



Australian Government
Department of Health
Therapeutic Goods Administration

Zpráva o neklinickém hodnocení

Vakcí na BNT162b2 [mRNA] COVID-19 (COMIRNATY™)

Číslo přílohy: PM-2020-05461-1-2

Sponzor: Pfizer Australia Pty Ltd

ledna 2021

TGA Health Safety
Regulation

NEKLINICKÁ HODNOCENÍ ZPRÁVA

Typ podání : Nová vakcína

Sponzor: Pfizer Australia Pty Ltd

Generický název: BNT162b2 [mRNA] vakcína proti COVID-19

Obchodní název: COMIRNATY

Dávková forma a síla: Roztok; 500 µg/ml (zředěno tak, aby bylo dosaženo 30 µg/0,3 ml na injekci)

Typ vakcíny: mRNA zapouzdřená v LNP

Číslo příspěvku: PM-2020-05461-1-2

Číslo souboru Tox: E20-375469

Označení TRIM: D20-3908532

Datum: 8. ledna 2021 (revidováno 15. ledna 2021)

Poznámka: Tato hodnota zpráva byla přezkoumána a je schválena k uvolnění zadavateli.

OBSAH

SOUHRN	4
ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ	5
POSOUZENÍ	7
BEZPEČNOSTNÍ FARMAKOLOGIE.....	9
FARMAKOKINETIKA.....	10
TOXICITA.....	11
PŘIPOMÍNKY K NEKLINICKÉ SPECIFIKACI BEZPEČNOSTNÍ SPECIFIKACE PLÁNU ŘEŠENÍ RIZIK	14
INFORMACE O PRODUKTU.....	15
HLAVNÍ TĚLESO ZPRÁVY	17
1. ÚVOD	17
1.1. POZADÍ	17
1.2. SOUVISEJÍCÍ VAKCÍNY.....	17
1.3. SLOŽENÍ PRODUKTU	17
1.4. POMOCNÉ LÁTKY	17
1.5. ŠARŽE POUŽITÝCH MODULŮ 4 STUDIE.....	18
1.6. ZÁMOŽSKÝ REGULAČNÍ STAV.....	19
2. PRIMÁRNÍ FARMAKOLOGIE	20
2.1. IMUNOGENITA U MYŠÍ	21
2.2. STUDIE IMUNOGENITY A OCHRANY U OPIC.....	28
2.3. VYJÁDŘENÍ ANTIGENŮ.....	34
2.4. STRUKTURÁLNÍ CHARAKTERIZACE ANTIGENU S (P2 S).....	36
2.5. CYTOKINŮ/CHEMOKINŮ V LIDSKÝCH PERIFERNÍCH KREVNÍCH MONONUKLEÁRNÍCH BUŇKÁCH (PBMCs).....	37
3. BEZPEČNOSTNÍ FARMAKOLOGIE.....	38
4. FARMAKOKINETIKA.....	38
4.1. PLAZMOVÁ KINETIKA	38
4.2. DISTRIBUCE	40
4.2.1. Studie R-20-0072.....	40
4.2.2. Studie 185350	43
4.3. METABOLISMUS	46
5. TOXICITA OPAKOVANÝCH DÁVEK	48
5.1. KRYSA.....	49
5.1.1. 17denní studie: Kandidát na vakcínu BNT162b2 (V9)	49
5.1.2. 17denní studie: Varianty BNT162 mRNA.....	52
6. REPRODUKČNÍ A VÝVOJOVÉ STUDIE	54
6.1. PLODNOST A VÝVOJ EMBRYOFETÁLU	55
7. REFERENCE	56

SOUHRN

- Společnost Pfizer Australia Pty Ltd požádala o prozatímní registraci nové vakcíny mRNA, BNT162b2 [mRNA] Vakcína COVID-19 (COMIRNATY), ve formulaci lipidových nanočástic (LNP) [BNT162b2 (V9)] indikovaná k aktivní imunizaci k prevenci onemocnění COVID-19 způsobeného virem SARS-CoV-2, u jedinců ve věku 16 let a starší. Navrhovaný dávkovací režim zahrnoval podání dvou dávek 30 µg mRNA/0,3 ml na dávku podaných s odstupem 21 dnů intramuskulárně (IM).
- Zadavatel obecně provedl adekvátní studie farmakologie a toxicity (GLP) vyhovující cíl opakované dávky a studie vývoje a reprodukční toxicity) s BNT162b2 (V9). Omezené farmakokinetické studie byly provedeny s formulací LNP a dvěma novými lipidovými pomocnými látkami (ALC-0159 a ALC-0315).
- BNT162b2 (V9) byl sledován imunogenní v neklinických studiích u myši, potkanů a makaků rhesus. BNT162b2 (V9) indukoval humorální a buněčnou imunitní reakce u myši a opic. Avšak protilátky a T buňky u opic rychle klesaly po 5 týdnech po druhé dávce BNT162b2 (V9), což vyvolalo obavy z dlouhodobé imunity.
- Vakcína chránila opice před infekcí při expozici 55 dnů po 2. dávce vakcíny na základě virové RNA zátěže a radiografických plicních lézí. Dávka vakcíny u opic (100 µg) byla vyšší než navrhovaná klinická dávka 30 µg.
- Téměř podobný mikroskopický zánět plic byl pozorován u kontrolních i imunizovaných zvířat po vrcholu infekce (7./8. den). Makakové rhesus nevykazují klinické příznaky a obecně se u nich vyvine pouze mírná plicní patologie z infekce SARS-CoV-2. Nebyly provedeny žádné studie ochrany starších zvířat před infekcí SARS-CoV-2 nebo trvání ochrany po imunizaci. Studie na zvířatech byly krátkodobě dlouhodobá imunita nebyla hodnocena. Zadavatel uvedl, že dlouhodobá imunita bude řešena údaji o lidech.
- Neexistují žádné údaje o distribuci a degradaci mRNA kódující antigen S. Celotělová zobrazovací studie s náhradní mRNA exprimující luciferázu ukazuje, že se očekává, že formulace vakcíny LNP účinně dodá mRNA in vivo, mRNA a translatovaný antigenní protein jsou lokalizovány hlavně v místě vpichu, distribuovány v játrech a pravděpodobně drenážních lymfatických uzlinách a téměř úplně degradován během 9 dnů.
- Omezené studie prokázaly pomalou eliminaci ALC-0315 a retenci v játrech a úplnou eliminaci ALC-0159 za 14 dní, přičemž ALC-0159 je eliminován s největší pravděpodobností žlučí. Oba lipidy jsou také eliminovány amidovou nebo esterovou hydrolyzou.
- BNT162b2 (V9) byl tolerován u potkanů bez známek systémové toxicity. Podání potkanů BNT162b2 (V9) (3 dávky jednou týdně po 30 µg/dávku, ~200násobek klinické dávky na základě µg/kg) vykazoval zánět v místě vpichu, klinickou patologii (zvýšení počtu bílých krvinek, bazofilů, eozinofilů, neutrofilů, velkých nezabarvených buněk, fibrinogen a proteiny akutní fáze) a tkáňové patologie (hypercelularita drenážních lymfatických uzlin, sleziny a kostní dřeně), v souladu s imunitní stimulací a zánětlivými reakcemi, stejně jako minimální vakuolizace portálních hepatocytů bez známek poškození jater. Všechny účinky byly buď částečně nebo plně reverzibilní po 3 týdnech zotavení. Dávkovací interval (jeden týden) však nebyl ideální vzhledem k vrcholům imunitní odpovědi 2-3 týdny po podání a klinický dávkovací interval je 3 týdny. Vzhledem k dostupnosti klinických údajů se další studie s opakovanými dávkami na zvířatech nepovažuje za nezbytnou. Nedostatek návrhu studie toxicity po opakované dávce by neměl bránit schválení vakcíny.

- Kombinovaná reprodukční a vývojová studie neprokázala žádných účinků na samičí fertilitu, embryofetální vývoj a postnatální vývoj (až do odstavení) u potkanů. Samice potkanů, kterým byl podáván IM čtyřikrát (21 a 14 dní před páření a 9. a 20. den březosti) 30 ug/dávka BNT162b2, vykazovaly přechodnější zánětlivý růstek hmotnosti matky po každé injekci a zánětlivé změny v místě vpichu. Neutralizační protilátky byly indukovány u samic a detekovány u plodů a mláďat.
- Neexistují žádné studie opakované dávky nebo reprodukční toxicity specificky s novými pomocnými látkami. Nezdá se, že by zjištěné ve studiích s formulací vakcíny LNP byla způsobena lipidovými pomocnými látkami s výjimkou vakuolizace hepatocytů, která byla pravděpodobně projevem vychytávání lipidů hepatocyty. Vzhledem k tomu, že obě nové pomocné látky jsou amino nebo amino/PEG lipidy, očekává se, že potenciální celoživotní expozice bude nízká, a vzhledem k dostupnosti klinických údajů je absence studií toxicity po opakované dávce s pomocnými látkami u druhého druhu přijatelná. Ve studii s opakovanými dávkami u potkanů s variantou V8 nebylo pozorováno žádné významné zvýšení cytokinů; nicméně počet zvířat studovaných na cytokiny byl malý (n=3) a existovaly velké rozdíly mezi zvířaty. Jedna studie in vitro s použitím lidských PBMC poskytla neprůkazné výsledky. Proto potenciál LNP nebo vakcí nové formulace pro aktivaci komplementu nebo stimulaci uvolňování cytokinů nebyl v neklinických studiích adekvátně hodnocen.
- Vzhledem k chemické struktuře pomocných látek a omezené potenciální celoživotní expozici neočekává se, že by pomocné látky měly genotoxický nebo karcinogenní potenciál.

ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ

- Primární farmakologické studie ukazují, že vakcína vyvolává jak neutralizační protilátky, tak i buněčnou imunitní odpověď na spike (S) antigen u myši a opic a poskytly určitou ochranu opic před infekcí.
- Protilátky a T buňky u opic rychle klesaly během 5 týdnů po druhé dávce BNT162b2 (V9), vyvolávají obavy ohledně dlouhodobí imunity, která bude posouzena klinickými studiemi podle sponzora.
- Studie toxicity po opakovaných dávkách s navrhovanou vakcínou a variantou, obojí v LNP formulace u krys nevyvolala žádné bezpečnostní problémy. Nález byl v souladu s imunitní stimulací a zánětlivými reakcemi (zánětlivé změny v místě vpichu, zvýšená tělesná teplota, leukocytóza, zvýšený počet velkých nezabarvených buněk, fibrinogen a proteiny akutní fáze a hypercelularita lymfohematopoetických tkání). Vakuolizace hepatocytů (pravděpodobně lipidové vakuoly) nebyla spojena s průkazem poškození jater a byla reverzibilní.
- Toxicita formulace LNP a nových pomocných látek ALC-0159 a ALC-0315 byla hodnocena u jednoho druhu v rámci studie s opakovanými dávkami vakcíny. Neočekává se, že by mRNA ani lipidové excipienty formulace LNP měly genotoxický potenciál. Avšak potenciál LNP nebo vakcí nové formulace pro aktivaci komplementu nebo stimulaci uvolňování cytokinů nebyl v neklinických studiích adekvátně hodnocen. Doporučuje se další zkoumání (tj. analýza aktivace komplementu a stimulace cytokinů), pokud tato konkrétní obava není řešena klinickými údaji. Neexistence studie toxicity po opakované dávce u druhého druhu a studie genotoxicity s novými pomocnými látkami byla sponzorem přiměřeně zdůvodněna.
- Kombinovaná reprodukční a vývojová studie neprokázala žádných účinků na samičí fertilitu, embryofetální vývoj a postnatální vývoj (až do odstavení) u potkanů. Kategorie těhotenství B1 je považována za přijatelnou.

- Krátkodobé ochranné studie, nedostatek farmakokinetických údajů pro mRNA kódující S antigen (BNT162b2 V9), suboptimální interval dávkování ve studii s opakovanými dávkami, absence studií toxicity po opakovaných dávkách u druhého druhu a studií genotoxicity s novými pomocnými látkami a nedostatek studií zkoumajících potenciál pro autoimunitní onemocnění. Tyto nedostatky jsou však buď adekvátně zdůvodněny zadavatelem, nebo je lze řešit klinickými údaji.
- Proti prozatímní registraci vakcíny nejsou žádné neklinické námitky. Dlouhodobá imunita, autoimunitní onemocnění vyvolaná vakcínou nebyla v neklinickém programu studována a měla by být řešena klinickými údaji po prozatímní registraci. Doporučují se neklinické studie aktivace komplementu a stimulace uvolňování cytokinů, pokud tyto problémy nejsou řešeny klinickými údaji. • Návrh informací o

přípravku by měl být upraven podle pokynů na stranách 15-16.

POSOUZENÍ

Obecné komentáře

Společnost Pfizer Australia Pty Ltd požádala o provizorní registraci nové biologické entity, vakcíny BNT162b2 [mRNA] COVID-19 (COMIRNATY), podle paragrafu 23AA zákona. Tato vakcína je indikována k aktivní imunizaci k prevenci onemocnění COVID-19 způsobeného virem SARS-CoV-2 u jedinců ve věku 16 let a starších. BNT162b2 je mRNA vakcína ve formulaci lipidových nanočástic (LNP) (LNP BNT162b2), exprimující cílový spike glykoprotein (S) plnědávky SARS-CoV-2. Navrhovaný dávkovací režim jsou dvě dávky 30 µg mRNA/0,3 ml na dávku podané s odstupem 21 dnů intramuskulárně (IM).

Modul 4 zahrnoval neklinické studie s řadou variant mRNA kódující cílový protein S včetně BNT162b2 [V8 a finální komerční kandidát V9] formulovaných ve formulacích LNP. S klinickou formulací byly provedeny stejné studie. Sponzor uvedl, že varianty BNT162b2 V8 a V9 mají identickou aminokyselinovou sekvenci s nepatrnými rozdíly v sekvencích optimalizace kodonů pro lepší expresi antigenu.

Formulace vakcíny obsahuje dvě nově pomocné látky, 2-[(polyethylenglykol)-2000]-N,N-ditetradecylacetamid (ALC-0159) a ((4-hydroxybutyl)azandiyl)bis(hexan-6,1-diyl)bis(2-hexyldekanoát) (ALC-0315).

Farmakologie

BNT162b2 mRNA (V9) kóduje plnou dávku spike-glykoproteinu SARS-CoV-2 s modifikací dvou nukleosidů na zbytcích 986 a 987 (nahrazeno prolinem; exprimovaný protein nazvaný P2S). BNT162b2 mRNA je zapouzdřena v LNP, od které se očekává, že umožní vstup do hostitelských buněk, expresi proteinu S a vyvolání protilátkových i buněčných imunitní odpovědí.

Protein S se váže na receptor hostitelské buňky, enzym konvertující angiotenzin 2 (ACE2), aby získal vstup do hostitelských buněk (Chou et al. 2020).

Expresí S antigenu in vitro byla potvrzena v savčích buňkách (buňkách lidských embryonálních ledvin) pomocí western blotu, průtokové cytometrie a imunofluorescenčních testů.

Imunogenita byla hodnocena u myši divokého typu a opice rhesus a také u potkanů ve studiích toxicity po opakovaných dávkách a ve vývojové reprodukční studii. Studie ochrany byla provedena na opicích rhesus, protože ACE2 makaků rhesus má vysokou homologii s lidským ACE2 a vyšší vazebnou aktivitu pro SARS-CoV-2 než ACE2 jiných laboratorních zvířat (Wan et al. 2020).

Byly použity antigenně specifické enzymatické imunisorbentní testy (ELISA) a virové neutralizační testy s použitím pseudovirionu (studie na myších a studie toxicity po opakovaných dávkách u potkanů) nebo divokého typu viru SARS-CoV-2 (studie na opicích a studie opakované dávky a reprodukční toxicity u potkanů) charakterizovat humorózní odpověď. Hodnocení buněčných odpovědí zahrnovalo vyšetření odpovědí CD8+ a CD4+ T buněk. V předložených farmakologických studiích bylo zaznamenáno několik omezení. Zatímco myšičí modely ve farmakologických studiích mohly být použity k posouzení imunogenicity vakcíny, myšičí divokého typu nemohly být použity k posouzení ochranné účinnosti vakcíny, protože protein SARS-CoV-2 S se účinně neváže na ACE2 myšičí divokého typu. k zahájení replikace (Zhao et al. 2020).

Ochranná účinnost byla tedy hodnocena pouze u jednoho živočišného druhu, opice rhesus.

Expresí antigenu S

Expresí antigenu P2S byla prokázána v buňkách HEK293 (buňky lidské embryonální ledviny) in vitro transfekovaných mRNA BNT162b2 za použití komerční transfekční soupravy, mRNA BNT162b2 formulované ve formulaci LNP nebo v lidské buněčné linii transfekované modifikovaným konstruktem pcDNA3.1 kódující mP2S. S protein kódující mRNA na platformách modifikované RNA (modRNA) vykazoval mírně vyšší rychlost transfekce ve srovnání se samoamplifikující mRNAs (saRNAs). Expresí S antigenu však byla vyšší u saRNA ve srovnání s modRNA. To se očekává s ohledem na replikační povahu platformy saRNA.

Exprimovaný protein S je lokalizován společně s markerem endoplazmatického retikula (ER), což naznačuje, že protein S je syntetizován a zpracováván v ER pro povrchovou expresi nebo sekreci. Exprimovaný P2S měl vysokou vazebnou afinitu k lidské ACE2 peptidázové doméně a anti-RBD lidské neutralizační protilátce (KD ~1,2 nM) a také se vázal na protilátky od pacientů v rekonvalescenci COVID-19. CryoEM analýza purifikovaného proteinu S2 exprimovaného z DNA potvrdila prefuzní konformaci P2 S podobnou dřívě uváděným strukturám P2 S (Cai et al. 2020; Henderson et al. 2020, Wrapp et al. 2020).

Imunogenicitá

Bylo zjištěno, že BNT162b2 (V9) je imunogenní u myši a opic, indukuje humorální i buněčnou imunitu. IgG protilátky u myši měly silnější afinitu k receptorové vazebné doméně (RBD) (KD 0,99 nM) proteinu S ve srovnání s S1 (KD 12 nM) proteinu S, a to jak s vysokou on rate (kon), tak nízkou rychlostí disociace (koff).

U myši jedna IM dávka BNT162b2 (V9) v 0,2, 1 nebo 5 µg/zvíře vyvolala protilátky anti-S1, anti-RBD a virus neutralizující protilátky, které byly detekovatelné od 7. dne a titry se zvyšovaly se zvyšující se dávkou a časem. 28 dní po imunizaci (doba posledního odběru vzorků). Protilátky indukované u myši byly subtypy IgG2 i IgG1, přičemž IgG2a byl mírně vyšší než IgG1 při imunizační dávce 1 a 5 µg, ale nižší než IgG1 v dávce 0,2 µg, což naznačuje imunitní odpověď zkravenou TH1 při vysokých dávkách (1 µg) a TH2-zkravená odpověď při nízkých dávkách.

U opic BNT162b2 (V9) indukoval podobné anti-S1 IgG a SARS-CoV-2 neutralizační protilátky v IM dávce 30 nebo 100 µg (5 a 17 µg/kg, vztaženo na tělesnou hmotnost 6 kg). Posilovací dávka 3 týdny po první dávce výrazně zvýšila titry protilátek. Protilátky se po imunizaci postupně snižovaly a 4 týdny po posilovací dávce se titry vázající S1 a neutralizační titry snížily 3-7krát. Sérové protilátky u imunizovaných opic nebyly sledovány dříve než 4 týdny po posilovací dávce. Sponzor uvedl, že dlouhodobá imunita byla hodnocena v probíhajících studiích fáze 1 v USA a Německu až 2 roky po očkování a tyto údaje by poskytl přesněji měřící dlouhodobé imunitě.

BNT162b2 (V9) také indukoval buněčnou imunitní reakci u myši a opic. Vakcíny vyvolala TH1-dominantní odpověď T buněk po jedné dávce 1 nebo 5 µg u myši a dvou dávkách (30 nebo 100 µg) u opic. U myši vyvolala imunizace BNT162b2 v dávce 1 µg vysoké hladiny T1 odpovědí, jak ukazují splenocyty IFN γ + CD4 a CD8, zvýšené uvolňování cytokinů cytokinů typu T1 (IFN γ , IL-2, TNF α) splenocyty po stimulaci S peptidy ex vivo a velmi nízké hladiny cytokinů TH2 (IL-4, IL-5, IL-13) s výjimkou nevysvětlitelných vysokých hladin IL-4, IL-5, IL-13 u jednoho z 8 zvířat.

Imunizace BNT162b2 také indukovala prozánětlivé cytokiny, jako je GM-CSF, TNF- α , IL-6 a IL-18, kromě IFN- γ , ve splenocytech. BNT162b2 zvýšil CD8+, CD4+ a TFH buňky (ale ne TH1) v drenážních lymfatických uzlinách. Podobně jako u myši byly u všech imunizovaných opic detekovány S-specifické TH1-dominantní reakce T-buněk IFN γ /IL2/TNF α se zvýšením S-specifických CD4+ T-buněk závislým na dávce, a to navzdory TH2-objektivní reakci v jednom z 6 opic. Stejně jako u myši vakcíny také vyvolala u opic odpověď CD8+ T buněk. Sponzor uvedl, že klinická data také prokázala silnou odpověď TH1-dominantních CD4+ T buněk a IFN γ + CD8+ T buněk po dvou dávkách 30 µg BNT162b2.

BNT162b2 (V8) indukoval humorální a buněčnou imunitní reakci u myši podobné BNT162b2 (V9), když byl podáván intramuskulárně. Nicméně byly pozorovány nižší titry funkčních neutralizačních protilátek ve srovnání s imunizací BNT162b2 (V9). Bylo tedy zjištěno, že BNT162b2 (V9) je více imunogenní u myši ve srovnání s BNT162b2 (V8), což potvrzuje vhodnost BNT162b2 (V9) jako klinického kandidáta.

Obě varianty BNT162b2 (V9 a V8) vyvolaly imunitní reakci (neutralizační protilátky) u potkanů, jak bylo zkoumáno ve studiích toxicity po opakovaných dávkách.

BNT162b2 (V9) v 0,05 až 15 µg/ml významně neindukoval prozánětlivé cytokiny (TNF-α, IL-6, IFN-γ, IL-1β) a chemokiny (MIP-1β a MCP-1) v lidské periferní krvi mononukleární buňky (PBMC) in vitro. Studie in vitro však poukázala pouze na PBMC od 3 dárců a výsledky byly mezi dárci velmi variabilní a zjištěná byla neprůkazná.

Ochrana proti infekci

BNT162b2 (V9) poskytl ochranu proti SARS-CoV-2 čelenž i u opic rhesus po dvou imunizačních dávkách 100 µg/dávku. Žádná virová RNA nebyla detekována v bronchoalveolární laváži (BAL), se sníženou virovou RNA detekována ve výtěrech z nosu a žádňoradiografické (rentgenové CT) léze u imunizovaných exponovaných zvířat. Naproti tomu virová replikace a plicní radiografické abnormality byly evidentní u neimunizovaných, provokovaných kontrol. Neexistoval žádný důkaz o zesílení onemocnění vyvolaného vakcínou, jak bylo zjištěno radiografickou analýzou. V žádných provokačních skupinách nebyly pozorovány žádné klinické příznaky, což je v souladu s jinými studiemi u primátů infikovaných SARS-CoV-2 (Munoz-Fontela et al. 2020). Zatímco opice nejsou dobrým zvířecím modelem těžkého onemocnění COVID-19 u lidí, jsou náchylné k virové replikaci a vyvinou se u nich relativně mírné plicní patologie způsobené SARS-CoV-2. Velmi mírný zánet plicních tkání byl pozorován u kontrolní i vakcinované skupiny 7 nebo 8 dnů po čelenž i, bez významného rozdílu ve skóre zánetu. V této studii byly použity srovnatelně mladší opice (2-4 roky staré), což mohlo přispět k absenci klinických příznaků a velmi mírné histologické patologii plic po virové infekci (Yu et al. 2020, Blair et al. 2020, Johansen a kol. 2020). Celkově vakcína chránila opice před infekcí SARS-CoV-2 na základě virové RNA zátěže a radiografických plicních lézí.

TH1 -objektivní reakce pozorovaná u myši a opic naznačuje nízké riziko zesílení na protilátkách (ADE) a zesílení respiračního onemocnění spojeného s vakcínou (VAERD).

Ačkoli v Austrálii dosud nebyla schválena žádná jiná vakcína na LNP-mRNA, výše uvedená farmakologická zjištění jsou v souladu se zjištěními z neklinických studií s několika vakcínami mRNA v rámci klinických studií využívající podobnou technologii platformy LNP (infekce chřipkou, vzteklinou a virem Zika) (Sahin et al. 2014, Pardi a kol., 2018, Pardi a kol., 2017).

Ačkoli imunitní mechanismus prevence infekce SARS-CoV-2 stále není dobře pochopen, je známo, že imunita zprostředkovaná protilátkami i imunita zprostředkovaná T buňkami jsou důležitými přispěvateli k účinné ochraně proti SARS-CoV-2 (Tay et al. 2020). Kromě toho, pokud je ochrana zprostředkovaná neutralizačními protilátkami neúplná, jsou cytotoxické CD8+ T buňky rozhodující pro virovou clearance (Arunachalam et al. 2020). Jedna studie zjistila, že mezi lidmi, kteří se uzdravili z COVID-19, 100 % mělo v oběhu CD4+ T buňky specifické pro S protein a 70 % mělo v oběhu CD8+ T buňky specifické pro S protein (Grifoni et al. 2020). Preklinické studie ukazují ochrannou roli T buněk v obraně hostitele proti SARS-CoV (Zhao & Perlman 2010).

Farmakologické studie ukázaly, že BNT162b2 (V9) indukuje humorální a buněčnou imunitní reakce u myši a opic. Vakcína chránila opice před infekcí při provokaci 55 dnů po 2. dávce vakcíny, ale dávka vakcíny (100 µg) u opic byla vyšší než navrhovaná klinická dávka 30 µg. Nebyly provedeny žádné studie o ochraně starších zvířat před SARS-CoV-2 infekce nebo trvání ochrany po imunizaci. Dlouhodobá imunita musí být posouzena z klinických studií. Sponzor se odvolával na probíhající zletou klinickou studii v USA a Německu, od které se očekává, že se bude zabývat dlouhodobou imunitou.

Bezpečnostní farmakologie

Omezené bezpečnostní farmakologické parametry, např. tělesná teplota, byly zkoumány ve studii toxicity v souladu se směrnici WHO pro neklinické hodnocení vakcín (WHO 2005).

Farmakokinetika

Farmakokinetické studie nejsou obecně vyžadovány pro vakcíny podle příslušných pokynů; nicméně jsou doporučovány pro nověpomocné látky nebo adjuvans použité v dané formulaci vakcíny a v těch kterých případech pro antigen. LNP v BNT162b2 obsahuje dvě nověpomocné látky, jejichž farmakokinetika byla studována na živočišných a in vitro. Kromě toho byla také studována tkáňová distribuce luciferázy exprimované luciferázou kódující mRNA jako zástupná mRNA vakcíny ve formulaci LNP.

distribuce a degradace mRNA/exprimovaného proteinu

Očekává se, že biodistribuce mRNA a exprimovaného antigenu kódovaného složkou mRNA BNT162b2 bude závislá na distribuci LNP. Pro vizualizaci tkáňové distribuce formulace mRNA-LNP byla mRNA kódující luciferázu formulována ve formulaci LNP (LNP8) podobné vakcíně BNT162b2. Po IM injekci formulace luciferázové mRNA u myši byla luciferáza detekována zobrazením celého těla hlavně v místě injekce, které po 9 dnech pokleslo na úroveň pozadí. Luciferáza byla také pozorována v játrech, která zmizela za 48 hodin. To je v souladu s jinými kinetickými studiemi s mRNA-LNP (Pardi et al.

2015). Citlivost zobrazovacího detekčního systému byla nízká. Distribuce do jiných tkání, např. drenážních lymfatických uzlin, je vysoce pravděpodobná (Lindsay et al. 2019), ale hladina byla pravděpodobně pod hranicí detekce zobrazovacího systému.

