

## CDAP 活化多糖制备 5 型肺炎链球菌荚膜多糖-破伤风类毒素结合疫苗

黄镇<sup>1</sup> 陈玉秋<sup>1</sup> 李薇<sup>2</sup> 向左云<sup>1</sup> 吴凯<sup>1</sup> 陶佳明<sup>1</sup> 范荣坤<sup>1</sup> 何建东<sup>1</sup> 方祖群<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 用 1-氰基-4-二甲氨基-吡啶四氟硼酸(CDAP)代替溴化氰(CNBr)活化 5 型肺炎链球菌荚膜多糖,制备 5 型肺炎链球菌荚膜多糖-破伤风类毒素(TT)结合疫苗。方法 将 5 型肺炎链球菌荚膜多糖溶液加 CDAP 活化,经 ADH 和缩合剂 EDAC 与破伤风类毒素进行偶联,经凝胶过滤柱层析纯化,得到 5 型肺炎链球菌多糖-TT 结合物,并对其生化指标、血清学特异性、安全性及免疫原性进行检测。结果 多糖-TT 结合物的游离多糖含量与多糖的衍化率成反比,血清学特异性良好,经动物实验证明其安全合格,具有良好的免疫原性,且游离多糖含量越低,免疫原性越强。结论 用 CDAP 活化工艺制备的 5 型肺炎链球菌荚膜多糖-TT 结合物适宜制备疫苗。

**【关键词】** CDAP 肺炎链球菌 荚膜多糖 破伤风类毒素 结合疫苗

## Preparation of Type 5 *Streptococcus pneumoniae* Capsular Polysaccharide -TT Conjugate Vaccine by Activation of Polysaccharide with CDAP

HUANG Zhen<sup>△</sup>, CHEN Yu-qiu, LI Wei, et al (<sup>△</sup>Yunnan Walvax Biotech Co. Ltd, Kunming 650106, China)

**【Abstract】 Objective** To prepare type 5 *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide -TT conjugate vaccine by activation of polysaccharide with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) instead of cyanogen bromide (CNBr). **Methods** Type 5 *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide solution was activated with CDAP and coupled to TT by using ADH and condensing agent EDAC, then purified by gel filtration column chromatography to prepare type 5 *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide-TT conjugate which was determined for biochemical indexes and evaluated for serological specificity, safety and immunogenicity. **Results** The free polysaccharide content in the prepared conjugate was negatively related to the derivation rate of polysaccharide. The conjugate showed high specificity and immunogenicity as well as safety in animal test, and its immunogenicity increased with the decreasing free polysaccharide content. **Conclusion** The type 5 *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide-TT conjugate prepared by activation with CDAP is suitable for development of vaccine.

**【Key words】** CDAP; *Streptococcus pneumoniae*; Capsular polysaccharide; Tetanus toxoid; Conjugate vaccine

肺炎链球菌是引起肺炎、脑膜炎和中耳炎的常见病原体,尽管可以利用有效的抗菌素进行治疗,但随着肺炎链球菌多重耐药性的出现,尤其是对青霉素和头孢霉素的耐药性已成为世界性难题<sup>[1,2]</sup>。因此,研发相关疫苗显得尤为重要。肺炎链球菌按其荚膜多糖的不同可分为 90 个血清型,其中约 30 个血清型的菌株对人类有致病性<sup>[3-5]</sup>。5 型肺炎链球菌是中国婴幼儿中流行率很高的肺炎链球菌,因此研发含有肺炎链球菌 5 型的疫苗,对于我国肺炎链球菌疾病的预防具有重要意义。本研究选择肺炎链球菌 5 型荚膜多糖,采用 1-氰基-4-二甲氨基-吡啶四氟硼酸(1-Cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate, CDAP)代替溴化氰(Cyanogen bromide, CNBr)作为多糖活化剂,用碳二亚胺[1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-p-ropyl)carbodiimide, EDAC]作为缩合剂,将多糖衍生物与精制破伤风类毒素(Tetanus toxoid,

