



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108904798 A

(43)申请公布日 2018.11.30

(21)申请号 201810786353.7

G01N 33/536(2006.01)

(22)申请日 2018.07.17

(71)申请人 成都安特金生物技术有限公司

地址 610000 四川省成都市高新区科园南路88号C1栋415

(72)发明人 王倩 罗丽娜 张建军 苏玉婷
钟正丹 王超 李银波 敬小兵
刘思利 凌燕 杨冬妮 黄放
王岩 薛平

(74)专利代理机构 北京驰纳智财知识产权代理
事务所(普通合伙) 11367

代理人 陈常美

(51)Int.Cl.

A61K 39/385(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

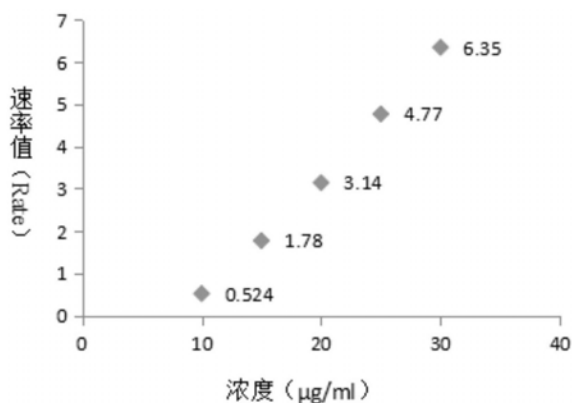
权利要求书2页 说明书25页 附图3页

(54)发明名称

一种多糖蛋白结合疫苗及其鉴别方法

(57)摘要

本发明涉及一种多糖蛋白结合物及其鉴别方法,以及根据上述多糖蛋白结合物制备的多糖蛋白结合疫苗及其鉴别方法。本发明的速率散射比浊法是一种基于免疫化学方法建立的技术手段,速率散射比浊法可测量悬浮于小杯中抗原抗体复合物聚集体颗粒所造成的散射光强度变化,并在几十秒内得出反应速率值。抗原抗体反应形成复合物聚集体颗粒,因抗原和/或抗体浓度的不同而速率不同。该法特异性强,灵敏度高,节约检测时间,且抗原抗体直接接触,有利于低浓度样品检测,可用于疫苗生产过程中原液和/或半成品和/或成品的鉴别。



1. 一种免疫原性多糖蛋白结合物,包括多糖和载体蛋白,其特征在于,所述多糖蛋白结合物是经过免疫速率比浊进行鉴别的,和/或,所述多糖蛋白结合物中多糖是经过免疫速率散射比浊进行鉴别的,和/或,所述多糖蛋白结合物中载体蛋白是经过免疫速率散射比浊进行鉴别的。

2. 根据权利要求1所述的免疫原性多糖蛋白结合物,其特征在于,所述免疫速率散射比浊至少包括将多糖蛋白结合物溶液与相应抗体接触形成抗原抗体复合物,再经免疫速率散射比浊测定生成抗原抗体复合物的反应速率值。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫原性多糖蛋白结合物,其特征在于,所述多糖蛋白结合物包括肺炎球菌荚膜多糖蛋白结合物、脑膜炎球菌荚膜多糖蛋白结合物、流感嗜血杆菌荚膜多糖蛋白结合物、伤寒沙门菌多糖蛋白结合物、金黄色葡萄球菌荚膜多糖蛋白结合物、隐球菌荚膜多糖蛋白结合物、链球菌荚膜多糖蛋白结合物、艰难梭菌荚膜多糖蛋白结合物、霍乱弧菌荚膜多糖蛋白结合物、肺炎克雷伯杆菌荚膜多糖蛋白结合物中的至少一种。

4. 根据权利要求1或2所述的免疫原性多糖蛋白结合物,其特征在于,所述多糖蛋白结合物中多糖包括肺炎球菌任一血清型荚膜多糖、脑膜炎奈瑟球菌任一血清群荚膜多糖、流感嗜血杆菌任一血清型荚膜多糖、伤寒沙门菌Vi多糖、金黄色葡萄球菌任一血清型荚膜多糖、隐球菌任一血清型荚膜多糖、链球菌任一血清群荚膜多糖、艰难梭菌任一血清群荚膜多糖、霍乱弧菌任一血清群荚膜多糖、肺炎克雷伯杆菌任一血清型荚膜多糖中的至少一种。

5. 根据权利要求1或2所述的免疫原性多糖蛋白结合物,其特征在于,所述多糖蛋白结合物中载体蛋白包括破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、白喉毒素无毒变异体(CRM₁₉₇)、B群脑膜炎球菌外膜蛋白(OMP)、肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌溶血素(Ply)、流感嗜血杆菌D蛋白(PD)、百日咳毒素(PT)、百日咳丝状凝血素(FHA)、百日咳黏附素(PRN)、霍乱毒素(CT)、胞壁酰二肽(MDP)、大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)、大肠杆菌耐热肠毒素(ST)、结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)、铜绿假单胞菌外毒素A(PEA)、卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)、破伤风毒素C片段(TTC)中的至少一种。

6. 一种鉴别免疫原性多糖蛋白结合物中多糖的免疫速率散射比浊方法,包括下列步骤:

- (1) 检测多糖抗原标准品与抗体反应速率值;
- (2) 改变反应时间检测抗原抗体反应速率值;
- (3) 标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值;
- (4) 测试多糖蛋白结合物供试样品。

7. 一种鉴别免疫原性多糖蛋白结合物中载体蛋白的免疫速率散射比浊方法,包括下列步骤:

- (1) 检测载体蛋白抗原参考品与抗体反应速率值;
- (2) 改变反应时间检测抗原抗体反应速率值;
- (3) 标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值;
- (4) 测试多糖蛋白结合物供试样品。

8. 一种多糖蛋白结合疫苗,包括免疫原性多糖蛋白结合物,免疫原性多糖蛋白结合物包括多糖和载体蛋白,其特征在于,所述多糖蛋白结合疫苗是经过免疫速率比浊进行鉴别

的,和/或,所述多糖蛋白结合疫苗中多糖是经过免疫速率散射比浊进行鉴别的,和/或,所述多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白是经过免疫速率散射比浊进行鉴别的。

9.一种鉴别多糖蛋白结合疫苗中多糖的免疫速率散射比浊方法,包括下列步骤:

- (1)检测多糖抗原标准品与抗体反应速率值;
- (2)改变反应时间检测抗原抗体反应速率值;
- (3)标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值;
- (4)测试多糖蛋白疫苗供试样品。

10.一种鉴别免疫原性多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白的免疫速率散射比浊方法,包括下列步骤:

- (1)检测载体蛋白抗原参考品与抗体反应速率值;
- (2)改变反应时间检测抗原抗体反应速率值;
- (3)标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值;
- (4)测试多糖蛋白结合疫苗供试样品。

一种多糖蛋白结合疫苗及其鉴别方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗领域,具体的涉及疫苗及疫苗的鉴别,尤其是一种免疫原性多糖蛋白结合物及其鉴别方法以及一种多糖蛋白结合疫苗及其鉴别方法。具体的涉及一种多糖蛋白结合疫苗及其鉴别方法。

背景技术

[0002] 疫苗接种是预防感染的有效措施,疫苗质量控制尤为重要。鉴别试验是利用药物的分子结构所表现的特殊化学行为(如进行化学反应、测定药物的理化常数等)或光谱、色谱、生物学等特征,来判断药品的真伪。药物的鉴别在药物质量检验工作中属首项工作。只有药物被鉴别无误、证实被分析药物组分正确后,才有必要进行检查和含量测定等分析工作。在结合疫苗中,多糖与蛋白载体共价偶联形成结合疫苗,可使多糖由T细胞非依赖型抗原转化成T细胞依赖性抗原,增强多糖的免疫原性,产生足够的保护力。多糖和蛋白载体的鉴别是保证多糖蛋白结合疫苗真伪和质量的一项重要质控指标。由于在多糖蛋白结合疫苗中一般存在多种多糖和蛋白载体成分,鉴别试验在检测多糖蛋白结合疫苗的质量稳定性,疫苗多糖组分和蛋白组分的正确性过程中起到了至关重要的作用。除此之外,利用特异性免疫反应对多糖蛋白结合疫苗进行鉴别试验,还可以间接证明疫苗中各有效成分是否具有相应的抗原性,疫苗制备的工艺流程是否破坏了各成分的抗原性。

[0003] 欧洲药典《European Pharmacopoeia 8.0》、WHO规程《WHO Technical Report Series》、《中华人民共和国药典》(2015年版三部)均要求对多糖蛋白结合疫苗原液和成品进行鉴别,如:A群脑膜炎球菌多糖结合疫苗、C群脑膜炎球菌多糖结合疫苗、A群C群脑膜炎球菌多糖结合疫苗、b型流感嗜血杆菌结合疫苗、肺炎球菌多糖结合疫苗。《European Pharmacopoeia 8.0》中C群脑膜炎球菌多糖结合疫苗、b型流感嗜血杆菌结合疫苗、肺炎球菌多糖结合疫苗生产过程中原液及成品中多糖的鉴别方法为免疫学方法和核磁共振法,生产过程中原液及成品中载体蛋白的鉴别方法为免疫学方法;《WHO Technical Report Series》中A群脑膜炎球菌多糖结合疫苗、b型流感嗜血杆菌结合疫苗、肺炎球菌多糖结合疫苗中推荐使用免疫学方法和核磁共振波谱;《中华人民共和国药典》(2015年版三部)中收载的A群C群脑膜炎球菌结合疫苗、b型流感嗜血杆菌结合疫苗生产过程中原液及成品的鉴别方法为免疫学方法。其中《中华人民共和国药典》(2015年版三部)中常用的免疫学方法为免疫双扩散法,该法是在琼脂板上打孔,将抗原抗体加入相应孔中,待其自由扩散后,抗原抗体形成可见的沉淀线。其中抗原抗体自由扩散的速度受分子量影响,分子量小者,扩散快,反之较慢。自由扩散这一性质使得该法耗时长,且对于分子量较大的多糖蛋白结合物而言免疫凝胶双扩散法较难形成明显的沉淀线,导致结合疫苗鉴别困难。

[0004] 《中华人民共和国药典》(2015年版3部)中收载的多糖蛋白结合疫苗,其结合物原液及成品均采用免疫学鉴别方法(凝胶免疫双扩散法),该法具体操作是:取琼脂糖加生理盐水煮沸溶胀成1.5%溶液,趁热倾倒入水平玻板上(每平方厘米加0.19ml琼脂糖),凝固后,在玻板上打方阵型孔(直径3mm,孔距3mm)。根据需要确定方阵型图数量。中央孔加入抗

血清,周边孔加入供试品溶液,并留1孔加入相应阳性对照血清,每孔加样20 μ l,然后置水平湿盒中,37 $^{\circ}$ C水平扩散24h。用生理氯化钠溶液充分浸泡琼脂糖凝胶板,将浸泡好的琼脂糖凝胶板放入0.5%氨基黑溶液中染色,浸泡30min,染色30min,用脱色液脱至背景无色,沉淀线呈清晰蓝色为止。用适当方法保存或复制图谱。该法中抗原抗体浓度不宜过小,自由扩散过程的稀释,导致浓度太小无法产生沉淀线,样品分子量过大也不利于扩散,影响试验效果。另外,整个过程耗时2天左右甚至更长,且采用自由扩散的方式使抗原抗体接触,样品分子量不宜过大,浓度不宜过低,否则均较难形成清晰的沉淀线,尤其对于在制备过程中因一系列反应使抗原性降低的样品,更难以达到免疫双扩散法中需求的适宜的抗原浓度,从而导致鉴别试验实施困难。

发明内容

[0005] 为了克服现有疫苗鉴别技术的不足之处,本发明目的在于提供一种免疫原性多糖蛋白结合物及其鉴别方法,以及根据上述免疫原性多糖蛋白结合物制备的多糖蛋白结合疫苗及其鉴别方法。本发明的速率散射比浊法是一种基于免疫化学方法建立的技术手段,速率散射比浊法可测量悬浮于小杯中的颗粒所造成的散射光强度变化,可在几十秒内得出反应速率值。抗原抗体反应形成抗原抗体复合物聚集体颗粒,抗原或抗体浓度的不同形成颗粒的速率不同。该法特异性强,灵敏度高,节约检测时间,且抗原抗体直接接触,有利于低浓度样品检测,可用于疫苗生产过程中原液和/或半成品和/或成品的鉴别。

