中国药学会团体标准

T/CPHARMA 011-2026

用于 mRNA 药物生产的 DNA 模板技术要求

Standard Specification for DNA Templates in mRNA Drug Manufacturing

2026-10-23 发布

中 国 药 学 会 发布

前　言

本文按照 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。

本标准由中国药学会归口。

本标准起草单位：中国药学会核酸药物专业委员会

编写组组长：黄震

专家组：按拼音排序排名不分先后

曹宏明	陈康明	陈　立	丁　侃	丁　平
方子辉	古昌友	郭广兴	辜勇军	黄永焯
黄志纾	金勇丰	孔　超	李军辉	栗世铀
李　威	李小方	李　炎	刘德芬	刘　璐
刘胜斌	卢瀚思	陆宏辉	麻锦彪	孟庆伟
莫　凡	乔明曦	任科云	单　革	宋相容
汤新景	王浩猛	王　鹏	王育才	魏　玲
吴　敏	席　真	熊长云	杨广宇	杨惠洁
杨振军	于涵洋	曾烽原	赵长春	张海洋
张　骥	张晶晶	章　祺	张文明	

引　言

随着 mRNA 技术在传染病疫苗、肿瘤疫苗和蛋白替代疗法等领域的快速发展与商业化应用，DNA 模板作为体外转录（IVT）的起始原材料/起始物料（Starting Material），其生产过程控制和质量属性（如序列完整性、纯度、杂质控制等）直接决定了 mRNA 的产量、完整性、翻译效率以及最终产品的安全性与有效性。目前，行业内对于 mRNA 生产用 DNA 模板的质量控制尚缺乏统一、细化的技术规范，存在标准不一、关键质量属性（CQAs）界定模糊等问题。为应对这一行业迫切需求，填补标准空白，本标准在遵循国家法律法规、《药品生产质量管理规范》及协调国际相关法规和指导文件的基础上，聚焦于 mRNA 生产场景，对 DNA 模板的生产过程、质量控制体系及质量风险管理提出了具体且细化的技术要求，旨在为行业的规范化、高质量发展提供技术支撑。

用于 mRNA 药物生产的 DNA 模板技术要求

1 范围

本标准规定了用于预防性或治疗性 mRNA 产品（包括疫苗和药物）生产的 DNA 模板（包括 E.coli 发酵路线和 cell-free 无细胞路线）的质量特性、生产过程、质量控制、稳定性研究、质量风险管理及文件管理要求。本标准适用于：

（1）DNA 模板生产商：作为其建立质量管理体系和技术规范的根本依据；

（2）mRNA 产品上市许可持有人（MAH）：作为其对 DNA 模板供应商进行审计、质量评估与协议签订的技术标准；

（3）研发机构与合同研发生产组织（CDMO）：用于指导 mRNA 产品研发与生产各阶段所用 DNA 模板的科学研究、工艺开发与质量控制。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件。凡是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。

2.1 国内法规与标准

《中华人民共和国药典》2025 年版 三部 · 总论《人用基因治疗制品总论》

《中华人民共和国药典》2025 年版 四部 · 通则 0233《生物制品生产检定用菌毒种管理及质量控制》

《中华人民共和国药典》2025 年版 四部 · 通则 0232《生物制品生产用原材料及辅料质量控制》

《中华人民共和国药典》2025 年版 四部 · 通则 3431《质粒 DNA 构象测定法》

《中华人民共和国药典》2025 年版 四部 · 通则 3407《宿主细胞 DNA 残留测定法》

《中华人民共和国药典》2025 年版 四部 · 通则 3405《宿主细胞蛋白（HCP）残留测定法》

《中华人民共和国药典》2025 年版 四部 · 通则 0239《生物制品分包装及贮运管理》

GB/T 40170-2021《质粒抽提及检测通则》

国家药品监督管理局 《药品记录与数据管理要求（试行）》

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）》

国家药品监督管理局《体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则（试行）》

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）》

国家药品监督管理局药品审评中心《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《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》

国家药品监督管理局《药品注册核查要点与判定原则（生物制品）》

国家药品监督管理局《药品生产质量管理规范（2010 年修订）》

国家药品监督管理局《药品生产质量管理规范（2010 年修订）》临床试验用药品附录（即《临床试验用药品（试行）》）

T/SHPPA 019-2023 《免疫细胞治疗产品生产用质粒生产质量管理指南》

2.2 国际标准与指南

WHO. Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations, 2021-12-07.

FDA. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs), 2020-01.

FDA. Manufacturing Changes and Comparability for Human Cellular and Gene Therapy Products, 2023-07.

EMA. Concept paper on the development of a guideline on the quality aspects of mRNA vaccine, 2023-09.

EMA. Guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational advanced therapy medicinal products in clinical trials, rev. 2, legal effective date 2025-07-01, 2025-02-06.

EMA. Questions and answers on the principles of GMP for the manufacturing of starting materials of biological origin used to transfer genetic material for the manufacturing of ATMPs, 2021-02-24.

