

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99812170.3

[51] Int. Cl.

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/108 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C08L 5/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 7 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1263510C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

[22] 申请日 1999.8.18 [21] 申请号 99812170.3

[30] 优先权

[32] 1998.8.19 [33] US [31] 60/097,120

[32] 1999.8.18 [33] US [31] 09/376,911

[86] 国际申请 PCT/US1999/018982 1999.8.18

[87] 国际公布 WO2000/010599 英 2000.3.2

[85] 进入国家阶段日期 2001.4.16

[71] 专利权人 巴克斯特健康护理股份有限公司

地址 瑞士瓦利塞伦

[72] 发明人 F·米绍 C·-H·黄

C·乌伊茨

审查员 张珍丽

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜

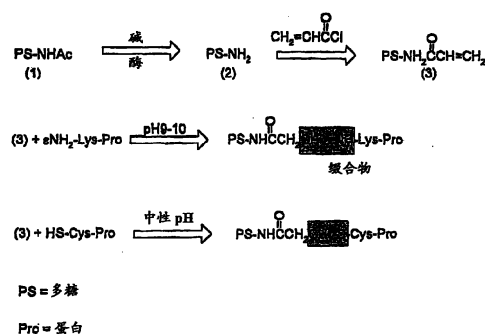
权利要求书 6 页 说明书 31 页 附图 1 页

[54] 发明名称

多糖-蛋白质缀合物或寡糖-蛋白质缀合物、其制备方法及其应用

[57] 摘要

提供了新的免疫原性的 β -丙酰胺基-联多糖-和 N-丙酰胺基-联寡糖-蛋白缀合物以及生产该缀合物的方法。所述缀合过程简单、快速、可重复并且适用于各种从细菌种属、酵母、癌细胞衍化的或化学合成的多糖或寡糖。也描述了应用 β -丙酰胺基-联多糖-和 β -丙酰胺基-联寡糖-蛋白缀合物抵抗感染或癌症的疫苗和免疫方法。



1. 免疫原性多糖-蛋白缀合物或寡糖-蛋白缀合物，所述缀合物包含通过 N-丙酸化多糖或 N-丙酸化寡糖丙酸部分的 β -位位点与蛋白直接偶合的 N-丙酸化多糖或 N-丙酸化寡糖，其中与蛋白直接偶合的 N-丙酸化多糖或 N-丙酸化寡糖诱导对所述 N-丙酸化多糖或 N-丙酸化寡糖有反应性的保护性抗体，其中所述 N-丙酸化多糖或 N-丙酸化寡糖衍生于包含 N-乙酰基的多糖或寡糖，并且其中至少 50%的 N-乙酰基已被 N-丙烯酰基所取代，产生与所述蛋白偶合的 N-丙酸化多糖或 N-丙酸化寡糖。

2. 根据权利要求 1 的缀合物，其中所述蛋白含有至少一个赖氨酸或半胱氨酸残基。

3. 根据权利要求 1 的缀合物，其中所述多糖或寡糖来源于从细菌、酵母、癌细胞获得的或化学合成制得的多糖。

4. 根据权利要求 1 的缀合物，其中所述多糖或寡糖来源于从大肠杆菌、脑膜炎球菌、肺炎球菌、链球菌、嗜血菌、奈瑟氏球菌、沙门氏菌、克雷伯氏菌或假单胞菌获得的多糖。

5. 根据权利要求 1 的缀合物，其中所述多糖或寡糖来源于从选自 Ia 型、Ib 型、II 型、III 型、V 型、VIII 型的 B 组链球菌及其组合获得的多糖。

6. 根据权利要求 4 的缀合物，其中所述多糖或寡糖来源于从选自 B 组、C 组、Y 组、W135 组的脑膜炎球菌及其组合获得的多糖。

7. 根据权利要求 4 的缀合物，其中所述多糖或寡糖来源于从大肠杆菌 K1、大肠杆菌 K92、4 型肺炎球菌、14 型肺炎球菌、A 组链球菌、C 组链球菌或其组合获得的多糖。

8. 根据权利要求 1 的缀合物，其中所述蛋白选自破伤风类毒素、白喉类毒素、脑膜炎奈瑟氏球菌外膜蛋白、pneumolysoid、B 组链球菌的 C- β 蛋白和 B 组链球菌的非-IgA-结合的 C- β 蛋白。

9. 根据权利要求 8 的缀合物, 其中所述蛋白是重组产生的蛋白。

10. 根据权利要求 9 的缀合物, 其中所述蛋白是重组的脑膜炎奈瑟氏球菌外膜蛋白。

5 11. 根据权利要求 1 的缀合物, 其中所述多糖或寡糖包括糖胺聚糖。

12. 根据权利要求 1 的缀合物, 其中所述多糖或寡糖含有至少具有一个游离氨基或 N-酰基的结构重复单位的糖残基。

10 13. 根据权利要求 12 的缀合物, 其中所述糖残基选自葡萄糖胺、半乳糖胺、甘露糖胺、岩藻糖胺和唾液酸。

14. 根据权利要求 1 的缀合物, 其中所述 N-丙酸化多糖或寡糖直接与所述蛋白的赖氨酸残基的 ϵ -游离氨基或半胱氨酸残基的巯基偶合。

15 15. 根据权利要求 1 的缀合物, 其中所述缀合物选自 N-丙酸化 III 型 B 组链球菌多糖-破伤风类毒素缀合物。

16. 一种药用组合物, 它包含根据权利要求 1 的多糖-蛋白缀合物或寡糖-蛋白缀合物和药学上可接受的载体。

17. 根据权利要求 16 的药用组合物, 它还包含佐剂。

20 18. 根据权利要求 17 的药用组合物, 其中所述佐剂选自明矾和硬脂酰酪氨酸。

19. 根据权利要求 16 的药用组合物, 它还包含第二种组分, 所述第二种组分选自白喉-破伤风-百日咳(DTP)、白喉-破伤风-非细胞性百日咳(DTaP)、破伤风-白喉(Td)、白喉-破伤风-非细胞性百日咳-B 型流感嗜血杆菌(DTaP-Hib)、白喉-破伤风-非细胞性百日咳-灭活的脊髓灰质炎病毒-B 型流感嗜血杆菌(DTaP-IPV-Hib)及其组合物。

25 20. 一种免疫原, 它包含根据权利要求 1 的多糖-蛋白缀合物或寡糖-蛋白缀合物, 所述免疫原诱导多糖特异性或寡糖特异性免疫应答。

21. 根据权利要求 20 的免疫原, 其中所述免疫应答包括产生多糖-特异性或寡糖-特异性免疫球蛋白。

22. 根据权利要求 21 的免疫原, 其中所述免疫球蛋白是 IgG、IgM、IgA 或其组合物。

5 23. 制备诱导产生保护性抗体的 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物或 β -丙酰胺基-联寡糖-蛋白缀合物的方法, 包括:

A) 用去-N-乙酰化试剂将多糖或寡糖去-N-乙酰化, 形成去-N-乙酰化多糖或去-N-乙酰化寡糖,

10 B) 用丙烯酰化试剂将去-N-乙酰化多糖或去-N-乙酰化寡糖 N-丙烯酰化, 形成 β -丙酰化多糖或 β -丙酰化寡糖, 以及

C) 将 β -丙酰化多糖或 β -丙酰化寡糖直接与蛋白偶合, 形成 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物或 β -丙酰胺基-联寡糖-蛋白缀合物。

24. 权利要求 23 的方法, 其中所述去-N-乙酰化试剂是碱或酶。

15 25. 权利要求 23 的方法, 其中所述去-N-乙酰化试剂选自 NaOH、KOH 和 KIOH。

26. 权利要求 23 的方法, 其中所述丙烯酰化试剂选自丙烯酰氯、丙烯酰酐、丙烯酸和脱水剂。

27. 权利要求 23 的方法, 其中所述多糖或寡糖从细菌、酵母、癌细胞获得或由化学合成制得。

20 28. 权利要求 23 的方法, 其中所述多糖或寡糖从大肠杆菌、脑膜炎球菌、肺炎球菌、链球菌、嗜血菌、奈瑟氏球菌、沙门氏菌、克雷伯氏菌或假单胞菌获得。

25 29. 权利要求 23 的方法, 其中所述蛋白选自破伤风类毒素、白喉类毒素、奈瑟氏球菌外膜蛋白、pneumolysoid、B 组链球菌的 C- β 蛋白和 B 组链球菌的非-IgA-结合的 C- β 蛋白。

30. 权利要求 29 的方法, 其中所述蛋白是重组产生的蛋白。

31. 根据权利要求 23 的方法, 其中所述偶合在 pH 约为 7.0 的条件下进行。

32. 根据权利要求 23 的方法, 其中所述偶合在 pH 大于 9 的条件下进行。

33. 根据权利要求 23 的方法, 其中所述偶合用选自磷酸盐缓冲液、重碳酸盐缓冲液和硼酸盐缓冲液的试剂进行。

5 34. 根据权利要求 23 的方法, 其中所述去-N-乙酰化剂是碱或酶而丙烯酰化试剂选自 N-丙烯酰氯、丙烯酰酐、丙烯酸和脱水剂。

35. 一种疫苗, 它包含根据权利要求 1 的多糖-蛋白缀合物或寡糖-蛋白缀合物, 其中所述疫苗提供对一个属有机体的至少一个成员的保护性免疫, 其中多糖-蛋白缀合物或寡糖-蛋白缀合物的多糖或寡糖组分是由所述有机体中提取的。

10

36. 根据权利要求 35 的疫苗, 其中所述有机体选自细菌和酵母。

37. 根据权利要求 36 的疫苗, 其中所述细菌选自大肠杆菌、脑膜炎球菌、肺炎球菌、链球菌、嗜血菌、奈瑟氏球菌、沙门氏菌、克雷伯氏菌和假单胞菌细菌。

15 38. 根据权利要求 35 的疫苗, 它还包含与所述多糖-蛋白缀合物或寡糖-蛋白缀合物结合的第二免疫原, 所述第二免疫原选自 DTP、DTaP、Td、DTaP、Hib、DTaP-IPV-Hib 及其组合物。

