

附件 1

治疗用肉毒毒素产品药学研究及评价技术指导原则
（征求意见稿）

国家药品监督管理局药品审评中心

2026 年 04 月

目 录

一、前言	1
二、适用范围.....	2
三、总体考虑.....	2
四、生产用原材料.....	4
(一) 生产用菌毒种/细胞	4
1. 天然来源的生产用菌种.....	4
2. 重组来源的生产用菌毒种及细胞	5
3. 种子批/细胞库	6
(二) 其他.....	7
五、生产工艺.....	8
(一) 一般要求	8
(二) 原液生产工艺	10
1. 天然来源	10
2. 重组来源	12
(三) 制剂处方及生产工艺	14
1. 制剂处方	15
2. 生产工艺开发	15
六、质量研究.....	16
(一) 结构与理化性质	17
(二) 杂质分析	18
1. 产品相关杂质	19

2. 工艺相关杂质	20
(三) 生物学活性	21
七、质量标准	22
(一) 原液	22
1. 天然来源	22
2. 重组来源	23
(二) 成品	24
(三) 分析方法开发和验证	25
1. 肉毒毒素含量检测	25
2. 效价	26
3. 纯度及产品相关杂质检测	26
4. 残留量检测	27
(四) 标准物质	27
八、稳定性研究	27
九、包装系统	28
十、参考文献	28
十一、缩写词列表	29

1 一、前言

2 肉毒毒素在自然界属于蛋白质超家族，包括经典的肉毒
3 毒素蛋白（*Botulinum Neurotoxin*，BoNT）、类肉毒素蛋白
4 （BoNT-like toxin）和肉毒素同源蛋白（BoNT homologs）。经
5 典的肉毒毒素是革兰氏阳性厌氧菌肉毒梭状芽孢杆菌
6 （*Clostridium Botulinum*，简称肉毒梭菌）在生长繁殖中产生
7 的细菌外毒素，属于神经毒素蛋白。治疗用肉毒毒素是基于
8 其抑制乙酰胆碱释放的生物学特性开发的一类产品。由于胆
9 碱能神经在体内分布广泛，该类药物在临床上应用多样，可
10 用于暂时改善上面部皱纹的外观（如眉间纹或外眦线等），眼
11 睑/面肌/上下肢痉挛，颈肌张力障碍（斜颈），斜视等。

12 根据中和抗体的不同，经典的肉毒毒素可分为七种主要
13 血清型（A-G），根据氨基酸序列的差异，同一血清型又可细
14 分为不同的亚型。不同血清型的肉毒毒素通过不同的细胞内
15 蛋白靶点发挥作用，并表现出不同的作用强度以及持续时间。
16 目前国内外已上市的治疗用肉毒毒素主要包括 A 型、B 型，
17 其中 A 型的应用最为普遍。

18 本指导原则主要针对经典肉毒毒素类产品申报上市阶
19 段的药学研究提出的技术要求。随着技术的发展、作用机制
20 研究的深入和生物学效应的进一步阐明，未来将有更多新型
21 肉毒毒素类产品如其他野生型血清型、血清型嵌合体或重组
22 肉毒毒素衍生物，以及新型缓释递送系统等将可能开发应用

于临床，临床应用领域也将不断拓展。随着研究技术的提高和相关法规的完善，本指导原则中的相关内容将逐步更新与完善。

二、适用范围

本指导原则适用于从肉毒梭菌提取纯化的天然肉毒毒素以及重组生物技术法开发的肉毒毒素，主要针对 A 型肉毒毒素。治疗用 A 型肉毒毒素包括但不限于以下两类：

1. 天然来源肉毒毒素：来源于肉毒梭菌提取产物，包括分子量约 150KDa 的毒素活性蛋白或其与一种或多种非毒素蛋白（即神经毒素伴随蛋白，NAPs，包括 NTNH、HA）组成的分子量最高可达约 900KDa 的毒素复合物；

2. 重组来源肉毒毒素：来源于重组表达的分子量约 150KD 毒素活性蛋白。

此外，对于其他型别肉毒毒素可酌情参考本指导原则的相关技术要求。

三、总体考虑

治疗用肉毒毒素产品药学研究应符合《中华人民共和国药品管理法》、《药品注册管理办法》、《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）等相关法规及技术要求。治疗用肉毒毒素产品的开发应遵从质量源于设计（Quality by Design, QbD）原则。

肉毒毒素具有极高的毒性，不当使用可发生严重的不良

45 反应，若在生产过程中发生肉毒梭菌的泄露及传播，将造成
46 严重的生化风险及公共卫生事件。因此，整个生产、流通等
47 过程应遵循国家相关规定，如《关于将 A 型肉毒毒素列入毒
48 性药品管理的通知》及《医疗用毒性药品管理办法》等，对
49 肉毒梭菌、重组工程细胞及其肉毒毒素进行生物安全风险评
50 估，并对原液及其制剂的生产、供应等进行严格管理，建立
51 符合高毒性药物生产所需的必要安全性防控措施，生产中产
52 生的废弃物在排放到环境之前经过严格灭活处理且无毒，灭
53 活方法应进行验证，确保灭活的有效性和可靠性。

