



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102178686 B

(45) 授权公告日 2016.01.13

(21) 申请号 201110020371.2

(22) 申请日 2011.01.07

(30) 优先权数据

61/335,415 2010.01.07 US

(73) 专利权人 王慧茹

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 王慧茹

(74) 专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司 11283

代理人 王崇 周建秋

(51) Int. Cl.

A61K 31/7012(2006.01)

A61K 31/7008(2006.01)

A61K 31/498(2006.01)

A61K 31/105(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

A61K 39/125(2006.01)

A61K 39/145(2006.01)

A61K 39/15(2006.01)

A61K 39/155(2006.01)

A61K 39/17(2006.01)

A61K 39/21(2006.01)

A61K 39/215(2006.01)

A61K 39/245(2006.01)

A61K 39/29(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

A61P 37/08(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 31/18(2006.01)

A61P 31/16(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

A61P 31/20(2006.01)

A61P 3/04(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

A61P 13/12(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

(56) 对比文件

杨威. 《n-乙酰神经氨酸衍生物的合成及其在快速检测流感病毒中的应用》. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2009, (第11期), 7-9页.

杨威. 《n-乙酰神经氨酸衍生物的合成及其在快速检测流感病毒中的应用》. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2009, (第11期), 7-9页.

审查员 张婷

权利要求书1页 说明书25页 附图5页

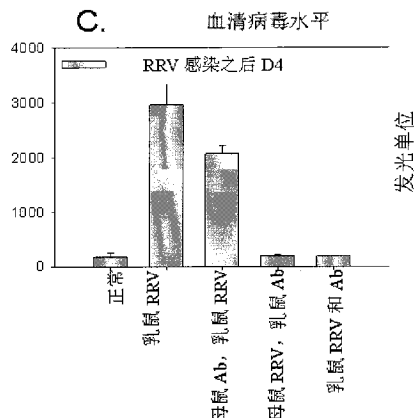
(54) 发明名称

多糖相关疾病的药物和疫苗及免疫测定产品

(57) 摘要

本发明提供了一种用于治疗或预防多糖相关疾病的药物组合物,所述组合物含有含多糖分子、多糖结合分子和多糖修饰分子中的一种或多种;其中,所述多糖结合分子为能与多糖结合的抗体和/或凝集素;所述多糖修饰分子中含有修饰基团,所述修饰基团为乙酰基、乳酰基、甲基、磷酸基和含硫基团中的一种或多种,并且所述修饰基团能与所述含多糖分子共价偶联。本发明还提供了用于治疗或预防多糖相关疾病的疫苗。本发明进一步提供了诊断多糖相关疾病的免疫测定产品。

CN 102178686 B



1. 一种用于治疗和 / 或预防传染病的药物组合物, 所述组合物的活性成分为含多糖分子和多糖修饰分子;

其中, 所述含多糖分子为唾液酸, 所述唾液酸为 N- 乙酰神经氨酸或 N- 乙酰神经氨酸甲酯;

所述多糖修饰分子为含硫氨基酸。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中, 所述组合物含有 0.1 毫克 / 毫升至 20 毫克 / 毫升的唾液酸, 以及 0.1 毫克 / 毫升至 20 毫克 / 毫升的多糖修饰分子。

3. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中, 所述组合物含有 0.1 毫克 / 克至 20 毫克 / 克的唾液酸, 以及 0.1 毫克 / 克至 20 毫克 / 克的多糖修饰分子。

4. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中, 所述含硫氨基酸为甲硫氨酸或甲硫氨酸 - 锌复合物。

5. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中, 所述唾液酸为 N- 乙酰神经氨酸, 所述多糖修饰分子为甲硫氨酸或甲硫氨酸 - 锌复合物。

6. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中, 所述传染病为由流感病毒、新城疫病毒或轮状病毒引起的传染病。

7. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中, 所述传染病为由病毒引起的腹泻。

8. 权利要求 1-5 中任意一项所述的组合物在制备用于治疗 and / 或预防传染病的药物组合物中的用途, 其中, 所述传染病为由流感病毒、新城疫病毒或轮状病毒引起的传染病; 或者, 所述传染病为由病毒引起的腹泻。

9. 根据权利要求 8 所述的用途, 其中, 所述药物组合物的给药剂量包括 0.1 毫克 / 公斤体重至 20 毫克 / 公斤体重的含多糖分子, 以及 0.1 毫克 / 公斤体重至 20 毫克 / 公斤体重的多糖修饰分子。

10. 根据权利要求 8 所述的用途, 其中, 给药途径包括口服及注射。

多糖相关疾病的药物和疫苗及免疫测定产品

[0001] 引用的相关申请

[0002] 本申请要求了 2010 年 1 月 7 日提交的题为《抗病毒药物和治疗产品和疫苗以及实验模型》的美国临时申请 No. 61/335, 415 的优先权。这个申请的全部说明书和内容都引入本文作为参考。

技术领域

[0003] 本发明主要涉及生物, 医药和流行病学领域, 特别是, 涉及一种或多种治疗和预防多糖相关疾病的药物组合物、一种或多种治疗和预防多糖相关疾病的疫苗以及一种或多种诊断多糖相关疾病的免疫测定产品。

背景技术

[0004] 细胞表面糖类与细胞粘附密切相关, 因此与细胞 - 细胞间或病原 - 宿主间的相互作用密切相关, 这种发现促进了糖生物学的日益升温。例如, 已发现唾液酸在人和动物组织以及例如细菌的病原中广泛分布。唾液酸在细胞外膜 (例如, 每个人红细胞有大于一千万个分子)、溶酶体膜内侧和分泌糖蛋白例如粘蛋白和血液蛋白中被大量表达。唾液酸具有稳定分子和膜的功能, 还具有调节与环境相互作用的功能。例如, 唾液酸可保护分子和细胞免受蛋白酶或糖苷酶的攻击, 调控受体的亲和力并抑制细胞凋亡 (Ajit Varli et al., *Essentials of Glycobiology*, Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008, pp209 (Ajit Varli 等, 糖生物学基础, 第二版, 冷泉港实验室出版社, 2008, pp209 页))。

[0005] 唾液酸的另一重要作用在于其二元性, 它们既可作为表物 (mask) 又可作为识别位点。在第一种情况中, 它们可掩护抗原位点和受体, 最重要的是, 它们还掩护了次末端的半乳糖残基。唾液酸脱落后, 分子和细胞可被吞噬并降解。在另一方面, 唾液酸本身可充当多种微生物和凝集素的配体。例如, 唾液酸是流感病毒的结合位点 (Ajit Varli et al., *Essentials of Glycobiology*, Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008, pp209 (Ajit Varli 等, 糖生物学基础, 第二版, 冷泉港实验室出版社, 2008, pp209 页))。

[0006] 基于唾液酸的多种不同病理生理作用, 人们在开发药理学活性物质中付出了很多努力。许多公知的小分子药物, 例如抗生素和抗癌治疗药剂都是含有多糖作为其基本结构的一部分和 / 或作为糖侧链 (即糖苷) 的天然产物。最著名的是唾液酸酶的竞争性抑制剂, 其源于 2- 脱氧 -2, 3- 二脱氢 - 乙酰神经氨酸, 并可阻碍 A 和 B 型流感病毒的出芽和扩散。这种方法促使了扎那米韦 (瑞乐沙) 和奥塞米韦 (达菲) 的研发。然而, 两种药物均靶向病毒并由此诱导了流感病毒抗药株的产生。

发明内容

[0007] 本发明的一个方面基于细胞表面多糖或糖类, 特别是唾液酸, 与细胞 - 细胞间或

病原-宿主间的相互作用密切相关的概念。在一个实施方式中,本发明公开了基于多糖特别是基于唾液酸的包括化学制品和生物制品的治疗剂、生物标记物和实验模型,它们可用于诊断、预防和治疗人、动物、植物和其它生物的传染病、癌症、自身免疫疾病、过敏、中毒、肥胖和/或其它疾病。本发明还公开了这些疾病的新致病机理和基于多糖治疗产品的新功能机理。

[0008] 本发明提供了一种用于治疗 and / 或预防多糖相关疾病的药物组合物,所述组合物含有含多糖分子、多糖结合分子和多糖修饰分子中的一种或多种。

[0009] 其中,所述多糖结合分子可以为能与多糖结合的抗体和/或凝集素。

[0010] 所述多糖修饰分子中含有修饰基团,所述修饰基团可以为乙酰基、乳酰基、甲基、磷酸基和含硫基团中的一种或多种,并且所述修饰基团能与所述含多糖分子共价偶联。

[0011] 其中,所述多糖相关疾病可以为传染病、癌症、自身免疫疾病、过敏反应、炎症、中毒和肥胖中的一种或多种。

[0012] 其中,所述多糖相关疾病可以为由病原、体内的由病原或疫苗诱导的抗体、外来的抗体和外来凝集素中的一种或多种引起的疾病。

[0013] 其中,所述抗体可以为抗病原的抗体中的一种或多种。

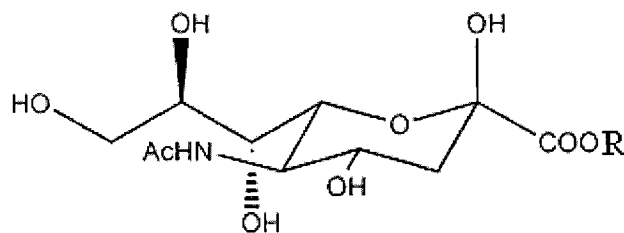
[0014] 所述病原可以为流感病毒、轮状病毒、呼吸道肠道病毒、腺病毒、冠状病毒、鼻病毒、新城疫病毒、RSV、HAV、HBV、HCV、HIV、EBV、HPV 和 CMV 的一种或多种;所述流感病毒可以为 H1N1 病毒、H3N2 病毒、H5N1 或 B 病毒中的一种或多种。

[0015] 所述凝集素可以为植物凝集素、动物凝集素和病原凝集素中的一种或多种;所述植物凝集素可以为小麦胚芽凝集素、荊豆凝集素 I 和大豆凝集素中的一种或多种。

[0016] 其中,所述含多糖分子可以为 N-乙酰神经氨酸、N-乙酰神经氨酸的衍生物、2-酮-3-脱氧壬酮糖酸、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰甘露糖胺和 N-羟乙酰基神经氨酸中的一种或多种。

[0017] 其中,所述 N-乙酰神经氨酸的衍生物是具有以下通用化学结构的化合物:

[0018]



[0019] 其中,R 可以为氢、烷基、环烷基、钠、取代烷基、取代环烷基、芳基、取代芳基、醚基、硫酯、硫醚、二硫化酯、二硫甲基、甲硫氨酸、甲硫氨酸-锌、S-CH₂-CH₃、S-CH₃、苯酚或苯酚衍生物;或者是该化合物的药学上可接受的盐、酯或溶剂化物。

[0020] 其中,所述多糖修饰分子可以为能够硫化多糖的含硫化合物。

[0021] 其中,所述含硫化合物可以为甲硫氨酸、硫酸盐、磺酸盐、磺酰化合物、半胱氨酸、二烯丙基二硫醚、大蒜素、二乙基二硫醚和甲硫氨酸-锌复合物中的一种或多种。

[0022] 本发明还提供了一种用于治疗 and / 或预防多糖相关疾病的疫苗,该疫苗为抗多种病原体的疫苗或通用的疫苗,所述疫苗含有至少一种共享的聚糖相关结合位点及其衍生物,或者含有共享该聚糖相关结合位点的至少两种不同的病原中的至少一种,其中,所述共

享的聚糖相关结合位点独立地与至少两种不同病原结合；

[0023] 优选地,所述共享的聚糖相关结合位点任选地为聚糖、糖蛋白、糖脂、多糖、寡糖、碳水化合物、凝集素、选择素、粘蛋白、红细胞凝集素、角蛋白、受体、细胞成分、癌基因产物、哺乳动物细胞和肿瘤细胞的片段；

[0024] 优选地,所述至少两种不同的病原中的至少一种任选地为流感病毒、轮状病毒、呼吸道肠道病毒、腺病毒、冠状病毒、鼻病毒、新城疫病毒、RSV、HAV、HBV、HCV、HIV、EBV、HPV 和 CMV。

[0025] 本发明进一步提供了一种诊断多糖相关疾病的免疫测定产品,所述产品含有 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺,或者含有能够与 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺结合的分子。

[0026] 其中,所述免疫测定产品用来检测怀疑患有多糖相关疾病的患者的生物样品中的 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺或者能够与 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺结合的分子的存在及水平;与正常受试者生物样品中的 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺水平或者能够与 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺结合的分子的水平相比,在患者中 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺或者能够与 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺结合的分子的数量增加 是患多糖相关疾病的指示。

[0027] 其中,所述多糖相关疾病可以包括癌症和 / 或自身免疫疾病。

[0028] 所述癌症可以为恶性黑色素瘤、脑恶性少突神经胶质瘤、肾透明细胞癌、头部皮肤基底细胞癌、喉癌、霍奇金氏锁骨上淋巴瘤、结肠中级间质瘤、甲状腺髓样癌和左胸腔壁皮肤鳞状细胞癌中的一种或多种。

[0029] 所述自身免疫疾病可以为自身免疫肝炎、自身免疫肠道疾病、胆管梗阻、糖尿病、川崎病、系统性红斑狼疮、溶血性尿毒症和肾病综合征中的一种或多种。

[0030] 其中,所述能够与 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺结合的分子可以为抗体和 / 或植物凝集素。

[0031] 所述抗体可以为抗流感病毒、轮状病毒、呼吸道肠道病毒、腺病毒、冠状病毒、鼻病毒、新城疫病毒、RSV、HAV、HBV、HCV、HIV、EBV、HPV 和 CMV 中的一种或多种的抗体。

