**ICS** 65.020.20

**CCS** B 38

**团体标准**

T/FDSA XXXXX—XXXX

|  |
| --- |
|  |

mRNA疫苗及药物中dsRNA杂质定量检测-ELISA法

Quantitative detection of dsRNA impurities in mRNA vaccines and drugs by ELISA method

|  |
| --- |
| （征求意见稿） |
|  |
|  |

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

中国食品药品企业质量安全促进会  发布

目 次

[前 言 II](#_Toc174538656)

[引 言 III](#_Toc174538657)

[1 范围 1](#_Toc174538659)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc174538660)

[3 术语和定义 1](#_Toc174538661)

[4 缩略语 1](#_Toc174538665)

[5 dsRNA杂质定量检测方法 1](#_Toc174538666)

[5.1 dsRNA标准品 2](#_Toc174538667)

[5.2 dsRNA标准品制备及修饰 2](#_Toc174538668)

[5.3 dsRNA标准品赋值技术 2](#_Toc174538669)

[5.4 dsRNA标准品稳定性考察 2](#_Toc174538670)

[5.5 ELISA抗体对的选择 2](#_Toc174538671)

[5.6 ELISA方法学验证 2](#_Toc174538672)

[5.7 ELISA检测流程 2](#_Toc174538673)

[参考文献 5](#_Toc174538674)

前 言

本文件按照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》的规定起草。

请注意本文件中的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国食品药品企业质量安全促进会提出并归口。

本文件起草单位：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、硅羿科技（上海）有限公司、江苏申基生物科技有限公司、云顶新耀医药科技有限公司、深圳源兴基因技术有限公司、苏州艾博生物科技有限公司、北京引正基因科技有限公司、楷拓生物科技（苏州）有限公司、成都威斯津生物医药科技有限公司、成都迈科康生物科技有限公司、惠正奇医药（广州）有限公司、固安鼎泰海规生物科技有限公司、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。

本文件主要起草人：杨广宇、耿玉杰、李梁、陆家海、叶宇翔、唐雪明、竺添、武飞飞、刘兰、黄东明、肖潇、黄磊、缪佳颖、高尚、沈明云、宋卫卫、顾文艺、于磊、黄贤明、梅雄、李文华。

引 言

mRNA 新冠核酸疫苗的开发和成功应用，快速推动了mRNA技术在预防性疫苗、治疗性疫苗和治疗性药物领域的广泛应用，mRNA与药物在疗效、研发速度周期、成本价格、生产的可拓展性和安全性等方面具有显著优势。其中，mRNA原液的制备和转录是疫苗生产的关键步骤，mRNA的质量直接决定了疫苗的临床表现。

在IVT（体外转录）的过程中，T7 RNA聚合酶可能以RNA或DNA（模板链与非模板链）为模板进行转录，形成不同类型的dsRNA副产物。dsRNA所表现出的免疫原性，一方面会因为自身免疫系统与翻译系统间的反馈调节而降低mRNA的翻译效率；另一方面，dsRNA使机体形成记忆免疫，当mRNA药物需要重复给药时，会造成药物效力降低。因此，需要在mRNA疫苗药物的生产过程中严格控制dsRNA的含量，这就要求生产厂商能对dsRNA进行精确定量检测。

为促进mRNA疫苗和药物制备生产过程中dsRNA杂质含量精准控制，建立了dsRNA标准品选择标准、赋值策略以及抗体对选择原则，并根据ELISA法操作流程及方法学验证标准，制定本文件。

2020年8月，国家药监局药审中心发布《新型冠状病毒预防用mRNA疫苗药学研究技术指导原则（试行）》，2022年5月国家药监局药审中心发布《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》。美国药典（USP）分别于2022年2月和2023年4月发布第一版和第二版《Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality（Draft Guidelines）》。2022年4月，WHO发布《evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations》。上述指导原则适用于mRNA类疫苗与药物的质量控制，均明确指出要控制mRNA相关杂质如5’非帽化RNA、双链RNA（dsRNA）、长链RNA、截短RNA等的含量。其中，USP《Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality（Draft Guidelines）》2nd Edition推荐dsRNA杂质的分析方法为Immunoblot和Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)，其中，ELISA法更适合用于dsRNA定量分析。为推动我国生物医药标准与国际接轨，上述文件将作为本项目编制过程中的重要参考依据。

mRNA疫苗及药物中dsRNA杂质定量检测方法

范围

本文件规范了dsRNA标准品设计、合成、结构修饰和制备技术；dsRNA标准品赋值技术；dsRNA标准品稳定性考察；抗体对筛选，ELISA方法学验证和ELISA检测。

