

2. 品質に関する資料及び機構における審査の概略

本剤は、SARS-CoV-2 の S タンパク質 S1 及び S2 をコードする mRNA を LNP に封入したワクチンである。

2.1 原薬

本薬（BNT162b2）は、SARS-CoV-2（Wuhan-Hu-1 株由来）の S タンパク質 S1 及び S2 をコードする mRNA であり、S タンパク質の最適な融合前構造を保つため、2 アミノ酸が置換（K986P 及び V987P）されるよう設計されている。また、5'末端にキャップ構造、翻訳の効率化のための配列（██████）、小胞体輸送のためのシグナル配列（██████）、RNA の安定化のための配列（██████）及びポリ A 鎖を含み、mRNA に対する免疫原性の抑制及び翻訳の促進のため、すべての UTP が m¹ΨTP に置換されている。

2.1.1 原材料製造時に用いられる細胞基材の調製及び管理

本薬の原材料の一つとなる DNA 鋳型の作製には、セルバンクが用いられる。██████、██████、S1 及び S2 タンパク質、██████並びにポリ A 鎖をコードするプラスミド DNA を大腸菌（██████株）に導入、クローニングした後、MCB が調製された。MCB から ██████ 代継代して WCB が調製された。

MCB 及び WCB の特性解析試験（██████及び ██████否定、宿主細胞同定、生存率、██████、制限酵素分析、██████及び遺伝子配列）並びに純度試験が実施された。

WCB は更新にあたり、上記の特性解析試験及び純度試験への適合性が確認される。

2.1.2 製造方法

原薬は、直鎖鋳型 DNA を鋳型に ██████、ATP、CTP、m¹ΨTP、GTP を用いて *in vitro* 転写反応により製造される。

原薬の製造工程は、*in vitro* 転写反応、██████、██████、██████及び ██████であり、すべて重要工程とされている。なお、直鎖鋳型 DNA は、WCB を培養後、回収された大腸菌を溶菌して環状プラスミド DNA を得て、環状プラスミド DNA を ██████、██████及び ██████により精製後、██████処理し、調製する。直鎖鋳型 DNA の管理項目として、性状（濁度及び色調）、pH、吸光度（██████）、制限酵素解析（██████の完全性）、純度、残存タンパク量、微生物限度、エンドトキシンが設定されている。

原薬の製造工程について、実生産スケールでプロセスバリデーションが実施されている。

2.1.3 外来性感染性物質の安全性評価

原薬の製造工程で、生物由来原料等は使用されていない。なお、原材料作製時に用いられる生物由来原料についても確認を行った。MCB 及び WCB の調製時に使用された ██████は、健康な ██████に由来し、██████℃以上で ██████分以上、██████℃以上で ██████時間以上の加熱処理及び ██████℃以上で乾燥処理により病原体の不活化が行われたものである。

2.1.4 製造工程の開発の経緯（同等性／同質性）

原薬の開発過程における製造方法の主な変更点は以下のとおりである。

非臨床試験及び臨床試験で用いられた原薬は Process 1 により製造され、市販予定製剤は Process 2 により製造される。Process 1 では、原薬は [] により作製した鋳型 DNA を用いて *in vitro* 転写反応後、[] [] を経て、[] により精製されている。Process 2 では、原薬はプラスミド DNA から作製した直鎖鋳型 DNA を用いて *in vitro* 転写反応後、[] [] 及び [] を経て、[] 及び [] により精製されている。なお、Process 1 から Process 2 への変更に際して、品質の同等性／同質性が確認されている。

また、製造工程の開発には QbD の手法が利用されている（2.3 参照）。

2.1.5 特性

2.1.5.1 構造及び特性

表 1 に示す特性解析が実施された。

表 1 特性解析における試験項目及び試験方法

項目		試験方法
一次構造	RNA 配列	RNase T1 処理後、オリゴヌクレオチドマッピング（IP-RP-HPLC/ESI/MS/MS 又は LC-MS/MS） 次世代シーケンシング（NGS）
	5'キャップ構造	RNase H 処理後、IP-RP-HPLC-UV/ESI MS 及び LC-UV/MS
	ポリ A 鎖	RNase T1 処理後、IP-RP-HPLC-UV/ESI MS 及び LC-UV/MS
	高次構造	円偏光二色性スペクトル

