

# 疫苗安全性视角下的肺炎链球菌荚膜多糖制备工艺研究进展

李跃龙<sup>1,2</sup>, 王剑龙<sup>1</sup>, 刘建凯<sup>1,2</sup>, 郑海发<sup>1,2\*</sup>

1 北京民海生物科技有限公司, 北京 102600

2 结合疫苗新技术研究北京市重点实验室, 北京 102600

李跃龙, 王剑龙, 刘建凯, 郑海发. 疫苗安全性视角下的肺炎链球菌荚膜多糖制备工艺研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3656-3669.

LI Yuelong, WANG Jianlong, LIU Jiankai, ZHENG Haifa. Research progress in the manufacturing process of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide from the perspective of vaccine safety[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3656-3669.

**摘要:**肺炎链球菌疫苗在防御由肺炎链球菌引发的各类侵袭性与非侵袭性疾病中扮演着不可或缺的角色, 荚膜多糖作为关键抗原成分, 杂质残留直接造成了肺炎多糖疫苗以及多糖结合疫苗在临床使用中的不良反应。随着全球对涵盖广泛血清型的高价肺炎链球菌疫苗需求的持续增长, 研发高效、高纯度且可大规模生产的荚膜多糖抗原技术愈发显得紧迫且至关重要。荚膜多糖的质量属性受到多维度因素的交互影响, 涵盖了病原菌株的选择、培养基配方、发酵过程调控以及纯化技术等诸多环节。遵循质量源于设计(quality by design, QbD)的质量管理理念与工艺开发路径, 本文系统性总结了从上游菌株筛选优化、精细化发酵工艺设计, 直到下游纯化技术的全过程的知识与经验, 旨在为构建和完善荚膜多糖生产工艺体系提供理论指导与实践策略。

**关键词:**肺炎疫苗; 荚膜多糖; 抗原; 质量; 杂质

资助项目: 北京市博士后工作经费(2023-ZZ-32)

This work was supported by the Beijing Postdoctoral Research Foundation (2023-ZZ-32).

\*Corresponding author. E-mail: zhenghaifa@biominhai.com

Received: 2024-04-23; Accepted: 2024-07-03; Published online: 2024-07-16

# Research progress in the manufacturing process of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide from the perspective of vaccine safety

LI Yuelong<sup>1,2</sup>, WANG Jianlong<sup>1</sup>, LIU Jiankai<sup>1,2</sup>, ZHENG Haifa<sup>1,2\*</sup>

1 Beijing Minhai Biotechnology Co., Ltd., Beijing 102600, China

2 Beijing Key Laboratory of New Technology Research of Conjugate Vaccine, Beijing 102600, China

**Abstract:** The pneumococcal vaccines play an indispensable role in defending against various invasive and non-invasive diseases caused by *Streptococcus pneumoniae*. The capsular polysaccharide is a key antigen, while the impurity residues in the capsular polysaccharide cause side effects of pneumococcal polysaccharide vaccines and conjugate vaccines. As the global demand for high-valent pneumococcal vaccines covering a wide range of serotypes keeps increasing, it is urgent and crucial to develop efficient and scalable production technologies for high-purity capsular polysaccharide antigens. The safety and quality attributes of capsular polysaccharide are influenced by multiple factors encompassing the selection of pathogen strains, formulation of culture media, control of fermentation processes, and purification technologies. Following the concept of Quality by Design (QbD) and the process development path, this article systematically summarizes the knowledge and experience throughout the entire process ranging from upstream strain screening and optimization, refined fermentation process design, to downstream purification, aiming to provide comprehensive and in-depth theoretical guidance and practical strategies for building and improving the production system of capsular polysaccharide.

**Keywords:** pneumococcal vaccine; capsular polysaccharide; antigen; quality; impurities

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)由巴斯德于 1881 年发现, 是一种常见的定殖于呼吸道及口腔的革兰氏阳性球菌, 形态呈成对排列的矛头状, 根据荚膜多糖化学组成可分为超过 100 种血清型<sup>[1-2]</sup>, 约 30 种具致病性, 尤其在学龄前儿童(20%–60%)和军事设施居民(50%–60%)中广泛定殖<sup>[3-4]</sup>。肺炎链球菌在机体免疫力下降、遭遇其他感染或体质虚弱时可由定殖转化为致病, 引发包括肺炎、菌血症、脑膜炎在内的肺炎链球菌侵袭性疾病(invasive pneumococcal disease, IPD)及非侵袭性疾病(non-invasive pneumococcal disease, NIPD)。据世界卫生组织(World Health

Organization, WHO)数据显示, 肺炎链球菌感染是全球儿童和老年人致病、住院和死亡的重要原因, 尤其在 5 岁以下儿童死亡病例中占比显著<sup>[5-6]</sup>。肺炎链球菌性疾病治疗首选抗菌药, 但耐药性问题日益严峻。美国疾病控制与预防中心数据显示, 超 30%肺炎链球菌分离株对抗生素耐药<sup>[5]</sup>。我国耐药问题也突出, 多重耐药率高达 83.3%<sup>[6]</sup>。因此, 肺炎链球菌疫苗在预防感染中作用凸显, 医学界再次关注疫苗研发<sup>[7-12]</sup>。

肺炎链球菌的致病因子包括荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)、溶血素和表面蛋

白<sup>[13]</sup>，其中荚膜多糖是关键的致病因子，对于肺炎链球菌在体内的生存至关重要<sup>[14-15]</sup>，同时其作为抗原能够刺激宿主产生保护性抗体，因此是开发疫苗的理想抗原<sup>[16-17]</sup>。肺炎链球菌疫苗主要有 2 条技术路线，分别为多糖疫苗和多糖蛋白结合疫苗，两者均离不开肺炎链球菌荚膜多糖的制备。随着肺炎链球菌疫苗价次的攀升，纯化后多糖中蛋白与核酸杂质累积增多，为降低疫苗中残留蛋白与核酸总量，需优化发酵与纯化工艺，减少单个血清型中杂质含量，进而降低高价次疫苗中的总杂质残留，提升疫苗安全性并减少副反应，这是当前疫苗研发中的重要挑战与研究方向<sup>[18-19]</sup>。深入了解肺炎链球菌荚膜多糖制备过程中影响多糖抗原质量的关键因素并总结制备技术的知识，有助于指导更高价次肺炎链球菌疫苗的开发，为提高肺炎链球菌疫苗的安全性提供新思路。

## 1 肺炎链球菌荚膜多糖抗原的主要杂质

在制备肺炎链球菌多糖疫苗或结合疫苗时，选定血清型的肺炎链球菌通过发酵以产生多糖。发酵后期添加杀菌剂引发细胞裂解，收集溶解产物中的多糖，经过纯化后制备疫苗产品。然而，此工艺产生的杂质包括蛋白质、核酸、细胞碎片和培养基残余组分，可能对疫苗质量(尤其是安全性)产生影响。按照目前的监管要求，对于肺炎链球菌疫苗安全性相关的质量控制指标包括残留蛋白质、残留核酸、细胞壁多糖(cell wall polysaccharide, CWPS)、致热源物质和纯化相关化学试剂的含量控制等<sup>[18-22]</sup>。

