

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

A61K 39/385

A61K 31/70



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 91109424.5

[45]授权公告日 1997年2月19日

[11] 授权公告号 CN 1034054C

[22]申请日 91.9.27 [24]颁证日 96.9.28

[21]申请号 91109424.5

[30]优先权

[32]90.9.28 [33]US[31]07 / 590,649

[73]专利权人 美国氰胺公司

地址 美国新泽西州

[72]发明人 马西莫·波罗

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 张恒康

审查员 周 莉

权利要求书 2 页 说明书 38 页 附图页数 4 页

[54]发明名称 改良的寡糖结合菌苗的制备方法

[57]摘要

本发明涉及制备寡糖结合菌苗的改良方法。本发明的另一方面是制备对荚膜多糖引起的专一特异性和同种免疫反应的寡糖菌苗。本发明的具体实施方案提供这样的菌苗，它能诱导对肺炎球菌 (*streptococcus pneumoniae*) 一些流行的血清型的免疫力。

权 利 要 求 书

1. 制备寡糖和载体蛋白共价结合物的方法，其特征在于，包括以下步骤：

(i) 在甲硼烷吡啶存在下，在 25—100℃ 温度下，将带有末端还原基团的寡糖与二氨基乙烷反应以发生还原胺化；

(ii) 将(i) 的氨化的寡糖产物和含两个官能团的分子反应，两个官能团中一个能和激活的寡糖的末端基团反应，另一个能和所述的载体蛋白反应；

(iii) 将(ii) 的激活的寡糖产物和所述载体蛋白反应，以发生结合。

2. 按权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中还原胺化是在约 100 °C 的温度下进行的。

3. 按权利要求 1 所述的方法，其特征在于，和甲硼烷吡啶的反应是在约 50°C 的温度下进行的。

4. 按权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中步骤(ii) 的含两个官能团的分子为二酯。

5. 按权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤(ii) 的含二个官能团的分子为己二酸的二酯或丁二酸的二酯。

6. 按权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中寡糖来自于肺炎球菌 (streptococcus pneumoniae) 荚膜多糖。

7. 按权利要求 6 所述的方法，其特征在于，其中寡糖来自具有从 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 和 33F 型所组成的一组中选出的精选的血清型的肺炎球菌 (streptococcus pneumoniae) 。

8. 按权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中寡糖来自从流

嗜血杆菌 (Haemophilus influenzae)、奈瑟氏脑膜炎双球菌 (Neisseria meningitidis)、绿脓假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)、伤寒沙门氏菌 (Salmonella typhi)、埃希氏大肠杆菌 (Escherichia coli)、Streptococcus mutans、新型隐球菌 (Cryptococcus neoformans)、肺炎杆菌 (Klebsiella pneumoniae) 和金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) 所组成的一组中选出的细菌的荚膜多糖。

9. 按权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 其中载体蛋白为 CRM₁₉₇。

10. 按权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 其中载体蛋白选自沙门氏菌属 (Salmonella) 鞭毛蛋白、嗜血杆菌 (Hemophilus) 纤毛、嗜血杆菌 15 KDa、28—30 KDa 或 40 KDa 膜蛋白、埃希氏大肠杆菌 (Escherichia coli) 热不稳定肠毒素 LTB、白喉毒素、破伤风毒素, 霍乱毒素、轮状病毒 VP₇ 蛋白和呼吸道合胞病毒 F 或 G 蛋白组成的一组。

说 明 书

改良的寡糖结合菌苗的制备方法

本发明涉及制备寡糖结合菌苗的改良方法。本发明的另一方面是制备对荚膜多糖引起专一特异性和同种免疫反应的寡糖菌苗。本发明的具体实施方案提供这样的菌苗，它能诱导对肺炎球菌(Streptococcus pneumoniae)一些流行的血清型的免疫力，在儿科病人及老年人和因体弱或疾病而免疫力降低者(包括例如爱滋病人)上使用可能特别重要。

肺炎球菌(Streptococcus pneumoniae)是革兰氏阳性有荚膜球菌，常成对或成短链状生长。在双球形中，毗邻的边缘是圆形的，相对的两端稍突出，使该有机体呈柳叶刀形。

根据形成荚膜的复杂多糖，可将肺炎球菌分成若干血清型。通过诺费尔德反应(Neufeld quelling reaction)，暴露于型特异的抗血清中，可鉴别出84种血清型。它们对人类全都致病，而第1、3、4、7、8或12型在临床实践中最为多见。第6、14、19和23型常引起儿童肺炎和中耳炎，而在成人则不常见(Austrian, 1983, in "Harrison's Principles of Internal Medicine", Petersdorf et al., eds., 10th Edition, McGraw Hill Book Co., New York pp. 918-922)。值得注意的是，肺炎球菌是引起儿童肺炎、败血症和脑膜炎的三个主要致病原之一(McMillan, 1982, in "Core Textbook of Pediatrics, Kaye et al., eds., Second Edition, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, p. 498)。

在发生肺炎球菌感染危险中处于高出平均水平的人包括有慢性全身性疾病的患者，如心脏病、慢性支气管肺部疾患、肝病、肾功能不全和恶性肿瘤。建议这些人接种菌苗以抗肺炎球菌感染。为此目

的,可采用 23 种菌苗.包括肺炎球菌 1,2,3,4,5,6B,7F,8,9N,9V,10A,11A,12F,14,15E,17F,18C,19A,19F,20,22F,23F 和 33F 型(它包括在美国和世界其它地方与 90% 严重肺炎球菌性疾病的发生有关的血清型或群)的荚膜多糖(Pneumovax[®] Merck, Sharpe & Dohme, and Pnu-Immune[®], Lederle 实验室)。对于儿童,此菌苗的效能不可靠,因为小于 6 岁的儿童,对各种荚膜抗原的免疫反应性在不同时间的发展是免疫系统成熟特征的结果。保护作用可比在成人中观察到的时间短(Harrison 等,同上)。虽然据信与大多数儿童肺炎球菌感染有关的肺炎球菌血清型较少(Gray et al., 1979, J. Infect. Disease 140:979—983),但它们包括了对用作菌苗的纯化荚膜多糖起反应的人类抗体成熟最慢的那些型(Anderson and Betts, 1989, Pediatric Infec. Dis. J. 8:S50—S53; Borgono et al., 1978, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 157:148—154)。

通过将流感嗜血杆菌 b (Haemophilus influenzae b) 荚膜抗原偶联到载体蛋白上产生“结合”菌苗,获得了人婴儿对流感嗜血杆菌的免疫反应性,据信 T 淋巴细胞辅助效应由载体蛋白诱导而来,并与免疫力的产生有关(Robbins et al., 1984, in “Bacterial Vaccines”, Germanier, ed. Academic Press, New York, pp. 289—316), 又见 Cruse & Lewis, 1989 in “Conjugate Vaccines” eds. Cruse & Lewis, Karger, Basel, pp. 1—10。同样的手段被用来产生肺炎球菌菌苗。

许多研究者分离和提纯了完整的荚膜聚合物,它们在菌苗方面或作为菌苗可能是有用的。例如,美国专利 No. 4,220,717 介绍了从流感嗜血杆菌 b (H. influenzae b) 的荚膜聚合物分离和提纯免疫活性磷酸多核糖基核糖酯 (PRP) 的方法。此外,美国专利 No. 4,210,641 介绍了流感嗜血杆菌 (H. influenzae) 多糖提取物,其表观分子量大于 200,000 道尔顿,主要由半乳糖、葡萄糖和甘露糖组成,并含少量糖胺。

一些研究者将这些和其它完整荚膜聚合物用在制剂中以获得较好的免疫学反应。例如，美国专利 No. 4,196,192 公开了含提纯的完整 PRP 和全细胞百日咳杆菌 (*Bordetella Pertussis*) 菌苗制剂。增加免疫原性的这一方法导致年轻哺乳动物抗 PRP 和抗百日咳杆菌抗体的水平增高。

载体蛋白不仅可增强结合的荚膜聚合物的免疫原性，它们还可在免疫原性上帮助半抗原。半抗原定义为能特异性地结合抗体或淋巴细胞受体但本身不能诱导免疫反应的分子（即它们是无免疫原性的）。为了引起免疫反应，被称作半抗原的小/低分子量或弱免疫原分子一般必须先偶联到大分子或载体上，这种大分子通常是异种蛋白。将半抗原—载体复合物注射到动物体内，使 B 淋巴细胞的抗体生成量提高，此中一些抗体可特异性地与未偶联的游离半抗原分子结合。

最早被研究的半抗原有偶氮染料化合物，如苯胺和邻—氨基苯甲酸。Landsteiner 和 Lampl (1918, *Z. Immun. Forsch.* 26 :293) 通过重氮化作用将这些化合物和血清蛋白结合。家兔注射这些人工制备的偶氮蛋白质时，产生沉淀的抗体，该抗体对附着的化学基团有特异性。

半抗原化合物的其它例子为二硝基苯酚和麦角酸二乙酰胺。二硝基苯酚是以二硝基苯基 (DNP) 偶联于牛血清白蛋白或牛 γ -球蛋白 (BGG) 而成为免疫原的。现已证明甚至甲醛也可作为半抗原，暴露于来自产品或实验室中甲醛蒸汽的人，在他们体内的内源性大分子甲酰化后，就变得对该化合物“敏感”了。

半抗原行为不限于有机小分子，直至胰岛素那样大小的多肽激素，即使有免疫原性，也常常是很弱的。为了获得对这些激素的高抗体滴度，必须将它们连接到载体分子上（或通过很多这种多肽分子交联在一起而产生较大的分子）。

载体分子的介入特别有趣之处在于载体远不止仅起转运作用。Ovary 和 Benaceraff (1963, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 114:723) 通过给家兔注射二硝基苯基—卡介苗(DNP—BCG)而证明了这点。很多免疫原物质注入动物,可产生对这种暴露的免疫“记忆”。当以后给予第二次注射时,即有强烈得多的免疫反应。确实,当 Ovary 和 Benaceraff 再次注射 DNP—BCG 时,有一种强的继发反应,导致抗 DNP 和 BCG 的抗体水平均明显地升高。但是,用 DNP—蛋清蛋白代替进行第二次注射时,观察到弱得多的抗 DNP 抗体反应。反应的这种差异是由于被称作载体效应的作用,并且似乎涉及辅助 T 淋巴细胞。

初步证据表明,所有蛋白对于某一半抗原来说可能不是等效的载体蛋白。Robbins 等(Infect. Immun. 40:245—256)提出了实验性蛋白—多糖结合疫苗的资料,在该资料中,相同的多糖半抗原被结合到不同的蛋白质载体上,而且对半抗原的抗体应答是定量的。在生成的抗半抗原抗体的量上注意到了明显的差异,表明对载体的主要作用。