2.1.5.2 目的物質関連物質／目的物質由来不純物

目的物質由来不純物は、二本鎖 RNA とされ、原薬の規格及び試験方法により適切に管理されている。

2.1.5.3 製造工程由来不純物

製造工程由来不純物は、鋳型 DNA、工程由来不純物A※、工程由来不純物B※、ATP、CTP、GTP、 $m^1\Psi$ TP、工程由来不純物C※、工程由来不純物D※、工程由来不純物E※、酢酸マグネシウム、塩化カルシウム、硫酸アンモニウム、Triton X-100、トリス塩酸緩衝液、グリセロール、塩化ナトリウム、塩化カリウム、工程由来不純物F※、工程由来不純物G※ 及び 工程由来不純物H※ とされた。

残存鋳型 DNA は、原薬の規格及び試験方法により適切に管理されている。工程由来不純物A※及び工程由来不純物B※は、製造工程において十分に除去されることが確認されている。また、ATP、CTP、GTP、 $m^1\Psi$ TP、工程由来不純物C※、工程由来不純物D※、工程由来不純物E※、酢酸マグネシウム、塩化カルシウム、硫酸アンモニウム、Triton X-100、トリス塩酸緩衝液、グリセロール、塩化ナトリウム、塩化カリウム、工程由来不純物F※、工程由来不純物G※ 及び 工程由来不純物H※ は、精製工程で不純物を除去できないと仮定しても、本剤の接種量に対して安全性に問題がない量であることが確認されている。

※新薬情報提供時に置き換え

2.1.6 原薬の管理

原薬の規格及び試験方法として、含量規格、性状、確認試験（RT-PCR）、pH、純度試験（二本鎖 RNA（免疫ブロット）及び鋳型 DNA（qPCR））、5'キャップ（逆相 HPLC）、ポリ A 鎖（ddPCR）、RNA 完全性（キャピラリーゲル電気泳動）、エンドトキシン、微生物限度、定量法（紫外可視吸光度測定法）が設定されている。

2.1.7 原薬の安定性

原薬の主な安定性試験の概略は、表 2 のとおりである。

表 2 原薬の主要な安定性試験の概略

試験名	製法	ロット数	保存条件	実施期間	保存形態
長期保存試験	Process 1	1	-20±5℃	6 カ月	■製容器
加速試験			5±3℃		
長期保存試験	Process 1	1	-20±5℃	3 カ月	■製容器
加速試験			5±3℃		
長期保存試験	Process 2	4	-20±5℃	3 カ月	■製容器

長期保存試験について、Process 1 で製造された 2 ロットは、RNA 完全性及び含量のみ試験が実施され、実施期間を通じて明確な変化は認められなかった。また、Process 2 で製造された連続した 4 ロット中、最初に製造された 1 ロットにおいて、2 及び 3 カ月時点の RNA 完全性が規格に適合しなかった。申請者は、RNA 完全性の規格値は開発過程で ■%から ■%に変更した経緯があり、当該 1 ロットにおいても、実施期間を通じて、試験実施時点に設定していた規格 (■%) は満たしていたと説明している。

加速試験について、Process 1 で製造された 2 ロットは、RNA 完全性及び含量のみ試験が実施され、実施期間を通じて明確な変化は認められなかった。

2.2 製剤

2.2.1 製剤及び処方並びに製剤設計

製剤は、希釈した原薬と、LNP を構成する脂質 (ALC-0159、ALC-0315、DSPC 及びコレステロール) を混合して製造し、1 バイアル (0.45 mL) あたり原薬 0.225 mg を含有する複数回接種用のバイアル製剤である。使用時に、生理食塩液 1.8 mL にて希釈し、全量 2.25 mL とする。製剤には、精製白糖、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸水素ナトリウム二水和物、リン酸二水素カリウム及び注射用水が添加剤として含まれる。

なお、本剤は、1 バイアルから 5 回分採取可能な製剤として申請されたが、1 バイアルからより多くの接種回数分を採取可能か確認する試験を実施中であり、その結果は報告 (2) で記載する。

2.2.2 製造方法

製剤の製造工程は、原薬の解凍、原薬の希釈、■調製、■調製、緩衝液交換、濃縮、ろ過、製剤バルク液の調製、無菌ろ過、無菌充填、表示、包装、保管、試験、保管の各工程からなる。

