### 《mRNA疫苗及药物中dsRNA杂质定量检测-ELISA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《mRNA疫苗及药物中dsRNA杂质定量检测-ELISA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**

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。mRNA疫苗的制备主要包括：前期研究确定抗原序列、质粒载体、扩增菌种、递送系统等相关参数，mRNA疫苗的生产主要包括质粒DNA（plasmid DNA，pDNA）模板的制备、mRNA原液的制备、mRNA的包封与灌装几个主要模块。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mRNA疫苗制备的体外合成过程中，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是引发机体炎症反应的诱导剂之一，可通过抗原呈递细胞激活固有免疫反应，触发信号通路的级联放大。外源dsRNA可被细胞中的Toll样受体（Toll like receptor，TLR）、维甲酸诱导基因-I（retinoic acid inducible gene I,RIG -I）和黑色素瘤分化相关蛋白5（melanoma differentiation associated protein 5，MDA5）识别而激活信号通路，释放TNF-α和IFN-y等细胞因子，导致炎症反应的发生。此外，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，为监测和控制疫苗中主要杂质的残留量，保证疫苗及药物的安全性，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。

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、4月和2024年8月发布第一版、第二版和第三版《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。

**（三）团体标准起草单位和主要起草人**

本标准起草单位：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、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。

本标准主要起草人：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。

**（四）主要工作**

**起草阶段：**

（1）2024年4月19日，完成《mRNA疫苗及药物中dsRNA杂质定量检测-ELISA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：

GB/T 33411-2016　酶联免疫分析试剂盒通则

YY/T 1183-2010　酶联免疫吸附法检测试剂（盒）通则

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）

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）

USP. Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality（Draft Guidelines）（2022.02）

USP. Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality（Draft Guidelines）（2023.04）

USP.Analytical Procedures for Quality of mRNA Vaccines and Therapeutics（Draft Guidelines）（2024.07）

WHO. evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations.2022.04）

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.

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.

Reikine S, Nguyen JB, Modis Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. Front Immunol. 2014 Jul 23;5:342.

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.

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.

Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. Cell. 2009 Feb 20;136(4):731-45.

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

USP. Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality Draft guidelines

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Sun H. Double -stranded RNA sensors and modulators in innate-immunity [ J]. Annu Rev lmmunol, 2019, 37 :349

Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon -stimulatedgenes: a complex web of host defenses [ J]. Annu Rev Immunol，2014，32:513

Mussabekova A, Daeffler L, Imler JL. Innate and in-trinsicantiviral immunity in Drosophila[ J]. Cell Mol Life Sci. 2017，74(11):2039

**（二）确定标准主要内容的依据**

本项目以国家药品监督管理局药品审评中心、美国食品药品监督管理局和世界卫生组织等管理单位制定的相关规范要求，结合各起草单位前期在mRNA技术领域大量研发与工艺工作基础，结合国内、外相关技术的发展，形成涵盖基于ELISA技术平台进行mRNA疫苗及药物中dsRNA杂质定量的检测方法，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mRNA技术在应用过程中的工艺控制具有重要作用。

主要技术内容：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。

本标准主要技术内容如下：

1.dsRNA标准品的制备

试剂盒中的标准品应满足以下要求：应为序列随机的dsRNA、应包含多种修饰类型、纯度高。

dsRNA标准品的制备可以参考文献报道：Voloudakis AE, Holeva MC, Sarin LP, Bamford DH, Vargas M, Poranen MM, Tenllado F. Efficient double-stranded RNA production methods for utilization in plant virus control. Methods Mol Biol. 2015;1236:255-74.以及Li C, Zamore PD. Preparation of dsRNAs for RNAi by In Vitro Transcription. Cold Spring Harb Protoc. 2019 Mar 1;2019(3).中关于dsRNA制备的描述，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。

2.dsRNA标准品赋值技术

根据国家《标准物质管理办法》，对于一级标准物质，应用绝对测量法或两种以上不同原理的准确可靠的方法定值。在只有一种定值方法的情况下，用多个实验室以同种准确可靠的方法定值。核酸定量方法有定磷法、定糖法、紫外吸收法（紫外分光光度计或Nano drop）、荧光光度法（荧光染料或探针），qPCR法和dPCR法。USP《Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality（Draft Guidelines）》2nd Edition中推荐的mRNA定量方式为UV法、qPCR法和dPCR法，对于dsRNA标准品的赋值，因为缺少参考物质，UV法和dPCR法更为合适，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。

3.dsRNA标准品准确度和稳定性

据国家《标准物质管理办法》，对于一级标准物质，准确度需具有国内最高水平，稳定性在一年以上或达到国际上同类标准物质的先进水平。

4.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满足：一，抗体对特异性识别dsRNA，对其它类型核酸无识别；二，对不同修饰类型dsRNA均有较好识别，对同一修饰类型dsRNA，抗体识别性基本不受长度和序列影响。

5.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，应符合中华人民共和国国家标准《GB/T 33411-2016 酶联免疫分析试剂盒通则》和中华人民共和国医药行业标准《YY/T 1183-2010 酶联免疫分析试剂盒通则》中关于标准品溯源、线性、准确度、灵敏度、精密度等的要求。

6.ELISA检测

（1）仪器设备：酶标仪、微孔板摇床、RNase-free枪头、EP管。

（2）试剂或材料：水、洗涤工作液、生物素化检测抗体、HRP-链霉亲和素、无修饰、pUTP修饰dsRNA标准品、N1-Me-pUTP修饰dsRNA标准品、5-OMe-UTP修饰dsRNA标准品、STE buffer、稀释液等。

（3）dsRNA定量检测。

（4）数据分析：使用curve expert 1.3或ELISA Calc （Logistic五参数或四参数拟合曲线计算方法）等。

**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。

本标准制定过程中采用的国际标准：

《Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality（Draft Guidelines）,1st Edition》

《evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations》

《Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality（Draft Guidelines）,2nd Edition》

《Analytical Procedures for Quality of mRNA Vaccines and Therapeutics（Draft Guidelines），3nd Edition》

**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。