〔19〕中华人民共和国专利局

〔11〕公开号 CN 1034208A

〔12〕发明专利申请公开说明书

〔21〕 申请号 88108010.1

〔51〕 Int.Cl⁴
C07K 7/00

〔43〕 公开日 1989年7月26日

〔22〕申请日 88.11.25

〔30〕优先权

〔32〕87.11.26 〔33〕FR 〔31〕8716420

〔71〕申请人 莱锋法默公司

地址 瑞士弗里堡

〔72〕发明人 比达特·琼·米歇尔
贝莱特·多米尼克 博恩·克劳德

〔74〕专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利代理部

代理人 唐 跃

C07K 9/00 A61K 37/24
A61K 39/08

说明书页数: 21 附图页数:

〔54〕发明名称 用于控制生育的多肽化合物及含有它们的免疫原的制备方法

〔57〕摘要

本发明的主题是一个至少含有如下序列的多肽化合物的制备方法:

——β-绒毛膜促性腺激素或β-促黄体发生激素的序列106-116.

——含有至少1个赖氨酸残基的至少5个氨基酸的序列.

这些化合物用多肽合成的方法制备.

这些多肽化合物可以用来制备用以控制生育的疫苗.

< 20 >

权　利　要　求　书

1．一个制备至少含有如下序列的多肽化合物的方法：

——— β—绒毛膜促性腺激素或β—促黄体发生激素的序列106～116。

——— 含有至少1个赖氨酸残基的至少5个氨基酸的序列，其中肽链是用依次缩合不同的氨基酸残基的方法制备的。

2．权项1中的方法，其中所制备的多肽至少包括：

——— β—人类绒毛膜促性腺激素的序列106～116。

——— 含有至少1个赖氨酸残基的至少5个氨基酸的序列。

3．权项1中的方法，其中所制备的多肽至少包括：

——— β—促黄体发生激素的序列106～116。

——— 含有至少1个赖氨酸残基的至少5个氨基酸的序列。

4．权项2中的方法，其中所制备的多肽包括：

——— β—人类绒毛膜促性腺激素的序列106～116。

——— α—绒毛膜促性腺激素的至少5个氨基酸的序列，其中至少含有一个赖氨酸残基。

5．权项4中的方法，其中所制备的多肽包括：

——— β—人类绒毛膜促性腺激素的序列106～116

——— α—人类绒毛膜促性腺激素的序列46～55。

6．权项4中的方法，其中所制备的多肽包括：

——— β—人类绒毛膜促性腺激素的序列106～116

——— α—人类绒毛膜促性腺激素的序列45～49。

7．权项4中的方法，其中所制备的多肽包括：

—— β－人类绒毛膜促性腺激素的序列１０６～１１６

—— α－人类绒毛膜促性腺激素的序列４３～４５。

８．权项1～7中的方法，其中制备多肽时是将两个序列线性结合。

９．权项8中的方法，其中所制备的多肽中，赖氨酸残基与β－绒毛膜促性腺激素或β－促黄体发生激素的序列１０６～１１６相隔至少4个氨基酸。

１０．权项8中的方法，其中所制备的多肽包括如下线性结合，至少含1个赖氨酸残基的序列 —— β－人类绒毛膜促性腺激素的序列１０６～１１６。

１１．权项１０中的方法，其中所制备的多肽包括如下线性结合：α－人类绒毛膜促性膜激素的序列４６～５５ —— β－人类绒毛膜促性膜激素的序列１０６～１１６。

１２．含有上述任一权项中方法制备的多肽化合物的合成免疫后的制备方法，其中将多肽偶联到一个载体上。

１３．权项１２中的方法，其中载体为破伤风类毒素。

１４．权项１２或１３中的方法，其中载体与至少含1个赖氨酸残基的序列中的赖氨酸相偶联。

１５．权项１４中的方法，其中偶联反应是用戊二醛完成的。

１６．权项１２或１３中的方法，其中载体偶联到β－人类绒毛膜促性腺激素的序列１０６～１１６中某一氨基酸上。

