



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104602696 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 06

(21) 申请号 201380040356. 1

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

(22) 申请日 2013. 05. 30

代理人 胡晨曦 黄革生

(30) 优先权数据

61/653, 389 2012. 05. 30 US

61/827, 661 2013. 05. 26 US

(51) Int. Cl.

A61K 31/715(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

A61P 31/10(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 01. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/043283 2013. 05. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/181348 EN 2013. 12. 05

(83) 生物保藏信息

PTA-5932 2004. 04. 21

PTA-5933 2004. 04. 21

PTA-5931 2004. 04. 21

(71) 申请人 布赖汉姆妇女医院

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 G·B·皮埃尔 C·塞维斯-本特利

D·斯库尔尼克

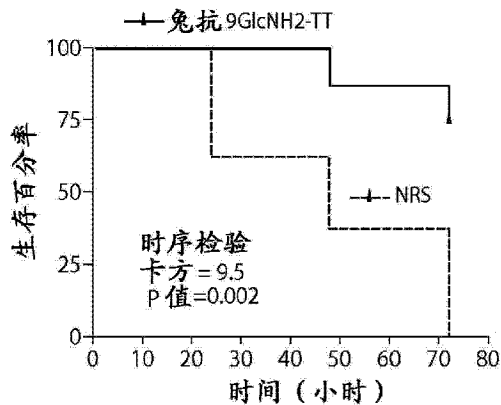
权利要求书8页 说明书28页 附图17页

(54) 发明名称

多糖组合物及使用方法

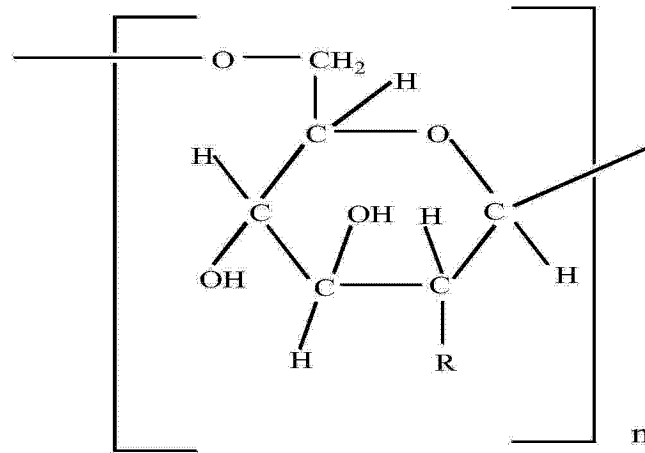
(57) 摘要

本发明部分地涉及聚N-乙酰化葡糖胺(PNAG)的组合物和PNAG特异性抗体在预防和治疗由某些PNAG阳性的病原体导致的感染中的用途,以及在检测(包括诊断)方法中的用途。



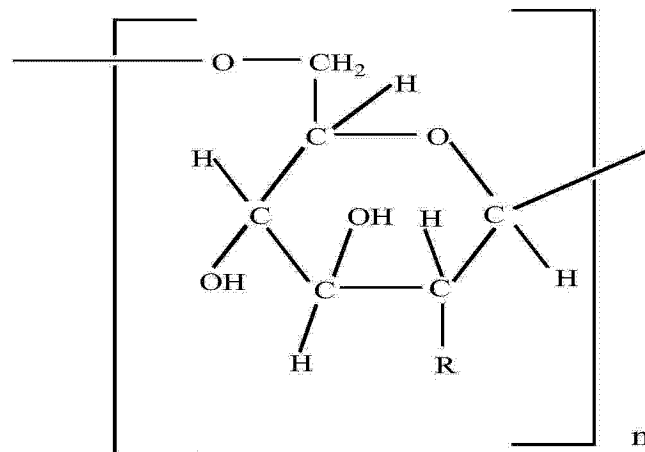
1. 一种方法,包括:

向具有或有风险发生非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体感染的个体施用能诱导针对病原体的免疫应答的有效量的具有下式的分离多糖



其中 n 至少是 5, R 选自  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$  和  $-\text{NH}_2$ , 条件是低于 50% 的 R 基团是  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 。

2. 一种方法,包括向具有或有风险发生非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体感染的个体施用能诱导针对病原体的免疫应答的有效量的与载体缀合的分离多糖,其中所述多糖具有下式结构



其中 n 是 5 或更多, R 选自基团  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$  和  $-\text{NH}_2$ , 条件是低于 50% 的 R 基团是  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 。

3. 权利要求 2 的方法,其中分离的多糖与载体通过接头缀合。

4. 权利要求 2 或 3 的方法,其中载体是肽载体。

5. 前述任一项权利要求的方法,其中低于 30%、低于 20%、低于 10% 或低于 5% 的 R 基团是  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 。

