



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113980104 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 22

(21) 申请号 202111241847.5

(22) 申请日 2021.10.25

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113980104 A

(43) 申请公布日 2022.01.28

(73) 专利权人 北京智飞绿竹生物制药有限公司  
地址 100176 北京市大兴区经济技术开发区(亦庄)同济北路22号

专利权人 重庆智飞生物制品股份有限公司  
安徽智飞龙科马生物制药有限公司

(72) 发明人 曾力平 赵林飞 姜真 赵常帅  
朱卫华 杜琳

(74) 专利代理机构 北京华科联合专利事务所  
(普通合伙) 11130

专利代理师 王为

(51) Int.Cl.

G07K 14/315 (2006.01)

G07K 1/34 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102286100 A, 2011.12.21

CA 2306032 A1, 1999.04.08

CN 112646050 A, 2021.04.13

CN 109336989 A, 2019.02.15

CN 108465028 A, 2018.08.31

CN 106220717 A, 2016.12.14

宋刚, 张宁, 彭志英. 超滤浓缩微生物胞外多糖PS-9415发酵液的研究. 食品科学. (02), 全文.

审查员 吕健

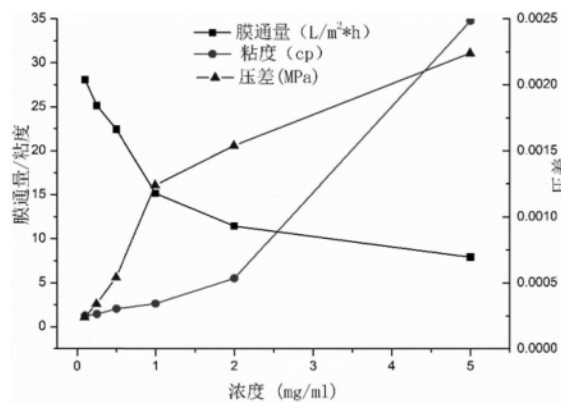
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54) 发明名称

一种切向流超滤纯化15价肺炎球菌多糖蛋白结合物的工艺方法

(57) 摘要

本发明提供了一种切向流超滤纯化15价肺炎球菌多糖蛋白结合物的工艺方法, 所述步骤采用不同膜包孔径、超滤倍数、维持体积、跨膜压差、清洗次数等切向流超滤工艺参数去除1、2、3、4、5、6A、6B、7F、9V、12F、14、18C、19A、19F、23F型共15种肺炎球菌多糖蛋白结合物中间样品中的小分子化合物, 缩短超滤时间, 减少原料损耗, 提高回收率, 超滤结束后的膜包采用碱溶液处理, 水通量能快速的恢复到初始值, 简单快捷效率高。该方法纯化过程中所用液体只需0.85%氯化钠溶液, 在疫苗生产过程中, 0.85%氯化钠溶液是常用溶剂, 产品质量安全性好, 且能降低浓缩透析等操作过程中膜的穿透渗漏等风险, 能防止生产过程中产品因泄露导致的环境污染和人员危险事件的发生, 适用于多种疫苗制备领域, 生产成本低、效率高, 有良好的经济价值。



CN 113980104 B

1. 一种切向流超滤15价肺炎球菌多糖蛋白结合物的纯化方法,包括以下步骤:

(1) 用纯化水冲洗切向流超滤系统;

(2) 取肺炎球菌多糖蛋白结合物中间产品,用0.85%氯化钠溶液先稀释后浓缩维持一定的体积,使用切向流超滤膜包进行超滤;

(3) 浓缩样品并收集,用0.85%氯化钠溶液加压循环清洗系统并收集清洗液;

(4) 用0.3mol/L氢氧化钠加压循环冲洗系统,纯化水冲洗并测水通量合格后用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存;

其中,步骤1) 先将膜包中的保存液排空,用纯化水冲洗切向流超滤系统,进料泵速为150~400rpm,调节回流阀使进出口压为0.05~0.15MPa,冲洗10~30分钟,直至透过液与回流液pH值为中性即可;

其中,步骤2): 切向流超滤膜包孔径为10~100KD,V流道,超滤前样品先稀释后浓缩,至样品粘度达到目标粘度范围,进料泵速150~400rpm,调节回流阀使TMP为0.10~0.15MPa,超滤用水为0.85%氯化钠溶液,超滤倍数为10~40倍;

其中,步骤3): 浓缩样品时,降低进料流速使TMP $\leq$ 0.15MPa,直至样品体积 $\leq$ 最终所需体积1/3后收集浓缩液,用0.85%氯化钠溶液加压循环冲洗该系统3~5分钟后收集,重复清洗1~3次;

其中,步骤4): 超滤结束后,用1~2L 0.1~0.5mol/L氢氧化钠溶液冲洗超滤系统后,再用0.1~0.5mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速150~400rpm,TMP 0.05~0.15MPa,循环10~30分钟后排空,纯化水冲洗超滤系统10~30分钟,直至透过液与回流液pH值为中性,测水通量合格后用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

