



(21) 申请号 202410196193.6

(22) 申请日 2024.02.22

(71) 申请人 北京民海生物科技有限公司

地址 102600 北京市大兴区中关村科技园  
区大兴生物医药产业基地思邈路35  
号、天富街25号

(72) 发明人 刘艳丽 高志鑫 李跃龙 曹欣  
王剑龙 刘建凯 郑海发

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限  
公司 11002

专利代理师 商秀玲

(51) Int. Cl.

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书27页

(54) 发明名称

一种制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多  
糖的方法

(57) 摘要

本发明涉及生物制品技术领域,具体涉及一  
种制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多  
糖的方法。本发明提供的制备肺炎链球菌荚膜多糖或其  
降解多糖的方法包括:将肺炎链球菌的发酵培养  
物进行杀菌处理后,分离上清液,将所述上清液  
依次进行第一超滤处理、沉淀处理和第二超滤处  
理;或者,将所述上清液依次进行第一超滤处理、  
沉淀处理、降解处理和第二超滤处理;所述沉淀  
处理使用的沉淀剂包含钙盐,所述沉淀处理为在  
pH 2.4-3.6条件下进行。该方法具有工艺简便、  
制备周期短的优点,显著降低了时间和物料成  
本,制得精制多糖和降解多糖的核酸、蛋白等杂  
质及特异基因等质控指标均优于标准要求,可用  
于制备肺炎链球菌荚膜多糖疫苗或结合疫苗。

1. 一种制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法,其特征在于,所述方法包括:将肺炎链球菌的发酵培养物进行杀菌处理后,分离上清液,将所述上清液依次进行第一超滤处理、沉淀处理和第二超滤处理;

或者,将所述上清液依次进行第一超滤处理、沉淀处理、降解处理和第二超滤处理;

其中,所述沉淀处理使用的沉淀剂包含钙盐,所述沉淀处理为在pH 2.4-3.6条件下进行。

2. 根据权利要求1所述的制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法,其特征在于,所述钙盐为氯化钙;

和/或,所述钙盐在沉淀体系中的终浓度为80-200mmol/L。

3. 根据权利要求2所述的制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法,其特征在于,所述沉淀处理为在2-8℃处理1-5小时后收集上清液,得到第一上清液。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法,其特征在于,所述降解处理为采用化学处理法或物理处理法进行。

5. 根据权利要求4所述的制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法,其特征在于,所述化学处理法为采用三氟乙酸进行降解处理,得到降解处理物;

和/或,所述物理处理法为采用超声波处理法或高压均质处理法进行降解处理,得到降解处理物。

6. 根据权利要求5所述的制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法,其特征在于,采用三氟乙酸进行降解处理中,三氟乙酸的终浓度为0.2-2mol/L,和/或,所述降解处理为在25-60℃处理2-10h。

7. 根据权利要求1~3、5、6任一项所述的制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法,其特征在于,所述方法还包括:将沉淀处理得到的第一上清液或所述降解处理物的pH调至6.8-7.5后,收集上清液,得到第二上清液,将所述第二上清液进行第二超滤处理。

8. 根据权利要求1~3、5、6任一项所述的制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法,其特征在于,所述第一超滤处理使用孔径为100-150KD的超滤膜进行;

和/或,对于未经降解处理制得的第二上清液,所述第二超滤处理使用孔径为100-150KD的超滤膜进行;对于经降解处理制得的第二上清液,所述第二超滤处理使用孔径为30-50KD的超滤膜进行。

9. 权利要求1~8任一项所述的制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法制备得到的肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖。

10. 权利要求1~8任一项所述的制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法或权利要求9所述的肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖在制备含肺炎链球菌荚膜多糖产品中的应用。

11. 一种肺炎链球菌荚膜多糖疫苗或肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗,其特征在于,所述疫苗包含权利要求9所述的肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖。

12. 一种肺炎链球菌荚膜多糖疫苗或肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗的制备方法,其特征在于,所述方法包括:利用权利要求1~8任一项所述的制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法制备得到肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖,以所述肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖为免疫原制备肺炎链球菌荚膜多糖疫苗或肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗。

## 一种制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物制品技术领域,尤其涉及一种制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法。

### 背景技术

[0002] 肺炎链球菌感染是在全球范围内引起死亡的重要原因之一,也是肺炎、脑膜炎、中耳炎的主要病因。随着抗菌素的大量使用,耐药菌株与日俱增,疫苗的研发备受关注。研究中发现细菌表面的荚膜多糖能够保护机体对抗细菌感染,由于多糖是非胸腺依赖性抗原,再次免疫不能使降低的抗体达到初次免疫的水平,不能诱导免疫记忆细胞的产生,且对婴幼儿和老人几乎没有保护作用,而该年龄段人群是肺炎链球菌感染的高危人群。而将肺炎链球菌荚膜多糖偶联到蛋白载体上,使其成为胸腺依赖性抗原,能够在T细胞和巨噬细胞的辅助下激活B细胞产生抗体,对婴幼儿提供免疫保护,诱导免疫记忆,再次免疫具有加强免疫效应。研究显示,肺炎链球菌疫苗的引入显著降低了全球肺炎链球菌疾病的负担。

[0003] 肺炎链球菌荚膜多糖是由重复单元构成的一系列分子量不等的高分子同系物,通常通过将肺炎链球菌发酵培养并从发酵培养物中提取纯化得到。一方面,制备肺炎链球菌荚膜多糖疫苗时,存在多糖纯化工艺较为复杂,纯化周期长,使用试剂存在安全或健康风险等问题,例如:现有的肺炎链球菌精制多糖制备方法中往往采用苯酚、乙醇等有机试剂,危害人体健康且完全去除较难;在制备肺炎链球菌精制多糖时往往工艺复杂,耗时较长;另外,在制备精制多糖时经常会使用层析系统(例如:中国专利申请CN104815327A、CN108079286A、CN112646050A、CN116970095A等),仪器和材料昂贵,大大增加了生产成本。中国专利申请CN116970095A公开了“两步沉淀法”去除蛋白质和核酸杂质的工艺,通过在适宜中性盐条件下将脱氧胆酸钠(DOC)与第一超滤液混合,控制溶液的pH为4.5-5.0,能够高效地发挥脱氧胆酸钠吸附沉淀蛋白质的效果,再通过钙盐沉淀,进一步去除蛋白、核酸等杂质,离心收集上清液,再将上清液进行洗滤,冻干即可获得精制多糖。然而,该方法仍然存在工艺复杂、脱氧胆酸钠用量大、纯化周期长等问题。因此需要开发工艺简单高效、安全性更高的纯化方法。

[0004] 另一方面,在制备肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗时,多糖往往分子量较大,而分子量过大不利于多糖的结合,分子量过小会影响免疫原性,因此需要通过一定的方法将多糖大分子降解成小分子量的多糖,以满足肺炎链球菌结合疫苗的需求和应用。现有的荚膜多糖降解工艺是将肺炎链球菌精制多糖冻干制剂溶解后再进行降解,操作复杂,不适于大规模生产应用。

### 发明内容

[0005] 本发明提供制备一种制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法。

[0006] 本发明在肺炎链球菌荚膜多糖制备方法的研发过程中,偶然发现了一种简单、快速的肺炎链球菌多糖制备方法,该方法只需利用钙盐在酸性条件下进行一步沉淀(一步钙

盐酸沉)配合常规超滤步骤,即可制备高质量的精制多糖,且制得精制多糖的各项指标均高于中国药典标准,显著降低了物料和时间成本,提高了纯化效率。

[0007] 具体地,本发明提供以下技术方案:

本发明提供一种制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法,所述方法包括:将肺炎链球菌的发酵培养物进行杀菌处理后,分离上清液,将所述上清液依次进行第一超滤处理、沉淀处理和第二超滤处理;

或者,将所述上清液依次进行第一超滤处理、沉淀处理、降解处理和第二超滤处理;

其中,所述沉淀处理使用的沉淀剂包含钙盐,所述沉淀处理为在pH 2.4-3.6条件下进行。

[0008] 本发明的制备方法分为不进行降解处理和进行降解处理两种实施方式,不进行降解处理的方法制得的荚膜多糖(精制多糖)分子量相对较大,适用于制备肺炎链球菌荚膜多糖疫苗,经降解处理可得到分子量降低的多糖(降解多糖),更适用于与载体蛋白(如TT、DT、CRM197等)结合后用于制备肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗。

[0009] 本发明发现,在上述“一步钙盐酸沉”方法的基础上,可将降解处理设置在“一步钙盐酸沉”之后,而无需将制得的冻干精制多糖重新溶解后再进行降解处理,极大地简化了工艺流程,提高了制备效率。

[0010] 以钙盐作为沉淀剂并在pH 2.4-3.6的酸性条件下进行沉淀处理(钙盐酸沉)是上述制备方法得以实现其效果的关键。配合于上述“钙盐酸沉”,在其前后分别设置一次超滤处理,第一超滤处理的主要作用在于去除发酵培养物杀菌处理后的上清液中的小分子杂质,进而更有利于“钙盐酸沉”更好地发挥除杂作用,提高杂质的去除效率,第二超滤处理的主要作用在于浓缩多糖溶液以及对多糖溶液进行洗滤,进一步除去多糖溶液中的小分子杂质以及盐离子。

