

团 体 标 准

T/CBPIA 0019—2026

脂肪酸长效侧链药学研究技术指南  
Technical Guidelines on CMC Studies for  
Long-Acting Fatty Acid Side Chains  
(征求意见稿)

2026 - XX - XX 发布

2026 - XX - XX 实施



# 目 次

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 目 次.....                     | I  |
| 前 言.....                     | II |
| 1 范围.....                    | 3  |
| 2 规范性引用文件.....               | 3  |
| 3 术语、定义及缩略语.....             | 3  |
| 4 脂肪酸长效侧链的制备工艺.....          | 4  |
| 5 结构确证.....                  | 11 |
| 6 质量研究和控制.....               | 11 |
| 7 稳定性考察.....                 | 15 |
| 8 参考文献.....                  | 16 |
| 附录 A 部分脂肪酸修饰长效多肽药物的侧链结构..... | 17 |

## 前言

本指南：按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本指南可为脂肪酸长效侧链的药学研究提供参考。

本指南由成都普康唯新生物科技有限公司提出。

本指南由中国生化制药工业协会归口管理。

本指南起草单位：成都普康唯新生物科技有限公司、四川普康药业有限公司、成都普康生物科技有限公司。

本指南主要起草人：吴涛、郭培良、陈震、杨化新、仲平、苏贤斌、陆益红、山广志、赵军锋、胡文言、周斌、范蕊萌、金燕京、李鑫。



# 脂肪酸长效侧链药学研究技术指南

## 1 范围

本指南描述了脂肪酸长效侧链药学研究的一般思路和原则,以确保脂肪酸长效侧链修饰多肽药物的质量、安全性和有效性,满足药品注册相关要求。

本指南可为中间体供应企业和药品研发生产企业在开展脂肪酸长效侧链的药学研究时提供参考。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本指南必不可少的条款。其中,凡是标注日期的引用文件,仅标注日期对应的版本适用于本指南;不标注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修订)适用于本指南。

在正文中引用文件时同样适用以上规则。

- 国家药监局药审中心.《胰岛素类产品生物类似药药学研究与评价技术指导原则》,2022年3月.
- 国家药监局药审中心.《化学合成多肽药物药学研究技术指导原则(试行)》,2023年2月.
- 国家药监局药审中心.《重组胰高血糖素样肽-1受体激动剂药学研究与技术评价指导原则(试行)》,2025年9月.
- ICH Q 系列及 M 系列相关指导原则.

## 3 术语、定义及缩略语

### 3.1 术语及定义

下列术语和定义适用于本指南。

#### 3.1.1 起始物料 (Starting Material)

用在原料药生产中的,以主要结构单元被并入该原料药的原料、中间体或原料药。原料药的起始物料可能是在市场上有售,能够根据合同或商业协议从一个或多个供应商处购得,或者自己生产。原料药的起始物料通常有特定的化学特性和结构。(引自 ICH Q7)

#### 3.1.2 杂质 (Impurity)

在脂肪酸长效侧链中化学结构与侧链不同的任何一种成分都称为杂质。其中与脂肪酸长效侧链主成分通过同一来源和过程产生的结构与性质相近或相关的有机杂质可称为有关物

质，其他有机杂质为“非目标侧链结构相关有机杂质”。

### 3.1.3 控制策略 (Control Strategy)

为确保工艺性能和产品质量而计划进行的一系列控制，来自于当前对产品和工艺的了解。这些控制可包括与原料药的材料和组分相关的参数和属性、设施和设备运行条件、过程控制、成品质量规范、以及相关的监测和控制方法与频率。(引自 ICH Q8)

### 3.1.4 长链脂肪酸 (Long-chain fatty acids)

本指南中的长链脂肪酸一般指包含 12 到 24 个碳原子的一元或二元直链脂肪酸。

### 3.1.5 连接子 (Connector)

在长效脂肪酸侧链中用于连接长链脂肪酸与肽链骨架或间隔子的结构片段。

### 3.1.6 间隔子 (spacer)

位于肽链骨架和连接子中间的结构片段，主要作用为调节肽类与目标受体亲和力。

## 3.2 缩略语

下列缩略语适用于本指南。

CMC: 药物的化学、生产和控制 (Chemistry, Manufacturing, and Controls)

PEG: 聚乙二醇 (Polyethylene glycol)

LPPS: 液相合成法 (liquid-phase peptide synthesis)

SPPS: 固相合成法 (Solid-phase peptide synthesis)

AEEA: 2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙酸 (2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)acetic acid)

$\gamma$ -Glu:  $\gamma$ -谷氨酸 ( $\gamma$ -Glutamic acid)

Cbz-OSu: N-(苄氧羰基氧基)琥珀酰亚胺 (N-(Benzyloxycarbonyloxy)succinimide)

Fmoc-OSu: 9-芴甲基-N-琥珀酰亚胺基碳酸酯

(N-(9H-Fluorene-9-ylmethoxycarbonyloxy)succinimide)

