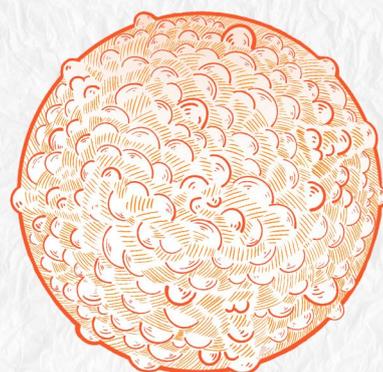
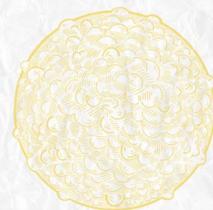


RNA

from Design to Therapy

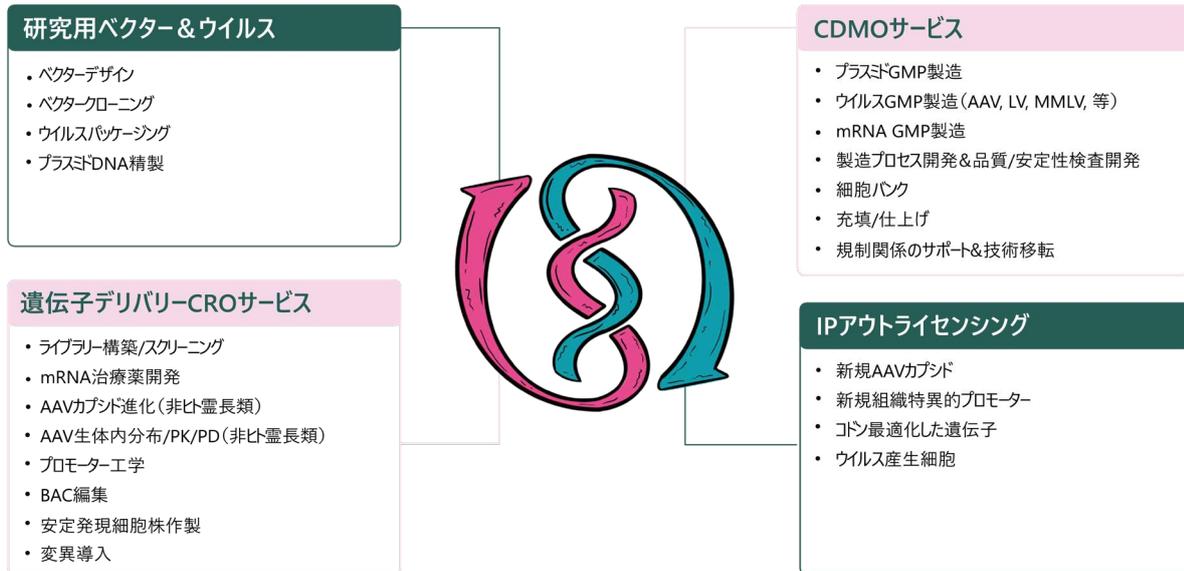


目次

ベクタービルダーについて.....	1
当社のmRNA製造実施能力	2
mRNA CROサービス	3
IVTベクターデザインとクローニング	3
IVT mRNAとLNP製造	4
品質管理	5
機能評価	6
mRNAとLNP既製品.....	7
mRNA CDMOサービス	8
技術情報.....	10
関連サービス.....	16

ベクタービルダーについて

遺伝子デリバリー技術の世界的リーダーとして、VectorBuilder は基礎研究から治療まで、事実上すべての研究および臨床ニーズをカバーする遺伝子デリバリーソリューションの全てのサービスをご提供しています。開発初期の研究用ベクターから、前臨床試験のためのGMP-like (類似) ベクター、臨床試験のための完全なGMPグレードのベクターまで、創薬パイプライン全体にわたって、世界中の何万もの研究所やバイオテクノロジー/製薬会社をサポートしてきました。当社の4つの主要事業セグメントには、研究用ベクター&ウイルス、遺伝子導入CROサービス、CDMOサービス、IPアウトライセンシングが含まれます。



VectorBuilderは製造方法の開発や分析試験において幅広い能力を有しており、常にお客様の期待を超える最高品質のIVT mRNAを保証しています。当社の厳格な文書記録・管理の実践は、規制基準に適合したmRNA医薬品製造を後押しし、当社のGMPエキスパートと提携することで、創薬・開発から臨床用mRNA医薬品の製造まで、シームレスに移行することができます。

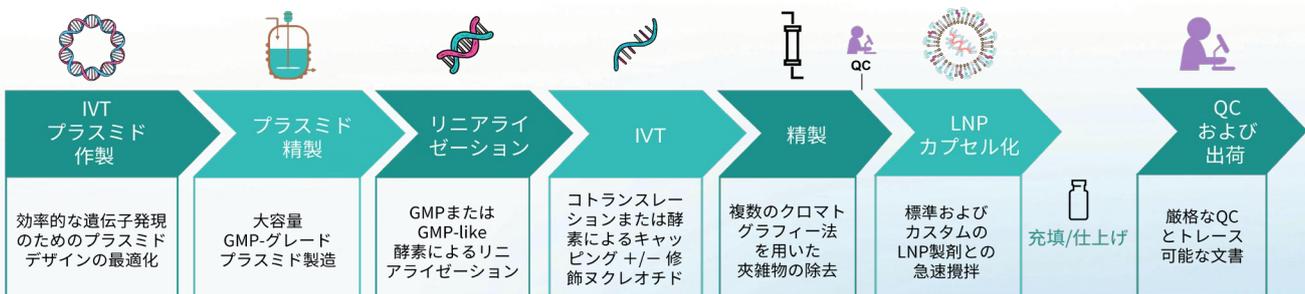
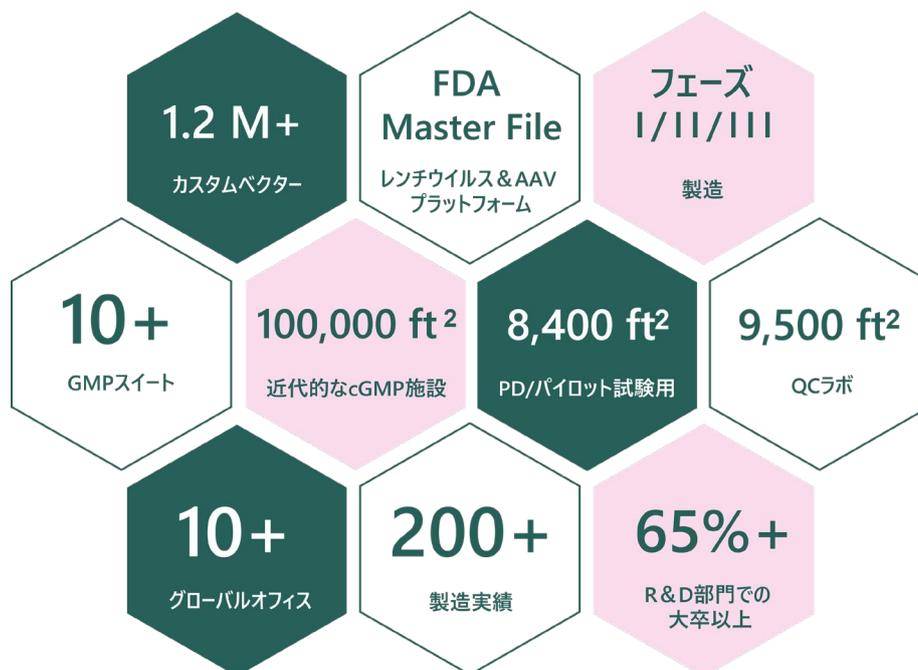


図1. IVT mRNA製造のワークフロー

当社のmRNA製造実施能力

プロセス開発、カスタムIVT mRNA合成、GMP準拠mRNA製造に必要なインフラストラクチャーが整備されており、同一性、完全性、純度、安全性、力価、および機能性評価を含む一連の分析サービスによって、包括的にmRNAの特性を評価することが可能です。当社はmRNA技術の最前線に立ち続けるため、常にイノベーションへコミットし、製造プロセスの改良を行っています。



VectorBuilderは高度に設計された施設に最新鋭の設備を備えた約 100,000 ft² の近代的GMP製造拠点を有しています。2023年第4四半期には、mRNAの探索フェーズから臨床医薬品製造までをシームレスに進行できる、mRNAに特化したGMP施設の稼働が予定されています。当施設は、お客様のプロジェクトの要件に対応できる柔軟性と適応性に重点を置いて設計されています。

