



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1981195 B

(45) 授权公告日 2012.07.04

(21) 申请号 200580015039. X
 (22) 申请日 2005.03.17
 (30) 优先权数据
 0406013.3 2004.03.17 GB
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2006.11.10
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/IB2005/000987 2005.03.17
 (87) PCT申请的公布数据
 W02005/090986 EN 2005.09.29
 (73) 专利权人 诺华疫苗和诊断有限公司
 地址 意大利锡耶纳
 (72) 发明人 A·巴多蒂 D·普罗蒂 S·里奇
 (74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
 司 31100
 代理人 陶家蓉

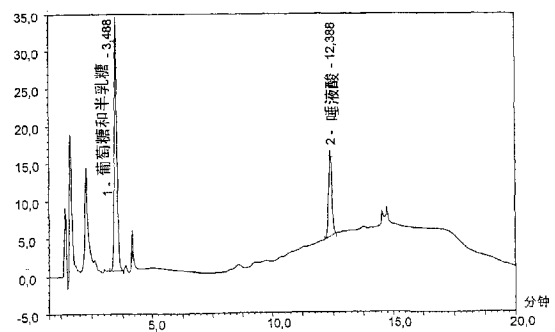
(51) Int. Cl.
G01N 33/548 (2006.01)
G01N 33/66 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 1428434 A, 2003.07.09,
 EP 0462794 A, 1991.12.27,
 WO 02058737 A, 2002.08.01,
 CN 1410532 A, 2003.04.16,
 审查员 杨冀川

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 9 页

(54) 发明名称
 无干扰地分析糖疫苗

(57) 摘要

本发明以分析多种血清群脑膜炎球菌混合糖的方法为基础,即使这些糖具有相同的单糖单元。本发明分析了血清群C、W135和Y的糖的组合物中的唾液酸、葡萄糖和半乳糖含量。葡萄糖和半乳糖结果可分别用于直接定量血清群Y和W135的糖,从唾液酸含量中扣除葡萄糖和半乳糖的合并含量而定量血清群C的糖。因此,可分辨这三种血清群,即使它们的单糖含量重叠。可分析同一物质中的三种不同单糖而不受单糖之间的干扰和该组合物中任何其它糖物质(例如,冻干稳定剂)的干扰。本方法可用于分析偶联疫苗中的全部糖和游离糖并简化了对含有多种血清群荚膜糖疫苗的质量控制。



1. 一种分析组合物的糖含量的方法,其中:

(a) 该组合物含有脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖和一种或两种以下荚膜糖:(i) 脑膜炎奈瑟球菌血清群 W135 的荚膜糖;和 / 或脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y 的荚膜糖;

(b) 所述方法包括分析该组合物中唾液酸含量的步骤,和以下步骤:(i) 如果该组合物含有血清群 W135 的糖,分析该组合物中半乳糖含量的步骤;(ii) 如果该组合物含有血清群 Y 的糖,分析该组合物中葡萄糖含量的步骤;

(c) 如果该组合物含有血清群 W135 的糖,根据步骤 (b) 的半乳糖分析结果确定该组合物中血清群 W135 的糖的含量;

(d) 如果该组合物含有血清群 Y 的糖,根据步骤 (b) 的葡萄糖分析结果确定该组合物中血清群 Y 的糖的含量;

(e) 比较唾液酸分析的结果与以下结果来确定该组合物中血清群 C 的糖的含量:(i) 如果该组合物含有血清群 W135 的糖但不含血清群 Y 糖,步骤 (b) 的半乳糖分析结果;(ii) 如果该组合物含有血清群 Y 的糖但不含血清群 W135 的糖,步骤 (b) 的葡萄糖分析结果;或 (iii) 如果该组合物同时含有血清群 W135 的糖和血清群 Y 的糖,合并步骤 (b) 的葡萄糖和半乳糖分析结果。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述组合物含脑膜炎奈瑟球菌所有三种血清群 C、W135 和 Y 的荚膜糖。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述组合物含有一种或多种其它荚膜糖。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述一种或多种其它荚膜糖选自脑膜炎奈瑟球菌血清群 A 的荚膜糖;和 b 型流感嗜血杆菌荚膜糖。

5. 如以上任一项权利要求所述的方法,其特征在于,包括处理所述组合物以解聚荚膜糖而得到它们的组成单糖的步骤。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,通过任选联用脉冲电流分析检测的高效阴离子交换层析检测唾液酸含量、葡萄糖含量和 / 或半乳糖含量。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,该方法还包括对一种或多种以下组分或性质进行分析:重量克分子渗透浓度、pH、每种糖或偶联物的聚合程度、蛋白质含量、铝含量、洗涤剂含量和防腐剂含量。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述荚膜糖得自糖-蛋白质偶联物。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述偶联物中的蛋白质是细菌毒素或类毒素。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述毒素或类毒素选自:白喉类毒素、破伤风类毒素、CRM197 白喉毒素衍生物和流感嗜血杆菌的 D 蛋白。

11. 一种分析组合物的方法,其中:

(a) 所述组合物含有脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖偶联物和一种或两种以下偶联物:(i) 脑膜炎奈瑟球菌血清群 W135 的荚膜糖偶联物;和 / 或 (ii) 脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y 的荚膜糖偶联物;

(b) 所述组合物可含有未偶联形式的荚膜糖;

(c) 用权利要求 1 到 7 中任一项所述的方法测定任何未偶联荚膜糖的含量;

(d) 用权利要求 1 到 7 中任一项所述的方法测定偶联荚膜糖的含量;和,任选的:

(e) 计算所述组合物中一种或多种荚膜糖的偶联:未偶联糖之比。

12. 一种定量测定至少两种不同脑膜炎球菌血清群的荚膜糖混合物中每种血清群的糖的方法,其中:(a) 所述不同血清群包括血清群 C 和以下一种或两种血清群:(i) 血清群 W135 和 / 或 (ii) 血清群 Y;(b) 所述方法包括解聚混合物中的荚膜糖得到解聚混合物的步骤;和 (c) 比较解聚混合物的单糖组成定量测定不同血清群。

13. 一种发放医生所用疫苗的方法,包括以下步骤:(a) 制备含脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 荚膜糖的偶联物和一种或两种以下偶联物的疫苗:(i) 脑膜炎奈瑟球菌血清群 W135 荚膜糖的偶联物;和 / 或 (ii) 脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y 荚膜糖的偶联物;(b) 分析疫苗中每种荚膜糖的偶联和 / 或未偶联糖的含量;和如果步骤 (b) 的结果表明糖含量可为临床应用所接受,则 (c) 发放医生所用的疫苗。

14. 一种疫苗,该疫苗在两批之间具有批次间一致性,其中:

(a) 每批疫苗含有:脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖偶联物和一种或两种以下偶联物:(i) 脑膜炎奈瑟球菌血清群 W135 荚膜糖偶联物;和 / 或 (ii) 脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y 荚膜糖偶联物;

(b) 第一批中血清群 C 偶联糖的浓度是 C_1 ;

(c) 第二批中偶联的血清群 C 糖的浓度是 C_2 ;

如果第一批疫苗含有脑膜炎奈瑟球菌血清群 W135 荚膜糖偶联物,则 (d) 第一批中血清群 W135 偶联糖的浓度是 W_1 ;

如果第二批疫苗含有脑膜炎奈瑟球菌血清群 W135 荚膜糖偶联物,则 (e) 第二批中血清群 W135 偶联糖的浓度是 W_2 ;

如果第一批疫苗含有脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y 荚膜糖偶联物,则 (f) 第一批中血清群 Y 偶联糖的浓度是 Y_1 ;

如果第二批疫苗含有脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y 荚膜糖偶联物,则 (g) 第二批中血清群 Y 偶联糖的浓度是 Y_2 ;

和其中, (h) C_1/C_2 、 W_1/W_2 和 Y_1/Y_2 的各自比例在 0.90 和 1.10 之间。

15. 如权利要求 14 所述的疫苗,其特征在于:(i) 第一批中未偶联的血清群 C 的糖的浓度是 C_3 ;(j) 第二批中未偶联的血清群 C 的糖的浓度是 C_4 ;如果第一批疫苗含有未偶联的血清群 W135 的糖,则 (k) 第一批中未偶联的血清群 W135 的糖的浓度是 W_3 ;如果第二批疫苗含有未偶联的血清群 W135 的糖,则 (l) 第二批中未偶联的血清群 W135 的糖的浓度是 W_4 ;如果第一批疫苗含有未偶联的血清群 Y 的糖,则 (m) 第一批中未偶联的血清群 Y 的糖的浓度是 Y_3 ;如果第二批疫苗含有未偶联的血清群 Y 的糖,则 (n) 第二批中未偶联的血清群 Y 的糖的浓度是 Y_4 ;(o) C_3/C_4 、 W_3/W_4 和 Y_3/Y_4 的各自比例在 0.90 和 1.10 之间。

16. 如权利要求 15 所述的疫苗,其特征在于: C_3/C_4 、 W_3/W_4 和 Y_3/Y_4 的各自比例在 0.95 和 1.05 之间。

17. 如权利要求 15 所述的疫苗,其特征在于:(p) C_3/C_1 、 C_4/C_2 、 W_3/W_1 、 W_4/W_2 、 Y_3/Y_1 和 Y_4/Y_2 的各自比例小于 0.20。

无干扰地分析糖疫苗

[0001] 本文所引用的所有文件全文纳入作为参考

技术领域

[0002] 本发明涉及含有细菌荚膜糖,特别是与载体相偶联的糖的疫苗的分析和质量控制领域。

背景技术

[0003] 含有与载体蛋白相偶联的荚膜糖的免疫原为本领域所熟知。这种偶联将 T 细胞不依赖性抗原转化为 T 细胞依赖性抗原,从而提高了记忆应答并产生保护性免疫力,原型偶联物疫苗用于 b 型流感嗜血杆菌 (Hib) [例如,参见参考文献 1 的第 14 章]。自 Hib 疫苗以来,开发了保护性的抗脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseriameningitidis*) (脑膜炎球菌) 和肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) (肺炎球菌) 的偶联糖疫苗。感兴趣的偶联疫苗涉及的其它微生物有无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B 族链球菌) [2]、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonasaeruginosa*) [3] 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) [4]。

[0004] 人用的脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的偶联疫苗已获批准,包括 Menjugate™ [5]、Meningitec™ 和 NeisVac-C™。混合的血清群 A、C、W135 和 Y 中各种偶联物已见报道 [例如,参考文献 6-9],包括 Menactra™ 产品。偶联抗原的其它混合物包括:(i) 脑膜炎球菌 A/C 混合物 [10, 11];(ii) 含有 7 种肺炎球菌偶联物的 PreVNar™ 产品 [12];(iii) 混合的脑膜炎球菌和 Hib 偶联物 [13, 14];和 (iv) 混合的脑膜炎球菌、肺炎球菌和 Hib 偶联物 [15]。

[0005] 偶联物疫苗所面对的问题包括稳定性和批次之间的一致性。例如,在 Hib 疫苗中,糖的催化性解聚已见报道 [16],而脑膜炎球菌血清群 A 的荚膜的偶联物易于水解 [17]。偶联物的不稳定性不良地导致免疫原性偶联物的有效剂量随时间而降低,批次之间的差异和特性未知分解产物的水平增加。参考文献 18 和 19 讨论了 Hib 偶联疫苗的稳定性的测试的有关问题。

[0006] 定量分析糖偶联物一般包括第一步骤糖水解,然后根据所释放的单糖进行分析。然而该分析只是直接相对于一种偶联物(例如,用阴离子交换层析方法分析 Hib [20] 和脑膜炎球菌血清群 A [21] 的水解偶联物),混合疫苗,特别是当不同的糖均具有相同单糖单元时,情况更复杂。例如,脑膜炎球菌血清群 C、W135 和 Y 的荚膜糖均含有唾液酸,因此根据测定所释放的唾液酸的任何方法不能区分这 3 种血清群。

[0007] 本发明的目的是通过改进对偶联疫苗中糖的定量评估来评估其稳定性和完整性。具体地说,本发明的目的是提供可用于测定脑膜炎球菌混合偶联疫苗中每种偶联物的方法,从而改进疫苗的质量控制和一致性。

