

预防传染病mRNA疫苗原材料、原液质控要点分析

孙巍, 佟乐, 杨亚莉, 王一平*, 杨振* (中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要 目的: 梳理归纳预防传染病mRNA疫苗原材料和原液质控要点, 为我国此类产品质量控制提供参考。方法: 通过梳理世界卫生组织及相关标准和审评机构关于预防传染病mRNA疫苗原材料、原液质控指导文件, 以及相关监管指南和文献, 总结归纳预防传染病mRNA疫苗原材料和原液关键质量控制属性及相关要求。结果与结论: 作为新型生物制品, mRNA疫苗核酸结构和脂质体包裹制剂的特性决定了该类疫苗质控特点, 序列和完整性、含量及纯度、加帽率和包封率是mRNA疫苗特有的、决定有效性和安全性的关键质量参数。从原材料和原液制备阶段就建立多个与mRNA特性相关的质控要点及其检测方法, 将有助于保障预防传染病mRNA疫苗安全有效、质量可控。

关键词: 预防传染病; mRNA疫苗; 世界卫生组织; 质量控制; 要点分析

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2024)02-0184-005

doi:10.16153/j.1002-7777.2024.02.009

Analysis of Important Factors about Quality Control of Raw Materials and Stock Solution of mRNA Vaccines for the Prevention of Infectious Diseases

Sun Wei, Tong Yue, Yang Yali, Wang Yiping*, Yang Zhen* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To provide references for the quality control of such products in China by combing and summarizing the key points of quality control of raw materials and stock solution of mRNA vaccines for preventing infectious diseases. **Methods:** By combing the World Health Organization (WHO) and relevant standards and review agencies on the quality control guidance documents for raw materials and stock solution of mRNA vaccine for prevention of infectious diseases, and related regulatory guidelines and literature, the key quality control attributes and related requirements of raw materials and stock solution of mRNA vaccines for the prevention of infectious diseases were summarized. **Results and Conclusion:** As a new biological product, the nucleic acid structure of mRNA vaccines and the characteristics of liposome encapsulated preparations determined the quality control characteristics of this vaccine. Sequence and integrity, quantity and purity, percentage capping and percentage encapsulation were the key quality parameters unique to mRNA vaccines, which determined efficacy and safety. Establishing multiple quality control points and detection methods related to mRNA characteristics from the preparation stage of raw materials and stock solution will help ensure the safety, effectiveness, and controllable quality of mRNA vaccines for preventing infectious diseases.

Keywords: infectious diseases; mRNA vaccine; WHO; quality control; analysis of key points

作者简介: 孙巍 Tel: (010) 53851351; E-mail: sunwei@nifdc.org.cn

通信作者: 王一平 Tel: (010) 53852478; E-mail: wangyiping@nifdc.org.cn

杨振 Tel: (010) 53851350; E-mail: yangzhen@nifdc.org.cn

2019年,由冠状病毒2型(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2)引起的严重急性呼吸系统综合征开始在全球流行。疫苗接种被认为是消除冠状病毒病流行最有效的方法。为控制新冠肺炎流行,全球研究者致力于研发灭活病毒疫苗、腺病毒载体疫苗、重组蛋白质疫苗、mRNA疫苗等各类疫苗。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)收集的数据,在临床试验的新冠肺炎疫苗中,mRNA和重组蛋白疫苗分别占23%和32%^[1]。由于mRNA疫苗可以同时诱导强效的体液和细胞免疫反应,其受到广泛关注和应用。mRNA疫苗打破了以往传统灭活、减毒疫苗的免疫激活模式,创新性地利用人体本身细胞生产抗原,以此激活特异免疫。mRNA疫苗保护率高,相对于其他创新型疫苗安全性也好,且mRNA疫苗生产和研发周期短,能够快速地更新迭代以应对不断出现的变异毒株。