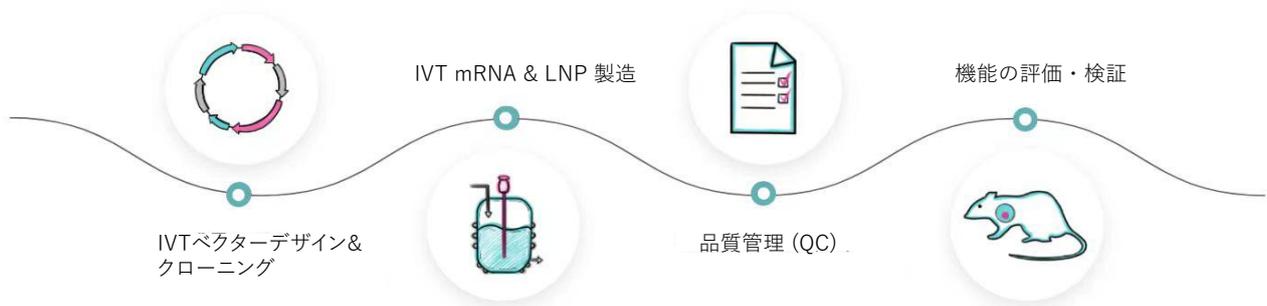
当社の設備の一例：

- 10 室以上の GMP 製造スイート
- 充填 / 仕上げスイート
- QC ラボ
- 分析開発スイート
- 製造プロセス開発スイート
- GMP 倉庫



mRNA CROサービス

ベクタービルダーはmRNA医薬（ワクチン、遺伝子編集、キメラ抗原受容体（CAR）、細胞または胚内でのタンパク質発現）の包括的な開発ソリューションを提供しています。RNA設計と生産に豊富な経験をもつ弊社チームはin vitro転写用ベクターの設計および作製、in vitro mRNA転写（IVT）、脂質ナノ粒子（Lipid Nanoparticle, LNP）パッケージング、in vitro/in vivo機能試験のサポートを通じて、お客様のmRNAワクチンや遺伝子医薬法開発を加速させます。



IVTベクターデザイン&クローニング

- 商業利用のための知的財産権（IP）の制約の無い、特許権フリーのIVTバックボーンを使用
- 高発現のための配列最適化
 - 5' および 3' UTR
 - コード配列
 - コザック配列

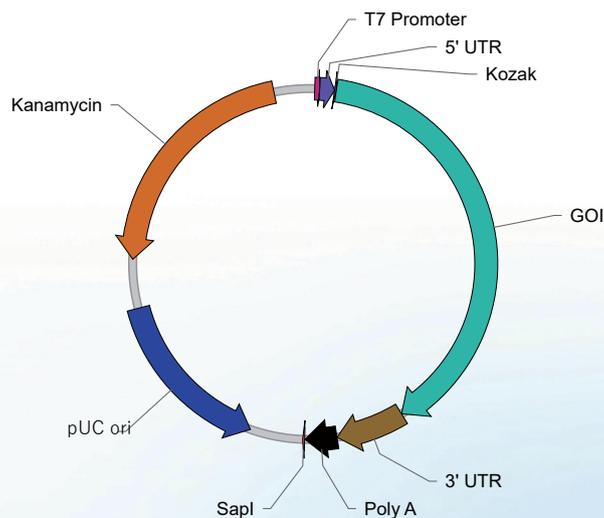


図2. IVTベクターデザイン。

T7ベクターを基本とし、5' UTRと3' UTR、およびpoly A tail がデザインされたVectorBuilderのIVTベクターマップ。

IVT mRNAとLNP製造

- ベクタークローニングからLNPカプセル化まで最短で5週間
- mRNA合成と自己複製型RNA (saRNA) は長さは10,000 nt まで、容量は μg 単位から g 単位まで受注可能
- 共転写または酵素による高キャッピング効率 (上限99%)
- in vivoにおける免疫応答や幅広い発現を実現させるための修飾ヌクレオチド

- o m1 Ψ
- o m5C
- o 5moU

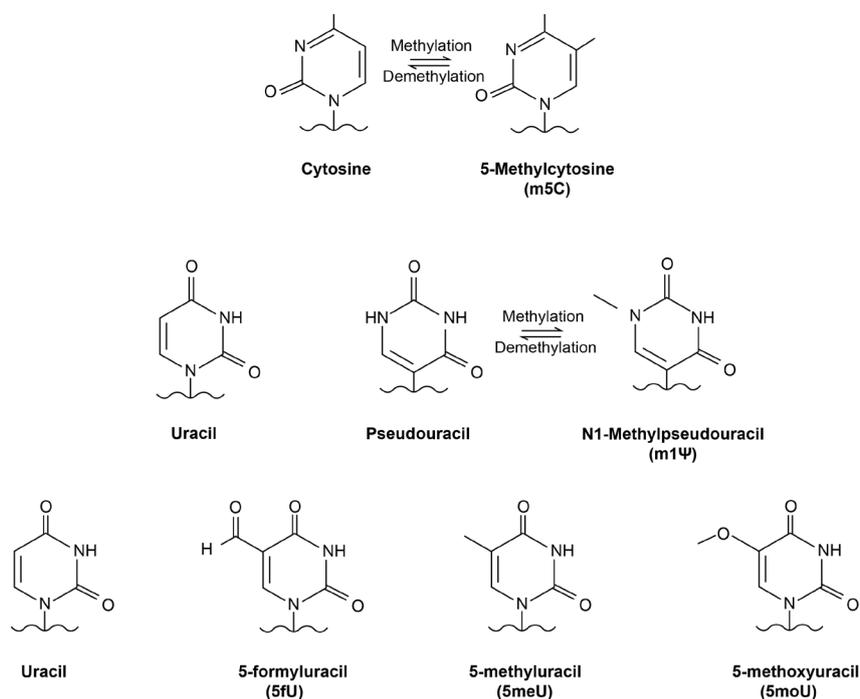


図3. 一般塩基と修飾塩基の構造

- 従来作製方法とカスタム作製方法による高品質LNP:

- o 高いカプセル化効率
- o 低い多分散インデックス (PDI)
- o 安定性の改善
- o デリバリー効率の向上
- o 抗体結合による適合性 (Ab-conjugation)

- 独自の精製技術で以下の不純物を迅速かつ効率的に除去しています:

- o IVT DNAテンプレート
- o 中途半端に転写されたmRNA 産物
- o 残存タンパク質
- o 二本鎖RNA (dsRNA)

品質管理 (QC)

VectorBuilderでは、IVT mRNAとLNPカプセル化において非常に多くの品質管理検査をご提供しています。✓マークされた標準品質管理検査項目は常時遂行されています。個々のプロジェクトに合わせた追加の品質管理検査もオプションで承っています。

IVT mRNA

属性		検査項目	リサーチ-グレード	GMP-like
アイデンティティ (特異性)	mRNA配列	サンガーシークエンシング	✓	✓
	mRNAの長さ	変性アガロースゲル電気泳動	✓	✓
		キャピラリーゲル電気泳動 (CGE)	オプション	✓
一般/物性	mRNA濃度	UV分光光度法	✓	✓
		RiboGreenアッセイ	オプション	✓
	外観	目視確認	オプション	✓
有効性	遺伝子発現	In vitro転写後にウェスタンブロットティング	オプション	オプション
		細胞へのトランスフェクション	オプション	オプション
安全性	無菌性	バイオーバーデン試験	オプション	✓
	マイコプラズマ	培養法	オプション	✓
		qPCR	オプション	オプション
	エンドトキシン	キネティッククロモジェニックアッセイ (KCA)	オプション	✓
純度	mRNA安定性	変性アガロースゲル電気泳動	✓	✓
		キャピラリーゲル電気泳動 (CGE)	オプション	✓
	A260/280	UV分光光度法	✓	✓
	Capping効率	LC-MS	オプション	✓
	PolyAのサイズ分布	LC-MS	オプション	✓
	残存dsRNA	ドットプロット法	オプション	✓
	残存テンプレートDNA	qPCR	オプション	✓
	残存タンパク質	NanoOrangeアッセイ	オプション	✓
	残存試薬	ガスクロマトグラフィー	オプション	オプション

LNPカプセル化

属性	検査項目	リサーチ-グレード	GMP-like
カプセル化効率	RiboGreenアッセイ	✓	✓
粒子サイズ、PDI	Dynamic light scattering (Zetasizer)	✓	✓
表面電荷	Dynamic light scattering (Zetasizer)	✓	✓