[0011] 优选地,所述钙盐为氯化钙。

[0012] 优选地,所述钙盐在沉淀体系中的终浓度为80-200 mmol/L。

[0013] 优选地,在第一超滤处理得到的第一超滤浓缩液添加终浓度为80-200 mmol/L的氯化钙,采用酸液将pH调至2.4-3.6,进行沉淀处理。

[0014] 优选地,所述沉淀处理为在2-8℃处理1-5h后收集上清液,得到第一上清液。

[0015] 与一些已有肺炎链球菌荚膜多糖的纯化方法需要升温酸沉(升温酸沉容易导致多糖的降解,造成分子量下降,影响其免疫原性)不同,本发明的沉淀处理只需在低温条件下进行即可实现较好的除杂效果。

[0016] 对于包含降解处理步骤的实施方式,所述降解处理为采用化学处理法或物理处理法进行。

[0017] 其中,所述化学处理法优选为采用三氟乙酸进行降解处理,得到降解处理物。

[0018] 所述物理处理法优选为采用超声波处理法或高压均质处理法进行降解处理,得到降解处理物。

[0019] 具体地,超声波处理法可参见中国专利CN108079286B,高压均质处理法可参见中国专利申请CN106413747A。

[0020] 在本发明的一些实施方式中,采用三氟乙酸进行降解处理,其中,三氟乙酸的终浓

度为0.2-2mol/L。优选所述降解处理为在25-60℃处理2-10h。在降解处理结束后,收集上清液。

[0021] 上述降解处理将大分子多糖降解为适合用于结合疫苗制备且不影响其免疫原性的适合分子量的降解多糖。

[0022] 以上所述的方法还包括:将沉淀处理得到的第一上清液或所述降解处理物的pH调至6.8-7.5后,收集上清液,得到第二上清液,将所述第二上清液进行第二超滤处理。

[0023] 本发明中,将pH调至酸性可采用酸液进行,包括但不限于冰醋酸、盐酸、磷酸等;优选为磷酸。将pH调至中性或碱性可采用碱液进行,包括但不限于氢氧化钠、氢氧化钾等;优选为氢氧化钠。

[0024] 以上所述的方法中,所述第一超滤处理使用孔径为100-150KD(优选为100KD)的超滤膜进行。

[0025] 在本发明的一些实施方式中,所述第一超滤处理为使用孔径为100KD的膜包浓缩3-5倍后等体积超滤。优选地,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的4-6倍。

[0026] 以上所述的方法中,对于未经降解处理制得的第二上清液,所述第二超滤处理使用孔径为100-150KD的超滤膜进行;对于经降解处理制得的第二上清液,所述第二超滤处理使用孔径为30-50KD(优选为30KD)的超滤膜进行。

[0027] 优选地,所述第二超滤处理中,洗滤所用注射用水体积为上清液体积的8-15倍。

[0028] 优选地,在所述第二超滤处理后,所述方法还包括将第二超滤处理得到的第二超滤浓缩液进行干燥的步骤。

[0029] 所述干燥可为冷冻干燥。

[0030] 本发明中,所述分离上清液可采用常规的固液分离方法进行,包括但不限于离心分离。

[0031] 本发明所述的制备方法对于杀菌处理的方法原则上没有特殊限制,可使用目前常用的脱氧胆酸钠(例如W02023202607A1、CN114106210A中使用的杀菌方法)对肺炎链球菌发酵培养物进行杀菌处理,或者,也可采用其他能够灭后肺炎链球菌并使其释放荚膜多糖的试剂进行杀菌处理。

[0032] 在本发明的一些实施方式中,在肺炎链球菌发酵培养物中加入脱氧胆酸钠进行杀菌处理,脱氧胆酸钠的终浓度为0.06%-0.24%。

[0033] 在本发明的另一些实施方式中,采用β-丙内酯(BPL)对肺炎链球菌的发酵培养物进行杀菌处理。对于β-丙内酯在处理体系中的终浓度,可以本领域常用的β-丙内酯用量加入。优选地,所述β-丙内酯在处理体系中的终浓度不低于0.01%。示例性的β-丙内酯终浓度可为0.01%、0.025%、0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%等。更优选地,所述β-丙内酯在处理体系中的终浓度不低于0.05%。在一些具体实施方式中所述β-丙内酯在处理体系中的终浓度为0.05-1%。优选为0.05-0.5%。所述处理的温度优选为2-8℃。所述处理的时间优选为8-16h。更优选为10-14h。所述处理优选为混合均匀后低温孵育处理。

[0034] 优选地,在肺炎链球菌发酵培养的对数生长后期添加β-丙内酯(BPL)进行处理。在添加β-丙内酯(BPL)后,先搅拌混匀,再低温孵育处理。

[0035] 在使用β-丙内酯进行杀菌处理时,以上所述的制备方法优选不使用脱氧胆酸钠。

[0036] 在已有肺炎链球菌荚膜多糖生产方法中,脱氧胆酸钠作为裂解菌体以释放荚膜多糖的裂解剂对于荚膜多糖的提取具有十分重要的作用,目前尚无替代试剂可用于肺炎链球菌荚膜多糖制备。本发明在研发过程中意外地发现, $\beta$ -丙内酯具有明显的灭活肺炎链球菌并促进肺炎链球菌释放荚膜多糖的作用,可用于处理肺炎链球菌,提取荚膜多糖,且与脱氧胆酸钠不同, $\beta$ -丙内酯不会裂解菌体,进而显著减少了菌体内蛋白、核酸等杂质的释放,更有利于降低荚膜多糖提纯过程中的杂质含量和去除难度,而且, $\beta$ -丙内酯易水解,且水解产物无毒无害,因此不会造成在荚膜多糖产品中的残留或健康风险。 $\beta$ -丙内酯目前多作为病毒灭活剂用于病毒疫苗的制备,关于其能够促进肺炎链球菌释放荚膜多糖且能够减少胞内蛋白质、核酸等杂质释放的功能,目前尚未见相关报道。上述方法中,以 $\beta$ -丙内酯替代脱氧胆酸钠对肺炎链球菌的发酵培养物进行处理,不仅解决了脱氧胆酸钠残留导致的健康风险或副作用问题,而且显著降低了提取荚膜多糖中蛋白质等杂质的含量,更有利于后续纯化去除杂质,而且具有较高的多糖回收率,回收率明显高于采用甲醛处理肺炎链球菌发酵培养物。

[0037] 本发明中,所述发酵培养物为肺炎链球菌经发酵培养得到的包含肺炎链球菌的培养物(例如发酵液)。

[0038] 本发明所述的肺炎链球菌荚膜多糖的制备方法可用于不同型别的肺炎链球菌,包括但不限于:1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F、33F型。

[0039] 优选地,所述肺炎链球菌为2、5、6A、10A、11A、19F型。

[0040] 本发明提供以上所述的制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法制备得到的肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖。

[0041] 本发明提供以上所述的制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法或所述肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖在制备含肺炎链球菌荚膜多糖产品中的应用。

[0042] 优选地,所述含肺炎链球菌荚膜多糖产品为疫苗。

[0043] 所述疫苗包括肺炎链球菌荚膜多糖疫苗或肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗。

[0044] 本发明提供一种肺炎链球菌荚膜多糖疫苗或肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗,所述疫苗包含以上所述的肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖。

[0045] 上述肺炎链球菌荚膜多糖疫苗或肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗可为单价或多价疫苗。

[0046] 其中,所述多价疫苗包含肺炎链球菌1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F、33F型中的至少两种型别的荚膜多糖。

[0047] 具体地,所述肺炎链球菌荚膜多糖疫苗可以为23价、24价、25价、26价、27价、28价、29价、30价甚至更高价肺炎链球菌荚膜多糖疫苗。示例性的,如23价肺炎链球菌荚膜多糖疫苗。

[0048] 所述肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗可以为10价、11价、12价、13价、14价、15价、16价、17价、18价、19价、20价甚至更高价肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗。示例性的,如13价肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗,20价肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗、24价肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗。

[0049] 示例性的,所述23价肺炎链球菌荚膜多糖疫苗含有1型、3型、4型、5型、6A型、6B型、

7F型、8型、9V型、10A型、11A型、12F型、14型、15B型、18C型、19A型、19F型、22F型、23F型和33F型等肺炎链球菌血清型。

[0050] 示例性的,所述13价肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗含有4、5、6A、6B、7F、9V、18C、19A、19F、23F型等肺炎链球菌血清型。

[0051] 示例性的,所述20价肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗含有1型、3型、4型、5型、6B型、7F型、8型、9V型、10A型、11A型、12F型、14型、15B型、18C型、19A型、19F型、22F型、23F型和33F型等肺炎链球菌血清型。

[0052] 示例性的,所述24价肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗含有1型、3型、4型、5型、6A型、6B型、7F型、8型、9N型、9V型、10A型、11A型、12F型、14型、15B型、18C型、19A型、19F型、22F型、23F型和33F型等肺炎链球菌血清型。

