

# **预防用 mRNA 疫苗药学研究技术指导原则**

## **(试行)**

国家药品监督管理局药品审评中心  
2026 年 1 月

# 目 录

一、前言 .....	1
二、模板设计、转录模板质粒构建和菌种种子批 .....	3
(一) 抗原序列选择及设计 .....	3
1.目标抗原选择及设计 .....	3
2.共表达组分选择及表达策略 .....	3
3.序列设计验证 .....	4
(二) mRNA 序列设计 .....	5
(三) 模板质粒、种子批的建立和检验 .....	6
1.重组质粒的构建和制备 .....	7
2.种子批的建立与检验 .....	7
3.模板质粒的制备与检验 .....	8
三、生产工艺 .....	8
(一) 一般要求 .....	8
(二) mRNA 原液生产 .....	10
1.生产用主要原材料 .....	10
2.线性化转录模板的制备 .....	12
3.mRNA 合成 .....	12
4.mRNA 纯化 .....	14
(三) 制剂处方及生产工艺 .....	15
1.脂质辅料 .....	17
2.mRNA 包封 .....	19
3.mRNA-LNP 纯化 .....	21

4.mRNA-LNP 冻干 .....	21
5.特殊给药途径的制剂 .....	22
<b>四、质量研究 .....</b>	<b>23</b>
(一) mRNA 的结构分析和理化性质分析 .....	23
(二) mRNA-LNP 的结构分析和理化性质分析 .....	24
(三) 杂质分析 .....	25
(四) 生物学活性研究 .....	27
<b>五、质量标准 .....</b>	<b>28</b>
(一) 转录模板 .....	28
(二) mRNA 原液 .....	29
(三) mRNA-LNP 原液 (如适用) .....	30
(四) 半成品 .....	31
(五) 成品 .....	31
(六) 方法学研究和方法学验证 .....	34
(七) 标准物质 .....	35
<b>六、稳定性研究 .....</b>	<b>36</b>
<b>七、直接接触制品的材料和包装容器 .....</b>	<b>37</b>
<b>八、平台技术产品研发的考虑 .....</b>	<b>38</b>
<b>九、名词解释 .....</b>	<b>39</b>
<b>十、参考文献 .....</b>	<b>40</b>
<b>十一、缩略词列表 .....</b>	<b>41</b>

## 一、前言

mRNA 疫苗是一类将外源目的基因序列通过体外转录、修饰等工艺制备为 mRNA，并通过一定递送系统导入机体细胞，在细胞内表达目标抗原蛋白，从而激发机体产生特异性免疫反应以获得免疫保护的核酸制剂。

mRNA 疫苗具有以下特点：（1）目标抗原蛋白通过体内自主表达；（2）能够刺激机体免疫系统产生体液免疫和/或细胞免疫应答，发挥相应的预防或治疗作用；（3）常用的递送系统在发挥递送作用的同时，具有一定佐剂样功能；（4）mRNA 可在体内降解代谢。

mRNA 疫苗制剂通常较为复杂，其药学研发和生产控制涉及多方面特殊考量，包括：（1）mRNA 序列设计对其稳定性、表达效率、翻译准确性、免疫原性及安全性均可能产生影响，需对目标序列的设计及密码子优化、关键元件的选择及优化、核苷酸的化学修饰等方面开展充分的研究；（2）制剂组成、结构和工艺具有特殊性，涉及递送系统的结构多样性、安全性和递送效率，以及 mRNA-脂质纳米颗粒的结构复杂性等，需要通过经确认的考察指标进行制剂处方组成、生产工艺的优化，以及建立与研发阶段相适应的控制策略；（3）如涉及新免疫调节组分表达和/或新辅料的使用，必要时，需要开展单独的安全性研究；（4）正在开发的 mRNA 疫苗包括非复制型、自复制型、环状 RNA(Circular

RNA, circRNA) 等, 不同类型 mRNA 的作用机制、产品特性等存在显著差异, 且研发进展及技术平台成熟度亦不相同, 需根据临床需求选择适宜的 mRNA 类型, 并基于产品特性和工艺特性开展相应研究。

近年来, 随着 mRNA 技术在预防用生物制品中的应用不断扩展, 此类产品在生产工艺、质量属性及其对产品安全性和有效性影响等方面积累了更多数据。同时, mRNA 技术路线的各项关键技术要素(如生产及检测设备、原辅料、检测方法等)迅速发展。基于上述进展, 药审中心对《新型冠状病毒预防用 mRNA 疫苗药学研究技术指导原则(试行)》的基本要求进行更新, 并增加了自复制型 mRNA 疫苗、环状 RNA 疫苗的相关研究要点。

预防用 mRNA 疫苗的递送系统主要包括但不限于以下类型:

(1) 基于脂质的递送系统, 如脂质纳米颗粒(Lipid Nanoparticle,LNP)、脂质体(liposome)和脂质复合物(lipoplex)等; (2) 基于聚合物的载体系统, 如多聚体(polyplexes)、纳米粒等; (3) 基于脂质和聚合物的复合载体系统, 如脂质多聚体(lipopolyplex)等。基于目前研发及申报现状, 本指导原则适用于以 LNP 为基础的非病毒递送系统, 如采用其他类型递送系统, 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。

## 二、模板设计、转录模板质粒构建和菌种种子批

### (一) 抗原序列选择及设计

抗原的选择和设计应基于系统的科学论证，并提供相关依据。应通过必要的结构、功能及免疫学表征，在不同的研发阶段持续评估和验证抗原序列及其设计对抗原表达、免疫反应类型及强度、安全性和有效性的影响，以支持最终疫苗成品的安全性和有效性。

#### 1. 目标抗原选择及设计

目标抗原的选择是 mRNA 疫苗设计的起点，其氨基酸序列、结构特征及免疫功能决定了疫苗诱导免疫应答的类型和强度。目标抗原序列设计可包括为稳定或获得预期空间构象而进行的序列改造或位点突变，也可包括影响抗原蛋白亚细胞定位的信号肽筛选、以及为调节免疫反应进行的序列融合或辅助组分序列引入等。在产品开发时应开展相关序列的筛选和研究工作。

应提供抗原来源与序列信息，明确目标抗原来源及理论序列（氨基酸序列和对应的 mRNA 核苷酸序列），并结合生物信息学工具分析其与流行病原体或相关毒株的序列同源性及保守性。

#### 2. 共表达组分选择及表达策略

应在充分考虑抗原亚细胞定位（胞外、膜结合、胞内）对其免疫原性影响的基础上，结合抗原特性和预期免疫应答类型，合理设计信号肽以引导其分泌或膜定位。应说明所选信号肽的来源与功能验证情况，提供表达产物细胞定位的研究数据。

除目标抗原外，若引入其他共表达组分，包括用于提高蛋白表达或稳定抗原构象的插入序列、可刺激和/或抑制免疫原性的辅助蛋白或细胞因子等，应进行全面评估，仅在提供充分科学证据证明其对疫苗有效性带来明确获益且安全风险可控的前提下，方可将此类共表达组分纳入产品设计。应阐明其功能和选择依据，说明表达策略（如融合表达或单独表达），并提供其与目标抗原的剂量比例、表达水平、生物活性等研究数据，系统研究分析其对免疫应答强度、偏向性、炎症程度、毒理风险的可能影响。若采用融合表达策略，应评估融合设计对目标抗原空间构象、关键表位暴露及其免疫原性的潜在影响，建议开展融合蛋白的结构和功能表征研究（如质谱鉴定、抗原表位验证、功能活性分析等）。若采用单独表达策略，应分别评估各表达产物的表达效率、生物活性及免疫学效应，关注相互作用可能带来的协同或干扰作用。若共表达组分尚无充分的先验知识，建议根据其功能、类别开展必要的非临床研究，对其安全性、有效性、共表达的合理性及必要性等进行系统评估。