Ph. Eur. Monograph 0784 Plasmid DNA for use in the manufacture of gene transfer medicinal products

ICH. Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin[R]. ICH Q5A(R2), step 5 (final), 2023-11-01.

ICH. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/ Biological Products[R]. ICH Q6B, step 4, 1999-03-10.

ICH. Quality Risk Management Q9(R1), step 5 (final), 2023-01-18.

FDA. Preparation of Investigational New Drug Products, 1997.

FDA. Current Good Manufacturing Practice for Phase 1 Investigational Drugs, 2008.

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。为节省篇幅，仅列出关键及新增术语，通用术语可参照 GB/T 40170-2021。

3.1 mRNA 生产用 DNA 模板（DNA template）

根据制备工艺，可分为 E.coli 发酵路线制得的质粒 DNA、cell-free 无细胞路线制得的 cell-free 线性化双链 DNA（linear dsDNA）。

质粒 DNA 特指经过设计和构建，用于 mRNA 体外转录的环状双链 DNA 分子。除具备自主复制功能外，其序列中应包含适用于体外转录的启动子（如 T7、SP6）、目标基因的开放阅读框（ORF）、5′和 3′非翻译区（UTRs）以及一段 Poly(A)尾编码序列或限制性酶切位点。质粒 DNA 需要酶切线性化制得线性化 dsDNA（linearized dsDNA）才能用于 mRNA 的体外转录生产。

cell-free 线性化 dsDNA（linear dsDNA），特指以化学合成的寡核苷酸（oligonucleotides）或者其他来源的序列为起源，经体外酶促组装/连接等反应制备模板，随后通过酶促反应（如滚环复制

和 PCR 等）放大、酶切和纯化等步骤，获得的线性双链 DNA（linear dsDNA），其可转录链也携带启动子、5′UTR 和 3′UTR、poly(A)/转录终止边界，并以明确 5′-P/3′-OH 末端作为分子端点；设计上不含细菌复制起点（Origin of Replication，Ori）、不含抗性基因骨架，不作为质粒环存在，不经“质粒环状→限制性酶切线性化（linearization）”获得，可直接用于 mRNA 的体外转录生产。受当前技术水平限制，现阶段 linear dsDNA 的制备规模小，更多应用于个性化 mRNA 产品；随着工艺技术迭代，也可根据工艺验证结果用于非个性化 mRNA 产品。而英文为 linearized dsDNA 的线性化 dsDNA，特指原本为环状双链 DNA（如质粒 DNA）的分子，在特定位点（通常为一个唯一限制性内切酶识别位点）发生双链切断后，被“打开”成一条具有明确两端的线性双链 DNA。

3.2 超螺旋质粒 (Supercoiled plasmid)

质粒 DNA 的一种拓扑结构，具有较高的稳定性和转染效率。在 mRNA 生产中，高比例的超螺旋质粒是衡量工艺水平和模板质量的关键指标之一。

3.3 宿主细胞残留 DNA (Residual DNA of the host cell)

在质粒 DNA 制备过程中，来自宿主细胞（如大肠杆菌）的残留 DNA 片段。其残留水平需进行控制，以降低潜在的安全风险。

3.4 宿主细胞残留蛋白 (Residual proteins of the host cell)

在质粒 DNA 制备过程中，来自宿主细胞的残留蛋白质。其残留水平需进行控制，以确保产品的纯度和安全性。

3.5 宿主细胞残留核酸（Residual RNAs of the host cell）

在质粒 DNA 制备过程中，来自宿主细胞的残留 RNA。其残留水平需进行控制，以确保产品的纯度和安全性。

3.6 Poly(A)尾 (Poly(A) tail)

位于 mRNA 编码序列下游的腺嘌呤核苷酸序列，对于 mRNA 的稳定性和翻译效率至关重要。

3.7 宿主细胞 (Host Cell)

用于质粒 DNA 扩增的微生物（如大肠杆菌 DH5α、BL21），需具备遗传稳定性且无外源因子污染。

3.8 培养基 (Culture Medium)

支持宿主细胞生长和质粒复制的营养基质，分为基础培养基和补料培养基。

3.9 层析介质 (Chromatography Media)

纯化工艺中用于分离和纯化质粒 DNA 的填料（如离子交换层析、亲和层析介质）。

3.10 RNase 残留 (RNase Residue)

生产过程中可能残留的核糖核酸酶，需通过检测确保其活性低于安全阈值。

3.11 内毒素 (Endotoxin)

革兰氏阴性菌细胞壁中的脂多糖成分，可能引发炎症反应，需严格控制其含量。

3.12 微生物限度 (Bioburden)

指在质粒 DNA 生产过程中（如发酵收获液、纯化中间体、原液）存在的活微生物总数。通常以菌落形成单位（CFU/mL 或 CFU/mg）表示。标准需规定原液和中间过程控制的限值（如 < 1 CFU/10 mL 或 < 1 CFU/mg），以控制后续除菌过滤前的微生物污染风险。

