(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103154737 B
(45)授权公告日 2015.07.15

(21)申请号 201180041817.8
(22)申请日 2011.08.26
(30)优先权数据
10181634.6 2010.09.29 EP
61/377485 2010.08.27 US
12/875618 2010.09.03 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.02.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2011/064702 2011.08.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/025612 EN 2012.03.01
(73)专利权人 英特维特国际股份有限公司
地址 荷兰博克斯梅尔
(72)发明人 M·阿伦 M·加雷特 U·P·布鲁德雷尔 M·A·J·蒂森
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 熊玉兰 万雪松
(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
(56)对比文件
US 4703001 A1,1987.10.27, 说明书第2-3栏,第5栏第5-6段.
CN 101583872 A,2009.11.18, 说明书第2页,第4页第1-2,5-6段,第5页第5段.
US 4459359 A,1984.07.10, 全文.
US 2009/0317423 A1,2009.12.24, 全文.
CN 1239225 A,1999.12.22, 全文.
CN 1387443 A,2002.12.25, 全文.
CN 101545904 A,2009.09.30, 全文.
刘梅影等.DTaP-Hib联合疫苗中Hib-TT免疫原性研究.《微生物学免疫学进展》.2008, 第36卷(第4期),27-30.
Michelle Durkin et al.Detection of Coccidioides Antigenemia following Dissociation of Immune Complexes.《CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY》.2009, 第16卷(第10期),1453-1456.
李贵凡等.无细胞百白破b型流感嗜血杆菌联合疫苗的研制.《中国生物制品学杂志》.2008, 第21卷(第9期),790-791.
Aaron Patton et al.An acid dissociation bridging ELISA for detection of antibodies directed against therapeutic proteins in the presence of antigen.《Journal of Immunological Methods》.2005, 第304卷189-195.
审查员 李宏悦

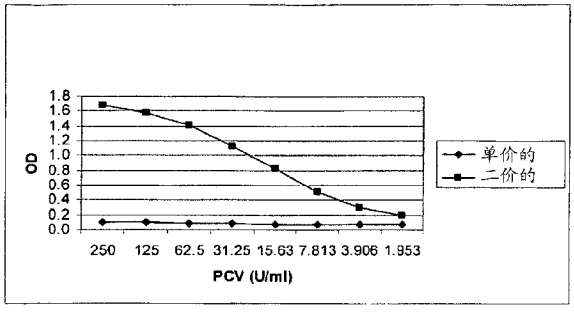
权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

疫苗制剂的效价测试

(57)摘要

本发明涉及测定混合物中第一抗原的抗原含量的某些方法,该混合物包含两种或更多种抗原。本发明还涉及联合疫苗中抗原的效价测试。该方法允许测定在额外包含能够与抗原结合的抗体的混合物中的抗原含量。



CN 103154737 B

1. 一种测定至少含有第一抗原的组合物、以及含有 (i) 第二抗原和 (ii) 能够结合第一抗原的抗体的组合物的联合疫苗中第一抗原的抗原含量的方法，所述方法包括以下步骤，

A 解离联合疫苗中第一抗原和抗体间形成的抗原 - 抗体复合物，和

B 通过免疫测定来确定第一抗原的抗原含量。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于第一抗原是 PCV-2 抗原，且第二抗原是猪肺炎支原体 (Mycoplasma hyopneumoniae) 抗原。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于免疫测定是 ELISA（酶联免疫吸附测定）。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于联合疫苗是即用型的疫苗制剂。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于将联合疫苗与酸溶液孵育以解离抗原 - 抗体复合物。

6. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于酸溶液是柠檬酸溶液。

7. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于联合疫苗与酸溶液孵育至少 8 小时。

8. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，在酸溶液与联合疫苗的体积比为至少 25:1 下孵育联合疫苗。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，在酸溶液与联合疫苗的体积比为 25-75:1 下孵育联合疫苗。

10. 根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于，在酸溶液与联合疫苗的体积比为 25-50:1 下孵育联合疫苗。

11. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于酸溶液的 pH 为 1.0-3.0。

12. 一种测定至少含有 PCV-2 抗原的组合物和含有猪肺炎支原体抗原的组合物的联合疫苗中 PCV-2 抗原的抗原含量的方法，所述方法包括以下步骤，

A 混合两种组合物，和

B 通过免疫测定来确定 PCV-2 抗原的抗原含量，

其特征在于猪肺炎支原体抗原从不含猪血清的培养物中获得。

13. 一种测定至少含有第一抗原的组合物和含有第二抗原的组合物的联合疫苗中第一抗原的抗原含量的方法，所述方法包括以下步骤，

A 在含有第二抗原和能够与第一抗原结合的抗体的组合物中分离第二抗原与所述抗体，

B 将第二抗原与含有第一抗原的组合物混合，并且，

C 通过免疫测定来确定联合疫苗中第一抗原的抗原含量。

14. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于所述方法是联合疫苗的效价测试。

疫苗制剂的效价测试

发明领域

[0001] 本发明涉及测定混合物中第一抗原的抗原含量的特定方法，该混合物包含两种或更多种抗原。本发明还涉及针对联合疫苗中抗原的效价测试 (potency test)。

[0002] 发明背景

[0003] 含有从不同病原生物衍生的保护性抗原的联合的疫苗对于疫苗接受者和生产者都具有多重明显的益处。尤其是联合或者多价疫苗，通过减少所需的注射次数和可能地护理次数，提供增加的施用容易性和对病人的更大舒适性及便利性。由于节省了组合散装材料 (bulk material) 的加工、容器、包装、分配以及注射设备，它们对于制造和施用也是更加经济的。

[0004] 在人类健康领域，联合疫苗常被用于做婴儿免疫的情形。联合疫苗如带有或不带有灭活脊髓灰质炎的 DTP（白喉，破伤风和百日咳）、以及 MMR（麻疹，流行性腮腺炎和风疹）已经应用多年，并且近些年新的抗原已加入该联合中。