54 肉毒毒素可通过生物提取天然肉毒毒素，也可通过基因
55 重组表达制备，两者在药学研究和质量控制方面均面临显著
56 挑战。天然肉毒毒素生产用菌种需选择产毒特异且稳定的菌
57 种；其目的产物，即活性蛋白及其复合物的结构具有复杂性
58 及多样性，结构表征存在挑战；且由于目的产物含量低、毒
59 性强，易受外界因素影响而失活，需在保证毒素纯度的同时
60 维持其活性，提取及纯化工艺较为复杂。根据肉毒毒素的药
61 理学特性，其在制剂中肉毒毒素含量极低，而辅料含量相对
62 较高，制剂处方及生产工艺的关键在于确保效价等关键质量
63 属性的稳定性；同时由于制剂处方的特殊性，常规理化分析
64 可能不适用，需在原液阶段建立严格且精准的检测方法，控
65 制杂质水平，以保证临床使用的安全性。重组表达的肉毒毒
66 素作为新兴技术平台，在生产工艺开发、处方筛选、及质量

控制策略等方面，同样面临上述复杂性和高风险性的挑战。当前，肉毒毒素的全面结构解析仍面临技术挑战，结构与活性相关性、产生系统毒性的深层机制尚未完全阐明，应采用多种分析手段综合控制。

四、生产用原材料

（一）生产用菌毒种/细胞

生产过程中使用的菌毒种和动物细胞基质应符合《中国药典》中“生物制品生产检定用菌毒种管理及质量控制”和“生物制品生产用细胞基质制备和质量控制”、ICH Q5D 的相关要求。国内生产用肉毒梭菌应严格按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》加强对有毒菌种管理，严格按照生产计划和药品生产质量管理规范（GMP）要求进行专线生产，避免交叉污染。

1. 天然来源的生产用菌种

生产用肉毒梭菌可来源于外购或自然筛选，应选择产毒特异且稳定的菌种。明确其来源、历史背景（包括分离过程、分离环境、鉴定、遗传谱系图等）、构建过程（如涉及基因工程改造，需详细说明构建策略、载体选择、插入片段序列及确认方法等）、生物学特性（如生长代谢规律、产毒能力、培养条件适应等）和具体血清型别等。为确保生产菌种的准确性与特异性，应结合产物血清型鉴定结果（如中和试验、抗原检测等）、全基因组或核心基因序列分析数据（如 16S rRNA

89 基因、毒素基因簇序列比对), 对生产用菌种进行正交确证和
90 精准鉴定, 明确其与目标生产菌种的一致性及与其他型别/菌
91 种的差异性。在菌种特性鉴定中, 除常规生物学特性分析外,
92 需重点关注安全性相关基因筛查, 通过全基因组测序、PCR
93 扩增结合测序等方法, 系统检测菌种是否携带耐药基因、毒
94 力增强基因及其他可能危害公共安全或其他潜在风险基因
95 或片段(如孢子形成基因), 并提供完整的筛查方法适用性数
96 据(如特异性、灵敏度)及风险评估报告。

97 2. 重组来源的生产用菌毒种及细胞

98 重组肉毒毒素, 通过基因重组技术, 将编码毒素基因重
99 组至大肠埃希菌等原核宿主、酵母或昆虫细胞等真核宿主及
100 其他经验证的表达系统中实现目标蛋白表达。需明确表达系
101 统的选择依据、宿主背景信息及重组表达载体构建细节, 结
102 合表达系统特性, 系统评估潜在外源因子污染风险, 必要时
103 进行病毒清除验证研究。若菌种/细胞株经基因工程修饰, 应
104 评估外源因子引入的风险。申请人应明确目的基因序列的来
105 源, 提供目的基因序列和氨基酸序列, 说明与天然肉毒毒素
106 核心蛋白的氨基酸序列是否一致。鉴于本品的剧毒特性, 在
107 相关质粒合成及表达阶段需制定严格的毒素控制策略, 如通
108 过诱导/病毒侵染调控表达、或设计为非毒性蛋白前体表达等,
109 明确相关的控制措施及风险评估报告, 若采用酶切激活工艺,
110 需通过质谱、氨基酸末端测序等方法确认酶切后是否存在氨

111 基酸残留或缺失，并评估其对蛋白功能、免疫原性、稳定性
112 及理化特性等是否存在不利影响。

113 3. 种子批/细胞库

114 应明确各级种子/细胞扩增的培养基和培养条件、传代方
115 法、制备规模和保存方式，并严格限定最大传代次数。为确
116 保种子批/细胞库的单克隆性和各级种子/细胞之间的一致性，
117 在主/工作种子批/细胞库建立过程中应避免进行挑取单克隆
118 的操作。

119 天然来源以及重组来源种子批检定应根据特定菌种确
120 定，质控项目通常包括培养特性、染色镜检、细胞活力、生
121 化反应、免疫学试验、培养物纯度、毒力试验等；生产用肉
122 毒梭菌还包括特异性中和试验、血清学试验、神经毒性和/或
123 复合物基因稳定性、全基因组序列测定等；采用重组基因工
124 程技术表达的重组肉毒毒素生产用种子批检定，还应对抗生
125 素抗性（如适用）、表达系统的遗传稳定性、目的基因表达稳
126 定性等的相关指标进行考察。肉毒梭菌种子批根据生产需求
127 选择孢子形态或非孢子形态储存，应明确其具体储存属性，
128 且应隔绝氧气储存，如充入惰性气体氩气或氮气等。