Očekává se, že mRNA vakcíny bude degradována vícestupňovými cestami [např. deadenylace, rozpad zprostředkovaný endonukleázou (Garneau et al. 2007)], zatímco antigenní protein podléhá proteolýze jako u endogenních proteinů. Neexistují žádné údaje o kinetice degradace mRNA BNT162b2. U myši injikovaných luciferázovou mRNA nepřítomnost exprimovaného proteinu do 9 dnů po dávkování indikuje, že mRNA byla degradována.

Nověpomocné látky

Jednodávková intravenózní (IV) studie u potkanů s použitím LNP zapouzdřující luciferázovou mRNA prokázala, že obě nověpomocné látky, ALC-0159 a ALC-0315 ve formulaci LNP se rychle distribuují z plazmy do jater, což byl jediný orgán odebraný pro analýzu. Velikost částic, účinnost enkapsulace a složení lipidů (ve vztahu ke koncentraci mRNA) v LNP byly podobné LNP použitému ve vakcíně. Eliminace obou lipidů byla pomalá, s eliminačními t_{1/2} (z plazmy) 73 h pro ALC-0159 a 139 h pro ALC-0315. Retence tkáně v játrech byla také kratší pro ALC-0159 než ALC-0315; koncentrace ALC-0315 v jaterní tkáni zůstala detekovatelná 14. den, zatímco ALC-0159 již nebyla kvantifikovatelná. Obě pomocné látky byly vyloučeny stolicí (~50 % dávky pro ALC-0159 a ~1 % dávky pro ALC-0315 za 14 dní). V moči nebyly zjištěny žádné změněné lipidy.

Distribuce lipidových nanočástic zapouzdřující mRNA kódující luciferázu byla zkoumána monitorováním radioaktivně značeného lipidového markeru po jediné IM injekci potkanům Wistar. Hlavní vychytávání lipidového markeru, pravděpodobně reprezentujícího lipidové nanočástice, bylo zaznamenáno v místě vpichu a v játrech s nízkou distribucí ve slezině, nadledvinách a vaječnicích (distribuce nebyla zkoumána v drenážních lymfatických uzlinách). Celková výtěžitost radioaktivity byla ve všech časových bodech velmi nízká (rozmezí = 20 – 60 %), pravděpodobně proto, že nebyly odebrány drenážní lymfatické uzliny v místě vpichu a nebyly analyzovány vzorky stolice, moči, jatečně upravených těl a výplachů z klece. Sponzor uvedl, že tkáň odebraná pro tuto studii byly standardním panelem tkání, který nezahrnoval drenážní lymfatické uzliny. Dávky vyšší (50 a 100 µg mRNA/zvíře) než ty navrhované lidem (30 µg mRNA) byly testovány na potkanech (průměrná BW ~ 225 g), kteří vykazovali klinické známky piloerectce, shrbenětlou, sníženou aktivitu a nepravidelné dýchání. To může naznačovat toxicitu formulace LNP ve vysokých dávkách. Dávka 50 µg mRNA/zvíře je ~ 370 x navrhovaná dávka pro člověka na základě µg/kg tělesné hmotnosti.

In vitro metabolické studie ukázaly pomalou, malou hydrolyzu obou nových lipidů u všech druhů (myš, potkan, opice a člověk). ALC-0159 byl převeden na N,N-ditetradecylamin a pravděpodobně PEG

(nestanoveno ve studii) pomalou hydrolyzou amidu a ALC-0315 na kyselinu 2-hexyldekanovou a hydroxyalkyl-azandiylověčí hydrolyzou esteru a bishydrolyzou. U potkanů, kterým byla podána jediná IV dávka LNP zapouzdřující mRNA kódující luciferázu (podobná LNP v klinické formulaci), nebyly detekovány žádné metabolity ALC-0159, zatímco kyselina 2-hexyldekanová v plazmě, [(4-hydroxybutyl)azandiy] dihexanol v plazmě, játrech, stolici a moči a glukuronidový konjugát [(4-hydroxybutyl)azandiy] dihexanolu v moči byly detekovány jako metabolity ALC-0315. Metabolity nebyly kvantifikovány.

Souhrnně, omezené farmakokinetické studie naznačují, že se očekává, že formulace vakcíny LNP bude účinně dodávat mRNA in vivo a antigen exprimovaný hlavně v místě vpichu, v játrech a pravděpodobně v drenážních lymfatických uzlinách. Omezené studie prokázaly pomalou eliminaci ALC-0315 a retenci v játrech a úplnou eliminaci ALC-0159 během 14 dnů, přičemž ALC-0159 se vyloučil s největší pravděpodobností žlučí.

Toxicita

17denní studie toxicity po opakovaných dávkách vyhovující GLP (studie 20GR142) byla provedena na potkanech za použití IM cesty s klinickou kandidátní vakcínou BNT162b2 (V9). Krysy dostaly 3 dávky vakcíny s odstupem 7 dnů po 30 µg/dávku (~120 µg/kg tělesné hmotnosti), ~200násobku klinické dávky na základě µg/kg (30 µg, což odpovídá 0,6 µg/kg na dávku pro 50 kg osobu).

Další studie na potkanech GLP (studie 38166) byla provedena s různými verzemi mRNA BNT162 včetně BNT162b2 (V8), která úzce souvisí s BNT162b2 (V9). Tři dávky BNT162b2 (V8) byly podávány krysám v dávce 100 µg/dávka (ekvivalent ~400 µg/kg na dávku). Obě studie použily adekvátní počet zvířat (10/pohlaví / ošetřovaná skupina plus 5/pohlaví /skupina pro pozorování zotavení).

Dávkovací interval nebyl optimální vzhledem k tomu, že imunitní odpověď vrcholí 2-3 týdny po podání a klinický dávkovací interval je 3 týdny. Kromě toho mají nově lipidové excipienty dlouhého poločasu eliminace. Studie toxicity po opakovaných dávkách s dávkovacím intervalem 2 nebo 3 týdny by byly vhodnější pro zkoumání potenciální toxicity vakcíny. Sponzor uvedl, že „Vzhledem k tomu, že byla k dispozici data platformy, bylo ve studiích toxicity po opakovaných dávkách použito paradigma zkráceného podávání, aby se vyhodnotila toxicita vakcíny se zkrácenou dobou studie umožňující rychlejší přechod do klinických studií. Údaje o platformě nebyly poskytnuty TGA ke kontrole. Vzhledem k dostupnosti klinických údajů se další studie s opakovanými dávkami na zvířatech nepovažuje za nezbytnou. Nedostatek návrhu studie toxicity po opakované dávce by neměl bránit schválení vakcíny.

Velké toxicity

Nález související s léčbou byly zvýšená tělesná teplota, akutní zánět v místě injekce s edémem a erytémem, zvýšený počet WBC, neutrofilů, velké zbarvené buňky (LUC), eozinofily, bazofily a fibrinogen ve studii s opakovanými dávkami u potkanů s BNT162b2 (V9). Snížil se poměr albumin/globulin a zvýšily se proteiny akutní fáze, α2-makroglobulin a α1-kyselý glykoprotein. Byly zaznamenány přechodně nižší retikulocyty (pouze 4. den) a mírně nižší množství červených krvinek (4. a 17. den). Hmotnost sleziny byla zvýšena v souvislosti se zvětšenou slezinou a lymfatickými uzlinami (odtokové lymfatické uzliny v místě vpichu). Nález byl v souladu s imunitní stimulací a zánětlivými reakcemi. Zvýšená LUC byla hlášena u pixatimodu, látky stimulující imunitu (Hammond et al. 2018) nebo akutních virových infekcí (Nixon et al. 1987).

Podobné nálezy byly pozorovány ve studii s variantami BNT162. U potkanů, kterým byla podávána dávka 100 µg BNT162b2 (V8), se kromě nálezů pro variantu V9 při opakovaném dávkování zvýšily lokální reakce, přirůstek tělesné hmotnosti po prvních 2 dávkách byl nižší než u kontrolní skupiny a došlo k malému zvýšení v séru GGT (2-3krát). Sérová GGT byla také stanovena ve studii V9 bez pozorovaných změn GGT souvisejících s vakcínou, ale citlivost testu GGT ve studii V9 (LOQ 3 IU/l) byla nižší než u testu ve studii V8 (LOQ < 1 IU/l). V žádné studii nebylo pozorováno zvýšení sérových ALT, AST, AP nebo bilirubinu.

Makroskopická patologie a změny hmotnosti orgánů byly u obou variant také podobné a zahrnovaly zvětšenou velikost drenážních (iliakálních) lymfatických uzlin a zvětšenou velikost a hmotnost sleziny. Mikroskopické nálezy související s léčbou byly pozorovány v místě vpichu a v okolních tkáních (zánětlivých buněk, většinou neutrofilů), drenážních lymfatických uzlinách (hypercelularita germinálních center a zvýšený počet plazmatických buněk, většinou plazmablastů), kostní dřeni (hypercelularita hematopoetických buněk, především myeloidních buněk), slezina (zvýšená hematopoéza a zárodečné centrum) a játra (vakuolizace hepatocytů v oblasti portálu), v souladu s imunitní odpovědí a zánětlivými reakcemi s výjimkou vakuolizace hepatocytů (minimální závažnosti), pravděpodobně lipidové vakuoly.

Klinické patologické nálezy (kromě sérového globulinu) a léze sleziny (hematopoéza), kostní dřeni a jater byly plně zvráceny po 3týdenní zotavovací fázi. Místní vpichu, slezina (zvýšené zárodečné centrum) a nálezy v lymfatických uzlinách přetrvávaly během 3týdenní zotavovací fáze (obě varianty V9 a V8) a tělesná teplota zůstala na zvýšené úrovni na konci 3týdenní zotavovací fáze (pro variantu V8).

Imunitní odpověď (vazebná pseudovirus neutralizující protilátky pro BNT162b2 [V8] a SARS-CoV-2 neutralizující protilátky pro BNT162b2 [V9]) byla vyvolána antigenem BNT162b2 (V8 a V9) u potkanů.

Nové pomocné látky

Toxicita formulace LNP nebo nových pomocných látek samotných nebyla specificky studována. Ve studiích toxicity po opakované dávce s klinickou kandidátskou vakcínou (BNT162b2 V9) a BNT162b2 V8 se dávky ALC-0159 a ALC-0315 pohybovaly v rozmezí 214 – 636 µg/kg a 1720 – 4700 µg/kg, což odpovídá 1284 – 3816 µg/m² (ALC-0159) a 10 320 – 28 200 µg/m² (ALC-0315).

Expozice u potkanů byla až ~100krát vyšší než klinická expozice na základě dávky na plochu povrchu těla (53 a 430 µg/dávka pro ALC-0159 a ALC-0315, ekvivalentní 35 a 285 µg/m², v tomto pořadí, pro 50 kg osobu s tělesným povrchem 1,51 m²). Není jisté, zda některá výše uvedená zjištění souvisela s těmito pomocnými látkami. Je pravděpodobné, že vakuolizace hepatocytů je způsobena vychytáváním těchto lipidů hepatocyty. V literatuře byly hlášeny protichůdné nálezy týkající se indukce aktivace komplementu a uvolňování cytokinů, akutní imunologické odpovědi, která může vést k anafylaktickému šoku, pomocí LNP nebo LNP zapouzdřujících mRNA nebo siRNA ve studiích na zvířatech (Sabnis et al. 2018, Sedic et al. 2018). Potenciál LNP nebo vakcín nové formulace pro aktivaci komplementu nebo stimulaci uvolňování cytokinů nebyl v neklinických studiích adekvátně hodnocen. Jedna studie in vitro s použitím lidských PBMC poskytla neprůkazné výsledky. Ve studii s opakovanými dávkami u potkanů s variantou V8 nebylo pozorováno žádné významné zvýšení cytokinů; nicméně počet zvířat studovaných na cytokiny byl malý (n=3) a existovaly vysoké rozdíly mezi zvířaty bez prázdné kontroly LNP.

Bezpečnost nových pomocných látek nebyla hodnocena u druhého druhu. Žádné další údaje nebudou předloženy, jak uvedl sponzor. V reakci na dotaz TGA týkající se hodnocení toxicity nových pomocných látek ve formulaci LNP sponzor odkázal na hodnocení produktu siRNA Onpattro™ (patisiran) 1, 2 podávaného jako přípravek LNP, který je schválen v USA, Evropě a Kanadě (nepřezkoumáno TGA) pro léčbu hereditární amyloidózy zprostředkované transthyretinem (amyloidóza hATTR) pomocí IV infuze každé 3 týdny. LNP v Onpattro™ se skládá z DLin-MC3-DMA, PEG2000-C-DMG, DSPC a cholesterolu. V hodnoceních FDA a EMA nebyly identifikovány žádné klinické bezpečnostní obavy týkající se pomocných látek, nečistot nebo produktů degradace. Primární toxicita pozorovaná u potkanů i opic bylo zvýšení jaterních enzymů s vakuolizací hepatocytů. Sponzor proto tvrdil, že by měly ALC-0315 a ALC-0159

1 US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Onpattro (patisiran) NDA 210922 multidiscipline review, 19. března 2018. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/210922Orig1s000MultiR.pdf. Přístup: leden 2021. 2 https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/onpattro-epar-public-assessment-report_pdf

podobný profil toxicity jako u lipidů DLin-MC3-DMA a PEG2000-C DMG, v daném pořadí, protože byly strukturně a funkčně podobné (viz část 1.4). Avšak zatímco pegylované lipidy (ALC-0159 a PEG2000-C DMG) jsou strukturálně podobné struktury ALC-0315 a DLin-MC3-DMA podobnější jsou. Nicméně vzhledem k tomu, že obě nově pomocné látky jsou amino nebo amino/PEG lipidy a očekává se, že potenciální celoživotní expozice bude nízká (viz diskuse níže), zdůvodnění sponzora pro neprovedení studií toxicity po opakovaných dávkách s novými pomocnými látkami u druhého živočišného druhu je přijatelné.

Genotoxicita

U vakcíny nebyly provedeny žádné studie genotoxicity. To je v souladu s příslušnými pokyny pro vakcíny. Také nebyly provedeny žádné studie genotoxicity s novými pomocnými látkami. Zadavatel uvedl, že se neočekává, že by nově pomocné látky byly genotoxické na základě analýzy in silico (Derek Nexus 6.1.0, Derek Knowledgebase 2020 verze 1.0 a Sarah Nexus 3.1.0, Sarah Model 2020.1 verze 1.8) nových lipidů a jejich primární metabolity (zprávy nejsou poskytnuty).

Zadavatel odůvodnil absenci studií genotoxicity novými expozicemi lipidům na základě konceptu prahu toxikologického zájmu (TTC).³ Lidská expozice ALC-0159 a ALC-0315 jako součásti vakcíny LNP-BNT162b2 je 53,4 µg a 430 µg, resp. Za předpokladu, že by vakcína byla podávána dvakrát ročně, TTC pro méně než celoživotní (LTL) expozici by byla 19,16 mg/den, na základě TTC 1,5 µg pro mutagenní látku po dobu života 70 let a lineární extrapolaci na LTL TTC podle směrnice ICH M7 (1,5 µg x 365 dnů x 70 let/2 dny = 19 162,5 µg). Vypočtená přijatelná expozice LTL je 360krát a 45krát vyšší než expozice ALC-0159, respektive ALC-0315 z vakcíny.

Sponzor také tvrdil, že ALC-0159 a ALC-0315 jsou strukturně a funkčně podobné lipidovým pomocným látkám PEG-2000-C-DMG a DLin-MC3-DMA, v daném pořadí, používaným v siRNA léku Patisiran.^{1, 2} Oba DLin- Bylo zjištěno, že MC3-DMA a PEG-2000-C-DMG jsou negativní v plně baterii testů genotoxicity patisiranu ve formulaci LNP.

Vzhledem k výše uvedenému se neočekává, že by nově pomocné látky v BNT162b2 představovaly genotoxické riziko.

Karcinogenita

Studie karcinogenity nebyly provedeny. To je přijatelné na základě doby používání. Neočekává se, že by nové pomocné látky byly karcinogenní na základě nízké expozice, trvání expozice a nepřítomnosti strukturálních výstrah pro mutagenitu (viz diskuse výše).

Reprodukční toxicita

Na potkanech byla provedena studie reprodukční a vývojové toxicity vyhovující cíli GLP. Krysám byla podána dávka dvakrát (21 a 14 dnů) před začátkem páření a dvakrát během březosti (9. a 20. březost). Dávka podaná potkanům byla 30 µg mRNA/dávka, což je ~200násobek navrhované klinické dávky na základě µg/kg. Tato studie byla adekvátně provedena, pokud jde o dávkovací období a velikost skupiny (44 samic potkanů na léčebnou skupinu) s 22 samicemi/skupinou pro cílový řez na konci březosti a zbývajícími 22 samicemi/skupinou bylo ponecháno na vrh a odchovat mláďata až do odstavení před odstavením. obětovat a zkoumat. Posuzován byl také postnatální vývoj mláďat až do odstavení.

Studie neprokázala žádné nepříznivé účinky na samičí plodnost, embryofetální vývoj a postnatální vývoj (až do odstavení) u potkanů, když jim byly podány čtyři injekce vakcíny BNT162b2 (V9). Samice potkanů vykazovaly přechodnější než tělesnou motnost po každé injekci a otoky

³ Směrnice ICH M7(R1) (2017): Hodnocení a kontrola DNA reaktivních (mutagenních) nečistot ve farmaceutických výrobcích s cílem omezit potenciální karcinogenní riziko.

místo (místa) injekce s nebo bez kulhání a piloerectce. Vakcíny v dávce pro člověka (30 µg) vyvolala aktivní imunitní odpověď na SARS-CoV-2 u všech potkaních samic z vakcinované skupiny. Byla také prokázána expozice plodů a mláďat protilátkám specifickým pro vakcínu.

Klasifikace těhotenství

Zadavatel navrhl kategorii těhotenství B1. Kategorie březosti B1 je považována za vhodnou pro tento produkt, protože v kombinované reprodukční a vývojové studii na potkanech nebyly zaznamenány žádné embryofetální účinky.

Místní tolerance

Jak bylo diskutováno výše, po IM dávkování byly pozorovány známky zánětlivých buněčných infiltrátů v místě injekce. V obou studiích s BNT162b2 (V8 a V9) místní zánět přetrvával, i když se částečně zotavil, po 3týdenní zotavovací fázi po poslední dávce. Kromě toho lokální klinický edém a erytém v místě vpichu u potkanů vymizel před každým dalším podáním vakcíny.

Imunotoxicita

Nebyla provedena žádná specializovaná studie imunotoxicity. In vitro studie o stimulaci uvolňování cytokinů v lidských PBMC buňkách poskytla neprůkazné výsledky. Podle očekávání byly ve farmakologických studiích a studiích toxicity po opakovaném podávání pozorovány imunostimulační účinky. Ve studiích nebyla pozorována žádná systémová intolerance nebo mortalita související s vakcínou.

Ve studiích s opakovanými dávkami s BNT162b2 variant V8 nebylo pozorováno žádné významné uvolňování cytokinů, nicméně počet zvířat studovaných na cytokiny byl malý (n=3) a mezi zvířaty byly velké rozdíly. IFN-γ byl zvýšen u zvířat imunizovaných BNT162b2. Bylo zjištěno, že IFN-γ hraje roli v autoimunitě (Lees 2015; Pollard et al. 2013). Autoimunitní onemocnění jsou tedy potenciálním rizikem vakcíny. To je řešitelné problémy cími 2letými klinickými studiemi.

Pediatrické použití

BNT162b2 není navržen pro pediatrické použití a nebyly předloženy žádné specifické studie na juvenilních zvířatech.

Komentáře ke specifikaci neklinické bezpečnosti plánu řízení rizik

Klíčové obavy týkající se bezpečnosti vyplývající z neklinických údajů jsou adekvátně identifikovány v bezpečnostní specifikaci plánu řízení rizik (část II, modul SII) ze dne 29. listopadu 2020. Výsledky studie vývojové a reprodukční toxicity nejsou v plánu řízení rizik uvedeny.

INFORMACE O PRODUKTU

Hodnocení 1. kola — Milník 3

Následující komentáře odkazují na revidovaný návrh dokumentu s informacemi o přípravku (verze: pfpcovii10121), který doprovází korespondenci sponzora ze dne 5. ledna 2021. Pokud jsou navrženy změny, je text navržený k vložení podtržen a text, který má být vymazán, je přeškrtnutý.

4.5 Interakce s jinými léky a jiné formy interakcí

Neexistují žádné klinické studie interakcí. Navrhovaná tvrzení by měla posoudit klinický hodnotitel.

4.6 Fertilita, březost a laktace

Účinky na plodnost

Prohlášení navržených oddílů 5.3 Předklinické údaje o bezpečnosti – Toxicita pro reprodukci by zde mělo být přesunuto s menší úpravou.

„V kombinované studii fertility a vývojové toxicity byla samicím potkanů intramuskulárně podána COMIRNATY před pářením a během březosti (4 plně dávky pro člověka, každá po 30 µg, v rozmezí mezi 21. dnem před pářením a 20. dnem březosti). Neutralizační protilátky SARS CoV-2 byly přítomny u mateřských zvířat před pářením do konce studie 21. den po narození, stejně jako u plodů a potomků. Nebyly zjištěny žádné účinky související s vakcínou na ženskou plodnost a míru otěhotnění. Studie na zvířatech nenaznačují přírodní nepřímé škodlivé účinky s ohledem na reprodukční toxicitu (viz bod 5.3 Předklinické údaje vztahující se k bezpečnosti).“

Použití v těhotenství

Jak je uvedeno v hodnocení, kategorie B1 v těhotenství je považována za vhodnou pro tento produkt, protože v kombinované reprodukční a vývojové studii na potkanech nebyly zaznamenány žádné embryofetální účinky.

Doporučují se následující změny.

„Těhotenství kategorie B21 —“

S použitím přípravku COMIRNATY u těhotných žen jsou omezené zkušenosti. Studie na zvířatech Studie kombinované fertility a vývojové toxicity na potkanech neprokázaly škodlivé účinky vakcín na embryofetální vývoj, nenaznačily příčné nebo nepřímé škodlivé účinky na těhotenství, embryo/fetální vývoj nebo postnatální vývoj (viz část Účinky na fertilitu 5.3 Předklinické údaje o bezpečnosti). O podávání COMIRNATY v těhotenství by se mělo uvažovat pouze tehdy, pokud potenciální přínosy převáží nad přírodními riziky pro matku a plod.

Použití při laktaci

Doporučuje se uvést výsledky studie na potkanech.

„Není známo, zda se BNT162b2 vylučuje do lidského mléka. Kombinovaná studie plodnosti a vývojové toxicity u potkanů neprokázala škodlivé účinky na vývoj potomstva před odstavením (viz Účinky na plodnost).“

5.1 Farmakodynamické vlastnosti

Mechanismus působení

Prohlášení o mechanismu účinku jsou podpořena klinickými údaji. Jsou navrženy drobné redakční změny.

„Nukleosidy modifikovaná messengerová RNA v COMIRNATY je formulována v lipidových nanočásticích, které umožňují dodání nereplikující se RNA do hostitelských buněk k přímé přechodné expresi SARS-CoV-2 spike antigenu (S). mRNA kóduje membránově ukotvený, kompletní S se dvěma bodovými mutacemi v centrální šroubovici. Mutace těchto dvou aminokyselin na prolin uzamkne S v antigenně preferovanou preferovanou konformaci. COMIRNATY vyvolává jak neutralizační protilátkové tak buněčné imunitní reakce na hroty (S) antigen, což může přispět k ochraně proti COVID-19.“

5.3 Předklinické údaje vztahující se k bezpečnosti

Prohlášení týkající se obecné reprodukční toxicity by měla být z této části odstraněna. Prohlášení o genotoxicitě a karcinogenitě je přijatelné

„Neklinické údaje na základě konvenčních studií toxicity po opakovaném podávání neodhalily žádné zvláštní riziko pro člověka.“

Obecná toxicita

Potkani intramuskulárně podávaná COMIRNATY (dostávají tři plné dávky pro člověka jednou týdně, generují relativně vyšší hladiny u potkanů kvůli rozdílu v tělesné hmotnosti) prokázaly určité edém v místě vpichu a erytém a zvýšení počtu bílých krvinek (většinou bazofilů a eozinofilů) v souladu se známou odpovědí, stejně jako vakuolizaci portálních hepatocytů bez známek poškození jater. Všechny účinky byly reverzibilní.

Genotoxicita/karcinogenita

Nebyly provedeny studie genotoxicity ani kancerogenity. Neočekává se, že složky COMIRNATY (lipidy a mRNA) mají genotoxický potenciál.

Reprodukční toxicita

Reprodukční a vývojová toxicita byla zkoumána u potkanů v kombinované studii fertility a vývojové toxicity, kde byly samicím potkanům intramuskulárně podávány COMIRNATY před pářením a během březosti (dostaly 4 plné dávky pro člověka, které generovaly relativně vyšší hladiny u potkanů kvůli rozdílu v tělesné hmotnosti, v rozmezí mezi den před pářením 21 a den březosti 20). Odezvy neutralizačních protilátek SARS-CoV-2 byly přítomny u mateřských zvířat před pářením do konce studie 21. den po narození, stejně jako u plodů a potomků. Nebyly zjištěny žádné účinky související s vakcínou na ženskou fertilitu, těhotenství nebo vývoj embrya, plodu nebo potomstva. Nejsou k dispozici žádné COMIRNATY údaje o placentárním přenosu vakcíny nebo vylučování do mléka.“

HLAVNÍ TĚLESO ZPRÁVY

1. ÚVOD

1.1. POZADÍ

Společnost Pfizer Australia Pty Ltd požádala o registraci novorekombinantní vakcíny, profylaktické mRNA vakcíny (kód: BNT162b2) zapouzdřené v pevných lipidových nanočásticích (COMIRNATY). Vakcína je indikována k aktivní imunizaci k prevenci onemocnění COVID-19 způsobeného virem těžkého akutního respiračního syndromu koronavirus-2 (SARS-CoV-2) u jedinců ve věku 16 let a starších. Vakcinační schéma se skládá ze dvou dávek 30 µg BNT162b2 mRNA v každé dávce 0,3 ml, podaných intramuskulárně (IM) dvakrát v intervalech 21 dnů.

1.2. SOUVISEJÍCÍ VAKCÍNY

Vakcína BNT162b2 COVID-19 je nukleosidy modifikovaná formulace na bázi pevných lipidových nanočástic na bázi mRNA, která má být registrována pro koronavirové onemocnění. V současné době není v Austrálii registrována žádná mRNA vakcína.

1.3. FORMULACE PRODUKTU

Vakcína BNT162b2 se dodává jako koncentrovaná suspenzní formulace bez konzervačních látek pro intramuskulární (IM) podání po naředění. Vakcína obsahuje nukleosidy modifikovanou messenger RNA, kódující SARS-CoV-2 Spike-glykoprotein (S), produkovaný in vitro transkripční procesem a zapouzdřené do pevných lipidových nanočástic (LNP). LNP se skládá ze čtyř lipidů: ALC-0315, ALC-0159, DSPC a cholesterolu. Množství mRNA, lipidů a pomocných látek jsou uvedeny níže v tabulce 1-1.

Tabulka 1-1. Formulace produktu

Pří sada
BNT162b2 mRNA
((4-hydroxybutyl)azandiyl)bis(hexan-6,1-diyl)bis(2-hexyldekanoát)*
2-[(polyethylenglykol)-2000]-N,N-ditetradecylacetamid#
1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-fosfocholin (DSPC)
Cholesterol
Chlorid draselný
Hydrogenfosforečnan sodný
Dihydrogenfosforečnan draselný
Chlorid sodný
Sacharóza
Voda na injekci



* kód společnosti = ALC-0315; # kód společnosti = ALC-0159

1.4. POMOCNĚLÁTKY

2-[(polyethylenglykol)-2000]-N,N-ditetradecylacetamid (ALC-0159) a ((4-hydroxybutyl)azandiyl)bis(hexan-6,1-diyl)bis(2-hexyldekanoát) (ALC-0315) jsou nově pomocné látky a nejsou uvedeny v databázi složek TGA. Tyto pomocné látky budou v této zprávě označovány jako ALC-0159 a ALC-0315. Podle prohlášení sponzora byl ALC-0315

optimalizovaný pro zapouzdření RNA a intracelulární dodání a ALC-0159 byl navržen tak, aby reguloval velikost LNP (40 – 180 nm) a transfekční účinnost. Údaje o šaržích pro více šarží navrhované vakcíny ukázaly velikost částic (D50) v rozmezí 58 – 94 nm (tabulka 1-3). Lipidy chrání mRNA před degradací a usnadňují přímou buňkou, proto jsou hlavními determinanty účinnosti (Jayaraman et al. 2012). Sponzor uvedl, že tyto nové excipienty, ALC-0159 a ALC-0315, jsou strukturálně a funkčně podobné lipidovým excipientům PEG2000-C DMG a DLin MC3-DMA, v daném pořadí, používaným v léčivém produktu siRNA-LNP Onpatro™ (patisiran), který je schválen v USA, Evropě (EMA) a Kanadě.