### 1.1 蛋白质

残余的细菌蛋白质可能引发过敏反应，特别是对于具有高度免疫原性的蛋白质。严格控制疫苗中的蛋白质残留能减少过敏风险，确保

疫苗使用的安全性。《中华人民共和国药典：三部》(2020 版，以下简称中国药典)中对于不同单型多糖原液中蛋白质残留的限量差距显著，其中 1、2、6B、8、9N、9V、11F、17F、19A、20、22、23F 型蛋白质残留应 $\leq 2\%$ ；33F 型蛋白质残留应 $\leq 2.5\%$ ；4、11A、12F、15B、18C、19F 型蛋白质残留应 $\leq 3\%$ ；3、7F、14 型蛋白质残留应 $\leq 5\%$ ；10A 型蛋白质残留应 $\leq 7\%$ ，而 5 型蛋白质残留应 $\leq 7.5\%$ <sup>[23]</sup>。

### 1.2 核酸

外来核酸可能存在潜在的转染风险，即被人体细胞吸收后可能导致基因表达变化，尽管这种风险在多糖疫苗中较低，但仍需按照监管要求严格控制，以消除潜在的安全隐患。同时核酸残留也是评估疫苗纯度的一个重要指标。全球各地的药监机构对疫苗中的核酸杂质都有严格的质量控制标准，如中国药典规定 23 价肺炎链球菌多糖疫苗的中单型多糖原液的核酸残留至少 $\leq 2\%$ <sup>[23]</sup>。

### 1.3 CWPS

在肺炎链球菌的细胞壁中，细胞壁多糖(CWPS)与荚膜多糖(CPS)共存，是 CPS 纯化过程中常见的污染物<sup>[24]</sup>。CWPS 是一种带负电荷的保守结构分子，能引起炎症反应，而且其抗体虽效价高但不具保护性<sup>[25-28]</sup>。CWPS 的存在可能导致疫苗副反应及低应答<sup>[29-33]</sup>，因此需将其与 CPS 分离。核磁共振(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)氢谱可用于定性和定量检测多糖中的 CWPS 成分，以优化纯化方法。

### 1.4 致热源物质和纯化相关化学试剂

在追求疫苗的安全性和稳定性时，细菌传代和发酵过程中使用的培养基成分至关重要。为了减少潜在风险，应尽量减少培养基中动物源性成分和高分子多聚糖的使用。动物源性成分可能带来未知的污染物和病原体，而高分

子多糖可能干扰多糖的纯化过程, 影响疫苗质量<sup>[21]</sup>。

## 2 发酵工艺

肺炎链球菌属于兼性厌氧菌, 是一种对营养要求非常挑剔的细菌, 需要在厌氧条件以及复杂成分的培养基中才能得到良好的生长, 其发酵培养是一个影响因素非常复杂的系统, 主要影响因素涉及荚膜多糖的生物合成机制、菌种特性、培养基成分(碳源、氮源、维生素、无机盐等)、发酵工艺(发酵 pH、溶氧、发酵温度、通气与搅拌等)、发酵模式(补料或流加等)<sup>[34-37]</sup>。

### 2.1 发酵培养基

肺炎链球菌是一种营养苛刻型微生物, 对发酵培养基的营养成分有着非常高的要求, 因此用于肺炎链球菌培养的培养基组成至关重要, 其对于肺炎链球菌的生长以及多糖等抗原成分的合成都有关键的影响。

应用于生产肺炎链球菌多糖的培养基应该满足以下标准: (1) 不包含血清成分; (2) 无动物源成分; (3) 能够为大规模生产提供高产和高纯度的多糖; (4) 不造成下游提取纯化的困难。

在遵循现行药品生产管理规范(current good manufacture practices, cGMP)的前提下, 肺炎链球菌培养基的开发着重于创建无血清和无动物源成分的化学成分确定的培养基, 以确保高度可重复性并优化营养需求控制的发酵过程<sup>[38-40]</sup>。

#### 2.1.1 无动物源成分培养基

无动物源成分培养基的开发和应用对于提高生物制品的安全性、质量和监管便捷性具有重要意义。无动物源性的植物大豆蛋白胨和酵母粉是一类良好的培养基混合氮源, 已有多项研究表明大豆蛋白胨和酵母粉制备的无动物源性培养基能有效提高肺炎链球菌的生长和荚膜多糖的合成。

在 Jain 等<sup>[41]</sup>的专利中提出了一种针对肺炎链球菌的新型发酵培养基, 该培养基不含有血清和动物源成分, 主要组分包括葡萄糖、大豆蛋白胨、酵母提取物以及多种氨基酸和无机盐, 例如 L-谷氨酰胺、L-天冬酰胺、硫乙醇酸、氯化胆碱、磷酸氢二钾、碳酸钠、硫酸亚铁、硫酸镁、硫酸锰和硫酸锌<sup>[41]</sup>。该培养基避免了因血清和动物源成分可能带来的污染风险, 并简化了下游处理过程。此外, 该培养基成本效益高, 支持肺炎链球菌大量产生多糖<sup>[41]</sup>。

德赛等<sup>[42]</sup>在其专利中描述了一种专门用于细菌细胞培养生产多糖的培养基和发酵方法, 该培养基是一个复合型培养基, 包括植物水解产品(如大豆水解物)、酵母提取物以及多样化的碳源。植物水解产物是从多个供应商处获得的大豆蛋白胨, 而酵母提取物可以是酵母自溶物、超滤后的酵母提取物或合成的酵母提取物<sup>[42]</sup>。碳源涵盖广泛的糖类, 包括葡萄糖、甘露糖醇(右旋糖)、乳糖、蔗糖、果糖、半乳糖、棉子糖、木糖和甘露糖等<sup>[42]</sup>。此外, 该培养基还添加了磷酸盐、氨基酸、维生素和无机盐等成分。通过实验验证, 这种含有特定植物水解产物、酵母提取物和多种碳源的培养基被证明非常有助于促进细菌细胞生长和高效生产多糖<sup>[42]</sup>。

黄放等<sup>[43]</sup>通过使用无动物源性培养基对高产糖 1 型肺炎链球菌进行筛选, 发现由大豆蛋白胨和酵母粉作为复合氮源制备的无动物源性培养基显著促进了肺炎链球菌的生长及其多糖产量。在经过这种无动物源成分培养基筛选的菌种在发酵罐中的培养结果显示, 其产糖量可达到 960 mg/L, 相较于使用动物源性培养基的筛选前产量提高了大约 8 倍<sup>[43]</sup>。同时, 为了保留培养基中的营养成分, 优化了灭菌方法, 采用除菌过滤处理取代传统的高压灭菌步骤, 这样的改进更有利于细菌的发酵培养<sup>[43]</sup>。

### 2.1.2 化学成分确定培养基

理想情况下,培养基应只包含基本成分,并且批次间具有高度的可重复性。化学成分确定的培养基在本质上比复杂的培养基更具可重复性以及安全性。

德赛等<sup>[42]</sup>的专利描述了一种用于肺炎链球菌多糖生产的无血清培养基,该培养基为化学成分确定的培养基,不含动物来源组分,并且全部成分具有明确的化学结构,这种培养基总氨基酸浓度超过 50 mmol/L,能够促进细胞生长和多糖生产。发明人还改良了这种培养基,命名为“改良的 AS3”,它支持不同血清型肺炎链球菌的生长和多糖合成,与基于大豆水解产物的复合培养基相比,能够实现更高密度的细胞生长,而多糖产量则相似<sup>[42]</sup>。

Texeira 等<sup>[38]</sup>开发了一种针对血清型 1 肺炎链球菌优化的化学成分确定的培养基,以提高细菌的生长密度和多糖产量。与 TSB 培养基相比,这种化学成分确定的培养基表现出更好的生长支持和更高的产量,同时提供了更高的可重复性<sup>[38]</sup>。此外,使用这种培养基结合连续培养技术还能简化下游处理过程<sup>[44]</sup>。

