

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391022 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.07.18

(22) Дата подачи заявки  
2021.11.23

(51) Int. Cl. G01N 30/74 (2006.01)  
G01N 30/89 (2006.01)  
C07F 9/50 (2006.01)  
G01N 30/88 (2006.01)

(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА В ПРОЦЕССЕ ОЧИСТКИ АНТИГЕНА PRP  
НАЕМОPHILUS INFLUENZAE ТИПА В

(31) 10-2020-0159439

(32) 2020.11.25

(33) KR

(86) PCT/KR2021/017295

(87) WO 2022/114735 2022.06.02

(71) Заявитель:

ЭлДжи КЕМ, ЛТД. (KR)

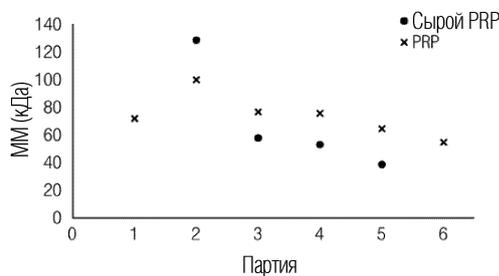
(72) Изобретатель:

Ан Кио Еун, Йео Донг Дзун (KR)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу оценки качества в процессе очистки антигена полирибозилрибитолфосфата (PRP) Наемophilus influenzae типа b (Hib). В соответствии с настоящим изобретением качество полученного продукта PRP Hib можно заранее оценить и предсказать путем определения молекулярной массы сырого PRP или молекулярной массы необработанного порошка PRP на стадии процесса очистки PRP Hib.



A1

202391022

202391022

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 577638EA/042

### СПОСОБ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА В ПРОЦЕССЕ ОЧИСТКИ АНТИГЕНА PRP НАЕМОPHILUS INFLUENZAE ТИПА В

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

##### [0001] Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0002] По данной заявке испрашивается преимущество корейской патентной заявки № 10-2020-0159439, поданной 25 ноября 2020 г. в Ведомство интеллектуальной собственности Кореи, описание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

##### [0003] Область техники

[0004] Настоящее изобретение относится к способу оценки качества в процессе очистки антигена полирибозилрибитолфосфата (PRP) *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) и, более конкретно, к способу оценки качества в процессе очистки полирибозилрибитолфосфата (PRP), который становится сырьем для получения вакцины против *Haemophilus influenzae* типа b.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) является основным патогеном, вызывающим у детей инвазивные и местные бактериальные инфекции (например, менингит, бактериемию, эпиглоттит, пневмонию, воспалительный артрит и т. д.). Полирибозилрибитолфосфат (PRP) *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) является основным полисахаридным компонентом, составляющим наружную мембрану Hib. Полисахаридная капсула на внешней мембране Hib становится основным фактором вирулентности.

[0006] Антитела к PRP вносят основной вклад в стерилизацию и ингибирование инфицированных Hib в сыворотке крови. PRP сам по себе используется не только в качестве компонента вакцины, но и в качестве конъюгированной вакцины, в которой PRP ковалентно связан с Т-клеточно-зависимым белковым антигеном.

[0007] PRP Hib получают в виде конечного необработанного порошка путем культивирования *Haemophilus influenzae* типа b и его очистки. Однако существует проблема, заключающаяся в том, что, когда возникает проблема качества конечного продукта, вся партия должна быть выброшена, что приводит к большим потерям с точки зрения стоимости. До сих пор на стадии очистки PRP Hib не был разработан метод контроля в процессе (IPC), который может предварительно оценивать и прогнозировать качество конечного продукта PRP.

[0008] [Документ предшествующего уровня техники]

[0009] [Патентный документ]

[0010] Патент США № 4220717

#### ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

#### ТЕХНИЧЕСКАЯ ЗАДАЧА

**[0011]** Авторы настоящего изобретения с помощью исследований предприняли усилия по разработке способа производственного контроля (IPC), способного проводить предварительную оценку и прогнозирование качества продукта PRP Hib, полученного в конечном итоге на технологической стадии получения PRP Hib. В результате они продемонстрировали, что качество очищаемого PRP можно оценить и предсказать заранее с помощью регрессионного анализа с использованием данных молекулярной массы сырого (то есть промежуточного продукта) или данных молекулярной массы необработанного порошка PRP (то есть конечного продукта) и данных о молекулярно-массовом распределении необработанного порошка PRP конечного продукта, в процессе очистки PRP Hib, создав тем самым настоящее изобретение.

**[0012]** Соответственно, целью настоящего изобретения является разработка способа оценки качества конечного необработанного порошка PRP в процессе получения необработанного порошка PRP путем очистки PRP Hib.

