·生命科学与新药探索·

多糖结合疫苗研究进展

赵崑荔，陈韦璁，裘旭华，娄豆豆，石蓓佳，陆益红，赵述强 *

（江苏省药品监督检验研究院，江苏 南京 210009）

[摘要] 多糖结合疫苗是一类将细菌表面荚膜多糖与载体蛋白通过共价键连接形成，用于预防特定传染病的重要疫苗。由多糖抗原与载体蛋白偶联形成的结合物，可将T细胞非依赖性抗原（多糖）转变为T细胞依赖性抗原，从而诱导婴幼儿产生特异性免疫应答，并促使抗体发生亲和力成熟，最终发挥免疫保护效应。该类疫苗目前已在临床中广泛应用并凸显重要价值，但在生产过程中仍存在诸多问题，如需大规模培养致病性细菌、使用剧毒活化试剂、多糖肽链长度难以均一控制、多糖与蛋白的结合位点及结合数量信息不明确，同时还面临产率偏低、终产品价格昂贵等现实挑战。综述多糖结合疫苗的相关研究进展，旨在通过系统梳理多糖结合疫苗的研究现状，为改进现有产品生产工艺、设计更为合理的疫苗候选物提供参考依据。

[关键词] 多糖结合疫苗；制备过程；质量标准控制

[中图分类号] R979.5 [文献标志码] A [文章编号] 1001-5094（2025）12-1104-09

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.20250023

Recent Progress of Polysaccharide Conjugate Vaccines

ZHAO Kunli, CHEN Weicong, QIU Xuhua, LOU Doudou, SHI Beijia, LU Yihong, ZHAO Shuqiang

(Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210009, China)

[Abstract] Polysaccharide conjugate vaccines, a category of important vaccines formed by covalent linkage between bacterial capsular polysaccharides and carrier proteins, are used for preventing specific communicable diseases. The conjugates generated by coupling polysaccharide antigens with carrier proteins can convert T cell-independent antigens (polysaccharides) into T cell-dependent antigens, thereby inducing specific immune responses in infants and young children, promoting antibody affinity maturation, and ultimately exerting immune protective effects. Currently, such vaccines are widely applied in clinical practice with significant value; however, there are still many problems in the manufacturing process, including the need for large-scale cultivation of pathogenic bacteria, the use of highly toxic activating reagents, difficulty in uniform control of polysaccharide peptide chain length, unclear information on the binding sites and binding quantity between polysaccharides and proteins, as well as practical challenges such as low yield and high price of the final product. This article reviews the research progress of polysaccharide conjugate vaccines, aiming to provide reference for improving the production process of existing products and designing more rational vaccine candidates by systematically reviewing the research status of polysaccharide conjugate vaccines.

[Key words] polysaccharide conjugate vaccine; manufacturing process; quality control standard

疫苗是一类用于预防或抵御传染病的有效且经济的生物制品。多糖疫苗以多糖为主要活性成分，其免疫特异性取决于病原体细胞表面荚膜多糖（capsular polysaccharide，CPS）或脂多糖的分子结构。早期研究认为高分子量多糖通常具有更强的免疫原性，但近年研究证实，多糖的分支结构及重复单元的化学特性对其抗原活性起决定性作用。例如，某些特定的糖残基（如四糖片段）同样可引发显著的免疫应答[1]。由此可见，多糖的免疫原性不仅与分子量相关，其分子结构、化学修饰等特征更为关键。临床常见的病原体多糖主要来源于肺炎链球菌、流行性脑脊髓膜炎球菌等致病性微生物[2]。

多糖疫苗通过直接与B细胞表面受体结合发挥作用，诱导机体产生的抗体以免疫球蛋白M（immunoglobulin M，IgM）和IgG2为主。此类抗体的产生不依赖T细胞介导的免疫应答，无法诱导免疫记忆形成，既不产生记忆B细胞，所产生抗体也存在半衰期短、无亲和力成熟等缺陷，尤其对2岁以下婴幼儿无有效免疫保护作用[3]，这一局限性严重制约了多糖疫苗的临床应用。

20世纪30年代初，Avery与Goebel首次提出多糖结合疫苗的设计理念，即将多糖与蛋白质通过共价键连接形成偶联物，研究证实该偶联物可实现T细胞对蛋白载体的识别及B细胞对多糖抗原的特异性识别[4]。随着多糖提取技术的日趋成熟，20世纪80年代中叶，针对b型流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae* type b，Hib）的多糖结合疫苗成功研发，

接受日期：2024-11-11

基金项目：江苏省2022年度药品监管科学研究计划项目（No. 202208）；江苏省市场监督管理局科技计划项目（No. KJ21125067）；江苏省药品监督管理局科研计划课题（No. 202120）