3.13 无菌检查 (Sterility Test)

检测质粒 DNA 中是否存在活菌污染的方法，通常采用《中国药典》通则 1101。

3.14 超螺旋比例 (Supercoiled Plasmid Ratio)

超螺旋比例（sc%）指质粒 DNA 中单体共价闭合环状质粒（monomer ccc；亦称 monomer sc）峰面积，占经方法分辨并可积分的单体拓扑物种总面积的百分比，计算公式：$sc\% = A_{monomer\ ccc} \div (A_{monomer\ ccc} + A_{monomer\ oc} + A_{linear} + A_{nicked\text{-}sc（若可分辨）}) \times 100\%$。式中 monomer ccc（即 sc）为单体长度无切口闭环形式；monomer oc 为单体开环（单 nick）形式；linear 为非目的性线性 dsDNA（降解/剪切）；nicked-sc 仅在色谱/电泳可基线分辨时单独积分，否则并入 oc 或 sc 包络（按预先定义的积分规则）。多聚体 ccc（dimeric/oligomeric ccc）不进入上述分母。通常通过高效液相色谱（HPLC）或毛细管电泳法测定。

3.15 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

用于扩增特定 DNA 片段的分子生物学技术。

3.16 质粒 DNA 构象测定法 (Plasmid DNA Conformation Assay)

通过琼脂糖凝胶电泳、毛细管电泳、高效液相色谱等分析质粒拓扑结构（如超螺旋、开环、线性）的方法。

4 缩略语

cGMP: 现行药品生产质量管理规范(Current Good Manufacturing Practice)

GMP: 药品生产质量管理规范(Good Manufacturing Practice)

NMPA：国家药品监督管理局（National Medical Products Administration）

CDE：国家药品监督管理局药品审评中心

WHO: 世界卫生组织(World Health Organization)

FDA: 美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration)

EMA：欧洲药品管理局（European Medicines Agency）

HPLC: 高效液相色谱(High-Performance Liquid Chromatography)

LNP: 脂质纳米颗粒(Lipid Nanoparticle)

mRNA: 信使核糖核酸(Messenger RNA)

OD_{600}: 600 nm 波长下的光密度值(Optical Density at 600 nm)

ORF: 开放阅读框(Open Reading Frame)

PCR: 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

QC: 质量控制(Quality Control)

QA: 质量保证(Quality Assurance)

TFF: 切向流过滤(Tangential Flow Filtration)

SDS-PAGE: 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

5 基本要求

5.1 合规性

DNA 模板的生产、检验和放行管理，应遵循 mRNA 产品的目标市场所在地区的《药品生产质量管理规范》及相关指导原则的要求。企业应基于风险评估建立相适应的质量管理体系，确保全过程的受控和法规符合性。

5.2 质量责任

药品上市许可持有人（MAH）或相关责任主体对所用 DNA 模板的质量负有最终责任。

5.3 全生命周期质量管理

应对 mRNA 生产用 DNA 模板实施从“设计-生产-检验-放行-贮存-运输-使用后反馈” 的全生命周期质量管理。质量管理体系应基于 ICH Q9 原则，贯穿始终。

5.4 风险管理的应用

应基于 DNA 模板在 mRNA 产品中的用途（如作为转录模板）、研发阶段（临床前、临床试验、商业化）及生产工艺特点，实施全生命周期的质量风险管理。重点关注生产用原材料的质量控制、批间一致性、杂质去除率、污染控制等可能影响 mRNA 产品安全性、有效性的因素。

5.5 不同阶段的风险评估及 GMP 符合性

DNA 模板作为 mRNA 生产的起始原材料/起始物料，其风险评估及 GMP 符合性应与用于生产 mRNA 药物产品特征（个性化或通用型）、临床阶段相匹配。建议在 mRNA 药物的确证性临床试验阶段，DNA 模板的生产完全符合 GMP 要求，避免因变更影响商业化进程。同时，推荐生产过程中采用一次性耗材和封闭生产设备，以简便、快速、更好地控制污染和交叉污染。

5.6 质粒 DNA 的设计与构建及细化要求

质粒 DNA 的设计与构建应科学、合理。应考虑元件的功能性和安全性，优先选择功能明确、风险可控的遗传元件。应尽量避免使用β-内酰胺类等抗生素抗性基因。若使用具有潜在风险的调控元件（如病毒来源的强启动子），应进行充分的风险评估与必要的安全性改造。应确保 Poly(A)尾序列的完整性与正确性。具体细化要求如下：

（1）抗生素抗性基因：强烈建议避免使用β-内酰胺类（如氨苄青霉素），因其可能引起严重的过敏反应。如必须使用，应在后续纯化工艺中证明其被有效去除至安全水平，并采用灵敏的方法（如 ELISA）进行残留量检测。可优先考虑使用卡那霉素等风险较低的替代标记。