#### **ТЕХНИЧЕСКОЕ РЕШЕНИЕ**

**[0013]** Для достижения вышеуказанной цели

**[0014]** аспект настоящего изобретения относится к способу оценки качества PRP в процессе очистки полирибозилрибитолфосфата (PRP) *Haemophilus influenzae* типа b (Hib), который включает:

**[00015]** (a) сбор образца, содержащего сырой PRP, в процессе очистки PRP из культуры, в которой культивировался Hib;

**[0016]** (b) определение молекулярной массы сырого PRP в собранном образце;

**[0017]** (c) определение молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP в необработанном порошке, где PRP был окончательно очищен;

**[0018]** (d) проведение регрессионного анализа между молекулярной массой сырого PRP и молекулярно-массовым распределением необработанного порошка PRP с использованием данных молекулярной массы сырого PRP, определенных на стадии (b), и данных молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP, определенных на стадии (c); и

**[0019]** (e) расчет молекулярной массы сырого PRP, который удовлетворяет молекулярно-массовому распределению необработанного порошка PRP на определенном уровне или выше из регрессионного анализа.

**[0020]** В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу оценки качества PRP в процессе очистки полирибозилрибитолфосфата (PRP) *Haemophilus influenzae* типа b (Hib), который включает следующие стадии:

**[0021]** (a') стадию определения молекулярной массы необработанного порошка PRP и молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP в конечном очищенном необработанном порошке, полученном очисткой полирибозилрибитолфосфата (PRP) из культуры, где культивировали *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

**[0022]** (b') проведение регрессионного анализа между молекулярной массой необработанного порошка PRP и молекулярно-массовым распределением

необработанного порошка PRP с использованием данных определенной молекулярной массы необработанного порошка PRP и данных молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP, определенных на стадии (a'); и

**[0023]** (с') расчет молекулярной массы необработанного порошка PRP, который удовлетворяет молекулярно-массовому распределению необработанного порошка PRP на определенном уровне или выше из регрессионного анализа.

**[0024]** Далее настоящее изобретение описано более подробно, чтобы помочь понять настоящее изобретение. В частности, термины или слова, используемые в настоящем описании и формуле изобретения, не должны толковаться как ограниченные общепринятыми или словарными значениями, а должны интерпретироваться как значения и понятия, соответствующие технической идее настоящего изобретения.

**[0025]** Аспект настоящего изобретения относится к способу оценки качества PRP в процессе очистки полирибозилрибитолфосфата (PRP) *Haemophilus influenzae* типа b (Hib), который включает:

**[0026]** (a) сбор образца, содержащего сырой PRP, в процессе очистки PRP из культуры, в которой культивировался Hib;

**[0027]** (b) определение молекулярной массы сырого PRP в собранном образце;

**[0028]** (c) определение молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP в необработанном порошке, где PRP был окончательно очищен;

**[0029]** (d) проведение регрессионного анализа между молекулярной массой сырого PRP и молекулярно-массовым распределением необработанного порошка PRP с использованием данных молекулярной массы сырого PRP, определенных на стадии (b), и данных молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP, определенных на стадии (c); и

**[0030]** (e) расчет молекулярной массы сырого PRP, который удовлетворяет молекулярно-массовому распределению необработанного порошка PRP на определенном уровне или выше из регрессионного анализа.

**[0031]** Сбор образца, содержащего сырой PRP Hib на стадии (a) по настоящему изобретению, может быть осуществлен на промежуточной стадии процесса очистки для очистки PRP от культуры, в которой культивировался Hib. Термин «сырой PRP» относится к PRP, очистка которого не была завершена, в качестве промежуточного продукта в процессе очистки PRP. Процесс очистки PRP Hib может включать процесс обработки этанолом (EtOH) или процесс обработки диатомитом.

**[0032]** В одном варианте осуществления изобретения определение молекулярной массы сырого PRP в образце, собранном на стадии (b), может быть выполнено с использованием хроматографического метода на образце, содержащем сырой PRP. Хроматографический метод может быть методом жидкостной хроматографии с использованием колонки, и метод может быть, например, методом ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, эксклюзионной хроматографии, обращенно-

фазовой хроматографии или хроматографии гидрофобного взаимодействия, но метод не ограничивается этим.

**[0033]** В другом варианте осуществления определение молекулярной массы сырого PRP в образце, собранном на стадии (b) по настоящему изобретению, может быть выполнено путем дополнительного включения метода определения поглощения ультрафиолетового (УФ) излучения или метода обнаружения рассеяния света в дополнение к хроматографическому методу, и, в частности, может быть осуществлено посредством дополнительного включения способа обнаружения многоуглового рассеяния света (MALS).