[0006] 本发明提供了一种免疫原性多糖蛋白结合物,包括多糖和载体蛋白,所述多糖蛋白结合物是经过免疫速率比浊进行鉴别的,和/或,所述多糖蛋白结合物中多糖是经过免疫速率散射比浊进行鉴别的,和/或,所述多糖蛋白结合物中载体蛋白是经过免疫速率散射比浊进行鉴别的。换言之,利用抗原与抗体特异结合形成抗原抗体复合物所测得的速率单位值对多糖和/或载体蛋白进行鉴别,经上述方法鉴别的多糖和/或载体蛋白组成了本发明的免疫原性多糖蛋白结合物。

[0007] 优选的是,所述免疫速率散射比浊至少包括将多糖蛋白结合物溶液与相应抗体接触形成抗原抗体复合物,再经免疫速率散射比浊测定生成抗原抗体复合物的反应速率值。

[0008] 上述任一方案优选的是,所述多糖蛋白结合物包括肺炎球菌荚膜多糖蛋白结合物、脑膜炎球菌荚膜多糖蛋白结合物、流感嗜血杆菌荚膜多糖蛋白结合物、伤寒沙门菌多糖蛋白结合物、金黄色葡萄球菌荚膜多糖蛋白结合物、隐球菌荚膜多糖蛋白结合物、链球菌荚膜多糖蛋白结合物、艰难梭菌荚膜多糖蛋白结合物、霍乱弧菌荚膜多糖蛋白结合物、肺炎克雷伯杆菌荚膜多糖蛋白结合物中的至少一种。

[0009] 上述任一方案优选的是,所述多糖蛋白结合物中多糖包括肺炎球菌任一血清型荚膜多糖、脑膜炎奈瑟球菌任一血清群荚膜多糖、流感嗜血杆菌任一血清型荚膜多糖、伤寒沙门菌Vi多糖、金黄色葡萄球菌任一血清型荚膜多糖、隐球菌任一血清型荚膜多糖、链球菌任一血清群荚膜多糖、艰难梭菌任一血清群荚膜多糖、霍乱弧菌任一血清群荚膜多糖、肺炎克雷伯杆菌任一血清型荚膜多糖中的至少一种。

[0010] 上述任一方案优选的是,所述多糖蛋白结合物中载体蛋白包括破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、白喉毒素无毒变体(CRM₁₉₇)、B群脑膜炎球菌外膜蛋白(OMP)、肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌溶血素(P1y)、流感嗜血杆菌D蛋白(PD)、百日咳毒素(PT)、

百日咳丝状凝血素 (FHA)、百日咳黏附素 (PRN)、霍乱毒素 (CT)、胞壁酰二肽 (MDP)、大肠杆菌不耐热肠毒素 (LT)、大肠杆菌耐热肠毒素 (ST)、结核菌素纯蛋白衍生物 (PPD)、铜绿假单胞菌外毒素A (PEA)、卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白 (KLH)、牛血清白蛋白 (BSA)、乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、乙型肝炎病毒核心抗原 (HBcAg)、破伤风毒素C片段 (TTC) 中的至少一种。

[0011] 本发明还公开一种鉴别免疫原性多糖蛋白结合物中多糖的免疫速率散射比浊方法,包括下列步骤:

[0012] (1) 检测多糖抗原标准品与抗体反应速率值;

[0013] (2) 改变反应时间检测抗原抗体反应速率值;

[0014] (3) 标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值;

[0015] (4) 测试多糖蛋白结合物供试样品。

[0016] 上述任一方案优选的是,所述步骤(1)中检测多糖抗原标准品与抗体反应速率值包括以下步骤:

[0017] a) 固定多糖抗原标准品浓度,改变抗体稀释倍数,检测多糖抗原标准品与抗体反应速率值。

[0018] b) 选择a)中抗体稀释倍数,改变多糖抗原标准品浓度,检测多糖抗原标准品与抗体反应速率值。

[0019] 上述任一方案优选的是,b)步骤中选择步骤a)抗体稀释倍数,改变抗原标准品浓度,检测抗原标准品与抗体反应速率值,其中抗原浓度大于 $0.1\mu\text{g/ml}$,优选为大于 $0.5\mu\text{g/ml}$,更优选为大于 $1\mu\text{g/ml}$ 。

[0020] 上述任一方案优选的是,所述步骤(2)中通过选择多糖抗原标准品浓度和抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值。

[0021] 上述任一方案优选的是,步骤(2)中通过选择步骤b)的抗原标准品浓度和步骤a)的抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值,其中反应时间为 $1.5\sim 10\text{min}$,优选为 $1.5\sim 5\text{min}$,更优选为 $1.5\sim 2.5\text{min}$ 。

[0022] 上述任一方案优选的是,所述步骤(3)中通过选择确定的抗体稀释倍数和反应时间,用不同浓度的多糖抗原标准品和抗体反应,标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值。

[0023] 上述任一方案优选的是,所述步骤(3)中通过选择确定的抗体稀释倍数和步骤c)的反应时间,用不同浓度的抗原标准品和抗体反应,标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值。

[0024] 上述任一方案优选的是,所述步骤(4)中应用标定曲线的参数测试多糖蛋白结合物供试样品,其速率值大于抗原抗体反应浓度-速率曲线最低点速率值判定多糖蛋白结合物中多糖鉴别试验合格。

[0025] 上述任一方案优选的是,所述步骤(4)中应用标定曲线的方法测试多糖蛋白结合物供试样品,其速率值大于步骤(3)中曲线最低点速率值判定供试品鉴别试验合格。

[0026] 上述任一方案优选的是,所述步骤(4)中选择确定的抗体稀释倍数和反应时间,测试多糖蛋白结合物供试样品与抗体反应速率值,其速率值大于阴性对照速率值判定多糖蛋白结合物中多糖鉴别试验合格。在该方法中步骤(3)不是必须步骤。

[0027] 上述任一方案优选的是,所述阴性对照至少包括PBS缓冲液、PB缓冲液、生理氯化

钠溶液、注射用水、去离子水、蒸馏水。

[0028] 即选择确定的抗体稀释倍数和步骤(2)中的反应时间,测试多糖蛋白结合物供试样品与抗体反应速率值,其速率值大于cutoff值(阴性对照速率值)判定多糖蛋白结合物多糖供试品鉴别试验合格,所述阴性对照至少包括PBS缓冲液、PB缓冲液、生理氯化钠溶液、注射用水、去离子水、蒸馏水,其中cutoff值为阴性对照平均速率值,优选为2.1倍阴性对照平均速率值,更优选为阴性对照平均速率值加上2个标准差,最优选为阴性对照平均速率值加3个标准差。

[0029] 本发明还公开一种鉴别免疫原性多糖蛋白结合物中载体蛋白的免疫速率散射比浊方法,包括下列步骤:

[0030] (1) 检测载体蛋白抗原参考品与抗体反应速率值;

[0031] (2) 改变反应时间检测抗原抗体反应速率值;

[0032] (3) 标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值;

[0033] (4) 测试多糖蛋白结合物供试样品。

[0034] 优选的是,所述步骤(1)中检测载体蛋白抗原参考品与抗体反应速率值包括以下步骤:

[0035] a) 固定载体蛋白抗原参考品浓度,改变抗体稀释倍数,检测载体蛋白抗原参考品与抗体反应速率值。

[0036] b) 选择a)抗体稀释倍数,改变蛋白抗原参考品浓度,检测蛋白抗原参考品与抗体反应速率值。其中抗原浓度为大于 $1\mu\text{g/ml}$,优选为 $10\mu\text{g/ml}$,更优选为 $15\mu\text{g/ml}$ 。

[0037] 上述任一方案优选的是,所述步骤(2)中通过选择确定的蛋白抗原参考品浓度和抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值。

[0038] 上述任一方案优选的是,所述步骤(2)中通过选择步骤b)的抗原参考品浓度和步骤a)的抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值,其中反应时间为 $1.5\sim 10\text{min}$,优选为 $1.5\sim 5\text{min}$,更优选为 $1.5\sim 2.5\text{min}$ 。抗原浓度为大于 $1\mu\text{g/ml}$,优选为大于 $10\mu\text{g/ml}$,更优选为大于 $15\mu\text{g/ml}$ 。

[0039] 上述任一方案优选的是,所述步骤(3)中通过选择确定的抗体稀释倍数和反应时间,用不同浓度的蛋白抗原参考品和抗体反应,标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值。

[0040] 上述任一方案优选的是,所述步骤(3)中选择确定的抗体稀释倍数和步骤(2)的反应时间,用不同浓度的抗原参考品和抗体反应,标定抗原抗体反应速率-浓度曲线,记录最低点反应速率值。

[0041] 上述任一方案优选的是,所述步骤(4)中应用标定曲线的参数测试多糖蛋白结合物供试样品,其速率值大于抗原抗体反应浓度-速率曲线最低点速率值判定多糖蛋白结合物中载体蛋白鉴别试验合格。抗原抗体反应浓度-速率曲线为步骤(3)中标定抗原抗体反应浓度-速率曲线。

[0042] 上述任一方案优选的是,所述步骤(4)中选择确定的抗体稀释倍数和反应时间,测试多糖蛋白结合物供试样品与抗体反应速率值,其速率值大于阴性对照速率值判定多糖蛋白结合物中载体蛋白鉴别合格。在该方法中步骤(3)不是必须步骤。

[0043] 上述任一方案优选的是,所述阴性对照至少包括PBS缓冲液、PB缓冲液、生理氯化

钠溶液、注射用水、去离子水、蒸馏水。

[0044] 即选择确定的抗体稀释倍数和步骤(2)的反应时间,测试多糖蛋白结合物供试样品与抗体反应速率值,其速率值大于cutoff值(阴性对照速率值)判定多糖蛋白结合物中载体蛋白供试品鉴别试验合格,所述阴性对照至少包括PBS缓冲液、PB缓冲液、生理氯化钠溶液、注射用水、去离子水、蒸馏水,其中cutoff值为阴性对照平均速率值,优选为2.1倍阴性对照平均速率值,更优选为阴性对照平均速率值加上2个标准差,最优选为阴性对照平均速率值加3个标准差。

[0045] 上述任一方案优选的是,所述多糖蛋白结合物包括肺炎球菌荚膜多糖蛋白结合物、脑膜炎球菌荚膜多糖蛋白结合物、流感嗜血杆菌荚膜多糖蛋白结合物、伤寒沙门菌多糖蛋白结合物、金黄色葡萄球菌荚膜多糖蛋白结合物、隐球菌荚膜多糖蛋白结合物、链球菌荚膜多糖蛋白结合物、艰难梭菌荚膜多糖蛋白结合物、霍乱弧菌荚膜多糖蛋白结合物、肺炎克雷伯杆菌荚膜多糖蛋白结合物中的至少一种。

[0046] 上述任一方案优选的是,所述多糖蛋白结合物中多糖包括肺炎球菌任一血清型荚膜多糖、脑膜炎奈瑟球菌任一血清群荚膜多糖、流感嗜血杆菌任一血清型荚膜多糖、伤寒沙门菌Vi多糖、金黄色葡萄球菌任一血清型荚膜多糖、隐球菌任一血清型荚膜多糖、链球菌任一血清群荚膜多糖、艰难梭菌任一血清群荚膜多糖、霍乱弧菌任一血清群荚膜多糖、肺炎克雷伯杆菌任一血清型荚膜多糖等中的至少一种。

[0047] 上述任一方案优选的是,所述多糖蛋白结合物中载体蛋白包括破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、白喉毒素无毒变异体(CRM₁₉₇)、B群脑膜炎球菌外膜蛋白(OMP)、肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌溶血素(Ply)、流感嗜血杆菌D蛋白(PD)、百日咳毒素(PT)、百日咳丝状凝血素(FHA)、百日咳黏附素(PRN)、霍乱毒素(CT)、胞壁酰二肽(MDP)、大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)、大肠杆菌耐热肠毒素(ST)、结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)、铜绿假单胞菌外毒素A(PEA)、卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)、破伤风毒素C片段(TTC)中的至少一种。

[0048] 本发明还提供一种多糖蛋白结合疫苗,包括免疫原性多糖蛋白结合物,免疫原性多糖蛋白结合物包括多糖和载体蛋白,其特征在于,所述多糖蛋白结合疫苗是经过免疫速率比浊进行鉴别的,和/或,所述多糖蛋白结合疫苗中多糖是经过免疫速率散射比浊进行鉴别的,和/或,所述多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白是经过免疫速率散射比浊进行鉴别的。

[0049] 上述任一方案优选的是,所述免疫速率散射比浊至少包括将多糖蛋白结合疫苗与相应抗体接触形成抗原抗体复合物,再经免疫速率散射比浊测定生成抗原抗体复合物的反应速率值。换言之,利用抗原与抗体特异结合形成抗原抗体复合物所测得的速率单位值对多糖和/或载体蛋白进行鉴别,经上述方法鉴别的多糖和/或载体蛋白组成了本发明的多糖蛋白结合疫苗。