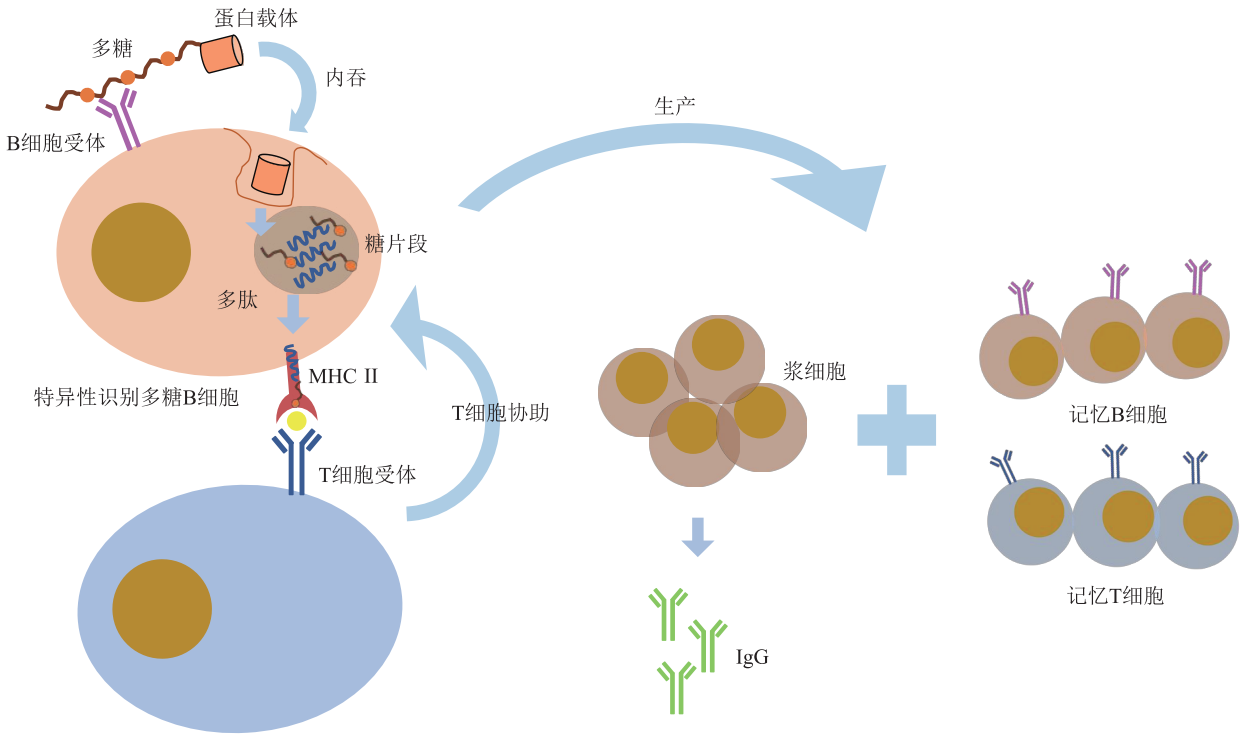
* 通信作者：赵述强，主任药师

研究方向：生物制品质量控制

E-mail：zhaoshuqiang1983@163.com

该疫苗通过载体蛋白触发 T 细胞依赖性免疫应答，可诱导产生持久免疫保护，对免疫力低下人群及儿童均具有明确免疫效果 [5-6]。

目前已有多款多糖结合疫苗通过化学或生物偶联技术开发完成，获批上市并广泛应用于临床实践 [7-10]。其免疫机制已得到较为充分的阐明：多糖结合疫苗进入机体后，其中的多糖-蛋白偶联物被抗原呈递细胞（antigen-presenting cell，APC）内化处理。过程中，多糖部分经氧化作用降解为小分子糖片段，载体蛋白则被酶解为多肽片段，二者形成“糖肽复合体”；随后，多肽片段与主要组织相容性复合体 II（major histocompatibility complex II，MHC-II）分子结合形成肽-MHC-II 复合体，同时将糖肽复合体展示于 APC（如 B 细胞）表面。尽管 MHC-II 分子主要负责呈递蛋白质抗原，但通过这一特殊呈递方式，T 细胞可实现对多糖成分的识别——糖肽-MHC-II 复合体与 $CD4^+$ T 细胞表面的 T 细胞受体结合后，即可启动 T 细胞活化程序。活化的 T 细胞通过分泌白介素-2（interleukin-2，IL-2）、IL-4 等细胞因子，进一步调控 B 细胞的分化和成熟，促进 B 细胞发生 IgM 向 IgG 的抗体类型转换，产生针对多糖抗原的特异性抗体，最终诱导形成记忆 B 细胞和长寿命浆细胞，建立持久的免疫记忆，具体免疫过程见图 1 [11]。



MHC-II：major histocompatibility complex II（主要组织相容性复合体 II）；IgG：immunoglobulin G（免疫球蛋白 G）

图 1 多糖结合疫苗免疫机制

Figure 1 Immune mechanism of polysaccharide conjugate vaccines

综上，多糖结合疫苗可激发更强的特异性免疫应答，诱导产生长效应记忆细胞，从而提高机体对特定病原体的免疫保护效能 [12]。近年来，随着生物技术的不断发展，多糖结合疫苗在传染病防控领域取得了显著进展，但随着研究与应用的深入，其临床应用中存在的问题也逐渐显现。本文将围绕多糖结合疫苗的制备工艺、质量控制、应用现状及未来发展趋势进行系统综述。

1 多糖结合疫苗的合成

多糖结合疫苗由多糖和载体蛋白两部分组成，二者需单独制备后通过偶联工艺连接形成终产物。对于特定疫苗而言，其多糖组分具有唯一性——该多糖既是细菌主要的毒力因子，也是抗体识别的关键靶标，通常以重复单元构成的线性或树枝状聚合物形式存在，单元间主要通过糖苷键连接 [13-14]。目前市售多糖结合疫苗中，多糖原料主要包括 CPS 和 O-抗原多糖两类。载体蛋白多采用经甲醛灭活处理的类毒素，其携带的人类 T 细胞表位可将多糖介导的 T 细胞非依赖性免疫反应转化为 T 细胞依赖性免疫反应，进而实现持久免疫保护 [15]。

多糖结合疫苗的制备以化学法和生物法为主。

已上市疫苗多数采用化学偶联工艺，即先从细菌发酵产物中纯化得到多糖，再通过化学反应与载体蛋白偶联，反应类型包括还原胺化、酰胺化和醚化反应[16]。其中，还原胺化法通过多糖还原末端与氰胺等功能性标签结合实现偶联，但因反应产率较低，需添加过量氰硼氢化钠，间接增加疫苗生产成本；酰胺化法通过引入酰胺基团形成多糖-蛋白共轭物，具有连接效率高、产物稳定性好的优势；醚化反应常用于不同分子（如药物、聚合物）的耦合，反应条件相对温和，但产物稳定性较差。