**[0034]** В еще одном варианте осуществления определение молекулярной массы сырого PRP в образце, собранном на стадии (b) по настоящему изобретению, может быть выполнено путем объединения хроматографического метода с методом определения поглощения УФ-излучения или методом обнаружения рассеяния света. В частности, определение может быть выполнено путем комбинирования метода обращенно-фазовой хроматографии со способом обнаружения многоуглового рассеяния света.

**[0035]** На стадии (c) выше молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP определяется относительно конечного очищенного PRP. Термин «необработанный порошок PRP» относится к PRP, содержащемуся в конечном очищенном необработанном порошкообразном материале.

**[0036]** Как используется в настоящем документе, термин «молекулярно-массовое распределение» относится к степени или форме, в которой распределены молекулярные массы полимеров, имеющих различные молекулярные массы. Распределение молекулярной массы может быть выражено в виде кривой количественного распределения, кривой распределения массы или кривой кумулятивного распределения, а также может быть выражено в виде индекса полидисперсности (PDI).

**[0037]** В одном варианте осуществления изобретения определение молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP по настоящему изобретению может быть выполнено с использованием метода хроматографического анализа образца, содержащего необработанный порошок PRP. Метод хроматографического анализа может представлять собой, например, эксклюзионную хроматографию или гель-проникающую хроматографию. При определении молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP методом хроматографии можно использовать один или несколько стандартных веществ с известной молекулярной массой.

**[0038]** На стадии (d) выше выполняется регрессионный анализ между молекулярной массой сырого PRP и распределением молекулярной массы необработанного порошка PRP с использованием данных молекулярной массы сырого PRP, определенных на стадии (b), и данных молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP, определенных на стадии (c).

**[0039]** В одном варианте осуществления изобретения регрессионный анализ может быть выполнен таким образом, что молекулярная масса сырого PRP, определенная на

стадии (b), и молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP, определенное на стадии (c), задается как переменная, и выполняется линейный регрессионный анализ между двумя переменными.

**[0040]** В варианте осуществления изобретения регрессионный анализ может быть выполнен с использованием метода наименьших квадратов.

**[0041]** С помощью регрессионного анализа может быть получено уравнение регрессии, в котором молекулярная масса сырого PRP и молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP могут быть получены в качестве переменных.

**[0042]** На стадии (e) выше молекулярная масса сырого PRP, которая удовлетворяет молекулярно-массовому распределению необработанного порошка PRP на определенном уровне или выше, рассчитывается на основе регрессионного анализа.

**[0043]** На стадии (e) выше значение молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP на определенном уровне или выше может быть установлено на подходящее значение в соответствии с рекомендациями по контролю качества конечного очищенного PRP, и не ограничивается каким-либо конкретным значением.

**[0044]** В конкретном варианте осуществления изобретения при анализе молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP с использованием двух видов стандартных веществ и эксклюзионной хроматографии молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP может быть проанализировано с использованием времени удерживания двух стандартных веществ, константы распределения и фракционных данных по размеру пиков эксклюзионной хроматографии необработанного порошка PRP.

**[0045]** В конкретном варианте осуществления изобретения значение молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP может быть установлено равным 50% или выше.

**[0046]** Значение молекулярной массы сырого PRP, которое удовлетворяет молекулярно-массовому распределению необработанного порошка PRP на определенном уровне или выше, может быть рассчитано с помощью описанного выше уравнения регрессии, в котором молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP и молекулярная масса сырого PRP являются переменными.

**[0047]** В одном варианте осуществления изобретения после стадии (e), описанной выше, способ может дополнительно включать стадию сравнения значения молекулярной массы сырого PRP, которое должно быть получено в процессе очистки PRP H<sub>1b</sub>, со значением молекулярной массы сырого PRP, рассчитанным на стадии (e) выше.

**[0048]** Расчетная молекулярная масса сырого PRP, которая удовлетворяет молекулярно-массовому распределению необработанного порошка PRP на определенном уровне или выше, может быть использована для контроля процесса (IPC) следующим образом: для получения необработанного порошка PRP, имеющего молекулярно-массовое

распределение на определенном уровне или выше в необработанном порошке PRP, молекулярная масса сырого PRP в образце, собранном на промежуточной стадии процесса очистки PRP, должна иметь значение молекулярной массы сырого PRP, рассчитанное с помощью регрессионного анализа. Таким образом, отслеживая, соответствует ли молекулярная масса сырого PRP в образце, собранном в процессе очистки PRP, расчетному значению молекулярной массы сырого PRP, это можно использовать для производственного контроля (IPC) производства PRP.