### 3. 序列设计验证

应对抗原设计开展相应的验证工作，对于无法在蛋白层面充分验证的情况，可结合非临床研究、体外功能试验等，综合评估不同抗原序列选择及设计对免疫反应的适用性及潜在影响，包括对免疫类型、强度、持续性、偏向性（Th1/Th2 免疫偏倚）、抗

体依赖的免疫增强 (ADE) 效应、疫苗相关增强性疾病 (VAED) 等的潜在影响。应基于相关疫苗的先验知识 (如呼吸道合胞病毒疫苗等)、非临床研究的风险信号提示、结构确证分析的可行性等进行综合研判，在必要的情况下开展表达抗原的结构、表位及组成等方面的确证性研究。

对于表达产物的结构与功能分析，应提供抗原理论预测信息，包括分子量、等电点、二硫键 (如有)、翻译后修饰位点 (如有) 等。建议结合已有研究或非临床研究数据等，说明该抗原是否能够诱导中和抗体、激活 T 细胞应答或其他特异性免疫反应；在可行的情况下，提供保护效力研究数据作为支持性信息。

## (二) mRNA 序列设计

在目标抗原设计的基础上，mRNA 序列设计是另一个影响疫苗表达效率、稳定性、免疫原性或反应原性的重要环节。应基于抗原表达需求、预期免疫应答类型及体外转录工艺特点，系统开展目标抗原 mRNA 序列与关键元件的优化与功能验证。

目标抗原 mRNA 序列，如对编码目标抗原的 mRNA 序列进行了序列改造或序列优化（如密码子优化、GC 含量调整等），应提供详细的设计依据和目的（如提高 mRNA 翻译效率、降低固有免疫原性、增加稳定性等）、示意图及支持性研究数据。

除目标抗原 mRNA 序列外，需提供其关键元件的来源、设计及确认研究结果，如帽子（Cap）、非编码区（UTR）、poly(A) 尾结构及长度、核苷三磷酸（NTP）类型及其修饰信息（如 N1-甲基假尿苷）等。同时，说明各关键元件对 mRNA 稳定性、翻译效率、免疫原性的影响，以及设计优化的依据和试验验证结果。如采用修饰核苷酸，应明确修饰核苷酸的类型及选用依据、修饰比例等，除免疫原性外，需评估其对 mRNA 翻译准确性的潜在影响。

对于自复制 mRNA，应对体外转录模板设计中额外含有的编码 mRNA 复制酶的相关基因及其调控元件进行阐述，说明其来源、调控方式及反应原性风险控制策略。建议评估复制酶表达及功能，关注 mRNA 复制动力学及潜在的固有免疫过度激活等风险。

对于环状 RNA，应重点阐述转录模板中为实现高效环化引入的自剪接序列或酶促连接位点，以及控制翻译起始的序列元件（如 IRES 或 IRES-like 序列）等，并验证翻译效率及结构准确性。

### （三）模板质粒、种子批的建立和检验

经细菌发酵、纯化获得模板质粒并对其进行线性化处理是目前常用的生产方式，建议至少将线性化质粒的生产作为产品生产工艺的起始阶段。模板质粒作为起始原材料，应确保其在源头环节具备质量可控性、工艺稳定性与批次可追溯性。如转录模板采

用无细胞酶促合成策略制备，需基于工艺特性等开展相关研究及控制。

### 1. 重组质粒的构建和制备

明确构建重组质粒的表达载体来源，对载体的控制元件和选择标记的序列与功能进行阐述，如转录启动子、抗生素抗性标记等。抗生素使用应符合《中华人民共和国药典》的相关要求。应提供构建和制备重组质粒的相关信息和步骤、鉴定及其确证方法，并对用于生产目标 mRNA 分子的全长核苷酸序列进行确认分析。

### 2. 种子批的建立与检验

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批系统，提供完整的检验报告，并确保批次记录可追溯。

明确所用宿主菌株的来源、基因型、表型特征，提供目标克隆筛选和验证的流程及相关研究数据。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批系统。说明各级种子批的制备规模、保存条件、扩增条件。

种子批的检验应保证其无外源因子污染及基因序列的准确性，包括细菌形态学、培养物纯度、质粒限制酶切图谱、目标基因和关键元件测序（如 poly(A)尾等）、质粒保有率、质粒拷贝数、抗生素抗性等。

开展种子批贮存稳定性和传代稳定性考察，对 poly(A)尾等

进行稳定性分析，通过贮存稳定性研究确定种子批的保存条件，根据传代稳定性研究明确各级种子批的限定传代次数。

### 3. 模板质粒的制备与检验

模板质粒的生产工艺通常包括发酵、收菌、裂解和纯化等工艺步骤，应提供其生产工艺、质量研究、质量控制等研究资料，并应建立完整的批记录以保证可追溯性。应对关键工艺参数及其控制范围进行确认，建立相应的过程控制检测标准，包括序列准确性、超螺旋比例、杂质残留等，并进行充分表征研究及质量控制。制定覆盖关键质量属性的质量标准，主要包括：鉴别、浓度/含量、测序、杂质（如宿主菌 DNA、宿主菌 RNA、宿主蛋白残留、抗生素残留等）、超螺旋比例、poly(A)尾长度及分布、内毒素和微生物限度等。

如需贮存，应明确其贮存条件、贮存方式并进行相关支持性研究。

## 三、生产工艺

### (一) 一般要求

鼓励基于质量源于设计（Quality by Design, QbD）的理念进行工艺开发，并结合科学合理的试验设计（Design of Experiment, DoE）方法，通过风险评估来识别并逐步确定目标产

品关键质量属性 (Critical Quality Attribute,CQA)，及其与关键物料属性(Critical Material Attribute, CMA)和关键工艺参数(Critical Process Parameter, CPP)之间的关系，进而构建工艺设计空间，确立生产工艺及工艺过程控制策略，并根据对产品理解的不断加深及新知识、新经验的积累持续优化更新。

非临床研究批次与临床研究批次相比应具有一定的代表性。临床研究批次的制备工艺应具备一定规模，并具有一定的生产连续性、工艺稳健性和放大可行性。生产的连续性和可控性可结合开发阶段、先验知识、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，以建立稳健的控制策略，持续确认工艺的一致性。建议确证性临床用样品采用与拟上市产品一致的生产工艺和规模，对于临床期间的变更，需参照国内外相关指导原则进行充分的可比性研究。

上市申报前应确定关键工艺参数，建立覆盖全流程的生产工艺过程控制策略，包括工艺操作参数控制、中间产品质量属性以及相应的检测方法等，并进行全面的商业化规模生产工艺验证。工艺验证内容一般包括工艺的一致性、关键参数的稳健性、产品相关杂质和工艺相关杂质的去除、产品质量属性批间一致性等。执行工艺验证时，除常规的过程控制及放行检测项目外，应适当增加取样节点和测试项目，以考察工艺过程控制、中间产物及最终成品的一致性及工艺稳健性。应持续关注关键物料属性、关键