当前多糖结合疫苗的主流制备流程如图 2 所示，包括化学法和生物法 2 种技术路径。化学制备过程中，首先分别完成胞外多糖的提取纯化及载体蛋白的表达纯化，随后采用化学试剂对多糖进行活化衍生以引入活性基团，使其与载体蛋白的羧基或氨基发生偶联反应，最终经体积排阻层析纯化、超滤浓缩和除菌过滤获得多糖结合疫苗原液。发酵和纯化条件对糖链长度具有显著影响，需严格控制各环节参数以保障最终产品质量一致性。

蛋白质合成过程中，终止密码子可确保蛋白质分子量均一，而细菌合成多糖缺乏此类调控机制，因此每批多糖均需检测分子大小分布，该指标的异常变化可提示纯化过程不稳定或多糖结构完整性受损。生产过程的复杂性是多糖结合疫苗制备的主要挑战之一：疫苗生产涉及致病性细菌的大规模培养及多步纯化操作，对环境条件要求严苛，工艺烦琐导致生产成本偏高、终产品价格昂贵。

同时，化学偶联可能影响疫苗免疫原性，因此偶联反应需具备特异性，优先选择仅作用于多糖或寡糖末端的反应类型，以避免多糖链发生非特异性化学修饰或形成交联结构，降低免疫原性丧失风险。研究表明，较大分子量的多糖及其偶联物通常具有更优的免疫原性和保护效力，其中多糖与载体蛋白的比例对疫苗免疫原性和保护力至关重要，但最佳比例需根据多糖种类及疫苗设计目标调整。

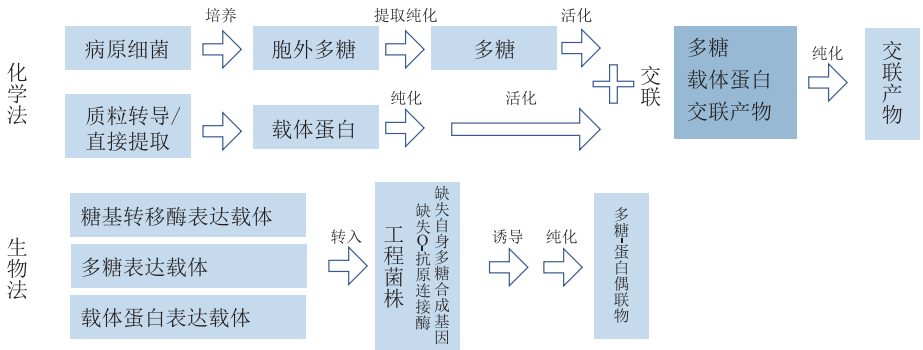


图 2 常见化学法和生物法工艺流程

Figure 2 Common chemical and biological process flows

此外，载体诱导表位抑制[17–18]现象提示，载体蛋白的表位暴露可能增强或抑制多糖特异性免疫反应，因此通过连接物调节多糖与载体蛋白的空间构象尤为关键——柔性连接物通常更利于提升免疫原性，刚性连接物则可能引发不良免疫应答[19]，常见连接物类型如表 1 所示。

表 1 常见连接物类型及特点

Table 1 Types and characteristics of common linkers

连接物	特点	对免疫原性影响	大小
己二酸二肼	与多糖还原末端特异性反应，常用连接臂	可能产生新的抗原结构，导致非保护性抗体生产	六碳
聚乙二醇	生物相容性好，易于修饰，可调节降解生物分子	抑制蛋白粘附，可能减少免疫原性	可变，分子量通常为数百至数千
碳二亚胺	用于激活多糖上的羧基，与蛋白质上的胺基形成酰胺键	反应条件温和，不引入新抗原结构	分子量较小
1-氰-4-二甲氨基吡啶	在温和条件下活化多糖，操作简单，毒性小	提高了偶联效率和免疫反应，适用于多种多糖和蛋白质	分子量较小
硫醇-马来酰亚胺	与硫醇基团反应，形成稳定的硫醚键	特异性高，可减少非特异性反应	分子量较小
糖类-氨基酸偶联物	直接结合多糖和蛋白质上的氨基酸	保持了多糖和蛋白质的原有抗原和免疫原性	可变

随着分子生物学技术的发展，生物合成法正逐步应用于多糖结合疫苗制备[20–21]。该方法基于微生物的蛋白糖基化系统，通过基因工程技术构建缺失 O-抗原连接酶和自身多糖合成基因的工程菌株，随后将含有目标多糖合成基因簇、含糖基化序列的载体蛋白基因及糖基转移酶基因的表达载体导入工程

菌株，经诱导表达及纯化后获得目标多糖-蛋白偶联物。生物合成法的优势在于可显著提高生产效率，并精准调控疫苗的结构与理化性质，难点在于合适糖基转移酶的筛选、载体蛋白的优化选择及病原细菌多糖来源的确定等方面。目前该技术已取得阶段性突破，瑞士 Glyco Vaxyn AG 公司研发的痢疾志贺菌多糖结合疫苗已完成 I 期临床试验 [22]。

多糖抗原的高效获取一直是疫苗生产领域的主要难题，尤其体现在大规模生产和纯化环节。传统的细菌提取法存在效率低、受环境影响大等缺陷，化学合成法则可通过精准控制反应条件，实现多糖结构和分子量的精确调控，保障抗原纯度，该技术已成功应用于部分疫苗开发，如基于合成寡糖片段构建糖缀合疫苗 [23]。