**[0049]** Другой аспект настоящей заявки относится к способу оценки качества PRP в процессе очистки PRP Hib, который включает следующие стадии:

**[0050]** (a') стадию определения молекулярной массы необработанного порошка PRP и молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP в конечном очищенном необработанном порошке, полученном очисткой полирибозилрибитолфосфата (PRP) из культуры, где культивировали *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

**[0051]** (b') проведение регрессионного анализа между молекулярной массой необработанного порошка PRP и молекулярно-массовым распределением необработанного порошка PRP с использованием данных определенной молекулярной массы необработанного порошка PRP и данных молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP, определенных на стадии (a'); и

**[0052]** (c') расчет молекулярной массы необработанного порошка PRP, который удовлетворяет молекулярно-массовому распределению необработанного порошка PRP на определенном уровне или выше из регрессионного анализа.

**[0053]** На стадии (a') выше определяют молекулярную массу необработанного порошка PRP.

**[0054]** В одном варианте осуществления изобретения определение молекулярной массы сырого PRP на стадии (a') может быть выполнено в образце, содержащем необработанный порошок PRP, с помощью хроматографического метода, в котором хроматографический метод может представлять собой метод ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, эксклюзионной хроматографии, обращенно-фазовой хроматографии или хроматографии гидрофобного взаимодействия.

**[0055]** В другом варианте осуществления изобретения определение молекулярной массы необработанного порошка PRP на стадии (a') по настоящему изобретению может быть выполнено путем дополнительного включения метода определения поглощения УФ-излучения или метода обнаружения рассеяния света в дополнение к хроматографическому методу и, в частности, может быть выполнено путем дополнительного включения способа обнаружения многоугольного рассеяния света (MALS).

**[0056]** В еще одном варианте осуществления изобретения определение молекулярной массы необработанного порошка PRP на стадии (a') по настоящему изобретению может быть выполнено путем объединения хроматографического метода с методом определения поглощения УФ-излучения или способом обнаружения многоугольного рассеяния света (MALS). В частности, определение может быть выполнено

путем комбинирования метода обращенно-фазовой хроматографии со способом обнаружения многоуглового рассеяния света.

**[0057]** На стадии (a') выше определяется молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP.

**[0058]** Поскольку содержание термина «молекулярно-массовое распределение» такое же, как описано в аспекте настоящего изобретения, описанном выше, детали опущены.

**[0059]** В одном варианте осуществления изобретения определение молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP по настоящему изобретению может быть выполнено с использованием метода хроматографического анализа образца, содержащего необработанный порошок PRP. Хроматографический метод может представлять собой, например, эксклюзионную хроматографию или гель-проникающую хроматографию. При определении молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP методом хроматографии можно использовать один или несколько стандартных веществ с молекулярными массами.

**[0060]** На стадии (b') выше выполняется регрессионный анализ между молекулярной массой необработанного порошка PRP и молекулярно-массовым распределением необработанного порошка PRP с использованием данных молекулярной массы необработанного порошка PRP, определенных на стадии (a'), и данных молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP.

**[0061]** В одном варианте осуществления изобретения регрессионный анализ может быть выполнен таким образом, что молекулярная масса необработанного порошка PRP, определенная на стадии (a'), и молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP задаются как переменные, и выполняется линейный регрессионный анализ между двумя переменными.

**[0062]** В одном варианте осуществления изобретения регрессионный анализ может быть выполнен с использованием метода наименьших квадратов. С помощью регрессионного анализа может быть получено уравнение регрессии, в котором молекулярная масса необработанного порошка PRP и молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP являются переменными.

**[0063]** На стадии (c') выше молекулярная масса необработанного порошка PRP, которая удовлетворяет молекулярно-массовому распределению необработанного порошка PRP на определенном уровне или выше, рассчитывается на основе регрессионного анализа.

**[0064]** На стадии (c') значение молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP на определенном уровне или выше может быть установлено равным соответствующему значению в соответствии с рекомендациями по контролю качества конечного очищенного PRP и не ограничивается каким-либо конкретным значением.

**[0065]** В конкретном варианте осуществления изобретения при анализе молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP с использованием двух видов стандартных веществ и эксклюзионной хроматографии молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP может быть проанализировано с использованием времени удерживания двух стандартных веществ, константы распределения и фракционных данных по размеру пиков эксклюзионной хроматографии необработанного порошка PRP.

**[0066]** В конкретном варианте осуществления изобретения значение молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP может быть установлено равным 50% или выше.