129 采用重组基因工程技术表达的重组肉毒毒素生产细胞
130 库检定，应包括细胞鉴别、无菌检测、支原体、螺原体（如
131 适用）、外源病毒因子、目的基因/蛋白鉴别（如适用）、成瘤
132 性/致瘤性（如适用）等。若涉及病毒载体，病毒种子批检定

应符合《中国药典》的相关要求。

种子批/细胞库应开展贮存稳定性和传代稳定性研究，通过贮存稳定性研究确定保存条件，根据传代稳定性研究明确各级种子/细胞的限定传代次数。鉴于肉毒毒素高毒性及原液发酵规模较小的生产特点，传代稳定性研究应至少开展可覆盖实际生产工艺传代稳定性研究。除常规种子批/细胞库放行检测外，对于生产用肉毒梭菌菌种需额外验证神经毒素基因核苷酸序列与基因库中相应型别神经毒素基因区核苷酸序列同源性应不低于 99.0%；对于重组表达的种子批/细胞库，应开展产物表达相关基因的分子遗传学特性、表达稳定性研究。另外，需结合本品高风险特性，针对性评估传代过程对菌种生物安全特性的潜在影响，明确是否产生新的致病性、水平基因转移或毒力改变等变异情况，确保种子批在整个传代周期内的安全性与稳定性。

（二）其他

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、酶切试剂、纯化试剂等）等。应参照《中国药典》等相关要求，基于风险评估对原材料进行分级管理及全流程管控，建立供应商资质定期审查机制，针对不同风险等级的原材料合理拟定内控质量标准。同时，需关注物料生产中外源因子的引入风险(包括 TSE/BSE 风险评

估), 尽可能避免使用动物源性原材料。

部分原材料对产品的纯度或活性产生重要影响, 如蛋白酶或核酸酶, 应关注批间一致性以及对特定工艺步骤的影响。蛋白酶通常用于重组类产品中前体酶切, 切除信号肽或激活蛋白, 应明确来源、工艺(如适用)、特性鉴定(如适用)、质量标准等, 特别注意关键质量属性(如蛋白酶纯度和比活度)的批间一致性。在蛋白酶来源或生产工艺变更时, 应基于风险, 评估变更对酶切效率及最终产品质量的潜在影响, 必要时开展原液的可比性研究, 以证明变更不会对最终目的蛋白的质量产生不利影响。核酸酶如用于细胞裂解物 DNA 和 RNA 的降解, 其酶活性直接影响核酸去除效果, 需将酶活性作为关键质量属性纳入核酸酶的质量标准, 另外, 需确保终产品核酸残留符合相关要求。

五、生产工艺

(一) 一般要求

工艺开发, 应遵循质量源于设计的理念, 根据肉毒毒素高毒性、生物活性依赖结构完整性等核心特性, 系统构建目标产品质量概况(Quality Target Product Profile, QTPP), 综合考虑临床预期(给药方案、剂量规格等)、质量特性、工艺的可控性及生物安全性等因素合理设计工艺路线。同时应基于产品特性和工艺特点, 参考国内外相关指导原则的质量风险管理理念, 运用科学的风险评估工具, 识别并逐步确定关键

质量属性（CQA）和关键工艺参数（CPP），从生产工艺、质量控制和稳定性等方面进行风险评估，结合对产品和工艺的理解制定整体质量控制策略。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的提升，持续迭代更新。

天然来源及重组来源的肉毒毒素的生产面临核心挑战：目的产物的表达量低，体系杂蛋白占比高，且毒素蛋白易受温度、pH、机械应力等工艺条件影响而失活，导致提取及纯化工艺难度较大。因此，生产工艺需兼顾“纯度提升”与“结构保护”双重目标，在通过多步纯化高效去除杂蛋白、核酸、内毒素等杂质的同时，最大限度保留毒素天然构象与功能结构的完整性，确保终产品达到预期生物学活性。应关注全工艺过程不同工艺步骤及工艺参数对生物学活性的影响，为工艺路线及参数的确立提供科学依据。建议以理化指标、生物学活性等为考察指标，对关键工艺参数范围、质量属性范围进行充分研究及表征，以确保在拟定的工艺参数及控制范围内工艺的可控性和稳健性。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。

对于商业化生产工艺验证，应根据产品的生产工艺特性和质量属性，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

199 工艺相关杂质的去除效果、产品质量属性批间一致性等。执
200 行工艺验证时，除常规的过程控制及放行检测项目外，应适
201 当增加取样节点和测试项目，以考察工艺过程控制、中间产
202 物及最终成品的一致性，全面验证工艺的稳健性。在商业化
203 生产阶段，应建立监测体系以评估工艺性能和产品质量，包
204 括对关键工艺参数和产品特性的测量与趋势分析，确保工艺
205 在设计空间内稳定运行。

