

多糖结合疫苗药学研究及评价技术指导原则 (试行)

国家药品监督管理局药品审评中心

2024 年 12 月

目 录

一、前言	3
二、生产用菌种及种子批	4
(一) 生产用菌种	5
(二) 种子批	5
三、培养基和生产用原材料	6
四、生产工艺	6
(一) 一般要求	6
(二) 多糖抗原	9
(三) 载体蛋白	10
(四) 结合物原液	11
(五) 制剂处方及生产工艺	13
五、质量研究	15
(一) 产品质量特性研究	15
(二) 杂质分析	18
(三) 生物学活性	19
六、质量标准	19
(一) 精制多糖	20
(二) 多糖降解物	20
(三) 多糖活化物、衍生物	20
(四) 载体蛋白	21
(五) 单价结合物原液	21
(六) 半成品	22
(七) 成品 (不含多联疫苗)	22
(八) 分析方法开发和验证	23
(九) 标准物质	26
七、稳定性研究	27
八、直接接触制品的包装材料和容器	27
九、名词解释	28
十、参考文献	28
十一、缩写词列表	29

一、前言

多糖结合疫苗 (Polysaccharide Conjugate Vaccine), 是指采用化学或其他方法将病原微生物的多糖抗原结合在载体蛋白上所制备成的多糖-蛋白结合疫苗, 用于提高细菌疫苗多糖抗原的免疫原性, 如 b 型流感嗜血杆菌多糖结合疫苗、脑膜炎球菌多糖结合疫苗和肺炎球菌多糖结合疫苗等。细菌多糖为 T 细胞非依赖性抗原 (T Cell-Independent Antigen ,TI-Ag), 多糖结合疫苗可赋予多糖抗原组分 T 细胞依赖性抗原 (T Cell-Dependent Antigen ,TD-Ag) 特征, 诱导产生的抗体可通过同种型转换、亲和力成熟和免疫记忆等功能提升疫苗的临床有效性。

多糖分子的多分散性、活化及结合位点的随机性、化学反应对糖链的影响等决定了多糖抗原中间产物及结合物的不均一特征。同时由于多糖结合疫苗生产涉及多个工艺步骤, 且多糖及载体蛋白的存在形式、抗原表位等在各工艺步骤中均可能发生变化并传递到下一步反应。因此, 在整个药学开发过程中, 需关注工艺步骤对各个中间产物抗原性、均一性和质量可控性的影响, 加强工艺控制及过程控制, 开展全面的工艺研究及验证, 确证工艺参数对质量属性的影响, 确保批间一致性及工艺稳健性。建议同时关注整个工艺过程中多糖/蛋白结构变化趋势及生物学活性变化趋势, 采用理化结构解析及免疫反应表征等多种分析方法和策略综合提升此类产品的开发水平及质量控制, 并鼓励积累构效关系相关研究数据。

多糖结合物的全面结构解析尚存在技术挑战, 因此应建立工艺表征 (Process Characterization)、工艺过程控制、采用多种分析手段的综合质控体系。多糖结合疫苗质控方法多为理化方法和免疫化学方法的组合或联合使用, 应建立灵敏、特异性强的检测方法体系, 并

需根据不同工艺阶段的产物特性选择适用的方法；对于含量低或需预处理的方法，应确保检测过程能够反映产品的真实状态；对于多糖含量等检测方法，如在不同生产阶段使用了不同原理的方法，应确保两种方法具有相关性或等效性。

近年来，随着技术的发展和作用机制（B 细胞表位、T 细胞表位等）的研究，多糖结合疫苗未来的研究方向包括新型病原体的开发、更高价次多价疫苗或多联疫苗的开发、新型含有更多 T 细胞表位或额外功能的载体蛋白开发、新型的结合方式（如，生物结合、点击化学等）开发等。

本指导原则适用于采用化学法制备的共价结合多糖结合疫苗及其为组分开发的联合疫苗。对于包含多糖结合疫苗的多价疫苗以及多联疫苗，在进行药学研究时应一并参考联合疫苗的相关指导原则。对于采用新型载体蛋白，新型结合技术路线如基因工程表达的结合疫苗、多抗原呈递系统(Multiple Antigen-Presenting System, MAPS)非共价结合多糖结合疫苗等，以及其它技术生产的多糖结合疫苗，在借鉴本指导原则时需根据产品相关特点和属性开展相应研究。

多糖结合疫苗药学研究应符合《中华人民共和国药品管理法》、《中华人民共和国疫苗管理法》、《药品注册管理办法》、《中华人民共和国药典》的相关要求。临床试验用样品的生产应符合现行版《药品生产质量管理规范》临床试验用药品（试行）附录的相关要求。本指导原则需结合国内外其他指导原则一并应用。

二、生产用菌种及种子批

多糖结合疫苗的生产用菌种包括用于多糖抗原生产的菌种和用于载体蛋白生产的菌种。多糖抗原和载体蛋白生产用菌种包括天然分离菌种及经遗传学改造菌种。对于生物合成多糖结合疫苗等技术路线

使用的遗传学改造菌种，建议根据产品特点开展更为充分的研究。

（一）生产用菌种

生产用菌种应符合《中华人民共和国药典》相关规定。应参照《中华人民共和国药典》及相关指导原则要求，明确生产用菌种来源，提供生产用菌种的来源、历史（包括分离、鉴定、谱系图等）、构建过程、特性和型别等研究资料。应结合多糖产物等结构确证对多糖抗原生产用菌株进行确证和鉴定，必要时可采用核磁等方法对多糖产物进行构型确认。

（二）种子批

应按现行版《中华人民共和国药典》相关规定建立种子批，并提供国家药品检定机构相应的检定报告。

应提供各级种子的制造及检定记录，说明种子扩增的培养基和培养条件、传代方法、制备规模和保存方式，对传代次数应严格限定。

种子批的检定，应根据特定菌株确定检测项目，通常包括培养特性、染色镜检、生化反应、免疫学试验、纯菌检查等；类毒素生产用菌种还包括产毒试验和特异性中和试验等。采用重组基因工程技术表达的重载体蛋白生产用种子批检定，还应对表达系统的遗传稳定性、目的基因表达稳定性和生产稳定性等的相关指标进行考察。