[0053] 本发明提供一种肺炎链球菌荚膜多糖疫苗或肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗的制备方法,所述方法包括:利用所述制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法制备得到肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖,以所述肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖为免疫原制备肺炎链球菌荚膜多糖疫苗或肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗。

[0054] 本发明的有益效果至少包括:

(1) 本发明的制备方法具有工艺简便、制备周期短的优点,在精制多糖制备中显著缩短了纯化工艺时长;在制备降解多糖工艺中直接在纯化后期将多糖进行降解,极大地简化了工艺流程。经测算,在时间成本方面,相比于中国专利申请CN116970095A公开的技术方案,在制备精制多糖时,专利申请CN116970095A公开的方法需要2天,而本发明的方法仅需要1天,工艺缩短时间达50%;在制备降解多糖时:专利申请CN116970095A公开的方法需要3天,而本发明的方法仅需要2天,工艺缩短时间达到30%以上,也即时间成本大幅下降;在物料成本方面,无论是制备精制多糖还是降解多糖,以脱氧胆酸钠的投料量为例,本发明的方法至少下降了50%。

[0055] (2) 采用本发明的方法制备肺炎链球菌荚膜多糖和降解多糖,其核酸、蛋白等杂质及特异基团等的质量控制指标均优于《中华人民共和国药典》(2020版)标准(23价肺炎链球菌多糖疫苗),且均优于现有工艺的质量指标,可用于肺炎链球菌荚膜多糖疫苗或荚膜多糖结合疫苗的制备。

[0056] (3) 本发明的方法在制备过程中避免了苯酚、丙酮和乙醇等有毒有害试剂的使用,减小了对人体健康和环境的危害;同时避免使用了层析法的操作,降低了成本,更有利于产业化规模生产。

## 具体实施方式

[0057] 本发明提供制备肺炎链球菌荚膜多糖或其降解多糖的方法。

[0058] 在本发明的一些实施方式中提供制备肺炎链球菌荚膜多糖的方法,所述方法包括如下步骤:

(1) 将肺炎链球菌发酵液经杀菌处理后于4℃静置6-12小时,然后离心收集上清液;

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到第一超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的1/5~1/4,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的5倍以上;

(3) 在第一超滤浓缩液中加入终浓度80-200mmol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后用酸液调节pH为2.4-3.6,充分搅匀后于2-8℃静置1-5h,然后离心收集上清液,用碱液回调pH至7.00-7.50,再次离心收集上清液;

(4) 将步骤(3)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍以上;

(5) 将步骤(4)得到的多糖超滤浓缩液进行冻干,结束后收集精制多糖。

[0059] 在本发明的一些实施方式中提供制备肺炎链球菌荚膜多糖的降解多糖的方法,所述方法包括如下步骤:

(1) 将肺炎链球菌发酵液经杀菌处理后于4℃静置6-12小时,然后离心收集上清液;

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到第一超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的1/5~1/4,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的5倍以上;

(3) 在第一超滤浓缩液中加入终浓度80-200mmol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后用酸液调节pH为2.4-3.6,充分搅匀后于2-8℃静置1-5h,然后离心收集上清液,用碱液回调pH至7.00-7.50,再次离心收集上清液;

(4) 在步骤(3)得到的上清液中加入终浓度0.2-2mol/L的三氟乙酸,在25-60℃条件下静置2-10h,用碱液回调pH至7.00-7.50,再次离心收集上清液;

(5) 将步骤(4)得到的上清液用孔径为30KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍以上;

(6) 将步骤(5)得到的多糖超滤浓缩液进行冻干,结束后收集降解多糖。

[0060] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0061] 实施例1 6A型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

[0062] 1、6A型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

(1) 将6A型肺炎链球菌发酵液经过0.1% DOC杀菌后于4℃静置12小时,然后于12000g离心30 min,收集上清液;

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的1/5~1/4,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的5倍以上;

(3) 向步骤(2)得到的超滤浓缩液中加入终浓度200mmol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后用磷酸调节pH为3.00±0.1,充分搅匀后于2-8℃静置1h,然后于12000g离心30 min,收集上清液,用NaOH溶液回调上清液的pH至7.00-7.50,再次12000g离心30 min,收集上清液;

(4) 将步骤(3)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍以上;

(5) 将步骤(4)得到的超滤浓缩液进行冻干,结束后收集精制多糖。

[0063] 2、6A型肺炎链球菌荚膜多糖的检定

荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;



核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;甲基戊糖的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。

[0064] 回收率的计算公式如下:回收率=精制多糖含量/发酵液杀菌后上清液中多糖含量×100%。

[0065] 相关检定结果见表1。

[0066] 表1 6A型肺炎链球菌荚膜多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收率(%)	蛋白 (≤2%)	核酸 (≤2%)	总氮 (0~2.0 )	磷含量 (2.5~5.0%)	甲基戊糖 (≥15%)	分子大小(K <sub>D</sub> )	分子量 (Da)
							CL-2B(≤0.50K <sub>D</sub> )	
6A-2308001	65.2	0.37	0.02	0.21	4.04	25.54	0.32	6.53×10 <sup>5</sup>
6A-2308002	66.1	0.35	0.01	0.25	4.12	27.32	0.35	7.09×10 <sup>5</sup>
6A-2308003	66.3	0.38	0.02	0.24	4.13	24.71	0.34	6.92×10 <sup>5</sup>

[0067] 注:表1中001、002、003分别代表三批实验,下同。

[0068] 实施例2 6A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

[0069] 1、6A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

(1) 6A型肺炎链球菌发酵液经过0.1% DCC杀菌后于4℃静置12小时,然后于12000g离心30 min,收集上清液;

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的1/5~1/4,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的5倍以上;

(3) 向步骤(2)得到的超滤浓缩液中分别加入终浓度为80mmol/L (6A-2308001L)、120mmol/L (6A-2308002L)、200mmol/L (6A-2308003L)的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后用磷酸调节pH为3.00±0.1,充分搅匀后于2-8℃静置1h,然后12000g离心30 min,收集上清液;

(4) 将步骤(3)得到的上清液加入终浓度0.25mol/L的三氟乙酸,在40℃条件下静置3h,回调pH至7.00-7.50,再次离心收集上清液;

(5) 将步骤(4)得到的上清液用孔径为30KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍以上;

(6) 将超滤浓缩液进行冻干,结束后收集降解多糖。

[0070] 2、6A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定

6A型肺炎链球菌荚膜多糖的降解多糖的检定参考《中华人民共和国药典》2020版,其中荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;甲基戊糖的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三

部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表2。

[0071] 表2 6A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收率 (%)	蛋白 (≤2%)	核酸 (≤2%)	总氮 (0~2.0%)	磷含量 (2.5~5.0%)	甲基戊糖 (≥15%)	分子大小 ( $K_D$ )	分子量 (Da)
							CL-2B	
6A-2308 001L	57.5	0.21	0.02	0.20	3.98	25.61	0.68	$1.33 \times 10^5$
6A-2308 002L	59.2	0.17	0.02	0.22	4.04	26.65	0.68	$1.59 \times 10^5$
6A-2308 003L	56.3	0.23	0.01	0.21	4.01	24.20	0.68	$1.27 \times 10^5$

[0072] 实施例3 5型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

[0073] 1、5型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

(1) 5型肺炎链球菌发酵液经过0.1% DOC杀菌后于4℃静置12小时,然后12000g离心30 min,收集上清液;

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的1/5~1/4,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的5倍以上;

(3) 向步骤(2)得到的超滤浓缩液中加入终浓度80mmol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后用磷酸调节pH为3.00±0.1,充分搅匀后于2-8℃静置5h,然后12000g离心30 min,收集上清液,用NaOH回调pH至7.00-7.50,再次12000g离心30 min,收集上清液;

(4) 将步骤(3)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍以上;

(5) 将步骤(4)得到的超滤浓缩液进行冻干,结束后收集精制多糖。

[0074] 2、5型肺炎链球菌荚膜多糖的检定

荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;糖醛酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;氨基己糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表3。

[0075] 表3 5型单价肺炎链球菌荚膜多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收率(%)	蛋白 (≤7.5%)	核酸 (≤2%)	总氮 (2.5~6.0%)	磷含量 (≤2.0%)	氨基己糖 (≥20%)	糖醛酸 (≥12%)	分子大小 (K <sub>D</sub> )	分子量 (Da)
								CL-2B(≤0.60 K <sub>D</sub> )	
5-2308001	45.2	5.15	0.14	4.52	0.21	29.53	23.94	0.38	3.12×10 <sup>5</sup>
5-2308002	44.5	5.90	0.10	4.60	0.20	29.14	23.16	0.38	2.88×10 <sup>5</sup>
5-2308003	47.3	5.87	0.09	4.55	0.24	28.48	23.82	0.40	3.07×10 <sup>5</sup>

[0076] 实施例4 5型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

[0077] 1、5型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

(1) 5型肺炎链球菌发酵液经过0.1% DOC杀菌后于4℃静置12小时,然后12000 g离心30 min,收集上清液;

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的1/5~1/4,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的5倍以上;