１７．权项１６中的方法，其中将载体偶联到β－人类绒毛膜促性腺激素的序列１０６～１１６中的某一天门冬氨酸残基上。

１８．抗生育疫苗的制备方法，其中将由权项1到１１任一权项

中的方法制备的多肽或用权项12到17任一权项中的方法制备的合成免疫原制成适于制剂的形式。

19．抗人类绒毛膜促性腺激素疫苗的制备方法，其中是将用权项2以及权项4～11任一权项中的方法制备的多肽或含有这些多肽与载体结合物的合成免疫原制成适于制剂的形式。

20．抗促黄体激素疫苗的制备方法，其中是将用权项3中的方法制备的多肽或含有这一多肽与载体结合物的免疫原制成适于制剂的形式。

说　　明　　书

用于控制生育的多肽化合物及含有它们的免疫原的制备方法

本发明涉及到一些多肽化合物和含有它们的合成免疫原的制备方法，以及它们的用途，尤其是用于制备控制人类或动物生育的疫苗。

本发明尤其涉及到抗人类绒毛膜促性腺激素疫苗和抗促黄体发生激素疫苗的制备。

人类绒毛膜促性腺激素（hCG）为体内的糖蛋白激素之一，这些激素中四个的结构是密切相关的；除了人类绒毛膜促性腺激素外，另外三个为人类促黄体发生激素（hLH），人类促卵泡激素（hFSH）和人促甲状腺激素（hTSH），每一激素都含有两个由非共价键相连的α和β亚单位。四个激素的α亚单位是一样的，β亚单位也具有很明显的类似性。具体来说，β－人类绒毛膜促性腺激素和β－人类促黄体发生激素有82%的残基是相似的，其区别在于羧端的30个氨基酸残基。

这种序列上的相似性也存在于其它种类的动物，进化过程中高度保留的结构区域不但见于不同物种间的同一激素（LH），而且也存在于不同的激素之间（CG／LH）。

再者，下面的看法将会被取消；绒毛膜促性腺激素只存在于高度进化的哺乳动物，而其它动物内绒毛膜促性腺激素的功能由促黄体发生激素来完成。

据知，人类绒毛膜促性腺激素在妊娠的发生和发展过程中起着重要的作用。人类绒毛膜促性腺激素的生物活性还不十分清楚，看来它的主要作用是作为受精卵向黄体发生的信号，以便使后者保持孕体激素的合成。人类绒毛膜促性腺激素在发挥生理作用前，必须首先与卵巢中的受体结合，这一结合过程须发生在黄体的水平。

人们早已做过尝试去抑制人类绒毛膜促性腺激素的活性以提供一个免疫方法来控制生育。基于这一目的，曾建议采用能诱导抗人类绒毛膜促性腺激素抗体形成的疫苗。

法国专利第７４，１５，７８０ 号可能提到了这一点，它描述了一种含有化学修饰的多肽，尤其是化学修饰的人类绒毛膜促性腺激素或β－人类绒毛膜促性腺激素作为抗原的疫苗。

法国专利７５ ２３ ６７３ 号也提到了这一点，其中描述了一种含有β－人类绒毛膜促性腺激素C－端片段（包括３０到３８氨基酸残基）作为抗原的疫苗。选择这一多肽片段是为了避免与相关激素的交叉反应，尤其是与人类促黄体发生激素的交叉反应。

Ｖｅｒｎｏｎ Ｓｔｅｖｅｎｓ 在《今日免疫》，第7卷，３６９页（１９８６）中报道了抗人类绒毛膜促性腺激素疫苗的试验。这篇文章报告了用与白喉类毒素偶联的β－人类绒毛膜促性腺激素序列１０９～１４５作为免疫原进行的开始阶段的试验。然而，作者最后指出有必要发展新的抗人类绒毛膜促性腺激素疫苗。

事实上，这一疫苗的致免疫活性的确较低，不能产生足够高的抗体效价。

在１９８５年的一份报告中，世界卫生组织（人类生殖研究发展和研究训练的特别方案）也得出一结论，有必要去发展新的免疫原。

再者，值得注意的是１９８６年7月1日到5日在多伦多举行的国际生殖免疫学学术会议上 Ａｕｓｈｕ Ｖａｓｈｉｓｈｔｈａ等人提到了一种与破伤风类毒素偶联的多肽作为免疫原的用途，这一多肽由β－人类绒毛膜促性腺激素的序列２１～３１和β－人类绒毛膜促性腺激素—— 酪氨酸序列１０５～１１５组成，这两个序列用二硫键来连接。