## 4 脂肪酸长效侧链的制备工艺

### 4.1 脂肪酸长效侧链的典型结构

脂肪酸修饰侧链的长效化是通过长链脂肪酸与血液中的白蛋白结合实现的。脂肪酸链越长，与白蛋白结合越紧密，从而延长多肽药物在血液循环中的时间。然而，用于修饰的脂肪链越长往往导致多肽和受体的结合能力下降，因此需要在长效与活性之间寻求一个平衡。同时，将脂肪酸通过一些特定分子结构与肽链进行连接，也可调整多肽的药代动力学特性。即脂肪酸链可直接连接到肽链骨架上，也可通过连接子和/或间隔子进行连接。脂肪酸长效侧链的典型结构和成功应用分别见图 1 和附录 A 所示。

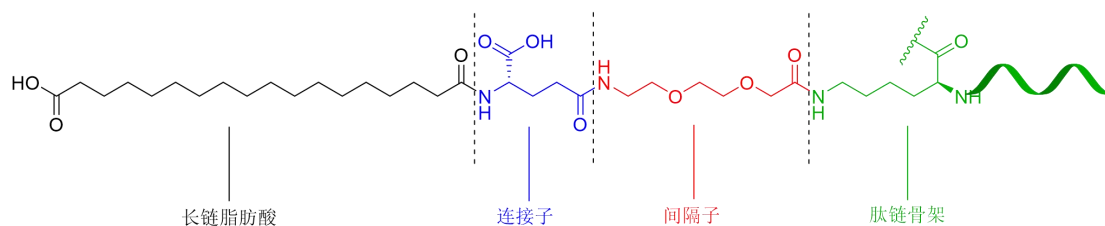


图 1. 脂肪酸长效侧链典型结构

➤ 长链脂肪酸：脂肪酸酰化药物与白蛋白的亲合力随烷基链长度的增加而增强，十八烷二酸(C18)和二十烷二酸(C20)是迄今为止成药的脂肪酸中与白蛋白结合亲和力最强的两种脂肪酸。

➤ 连接子： $\gamma$ -Glu 常作为连接子，对白蛋白结合和半衰期以及多肽的自我聚集有重要影响， $\gamma$ -Glu 带负电荷，增加了药物的亲水性，因而可以改善药物制剂的特性。

➤ 间隔子：通常为亲水性小分子，如 AEEA，在与白蛋白结合的同时提供足够的体内活性，平衡脂肪酸侧链修饰药物的长效化和活性。

➤ 肽链骨架：脂肪酸长效侧链需要与肽链的氨基残基偶联以完成修饰，通常为赖氨酸残基。此外，由于肽链的 N 端往往与受体结合的活性相关，因此肽类骨架中与脂肪酸长效侧链结合的位置对于达到半衰期和效力而言非常重要。

实际上，脂肪酸长效侧链上可能含有多个活性基团，在实际应用中，为有效保证偶联反应的选择性，通常需要对脂肪酸长效侧链其他羧基或氨基残基进行适当保护，并在与肽链缩合以后再脱保护以制备多肽原料药，具体的保护基种类取决于原料药的制备工艺。此外，若多肽药物的设计工艺路线为固相合成，可将肽骨架的 Lys 残基与脂肪酸链完成偶联，这样构成的固相合成用修饰侧链从本质上类似于保护氨基酸，可在合成过程中作为保护氨基酸使用，合成肽链的同时即完成修饰侧链的构建。

#### 4.2 起始物料及其关键物料属性

脂肪酸长效侧链的生产工艺一般需要纳入申报工艺，其生产所用起始物料应参考 ICH Q11 的要求进行选择和控制。对于典型的脂肪酸长效侧链，由长链脂肪酸、 $\gamma$ -谷氨酸连接子、PEG 间隔子、Lys 骨架（针对固相合成用侧链）以酰胺键连接而成。这几个片段作为脂肪酸长效侧链的结构组成部分，化学性质结构明确，均为成熟商业产品，市售可得；此外，由上述几个片段制备侧链需要经历多步酰胺化缩合反应，杂质来源、走向清晰，因此可考虑将长链脂肪酸或其衍生物、 $\gamma$ -谷氨酸衍生物、PEG 片段、保护的 Lys 等定义为起始物料。