[0050] 上述任一方案优选的是,所述多糖蛋白结合疫苗包括肺炎球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、脑膜炎球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、流感嗜血杆菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、伤寒沙门菌多糖蛋白结合疫苗、金黄色葡萄球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、隐球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、链球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、艰难梭菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、霍乱弧菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、肺炎克雷伯杆菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、脑膜炎球菌(结合)流感嗜血杆菌(结合)联合疫苗中的至少一种。

[0051] 上述任一方案优选的是,所述多糖蛋白结合疫苗中多糖包括肺炎球菌任一血清型荚膜多糖、脑膜炎奈瑟球菌任一血清群荚膜多糖、流感嗜血杆菌任一血清型荚膜多糖、伤寒沙门菌Vi多糖、金黄色葡萄球菌任一血清型荚膜多糖、隐球菌任一血清型荚膜多糖、链球菌任一血清群荚膜多糖、艰难梭菌任一血清群荚膜多糖、霍乱弧菌任一血清群荚膜多糖、肺炎克雷伯杆菌任一血清型荚膜多糖中的至少一种。

[0052] 上述任一方案优选的是,所述多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白包括破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、白喉毒素无毒变异体(CRM₁₉₇)、B群脑膜炎球菌外膜蛋白(OMP)、肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌溶血素(Ply)、流感嗜血杆菌D蛋白(PD)、百日咳毒素(PT)、百日咳丝状凝血素(FHA)、百日咳黏附素(PRN)、霍乱毒素(CT)、胞壁酰二肽(MDP)、大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)、大肠杆菌耐热肠毒素(ST)、结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)、铜绿假单胞菌外毒素A(PEA)、卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)、破伤风毒素C片段(TTC)中的至少一种。

[0053] 本发明还公开一种鉴别多糖蛋白结合疫苗中多糖的免疫速率散射比浊方法,包括下列步骤:

[0054] (1) 检测多糖抗原标准品与抗体反应速率值;

[0055] (2) 改变反应时间检测抗原抗体反应速率值;

[0056] (3) 标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值;

[0057] (4) 测试多糖蛋白疫苗供试样品。

[0058] 上述任一方案优选的是,所述步骤(1)中检测多糖抗原标准品与抗体反应速率值包括以下步骤:

[0059] a) 固定多糖抗原标准品浓度,改变抗体稀释倍数,检测多糖抗原标准品与抗体反应速率值。

[0060] b) 选择a) 抗体稀释倍数,改变多糖抗原标准品浓度,检测多糖抗原标准品与抗体反应速率值。其中抗原浓度大于0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为大于0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,更优选为大于1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0061] 上述任一方案优选的是,所述步骤(2)中通过选择多糖抗原标准品浓度和抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值。

[0062] 上述任一方案优选的是,所述步骤(2)中通过选择抗步骤(b) 原标准品浓度和步骤a) 的抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值,其中反应时间为1.5~10min,优选为1.5~5min,更优选为1.5~2.5min。

[0063] 上述任一方案优选的是,所述步骤(3)中通过选择确定的抗体稀释倍数和反应时间,用不同浓度的多糖抗原标准品和抗体反应,标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值。

[0064] 上述任一方案优选的是,所述步骤(3)中选择确定的抗体稀释倍数和步骤2) 的反应时间,用不同浓度的抗原标准品和抗体反应,标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值。

[0065] 上述任一方案优选的是,所述步骤(4)中应用标定曲线的参数测试多糖蛋白结合疫苗供试样品,其速率值大于抗原抗体反应浓度-速率曲线最低点速率值判定多糖蛋白结合疫苗中多糖鉴别试验合格。应用标定曲线的方法测试多糖蛋白结合疫苗供试样品,其速率值大于步骤(3) 曲线最低点速率值判定供试品鉴别试验合格。

[0066] 上述任一方案优选的是,所述步骤(4)中选择确定的抗体稀释倍数和反应时间,测试多糖蛋白结合疫苗供试样品与抗体反应速率值,其速率值大于阴性对照速率值判定多糖蛋白结合疫苗中多糖鉴别试验合格。在该方法中步骤(3)不是必须步骤。

[0067] 上述任一方案优选的是,所述阴性对照至少包括PBS缓冲液、PB缓冲液、生理氯化钠溶液、注射用水、去离子水、蒸馏水。

[0068] 选择确定的抗体稀释倍数和步骤(2)的反应时间,测试多糖蛋白结合疫苗供试样品与抗体反应速率值,其速率值大于cutoff值(阴性对照速率值)判定多糖蛋白结合疫苗中多糖鉴别试验合格,所述阴性对照至少包括PBS缓冲液、PB缓冲液、生理氯化钠溶液、注射用水、去离子水、蒸馏水,其中cutoff值为阴性对照平均速率值,优选为2.1倍阴性对照平均速率值,更优选为阴性对照平均速率值加上2个标准差,最优选为阴性对照平均速率值加3个标准差。

[0069] 本发明还公开一种鉴别免疫原性多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白的免疫速率散射比浊方法,包括下列步骤:

[0070] (1) 检测载体蛋白抗原参考品与抗体反应速率值;

[0071] (2) 改变反应时间检测抗原抗体反应速率值;

[0072] (3) 标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值;

[0073] (4) 测试多糖蛋白结合疫苗供试样品。

[0074] 优选的是,所述步骤(1)中检测载体蛋白抗原参考品与抗体反应速率值包括以下步骤:

[0075] a) 固定载体蛋白抗原参考品浓度,改变抗体稀释倍数,检测载体蛋白抗原参考品与抗体反应速率值。

[0076] b) 选择a) 抗体稀释倍数,改变蛋白抗原参考品浓度,检测蛋白抗原参考品与抗体反应速率值。其中抗原浓度为大于 $1\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为大于 $10\mu\text{g}/\text{ml}$,更优选为大于 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0077] 上述任一方案优选的是,所述步骤(2)中通过选择蛋白抗原参考品浓度和抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值。即选择步骤b)的抗原参考品浓度和步骤a)的抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值,其中反应时间为 $1.5\sim 10\text{min}$,优选为 $1.5\sim 5\text{min}$,更优选为 $1.5\sim 2.5\text{min}$ 。

[0078] 上述任一方案优选的是,所述步骤(3)中通过选择确定的抗体稀释倍数和反应时间,用不同浓度的载体蛋白抗原参考品和抗体反应,标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值。通过选择确定的抗体稀释倍数和步骤2)的反应时间,用不同浓度的抗原参考品和抗体反应,标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值。

[0079] 上述任一方案优选的是,所述步骤(4)中应用标定曲线的参数测试多糖蛋白结合疫苗供试样品,其速率值大于抗原抗体反应浓度-速率曲线最低点速率值判定多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白鉴别试验合格。抗原抗体反应浓度-速率曲线是步骤(3)中标定的抗原抗体反应浓度-速率曲线。

[0080] 上述任一方案优选的是,所述步骤(4)中选择确定的抗体稀释倍数和反应时间,测试多糖蛋白结合疫苗供试样品与抗体反应速率值,其速率值大于阴性对照速率值判定多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白鉴别合格。在该方法中步骤(3)不是必须步骤。

[0081] 上述任一方案优选的是,所述阴性对照至少包括PBS缓冲液、PB缓冲液、生理氯化

钠溶液、注射用水、去离子水、蒸馏水。即通过选择确定的抗体稀释倍数和步骤(2)的反应时间,测试多糖蛋白结合疫苗供试样品与抗体反应速率值,其速率值大于cutoff值(阴性对照速率值)判定多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白鉴别试验合格,所述阴性对照至少包括PBS缓冲液、PB缓冲液、生理氯化钠溶液、注射用水、去离子水、蒸馏水,其中cutoff值为阴性对照平均速率值,优选为2.1倍阴性对照平均速率值,更优选为阴性对照平均速率值加上2个标准差,最优选为阴性对照平均速率值加3个标准差。

[0082] 上述任一方案优选的是,所述多糖蛋白结合疫苗包括肺炎球菌荚膜多糖蛋白结合物、脑膜炎球菌荚膜多糖蛋白结合物、流感嗜血杆菌荚膜多糖蛋白结合物、伤寒沙门菌多糖蛋白结合物、金黄色葡萄球菌荚膜多糖蛋白结合物、隐球菌荚膜多糖蛋白结合物、链球菌荚膜多糖蛋白结合物、艰难梭菌荚膜多糖蛋白结合物、霍乱弧菌荚膜多糖蛋白结合物、肺炎克雷伯杆菌荚膜多糖蛋白结合物中的至少一种。

[0083] 上述任一方案优选的是,所述多糖蛋白结合疫苗中多糖包括肺炎球菌任一血清型荚膜多糖、脑膜炎奈瑟球菌任一血清群荚膜多糖、流感嗜血杆菌任一血清型荚膜多糖、伤寒沙门菌Vi多糖、金黄色葡萄球菌任一血清型荚膜多糖、隐球菌任一血清型荚膜多糖、链球菌任一血清群荚膜多糖、艰难梭菌任一血清群荚膜多糖、霍乱弧菌任一血清群荚膜多糖、肺炎克雷伯杆菌任一血清型荚膜多糖等中的至少一种。

[0084] 上述任一方案优选的是,所述多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白包括破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、白喉毒素无毒变异体(CRM₁₉₇)、B群脑膜炎球菌外膜蛋白(OMP)、肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌溶血素(Ply)、流感嗜血杆菌D蛋白(PD)、百日咳毒素(PT)、百日咳丝状凝血素(FHA)、百日咳黏附素(PRN)、霍乱毒素(CT)、胞壁酰二肽(MDP)、大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)、大肠杆菌耐热肠毒素(ST)、结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)、铜绿假单胞菌外毒素A(PEA)、卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)、破伤风毒素C片段(TTC)中的至少一种。

[0085] 有益效果:

[0086] (1) 本发明的一种免疫原性多糖蛋白结合物及其制备的多糖蛋白结合疫苗的鉴别方法-免疫速率散射比浊法与现有技术及文献不同。在现有文献报道和上述典籍的方案中,多糖蛋白结合疫苗原液和成品的鉴别方法为免疫沉淀法、免疫电泳法、核磁共振技术。其中免疫沉淀法和免疫电泳法,涉及样品在体系中的扩散,因此样品需较高的浓度;核磁共振技术样品需求量大,且对样品纯度要求高,因此在多糖蛋白结合物鉴别中以上典籍均不推荐核磁共振技术。这两种方法在检测低浓度样品时有一定困难。而本发明的免疫速率散射比浊法,抗原抗体直接接触,由仪器通过散射光强的改变直接检测,所需样品浓度小,通常只需几十微克,几微克,甚至可鉴别浓度小于1 μ g/ml的样品,灵敏度高,尤其适用于在生产过程中抗原性降低的样品。

[0087] (2) 本发明的一种免疫原性多糖蛋白结合物及其制备的多糖蛋白结合疫苗的鉴别方法-免疫速率散射比浊法,是基于免疫学原理建立的,抗原仅与其对应的抗体发生特异性反应,形成抗原抗体复合物聚集体,对于含多组分的样品尤其适用,鉴别样品中某一组分时可排除其他组分的干扰,特异性好。

[0088] (3) 本发明的一种免疫原性多糖蛋白结合物及其制备的多糖蛋白结合疫苗的鉴别方法-免疫速率散射比浊法,整个鉴别过程在免疫化学系统(Immunochemistry System)中

进行,从取样、反应到检测均由仪器完成,速率比浊检测器通过检测抗原抗体复合物聚集颗粒的光散射强度变化,将其转换成速率单位值,将结果数字化直接读取,更加直观。而免疫沉淀和免疫电泳法,采用肉眼观察,这就要求形成的沉淀线足够清晰,核磁共振技术则需要解析图谱,寻找特征峰,对于结构复杂的多糖及多糖蛋白结合物图谱解析困难。

[0089] (4) 本发明的一种免疫原性多糖蛋白结合物及其制备的多糖蛋白结合疫苗的鉴别方法-免疫速率散射比浊法,抗原抗体直接接触反应,无需扩散,在反应开始后的10分钟内便可得出结果,且可同时检测72个样品。而常用的免疫沉淀法通过自由扩散使抗原抗体接触,耗时长达十几个小时,免疫电泳法使抗原抗体接触,也需几十分钟甚至更长,而后还需染色脱色至少几小时甚至几天,方可观察结果,步骤繁琐耗时长。