另外，Ｊｅａｎ Ｍｉｃｈｅｌ Ｂｉｃｌａｒｔ等人在分子免疫学，２４卷，３３９页，１９８７年上报告了两个β－人类绒毛膜促性腺激素中两个免疫决定区域，即区域１１０～１１６和区域１３４～１３９。

现已发现通过将一个β－人类绒毛膜促性腺激素的强免疫原活性的区域，在β－人类绒毛膜促性腺激素第１１２个残基附近。具体来说为１０６～１１６，与一个含有赖氨酸残基的氨基酸序列，例如那些在进化过程中高度保留的α－亚单位中存在的序列相偶联可以得到很强的免疫原活性，另一方面，可能可用这种方法生产一个抗人类绒绒膜促性腺激素的疫苗。

另外，已证明这发现可延伸到其它的糖旦白激素，尤其是在某些动物（猫，狗等）的生殖中起重要作用的促黄体发生激素。

因此，本发明的主题是至少包括如下一些多肽化合物的制备方法：

——— β－绒毛膜促性腺激素或β－促黄体发生激素的序列１０６～１１６

——— 含有至少一个赖氨酸残基的至少有５个氨基酸的序列。

更具体些讲，本发明的主题是至少包括如下多肽化合物的制备方

法，

——— β—人类绒毛膜促性腺激素的序列１０６～１１６

——— 含有至少1个赖氨酸残基的至少有5个氨基酸的序列。

本发明的另一个主题是至少包括如下多肽化合物的制备方法，

——— β—促黄体发生激素的序列１０６～１１６

——— 含有至少1个赖氨酸残基的至少有5个氨基酸的序列。

β— 人类绒毛膜促性腺激素的序列１０６～１１６为

HPLTCDDPRFQ*。

β—犬促黄体发生激素的序列１０６－１１６为

QSLACDRPLLP（见WO 86／07383）。

含有至少1个赖氨酸残基的至少有5个氨基酸的序列可认为至少含有1个赖氨酸残基的α—绒毛膜促性腺激素的一个序列，具体来讲是α—人类绒毛膜促性腺激素的序列４６～５５、α—人类绒毛膜促性腺激素的序列４５～４９、α—人类绒毛膜促性腺激素的序列４３～４５或α—人类绒毛膜促性腺激素的序列４１～５８或５９。然而，也可以是至少含有1个赖氨酸残基的其它序列。尤其是可以为至少含有1个赖氨酸残基的α—人类绒毛膜促性腺激素的序列的逆序列或者甚至是除赖氨酸残基外含其它任何氨基酸序列的一个序列。

本发明中多肽化合物的两个氨基绒序列，可呈线性连接，这种情况下赖氨酸残基宜离开β—绒毛膜促性腺激素或β—促黄体发生激素的序列１０６～１１６至少4个氨基酸。在线性组合中，两个序列可

以以任何形式来连接，即可以为，（含赖氨酸的序列）———（β－人绒毛膜促性腺激素的序列１０６～１１６），也可以为，（β－人类绒毛膜促性腺激素的序列１０６～１１６）———（含赖氨酸的序列）。

另外，在线性组合中两个序列之间可存在1个含有1到１０个氨基酸的插入序列或“间隔”。

两个序列也可以由分子间或甚至分子内化学键来连接。因此，两个序列可由第一天门冬氨酸的——ＣＯＯＨ基团与赖氨酸的游离－NH_2 基团形成的键来连接。在有分子内化学键的情况下。多肽化合物的结构呈环状。