稳定性研究包括贮存稳定性和传代稳定性，应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。对于传代稳定性研究，应开展模拟传代稳定性研究及实际生产工艺传代稳定性研究，除常规种子批放行检测外，对于基因工程构建的载体蛋白种子批，应在临床试验申请时尽可能提供目的基因及两翼关键元件测序研究数据，并关注与载体蛋白减毒等功能相关位点的遗传稳定性。对于多糖生产的种子批，应结合多糖抗原的结构、

分子大小及分布等评估种子批的传代稳定性及商业化生产的适用性，建议开展产物表达相关基因的分子遗传学特性研究。

三、培养基和生产用原材料

多糖结合疫苗生产过程中使用的所有原材料与产品的安全性、有效性和批间一致性密切相关，包括生产过程中使用或添加的物料（如培养基及其添加成分、纯化试剂、偶联试剂等）等。应参照《中华人民共和国药典》等相关要求基于风险评估的原则进行质量控制。部分原材料会对产品反应动力学、批间一致性及免疫原性等产生明显影响，应进行充分评估，并对原材料进行适宜的预处理或建立其他适宜的控制措施。

对于动物源性材料（包括在细胞库/种子批系统制备过程中使用的原材料）和关键复杂原材料，要明确来源、特性鉴定（如适用）、质量标准等，并进行外源因子安全性（包括 TSE/BSE 风险）和批间一致性评估。培养基成分应尽可能避免使用动物源性材料，禁止使用来自疯牛病疫区的牛源性材料。鼓励尽可能减少或避免动物源性原材料的使用。对于可能引入毒性的生产用原材料及其中间产物，应充分评估安全性风险。

四、生产工艺

（一）一般要求

多糖结合疫苗工艺开发，应遵循质量源于设计的理念，根据多糖、载体蛋白和结合物等特性设计目标产品质量概况（Quality Target Product Profile, QTPP），综合考虑临床预期（临床用途、给药方案、剂量规格等）、质量特性、工艺路线匹配性、工艺的可控性及操作性等因素合理设计工艺路线。同时应基于产品和工艺的特点，参考国内

外相关指导原则的质量风险管理理念，科学利用风险评估工具，识别并逐步确定关键质量属性（Critical Quality Attributes, CQA）和关键工艺参数（Critical Process Parameters, CPP）；从生产工艺、质量控制和稳定性等方面进行风险评估，根据风险评估结果，结合对产品和工艺的理解制定相应的风险控制策略。风险控制策略应贯穿于产品的全生命周期，随着新知识、生产经验的积累和对产品质量属性的理解不断更新。

整体上，应围绕中间产物和成品预期的关键质量属性及工艺特点，开展工艺参数的研究和优化。在整个生产工艺过程中，尽可能保持多糖分子的抗原决定簇、结构或者特异基团等不被显著破坏，并实现预期的免疫原性。应关注全工艺过程不同工艺步骤及工艺参数对分子大小、抗原性、特异基团等的影响，为工艺路线及参数的确立提供科学依据。建议以理化指标、动物体内免疫原性等为考察指标，对关键工艺参数范围、质量属性范围进行充分研究及表征，以确保拟定工艺的可控性和稳健性，确保在拟定工艺参数及质量标准范围内的产品安全性和有效性可比。以代表性型别进行工艺研究时，需明确代表性型别的选择依据，关注型别之间的差异及拟定工艺在不同型别产品中的适用性。

在工艺研究和工艺开发过程中，应对关键工艺参数及其控制范围进行建立、优化和确认，逐步明确工艺过程控制策略。可依据工艺开发和多批次中间产物及制剂生产阶段的工艺过程控制信息，拟定合理的过程控制项目及限度。

非临床研究批次与临床研究批次应具有一定的代表性。临床研究批次制备工艺应具备一定规模，并且还应具有一定的生产连续性和规模放大可行性。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、规模和场地，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。

对于商业化生产工艺验证，应根据产品的生产工艺和质量属性，以风险评估的方式确定工艺验证内容，一般包括工艺的一致性、关键工艺参数的稳健性、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的稳健性。建议扩展的验证项目包括但不限于不同工艺阶段产物分子量大小及其分布、特异基团保留状态等。

此外，多糖蛋白结合疫苗生产过程通常包括多糖降解、多糖活化或衍生、载体蛋白衍生、多糖蛋白结合、未结合的活化位点封闭等一系列化学反应过程。参与反应的多糖与蛋白质均为大分子物质，各个工艺参数都有可能影响最终的结果，反应过程的一致性较大程度决定了产品质量一致性。动力学曲线研究应贯穿药学研究的全生命周期，工艺研究时建议进行系统的反应动力学研究，可为关键工艺参数的确定提供依据；工艺确认及验证时开展反应动力学研究，有助于评估反应过程的一致性，从而更好的控制产品质量。

多糖结合疫苗在不同生产阶段可划分为不同的生产单元（多糖生产、结合物生产等）和工艺类型，上市申请阶段应固定生产架构和模式，并完成全面的工艺验证。由于多糖性质等差异，不同群/型工艺参数不完全一致，应谨慎评估采用括号法/矩阵法进行工艺验证的策略，并基于生产线的设置情况，合理制定商业化规模工艺验证方案，原则上，上市前对各个型别应至少完成连续三批次验证。对于在已上市产品中增加价次，如共有型别未发生工艺变更，可减免相应型别的

相关验证。

（二）多糖抗原

多糖抗原生产工艺一般包括发酵、杀菌（或除菌等）、纯化等三个阶段。

发酵工艺，应根据菌种的生长代谢和产物生物合成途径，合理选择培养基和发酵工艺。应对培养基成分及 pH、接种比例及种子浓度、发酵工艺参数（温度、通气、溶氧、转速、罐压等）、补料时机、发酵终点等进行研究与优化，明确生产用菌种的传代次数、制备条件和培养终点，加强不同批或不同培养罐中细菌生长及多糖表达量的一致性研究，通常考察指标包括收获终点时的菌体密度和单位体积培养基中的多糖产量等。建议开展细菌生长曲线和多糖表达量曲线等研究，合理确定发酵终点。细菌发酵结束后应取样进行纯菌试验，证明发酵过程为纯菌培养。