6. 前述任一项权利要求的方法,其中没有 R 基团是  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 。

7. 权利要求 1-6 任一项的方法,其中 n 至少是 15、至少是 20,至少是 50,至少是 100,至少 100,至少 200,至少 300,至少 400 或至少 500。

8. 权利要求 1-6 任一项的方法,其中分离的多糖的分子量为 100-500kDa。

9. 权利要求 1-8 任一项的方法,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性球菌。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性球菌是肺炎链球菌、A 组链球菌、B 组链球菌或肠球菌属。

11. 权利要求 1-8 任一项的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性杆菌。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性杆菌是利斯特菌属、难辨梭菌、枯草芽孢杆菌、结核分枝杆菌或耻垢分枝杆菌。

13. 权利要求 1-8 任一项的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性球菌或球杆菌。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性球菌或球杆菌是脑膜炎奈瑟球菌、淋病奈瑟球菌、非典型流感嗜血杆菌、螺杆菌属或弯曲杆菌属。

15. 权利要求 1-8 任一项的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性杆菌。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性杆菌是脆弱拟杆菌、多形拟杆菌、*B. vulgatis*、啮齿类柠檬酸杆菌、霍乱弧菌、伤寒杆菌或鼠伤寒沙门氏菌。

17. 权利要求 1-8 任一项的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的真菌。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的真菌是白色念珠菌(酵母)、白色念珠菌(菌丝)、曲霉属、镰刀菌属或隐球菌属。

19. 权利要求 1-8 任一项的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的寄生虫。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的寄生虫是伯氏疟原虫或恶性疟原虫。

21. 任一前述权利要求的方法,其中所述个体是人。

22. 任一前述权利要求的方法,其中所述个体是灵长类、马、牛、猪、山羊、绵羊、狗或猫。

23. 权利要求 1-22 任一项的方法,其中所述个体感染非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体。

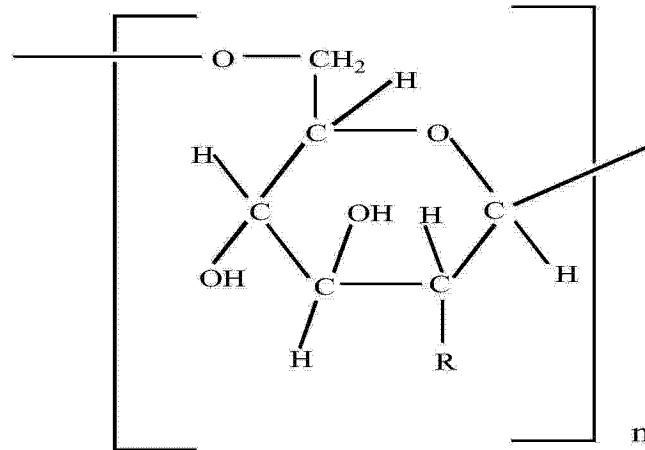
24. 权利要求 1-22 任一项的方法,其中所述个体具有感染非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体的风险。

25. 任一前述权利要求的方法,其中分离的多糖与佐剂一起施用。

26. 任一前述权利要求的方法,其中分离的多糖进行全身性施用。

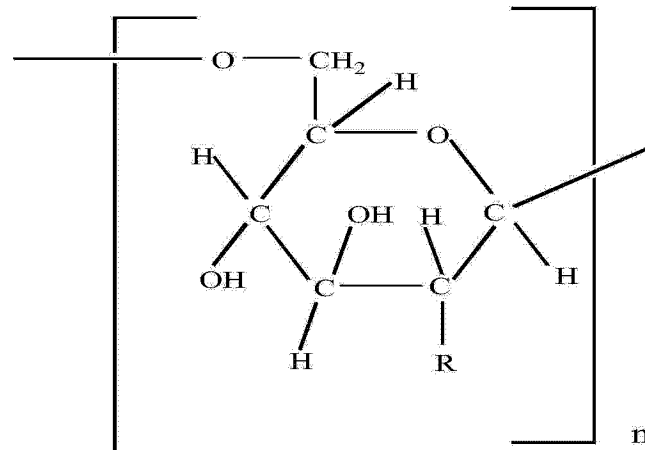
27. 任一前述权利要求的方法,其中分离的多糖经局部施用。

28. 药物组合物,其包含具有下式结构的分离的多糖



其中  $n$  至少是 5,  $R$  选自基团  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$  和  $-\text{NH}_2$ , 条件是低于 50% 的  $R$  基团是  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ , 用于预防或治疗个体中非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性病原体的感染。