[0005] 在动物健康领域，联合疫苗也被普遍应用。尤其是家禽、猪、反刍动物和宠物的疫苗往往是基于多种抗原的联合。这些疫苗的例子是针对对犬的犬瘟热、肝炎、II 型副流感、细小病毒、钩端螺旋体和狂犬病毒，对家畜的轮状病毒、冠状病毒和大肠杆菌，对家禽的新城疫病毒、传染性支气管炎、传染性法氏囊病、肿头综合征和产蛋下降综合征的联合疫苗。

[0006] 一批疫苗只有在发出许可证或上市授权后才可准予销售。此外，该获得授权的疫苗批次的每个后续批次必须遵守所涉及的一州或多州的规定正式准许。这样的准许可在规定的批次测试令人满意地完成后基于制造商的授权而允许。因此，为了保证每一批次及各个批次的疫苗会具有其意图的效果，必须执行质量恒定的制造过程，并且效价测试的应用是该过程的重要部分。

[0007] 目前，不同的测试方法被用于测定疫苗效价，如生理化学性质、抗原性、免疫原性、感染性以及抗感染或疾病的保护性的测定。它们的应用取决于疫苗抗原的性质和测试的目的。在活疫苗中，效价可以基于疫苗中存在的生物数目（滴度）。在灭活疫苗的情况下，通常通过测定靶动物物种或者其他物种如小鼠或大鼠中的免疫反应来测定效价。可选地，灭活疫苗的效价可以基于其抗原性，通过测定存在的抗原的数量（抗原量），应用使用特异性抗体的免疫测定，如 ELISA（酶联免疫吸附测定）进行。

[0008] 虽然，对联合疫苗中个别抗原组分的药典需求提供了起点来建立相关及有效的效价测试，但是在更复杂的联合疫苗中各种组分间相互作用导致的问题是公知的 (Vidor, J.Comp.Path.137,62-66,2007;Sesardic et al.,Biologicals27,177-181,1999)。每个联合疫苗由活性组分赋形剂和残余物质的独特聚集体组成。这些物质中的任何都可干扰特定活性组分效价的精确测定。对于抗原的抗原性或免疫原性的干扰可能由存在的其它抗原的性质、其质量、数量或比例、佐剂、防腐剂、稳定剂、pH 值、疫苗的等渗性等引起。

[0009] 本发明人现在已经鉴定了在分别混合包含抗原和其他组分的组合物之后，联合疫苗中特定抗原和其他组分间意想不到的相互作用。

发明内容

[0010] 令人惊讶地，发现在含有第一抗原的组合物和含有第二抗原的组合物的混合物中，第一抗原的抗原性受到结合该第一抗原从而形成抗原－抗体复合物的抗体的存在的影响，并且这些抗体可以来自含有第二抗原的组合物。实施例 1 和 2 显示下列问题：在含有不同抗原的组合物的混合物中，抗原无法被有效地检测，以及在这种混合物中可形成抗原－抗体复合物，其中抗体来自与含待测抗原的组合物不同的组合物。此外，发现抗原－抗体复合物的解离导致第一抗原的抗原性恢复。这些干扰抗体的存在可由在衍生自动物的血清的存在下体外培养特定微生物（第二抗原）的必要性以及从其收获血清的这些动物被诱发针对第一抗原的抗体的微生物感染来解释。混合物中这些抗体对第一抗原的抗原性的干扰影响免疫测定中第一抗原的定量，例如效价测试用于准许疫苗批次进行销售。

[0011] 简言之，本发明涉及测定至少包含第一抗原的组合物和包含第二抗原的组合物的混合物中第一抗原的抗原含量的方法。

[0012] 更具体地，本发明涉及这样的方法，其中包含第二抗原的组合物还包含能够结合第一抗原的抗体。

[0013] 本发明还涉及测定混合物中第一抗原的抗原含量的方法，所述混合物为至少包含第一抗原的组合物、以及含有 (i) 第二抗原和 (ii) 能够结合第一抗原的抗体的组合物的混合物，该方法包括如下步骤，

[0014] A 解离混合物中第一抗原及抗体间形成的抗原－抗体复合物，和

[0015] B 通过免疫测定来测定第一抗原的抗原含量。

[0016] 免疫测定的设计可以变化，并且可以与本领域中通常用于定量样品中病毒或细菌抗原的那些免疫测定类似。例如，测定可以基于竞争性或者直接反应。此外，方案可以使用固体载体，如微量滴定板。抗原的检测可以涉及对第一抗原具有特异性的（直接地或间接地）标记抗体（检测抗体）的应用，并且标记可以是酶分子、荧光分子、化学发光分子、放射性分子或者染料分子。检测抗体可以是单特异性的多克隆抗体或者单克隆抗体。用于根据本发明方法的典型免疫测定在标准的实验室教科书中描述，如 Antibodies:A Laboratory Manual，eds.:Harrlow and Lane，Cold Spring Harbor Laboratory Press，1988。这些测试的实例是凝集测定、ELISA 以及 AlphaLISA。

[0017] 抗原可以是任意类型的抗原，但是优选来自对人或动物有病原性的微生物。尤其地，抗原来自病毒或细菌。

[0018] 一般地，术语抗原是指含有至少一个表位的物质组合物，当施用给人或动物时，所述表位能够诱导、刺激或者增强免疫反应。

[0019] 抗原可以是完整的病原体，优选灭活或减毒形式，病原体的提取物或者病原体的免疫原性蛋白。

[0020] 更优选地，抗原为在体外培养的细胞中表达及从所述细胞回收的免疫原性蛋白。

[0021] 特别地，第一抗原可以是病原体的抗原，该抗原在特定动物物种中诱导（通过自然暴露或者疫苗接种）高度普遍的病原体特异性抗体。

[0022] 例如，该病原体可以选自猪 II 型环状病毒 (PCV-2)，猪红斑丹毒丝菌 (Erysipeiothrix rhusiopathae)，蓝舌病毒，边缘病病毒，犬新孢子虫，火鸡冠状病毒以及手足口病病毒。