表 1. 脂肪酸长效侧链起始物料中的关键杂质汇总表

| 起始物料           | 关键杂质             | 研究策略  |
|----------------|------------------|---|
| 长链脂肪酸          | 游离脂肪二酸、脂肪二酸双酯    | 采用长链脂肪二酸时，应对其中一个羧基进行保护以保证反应选择性。如两个羧基均游离则无法保证选择性产生杂质，结合杂质转化情况的研究进行控制；均酯化则无法进一步反应，应进行适当限定。  |
|                | 其他单酯类            | 不同的酯的脱除条件不一致，如非目标酯，在最终脱保护时无法反应，应严格控制。   |
|                | 同系物杂质            | 同系物杂质除碳链长度不同，其结构性质与目标脂肪酸一致，后续难以去除，应严格控制。  |
|                | 支链脂肪酸、不饱和脂肪酸     | 支链脂肪酸和不饱和脂肪酸均参与后续反应，需结合工艺评估其存在的风险。  |
| $\gamma$ -谷氨酸酯 | 手性异构体            | 谷氨酸是手性氨基酸，其 $\gamma$ -羧基用于连接，必须确保为单一的 L 型或 D 型（通常为 L 型），需通过手性 HPLC 检测并控制。                 |
|                | $\alpha$ -谷氨酸酯   | 必须确认连接发生在 $\gamma$ -羧基（即对另一羧基进行保护以保证反应选择性），如保护位点不正确，则导致 $\gamma$ -羧基参与偶联反应，应进行控制。         |
|                | 游离氨基酸            | 未正确保护的氨基酸无法保证反应的选择性，应进行控制。  |
|                | 其他酯类             | 不同的酯的脱除条件不一致，如非目标酯，在最终脱保护时无法反应，应严格控制。   |
|                | 焦谷氨酸衍生物          | 谷氨酸酯的制备过程中，可能发生分子内脱水形成焦谷氨酸衍生物，应评估对后续工艺的影响，加以限定。   |
|                | $\beta$ -Ala 衍生物 | 取决于起始物料制备工艺中是否使用 Fmoc/Cbz-OSu 等试剂。如使用，应进行评估和控制。   |
| PEG 片段         | 其他聚合度的 PEG       | 与 PEGn 原料存在乙二醇片段增加或缺失的杂质，特别是存在一个乙二醇片段差异的杂质在后续工艺中难以清除，应严格控制。                               |
|                | $\beta$ -Ala 衍生物 | 取决于起始物料制备工艺中是否使用 Fmoc/Cbz-OSu 等试剂。如使用，应进行评估和控制。   |
|                | 缺失片段和多聚物         | 采用多个 PEG 片段顺次链接作为起始物料（如 AEEA-AEEA）时，其可能含有片段缺失或增加的杂质（如含 AEEA 或 AEEA-AEEA-AEEA 杂质），应进行研究和控制 |
| 保护的-Lys        | 手性异构体            | 赖氨酸是手性氨基酸，需保证采用的氨基酸为高纯度的单一构型，需通过手性 HPLC 检测并控制。  |
|                | 游离 Lys 或支链氨基保    | 采用保护基对 Lys 的 $\alpha$ -氨基进行保护以保证脂肪  |

|  |                  |   |
|--|------------------|---|
|  | 护的 Lys           | 酸长效侧链制备过程中的反应选择性，未保护或保护位点不正确则无法确保反应选择性，应进行控制    |
|  | $\beta$ -Ala 衍生物 | 取决于起始物料制备工艺中是否使用 Fmoc/Cbz-OSu 等试剂。如使用，应进行评估和控制。 |
|  | 氧化杂质             | 支链氨基暴露在空气中氧化可能逐步转变为醛或羧酸，应评估其对侧链质量的影响，加以必要限制。    |

起始物料的关键物料属性主要关注其杂质。研究时，应结合起始物料的结构特点和合成工艺确定杂质谱组成，开发出能检出各潜在杂质的分析方法，并进行必要的方法学验证，充分证明所采用的分析方法的可行性，重点关注分析方法的专属性和灵敏度。杂质标准的建立应基于风险和科学性，重点关注杂质的活性和反应性、工艺对杂质的清除能力等，以制定合理的限度。

#### 4.2.1 长链脂肪酸或其衍生物

用于制备脂肪酸长效侧链的长链脂肪酸可以是脂肪单酸，也可以是脂肪二酸。长链脂肪酸需要与 $\gamma$ -谷氨酸进行偶联，其在侧链制备中的活性反应位点为羧基，因此若采用长链脂肪二酸，需要对其中一个羧基进行酯化保护（如叔丁酯化、甲酯/乙酯化、苄酯化），以保证反应的选择性。长链脂肪二酸的单酯化保护策略，取决于侧链制备的工艺过程，同时也将直接关系到最终的脱保护策略。一般的，采用单叔丁酯的保护策略为优选，其即可在酰胺化缩合的碱性条件中保持稳定，又能在完成多肽构建以后，在酸性条件下轻松脱除。

对于长链脂肪酸衍生物，关键质量属性主要考虑杂质，重点关注：

1) 对于未成酯的长链脂肪二酸，两端的羧基均会参与反应，从而形成衍生杂质，应加以研究和控制。

2) 在长链脂肪二酸单酯制备过程中，可能产生其他酯类工艺杂质：如采用醇作为酯化试剂时，其中含有的其他杂醇可能参与反应、工艺过程中使用的酯类等溶剂发生酯交换反应等。由于不同的酯的酸/碱稳定性存在很大差异，因此可能在制备侧链过程即脱落形成副产物，或导致侧链与主链缩合后无法彻底脱保护，也应进行研究和控制。

3) 长链脂肪酸杂质控制的另一个重点为同系物杂质，这些杂质除碳链长度与主成分不同以外，其结构和官能团均与主成分一致，具有非常相近性质，一旦引入即很难在工艺过程中清除，特别是当杂质碳链与主成分越发接近时分离难度更大，需对这些同系物杂质进行科