Lin 和 Lee (1982, Immunology 46:333)特别就肺炎球菌菌苗,研究了暴露于 6A 型和 19F 型多糖及结合在蛋白上的 19F 型的成年和年轻小鼠的免疫应答。在接受 19F 多糖—蛋白结合物的小鼠上诱导出比只接受 19F 多糖的对照组高得多的 IgM 和 IgG₂ 抗体滴度。

在借助所谓“载体效应”来提高抗体生成的一项努力中,其他研究者研究了荚膜聚合物和载体蛋白的结合。例如 Schneerson 等(Journal of Experimental Medicine 152:361—376(1980)描述了流感嗜血杆菌 b (*H. influenzae* b) 聚合物—蛋白结合物,此结合物被揭示可给予机体对流感嗜血杆菌 b 所致侵袭性疾病的免疫力。该文献证明在婴儿体内与年令有关的荚膜聚合物的免疫行为,并寻求用完整荚膜聚合物与各种蛋白[包括血清白蛋白、鲎血兰蛋白(*Limulus*

polyphemus hemocyanin) 和白喉毒素]的结合来克服这种年令依赖性。结合的方法涉及使用偶联剂,如己二酸二酰肼。

Geyer 等(*Med. Microbiol. Immunol.* 165: 171—288(1979))用还原胺化反应制备了某些肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)荚膜多糖片断与硝基苯基乙胺偶联剂的结合物,然后用偶氮偶联反应将此衍生的糖附着在蛋白质上。

McIntire 1974年5月9日申请的美国专利 No. 4,057,685 介绍了通过和卤酰基卤化物反应而共价偶联于蛋白质抗原的减毒大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)脂多糖。

由 Jennings 等于 1981年5月27日申请,1982年10月26日公告的美国专利 No. 4,356,170 介绍了用还原胺化反应制备多糖—蛋白质结合物。

Anderson (1983, *Infection and Immunity* 39 :233—238)介绍了从流感嗜血杆菌 b 荚膜多糖而来的寡糖和 CRM₁₉₇(一种无毒而抗原性上鉴定的白喉毒素的变种)之间的结合物。

Snippe 等(1983, *Infection and Immunity* 42 :842—844)介绍了对肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)3型的半合成菌苗,其中从荚膜多糖 S₃ 经部分酸水解而分离得到的己糖通过还原胺化偶联到硬脂酰胺上,然后掺入脂质体。在小鼠上观察到所得的结合物/脂质体菌苗诱导对肺炎球菌(*S. pneumoniae*)3型的保护作用。

由 Tsay 等在 1983年3月14日申请,于 1987年5月5日公告的美国专利 No. 4,663,160 涉及这样的细菌,其中从革兰氏阳性杆菌来的去毒多糖借助 4—12 碳基团共价地偶联到从同种革兰氏阴性杆菌来的去毒蛋白质。

由 Gordon 在 1984年1月5日申请,于 1986年10月28日公告的美国专利 No. 4,619,828 涉及在致病菌[如流感嗜血杆菌 b (*Haemophilus influenzae* b)、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、奈

瑟氏脑膜炎双球菌(Neisseria meningitidis)和埃希氏大肠杆菌(Escherichia coli)]而来的多糖分子和 T 细胞依赖性抗原(如白喉毒素和破伤风毒素) 之间的结合物。

由 Anderson 和 Clements 在 1984 年 8 月 10 日申请, 于 1989 年 2 月 28 日公告的美国专利 No. 4,808,700 和由 Anderson 在 1986 年 3 月 28 日申请, 于 1988 年 8 月 2 日公告的美国专利 No. 4,761,283 涉及荚膜聚合物片断和细菌毒素、类毒素或结合亚单位借助还原胺化反应发生的共价结合。

由 Porro 等在 1986 年 7 月 2 日申请, 于 1987 年 12 月 8 日公告的美国专利 No. 4,711,779 涉及糖蛋白结合物菌苗, 它具有三价免疫原活性, 包含从革兰氏阳性杆菌和革兰氏阴性杆菌而来的荚膜多糖, 以及 CRM₁₉₇、破伤风类毒素或百日咳毒素。

荚膜多糖半抗原偶联于载体蛋白的结合菌苗的制备必须包括以下步骤:

- (i) 必须制备荚膜多糖,
- (ii) 如果使用多糖片断, 必须从完整多糖中将其分离出来,
- (iii) 糖类必须被激活, 或使其能经受结合作用, 即必须产生能共价地结合到蛋白质上的基团,
- (iv) 将糖类结合到蛋白质上。

已有技术中已知的完成这四个步骤的各种方法列于表 1。

表 1

参考文献	多糖的制备	多糖的裂解	多糖的激活	与蛋白质的结合
美国专利 No. 4, 356, 170 (Jennings 1981. 5. 27 申请 1982. 10. 25 公告)			应用过碘酸以产生醛基	用氰基氢硼化物进行还原胺化
美国专利 No. 4, 663, 160 (Tsay 等 1983. 3. 14 申请, 1987. 5. 5 公告)			应用过碘酸以产生醛基	i) 在缩合剂如碳化二亚胺存在下, 将 4—12 碳基团偶联到蛋白质上 ii) 在还原剂如氰基氢硼化物存在下, 经希夫氏碱反应, 将多糖偶联到衍生来的带 4—12 碳基团的蛋白质上
美国专利 No. 4, 619, 828 (Gordon 1984. 1. 5 申请, 1986. 10. 28 公告)	经热处理, 将多糖调整到分子大小在 200,000—2,000,000 道尔顿之间		• 氟溴化物	• 经 4—8 碳原子隔离桥连接, 如存在于蛋白质的己二酸酐衍生物中的那种结合

表 1 (续)

参考文献	多糖的制备	多糖的裂解	多糖的激活	与蛋白质的结合
美国专利 No. 4, 808,700 (Anderson 和 Clements 1984. 8. 10 申请, 1989. 2. 18 公告)		用于产生至少有一个还原端的抗原片断的各种方法, 如: 用过碘酸限制性氧化裂解, 用糖苷酶水解, 或酸水解		在氰基氢硼化物存在下, 经还原胺化进行结合(约 2—3 周)
上述题为“肺炎球菌的荚膜聚合物片断与 CRM ₁₉₇ 的结合”的专利的第 6. 5 节	Danish 6A 型 Eli Lilly 公司	在 0.1 N HCl 中于 100 °C 下进行 10 分钟酸水解以产生还原性片断		在 37°C 下, 用氰基氢硼化钠经 18 天将其结合于磷酸盐缓冲液配制的 CRM ₁₉₇ 上
美国专利 No. 4, 711,779 (porro 和 Costantino 1986. 7. 2 申请. 1987. 12. 8 公告)		100 °C 酸解 6—40 小时, 合适的半抗原分子量为 1000—2000 道尔顿	通过将伯胺基团引入末端还原基团(例如用氰基氢硼化钠)接着转化为酯(例如在己二酸衍生物存在下)而激活	在有机溶剂(例如二甲亚砜)的存在下, 和类毒素结合
用于肺炎球菌 6A 型		100°C 酸解 39 小时	在氰基氢硼化钠存在下(引入伯胺基), 在氨盐缓冲液中激活 2 周, 在含己二酸的二琥珀酰亚胺酯的二甲亚砜水溶液中经 4 小时转化为相应的一元酯	在室温下, 在二甲亚砜中, 与 CRM ₁₉₇ 结合 15 小时

本发明涉及用新颖的方法将得自细菌荚膜多糖的寡糖共价结合到载体蛋白上。

本方法以明显快于目前所用方法的生成速率高效地合成糖结合物。本发明的糖结合物可用于菌苗制剂，并证明是免疫原性的。

在特定的实施方案中，本发明涉及掺入得自肺炎球菌(Streptococcus pneumoniae)荚膜多糖的寡糖的糖结合物的制备。本发明的方法导致肺炎球菌(S. pneumoniae)糖结合物高收益的高效制备，此种糖结合可用于特别与儿童群体有关的菌苗制剂，在此群体中主要疾病的大部分是与肺炎球菌(S. pneumoniae)感染有关。已发现免疫原结合物比荚膜聚合物本身较少年令依赖性，有助于激活很幼小的温血哺乳动物对各自的有荚膜细菌的全身感染的免疫反应。

在本发明的进一层意义上，令人吃惊地发现，本发明的糖结合物引起专一特异性的和同种的免疫反应，这可有助地避免自身免疫反应和有关的菌苗接种后综合症。

重要的是，本发明的免疫结合物不含有潜在的毒性偶联剂，如用于将糖类结合到蛋白质上的丁二酸二酰肼或对一硝基苯乙胺。

本发明中涉及的缩写词的定义如下：

CRM ₁₉₇	与白喉毒素在抗原性上有交叉反应的无毒蛋白
DMSO	二甲亚砷
DP	聚合度
MIC	最小抑制浓度
SD	取代程度
SIDEA	己二酸的琥珀酰亚胺二酯
SIDES	丁二酸的琥珀酰亚胺二酯

图 1. 寡糖——蛋白结合物合成的一般方案

- A. 将高分子量多糖酸解以得到平均分子量为 2.5×10^3 的寡糖。
- B. 将寡糖(1) 在 pH9 的条件下，与二氨基乙烷 [$H_2N(CH_2)_2NH_2$]

反应而使之激活，用氢硼化吡啶还原，(2) 在二甲亚砜(DMSO)中与己二酸的琥珀酰亚胺二酯(SIDEA) 反应。

C. 将激活的寡糖通过赖氨酸残基连接到载体蛋白上。

图 2. 在连接过程中“特定”间隔物的使用

A. 如 Porro 等(Mol. Immunol. 22 :907—917, 1985) 描述的较早的方法所生成的糖结合物，该方法系在寡糖和己二酸四碳链之间形成酰胺键(如箭头所示)。间隔物的总长度约为 10.4Å。

B. 按本发明所生成的糖结合物，其中，在寡糖和由 SIDES 反应形成的丁二酸二碳链之间存在一个二碳残基(如箭头所示，由二氨基乙烷所形成) 和一个酰胺键。间隔物的总长度约为 10Å。

C. 按本发明所生成的糖结合物，其中，在寡糖和由 SIDES 反应形成的己二酸四碳残基之间存在一个二碳残基(如箭头所示，由二氨基乙烷所形成) 和一个酰胺键。间隔物的总长度约为 14.5Å。

图 3. CRM₁₉₇与激活的寡糖(含己二酸对丁二酸衍生物间隔物)的结合效能，结合反应产物的 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳(银染色法)

A. 带 1: 分子量标准品(92.5 K, 66.2K, 45.0 K, 31.0 K, 21.5 K)

带 2: CRM₁₉₇(1μg)参比物

带 3: 带有丁二酸间隔物(2μg)的结合的寡糖 6A—CRM₁₉₇(1:1 比例一元酯/CRM₁₉₇的总氨基，在 50%DMSO 中)