206 （二）原液生产工艺

207 考虑到肉毒梭菌的致病性及表达产物肉毒毒素的剧毒
208 性，为严格防控人员暴露风险，避免产品与缺乏足够生物安
209 全防护环境接触导致的安全隐患，生产过程需建立完善的生
210 物安全防护体系。天然肉毒毒素的生产应在受控环境及封闭
211 系统进行；重组肉毒毒素应根据生产工艺设计和产品特性，
212 对易产生气溶胶的高风险环节考虑合理的防控措施，以减少
213 人员暴露风险，如使用封闭系统/生物安全柜、合理的厂房设
214 计以及个人防护设备等。同时，为消除交叉污染风险及强化
215 生物安全管控，生产中所使用的层析介质、滤膜等尽量采用
216 一次性使用方式；若确需重复使用，应建立经过验证的消毒
217 处理程序，并按照相关规定对使用后耗材妥善处置。

218 1. 天然来源

219 天然来源肉毒毒素的生产工艺较为复杂，应关注生产工
220 艺效率、商业化生产的适配性和工艺及产品相关杂质可控性。

典型工艺包括发酵、收获、纯化等阶段。若发酵产物为无活性的毒素复合物，可能还需要通过激活步骤转化为活性形式。

发酵：天然来源 A 型肉毒毒素生产用菌种多为厌氧菌，该类菌缺乏完整的代谢酶体系，能量代谢主要通过无氧发酵的方式进行，不同菌株可产生不同大小的复合体。发酵工艺开发过程中，应根据菌种的生长代谢和产物生物合成途径，合理选择培养基并优化发酵工艺参数。应对培养基组成、发酵工艺参数（温度、培养时间）等进行研究优化，考察收获终点时的菌体密度（A600 或其他适当波长）等。建议开展生长曲线研究，合理确定发酵终点。发酵期间或发酵结束后应取样进行纯菌试验，以证实发酵过程为无菌污染状态。

收获：此步骤主要涉及收获肉毒梭菌菌体或其释放的毒素前体，具体取决于发酵过程中肉毒梭菌是否发生自溶。通常，该步骤会采用沉淀、微滤、破菌（如需要）、或毒素提取及深层过滤等技术，以清除微生物、菌体碎片及核酸等杂质，减少液体体积，并使收获产物适用于后续纯化步骤。在收获过程中，保护肉毒毒素免受蛋白酶解至关重要。常见的沉淀工艺主要是通过酸处理使肉毒毒素从梭菌培养物中沉淀出来，随后向沉淀的毒素复合物中添加缓冲液，再经过蛋白酶抑制剂和核酸酶处理，最终提取目标蛋白。去除核酸也可采用加入提取沉淀剂如硫酸鱼精蛋白等，经沉淀离心去除。酸沉淀过程中，需关注 pH、处理时间等参数对目的产物产量及

杂质水平的影响，根据研究结果确定工艺参数及过程控制策略。同时结合后续纯化步骤合理选择缓冲液类型，也可采用透析等工艺去除缓冲盐。为提高产物纯度，可选择多次沉淀作为初步纯化的手段，再结合层析等步骤进一步精纯。沉淀复溶应重点关注缓冲液类型、pH 等参数对毒素溶解及可能的解离影响。蛋白酶抑制剂和核酸酶通常为过量添加，应根据纯度等质量属性，系统研究酶的添加量、反应温度、pH、搅拌转速、反应时间等工艺参数，确保处理效果与工艺稳健性。化合物沉淀去除核酸需要开展使用浓度摸索，避免核酸沉淀的同时蛋白沉淀。

纯化：纯化工艺通常采用离子交换、疏水层析、分子筛、亲和层析等多种色谱法。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，对流速、上样电导率、pH 值、载量、收峰范围、温度等层析参数及其控制范围进行研究与优化。在工艺开发过程中，需考察各项工艺参数对毒素关键质量属性的影响，如分子量大小及分布、纯度及杂质等，并对蛋白浓度、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。

2. 重组来源

对于重组技术表达的 A 型肉毒毒素，其发酵及纯化工艺可参考重组蛋白的相关技术要求。但由于表达的肉毒毒素具

有毒性，应对重组表达系统及其产物进行生物安全风险评估，并落实必要的安全预防和防控措施。因表达系统不同，生产工艺存在差异。以常用的大肠埃希菌表达系统为例，若目标蛋白设计为可溶性表达，其典型生产工艺一般包括发酵（含诱导表达）、破菌、亲和层析（如涉及）、酶切（如涉及）等其他纯化步骤。若目标蛋白以包涵体形式（沉淀）表达，则生产工艺还需增加包涵体变性、复性等处理步骤。

发酵：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，并明确生产用菌种的传代次数。应对培养基成分、接种比例、发酵培养工艺（pH、温度、通气、溶氧、转速、罐压等）、补料策略、诱导表达工艺（诱导剂浓度、诱导时机、诱导温度、诱导时长等）、发酵终点等进行研究与优化，通常主要考察的性能指标为收获终点时的菌体密度、单位菌泥蛋白表达（SDS-PAGE）等。生产中应避免添加抗生素。细菌发酵结束后应取样进行镜检、噬菌体等检测，证明发酵过程为纯菌培养，无外源因子污染。