McFarland 等<sup>[45]</sup>的研究表明,在肺炎链球菌发酵培养基中,通过增加锰(Mn)与锌(Zn)的比例可以直接激活磷酸葡萄糖变位酶(phosphoglucosmutase, Pgm),从而增加荚膜多糖的产量;Pgm 是在糖酵解和荚膜多糖生物合成途径的分支点上独立于转录调控发挥作用的酶。此外,研究还发现,即使在锰浓度较高的条件下,CPS 生物合成途径中的另一种蛋白 CpsB (一种锰依赖性磷酸酶)也不会异常地去磷酸化其目标分子荚膜酪氨酸激酶 CpsD<sup>[45]</sup>。

## 2.2 发酵工艺

发酵工艺的优化需要平衡肺炎链球菌的生长以及荚膜多糖的合成。肺炎链球菌发酵工艺

中的荚膜多糖产量与菌体浓度并不简单地成正比关系,文献资料表明,细菌荚膜多糖的产生往往在培养条件并非最优的条件下获得,比如稍低的 pH、稍低的温度等<sup>[39-40,46-48]</sup>。

Henriques 等<sup>[47]</sup>采用中心复合设计(face centered central composite design, FCCCD),研究了温度、pH 值、搅拌速度等工艺变量对多糖合成的影响,利用响应面优化计算这些工艺变量的最优组合值,结果表明,培养温度 37 °C、培养 pH 7.0、搅拌速度保持在 1 300 r/min 能够提供最高的荚膜多糖的产量。同时数据表明,虽然生物量的提高和葡萄糖摄取几乎不受温度的影响,但荚膜多糖的产量差异显著<sup>[47]</sup>。此外,有利于细菌生长的条件并不总是有利于多糖的合成,温度对多糖合成的影响可能与参与荚膜多糖生物合成的一些酶的调节活性有关,温度调节了一些参与荚膜多糖生物合成的酶的活性<sup>[47]</sup>。因此,通过工艺优化寻找到最有利于荚膜多糖合成的工艺条件的组合,能够有效地提高肺炎链球菌荚膜多糖的厚度<sup>[47]</sup>。

研究表明,灌注发酵能够将培养物通过灌注系统进行循环,除去用完的培养基和废物产物,并通过引入新鲜培养基来维持培养体积,灌注发酵能够极大地提升肺炎链球菌的生长密度,同时能够有效地去除发酵体系中的副产物杂质, $OD_{600}$  可以达到 30,相应的多糖产量可以达到 2.2 g/L<sup>[42]</sup>。然而,由于灌注发酵的操作复杂,而且耗材成本较高,因此在实际的生产工艺中经常使用分批发酵(batch)或补料分批发酵(fed-batch)这 2 种模式。维纳亚克等<sup>[49]</sup>通过一系列的工艺优化,使 14 型肺炎链球菌荚膜多糖的分批发酵产量为 450 mg/L,补料分批发酵可达 1 100 mg/L。

## 3 杀菌工艺

当肺炎链球菌发酵至对数期末端或平台

期, 需要通过加入杀菌剂或裂解剂以灭活和裂解菌体, 从而释放出荚膜多糖, 再经过适宜的纯化工艺获得精制多糖。选择适宜的杀菌剂并控制其残留及其他杂质, 是影响肺炎链球菌多糖抗原质量的重要因素之一。

### 3.1 杀菌剂

目前主流杀菌工艺是通过添加脱氧胆酸钠 (sodium deoxycholate, DOC) 诱导裂解, 然后收获发酵裂解物, 用于荚膜多糖的回收和纯化<sup>[50-52]</sup>。

Gonçalves 等<sup>[40,53]</sup>的研究中调整发酵平台期的培养气体环境, 将完全厌氧的氮气环境改变为空气环境, 并且通过免疫电子显微镜观察培养气体环境变化后菌体荚膜的状态(图 1), 结果发现随着培养气体环境的变化, 荚膜表面多糖大量脱落, 伴随着大量的可溶性多糖进入发酵上清液。基于这一发现, 他们提出通过仅提取发酵上清液中的荚膜多糖而不是裂解所有菌体, 可以显著降低纯化过程的复杂性<sup>[40,53]</sup>。

马利等<sup>[54]</sup>在其专利中提出了一种制备免疫原性组合物的方法, 该方法使用  $\beta$ -丙内酯 ( $\beta$ -propiolactone, BPL) 对肺炎链球菌细胞进行灭活。BPL 能够有效地释放肺炎链球菌表面的可

溶性多糖以及其他保护性免疫原分子, 同时使细胞部分裂解, 这样最大化地暴露了肺炎链球菌荚膜下的抗原, 同时保持了肺炎链球菌细胞的整体结构<sup>[54]</sup>。此外, BPL 易水解, 而且产物无毒无害, 无需专门的去除步骤<sup>[54]</sup>。

Zanardo 等<sup>[44]</sup>采用了硫柳汞来灭活细菌, 并通过过滤的方式去除了完整的肺炎链球菌菌体。这种方法避免了使用表面活性剂破坏细胞膜, 从而防止了大量细胞内污染物的释放, 这些污染物可能会使得纯化过程变得更加困难。

李跃龙等<sup>[55]</sup>提出了一种新的肺炎链球菌荚膜多糖的制备方法, 使用甲醛以及 BPL 处理肺炎链球菌发酵培养物, 可在避免裂解菌体的情况下达到灭活菌体并有效释放荚膜多糖的效果, 阻止了菌体裂解后胞内蛋白质、核酸等杂质的大量释放, 尤其经过 BPL 处理后, 获得了较高的多糖收率, 可采用简化的下游纯化工艺进行肺炎链球菌荚膜多糖的纯化, 能够高效率地完成对杂质的去除, 各项质量参数符合中国药典的要求。

### 3.2 杀菌剂的残留

在主流的肺炎链球菌荚膜多糖生产过程中, 通常需要添加脱氧胆酸钠溶液来裂解菌体, 释放其表面

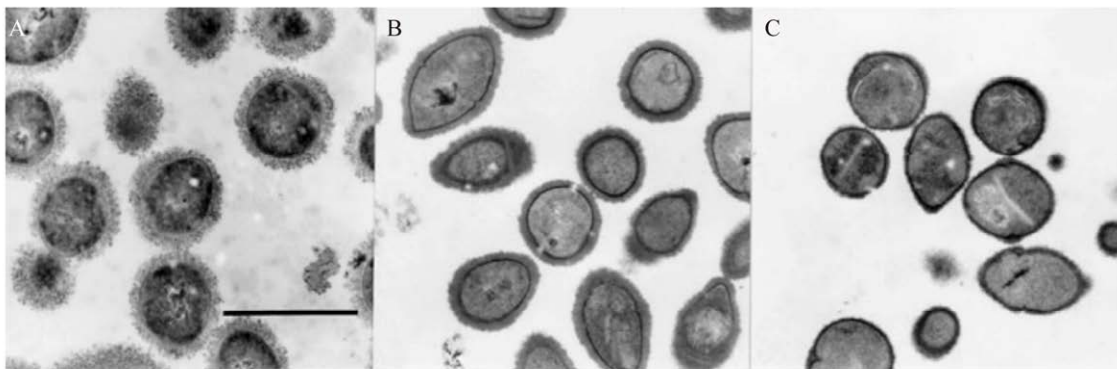


图 1 肺炎链球菌荚膜免疫电镜图<sup>[53]</sup>

Figure 1 Immunoelectron microscopy of pneumococcal capsules<sup>[53]</sup>. A: After 4 h of cultivation, exponential phase under nitrogen. B: After 12 h of cultivation, stationary phase under nitrogen. C: After 12 h of cultivation, stationary phase under air, after anaerobic growth (size bar=1.0  $\mu$ m).