29. 药物组合物, 其包含与载体缀合的分离多糖, 其中所述多糖具有下式结构



其中  $n$  是 5 或更多,  $R$  选自基团  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$  和  $-\text{NH}_2$ , 条件是低于 50% 的  $R$  基团是  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ , 用于预防或治疗个体中非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性病原体的感染。

30. 权利要求 29 的药物组合物, 其中分离的多糖与载体通过接头缀合。

31. 权利要求 29 或 30 的药物组合物, 其中所述载体是肽载体。

32. 权利要求 28-31 任一项的药物组合物, 其中低于 30%、低于 20%、低于 10% 或低于 5% 的  $R$  基团是  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 。

33. 权利要求 28-32 任一项的药物组合物, 其中没有  $R$  基团是  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 。

34. 权利要求 28-33 任一项的药物组合物, 其中  $n$  至少是 15、至少是 20, 至少是 50, 至少是 100, 至少 200, 至少 300, 至少 400 或至少 500。

35. 权利要求 28-33 任一项的药物组合物, 其中分离的多糖的分子量为 100-500kDa。

36. 权利要求 28-35 任一项的药物组合物, 其中所述非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的病原体是非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性球菌。

37. 权利要求 36 的药物组合物, 其中所述非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性球菌是肺炎链球菌、A 组链球菌、B 组链球菌或肠球菌属。

38. 权利要求 28-35 任一项的药物组合物, 其中所述非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的病原体是非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性杆菌。

39. 权利要求 38 的药物组合物,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性杆菌是利斯特菌属、难辨梭菌、枯草芽孢杆菌、结核分枝杆菌或耻垢分枝杆菌。

40. 权利要求 28-35 任一项的药物组合物,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性球菌或球杆菌。

41. 权利要求 40 的药物组合物,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性球菌或球杆菌是脑膜炎奈瑟球菌、淋病奈瑟球菌、非典型流感嗜血杆菌、螺杆菌属或弯曲杆菌属。

42. 权利要求 28-35 任一项的药物组合物,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性杆菌。

43. 权利要求 42 的药物组合物,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性杆菌是脆弱拟杆菌、多形拟杆菌、*B. vulgatis*、啮齿类柠檬酸杆菌、霍乱弧菌、伤寒杆菌或鼠伤寒沙门氏菌。

44. 权利要求 28-35 任一项的药物组合物,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的真菌。

45. 权利要求 44 的药物组合物,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的真菌是白色念珠菌(酵母)、白色念珠菌(菌丝)、曲霉属、镰刀菌属或隐球菌属。

46. 权利要求 28-35 任一项的药物组合物,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的寄生虫。

47. 权利要求 46 的药物组合物,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的寄生虫是伯氏疟原虫或恶性疟原虫。

48. 权利要求 28-47 任一项的药物组合物,其中所述个体是人。

49. 任一前述权利要求的药物组合物,其中所述个体是灵长类、马、牛、猪、山羊、绵羊、狗或猫。

50. 权利要求 28-49 任一项的药物组合物,其中所述个体感染非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体。

51. 权利要求 28-49 任一项的药物组合物,其中所述个体具有感染非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体的风险。

52. 权利要求 28-51 任一项的药物组合物,其中分离的多糖与佐剂一起施用。

53. 权利要求 28-52 任一项的药物组合物,其中分离的多糖配制用于全身性施用。

54. 权利要求 28-52 任一项的药物组合物,其中分离的多糖配制用于局部施用。

55. 一种方法,包括

向具有或有风险发生非 ica/pgal 但 PNAG 阳性的病原体感染的个体施用有效量的 PNAG- 特异性抗体或 PNAG- 特异性抗体片段。

56. 权利要求 55 的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性球菌。

57. 权利要求 56 的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性球菌是肺炎链球菌、A 组链球菌、B 组链球菌或肠球菌属。

58. 权利要求 55 的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性杆菌。

59. 权利要求 58 的方法,其中所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性杆菌是利斯特

菌属、难辨梭菌、枯草芽孢杆菌、结核分枝杆菌或耻垢分枝杆菌。

60. 权利要求 55 的方法,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性球菌或球杆菌。

61. 权利要求 60 的方法,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性球菌或球杆菌是脑膜炎奈瑟球菌、淋病奈瑟球菌、非典型流感嗜血杆菌、螺杆菌属或弯曲杆菌属。

62. 权利要求 55 的方法,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性杆菌。

63. 权利要求 62 的方法,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性杆菌是脆弱拟杆菌、多形拟杆菌、*B. vulgatis*、啮齿类柠檬酸杆菌、霍乱弧菌、伤寒杆菌或鼠伤寒沙门氏菌。