重要工程は、原薬の希釈、■調製、■調製、緩衝液交換、濃縮、ろ過、製剤バルク液の調製、無菌ろ過、無菌充填、表示、包装、保管とされている。

製剤の製造工程について、実生産スケールにおけるプロセスバリデーションは実施中である。

2.2.3 製造工程の開発の経緯

臨床試験で使用された製剤から申請製法では製造スケールが変更された。当該変更に伴う品質の同等性／同質性について確認されている。

製造工程の開発には QbD の手法が利用されている (2.3 参照)。

2.2.4 製剤の管理

製剤の規格及び試験方法として、含量規格、性状、確認試験（脂質（HPLC）及びRNA（RT-PCR））、浸透圧、pH、RNA 完全性（キャピラリーゲル電気泳動）、封入 RNA（蛍光分析）、粒子径及び粒子の多分散性（動的光散乱法）、エンドトキシン、採取容量、不溶性微粒子、無菌、脂質含量（HPLC）、定量法（蛍光分析）が設定されている。審査の過程において、生物活性（XXXXXXXXXX）が追加された。

2.2.5 製剤の安定性

製剤の主な安定性試験の概略は、表 3 のとおりである。

表 3 製剤の主要な安定性試験の概略

試験名	原薬の製法	ロット数	保存条件	実施期間	保存形態
長期保存試験	Process 1	2	-70±10℃	6 カ月	XXXXXXXXXX ゴム製ゴム栓の ガラス製容器
長期保存試験	Process 2	2	-90～-60℃	3 カ月	XXXXXXXXXX ゴム製ゴム栓の ガラス製容器

長期保存試験では、実施期間を通じて品質特性に明確な変化は認められなかった。

2.3 QbD

原薬及び製剤の開発には QbD の手法が利用され、以下の検討等により、品質の管理戦略が構築された。

- CQA の特定

本剤の有効性及び安全性に影響を及ぼす品質特性として、以下の CQA が特定された。

原薬の CQA：性状（濁度及び色）、pH、RNA 完全性、微生物限度、エンドトキシン

製剤の CQA：粒子径及び粒子の多分散性、封入 RNA、RNA 含量、脂質（ALC-0159、ALC-0315、DSPC 及びコレステロール）含量、*in vitro* 発現、RNA 完全性、5'キャップ構造、ポリ A 鎖

- 工程の特性解析

工程パラメータに基づき、各工程の特性解析が実施された。

- 管理方法の策定

上記の工程特性解析を含む工程知識、製品品質特性、安定性試験等に基づき、工程パラメータ及び性能特性の管理、並びに規格及び試験法の組合せによる本剤の品質特性の管理が策定された（目的物質由来不純物及び製造工程由来不純物の管理については、2.1.5.2 及び 2.1.5.3 参照）。

2.R 機構における審査の概略

2.R.1 原薬の製造方法の変更について

原薬の製造方法の変更（2.1.4）について、申請者は以下のように説明した。

Process 1 で製造した原薬 4 ロットと Process 2 で製造した 5 ロットについて、性状、pH、確認試験（RT-PCR）、含量、RNA 完全性（キャピラリー電気泳動）、5'キャップ構造（逆相 HPLC）、ポリ A 鎖（ddPCR）、鋳型 DNA（qPCR）、二本鎖 RNA（免疫ブロット）及び浸透圧を比較した結果、大きな差異は認められなかった。Process 1 と比較して Process 2 の原薬は、RNA 完全性が低い傾向を示したが、いずれも規格に適合していた。また、Process 1 で製造した 3 ロットと Process 2 で製造した 1 ロットについて、ポリ A 鎖含量にわずかな差が認められたが、すべてのロットが規格に適合していた。また、質量分析及び分光分析により、一次構造及び高次構造が同等であることが確認された。*in vivo* でのタンパク質抗原の翻訳に重要と考える 5'キャップ構造を有する完全な RNA の割合に大きな差異は認められなかった。