2. 根据权利要求1所述的纯化方法,其特征在于,包括以下步骤:

先用纯化水冲洗切向流超滤系统;10mg/ml肺炎球菌荚膜多糖经0.5mol/L冰醋酸水解72h、10mmol/L高碘酸钠氧化6h,加入甘油终止反应,切向流超滤纯化得到肺炎球菌多糖氧化物,即样品;切向流超滤膜包孔径为30KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释3倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至300ml,TMP为0.15MPa,维持体积超滤10倍,样品体积浓缩至100ml后收集,用100ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复两次;超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

3. 根据权利要求1所述的纯化方法,其特征在于,包括以下步骤:

先用纯化水冲洗切向流超滤系统;10mg/ml白喉类毒素加入0.25mol/LADH与0.02mol/LLEDAC反应4h,切向流超滤纯化得到白喉类毒素衍生物,即样品;切向流超滤膜包孔径为10KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释5倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至200ml,TMP为0.15MPa,维持体积超滤30倍,样品体积浓缩至50ml后收集,用75ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复两次;超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

4. 根据权利要求1所述的纯化方法,其特征在于,包括以下步骤:

先用纯化水冲洗切向流超滤系统;5mg/ml肺炎球菌多糖氧化物加入40mg/ml ADH与2mg/ml硼氢化钠反应72h,切向流超滤纯化得到肺炎球菌多糖衍生物,即样品;切向流超滤膜包孔径为30KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释3倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至300ml,TMP为0.15MPa,维持体积超滤30倍,样品体积浓缩至100ml后收集,用100ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复两次;超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

5. 根据权利要求1所述的纯化方法,其特征在于,包括以下步骤:

先用纯化水冲洗切向流超滤系统;2mg/ml肺炎球菌多糖氧化物与等质量白喉类毒素衍生物混合,加入2mg/mL硼氢化钠室温反应3天后切向流超滤纯化得到2型肺炎球菌多糖蛋白结合物,即样品;切向流超滤膜包孔径为100KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释2倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至300ml,TMP为0.15MPa,维持体积超滤20倍,样品体积浓缩至100ml后收集,用100ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复三次;超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

6. 根据权利要求1所述的纯化方法,其特征在于,包括以下步骤:

先用纯化水冲洗切向流超滤系统;1mg/ml肺炎球菌多糖衍生物与等质量白喉类毒素混合,加入0.02mol/L EDAC反应150分钟后切向流超滤纯化得到肺炎球菌多糖蛋白结合物,即样品;切向流超滤膜包孔径为100KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释1倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至300ml,TMP为0.15MPa,维持体积超滤20倍,样品体积浓缩至100ml后收集,用100ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复三次,超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

## 一种切向流超滤纯化15价肺炎球菌多糖蛋白结合物的工艺方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物疫苗纯化方法,具体涉及一种15价肺炎球菌多糖蛋白结合物纯化工艺。

### 背景技术

[0002] 肺炎球菌是导致肺炎、中耳炎、脑膜炎等病的主要病因,发病人群以老人儿童为主,预防肺炎球菌感染的疫苗主要包括肺炎球菌多糖疫苗和肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗这两类疫苗。

[0003] 肺炎球菌多糖疫苗主要对老年人及一些免疫力较弱的人群有保护作用,对2岁以下婴幼儿的保护效果弱,且受时间年限影响。肺炎球菌多糖与蛋白质结合形成的疫苗可以将肺炎球菌多糖从非T细胞依赖性抗原变为T细胞依赖性抗原,肺炎球菌多糖与蛋白结合制备的疫苗能诱导婴幼儿产生良好的免疫记忆。

[0004] 切向流过滤也叫超滤,是一种膜分离技术,以压力差为推动力,在分离过程中主要依靠流速和压力,通过膜孔径的大小来筛选分离不同分子水平的物质,小分子成分透过膜孔径滤出,大分子成分被截留。超滤过程不需要加热,可在常温下进行,条件温和、能耗低,不发生相变化,无需另加其他化学试剂,无污染,分离效率高,即可浓缩又可透析置换溶剂,有利于低浓度溶液中微量成分的收集,且拆装简单、操作方便、便于清洗和维护,因而广泛应用于医药、食品、环保等领域。

[0005] 目前我国市面上销售的肺炎球菌多糖蛋白结合疫苗主要是进口疫苗,以英国葛兰素史克公司的“10价肺炎球菌结合疫苗”和美国辉瑞公司的“13价肺炎球菌结合疫苗”为主,多糖蛋白结合物是结合疫苗的主要抗原成分,其制备方法包括CDAP介导的氰基活化法和胺还原法等,本发明内容是以胺还原法来制备肺炎球菌多糖蛋白结合物,该方法是多糖溶液经醋酸水解、高碘酸钠氧化得多糖氧化物,氧化多糖与己二酰肼(ADH)在硼氢化钠作用下衍生,在碳二亚胺(EDAC)作用下与载体蛋白结合形成结合物,切向流超滤的主要目的就是选取不同孔径的超滤膜包与超滤倍数,使过程中的己二酰肼(ADH)、硼氢化钠、碳二亚胺(EDAC)等小分子化合物通过膜孔径流出,大分子肺炎球菌多糖蛋白结合物中间产物被超滤膜包截留下来并浓缩收集。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种高效快速纯化15价肺炎球菌多糖蛋白结合物的方法。