破菌：商业化生产工艺中常见的破菌工艺包括机械法（如高压均浆、超声法等）、物理法（如渗透压）、化学法（如有机溶剂、表面活性剂、酸碱法）、酶解法等，关注破菌工艺参数（持续时间、裂解压力、试剂浓度等），根据所选工艺参数对产品蛋白含量的影响进行优化。若采用机械法破菌，需评估过程中是否存在安全性潜在风险，并采取充分防控措施。

287 **亲和层析：**根据本品涉及标签蛋白的差异，选择相应的
288 亲和层析。标签蛋白一般应酶切去除，若保留标签蛋白，应
289 明确是否会带来免疫原性的影响。

290 **酶切：**毒素前体经酶切可以去除标签蛋白或以激活毒素。
291 应根据酶切效率、纯度等指标，对底物与酶的浓度及比例、
292 缓冲盐、温度、pH、反应时间等工艺参数进行研究。因酶切
293 可能涉及其他反应位点，需关注可能存在的副反应及副产物。
294 开展残留酶、毒素前体、副产物的去除研究。

295 **纯化工艺：**多采用沉淀、层析和过滤等。应根据产品特
296 性合理设计纯化工艺路线，并依据目标产物特性和纯化原理，
297 对缓冲液、pH、离子强度、载量、洗脱梯度等关键工艺参数
298 及其控制范围进行研究与优化。需考察各项工艺参数对肉毒
299 毒素关键质量属性的影响，对目标产物收率、产品及工艺相
300 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
301 控制策略。生产工艺应具有稳健的内毒素清除能力，以确保
302 产品安全性。

303 （三）制剂处方及生产工艺

304 制剂工艺应全程在封闭环境中进行。由于肉毒毒素蛋白
305 具有热不稳定性，通常制剂采用干燥工艺制成冻干粉针剂型，
306 以便于储存和运输，且可于较长的有效期内维持产品质量特
307 别是活性的稳定。为满足临床使用的便利性需求，也逐步开
308 发了注射液剂型。应提供制剂处方、工艺及其确定依据，以

及辅料来源、质量标准及检验报告。

1. 制剂处方

为获得适宜的肉毒毒素剂型与制剂处方，需对除活性成分以外的各类关键辅料进行充分研究与论证。制剂处方应明确每种组分的功能、用量以及选择的依据；可参考同类产品或平台知识，通过对比不同制剂处方/工艺对产品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

肉毒毒素成品制剂中蛋白的含量极低，仅相当于毫克级别的百万分之一左右。处方筛选过程中，首先要考虑选择合适的保护剂，以减少因蛋白性质变化或界面非特异性吸附等引起的效价降低。在进行保护剂选择时，应特别关注其潜在的免疫原性及病毒安全性风险。由于不同肉毒毒素的分离及纯化工艺的不同，其分子大小、蛋白复合物形态和用于防止降解的稳定剂也各不相同，处方设计需结合具体产品特性进行。对于冻干剂型，需重点考察赋形剂浓度对制剂外观、复溶性能及物理结构的影响；对于液体剂型，则应关注缓冲体系、pH 范围、防腐剂添加等对毒素稳定性、无菌保障及使用过程中活性保持的影响。在开发过程中，需针对目标剂型特点开展相应的处方优化研究。

2. 生产工艺开发

制剂生产通常包括缓冲液配制、半成品配制、灌装、冻干（如适用）及密封、组装（如适用）等多步工艺步骤。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。

半成品配制环节,需对原液和辅料的添加顺序及投料量、
混合搅拌速度、时间及温度等参数进行研究与优化。应关注
制剂生产的不同环节(如配液、过滤、灌装、冻干等),药物
吸附在容器壁、过滤器、管道等表面或蛋白质性质变化可能
导致的效价损失;若采用过量投料,应提供充分的研究验证
资料。蛋白质性质变化导致的效价损失,不提倡采用过量投
料的方式进行补偿,应优先优化处方及工艺。由于本品原液
用量极低,从原液至半成品的稀释比例通常高达数万至数十
万倍。为减少稀释过程的误差,确保混合均一性,需对配制
液的效价、辅料含量、渗透压及 pH 等指标进行考察。

常见的干燥工艺包括真空干燥和冷冻干燥。二者在干燥
原理及冻干后物料形态等方面存在一定的差异,故二者关键
工艺参数及过程控制策略也各有不同。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,并
开展冻干工艺对外观、水分、效力等影响的研究。

六、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)商业化工工艺批次等)和/或适当生产阶段的
样品作为研究对象。除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。鼓励基于产品自身特点, 开发更先进的分析方法, 同时应关注样品的处理和分析环节, 避免预处理等分析过程对产品质量产生影响, 导致分析结果无法真实反映样品的实际质量。

在产品的开发阶段及工艺发生重大变更时, 均应进行详尽的质量特性分析工作。如存在参比标准品, 产品应与其进行比较; 如条件允许, 建议将产品与其对应的天然成分作比较。