[0032] 所述植物凝集素可以为小麦胚芽凝集素、荆豆凝集素 I 和大豆凝集素中的一种或多种。

[0033] 下文将通过详细描述来阐述本发明的多种其它目的、特征和优势。

附图说明

[0034] 图 1 是用 (右二) 和不用 (左三) Neu5Ac 治疗的感染恒河猴轮状病毒 (RRV) 的 bulb/c 乳鼠的示意图。

[0035] 图 2 是通过向怀孕母鼠注射羊抗轮状病毒 (RV) 抗体诱导的乳鼠的组织学变化的示意图。A-B:二周 (A) 和一周 (B) 的乳鼠的胆管和胆囊;C:一周的乳鼠肝脏;D-E:P4 和 P5 的乳鼠胆管。

[0036] 图 3 是感染轮状病毒的不同小鼠模型的生存曲线示意图。

[0037] 图 4 是抗轮状病毒抗体 (NCDV) 结合至某增殖标记物 (PCNA)、感染及未感染轮状病毒 (RRV) 的乳鼠的组织学示意图。

[0038] 图 5 是感染 2009H1N1 流感病毒的新生雏鸡的示意图。在胚龄 E16 时,将鸡胚用盐水 (A)、抗 2009H1N1 (加利福尼亚) 病毒血清 (B)、抗季节性 H1N1 (上海,1999) 病毒血清 (C) 和由抗 2009H1N1 (加利福尼亚) 病毒血清和 Neu5Ac 组成的制剂 (D) 进行预处理,之后在胚龄 E17 时接种病毒。

[0039] 图 6 是在胚龄 E16 时用盐水 (A)、抗 2009H1N1 (加利福尼亚) 病毒血清 (B)、抗季节性 H1N1 (上海,1999) 病毒血清 (C)、抗 H3N2 (江西,2004) 病毒血清 (D)、抗 H5N1 (安徽,2005) 病毒血清 (E) 和多种健康人血清混合物 (F) 进行处理的新生雏鸡的示意图。

[0040] 图 7 是通过点印杂交检测由注射了羊抗 RV (B) 的母鼠所生乳鼠的血清中的羊 IgG 水平的示意图。不同浓度的羊 IgG 作为对照 (A)。用抗羊 IgG-PE 检测出的一周龄 (C) 时羊 IgG 与乳鼠小肠杯状细胞的结合,并与未用抗体治疗的对照 (D) 比较。

[0041] 图 8 是抗呼吸道合胞病毒 (RSV) 抗体结合至由注射了羊抗 RSV 的母鼠所生乳鼠的肺部的组织切片示意图。

具体实施方式

[0042] 本发明可允许多种不同形式的实施方式,以下将具体描述本发明的优选和可选实施方式。然而应该理解的是,所公开的应被认为是发明原理的实施例,而不是限制本发明的实质和范围 / 或仅主张所示的实施方式。

[0043] 在本发明中,生物、病原、抗体、多糖、糖偶联物、糖识别系统、草药、无机离子、小分子和毒素与 PCT/US2007/018258 和 PCT/US2009/039810 中所描述的一样。

[0044] 此外,本发明的小分子还包括多糖结合分子,所述多糖结合分子包括但不限于作为唾液酸或其它多糖乙酰化、甲基化和硫化供体的含乙酰基、甲基 和硫的分子。含硫分子或化合物如 PCT/US2009/039810 所述。所述多糖结合分子还包括所有能识别多糖的多糖结合抗体。唾液酸或多糖的产物包括含有至少一分子唾液酸、多糖、唾液酸衍生物或多糖衍生物的物质。唾液酸或多糖的产物还包括糖脂 (例如神经节苷脂)。

[0045] 1. 唾液酸或多糖的治疗应用

[0046] 唾液酸 (Sias) 是一种九碳单糖神经氨酸的 N- 或 O- 取代衍生物的总称。该组物质的成员包括 :N- 乙酰神经氨酸 (Neu5Ac 或 NANA)、2- 酮 -3- 脱氧壬酮糖酸 (2-keto-3-deoxynononic acid, Kdn)、N- 乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc)、N- 乙酰半乳糖胺 (GalNAc)、N- 乙酰甘露糖胺 (ManNAc) 和 N- 羟乙酰基神经氨酸 (Neu5Gc)。氨基既可连接乙酰基又可连接羟乙酰基。羟基取代物可有很多变化 :已发现乙酰基、乳酰基、甲基、硫基和磷酸基。唾液酸的产物包括含有至少一分子唾液酸或唾液酸衍生物的物质。唾液酸的产物还包括糖脂 (例如神经节苷脂)。其他多糖包括但不限于葡萄糖、半乳糖、乳糖、甘露糖、麦芽糖。

[0047] 1.1 通过竞争病原结合位点预防感染

[0048] 在本发明的一种实施方式中,唾液酸、多糖、唾液酸的衍生物或多糖的衍生物通过竞争宿主的天然病毒结合位点或毒素结合位点而被用作拮抗药物。在实施例中描述了应用 N- 乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 来预防和治疗轮状病毒和 A 型 H1N1、2009H1N1、H3N2 和 H5N1 流感病毒感染。在 PCT/US2009/039810 还描述了应用唾液酸预防和治疗新城疫病毒 (NDV) 的病毒感染,以及过敏。唾液酸或多糖的这种治疗适应症以前未见过报道。

[0049] 1.2 唾液酸或多糖的修饰

[0050] 在本发明的一种实施方式中,采用含乙酰基、含甲基、含硫的分子作为唾液酸或其它多糖乙酰化、甲基化和硫化的供体(药物)来修饰由唾液酸或多糖构成的病毒受体或结合位点。例如甲硫氨酸含有-S-CH₃,因此可作为供体将病原结合位点(唾液酸或多糖)修饰成甲基化和硫化形式。含硫化合物例如 PCT/US2009/039810 所述的硫醚(例如大蒜素产品)也可作为二硫键(-S-S-)的供体。这些化学修饰会减弱甚至阻止病原与于宿主的唾液酸或多糖相关联的受体结合。

[0051] 在实施例中描述了应用甲硫氨酸、甲硫氨酸-锌(Zn)复合物和由乙酰神经氨酸与甲硫氨酸或甲硫氨酸-Zn组成的制剂来预防和治疗轮状病毒感染;N-乙酰神经氨酸、N-乙酰神经氨酸甲酯和由N-乙酰神经氨酸和乙酰神经氨酸甲酯组成的制剂,或N-乙酰神经氨酸和二乙基二硫醚,或乙酰神经氨酸甲酯和二乙基二硫醚用于治疗流感。在 PCT/US2009/039810 描述了应用大蒜素产品预防和治疗轮状病毒、A型流感病毒 H1N1、新城疫病毒(NDV)的病毒感染,以及过敏。化学分子的这些应用可被扩展至采用唾液酸或其它多糖作为其结合位点的其它病原的其它感染。

[0052] 这类治疗方法的功能机理是靶向和修饰宿主的病原结合位点,其不同于靶向病原的其它抗生素。这些治疗方法的显著优势是诱导抗药性的概率非常低。

[0053] a. 误导病原微生物唾液酸酶

[0054] 在本发明的另一种实施方式中,游离唾液酸或多糖作为假目标,与病原微生物唾液酸酶结合并使其错误激活(错误诱导)。该靶向误导保护宿主细胞免受病原微生物唾液酸酶的攻击,或保护宿主细胞表面的唾液酸免于脱落。而且,通过假目标的无效工作可将病原微生物唾液酸酶耗尽。这种机理不同于已报道的唾液酸酶竞争性抑制剂的作用机理。

[0055] 金属可与病原微生物唾液酸酶和细胞表面(质膜)和细胞质内唾液酸酶结合或偶联,从而阻断唾液酸酶功能或使其失活。

[0056] 在实施例中描述了应用甲硫氨酸-锌复合物、N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)、N-乙酰神经氨酸甲酯来治疗轮状病毒、A型流感病毒 H1N1、2009H1N1、H3N2 和 H5N1 的病毒感染。

[0057] b. 中和唾液酸结合分子

[0058] 在本发明的一种实施方式中,唾液酸或唾液酸衍生物被用于结合并中和或修饰多糖结合分子,如有害毒素、凝集素和抗体,从而保护宿主细胞。

[0059] 支持这种作用机理的一个证据如实施例所述:高剂量的抗轮状病毒抗体导致了感染轮状病毒的乳鼠的死亡。而同剂量的相同抗体用 Neu5Ac 处理(中和)之后,抗体不再诱导感染轮状病毒的乳鼠死亡(表 3)。

[0060] 另一支持证据是 Neu5Ac 或 Neu5Ac-甲酯具有治疗流感抗体副作用的功效。如实施例中所述,注射中等或高剂量针对 2009H1N1(猪)、季节性 H1N1 和 H5N1 禽流感病毒的免疫血清至 15-16 或 18-19 天的鸡胚会诱导新生雏鸡死亡或腿残疾,这类似于人的格林巴氏综合症(Guillain-Barre syndrome, GBS)(图 6)。然而,注射用 Neu5Ac 或 Neu5Ac-甲酯预处理的相同免疫血清之后,新生雏鸡未显现该综合症。

[0061] 2. 疫苗和治疗性抗体的新功能机理

[0062] 在 PCT/US2007/018258 和 PCT/US2009/39810 中描述了疫苗接种、被动免疫和抗体治疗的新型功能机理的体外和体内证据。所述功能机理是指用通过感染或疫苗诱导的或被

动免疫获得的抗体,结合和封闭至少一个病原结合位点。这可能是有效疫苗和被动免疫的主要功能机理。靶向和封闭感染原的结合位点的这种机理有别于传统疫苗接种和被动免疫的中和感染原的机理。本发明进一步提供了支持新作用机理的体内证据。

[0063] 一个实施例是在注射了羊抗轮状病毒抗体的母鼠所生新生乳鼠的血清中检测不到羊 IgG。然而,在相同的乳鼠体内,于 1 周(图 7)至 3 周龄时检测到羊 IgG 与乳鼠小肠杯状细胞的结合。此外,口服低剂量的相同抗轮状病毒抗体在乳鼠模型中具有预防和治疗轮状病毒感染的效果(PCT/US2007/018258)。

[0064] 类似地,在 P9(图 8)和 P14 龄时可检测到由注射了羊抗呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus,RSV)抗体的母鼠所生乳鼠的肺与羊 IgG 的结合。采用抗呼吸道合胞病毒(RSV)抗体例如帕利珠单抗(Palivizumab, **Synagis**[®])保护早产婴儿预防严重的 RSV 疾病已显临床功效。然而,该药物的作用机理至今尚不清楚。本发明公开的作用机理可能是帕利珠单抗的功能机理。

[0065] 作为更多体内证据,通过尿囊腔注射抗流感病毒免疫血清治疗 16 天(E16)的鸡胚;从出生 3 天(血清注射 8 天之后)的新生雏鸡中收集血液;然后以 2009H1N1(加利福尼亚/09)病毒感染雏鸡。新生雏鸡注射了含针对 2009H1N1(加利福尼亚/09)和季节性 H1N1(中国)病毒的抗体的血清未感染 2009H1N1 病毒。在病毒感染之前收集的血清中通过抑制性红细胞凝集试验检测到的抗体水平为零。

[0066] 因此,以上所述的抗体作用机理是封闭病毒结合位点而不是游离抗体中和病毒。

[0067] 3. 抗多病原或通用流感疫苗

[0068] 现有通用疫苗的功能机理是通过一种病原诱导的抗体中和多种病原。例如,H1N1 流感病毒诱导的单克隆抗体不仅可与 H1N1 还可以与 H5N1 病毒作用(中和病毒)。

[0069] 本发明公开了抗多种病原或通用疫苗的新功能机理。如果至少两个病原共享一个相同结合位点,由一种病原诱导的抗体可与该共享结合位点结合并预防该病原和至少另一病原的感染。靶向和封闭感染原的共享结合位点的这种机理有别于传统通用疫苗中和感染原的机理。

[0070] 如实施例中所述,抗 2009H1N1(加利福尼亚)和抗 H5N1 免疫血清(用 Neu5Ac 预处理)可有效预防和治疗乳鼠的 A/PR/8/34(H1N1)病毒感染;抗 H1N1(季节性)人血清和抗 H5N1 免疫血清(用 Neu5Ac 预处理)可有效预防和治疗鸡胚和新生雏鸡的 2009H1N1(加利福尼亚)病毒感染。这些结果提供了 2009H1N1(加利福尼亚),季节性 H1N1 和禽 H5N1 流感病毒共享至少一个结合位点的体内证据。因此本发明的一个实施方式公开了下列基于共享结合位点的新疫苗和疫苗的新功能机理。

[0071] a. 用于预防 2009H1N1(猪),其它 H1N1 和 H5N1 流感病毒感染的季节性 H1N1 病毒疫苗;

[0072] b. 用于预防 2009H1N1(猪),其它 H1N1 和 H5N1 流感病毒感染的 2009H1N1(加利福尼亚)病毒疫苗;和

[0073] c. 用于预防 2009H1N1(猪),其它 H1N1 和 H5N1 流感病毒感染的 H5N1 病毒疫苗。

[0074] 4. 抗病原抗体作为药物用于传染病的抗体预防和治疗

[0075] 在 PCT/US2007/018258 和 PCT/US2009/39810 中描述了抗体作为药物用于传染病的抗体预防和治疗。本发明提供了进一步的体内证据。

[0076] 如以上所述和实施例中所描述的,低剂量的下列免疫血清或抗体可作为药物用于流感的抗体预防和抗体治疗。

[0077] a. 用于预防 2009H1N1(猪),其它 H1N1 和 H5N1 流感病毒感染的抗季节性 H1N1 病毒抗体;

[0078] b. 用于预防 2009H1N1(猪),其它 H1N1 和 H5N1 流感病毒感染的抗 2009H1N1(加利福尼亚)病毒抗体;和

[0079] c. 用于预防 2009H1N1(猪),其它 H1N1 和 H5N1 流感病毒感染的抗 H5N1 病毒抗体。

[0080] 5. 抗体的两面性

[0081] 抗体的作用可以是两面的;一方面它们可通过识别和封闭病原结合位点保护宿主免于感染;另一方面抗体和这些位点的结合可触发宿主体内的特定有害旁路或诱发过强的宿主免疫反应而诱发疾病;如 PCT/US2007/018258 和 PCT/US2009/39810 所述。

