

RNA-LNP 药品临床和 产业化生产 策略

标准化工艺放大，
缩短上市时间

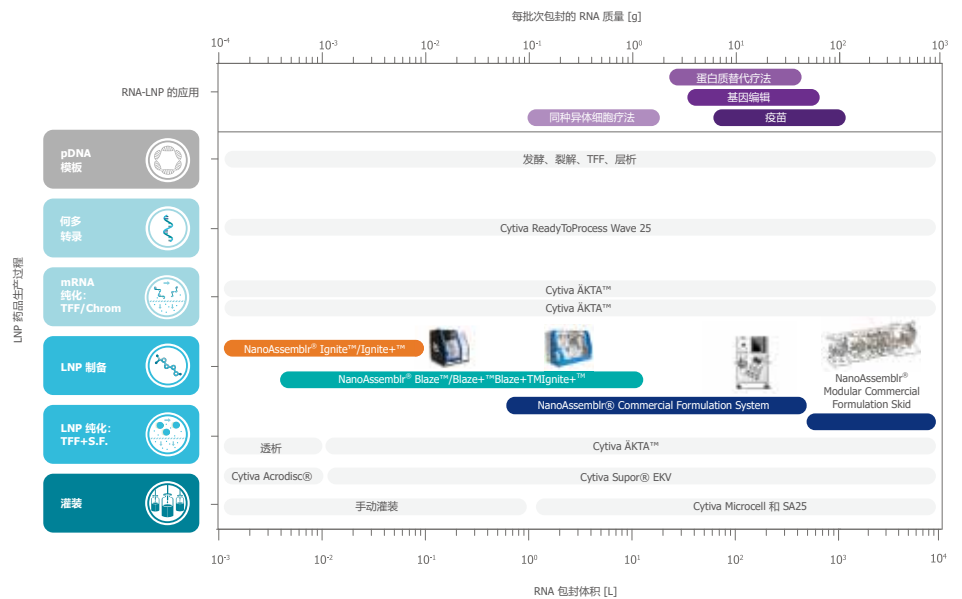
Ian Johnston; Ashley Braun; Braeden MacDougall; Anastasia Lazic; Brian Ma; Leanna Yee; Kelsey Schwartz; Karen Markwick; Andrew Tappe; Logan Ingalls; Vinay Mayya, PhD; Emily Soon; Sijo Chemmannur, PhD; Andra St. Quintin; Jeff Farnese; Curtis Robin; Laura Ho; Pierrot Harvie, PhD; Suraj Abraham, PhD; Felix Yuen; Jeffery Lam, PhD; Pam Arstikaitis, PhD; Jay Paquette, PhD; Vicki Stronge, PhD; Samuel Clarke, PhD

简介

辉瑞 Comirnaty® 以及 Moderna Spikevax™ 疫苗的获批表明，针对 SARS-CoV-2 感染的预防性信使 RNA (mRNA) 疫苗的脂质纳米颗粒 (LNP) 递送技术已通过临床验证¹⁻²。如今，这一成功激发了人们对用于各种新治疗方法和靶点的 LNP 介导的递送的兴趣。就传染病而言，针对寨卡病毒、甲型流感、狂犬病和鼠疫的疗法正处于临床试验阶段，或出现在文献中³⁻⁶。对于罕见疾病，蛋白质替代疗法等应用涉及递送编码缺失或低表达蛋白质的 mRNA (图 1, 顶部)。此外，LNP 还可用于递送基因编辑成分，例如 CRISPR/Cas9 核酸酶，用于基因的永久插入或删除，这可用于体内治疗，以及用于癌症同种异体细胞疗法的离体工程⁷。到 2036 年，预计 RNA-LNP 疗法市场将增加一倍以上，而这得益于健康的新疗法管线：22 种 RNA-LNP 疗法目前处于 1 期临床试验阶段；16 种处于 2/3 期临床试验阶段；3 种已上市⁸。尽管发展势头迅猛，开发基于 RNA 的疫苗和疗法仍然面临着重大的生产挑战。首先，RNA-LNP 平台必须在药物发现和产业化规模上生产相同的药品。其次，需要对 RNA-LNP 制备的上下游生产工艺进行设计并降低风险，以最小化工艺开发时间并加快进程。第三，也是最后一点，生产工艺需要符合不断增加的监管要求。在本应用笔记中，我们将讨论使用 NxGen™ 混合技术解决这三个关键挑战的策略。

图 1. mRNA 治疗应用和生产流程概述。

顶部) 根据批量规模显示的 RNA-LNP 疗法的新兴和成熟应用。左侧) 批量制备 RNA-LNP 的关键单元操作和代表性仪器。顶部标度表示对数标度上每批次封装的 RNA 质量。底部标度表示对数标度上的等效 RNA-LNP 制剂体积。首字母缩写和缩略语：TFF-切向流过滤，Chrom-层析，S.F.-过滤除菌。



RNA-LNP 疗法的生产可分为六大步骤 (图 1, 左侧)：1) 通过发酵生产 pDNA 模板，2) 使用体外转录 (IVT) 反应生成 mRNA 药物，3) 通过层析和切向流过滤 (TFF) 纯化 mRNA，4) 通过将水相中的 RNA 与乙醇中的脂质混合并随后在线稀释来配制 RNA-LNP 药品，5) 通过 TFF 和过滤除菌去除乙醇，和 6) 无菌灌装至小瓶中。在步骤 4 中，将 RNA 封装在 LNP 中是最难扩大到高通量和大批量生产的单元操作之一，因为该步骤需要 RNA 和脂质的高度受控混合。混合工艺是药品的固有工艺，会影响药物的物理性质、效力和毒性。此外，以全规模进行 RNA-LNP 生产的工艺开发成本高昂且耗时。

随着 RNA-LNP 药品的开发，以及从发现阶段到工艺开发再到产业化生产，监管合规性变得愈发重要。在从后期工艺开发到产业化生产的过程中，应考虑四个监管要求：1) 100% 乙醇常用于溶解脂类，属于易燃液体，在环境温度下可在空气中点燃。当地法规可能要求使用危险场所 (HazLoc) 认证设备处理易燃液体。两项 HazLoc 认证是 ATEX (易爆气体环境) 和 IECEx (国际电工委员会防爆电气安全认证体系)；2) 支持电子记录的软件应以符合 FDA 21 CFR Part 11 的方式适用于受监管的环境；3) 需要通过在位清洁 (CIP) 和后续验证，或通过使用伽马射线照射的一次性技术 (SUT) 对系统的生物负载进行控制，以支持工艺验证；和 4) 应使用美国药典 (USP) <665>指南来评估与流体接触的材料的可提取物和可浸出物 (E&L)。

