Malvern Panalytical
a spectris company

DKSH

Liệu pháp gen và vectơ đưa vắc xin trong cơ thể

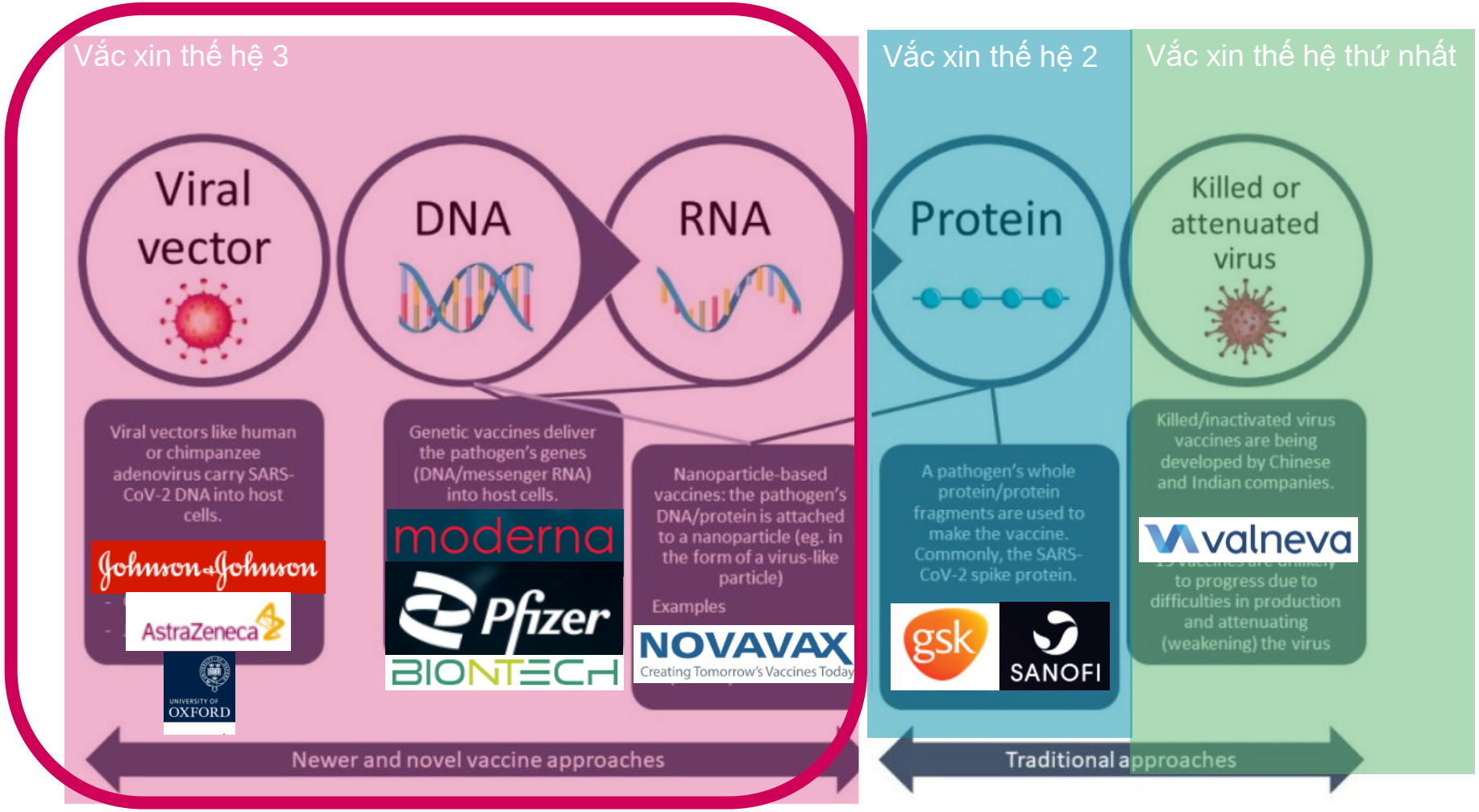
Dr Michael Caves

Các thế hệ của Vắc xin

Phân loại như thế nào ?

Malvern Panalytical
a spectris company

Kháng nguyên:



© 2022 Malvern Panalytical

COVID-19 vaccine platforms - The Melbourne Vaccine Education Centre (MVEC) (mcri.edu.au)

Đặc điểm cụ thể của Liệu pháp gen và vắc xin thế hệ thứ 3

Mục tiêu là hệ gen

- Tải 'kháng nguyên' trên các hạt nano
- Phương thức hoạt động phức tạp - cơ chế xâm nhập tế bào không hoàn toàn rõ ràng
- mRNA rất đắt
- Kiến thức hạn chế về sự ổn định của phân tử
- Yêu cầu quy định về liposome

- Khi các quy trình được phát triển để giải quyết những chi tiết những vấn đề cụ thể này, **vắc xin nano có thể được sản xuất hàng loạt với chất lượng ổn định và nhất quán cao**.