（2）复制起点：应选择与宿主菌和发酵规模相匹配的复制起点。对于高拷贝数质粒，需关注其在发酵过程中的遗传稳定性，防止因拷贝数过高导致菌体代谢负荷过重或质粒重组。

（3）Poly(A)尾：若通过质粒编码 Poly(A)尾，其长度应均一且明确（如 100 个腺嘌呤核苷酸）。严禁在 Poly(A)区引入限制性酶切位点，以防线性化时破坏其结构。应对 Poly(A)尾的完整性进行强制检定。

（4）5′和 3′非翻译区（UTRs）: 是质粒骨架中调控目的基因转录及后续 mRNA 翻译效率的关键非编码序列。作为体外转录（IVT）模板的组成部分，UTRs 的设计应确保其转录至 mRNA 产物中，并直接影响 mRNA 的稳定性和翻译效率。当使用病毒 UTR 或 IRESs 作为 mRNA 的 5'UTR 时，应检测其中是否带有 ATG 序列。

6 生产过程要求

6.1 质粒 DNA

6.1.1 种子批系统

(1) 菌库层级与规模：一般应建立主种子批（MCB） 和工作种子批（WCB） 两级库。MCB 的规模应能满足整个产品生命周期（包括商业化阶段）的需求。WCB 由 MCB 扩增而来，不得回冻。种子批的建立、检定和贮存应参照《中国药典》相关通则及 T/SHPPA 019-2023 的要求。建库过程中应避免使用β-内酰胺类抗生素，如需使用其他种类的抗生素，应对抗生素的残留量进行控制和安全性评估。

(2) 种子批的来源、历史、遗传背景应清晰，并经过充分鉴定。检定项目至少包括：菌落形态、革兰氏染色、生化特性、抗生素抗性、质粒限制性酶切、质粒全序列测定、宿主细胞纯度（无其他细菌、真菌、噬菌体）等。

（3）单克隆源性：必须提供证据链（如单克隆照片、有限稀释法记录） 证明 MCB 和 WCB 均来源于一个经鉴定的单克隆。

（4）建库流程：建库过程应在 C 级或更高洁净度的环境下进行。冻存前应在菌体生长对数中后期进行收获，并使用经验证的冻存液（如含 10%-20%甘油），以可控的降温速率（如-1℃/min）冻存于-70℃或液氮中。

（5）不同质粒的种子批应通过独立的编号、标签和储存管理，严防混淆与交叉污染。

（6）检定项目细化：

* 基因型鉴定：应通过全基因组测序或 PCR 确认宿主菌的基因型（如 DH5α的 endA1、recA1 突变）。

* 质粒全序列测定：对 MCB 必须进行全长/双链测序，覆盖整个质粒序列，包括骨架、所有调控元件、ORF、UTRs 及 Poly(A)区；WCB 除关键功能区域测序比对外，建议增加质粒拷贝数、限制性酶切图谱作为辅助确证手段。

* 拷贝数测定：应采用 qPCR 等方法测定质粒在宿主菌中的平均拷贝数，作为发酵工艺的基线参考。

6.1.2 发酵工艺

（1）种子扩增：应明确种子液的传代代次，不得超过基于传代稳定性研究确定的最高限定代次。种子扩增阶段应监控种子液 OD_{600}。传代扩增时处于对数生长期。

（2）发酵控制策略：

* 温度：大肠杆菌系统通常为 37°C，但可根据质粒稳定性调整。

* pH：通常控制在 6.5-7.5，应有明确的控制范围和补加酸碱的策略。

* 溶氧（DO）：应维持在 20%-30%饱和度以上，防止厌氧环境导致质粒丢失或菌体代谢异常。

* 补料策略：高密度发酵一般采用补料分批培养。应明确补料培养基的组成、开始补料的时间（如 OD600 达到某个阈值）、补料速率和模式（如恒速、指数流加）。一般培养和补料添加物中无动物来源成分。生产过程中应避免使用β-内酰胺类抗生素，如需使用其他种类的抗生素，应对抗生素的残留量进行控制和安全性评估。

（3）收获：收获时机应基于质粒产量、超螺旋纯度、polyA 完整性来综合确定，可通过定时

取样检测菌体中质粒浓度、质粒超螺旋比例和 polyA 完整性来确定。收获时菌体 OD_{600} 不宜过高，以防过度衰老导致杂质（如基因组 DNA、内毒素）释放增加。

6.1.3 纯化工艺

（1）裂解：碱裂解是质粒生产的核心步骤。必须精确控制裂解时间（通常为 3-5 分钟） 和温度（室温）。裂解时间过长或温度过高会导致不可逆的 DNA 变性，形成不可逆开环质粒。

