

预防用 mRNA 疫苗脂质纳米颗粒质量研究及 质量控制药学评价的考虑

杨丹,赵欣,李小静,李敏

(国家药品监督管理局药品审评中心,北京 100038)

[摘要] 随着预防用 mRNA 疫苗研究不断深入,发现了脂质纳米颗粒结构/形态等新问题。根据 ICH Q6B 理念,从药学评价角度对脂质纳米颗粒的结构特点、变化趋势等进行初步探讨,对其结构特征表征需要额外开展的研究工作也进行了一些探索与思考,以期为预防用 mRNA 疫苗质量研究及质量控制提供参考。

[关键词] mRNA 疫苗;脂质纳米颗粒;粒径;形态;工艺控制;质量研究

[中图分类号] R95 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)24-2452-05

Considerations on pharmaceutical quality assessment and control of lipid nanoparticles of prophylactic mRNA vaccines

YANG Dan, ZHAO Xin, LI Xiao-jing, LI Min

(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100038, China)

[Abstract] As the continuous in-depth research on prophylactic mRNA vaccines, new questions have been raised about lipid nanoparticles in aspects of structures and morphologies. Based on the principle of ICH Q6B, the characteristics and changes of the structures of lipid nanoparticles were preliminarily discussed from the perspective of pharmaceutical evaluation, and the additional study for the structural characteristics were also addressed for providing a reference for the quality assessment and control of prophylactic mRNA vaccines.

[Key words] mRNA vaccine; lipid nanoparticle; particle size; morphology; process control; quality study

1 前言

核酸药物发展几十年来,递送系统一直是制约其发展的主要瓶颈,而脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)技术的研发极大地推动了核酸药物的发展。mRNA-LNP 的制备工艺尽管工艺步骤简单、周期较短,但短短几分钟内就可能存在复杂的相变。同时,近年来脂质材料、生产设备不断发展,这些因素都增加了 mRNA-LNP 形态多样化的可能,为其生产工艺过程控制、质量特性研究和质量控制带来挑战。

近年来,国内外监管机构相继发布了 mRNA 疫

苗的技术指南,如国家药品监督管理局药品审评中心发布《新型冠状病毒预防用 mRNA 疫苗药学研究技术指导原则(试行)》^[1]、WHO 发布的“Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations”等^[2],初步建立了 mRNA 疫苗的质量评价标准。

随着 mRNA-LNP 在预防用疫苗领域应用越来越广泛,申报品种包括新型冠状病毒疫苗、偏肺病毒疫苗等创新性疫苗,也涉及带状疱疹疫苗、流感疫苗等改良新品种。已发表数据显示在研品种 LNP 存在生产过程及贮存过程粒径变化较大、LNP 形态各异等现象。

ICH Q6B^[3] 对于生物制品强调了生产工艺全过程控制,同时认为,在质量标准中纳入哪些质控项目需要根据产品工艺特点、特性特点及其与安全有效

[作者简介] 杨丹,女,助理研究员,研究方向:疫苗药学技术评价。

联系电话:(010)80996178, E-mail: yangdan@cde.org.cn。

[通讯作者] 李敏,女,主任药师,研究方向:生物制品药学技术评价。

联系电话:(010)80996187, E-mail: lim@cde.org.cn。

性、质量可控性的相关性予以确定。本文根据 ICH Q6B 理念从药学评价角度对上述结构特点/变化趋势等进行初步探讨,对结构特征需要考虑额外开展的研究工作提出建议,以期为预防用 mRNA 疫苗研发、生产及产品质量提升提供借鉴。

2 mRNA-LNP 的组成及形成机制

目前阶段,预防用 mRNA 疫苗经典的 LNP 制剂处方主要包含 4 种不同脂质成分:可电离脂质化合物、辅助磷脂化合物、胆固醇和聚乙二醇(PEG)脂质化合物。其中,可电离脂质化合物主要作用是结合 mRNA,维持 mRNA 稳定并将其有效递呈至靶细胞,同时在内涵体逃逸过程中发挥了重要作用;辅助磷脂和胆固醇在稳定 LNP 以及提高 LNP 与细胞膜融合过程中发挥重要作用,胆固醇通过填补脂质间的空隙增强 LNP 的稳定性,并在细胞融合阶段帮助脂质体与体内细胞膜融合,辅助脂质主要发挥纳米颗粒流动性的调节作用,同时也辅助与细胞膜融合的过程;PEG 脂质化合物则主要通过均匀分布在 LNP 表面增强 LNP 稳定性,且通过限制脂质融合以控制 LNP 的粒径,在体内发挥降低血浆清除、延长体内循环等功能^[4]。