本文件适用于基于ELISA方法定量检测mRNA疫苗和药物中dsRNA杂质的全过程。

规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成对本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 33411-2016　酶联免疫分析试剂盒通则

YY/T 1183-2010　酶联免疫分析试剂盒通则

术语和定义



信使核糖核酸　Messenger RNA，mRNA

mRNA是由DNA的一条链作为模板转录而来的单链核糖核酸，携带遗传信息能指导蛋白质合成的一类单链核糖核酸。在细胞内，mRNA通过与核糖体结合，并在tRNA（转运RNA）的帮助下，翻译成多肽链，进而形成蛋白质。mRNA在基因表达过程中起着承上启下的作用，它从DNA传递遗传信息，指导蛋白质的合成，从而控制生物体的生长、发育和功能。

* 1. 缩略语

dsRNA：双链核糖核酸（double-stranded RNA）

ELISA：酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immuno sorbent assay)

HRP：辣根过氧化物酶（Horseradish Peroxidase）

dsRNA杂质定量检测方法

dsRNA标准品

试剂盒中的标准品应满足以下要求：

1. 应为序列随机的dsRNA。
2. 应包含多种修饰类型，如无修饰、pUTP修饰、N1-Me-pUTP修饰、5-OMe-UTP修饰，以满足不同修饰类型mRNA产品中dsRNA杂质含量的检测。
3. 纯度高，以避免杂质影响dsRNA精确定量。

dsRNA标准品制备及修饰

dsRNA制备的基本思路为：PCR获得转录模板→体外转录→退火形成双链→DNA酶和RNA酶处理→醇沉淀→重悬、定量，dsRNA修饰可通过使用相应修饰碱基完成。

dsRNA标准品赋值技术

对于dsRNA标准品的赋值，在验证纯度的基础上，采用UV法或dPCR法进行绝对定量。对于有修饰的dsRNA，像pUTP、N1-Me-pUTP和5-OMe-UTP修饰dsRNA，因为缺少吸光系数的参考信息，不依赖于吸光系数的dPCR法定量更具有科学性和参考性。

dsRNA标准品稳定性考察

用于ELISA实验的dsRNA标准品应进行稳定性验证，以保证整个试验周期内，标曲测值不会因标准品放置时间有明显改变。

ELISA抗体对的选择

为了保证对不同序列、长度、修饰类型dsRNA的准确定量，ELISA实验中所用的抗体对需进行以下验证：

1. 抗体对应特异性识别dsRNA，对其它类型核酸无识别；
2. 对于同一修饰类型dsRNA，抗体对亲和力基本不受长度和序列影响，抗体对对样本中dsRNA的亲和力与标准品的一致程度决定了定量结果的准确性。

ELISA方法学验证

所建立的ELISA实验方法或采用的商用ELISA试剂盒，应符合GB/T 33411-2016和YY/T 1183-2010中关于标准品溯源、线性、准确度、灵敏度、精密度等的要求。

ELISA检测流程

仪器设备

酶标仪、微孔板摇床、RNase-free枪头、EP管。

试剂或材料

水

RNase-free水。

洗涤工作液

包含0.05% Tween-20的1X PBS溶液，或其它符合要求的溶液。

样本稀释液

可以通过等体积混合0.1 M NaCl和1X TE溶液配制样本稀释液，也可采用其它符合要求的溶液。

dsRNA定量检测

包被

将捕获抗体用包被液稀释至合适浓度，按100μL/孔加至96孔板中，2-8℃过夜孵育。如果采用预包被有捕获抗体的96孔板进行实验，可省略此步骤。

加样

标准品和样本用样本稀释液稀释至合适浓度后，按100μL/孔加至96孔板中。标准品一般稀释6-8个合适浓度。预估样本的浓度范围，使其稀释后测值在线性检测范围内。如果不能确定待测样品中dsRNA含量，应当用样本稀释液做多个稀释倍数测试，以免含量过高或过低不能够读取有效数值

孵育

用封板膜封住反应孔，室温下振板（500rpm）反应60min（此步骤结束前5min，可提前配制检抗工作液）。

洗板

弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液（250μL液体），静置30s，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板4次。

加检测抗体

每孔加入工作浓度的生物素化检测抗体100μL。

孵育

用封板膜封住反应孔，室温下振板（500rpm）反应60min（此步骤结束前5min，可提前配制HRP-链霉亲和素工作液）。

洗板

弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液（250μL液体），静置30s，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板4次。

加HRP-链霉亲和素

每孔加入工作浓度的HRP-链霉亲和素100μL。

孵育

用封板膜封住反应孔，室温下振板（500rpm）反应30min。

洗板

弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液（250μL液体），静置30s，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板4次。