（2）澄清：裂解液的中和产物需通过深层过滤或离心有效去除细胞碎片等杂质物质。应明确过滤器的型号、载量、操作压力等参数。

（3）纯化：可分为层析法和无层析法。在不同生产技术平台上，可按需选择，但应优先确保 DNA 模板质量。

层析法：第一步（捕获）：常采用阴离子交换层析（AEX），在高盐条件下洗脱。应优化上样量（如 80%柱动态结合容量）、线性流速、洗脱盐梯度，以平衡收率与纯度。第二步（精纯）：常采用体积排阻层析（SEC） 或疏水相互作用层析（HIC）。SEC 可有效去除 RNA 和小片段 DNA，并转换缓冲液。HIC 可基于超螺旋与开环/线性质粒疏水性的差异，进一步提高超螺旋比例。另，根据工艺的不断优化提升，建议开发一步层析以提高纯化效率；采用一步层析工艺时，应充分验证杂质去除能力，确保宿主 DNA、宿主蛋白、RNA、内毒素等关键杂质控制满足质量标准。

无层析法：一般采用连续裂解控制碱裂解过程，后续通过深层过滤，沉淀，TFF 过滤等步骤去除产品相关和工艺相关杂质，如 HCD，HCP 和 HCR，保留目的超螺旋构象质粒。

（4）浓缩与换液：采用切向流过滤（TFF）。应优化膜包截留分子量（通常为 30-100 kDa）、跨膜压（TMP）、浓缩倍数和透析体积，确保目标质粒 DNA 回收率高且剪切力导致的线性化在可接受范围内。最终产物经 0.22μm 除菌过滤，分装至经去内毒素处理冻存管。

6.2 cell-free 线性化 dsDNA

6.2.1 合成原料与酶试剂管理系统

（1）原料层级与管理

cell-free 路线不使用菌种种子批，其序列信息的物理载体为化学合成的寡核苷酸（oligonucleotides，oligos），应按受控物料管理：合成 oligos 应附带供应商 CoA 并执行入厂放行或检验；关键酶试剂应附带 CoA 并登记批号；dNTP/NTP/辅因子应使用分子生物学级或经认证级别原料，批号可追溯。

（2）接收、检验与贮存

合成 oligo 与酶试剂应独立编号、标签、分区存放，严防混淆与交叉污染，贮存条件按供应商规定，建立复验期/有效期管理制度，过期或超复验期物料不得投入 GMP 生产。

（3）序列设计文件控制

每一条模板的参考序列（Reference Sequence） 须作为受控文件管理，含：版本号、生效日期、变更历史、批准签字；设计内容须包含：T7（或 SP6）启动子→5′UTR→目标基因 ORF→3′UTR→poly(A)编码序列及明确转录终止边界；设计上不含细菌复制起点（Origin of Replication，ori）及抗生素抗性基因骨架，并于放行检验中以 NGS 确证。

（4）单源性（序列来源追溯）

不依赖单克隆菌落，但须提供设计文件版本→合成 oligo 批号→组装产物→最终模板批 的完整追溯链；如采用环状中间体（用于扩增），该中间体须经全序列测定 确证无误，并限定使用

代次（如≤5 次传代扩增）。

6.2.2 体外组装与扩增工艺

（1）组装（Assembly）

将覆盖目标全长的合成 oligos 通过酶促方式拼接为全长线性 dsDNA；常用方法包括（但不限于）：重叠延伸 PCR（OE-PCR）、Gibson Assembly®、Golden Gate Assembly、连接酶依赖性组装；应做好记录。

（2）扩增（Amplification，可选但常见）

为获得足够产量，组装产物可经等温或有限循环扩增，如：滚环扩增（RCA，Phi29 驱动）、线性模板有限扩增（非高循环 PCR）。应做好记录，并包括关键参数如酶种类与用量、反应温度与时间、dNTP 浓度、产物长度监控。

（3）反应终止与粗纯

扩增结束通过加热灭活或蛋白酶处理+再灭活终止酶反应；可采用乙醇沉淀或磁珠法初步脱盐浓缩，去除大部分 dNTP、酶蛋白及短片段；粗产物应立即进入下步纯化，不宜长时间室温放置。

6.2.3 纯化工艺

cell-free 产物不含宿主 gDNA/HCP/RNA，主要杂质为：截短 dsDNA、残留酶、残留 dNTP、内毒素（源于耗材/试剂）、可能极少量环状副产物。

（1）初级纯化：脱盐与浓缩

采用切向流过滤（TFF）或超滤离心，优化跨膜压、浓缩倍数、透析体积等参数，去除 dNTP/盐/短片段，完成缓冲液置换。

（2）中级纯化：阴离子交换层析（AEX）

使用强阴离子交换介质有效去除截短 dsDNA、残余 ssDNA/oligo、内毒素，是纯化的核心步骤。

（3）精纯

可选二次 AEX 或体积排阻层析（SEC）。SEC 按分子大小分离，进一步去除痕量短片段/酶残留，完成缓冲液最终置换；二次 AEX（更陡梯度）进一步提高全长比例与内毒素清除。