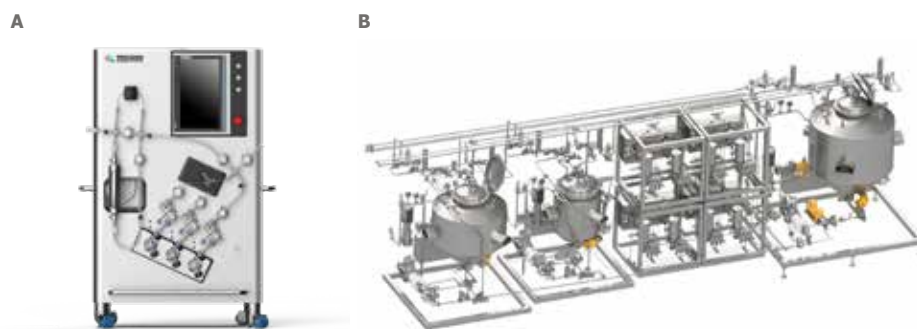
Precision NanoSystems 开发了 NanoAssemblr® 系列平台，全平台利用 NxGen 混合技术生产 RNA-LNP。具体来说，流体通道最初开发了两种尺寸，NxGen 和 NxGen 500，允许在宽范围流速和体积内高度可重复、易放大地生产 RNA-LNP，克服了批量方法 (例如湍流在线混合) 的主要限制。所有 NxGen 混合芯片均为一次性产品，降低了批次之间交叉污染的风险。NanoAssemblr Ignite™ 和 Ignite+™ 每次运行可产生 1–60 mL 的 RNA-LNP，用于临床前制备开发、优化、早期工艺开发以及下游工艺开发的初始工艺参数相关工作。NanoAssemblr Blaze™ 和 Blaze+™ 可生产高达 10 L 的产品，实现上下游工艺开发和放大。

图 2.来自 Precision NanoSystems 的

NanoAssemblr 仪器，用于制备产业化规模的批次。

A) NanoAssemblr commercial formulation system.

B) NanoAssemblr modular commercial formulation skid.



Precision NanoSystems 最近开发了两个系统。这些系统均配有符合 21 CFR Part 11 标准*的软件，均通过 ATEX 和 IECEx** 认证，并利用 NxGen 产业化芯片 48 L/h 进行临床和产业化 RNA-LNP 生产。NanoAssemblr commercial formulation system (图 2A) 旨在生产用于临床 1-3 期试验和产业化的 RNA-LNP，批量为 0.5-400 L。该系统支持适当地使用 NxGen 500 混合器 (以 NxGen 产业化芯片 12 L/h 销售) 或 NxGen 产业化芯片 48 L/h 以 6-48 L/h (100-800 mL/min) 的稀释前流速生产 LNP。为了减少批次之间的周转时间并消除不同工作流程之间的交叉污染，该系统使用了经过伽马射线照射的一次性流体通路，其中包括泵、流量计和 NxGen 芯片。Commercial formulation system 支持 NxGen 500 和新的 NxGen 产业化芯片 48 L/h。NanoAssemblr modular commercial formulation skid (图 2B)

* 等待第三方审核

** 等待最终认证

旨在生产体积为 400-3200 L 的大型产业化生产批次，用于包括 3 期基因编辑、蛋白质替代疗法和大流行病疫苗在内的应用。该通道可根据用户要求进行配置，并同时使用多达 8 个 NxGen 产业化芯片，以生产高达 384 L/h 的 RNA-LNP。

在这项工作中，我们演示了 commercial formulation system 和 modular commercial formulation skid 的性能，以及相应的工作流程，该流程允许从用于发现研究的小规模 LNP 生产快速发展到大规模产业化生产。首先，我们展示了使用 NxGen、NxGen 500 和 Nxgen 产业化芯片 48 L/h 生产的 POPC:胆固醇脂质体随着流速的增加而遵循预测的极限粒径行为，并且可以在高达 48 L/h (800 mL/min) 的流速下生产高质量的脂质体。为了证明 NxGen 技术的可放大性，我们接下来使用质粒 DNA 作为 mRNA 替代物，并使用 NxGen 产业化芯片 48 L/h 制备多达 50 L 的 pDNA-LNP 批次。最后，我们选择了一种临床相关的 LNP 成分，以展示该 commercial formulation system 和 modular commercial formulation skid 如何简化 SARS-CoV-2 自扩增 mRNA (saRNA) LNP 候选疫苗的开发。我们使用 Ignite+ 在低体积和低流速下建立了关键质量属性 (CQA)，并使用 Blaze、commercial formulation system 和 modular commercial formulation skid 逐步将流速增加到 800 mL/min。我们使用常见的理化分析，并通过在体外细胞系和体内动物模型中测试生物活性，证明了系统和混合器之间的 CQA 等效性。

材料和方法

材料和耗材

RNA	SARS-CoV-2 saRNA 构建体 (~12,000 nt), Precision NanoSystems, 定制成分
pDNA	pcDNA3.1+N-eGFP 质粒, Genscript™, 定制合成
脂质试剂	脂质体: 1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (POPC), NOF America, Coatsome™ MC-6081 Cholesterol, Millipore Sigma, C8667 脂质纳米颗粒: LNP 脂质成分 (可电离脂质、DSPC、胆固醇、稳定剂), Precision NanoSystems, 定制
缓冲液	1X PBS, Corning, 21-031-CV 无水乙醇, Commercial Alcohols; P016EAAN RNase-free 水, VWR, 02-0201-0500 酸性缓冲液, Precision NanoSystems, 定制 低温保存缓冲液, Precision NanoSystems, 定制
通用耗材	15 mL Nunc™ 锥形无菌试管, Thermo Fisher Scientific, 339651 50 mL Nunc™ 锥形无菌试管, Thermo Fisher Scientific, 339652 100 mL Nalgene™ 高速圆底 PPCO 离心管, Thermo Fisher Scientific, 3110-1000 Allegro™ 2D 生物容器, 5 L, Cytiva, 650-202P Allegro™ 2D 生物容器, 50 L, Cytiva, 650-202W
过滤器	Amicon® Ultra-15 30kDa MWCO 离心过滤器, Millipore Sigma, UFC903008 MidiKros™ 20 cm 300K mPES 过滤器, Repligen, D02-E300-05-S Centramate 93 cm ² 30 kD T 系列膜盒, Cytiva, DC030T01 Acrodisc® 针筒过滤器 0.2 μm 超滤膜, Cytiva, PN 4612

RNA 定量	Quant-iT™ RiboGreen® RNA 检测试剂盒, 包括 20X TE 缓冲液, RNase-free, Thermo Fisher Scientific, R11490
生物试剂	<p>体外试验: BHK570 细胞, ATCC®, CRL10314™ SARS-CoV-2 Spike S1 Subunit Alexa Fluor®488-偶联抗体, biotechne, FAB105403G Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific, 11965084 Paraformaldehyde, Millipore Sigma, 158127-5G Triton X-100, Thermo Fisher Scientific, HFH10</p> <p>体内试验: BALB/c 小鼠, 私人供应商, 定制方案 SARS-CoV-2 总 IgG ELISA, 不同供应商, 定制方案</p>