© 2022 Malvern Panalytical

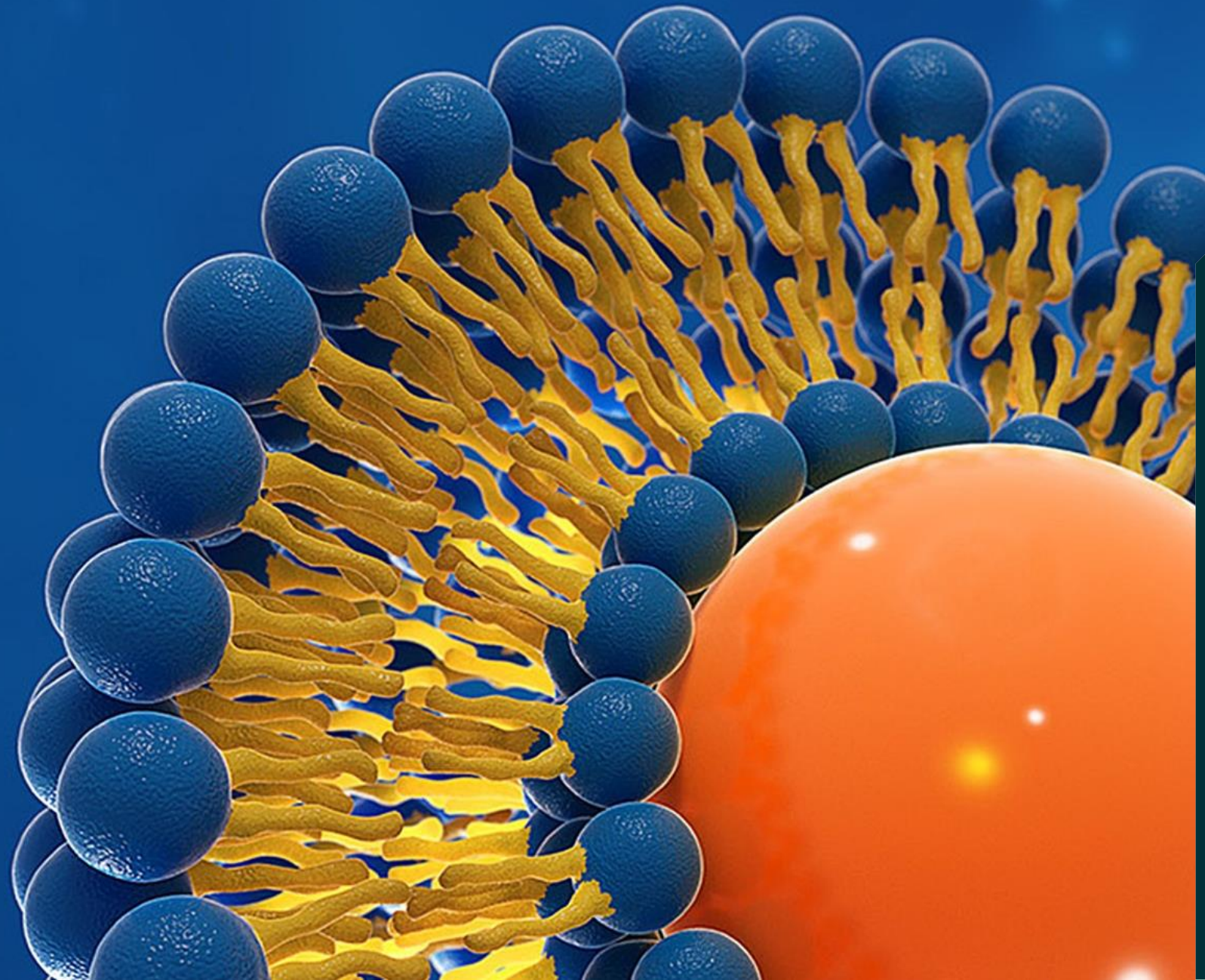
Những giải pháp của Malvern Panalytical giúp tăng giá trị cho liệu pháp gen / phát triển vắc xin

Malvern Panalytical
a spectris company

Tối ưu hóa hiệu quả sản phẩm, thời hạn sử dụng và thời gian đưa ra thị trường

- **Zetasizer Ultra** – Để xác định nồng độ hiệu giá vỏ bọc AAV (adeno associated Virus) Virus kết hợp Adeno.
- **NanoSight NS300** – Đối với kích thước và nồng độ của vi rút và hạt nano lớn hơn.
- **PEAQ DSC** – Để kiểm tra độ ổn định nhiệt của các mẫu vi rút.
- **OMNISEC** – Đối với các phép đo SEC-MALS và xác định AAV rỗng / đầy đủ.

© 2022 Malvern Panalytical



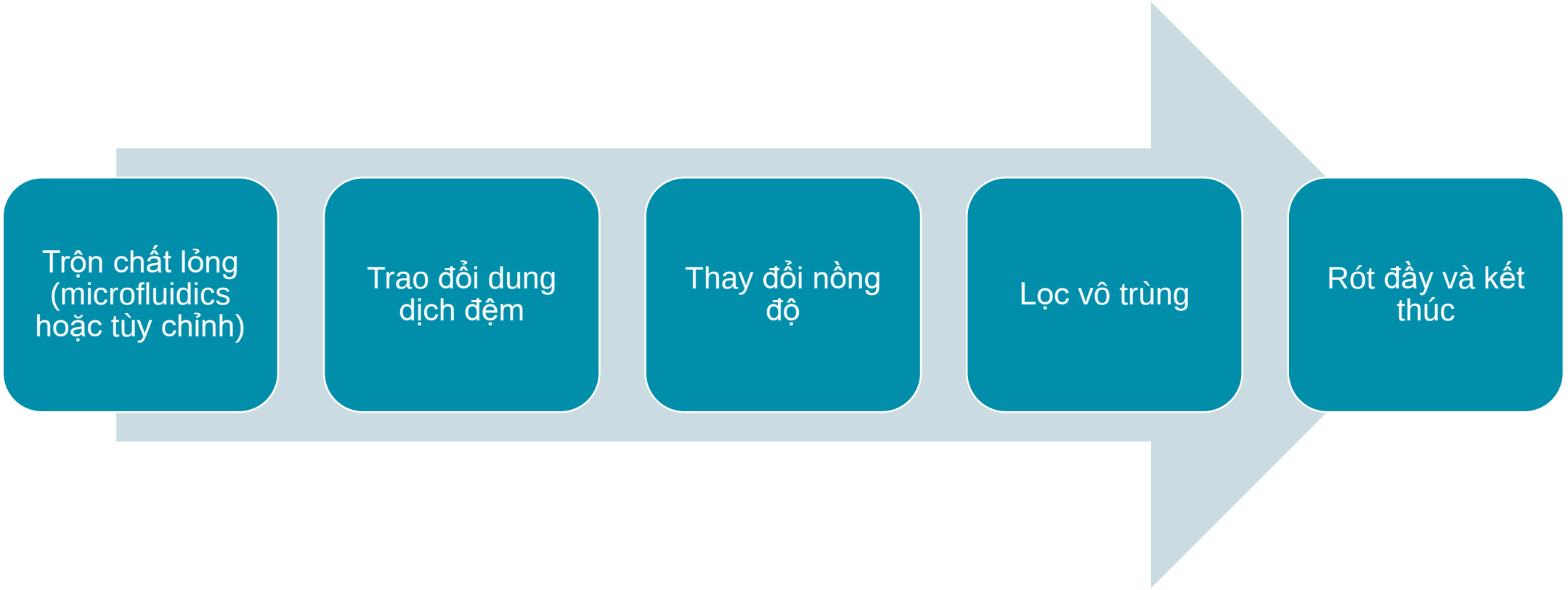
Lipid NanoParticles (LNPs)
Hạt nano Lipid

Malvern Panalytical
a spectris company

Quy trình mRNA-LNP

Các bước chung được thực hiện trong quy trình phụ thuộc vào nồng độ thành phần, tỷ lệ trộn, tốc độ dòng chảy, v.v..