(3) 向步骤(2)得到的超滤浓缩液中加入终浓度100mmol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后用磷酸调节pH分别为2.50±0.1(5-2308001L),3.00±0.1(5-2308002L),3.50±0.1(5-2308003L),充分搅匀后于2-8℃静置5h,然后12000 g离心30 min,收集上清液;

(4) 将步骤(3)得到的上清液加入终浓度1.5 mol/L的三氟乙酸,在25℃条件下静置10h,回调pH至7.00-7.50,再次离心收集上清液;

(5) 将步骤(4)得到的上清液用孔径为30KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍以上;

(6) 将步骤(5)得到的超滤浓缩液进行冻干,结束后收集降解多糖。

[0078] 2、5型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定

5型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定参考《中华人民共和国药典》2020版,其中荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;糖醛酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;氨基己糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表4。

[0079] 表4 5型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收率 (%)	蛋白 (≤7.5%)	核酸 (≤2%)	总氮 (2.5~6.0%)	磷含量 (≤2.0%)	氨基己糖 (≥20%)	糖醛酸 (≥12%)	分子大小 (K <sub>D</sub> )	分子量 (Da)
								CL-2B	
5-2308001L	40.9	4.64	0.11	4.31	0.20	28.31	21.32	0.56	1.37×10 <sup>5</sup>
5-2308002L	39.2	4.61	0.08	4.33	0.19	29.19	22.90	0.55	1.55×10 <sup>5</sup>
5-2308003L	41.5	4.78	0.07	4.46	0.23	29.22	22.57	0.55	1.64×10 <sup>5</sup>

[0080] 实施例5 10A型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

## [0081] 1、10A型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

(1) 10A型肺炎链球菌发酵液经过0.1% DOC杀菌后于4℃静置12小时,然后12000g离心30 min,收集上清液;

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的1/5~1/4,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的5倍以上;

(3) 向步骤(2)得到的超滤浓缩液中加入终浓度80mmol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后用磷酸调节pH为2.50±0.1(10A-2308001),3.00±0.1(10A-2308002),3.50±0.1(10A-2308003),4.00±0.1(10A-2308004),充分搅匀后于2-8℃静置3h,然后12000g离心30 min,收集上清液,用NaOH回调pH至7.00-7.50,再次12000g离心30 min,收集上清液;

(4) 将步骤(3)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍以上;

(5) 将步骤(4)得到的超滤浓缩液进行冻干,结束后收集精制多糖。

## [0082] 2、10A型肺炎链球菌荚膜多糖的检定

荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;氨基己糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表5。结果显示,步骤(3)的钙盐酸沉中,pH控制在2.4-3.6范围内,制得精制多糖中蛋白杂质含量明显下降,显著低于pH为4.0的组别。

[0083] 表5 10A型肺炎链球菌荚膜多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率(%)	蛋白 (≤7.0%) )	核酸 (≤2%)	总氮 (0.5~3.5 %)	磷含量 (1.5~3.5%)	氨基己糖 (≥12%)	分子大小 (K <sub>D</sub> )	分子量 (Da)
							CL-2B(≤0.65 K <sub>D</sub> )	
10A-2308001	54.2	3.13	0.01	1.30	2.42	13.60	0.42	6.78×10 <sup>5</sup>
10A-2308002	54.5	3.20	0.02	1.33	2.39	13.68	0.41	6.48×10 <sup>5</sup>
10A-2308003	56.1	3.18	0.01	1.40	2.40	13.72	0.41	6.06×10 <sup>5</sup>
10A-2308004	55.2	4.30	0.02	1.35	2.60	12.66	0.39	7.31×10 <sup>5</sup>

## [0084] 实施例6 10A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

## [0085] 1、10A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

(1) 10A型肺炎链球菌发酵液经过0.1% DOC杀菌后于4℃静置12小时,然后12000 g离心30 min,收集上清液;

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的1/5~1/4,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的5倍以上;

(3) 向步骤(2)得到的超滤浓缩液加入终浓度80mmol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后用磷酸调节pH为3.00±0.1,充分搅匀后于2-8℃静置3h,然后12000 g离心30 min,收集上

清液；

(4) 将步骤(3)得到的上清液加入终浓度0.5mol/L的三氟乙酸,在30℃条件下静置3h,回调pH至7.00-7.50,再次离心收集上清液；

(5) 将步骤(4)得到的上清液用孔径为30KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍以上；

(6) 将步骤(5)得到的超滤浓缩液进行冻干,结束后收集精制多糖。

#### [0086] 2、10A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定

10A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定参考《中华人民共和国药典》2020版,其中荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行；蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行；核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行；总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行；磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行；氨基己糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行；荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表6。

[0087] 表6 10A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率(%)	蛋白 (≤7.0 %)	核酸 (≤2 %)	总氮 (0.5~3.5 %)	磷含量 (1.5~3.5 %)	氨基己 糖 (≥12%)	分子大小 ( $K_D$ )	分子量 (Da)
							CL-2B	
10A-2308001L	46.2	3.02	0.01	1.26	2.31	13.13	0.70	$1.21 \times 10^5$
10A-2308002L	48.1	3.18	0.01	1.30	2.35	13.32	0.70	$1.22 \times 10^5$
10A-2308003L	47.2	3.10	0.01	1.31	2.34	13.27	0.70	$1.26 \times 10^5$

#### [0088] 实施例7 11A型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

##### [0089] 1、11A型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

(1) 11A型肺炎链球菌发酵液经过0.1% DOC杀菌后于4℃静置12小时,然后12000g离心30 min,收集上清液；

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的1/5~1/4,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的5倍以上；

(3) 向步骤(2)得到的超滤浓缩液加入终浓度80mmol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后调节pH为3.00±0.1,充分搅匀后于2-8℃静置2h,然后12000g离心30 min,收集上清液,用NaOH回调pH至7.00-7.50,再次12000g离心30 min,收集上清液；

(4) 将步骤(3)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍以上；

(5) 将步骤(4)得到的超滤浓缩液进行冻干,结束后收集降解多糖。

##### [0090] 2、11A型肺炎链球菌荚膜多糖的检定

荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行；蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行；核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行；总氮含量的检

定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;0-乙酰基含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3117)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表7。

[0091] 表7 11A型肺炎链球菌荚膜多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率(%)	蛋白 (≤3%)	核酸 (≤2%)	总氮 (0~2.5 %)	磷含量 (1.5~3.5 %)	O-乙酰基 (≥9%)	分子大小 (K <sub>D</sub> )	分子量 (Da)
							CL-2B(≤0.40 K <sub>D</sub> )	
11A-2308001	72.6	0.32	0.08	0.20	2.62	14.21	0.38	1.26×10 <sup>6</sup>
11A-2308002	72.2	0.30	0.05	0.22	2.55	14.28	0.39	9.77×10 <sup>5</sup>
11A-2308003	74.5	0.37	0.10	0.23	2.60	14.15	0.40	1.12×10 <sup>6</sup>

[0092] 实施例8 11A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

[0093] 1、11A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

(1) 11A型肺炎链球菌发酵液经过0.1%DOC杀菌后于4℃静置12小时,然后12000 g离心30 min,收集上清液;

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的1/5~1/4,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的5倍以上;

(3) 向步骤(2)得到的超滤浓缩液中加入终浓度100mmol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后调节pH为3.00±0.1,充分搅匀后于2-8℃静置2h,然后12000 g离心30 min,收集上清液;

(4) 将步骤(3)得到的上清液加入终浓度0.5mol/L的三氟乙酸,在40℃条件下静置6h,回调pH至7.00-7.50,再次离心收集上清液;

(5) 将步骤(4)得到的上清液用孔径为30KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍以上;

(6) 将步骤(5)得到的超滤浓缩液进行冻干,结束后收集精制多糖。

[0094] 2、11A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定

11A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定参考《中华人民共和国药典》2020版,其中荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;0-乙酰基含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3117)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表8。

[0095] 表8 11A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率(%)	蛋白 ( $\leq 3\%$ )	核酸 ( $\leq 2\%$ )	总氮 (0~2.5%)	磷含量 (1.5~3.5%)	O-乙酰 基 ( $\geq 9\%$ )	分子大小 ( $K_D$ )	分子量 (Da)
							CL-2B	
11A-2308001L	60.2	0.20	0.12	0.21	2.44	13.71	0.67	$1.28 \times 10^5$
11A-2308002L	63.2	0.26	0.15	0.22	2.48	13.77	0.67	$1.35 \times 10^5$
11A-2308003L	64.3	0.28	0.10	0.24	2.52	12.96	0.67	$1.05 \times 10^5$

[0096] 实施例9 19F型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

[0097] 1、19F型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

(1) 19F型肺炎链球菌发酵液经过0.1% DOC杀菌后于4℃静置6h小时,然后12000g离心30 min,收集上清液;

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的4~5倍,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的10倍;

(3) 向步骤(2)得到的超滤浓缩液中加入终浓度80mmol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后调节pH为3.00±0.1,充分搅匀后于2-8℃静置2h,然后12000g离心30 min,收集上清液,用NaOH回调pH至7.00-7.50,再次12000g离心30 min,收集上清液;

(4) 将步骤(3)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍;