设备

NanoAssemblr 系统和 NxGen 混合芯片	NanoAssemblr Ignite+, Precision NanoSystems, 1001413 NxGen Dilution, Precision NanoSystems, NIN0063 NxGen 500D, Precision NanoSystems, 1001399
	NanoAssemblr Blaze, Precision NanoSystems, NIB0055 NxGen 500D, Precision NanoSystems, 1000461
	NanoAssemblr commercial formulation system, Precision NanoSystems, 1002276 NxGen 产业化生产流路套件 12 L/h, Precision NanoSystems, 1002279 NxGen 产业化生产流路套件 48 L/h, Precision NanoSystems, 1002280
	NanoAssemblr modular commercial formulation skid, Precision NanoSystems NxGen 产业化芯片 48 L/h, Precision NanoSystems, 1001396
切向流过滤 (TFF) 系统	Centramate™ LV 夹持器, Cytiva, CM018LV KR2i, Spectrum Labs, 708-12295-000 KrosFlo™ KR Jr Pump, Spectrum Labs, 708-13683-000 KrosFlo™ Scale, Repligen, ACSS-20k
DLS	Zetasizer™ Nano, Malvern, ZEN1600
荧光分析仪	Synergy™ H1, Biotek, SH1M
活细胞成像	Cytation™ 7, Biotek, CYT7USN

A. POPC:胆固醇脂质体的制备及分析

- 有机相由 9.4 mg/mL POPC 和 3.92 mg/mL 胆固醇的乙醇溶液组成。水相是 1X 磷酸盐缓冲液 (PBS)。有机相与水相在使用前均通过 0.22 µm 过滤器过滤。
- 使用 NxGen、NxGen 500 和 NxGen 产业化芯片 48 L/h, 以 3:1 的水相/有机相流速比和适合混合器的流速范围配制 POPC:胆固醇脂质体:
 - NxGen: 2-20 mL/min
 - NxGen 500: 25-200 mL/min
 - NxGen 产业化芯片 48 L/h: 200-1000 mL/min
- 将 POPC:胆固醇脂质体立即在 1X PBS 中以 1:1 稀释, 并使用 DLS 确定粒径。

B.pDNA-和 saRNA-LNP 的制备

- 有机相由溶于乙醇的 Precision NanoSystems 定制 LNP 脂质成分组成, 水相是含有核酸药物的弱酸性缓冲液。核酸是编码绿色荧光蛋白的质粒或编码 SARS-CoV-2 刺突蛋

白的自扩增 RNA。在线稀释剂是 1X PBS。将这些试剂置于适合系统的容器中：用于 Ignite+ 的注射器；用于 Blaze 系统的锥形烧瓶；以及用于 commercial formulation system 和 modular commercial formulation skid 的生物工艺容器。

2. 对于 commercial formulation system 和 modular commercial formulation skid, 在生物工艺容器中准备额外的乙醇和酸性缓冲液, 以启动和校准系统。
3. 在制备 saRNA-LNP 批次之前, 除 Ignite+ 外的所有系统均通过循环 NaOH_(水溶液) 进行在位清洁, 然后用注射用水 (WFI) 冲洗。
4. 使用 NxGen 产业化芯片 48 L/h 以 8 的 N/P 比和 3:1 的稀释比制备 5、10 和 50 L 的 pDNA-LNP 批次。
5. 在每个系统上以 3:1 的流速比和 8 的 N/P 比制备三批 saRNA-LNP。
 - a. 对于 Ignite+, 以 12、115 和 200 mL/min 的总流速和 0.75:1 (稀释剂/saRNA-LNP 溶液) 的在线稀释比制备 30 mL 的 saRNA-LNP。
 - b. 对于 Blaze, 以 115 mL/min 的总流速和 2:1 (稀释剂/saRNA-LNP 溶液) 的在线稀释比制备 30 mL 的 saRNA-LNP。
 - c. 对于 commercial formulation system, 使用产业化芯片 12 L/h 以 200 mL/min 的总流速并使用 NxGen 产业化芯片 48 L/h 以 800 mL/min 的总流速制备 100 mL 的 saRNA-LNP。这两种条件都使用 3:1 的在线稀释比。
 - d. 对于 modular commercial formulation skid, 以 800 mL/min 的总流速和 3:1 的在线稀释比制备 150 mL 的 saRNA-LNP。

C.用 Cytiva Delta™ TFF 膜盒对 saRNA-LNP 进行下游纯化

1. 根据制造商的说明安装 TFF 过滤器、存储箱、泵、压力传感器和天平。
2. 通过用 WFI、NaOH_(水溶液)、NaOAc_(水溶液)、WFI, 最终用 1X PBS 冲洗来调节过滤器。
3. 然后将批量稀释的样品浓缩至原始体积的十分之一。
4. 浓缩后, 用四倍体积的 Precision NanoSystems 低温保存缓冲液渗滤样品。
5. 接下来, 在生物安全柜中使用 0.22 μm Cytiva Acrodisc® 过滤器对样品进行无菌过滤, 并用额外的低温保存缓冲液将包封的 RNA 的浓度稀释至 20 μg/mL。
6. 然后在 -80°C 下储存样品直至使用。

D. saRNA-LNP 分析表征

1. 通过动态光散射 (DLS) 在整个生产过程中表征 LNP 的粒径和多分散性。
2. 使用 RiboGreen® RNA 试剂测量 RNA 浓度 (附录 1)。
3. 通过毛细管凝胶电泳分析 saRNA 的完整性。
4. 用低温透射电子显微镜 (cryo-EM) 评估 saRNA-LNP 的形态。

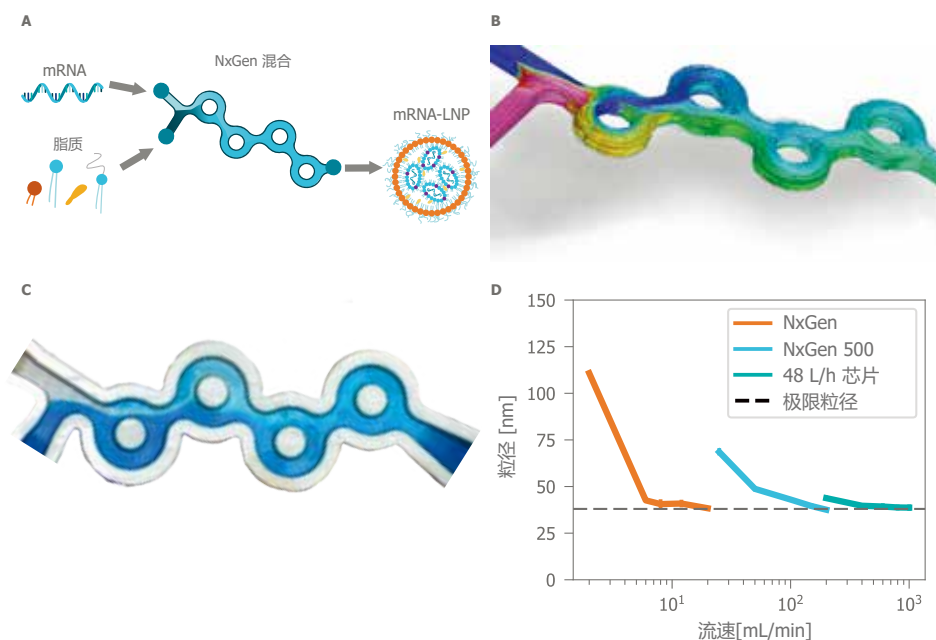
E. saRNA-LNP 生物测试

1. 用幼仓鼠肾 (BHK) 细胞模型评估 saRNA-LNP 的体外效力, 其中 SARS-CoV-2 刺突蛋白的表达通过与 AlexaFluor488™ 荧光团偶联的抗刺突蛋白定量。
2. 在 BALB/c 小鼠模型中, 使用第 1 天初始剂量、第 28 天加强剂量和第 42 天最终读数方案评估 saRNA-LNP 的体内免疫原性。通过 ELISA 从收集的血清中测定 SARS-CoV-2 特异性 IgG 的总水平。