的荚膜多糖。然而，这种方法不仅给后续的纯化过程带来困难，还可能导致脱氧胆酸钠残留，以及潜在动物病原体或其他有害物质的存在，这可能会引起严重的副作用。

硫柳汞是一种含汞的有机化合物，长期以来一直被广泛用作生物制品及药物制剂(包括许多疫苗的防腐剂)，以预防有害微生物污染所致的潜在危害。在生物制品的历史中，硫柳汞这样的防腐剂的应用已具有 60 多年的历史，用作杀菌剂，即使有微量残留，也不会造成大的安全性风险。

甲醛以及 BPL 可在保持菌体完整性的情况下达到灭活的效果，避免了菌体裂解后胞内蛋白核酸等杂质的大量释放，从而降低了后续下游纯化工作的难度；甲醛与 BPL 属于小分子物质，可轻易地通过超滤去除，此外，BPL 易水解，而且水解产物无毒无害，可不必担心在成品疫苗中的残留<sup>[56]</sup>。

## 4 纯化工艺

由于肺炎链球菌荚膜多糖结构的复杂性和较差的稳定性<sup>[57-58]</sup>，选择合适的分离和除杂方法至关重要。纯化工艺通常包括多个步骤，如深层过滤、有机溶剂处理、酶处理、层析以及膜分离等。这些步骤往往昂贵、劳动密集且技术要求高。在整个纯化过程中，残留蛋白水平是一个主要问题，因为蛋白质的物理和化学性质使得其难以彻底去除。

传统的肺炎链球菌荚膜多糖纯化工艺主要有以下 2 种方法。(1) 十六烷基三甲基溴化铵(cetyltriethylammoniumbromide, CTAB)沉淀法：此方法通过添加 CTAB 来沉淀多糖和核酸，从而将它们与杂质分离。之后，使用柱层析技术进一步纯化多糖。这种方法对于带有电荷的多糖效果较好，但对于中性肺炎链球菌多糖，CTAB 无法

有效沉淀，因此需要依靠层析技术去除杂质，这增加了成本。(2) 苯酚抽提法：这种方法利用苯酚去除蛋白质和其他杂质。苯酚能够使蛋白质变性并沉淀，从而可以从多糖中分离出来。然而，苯酚对人体和环境都有危害，由于其具有较强的腐蚀性，因此在操作过程中需要特别注意安全，并且对苯酚在最终产品中的残留量有严格限制。

这 2 种方法都存在不足之处，尤其是在处理中性肺炎链球菌多糖时。因此，需要开发新的纯化技术或改进现有方法，以实现更安全、高效、环保的荚膜多糖纯化工艺。

理想的荚膜多糖提取工艺应具有如下特征<sup>[18-20,22]</sup>：(1) 尽可能减少核酸、蛋白质、内毒素等可以引起不良反应的杂质残留量；(2) 纯化条件尽可能温和，不破坏多糖的结构、化学基团含量和分子质量大小；(3) 纯化过程中使用的试剂应无毒、无害；(4) 工艺流程简单，回收率高，纯化工艺容易线性放大。

### 4.1 沉淀法

通过吸附或絮凝的方式沉淀杂质是一种重要的沉淀除杂方式，如马图尔等<sup>[59]</sup>通过在 15–60 °C 的温度下向多糖溶液中添加二氧化硅悬浮液，使蛋白质杂质与二氧化硅结合，并通过吸附聚集及离心或过滤步骤来分离这些杂质，从而实现多糖的纯化。相关专利<sup>[60]</sup>提出使用絮凝剂(例如明矾等)来沉淀细胞碎片、宿主细胞蛋白和核酸，帮助下游澄清单元操作，数据显示，在 pH 2.5–4.0 条件下及 1.5%–3.0% 的明矾浓度下，可以有效去除超过 90% 的蛋白质杂质。Macha 等<sup>[61]</sup>则采用了磷酸铝和乙醇处理，并通过离心、孵育、超滤和微滤等步骤将多糖纯化，有效将多个血清型多糖的蛋白和核酸杂质含量降至 1% 以下。王立波等<sup>[62]</sup>利用酸沉去除蛋白核酸，通过调节 pH 和添加 CaCl<sub>2</sub> 及乙醇来收集多糖沉淀。Yuan 等<sup>[63]</sup>通过调节 pH 至

3.5 左右沉淀蛋白质,并用活性炭过滤去除残留蛋白。刘艳丽等<sup>[64-66]</sup>通过一系列研究,从使用 CTAB 的多次沉淀法到简化的脱氧胆酸钠和钙盐两步沉淀法,再到最新的一步钙盐酸沉淀法,逐步迭代优化了多糖纯化工艺,缩短了工艺流程,并能够控制多糖的分子量。

酸沉和乙醇沉淀配合使用除杂也是一条常用的工艺路线,如 Seung-Jin 等<sup>[67]</sup>开发了一种简化的纯化流程,通过调整 pH 至 4.5 并进行酸化沉淀,随后用 50%–80%乙醇分离和透析以获得纯化荚膜多糖。Cano 等<sup>[68]</sup>公开了涉及一个或两个醇沉淀反应的纯化荚膜多糖方法。李小波等<sup>[69]</sup>建立了 14 型肺炎链球菌荚膜多糖的酸沉淀法纯化工艺,优化氯化钙浓度、pH 值和反应时间,并通过乙醇沉淀处理和冷冻干燥收集精制多糖。

其他基于沉淀法的工艺路线包括: Bahler 等<sup>[70]</sup>描述了肺炎链球菌血清型 3 多糖的纯化方法,通过加热和低 pH 沉淀以去除杂质; Lee 等<sup>[71]</sup>对传统荚膜多糖纯化工艺进行了优化,通过加入酸沉淀的工艺以及优化了 CTAB 沉淀的参数,实现了对血清型 5 荚膜多糖的杂质(蛋白质、核酸和 CWPS)的进一步去除,优化后的工艺同时也适用于其他 14 个型别的肺炎荚膜多糖纯化。疫苗的酶联免疫吸附试验和调理吞噬试验表明,改进纯化工艺制备的 CPS 制备的结合疫苗具有更高的免疫原性<sup>[71]</sup>。

## 4.2 层析法

马图尔等<sup>[59]</sup>描述了一种肺炎链球菌多糖的纯化方法,其中使用 Capto<sup>TM</sup>多模式阴离子交换剂的色谱步骤来替换传统的苯酚萃取的有害步骤。卡普雷等<sup>[72]</sup>描述了一种适用于肺炎链球菌的荚膜多糖的纯化方法,该方法包括酶处理、切向流过滤和疏水相互作用色谱法或混合模式离子交换树脂色谱法的纯化步骤,从而避免了

使用有机溶剂(例如醇、酚)和超速离心设备。Kapre 等<sup>[73]</sup>提出一种不含醇和 CTAB 的纯化肺炎链球菌多糖的方法,该方法利用色谱法基于净表面电荷差异来分离多糖的 C-Ps (PnPs),过程中不使用乙醇和 CTAB。金永杰等<sup>[74]</sup>描述了一种肺炎链球菌荚膜多糖的制备方法,可使用乙醇沉淀配合分子筛排阻层析技术对粗糖溶液进行分离,从而获得精制多糖。