为了更好地保障mRNA疫苗安全有效和质量可控,WHO及各国标准和审评机构颁布了一系列监管指南和质控文件。目前所有指南文件中关于预防传染病mRNA疫苗制备的主要质控项目包括原材料质量控制、mRNA原液质量控制和成品质量控制三个方面。本文主要对原材料和原液质量控制要点进行梳理归纳,旨在为我国预防传染病mRNA疫苗质量控制提供参考。

1 近年全球关于mRNA疫苗相关监管指南和质控管理文件

2019年前,未有专门针对mRNA疫苗质量控制监管指南的发布,仅沿用了继往生物疗法质量的高级指导文件。直到新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)的暴发,多国相继紧急发布了相关的监管指南和指导意见,如2020年8月国家药品监督管理局药品审评中心发布了《新型冠状病毒预防性疫苗药学研究技术指导原则(试行)》,用于指导特殊应急状态下mRNA疫苗的研发^[2]。2021年10月22日,WHO在生物制品标准化专家委员会(Expert Committee Biological Standardization, ECBS)第74届会议上审议通过了《预防传染病mRNA疫苗质量、安全及有效性评价法规考虑要点》的指南文件^[3-4]。2022年2月,美国药典委员会(USP)颁布了《mRNA疫苗质量分析方法》针对疫苗鉴别、含量、完整性、纯度以及安

全性和其他6类关键质量属性的通用检测方法和操作细则,但未包含任何验收标准^[5]。2022年5月,药审中心发布《体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则(试行)》^[6],建议mRNA疫苗制备过程中需设置合理的过程控制指标,例如mRNA浓度、双链mRNA含量、不完整mRNA含量、残留DNA、无菌、细菌内毒素等^[7]。虽然现有的各指南均基于目前mRNA疫苗公开发布的信息而制定,但许多候选mRNA疫苗的细节例如检测项目以及分析方法和接受标准并未公开,从而影响了mRNA疫苗质控的标准化和一致性研究,以及具体的国际指南制定。如何整合疫苗监管、研发和生产的资源,建立统一标准和质控体系,是目前mRNA疫苗行业发展面临的关键问题。

疫苗质量标准研究时需从产品的设计目标着手,全面考虑安全性、有效性、工艺、检测方法、稳定性等内容,依据所使用检测方法总误差、多批次、临床批次和稳定性数据综合制定^[8]。WHO认为在研发早期质量标准可宽松,最终标准应基于临床试验中已被证明安全有效的批次检测结果制定,例如疫苗效力标准应基于临床试验中证明疗效的最低剂量以及人类免疫原性数据设定,同时要求提供分析方法和接受限度的描述。

mRNA疫苗核酸结构和脂质体包裹制剂的特性决定了该类疫苗质控特点,序列和完整性、含量及纯度、加帽率和包封率是mRNA疫苗特有的、决定有效性和安全性的关键质量参数。《生物制品生产质量管理规范》(Good Manufacturing Practice, GMP)作为首要指南^[8],规定了预防传染病mRNA疫苗GMP的相关要求。该指南建议针对mRNA疫苗制备过程进行质量控制,同时也要求了临床研究的mRNA疫苗也应在适合临床开发阶段的GMP条件下评价其含量、鉴别、纯度、效价;但在紧急情况下,基于获益-风险评估标准,也可接受使用不完全符合GMP要求制备的起始材料。

2 预防传染病mRNA疫苗原材料质量控制要点

mRNA疫苗制备的第一个阶段可以从细菌扩增的线性化DNA质粒开始(类似于质粒DNA疫苗等生物制品的生产方法),也可以通过聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)或其他合成方法以酶的方式制备线性DNA分子。无论mRNA合成