结果和讨论

图 3. 使用 NxGen 技术的受控混合允许在广泛的流速范围内生产极限粒径纳米颗粒。

A) NxGen 混合器中混合过程示意图。B) 计算流体动力学模拟技术模拟水 (蓝色) 和乙醇 (粉红色) 在 NxGen 产业化芯片 48 L/h 中的混合。C) 水相 (无染料) 和有机相 (蓝色染料) 以 3:1 的流速比和 48 L/h 的总流速在改良 NxGen 产业化芯片 48 L/h 中混合。D) 使用 NxGen、NxGen 500 和 NxGen 产业化芯片 48 L/h 在一系列流速下制备的 POPC:胆固醇脂质体的粒径。



RNA-LNP 药品的质量受到包封步骤中混合过程的强烈影响。因此, 扩大 RNA-LNP 生产的关键工艺开发目标是确保粒径和多分散指数 (PDI) 等关键质量属性 (CQA) 保持不变, 同时提高流速等关键工艺参数 (CPP) 以满足大批量生产的要求。NxGen 的几何结构包括 RNA 和脂质入口, 以及四个圆环形混合器 (图 3A)。流体在沿着环形混合器的曲线行进时会受到向外的向心力, 导致其垂直于通道旋转。由于这种混合机制不依赖于微米级特征的制造, 因此 NxGen 几何结构中环形混合器的尺寸可以增加, 以实现大规模生产批次所需的高流速。NxGen 混合器可以制备高达 1.2 L/h 的 RNA-LNP, 而尺寸增大的 NxGen 500 和产业化芯片 12 L/h 可以制备高达 12 L/h 的 RNA-LNP。为了满足大批量临床和产业化生产所需的更高通量, 我们通过进一步增加 NxGen 500 的尺寸开发了 NxGen 产业化芯片 48 L/h。

为了验证 NxGen 产业化芯片 48 L/h 的设计合理性, 我们利用计算流体动力学 (图 3B) 来模拟较大混合器几何结构中水和乙醇的混合。该分析表明, 完全混合发生在四个环形混合器中第三个的末端, 并且与较小的 NxGen 500 的模型非常一致。为了验证我们的计算模型, 我们为一个 NxGen 产业化芯片 48 L/h 增加了透明观察窗, 以便能够直接观察混合的

流体。借助该装置，我们可以观察到水相（透明且无色的流体）与有机相（用蓝色染料染色的流体）的混合，以产生完全混合的溶液（图 3C）。通过实验，我们看到流体在第三个环形混合器末端完全混合，这表明计算模型准确地模拟了 NxGen 产业化芯片 48 L/h 内流体的混合。

为了用 LNP 制剂测试 NxGen 产业化芯片 48 L/h，我们选择 POPC:胆固醇脂质体作为代表性制剂。POPC:胆固醇脂质体是一种经过充分研究的制剂，其极限粒径为 40 nm。在过去的工作中，我们发现 POPC:胆固醇脂质体对混合中的细微变化有强烈的反应，因此是证明受控和一致混合的理想制剂。我们采用 3:1 的水相/有机相流速比 (FRR) 和适合每个混合芯片的总流速范围 (TFR) 制备了 POPC:胆固醇脂质体（图 3D）。对于 NxGen 混合器、NxGen 500 混合器和 NxGen 产业化芯片 48 L/h，POPC:胆固醇脂质体分别在约 6 mL/min (0.36 L/h)、80 mL/min (4.8 L/h) 和 400 mL/min (24 L/h) 时达到预测的 40 nm 极限粒径。当超过 NxGen、NxGen 500 和 NxGen 产业化芯片 48 L/h 的极限粒径 TFR 时，POPC:胆固醇脂质体具有相同的粒径和 PDI，展示了如何在将流速等 CPP 逐步增加几个数量级的同时保持代表性制剂的 CQA 不变。

图 4.用 NxGen 产业化芯片 48 L/h 以高达 50 L 的体积批量制备的 pDNA-LNP。

使用 NxGen 产业化芯片 48 L/h 制备的 3 种 pDNA-LNP 制剂的粒径、多分散指数和包封率与批量（体积）的函数关系。5、10 和 50 L 批次的数值为 $n=1$ ，2 mL NxGen 对照样品的实验次数为 3。

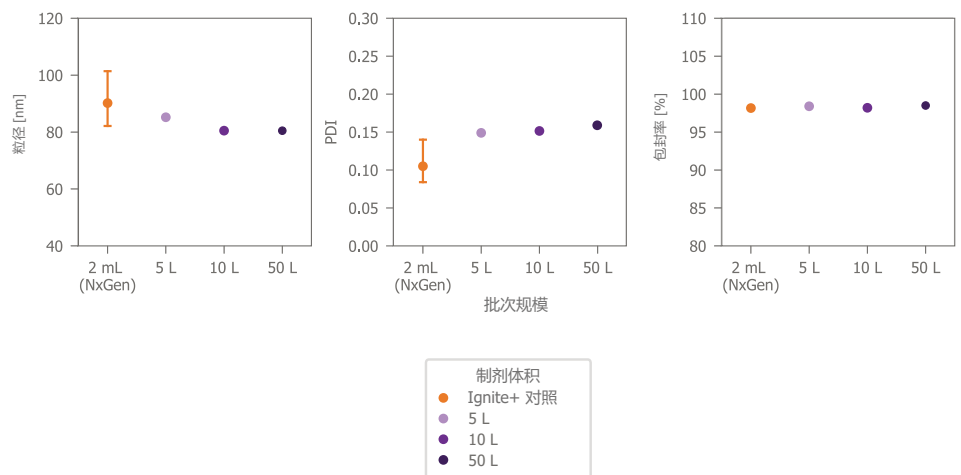


表 1.为测试 NxGen 产业化芯片 48 L/h 而制备的 pDNA-LNP 的实验条件。

制剂体积 [L]	混合器	流速 [L/h]	封装的 pDNA 的质量 [g]
0.002	NxGen	0.72	2.5×10^{-4}
5	NxGen 产业化芯片 48 L/h	48	0.625
10	NxGen 产业化芯片 48 L/h	48	1.25
50	NxGen 产业化芯片 48 L/h	48	6.25

虽然 POPC:胆固醇脂质体适用于小规模工艺参数的早期筛选，但它们不含核酸药物，也不具有与典型 RNA-LNP 疗法相同的脂质复杂性。为了对更相关的制剂进行演示，我们使用 Precision NanoSystems 的脂质纳米颗粒组合中的可电离脂质以及编码绿色荧光蛋白 (GFP) 的质粒 DNA (pDNA) 药物（作为 mRNA 的廉价替代物）设计了一种包含四种组分的 LNP 成分。接下来，我们使用 NxGen 产业化芯片 48 L/h 配制了第三批 5、10 和 50 L 的 pDNA-LNP，并评估了它们的理化特性。我们还使用 NxGen 芯片在 Ignite+ 上配制了用作对照的

pDNA-LNP。使用产业化芯片生产的 pDNA-LNP 具有高质量，粒径为 80-85 nm，并且所有情况下的多分散指数 (PDI) 均低于 0.2 (图 4)。我们还发现，所有批量下的包封率相似，均大于 95%。在 NxGen 产业化芯片 48 L/h 上生产的 pDNA-LNP 的理化结果均与在 NxGen 上生产的小规模对照品一致，为使用额外的成分在各种混合器中进行一致混合提供了进一步的证据。以 5-50 L 的大规模生产的 pDNA-LNP 具有一致性，表明各种体积的 LNP 制剂均稳定，突出了 NxGen 产业化芯片 48 L/h 能够可靠地用于所需的产业化大批量生产。