(一) 结构与理化性质

肉毒毒素由一条重链和轻链组成(L: 约 50KDa; H: 约 100KDa), 通过二硫键相连。天然来源的 A 型肉毒毒素产品可以为提纯的约 150KDa 神经毒素, 也可开发由 BoNT、无毒非血凝素蛋白 (NTNH, 约 138KDa) 和/或血凝素蛋白 (HA50、HA33、HA20、HA17) 非共价结合而成的毒素复合物。天然来源的肉毒毒素及其复合物结构复杂, 全面结构解析仍面临挑战, 结构与活性相关性尚未完全阐明, 应采用多种分析手段综合控制。重组来源肉毒毒素可参考《中国药典》重组 DNA 蛋白制品的相关要求。应采用科学、先进的分析技术手段进行全面的结构鉴定和特性分析。

理化性质: 通常包括 pH、等电点 (cIEF)、消光系数等。

一级结构: 通常包括质谱分子量 (毒素复合物需明确各

组分相对分子质量)、酶切肽图及氨基酸序列、N 端/C 端测序、游离巯基及二硫键、翻译后修饰如氧化脱酰胺等。天然来源肉毒毒素或其复合物,受到体内翻译后修饰或蛋白酶切的影响,N 端/C 端存在异质性,各组分的氨基酸序列可能无法完全确证,可基于现有科学知识,参考国内外指南及相关文献进行合理推断和结构解析。肉毒毒素含有多个游离的半胱氨酸,需对二硫键错配比例及其影响进行研究。

高级结构:可采用圆二色谱(近紫外和远紫外圆二色谱)、红外光谱、紫外吸收光谱、荧光光谱、多角度光散射、差示扫描量热分析等确证分子的二级和高级结构。鼓励采用冷冻电子显微检测等方法对天然来源肉毒毒素产品进行结构确证,进一步解析其三维结构。

氨基酸序列以及空间结构对维持肉毒毒素活性至关重要,重组来源与天然来源肉毒毒素在结构上可能存在差异,需基于相关文献和研究数据,明确这些结构差异的具体表现,并进一步评估这些差异对临床安全性和有效性的潜在影响。

(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。结合工艺实际、既往积累的科学知识及同类品种相关信息等,列出潜在的产品相关杂质及工艺相关杂质,明确其来源、去除及残留量的安全性水平,必要时开展进一步杂质的分离、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有效性、安全性之间的相关性，参考 ICH Q6B 的理念，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《中国药典》收纳的检项，必须符合相应标准。

1. 产品相关杂质

应在临床试验期间完成产品相关杂质的全面表征，在确证组成和结构的基础上，结合非临床和临床研究数据，明确其对产品质量、临床安全性和有效性的影响，并合理制定质量控制策略。

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，包括蛋白聚体、降解产物、氨基酸修饰等各种变体，可能影响生物学活性、安全性和免疫原性。生产工艺中若涉及到酶切步骤，引入的产品相关杂质还包括未反应的毒素前体、酶切副产物等。

肉毒毒素易于发生氧化、脱酰胺等翻译后修饰，且对温度、光照、酸碱等条件较为敏感，可形成聚集/沉淀、片段、变异体等，高级结构也可能发生变化，进而导致效价的降低。应开展酸碱、氧化、高温、光照、振荡、反复冻融等强制降解研究，采用 SDS-PAGE 或 CE-SDS、SEC-HPLC、IEX-HPLC、LC-MS、高级结构分析及效价检测等对降解产物进行表征，明确主要降解途径及降解杂质类型（如可能），评估对活性的

潜在影响。翻译后修饰若位于功能位点，则其变化可能会影响效价，目前肉毒毒素空间结构及功能的关系尚未完全明确，可结合文献综合评价。通过上述研究也可为处方筛选及工艺优化提供依据。

应开展生产工艺对产品相关杂质的去除研究，评估从收获液至纯化步骤中 SDS-PAGE 或 CE-SDS 纯度、聚体、电荷变异体的去除能力。天然肉毒毒素杂蛋白成分较为复杂，主要存在的杂蛋白为 HCP、NTNH 和/或 HA（若目标蛋白仅为毒素蛋白，则根据不同菌株表达的复合物形式不同存在差异）等工艺相关杂质，可能还包含非预期毒素复合物、毒素前体等产品相关杂质等，需明确主要蛋白条带/峰、杂蛋白去除步骤等，必要时结合 LC-MS 明确杂蛋白的类型。

2. 工艺相关杂质

工艺相关杂质是指生产过程中引入的各类杂质，应根据风险进行定性和/或定量研究，评价生产工艺对工艺相关杂质的清除能力，并根据人体暴露量和毒理学安全阈值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。

天然肉毒毒素工艺相关杂质通常包括宿主细胞相关残留，如宿主细胞蛋白、宿主细胞核酸、孢子、NTNH 或 HA 及其降解物（若涉及）；生产中添加的培养基组分、试剂等添加物，如酶（若涉及）、有机溶剂（若涉及）、沉淀剂（若涉

及)等。

重组肉毒毒素工艺相关杂质通常包括：宿主细胞相关残留，如宿主细胞蛋白、宿主细胞核酸；生产中添加的培养基组分、试剂等添加物，如消泡剂、诱导剂、抗生素、酶、标签蛋白（若涉及）、填料配基（若涉及）、有机溶剂等。