Zanardo 等<sup>[44]</sup>提出可以使用 5%三氯乙酸和乙醇沉淀配合阴离子交换色谱针对肺炎链球菌 14 型荚膜多糖进行纯化。Suárez 等<sup>[75]</sup>开发了一种高效纯化肺炎链球菌荚膜多糖的方法,该方法使用固定化大豆凝集素作为亲和吸附剂,利用了凝集素对半乳糖和 N-乙酰-D-半乳糖胺的特异性识别能力,这些单糖是 14 型肺炎链球菌荚膜多糖重复单元中存在的半乳糖残基的一部分,通过亲和层析可以有效地从其他组分中分离出 14 型肺炎链球菌荚膜多糖,从而将杂质蛋白的残留量降低至 0.15%或以下。

## 4.3 酶解法

酶解法在纯化多糖的过程中具有自身优势,但同时也存在一些局限性:酶的制备和使用成本相对较高,并且酶解效果受到酶的种类、添加量、温度、pH、水解时间等多种因素的影响,同时在纯化工艺中需要通过多种方法去除外源酶。

尽管存在一些挑战,酶解法仍然是一种非常有前景的多糖纯化技术。任克明等<sup>[76]</sup>在多糖的纯化过程使用脱氧胆酸钠进行酸化沉淀和核酸酶处理来去除杂质。Gonçalves 等<sup>[77]</sup>描述了一种针对 23F 型肺炎链球菌荚膜多糖的纯化流程,采用乙醇沉淀配合酶处理(添加核酸酶和蛋白酶)水解残留的蛋白质和核酸杂质,使得精制多糖最终的蛋白质和核酸杂质残留质量分数分别为 1.5%和 0.3%。王见冬等<sup>[78]</sup>提出了酶催化反应配



合超滤和层析的方法进行纯化，即使用蛋白酶和核酸酶在特定的反应条件下将蛋白质和核酸降解成小分子片段，通过超滤去除大分子杂质，然后利用层析技术进一步纯化多糖。

## 5 总结与展望

肺炎链球菌疫苗在预防肺炎链球菌引起的侵袭性以及非侵袭性疾病方面发挥着重要的作用，随着肺炎链球菌耐药性的日趋严重，人类需要开发高价次的肺炎链球菌疫苗以提高保护效率。荚膜多糖作为肺炎链球菌最为有效的抗原，是肺炎链球菌多糖疫苗以及多糖结合疫苗中最为关键的抗原成分。通过优化肺炎链球菌多糖制备的关键技术，从而提升各血清型的肺炎链球菌荚膜多糖质量，能够从源头上控制疫苗安全风险。

疫苗的质量控制不仅仅取决于终产品的出厂检验，应贯穿于整个疫苗的生产全过程控制<sup>[21]</sup>。本文基于 QbD 质量管理与工艺开发的理念，结

合产品特性以及监管要求，系统地梳理了影响肺炎链球菌多糖抗原安全性的主要杂质，进而围绕这些关键质量属性(critical quality attributes, CQAs)，从肺炎链球菌荚膜多糖制备工艺的全过程，识别并控制工艺开发的关键环节，总结了已有的知识与经验。

肺炎链球菌多糖制备技术发展至今约有 90 年历史，总体来看我国肺炎链球菌多糖的制备技术相比国际先进水平存在一定差距。为满足高质量高价次肺炎链球菌疫苗开发需求、控制成本及符合监管安全标准，肺炎链球菌荚膜多糖的制备技术还在持续进行技术迭代。展望未来，肺炎链球菌多糖制备工艺的发展可聚焦以下关键技术(图 2)。

(1) 培养基革新：国内生产商预计将逐步淘汰动物源成分的传统培养基，转向采用无动物源培养基或化学成分确定的培养基。这种转变有望降低外源因子污染风险，提升产品的质量稳定性，并符合国际安全标准。

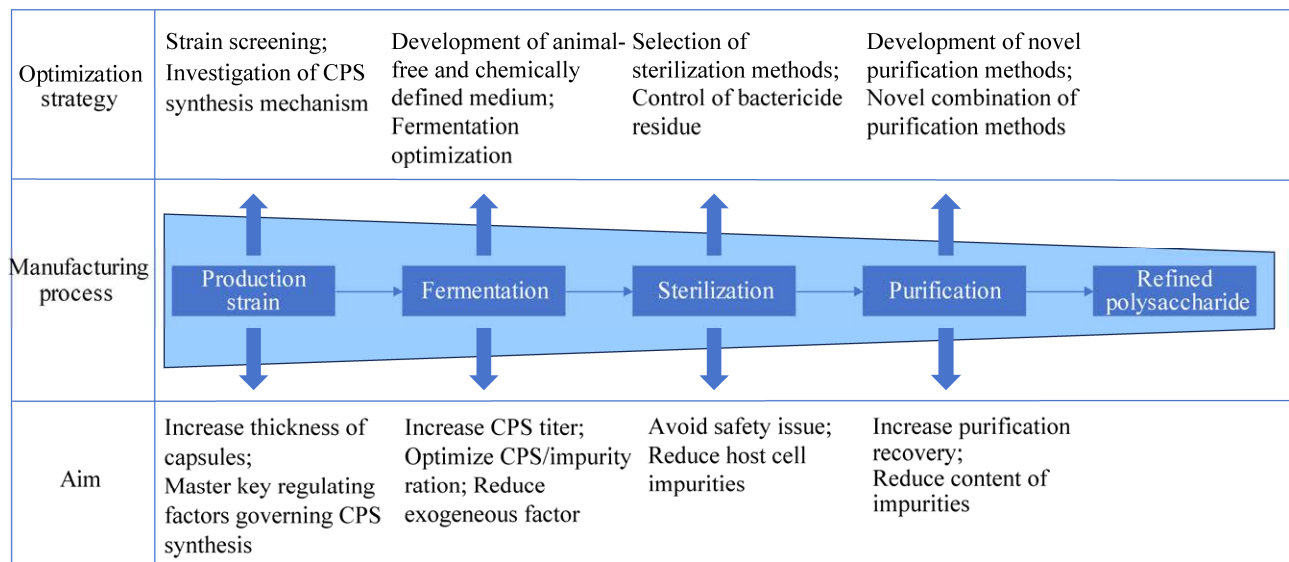


图 2 肺炎链球菌荚膜多糖制备技术工艺优化策略

Figure 2 Optimization strategies for the manufacturing technology of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide.

