

新型冠状病毒预防用 mRNA 疫苗药学研究
技术指导原则（试行）

药品审评中心

2020 年 8 月

目 录

一、前言	1
二、模板设计、转录模板质粒构建和菌种库研究资料	3
(一) 目标抗原选择和 DNA 模板设计	3
(二) 转录模板质粒的构建和制备	4
(三) 种子库的建立和检定	4
三、生产工艺	5
(一) 一般要求	5
(二) mRNA 原液生产	6
(三) 制剂处方及生产工艺	10
四、质量特性研究	15
(一) mRNA 的结构分析和理化性质分析	15
(二) 纳米颗粒的结构分析和理化性质分析	16
(三) 杂质分析	17
(四) 生物学活性研究	18
五、质量标准	20
(一) DNA 转录模板	20
(二) mRNA 原液	20
(三) 制剂中间产物	21
(四) 成品	22
(五) 方法学研究和方法学验证	23

(六) 标准品	24
六、稳定性研究	24
七、直接接触制品的包装材料和容器的来源、选择依据及质量标准等研究	25
八、应急状态下药学研发的阶段性考虑与研发期间的变更	25
(一) 种子库	25
(二) 生产工艺	26
(三) 质量特性研究	27
(四) 质量标准	27
(五) 临床申报阶段应提供能够支持临床试验开展的稳定性研究数据	28
(六) 研发期间的工艺变更	28
九、名词解释	29
十、参考文献	29

一、前言

mRNA 疫苗是将外源目的基因序列通过转录、合成等工艺制备的 mRNA 通过特定的递送系统导入机体细胞并表达目的蛋白、刺激机体产生特异性免疫学反应，从而使机体获得免疫保护的一种核酸制剂。

mRNA 疫苗具有以下特点：（1）能导入细胞，在体内表达相应的抗原蛋白，避免了体外蛋白表达、纯化过程；（2）能够刺激免疫系统产生体液免疫和/或细胞免疫应答，发挥相应的免疫预防和/或免疫治疗作用；（3）其递送系统具有类似佐剂的部分特性，能够通过刺激机体免疫系统产生多种细胞因子等方式增强机体免疫反应能力或改变免疫应答类型；（4）由于 mRNA 的降解是通过细胞正常代谢完成，降低了因感染或整合诱发基因突变的潜在风险。

尽管 mRNA 疫苗在巨细胞病毒 (CMV)、流感病毒、埃博拉病毒和寨卡病毒等多种传染病临床研究中取得了一定的研究进展，但尚存在待确证的诸多问题，如，mRNA 本身具有的潜在免疫原性；递送系统（如，脂质纳米颗粒）的稳定性、纳米剂型安全性及所使用阳离子聚合物/脂质体安全性、递送靶向性及递送效力等诸多问题，影响疫苗的有效性、安全性和质量可控性。

mRNA 疫苗通常需采用较为复杂的制剂系统，其药学研发和生产控制涉及诸多特殊考虑，包括：（1）mRNA 序列的分子

设计对 mRNA 稳定性、目的抗原的表达效率、免疫原性均可能产生影响，如加帽结构的选择、非翻译区序列的选择及序列的改构、目的序列的优化、核苷酸的化学修饰等方面；（2）制剂组成、结构和工艺具有特殊性，主要特点是涉及阳离子聚合物或脂质材料、递送系统的结构多样性及纳米级粒径特性、工艺复杂性等，需要通过研究确认主要的考察指标来进行制剂处方组成和工艺的优化以及控制策略的建立；（3）同时可能涉及新免疫调节组分表达及新辅料的使用，必要时，需要单独的安全性研究支持。

本指导原则是根据新型冠状病毒肺炎疫情防控应急工作需要，基于对此类疫苗有限的科学认知水平起草，用于指导应急状态下 mRNA 疫苗研制，明确现阶段对 mRNA 疫苗研发技术的基本要求，相关内容将随着新型冠状病毒及 mRNA 疫苗研究进展和认知的不断深入予以更新。本指导原则并不代表对新型冠状病毒疫苗类型的推荐性意见。

本指导原则主要针对非自我扩增型 mRNA 疫苗，对于自我扩增型 mRNA 疫苗、多组分 mRNA 疫苗在借鉴本指导原则时还需根据产品相关特点和属性开展相应研究。

针对突发公共卫生紧急情况新药研发中药学研究的阶段性、渐进性等特点，研发者需要提前统筹新药整体研发设计考虑，应提交药学研发路线图、阶段性研究方案及各阶段风险控制的策略。在各阶段，若有简化或减免的有关研究，

应阐释说明依据和理由，提交资料前建议进行充分的沟通交流。

二、模板设计、转录模板质粒构建和菌种库研究资料

(一) 目标抗原选择和 DNA 模板设计

1. 目的抗原选择依据及来源

明确目的抗原来源、氨基酸和基因序列及蛋白结构，并与我国当前流行株的核苷酸和氨基酸同源性进行分析；明确目的抗原选择的依据以及其表达蛋白在预防新型冠状病毒中的作用或作用机理。针对新型冠状病毒，建议结合产品完成的临床前毒理研究同时考虑不同序列选择对疫苗抗体依赖性感染增强 (ADE) 效应、肺部免疫病理反应等的潜在影响。应提供目的产物的理论序列、分子量、分子式、二硫键 (如有)、修饰 (如有) 等重要结构信息。