显色

每孔加入100μL单组分底物显色液，用封板膜封住反应孔，室温静置避光反应30min。

终止

每孔加入50μL终止液，立即进行检测，设定酶标仪波长于450nm处（建议用双波长450nm/650nm）。

数据分析

定量检测的标准工作曲线绘制

ELISA的实验通常会设置复孔，两个复孔的OD值取平均值作为该浓度下的OD值。以OD值作为Y轴，标准品浓度作为X轴，使用curve expert 1.3或ELISA Calc等专业软件进行Logistic五参数或四参数标准曲线拟合，应保证相关系数r2≥0.99。

线性范围的确定

以OD值作为Y轴，标准品浓度作为X轴，进行直线拟合，能满足直线拟合相关系数r2≥0.99的标准品浓度范围为检测线性范围。

样本浓度计算

将样本OD值代入标曲方程，由Y计算X值，得出样本浓度读值，如果读值落在线性范围内，则为有效读值，若在线性范围外，为无效读值。样本浓度按式（1）进行计算：

样本浓度=(有效读值1×稀释倍数1+有效读值2×稀释倍数2+……+有效读值n×稀释倍数n)/n …………………………………………………………………………………………(1)

# 参 考 文 献

1. 国家药品监督管理局药品审评中心，新型冠状病毒预防用mRNA疫苗药学研究技术指导原则（试行）（2020年08月）
2. 国家药品监督管理局药品审评中心，体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）（2022年05月）
3. USP.Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality（Draft Guidelines）（2022.02）
4. USP.Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality（Draft Guidelines）（2023.04）
5. USP.Analytical Procedures for Quality of mRNA Vaccines and Therapeutics（Draft Guidelines）（2024.07）
6. WHO.evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations.2022.04）
7. Bijoyita Roy, Monica Z. Wu. Understanding and Overcoming the Immune Response from Synthetic mRNAs. Genetic Engineering & Biotechnology News. 2019 Dec 19; 39(12):56-58.
8. Nelson J, Sorensen EW, Mintri S, Rabideau AE, Zheng W, Besin G, Khatwani N, Su SV, Miracco EJ, Issa WJ, Hoge S, Stanton MG, Joyal JL. Impact of mRNA chemistry and manufacturing process on innate immune activation. Sci Adv. 2020 Jun 24;6(26):eaaz6893.
9. Reikine S, Nguyen JB, Modis Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. Front Immunol. 2014 Jul 23;5:342.
10. Botos I, Liu L, Wang Y, Segal DM, Davies DR. The toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex. Biochim Biophys Acta. 2009 Sep-Oct;1789(9-10):667-74.
11. Anderson BR, Muramatsu H, Nallagatla SR, Bevilacqua PC, Sansing LH, Weissman D, Karikó K. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. Nucleic Acids Res. 2010 Sep;38(17):5884-92.
12. Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. Cell. 2009 Feb 20;136(4):731-45.
13. Stanton, M.G., Murphy-Benenato, K.E. Messenger RNA as a Novel Therapeutic Approach. In RNA Therapeutics. Topics in Medicinal Chemistry, : Garner, A. Ed. (Springer International Publishing, 2017), 27:237-253
14. USP. Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality Draft guidelines
15. Schönborn J, Oberstrass J, Breyel E, Tittgen J, Schumacher J, Lukacs N. Monoclonal antibodies to double-stranded RNA as probes of RNA structure in crude nucleic acid extracts. Nucleic Acids Res. 1991 Jun 11;19(11):2993-3000.
16. Chaudhary, N., Weissman, D. & Whitehead, K.A. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. Nat Rev Drug Discov. 2021, 20, 817–838.
17. Mu X, Greenwald E, Ahmad S, Hur S. An origin of the immunogenicity of in vitro transcribed RNA. Nucleic Acids Res. 2018 Jun 1;46(10):5239-5249.
18. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. Mol Ther. 2008 Nov;16(11):1833-40.
19. Vaidyanathan S, Azizian KT, Haque AKMA, Henderson JM, Hendel A, Shore S, Antony JS, Hogrefe RI, Kormann MSD, Porteus MH, McCaffrey AP. Uridine Depletion and Chemical Modification Increase Cas9 mRNA Activity and Reduce Immunogenicity without HPLC Purification. Mol Ther Nucleic Acids. 2018 Sep 7;12:530-542.
20. Nwokeoji AO, Kilby PM, Portwood DE, Dickman MJ. Accurate Quantification of Nucleic Acids Using Hypochromicity Measurements in Conjunction with UV Spectrophotometry. Anal Chem. 2017 Dec 19;89(24):13567-13574.