为增强免疫原性，最好是将多肽化合物用已知的方法偶联到一个载体上。

因此，本发明的主题也包括一个将本发明中的多肽化合物偶联到一个载体上制备合成免疫原的方法。

载体宜为旦白质载体，尤其是：

１），类毒素：

破伤风类毒素，按照Ｃｏｖｅｙ等人，美国生殖免疫学和微生物学杂志，第８期，４３页（１９８５）中的方法制备的组分Ⅱ。

·白喉和百日咳类毒素。

２）抗痢疾疫苗〔抗轮虫病毒（ｒｏｔａｖｉｒｕｓ）、霍乱菌、志贺氏菌、大肠杆菌和沙门氏菌〕。

３）被热和辐照灭活的脊髓灰质炎和黄热病病毒。

4）P. Falciparus 子孢子的膜旦白。

5）钥孔蝛血蓝旦白（KLM）。

偶联反应可在缩合剂如戊二醛、碳二亚胺或二迭氮联苯胺的存在下完成。

戊二醛导致旦白质和至少含1个赖氨酸的序列中的赖氨酸残基之间的缩合。

碳二亚胺导致旦白质和β－绒毛膜促性腺激素或β－促黄体发生激素的序列106～116中天门冬氨酸残基之间的缩合（例如在β－人类绒毛膜促性腺激素的序列106～116中111和112位有天门冬氨酸）。

用二迭氮联苯胺进行缩合时多肽内必须有酪氨酸残基。基于这一目的，最好将酪氨酸加到肽链的终端。

合成免疫原也可按照D. Posnett等人（生理化学杂志，263期，17～19页，1988）的多种抗原肽（MAP）技术来制备。在这种情况下，多肽的合成是在事先制备好的多聚赖氨酸基质上进行的。这一方法产生一个多肽的“聚合物”，使其分子量足够大而具有免疫原活性。

本发明的另一个主题是抗生育疫苗的制备方法，它包括本发明中的一个多肽化合物，较好的是本发明中的合成免疫原和一个适于药用的赋形剂。

具体来讲，本发明的主题为制备至少含有如下序列的多肽化合物组成的抗人类绒毛膜促性腺激素疫苗的方法。

——— β－人类绒毛膜促性腺激素序列106～116

——— 含有至少1个赖氨酸残基的至少有5个氨基酸的序列。

或一个由偶联到载体上的本发明的多肽化合物和一个适于制剂的赋形剂构成的合成免疫原。

具体来讲，本发明的另一个主题是含有至少如下结构的多肽化合物的抗促黄体发生激素疫苗的制法：

——— β－促黄体发生激素的序列１０６～１１６

——— 含有至少1个赖氨酸残基的至少5个氨基酸的序列

或偶联到载体上的这些多肽和一个适于制剂的赋形剂构成的合成免疫原。

连到载体上的合成免疫原在给药前最好先与免疫辅剂混合。例如，抗原可与用盐水稀释的胞壁酰二肽（ＭＤＰ，Ｎ－乙酰基－氨基葡糖－３－基－乙酰基－Ｌ－丙氨酰－Ｄ－异谷氨酰胺）的正丁酯（胞壁丁酯）混和。然后用等量含有ａｒｌａｃｌ（赋形剂）的角鲨烯使其乳化。也可以采用其它辅剂如胞壁酰二肽的类似物、细菌提取物如链霉菌制剂（ＯＫ　４３２）、生物制品（Ｂｉｏｓｔｉｍ　０１Ｋ２）或化学修饰的脂多糖制剂（ＬＰＳ）、肽多糖（Ｎ－Ｏｐａｃａ）或巨白多糖（Ｋ－Ｐｎｅｕｍｏｎｉｒｅ）。采用这些赋形剂时，水／油乳剂优于油／水乳剂。

合成免疫原也可以生物降解型颗粒的形式给药，如微胶囊或微球、脂质体和微粒制剂。这些情况下，免疫原包在颗粒里面。这种方法给药是为了延长疫苗的作用时间。

疫苗可经非肠道途径给药（悬浮形式的疫苗），也可经口服途径给药（颗粒形式的疫苗）。例如，乳剂可通过肌肉注射给到三角肌内。每次注射的免疫原的量可以不同，因为它决定于各个体的免疫反应。实际上，所用剂量为每次注射５０到１０００微克即1～２０微