近年来，研究者围绕多糖提取与合成的环保化、高效化开展了大量研究，并取得系列进展：低共熔溶剂因低毒性、溶解能力强的特性，用于天然多糖提取时可显著提升提取效率并减少环境污染物排放；层析技术凭借优越的选择性与节能优势，在多糖高效纯化中可有效提高产物纯度与收率。同时，植物多糖因来源丰富、结构多样，有望成为细菌多糖的替代原料用于疫苗开发；化学合成 [24] 与酶促合成的结合，也为提升复杂多糖结构合成的精确性提供了技术支撑。这些进展表明，多糖抗原的规模化、高纯度、环保化生产已具备技术可行性，为多糖疫苗的后续开发奠定了新的技术基础。

2 载体蛋白

在多糖结合疫苗的制备中，载体蛋白的合理选择至关重要，需综合考量其安全性、免疫有效性及在药品生产质量管理规范条件下的规模化生产可行性。目前临床常用的载体蛋白包括白喉类毒素（diphtheria toxoid，DT）、破伤风类毒素（tetanus toxoid，TT）等。这类蛋白可将 T 细胞非依赖性抗原（多糖）转变为 T 细胞依赖性抗原，通过增强免疫细胞激活效率提升免疫保护效果。此外，已有研究探索将病原细菌自身蛋白作为载体，如以金黄色葡萄球菌 α 溶血素作为载体蛋白的相关研究 [25]。

对于新型载体蛋白，需系统评价其理化与免疫学特性，具体包括溶解性、结构稳定性、生产可重复性、用于偶联所需的暴露活性氨基酸数量及偶联后疫苗的免疫原性等。相关评价结果需经药品监管部门认可；若载体蛋白自身具备抗原活性，还需额外明确其与多糖的结合位点及表位暴露情况，避免对多糖特异性免疫应答产生干扰。

2.1 DT

DT 的分子量约为 62 000，是由轻链与重链组成的二聚体蛋白：轻链负责发挥腺苷二磷酸核糖基转移酶（adenosine diphosphate ribosyltransferase，ADPRT）活性，重链则介导蛋白与细胞受体的结合及后续细胞内转运过程 [26]。该蛋白与 TT 在结构和功能上存在一定同源性。交叉反应物质（cross-reacting material，CRM）家族成员 CRM45 和 CRM197 是 DT 的 2 种主要无毒变异体 [27]，二者的结构差异决定了其载体应用场景的不同。

CRM45 因缺失 C 末端 149 个氨基酸残基，其空间构象与完整 DT 存在显著差异；CRM197 则是 DT 的 G52E 点突变体，该突变导致其 ADPRT 活性完全丧失，从而消除毒性 [28]。与 CRM45 相比，CRM197 不仅因毒性缺失可避免引发白喉相关临床症状，还能有效激发机体免疫应答，尤其与多糖偶联后可显著增强多糖抗原的免疫原性。此外，CRM197 具有更稳定的分子结构，在疫苗制备中展现出更高的应用可靠性 [29]，目前已广泛用于肺炎链球菌、脑膜炎球菌等多类多糖结合疫苗的生产 [8,12]。

2.2 TT

TT 是分子量约为 15 000 的大分子蛋白质，其分子结构包含轻链和重链 2 个功能亚基：重链进一步分为 N 端结构域和 C 端结构域，分别负责受体结合及细胞内转运功能；轻链为原毒素发挥毒性的核心区域，经脱毒处理后该区域的毒素活性已完全丧失，仅保留其抗原表位 [30]。作为多糖结合疫苗的载体蛋白，TT 的核心作用是携带和展示多糖抗原，通过自身携带的 T 细胞表位激活 T 细胞免疫应答，从而增强免疫系统对多糖抗原的识别效率及特异性免疫应答强度。

将多糖与 TT 偶联后，可触发更强烈持久的 T 细胞依赖性免疫应答，该特性在婴儿和多糖抗原低应答人群中尤为重要。以 Hib-TT 疫苗为例，其通过将 Hib 的 CPS 与 TT 偶联制备而成，目前已被广泛纳入婴幼儿常规免疫计划，用于预防 Hib 感染引发的流行性疾病 [31]，充分证实了 TT 作为载体蛋白的临床应用价值。

2.3 膜外蛋白复合体

膜外蛋白复合体（outer membrane protein complex，OMPC）是一类来源于细胞外膜的蛋白复合体，临床应用中以脑膜炎球菌来源的 OMPC 最为常见 [32]。作为膜蛋白，OMPC 可通过与宿主细胞表面受体特异性结合启动免疫激活信号，这种模拟自然感染的激活方式能有效增强机体免疫应答强度；同时，OMPC 作为载体蛋白可显著提升多糖抗原的结构稳

定性，减少抗原在体内的降解速率，延长抗原暴露时间，从而提高免疫系统对多糖抗原的感知与应答效率[33]。

与类毒素类载体蛋白相比，OMPC 的优势在于无需经过大规模基因工程改造即可直接应用，其主要功能定位为通过载体效应增强疫苗中多糖抗原的免疫效力，在多价多糖结合疫苗的研发中具有独特应用前景。

2.4 蛋白 D

蛋白 D 是由流感嗜血杆菌分泌的一种外膜蛋白[34]。该蛋白自身具备独立的抗原活性，可诱导机体产生针对流感嗜血杆菌的特异性抗体，从而直接提升对该病原菌的免疫保护水平。基于这一特性，蛋白 D 常被用作 Hib 疫苗的载体蛋白[35]，同时也可与肺炎链球菌、脑膜炎球菌等其他病原菌的多糖抗原偶联，制备多价结合疫苗，实现对多种传染病的联合预防。