2. DNA 转录模板序列设计及结构

(1) 对 DNA 转录模板设计进行全面阐述，除目的抗原涉及的 mRNA 序列外，需重点提供其功能性元件的设计及确认研究结果，如，帽子结构设计，转录启动子的选择，5'UTR 和 3'UTR 的设计，信号肽的设计，Poly (A) 加尾结构/长度设计、所用核苷三磷酸 (NTP) 类型及其修饰信息等。

(2) 若对编码目标抗原的 mRNA 序列进行了任何修饰、序列改构或序列优化 (如密码子优化等)，均应详细提供修

饰或序列更改的依据与目的（如提高 mRNA 翻译效率、降低先天免疫原性、增加稳定性等）。应提供结构示意图等，并对基因修饰或序列改构的利弊进行权衡分析，提供确认的支持性研究结果。如可能，应评估构建的 mRNA 疫苗本身的免疫原性。

某些情况下，若构建的基因序列包括除抗原目的基因以外的其它基因序列时，应对额外引入基因序列的作用和选择依据进行分析，如具有利于 S 蛋白三聚体形成的额外插入序列等，并提供相应序列设计及确认研究数据结果。

(二) 转录模板质粒的构建和制备

(1) 应对转录模板的控制元件和选择标记的序列与来源进行阐述，如：转录启动子、转录终止序列、抗生素抗性标记等进行分析。抗生素使用应符合《中国药典》的相关要求。

(2) 应提供构建和制备转录模板质粒的详细信息和步骤、鉴定及确证方法。

(3) 对转录模板质粒应结合工程菌种子库的检定进行全基因序列分析及确认，提供用于生产 mRNA 的转录模板的全长核苷酸序列，尤其对转录模板的控制元件、插入的目的基因序列、选择标记基因有无变异等进行分析。

(三) 种子库的建立和检定

如 DNA 转录模板制备涉及质粒构建及工程菌的使用，还应按《中华人民共和国药典》相关规定或与国际通行要求建立种子库系统，并提供国家药品检定机构相应检定报告。

(1) 明确宿主菌的来源、基因型、表型以及目标克隆筛选的流程。鼓励对宿主菌开展鉴定研究，鉴定项目可包括：鉴别、抗生素敏感性等。

(2) 工程菌的建立及鉴定：经转化条件优化后，将合格的目标质粒转化至适宜的工程菌，经克隆筛选后建立种子库系统。

(3) 种子库的检定：应保证种子库无外源因子污染及目的基因序列和其他元件的准确性，包括细菌形态学、培养物纯度、质粒限制酶切图谱、目的基因和其他元件测序等。鼓励对工程菌活性、质粒保有率、鉴别、抗生素抗性等指标进行检定。

(4) 传代稳定性研究：开展种子库遗传稳定性分析（序列大小、序列准确性、质粒限制酶切图谱、质粒拷贝数）并明确各级种子库的限定传代代次及依据。

说明各级种子库的制备规模、保存条件、扩增条件、允许的传代次数等信息。

三、生产工艺

(一) 一般要求

工艺开发阶段，应进行各步工艺参数对 mRNA 和/或制剂质量特性影响的研究。研发阶段应通过工艺参数的研究和优化，确立 mRNA 和/或制剂的生产工艺及工艺过程控制策略。

临床样品制备工艺应具备一定规模，并且还应具有有一定的生产连续性和放大可行性，临床样品应在符合 GMP 的条件下生产。生产的连续性和可控性可结合开发阶段、平台先期先验工艺经验、工艺成熟度、过程检测充分性等多方面综合评价。产品开发进程中应不断积累数据，持续确认工艺的一致性和可控程度。上市生产开始前应明确关键工艺参数，在此基础上建立充分的生产工艺过程控制策略，包括关键及主要工艺操作参数控制、中间产品性能参数检测以及相应的检测方法等。研究数据应能够支持对工艺稳定性及批间一致性的分析评价。

(二) mRNA 原液生产

1. 原液生产用主要原材料

生产用原材料应符合现行版《中华人民共和国药典》相关规定和/或与国际通行要求一致。

提供工程菌以外的生产用其它原材料的来源、质量标准及检定报告。应重点提供以下原材料的相关信息：用于转录的核苷酸和修饰核苷酸、5'-帽类似物、用于 mRNA 体外合成大量使用的各种酶（如 T7 转录酶、加帽反应过程中添加的酶

等)和缓冲液、原液生产过程中使用的反应及纯化介质(层析柱、磁珠、过滤膜)溶剂等。对于采用重组技术或生物/化学合成技术自行制备的生产用原材料(如 T7 转录酶、焦磷酸酶、RNA 酶抑制剂等),需提供相应的生产工艺和质量研究资料。对于生产中使用的各种酶的保真度需予以分析。对于 5'-帽类似物、核苷酸等原材料的质量标准应含有可充分表征产品相关杂质的纯度检测,如,质谱、核磁、HPLC 等方法。原液和制剂生产过程中原则上应避免人或动物来源的成分。如果使用人源或动物源物质,应符合《中华人民共和国药典》相关规定和/或参照 ICH Q5A 等技术指南提供外源因子风险评估。