Podrobnosti o těchto lipidech jsou uvedeny níže.

Produkt	Nový lipidový excipient (Č. CAS, Molekulární vzorec a hmotnost v Da)	Struktura	Chemický název
BNT162b2 V9	ALC-0159 (CAS č. 1849616-42-7, (C ₂ H ₄ O) _n C ₃₁ H ₆₃ NO ₂ , n=45-50 a 2400-2600 Da)		2-[[polyethylenglykol]-2000]-N,N-ditetradecylacetamid
	ALC-0315 (čí slo CAS 2036272-55-4, C ₄₈ H ₉₅ NO ₅ a 766 Da)		((4-hydroxybutyl)azandiyl)bis(hexan-6,1-diyl)bis(2-hexyldecanoát)
Onpatro™ (patisiran)	PEG2000-C-DMG [NA, C ₂ H ₄ O) _n C ₃₆ H ₇₃ NO ₅ , n=47 a 2650±300 Da]		(α-(3'-[[1,2-di((myristyloxy)propanoxy)karbonylamino)propyl
	DLin-MC3-DMA [NA, C ₄₃ H ₇₉ NO ₂ a 642,09 Da]		(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino)butanoát

1.5. ŠARŽE POUŽITĚV MODULU 4 STUDIE

Vývoj vakcíny COVID-19 zahrnoval několik variant mRNA BNT162, které jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 1-2).

Tabulka 1-2. Varianty kandidátů na vakcíny BNT162 mRNA

Kandidát na vakcíny BNT162	typ RNA	Kódovaný antigen
BNT162a1	Nemodifikovaná uridinová mRNA	Vazebná doména receptoru SARS-CoV-2, secernovaná varianta
BNT162b1	Nukleosidy modifikovaná mRNA	Vazebná doména receptoru SARS-CoV-2, secernovaná varianta
BNT162b2 (V8 a V9)	Nukleosidy modifikovaná mRNA	Plná délka spike proteinu SARS-CoV-2 nesoucí mutace zachovávají cílovou citlivost na neutralizaci
BNT162b3	Nukleosidy modifikovaná mRNA	Vazebná doména receptoru SARS-CoV-2, varianta vázaná na membránu

Kandidát na vakcínu BNT162	typ RNA	Kódovaný antigen
BNT162c1	Samoamplifikující cí mRNA	Vazebná doména receptoru SARS-CoV-2, secernovaná varianta
BNT162c2	Samoamplifikující cí mRNA	Plná dělá proteinu SARS-CoV-2 S nesoucí mutace zachovávají cí mí sta citlivá na neutralizaci

Jako klinický kandidát byla vybrána varianta V9. V8 a V9 mají identické aminokyselinové sekvence kódovaných antigenů a liší se pouze svými sekvencemi pro optimalizaci kodonů, které byly navrženy pro zlepšení exprese antigenu (V9) s vyšším obsahem cytosin ribonukleotidů.

Hlavní farmakologické studie a klíčové studie s opakovaným podáváním byly provedeny s BNT162b2 (V9). Studie imunogenicity a toxicity byly také provedeny s variantou V8. Všechny varianty mRNA testované v neklinických studiích byly formulovány s LNP.

Během vývoje bylo zavedeno několik změn výrobního procesu pro BNT162b2 mRNA, včetně výrobního měřítka. Navrhovaný výrobní proces v komerčním měřítku zahrnuje použití linearizovaného templátu plazmidové DNA pro produkci mRNA, zatímco v raných vývojových fázích byla použita PCR-amplifikace templátu DNA. Charakteristiky šarží BNT162b2 LNP použitých v neklinických studiích jsou uvedeny v následující tabulce (odpověď sponzora na neklinické otázky TGA).

Tabulka 1-3. Charakterizace LNP v neklinických studiích

Studie č.	Šarže LNP	Velikost (nm)	Účinnost zapouzdření (mg/ml) (%)	RNA	Lipid (mg/ml)			
					ALC-0315	ALC-0159	DSPC	Cholesterol
R-20-0072	LNP8 FM-1074-D	■	■	■	■	■	■	■
072424 (PF-07302048_6. července 2)	FM-1261A	■	■	■	■	■	■	■
185350	NC-0552-1	■	■	■	■	■	■	■
R-20-0085	BNT162b2 (V9) (RBP020,2 LNP)	■	■	■	■	■	■	■
R-20-0112								
VR-VTR-10671								
20GR142								
20256434								
LPT 38166	BNT162b2(V8) (RBP020,1 LNP)	■	■	■	■	■	■	■

NA: není k dispozici v osvětlení o analýze

Jak RBP020.1 LNP RNA, tak RBP020.2 LNP RNA byly vyrobeny s použitím výrobního procesu počínaje (lineární) produktem PCR.

1.6. ZÁMOŽSKÝ REGULAČNÍ STAV

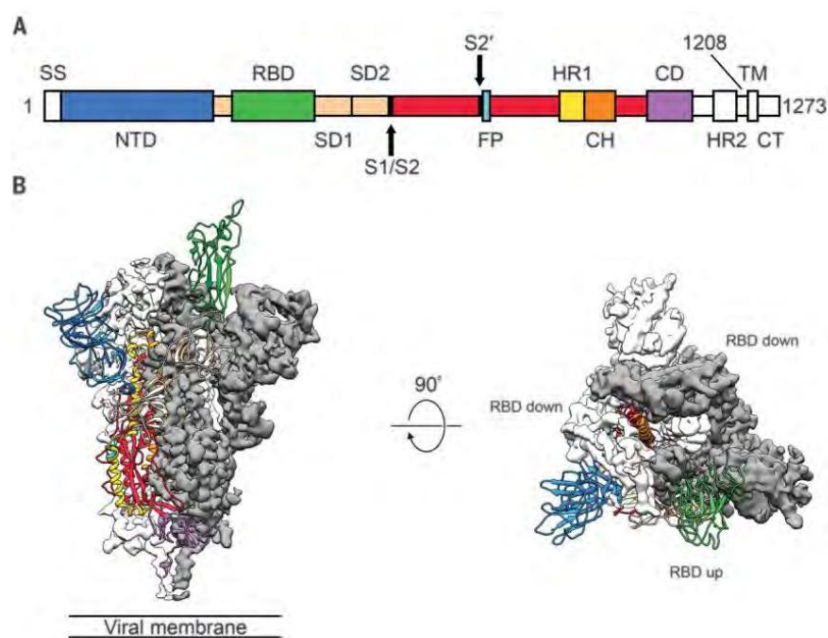
Podobná žádost byla podána v USA, EU, Kanadě, Švýcarsku a na Novém Zélandu (vše v říjnu 2020). USA, Velká Británie a Kanada schválily produkt pro nouzové použití (prosinec 2020).

EU a Švýcarsko rovněž schválily podmíněné registrace.

2. PRIMÁRNÍ FARMAKOLOGIE

SARS-CoV-2 má spike (S) glykoprotein, který se váže na membránový protein hostitelské buňky ACE2 a vstupuje do lidských buněk. Vazba virus-ACE2 vede k uvolnění virového genomu v hostitelských buňkách. S-protein má dvě funkční jednotky, S1 a S2 (obrázek 2-1). Pro infekci vyžaduje S proteolytické štěpení dvěma hostitelskými proteázami, proteázou podobnou furinu mezi podjednotkami S1 a S2 a serinovou proteázou TMPRSS2 na konzervovaném místě přímo předcházejícímu fúznímu peptidu (S2')

(Bestle et al. 2020). Zatímco membránový-proximální fragment furinu S2 je zodpovědný za membránovou fúzi, membránový-distální fragment S1 se svou doménou vázající receptor (RBD) rozpoznává hostitelský receptor a váže se na cílovou hostitelskou buňku. Během vstupu do buňky se fragment S1 disociuje a fragment S2 podstoupí zpětné přeuspořádání na postfúzní konformaci v procesu, který usnadňuje fúzi virových a hostitelských buněčných membrán.



Obrázek 2-1. Struktura proteinu SARS-CoV-2 S v prefúzní konformaci (Wrapp et al. 2020)

BNT162b2 mRNA kóduje protein S plněně s modifikací dvou nukleosidů (zbytky 986 a 987, nahrazené prolinem: K986P, V987P; P2 S). Očekává se, že BNT162b2 bude indukovat protilátky zacílené na S protein.

Bylo provedeno několik studií in vitro a in vivo na myších a nehumánních primátech, aby se prokázala exprese S proteinu, imunogenita a ochranná účinnost. Neklinické farmakologické studie jsou uvedeny v tabulce 2-1.

Tabulka 2-1. Souhrn neklinických farmakologických studií (klinický kandidát je vyznačen tučným písmem)

Cíl studie	Testovaný materiál (zvířecí model)	Číslo studie
Hodnocení imunogenicity vakcíny	BNT162b2 V9 (myši BALB/c)	R-20-0085
Hodnocení imunogenicity vakcíny	BNT162b2 V8 (myši BALB/c)	R-20-0054
Hodnocení imunogenicity a ochrany proti SARS-CoV-2 divokého typu	BNT162b2 V9 (šarže č. CoVAC/270320) (opice Rhesus)	VR-VTR-10671
Charakterizace imunofenotypu ve slezině a lymfatických uzlinách myší léčených Kandidáti na vakcíny proti SARS-CoV-2	BNT162a1, BNT162b1, BNT162b2, BNT162c2 (myši BALB/c)	R-20-0112
In vitro exprese léčiva BNT162b2 Látka a léčivo Produkt	BNT162b2-RNA, BNT162b2 (ATM LNP), šarže Polymun RBP020.2 LNP s šarží: CoVAC/270320 (buňky HEK293T)	R-20-0211

Cíl studie	Testovaný materiál (zvířecí model)	Číslo studie
In vitro exprese mRNA konstruktů kódujících SARS-CoV-2 Spike proteinové varianty V8 a V9	BNT162b2 V8 a V9 (člásky HEK293T)	R-20-0360
Strukturní a biofyzikální charakterizace SARS-CoV-2 vrcholového glykoproteinu (P2S)	modifikovaný konstrukt pcDNA3.1 kódující antigen P2S (značený a nezačený) (buňky Expi293F)	VR-VTR-10741
In vitro studie sekrece cytokinů/chemokinů	BNT162b2 V9 (mononukleární buňky lidské periferní krve)	R-20-0357

2.1. IMUNOGENITA U MYŠÍ

Studie č. R-20-0085: Imunogenita BNT162b2 (V9) u myši

BALB/c myši (n = 8 /skupina)

Testovaná položka: BNT162b2 V9; šarže: RNA: RNA-RF200321-06

Polymun šarže: RBP020.2 LNP se šarží: CoVAC/270320 Jednorázové

IM dávkování: 20 ul vakcín obsahujících 0,2 ug, 1 ug nebo 5 ug BNT162b2 V9 v PBS + 300 mM sacharóza; Kontrola: PBS+300 mM sacharóza

Podrobnosti ke studiu

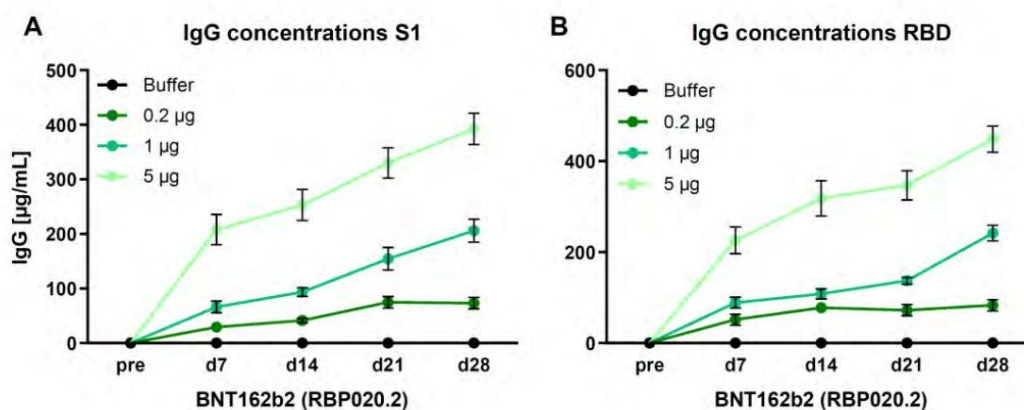
Krev odebraná v den 7, 14 a 21 za účelem analýzy imunitní odpovědi protilátek pomocí ELISA a neutralizačního testu založeného na pseudovirech (pVNT)

Krev odebraná v den 28 pro ELISA, analýzy pVNT a měření afinity vakcínou indukovaných protilátek vůči rekombinantnímu SARS-CoV-2 S a domnělé RBD prostřednictvím povrchové plazmové rezonance (SPR); Další analýza odpovědi T-buněk ve splenocytech pomocí ELISpot, luminexového testu a intracelulárního cytokinového barvení (ICS)

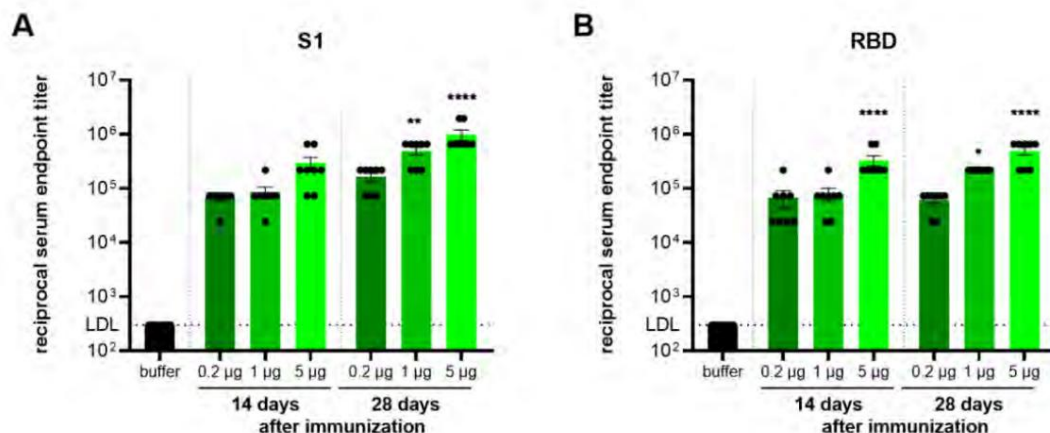
Hlavní zjištění

Detekce IgG protilátek

- Dávkově závislý u S1 (jak podtypy IgG1, tak IgG2) a IgG specifických pro RBD v průběhu času u všech imunizovaných skupin. Poměr IgG2a/IgG1 byl podobný pro obě dávky 1 µg a 5 µg (~1,3, respektive ~1,15), zatímco vyšší IgG1 byl získán při dávce 0,2 µg (poměr IgG2a/IgG1 ~0,6).
- Ve skupinách před imunizací ani v kontrolních skupinách nebyl detekován žádný IgG.
- Titry sérových protilátek proti S1 a RBD se v průběhu času zvyšovaly v závislosti na dávce (statisticky významně u všech imunizovaných skupin ve srovnání s kontrolou (obrázek 2-2, obrázek 2-3).



Obrázek 2-2. Kinetika koncentrace protilátek proti virovému antigenu [Skupinové průměrné koncentrace protilátek jsou zobrazeny (±SEM)]



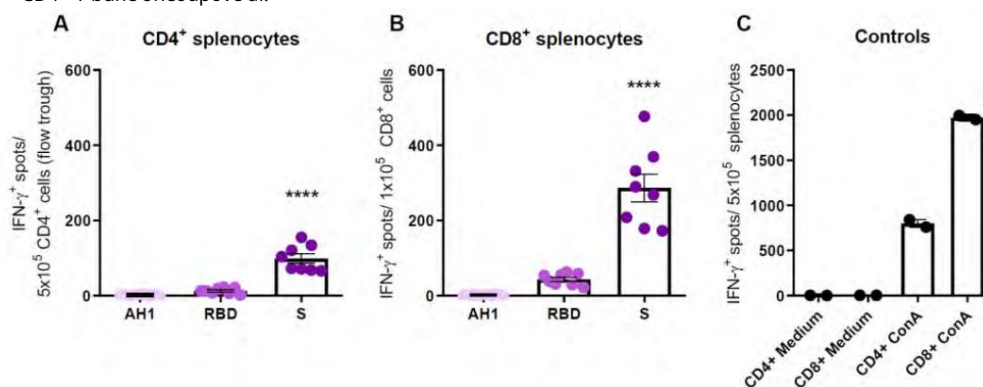
Obrázek 2-3. Titry sérových Ab 14. a 28. den po imunizaci (S1, 28. den: $p = 0,0082$ a $< 0,0001$ pro 1 a 5 μg , v daném pořadí; RBD, den 28: $p = 0,011$ a $< 0,0001$ pro 1 a 5 μg , v tomto pořadí)

- BNT 162b2-indukovaný IgG prokázal afinitu pro S1 (KD: 12 nM) a RBD (KD: 0,99 nM), oba s vysokou on-rate (geometrický průměr r kon: $3,33 \times 10^4/\text{Ms}$ pro S1-specifickou afinitu; $6,02 \times 10^5/\text{Ms}$ pro RBD-specifickou afinitu) a nízkou off-rate (geometrický průměr r koff: $4,00 \times 10^{-4}/\text{s}$ pro S1-specifickou afinitu; $5,97 \times 10^{-4}/\text{s}$ pro RBD-specifickou afinitu).
- Funkční neutralizační protilátky se vyvinuly u všech zvířat způsobem závislým na dávce, jak bylo analyzováno pomocí pVN (den 14-28), s vyššími titry ve dnech 21 a 28 než v den 14.

Titry protilátek v den 28	BNT162b2		
	0,2 ug	1 ug	5 ug
Anti S1 protein celkový IgG [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	$73,0 \pm 10,4$	$205,9 \pm 21,0$	$392,7 \pm 28,9$
Anti RBD protein celkový IgG [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	$83,1 \pm 12,3$	$241,7 \pm 17,2$	$448,6 \pm 28,6$
pVN50 titer [reciproční řadě ní]	$33,0 \pm 9,8$	$192,0 \pm 31,4$	$312,0 \pm 35,1$

Buněčná imunitní odpověď

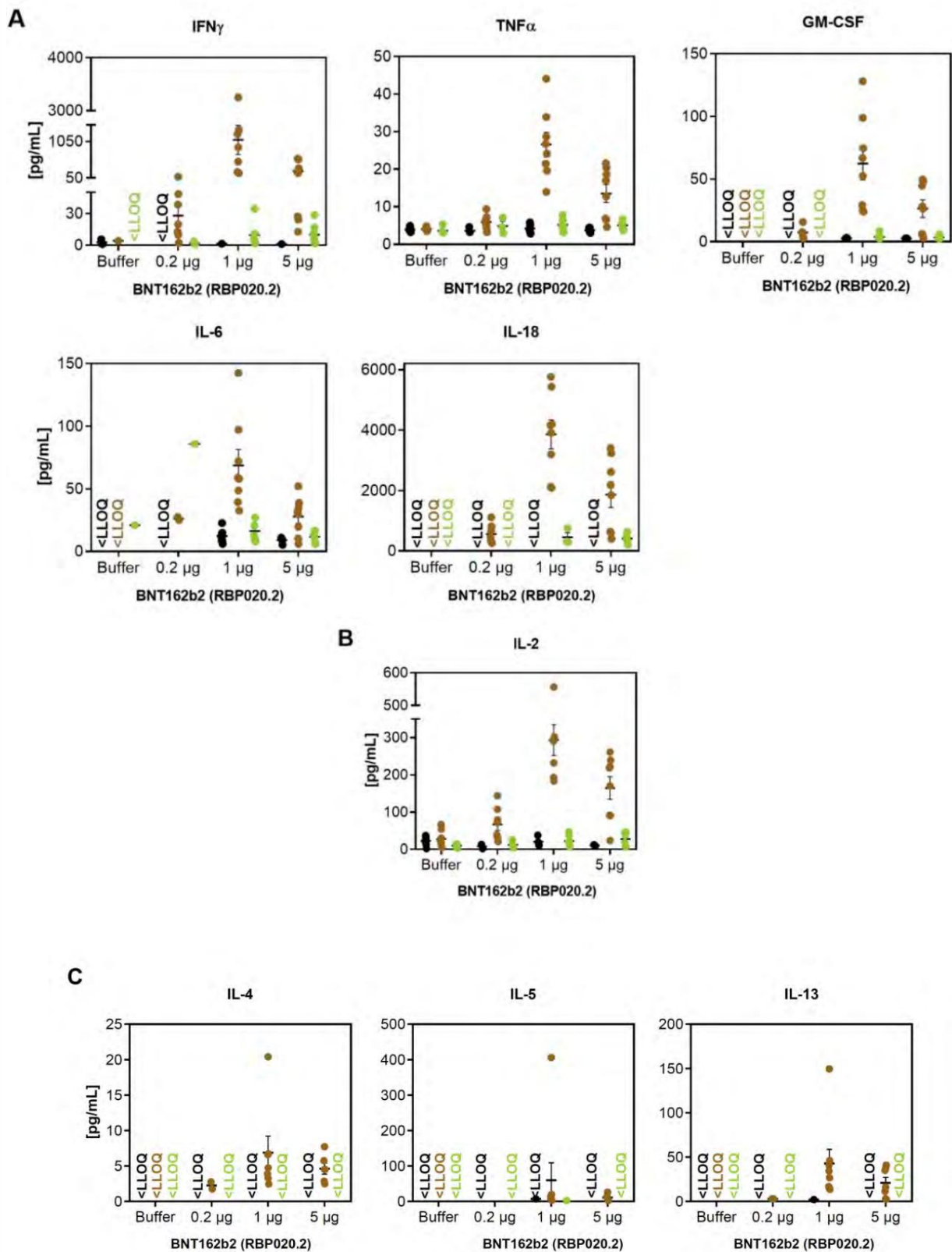
- S protein nebo RBD specifické peptidové pooly (S protein: 315 překrývají cílech se peptidů; RBD: 48 překrývají cílech se peptidů) indukovala IFN- γ odpovědi v T buňkách jak z čerstvých, tak zmražených splenocytů imunizovaných zvířat (vyšší odpověď na dávku vakcíny 1 nebo 5 μg než na dávku 0,2 μg).
- U splenocytů ze skupin lčených 5 μg RNA byly pozorovány reaktivní reakce CD8+ i CD4+ T-buněk. a stimulovaním peptidů S proteinu (CD8+ > CD4+) ve srovnání se splenocyty stimulovanými poolem peptidů specifických pro AH1 (kontrola) pomocí ELISpot. V buňkách stimulovaných RBD peptidovým poolem nebyly pozorovány žádné významné CD8+ a CD4+ T-buněk odpovědi.



Obrázek 2-4. ELISpot analýza splenocytů z myši imunizovaných 5 μg BNT162b2 v den 28

- Imunizace BNT162b2 vyvolala zvýšenou hladinu TH1-specifických a prozánětlivých cytokinů (IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , IL-6, IL-18) v supernatantech stimulovaných splenocytů. • 1 μg BNT162b2 indukoval více cytokinů ve srovnání s jinými skupinami.
- S-peptidový pool (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{peptid}$) indukoval více cytokinů ve srovnání s RBD-peptidovým poolem (0,66 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{peptid}$). Velmi nízké hladiny cytokinů TH2 (IL-4, IL-5, IL-13) byly detekovány v buňkách stimulovaných peptidy S (nikoli v buňkách stimulovaných peptidy RBD), s vysokými hladinami IL-4, IL-5, IL-13 pouze u jednoho zvířete (obrázek 2-5).

- Reaktivní IFN- γ , TNF- α a IL-2 secernují cí CD4+ a CD8+ T buňky byly detekovány po stimulaci peptidů intracelulární barvení cytokinů (ICS).



Obrázek 2-5. Cytokiny ve stimulovaných splenocytech 28 dní po imunizaci a. TH1 specifické cytokiny; b. TH1 specifické cytokiny a c. TH2 specifické cytokiny

Závěr: BNT 162b2 indukoval anti-S a anti-RBD IgG a neutralizační protilátky proti antigenu, s vysokou vazebnou afinitou k S1 a RBD, stejně jako TH1- objektivní odpověď T-buněk k včetně cytotoxické odpovědi T-buněk.

Studie č. R-20-0054: Imunogenicitá BNT162b2 (V8) u myši

BALB/c myši (n = 8 /skupina)

Testované položky: BNT162b2 (V8); šarž RNA: RNA-KG200312-01; Polymun šarž RNA: RBP020.1, LNP se šarží: CoVAC/160320 Jednorázové IM dávkování; 20 µl vakcín obsahují cí 0,2 µg, 1 µg nebo 5 µg BNT162b2 V8 v PBS+300 mM sacharóza. Kontrola: PBS+300 mM sacharóza. Podrobnosti studie Krev

odebraná 7, 14

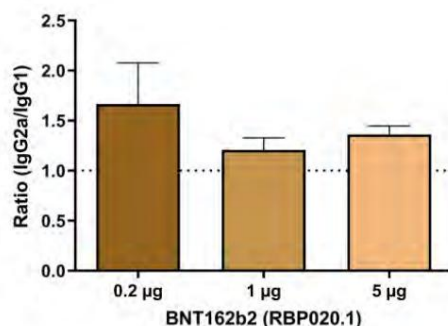
a 21 dnů po imunizaci pro screeningovou analýzu a den 28 pro titraci koncového bodu pro analýzu imunitní odpovědi protilátky pomocí ELISA a po 14, 21 a 28 dnech pro VSV/SARS-CoV-2 pVNT. Krev odebraná v den 28 pro měření afinity (pouze kohorta s dávkou 5 µg BNT162b2) vakcínou indukovanou protilátkou proti rekombinantnímu SARS-CoV-2 S a doménně RBD prostřednictvím SPR

Sleziny odebrané pro izolaci splenocytů a analýzu odpovědi T-buněk pomocí IFN-γ specifických testů ELISpot. Cytokinové reakce byly hodnoceny pomocí luminexových testů a ICS.

Hlavní zjištění

Detekce IgG protilátek

- Závislá na dávce u S1 (jak podtypy IgG1, tak IgG2) a IgG specifických pro RBD v průběhu času ve všech imunizovaných skupinách podobná zjištění ve studii č. R-20-0085 s kandidátem vakcín BNT162b2 (V9). Nicméně koncentrace obou IgG proti S1 a RBD indukovaná BNT162b2 (V8) byla nižší než koncentrace indukovaná BNT162b2 (V9) (studie č. R-20-0085).
- Poměr IgG2a/IgG1 (obrázek 2-6) byl podobný pro všechny dávky v obou studiích. Mírně vyšší koncentrace IgG2a ve srovnání s IgG1 byly pozorovány u všech dávek BNT162b2 (V8), zatímco vyšší IgG1 byl zaznamenán při dávce 0,2 µg BNT162b2 (V9) (studie R-20-0085). Žádný IgG nebyl detekován ani ve skupinách před imunizací, ani v kontrolních skupinách.



Obrázek 2-6. Poměr podtypů IgG2a/IgG1 v den 28

- Funkční neutralizační protilátky se vyvinuly u zvířat léčených 1 a 5 µg BNT162b2 (V8) způsobem závislým na dávce, jak bylo analyzováno pomocí pVNT, zatímco mnohem vyšší titry protilátek se vyvinuly ve všech dávkách BNT162b2 (V9) (studie R-20-0085).
- BNT162b2 (V8) indukoval nižší titer funkčních neutralizačních protilátek (~ 3-5krát) ve srovnání s BNT162b2 (V9).