3 多糖结合疫苗质量控制情况

目前临床常用的多糖结合疫苗主要包括肺炎球菌结合疫苗、脑膜炎球菌结合疫苗、Hib 疫苗。多糖结合疫苗的质量标准控制是确保检测结果持续准确可靠的关键质量活动，也是保障疫苗临床有效性和安全性的重要环节。目前，多糖结合疫苗的质量控制主要包括多糖和蛋白的含量测定、结构分析及免疫原性评价等。世界卫生组织（World Health Organization，WHO）已针对 Hib 结合疫苗、脑膜炎球菌结合疫苗和肺炎球菌结合疫苗，发布了各生产阶段关键质量属性的控制指南，明确要求检测活化多糖的活化程度和分子大小、载体蛋白纯度、疫苗稳定性及免疫原性等关键指标[36]。

美国药典及《中华人民共和国药典》2025 年版四部通则[37-38]均收载了分子排阻色谱法（size exclusion chromatography，SEC），该技术可用于分离不同分子量的多糖抗原、检测多糖聚集状态并提供分子大小信息。SEC 分布系数是评估多糖结合疫苗制备一致性的重要指标。此外，SEC 还可用于确定分子量、检测疫苗中的蛋白质聚合物，同时应用于多糖 - 载体蛋白偶联物的纯化过程，为疫苗配方的稳定性评估提供快速且可重复的实验结果[39-41]。

疫苗制剂中存在的游离多糖可能降低结合疫苗的免疫活性，研究表明，当游离多糖含量高于结合多糖的 10% 时，会显著抑制机体对多糖抗原的特异性免疫应答[42]，因此需严格控制游离多糖含量。高效阴离子交换色谱联合脉冲安培检测（pulsed amperometric detection，PAD）技术常用于分析游离糖和总糖含量，该技术具有选择性强、灵敏度高和准确性优的特点，与 PAD 的结合为碳水化合物的分离和定量提供了高效技术平台[43]。

核磁共振技术可用于多糖结合疫苗的结构测定、碳水化合物组成及完整性鉴定，同时可实现多糖含量的绝对定量，还能用于分析偶联过程中的中间体，并识别和定量生产过程中引入的杂质和残留试剂。酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）通过酶标记偶联物与酶底物反应产生的颜色变化，直观反映抗原-抗体结合反应，进而实现生物液体中目标分子的浓度检测。该技术已广泛应用于多糖结合疫苗接种后多糖特异性抗体应答的定量分析，例如商业 ELISA 试剂盒可用于测定人血清抗 Hib 抗体滴度[44]。上述主要检测方法及应用总结如表 2 所示。

针对常用载体蛋白的质量控制，DT 和 TT 作为独立抗原时，质量标准需符合 WHO 及相关药典要求；作为载体蛋白应用时，其质量受制造工艺影响，需通过絮凝实验测定比活性，要求 DT 和 TT 的比活性分别不低于 1 500 和 1 000 $Lf \cdot mg^{-1}$[Lf 指絮状单位（limes flocculation unit）]，同时采用十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）或光散射检测器联用 SEC- 高效液相色谱（high performance liquid chromatography，HPLC）分析其聚合体分布情况。对于 CRM197，需采用 HPLC、SDS-PAGE、毛细管电泳 -SDS 技术测定纯度，纯度需大于 90%（部分标准要求大于 95%）；通过还原型 SDS-PAGE 法测定其切割蛋白的相对含量，要求该成分占比不得超过 5%。

载体蛋白的结构鉴定需采用 X 射线衍射、质谱、肽图分析、测序、氨基酸分析、体外荧光标记等技术，同时需通过多种检测手段分析载体蛋白的纯度、杂质、污染物、结构完整性及稳定性[36]。

2024 年 7 月 25 日，国家药品监督管理局药品审评中心发布《多糖结合疫苗质量控制技术指导原则》（征求意见稿），该指导原则从生产用菌株及种子批、培养基和生产用原材料、生产工艺、质量研究、质量标准、稳定性研究、直接接触制品的包装材料和容器等方面进行了针对性阐述。指导原则强调，多糖结合疫苗的工艺开发应遵循“质量源于设计”（quality by design，QbD）理念，需根据多糖、载体蛋白及偶联反应的特性设计目标产品质量概况，结合临床预期与工艺可控性设计工艺路线，强化物料源头控制与生产全过程控制；同时围绕中间品和成品的关键质量属性和工艺特点，开展工艺参数研

究及优化。

此外，指导原则要求选择代表性批次，结合产品自身特点开发更先进的分析方法，客观真实反映样品实际质量；针对糖结构鉴定、分子量和分子大小分布，推荐采用当前广泛应用的 HPLC 联用多角度激光散射与密度梯度离心技术；对于载体蛋白，应选用对单体与聚体分离度良好的检测方法，并开展各峰组分归属解析研究 [45]。

表 2 多糖结合疫苗质量控制项目及方法

Table 2 Quality control items and methods for polysaccharide conjugate vaccines

检测项目	检测方法与原理概述
多糖专一性与结构确认	酶联免疫吸附测定：基于抗原 - 抗体特异性结合原理，检测多糖与特异性抗体的结合能力，辅助评估多糖免疫活性
	核磁共振波谱法：解析原子核共振信号，确定精确化学结构
	比色法：基于特定试剂与糖类发生显色反应生成有色化合物，依据吸光度与浓度的线性关系，对照标准品，实现糖类的定性与定量分析
	免疫双扩散：抗原与抗体在琼脂中形成沉淀线，确认二者血清特异性
多糖含量	高效液相色谱：通过色谱分离、衍生化及检测器检测，确定多糖含量
	分子排阻法：通过分离不同分子大小的多糖组分，分析多糖的聚集状态及分子量分布
	高效阴离子交换色谱联合脉冲安培检测：高 pH 条件下阴离子交换分离，有效分离和定量碳水化合物，检测游离多糖和结合多糖含量
蛋白含量	紫外吸收法：检测蛋白质在 280 nm 处的特征紫外吸收，实现快速定量
	福林酚法：利用蛋白质与试剂在碱性条件下生成蓝色复合体的特性，进行比色定量
糖与蛋白比例	质谱法：测定多糖与载体蛋白的比例

