

目次

略号一覧表	2
2.4 非臨床試験の概括評価	4
2.4.1 非臨床試験計画の概略	4
2.4.1.1 背景	4
2.4.1.2 被験物質	5
2.4.1.3 非臨床試験計画	5
2.4.2 薬理試験	7
2.4.2.1 薬効薬理	8
2.4.3 薬物動態試験及び組織分布	10
2.4.3.1 薬物動態試験及び組織分布	11
2.4.4 毒性試験	11
2.4.4.1 反復投与毒性試験	13
2.4.4.2 遺伝毒性試験	14
2.4.4.3 生殖発生毒性試験	15
2.4.4.4 その他の毒性試験	15
2.4.4.5 非臨床毒性試験における安全域についての要約	15
2.4.5 総括及び結論	16
2.4.6 参考文献一覧	17

表

表 2.4.2-1 mRNA-1273 の薬理試験プログラムの概要	8
表 2.4.3-1 mRNA-1273 の薬物動態試験の要約	11
表 2.4.4-1 mRNA-1273 の毒性試験プログラムの要約	12

略号一覧表

略語	略していない表現又は説明（英語）	略していない表現又は説明（日本語）
ACE-2	angiotensin converting enzyme 2	アンジオテンシン変換酵素 2
AUC	area under the concentration versus time curve	濃度－時間曲線下面積
AUC _(0-t)	area under the concentration versus time curve from the start of dose administration to the time after dosing at which the last quantifiable concentration was observed	接種開始から最終定量可能時間までの濃度－時間曲線下面積
cDC	conventional dendritic cell	（通常型）樹状細胞
C _{max}	maximum concentration	最高濃度
CMV	cytomegalovirus	サイトメガロウイルス
CoV	coronavirus	コロナウイルス
COVID-19	coronavirus disease caused by the 2019 novel coronavirus	2019 年新型コロナウイルスに起因する疾患
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン
DTPA	diethylenetriamine pentaacetic acid	ジエチレントリアミン五酢酸
ERD	enhanced respiratory disease	増強呼吸器疾患
gB	glycoprotein B	糖蛋白質 B
GD	Gestation Day	妊娠日
gH	glycoprotein H	糖蛋白質 H
gL	glycoprotein L	糖蛋白質 L
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GMP	Good Manufacturing Practice	医薬品等の製造管理および品質管理に関する基準
hMPV	human metapneumovirus	ヒトメタニューモウイルス
ICH	International Council for Harmonisation	医薬品規制調和国際会議
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IM	intramuscular(ly)	筋肉内
IP-10	interferon gamma-induced protein 10	インターフェロン γ 誘導蛋白質 10
LD	Lactation Day	授乳日
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
LNP	lipid nanoparticle	脂質ナノ粒子
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1	単球走化性蛋白質 1
MIP-1- α	macrophage inflammatory protein 1 alpha	マクロファージ炎症性蛋白質 1 α
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA
NTD	N-terminal domain	N 末端ドメイン
NHP	nonhuman primate	非ヒト霊長類
NPI	nascent peptide imaging	新生ペプチドイメージング
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
pDC	plasmacytoid dendritic cell	形質細胞様樹状細胞
PEG2000-DMG	1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000	1,2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000
PG	propylene glycol	プロピレングリコール
PIV3	parainfluenza virus type 3	パラインフルエンザウイルス 3 型
RBD	receptor binding domain	受容体結合ドメイン
RS	respiratory syncytial	呼吸器合胞体
S	spike	スパイク
S-2P	spike protein modified with 2 proline substitutions within the heptad repeat 1 domain	heptad repeat 1 ドメイン内の 2 つのプロリン置換により修飾されたスパイク蛋白質
SARS	severe acute respiratory syndrome	重症急性呼吸器症候群
SARS-CoV	severe acute respiratory syndrome coronavirus	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス

略語	略していない表現又は説明（英語）	略していない表現又は説明（日本語）
SARS-CoV-1 DIV	double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus-1	二重不活化重症急性呼吸器症候群コロナウイルス-1
SARS-CoV-2	2019 novel coronavirus	2019 年新型コロナウイルス
SM-102	heptadecan-9-yl 8-((2-hydroxyethyl)(6-oxo-6-(undecyloxy)hexyl)amino)octanoate	ヘプタデカン-9-イル 8-((2-ヒドロキシエチル)(6-オキソ-6-(ウンデシルオキシ)ヘキシル)アミノ)オクタン酸
T _{1/2}	half-life	半減期
Th	T helper	ヘルパーT 細胞
T _{max}	time to peak (maximum) concentration	最高濃度到達時間
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane	トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン
WHO	World Health Organization	世界保健機関
WT	wild type	野生型

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画の概略

2.4.1.1 背景

コロナウイルス (CoV) は、感冒から中東呼吸器症候群や重症急性呼吸器症候群 (SARS) などのより重度の疾患まで、様々な疾患を引き起こすウイルスの一大ファミリーである。

2019 年新型 CoV (2019-nCoV、以下 SARS-CoV-2) に起因する CoV 疾患 (COVID-19) の大流行は、2019 年 12 月に中国の湖北省武漢で始まり、以降世界的に広がっている[1]。公衆衛生的介入の実施に更なる進展がみられなければ、COVID-19 による死亡は 2021 年 3 月 1 日までに全世界で 250 万例を超え、この期間の 1 日あたりの死亡は約 15,000 例でピークに達すると予想される[2]。重症の SARS-CoV-2 感染症を治療するための新規抗ウイルス薬及び治療法を評価するための世界的取組みが強化されており、この疾患の拡大を防ぐためのワクチンなどの新たな予防療法を速やかに導入することが、公衆衛生上の差し迫ったニーズとなっている。

Moderna TX, Inc. (以下、Moderna TX 社) は、メッセンジャーRNA (mRNA) 送達システムに基づく独自の迅速対応型ワクチンプラットフォームを開発した。このプラットフォームは、生体内の細胞が mRNA を取り込み、それを翻訳した後、ウイルス蛋白抗原を細胞表面に発現するという原理と観察に基づいている。取り込まれた mRNA は細胞核に入らず、ゲノムと相互作用せず、複製せず、一過性に発現する。Moderna TX 社の mRNA ベースのプラットフォームを用いて開発された mRNA ワクチンは、サイトメガロウイルス (CMV ; NCT03382405)、ヒトメタニューモウイルス (hMPV)、パラインフルエンザウイルス 3 型 (PIV3 ; NCT03392389)、ジカウイルス (NCT04064905)、インフルエンザウイルス (NCT03076385 及び NCT03345043) などの感染性病原体に対する免疫応答を誘導するために使用されている。

Moderna TX 社は、この mRNA ベースのプラットフォームを用いて、SARS-CoV-2 に対する、mRNA を脂質ナノ粒子 (LNP) に含有した新規ワクチンの mRNA-1273 (TAK-919) を開発した。mRNA-1273 は、スパイク (S) 蛋白質を融合前の立体構造に安定化させるため、heptad repeat 1 ドメイン内に 2 つのプロリン置換を有するように修飾した完全長の SARS-CoV-2 S 糖蛋白質 (S-2P) をコードする 1 本の mRNA が含まれている。CoV S 蛋白質は宿主細胞へのウイルスの付着及び侵入を誘導し (アンジオテンシン変換酵素 2 (ACE-2) 受容体への結合及びその後の膜融合による)、感染を防ぐ中和抗体の主要な標的となる[3][4][5][6][7][8][9][10]。安定化した SARS-CoV-2 S-2P mRNA は哺乳類の細胞で良好に発現し、融合前の構造であることが確認されている[11]。

非臨床試験では、CoV S 蛋白質は免疫原性を有し、mRNA 送達プラットフォームに基づくワクチンを含む S 蛋白質ベースのワクチンは、動物において防御的であることが示されている[12][13][14][15][16][17]。

成人への接種を支持するための mRNA-1273 の臨床開発として、米国で実施されている臨床試験は、米国国立アレルギー感染症研究所が主導する第 1 相、非盲検、用量設定試験