Thanh lọc và tối ưu hóa liều lượng



© 2022 Malvern Panalytical

Đặc tính chất lượng sản phẩm

Các kỹ thuật phân tích được áp dụng

Liposome Drug Products

Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation

Guidance for Industry

U.S. Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)

April 2018
Pharmaceutical Quality/CMC

Table 3
Assays to determine and monitor mRNA drug substance and mRNA-LNP drug product quality attributes and stability.[1)]

Assay[2)]	Attribute
Characterizing DNA templates and RNA transcripts	
DNA template sequencing/mRNA sequencing	Identification of mRNA
UV spectroscopy (A260 nm, A260/A280, A260/A230)	Quantification - purity dependent
Fluorescence-based assays (e.g., residual DNA)	Quantification – purity dependent
Agarose/acrylamide electrophoresis	Molecular mass, RNA integrity and quantification
Reverse transcriptase qPCR	Identification and quantification of mRNA
Western blot for dsRNA	Quality assessment
mRNA capping analysis	Quality assessment
mRNA polyadenylated tail analysis	Quality assessment
Chromatographic assays: RP-HPLC, SE-HPLC, IP-HPLC and IEX-HPLC	Quantity and quality assessment
Characterizing mRNA-encoded translation products	
In vitro translation - cell free medium	Translation into target protein
Messenger RNA evaluation using various cell-based systems	Translation product analysis and potential toxicity assay
Characterizing mRNA-lipid complexes	
DLS	Particle size (distribution)
Laser Doppler electrophoresis	Zeta potential
NTA/TRPS	Particle size (distribution)
SE-HPLC(-MALS)	Particle size distribution; assessing bound/unbound mRNA
Microscopy (cryo TEM, ESEM, AFM)	Nanoparticle morphology, particle size (distribution)
Gel or capillary electrophoresis	Assessing bound/unbound mRNA and surface charge
Chromatographic assays: RP-HPLC, SE-HPLC, IP-HPLC and IEX-HPLC / mass spectrometry	Quantification and integrity of lipids and/or mRNA; for some: assessing bound/unbound mRNA and molar mass
Fluorescent dyes	Encapsulation efficiency
General pharmaceutical tests	
	Appearance, pH, osmolality, endotoxin concentration, sterility

[1)] Adapted from Poveda et al, 2019; Muralidhara et al., 2016; Fan et al., 2021;

Malvern Panalytical
a spectris company

International Journal of Pharmaceutics 601 (2021) 120586

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Review

mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability

Linde Schoenmaker [a], Dominik Witzigmann [b,c], Jayesh A. Kulkarni [b,c], Rein Verbeke [d], Gideon Kersten [a,e], Wim Jiskoot [a,*], Daan J.A. Crommelin [f,*]

[a] Division of BioTherapeutics, Leiden Academic Centre for Drug Research, Leiden University, 2300 RA Leiden, the Netherlands
[b] Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, 2350 Health Sciences Mall, Vancouver, BC V6T 1Z3, Canada
[c] NanoMedicines Innovation Network (NMIN), University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada
[d] Ghent Research Group on Nanomedicines, Faculty of Pharmacy, Ghent University, Ottergemsesteenweg 460, 9000 Ghent, Belgium
[e] Cevolis Pharma, Fraunhoferstrasse 18b, 82152 Martinsried, Germany
[f] Department of Pharmaceutics, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences (UIPS), Faculty of Science, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands

ARTICLE INFO

Keywords:
COVID-19
Lipid nanoparticle (LNP)
Lyophilisation
mRNA
Shelf life
Storage stability
Structure
Vaccine

ABSTRACT

A drawback of the current mRNA-lipid nanoparticle (LNP) COVID-19 vaccines is that they have to be stored at (ultra)low temperatures. Understanding the root cause of the instability of these vaccines may help to rationally improve mRNA-LNP product stability and thereby ease the temperature conditions for storage. In this review we discuss proposed structures of mRNA-LNPs, factors that impact mRNA-LNP stability and strategies to optimize mRNA-LNP product stability. Analysis of mRNA-LNP structures reveals that mRNA, the ionizable cationic lipid and water are present in the LNP core. The neutral helper lipids are mainly positioned in the outer, encapsulating, wall. mRNA hydrolysis is the determining factor for mRNA-LNP instability. It is currently unclear how water in the LNP core interacts with the mRNA and to what extent the degradation prone sites of mRNA are protected through a coat of ionizable cationic lipids. To improve the stability of mRNA-LNP vaccines, optimization of the mRNA nucleotide composition should be prioritized. Secondly, a better understanding of the milieu the mRNA is exposed to in the core of LNPs may help to rationalize adjustments to the LNP structure to preserve mRNA integrity. Moreover, drying techniques, such as lyophilization, are promising options still to be explored.

1. Introduction

Of the many COVID-19 vaccines under development, the two vaccines that have shown the most promising results in preventing COVID-19 infection represent a new class of vaccine products: they are composed of messenger ribonucleic acid (mRNA) strands encapsulated in lipid nanoparticles (LNPs). The efficacy of these mRNA vaccines developed by BioNTech/Pfizer and Moderna is about 95% (Baden et al., 2021; Polack et al., 2020) and they were the first mRNA vaccines to receive 'emergency use authorization' (by FDA) and 'conditional approval' by EMA. These mRNA COVID-19 vaccines encode the viral Spike (S) glycoprotein of SARS-CoV-2 that includes two proline substitutions (K986P and V987P mutations), in order to stabilize the prefusion conformation of the glycoprotein (Wrapp et al., 2020). Upon intramuscular (IM) administration, the LNP system enables the uptake by host cells and the delivery of mRNA inside the cytosol, where the translation of the mRNA sequence into the S protein occurs in the ribosomes. After post-translation processing by the host cells, the S protein is presented as a membrane-bound antigen in its prefusion conformation at the cellular surface, providing the antigen target for B cells. In addition, part of the temporally produced Spike proteins enter antigen presentation pathways, providing antigen recognition by T cells via MHC presentation of T-cell epitopes (Verbeke et al., 2021). The EMA assessment report formulates the mechanism of action of mRNA vaccines at the injection site as follows: 'Administration of LNP-formulated RNA vaccines IM results in transient local inflammation that drives recruitment of neutrophils and antigen presenting cells (APCs) to the site of delivery. Recruited APCs are capable of LNP uptake and protein expression and can subsequently migrate to the local draining lymph nodes where T cell priming occurs (EMA, 2020a).' Because of this inherent innate immune activity, it is not necessary to formulate the mRNA vaccines with additional adjuvants. Interestingly, Pfizer/