工艺参数控制的稳健性等，以及其对产品关键质量属性的影响。

原液和制剂生产过程中原则上应避免使用人源或动物源性材料。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安全性评估。

## （二）mRNA 原液生产

mRNA 原液的生产工艺通常包括 DNA 模板线性化、mRNA 体外转录合成、DNA 模板消化去除、mRNA 纯化等步骤。根据反应机制的不同，非复制及复制型 mRNA 的加帽和/或加尾、环状 RNA 的环化可在转录过程中同步进行，也可在转录后作为单独的工艺步骤实施。

应明确生产工艺流程，提交流程图，说明各工艺步骤的目的、工艺操作、过程控制策略、物料流转路径及中间产物情况等。应提供原液生产各工艺步骤的研究内容，探索和优化工艺参数，阐明关键工艺参数及其对关键质量属性的影响，建立稳定、可控的工艺流程，并制定相应的过程控制策略。

### 1. 生产用主要原材料

生产用原材料应符合《中华人民共和国药典》相关规定和/或与国际通行要求一致。应提供原材料的来源、用途、关键质量属性、质量标准及检验报告等，重点关注原材料的纯度、杂质控制、

批间一致性、贮存及使用过程中的稳定性等。

起始原材料，除转录模板外，还包括核苷酸(含修饰核苷酸)、5'-帽类似物等，应说明其结构、选择依据并提供相应研究数据，其质量标准应含有能够充分表征主要化合物及相关杂质的鉴别和纯度检测，如采用质谱、核磁、HPLC 等方法。应严格控制核酸酶、金属离子等残留量及其污染的可能性，评估其对 mRNA 转录效率、杂质产生及后续包封效率的影响。

关键原材料，主要包括用于 mRNA 体外合成使用的各种酶（如 RNA 聚合酶、DNase、RNA 环化使用的连接酶及 RNase R 等）以及 5'-加帽试剂等。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 RNA 聚合酶、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，应对酶的特异性、保真度（如适用）、酶活性等予以控制，并考察其稳定性，开展 RNA 聚合酶对 dsRNA 含量影响的研究。

其他原材料，主要包括缓冲液、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。生产过程中使用的反应及纯化介质（层析柱、磁珠、过滤膜）应具有稳定的物理和化学特性，且与直接接触的溶液、中间产物等具有良好的相容性。

## 2. 线性化转录模板的制备

如采用酶切线性化工艺制备转录模板，应系统研究并优化相关工艺参数，包括：模板质粒浓度、限制性内切酶的类型与用量、孵育时间和反应温度等。应对转录模板制备的关键工艺参数及其控制范围进行确认，并采用适宜指标开展工艺验证，如线性化效率（如适用）、模板浓度、序列准确性、纯度以及杂质残留等。

## 3. mRNA 合成

提供详细的 mRNA 合成工艺步骤，并对关键工艺参数及其控制范围进行研究与确认，包括：

(1) 体外转录工艺，应提供缓冲体系组成、RNA 聚合酶类型及其浓度、NTP 浓度及比例、帽类似物类型及浓度（如适用）、反应时长与温度、终止反应条件等工艺参数及其研究数据，重点考察序列准确性与完整性、加帽率、dsRNA 含量、poly(A)尾长度及分布等。

(2) 加帽工艺（如为单独的工艺步骤），应提供 mRNA 预变性条件（如预热温度与时间）、加帽反应缓冲体系、关键物料（如加帽酶、鸟苷三磷酸、S-腺苷甲硫氨酸、RNA 酶抑制剂、甲基转移酶等）的投料比与补料方式、反应时长和温度等工艺参数及其研究数据。如需进行去磷酸化处理，应提供磷酸酶浓度、反应温度、反应时间等工艺参数及其研究数据。应对工艺过程中加

帽效率、潜在的 mRNA 降解、序列完整性、不同加帽结构（如 Cap-0、Cap-1、Cap-2 等）及其比例等进行研究和确认。

(3) 加尾工艺，目前多采用共转录加尾工艺，即在转录模板中预先设计 poly(T) 序列以实现 poly(A) 的同步转录。如采用转录后酶促加尾法，应对反应时间与温度、poly(A) 聚合酶浓度和 ATP 浓度等工艺参数进行研究，重点考察 poly(A) 尾的长度分布、加尾效率及含尾 mRNA 的比例，确保 poly(A) 尾的功能性与均一性。

(4) DNA 酶处理工艺，应明确用于去除转录模板的核酸酶类型、酶浓度、处理时长和温度、终止反应条件等，并提供相关研究数据。开展转录模板去除效率相关研究，建立转录模板残留的检测方法并设定控制限。

(5) 环化工艺（如适用），若采用核酶介导的自剪接环化策略，应明确反应缓冲体系、RNA 聚合酶浓度、反应时长和温度、核苷酸浓度、终止反应条件等参数；若采用蛋白连接酶介导的环化策略，应明确投料浓度和比例（如夹板寡核苷酸（如适用）、RNA 底物、连接酶）、反应时长和温度、反应缓冲体系、终止反应条件等。环化工艺应关注环化效率，分析环化过程中产生的杂质种类并控制其残留量。对于核酶介导的环化体系，杂质包括未环化的前体线性 RNA（precursor RNA）、环化过程中产生的非目标 RNA（如自剪切产生的小片段内含子 RNA、未反应完全的

中间体 RNA 和较大尺寸多联体 RNA 等) 以及开环异构体切口 RNA (nicked RNA) 等; 对于连接酶介导的环化体系, 杂质包括未连接的前体线性 RNA、非特异连接的多联体 RNA (线性或环状)、投入的夹板寡核苷酸残留 (如适用) 以及开环异构体切口 RNA 等。

应对上述工艺步骤产物进行产品相关杂质的确认, 并建立必要的过程控制检测, 如加帽率 (如适用)、poly(A)尾产物长度及分布 (如适用)、mRNA 序列完整性、mRNA 产物浓度、杂质类型及残留量等; 对于环状 RNA, 应额外进行环化效率等控制。

#### 4.mRNA 纯化

在产品开发过程中, 应明确 mRNA 生产过程中潜在产品相关杂质与工艺相关杂质的来源, 并逐步建立系统的杂质谱, 基于工艺特性及产品特性合理选择纯化策略。明确各纯化工艺步骤的目的和作用, 确定关键工艺参数及过程控制策略, 系统评估各纯化工艺步骤对杂质去除率和 mRNA 回收率的影响, 开展相关研究及验证, 以确保杂质控制的有效性和工艺的批间一致性。如采用蛋白酶 (proteinase) 与超滤浓缩工艺, 应对蛋白酶添加量、反应时长和温度等进行优化, 保证有效去除蛋白质残留的同时评估其对 mRNA 结构完整性的影响, 并对蛋白酶残留进行质控。如采用柱层析纯化工艺, 应对填料选择依据、动态载量以及杂质去