(NCT04283461)、並びに Moderna TX 社による第 2a 相、無作為化、オブザーバーブラインド、プラセボ対照用量確認試験 (NCT04405076) 及び本ワクチンの有効性、安全性、及び免疫原性を評価するために第 3 相、無作為化、層別化、オブザーバーブラインド、プラセボ対

照試験（NCT04470427）の3試験である。本ワクチンのために迅速かつ大規模な製造を可能にする特別な製造工程も開発され、mRNA-1273の開発は進行中のCOVID-19の大流行に対処できるように急ピッチで進められている。

2.4.1.2 被験物質

mRNA-1273は、SARS-CoV-2 S-2Pをコードする一本のmRNAを含み、Moderna TX社のmRNA ワクチンプラットフォームと共通の4種類の脂質（SM-102、コレステロール、DSPC、及びPEG2000-DMG）の混合物と混和されている。mRNA-1273製剤は、87 g/L ショ糖及び4.3 mM 酢酸を含有するpH 7.5の20 mM Tris 緩衝液に0.20 mg/mLの濃度で溶解した注射用無菌懸濁液として提供される。

承認用の毒性試験は、SM-102含有LNPを用いてModerna TX社のmRNAベースのプラットフォームで開発した様々な抗原をコードするmRNA ワクチンを用いて実施した。非臨床薬理試験プログラムで評価された開発用mRNA-1273ロット（ロット [REDACTED] 及び [REDACTED]）は、第3相臨床試験で評価されたGMP mRNA-1273製剤と同等の製造工程〔モジュール3、3.2.P.2.3項（スケールAプロセス）記載〕を用いて調製した、臨床使用ロットと同等のものであった。ロット [REDACTED] 及び [REDACTED] は、87 g/L ショ糖及び10.7 mM 酢酸を含有する20 mM Tris 緩衝液（pH 7.5）中で0.5 mg/mLの濃度で製造した。

LNPで製剤化されたmRNA ワクチンに関連する分布、毒性及び遺伝毒性は、mRNAがコードする抗原の生物学的活性の影響はより小さく、主にLNPの成分に依存する。そのため、Moderna TX社は、SM-102含有LNPを用いたmRNAベースのプラットフォームで開発した様々な抗原をコードするmRNA ワクチンを用いて実施した分布試験、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用の毒性試験、及びGLP適用in vivo 遺伝毒性試験により、mRNA-1273の承認審査が可能と考えている。mRNA-1273に使用される新規脂質のSM-102及びPEG2000-DMG（市販品、Sunbright® GM-020; NOF Corporation）の遺伝毒性は、GLP適用in vitro 遺伝毒性試験において個別に評価した。さらに、GLP非適用反復投与試験において、mRNA-1273の免疫原性及び毒性プロファイルを評価し、また、Sprague Dawley ラットの生殖発生毒性試験によりmRNA-1273の受胎能並びに出生前及び出生後の発生に対する影響を評価した。臨床的に妥当な接種量における潜在的な毒性を評価するGLP適用Sprague Dawley ラット反復投与毒性試験を実施中である。

2.4.1.3 非臨床試験計画

非臨床試験計画は、国際的な規制ガイドライン、意図した臨床開発プログラム並びに薬理及び毒性の原則を遵守するようにデザインされており、医薬品規制調和国際会議（ICH）のICH S6（R1）を含む生物製剤開発に関するガイドライン（バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価）及び試験実施時に適用される適切なGLP規制に準拠していた。主要な非臨床安全性試験は、経済協力開発機構（OECD）の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準の原則（ENV/MC/CHEM[98]17）又はOECDのデータ相互受け入れ協定（例えば、連邦規則集第21巻58条：非臨床試験の優良試験所基準）に署名したその他の国におけるGLP規制に従って実施した。

非臨床試験で使用した mRNA-1273 の投与経路は、臨床投与経路と同一の筋肉内投与とした。

HEK293T 細胞を用いた *in vitro* 試験並びに若齢及び高齢マウス (BALB/c、BALB/cJ、C57/BL6J 及び B6C3F1/J 系統)、ゴールデンシリアンハムスター並びにアカゲザル〔非ヒト霊長類 (NHP)〕の動物モデルを用いた *in vivo* における非臨床薬効薬理評価を実施し、mRNA-1273 の発現及び免疫原性、SARS-CoV-2 チャレンジ後のウイルス複製及び疾患進行に対する mRNA-1273 の効果の特徴を明らかにするとともに、ウイルスチャレンジ後の mRNA-1273 の安全性プロファイル、ワクチン関連の増強呼吸器疾患 (ERD) の誘発能を検討した。ワクチン関連 ERD は、RS ウイルス[18]及び麻疹[19]に対するワクチン、並びに SARS-CoV ワクチンを接種した動物モデル[20][21][22][12]で過去に確認されている。また、Sprague Dawley ラット反復投与試験で、mRNA-1273 の免疫原性を評価した。

SARS-CoV-2 は新たに出現した CoV であるため、予防ワクチン及び治療の評価に適した動物モデルは確立されていなかった。そこで、mRNA にコードされた SARS-CoV-2 S-2P 抗原の発現について *in vitro* 及び *in vivo* で確認し、mRNA-1273 免疫化の影響を包括的に理解するために、複数の動物種で非臨床試験を開始した。野生型マウスは、ワクチン免疫原性を評価するうえで利便性が高く、使いやすいモデルであるが、SARS-CoV-2 の結合と侵入の主要経路である ACE-2 受容体はマウスとヒトとの間で大きく異なることから、野生型 SARS-CoV-2 はマウスに感染しない。よって、ノースカロライナ大学チャペルヒル校の Dr. Ralph Baric の研究室で開発したマウス適応 SARS-CoV-2 株を用いて、SARS-CoV-2 チャレンジに対する免疫マウスの防御能を評価した。このマウス適応株は若齢マウスに感染して軽症の疾患症状を誘発するが、高齢マウス (12 ヶ月齢超) ではより重症化することが明らかになっている[23]。したがって、ウイルスチャレンジに対する免疫応答及び感染防御レベルの特性を詳細に評価するため、非臨床薬理試験の対象に高齢マウスを含めた。さらに、このモデルを用いて、mRNA-1273 によって誘導された免疫がワクチン関連 ERD を促進すると予測されるかどうかを決定するために、免疫応答の質の特性を明らかにした。高齢マウスを用いた免疫原性及び感染防御試験は、ウイルスチャレンジに対する至適な又は至適レベル未満の防御効果をもたらすと予測される用量の評価を通じて、この懸念に直接対処するようデザインされた。評価のための適切なモデルとしてゴールデンシリアンハムスターも選択した。野生型 SARS-CoV-2 はハムスターに増殖的に感染し、体重減少及び中等症から重症の肺症状を引き起こす。このモデルを選択した理由は、現時点でウイルスチャレンジ後に重症呼吸器疾患が顕著な唯一の動物種であるためである[24]。NHP はヒトと最も近縁の種であり、これまでに SARS-CoV 感染のいくつかの重要な特性を再現した[25]。NHP における SARS-CoV-2 感染は軽症の臨床症状のみをもたらすが、感染は肺炎の所見を伴う疾患を引き起こす[26]。

LNP で製剤化された mRNA ワクチンの生体内分布は LNP の特性に依存すると考えられ、同一組成の LNP (すなわち SM-102 含有 LNP) 内に存在する mRNA も同様に分布すると予想される。SM-102 含有 LNP に 6 種類の mRNA 配列が封入されている CMV の mRNA ワクチンである mRNA-1647 の分布は、GLP 非適用単回筋肉内接種分布試験で検討されており、mRNA-1273 開発の根拠としている。

Sprague Dawley ラットは、非臨床毒性試験用のげっ歯類として規制当局が認めている動物種であり、また mRNA ワクチンに免疫反応を示すことから毒性及び免疫原性評価に適切な動物種であり、mRNA ワクチンの毒性評価動物として選択した。