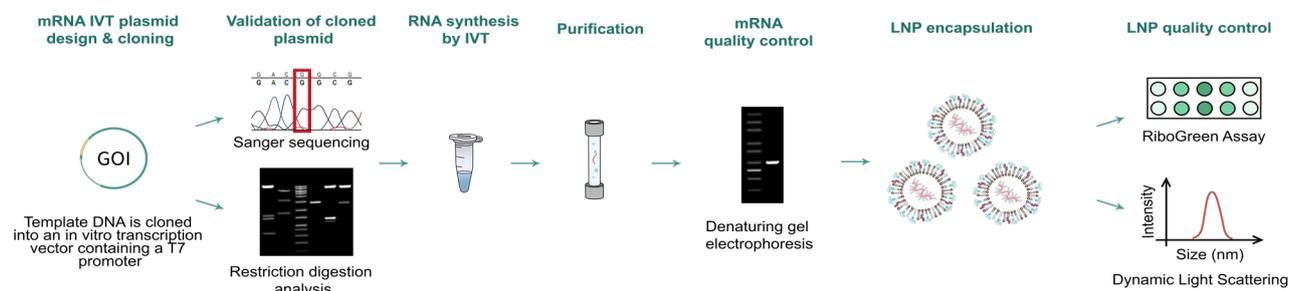


図4. mRNA製造とQCの一般的なワークフロー

図4. に示すように、一般的なmRNA製造のワークフローでは、まずコドン、GC含量、二次構造の熱力学的安定性について検討を行い、最適化されたテンプレートDNA配列をデザイン・合成し、IVTベクターへクローニングします。クローニングされたプラスミドDNAはシーケンスを確認後、目的の転写産物が合成されるよう、IVT反応前に線状化されます。in vivo翻訳効率を向上、および免疫原性を減少させるため、m1Ψ、m5C、5moUのような修飾ヌクレオシドを、IVT反応で取り込ませることも可能です。mRNAは、共転写、あるいは酵素のどちらでも、高い効率 (>95%) でキャッピングされます。mRNAはその後、mRNA吸着ビーズによって精製されますが、ご依頼に応じて、オリゴdTクロマトグラフィーやイオン対逆相クロマトグラフィーなどで精製することも可能です。次に、マイクロ流体ミキサーでmRNAをLNPにカプセル化し、QCテストでカプセル化効率とナノ粒子の評価を行います。

機能評価

- 当社のハイスループット化したクローニング、合成、そして試験/検証プラットフォームによって、GOI発現への異なる配列 (UTR s、コーディング配列、ポリ A、コザック配列、など) の影響を検証し、最適化しています。
- 抗原提示、抗体産生、CAR発現、そしてCRISPRなど、様々な用途に合わせて機能評価系を確立しています。
- げっ歯類や非ヒト霊長類の動物モデルを用いて、LNP-mRNA遺伝子デリバリーの有効性と安全性を評価しています。

mRNAとLNP既製品

VectorBuilderは、既製品IVT mRNAとLNPカプセル化mRNAを提供しています。in vitroとin vivoで検証済みであり、LNPを用いたmRNAデリバリーシステムの効率の評価やmRNA実験のコントロールとして利用できます。

カテゴリー	カタログ番号	製品名	ヌクレオチド	スケール	価格 (税別、送料別)
IVT mRNA	NR1010-0100	EGFP IVT mRNA	unmodified	100 µg	39,000円
	NR1010-1000	EGFP IVT mRNA	unmodified	1 mg	262,000円
	NR1011-0100	EGFP IVT mRNA	m1Ψ substitution	100 µg	51,000円
	NR1011-1000	EGFP IVT mRNA	m1Ψ substitution	1 mg	232,500円
	NR1020-0100	HiExpress™ ホタル ルシフェラーゼ IVT mRNA	unmodified	100 µg	46,500円
	NR1020-1000	HiExpress™ ホタル ルシフェラーゼ IVT mRNA	unmodified	1 mg	294,500円
	NR1021-0100	HiExpress™ ホタル ルシフェラーゼ IVT mRNA	m1Ψ substitution	100 µg	57,500円
	NR1021-1000	HiExpress™ ホタル ルシフェラーゼ IVT mRNA	m1Ψ substitution	1 mg	325,500円
	NR1030-0100	mCherry IVT mRNA	unmodified	100 µg	39,000円
	NR1030-1000	mCherry IVT mRNA	unmodified	1 mg	262,000円
	NR1031-0100	mCherry IVT mRNA	m1Ψ substitution	100 µg	51,000円
	NR1031-1000	mCherry IVT mRNA	m1Ψ substitution	1 mg	232,500円
	NR1040-0100	hSpCas9 IVT mRNA	unmodified	100 µg	49,500円
	NR1040-1000	hSpCas9 IVT mRNA	unmodified	1 mg	262,000円
	NR1041-0100	hSpCas9 IVT mRNA	m1Ψ substitution	100 µg	62,000円
	NR1041-1000	hSpCas9 IVT mRNA	m1Ψ substitution	1 mg	324,000円
	NR1050-0100	HiExpress™ ガウシア ルシフェラーゼ IVT mRNA	unmodified	100 µg	46,500円
	NR1050-1000	HiExpress™ ガウシア ルシフェラーゼ IVT mRNA	unmodified	1 mg	294,500円
	NR1051-0100	HiExpress™ ガウシア ルシフェラーゼ IVT mRNA	m1Ψ substitution	100 µg	57,500円
	NR1051-1000	HiExpress™ ガウシア ルシフェラーゼ IVT mRNA	m1Ψ substitution	1 mg	325,500円
NR1070-0010	Zebrafish EGFP IVT mRNA	unmodified	10 µg	56,000円	

mRNA CDMOサービス

VectorBuilderは、医療目的の in vitro 転写 (IVT) mRNA 製造および脂質ナノ粒子 (LNP) 開発を全工程でサポートする CRO および CDMO サービスを提供しています。革新的なベクターデザインプラットフォームと豊富な経験をもとに、様々な研究・臨床ニーズに合わせた最適な in vitro 転写ベクターデザイン、大規模な IVT mRNA 製造、LNP カプセル化、徹底した品質管理をご提供しています。創薬研究、前臨床試験など、さまざまなダウンストリームニーズに対応した複数のグレードを用意しています。

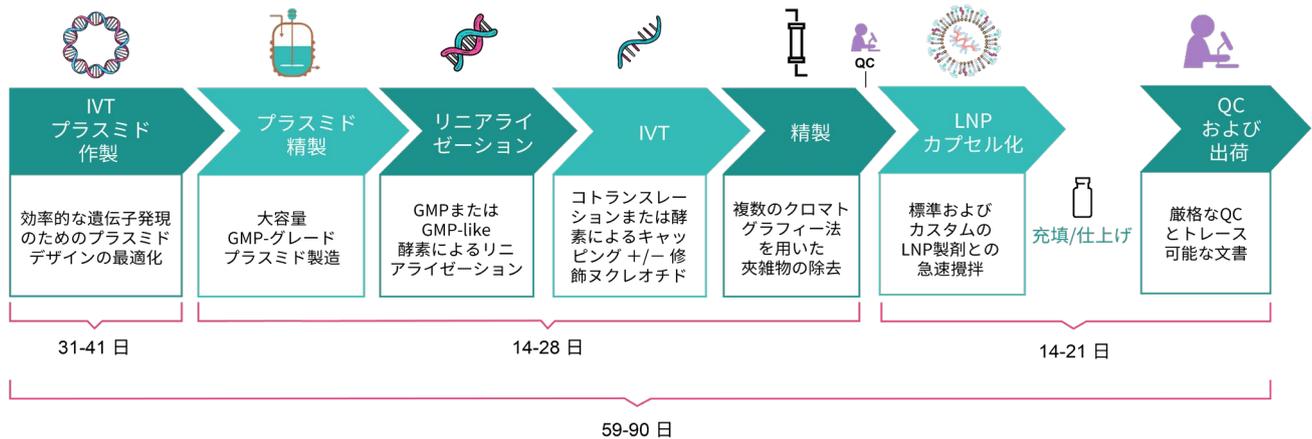


図7. IVT mRNA製造のワークフロー

IVT mRNAのグレード別比較

	リサーチグレード	GMP-like
アプリケーション (用途)	基礎研究、治療薬開発、および 前臨床研究	ADMEなどの前臨床試験
製造スケール	mRNA: 0.1-10 mg LNP: 0.1-3 mg	mRNA: 0.01-5 g LNP: 3-20 mg
作業日数	49-71 日 <ul style="list-style-type: none"> ベクターデザインとクローニング: 26-36 日 プラスミド作製とリニアライゼーション: 14-21 日 IVT mRNA生産: 14-21 日 LNPカプセル化: 9-14 日 	59-90 日 <ul style="list-style-type: none"> ベクターデザインとクローニング: 31-41 日 プラスミド作製とリニアライゼーション: 14-28 日 IVT mRNA生産: 14-28 日 LNPカプセル化: 14-21 日
品質管理システム	ISO9001	GMP製造の主要な特長を取り入れた ISO9001
製造場所	標準的な実験室での並行生産	隔離された製造スイートで製造
文書管理とトレーサビリティ	なし	あり
QCおよび出荷時検査	標準QC	個々のプロジェクトのニーズに合わせて実施 (下記参照)
無菌充填	N/A	要望があれば可能
サンプルの保存	Available upon request	要望があれば可能
Other deliverable	COA	1. COA 2. 製造サマリー 3. TSE/BSE文書 (要望があった場合のみ)