[0007] 本发明所述的纯化方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 用纯化水冲洗切向流超滤系统;

[0009] (2) 取肺炎球菌多糖蛋白结合物中间产品,用0.85%氯化钠溶液先稀释后浓缩维持一定的体积,使用切向流超滤膜包进行超滤;

[0010] (3) 浓缩样品并收集,用0.85%氯化钠溶液加压循环清洗系统并收集清洗液。

[0011] (4)用0.3mol/L氢氧化钠加压循环冲洗系统,纯化水冲洗并测水通量合格后用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0012] 其中,优选的步骤1):

[0013] 先将膜包中的保存液排空,用纯化水冲洗切向流超滤系统,进料泵速为150~400rpm,调节回流阀使进出口压为0.05~0.15MPa,冲洗10~30分钟,直至透过液与回流液pH值为中性即可。

[0014] 其中,优选的步骤2):

[0015] 切向流超滤膜包孔径为10~100KD,V流道,超滤前样品先稀释后浓缩,至样品粘度达到目标粘度范围,进料泵速150~400rpm,调节回流阀使TMP为0.10~0.15MPa,超滤用水为0.85%氯化钠溶液,超滤倍数为10~40倍。

[0016] 其中,优选的步骤3):

[0017] 浓缩样品时,降低进料流速使TMP≤0.15MPa,直至样品体积≤最终所需体积1/3后收集浓缩液,用0.85%氯化钠溶液加压循环冲洗该系统3~5分钟后收集,重复清洗1~3次。

[0018] 其中,优选的步骤4):

[0019] 超滤结束后,用1~2L 0.1~0.5mol/L氢氧化钠溶液冲洗超滤系统后,再用0.1~0.5mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速150~400rpm,TMP 0.05~0.15MPa,循环10~30分钟后排空,纯化水冲洗超滤系统10~30分钟,直至透过液与回流液pH值为中性,测水通量合格后用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。其中,优选的步骤4):

[0020] 水通量的测定中,进料泵速150~400rpm,排空超滤系统中的空气后,调节回流阀使TMP为0.05~0.15MPa,测透过流速并记录透过液温度,通过计算得出水通量并与初始水通量比较,若在初始水通量的80%~120%即表示水通量合格,其中未使用过的新膜包在上述方法下测定的值即为初始水通量,水通量的计算公式如下:

$$[0021] \quad NWP = \frac{R * F}{A * \left\{ \left[ \frac{P_{in} + P_{out}}{2} \right] - P_p \right\}}$$

[0022] 其中,A:膜包面积m<sup>2</sup>,R:透过速度L/h,P<sub>in</sub>:进口压bar

[0023] P<sub>out</sub>:出口压bar,P<sub>p</sub>:透进口压bar,F:温度系数

[0024] 其中,肺炎球菌多糖蛋白结合物中间产品包括肺炎球菌多糖氧化物,肺炎球菌多糖衍生物,白喉类毒素衍生物和肺炎球菌多糖蛋白结合物,这些中间产品均是肺炎球菌多糖蛋白结合物制备过程中肺炎球菌多糖经小分子化合物如高碘酸钠、己二酰肼(ADH)、硼氢化钠、碳二亚胺(EDAC)等反应下一步步制备而成。

[0025] 根据实施例之一,本发明所述的纯化方法,包括以下步骤:

[0026] 先用纯化水冲洗切向流超滤系统;10mg/ml肺炎球菌荚膜多糖经0.5mol/L冰醋酸水解72h、10mmol/L高碘酸钠氧化6h,加入甘油终止反应,切向流超滤纯化得到肺炎球菌多糖氧化物,即样品;切向流超滤膜包孔径为30KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释3倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至300ml,TMP为0.15MPa,维持体积超滤10倍,样品体积浓缩至100ml后收集,用100ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复两次;超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液

与回流液pH 值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0027] 根据实施例之一,本发明所述的纯化方法,包括以下步骤:

[0028] 先用纯化水冲洗切向流超滤系统;10mg/ml白喉类毒素加入0.25mol/LADH与0.02mol/LEDAC反应4h,切向流超滤纯化得到白喉类毒素衍生物,即样品;切向流超滤膜包孔径为10KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释5倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至200ml,TMP为0.15MPa,维持体积超滤30倍,样品体积浓缩至50ml后收集,用75ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复两次;超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0029] 根据实施例之一,本发明所述的纯化方法,包括以下步骤:

[0030] 先用纯化水冲洗切向流超滤系统;5mg/ml肺炎球菌多糖氧化物加入40mg/ml ADH与2mg/ml硼氢化钠反应72h,切向流超滤纯化得到肺炎球菌多糖衍生物,即样品;切向流超滤膜包孔径为30KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释3倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至300ml,TMP为0.15MPa,维持体积超滤 30倍,样品体积浓缩至100ml后收集,用100ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复两次;超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L 氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L 氢氧化钠溶液保存。

[0031] 根据实施例之一,本发明所述的纯化方法,包括以下步骤:

[0032] 先用纯化水冲洗切向流超滤系统;2mg/ml肺炎球菌多糖氧化物与等质量白喉类毒素衍生物混合,加入2mg/mL硼氢化钠室温反应3天后切向流超滤纯化得到2 型肺炎球菌多糖蛋白结合物,即样品;切向流超滤膜包孔径为100KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释2倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至300ml,TMP为0.15MPa,维持体积超滤20倍,样品体积浓缩至100ml后收集,用100ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复三次;超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速 200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH 值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0033] 根据实施例之一,本发明所述的纯化方法,包括以下步骤:

[0034] 先用纯化水冲洗切向流超滤系统;1mg/ml肺炎球菌多糖衍生物与等质量白喉类毒素混合,加入0.02mol/L EDAC反应150分钟后切向流超滤纯化得到肺炎球菌多糖蛋白结合物,即样品;切向流超滤膜包孔径为100KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释1倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至300ml,TMP为 0.15MPa,维持体积超滤20倍,样品体积浓缩至100ml后收集,用100ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复三次。超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0035] 本发明各个步骤都是优选得到的,其有益效果分别在于:

[0036] 在切向流超滤过程中,超滤前先排空系统中的保存液,用纯化水冲洗,进料泵速

150~400rpm,调节回流阀使进出口压力为0.05~0.15MPa左右,清洗10~30分钟,直至回流液与透过液pH值为中性即可,该过程用水少,洗的快,节约成本。

[0037] 在切向流超滤过程中,不同中间样品超滤膜包采用不同的孔径,根据切向流超滤原则,小分子通过膜进入滤液,膜孔径应为产品分子量1/5~1/3,所以切向流超滤纯化肺炎球菌多糖蛋白结合物中间产物时所选用的超滤膜包孔径为10KD~100KD。

[0038] 在切向流超滤过程中,V流道相对于A、C、D流道,系统压力小,透过速度快,易清洗,样品损失小,超滤效率高。

[0039] 在切向流超滤过程中,先稀释后浓缩可避免样品因初始浓度太大导致膜表面吸附大量的样品形成的凝胶层增加系统压力,降低膜通量,切向流超滤速度降低,时间延长,样品损失增大。

[0040] 在切向流超滤过程中,在跨膜压(TMP)≤0.15MPa时,增大进料流速,超滤膜包表面的剪切力增加使膜表面吸附的凝胶层减少,透过速度增加,损失减少。

[0041] 在切向流超滤过程中,根据最终所需样品浓度来确定收集体积,浓缩样品直至体积≤最终所需体积1/3后收集浓缩液,用0.85%氯化钠溶液加压循环冲洗超滤系统3~5分钟后收集,重复清洗1~3次,使超滤系统中残留的样品能被洗脱出来,增加产品的回收率。

[0042] 在切向流超滤结束后,用0.1~0.5mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗超滤系统10~30分钟后,测其水通量发现水通量基本恢复到初始值。

[0043] 本发明主要针对15价肺炎球菌多糖蛋白结合物制备过程中的纯化,样品超滤前先稀释后浓缩,不同的中间产物采用不同的膜包孔径和超滤倍数,利用样品粘度、跨膜压差等的联系选取不同的维持体积及最终清洗次数,减少了膜包表面附着的样品,增大了膜通量和回收率,减少了超滤时间与超滤液体的用量,降低了管路等材料的损耗,提高了工作效率,采用氢氧化钠溶液清洗膜包,用料少,操作步骤快捷简单,清洗效果好。

[0044] 本发明采用不同膜包孔径、超滤倍数、维持体积、跨膜压差、清洗次数等切向流超滤工艺参数去除1、2、3、4、5、6A、6B、7F、9V、12F、14、18C、19A、19F、23F型共15种肺炎球菌多糖蛋白结合物中间样品中的小分子化合物,缩短超滤时间,减少原料损耗,提高回收率,超滤结束后的膜包采用碱溶液处理,水通量能快速的恢复到初始值,简单快捷效率高。该方法纯化过程中所用液体只需0.85%氯化钠溶液,在疫苗生产过程中,0.85%氯化钠溶液是常用溶剂,产品质量安全性好,且能降低浓缩透析等操作过程中膜的穿透渗漏等风险,能防止生产过程中产品因泄露导致的环境污染和人员危险事件的发生,适用于多种疫苗制备领域,生产成本低、效率高,有良好的经济价值。