SM-102 含有 LNP で製剤化された mRNA ワクチン (mRNA-1273 等) の毒性プロファイルは、mRNA がコードする抗原の生物学的活性の影響はより小さく、主に LNP の成分に依存する。Moderna TX 社の SM-102 含有 LNP を用いた mRNA ワクチンのプラットフォーム技術を用いて開発された抗原をコードする 5 種類の mRNA ワクチン (ジカウイルスワクチン 2 種類 : mRNA-1706 及び mRNA-1893、hMPV 及び PIV3 ワクチン 1 種類 : mRNA-1653、CMV ワクチン 2 種類 : mRNA-1647 及び mRNA-1443) の安全性及び忍容性について、6 つの GLP 適用 Sprague Dawley ラット反復投与毒性試験で検討している。また、Moderna TX 社は、臨床的に妥当な接種量における潜在的な毒性を評価するために Sprague Dawley ラットを用いた GLP 非適用反復投与試験を実施した。さらに、Sprague Dawley ラットを用いた GLP 適用反復投与毒性試験を実施中である。

ラットに予想される最大耐量 150 µg/回までの用量を投与したところ、投与部位の変化と一過性の体温上昇を含む一般状態の変化とともに、体重減少及び摂餌量の減少が認められた (100 µg/回)。個々の GLP 試験で選択された接種回数は、個々の臨床試験の予定投与回数より 1 回多い、3~4 回で設定され、2 週間間隔で投与した。

mRNA-1273 に用いられている新規脂質の SM-102 及び PEG2000-DMG の遺伝毒性は、ICH S2 (R1) の標準的な方法[27]を用いて、*Salmonella typhimurium* (ネズミチフス菌) 及び *Escherichia coli* (大腸菌) を用いた GLP 適用細菌復帰突然変異 (Ames) 試験並びにヒト末梢血リンパ球を用いた GLP 適用 in vitro 小核試験で評価した。また、LNP の in vivo 遺伝毒性リスクを、SM-102 含有 LNP で製剤化された mRNA ワクチン (mRNA-1706) を用いた GLP 適用 in vivo ラット小核試験、及び SM-102 含有 LNP で製剤化されたレポーター mRNA [新生ペプチドイメージング (NPI) ルシフェラーゼ mRNA] を用いた GLP 非適用 in vivo ラット小核試験で評価した。

また、Moderna TX 社は、雌 Sprague Dawley ラットを用いた GLP 適用生殖発生毒性試験を実施し、mRNA-1273 の受胎能並びに出生前及び出生後の発生に対する影響を評価した。

2.4.2 薬理試験

mRNA-1273 の非臨床薬理試験プログラムの要約を表 2.4.2-1 に示す。薬理試験の結果の完全な要約をモジュール 2.6.2 に示す。

表 2.4.2-1 mRNA-1273 の薬理試験プログラムの概要

Study Type/Description	Test Article Dose (μg)	Species, Strain	Method of Administration; Immunization Schedule	GLP	Report Number
Primary Pharmacodynamics					
Evaluation of in vitro expression of SARS-CoV-2 mRNA and in vivo expression of mRNA-1273	SARS-CoV-2 S-2P mRNA: 0.003125 through 0.2 μg mRNA-1273: 2 or 10 μg	HEK293T cells BALB/c mice	In vitro transfection In vivo IM; single injection	No	MOD-4112.1 273 (評価)
Evaluation of immunogenicity, protective capacity, and safety in young mice	mRNA-1273: 0.01, 0.1, 1 or 10 μg SARS-CoV-2 S-2P: 0.01, 0.1, or 1 μg (+ SAS-adjuvant)	Mouse (young), BALB/cJ, C57BL/6J, B6C3F1/J	IM; prime only prime/boost (3-week interval) prime/boost (4-week interval)	No	VRC01 (参考)
Immunization and protein restimulation in young BALB/c mice with enhanced respiratory disease endpoint monitoring	mRNA-1273: 1 or 10 μg SARS-CoV-2 S-2P: 10 μg (+ alum)	Mouse (young), BALB/c	IM; prime/boost (2-week interval)	No	MOD-3937 (評価)
Immunogenicity and determination of titer dynamic range in young BALB/c mice	mRNA-1273: 0.0025 through 20 μg	Mouse (young), BALB/c	IM; prime/boost (3-week interval)	No	MOD-3938/ MOD-3940 (評価)
Immunogenicity and characterization of cellular response in young BALB/cJ mice	mRNA-1273: 0.1 or 1 μg SARS-CoV-1 DIV: 0.2 or 1 μg (+ alum) CDS: 0.2 or 1 μg (+ alum)	Mouse (young), BALB/cJ	IM; prime/boost (3-week interval)	No	VRC05 (評価)
Efficacy and enhanced respiratory disease in aged BALB/c mice	mRNA-1273: 0.1 or 1 μg SARS-CoV-1 DIV: 0.1 μg (+ alum)	Mouse (aged), BALB/c	IM; prime/boost (3-week interval)	No	VRC02 (評価)
Five-week (2 doses: prime/boost) repeat-dose immunogenicity with safety endpoints	mRNA-1273: 30, 60, or 100 μg	Rat, Sprague Dawley	IM; prime/boost (3-week interval)	No	2308-123 (参考)
Protection from WT SARS-CoV-2 in hamsters using optimal and suboptimal doses	mRNA-1273: 1, 5, or 25 μg	Hamster, golden Syrian	IM; prime/boost (3-week interval)	No	UTMB01 (評価)
Immunogenicity and protective efficacy in NHPs	mRNA-1273: 10 or 100 μg	NHP, rhesus macaque (Indian-origin)	IM; prime/boost (4-week interval)	No	VRC04 (評価)
Evaluation of immunogenicity and efficacy from expanded dose range in NHPs	mRNA-1273: 2.5, 30, or 100 μg NTFIX mRNA: 100 μg	NHP, rhesus macaque (Indian-origin)	IM; prime/boost (4-week interval)	No	VRC07 (評価)

Abbreviations: alum = aluminum hydroxide; CDS = conformationally disrupted severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 S protein; GLP = Good Laboratory Practice; IM = intramuscular; mRNA = messenger RNA; NHP = nonhuman primate; NTFIX = noncoding mRNA; SARS-CoV-1 DIV = double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus-1; SARS-CoV-2 = 2019 novel coronavirus; S-2P = spike protein modified with 2 proline substitutions within the heptad repeat 1 domain; SAS = Sigma Adjuvant System®; WT = wild-type.

2.4.2.1 薬効薬理

非臨床薬効薬理試験は、HEK293T 細胞を用いた in vitro 試験並びに若齢及び高齢マウス (BALB/c、BALB/cJ、C57BL/6J 及び B6C3F1/J 系統)、ゴールデンシリアンハムスター並びに

にアカゲザル（NHP）動物モデルを用いた *in vivo* 試験を実施し、mRNA-1273 の発現及び免疫原性、SARS-CoV-2 チャレンジ後のウイルス複製及び疾患進行に対する mRNA-1273 の効果の特徴を明らかにするとともに、ウイルスチャレンジ後の mRNA-1273 の安全性プロファイル及びワクチン関連 ERD の誘発能を検討した（モジュール 2.6.2）。さらに、Sprague Dawley ラットを用いた GLP 非適用反復投与薬理試験において mRNA-1273 の免疫原性を評価した（モジュール 2.6.6）。

mRNA にコードされた SARS-CoV-2 S-2P 抗原の発現は、*in vitro* 及び *in vivo* において確認された。抗原発現は、SARS-CoV-2 S-2P 抗原をコードした mRNA を 0.003125～0.2 µg の量で一時的に導入した HEK293T 細胞において、24、48 及び 72 時間まで持続的に認められた。これは、SARS-CoV-2 S 蛋白の受容体結合ドメイン（RBD）又は N 末端ドメイン（NTD）エピトープ（それぞれ CR3022 mAb 及び 4A8 mAb により検出）を発現している細胞の頻度の増加によって示され、また、わずかな用量効果が観察された。2 又は 10 µg の mRNA-1273 を接種した BALB/c マウスでは、脾臓及び流入領域リンパ節の免疫細胞〔樹状細胞（cDCs）及び形質細胞様樹状細胞（pDCs）〕において SARS-CoV-2 S-2P 抗原の *in vivo* 発現が誘導された。抗原発現のレベルは cDCs と pDCs で同等であり、より高い用量（10 µg mRNA-1273）でより高い抗原発現レベルが誘導された。