Titry protilátek v den 28	BNT162b2 V8		
	0,2 ug	1 ug	5 ug
Anti S1 protein celkový IgG [µg/ml]	74,0 ± 21,3	296,2 ± 37,2	558,4 ± 53.
Anti RBD protein celkový IgG [µg/ml]	73,4 ± 23,1	266,9 ± 40,6	410,5 ± 66,3
pVN50 titer [reciproční ředění]	7,5 ± 0,9	52,5 ± 10,6	90,0 ± 5,6

Buněčná imunitní odpověď

- S protein nebo RBD-specifické peptidové pooly indukovaly IFN-γ odpovědi v T buňkách ze splenocytů imunizovaných zvířat (vyšší odpověď na dávku vakcín 1 nebo 5 µg než dávka 0,2 µg). Buňky CD4+ i CD8+ vykazovaly reakce IFN-γ po stimulaci pomocí poolu peptidů. Žádné významné CD8+ a CD4+ T-buněčné reakce byly pozorovány v buňkách stimulovaných RBD peptidovým poolem.
- Imunizace 5 µg BNT162b2 vyvolala zvýšenou hladinu většiny TH1 specifických a prozánětlivých cytokinů (IFN γ, GM-CSF, TNF-α, IL-6, IL-18) a IL-2 v supernatantech stimulovaných splenocytů. Někteří hodnoty však byly pod spodní úroveň kvantifikace pro statistickou analýzu (výpočet hodnot p) v některých léčebných skupinách. Soubor peptidů S (0,1 µg/ml peptidu) indukoval více cytokinů ve srovnání s poolem peptidů RBD (0,165 µg/ml peptidu).
- Frakce CD3+CD4+ T buněk exprimující cí ch IFN-γ byla významně vyšší u myši imunizovaných BNT162b2 ve srovnání s kontrolou (p = < 0,05), zvýšené frakce CD3+CD4+ T buněk exprimující cí ch TH2 cytokiny IL-4 a TNF-α byly pozorovány ve specifických léčebných skupinách (dávkově závislý IL-4; TNF-α ve skupině léčené 0,2 µg). Pro IL-2 nebyla detekována žádná významná změna.

- Frakce CD3+CD8+ T buněk exprimující cí ch IFN- γ byla významně vyšší u zví řat imunizovaných 5 μ g BNT162b2 ve srovnání s kontrolou ($p = 0,0055$). Pro TNF- α a IL-2 nebyla detekována žádná významná změna. • Výsledky ICS byly považovány za neprůkazné protože signály specifické pro peptid byly v rozsahu pozadí média signály.

Závěr: BNT162b2 (V8) indukoval anti-S a anti-RBD IgG a neutralizační protilátky proti antigenu S1 a RBD ve vyšších dávkách (1 a 5 μ g) a také odpověď T buněk.

Studie č. R-20-0112: Charakterizace imunofenotypu ve slezině a lymfatických uzlinách myši léčených kandidáty vakcíny SARS COV-2

BioNTech SE, 55131 Mainz, Německo
Zkušební předměty

ID	platforma RNA	Antigen
BNT162a1	Nemodifikovaná RNA (uRNA)	RBD proteinu S1S2 (V5)
BNT162b1	Modifikovaná RNA	RBD proteinu S1S2 (V5)
BNT162b2	Modifikovaná RNA	Plný protein S1S2 (V9)
BNT162c2	Samoamplifikující RNA (saRNA)	Plná dleka proteinu S1S2 (V9)

Cíle studie • Charakterizace

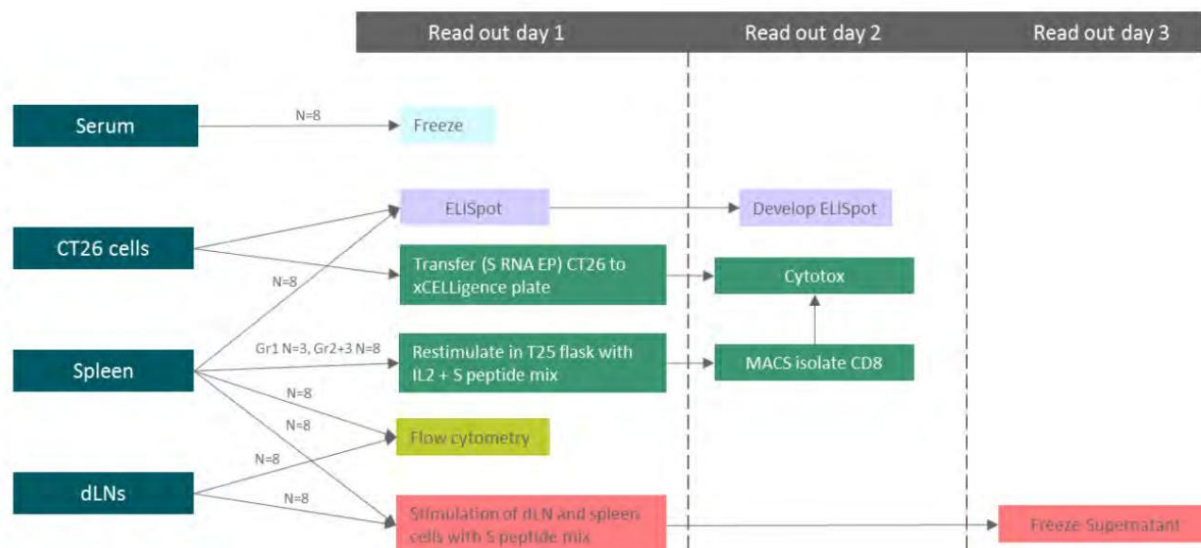
odpovědí T- a B-buněk ve slezině, lymfatických uzlinách a krvi. • Stanovení schopnosti CD8+ T buněk zabíjet buňky prezentující cí antigen kódovaný vakcínou. • Stanovení reakcí neutralizačních protilátek (analýza neprovedena)

Podrobnosti

studie BALB/c myši (n = 8 /skupina)

Dávkování jednou IM; 20 μ l vakcíny obsahující cí 0,2 μ g, 1 μ g nebo 5 μ g BNT162b2 v PBS+300 mM sacharóze bylo podáno v den 0; Kontrola: 0,9% NaCl
Krev odebrána v den 7. S \acute{e} rum

a tkáně byly analyzovány v den 12 a den 27. Následující cí diagram ukazuje přehled následných analytických metod včetně rozdělení vzorků do příslušných testů.



Analýzy •

S \acute{e} rum bylo analyzováno za účelem stanovení odpovědí IgG specifických pro SARS-CoV-2.

- Splenocyty byly testovány na rozpoznání směsí peptidů specifických pro S protein nebo buněk CT26 elektroportovaných S RNA pomocí sekrece IFN- γ (IFN- γ ELISpot test).
- Frakce splenocytů byla přes noc stimulována směsí peptidů specifických pro S protein a rekombinantní mIL-2 a izolované CD8+ T buňky byly vystaveny další den zabíjení buněk karcinomu tlustého střeva CT26 elektroportovaných S RNA (test cytotoxicity xCELLigence).
- Splenocyty a drenážní lymfatické uzliny (dLN; popliteální, iliakální a inguinální, spojené buňky byly analyzovány na T- (CD4+ TH1, TH2, TFH, CD8+ T lymfocyty) a B lymfocytární fenotyp (GC, plazma, paměťové B lymfocyty).
- dLN a slezině buňky byly stimulovány po dobu 48 hodin směsí peptidů specifických pro S protein za účelem analýzy cytokinů sekretovaných T-buňkami (Multiplexní test cytokinů ProcartaPlex).

Hlavní nálezy

Odpovědi T-buněk k specifické pro S protein (sekrece IFN- γ) byly detekovány ve skupinách dostávajících BNT162b2, BNT162b1 a BNT162c2 po stimulaci buď S peptidem nebo S RNA (průměrný počet skvrn > 1000 pro b2 a c2 a 750 pro b1) a v menší míře ve skupinách lčených BNT162a1 (průměrný počet skvrn 36-100).

Analýza T a B buněk v krvi**Frekvence lymfocytů**

Léčba BNT162b2 zvýšila CD8+ (34 %) a snížila CD4+ T buňky. Léčba BNT162b1,

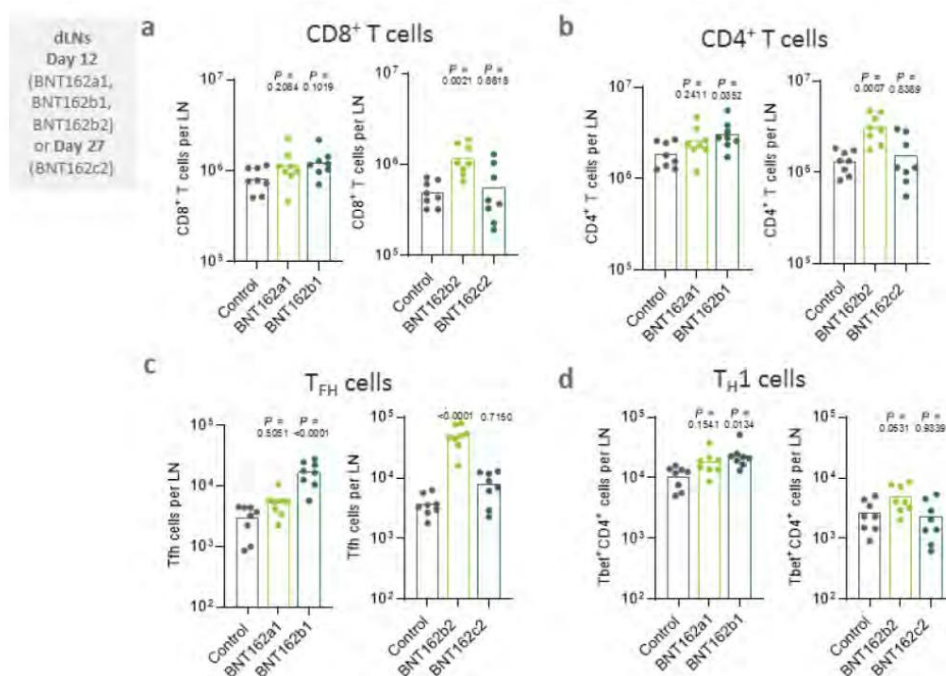
BNT162b2 a BNT162c2 vyvolala zvýšení a aktivaci TFH buněk mezi CD4+ T buňkami (1,34 %, 0,53 % a 0,48 % BNT162c2, BNT162b2 a BNT162b1, v tomto pořadí). B buňky ve všech skupinách.

Aktivace T buněk

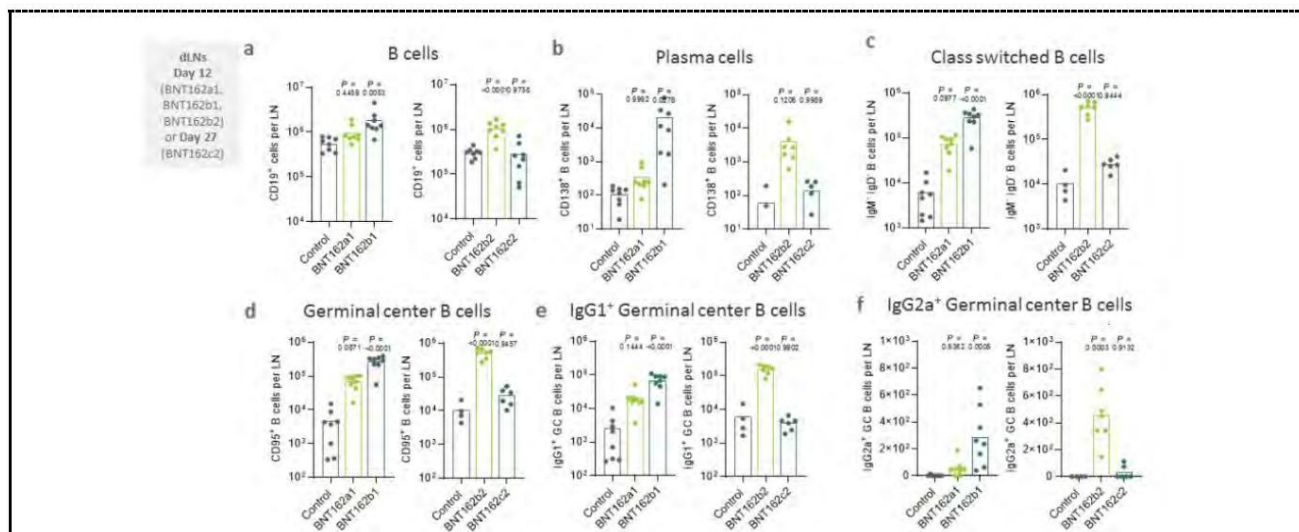
- Léčba BNT162b1 a BNT162b2 vedla k aktivaci T buněk (CD44, CD38, PD-1 CD8+ T buňkami a ICOS CD8+ i CD4+) a antigenně specifické sekreci cytokinů splenocyty. ICOS+ TFH buňky ve všech skupinách, ale nejvýrazněji pro BNT162b1, BNT162b2 a BNT162c2.

Analýza T a B buněk v dLN

- CD8+ T buňky ve skupinách BNT162b2, CD4+ T buňky a TFH ve skupinách BNT162b1 a BNT162b2. TH1 T ve skupinách BNT162b1 a BNT162b2 (obrázek 2-7).
- B lymfocyty ve skupinách BNT162b1 a BNT162b2 s vyšším počtem plazmatických B lymfocytů produkujících protilátky a B lymfocytů germinálního centra (obrázek 2-8).
- B buňky germinálního centra prokázaly změny třídy na IgG1 (BNT162a1, BNT162b1 a BNT162b2) nebo IgG2a (BNT162b1 a BNT162b2) pouze ve skupinách BNT162a1, BNT162b1 a BNT162b2.



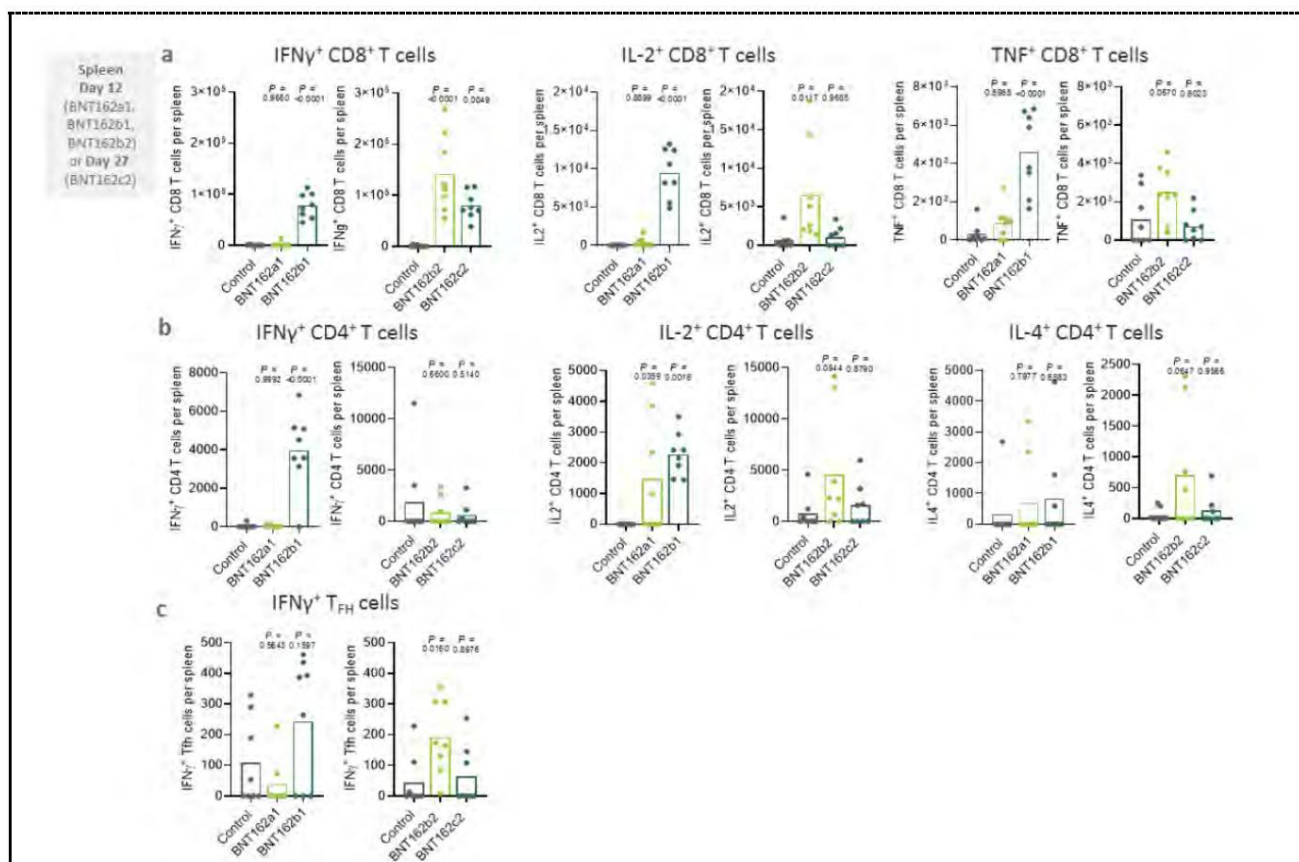
Obrázek 2-7. Odpověď T buněk v dLN



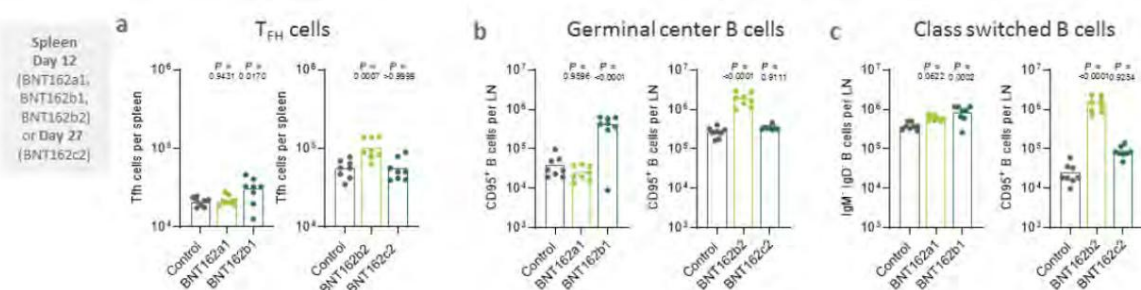
Obrázek 2-8. Odpověď B buněk k dLN

Analýza T a B buněk ve slezině (obrázek 2-9 a obrázek 2-10)

- TFH buňky, B buňky germinální centra a B buňky se změnou třídu ve skupinách BNT162b1 nebo BNT162b2 podobně nalezneme ve slezině, ale méně výrazně srovnání s krví a dLN.
- Významně antigenně specifické uvolňování TH1 cytokinů IFN- γ a IL-2 bylo pozorováno ve skupinách BNT162b1, BNT162b2 a BNT162c2 (analýza průtokovou cytometrií a cytokinový multiplexní test). Významné uvolňování IL-2 a TNF v CD8⁺ T buňkách ze skupin BNT162b1 a BNT162b2.
- Významné uvolňování TH1 cytokinů IFN- γ a IL-2 z CD4⁺ T buněk ze skupiny BNT162b1, ale nikoli TH2 cytokinu IL-4. Přestože počty byly obecně nízké, variace mezi léčnými skupinami vysoké, významné antigenově specifické sekrece IFN- γ mezi TFH buňky byly detekovány ve skupině BNT162b2.
- Významná odpověď IL-2 a slabé uvolňování IFN- γ byly pozorovány u splenocytů z myši léčných BNT162a1 (3 z 8 myši, cytokinový multiplexní test). Nejvyšší odezvy pro oba cytokiny překračují cí horní limit kvantifikace pro IFN- γ byly nalezeny v BNT162b2 a BNT162c2 skupině kódující S protein plnědčky. Byla naměřena srovnatelně slabá nebo žádná sekrece TH2 cytokinů IL-4 a IL-5. U BNT162b2 a BNT162c2 bylo prokázáno nízké ale významné uvolňování IL-4 a IL-5. U myši očkovaných BNT162b1 byl detekován IL-4, ale ne IL-5 (cytokinový multiplexní test).
- Vysoká množství prozánětlivého IL-18 byla uvolněna ve skupinách BNT162b2 a BNT162c2 a v menší míře v skupině BNT162b1 a BNT162a1.
- Prozánětlivé cytokiny (GM-CSF a IL-6) byly zvýšeny ve skupinách BNT162b1, BNT162b2 a BNT162c2.



Obrázek 2-9. Odpověď T buněk ve slezinách po restimulaci S peptidem



Obrázek 2-10. Odpověď B buněk ve slezině po restimulaci S peptidem (Poznámka: označení osy y na obrázku bac odráží výsledky pozorované ve slezině podle odpovědi sponzora na neklinické otázky)

Cytotoxicita vůči S proteinu •

Ve skupině BNT162a1 nebyla pozorována žádná relevantní lýza buněk

CT26. • U skupiny očkované BNT162b1 byla pozorována tendence k zabíjení buněk u čtyř z osmi porovnávaných myš. kontrolovat.

• Výrazněji lýza nádorových buněk u osmi z osmi myš byla pozorována u splenocytů myš očkovaných BNT162b2 nebo BNT162c2, které kódují S protein plnědávky. Celkově byly zjištěny účinky spíše slabě zaručené další optimalizací testu. Nebyla provedena žádná kvantitativní a statistická analýza tohoto souboru dat.

• Závěr: Kandidát na vakcínu SARS-CoV-2 BNT162b2 byl schopen vyvolat reakce T i B buněk.

2.2. STUDIE IMUNOGENITY A OCHRANY U OPIC

Studie č. VR-VTR-10671: BNT162b2 (V9) Imunogenita a hodnocení ochrany proti SARS-CoV-2 členě i u makaků rhesus

Výzkum vakcíny Pfizer
Pearl River, NY 10965

Opice Rhesus (n = 6 /skupina), 2-4 roky staré

Fáze léčby IM

dávkování v den 0 a 21, 0,5 ml vakcíny obsahují cí 30 µg nebo 100 µg BNT162b2 V9 LNP kontrola: fyziologický

roztok Vzorky krve byly odebrány před podáním dávky a každých 7 dní po podání do 56. dne. S-specifické T-buňky odpovědi byly analyzovány pomocí ELISpot a ICS.

Vyvolávací fáze

Vyvolávací virus: Pracovní virová zásoba byla vytvořena ze dvou pasáží izolátu USA-WA1/2020 (zásobní zásoba 4. pasáže zakoupená od BEI Resources; NR-52281) v buňkách Vero 76.

Skupiny imunizované dvěma IM dávkami 100 µg BNT162b2 (V9) (a 3 kontrolní opice) byly infikovány 55 dní po druhé imunizaci $1,05 \times 10^6$ plak tvořících jednotek SARS-CoV-2 (kmen USA-WA1/2020), rovnoměrně rozděleny mezi intranazální (IN) a intratracheální (IT) cestu.

Třem naivním kontrolním opicím bylo simulovaně vystaveno buněčné kultivační médium (Sentinel). Byly odebrány nosní a orofaryngeální (OP) výtěrky a byla provedena bronchoalveolární laváž (BAL) a vzorky byly testovány na přítomnost SARS-CoV-2 RNA pomocí RT-qPCR pomocí testu 2019-nCoV_N1 vyvinutého CDC. Rentgenové snímky hrudníku a CT skeny byly provedeny před stimulací a v den 3 a 10 po stimulaci.

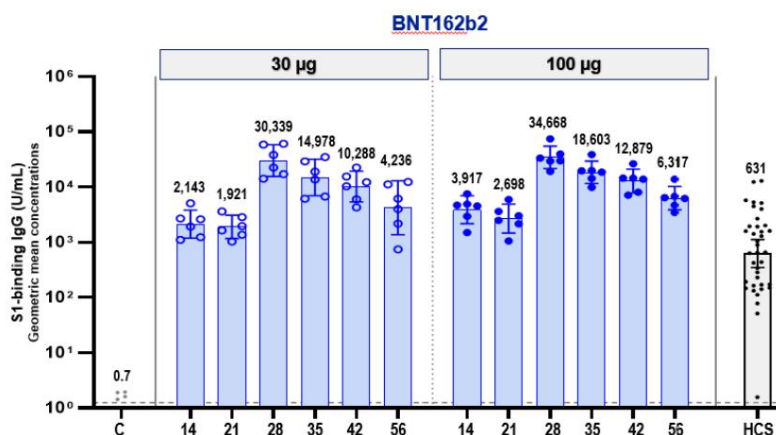
Histopatologické hodnocení byla provedena 7. nebo 8. den po infekčním SARS-CoV-2 čelením u zvířat imunizovaných BNT162b2 (n=6) a kontrolních zvířat imunizovaných fyziologickým roztokem (n=3). Odebraná mikroskopicky hodnocená tkáň zahrnovala plíce, ledviny, játra, slezinu, kůži, tuková tkáň, srdce [s koronárními tepnami], kostní dřeň, nosní přepážku, jazyk, průdušnici, mediastinální lymfatické uzliny a mukokutánní spojení.

Plicní léze byly hodnoceny pomocí semikvantitativního skórovacího systému se zahrnutím buněčných typů a/nebo distribuce. Pro hodnocení každého plicního laloku bylo použito skóre oblasti zánětu, založené na odhadované ploše řezu plic se zánětem: 0 = normální; 1 = < 10%; 2 = 11-30%; 3 = 30-60%; 4 = 60-80%; 5 => 80%. Pro každé zvíře bylo zprůměrováno skóre oblasti zánětu pro každý plicní lalok, aby se vytvořilo jediné skóre oblasti zánětu pro toto zvíře. Toto skóre bylo použito k hodnocení závažnosti respiračního onemocnění po expozici SARS-CoV-2.

Imunogenita • S1

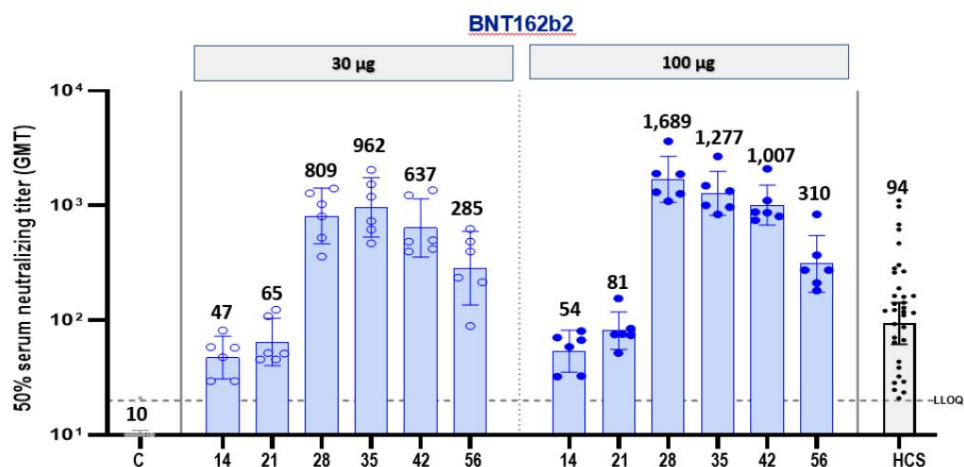
specifické IgG byly detekovány 14. den po první dávce, IgG se výrazně zvýšily po dávce 2 v závislosti na způsobu. V kontrolní skupině byl detekován zanedbatelný S1 specifický IgG.

- Geometrické průměrné koncentrace (GMC) IgG vázajícího se na S1 (30 339 U/ml a 34 668 U/ml při dávkách 30 µg, respektive 100 µg) 7 dní po 2. imunizační dávce byly významně vyšší než u IgG GMC vázajícího se na S1 (631 U/ml) lidského rekonvalescentního séra (HCS) (obrázek 2-11). IgG relativně rychle klesl na ~4000 a ~6000 U/ml v den 56 (5 týdnů po 2. imunizační dávce).