[0082] 5.1 高水平的抗体是有害的

[0083] 如实施例所述的(表 5-10),高剂量的含抗季节性 H1N1 抗体或抗 2009H1N1 抗体的血清无助于或不利于预防新生乳鼠的 A/PR/8/34(H1N1) 感染。而且,高剂量的血清可诱导鸡胚和新生雏鸡死亡或严重疾病(表 7 和图 14)。

[0084] 5.2 格林巴氏综合症(GBS)

[0085] 注射中等或高剂量抗 H1N1(CA,09) 和抗 H5N1 抗体至 E16 的鸡胚会诱导新生雏鸡死亡或腿残疾(图 15B,15C 和 15D),这类似于人的格林巴氏综合症(GBS)。具有诱导 GBS 最高风险的是 2009H1N1(加利福尼亚)病毒诱导的抗体,其次是禽 H5N1(安徽,2005)病毒和季节性 H1N1(上海,1999)病毒诱导的抗体。

[0086] 5.3 有害抗体的致病机理

[0087] PCT/US2007/018258 和 PCT/US2009/039810 描述了有害抗体的致病机理。其它致病机理包括但不限于抗体依赖的细胞毒性。

[0088] 感染期间,病毒与唾液酸或多糖的结合可激活唾液酸酶,切除唾液酸使细胞或组织失去保护层进而激活激酶的信号旁路(病毒的原发性伤害)。而且,由感染或疫苗诱导的抗体随后与膜多糖或蛋白结合,进一步刺激并激活信号旁路并引起或加重疾病(抗体的继发性伤害)。

[0089] 这些致病机理也适用于其他多糖结合分子,如植物或生物凝集素或毒素。

[0090] 6. 传染病、自身免疫疾病和癌症的新诊断产品

[0091] 基于以上以及在 PCT/US2007/018258 和 PCT/US2009/039810 中所述的抗病原抗体的致病性,本发明的一个实施方式公开了传染病、自身免疫疾病和癌症的新诊断产品。这些产品包括但不限于检测患有严重传染病、自身免疫疾病和癌症的患者的抗病原抗体水平。示例包括但不限于:

[0092] a. 检测抗流感病毒、抗 RSV、抗鼻病毒和抗冠状病毒抗体用于诊断严重的流感感染、下呼吸道疾病、肺炎、哮喘和格林巴氏综合症;

[0093] b. 检测抗轮状病毒、抗呼肠病毒、抗腺病毒、抗 CMV 和抗 EBV 抗体用于诊断自身免疫肝炎、胆管梗阻、糖尿病和炎症疾病或肝脏、胆管、小肠和胰腺的癌症;

[0094] c. 检测抗腺病毒抗体用于诊断川崎病(Kawasaki disease)和血管瘤;

[0095] d. 检测抗轮状病毒、抗呼肠病毒、抗流感病毒、抗腺病毒、抗 HIV、抗 CMV 和抗 EBV

抗体用于诊断肠道炎症疾病和包括结肠癌的癌症；

[0096] e. 检测抗腺病毒,抗 EBV 和抗 CMV 抗体用于诊断系统性红斑狼疮、糖尿病、白血病或肾脏和心脏疾病,例如但不限于溶血性尿毒症和肾病综合症。

[0097] 7. 重症传染病和有害抗体的治疗产品

[0098] 基于以上所述的抗体的致病机理(去除保护性脱落之后激活激酶),本发明的一个实施方式公开了采用下列治疗产品来预防和治疗传染病包括但不限于严重的下呼吸道感染例如 2009H1N1、H5N1 和 RSV 感染,其它传染病、自身免疫疾病、哮喘、癌症、肥胖和其它疾病,以中和、减弱或阻断有害抗体与其目标的结合。

[0099] a. 唾液酸或其它多糖和它们的衍生物,包括神经节苷脂产物；

[0100] b. 激酶抑制剂；

[0101] c. β -2 受体抑制剂；

[0102] d. 作为唾液酸或其它多糖乙酰化、甲基化和硫化的供体的含乙酰基、甲基和硫的分子；

[0103] e. 免疫球蛋白产物或血清或血浆；和

[0104] f. 阻断激酶激活途径或有害抗体与其靶标的结合的任何其它物质和方法。

[0105] 这些治疗剂也可用于预防和治疗其他治疗性抗体的副作用及由其他多糖结合分子(如植物或生物凝集素或毒素)引起的疾病。

[0106] 8. 多糖相关生物标记

[0107] 在 PCT/US2009/039810 中描述了凝集素与健康 and 疾病组织切片的结合技术用于鉴别多糖相关生物标记。还公开了 N-乙酰基葡萄糖胺和 N-乙酰基半乳糖胺可作为与炎症或癌症相关的生物标记物(PCT/US2009/039810)。

[0108] 在本发明中,用由 US-FDA 正常人器官和恶性肿瘤组织切片组成的组织阵列芯片(Immgenex, 圣地亚哥, 美国)检测了人健康和疾病组织与小麦胚芽凝集素(WGA)的结合。结果显示了除骨髓、唾液腺、肺和脑下垂体之外,大部分正常人器官都不表达或很少表达 N-乙酰-D-葡萄糖胺,然而,下列癌组织强阳性表达 N-乙酰-D-葡萄糖胺:恶性黑色素瘤、脑恶性少突神经胶质瘤、肾透明细胞癌、头部皮肤基底细胞癌、喉癌、结肠中级间质瘤(colonintermediate grade interstitialoma)、甲状腺髓样癌和左胸腔壁皮肤鳞状细胞癌。这些数据提供了 N-乙酰-葡萄糖胺是癌症相关生物标记物的证据。

[0109] 本发明的一个实施方式公开了 N-乙酰-葡萄糖胺作为生物标记物用于癌症、炎症、自身免疫疾病和哮喘的下列治疗。

[0110] 8.1. 诊断炎症、癌症或自身免疫疾病的产品

[0111] 用含 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺或者能够与 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺结合的分子的免疫测定产品,检测怀疑患有炎症、癌症或自身免疫疾病的患者的生物样品中 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺或者能够与 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺结合的分子的存在,可以用于上述疾病的诊断。如患者生物样品中的 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺或者能够与 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺结合的分子的含量明显高于正常人生物样品中的水平,则是炎症、癌症或自身免疫疾病的指征。

[0112] 8.2. 用于治疗炎症、肿瘤或自身免疫疾病的给药工具

[0113] 任何能够与 N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖结合的分子都可用作治疗此二种多

糖相关疾病的给药工具。

[0114] 9. 多糖修饰化学制品

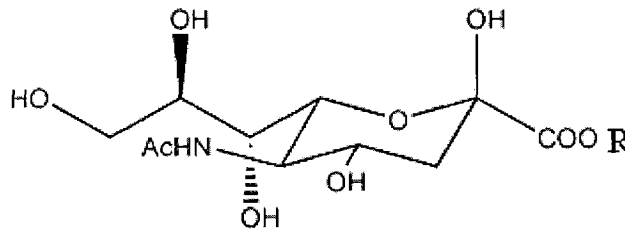
[0115] 本发明的一个实施方式公开了多糖修饰的化学制品,包括但不限于:

[0116] a. 含乙酰基、乳酰基、甲基、磷酸和硫的产物,并且,任选地,其中多糖修饰化学制品与含多糖分子共价偶联。

[0117] b. 能够硫化多糖的含硫产物,其中含硫产物选自硫酸盐、磺酸盐、磺酰化合物、硫酸醚、硫化物、含硫氨基酸以及这些含硫产物的功能类似的衍生物。

[0118] c. 具有以下通用化学结构的化合物

[0119]



[0120] 其中 R 是氢、烷基、环烷基、钠 (Na)、

[0121] 其中, R 为烷基、环烷基、钠、取代烷基、取代环烷基、芳基、取代芳基、醚基、硫酸酯、硫酸醚、二硫化酯、二硫甲基、甲硫氨酸、甲硫氨酸-锌、S-CH₂-CH₃、S-CH₃、苯酚或苯酚衍生物;或者是该化合物的药学上可接受的盐、酯或溶剂化物。

[0122] 10. 实验模型

[0123] 基于以上和 PCT/US2007/018258、PCT/US2009/039810 中所述的抗病原抗体的致病作用和疫苗与抗体治疗的新机理(封闭病原结合位点),本发明的一个实施方式公开了通过给动物注射抗病原抗体建立实验模型,用于传染病、自身免疫疾病、癌症和与这些病原相关的其它疾病的致病性研究、诊断和药物筛选。以下是作为示例性描述的这些动物模型的实例。

[0124] 10.1 格林巴氏综合症的雏鸡模型

[0125] 在实施例中描述了通过抗流感病毒抗体诱导的格林巴氏综合症(GBS)雏鸡模型。给 E16 的鸡胚注射中等或高剂量的抗 2009H1N1(加利福尼亚)和抗 H5N1(安徽/05)抗体诱导出腿残疾的新生雏鸡,其症状与人 GBS 类似。该动物模型是世界上第一个 GBS 模型,并第一次为中高水平的抗 2009H1N1(猪)和抗 H5N1 抗体可引起严重的(包括 GBS 和死亡)副作用提供了直接证据。

[0126] 10.2 用于快速评估流感疫苗和抗体的功效和安全性的动物模型

[0127] 在实施例中描述了检测抗流感病毒抗体严重副作用的小鼠模型。给怀孕 15-16 天(E15-E16)或 E18-E20 的孕鼠注射中等或高剂量的针对流感 H1N1、H3N2、H5N1、B 病毒、RSV、HAV 的免疫血清诱导了胎鼠或新生乳鼠的流产、早产和死亡。这些发现提示了给孕妇接种流感疫苗对胎儿和新生儿是危险的。

[0128] 以上所述的鸡和小鼠模型可用于但不限于严重流感感染、包括 GBS 的自身免疫疾病、癌症和与流感感染相关的其它疾病的致病性研究、诊断以及预防和治疗药物的筛选。而且,动物模型也可用于快速评估流感疫苗和抗体的功效和安全性。

[0129] 10.3 新生小鼠乳鼠的流感感染

[0130] 如实施例所述的,用流感病毒小鼠适应株感染 5-7 天的新生乳鼠,并将乳鼠饲养 8-10 天,观察和检测患病和死亡情况。80-100%的乳鼠在 8-10 天内死亡。该乳鼠模型比成年小鼠更为敏感。

[0131] 10.4 自身免疫肝炎的小鼠模型

[0132] 如实施例所述的,用轮状病毒感染 1-3 天的新生乳鼠并将乳鼠饲养 3 周用于观察和检测患病和死亡情况。从感染病毒的第 10 天,乳鼠开始出现黄疸,进食不佳,体重停止增长。组织学变化显示该小鼠模型表现出肝炎特征。

[0133] 10.5 用于胆管梗阻致病性研究的小鼠模型

[0134] 如实施例所述的,在胚龄 E14、E16 和 E18 时,给孕鼠注射抗轮状病毒抗体,由这些母鼠分娩的乳鼠患有胆管梗阻和肝炎。该模型揭示了胆管闭锁和自身免疫肝炎的致病机理。

[0135] 显然,这些动物模型可扩展至其它动物和由其它病毒或疫苗诱导的其它抗体。由抗体诱导的这些动物模型可用于传染病、自身免疫疾病、癌症和与这些病原相关的其它疾病的致病性研究、诊断和药物筛选。

[0136] 实施例

[0137] 1. 候选药物

[0138] a. 合成的 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) (JunKang Biotech Co., Ltd, 中国广州)。

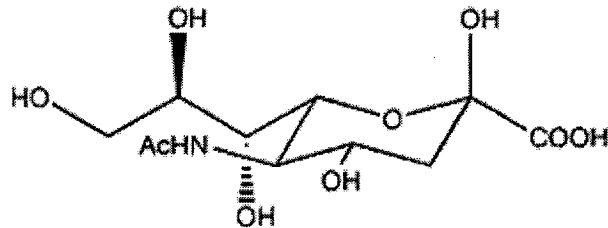
[0139]

分子式: $C_{11}H_{19}NO_9$

分子量: 309.3

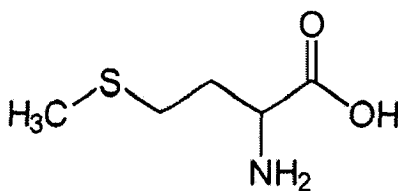
结构: 如右式所示

纯度(HPLC): 98.7%



[0140] b. 甲硫氨酸 (J. R. Carlson Laboratories, Inc., Arlington Hts, 美国伊利诺州)。

[0141] 分子式: $C_5H_{11}NO_2S$



[0142] 分子量: 149.21

[0143] 结构: 如右式所示

[0144] c. 大蒜素产品,每个软胶囊中含有 10 毫克大蒜素 (Nature's Bounty, INC, 美国纽约)。有效成分主要是二烯丙基二硫醚。

[0145]

分子式: $C_6H_{10}S_2$

分子量: 146.28

结构: 如右式所示



[0146] d. 纯化的抗牛轮状病毒株 NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Virus, 内布拉斯加牛

腹泻病毒)的羊多克隆抗体(Meridian Life Science, Inc., Saco, 美国缅因州)。

[0147] 纯度 : > 95%

[0148] 浓度 : 5 毫克 / 毫升 .

[0149] e. 与牛和人轮状病毒分离株的 P41 主衣壳蛋白 (VP6) 反应的单克隆抗体 (Meridian Life Science, Inc., Saco, 美国缅因州)。

[0150] 纯度 : > 95%

[0151] 浓度 : 0.1 毫克 / 毫升 .

[0152] f. 二乙基二硫醚 (Lida Chemicals, 中国石家庄)

[0153] 分子式 : $C_4H_{10}S_2$

[0154] 结构 : $CH_3CH_2SSH_2CH_3$

[0155] g. 甲硫氨酸 - 锌 (Zn) 复合物 (Jiande Biotech, 中国浙江)

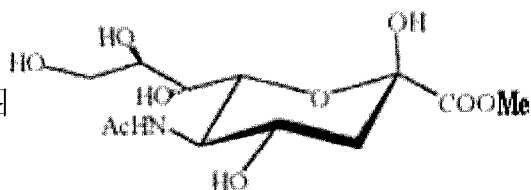
[0156] 锌 (Zn) : 25% .