39. 根据权利要求 35 到 38 任何一项的疫苗在制备免疫哺乳动物抵抗导致机体疾病的有机体或导致疾病的细胞的药物中的用途。

20 40. 根据权利要求 35 到 38 任何一项的疫苗在制备免疫哺乳动物抵抗肺炎链球菌的药物中的用途。

41. 根据权利要求 35 到 38 任何一项的疫苗在制备免疫哺乳动物抵抗 B 组链球菌的药物中的用途。

25 42. 根据权利要求 35 到 38 任何一项的疫苗在制备免疫哺乳动物抵抗 B 组脑膜炎奈瑟氏球菌的药物中的用途。

43. 根据权利要求 35 到 38 任何一项的疫苗在制备免疫哺乳动物抵抗 C 组脑膜炎奈瑟氏球菌的药物中的用途。

44. 根据权利要求 35 到 38 任何一项的疫苗在制备免疫哺乳动

物抵抗 B 型流感嗜血菌的药物中的用途。

45. 根据权利要求 1 到 15 任何一项的多糖-蛋白缀合物或寡糖-蛋白缀合物在制备诱导哺乳动物产生针对多糖或寡糖的抗体应答的药物中的用途。

5 46. 根据权利要求 45 的方法制备的免疫球蛋白或其抗原-结合片段。

47. 根据权利要求 46 的免疫球蛋白，它选自 IgG 抗体、IgM 抗体、IgA 抗体及其组合物。

10 48. 根据权利要求 47 的免疫球蛋白，其中所述抗体是分离的 IgG。

49. 在对根据权利要求 1 的 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物或 β -丙酰胺基-联寡糖-蛋白缀合物的应答中诱导产生的分离的免疫球蛋白或其抗原结合片段，所述免疫球蛋白或其抗原结合片段对 N-丙酸化多糖或 N-丙酸化寡糖具有特异性免疫活性，并对由其衍生 N-丙酸化多糖或 N-丙酸化寡糖的天然 N-乙酰化多糖具有免疫活性。

15 50. 根据权利要求 49 的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述天然 N-乙酰化多糖是细菌、酵母或癌细胞的成分。

51. 根据权利要求 50 的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述多糖或寡糖从大肠杆菌、脑膜炎球菌、肺炎球菌、链球菌、嗜血菌、奈瑟氏球菌、沙门氏菌、克雷伯氏菌或假单胞菌细菌获得。

20 52. 根据权利要求 49 的免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述免疫球蛋白是重组产生的免疫球蛋白。

53. 根据权利要求 49 到 52 任何一项的免疫球蛋白或抗体在制备被动免疫抵抗导致疾病的有机体或导致疾病的细胞的药物中的用途。

25 54. 根据权利要求 53 的用途，其中所述免疫球蛋白是分离的 IgG 抗体或其抗原结合片段。

55. 根据权利要求 53 的用途，其中所述免疫球蛋白是分离的 IgM

抗体或其抗原结合片段。

56. 根据权利要求 53 的用途，其中所述免疫球蛋白是分离的 IgA 抗体或其抗原结合片段。

多糖-蛋白质缀合物或寡糖-蛋白质缀合物、其制备方法及其应用

5

发明领域

本发明涉及免疫原性 β -丙酰胺基-联(propionamido-linked)多糖蛋白缀合物以及由细菌、酵母或癌细胞生产所述缀合物的方法。所述缀合物可用作疫苗。

10

发明背景

革兰氏阳性菌如链球菌属(*Streptococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、杆菌属(*Bacillus*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、利斯特氏菌属(*Listeria*)、丹毒丝菌属(*Erysipelothrix*)和梭菌属(*Clostridium*)细菌以及由革兰氏阴性菌如嗜血菌属(*Haemophilus*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、奈瑟氏球菌属(*Neisseria*)细菌和某些类型的大肠杆菌(*Escherichia coli*)引起的细菌感染在整个全球的发病率非常高。这一现象结合细菌对抗生素的抗药性的不断升高,说明需要开发细菌疫苗。例如,链球菌是一大类不同类型的革兰氏阳性菌,已根据其细胞壁多糖的抗原性和结构将链球菌分成几个组(26,27)。其中两组与人类的严重感染有关。A组链球菌引起各种感染性疾病,包括“链球菌咽喉”、风湿热、链球菌性脓疱病和脓毒症。B组链球菌是美国及发展中国家重要的产期致病菌(37)。

20

25

革兰氏阴性菌也是重要的致病因素。在近期开发以及应用直接抗b型流感嗜血菌(Hib)的多糖蛋白疫苗之前, Hib 细菌感染是造成多数婴幼儿精神发育迟缓的原因。脑膜炎奈瑟氏球菌(*N. meningitidis*)和大肠杆菌(*E. coli*)K1 感染引起新生儿脑膜炎。已将革兰氏阴性菌-大

肠杆菌的菌株与严重疾病包括由于食用被大肠杆菌腐坏的肉类而导致的死亡联系在一起。

5 当所述多糖与另一种免疫原性分子如多肽或蛋白质结合时，将其用于诱生对各种革兰氏阴性和革兰氏阳性菌应答的抗体。多糖或寡糖与多肽的结合可将多糖或寡糖的免疫应答从典型的 T 细胞非依赖性转换成 T 细胞依赖性的应答。

10 先有技术公开了多糖与蛋白质的直接结合和间接结合以形成缀合物(总结于参考文献(11)和美国专利第 5,306,492 号中)。缀合方法包括将多糖结合到蛋白载体上的重氮结合(diazo coupling)、硫醚键、酰胺化作用、还原性胺化作用和硫代氨基甲酰基结合。

Geyer 等描述了通过还原性胺化作用和衍生糖利用偶氮基结合的连接作用使某些肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)的荚膜多糖片段缀合到硝基苯基-乙胺接头上(Med. Microbiol. Immunol, 165: 171-288(1979))。

15 McIntire 描述了通过与卤酰卤(haloacyl halid)反应将大肠杆菌(*Escherichia coli*)的减毒性脂多糖共价结合于蛋白质抗原上(美国专利第 4,057,685 号)。

Jennings 等描述了通过还原性胺化作用产生多糖-蛋白缀合物(美国专利第 4,356,170 号)。

20 Anderson 描述了免疫原性的缀合物的制备，该缀合物含有从肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)或流感嗜血菌(*H. influenzae*)的荚膜聚合物中衍生的免疫原性荚膜多糖片段的还原性胺化产物和作为蛋白载体的细菌毒素或类毒素，所述胺化产物含有通过诸如用高碘酸盐氧化裂解或水解糖苷键制备的还原性末端(美国专利第 4,673,574、4,761,283 和 4,808,700 号)。

25 Hillman 等描述了多糖-蛋白缀合物的制备，其制备方法是用溴化氰活化 b 型流感嗜血菌(*H. influenzae*)的多糖，用间隔分子 6-氨基己酸衍生化所述活化多糖以及用水溶性碳化二亚胺缀合脑膜炎奈瑟

氏球菌(*Neisseria meningitidis*)的主要外膜蛋白以通过 6-氨基己酸间隔分子与所述多糖的复杂多样的连接形成与所述蛋白质的酰胺型连接(美国专利第 4,459,286 号)。

5 Gordon 描述了水溶性多糖-白喉类毒素的共价缀合物, 其中用溴化氰活化纯净 b 型流感嗜血菌的多糖并立即与已用 ADH 间隔分子衍化的白喉类毒素混合(美国专利第 4,965,338 号)。

Tsay 等描述了通过 4-12 个碳原子部分将革兰氏阴性细菌的去毒多糖与同一种革兰氏阴性细菌的去毒蛋白质共价结合(美国专利第 4,663,160 号)。

10 Gordon 描述了致病性细菌如 B 型流感嗜血菌、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟氏菌和大肠杆菌的多糖分子与 T 细胞依赖性抗原如白喉类毒素和破伤风类毒素之间的缀合物(美国专利第 4,619,828 号)。

Porro 等描述了具有三价免疫原性活性的糖蛋白缀合物疫苗, 它含有革兰氏阳性细菌的荚膜多糖的抗原决定簇以及 CRM₁₉₇、或破伤风类毒素或百日咳毒素(美国专利第 4,711,779 号)。

Porro 描述了寡糖-载体蛋白缀合物, 其制备方法是使具有末端还原基团的寡糖与二氨基甲烷在吡啶硼烷存在下的反应使得产生还原性胺化作用, 使所述胺化寡糖产物与具有两个官能基团的分子反应, 然后将该活化的寡糖产物与蛋白载体反应(美国专利第 5,306,492 号)。

20 Kuo 等描述了含有从 b 型流感嗜血菌的荚膜多糖衍化而来的氧化多聚核糖基-核糖醇-磷酸多糖片段的还原性胺化产物和 b 型流感嗜血菌的外膜蛋白的多糖-蛋白缀合物(美国专利第 5,192,540 号)。

欧洲专利公开第 EP 0747063 A2 号描述了含有多唾液酸衍化物和连接到载体分子的异双功能(heterobifunctional)连接分子的修饰荚膜多糖。使用所述连接物可使 1 个多糖最多 N-烷基化约 5 个唾液酸残基。然后用丙酸酐(propionic anhydride)或醋酸酐酰化其余氨基基团。

因此需要更有效、产率更高而且更简单的获得纯化免疫原性多

糖-蛋白缀合物的方法，以大规模生产免疫原性多糖-蛋白缀合物疫苗。

发明概述

5 本发明为一种免疫原性 β -丙酰胺基-联多糖-和 β -丙酰胺基-联寡糖-蛋白缀合物。

 本发明目的之一是提供一种制备免疫原性 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物的方法，该方法比目前使用的方法更好。本发明的另一目的是提供得自免疫原性 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物的药用组合物、疫苗和其它免疫学试剂。