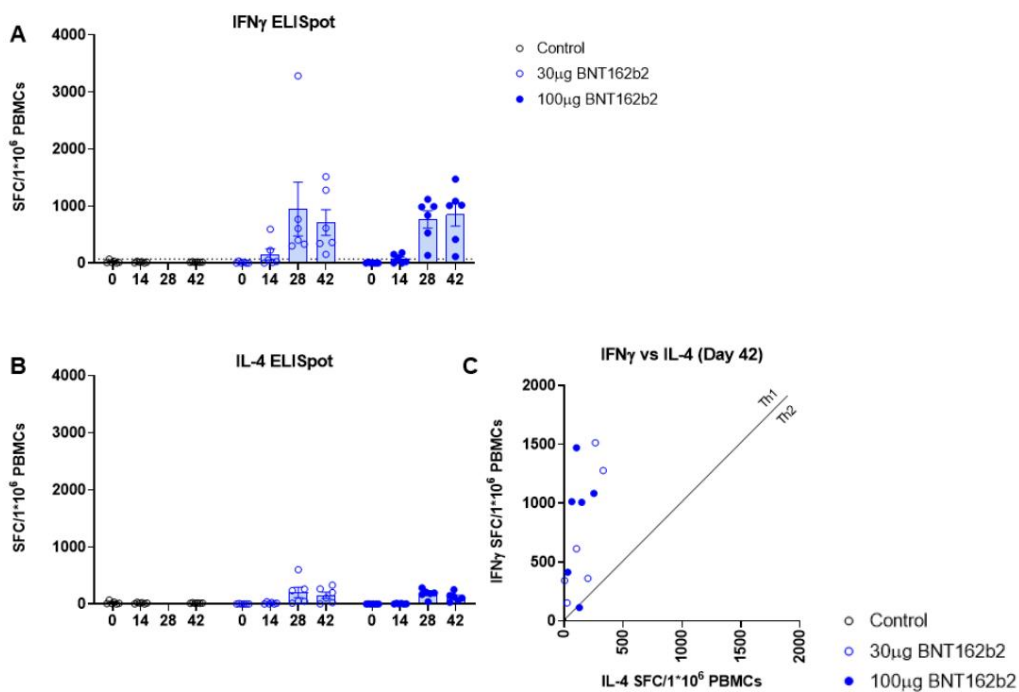
Obrázek 2-11. Koncentrace IgG vázajícího se na S1 (GMC) vyvolané imunizací BNT162b2 (V9). C - fyziologický roztok kontrola imunizace; HCS - panel lidského rekonvalescentního séra

- Podávání BNT162b2 (V9) stimulovalo 50% neutralizační titry séra (VNT50), jak bylo zjištěno v opicím séru den 14 po první dávce (měřeno geometrickým průměrem titru nebo GMT). GMT dosáhly vrcholu 1 týden po druhé dávce (GMT 962, 14 dní po dávce 2 30 µg a GMT 1689 po dávce 2 100 µg) a trvaly do 56. dne s GMT významně vyšší než neutralizační GMT HCS (GMT 94). Do 5 týdnů po druhé dávce se neutralizační titry snížily 3-5krát oproti vrcholu (obrázek 2-12).

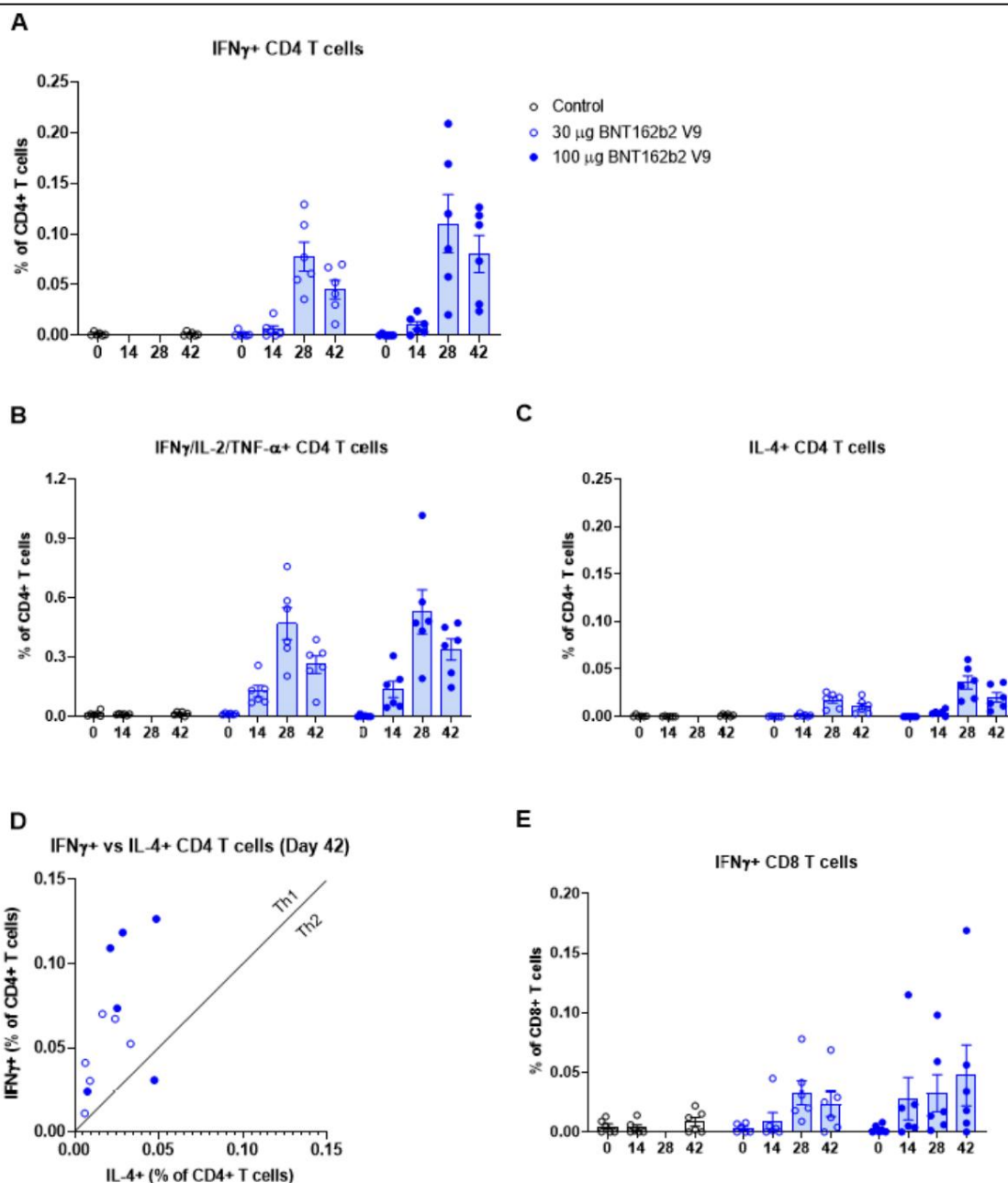


Obrázek 2-12. 50% sérové neutralizační titry (GMT) vyvolané imunizací BNT162b2 (V9). C – fyziologický roztok kontrola imunizace; HCS – panel lidského rekonvalescentního séra

- Silné reakce IFN- γ a nízké IL-4 byly detekovány u zvířat imunizovaných BNT162b2 (analýza ELISpot) 28. a 42 (obrázek 2-13).
- Podávání BNT162b2 vyvolalo vysokou frekvenci S-specifických CD4⁺ T buněk produkujících IFN- γ , IL-2 nebo TNF- α , ale nízkou frekvenci CD4⁺ buněk, které produkují IL-4, což ukazuje na TH1-objektivní odpověď s výjimkou jedné opice, který má o něco vyšší odezvu TH2 než TH1. S-specifické IFN- γ produkující CD8⁺ T buněk odpovědi byly také pozorovány u imunizovaných zvířat (průtoková cytometrie ICS analýza). Vakcíny také zvýšila IFN- γ CD8⁺ T buňky (obrázek 2-14). Odezvy T-buněk byly mezi dvěma úrovněmi dávek podobné. Reakce T lymfocytů specifické pro S protein se snížily od 28. dne do 42. dne <2krát (nestanoveny v den 56), ačkoli pokles byl relativně malý nebo nedošlo k žádnému významnému změně pro CD8⁺ T lymfocyty ve skupině s vysokou dávkou (100 µg)



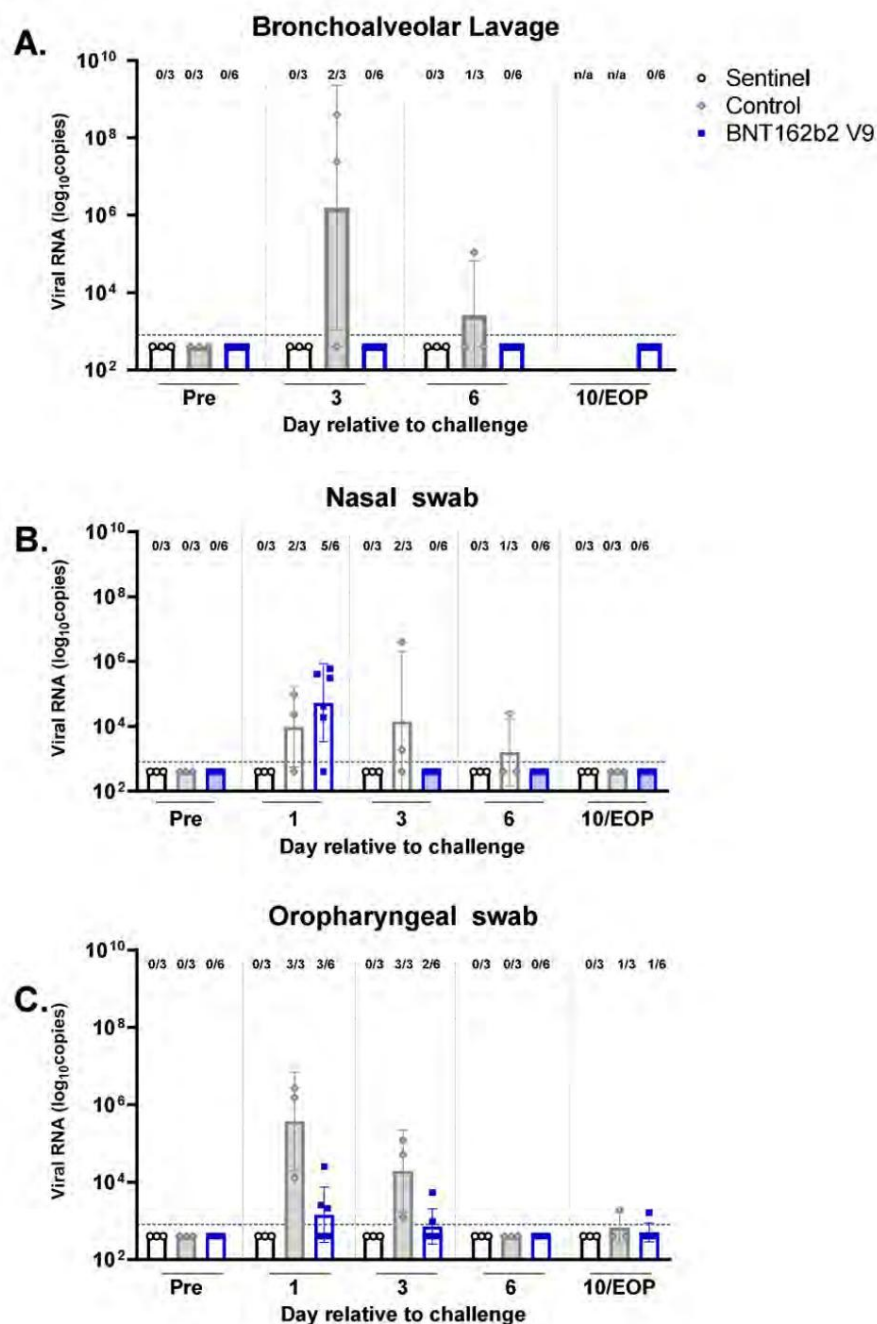
Obrázek 2-13. Výsledky ELISpot IFN- γ a IL-4 u zvířat imunizovaných BNT162b2 a kontrolou



Obrázek 2-14. S-specifické CD4 a CD8 T-buně čné reakce u BNT162b2- a kontrolních imunizovaných zvířat (ICS test)

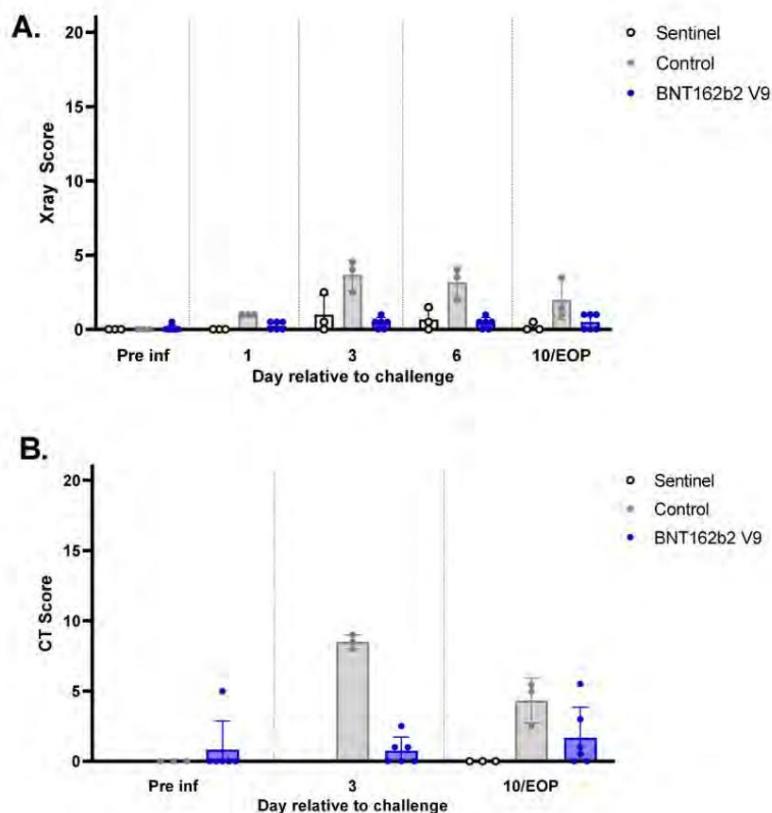
Ochrana

- V době expozice se titry neutralizující cí SARS-CoV-2 pohybovaly od 260 do 1 004 v BNT162b2 (V9)-imunizovaných zvířat. Neutralizační titry byly nedetekovatelné u zvířat z kontrolní imunizované a sentinelové skupiny.
- Virová RNA byla detekována v tekutině BAL od 2/3 kontrolních imunizovaných zvířat v den 3 a od 1/2 v den 6 po expozici, zatímco v tekutině BAL z BNT162b2 (V9) imunizovaných a SARS-CoV- nebyla detekována žádná virová RNA. 2 napadení makakové (statisticky významně) (obrázek 2-15).
- Virová RNA byla detekována v nosních výtěrech získaných od kontrolních imunizovaných zvířat 1. den (virová RNA: $\sim 104 \log_{10}$ kopií), 3. ($\sim 104 \log_{10}$ kopií) a 6. den ($\sim 103 \log_{10}$ kopií) po expozici. Vysoké kopie virové RNA byly detekovány v nosních výtěrech získaných od zvířat imunizovaných BNT162b2 (V9) v den 1 (virová RNA: den 1 $\sim 105 \log_{10}$), ale kopie RNA byly pod limitem detekce ode dne 3 (méně než $\sim 102 \log_{10}$ kopie).
- Nízké hladiny RNA byly pozorovány z OP výtěrů u imunizovaných opic ve dnech 1 a 3 ve srovnání s kontrolou imunizované opice.



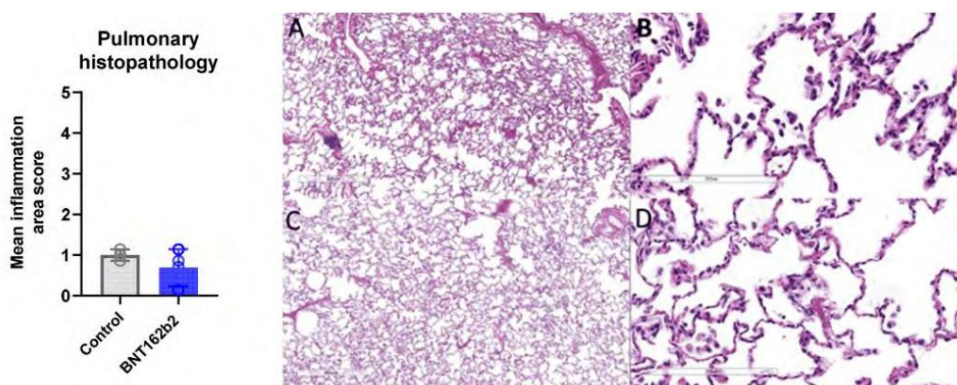
Obrázek 2-15. Virová RNA v tekutině BAL a nosních a orofaryngeálních výtěrech zvířat po infekční m SARS-CoV-2 výzva

- Přes přítomnost nebyly pozorovány žádné významné klinické příznaky onemocnění u žádných skupin zvířat včetně kontrolních zvířat. Virová RNA v tekutině BAL z exponovaných kontrolních zvířat.
- Radiografický důkaz (rentgenový snímek) plicní abnormality byl pozorován u kontrolovaných exponovaných, ale nikoli u zvířat imunizovaných BNT162b2-V9 ani u neinfikovaných sentinelů. Velmi mírné zvýšení skóre CT bylo pozorováno u imunizovaných zvířat v den 10 ve srovnání se dnem 3 vzhledem k expozici; nicméně jak rentgenové tak CT skóre byly nižší ve srovnání s kontrolními exponovanými zvířaty (obrázek 2-16)
- Nebyl pozorován žádný rentgenový důkaz zesíleného onemocnění vyvolaného vakcínou (obrázky nebyly poskytnuty).



Obrázek 2-16. Rentgenová CT skóre plic po provokaci [Rentgenové (A) a CT (B) skóre bylo přiřazeno na stupnici 1-20. Výška sloupců označuje průměrné skóre].

- V žáděném orgánu nebyly zaznamenány žádné významné makroskopické patologické nálezy.
- Mírný zánět plic (< 10 %) byl pozorován u zvířat imunizovaných fyziologickým roztokem i BNT162b2-V9 s mírně nižšími skóre zánětu u imunizovaných zvířat.
- Zánětlivé buňky (neutrofilů, makrofágů, lymfocytů, plazmatických buněk a některých eozinofilů) u kontrolních i imunizovaných zvířat.
- Nebyly pozorovány žádné známky zvýšeného respiračního onemocnění.
- V jiných analyzovaných tkáních nebyl pozorován žádný jiný významný mikroskopický efekt.



Obrázek 2-17. Skóre oblasti zánětu plic po infekci IN/IT SARS-CoV-2 (levý panel: sloupce označují geometrický průměr skóre oblasti (zánět plic) v každé skupině 7. nebo 8. den po expozici IN/IT SARS-CoV-2. Imunizováno fyziologickým roztokem a exponovaná zvířata (kontrola; n=3) jsou zobrazena šedě a zvířata očkováná BNT162b2 a exponovaná zvířata (BNT162b2; n=6) jsou zobrazena modře; Právní panel: mikrofotografie řezů plic z kontrolních zvířat a plic z imunizovaných BNT162b2 a exponovaná zvířata (A, C a B, D: 2,5 x a 20 x objektiv, v daném pořadí).

Závěr

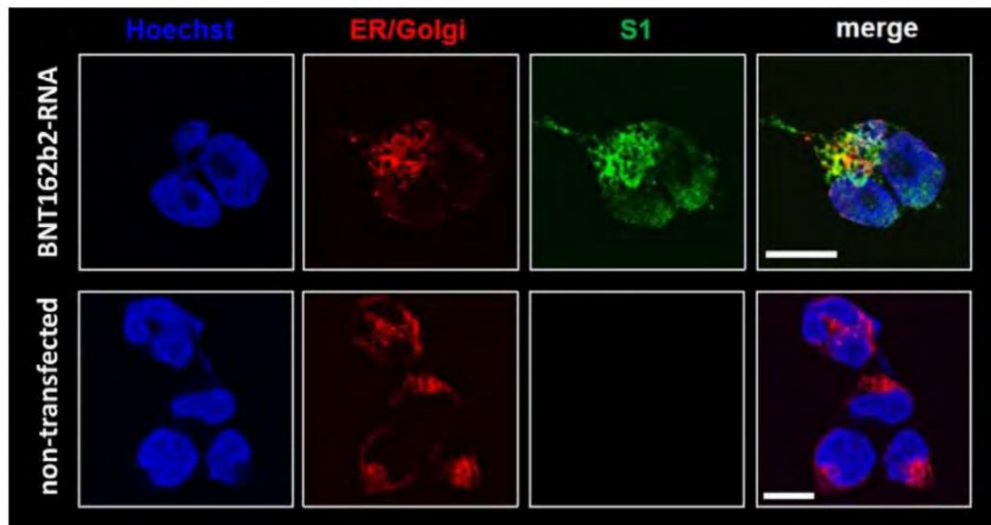
- Bylo zjištěno, že BNT162b2 (V9) je imunogenní u opic a indukuje odezvy T lymfocytů zesílené TH1.
- BNT162b2 (V9) poskytl ochranu 2-4letým opicím makaka rhesus před infekčním SARS-CoV-2 se sníženou detekovatelnou virovou RNA v dýchacím systému ve srovnání s kontrolou ve fyziologickém roztoku.

- Mírný zánět plic byl zaznamenán u kontrolních i imunizovaných zvířat s mírně nižšími skóre zánětu u imunizovaných zvířat ve srovnání s kontrolou.

2.3. VYJÁDŘENÍ ANTIGENŮ

Pro analýzu exprese proteinu S (tj. SARS-CoV-2 P2 S) byly provedeny různé metody in vitro, které jsou popsány v následující tabulce.

Studie č. R20-0211: Analýza exprese SARS-CoV-2 P2 S antigenu																
<p>Testované položky: BNT162b2-RNA (DS) a BNT162b2-LNP (DP)</p> <p>Kontrola: GFP kódující modifikovaná RNA (pozitivní); netransfekované buňky (negativní)</p> <p>Podrobnosti</p> <p>studie Buňky HEK293T transfekované buď BNT162b2-RNA (DS) nebo BNT162b2-LNP (DP) byly inkubovány po dobu 18 hodin před sklizní pro analýzy. Komerční transfekční souprava (RiboJuice mRNA transfection kit) byla použita při transfekci buněk pomocí BNT162b2-RNA. Buňky transfekované GFP byly mikroskopicky zkoumány na úspěšnou transfekci</p>																
<p>Hodnocení transfekčních frekvencí</p> <p>Western blot buněk a lyzátu byl proveden s transfekovanými buňkami HEK293, aby se potvrdila exprese BNT162b2-RNA (DS) a analýza FACS pro posouzení frekvence transfekce a životaschopnosti buněk k transfekovaným BNT162b2-RNA (DS) nebo BNT162b2-LNP (DP).</p> <p>Hlavní zjištění</p> <ul style="list-style-type: none"> Analýza Western blot potvrdila expresi antigenu BNT162b2 v buňkách HEK293T. BNT162b2-RNA (DS) i BNT162b2-LNP (DP) vykazovaly vysoké frekvence transfekce, přičemž BNT162b2-LNP (DP) vykazovaly mírně vyšší frekvenci transfekce ve srovnání s BNT162b2-RNA (DS). Mezi všemi buněčnými skupinami nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v životaschopnosti buněk (obrázek 2-18). 																
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>Transfection frequency</p> <table border="1"> <caption>Transfection frequency data</caption> <thead> <tr> <th>Condition</th> <th>anti-S1-AB positive cells [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>non transfected</td> <td>~2</td> </tr> <tr> <td>DS BNT162b2-RNA 1 µg</td> <td>~85</td> </tr> <tr> <td>DP BNT162b2 1 µg</td> <td>~95</td> </tr> </tbody> </table> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Viability</p> <table border="1"> <caption>Viability data</caption> <thead> <tr> <th>Condition</th> <th>viable cells [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>non transfected</td> <td>~95</td> </tr> <tr> <td>DS BNT162b2-RNA 1 µg</td> <td>~95</td> </tr> <tr> <td>DP BNT162b2 1 µg</td> <td>~90</td> </tr> </tbody> </table> </div> </div> <p>Obrázek 2-18. FACS analýza frekvence transfekce a životaschopnosti buněk</p>	Condition	anti-S1-AB positive cells [%]	non transfected	~2	DS BNT162b2-RNA 1 µg	~85	DP BNT162b2 1 µg	~95	Condition	viable cells [%]	non transfected	~95	DS BNT162b2-RNA 1 µg	~95	DP BNT162b2 1 µg	~90
Condition	anti-S1-AB positive cells [%]															
non transfected	~2															
DS BNT162b2-RNA 1 µg	~85															
DP BNT162b2 1 µg	~95															
Condition	viable cells [%]															
non transfected	~95															
DS BNT162b2-RNA 1 µg	~95															
DP BNT162b2 1 µg	~90															
<p>Hodnocení buněčné lokalizace</p> <p>Imunofluorescenční barvení buněk HEK-293 transfekovaných BNT162b2-RNA (DS) bylo použito ke zkoumání, zda byl konstrukt zpracován v endoplazmatickém retikulu (ER).</p> <p>Hlavní zjištění</p> <ul style="list-style-type: none"> Byla detekována společná lokalizace S-proteinového antigenu s ER markerem, což naznačuje, že S protein je zpracován v rámci ER (obrázek 2-19). Netransfekované buňky neexprimovaly protein S1. 																