[0023] 特别地，第二抗原可以是病原体的抗原，该病原体的体外培养取决于来自特定动物物种的血清。

[0024] 例如，这种病原体可以选自支原体属，劳森氏菌 (Lawsonia)，利士曼原虫属，巴贝虫属，弓形虫属以及新孢子虫属。

[0025] 在根据本发明的特别优选方法中，第一抗原是猪 II 型环状病毒 (PCV-2) 抗原，尤其是 PCV-2ORF2 抗原。

[0026] 在根据本发明的方法中待使用的 PCV-2ORF2 抗原代表约 30kDa 的蛋白，并且用作可商购的 PCV2 疫苗中的活性组分，所述疫苗如 Porcilis™PCV(Intervet/Schering-Plough Animal Health，Netherlands)，Ingelvac™CircoFLEX(Boehringer Ingelheim Veteedica Inc.，USA) 以及 Suvaxyn™PCV(Fort Dodge Animal Health，USA)。根据本发明的方法中待使用的 PCV-2ORF2 可以例如从体外培养的感染了重组杆状病毒的昆虫细胞获得，所述重组杆状病毒用编码 PCV-2ORF2 蛋白的基因转化并且在昆虫细胞中表达该蛋白 (Fort et al.，Vaccine27，4031-4037，2009；Nawagitgμ L et al.，J.Gen.Virol.81 2281-87，2000 和 Fachinger et al.，Vaccine26，1488-99，2008)。

[0027] 在根据如上述本发明的另一优选方法中，第二抗原是猪肺炎支原体 (M.hyo)，且含有第二抗原的组合物还含有血清，尤其是针对第一抗原并能够结合第一抗原的血清抗体。

[0028] 在根据本发明的特别优选方法中，第一抗原是 PCV-2 抗原，优选地，是 PCV-2OR2 蛋白；且第二抗原是 M.hyo 抗原，优选地，是 M.hyo 菌苗。

[0029] 基本上，本发明的方法包括在常规的免疫测定中确定其抗原含量之前对包含待分析抗原的混合物进行预处理。该预处理牵涉在第一抗原和能与该第一抗原结合的抗体间形成的抗原－抗体复合物的解离。发明人已示出，这一解离步骤使得第一抗原可再次在免疫测定中用于定量。

[0030] 在人和动物健康领域，生产包含两种以上不同抗原的联合疫苗都是常见的。尤其是在动物健康领域，包含 3 到 6 种不同抗原的联合疫苗不是罕见的。因此，本发明的方法也考虑混合物中第一抗原的抗原含量的测定，所述混合物由含有不同抗原的两种以上组合物、尤其是 3 到 6 种组合物构成。

[0031] 根据如上所述的本发明的特别适合的方法包括众所周知的 ELISA 法作为免疫测定。

[0032] 在根据如上所述的本发明方法中应用的示例性 ELISA 中，应用如下步骤：－用针对第一抗原的捕获抗体包被 ELISA 微量滴定板的孔，所述抗体优选单克隆抗体，

[0033] －在孔中孵育待分析的混合物的测试样本（的系列稀释物），在其旁边设置参比标准（的系列稀释物），以及合适的对照溶液。

[0034] －用针对第一抗原的检测抗体、优选单克隆抗体孵育孔。检测抗体可以是酶直接标记的，优选地是酶间接标记的。更优选地，检测抗体为生物素化的抗体。

[0035] －在间接标记的情况下，用酶与抗体结合的酶－缀合物孵育孔。优选地，缀合物是抗生物素蛋白－酶缀合物。

[0036] －向孔中加入酶底物溶液，然后进行发色检测。针对参比标准计算测试样本中的抗原量。更详细的 ELISA 过程在实施例中描述。

[0037] 典型地，本文应用的酶是辣根过氧化物酶，且酶底物是 TMB((3,3′,5,5′－四甲

基联苯胺）。

[0038] 根据本发明的方法可以用来在联合疫苗生产过程中的不同阶段测定混合物中某种抗原的效价。例如，该方法可以用于混合物样品，其由含有抗原的两种或更多种组合物构成，直接从培养容器中收获。

[0039] 可选地，组合物包含如通过离心法、过滤法或者沉淀法进一步纯化形式的抗原。

[0040] 理想情况下，测定即用形式的最终疫苗制剂中的疫苗中抗原的效价。即用疫苗制剂包括允许疫苗用于该领域的必要和足够的所有组分和赋形剂。尤其地，即用疫苗含有两种或更多种抗原，佐剂，稳定剂和防腐剂。

[0041] 因此，在根据如上所述本发明的优选方法中，混合物是即用疫苗制剂。

[0042] 在根据如上所述本发明的特别优选方法中，混合物用酸溶液孵育以解离抗原－抗体复合物。

[0043] 在这一预处理步骤中，混合物被酸（解离）溶液稀释，任选地作为缓冲液，例如PBS缓冲液或者Tris-HCl缓冲液，并且孵育使得抗原－抗体复合物解离。孵育可以在室温下在轻微振荡下发生。在预处理步骤之后在免疫测定中分析酸处理过的混合物样品，优选地，将酸处理过的混合物样品加入ELISA板中，并如前所述进一步测试。

[0044] 已发现酸溶液的性质并不是关键的。实例显示出：许多酸溶液能够解离抗原－抗体复合物，同时保持抗原的抗原性不受影响。

[0045] 在根据如上所述本发明的另一优选方法中，酸溶液是醋酸溶液，硫酸溶液，盐酸溶液或者柠檬酸溶液，优选地，酸溶液是柠檬酸溶液。

[0046] 在根据如上所述本发明的可选方法中，酸溶液是缓冲液。

[0047] 混合物用酸溶液的孵育时间可以随着抗原－抗体复合物中抗原的性质变化。优选地，应用即用疫苗的孵育时间为至少8小时，优选8-18小时，更优选16-18小时。