克／公斤体重。注射数次，直至得到足够高的抗体效价为止；免疫辅剂的注射与上次注射相隔4～6周。第二次注射辅剂5天后检查抗人类绒毛膜促性腺激素抗体和抗载体旦白抗体的存在，然后于接种后6个月检查。

本发明中的疫苗也可以含有其它多肽或其它免疫原。

本发明的另一个主题是将本发明中的疫苗用于雌性动物或妇女来控制生育的方法。

本发明的这一主题更具体地讲是一个将含有至少以下多肽序列的疫苗用于妇女来控制生育的方法：

—— β－人类绒毛膜促性激素的序列106～116

—— 含有至少1个赖氨酸残基的至少5个氨基酸的序列

或一个由偶联到载体上的上述多肽化合物和一个适于制剂的赋形剂组成的合成免疫原。

此外，至少含有：

—— β－人类绒毛膜促性腺激素的序列106～116

—— 含有至少1个赖氨酸残基的至少5个氨基酸的序列

的多肽化合物可用来阻断人类绒毛膜促性腺激素受体并抑制妊娠的发展。

所以，本发明的主题也包括一个含有至少以下序列的多肽化合物为有效成分的导致流产的组分：

—— β－人类绒毛膜促性腺激素的序列106～116

——含有至少1个赖氨酸残基的至少5个氨基酸的序列。

本发明中的多肽结构按照多肽合成的标准方法来前备，在固相或溶液中依次将氨基酸残基进行缩合（液相中从N－端→C－端，或在

固相合成中从C－端→N－端），N－端和活泼侧链事先用已知的合适的保护基进行保护。

可以采用不同的缩合方法，

1．使用碳二亚胺进行缩合〔例如，N－环已基－N'－吗啡啉乙基碳二亚胺（CMECDI）、二环已基碳二亚胺（DCC）、N－乙基－N'－（3－二甲基－氨基丙基）碳二亚胺（EDC）〕，反应体系中可以加入催化剂〔如，1－羟基苯并三唑（HOBT）〕或其它缩合剂〔如，N－乙氧羰基－2－乙氧基－1，2－二氢喹啉（EEDQ）〕，也可以不加。

2．采用事先制备的氨基酸对称酸酐。

3．采用氨基酸活泼酯的形式（如，对硝基苯酯，HOBT酯），并通过DCC进行缩合。

但采用被称为Merrifield方法的固相合成法较好。

这种方法中采用多孔树脂。

功能团用不同的方法连接到树脂上。第1个氨基酸通过它的终端羧基连到树脂上；氨基同时用能脱除的保护基保护。侧链也进行保护，其保护基在整个合成过程中不予去除。

连在树脂上的氨基酸的氨基脱保护后，一方面将待偶合的氨基酸的羧基活化，另一方面完成肽键的形成。洗涤并除去反应中的产物后，进行下一步脱保护以接上另一个活化的氨基酸。

最后，在脱除各侧链保护基的同时或之后，将肽段从树脂上脱下来。

当氨基的保护基用叔丁氧羰基（t－BOC）保护时，用三氟乙酸脱保护。

在这种情况下，侧链功能团用对三氟乙酸稳定的保护基保护。如用对甲基苯磺酰基保护精氨酸和组氨酸侧链，用苄基保护天冬氨酸侧链，用苄氧羰基（Z）保护赖氨酸侧链。

整个肽链的合成完成后，除掉不同氨基酸上的保护基，尤其是选用低浓度的氟化氢在对甲苯酚／二甲基硫醚混和物中的溶液，采用高浓度的氟化氢将肽段从树脂上脱下来。

下面实施例对本发明进行进一步的说明：

I———多肽化合物的制备

1）．多肽（α－hCG的序列46～55）（β－hCG的序列106～116）（TMLVQKNVTSHPLT-CDDPRFQ）的制备

合成用Applies1 Biosystem Model 410A自动合成仪来完成。

氨基酸的氨基用t－BOC保护，用三氟乙酸脱保护。

最后，每1克含肽链树脂用含6．5毫升二甲硫醚、1克对甲苯酚和1毫升氟化氢的混和物在0℃下反应1小时来脱保护。每1克去保护的含肽链树脂用10毫升氟化氢和1克对甲苯酚将多肽从树脂上切下来。