2. 工艺研究及确认

mRNA 原液生产工艺一般分为两个阶段,即 DNA 转录模板的制备和 mRNA 的制备。转录模板制备可采用质粒 DNA 扩增或 PCR 扩增、纯化及线性化等方法; mRNA 制备工艺通常采用转录模板进行 mRNA 体外转录、mRNA 加帽、去磷酸化、DNA 酶处理、mRNA 纯化等步骤获得 mRNA 原液。mRNA 修饰(如修饰核苷的加入)、加 Poly(A)尾通常在转录过程中进行;加帽可在转录过程中同时进行也可作为单独的工艺步骤。

应明确生产工艺流程,提交流程图,说明相应工艺步骤的目的、工艺流程步骤、过程控制描述、物料流转及中间产物等。应提供原液生产工艺各步骤的研究内容,对生产工艺

各步骤中各种工艺参数进行探索和优化，建立稳定工艺，并制定相应的过程控制策略。

需提供工艺确认资料，包括工艺过程控制确认（含中间产物关键质量属性是否符合可接受标准及关键工艺参数、重要工艺参数是否在控制范围内等）、批次放行数据结果及必要的杂质清除效果等数据。

2.1 转录模板的制备

如采用转录模板质粒扩增/线性化工艺，需考虑研究优化的工艺参数如：质粒浓度、质粒线性化酶浓度、孵育时间、温度等。如采用 PCR 扩增工艺，需考虑研究优化的工艺参数如温度、PCR 扩增体系、循环次数、时间、温度等。需对转录模板制备的关键工艺参数及其控制范围进行确认，并建立相应的过程控制检测标准，如线性化效率、模板浓度、序列准确性、纯度、杂质残留等。

如需储存，应明确储存条件、储存方式并进行相关支持性研究。

2.2 mRNA 合成

应对 mRNA 的体外转录、加 Poly(A) 尾、加帽、去磷酸化、DNA 酶处理等工艺步骤的关键工艺参数进行研究与优化，对关键工艺参数及其控制范围进行确认，如：1) 体外转录工艺中的反应体系、RNA 聚合酶浓度、NTP 浓度、转录时间、温度、终止反应条件等；2) DNA 酶处理工艺（如有）中的 DNA 酶浓

度、处理时间、温度、终止反应条件等；3）加帽步骤应研究 RNA 反应浓度、温度、时间，加帽反应缓冲体系、物料投料比（如 5'-帽类似物、鸟苷三磷酸、核糖核酸酶抑制剂、相关转移酶等）、补料方式、反应温度、时间等，工艺过程中需关注加帽的效率、mRNA 片段的降解情况以及序列的准确性，对加帽类型及不同加帽类型的比例进行研究；4）去磷酸化工艺中（如有）的磷酸酶浓度、反应时间等；5）如涉及修饰核苷酸，应明确被修饰的核苷酸、修饰类型、修饰后的纯化方法和纯度、投料比例等。

应对上述工艺步骤产物进行过程控制检测，如加帽率、加 Poly(A) 尾产物长度、mRNA 序列完整性、序列准确性、纯度、mRNA 浓度、副反应产物浓度（不完整 mRNA、双链 RNA、截短 RNA、长链 RNA 等）、残留蛋白、残留 DNA、无菌、内毒素等。

2.3 mRNA 纯化

应明确 mRNA 生产过程中各纯化工艺步骤的目的并建立杂质谱。应对纯化方式、介质选择依据、动态载量、回收率、杂质去除率等进行研究。对 mRNA 纯化工艺的关键工艺参数优化并确认。

需对 mRNA 纯化工艺建立相应的过程控制，包括纯化产物检测，如 mRNA 浓度、mRNA 序列准确性及完整性、产品及工艺相关杂质去除率等。

2.4 工艺确认

除连续批次的生产及放行检验外，应对 mRNA 纯化工艺过程中的潜在杂质进行研究，提供 mRNA 生产潜在产品相关杂质与工艺相关杂质的来源、去除步骤、去除能力等，包括 5'非帽化 RNA、双链 RNA (dsRNA)、长链 RNA、截短 RNA、残留模板 DNA、残留酶底物、内毒素等。对残留物安全性进行评估，必要时进行毒理学分析。

(三) 制剂处方及生产工艺

提供制剂处方、工艺及其确定依据，辅料的来源、质量标准及检定报告。

应明确制剂处方中每种组分的作用、含量以及选择的依据；可结合前期递送系统平台知识通过不同制剂处方/工艺对 mRNA-佐剂/递送系统相互作用、制剂对 mRNA 的保护作用（mRNA 和 mRNA 制剂在血清或外加核酸酶条件下的降解研究）、mRNA 的转染效率（mRNA 入胞及内体逃逸效率）、mRNA 的体外翻译（无细胞提取液、细胞等）、动物药效学研究（免疫原性、保护力研究）、毒理研究、生产工艺可控性、稳定性等方面的影响筛选和确定初步的制剂处方。

提供初步的研究资料（包括研究方法、研究结果和研究结论）以说明制剂工艺关键步骤确定的合理性以及工艺参数控制范围的合理性，包括主要工艺参数研究资料，生产工艺

参数对制剂质量属性的影响，如复合率、包封率、粒径及其分布、载药量、脂质组分、氮磷比（可质子化的氨基与 mRNA 的磷酸基团的摩尔比）与目标理论值的一致性研究资料。