4 总结与展望

多糖结合疫苗作为预防传染病的重要生物制品，其研究和应用已取得显著进展，但仍存在诸多待解决的问题，如寡糖最佳分子大小与长度不明确、多糖与载体蛋白最佳比例尚未确立、载体蛋白和连接子可能引发自身免疫抑制等 [46]。疫苗免疫应答是复杂的生物学过程，多糖结合疫苗的免疫原性受多种因素调控，包括多糖分子大小、结构修饰情况、载体蛋白类型、多糖与载体蛋白比值、化学偶联反应条件、载体蛋白上连接子的性质及结合位点分布等，这些因素可能导致非预期的抗原竞争或载体诱导表位抑制现象 [47-49]。针对糖链长度不均一和结构修饰差异对疫苗活性的影响，可通过水解、酶解、高碘酸氧化、均质化、超声等方法调控多糖分子大小以改善疫苗性能 [15]。

由于多糖结构的复杂性和化学修饰的随机性，多糖结合疫苗的质量控制面临诸多挑战，主要集中在以下 3 个方面：一是多糖结构涉及糖链长度、连接方式、化学修饰等多个维度，要求质量控制体系需全面覆盖结构相关关键属性；二是化学法制备过程中连接位点的随机性导致产品一致性难以控制，显著增加质量控制难度；三是糖基转移酶的筛选与工程化改造难度高、制备流程烦琐及产品均一性差等问题，限制了生物工程法的规模化应用。

化学和生物化学技术的进步为多糖的规模化合成提供了技术支撑 [50]。例如，2004 年古巴批准上市的 Quimi-Hib 1，通过模拟 Hib CPS 成分多聚核糖醇磷酸盐（polyribosylribitol phosphate，PRP），将平均 7 个重复单元的 PRP 通过丙酰胺键与 TT 偶联，既保证了多糖结构的均一性，又在儿童群体中展现出较高的保护效力 [49]。在载体蛋白研发方面，预防性疫苗领域已出现多种新型载体，包括重组非毒性假单胞菌外毒素 A、外膜囊泡与膜抗原通用模块、糖工程蛋白与外膜囊泡、链球菌 C5a 羧肽酶、病毒样颗粒蛋白、蛋白纳米笼、合成多肽等，部分研究已显示出良好的应用前景 [51]。

其中，外膜囊泡可作为构建新型结合疫苗的灵活多样化平台，目前其适用的病原体范围有限，有待进一步拓展；合成多肽因具备易于设计、可规模化生产且纯度高的优势，既可作为抗原或载体蛋白，也可作为佐剂诱导特异性 B 细胞或 T 细胞介导的免疫应答，是极具潜力的新型载体蛋白，有望推动结合疫苗的创新发展。随着合成生物学技术的进步，未来可通过成簇规律间隔短回文重复序列等基因编辑技术优化生产菌株，实现多糖的精准设计与合成，严格控制多糖的结构与组成；同时，通过新型佐剂和递送系统的开发，可进一步提升疫苗的特异性和免疫原性。这些技术方法不仅能改善现有疫苗的效果和安全性，还能为应对未来新发突发传染病挑战提供有力支撑。

目前尚未发现单一载体蛋白与多糖偶联的通用最优模式，需结合具体疫苗的设计目标开展针对性测试。安全性和规模化生产可行性是载体蛋白选择及人用新疫苗研发的主要标准，载体蛋白在应用前

需去除毒性或酶活性，需重点关注的是，脱毒操作引发的广泛化学修饰和异质性，会增加产品质控难度，甚至造成可结合氨基酸数量减少。因此，新型载体蛋白需通过临床研究系统评价其免疫原性，并尽可能与现有成熟载体蛋白进行优势对比分析。

实践表明，载体蛋白选择除考量免疫原性外，还需兼顾实用性、产量、生产成本和最终产品质量等因素；同时应严格遵循 QbD 理念，在产品设计初期，基于临床预防或治疗需求设定目标产品质量概况，结合科学认知，借助过程分析技术和风险管理工具，明确关键物料、关键工艺参数（如菌株类型、培养基组成、发酵参数、纯化方式、反应比例等）与关键质量属性的关联，建立合理的设计空间，制定覆盖生产全流程的总体控制策略，并在产品生命周期内持续提升产品质量。

多糖结合疫苗的研发与生产仍面临诸多挑战，涉及多糖发酵与纯化、载体蛋白筛选与生产、多糖 - 蛋白偶联方式优化、处方筛选等多个环节 [36]。目前，关于细菌多糖结合疫苗中多糖长度、分子大小及最优多糖 / 蛋白比例的通用原则尚未建立，且现有疫苗覆盖的血清型有限，因此研发同种抗原不同血清型或不同抗原组合的多价、多联疫苗已成为当前疫苗领域的研发热点与主流方向。例如，我国 2021 年上市的 4 价脑膜炎球菌多糖结合疫苗、2023 年国外上市的 5 价脑膜炎球菌多糖结合疫苗，以及国内学者正在开展的双蛋白载体 5 价脑膜炎球菌多糖结合疫苗，均为该领域的典型研发成果 [52-53]。

多联多价疫苗研发需重点关注组分间的相容性、佐剂的干扰效应及抗原过量可能引发的潜在安全风险等问题 [54]。未来，多联多价多糖结合疫苗的研发需要免疫学、微生物学和药学等领域专业人员的深度协作，基于可靠的动物模型与充分的临床试验数据证实产品的安全性和有效性；同时，通过完善的生产工艺与质量控制体系持续保障产品的批间一致性与整体质量可控性，此类产品才能获得监管部门的认可并得到市场青睐。

[参考文献]

[1] Mawas F, Niggemann J, Jones C, *et al*. Immunogenicity in a mouse model of a conjugate vaccine made with a synthetic single repeating unit of type 14 pneumococcal polysaccharide coupled to CRM197[J]. *Infect Immun*, 2002, 70(9): 5107-5114.