[0090] (5) 本发明的一种免疫原性多糖蛋白结合物及其制备的多糖蛋白结合疫苗的鉴别方法-免疫速率散射比浊法,因其较高的灵敏度高,所需抗原抗体浓度低,无需染色剂脱色液,不必制备凝胶板,大大节约鉴别成本。

[0091] (6) 本发明所述的一种免疫原性多糖蛋白结合物及其制备的多糖蛋白结合疫苗的鉴别方法-免疫速率散射比浊法,是经过免疫速率散射比浊检测多糖蛋白结合物及多糖蛋白结合疫苗中多糖抗原和载体蛋白抗原与相应抗体的反应速率值,可大大提高疫苗生产过程中鉴别的效率,缩短时间。

[0092] (7) 本发明所述一种免疫原性多糖蛋白结合物及其制备的多糖蛋白结合疫苗的鉴别方法-免疫速率散射比浊法,该方法基于抗原抗体特异性反应的免疫学原理,抗原抗体在37℃直接接触,在反应开始后10min内由检测器直接读取速率值,直观表达速率值,无需染色脱色,可对低浓度样品进行鉴别,灵敏度高,结果可靠;且将自由扩散后的接触改为直接接触,缩短试验时间,大大提高了鉴别效率,可应用于疫苗生产中原液、半成品和成品鉴别,在生产中具有很大的应用价值。

[0093] (8) 本发明建立了一种免疫速率散射比浊鉴别法,确定了抗原抗体反应的适宜浓度,合适的反应时间,并对方法进行精密度、准确度和专属性进行验证,应用建立的方法鉴别疫苗生产中多糖蛋白结合物原液、鉴别多糖蛋白结合疫苗。

[0094] (9) 本发明中建立的免疫速率散射比浊鉴别法,是将抗原抗体稀释至合适浓度,37℃直接接触反应,在10min内读取反应速率值。相较于免疫双扩散法,免疫速率散射比浊法操作简单,耗时短,无需凝胶板,无需染色脱色,直接接触也使抗原抗体可在较小的浓度范围进行反应,结果直观,对于抗原性降低的大分子样品尤为适合。

[0095] 以上公开的内容对本发明进行了一般性描述,可以通过如下实施例,但非限制,举例进一步理解本发明的核心内容或精神。所述实施例仅用于阐述本发明的概念和几个优选的实施方案,不应理解为以任何方式限制本发明的范围。应当理解本发明并不限于如下具体实施方案,并且对如下实施例进行的多种变化、调整、修饰、修改、改变、改良、改进、减少、简化、增加、增添等可以由本领域技术人员实施,而不背离本发明的范围或精神。本发明的其它实施例在不背离本发明的核心的前提下为本领域技术人员所预见。

附图说明

[0096] 图1为b型流感嗜血杆菌多糖抗原浓度范围确定图。

[0097] 图2为破伤风类毒素抗原浓度范围确定图。

[0098] 图3为肺炎球菌3型多糖蛋白结合物多糖鉴别试验,图中1为阳性对照,4为阴性对照,2、3、5、6为多糖蛋白结合物。

[0099] 图4为肺炎球菌3型多糖蛋白结合物载体蛋白鉴别试验;图中1为阳性对照,2为阴性对照,3、4、5为多糖蛋白结合物,6无样品。

[0100] 图5为13肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗多糖鉴别试验,图中1为阳性对照,4为阴性对照,2、3、5、6为多糖蛋白结合疫苗。

[0101] 图6为13价肺炎球菌多糖蛋白结合物载体蛋白鉴别试验;图中1为阳性对照,2为阴性对照,3、4、5为多糖蛋白结合疫苗,6无样品。

具体实施方式

[0102] 本发明可通过结合如下实施例进一步论述,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商建议的条件,除非另行定义,文中使用的所有专业与科学用语及缩写与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。

[0103] 以下实施例中使用的免疫化学系统(Immunochemistry System)(购自Beckman Coulter公司,型号:IMMAGE 800)、所用配套稀释液I、缓冲液I、清洗液(均购自Beckman Coulter公司)。

[0104] 实施例1

[0105] 本发明提供一种免疫原性多糖蛋白结合物,所述多糖蛋白结合物是经过免疫速率散射比浊进行鉴别的,所述多糖蛋白结合物中多糖是经过免疫速率散射比浊进行鉴别的,所述多糖蛋白结合物中载体蛋白是经过免疫速率散射比浊进行鉴别的,所述免疫速率散射比浊至少包括将多糖蛋白结合物溶液与相应抗体接触形成抗原抗体复合物,再经免疫速率散射比浊测定生成抗原抗体复合物的反应速率值。

[0106] 本发明进一步优化的技术方案是,多糖蛋白结合物包括肺炎球菌荚膜多糖蛋白结合物、脑膜炎球菌荚膜多糖蛋白结合物、流感嗜血杆菌荚膜多糖蛋白结合物、伤寒沙门菌多糖蛋白结合物、金黄色葡萄球菌荚膜多糖蛋白结合物、隐球菌荚膜多糖蛋白结合物、链球菌荚膜多糖蛋白结合物、艰难梭菌荚膜多糖蛋白结合物、霍乱弧菌荚膜多糖蛋白结合物、肺炎克雷伯杆菌荚膜多糖蛋白结合物中的至少一种。

[0107] 本发明进一步优化的技术方案是,所述多糖蛋白结合物中多糖包括肺炎球菌任一血清型荚膜多糖、脑膜炎奈瑟球菌任一血清群荚膜多糖、流感嗜血杆菌任一血清型荚膜多糖、伤寒沙门菌Vi多糖、金黄色葡萄球菌任一血清型荚膜多糖、隐球菌任一血清型荚膜多糖、链球菌任一血清群荚膜多糖、艰难梭菌任一血清群荚膜多糖、霍乱弧菌任一血清群荚膜多糖、肺炎克雷伯杆菌任一血清型荚膜多糖中的至少一种。

[0108] 本发明进一步优化的技术方案是,所述多糖蛋白结合物中载体蛋白包括破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、白喉毒素无毒变异体(CRM₁₉₇)、B群脑膜炎球菌外膜蛋白(OMP)、肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌溶血素(Ply)、流感嗜血杆菌D蛋白(PD)、百日咳毒素(PT)、百日咳丝状凝血素(FHA)、百日咳黏附素(PRN)、霍乱毒素(CT)、胞壁酰二肽(MDP)、大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)、大肠杆菌耐热肠毒素(ST)、结核菌素纯蛋白衍生物(PRD)、铜绿假单胞菌外毒素A(PEA)、卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、乙型肝炎病

毒表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)、破伤风毒素C片段(TTC)中的至少一种。

[0109] 一种鉴别免疫原性多糖蛋白结合物中多糖的免疫速率散射比浊方法,所述方法至少包括以下步骤:

[0110] a) 固定多糖标准品浓度,改变抗体稀释倍数,测试多糖标准品抗原与抗体反应速率值。

[0111] b) 选择a) 抗体稀释倍数,改变抗原标准品浓度,检测抗原标准品与抗体反应速率值,其中抗原浓度大于0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为大于0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,更优选为大于1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0112] c) 选择b) 的抗原标准品浓度和a) 的抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值,其中反应时间为1.5~10min,优选为1.5~5min,更优选为1.5~2.5min。

[0113] d) 选择确定的抗体稀释倍数和c) 的反应时间,用不同浓度的抗原标准品和抗体反应,标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值。

[0114] e) 应用标定曲线的方法测试多糖蛋白结合物供试样品,其速率值大于d) 曲线最低点速率值判定供试品中多糖鉴别试验合格。

[0115] 本发明还提供了一种鉴别免疫原性多糖蛋白结合物中多糖的免疫速率散射比浊方法,所述方法至少包括以下步骤:

[0116] a) 固定多糖标准品浓度,改变抗体稀释倍数,测试多糖标准品抗原与抗体反应速率值。

[0117] b) 选择a) 抗体稀释倍数,改变抗原标准品浓度,检测抗原标准品与抗体反应速率值,其中抗原浓度大于0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为大于0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,更优选为大于1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0118] c) 选择b) 的抗原标准品浓度和a) 的抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值,其中反应时间为1.5~10min,优选为1.5~5min,更优选为1.5~2.5min。

[0119] d) 选择确定的抗体稀释倍数和c) 的反应时间,测试多糖蛋白结合物供试样品与抗体反应速率值,其速率值大于cutoff值(阴性对照速率值)判定多糖蛋白结合物多糖供试品多糖鉴别试验合格,所述阴性对照至少包括PBS缓冲液、PB缓冲液、生理氯化钠溶液、注射用水、去离子水、蒸馏水,其中cutoff值为阴性对照平均速率值,优选为2.1倍阴性对照平均速率值,更优选为阴性对照平均速率值加上2个标准差,最优选为阴性对照平均速率值加3个标准差。

[0120] 本发明还提供了一种鉴别免疫原性多糖蛋白结合物中载体蛋白的免疫速率散射比浊方法,所述方法至少包括以下步骤:

[0121] a) 固定载体蛋白抗原参考品浓度,改变抗体浓度,检测蛋白抗原参考品与抗体反应速率值。

[0122] b) 选择a) 抗体稀释倍数,改变抗原参考品浓度,检测抗原参考品与抗体反应速率值,其中抗原浓度为大于1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为大于10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,更优选为大于15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0123] c) 选择b) 的抗原参考品浓度和a) 的抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值,其中反应时间为1.5~10min,优选为1.5~5min,更优选为1.5~2.5min。

[0124] d) 选择确定的抗体稀释倍数和c) 的反应时间,用不同浓度的抗原参考品和抗体反应,标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值。

[0125] e) 应用标定曲线的方法测试多糖蛋白结合物供试样品,其速率值大于d) 曲线最低

点速率值判定供试品中载体蛋白鉴别试验合格。

[0126] 本发明还提供了一种鉴别免疫原性多糖蛋白结合物中载体蛋白的免疫速率散射比浊方法,所述方法至少包括以下步骤:

[0127] a) 固定载体蛋白抗原参考品浓度,改变抗体浓度,检测蛋白抗原参考品与抗体反应速率值。

[0128] b) 选择a) 抗体稀释倍数,改变抗原参考品浓度,检测抗原参考品与抗体反应速率值,其中抗原浓度为大于 $1\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为大于 $10\mu\text{g}/\text{ml}$,更优选为大于 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0129] c) 选择b) 的抗原参考品浓度和a) 的抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值,其中抗原浓度为大于 $1\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为大于 $10\mu\text{g}/\text{ml}$,更优选为大于 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0130] d) 选择确定的抗体稀释倍数和c) 的反应时间,测试多糖蛋白结合物供试样品与抗体反应速率值,其速率值大于cutoff值(阴性对照速率值)判定多糖蛋白结合物供试品中载体蛋白鉴别试验合格,所述阴性对照至少包括PBS缓冲液、PB缓冲液、生理氯化钠溶液、注射用水、去离子水、蒸馏水,其中cutoff值为阴性对照平均速率值,优选为2.1倍阴性对照平均速率值,更优选为阴性对照平均速率值加上2个标准差,最优选为阴性对照平均速率值加3个标准差。

[0131] 本发明进一步优化的技术方案是,所述多糖蛋白结合物包括肺炎球菌荚膜多糖蛋白结合物、脑膜炎球菌荚膜多糖蛋白结合物、流感嗜血杆菌荚膜多糖蛋白结合物、伤寒沙门菌多糖蛋白结合物、金黄色葡萄球菌荚膜多糖蛋白结合物、隐球菌荚膜多糖蛋白结合物、链球菌荚膜多糖蛋白结合物、艰难梭菌荚膜多糖蛋白结合物、霍乱弧菌荚膜多糖蛋白结合物、肺炎克雷伯杆菌荚膜多糖蛋白结合物中的至少一种。

[0132] 本发明进一步优化的技术方案是,所述多糖蛋白结合物中多糖包括肺炎球菌任一血清型荚膜多糖、脑膜炎奈瑟球菌任一血清群荚膜多糖、流感嗜血杆菌任一血清型荚膜多糖、伤寒沙门菌Vi多糖、金黄色葡萄球菌任一血清型荚膜多糖、隐球菌任一血清型荚膜多糖、链球菌任一血清群荚膜多糖、艰难梭菌任一血清群荚膜多糖、霍乱弧菌任一血清群荚膜多糖、肺炎克雷伯杆菌任一血清型荚膜多糖中的至少一种。