10

 所提供的制备免疫原性多糖-蛋白缀合物的方法包括通过碱法或酶法水解使多糖或寡糖的脱-N-乙酰化，随后经过对所述 N-去乙酰基多糖进行 N-丙烯酰化作用(acryloylation)。所述 N-丙烯酰化的多糖与载体蛋白直接偶联形成免疫原性 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物。

15 按照本发明通过水解连接多糖和其它细胞成分的碱不稳定键或通过酶性水解，可从细菌、酵母或哺乳动物细胞上清液或直接从细菌、酵母或哺乳动物细胞提取荚膜多糖和细胞表面多糖。通过水解从所述多糖去除的一定比例的 N-乙酰基由 N-丙烯酰基代替，它再直接与蛋白偶联形成本发明的缀合物。

20 一方面，本发明提供了在多个位点直接与蛋白偶联的寡糖和多糖。

 另一方面，本发明是一种免疫哺乳动物对抗细菌或酵母感染或抗肿瘤的方法，其包括给予所述哺乳动物有效量的本发明的疫苗来预防致病微生物感染或癌症。

25 再一方面，本发明是一种使用 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物在哺乳动物体内激发产生抗体的方法，该方法保护所述哺乳动物免于感染或疾病。

 本发明的另一方面是应答用 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物的免

疫接种时产生的免疫球蛋白和分离的抗体。这种免疫球蛋白和分离抗体可用作治疗药物和诊断试剂。

附图简述

- 5 图 1. 图示制备免疫原性 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物的方法。

发明详述

10 本发明是一种可用作抗细菌感染、酵母感染的免疫原和疫苗以及癌症治疗药物的新型多糖-蛋白缀合物和寡糖-蛋白缀合物。用于形成免疫原性 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物的多糖或寡糖得自多糖或寡糖的来源，该来源包括但不限于革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌、酵母、癌细胞或癌组织等，其中在它们逃逸宿主防御机制时所述多糖或寡糖对所述细胞起毒性因子作用。通过在蛋白上 Michael-型加成
15 亲核位点使 N-丙烯酰化多糖与蛋白直接偶联形成本发明的所述多糖-蛋白缀合物。

 利用碱或酶水解连接所述多糖或寡糖与所述细胞成分的键可从多种来源包括革兰氏阴性细菌、革兰氏阳性细菌、酵母、癌细胞或它们的重组形式获得多糖或寡糖。通过将所述生物体或细胞或者含
20 有所述生物体或细胞碎片的溶液与碱或酶接触，可以从所述生物体或细胞提取多糖或寡糖。在通过多种方法的碱或酶水解后，可回收多糖或寡糖。按照本发明使用的革兰氏阳性细菌和其重组菌株的非限制性实例有链球菌属(*Streptococci*)、葡萄球菌属(*Staphylococci*)、
 肠球菌属(*Enterococci*)、杆菌属(*Bacillus*)、棒杆菌属
25 (*Corynebacterium*)、利斯特氏菌属(*Listeria*)、丹毒丝菌属(*Erysipelothrix*)和梭菌属(*Clostridium*)细菌。具体地说，更优选使用链球菌属细菌，最优选使用 Ia、Ib、II、III、IV、V 和 VIII 型 B 组链球菌。用于本发明的革兰氏阴性细菌和其重组菌株的非限制性实例包括流感嗜血

菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、大肠杆菌、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、肺炎克雷伯氏菌和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。具体地说,更优选使用 b 型流感嗜血菌、B、C、Y 和 W135 型脑膜炎奈瑟氏球菌、大肠杆菌 K1 及大肠杆菌 K92。用于本发明的酵母的实例包括但不

5 包括但不限于新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*), 用于本发明的癌细胞或癌组织的实例包括但不限于小细胞肺癌、成神经细胞瘤、乳腺癌、结肠癌等。

通过本领域已知的方法按照本发明能使用多种条件在水性或有机溶剂中水解多糖或寡糖。可通过反应条件控制水解所述碳水化合物的 N-乙酰键的程度。在一个实施方案中,水解去除至少约 50%的

10 N-乙酰基,优选去除约 50%-100%,更优选去除约 90%或以上的天然 N-乙酰基。在一个具体实施方案中,用水解试剂处理从所述多糖水解约 95%或以上的 N-乙酰基。

适合碱提取的荚膜多糖为缺乏任何不能被取代的碱不稳定取代基(如决定免疫原性的 O-乙酰基)的多糖。适合碱提取的其它荚膜多糖是缺乏磷酸二酯键的多糖和缺乏 4-连接的铀酸残基的多糖。

15

在碱水解的一个优选实施方案中,从 B 组链球菌(GBS)提取所述荚膜多糖(CPS)。在一个最优选的实施方案中,从 Ia、Ib、II、III、V 和 VIII 型 GBS 提取所述 CPS。

在另一碱水解的优选实施例,从肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)提取所述 CPS。在更优选的碱水解实施例中,从 III、IV 和 XIV 型肺炎链球菌提取所述 CPS。

20

在另一碱水解的优选实施方案中,从奈瑟氏球菌属或埃希氏菌属提细菌取所述 CPS。在一个更优选的碱提取的实施方案中,从 B、C、Y 或 W135 型脑膜炎奈瑟氏球菌、大肠杆菌 K1 或大肠杆菌 K92 提取所述 CPS。

25

适合酶法去乙酰基的多糖是那些缺乏任何决定免疫原性的酶不稳定性取代基的多糖,其中所述取代基不能被免疫原性部分替代或

取代, 这些多糖包括但不限于 GBS 等。

A. N-丙烯酰化多糖的制备

1. 多糖的去乙酰基作用

5 a). 原材料

采用本领域已知的标准方法, 使用碱水解或酶法水解从浓缩的细菌、酵母、哺乳动物细胞或这些细胞的重组形式或者从匀浆细胞的上清液或条件培养基中可以获得多糖或寡糖。通过本领域已知的标准方法可以分离和纯化所述多糖或寡糖。市售的分离及纯化的多糖或寡糖也用作原料。

10 分离多糖的方法依赖于具体使用的多糖。通常的方法是使用离子型去污剂与带电多糖络合。沉淀并分离所述络合物。然后将所述络合物溶于高离子强度的溶液如氯化钙中, 再用乙醇沉淀所述多糖。

15 所获得的用于本发明的分离并纯化的多糖和寡糖优选含有少于 1%核酸及蛋白质杂质以用于人类。由于存在无机盐, 纯化后常常观测到碳水化合物的纯度为 80-100%。

b). 碱法水解

能用碱处理所述纯化的多糖或寡糖来去除所述 N-乙酰基。按照本发明可以使用的碱的非限制性实例为 NaOH、KOH、LiOH、NaHCO₃、Na₂CO₃、K₂CO₃、KCN、Et₃N、NH₃、H₂N₂H₂、NaH、NaOMe、NaOEt 或 KOtBu。诸如 NaOH、KOH、LiOH、NaH、NaOMe 或 KOtBu 的碱在 0.5 N-5.0 N 的范围使用最有效。诸如 NaHCO₃、Na₂CO₃、K₂CO₃ 和 KCN 的碱能以其能溶解的最高浓度使用。只要存在实现水解的诸如水或乙醇的试剂, 可使用中至高(50-100%)浓度的有机碱, 诸如 Et₃N。诸如 NH₃ 或 H₂N₂H₂ 的碱几乎能以任何浓度包括 100%的浓度使用。溶剂如水、醇类(优选 C₁-C₄ 醇)、二甲亚砜、二甲基甲酰胺或这些溶剂的混合物和其它有机溶剂也可使用。最优选含水的碱溶液。

从所述多糖或寡糖去除 N-乙酰基的最有效的 pH 范围是大约 9-

14, 最佳 pH 是 12 左右。随后用本领域已知的标准方法通过使用膜或透析的超纯化从剩下的试剂中纯化所述 N-去乙酰化多糖。

c). 酶法水解

可使用 N-脱乙酰基酶从多糖或寡糖中酶法去除 N-乙酰基。在一个实施方案中, 在参考文献 47、48 和 49 中描述了可用于从多糖或寡糖中去除 N-乙酰基的 N-脱乙酰基酶。在酶法水解中, 在合适的 pH 和温度条件下将所述多糖或寡糖和脱乙酰基酶与合适的酶缓冲系统混合并使其反应足够时间以去除 N-乙酰基。在一个实施方案中, 于 37 °C 下将多糖和脱乙酰基酶与合适的酶缓冲系统(例如, 50 mM MES、10 mM MnCl₂, pH 6.3)混合 60 分钟以形成 N-脱乙酰基的多糖。使用合适的终止溶液(例如 1 M 一氯乙酸、0.5 M NaOH、2 M NaCl)或通过使用合适的缓冲溶液稀释终止该反应。

2. 多糖的 N-丙烯酰化作用

所述多糖或寡糖的碱或酶法水解导致从所述多糖或寡糖的唾液酸和氨基糖残基去除 N-乙酰基。在水解以后, 通过使用多种丙烯酰化剂将所述多糖或寡糖 N-丙烯酰化至需要程度。

在一个实施方案中, 所述方法包括加入丙烯酰化试剂以 N-丙烯酰化 N-脱乙酰基的多糖或寡糖。丙烯酰化试剂的实例包括但不限于丙烯酰氯、丙烯酰酐、丙烯酸和脱水剂如 DCC、CH₂CHCOCN 等, 以约 1 M 的浓度过量使用。在 N-脱乙酰基多糖的 N-丙烯酰化方法中, 在反应期间将所述 pH 调节并维持在约 9-11, 优选 pH 约为 10。反应期间的温度为约 2 °C-8 °C, 优选约 4 °C。所述反应进行约 1 小时时间。所得 N-丙烯酰化多糖或 N-丙烯酰化寡糖至少丙烯酰化约 95%或以上。