TT)结合制成结合疫苗,并对结合疫苗的生化指标、安全性及免疫原性等进行检测。

### 1. 材料与方法

#### 1.1 菌株

5 型肺炎链球菌原始菌种购自中国药品生物制品检定所。

#### 1.2 5 型肺炎链球菌荚膜多糖及破伤风类毒素

5 型肺炎链球菌荚膜多糖由云南沃森生物技术股份有限公司制备,各项指标均符合《欧洲药典》相关质量标准,破伤风类毒素由玉溪沃森生物技术股份有限公司提供,各项指标均符合《中国药典》三部(2005 版)相应标准。

#### 1.3 主要试剂

CDAP 为 Fluck 公司产品;ADH、EDAC、TNBS 和 2,4,6-三硝基苯磺酸均为 Sigma 公司产品;5 型肺炎链球菌抗血清为丹麦血清研究所产品;TT 抗毒素购自中国药品生物制品检定所;三乙胺(TEA)、碳酸氢钠、盐酸、氢氧化钠、萘酚及浓硫酸等均为国产

作者单位:1 云南沃森生物技术股份有限公司(昆明 650106);

2 中国药科大学药学院制药工程专业(南京 210009)。

通讯作者:黄镇, E-mail: walvaxhuangzhen@126.com

分析纯试剂 ;XK16 Sepharose CL-4B 柱为 Pharmacia 公司产品 ;Sepharose 4FF 凝胶柱为 GE 公司产品。

### 1.4 实验动物

普通级健康新西兰大耳白兔 雌性 ,体重 1.7 ~ 2.5 kg ,由成都达硕生物科技有限公司提供。

### 1.5 多糖的衍化

将 5 型肺炎链球菌荚膜多糖用注射用水溶解成 5 mg/ml 的溶液 ,加入 CDAP 活化 ,再加入等体积的 ADH 溶液 ,进行偶联反应。反应物经超滤浓缩 ,得到多糖衍生物。

### 1.6 多糖-TT 结合物的制备

在多糖-ADH 衍生物溶液中加入等体积的 TT 溶液 ,混匀后置冰浴中 ,加入 EDAC 粉末至终浓度为 20 mmol/L 维持 pH(4.7 ± 0.2) ,于 2 ~ 8℃反应 2 ~ 4 h。反应物经 Sepharose 4FF 凝胶柱分离纯化 ,收集 V<sub>0</sub> 附近的吸收峰 除菌过滤 ,于 2 ~ 8℃保存。共制备 4 批。

### 1.7 衍生物及结合物的生化检测

采用 TNBS 法测定 ADH 含量(ADH 作标准) ; 蒽酮-硫酸法测定多糖含量 ;Lowry 法测定蛋白含量 ; 乙醇冷沉法测定游离多糖含量 [6] ;Sepharose CL-4B 层析检测相对分子量。

### 1.8 结合物中多糖和 TT 的血清学特异性检测

采用琼脂双扩散法。中央孔为 5 型肺炎链球菌抗血清或 TT 抗毒素 ,边孔为 4 批结合物和生理盐水(阴性对照) ,分别检测结合物中多糖和 TT 的抗原活性 [7,8]。

### 1.9 结合物的安全性检测

采用《中国药典》三部(2005 版)“异常毒性检查”方法评价结合物的安全性。

### 1.10 结合物的免疫原性检测

参考文献[9]。将家兔分为 5 组 :4 批多糖-TT 结合物组(1 组 批号 20070206 ,2 组 批号 20070207 ,3 组 批号 20070308 ,4 组 批号 20070309)和 5 型多糖衍生物对照组(5 组) ,每组 10 只。将结合物原液、衍生物稀释为含糖 4 μg/ml ,经家兔腿弯部淋巴结处皮下注射 ,0.5 ml/只(双侧 ,每侧 0.25 ml) ,于第 0、21、42 天各免疫 1 次 ,分别于第 1 针免疫后第 35 和 56 天采血分离血清 ,置-20℃保存备用。取家兔抗血清 50 倍稀释 ,与等体积的细胞壁多糖(20 μg/ml) 混合 ,在 37.8℃下预孵化 60 min ,再在 2 ~ 8℃下孵化过夜 ,抑制所有的细胞壁多糖抗体。对抑制细胞壁多糖活性的血清进一步稀释 ,ELISA 法测定抗 5 型肺炎链球菌荚膜多糖的特异性 IgG 抗体滴度。