学控制，通常建议控制单个同系物  $\leq 0.10\%$ （特殊情况下可根据脂肪酸长效侧链制备工艺对杂质的清除能力制定）。

4) 应结合长链脂肪酸的制备工艺，分析评估长链脂肪酸中含有支链烷基链类脂肪酸和不饱和脂肪酸杂质的潜在风险，并进行合理控制。

5) 长链脂肪酸起始物料中还可能残留羧基均叔丁酯化的杂质，尽管该杂质不参与后续反应，也应结合后续工艺对该杂质的清除能力，进行适当控制。

#### 4.2.2 $\gamma$ -谷氨酸酯

通常采用 $\alpha$ 位羧基保护的谷氨酸酯作为起始物料。羧基保护优先选择与长链脂肪酸一致的保护酯，因其在工艺过程中的稳定性与长链脂肪二酸单酯一致，同时在完成多肽构建以后，可采用同一条件脱除所有保护酯。 $\gamma$ -谷氨酸酯的关键质量属性重点关注杂质，需对潜在存在的L-谷氨酸、其他杂酯、 $\gamma$ 位羧基酯化的L-谷氨酸、谷氨酸双叔丁酯等杂质进行研究和控制，并制定合理的控制策略。

在谷氨酸衍生物的制备过程中，可能发生分子内脱水形成焦谷氨酸衍生物，需进行评估和控制。

此外，谷氨酸存在手性位点，其衍生物中潜在含有D-异构体杂质。手性异构体具有类似的结构反应活性，在后续制备侧链的工艺中很难清除，且其生理活性可能存在很大差异，应进行严格控制，一般建议限度为0.10%（特殊情况下可根据脂肪酸长效侧链制备工艺对异构体的清除能力制定）。

#### 4.2.3 PEG 片段

脂肪酸长效侧链中的PEG间隔子为非天然氨基酸结构，即 $-\text{NH}_2\text{-PEG}_n\text{-羧酸-}$ ，通常是结构明确的单一分子量的纯净化合物。PEG片段中的杂质控制重点为其他分子量的PEG，特别是聚合度与主成分接近的杂质，如 $-\text{NH}_2\text{-PEG}_{n-1}\text{-羧酸-}$ 和 $-\text{NH}_2\text{-PEG}_{n+1}\text{-羧酸-}$ ，这些杂质应按特定杂质定入起始物料标准，制定合理的限度。

若拟制备的脂肪酸长效侧链采用多个PEG片段作为链接子，各个PEG片段均应定义为起始物料。在充分论证的基础上，也可考虑将这些PEG片段缩合形成非天然短肽，作为起始物料，如AEEA-AEEA。

对于采用多个PEG形成的短肽段作为起始物料，缺失片段和多聚物应纳入研究和控制。

#### 4.2.4 保护的-Lys

作为固相合成使用的侧链，将赖氨酸的 $\alpha$ -氨基选择性保护后，通过合成工艺与侧链其他片段连接，形成双保护氨基酸的结构用于肽段合成并同时完成侧链构建。根据固相合成工艺

的不同，保护基一般可选 Boc 和 Fmoc，相较于 Boc 法需要反复采用 TFA 脱保护，Fmoc 法条件平稳，为目前固相合成的主流选择。对于选择性保护的-Lys，应研究保护位点是否正确以及是否存在未保护的游离氨基酸等。氨基保护基的使用还可造成其他杂质，为几个起始物料的特性特点（工艺过程如使用氨基保护基），在“4.2.5 小结”统一评述。

赖氨酸为手性氨基酸，其 D-异构体杂质应纳入研究和控制。

此外，赖氨酸及其衍生物在储存过程中，长时间光照或暴露于空气中均可发生氧化反应，经醛类中间态，最终形成氨基己二酸杂质，如图 2。应评估其对侧链质量的影响。

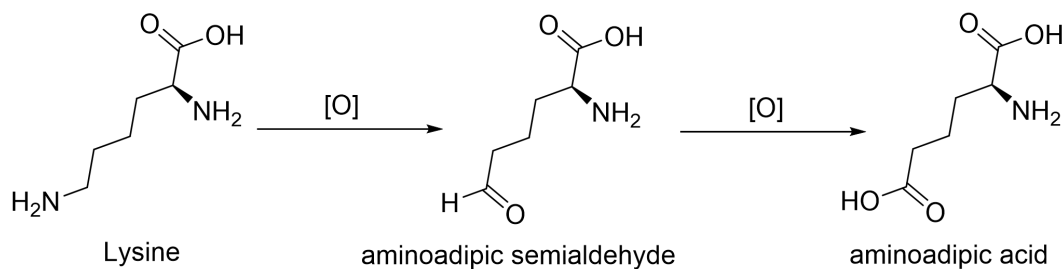


图 2.赖氨酸及其衍生物的氧化过程

#### 4.2.5 氨基保护基引入起始原料的其他杂质

在制备起始物料时，还可能引入氨基酸保护基产生的杂质。例如，使用 Fmoc-OSu 或 Cbz-OSu 对氨基进行保护时，可能会伴随产生 Fmoc(或 Cbz)- $\beta$ -Ala-OH 和 Fmoc(或 Cbz)- $\beta$ -Ala-AA 杂质，其产生的原理为反应体系中的亲核试剂进攻 Fmoc(或 Cbz)-OSu 的一个羰基后，通过 Lossen 重排产生  $\beta$ -Ala 结构，该结构与另一当量 Fmoc(或 Cbz)-OSu 发生保护反应，或者与拟保护的氨基酸缩合为二肽以后发生保护反应，形成相应杂质，见图 3。此外反应过程中还可能拟保护的氨基酸分子间缩合形成二肽，最终产生 Fmoc(或 Cbz)-AA-AA-杂质。