• リサーチグレードmRNA

リサーチグレードの mRNA は、基礎研究および創薬研究用として開発されました。標準的な実験室の条件下で、厳格な QC により製造されており、下流のあらゆる研究ニーズに適した高品質を保証しています

• GMP-like mRNA

GMP-like mRNA は、医薬品の安全性や代謝に関する動物実験などの前臨床試験を対象としています。GMP ガイドラインの主要な特徴に従って同等に製造されており、同様の製造工程と品質属性を有しています。製造は隔離された製造室で行われ、文書管理、トレーサビリティが確保されています。GMP-like グレードは、最終的な GMP 製品の小規模な模倣品と見なすことができますが、はるかに低コストで、より迅速なタイムラインを実現します。必要に応じて、GMP-like mRNA は、RNase フリーの培養および精製条件下で製造することができます。製品リリース時に品質検査証明書 (COA) をご提供いたします。TSE/BSE ステートメントは、ご要望に応じて発行いたします。

• GMPグレードmRNA *Coming soon*

GMP グレードの mRNA は、GMP ガイドラインを厳守し、当社の認定 GMP サイトで製造されています。製造工程では、包括的な品質保証システムが導入されています。幅広いインプロセスおよびリリース QC アッセイを実施し、mRNA が必要とされる品質および安全基準を満たすか、それ以上であることを確認します。製品リリース時には、製造工程を完全に記録したバッチリリースレポートと COA をご提供しています。その他の文書については、ご要望に応じてご提供します。

QCテスト

標準 QC テストには、IVT mRNA ではサンガーシークエンシス、変性アガロースゲル電気泳動、および UV-Vis 分光光度測定、また LNP-mRNA ではカプセル化効率、粒子径、PDI、およびゼータ電位測定が含まれています。

製品	属性	分析方法
IVT DNA テンプレート	濃度	分光測定
	アイデンティティ (特性)	ゲル電気泳動、サンガーシークエンシング
	リニアライゼーション	キャピラリーゲル電気泳動
	宿主 E. coli DNA の残留	qPCR
mRNA	濃度	UV-Vis 分光測定
	インテグリティ (完全性)	キャピラリーゲル電気泳動、逆転写後にサンガーシークエンシング
	Capping 効率	LC-MS、キャピラリーゲル電気泳動
	PolyA tail インテグリティ	LC-MS、キャピラリーゲル電気泳動
	残留タンパク質	NanoOrange アッセイ
	残留プラスミド DNA	qPCR
	dsRNA	ドットプロット
LNP	エンドトキシン	キネティッククロモジェニックアッセイ (KCA)
	カプセル化効率	RiboGreen アッセイ
	直径、PDI (多分散度指数)、およびゼータ電位	Zetasizer

技術情報

IVTベクターシーケンスの最適化

UTR

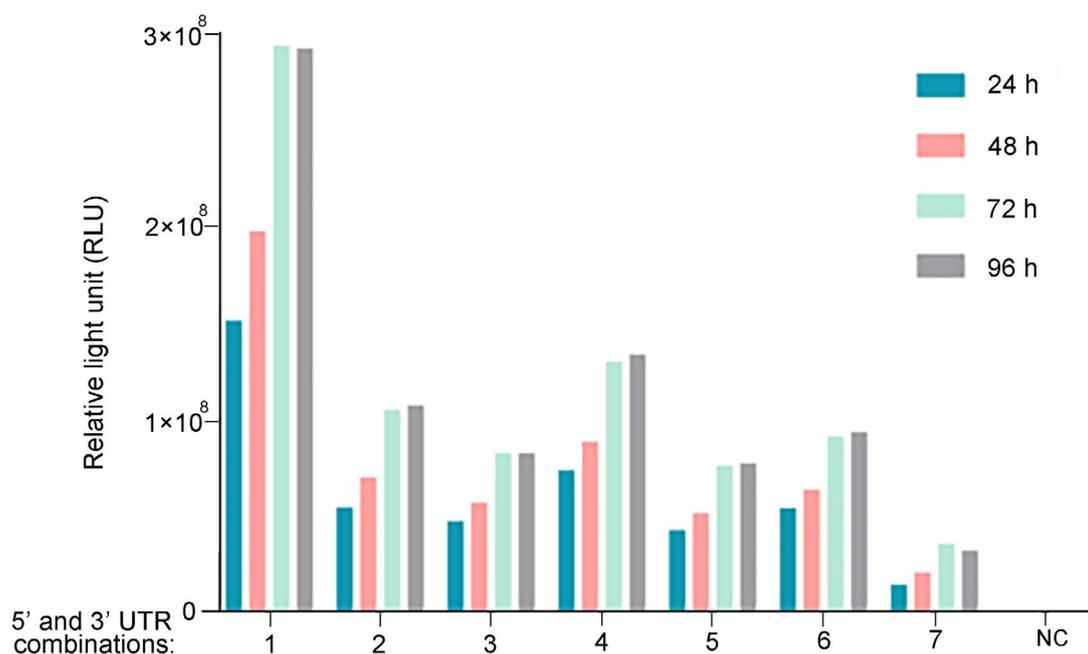


図6. mRNA発現を改善するUTR配列の条件検討と最適化。

グアシアルシフェラーゼの最大発現量を達成できるmRNAを最適化するために、異なるUTRの組み合わせを検証した。293T細胞をウェル当たり 2.3×10^5 個の密度で12ウェルプレートに播種した。1ウェルあたり $1 \mu\text{g}$ のmRNAを細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション後6時間、24時間、48時間、72時間、96時間に、培地中のグアシアルシフェラーゼ活性を定量した。

コーディング配列

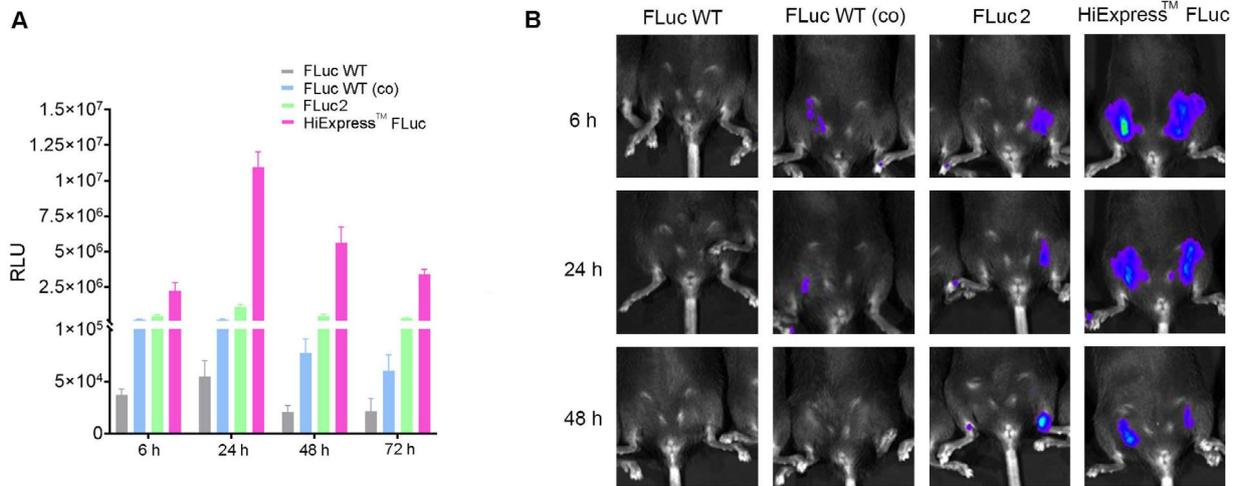


図7. mRNA発現量はin vitro および in vivoでコドン最適化によって増加する。(A) HEK293T細胞におけるHiExpress™ Firefly Luciferase mRNAおよび他のルシフェラーゼmRNAの発現。12ウェルプレート上で増殖させた細胞に、1ウェルあたり0.5 ugのmRNAをトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性をトランスフェクション後6時間、24時間、48時間、72時間で測定した。(B) 成体C57BL/6マウスに30 μgのLNPカプセル化mRNAを筋肉内注射し、注射後6時間、24時間、48時間にルシフェラーゼ活性を測定した。FLuc WTは野生型ホタルルシフェラーゼを示す。FLuc WT (co) はコドン最適化された野生型ホタルルシフェラーゼを示す。FLuc2はLuc2ホタルルシフェラーゼを示す。