* Corresponding authors at: Division of BioTherapeutics, Leiden Academic Centre for Drug Research, Leiden University, Einsteinweg 55, 2333 CC Leiden, the Netherlands (W. Jiskoot). Department of Pharmaceutics, Faculty of Science, Utrecht University, Universiteitsweg 99, 3584 CG Utrecht, the Netherlands (D. Crommelin).
E-mail addresses: w.jiskoot@lacdr.leidenuniv.nl (W. Jiskoot), d.j.a.crommelin@uu.nl (D.J.A. Crommelin).

https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586
Received 24 March 2021; Received in revised form 5 April 2021; Accepted 6 April 2021
Available online 9 April 2021
0378-5173/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

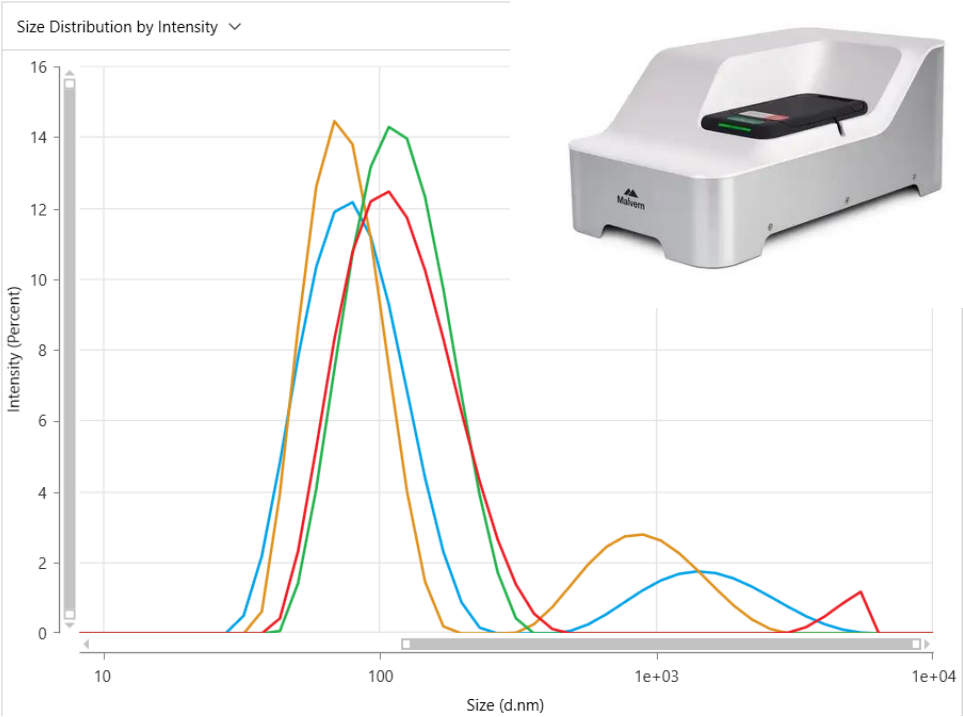
Truy cập tự do

© 2022 Malvern Panalytical

Công cụ để phân biệt giữa các công thức

Các lipid có thể ion hóa khác nhau ảnh hưởng như thế nào đến sự hình thành LNP?

CQA chính: Kích thước và phân bố kích thước (Z-Average và PDI)



DLS (NIBS) nồng độ chuẩn mRNA-LNPs trong PBS

LNP1_1,**LNP1_2**, **LNP2_1**, **LNP2_2**

Mẫu	Số aliquots /bản sao	Z-average (nm)
LNP1	1/5	88 ± 2
LNP2	1/5	115 ± 9

LNP1 < LNP2

© 2022 Malvern Panalytical May 19, 2022

Công thức của LNPs

Đánh giá sự khác biệt về điện cực giữa các công thức

Drug Delivery

Malvern Panalytical
a spectris company

Mẫu	Thông số	Giá trị
LNP 1	**Thế Zeta (mV)**	**-19.7 ± 1**
	Độ dẫn điện (mS/cm)	16.7 ± 0.6
LNP 2	**Thế Zeta (mV)**	**-5.5 ± 2**
	Độ dẫn điện (mS/cm)	16 ± 0.2

Dung dịch đệm: 1x PBS pH7.4

LNP 1 tích điện âm nhiều hơn LNP 2 ở pH trung tính

Patented by MP

Phương pháp truyền thống~750 µL

Phương pháp Diffusion barrier fill ~20-50 µL

© 2022 Malvern Panalytical

Zetasizer Ultra – Giá trị mang lại

Tăng hiệu quả tối ưu hóa quy trình và mở rộng quy mô

- Trong một phép đo Zetasizer Ultra mang đến:
  - **Nồng độ / năng suất Capsid**(còn được gọi là số lượng capsid hoặc hiệu giá hạt virus)
  - **Kích thước Virus**
  - **Vón cục**
  - **Độ ổn định**

- Phép đo:

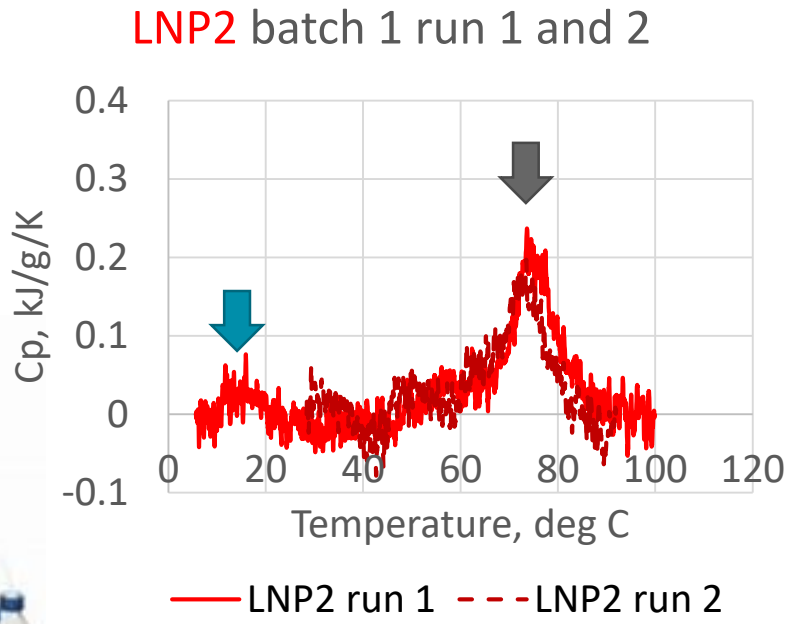
  - **Nhanh.** Thời gian đo chỉ từ 5-10 phút.
  - **Thể tích mẫu thấp.** Chỉ yêu cầu tổng thể tích mẫu là 20 micro lít.
  - **Không phá hủy mẫu.** Mẫu có thể được sử dụng lại cho các xét nghiệm khác.
  - **Có độ tái lập.** Kết quả nồng độ thường nằm trong khoảng độ lệch chuẩn 10-15%.

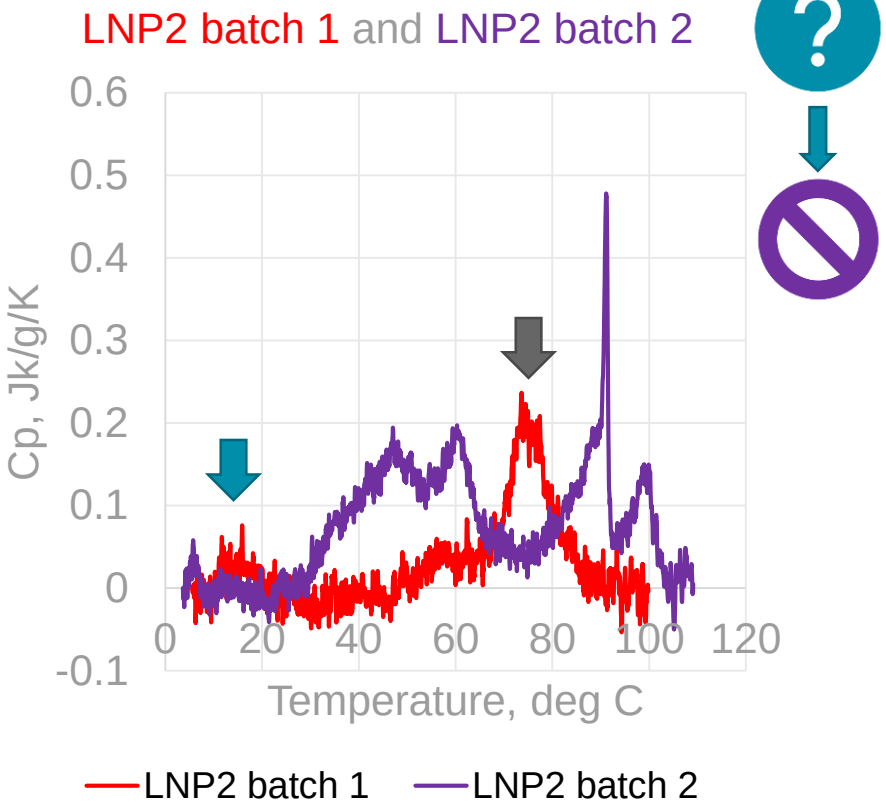
- Để đánh giá chất lượng nhanh chóng chất lượng của các mẫu vector virus.

© 2022 Malvern Panalytical

Thông tin cấu trúc bằng DSC

Tính nhất quán hàng loạt của HOS





- Sự khác biệt về định tính và định lượng được xác định giữa các cấu hình DSC của LNP2 lô 1 và lô 2
- LNP2 lô 2 dường như có cấu hình bộc lộ nhiệt phức tạp hơn.
- Thay đổi thành phần và tăng tính không đồng nhất về cấu trúc trong mẫu?

© 2022 Malvern Panalytical

Adeno-Associated Virus (AAV)

Virus kết hợp Adeno

Malvern Panalytical
a spectris company

3 Các phương pháp phân tích để nghiên cứu các đặc tính của AAV

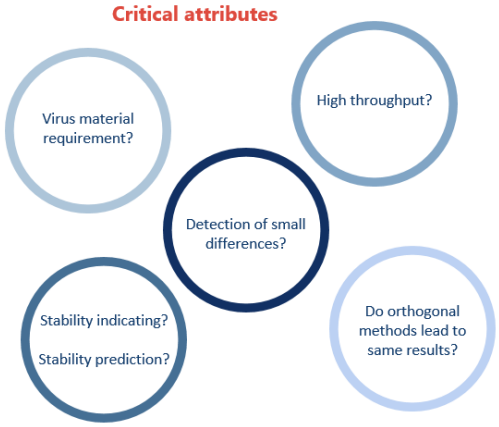
Malvern Panalytical
a spectris company

Tổng quan về các thuộc tính AAV và các phương pháp phân tích đã chọn đã được đánh giá:

Phân bố kích thước/ Khối lượng	Protein tháo xoắn	Nồng độ Capsid	Tải bộ gen
• SE-HPLC (-MALS) • DLS & MADLS • NTA & AUC	• DSC	• SEC-MALS • MADLS • ELISA	• SEC-MALS • AUC [1] • Combi: qPCR[2] + ELISA[2]

Malvern Panalytical
a spectris company

1/2/3 - Sử dụng một phần các cộng tác viên bên thứ 3



NON-CONFIDENTIAL © 2022 Malvern Panalytical

Quá trình phát triển và sản xuất vectơ virut

Nhiều đơn vị hoạt động và quá trình trung gian

Hiệu giá capsid của virut

Độ tinh sạch

Quy trình ngược dòng trong lò phản ứng sinh học Mở rộng tế bào, chuyển nạp và thu hoạch