用于制备 RNA-LNP 药品的可放大解决方案

为了满足不同药品大规模生产的要求，新的 commercial formulation system 与 NxGen 产业化芯片 12 L/h (其具有与现有 NxGen 500 混合芯片相同的混合几何结构) 和 NxGen 产业化芯片 48 L/h 兼容，而新的 modular commercial formulation skid 与 NxGen 产业化芯片 48 L/h 兼容。由于基础的 NxGen 技术设计为可从发现阶段放大为产业化生产，因此在 Ignite 和 Blaze 上建立的小规模工艺可以转移到 commercial formulation system 和 modular commercial formulation skid 上，以最短的工艺开发时间实现大规模生产。

我们选择了新冠肺炎疫苗模型来演示如何在新的 commercial formulation system 和 modular commercial formulation skid 上利用 NxGen 混合技术来设计、放大和生产 RNA-LNP 候选药物。我们使用 Precision NanoSystems 的脂质纳米颗粒组合中的可电离脂质 (以实现疫苗动物模型中的最佳 RNA 递送和效力) 以及编码 SARS-CoV-2 融合前刺蛋白的自扩增 RNA (saRNA) 开发了一种脂质成分。我们进行了一项研究，以比较用八种不同的系统和混合器条件配制的 SARS-CoV-2 saRNA-LNP 的理化和生物学特性，这些条件涵盖与从早期工艺开发到产业化生产的整个过程相关的流速和批量。最初，我们使用 Ignite+ 系统建立了 saRNA-LNP 成分的极限粒径流速和 CQA。接下来，我们使用 Blaze 系统逐步增加该制剂的流速和批量。最后，我们适当地使用 NxGen 500 和 NxGen 产业化芯片 48 L/h 在 commercial formulation system 和 modular commercial formulation skid 上制备了 saRNA-LNP (表 2)。在所有情况下，用 Cytiva Delta TFF 膜盒纯化 saRNA-LNP，并用 Cytiva Acrodisc 过滤器进行无菌过滤。

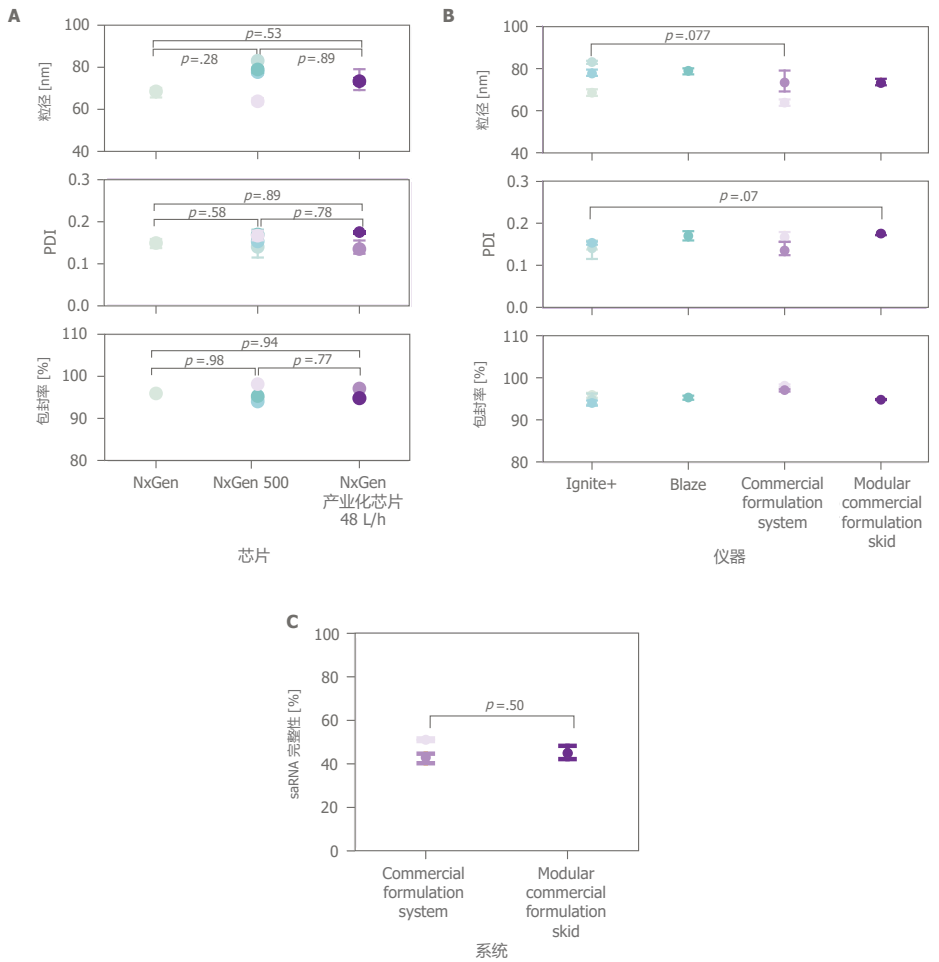
我们选择了 RNA-LNP 生产流程的代表性实验条件。对于需要在位清洁方案的仪器，提前一天使用循环氢氧化钠进行清洁，然后用 WFI 冲洗。对于使用一次性流体通路的仪器，如 commercial formulation system，在 RNA 包封步骤当天安装新的流体通路。此外，我们在前一天通过消毒和冲洗来准备 TFF 系统。我们在一天内完成了从 RNA 包封到过滤除菌和样品冷冻的所有单元操作，各步骤之间的保持时间很短。我们在六个小时的轮班中轻松地完成了 RNA 包封和所有后续的单元操作。除了为操作员提供更大的便利外，这种结构化的制备方法还消除了各单元操作之间可变保持时间可能产生的任何问题，提高了批间一致性。

表 2.为测试 commercial formulation system 和 modular commercial formulation skid 的性能而制备的 saRNA-LNP 的实验条件。

条件	NanoAssemblr 系统	NxGen 混合芯片	总流速 [L/h]	批次产量 [mL]	RNA 包封量 [mg]																							
1	Ignite+	NxGen	0.72	30	1.1																							
2	Ignite+	NxGen 500	6.9	30	1.1																							
3	Ignite+	NxGen 500	12	1.1	4	Blaze	NxGen 500	6.9	30	1.1	5	Commercial formulation system	NxGen 产业化芯片 12 L/h [NxGen 500]	12	100	3.3	6	Commercial formulation system	NxGen 产业化芯片 48 L/h	48	100	3.3	7	Modular commercial formulation skid	NxGen 产业化芯片 48 L/h	48	150	5.0
4	Blaze	NxGen 500	6.9	30	1.1																							
5	Commercial formulation system	NxGen 产业化芯片 12 L/h [NxGen 500]	12	100	3.3																							
6	Commercial formulation system	NxGen 产业化芯片 48 L/h	48	100	3.3																							
7	Modular commercial formulation skid	NxGen 产业化芯片 48 L/h	48	150	5.0																							