是源自于质粒DNA产生的线性化分子，还是线性DNA序列，均是需要DNA依赖性的RNA聚合酶（通常来自噬菌体 T7）在体外通过三磷酸核苷将DNA模板转录为mRNA。为了获得最佳的体外转录产量，模板DNA的质量是至关重要的。一般对于线性DNA的关键质量属性要求包括至少70%的超螺旋率以及经过测序验证的正确Poly(A)尾长^[9]。因此，基于WHO《预防传染病mRNA疫苗质量、安全及有效性评价法规考虑要点》质控要求，应提供DNA模板的注释序列。由于一些DNA模板来自于上游材料，所以还需描述清楚工艺中使用的线性DNA模板的来源和原材料。例如质粒DNA制备线下DNA时，应对质粒DNA和线性模板的基因序列鉴别、完整性确认（所需抗原的编码序列和调节/控制序列）和线性DNA百分比，以及基因组残留DNA、RNA和蛋白检测（使用适当的标准物质）、无菌或可允许的生物负荷和内毒素水平作出说明。同时，细胞库的建立程序和质粒DNA的生产应按照用于后续GMP生产的原料生产要求进行。在建立细胞库系统时，应该说明微生物纯度（无细菌和真菌污染）检测和鉴别情况，并且验证种子库的遗传稳定性。例如Poly(A)尾编码在质粒DNA上，则要求测定DNA质粒上该区域的重组率。此外，生产工艺应通过纯化工艺减少DNA质粒中的杂质（例如RNA、宿主细胞DNA、蛋白、脂质和多糖），从而避免微生物污染的风险^[3]。

在临床开发早期阶段，需要对关键试验和商业生产进行更多的控制，使用完全具备条件的原料则是可以接受的。

3 预防传染病mRNA疫苗原液质量控制

mRNA疫苗制备的第二个阶段是mRNA原液制备，包括mRNA体外转录、加工及纯化。经转录的mRNA序列一般由5'-cap（5'端帽子）、5'UTR（5'端非编码区）、ORF（编码区）、3'UTR（3'端非编码区）以及Poly(A)尾（多聚腺苷酸尾）组成^[10]。上游材料的加工选项会影响活性物质的质量。其中最为关键的是RNA加帽策略。目前常用的加帽策略是一步法（共转录法）^[11]或两步法（转录后加帽法）^[12]。转录后加帽是较为传统的加帽方式，该方法需在T7聚合酶参与的IVT反应结束后，第一次纯化获得未加帽的mRNA，通过牛痘病毒加帽酶生成Cap0，再通过2'-O-甲基转移酶和S-腺苷甲硫氨酸

转化为Cap1，经过第二次纯化获得最终的mRNA。该过程使总体工艺步骤变得复杂、引入更多的杂质，增加了QA/QC质检项。另外，加帽效率受模板长度和序列影响较大，不同模板的加帽率各不相同；而一步法共转录加帽，就是在T7聚合酶参与的体外转录（IVT）反应体系中直接加入帽类似物，实现一步法获得含Cap1结构的mRNA，全程只需一次纯化。这减少了制备步骤，进而有效缩短整体处理时间、简化纯化步骤和减少所需酶的数量。共转录加帽在工艺上相对简单，引入杂质少，能够迅速提升mRNA疫苗和药物的产能，这种方法也正在逐步成为mRNA制备的主流技术路线。

建立mRNA原液（纯化后mRNA溶液）的关键质量参数标准，应包括鉴别、纯度、含量和物理性状、安全性和特征等。首先，mRNA中所含全部元件的序列、位置或长度，包括起始和终止密码子、侧面UTRs、调节元件（例如RNA聚合酶的启动子）、5'帽子和3'Poly(A)尾和目的抗原的ORF需要提供完整说明；其次，还应提供编码其他蛋白（例如自扩增结构或细胞因子）的序列，mRNA结构中包含的任何附加序列和功能均应说明；最后，详细的生产与质控方法以及影响mRNA疫苗质量、安全性和有效性的重大变更，均应与监管当局讨论后报其批准^[3]。