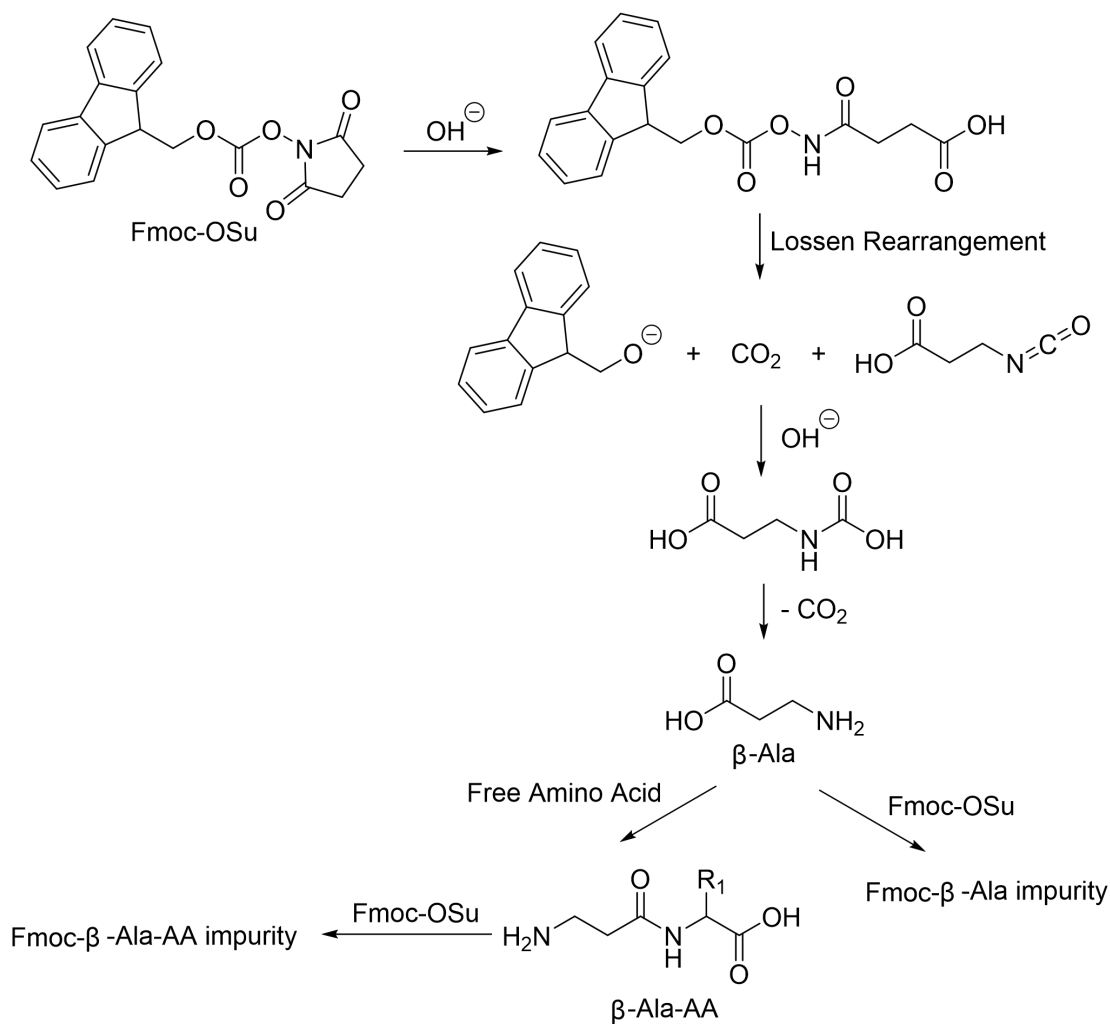


图 3.  $\beta$ -Ala 衍生物杂质产生原理（以 Fmoc-AA 例）

以上杂质可能出现在 $\gamma$ -谷氨酸酯、PEG 片段、保护的-Lys 中，取决于几个起始物料的合成策略中是否采用了 Fmoc-OSu 或 Cbz-OSu 保护氨基酸的。在起始物料制备过程中，若产生的杂质在后续工艺步骤中会进一步转化，还应根据实际情况对转化产物进行研究和控制。

### 4.3 制备工艺

#### 4.3.1 工艺路线

脂肪酸长效侧链为长链脂肪酸、连接子、间隔子等通过酰胺键顺次连接而成，可灵活选择 LPPS 或 SPPS 的方式。由于脂肪酸长效侧链序列不长，LPPS 以其反应规模大、合成成本低、均相体系中可选用的反应条件选择多、杂质谱更明确和容易控制等优点，是为优选。

侧链的合成可根据工艺需要，灵活选择碳二亚胺类缩合剂法、鎓盐类缩合剂法、活性酯法、混合酸酐法、酰氯法等。需注意，酰胺制备的过程中，多数中间体或中间态并不稳定（如活性酯）、也可能存在一些手性位点易消旋的情况，应基于风险明确关键工艺步骤和关键参

数,进行更精准的控制。应提供脂肪酸长效侧链完整的工艺流程图和详细工艺描述,以代表性批次为例,照工艺流程详细描述各步骤工艺操作,包括投入的物料和试剂及投料量、反应条件和参数、过程控制、后处理方式等。侧链的纯化如采用柱层析的方式,应确定硅胶的参数、层析柱的装载量和载样量、洗脱程序、过程监控手段等参数。