B. β-丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物的制备

当与另一种免疫原性分子如多肽或蛋白缀合时, 本发明的所述多糖或寡糖可用于在个体中对多种革兰氏阴性及革兰氏阳性细菌、

酵母和癌症激发产生抗体应答。所述多糖或寡糖与所述多肽的缀合对所述多糖或寡糖的通常是 T 细胞非依赖性免疫应答转化为 T 细胞依赖性免疫应答。因此, 优选所述多肽的大小是一种足以引起所述应答从 T 细胞非依赖型转化为 T 细胞依赖型的多肽大小。为了提供第二免疫原的目的, 使用较小的多肽可能是有效的。所述蛋白质载体的大小通常是约 50,000-500,000 M.W.。

优选的载体蛋白包括但不限于破伤风类毒素、白喉类毒素、霍乱毒素亚单位 B、脑膜炎奈瑟氏球菌外膜蛋白、pneumolysoid、B 组链球菌的 C- β 蛋白、B 组链球菌的 C- β 蛋白、B 组链球菌的非-IgA 结合的 C- β 蛋白、铜绿假单胞菌类毒素、百日咳类毒素、含有赖氨酸或半胱氨酸残基的合成蛋白等。所述载体蛋白可以是天然蛋白、化学修饰的蛋白、去毒蛋白或重组蛋白。就所述蛋白成分而言, 按照本发明制备的缀合物分子可以是单体、二聚体、三聚体和更高的交联分子。

本发明提供了生产缀合物分子的能力, 在该缀合物分子中所述蛋白是通过在所述多糖或寡糖上的一个或多个位点与所述多糖或寡糖连接。所述多糖或寡糖的大小可以有很大不同。一种或多种多糖或寡糖可以与一种或多种蛋白交联。本发明的缀合物优选为点阵结构。连接点是在所述蛋白的赖氨酸或半胱氨酸残基与所述多糖或寡糖的 N-丙烯酰基之间。

在一种形成免疫原性多糖-蛋白缀合物的方法中, 首先用碱或酶水解处理在构成其重复单元的糖残基中含有游离氨基或 N-酰基(如 N-乙酰基)的分离的多糖(糖胺聚糖), 以去除其部分或全部 N-酰基。然后用 N-丙烯酰化试剂将所述游离氨基进行 N-酰化以形成上述 N-丙烯酰化多糖。然后在最佳 pH、温度和时间条件下使所述 N-丙烯酰化的多糖直接与蛋白质偶联, 从而形成免疫原性 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物。

在一个实施方案中, 在 pH 9.0 以上进行该缀合方法, 对于蛋

白质赖氨酸残基的 ϵ -游离氨基基团的最佳反应性优选 pH 约 9.0-10.0。在另一个实施方案中，在所述蛋白半胱氨酸残基的巯基(SH)基团的最佳反应性的约 7.0 的中性 pH 下进行该缀合方法。可根据特定载体蛋白的反应基团数目选择进行缀合方法的 pH。例如，使用包含更多反应性赖氨酸残基(与半胱氨酸残基数相比)的蛋白的方法优选在碱性 pH 下进行。使用包含更多反应性半胱氨酸残基(与赖氨酸残基数相比)的蛋白的缀合方法优选在约中性 pH 下进行。

所述缀合反应可在缓冲试剂中进行，该缓冲试剂包括但不限于碳酸盐/碳酸氢盐、硼酸盐缓冲剂、磷酸盐等。所述缀合反应的温度至少约为 25℃，优选约 37℃，反应持续优选约 24 小时。如 Romanowska 等(46)所述，关键反应涉及蛋白上的亲核性半胱氨酸巯基基团或赖氨酸 ϵ -NH₂基团与 N-丙烯酰化糖残基的 1,4-缀合加成(迈克尔型加成)，所述 N-丙烯酰化糖残基存在于图 1 所示的所述多糖的重复单元内。所得 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物的多糖与蛋白比率约 0.1-0.6。

适于与蛋白上的半胱氨酸和/或赖氨酸残基直接缀合的具有 N-酰基的所述多糖的糖基残基包括但不限于葡萄糖胺、半乳糖胺、甘露糖胺、岩藻糖胺、唾液酸等。所述多糖可得自天然来源如细菌、酵母或癌细胞，或得自合成来源。合成来源包括化学合成、酶法合成以及化学酶合成。所述合成可以是全程合成或是修饰天然碳水化合物的。天然分离的碳水化合物能通过改变碳水化合物残基上的官能团或通过加减碳水化合物残基来修饰。

用于制备本发明所述 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物和 β -丙酰胺基-联寡糖-蛋白缀合物的所述多糖或寡糖可以改变大小以与载体蛋白缀合。作为本文定义，用于本发明的寡糖包含至少 10 个糖残基，优选 10 到约 50 个糖残基。作为本文定义，多糖糖残基 50 个以上，并且最高可为约 600 个或更多的残基。在某些情况下，需要大的构建物来增强免疫原性。本发明方法适用于非常大的多糖，因为许多反应位点能被引入单个多糖中。本发明超越先有技术的另一优势是不

改变所述多糖或寡糖的带电官能团，该基团常常与决定免疫性的表位相互作用/或构成决定免疫性的表位部分。

C. 疫苗

5 本发明也涉及疫苗制备。按照本发明，可将上述分离的 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物用作抗原以产生对所述多糖或寡糖反应的抗体，并因此对所述多糖或寡糖从其分离的生物体或细胞反应。本发明疫苗可以是除了 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物进一步包含其它成分的复合疫苗或多成分疫苗，包括但不限于白喉-破伤风-百日咳
10 (DTP)、破伤风-白喉(Td)、DTaP、DTaP-Hib 疫苗、DTaP-IPV-Hib 疫苗等以及其复合物，从而提供用于免疫抗多种引起疾病的生物体或引起疾病的细胞的多功能疫苗。

 本发明疫苗可提供主动或被动免疫。提供主动免疫的疫苗包含与至少一种抗原肽缀合的分离并纯化的 N-丙烯酰化多糖或寡糖。

15

D. 药用组合物

 本发明组合物可包含至少一种多糖-蛋白缀合物和药学上可接受的载体如盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等。在另一实施方案中，所述药用组合物包含另一种免疫原性部分如肽，或含有由本发明的一种
20 CPS 产生的抗体的组合物。所述组合物也可含有佐剂以增强接受者的免疫应答。该佐剂可以是铝基佐剂如明矾或长链烷基佐剂如硬脂酰酪氨酸(参见 1990 年 9 月 17 日申请的美国序号 583,372；欧洲专利 EP 0 549 617 B1；Moloney 等，美国专利号 4,258,029)、胞壁酰二肽(MDP)或其衍生物、单磷酸脂质 A(MPL)、皂甙(Quil-A)等。还参见
25 Jennings 等，美国专利号 5,683,699 和 Paoletti 等，J. Infectious Diseases 1997; 175:1237-9。所述药用组合物可进一步包含一种或多种附加的免疫原，包括但不限于白喉-破伤风-百日咳(DTP)、破伤风-白喉(Td)、DTaP、DTaP-Hib、DTaP-IPV-Hib 等以及其复合物。这些药用组合物

作为疫苗特别有效。

对于引起被动免疫，所述药用组合物可以含有多克隆抗体、或单克隆抗体、它们的衍生物或其片段以及它们的重组形式。抗体、片段或衍生物的量将是按标准临床技术确定的治疗学上或预防学上的有效量。

通过本领域中已知的有效方法可将本发明的药用制剂引入个体。给予途径包括但不限于皮内、腹腔内、静脉内、皮下、肌肉内、口服和鼻内给予。

本发明组合物可含有本领域技术人员已知的适用于疫苗的标准载体、缓冲剂或防腐剂，包括但不限于任何合适的药学上可接受的载体，如生理盐水或其它可注射的液体。也可含有疫苗常规添加剂，例如稳定剂如乳糖或山梨醇和增强免疫原性应答的佐剂如磷酸铝、氢氧化铝或硫酸铝以及硬脂酰酪氨酸。按照本发明生产的疫苗也可作为多价疫苗的成分，该多价疫苗可激发产生抗多种传染原的免疫应答。

以足以激发产生作为免疫原性反应的一部分的抗体的量给予本发明的疫苗。所述疫苗可以胃肠外使用以产生 IgG 和 IgM 抗体，或者将其给予粘膜以在组织表面产生 IgA 抗体。可根据接受所述疫苗的个体的体型大小、重量或年龄调节剂量。可通过检测抗体滴度或杀菌活性监测个体的所述抗体应答，并且如果需要可加强免疫以增强所述免疫应答。通常，用于婴幼儿的单剂量为每剂量约 10 μ g 的缀合物疫苗或者为大约 0.5 μ g-20 μ g/公斤。成人一次剂量为约 0.5 μ g-20 μ g/公斤的所述缀合物疫苗。对于所述 CPS-蛋白缀合物疫苗，常规剂量为每剂量的每种 CPS 各约 25 μ g。即，抗 B 组链球菌疫苗可以含有九个血清型的每一 CPS 型各 25 μ g。

E. 抗体

直接抗所述多糖的抗体可以通过本领域已熟知的任何技术生

产。根据一种方法，可通过将分离的免疫原性 β -丙酰胺基-联多糖-蛋白缀合物给予宿主动物来产生所述抗体。所述宿主动物可以是但不限于大鼠、小鼠、兔、非人类的灵长类动物或人。优选所述宿主为人。在一个实施方案中，通过使用本领域已知的佐剂可以增强免疫应答。