[0157] h. 合成的 N-乙酰神经氨酸甲酯 (JunKang Biotech Co., Ltd, 中国广州)。

[0158] 分子量 : 323.3

[0159] 分子式 : $C_{12}H_{21}NO_9$

[0160] 结构 : 如右图



[0161] 2. 轮状病毒感染的预防和治疗

[0162] 2.1 用化合物预防和治疗轮状病毒感染

[0163] 将出生后第一天 (P1) bulb/c 乳鼠随机分成四组, 经口服分别给予盐水 (对照组) 或候选药物; 第 2 天 (P2) 每只乳鼠给 20 微升浓度为 1×10^7 PFU/ 毫升的恒河猴轮状病毒 (RRV) 进行接种感染。不同组的小鼠在第 3 天 (P3) 分别给一次 20 微升以下物质进行治疗: 1) 盐水 (RRV 组, $n = 11$); 2) 浓度为 2 毫克 / 毫升的 Neu5Ac (Sia 组, $n = 13$); 3) 浓度为 2 毫克 / 毫升的甲硫氨酸 (Met 组, $n = 12$); 和 4) 由 Neu5Ac (2 毫克 / 毫升) 和甲硫氨酸 (2 毫克 / 毫升) (制剂 -1, $n = 12$) 组成的制剂。RRV 感染后小鼠观察 3 周。

[0164] 轮状病毒感染病程为: 在 RRV 感染之后的一周内, 乳鼠出现腹泻, 粪便呈灰白色, 进食不佳且体重增长缓慢或停止; 重症感染可出现黄疸。第二周时, 所有乳鼠都出现黄疸, 进食不佳且体重停止增长; 且 80% 的重病乳鼠死亡。病毒通常在一周内被清除且检测不出。

[0165] 表 1. 用于轮状病毒 (RRV) 感染的候选药物的药效试验结果

[0166]

候选药物	患病	未患病	患病率 (%)	OR	95%CI	P 值
盐水	9	2	81.8	4.5	0.10-0.79	0.01
Neu5Ac	3	10	23.1	0.07	0.01-0.49	0.01
甲硫氨酸	3	9	25.0	0.07	0.01-0.56	0.01
Neu5Ac+Meth*	2	10	16.7	0.01	0.01-0.38	0.003

[0167] * :Meth = 甲硫氨酸

[0168] 和用盐水预处理的对照乳鼠相比,用候选药物预处理的乳鼠没有感染。统计分析的结果总结在表 1 中。图 1 所示分别为用盐水和 Neu5Ac 预处理的乳鼠。

[0169] 候选药物用于人轮状病毒感染的有效剂量换算如表 2 所示。

[0170] 表 2. 用于轮状病毒感染的候选药物剂量

[0171]

候选药物	低剂量(毫克/kg)	高剂量(毫克/kg)	范围(毫克/kg)
Neu5Ac	0.1	20	0.1-20
甲硫氨酸	0.1	20	0.1-20
Neu5Ac+Meth*	0.1:0.1	20:20	0.1-20

[0172] * :Meth = 甲硫氨酸 ;** :Ab :抗轮状病毒多克隆抗体

[0173] 2.2 用低剂量的抗体预防和治疗轮状病毒感染

[0174] 将出生后当天 (P0) bu1b/c 乳鼠随机分成六组,经口服分别给予 20 微升含有不同候选药物的盐水溶液,在 P1 日口服接种 20 微升 RRV (1×10^7 PFU/毫升)。不同的候选药物治疗包括:1) 仅限盐水(病毒对照, n = 11);2) 抗 NCDV 抗体(10 微克)(Ab-1+RRV, n = 15);3) 抗 VP6 单克隆抗体(1 微克)(Ab-2+RRV, n = 12);4) 抗 NCDV(10 微克)和抗 VP6(1 微克)抗体的组合(Ab-1/5 微克 + Ab-2/1 微克 + RRV, n = 8);和 5) 抗 NCDV 抗体(50 微克)和 Neu5Ac(25 微克)组成的制剂(制剂-2, n = 6)。

[0175] RRV 感染后小鼠观察 3 周。

[0176] 轮状病毒感染病程如上所述。统计分析结果总结在表 3 中。

[0177] 表 3. 用于轮状病毒感染的抗体治疗的药效试验结果

[0178]

候选药物	患病	未患病	患病率 (%)	OR)	95%CI	P 值
盐水	9	2	81.8	4.5	0.10-0.79	0.01
Ab-1*	5	10	33.3	0.11	0.02-0.72	0.02
Ab-2**	2	10	16.7	0.04	0.005-0.38	0.003
Ab-1+ Ab-2	1	7	12.5	0.03	0.002-0.43	0.005
Ab-1+ Neu5Ac	1	5	16.7	0.04	0.003-0.62	0.02

[0179] * :抗 NCDV 抗体 ** :抗 RV-VP6 抗体

[0180] 结合 PCT/US2007/018258 所述结果,药效实验数据提示 :1) 低剂量的抗 NCDV 抗体 (小于 20 微克 / 每只乳鼠) 减低了轮状病毒感染的严重程度及缩短了病程 ;2) 单独的抗 VP6 抗体或其与抗 NCDV 抗体的组合预防了轮状病毒感染 ;和 3) Neu5Ac 降低了抗 NCDV 抗体的毒性 (表 3)。

[0181] 3. 流感感染的预防和治疗

[0182] 3.1 鸡胚流感感染的预防和治疗

[0183] 将 10 日龄鸡胚随机分成四组,每组每枚分别注射 100 微升含有以下物质的盐水溶液 :1) 仅限盐水 (对照组, n = 10) ;2) 50 微克的 Neu5Ac (Neu5Ac 组, n = 10) ;3) 40 微克的大蒜素 (大蒜素组, n = 5) ;和 4) 40 微克的 Neu5Ac 加 40 微克的大蒜素 (制剂 -2 组, n = 5)。次日,每枚鸡胚尿囊腔接种 100 微升 2009H1N1 (猪) 流感病毒株 (加利福尼亚 /2009, 1 : 256, 100 倍稀释)。另两组用盐水 (对照) 和 50 微克的 Neu5Ac 作相同治疗的鸡胚则每枚接种 100 微升季节性 H1N1 (布鲁斯班 /59/2007, 1 : 256, 100 倍稀释) 病毒。病毒接种后 24 小时再分别给 100 微升盐水或 Neu5Ac 溶液 (同上)。接种病毒后 48 小时收集尿囊液并用红细胞凝集试验测定尿囊液中的病毒滴度。

[0184] 3/5 (60%) 用大蒜素治疗的鸡胚的病毒滴度是 1 : 16 或 1 : 32 ;3/5 (60%) 用制剂 -2 (Neu5Ac+ 大蒜素) 治疗的鸡胚的病毒滴度是 1 : 1 或 1 : 2。结果总结如下。

[0185] H1N1 的滴度 (加利福尼亚 /09) :

[0186] 组	1	3	4
[0187] 治疗	盐水	大蒜素	制剂 -2
[0188] 病毒滴度	1 : 256	1 : 16-32	1 : 1-2

[0189] H1N1 的滴度 (布鲁斯班 /59/2007) :

[0190] 组	1	3	4
[0191] 治疗	盐水	大蒜素	制剂 -2
[0192] 病毒滴度	1 : 256	1 : 2	1 : 0

[0193] 3.2 用 Neu5Ac 治疗禽 (H5N1) 流感疫苗的副作用

[0194] SPF 级鸡 (约 2kg) 用 H5N1 候选疫苗处理 3 周之后出现病症。病鸡精神萎靡且进食不佳。分别对随机两组病鸡每天每只口服给一次 2 毫升盐水 (对照组, n = 7), 或 2 毫升浓度为 2 毫克 / 毫升的 Neu5Ac (药物治疗组, n = 8) 进行治疗, 为期三天。治疗第

一天时,用 Neu5Ac 治疗的鸡精神状态及进食好转;第三天时,7/8(87.5%)的病鸡完全恢复进食且精神状态正常。然而,6/7(85.7%)的盐水对照组的鸡未见好转。实验结果提示 Neu5Ac 将该 H5N1 候选疫苗的副作用从 85.7%降至 12.5%(优势比(OR) = 0.02,95% CI = 0.001-0.40, P = 0.01)。

[0195] 4. 致病性抗体

[0196] 如果抗体和连接于有害的激活旁路的分子结合(例如激酶旁路),则抗体可能是有害的。

[0197] 4.1 来自孕鼠的抗体诱发了疾病

[0198] 在胚龄 E14、E16 和 E18 时,分别给 bulb/c 孕鼠腹腔内注射 250 微克抗 NCDV 抗体三次,其新生乳鼠未接种 RRV(实验组, n = 21)。对照组孕鼠(n = 20)同法给生理盐水。实验组母鼠所分娩的 7 只(33.3%)乳鼠在出生后第二天死亡;52.4%的乳鼠出生之后 10 天内体重增长缓慢,并出现了类似于实验性胆管梗阻的症状。与盐水对照组相比较,抗体注射组的乳鼠的胆管和胆囊在第二周时显示变形扭曲(图 2A)。而且,在第一周时抗体注射组的乳鼠的胆管上皮细胞显著增殖(图 2B),肝脏有炎症细胞的浸润(图 2C)(图 3:Ab 给至母鼠)。在另一实验中,与盐水对照乳鼠相比(图 2D),在 E18 时注射一次 15 微克的抗 RV 抗体导致了乳鼠胆管上皮细胞明显的炎症增殖(如 P4 日所示),这些增殖细胞导致了从 P5 日开始胆管的完全梗阻(图 2E)。

[0199] 4.2 高剂量的抗体加 RRV 诱导了更严重病毒感染

[0200] 将 bulb/c 乳鼠随机分成五组,分别经腹腔内注射 20 微升含有以下物质的盐水进行治疗:1)P0 日给盐水而 P1 日给 RRV(对照组, n = 21);2)P0 日给抗 NCDV 抗体(50 微克)而 P1 日给 RRV(Ab+RRV, n = 14);3)P0 日给 RRV 而 P1 日给抗体(50 微克)(RRV+Ab, n = 10);4)怀孕 18 天(E18)给孕鼠注射抗体(75 微克)而在 P0 日给乳鼠注射 RRV(Ab 至母鼠+RRV, n = 21);和 5)产前胚龄为 E14、E16 和 E18 时注射 250 微克的抗 NCDV 抗体三次,且如上所述不给乳鼠进行 RRV 接种。RRV 浓度是 1×10^7 PFU/毫升。RRV 感染之后将小鼠饲养三周。轮状病毒感染病程如上所述。结果总结在表 4 中。与仅用 RRV 感染的乳鼠相比,由产前经抗体处理的母鼠所分娩的乳鼠患病更早且更严重。此外,来自未经 RRV 感染的怀孕母鼠的抗轮状病毒抗体诱导了由这些母鼠分娩的乳鼠的死亡和胆管梗阻及肝炎。

[0201] 表 4. 轮状病毒感染中高剂量抗体的结果

[0202]

治疗	乳鼠数量	死亡	患病*	死亡率(%)	患病率(%)
盐水+RRV	28	9	24	32.1	85.7
**Ab(乳鼠)+RRV	14	4	11	28.6	78.6
RRV+ Ab(乳鼠)	10	1	6	10.0	60.0
Ab(母鼠)+RRV	21	10	20	47.6	95.2
Ab 至母鼠	21	7	11	33.3	52.4

[0203] * :包括死亡 ;** :Ab = 抗 NCDV 抗体

[0204] 4.3 抗体可诱导癌症

[0205] 用 FITC 偶联的抗羊 IgG 抗体、德克萨斯红偶联的抗增殖细胞核抗原 (PCNA) 抗体进行免疫荧光染色,检测下列乳鼠胆管组织切片中结合至增殖(炎症)细胞的抗 NCDV 抗体。

[0206] 1) 母鼠注射盐水,未经 RRV 感染(正常对照);

[0207] 2) 乳鼠注射 RRV (RRV);

[0208] 3) 母鼠注射抗 NCDV (Ab),未经 RRV 感染;

[0209] 4) 母鼠注射抗 NCDV 而乳鼠注射 RRV (Ab+RRV)。

[0210] 和对照组乳鼠的胆管相比(图 4:NCDV 行的盐水和 RRV),在上述第三组及第四组的乳鼠(图 4NCDV 行的 Ab 和 Ab+RRV)胆管中检测到与增殖的胆管上皮细胞结合的羊 IgG(图 4)。而且,与另两组相比,第三组及第四组的乳鼠胆管上皮增殖细胞阳性表达作为增殖标记的增殖细胞核抗原(PCNA)(图 4:PCNA 行)。与盐水对照组的乳鼠相比,抗 NCDV 抗体也与第三组及第四组的 P2 乳鼠的肝组织结合。重叠行显示抗 NCDV 抗体与表达 PCNA 的同一细胞结合,提示 PCNA 和 N-乙酰葡萄糖胺是同一物质。

[0211] 已有报道多种恶性肿瘤都有 PCNA 的异常表达。因为抗 NCDV 抗体刺激表达 PCNA 的炎症细胞增生,且许多癌症都是从炎症开始,所以由传染病诱导的抗体具有诱导癌症的潜能。如果这种抗体刺激长期存在并最终导致细胞增生失控,就会发生癌症。

[0212] 如上及 PCT/US2009/039810 所述,抗 NCDV 抗体结合识别 N-乙酰-D-葡萄糖胺和 PCNA,并刺激细胞增生。提示抗轮状病毒抗体可诱导炎症和癌症。

[0213] 5. 轮状病毒感染的诊断试剂盒

[0214] 检测轮状病毒的夹心 ELISA 试剂盒按如下研制。

[0215] a. 捕获抗体:单克隆抗 VP6 抗体(0.1 毫克/毫升)(Meridian Life Science, Inc., Saco, 美国缅因州):1 : 200 稀释。