脂肪酸长效侧链的生产应符合监管要求,生产企业需建立并健全生产质量管理体系,以保证侧链内在质量的批间一致性。

#### 4.3.2 反应终点控制和中间体控制

侧链制备的反应终点一般可采用 TLC 法、HPLC 法等色谱方法进行监测,应选择适当的显色剂或检测器,以监控反应进程,并根据工艺需要监控特定杂质的变化情况。为减少工艺和纯化的压力,应制定适当的终点可接受标准。应确保检测方法的专属性和灵敏度符合检测要求,需注意的是,特殊情况下,单一方法的灵敏度和专属性可能达不到监测需求,可采取多手段监控。

对于液相合成,应参照《化学药物原料药制备和结构确证研究的技术指导原则》对每一个可分离的中间体的质量进行控制,如鉴别、有关物质、含量等。用于中间体检测的分析方法应经过必要的验证,以保证足够的检出能力。由于侧链制备反应步骤较多,且存在多个步骤反应类型和原理一致,其过程杂质传递情况较为复杂,建议基于风险,对中间体中的一些可偶联的特定杂质进行充分的评估,制定合理的控制策略。

### 5 结构确证

脂肪酸长效侧链的分子量与小分子药物接近,一般情况下参照《化学药物原料药制备和结构确证研究的技术指导原则》,采用小分子化学药物结构研究常用的表征方法足以解析其结构,如 IR、UV、NMR、MS 等。对于结构较复杂、分子量较大的侧链,可采用适当的方法对其一级结构进行分析,如质谱测序等。

脂肪酸长效侧链及其光学异构体的构型判断,通常可结合异构体方法学研究、理化性质和结构表征、制备工艺等进行,对于结构较复杂或存在多个手性位点的侧链,可采用必要的分析手段进一步表征其绝对构型,如单晶粉末衍射;也可使用氘代试剂在强酸性体系将侧链水解为单个氨基酸,气相色谱-质谱联用(GC-MS)或液相色谱-质谱联用(LC-MS)定性分析单个氨基酸的构型,以确定侧链的绝对构型,必要时可采用 Marfey 试剂、邻苯二甲醛等试剂对水解后的氨基酸进行衍生。

### 6 质量研究和控制

脂肪酸长效侧链的质量研究可参考小分子化学药物质量研究进行。由于脂肪酸长效侧链

非药品，还需要与肽链发生化学偶联，其研究项目和可接受限度的制定，还应根据侧链的合成工艺和结构特点、与肽链偶联的工艺手段、成品肽的拟定的质量属性等确定。表 2 列举了脂肪酸长效侧链质控项目，仅作为参考示例，并不代表全部情况，实际研究中应根据产品特性拟定具体考察项目。

表 2.脂肪酸长效侧链的质量控制项目

| 研究及检测项目       | 概述   |
|---------------|--|
| 理化性质          | 性状、在特定溶剂中溶解性等；<br>若侧链含手性碳，应考虑其比旋度的测定。  |
| 鉴别            | 可考虑采用不同的分析方法进行鉴别实验。如 HPLC 鉴别—供试品溶液与对照品溶液主峰保留时间一致；MS 鉴别—应在理论值 $\pm 1.0\text{Da}$ 范围内。 |
| 有关物质          | 应采用杂质对照品（基于侧链工艺和特性拟定的潜在杂质，如工艺杂质、降解杂质、异构体等）进行方法学验证，充分关注方法的分离检出能力。                     |
| 非目标侧链结构相关有机杂质 | 主要为工艺过程使用的缩合剂及其转化物的残留，应充分评估杂质的去除途径和质量风险，对于存在风险的杂质进行适当限定。                             |
| 残留溶剂          | 参考 ICH Q3C 重点关注生产过程中接近终产品工艺步骤所用到的溶剂，以及可能对多肽质量造成影响的溶剂。                                |
| 元素杂质          | 参考 ICH Q3D 根据风险评估结果对可能引入的元素杂质进行适当评估和控制   |
| 水分            | 部分脂肪酸长效侧链具有引湿性，水分可能影响侧链稳定性和后续偶联反应，需依据侧链的批分析数据、稳定性数据以及对后续工艺的影响设定可接受标准。                |
| 含量测定          | 含量可采用 HPLC 外标法、质量平衡法、滴定法等测定，用于指导后续工艺中侧链的投料比。HPLC 外标法可参考有关物质/鉴别检测方法。                  |

### 6.1 理化性质

性状、溶解度等理化性质可初步判断脂肪酸长效侧链有无质量异常，其中溶解性项目的

研究与设置还应考虑对与肽链偶联反应提供一定指导。

## 6.2 鉴别

脂肪酸长效侧链的鉴别方法应具有足够的专属性，如 HPLC 法、质谱法、红外法等，必要时可采用多种不同原理的鉴别方法互相印证。

## 6.3 杂质

脂肪酸长效侧链的杂质对多肽药品安全性、有效性和质量可控性具有较强的潜在影响，杂质谱的研究和控制是其药学研究关注的重点。根据脂肪酸长效侧链的结构特点和其使用范围的特殊性，将其分为有关物质和非目标侧链结构相关杂质（非目标侧链结构相关有机杂质、溶剂残留、元素杂质等）。