(2) 发酵工艺升级：分批发酵或补料分批发酵技术将向更先进的灌注培养系统演变。通过持续补充营养和移除废物，灌注系统将显著提高菌体生长密度和多糖产量，从而提高生产效率，并简化下游纯化工艺。

(3) 杀菌技术进步：为减少杂质释放并提高目标产物提取率，创新性的杀菌方法将成为研究和实践的重点。N-月桂基肌氨酸钠(N-lauryl sarcosine sodium, NLS)、高温酸碱处理、BPL 以及机械方法等技术将被进一步探索和应用。

(4) 纯化工艺优化：当前多步沉淀结合超滤和层析的纯化流程将得到改进，以提高收率和减少耗时。借鉴辉瑞公司(Pfizer Inc.)等厂家的成功经验，简化工艺流程同时确保最终产品质量满足中国药典标准，将是多糖纯化工艺优化的主要目标。

这些技术的创新和工艺改进不仅有助于提升中国肺炎链球菌多糖制备技术的整体水平和竞争力，还将促进产业可持续发展，保障疫苗供应的稳定性和可及性。随着成本的降低和质量的提升，肺炎疫苗将为全球公共卫生事业做出更大的贡献，推动疾病预防和控制工作向前迈进。

## 参考文献

- [1] PATON JC, TRAPPETTI C. *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(2): 10.1128.
- [2] 任红宇, 王艳晴, 李一楠, 赵娜, 秦天. 102 株侵袭性肺炎链球菌血清型分布特征及耐药谱分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2021, 37(9): 801-807.  
REN HY, WANG YQ, LI YN, ZHAO N, QIN T. Analysis of serogroups distribution characteristics and drug resistance spectrum of 102 strains of invasive *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2021, 37(9): 801-807 (in Chinese).
- [3] BOGAERT D, van BELKUM A, SLUIJTER M, LUIJENDIJK A, de GROOT R, RÜMKE HC, VERBRUGH HA, HERMANS P. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children[J]. *The Lancet*, 2004, 363(9424): 1871-1872.
- [4] 朱旭慧, 孙自镛, 李丽, 张蓓, 陈中举, 田磊, 王斌, 朱琴. 肺炎链球菌的分布及耐药性分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2010, 25(2): 100-102.  
ZHU XH, SUN ZY, LI L, ZHANG B, CHEN ZJ, TIAN L, WANG B, ZHU Q. Distribution and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2010, 25(2): 100-102 (in Chinese).
- [5] SFEIR MM. Diagnosis of multidrug-resistant pathogens of pneumonia[J]. *Diagnostics*, 2021, 11(12): 2287.
- [6] 中华预防医学会, 中华预防医学会疫苗与免疫学分会. 肺炎球菌性疾病免疫预防专家共识(2020 版)[J]. *中国疫苗和免疫*, 2021, 27(1): 1-47.  
Chinese Preventive Medicine Association, Vaccine and Immunology Branch of the Chinese Preventive Medicine Association. Expert consensus on immunoprophylaxis of pneumococcal disease (2020 version)[J]. *Chinese Journal of Vaccines and Immunization*, 2021, 27(1): 1-47 (in Chinese).
- [7] FITZGERALD D, WATERER GW. Invasive pneumococcal and meningococcal disease[J]. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2019, 33(4): 1125-1141.
- [8] WEISER JN, FERREIRA DM, PATON JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(6): 355-367.
- [9] GUO Y, QIAO LN. Clinical features and antibiotic sensitivity of invasive pneumococcal disease versus noninvasive pneumococcal disease in children[J]. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 2021, 23(5): 466-470.
- [10] LEES JA, CROUCHER NJ, GOLDBLATT D, NOSTEN F, PARKHILL J, TURNER C, TURNER P, BENTLEY SD. Genome-wide identification of lineage and locus specific variation associated with pneumococcal carriage duration[J]. *eLife*, 2017, 6: e26255.
- [11] 潘方平, 吴璐怡, 叶云飞, 孙爱华. 肺炎链球菌耐药性检测及其对大环内酯类抗生素耐药机制的研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(3): 255-258, 262.  
PAN FP, WU LY, YE YF, SUN AH. Resistance detection and macrolide antibiotic-resistant mechanism of *Streptococcus pneumoniae* isolates[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2010, 26(3): 255-258, 262 (in Chinese).

- [12] 刘小宇, 陈敏. 肺炎链球菌糖疫苗的研究进展[J]. 微生物学报, 2022, 62(2): 446-457.  
LIU XY, CHEN M. Carbohydrate-based vaccines of *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 446-457 (in Chinese).
- [13] KADIOGLU A, WEISER JN, PATON JC, ANDREW PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(4): 288-301.
- [14] HAMAGUCHI S, ZAFAR MA, CAMMER M, WEISER JN. Capsule prolongs survival of *Streptococcus pneumoniae* during starvation[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(3): e00802-e00817.
- [15] HYAMS C, CAMBERLEIN E, COHEN JM, BAX K, BROWN JS. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(2): 704-715.
- [16] AVERY OT, HEIDELBERGER M. Immunological relationships of cell constituents of pneumococcus[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1925, 42(3): 367-376.
- [17] AVERY OT, HEIDELBERGER M, GOEBEL WF. The soluble specific substance of friedlander's bacillus: paper II. Chemical and immunological relationships of pneumococcus type II and of a strain of friedlander's bacillus[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1925, 42(5): 709-725.
- [18] TALAGA P, VIALLE S, MOREAU M. Development of a high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection based quantification assay for pneumococcal polysaccharides and conjugates[J]. *Vaccine*, 2002, 20(19/20): 2474-2484.
- [19] JONES C, CURRIE F. Control of components of bacterial polysaccharide vaccines by physical methods[J]. *Biologicals*, 1991, 19(1): 41-47.
- [20] 赵海平, 赵志强, 谢贵林. 细菌荚膜多糖的分离纯化研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2012, 40(2): 72-78.  
ZHAO HP, ZHAO ZQ, XIE GL. Progress in isolation and purification of bacterial capsular polysaccharide[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2012, 40(2): 72-78 (in Chinese).
- [21] 陈琼, 石继春, 王春娥, 王珊珊, 叶强. 23 价肺炎球菌多糖疫苗质量控制现状和展望[J]. 中国药品标准, 2022, 23(2): 156-160.  
CHEN Q, SHI JC, WANG CE, WANG SS, YE Q. Current status and prospect of quality control of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine[J]. *Drug Standards of China*, 2022, 23(2): 156-160 (in Chinese).
- [22] JONES C. Glycoconjugate vaccines: the regulatory framework[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1331: 229-251.
- [23] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 三部[M]. 11 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.  
Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Part Three*[M]. 11th ed. Beijing: China Medical Science Press, 2020 (in Chinese).
- [24] XU QW, ABEYGUNAWARDANA C, NG AS, STURGESS AW, HARMON BJ, HENNESSEY JP Jr. Characterization and quantification of C-polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide preparations[J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 336(2): 262-272.
- [25] VIALLE S, SEPULCRI P, DUBAYLE J, TALAGA P. The teichoic acid (C-polysaccharide) synthesized by *Streptococcus pneumoniae* serotype 5 has a specific structure[J]. *Carbohydrate Research*, 2005, 340(1): 91-96.
- [26] BROWN S, SANTA MARIA JP Jr, WALKER S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2013, 67: 313-336.
- [27] TUOMANEN E, RICH R, ZAK O. Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surface [J]. *American Review of Respiratory Disease*, 1987, 135(4): 869-874.
- [28] NIELSEN SV, SØRENSEN UBS, HENRICHSEN J. Antibodies against pneumococcal C-polysaccharide are not protective[J]. *Microbial Pathogenesis*, 1993, 14(4): 299-305.
- [29] BRYANT KA, BLOCK SL, BAKER SA, GRUBER WC, SCOTT DA. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine[J]. *Pediatrics*, 2010, 125(5): 866-875.
- [30] GOLDBLATT D, LEVINSKY RJ, TURNER MW. Role of cell wall polysaccharide in the assessment of IgG antibodies to the capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* in childhood[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 1992, 166(3): 632-634.
- [31] MUSER DM, LUCHI MJ, WATSON DA, HAMILTON R, BAUGHN RE. Pneumococcal polysaccharide vaccine in young adults and older bronchitics: determination of IgG responses by ELISA