（4）去内毒素

可使用去内毒素专用介质或 Triton X-114 两相萃取（工艺允许时），确保最终内毒素符合质量标准要求。

（5）浓缩与最终换液

采用切向流过滤（TFF）浓缩至目标浓度，透析入贮存缓冲液。最终产物经 0.22μm 除菌过滤，分装至经去内毒素处理冻存管。

6.3 厂房设施与设备

（1）环境监测：对于生产洁净区，应定期进行沉降菌、浮游菌、表面微生物和悬浮粒子的监测，并建立合理的警戒限和行动限。

（2）设备清洁验证：对于非一次性设备，清洁验证应证明能有效清除活性成分残留（DNA 模板）、工艺杂质（宿主蛋白、DNA、RNA）和清洁剂。应使用经验证灵敏度的检测方法（如 qPCR、TOC 法、ELISA）进行取样和检测。

（3）关键生产设备（如生物反应器、层析系统）应进行确认（IQ/OQ/PQ）。鼓励使用一次性技术以降低交叉污染风险。若设备重复使用，清洁方法必须经过验证。

（4）计算机化系统应符合数据可靠性要求，确保数据的真实性、准确性和可追溯性。

6.4 物料管理

（1）生产用物料（如培养基、缓冲液、酶）的质量标准应基于风险制定。优先选择药用级别物料；若无，需进行充分的质量评估。

（2）应建立供应商管理体系，对关键物料供应商进行审计和质量评估。

（3）应避免使用人源或动物源性材料。如必须使用，需进行外源因子风险评估。

（4）关键物料清单：应建立生产用关键物料清单，至少包括：宿主菌、层析填料、过滤器、一次性耗材（反应袋、管路）、内包装材料（储存管、瓶子）。

（5）内包装材料相容性：必须对直接接触产品的内包装材料进行相容性研究，评估其可提取物和浸出物，确保不会引入毒性物质或抑制后续酶促反应（如转录）的物质。

7 质量控制要求

7.1 总体原则

DNA 模板的质量控制应贯穿从起始物料到产品放行的全过程。质量标准应基于其作为 mRNA 转录模板的角色、工艺能力和风险评估而制定，确保产品的安全性、纯度和有效性。应建立入厂物料、中间体、产品的分级质量控制策略。所有检测方法应逐步完成方法学验证或确认，证明其专属性、准确性、精密度、线性、范围、定量限/检测限和耐用性。

本文 7.2 所列的 DNA 模板的质量控制标准，可支持 DNA 模板所应用的 mRNA 药物的药品上市许可申请和商业化阶段的需求。根据本文“5.5 不同阶段的风险评估及 GMP 符合性”，在临床前阶段和早期临床试验期间，在确保临床试验用药品安全的前提下，为了节约制造费用，DNA 模板的质量控制部分指标如杂质、细菌内毒素等，可以基于风险控制放宽。

7.2 成品 DNA 模板放行检验

每批 DNA 模板均应进行放行检验。检验项目、分析方法和可接受标准应参照《中国药典》相关通则、ICH Q6B 指南及本标准表 1 或表 2 的要求。关键质量控制指标应包括：

表 1 质粒 DNA 质量控制指标

质量属性	检测项目	推荐方法（细化）	可接受标准（示例）	依据/说明
鉴别	限制性内切酶图谱	**琼脂糖凝胶电泳**：使用高分辨率凝胶（如 0.8%-1%），与经测序验证的参照品比对。	所得条带数量与大小与理论预测完全一致。	确认质粒结构未被改变。
	全序列测定	**Sanger 法（双链）或二代测序**。必须覆盖**整个 ORF、启动子、UTRs、Poly(A)区、酶切位点**。	与理论参考序列的一致性应为 100%。	MCB 必检，WCB 和产品可检关键区域。