自扩增mRNA（self-amplifying mRNA，sa-mRNA）通常来源于正义单链RNA病毒的基因组，例如甲病毒、黄病毒和小核糖核酸病毒^[13]。sa-mRNA编码细胞内RNA扩增和高水平抗原表达所需的靶抗原和病毒非结构蛋白（nsP）^[14]。通过用感兴趣的抗原基因替换病毒结构基因来创建自我扩增的mRNA复制子，这些基因在递送到靶细胞的细胞质中后，能够进行RNA扩增以表达高水平的感兴趣的抗原。因此，扩增mRNA疫苗平台能够在同一个复制子中编码多个抗原，并允许开发同时表达靶抗原和免疫调节生物分子以增强效力的疫苗、编码B和T细胞抗原的疫苗、同时靶向多种病原体的单一组合疫苗，或靶向疫苗多亚基复合抗原^[15]。所以这类复制子的序列信息均应明确，并说明其功能。如果复制子编码在与目的抗原不同的mRNA分子上，那么应对每个成分的生产与检定进行例证和详细描述。一般来说，这些编码序列存在于同一分子上，但如不在同一分子上，则可能需要

额外的检定，并应加以说明。例如，应考虑控制编码复制子的mRNA分子和编码目的抗原的mRNA分子的比例，或采取确保2种mRNA分子被包封在相同LNP的方法。对于上述2种mRNA在不同分子上的sa-mRNA，应确保2种RNA被共同包封，以便在体内能被同一细胞摄取。因此，如果将这2种RNA分别包封后再混合，则需要提供该方法的合理性，若mRNA疫苗所含序列能够编码其他免疫调节剂（例如细胞因子），或是所含的非编码序列能充当免疫调节剂的，应提供这些序列及其用途信息^[3]。

IVT生成 mRNA 后，必须使用多个纯化步骤从反应混合物中分离和纯化，以达到临床纯度标准。反应混合物中不仅含有所需的产物，还含有许多杂质，包括酶、残留的 NTP 和 DNA 模板，以及在 IVT过程中形成的异常mRNA^[16]。异常的mRNA通常

是由于IVT反应过早终止而产生的较短片段，或者产生的链可以通过自启动的机制在3'端延伸，导致链比预期的mRNA序列更长。IVT反应的另一个不需要的副产品是双链RNA（dsRNA），它在细胞内可以被识别为病毒入侵的标志，具有高度免疫原性。因此，需要对转录形成的mRNA进行纯化，去除dsRNA污染物，使含有修饰核苷酸的mRNA不再诱导干扰素和炎性细胞因子^[10]。

除了mRNA体外转录合成过程中的杂质，仍需要评估mRNA原液在制造和储存过程中形成的降解产物。虽然来自合成过程中的杂质不会随着时间的推移而增加，但降解形成的杂质可能会随着时间的推移而增加。表1^[17]总结了该过程中可能的降解途径和易发生反应的位点。

表1 mRNA在制造和储存过程中形成的降解产物

降解产物	来源
RNA片段	水解（碱）、热、过氧化物、H ₂ O ₂ 、核糖核酸酶
脱嘌呤（基本位点）	水解（酸）、氧化
脱氨水解碱基	水解（酸）
碱基氧化	自氧化、金属残留物、光

4 结语

新冠肺炎大流行进一步凸显了研发mRNA疫苗的重要性。mRNA是生物制药领域的后起之秀，但使用mRNA作为疫苗疗法仍然面临诸多挑战，需要克服mRNA开发核心技术的高壁垒。对监管机构而言，急需基于预防传染病mRNA疫苗的关键质量属性和验收标准的国际专家共识出台，从而更利于预防传染病mRNA疫苗产品的统筹管理与质量监督。在COVID-19流行期间WHO努力召集疫苗开发商、制造商和监管机构的专家进行国际讨论，以审查现有科学证据，讨论关键问题并就科学和技术期望达成共识，以确保 mRNA疫苗的质量、安全性和有效性。欧洲药典（Ph Eur）于2022年6月宣布成立一个名为 mRNA VAC（mRNA疫苗工作组）的新工作组，其任务是制定一项关于mRNA疫苗及其成分未来标准。而我国标准物质相关研发机构也致力于mRNA疫苗标准物质的研制，如近期启动的新