**[0067]** Значение молекулярной массы необработанного порошка PRP, которое удовлетворяет молекулярно-массовому распределению необработанного порошка PRP на определенном уровне или выше, может быть рассчитано с помощью описанного выше уравнения регрессии, используя молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP и молекулярную массу необработанного порошка PRP в качестве переменных.

**[0068]** В одном варианте осуществления изобретения после стадии (с'), описанной выше, способ может дополнительно включать стадию сравнения значения молекулярной массы необработанного порошка PRP, полученного в процессе очистки PRP Hib, со значением молекулярной массы необработанного порошка PRP, рассчитанным на стадии (с') выше.

**[0069]** Расчетная молекулярная масса необработанного порошка PRP, которая удовлетворяет молекулярно-массовому распределению необработанного порошка PRP на определенном уровне или выше, может быть использована для производственного контроля (IPC) следующим образом: для получения необработанного порошка PRP, имеющего молекулярно-массовое распределение на определенном уровне или выше в необработанном порошке PRP, молекулярная масса необработанного порошка PRP в необработанном порошке, который является конечным продуктом очистки PRP, должна иметь значение молекулярной массы необработанного порошка PRP, рассчитанное с помощью регрессионного анализа. Таким образом, контролируя, соответствует ли молекулярная масса необработанного порошка PRP в конечном продукте очистки PRP расчетному значению молекулярной массы необработанного порошка PRP, это можно использовать для производственного контроля (IPC) производства PRP.

**[0070]** Значение молекулярной массы сырого PRP и значение молекулярной массы необработанного порошка PRP, которые были рассчитаны в соответствии с описанным выше способом по настоящему изобретению, можно использовать по отдельности или в сочетании друг с другом в способе оценки качества PRP по настоящему изобретению.

#### **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ**

**[0071]** В соответствии со способом оценки качества PRP по настоящему изобретению качество окончательно полученных продуктов PRP Hib может быть оценено

и предсказано заранее путем определения значения молекулярной массы сырого PRP или значения молекулярной массы необработанного порошка PRP с помощью регрессионного анализа на стадии процесса очистки PRP Hib. Кроме того, способ по настоящему изобретению можно применять в качестве метода внутрипроизводственного контроля (IPC) на промежуточной стадии процесса очистки необработанного порошка PRP Hib, и его можно эффективно использовать для подтверждения момента времени возникновения проблем с качеством, возникающих в реальном процессе.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР**

**[0072]** На ФИГ. 1 показаны данные определения молекулярной массы PRP и данные определения молекулярной массы сырого PRP, определенные в партиях с 1 по 6.

**[0073]** На ФИГ. 2 показана аппроксимированная линия и уравнение регрессии, полученные путем проведения регрессионного анализа между молекулярной массой сырого PRP и молекулярно-массовым распределением необработанного порошка PRP. Кроме того, показаны аппроксимированная линия и уравнение регрессии, полученные путем проведения регрессионного анализа между молекулярной массой необработанного порошка и молекулярной массой распределения необработанного порошка PRP.

**[0074]** На ФИГ. 3 показана схематическая диаграмма, иллюстрирующая концепцию выполнения производственного контроля (IPC) в процессе производства PRP Hib по настоящему изобретению.

#### **СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0075]** Далее настоящее изобретение описано подробно. Однако следующие примеры только иллюстрируют настоящее изобретение, но содержание настоящего изобретения не ограничивается следующими примерами.

#### **[0076] Примеры**

**[0077] Экспериментальный пример 1: Способ оценки качества с использованием молекулярной массы сырого PRP и молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP**

**[0078] Экспериментальный пример 1-1: Определение молекулярной массы сырого PRP**

**[0079]** В процессе получения конечного очищенного необработанного порошка PRP, очищенного от культуры, полученного путем культивирования *Haemophilus influenzae* типа b (Hib), образец, содержащий сырой PRP, очистка которого не была завершена, собирали как промежуточный продукт процесса очистки, и определяли молекулярную массу сырого PRP в собранном образце. Поскольку PRP является веществом с высокой полярностью, он проходит через колонку обращенно-фазовой хроматографии; однако примеси, отличные от PRP, связываются с колонкой для хроматографии с обращенной фазой, и, таким образом, только PRP может быть чисто отделен в образце с помощью хроматографии с обращенной фазой. После введения собранного образца, содержащего сырой PRP, в хроматографическую колонку с обращенной фазой, а также сырого PRP, прошедшего через нее без связывания с

колонкой, определяли его молекулярную массу с использованием детектора многоуглового рассеяния света (MALS).