质量属性	检测项目	推荐方法（细化）	可接受标准（示例）	依据/说明
纯度与含量	浓度	**A260 紫外分光光度法**：使用**核酸定量专用模式**，样品需适当稀释使 A260 读数在 0.1-1.0 之间。	报告实测值，并根据用途设定范围（如 0.5-5.0 mg/mL）	需注意 dsDNA 的消光系数（通常 50 μg/OD）
	A260/A280, A260/A230	**A260 紫外分光光度法**：使用高纯度溶剂（如 TE 缓冲液）作为空白。	**A260/A280：1.8-2.0；A260/A230：2.0-2.5**	分别指示蛋白污染和有机溶剂/盐离子残留。
	超螺旋比例	**HPLC** 或**毛细管凝胶电泳荧光检测法**（CGE-LIF）。方法必须能**基线分离超螺旋、开环和线性**三种构象。	**≥85%**（建议目标，可根据工艺能力设定，但不应低于 80%。超螺旋聚体建议报告比例，如需纳入需确认未对下游线性化和 IVT 产生影响）	**关键质量属性**，直接影响转录模板的有效性。
杂质	宿主菌 DNA 残留	**qPCR 法**：针对宿主菌**单拷贝基因（如 rnc 基因）**设计特异性引物探针。	**< 1% (w/w)**或 **< 10 ng / μg pDNA**	关键安全性指标，需进行方法学验证。
	宿主菌蛋白残留	**ELISA 法**：使用**抗大肠杆菌总蛋白的多克隆抗体**。	**< 0.1%(w/w)** 或**< 1 ng/μg pDNA**	关键安全性指标
	残留 RNA	**荧光染料法**：使用可与 RNA 特异性结合且对 DNA 不敏感的染料（如 RiboGreen）。**琼脂糖凝胶电泳**：灵敏度较低，作为补充。	**< 1% (w/w)**或低于定量限	工艺纯化效果指标
	RNase 残留	**荧光探针法**：使用对 RNase A/B 敏感的 RNA 荧光底物，通过监测荧光衰减来定量酶活性。	**低于方法检测限**（通常要求极低，如<0.3125 ng/mL）	**关键安全性指标**，防止 mRNA 产物降解。
	抗生素残留（如适用）	**ELISA** 或**微生物抑制法**。	根据所用抗生素的毒理学数据设定**严格的残留限度**。	仅在生产过程中添加抗生素时检测
安全性	无菌检查	**《中国药典》1101**，可采用**薄膜过滤法**	**无菌生长**	关键放行指标，可根据风险评估选择其中一项进行控制
	微生物限度	**《中国药典》1105**，可采用**薄膜过滤法**	**应符合规定，如＜2 CFU/mL**	
	细菌内毒素	**《中国药典》1143 动态显色法**或《中国药典》9251 重组 C 因子法（rFC）	**< 100 EU/mg pDNA** 或按 mRNA 体外合成的控制限度倒推	所选放行方法应符合目标市场相关法规要求

质量属性	检测项目	推荐方法（细化）	可接受标准（示例）	依据/说明
其他	外观	目视检查：在白色和黑色背景下观察。	应为**无色、澄明**的液体，**无可见异物**。	基本性状
	pH	精密 pH 计测定	应符合企业内控标准（如 7.0-8.5）	确保储存稳定性

表 2 cell-free 线性化双链 DNA 质量控制指标

质量属性	检测项目	推荐方法（细化）	可接受标准（示例）	依据/说明
鉴别	全序列一致性	Sanger 法（双链）或二代测序，需覆盖 ORF、启动子、UTRs、Poly(A)区、限制性位点/末端连接区。	与理论参考序列一致（关键功能区除 Poly(A)外应 100%一致）	关键项目，每批检测
	线性结构确认	毛细管凝胶电泳（CGE），必要时酶切或特异 PCR 辅助。	仅观察到目标线性构型；无明显异常构型。 若为闭合末端线性 dsDNA（closed-ended/LC-dsDNA），则需确认末端结构符合设计	关键项目，每批检测
纯度与含量	含量/浓度	荧光法（dsDNA 染料）、UV 吸收；必要时 dPCR/ qPCR	标示浓度 ± 10%	需注意 dsDNA 的消光系数（通常 50 μg/OD）
	长度/完整性	毛细管凝胶电泳（CGE）（含微流控平台）	主峰迁移对应设计全长；Full- length linear% ≥ 90%（工艺稳定后不应低于 80%）；短片段（< 0.9 ×设计全长）≤ 5%（或 ND） NGS（如触发）：与参考序列 100% 匹配（关键元件区）；off- target reads ≤ 0.5%（或经验证上限）；indel 率 ≤ 1%。	关键项目，电泳可用于观察线性 DNA 典型分离图谱与大小分布。
	纯度	A260/A280：微量紫外分光光度法（NanoDrop 或同类）	1.80 – 2.00	指示蛋白/酚类残留；不作为放行浓度唯一依据
		A260/A230：微量紫外分光光度法	≥ 2.0（或 2.0–2.5）	指示盐/有机溶剂/残留 dNTP 清除效果

质量属性	检测项目	推荐方法（细化）	可接受标准（示例）	依据/说明
杂质	截短/错配杂质画像	二代测序读段分布分析（off-target / indel 定量）	Off-target reads ≤ 0.5%（或经验证上限）；Indel 率 ≤ 1%	cell-free 路线特有核心 CQA，每批检测
	环状副产物	毛细管凝胶电泳（CGE）（观察 sc-like 迁移区）或二代测序环读检测	Not detected（LOD ≤ X ng/μg 或 ≤ 1% area）	若工艺涉及连接/末端互补，可能产生环状副产物；须证明清除
	残留酶活性	功能性底物检测（针对 Phi29 / Ligase / Polymerase 等）	Not detected @ 灵敏度（如 ≤ 0.01 U/mL 或等效）	残留酶可能干扰 IVT 或降解模板；
安全性	无菌检查	《中国药典》1101；可采用薄膜过滤法	无菌生长	关键放行指标，可根据风险评估选择其中一项进行控制
	微生物限度	《中国药典》1105；可采用薄膜过滤法	应符合规定，如＜2 CFU/ mL	
	细菌内毒素	《中国药典》1143 动态显色法或《中国药典》9251 重组 C 因子法（rFC）	≤ 2 EU/mg dsDNA 或按 mRNA 体外合成的控制限度倒推	所选放行方法应符合目标市场相关法规要求
其他	外观	目视检查：在白色和黑色背景下观察。	应为无色、澄明的液体，无可见异物。	基本性状
	pH	精密 pH 计测定。	应符合企业内控标准（如 7.0-8.5）。	确保储存稳定性。