免疫原性の特徴は、若齢及び高齢マウス、ラット、ハムスター並びに NHP を用いて、初期感作のみ又は初期感作／追加免疫によるスケジュールで様々な用量の mRNA-1273 を接種して誘導した液性免疫応答〔免疫グロブリン（Ig）G 結合抗体〕、細胞免疫応答〔T 細胞サイトカイン、並びに 1 型ヘルパー T 細胞（Th）指向性の CD4+ 及び CD8+ 応答〕、及び／又は中和抗体反応の評価を通じて明らかにした。

若齢及び高齢マウス、ハムスター並びに NHP を初期感作のみ又は初期感作／追加免疫スケジュールで免疫化した後に、高用量の SARS-CoV-2（マウス適応 SARS-CoV-2 株、ハムスター及び NHP：野生型 SARS-CoV-2 株、ワシントン州分離株）によるウイルスチャレンジを実施し、mRNA-1273 免疫化による防御を評価した。これらの試験では、至適な又は至適レベル未満の防御能を誘導すると予測される mRNA-1273 の用量及び接種スケジュールを組み入れ、各レジメンの免疫応答を同定するとともに、様々な用量によって成立する防御能のレベルを評価した。疾患増強の理論的リスクを評価するため、部分的な防御能のみが得られる至適用量未満接種も組み入れた。ウイルスチャレンジ後において、上気道（鼻甲介）及び下気道（肺）のウイルス量及び複製の評価、並びに肺の病理評価及び炎症評価を実施した。

mRNA-1273 がワクチン関連 ERD を促進する可能性については、若齢及び高齢のマウス、ハムスター並びに NHP を用いて、防御能及び疾患増強の表現型を示す免疫原性評価項目（IgG1：IgG2a 比、Th1/Th2 サイトカインのプロファイル、中和抗体結合率）の評価、ウイルスチャレンジ後のウイルス量とウイルス複製の評価、並びに肺組織の病理組織評価を実施した。mRNA-1273 で免疫化したマウスの免疫応答を、2 つのマウス研究で対照として含めた ERD と関連したワクチン（SARS-CoV-1 DIV 及び水酸化アルミニウムアジュバントで立体配座が破壊されたスパイク蛋白質）のそれと比較した。

これらの試験から、mRNA-1273 は評価したすべての動物種で免疫原性を有することが示され、IgG 結合抗体価及び中和抗体活性に用量依存的な反応がみられた。マウス及び NHP において抗原特異的 T 細胞応答が認められた。マウス及び NHP における Th1 指向性の応答の直

接測定、マウスにおける Th1 指向性の応答（IgG2a/c : IgG1 抗体サブクラス）の間接測定、並びにすべての動物種における高レベルの中和抗体により、mRNA-1273 接種に伴い ERD のリスクに関する懸念が軽減する。さらに、マウスにおける頑健かつ用量依存的な CD8+T 細胞応答及び NHP における低い CD8+T 細胞応答が、mRNA-1273 の 2 回目の接種による追加免疫後に観察された。

免疫応答の測定に加えて、マウス、ハムスター及び NHP に対して、高用量の SARS-CoV-2（マウス：マウス適応 SARS-CoV-2 株、ハムスター及び NHP：野生型 SARS-CoV-2 株、ワシントン州分離株）を用いてチャレンジした。マウス及びハムスターは鼻腔内にチャレンジを実施し、NHP は鼻腔内及び気管内にチャレンジを実施した。これらの試験では、至適（完全防御）及び至適レベル未満（部分的防御）と予測される用量を組み入れた。高用量では、マウス、ハムスター及び NHP は両肺及び鼻腔のいずれにおいてもウイルス複製から完全に防御された。至適用量未満を接種した動物では、チャレンジ後に肺が完全に防御されているか、又は対照動物よりもウイルス量が減少していた。至適用量未満の mRNA-1273 を接種した動物でウイルス量の増加が認められなかったことから、mRNA-1273 接種によって ERD が促進されないことがさらに裏付けられた。肺の病理組織学的評価によって、mRNA-1273 を接種した動物へのウイルスチャレンジに対する炎症の減少、免疫複合体の沈着、及び免疫細胞浸潤を確認し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を接種した対照と比較した。至適用量又は至適用量未満のいずれかで mRNA-1273 を接種した動物では、軽微な炎症は認められたが、従来からワクチン関連 ERD との関係が認められている顕著な好中球関連の肺胞疾患及び好酸球優位型の炎症反応がみられないことが示すように、マウス及び NHP の肺の病理組織学的評価によって ERD の所見は確認されなかった。これとは対照的に、PBS 対照動物では、SARS-CoV-2 感染により、小気道及び隣接する肺胞に中等症から重症の炎症が誘発された。

全体として、非臨床薬理試験の結果より、mRNA-1273 の忍容性は良好であり、免疫原性が認められ、SARS-CoV-2 曝露から防御することが示された。マウス、ハムスター及び NHP に対して、初期感作のみによるスケジュールで接種すると、頑健な SARS-CoV-2 特異的結合及び中和抗体応答が誘導され、2 回目の mRNA-1273 接種による追加免疫後において反応は有意に上昇した。初期感作／追加免疫によるスケジュールでラットに接種すると、強力かつ用量依存的な結合抗体反応が誘導された。さらに、Th1 指向性の抗原特異的 CD4+及び CD8+T 細胞応答がマウスで観察され、Th1 指向性の抗原特異的 CD4+T 細胞応答が NHP で観察された。mRNA-1273 は、初期感作のみ又は初期感作／追加免疫により 1 µg/回以上をマウス及びハムスターに接種したとき、並びに初期感作／追加免疫により 30 µg/回以上を NHP に接種したときに、ウイルスチャレンジから完全に防御した。さらに、mRNA-1273 は、マウス、ハムスター及び NHP においてワクチン関連 ERD を促進しなかった。このことは、完全防御（至適用量）又は部分的防御（至適用量未満）が予測される用量を接種したときに、免疫に対して均衡した Th1/Th2 指向性の免疫応答がみられたこと、肺病変が増加しなかったこと、及びウイルスチャレンジ後のウイルス複製が制御されたことによって示された。

2.4.3 薬物動態試験及び組織分布

表 2.4.3-1 に、mRNA-1273 の開発を支持するものとして mRNA-1647 を用いた非臨床薬物動態及び組織分布試験を示す。生体内分布試験の結果の完全な要約をモジュール 2.6.4 に示す。

表 2.4.3-1 mRNA-1273 の薬物動態試験の要約

Study Type	Test Article	Species, Strain	Method of Administration, Dose	GLP	Report Number
Single-dose tissue distribution study	mRNA-1647 ^a	Rat, Sprague Dawley	IM injection dose of 100 µg on Day 1	No	5002121 Amendment 1 (評価)

Abbreviations: CMV = cytomegalovirus; gB = glycoprotein B; gH = glycoprotein H; gL = glycoprotein L; GLP = Good Laboratory Practice; IM = intramuscular; mRNA = messenger RNA.

^a mRNA-1647 contains 6 mRNAs that encode the full-length CMV gB and the pentameric gH/gL/UL128/UL130/UL131A glycoprotein complex. The 6 mRNAs are combined at a target mass ratio of 1:1:1:1:1 in a mixture of 4 lipids (SM-102, PEG2000-DMG, cholesterol, and DSPC).