发明内容

[0008] 本发明基于可分析脑膜炎球菌多种血清群的混合糖的方法,即使这些糖具有相同的单糖单元。因此,本发明提供一种分析组合物中糖含量的方法,其中:

[0009] (a) 所述组合物含有脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖和以下一种或两种荚膜糖：(i) 脑膜炎奈瑟球菌血清群 W135 的荚膜糖；和 / 或脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y 的荚膜糖；

[0010] (b) 所述方法包括分析组合物中唾液酸含量的步骤和：(i) 如果组合物含有血清群 W135 的糖，分析组合物中半乳糖含量的步骤；(ii) 如果组合物含有血清群 Y 的糖，分析组合物中葡萄糖含量的步骤；

[0011] (c) 如果组合物含有血清群 W135 的糖，则根据步骤 (b) 的半乳糖分析结果测定组合物中血清群 W135 的糖含量。

[0012] (d) 如果组合物含有血清群 Y 的糖，则根据步骤 (b) 的葡萄糖分析结果测定组合物中血清群 Y 的糖含量。

[0013] (e) 通过比较唾液酸分析的结果与以下结果来测定组合物中血清群 C 的糖含量：

(i) 如果组合物含有血清群 W135 的糖而不是血清群 Y 的糖，分析步骤 (b) 的半乳糖结果；

(ii) 如果组合物含有血清群 Y 的糖而不是血清群 W135 的糖，分析步骤 (b) 的葡萄糖结果；

或 (iii) 如果组合物同时含有血清群 W135 的糖和血清群 Y 的糖，分析步骤 (b) 的葡萄糖和半乳糖联合结果。

[0014] 因此，当联用血清群 C、W135 和 Y 的糖时，本发明可以分析唾液酸、葡萄糖和半乳糖含量。利用葡萄糖和半乳糖的结果分别直接定量血清群 Y 和 W135 的糖，从唾液酸含量中减去葡萄糖和半乳糖含量之和来定量血清群 C 的糖。因此，可以分辨这三种血清群，即使它们的单糖含量重叠。本发明人有利地发现可对同一物质进行这三种不同的单糖分析，而单糖之间无干扰和与组合物中其它糖类物质（例如，冻干稳定剂）无干扰。该方法可用于分析偶联疫苗中总糖和游离糖，简化含有多种血清群的荚膜糖的疫苗的质量控制。

[0015] 分析醛糖、氨基己糖和唾液酸混合物而无干扰的方法已有描述 [22]，但该方法依赖于酶处理和化学衍生。相反，本发明的方法不需要这些步骤，因此能更快更易进行。此外，参考文献 22 所述的条件不会存在分辨具有相同单糖单元的不同糖的固有问题。

[0016] 本发明也提供了适用于执行本发明方法的计算机设备。具体地说本发明提供分析上述组合物中糖含量的计算机程序，包括用于以下操作的程序模块：(a) 接受样品的唾液酸含量、葡萄糖含量和 / 或半乳糖含量的数据；和 (b) 从这些数据计算血清群 C 和血清群 W135 和 / 或 Y 的荚膜糖含量。本发明也提供包括保存了本发明计算机程序的计算机可读存储介质的计算机程序产品。

[0017] 血清群 C、W135 和 Y 的荚膜糖

[0018] 本发明方法是用于脑膜炎球菌荚膜糖混合物。所述混合物包含 (i) 血清群 C 和 (ii) 血清群 W135 和 Y 的一种或两种的荚膜糖，即 C+W135、C+Y 或 C+W135+Y。也可以存在其它糖。

[0019] 血清群 C 的荚膜糖是 ($\alpha 2 \rightarrow 9$)-连接唾液酸 (N-乙酰基神经氨酸或“NeuNAc”) 的均聚物。大多数血清群 C 菌株在唾液酸残基的 C-7 和 / 或 C-8 处含有 O-乙酰基，但约 15% 的临床分离物缺乏这些 O-乙酰基 [23、24]。乙酰化似乎不影响其保护性效力（例如，与 Menjugate™ 产品不同，NeisVac-C™ 产品利用脱 -O-乙酰基的糖，但两种疫苗均有效）。糖结构如图 13 所示，写成： $\rightarrow 9$ -Neu p NAc7/8OAc-($\alpha 2 \rightarrow$ 。

[0020] 血清群 W135 的糖是唾液酸 - 半乳糖二糖单元的均聚物。与血清群 C 的糖相似，它含有可变的 O-乙酰化，但是在唾液酸 7 和 9 位 [50]。其结构如图 14 所示，写成： $\rightarrow 4$)-D-N

eup5Ac(7/90Ac)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Gal- α -(1 \rightarrow).

[0021] 血清群 Y 的糖与血清群 W135 的糖类似,除了二糖重复单元含葡萄糖而不是半乳糖(参见图 16)。与血清群 W135 的糖相似,它在唾液酸 7 和 9 位含有可变化的 O-乙酰化[25]。血清群 Y(糖)的结构如图 15 所示,写成: \rightarrow 4)-D-Neup5Ac(7/90Ac)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Glc- α -(1 \rightarrow 。

[0022] 因此,在含有血清群 C、W135 和 Y 荚膜糖的组合物中有三种不同的构成单体(葡萄糖、半乳糖和唾液酸),这三种单体存在于水解后的混合物中。这种混合物中葡萄糖单体的含量与原初组合物中血清群 Y 糖的含量直接相关,半乳糖单体的含量与 W135 糖的含量直接相关。然而,对于血清群 C 情况更复杂:唾液酸是可用于定量血清群 C 糖的唯一单体,但测定的混合物中唾液酸含量将包括血清群 W135 和 Y 的糖产生的单体。本发明通过以下方法克服了该分析的复杂性:先测定混合物中半乳糖、葡萄糖和唾液酸各自的含量(分开和/或同时测定),然后(a)利用半乳糖含量来定量水解前血清群 W135 的含量;(b)利用葡萄糖含量来定量水解前血清群 Y 的含量;(b)利用唾液酸含量与葡萄糖半乳糖含量之和的差异来定量水解前血清群 C 的含量,即根据唾液酸的摩尔量减去(葡萄糖+半乳糖)的摩尔量来计算血清群 C 的摩尔量。从唾液酸的摩尔含量中减去葡萄糖和半乳糖的摩尔含量纠正了血清群 W135 和 Y 的干扰,只得到血清群 C 的唾液酸(含量)。

[0023] 本发明可用于分析长度不同的荚膜糖。例如,MenjugateTM 和 MeningitecTM 含有全长血清群 C 的多糖的按分子大小选择的片段(寡糖),而 NeisVac-CTM 利用全长多糖。寡糖和/或全长的多糖均可利用本发明(测定)。寡糖的聚合程度(DP)低于细菌中存在的天然荚膜多糖所发现的程度,其平均值可以是 DP<30,例如 10-25 之间。DP 不难通过离子交换层析或比色试验测定[26]。

[0024] 分析单糖含量

[0025] 本发明的方法包括分析唾液酸、半乳糖(如果存在血清群 W135)和葡萄糖(如果存在血清群 Y)含量的步骤。如果某种方法可用于监测组合物中单糖单元的存在(例如,简单地监测生产早期残留的单糖,或监测偶联物中可能水解释放的单体),则可直接应用于该组合物。然而,该方法一般用于检测组合物中糖的总含量,所以在分析前要水解组合物为单糖。因此,本发明方法通常包括处理组合物以解聚荚膜糖从而得到它们的组成单糖的步骤。然后分析解聚混合物所释放的单糖的唾液酸含量和半乳糖和/或葡萄糖含量。

[0026] 将荚膜糖解聚为它们的组成单糖的条件为本领域所知。例如,可用 100mM

[0027] HCl80 $^{\circ}$ C 处理 2 小时来水解血清群 C 的糖分析糖的总含量[27]。利用三氟乙酸(TFA)进行酸水解可用于水解所有的血清群 C、W135 和 Y,就血清群 C 而言,培育温度应稍低以免其唾液酸降解(90 $^{\circ}$ C 而非 100 $^{\circ}$ C)。典型的 TFA 处理包括将 TFA 加入至终浓度 2M,然后加热至 90-100 $^{\circ}$ C,持续 90 分钟。解聚后,可干燥糖水合物,例如利用真空干燥器。

[0028] 解聚后,组合物含有血清群 C 和 W135 和/或 Y 的混合单糖。混合物中这些单糖的含量与水解前原初组合物中这些糖的含量直接相关,所以可如上所述测定原始糖的含量。可根据分子、质量、比例或浓度的数量(例如,摩尔量)来测定含量。一般以摩尔量进行(测定),因为唾液酸与葡萄糖/半乳糖的分子量不同,但可利用和互换这些量度来评估混合物中的糖含量。为定量检测,可将分析结果与某具体糖含量已知的标准品进行比较。

[0029] 优选将解聚的混合物完全水解为单糖。发明人发现有时会发生不完全水解,得到

的混合物中存在二糖片段（即，MenW135 的 Gal-NeuNAc 和 MenY 的 Glc-NeuNAc）。然而，单糖以正确的理论比例释放，二糖不会干扰单糖的分析，所以它们的存在不会造成麻烦。

[0030] 可通过用已知技术，例如 NMR、质谱等检测混合物的聚合程度（DP）来核查解聚的进程（例如核查全部水解为单糖而非部分水解为寡糖）。

[0031] 定量葡萄糖、半乳糖和唾液酸单糖的方法为本领域所熟知。这些方法可以是直接或间接的（例如，这些方法可包括衍生单糖，然后分析与原初单糖含量的相关性）。这些方法可包括使两种 / 三种不同的单糖互相分离，然后分别分析，在这种情况下，由于分离导致了特异性，单糖含量的实际测定在每种情况中可以相同。然而，优选采用在有其它单糖存在时能分析某单糖的方法，因此这些方法无需在分解前将这些糖相互分开。此外，这些方法可用于偶联糖，其中在解聚后无需将载体与糖分开。一种优选的方法是阴离子层析，特别是高效阴离子交换层析（HPAEC），通常联用脉冲电流分析检测（PAD）[28, 29]。HPAEC-PAD 系统由 Dionex™ Corporation (Sunnyvale, CA) 提供，例如 BioLC™ 系统，该系统采用诸如 PA1 [直径 10 μm 的聚苯乙烯基质，与二乙烯基苯交联度为 2%，与 500nm MicroBead 季铵功能化的乳胶凝聚（交联度 5%）] 或 PA10 [直径 10 μm 的乙基乙烯基苯基质，与二乙烯基苯交联度为 55%，与 460nm MicroBead 双功能季铵离子凝聚（交联度 5%）] 柱。这些系统能定量分析混合物中的每种糖而无需衍生或在分析前分离。就糖类分析而言，在加入柱前需要滤去其它化合物，Dionex™ 生产了用于此目的的预柱捕获器和保护装置（guard），例如用于除去氨基酸的氨基酸捕获装置和硼酸盐捕获器等。

[0032] 定量测定解聚混合物中葡萄糖、半乳糖和唾液酸单糖的另一方法是核磁共振法（NMR）。然而，为便于使用和高灵敏度起见，优选本发明的层析方法。

[0033] 唾液酸含量和葡萄糖和 / 或半乳糖含量测定后，简单地比较混合物中每种单糖的摩尔量，即可计算出原初组合物中荚膜糖的含量。

[0034] 本发明的方法一般是破坏性的。因此，不能对全部组合物实施该方法，更通常是从感兴趣的组合物中取一样品，然后分析该样品。

[0035] 偶联物

[0036] 本发明可用于分析疫苗，特别是含有偶联糖的疫苗中糖的含量。共价偶联可通过将糖从 T- 细胞不依赖性抗原转变为 T- 细胞依赖性抗原、引发免疫记忆而提高了糖的免疫原性。偶联对儿科疫苗特别有用，它是熟知的技术 [例如，参考文献 30-39 所总结的]。糖可直接与载体相连 [40, 41]，但通常利用接头或间隔臂，例如脂肪酸、β- 丙酰胺 [42]、硝基苯基- 乙胺 [43]、卤代酰卤 (haloacylhalide) [44]、糖苷键 [45]、6- 氨基己酸 [46]、ADH [47]、C₄-C₁₂ 组分 [48] 等。