Phân lập lysate / môi trường

Sắc ký. Bước 1

Sắc ký. Bước 2

TFF và lọc

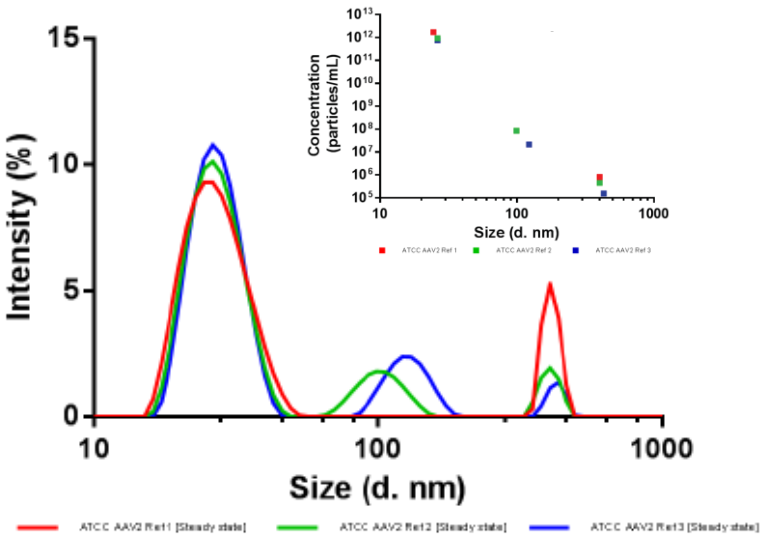
UF/DF lọc vô trùng

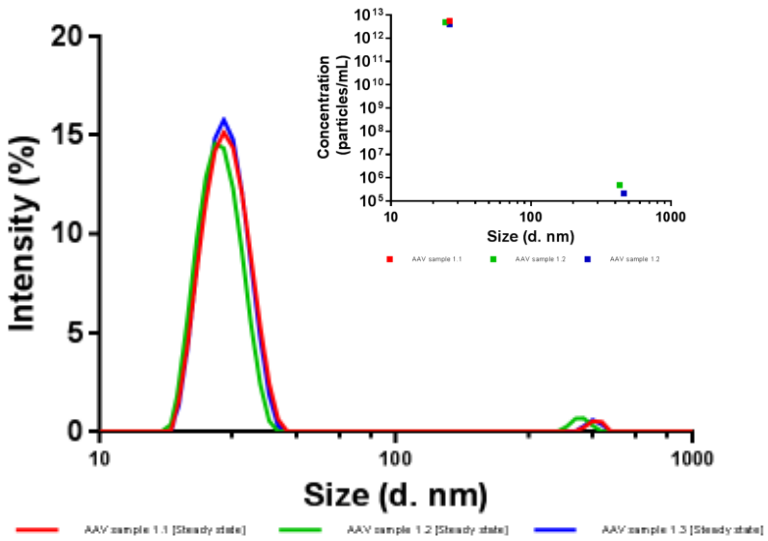
Các ứng suất liên quan đến quy trình: thay đổi pH, muối, môi trường, cắt, đông lạnh / rã đông. Nguy cơ phân hủy

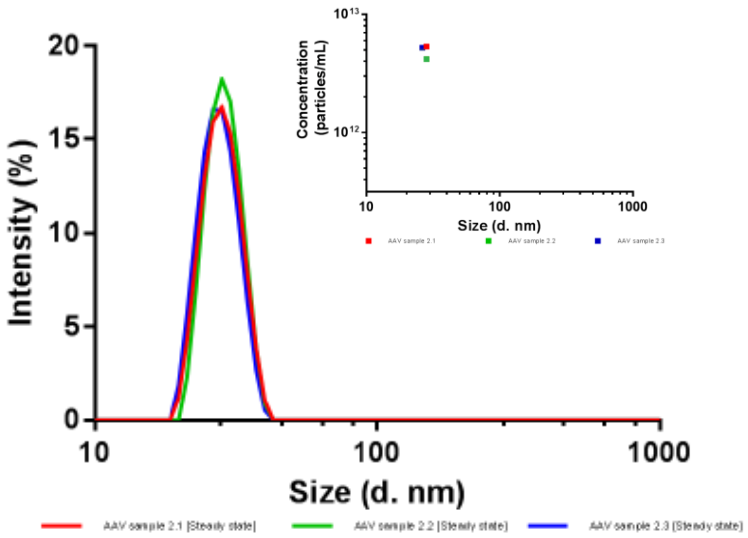
© 2022 Malvern Panalytical

Chỉ 5 phút phân tích về sản lượng và độ tinh khiết

Dữ liệu Allergan







https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/application-notes/AN180608AdenoVirusConcentrationMADLS.html

© 2022 Malvern Panaly

OMNISEC sắc ký loại trừ kích thước đa đầu dò

Công cụ mô tả đặc tính độ phân giải cao, linh hoạt

- Các thuộc tính chính có thể được đo lường bằng OMNISEC cho rA

Trọng lượng phân tử tuyệt đối (Mw) → **Tổng hợp, trạng thái oligomeric & Phân mảnh**; **Độ phân tán (Mw / Mn)** → **Độ ổn định cuả mẫu**; **Capsid/DNA Mw**