[0216] b. 检测抗体(一抗):纯化的羊多克隆抗 NCDV 抗体(5 毫克/毫升)(Meridian Life Science, Inc., Saco, 美国缅因州):1 : 200 稀释。

[0217] c. 第二检测抗体:抗羊 IgG 抗体(Meridian Life Science, Inc., Saco, 美国缅因州)。

[0218] 用 ELISA 试剂盒检测经 RRC 感染的小鼠乳鼠血清中的病毒水平,结果如图 3C 所示。

[0219] 6. 预防和治疗病毒感染的其它候选药物

[0220] 6.1 轮状病毒感染的预防和治疗

[0221] 将出生 1 天(P1)的 bulb/c 小鼠乳鼠随机分成三组,口服给予盐水(对照组)或候选药物,第二天(P2)用 20 微升浓度为 1×10^7 PFU/毫升的恒河猴轮状病毒(RRV)进行感染。不同组的小鼠用 20 微升的以下物质进行预处理:1) 盐水(RRV 组, $n = 7$);2) 浓度为 2 毫克/毫升甲硫氨酸-锌(Zn)复合物(Met-Zn 组, $n = 7$);和 3) Neu5Ac(2 毫克/毫升)和甲硫氨酸-锌(Zn)复合物(2 毫克/毫升)组成的制剂(Neu5Ac+Met-Zn 组, $n = 6$)。RRV 感染之后小鼠观察 3 周。轮状病毒感染病程如上所述。

[0222] 表 5. 用于轮状病毒(RRV)感染的候选药物的功效试验结果

[0223]

候选药物	患病	未患病	患病率 (%)	OR	95%CI	P 值
盐水	6	1	86	30	1.47-612	0.03
甲硫氨酸-Zn	1	6	14	0.03	0.001-0.55	0.03
Neu5Ac+Meth-Zn*	1	5	17	0.03	0.02-0.68	0.03

[0224] *:Meth-Zn = 甲硫氨酸 -Zn 复合物

[0225] 与盐水对照组乳鼠相比,用候选药物预处理的乳鼠未感染。统计分析结果总结在表 5 中。

[0226] 用于人轮状病毒感染的候选药物的有效剂量换算,如表 6 所列。

[0227] 表 6. 用于轮状病毒感染的候选药物剂量

[0228]

候选药物	低剂量(毫克/kg)	高剂量(毫克/kg)	范围(毫克/kg)
盐水	0.1	20	0.1-20
甲硫氨酸-Zn	0.1	20	0.1-20
Neu5Ac+Meth-Zn*	0.1:0.1	20:20	0.1:0.1-20:20

[0229] *:Meth-Zn = 甲硫氨酸 -Zn 复合物

[0230] 6.2 用于流感感染的晚期鸡胚和新生雏鸡动物模型

[0231] 将 16 天 (E16) 鸡胚随机分成四组,分别经尿囊腔注射 100 微升含有以下物质的盐水溶液:1) 仅盐水 (对照组, n = 6);2) 20 微升 2% 的二乙基二硫醚 (n = 6);3) 20 微克的大蒜素 (n = 6);和 4) 100 微克的 Neu5Ac 加 100 微克的甲硫氨酸 (n = 6),次日尿囊腔接种 100 微升 2009H1N1 流感病毒株 (加利福尼亚株, 1 : 128,用盐水 100 倍稀释)。接种病毒之后 48 小时收集尿囊液并通过红细胞凝集试验测定尿囊液中的病毒滴度。将鸡胚培育在 35°C 温育箱中直至新生雏鸡出壳。

[0232] 尿囊液中的 2009H1N1 加利福尼亚株 (48 小时) 的病毒滴度总结如下。

[0233]

鸡胚号	1	2	3	4	5	6
盐水	4+	4+	4+	4+	4+	-
二乙基二硫醚	2+	-	-	-	-	-
大蒜素	-	-	-	-	-	-
[0234]						
Neu5Ac+甲硫氨酸	+	-	-	-	-	+

[0235] 组 1(病毒对照)的新生雏鸡显病态,而组 2(二乙基二硫醚)、组 3(大蒜素)和组 4(制剂)的新生雏鸡看起来是健康的。如表 7 中所总结的,二乙基二硫醚、大蒜素和制剂显著地抑制了 2009H1N1 病毒对晚期鸡胚的感染。

[0236] 表 7. 针对 2009H1N1 病毒感染的药物的鸡胚试验结果

[0237]

候选药物	患病	未患病	患病率 (%)	OR	95%CI	P 值
盐水	5	1	83	ND*	ND	ND
二乙基二硫醚	1	5	17	0.04	0.002-0.83	0.08
大蒜素	1	6	14	0.03	0.002-0.68	0.03
Neu5Ac+甲硫氨酸*	1	5	17	0.04	0.002-0.83	0.08

[0238] *:ND = 未检测

[0239] 晚期鸡胚 (E16-E20) 和新生雏鸡的动物模型可用于但不限于筛选抗流感病毒药物。

[0240] 6.3 用于预防和治疗流感病毒感染的抗体

[0241] 用如下所述免疫血清检测抗流感抗体对流感病毒感染的预防和治疗作用。

[0242] a. 抗 2009H1N1 流感病毒 (加利福尼亚株) (中国 CDC 国家流感中心) 的鸡免疫血清。

[0243] 免疫原:纯化的 2009H1N1 流感病毒 (加利福尼亚株)。

[0244] 抗体滴度:1 : 1280 (10 倍稀释至 1 : 128)。

[0245] b. 抗季节性 H1N1 流感病毒 (上海,1999) (中国 CDC 国家流感中心) 的羊免疫血清。

[0246] 免疫原:纯化的 H1N1 流感病毒 (上海,1999)。

[0247] 抗体滴度:1 : 128

[0248] c. 抗 H3N2 流感病毒 (江西,2004) (中国 CDC 国家流感中心) 的羊免疫血清。

[0249] 免疫原:纯化的 H3N2 流感病毒 (江西,2004)。

[0250] 抗体滴度:1 : 1280 (10 倍稀释至 1 : 128)。

[0251] d. 抗 H5N1 流感病毒 (安徽,2005) (中国 CDC 国家流感中心) 的兔免疫血清。

[0252] 免疫原:纯化的 H5N1 流感病毒 (安徽,2005)。

[0253] 抗体滴度:1 : 1280 (10 倍稀释至 1 : 128)。

[0254] e. 含有低水平 (1 : 5) 抗季节性 H1N1 流感病毒 (中国, 2009) (中国 CDC 国家流感中心) 抗体的健康人血清混合物 (10 人份)。

[0255] 季节性 H1N1、H3N2 和 B 流感病毒的抗体滴度 : 1 : 5。

[0256] 通过红细胞凝集试验测定, 除抗 2009H1N1 (加利福尼亚) 血清之外, 上述所有免疫血清都不与 2009H1N1 (加利福尼亚) 流感病毒反应。

[0257] 7. 病毒感染的实验模型

[0258] 7.1 用于治疗流感病毒感染的新生小鼠模型

[0259] 将新生第 5 日 (P5) bulb/c 乳鼠随机分为三组, 经鼻腔和口服接种 30 微升 A/PR/8/34(H1N1) 流感病毒 (滴度 : 1 : 512, 用盐水稀释 300 倍); 在第 6 天腹腔内注射 100 微升含有以下物质的盐水 : 1) 仅盐水 (n = 6); 2) 20 微升的上述鸡抗 2009H1N1 病毒血清 (抗体滴度 : 1 : 128) (n = 7); 3) 经 100 微克 Neu5Ac 预处理的 20 微升鸡抗 2009H1N1 病毒血清 (n = 7); 和 4) 20 微升由 Neu5Ac (10 毫克 / 毫升) 和 2% 二乙基二硫醚组成的制剂 (n = 6), 处理之后将小鼠观察 7 天。

[0260] 如表 8 所总结的, 病毒感染之后的第 2 天, 5/6 (83%) 用盐水治疗的乳鼠和所有 (100%) 仅用抗 2009H1N1 血清治疗的乳鼠死亡; 而抗 2009H1N1 血清 + Neu5Ac 制剂治疗组仅有 1/7 (14.3%) 乳鼠死亡。类似地, Neu5Ac + 甲硫氨酸制剂治疗组仅有 2/7 (28.6%) 乳鼠死亡。实验结果表明抗 2009H1N1 抗体和 Neu5Ac 将高致病性 A/PR/8/34 (H1N1) 感染的死亡率从 83.3% 降至 14.3% (5.9 倍); Neu5Ac 和甲硫氨酸组成的制剂将 A/PR/8/34 (H1N1) 感染的死亡率从 83.3% 降至 28.6% (2.8 倍)。数据还表明了单独使用高剂量的 2009H1N1 抗体对于治疗新生乳鼠的 A/PR/8/34 (H1N1) 感染是有害而非有益的。

[0261] 表 8. 抗 A/PR/8/34 (H1N1) 病毒感染的药物的 bulb/c 小鼠试验结果

[0262]

候选药物	死亡	未死亡	死亡率(%)	OR	95%CI	P 值
盐水	5	1	83.3	ND*	ND	ND
H1N1-Ab.1 ^a	7	0	100	ND	ND	ND
H1N1-Ab.1 + Neu5Ac	1	6	14.3	0.03	0.002-0.68	0.03
Neu5Ac + 甲硫氨酸	2	5	28.6	0.08	0.005-1.19	0.10

[0263] * : ND = 未检测

[0264] 7.2 预防流感感染的新生小鼠模型

[0265] 将新生 6 天 (P6) bulb/c 乳鼠随机分为八组, 经腹腔内注射 50 微升含有以下物质的盐水 : 1) 仅盐水 (对照组, n = 6); 2) 10 微升上述鸡抗 2009H1N1 病毒血清 (n = 7); 3) 10 微升上述羊抗季节性 H1N1 血清 (n = 7); 4) 10 微升上述人血清混合物 (n = 5); 5) 10 微升上述羊抗 H3N2 血清 (n = 5); 6) 10 微升上述兔抗 H5N1 血清 (n = 6); 7) 用 10 微升 (300 微克) Neu5Ac (30 毫克 / 毫升) 预处理的 10 微升上述鸡抗 2009H1N1 病毒血清 (温育 30 分钟) (n = 5); 和 8) 10 微升上述鸡抗 2009H1N1 流感病毒血清加 10 微升人血清混合物 (n =

5)。在第 7 天乳鼠通过滴鼻及口服接种 50 微升 A/PR/8/34(H1N1) 病毒 (滴度 :1 : 512, 用盐水稀释 100 倍), 并在病毒感染后观察 7 天。

[0266] 结果总结在表 9 中。数据显示 :1) 由抗 2009H1N1 抗体 +Neu5Ac 组成的制剂或抗 H5N1 的抗体对于预防 A/PR/8/34(H1N1) 流感病毒感染有显著效果 ;2) 含有低剂量的抗季节性 H1N1 抗体 (H1N1-Ab. 3, 1 : 5) 的人血清混合物将 A/PR/8/34(H1N1) 感染死亡率从 83.3% 降至 40.0% (2.1 倍) ;3) 中高剂量的抗季节性 H1N1 抗体 (H1N1-Ab. 2, 1 : 128) 对于预防新生乳鼠的 A/PR/8/34(H1N1) 感染无效, 甚至有害。

[0267] 表 9. 抗体预防 A/PR/8/34(H1N1) 病毒感染的小鼠试验结果

[0268]

治疗	n=	未死亡	死亡率 (%)	OR	95%CI	P 值
盐水	6	1	5(83.3)	1.4	0.07-28.1	1.0
H1N1-Ab.1 ^a	7	0	7(100)	无穷大	无穷大	无穷大
H1N1-Ab.2 ^b	7	0	7(100)	无穷大	无穷大	无穷大
H1N1-Ab.3 ^c	5	3	2(40.0)	0.13	0.008-2.2	0.24
H3N2-Ab	5	0	5(100)	无穷大	无穷大	无穷大
H5N1-Ab	6	5	1(16.7)	0.04	0.002-0.83	0.08
H1N1-Ab.1 + Neu5Ac	6	5	1(16.7)	0.04	0.002-0.83	0.08
H1N1-Ab.1 + Ab.3	5	2	3(60.0)	0.30	0.02-4.91	0.55

[0269] a :鸡抗 2009H1N1 (加利福尼亚, 2009) 血清, 1 : 128 ;b :羊抗季节性 H1N1 (上海, 1999) 血清, 1 : 128 ;c :人血清混合物 :抗 H1N1 (中国, 2009) :1 : 5

[0270] 上述动物模型可用于但不限于快速评估动物或人疫苗和抗体的药效和副作用。显而易见, 用各种其他年龄的小鼠或各种年龄的其他动物可开发出类似的实验模型。

[0271] 7.3 用于流感感染的新生雏鸡模型

[0272] 将 16 日 (E16) 鸡胚随机分为五组, 经尿囊腔分别注射 100 微升以下物质 :1) 仅盐水 (n = 6) ;2) 上述鸡抗 2009H1N1 病毒血清 (1 : 128, n = 9) ;3) 上述羊抗季节性 H1N1 血清 (1 : 128, n = 8) ;4) 上述人血清混合物 (1 : 5, n = 6) ;5) 上述用 10 微升 (300 微克) Neu5Ac (30 毫克 / 毫升) 预处理的鸡抗 2009H1N1 (加利福尼亚) 血清 (1 : 128) (温育 30 分钟) (n = 8)。第二天 (E17), 经尿囊腔分别每枚接种 100 微升 2009H1N1 流感病毒 (加利福尼亚株, 滴度 :1 : 128, 用盐水稀释 100 倍)。将鸡胚培育在 35°C 温箱中直至新生雏鸡出壳。