通过本领域已熟知的任何一种技术也可制备直接抗所述多糖的单克隆抗体。按照一种方法，使用杂交瘤细胞系培养物(Kohler 和 Milstein(1975) Nature 256:495-497)。直接抗所述多糖的单克隆抗体可以通过本领域已熟知的任何技术制备的人单克隆抗体、嵌合单克隆抗体或人源化单克隆抗体。根据一种方法，可以产生具有与人类恒定区结合的非人类(如小鼠)抗原-结合域的嵌合单克隆抗体。(Takeda 等(1985) Nature 314:452)。按照 Queen 等，美国专利号 5,585,089 和美国专利号 5,530,101 的方法能够生产人源化抗体。通过本领域已知的方法可以构建单链抗体(美国专利号 4,946,778; Davis, G.T.等 1991 Biotechnology 9:165-169; Pluckthun, A. 1990 Nature 347:497-498)。通过本领域已知方法(WO 89/07142)可以修饰所述抗体的恒定区的结构域。

通过本领域已熟知的任何技术可以纯化直接抗所述多糖或寡糖的抗体，所述技术包括但不限于免疫吸附或免疫亲和层析、或其它层析法(如 HPLC)。抗体也可作为免疫球蛋白部分从血清、血浆或细胞培养基纯化。

本发明的抗体分子可以是完整的免疫球蛋白分子、大体上完整的免疫球蛋白分子或含有抗原结合位点的免疫球蛋白分子部分诸如 Fab 片段。所述抗体分子可以是任何类型，包括 IgG、IgM 和 IgA。

通过本领域已熟知的任何技术可以生产直接抗所述 CPS 的抗体片段。(Campbell(1985)生物化学和分子生物学实验室技术，第 13 卷，Burdon 等(编辑)，Elsevier Science 出版社，Amsterdam)。

所述抗体或其抗原结合片段可作为治疗剂使用以提供被动保护

来对抗由 Gram(+)、Gram(-)菌或酵母引起的疾病。所述抗体或其抗原结合片段也可作为标准免疫测定中的诊断试剂以检测和/或鉴定细菌、酵母或癌细胞。所述抗体可以试剂盒形式单独或与标准试剂一起提供用于免疫测定。

5 在本发明的另一实施方案中，可将本发明的直接抗所述多糖或寡糖的抗体作为治疗或预防用途的药用制剂使用以便将一个宿主个体的被动免疫转移给另一个体(即，增强个体的对革兰氏阴性或革兰氏阳性菌或酵母的免疫应答或者在无免疫应答的或免疫耗竭的个体包括 AIDS 患者中提供免疫应答)。抗体的被动转移在本领域是已知的并且可通过任何已知方法完成。按照一种方法，本发明的直接抗其缀合物的抗体在具有免疫能力的宿主(“供体”)动物中生成、从所述宿主动物中获取并输注到接受的个体。例如，可采用人类供体生产对本发明的所述多糖-蛋白缀合物反应的抗体。然后将所述抗体以治疗学或预防学上的有效量给予需要治疗的人类受者，从而使所述接受者具有对细菌的抵抗力，由所述多糖成分激发产生的抗体结合细菌。(参见 Grossman, M.和 Cohen, S. N., “基础和临床免疫学”，第 7 版，(Stites, D. P.和 Terr, A. T.编辑，Appleton & Lange 1991)58 章“免疫”。)

10

15

在某些情况下，本发明使用的所述多糖可以诱导与其它病原体交叉反应的抗体，因此具有抗这些其它细菌感染的保护能力。

20

F. 诊断试剂盒

在另一实施方案中，可以诊断试剂盒提供本发明的所述 CPS 或其衍生物或其片段以指示直接抗细菌、酵母或癌细胞的抗体的存在。存在这类抗体表明以前曾暴露于所述病原体，并预测对感染有抵抗力的个体。所述诊断试剂盒可包含至少一种本发明的所述 CPS 或其衍生物或其片段(单独或与蛋白缀合)和合适的试剂，当所述修饰的 CPS 或衍生物或片段与含有直接抗革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、

25

酵母或癌细胞或癌组织的抗体的样本混合时，所述试剂用于检测抗体反应。抗体反应可通过本领域中描述的任何方法鉴定，包括但不限于 ELISA 检测。这样的了解是重要的并能避免不必要的免疫接种。

5 或者，所述诊断试剂盒可进一步包含固体载体或磁珠或塑料基质和至少一种本发明的所述 CPS 或其衍生物或其片段。

在某些情况下，优选标记所述 CPS 或衍生物或片段。标记物是本领域中已知的。例如，标记物包括但不限于放射性、化学发光、生物发光、发光或其它方便分析的鉴定“标记”。可将体液或组织样本(如血液、血清、唾液)收集和纯化并加样于所述诊断试剂盒。所述 CPS、衍生物或片段可以是纯化的或非纯化的，可由分子混合物组成。

15 固体基质是本领域已知的，并可使用包括但不限于试管、珠、微粒、浸-棒(dip-sticks)、平板等形状的聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚碳酸酯或任何固体可塑性物质。其它基质包括但不限于膜、96 孔微量滴定板、试管和 Eppendorf 管。通常这种基质含有配体结合剂能够附着于其上的任何表面或者其自身提供配体附着位点的表面。

20 本文涉及的所有公开出版物、专利和文章通过引用特别结合到本文中。给出以下实施例以说明本发明，但绝不能解释为用其限制本发明的范围。本领域技术人员将认识到可对其作许多修改和替代而没有偏离本发明的精神和权限范围。

实施例 1

β -丙酰胺基-联多糖-蛋白载体缀合物的制备

25 下述非限制性实施例描述了一系列与临床相关的抗肺炎链球菌(14 型)、III 型和 II 型 B 组链球菌(GBS)以及大肠杆菌 K1 的多糖-蛋白缀合物疫苗的制备。用于本实施例的所有上述多糖是在一个或多个糖基残基中含有 N-乙酰基基团糖胺聚糖，所述糖基残基是其结构重复单位组分。

A. 14 型肺炎球菌多糖的解聚作用

为增加所述多糖的溶解性, 首先通过声处理将其部分解聚。将 200 mg 的 14 型肺炎球菌多糖 (批号 2020510, 美国典型培养物保藏中心) 溶于 20 ml 的 PBS 中并用 Branson Sonifier Model 450 在 0℃ 进行声处理。透析所得多糖并冻干, 然后通过用磷酸缓冲盐溶液(PBS)平衡的 superdex 200 柱子筛分。合并峰部分, 然后用截留分子量(MWCO)为 3,500 的 Spectra/Por[®] Membrane 对去离子(d.i.)水透析。冻干后获得 157.5 mg 的固体产物。用具有 miniDAWN 的 SEC-MALLS (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA) 测定所述声处理的多糖的平均分子量约为 50,000。

B. 14 型肺炎球菌多糖的去-N-乙酰化

将 100 mg 筛分的 14 型肺炎球菌多糖溶于 10 ml 的 NaOH(2N)中, 然后向该反应混合物中加入 10 mg 的 NaBH₄。将该混合物在 100℃ 下加热 1 小时, 然后冷却至室温。将该 N-去乙酰化的组分用截留分子量(MWCO)为 3,500 的 Spectra/Por[®] Membrane 对去离子(d.i.)水透析并冻干, 获得 84 mg 的白色固体。用 H¹-NMR 在 500 MHz 处测定分析所述 N-去乙酰化的多糖, 发现其含有少于 5%残余 N-乙酰基。

C. N-去乙酰化的 14 型肺炎球菌多糖的 N-丙烯酰化

将 84 mg 的 N-去乙酰化的 14 型肺炎球菌多糖溶于 4.2 ml 的去离子水中。在冰浴中用 2N 的 NaOH 将该溶液的 pH 调节至 10。然后加入 420 μl 的 1:1(v/v)的丙烯酰氯: 二噁烷并用 2N 的 NaOH 调节 pH 至 11。在 pH 11 时使其再反应 1 小时以确保完全水解因为 O-酰化作用形成的酯。透析溶液并冻干, 获得 42 mg 的干粉。在用 H¹-NMR 在 500 MHz 处测定分析后发现该多糖有超过 95%的 N-丙烯酰化。

D. N-丙烯酰化的 14 型肺炎球菌多糖与破伤风类毒素单体的缀合

将 22 mg 的 N-丙烯酰化的 14 型肺炎球菌多糖溶于 1.1 ml 的碳酸钠/重碳酸钠缓冲液(pH 9.5)中。向该反应混合物中加入 22 mg 的破伤风类毒素单体。将该反应混合物在 37℃ 孵育过夜。用配有 superose 12 柱子装备的 Biologic system(Bio-Rad)测定分析缀合进程。用 280 nm 处的紫外吸光度监测，以柱空隙体积洗脱的峰进行性升高说明多糖与破伤风类毒素的缀合。缀合完成后，用 0.1N 的 HCl 中和该溶液至 pH 7，然后对 PBS 透析。将该缀合物通过 1.6 × 60 cm 的 Superdex 200 PG 柱(Pharmacia)过柱纯化并用含有 0.01% 硫汞撒的 PBS 洗脱。合并相当于空隙体积峰的部分。用 Dubois 等(51)的硫酸苯酯法和 Bradford(9)的 Coomassie 法评估所述缀合物中的碳水化合物和蛋白含量。

将同样方法用于 II 型、III 型 GBS 以及大肠杆菌 K1 和脑膜炎球菌 C 型多糖。这些多糖各自的反应条件列于下表。

表 1

E. II 型和 III 型 GBS 多糖的去-N-乙酰化

	PS 大小* (kD)	多糖 (mg)	NaOH	NaBH ₄	温度	反应时间	产量
GBS II	250	63 mg	6 ml	12 mg	110℃	6 小时	63 mg
GBS III	110	50 mg	5 ml	10 mg	110℃	6 小时	55 mg

* 用 SEC-MALLS 测定

表 2

II 型和 III 型 GBS 多糖的 N-丙烯酰化

	多糖量 (mg)	去离子水	1:1(v/v) 丙烯酰氯: 二噁烷	产物
GBS II	60	3 ml	300 µl	60 mg
GBS III	55	2.75 ml	275 µl	55 mg