[HiExpress™ Firefly Luciferase IVT mRNAの詳細はこちら](#)

[HiExpress™ Firefly Luciferase LNP-mRNAの詳細はこちら](#)

ポリAテイル

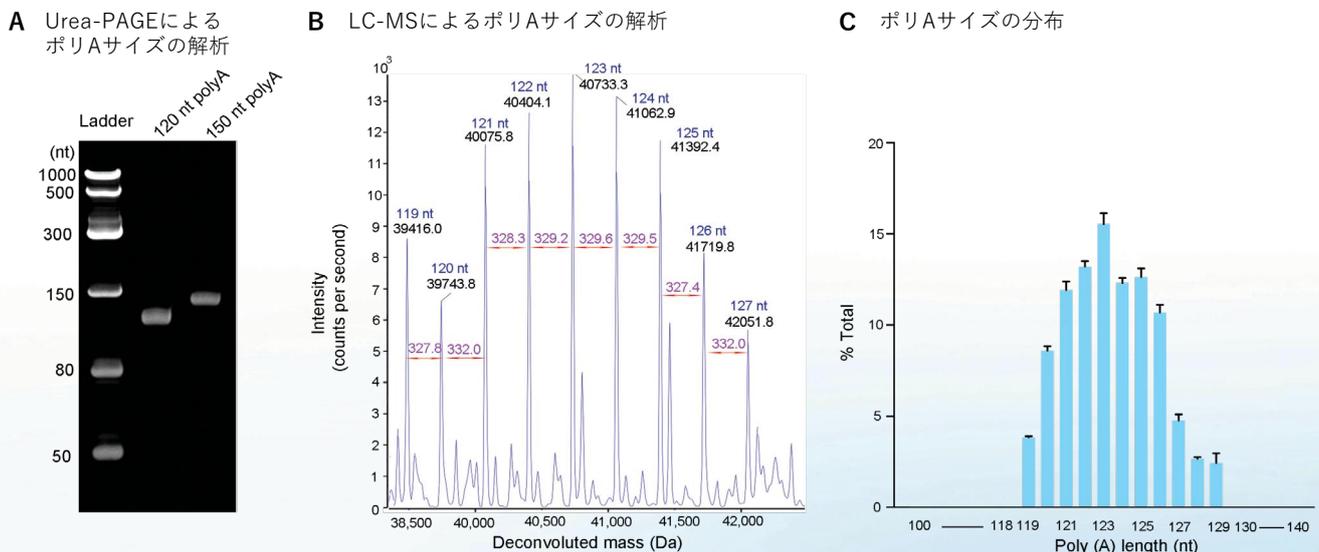


図8. ポリA サイズの解析。リボヌクレアーゼT1を用いてmRNAからポリAテイルを切断し、オリゴdTアフィニティークロマトグラフィーで分離した。抽出されたテイルはLC-MSで分析され、一塩基分解能でポリAテイルの長さの情報が得られた。(A) Urea-PAGEによるポリAサイズ分析。60 ngの消化されたmRNAポリAは120 ntと150 ntのサイズが予想され、変性尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析した。(B) LC-MSによるポリAサイズ分析。120 pmolのmRNAポリA (予想サイズ120 nt) からデコンボリューションしたスペクトル。(C) 予想サイズ120 ntのポリAテイルのサイズ分布。棒グラフは、ポリAテイルに小さな不均一性があることを示している。エラーバーは3回の消化実験の標準偏差を表す。加重平均長さは123 ntである。

コザック配列

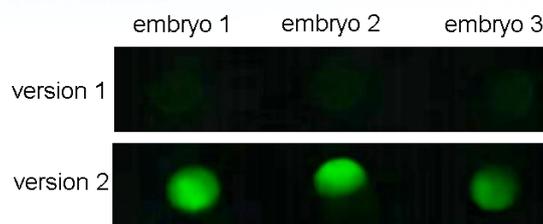


図9. 1細胞期のゼブラフィッシュ胚に、ゼブラフィッシュEGFP IVT mRNAを250pg注入し、6時間後にEGFP発現についてスクリーニングした。蛍光画像は、改変Kozak配列 (version 2) を含むIVT mRNAをトランスフェクションしたゼブラフィッシュ胚で、従来のKozak配列 (version 1) を含むIVT mRNAをトランスフェクションした場合よりも強いEGFPの発現が観察された。

Zebrafish IVT mRNAの詳細はこちら [🔗](#)

IVT mRNA合成最適化

IVT mRNA強度 (安定性)

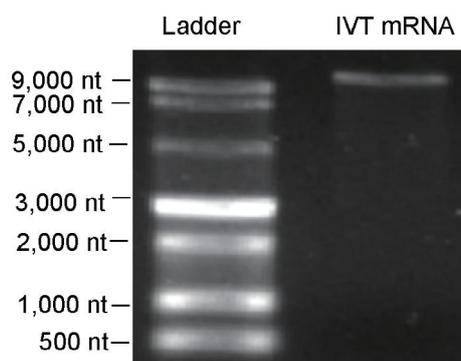


図10. 変性アガロースゲル電気泳動による結果はIVT mRNAは10,000 nt以上であり、非常に高い安定性が保たれていることを示す。

ヌクレオチド修飾

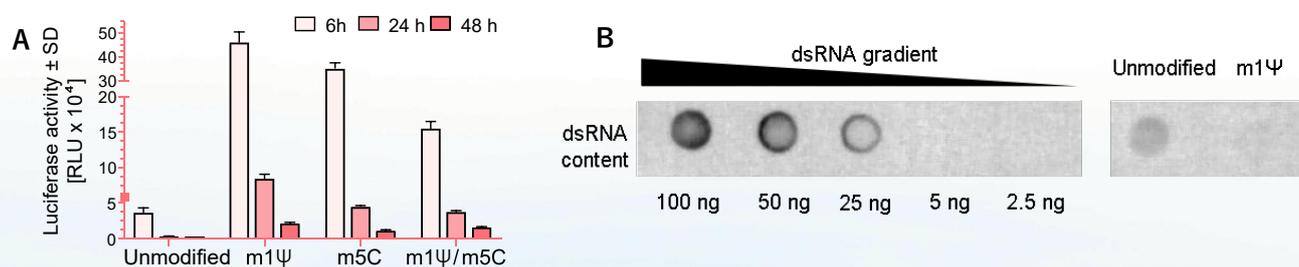


図11. ヌクレオチドの最適化によるmRNA発現の増加とdsRNA不純物の減少。(A) 293T細胞におけるホタルルシフェラーゼの発現。修飾ヌクレオチドであるN1-メチルシュドウリジン (m1Ψ) と5-メチルシトシン (m5C) の有無により、種々のmRNAを作成した。12ウェルプレート上で増殖した細胞に、ウェルあたり1 ugのmRNAをトランスフェクトした。トランスフェクション後6時間、24時間、48時間における293T細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。エラーバーは標準偏差を示す。(B) ヌクレオチド修飾 (m1Ψ) 有り、または無しで、磁性ビーズで精製したEGFP IVT mRNAを等量 (1ドットあたり750 ng) プロットし、その後ドットブロットアッセイで検出し、dsRNAの不純物を推定した。

HiExpress™ Firefly Luciferase IVT mRNAの詳細はこちら [🔗](#)