带 4: 带有丁二酸间隔物(2μg)的结合的寡糖 6A—CRM₁₉₇(1:2 比例一元酯/CRM₁₉₇的总氨基，在 50%DMSO 中)

带 5: 带有己二酸间隔物(2μg)的结合的寡糖 6A—CRM₁₉₇(1:2 比例一元酯/CRM₁₉₇的总氨基，在 50%DMSO 中)

带 6: 带有丁二酸间隔物(2μg)的结合的寡糖 14—CRM₁₉₇(1:4 比例一元酯/CRM₁₉₇的总氨基，在 50%DMSO 中)

带 7: 带有丁二酸间隔物(2 μ g)的结合的寡糖 19F—CRM₁₉₇(1:4 比例一元酯/CRM₁₉₇的总氨基, 无 50%DMSO)

带 8: 带有丁二酸间隔物(2 μ g)的结合的寡糖 23F—CRM₁₉₇(1:2 比例一元酯/CRM₁₉₇的总氨基, 在 50%DMSO 中)

带 9: CRM₁₉₇(1 μ g)参比物

B. 带 1: CRM₁₉₇(1 μ g)参比物

带 2: CRM₁₉₇参比物(1 μ g, 与带 1 相比, 不是同批的)

带 3: 带有己二酸间隔物(2 μ g)的结合的寡糖 23F—CRM₁₉₇(1:2 比例一元酯/CRM₁₉₇的总氨基, 在 50%DMSO 中)

带 4: 分子量标准品(92.5 K, 66.2K, 45.0 K, 31.0 K, 21.5 K)

带 5: 带有己二酸间隔物(2 μ g)的结合的寡糖 23F—CRM₁₉₇(1:2 比例一元酯/CRM₁₉₇的总氨基, 在 50%DMSO 中)

带 6: CRM₁₉₇(1 μ g)参比物

CRM₁₉₇参比物(1 μ g, 与带 1 相比, 不是同批的)

带 7: 带有己二酸间隔物(2 μ g)的结合的寡糖 6A—CRM₁₉₇

C. 带 1: 分子量标准品(92.5 K, 66.2K, 45.0 K, 31.0 K, 21.5 K)

带 2: CRM₁₉₇(1 μ g)参比物

带 3: 带有己二酸间隔物(2 μ g)的结合的寡糖 6A—CRM₁₉₇

带 4: 带有己二酸间隔物(2 μ g)的结合的寡糖 14—CRM₁₉₇

带 5: 带有己二酸间隔物(2 μ g)的结合的寡糖 19F —CRM₁₉₇

带 6: 带有己二酸间隔物(2 μ g)的结合的寡糖 23F —CRM₁₉₇

带 7: 分子量标示(92.5 K, 66.2K, 45.0K, 31.0 K, 21.5 K)

图 4. 家兔免疫球蛋白 G 与肺炎球菌(*S. pneumoniae*)寡糖 6A—CRM₁₉₇结合物的反应, 诱导的对荚膜多糖同型 IgG 的亲合力数值的抑制性酶联免疫吸附试验(ELISA)分析。

A. 6A 型荚膜多糖

B. 游离型或结合到 CRM₁₉₇ 上的 6A 型寡糖 ($\overline{DP}=10$)

C. 被分子间隔物或结合到 CRM₁₉₇ 上而激活的 14 型寡糖 ($\overline{DP}=12$)

本发明涉及来自细菌荚膜多糖的寡糖共价连接到载体蛋白上，本发明的方法系经新的步骤产生新的糖结合物。

为了揭示清晰而又不借助于限制手段，本发明的详述分为以下几部分：

(i) 寡糖的制备

(ii) 寡糖的激活

(iii) 寡糖的与蛋白质的结合

(iv) 糖结合物的免疫化学特性

(v) 菌苗配制和用法

(vi) 肺炎球菌寡糖结合菌苗的应用

(i) 寡糖的制备

高分子量荚膜多糖可购买成品(美国典型培养物中心(ATCC)(Rockville, MD))或采用 Porro 等(1983, J. Biol. Stand. 11 :65—71.)描述的方法而获得,可以使用包括(但不限于)以下细菌的荚膜上发现的任一多糖,这些细菌为:肺炎球菌(Streptococcus pneumoniae)、流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)、奈瑟氏脑膜炎双球菌(Neisseria meningitidis)、埃希氏大肠杆菌(Escherichia coli)、伤寒沙门氏菌(Salmonella typhi)、Streptococcus mutans, 新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)、肺炎杆菌(Klebsiella pneumoniae)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)和绿脓假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)。

可用各种方法(由特定荚膜聚合物的结构特征决定),从荚膜聚合物得到至少带有一个还原端的抗原片断。用过碘酸盐(或相应试

剂)进行限制性氧化裂解可留下醛基末端,这一手段限于在非环状残基上具有邻近的二羟基的聚合物。糖甙键的水解产生还原糖末端。这一水解过程可由糖甙酶的酶促反应而最特异性地完成,但本申请将限于相对少的荚膜聚合物上,如肺炎球菌 8 (Streptococcus pneumoniae 8),用于此类荚膜聚合物的糖甙酶是已知的。糖甙键的水解常用酸性水解。如果聚合物含对酸敏感的非糖甙键或如果聚合物含有在抗原特异性上重要的对酸敏感的侧链,这一方法的应用就受到限制了。

在本发明的具体实施方案中,肺炎球菌(S. pneumoniae) 6A 型荚膜多糖可在约 10^{-2} M 乙酸中,在约 100 °C 下水解约 30 小时;肺炎球菌 14 型荚膜多糖可在约 0.5 M 三氟乙酸中在约 70 °C 下水解约 7 小时;肺炎球菌 19F 型多糖可在约 10^{-2} M 乙酸中在约 50 °C 下水解约 48 小时;肺炎球菌 23F 型多糖可在约 0.25 M 三氟乙酸中在约 70 °C 下水解约 3 小时。

按照本发明,被结合到蛋白质上的寡糖较佳地由 3 和 6 之间的重复单位(或约 10 和 30 之间的单糖残基)所组成,更佳地由 3 和 4 之间的重复单位(或约 15 个单糖残基)所组成,由于这一长度的寡糖掺入糖结合物中,已被证明是最适免疫原性的。

(ii) 寡糖的激活

通过还原胺化方法,接着与二官能团分子(例如,但不限于,二酯)反应,可使寡糖激活。图 1 和表 I 提出了本发明方法的概述,此概述将本发明的方法和 Porro 等(1985. Mol. Immunol. 22:907—919)描述的方法进行比较,请注意,用前一方法的激活时间是 7—14 天,而按本发明则缩短到 15 分钟。还请注意,用前一方法的还原时间为 7—14 天,而按本发明则缩短到 48 小时。因此,本发明的完成所需要的时间比前一方法少 12—26 天。这是一个重要的优点,因为糖类暴露在升高的温度(例如 50 °C)中可导致降解。

表 I 肺炎球菌 (*S. pneumoniae*) 寡糖末端
还原单位的化学激活

参数	以前的方法	本方法
导入基团	NH ₂	NH(CH ₂) ₂ NH ₂
试剂(pH)	铵盐缓冲液(9)	二氨基乙烷(9)
激活温度	50℃	100℃
激活时间	7—14天	15分钟
还原剂	氰基氢硼化钠	甲硼烷吡啶
还原温度	50℃	50℃
还原时间	7—14天	48小时
生成产物	低聚—NH ₂	低聚—NH(CH ₂) ₂ NH ₂
激活二官能团 间隔物	SIDEA(己二酸的琥珀 酰亚胺二酯)	SIDES 或 SIDEA(丁二 酸或己二酸的琥珀酰亚 胺二酯)
反应温度	25℃	4℃
反应时间	4小时	2小时
生成产物	低聚—NH—单酯	低聚—NH(CH ₂) ₂ NH— 单酯
反应效率	25—30%	70%

按照本发明的方法,寡糖末端还原单位是用含两个氨基的分子进行还原胺化的。在本发明的一个较佳实施方案中,在约 25—100℃温度(以 100℃为佳)下,在约 pH9 的 0.2 M KH₂PO₄ 缓冲液中,用 10 倍摩尔的过量二氨基乙烷溶液与一定摩尔量的寡糖反应约 1—60 分钟(以约 15 分钟为佳)而完成还原胺化反应之后,可加入相

当于制剂中寡糖的摩尔浓度 25 倍的 1 摩尔量的甲硼烷吡啶，在约 25—100 °C 之间（以约 25 °C 为佳），反应进行约 1—72 小时（以约 48 小时为佳）。

然后可将还原胺化反应所得的产物和二官能分子反应，该分子的每个官能团均能与激活的寡糖的末端氨基和载体蛋白结构上存在的氨基起反应，这样，二官能团分子就可起到连接寡糖和载体蛋白的作用。在本发明的一个最佳实施例中，二官能团为二酯（更特殊地为己二酸二酯），它已被证明与蛋白质更有效的糖基化作用有关。在本发明的一个最佳具体实施例中，经历了如上所述的还原胺化作用的寡糖再进一步与丁二酸（或更佳地为己二酸）的琥珀酰亚胺二酯进行反应；最好是在约 0—25 °C 之间（优选 4 °C），在二甲亚砜（DMSO）溶液中，与摩尔浓度（按氨基计）相当于 SIDEA（或 SIDES）摩尔浓度 1/5 的胺化的寡糖进行约 0.5—5 小时之间（优选约 2 小时）的反应。然后可用 1.4 二噁烷（80% v/v）沉淀来收集激活的寡糖，上清液中还留下 SIDEA（或 SIDES）。

(iii) 寡糖与蛋白质的结合

按照本发明，可被利用的蛋白质包括可安全地给予年幼哺乳动物并可充当免疫学上有效的载体蛋白的任何蛋白质。在特定的实施例中，细胞表面蛋白、膜蛋白、毒素和类毒素均可使用。安全性的标准包括无原有的毒性和最小的变态反应危险。白喉和破伤风类毒素满足这些标准，即经合适的制备后，它们是无毒的，变态反应的发生率是可接受地低。尽管对成人，变态反应的危险可以是明显的，但对婴儿，这种危险为最小。按照本发明的附加的特例，合适的载体蛋白包括（但不限于）沙门氏菌（Salmonella）鞭毛蛋白、嗜血杆菌（Hemophilus）纤毛、嗜血杆菌 15 KDa、28—30 KDa 和 40 KDa 膜蛋白、埃希氏大肠杆菌（Escherichia coli）热不稳定肠毒素 LTB、霍乱毒素，以及包括轮状病毒 VP₇和呼吸道合胞病毒 F 和 G 蛋白的病毒

