

预防传染病 mRNA 疫苗成品质量控制要点分析

孙巍, 佟乐, 杨亚莉, 王一平*, 杨振*

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要: mRNA 疫苗已经开发近 30 年, 但由于生产环节、稳定性和反应原性存在一定的技术瓶颈, 导致 mRNA 疫苗发展较为缓慢。如今, 基于预防 COVID-19 的 mRNA 疫苗的应用, 充分验证了预防传染病 mRNA 疫苗的有效性和安全性。本文通过梳理 WHO 及药品监管和标准化机构关于预防传染病 mRNA 疫苗成品质量控制的指导文件, 总结归纳预防传染病 mRNA 疫苗成品关键质量控制属性及相关要求, 旨在为中国预防传染病 mRNA 疫苗质量控制提供参考。

关键词: 传染病; mRNA; 疫苗; WHO; 质量控制

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2024)05-0912-04

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.05.20

Analysis of critical quality attributes about quality control of mRNA vaccines for the prevention of infectious diseases

SUN Wei, TONG Yue, YANG Ya-li, WANG Yi-ping*, YANG Zhen*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: Although mRNA vaccines have been developed for nearly 30 years, but due to certain technical bottlenecks in production, stability, and reactivity, the development of mRNA vaccines has been relatively slow. During the epidemic of COVID-19, mRNA vaccine had been fully verified its effectiveness and safety for preventing infectious diseases. Here, this article summarized the key quality control attributes and related requirements of mRNA vaccine products for preventing infectious diseases by reviewing the quality control guidance documents of WHO and drug regulatory and standardization agencies, aiming to provide reference for the quality control of mRNA vaccine products for preventing infectious diseases in China.

Keywords: infectious diseases; mRNA; vaccine; WHO; quality control

mRNA(信使核糖核酸)由 DNA 模板转录而来, 携带遗传信息, 指导细胞生产胞内蛋白、膜蛋白及胞外蛋白。mRNA 疫苗的核心原理是将编码抗原的 mRNA 通过不同的递送方式递送到机体组织细胞内, 在细胞内翻译后产生相应的抗原蛋白, 从而有效激起生物体产生特异性免疫反应并获得免疫保护的一种新型疫苗。与传统的灭活、减毒疫苗或基因工

程疫苗相比, mRNA 疫苗具有如下优点: 研发周期短, 生产工艺简单、扩产容易, 无需佐剂、有效性高, 不进入细胞核、安全性较好等。与 DNA 疫苗相比, mRNA 疫苗直接在细胞质中发挥其功能, 既不依赖于运输机制, 也不依赖于细胞转录机制, 所以起效更快, 效果更强。尽管 mRNA 疫苗在 1990 年初期首次进行了测试, 但由于疫苗稳定性较脆弱, 故而最初并未得

* 通信作者 杨振 Tel: (010)53851350; E-mail: yangzhen@nifdc.org.cn

王一平 Tel: (010)53852478; E-mail: wangyiping@nifdc.org.cn

第一作者 Tel: (010)53851351; E-mail: sunwei@nifdc.org.cn

到广泛使用。Ross 等^[1]于 1995 年发表了关于通过优化和配制可以提高 mRNA 稳定性的初步证明,从那时起,对 mRNA 疫苗的研究呈爆炸式增长。如今,抗 SARS - Cov - 2 mRNA 疫苗的有效性和安全性在新冠疫情大规模爆发中得到了充分证明,mRNA 疫苗技术被推到了新兴疗法的前沿。但是,mRNA 疫苗的生产过程中所涉及的分子结构设计、递送系统的优化、生产工艺放大等诸多环节,仍有很多技术壁垒或者工艺难点急需解决。本文通过梳理 WHO 于 2021 年发布的《预防传染病 mRNA 疫苗质量、安全及有效性评价法规考虑要点》^[3],旨在探讨预防传染病 mRNA 疫苗成品质量的控制要点。

1 mRNA 疫苗质量控制相关法规和指南

目前,除新冠 mRNA 疫苗外,其他传染病的预防性 mRNA 疫苗和肿瘤治疗性 mRNA 疫苗也是研究热点之一。mRNA 疫苗的快速发展为该类疫苗的质量控制提出了新的挑战。2006 年,欧盟颁布了临床试验用药申报资料(Investigational Medicinal Product Dossier, IMPD)文件,指出了 mRNA 疫苗关键质量属性,包括 mRNA 完整性、含量、效价^[4]。2020 年,国家药品监督管理局药品审评中心颁布了《新型冠状病毒预防用 mRNA 疫苗药学研究技术指导原则(试行)》^[5],对 mRNA 疫苗模板设计、质粒构建、生产工艺、制剂处方、质量特性及标准制定、稳定性研究、申报临床阶段等方面提出技术指导。2021 年,WHO 颁布指南文件《预防传染病 mRNA 疫苗质量、安全及有效性评价法规考虑要点》^[3],指出 mRNA 疫苗考察指标包括外观、mRNA 含量、疫苗效价、mRNA 完整性、包封率、粒径、分散性以及及与 mRNA 和脂质相关的杂质。