[0048] 因此，在根据如上所述本发明的另一优选方法中，混合物用酸溶液孵育至少8小时。

[0049] 发明人已发现：酸溶液和混合物的比（v/v）可影响抗原－抗体复合物的解离水平。在酸溶液和混合物的比例（v/v）为至少25时，尤其是比例（v/v）为25-75时，更尤其是比例（v/v）为25-50时，得到了良好的结果。

[0050] 因此，在根据如上所述本发明的另一优选方法中，混合物在酸溶液与混合物的比（v/v）为至少25，优选为25-75，更优选为25-50下孵育。

[0051] 在根据如上所述本发明的另一优选方法中，酸溶液的pH值为1.0-3.0，优选1.5(±0.2)。

[0052] 任选地，在根据如上所述本发明的方法中，在混合物与酸溶液孵育之后，但是在免疫测定中分析其之前，将酸处理过的混合物的pH值提高至更为中性的pH，优选5-7。这可以通过向酸处理过的混合物中加入碱溶液或者缓冲液实现。用于此目的的合适的溶液是氢氧化钠，磷酸盐或者Tris缓冲液。

[0053] 本发明还涉及测定混合物中PCV-2抗原的抗原含量的方法，所述混合物为至少含有PCV-2抗原的组合物和含有M.hyo抗原的组合物的混合物，所述方法包括以下步骤，

[0054] A混合两种组合物，并且

[0055] B用免疫测定来测定PCV-2抗原的抗原含量，

[0056] 其特征在于M.hyo抗原从包含非猪血清的培养物中获得。

[0057] 特别地，M.hyo抗原从含有牛、马或者羊血清的培养物中获得(Almad et al.，Avian diseases32,519-526,1988;Ramirez et al.,178,149-152,2008)。

[0058] 在另一可选的方法中，对含有第二抗原和针对第一抗原的抗体的组合物进行这两种组分的分离，之后将仅含有第二抗原的组合物和含有第一抗原的组合物混合。随后，用免疫测定来测定第一抗原的抗原含量。

[0059] 因此，本发明还涉及测定混合物中第一抗原的抗原含量的方法，所述混合物为至少含有第一抗原的组合物和含有第二抗原的组合物的混合物，所述方法包括如下步骤，

[0060] A在含有第二抗原和能够结合第一抗原的抗体的组合物中将第二抗原与所述抗体分离，

[0061] B将第二抗原与含有第一抗原的组合物混合，和

[0062] C用免疫测定来测定混合物中第一抗原的抗原含量。

[0063] 第二抗原从如其中培养抗原的培养基中的分离可以通过适于这一目的的常规方法进行。例如，在第二抗原是细菌的情况下，可以通过在15,000g下离心10分钟分离它们。

[0064] 也可通过下列方法常规实现分离，其中抗体用对抗体显示亲和力的配体捕获的免疫耗竭，然后分离这些配体-抗体复合物与第二抗原。通常用于这一目的的配体为Protein-G、Protein-A或者是针对待分离抗体的抗体。通常这些配体结合于协助将抗原与抗体分离的固相(如Sepharose4B)。

[0065] 因此，在这一方法的优选实施方案中，通过离心或者免疫耗竭步骤实现分离。

[0066] 在这一方法的另一优选实施方案中，待使用的抗原和其中采用的免疫测定与上文限定的那些相同。

[0067] 本发明还涉及如上所述的任何方法，其进一步特征在于所述方法是联合疫苗的效价测试。

[0068] 疫苗的效价测试定义为测定疫苗特异性能力或潜力的测试，如通过合适的实验室测试或者通过充分受控的临床数据所示，所述数据通过以意图方式施用疫苗而实现保护性免疫而获得。如此，本发明中应用的效价测试是用于商品化目的产生的疫苗批次的测试，提供显示该疫苗批次是否符合关键的测定参数的数据。

[0069] 在根据本发明所述的优选效价测试中，免疫测定是ELISA(如上所概述)，并且关键的测定参数是以ELISA单位(EU)表示的混合物中第一抗原的抗原量。EU与抗原的内参标准相关，该内参标准又与靶动物中的保护性免疫相关。

实施例

[0070] 实施例1.ELISA中M.hyo组合物对PCV-2抗原的定量的影响

[0071] 作为质量控制方法，含PCV2疫苗的浓度在基于两种PCV2特异性的单克隆抗体的夹心ELISA中测定。但是与单价疫苗相比，在含有PCV2和猪肺炎支原体(M.hyo)制剂的二价疫苗中，测定到显著低于预期的浓度。

[0072] 含有猪肺炎支原体和PCV2抗原的联合疫苗如下制备：通过在肉汤培养基中培养猪肺炎支原体菌株11产生猪肺炎支原体全细胞抗原，所述培养基基于Friis最初描述的培养基(Nord.Vet.-Med.,27,337-339,1975)。这是包含酵母提取物、血清以及多种猪源和牛

源提取物的复合培养基。在培养的末期，细菌细胞被灭活，并且通过超滤法将整个培养物浓缩至少 10 倍，且用于疫苗配制。PCV2ORF2 抗原在草地贪叶蛾 (Sf21) 细胞中应用杆状病毒表达重组制备，所述草地贪叶蛾细胞培养在适于昆虫细胞生长的培养基中。在收获病毒液并灭活病毒颗粒后，通过离心浓缩 PCV2ORF2 抗原，且用于疫苗生产。为制备联合疫苗，将两种抗原混合，用缓冲液稀释并与 w/o 佐剂 Xsolve（维生素 E 乙酸盐 / 轻液体石蜡 / 吐温 80）以 70/30 的比例 (v/v) 混合。

[0073] 表 1 中示出 PCV2 制备物与安慰剂或几个批次的 M.hyo 制备物混合的结果的概述。

[0074] 表 1. M.hyo 对通过 ELISA 的 PCV 定量的影响

[0075]