[0045] 本发明的纯化方法中,主要应用切向流过滤也叫超滤,超滤属于常规技术手段,本发明主要针对肺炎球菌多糖氧化物和衍生物、白喉类毒素衍生物和肺炎球菌多糖蛋白结合物这几种样品的粘度和浓度等,改进切向流超滤过程中的各种工艺参数,如跨膜压(TMP)、进料泵速、维持体积、清洗次数、膜包孔径和面积、膜包处理溶液等,选取最佳的工艺参数使得超滤时间大大缩短,回收率提高,膜包可再生效果好,管路等耗材损失降低。

[0046] 对于说明书中出现的技术词语进行解释:

[0047] 15价肺炎球菌多糖蛋白结合物:1、2、3、4、5、6A、6B、7F、9V、12F、14、18C、19A、19F、23F型共15种肺炎球菌多糖蛋白结合物经纯化和除菌过滤后得到的15种结合物原液。

## 附图说明

- [0048] 图1为实施例1中样品浓度与粘度,进出口压差和膜通量的关系图
- [0049] 图2为实施例1中跨膜压(TMP)与膜通量的关系
- [0050] 图3为实施例1中清洗次数与回收率的关系
- [0051] 图4为超滤倍数与杂质含量的关系
- [0052] 图5为进料泵速与膜通量的关系

## 具体实施方式

[0053] 以下通过实施例进一步说明本发明。本实施例仅为一种举例,是本发明的解决方案之一,本发明的保护范围不局限于下面的实施例。

[0054] 以下实施例中涉及的材料:

[0055] 肺炎球菌荚膜多糖

[0056] 白喉类毒素

[0057] 实施例1:

[0058] 1) 仪器及试剂

[0059] Pellicon 2Mini切向流超滤系统购自于Millipore公司,BT600-2J型蠕动泵购自于保定兰格

[0060] 试剂:己二酰肼(ADH)、碳二亚胺(EDAC)、硼氢化钠和高碘酸钠购自于默克Sigma公司,冰醋酸、氯化钠和氢氧化钠购自于国药集团化学试剂有限公司。

[0061] 2) 10mg/ml 2型肺炎球菌荚膜多糖经0.5mol/L冰醋酸水解72h、10mmol/L高碘酸钠氧化6h,加入甘油终止反应,切向流超滤纯化得到肺炎球菌多糖氧化物。切向流超滤膜包孔径为30KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释3倍,进料泵速 400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至300ml,TMP为0.15MPa,维持体积超滤 10倍,样品体积浓缩至100ml后收集,用100ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复两次。超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0062] 3) 10mg/ml白喉类毒素加入0.25mol/LADH与0.02mol/LEDAC反应4h,切向流超滤纯化得到白喉类毒素衍生物。切向流超滤膜包孔径为10KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释5倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至200ml, TMP为0.15MPa,维持体积超滤30倍,样品体积浓缩至50ml后收集,用75ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复两次。超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0063] 4) 2mg/ml 2型肺炎球菌多糖氧化物与等质量白喉类毒素衍生物混合,加入 2mg/mL硼氢化钠室温反应3天后切向流超滤纯化得到2型肺炎球菌多糖蛋白结合物。切向流超滤膜包孔径为100KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释2倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至300ml,TMP为0.15MPa,维持体积超滤20倍,样品体积浓缩至100ml后收集,用100ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复三次。超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧



化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0064] 实施例2:

[0065] 1) 仪器及试剂

[0066] Pellicon 2Mini切向流超滤系统购自于Millipore公司,BT600-2J型蠕动泵购自于保定兰格

[0067] 试剂:己二酰肼(ADH)、碳二亚胺(EDAC)、硼氢化钠和高碘酸钠购自于默克Sigma公司,冰醋酸、氯化钠和氢氧化钠购自于国药集团化学试剂有限公司。

[0068] 2) 10mg/ml 3型肺炎球菌荚膜多糖经0.5mol/L冰醋酸水解72h、10mmol/L高碘酸钠氧化6h,加入甘油终止反应,切向流超滤纯化得到肺炎球菌多糖氧化物。切向流超滤膜包孔径为30KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释5倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至300ml,TMP为0.15MPa,维持体积超滤10倍,样品体积浓缩至100ml后收集,用100ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复两次。超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0069] 3) 5mg/ml 3型肺炎球菌多糖氧化物与40mg/ml ADH混合,加入2mg/ml硼氢化钠室温反应72h,切向流超滤纯化得到肺炎球菌多糖衍生物。切向流超滤膜包孔径为30KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释3倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至300ml,TMP为0.15MPa,维持体积超滤30倍,样品体积浓缩至100ml后收集,用100ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复两次。超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0070] 4) 1mg/ml 3型肺炎球菌多糖衍生物与等质量白喉类毒素混合,加入0.02mol/L EDAC反应150分钟后切向流超滤纯化得到3型肺炎球菌多糖蛋白结合物。切向流超滤膜包孔径为100KD,V流道,样品用0.85%氯化钠稀释1倍,进料泵速400rpm,调节回流阀使样品体积浓缩至300ml,TMP为0.15MPa,维持体积超滤20倍,样品体积浓缩至100ml后收集,用100ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集,重复三次。超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速200rpm,TMP 0.1MPa,循环20分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0071] 实施例3:

[0072] 1) 仪器及试剂

[0073] Pellicon 2Mini切向流超滤系统购自于Millipore公司,BT600-2J型蠕动泵购自于保定兰格

[0074] 试剂:己二酰肼(ADH)、碳二亚胺(EDAC)、硼氢化钠和高碘酸钠购自于默克Sigma公司,冰醋酸、氯化钠和氢氧化钠购自于国药集团化学试剂有限公司。

[0075] 2) 10mg/ml 2型肺炎球菌荚膜多糖经0.5mol/L冰醋酸水解72h、10mmol/L高碘酸钠氧化6h,加入甘油终止反应,切向流超滤纯化得到肺炎球菌多糖氧化物。切向流超滤膜包孔径为30KD,V流道,进料泵速220rpm,调节回流阀使样品浓缩至200ml,TMP为0.08MPa,维持体积超滤50倍,样品体积浓缩至150ml后收集,用150ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集。超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速 220rpm,TMP 0.08MPa,循环30分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0076] 3) 10mg/ml白喉类毒素加入0.25mol/LADH与0.02mol/LLEDAC反应4h,切向流超滤纯化得到白喉类毒素衍生物。切向流超滤膜包孔径为10KD,V流道,进料泵速220rpm,调节回流阀使样品浓缩至200ml,TMP为0.08MPa,维持体积超滤 50倍,样品体积浓缩至100ml后收集,用100ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集。超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速220rpm,TMP 0.08MPa,循环30分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0077] 4) 2mg/ml 2型肺炎球菌多糖氧化物与等质量白喉类毒素衍生物混合,加入 2mg/mL硼氢化钠室温反应3天后切向流超滤纯化得到2型肺炎球菌多糖蛋白结合物。切向流超滤膜包孔径为100KD,V流道,进料泵速220rpm,调节回流阀使样品浓缩至200ml,TMP为0.08MPa,维持体积超滤50倍,样品体积浓缩至200ml 后收集,用200ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集。超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速220rpm,TMP 0.08MPa,循环30分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0078] 实施例4:

[0079] 1) 仪器及试剂

[0080] Pellicon 2Mini切向流超滤系统购自于Millipore公司,BT600-2J型蠕动泵购自于保定兰格

[0081] 试剂:己二酰肼(ADH)、碳二亚胺(EDAC)、硼氢化钠和高碘酸钠购自于默克Sigma公司,冰醋酸、氯化钠和氢氧化钠购自于国药集团化学试剂有限公司。

[0082] 2) 10mg/ml 3型肺炎球菌荚膜多糖经0.5mol/L冰醋酸水解72h、10mmol/L高碘酸钠氧化6h,加入甘油终止反应,切向流超滤纯化得到肺炎球菌多糖氧化物。切向流超滤膜包孔径为30KD,V流道,进料泵速220rpm,调节回流阀使样品浓缩至 200ml,TMP为0.08MPa,维持体积超滤50倍,样品体积浓缩至150ml后收集,用 150ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集。超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,进料泵速 220rpm,TMP 0.08MPa,循环30分钟后排空,纯化水冲洗系统至透过液与回流液 pH值为中性,测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0083] 3) 5mg/ml 3型肺炎球菌多糖氧化物与40mg/ml ADH混合,加入2mg/ml硼氢化钠室温反应72h,切向流超滤纯化得到肺炎球菌多糖衍生物。切向流超滤膜包孔径为30KD,V流道,进料泵速220rpm,调节回流阀使样品浓缩至200ml,TMP为 0.08MPa,维持体积超滤50倍,样品体积浓缩至150ml后收集,用150ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集。超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统,2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统,

进料泵速220rpm, TMP 0.08MPa, 循环30分钟后排空, 纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性, 测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0084] 4) 1mg/ml 3型肺炎球菌多糖衍生物与等质量白喉类毒素混合, 加入0.02mol/L EDAC反应150分钟后切向流超滤纯化得到3型肺炎球菌多糖蛋白结合物。切向流超滤膜包孔径为100KD, V流道, 进料泵速220rpm, 调节回流阀使样品浓缩至200ml, TMP为0.08MPa, 维持体积超滤50倍, 样品体积浓缩至200ml后收集, 用200ml 0.85%氯化钠加压循环清洗膜包并收集。超滤结束后用1L 0.3mol/L氢氧化钠溶液冲洗系统, 2L 0.3mol/L氢氧化钠溶液加压循环冲洗系统, 进料泵速220rpm, TMP 0.08MPa, 循环30分钟后排空, 纯化水冲洗系统至透过液与回流液pH值为中性, 测水通量并用0.1mol/L氢氧化钠溶液保存。