[0133] 本发明进一步优化的技术方案是,所述多糖蛋白结合物中载体蛋白包括破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、白喉毒素无毒变异体(CRM₁₉₇)、B群脑膜炎球菌外膜蛋白(OMP)、肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌溶血素(Ply)、流感嗜血杆菌D蛋白(PD)、百日咳毒素(PT)、百日咳丝状凝血素(FHA)、百日咳黏附素(PRN)、霍乱毒素(CT)、胞壁酰二肽(MDP)、大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)、大肠杆菌耐热肠毒素(ST)、结核菌素纯蛋白衍生物(PRD)、铜绿假单胞菌外毒素A(PEA)、卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)、破伤风毒素C片段(TTC)中的至少一种。

[0134] 实施例2

[0135] 本发明还提供了一种多糖蛋白结合疫苗,所述多糖蛋白结合疫苗是经过免疫速率散射比浊进行鉴别的,所述多糖蛋白结合疫苗中多糖是经过免疫速率散射比浊进行鉴别的,所述多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白是经过免疫速率散射比浊进行鉴别的,所述免疫速率散射比浊至少包括将多糖蛋白结合疫苗溶液与相应抗体接触形成抗原抗体复合物,再经免疫速率散射比浊测定生成抗原抗体复合物的反应速率值。

[0136] 本发明进一步优化的技术方案是,所述多糖蛋白结合疫苗包括肺炎球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、脑膜炎球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、流感嗜血杆菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、伤寒沙门菌多糖蛋白结合疫苗、金黄色葡萄球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、隐球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、链球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、艰难梭菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、霍乱弧菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、肺炎克雷伯杆菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、脑膜炎球菌(结合)流感嗜血杆菌(结合)联合疫苗中的至少一种。

[0137] 本发明进一步优化的技术方案是,所述多糖蛋白结合疫苗中多糖包括肺炎球菌任一血清型荚膜多糖、脑膜炎奈瑟球菌任一血清群荚膜多糖、流感嗜血杆菌任一血清型荚膜多糖、伤寒沙门菌Vi多糖、金黄色葡萄球菌任一血清型荚膜多糖、隐球菌任一血清型荚膜多糖、链球菌任一血清群荚膜多糖、艰难梭菌任一血清群荚膜多糖、霍乱弧菌任一血清群荚膜多糖、肺炎克雷伯杆菌任一血清型荚膜多糖中的至少一种。

[0138] 本发明进一步优化的技术方案是,所述多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白包括破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、白喉毒素无毒变异体(CRM₁₉₇)、B群脑膜炎球菌外膜蛋白(OMP)、肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌溶血素(Ply)、流感嗜血杆菌D蛋白(PD)、百日咳毒素(PT)、百日咳丝状凝血素(FHA)、百日咳黏附素(PRN)、霍乱毒素(CT)、胞壁酰二肽(MDP)、大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)、大肠杆菌耐热肠毒素(ST)、结核菌素纯蛋白衍生物(PRD)、铜绿假单胞菌外毒素A(PEA)、卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)、破伤风毒素C片段(TTC)中的至少一种。

[0139] 本发明还提供了一种鉴别免疫原性多糖蛋白结合疫苗中多糖的免疫速率散射比浊方法,所述方法至少包括以下步骤:

[0140] a) 固定多糖标准品浓度,改变抗体稀释倍数,测试多糖标准品抗原与抗体反应速率值。

[0141] b) 选择a) 抗体稀释倍数,改变抗原标准品浓度,检测抗原标准品与抗体反应速率值,其中抗原浓度大于0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为大于0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,更优选为大于1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0142] c) 选择b) 的抗原标准品浓度和a) 的抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值,其中反应时间为1.5~10min,优选为1.5~5min,更优选为1.5~2.5min。

[0143] d) 选择确定的抗体稀释倍数和c) 的反应时间,用不同浓度的抗原标准品和抗体反应,标定抗原抗体反应速率-浓度曲线,记录最低点反应速率值。

[0144] e) 应用标定曲线的方法测试多糖蛋白结合疫苗供试样品,其速率值大于d) 曲线最低点速率值判定供试品中多糖鉴别试验合格。

[0145] 本发明还提供了一种鉴别免疫原性多糖蛋白结合疫苗中多糖的免疫速率散射比浊方法,所述方法至少包括以下步骤:

[0146] a) 固定多糖标准品浓度,改变抗体稀释倍数,测试多糖标准品抗原与抗体反应速率值。

[0147] b) 选择a) 抗体稀释倍数,改变抗原标准品浓度,检测抗原标准品与抗体反应速率值,其中抗原浓度大于0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为大于0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,更优选为大于1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0148] c) 选择b) 的抗原标准品浓度和a) 的抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值,其中反应时间为1.5~10min,优选为1.5~5min,更优选为1.5~2.5min。

[0149] d) 选择确定的抗体稀释倍数和c)的反应时间,测试多糖蛋白结合疫苗供试样品与抗体反应速率值,其速率值大于cutoff值(阴性对照速率值)判定多糖蛋白结合疫苗中多糖鉴别试验合格,所述阴性对照至少包括PBS缓冲液、PB缓冲液、生理氯化钠溶液、注射用水、去离子水、蒸馏水,其中cutoff值为阴性对照平均速率值,优选为2.1倍阴性对照平均速率值,更优选为阴性对照平均速率值加上2个标准差,最优选为阴性对照平均速率值加3个标准差。

[0150] 本发明还提供了一种鉴别免疫原性多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白的免疫速率散射比浊方法,所述方法至少包括以下步骤:

[0151] a) 固定载体蛋白抗原参考品浓度,改变抗体浓度,检测蛋白抗原参考品与抗体反应速率值。

[0152] b) 选择a)抗体稀释倍数,改变抗原参考品浓度,检测抗原参考品与抗体反应速率值,其中抗原浓度为大于1 μ g/ml,优选为大于10 μ g/ml,更优选为大于15 μ g/ml。

[0153] c) 选择b)的抗原参考品浓度和a)的抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值,其中反应时间为1.5~10min,优选为1.5~5min,更优选为1.5~2.5min。

[0154] d) 选择确定的抗体稀释倍数和c)的反应时间,用不同浓度的抗原参考品和抗体反应,标定抗原抗体反应浓度-速率曲线,记录最低点反应速率值。

[0155] e) 应用标定曲线的方法测试多糖蛋白结合疫苗供试样品,其速率值大于d)曲线最低点速率值判定供试品鉴中载体蛋白鉴别试验合格。

[0156] 本发明还提供了一种鉴别免疫原性多糖蛋白结合物中载体蛋白的免疫速率散射比浊方法,所述方法至少包括以下步骤:

[0157] a) 固定载体蛋白抗原参考品浓度,改变抗体稀释倍数,检测蛋白抗原参考品与抗体反应速率值。

[0158] b) 选择a)抗体稀释倍数,改变抗原参考品浓度,检测抗原参考品与抗体反应速率值,其中抗原浓度为大于1 μ g/ml,优选为大于10 μ g/ml,更优选为大于15 μ g/ml。

[0159] c) 选择b)的抗原参考品浓度和a)的抗体稀释倍数,改变反应时间检测抗原抗体反应速率值,其中反应时间为1.5~10min,优选为1.5~5min,更优选为1.5~2.5min。

[0160] d) 选择确定的抗体稀释倍数和c)的反应时间,测试多糖蛋白结合疫苗供试样品与抗体反应速率值,其速率值大于cutoff值(阴性对照速率值)判定多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白鉴别试验合格,所述阴性对照至少包括PBS缓冲液、PB缓冲液、生理氯化钠溶液、注射用水、去离子水、蒸馏水,其中cutoff值为阴性对照平均速率值,优选为2.1倍阴性对照平均速率值,更优选为阴性对照平均速率值加上2个标准差,最优选为阴性对照平均速率值加3个标准差。

[0161] 本发明进一步优化的技术方案是,所述多糖蛋白结合疫苗包括肺炎球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、脑膜炎球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、流感嗜血杆菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、伤寒沙门菌多糖蛋白结合疫苗、金黄色葡萄球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、隐球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、链球菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、艰难梭菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、霍乱弧菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、肺炎克雷伯杆菌荚膜多糖蛋白结合疫苗、脑膜炎球菌(结合)流感嗜血杆菌(结合)联合疫苗中的至少一种。

[0162] 本发明进一步优化的技术方案是,所述多糖蛋白结合疫苗中多糖包括肺炎球菌任

一血清型荚膜多糖、脑膜炎奈瑟球菌任一血清群荚膜多糖、流感嗜血杆菌任一血清型荚膜多糖、伤寒沙门菌Vi多糖、金黄色葡萄球菌任一血清型荚膜多糖、隐球菌任一血清型荚膜多糖、链球菌任一血清群荚膜多糖、艰难梭菌任一血清群荚膜多糖、霍乱弧菌任一血清群荚膜多糖、肺炎克雷伯杆菌任一血清型荚膜多糖中的至少一种。

[0163] 本发明进一步优化的技术方案是,所述多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白包括破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、白喉毒素无毒变异体(CRM₁₉₇)、B群脑膜炎球菌外膜蛋白(OMP)、肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌溶血素(Ply)、流感嗜血杆菌D蛋白(PD)、百日咳毒素(PT)、百日咳丝状凝血素(FHA)、百日咳黏附素(PRN)、霍乱毒素(CT)、胞壁酰二肽(MDP)、大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)、大肠杆菌耐热肠毒素(ST)、结核菌素纯蛋白衍生物(PRD)、铜绿假单胞菌外毒素A(PEA)、卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)、破伤风毒素C片段(TTC)中的至少一种。

[0164] 本发明,建立了一种免疫速率散射比浊鉴别法,确定了抗原抗体反应的适宜浓度,合适的反应时间,并对方法进行精密度、准确度和专属性进行验证,应用建立的方法鉴别疫苗生产中多糖蛋白结合物原液、多糖蛋白结合疫苗。相较于免疫双扩散法,免疫速率散射比浊法操作简单,耗时短,无需凝胶板,无需染色脱色,直接接触也使抗原抗体可在较小的浓度范围进行反应,结果直观,对于抗原性降低的大分子样品尤为适合。

[0165] 实施例3

[0166] 样品来源:脑膜炎球菌血清群A、C、Y、W135荚膜多糖、流感嗜血杆菌血清型b荚膜多糖、破伤风类毒素参考品均购于NIBSC(英国国家生物制品检定所),肺炎球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F荚膜多糖标准品均购于ATCC,脑膜炎球菌血清群A、C、Y、W135抗血清均购于BD生物公司,流感嗜血杆菌血清型b抗血清购于BD生物公司,肺炎球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F抗血清购于丹麦国立血清研究所。

[0167] (1)按照本公司另一发明专利CN201010129404.2及中国专利CN201610622999.2、中国专利CN201310511943.6公布方法制备以下多糖蛋白结合物原液及多糖蛋白结合疫苗:A群脑膜炎球菌多糖-TT结合物原液(A-TT)、C群脑膜炎球菌多糖-TT结合物原液(C-TT)、b型流感嗜血杆菌多糖-TT结合物原液(Hib-TT)、W135群脑膜炎球菌多糖-TT结合物原液(W135-TT)、Y群脑膜炎球菌多糖-TT结合物原液(Y-TT)、1型肺炎球菌多糖-TT结合物原液(1-TT)、3型肺炎球菌多糖-TT结合物原液(3-TT)、4型肺炎球菌多糖-TT结合物原液(4-TT)、5型肺炎球菌多糖-TT结合物原液(5-TT)、6A型肺炎球菌多糖-TT结合物原液(6A-TT)、6B型肺炎球菌多糖-TT结合物原液(6B-TT)、7F型肺炎球菌多糖-TT结合物原液(7F-TT)、9V型肺炎球菌多糖-TT结合物原液(9V-TT)、14型肺炎球菌多糖-TT结合物原液(14-TT)、18C型肺炎球菌多糖-TT结合物原液(18C-TT)、19A型肺炎球菌多糖-TT结合物原液(19A-TT)、19F型肺炎球菌多糖-TT结合物原液(19F-TT)、23F型肺炎球菌多糖-TT结合物原液(23F-TT)、A群C群脑膜炎球菌多糖-TT结合物原液(AC-TT)、ACYW135群脑膜炎球菌多糖-TT结合物原液(ACYW135-TT)。A群脑膜炎球菌多糖结合疫苗、C群脑膜炎球菌多糖结合疫苗、A群C群脑膜炎球菌多糖结合疫苗、ACYW135群脑膜炎球菌多糖结合疫苗、b型流感嗜血杆菌多糖结合疫苗、13价肺炎球菌多糖结合疫苗、AC脑膜炎球菌(结合)b型流感嗜血杆菌(结合)联合疫苗。