### 6.3.1 有关物质

有关物质是指与目标分子结构有关联的杂质。在脂肪酸长效侧链中，这类杂质往往会同目标分子一样参与肽链的偶联反应，是反映侧链化学纯度的重要指标之一。有关物质可由起始物料引入、生产工艺副反应引入或储存过程中降解产生。表 3 列举了脂肪酸长效侧链有关物质，仅作为参考示例，并不代表全部情况，应结合产品特定拟定和评估研究的杂质谱。

表 3.脂肪酸长效侧链有关物质类别及来源

| 杂质类型 | 描述                     | 来源  |
|------|------------------------|---|
| 缺失片段 | 缺失一个/多个片段              | 合成或降解<br>如：储存过程中水解产生的断裂片段；残留的反应中间体；未反应完全的中间体跳步产物                                  |
| 错结片段 | 存在一个/多个额外片段            | 起始物料或合成<br>如：长链脂肪酸中的同系物；洛森降解产生的 $\beta$ -Ala 衍生物； $\gamma$ -谷氨酸酯中的 $\alpha$ -谷氨酸酯 |
| 插入片段 | 存在一个/多个（与目标序列）不同的片段    | 起始物料或合成<br>如：起始物料片段中的二聚体；缩合反应产生的 AA 二聚肽   |
| 差向片段 | 一个/多个手性中心发生构型翻转产生光学异构体 | 起始物料，合成或降解<br>如：起始物料引入的手性异构体；反应过程   |

|                  |                      |  |
|------------------|----------------------|--|
|                  |                      | 或者储存过程产生的消旋  |
| N-酰化/烷化脂<br>肪酸侧链 | 氨基官能团发生酰化或叔<br>丁烷化   | 合成或降解<br>如：使用乙酸/乙酸乙酯等溶剂发生氨解；<br>N-叔丁基化主要产生于侧链制备工艺需脱<br>Boc，在适宜条件下产生的叔丁正离子中间<br>态被亲核基团氨基俘获。 |
| 其他酯基化侧<br>链      | 侧链羧基被目标酯以外的<br>其他酯取代 | 起始物料、合成或降解<br>起始物料中的其他羧基保护酯引入；工艺过<br>程醇类、酯类溶剂发生酯交换反应                                       |

有关物质的分析方法研究应重点关注分析方法的专属性和灵敏度，由于部分杂质与主成分结构性质差异较小，采用单一方法未必能对各潜在杂质进行有效分离，应考虑采用不同原理的方法进行检测。在分析方法验证中，可采用与目标结构接近的潜在工艺杂质或降解杂质对照品进行分离度考察，同时采用强制降解试验样品考察峰纯度和质量守恒，以充分评估方法对潜在杂质的检出能力。需注意的是，侧链的降解片段中可能存在一些弱紫外吸收的物质，单纯采用紫外检测器方法灵敏度未必满足要求，可考虑使用 ELSD、CAD、MS 等检测器对这类潜在杂质进行充分评估。

差向片段杂质色谱行为与主成分非常类似，鉴别和分离难度较大。对于侧链中含有 1 个或 2 个手性位点时，可考虑合成对应的异构体杂质对照品，选择合适的色谱条件进行分离检测；当侧链中存在多个手性位点时，可使用氘代试剂在酸性条件水解侧链，采用气相色谱-质谱联用（GC-MS）或液相色谱-质谱联用（LC-MS）检测水解后单个氨基酸的手性纯度，或通过此法确认结构中的易消旋氨基酸后，再制备相应杂质对照品进行定量检测，可降低研究的难度和工作量。

侧链的有关物质控制要求可基于杂质在后续工艺反应过程中确定。对于可参与后续反应的杂质建议参考 ICH Q3A 的要求进行研究和控制，即报告限、鉴定限、界定限分别为 0.05%、0.10%、0.15%；超出该限度要求的杂质，需要开展适当研究（例如，杂质加标清除研究）支持限度的合理性。对于后续工艺中不参与反应的杂质可基于后续工艺对杂质的清除能力酌情放宽控制限度。需要指出的是，具体的可接受限度应基于后续与肽链的偶联工艺及对多肽药物质量的影响决定。

### 6.3.2 非目标侧链结构相关有机杂质

非目标侧链结构相关有机杂质为工艺过程中引入的与侧链目标分子结构不相关的有机杂质，主要为有机反应试剂、缩合剂及其降解物、保护基团及其降解物等。这些有机杂质通常可用有关物质项的相同或相似的检测方法和控制策略进行检测和评估。但明确的是，诸如缩合剂及其降解产物等具有潜在的致突变性风险，如碳二亚胺缩合剂为警示结构、缩合试剂 HOBT 可能存在胍类物质，应按照 ICH M7 进行评估和研究，制定合理的控制策略。

一般情况下，可采用代表性的化合物或接近终产品工艺步骤使用或生成的化合物进行针对性的清除效力研究，证明采用的工艺可有效去除这些杂质。对于存在残留风险的警示结构杂质，应结合 ICH M7 和下游多肽药物生产企业对后续偶联工艺的研究，制定合理的控制限度。