**[0080] Экспериментальный пример 1-2: Определение молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP**

**[0081]** В конечном очищенном необработанном порошке PRP, очищенном от культуры, полученным путем культивирования *Haemophilus influenzae* типа b (Hib), определяли молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP. Молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP определяли с помощью следующей процедуры. Необработанный порошок PRP подвергали эксклюзионной хроматографии (SEC) с использованием синего декстрана и хлорида натрия (NaCl) в качестве стандартов молекулярной массы, и подтверждали время удерживания (RT) стандартных веществ. Эталонное значение  $V_p$ , которое удовлетворяет константе распределения (или константе распределения,  $K_d$ ), равной 0,3, было рассчитано путем установления RT синего декстрана, выходящего из колонки первым, как  $V_0$ , и RT хлорида натрия, выходящего из колонки вторым, как  $V_t$  [Пр.:  $V_p = 0,3 \times (V_t - V_0) + V_0$ ]. Затем необработанный порошок PRP пропускали через эксклюзионную хроматографию (SEC), фракционировали в соответствии с размером частиц, и рассчитывали относительную площадь (%) предыдущей площади на основе значения  $V_p$  от общей площади основного пика, и это выражали как молекулярно-массовое распределение. То есть молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP было получено по следующему уравнению: молекулярно-массовое распределение (%) = площадь, предшествующая  $V_p$  / общая площадь  $\times 100$ .

**[0082] Экспериментальный пример 1-3: Регрессионный анализ**

**[0083]** Определения в экспериментальном примере 1-1 и экспериментальном примере 1-2, описанных выше, были выполнены в общей сложности для четырех партий (партия 2-партия 5) в процессе очистки PRP Hib, и на основе определенных данных был выполнен регрессионный анализ. В частности, данные о молекулярной массе сырого PRP, определенные в экспериментальном примере 1-1, и данные о распределении молекулярной массы необработанного порошка PRP, определенные в экспериментальном примере 1-2, были установлены как переменные, соответственно, и уравнение регрессии было рассчитано с помощью линейного регрессионного анализа (таблица 1 и ФИГ. 2). Рассчитанное уравнение регрессии было « $y = 0,0042x + 0,3377$ ». В уравнении регрессии  $x$  представляет молекулярную массу сырого PRP,  $y$  представляет распределение молекулярной массы необработанного порошка PRP, а значение R-квадрата ( $R^2$ ), представляющее надежность (пояснительную силу) уравнения регрессии, составляло 0,7346. Значение R-квадрата ( $R^2$ ) составило 0,7346, что указывает на высокую корреляцию. Из уравнения регрессии видно, что молекулярная масса сырого PRP должна составлять 38,5 кДа или больше, чтобы получить необработанный порошок PRP с молекулярно-массовым распределением 50% или более по сравнению с необработанным порошком PRP. Основываясь на приведенном выше анализе, если молекулярная масса

сырого PRP составляет 38,5 кДа или выше в процессе очистки PRP, можно получить конечный очищенный необработанный порошок PRP, в котором молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP (которое является стандартом контроля качества) составляет 50% или выше.

**[0084]** [Таблица 1]

	Партия 2	Партия 3	Партия 4	Партия 5	Расчетное значение регрессионного анализа
Молекулярная масса сырого PRP	128,6	56,9	53,3	38,9	38.5
Молекулярно- массовое распределение необработанного порошка PRP	85%	66%	64%	37%	50%

**[0085]** Единица молекулярной массы: кДа

**[0086] Экспериментальный пример 2: Способ оценки качества с использованием молекулярной массы и молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP**

**[0087] Экспериментальный пример 2-1: Определение молекулярной массы необработанного порошка PRP**

**[0088]** Конечный очищенный необработанный порошок PRP готовили путем очистки PRP от культуры, в которой культивировали *Haemophilus influenzae* типа b (Hib). Молекулярную массу необработанного порошка PRP определяли в конечном очищенном необработанном порошке PRP. Определение молекулярной массы необработанного порошка PRP проводили таким же образом, как и определение молекулярной массы сырого PRP в экспериментальном примере 1-1. После введения образца, содержащего необработанный порошок PRP, в хроматографическую колонку с обращенной фазой, и для необработанного порошка PRP, который прошел через колонку без связывания, определяли его молекулярную массу с использованием детектора многоугольного рассеяния света (MALS).

**[0089] Экспериментальный пример 2-2. Определение молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP**

**[0090]** Молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP определяли в конечном очищенном необработанном порошке PRP, очищенном от культуры, полученным путем культивирования *Haemophilus influenzae* типа b (Hib). Молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP определяли таким же образом, как описано в экспериментальном примере 1-2.