(5) 将步骤(4)得到的超滤浓缩液进行冻干,结束后收集精制多糖。

[0098] 2、19F型肺炎链球菌荚膜多糖的检定

荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;氨基己糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;甲基戊糖的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表9。

[0099] 表9 19F型肺炎链球菌荚膜多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率 (%)	蛋白 ( $\leq 3\%$ )	核酸 ( $\leq 2\%$ )	总氮 (1.4~3.5%)	磷含量 (3.0~5.5%)	甲基戊 糖 ( $\geq 20\%$ )	氨基己 糖 ( $\geq 12.5\%$ )	分子大小 ( $K_D$ )	分子量 (Da)
								CL-4B( $\leq 0.20$ $K_D$ )	
19F-2308001	62.2	0.32	0.05	2.43	4.92	30.20	14.57	0.04	$7.48 \times 10^5$
19F-2308002	61.8	0.34	0.07	2.44	5.10	29.32	14.74	0.05	$7.52 \times 10^5$
19F-2308003	60.3	0.33	0.04	2.50	5.30	31.27	15.29	0.02	$7.51 \times 10^5$

[0100] 实施例10 19F型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

[0101] 1、19F型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

(1) 19F型肺炎链球菌发酵液经过0.1% DOC杀菌后于4℃静置6 h小时,然后12000

g离心30 min,收集上清液;

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的1/5~1/4,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的5倍以上;

(3) 向步骤(2)得到的超滤浓缩液中加入终浓度80mmol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后调节pH为3.00±0.1,充分搅匀后于2-8℃静置2h,然后12000 g离心30 min,收集上清液;

(4) 将步骤(3)得到的上清液加入终浓度0.25 mol/L的三氟乙酸,在25℃条件下静置3h,回调pH至7.00-7.50,再次离心收集上清液;

(5) 将步骤(4)得到的上清液用孔径为30KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍以上;

(6) 将步骤(5)得到的超滤浓缩液进行冻干,结束后收集降解多糖。

#### [0102] 2、19F型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定

19F型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定参考《中华人民共和国药典》2020版,其中荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;氨基己糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;甲基戊糖的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表10。

[0103] 表10 19F型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收率 (%)	蛋白 (≤3%)	核酸 (≤2%)	总氮 (1.4~3.5 %)	磷含量 (3.0~5.5 %)	甲基戊糖 (≥20%)	氨基己糖 (≥12.5 %)	分子大小(K <sub>D</sub> ) CL-4B	分子量 (Da)
19F-2308001L	53.2	0.22	0.02	2.22	4.81	30.01	14.81	0.42	1.65×10 <sup>5</sup>
19F-2308002L	52.8	0.31	0.03	2.20	4.90	30.05	14.69	0.42	1.37×10 <sup>5</sup>
19F-2308003L	54.9	0.26	0.03	2.48	4.86	31.10	14.56	0.42	1.49×10 <sup>5</sup>

#### [0104] 实施例11 2型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

##### [0105] 1、2型肺炎链球菌荚膜多糖的纯化

(1) 2型肺炎链球菌发酵液经过0.1% DOC杀菌后于4℃静置12小时,然后12000g离心30 min,收集上清液;

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的1/5~1/4,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的5倍以上;

(3) 向步骤(2)得到的超滤浓缩液加入终浓度80mmol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后调节pH为3.00±0.1,充分搅匀后于2-8℃静置4h,然后12000g离心30 min,收集上清液,用NaOH回调pH至7.00-7.50,再次12000g离心30 min,收集上清液;

(4) 将步骤(3)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍以上;



(5) 将步骤(4)得到的超滤浓缩液进行冻干,结束后收集精制多糖。

[0106] 2、2型肺炎链球菌荚膜多糖的检定

荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;糖醛酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;甲基戊糖的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表11。

[0107] 表11 2型单价肺炎链球菌荚膜多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率(%)	蛋白 ( $\leq 2\%$ )	核酸 ( $\leq 2\%$ )	总氮 (0~1.0% )	磷含量 (0~1.0%)	甲基戊 糖 ( $\geq 38\%$ )	糖醛酸 ( $\geq 15\%$ )	分子大小 ( $K_D$ )	分子量 (Da)
								CL-4B( $\leq 0.1$ 5 $K_D$ )	
2-2308001	65.2	0.10	0.04	0.62	0.51	51.28	22.10	0.04	$1.36 \times 10^6$
2-2308002	66.5	0.11	0.03	0.66	0.52	51.16	22.13	0.06	$1.43 \times 10^6$
2-2308003	66.2	0.09	0.05	0.60	0.50	51.23	22.24	0.07	$1.42 \times 10^6$

[0108] 实施例12 2型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

[0109] 1、2型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

(1) 2型肺炎链球菌发酵液经过0.1% DOC杀菌后于4℃静置12小时,然后12000 g离心30 min,收集上清液;

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的1/5~1/4,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的5倍以上;

(3) 向步骤(2)得到的超滤浓缩液中加入终浓度80mmol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后调节pH为3.00±0.1,充分搅匀后于2-8℃静置2h,然后12000 g离心30 min,收集上清液;

(4) 将步骤(3)得到的上清液加入终浓度0.5mol/L的三氟乙酸,在40℃条件下静置3h,回调pH至7.00-7.50,再次离心收集上清液;

(5) 将步骤(4)得到的上清液用孔径为30KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍以上;

(6) 将步骤(5)得到的超滤浓缩液进行冻干,结束后收集降解多糖。

[0110] 2、2型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定

2型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定参考《中华人民共和国药典》2020版,其中荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;糖醛酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;甲基戊糖的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中

(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表12。

[0111] 表12 2型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率(%)	蛋白 ( $\leq 2\%$ )	核酸 ( $\leq 2\%$ )	总氮 (0~1.0%)	磷含量 (0~1.0%)	甲基戊 糖 ( $\geq 38\%$ )	糖醛酸 ( $\geq 15\%$ )	分子大小	分子量 (Da)
								(K <sub>D</sub> ) CL-4B	
2-2308001L	57.2	0.07	0.02	0.50	0.40	50.50	22.23	0.36	$1.37 \times 10^5$
2-2308002L	58.3	0.08	0.03	0.43	0.41	50.82	21.81	0.36	$1.64 \times 10^5$
2-2308003L	59.1	0.09	0.05	0.44	0.43	50.43	23.80	0.35	$1.36 \times 10^5$

[0112] 需要说明的是,上述实施例中的杀菌方法仅作为示例性说明,本发明的荚膜多糖纯化方法的改进及其效果提升不依赖于特定的杀菌方法。本发明通过实验验证,将脱氧胆酸钠杀菌处理替换为 $\beta$ -丙内酯作为杀菌剂,配合本发明的荚膜多糖纯化方法也能够取得与上述实施例相当的纯化效果,作为示例,以下提供利用0.1%  $\beta$ -丙内酯进行杀菌处理的实施例。此外,本发明还尝试了采用其他浓度的 $\beta$ -丙内酯进行杀菌处理,结果显示,终浓度不低于0.01%的 $\beta$ -丙内酯均能实现较好的杀灭肺炎链球菌并释放荚膜多糖的作用。

[0113] 实施例13 14型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

[0114] 1、14型肺炎链球菌荚膜多糖的纯化

(1) 14型肺炎链球菌发酵液加入终浓度0.1%  $\beta$ -丙内酯,搅拌均匀后,于4℃孵育12小时,然后12000g离心30 min,收集上清液;

(2) 将步骤(1)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到超滤浓缩液,浓缩后体积为上清液体积的1/5~1/4,超滤所用纯化水体积为浓缩液体积的5倍以上;

(3) 向步骤(2)得到的超滤浓缩液中分别加入终浓度80mmol/L (14-2308001)、120mmol/L (14-2308002)、200mmol/L (14-2308003)的CaCl<sub>2</sub>溶液,充分搅匀后调节pH为3.00±0.1,充分搅匀后于2-8℃静置5h,然后12000g离心30 min,收集上清液,用NaOH回调pH至7.00-7.50,再次12000g离心30 min,收集上清液;

(4) 将步骤(3)得到的上清液用孔径为100KD膜进行超滤得到多糖超滤浓缩液,超滤所用注射用水体积为上清液体积的10倍以上;

(5) 将步骤(4)得到的超滤浓缩液进行冻干,结束后收集精制多糖。

[0115] 2、14型肺炎链球菌荚膜多糖的检定

荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;糖醛酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;甲基戊糖的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表13。

[0116] 表13 14型肺炎链球菌荚膜多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率(%)	蛋白 ( $\leq 2\%$ )	核酸 ( $\leq 2\%$ )	总氮 (1.5~4.0 %)	磷含量 (0~1.0%)	氨基己 糖 ( $\geq 20\%$ )	分子大小 ( $K_D$ )	分子量 (Da)
							CL-4B( $\leq 0.3$ $K_D$ )	
14-2308001	68.2	0.50	0.06	2.40	0.51	24.8	0.13	$1.44 \times 10^6$
14-2308002	67.5	0.58	0.08	2.40	0.55	24.1	0.13	$1.43 \times 10^6$
14-2308003	69.2	0.55	0.09	2.50	0.52	24.6	0.15	$1.45 \times 10^6$