Obrázek 2-19. Imunofluorescenční barvení transfekovaných buněk

Studie č. R-20-0360: Analýza exprese antigenů z mRNA konstruktů kódujících S protein

Testované položky: různé konstrukty mRNA kódující antigen S včetně V8 (šarže RNA: RNA-KG200312-01) a konstrukty V9 (šarže RNA: RNA-RF200321-06) na různých platformách RNA (modRNA = nukleosidy modifikovaná mRNA, saRNA = vlastní amplifikující cí RNA, uRNA = nemodifikovaná mRNA obsahující cí uridin)

Kontrola: GFP kódující modifikovaná RNA (pozitivní); netransfekované buňky (negativní)

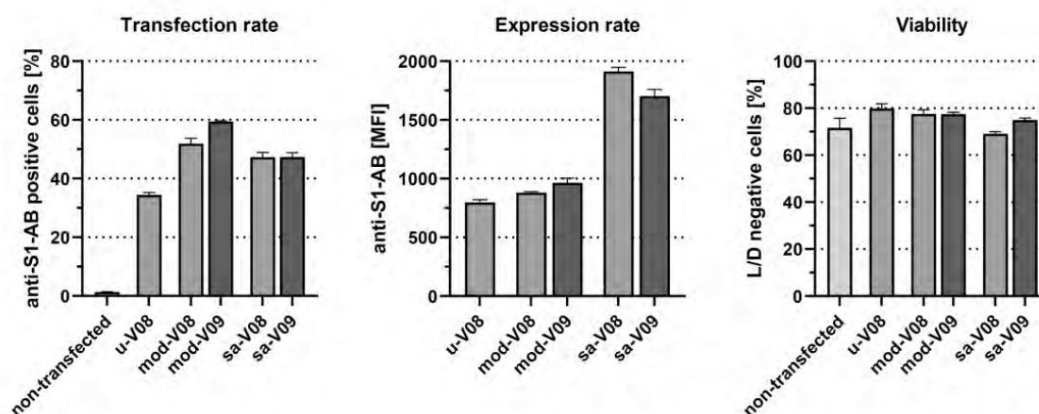
Podrobnosti studie

s47

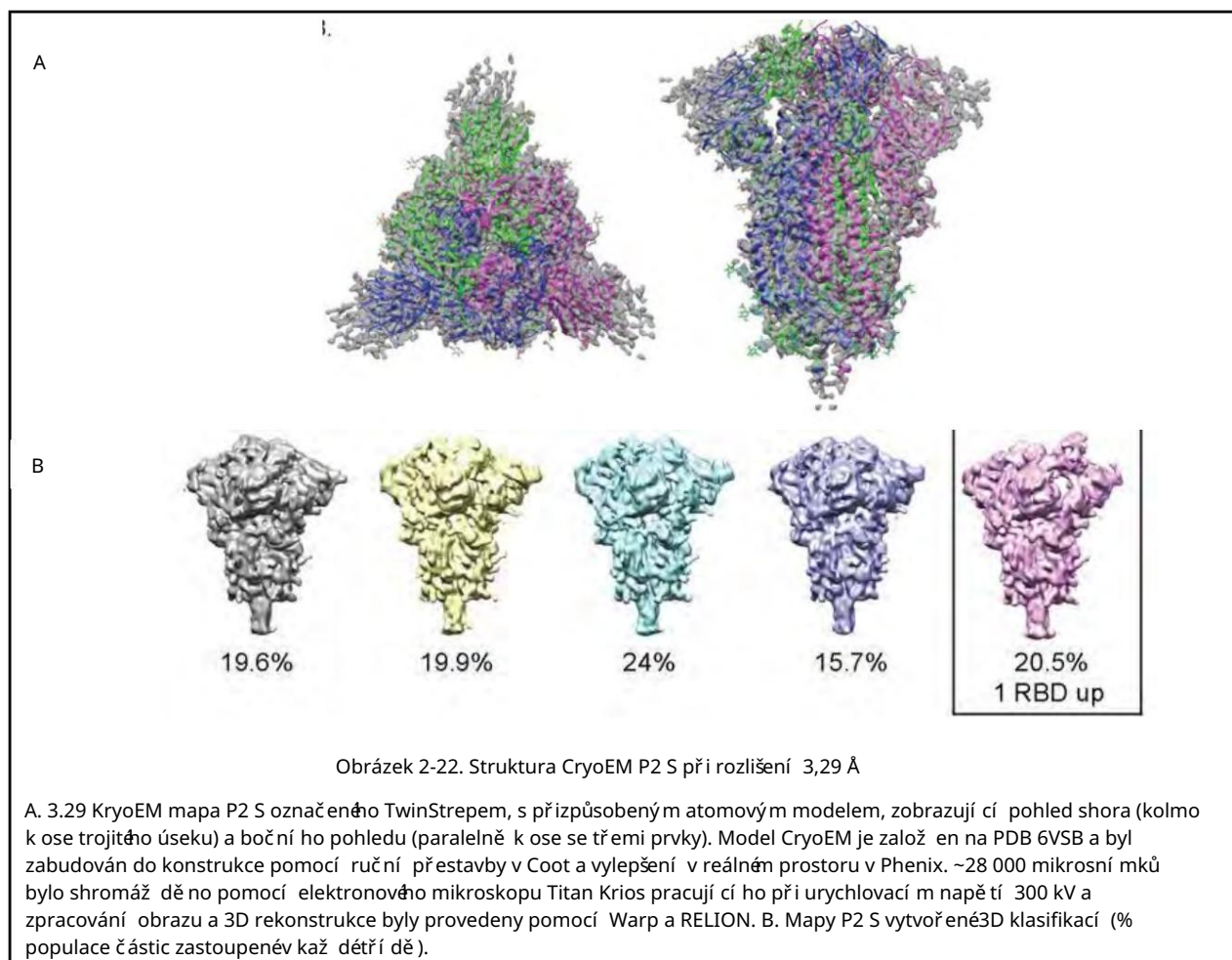


Hlavní zjištění

- modRNA (V9 a V8) prokázaly vysoké frekvence transfekce ve srovnání se saRNA.
- konstrukty saRNA vykazovaly vyšší míru exprese než ostatní dvě platformy RNA (modRNA a uRNA).
- Mezi všemi buněčnými skupinami nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v životaschopnosti buněk.



Obrázek 2-20. FACS analýza transfekce, exprese antigenu a životaschopnosti buněk



2.5. SEKRECE CYTOKINŮ/CHEMOKINŮ V LIDSKÝCH PERIFERNÍCH KREVNÍCH MONONUKLEÁRNÍCH BUŇKÁCH (PBMCs)

Studie č. R-20-0357

Testovací systém: Lidské mononukleární buňky periferní krve (PBMC) (n = 3 zdraví dárce)

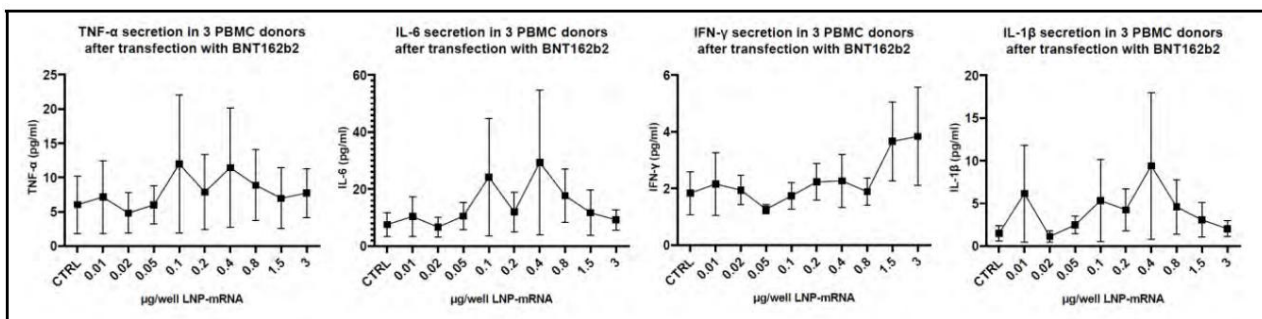
Testované položky: BNT162b2 (V9); Polymun šarže mRNA RBP020.2-LNP; šarže: CoVAC/270320; šarže RNA: RNA-RF200321-06; Kontrola: PBS

Dávky BNT162b2: 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,5 a 3 µg LNP-mRNA na jamku, což odpovídá 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 4 mL 5 a 2, µg z BNT162b2 s47

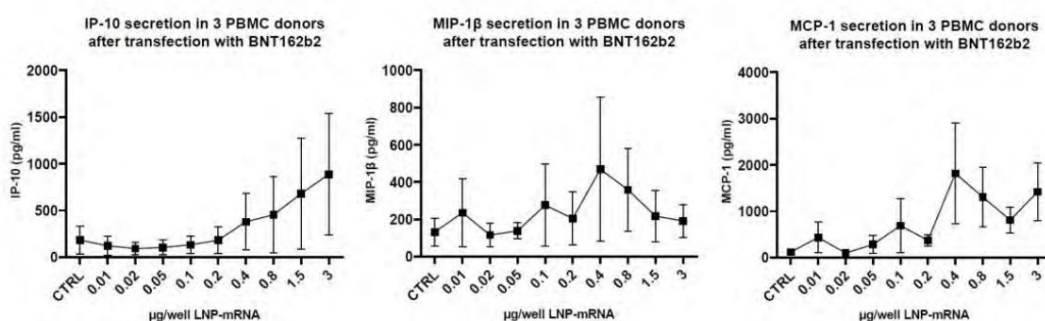


Hlavní zjištění

- Všechny PBMC vykazovaly bazální až nízké hladiny TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-1 β napříč dávkami, bez konzistentního a/nebo na dávce závislého zvýšení (obrázek 2-23). Všechny cytokiny se zvýšily (~2-6krát) při dávce BNT162b2 15 µg/ml a IFN- γ při 8 µg/ml ve vzorcích od dárce 1.

Obrázek 2-23. Sekrece cytokinů po transfekci PBMC pomocí BNT162b2 (průměr \pm SEM)

- PBMC od všech tří dárců vykazovaly bazální až nízké hladiny IP-10, MIP-1 β a MCP-1 v dávkách do 1 μ g/ml BNT162b2.
- Bylo pozorováno na dávkách závislé zvýšení sekrece IP-10 při 1 μ g/ml u dárce 1, což vedlo ke zvýšení průměrné hodnoty pro všechny vzorky (vyšší směrodatné odchylky při vyšších dávkách). Byly pozorovány nekonzistentní změny v sekreci MIP-1 β a MCP-1 (obrázek 2-24).

Obrázek 2-24. Sekrece chemokinů po transfekci PBMC pomocí BNT162b2 (průměr \pm SEM)

- ~ 100% životaschopnost buněk byla pozorována v PBMC od dvou dárců. U PBMC od dárce 2 bylo pozorováno malé na dávkách závislé snížení životaschopnosti buněk (až o 12% při 15 μ g/ml).

Závěr

Transfekce lidských PBMC pomocí BNT162b2 vedla k nízkým hladinám sekrece prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-1 β). Z chemokinů (IP-10, MIP-1 β , MCP-1) měla pouze sekrece IP-10 tendenci být zvýšena při 2 μ g/ml BNT162b2. Výsledky byly velmi variabilní například vzorky kvůli nízkému počtu vzorků a neprůkazné

3. BEZPEČNOSTNÍ FARMAKOLOGIE

Nebyly provedeny žádné farmakologické studie bezpečnosti. Ve studiích toxicity po opakovaných dávkách byly prováděny tělesné teploty a denní klinická pozorování.

4. FARMAKOKINETIKA

4.1. PLAZMOVÁ KINETIKA

Nebyly provedeny žádné absorpční studie pro BNT162b2, což je přijatelné podle příslušných pokynů WHO a EMA (WHO, 2005; EMA, 1998). Formulace LNP vakcíny obsahuje dvě nové pomocné látky ALC-0159 a ALC-0315, pro které farmakokinetika byly provedeny studie (studie 072424).

Plazmatická kinetika a eliminace ALC-0159 a ALC-0315 byly zkoumány po jedné intravenózní (IV) dávce LNP obsahující luciferázu kódující mRNA (1 mg/kg) u samic Wistar Han

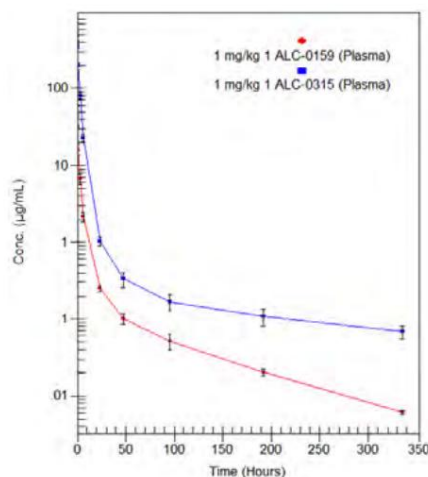
krysy. Složení LNP bylo podobné jako LNP ve vakcíně BNT162b2 (tabulka 1-3). Dávky ALC 0159 a ALC-0315 byly 1,96 a 15,3 mg/kg, v daném pořadí.

Analýzy

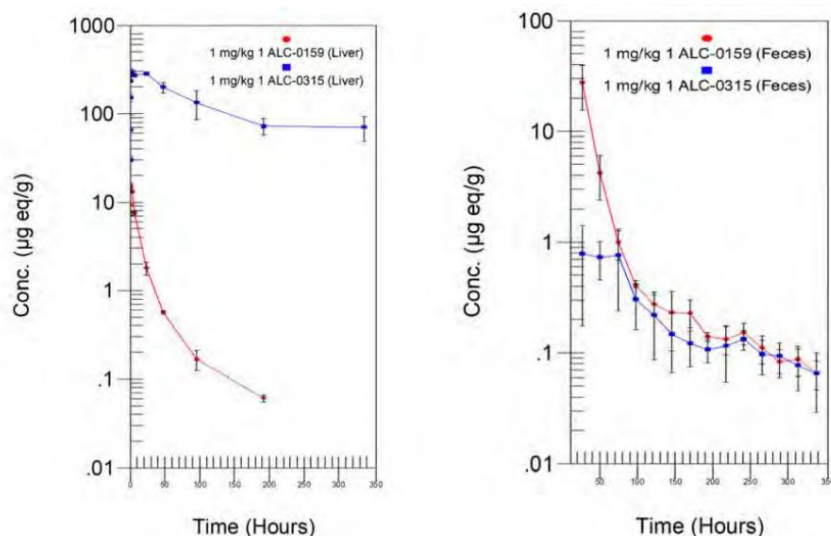
- 20 µl alikvoty vzorků plazmy, jaterního homogenátu, moči a homogenátu stolice od potkanů byly odstředěny, aby se získal supernatant, který byl analyzován pomocí LC-MS/MS. Krev a játra byly odebrány před dávkou a 0,1, 0,25, 0,5, 1, 3, 6, 24, 48, 96, 192 a 336 hodin po dávce (n=3/časový bod). Výkaly a moč byly odebrány denně po dobu 2 týdnů.
- Koncentrace BLQ nebyly použity ve výpočtech PK. Lineární dynamický rozsah standardní křivky pro ALC-0159 a ALC-0315 byly 4,88 až 2500 ng/ml pro plazmu, 19,53 až 10 000 ng/g pro játra, 4,88 až 2500 ng/ml pro moč a 6,592 až 3375 ng/g pro stolicí.
- Farmakokinetické parametry byly stanoveny ze shromážděných údajů o zvířatech za použití nekompartmentové analýzy ve Watson LIMS 7.5.

Hlavní zjištění

- Plazmatické koncentrace ALC-0159 a ALC-0315 rychle klesaly (počáteční $t_{1/2}$ 1,74, resp. 1,62 h). ALC-0159 a ALC-0315 byly pomalu odstraněny z plazmy, s terminální eliminací $t_{1/2}$ 72,7 h a 139 h, v daném pořadí. AUC_{last} byla 98,6 ug.h/ml pro ALC-0159 a 1020 ug.h/ml pro ALC-0315 a AUC_{inf} 99,2 a 1030 ug.h/ml, v daném pořadí (obrázek 4-1).
- Koncentrace ALC-0159 a ALC-0315 v plazmě klesly 8000 a 7000krát a v játrech > 250 a 4krát 2 týdny po podání.
- Zdá se, že hlavní místem příjmu obou lipidů z krve jsou játra (~ 20 % dávky pro ALC-0159 a ~ 60 % dávky pro ALC-0315 (na základě nejvyššího průměrného množství za 1 hodinu a 24 hodin). Vylučování nezměněných lipidů stolicí bylo ~47% a ~1% dávky pro ALC-0159 a ALC-0315, v daném pořadí (obrázek 4-2). Oba lipidy byly v moči pod LOQ.



Obrázek 4-1. Průměrná plazmatická koncentrace ALC-0315 a ALC-0159



Obrázek 4-2. Průměrné jaterní a fekální koncentrace ALC-0315 a ALC-0159

4.2. ROZDĚLENÍ

Distribuce LNP-BNT162b2 (V9) mRNA nebo exprimovaného S proteinu nebyla studována.

4.2.1. Studie R-20-0072

Byla zkoumána exprese luciferázy kódující mRNA zapouzdřené v různých LNP formulacích po im podání myším BALB/c.

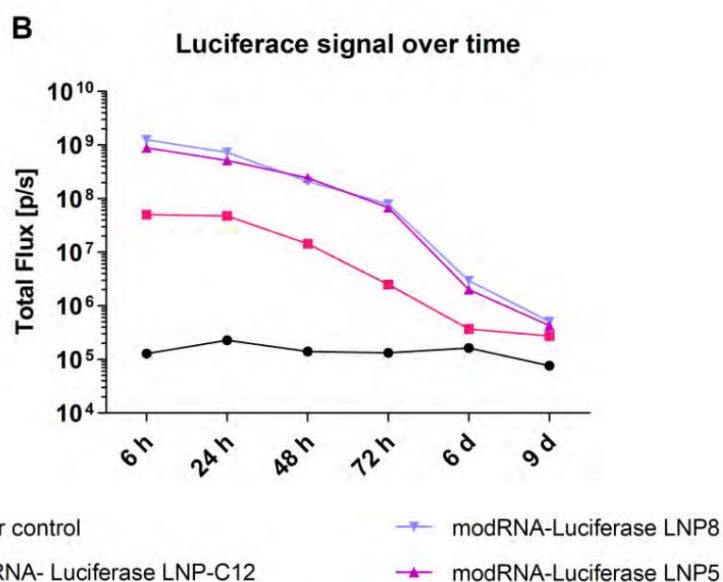
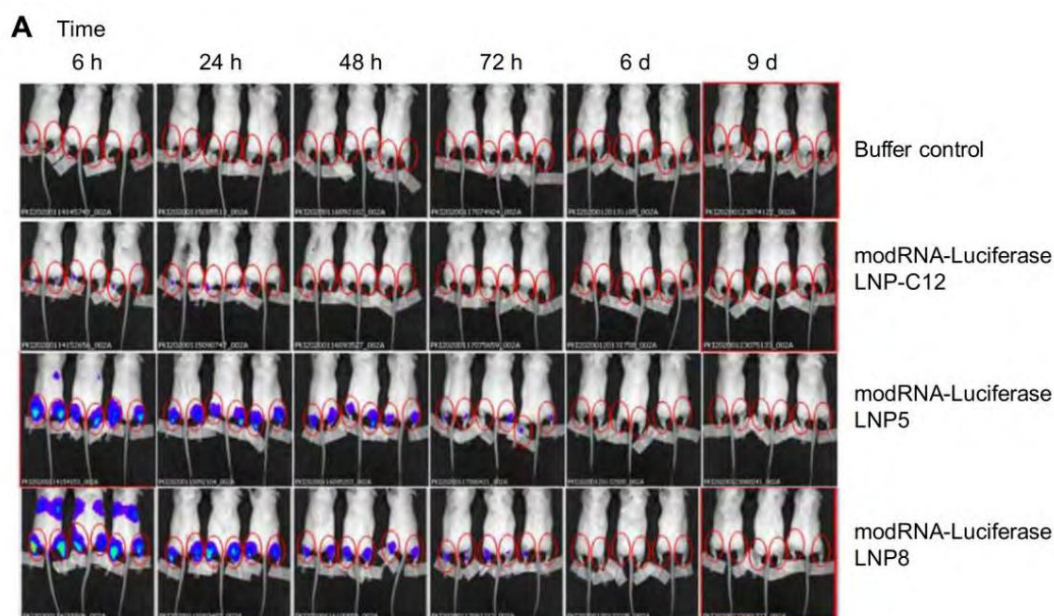
Tabulka 4-1. Studovat design

Léčebná skupina	dávka mRNA (µg)	Formulace
Řízení vyrovnávací paměti (DPBS)	N/A	N/A
mRNA luciferáza LNP12	2 µg	DODMA:Chol:DOPE:PEGcerC16 (40:48:10:2); RNA-EH190611-01c, FSU I#029, 79% zapouzdření, 0,9053 mg/ml zapouzdřenéRNA, průměr 84 nm, polydisperzita 0,202, skladovací teplota +4 °C.
mRNA luciferáza LNP5	2 µg	Acuitas proprietární; RNA-EH190611-01c, šarže FM-1055-D, 79% zapouzdření, 0,924 mg/ml zapouzdřenéRNA, průměr 108 nm, polydisperzita 0,091, skladovací teplota -80 °C.
mRNA luciferáza LNP8	2 µg	"GMP-ready"; RNA-EH190611-01c, šarže FM-1074-D, 90% zapouzdření, 1,0 mg/ml zapouzdřenéRNA, průměr 71 nm, polydisperzita 0,053, skladovací teplota -80 °C. S touto formulací je formulován klinický kandidát S antigen kódující mRNA.
<p>Podrobnosti studie • LNP-formulovaná mRNA kódující luciferázu byla naředěna na 0,05 mg/ml, aby se získala dávka 1 µg při aplikaci 20 µl hlasitost.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Formulace LNP a kontrola byly podávány čtyřem skupinám po třech samicích myším BALB/c (1 µg IM v každé noze). • 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 6 d a 9 d po injekci bylo provedeno in vivo zobrazení exprese luciferázy pomocí zařízení Xenogen IVIS® Spectrum po injekci luciferinu (IP, 150 mg/kg) 5 minut před snímkováním. • Vzorky séra byly odebrány 1. a 6. den a 9. den po imunizaci pro stanovení hladiny cytokinů/chemokinů (multiplex) a ve dnech -1 a 9 pro luciferázově specifickou ELISA. • 9. den byly sleziny resekovány za účelem imunologické analýzy pomocí IFN-γ ELISpot. 		

Hlavní zjištění

Expres mRNA kódující luciferázu

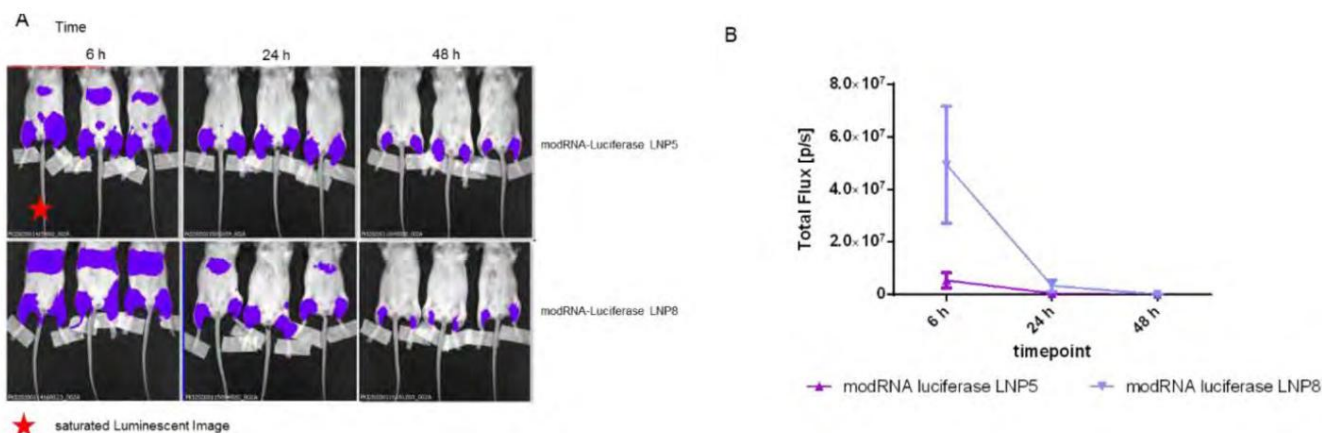
- Bioluminiscenční měření ukázala, že všechny formulace vedly k expresi mRNA s nejvyšším signálem detekovaným po 6 hodinách v místě vpichu, který v průběhu času pomalu klesal až do 9. dne (obrázek 4-3).
- Průměrná skupinová exprese luciferázy z RNA formulované LNP8 v místě injekce po 6 hodinách byla $\sim 1 \times 10^9$ p/s. Exprese luciferázy pomalu klesala na $\sim 7 \times 10^7$ p/s za 72 hodin a $\sim 3\text{--}5 \times 10^5$ p/s v den 9).



Obrázek 4-3. Měření bioluminiscence pomocí LNP-formulované mRNA kódující luciferázu

- Luciferáza exprimovaná LNP8-mRNA odváděná do jater, jak je vizualizováno luciferázou exprese po 6 hodinách v oblasti jater (obrázek 4-4).

- Průměrná skupinová exprese luciferázy z LNP8-mRNA v játrech po 6 hodinách byla $\sim 4,94 \times 10^7$ p/s (obrázek 4-4). 48 hodin po imunizaci nebyl v játrech detekován žádný signál.



Obrázek 4-4. Měření bioluminescence v játrech pomocí luciferázy kódující mRNA-LNP

Aktivace vrozeného imunitního systému

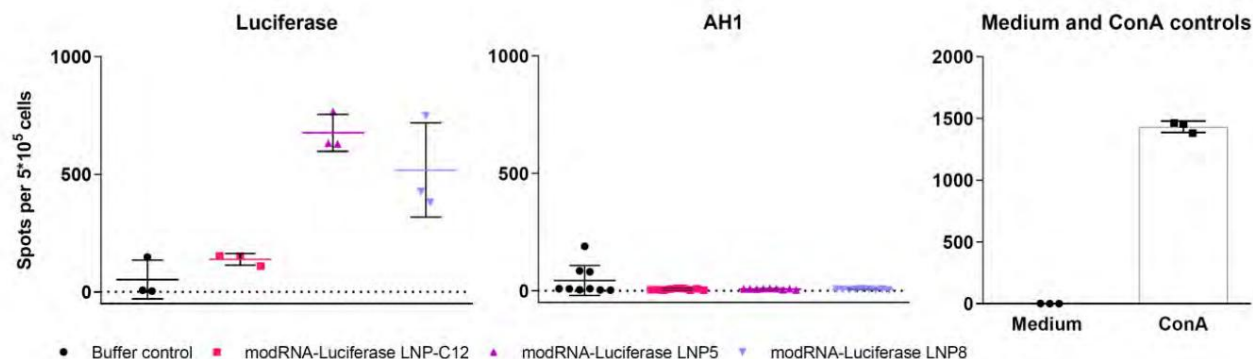
- Vzorky séra byly testovány na MCP-1, MIP-1 β , TNF- α , IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-10, IL1- β a IP-10.
- V séru před podáním dávky nebyly detekovány žádné cytokiny/chemokiny.
- Imunizace mRNA formulovanou s LNP8 indukovala MCP-1, IL-6 a IP-10 u všech 3 zvířat a MIP-1 β u jednoho zvířete 6 hodin po imunizaci. Hladiny cytokinů byly výrazně nižší než hladiny indukované LNP5, který také indukoval IFN- α a IFN- γ . Všechny hladiny chemokinů/cytokinů klesly na úroveň pozadí v den 9.

Exprese IgG specifická pro luciferázu

- V žádné skupině nebyl detekován žádný IgG specifický pro luciferázu.

Odpovědi T buněk

- Stimulace splenocytů s luciferázovým peptidovým poelem ex vivo indukovala IFN- γ odpovědi v T buňkách zvířat imunizovaných všemi kandidáty LNP mRNA.
- Skupinový průměrný počet spotů po stimulaci splenocytů s luciferázovým peptidovým poelem byl 53, 138, 676 a 519 spotů na 5×10^5 buněk pro puřovou kontrolu, LNPC12, LNP5 a LNP8 mRNA skupiny, v tomto pořadí, jak bylo zjištěno testem IFN- γ ELISpot. Reaktivita splenocytů lčených skupin na stimulaci nepřibuzným peptidem AH1 byla velmi nízká (6-8 skvrn na 5×10^5 buněk), a proto je aktivace T-buněk k luciferázovými peptidy specifická v lčených skupinách (obrázek 4-5).



Obrázek 4-5. Analýza ELISpot s použitím splenocytů v den 9 po imunizaci

Závěr

Expres luciferázy byla z velké části omezena na místo vpichu s určitou distribucí do jícna.

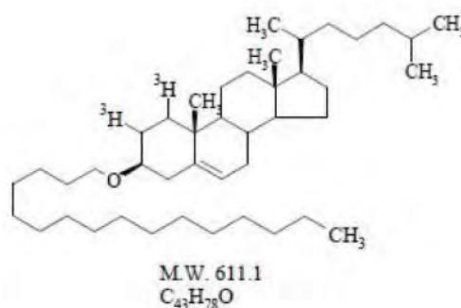
- Signál luciferázy snížen na základní úroveň v místě vpichu a v játrech za 216 hodin a 48 hodin, resp.
- LNP8 vyvolal antigen-specifickou T buněčnou odpověď, ale ne B buněčnou odpověď (žádná anti-luciferáza protilátka).

4.2.2. Studie 185350

Distribuce lipidových nanočástic (obsahují cílech ALC-0315 a ALC-0159) zapouzdřujících cílech mRNA kódujících luciferázu byla zkoumána monitorováním radioaktivně značeného (^3H -) lipidového markeru po IM podání potkanům Wistar.

Podrobnosti

studie • Formulace lipidových nanočástic [velikost LNP, složení lipidů (vzhledem k mRNA koncentraci) a účinnost enkapsulace podobná LNP ve vakcíně BNT162b2] spolu se stopovým množstvím radioaktivně značeného lipidového markeru cholesteryl-1,2- ^3H (N)-cholesterylhexadecyletheru (obrázek 4-6), byl podán intramuskulárně do 42 Wistar Han krys (21/pohlaví; věk 8-11 týdnů) při cílové dávce 50 ug mRNA/zvíře (1,29 mg celkového lipidu/zvíře).

Obrázek 4-6. Struktura lipidového markeru cholesteryl-1,2- ^3H (N)-cholesterylhexadecylether (firma kód: [3H]-CHE)

- Další zvířecí skupině 21 samců potkanů Wistar Han byla intramuskulárně injikována cílová dávka 2,57 mg celkových lipidů/zvíře (100 ug mRNA/zvíře).
- Celková radioaktivita byla měřena kapalinovým scintilačním počítáním vzorků krve, plazmy a tkáně odebraných 0,25, 1, 2, 4, 8, 24 a 48 hodin po dávce (n=3/pohlaví /časový bod).

- Sbírka tkání byla rozsáhlá a typická. Vzorky moči, stolice a výplachu klece byly také shromážděny, ale neanalyzovány na celkovou radioaktivitu (možná budoucí analýza specifických lipidů pomocí LC-MS/MS).