表 3

II 型和 III 型 GBS 多糖与破伤风类毒素单体的缀合

	多糖量 (mg)	破伤风类 毒素(mg)	碳酸钠/重碳酸钠 缓冲液(pH 9.5)	温度	孵育时间
GBS II	10	10	0.5 ml	37℃	过夜
GBS III	10.52	9.52	0.5 ml	37℃	过夜

F. K1 多糖的去-N-乙酰化

5 将 300 mg 的 K1 多糖溶于 15 ml 2.0N NaOH 溶液(其中加有 150 mg 的氢硼化钠)中。将该溶液在 110℃ 下加热 6 小时, 冷却至室温并用 20 倍体积的去离子水稀释。用去离子水通过 Amicon YM3 膜的渗滤后, 冻干该溶液得到 255 mg 的 N-去乙酰化的 K1 多糖产物。用 H^1 -NMR 在 500 MHz 处测定证实完全 N-去乙酰化。

10

G. K1 多糖的 N-丙烯酰化

向在冰浴中冷却的含有 250 mg 的去-N-乙酰化的 K1 多糖的 10 ml 去离子水溶液中滴加丙烯酰氯(Aldrich, Milwaukee, WI)溶液, 所述丙烯酰氯溶液通过将 1 ml 丙烯酰氯与 1 ml 二噁烷混合制得。通过加入 15 2N 的氢氧化钠溶液将该溶液的 pH 维持在 7.0 到 10.5 之间。完成滴加后, 所述 pH 升至 13 并在室温下维持在 12.9 到 13.1 之间 1 小时。滴加 1N HCl 调节该溶液的 pH 至 9.5。将该溶液用去离子水通过搅拌池(stirrcell)中的 Amicon YM3 膜的渗滤。将所述残留物冻干至干燥, 并将该物质(N-丙烯酰基 K1 多糖)保存于-20℃ 冰箱的干燥器中。H¹- 20 NMR 在 500 MHz 处指示在反应期间发生了完全的 N-丙烯酰化。

H. β -丙酰胺基-联 K1-rPorB 缀合物(K1-rPorBI)

将 0.3 ml 含有 8.4 mg 的 N-丙烯酰 K1 多糖和 4.0mg 的重组脑膜炎奈瑟氏球菌 PorB 的 0.2 M 硼酸盐、0.05% ZwittergenTM3,14(Boehring

mannhein)溶液(pH 9.5)在 37℃ 孵育 3 天。通过 Superdex 200 制备级柱的尺寸排阻层析纯化该缀合物,并用含 0.01% 硫汞撒的 PBS 洗脱。合并位于或接近于柱子的空隙体积处洗脱的在 uv-280 nm 活性信号的部分并保存于冰箱中。分别通过间苯二酚和考马斯蛋白分析法测定分析该缀合物中的唾液酸和蛋白含量。

I. 硫醇化 rPorB 的制备

向 1 ml rPorB 膜孔蛋白浓度为 10 mg/ml 的溶液(含有 0.25 M 的氯化钠和 0.05% zwittergent 3-14 的 0.25 M HEPES 缓冲液 pH, 8.5)中加入 0.2 ml 的 0.05 M 的 N-琥珀酰亚胺基 3-[2-吡啶基二硫代]丙酸盐溶液。充分混匀该溶液并将其在室温下放置 1 小时。向该溶液中加入 0.06 ml 溶于相同缓冲液中的 1 M 二硫苏糖醇溶液。再次充分混匀该溶液并将其在室温下放置 2 小时。用 1.3 ml 含有 0.25 M 氯化钠和 0.05% zwittergent 3-14 的 pH 为 7.0 的 0.25 M HEPES 缓冲液稀释该溶液并将其上样到用相同缓冲液预先平衡的 Pharmacia PD-10 脱盐柱上。用相同缓冲液洗脱该柱,收集洗出液并用 Amicon Centricon 30 浓缩器以 5,000 RPM 浓缩 1 小时。收集所述残余物并测定蛋白浓度。

H. N-丙烯酰化的 K1-S-rPorB 缀合物(K1-S-PorB)的制备

向上述的浓度为 25 mg/ml 的 0.17 ml 的硫醇化 rPorB 溶液中加入 9 mg 的 N-丙烯酰化的 K1 多糖。充分混匀该溶液并将其在 37℃ 烘箱中孵育 18 小时。将该溶液通过 Supedex 200 柱(Pharmacia)纯化,以 PBS 作洗脱液。合并于或接近于柱子的空隙体积处洗脱的 uv-280 nm 活性部分。分析显示该缀合物含有 25 µg/ml 的多糖和 188 µg/ml 的蛋白。

I. N-丙烯酰化的 GCMP-S-rPorB 缀合物(GCMP-S-rPorB)的制备

同样,用与上述 N-丙烯酰化的 K1-S-rPorB 缀合物的制备方法相似的方法制备 N-丙烯酰化 GCMP-S-rPorB,发现该缀合物含有 43

μg/ml 的多糖和 200 μg/ml 的蛋白。

表 4
上述缀合物的分析数据

	蛋白浓度 μg/ml	多糖浓度 μg/ml	缀合物中的多糖百 分比
Pn14-TT(3)	547	293(1)	35
GBS II-TT(3)	377	160(2)	30
GBS III-TT(3)	365	115(2)	24
K1-rPorB I(3)	147	17(2)	10
K1-rPorB II(4)	406	41(2)	9
K1-S-rPorB(3)	188	25(2)	12
GCMP-S-rPorB(3)	200	43(2)	18

- (1)总碳水化合物的 Dubois 分析
- 5(2)间苯二酚唾液分析
- (3)通过 N-丙烯酰化多糖与相应载体蛋白的直接偶联制得
- (4)通过高碘酸氧化的 N-丙烯酰化 K1 PS 与 rPorB 的还原胺化作用制备的对照缀合物

10

实施例 2

β-丙酰胺基-联多糖-蛋白载体缀合物的免疫原性和效能
所述缀合物在小鼠中的临床前评估

15

免疫分析：用 ELISA 测定每种多糖缀合物的血清抗体。通过还原性胺化作用制备用于 ELISA 分析中的人血清白蛋白(HSA)(Sigma, St Louis, MO)缀合物。向 HAS 中加入氧化的多糖，然后用 NaCNBH₃进行还原性胺化作用。通过凝胶过滤层析分离该缀合物，并将其冻干保存于-70℃。用 ELISA 按下述测定多糖-特异性抗体滴度。用溶于 PBS(0.01 M 磷酸钠，0.15 M 氯化钠，pH 7.5)中的 PS-HSA 缀合物以每孔 0.25 μg(100 μl/每孔)包被 96 孔聚苯乙烯平底微量滴定板

20

(NUNC Polysorb)(Nunc, Naperville, IL)，在 37℃ 孵育 1 小时，随后用 PBS-Tween(溶于 PBS 的 0.05%(v/v)Tween 20)洗涤(5 次)。在室温下进

行随后所有的孵育。将 PBS-Tween 用于所有需要的洗涤。然后对于 IgG ELISA 用 PBS-BSA(溶于 PBS 的 0.5%(w/v)牛血清白蛋白)、或对于 IgM ELISA 中用 0.1%(w/v)Carnation 脱脂奶粉以每孔 0.15 ml 封闭所述包被板 1 小时, 随后洗涤。在板中以每孔 100 μ l 稀释血清 2 倍, 一式二份, 并孵育 1 小时, 随后洗涤。以每孔 100 μ l 加入抗体缀合物(过氧化物酶标记的羊抗小鼠抗体)(Kirkegaard & Perry Lab, Gaithersburg, MD)并孵育 30 分钟, 随后洗涤。以每孔 0.05 ml 加入 1:1 的染料和底物溶液(Kirkegaard & Perry TMB)和过氧化物并孵育 10 分钟。然后用 1 M H_3PO_4 以每孔 0.05 ml 终止过氧化物酶反应, 并将该板置于 Molecular Devices Emax 微板读数仪(Molecular Devices, Menlo Park, CA)上读取波长为 450 nm 的读数, 以 650 nm 作参考波长。测定几个无血清对照孔的本底吸光度并平均每板的数值。对于每个血清稀释度, 减去本底吸光度平均值, 然后平均复孔的血清吸光值。将改良的 Scatchard 作图用于随后的数据分析, 其中将吸光度(y 轴)对吸光度乘以稀释度的倒数(x 轴)(参考)作图。在平衡和过量抗体条件下, 获得每种血清稀释系列的直线; 根据这条线可推断 x 轴以测定抗体滴度。为对所有血清标准化提供参考, 将板与板间和天与天间的变异减少到最小, 将预先测定抗体滴度的阳性对照血清用于每块板。这些分析的结果示于表 5、6 和 7。

20 **调理素吞噬细胞试验(OP):** 应用人早幼粒细胞白血病 HL-60 细胞系(ATCC 号 CCL 240)的体外调理素吞噬杀伤试验测试小鼠抗血清对链球菌 B(GBS)和肺炎球菌缀合物的调理活性。简要地说, 将 200 cfu 的 III 型 GBS M781 菌株细胞或 14 型肺炎球菌株与等体积的血清抗体混合并在 35 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中振摇孵育 15 分钟。将幼兔补体和
25 在 90 mM 的 DMF(N,N-二甲基甲酰胺)存在下培养 5 天的 HL-60 细胞 (5×10^5)加入该混合物中并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下振摇孵育 1 小时。取出一等份用于培养物的定量。通过推断相当于 50%存活细菌的抗体稀释度测定滴度。这些试验中 14 型肺炎球菌缀合物的结果示于表 5 而 III 型 GBS