可提取物和浸出物：应对整体工艺中直接接触组件进行可提取物以及浸出物的风险评估，并制定相应的风险缓解策略。

（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。

A型肉毒毒素作用机制是重链受体结合域与神经元末梢膜上的神经节苷脂、突触小泡膜上的蛋白受体（突触囊泡蛋白2，SV2）结合，随后通过受体介导的内吞作用内化到神经元中，在内化的酸性环境下，重链发生构象变化，将轻链转运穿过突触小泡膜进入到神经元胞质中，轻链作为锌离子（ Zn^{2+} ）依赖性蛋白酶发挥作用，会切割神经末梢的SNARE复合物蛋白（如突触相关蛋白SNAP25），阻止了突触小泡与突触前膜的融合，导致神经递质乙酰胆碱释放受到抑制和肌肉麻痹。不同血清型的BoNT重链结合的神经元表面受体或

轻链切割 SNARE 复合体中的关键蛋白可能不同，即使作用于同一关键蛋白，切割的位点也存在差异。同一血清型不同的亚型，氨基酸序列略有差异，结合的空间构象也存在差异。

根据 BoNT/A 作用机制考虑开展神经节苷脂结合活性、SV2 结合活性、SNAP25 切割效率（内肽酶活性）等研究。

采用经典的小鼠半数致死量（LD50）进行生物学活性或效价的测定，若采用其他方法检测，需提供相关的桥接研究数据。

根据 A 型肉毒毒素特异的抗原抗体反应，考察其免疫学特性（如 Western Blot、ELISA）等。

七、质量标准

质量标准的建立可参照《中国药典》、ICH Q6B 和国内外相关指导原则等，根据肉毒毒素产品特点、生产工艺、放行检测及稳定性研究结果，结合非临床研究和临床研究批次综合确定，原则上应不低于国家标准及已上市同类产品的要求。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，可结合工艺过程进行控制，相关检测可不列于放行检测项目中。鼓励采用先进的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。

（一）原液

1. 天然来源

天然来源的肉毒毒素原液的质量标准应至少符合现行版《中国药典》的要求。考虑到不同来源的肉毒毒素在工艺

及结构特性上的差异，为确保复合物的稳定性、安全性、有效性和批间一致性，应建立相应的质量控制方法。建议建立包括以下质控项目的质量控制体系：

鉴别：采用适当方法毒素型别鉴定（免疫鉴别）、蛋白组分鉴别（SDS-PAGE 或替代方法）。

含量检测：总蛋白含量或神经毒素含量。

效价：开展特异性效价（U/mg）研究。

纯度及产品相关杂质/物质：包括但不限于降解产物、聚体等。检测方法包括SDS-PAGE、CE-SDS、SEC-HPLC等方法。

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，包括核酸残留、蛋白酶残留（若涉及）等。

安全性指标：包括微生物检查、细菌内毒素检查。

2. 重组来源

重组来源的肉毒毒素，应参照重组 DNA 蛋白制品相关要求进行质量控制。不同来源的肉毒毒素工艺不同，质量不同。为了确保产品的稳定性、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：

鉴别：采用适当方法鉴别试验，如肽图、等电点。

含量检测：蛋白含量或神经毒素含量等。

507 效价：开展特异性效价（U/mg）研究。

508 纯度及产品相关杂质/物质：包括但不限于降解产物、聚
509 体、电荷变异体等。检测方法包括 SDS-PAGE、CE-SDS、RP-
510 HPLC、SEC-HPLC、IEX-HPLC 等方法。

511 工艺相关杂质：应结合杂质残留的安全风险、工艺路线
512 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
513 留纳入质量标准进行控制，如宿主细胞蛋白残留量、宿主细
514 胞 DNA 残留量、蛋白酶残留、填料配基残留、抗生素残留
515 等。

516 安全性指标：包括微生物限度检查、细菌内毒素检查。

517 （二）成品

518 建议考虑以下质控项目：产品鉴别、理化特性、含量、
519 安全性指标、生物学活性等。

520 鉴别：通常采用特异性抗体进行免疫学测定。

521 理化特性：包括外观、pH 值、装量、渗透压摩尔浓度、
522 可见异物、不溶性微粒等。如为冻干制品，应进行水分、复
523 溶时间的控制。

524 含量检测：总蛋白含量（若涉及）、辅料含量（如必要）、
525 肉毒毒素含量等。

526 安全性指标：通常包括细菌内毒素、无菌检查等。

527 生物学活性检测：小鼠 LD50 法或其他替代方法。

（三）分析方法开发和验证

申请人应根据产品特点和工艺特点选择合理的分析方法。鼓励采用先进方法进行质控，如采用 HPLC 等方法对产品相关杂质残留进行检测。由于成品中肉毒毒素含量较低而辅料浓度较高，样品处理中应防止肉毒毒素产生吸附导致的含量检测偏差。

可分别或组合使用理化、免疫学方法进行全面质控。对于《中国药典》收载的方法，应评估后进行适用性确认。自建方法应经全面验证，包括准确度、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。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. 肉毒毒素含量检测