[0168] (2)按世界卫生组织正式颁布的肺炎球菌结合疫苗制造及检定规程(WHO

Technical Report Series, No.927, 2005)、《中华人民共和国药典》(2015年版三部)、欧洲药典《European Pharmacopoeia 8.0》规定方法和标准对样品进行检定。

[0169] 以下实施例中抗体稀释倍数、多糖标准品浓度范围及反应时间仅限于本次试验, 但非限制, 因标准抗体无准确抗体含量或滴度, 由其瓶号、批次、titer的不同, 多糖标准品批次不同, 各血清型抗原抗体反应特性的差异, 可根据实际情况调整反应参数。

[0170] 实施例4 b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合物(Hib-TT) 鉴别

[0171] 按照实施例1所述方法, 建立流感嗜血杆菌多糖鉴别方法, 具体为:

[0172] (1) 取b型流感嗜血杆菌荚膜多糖标准品, 溶解成含多糖6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液, 取一定量b型流感嗜血杆菌荚膜多糖抗血清, 稀释至不同倍数, 将抗原抗体放入仪器对应位置, 运行, 记录各稀释倍数下速率单位值, 表1, 抗体稀释1、2、3倍速率值相差不大, 而后继续稀释抗体, 反应速率值开始明显降低, 以3倍稀释的抗体为确定的抗体稀释倍数。

[0173] 表1. 抗血清不同稀释倍数反应速率值

抗血清稀释倍数	1	2	3	4	5
速率值 (Rate)	8.44	8.02	8.13	5.94	3.43

[0175] (2) 取上述项确定的抗体稀释倍数3倍, 将多糖标准品溶解成不同的浓度梯度(具体为2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 将抗原抗体放入仪器对应位置, 运行, 记录各浓度下速率单位值, 当抗原浓度在2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内, 速率值随浓度增加而变大, 绘制速率-浓度曲线, 发现当抗原浓度增大到8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 后, 增幅减小, 图1, 确定抗原的浓度范围为2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。根据上述两项确定的抗体稀释倍数和抗原浓度, 改变反应时间(具体为1.5min、2.5min、5min、7.5min、10min), 将抗原抗体放入仪器对应位置, 运行, 记录各时间下反应速率值, 表2, 以最大速率值8.02Rate对应时间2.5min为最佳反应时间。根据确定的反应参数(抗体稀释3倍, 反应时间2.5min), 将抗原抗体放入仪器对应位置, 运行, 记录各浓度下反应速率值, 及线性最低点速率值(2.12Rate, 表3)。并对方法进行精密度、准确度、专属性验证。

[0176] 表2. 不同反应时间速率值

时间 (min)	1.5	2.5	5.0	7.5	10
速率值 (Rate)	7.59	8.02	6.23	5.44	3.01

[0178] 表3. b型流感嗜血杆菌多糖抗原不同浓度对应速率值

抗原浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2	3	4	6
速率值 (Rate)	2.12	3.62	5.32	8.66

[0180] (3) 将多糖蛋白结合物稀释至多糖2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~5.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 同时取多糖蛋白结合物溶剂系统(生理氯化钠溶液)为阴性对照, 将对应抗体稀释3倍, 将抗原抗体放入仪器对应位置, 抗原抗体取样量各20 μl 反应2.5min, 应用建立曲线的参数测试多糖速率值。

[0181] (4) 按照上述实施例1方法建立载体蛋白破伤风类毒素(TT) 鉴别方法。取载体蛋白

参考品,溶解成含蛋白20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液,取对应载体蛋白抗体,稀释至不同效价单位(具体为10Lf/ml、15Lf/ml、20Lf/ml、25Lf/ml、30Lf/ml),将抗原抗体放入仪器对应位置,运行,记录各稀释倍数下速率单位值,表4,确定合适的抗体浓度为25Lf/ml。

[0182] 表4.不同浓度抗体对应反应速率值

	抗毒素效价 (Lf/ml)	10	15	20	25	30
[0183]	浊度值 (Rate)	0.637	2.83	3.47	3.51	3.55

[0184] (5)取上述确定的抗体浓度,将蛋白参考品溶解成不同的浓度梯度(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$),将抗原抗体放入仪器对应位置,运行,记录各浓度对应速率单位值,当抗原浓度为10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,结果不稳定变化大,因此选择抗原的浓度范围为15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$,图2。将抗体稀释至25lf/ml,蛋白参考品稀释至20 $\mu\text{g}/\text{ml}$,改变反应时间(1.5min~10min),将抗原抗体放入仪器对应位置,运行,记录各时间下反应速率值,确定最佳反应时间为1.5min,表5。根据确定的反应参数,将抗原抗体放入仪器对应位置,运行,记录各浓度下反应速率值,记录线性最低点速率值,表6。并对方法进行精密度、准确度、专属性验证。

[0185] 表5.不同反应时间对应速率值

	时间 (min)	1.5	2.5	5.0	7.5	10
[0186]	速率值 (Rate)	4.14	3.07	1.78	1.45	1.23

[0187] 表6.破伤风类毒素不同浓度对应速率值

	抗原浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	15	20	25	30
[0188]	速率值 (Rate)	1.08	3.45	5.04	6.91

[0189] (6)取b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合物(Hib-TT)稀释至含蛋白15~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作为供试品,同时取多糖蛋白结合物溶剂系统(生理氯化钠溶液)为阴性对照,将抗毒素稀释至25Lf/ml,将抗原抗体放入仪器对应位置,抗原抗体取样量各20 μl 反应1.5min,应用建立曲线的参数测试载体蛋白速率值。

[0190] (7)b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合物鉴别结果见表7。由结果可以看出,b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合物中多糖速率值(6.34Rate)大于其对应曲线最低点速率值(2.04Rate),且大于阴性对照平均值(0.456Rate),b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合物中蛋白速率值(3.56Rate)大于其对应曲线最低点速率值(0.787Rate),且大于阴性对照平均值(0.203Rate),b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合物鉴别试验合格。

[0191] 表7.b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合物鉴别结果

[0192]

	多糖速率值	多糖曲线最低点速率值	阴性对照速率值	蛋白载体速率值	蛋白载体曲线最低点速率值	蛋白载体阴性对照速率值
速率值 (Rate)	6.34	2.04	0.456	3.56	0.787	0.203

[0193] 实施例5b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合疫苗鉴别

[0194] (1) 按照实施例4建立的方法,取b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合疫苗和AC脑膜炎球菌(结合)b型流感嗜血杆菌(结合)联合疫苗稀释至b型流感嗜血杆菌多糖含量为2.5 μ g/ml~5.5 μ g/ml,同时取多糖蛋白结合疫苗溶剂系统(生理氯化钠溶液)为阴性对照,将抗血清稀释3倍,将抗原抗体放入仪器对应位置,抗原抗体取样量各20 μ l反应2.5min,应用建立曲线的参数测试多糖蛋白结合疫苗中多糖速率值。

[0195] (2) 按照实施例4建立的方法,取b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合疫苗和AC脑膜炎球菌(结合)b型流感嗜血杆菌(结合)联合疫苗稀释至含蛋白15~30 μ g/ml,将抗毒素稀释至251f/ml,同时取多糖蛋白结合疫苗溶剂系统(生理氯化钠溶液)为阴性对照,将抗原抗体放入仪器对应位置,抗原抗体取样量各20 μ l反应1.5min,应用建立曲线的参数测试载体蛋白速率值。

[0196] (3) b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合疫苗鉴别结果见表8。由结果可以看出,b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合疫苗中多糖速率值(8.24Rate)大于其对应曲线最低点速率值(2.04Rate),且大于阴性对照平均值(0.456Rate),b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白速率值(3.67Rate)大于其对应曲线最低点速率值(0.787Rate),且大于阴性对照平均值(0.203Rate),b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合物鉴别试验合格。AC脑膜炎球菌(结合)b型流感嗜血杆菌(结合)联合疫苗中多糖速率值(10.24Rate)大于其对应曲线最低点速率值(2.04Rate),且大于阴性对照平均值(0.456Rate),AC脑膜炎球菌(结合)b型流感嗜血杆菌(结合)联合疫苗中载体蛋白速率值(2.84Rate)大于其对应曲线最低点速率值(0.787Rate),且大于阴性对照平均值(0.203Rate),AC脑膜炎球菌(结合)b型流感嗜血杆菌(结合)联合疫苗鉴别试验合格。

[0197] 表8.b型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合疫苗鉴别结果

[0198]

速率值 (Rate)	多糖速率值	多糖曲线最低点速率值	阴性对照速率值	蛋白载体速率值	蛋白载体曲线最低点速率值	蛋白载体阴性对照速率值
结合疫苗	6.34	2.04	0.456	3.67	0.787	0.203
结合联合疫苗	8.24	2.04	0.456	2.84	0.787	0.203

[0199] 实施例6脑膜炎球菌多糖蛋白结合物鉴别

[0200] (1) 按照实施例1所述方法,建立脑膜炎球菌多糖鉴别方法并测试样品。脑膜炎球菌各血清型荚膜多糖对应抗体稀释倍数(表9,具体为1:2~1:6之间),脑膜炎球菌多糖抗原

标准品的浓度范围 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~6 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 最佳反应时间为2.5min。根据确定的反应参数, 将抗原抗体放入仪器对应位置, 运行, 抗原抗体取样量各20 μl , 记录各浓度下反应速率值 (表10), 记录线性最低点速率值 (表9)。并对方法进行精密度、准确度、专属性验证。

[0201] 表9. 脑膜炎球菌多糖鉴别试验参数范围

血清群	A	C	Y	W135
血清稀释倍数	1: 5	1: 6	1: 3	1: 4
反应时间 (min)	2.5	2.5	2.5	2.5
最低点速率值 (Rate)	6.43	3.15	4.26	1.87

[0203] 表10. 各浓度对应反应速率值

浓度梯度/速率值 (Rate)	血清群			
	A	C	Y	W135
2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	6.43	3.15	4.26	1.87
4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	13.42	10.02	8.78	6.19
6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	18.38	15.12	14.57	12.00
8.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	25.61	23.24	20.68	17.86

[0206] (2) 应用实施例4建立的载体蛋白鉴别方法, 鉴别脑膜炎球菌多糖蛋白结合物中载体蛋白。

[0207] (3) 将脑膜炎球菌多糖蛋白结合物稀释至各血清群多糖浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 同时取脑膜炎球菌多糖蛋白结合物溶剂系统 (生理氯化钠溶液) 为阴性对照, 将对应抗体稀释合适倍数, 即脑膜炎球菌血清群A、C、Y、W135抗血清分别稀释5、6、3、4倍, 将抗原抗体放入仪器对应位置, 抗原抗体取样量各20 μl 反应2.5min, 应用建立曲线的参数测试多糖速率值。

[0208] (4) 取脑膜炎球菌多糖蛋白结合物稀释至含蛋白15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 同时取脑膜炎球菌多糖蛋白结合物溶剂系统 (生理氯化钠溶液) 为阴性对照, 将抗毒素稀释至25Lf/ml, 将抗原抗体放入仪器对应位置, 抗原抗体取样量各20 μl 反应1.5min, 应用建立曲线的参数测试载体蛋白速率值。

[0209] (5) 脑膜炎球菌多糖蛋白结合物鉴别结果见表11。由结果可以看出, 脑膜炎球菌多糖蛋白结合物中多糖速率值均大于曲线最低点速率值, 大于阴性对照速率值; 脑膜炎球菌多糖蛋白结合物中载体蛋白速率值均大于曲线最低点速率值, 大于阴性对照速率值, 脑膜炎球菌多糖蛋白结合物鉴别试验合格。

[0210] 表11. 脑膜炎多糖蛋白结合物鉴别结果

[0211]

样品名称	A-TT	C-TT	Y-TT	W135-TT	AC-TT		ACYW135-TT			
					A	C	A	C	Y	W135
多糖速率值 (Rate)	15.28	10.74	25.17	8.17	13.28	12.17	14.14	14.35	20.16	7.73
曲线最低点 速率值(Rate)	6.43	3.15	4.26	1.87	6.43	3.15	6.43	3.15	4.26	1.87
阴性对照速 率值(Rate)	0.098	0.156	0.279	0.483	0.098	0.156	0.098	0.156	0.279	0.483
蛋白载体速 率值(Rate)	5.16	4.28	3.77	5.02	2.77			4.68		
曲线最低点 速率值(Rate)					0.787					
阴性对照速 率值(Rate)					0.203					