型冠状病毒mRNA疫苗含量标准品研制，以期促进mRNA疫苗研制和应用水平提高，从而提升我国相关生物制品的质量。

参考文献：

- [1] WHO. COVID-19-Landscape of Novel Coronavirus Candidate Vaccine Development Worldwide[EB/OL]. (2022-10-28) [2023-06-05]. <https://www.who.int/publications/m/item/draftlandscape-of-covid-19-candidate-vaccines>.
- [2] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《新型冠状病毒预防用疫苗研发技术指导原则(试行)》等 5 个指导原则的通告（2020年第21号）[EB/OL]. (2020-08-15) [2023-06-05]. http://www.gov.cn/xinwen/2020-08/15/content_5535069.htm.
- [3] World Health Organization. Evaluation of the Quality, Safety and Efficacy of RNA-based Prophylactic Vaccines

- for Infectious Diseases: Regulatory Considerations[EB/OL]. (2021-12-07) [2023-06-05]. <https://www.who.int/publications/m/item/evaluation-of-the-quality-safety-and-efficacy-of-messenger-rna-vaccines-for-the-prevention-of-infectious-diseases-regulatory-considerations>
- [4] Liu M, Zhou T, Sheets R, et al. WHO Informal Consultation on Regulatory Considerations for Evaluation of the Quality, Safety and Efficacy of RNA-based Prophylactic Vaccines for Infectious Diseases[J]. *Emerging Microbes & Infection*, 2021, 11: 384-391.
- [5] USP. USP mRNA Vaccine Chapter: Analytical Procedures for mRNA Vaccines[EB/OL]. (2022-02-10) [2022-07-13]. https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/usp-nf-notices/gc-xxx-analyticalprocedures-mrna-vaccines.pdf.
- [6] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则(试行)》的通告(2022年第29号)[EB/OL]. (2022-05-31) [2023-06-05]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/6f14372f020446361601bb074a09410d>
- [7] 谭德讲, 韩璐, 段丽, 等. 生物效价限度标准的确立要点探讨[J]. *药物分析杂志*, 2022, 42(6): 33-38.
- [8] Jill Whitley, Christopher Zwolinski, Christian Denis, et al. Development of mRNA Manufacturing for Vaccines and Therapeutics: mRNA Platform Requirements and Development of a Scalable Production Process to Support Early Phase Clinical Trials[J]. *Transl Res*, 2022(242): 38-55.
- [9] Enyue Fang, Xiaohui Liu, Miao Li, et al. Advances in COVID-19 mRNA Vaccine Development[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 94.
- [10] Ramanathan A, Robb GB, Chan S-H. mRNA Capping: Biological Functions and Applications[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 7511-7526.
- [11] Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. Recent Advances in mRNA Vaccine Technology[J]. *Curr Opin Immunol*, 2020, 65: 14-20.
- [12] Tews BA, Meyers G. Self-replicating RNA[J]. *Methods Mol Biol*, 2017(1499): 15-35.
- [13] Lundstrom K. Replicon RNA Viral Vectors as Vaccines[J]. *Vaccines (Basel)*, 2016, 4(4): 39.
- [14] Giulietta Maruggi, Cuiling Zhang, Junwei Li, et al. mRNA as a Trans for Mative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases[J]. *Mol Ther*, 2019, 27(4): 757-772.
- [15] Sara Sousa Rosa, Duarte MF Prazeres, Ana M Azevedo, et al. mRNA Vaccines Manufacturing: Challenges and Bottlenecks[J]. *Vaccine*, 2021, 39(16): 2190-2200.
- [16] Simms CL, Zaher HS. Quality Control of Chemically Damaged RNA[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(19): 363-3653.
- [17] Ph Eur. Commission Establishes a New Working Party on mRNA Vaccines[EB/OL]. (2022-08-03) [2023-06-05]. <https://www.edqm.eu/en/-/ph-eur-commission-establishes-a-new-working-party-on-mrna-vaccines>.

(收稿日期 2023年8月11日 编辑 肖妍)