图 5.使用 NxGen 技术制备的 saRNA-LNP 的理化表征。

A) 粒径、PDI 和包封率作为 NxGen 混合芯片的函数。B) 粒径、PDI 和包封率与用于制备 saRNA-LNP 的系统的函数关系。C) 用毛细管电泳评估无菌过滤样品中 saRNA 的完整性。



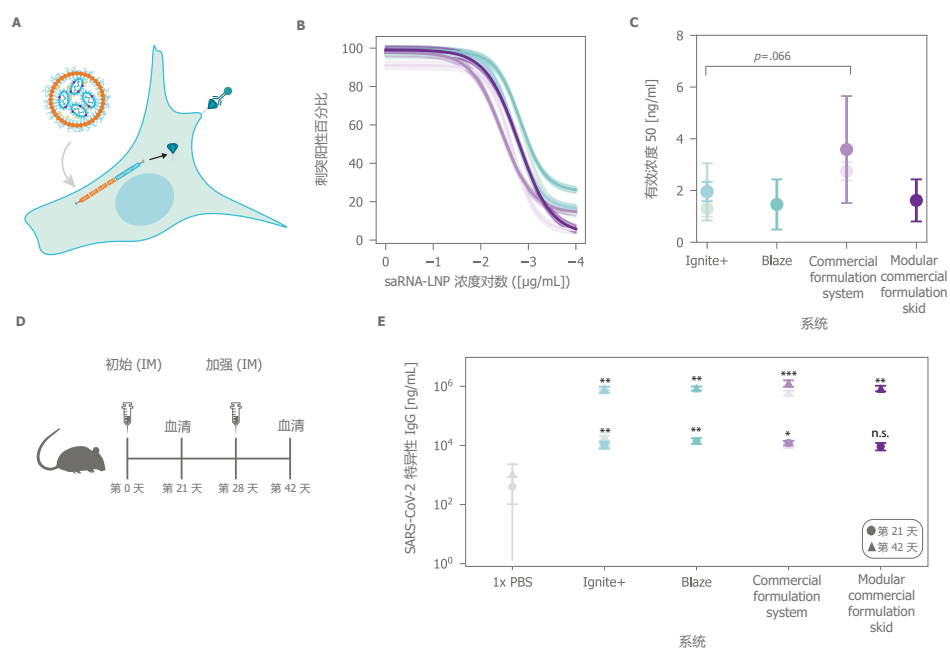
接下来，我们使用常用的分析方法来表征在八个系统和混合器条件下产生的 saRNA-LNP。所有条件下获得的 saRNA-LNP 均具有高质量，并且粒径、多分散指数 (PDI) 和包封率在正常范围内。无菌过滤颗粒的粒径为 60-86 nm，平均粒径为 73 nm，而 PDI 平均值为 0.18 (SD=0.03)。所有情况下的包封率均在 93% 以上。理化数据与混合器 (图 5A) 或 saRNA-LNP 制备过程中的点 (数据未显示) 的函数关系显示，混合器和系统平台之间具有高度一致性。通过按混合器合并数据，单向方差分析 (ANOVA) 检验显示，不同混合器之间的 LNP 粒径 ($p=0.53$)、PDI ($p=0.31$) 或包封率 ($p=0.79$) 没有显著差异 ($\alpha=0.05$) (适当时进行

成对比较)。分析理化性质与系统的函数关系再次表明, 粒径和多分散性的结果一致 (图 5B)。分析理化性质与过程中的点和混合器类型的函数关系表明, 虽然过程中的点通常是显著的, 但不同混合器在粒径($p=0.57$)、PDI ($p=0.51$) 或包封率 ($p=0.98$) 方面没有显著差异 (数据未显示)。在整个过程中, 粒径的增加和过滤除菌后多分散性的降低均符合预期, 并且在正常变化范围内。

为了更好地了解核酸药物和脂质纳米颗粒的结构, 我们进行了低温电子显微镜 (cryo-EM) 和毛细管电泳 (CE) 测量。通过 cryo-EM, 在使用所有系统和混合器组合制备的样品中观察到一致的 saRNA-LNP 形态 (数据未显示)。与通过 DLS 获得的结果相比, 通过 cryo-EM 分析获得的 saRNA-LNP 粒径较小, 通过配对 t 检验获得的平均差异为 8 nm($p=0.028$) (数据未显示)。考虑到 DLS 测量的是 RNA-LNP 周围的水合球而 cryo-EM 并非如此, 这一结果是合理的。接下来, 我们进行了 CE 测量, 以评估包封的 saRNA 的完整性。通过比较 commercial formulation system 和 modular commercial formulation skid, 我们发现 saRNA 的完整性在 40%-53% 范围内 (图 5C)。比较各系统平台的单因素 ANOVA 显示没有显著差异 ($\alpha=0.05$, $p=0.50$), 表明这三个不同的系统不影响核酸构建体的完整性。总之, 我们可以得出结论, 无论系统、NxGen 混合芯片和流速如何, 本研究中生产的 saRNA-LNP 在粒径、PDI 和包封率方面具有一致的 CQA。

图 6. SARS-CoV-2 抗原的表达和对使用 NxGen 技术制备的 saRNA-LNP 的免疫反应。

A) 通过转染 BHK 570 细胞进行体外试验的示意图。细胞用抗刺突的 AlexaFluor488 抗体染色, 用于荧光成像。**B)** BHK 570 细胞中表达 SARS-CoV-2 刺突蛋白的细胞百分比与每个系统和混合器条件下 saRNA 剂量的函数关系, 阴影区域为 95% 置信区间。**C)** EC_{50} 值与系统的函数关系图。误差条形图代表 95% 置信区间。**D)** 体内免疫研究设计示意图, 记录初始和加强剂量以及血清收集。**E)** 在每种条件下, 在注射后第 21 天和第 42 天的 BALB/c 小鼠血清中观察到 SARS-CoV-2 特异性 IgG 应答。误差条形图代表标准偏差。在单因素 ANOVA 后, 使用事后 Tukey 检验对给定时间点的 1xPBS 与仪器进行比较的 p 值 ($*p\leq 0.05$, $**p\leq 0.01$, $***p\leq 0.001$, $****p\leq 0.0001$)。



为了评估 SARS-CoV-2 saRNA-LNP 候选疫苗的生物活性, 我们在体外和体内新冠肺炎试验中测试了八个不同的系统和混合条件。对于体外试验, 用递减量的 saRNA-LNP 转染 BHK 570 细胞, 以确定表达刺突蛋白的细胞的百分比 (图 6A)。通过分析剂量反应 (图 6B), 我们确定不同条件下的 EC_{50} 值在 1.3-3.6 ng/mL 内, 表明体外活性一致 (图 6C)。接下来, 我们在 BALB/c 小鼠中进行了 42 天 (6 周) 的体内免疫研究, 以比较对八种条件下产生的 saRNA-LNP 的免疫反应 (图 6D)。在第 0 天和第 28 天, 分别肌内