如果冻干则应开展冻干工艺对产品质量、纳米颗粒相关特性、冻干前后效力等影响的研究，并拟定适宜的生产工艺参数。

1. 制剂工艺阶段原辅料（佐剂或递送物质）的要求

应对纳米颗粒和递送系统制备涉及的关键原材料/辅料（脂质、阳离子聚合物等）进行充分的筛选和质控。原则上应提供递送系统各个成分的选择依据、来源（天然或合成，尤其是卵磷脂和高分子等的来源）、生产用原材料、生产工艺、特性鉴定、质量控制和稳定性的研究资料；包括但不限于正电荷脂质材料（DOTAP（2,3-二油酰基-丙基）-三甲胺）、DC-Chol（N', N'-二甲基乙二胺基氨甲酰基胆固醇）和 DLin-MC3-DMA 等）、辅助磷脂/脂材（DSPC、DOPE、DPPC 和胆固醇）、PEG 化的脂材（mPEG-DSPE、PEG-c-DMA）、阳离子聚合物材料（聚乙烯亚胺（PEI）、聚氨基酸）以及上述材料的衍生物。

（1）递送系统较多用到阳离子聚合物或正电荷脂质等非传统疫苗辅料组分，且各家制剂组分不尽相同。对于明确使用已商品化的佐剂和递送物质，需提供该类物质的组分、化学组成及规格，国内外使用该类物质的情况及已完成的毒

理、安全性研究和人体使用的安全性研究数据。鉴于不同递送系统所用辅料生产商的工艺、杂质谱可能存在差异，建议尽早明确并固定脂质辅料的生产商，在脂质辅料首次选用、供应商变更、生产变更（如生产工艺等）时，建议进行全面的脂质辅料质量特性研究，积累对脂质辅料质量特性的认知，确保变更对产品质量不会产生负面影响。

若国内外均未使用过该类递送物质，则应参照《新药用辅料非临床安全性评价指导原则》对其作用原理、CMC 信息（包括供应商、新辅料合成工艺、质量控制等）、安全性及其功能效应进行详细的研究。如果使用了 PEG 化的脂质，还应重点提供 PEG 化脂质的结构图、合成率、结构分布率及纯度等信息。

（2）建议对递送系统所用辅料制备工艺的稳健性开展研究和优化。由于 mRNA 递送系统的复杂性，建议开展对不同批号的聚合物材料或脂质组分对 mRNA 的复合或包封效果、纳米颗粒结构完整和粒径均一性的研究，以确保 mRNA 纳米颗粒制剂的均一性和质量可控性，并建议根据研究结果拟定阳离子聚合物或特殊脂质材料可以接受的质量标准。建议申请人明确关键原材料/辅料中的杂质残余及可能影响制剂质量属性的关键要素，拟定的质量标准应含有可充分表征产品相关杂质的纯度检测，如，质谱、核磁、HPLC 等方法。

(3) 佐剂: 鉴于 mRNA 递送系统的复杂性及可能存在的佐剂作用、国内外在研 mRNA 递送平台的实际情况, 不建议添加单独的佐剂成分。如需添加佐剂, 应保证添加的佐剂不会引起不可接受的毒性。临床前须通过明确的功能指标及试验研究证实佐剂发挥的具体的免疫调节作用, 同时关注添加该佐剂成分后可能引入的风险, 如, 对 mRNA 结构、非预期免疫反应及免疫损伤和免疫病理等。使用佐剂所带来的增强免疫应答的潜在获益必须超过其所带来的风险等。应参照佐剂相关研究指南提交全套的佐剂药学研究资料。

2. mRNA 包封/装载及纯化

mRNA 的非病毒递送系统主要包括但不限于基于脂质的递送系统(如核酸脂质复合物(lipoplexes)和阳离子脂质体等)、基于聚合物的载送系统(如 polyplexes 等)、基于脂质和聚合物的载体系统(如 lipopolyplexes 等)。mRNA 包封/装载的过程一般系以聚阳离子材料或正电荷脂质等材料与 mRNA 复合(complexing)后直接成粒, 或成粒后再经包覆形成核壳形结构的过程。制剂制备过程可能还包括后续纯化步骤, 以去除未包封/装载的 mRNA、游离的聚合物或脂质材料和/或包封过程中引入的有害物质。制备递送物质的工艺及其与 mRNA 的复合、颗粒成型等工艺系 mRNA 疫苗的关键工艺步骤, 应说明 mRNA 的包封形式及递送系统选择的依据、包

封工艺和复合物（如脂质体或纳米颗粒）纯化工艺的研究与优化。

包封工艺可能包括：

- （1）mRNA 与阳性聚合物材料的复合阶段；
- （2）纳米颗粒制备及纯化阶段。

复合阶段关键工艺参数可能包括投料比（阳离子材料与 mRNA 的比率）、各个复合物料的反应浓度、缓冲体系及浓度、pH 和复合时间等；应对阳离子聚合物材料和复合工艺进行筛选和优化，重点可考察氮磷比对复合率以及 mRNA 稳定性的影响等。应对复合中间体拟定适宜的过程控制及检定标准，如包封均一性等。