共転写と酵素によるキャッピング

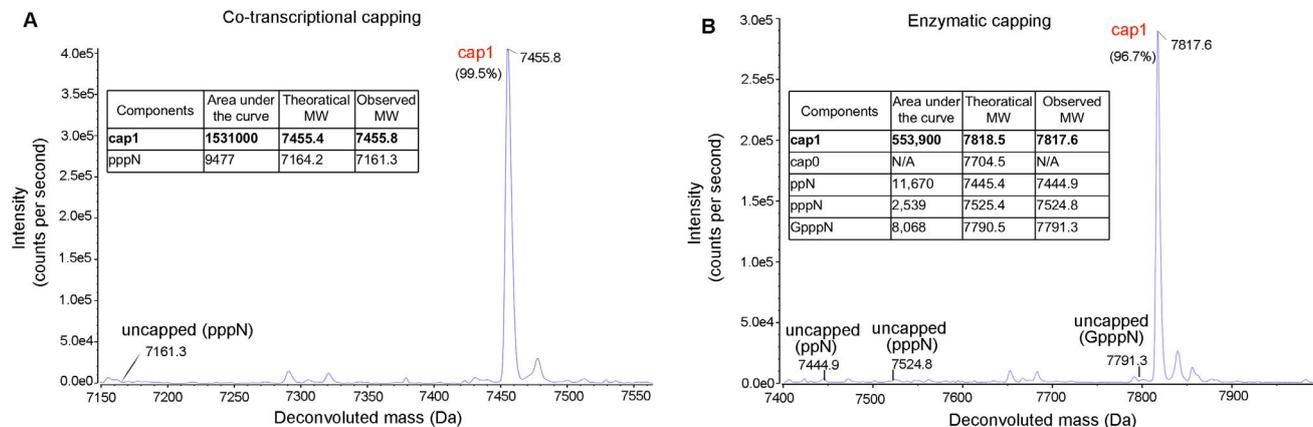


図12. LC-MS-によるキャッピング効率の解析。(A)共転写または(B)酵素的アプローチにより、高効率のキャッピング(99%以上)が達成できる。

dsRNAの除去

二本鎖RNA (dsRNA) はIVTの副産物であり、できる限り避けたい高免疫原性の主な原因となる。ドットプロットの結果は、非常に低レベルのdsRNAで超精製スケールを達成するためには、精製工程(例えばIP-PR)の追加が必要であることを示している。

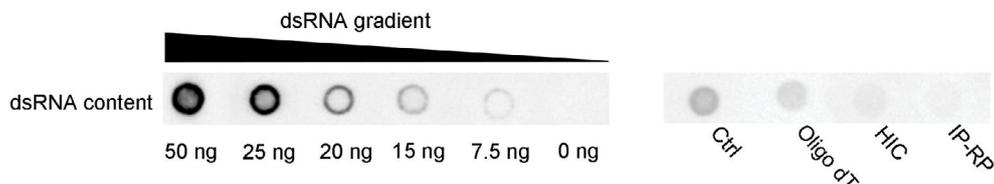


図13. 精製工程の違いによるdsRNA除去効率。異なるプロセスで精製したhSpCas9 IVT mRNAを等量(1,500 ng/ドット)ずつプロットし、ドットプロットアッセイで検出し、dsRNAの不純物を推定した。HIC, 疎水性相互作用クロマトグラフィー; IP-RP, イオンペア逆相液体クロマトグラフィー

[hSpCas9 IVT mRNAの詳細はこちら](#)

LNP-mRNA QCデータ

TEM

透過型電子顕微鏡(TEM)の結果は、当社がカプセル化したLNP-mRNAの構造的完全性とサイズの均一性を示している。

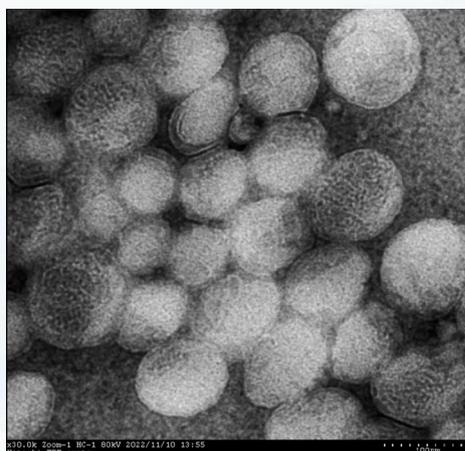


図14. LNP-mRNAのネガティブ染色透過型電子顕微鏡(TEM)像。スケールバー=100 nm。

多分散インデックス(PDI) とゼータ電位

動的光散乱 (DLS) 分析によると、当社のLNP-mRNA製品は非常に低いPDI値 (PDI<0.1) に達していることが示されています。

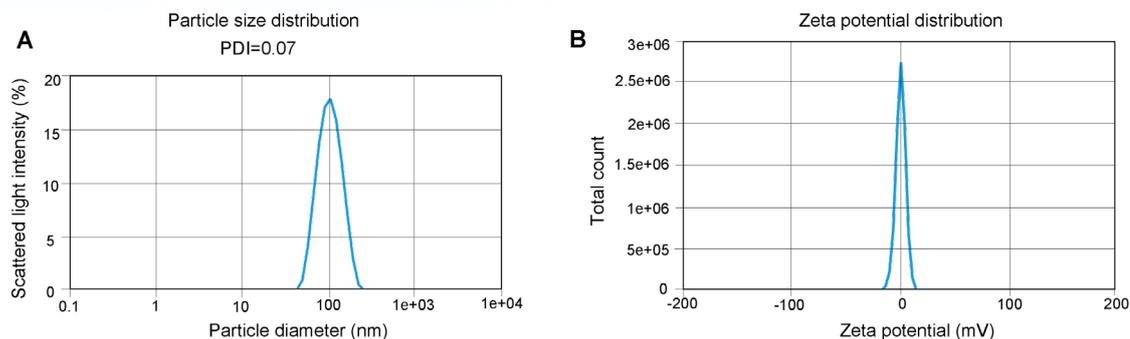


図15. 粒子サイズとゼータ電位の分布。PDI(A)とゼータ電位(B)は、粒子の運動により変動する光の強度差を測定するDLSにより決定した。試料のゼータ電位は-1.872 mVから+1.872 mVの間である。

[EGFP LNP-mRNAの詳細はこちら](#)