### 1.11 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析 ,实验数

据经方差分析 ,以最小显著差法(LSD) 进行各组间两两比较 ,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2. 结果

### 2.1 结合物纯化后的组分分布

多糖-TT 结合物经 Sepharose 4FF 凝胶柱分离 ,用 206 nm 和 280 nm 波长检测洗脱液 ,可见两个波长在 0.2 Kd 以前同时起落 ,且洗脱峰均较高 ,表明已产生了多糖和蛋白的结合物 ;而在 0.2 Kd 以后 ,280 nm 的吸收几乎为 0 ,而 206 nm 的吸收仍很明显 ,表明 0.2 Kd 以后的洗脱液基本为未结合的游离多糖和其他反应试剂等。见图 1(以 20070308 批为例)。

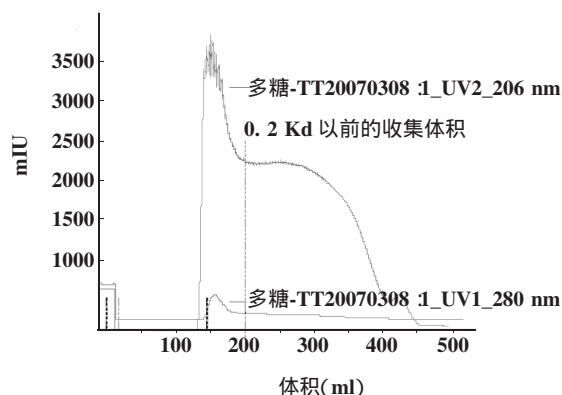


图 1 经 Sepharose 4FF 凝胶分离的多糖-TT 结合物的层析图谱

Fig 1. Sepharose 4FF gel chromatographic profile of type 5 *Streptococcus pneumoniae* capsular polysacchareide-TT conjugate

### 2.2 衍生物及结合物的生化指标

检测结果显示 ,多糖-ADH 衍生物的衍化率提高 ,多糖-TT 结合物的多糖含量也相应提高 ,游离多糖含量降低。表明结合物的游离多糖含量与多糖的衍化率成反比 ,即多糖衍化率越高 ,游离多糖含量越低 ,见表 1 和表 2。

### 2.3 结合物中多糖和 TT 的血清学特异性

检测结果显示 ,阴性对照未与 5 型肺炎链球菌抗血清或 TT 抗毒素产生沉淀线 ,而 4 批结合物均与 5 型肺炎链球菌抗血清和 TT 抗毒素产生沉淀线 ,见图 2。

### 2.4 结合物的安全性

试验结束 ,小鼠、豚鼠均正常 ,体重增加 符合规定。

### 2.5 结合物的免疫原性

检测结果显示 ,5 型多糖衍生物对照组(5 组)1、2、3 针免疫后血清抗体阳转率及多糖特异性 IgG 抗

体 GMT 均很低 ,与免疫前比较 ,差异均无统计学意义( $F$  值分别为 2.42、1.14 和 3.11  $P > 0.05$ ) ,各针次间比较 ,差异也无统计学意义( $F_{1,2} = 3.13$   $F_{1,3} = 2.41$   $F_{2,3} = 1.20$   $P > 0.05$ )。4 批结合物免疫组血清抗体阳转率及 GMT 水平较免疫前均不同程度提高 ,其中游离多糖含量低的结合物免疫组(3 组和 4 组)血清抗体阳转率和 GMT 水平均呈递增趋势 ,血清抗体阳转率 1 针与 2 针和 3 针差异有统计学意义(3 组  $F_{1,2} = 6.34$   $F_{1,3} = 11.12$  4 组  $F_{1,2} = 4.66$   $F_{1,3} = 6.47$   $P$  均  $< 0.05$ ) ,GMT 3 针间差异均有统计学意义(3 组  $F_{1,2} = 4.24$   $F_{1,3} = 8.62$   $F_{2,3} = 5.17$  4 组  $F_{1,2} = 4.25$   $F_{1,3} = 6.01$   $F_{2,3} = 7.24$   $P$  均  $< 0.05$ ) ;而游离多糖含量高的结合物免疫组(1 组和 2 组)仅免疫后与免疫前差异有统计学意义( $F$  值分别为 8.92 和