纳米颗粒形成阶段的关键工艺参数可能包括 mRNA 浓度、递送材料（尤其是阳离子材料）浓度、混合时的溶剂系统及流速、混合压力、纯化参数和除菌过滤等。建议关注纳米颗粒形成过程中及形成后的工艺过程对纳米颗粒的聚集或解散、mRNA 泄露、mRNA 完整性以及稳定性的影响，建议关注核酸/脂质比、电位等与 mRNA 稳定性以及转染效率、表达效率之间的关系。纳米颗粒质控方面应设置适宜的控制标准，如，mRNA 含量、包封率、Zeta 电位、粒度大小及分布和辅料组分含量及试剂残留等项目。

3. 工艺确认

提供连续批次生产工艺的确认和评价资料，应至少包括检验分析和验证在该生产工艺条件下中间产物及成品的质量情况；工艺相关杂质和产品相关杂质去除效果等研究资料。

四、质量特性研究

mRNA 疫苗质量特性研究可参考已上市 siRNA 脂质纳米颗粒及纳米产品的相关技术指南。提供常规放行检验分析和采用先进的分析技术进行的质量研究和特性分析研究数据。特性分析通常包括结构特征（尤其与 mRNA 递送系统功能相关的结构属性）、纯度、杂质分析（工艺相关杂质及产品相关杂质）、体内外效力、免疫学特性等研究。除常规放行检验项目外，mRNA 疫苗质量研究和特性分析研究资料应考虑开展以下研究，并鼓励对影响疫苗效力或安全性的其他结构特征开展研究。

在研发早期，应对样品进行初步结构确证，提交研究数据，完整的结构确证数据可在申报新药上市时提交；疫苗的生物效价研究是反映工艺性能和产品质量的综合指标，建议尽早开展相关研究。

在递送系统的质量特性研究中，应关注取样样品的代表性以及制样过程对样品实际状态的影响。

（一）mRNA 的结构分析和理化性质分析

应对核酸序列正确性（包括影响疫苗稳定性、转录、翻译表达效率的关键元件）、mRNA 浓度（紫外吸收）、mRNA 修饰比例、加帽率、完整性、纯度、物理特性（如外观、pH 值等）、mRNA 体外翻译活性等特性进行分析。如可能，应评估构建的 mRNA 疫苗本身的免疫原性。

（二）纳米颗粒的结构分析和理化性质分析

应基于制剂质量特性对产品功效的影响程度来确定表征的完整度和等级。建议对 mRNA 复合及成核效率、pH、复合率和/或包封率、平均粒径和粒径分布、粒子微观形态、Zeta 电位、渗漏/释放的评价、mRNA 和免疫增强剂在各磷脂含量/比例、成品中药脂比、装载和未装载 mRNA 量（药物在脂质体中的分布情况/存在状态）、未形成组装结构的聚合物材料和正电荷脂质材料、氮磷比、辅料杂质（尤其是含有不饱和双键的脂材，如 DOPE、DLin-MC3-DMA 的氧化/降解产物、合成聚合物相关杂质等）等进行分析研究。如适用，建议进行成核颗粒聚集度、PEG 密度等表征研究。建议开展脂质纳米颗粒（LNP）质量属性（如粒径、粒径分布、电荷、包埋率）与免疫效果的相关性研究。mRNA 释放性能与有效性密切相关，鼓励开展 mRNA 释放特征研究，如体外模拟释放、溶酶体 pH 环境下的释放性能等，可采用色谱、光谱等方法检测。

对于 mRNA-递送系统的相互作用：建议结合递送系统与 mRNA 相互作用的结构或特性开展必要的质量研究，理化结构特性如等电点、递送材料的 pKa 值、粒径及其分布、颗粒形态、mRNA 的包封率及分布、mRNA 的泄露或释放等；生物学活性如佐剂或新的递送系统对 mRNA 递送效果、降低佐剂或抗原毒性和/或增强抗原免疫反应的相关研究，mRNA-递送系统复合物最终表达蛋白及其对免疫原性影响的研究等。

(三) 杂质分析

生产工艺、贮存、和/或用于保存原液的密封容器中产生的、和/或稳定性研究批次中发现的潜在杂质，包括工艺相关杂质和产品相关杂质。对于早期临床试验申请，可根据来源、风险及残留量的安全性水平等，列出潜在的杂质（建议结合毒理试验结果、文献资料、既往积累的认知信息等综合考虑），如 mRNA 相关杂质、DNA 残留、蛋白质残留、递送物质相关杂质、颗粒相关杂质及生产工艺相关杂质等。对主要杂质进行监测与分析，必要时纳入质量标准 and 进行安全性初步评价。对于开发后期临床试验，除了早期临床试验申请提供的信息之外，还需进一步进行杂质的分离、鉴别等的分析。考虑其在生产和贮存期间是否显著增加及其与疫苗有效性的相关性，确定是否纳入过程控制或放行标准；对于需纳入质控体

系的项目应随研究的逐步推进加强标准要求。对于药典收纳的检项，必须符合药典的标准。

mRNA 产品相关杂质建议关注影响 mRNA 功能的截短序列（可能来源于转录不完全或 mRNA 的降解/断裂）、可能导致非特异性免疫反应的双链 mRNA 序列、加帽不完全的 mRNA、帽子相关杂质、去磷酸不完全的 mRNA、修饰过度的 mRNA 等；此外，需关注 mRNA 错配序列、mRNA 氧化产物等。