杀菌工艺，应对杀菌剂种类和浓度、杀菌条件（温度、时间、细菌浓度等）进行研究优化。应进行杀菌或除菌效果研究和验证，鼓励在商业化规模工艺确认批进行杀菌动力学曲线研究。杀菌工艺若为细菌的自溶过程，可能产生 C 多糖等产品相关杂质；另外杀菌工艺也对抗原纯度等存在潜在影响，建议进行杀菌工艺对多糖质量和结构的影响研究，并在工艺验证批予以确认。

纯化工艺，多采用沉淀法（有机溶剂沉淀、变性沉淀、表面活性剂沉淀等）、过滤法（深层过滤、炭滤等）、层析和超滤等。应根据产品特性合理设计纯化工艺路线，根据目标产物特性和纯化原理，对目标产物浓度、温度、流速、试剂配方及浓度、pH 值、离子强度、处理时间、压力、载量等关键工艺参数及其控制范围进行研究与优化，考察各项工艺参数对多糖抗原关键质量属性的影响，如分子大小、特异

基团的变化等，并对目标产物回收率、产品及工艺相关杂质去除率开展研究，根据研究结果确定工艺参数及过程控制策略。对确定的生产工艺开展充分的工艺验证，除常规放行指标外，应验证各工艺步骤的工艺杂质去除率等，鼓励采用核磁共振技术（NMR）等先进方法进行表征。生产过程中应控制细菌内毒素水平，对于生产用菌株为革兰氏阴性菌的，应包含去除内毒素的工艺步骤并予以充分验证。

（三）载体蛋白

载体蛋白包括破伤风/白喉类毒素、细菌毒素突变体、细菌外膜蛋白等多种类型。不同载体蛋白质量属性、可结合位点丰度、免疫原性等均存在较大差异。应提供选择载体蛋白的依据、载体蛋白的优势等资料。载体蛋白应能有效的将多糖抗原由 TI-Ag 转化为 TD-Ag，激发机体的体液免疫和/或细胞免疫，诱导免疫记忆，不引起机体产生严重超敏反应。载体蛋白的种类、结构、纯度、结合位点数量等均影响结合反应效率、结合物免疫原性及安全性，应综合考虑载体蛋白对结合疫苗安全性及有效性的影响，结合原液生产工艺、质控策略、规模化生产可行性等进行载体蛋白的选择。对含结合疫苗组分的多价、多联疫苗，还需结合成品总蛋白含量、免疫剂次等，对接种后可能产生的免疫抑制、免疫干扰、安全性影响等进行充分评估及研究，合理选择载体蛋白种类及添加量。

载体蛋白生产工艺主要包括发酵、纯化等工艺步骤，应合理选择工艺路线，以确保蛋白质氨基含量和单体蛋白纯度满足结合工艺要求。可参考类毒素和基因工程重组蛋白等相关指导原则开展工艺研究，建立全面的过程控制策略，对各工艺步骤中非目标蛋白、蛋白聚体、工艺相关杂质的去除效果及结合位点保留比例进行研究。类毒素载体蛋白因脱毒工艺会形成蛋白聚体并封闭氨基等结合位点，与其作为类毒

素疫苗（如，破伤风疫苗等）组分的考虑不一致，可进行脱毒工艺的进一步优化，在确保脱毒完全基础上尽可能保留更多结合位点，并关注脱毒工艺的批间一致性。为确保结合物的均一性和质量可控性，应尽可能提高载体蛋白的纯度，建议在传统类毒素生产工艺基础上设置有效的纯化工艺以将类毒素分子大小及分布控制在一定范围内。

（四）结合物原液

基于多糖抗原结构及特性、载体蛋白种类、工艺路线原理、工艺可控性、结合物免疫原性等多种因素，在保证工艺可行性、工艺可控性、免疫原性的基础上，综合评估并选择适宜的工艺路线。此外，需关注各个工艺阶段可能存在的副反应（Side Reaction）及可能出现在终产品中的副产物。

1、多糖降解

多糖降解可提高结合物的均一性、批间一致性及工艺操作性（如，降低黏度等），另外某些多糖抗原可通过降解引入结合位点（如，末端羟基等）。通常采用物理（超声、机械剪切）和化学（水解、氧化等）等方法进行多糖降解。此外，部分活化、衍生工艺可能伴随多糖的降解（如，高碘酸钠氧化、溴化氰活化等）。降解产物的分子量大小及分布将影响结合物的免疫原性，降解过程中由于糖链的断裂可能影响特异基团的含量，因此应提供多糖降解分子大小及分布范围的拟定依据，以多糖降解物的分子大小及分布、抗原性等关键质量属性为考察指标对降解工艺路线以及工艺参数进行研究与优化，开展降解动力学曲线研究。在工艺验证中对多糖分子大小及分布、特异基团含量、抗原性等予以确认，建议至少采用商业化规模工艺确认批进行降解动力学曲线验证。

2、活化、衍生

活化和衍生工艺是指通过对多糖或蛋白质分子的化学修饰，引入新的化学位点的过程。活化、衍生工艺路线较多且参与反应的基团和机理均不相同，应基于多糖和蛋白的结构和特性等选择活化和/或衍生工艺，并进行相应的研究和验证。对于反应速度较快、活性较高/易水解的化学反应等，可考虑采用适宜处理方式（如低温条件等）开展动力学曲线等工艺表征和验证，并鼓励先进分析方法（如 NMR、GC-MS）的使用。