- and the effect of adsorption of serum with non-type-specific cell wall polysaccharide[J]. The Journal of Infectious Diseases, 1990, 161(4): 728-735.
- [32] POOLMAN J, BORROW R. Hyporesponsiveness and its clinical implications after vaccination with polysaccharide or glycoconjugate vaccines[J]. Expert Review of Vaccines, 2011, 10(3): 307-322.
- [33] SEN G, KHAN AQ, CHEN QY, SNAPPER CM. *In vivo* humoral immune responses to isolated pneumococcal polysaccharides are dependent on the presence of associated TLR ligands[J]. The Journal of Immunology, 2005, 175(5): 3084-3091.
- [34] 柴雁菁, 左智洁, 马波, 向左云, 施兢, 周红军, 徐东梅, 黄镇. 肺炎链球菌 5 型发酵工艺的优化[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(9): 1660-1664.  
CHAI YJ, ZUO ZJ, MA B, ZUO Y, SHI J, ZHOU HJ, XU DM, HUANG Z. Optimization of condition for the fermentation process of *Streptococcus pneumoniae* serotype 5[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(9): 1660-1664 (in Chinese).
- [35] MOZZI F, GIORI G, OLIVER G, VALDEZ G. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei*. I: influence of salts[J]. Milchwissenschaft-milk Science International, 1995, 50: 186-188.
- [36] GROBBEN GJ, van CASTEREN WHM, SCHOLS HA, OOSTERVELD A, SALA G, SMITH MR, SIKKEMA J, de BONT JAM. Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 48(4): 516-521.
- [37] DEGEEST B, DE VL. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(7): 2863-2870.
- [38] TEXEIRA E, CHECA J, RÍAL A, CHABALGOITY JA, SUÁREZ N. A new chemically defined medium for cultivation of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1[J]. Journal of Biotech Research, 2015, 6:54-62.
- [39] RESTREPO AV, SALAZAR BE, AGUDELO M, RODRIGUEZ CA, ZULUAGA AF, VESGA O. Optimization of culture conditions to obtain maximal growth of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*[J]. BMC Microbiology, 2005, 5(1): 34.
- [40] GONÇALVES VM, ZANGIROLAMI TC, GIORDANO RLC, RAW I, TANIZAKI MM, GIORDANO RC. Optimization of medium and cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(6): 713-717.
- [41] JAIN R, MAITHAL K. Fermentation process for *Streptococcus pneumoniae*: PCTIN2011000365[P]. 2011-12-08.
- [42] 德赛 SG, 汉森 MA, 金罗斯 JP, 拉斯科 DR, 隆伯克 SE, 洛特文 JA, 帕特尔-布朗 SK, 孙 WQ, 托马塞罗 PA. 用于在细菌细胞培养物中生产多糖的培养基和发酵方法: CN201680077135.5[P]. 2018-08-31 (in Chinese).
- [43] 黄放, 邓杰, 赵兆, 王智杰, 周宇, 刘威, 张珂, 张伟, 李小波. 菌种筛选对 1 型肺炎链球菌产糖量的影响[J]. 国际生物制品学杂志, 2014, 37(3): 126-128, 136.  
HUANG F, DENG J, ZHAO Z, WANG ZJ, ZHOU Y, LIU W, ZHANG K, ZHANG W, LI XB. Effect of bacterial colony screening on polysaccharide yield of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1[J]. International Journal of Biologicals, 2014, 37(3): 126-128, 136 (in Chinese).
- [44] ZANARDO RT, FERRI ALS, FIGUEIREDO DB, KRASCHOWETZ S, CABRERA-CRESPO J, GONÇALVES VM. Development of a new process for purification of capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* serotype 14[J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2016, 33(3): 435-443.
- [45] MCFARLAND AL, BHATTARAI N, JOSEPH M, WINKLER ME, MARTIN JE. Cellular Mn/Zn ratio influences phosphoglucomutase activity and capsule production in *Streptococcus pneumoniae* D39[J]. Journal of Bacteriology, 2021, 203(13): e0060220.
- [46] MARTHOS BV, FERRI ALS, de FIGUEIREDO DB, ZANGIROLAMI TC, GONÇALVES VM. Capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 1: from strain selection to fed-batch cultivation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(24): 10447-10456.
- [47] HENRIQUES AWS, JESSOUROUN E, LIMA EL, ALVES TLM. Capsular polysaccharide production by *Neisseria meningitidis* serogroup C: optimization of process variables using response surface methodology[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(8): 1822-1828.

- [48] DE LOURDES MOURA LEAL M, DA SILVA GOMES PEREIRA D, JESSOUROUN E, PEIXOTO GIMENES COUTO MA, PEREIRA N. Investigation of cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 14[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2011, 14(5): 6.
- [49] 维纳亚克 KS, 库马尔 JS, 斯里瓦斯塔瓦 AK. 培养细菌以提高荚膜多糖产率的新方法: CN201180076292.1[P]. 2017-06-30 (in Chinese).
- [50] 王婷婷, 魏文进, 韩菲, 何佳琦. 一种肺炎链球菌多糖溶液中脱氧胆酸钠的测定方法: CN201210314112.5[P]. 2013-12-11.  
WANG TT, WEI WJ, HAN F, HE JQ. Determination method for sodium deoxycholate in *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide solution: CN201210314112.5[P]. 2013-12-11 (in Chinese).
- [51] 黄镇, 向左云, 施兢, 吴凯, 袁琳, 方国良, 陈玉秋, 钱雯, 王铭, 左智洁, 陈南萍. 一种13价肺炎球菌多糖-蛋白结合物组合物及其制备方法和应用: CN201810053602.1[P]. 2018-05-29.  
HUANG Z, XIANG ZY, SHI J, WU K, YUAN L, FANG GL, CHEN YQ, QIAN W, WANG M, ZUO ZJ, CHEN NP. A 13-valent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate composition and preparation method and application thereof: CN201810053602.1[P]. 2018-05-29 (in Chinese).
- [52] 豪斯多夫 WP, 西贝尔 GR, 帕拉迪索 PR. 多价肺炎球菌多糖-蛋白质缀合物组合物: CN200680017776.8[P]. 2012-07-18 (in Chinese).
- [53] GONÇALVES VM, TAKAGI M, CARNEIRO SM, de CAMPOS GIORDANO R, TANIZAKI MM. Introduction of air in the anaerobic culture of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F induces the release of capsular polysaccharide from bacterial surface into the cultivation medium[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101(5): 1009-1014.
- [54] 马利 R, 安德森 P, 陆 YJ, 奥尔德森 M, 罗伯逊 GA, 迈松纳夫 JL, 泰特 AM, 迪亚斯 WD, 贡萨尔维斯 VM. 选择性裂解的全细胞疫苗: CN201080055928.X[P]. 2012-08-22 (in Chinese).
- [55] 李跃龙, 赵毅, 刘艳丽, 曹欣, 王研研, 王剑龙, 刘建凯. 一种肺炎链球菌荚膜多糖的制备方法: CN202410196199.3[P]. 2024-03-26.  
LI YL, ZHAO Y, LIU YL, CAO X, WANG YY, WANG JL, LIU JK. A process for preparing the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae*: CN202410196199.3[P]. 2024-03-26 (in Chinese).
- [56] GONÇALVES VM, DIAS WO, CAMPOS IB, LIBERMAN C, SBROGIO-ALMEIDA ME, SILVA EP, CARDOSO CP Jr, ALDERSON M, ROBERTSON G, MAISONNEUVE JF, TATE A, ANDERSON P, MALLEY R, FRATELLI F, LEITE LCC. Development of a whole cell pneumococcal vaccine: BPL inactivation, cGMP production, and stability[J]. *Vaccine*, 2014, 32(9): 1113-1120.
- [57] PUJAR NS, HUANG NF, DANIELS CL, DIETER L, GAYTON MG, LEE AL. Base hydrolysis of phosphodiester bonds in pneumococcal polysaccharides[J]. *Biopolymers*, 2004, 75(1): 71-84.
- [58] STURGESS AW, RUSH K, CHARBONNEAU RJ, LEE JI, WEST DJ, SITRIN RD, HENNESSEY JP Jr. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine stability: catalytic depolymerization of PRP in the presence of aluminum hydroxide[J]. *Vaccine*, 1999, 17(9/10): 1169-1178.
- [59] 马图尔 RV, 坎迪马拉 VB, 曼特纳 ND, 达特拉 M, 雷迪 MV, 查兰 K. 用于从微生物荚膜多糖分离蛋白质和其他杂质的方法: CN201680037932.0[P]. 2018-03-23 (in Chinese).
- [60] 朱 LJ, 库克 SA, 麦钱特 N, 莫兰 JK. 纯化细菌多糖的方法: CN202080030584.0[P]. 2021-11-30.  
ZHU LJ, COOK SA, MERCHANT N, MORAN JK. Method for purifying bacterial polysaccharides: CN202080030584.0[P]. 2021-11-30 (in Chinese).
- [61] MACHA C, LAVANYA A, NANNA R. Purification of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides using aluminium phosphate and ethanol[J]. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2014, 6: 385-387.
- [62] 王立波, 吴贺, 高瑞芳, 李涛. 一种肺炎链球菌荚膜多糖的纯化方法: CN201710047246.8[P]. 2017-08-22.  
WANG LB, WU H, GAO RF, LI T. Method for purifying *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide: CN201710047246.8[P]. 2017-08-22 (in Chinese).
- [63] YUAN YH, RUPPEN M, SUN WQ, CHU L, SIMPSON J, PATCH J, MORAN JK, FINK P. Shortened purification process for the production of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides: US12/052525[P]. 2014-02-18.
- [64] 刘艳丽, 刘建凯, 曹欣, 尹珊珊, 徐永学, 李金阳, 宁云云, 王研研, 林浩卿, 汪辉, 王元泽, 邓海清, 韩菲, 郝倩, 殷寻. 肺炎球菌荚膜多糖的制备: CN202011545068.X[P]. 2021-04-06.  
LIU YL, LIU JK, CAO X, YIN SS, XU YX, LI JY, NING YY, WANG YY, LIN HQ, WANG H, WANG