	PCV 批次 #1		PCV 批次 #2		PCV 批次 #3	
ELISA	单位 a)	回收率(%) b)	单位	回收率(%)	单位	回收率(%)
-	2961	100	2765	100	2482	100
M.hyo 批次 #1	1109	37.5	1607	58.1	1627	65.6
M.hyo 批次 #2	960	32.4	1641	59.3	1838	74.1
M.hyo 批次 #3	939	31.7	2171	78.5	1983	79.9

[0076] a) PCV 浓度通过经 ELISA 比较参比制备物和测试样本的滴度测定。为此，用最适浓度的单克隆抗体 3/1B4-INT（在 pH9.6 的碳酸盐缓冲液中稀释）孵育 96 孔 Nunc MaxiSorp 板 4℃过夜，在含有 BSA 和 Tween 的 PBS(EIA 缓冲液）中稀释的参比液和测试样本系列稀释物在 37℃孵育 1 小时。随后是洗涤步骤，用在 EIA 缓冲液中稀释的最适浓度的生物素标记的单克隆抗体 5/6H12-INT 在 37℃孵育 1 小时。随后是洗涤步骤，用 EIA 缓冲液中稀释的最适浓度的 HRP- 标记抗生物素蛋白在 37℃孵育 0.5 小时。随后是洗涤步骤，用最适浓度的 TMB 底物孵育 15 分钟，通过硫酸终止，并用酶标仪测量光密度。用 4PL 法计算浓度。值表示为 ELISA 单位（三次测定的平均值）。

[0077] b) 与缺乏 M.hyo 的含相同量的 PCV 的疫苗相比的回收率 (%)。

[0078] 这些结果显示在含有 PCV 和 M.hyo 的疫苗中，M.hyo 负面影响联合疫苗中 PCV-2 抗原的检出能力，且回收程度 (31%-80%) 取决于混合的 PCV-2 和 M.hyo 制备物的联合。

[0079] 实施例 2 抗原 - 抗体复合物的鉴定

[0080] 已通过夹心 ELISA 证明二价 PCV-2/M.hyo 疫苗中的抗原抗体复合物。用包被于微量滴定板孔的抗 PCV-2 单克隆抗体捕获 PCV-2 抗原与猪抗 PCV-2 多克隆抗体间的复合物，并用酶标记的抗猪 IgG 缀合物检测。图 1 示出了含有 PCV-2 的单价疫苗以及含有 PCV-2 和 M.hyo 的二价疫苗的滴度。ELISA 如实施例 1 中所述进行，除了替代标记的抗 PCV 单克隆抗体，用酶标记的抗猪 IgG 缀合物检测复合物。数据点代表三次重复的平均值。结果证明 :a) M.hyo 制备物含有猪抗 PCV-2 抗体，和 b) 这些抗体与 PCV-2 形成复合物。（图 1）

[0081] 对于二价疫苗中 PCV-2 检出能力减弱的最可能解释是：猪抗 PCV-2 抗体阻断了 PCV-2 夹心 ELISA 中相关的 PCV-2 表位。发现在用于培养 M.hyo 用于以商业规模制造疫苗的培养基中必需的商品化猪血清批次中存在 PCV-2 抗体。

[0082] 实施例 3 对逆转 M.hyo 抑制效果的尝试

[0083] 通过处理含相同量 PCV-2 但缺少 M.hyo（单价疫苗）或包含（二价疫苗）M.hyo 的两种疫苗制备物来测试逆转 M.hyo 制备物抑制效果的过程。在稀释液中多种浓度试剂 (SDS，Tween Triton，脱氧胆酸钠，尿素）存在下进行如实施例 1 中所述的夹心 ELISA。另外，测定硫酸铵 (AS) 沉淀（不存在或存在 Triton) 的上清液和团块以及按大小分离的级分（存在 Triton)。

[0084] 表 2. 疫苗处理的效果

[0085]

处理	浓度范围	回收率（%）	
		单价的	二价的
-		100	33.9
SDS（%）	0.25-2	72-167	24-48
Tween（%）	0.1-5.4	106-116	26-30
Triton-X100（%）	0.1-5.4	113-119	32-35
脱氧胆酸钠（%）	0.1-5.4	113-129	31-44
尿素（M）	1-8	0-101	0-47

[0086]

硫酸铵沉淀（%），上清液	2.5-80	ND	3-37
硫酸铵沉淀（%），团块	2.5-80	ND	0.2-7.6
2% SDS，硫酸铵沉淀（%），上清液	2.5-80	2.7-16	0.1-25
2% SDS，硫酸铵沉淀（%），团块	2.5-80	6.6-17	0.4-16
10% Triton-X100，过滤>300kD		56	9
10% Triton-X100，过滤<300kD		3	1

[0087] 表 2 的结果显示：处理均不使单价疫苗不受影响并且逆转了 M.hyo 的抑制效果。

[0088] 实施例 4：酸处理对病毒抗原 - 抗体复合物的影响

[0089] 酸处理的潜能已被评估。将 1 份（体积）疫苗与 49 份 0.1M 的柠檬酸（蒸馏水稀释的）混合，在室温下伴随轻微振荡孵育过夜。

[0090] 表 3 中示出用发展的标准方法产生的代表性结果。

[0091] 表 3. 酸处理的影响

[0092]

	酸处理	PCV 批次 #1		PCV 批次 #2		PCV 批次 #3	
		单位 a)	回收率 (%) b)	单位	回收率 (%)	单位	回收率 (%)
-	-	2961	100	2765	100	2482	100
	+	3273	100	2941	100	3430	100
M. hyo 批次 #1	-	1109	37.5	1607	58.1	1627	65.6
	+	3061	93.5	2844	96.7	3110	90.7
M. hyo 批次 #2	-	960	32.4	1641	59.3	1838	74.1
	+	3124	95.4	2760	93.8	2950	86.0
M. hyo 批次 #3	-	939	31.7	2171	78.5	1983	79.9
	+	3247	99.2	2875	97.8	3468	101.1