mRNA 疫苗包含脂质体和核酸两部分结构,关于脂质体药物的关键质量属性可以参考 2018 年美国 FDA 发布的《脂质体药物 CMC、人体药动学和生物等效性研究以及标签管理》行业指南^[6],文中指出脂质体药物的关键质量属性,包括粒径大小、粒径分布和形态学特征等。

2 WHO 指南文件对 mRNA 成品疫苗的质量控制

由于 mRNA 的分子量大($10^4 \sim 10^6$)、带负电荷且易于被核酸酶降解,因此,很难通过细胞膜的磷脂双层。近年来,已开发出用于 mRNA 封装的各种运载工具,包括脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)、聚合物纳米颗粒、脂聚合物(Lipopolyplex, LPP)和阳离子多肽等^[7]。脂质及其衍生物被认为是 1 种新型的

mRNA 疫苗递送系统,由于其低免疫原性、生物相容性和高包封率而备受关注。大多数 mRNA 常用脂质纳米颗粒(LNP)作为传递系统,LNP 通常包括可电离脂质、胆固醇、辅助脂质和聚乙二醇化脂质 4 大部分,一起封装和保护脆弱的 mRNA 核心。LNP 封装直接关系到 mRNA 疫苗的最终质量,特别是涉及靶基因序列设计、原材料、mRNA 纯度和完整性,以及载药量 mRNA - LNP 制剂的制备,一般采用冲击式射流混合法、微流控混合合法等技术,将 mRNA 原液和 LNP 按一定比例精确混合,形成粒径均一的包裹 mRNA 的纳米脂质体,经超滤换液等步骤,去除杂质后制成 mRNA - LNP 制剂中间产物。在该过程中,必须通过测量平均粒径、粒径分布、mRNA 含量、封装效率和无菌性来仔细检查 mRNA - LNP 中间产物^[8]。最后,将获得的 mRNA 疫苗制剂进一步进行无菌过滤和灌装的最后加工。由于 mRNA - LNP 的大小、多分散性和稳定性,会同时受到生产中脂质和水相的流体动力学和剪切应力的影响,因此,配制 mRNA - LNP 的关键工艺参数和操作空间,以及疫苗的稳定性都应进行充分研究。

LNP 不稳定并且易于降解,主要的降解途径是由于暴露于光、氧气、金属残留物 and 高温而导致的氧化。不饱和烷基链与聚环氧乙烷或聚环氧丙烷基团是 LNP 氧化的潜在底物。聚乙二醇化(PEG)脂质在空间上保护 LNP 不与其他脂质颗粒或血液成分相互作用,从而降低 LNP 自聚集、调理作用或吞噬作用,但它是过氧化物的潜在来源。氢过氧化物通常不稳定,分解会导致链式反应,从而催化可电离脂质的降解。这些脂质降解中的一些产物可能与 mRNA 反应,形成共价 mRNA 脂质加合物,或诱导其他可使 mRNA 降解的反应,因此,氢过氧化物是一种可疑的降解源,可以直接或间接地破坏 mRNA。另外,含有酯键的脂质会因脂质化学结构、pH、温度和缓冲液组成而被水解,从而影响 LNP 的结构完整性,因此,应评估每个批次成品疫苗的递送系统成分产生的潜在杂质,以及控制成品中因氧化和降解产生的杂质。通常单次检测不足以检测出所有潜在的杂质,需要考虑对 mRNA 完整性、颗粒大小、脂质/聚合物杂质和包裹在 LNP 中的 mRNA 比例/效率进行检测。而关于容器和胶塞的匹配性、溶出物和萃取物的评估,也应在申请上市许可时一并提交。除此之外,也应对结构性递送系统(如纳米颗粒)的物理和化学属性进行特性研究,以解决递送系统和成品制剂的一致

性和稳定性等问题,同时还应考虑到脂质的质量和制剂的关键质量属性。此外,对 mRNA-LNP 及其在目标细胞中的摄取进行充分特性研究,包括了解合成 mRNA-LNP 的表面化学、大小、多分散性、形状、电荷和蛋白质结合特性,以确保对 mRNA 的充分保护和疫苗达到必要稳定性^[3]。