由于 DNA 残留不同于传统疫苗细胞基质的 DNA 残留，系特定 DNA 序列的残留，应结合产物序列、残留量、残留 DNA 片段大小等评价 DNA 底物残留的安全性风险。

制剂相关杂质建议关注：（1）正电荷材料相关杂质，包括材料合成产生的杂质以及 mRNA 复合过程中可能产生的杂质；（2）不饱和脂质的氧化及相关降解产物；（3）纳米颗粒聚集产生的颗粒物；（4）未组装的脂质分子、阳离子物质；未包封的 mRNA；在制剂及贮存过程中可能降解或失活的 mRNA 等。其中，未组装的脂质分子会影响 LNP 的稳定性；游离 mRNA 易降解，影响产品的有效性。

（四）生物学活性研究

体内效力试验：根据 mRNA 疫苗理论的免疫反应原理应评价其体液免疫和/或细胞免疫的生物活性。在评价体液免疫效价时，可使用中和抗体和/或总抗体检测方法。应尽可能

选择与人体免疫效应具有相关性的实验动物。建立检测动物血清中和抗体和/或总抗体的方法，包括中和试验毒株、包被抗原、参比品的研究等。如有必要和可能，鼓励建立抗体性质的评价方法，如亚型测定、针对抗原中和位点的分析等。建议建立检测评价细胞免疫的方法（如利用细胞因子Elispot检测评价特异性CTL反应等方法）进行细胞免疫效价的评价。该类方法应至少具有支持临床期间变更评价的适用性及相应的质量标准。

体外活性检测（体外抗原表达量检测）：通常采用体外转染哺乳动物细胞、检测其表达量的方法。建议建立定量检测表达抗原的方法以及表达抗原的定量标准，并对该检测方法的敏感性以及定量的准确性进行验证；建议检测表达产物抗原谱，其各表达目的抗原的大小应与预计大小相同；鼓励建立相应的方法并经验证后拟定各表达抗原的量和图谱的质量控制标准。鼓励进行体外检测与动物模型中的免疫原性或有效性的相关性研究。

动物保护性试验：系最理想的临床前有效性评价手段之一，可结合药效学研究开展。

共表达基因序列的活性：若构建的基因序列除新型冠状病毒目的抗原序列外，还包括具有调节免疫反应功能的细胞因子序列或包含佐剂效应的序列，则应对这类分子进行详细分析，包括分子大小、表达量及免疫学反应等。若这种因子

或佐剂效应序列未批准上市，则应对这类分子进行单独的药理学和毒理学研究。

五、质量标准

申报临床时可根据工艺确认资料初步确定质量标准；上市阶段应按照相关指导原则进行风险控制分析并结合工艺验证情况提供完整的质量标准。以下检定项目均为建议的检定项目，早期阶段可作为内控项目积累数据，上市阶段根据研究数据确定是否纳入放行标准；对于一般工艺相关杂质，如经充分验证证明工艺可对其有效、稳定地清除，可结合工艺进行控制，相关残留物检测可不列于检定项目中。

（一）DNA 转录模板

建议考虑以下质控项目：鉴别、DNA 模板浓度/含量、测序、纯度、线性效率（如适用）、杂质残留、微生物限度、内毒素等检测。鼓励申请人建立 DNA 转录模板体外转录活性的质控。

转录模板中的杂质残留可能包括宿主菌 DNA、宿主菌 RNA、宿主蛋白残留等。

由于 mRNA 测序准确性不如模板 DNA 测序且受限于其转录长度，因此，为保证 mRNA 序列准确性，转录模板的测序是必需的。

（二）mRNA 原液

建议考虑以下质控项目：mRNA 鉴别、mRNA 序列长度、序列完整性及准确性、mRNA 理化特性（如 pH、外观等）、mRNA 含量、加帽率、纯度、产品相关杂质（如不完整 mRNA、双链 RNA 等）、工艺相关杂质（如残留蛋白酶、DNA 模板残留、有机溶剂、金属离子残留等）、无菌、内毒素等。

（三）制剂中间产物

应基于 mRNA 递送系统制备工艺的实际情况，定义制剂中间产物并建立中间体质量标准，可能包括 mRNA 与阳性聚合物材料复合后产物、纳米颗粒中间产物等。中间产物检测是过程控制的一部分，是否定义为中间产物及对应的检测要求应考虑以下因素：（1）该阶段是否为对应检测项目的最敏感阶段；（2）后续生产工艺、制剂处方对活性组分是否存在影响，如是否进行冻干；（3）后续工艺步骤是否需要该步检测，如活性成分含量用于指导配制。