[0093] a)-b) 如实施例 1 中所述

[0094] 表 3 中的结果表明酸处理可以逆转 M. hyo 制备物的抑制效果。

[0095] 实施例 5: 酸处理对细菌抗原 - 抗体复合物的影响

[0096] 为了证明酸处理对细菌抗原 - 抗体复合物的影响，在进行酸处理或不进行酸处理的情况下，在存在和缺乏人工加入的包含塔氏钩端螺旋体 (L. tarassovi) 特异性抗体的犬血清多克隆抗体下，在夹心 ELISA(与 PCV-2ELISA 相似) 中定量针对钩端螺旋体病的犬疫苗的组分 (塔氏钩端螺旋体 (Leptospirae tarassovi))。

[0097] 表 4. 通过 ELISA 测定细菌抗原以及抗原 - 抗体复合物 a)

[0098]

处理	A	B	C	D
猪多克隆抗塔氏钩端螺旋体抗体的孵育	-	+	-	+
酸处理	-	-	+	+
ELISA（对照的%）	100	50.9±2.1	93.8±1.8	99.2±3.6

[0099] a) 基本如实施例 1 中所述通过 ELISA 对塔氏钩端螺旋体抗原定量，其中使用塔氏钩端螺旋体特异性单克隆抗体 (A)。在用 ELISA 进行抗原定量前，将含有抗塔氏钩端螺旋体多克隆抗体的犬血清和抗原进行孵育 (B，D)。酸处理如实施例 4 中所述进行。ELISA 结果表示为对照实验 (A) 的百分比。值为两次重复的平均值 ± 标准差。

[0100] 这些结果表明 :酸处理可以逆转犬血清抗体对于 ELISA 定量细菌疫苗组分的抑制效果。

[0101] 实施例 6: 影响酸处理的参数

[0102] 6.1 不同酸和碱的能力

[0103] 表 5 中概述几种酸和碱对测定疫苗制备物中抗原含量的影响

[0104] 表 5. 用不同的酸和氢氧化钠处理

[0105]

处理[a)]	柠檬酸	醋酸	硫酸	盐酸	氢氧化钠
	回收率(%)	回收率(%)	回收率(%)	回收率(%)	回收率(%)
ELISA[b)]	97[c)]	94	98	128	0[d)]

[0106] a) 如实施例 4 中所述处理二价疫苗制备物，除了所有酸调节为 pH = 1.5，氢氧化钠调节为 pH = 13.5。

[0107] b) 如实施例 1 中所述通过 ELISA 测定 PCV 浓度。

[0108] c) 回收率表示为测量的浓度与未经处理的浓度的百分比。

[0109] d) 通过 ELISA 不可检测的 PCV

[0110] 这些结果表明：M.hyo 的抑制效果与所用的酸的类型无关。

[0111] 在 pH13.5 用氢氧化钠处理完全破坏 PCV-2 抗原通过 ELISA 的检测。这可能是因为 ELISA 中应用的单克隆抗体识别的 PCV-2 表位的破坏。

[0112] 6.2 酸浓度的影响

[0113] 通过改变 0.1M 柠檬酸与单价或二价疫苗间的比 (v/v)，测定酸浓度的影响。(图 2)

[0114] 图 2 中的结果表明：通过用比例≥ 25 的酸处理，可以克服二价疫苗的低回收率。

[0115] 6.3 处理时间的影响

[0116] 图 3 中示出处理时间的影响。

[0117] 结果表明：对于足够程度的抑制逆转，需要处理≥ 8 小时。

[0118] 6.4pH 值的影响

[0119] 通过不同 pH 值下的酸处理评估 pH 值的影响。(图 4)

[0120] 这些数据表明：在 pH ≤ 3 的酸处理导致 M.hyo 制备物的抑制效果的显著逆转。

[0121] 实施例 7：通过 AlphaLISA 法测定 PCV ORF2 抗原含量

[0122] 7.1 目标：

[0123] 为了评估所用的分析方法的效果，检测被第二抗原样品中的抗体阻断的第一抗原的酸预处理是否也是必要的，如果通过高敏感性的 AlphaLISA 法进行第一抗原含量测定。

[0124] 7.2 材料：

[0125] 注射用水中的 0.1 和 0.2M 柠檬酸；免疫测定缓冲液：PBS+0.05%Tween-80；生物素化的小鼠 PCV ORF2 特异性单克隆抗体：5/6H12-INT，同实施例 1 中所述；未缀合的受体珠 (AlphaScreen™，perkin Elmer)；抗生物素蛋白包被的供体珠 (AlphaScreen™，PE)；设备：EnVision™2104 多标记微孔板检测仪 (PE)。

[0126] 7.3 方法：

[0127] 使用含有 PCV Orf2 和 M.hyo 抗原的 4 个单独批次的联合疫苗用于这些测试。PCV 抗原或是不进行处理地检测，或是用 0.1 或 0.2M 柠檬酸预孵育，如实施例 4-6 所述，

和在不同的预稀释物中孵育。然后将该抗原加入免疫测定缓冲液，每 5μL 样品含有约 10.000ELISA 单位的 PCV2 抗原，将样品转移至 384 孔板的孔中，接下来在测试缓冲液中以 8 个连续梯度 1 ： 2 稀释。单独预稀释生物素化的 PCV Moab 5/6H12-INT，并将 5μL 样品加入测试孔中。相似地，依照厂商说明书，将 PCVOrf2Moab3/1B4-INT 特异性的小鼠第二单克隆抗体（见实施例 1）与受体珠缀合。将它们进行适当稀释并向测试孔中加入 20μL 样品。将孔（现在有 30μL）在 2-8℃孵育过夜。接下来，在弱光下将预稀释的供体珠 20μL 加入，密封孔，室温下孵育 1 小时。读取平板，利用标准电子表格软件通过标准的 LogitLog 转换和线性回归计算分析结果。使用与标准样品最高相关的曲线部分，以便最多 8 个数据点可应用。