LNP-mRNAの機能評価

In vitroにおけるLNP-mRNA

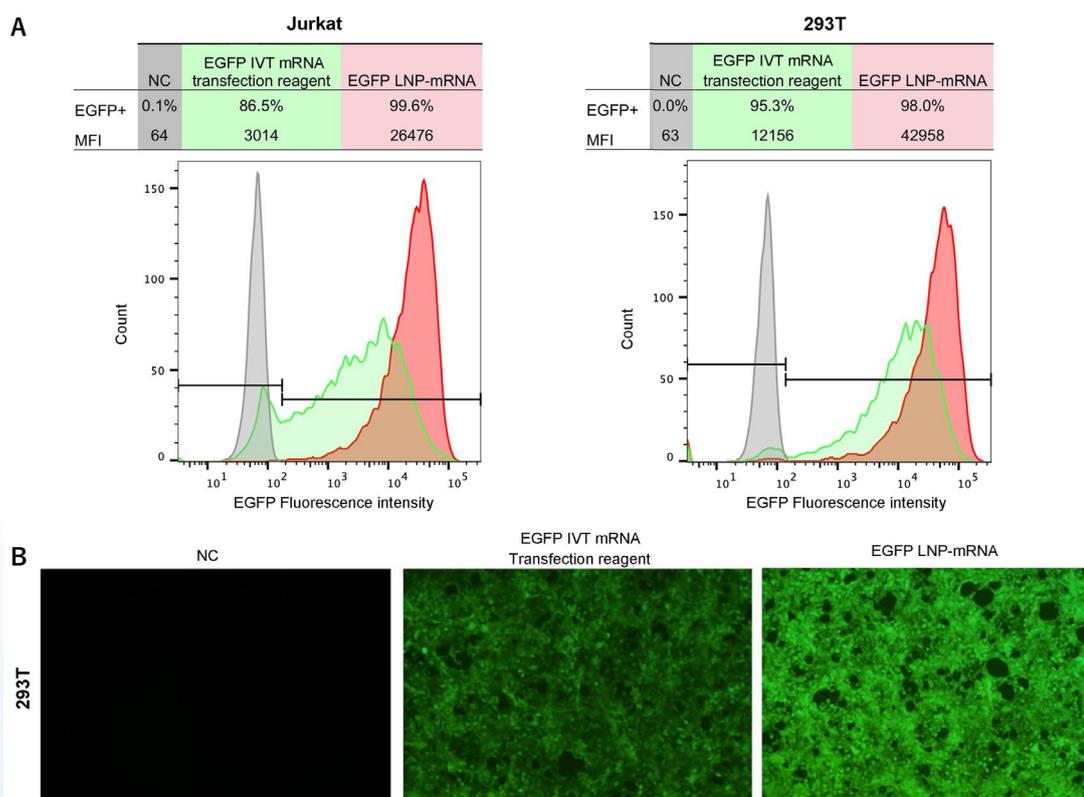


図16. LNPによる高いmRNAデリバリー効率。EGFP mRNAをLNPカプセル化して細胞導入した場合、市販のトランスフェクション試薬で細胞導入した場合に比べ、より高いEGFP発現が確認された。1 µgのEGFP mRNAを細胞にトランスフェクションし、その24時間後に (A) Jurkat細胞および293T細胞におけるEGFP発現のフローサイトメトリー分析、および (B) 293T細胞における蛍光イメージングを行った。EGFP mRNAのヌクレオチドはいずれも未修飾のものを使用した。MFI(median fluorescence intensity)は平均蛍光強度を示す。

[EGFP LNP-mRNAの詳細はこちら](#)

In vivoにおけるLNP-mRNA

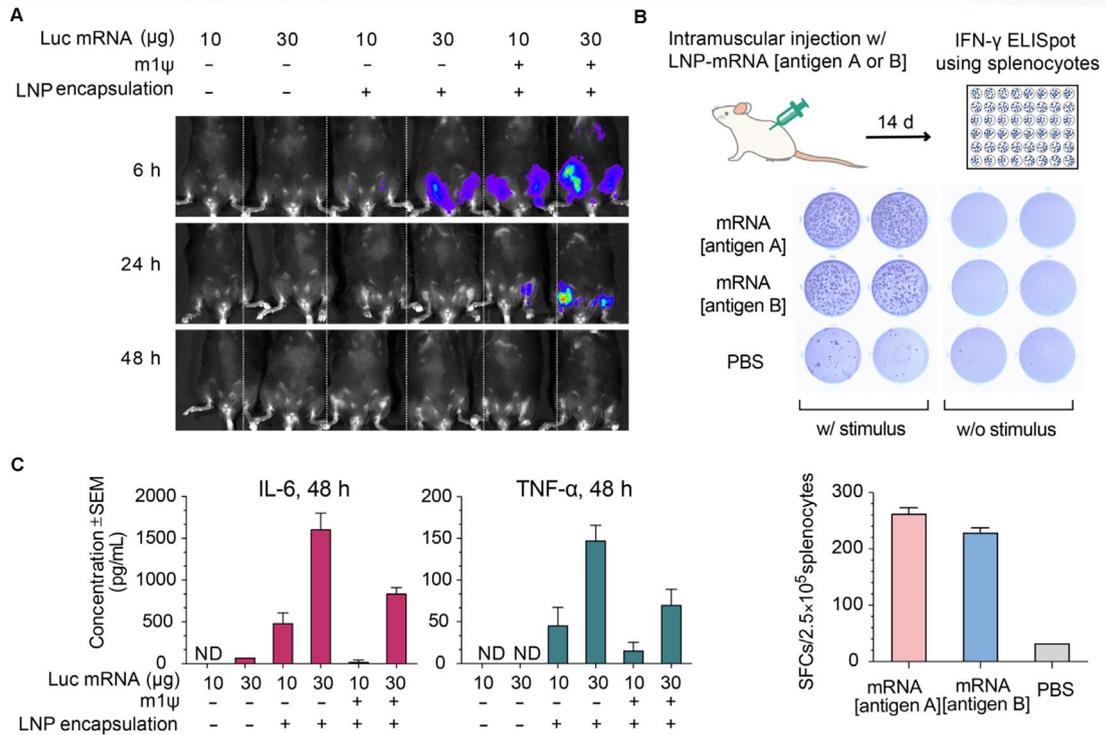


図17. マウスにおけるルシフェラーゼ(Luc) mRNAの発現とmRNAに対する免疫反応。(A) インジェクション後6、24、48時間経過後のルシフェラーゼ活性のライブイメージング像。(B) インジェクション後48時間経過後の血清における炎症性サイトカイン、IL-6とTNG- α の定量をした。エラーバーは標準誤差を示す。マウス：C57BL/6J、8週齢、投与方法：筋肉内注射 (C) Balb/cマウスにmRNA-LNP(antigen A, antigen B, PBSコントロール) 30 μ gを筋肉内注射し、14日後の脾臓細胞のIFN- γ ELISpotアッセイ結果。

HiExpress™ Firefly Luciferase LNP-mRNAの詳細はこちら [🔗](#)

抗体結合LNP-mRNA

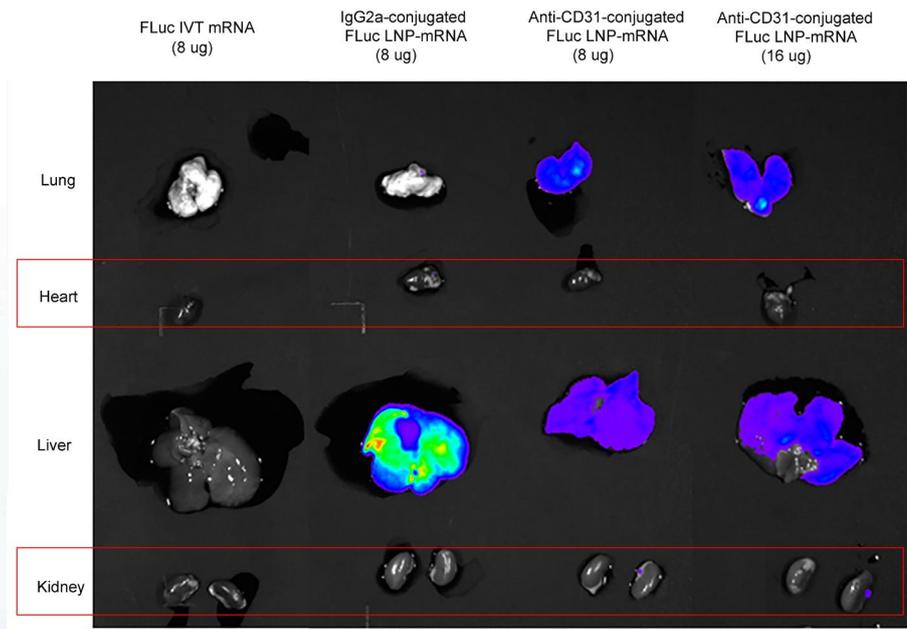


図18. LNPに抗体を結合させたことによるLNP-mRNAの生体内分布への影響。抗体コンジュゲーションは用量依存的に肺へのターゲティング効果を増加させる。FLuc LNP-mRNA を静注したC57BC/6Jマウス (6-8週齢, メス) の組織のホタルルシフェラーゼ (FLuc) の発現を示す代表的なバイオ発光画像。ネイキッドIVT mRNAはネガティブコントロールとして、IgG2a標識FLuc LNP-mRNAはアイソタイプコントロールとして使用した。

ご提供している関連商品

VectorBuilderでは、mRNAに加え、CRISPR 遺伝子編集用の IVT Cas9 mRNA および sgRNA、自己増幅 mRNA (saRNA) を提供しています。LNP製剤は、IVT mRNA分子、siRNA、プラスミドDNAのカプセル化に使用でき、複数の方法での遺伝子導入を可能にしています。

saRNA

自己増幅型mRNA (saRNA) は、医薬品やワクチン開発における新しい技術です。IVT saRNAは、従来のIVT mRNAの利点（無細胞合成、変異原性リスクの低さ、迅速なリプログラミング効率）はそのままに、自己増幅という大きな利点があります。宿主細胞に取り込まれたsaRNAは、ウイルスのように自己複製することができるため、IVT saRNAの発現効率が向上します。saRNAは従来のmRNAと同様の基本構造（5'キャップ、5'および3' UTR、ポリ(A) テール）を有していますが、5'末端に非構造タンパク質 (nsP1-4) をコードする大きなオープンリーディングフレーム (ORF) と、アルファウイルスのゲノムに由来するサブゲノムプロモーターが含まれています。そのため、saRNAのサイズは非増幅型mRNAよりもかなり大きく (9k-12k nt) になります。nsP1-4にコードされているレプリカーゼは、サブゲノムプロモーターによって駆動される目的の遺伝子 (GOI) を、急速に増幅する役割を担っています。

saRNAは、投与量が少量ですみ、また抗原ドメインの改変が容易であるなど、多くの利点があり、ヒトへの応用の可能性が高まっています。従来のmRNAワクチンと比較し、saRNAは、非常に少量で標的遺伝子の発現を上昇させることができます。例えば、第3相臨床試験中のCOVID-19 saRNAワクチンARCT-154の投与量 (5 μg) は、Pfizer-BioNTech社製 mRNAワクチン (30 μg) の1/6、またModerna社製 mRNAワクチン (100 μg) の1/20となっています。saRNAは、同様の効果を得るために必要な投与量が少量ですむため、製造コストを削減し、ワクチン接種時の潜在的な副作用を低減することができます。これらの特性により、saRNAは魅力的な治療手段であるといえます。