建议考虑以下质控项目，包括物理特性、鉴别、含量、内毒素和无菌等评估。

（1）物理特性：包括 pH、外观、纳米颗粒大小及分散系数（PDI）、Zeta 电位等。

（2）鉴别：通过适当的方法进行确认，如测序、电泳、高效液相色谱等。

(3) 含量检测：包括核酸浓度、mRNA 包封率检测，可采用 A260 法或荧光分析法等适宜方法进行检测。

(4) 工艺相关杂质残留。

(5) 安全性相关分析：包括内毒素、无菌检查。

(四) 成品

建议考虑以下质控项目：产品鉴别与 mRNA 序列确认、含量（mRNA、递送物质及相关辅料）、成品理化特性、纯度及相关杂质残留、生物学活性、安全性指标等。

1. 鉴别

应通过适当方法对 mRNA 及相关递送系统组分进行鉴别。

2. 含量检测

应对 mRNA 含量、mRNA 完整性、mRNA 纯度、递送系统各组分含量、佐剂含量（如适用）、其他特殊辅料含量（如适用）进行检测。

3. 理化特性

包括影响产品安全有效性的关键质控项目，如纳米颗粒粒径及分散系数（PDI）、Zeta 电位、pH 值等。此外还需包括成品的常规属性检测，如外观、装量/装量差异、可见异物、渗透压、不溶性颗粒、残留水分（如适用）等。

4. 纯度及工艺相关杂质残留

包括包封率和工艺相关杂质残留量（如乙醇）等。建议根据贮存过程中脂质组分（如 DOPE 等）氧化/降解产物情况及其对疫苗安全有效性的影响探索适宜的纯度指标并建立适宜检测方法。

5. 生物学活性检测

可采用体外或体内生物学活性检测。研发早期阶段建议根据质量研究部分选择适宜的方法建立体内效力质控检测；必要时，根据产品的作用机理建立细胞免疫检测活性的质控检测。由于生物学活性方法存在较大的变异性，建议设立参考疫苗以适宜的比值方法予以拟定标准限度。

6. 安全性指标

通常包括内毒素、异常毒性、无菌检查等。

(五) 方法学研究和方法学验证

mRNA 原液及其制剂检测过程中选用的检测方法类型、样品的预处理过程（如逆转录、富集、酶切、裂解等）、试验条件等将影响检测结果的可靠性，应对检测方法进行必要的确认，采取多种方法分析 mRNA 纯度、加帽率、脂质纳米颗粒粒径分布等关键指标，并对不同原理方法的相互佐证，根据方法的灵敏性、准确性、精密性和耐用性等验证结果选择适宜的质控方法。

申报临床时提供的方法学验证资料应能初步证实检测方法的适用性，对重要指标或关键质量属性（如包封率、加帽率、Zeta 电位、粒径及其分布、纯度、体外效价、体内效价等）的检测方法，应提供与研发阶段的控制及重要性相符或适用的验证资料；上市阶段应按照相关指导原则提供全面的方法学验证资料。

(六) 标准品

在申报临床阶段应提供建立的参考品或对照品（包括用于核酸含量、纯度和生物活性，包括全序列测定）来源、制备、检定结果、标定过程及稳定性研究（定期复检）等方面的初步研究资料。

六、稳定性研究

mRNA 疫苗稳定性研究与评价应当遵循生物制品稳定性研究的有关指导原则开展研究。

稳定性考察应采用能够反映产品整体质量的敏感指标，应重点考察 mRNA 的理化特性和表达效率：如包封率、活性物质含量、粒径及其分布、Zeta 电位、纳米颗粒的聚集和体内效力，并以 pH 值、外观和微生物负荷/无菌作为补充。稳定性考察条件应考虑温度变化、pH 值变化、光稳定性、湿度（用于冻干的 mRNA）或反复冻融（冷冻储存时）、复溶后或使用中稳定性等方面。

疫苗生产过程中各中间产物如需储存，同样应开展稳定性研究或相关验证研究，应明确储存条件、储存方式并进行可用于生产的相关研究。

七、直接接触制品的包装材料和容器的来源、选择依据及质量标准等研究

除成品制剂需按照相关指导原则开展包材相容性研究并在申报时提交相关资料外，原液、制剂生产工艺中使用的所有与产品接触的耗材（如储存袋、硅胶管、微流控芯片、管道等），需提交相关研究资料或其他适用的支持资料，并提供支持包材相容性的研究数据。

八、应急状态下药学研发的阶段性考虑与研发期间的变更

在应急状态下，为加速疫苗研发、更好为申报资料提供指导性意见，建议在应急状态下考虑早期产品开发采用研发数据积累、样品检测与生产过程控制、放行控制协同考虑，在风险识别基础上及时查漏补缺等策略，但仍需在临床期间按照常规疫苗上市要求对药学研究逐步完善。将在临床试验过程中及时跟进沟通，收集现场反馈信息，根据疫情调整审评策略。

对早期临床研究的药学部分生产工艺、质量特性研究及质量标准等各部分提出初步考虑如下：

（一）种子库

重点关注外源因子检测、DNA 序列一致性问题；同时关注基因序列选择问题，可结合产品毒理、药效学研究结果予以论证。

(二) 生产工艺

若申请人具有前期的工艺平台知识，经初步确认后，可用于新型冠状病毒疫苗生产工艺及工艺控制的初步建立，可在临床期间持续放大和优化工艺参数；但需要确保影响产品安全性的生产工艺步骤的充分开发。建议建立尽可能多的过程控制指标以积累产品知识和工艺知识，以对可能存在的工艺放大中可能出现的问题及其可比性研究奠定基础，待积累并验证充分后再考虑减少控制指标。