注射 1 µg saRNA-LNP 用于初始剂量和加强剂量研究。21 天后，与 1X PBS 对照相比，大多数 saRNA-LNP 条件产生了具有统计学意义的血清转化 (图 6E)。在研究终点，血清转化更为明显，SARS-CoV-2 特异性 IgG 滴度在 1.94×10^5 至 2.83×10^6 ng/mL 范围内，表明所有样品都能引发强烈的免疫反应。ANOVA 检验和事后 Tukey 多重比较检验表明，所有仪器生产的 saRNA-LNP 在小鼠模型中诱导了显著的血清转化 ($p=0.0001$)。此外，不同仪器条件下的体内效力没有显著差异。总的来说，来自体外和体内试验的数据表明，所有 NanoAssemblr 系统生产的 saRNA-LNP 都具有生物活性并产生强劲且一致的药效作用。

总体而言，这项研究的结果显示，在不同的 NanoAssemblr 系统和混合器条件下，SARS-CoV-2 saRNA-LNP 候选疫苗的理化和生物学结果是一致的。我们演示了 NxGen 混合技术如何在 Ignite 和 Blaze 上实现 RNA-LNP 药物的小规模测试和放大，以及随后如何在 commercial formulation system 和制备通道上以最短的工艺开发时间进行大规模生产。Commercial formulation system 和制备通道可实现 RNA-LNP 药品的高通量和大规模生产，以用于不同治疗应用和临床开发阶段。

结论

随着 RNA-LNP 药物领域的持续发展，RNA 药物包封系统必须可放大，并与更大型的上下游单元操作兼容，同时满足监管要求。在本应用笔记中，我们演示了 NanoAssemblr commercial formulation system、modular commercial formulation skid 和 NxGen 产业化芯片如何满足产业化规模 RNA 包封的要求。首先，通过使用具有一系列递增批量的代表性 LNP 制剂，我们演示了如何在将 CPP 的值从发现规模逐步增加到产业化生产规模的同时保持 CQA (如粒径、PDI、体外效力和体内免疫原性) 不变。其次，我们展示了如何在下游单元操作 (如 TFF 和过滤除菌) 中轻松处理由 NanoAssemblr 系列系统产生的 saRNA-LNP。第三，也是最后一点，我们描述了 commercial formulation system 和配套的流路套件如何满足 RNA-LNP 原料药生产的监管要求。

附录 A – RiboGreen 检测方案

若要实现 RNA-LNP 的准确给药，必须确定 RNA 的包封率。如果遵循本指南中概述的 RNA-LNP 制备方案，RNA-LNP 预计将装载 100–120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 RNA，其变化通常源于最终样品体积的变化。

推荐的包封率方案如下：

RiboGreen 检测测定 RNA 包封率

附加试剂/一次性用品

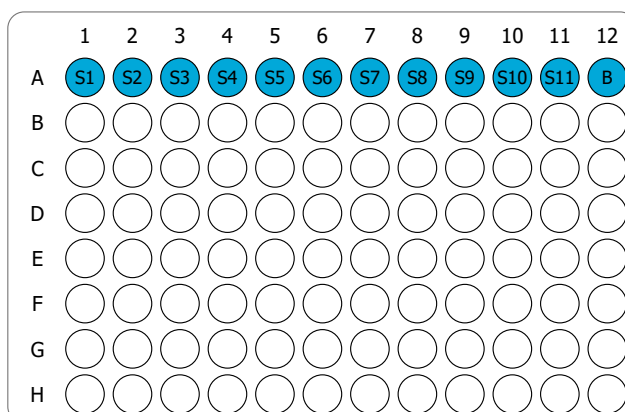
描述	推荐供应商
Invitrogen™ TE 缓冲液 (20X), RNase-Free	Thermo Fisher Scientific
Quant-iT™ RiboGreen® 检测试剂盒	Thermo Fisher Scientific
Triton™ X-100	Sigma Aldrich
RNase-Free 水	General Laboratory Supplier
RNase-Free 过滤移液管吸头 (10、20、200 和 1000 μL)	General Laboratory Supplier
移液池	General Laboratory Supplier
96 孔黑色板	General Laboratory Supplier
Mg^{2+} / Ca^{2+} 游离 PBS 1x	General Laboratory Supplier
18 号针	General Laboratory Supplier

必要的额外设备

描述	推荐供应商/产品
板读取器	Synergy™ H1 Biotek® Plate Reader
多通道移液管 (10 –300 μL)	General Laboratory Supplier
微量吸管 (10, 20, 200 and 1000 μL)	General Laboratory Supplier

样品储备溶液的制备

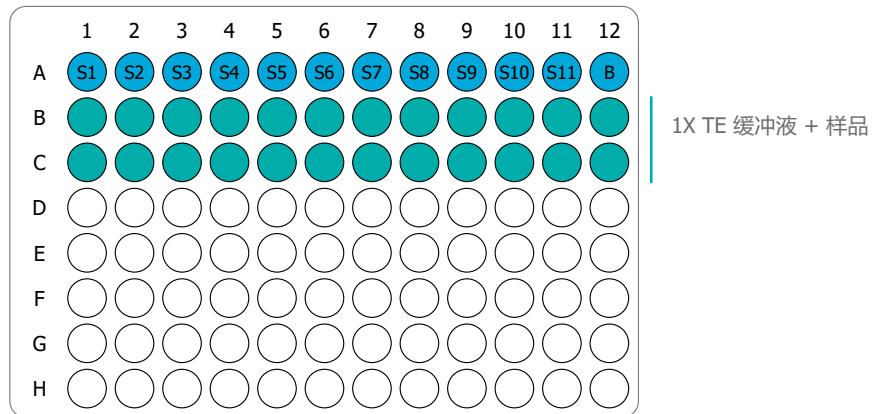
- 用 20X TE 缓冲液制备 1X TE 缓冲液：将 10 mL 20X TE 缓冲液添加到透明玻璃瓶中的 190 mL RNase-free 水中。摇晃瓶子进行混合。
- 将 2 mL Triton X-100 加入到制备好的 100 mL TE 缓冲液中。使用磁力搅拌器搅拌 15 分钟。这种溶液就是 Triton 缓冲液。
- 将 1X TE 缓冲液和 Triton 缓冲液倒入单独的移液池中。
- 在 96 孔板的顶行 (A 行) 中，向这些孔 (S1-S11) 中添加 15 μL RNA-LNP 样品。向空白孔 (B) 中加入 15 μL PBS。
- 使用多通道移液管，向 A 行添加 1X TE 缓冲液，使体积达到 250 μL 。用移液管混合。



