を加速してまいります。本事業により期待される主なメリットは以下の通りです。

- ・化学プロセスに基づく製造プロセスの大幅な短縮
- ・高い持続性、安定性による投与量、投与回数の低減、QOLの向上
- ・リガンドコンジュゲートなど、アクティブターゲティングが可能
- ・LNP等のDDS材料不要による全身症状や臓器障害の抑制

# mRNA synthesis



化学修飾自在・3日でmRNAを合成