以上より、Process 1 と Process 2 の原薬に、安全性及び有効性に影響を与えるような差異はなく、同等性／同質性は示されたと考える。

機構は、申請者の説明を了承した。

2.R.2 不溶性異物について

製剤のロット分析の「不溶性異物」において、白色～灰白色の不透明な無晶性の粒子が検出されている。申請者は、当該粒子について、以下のように説明した。

「白色～灰白色の不透明な無晶性の粒子」は、■■■■～■■■■%で認められ、脂質供給元、製造所及び充填工程における発生の相関は認められなかった。経時的な粒子の増減はなく、粒子を解析した結果、製剤に含まれる RNA 及び脂質であることが判明した。また、粒子は生理食塩液で希釈することで消失すること、粒子の有無により RNA 含量及び封入 RNA の割合に違いがないことを確認した。

以上から、本剤中に粒子が生じて、本剤の有効性及び安全性に影響を与えることはないと考えられる。

なお、稀に生理食塩液で希釈後の溶液中にも粒子が存在することが確認されているため、添付文書において、生理食塩液で希釈した液に粒子が認められないことを確認した上で使用し、粒子が認められた場合は使用しない旨を記載する予定である。

機構は、申請者の説明を了承した。

2.R.3 原薬及び製剤の有効期間について

申請者は、本剤の原薬及び製剤の有効期間について、いずれも海外で設定されている有効期間と同じ 6 カ月と設定している。申請者は、原薬及び製剤の有効期間について、以下のように説明している。

Process 1 と Process 2 で製造された原薬の同等性／同質性は示されている（2.R.1 参照）。

原薬の有効期間について、Process 1 で製造した原薬 2 ロットの長期保存試験及び加速試験（2.1.7 参照）において RNA 完全性及び RNA 含量に変化は認められなかったことから、原薬の有効期間を 6 カ月と設定することは可能と考える。なお、Process 2 で製造した原薬 4 ロットについて長期保存試験を継続中であり、6 カ月を超えてデータを取得する予定である。

製剤の有効期間について、Process 1 の原薬を用いた製剤 2 ロットの長期保存試験において、6 カ月時点までの主な品質特性（RNA 完全性、封入 RNA、粒子径及び粒子の多分散性、RNA 含量等）に大きな変化がないことを確認した。また、Process 2 の原薬を用いた製剤 2 ロットの長期保存試験（表 3）は、生物活性のデータは得られていないものの、3 カ月まですべて規格に適合していることから、製剤の有効期間を 6 カ月と設定することは可能と考える。なお、Process 2 の原薬を用いた製剤 2 ロットについて長期保存試験を継続中であり、6 カ月を超えてデータを取得する予定である。

機構は、以下のように考える。

原薬の有効期間について、Process 1 で製造した原薬 2 ロットの長期保存試験は規格試験項目のうち一部の項目のみ試験が実施されていること、また、ロット数も ICH Q5C で例示されている 3 ロットに満たないことから、6 カ月までの原薬の安定性を確認するにはさらに追加の情報が必要と考える。しかしながら、提出された安定性試験成績において経時的に大きな変化は認められていないこと、また、Process 2 で製造した原薬の長期保存試験において最初の 1 ロットが RNA 完全性の規格に適合しなかったものの、当該ロットは試験開始時から規格の下限（ $\blacksquare$ %）に近い値を示していたこと、当該ロットの後に製造された連続 3 ロットの長期保存試験では 3 カ月時点まですべて適合していることから、現時点で原薬の安定性に大きな問題は認められていないと判断した。

製剤の有効期間について、提出された 6 カ月の長期保存試験成績は 2 ロットのみであり、6 カ月までの製剤の安定性を確認するにはさらに追加の情報が必要と考える。しかしながら、Process 2 の原薬を用いた製剤の 3 カ月時点までの長期保存試験成績も含め、提出された試験成績はすべての規格に適合しており、経時的に大きな変化は認められていない。

本剤は各国共通の原薬から製剤が製造され、各国へ供給されている。原薬及び製剤の有効期間を別途設定することは製造管理及び流通管理の上で支障となり、日本に供給されるロットや数量に影響する可能性があることから、現在の COVID-19 流行状況及び本剤の社会的必要性を鑑みると、現時点では原薬及び製剤の有効期間を海外の有効期間と同じ 6 カ月と設定することはやむを得ないと判断した。ただし、現在実施中である原薬及び製剤の長期保存試験の試験成績については、取得後速やかに機構に提出する必要があると考える。