蛋白质。

在“载体效应”中，弱的抗原吸附到作为载体的较强的抗原（即异种蛋白）上，就变得比它单独使用更具免疫原性。如动物先前被载体单独免疫过，动物可处于“待发状态”，不仅对载体抗原而且对附着的半抗原基团产生增强的免疫反应。常规地用破伤风和白喉类毒素对婴儿进行免疫。从而，他们对以后给予的结合于这两种类毒素中任一种的荚膜聚合物抗原将是“待发”的。

通常，任何异种蛋白均可作载体抗原。但是某些细菌毒素，如破伤风和白喉类毒素，在它们由两部分组成这点上可能具有额外的优势，这两部分之一（“结合”亚单位）对于哺乳动物细胞表面结合具有强的亲和力。可以想象，结合在这样一种“结合”蛋白上将使载体抗原更有效地引发免疫系统细胞的反应。

有荚膜聚合物结合的载体蛋白可为天然毒素或去毒的毒素（类毒素）。又，借助比较新的突变技术，可产生遗传学上改变的蛋白质，它们在抗原性上与毒素相同而无毒性，被称作“交叉反应物质”即 CRM_s。CRM₁₉₇是值得注意的，因为它有一个从天然白喉毒素改变而来的单个氨基酸，并与之在免疫学上难以区分。

荚膜聚合物与天然毒素结合可降低毒性，但仍可保留明显的毒性。因此，用甲醛水溶液和蛋白质的游离氨基起反应，进行蛋白质毒素的进一步解毒。残余毒性仍然受到关注。此外，任何特别大量的菌苗均能自发解毒，对这一处理仍有争论。

另一可供选择的方法是，在与荚膜聚合物结合之前，可用甲醛水溶液对天然毒素进行解毒，以产生常规类毒素。但是，在前的甲醛水溶液处理可减少在与荚膜聚合物片断反应时可利用的游离氨基的数目。因此，CRM_s在无固有毒性，其氨基也无一被甲醛水占据这些方面具有明显的优点。更大的优点是，在用 CRM_s操作时无生物毒害存在。

对于免疫学上和天然毒素相同的 CRM₁₉₇，用甲醛水处理（尽管无须解毒）大大增强免疫反应。据认为，这是由于该分子对机体降解机制的稳定，和/或交联聚集之故（颗粒的免疫原性随体积增大而增加）。

由于上述全部理由，破伤风和白喉毒素为载体蛋白的首选者，还有其它毒素可能也是适合的。虽然这些其它毒素可能没有在白喉和破伤风上所见的历史，但可能有其它强有力的理由来使用它们。例如，它们作为载体甚至可能更有效，或生产经济性可能更为明显。载体的其它候选者包括假单胞菌属、葡萄球菌属、链球菌属、百日咳和埃希氏大肠杆菌的毒素。

在本发明的一个具体实例中，被激活的寡糖可被偶联于 CRM₁₉₇ 蛋白，后者可按如下所述进行纯化：

白喉棒状杆菌（*Corynebacterium diphtheriae*）株产生的 CRM₁₉₇ 可按下文实例所述，将细菌培养物通过微孔滤膜而从培养基中分离出来，从滤液中沉淀出蛋白质，并用离子交换层析法提纯 CRM₁₉₇。或者，可用现有技术中已知的任何方法获得实质纯的 CRM₁₉₇。

在有机溶剂存在下，和可选择地在便于促进激活的寡糖的末端官能团联结到蛋白质上的任何其它试剂（如缩合剂）的存在下，可将激活的寡糖共价地联结到载体蛋白上。在本发明的一个具体的最佳实例中，其按如下步骤，将带有末端酯基的寡糖共价地联结到载体蛋白上存在的游离氨基上：

可将激活的寡糖溶解于二甲亚砜，然后加到载体蛋白水溶液中（例如，但不限于 CRM₁₉₇，浓度为约 2 mg/ml），以致单酯—激活的寡糖/载体蛋白总氨基的摩尔比例为约 1:2，DMSO 的终浓度为约 50% v/v。结合反应在 4 °C 下进行，虽然在约 2 小时中反应近于完成，但为了增加反应的产量，对每一型具体的糖结合物来说都在最高值，合适的是将反应物放置过夜。然后用凝胶层析法纯化来得到

该糖结合物。

为了合成单价菌苗，可将来自单一细菌血清型而来的寡糖结合到蛋白质上。为了合成多价菌苗，可将来自不同种或不同血清型细菌的寡糖混合物联结到载体蛋白上来制备糖结合物；或者，将不同的单一型寡糖和载体蛋白各自进行反应制备出糖结合物，然后混合在一起。多价菌苗可包括带有同种或异种联结的寡糖的载体蛋白。

(iv) 糖结合物的免疫化学特性

在给人使用前，可在合适的动物系统，包括（但不限于）家兔、猪、豚鼠、小鼠、大鼠或山羊上验证用上述方法制备的糖结合物的免疫原性。在本发明的一个具体实施方案中，可给家兔（约重 2 kg）皮下接种有或无磷酸铝或氢氧化铝存在的糖蛋白结合物。2 kg 家兔的合适剂量为约 2.5 μg 寡糖。然后，用酶联免疫吸附试验（ELISA）或其它任何现有技术中已知的方法评估抗体滴度。因为针对本发明的糖结合物产生的抗体无免疫沉淀抗原作用，因此不推荐依赖免疫沉淀反应的抗体检测试验来测定滴度。

(v) 菌苗配制和用法

配制菌苗的合适载体基质包括磷酸钠缓冲盐水（pH7.4）或悬浮于磷酸钠缓冲盐水（pH6）的 0.125 M 磷酸铝凝胶和其它合适的基质。

一般来说，含从约 5 至约 100 μg （较佳地为约 10 至约 50 μg ）寡糖的菌苗适合于在年轻温血哺乳动物上诱发有效水平的抗荚膜聚合物抗体。当然，确切的剂量由常规的剂量/反应实验确定。用于制备儿童用菌苗的糖蛋白结合物的浓度包含在约 25 至 200 μg 寡糖的范围内。根据体重可给予较大的剂量。连续给予几个小剂量可被认为优于一次注射给予等量的结合物。

本发明的菌苗可被用于任何年令的温血哺乳动物，并特别适用于诱导抗下列致病原在年幼哺乳动物上引起的全身感染的主动免

疫，这些致病原为：流感嗜血杆菌 b 型、埃希氏大肠杆菌、肺炎球菌、奈瑟氏脑膜炎双球菌和绿脓假单胞菌。

按照本发明，可经皮下、静脉内、肌肉内、腹腔内、口腔或鼻腔内接种菌苗。菌苗可包括以溶解形式或微粒形式存在的或嵌入微粒或微囊（包括脂质体）的糖结合物。

(vi) 寡糖结合菌苗的应用

在本发明的最佳实例中，将针对有荚膜病原菌的糖结合物用于保护易感个体，使其不发生这些菌所引起的感染。易感个体包括免疫系统不成熟的幼儿，无脾者，及患有免疫系统缺陷或慢性疾病（特别是获得性免疫缺陷综合征，A. I. D. S.）、造血系统恶性肿瘤、糖尿病、慢性心脏病、慢性肺部疾患、镰形红细胞贫血的任何个体。本发明的糖结合物，借助于结合到载体蛋白上而增强它们所携带的寡糖的免疫原性。

因此，本发明的糖结合物可用于接种，以对任何具有多糖荚膜的细菌感染提供保护，这些细菌包括：肺炎球菌、流感嗜血杆菌、埃希氏大肠杆菌、奈瑟氏脑膜炎双球菌、伤寒沙门氏菌、*Streptococcus mutans*、新型隐球菌、肺炎杆菌、金黄色葡萄球菌和绿脓假单胞菌。对儿童致病性特别强而特别为本发明提供的肺炎球菌株包括 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23, 和 33F 型。

在特定的实例中，本发明的菌苗可用来诱发专一特异的和同种的免疫反应。专一特异的免疫反应和很多优点联系在一起，包括提供具有如下特点的抗体：(i) 同种特异性，其中实质上全部抗体都是针对一个特定表位型，并且以相同的亲和力常数为其特征；(ii) 高亲和力并有高度抗菌活性；(iii) 靶特异性增高而无与宿主相关抗原的交叉反应性，从而产生较安全的菌苗；(iv) 由于专一特异性抗体的沉淀活性降低而引起补体激活降低，也导致较安全的菌苗。

在另外的实例中，本发明可用来制备能识别用本发明方法联结到载体蛋白质上的肽类、脂寡糖或其它表面寡糖半抗原的菌苗。这样的菌苗可被用在，例如，对肿瘤细胞的免疫诱导上，或结合于化疗或生物活性剂的抗肿瘤抗体的制备上。用本发明的方法，将肿瘤特异性抗原或其表位型联结于载体蛋白，可诱导这样的抗肿瘤活性。

实例 1. 多糖的制备

从美国典型培养物中心得到肺炎球菌 6A 型荚膜多糖、肺炎球菌 14 型荚膜多糖、肺炎球菌 19F 型荚膜多糖和肺炎球菌 23F 型荚膜多糖。

实例 2. 肺炎球菌 6A 型多糖的水解

将 2 mg 6A 型肺炎球菌荚膜多糖溶于 1 ml 含 10 mM 乙酸(pH = 3.4)的水溶液，然后放在密闭的安瓿中，浸在 100 °C 油浴中水解 30 小时。再经葡聚糖凝胶 G15 (Pharmacia, Uppsala)层析，在 4 °C 下用 15 mM NaCl 溶液(pH7.0)洗脱，从反应混合物中分离出生成的寡糖。

然后，按 Kabat, (1964 in “Experimental Immunochemistry”, Ed. E. A. Rabat and Mayer, pp. 538—541), Chen et al. (1956, Anal. Chem. 28:1756—1758)和 Porro et al (1981, Anal. Biochem. 118:301—306)报告的方法分析层析洗脱液，以证实甲基戊糖、含磷化合物和还原基团的醛基的存在。分析结果揭示了甲基戊糖/乙醛为 3.96, 甲基戊糖/含磷化合物为 0.96, 含磷化合物/乙醛为 4.12。

使用缓冲液洗脱的葡聚糖 G—50 超细级(Pharmacia)凝胶层析揭示，分布常数(Kd)为 0.538(用己糖)，相应于分子量为约 2,500。

核磁共振，气相色谱和化学计算分析表明，寡糖由约 3—4 个基本重复单位组成，在这些基本复重单位中发现免疫显性糖——半乳糖。

实例 3. 肺炎球菌 14 型多糖的水解

将 2 mg 14 S 型肺炎球菌荚膜多糖溶于 1 ml 含 0.5 M 三氟乙酸的水溶液，然后放在密闭的安瓿中，浸在 70℃ 温度的油浴中水解 7 小时。再经葡聚糖凝胶 G15 (Pharmacia, Uppsala) 层析，在 4℃ 下用 15 mM NaCl 溶液 (pH 7.0) 洗脱，从反应混合物中分离出生成的寡糖。