除率等进行研究，需要明确配基来源（合成或生物），关注和评价填料的稳定性和配基脱落情况等。

对于自复制 mRNA 疫苗，由于其序列长度明显增加，应在纯化工艺开发及验证中对 mRNA 完整性等予以重点关注。

对于环状 RNA 疫苗，因未环化的前体线性 RNA、环化中间体 RNA、开环异构体切口 RNA 等产品相关杂质与目标环状 RNA 分子量相近，分离难度大，且部分杂质（如未经处理的残留 5' 三磷酸线性 RNA）可能引发固有免疫激活反应，在纯化工艺开发及验证中应确保相应杂质得到有效去除及有效控制，并结合最终产品的固有免疫激活水平予以确认。纯化工艺中如果使用 RNase R 富集环状 RNA 分子，考虑 RNase R 的非特异性切割，应对 RNase R 添加量、反应缓冲体系、反应时长等进行优化，考察上述工艺参数对于环状 RNA 富集效果、非特异性切割引入新杂质、RNase R 残留等的影响。

### （三）制剂处方及生产工艺

制剂处方、生产设备及工艺参数是影响 mRNA-LNP 结构形态、递送效率、生物学活性等的关键因素，应在产品早期研发阶段加强制剂处方及生产工艺的科学系统优化，通过在不同工艺步骤和稳定性考察阶段取样进行质量研究，加深对产品工艺特性以及关键质量属性与产品安全有效性的关联性及关联程度的理解。

加强制剂工艺研究，建立科学合理的过程控制体系和质量标准，确保 mRNA-LNP 在结构均一性、稳定性及批间一致性方面具备良好表现。

应提供完整的制剂处方及其确定依据，明确制剂处方中每种组分的功能、含量及其选择依据。可结合前期平台知识，通过不同制剂处方和工艺条件的探索研究，基于 mRNA 与 LNP 间的相互作用、脂质成分间的相互作用、产品安全性与有效性、对制剂工艺的潜在影响等筛选和确定初步的制剂处方。通过非临床研究、早期临床研究进一步确定目标临床剂量及最终的制剂处方，并在确证性临床中予以验证。拟上市产品的制剂处方（包括配制点浓度、规格等）应与确证性临床用样品一致。

制剂工艺开发应提供系统的研究资料，建议以关键质量属性为考察指标对制剂关键工艺步骤及工艺参数控制范围的合理性进行全面研究及确证，如包封率、粒径大小及分布、载药量、氮磷比（可质子化氮原子与 mRNA 中磷酸基团的摩尔比）与目标理论值的一致性等。充分考虑生产工艺的可放大性与批间一致性，关注生产时长、流速及压力等对产品关键质量属性的影响，合理选择工艺设备并优化工艺参数，确保产品质量的可控性与稳定性。

## 1. 脂质辅料

mRNA 疫苗的递送系统对 mRNA 包载、释放、稳定性、免疫原性及安全性等发挥重要作用。常见的 LNP 递送系统通常由可电离脂质、辅助脂质、胆固醇、聚乙二醇脂质组成，其开发及优化应综合考虑脂质辅料的组分类型、结构特性、含量及比例(如氮磷比、脂质辅料摩尔比等)等对产品安全性和有效性的影响。应提供脂质辅料的选择依据、来源(天然或化学合成)、生产用原材料、生产工艺、杂质谱、质量标准和稳定性等研究资料，并建立适宜的控制策略。

建议对用于 LNP 制备的脂质辅料开展工艺研究和优化，提高工艺稳健性，开展不同批次脂质辅料对 mRNA-LNP 包封效率、纯度和粒径均一性等方面的研究，以确保 mRNA-LNP 的批间一致性和质量可控性。

脂质辅料应进行结构确认(如采用红外、核磁、质谱等方法)、纯度/含量测定、相关杂质(如工艺杂质、副产物以及储存过程中可能产生的降解/氧化杂质、重金属等)、安全性指标(如内毒素、微生物限度)等的质量研究及质量控制。应对脂质辅料、mRNA-LNP 及相应稳定性研究样品开展质量研究，系统分析贮存期间及不同条件下脂质杂质的变化趋势，对相应杂质进行鉴别、结构解析与归属研究，并分析其对产品质量、安全性和有效性的影响。考虑到可电离脂质分子结构直接影响 mRNA-LNP 的组织或器官

靶向性、体内代谢动力学和细胞毒性，在筛选及研究中除药学评价指标外，需结合非临床研究数据进行综合评估。对于因手性或其他结构因素而存在异构体的可电离脂质，建议基于多批次脂质对安全性、递送效率及 mRNA-LNP 关键质量属性影响的研究数据，综合考虑分子设计意图和工艺路线等因素，必要时对异构体组成（如各异构体比例或含量）进行控制（如研究数据提示不同异构体在安全性和/或效力方面存在差异，和/或产品设计及工艺控制明确指向特定异构体等情形）。对于聚乙二醇脂质，应关注聚乙二醇链长度、连接方式（如酯键、酰胺键等）、聚合度、端基脂质的取代率等结构信息，建议关注其对 mRNA-LNP 稳定性、递送效率、免疫原性的影响。

对于已商品化的脂质辅料，除提供上述药学研究资料外，如其已在国内外产品中使用，可提供既往已完成的非临床研究和人体使用的安全性研究数据等作为支持性信息。鉴于不同脂质辅料生产商的工艺、杂质谱可能存在差异，建议尽早确定脂质辅料的生产商（尤其是可电离脂质、聚乙二醇脂质等），在脂质辅料首次选用、供应商变更、生产工艺发生重大变更时，建议对脂质辅料进行全面的质量研究，积累相关研究数据，确保变更对产品质量不会产生不利影响，必要时开展非临床/临床研究。

对于尚未在国内外产品中使用的新型脂质辅料，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（包括生产工艺、质量研究等）、安全性及其功能效应进行详细的研究。提供脂质辅料结构设计的依据（如头部基团、连接片段、疏水性尾部等）及相关研究数据，并说明与已上市产品所用脂质结构的异同；生产工艺方面，提供各工艺步骤的目的、工艺流程、工艺参数探索和优化研究数据、杂质去除效率等；质量研究方面，除涵盖脂质辅料常规质控指标外，同时应关注脂质降解杂质、其与 mRNA 和其他脂质组分相互作用等；安全性研究方面，包括潜在毒性、可降解性、与其他化合物分子的反应性及潜在新化合物的安全性和代谢分解能力等；有效性研究方面，建议涵盖新型脂质分子体内外递送 mRNA 效果、体内组织器官靶向性以及体内递送后免疫原性等；鼓励开展新脂质及其制备的 mRNA-LNP 理化及结构特征（如疏水性或电荷性、形成 LNP 的粒径大小及分布等）对疫苗生物学活性的影响等研究。

## 2.mRNA 包封

以 LNP 为递送系统，其包封过程一般通过可电离脂质在酸性条件下与辅助脂质以及 mRNA 共同自组装而成。

mRNA 包封工艺通常将溶解于有机相中的脂质辅料与溶解在水相缓冲液中的 mRNA 以特定方式混合，诱导纳米颗粒的自组装。明确包封工艺设备原理、生产商等，并提供设备相关参数（如管道直径、管路形态设计等）。应以关键质量属性为考察指