[0212] 实施例7脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗鉴别

[0213] (1) 根据实施例6建立的脑膜炎球菌多糖蛋白结合物鉴别方法测试样品。取A群脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗、C群脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗、A群C群脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗、ACYW135群脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗、AC脑膜炎球菌(结合)b型流感嗜血杆菌(结合)联合疫苗稀释至含各群多糖 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}\sim 7.5\mu\text{g}/\text{ml}$,同时取脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗溶剂系统(生理氯化钠溶液)为阴性对照,脑膜炎球菌血清群A、C、Y、W135抗血清分别稀释5、6、3、4倍,将抗原抗体放入仪器对应位置,抗原抗体取样量各 $20\mu\text{l}$ 反应 2.5min ,应用建立曲线的参数测试多糖速率值。

[0214] (2) 取脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗稀释至含蛋白 $15\mu\text{g}/\text{ml}\sim 30\mu\text{g}/\text{ml}$,将抗毒素稀释至 $25\text{Lf}/\text{ml}$,同时取脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗溶剂系统(生理氯化钠溶液)为阴性对照,将抗原抗体放入仪器对应位置,抗原抗体取样量各 $20\mu\text{l}$ 反应 1.5min ,应用建立曲线的参数测试载体蛋白速率值。

[0215] (3) 脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗鉴别结果见表12。由结果可以看出,脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗中多糖速率值均大于曲线最低点速率值,大于阴性对照速率值;脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白速率值均大于曲线最低点速率值,大于阴性对照速率值,脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗鉴别试验合格。

[0216] 表12. 脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗鉴别结果

[0217]

样品名称	A 群脑膜炎多糖结合疫苗	C 群脑膜炎多糖结合疫苗	AC (结合) Hib(结合)联合疫苗		A 群 C 群脑膜炎多糖结合疫苗		ACYW135 群脑膜炎多糖结合疫苗			
			A	C	A	C	A	C	Y	W135
多糖速率值 (Rate)	20.19	13.26	18.66	12.70	19.14	10.55	17.68	15.21	9.25	5.44
曲线最低点速率值(Rate)	6.43	3.15	6.43	3.15	6.43	3.15	6.43	3.15	4.26	1.87
阴性对照速率值(Rate)	0.098	0.156	0.098	0.156	0.098	0.156	0.098	0.156	0.279	0.483
蛋白载体速率值(Rate)	5.16	4.28	4.77		6.43		6.36			
曲线最低点速率值(Rate)					0.787					
阴性对照速率值(Rate)					0.203					

[0218] 实施例8肺炎球菌多糖蛋白结合物鉴别

[0219] (1) 按照实施例1所述方法,确定肺炎球菌各血清型荚膜多糖对应抗体稀释倍数(表13,具体为1:2~1:6之间),肺炎多糖抗原标准品的浓度范围(0.5 μ g/ml~6 μ g/ml),反应时间2.5min。根据确定的反应参数,将抗原抗体放入仪器对应位置,运行,抗原抗体取样量各20 μ l,记录各浓度下反应速率值(表14),记录线性最低点速率值(表13)。并对方法进行精密度、准确度、专属性验证。

[0220] 表13.肺炎球菌多糖鉴别试验参数范围

[0221]

血清型	1	3	4	5	6A	6B	7F
血清稀释倍数	1: 4	1: 4	1: 5	1: 6	1: 2	1: 2	1: 6
反应时间 (min)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
最低点速率值 (Rate)	5.07	24.27	2.97	1.40	0.989	1.06	5.86
血清型	9V	14	18C	19A	19F	23F	

[0222]

血清稀释倍数	1: 2	1: 6	1: 4	1: 4	1: 4	1: 6
反应时间 (min)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
最低点速率值 (Rate)	2.4	3.54	2.66	2.76	4.70	3.48

[0223] 表14.各浓度对应反应速率值

[0224]

浓度梯度/速率 值 (Rate)	血清型						
	1	3	4	5	6A	6B	7F
0.5 $\mu\text{g/ml}$	5.07	24.27	2.97	1.40	0.989	1.06	5.86
2.0 $\mu\text{g/ml}$	14.44	33.42	16.19	4.97	3.78	4.08	18.66
4.0 $\mu\text{g/ml}$	23.72	44.05	32.16	9.16	7.37	8.56	32.89
6.0 $\mu\text{g/ml}$	36.77	58.43	48.29	15.88	11.33	12.17	48.04

浓度梯度/速率 值 (Rate)	血清型					
	9V	14	18C	19A	19F	23F
0.5 $\mu\text{g/ml}$	2.4	3.54	2.66	2.76	4.70	3.48
2.0 $\mu\text{g/ml}$	11.7	13.17	5.87	9.04	12.45	11.95
4.0 $\mu\text{g/ml}$	22.33	22.33	12.43	16.34	18.02	21.60
6.0 $\mu\text{g/ml}$	30.24	27.44	30.49	44.66	22.75	19.09

[0225] (2) 取肺炎球菌多糖蛋白结合物稀释至多糖浓度为 $1\mu\text{g/ml} \sim 5.5\mu\text{g/ml}$,同时取多糖蛋白结合物溶剂系统(具体为生理氯化钠溶液)为阴性对照,将对应抗体稀释合适倍数,即肺炎球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F抗血清分别稀释4、4、5、6、2、2、6、2、6、4、4、4、6倍,将抗原抗体放入仪器对应位置,抗原抗体取样量各 $20\mu\text{l}$ 反应时间2.5min,应用建立曲线的参数测试多糖速率值。

[0226] (3) 取肺炎球菌多糖蛋白结合物稀释至含蛋白 $15\mu\text{g/ml} \sim 30\mu\text{g/ml}$,将抗毒素稀释至 25Lf/ml ,同时取肺炎球菌多糖蛋白结合物溶剂系统(生理氯化钠溶液)为阴性对照,将抗原抗体放入仪器对应位置,抗原抗体取样量各 $20\mu\text{l}$ 反应1.5min,应用建立曲线的参数测试载体蛋白速率值。

[0227] (4) 肺炎球菌多糖蛋白结合物鉴别结果见表15。由结果可以看出,肺炎球菌多糖蛋白结合物中多糖速率值均大于曲线最低点速率值,大于阴性对照速率值;肺炎球菌多糖蛋白结合物中载体蛋白速率值均大于曲线最低点速率值,大于阴性对照速率值,肺炎球菌多糖蛋白结合物鉴别试验合格。

[0228] 表15.肺炎球菌多糖蛋白结合物鉴别结果

[0229]

样品名称	1-TT	3-TT	4-TT	5-TT	6A-TT	6B-TT	7F-TT	9V-TT	14-TT	18C-TT	19A-TT	19F-TT	23F-TT
------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------	--------

[0230]

多糖速率值(Rate)	11.19	35.14	18.02	7.75	3.89	4.01	16.21	10.41	15.77	6.44	9.71	10.81	9.74
曲线最低点速率值(Rate)	5.07	24.27	2.97	1.40	0.989	1.06	5.86	2.4	3.54	2.66	2.76	4.70	3.48
阴性对照速率值(Rate)	0.418	0.781	0.201	0.582	0.309	0.414	0.107	0.215	0.870	0.445	0.397	0.794	0.289
蛋白载体速率值(Rate)	5.43	4.75	3.58	5.73	4.19	6.82	5.38	6.22	4.77	3.94	5.72	6.83	4.05
曲线最低点速率值(Rate)							0.787						
阴性对照速率值(Rate)							0.203						

[0231] 实施例9肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗鉴别

[0232] (1) 根据实施例8建立的肺炎球菌多糖蛋白结合物鉴别方法测试样品。取13价肺炎球菌多糖蛋白疫苗稀释至多糖浓度为1μg/ml~5.5μg/ml,同时取多糖蛋白结合疫苗溶剂系统(具体为生理氯化钠溶液)为阴性对照,将对应抗体稀释合适倍数,即肺炎球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F抗血清分别稀释4、4、5、6、2、2、6、2、6、4、4、4、6倍,将抗原抗体放入仪器对应位置,抗原抗体取样量各20μl反应时间2.5min,应用建立曲线的参数测试多糖速率值。

[0233] (2) 取肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗稀释至含蛋白15μg/ml~30μg/ml,将抗毒素稀释至25Lf/ml,同时取肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗溶剂系统(生理氯化钠溶液)为阴性对照,将抗原抗体放入仪器对应位置,抗原抗体取样量各20μl反应1.5min,应用建立曲线的参数测试载体蛋白速率值。

[0234] (3) 肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗鉴别结果见表16。由结果可以看出,肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗中多糖速率值均大于曲线最低点速率值,大于阴性对照速率值;肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白速率值均大于曲线最低点速率值,大于阴性对照速率值,肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗鉴别试验合格。

[0235] 表16. 多糖蛋白结合疫苗鉴别结果

[0236]

样品名称	13 价肺炎球菌多糖结合疫苗												
多糖血清型	1	3	4	5	6A	6B	7F	9V	14	18C	19A	19F	23F
多糖速率值(Rate)	19.78	42.64	15.07	8.25	5.37	4.68	11.35	9.73	10.24	5.93	9.71	9.18	7.98
曲线最低点速率值(Rate)	5.07	24.27	2.97	1.40	0.989	1.06	5.86	2.4	3.54	2.66	2.76	4.70	3.48
阴性对照速率值(Rate)	0.418	0.781	0.201	0.582	0.309	0.414	0.107	0.215	0.870	0.445	0.397	0.794	0.289
蛋白载体速率值(Rate)							3.42						

[0237]

曲线最低点 速率值 (Rate)	0.787
阴性对照速 率值(Rate)	0.203

[0238] 实施例10多糖蛋白结合物鉴别(免疫双扩散法,对比实施例)

[0239] 以肺炎球菌多糖蛋白结合物为例,说明免疫双扩散鉴别试验。

[0240] (1) 称取琼脂糖加生理氯化钠溶液煮沸使完全溶胀,配成1%琼脂糖溶液,将溶液倾倒入水平玻板上(每平方厘米约0.19ml琼脂糖),待其凝固后,按下图打孔,直径3mm,孔距3mm。中央孔加多糖对应血清型抗血清,各血清型抗血清稀释2~6倍,稀释倍数与免疫速率散射比浊法相同,即肺炎球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F抗血清分别稀释4、4、5、6、2、2、6、2、6、4、4、4、6倍,周边孔加肺炎球菌多糖蛋白结合物、阳性对照(多糖标准品)和阴性对照(生理氯化钠溶液),肺炎球菌多糖蛋白结合物不稀释(多糖浓度100 μ g/ml~150 μ g/ml之间),阳性对照稀释至多糖浓度100 μ g/ml~150 μ g/ml之间,每孔加样20 μ l,置水平湿盒中37 $^{\circ}$ C扩散48小时。再用生理氯化钠溶液充分浸泡琼脂糖凝胶板20min,以除去未结合的抗原抗体。将浸泡好的琼脂糖凝胶板取出,用滤纸压干后考马斯亮蓝G250染色液染色30min,用脱色液(乙醇:冰乙酸:水=2:9:9体积比)脱色至背景无色,期间更换脱色液4次/天,共3天,沉淀线呈清晰的蓝色为止。

[0241] (2) 按上述方法制备凝胶板,中央孔加载体蛋白抗体(破伤风抗毒素),抗毒素稀释至100Lf/ml,周边孔加肺炎球菌多糖蛋白结合物、阳性对照(破伤风类毒素参考品)和阴性对照(生理氯化钠溶液),肺炎球菌多糖蛋白结合物不稀释(蛋白浓度50 μ g/ml~150 μ g/ml之间),阳性对照稀释至蛋白浓度50 μ g/ml~150 μ g/ml之间,每孔加样20 μ l,置水平湿盒中37 $^{\circ}$ C扩散48小时。再用生理氯化钠溶液充分浸泡琼脂糖凝胶板20min,以除去未结合的抗原抗体。将浸泡好的琼脂糖凝胶板取出,用滤纸压干后考马斯亮蓝G250染色液染色30min,用脱色液(乙醇:冰乙酸:水=2:9:9体积比)脱色至背景无色,期间更换脱色液4次/天,共3天,沉淀线呈清晰的蓝色为止。

[0242] (3) 图3和图4以肺炎球菌3型多糖蛋白结合物为例,说明免疫双扩散法鉴别试验。在凝胶中多糖蛋白结合物中多糖与肺炎球菌3型抗血清反应,环状条带弥散在加样孔周围,难以判断是否为沉淀线,阴性对照不形成沉淀线,多糖蛋白结合物中载体蛋白抗毒素反应,环状条带弥散在加样孔周围,难以判断是否为沉淀线,阳性对照形成沉淀线,阴性对照不形成沉淀线,鉴别试验结果难以判断。

[0243] 实施例11多糖蛋白结合疫苗鉴别(免疫双扩散法,对比实施例)