然后对层析洗脱液作己胺和乙醛含量分析，发现己胺与乙醛之比为 3.17。气相色谱和化学计算分析表明，分子大小相当于 3—4 个基本重复单位。如气相色谱所测定的那样，半乳糖的脱支链化在 10% 以内。

使用 15 mM NaCl (pH 7.0) 洗脱的葡聚糖 G—50 (超细级) (Pharmacia) 凝胶层析揭示，对于寡糖，按总己糖测得的分布常数 (Kd) 为 0.30。

实例 4. 肺炎球菌 19F 型多糖的水解

将 2 mg 19F 型肺炎球菌荚膜多糖溶于 1 ml 含 10 mM 乙酸 (pH = 3.4) 的水溶液，然后放在密闭的安瓿中，浸在 50℃ 温度的油浴中水解 48 小时。再经葡聚糖 G-15 (Pharmacia, Uppsala) 层析，在 4℃ 下用 15 mM NaCl 溶液 (pH 7.0) 洗脱，从反应混合物中分离出生成的寡糖。

然后，按 Kabat (1964, in "Experimental Immunochemistry," Ed. E. A. Rabat and Mayer, pp. 538—541), Chen et al. (1956, Anal. Chem. 28:1756—1758) 和 Porro et al. (1981, Anal. Biochem. 118:301—306) 报告的方法，分析层析洗脱液，以证实甲基戊糖、含磷化合物和还原基团如醛基的存在。分析结果揭示了甲基戊糖/还原性甲基戊糖为 3.5, 甲基戊糖/含磷化合物为 3.2。

葡聚糖 G—50 (超细级) (Pharmacia) 凝胶层析揭示，对于寡糖，Kd = 0.46 (按总己糖计)；气相色谱和化学计算的结合分析表明，分子大小对应于 3—4 个基本重复单位。

实例 5. 肺炎球菌 23F 型多糖的水解

将 2 mg 23F 型肺炎球菌荚膜多糖溶于 1 ml 0.25 M 三氟乙酸的水溶液，然后放在密闭的安瓿中，浸在 70℃ 温度的油浴中水解 3 小时。再经葡聚糖凝胶 G 15 (Pharmacia, Uppsala) 层析，在 4℃ 下用 15 mM NaCl 溶液 (pH=7.0) 洗脱，从反应混合物中分离出生成的寡糖。

然后，按 Kabat (1964, in "Experimental Immunochemistry," Ed. E. A. Kabat and Mayer, pp. 538—541), Chen et al. (1956, Anal. Chem. 28:1756—1758) 和 Porro et al. (1981, Anal. Biochem. 118:301—306) 报告的方法，分析层析洗脱液，以证实甲基戊糖、含磷化合物和还原基团如醛基的存在。分析结果揭示了己糖/乙醛为 4.5，己糖/甲基戊糖为 2.3，含磷化合物/乙醛为 2.9。

气相色谱和化学计算分析表明，存在 3.5—4.5 之间的基本重复单位。如气相色谱所测定的那样，鼠李糖的脱支链化为低于 8%。

葡聚糖 G-50(超细级)(Pharmacia)凝胶层析揭示分布常数(Kd)为 0.38(按己糖计)。

实例 6. 肺炎球菌寡糖半抗原的免疫化学特性

按 Porro 等(1985, Mol. Immunol. 22:907—919)描述的方法，测定肺炎球菌 6A、14、19F 和 23F 型寡糖与针对完整的荚膜多糖的抗体之间相互作用的能力，即采用测定半抗原(如寡糖)抑制同型的抗原(荚膜多糖)对抗体的免疫沉淀反应的技术(低分子量的半抗原，当与同型抗体测试时，不产生沉淀反应)。

称作“鉴别免疫电泳”的方法操作如下：作免疫电泳用的塑料板上有 3 个 1% (w/v) 琼脂糖间隔(琼脂糖 M—LKB, Bromma, Sweden)、第一个间隔加有 0.05% (v/v) 抗荚膜多糖的参比抗血清。第二个间隔加有 0.05% (v/v) 抗荚膜多糖的参比抗血清，该抗血清已预先在 37℃ 与一已知量的参比荚膜多糖孵育了 15 分钟。第三个间隔加有抗荚膜多糖的参比抗血清，该抗血清预先已与已知量的寡糖

半抗原进行了孵育。然后进行4次连续对倍稀释的荚膜多糖电泳分离，电泳分离在70 v/cm, 20 mM Tris-巴比妥缓冲液, pH 8.8的条件下, 进行90分钟。在电泳后, 琼脂糖板经银染色, 干燥和定量。由寡糖分子造成的抑制则由显示在含预先与半抗原孵育的参比抗血清的间隔中的较高的火箭状免疫沉淀来证实。半抗原的最小抑制浓度计算为:

$$MIC_{Ha} = C_{Ha} \frac{h_{Ag}}{h_{Ha}}$$

此处, C_{Ha} : 在凝胶中被测半抗原的浓度

h_{Ag} : 当凝胶中有参比抗原时, 由所得的火箭状免疫沉淀的高度来确定的直线截距,

h_{Ha} : 当凝胶中有受试半抗原时, 由所得的火箭状免疫沉淀的高度来确定的直线截距,

类似的, $MIC_{Ag} = C_{Ag} \cdot h_{Ag}$

$$\text{特异性} = \frac{MIC_{Ag}}{MIC_{Ha}}$$

不同大小的寡糖半抗原均被测定。

用特异抗体进行的寡糖阻断荚膜多糖免疫沉淀的能力也用放射免疫扩散的非电泳方法进行了测定。按照本方法, 寡糖分子的抑制可由在含有预先与一定量抑制因子(寡糖)孵育过的特异抗体的1% (w/v) 琼脂糖中抗原(荚膜多糖)扩散所形成的免疫沉淀范围来证实。一旦对所给半抗原的最小结合浓度(MCC) 在实验中被发现, 则特异性即可按前面已提到的公式来计算:

$$\text{特异性} = \frac{MCC_{Ag(Ps)}}{MCC_{Ha(Oligo)}}$$

表 III
肺炎球菌寡糖半抗原的免疫学特性

寡糖类型	\overline{DP}	\overline{MW}	(MIC _{Ps} /MIC _{Hip}) DIEP 法	(MCC _{Ps} /MCC _{Hip}) IRID 法
	2	1.5 K	10 ⁻³	
6A 型	3.5	2.5 K	10 ⁻³	10 ⁻³
	10	7.0 K	10 ⁻¹	
14 型	5	3.5	n. t.	10 ⁻¹
	15	10.4 K	n. t.	10 ⁻¹
19F 型	3.5	2.5 K	10 ⁻³	10 ⁻⁴
23 F CH ₃ COOH (水解)	3	2.3 K	10 ⁻³	10 ⁻²
	6	4.5 K	10 ⁻¹	10 ⁻¹
TFA(水解)	4.5	3.4 K	10 ⁻⁴	5×10 ⁻³
	9.5	7.2 K	10 ⁻¹	10 ⁻¹

n. t.: 不能测定

DIEP: 鉴别免疫电泳

IRID: 放射免疫扩散抑制

MIC: 最小抑制浓度

MCC: 最小结合浓度

实例 7. 肺炎球菌寡糖末端还原单位的激活

将按上文实例 2—5 所述得到的寡糖半抗原溶于水至终浓度为约 5 mg/ml。向每一溶液中，按每 ml 溶液加 0.1 ml 0.2 M KH₂PO₄,

并加入需要量的二氨基甲烷使 pH 升至 9.2—9.4(一般说来, 每 ml 溶液需体积为 2 μ l 的二氨基甲烷)。将混合物于 100 $^{\circ}$ C 下保持 15 分钟, 然后每 ml 溶液加入约 4 μ l 吡啶甲硼烷。用 1 N NaOH 将 pH 调节在 9.2。然后将混合物装在密闭的安瓿中, 移到 50 $^{\circ}$ C 油浴中再保持 48 小时。此后, 用 1N HCl 将此氨基被激活的寡糖溶液中和, 在葡聚糖 G—15(超细级) 柱上纯化(15 mM NaCl, pH7.01)。汇集所收集到的层析流分并冷冻干燥。然后, 将冻干的残渣按 10 mg/ml 溶于 DMSO, 并加到 1 摩尔量的 SIDEA (或 SIDES) 中, 后者相当于对应冻干化合物中存在的氨基量 5:1 摩尔/摩尔的比例。反应在室温下进行 4 小时, 然后向溶液中加入 4 倍体积的 1,4-二噁烷(在 1,4-二噁烷中终浓度为 80%), 以便沉淀出酯激活的寡糖。离心收集沉淀物, 用 1,4-二噁烷洗涤三次, 于 -20 $^{\circ}$ C 或更低温度下保持到在结合过程中加以使用。四种寡糖中每一种在激活过程中的收率见表 IV 所示。

表 IV
肺炎球菌寡糖的激活:
过程的收率(% w/w)

血清型	寡-NH(CH ₂) ₂ NH ₂	寡-NH(CH ₂) ₂ NH- -酯	总值
6A 型	75	93	70
14 型	73	90	66
19F 型	100	100	100
23F 型	50	90	45
X ₆ (\pm SD)	74.5(\pm 20)	93.3(\pm 4.7)	70(\pm 23)

实例 8. CRM₁₉₇蛋白的制备

用微孔 XM—50 (NMWL 5×10^{-4} 膜通过分子过滤, 从培养基中分离出由白喉棒状杆菌 C7 (B^{ex-197} 产生的 CRM₁₉₇。然后向滤液中加入硫酸铵饱和溶液(至 65% w/v)来沉淀蛋白。离心收集沉淀了的蛋白质, 再溶解于 0.01 M 磷酸盐缓冲液(pH=7.2)。

通过离子交换层析获得 CRM₁₉₇的进一步纯化, 使用以 0.01 M 磷酸盐缓冲液(pH7.2)处理的 2.5×100 cm DEAE-琼脂糖 6B/CL 柱 (Pharmacia Uppsala), 用含 0.09 M NaCl 的 0.01 M 磷酸盐缓冲液作洗脱剂。在还原条件下的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Pappenheimer 等., 1972, Immunochem. 9:891—906) 表明, 所获得的 CRM₁₉₇ 的 80% 以其天然分子的形式存在。蛋白纯度被发现为每 mg 约 400 絮状反应限量(Lf)。

实例 9. 激活的寡糖的结合

结合过程包括琥珀酰亚胺单酯激活的寡糖半抗原偶联到载体蛋白 CRM₁₉₇的赖氨酸残基的 ϵ -氨基上。

然后将含己二酸的琥珀酰亚胺酯激活的肺炎球菌 6A、14、19F 和 23F 型荚膜多糖的寡糖的二甲亚砷加到含 2 mg/ml CRM₁₉₇的 0.1 M 碳酸氢盐溶液(pH=8.0)中, 以得到一种溶液, 它在水中占 50%, 其中酯激活的寡糖与载体蛋白总氨基之摩尔比为 1:2。