[0037] 偶联物中的运载体蛋白通常是细菌毒素或类毒素，例如白喉类毒素或破伤风类毒素。CRM₁₉₇ 白喉毒素衍生物 [49-51] 是 Menjugate™ 和 Meningitec™ 中的载体蛋白，而破伤风类毒素用于 NeisVac™ 中。白喉类毒素用作 Menactra™ 中的载体。其它已知的载体蛋白包括脑膜炎奈瑟球菌外膜蛋白 [52]、合成的肽 [53, 54]、热激蛋白 [55, 56]、百日咳蛋白 [57, 58]、细胞因子 [59]、淋巴因子 [59]、激素 [59]、生长因子 [59]、含各种病原体衍生抗原的多种人 CD4⁺T 细胞表位的人工蛋白 [60]、流感嗜血杆菌的 D 蛋白 [61, 62]、肺炎球菌表面蛋白 PsPA [63]、铁摄取蛋白 [64]、艰难梭菌 (C. difficile) 的毒素 A 或 B [65] 等。组合物可利用多种载体蛋白以降低载体抑制的风险，一种载体蛋白可携带多种糖抗原 [66]。偶联物的

糖:蛋白之比(w/w)一般在1:5(即,蛋白过量)和5:1(即糖过量)之间。除偶联物之外,组合物还可含有游离载体蛋白[67]。

[0038] 总体上,可用本发明的两种方式分析含有偶联糖的组合物。第一,可测定组合物中每种血清群糖的总浓度,例如测定疫苗释放前(出于调节或质量控制目的),或者核查偶联物混合后的浓度。第二,可测定组合物中游离的未偶联糖,例如核查不完全偶联(的情况),或通过监测游离糖随时间的增加来跟踪偶联物水解。通过进行此两类分析,可估计每种血清群的游离糖与总糖含量之比,该比例可用于调节或质量控制目的。总体上,需要保证疫苗所含每种游离形式的糖<25%(例如<20%、<15%、<10%等)。游离糖水平高意味着偶联物的免疫原性剂量较低。

[0039] 因此,本发明提供一种分析组合物的方法,其中:

[0040] (a) 所述组合物含有脑膜炎奈瑟球菌血清群C的荚膜糖的偶联物和以下一种或两种:(i) 脑膜炎奈瑟球菌血清群W135的荚膜糖的偶联物;和/或(ii) 脑膜炎奈瑟球菌血清群Y的荚膜糖的偶联物;

[0041] (b) 所述组合物可含有未偶联形式的荚膜糖;

[0042] (c) 通过上述本发明方法测定任何未偶联的荚膜糖的含量;

[0043] (d) 通过上述本发明方法测定偶联的荚膜糖的含量;和,任选的:

[0044] (e) 计算一种或多种荚膜糖的偶联:未偶联糖之比。

[0045] 步骤(c)和(d)可以任一顺序进行或同时进行。

[0046] 本发明也提供一种释放医生所用疫苗的方法,包括以下步骤:(a) 制备含有脑膜炎奈瑟球菌血清群C的荚膜糖的偶联物和以下一种或两种:(i) 脑膜炎奈瑟球菌血清群W135的荚膜糖的偶联物;和/或(ii) 脑膜炎奈瑟球菌血清群Y的荚膜糖的偶联物;(b) 分析疫苗中每种所述荚膜糖的偶联和/或未偶联糖含量;和如果步骤(b)的结果表明糖含量可为临床应用所接受,则(c) 释放医生所用的疫苗。步骤(b)包括评价最低糖浓度(例如,每种血清群1-20 μ g的总糖浓度之间),评价未偶联:偶联糖之比(例如,以重量计未偶联糖 \leq 20%,优选 \leq 10%或 \leq 5%)等。可对包装好的疫苗,或者包装前的散装疫苗实施步骤(b)。

[0047] 为分别评估偶联与未偶联的糖,必须将它们分开。可以各种方法将水相组合物中的游离(即,未偶联的)糖与偶联糖分开。偶联反应改变了糖的各种化学和物理参数,可利用这些差异来分离糖。例如,可利用分子大小分离游离和偶联糖,因为偶联物质因载体蛋白而具有较大分子量。超滤是优选的分子大小分离方法,可使游离糖通过具有合适截断值(例如,CRM₁₉₇载体为30kDa)的超滤膜,而保留偶联物。另一方法是利用可保留偶联物而游离糖可通过成为洗脱液流出的柱或膜的固相提取法(SPE)。SPE更为快速且一致,但分子大小分离应用得更普遍。另一方法是,如果将偶联物吸附到辅佐剂上,则可离心分离吸附的偶联物(沉淀物)与水解后解吸的游离糖(上清液)。

[0048] 因此,可将游离的糖与总糖分开而分别分析,从而可测定组合物中非偶联物质的含量。比较游离(糖)含量与总(糖)含量比分别分析分离后两种(糖)合并物要容易,特别是如果在分离期间偶联物质能保留在支持物上。

[0049] 其它荚膜糖组分

[0050] 本发明能分析含有脑膜炎奈瑟球菌血清群C和W135和/或Y的荚膜糖的组合物。

本发明也可用于分析含有其它荚膜糖,例如脑膜炎奈瑟球菌血清群 A 的荚膜糖、b 型流感嗜血杆菌荚膜糖等的组合物。

[0051] 脑膜炎球菌血清群 A 的荚膜糖是在 C3 和 C4 位部分 O-乙酰化的 ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-连接的 N-乙酰基-D-甘露糖胺-1-磷酸的均聚物(图 17)。可用封闭基团取代乙酰基以防水解 [17],这种修饰的糖仍然是本发明意义中的血清群 A 糖。如以上其它血清群所述,血清群 A 的荚膜糖的解聚条件已知 [21],例如用 TFA 在 100°C 水解。另一方法包括 Dowex50H+,然后在 100°C 加热 1 小时 [68]。所释放的甘露糖胺磷酸单体可用例如 HPAEC-PAD 与葡萄糖、半乳糖和唾液酸平行分析 [21]。

[0052] Hib 荚膜糖是核糖、核糖醇和磷酸酯的聚合物。该糖称为“PRP”(聚-3-D-核糖-(1,1)-D-核糖醇-5-磷酸),如图 18 所示。将 PRP 解聚为单糖用于 HPAEC-PAD 或 ^{31}P -NMR 分析的方法已知,例如室温与 NaOH 温育过夜 [20]。所释放的核糖与核糖醇可与葡萄糖、半乳糖和唾液酸平行分析。

[0053] 血清群 C 荚膜多糖是 ($\alpha 2 \rightarrow 9$)-连接的唾液酸的均聚物(也称为多聚乙酰神经氨酸)。本发明所分析的组合物优选不含有任何其它的唾液酸均聚物,例如脑膜炎球菌血清群 B 的荚膜糖 ($\alpha 2 \rightarrow 8$ 连接的唾液酸)或大肠杆菌 K12 的荚膜糖 ($\alpha 2 \rightarrow 8$ 和 $\alpha 2 \rightarrow 9$ 连接)。一般地说,如果待分析的组合物包含含有葡萄糖、半乳糖或唾液酸单体的荚膜糖,为了有助于混合(物)的分析,此种荚膜糖优选也含有只有该糖才有的其它单体(混合物内)。甚至当这些糖之间具有相同的单体时,存在独特的单体使得可用与分辨脑膜炎球菌血清群 C、W135 和 Y 的所述相同的原理来平行分析不同的糖。

[0054] 非荚膜糖组分

[0055] 当本发明依赖得自待分析组合物的混合物的单糖分析时,该组合物优选不含有游离形式的该单糖(除了得自荚膜糖水解释的任何背景单糖外)。例如,待分析组合物中含有游离的唾液酸会过高估计血清群 C 的含量。如果含有二糖等,然后水解,也适用同样的原理,例如存在蔗糖(葡萄糖+果糖),或麦芽糖或海藻糖(均是两个葡萄糖)时会过高估计血清群 Y 的含量,存在乳糖(葡萄糖+半乳糖)时会过高估计 W135 和 Y(以及过低估计血清群 C)。

[0056] 然而,这些糖是疫苗制剂中常用的(例如,作为稳定剂 [69,70]),最大程度降低或避免这些干扰问题主要有两种方法。第一,可以测定这些成分的初始水平,然后从解聚混合物的测定水平中扣除。第二,可在分析前从组合物中除去这些组分,例如通过过滤或透析。可利用超滤膜来除去低分子量组分,例如用 1K 膜除去蔗糖(分子量:360)。

[0057] 待分析荚膜糖中也未发现的单糖的存在通常不导致干扰问题。例如,疫苗中可能存在作为冻干稳定剂的糖醇 [71],但 HPAEC-AED 能区分样品单糖和相应的多元醇单糖,例如甘露糖(产气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) 荚膜中发现 [72])和甘露醇(稳定剂)单糖以及核糖与核糖醇 [73]。

[0058] 非糖成分的分析

[0059] 该方法可包括对其它组分或性质的分析,例如重量克分子渗透浓度、pH、每种糖或偶联物的聚合程度、蛋白质含量(特别是运载体蛋白)、铝含量、洗涤剂含量、防腐剂含量等,以及组合物中糖含量的分析。

[0060] 本发明提供制备疫苗组合物的方法,包括分析本发明组合物的步骤,包括测定 pH

的步骤,然后将组合物的 pH 调节至所需值的步骤,例如 6-8 之间,或约 7。

[0061] 本发明提供包装疫苗的方法,包括以下步骤:(a) 制备含有脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖偶联物和一种或两种以下偶联物的散装疫苗:(i) 脑膜炎奈瑟球菌血清群 W135 的荚膜糖偶联物;和/或(ii) 脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y 的荚膜糖偶联物;(b) 分析散装疫苗中每种所述荚膜糖的偶联和/或未偶联糖的含量;(c) 任选分析散装疫苗的 pH 和/或其它性质;和如果步骤(b)和(c)的结果表明散装疫苗可为临床应用所接受,则(d)将散装疫苗制备并包装为人用疫苗。步骤(c)包括(见上文)评价最低糖浓度,评价未偶联:偶联糖之比等。步骤(d)可包括包装成单位剂型或多剂型,例如装入小瓶或注射器中。用于注射的典型人用剂量体积是 0.5ml。

[0062] 在步骤(c)和/或(d)之前将散装疫苗与一种或多种其它抗原混合,例如与以下抗原混合

[0063] - 脑膜炎奈瑟球菌血清群 A 的荚膜糖抗原。

[0064] - 脑膜炎奈瑟球菌血清群 B 的蛋白质抗原。

[0065] - 脑膜炎奈瑟球菌血清群 B 的微泡囊 [74]、“天然 OMV” [75]、细胞泡或外膜泡囊 [例如,参考文献 76 到 81 等] 的制剂。

[0066] -b 型流感嗜血杆菌糖抗原。

[0067] - 肺炎链球菌抗原,例如多价偶联的糖抗原 [例如,参考文献 82 到 84]。

[0068] - 甲肝病毒抗原,例如灭活的病毒 [例如,85,86]。

[0069] - 乙肝病毒抗原,例如表面和/或核心抗原 [例如,86,87]。

[0070] - 百日咳博德特菌 (*Bordetella pertussis*) 抗原,例如百日咳博德特菌的百日咳全毒素 (PT) 和丝状血凝素 (“FHA”),任选与 pertactin 和/或凝集原 2 和 3 联用 [例如,参考文献 88 和 89]。可以利用百日咳细胞抗原。

[0071] - 白喉抗原,例如白喉类毒素 [参考文献 1 的第 13 章],例如 CRM₁₉₇ 突变体 [例如,90]。

[0072] - 破伤风抗原,例如破伤风类毒素 [参考文献 1 的第 27 章]。

[0073] - 脊髓灰质炎抗原 [例如,91,92],例如 IPV。

[0074] 这类抗原可以吸附到铝盐佐剂上(例如,氢氧化铝或磷酸铝)。优选含有任何其它糖抗原作为偶联物。

[0075] 批次的一致性

[0076] 就人用疫苗制备而言,偶联的糖在偶联前(例如,糖和载体蛋白)、偶联后、配制后与混合后应进行质量控制。脑膜炎球菌血清群 C、W135 和 Y 的荚膜糖在混合后,基于单糖分析的现有技术方法不能用于区分它们,因为多种来源的唾液酸可导致干扰。然而,本发明的单糖分析方法可用于分析混合的偶联物。此外,本发明的方法可靠而一致,从而可正确比较不同批次的混合偶联物,而这利用现有技术方法不可能。因此,可制备、检验不同批次的混合偶联疫苗,然后选择最一致的批次用于释放和应用,而弃去异常的批次。