成品中肉毒毒素含量较低（ng 级别），含量准确检测存在困难，可考虑开发免疫学方法如 ELISA、荧光衍生 HPLC 法或 LC-MS/MS 进行检测。在方法开发时，应关注人血白蛋白等赋形剂和/或其他毒素蛋白等会对测定造成背景干扰，方法学验证时应重点关注方法的专属性、系统适用性、灵敏度及加样回收率等。若成品中涉及到人血白蛋白、肽等，还应

对关键辅料总蛋白含量进行控制，一般可采用紫外法进行检测。

2. 效价

肉毒毒素的效价通常用“单位”(Unit,U)来表示。1个单位的肉毒毒素(1U)被定义为:在特定实验室条件下,腹腔注射后能杀死一组特定品系雌性小鼠的50%所需的剂量。不同肉毒毒素产品的效价单位定义因所基于的小鼠品系、测试方法或标准可能不同,因此不能直接换算。

《中国药典》小鼠半数致死量(LD₅₀)测定法是当前公认的经典生物学活性检测方法。然而,该方法存在动物伦理问题,且系统误差较大,易受到动物个体差异、实验人员及注射部位和角度等多方面影响。随着新技术的发展,鼓励开发和应用替代方法如细胞法、以瘫痪为终点的小鼠生物测定等用于效价测定。细胞法所选细胞系应稳定,具备完整的功能结构,能够准确反映肉毒毒素作用机制的所有步骤,包括神经元结合、内化、轻链释放和轻链酶切25kDa突触体相关蛋白(SNAP25)。若采用替代方法,应提供充分的试验数据证明其科学性及可行性,并与药典LD₅₀法进行桥接对比研究。

3. 纯度及产品相关杂质检测

重组肉毒毒素应采用至少两种不同原理的检测方法对纯度进行质控。天然肉毒毒素原液通常采用基于分子量大小进行分离的SEC-HPLC/UPLC、CE-SDS或SDS-PAGE。由于其结构的复杂性,其他方法的开发可能存在一定的难度。但

考虑到更多了解产品特性及更多维度对产品进行纯度控制，建议开发基于电荷或疏水性不同进行分离的纯度分析方法。另外，对于肉毒毒素复合物，建议对不同组成的比例进行研究并制定合理范围限度，有助于对产品批间一致性的质量控制。

4. 残留量检测

鼓励采用色谱法、ELISA 等更为敏感的方法进行相关工艺相关残留的研究。准确度验证中应添加可覆盖产品实际检测浓度范围的标准物质进行验证。

（四）标准物质

标准物质的建立和制备可参照《中国药典》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。建议采用关键临床试验代表性批次建立两级标准物质，并确保其可溯源性。如有国际标准物质或国家标准物质，建议进行相关标定。

八、稳定性研究

稳定性研究应当遵循《中国药典》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《中国药典》中“生物制品贮藏和运输规程”相关规定的要求。

稳定性研究方案应结合剂型特点、生产工艺、临床用药方案等情况设计。研究内容通常包括长期试验、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等，研究条件应充分考虑产品在生产、贮存、运输和使用中可能遇到的各种环境因素。采用的包装系统应可代表实际储存条件，检项应全面且具有稳定性指示作用。使用过程中稳定性研究应模拟实际使用条件，包括稀释及注射装置、稀释程序、贮存条件及放置时间等，关注可能影响产品质量的蛋白吸附或效价损失等风险。当产品开发多剂量使用，或复溶后可短暂保存的，建议开展微生物挑战试验，以评估微生物污染风险。

九、包装系统

生产过程中使用的包装系统应具有稳定的物理和化学特性，并与直接接触的产品有良好的相容性。需按照国内外相关指导原则开展容器密封性及包材相容性研究或提供其他适用的支持资料。当肉毒毒素以预充式包装（如预充式注射器）时，还需特别关注整个给药系统设计及验证，关注相关的性能指标。同时还要对可抽出/可推出体积、注射器的剂量准确性进行检测，确认符合相关适应症的要求。

十、参考文献

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

[2] ICH. ICH Q5D:Derivation and Characterisation of C

ell Substrates Used for Production of Biotechnological Biological Products》[EB/OL]. Jul 1997. <https://www.cde.org.cn/ichWeb/guideIch/toGuideIch/1/0>.

[3]ICH. ICH Q11:Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities)》[EB/OL]. May 2012. <https://www.cde.org.cn/ichWeb/guideIch/toGuideIch/1/0>.

[4]ICH. ICH Q6B:Specifications Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products》[EB/OL]. Mar 1999. <https://www.cde.org.cn/ichWeb/guideIch/toGuideIch/1/0>.

[5]国家药品监督管理局.《生物制品稳定性研究技术指导原则（试行）》[EB/OL]. 2015年4月. <https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=f1589779e6723f65431662d0a4dea9d6>.

[6]Whitcup S M, Hallett M.Botulinum Toxin Therapy[J]. Handbook of Experimental Pharmacology, 2021.

十一、缩写词列表

缩写词	全称	中文译名
NAPs	neurotoxin associated proteins	神经毒素伴随蛋白
NTNH	non-toxin non-hemagglutinin	无毒非凝血蛋白
HA	hemagglutinin	血凝素蛋白
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment	可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子

缩写词	全称	中文译名
	protein receptor	附着蛋白受体
SNAP	synaptosomal associated protein	突触小体相关蛋白

633