[0273] 数据表明由抗 2009H1N1 抗体 +Neu5Ac 组成的制剂对于预防 2009H1N1 流感病毒感染有显著效果 (表 10, 图 5D) ;而尽管含有中等或高剂量的抗流感病毒抗体 (H1N1-Ab. 1 和 H1N1-Ab. 2) 的其它血清具有更低的死亡率 (表 10), 但它们对于预防 2009H1N1 病毒感染是有害而不是有效的 (图 5B 和 5C)。

[0274] 表 10. 抗体预防 2009H1N1 流感病毒感染的雏鸡试验结果

[0275]

处理	n =	未患病	患病率 (%) [*]	死亡率 (%)	OR	95%CI	P 值
仅病毒**	6	1	5(83.3)	3(50.0)	0.83	0.04-17.0	1.0
H1N1-Ab.1 ^a + 病毒	9	1	8(88.9)	2(22.2)	1.2	0.06-24.5	1.0
H1N1-Ab.2 ^b + 病毒	8	1	7(87.5)	3(37.5)	1.4	0.07-28.1	1.0
H1N1-Ab.3 ^c + 病毒	6	1	5(83.3)	2(33.3)	1.0	0.05-20.8	1.0
H1N1-Ab.1 + Neu5Ac	8	7	1(12.5)	1(12.5)	0.03	0.001-0.57	0.03

[0276] * :包括死亡 ;** :2009H1N1 (加利福尼亚) 流感病毒 ;a :鸡抗 2009H1N1 (加利福尼亚) 血清, 1 : 128 ;b :羊抗季节性 H1N1 (上海, 99) 血清, 1 : 128 ;c :人血清混合物 :抗 H1N1 (中国, 09) :1 : 5

[0277] 晚期胚胎 (E16-E20) 和新生雏鸡的动物模型可以用于但不限于评估流感疫苗和抗体的药效和安全性。

[0278] 8. 用于评估疫苗和抗体的实验模型

[0279] 8.1 用于快速评估疫苗和抗体安全性的动物模型

[0280] 将 16 天 (E16) 的鸡胚随机分为六组, 经尿囊腔分别注射 100 微升以下物质 :1) 仅盐水 (n = 10) ;2) 上述鸡抗 2009H1N1 病毒血清 (n = 11) ;3) 上述羊抗季节性 H1N1 血清 (n = 11) ;4) 上述人血清混合物 (n = 8) ;5) 羊上述抗 H3N2 血清 (n = 10) ;6) 上述兔抗 H5N1 血清 (n = 8) ;将鸡胚培育在 35°C 温育箱中直至新生雏鸡出壳。

[0281] 结果总结在表 11 和图 6。用抗 2009H1N1 血清 (图 6B)、抗季节性 H1N1 血清 (图 6C) 和抗 H5N1 血清 (图 6E) 治疗的雏鸡呈病态。然而, 用盐水 (图 6A)、抗 H3N2 血清 (图 6D)、人血清混合物 (图 6F) 治疗的雏鸡状态健康。数据表明了中等或高剂量抗 H1N1 和抗 H5N1 抗体诱导了鸡胎和新生雏鸡的死亡或严重疾病。

[0282] 表 11. 针对流感病毒的抗体功效和安全性的鸡试验结果

[0283]

治疗	n=	未患病	患病率 (%)	死亡率 (%)	OR	95%CI	P 值
盐水	10	9	1(10)	1(10)	1.1	0.06-20.5	1.0
H1N1-Ab.1 ^a	11	1	10(91)	2(18)	90	4.9-1660	0.0003
H1N1-Ab.2 ^b	11	2	9(82)	5(46)	41	3.09-530	0.002
H1N1-Ab.3 ^c	8	7	1(13)	1(13)	1.29	0.07-24.3	1.00
H3N2-Ab	10	7	3(30)	3(30)	3.86	0.33-45.6	0.58
H5N1-Ab	8	4	4(50)	1(13)	9.0	0.81-100	0.14

[0284] * :包括死亡 ;a :鸡抗 2009H1N1 (加利福尼亚) 血清,1 : 128 ;b :羊抗季节性 H1N1 (上海,1999) 血清,1 : 128 ;c :人血清混合物 :抗 H1N1 (中国,2009) :1 : 5

[0285] 8.2 格林巴氏综合症的动物模型

[0286] 如上所述,抗 2009H1N1 血清、抗季节性 H1N1 血清和抗 H5N1 血清注射至胚龄为 E16 的鸡胚中诱导了新生雏鸡的腿残疾 (图 6B,6C 和 6D),其症状类似于人的格林巴氏综合症 (GBS)。抗流感病毒抗体诱导 GBS 的频率如表 12 所列。结果表明,具有诱导 GBS 最高风险的是 2009H1N1 (加利福尼亚) 病毒诱导的抗体,其次是禽 H5N1 (安徽,2005) 病毒和季节性 H1N1 (上海,1999) 病毒诱导的抗体。

[0287] 表 12. 抗流感抗体诱导格林巴氏综合症的频率

[0288]

治疗	n=	未患病	GBS 患病率 (%)*	OR	95%CI	P 值
盐水	10	9	0(0.0)	无穷大	无穷大	无穷大
H1N1-Ab.1 ^a	11	1	8(89)	72	3.84-1350	0.001
H1N1-Ab.2 ^b	11	2	4(67)	18	1.24-261	0.04
H1N1-Ab.3 ^c	8	7	0(0.0)	无穷大	无穷大	无穷大
H3N2-Ab	10	7	0(0.0)	无穷大	无穷大	无穷大
H5N1-Ab	8	4	4(50)	9.0	0.81-100	0.14
H1N1-Ab.1+Neu5Ac	6	5	0(0.0)	无穷大	无穷大	无穷大

[0289] * :格林巴氏综合症 ;a :鸡抗 2009H1N1 (加利福尼亚) 血清,1 : 128 ;b :羊抗季节性 H1N1 (上海,1999) 血清,1 : 128 ;c :人血清混合物 :抗 H1N1 (中国,2009) :1 : 5

[0290] 晚期胚胎 (E16-E20) 和新生雏鸡动物模型可以用于但不限于评估流感疫苗和抗体的功效和安全性,用于 GBS 的致病性研究以及筛选预防和治疗 GBS 和疫苗和抗体的副作

用药物。显而易见,用各种其他年龄的鸡或各种年龄的其他动物可开发出类似的实验模型。

[0291] 9. Neu5Ac 对流感的治疗应用

[0292] 9.1 用 Neu5Ac 治疗流感疫苗和抗体的副作用

[0293] 将 100 微升分别含有上述鸡抗 2009H1N1、羊抗季节性 H1N1 和兔抗 H5N1 的血清分别与 100 微克 Neu5Ac 温育 30 分钟,然后经尿囊腔注射至三组胚龄为 16 天的 (E16) 鸡胚中。将鸡胚培育在 35°C 温育箱中直至新生雏鸡出壳。

[0294] 结果总结在表 9 和表 10 中。数据显示了注射了用 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 预处理的免疫血清的新生雏鸡既未患病也未患 GBS。

[0295] 9.2 而且,如上所述,在新生雏鸡中用 Neu5Ac 预处理的免疫血清对于预防和治疗 2009H1N1 (加利福尼亚) 病毒感染是有效的 (表 8,图 5D)。

[0296] 10. 疫苗和抗体治疗的新型作用机理的体内证据

[0297] 在 PCT/US2007/018258 和 PCT/US2009/039810 中描述了疫苗和被动免疫的新的功能机理以及体外和体内证据。本发明提供了进一步的体内证据。

[0298] 10.1 给怀孕母鼠注射 250 微克羊抗 NCDV 抗体,并在不同时间点从这些母鼠所生的乳鼠收集血液和组织样品。如图 7 所示,7A 为已知浓度的羊 IgG ;P0、P1、P3 和 P7 龄的乳鼠血清中检测到的羊 IgG 的量均小于 1.0ng/毫升 (图 7B);。相反地,与盐水对照组的乳鼠 (图 7D) 比较,在抗体注射组的乳鼠中检测到羊抗 RV 抗体与 P7 龄乳鼠小肠杯状细胞呈强阳性结合 (图 7C)。这种结合在 P21 龄乳鼠的小肠中仍可检测出。

[0299] 类似地,在另一组给孕鼠注射了 75 微克羊抗 RSV 的实验组,在其所生乳鼠中高达 P9 (图 8) 和 P14 龄时可检测到羊 IgG 与鼠肺的结合。

[0300] 同样地,如 PCT/US2007/018258 和如上所述,在小鼠模型中,低剂量 (低于 20 微克) 的抗 NCDV 抗体降低了轮状病毒感染的严重性并缩短了病程。

[0301] 上述实验数据支持一疫苗和抗体治疗的新型作用机理:由疫苗或传染原诱导产生的抗体结合至并封闭传染原的受体。这种结合不但阻断传染原进入宿主细胞,而且保护抗体不被快速清除。

[0302] 使用抗呼吸道合胞病毒 (RSV) 抗体例如帕利珠单抗 (**Synagis®**) 保护早产儿预防严重 RSV 感染已证明有效。然而,该药物的作用机理还不清楚。本 发明公开的结合并封闭受体可能是帕利珠单抗的功能机理。

[0303] 10.2 作为进一步的体内证据,从如 7.2 和 7.3 所述的注射抗流感免疫血清治疗的新生雏鸡 (表 9) 中收集血液;在 P3 日 (血清注射之后 8 天) 通过鼻腔滴入和口服接种 100 微升 2009H1N1 (加利福尼亚) 病毒 (1 : 32, 2 倍稀释)。感染之后将小鸡饲养 4 天以观察流感症状。

[0304] 表 13. 抗 2009H1N1 流感病毒抗体药效的雏鸡试验结果

[0305]

处理	n=	未患病	患病率 (%)	死亡率 (%)	OR	95%CI	P 值
盐水	9	1	8(89)	1(11)	64	3.38-1210	0.003
H1N1-Ab.1 ^a	9	6	3(33)	3(33)	0.06	0.005-0.75	0.05
H1N1-Ab.2 ^b	7	5	1(17)	0(0.0)	0.03	0.001-0.50	0.01
H1N1-Ab.3 ^c	7	2	5(71)	4(57)	0.31	0.02-4.41	0.55
H3N2-Ab	7	1	6(86)	4(57)	0.75	0.04-14.6	1.00
H5N1-Ab	7	4	3(43)	3(43)	0.09	0.007-1.22	0.11

[0306] *:包括死亡;a:鸡抗 2009H1N1(加利福尼亚)血清,1:128;b:羊抗季节性 H1N1(上海,1999)血清,1:128;c:人血清混合物:抗 H1N1(中国,2009):1:5

[0307] 如表 13 所总结的,在病毒感染之后 3 天,在 8 天前注射含有 2009H1N1-Ab(6/9, 63%)、季节性 H1N1-Ab(5/6, 83%)和 H5N1-Ab(4/7, 57%)血清的新生雏鸡未感染 2009H1N1(猪)病毒。

[0308] 用红细胞凝集试验检测,病毒感染前从雏鸡收集的所有血清的抗体滴度为阴性(零)。数据表明抗流感免疫血清预防病毒感染是通过抗体封闭病毒受体而不是中和病毒而实现的。

[0309] 11. 多糖相关生物标记物的鉴定

[0310] N-乙酰-D-葡萄糖胺作为炎症和癌症相关的生物标记物在 PCT/US2009/039810 已有描述。本发明提供了进一步的体内证据。

[0311] 用正常人器官+恶性肿瘤组织构成的组织阵列芯片(Immgenex, ArrayI+II, 圣地亚哥, 美国)检测了人健康和疾病组织与 WGA 的结合。结果显示除骨髓,唾液腺,肺和脑下垂体之外,正常人器官都不表达或很少表达 N-乙酰-D-葡萄糖胺,同时下列癌组织强烈表达 N-乙酰-D-葡萄糖胺:恶性黑色素瘤、脑恶性少突神经胶质瘤、肾透明细胞癌、头部皮肤基底细胞癌、喉癌、霍奇金氏锁骨上淋巴瘤、结肠中级间质瘤、甲状腺髓样癌和左胸腔壁皮肤鳞状细胞癌。

[0312] 12. 预防和治疗 A549 细胞的流感感染

[0313] 试验了下列候选药物。

[0314] 1) 浓度为 3 毫克/毫升的 Neu5Ac;

[0315] 2) 浓度为 3 毫克/毫升的 Neu5Ac 甲酯 (Neu5AcMe);

[0316] 3) 浓度为 3 毫克/毫升的甲硫氨酸;

[0317] 4) 由 Neu5Ac(2 毫克/毫升)和二乙基二硫醚(2%)组成的制剂-1;

[0318] 5) 由 Neu5AcMe(2 毫克/毫升)和二乙基二硫醚(2%)组成的制剂-2;

[0319] 在长满单层人肺腺癌上皮细胞(A549 细胞系)的 12 孔细胞培养板中,分别加入各 50 微升上述候选药物,每个药物加入两孔细胞,温育 1 小时,吸去上清液;然后用 100 微升 2009 流感 AH1N1 病毒(加利福尼亚株,1:128,50 倍稀释)、季节性 H1N1 病毒(布鲁斯班/59/2007,1:256,100 倍稀释)或 H3N2 病毒(布鲁斯班/10/2007,1:128,50 倍稀释)感染细胞 1 小时,吸去上清液并加入 1 毫升分别含有 100 微升上述候选药物的培养基。仅

加有培养基而未加入药物的两个孔作为对照。在 24 和 48 小时收集培养上清液并用于红细胞凝集抑制试验。

[0320] 观察红细胞抑制试验的结果,孔底部的 RBC 沉淀为阳性结果(抑制效果);孔底部无 RBC 沉淀或部分沉淀为阴性结果(未抑制)。结果总结如下。

[0321] a. 用 2009H1N1 流感 A 病毒(加利福尼亚株)感染 A549 细胞

[0322]

孔	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	小时
处理	培养基	Neu5Ac	Neu5AcMe	Met*	Frm-1**	Frm-2	
病毒							
滴度	2+	-	+	-	-	-	24
	4+	+	2+	+	-	+	48

[0323] *:Met = 甲硫氨酸;和 **:Frm = 上述的制剂

[0324] b. 用季节性 H1N1(布鲁斯班)流感 A 病毒感染 A549 细胞

[0325]