[0077] 本发明提供定量测定脑膜炎球菌至少两种不同血清群的荚膜糖(组分)混合物中每种血清群糖的方法,其中:(a) 所述不同血清群包括血清群 C 和一种或两种以下血清群:(i) 血清群 W135 和/或(ii) 血清群 Y;(b) 所述方法包括解聚混合物中的荚膜糖得到解聚混合物的步骤;和(c) 通过比较所述解聚混合物中单糖的组成来定量测定不同血清群

(糖)。

[0078] 本发明也提供 n 批疫苗,其中:(a) 所述 n 批疫苗中的每批含有:脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的荚膜糖的偶联物和一种或两种以下偶联物:(i) 脑膜炎奈瑟球菌血清群 W135 的荚膜糖偶联物;和/或(ii) 脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y 的荚膜糖偶联物;(b) 第一批中血清群 C 偶联糖的浓度是 C_1 ;(c) 第二批中血清群 C 偶联糖的浓度是 C_2 ;如果适用,(d) 第一批中血清群 W135 偶联糖的浓度是 W_1 ;如果适用,(e) 第二批中血清群 W135 偶联糖的浓度是 W_2 ;如果适用,(f) 第一批中血清群 Y 偶联糖的浓度是 Y_1 ;如果适用,(g) 第二批中血清群 Y 偶联糖的浓度是 Y_2 ;(h) C_1/C_2 、 W_1/W_2 和 Y_1/Y_2 的各自比例在 0.90 和 1.10 之间,优选各自比例在 0.95 和 1.05 之间;和(i)n 的值是 2 或以上(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或更大)。

[0079] (h) 中所述比例可以根据受比较每批的一份样品,但通常是根据每批的多份样品的平均值(例如平均值)而定。因此,对 n 批中的每批可取多个样品,可多次检测每份样品的 C_1 、 C_2 、 W_1 、 W_2 、 Y_1 和 Y_2 ,然后计算出每批的平均值,用该平均值计算所需比例。

[0080] 每批(或每组)疫苗可分开制备。例如,可通过不同地混合同一种散装偶联物或通过混合不同制备的一种散装偶联物来制备不同的两批。同一散装混合物的不同样品不是不同的批次,因为这些样品不会发生制备不同偶联物的混合物时所产生的差异而致的批次之间差异。

[0081] 除了上述(a)到(i)所述的特征外。所述 n 批(疫苗)的特征还在于:(j) 第一批中未偶联的血清群 C 糖的浓度是 C_3 ;(k) 第二批中血清群 C 未偶联糖的浓度是 C_4 ;如果适用,(l) 第一批中血清群 W135 未偶联糖的浓度是 W_3 ;如果适用,(m) 第二批中血清群 W135 未偶联糖的浓度是 W_4 ;如果适用,(n) 第一批中血清群 Y 未偶联糖的浓度是 Y_3 ;如果适用,(o) 第二批中血清群 Y 未偶联糖的浓度是 Y_4 ;(p) C_3/C_4 、 W_3/W_4 和 Y_3/Y_4 的各自比例在 0.90 和 1.10 之间,优选各自比例在 0.95 和 1.05 之间。这些批次的特征也在于:(q) C_3/C_1 、 C_4/C_2 、 W_3/W_1 、 W_4/W_2 、 Y_3/Y_1 和 Y_4/Y_2 的比例各自小于 0.20(例如,<0.15、<0.10、<0.05、<0.02、0)。

[0082] 通用术语

[0083] 术语“含有”包括“包括”以及“包含”,例如“含有”X 的组合物可排他性地由 X 组成或者可以包括其它的物质,例如 X+Y。

[0084] 词“基本上”不排除“完全”,例如“基本上不含”Y 的组合物可以完全不含 Y。如果需要,词“基本上”可从本发明的定义中省去。

[0085] 与数值 x 相关的术语“约”表示,例如 $x \pm 10\%$ 。

[0086] 应该理解糖环可存在开环和闭环形式,虽然本文的结构式显示了闭环形式,本发明也包括开环形式。

[0087] 附图简述

[0088] 图 1 和 2 显示了对采用甘露醇稳定剂冻干的脑膜炎球菌血清群 A 的偶联物的 HPAEC-PAD 分析(结果)。图 3 和 4 显示了采用蔗糖作为稳定剂的物质的类似分析(结果)。

[0089] 图 5 和 6 显示了对未冻干的血清群 Y 偶联物的类似分析(结果),图 7 和 8 显示了对血清群 W135 偶联物的相同分析(结果)。

[0090] 图 9 到 12 显示了对血清群 C、W135 和 Y 混合偶联物的 HPAEC-PAD 分析(结果)。

[0091] 图 13 到 15 显示了脑膜炎球菌血清群 C(13)、W135(14) 和 Y(15) 的荚膜糖的结构

式。图 16 显示了血清群 W135 和 Y 之间的差异。

[0092] 图 17 显示了脑膜炎球菌血清群 A 的荚膜糖的结构式。

[0093] 图 18 显示了 b 型流感嗜血杆菌荚膜糖的结构式。

[0094] 图 19 显示了在 6 个时间点时血清群 C(◆)、W135(■)和 Y(▲)混合偶联物中游离糖的变化。

[0095] 本发明的实施方式

[0096] 偶联物制备和层析方法

[0097] 如参考文献 7 所述制备了脑膜炎奈瑟球菌血清群 A、C、W135 和 Y 的荚膜糖抗原并与 CRM₁₉₇ 偶联。

[0098] 混合这四种偶联物得到水溶性“MenACWY”组合物。

[0099] 另外在蔗糖或甘露醇存在时冻干血清群 A 偶联物和制备血清群 C、W135 和 Y 偶联物的混合物 (“MenCWY”)。

[0100] 根据生产商的使用说明,在 Dionex™ HPAEC-PAD 层析系统上分析糖含量。该仪器具有梯度泵组件 (GP40 或 GP50)、脉冲电流分析检测器 (ED40 或 ED50) 和自动进样器 (AS3500 或 AS50)。通过测定糖在金工作电极 (以 Ag/AgCl 为参比电极) 表面氧化所产生的电流来检测糖。采用以下设置施加三相 - 电位波形 :E1 = 0.05V ;t1 = 400ms ;E2 = 0.75V ;t2 = 200ms ;E3 = -0.15V ;t3 = 400ms)。在施加 E1 期间对 200 到 400ms 进行积分。利用 PeakNet6.4 数据还原软件积分并处理层析数据。

[0101] 血清群 A

[0102] 将血清群 A 糖的甘露醇冻干制剂在 4℃ 保存 3 个月后用 HPAEC-PAD 检验。用 C4 固相提取 (SPE) 柱分离含偶联物的组合物与游离糖。用 TFA 在 100℃ 酸水解含游离糖的溶液 2 小时。然后用 PA1 防护装置、将混合物加入 Dionex™ CarboPac PA1 柱上进行梯度洗脱和 PAD 检测来检测甘露糖胺 -6- 磷酸。结果见图 1。

[0103] 进行相同的分析,但不用 SPE 分离游离的糖。该分析结果见图 2。鉴于图 1 分析采用了 1:2 的稀释液而图 2 分析采用了 1:5 的稀释液,图 1 和 2 的比较显示图 1 中甘露糖胺 -6- 磷酸峰远低于 (于图 2 的),表明该组合物中游离糖的水平低。定量分析显示每个小瓶有 10.7 μg 的总糖,其中有 3.7% 为游离糖。

[0104] 每瓶用 600 μl 水重建后,以同一方法分析蔗糖冻干的偶联物,然后合并样品,每次分析采用 2-3ml。在 SPE C4 之前,用 1K 膜超滤该组合物 (用 2ml 水洗涤、加入 2ml 样品溶液、每次用 2ml 水洗涤 3 轮、回收渗余物并将体积调节至 1ml,按 1:1 稀释得到最终 NaCl 浓度为 0.9% 的溶液用于 SPE 上样)。图 3 显示该组合物中游离糖可忽略不计,但大峰对应于偶联糖 (图 4)。

[0105] 血清群 W135 和 Y

[0106] 在与其它偶联物混合前分析散装的血清群 Y 偶联物。用 30kDa 超滤膜分离偶联物与游离糖。用 TFA100℃ 水解待分析的物质,然后根据生产商使用说明,用 CarboPac PA1 柱、氨基酸捕获装置、等度洗脱和再生步骤、和 PAD 检测在 Dionex™ 仪器上定量分析葡萄糖。将水解物加到柱上之前无需除去 CRM₁₉₇ 载体。可检测到未偶联糖 (图 5),但其丰度低于总葡萄糖 (图 6)。考虑到稀释度不同,解析这些图谱得出游离糖组分占 1.8%。以相同的方法处理并分析散装的血清群 W135 糖,但检测的是半乳糖而非葡萄糖 (图 7 和 8)。考虑到稀释

度不同,解析这些图谱得出游离糖组分占 6%。

[0107] 组合的偶联物

[0108] 如参考文献 7 所述,组合血清群 A、C、W135 和 Y 偶联物与磷酸铝佐剂。将在 4°C 保存 2 周的 MenCWY 偶联物组合用于重建冻干的 MenA 偶联物,48 小时后离心分离佐剂与偶联物进行分析。用 30kDa 膜两轮超滤分离组合的偶联物与游离糖。第二轮降低了有时见于进入第一轮渗透液的糖偶联物的污染。用 TFA90°C /100°C 酸水解检验超滤前后的糖,然后用 Dionex™ CarboPac PA1 柱分别进行两次 HPAEC-PAD 分析。

[0109] 就血清群 C 分析而言,该柱具有 CarboPac PA1 防护装置并采用梯度洗脱。该柱运行模式不能分辨葡萄糖和半乳糖,因为这样更快。结果见图 9 和 10。就血清群 W135 和 Y 而言,该柱具有氨基酸捕获装置并采用等度洗脱和再生,可分辨葡萄糖和半乳糖。结果见图 11 和 12。

[0110] 为计算每种不同糖的含量,通过扣除葡萄糖和半乳糖的合并含量来纠正图 9/10 分析中对唾液酸含量的干扰。该值给出了 MenC 浓度。然后利用图 11/12 分析中半乳糖和葡萄糖的含量来定量血清群 W135 和 Y。如上所述,图 11/12 中葡萄糖和半乳糖的合并含量可能因为水解不完全而与得自图 9/10 的含量不匹配,但这些差异不会影响总的分析。通过与含有已知量葡萄糖、半乳糖和唾液酸的标准品比较来计算含量。

[0111] 对偶联物中总的和游离的 MenC 糖的典型一式两份分析得到以下结果:

[0112]

样品	Glc+Gal (nmol/ml)	总的 SA	差异 (nmol/ml)	稀释度	MenC (µg/ml)	平均值	游离的 MenC
总糖	9.26	14.93	5.67	10×	17.5	17.6	<5%
	8.72	14.46	5.74		17.8		
游离糖	2.45	2.35	0.10	2×	<1.0	<1.0	
	2.53	2.33	0.20		<1.0		

[0113] ↑即,血清群 C 糖的浓度

[0114] 因此,尽管对血清群 C 糖缺乏独特的糖来定量,但本发明可以血清群 W135 和 Y 糖为背景定量检验该物质。

[0115] 图 9 和 11 的类似分析揭示了 MenACWY 组合物中每种游离糖的含量,游离糖以占组合物总糖的百分比表示。对于配制成含 10 µg/剂(即,20 µg/ml)每种糖的 MenCWY 组合物,在 1 年时期的不同时间点进行了该项分析。结果为:

[0116]

	时间 (周)	0	2	4	13	34	52	平均值	SD	CV
C	总糖 (µg/ml)	18.3	20.3	22.6	23.6	21.3	20.5	21.1	1.86	8.8
	游离糖 (%)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.2	5.0	-	-	-

[0117]