2.4.3.1 薬物動態試験及び組織分布

雄 Sprague Dawley ラットを用いた mRNA-1647 の生体内分布、GLP 非適用、単回、筋肉内接種試験の結果〔表 2.6.5.5 (モジュール 2.6.5) 及び報告書 5002121 改訂 1〕は、mRNA-1273 の開発を支持する。mRNA-1647 は、SM-102 含有 LNP 中で 1:1:1:1:1 の目標質量比で混合された 6 つの異なる mRNA 配列〔1 つは完全長 CMV 糖蛋白質 B (gB) をコードし、5 つは 5 量体糖蛋白質 H (gH) / 糖蛋白質 L (gL) / UL128 / UL130 / UL131A 糖蛋白質複合体をコードする〕を含有する新規の CMV の mRNA ワクチンである。

雄性ラットに mRNA-1647 を単回筋肉内接種後、mRNA-1647 を構成する 6 種類の mRNA (gB、gH、gL、UL128、UL130、UL131) の濃度は、血漿及び組織から 1:1:1:1:1 の比率で検出された。接種後の最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}) はいずれの mRNA でも 2 時間で、その後すみやかに消失し、半減期 ($T_{1/2}$) の推定値は 2.7~3.8 時間であった。最高血漿中濃度 (C_{max}) は 1.60~2.30 ng/mL、接種開始から最終定量可能時点までの濃度-時間曲線下面積 ($AUC_{[0-t]}$) は 22.7~25.5 ng·h/mL であった。

mRNA-1647 を構成する 6 種類の mRNA の濃度はいずれも、腎臓では定量下限値 (LLOQ) 未満であったが、それ以外の検討したほとんどの組織では LLOQ を上回った。曝露量の高い組織〔接種部位 (筋肉)、近位及び遠位リンパ節、脾臓〕では、 C_{max} が接種後 2~24 時間に認められた。 $T_{1/2}$ は、6 種類すべての mRNA の各組織における $T_{1/2}$ の平均値とし、接種部位 (筋肉) で 14.9 時間、近位 (膝窩) リンパ節で 34.8 時間、遠位 (腋窩) リンパ節で 31.1 時間、脾臓で 63.0 時間であった。

他の筋肉内接種ワクチンと同様に、mRNA 濃度は接種部位で最も高く、次いで近位 (膝窩) リンパ節、遠位 (腋窩) リンパ節の順であり、リンパ系を介した分布と一致した。これらの組織と脾臓及び眼における AUC の組織対血漿比は 1.0 を上回った。接種した mRNA-1647 の遠位組織へ分布する割合は相対的に小さく、また、すべての mRNA の $T_{1/2}$ の平均値が 14.9~63.0 時間であった筋肉 (接種部位)、近位 (膝窩) リンパ節、遠位 (腋窩) リンパ節及び脾臓以外の組織では mRNA は 1~3 日で検出されなくなった。

2.4.4 毒性試験

mRNA-1273 の開発に用いた非臨床毒性試験プログラムを表 2.4.4-1 に要約する。毒性試験の結果の要約をモジュール 2.6.6 に示す。

表 2.4.4-1 mRNA-1273 の毒性試験プログラムの要約

Study Type	Test Article	Species, Strain	Method of Administration; Dose	GLP	Report Number
Repeat-Dose Toxicity					
1-month (3 doses) repeat-dose study with 2-week recovery	mRNA-1706 ^a	Rat, Sprague Dawley	IM; 0, 13, 65, 129 µg/dose ^b (Days 1, 15, 29)	Yes	5002045 (評価)
1-month (3 doses) repeat-dose study with 2-week recovery	mRNA-1706 ^a	Rat, Sprague Dawley	IM; 0, 10, 50, 100 µg/dose (Days 1, 15, 29)	Yes	5002231 (評価)
1-month (3 doses) repeat-dose study with 2-week recovery	mRNA-1653 ^c	Rat, Sprague Dawley	IM; 0, 10, 50, 150 µg/dose (Days 1, 15, 29)	Yes	5002033 (評価)
1-month (3 doses) repeat-dose study with 2-week recovery	mRNA-1893 ^d	Rat, Sprague Dawley	IM; 0, 10, 30, 96 µg/dose (Days 1, 15, 29)	Yes	5002400 (評価)
6-week (4 doses) repeat-dose study with 2-week recovery	mRNA-1647 ^e	Rat, Sprague Dawley	IM; 0, 8.9, 27, 89 µg/dose ^f (Days 1, 15, 29, 43)	Yes	5002034 (評価)
6-week (4 doses) repeat-dose study with 2-week recovery	mRNA-1443 ^g	Rat, Sprague Dawley	IM; 0, 9.6, 29, 96 µg/dose ^h (Days 1, 15, 29, 43)	Yes	5002158 (評価)
In Vitro Genotoxicity					
Bacterial reverse mutation test	SM-102	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i>	0, 1.58, 5.0, 15.8, 50, 158, 500, 1581, 5000 µg/plate SM-102 with or without supplemented rat liver fraction	Yes	9601567 (評価)
	PEG2000-DMG (Sunbright [®] GM-020) ⁱ	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i>	0, 1.58, 5.0, 15.8, 50, 158, 500, 1581, 5000 µg/plate PEG2000-DMG with or without supplemented rat liver fraction	Yes	9601035 (評価)
Mammalian cell micronucleus test	SM-102	Human peripheral blood lymphocytes	0, 163, 286, 500 µg/mL SM-102 with or without supplemented rat liver fraction	Yes	9601568 (評価)
	PEG2000-DMG (Sunbright [®] GM-020) ⁱ	Human peripheral blood lymphocytes	0, 53.3, 93.3, 163, 286, 500 µg/mL PEG2000-DMG with or without supplemented rat liver fraction	Yes	9601036 (評価)
In Vivo Genotoxicity					
In vivo mammalian erythrocyte micronucleus test	mRNA-1706 ^a	Rat, Sprague Dawley	Single IV; 0, 0.6 (F), 1.3, 2.6, 5.2 (M) mg/kg mRNA-1706 ^{j, k}	Yes	9800399 (評価)
In vivo mammalian erythrocyte micronucleus test	NPI luciferase mRNA ^l	Rat, Sprague Dawley	Single IV; 0, 0.32, 1.07, 3.21 mg/kg NPI luciferase mRNA	No	AF87FU.125012 NGLPICH.BTL (評価)
Reproductive Toxicology					
Combined developmental and perinatal/postnatal reproductive toxicity study	mRNA-1273m	Rat, Sprague Dawley	IM; 0, 100 µg/dose (Study Days 1 and 15 [28 and 14 days prior to mating, respectively] and Gestation Days 1 and 13)	Yes	20248897 (評価)
Other Toxicology					
5-week (2 doses) repeat-dose immunogenicity and toxicity study	mRNA-1273 ⁿ	Rat, Sprague Dawley	IM; 0, 30, 60, 100 µg/dose (Days 1 and 22)	No	2308-123 (参考)

Abbreviations: CMV = cytomegalovirus; F = female; gB = glycoprotein B; gH = glycoprotein H; gL = glycoprotein L; GLP = Good Laboratory Practice; IM = intramuscular; IV = intravenous; M = male; mRNA = messenger RNA; NPI = nascent peptide imaging; pp65 = phosphoprotein 65; prME = pre-membrane and envelope; S-2P = spike protein modified with 2 proline substitutions within the heptad repeat 1 domain; SARS-CoV-2 = 2019 novel coronavirus; SoA = summary of analysis.

^a mRNA-1706 contains a single mRNA sequence that encodes the prME structural proteins of Zika virus combined in a mixture of 4 lipids (SM-102, PEG2000-DMG, cholesterol, and DSPC) and formulated in 20 mM Tris, 8% sucrose, pH 7.4.

^b The original dose levels selected were 0, 10, 50, and 100 µg/dose, respectively (SoA issued on [REDACTED] 20[REDACTED]). The calculated dose levels were revised based on the updated concentration reported for mRNA-1706 Lot No. [REDACTED] (SoA issued on [REDACTED] 20[REDACTED]). The change in the reported mRNA content for mRNA-1706 was 29%.

^c mRNA-1653 contains 2 distinct mRNA sequences that encode the full-length membrane-bound fusion proteins of human metapneumovirus and parainfluenza virus type 3. The 2 mRNAs are combined at a target mass ratio of 1:1 in a mixture of 4 lipids (SM-102, PEG2000-DMG, cholesterol, and DSPC) and formulated in 93 mM Tris, 7% PG, 1 mM DTPA, pH 7.4.