工艺开发过程中应评估新化学位点的引入及其数量对抗原结构和抗原性的影响，按照结合工艺需求拟定活化度、衍生率等关键质量属性范围，据此研究确定化学反应的抗原浓度、反应溶液体系、活化和衍生试剂加入量、温度、pH 值、反应时间等关键工艺参数，开展活化、衍生动力学曲线研究，确认工艺参数与活化度或衍生率的关系。对于多糖的化学修饰，还应考虑化学修饰对特异基团（如 O-乙酰基等）含量、多糖分子大小和抗原性等的影响，制定参数范围，采取有效的工艺控制策略。对于载体蛋白的化学修饰，应考虑化学修饰过程对蛋白质单体含量的影响，避免形成过度交联。

应选择有效的纯化工艺去除工艺相关杂质，包括活化试剂、有机溶剂、淬灭剂、未被结合的间隔剂以及相关试剂的副产物等，并对生产过程中可能引入或产生的杂质进行全面评估验证以确定纯化效果。

对于活化、衍生工艺的验证，除放行检测外，建议开展化学修饰对多糖特异基团（如 O-乙酰基等）含量、多糖分子大小和抗原性等的影响验证；对蛋白单体含量、结合位点含量影响的验证，建议至少采用商业化规模工艺确认并开展活化、衍生动力学曲线研究；进行杂质去除效果验证。

3、结合工艺

结合工艺系将多糖和载体蛋白进行共价或非共价结合，应提供结合工艺路线选择依据及其反应原理。

工艺开发应对关键工艺参数及其控制范围进行研究与确认，包括多糖蛋白投料比及反应浓度、反应 pH、温度、反应时长、终止反应条件等。应开展结合动力学曲线研究，关注活化和衍生基团的利用效率，并优化反应参数以降低未反应基团比例。应明确各纯化工艺步骤目的，并对纯化工艺的关键工艺参数进行研究与确认，根据结合物的关键质量属性，对不同收集组分的多糖结合物进行评估，合理地确定收集组分。结合反应和纯化工艺均应建立相应的过程控制策略，通过对反应参数和纯化参数的监测和控制实现保证结合物质量。

多糖/蛋白比、结合物分子大小及分布、游离多糖、游离蛋白等关键质量属性，均对免疫原性产生影响，建议在工艺开发过程中开展可覆盖工艺及产品质量属性变异范围的动物免疫原性研究，以确认工艺的稳健性。

结合及纯化工艺验证除常规放行检测项目外，应对目标分子大小的单价结合物的回收率，游离蛋白、游离多糖、未结合的活化位点和工艺相关杂质的去除率等予以关注。建议至少采用商业化规模工艺确认批开展结合动力学曲线验证，可通过游离蛋白/游离多糖-时间曲线进行工艺可控性的验证。

（五）制剂处方及生产工艺

多糖结合疫苗涉及含佐剂疫苗、多价疫苗、多联疫苗等多种形式。制剂中含有结合抗原、游离抗原、游离蛋白等多种组分，可能存在多种抗原、佐剂、缓冲液/辅料之间的相互作用。疫苗制剂可能需要通过抗原配制、缓冲液配制、佐剂配制、抗原-佐剂吸附、半成品配制、冻干等多步工艺实现。应提供制剂处方、工艺及其确定依据，辅料来

源、质量标准及检验报告。

制剂处方应明确每种组分的作用(包括佐剂、稳定剂、缓冲体系、表面活性剂等)、含量以及选择的依据;可结合既往同类品种研发情况、平台知识,通过不同制剂处方/工艺对动物药效学研究(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,提供相关依据。对于多价/多联疫苗抗原含量,应对不同血清型/抗原之间的相容性开展研究,并建议对免疫原性潜在干扰予以关注。应通过非临床研究及早期临床研究初步确定抗原含量,并在确证性临床试验中予以验证。拟上市产品的制剂处方(包括配制点、规格等)应与确证性临床用样品一致。

制剂工艺开发应提供初步的研究资料(包括研究方法、研究结果和研究结论)以说明关键工艺步骤及其参数控制范围的合理性。半成品配制工艺,对原液和辅料的加入顺序及加入量、混合搅拌的速度、时间和温度控制等参数进行研究与优化。确保制剂过程中保持结合物的完整性和制剂的批间一致性。如为冻干制剂,应对冻干工艺的关键工艺参数及其控制范围进行研究与优化,提供冻干曲线;开展冻干工艺对冻干前后结合疫苗质量及相关特性、效力等影响的研究。

如需添加佐剂,应说明添加佐剂的合理性及必要性,提供佐剂种类、用量以及与抗原的最佳配伍剂量相关研究数据。使用佐剂所带来的潜在获益必须超过其所带来的风险。应参照佐剂相关指导原则提交全套的佐剂药学研究资料,如果佐剂与抗原相互吸附,应提供吸附动力学曲线,在产品开发过程中开展各个型别结合物吸附率的相关研究。

根据多糖结合疫苗工艺研究及验证、质量标准、稳定性考察、临床试验结果确定产品规格。多糖结合疫苗的产品规格原则上应与配制点一致。

五、质量研究

质量研究需选择代表性批次（如非临床研究批次、临床研究批次和（或）商业化工艺批次等）和/或适当生产阶段的样品作为研究对象，除进行常规放行检验分析外，应采用适宜分析方法进行质量特性分析研究，通常包括结构特征、纯度、杂质分析（工艺相关杂质及产品相关杂质）、生物学活性等研究，应提供尽可能全面的信息以反映样品的质量属性。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，导致分析结果无法代表样品的实际质量。

（一）产品质量特性研究

1、不同阶段中间产物糖链相关的质量特性研究（精制多糖、降解产物、活化物、衍生物、结合物原液等）

糖链的解析高度依赖于先验知识，如为已知多糖，可参考国内外药典、指导原则及相关文献开展研究；如为未知多糖，则需要进行完整的结构解析。

精制多糖、降解产物、活化物、衍生物、结合物原液等的质量特性研究项目主要包括单糖组成、结构（鉴别、特异基团含量）、分子大小及分布、糖链与载体蛋白的结合状态（结合方式、比例、氨基酸利用率等）、产品相关杂质和工艺相关杂质残留、安全性指标（如细菌内毒素、无菌）等。