所得多肽用排阻色谱法纯化。它用酸水解后用交换高效液相层析法分析并用茚三酮检测，并检测其序列。

此法所制备的多肽及其它用类似方法制备的多肽列于表I；

表　1

多肽：含赖氨酸的序列－β－hCG的序列106－116

含赖氨酸的序列		β－hCG序列 106－116
拟肽段1：含α－hCG的序列 46－55	TMLVQKNVTS	HPLTCDDPRFQ
拟肽段2：含α逆向序列	STVNKQVLMT	HPLTC DDPRFQ
拟肽段3：含α－hCG的序列 45－49	KTTMLV	HPLTCDDPRFQ
拟肽段4：含α－hCG的序列 43－49	SKKTMLV	HPLTC DDPRFQ
拟肽段5：含α－hCG的序列 43－45	SKKTMLVQKNVTS	HPLTCDDPFRQ

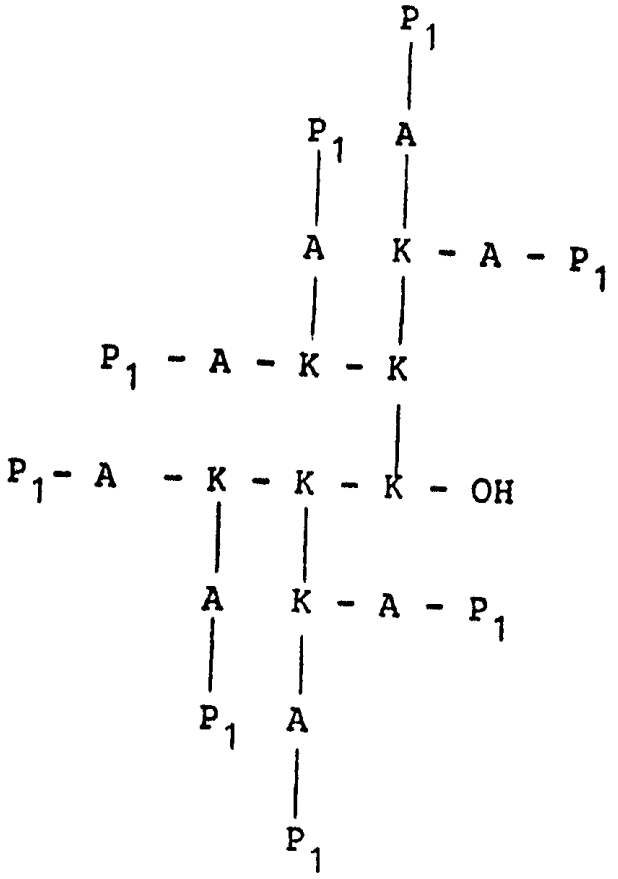
2）含酪氨酸残基多肽的制备

下面这一多肽是将其酪氨酸残基用联苯胺法接到钥孔蛾血蓝旦白（KLH）上的。这个多肽的羧端以—— CONM$_2$ 的形式保护

TMLVQKNVTSHPLTCDDPRFQYG——CONH$_2$ 。

3）. MAP型多肽的制备

用Posnett等人（文献已给出）的方法制备有如下结构式的MAP型多肽：



其中R_1 ＝T M L V Q K N V T S H P L T C D D P R F Q（拟肽段1）

Ⅱ———合成免疫原的制备

1．偶联到破伤风类毒素上

拟肽段可用戊二醛或碳二亚胺衍生物作缩合剂将其偶联到破伤风类毒素上。

a）．用戊二醛缩合

选用此缩合剂的目的在于联接赖氨酸残基的ε－NH_2 和载体旦白的ε－NH_2 。

反应路线如下：

R_1 －NH_2 ＋OCH－(CH_2)$_3$ －CHO＋NH_2 －R_2 →

R_1 －N＝CH－(CH_2)$_3$ －CH＝N－R_2

多肽与旦白的反应比例为50：1，采用含0．15M氯化钠的0．1M碳酸氢钠缓冲液，pH为8．5。

慢慢滴加戊二醛（用同种缓冲液稀释成1／10），到戊二醛／多肽的比例为50为止。

混合物室温下设置2小时（溶液变黄，但无沉淀产生）。

用葡聚糖G25柱进行排阻层析。

用拟肽段1时获得多肽／载体旦白的比例为[illegible]4。

b）用水溶性碳二亚胺衍生物缩合