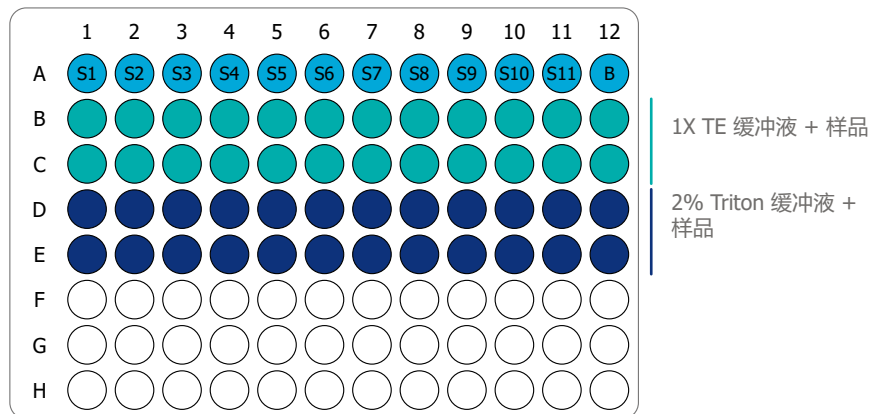
RNA-LNP 样品设置

该检测一式两份。建议使用多通道移液管进行液体处理。

1. 向每个 RNA-LNP 样品正下方的两个孔中加入 50 μ L 1X TE 缓冲液 (B 行和 C 行)。
2. 将来自 A 行的 50 μ L RNA-LNP 样品储备液加入 B 行和 C 行的孔中。
3. 向每个样品下方 D 行和 E 行的孔中加入 50 μ L Triton 缓冲液。



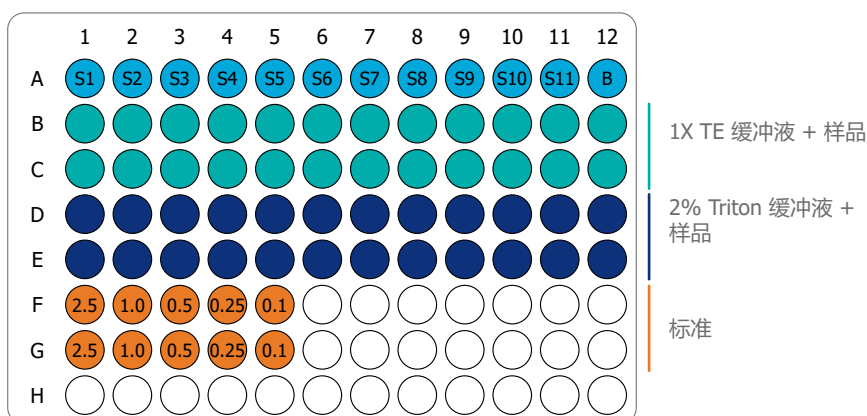
4. 将来自 A 行的 50 μ L 样品储备液加入 D 行和 E 行的孔中。



RNA 标准曲线设置

- 如下表所示，使用 RNA 储备液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA)、1X TE 缓冲液和 Triton 缓冲液设置标准曲线 (F 行和 G 行一式两份)。

最终 RNA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	所需的 RNA 储备液 (μL)	所需的 TE 缓冲液 (μL)	所需的 Triton 缓冲液 (μL)	每个孔的总体积 (μL)
2.5	25	25	50	100
1	10	40	50	100
0.5	5	45	50	100
0.25	2.5	47.5	50	100
0.1	1	49	50	100



- 将样品和标准曲线放入板中后，在 37°C 下孵育板 10 分钟，从而在 Triton 缓冲液存在的情况下裂解 RNA-LNP。

RiboGreen 溶液的制备

- 合计样品孔和标准曲线孔的总数。这个数加 4，总数乘以 100。这是该检测所需的 RiboGreen 溶液的总容积，单位为 μL 。
- 在 15 mL RNase-Free Falcon 试管中，将 RiboGreen 试剂以 1:100 稀释到 1X TE 缓冲液中，达到上一步计算的总容积。

注意：例如，如果需要 3000 μL RiboGreen 溶液，则将 30 μL RiboGreen 试剂加入到 2970 μL 1X TE 缓冲液中。

- 将 RiboGreen 溶液涡旋 10 秒钟以混合。

添加 RiboGreen 溶液并读取样品

1. 从 37°C 培养箱中取出 96 孔板。
2. 向每个孔中加入 100 μ L RiboGreen 溶液。
3. 用针戳破气泡。
4. 使用荧光板读取器读取，设置如下：

板读取器参数

激发	485 nm
发射	528 nm
光学	顶部读取
增益	55
读取高度	8 mm

注意：增益和读取高度会因仪器而异。

样品分析

1. 将每个 mRNA-LNP 样品和每个标准曲线样品输入到 RNA 定量工作簿 (PNI-WB-S9-001-INT) 中。该表将计算每个样品的包封率和 mRNA 浓度。

注意：RNA 定量工作表可通过联系 Precision NanoSystems 的现场应用科学家获得。

2. 该工作簿的第二张表 (名称: 孔板设置) 提供了将 O.D.值输入第一张表 (名称: RNA 定量) 计算方法。
3. 工作簿中的第三张表 (名称: 稀释系数计算) 提供了在第一张表 (名称: RNA 定量) 的 "O" 列中输入稀释系数值的计算方法。

参考文献

1. L. R. Baden, *et. al.*, "Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine," *N Engl J Med*, pp. 403-416, 2021.
2. Polack, F. P.; *et. al.*, "Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine," *N Engl J Med*, vol. 383, pp. 2603-2615, 2020.
3. N. Pardi, *et. al.*, "Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies," *Nature Communications*, vol. 9, no. 3361, 2018.
4. Richner J. M.; *et. al.*, "Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection," *Cell*, vol. 10, pp. 1114-1125, 2017.
5. Alberer, M.; *et. al.*, "Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial," *Lancet*, vol. 390, no. 10101, pp. 1511-1510, 2017.
6. Kon, E.; *et. al.*, "A single-dose F1-based mRNA-LNP vaccine provides protection against the lethal plague bacterium," *SCIENCE ADVANCES*, vol. 9, no. 10, 2023.
7. R. Geczy, "Genome Editing of Human Primary T Cells with Lipid Nanoparticles Gene edited CAR T," Precision NanoSystems ULC, Vancouver, BC, 2022.
8. M. Verma, I. Ozer, W. Xie, R. Gallagher, A. Teixeira and M. Choy, "The landscape for lipid-nanoparticle-based genomic medicines," *Nat Rev Drug Discov*, 2023.

Precision NanoSystems:
50 - 655 West Kent Ave.N.,
Vancouver, BC, V6P 6T7
Canada

Precision NanoSystems USA:
395 Oyster Point Boulevard, Suite 145
South San Francisco, CA, 94080
USA

电话: 1-888-618-0031
info@precision-nano.com

precisionnanosystems.com

相关材料

请定期访问我们的网站, 获取最新信息、应用笔记、在线研讨会和其他科学资源。

precisionnanosystems.com

文档 ID: commercialformulationsystem-AN-JUNE23

用于研究或进一步生产。不能直接用于人类。版权所有 © Precision NanoSystems ULC.2023 保留所有权利。Create Transformative Medicines™、NanoAssemblr®、NanoAssemblr Ignite™、NanoAssemblr Blaze®、Genvoy™ 和 NxGen™ 均为 Precision NanoSystems 的商标。Cytiva 和 Drop 标志是 Life Sciences IP Holdings Corporation 或以 Cytiva 名义经营的关联公司的商标。Akta 和 Ulta 是 Global Life Sciences Solutions USA LLC 或以 Cytiva 名义经营的关联公司的商标。