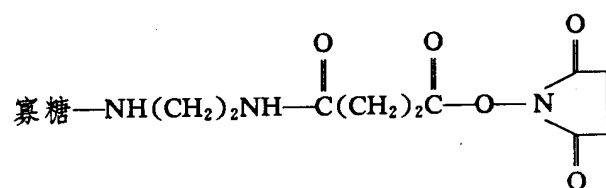
在轻微搅拌下, 将这样得到的混合物在 4 °C 中保持 15 小时。从四种血清型的每一种得来的寡糖在各自的反应中被结合到蛋白上。所得到的糖结合物的物理化学特性总结列于表 V。

表 V
糖结合物的特性

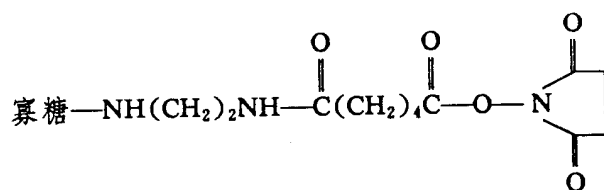
血清型	寡糖的 \overline{DP}	寡糖平均 分子量	结合物的平均分子量 (在 SDS 凝胶中)	SD [寡糖摩尔数/ 蛋白 摩尔数% (w/w)]	结合 蛋白
6 A 型	3	2.1 K	77.6 K	7	100
14 型	5	3.5 K	85.1 K	6	100
19 型	3	1.9 K	69.2 K	4	100
23 型	6	4.5 K	85.0 K	5	100

实例 10. 用作偶联剂的己二酸的琥珀
酰亚胺二酯对丁二酸的琥珀
酰亚胺二酯的结合效能比较

和丁二酸的琥珀酰亚胺二酯 (SIDES) 反应所形成的激活寡糖为
如下结构



而和己二酸的琥珀酰亚胺二酯 (SIDEA) 反应所形成的激活寡糖为
如下结构



因此, 在寡糖和结合的蛋白之间产生不同大小的偶联剂(见图 2)。
用 SIDES 对 SIDEA 激活的寡糖, 进行结合效能的评价。如图 3A、B

和 C 所示, 只有当偶联剂来自 SIDEA 时, 蛋白质显示出完全的糖基化形式(在此情况下极少或没有游离的 CRM₁₉₇带可被检出)。

实例 11. 肺炎球菌糖结合物的免疫原性

4 种糖结合物抗原的几种制剂被制备, 并在家兔中进行测定(参照表 4 描述的计划表): 型特异的糖结合物以单价制剂(2.5 或 5.0 μg 寡糖/剂)或多价制剂(每一寡糖 2.5 μg /剂), 加或不加氢氧化铝[Al(OH)₃]作为无机佐剂(仅在多价制剂中按每剂 1 mg 加入)。4 种糖结合物对氢氧化铝的完全吸附仅出现在合适的状况下, 因为无论用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 还是火箭免疫电泳, 处理多价制剂的上清液, 均不能分出任何可测定量的游离蛋白。每一糖结合物的平均剂量含大约 2.5 μg 寡糖和 13 μg 载体蛋白 CRM₁₉₇(比得上白喉类毒素的平均人菌苗剂量)。免疫计划包括一次初次免疫剂量和 2 次间隔 4 周的加强免疫剂量。放血在 0 周、4、6 和 10 周进行。

表 VI

家兔与小鼠的免疫计划及菌苗剂量

免疫在 0, 4, 8 周
放血在 0, 4, 6, 10 周
A. 可溶性单价(单型)制剂
1 剂(0.5 ml): 2.5 μg 寡糖和 13 μg (5Lf) CRM ₁₉₇
1 剂(0.5 ml): 5.0 μg 寡糖和 26 μg (10Lf) CRM ₁₉₇
B. 可溶性多价(4 型混合)制剂
1 剂(0.5 ml): 2.5 μg 型特异寡糖(总量 10 μg 寡糖)和总量为 52 μg (20Lf) 的 CRM ₁₉₇
C. 氢氧化铝吸附的多价(4 型混合)制剂
1 剂(0.5 ml): 2.5 μg 型特异寡糖(总量为 10 μg 寡糖)和总量为 52 μg (20 Lf) 的 CRM ₁₉₇ , 含 1 mg 氢氧化铝

表 VII 显示型特异抗体的放免测定(FARR 法)估测量, 和反应动

物数/被免疫动物数。率(R)表明,在每一免疫剂量后达到倍增。

表Ⅷ显示称为 IgG 同型抗体的 ELISA 滴度,和反应动物数/被免疫动物数。率 $-R_1$ 、 $-R_2$ 和 $-R_3$ 表明,在每一免疫剂量后滴度有倍增;而率 $-R'_1$ 、 R'_2 和 R'_3 表明,就前滴度而言,对一给予的免疫剂量,在滴度上有倍增。

表Ⅸ报告在活的链球菌上多糖荚膜的识别中诱导产生的 IgG 抗体的功能方面的定量结果(肿胀反应或中和试验)。

表 X 显示,用非洲绿猴肾细胞试验来估价的,用载体蛋白 CRM₁₉₇在家兔中诱导产生的白喉毒素中和滴度。因为使用参考的 FDA 抗血清作对照,以 μ /ml 表示的滴度也被包括在内。

表 VI

以共价结合于载体蛋白 CRM₁₉₇ 的
肺炎球菌 6A, 14, 19F, 23F 型寡糖***
免疫**兔的放射免疫法测定的滴度*

	可溶型				氢氧化铝吸附型			
	0周	4周	6周	11周	0周	4周	6周	11周
6A 型	n. d.	n. d.	495(6/6)		n. d.	538(5/5)	3,190 (5/5)	4,064 (5/5)
		150(2/6)					R=6.0	R=1.3
14 型	n. d.	n. d.	195(2/6)		n. d.	77(3/6)	203(4/5)	216(5/5)
		230(1/6)					R=2.6	R=1.1
19F 型	n. d.	n. d.	75(6/6)		n. d.	72(6/6)	108(5/5)	188(5/5)
		n. d.					R=1.5	R=1.7
23F 型	n. d.	n. d.	140(1/5)		n. d.	283(3/6)	n. d.	246(5/5)
		400(1/6)						

* 资料显示以 ngN_{Ab}/ml 表示的几何平均值,应答者/被免疫

动物总数在括号内。

* * 由 4 种糖结合物以可溶型和氢氧化铝吸附型(1 mg/剂)组成的多价制剂, 每一糖结合物含有平均 2.5 μ g 的寡糖和平均 13 μ g 的蛋白 CRM₁₉₇, 于 0 周, 4 周, 和 9 周免疫, 在 0 周, 4 周, 6 周, 11 周放血。

* * * 6A 与 19F 型寡糖有平均 $\overline{DP} = 3$; 14 与 23F 型寡糖有 \overline{DP} 均值为 5。

* * * * 6A 型糖结合物中每单位载体蛋白寡糖 (mol/mol) 的平均置换度 (\overline{SD}) 为 7,

\overline{SD} 在 14 型糖结合物是 6, 19F 型是 4, 23F 型是 5。

表 VIII

由多价菌苗, 包括 \overline{DP} 为 3—6 的肺炎球菌
6A, 14, 19F, 23F 型荚膜寡糖吸附到
无机佐剂氢氧化铝上形成的糖结合物,
诱导的 IgG 型同型抗体滴度* 的 ELISA 结果

	预滴度 (0 周)	初次免疫 (4 周)	第一次增强免疫 (6 周)	第二次增强免疫 (11 周)
6A 型	<50 (0/5) $R_1 > 96.0$	4,800 (5/5) $R_2 = 10.7 (\alpha < 0.01)$ $R_2' > 1,027$	51,200 (5/50) $R_3 = 2.5 (\alpha < 0.01)$ $R_3' > 2,600$	130,000 (5/5)
14 型	<50 (0/5) $R_1 > 7.2$	360 (5/5) $R_2 = 12.4 (\alpha < 0.01)$ $R_2' > 89.3$	4,480 (5/5) $R_3 = 4.4 (\alpha < 0.01)$ $R_3' > 396.0$	19,000 (5/5)
19F 型	<50 (0/5) $R_1 > 41.6$	2,080 (5/5) $R_2 = 9.0 (\alpha < 0.01)$ $R_2' > 371.2$	18,560 (5/5) $R_3 = 1.9 (\alpha < 0.01)$ $R_3' > 704.0$	35,200 (5/5)

23F 型	<50 (0/5)	880(5/5)	1,280(5/5)	11,880**
	$R_1 > 17.6$	$R_2 = 1.5 (\alpha < 0.01)$	$R_3 = 9.3 (\alpha < 0.01)$	
		$R_2' > 25.6$		$R_3' > 237.6$

* 以最高血清稀释度的倒数的几何均值表示的滴度，用反应背景 2 倍的吸光度 (ABS) 值为显示，括号内报告的是动物数 (反应动物 / 总注射动物)

** 该值包括一异乎寻常高反应家兔的滴度，在 5 只受免疫兔中 2 只被摒弃，即最好和最差反应动物，在此列出留下的 3 只家兔对 23F 血清型的结果。

(0 周)	(4 周)	(6 周)	(11 周)
<50 (0/5)	667(3/3)	1,333(3/3)	2,667(3/3)
$R_1 > 13.3$	$R_2 = 2.0 (\alpha < 0.01)$	$R_3 = 2.0 (\alpha < 0.01)$	
	$R_2' > 26.7$	$R_3' > 53.3$	

表 IX
家兔血清抗体对结合于 CRM₁₉₇ 的
DP=3—6 寡糖的免疫学功能
定性分析
(对荚膜识别的肿胀反应*)

肺炎球菌 6A 型:	阳性反应
肺炎球菌 14 型:	阳性反应
肺炎球菌 19F 型:	阳性反应
肺炎球菌 23F 型:	阳性反应

* 按 Austrian (1976) 的方法进行, (Mt. Sinai J. Med. 43:699 — 709)。

表 X

以共价联结于载体蛋白 CRM₁₉₇ 的
肺炎球菌寡糖所合线的多价糖
结合物免疫的家兔中，引入非洲绿猴肾
细胞试验来测定抗白喉滴度*

	前滴度 (0周)	初次免疫 (4周)	第一次加强免疫 (6周)	第二次加强免疫 (11周)
溶解形式	<10	<10 R=2.5	25(0.019 μ /ml) R=77.0	1,920(1.4 μ /ml)
氢氧化铝 吸附形式	<10	20(0.015 μ /ml) R=64.0	1,280(0.96 μ /ml) R=3.0	3,840(2.9 μ /ml)