[2] Jones C. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria[J]. *An Acad Bras Cienc*, 2005, 77(2): 293-324.

[3] Pollard A J, Bijker E M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(2): 83-100.

[4] Avery O T, Goebel W F. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins: v. the immunological specifity of an antigen prepared by combining the capsular polysaccharide of Type III pneumococcus with foreign protein[J]. *J Exp Med*, 1931, 54(3): 437-447.

[5] Kuo C S, Lu C W, Chang Y K, *et al*. Effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine on diabetic elderly[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(26): e4064.

[6] Klein N P, Reisinger K S, Johnston W, *et al*. Safety and immunogenicity of a novel quadrivalent meningococcal CRM-conjugate vaccine given concomitantly with routine vaccinations in infants[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2012, 31(1): 64-71.

[7] Maiden M C J, Ibarz-Pavón A B, Urwin R, *et al*. Impact of meningococcal serogroup C conjugate vaccines on carriage and herd immunity[J]. *J Infect Dis*, 2008, 197(5): 737-743.

[8] Shirley M. 20-valent pneumococcal conjugate vaccine: a review of its use in adults[J]. *Drugs*, 2022, 82(9): 989-999.

[9] Slack M P E, Cripps A W, Grimwood K, *et al*. Invasive *Haemophilus influenzae* infections after 3 decades of Hib protein conjugate vaccine use[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2021, 34(3): e0002821.

[10] Höltl L, Zelle-Rieser C, Gander H, *et al*. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(11): 3369-3376.

[11] Avci F Y, Li X, Tsuji M, *et al*. A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design[J]. *Nat Med*, 2011, 17(12): 1602-1609.

[12] Rosenstein N E, Fischer M, Tappero J W. Meningococcal vaccines[J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2001, 15(1): 155-169.

[13] Bystrický S, Paulovicová E, Machová E. Candida albicans mannan-protein conjugate as vaccine candidate[J]. *Immunol Lett*, 2003, 85(3): 251-255.

[14] Stefanetti G, MacLennan C A, Micoli F. Impact and control of sugar size in glycoconjugate vaccines[J]. *Molecules*, 2022, 27(19): 6432.

[15] Bröker M, Berti F, Schneider J, *et al*. Polysaccharide conjugate vaccine protein carriers as a “neglected valency” –Potential and limitations[J]. *Vaccine*, 2017, 35(25): 3286-3294.

[16] Del Bino L, Østerlid K E, Wu D Y, *et al*. Synthetic glycans to improve current glycoconjugate vaccines and fight antimicrobial resistance[J]. *Chem Rev*, 2022, 122(20): 15672-15716.

[17] Jegerlehner A, Wiesel M, Dietmeier K, *et al*. Carrier induced epitopic suppression of antibody responses induced by virus-like particles is a dynamic phenomenon caused by carrier-specific antibodies[J].

Vaccine, 2010, 28(33): 5503–5512.

[18] Pecetta S, Tontini M, Faenzi E, *et al*. Carrier priming effect of CRM197 is related to an enhanced B and T cell activation in meningococcal serogroup A conjugate vaccination. Immunological comparison between CRM197 and diphtheria toxoid[J]. *Vaccine*, 2016, 34(20): 2334–2341.

[19] Peeters J M, Hazendonk T G, Beuvery E C, *et al*. Comparison of four bifunctional reagents for coupling peptides to proteins and the effect of the three moieties on the immunogenicity of the conjugates[J]. *J Immunol Methods*, 1989, 120(1): 133–143.

[20] Kelly J, Jarrell H, Millar L, *et al*. Biosynthesis of the N-linked glycan in *Campylobacter jejuni* and addition onto protein through block transfer[J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(7): 2427–2434.

[21] Feldman M F, Wacker M, Hernandez M, *et al*. Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(8): 3016–3021.

[22] Hatz C F R, Bally B, Rohrer S, *et al*. Safety and immunogenicity of a candidate bioconjugate vaccine against *Shigella dysenteriae* type 1 administered to healthy adults: a single blind, partially randomized Phase I study[J]. *Vaccine*, 2015, 33(36): 4594–4601.

[23] Verez-Bencomo V, Fernández-Santana V, Hardy E, *et al*. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type b[J]. *Science*, 2004, 305(5683): 522–525.

[24] 庄丽琴, 邓妤, 曾铮, 等. 3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸寡糖的合成研究进展[J]. 药学进展, 2020, 44(7): 521–534.

[25] Metz B, Michiels T, Uittenbogaard J, *et al*. Identification of formaldehyde-induced modifications in diphtheria toxin[J]. *J Pharm Sci*, 2020, 109(1): 543–557.

[26] Rodnin M V, Kashipathy M M, Kyrychenko A, *et al*. Structure of the diphtheria toxin at acidic pH: implications for the conformational switching of the translocation domain[J]. *Toxins (Basel)*, 2020, 12(11): 704.

[27] Giannini G, Rappuoli R, Ratti G. The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197[J]. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12(10): 4063–4069.

[28] Gallagher D T, Oganesyan N, Lees A. Monomeric crystal structure of the vaccine carrier protein CRM_{197} and implications for vaccine development[J]. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2023, 79(Pt 4): 82–86.