[0085] 试验例1

[0086] 通过本发明工艺所获得肺炎球菌多糖蛋白结合物中间产物与标准及相关要求相比结果如下:

[0087] 可以发现本发明工艺所获得肺炎球菌多糖蛋白结合物中间产物中的各项指标均符合标准及相关要求。

	项目	己二酰肼 (ug/mg)	氰化物 (ng/mg)	碳二亚胺 (umol/L)	内毒素 (EU/ug)	水通量 (%)
[0088]	标准及相关要求	10~80	≤5	<10	≤1	80~120
	实施例1	47.66	0	1.124	0.5	96
	实施例2	39.42	0	2.037	0.4	99
[0089]	实施例3	45.83	0	1.098	0.4	81
	实施例4	40.07	0	1.937	0.4	85

[0090] 试验例2比较试验

[0091] 现有工艺在超滤过程中, 反应溶液直接浓缩而不先稀释、体积维持在系统最小体积, 跨膜压和进料泵速固定不变, 分别是0.08MPa和220rpm, 超滤倍数以系统最大处理能力来确定为50倍, 浓缩收集样品时只留下能充满系统体积的空间来清洗一次并收集。

[0092] 实验中探究了样品浓度与粘度与膜通量的关系, 结果如图1, 发现糖浓度越大, 溶液粘度越大, 膜表面吸附的凝胶层越多, 损失越大, 本发明工艺通过样品浓度与粘度的关系, 超滤前对样品进行稀释再浓缩, 使其粘度控制在1-10cp之间来确定维持体积;

[0093] 实验中通过比较不同TMP对膜通量的影响, 结果如图2, 发现TMP在 0.10-0.15MPa时, 膜通量趋于稳定, 现有工艺TMP为0.07MPa, 一直保持在较低的值下, 而本工艺结合TMP与膜通量的关系选取的TMP在0.10-0.15MPa, 使得超滤时间缩短;

[0094] 实验中通过检测不同超滤倍数中杂质的含量, 结果如图3, 发现不同的膜包孔径对杂质的去除效果不一样, 但整体趋势一样, 溶液中杂质含量与超滤倍数呈对数关系, 因此, 本工艺对应不同中间产物的切向流超滤时, 超滤倍数不一样。

[0095] 实验中探究了最终收集时的清洗次数与回收率的关系如图4, 发现清洗次数越多,

回收率越高,因此,本工艺根据最终所需要的体积来确定清洗次数,从而达到提高产量的目的。

[0096] 实验中探究了进料泵速与膜通量的关系,结果如图5,发现进料泵速越大,超滤系统的剪切力越大,膜表面形成的凝胶层越少,膜通量越大,因而超滤速度越快,因此,本工艺超滤过程中在泵速适用的范围内尽可能增大进料泵速来提高工作效率。

[0097] 通过本发明工艺(实施例1与实施例2),肺炎球菌多糖制备成肺炎球菌多糖蛋白结合物时总体超滤时间和回收率与现有工艺(实施例3与实施例4)相比,结果如下:

项目	超滤时间(min)	回收率(%)
实施例1	120	64.2
[0098] 实施例2	137	65.7
实施例3	239	41.6
实施例4	258	38.8

[0099] 采用上述工艺方法能高效快速纯化肺炎球菌多糖蛋白结合物中间产物,且纯化工艺简单,适用于大规模生产,不同中间样品分子量不同,浓度不同,对应的粘度不同,切向流超滤工艺参数结合对应的样品,通过选取不同的膜包孔径和流道,调节进料流速,跨膜压差,维持的超滤体积和超滤倍数等工艺参数,降低了样品在膜包表面的吸附量,膜通量增加,大大缩短了超滤纯化的时间,减少了超滤液体的用量,降低了管路等材料的损耗,提高了工作效率,切向流超滤系统采用简单的碱溶液处理,水通量能快速的恢复到初始值,用料少,简单快捷效率高,延长了膜包的使用寿命。