W	总糖 ($\mu\text{g/ml}$)	21.0	20.3	20.1	21.7	20.2	21.9	20.9	0.79	3.8
	游离糖 (%)	10.7	11.2	10.1	8.8	9.8	9.9	-	-	-
Y	总糖 ($\mu\text{g/ml}$)	19.5	17.3	17.0	18.7	19.1	22.4	19.0	1.94	10.2
	游离糖 (%)	5.6	6.7	5.3	6.3	5.3	10.8	-	-	-

[0118] SD = 标准偏差

[0119] CV = 差异系数, 即 $(\text{SD} / \text{平均值}) \times 100\%$

[0120] 图 19 显示了在 6 个时间点游离糖%的差异。

[0121] 在第二系列的实验中, 相对于先前工作将疫苗配制半剂量 (每剂含 $5\mu\text{g}$ 每种糖) 和四分之一剂量 (每剂含 $2.5\mu\text{g}$ 每种糖)。用本发明方法分辨该组合中不同的糖, 结果如下:

[0122]

		时间(月)	0	1	3	平均值	SD	CV
5 μg /剂(10 $\mu\text{g/ml}$)	C	总糖($\mu\text{g/ml}$)	8.0	9.1	8.2	8.43	0.59	7.0%
		游离糖(%)	<10.0	<10.0	<10.0	-	-	-
	W	总糖($\mu\text{g/ml}$)	9.4	9.8	8.9	9.37	0.45	4.8%
		游离糖(%)	<10.6	11.5	<10.6	-	-	-
	Y	总糖($\mu\text{g/ml}$)	10.5	12.3	11.2	11.33	0.91	8.0%
		游离糖(%)	<10.6	<10.6	<10.6	-	-	-

[0123]

		时间(月)	0	1	3	平均值	SD	CV
2.5 μg /剂(10 $\mu\text{g/ml}$)	C	总糖($\mu\text{g/ml}$)	4.1	4.3	5.5	4.63	0.76	16.3%
		游离糖(%)	<20.0	<20.0	<20.0	-	-	-
	W	总糖($\mu\text{g/ml}$)	4.7	4.4	5.2	4.77	0.40	8.5%
		游离糖(%)	<21.2	<21.2	<21.2	-	-	-
	Y	总糖($\mu\text{g/ml}$)	5.8	6.2	6.5	6.17	0.35	5.7%
		游离糖(%)	<21.2	<21.2	<21.2	-	-	-

[0124] 应该理解本发明只是经由实施例得到了描述, 可以作出改进形式而仍属于本发明的范围和构思内。

[0125] 参考文献 (其内容纳入本文作为参考)

[0126] 《疫苗》(Vaccines), (Plotkin 等编), 第四版, ISBN :0721696880。

[0127] Baker 等, (2003), JInfect Dis, 188 :66-73。

[0128] Theilacker 等, (2003), Infect Immun, 71 :3875-84。

[0129] 匿名, (2003), DrugsRD, 4 :383-5。

[0130] Jones, (2001), Curr Opin Investig Drugs, 2 :47-49。

[0131] W002/058737

- [0132] W003/007985
- [0133] Rennels 等, (2002), *Pediatr Infect DisJ*, 21 :978-979。
- [0134] Campbell 等, (2002), *J Infect Dis*, 186 :1848-1851。
- [0135] Costantino 等, (1992), *Vaccine*, 10 :691-698。
- [0136] Lieberman 等, (1996), *JAMA*, 275 :1499-1503。
- [0137] Darkes 和 Plosker, (2002), *Paediatr Drugs*, 4 :609-630。
- [0138] Ugozzoli, (2002), *J Infect Dis*, 186 :1358-61。
- [0139] Granoff 等, (1997), *Infect Immun*, 65 :1710-5。
- [0140] Paradise 和 Lindberg, (1996), *Dev Biol Stand*, 87 :269-275。
- [0141] Corbel, (1996), *Dev Biol Stand*, 87 :113-124。
- [0142] W003/080678
- [0143] Klug, (1996), *Dev Biol Stand*, 87 :263-267。
- [0144] Plumb 和 Yost, (1996), *Vaccine*, 14 :399-404。
- [0145] Tsai 等, (1994), *Vaccine*, 12 :700-706。
- [0146] Ricci 等, (2001), *Vaccine*, 19 :1989-1997。
- [0147] Yasuno 等, (1999), *Biosci Biotechnol Biochem*, 63 :1353-1359。
- [0148] Glode 等, (1979), *J Infect Dis*, 139 :52-56 ;
- [0149] W094/05325 ;美国专利 5, 425, 946
- [0150] 英国专利申请 0323103. 2
- [0151] Ravenscroft 等, (1999), *Vaccine*, 17 :2802-2816。
- [0152] Jumel 等, (2002), *Biotechnol Appl Biochem*, 36 :219-226。
- [0153] Hardy 等, (1988), *Anal biochem*, 170 :54-62。
- [0154] Wang 等, (1990), *Anal Biochem*, 190 :182-187。
- [0155] Ramsay 等, (2001), *Lancet*, 357 (9251) :195-196。
- [0156] Lindberg, (1999), *Vaccine*, 17 增刊 2 :S28-36。
- [0157] BATTERY 和 Moxon, (2000), *J R CollPhysicians Lond*, 34 :163-168。
- [0158] Ahmad 和 Chapnick, (1999), *Infect Dis Clin North Am*, 13 :113-133, vii。
- [0159] Goldblatt, (1998), *J. Med. Microbiol.* , 47 :563-567。
- [0160] 欧洲专利 0477508
- [0161] 美国专利 5, 306, 492
- [0162] W098/42721
- [0163] 《偶联物疫苗》(Conjugate Vaccines), (Cruse 等编), ISBN3805549326, 特别是第 10 卷 :48-114。
- [0164] Hermanson, (1996), 《生物偶联技术》(Bioconjugate Techniques), ISBN : 0123423368 或 012342335X。
- [0165] 美国专利 4, 761, 283
- [0166] 美国专利 4, 356, 170
- [0167] W000/10599
- [0168] Geveer 等, *Med. Microbiol. Immunol*, 165 :171-288, (1979)。

- [0169] [44J 美国专利 4, 057, 685
- [0170] 美国专利 4, 673, 574 ;4, 761, 283 ;4, 808, 700。
- [0171] 美国专利 4, 459, 286
- [0172] 美国专利 4, 965, 338
- [0173] 美国专利 4, 663, 160
- [0174] 匿名, (2002 年 1 月), Research Disclosure, 453077。
- [0175] Anderson, (1983), Infect Immun, 39(1) :233-238。
- [0176] Anderson 等, (1985), J Clin Invest, 76(1) :52-59。
- [0177] EP-A-0372501
- [0178] EP-A-0378881
- [0179] EP-A-0427347
- [0180] W093/17712
- [0181] W094/03208
- [0182] W098/58668
- [0183] EP-A-0471177
- [0184] W091/01146
- [0185] Falugi 等, (2001), Eur J Immunol, 31 :3816-3824。
- [0186] EP-A-0594610
- [0187] W000/56360
- [0188] W002/091998
- [0189] W001/72337
- [0190] W000/61761
- [0191] W099/42130
- [0192] W096/40242
- [0193] Lawrence 等, (2000), J Biol Chem, 23 :17869-17877。
- [0194] Paoletti 等, (2001), Vaccine, 19 :2118-2126。
- [0195] W000/56365
- [0196] W099/47174
- [0197] Yurewicz 等, (1971), J Biol Chem, 246 :5596-5606。
- [0198] Bardotti 等, (2000), Vaccine, 18 :1982-1993。
- [0199] W002/09643
- [0200] Katial 等, (2002), Infect Immun, 70 :702-707。
- [0201] W001/52885
- [0202] 欧洲专利 0301992
- [0203] Bjune 等, (1991), Lancet, 338(8775) :1093-1096。
- [0204] Fukasawa 等, (1999), Vaccine, 17 :2951-2958。
- [0205] W002/09746
- [0206] Rosenqvist 等, (1998), Dev. Biol. Stand., 92 :323-333。
- [0207] Watson, (2000), Pediatr Infect DisJ, 19 :331-332。

- [0208] Rubin, (2000), *Pediatr Clin North Am*, 47 :269-285, v。
- [0209] Jedrzejewski, (2001), *Microbiol Mol Biol Rev*, 65 :187-207。
- [0210] Bell, (2000), *Pediatr Infect Dis J*, 19 :1187-1188。
- [0211] Iwarson, (1995), *APMIS*, 103 :321-326。
- [0212] Gerlich 等, (1990), *Vaccine*, 8 增刊 :S63-68 和 79-80。
- [0213] Gustafsson 等, (1996), *N. Engl. J. Med.* , 334 :349-355。
- [0214] Rappuoli 等, (1991), *TIBTECH*, 9 :232-238。
- [0215] Del Giudice 等, (1998), *Molecular Aspects of Medicine*, 19 :1-70。
- [0216] Sutter 等, (2000), *Pediatr Clin North Am*, 47 :287-308。
- [0217] Zimmerman 和 Spann, (1999), *Am Fam Physician*, 59 :113-118, 125-126。

