### 《生物制品中RNase残留检测－核酸荧光底物法》

### 征求意见稿 编制说明

**一、工作简况**

**（一）任务来源**

按照《中国食品药品企业质量安全促进会团体标准管理办法（试行）》的有关规定和要求，由国家药品监督管理局疫苗及生物制品质量监测与评价重点实验室、武汉瀚海新酶生物科技有限公司提出《生物制品中RNase残留检测－核酸荧光底物法》立项申请，中国食品药品企业质量安全促进会于2024年4月组织专家按程序审议后予以立项。

**（二）目的、意义及必要性**

核糖核酸酶（RNase）是一种可以将聚核苷酸链的磷酸二酯键切断从而降解RNA分子的水解酶。RNase普遍存在于环境和许多生物材料中，且具有极强的活性，微量的RNase污染可以造成大量RNA的降解，对实验和生产工艺造成显著影响。

RNA药物及生物制品生产过程中，也存在大量RNase的残留和污染的可能性，包括生物样品中含有的内源性RNase，存在于环境中的水，缓冲液，耗材表面以及环境微生物和人等外源性RNase。残留RNase作为杂质，如果跟随药物或生物制品进入人体内，有可能引发高强度的免疫原性等反应，引起较严重的安全性风险。因此需要对生物制品的外来物料、耗材和环境等的RNase残留进行准确分析检测，使之控制在安全范围内。

《中华人民共和国药典2020年版》中就《人用疫苗总论》《人用重组单克隆抗体制品总论》《人用基因治疗制品总论》及《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》均提到了在该类型生物制品的研发及生产过程中需要对工艺杂质中包含RNase的残留进行控制；此外，欧洲药品监督管理局表明基因治疗产品方面应制定检验方法，并设定上限，以检测细胞来源污染物的残留水平。然而目前国内外暂没有通用标准中明确规定疫苗和生物制品中核酸酶残留量上限及其对应的检测方法。

核酸水解凝胶电泳法和紫外分光光度计法常被用于检测RNase的残留。然而核酸水解凝胶电泳法受实验人员的主观判断影响较大，无法准确定量，且操作时间长，测定通量较低。核酸水解紫外分光光度法定量限仅为0.01U/μL，不适合微量核酸酶残留的活性检测；HPLC法和电化学法则受限于仪器设备。相比之下，核酸荧光底物法灵敏度高、检测速度快且能实现核酸酶活性的定量检测，该方法在海外已用于检测分子生物学环境及试剂中核酸酶残留量，如日本WAKO公司分子级别的无核酸酶化学品采用该方法作为质量认证的标准之一，德国Sartorius也将该方法作为无核酸酶耗材的质量认证标准。2023年4月，为进一步提升《中国药典》生物制品标准的科学性，更好地保障生物制品质量，国家药典委员会设立了核酸酶残留量检测方法研究的课题，并在《关于征求核酸酶残留量检测方法验证意见的函》中提出了核酸酶残留量测定法（核酸荧光底物法）的草案。

**（三）团体标准起草单位和主要起草人**

本标准起草单位：武汉瀚海新酶生物科技有限公司、国家药品监督管理局疫苗及生物制品质量监测与评价重点实验室、中生复诺健生物科技（上海）有限公司、江苏申基生物科技有限公司、苏州艾博生物科技有限公司、北京引正基因科技有限公司、深圳市晋百慧生物有限公司、惠正奇医药（广州）有限公司、广州正达医药科技有限公司、百奥泰生物制药股份有限公司、深圳深信生物科技有限公司。

本标准主要起草人：杨广宇、耿玉杰、李梁、严壮、陆家海、叶宇翔、武飞飞、竺添、沈明云、顾文艺、于磊、黄贤明、梅雄、李文华。

**（四）主要工作**

**起草阶段：**

（1）2024年4月19日，完成《生物制品中RNase残留检测－核酸荧光底物法》团体标准立项。

（2）2024年4月，成立标准制定工作组。按照团体标准的制修订程序组织参编单位共同成立标准制定工作组。

（3）2024年4月-5月，完成第一稿。结合收集到的资料和起草小组专家深厚的专业知识，完成标准草案的第一稿。

（4）2024年8月，进入草案的修订完善阶段。经过多轮深入研讨，并广泛咨询行业内的资深专家以及国家标准制定的资深专家。在听取各方意见和充分论证的基础上，对标准草案进行修订和完善，确保草案的准确性、完整性和一致性。

在标准草案基础上，标准编制工作组对标准框架和主要技术内容进行了再次讨论与修改，并进一步规范标准文本格式，形成标准征求意见稿与编制说明。

**二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据**

**（一）标准编制原则**

本标准的制定符合产业发展的原则，本着先进性、科学性、合理性和可操作性的原则，以及标准的目标、统一性、协调性、适用性、一致性和规范性原则来进行本标准的制定工作。

本标准起草过程中，主要按GB/T 1.1－2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》进行编写。

本标准制定过程中，引用或参考了以下标准或文件：

[1] Bender A T, Sullivan B P, Lillis L, et al. Enzymatic and chemical-based methods to inactivate endogenous blood ribonucleases for nucleic acid diagnostics[J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2020, 22(8): 1030-1040.

[2] Tong C, Zhao C, Liu B, et al. Sensitive detection of RNase a activity and collaborative drug screening based on rGO and fluorescence probe[J]. Analytical chemistry, 2018, 90(4): 2655-2661.

**（二）确定标准主要内容的依据**

本项目基于各起草单位前期已利用核酸荧光底物法技术开发了核糖核酸酶残留量检测技术的基础，结合国内、外相关技术的发展，形成适用于生物制品中RNase残留检测－核酸荧光底物法，可以弥补国内目前该领域在法规层面和技术层面的空白，对推动我国核酸酶残留检测技术的发展以及其在疫苗和生物制品方面的发展和应用具有重要作用。

本标准主要技术内容如下：

1.方法学原理

试样与核酸荧光底物一起孵育，试样中残留的RNase催化核酸荧光底物分解，降解产物在对应波长的激发下会发出荧光，通过荧光检测器检测，外标法定量，测定RNase的含量。

2.分析步骤

（1）环境要求

所有试验操作均应在洁净的无外源RNase环境中进行。

所有试验操作均应使用洁净的无外源RNase耗材。

（2）试验溶液的制备

核酸荧光底物溶液、样本稀释溶液、固体样品待测液制备、液体样品待测液制备、标准品溶液制备等。

（3）酶促反应。

供试品、标准品、对照品。

3.结果分析

定性分析、定量分析、定量限及重复性。

**三、与现行法律法规、强制性标准和其他有关标准的关系，采用国际标准的程度及水平简要说明**

本标准与现行法律法规、强制性标准和其他有关标准协调一致。

本标准制定过程中未查询到国际标准。

**四、重大分歧意见的处理结果和依据。**

本标准制定过程中无重大分歧意见。

**五、贯彻促进会标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）**

标准发布后1年内，将根据各方反馈意见择期召开标准宣贯会议。向业内标准使用单位发放标准宣贯资料，并解答标准中相关技术难点和疑点。

**六、其他应予说明的事项。**

无。