标，对包封工艺进行研究和优化，确定关键工艺参数、控制范围及其制订依据，建立适当的中间过程控制策略（如监测包封过程的电导、压力及流速等）。mRNA 包封工艺的关键工艺参数包括但不限于：水性缓冲液 pH、物料浓度（如 mRNA 和脂质辅料浓度）、混合流速和流速比、稀释缓冲液组分及稀释倍数等。应关注 mRNA-LNP 形成过程及后处理工艺过程对 mRNA-LNP 质量特性（如形态、聚集度、粒径大小及分布、mRNA 完整性）以及稳定性的影响，同时建议关注氮磷比、表面电位等与 mRNA 稳定性、递送效率、表达效率之间的关系。

含有一种以上目标 mRNA 分子的疫苗可能存在多种设计方式，如序列串联、马赛克序列、LNP 分别包封不同 mRNA 后再混合（先包后混工艺）、不同 mRNA 原液混合后包封（先混后包工艺）等。对于后两种情形，应基于序列设计、产品属性等选择适宜的工艺路线，评估不同设计方式对包封效率（如 mRNA 序列长度、荷电量等对包封时序列选择性的影响）、关键质量属性（如粒径大小及分布等）以及生物学活性（特异性免疫及共同免疫应答）的影响，重点关注制剂均一性、各组分的相容性及稳定性。建立各目标 mRNA 的含量、生物学活性等关键指标的分型质控标准。

对于自复制 mRNA，如果编码复制酶的 mRNA 序列和表达目标抗原的 mRNA 序列设计在不同分子上，应考虑不同 mRNA

序列对包封效率、关键质量属性、表达效率及半衰期的影响，基于实现自复制特性合理选择包封工艺。

### 3.mRNA-LNP 纯化

mRNA-LNP 纯化通常采用超滤换液工艺，应对超滤系统（如中空纤维或膜包）、缓冲液组分及浓度、工艺参数（如压力、浓缩换液倍数）等开展研究，建立适当的中间过程控制（包括粒径大小及分布、包封率等）。提供工艺相关杂质和产品相关杂质去除效果的相关研究资料。

提供各工艺步骤添加的缓冲液、pH 等信息，在工艺开发及验证过程中应对不同制剂阶段（包封、超滤过程、除菌过滤后）关键质量属性（如包封率、粒径大小及分布等）及颗粒形态等进行变化趋势监测，进一步阐述与论证 mRNA-LNP 的形成过程及作用机制。

### 4.mRNA-LNP 冻干

对于采用冻干剂型的产品，应系统开展冻干保护剂、缓冲体系及复溶介质的筛选研究，并对冻干工艺进行充分评估。开展冻干工艺对产品质量属性影响的研究，特别是冻干前后 mRNA-LNP 关键理化特性（如粒径大小及分布、包封率等）、结构特征以及生物学活性等的比较研究，并结合 mRNA-LNP 稳定性等论

述剂型选择的合理性。应基于产品特性优化冻干工艺，并明确关键工艺参数及其控制范围。

此外，为确保最终制剂的安全性和有效性，还应确保冻干前样品具备良好的质量稳定性及工艺可控性，以提高冻干产品复溶后的结构完整性与关键质量属性的一致性。

## 5.特殊给药途径的制剂

如采用肌肉注射外的其他给药途径（如吸入、鼻喷等），应根据其特性及作用机制等对制剂处方及生产工艺开展针对性研究，关注 mRNA-LNP 粒径大小及分布、包封率、完整性等关键质量属性是否可满足相应给药途径要求，并评估给药过程中可能存在的剪切力等对 mRNA-LNP 关键质量属性、稳定性、安全性的影响。

如采用微针制剂，除开展微针本身机械强度、皮肤穿刺能力、以及递送效率等药物递送属性的研究外，需进一步评估 mRNA 分子、脂质辅料与微针基质辅料的相容性，关注微针制剂工艺、释放、运输、贮存过程中对 mRNA-LNP 关键质量属性、颗粒形态、含水量、释放效率等的影响。

## 四、质量研究

mRNA 疫苗质量研究通常包括结构特征、理化性质、纯度、杂质（工艺相关杂质及产品相关杂质）、生物学活性以及免疫学特性等方面。

质量研究需选择代表性批次（如非临床研究批次、临床研究批次、商业化规模批次）和/或适当生产阶段的样品作为研究对象。

鼓励根据产品自身特点，开发更先进的分析方法，同时应关注取样样品的代表性、样品的处理和分析过程，避免预处理等分析过程对产品质量产生影响，导致分析结果无法反映样品的实际质量。由于 mRNA-LNP 的结构特性等可能影响产品的安全性和有效性，而现有 mRNA 疫苗放行质量标准尚不能充分表征 mRNA-LNP 结构特征等，建议结合多种互补分析技术、从不同维度进行质量研究，提供尽可能全面的信息以反映样品的质量属性，积累并分析 mRNA-LNP 形态结构及稳定性等属性与疫苗安全性和有效性的关系。

### （一）mRNA 的结构分析和理化性质分析

mRNA 质量特性研究主要包括物理特性（如外观、pH 等）、核酸序列正确性（包括编码序列及影响翻译表达效率的关键元件，关注插入/缺失/点突变情形）、mRNA 含量、mRNA 完整性、mRNA 聚集体、帽子结构及加帽率（如适用）、poly(A)尾长度及分布（如

适用)、含有 poly(A)尾 mRNA 的相对含量(如适用)、mRNA 修饰比例(如适用)等。

mRNA 和脂质辅料之间的相互作用可能受其序列长度及二级结构影响，进而可能影响 mRNA-LNP 的粒径大小及分布、表面电位及稳定性等，鼓励采用多种互补分析技术开展 mRNA 结构表征研究，如圆二色谱法、差示扫描量热法等。

此外，自复制 mRNA 需额外关注其自复制的控制机制，评估复制酶的活性、复制效率以及其潜在固有免疫原性和安全性，鼓励探究影响其在细胞内自复制表达的关键因素，如自复制的终止机制等。

对于环状 RNA，重点关注环化位点的序列准确性、环化比例等。

## (二) mRNA-LNP 的结构分析和理化性质分析

除 mRNA 的序列长度及二级结构外，mRNA 与 LNP 之间的相互作用还受脂质辅料组分及结构等因素的影响，需结合 LNP 与 mRNA 相互作用的机制及特性开展必要的质量研究。研究内容应涵盖 LNP 颗粒特性(如微观形态、粒径大小及分布、颗粒数和颗粒浓度、脂质成分均匀性)、LNP 包封特性(如包封率、mRNA/脂质比例、载药量、mRNA 在 LNP 中定位、不同条件下 mRNA 体外释放特征)、LNP 表面特性(如表观 pKa、等电点 pI、

Zeta 电位、表面 PEG )、其他理化特性 (如鉴别、含量、mRNA 完整性、不溶性微粒、pH) 和安全性指标(如细菌内毒素、无菌) 等方面。PEG 密度会影响 mRNA-LNP 的表面特性，进而影响产品的稳定性、细胞相互作用和免疫反应特性，鼓励对 mRNA-LNP 的 PEG 密度和分布开展拓展性研究。