[0117] 对比例1 6A型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

[0118] 1、6A型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

步骤(1)和(2)与实施例1的方法相同,步骤(3)-(6)如下:

(3)向步骤(2)得到的超滤浓缩液中加入NaCl至浓度为0.3mol/L,待完全溶解后,再加入0.5%(w/v)的脱氧胆酸钠,一边搅拌一边滴加冰醋酸调pH至5.0,充分搅匀后于2-8℃静置12小时,然后12000 g离心30min,收集上清液,弃沉淀,上清液中若有小碎屑则用0.8 $\mu$ m滤膜澄清过滤;

(4)用氢氧化钠或氢氧化钾将步骤(3)得到的上清液回调pH至中性,然后向得到的料液中加入终浓度为0.01mol/L的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 和终浓度为0.01mol/L的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 作为缓冲体系,待完全溶解后,再加入乙酸钠终浓度为0.6mol/L、 $\text{CaCl}_2$ 终浓度为0.25mol/L,搅拌至溶解,向料液中滴加冰醋酸调pH至5.3-5.5,充分搅匀后于2-8℃静置12小时,静置完成后,12000 g离心30min,收集上清液,弃沉淀,上清液中若有小碎屑可以用0.8 $\mu$ m滤膜澄清过滤;

(5)将步骤(4)得到的上清液用纯化水超滤,待透过端电导率低于10 $\mu$ s/cm收集多糖溶液,通过除菌过滤后收集多糖溶液;

(6)进一步将多糖溶液冻干制得肺炎链球菌荚膜多糖。

[0119] 2、6A型肺炎链球菌荚膜多糖的检定

荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;甲基戊糖的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表14。

[0120] 表14 6A型肺炎链球菌荚膜多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率(%)	蛋白 ( $\leq 2\%$ )	核酸 ( $\leq 2\%$ )	总氮 (0~2.0%)	磷含量 (2.5~5.0 %)	甲 基 戊 糖 ( $\geq 15\%$ )	分子大小 ( $K_D$ )	分子量 (Da)
							CL-2B( $\leq 0.50$ $K_D$ )	
6A-2308001Y	64.2	0.42	0.03	0.21	4.21	25.51	0.35	$7.02 \times 10^5$
6A-2308002Y	64.8	0.44	0.02	0.20	4.24	24.79	0.34	$7.14 \times 10^5$
6A-2308003Y	64.5	0.39	0.02	0.24	4.14	25.48	0.36	$6.91 \times 10^5$

[0121] 结果表明,与对比例1的方法制得的6A型肺炎链球菌精制多糖质量控制指标相比,实施例1的方法制得精制多糖的蛋白含量显著降低,且实施例1制得的6A型肺炎链球菌精制多糖的其他质量控制指标均不劣于对比例1,而且缩短了工艺时长。

[0122] 对比例2 6A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

[0123] 1、6A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

(1) 取对比例1所得精制多糖 $3.0 \pm 0.15\text{g}$ 溶于 $1.0\text{L}$ 的 $0.15\text{mol/L}$ 氯化钠溶液中,搅拌至完全溶解;

(2) 将步骤(1)中的精制多糖溶液用高压均质机均质,压力 $600 \pm 50\text{bar}$ ,循环2次,收获降解多糖溶液;

(3) 将降解多糖溶液进行冻干,结束后收集降解多糖。

[0124] 2、6A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定

6A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定参考《中华人民共和国药典》2020版,其中荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;甲基戊糖的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表15。

[0125] 表15 6A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收率(%)	蛋白 ( $\leq 2\%$ )	核酸 ( $\leq 2\%$ )	总氮 ( $0 \sim 2.0\%$ )	磷含量 ( $2.5 \sim 5.0\%$ )	甲基戊糖 ( $\geq 15\%$ )	分子大小 ( $K_D$ )	分子量 ( $Da$ )
							CL-2B	
6A-2308001YL	63.7	0.41	0.02	0.20	4.08	25.1	0.68	$1.52 \times 10^5$
6A-2308002YL	62.2	0.42	0.01	0.21	4.13	25.6	0.67	$1.25 \times 10^5$
6A-2308003YL	63.3	0.38	0.02	0.24	4.05	25.9	0.67	$1.39 \times 10^5$

[0126] 结果表明,本发明实施例2的方法制得6A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的质量控制指标较对比例2制得的降解多糖的蛋白含量显著减少,且其他质量控制指标均不劣于对比例2,而且简化了工艺流程,缩短了工艺时长。

[0127] 对比例3 5型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

[0128] 1、5型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

步骤(1)和(2)与实施例3的方法相同,步骤(3)-(6)如下:

(3) 向步骤(2)得到的超滤浓缩液中加入NaCl至浓度为 $0.3\text{mol/L}$ ,待完全溶解后,再加入 $0.5\%$ (w/v)的脱氧胆酸钠,一边搅拌一边滴加冰醋酸调pH至 $5.0$ ,充分搅匀后于 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 静置12小时,然后 $12000\text{g}$ 离心 $30\text{min}$ ,收集上清液,弃沉淀,上清液中若有小碎屑用 $0.8\mu\text{m}$ 滤膜澄清过滤;

(4) 用氢氧化钠或氢氧化钾将步骤(3)得到得上清液回调pH至中性,然后向得到的料液中加入终浓度为 $0.01\text{mol/L}$ 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 和终浓度为 $0.01\text{mol/L}$ 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 作为缓冲体系,待完全溶解后,再加入乙酸钠终浓度为 $0.6\text{mol/L}$ 、 $\text{CaCl}_2$ 终浓度为 $0.25\text{mol/L}$ ,搅拌至溶解,

向料液中滴加冰醋酸调pH至5.3-5.5,充分搅匀后于2-8℃静置12小时,静置完成后,然后12000 g离心30min,收集上清液,弃沉淀,上清液中若有小碎屑可以用0.8 $\mu$ m滤膜澄清过滤;

(5) 将步骤(4)得到的上清液用纯化水超滤,待透过端电导率低于10 $\mu$ s/cm收集多糖溶液,通过除菌过滤后收集多糖溶液;

(6) 进一步将多糖溶液冻干制得肺炎链球菌荚膜多糖。

#### [0129] 2、5型肺炎链球菌荚膜多糖的检定

荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;糖醛酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;氨基己糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表16。

#### [0130] 表16 5型肺炎链球菌荚膜多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收率 (%)	蛋白 ( $\leq 7.5$ %)	核酸 ( $\leq 2$ %)	总氮 (2.5~6.0 %)	磷含量 ( $\leq 2.0$ %)	氨基己糖 ( $\geq 20$ %)	糖醛酸 ( $\geq 12$ %)	分子大小 ( $K_D$ )	分子量 (Da)
								CL-2B( $\leq 0.60$ )	
5-2308001Y	44.1	5.21	0.16	4.50	0.20	27.41	22.14	0.39	$3.45 \times 10^5$
5-2308002Y	44.7	5.09	0.15	4.53	0.19	27.10	22.62	0.39	$3.22 \times 10^5$
5-2308003Y	44.1	5.11	0.11	4.46	0.21	27.49	22.82	0.38	$3.15 \times 10^5$

[0131] 结果表明,本发明实施例3制得5型肺炎链球菌精制多糖的质量控制指标均不劣于对比例3制得精制多糖的质量控制指标,而且缩短了工艺时长。

#### [0132] 对比例4 5型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

#### [0133] 1、5型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

(1) 取对比例3所得精制多糖 $3.0 \pm 0.15$ g溶于1.0L的0.15mol/L氯化钠溶液中,搅拌至完全溶解;

(2) 将步骤(1)中的精制多糖溶液用高压均质机均质,压力 $1100 \pm 50$ bar,循环3次,收获降解多糖溶液;

(3) 将降解多糖溶液进行冻干,结束后收集降解多糖。

#### [0134] 2、5型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定

5型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定参考《中华人民共和国药典》2020版,其中荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;糖醛酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;氨基己糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三

部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表17。

[0135] 表17 5型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率(%)	蛋白 ( $\leq 7.5\%$ )	核酸 ( $\leq 2\%$ )	总氮 (2.5~6.0 %)	磷含量 ( $\leq 2.0\%$ )	氨基己 糖 ( $\geq 20\%$ )	糖醛酸 ( $\geq 12\%$ )	分子大小 ( $K_D$ ) CL-2B	分子量 (Da)
5-2308001YL	45.9	5.31	0.10	4.51	0.21	27.33	22.21	0.54	$1.33 \times 10^5$
5-2308002YL	45.8	5.08	0.12	4.53	0.20	27.29	21.59	0.55	$1.25 \times 10^5$
5-2308003YL	45.2	5.12	0.09	4.38	0.22	27.20	22.27	0.55	$1.36 \times 10^5$

[0136] 结果表明,本发明实施例4制得的5型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的质量控制指标较对比例4制得的降解多糖的蛋白含量减少,氨基己糖含量增加,且其他质量控制指标均不劣于对比例4,而且简化了工艺流程,缩短了工艺时长。

[0137] 对比例5 10A型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

[0138] 1、10A型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

步骤(1)和(2)与实施例5的方法相同,步骤(3)-(6)如下:

(3)向步骤(2)得到的超滤浓缩液中加入NaCl至浓度为 $0.3\text{mol/L}$ ,待完全溶解后,再加入 $0.5\%$ (w/v)的脱氧胆酸钠,一边搅拌一边滴加冰醋酸调pH至 $5.0$ ,充分搅匀后于 $2-8^\circ\text{C}$ 静置12小时,然后 $12000\text{ g}$ 离心 $30\text{min}$ ,收集上清液,弃沉淀,上清液中如果有小碎屑用 $0.8\mu\text{m}$ 滤膜澄清过滤;

(4)用氢氧化钠或氢氧化钾将步骤(3)得到的上清液回调pH至中性,然后向得到的料液中加入终浓度为 $0.01\text{mol/L}$ 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 和终浓度为 $0.01\text{mol/L}$ 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 作为缓冲体系,待完全溶解后,再加入乙酸钠终浓度为 $0.6\text{mol/L}$ 、 $\text{CaCl}_2$ 终浓度为 $0.25\text{mol/L}$ ,搅拌至溶解,向料液中滴加冰醋酸调pH至 $5.3-5.5$ ,充分搅匀后于 $2-8^\circ\text{C}$ 静置12小时,静置完成后,然后 $12000\text{ g}$ , $30\text{min}$ 离心,收集上清液,弃沉淀,上清液中如果有小碎屑可以用 $0.8\mu\text{m}$ 滤膜澄清过滤;

(5)将步骤(4)得到的上清液用纯化水超滤,待透过端电导率低于 $10\mu\text{s/cm}$ 收集多糖溶液,通过除菌过滤后收集多糖溶液;

(6)进一步将多糖溶液冻干制得肺炎链球菌荚膜多糖。

[0139] 2、10A型肺炎链球菌荚膜多糖的检定

荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;氨基己糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表18。

[0140] 表18 10A型肺炎链球菌荚膜多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率(%)	蛋白 ( $\leq 7.0\%$ )	核酸 ( $\leq 2\%$ )	总氮 (0.5~3.5 %)	磷含量 (1.5~3.5 %)	氨基己 糖 ( $\geq 12\%$ )	分子大小 ( $K_D$ )	分子量 (Da)
							CL-2B( $\leq 0.65$ $K_D$ )	
10A-2308001Y	56.2	3.40	0.02	1.32	2.50	12.02	0.42	$6.52 \times 10^5$
10A-2308002Y	57.5	3.42	0.02	1.28	2.52	12.91	0.42	$6.07 \times 10^5$
10A-2308003Y	57.8	3.36	0.01	1.26	2.49	12.76	0.42	$6.35 \times 10^5$

[0141] 结果表明,本发明实施例5制得10A型肺炎链球菌精制多糖的质量控制指标较对比例5的蛋白含量和总磷含量减少,氨基己糖含量较对比例5增加,且其他质量控制指标均不劣于对比例,而且缩短了工艺时长。

[0142] 对比例6 10A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

[0143] 1、10A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

(1) 取对比例5所得精制多糖 $3.0 \pm 0.15\text{g}$ 溶于1.0L的0.15mol/L氯化钠溶液中,搅拌至完全溶解;

(2) 将步骤(1)中的精制多糖溶液用高压均质机均质,压力 $600 \pm 50\text{bar}$ ,循环3次,收获降解多糖溶液;

(3) 将降解多糖溶液进行冻干,结束后收集降解多糖。

[0144] 2、10A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定

10A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定参考《中华人民共和国药典》2020版,其中荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;氨基己糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表19。

[0145] 表19 10A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率 (%)	蛋白 ( $\leq 7.0\%$ )	核酸 ( $\leq 2\%$ )	总氮 (0.5~3.5 %)	磷含量 (1.5~3.5 %)	氨基己 糖 ( $\geq 12\%$ )	分子大小 ( $K_D$ )	分子量 (Da)
							CL-2B	
10A-2308001YL	55.2	3.32	0.02	1.32	2.41	13.17	0.69	$1.23 \times 10^5$
10A-2308002YL	54.1	3.28	0.01	1.30	2.43	13.21	0.69	$1.35 \times 10^5$
10A-2308003YL	55.2	3.26	0.01	1.28	2.27	13.19	0.69	$1.36 \times 10^5$

[0146] 结果表明,本发明实施例6制得10A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的质量控制指标较对比例6制得降解多糖的蛋白含量减少,其他质量控制指标均不劣于对比例6,而且简化了工艺流程,缩短了工艺时长。

[0147] 对比例7 11A型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

[0148] 1、11A型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

步骤(1)和(2)与实施例7的方法相同,步骤(3)-(6)如下:

(3)向步骤(2)得到的超滤浓缩液中加入NaCl至浓度为0.3mol/L,待完全溶解后,再加入0.5%(w/v)的脱氧胆酸钠,一边搅拌一边滴加冰醋酸调pH至5.0,充分搅匀后于2-8℃静置12小时,然后12000 g离心30min,收集上清液,弃沉淀,上清液中如果有小碎屑用0.8μm滤膜澄清过滤;

(4)用氢氧化钠或氢氧化钾将步骤(3)得到的上清液回调pH至中性,然后向得到的料液中加入终浓度为0.01mol/L的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 和终浓度为0.01mol/L的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 作为缓冲体系,待完全溶解后,再加入乙酸钠终浓度为0.6mol/L、 $\text{CaCl}_2$ 终浓度为0.25mol/L,搅拌至溶解,向料液中滴加冰醋酸调pH至5.3-5.5,充分搅匀后于2-8℃静置12小时,静置完成后,然后12000 g离心30min,收集上清液,弃沉淀,上清液中如果有小碎屑可以用0.8μm滤膜澄清过滤;

(5)将步骤(4)得到的上清液用纯化水超滤,待透过端电导率低于10μs/cm收集多糖溶液,通过除菌过滤后收集多糖溶液;

(6)进一步将多糖溶液冻干制得肺炎链球菌荚膜多糖。

#### [0149] 2、11A型肺炎链球菌荚膜多糖的检定

荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;0-乙酰基含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3117)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表20。

[0150] 表20 11A型肺炎链球菌荚膜多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收率(%)	蛋白 (≤3%)	核酸 (≤2%)	总氮 (0~2.5%)	磷含量 (1.5~3.5%)	O-乙酰基 (≥9%)	分子大小( $K_D$ )	分子量 (Da)
							CL-2B(≤0.40 $K_D$ )	
11A-2308001Y	71.2	0.72	0.31	0.22	2.71	14.12	0.38	1.02×10 <sup>6</sup>
11A-2308002Y	71.7	0.71	0.33	0.20	2.68	13.89	0.38	1.21×10 <sup>6</sup>
11A-2308003Y	72.0	0.75	0.27	0.27	2.65	14.14	0.39	1.48×10 <sup>6</sup>

[0151] 结果表明,本发明实施例7的方法制得11A型肺炎链球菌精制多糖的质量控制指标较对比例7的蛋白含量、核酸、总磷含量减少,0-乙酰基含量较对比例7增加,其他质量控制指标均不劣于对比例,而且缩短了工艺时长。

#### [0152] 对比例8 11A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

##### [0153] 1、11A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

(1)取对比例7所得精制多糖 $3.0 \pm 0.15\text{g}$ 溶于1.0L的0.15mol/L氯化钠溶液中,搅拌至完全溶解;

(2)将步骤(1)中的精制多糖溶液用高压均质机均质,压力 $600 \pm 50\text{bar}$ ,循环3次,收获降解多糖溶液;

(3)将降解多糖溶液进行冻干,结束后收集降解多糖。



## [0154] 2、11A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定

11A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定参考《中华人民共和国药典》2020版,其中荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;O-乙酰基含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3117)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表21。

[0155] 表21 11A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收率(%)	蛋白 ( $\leq 3\%$ )	核酸 ( $\leq 2\%$ )	总氮 (0~2.5%)	磷含量 (1.5~3.5%)	O-乙酰基 ( $\geq 9\%$ )	分子大小 ( $K_D$ )	分子量 (Da)
							CL-2B	
11A-2308001YL	70.1	0.62	0.21	0.21	2.63	13.72	0.66	$1.14 \times 10^5$
11A-2308002YL	72.2	0.70	0.23	0.23	2.64	13.29	0.65	$1.33 \times 10^5$
11A-2308003YL	70.9	0.72	0.26	0.20	2.57	13.87	0.66	$1.24 \times 10^5$

[0156] 结果表明,本发明实施例8的方法制得11A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的质量控制指标较对比例8制得降解多糖的蛋白含量、核酸、总磷含量减少,且其他质量控制指标均不劣于对比例8,而且简化了工艺流程,缩短了工艺时长。

## [0157] 对比例9 19F型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

## [0158] 1、19F型肺炎链球菌荚膜多糖的纯化

步骤(1)和(2)与实施例9的方法相同,步骤(3)-(6)如下:

(3)向步骤(2)得到的超滤浓缩液中加入NaCl至浓度为0.3mol/L,待完全溶解后,再加入0.5%(w/v)的脱氧胆酸钠,一边搅拌一边滴加冰醋酸调pH至5.0,充分搅匀后于2-8℃静置12小时,然后12000g离心30min,收集上清液,弃沉淀,上清液中如果有小碎屑用0.8 $\mu$ m滤膜澄清过滤;