5.57  $P$  均  $< 0.05$ ) ,各针次间差异无统计学意义(1 组  $F_{1,2} = 1.16$   $F_{1,3} = 2.11$   $F_{2,3} = 1.89$  2 组  $F_{1,2} = 2.03$   $F_{1,3} = 2.31$   $F_{2,3} = 1.24$   $P$  均  $> 0.05$ )。见表 3。表明结合疫苗的免疫原性优于多糖衍生物 ,且免疫原性的强弱与结合物中游离多糖的含量密切相关 ,游离多糖含量越低 ,免疫原性越强。

表 1 5 型肺炎链球菌多糖衍生物的检测结果

Tab 1. Determination result of type 5 *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide derivatives

批号	多糖含量( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	ADH 含量( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	衍化率(%)
20070206	117.19	4.45	3.8
20070207	100.14	6.31	6.3
20070308	119.43	9.32	7.8
20070309	150.21	14.87	9.9

表 2 5 型肺炎链球菌多糖结合物的检测结果

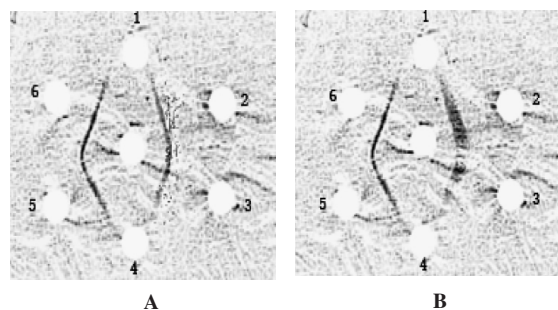
Tab 2. Determination result of type 5 *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide conjugate

批号	多糖含量( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	蛋白含量( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	游离多糖含量(%)	多糖蛋白比	结合物 kd 值	kd $< 0.2$ 的分子回收率(%)
20070206	42.05	75.09	37.36	0.56	0.04	98.9
20070207	53.53	97.33	30.60	0.55	0	100
20070308	73.72	179.80	17.62	0.41	0.04	97.8
20070309	80.31	250.97	12.37	0.32	0.04	98.4

表 3 各组家兔免疫后的血清抗体阳转率及多糖特异性 IgG 抗体 GMT 水平

Tab 3. Seroconversion rate and polysaccharide-specific IgG antibody GMT of rabbits in various groups after immunization

组别	免疫前 GMT	第 1 针免疫后		第 2 针免疫后		第 3 针免疫后	
		阳转率(%)	GMT	阳转率(%)	GMT	阳转率(%)	GMT
1	1	60	1.94	70	2.06	50	2.28
2	1	40	1.88	60	1.99	30	2.13
3	1	60	3.46	100	4.13	100	5.06
4	1	70	3.17	100	3.98	100	4.46
5	1	20	1.04	10	1.06	0	1.03



A :中央孔为 5 型肺炎链球菌抗血清 ;B :中央孔为 TT 抗毒素 ;1 :生理盐水 ;2 3 5 6 :4 批结合物

图 2 结合物中多糖和 TT 抗原活性检测的琼脂双扩散图

Fig 2. Determination of polysaccharide and TT antigen activities in conjugate by double agar diffusion test