FDA 参比抗血清含量 6 μ /ml, 在 1/8,000 稀释时可提供 50% 保护

* 滴度以稀释度的倒数表示，在该稀释度时抗血清混合物可对暴露于白喉毒素的细胞，按³H—亮氨酸标记物评估，有 50% 保护。

括号中数字表示用 FDA 参比抗血清作对照，测得的以 μ /ml 表示的滴度

实例 12. 链长 $\overline{DP}=10-20$ 的寡糖是亚理想的免疫原

按照以上所述的合成方案，但用有二种不同的链长“范围值”，即 $\overline{DP}=3-5$ 和 $\overline{DP}=10-20$ 的肺炎球菌 6A, 14, 19F 和 23F 型的糖类，合成了二组糖结合物菌苗。问题然而变成，无论是链长 $\overline{DP}=20$ 或更长的寡糖也均成合适的免疫原（依据对选择的载体蛋白 CRM₁₉₇ 的结合），与短得多的链长，诸如 $\overline{DP}=3$ 的寡糖相比较，在初次免疫或加强免疫能力上均如此。

用列于表 XI 中的草案来免疫家兔。表 XII 和 X III 是关于 $\overline{DP}=10-$

14 和 $\overline{DP}=3-6$ 的肺炎球菌可溶性寡糖分别诱导的 IgG 同型抗体滴度的 ELISA 测定结果, 表 X IV 与 X V 是关于吸附在氢氧化铝上的, $\overline{DP}=10-14$ 和 $\overline{DP}=3-6$ 的肺炎球菌寡糖分别诱导产生的 IgG 同型抗体滴度的 ELISA 测定结果, 表 XII、X III 的比较结果和表 X IV、表 X V 的比较结果均表明, $\overline{DP}=10-14$ 与提高免疫原性无关。事实上, $\overline{DP}=3-5$ 的寡糖结合物的 IgG 初次与加强激活, 较之用 $\overline{DP}=10-14$ 寡糖结合物观察到的激活远为强。并非偶然, 被研究的所有 4 个糖结构均有类似结果。更进一步, 以 $\overline{DP}=10-14$ 的糖结合物中和白喉毒素, 较之用 $\overline{DP}=3-6$ 的糖结合物所达到的中和效果差(表 X VI)。因此, 链长 $\overline{DP}=10-20$ 的寡糖在本发明的结合物中是有功能的, 虽然 $DP=3-6$ 的寡糖可激发更高的抗体滴度。

表 XI

家兔免疫计划表

按每剂 2.5 μg 糖进行糖结合物模式的注射。

由于受试的模式差异仅在于共价连接于寡糖

上的链长度, 所以载体蛋白的相应量为:

	糖剂量(μg)	载体蛋白剂量(μg)	重量比(w/w)
$\overline{DP}=3-6$ 寡-CRM ₁₉₇	2.5	12.5	0.2
$\overline{DP}=10-14$ 寡-CRM ₁₉₇	2.5	2.5	1.0

在 0、4 和 8 周免疫, 在 0、4 和 10 周放血

表 XII

由包含有可溶形式的肺炎球菌 6A, 14, 19F, 23 F

$\overline{DP}=10-14$ 荚膜寡糖的糖结合物的多价菌苗诱导产生的

IgG 同型抗体滴度的 ELISA 测定结果

	前滴度 (0周)	初次免疫 (4周)	第1次加强免疫 (6周)	第2次加强免疫 (10周)
6A型	<100	<100	<100	500(2/5)
14型	<100	300	2,400(3/5)	4,600(3/5)
19F型	<100	<100	<100	<100
23F型	<100	<100	<100	<100

表 X III

由包含有可溶形式的肺炎球菌 6A, 14, 19F, 23 F
 DP=3 — 6 荚膜寡糖的糖结合物的多价菌苗诱导产生的
 IgG 同型抗体滴度的 ELISA 测定结果

	前滴度 (0周)	初次免疫 (4周)	第1次加强免疫 (6周)	第2次加强免疫 (11周)
6A型	<50	<200	967(6/6) $R_3=8.8$ $(\alpha<0.01)$	8,500(6/6)
14型	<50	1,800	3,266(3/6)	3,650(4/6)
19F型	<50	<50	675(4/6)	1,750(6/6)
23F型	<50	<50	<50	<50

表 X IV

由包含有吸附在无机佐剂氢氧化铝上的
 肺炎球菌 6A, 14, 19F, 23F 型 $\overline{DP}=10-14$
 荚膜寡糖的糖结合物的多价菌苗诱导产
 生的 IgG 同型抗体滴度的 ELISA 测定结果

	前滴度 (0周)	初次免疫 (4周)	第1次加强免疫 (6周)	第2次加强免疫 (11周)
6A型	<100 $R_1 > 2.4$	240 (5/5) $R_2 = 3.8 (\alpha < 0.01)$ $R_2' > 9.0$	900 (5/5)	500 (5/5)
14型	<100 $R_1 > 3.0$	300 (5/5) $R_2 = 3.5 (\alpha < 0.01)$ $R_2' > 10.4$	1,040 (5/5) $R_3 = 8.2 (\alpha < 0.01)$ $R_3' > 84.9$	8,480 (5/5)
19F型	<100	<100	400(1/5)	800(1/5)
23F型	<100	<100	<100	200(1/5)

表 X V
由包含有吸附在无机佐剂氢氧化铝上的肺炎球菌 6A, 14, 19F, 23F 型, $\overline{DP} = 3-6$ 荚膜寡糖的糖结合物的多价菌苗诱导产生的 IgG 同型抗体滴度的 ELISA 测定结果

	前滴度 (0周)	初次免疫 (4周)	第1次加强免疫 (6周)	第2次加强免疫 (11周)
6A型	<50(0/5) $R_1 > 96.0$	4,800(5/5) $R_2 = 10.7 (\alpha < 0.01)$ $R_2' > 1,027$	51,200(5/5) $R_3 = 2.5 (\alpha < 0.01)$ $R_3' > 2,600$	130,000(5/5)
14型	<50(0/5) $R_1 > 7.2$	360(5/5) $R_2 = 12.4 (\alpha < 0.01)$ $R_2' > 89.3$	4,480(5/5) $R_3 = 4.4 (\alpha < 0.01)$ $R_3' > 396.0$	19,800(5/5)
19F型	<50 (0/5) $R_1 < 41.6$	2,080 (5/5) $R_2 = 9.0 (\alpha < 0.01)$ $R_2' > 371.2$	18,560 (5/5) $R_3 = 1.9 (\alpha < 0.01)$ $R_3' > 704.0$	35,200(5/5)

23F 型 <50 (0/5) 880 (5/5) 1,280 (5/5) 11,880 (5/5)
 $R_1 > 17.6$ $R_2 = 1.5 (\alpha < 0.01)$ $R_3 = 9.3 (\alpha < 0.01)$
 $R_2' > 25.6$ $R_3' > 237.6$

以最高血清稀释度的倒数几何均值表示的滴度，显示 2 倍于反应背景的吸光度 (ABS) 值，括号内报告的是动物数 (反应动物/总注射动物)

表 X VI

用从由肺炎球菌寡糖-CRM₁₉₇糖结合物
 免疫兔中分离得的血清在体外对白喉毒素行中和试验*

	前滴度 (0 周)	初次免疫 (4 周)	第 1 次加强免疫 (6 周)	第 2 次加强免疫 (10 周)
$\overline{DP} = 3-6$ 寡-CRM ₁₉₇ :				
可溶性	<1/10	<1/10	1.20 (0.03 φ /ml)	1/1,280 (2.05 φ /ml)
氢氧化铝吸附	<1/10	1/10	1/640 (1.02 φ /ml)	1/2,560 (4.10 φ /ml)
$\overline{DP} = 10-14$ 寡-CRM ₁₉₇ :				
可溶性	<1/10	<1/10	<1/10 (0.016 φ /ml)	1/10
氢氧化铝吸附	<1/10	<1/10	1/40 (0.06 φ /ml)	1/80 (0.13 φ /ml)

* 滴度以稀释度的倒数表示，在该稀释度时抗血清混合物可对暴露于白喉毒素的细胞，按³H-亮氨酸标记物评估，有 50% 保护

括号中数字表示用 FDA 参比抗血清作对照，测定的以 μ /ml

表示的滴度

在人中测得 MPL 为 $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$

实例 13. 对于糖结合物的免疫反应
是专一特异的和同种的

对列于表 VII 和 VIII 中的结果进行比较, 即比较由放射免疫法 (RIA) 测定的抗体滴度和用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定的抗体滴度, 表明, RIA 测定的滴度始终低于 ELISA 测定的滴度。这个观察, 以及用于抗糖结合物抗血清的放射免疫扩散和火箭电泳分析的琼脂糖凝胶中, 免疫沉淀物的缺乏, 证明家兔抗肺炎球菌寡糖-CRM₁₉₇ 结合物的抗血清含有高特异的 IgG 同型抗体, 该抗体不能沉淀各自的用于产生寡糖的纯化糖聚合物。

在抗血清中沉淀性抗体的缺乏是专一特异性的标志, 也即对所给的分子的抗原性的全部组成部分中, 仅一个表位有抗体识别 (Berzofsky-Schechter, 1981, *Molecular Immunol.* 18:751—763)、抗原抗体复合物的沉淀要求晶格形成, 以产生连接抗原和抗体分子的三维支链网。要产生此现象, 抗原和抗体二者都要求是多价的, 因为必须有一个以上抗体分子能同时结合到一个抗原分子上。从而, 在家兔对肺炎球菌寡糖—CRM₁₉₇ 结合物的抗血清和同种纯化的高分子量荚膜多糖之间缺乏可观察到的沉淀反应, 这有力地表示, 抗血清含有对糖聚合物特异性的抗体 (如 ELISA 和 ELISA 抑制分析所显示的), 但只针对多糖的一个抗原决定簇 (表位型)。

除了显示免疫沉淀活性物, 异种抗体一般还伴有下面的性质: 用于诱发抗体反应的抗原的一个表位型不能完全抑制抗体的整个种群与完全抗原的结合, 而只能抑制结合于该一表位型的抗体, 其它抗体则游离, 以与完全抗原上存在的其余表位型结合。用 ELISA 一抑制试验可评估抗体总群的异种性。在此试验中, 可在抗原/抗体结合抑制因子 (如分离出来的抗原表位型) 的存在下, 测定抗体总