选此缩合试剂的目的在于把某一残基的游离羧基β－COOH（天冬氨酸，111或112位）与载体旦白的－NH_2 相偶联。

碳二亚胺衍生物选用CMECDI。

6毫克上述多肽溶于0．5毫升磷酸盐／氯化钠缓冲液，往其中加入0．2毫升CMECDI的间甲苯磺酸盐（10毫克／毫升），搅拌这一溶液后，加入5毫克载体旦白（6毫克／毫升破伤风类毒素的溶液）。混和物在室温搅拌2小时。多肽－载体旦白结合物用排阻色谱法纯化，用Lowry试验的旦白质分析法检测这一结合旦白。多肽摩尔数／载体旦白摩尔数 的比 值是用酸水解后的氨基酸分析来确定的。

2）偶联到钥孔戚血蓝旦白（KLH）上

为能使联苯胺快速并完全地溶解，在25℃至30℃间缓缓加热使18．8毫克联苯胺溶于1．8毫升0．2M的盐酸，然后冷却并保持在0℃。

在0℃下往其中滴加200微升亚硝酸钠溶液（14毫升／200微升）。

此反应在0℃下进行大约3分钟，所得二迭氮联苯胺立即使用。

下述二溶液在0℃下混合：

—— 10毫克KLH（分子量为6．5×10⁶），即1．5毫摩尔溶于750微升含0．15M氯化钠的0．16M硼酸盐缓冲液，pH＝9．1。（使用前溶掉KLH的不溶部分）。

—— 3毫摩尔多肽（即8毫克I．1）中说明的多肽）溶于750微升的同种硼酸盐缓冲溶液，如前所述，pH＝9．1。

慢慢滴加100微升二迭氮联苯胺。

反应进行1分钟后，用葡聚糖G25M（Pharmacia）PD10柱，柱高50毫米，直径15毫米），这一柱子事先用

0．15M氯化钠溶液作为洗脱剂使其平衡。

每一组分收集1毫升溶液，取各组分10微升做茚三酮试验后，保存组分3和组分4（0．6毫升）。这两组分中含有联到KLH上的多肽。用100微升组分做酸水解（6N盐酸＋0．1%苯酚），在110℃反应18小时。进行氨基酸分析后，计算实际比例，即在本例中R＝1520，相当于3．75毫克／毫升（6毫克／1．6毫升）。

Ⅲ———免疫试验

每一免疫原至少用两只兔子（Fauve de Bourgogne）来做免疫反应实验。

免疫反应实验记录

1．1．用于免疫实验的免疫原的制备

相当于200微克多肽的结合旦白（即对拟肽段I来说，用戊二醛偶联时为133微升多肽／载体旦白溶液，用CMECDI偶联时为167微升）用500微升pH＝7．5，含0．15M氯化钠的磷酸盐缓冲液稀释。