Hlavní zjištění

Klinická pozorování

Skupina s dávkou 100 µg mRNA/krysa (pouze):

o Jedno zvíře bylo humánně usmrceno po 30 hodinách po dávce pitvou vykazující výraznou lobulární architekturu v játrech (neposkytly se žádné histologické snímky). U tohoto zvířete byla zaznamenána snížená aktivita, hnědý zbarvení na tlamě a nepravidelné dýchání 24 hodin po dávce, po čemž následovala další pozorování piloerekce, shrbeného těla a přecitlivělosti na hlukové podněty 30 hodin po dávce. o Dvě další zvířata byla shrbená a vztyčená 30 hodin po dávce. o Všechna zvířata v této skupině ztratila tělesnou hmotnost v průměru o 7 % s nedotčenými zásobními krmiva (neuvedena nezpracovaná data).

Skupina s dávkou 50 µg mRNA/krysa (+):

o Žádná významná nepřítivá klinická

pozorování u samců. o Jeden vykazoval sníženou aktivitu a nepravidelné dýchání 30 hodin po dávce. Tohle bylo navíc shrbený a vztyčený 48 hodin po dávce.

Tkáňová distribuce

Koncentrace radioaktivního lipidového markeru dosáhla maximální hladiny v plazmě (8,9 µg lipidového ekv/ml) mezi 1 – 4 h po dávce a distribuce hlavně do jater, nadledvin, sleziny a vaječnicků za 48 h (Tabulka 4-2).
Koncentrace radioaktivity zůstala nejvyšší v místě injekce ve všech časových bodech.

- Koncentrace byly vyšší v plazmě než v krvi, s průměrným poměrem krev:plazma 0,5 – 0,6.

Tabulka 4-2. Průměrná koncentrace radioaktivity (kombinace pohlaví) v tkáni a krvi po jedné IM dávce 50 ug mRNA/krysa

Vzorek	Celková koncentrace lipidů (µg lipidového ekv./g (nebo ml)) 2 h 4 h 8 h 24 h 48 hod						
	0,25 min	1 h	0,057 h	h			
Tuková tkáň		0,100	0,126	0,128	0,093	0,084	0,181
Nadledvinky	0,27	1,48	2,72	2,89	6,80	13,77	18,21
Měchýř	0,041	0,130	0,146	0,167	0,148	0,247	0,365
Kost (femur)	0,091	0,195	0,266	0,276	0,340	0,342	0,687
Kostní dřeň (femur)	0,48	0,96	1,24	1,24	1,84	2,49	3,77
Mozek	0,045	0,100	0,138	0,115	0,073	0,069	0,068
Oči	0,010	0,035	0,052	0,067	0,059	0,091	0,112
Srdce	0,28	1,03	1,40	0,99	0,79	0,45	0,55
Místo vpichu	128,3	393,8	311,2	338,0	212,8	194,9	164,9
Ledviny	0,39	1,16	2,05	0,92	0,59	0,43	0,42
Tlusté střevo	0,013	0,048	0,09	0,29	0,65	1,10	1,34
Játra	0,74	4,62	10,97	16,55	26,54	19,24	24,29
Plíce	0,49	1,21	1,83	1,50	1,15	1,04	1,09
Lymfatická uzlina (mandibulární)	0,064	0,189	0,290	0,408	0,534	0,554	0,727
Lymfatická uzlina (mezenterická)	0,050	0,146	0,530	0,489	0,689	0,985	1,366
Sval	0,021	0,061	0,084	0,103	0,096	0,095	0,192
Vaječníky (ženy)	0,104	1,34	1,64	2,34	3,09	5,24	12,26
Slinivka břišní	0,081	0,207	0,414	0,380	0,294	0,358	0,599
Hypofýza	0,339	0,645	0,868	0,854	0,405	0,478	0,694
Prostata (muži)	0,061	0,091	0,128	0,157	0,150	0,183	0,170
Slinivka slinná	0,084	0,193	0,255	0,220	0,135	0,170	0,264
Kůže	0,013	0,208	0,159	0,145	0,119	0,157	0,253
Tenké střevo	0,030	0,221	0,476	0,879	1,279	1,302	1,472
Mícha	0,043	0,097	0,169	0,250	0,106	0,085	0,112
Slezina	0,33	2,47	7,73	10,30	22,09	20,08	23,35
Žaludek	0,017	0,065	0,115	0,144	0,268	0,152	0,215
Varlata (samci)	0,031	0,042	0,079	0,129	0,146	0,304	0,320
Brzlík	0,088	0,243	0,340	0,335	0,196	0,207	0,331
Šitná žláza	0,155	0,536	0,842	0,851	0,544	0,578	1 000
Děloha (ženy)	0,043	0,203	0,305	0,140	0,287	0,289	0,456
Plná krev	1,97	4,37	5,40	3,05	1,31	0,91	0,42
Plazma	3,96	8,13	8,90	6,50	2,36	1,78	0,81
Poměr krev:plazma	0,815	0,515	0,550	0,510	0,555	0,530	0,540

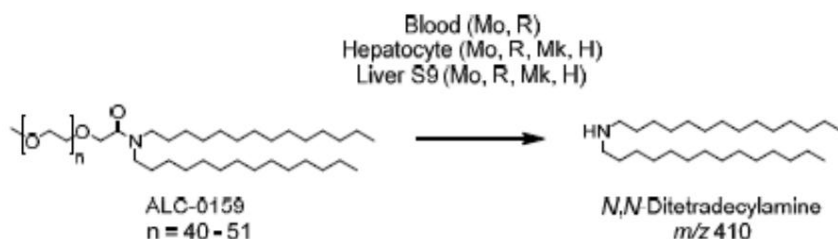
- Průměrná celková radioaktivita byla nejvyšší v místě vpichu a poté v játrech s velkým množstvím nižší celkové zotavení ve slezině, nadledvinách a vaječnících (tabulka 4-2). Celková výtečnost radioaktivity byla ve všech časových bodech nižší než 100% (rozmezí = 20 - 60%), pravděpodobně kvůli potížím se sběrem všech vzorků z místa vpichu a přítomnosti radioaktivity v jatečně upraveném těle, stolici a moči, které nebyly analyzovány.
- Vzorek tkáňové distribuce byl podobný ve skupině s dávkou 100 ug mRNA/zvíře, jak bylo uvedeno výše pro dávku 50 ug mRNA/zvíře, s nejvyšší distribucí do jater, nadledvin a sleziny.
- Odtokové lymfatické uzliny do místa vpichu by měly být odebrány a analyzovány na radioaktivitu, vzhledem ke zvýšené velikosti drenážních lymfatických uzlin pozorovaných jiných neklinických studiích po podání dávky.

Závěry •

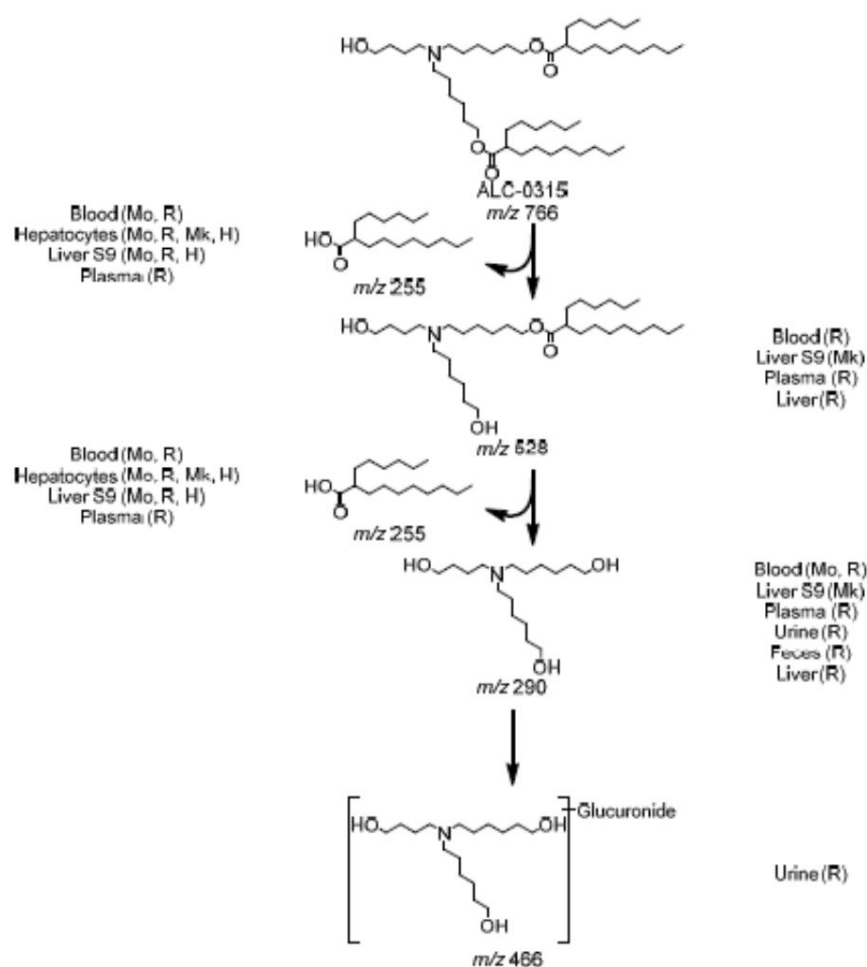
- Pomalá, ale významná distribuce lipidových nanočástic z místa vpichu s major vstřebávání do jater.
- Menší distribuce ve slezině, nadledvinách a vaječnících po dobu 48 hodin.
- Průměrné poměry krev:plazma 0,5-0,6 indikují nanočástice převážně přítomné v plazmatické frakci krve s maximální koncentrací v plazmě přibližně 2 hodiny po dávce.

4.3. METABOLISMUS

Byly provedeny studie in vitro a in vivo za účelem hodnocení metabolismu nových lipidů ALC-0159 a ALC-0315. Studie metabolismu využily bioanalytické metody LC/MS-MS pro detekci nových lipidů a jejich metabolitů. Hlavní metabolické dráhy pro ALC-0159 a ALC-0315 u různých druhů, jak navrhuje sponzor, jsou znázorněny na obrázku 4-7 a obrázku 4-8.



Obrázek 4-7. Navrhovaná metabolická dráha pro ALC-0159



Obrázek 4-8. Navrhovaná metabolická dráha pro ALC-0315

Studie in vitro ukázaly menší metabolismus ALC-0159 a ALC-0315 v játrech, přičemž většina lipidů byla nalezena nezměněná na konci 2 nebo 4 hodin inkubační doby (tabulka 4-3 a tabulka 4-4).

Tabulka 4-3. Procento metabolismu ALC-0159 (1 uM ve všech testech) in vitro

Číslo studie/ Testovací systém	Druh	Procento zbývajících bez změny ALC-0159								Polovina život t _{1/2} (min)	Clint (ml/min/kg)		
		0 min	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min				
01049-20020 Jaterní mikrozomální protein (0,5 mg/ml)	Myš	100,82,3		86,4	85,5	85,4	95,9	-	-	>120	<45,5		
	SD Krysa	100,101,2	93,8		98,3	95,4	97,1	-	-	>120	<20,7		
	Wistar Han Rat	100,112,1	102,7	105,4	100,9	109,0			-	-	>120	<20,7	
	Opice 100	100,8	85,1	Člověk 100	99,6	92,3	86,4	94,6	93,4	-	-	>120	<16,9
					95,5	98,0	93,1	-	-	>120	<14,5		
01049-20021 Jaterní protein S9 (0,5 mg/ml)	Myš	100,98,9		91,1	102,8	90,7	106,8			-	-	>120	-
	SD Krysa	100,84,4	90,9		98,0	93,5	92,7	-	-	>120	-		
	Opice 100	100,91,3	Člověk 100	106,7	98,0	105,6	108,3	105,7			-	-	>120
										-	-	>120	-
01049-20022 Suspenze hepatocytů (8x104 buněk)	Myš	100	-	100,8	94,9		94,3	87,1	94,9	102,8	>240		<34,1
	SD Krysa	100	-	93,4	91,8	90,3	89,5	94,0	94,9	>240		<13,5	
	Wistar Han Rat	100	-	113,0	105,1	112,8	104,1	102,9	98,8	>240		<13,5	
	Opice 100		-	90,2	92,9	94,6	97,5	89,8	92,9	>240		<11,3	
	Lidská 100		-	106,3	101,6	92,7		96,0	93,7	102,6	>240		<7,4

- Neurčeno

Tabulka 4-4. Procento metabolismu ALC-0315 (1 uM ve všech testech) in vitro

Číslo studie/ Testovací systém	Druh	Procento zbývajících bez změny ALC-0315								Poločas rozpadu (t _{1/2}) (min)	Clint (ml/min/kg)		
		0 min	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min				
01049-20008 Jaterní mikrozomální protein (0,5 mg/ml)	Myš	100,98,8		97,8	100,5	97,8		96,5	-	-	>120	<45,5	
	SD Krysa	100,94,4	96,3		99,7	98,7	96,0	-	-	>120	<20,7		
	Wistar Han Rat	100,96,3		97,3	98,5	94,1	93,7	-	-	>120	<20,7		
	Opice 100	100,98,0	Člověk 100	100,2	96,2	100,98,0		97,7	-	-	>120	<16,9	
										-	-	>120	<14,5
01049-20009 Jaterní protein S9 (0,5 mg/ml)	Myš	100,97,7		97,2	98,6	98,1	96,8	-	-	>120	-		
	SD Krysa	100,98,8		99,6	99,6	98,8	98,5	-	-	>120	-		
	Opice 100	100,99,6	Člověk 100	96,0	97,0	99,1	98,7	99,6	-	-	>120	-	
					97,3	95,0	98,3	99,3	-	-	>120	-	
01049-20010 Suspenze hepatocytů (8x104 buněk)	Myš	100	-	101,1	100,8	101,9	98,8	101,1	99,6	>240		<34,1	
	SD Krysa	100	-	97,7	98,5	99,2	97,4	98,9	101,1	>240		<13,5	
	Wistar Han Rat	100	-	102,7	102,3	103,1	99,6	103,5	100	>240		<13,5	
	Opice 100		-	96,4	97,8	100,96,4	95,6			93,8	>240	<11,3	
	Lidská 100		-	100,7	101,4	100,4	100,7	98,9		99,6	>240	<7,4	

- Neurčeno

Potenciální metabolity ALC-0159 a ALC-0315 byly analyzovány in vitro v krvi, hepatocytech a jaterní frakci S9 a in vivo v potkaní plazmě, moči, stolici a játrech po jedné IV dávce LNP obsahující luciferázovou mRNA (zpráva 043725). Ve farmakokinetické studii na potkanech nebyly pozorovány žádné jedinečné metabolity ALC-0159 in vivo, ale N,N-ditetradecylamin vzniklý pomalou hydrolyzou amidu byl identifikován v hepatocytech a frakcích ch jater S9 myši, potkanů, opic a lidí.

Deesterifikovaný metabolit ALC-0315 (vytvořený hydrolyzou esteru) byl pozorován in vitro v krvi myši a potkanů; frakce opičích jater S9; a in vivo v potkaní plazmě, moči, stolici a játrech. Glukuronidový konjugát tohoto deesterifikovaného metabolitu byl pozorován v moči potkanů (tabulka 4-5).

Tabulka 4-5. Metabolický profil ALC-0315

	In vitro: Krev	In vitro: hepatocyty (10 uM; 4h inkubace)	In vitro: játra S9 zlomky	In vivo: 14denní farmakokinetika u potkanů
--	----------------	--	------------------------------	---

m/z: Metabolická dráh	(10 uM; 24h inkubace)								(10 uM; 24h inkubace)				studie (15,3 mg/kg ALC-0315 IV; 5 časových bodů v průběhu 0,1-336 h)			
104,07: N Dealkylace, oxidace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
132,10: N Dealkylace, oxidace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
145,05: N Dealkylace, hydrolyza, oxidace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
255,23: Hydrolyza (kyselina)	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
290,27: Bis hydrolyza (amin)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
466,30: Bis hydrolyza (amin), glukuronidace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
528,50: hydrolyza (amin)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+

* V této tabulce nejsou uvedeny všechny potenciální metabolity. Další potenciální metabolity, které nejsou uvedeny v této tabulce, nebyly detekovány v žádném ze vzorků. + = identifikovaný metabolit; - = Nedetekováno

5. TOXICITA OPAKOVANÝCH DÁVKOVÁNÍ

Byly předloženy dvě studie na potkanech zkoumající toxicitu opakovaných dávek různých verzí mRNA vakcín [BNT162a1, BNT162b1, BNT162c1, BNT162b3c, BNT162b2 (V8) a BNT162b2 (V9)]. Jedna ze studií hodnotila klinickou formulaci vakcín. Studie s opakovanými dávkami byly provedeny za použití klinické cesty podání a byla hodnocena lokální tolerance. Ve studiích byla hodnocena nejvyšší dávka (v absolutních hodnotách) použitá v navrhované klinické studii.

Tabulka 5-1. Přehled studií toxicity po opakovaném podávání

Druh a kmen	Studie	Doba trvání	Trasa	dávka (µg/zvíře); frekvence	datum	GLP
Krysa (Wistar Han)	38166	17 dní	IM	0, 10, 30, 100; QWx3	17. září 2020	Ano
	20GR142	17 dní	IM	0,30; QWx3	23. listopadu 2020	Ano

5.1. KRYSA

5.1.1. 17denní studie: Kandidát na vakcínu BNT162b2 (V9)

Studie: 20GR142 Laboratoř: Pfizer Worldwide Výzkum a vývoj, Drug Bezpečnostní výzkum a vývoj, Eastern Point Road, Groton, USA Datum: První dávka: 06.07.2020 GLP: Ano Číslo šarže: COVAC/270320 (BNT162b2 [V9]), BCV/040620 (BNT162b3c)	Kmen: Wistar Han, Věk k: ~9 týdnů Testovací článek: BNT162b2 (V9): 0,5 mg/ml RNA kódující úplnou variantu proteinu SARS-CoV-2 Spike (S) P2 BNT162b3c: 0,5 mg/ml RNA kódující membránově ukotvenou trimerizovanou variantu RBD SARS-CoV-2 S proteinu Cesta a frekvence: IM, týdně ve dnech 1, 8 a 15 Dávka: 30 µg RNA, 60 µl/místo podání / dávka Vehikulum: 0,9% sterilní fyziologický roztok Síla: 0,5 mg/ml Velikost skupiny: 10/ pohlaví (hlavní) + 5/sex (zotavení) Doba trvání: 17 dní (± 3 týdny fáze zotavení)
--	--

Úmrtnost: žádná

Klinické příznaky: žádná souvislost s léčbou

Místní tolerance:

mRNA	Den	Dávka (µg)	Po dávce (h)	Otok		Erytém	
Řízení	1-15	0	-	-	-	-	-
BNT162b2 (V9)	1	30	24	++	++	+	+
			144	-	++	-	+
	15		24	++	++	-	+
			72	+	++	-	+
BNT162b3c	1	30	24				
			144				
	15		24				
			72				

Poznámka: - žádná podrážka dění, + mírná podrážka dění, ++ střední podrážka dění, +++ vysoká podrážka dění

Zvýšení tělesné motnosti: žádná souvislost s

léčbou Spotřeba potravy: žádná souvislost s

léčbou Oftalmologie: žádná souvislost s

léčbou Tělesná teplota: podání BNT162b2 nebo BNT162b3c v testovacích dnech 1, 8 a 15 vedlo k mírnému, ale statisticky významně

zvýšenému tělesnému teplotám ve srovnání kontrolní skupiny po každé dávce o ~ 1 °C u samic (hodnoty dne 15: kontrola 37,34 °C, 38,02 °C; BNT162b2 38,37 °C (P<0,001), 38,15 °C; BNT162b3c 38,43 °C (P<0,001), 38,35 °C)

Hematologie (den 17):

mRNA	Řízení	BNT162b2	BNT162b3c
Sex			
WBC (103/µL)	3,84	2,16	8,83† 5,70†
Monocyty (103/µl)	0,071	0,056	0,234† 0,154†
Neutrofily (103/µl)	0,674	0,409	4 449† 2,469†
Velké zbarvené buňky (103/µL)	0,026	0,010	0,209† 0,132†
Fibrinogen (mg/dl)	253,1	217,2	596,7† 596,7†
Eozinofily (103/µl)	0,056	0,029	0,141† 0,092†
bazofil (103/µl)	0,003	0,001	0,017† 0,008†

† p < 0,01

Kromě toho přechodně nižší (0,44 × -0,27 × 4. den pro obě pohlaví) a vyšší (1,2-1,31 × 17. den, pouze) počet retikulocytů a menší než stvícených červených krvinek (počet červených krvinek, hemoglobin a hematokrit v den 17) byly zaznamenány u obou skupin léčených BNT162b2 (V9) a BNT162b3c, srov. řízení. Vyšší průměrná koncentrace hemoglobinu v buňkách (4. den,), nižší průměrný buněčný hemoglobin [MCH] a vyšší šířka distribuce červených krvinek (17. den; obě pohlaví) byly také pozorovány u léčených skupin, srov. řízení.

Chemie séra (den 17):

mRNA	Řízení		BNT162b2		BNT162b3c
Sex					S47
albumin	3,50	3,60	3,43	3,07 †	
Globulin	1,89	1,84	2,08*	1,91	
Album/globulin	1,88	1,96	1,65†	1,61†	
Celková bílkovina	5,39	5,44	5,51	4,98 †	

*p <0,05; † p <0,01, významně odlišné od kontroly na základě trendu nebo párového srovnání

Proteiny akutní fáze (den 17):

mRNA	Řízení		BNT162b2		BNT162b3c
Sex					S47
α 2-Makroglobulin (µg/ml)	14	33,1	991†	521†	
α 1-kyselý glykoprotein (µg/ml)	47,7	96	1836†	1492†	

† p <0,01

Z klinických patologických nálezů pouze globulin ve skupině BNT162b2 zůstal po fázi zotavení vyšší než kontrolní skupina (2,26 srov. 2,10 g/dl, P<0,05).

Analýza moči: žádná nesouvisící

s lébou Hmotnosti orgánů (relativní k tělesné hmotnosti): Slezina: 1,4-1,6krát a 1,5krát ve skupinách BNT162b2 a BNT162b3c, v tomto pořadí, ve srovnání s kontrolou (statisticky významně).

Hrubá patologie: edém a erytém byly pozorovány u 4-7 zvířat a ve skupinách BNT162b2 a BNT162b3c, v daném pořadí, ve srovnání s 1 v kontrole (n=10); zvětšená drenážní lymfatická uzlina u 2 a 4 zvířat ve skupinách BNT162b2 a BNT162b3c, v tomto pořadí, ve srovnání s nulou u kontroly (n=10) a **S47**.

Histopatologie:

	Řízení		BNT162b2		BNT162b3c
	mužský	ženský	mužský	ženský	
Místní vpichu (počet vyšetřených)#	10 (5)	10 (5)	10 (5)	10 (5)	S47
Záněť	4	5	10	10	
Minimální	4	5	- (5)	- (5)	
Mírný	-	-	7	7	
Mírný	-	-	3	3	
Otok	-	-	9	10	
Mírný	-	-	8	9	
Mírný	-	-	1	1	
Lymfatická uzlina, drenáž (počet vyšetřených)#†	10 (4)	10 (5)	9 (5)	10 (5)	
Zvýšená buněčnost, plazmatická buňka	-	-	7 (4)	9 (4)	
Minimální	-	-	1 (4)	1 (4)	
Mírný	-	-	4	1	
Mírný	-	-	2	7	
Zvýšená buněčnost, zárodečné centrum	2	2 (1)	6 (4)	5 (3)	
Minimální	1	1 (1)	2 (2)	3 (1)	
Mírný	1	1	4 (1)	2 (2)	
Infiltrace makrofágy	-	-	- (3)	- (3)	
Minimální	-	-	- (2)	- (1)	
Mírný	-	-	- (1)	- (2)	
Lymfatická uzlina, tříselná (počet vyšetřených) #	9 (5)	10 (5)	10 (5)	10 (5)	
Zvýšená buněčnost, plazmatická buňka	-	-	1	2	
Minimální	-	-	1	2	

Zvýšená buněčnost, zárodečné centrum	1 (2)	1 (2)	5 (3)	6 (1)
Minimální	- (2) 1	1 (2)	1 (3)	3 (1)
Mírný	-	-	4	3
Infiltrace makrofágů	-	-	-	-
Minimální	-	-	-	-
Játra (počet vyšetřených)	10	10	10	10
Vakuolizace hepatocytů, periportální	-	-	5	10
Minimální	-	-	5	10
Slezina (počet vyšetřených)	10 (5)	10 (5)	10 (5)	10 (5)
Zvýšená buněčnost, hematopoetická buňka	-	-	10	9
Minimální	-	-	10	9
Zvýšená buněčnost, zárodečné centrum	-	-	5 (1)	6 (2)
Minimální	-	-	5 (1)	6 (2)
Kostní dřevina, hrudní kost (vyšetřené části)	10	10	10	10
Zvýšená buněčnost, hematopoetická buňka	-	-	10	10
Minimální	-	-	10	10

s47

Obnova dat v závorkách; † lymfatická uzlina není uvedena ve zprávě o studii, ale zadavatel to potvrdil
byla ilická lymfatická uzlina; Hodnocení lézí: minimální = stupeň 1, mírné = stupeň 2, střední = stupeň 3

• Podobné histologické nálezy pro dvě varianty mRNA • Zánětlivost

mírně v pichu (zánětlivost smíšených buněk, většinou neutrofilů a edém; zánětlivé buňky často infiltrovaly a expandovaly epimysium, perimysium a endomysium a oddělyly svalová vlákna a/nebo krevní cévy v kosterním svalu a při ležetostně rozšířena do tkáně SC a do extrakapsulární tkáně kloubu)

- celularita zárodečných center (minimální až mírná) drenážních a inguinálních lymfatických uzlin a sleziny • plazmatické buňky (minimální až střední; většinou nezralé jako plazmablasty) v kortikálních, medulárních a subkapsulárních sinusech lymfatických uzlin, s větším výskytem a závažností v drenážních lymfatických uzlině (minimální až střední) než v tříselných lymfatických uzlině (minimální); žádný nálezy v mezenterických lymfatických uzlině
- hematopoéza (minimální; primárně myeloidní prekurzory) v kostní dřevině a červené dřevině sleziny • Vakuolizace hepatocytů (minimální; malá čírá kulatá membrána vázaná struktura v cytoplazmě) v oblasti portálu

Po 3týdenní zotavovací fázi již nebyly přítomny edém v mírně v pichu, hepatocelulární vakuolizace, zvýšená krvetvorba kostní dřevině a sleziny. Ostatní nálezy částečně obnoveny (nižší výskyt a/nebo závažnost). • Mírně v pichu: zánětlivost (většinou lymfocyty a plazmatické buňky s malým počtem neutrofilů) • Slezina: Zvýšená celularita zárodečných center (minimální)

- Lymfatické uzliny (drenážní a tříselné): zvýšená celularita zárodečných center (minimální až mírná) a plazmatických buněk (minimální zralé plazmatické buňky nahradily plazmablasty), infiltrace makrofágů (minimální až mírná); s47

Závěr: Většina nálezů souvisela s imunitní odpovědí na vakcínu a zcela nebo částečně se změnila po 3týdenní zotavovací fázi.

Hepatocelulární vakuolizace byla pravděpodobně způsobena vychytáváním LNP nebo disociovaných lipidů (tkáňový řez nebyl obarven na lipidy). Vakcíny na indukovala NAb u potkanů. Uvolňování cytokinů nebylo hodnoceno.

Hodnocení imunogenicity: NAb byla stanovena mikroneutralizačními testy založenými na cytopatických účincích SARS-CoV-2 virus (2019-nCoV/Itálie-INMI1) v buňkách Vero E6. U kontrolních zvířat nebo ve vzorcích ošetřených zvířat před podáním dávky nebyla detekována žádná NAb. U všech léčených zvířat se vyvinul NAb; geometrický průměr titerů NAb je uveden v tabulce níže.