[0244] 以肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗为例,说明免疫双扩散鉴别试验。

[0245] (1) 称取琼脂糖加生理氯化钠溶液煮沸使完全溶胀,配成1%琼脂糖溶液,将溶液倾倒入水平玻板上(每平方厘米约0.19ml琼脂糖),待其凝固后,按下图打孔,直径3mm,孔距3mm。中央孔加多糖对应血清型抗血清,各血清型抗血清稀释2~6倍,稀释倍数与免疫速率散射比浊法相同,即肺炎球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F抗血清分别稀释4、4、5、6、2、2、6、2、6、4、4、4、6倍,周边孔加肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗、阳性对照(多糖标准品)和阴性对照(生理氯化钠溶液),肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗不稀释(多糖浓

度40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间),阳性对照稀释至多糖浓度40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间,每孔加样20 μl ,置水平湿盒中37 $^{\circ}\text{C}$ 扩散48小时。再用生理氯化钠溶液充分浸泡琼脂糖凝胶板20min,以除去未结合的抗原抗体。将浸泡好的琼脂糖凝胶板取出,用滤纸压干后考马斯亮蓝G250染色液染色30min,用脱色液(乙醇:冰乙酸:水=2:9:9体积比)脱色至背景无色,期间更换脱色液4次/天,共3天,沉淀线呈清晰的蓝色为止。

[0246] (2)按上述方法制备凝胶板,中央孔加载体蛋白抗体(破伤风抗毒素),抗毒素稀释至100Lf/ml,周边孔加肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗、阳性对照(破伤风类毒素参考品)和阴性对照(生理氯化钠溶液),肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗不稀释(蛋白浓度40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间),阳性对照稀释至蛋白浓度40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间,每孔加样20 μl ,置水平湿盒中37 $^{\circ}\text{C}$ 扩散48小时。再用生理氯化钠溶液充分浸泡琼脂糖凝胶板20min,以除去未结合的抗原抗体。将浸泡好的琼脂糖凝胶板取出,用滤纸压干后考马斯亮蓝G250染色液染色30min,用脱色液(乙醇:冰乙酸:水=2:9:9体积比)脱色至背景无色,期间更换脱色液4次/天,共3天,沉淀线呈清晰的蓝色为止。

[0247] (3)图5和图6以13价肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗中4型多糖为例,说明免疫双扩散法鉴别试验。在凝胶中多糖蛋白结合疫苗中多糖与肺炎球菌4型抗血清反应,环状带弥散在加样孔周围难以判断是否为沉淀线,阴性对照不形成沉淀线,多糖蛋白结合疫苗中载体蛋白与抗毒素反应,环状带弥散在加样孔周围难以判断是否为沉淀线,阳性对照形成明显沉淀线,阴性对照不形成沉淀线,多糖蛋白结合疫苗鉴别试验结果难以判断。

[0248] 综合以上实施例,免疫双扩散鉴别多糖蛋白结合物,(1)由于分子量较大样品难以扩散,往往需扩散几十小时,耗时长,在生产中不能实现实时性;(2)当抗原抗体分子量相差较大时即使形成沉淀线,其位置会偏向分子量较大的一方,且呈弯曲状或呈弥散状,结果判定困难;(3)对于疫苗成品,由于其中抗原浓度有限,往往难以达到免疫双扩散法所需浓度,鉴别试验更难进行;(4)一块凝胶只能用于同一血清型(群)样品鉴别,且同一凝胶至多同时鉴别4个同一血清型(群)样品,有多个样品时需另行试验。本发明的鉴别方法-免疫速率散射比浊法,用于多糖蛋白结合物及疫苗的鉴别,其特征在于:(1)操作简单,从取样到结果判定均由机器完成;(2)耗时短,无需制备凝胶板、扩散、染色、脱色等步骤,且可同时鉴别72个同类和/或不同类别样品,相比于免疫双扩散法2天甚至更长的试验时间,本发明方法鉴别72个样品可在几十分钟内完成,可实现生产中的实时性;(3)灵敏度高,免疫双扩散法鉴别样品,抗原浓度通常需要样品浓度达到几十上百微克每毫升,本发明方法可鉴别浓度小于5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 样品;(4)结果以数字形式呈现更加直观;(5)若判定标准采用与曲线最低点速率值比较方法,曲线一经建立,在抗体效价不变情况下,曲线无需重新标定可重复使用,样品鉴别时只需测试样品速率值;若判定标准采用与阴性对照比较,无需标定曲线,样品测试时只需测试样品与阴性值。本发明的鉴别方法-速率散射比浊法有很强的实用价值。

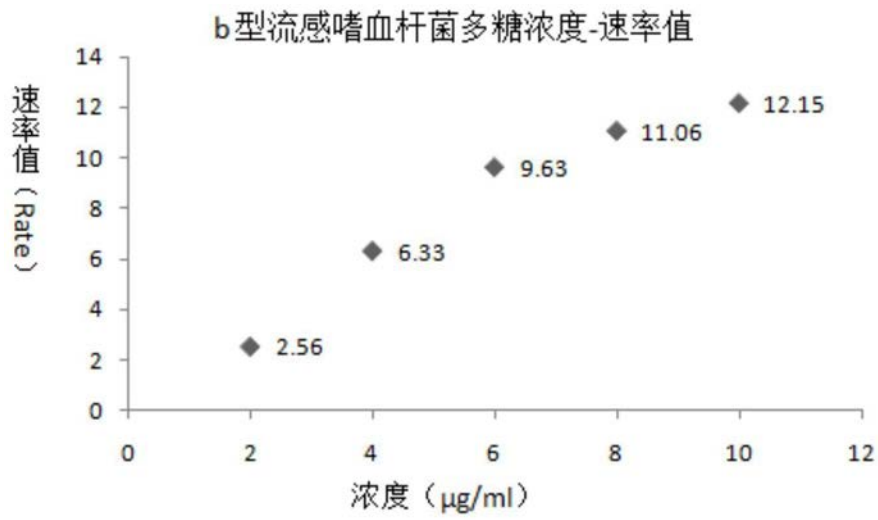


图1

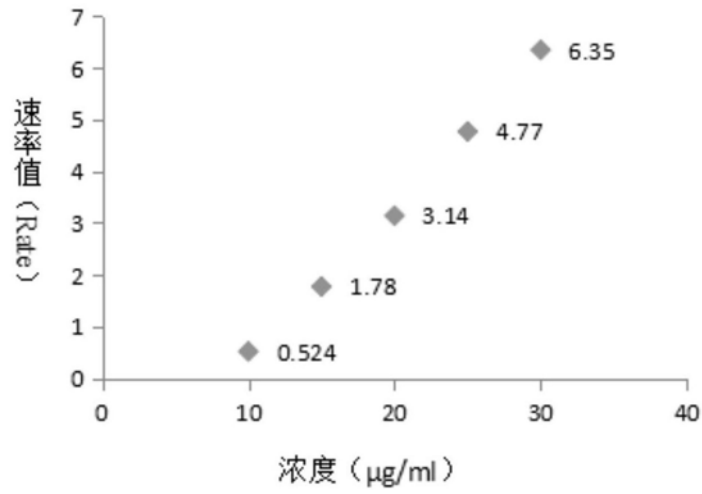


图2

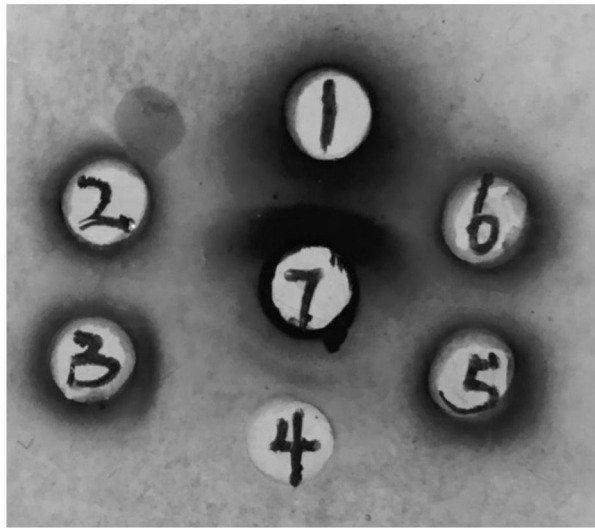


图3

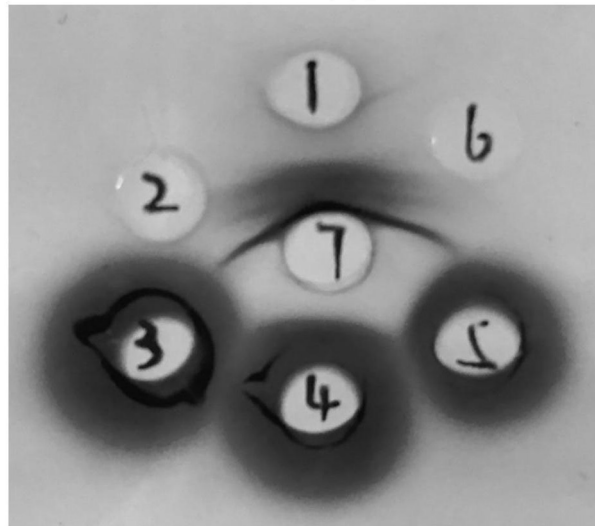


图4

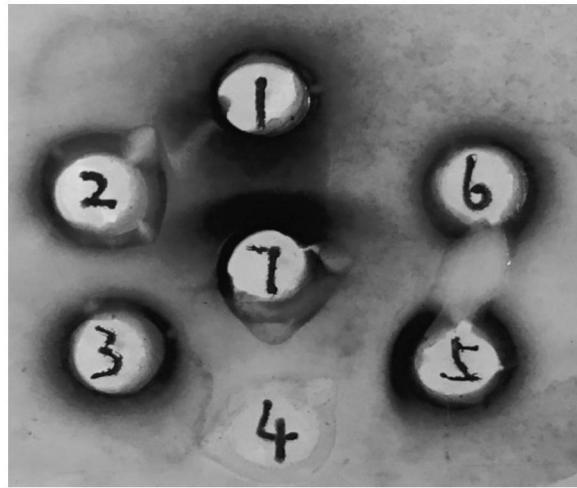


图5

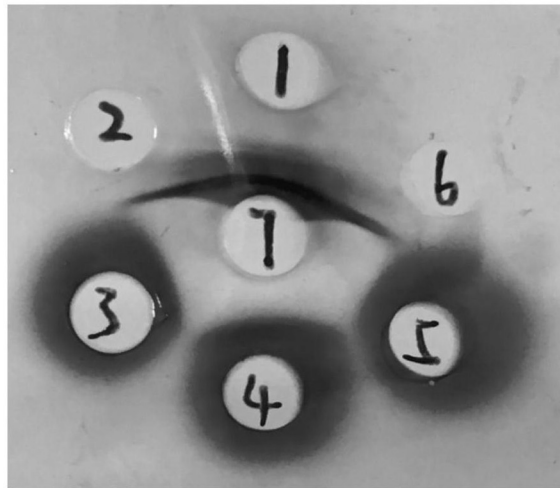


图6

专利名称(译)	一种多糖蛋白结合疫苗及其鉴别方法		
公开(公告)号	CN108904798A	公开(公告)日	2018-11-30
申请号	CN201810786353.7	申请日	2018-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	成都安特金生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	成都安特金生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	成都安特金生物技术有限公司		
[标]发明人	王倩 罗丽娜 张建军 苏玉婷 钟正丹 王超 李银波 敬小兵 刘思利 凌燕 杨冬妮 黄放 王岩 薛平		
发明人	王倩 罗丽娜 张建军 苏玉婷 钟正丹 王超 李银波 敬小兵 刘思利 凌燕 杨冬妮 黄放 王岩 薛平		
IPC分类号	A61K39/385 A61P31/04 G01N33/536		
CPC分类号	A61K39/385 A61K2039/6037 A61K2039/6081 A61P31/04 G01N33/536		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种多糖蛋白结合物及其鉴别方法，以及根据上述多糖蛋白结合物制备的多糖蛋白结合疫苗及其鉴别方法。本发明的速率散射比浊法是一种基于免疫化学方法建立的技术手段，速率散射比浊法可测量悬浮于小杯中抗原抗体复合物聚集体颗粒所造成的散射光强度变化，并在几十秒内得出反应速率值。抗原抗体反应形成复合物聚集体颗粒，因抗原和/或抗体浓度的不同而速率不同。该法特异性强，灵敏度高，节约检测时间，且抗原抗体直接接触，有利于低浓度样品检测，可用于疫苗生产过程中原液和/或半成品和/或成品的鉴别。