以上を踏まえ、原薬の有効期間は $\blacksquare$ 製容器を用いて $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ で保存するとき 6 カ月、製剤の有効期間は $-90\sim -60^{\circ}\text{C}$ で保存するとき 6 カ月とする。

2.R.4 新添加剤について

製剤には、新添加剤として、使用前例がない ALC-0159 及び ALC-0315 並びに「特定の製剤や特定の条件下においてのみ使用が認められた添加物の取扱いについて」（平成 21 年 6 月 23 日付け事務連絡）において特定の製剤又は特定の条件下においてのみ使用が認められている DSPC が含まれる。

申請者は、各添加剤の使用理由について、ALC-0159 は本剤と血漿タンパク質との相互作用を抑えること、ALC-0315 は本剤の粒子形成、細胞への取込み及び本剤に含有される RNA のエンドソームからの放出を調節すること、DSPC は $\blacksquare$ $\blacksquare$ $\blacksquare$ することを目的としている旨を説明している。

2.R.4.1 規格及び試験方法並びに安定性について

機構は、ALC-0159、ALC-0315 及び DSPC の規格及び試験方法並びに安定性について、提出された資料から問題はないと判断した。

2.R.4.2 安全性について

申請者は、ALC-0159、ALC-0315 及び DSPC の単回投与毒性、反復投与毒性及び生殖発生毒性について、本剤の毒性試験（CTD 4.2.3.2.1、4.2.3.2.2 及び 4.2.3.5.1.1）の結果に基づき説明している。また、これら新添加剤の遺伝毒性について、投与経路の異なる使用前例、構造活性相関による変異原性評価（専門的経験に基づくルールベースの方法及び統計ベースの方法）等により安全性に懸念がないと説明している。

機構は、以下のように考える。

ラットにおける反復筋肉内投与毒性試験では、肝臓への影響（血中 GGT の増加及び肝細胞の空胞化）が認められているが、毒性学的意義は低いと考えられる（5.R.1 参照）。また、ALC-0159、ALC-0315 及び DSPC は本剤の製剤特性を担保するために必要と考えられることから、本剤にこれらの添加剤を使用することは可能と考える。しかしながら、本剤の毒性試験では長期間の反復投与毒性が評価されていないことから、これらの添加剤は、本剤の用法・用量に限った使用とすべきであり、使用前例として取り扱わないことが適切と判断した。

3. 非臨床薬理試験に関する資料及び機構における審査の概略

本剤の非臨床薬理試験として、効力を裏付ける試験成績が提出された。

3.1 効力を裏付ける試験

3.1.1 *in vitro* における抗原発現（CTD 4.2.1.1.1、4.2.1.1.5）

トランスフェクション試薬と混合した本薬（BNT162b2）を HEK293T 細胞内に導入し、抗原（SARS-CoV-2 由来全長 S タンパク質）の発現がウエスタンブロット法及び免疫蛍光法で評価された。その結果、HEK293T 細胞において抗原の発現が確認され、発現した抗原は小胞体に局在していたことから、抗原が小胞体で合成され、プロセッシングを受けることが示唆された。

本剤（LNP 封入 BNT162b2）又はトランスフェクション試薬と混合した本薬（BNT162b2）を HEK293T 細胞内に導入し、細胞への導入効率及び細胞の生存率がフローサイトメトリーで評価された。その結果、本剤群及び本薬群における抗原発現細胞はそれぞれ $98.0 \pm 0.2\%$ 及び $85.1 \pm 4.4\%$ であった。また、本剤群及び本薬群の細胞の生存率は対照群（非トランスフェクション処理細胞）と同程度であった。

Expi293F 細胞に、本薬と同じアミノ酸配列をコードする DNA により S タンパク質を発現させたところ、発現した S タンパク質のヒト細胞受容体であるアンジオテンシン変換酵素 2 及びヒト抗 RBD 中和抗体への結合、並びに細胞表面への発現が確認された。

3.1.2 マウス免疫原性試験（CTD 4.2.1.1.2）

BALB/c マウス（雌 8 例/群）に本剤（RNA 量として 0.2、1.0 又は 5.0 μg ）を単回筋肉内投与した際の免疫応答が評価され、結果は以下のとおりであった。