制备 mRNA-LNP 一般划分为 2 个生产阶段:首先是通过线性化的质粒模板进行转录、加帽和纯化得到 mRNA 原液。成品的生产工艺流程通常是将 mRNA 溶解在 pH 酸性的水相缓冲液中,脂质成分

按照一定的比例溶解在乙醇溶液中,有机相的脂质混合溶液和水相的 mRNA 溶液按一定的流速比经纳米混合设备(微流控芯片设备或者射流混合器)混合得到 mRNA-LNP 包封液,包封液经 pH 调节及稀释、超滤、浓缩和无菌过滤后得到最终的 mRNA-LNP 成品。

如图 1 所示^[5],在 mRNA-LNP 形成过程中,首先在酸性缓冲溶液中脂质乙醇溶液和 mRNA 水溶液进行混合,酸性条件下可电离阳离子脂质化合物中叔胺基团迅速被质子化形成带有正电的季铵盐结构,与带有负电荷磷酸基团的 mRNA 通过静电相互作用形成疏水性复合物,该复合物结构一般为反六角相的结构^[6],其他脂质成分由于其两亲的结构特性形成胶束、囊泡等颗粒结构,在该过程中得到的主要是一些小颗粒复合物。上述不规则的小颗粒复合物分散在含有乙醇的酸性缓冲溶液中,需要立即将 LNP 置于中性缓冲液中进行稀释和透析(或超滤)。随着 pH 值的升高,脂质颗粒之间发生融合^[5,7-8],各脂质组分重新分配,可电离脂质去质子化使其电荷趋向中性,与 mRNA 的静电结合能力下降。在水相环境中,可电离脂质和胆固醇发生分离,在 LNP 内部形成无定形的油相内核^[6],而双亲性的辅助磷脂和 PEG 脂质在外层形成单层、双层或者多层的壳状结构,最终形成一个热力学稳定的壳核球状结构。

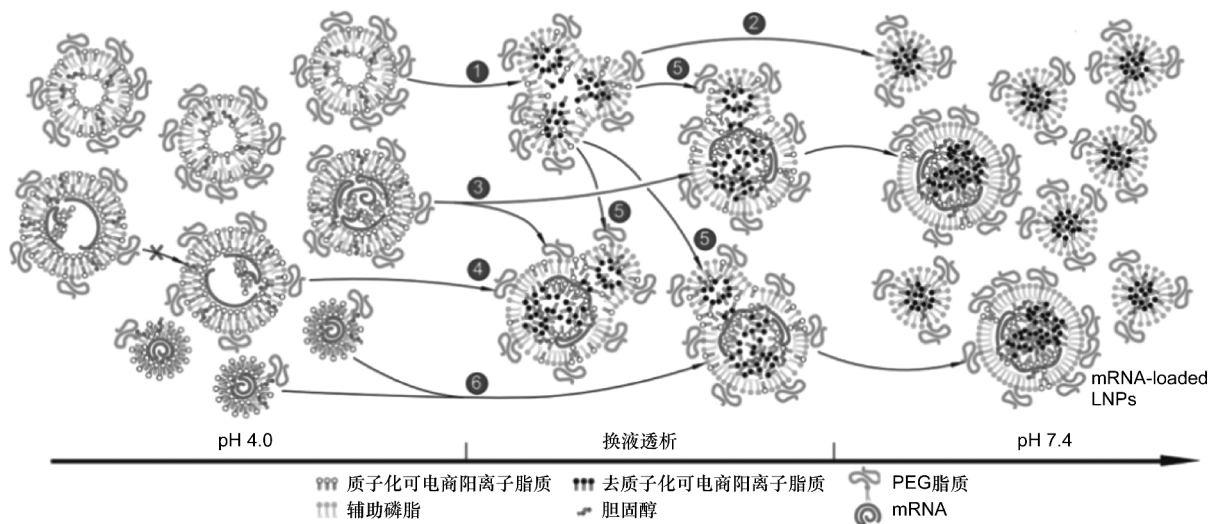


图 1 mRNA-LNP 复合物形成机制示意图^[5]