缀合物的结果示于表 6。

血清杀菌试验(SBA): 根据杀伤 50%靶细菌的杀菌滴度或稀释度的倒数测定抗体-依赖补体介导的杀菌活性。首先将所有血清中的补体在 56℃ 孵育 30 分钟。然后用 GBSS 在无菌的 96 孔 U 型底的微量滴定板(Sigma)中对每种血清进行 2 倍系列稀释, 每孔终体积为 50 μl。用工作浓度的 GBM 细菌(15 血清型菌株, 44/76)或 C 组脑膜炎球菌 C11 参考菌株按 1:1 稀释幼兔血清补体(Pel-Freez, Brown Deer, WI)并将其在含有所述稀释血清的每孔中加入 50 μl, 每孔反应混合物的终体积为 100 μl。将这种含有 50% 血清(加热灭活并稀释)、25% 兔血清补体和 25% 细菌(工作浓度)的反应混合物在 37℃、5% CO₂ 的潮湿培养箱中的微量滴定板振摇器(LKB-Wallac; pharmacia Biotech)上快速振摇孵育 60 分钟。

然后将所有孔中的培养物以 30 μl/板铺于巧克力琼脂平板上。时间为零的(time zero)细菌样本也同样铺于平板上。象前述一样将所有平板孵育过夜。然后用 Imaging Products International(Chantilly, VA)的自动集落计数器计数菌落形成单位(cfu), 每板均取三个读数的平均值。直接从绘制的图上读取 50% 杀伤的稀释度的倒数或滴度, 所述图中 x 轴代表相当于稀释度的倒数的 10 的对数而 y 轴代表存活百分率。这些试验的结果示于表 7。

表 5:

14 型肺炎球菌-破伤风类毒素缀合物的免疫原性

疫苗/佐剂	ELISA 第 0 天	ELISA 第 28 天	ELISA 第 38 天	ELISA 第 59 天	OP 第 59 天
对照/盐水	<50	2,250	29,000	32,600	3,100
对照/Alum	<50	18,200	99,000	265,000	25,000
Pn14-TT/盐水	<50	4,600	89,000	59,200	3,900
Pn14-TT/Alum	<50	27,000	185,000	251,000	26,000
PBS/Alum	<50	<50	<50	<50	<50

对照疫苗是通过还原性胺化作用制备的 14 型多糖-破伤风类毒素缀合物。Pn14-TT 缀合物是 N-丙烯酰化 14 型肺炎球菌多糖和破伤风类毒素之间的直接缀合的产物。

5 本研究中将 6-8 周龄的 CD1 小鼠(Charles River Laboratory)分组(一组 10 只), 在第 0、28 和 38 天皮下注射给予 2.0 μg 多糖缀合物。在第 0、28、38 天从动物取血并于第 59 天放血。应用通过还原性胺化作用制备 Pn 14 多糖-HSA 缀合物进行 ELISA。报告于表 5 的 ELISA 滴度代表总 IgG。所报告的 OP 滴度是抗 14 型肺炎球菌株的滴度。

10

表 6:

III 型 GBS 缀合物的免疫原性

疫苗/佐剂	ELISA 第 0 天	ELISA 第 21 天	ELISA 第 42 天	ELISA 第 52 天	OP 第 52 天
缀合物对照/Alum	<50	900	1,800	3,000	170
GBS III-TT/Alum	<50	500	8,500	25,000	3,100
PBS/Alum	<20	<20	<20	<20	<20

对照缀合物疫苗是 III 型 GBS -破伤风类毒素缀合物, 该缀合物通过高碘酸盐氧化的 III 型 GBS 多糖和破伤风类毒素的还原性胺化作用制得。III 型 GBS-TT 缀合物是 N-丙烯酰化 III 型多糖和破伤风类毒素之间的直接缀合的产物。

15 本研究中将 6-8 周龄的 CD1 小鼠(Charles River Laboratory)分组(一组 10 只), 在第 0、21 和 42 天皮下注射给予 2 μg 多糖缀合物。在第 0、21、42 天从小鼠取血并于第 52 天放血。应用与人血清白蛋白缀合的 III 型 GBS 多糖测定 ELISA 滴度, 示于表 6 的滴度代表抗 III 型多糖的总 IgG。

20

表 7:
大肠杆菌 K1 缀合物的免疫原性

疫苗/佐剂	ELISA 第 0 天	ELISA 第 28 天	ELISA 第 42 天	ELISA 第 52 天	SBA 第 52 天
第 1 批 K1-rPorB II/Alum 对照	<50	1,000	39,000	106,000	450
第 2 批 K1-rPorB II/Alum 对照	<50	450	124,000	250,000	1,000
第 1 批 K1-rPorB I/Alum	<50	220	27,000	96,000	810
第 2 批 K1-rPorB I/Alum	ND	ND	24,000	71,000	3,800
第 1 批 K1-S-rPorB/Alum	ND	ND	45,000	114,000	2,600
第 2 批 K1-S-rPorB/Alum	ND	ND	41,000	94,000	1,700
PBS/Alum	<50	<50	<50	<50	<50

对照疫苗(K1-rPorB II)是高碘酸盐氧化的 N-丙烯酰化 K1 多糖和破伤风类毒素之间的还原性胺化作用的产物。K1-rPorB I 疫苗是 N-丙烯酰化 K1 多糖和破伤风类毒素的直接缀合的产物。K1-S-rPorB 是硫醇化膜孔蛋白 rPorB 和 N-丙烯酰化 K1 多糖的直接缀合产物。

本研究中将 Charles River Laboratory 的 CD1 小鼠(6-8 周龄)分组(一组 10 只), 在第 0、28 和 42 天进行腹腔免疫。在第 0、28、42 天从小鼠取血并于第 52 天放血。应用与人血清白蛋白缀合的 N-丙烯酰化 K1 多糖测定 ELISA 滴度。示于表 7 的滴度代表抗修饰的 N-丙烯酰化 K1 多糖的总 IgG。抗 15 血清型 B 组脑膜炎奈瑟氏球菌 H 44/76 菌株的血清抗杀活性(SBA)(第 52 天放血)也示于表 7。

表 8:
GCMP 缀合物的免疫原性

疫苗/佐剂	ELISA , 第 38 天	SBA , 第 38 天
GCMP-S-rPorB/AlumLot1	44,000	2,100
GCMP-S-rPorB/AlumLot2	43,000	2,800
PBS/Alum	<50	<50

5 GCMP-S-rPorB 是 N-丙烯酰化的 C 组脑膜炎球菌多糖(GCMP)和
硫醇化 rPorB 之间的直接缀合产物。在这些动物试验中将 HSD 的远
系繁殖的 Swiss Webster 雌性小鼠(6-8 周龄)分组(一组 10 只), 在第 0
和 28 天皮下注射每剂量 2 μ g 多糖缀合物。在第 38 天将动物放血至
死。应用与人血清白蛋白缀合的 GCMP 测定对 C 组多糖的 ELISA 滴
度。应用脑膜炎球菌 C11 参考菌株获得血清杀菌滴度。

10

参考文献

1. Anderson, P., G. Peter, R.B. Johnson, L.H. Wetterlow 和 D.H. Smith. 1972. 用 b 型流感嗜血菌的荚膜抗原多聚磷酸核糖酯免疫接种人群。 J.Clin.Invest. 51:39-44.
- 5 2. Avery, O.T.和 W.F. Goebel. 1931. 缀合的糖-蛋白 V 的化学-免疫学研究。 3 型肺炎球菌的荚膜多糖与外源蛋白结合制备的抗原的免疫学特异性。 J.Exp.Med. 54:437-447.
3. Baker, C.J.和 D.L. Kasper. 1985. B 组链球菌疫苗。 Rev.Inf.Dis. 7:458-467.
- 10 4. Baker, C.J., M.A. Rench, M.S. Edwards, R.J. Carpenter, B.M. Hays 和 D.L. Kasper. 1988. 用 B 组链球菌的多糖疫苗免疫接种孕妇。 N.Engl.J.Med. 319:1180-1185.
5. Baker, C.J., M.A. Rench 和 D.L. Kasper. 1990. 婴儿感染侵袭性 B 组链球菌的妇女对 III 型多糖的应答。 New Engl.J.Med. 15 322:1857-1860.
6. Baltimore, R.S., D.L. Kasper 和 J. Vecchitto. 1979. 小鼠对 III 型 B 组链球菌的保护性测试。 J.Infect.Dis. 140:81-86.
7. Bednar, B.和 J.P. Hennessey. 1993. 对从肺炎链球菌制备的荚膜多糖的分子大小的分析。 Carbohyd.Res. 243:115-130.
- 20 8. Beri, R.G., J. Walker, E.T. Reese 和 J.E. Rollings. 1993. 通过联合大小排阻层析和多角度激光光散射技术特征鉴定壳聚糖。 Carbohyd.Res. 238:11-26.
9. Bradford, M.M.. 1976. 利用蛋白-染料结合的原理定量毫克量蛋白的快速敏感方法。 Analyt. Biochem. 72:248-254.
- 25 10. D'Ambra, A.J., J.E. Baugher, P.E. Concannon, R.A. Pon 和 F. Michon. 1997. b 型流感嗜血菌荚膜多糖片段的克分子-质量(molar-mass)的直接和间接分析方法。 Anal.Biochem. 250(2):228-236.
11. Dick, W.E., Jr.和 M. Beurret. 1989. 细菌碳水化合物抗原的

糖缀合物, 第 48-114 页, 复合疫苗对微生物学和免疫学的贡献。 J.M. Cruse 和 R.E. Lewis, Jr., (编辑)S. Karger, Basel.

12. Dillon, H.C., Jr., S. Khare 和 B.M. Gray. 1987. B 组链球菌的携带与疾病: 6 年前瞻性研究。 J.Pediat. 110:31-36.

5 13. Goebel, W.F. 和 O.T. Avery. 1931. 缀合的糖-蛋白 IV 的化学-免疫学研究。 3 型肺炎球菌的可溶性特异性物质的 p-氨基基醚的合成及其与蛋白的结合。 J.Exp.Med. 54:431-436.