研究表明,mRNA 极易被无处不在的核糖核酸酶(RNase)降解,因此,建议超低温储存以限制 RNase 活性,有效地保护 mRNA 稳定性。此外,超低温保存也更有利于保持 mRNA-LNP 复合物的原有构象^[13]。事实上,尽管目前用于 mRNA 疫苗的递送系统是基于 LNP,但疫苗制造商的储存条件和稳定性各不相同。例如,Moderna 的 mRNA-1273 疫苗在 -20 °C 下可保持 6 个月的有效性,BioNTech 的 BNT162b2 疫苗在 -60 ~ -80 °C 的温度下可保持 6 个月的有效性,CureVac 的 CVnCoV 疫苗可以

在 -60 °C 下储存 3 个月。因此,应考虑对冷链运输和储存条件进行适当验证,以确保 mRNA 疫苗的质量。

3 检测项目及优化

无论是在水溶液中作为药物成分还是在 LNP 中配制(或提取)作为药物产品,mRNA 的分子大小、物理和化学性质都给检测方法提出了挑战。针对 mRNA、脂质体和制剂的特性以及相关杂质等 mRNA 疫苗关键质量属性,研发机构应建立检测方法。表 1 总结了现有的 mRNA 原料药和 mRNA 成品的检测方法^[16]。2021 年颁布的美国药典通则 <1220>,将生命周期管理理念应用到检测方法中,使方法设计、确认、转移和验证活动整合到检测方法生命周期过程中,并将其视为 1 个连续动态而非割裂的不同独立阶段的活动,以提升分析方法的质量水平^[16]。ICHQ2(R2)^[19]及 Q14^[20]征求意见稿进一步明确了检测方法建立和验证的技术要求。

表 1 mRNA 原料药和 mRNA 成品的检测方法

Tab. 1 Test methods for drug substance and final product of mRNA

类别(classification)	检测分析方法(method of detection and analysis)	属性(attributes)
表征 DNA 模板和 RNA 转录本 (characterization of DNA template and RNA transcripts)	DNA 模板测序/mRNA 测序(DNA template sequencing/mRNA sequencing)	mRNA 的鉴定(identity of mRNA)
	紫外光谱($A_{260\text{ nm}}$, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$) [ultraviolet spectroscopy ($A_{260\text{ nm}}$, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$)]	基于纯度的量化评估(quantitative assessment - based purity)
	基于荧光的检测(如残留 DNA) [fluorescein - based assays (such as residual DNA)]	基于纯度的量化评估(quantitative assessment - based purity)
	琼脂糖/丙烯酰胺电泳(agarose/acrylamide electrophoresis)	分子质量、RNA 完整性和定量(molecular mass, RNA integrity and quantification)
	逆转录酶 qPCR (RT qPCR)	mRNA 的鉴定和定量(identity and quantification of mRNA)
	dsRNA 的蛋白质印迹(dsRNA western blotting)	质量评估(quality evaluation)
	mRNA 加帽分析(tests for percentage capping)	质量评估(quality evaluation)
表征 mRNA 编码的翻译产物 (characterization of mRNA - encoded translation products)	mRNA 聚腺苷酸尾分析(mRNA polyadenylate tail analysis)	质量评估(quality evaluation)
	色谱分析:RP - HPLC, SE - HPLC, IP - HPLC 和 IEX - HPLC (chromatographic assays: RP - HPLC, SE - HPLC, IP - HPLC and IEX - HPLC)	数量和质量评估(quantitative and quality assessment)
	体外翻译 - 无细胞培养基(<i>in vitro</i> translation - cell free medium)	翻译成的目标蛋白评估(evaluation of the translated target protein)
表征 mRNA - 脂质复合物 (characterization of mRNA - lipid complexes)	通过细胞的体系评估 mRNA 功能(assessing mRNA function by cell system)	翻译产物的分析和潜在毒性试验(analysis of translated products and potential toxicity testing)
	光散射技术(light - scattering techniques)	粒度分布(particle size distribution)
	激光多普勒电泳(laser doppler electrophoresis)	Zeta 电位(Zeta potential)
	NTA/TRPS	粒度分布(particle size distribution)
	SE - HPLC (-MALS)	粒度分布; 评估结合/未结合的 mRNA (particle size distribution; evaluating bound/unbound mRNA)
表征 mRNA - 脂质复合物 (characterization of mRNA - lipid complexes)	显微镜(冷冻 TEM, ESEM, AFM) [microscopy (frozen TEM, ESEM, AFM)]	纳米粒子形貌、粒径(分布) [morphology of nanoparticles, particle size (distribution)]
	凝胶或毛细管电泳(gel or capillary electrophoresis)	评估结合/未结合的 mRNA 和表面电荷(evaluating bound/unbound mRNA and surface charge)