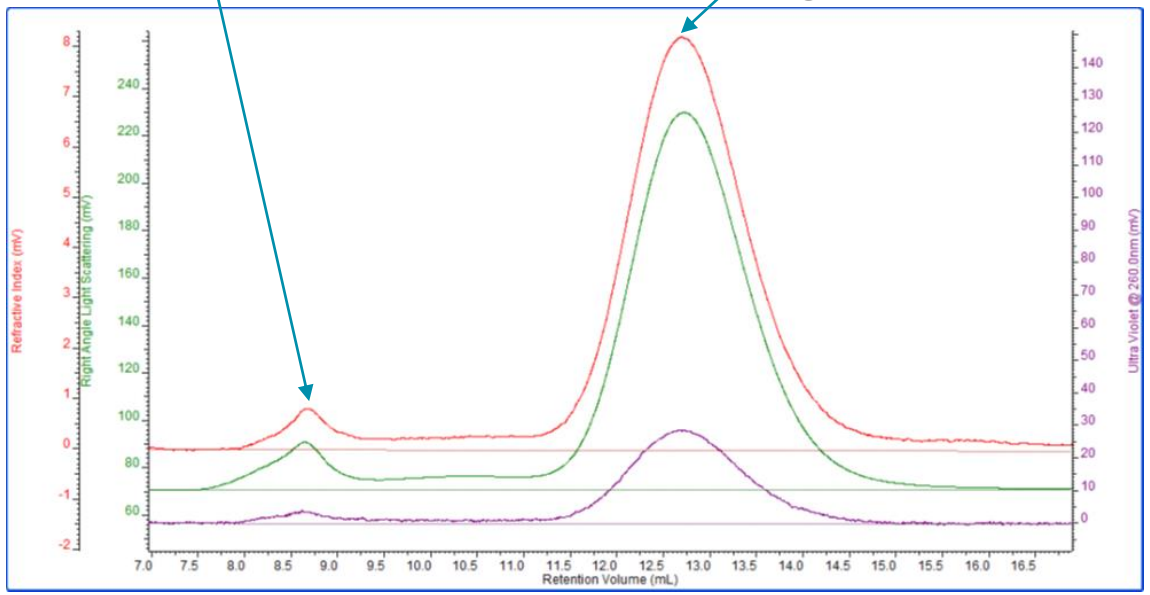
Nồng độ mẫu → **Phân tích thành phần** → **Hiệu giá Capsid**; **Độ tinh khiết**; **% Full rAAV**

© 2022 Malvern Panalytical

Tỉ lệ Filled/Empty

Đông tụ

Toàn bộ Monomer: hỗn hợp rỗng



- Full AAV% calculation assumes Full or empty virus

	Monomer	Aggregates
Mw (g/mol) total	4.49×10^6	9.74×10^6
Mw/Mn	1.00	1.215
Fraction protein (%)	86	-
Mw (g/mol) capsid	3.89×10^6	7.24×10^6
Mw (g/mol) ssDNA	6.13×10^5	2.49×10^6
Frac. of sample (%)	93.2	7.0
Full AAV %	78.1	-

Tổng Titre (đơn phân và đông tụ) = 7.48×10^{13} 3.9%RSD

Hình thành đông tụ | Hiệu giá Virut | Nồng độ phân mảng | Tỉ lệ Full/empty

© 2022 Malvern Panalytical

DSC là công cụ được thiết lập tốt để xác định đặc tính và phát triển các sản phẩm dựa trên vi rút

Malvern Panalytical
a spectris company

Các sản phẩm sinh học dựa trên vi rút được đặc trưng với DSC :

- Polio virus strains
- Rabies virus
- Influenza virus strains
- Papillomavirus
- AAV & Adenovirus
- Newcastle disease virus
- Norwalk virus
- Tobacco Mosaic virus

Bản đồ ổn định nhiệt

Đặc tính của cấu trúc thứ tự cao hơn

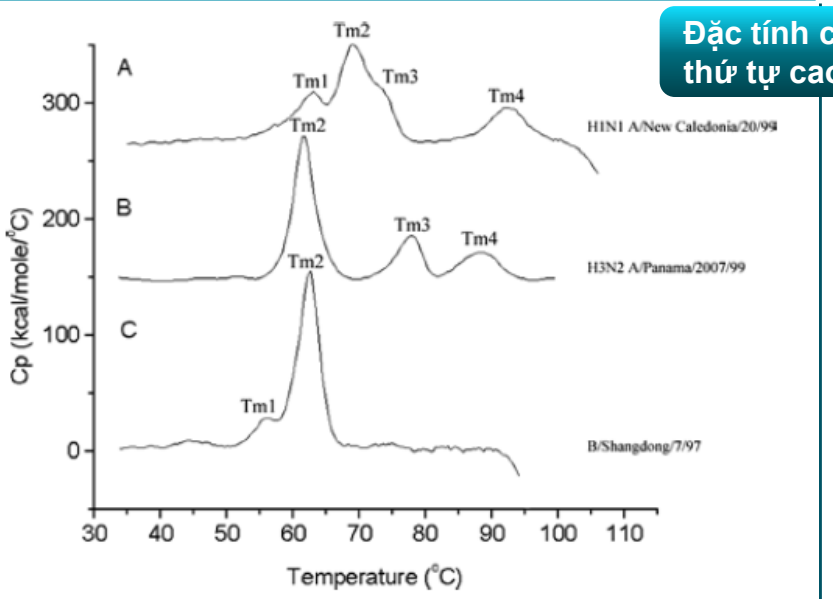


Figure 1 DSC thermograms of three different strains of active influenza virus

Tino Krel et al. Biotechnol. Appl. Biochem. (2005) ***41****, 241–246*

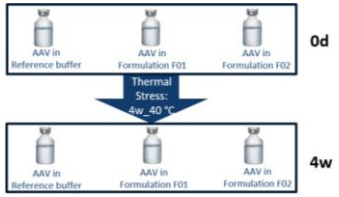
© 2022 Malvern Panalytical

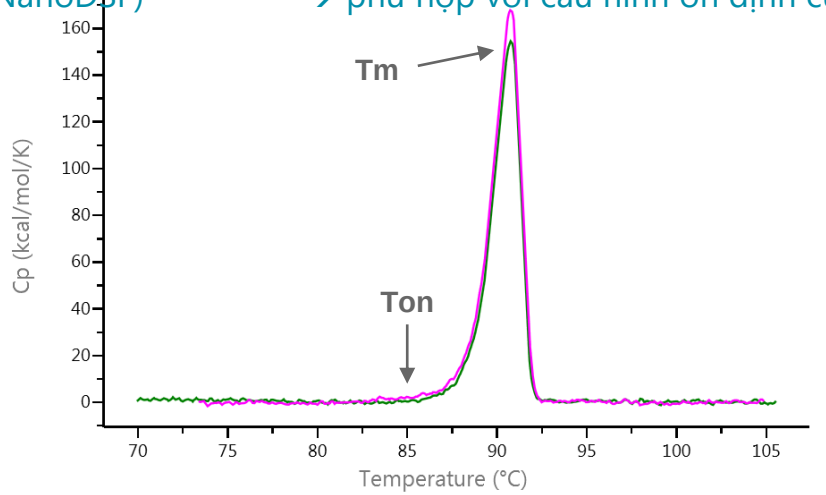
Phương pháp phân tích nghiên cứu sự tháo xoắn của protein capsid

Malvern Panalytical
a spectris company

DSC phù hợp như phương pháp dự đoán?