多糖降解物的质量研究一般采用与精制多糖相同的方法，并关注相应质量属性的变化情况。活化物、衍生物是经过化学修饰的中间产物，应根据活化、衍生基团的物理化学特性选择适宜的方法对修饰度予以表征。修饰度范围应通过理化指标、生物学活性进行确认，避免对天然抗原的过度修饰。可采用定量或半定量的免疫化学方法（如

ELISA 法、速率比浊法),考察多糖抗原修饰前后的抗原活性变化情况,也可采用核磁共振的方法考察多糖抗原结构是否存在变化。

单价结合物原液质量特性研究项目主要包括多糖/蛋白比、游离多糖、游离蛋白、分子大小及分布、糖链与载体蛋白的结合状态、未反应的活化基团含量等。多糖/蛋白比、游离多糖、游离蛋白等既与结合物免疫原性相关,又是衡量批间一致性的重要指标,应采用适宜方法进行检测。多糖和蛋白质形成结合物后,有些特异性化学基团采用原有方法难以检测,应尽量采用其它适宜、可行的方法予以检测。应当采用适宜方法证明单价结合物的多糖或载体蛋白上不含活化的功能基团,或者通过检测封闭反应的产物或可监测封闭反应以显示未发生反应的功能基团的残留情况,对于可能存在的方法学局限应进行充分说明。结合状态系目前结合物解析的难点,可采用 NMR、液质联用分析(LC-MS)、氨基酸分析等方法开展研究。

核磁共振技术可用于不同阶段的中间产物(精制多糖、多糖降解物、多糖活化物、多糖衍生物、多糖结合物)中糖链结构的完整解析,包括单糖种类、连接方式、修饰基团等。部分多糖结合物样品核磁解析存在技术难度,建议在临床研究期间不断完善相关检测。

核磁共振技术包括采用一维核磁谱图(氢谱、碳谱、磷谱)、二维核磁谱图(^1H - ^1H COSY、 ^1H - ^1H TOCSY、 ^1H - ^{13}C HSQC、 ^1H - ^{13}C HMBC),通过对化学位移、积分、偶合常数信息的整合分析,完成对糖链结构的完整解析。对于已知多糖,应至少提供一维核磁图谱,明确特征化学位移范围及其对应的质子或化学元素,鼓励开展二维核磁图谱研究。定量核磁共振法整合了定量氢谱法和定量磷谱法,可高效进行精制多糖和多糖降解物中多糖、磷、以及各特异基团(糖醛酸、氨基己糖、甲基戊糖、O-乙酰基、甘油基团和丙酮酸基团等)含量的测定。应根

据多糖结构和含量分析的目的，选用检测性能足够高的核磁共振仪，选择适宜分析方法和样品预处理方式进行综合解析；对于核磁共振图谱解析过程应建立综合分析的手段。

鼓励采用高效液相色谱联用多角度激光散射 (High Performance Size Exclusion Chromatography Multiangle Laser Light Scattering, HPSEC-MALLS)、密度梯度离心等方法进行精确分子量和分子大小及分布等研究。

2、载体蛋白

应依据载体蛋白类型、工艺路线开展质量特性研究，关注蛋白单体含量/均一性、结合位点含量等影响结合反应的质量特性。

类毒素载体蛋白，除参照《中华人民共和国药典》要求的项目外，还应对均一性、氨基含量等开展研究。重组载体蛋白，除纯度、单体含量、结合位点丰度外，应按重组 DNA 蛋白制品要求开展质量研究，包括一级结构（氨基酸组成、游离巯基、翻译后修饰、序列覆盖率、分子量、肽图、氨基酸序列、末端氨基酸序列分析等）、高级结构（圆二色谱等）、电荷异质性（等电点测定、电荷异质体等）及分子大小异质体（单体、聚体、降解片段等）开展研究。载体蛋白的纯度高度依赖于检测方法，应选用对单体和聚体分离度较好的方法，并开展对各峰组分归属解析等研究。

部分工艺涉及衍生载体蛋白，应对衍生率和衍生过程中对单体含量、纯度及工艺相关杂质残留进行研究，鼓励采用肽指纹图谱、氨基酸分析等适宜方法对蛋白质衍生位点进行分析。

3、制剂

应开展制剂工艺对结合疫苗质量特性、效力等影响的研究，包括制剂过程对结合物稳定性影响的研究，如多糖结合物分子大小及分布、

粒径、游离糖含量变化等；如为多价疫苗或含佐剂疫苗，应开展全面的组分相容性研究，包括多个抗原、抗原-佐剂-缓冲体系之间的相容性等。对于含佐剂疫苗，建议在工艺开发过程中开展各个型别结合物的吸附状态、吸附动力学研究、吸附率等研究。

（二）杂质分析

生产过程、贮存过程中产生的、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，列出潜在的产品相关杂质（建议结合毒理试验结果、文献资料、既往积累的科学认知以及同类产品的相关信息等综合考虑）及工艺相关杂质，对主要杂质进行监测与分析，必要时纳入质量标准和/或进行安全性初步评价。在上市申报前需进一步进行杂质的分离、鉴别等分析研究。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，参考 ICH Q6B 的理念评估其安全性风险，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着研究的逐步推进加强限度标准要求。对于《中华人民共和国药典》收纳的检项，必须符合相应标准。

产品相关杂质是指生产或储存过程中由目标产物衍生的非预期产物，包括细菌杂多糖（C 多糖等）、蛋白聚体、降解产物（杂蛋白等）、未结合产物（游离多糖、游离蛋白等）等。对于 C 多糖等产品相关杂质建议采用定量核磁共振法等适宜方法进行测定。

工艺相关杂质是指生产过程中添加的非制剂组成部分的各种试剂残留产生的杂质，应结合生产用原材料、生产工艺等鉴定潜在的工艺相关杂质，并根据风险进行定性和/或定量研究，评估杂质残留的安全性风险，必要时将具有潜在安全性风险的杂质残留纳入质量标准进行控制。考虑加入的反应试剂多为有活性的试剂，部分试剂化学性