### [0091] Экспериментальный пример 2-3. Регрессионный анализ

[0092] Определения в соответствии с экспериментальным примером 2-1 и экспериментальным примером 2-2, описанными выше, были выполнены в общей сложности для шести партий (то есть от партии 1 до партии 6) процесса очистки PRP Ніб, и был проведен регрессионный анализ на основе определенных данных. В частности, данные молекулярной массы необработанного порошка PRP, определенные в экспериментальном примере 2-1, и данные распределения молекулярной массы необработанного порошка PRP, определенные в экспериментальном примере 2-2, были заданы как переменные, и уравнение регрессии было рассчитано с помощью линейного регрессионного анализа (таблица 2 и ФИГ. 2). Рассчитанное уравнение регрессии было « $y=0,0131x-0,4035$ ». В уравнении регрессии  $x$  представляет собой молекулярную массу необработанного порошка PRP,  $y$  представляет распределение молекулярной массы необработанного порошка PRP, а значение R-квадрата ( $R^2$ ), представляющее надежность (объяснительную силу) уравнения регрессии, составляет 0,9222. Значение R-квадрата ( $R^2$ ) составило 0,9222, что указывает на высокую корреляцию. Из уравнения регрессии видно, что молекулярная масса необработанного порошка PRP должна составлять 69,1 кДа или больше, чтобы получить необработанный порошок PRP с молекулярно-массовым распределением 50% или более по отношению к необработанному порошку PRP. Основываясь на приведенном выше анализе, если молекулярная масса необработанного порошка PRP достигает 69,1 кДа или выше в процессе очистки PRP, можно получить конечный очищенный необработанный порошок PRP, в котором молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP (что является стандартом контроля качества) составляет 50% или выше.

### [0093] [Таблица 2]

	Партия 1	Партия 2	Партия 3	Партия 4	Партия 5	Партия 6	Расчетное значение регрессионного анализа
Молекулярная масса необработанного порошка PRP	72,1	99,8	76,5	75,5	64,5	55	69,1
Молекулярно-массовое распределение необработанного порошка PRP	57%	85%	66%	64%	37%	29%	50%

[0094] Единица молекулярной массы: кДа

**[0095]** Хотя репрезентативные примеры настоящей заявки были описаны в качестве примеров, объем настоящей заявки не ограничивается только этими конкретными примерами, как указано выше, и специалист в данной области сможет соответствующим образом внести изменения в пределах объема, описанного в формуле изобретения настоящей заявки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ оценки качества PRP в процессе очистки полирибозилрибитолфосфата (PRP) *Haemophilus influenzae* типа b (Hib), включающий следующие стадии:

(а) сбор образца, содержащего сырой PRP, в процессе очистки PRP из культуры, в которой культивировался Hib;

(b) определение молекулярной массы сырого PRP в собранном образце;

(с) определение молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP в необработанном порошке, где PRP был окончательно очищен;

(d) проведение регрессионного анализа между молекулярной массой сырого PRP и молекулярно-массовым распределением необработанного порошка PRP с использованием данных молекулярной массы сырого PRP, определенных на стадии (b), и данных молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP, определенных на стадии (с); и

(е) расчет молекулярной массы сырого PRP, который удовлетворяет молекулярно-массовому распределению необработанного порошка PRP на определенном уровне или выше из регрессионного анализа.

2. Способ по п.1, где стадию определения молекулярной массы сырого PRP на стадии (b) осуществляют с помощью ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, эксклюзионной хроматографии, обращенно-фазовой хроматографии или хроматографии гидрофобного взаимодействия.

3. Способ по п.2, где стадию определения молекулярной массы сырого PRP на стадии (b) осуществляют путем дополнительного включения метода определения поглощения УФ-излучения или способа обнаружения рассеяния света.

4. Способ по п.1, где стадию определения молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP на стадии (с) проводят с использованием метода хроматографического анализа.

5. Способ по п.1, где регрессионный анализ на стадии (d) представляет собой линейный регрессионный анализ.

6. Способ по п.1, где способ после стадии (е) дополнительно включает стадию сравнения значения молекулярной массы сырого PRP, полученного в процессе очистки PRP Hib, и значения молекулярной массы сырого PRP, рассчитанного на стадии (е).

7. Способ оценки качества PRP в процессе очистки полирибозилрибитолфосфата (PRP) *Haemophilus influenzae* типа b (Hib), включающий следующие стадии:

(а') стадию определения молекулярной массы необработанного порошка PRP и молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP в конечном очищенном необработанном порошке, полученном очисткой полирибозилрибитолфосфата (PRP) от культуры, где культивировали *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

(b') проведение регрессионного анализа между молекулярной массой необработанного порошка PRP и молекулярно-массовым распределением необработанного порошка PRP с использованием данных определенной молекулярной

массы необработанного порошка PRP и данных молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP, определенных на стадии (a'); и

(с') расчет молекулярной массы необработанного порошка PRP, который удовлетворяет молекулярно-массовому распределению необработанного порошка PRP на определенном уровне или выше из регрессионного анализа.