孔	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	小时
处理	培养基	Neu5Ac	Neu5AcMe	Met*	Frm-1**	Frm-2	
病毒							
滴度	4+	-	-	-	-	+	24
	4+	+	+	2+	+	2+	48

[0326] c. 用 H3N2 流感 A 病毒(布鲁斯班)感染 A549 细胞

[0327]

孔	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	小时
处理	培养基	Neu5Ac	Neu5AcMe	Met*	Frm-1**	Frm-2	
病毒							
滴度	3+	+	+	-	+	+	24
	4+	2+	2+	+	2+	3+	48

[0328] *:Met = 甲硫氨酸;和 **:Frm = 上述的制剂

[0329] 以上结果显示了在 A549 细胞培养体系中候选药物抑制了 2009H1N1、季节性 H1N1 和 H3N2 流感病毒的感染。

[0330] 13. 预防和治疗小鼠的流感感染

[0331] 13.1 来自怀孕母鼠的抗体诱导了胎儿和新生儿的疾病

[0332] 将从感染流感或用流感疫苗免疫的受试者中收集的人免疫血清在孕龄 E19 时,经腹腔内注射至 bulb/c 孕鼠(表 6)。这些血清的滴度调整至 1 : 128,各血清的注射量分别为 200 微升。由 5 位健康个体血清组成的人血清混合物和感染 RSV 患者的血清用作对照。人血清混合物对于季节性流感 H1N1、H3N2 和 B 病毒的滴度是 1 : 5。胎鼠和孕鼠所分娩的新生乳鼠的死亡率总结在表 14 中。

[0333] 表 14. 胎鼠和新生乳鼠的死亡率

[0334]

免疫血清	n	死亡	死亡率 (%)	OR	95%CI	P 值
在 E19 的一次注射						
接种疫苗前人血清	12	0	0.00	无穷大	无穷大	无穷大
人抗 RSV(感染)	15	1	6.70	0.93	0.05-16.4	1.00
接种疫苗后人抗 09H1N1	12	6	50.0	14.0	1.37-143	0.02
接种疫苗后人抗 S-H1N1*	14	3	21.4	3.82	0.35-42.0	0.33
感染后人抗 H5N1	18	9	50.0	14.0	1.51-130	0.009
兔抗 H5N1	12	6	50.0	14.0	1.37-143	0.02

[0335] * :S = 季节性

[0336] 结果和动物模型提供了直接证据,即在胎鼠和新生鼠中高水平的抗 2009H1N1 和抗 H5N1 抗体可引起严重副作用甚至死亡。而且,这个发现表明了给孕妇接种 2009H1N1 (猪) 流感疫苗或 H5N1 疫苗对于胎儿和新生儿是危险的。

[0337] 13.2 治疗新生小鼠的流感感染

[0338] 将第 5 天 (P5) bu1b/c 乳鼠随机分成五组,通过滴鼻和口服接种 20 微升的 A/PR/8/34(H1N1) 流感病毒株 (滴度 :1 : 256,用盐水稀释 200 倍);在第 2、3、4 和 5 天经口服或腹腔内注射 100 微升含有下列物质的盐水 :1) 仅盐水 (n = 10) ;2) 150 微克 Neu5AcMe ; 3) 30 微升 2% 二乙基二硫醚加 200 微克 Neu5AcMe (n = 10) ;4) 30 微升 2% 二乙基二硫醚加 200 微克 Neu5Ac (n = 10) ;和 5) 100 微克 Neu5Ac 加 100 微克 Neu5AcMe。处理之后将小鼠饲养观察 10 天。

[0339] 在病毒感染后第 3 或 4 天,9/10 (90%) 仅用盐水治疗的乳鼠死亡,而 5/10 (50%) 用 Neu5AcMe 或二乙基二硫醚 +Neu5Ac 治疗的乳鼠存活。而且,9/11 (82%) 和 8/10 (80%) 用 Neu5AcMe+Neu5Ac 和二乙基二硫醚 +Neu5AcMe 治疗的乳鼠和 5/10 (50%) 用 Neu5AcMe 或二乙基二硫醚 +Neu5Ac 治疗的乳鼠存活。数据表明了由二乙基二硫醚 +Neu5AcMe (OR = 0.03, 95% CI = 0.002-0.37, p = 0.005) 组成的制剂或由 Neu5AcMe+Neu5Ac (OR = 0.03, 95% CI = 0.002-0.32, p = 0.002) 组成的制剂对于治疗严重 A/PR/8/34 (H1N1) 流感感染有显著效果。

[0340] 除以上之外的其它实施方式也是相关的。因此术语和表述仅用于通过实施例描述公开的内容,但不对所公开的内容进行限制。可以认为,不同前述的其它实施方式也不背离本文所述和所要求的公开内容的实质和范围。所有专利,公开专利,和本文引用的其它参考文献都全文并入本文作为参考。