质不稳定，应依据试剂及副产物分子特性开发适宜的检测方法。对于与疫苗关键质量属性相关的工艺杂质，如因产品特性无法在成品中检测时，应在适当的中间产物（如精制多糖、结合物等）取样检测，其检测结果应能准确反映每一成品剂量中的残留水平。

（三）生物学活性

生物学活性是反映产品质量和临床有效性的重要指标，其通常可作为工艺开发阶段工艺路线、关键工艺参数范围及成品制剂处方的重要参考依据，同时也是稳定性考察中的敏感指标。

体外抗原性检测是工艺开发、工艺确认和工艺验证中的常用手段。鼓励建立适宜的标准血清用于考察不同阶段的中间产物其抗原性、总体抗原表位等在生产过程中保留的整体情况。

体内效力研究包括总抗体和功能性抗体的研究，建议进行多糖含量、总抗体、功能抗体相关性研究，选择适宜的效力方法进行成品质控。试验动物的种属及品系、免疫剂量、免疫程序和免疫途径等因素均会对免疫应答产生较大影响，因此在试验方法开发过程中应进行充分考察及优化。

此外，随着新技术的发展，可考虑采用糖芯片等技术进行中间产物中糖链的免疫活性分析、利用单克隆抗体开展糖抗原的抗原表位解析等研究。非特异性多糖、连接臂或生产过程中过度破坏的糖链等结构可能导致非预期的免疫学反应，鼓励开展相关研究。

六、质量标准

质量标准的建立可参照《中华人民共和国药典》、ICH Q6B和国内外相关指导原则等，根据多糖结合疫苗产品特点、生产工艺、各阶段质量研究数据、批次放行检测结果及稳定性研究结果，结合非临床研究和临床研究批次综合确定。对于一般工艺相关杂质，如经充分验证

证明生产工艺可对其有效、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放行检测项目中。对于易受贮存过程影响、变化幅度较大且与产品安全、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。鼓励采用先进的理化分析方法进行质量控制，但应提供方法的适用性验证等资料。通常先进质控方法在不同研发阶段的方法适用性验证和不同实验室之间的方法转移中存在较大挑战，应关注不同研发阶段方法适用性验证的差异，并采用适宜方法对方法转移前后检测结果的一致性进行评价。

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）精制多糖

建议考虑以下质控项目：固体总量、鉴别试验、多糖含量、特异基团含量、分子大小及分布、核酸残留量、蛋白质残留量、其他工艺杂质残留、细菌内毒素、无菌等检测。采用冻干保存的精制多糖，应对水分残留量进行质控。

对于特异基团，应提供检测基团选择的依据。

（二）多糖降解物

考虑降解多糖分子大小与后续生产工艺及结合物免疫原性密切相关，应对多糖降解物分子大小及分布进行质量控制。如在工艺开发和质量特性研究中证明多糖降解工艺对特异基团含量有影响，则需对特异基团含量进行质量控制。

（三）多糖活化物、衍生物

应采用适宜的方法检测化学修饰的效果，即活化度或衍生率；另外，可采用凝胶过滤或高效液相色谱等适宜方法测定活化物、衍生物

的分子大小及分布，以确保多糖－蛋白结合反应的批间一致性。

（四）载体蛋白

若采用已有国家标准的破伤风类毒素和白喉类毒素等作为载体，其各项质量指标应符合现行版《中华人民共和国药典》的要求。此外，应采用高效液相色谱等方法进行单体含量质控；采用适宜方法进行结合位点含量（如，氨基含量）检测。方法学验证中应关注所选用方法是否可有效分离载体蛋白单体、聚体，同时建议进行各峰归属解析等研究。

采用上述以外的其它蛋白作为载体，除参照上述载体蛋白质量标准要求外，结合其自身特点及生产工艺建立相应的质量标准，比如纯度、蛋白含量、细菌内毒素、宿主 DNA 残留、活性/特异性毒性（如适用）等。以重组蛋白为载体的，同时应参照重组 DNA 蛋白制品相关要求质量控制，建议采用两种不同原理的检测方法对纯度进行质控。

结合前，对载体蛋白进行衍生处理的，应进行衍生率、纯度（如单体含量、分子大小及分布等）质控，以确保批间一致性。

（五）单价结合物原液

不同多糖结合疫苗可能采用不同的结合工艺，但均需进行多步反应。为了确保结合物的稳定性、安全性、有效性和批间一致性，应建立相应的质量控制方法。建议考虑以下质控项目：

1、鉴别：采用适当方法进行多糖和载体蛋白的鉴别试验。

2、含量检测：包括多糖含量、蛋白质含量等。

3、多糖/蛋白比：该指标对结合物的免疫原性、一致性、稳定性产生影响，可作为判断结合反应的一个间接标志。如果化学结合反应过程能产生独特的结合标志（例如某一独特的氨基酸），可通过测定

该标志物定量分析多糖—蛋白结合反应的程度。

4、分子大小及分布：检测方法包括已收录《中华人民共和国药典》的 Sepharose CL-4B/CL-2B，鼓励采用先进的方法进行分子大小及分布的放行检测。

5、产品相关杂质：包括但不限于游离多糖、游离蛋白含量等，游离多糖测定应设立试验成功的条件，如每次沉淀游离多糖的回收率要求等。游离蛋白检测方法包括 SDS-PAGE 电泳、HPLC 等方法。