- YZ, DENG HQ, HAN F, HAO Q, YIN X. Method for preparing pneumococcal capsular polysaccharide: CN202011545068.X[P]. 2021-04-06 (in Chinese).
- [65] 刘艳丽, 曹欣, 宁云, 徐永学, 高志鑫, 李金阳, 尹珊珊, 王研研. 一种肺炎球菌荚膜多糖的制备方法: CN202210376971.0[P]. 2023-10-31.
- LIU YL, CAO X, NING YY, XU YX, GAO ZX, LI JY, YIN SS, WANG YY. The preparation method of pneumococcal capsular polysaccharide: CN202210376971.0[P]. 2023-10-31 (in Chinese).
- [66] 刘艳丽, 高志鑫, 李跃龙, 曹欣, 王剑龙, 刘建凯, 郑海发. 一种制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法: CN202410196193.6[P]. 2024-03-26.
- LIU YL, GAO ZX, LI YL, CAO X, WANG JL, LIU JK, ZHENG HF. The invention relates to a method for preparing *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide or its degraded polysaccharide: CN202410196193.6[P]. 2024-03-26 (in Chinese).
- [67] SEUNG-JIN JUNG, EUN-SEONG SEO, SANG-IL YUN, BUI NGUYET MINH, SHENG-DE JIN, HWA-JA RYU, DOMAN KIM. Purification of capsular polysaccharide produced by *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 21(7): 734-738.
- [68] CANO FJ, KUO JS, QUERRY MV. Purification of pneumococcal capsular polysaccharides: US6466379[P]. 1980-12-30.
- [69] 李小波, 张锐, 谢媛媛, 程尊平, 陈娟, 江山. 酸沉淀法纯化 14 血清型肺炎链球菌荚膜多糖工艺的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(8): 856-860.
- LI XB, ZHANG R, XIE YY, CHENG ZP, CHEN J, JIANG S. Development of a procedure for purification of capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 14 by acidification method[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2016, 29(8): 856-860 (in Chinese).
- [70] BAHLER BD, HUGHES E, LEE T. Improved methods for separation of *Streptococcus pneumoniae* 3 polysaccharide: US11869206[P]. 2010-02-09.
- [71] LEE C, CHUN HJ, PARK M, KIM RK, WHANG YH, CHOI SK, BAIK YO, PARK SS, LEE I. Quality improvement of capsular polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* by purification process optimization[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 39.
- [72] 卡普雷 SV, 达塔 AK. 使用裂解酶、切向流过滤和多模式色谱法的用于疫苗生产的多糖纯化: CN201880057635.1[P]. 2020-06-16.
- KAPRE SV, DATTA AK. Polysaccharide purification for vaccine production using lytic enzymes, tangential flow filtration and multimode chromatography: CN201880057635.1[P]. 2020-06-16 (in Chinese).
- [73] KAPRE SV, JANA SK, JOGLEKAR TD. A novel process for preparation of polysaccharides: PCTIN2011000323[P]. 2012-09-27.
- [74] 金永杰, 孙倩, 李军强, 赵秋敏, 李亚冰, 刘贺军, 曹小丹, 李静, 李剑. 一种肺炎链球菌荚膜多糖的制备方法: CN201210490414.8[P]. 2014-06-04.
- JIN YJ, SUN Q, LI JQ, ZHAO QMI, LI YB, LIU HJ, CAO XD, LI J, LI J. Method for preparing *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide: CN201210490414.8[P]. 2014-06-04 (in Chinese).
- [75] SUÁREZ N, FRAGUAS LF, TEXEIRA E, MASSALDI H, BATISTA-VIERA F, FERREIRA F. Production of capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 14 and its purification by affinity chromatography[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(2): 969-971.
- [76] 任克明, 王玺, 王剑虹, 白贵杰, 沈荣. 一种肺炎链球菌荚膜多糖的纯化方法: CN201510468552.X[P]. 2015-12-09.
- REN KM, WANG X, WANG JH, BAI GJ, SHEN R. Purification method of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide: CN201510468552.X[P]. 2015-12-09 (in Chinese).
- [77] GONÇALVES VMM, TAKAGI M, LIMA RB, MASSALDI H, GIORDANO RC, TANIZAKI MM. Purification of capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F by a procedure suitable for scale-up[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2003, 37(3): 283-287.
- [78] 王见冬, 赵浩, 宋大伟, 梁海兰, 谭剑, 韩星, 高强, 尹卫东. 一种纯化肺炎链球菌荚膜多糖的方法: CN201410767761.X[P]. 2015-04-22.
- WANG JD, ZHAO H, SONG DW, LIANG HL, TAN J, HAN X, GAO Q, YIN WD. Method for purifying pneumococcal capsular polysaccharide: CN201410767761.X[P]. 2015-04-22 (in Chinese).