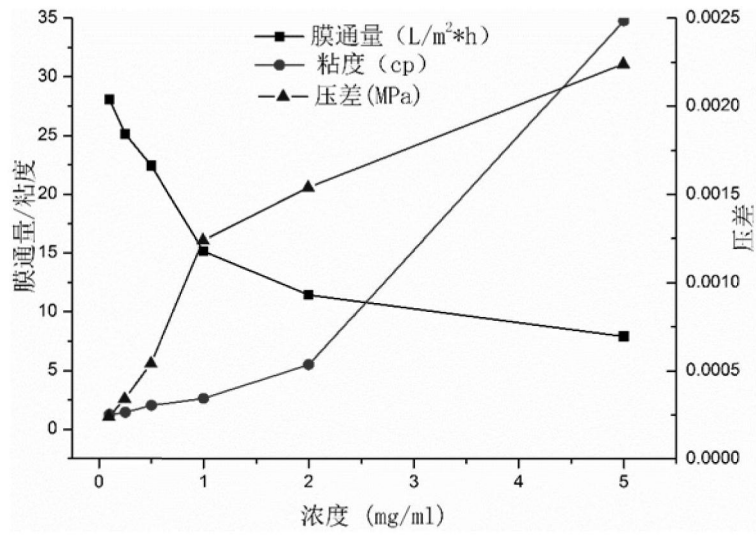


图1

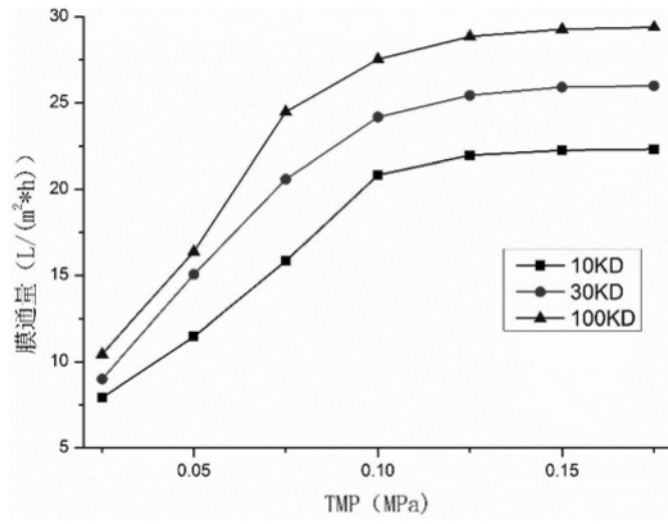


图2

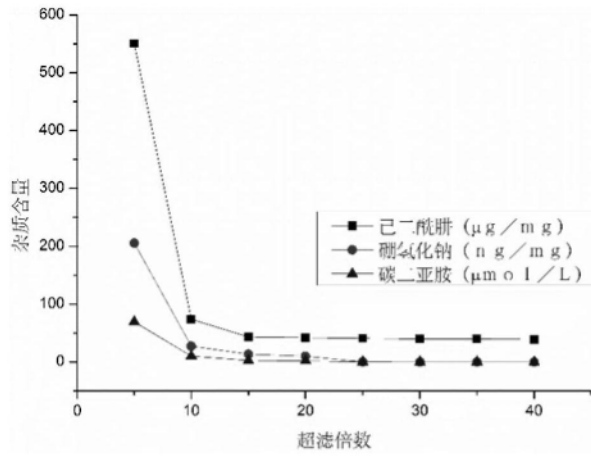


图3

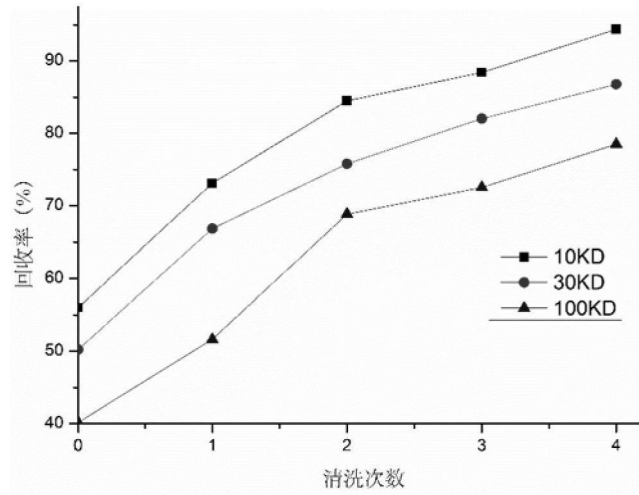


图4

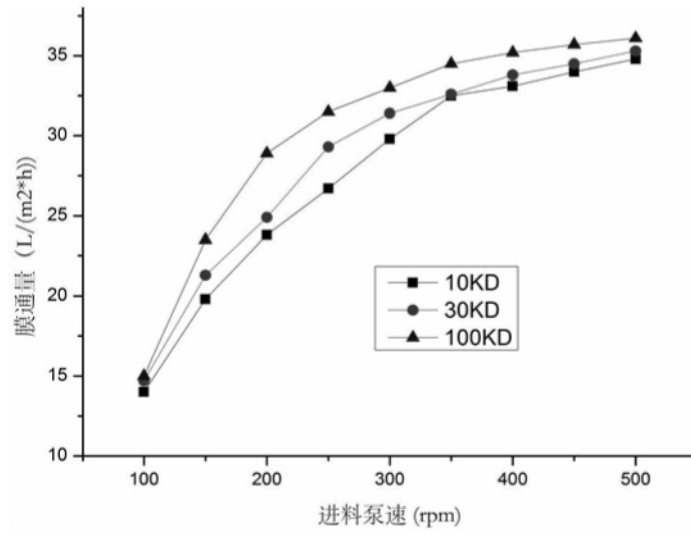


图5