[0128] 实验分组为 :A: 在仅测定缓冲液中的 1:5 预稀释的联合疫苗抗原，未用酸预处理 ;B:1:5 稀释的抗原，用 0.1M 柠檬酸预处理 ;C:1:20 稀释的抗原，用 0.1M 柠檬酸预处理 ; 和 D:1:5 稀释的抗原，用 0.2M 柠檬酸预处理。PCV2 抗原标准样品具有 7696Elisa 单位 / 毫升的平均值，测试样品与该值相比。

[0129] 7.4 结果 :

[0130] 所有测试双份进行 ; 两个测试的结果差异小于 20%。表 6 中示出来自反应 (runs) 之一的一个样品的典型结果。

[0131] 表 6 :通过 AlphaLISA 测定时柠檬酸预处理的影响

[0132]

样品			AlphaLISA U/ml	
	预处理	U/ml	测定的	比例 *)
STD		7696	7599	0.987
A	1:5，在测定缓冲液中	10,000	1079	0.108
B	1:5，在 0.1M 柠檬酸中	10,000	11002	1.100
C	1:20，在 0.1M 柠檬酸中	10,000	15886	1.589
D	1:5，在 0.2M 柠檬酸中	10,000	10538	1.054

[0133] *) 比例＝测量值比期望值

[0134] 结果表明 :未使用酸处理则 PCV2 抗原几乎不能被测定，如 A 组中只有 10% 的输入被找回。但是，进行（柠檬）酸预处理则有更多的输入抗原被测定（组 B,C,D），由此，D 组的条件对于此处使用的特异性联合疫苗抗原是最佳的。

[0135] 7.5 结论 :

[0136] 为了获得好的定量测定，酸预处理也是必要的，甚至当应用与 AlphaLISA 一样灵敏的抗原含量检测方法时也是如此。

[0137] 图例

[0138] 图 2:

[0139] a) 基于如实施例 1 所述通过 ELISA 测定的未处理的单价疫苗的回收率 (%)。

[0140] b) 在如实施例 4 所述的酸处理中，酸和疫苗间的比例 (v/v)。

[0141] 图 3:

[0142] a) 如实施例 1 所述通过 ELISA 测定的单位 / 毫升。

[0143] 图 4:

[0144] a)5 个不相关的 PCV 批次各与 2 个 (A,B) 不相关的 M.hyo 批次之一混合。所有 10 个制备物如实施例 4 中所述酸处理,用 0.1M 柠檬酸,或醋酸钠调节至 pH2,3,4 或 5 的 0.1M 柠檬酸,或者缓冲液 (C = 对照)。浓度表示为通过标准处理 (0.1M 柠檬酸, pH1.5) 得到的浓度的百分比。数据显示为与 M.hyo 批次 A 或 B 组合的 5 个 PCV 批次的平均值 ± 标准差。

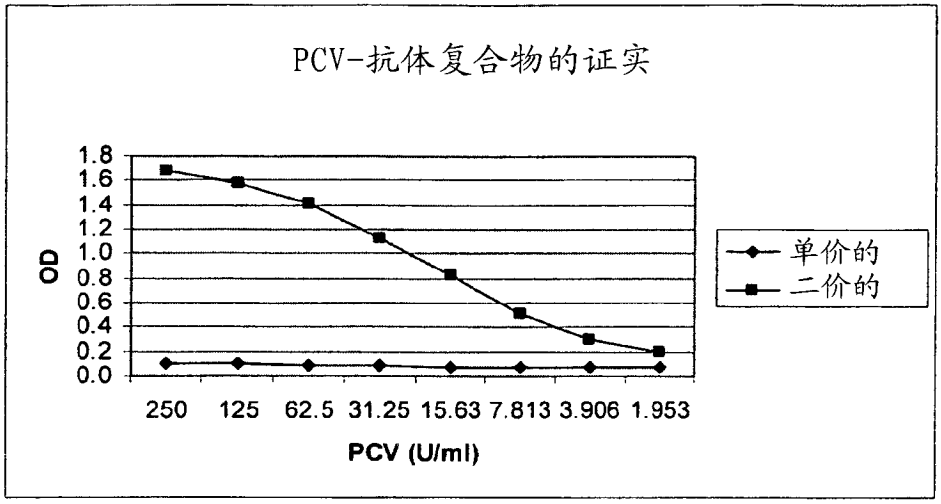

PCV-抗体复合物的证实
OD
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
250 125 62.5 31.25 15.63 7.813 3.906 1.953
PCV (U/ml)
单价的
二价的

图 1

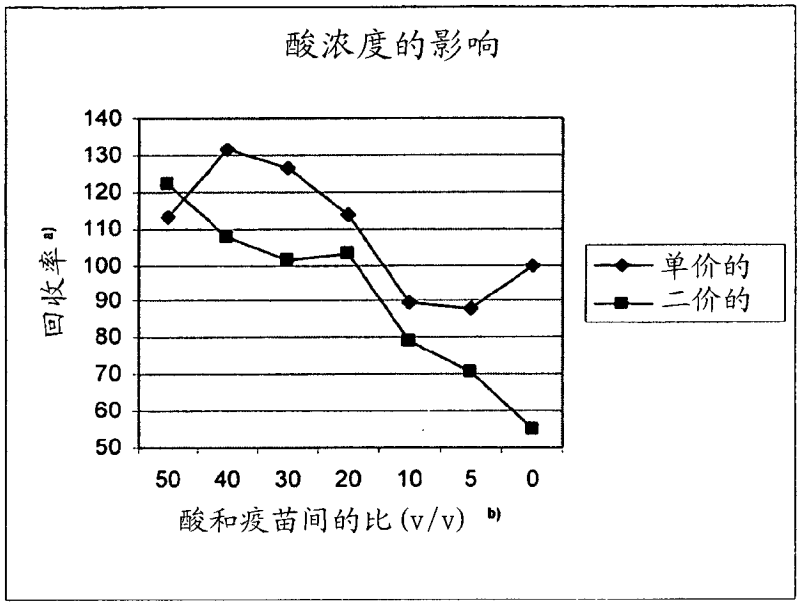

酸浓度的影响
回收率 a)
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
50 40 30 20 10 5 0
酸和疫苗间的比(v/v) b)
单价的
二价的