^d mRNA-1893 contains a single mRNA sequence that encodes the prME structural proteins of Zika virus in a mixture of 4 lipids (SM-102, PEG2000-DMG, cholesterol, and DSPC) and formulated in 100 mM Tris, 7% PG, 1 mM DTPA, pH 7.5.

^e mRNA-1647 contains 6 mRNAs that encode the full-length CMV gB and the pentameric gH/gL/UL128/UL130/UL131A glycoprotein complex. The 6 mRNAs are combined at a target mass ratio of 1:1:1:1:1:1 in a mixture of 4 lipids (SM-102, PEG2000-DMG, cholesterol, and DSPC) and formulated in 93 mM Tris, 60 mM NaCl, and 7% PG.

^f The original dose levels selected were 0, 10, 30, and 100 µg/dose, respectively (SoA issued on [REDACTED] 20[REDACTED]). The calculated dose levels were revised based on the updated concentration reported for mRNA-1647 Lot No. [REDACTED] (SoA issued on [REDACTED] 20[REDACTED]). The change in the reported mRNA content for mRNA-1647 was -11%.

^g mRNA-1443 contains a single mRNA sequence that encodes a phosphorylation mutant of the CMV phosphoprotein 65 protein (ie, deletion of amino acids 435-438) combined in a mixture of 4 lipids (SM-102, PEG2000-DMG, cholesterol, and DSPC) and formulated in 93 mM Tris, 60 mM NaCl, and 7% PG.

^h The original dose levels selected were 0, 10, 30, and 100 µg/dose, respectively (SoA issued on [REDACTED] 20[REDACTED]). The calculated dose levels were revised based on the updated concentration reported for mRNA-1443 Lot No. [REDACTED] (SoA issued on [REDACTED] 20[REDACTED]). The change in the reported mRNA content for mRNA-1443 was -4%.

ⁱ Multiple test articles (Sunbright GM-020 and MC3) were assessed in this study. Only data relevant to the development of mRNA-1273 are discussed in this dossier.

^j A dose-range finding test was performed prior to the main phase of the study, wherein male and female rats (3 animals/sex) were given a single IV injection (doses 2.6, 3.9, and 5.2 mg/kg mRNA-1706 for females, and 2.6, 5.2, and 10.3 mg/kg mRNA-1706 for males).

^k The original dose levels selected were 0, 1.0, 2.0, 4.0, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/kg mRNA-1706, respectively (SoA issued on [REDACTED] 20[REDACTED]). The calculated dose levels were revised based on the updated concentration reported for mRNA-1706 Lot No. [REDACTED] (SoA issued on [REDACTED] 20[REDACTED]). The change in the reported mRNA content for mRNA-1706 was 29%.

^l The NPI luciferase mRNA is combined in a mixture of 4 lipids (SM-102, PEG2000-DMG, cholesterol, and DSPC) and formulated in 25 mM Tris, 123 g/L sucrose, 1 mM DTPA, pH 7.5.

^m mRNA-1273 contains a single mRNA sequence that encodes the full-length SARS-CoV-2 S-2P combined in a mixture of 4 lipids (SM-102, PEG2000-DMG, cholesterol, and DSPC) and formulated in 20 mM Tris, 87 mg/mL sucrose, 17.5 mM sodium acetate, pH 7.5.

ⁿ mRNA-1273 contains a single mRNA sequence that encodes for the full-length SARS-CoV-2 S 2P combined in a mixture of 4 lipids (SM-102, PEG2000 DMG, cholesterol, and DSPC) and formulated in 20 mM Tris, 87 mg/mL sucrose, 10.7 mM sodium acetate, pH 7.5.

2.4.4.1 反復投与毒性試験

SM-102 含有 LNP を用いた mRNA ベースのプラットフォームで開発された様々な抗原をコードする mRNA ワクチンの安全性及び忍容性は、Sprague Dawley ラットを用いた複数の GLP 適用反復投与毒性試験において、150 µg までの用量を 2 週ごとに最長 6 週間投与した後に 2 週間の休薬期間を設けて評価された。さらに、Moderna TX 社は、Sprague Dawley ラットを用いた GLP 非適用反復投与試験を実施し、臨床的に妥当な用量の mRNA-1273 を投与した場合の免疫原性反応及び毒性の特性を明らかにした (2.4.4.4 項)。

ラットに mRNA ベースのワクチン (mRNA-1706、mRNA-1653 又は mRNA-1893) を 2 週間に 1 回、150 µg までの用量で 1 ヶ月間 (3 回) 筋肉内投与し、その後 2 週間の休薬期間を設けた [表 2.6.7.7A (モジュール 2.6.7) 及び報告書 5002045、表 2.6.7.7B (モジュール 2.6.7)]

及び報告書 5002231、表 2.6.7.7C (モジュール 2.6.7) 及び報告書 5002033、表 2.6.7.7D (モジュール 2.6.7) 及び報告書 5002400]。また、ラットに mRNA ベースのワクチン (mRNA-1647 又は mRNA-1443) を 2 週間に 1 回、96 µg までの用量で 6 週間 (4 回) 筋肉内投与し、その後 2 週間の休薬期間を設けた〔表 2.6.7.7E (モジュール 2.6.7) 及び報告書 5002034、表 2.6.7.7F (モジュール 2.6.7) 及び報告書 5002158〕。

SM-102 含有 LNP で製剤化された mRNA ベースのワクチンの GLP 毒性試験から得られた一連のラット反復投与毒性プロファイルは、8.9~150 µg/回の用量で 2 週間に 1 回、最長 6 週間の筋肉内投与により得られている。投与したすべての用量で忍容性が認められた。8.9 µg/回以上の用量で認められた被験物質投与に関連した所見は、投与部位の回復性のある紅斑及び浮腫、並びに一過性の体温上昇 (投与 6 時間後にみられ、投与 24 時間後にはベースライン値に回復) であった。

8.9 µg/回以上の用量で、被験物質投与に関連した用量依存的な臨床病理学的変化が観察された。血液学的検査では、白血球、好中球及び好酸球の増加並びにリンパ球減少が、凝固系検査では、フィブリノゲン及び活性化部分トロンボプラスチン時間の増加が、血液生化学的検査では、アルブミンの減少及びグロブリンの増加とそれに伴うアルブミン/グロブリン比の低下がみられている。臨床病理学的変化は 2 週間の休薬期間終了までに概ね回復又は回復傾向を示した。また、8.9 µg/回以上の用量で、投与 6 時間後に IP-10、MCP-1、MIP-1-α を含む、被験物質投与に関連した一過性のサイトカインの増加が観察され、このサイトカインの変化は 2 週間の休薬期間終了までに概ね回復傾向を示した。

8.9 µg/回以上の用量で、剖検時に被験物質投与に関連した用量依存的な器官重量の変化並びに剖検及び病理組織学的所見が観察された。器官重量の増加は、脾臓、肝臓及び副腎で観察され、これらの器官重量の変化は 2 週間の休薬期間終了まで概ね回復傾向を示した。剖検所見として投与部位の肥厚及びリンパ節の腫大が認められ、投与部位の変化は 2 週間の休薬期間終了までに完全に回復し、リンパ節の変化は回復傾向を示した。病理組織学的所見として、投与部位の混合細胞型炎症、鼠径部、腸骨及び膝窩リンパ節における細胞充実性及び周囲組織の混合細胞型炎症の増加、脾臓の細動脈周囲リンパ鞘における細胞充実性の低下、骨髄における骨髄細胞充実性の増加、並びに肝臓の肝細胞空胞化及びクッパー細胞肥大がみられ、これら病理組織学的変化は 2 週間の休薬期間終了までに概ね回復傾向を示した。