8. Способ по п.7, где стадию определения молекулярной массы необработанного порошка PRP на стадии (a') осуществляют с помощью ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, эксклюзионной хроматографии, обращенно-фазовой хроматографии или хроматографии гидрофобного взаимодействия.

9. Способ по п.8, где стадию определения молекулярной массы сырого PRP на стадии (a') осуществляют путем дополнительного включения метода определения поглощения УФ-излучения или способа обнаружения рассеяния света.

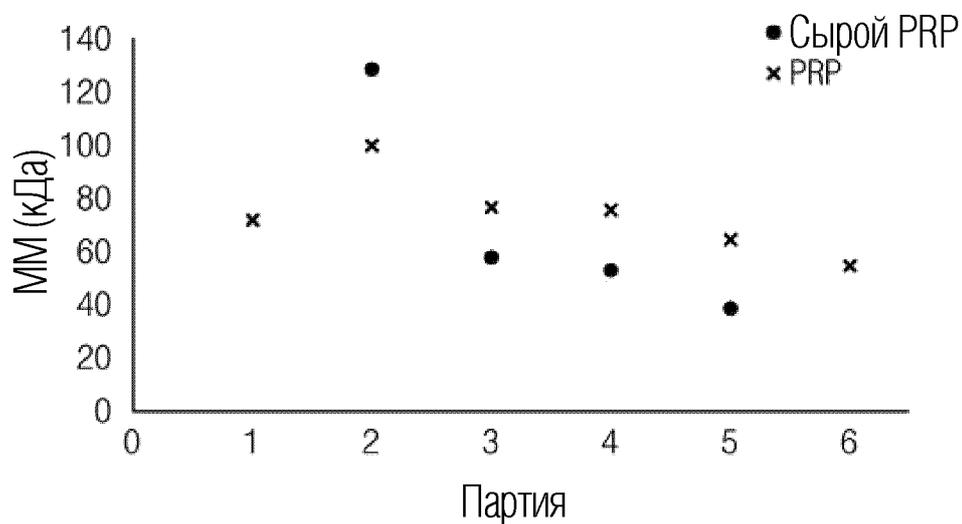
10. Способ по п.7, где стадию определения молекулярно-массового распределения необработанного порошка PRP на стадии (a') проводят с использованием метода хроматографического анализа.

11. Способ по п.7, где регрессионный анализ на стадии (b') представляет собой линейный регрессионный анализ.

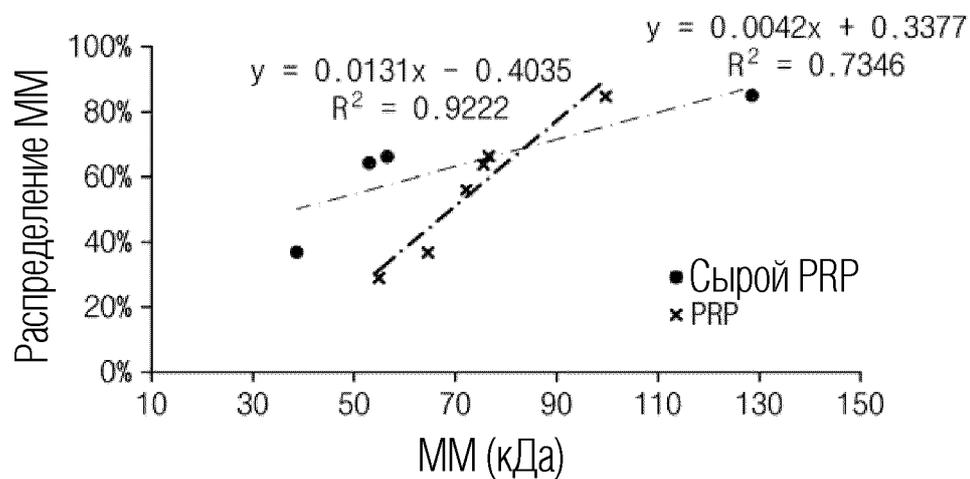
12. Способ по п.7, где способ после стадии (с') дополнительно включает стадию сравнения значения молекулярной массы необработанного порошка PRP, полученного в процессе очистки PRP H<sub>1b</sub>, и значения молекулярной массы необработанный порошок PRP, рассчитанного на стадии (с').

По доверенности

ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3