开展制剂过程不同阶段产物 (如包封、pH 调节、超滤、半成品及成品) 的关键质量属性研究，如粒径大小及分布、包封率、载药量等。鼓励采用多种互补分析技术对 mRNA-LNP 的结构及理化特性进行研究，如形态结构、粒径大小及分布、颗粒浓度、热稳定性、mRNA-LNP 颗粒成分均匀性、mRNA 与脂质复合过程中可能产生的杂质 (如 mRNA-脂质加合物) 等。冷冻电镜是 mRNA-LNP 形态结构考察的常用方法，建议建立规范化的操作流程，将其应用到关键工艺步骤及其中间产品的表征研究、工艺过程稳定性及贮存稳定性研究。持续积累数据开展 mRNA-LNP 形态结构及质量属性与疫苗生物学活性、稳定性的相关性研究。

### (三) 杂质分析

mRNA 疫苗生产、贮存过程中可能产生多种潜在杂质，包括工艺相关杂质和产品相关杂质。对于《中华人民共和国药典》收纳的杂质检项，应符合相应标准。对于产品特异性的杂质应在研发过程中逐步识别、积累相关数据，并最终建立适宜的质控策略。

对于早期临床试验申请，可初步识别潜在的产品及工艺相关杂质，根据来源、风险及残留量等，对主要杂质进行安全性风险评估，尽可能进行全面的监测。在上市申报前需进一步进行杂质的分离、鉴别及结构确证研究。应监测相关杂质在生产和贮存过程中的动态变化情况，评估其是否显著增加，结合逐步开展的非临床及临床研究评估其是否可能影响疫苗的安全性与有效性。参考 ICH Q6B 所阐述的原则评估其安全性风险，确定是否将相关杂质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着研究的逐步推进加强限度标准要求。

mRNA 产品相关杂质建议关注可能影响其生物学功能或诱发非特异性免疫反应的成分，包括但不限于转录不完全或 mRNA 降解/断裂导致的截短序列、聚集体、长 RNA、dsRNA、加帽不完全的 mRNA、不同帽子结构的相关杂质、缺失 poly(A)尾的 mRNA、去磷酸化不完全的 mRNA、mRNA 氧化产物等。对于环状 RNA，应关注其特有的杂质类型。建议采用高通量测序技术对 mRNA 序列中的缺失、插入或突变等杂质进行鉴定与评估。

mRNA 工艺相关杂质应结合工艺特点进行相关研究，包括但不限于总蛋白残留、各类添加蛋白酶残留（如 RNA 聚合酶、无机焦磷酸酶、DNase 等）、DNA 模板残留、NTP 和帽类似物残留、缓冲液成分、金属离子以及有机溶剂等。

除 mRNA 产品相关杂质、mRNA 工艺相关杂质、在制剂制备及贮存过程中可能降解或失活的 mRNA、工艺残留溶剂等杂质外，还应关注脂质辅料杂质及相关化学反应产物，包括氧化产物、降解产物、脂质分子间化学反应生成的杂质（如酯交换反应）、mRNA-脂质加合物等。此外，对于纳米颗粒聚集产生的颗粒物、未包载 mRNA 的 LNP（Empty LNP）、在制剂制备及贮存过程中产生的可能影响产品安全有效性的 LNP 形态（如空泡结构、颗粒融合等）等也需开展相关研究。

#### （四）生物学活性研究

体外生物学活性研究主要为抗原表达量的定量检测。

体内效力研究，通过药效学等研究系统评估其体液免疫和细胞免疫应答，同时建议开展同类品种的比较研究。

在产品研发期间，建议同步开展体外生物学活性、体内效力的监测及数据积累，积累疫苗生物学活性检测结果与动物攻毒保护效果、人体临床试验等结果的相关性数据，从而确定适宜的疫苗效力控制及评价方法。

对于自复制 mRNA，建议采用体外细胞模型及体内模型等多种研究手段开展表达动力学、抗体产生动力学等研究，为该技术路线的选择提供依据。由于自复制 mRNA 体内转录过程中仍会产生 dsRNA，建议开展相关炎症反应及其潜在风险的相关研究。

环状 RNA，除开展翻译效率、蛋白表达水平研究外，考虑其线性 RNA 杂质、未使用修饰核苷酸等可能引发的免疫反应，建议开展免疫反应类型强度、持久性以及其引发的免疫反应类型是否与目标适应症相匹配等相关研究。

## 五、质量标准

建议参照国内外相关指导原则，考虑 mRNA 技术路线的产品特点，综合工艺验证、质量研究、稳定性研究、非临床研究和临床研究批次的研究数据等确定质量标准。质量标准的检测项目需结合控制策略等进行综合评估，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、稳定地去除，可结合工艺进行控制，相关残留物检测可不列于检测项目中。对于在贮存过程中易发生变化，且与产品安全性和有效性相关的检测项目，建议同时设置放行标准和货架期标准。

申报临床时可根据工艺确认资料初步拟定质量标准；上市阶段应按照相关指导原则进行风险控制分析并基于工艺验证情况提供完整的质量标准及方法学验证资料。

### （一）转录模板

建议考虑以下质控项目：pH、外观、鉴别、模板浓度/含量、测序、纯度、poly(A)尾长度及分布、线性化效率（如适用）、超螺旋比例（适用于模板质粒）、杂质残留（如总蛋白残留、宿主

菌 DNA、宿主菌 RNA、宿主蛋白残留、抗生素残留等）、微生物限度、内毒素等检测。

杂质残留可根据生产商、生产工艺等实际情况在模板质粒或线性化转录模板中进行质控，如宿主菌 DNA、宿主菌 RNA、抗生素残留等已在模板质粒中质控，则线性化转录模板可不重复检测；通常模板质粒进行宿主蛋白残留检测，线性化转录模板进行总蛋白残留检测。

## （二）mRNA 原液

建议考虑以下质控项目：鉴别、mRNA 测序（除目的抗原序列外，还应考察自复制 mRNA 复制酶基因、环状 RNA 的环化位点等序列准确性）、mRNA 原液理化特性（如 pH、外观等）、mRNA 含量、加帽率、poly(A)尾长度及分布、mRNA 纯度/完整性、产品相关杂质（如 dsRNA、聚集体等）、工艺相关杂质（如蛋白酶、DNA 模板、有机溶剂残留等）、生物学活性（如目标蛋白表达）、安全性指标（如无菌、细菌内毒素）等。

mRNA 完整性，旨在考察完整全长 mRNA 分子（含帽子、poly(A)等关键元件）所占的比例（如是否可区分完整序列、无尾序列、短尾序列等），应根据产品特性及生产工艺合理选择检测方法。不同产品结构对完整性检测可能产生不同影响，建议采用两种原理不同的检测方法（如 RP-HPLC、毛细管电泳法）互为补充。对不同检测方法的分离效果等开展分析研究，应采用能反映产品批间差异和稳定性变化趋势且灵敏度较高的检测方法。同时

应根据产品特性及验证数据设置合理的积分范围，包括但不限于积分范围与产品有效性的相关性研究、杂质峰的分离确证、样品经强制降解后积分范围是否还能有效表征产品质量等。

加帽率、poly(A)尾长度及分布与产品的安全有效性密切相关，关键批次建议采用质谱法检测，开展结构解析及不同组分（包括不同帽结构、poly(A)尾长度）占比研究，积累生产工艺对不同组分占比的影响及其质量属性范围与产品安全有效性的相关性。若拟采用其他方法（如 RP-HPLC）进行放行检测，应用质谱法进行替代方法的性能验证并建立经确证的参考品。