2.4.4.2 遺伝毒性試験

mRNA-1273 に用いられている新規脂質の SM-102 及び PEG2000-DMG の遺伝毒性は、ICH S2 (R1) の標準的な方法[27]を用いて、*S. typhimurium* (ネズミチフス菌) 及び *E. coli* (大腸菌) を用いた GLP 適用 in vitro 細菌復帰突然変異 (Ames) 試験〔表 2.6.7.8A (モジュール 2.6.7) 及び報告書 9601567、表 2.6.7.8B (モジュール 2.6.7) 及び報告書 9601035〕並びにヒト末梢血リンパ球を用いた GLP 適用 in vitro 小核試験〔表 2.6.7.8C (モジュール 2.6.7) 及び報告書 9601568、表 2.6.7.8D (モジュール 2.6.7) 及び報告書 9601036〕で評価した。

また、LNP の in vivo での遺伝毒性リスクを、SM-102 含有 LNP で製剤化した mRNA ワクチン〔表 2.6.7.9A (モジュール 2.6.7) 及び報告書 9800399〕を用いた GLP 適用 in vivo ラット小核試験、及び SM-102 LNP で製剤化したレポーター mRNA (NPI ルシフェラーゼ mRNA)

を用いた GLP 非適用 in vivo ラット小核試験〔表 2.6.7.9B (モジュール 2.6.7) 及び報告書 AF87FU.125012NGLPICH.BTL〕で評価した。

SM-102 及び PEG2000-DMG の遺伝毒性評価において、それぞれの脂質は細菌を用いた変異原性アッセイ及びヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常アッセイにおいて遺伝毒性を示さなかった。また、SM-102 含有 LNP で製剤化された mRNA ベースのワクチンを用いて、静脈内投与による 2 つの in vivo 小核アッセイを実施した。報告書 AF87FU.125012NGLPICH.BTL では、3.21 mg/kg までの NPI ルシフェラーゼ mRNA/SM-102 は陰性であったが、報告書 9800399 では、雄の 1.3 mg/kg mRNA-1706、雌の 2.6 mg/kg mRNA-1706 で陽性であった。この一貫性のみられない結果は、高用量の静脈内投与による LNP 誘発性の全身性の炎症により誘発されたサイトカインの増加あるいは体温上昇に伴う二次的な小核形成によるものと考えられる。ヒトへの筋肉内投与後の全身曝露量はわずかで、曝露期間は限定的であること、また、in vitro 試験の結果が陰性であったことから、ヒトに対する遺伝毒性リスクは低いと考えられる。

2.4.4.3 生殖発生毒性試験

雌 Sprague Dawley ラットを用いた GLP 生殖毒性試験において、mRNA-1273 を 100 µg/回の用量で Day 1 及び 15 (それぞれ交配前 28 日及び 14 日) 並びに妊娠日 (GD) 1 及び 13 に筋肉内投与し、その受胎能及び授乳中の生殖能及び出生前/後の発生に対する mRNA-1273 の影響を評価した〔2.6.6.6.3 項 (モジュール 2.6.6)、表 2.6.7.14A (モジュール 2.6.7) 及び報告書 20248897〕。その結果、母動物、胎児及び出生児に対する有害作用は認められなかった。mRNA-1273 に関連した毒性ではない影響として、骨格変異である肋骨結節及び波状肋骨を認める胎児数の増加がみられたが、出生児の生存率や成長及び発生に対する影響は認められなかった。また、mRNA-1273 の 4 回投与により十分な IgG 反応が観察され、抗体価は GD 13 にピークを示し、分娩時 (GD 21) にプラトーになり、授乳日 (LD) 21 まで一定のレベルで推移した。母体から胎児あるいは母体から出生児への抗体の移行が認められた。

2.4.4.4 その他の毒性試験

Sprague Dawley ラットを用いた GLP 非適用試験において、mRNA-1273 を 30、60 及び 100 µg/回の用量で Day 1 及び Day 22 に筋肉内投与し、その免疫原性反応及び潜在的な毒性を評価した〔2.6.2.2.7 項 (モジュール 2.6.2)、表 2.6.7.17 (モジュール 2.6.7) 及び報告書 2308-123〕。

SARS-CoV-2 S-2P に対する強力な免疫原性反応が Day 35 に観察され、すべての用量で IgG 抗体価の測定値は 10^6 を上回った。体重に影響なく、すべての用量で、後肢障害を伴う/伴わない用量依存的な投与部位の浮腫が限定的かつ一過性に認められた。臨床病理所見の一部は 30 µg/回以上でみられた炎症に関連した変化であった。観察された変化は、概ね、SM-102 含有 LNP で製剤化された他の mRNA ベースのワクチンを用いて実施した過去の GLP ラット毒性試験の結果と一致していた。

2.4.4.5 非臨床毒性試験における安全域についての要約

mRNA-1273 の第 3 相臨床試験では、100 µg/回のヒト用量は安全かつ SARS-CoV-2 感染に対する防御免疫を示すことが予想される。

ラットを用いた反復投与毒性試験では、100 µg/回までの用量で mRNA-1273 を Day 1 及び Day 22 に投与し、150 µg/回までの用量で mRNA-1706、mRNA-1653、又は mRNA-1893 を 2 週間に 1 回、1 ヶ月間投与し（3 回）、あるいは 96 µg/回までの用量で mRNA-1647 及び mRNA-1443 を 2 週間に 1 回、6 週間投与したところ（4 回）、投与した mRNA/LNP ワクチンは忍容性良好であった。また、mRNA-1273 を 100 µg/回の用量で 2 週間に 1 回、6 週間（4 回）投与した Sprague Dawley ラットを用いた生殖毒性試験において、母動物及び出生児に毒性所見はみられなかった。典型的なワクチンに関連した所見として、体温及び脾臓重量の増加、炎症を示唆するサイトカインプロファイルの変化並びにワクチン投与部位の反応が認められ、いずれの所見も回復性を示した。また、ラットを用いた毒性試験、又はマウス（若齢及び高齢）、ラット、ハムスター及び NHP を用いた免疫原性試験でも、過剰な免疫反応は観察されなかった。

体重 0.30 kg のラットにおいて mRNA-1273 の 100 µg/回で忍容性が示され、この用量は、体重 60.0 kg のヒト被験者への投与量と比体重で比較した場合、200 倍の安全域がある。なお、第 3 相臨床試験における mRNA-1273 ワクチンの有効性及び安全性プロファイルが、ヒトに対する承認用量の最終的な決定因子となる。

2.4.5 総括及び結論

SARS-CoV-2 に対する mRNA-1273 の開発を支持する非臨床試験として、mRNA-1273 又は SM-102 含有 LNP を用いた mRNA ベースのプラットフォームで開発した様々な抗原をコードするその他の mRNA ワクチンを用いて、非臨床薬理試験、生体内分布試験及び毒性試験を実施した。

本申請に示した非臨床試験プログラムのデータは、mRNA-1273 を 100 µg までの用量で 28 日間の間隔をあけて筋肉内投与したときの臨床的有效性及び安全性を裏付けている。

- ・ mRNA にコードされた SARS-CoV-2 S-2P 抗原の発現は、in vitro 及び in vivo において確認された。mRNA を 0.003125～0.2 µg の量で導入した HEK293T 細胞において、SARS-CoV-2 S 蛋白の RBD 又は NTD エピトープを認識するモノクローナル抗体により検出される SARS-CoV-2 S-2P 抗原の発現がみられた。これらエピトープの発現は、2 又は 10 µg の mRNA-1273 を接種した BALB/c マウスの脾臓及び流入領域リンパ節の免疫細胞（cDCs 及び pDCs）において同様に確認された。
- ・ mRNA-1273 の非臨床薬理試験は若齢及び高齢マウス、ラット、ハムスター並びに NHP で実施した。これらの試験において、mRNA-1273 の忍容性、免疫原性、高レベルの SARS-CoV-2 特異的な抗体産生及び T 細胞の反応が確認された。ウイルスチャレンジ試験では、初期感作のみ又は初期感作／追加免疫により 1 µg/回以上をマウス及びハムスターに接種、並びに初期感作／追加免疫により 30 µg/回以上を NHP に接種することで、mRNA-1273 はウイルスチャレンジから完全に防御した。また、これらの非臨床モデルでは、部分的防御用量を含むいずれの用量においてもワクチン関連 ERD を誘導しなかった。
- ・ LNP で製剤化された mRNA ベースのワクチンの生体内分布は、LNP の特性によると予測される。したがって、類似の LNP に含まれる mRNA（例えば mRNA-1273 及び mRNA-1647）は同様に分布すると予想され、mRNA-1647 の生体内分布試験は mRNA-1273 の臨床開発を支持すると考えられる。本試験では、mRNA が筋肉（接種部位）、近