6、工艺相关杂质：应结合杂质残留的安全风险、工艺路线和去除效果进行综合考虑，将具有潜在安全性风险的杂质残留纳入质量标准进行控制。

7、安全性指标：包括无菌检查、细菌内毒素检查。

对于含佐剂的多价疫苗，如采用先添加佐剂（如，吸附等）后混合工艺，则应对吸附后单价原液的多糖含量、游离多糖含量、佐剂含量、吸附率和无菌等进行检测。

（六）半成品

在充分的质量研究和工艺验证的前提下，半成品应进行无菌检查。

（七）成品（不含多联疫苗）

建议考虑以下质控项目：产品鉴别、理化特性、含量、安全性指标、生物学活性等。冻干剂型，应对复溶用稀释剂进行检测。多联疫苗应参照相关指导原则进行检查。

1、鉴别：通常采用多糖和载体蛋白的特异性抗体进行免疫学测定。

2、理化特性：包括外观、pH 值、装量、渗透压摩尔浓度、分子大小及分布等。如为冻干制品，应进行水分质控。

3、含量检测：各型多糖含量、总蛋白含量、游离糖含量、辅料含

量（如必要）等。如使用佐剂，应进行佐剂含量、吸附率、结合抗原含量、结合蛋白含量等质控。

4、安全性指标：通常包括内毒素、异常毒性、无菌检查等。

5、生物学活性检测：由于动物体内免疫原性检测方法存在较大变异性，建议设立参考疫苗以适宜的比值方法拟定标准限度。不同多糖蛋白结合疫苗对试验用动物的敏感性不同，建议结合先验知识、药效学研究等，合理选择试验用动物、免疫程序及免疫剂量等。

（八）分析方法开发和验证

申请人应根据多糖结合疫苗的产品特点和工艺特点选择合理的分析方法。成品存在型别多、糖含量低的品种，可分别或组合使用理化、免疫学方法进行全面质控。原液和成品检测均涉及进行样品的预处理，如游离多糖沉淀、佐剂解吸附、多糖水解为特异单糖等，预处理过程可能引入系统误差，原则上，应确保预处理过程可保持产品的固有状态或反映产品的原始状态，获得可接受的回收率，必要时应建立试验成立的内控。鼓励采用先进方法进行质控，如，采用 NMR 等方法对多糖鉴别、特异基团和杂质等进行质量控制；采用 HPLC 等方法对工艺相关杂质残留进行检测；采用 HPSEC-MALLS 等进行分子量大小及分布的质控。

对于《中华人民共和国药典》方法，应评估后进行适用性确认。自建方法应经全面验证后根据方法检测目的物质的不同，确认并验证方法的准确度、精密度（包括重复性、中间精密度和重现性）、专属性、检测限、定量限、线性、范围和耐用性等指标。

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，分析方法的开发和验证应随着产品的开发和研究的不断深入逐步优化完善并验证；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。

1、分子大小及分布

应基于产品特性及生产工艺采用适宜方法客观反映分子量大小及分布情况，所用方法应在适当的分子量范围内具有足够的分离度。由于不同工艺阶段的产物（多糖、水解多糖、活化多糖、某些载体蛋白、结合物等）均具有分子量连续分布等特点，对于分子量大小及其分布的检测，应关注方法分离范围与待检产品的适用性及产品分离度验证。

基于 K_D 值及其回收率表征分子大小及分布的方法，应选择能较敏感地反映产品批间一致性的 K_D 界值，同时推荐对 50%峰面积对应的 K_D 值进行相关研究并积累数据。

基于 HPSEC-MALLS 测定重均分子量的检测方法，需要关注多糖结构、纯度对 dn/dc 的影响，开展本方法与《中华人民共和国药典》方法的相关性研究。

多价疫苗成品因单价结合物抗原无法分离且含量低，可采用总抗原分子大小检测方法，以反映总抗原的稳定性。如有必要，应该开发单价原液特异性的分子大小检测方法。

2、多糖含量检测

通常包括化学方法、色谱法和免疫学方法的检测，应关注以下方面：（1）化学方法和色谱法（如 HPAEC-PAD），多用于价次较少的结合疫苗，采用多糖特异基团含量进行计算，需关注各种抗原中特异性单糖或化学基团的水解及洗脱、对照品的选择；明确对应型别的计算公式，如使用特定的校正因子，应提供相应的依据。（2）免疫学方法包括 ELISA、火箭电泳、速率比浊法等。（3）单价结合物原液一般采

用化学法检测多糖含量，多价多糖结合疫苗成品常采用免疫法进行多糖含量检测，考虑两种方法多糖含量检测结果存在系统差异，建议在前期研发中对两种方法的相关性进行充分研究及数据积累，避免因检测方法导致拟上市产品与确证性临床批次配制点存在差异。（4）成品抗原含量相关检测方法，易受冻干保护剂、佐剂和表面活性剂干扰，通常需要分离抗原后检测，需进行解吸附等预处理效果等验证。

3、游离糖含量检测

结合物原液多采用脱氧胆酸钠法、高盐高醇析出法、氢氧化铝凝胶结合法对游离多糖和结合多糖进行分离；多价产品因含量低、佐剂和组分干扰等因素，部分产品原液游离多糖方法在成品检测时不适用。冻干疫苗可采用减少复溶体积的方式实现成品含量的富集，用以检测游离多糖和游离蛋白。抗原含量低的多价液体/佐剂吸附疫苗，游离多糖和游离蛋白检测方法需满足相应的定量限或检出限要求。应关注不同预处理方式对检测结果的影响，建议对方法成立条件进行控制；通过加标试验等方法学验证证实方法学的适用性，验证时应采用与残留水平一致的样品进行掺入。

4、结合抗原含量/结合蛋白含量 (bound antigen/bound protein)

用以表征总吸附率和总结合率，应验证吸附成分和非吸附成分的分离效果，采用上清或沉淀含量的测定方法均可接受，如检测方法与总抗原或蛋白检测方法有差异，应证明方法差异不影响检测结果。

5、残留量检测

鼓励采用色谱法等更为敏感的方法进行相关残留的研究。准确度验证中应添加可覆盖产品实际浓度范围的标准物质行验证。

6、检测用血清

检测用血清用于产品工艺开发、质控方法开发，是影响产品成功

开发的关键因素之一，需要关注其对多糖抗原表位保留能力的表征、特异性、效价、批间一致性、储备量和保存稳定性。应尽可能采用质量较高的抗原进行血清的制备。多价疫苗血清易发生抗原与血清的交叉反应，可采取适当的纯化或交叉吸附以减少交叉反应，保证特异性。应对标准血清效价（或特异性抗体含量）进行质量控制，低效价血清往往无法满足多价疫苗抗原定量检测的要求。申请人应建立及储备较充足的检测用血清，同时采用适宜的保存条件，以保证其在效期内满足检测要求。