依注射方式不同，往这两种旦白溶液中临时加入500微升Freund的完全或不完全免疫辅剂。

混合物被乳化后，进行注射。

1．2．注射时间表（D代表天数）

D．0．取血样（对照）

真皮内注射加完全Freund免疫辅剂的旦白溶液（总体积为1毫升）。

取背部10到20个点进行注射。

D．＋１０皮下注射加不完全Ｆｒｅａｎｃｌ免疫辅剂的旦白溶液（总体积为１毫升）。

一次注射

D．＋２０皮下注射加不完全Ｆｒｅａｎｄ免疫辅剂的旦白溶液（总体积为１毫升）。

D．＋２２取血样并检查抗体的存在和效价。

D．＋３０与D．＋２０一样的辅剂剂量。

D．＋３３与D．＋２２一样取样并检查。

１．３．免疫反应的结果

抗激素及其亚单位的抗体的出现及特异性用放射免疫分析法（ＲＩＡ）来确定。激素（ｈＣＧ、ｈＬＨ）及其亚单位（α－ｈＣＧ、β－ｈＬＨ）按Ｐ．Ｊ．Ｆｒａｃｋｅｒ和Ｊ．Ｃ．Ｓｐｅｃｋ 在《生物化学和生物物理研究通讯》８０卷．８４９页（１９７８）中给出的方法用放射性元素（$Na\ I^{125}$）进行标记。待测试抗血清用不同的标记分子（示踪物）培养，抗血清用适当ｐＨ值的缓冲液进行稀释并加入恒量的示踪物。如果血清内有抗体，用聚乙二醇就能沉淀出抗原（标记分子）—— 抗体复合物。沉淀的放射量与抗体量成正比。抗体的特异性用下面的方法检测，将一定量的ｈＣＧ－I^{125}加到恒定稀释的抗血清内，而逐渐增加加入的待测分子（ｈＣＧ，β－ｈＣＧ，α－ｈＣＧ，ｈＬＨ）的量。抗体的特异性则指其分子在最低浓度时能引起可观的抗原 － 抗体键合取代（免免疫作用的２个结果）。

下表列出了由Ｄ２２组所取的免疫血清样本的结果，这些样本是

用本发明中的多肽化合物连到破伤风类毒素上所得免疫原进行的免疫反应得到的。

表　2

	偶合方法	动物数	阳性结果数			
			hCG -	hCG -	hCG	hLH
拟肽段1：α－hCG序列46－55	α	12	0	11	12	0
	β	18	0	13	14	0
拟肽段2：α逆向序列	β	2	0	0	1	0
拟肽段4：α－hCG序列43－49	β	2	2	0	2	1
拟肽段5：α－hCG序列43－55	β	2	1	2	2	1

α偶合方法＝戊二醛方法

β偶合方法＝碳二亚胺法

表Ⅱ结果表明，拟肽段1具有很好的结果，对hCG而言每例都得到了有效的免疫反应，而与hLH无交叉作用。

下表给出了抗拟肽段1血清对hCG及其亚单位的平均结合活性（平均＋SD）（稀释1／10后的百分比）。

偶合位置	动物数	hcG－α	结合对象	hCG
α	10	0	21(12)	32(17)*
β	10	0	21(17)	19(15)**

* t＝1．51

** t＝0．18

t大于1．18时，P＜0．05有显著性差异

对hCG及其β亚单位而言得到的结合活性表明多肽与α序列偶合方式，对hCG而言，与由拟肽段1得到的抗血清有更高的结合活性。

Ⅳ ——抗血清的生物活性

通过测定对大鼠排卵的抑制活性确定了免抗体对hCG的生物活性有中和作用。

基于此目的，给每组两只大鼠注射：1）免疫前血清 2）从免中得到的抗拟肽段1的免疫血清 3）生理血清。8小时后给500毫免疫单位（mIU）hCG。4小时后将动物处死，记录卵巢内有（＋）或无（－）充血囊泡出现。

	免疫前血清		抗血清		生理血清	
	卵巢		卵巢		卵巢	
	1	2	1	2	1	2
大鼠 1	+	+	−	−	+	+
大鼠 2	+	+	−	+	+	+

这些实验结果表明抗拟肽段1的抗血清时卵泡的形成有拮抗作用。

氨基酸符号		
A	Ala	丙氨酸
C	Cys	半胱氨酸
D	Asp	天门冬氨酸
E	Glu	谷氨酸
F	Phe	苯丙氨酸
G	Gly	甘氨酸
H	His	组氨酸
I	Ile	异亮氨酸
K	Lys	赖氨酸
L	Leu	亮氨酸
M	Met	蛋氨酸
N	Asn	天门冬酰胺
P	Pro	脯氨酸
Q	Gln	谷氨酰胺
R	Arg	精氨酸
S	Ser	丝氨酸
T	Thr	苏氨酸
V	Val	缬氨酸
W	Trp	色氨酸
Y	Tyr	酪氨酸