群与完全抗原结合的能力。用图解表示在未标记完全抗原增加浓度的情况下测定抗体与标记的完全抗原的结合，产生S形曲线，可将其用作抗体/抗原结合的标准曲线。如果抗体总群是异种的，抗体和完全抗原之间的结合不能被加入单一抗原表位型而完全抑制，抗体/抗原结合的标准曲线象其它抗原/抗体之间反应那样，只是部分取代(部分重迭或部分平行)，有别于那些与表位型有关的，被测试的，占优势的抗原抗体间反应。相反，因种群抗体与抗原的结合可以完全被加入的分离的抗原之表位型所抑制，对同种群抗体来说，标准的S型抗原抗体结合曲线是与加入与种群特异性相应的被分离的表位型所产生的曲线重叠与平行。在实验时，以这种方式测定肺炎球菌菌糖结合物诱导产生的象兔IgG，观察到密切相关的模式，即预示有同种群抗体(图4)。肺炎球菌6A型寡糖(无论是非结合的或结合的)均与结合的抑制性S型曲线有关，且与用血清型6A高分子量荚膜多糖所得的曲线大致平行。可预计，异种的(14型)寡糖，无论是游离型(偶联激活)或结合型，不能抑制对6A型抗原特异的IgG表位型群。

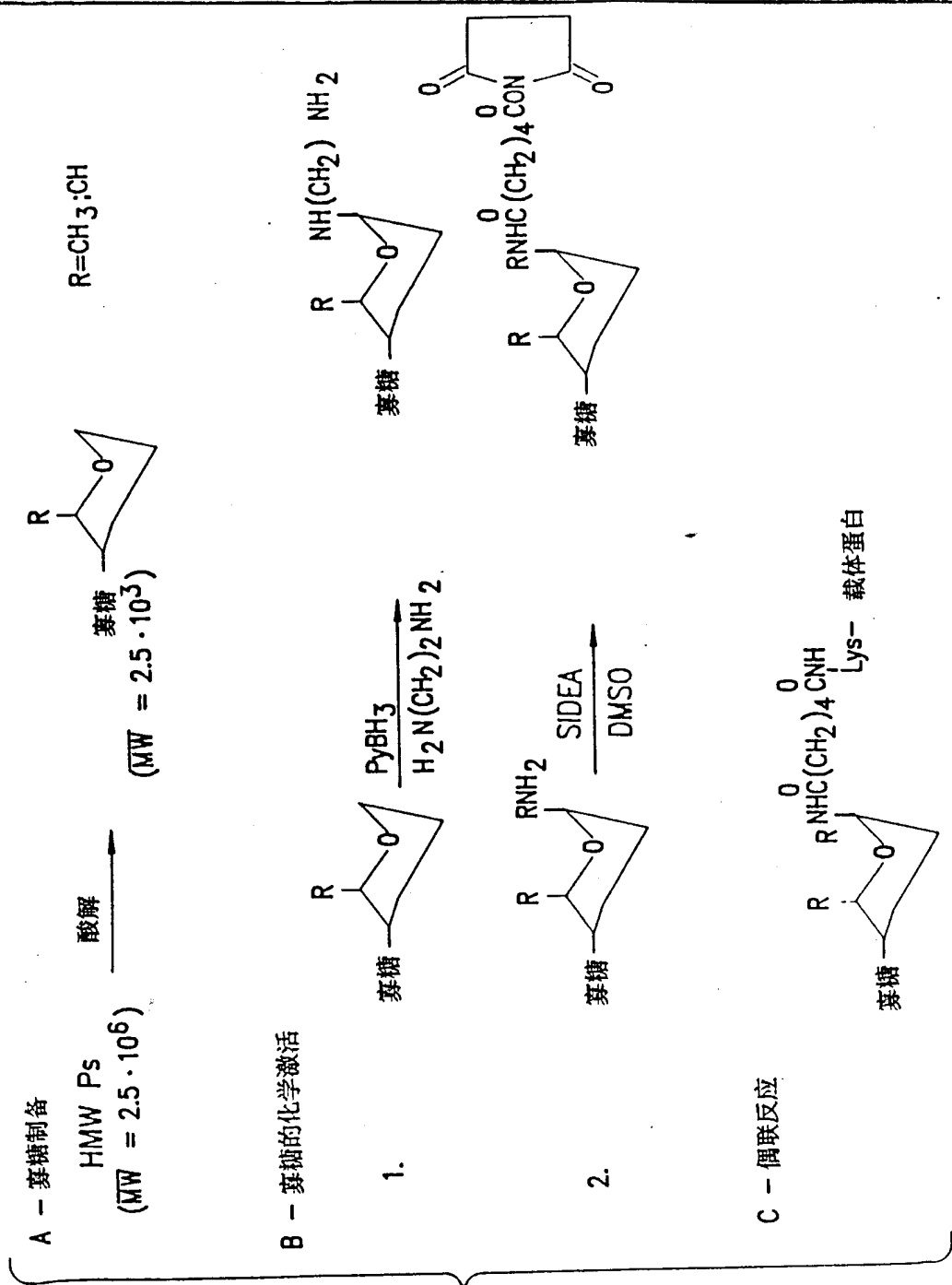


图1

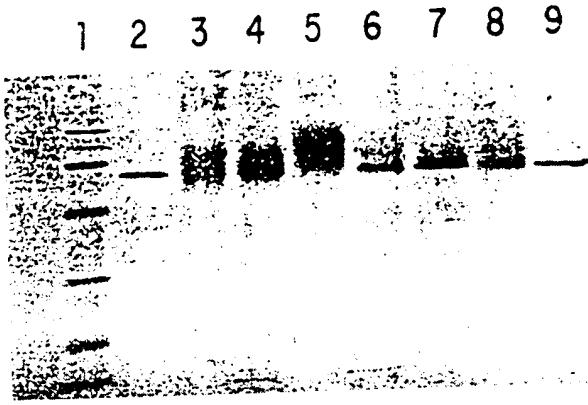


图3A

1 2 3 4 5 6 7

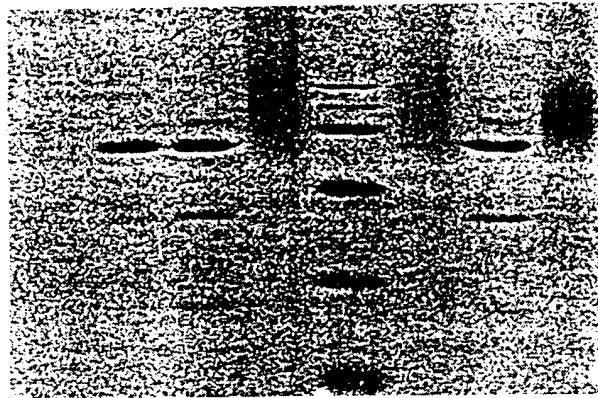


图3B

1 2 3 4 5 6 7

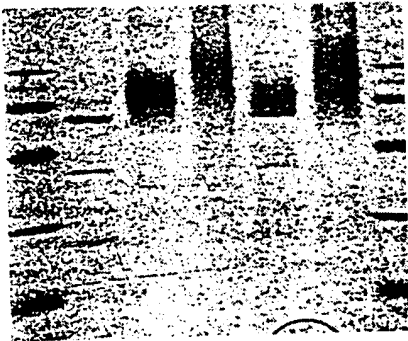
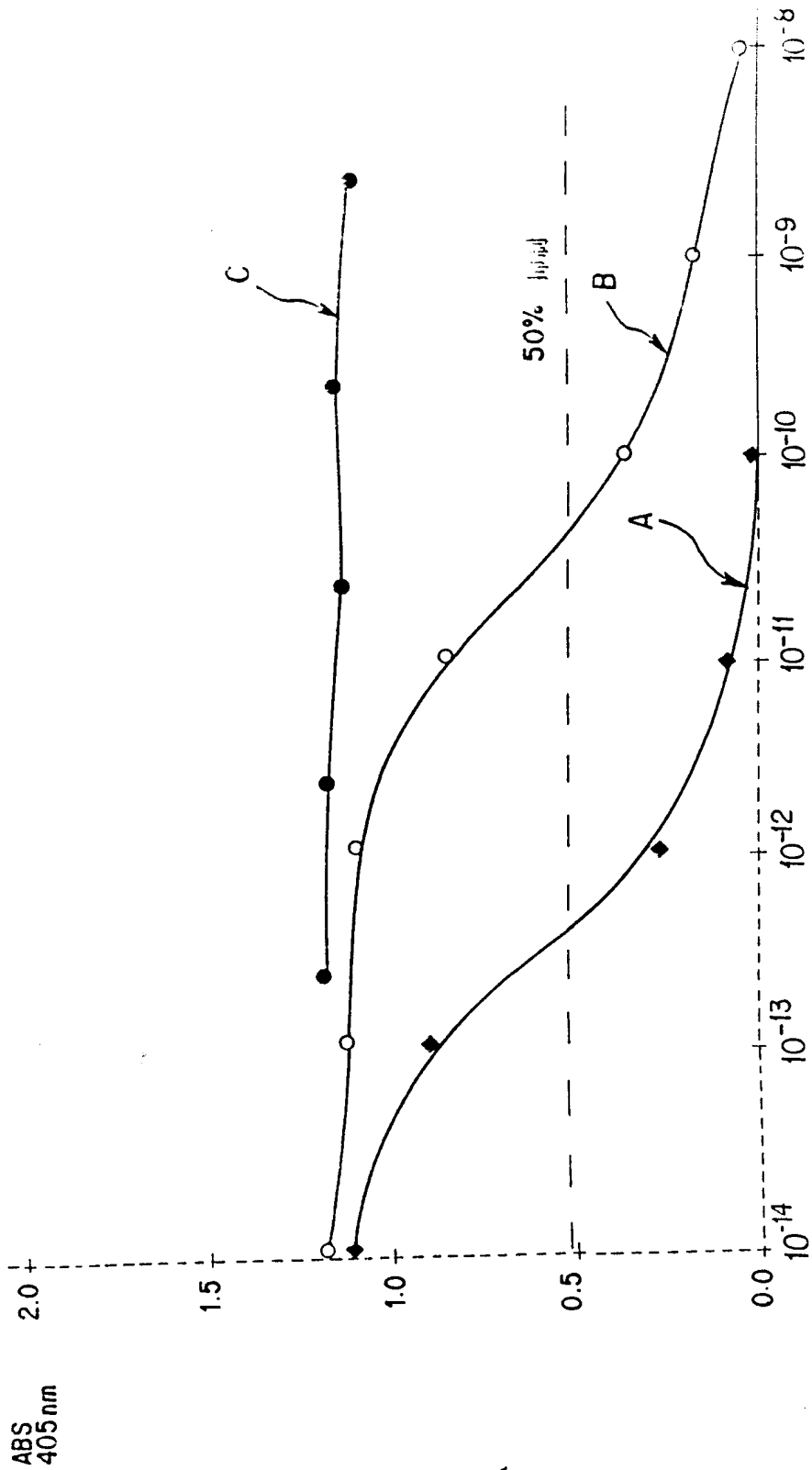


图3C



抑制剂

图 4