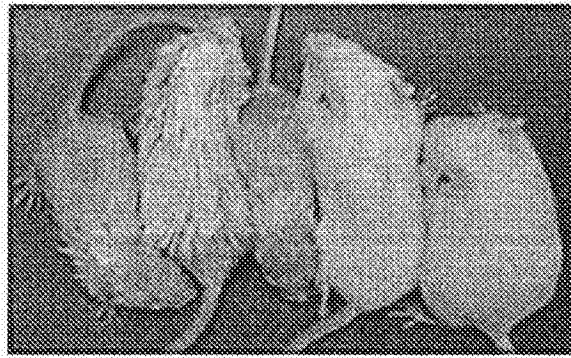


图 1

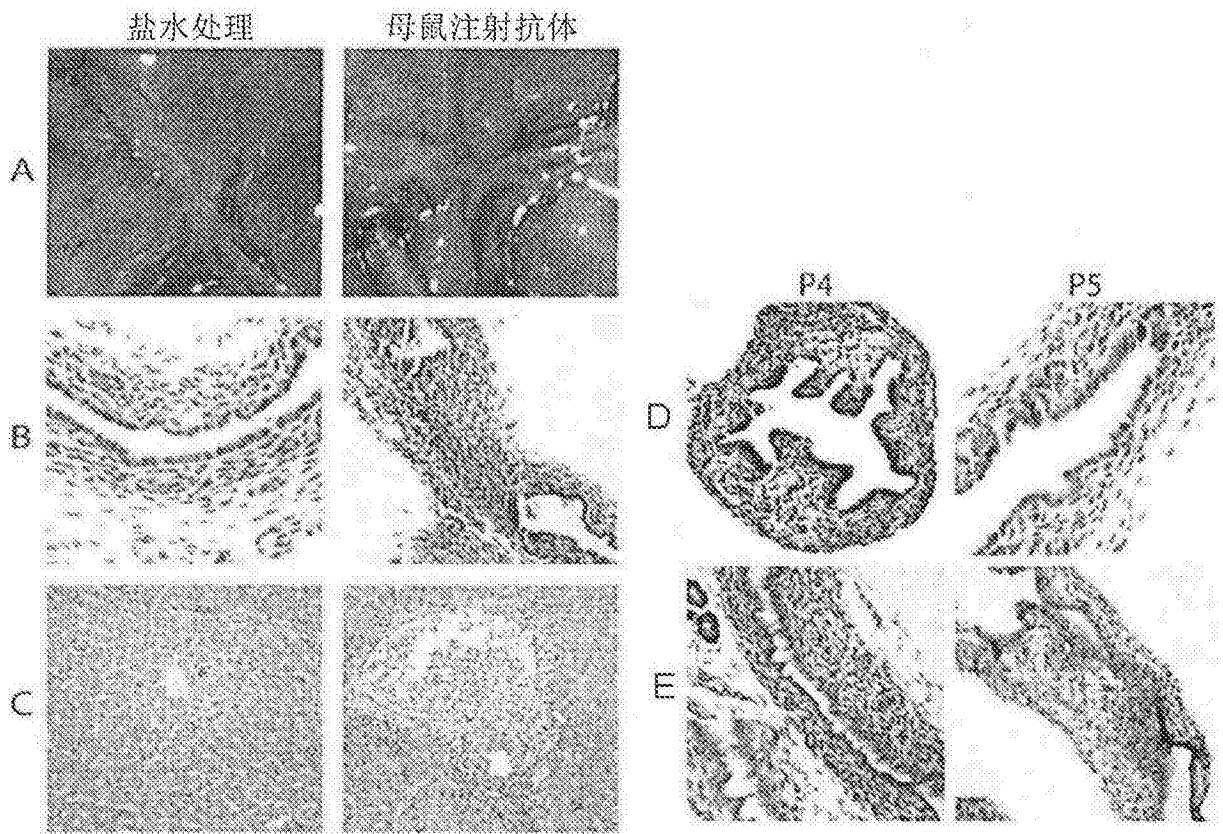


图 2

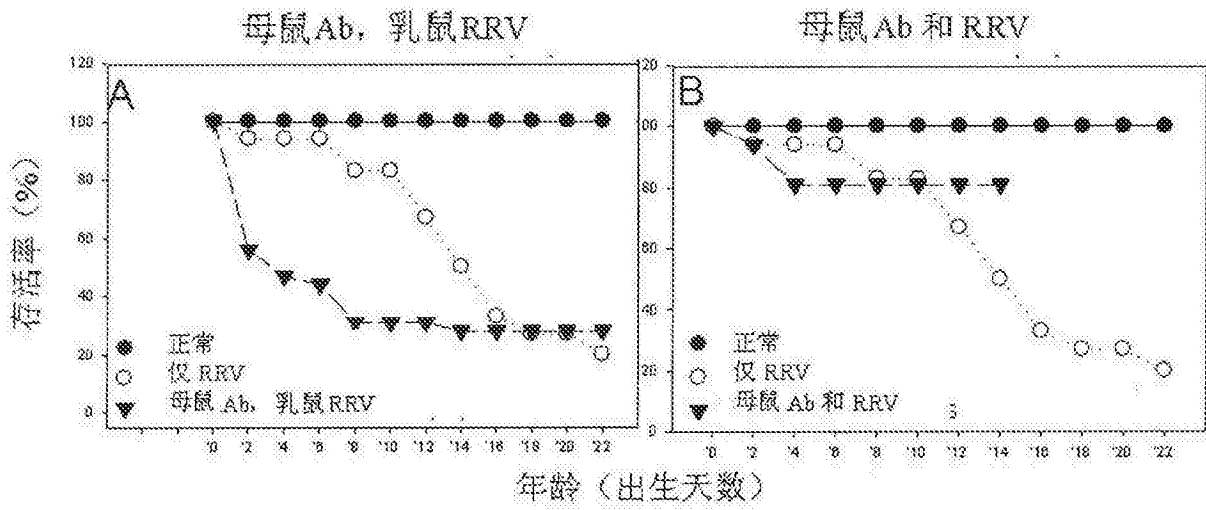


图 3 A

图 3 B

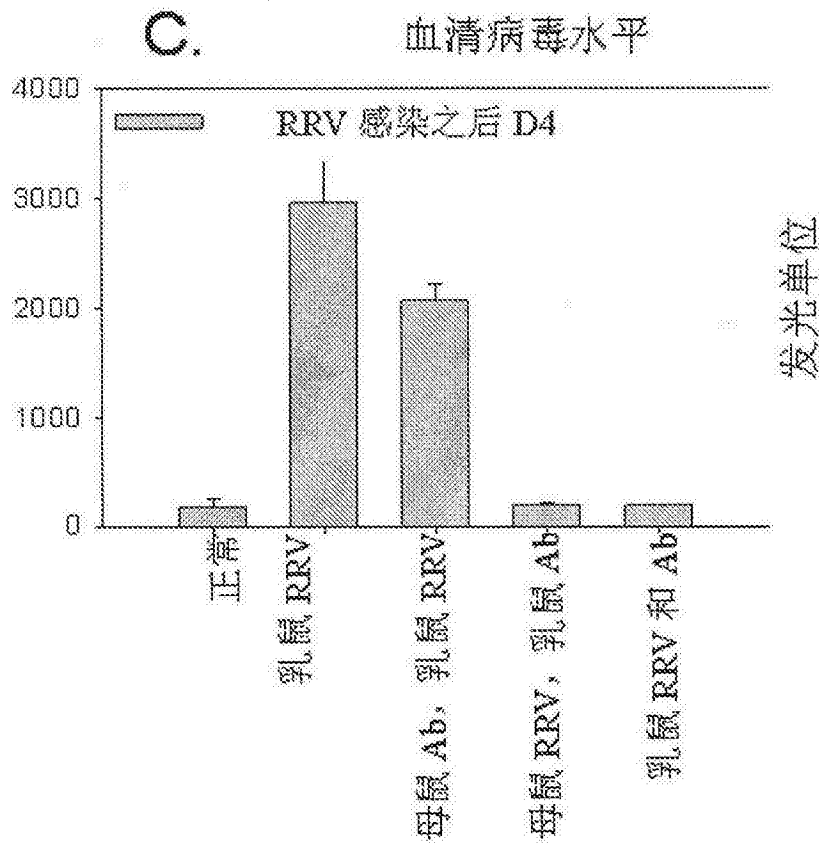


图 3C

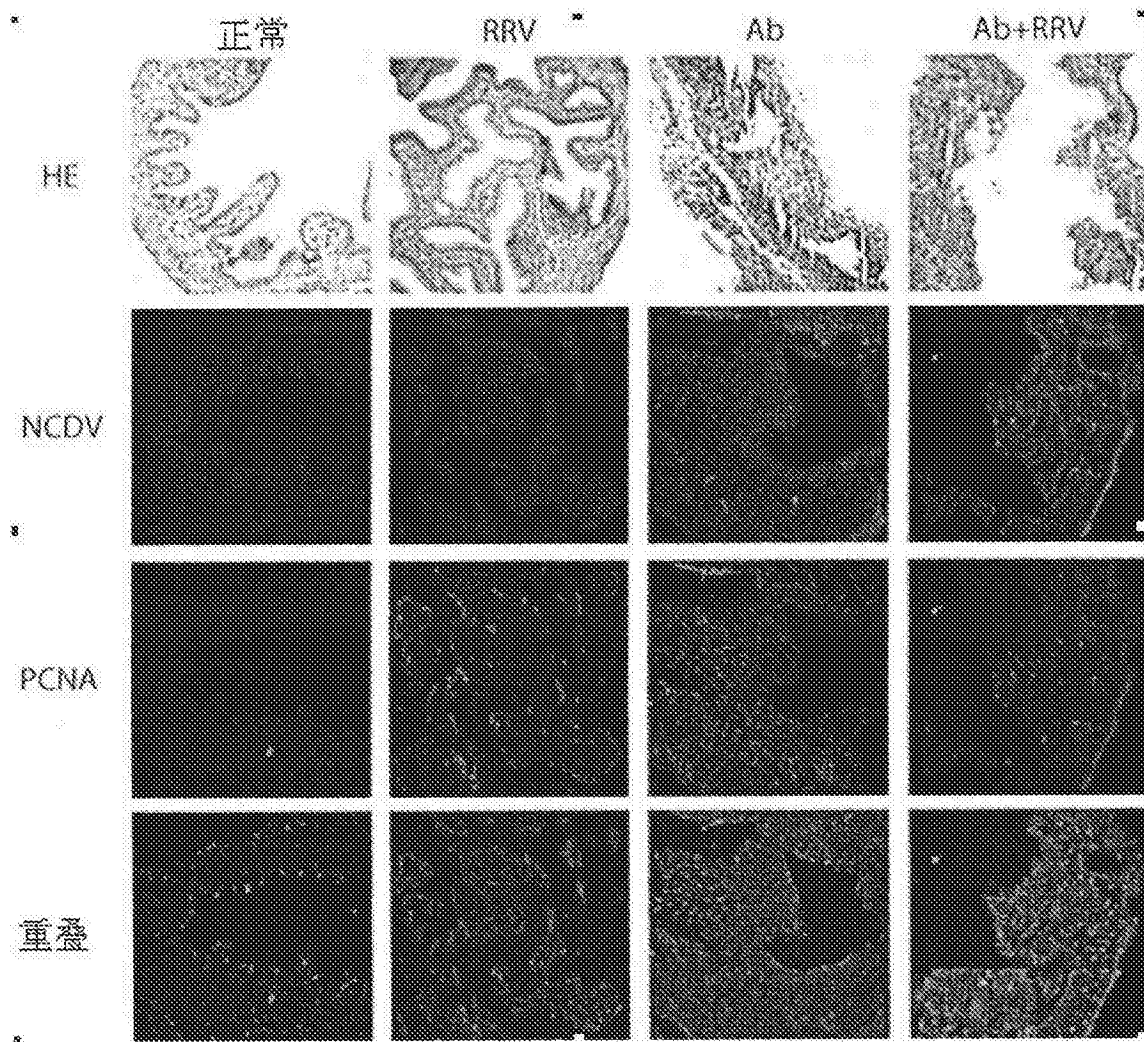


图 4

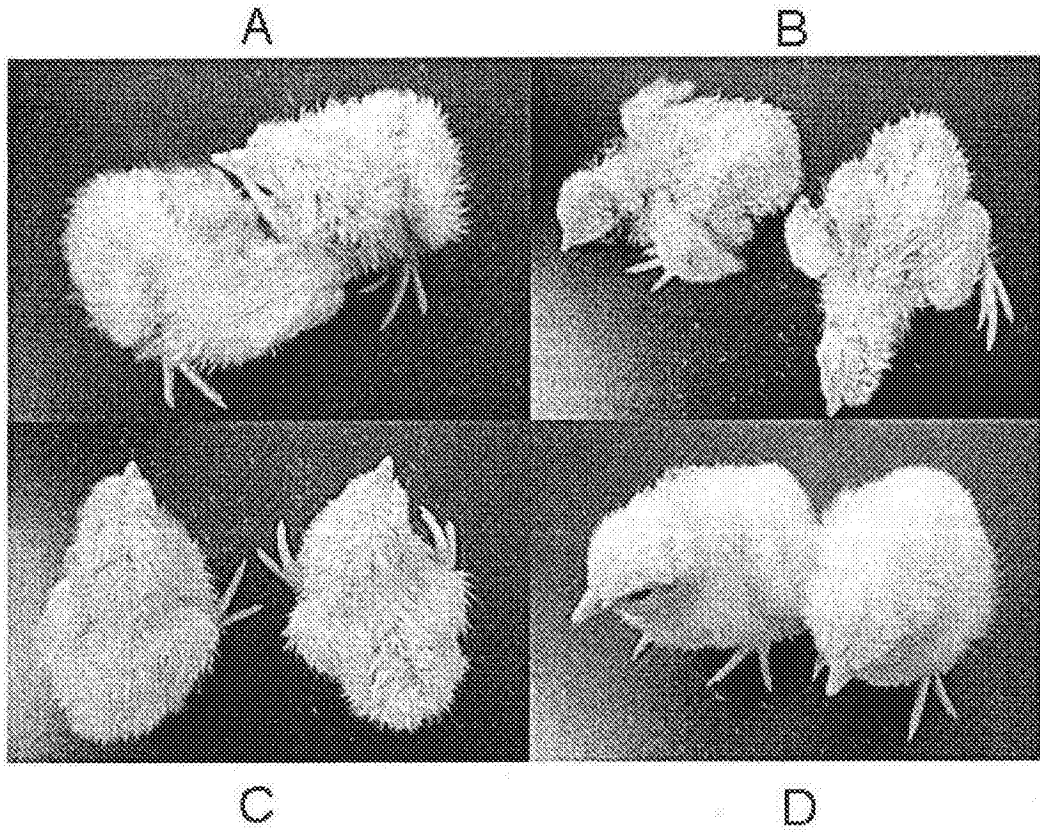


图 5

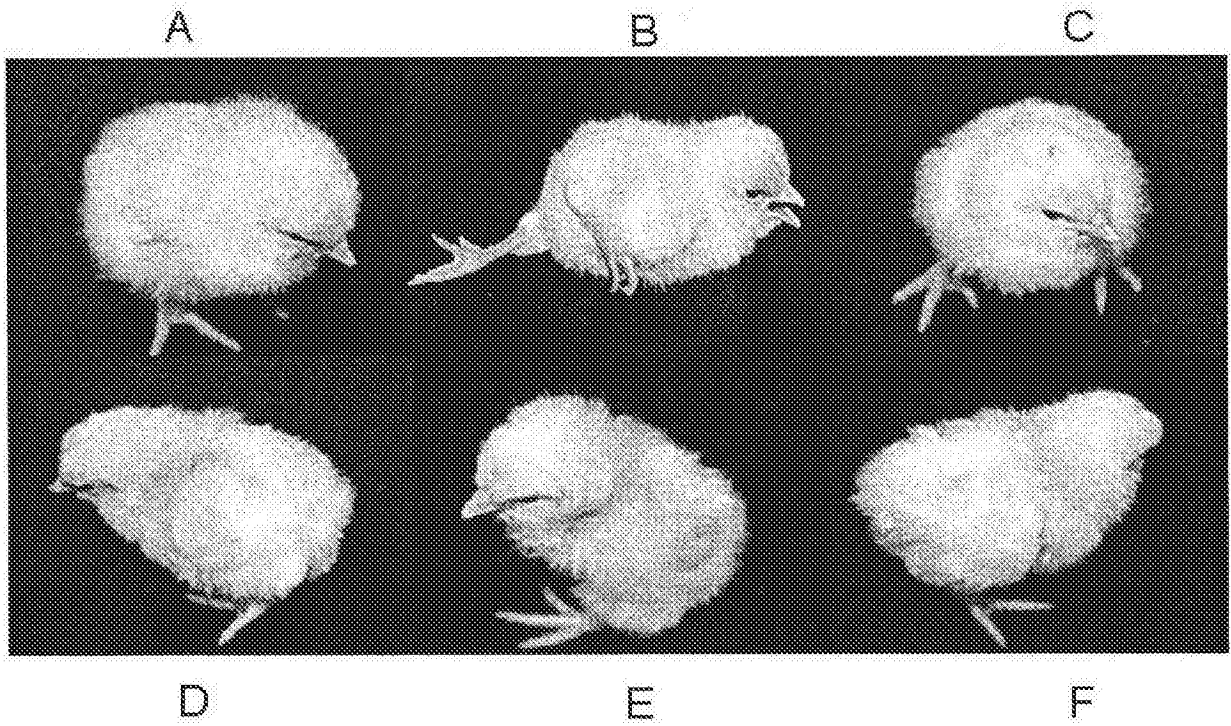


图 6

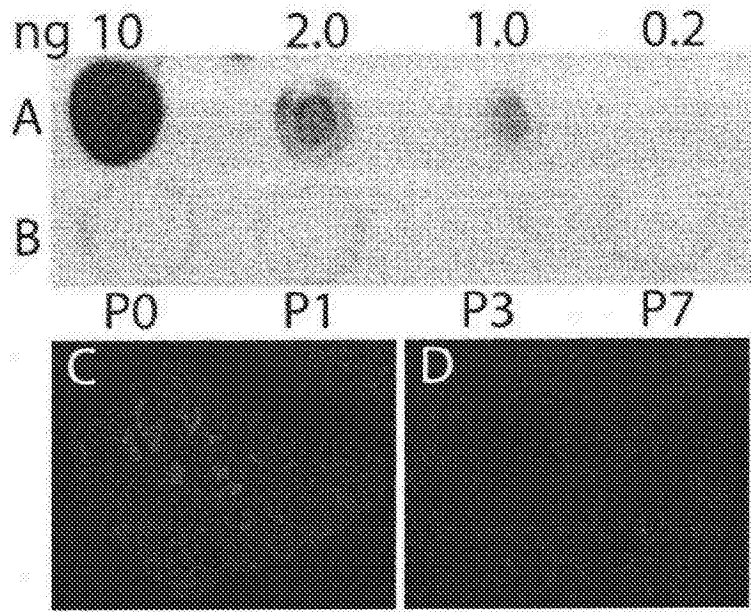


图 7

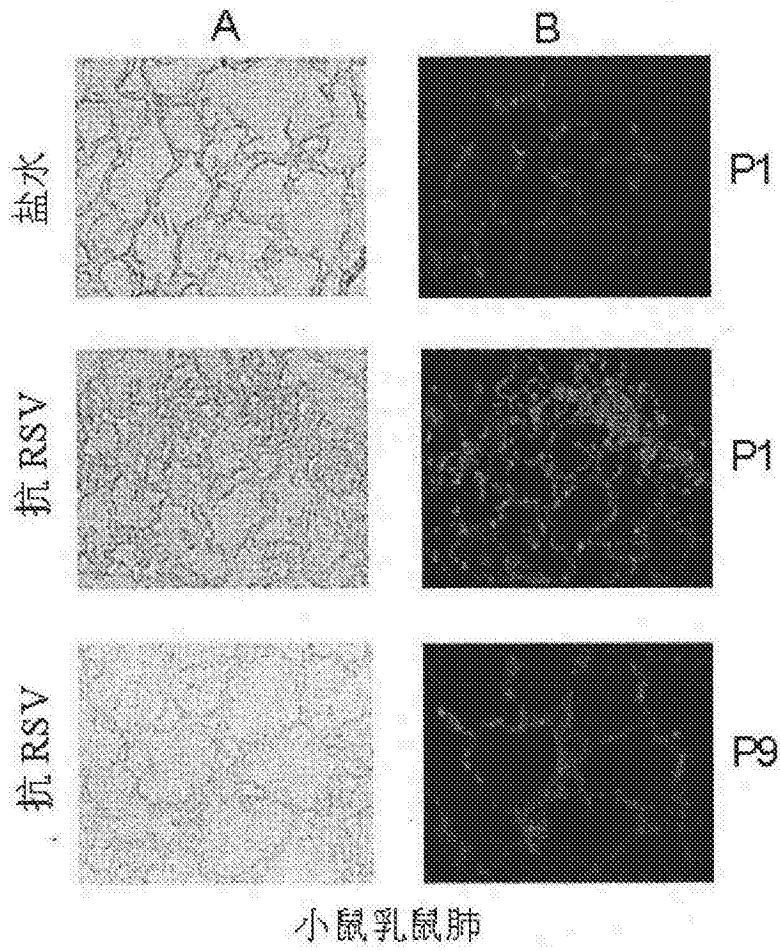


图 8

专利名称(译)	多糖相关疾病的药物和疫苗及免疫测定产品		
公开(公告)号	CN102178686B	公开(公告)日	2016-01-13
申请号	CN201110020371.2	申请日	2011-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	王慧茹		
申请(专利权)人(译)	王慧茹		
当前申请(专利权)人(译)	王慧茹		
[标]发明人	王慧茹		
发明人	王慧茹		
IPC分类号	A61K31/7012 A61K31/7008 A61K31/498 A61K31/105 A61K38/16 A61K39/12 A61K39/125 A61K39/145 A61K39/15 A61K39/155 A61K39/17 A61K39/21 A61K39/215 A61K39/245 A61K39/29 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P29/00 A61P31/18 A61P31/16 A61P31/14 A61P31/20 A61P3/04 A61P3/10 A61P13/12 G01N33/53 G01N33/574		
代理人(译)	王崇 周建秋		
审查员(译)	张婷		
优先权	61/335415 2010-01-07 US		
其他公开文献	CN102178686A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于治疗或预防多糖相关疾病的药物组合物，所述组合物含有含多糖分子、多糖结合分子和多糖修饰分子中的一种或多种；其中，所述多糖结合分子为能与多糖结合的抗体和/或凝集素；所述多糖修饰分子中含有修饰基团，所述修饰基团为乙酰基、乳酰基、甲基、磷酸基和含硫基团中的一种或多种，并且所述修饰基团能与所述含多糖分子共价偶联。本发明还提供了用于治疗或预防多糖相关疾病的疫苗。本发明进一步提供了诊断多糖相关疾病的免疫测定产品。