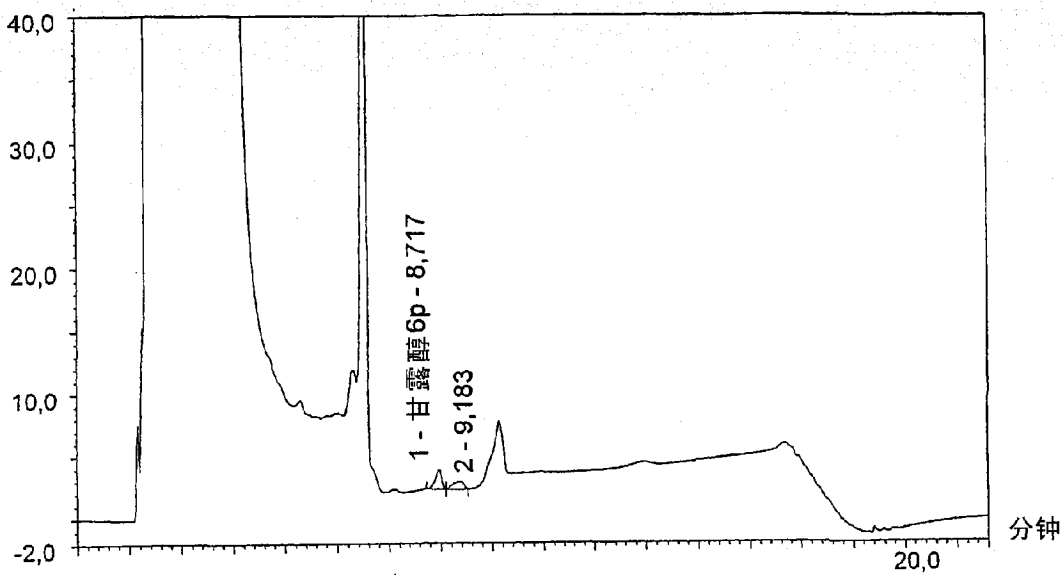


图 1

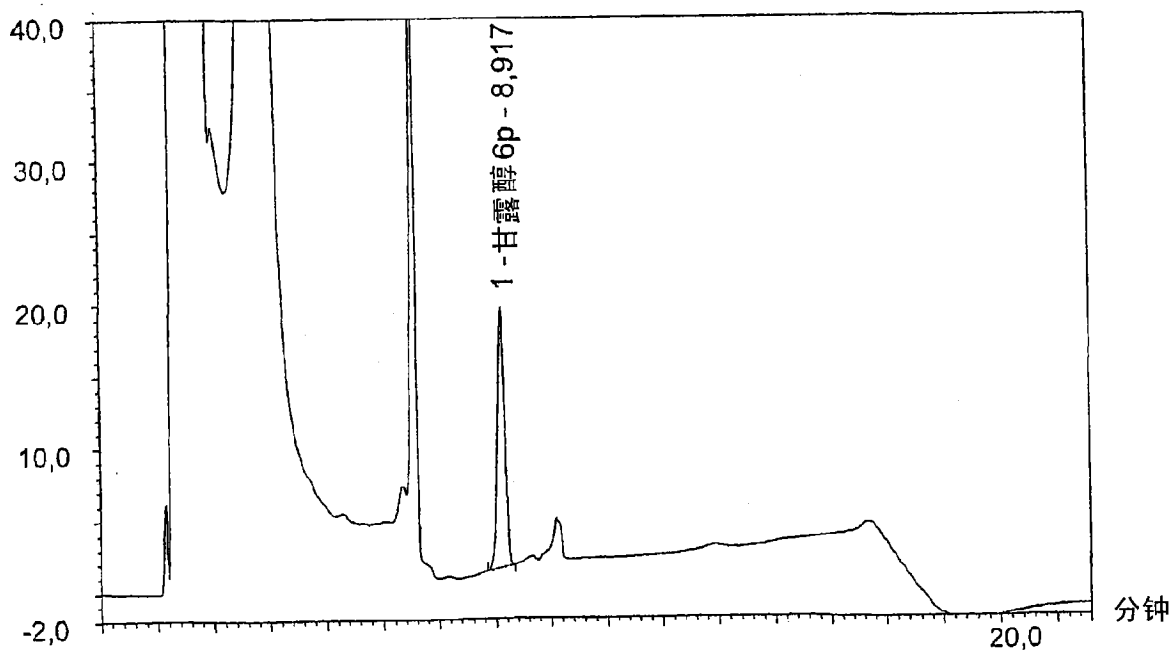


图 2

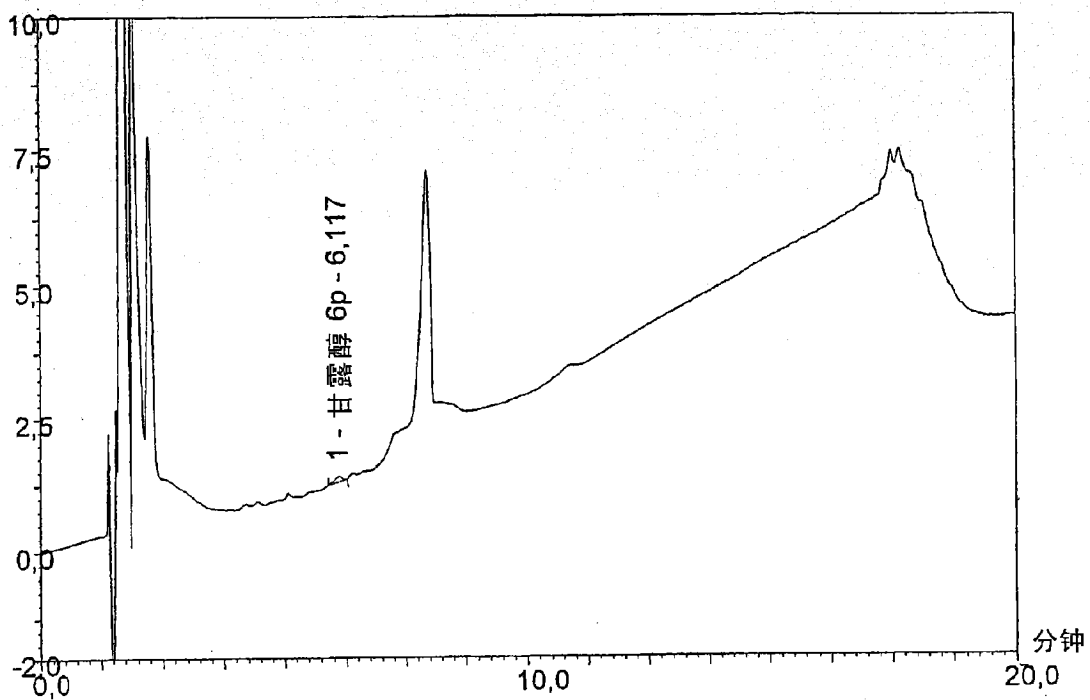


图 3

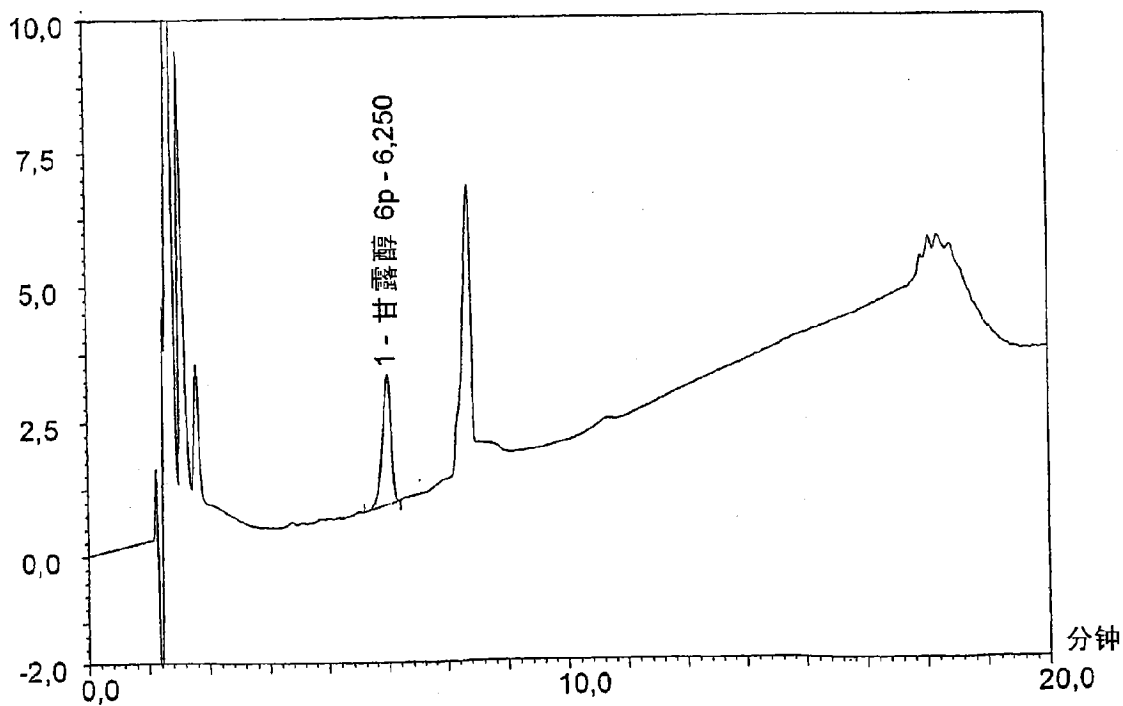


图 4

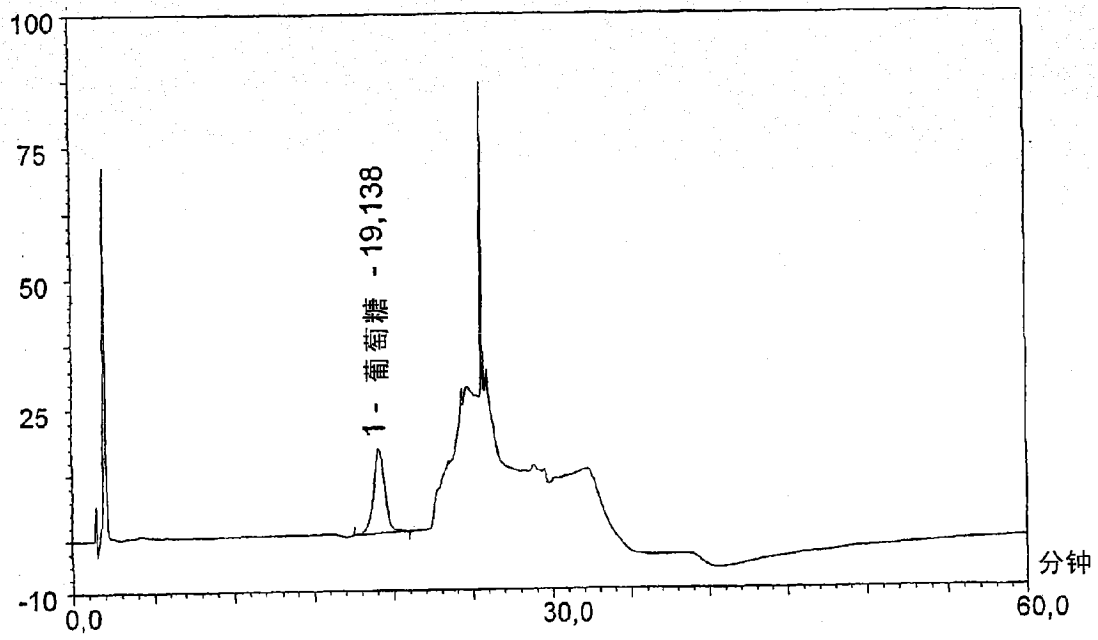


图 5

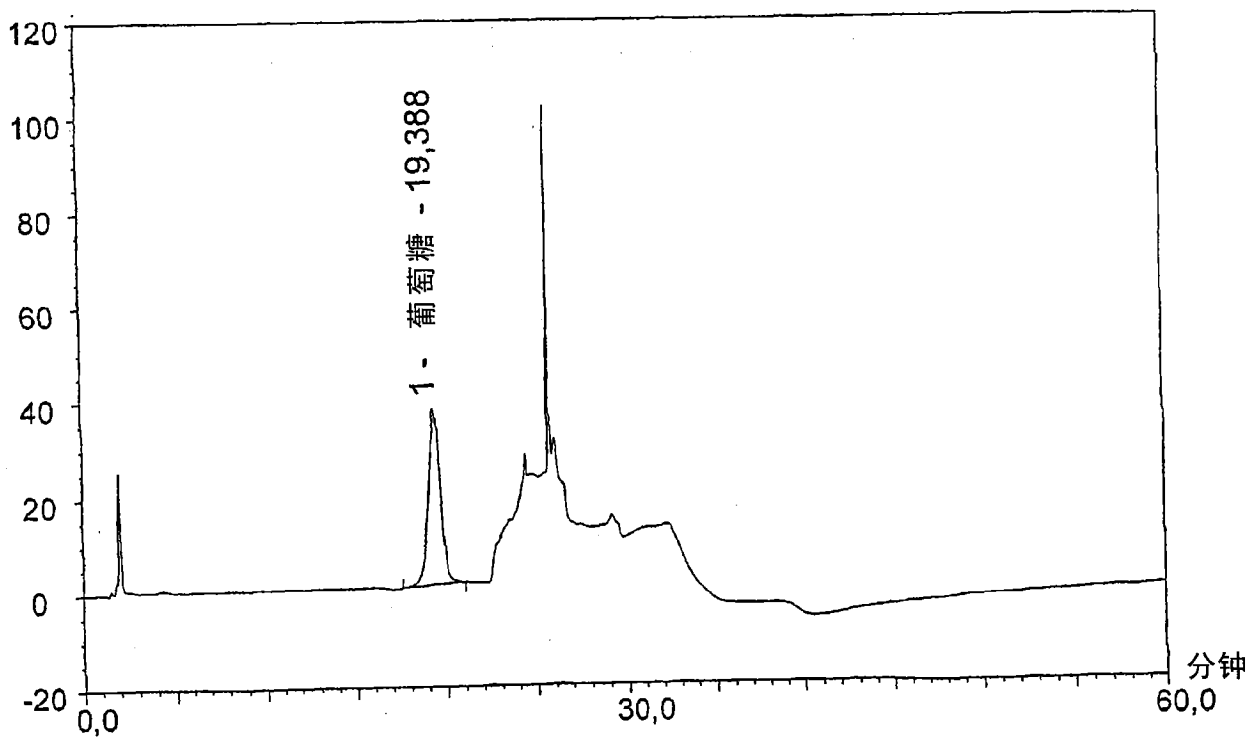


图 6

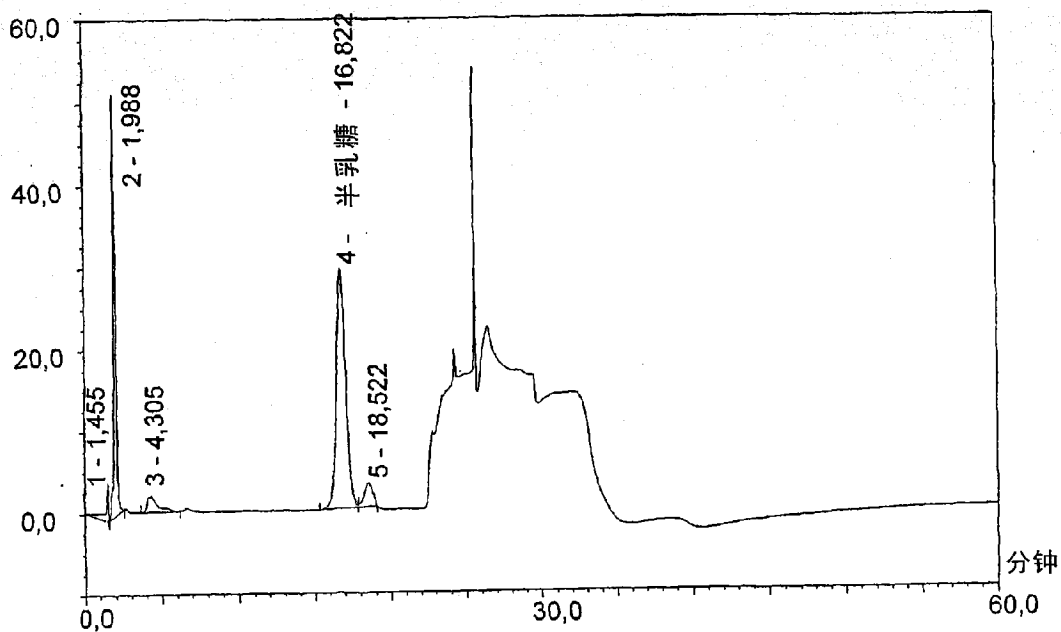


图 7

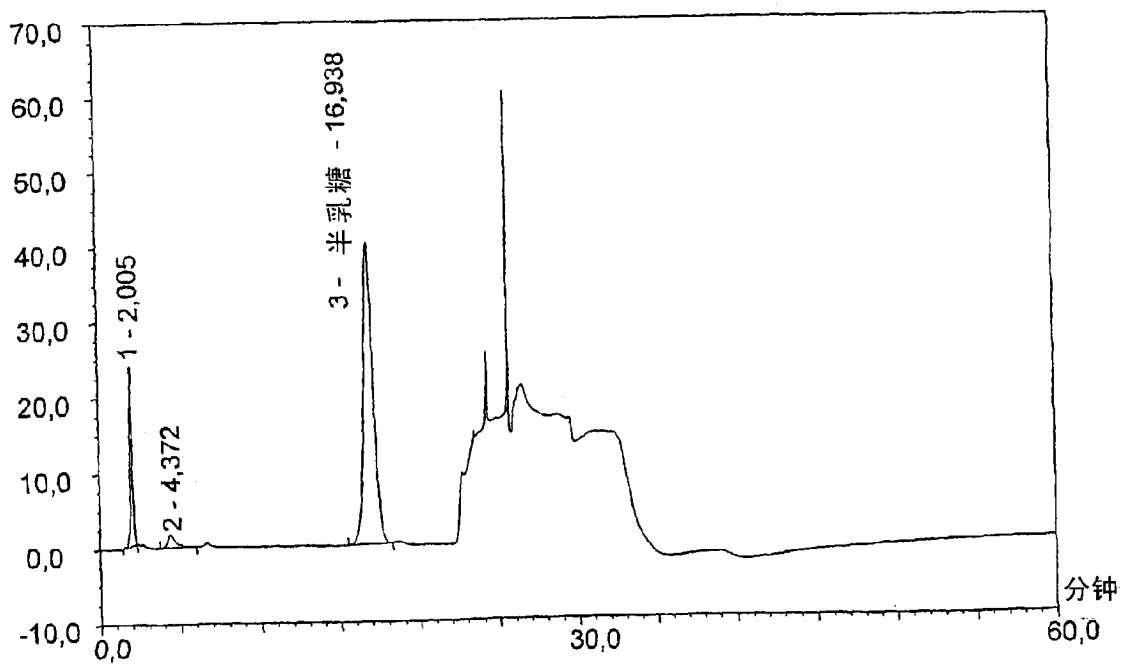


图 8

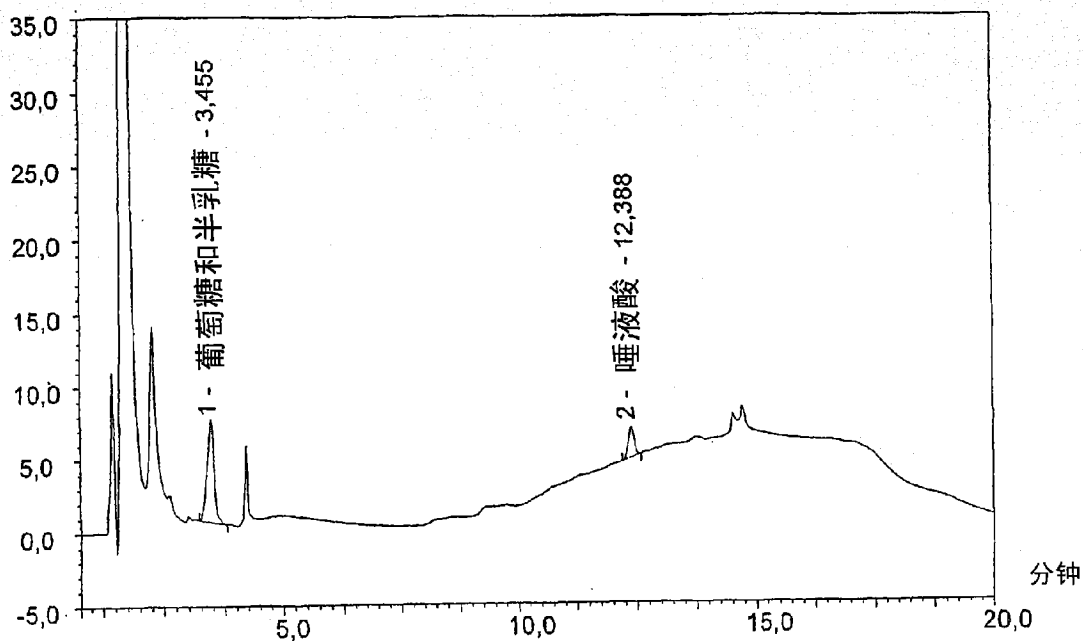


图 9

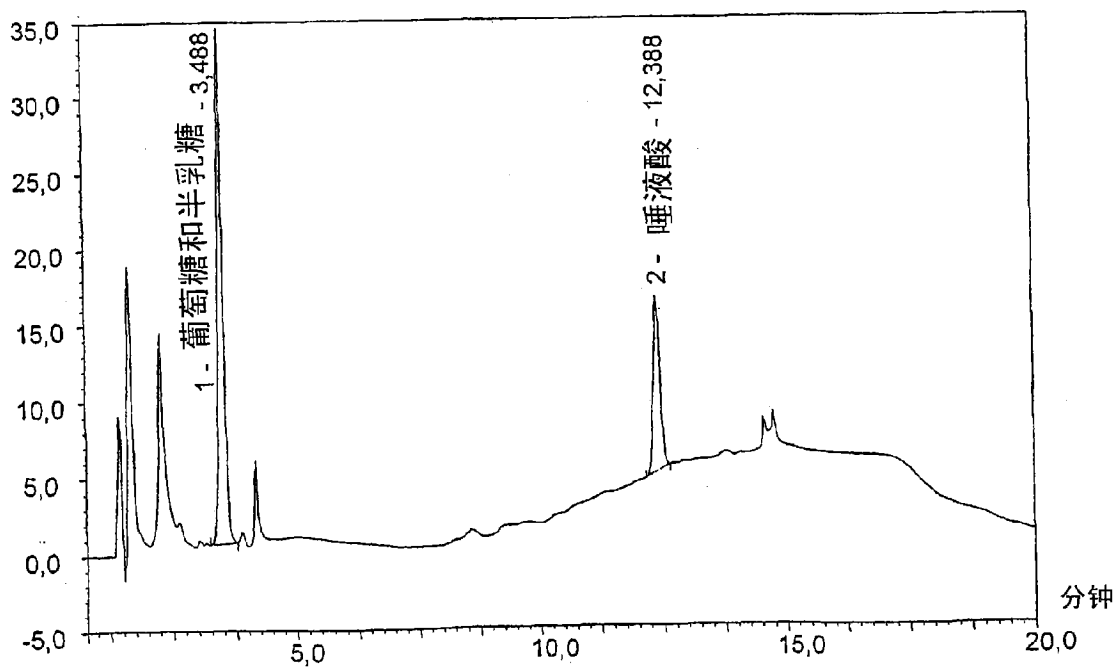


图 10

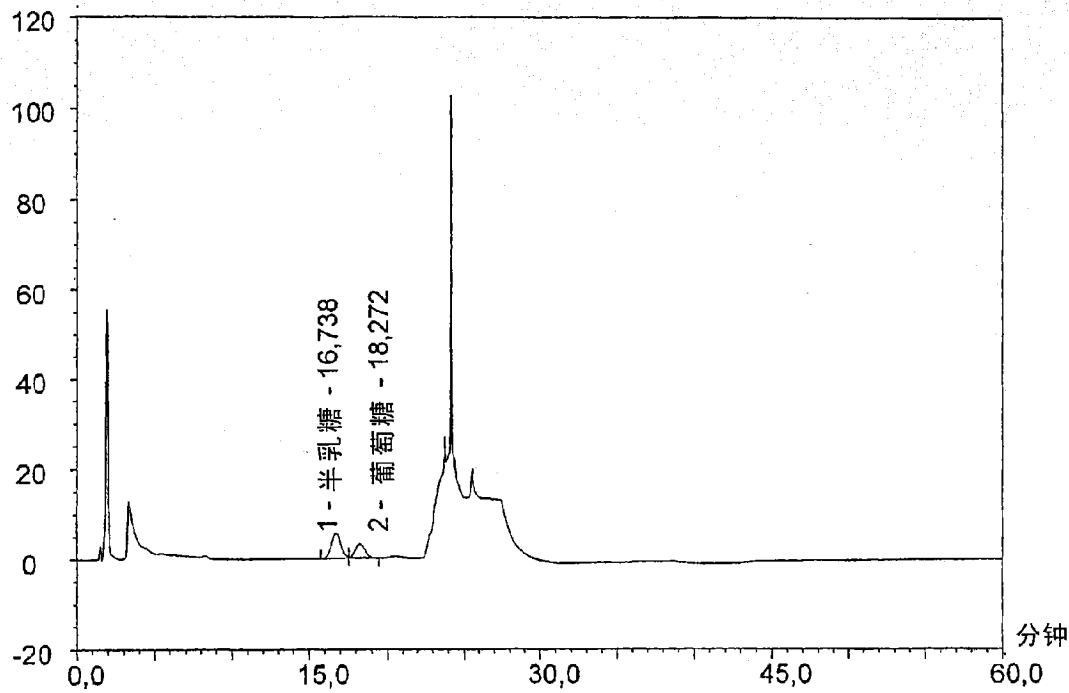


图 11

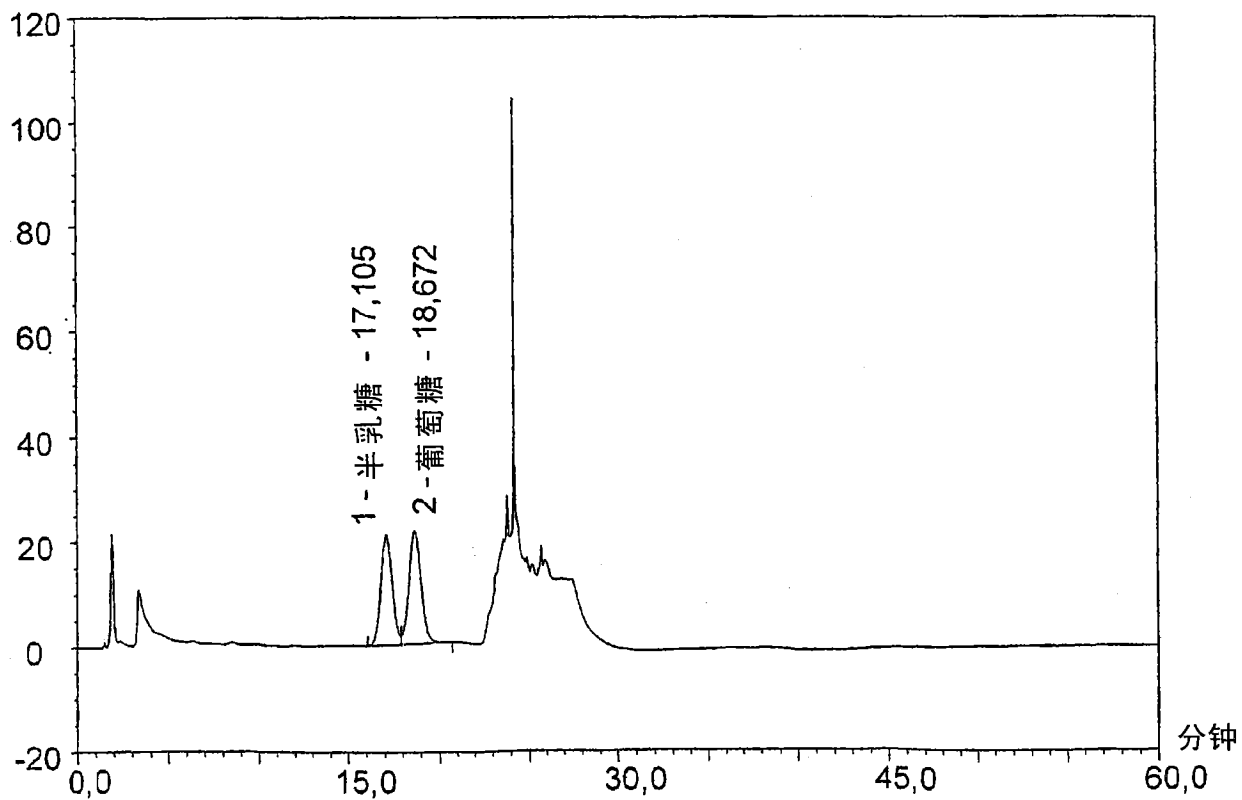


图 12