4 结语

近年来,mRNA 疫苗在全球迅速崛起,其在服务全球公众健康领域有着无限潜力。安全有效的预防传染病的 mRNA 疫苗有望在应对突发公共卫生事件的传染病防治中发挥重要作用。疫苗作为预防性生物制品,其成品质量控制尤为重要,希望在不久的将来,可将 mRNA 疫苗的产品质量与临床、非临床研究相联系,从而确保 mRNA 疫苗的安全性和有效性;并在利益相关方之间就 mRNA 疫苗的技术规范达成国际共识,以确保疫苗的质量、安全性和疗效。

参考文献

- [1] WOLFF JA, MALONE RW, WILLIAMS P, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*[J]. *Science*, 1990, 247(4949):1465
- [2] ROSS J. mRNA stability in mammalian cells [J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59(3):423
- [3] WHO. Evaluation of the quality, safety and efficacy of RNA - based Prophylactic Vaccines for Infectious Diseases; Regulatory Considerations[EB/OL]. (2021 - 12 - 07) [2023 - 09 - 21]. <https://www.who.int/publications/m/item/evaluation-of-the-quality-safety-and-efficacy-of-messenger-rna-vaccines-for-the-prevention-of-infectious-diseases-regulatory-considerations>
- [4] SCHMID A. Considerations for producing mrna vaccines for clinical trials [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1499:237
- [5] Center for Drug Evaluation. Technical Guidelines on Research and Development of Covid - 19 Prophylactic mRNA Vaccines (Draft Edition) [EB/OL]. (2020 - 8 - 14) [2023 - 09 - 21]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/4cbbbe5b191c1110c4b73bbca35b3e0c>
- [6] FDA. Liposomal Drug Products:Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetic and Bioavailability; and Labeling Documentation [EB/OL]. (2018 - 04) [2023 - 09 - 21]. <https://www.fda.gov/media/70837/download>
- [7] NAMIT C, DREW W, KATHRYN A, *et al.* mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(11):817
- [8] FANG E, LIU XH, LI M, *et al.* Advances in COVID - 19 mRNA vaccine development [J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):94
- [9] LIU T, TIAN Y, ZHENG A, *et al.* Design strategies for and stability of mRNA - lipid nanoparticle COVID - 19 vaccines [J]. *Polymers (Basel)*, 2022, 14(19):4195
- [10] ZHANG Y, SUN C, WANG C, *et al.* Lipids and lipid derivatives for RNA delivery [J]. *Chem Rev*, 2021, 121(20):12181
- [11] MUSAKHANIAN J, RODIER JD, DAVE M. Oxidative stability in lipid formulations: a review of the mechanisms, drivers, and inhibitors of oxidation [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2022, 23(5):165
- [12] KUMAR V, KALONIA DS. Removal of peroxides in polyethylene glycols by vacuum drying: implications in the stability of biotech and pharmaceutical formulations [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2006, 7(3):E47
- [13] GRIT M, CROMMELIN DJA. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability [J]. *Chem Phys Lipids*, 1993, 64(1-3):3
- [14] MAMONTOV E, DAEMEN LL, NOVAK E, *et al.* Melting and re-freezing leads to irreversible changes in the morphology and molecular - level dynamics of Pfizer - BioNTech COVID - 19 Vaccine [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2021, 57(12):1343
- [15] UDDIN MN, RONI MA. Challenges of storage and stability of mRNA - based COVID - 19 vaccines [J]. *Vaccines*, 2021, 9(9):1033
- [16] CROMMELIN D, ANCHORDOQUY T, VOLKIN T, *et al.* Addressing the cold reality of mRNA vaccine stability [J]. *J Pharm Sci*, 2021, 110(3):997
- [17] SCHOENMAKER L, WITZIGMANN D, KULKARNI JA, *et al.* mRNA - lipid nanoparticle COVID - 19 vaccines: structure and stability [J]. *Int J Pharm*, 2021. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120586
- [18] USP. Analytical Procedure Life Cycle [EB/OL]. (2021 - 11 - 01) [2022 - 01 - 11]. https://online.usppf.com/usppf/document/GUID-35D7E47E-65E5-49B7-B4CC-4D96FA-230821_10101_en-US
- [19] ICH. Technical and Regulatory Considerations for Pharmaceutical Product Lifecycle Management Q12 [EB/OL]. (2019 - 11 - 20) [2022 - 07 - 13]. https://database.ich.org/sites/default/files/Q12_Guideline_Step4_2019_1119.pdf
- [20] ICH. Validation of Analytical Procedures Q2 (R2) [EB/OL]. (2022 - 03 - 24) [2022 - 07 - 13]. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2-R2_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf

(本文于2023年8月8日收到)