对于自复制 mRNA，应结合此类产品自身结构特点及生产特性进行质量标准的制定，对复制酶 mRNA 分子、目标抗原 mRNA 分子分别进行相应质控，同时建议对复制酶活性或复制酶的表达水平进行质控。由于自复制 mRNA 的序列长度明显长于非复制型 mRNA，应对其序列完整性予以重点关注。

对于环状 RNA，应对完整环形 RNA 的占比进行质控，不断完善检测方法的准确度，开展全面的方法学验证。同时应基于成环机制制定相应的杂质质控策略，除聚集体、线性前体 RNA 杂质、开环异构体切口 RNA 外，如采用核酶介导自剪接环化法需关注内含子片段等；采用连接酶介导环化法需关注连接酶和核酸外切酶残留等。

### （三）mRNA-LNP 原液（如适用）

基于工艺关键性和风险控制策略对制剂关键中间产物设置必要的质控项目，确保关键质量属性受控，以支撑后续工艺的稳健性。以 mRNA-LNP 原液为例，建议进行粒径大小及分布、包封率、mRNA 含量、无菌等检测。

#### (四) 半成品

半成品应按照《中华人民共和国药典》进行无菌检查。

#### (五) 成品

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

(1) 鉴别：应通过适当方法对 mRNA 及 LNP 组分进行鉴别，对于含多个 mRNA 的疫苗，应确保各 mRNA 成分可特异性区分。

(2) 含量检测：mRNA 含量、各脂质组分含量、辅料含量（如必要）等。mRNA 含量，应对各目标 mRNA 含量分别进行质控，并确认每种 mRNA 与其他 mRNA 的比例符合预期。

(3) 理化特性：包括影响产品安全有效性的关键质控项目，如包封率、粒径大小及分布、Zeta 电位（如适用）、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、不溶性微粒等。如为冻干制品，应进行残留水分质控。

粒径大小及分布，为生产工艺和稳定性考察中的敏感指标，通常采用动态光散射法（Dynamic Light Scattering, DLS）进行放行检测，其结果代表具有相同平动扩散系数的等效球形颗粒直径，需重点关注 mRNA-LNP 均一度、颗粒形态等对检测结果的影响。建议结合 mRNA-LNP 的表征研究、不同原理方法粒径大小及分布检测结果等，进一步对 DLS 检测方法的适用性进行确认。

（4）纯度及杂质残留：建立 mRNA 完整性质控。杂质包括工艺相关杂质残留量(如残留溶剂等)和产品相关杂质残留量(如 mRNA 降解产物、脂质降解产物、mRNA-脂质加合物等)。

脂质杂质，除总杂、特定单杂外，申报临床时应至少报告其他脂质杂质检测结果。建议结合脂质辅料和制剂稳定性考察优化脂质杂质相关检测方法，随着检测方法灵敏度提升可能检出更多杂质，应根据 ICH Q6B 等指南所阐述的原则逐步积累数据并建立相关杂质的控制策略。建议根据脂质杂质种类及含量变化情况，同时结合非临床及临床研究数据综合评价其对疫苗安全有效性的影响，建立相应的杂质控制限度，必要时进行脂质辅料的进一步开发。不同脂质供应商、同一脂质的不同批次均可能存在脂质杂质差异，建议疫苗上市许可人建立充分的质量研究体系，综合

供应商审计、自检数据等进行风险评估，并充分完善脂质质量控制体系。

(5) 生物学活性检测：研发早期阶段应根据质量研究数据选择适宜的方法建立体内效力放行检测，建议结合先验知识、药效学研究等，合理选择试验用动物、免疫程序、免疫途径及免疫剂量等；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；尽早开展相关研究，并关注研究方法以及标准物质的可溯源性。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。

鼓励进行体外活性与体内效力相关性研究，用于替代体内效力的体外方法可能是影响产品生物学活性的多个指标的组合，如包封率、mRNA 完整性、mRNA 含量等。相关体外方法或其组合应具备以下前提：①经过全面的方法学验证；②能科学合理地检测出与生产过程控制相关的差异；③能够指示体内外生物学活性的变化趋势；④根据具体情况，积累并比较体外活性和体内效力方法的性能。建议在临床前和临床阶段开展多批次产品体内和体外活性的同步研究，积累并分析体内外生物学活性与临床保护效果和安全性的相关性。采用不同条件处理样品（如不同 mRNA 完整性、粒径大小及分布）开展体内外生物学活性研究，确证体外活性方法的性能并与体内效力进行比较。

(6) 安全性指标：通常包括细菌内毒素、无菌检查等。

对于 mRNA 联合疫苗，应对各目标 mRNA 的鉴别、含量、生物学活性等分别进行质控。

如终产品采用特殊容器或药械组合装置，应根据装置的功能增加特定检项。

## （六）方法学研究和方法学验证

mRNA 原液及制剂的质量控制涉及多种分析方法，所选用的检测方法类型、样品的预处理过程以及检测条件等均会对检测结果产生影响，应对检测方法进行必要的确认及方法学验证，确保检测结果的准确性与可靠性。对于 mRNA 完整性、粒径大小及分布、脂质杂质、生物学活性等关键质量属性，建议采取多种不同原理的分析方法进行相互佐证，根据方法的准确性或相对准确度、精密性和耐用性等方法学验证结果选择适宜的质控方法。定量分析方法应对检测样品的稳定性具有指示性，能够检测样品在贮存期间相关质量属性的变化。准确度验证中应采用可覆盖产品实际浓度范围的标准物质进行验证。

鼓励采用先进方法进行质控，如基于三代测序技术（nanopore）等对序列完整性、dsRNA、开环异构体切口 RNA 的类型及开环位点等进行检测；采用微滴式数字 PCR（Droplet Digital PCR, ddPCR）等方法进行联合疫苗的组分鉴别和比例质

控；结合体外细胞表达和质谱技术，进行 mRNA 疫苗尤其是联合疫苗的表达活性研究等。

申报临床时，应提供能初步证明检测方法适用性的方法学验证资料，对重要指标或关键质量属性（如包封率、加帽率、粒径大小及分布、纯度、生物学活性等）的检测方法，应提供与研发阶段的控制要求及重要性相符或适用的验证资料。检测方法的开发和验证应随着产品的开发和研究的不断深入而逐步完善，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。研发期间若发生方法学变更或转移，应开展相应的检测方法桥接研究，关注不同检测方法之间、生产工艺与产品质量属性间关联性的衔接。

## （七）标准物质

标准物质（reference materials）的建立及制备应参照《中华人民共和国药典》及其他相关指导原则的要求。若采用国际或国家标准物质，应明确所用标准物质信息（来源、批次、检定等）。若采用自制标准物质，应进行制备工艺、标定方法、稳定性等相关研究，并提供相关研究资料。建议采用非临床和/或确证性临床试验批次建立关键质量属性检测的标准物质，关注标准物质的可溯源性。

## 六、稳定性研究

整体上, mRNA 疫苗稳定性研究与评价可参照国内外生物制品稳定性研究的相关指导原则开展。应在上市申报前完成全面的稳定性考察, 并选择适宜包材, 明确贮藏条件及运输条件, 制定合理的有效期。