（九）标准物质

标准物质的建立和制备可参照《中华人民共和国药典》和其它相关指导原则要求。若采用国际/国家标准物质，应明确所用的标准物质信息（来源、批次、检定等）。若为自制标准物质，应进行制备工艺、标定、稳定性等相关研究。建议采用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。

由于存在多个中间产物、多种检测方法，多糖结合疫苗检测涉及到多种种类的标准物质。以单一成分存在的中间产物或成品，标准物质可选择相应的单一成分或特性相似的物质。多价疫苗成品多糖抗原含量检测的标准物质，采用化学法检测的，标准物质应与抗原有相同的化学反应特性，如采用离子色谱法测定多糖含量时，当结合物中的多糖可被完全水解为单糖，则以单糖为标准物质，当结合物中的多糖不可被完全水解为单糖，则考虑以多糖为标准物质。采用免疫学检测方法的，标准物质应保持稳定的抗原性，以保证其参与抗原-抗体结合反应的稳定性。以含多糖的抗原作为标准物质的，应采用适宜的方法对抗原含量进行赋值。应选择适宜的标准物质，如有国际标准物质或国家标准物质，建议进行相关标定。

抗原分子大小检测方法如需使用标准物质，则应选择稳定的多糖，并对其稳定性进行考察。如需与《中华人民共和国药典》规定的 K_0 值桥接，应提供桥接验证数据。

七、稳定性研究

多糖结合疫苗稳定性研究应当遵循《中华人民共和国药典》中“生物制品稳定性试验指导原则”、《生物制品稳定性研究技术指导原则（试行）》和 ICH 相关指导原则的要求，并应符合《中华人民共和国药典》中“生物制品贮藏和运输规程”相关规定的要求。在上市申报前完成全面的稳定性考察，选择适宜的包装材料，明确贮存、运输条件，制定合理的有效期。

稳定性研究方案应结合多糖结合疫苗剂型特点、生产工艺、临床用药方案等情况设计，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（尤其是部分型别采用冻干独立包装的情形）等，研究条件应充分考虑未来生产、贮存、运输和使用中可能遇到的情况。

多糖结合疫苗产品的稳定性研究包括需要保存的中间产物，如纯化多糖、降解/衍生多糖、载体蛋白、结合物原液等，以及半成品和成品，在关键时间点进行全检。除放行检测指标外，还应根据产品特点选择其他研究性敏感指标，如中间产物增加分子大小及分布、特异基团等，成品增加吸附率、结合抗原、结合蛋白、体内效力检测等指标。

为更好的对临床期间变更或上市后变更进行可比性研究，各中间产物除长期稳定性外均应开展加速稳定性研究。因多糖结合疫苗中间产物较多，如涉及多阶段的贮存，应开展累积稳定性考察。

八、直接接触制品的包装材料和容器

多糖结合疫苗生产过程中使用的所有与产品接触的耗材（如层析填料、过滤器、膜包、储液袋、移液管路等）及包装系统应具有稳定的物理和化学特性，并与直接接触的中间产物和溶液有良好的相容性。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。

九、名词解释

载体蛋白：指用化学方法等方法与细菌多糖抗原共价结合后，以增强抗原 T 细胞依赖性免疫应答的蛋白质。

多糖降解：指采用物理、化学或生物学方法处理天然多糖，使糖链断裂的过程，所生成的产物称为多糖降解物。

活化：指采用活化反应，生成的具有化学反应活性的多糖或蛋白质的过程，所生成的产物称为活化物。

衍生：指将具有反应活性的分子连接至多糖或蛋白质的过程，所生成的产物称为衍生物。

工艺表征：通过系统性地研究工艺参数对产品质量和工艺性能的影响，制定完整的工艺控制策略，以确保生产过程的稳定性和产品的一致性。

工艺稳健性：生产工艺受到原辅料、工艺设备、工艺操作参数、环境和人为因素等变异带来的影响，工艺稳健性是指工艺可承受上述因素影响、对产品质量未带来不利影响的能力。

特异基团：指多糖分子骨架或侧链上连接的能决定多糖群/型特异性或者影响免疫原性的化学基团，如 O-乙酰基、甲基等。

十、参考文献

- [1] 国家药典委员会.《中华人民共和国药典》(2020 年版). 2020.
- [2] CDE. 结合疫苗质量控制和临床研究技术指导原则. 2005.
- [3] ICH Q5D. Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. [EB/OL]. [1997].
- [4] ICH Q11. Development and Manufacture of Drug Substances. [EB/OL]. [2012].
- [5] CDE.《预防用含铝佐剂疫苗技术指导原则》.2019.
- [6] WHO EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION (51st WHO TRS N°897 (A1): 2000) Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* conjugate vaccines.
- [7] WHO EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION (57th report: WHO TRS N°962 (A2): 2006) Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of group A meningococcal conjugate vaccines.
- [8] WHO EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION (55th report: WHO TRS N°924 (A2): 2004) Recommendations for the production and control of group C meningococcal conjugate vaccines.
- [9]WHO EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION (60th report: WHO TRS N°927 (A2): 2009) Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines.
- [10] CDE. 生物制品稳定性研究技术指导原则(试行). 2015.
- [11] The United States Pharmacopeial Convention.《VACCINES FOR HUMAN USE-POLYSACCHARIDE AND GLYCOCONJUGATE VACCINES》. 2017.

十一、缩写词列表

缩写词	全称	中文译名
BSE	Bovine Spongiform Encephalitis	牛海绵状脑病
TSE	Transmissible Spongiform Encephalopathies	可传播性海绵状脑病
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
ICH	International Council for Harmonization	国际人用药品注册

		技术协调会
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附实验
NMR	Nuclear Magnetic Reasonance	核磁共振成像
LC-MS	Liquid Chromatograph Mass Spectrometer	液相色谱-质谱联用仪
DNA	Deoxyribonucleic Acid	脱氧核糖核酸
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高效液相色谱