Testovací den	BNT162b2		BNT162b3c	
Den 17	1114	2501		
Den 38 (den zotavení 21)	5120	5120		

s47

5.1.2. 17denní studie: Varianty BNT162 mRNA

<p>Studium: 38166 Laboratoř: Laboratoř farmakologie a toxikologie (LPT), GmbH & Co. KG, Hamburg, Německo Datum: 17. září 2020 (první dávka: 17. března 2020) GLP: Ano Číslo šarže: CoVAC/090320 (BNT162a1), CoVAC/100320 (BNT162b1), CoVAC/130320 (BNT162c1), CoVAC/160320 (BNT162b2 [V8])</p>	<p>Kmen: krysy Wistar Han Věk: ~7-9 týdnů Testovací články: • BNT162a1 (uRNA-LNP, RBD proteinu S) • BNT162b1 (mRNA-LNP, RBD proteinu S) • BNT162b2 (V8; mRNA-LNP, mutovaný protein S plněděky) • BNT162c1 (samoamplifikující mRNA-LNP, RBD proteinu S) Trasa a frekvence: IM, QW × 3 (dny 1, 8, 15) (kromě BNT162c1 v den 1 a 8) Dávka: BNT162a1: 10 a 30 µg/zvíře; BNT162b1: 30 a 100 µg/zvíře; BNT162c1: 30 µg/zvíře a BNT162b2: 100 µg/zvíře, 20 až 100 µl/místo podání /dávka Vehikulum: Fosfátem pufovaný fyziologický roztok, 300 mM sacharóza/Síla roztoku: 0,5 mg/1 ml hlavní skupiny + velikost skupiny 5/sex (zotavení) Trvání: 17 dní (± 3 týdny zotavení) (Zvířata, kterým byl podáván BNT162c1, byla utracena v testovací den 10 po dvou dávkách a po zotavení v testovací den 31)</p>
--	---

Níže jsou shrnuta pouze zjištěná z kontrolních zvířat a zvířat léčených BNT162b2 (V8).

Nálezky pro ostatní varianty kromě BNT162c1 byly obecně podobné jako pro BNT162b2.

Úmrtnost: žádná

Klinické příznaky: žádná souvislost s léčbou

Místní tolerance:

mRNA	Den	Dávka (µg)#	Po dávce (h)	Edém Erytém				I/H Indurace/Kalení	
Řízení	1-15	0	-	-	-	-	-	-	-
BNT162b2 (V8)	1	100	24	+	+	+			-
			144	-	-	-	-		
	15		24	+++++++	-	-			
			528/480^	-	-	-	-		

Poznámka: - žádný účinek, + velmi mírné podráždění; ++ až mírné podráždění; +++ až střední podráždění; ++++ až silné podráždění; ^ erytém

Přírůstek tělesné hmotnosti:

mRNA	Dávka (µg)	Rozdíl tělesné hmotnosti od 1. dne (%)			
		Den 9		Den 16	
Řízení	0	21.3	11.7	37.1	16.7
BNT162b2	100	-4.1	1.2	4.8	6.4

Poznámka: tělesná hmotnost byla snížena až o 11,3% u samců ve srovnání s kontrolní skupinou v testovacích dnech 9 a 16 (statisticky významněji p = 0,01 v testovacích dnech 9 a 16), zatímco snížení tělesné hmotnosti o ~ 6,8% bylo zaznamenáno u samic ve srovnání s kontrolní skupinou od 2. do 16. dne (statisticky významněji p < 0,01 nebo p < 0,05 v testovacích dnech 9. a 16.). Na konci období zotavení nebyl žádný významný rozdíl v tělesné hmotnosti mezi kontrolní skupinou a skupinou léčenou BNT162b2.

Spotřeba potravy: žádná účinky související s léčbou

Oftalmologie: žádná účinky související s léčbou

Tělesná teplota: podání BNT162b2 (100 µg) v testovacích dnech 1, 8 a 15 (3 podání) vedlo k mírně zvýšeným tělesným teplotám ve 4 h po nebo 24 h po ve srovnání s kontrolní skupinou (statisticky významně).

Během období zotavení zůstala tělesná teplota na mírně vyšší úrovni ve srovnání s kontrolní skupinou ve všech léčených skupinách.

Hematologie: (všechny hodnoty ve srovnání s kontrolou, statisticky významně změny)

BNT162b2 100 µg 17. den • WBC

buňky: 118,7 % a 111 % • neutrofilů: 605,8 % a 679,8 % • eosinofilů: 45 09,6 % bazofilů: 146,7 % a 105,3 % • velkénézabarvené buňky (LUC): 685,2 % a 594,8 % • Fibrinogen: 205,2 % a 160,2 % • hemoglobin: 9,1 % hemato' a 1 % hemato"): 11,9 % a 13,5 % • krevních destiček: 29,2 % a 34,1 % • červených krvinek: 9,8 % pouze kromě toho absolutní (72,1 % a 48,2 %) a ul. % '7 % ocytů (74), byly pozorovány pouze 4. den.

Chemické složení séra (17. den, % relativních rozdílů oproti kontrolní skupině):

mRNA	BNT162b2	
Sex		
albumin	-5,9*	-11*
Globulin	+23,1*	+17,7*
GGT [^]	+198,1*	+317,4*

* Statisticky významný; ^ Kontrolní skupina: zvýšení o 1,62 IU/l, rozsah jednotlivých údajů zaznamenaných pro aktivitu GGT v několika testovacích skupinách mírně překročil rozsah historických údajů [průměr historických údajů LPT (rozsah individuálních údajů): 2,28 (0,4-5,1), 2,43 (0,2-4,8)]

Proteiny akutní fáze (násobné zvýšení ve srovnání s kontrolou, statisticky významné p<0,01)

Protein akutní fáze	mRNA	BNT162b2	
	Sex		
α1-kyselý glykoprotein	Den 4	6.9	5.6
	Den 17	20.7	15.9
α2-makroglobulin	Den 4	54,3	75,3
	Den 17	217	121

Cytokiny (n=3): IFN-γ, TNF-α, IL-1p, IL-6 a IL-10 6 hodin po podání byly zvýšeny ve všech skupinách včetně kontrolní skupiny ve srovnání s hodnotami před podáním dávky. Mezi kontrolní a léčnou skupinou nebyl žádný jasný rozdíl (s ohledem na malou velikost vzorku a rozdíl mezi zvířaty).

Analýza moči: žádná nesouvisící s

léčbou Hmotnosti orgánů (relativní k tělesné hmotnosti): slezina (o 1,2-1,6 × ve všech skupinách ve srovnání s kontrolou)

Hrubá patologie: indurovaná místa vpichu u > 6 zvířat/pohlaví /skupiny (n=10) ve srovnání s nulou u kontroly; zvěššená kyčelní lymfatická uzlina a zvěššená slezina u testovaných skupin ve srovnání s nulou u kontroly Histopatologie:

mikroskopické nálezy souvisící s testovanou položkou na konci dávkování zahrnovaly • Zánětlivost v místě

vpichu a okolních tkání (všechny léčenské skupiny) • celularita germinálních center (minimální až

střední) a zvýšený počet plazmatických buněk (minimální až střední) v drenážní (iliakální) lymfatické uzlině (všechny léčenské skupiny)

• hematopoéza (minimální) v kostní dřevě a slezině (všechny léčenské skupiny) • Vakuolizace hepatocytů

(minimální až mírná) v oblasti portálu (všechny léčenské skupiny).

Všechny mikroskopické nálezy v místech vpichu a lymfatických uzlin přetrvávaly během fáze zotavení s důkazem částečného zotavení (snížení esnékore závažnosti ve srovnání s fází dávkování; 31. den pro skupinu 6; 38. den pro všechny ostatní skupiny). Účinky na slezinu, kostní dřevě a játra byly plně obnoveny na konci 3týdenní fáze zotavení.

Všechny klinické patologické nálezy (včetně cytokinů, proteinů akutní fáze) byly reverzibilní.

Hodnocení imunogenicity Výsledky

imunogenicity s BNT162b2 (V8), bílé zce pří buznou variantou BNT162b2 (V9), jsou uvedeny níže.

Vzorky séra byly odebrány od léčných zvířat hlavní studie v den 17, stejně jako od léčných kohort zotavení v den 38.

Testovací systémy

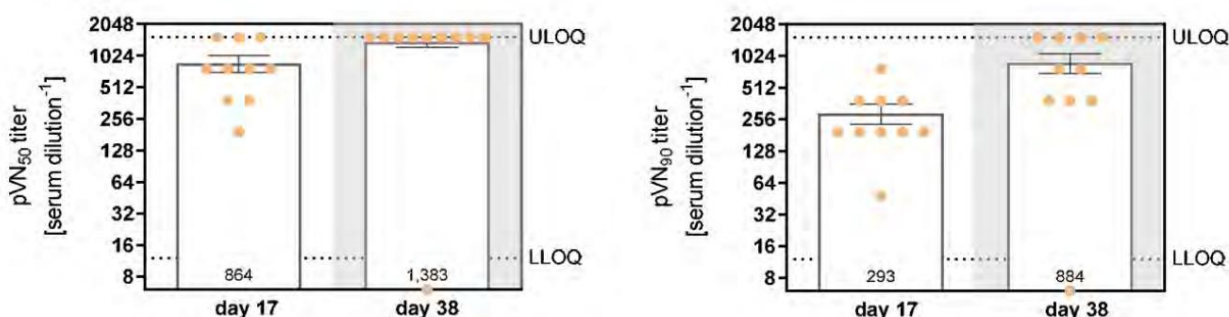
- Rekombinantní His-značená doména SARS-CoV-2-S spike proteinu S1 potažena na 96jamkové destičce s vysokým obsahem proteinu
- Rekombinantní His-značený SARS-CoV-2-S spike protein RBD subdoména potažena ve vysokoproteinové vazbě 96jamková destička
- HEK293T/17 (ATCC® CRL-11268™; pro generování pseudoviru VSV/SARS-CoV-2-S) • VERO 76 (ATCC® CRL-1587™; pro VSV/SARS-CoV-2-S titrace pseudovirů a testování neutralizace pseudovirů)

Hlavní zjištění

- Imunizace BNT162b2 vyvolala IgG proti S1 a RBD SARS-CoV-2 S, který se v průběhu času po poslední dávce zvyšoval. Skupinové průměrné koncentrace IgG proti S1 a RBD jsou uvedeny v následující tabulce.

		Průměrná koncentrace IgG [mg/ml]
17 dní po první imunizaci	Proti S1	1,76 ± 0,16
	Proti RBD	2,33 ± 0,19
38 dní po první imunizaci	Proti S1	3,46 ± 0,52
	Proti RBD	4,90 ± 0,87

- Podávání BNT162b2 (V8) vyvolalo neutralizační protilátky proti pseudovirové infekci. Títry neutralizačních protilátek u očkovaných zvířat se v průběhu času po poslední dávce zvyšovaly. Sérovitry vedoucí k 50% neutralizaci pseudoviru překročily horní limit kvantifikace (ULOQ) recipročního titru 1536 u více než 8 z deseti zvířat v den 38, a proto byl vyhodnocen neutralizační titer 90 % (obrázek 5-1).



Obrázek 5-1. Neutralizační aktivita pseudovirů u potkanů po imunizaci BNT162b2 V8

6. REPRODUKČNÍ A VÝVOJOVÉ STUDIE

Byla provedena jediná reprodukční a vývojová studie hodnotící potenciální účinky tří kandidátů na vakcíny COVID-19 (BNT162b1, BNT162b2 a BNT162b3 v lipidových nanočásticích) na plodnost a pre-/postnatální vývoj u samic potkanů Wistar (tabulka 6.1). Navrhovaná klinická dávka (30 µg/dávka) byla hodnocena v reprodukční a vývojové studii.

Tabulka 6.1. Přehled studie reprodukční toxicity

Druh a kmen	Typ studie	Dávka a cesta	Frekvence	Studie	GLP
Krysa (Wistar)	Plodnost a embryofetální vývoj	0,30 µg/dávka mRNA v 0,06 ml; IM	4 dávky krysám: 21 a 14 dní před pářením a GD9 & GD20	20256434 [RN9391R58]	Ano

6.1. PLODNOST A VÝVOJ EMBRYOFETÁLU

Studie: 20256434 [RN9391R58] Laboratoř: Charles River Laboratories, Saint Germain-Nuelles, Francie Datum: 22. prosince 2020 (první dávka: 27. července 2020) GLP: Ano Číslo položky: BNT162b1: Číslo šarže: RBP020.3 LNP; Číslo šarže: CoVAC/100320 BNT162b2: Číslo šarže: RBP020.2 LNP Číslo šarže: CoVAC/270320 BNT162b3: Číslo šarže: RBP020.8 LNP Číslo šarže: BCV/040620	Kmen: krysy Wistar[Han] Věk: ~ 11 týdnů Testované lánky: BNT162b1; BNT162b2; BNT162b3 Velikost skupiny = 44 /skupina (22 /skupina pro císařský řez a další ch 22 /skupina pro smet)) Dávka: 0, 30 ug/dávka IM; 21 a 14 dní před páření m a GD9 a GD20. Trvání: Ošetření od 21 dnů před páření m – GD20; ukončení na GD21 (podskupina císařského řezu) a LD21 (podskupina vrhání vrhů) Postnatální vývoj hodnocený u 4 mláďat/pohlaví /vrh; ukončení na PND21 (další mláďata utracena na PND4).
--	--

Úmrtnost matek: Žádná léba nesouvisela ve skupinách léčených BNT162b2.

Přírůstek tělesné hmotnosti matky: ~ 12-14 % během období prematingu ve skupině léčené BNT162b2 srovnání žen; úplné zotavení na konci období těhotenství. Po podání první dávky byla zaznamenána snížená průměrná spotřeba potravy; účinky byly reverzibilní na konci dávkovacího režimu.

Mateřské klinické příznaky: Otoky (~ 100 % léčených potkanů v období prematování a ~ 10-50 % léčených potkanů v období březosti, viz kontrola), u některých potkanů spojených kulhání a/nebo piloerectie.

Cykly říje: Žádné účinky související s lébou na průměrnou délku a pravidelnost estrálních cyklů (BNT162b2 srovnání kontrola).

Páření: Žádný významný vliv na index páření (97,7-100 % pro všechny skupiny) a prekoitální interval (2,7-3,0 dnů pro všechny skupiny).

Fertilita: Žádný významný vliv na index plodnosti (95-100 %) a míru otěhotnění (93-100 % pro všechny skupiny).

Porod: Jedna ve skupině BNT162b3 byla usmrcena na LD1 se shrbeným držení m těla, bledou, výraznou piloerectií, krvácením z vulvy, nataženým/fialovým břichem. Po jednom ve skupinách BNT162b1 a BNT162b3 bylo usmrceno kvůli všem mrtvým narozeným mláďatům nebo úplnému úmrtí vrhu. Při pitvě matky nebyly zaznamenány žádné makroskopické nálezy.

Děka březosti: Průměrná délka gestace byla ~22 dní ve všech skupinách. Gestacní index byl 95-100 % pro všechny skupiny.

Hodnoty vrhu:

- Žádný významný vliv na počet žlutých tělísek, počet implantací, postimplantační ztráty, velikost živého vrhu, poměr pohlaví a průměrnou hmotnost plodu.
- Zvýšená preimplantační ztráta ve skupině BNT162b2 srovnání kontrolní skupina, ale v rozsahu historických kontrolních dat.

Nález	Skupina				Rozsah historických řídicích dat (WI[Han])
	Řízení	BNT162b1	BNT162b2	BNT162b3	
Předimplantační ztráta: (průměr %)	4.1	4.8	9,8*	8,0	2.6 - 13.8a

* P<0,05 (Dunnettův neparametrický 2stranný test); a: Historické údaje založené na 27 studiích zahrnujících 568 březích potkaních samic (GD20: 562, rok neuveden).

Fetální variace/malformace: • Incidence

zvýšených fetálních abnormalit v léčených skupinách srovnání kontrol, ale v rozsahu historických kontrolních dat pro potkany Wistar. Výskyt krátkých nadpočetných lumbálních žeberek byl srovnatelný mezi léčenou a kontrolní skupinou. Výskyt nadpočetných lumbálních žeberek byl vyšší v léčené skupině srovnání kontrol než neovládání.

Historická kontrolní data z CRL ve Francii (Lyon) zahrnují dva záznamy: jeden pro nadpočetná bederní žebra s rozsahem 0-5,3 % pro plod a 0-22,7 % pro podestýlku a druhý záznam pro torakolumbálně plný s rozsahem 0-9,7 % pro plod a 0-50,0 % pro vrh. Zadavatel na základě vysvětlení poskytnutého autory studie uvedl, že „nadpočetná bederní žebra“ a „thorakolumbální, plná“ jsou dva termíny (v různých verzích preklinického softwaru) použité vaně pro stejný nález (D21-2058752). Proto rozsah historických kontrolních dat použitých pro nadpočetná lumbální žebra v níž je uvedena tabulka je rozsah uvedený pro torakolumbálně plnou ve zprávě o studii (strana 1102). Vyšší výskyt nadpočetných žeberek ve srovnání se srovnání kontrolní skupinou se tedy nepovažuje za související s lébou.

Abnormalita	Fetální výskyt; [výskyt odpadků]				Rozsah historických kontrolních dat (%) - WI (Han)
	Řízení	BNT162b1	BNT162b2	BNT162b3	
Pravostranný aortický oblouk (malformace)	0/133 [0/21]	0/135 [0/20]	1/132 [1/21]		0-1,0c [0-5,0]
Malá ústa a čelist agnathia (malformace)	0/277 [0/21]	0/282 [0/20]	1/276 [1/21]		GD20: 0-0,4b [0-4,8]
Chybějící plicní lalok (anomálie)	0/133 [0/21]	0/135 [0/20]	1/132 [1/21]		0-0,71d [0-4,17]
Gastrošchíza	0/277	0/282	1/276		0-0,5c

(malformace)	[0/21]	[0/20]	[1/21]	[0-5,0]
Transponovaná pupeční tepna (variace)	7/133 [6/21]	12/135 [9/20]	13/132 [8/21]	0-10c [0-44]
Krátké zdeformovaná srostlé kusadla (malformace)	0/144 [0/21]	0/147 [0/20]	1/144 [1/21]	0-0,95a [0-4,8]
Neúplná hyojdní osifikace (anomálie)	0/144 [0/21]	1/147 [1/20]	1/144 [1/21]	0-2a [0-5]
Vlnitá žebra (anomálie)	0/144 [0/21]	1/147 [1/20]	1/144 [1/21]	0-3,4a [0-12,5]
Neúplná osifikace hrudní kosti (anomálie)	1/144 [1/21]	0/147 [0/20]	3/144 [3/21]	0-9,6a [0-37,5]
Neúplná osifikace krční kosti (anomálie)	0/144 [0/21]	0/147 [0/20]	2/144 [2/21]	0-5,8a [0-19,0]
Bederní žebra (anomálie)	1/144 [1/21]	0/147 [0/20]	3/144 [2/21]	0-3,2a [0-13,6]
Nadpočetná bederní žebra (anomálie)	3/144 [3/21]	5/147 [3/20]	12/144 (8,3 %) [6/21, 28,6 %]	0-9,7a [0-50,0]

a: Historická data ze 17 studií, 275 vrhů & 1721 plodů v CRL Lyon (rok: neúspěšný); b: Historická data ze 3 studií, 70 vrhů a 812 plodů v CRL Horsham (rok: neúspěšný); c: Historická data ze 7 studií, 148 vrhů & 1618 plodů v CRL Horsham (rok: neúspěšný); d: Historická data z 16 studií, 350 vrhů a 1931 plodů v CRL Montreal (rok: 2006-14).

Vývoj mláďat:

Žádný významný rozdíl mezi BNT162b2 a kontrolními skupinami, pokud jde o index odstavení, rozvinutí čepu, otevření očí, pupilární reflex, sluchový reflex a první růstek tělesné hmotnosti mláďat. Žádná významná klinická pozorování ve skupině BNT162b2 kromě několika (1-3) mláďat v této skupině byla bledá a studená na dotek po dobu první chvilky od data vrhu. Žádné významné abnormality u mláďat skupiny BNT162b2 při pitvě po laktaci (PND21). Jedno mládě vykazovalo jaterní kýlu v této skupině při utrácení PND4.

Pitva matky:

Pevně zbledlá žilná tkáň v místě vpichu bylo zaznamenáno u mnoha (4-9/43) zvířat ze skupiny BNT162b2. Pevná, tmavá heterogenní hmota přilnutá k jaterní tkáni u jednoho zvířete.

Toxikokinetika: Žádné toxikokinetické údaje

Titry sérových protilátek (mikroneutralizační test s použitím viru WI-MNSARS-CoV-2 na základě cytopatického účinku): BNT162b2 vyvolal imunitní odpověď u samic během březosti a u mláďat během postnatálního vývoje.

Střední titry neutralizačních protilátek SARS-CoV-2

Interval/Příležitost	Referenční	BNT162b1	BNT162b2	BNT162b3
Před dávkou	5,0	5,0	5,3	
Před pářením	5,0	525,6	3886,4	
GD21 (přehrad)	5,0	987,0	3445,5	
LD21	5,0	3377,9	3620,4	
GD21 (plody)	5,0	293,4	640,0	
PND21 (štěňata)	5,0	4017,1	4561,4	

7. REFERENCE

Arunachalam PS, Charles TP, Joag V. a kol. (2020) Vakcíny indukují cílové T buňky trvale zabraňuje slizniční infekci SHIV i při nižších titrech neutralizačních protilátek. *Nat. Med* 26:932-940.

Bestle D., Heindl MR, Limburg H. a kol. (2020) TMPRSS2 a furin jsou nezbytné pro proteolytickou aktivaci SARS-CoV-2 v lidských buňkách dýchacích cest. *Life Sci. Alliance* 3: e202000786.

Blair RV, Vaccari M., Doyle-Meyers LA a kol. (2020) Akutní respirační potíže u starých afrických zelených opic infikovaných SARS-CoV-2, ale ne u makaků rhesus. *Am J Pathol* 2020,-: 1e9; <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.10.016> (Neopravený důkaz)

Cai Y, Zhang J, Xiao T, a kol. (2020) Výrazné konformační stavy spike proteinu SARS-CoV-2. *Věda*; 369:1586-92.

EMA (1998). CPMP/SWP/465/95 — Poznámka k pokynům pro předklinické farmakologické a toxikologické testování vakcín. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific_guideline/note-guidance-preclinical-pharmacological-toxicological-testing-vaccines_en.pdf

Garneau, N., Wilusz, J. & Wilusz, C. (2007) Dálnice a cesty rozpadu mRNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 113-126.

Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez SI a kol. (2020) Cíle odpovědí T buněk na koronavirus SARS-CoV-2 u lidí s onemocněním COVID-19 a neexponovaných jedinců. *Cell* 181:1489–1501.e15

Hammond E., Haynes NM, Cullinane C. a kol. (2018) Imunomodulační aktivity pixatimodu: objevují cíle neklinická a klinická data a jejich potenciální využití v kombinaci s inhibitory PD-1. *J ImmunoTher Cancer* 6:54.

Henderson R a kol. (2020) Kontrola konformace vrcholového glykoproteinu SARS-CoV-2. *Nat Struct Mol Biol* 27:925-33.

ICH M7 (R1): Směrnice ICH M7 (R1) o hodnocení a kontrole DNA reaktivních (mutagenních) nečistot ve farmaceutických výrobcích za účelem omezení potenciálního karcinogenního rizika

Jayaraman M., Ansell SM, Mui BL a kol. (2012) Maximalizace účinnosti lipidových nanočástic siRNA pro umlčení jaterního genu in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl* 51:8529–8533.

Johansen MD, Irving A., Montagutelli X., Tate MD, Rudloff I., Nold MF et al. (2020) Zvířecí a translační modely infekce SARS-CoV-2 a COVID-19. *Mucosal Immunol.* 13: 877–891.

Lees JR. (2015) Interferon gama v autoimunitě: Komplikovaný hráč na složité scéně. *Cytokin.* 74 (1), 18-26.

Lindsay KE, Bhosle SM, Zurla C. a kol. (2019) Vizualizace časných událostí při dodávání vakcíny mRNA u primátů kromě člověka prostřednictvím PET-CT a bílého infračerveného zobrazování. *Nat Biomed Eng* 3: 371–380.

Munoz-Fontela C., Dowling WE, Funnell SGP a kol. (2020) Zvířecí modely pro COVID-19. *Příroda* 586, 509–515. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2787-6>

Nixon DF, Parsons AJ & Eglin RP (1987) Rutinní plný krevní obraz jako indikátory akutních virových infekcí. *J Clin Pathol* 40:673-675.

Pardi N., Hogan MJ, Pelc RS a kol. (2017) Ochrana viru Zika jedinou vakcínou mRNA modifikovanou nízkou dávkou nukleosidů. *Nature* 543(7644):248-51.

Pardi N., Parkhouse K., Kirkpatrick E. a kol. (2018) Imunizace mRNA modifikovanou nukleosidy vyvolává protilátky specifické pro stopku hemaglutininu viru chřipky. *Nat Comm* 9(1) (08):3361.

Pardi N., Tuyishime S., Muramatsu H. a kol. (2015) Kinetika exprese nukleosidy modifikované mRNA dodané v lipidových nanočásticích myšmi různými cestami. *J. Control. Vydání* 217: 345–351.

Pollard, KM, Cauvi, DM, Toomey, CB, Morris, KV, & Kono, DH (2013). Interferon- γ a systémová autoimunita. *Discovery Medicine*, 16 (87), 123–131.

Sabnis, S., a kol. (2018). Nová řada aminolipidů pro dodávání mRNA: Zlepšený endozomální únik a trvalá farmakologie a bezpečnost u primátů kromě člověka. *Molekulární terapie: časopis Americké společnosti pro genovou terapii*, 26(6), 1509–1519. <https://doi.org/10.1016/j.jymthe.2018.03.010>

Sahin U., Karikó K. & Türeci Ö (2014) terapeutika založená na mRNA – vývoj nově třídy léků.

Nat Rev Drug Discov 13(10):759-80. Tay MZ, Poh CM, Rénia L. et al. (2020) Trojice COVID-19: imunita, zánět a intervence.

Nat. Rev. Immunol 20:363-374 Sedic, M. et al. (2018). Hodnocení bezpečnosti modifikované

mRNA ve formě lipidových nanočástic u krysu Sprague-Dawley a opice *Cynomolgus*. *Veterinární patologie*, 55(2), 341–354. <https://doi.org/10.1177/0300985817738095>

Wan Y., Shang J., Graham R. a kol. (2020) Rozpoznání receptorů novým koronavirem z Wu-chanu: analýza založená na desetiletých strukturálních studiích koronaviru SARS. *J. Virol.* 94:e00127-20.

- WHO (2005) Pokyny WHO pro neklinické hodnocení vakcíny. Řada technických zpráv WHO č. 927, příloha 1. https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/TRS_987_Annex2.pdf?ua=1 Wrapp D., Wang N., Corbett KS et al. (2020) Cryo-EM struktura vrcholu 2019-nCoV v prefuzní konformaci. *Science* 367: 1260–1263
- Wu Y, Wang F, Shen C, a kol. (2020) Nesoutěžití cílů lidských neutralizačních protilátek blokuje vazbu viru COVID-19 na jeho receptor ACE2. *Science* 368(6496)(06):1274-8.
- Yuan M, Wu NC, Zhu X a kol. (2020) Vysoce konzervovaný kryptický epitop v receptorových vazebných doménách SARS-CoV-2 a SARS-CoV. *Science* 368(6491)(05):630-3.
- Yu P., Qi F., Xu Y., a kol. (2020) Modely makaka rhesus souvisejí s věkem COVID-19. Zvířecí model *Exp Med.* 3:93–97. <https://doi.org/10.1002/ame2.12108>
- Zhao X., Chen D., Szabla R. a kol. (2020) Široká diferenciální využití receptoru enzymu 2 konvertují cíle angiotenzinu u zvířat SARS-CoV-2. *J. Virol.* 94: e00940-20.
- Zhao J., Zhao J. & Perlman S. (2010) Odpovědi T buněk jsou vyžadovány pro ochranu před klinickým onemocněním a pro odstranění viru u myši infikovaných koronavirem s těžkým akutním respiračním syndromem. *J. Virol.* 84: 9318-9325
- Zhou M., Zhang X. a Qu J. (2020) Coronavirus disease 2019 (COVID-19): klinická aktualizace. *Přední Med.* 14: 126–135.