- T = 0d so với 4w: không phát hiện thấy tác động của ứng dụng ứng suất nhiệt đối với Tm & Ton của AAV-5 trong bất kỳ dung dịch đệm nào (được xác nhận bởi NanoDSF)
  → Không ổn định
- T = 0d: hiệu quả ổn định khác nhau của đệm trên AAV → Tm & Ton: với Ref = thấp nhất, với F01 cao nhất (được xác nhận bởi NanoDSF) → phù hợp với cấu hình ổn định của SE-HPLC của công thức ở t = 4w → tiềm năng dự đoán?





Đường cong nhiệt dung của AAV-5 trong dd đệm chuẩn trước (t = 0d, xanh lục) và sau (t = 4w, hồng) khi ứng dụng ứng suất nhiệt trong 4 tuần 40 ° C (n = 1).

Sample	Tm	
	0d	4w
AAV_Reference buffer	90.3	90.3
AAV_Formulation F01	90.9	90.8
AAV_Formulation F02	90.7	90.7

Sample	T_{ON}	
	0d	4w
AAV_Reference buffer	85.6	85.8
AAV_Formulation F01	86.9	86.6
AAV_Formulation F02	86.7	86.6

Kết quả DSC của AAV-5 trong dd đệm chuẩn, công thức F01 và F02 trước (t = 0d) và sau (t = 4w) ứng dụng ứng suất nhiệt trong 4 tuần 40 ° C; n = 1.

© 2022 Malvern Panalytical
NON-CONFIDENTIAL

Malvern Panalytical
a spectris company

Tổng kết

> 10 Tỷ liều vắc xin được tiêm trên toàn thế giới trong 14 tháng qua, 70% đã sử dụng LNP hoặc AAV

- Malvern Panalytical có vai trò quan trọng trong việc phát triển các đổi mới quy trình cần thiết để cung cấp đợt tiêm chủng lớn nhất trong lịch sử

  Đánh giá độ tinh khiết nhanh chóng
  Tối ưu hóa vectơ
  Đảm bảo chất lượng nhanh chóng và đáng tin cậy

- Tất cả hiện có sẵn dưới dạng dịch vụ thông qua phân tích hợp đồng Thương hiệu CLS của Malvern Panalytical - cung cấp kiến thức chuyên môn trong ngành kết hợp với công nghệ tiên tiến

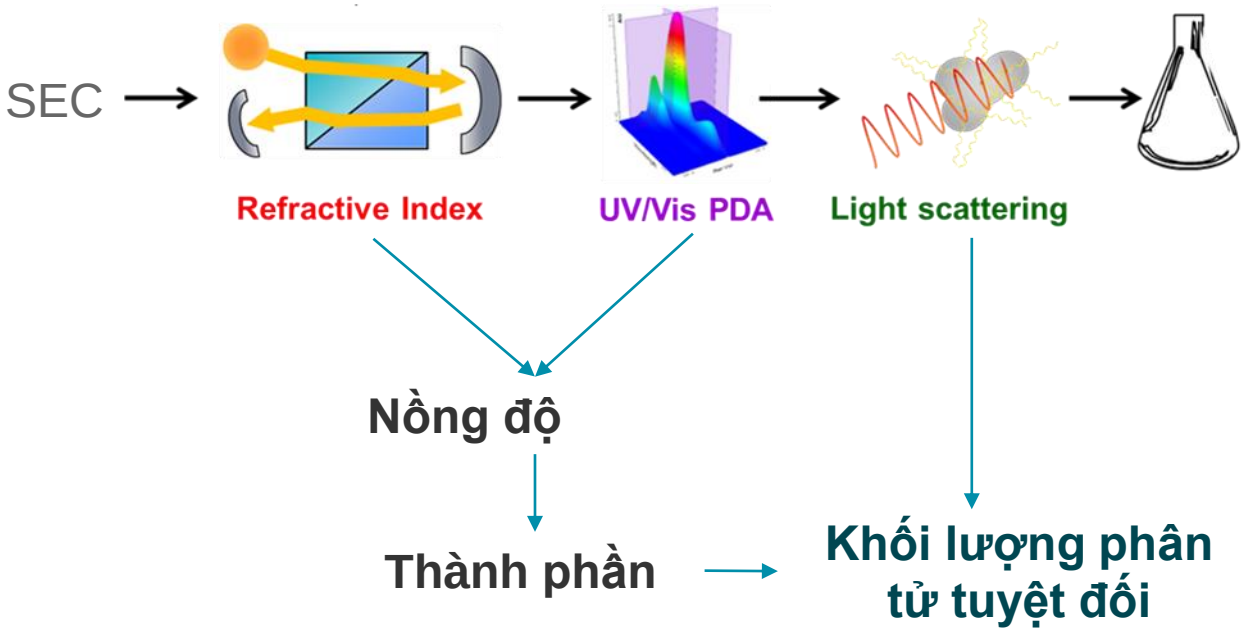
Necessity is the Mother of Invention

Plato

We are
Malvern Panalytical
We're BIG on small™

OMNISEC cho rAAV

Công cụ mô tả đặc tính độ phân giải cao, linh hoạt



- ***Khối lượng phân tử tuyệt đối không phụ thuộc vào thể tích giữ cột hoặc bất kỳ chất chuẩn nào được sử dụng để hiệu chuẩn hệ thống***

- **Phân tích thành phần:**
  - UV 260nm – DNA
  - RI – Capsid và DNA
- **Nồng độ**
  - $Conc_{DNA}$ - mg/mL of DNA
  - $Conc_{Capsid}$ - mg/mL Tổng nồng độ capsid
- **Tổng Mw**
  - Mw_{Capsid}
  - Mw DNA – không được dùng cho phân tích

Tổng nồng độ hạt AAV

$$C_{total} = (Conc_{Capsid} NA)/(Mw_{Capsid})$$

Tổng nồng độ hạt AAV đầy đủ

$$C_{full} = (Conc_{DNA} NA)/(Mw_{Seq\ DNA})$$

Tổng nồng độ hạt AAV rỗng

$$C_{Empty} = C_{total} - C_{full}$$

© 2022 Malvern Panalytical