除通用要求外, 稳定性考察方案应结合 mRNA 疫苗的技术路线特点、剂型特点、生产工艺、临床用药方案等情况进行设计, 一般包括长期试验、加速试验、影响因素试验、运输稳定性试验和使用稳定性试验(尤其应关注使用前需复溶混匀等情形)等, 应充分考虑温度变化、震荡、水分(适用于冻干剂型)、反复冻融等情形对产品关键质量属性和生物学活性的影响。应采用能够反映产品整体质量变化趋势的敏感指标, 重点考察 mRNA 的理化特性和表达效率, 如包封率、mRNA 含量及完整性、粒径大小及分布、生物学活性等。除放行检测指标外, 还应根据产品特点增加适宜的拓展性指标, 如颗粒形态等。

对于自复制 mRNA 疫苗, 由于序列较长, 需重点关注其 mRNA 完整性在贮存过程中的变化趋势。对于环状 RNA 疫苗, 重点关注其在不同条件下的开环和降解风险。

疫苗生产过程中涉及到的各中间产物如需贮存, 均应开展相应的稳定性研究或验证研究, 明确其贮存条件及贮存方式等。若

中间产物或原液涉及运输，应在适当的储存温度和条件下进行运输稳定性验证。

## 七、直接接触制品的材料和包装容器

mRNA 疫苗生产过程中使用的所有与产品直接接触的耗材（如管道及接头、混匀芯片、膜包、过滤器等）及包装系统均应具有稳定的物理和化学特性，并与接触的中间产物和溶液具有良好的相容性。基于 LNP 中脂质体的表面活性特性，应关注 LNP 在与密封容器包装材料接触界面可能发生的吸附或降解现象。需按照国内外相关指导原则开展各个生产阶段包材相容性研究或提供其他适用的支持资料，并在申报上市时提交商业化产品及包材开展的相容性研究资料。

若 mRNA 疫苗采用特殊的给药方式或配套给药装置（如鼻喷、吸入等），应明确给药装置的作用原理、供应商来源、材质等相关信息，提供选择该给药方式或给药装置的依据和合理性分析、给药装置的递送效能等相关资料，并对给药装置本身进行质量特性研究和质控。应根据给药装置与疫苗接触的不同阶段（如疫苗是否在给药装置中贮存、是否仅在给药时与装置进行接触），考察组合后对疫苗关键质量属性及稳定性和/或使用中稳定性的影响。

## 八、平台技术产品研发的考虑

mRNA 技术路线具有模块化、生产周期短等优势，平台技术有助于加速疫苗研制进程。

既有技术平台是否可被视为平台技术依赖于已有产品的验证程度。采用平台技术推进或简化新产品开发数据，需基于分子结构及作用机制、变更风险（如关键元件、修饰核苷、制剂处方等物质基础是否发生改变）、平台技术的成熟度和稳健性、工艺及质控分析一致性等对平台技术数据是否适用进行充分的评估。

平台技术的适用性应通过产品间的可比性研究予以确认。若产品间仅更换编码区序列，而平台核心要素（如关键元件、递送系统、关键工艺参数、分析方法等）保持不变，且新产品关键质量属性与已验证平台产品高度一致，可适当减少药学重复开发工作。但对于基于平台技术开展新病原体疫苗的开发，仍需开展必要的非临床和临床研究。

平台技术的界定系动态界定，需随着新产品的开发、行业的发展等不断进行完善更新。平台数据的适用性应持续验证，同时支持性数据包需不断完善，对于部分重大变更，需开展必要的非临床和/或临床研究。

## 九、名词解释

**非自复制 mRNA 疫苗:** 是一种基于 mRNA 技术的疫苗形式，其 mRNA 仅编码目标抗原蛋白，不含病毒复制酶或其他自我扩增元件，完全依赖宿主细胞的翻译系统完成单次抗原表达。

**自复制 mRNA 疫苗:** 是一种基于病毒复制机制的 mRNA 疫苗类型，通过编码病毒 RNA 聚合酶实现自我扩增以提高抗原蛋白表达水平，从而实现更低剂量下的长效免疫应答。

**环状 RNA 疫苗:** 一种基于共价闭合环状 RNA 的疫苗形式，其在细胞内通过反向剪接形成单链闭合环状 RNA，而体外合成可通过核酶自剪接或酶促连接法成环。其无传统线性 mRNA 的 5'帽结构和 3'poly(A)尾，依赖内部核糖体进入位点 (IRES) 启动翻译；可抵抗核酸外切酶降解，显著延长 mRNA 半衰期，实现低剂量下的持续抗原表达；通过滚环翻译机制生成大量抗原蛋白，同时激活 CD8<sup>+</sup>T 细胞主导的细胞免疫和 B 细胞介导的体液免疫。

**表观 pKa:** 指在特定 mRNA-LNP 配方和测定条件下，可电离脂质质子化/去质子化行为所表现出的有效 pKa，其反映的是整个纳米颗粒（尤其是表面）的平均电荷状态，而非该可电离脂质在水溶液中的固有分子 pKa。检测缓冲体系、氮磷比、各脂质摩尔比及配方组成等对表观 pKa 检测结果影响较大。

**mRNA/脂质比例:** mRNA 的质量（或摩尔数）与脂质总质量（或总摩尔数）的比值。

载药量：单位体积或单位质量的 mRNA-LNP 中所包封的有效 mRNA 药物的含量，载药量=包封在 LNP 内的 mRNA 质量 /mRNA-LNP 的总质量（或总体积）。

mRNA-脂质加合物：指 mRNA 与某些脂质杂质（如活性酯、醛类氧化物）发生化学反应后形成的共价结合产物，可能影响 mRNA 的稳定性与翻译效率。

## 十、参考文献

- [1] 国家药品监督管理局.《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 8 月.
- [2] FDA. Guidance for Industry-Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications. CBER. November 2007.
- [3] FDA. Guidance for Industry-Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation. April 2018.
- [4] FDA. Guidance for Industry-Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials(draft guidance). December 2017.
- [5] 国家药品监督管理局.《脂质体药物质量控制研究技术指导原则》.2023 年 10 月.

[6] ICH.Q6B. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. March 1999.

[7] 国家药品监督管理局.《预防用 mRNA 疫苗非临床研究技术指导原则》.2025 年 1 月.

[8] WHO. Evaluation of the Quality, Safety and Efficacy of messenger RNA Vaccines for the Prevention of Infectious Diseases: Regulatory Considerations. April 2022.

[9] EMA. Guideline on the quality aspects of mRNA vaccines (draft) . Mrach 2025.

[10] WHO. Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations. December 2021.

## 十一、缩略词列表

英文简称	英文	中文全称
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid	信使核糖核酸
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链反应
Th1	Type I Helper T cells	I 型辅助 T 细胞
Th2	Type II Helper T cells	II 型辅助 T 细胞
IRES	Internal Ribosome Entry Segments	内部核糖体进入位点
UTR	Untranslated Region	非编码区

dsRNA	Double-stranded RNA	双链 RNA
RNase R	Ribonuclease R	核糖核酸酶 R
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高效液相色谱
NTP	Nucleotide Triphosphate	核苷三磷酸
CMC	Chemical Manufacturing and Control	化学成分生产和控制
IP-RP-HPLC	Ion-pair Reversed-phase High Performance Liquid Chromatographic	离子对反相高效液相色谱
PEG	Polyethylene Glycol	聚乙二醇脂质