7.3 稳定性研究

（**1**）长期稳定性：应放置在拟定的长期贮存条件下（如-20℃ ± 5℃、-80℃ ± 10℃），于第 0、3、6、9、12、24、36 个月末取样检测（可根据实际情况减少考察点位，建议至少做到 24 个月）。考察项目应至少包括所有 CQAs（无菌或微生物限度可适当减少检测点位）。对于临床早期阶段样品，若完整长期稳定性数据尚未完成，可采用中期稳定性数据支持放行，同时持续完成长期稳定性考察。

（2）加速稳定性：应放置在加速条件下（参考现行《中国药典》、ICH 对生物制品的稳定性考察相关要求），于第 0、1、2、3、6 个月末取样检测。可选做，以用于评估在偏离贮存条件时的降解情况，并支持运输验证。

（3）使用稳定性：如产品需要复融或多次冻融/开启使用，应进行使用中稳定性研究，确定复融后的保存条件和时限、冻融次数等。一般用于生产临床用 mRNA 药物的 DNA 模板，不建议反复冻融后使用。

对于用于个性化 mRNA 产品的 DNA 模板，因产量小，可采用代表性序列（覆盖目标长度与

GC 范围）开展平台稳定性研究，支持拟定贮存条件与复验期。稳定性考察项目应包括浓度、A260/A280、全长%（CE）、截短杂质%（NGS/CE）、内毒素、残留酶活性、环状 DNA（如适用）等项目。

8 风险管理

8.1 风险识别与评估

应使用失效模式与影响分析（FMEA） 等工具，系统性地识别生产全过程中可能影响 DNA 模板 CQAs 的潜在失效模式

高风险环节示例：

①种子批：混淆、交叉污染、遗传不稳定性。

②发酵：噬菌体污染、质粒丢失、代谢副产物积累、交叉污染、以及反应器可放大性。

③纯化：裂解工艺可放大性、层析柱载量过高导致收率与纯度下降、TFF 过滤收率过低、批次间交叉污染。

④分装：产品分装现场清场不彻底导致的产品、包材的混淆和差错。

⑤人员：未受训人员操作关键设备、无菌操作不规范，计算机化系统权限管理不当、数据篡改/误操作风险。

8.2 风险控制

针对识别出的高风险点，应制定并实施控制措施：

①技术措施：如采用一次性耗材技术、工艺过程操作尽量保持密闭性，增加中间过程控制点、进行批次间清洁验证。降低交叉污染的风险。

②管理措施：如严格的人员培训和资质确认、清晰的 SOP 和批生产记录、完善的变更控制和偏差管理程序。

8.3 风险沟通与审核

质量风险管理的活动与结果应在相关部门（生产、QA、QC）之间有效沟通。风险管理文件应定期审核，特别是在发生重大变更、出现重大偏差或产品上市后，应进行再评估。

9 文件管理

9.1 总体要求

应建立完善的文件管理体系，确保 DNA 模板生产、检验和储存的全过程可追溯、数据真实可靠。

9.2 批档案

每一批 DNA 模板均应建立一个完整的批档案，至少包括：

①批生产记录：所有单元操作的完整、实时记录，包括物料信息、设备编号、工艺参数、操作人员签名及日期/时间。

②批检验记录：所有原辅料、中间体、产品的检验原始数据和报告。

③包装记录：包装、贴签过程的记录。

④偏差报告：本批次生产/检验过程中发生的所有偏差及调查报告。

⑤放行审核报告：由质量受权人签发的产品放行决定。。

9.3 文件类型

（1）质量管理文件：质量手册、标准操作规程（SOP）、偏差管理、变更控制、CAPA 等。

（2）技术文件：生产工艺规程、批生产记录、批检验记录、工艺验证报告、清洁验证报告。

（3）质量控制文件：质量标准、检验操作规程、稳定性研究方案与报告。

（4）资质证明文件：物料供应商档案、设备与系统验证文件、人员资质档案。

9.4 数据完整性

所有与产品生产和质量相关的记录和数据，包括纸质和电子数据，应符合《药品记录与数据管理要求（试行）》。所有由计算机化系统产生的电子数据（如生物反应器参数、HPLC 图谱、qPCR 数据）应符合 ALCOA+原则，即：

①可归因性：明确是谁在何时创建或修改了数据。

②清晰可读：数据始终可读且可理解。

③同步性：在操作或事件发生时即被记录。

④原始性：数据是首次捕获的，或作为经认证的副本保存。

⑤准确性：数据正确无误。

⑥持久性：数据在记录的保存期内始终可用和可读。

⑦可用性：在需要时能够检索、搜索和访问数据