通过 mRNA-LNP 形成过程,可以看出脂质成分比例、脂质相和水相的流速及比例、缓冲盐种类及浓

度、过程中 pH 控制以及稀释纯化方法都会直接影响到 mRNA-LNP 颗粒大小、包封率、表面电势、颗粒

形态等关键质量属性。

3 mRNA-LNP 粒径变化

LNP 在生产及储存过程中粒径出现不均一、不稳定且变化较大的共性问题,这也是在 mRNA 疫苗多年开发过程中全球聚焦的问题之一。制剂制备过程中,尽管 mRNA-LNP 形成的上述原理较为通用,但由于各企业制剂处方、制剂工艺及设备的不同,LNP 粒径在不同工艺阶段的动态变化也会有所差异。产品粒径变化可能存在以下 3 种情形:① LNP 包封到成品放行检测粒径均无明显变化。② LNP 自包封至半成品粒径较为稳定,成品放行检测中因产品贮存条件原因(涉及冻融),呈现粒径明显增大现象^[9]。③ 在包封后的各步稀释、pH 调整步骤粒径增大明显,之后趋于稳定,反复冻融对粒径未产生明显影响。

mRNA 疫苗创新程度较高且工艺复杂,整体上多种因素可能影响 mRNA-LNP 颗粒形成以及颗粒的大小,目前对粒径变化原因进行充分分析存在挑战,粒径大小对药品安全有效性的影响也尚需在临床试验中进行进一步验证。但从生产工艺稳定性及批间一致性角度,粒径处于相对稳定的状态更利于质控。从评价角度提出如下科学建议:在处方和工艺研究初期开展并积累更多的粒径-工艺参数相关性研究数据,依据相关影响因素持续优化生产工艺、储存条件等;对不同 LNP 生产阶段工艺参数设置、LNP 变化趋势进行深入研究,并建立适宜的内控,主要考虑阶段及因素如产品包封、包封后稀释、超滤、半成品配制各步的 pH 控制范围,对于 pH 变化较大的和/或 pH 接近可电离阳离子 pKa 的步骤,研究 LNP 粒径及其分布是否改变及其变化趋势;采用多种检测方法对粒径进行更深入的研究,除常规的动态光散射(DLS)法,还可以采用纳米颗粒追踪分析(NTA)、电镜计数、凝胶色谱,纳米流式等方法;另外除平均粒径外,建议积累颗粒累积分布 D_{10} 、 D_{50} 、 D_{90} 以及总粒子计数等参数,以期达到 LNP 粒径在一定条件下可以相对稳定的目标。

4 mRNA-LNP 不规则形态

综上所述,mRNA-LNP 的形成和结构转变的过程是一个由动力学控制逐渐转为热力学控制的过程。文献报道的 mRNA-LNP 冷冻电镜图主要包含 2 种结构类型,分别为无囊泡突出的单室结构以及含有双层囊泡突出结构的双室或多室结构^[10-13]。在 mRNA-LNP 的制备过程中,多种因素可能影响到

mRNA-LNP 的形态,如脂质种类、包封过程中的流速比、从 pH 酸性到中性的中和以及最终的透析超滤过程使用的缓冲盐种类及浓度等。同时,mRNA-LNP 成品在长期储存、反复冻融以及冻干复溶的过程也会引起 LNP 内部脂质、水和 mRNA 的重新分布,从而导致 mRNA-LNP 形态变化^[9, 14-15]。

针对 mRNA-LNP 的颗粒形态表征方法目前主要有透射电镜(TEM)、冷冻电镜(cryo-TEM)、原子力显微镜(AFM)、小角 X 射线散射(SAXS)、差示扫描量热法(DSC)、DLS、NTA 等方法^[16]。其中,虽然冷冻电镜存在仅能对局部视野进行定性监测、受主观影响较大等缺点,但其仍是当前颗粒形态表征中较为成熟的方法,且观测结果也较能反映颗粒实际状态。

目前,国内外已上市和正在研发的 mRNA 疫苗 LNP 多为无囊泡突出的单室结构,但也有部分研究的电镜图显示其 LNP 颗粒极度不均一^[17-19],形态各异,存在空泡和/或融合等现象。虽然有文献报道 mRNA-LNP 的囊泡结构可增加体外细胞转染效力及小鼠体内蛋白表达^[20],但上述研究仅为实验室探索性研究。因现有临床数据较为有限,尚无确证数据表明 LNP 囊泡结构与 mRNA 疫苗临床的安全性、有效性具有相关性。