[29] Badahdah A M, Rashid H, Khatami A. Update on the use of meningococcal serogroup C CRM_{197}-conjugate vaccine (Meningitec) against meningitis[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2016, 15(1): 9–29.

[30] Bayart C, Peronin S, Jean E, *et al*. The combined use of analytical tools for exploring tetanus toxin and tetanus toxoid structures[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1054: 80–92.

[31] Leonardi M, Latiolais T, Sarpong K, *et al*. Quadrivalent meningococcal (MenACWY-TT) conjugate vaccine or a fourth dose of H. influenzae-*N. meningitidis* C/Y conjugate vaccine (HibMenCY-TT) is immunogenic in toddlers who previously received three doses of HibMenCY-TT in infancy[J]. *Vaccine*, 2015, 33(7): 933–941.

[32] Lai Z, Schreiber J R. Outer membrane protein complex of Meningococcus enhances the antipolysaccharide antibody response to pneumococcal polysaccharide-CRM_{197} conjugate vaccine[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(5): 724–729.

[33] Yu H, Karunakaran K P, Jiang X, *et al*. Comparison of *Chlamydia* outer membrane complex to recombinant outer membrane proteins as vaccine[J]. *Vaccine*, 2020, 38(16): 3280–3291.

[34] Forsgren A, Riesbeck K, Janson H. Protein D of *Haemophilus influenzae*: a protective nontypeable *H. influenzae* antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines[J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 46(5): 726–731.

[35] Croxtall J D, Keating G M. Pneumococcal polysaccharide protein D-conjugate vaccine (synflorix; PHiD-CV)[J]. *Paediatr Drugs*, 2009, 11(5): 349–357.

[36] Ghattas M, Dwivedi G, Lavertu M, *et al*. Vaccine technologies and platforms for infectious diseases: current progress, challenges, and opportunities[J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9(12): 1490.

[37] USP Convention. Vaccines for human use—polysaccharide and glycoconjugate vaccines[S]. USP-NF, 2023: 1234.

[38] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：四部 [S]. 北京 : 中国医药科技出版社, 2025: 111–112.

[39] Planinc A, Bones J, Dejaegher B, *et al*. Glycan characterization of biopharmaceuticals: updates and perspectives[J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 921: 13–27.

[40] Hong P, Koza S, Bouvier E S P. Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates[J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2012, 35(20): 2923–2950.

[41] Zhang T, Yu W, Wang Y, *et al*. Moderate PEGylation of the carrier protein improves the polysaccharide-specific immunogenicity of meningococcal group A polysaccharide conjugate vaccine[J]. *Vaccine*, 2015, 33(28): 3208–3214.

[42] Bardotti A A, Ravenscroft N N, Ricci S S, *et al*. Quantitative determination of saccharide in *Haemophilus influenzae* type b glycoconjugate vaccines, alone and in combination with DPT, by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. *Vaccine*, 2000, 18(19): 1982–1993.

[43] Yi L, Ouyang Y, Sun X, *et al*. Qualitative and quantitative analysis of branches in dextran using high-performance anion exchange

chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1423: 79–85.

[44] Hamidi A, Kreeftenberg H. Use of immuno assays during the development of a *Hemophilus influenzae* type b vaccine for technology transfer to emerging vaccine manufacturers[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2014, 10(9): 2697–2703.

[45] 国家药品监督管理局审评中心. 关于公开征求《多糖结合疫苗质量控制技术指导原则（征求意见稿）》意见的通知[EB/OL].（2024-07-25）[2024-11-11]. https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/a96ebafaa89c587181ca7d93023cdc4b.

[46] Mettu R, Chen C Y, Wu C Y. Synthetic carbohydrate-based vaccines: challenges and opportunities[J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27(1): 9.

[47] Khatun F, Stephenson R J, Toth I. An overview of structural features of antibacterial glycoconjugate vaccines that influence their immunogenicity[J]. *Chemistry*, 2017, 23(18): 4233–4254.

[48] Micoli F, Adamo R, Costantino P. Protein carriers for glycoconjugate vaccines: history, selection criteria, characterization and new trends[J]. *Molecules*, 2018, 23(6): 1451.

[49] Costantino P, Rappuoli R, Berti F. The design of semi-synthetic and synthetic glycoconjugate vaccines[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2011, 6(10): 1045–1066.

[50] 李格非, 熊德彩, 叶新山. 人工合成糖疫苗的研究进展与发展趋势[J]. 药学进展, 2020, 44(7): 512–520.

[51] Adamo R. Advancing homogeneous antimicrobial glycoconjugate vaccines[J]. *Acc Chem Res*, 2017, 50(5): 1270–1279.

[52] 徐娟, 严冬山, 徐丽, 等. 全球脑膜炎球菌多糖结合疫苗研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2024, 44(4): 304–316.

[53] 姚永鹏, 黄杰, 魏鑫, 等. 一种基于双蛋白载体的五价脑膜炎球菌多糖结合疫苗的制备方法及其产品：CN118078981A[P]. 2024-05-28.

[54] 马磊, 杨昭庆, 王佑春. 全球疫苗研发现状和展望[J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(1): 115–126.



[专家介绍] 赵述强：江苏省药品监督检验研究院主任药师，主要从事疫苗等生物制品质量控制研究，兼任国家级药品生产检查员、中国药科大学校外硕士生导师、江苏省工程师学会生物医药与大健康产业专委会副主任委员、第一届江苏省生物专用计量技术委员会委员、《药学与临床研究》编委。主持完成江苏省药监局课题 1 项，牵头 2025 年度江苏省科技重大专项“创新生物药”子课题 1 项，主持在研 2026 年度江苏省市场局科研课题 1 项；两次荣获江苏省药学会科学技术奖三等奖，获 2024 年第十届江苏医药科技二等奖。

（责任编辑：邢爱敏）