位の膝窩リンパ節及び遠位の腋窩リンパ節及び脾臓以外の組織では1～3日に消失した。筋肉、リンパ節及び脾臓における mRNA-1647 の6つの mRNA の平均 $T_{1/2}$ 値は14.9～63.0時間であった。

- ・ラットに8.9～150 µg/回の用量で2週間に1回、最長6週間筋肉内投与した一連の同一プラットフォームを用いた mRNA ワクチンの GLP 反復投与毒性試験では、異なる抗原をコードする mRNA にも関わらず、その毒性プロファイルは類似していた。したがって、Moderna TX 社は、類似の LNP で製剤化された mRNA ワクチンに関連する毒性は、mRNA がコードする抗原の生物学的活性の影響はより小さく、主に LNP の組成によるものであると考えている。一連のラットの GLP 反復投与毒性試験のデータ及び mRNA-1273 の非 GLP 反復毒性試験の結果は、mRNA-1273 の臨床開発を支持するものと考えられる。
- ・Sprague Dawley ラットに mRNA-1273 の100 µg を交配前28日及び14日並びに GD 1 及び13に4回筋肉内投与した GLP 生殖発生毒性試験では、毒性ではない骨格変異として肋骨結節及び波状肋骨を認める胎児数の軽度な増加がみられたが、母動物、胎児及び出生児に対する有害作用はみられなかった。また、SARS-CoV-2 S-2P 抗体が母動物から胎児へ、また母動物から出生児へ移行することが示された。

全体として、これらの非臨床試験から、mRNA-1273 が安全で忍容性が良好であること、免疫原性が認められること、ウイルスチャレンジから動物を完全に防御すること、並びに至適用量及び至適用量未満のいずれにおいても ERD を促進しないことが示されている。

2.4.6 参考文献一覧

- [1] World Health Organization (WHO). Weekly Operational Update on COVID-19 - 13 November 2020 [Internet]. Geneva, Switzerland: WHO; 2020a Nov 13 [cited 16 Nov 2020]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-operational-update-on-covid-19---13-november-2020>. (添付なし)
- [2] Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). Seattle, WA: IHME, University of Washington, 2020; [cited 15 Nov 2020]. Available from: <http://covid19.healthdata.org/global?view=total-deaths&tab=trend>. (添付なし)
- [3] Corti D, Zhao J, Pedotti M, Simonelli L, Agnihothram S, Fett C, et al. Prophylactic and postexposure efficacy of a potent human monoclonal antibody against MERS coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(33):10473-8.
- [4] Wang L, Shi W, Joyce MG, Modjarrad K, Zhang Y, Leung K, et al. Evaluation of candidate vaccine approaches for MERS-CoV. *Nat Commun*. 2015;6:7712.
- [5] Yu X, Zhang S, Jiang L, Cui Y, Li D, Wang D, et al. Structural basis for the neutralization of MERS-CoV by a human monoclonal antibody MERS-27. *Sci Rep*. 2015;5:13133.
- [6] Johnson RF, Bagci U, Keith L, Tang X, Mollura DJ, Zeitlin L, et al. 3B11-N, a monoclonal antibody against MERS-CoV, reduces lung pathology in rhesus monkeys following intratracheal inoculation of MERS-CoV Jordan-n3/2012. *Virology*. 2016;490:49-58.

- [7] Chen Y, Lu S, Jia H, Deng Y, Zhou J, Huang B, et al. A novel neutralizing monoclonal antibody targeting the N-terminal domain of the MERS-CoV spike protein. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(5):e37.
- [8] Wang L, Shi W, Chappell JD, Joyce MG, Zhang Y, Kanekiyo M, et al. Importance of neutralizing monoclonal antibodies targeting multiple antigenic sites on the Middle East respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein to avoid neutralization escape. *J Virol.* 2018;92(10):e02002-17.
- [9] Kim Y, Lee H, Park K, Park S, Lim J-H, So MK, et al. Selection and characterization of monoclonal antibodies targeting Middle East respiratory syndrome coronavirus through a human synthetic Fab phage display library panning. *Antibodies (Basel).* 2019;8(3):42.
- [10] Widjaja I, Wang C, van Haperen R, Gutiérrez-Álvarez J, van Dieren B, Okba NM, et al. Towards a solution to MERS: protective human monoclonal antibodies targeting different domains and functions of the MERS-coronavirus spike glycoprotein. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):516-30.
- [11] Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C-L, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020;367(6483):1260-3.
- [12] Corbett KS, Edwards D, Leist SR, Abiona OM, Boyoglu-Barnum S, Gillespie RA, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature.* 2020a;586(7830):567-71.
- [13] Corbett KS, Flynn B, Foulds KE, Francica JR, Boyoglu-Barnum S, Werner AP, et al. Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates. *N Engl J Med.* 2020b;383(16):1544-55.
- [14] Graham SP, McLean RK, Spencer AJ, Belij-Rammerstorfer S, Wright D, Ulaszewska M, et al. Evaluation of the immunogenicity of prime-boost vaccination with the replication-deficient viral vectored COVID-19 vaccine candidate ChAdOx1 nCoV-19. *NPJ Vaccines.* 2020;5:69.
- [15] Mercado NB, Zahn R, Wegmann F, Loos C, Chandrashekar A, Yu J, et al. Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature.* 2020;586(7830):583-8.
- [16] Tian JH, Patel N, Haupt R, Zhou H, Weston S, Hammond H, et al. SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. *Nat Commun.* 2021;12(1):372.
- [17] Tostanoski LH, Wegmann F, Martinot AJ, Loos C, McMahan K, Mercado NB, et al. Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 severe clinical disease in hamsters. *Nat Med.* 2020;26(11):1694-700.
- [18] Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol.* 1969;89(4):422-34.
- [19] Polack FP. Atypical measles and enhanced respiratory syncytial virus disease (ERD) made simple. *Pediatr Res.* 2007;62(1):111-5.
- [20] Czub M, Weingartl H, Czub S, He R, Cao J. Evaluation of modified vaccinia virus Ankara based recombinant SARS vaccine in ferrets. *Vaccine.* 2005;23(17-18):2273-9.

- [21] Deming D, Sheahan T, Heise M, Yount B, Davis N, Sims A, et al. Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-CoV bearing epidemic and zoonotic spike variants. *PLoS Med.* 2006;3(12):e525. Correction in: *PLoS Med.* 2007;4(2):e80.
- [22] Bolles M, Deming D, Long K, Agnihothram S, Whitmore A, Ferris M, et al. A double inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. *J Virol.* 2011;85(23):12201-15.
- [23] Dinno KH III, Leist SR, Schäfer A, Edwards CE, Martinez DR, Montgomery SA, et al. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. *Nature.* 2020;586(7830):560-6.
- [24] Chan JF, Zhang AJ, Yuan S, Poon VK, Chan CC, Lee AC, et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin Infect Dis.* 2020;71(9):2428-46.
- [25] Lu S, Zhao Y, Yu W, Yang Y, Gao J, Wang J, et al. Comparison of nonhuman primates identified the suitable model for COVID-19. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):157.
- [26] Johansen MD, Irving A, Montagutelli X, Tate MD, Rudloff I, Nold MF, et al. Animal and translational models of SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Mucosal Immunol.* 2020;13(6):877-91.
- [27] International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use: S2(R1). 09 November 2011 [cited 2019 Apr 16] [29 screens]. Available from: <https://database.ich.org/sites/default/files/S2%28R1%29%20Guideline.pdf>. (添付なし)