### 3. 讨论

用于制备多糖蛋白结合疫苗的方法有直接结合和间接结合两种 ,国内外采用的活化剂有  $\text{NaIO}_4$ 、 $\text{CNBr}$  和 CDAP ,而国内常采用  $\text{CNBr}$  作为多糖的活化剂 [10-12]。本研究采用 CDAP 作为 5 型肺炎链球菌荚膜多糖的活化剂 ,用 ADH 作为偶联剂 ,在 EDAC 的作用下使多糖-ADH 衍生物与 TT 偶联 ,形成 PS-ADH-TT 的结合物。此方法与  $\text{CNBr}$  法相比 ,反应较温和 ,减少了由于强碱性条件导致多糖结构的破坏和多糖抗原决定簇的丢失 ,从而使多糖更好地保留了其免疫原性。多糖与蛋白结合后 ,免疫原性得到了进一步提高。结合物分子明显大于多糖 ,结合物与多糖特异性抗血清和 TT 产生了明显的沉淀线 ,表明多糖与

(下转第 499 页)

好的免疫原性。免疫剂量在 1.25 ~ 15 μg 内与抗体滴度呈正相关,但 15 μg 与 10 μg 产生的抗体水平差异无统计学意义,因此,确定免疫剂量为 10 μg/只。3 针免疫诱导产生的 IgG 抗体滴度显著高于 2 针免疫,因此确定最佳免疫针次为 3 针。小鼠保护性试验表明,纯化的 P6 蛋白对 NIH 小鼠具有一定的保护力。

本实验在大量培养不可分型流感嗜血杆菌(NTHi)后,直接从菌体纯化出外膜蛋白 P6,通过小鼠免疫,证实其能够诱导机体产生良好的体液免疫反应,为 NTHi 疫苗的开发奠定了基础。

参考文献

[1] Webster P, Wu S, Gomez G, et al. Distribution of bacterial proteins in biofilms formed by non-typeable *Haemophilus influenzae* [J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54 (7): 829-842.

[2] Hlrano T, Hou Y, Jiao X, et al. Intranasal immunization with a lipooligosaccharide-based conjugate vaccine from nontypeable *Haemophilus influenzae* enhances bacterial clearance in mouse nasopharynx [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, 35(1): 1-10.

[3] Novotny LA, Partida-Sánchez S, Munson RS Jr, et al. Differential uptake and processing of a *Haemophilus influenzae* P5-derived immunogen by chinchilla dendritic cells [J]. *Infect Immun*, 2008, 76 (3):967-977.

[4] Kodama S, Suenaga S, Hirano T, et al. Induction of specific immunoglobulinA and Th2 immune responses to P6 outer membrane protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* in middle ear mucosa by intranasal immunization [J]. *Infect Immun*, 2000, 68 (4): 2294-2300.

[5] Toropainen M, Raitolehto A, Henckaerts I, et al. Pneumococcal *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine induces anti-

bodies that inhibit glycerophosphodiester phosphodiesterase activity of protein D [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(10): 4546-4553.

[6] Berenson CS, Murphy TF, Wrona CT, et al. Outer membrane protein P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a potent and selective inducer of human macrophage proinflammatory cytokines [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(5): 2728-2735.

[7] Koyama J, Ahmed K, Zhao J, et al. Strain-specific pulmonary defense achieved after repeated airway immunizations with non-typeable *Haemophilus influenzae* in a mouse model [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2007, 211 (1): 63-74.

[8] Karalus RJ, Murphy TF. Purification and characterization of outer membrane protein P6, a vaccine antigen of non-typeable *Haemophilus influenzae* [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1999, 26 (2): 159-166.

[9] Sabirov A, Casey JR, Murphy TF, et al. Breast-feeding is associated with a reduced frequency of acute otitis media and high serum antibody levels against NTHi and outer membrane protein vaccine antigen candidate P6 [J]. *Pediatr Res*, 2009, 66 (5): 565-570.

[10] Poolman JT, Bakaletz L, Cripps A, et al. Developing a nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) vaccine [J]. *Vaccine*, 2000, 19 (Suppl 1): S108-115.

[11] Sabirov A, Casey JR, Murphy TF, et al. Breast-feeding is associated with a reduced frequency of acute otitis media and high serum antibody levels against NTHi and outer membrane protein vaccine antigen candidate P6 [J]. *Pediatr Res*, 2009, 66 (5): 565-570.