LNP 结构需要考虑 mRNA 在颗粒内的分布、mRNA 是否被有效包封、LNP 融合状态等方面,从作用机制考虑,上述 LNP 颗粒形态、微观形态及群体形态的分布与产品递送效率、递送过程中是否会导致 mRNA 丢失等有关。虽然对于 mRNA-LNP 囊泡结构是否为稳定状态,目前存在着一定争议。但针对相同脂质材料仍存在不同产品或不同批次 mRNA-LNP 形态存在差异的情况,说明关键工艺参数及 LNP 制备设备等对 mRNA-LNP 关键质量属性影响较大,因此在工艺开发及优化过程中开展更多表征研究对于工艺和产品质量的不断优化尤为重要。为确保上市产品的批间一致性和可控性,建议考虑如下研究:不同囊泡结构对 mRNA-LNP 其他理化指标、体内外生物学活性、批间一致性以及临床安全有效性的影响,加深理解各种理化性质与生物活性的关系,为上市时制定有效的控制策略及控制标准提供依据。强化制剂处方、制备工艺、生产设备等的科学系统优化,包括不同工艺核心节点、制剂、稳定性考察等不同阶段的取样考察,尽量避免在成品中出现囊泡结构等不规则形态,以保证产品批间一致性

和可控性。

5 研究建议

目前国内外 mRNA 疫苗的指南中尚未对微观形态、药物包封状态等关键质量属性研究提出相关考虑,例如:常用于粒径及其分布分析的 DLS 方法的假设往往基于产品为规则的球形^[16],对于非球形形态不能有效客观地定量检测。对于出现的新结构特点,需要采用适宜的表征方法进一步深入研究,并进一步积累 mRNA-LNP 质量属性与临床安全有效性的关系,包括微观形态、分布状态等非常规质控项目。因此,在《新型冠状病毒预防用 mRNA 疫苗药学研究技术指导原则(试行)》等相关指导原则基础上,建议从多角度对 mRNA-LNP 进行表征。

将电镜技术应用到关键工艺步骤及其中间产物的颗粒质控研究、产品质量表征、工艺过程稳定性及贮存稳定性研究中^[21],提供多批次中间产物(至少包括超滤后样品、半成品)、成品及稳定性考察期间的电镜图谱。鼓励尽可能开展包封、超滤过程等阶段样品的电镜分析,同时需要规范电镜检测方法。粒径除放行标准中的 DLS 法,积累 D_{10} , D_{50} , D_{90} 等研究数据。开展制剂过程中不同阶段(如包封、pH 调整及超滤等过程中、半成品、成品)产物包封率、粒径分布的检测。

建议参照相关指南开展除电镜外对纳米颗粒的更多结构和表征研究,如在不同条件下核酸的泄露或释放行为研究;开展制剂过程中不同阶段(如包封、pH 调整及超滤等过程中)产物不含 mRNA 的空载体数、颗粒数及颗粒浓度、脂质成分均匀性等研究。积累数据分析 mRNA-LNP 形态特征及质量属性和疫苗效力、稳定性相关指标之间的关联性。

可开展制剂过程中不同阶段(如包封、pH 调整及超滤等过程中)产物 mRNA 在 LNP 中分布位置的拓展性、探索性研究。采用多种检测方法对关键指标进行研究,例如:粒径检测,除放行质量标准中的 DLS 法,建议采用 NTA、电镜计数、凝胶色谱、纳米流式等方法以及总粒子计数等方法;包封率检测,除常规使用的 Ribogreen 法,建议采用不同或互补的检测方法,如超速离心、超滤、凝胶色谱等进一步确证,在确证研究中采用不同条件包括极端条件处理后的产品以验证相关检测方法的适用性和产品的降解途径等。

6 小结

随着预防用 mRNA 疫苗研究不断深入,发现了

mRNA-LNP 结构/形态等新问题,因现有临床数据较为有限,mRNA-LNP 粒径大小、形态结构等质量属性与疫苗安全有效性的相关性尚不明确,但需站在产品全生命周期管理的角度进行产品特异性的全面评估,避免简单套用已有指南和标准的情况,应结合产品工艺特点及质量特性等加强药学研究理念。进一步开展 mRNA-LNP 粒径、形态及质量属性与生产工艺、制剂处方、生产设备等相关性的研究,加强工艺研究及过程控制,保证 mRNA-LNP 的可控性、稳定性及批间一致性。相信随着行业的发展,基础研究的加深以及企业和监管机构的合作探索,会有更加深入的研究,为未来 mRNA-LNP 药物的研发提供更好的借鉴。