14. Gold, R., M.L. Lepow, I. Goldschneider, T.L. Draper 和 E.C. Gotschlich. 1975. A 组和 C 组脑膜炎球菌多糖疫苗在婴幼儿中的临床评估。 J.Clin.Invest. 56:1536-1547.

15 15. Gold, R., M.L. Lepow, I. Goldschneider 和 E.C. Gotschlich. 1977. 婴幼儿对 A 组和 C 组脑膜炎奈瑟氏球菌多糖疫苗的免疫应答。 J.Infect.Dis. 136S:S31-S35.

16. Gold, R., M.L. Lepow, I. Goldschneider, T.F. Draper 和 E.C. Gotschlich. 1978. 在婴儿 2、4 和 6 月时给予三剂 A 组脑膜炎奈瑟氏球菌疫苗的的抗体应答。 J.Infect.Dis. 138:731-735.

17. Hennessey, J.P., B. Bednar 和 V. Manam. 1993. b 型流感嗜血菌荚膜多糖的分子大小分析。 J.Liq.Chromat. 16:1715-1729.

18. Howard, J.G., G.H. Christie, B.M. Courtenay, E. Leuchars 和 A.J.S. Davies. 1971. 麻痹的免疫学研究VI: 对 III 型肺炎球菌多糖的胸腺非依赖性耐受和免疫性。 Cell. Immunol. 2: 614-626.

19. Jennings, H.J., E. Katzenellenbogen, C. Lugowski 和 D.L.Kasper. 1983. Ia 型和 Ib 型 B 组链球菌的天然多糖抗原的结构。 Biochemistry 22:1258-1263.

20 20. Jennings, H.J., K.-G. Rosell 和 D.L. Kasper. 1980. III 型 B 组链球菌的天然多糖抗原的结构测定和血清学。 Can.J.Biochem. 58:112-120.

21. Jennings, H.J., K.-G. Rosell 和 D.L. Kasper. 1980. Ia 型 B 组

链球菌的天然多糖抗原的结构和血清学。 *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* 77:2931-2935.

22. Jennings, H.J., K.-G. Rosell, E. Katzenellenbogen 和 D.L. Kasper. 1983. II 型 B 组链球菌的荚膜多糖抗原的结构测定。
5 *J.Biol.Chem.* 258:1793-1798.

23. Jennings, H.J.和 R.K. Sood. 1994. 用作人类疫苗的合成复合糖。 第 325-371 页。 Y.C. Lee 和 R.T. Lee, 新复合糖: 制备和应用。 Academic Press, New York.

24. Kasper, D.L., C.J. Baker, R.S. Baltimore, J.H. Crabb, G. Schiffman 和 H.J. Jennings. 1979. 免疫测定人对 III 型 B 组链球菌的免疫特异性。 *J.Exp.Med.* 149:327-339。
10

25. Knobloch, J.E.和 P.N. Shaklee. 1997. 通过大小排阻层析法和多角度激光光散射测定低分子量肝素的绝对分子量。 *Anal.Biochem.* 245:231-241.

26. Lancefield, R.C.. 1933. 其它组别溶血性链球菌的人类血清学差异。 *J.Exp.Med.* 57:571-595。
15

27. Lancefield, R.C.. 1938. 溶血性链球菌分类用微-沉淀素技术以及产生抗原的改良方法。 *Proc.Soc.Exp.Biol. and Med.* 38:473-478.

28. Lancefield, R.C., M. McCarty 和 W.N. Everly. 1975. 直接针对 B 组链球菌的小鼠-保护性复合抗体: 特别参照抗蛋白抗原有效的抗体。 *J.Exp.Med.* 142:165-179。
20

29. Madoff, L.C., L.C. Paoletti, J.Y. Tai 和 D.L. Kasper. 1994. 用 III 型 B 组链球菌多糖- β C 蛋白缀合物母体免疫小鼠诱导产生针对多种血清型的保护性抗体。 *J.Clin.Invest.* 94:286-292.

30. Marques, M.B., D.L. Kasper, A. Shroff, F. Michon, H.J. Jennings 和 M.R. Wessels. 1994. 多糖-蛋白缀合物疫苗诱导产生的针对 B 组链球菌 B 组多糖的抗体的功能活性。 *Infect.Immun.* 62:1593-1599。
25

31. Mäkelä, P.R.H., H. Peltola, H. Kayhty 等 1977. A 组脑膜炎奈

瑟氏球菌和 b 型流感嗜血菌的多糖疫苗：在芬兰的现场试验。
J.Infect.Dis. 136:S43-50.

32. Michon, F., J.R. Brisson, A. Dell, D.L. Kasper 和 H.J. Jennings.
1988. B 组链球菌多触角的组特异性多糖。 Biochem. 27:5341-5351.

5 33. Peltola, A., H. Käyhty, A. Sivonen 和 P.R.H. Mäkelä. 1977. b
型流感嗜血菌荚膜多糖疫苗在儿童的应用：在芬兰对 3 个月-5 岁儿
童的 100,000 疫苗的双盲现场研究。 Pediatrics 60:730-737.

34. Peltola, A., P.R.H. Mäkelä, H. Jousimies 等。 1977. A 组脑膜
炎球菌疫苗在 3 个月-5 岁儿童的临床效应。 N.Engl.J.Med. 297:686-
10 691.

35. Reuter, G.和 R. Schauer. 1994. 唾液酸的测定。第 168-199
页。 W.J. Lennarz 和 G.W. Hart, 酶学方法。第 230 卷。糖生物学技术。
Academic Press, New York.

36. Robbins, J.B.和 R. Schneerson. 1990. 多糖-蛋白缀合物：新
15 一代疫苗。 J.Infect.Dis. 161:821-832.

37. Smith, A.L.和 J. Haas. 1991. 新生儿细菌性脑膜炎。第 313-
333 页。 W.M. Scheld, R.J. Whitley 和 D.T. Durack, 中枢神经系统感
染。 Raven Press, Ltd., New York.

38. Tsunashima, T., K. Moro, B. Chu 和 T.-Y.Liu. 1978. 光-散射
20 光谱法特征鉴定 C 组脑膜炎球菌多糖 III: 分子量、转动半径和平动
扩散系数的测定。 Biopolymers 17:251-265.

39. von Hunolstein, C., L. Nicolini, S.D'Ascenzi, C. Volpe, G.
Alfarone 和 G. Orefici. 1993. 不同生长条件下无乳链球菌产生的唾
液酸和生物量。 Appl.Microbiol.Biotechnol. 38:458-462.

25 40. Wessels, M.R., W.J. Benedi, H.J. Jennings, F. Michon, J.L.
DiFabio 和 D.L. Kasper. 1989. IV 型 B 组链球菌荚膜多糖的分离和
特征鉴定。 Infect.Immun. 57:1089-1094.

41. Wessels, M.R., J.L. DiFabio, V.J. Benedi 等。 1991. V 型 B

组链球菌荚膜多糖的结构测定以及免疫化学特征鉴定。 J.Biol.Chem. 266:6714-6719.

42. Wessels, M.R., L.C. Paoletti, D.L. Kasper 等。 1990。 针对 III 型 B 组链球菌的多糖-蛋白缀合物疫苗对动物的免疫原性。
5 J.Clin.Invest. 86:1428-1433.

43. Wessels, M.R., L.C. Paoletti, A.K. Rodewald 等。 1993。 用 Ia 型多糖-破伤风类毒素缀合物疫苗刺激产生针对 Ia 型和 Ib 型 B 组链球菌的保护性抗体。 Infect.Immun. 61:4760-4766.

44. Wessels, M.R., V. Pozsgay, D.L. Kasper 和 H.J. Jennings.
10 1987。 III 型 B 组链球菌荚膜多糖的寡糖重复单位的结构和免疫化学: III 型 B 组链球菌荚膜多糖抗原的改进结构。 J.Biol.Chem. 262:8262-8267.

45. Wyle, S.A., M.S. Artenstein, B.L. Brandt 等。 1972。 人对 B 组脑膜炎球菌多糖疫苗的免疫应答。 J.Infect.Dis. 126:514-522.

46. Romanowska, A., S.J. Meunier, F.D. Tropper, C.A. LaFerriere
15 和 R. Roy。 1994。 迈克尔加成合成的新型糖蛋白。 酶学方法。 Vol.242:90-101.

47. Orellana, A.和 C.B. Hirshberg。 1994。 肝素-生成细胞系的糖胺聚糖 N-乙酰氨基葡萄糖基 N-去乙酰基酶/N-磺基转移酶的分子克隆和
20 表达。 J.Biol.Chem. 第 269 卷, 第 3 期, 第 2270-2276, 页。

48. Cheung, W-F., I. Eriksson, M. Kusche-Gullberg, U. Lindahl 和 L. Kjéllén。 1996。 小鼠肥大细胞瘤的氨基葡萄糖基 N-去乙酰基酶/N-磺基转移酶在人肾脏 293 细胞中的表达导致硫酸乙酰肝素的 N-硫酸化增加。 Biochem 35:5250-5256.

49. Kusche-Gullberg, M., I. Eriksson, D. Sandback Pikas 和 L. Kjellen。 1998。 两个硫酸乙酰肝素的氨基葡萄糖基 N-去乙酰基酶/N-磺基转移酶基因在小鼠中的鉴定和表达。 J.Biol.Chem. 第 273 卷,
25 No.19:11902-11907.

50. Finke, A., D. Bronner, A.V. Nikolaev, B. Jann 和 K. Jann.
1991. 典型 II 组荚膜多糖大肠杆菌 K5 多糖的生物合成: 体外聚合和
产物的特征鉴定. J.Bacteriology 173, No.13:4088-4094.

51. Dubois, M 等. 1965. 糖和相关物质的比色测定方法. Analytic.
5 Chem. Vol.28:350-366.