此外，侧链制备过程中，往往会采用三乙胺、DIPEA、DMF、DMAC 等有机胺源作为反应缚酸剂或溶剂，应充分评估亚硝胺类杂质存在的风险。

### 6.3.3 残留溶剂和元素杂质

脂肪酸长效侧链的残留溶剂可参考 ICH Q3C 的相关要求进行评估和控制。由于侧链还需与肽链进行化学反应才能得到药物活性成分，溶剂残留限度的建立应当同多肽药物生产企业一起评估，综合考量侧链能达到的溶剂残留水平和付出的成本、后续肽链偶联工艺使用的溶剂、后续工艺对其他溶剂的清除能力等，制定更合理的策略，特别是当某溶剂拟控制的限度不在 ICH Q3C 建议的范围以内时，应充分评估肽段偶联工艺对其的清除能力和对多肽药物的质量风险。对于乙酸、乙酸乙酯等溶剂，可能导致 N-酰化封端风险，应基于下游偶联工艺评估并制定限度，可参考目标：乙酸  $\leq 100$  ppm。

侧链或其起始物料制备过程中可能使用金属试剂/催化剂，如催化氢化脱保护使用的 Pd 催化、水解酯使用的 LiOH、氨基酸选择性保护使用 Cu 络合等，应进行应对元素杂质进行合理评估和控制。如这些金属催化试剂在侧链中难以清除干净，应根据后续多肽药物制备工艺中的清除能力，制定合理的限度。

### 6.3.4 含量测定

含量测定除保障脂肪酸长效侧链质量，也可用于指导下游偶联反应的投料量，是侧链的重要质量属性之一。侧链含量的测定一般采用 HPLC 外标法、滴定法，也可选择其他经充分验证的分析方法。对于某些稳定性很差的侧链（如已被活化的侧链），在溶液状态下可能短时间即开始明显分解，宜采用质量平衡法进行含量计算，可保证系统误差的可控性。

## 7 稳定性考察

脂肪酸长效侧链的稳定性研究应照 ICH Q1A 以及《化学药物(原料药和制剂)稳定性研

究技术指导原则（修订）》的一般性要求进行。重点关注储存期间物理、化学性质的变化

侧链制备过程中的涉及到一些可分离中间体的暂存，特别是一些活化酯稳定性较差，并且其降解产物会引入缺失肽杂质，需要对每一个暂存的可分离中间体进行稳定性研究，以制定合理的储存条件和储存期限。中间体的稳定性研究根据实际生产情况进行，重点关注有关物质、水分等可能影响工艺稳定性和侧链质量的指标，研究时长应覆盖中间体的最长暂存时间。

部分脂肪酸长效侧链为粘稠状液体，建议选择内衬聚四氟乙烯材质或玻璃材质的惰性包材，包材的选择需要结合影响因素或强制降解识别的不稳定因素、包材的防潮和避光属性、包装材料与侧链的相容性等进行包材适用性的研究和论述。

## 8 参考文献

- 胡玉玺,蒋煜,韩天娇,何驰宇. 合成多肽物质控及杂质谱研究[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(5): 502-508.
- 胡玉玺,蒋煜,韩天娇. 制备工艺和过程控制对合成多肽药物有关物质的影响[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(18): 2143-2148.
- 赵靖,韦薇,魏开坤. 脂肪酸链修饰的重组胰高血糖素样肽 1 类药物的药学研究和评价考虑[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(24): 2507-2512.
- Svend Havelund, Anne PlumThe, et al. mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin. Pharm Res. 2004 Aug;21(8): 1498-504.
- Knudsen LB, Lau J. The Discovery and Development of Liraglutide and Semaglutide. Front Endocrinol (Lausanne). 2019 Apr 12;10:155.
- Suo Y, Jiang Z, Heberlig GW, et al. Role of Human Mitochondrial Ketosynthase in Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis. J Am Chem Soc. 2025 Sep 10;147(36):33248-33255.

## 附录 A

## 部分脂肪酸修饰长效多肽药物的侧链结构

| 药物名称  | 长链脂肪酸 | 连接子           | 间隔子       |
|-------|-------|---------------|-----------|
| 利拉鲁肽  | 棕榈酸   | $\gamma$ -Glu | /         |
| 德谷胰岛素 | 十六烷二酸 | $\gamma$ -Glu | /         |
| 司美格鲁肽 | 十八烷二酸 | $\gamma$ -Glu | AEEA-AEEA |
| 替尔泊肽  | 二十烷二酸 | $\gamma$ -Glu | AEEA-AEEA |
| 卡格列肽  | 二十烷二酸 | $\gamma$ -Glu | /         |
| 瑞他鲁肽  | 二十烷二酸 | $\gamma$ -Glu | AEEA      |
| 依柯胰岛素 | 二十烷二酸 | $\gamma$ -Glu | AEEA-AEEA |
| 伊诺格鲁肽 | 十八烷二酸 | $\gamma$ -Glu | AEEA-AEEA |
| 玛仕度肽  | 二十烷二酸 | $\gamma$ -Glu | AEEA-AEEA |



# 脂肪酸长效侧链药学研究技术指南

T/CBPIA 0019—2026

\*

## 中国生化制药工业协会秘书处

地址：北京市西城区广内大街广义街 5 号广益大厦 B 座 806

电话：010-67046276 传真：010-67046276

邮箱：chinabpia@163.com

网址：<http://www.cbpia.org.cn>