[参 考 文 献]

- [1] 国家药品监督管理局药品审评中心. 新型冠状病毒预防用 mRNA 疫苗药学研究技术指导原则(试行)[S]. 2020.
- [2] WHO. Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases; regulatory considerations[EB/OL]. (2022-04-12). <https://www.who.int/publications/i/item/9789240046870>.
- [3] ICH. Q6B: Specifications Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products[EB/OL]. (1999-05-10). <https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B%20Guideline.pdf>.
- [4] ZHANG Y, SUN C, WANG C, et al. Lipids and lipid derivatives for RNA delivery[J]. *Chem Rev*, 2021, 121(20): 12181-12277.
- [5] LI S, HU Y, LI A. et al. Payload distribution and capacity of mRNA lipid nanoparticles[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5561.
- [6] PALONCÝOVÁ M, ŠREJBER M, ČECHOVÁ P, et al. Atomistic insights into organization of RNA-loaded lipid nanoparticles [J]. *J Phys Chem B*, 2023, 127(5): 1158-1166.
- [7] KULKARNI JA, DARJUAN MM, MERCER JE, et al. On the formation and morphology of lipid nanoparticles containing ionizable cationic lipids and siRNA[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(5): 4787-4795.
- [8] KULKARNI JA, WITZIGMANN D, LEUNG J, et al. Fusion-dependent formation of lipid nanoparticles containing macromolecular payloads[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(18): 9023-9031.
- [9] HENDERSON MI, EYGERIS Y, JOZIC A, et al. Leveraging biological buffers for efficient messenger RNA delivery via lipid nanoparticles[J]. *Mol Pharm*, 2022, 19(11): 4275-4285.
- [10] CORNEBISE M, NARAYANAN E, XIA Y, et al. Discovery of a novel amino lipid that improves lipid nanoparticle performance through specific interactions with mRNA[J]. *Adv Funct Materials*, 2022, 32(8): 2106727.
- [11] DI JX, DU ZL, WU KZ, et al. Biodistribution and non-linear gene expression of mRNA LNPs affected by delivery route and particle size[J]. *Pharm Res*, 2022, 39(1): 105-114.
- [12] WANG HM, CHEN Z, WANG ZH, et al. mRNA based vaccines provide broad protection against different SARS-CoV-2 variants of concern[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2022, 11(1): 1550-1553.
- [13] ZHAO H, WANG TC, LI XF, et al. Long-term stability and pro-

- tection efficacy of the RBD-targeting COVID-19 mRNA vaccine in nonhuman Primates[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 438.
- [14] SUZUKI Y, MIYAZAKI T, MUTO H, *et al*. Design and lyophilization of lipid nanoparticles for mRNA vaccine and its robust immune response in mice and nonhuman Primates[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 30: 226 – 240.
- [15] AI LX, LI YF, ZHOU L, *et al*. Lyophilized mRNA-lipid nanoparticle vaccines with long-term stability and high antigenicity against SARS-CoV-2[J]. *Cell Discov*, 2023, 9(1): 9.
- [16] MOURDIKODIS S, PALLARES RM, THANH NTK. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(27): 12871 – 12934.
- [17] BRADER ML, WILLIAMS SJ, BANKS JM, *et al*. Encapsulation state of messenger RNA inside lipid nanoparticles[J]. *Biophys J*, 2021, 120(14): 2766 – 2770.
- [18] LEUNG AK, TAM YY, CHEN S, *et al*. Microfluidic mixing: a general method for encapsulating macromolecules in lipid nanoparticle systems[J]. *J Phys Chem B*, 2015, 119(28): 8698 – 8706.
- [19] RIPOLL M, BERNARD MC, VAURE C, *et al*. An imidazole modified lipid confers enhanced mRNA-LNP stability and strong immunization properties in mice and non-human Primates[J]. *Biomaterials*, 2022, 286: 121570.
- [20] CHENG MHY, LEUNG J, ZHANG Y, *et al*. Induction of bleb structures in lipid nanoparticle formulations of mRNA leads to improved transfection potency[J]. *Adv Mater*, 2023, 35(31): e2303370.
- [21] 安子璇, 张奇, 史彩云, 等. 乳铁蛋白修饰党参多糖脂质体的制备及体外评价[J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40(10): 1317 – 1329.

编辑:刘卓越/接受日期:2023-11-10