可结合前期工艺平台知识，并根据新型冠状病毒疫苗临床前药效、毒理学研究拟定初步的制剂处方及制剂工艺，经初步疫苗稳定性确认后，临床期间开展深入的抗原-佐剂/递送系统相互作用，逐步优化制剂处方。在脂质纳米颗粒制剂工艺放大过程中可能伴随关键设备的不断改变，应关注工艺参数的不断优化及调整以确保脂质纳米颗粒质量的可比性，并对不同规模生产设备的持续验证（清洁、无菌保证、使用次数等）及与产品的相容性等验证。

生产规模应至少满足早期临床研究。对于生产工艺的连续性、可控性的确认应至少通过连续 3 批次的生产予以确证，连续批次确认应尽可能在开展临床试验前完成。

(三) 质量特性研究

在研发早期，应对样品进行初步结构确证，提交研究数据，完整的结构确证数据可在申报新药上市时提交；疫苗的生物效价研究是反应工艺性能和产品质量的综合指标，建议尽早开展相关研究。

(四) 质量标准

由于生产批次、生产规模、质控方法均处于开发的初期阶段，应重点考虑检测项目的全面性，如检测项目应尽可能涵盖产品纯度、工艺相关杂质、产品相关杂质、生物学活性等方面，鼓励临床研究期间积累充分、全面的产品质量检测数据；对于方法学适用性开展初步研究，重要指标或关键质量属性（如保护效力等）的检测方法，应提供与研发阶段的控制及重要性相符或适用的验证资料，而产品相关杂质的确认及全面的方法学验证可在临床期间开展；标准限度可综合临床前毒理研究、工艺放大、稳定性研究等方面初步建立或报告结果，在临床期间通过更多生产经验的积累予以确定。对产品安全性相关的质控指标（如微生物污染控制指标、有

害物质残留等），建议尽早进行方法学验证，至少对适用性进行确认研究。

mRNA 含量等指标主要反映抗原对成品效力的影响，因此，通常成品应进行体内效力检测。上市后可通过足够批次的体内和体外效力数据及其与临床批次的对比分析，评价体外效力代替体内效力的可行性。

(五) 临床申报阶段应提供能够支持临床试验开展的稳定性研究数据

如果有可替代或支持性的其他研究资料（如采用与已上市疫苗同样的包材、辅料、处方等），应提交说明。

(六) 研发期间的工艺变更

药品在研发阶段、尤其是研发早期，药学变更往往是不可避免的。鼓励采用临床试验样品的工艺代表性批次开展临床前药理毒理研究。如存在临床前到临床批次的药学变更，需提供变更前后详细的药学对比信息并对变更后工艺进行详细描述、分析和风险评估，应提供相应的可比性研究数据证明变更未对产品质量产生不利影响。

临床期间可能伴随生产规模放大、工艺优化等持续变更，应开展充分的可比性研究评估变更对产品质量的潜在影响。需提前进行可比性研究的设计，对取样批次、步骤、需要开展的检测予以提前布局，尤其需关注各个研发阶段的代表性

留样问题。此外，抗原含量、动物效力等关键指标标准品的全面研究有利于保证产品质量及标准品的可溯源性。

如质量可比性分析研究不足以证实变更未对产品产生不利影响时，可能需要补充非临床、甚至临床研究数据，如免疫原性比较和必要的安全性比较等。鉴于 mRNA 疫苗的复杂性及目前的有限认知，对于临床期间的重大变更，建议开展变更前后体液免疫、细胞免疫等全面的效力研究的比较分析。

九、名词解释

mRNA 疫苗: mRNA 疫苗是将外源目的基因序列通过转录、合成等工艺制备的修饰后 mRNA 通过特定的递送系统导入细胞、表达目的蛋白、刺激机体产生特异性免疫学反应从而使机体获得免疫保护的一种核酸制剂。

递送系统: 递送系统常常是通过特定的递送材料将核酸药物压缩 (condensation)、复合 (complexing) 和 (或) 包裹 (packaging) 后，增加核酸药物在血液、核酸酶或其它条件下的稳定性，并基于递送系统-细胞相互作用，运送核酸等穿过细胞膜，并使其能够接触到胞质 (对于 siRNAs 和 mRNA) 或进入细胞核 (对于 DNA)，从而使核酸发挥其功能。

多组分疫苗: 指分别构建的携带不同新冠病毒抗原目的基因序列的 mRNA，被共同包装在递送系统中。

十、参考文献

1、苗鹤凡, 郭勇, 江新香, et al. mRNA 疫苗研究进展及挑战[J]. 免疫学杂志, 2016, 32(05): 446-449.

2、林曼, 曾宪成, 洪敏, et al. mRNA 疫苗研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(6): 658-660.

3、Schmid A . Considerations for Producing mRNA Vaccines for Clinical Trials[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1499: 237-251.

4、Hinz T , Kallen K , Britten C M , et al. The European Regulatory Environment of RNA-Based Vaccines[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1499: 203-222.

5、FDA. Guidance for Industry-Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications. CBER. November 2007.

6、Kauffman K J , Webber M J , Anderson D G . Materials for Non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics[J]. J Control Release, 2016, 240: 227-234.

7、FDA. Guidance for Industry-Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation. CDER. April 2018.

8、FDA. Guidance for Industry-Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials (draft guidance). CDER&CBER. December 2017.