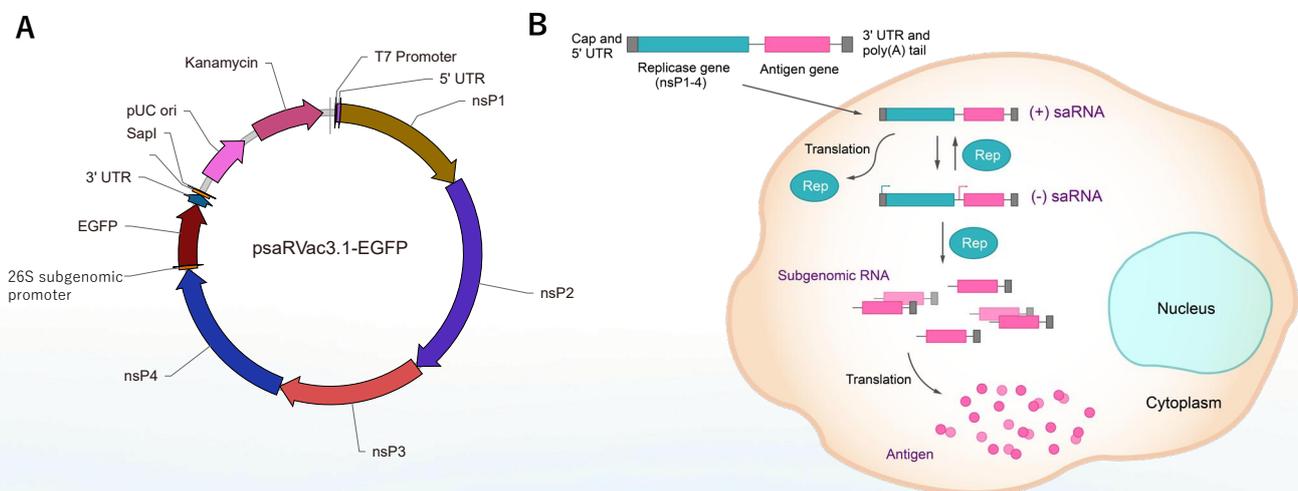


図10. saRNAの模式図。

(A) saRNAのバックボーンデザイン例。

(B) saRNAの仕組み。細胞内に入ると saRNAのプラス鎖は、宿主のリボソームによって、レプリカーゼを形成する nsP1~4 (図中ではRepと表示) に翻訳される。nsP1-4はそれぞれ固有の機能を有しているが、例えば、RNA依存性ポリメラーゼであるnsP4は、プラス鎖RNAを鋳型としてマイナス鎖saRNAを合成する。このマイナス鎖saRNAは、サブゲノムプロモーターを認識するレプリカーゼの鋳型となり、サブゲノムRNAの合成が開始される。サブゲノムRNAは宿主細胞内に蓄積し、そのコピー数は 10^6 以上となる。その結果、蓄積されたRNAからは、RNAコピー数以上の抗原が翻訳されるようになる。

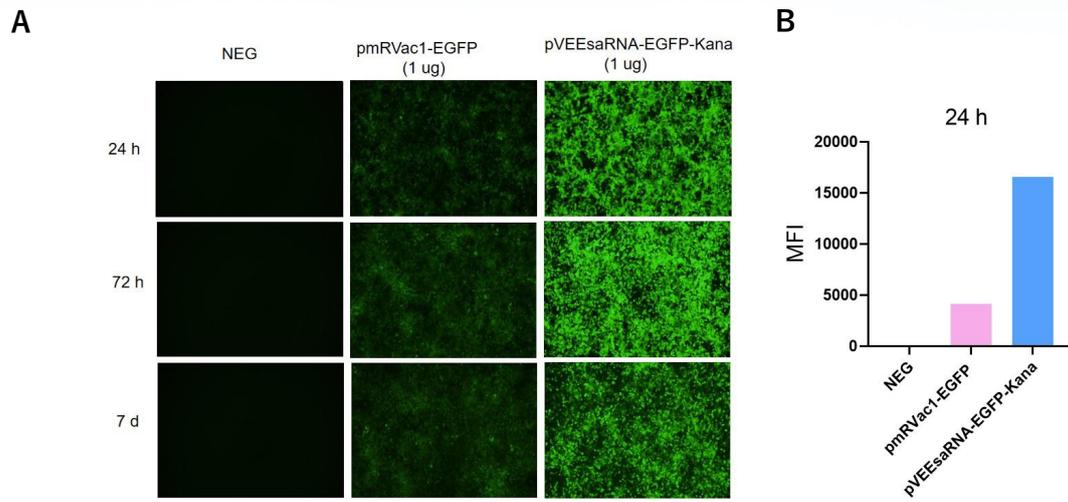


図11. saRNA の in vitro 評価。

12 ウェルプレート上で増殖させた HEK 293T 細胞に、1 ウェルあたり 1 μ g の EGFP-mRNA または EGFP-saRNA をトランスフェクションした。

(A) トランスフェクション24 時間、48 時間、7日後 での EGFP 発現の代表イメージ。

(B) トランスフェクション24 時間後の HEK 293T 細胞における MFI を定量化した。



US Headquarters

VectorBuilder Inc.
1010 W 35th Street, Suite 515
Chicago, IL 60609, USA
Tel: 800-517-2189
+1 773-475-7751
Fax: 408-649-5280
Email: service-us@vectorbuilder.com
cdmo@vectorbuilder.com

Japan

VectorBuilder Japan, Inc.
2-12-16, Shin-Yokohama, Kouhoku-ku,
Yokohama, Kanagawa, 222-0033, Japan
Tel: +81-45-628-9207
Email: service-jp@vectorbuilder.com
cdmo-jp@vectorbuilder.com
Kobe Biomedical Innovation Cluster Office
Kobe KIMEC Center Bldg. Rm 9H
1-5-2 Minatojima-Minami-machi, Chuo-ku,
Kobe, Hyogo, 650-0047, Japan
Tel: +81(0)78-945-9155

UK

VectorBuilder Ltd.
Suite F1 Bush House, Edinburgh Technopole
Penicuik, EH26 0PH, United Kingdom
Tel: +44 (0) 7448341295
Email: service@vectorbuilder.com
cdmo@vectorbuilder.com

Australia

VectorBuilder Australia
Unit 11/42 Stud Road, Bayswater VIC 3153
Tel: 1800-719-779 (9:00 am - 5:30 pm AEDT)
Email: service@vectorbuilder.com (for general inquiry)
cdmo@vectorbuilder.com (for CDMO inquiry)

Europe

VectorBuilder GmbH
Martin-Behaim-Str. 15
63263 Neu-Isenburg, Germany
Tel: +49 (0) 6102-2486890
Fax: +49 (0) 6102-2486891
Email: service@vectorbuilder.com
cdmo@vectorbuilder.com

China (Mainland)

VectorBuilder China
Building D, 3rd Floor, 3 Juquan Road, Science City
Guangzhou, 510663, China
Tel: +86 20-28069042
Email: service@vectorbuilder.cn
cdmo@vectorbuilder.com

Korea

Tel: +82-2-833-9631
Email: service-kr@vectorbuilder.com
cdmo@vectorbuilder.com

Israel

Tel: + 34631 821 941
Email: service@vectorbuilder.com
cdmo@vectorbuilder.com

Singapore

Tel: +65 8030 2121
Email: service@vectorbuilder.com
cdmo@vectorbuilder.com