图 2

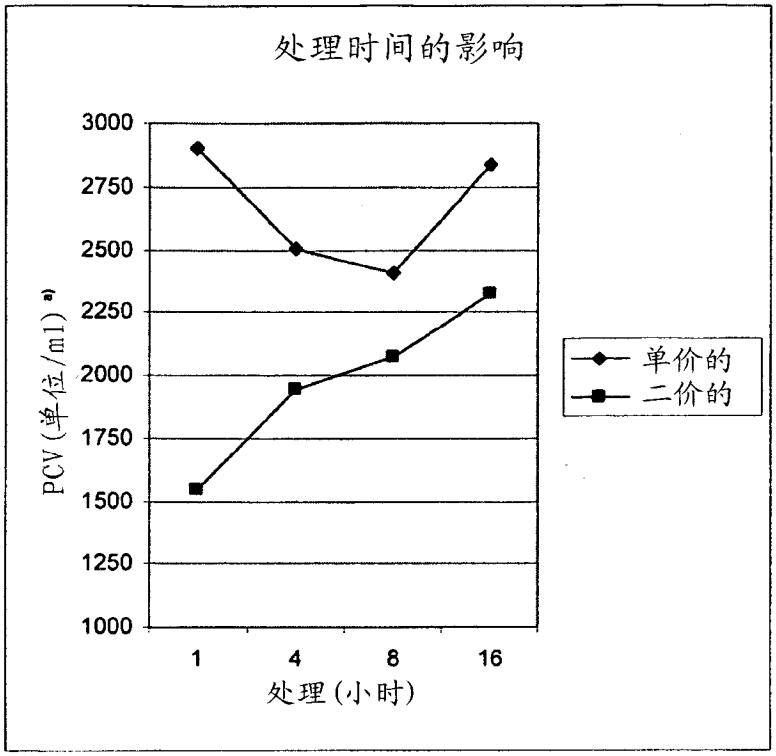

处理时间的影响
3000
2750
2500
2250
2000
1750
1500
1250
1000
PCV(单位/ml) a)
1
4
8
16
处理(小时)
单价的
二价的

图 3

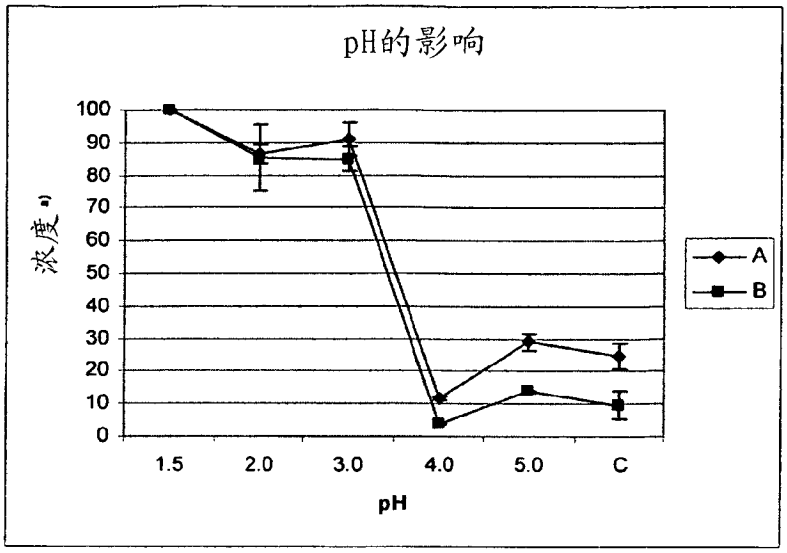
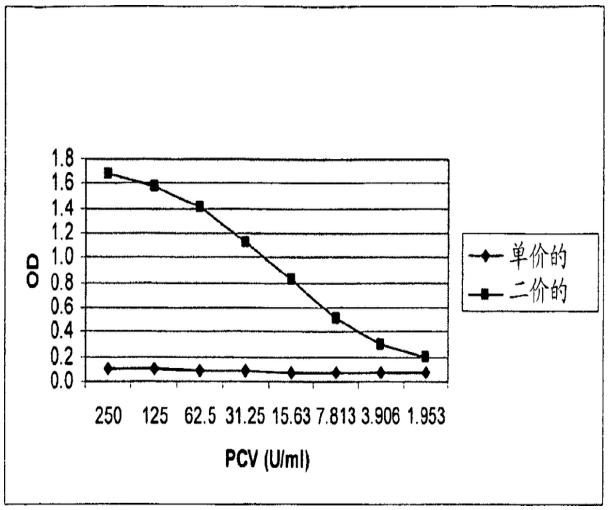

pH的影响
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
浓度 a)
1.5
2.0
3.0
4.0
5.0
C
pH
A
B

图 4

专利名称(译)	疫苗制剂的效价测试		
公开(公告)号	CN103154737B	公开(公告)日	2015-07-15
申请号	CN201180041817.8	申请日	2011-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	英特维特国际股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	英特维特国际股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	英特维特国际股份有限公司		
[标]发明人	M阿伦 M加雷特 UP布鲁德雷尔 MAJ蒂森		
发明人	M·阿伦 M·加雷特 U·P·布鲁德雷尔 M·A·J·蒂森		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N2333/30 G01N33/5306		
代理人(译)	万雪松		
优先权	2010181634 2010-09-29 EP 61/377485 2010-08-27 US 12/875618 2010-09-03 US		
其他公开文献	CN103154737A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及测定混合物中第一抗原的抗原含量的某些方法，该混合物包含两种或更多种抗原。本发明还涉及联合疫苗中抗原的效价测试。该方法允许测定在额外包含能够与抗原结合的抗体的混合物中的抗原含量。