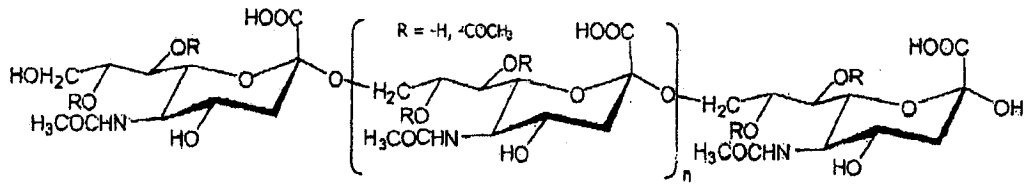


图 13

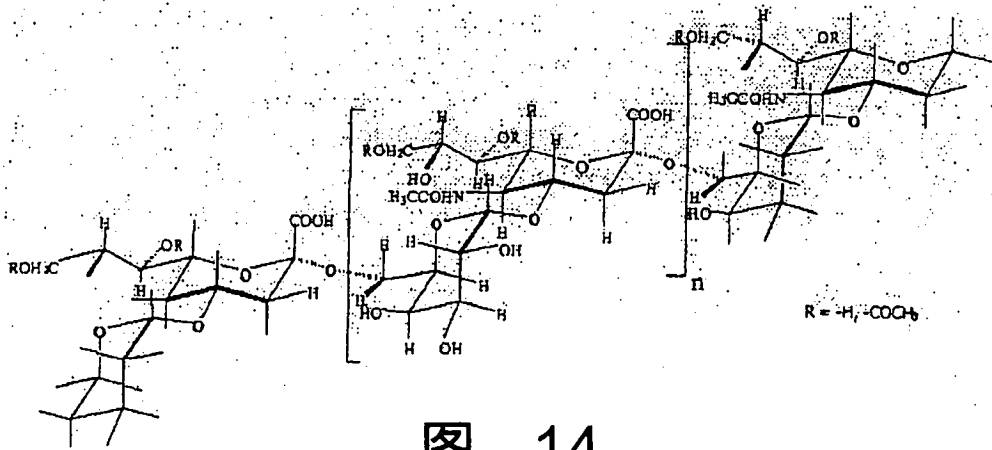


图 14

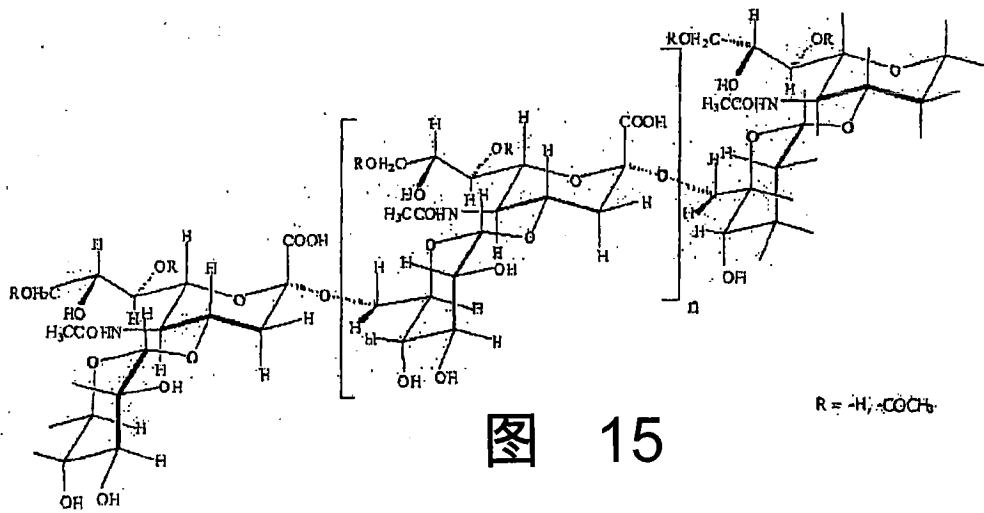


图 15

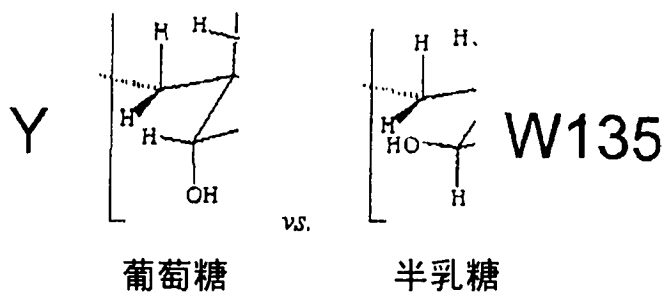


图 16

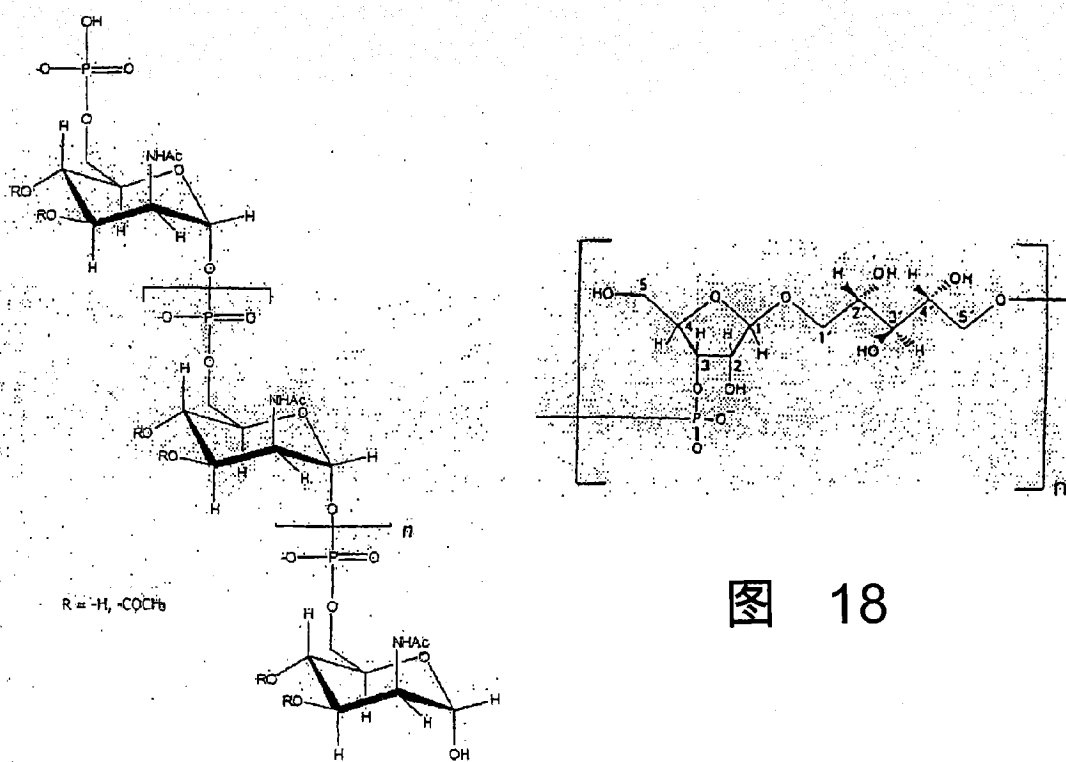


图 18

图 17

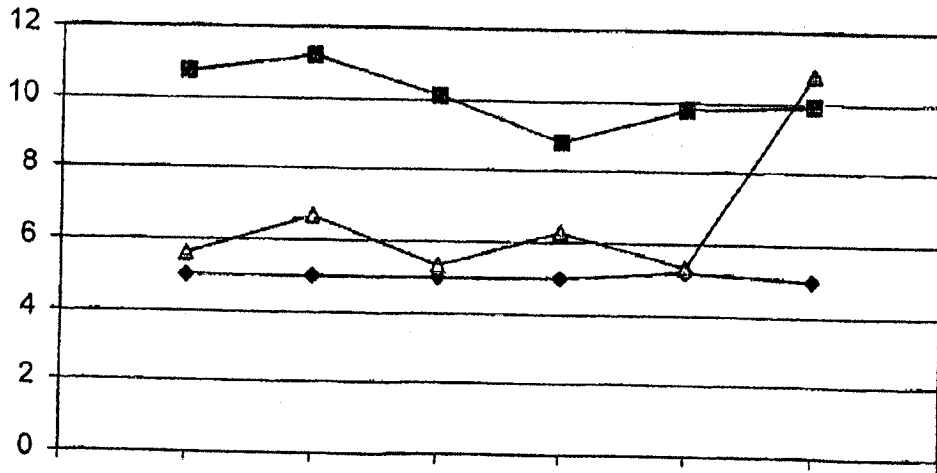


图 19

专利名称(译)	无干扰地分析糖疫苗		
公开(公告)号	CN1981195B	公开(公告)日	2012-07-04
申请号	CN200580015039.X	申请日	2005-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	希龙公司		
申请(专利权)人(译)	启龙有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺华疫苗和诊断有限公司		
[标]发明人	A巴多蒂 D普罗蒂 S里奇		
发明人	A·巴多蒂 D·普罗蒂 S·里奇		
IPC分类号	G01N33/548 G01N33/66 A61K39/095 G01N30/02 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/5308 G01N2400/10 G01N2333/22 G01N30/02 A61K2039/6087 A61K39/095 G01N33/56911 A61P31/04 A61P37/04 Y10T436/143333 B01D15/363		
优先权	2004006013 2004-03-17 GB		
其他公开文献	CN1981195A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明以分析多种血清群脑膜炎球菌混合糖的方法为基础，即使这些糖具有相同的单糖单元。本发明分析了血清群C、W135和Y的糖的组合物中的唾液酸、葡萄糖和半乳糖含量。葡萄糖和半乳糖结果可分别用于直接定量血清群Y和W135的糖，从唾液酸含量中扣除葡萄糖和半乳糖的合并含量而定量血清群C的糖。因此，可分辨这三种血清群，即使它们的单糖含量重叠。可分析同一物质中的三种不同单糖而不受单糖之间的干扰和该组合物中任何其它糖物质(例如，冻干稳定剂)的干扰。本方法可用于分析偶联疫苗中的全部糖和游离糖并简化了对含有多种血清群荚膜糖疫苗的质量控制。