[12] Sabirov A, Kodama S, Hirano T, et al. Intranasal immunization enhances clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* and reduces stimulation of tumor necrosis factor alpha production in the murine model of otitis media [J]. *Infect Immun*, 2001, 69 (5):2964-2971.

[13] Wu T, Chen J, Murphy TF, et al. Investigation of nontypeable *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6 as a new carrier for lipooligosaccharide conjugate vaccines [J]. *Vaccine*, 2005, 23 (44): 5177- 5185.

(收稿日期 2010-02-09)

(上接第 495 页)

TT 偶联形成了多糖-TT 共价结合物,CDAP 作为 5 型肺炎链球菌荚膜多糖的活化剂,不会破坏其抗原性。

结合疫苗的免疫原性受多种因素影响,如结合物中游离多糖含量、结合多糖分子的大小、结合多糖的浓度、多糖蛋白比等。游离多糖含量的影响尤为突出,因其改变会连带其他因素<sup>[10,11]</sup>。动物实验显示,结合物中游离多糖含量越低,免疫原性越好。

综上所述,本实验用 CDAP 作为多糖活化剂制备了 5 型肺炎链球菌荚膜多糖-TT 结合物,通过进一步的条件优化,可制备出游离多糖含量较低的结合物,该结合物安全性合格,能诱导高水平的 IgG 抗体应答和免疫记忆。本实验仅就 CDAP 活化多糖法制备 5 型肺炎链球菌结合物进行了初步探讨,尚需进行更深入的研究。

参考文献

[1] 陈晓航,王剑虹,任克明,等. 5 型肺炎链球菌荚膜多糖结合疫苗的不同糖蛋白比与免疫原性的关系. *微生物学免疫学进展*, 2006,34 (4) :19-22.

[2] 张萍,王欣茹,侯亚莉,等. 14 型肺炎链球菌荚膜多糖-破伤风类毒

素结合疫苗的研制. *微生物学免疫学进展*, 2007, 35 (1) :1-4.

[3] Stroop CJ, Xu Q, Retzlaff M, et al. Structural analysis and chemical depolymerization of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 1. *Carbohydrate Res*, 2003,337 (4): 335-344.

[4] 城野洋一郎,任常陵. 欧美开发的新肺炎球菌糖结合疫苗. *日本医学介绍*, 2007, 28 (2): 82.

[5] Briles DE, Hollingshead SK, Crain MJ, et al. Pneumococcal proteins that may constitute the next generation vaccine for pneumococcal disease. *Int Congress Series*, 2003, 1257 (9) 27-31.

[6] 吴凯,陈磊,周红军,等. 肺炎链球菌 18C 型多糖结合物中游离多糖含量检测方法的建立. *中国生物制品学杂志*, 2009, 22 (9): 930-932.

[7] 张萍,王欣茹,侯亚莉,等. 不同方法制备的 1 型肺炎球菌多糖-蛋白结合疫苗生化及免疫学特性比较. *中国生物制品学杂志*, 2007, 20(5): 369-371.

[8] 王雪薇,梅影. 3 针肺炎链球菌结合疫苗免疫程序的免疫原性和安全性. *国际生物制品学杂志*, 2006, 29 (2) 89.

[9] Pawlowski A, Kallenius G, Svensona SB. Preparation of pneumococcal capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines utilizing new fragmentation and conjugation technologies. *Vaccine*, 2000, 18 (18): 1873-1885.

[10] 黄镇,钱雯,袁琳,等. A+C 群脑膜炎球菌多糖结合疫苗的研制. *中国生物制品学杂志*, 2005, 18 (6): 483-486.

[11] 黄镇,钱雯,李文春,等. C 群脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗衍化工艺研究. *预防医学情报杂志*, 2005, 21 (4):397-400.

[12] 吴兵,刘方雷,杜琳,等. 三种不同载体的 C 群脑膜炎球菌荚膜多糖-蛋白质结合疫苗比较研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2006, 26 (11): 1042-1047.

(收稿日期 2009-10-20)