(4)用氢氧化钠或氢氧化钾将步骤(3)得到的上清液回调pH至中性,然后向得到的料液中加入终浓度为0.01mol/L的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 和终浓度为0.01mol/L的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 作为缓冲体系,待完全溶解后,再加入乙酸钠终浓度为0.6mol/L、 $\text{CaCl}_2$ 终浓度为0.25mol/L,搅拌至溶解,向料液中滴加冰醋酸调pH至5.3-5.5,充分搅匀后于2-8℃静置12小时,静置完成后,12000g离心30min,收集上清液,弃沉淀,上清液中如果有小碎屑可以用0.8 $\mu$ m滤膜澄清过滤;

(5)将步骤(4)得到的上清液用纯化水超滤,待透过端电导率低于10 $\mu$ s/cm收集多糖溶液,通过除菌过滤后收集多糖溶液。

[0159] (6)进一步将多糖溶液冻干制得肺炎链球菌荚膜多糖。

## [0160] 2、19F型肺炎链球菌荚膜多糖的检定

荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人

民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;氨基己糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;甲基戊糖的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表22。

[0161] 表22 19F型肺炎链球菌荚膜多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率 (%)	蛋白 (≤3 %)	核 酸 (≤2 %)	总氮 (1.4~ 3.5%)	磷含 量 (3.0~ 5.5%)	甲基 戊糖 (≥20 %)	氨基 己糖 (≥12.5 %)	分子大 小(K <sub>D</sub> )	分子量 (Da)
								CL-4B( ≤0.20K D)	
19F-2308001Y	60.1	0.41	0.03	2.41	5.11	30.12	14.83	0.03	7.66×10 <sup>5</sup>
19F-2308002Y	60.5	0.40	0.02	2.50	5.18	29.51	14.22	0.04	7.85×10 <sup>5</sup>
19F-2308003Y	60.0	0.37	0.04	2.48	5.10	29.58	14.90	0.04	7.57×10 <sup>5</sup>

[0162] 结果表明,本发明实施例9制得11A型肺炎链球菌精制多糖的质量控制指标较对比例9制得精制多糖的蛋白含量减少,且其他质量控制指标均不劣于对比例9,而且缩短了工艺时长。

[0163] 对比例10 19F型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

[0164] 1、19F型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

(1) 取对比例9所得精制多糖 $3.0 \pm 0.15$ g溶于1.0L的0.15mol/L氯化钠溶液中,搅拌至完全溶解;

(2) 将步骤(1)中的精制多糖溶液用高压均质机均质,压力 $600 \pm 50$ bar,循环2次,收获降解多糖溶液;

(3) 将降解多糖溶液进行冻干,结束后收集降解多糖。

[0165] 2、19F型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定

19F型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定参考《中华人民共和国药典》2020版,其中荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;氨基己糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;甲基戊糖的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表23。

[0166] 表23 19F型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率 (%)	蛋白 ( $\leq 3\%$ )	核酸 ( $\leq 2\%$ )	总氮 (1.4~3.5 )	磷含量 (3.0~5.5 )	甲基戊 糖 ( $\geq 20\%$ )	氨基己 糖 ( $\geq 12.5\%$ )	分子大 小 ( $K_D$ )	分子量 (Da)
								CL-4B	
19F-2308001YL	59.9	0.41	0.03	2.44	5.10	29.81	14.85	0.42	$2.55 \times 10^5$
19F-2308002YL	60.4	0.43	0.03	2.42	5.12	29.22	14.73	0.42	$2.59 \times 10^4$
19F-2308003YL	60.0	0.40	0.02	2.40	5.09	29.29	14.69	0.42	$2.62 \times 10^4$

[0167] 结果表明,本发明实施例10制得11A型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的质量控制指标较对比例10制得降解多糖的蛋白含量和总磷含量减少,且其他质量控制指标均不劣于对比例10,而且简化了工艺流程,缩短了工艺时长。

[0168] 对比例11 2型肺炎链球菌荚膜多糖的制备

[0169] 1、2型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

步骤(1)和(2)与实施例11的方法相同,步骤(3)-(6)如下:

(3)向步骤(2)制得超滤浓缩液中加入NaCl至浓度为0.3mol/L,待完全溶解后,再加入0.5%(w/v)的脱氧胆酸钠,一边搅拌一边滴加冰醋酸调pH至5.0,充分搅匀后于2-8℃静置12小时,然后12000 g离心30min,收集上清液,弃沉淀,上清液中如果有小碎屑用0.8 $\mu$ m滤膜澄清过滤;

(4)用氢氧化钠或氢氧化钾将步骤(3)得到的上清液回调pH至中性,然后向得到的料液中加入终浓度为0.01mol/L的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 和终浓度为0.01mol/L的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 作为缓冲体系,待完全溶解后,再加入乙酸钠终浓度为0.6mol/L、 $\text{CaCl}_2$ 终浓度为0.25mol/L,搅拌至溶解,向料液中滴加冰醋酸调pH至5.3-5.5,充分搅匀后于2-8℃静置12小时,静置完成后,然后12000 g离心30min,收集上清液,弃沉淀,上清液中如果有小碎屑可以用0.8 $\mu$ m滤膜澄清过滤;

(5)将步骤(4)得到的上清液用纯化水超滤,待透过端电导率低于10 $\mu$ s/cm收集多糖溶液,通过除菌过滤后收集多糖溶液。

[0170] (6)进一步将多糖溶液冻干制得肺炎链球菌荚膜多糖。

[0171] 2、2型肺炎链球菌荚膜多糖的检定

2型肺炎链球菌荚膜多糖的检定参考《中华人民共和国药典》2020版,其中荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;糖醛酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;甲基戊糖的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表24。

[0172] 表24 2型肺炎链球菌荚膜多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收率 (%)	蛋白 ( $\leq 2\%$ )	核酸 ( $\leq 2\%$ )	总氮 (0~1.0 )	磷含量 (0~1.0 )	甲基戊 糖 ( $\geq 38\%$ )	糖醛酸 ( $\geq 15\%$ )	分子大小 ( $K_D$ )	分子量 (Da)
								CL-4B( $\leq 0.15K_D$ )	
2-2308001Y	60.2	0.10	0.07	0.60	0.51	50.53	22.22	0.06	$1.67 \times 10^6$
2-2308002Y	60.0	0.12	0.04	0.61	0.62	50.98	21.02	0.07	$1.86 \times 10^6$
2-2308003Y	60.5	0.13	0.06	0.62	0.59	50.81	21.05	0.07	$1.88 \times 10^6$

[0173] 结果表明,本发明实施例11制得2型肺炎链球菌精制多糖的质量控制指标较对比例11的核酸含量减少,甲基戊糖含量较对比例11增加,且其他质量控制指标均不劣于对比例11,而且缩短了工艺时长。

[0174] 对比例12 2型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

[0175] 1、2型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的制备

(1) 取对比例11所得精制多糖 $3.0 \pm 0.15g$ 溶于1.0L的0.15mol/L氯化钠溶液中,搅拌至完全溶解;

(2) 将步骤(1)中的精制多糖溶液用高压均质机均质,压力 $800 \pm 50bar$ ,循环3次,收获降解多糖溶液。;

(3) 将降解多糖溶液进行冻干,结束后收集降解多糖。

[0176] 2、2型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定

2型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的检定参考《中华人民共和国药典》2020版,其中荚膜多糖含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中速率比浊法(3.3.2)进行;蛋白含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;核酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;总氮含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0704)进行;磷含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则3103)进行;糖醛酸含量的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0731)进行;甲基戊糖的检定依据《中华人民共和国药典》2020版三部中(通则0401)进行;荚膜多糖分子大小的测定依据《中华人民共和国药典》2020版三部3.1.2.10中第一法进行。相关检定结果见表25。

[0177] 表25 2型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的回收率和质量控制指标

检测项 (药典标准)	回收 率(%)	蛋白 ( $\leq 2\%$ )	核酸 ( $\leq 2\%$ )	总氮 (0~1.0 )	磷含量 (0~1.0 )	甲基戊 糖 ( $\geq 38\%$ )	糖醛酸 ( $\geq 15\%$ )	分子大 小( $K_D$ )	分子量 (Da)
								CL-4B	
2-2308001YL	66.2	0.12	0.04	0.61	0.51	50.52	20.22	0.35	$1.47 \times 10^5$
2-2308002YL	66.6	0.15	0.05	0.63	0.50	50.51	21.53	0.36	$1.52 \times 10^5$
2-2308003YL	66.8	0.10	0.05	0.59	0.52	50.69	20.30	0.35	$1.34 \times 10^5$

[0178] 结果表明,本发明实施例12制得2型肺炎链球菌荚膜多糖降解多糖的质量控制指标较对比例12制得降解多糖的蛋白含量、核酸、总氮、总磷含量减少,且其他质量控制指标均不劣于对比例12,而且简化了工艺流程,缩短了工艺时长。

[0179] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可

以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。