64. 权利要求 55 的方法,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pga 的 PNAG 阳性的真菌。

65. 权利要求 64 的方法,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的真菌是白色念珠菌(酵母)、白色念珠菌(菌丝)、曲霉属、镰刀菌属或隐球菌属。

66. 权利要求 55 的方法,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pga 的 PNAG 阳性的寄生虫。

67. 权利要求 66 的方法,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的寄生虫是伯氏疟原虫或恶性疟原虫。

68. 权利要求 55-67 任一项的方法,其中所述个体是人。

69. 权利要求 55-67 任一项的方法,其中所述个体是灵长类、马、牛、猪、山羊、绵羊、狗或猫。

70. 权利要求 55-69 任一项的方法,其中所述个体感染非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体。

71. 权利要求 55-69 任一项的方法,其中所述个体具有感染非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体的风险。

72. 权利要求 55-71 任一项的方法,其中所述抗体或抗体片段通过全身施用。

73. 权利要求 55-71 任一项的方法,其中所述抗体或抗体片段通过局部施用。

74. 权利要求 55-73 任一项的方法,其中所述抗体或抗体片段是 F598 (ATCC PTA-5931) 抗体或其片段。

75. 权利要求 55-73 任一项的方法,其中所述抗体或抗体片段是 F628 (ATCC PTA-5932) 抗体或其片段。

76. 权利要求 55-73 任一项的方法,其中所述抗体或抗体片段是 F630 (ATCC PTA-5933) 抗体或其片段。

77. 权利要求 55-74 任一项的方法,其中所述抗体或抗体片段与试剂缀合。

78. 权利要求 77 的方法,其中所述试剂是细胞毒性剂。

79. 药物组合物,其包含 PNAG 特异性的抗体或 PNAG 特异性的抗体片段,用于预防或治疗个体的非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体的感染。

80. 权利要求 79 的药物组合物,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性球菌。

81. 权利要求 80 的药物组合物,所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性球菌是肺炎链球菌、A 组链球菌、B 组链球菌或肠球菌属。

82. 权利要求 79 的药物组合物,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性杆菌。

83. 权利要求 82 的药物组合物,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性杆菌是利斯特菌属、难辨梭菌、枯草芽孢杆菌、结核分枝杆菌或耻垢分枝杆菌。

84. 权利要求 79 的药物组合物,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性球菌或球杆菌。

85. 权利要求 84 的药物组合物,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性球菌或球杆菌是脑膜炎奈瑟球菌、淋病奈瑟球菌、非典型流感嗜血杆菌、螺杆菌属或弯曲杆菌属。

86. 权利要求 79 的药物组合物,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性杆菌。

87. 权利要求 86 的药物组合物,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性杆菌是脆弱拟杆菌、多形拟杆菌、*B. vulgatis*、啮齿类柠檬酸杆菌、霍乱弧菌、伤寒杆菌或鼠伤寒沙门氏菌。

88. 权利要求 79 的药物组合物,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pga 的 PNAG 阳性的真菌。

89. 权利要求 88 的药物组合物,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的真菌是白色念珠菌(酵母)、白色念珠菌(菌丝)、曲霉属、镰刀菌属或隐球菌属。

90. 权利要求 79 的药物组合物,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pga 的 PNAG 阳性的寄生虫。

91. 权利要求 90 的药物组合物,其中所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的寄生虫是伯氏疟原虫或恶性疟原虫。

92. 权利要求 79-91 任一项的药物组合物,其中所述个体是人。

93. 权利要求 79-91 任一项的药物组合物,其中所述个体是灵长类、马、牛、猪、山羊、绵羊、狗或猫。

94. 权利要求 79-93 任一项的药物组合物,其中所述个体感染非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体。

95. 权利要求 79-93 任一项的药物组合物,其中所述个体具有感染非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体的风险。

96. 权利要求 79-95 任一项的药物组合物,其中所述抗体或抗体片段配制用于全身施用。

97. 权利要求 79-95 任一项的药物组合物,其中所述抗体或抗体片段配制用于局部施用。

98. 权利要求 79-97 任一项的药物组合物,其中所述抗体或抗体片段是 F598(ATCC PTA-5931) 抗体或其片段。

99. 权利要求 79-97 任一项的药物组合物,其中所述抗体或抗体片段是 F628(ATCC PTA-5932) 抗体或其片段。

100. 权利要求 79-97 任一项的药物组合物,其中所述抗体或抗体片段是 F630(ATCC

PTA-5933) 抗体或其片段。

101. 权利要求 79-98 任一项的药物组合物,其中所述抗体或抗体片段与试剂缀合。

102. 权利要求 101 的药物组合物,其中所述试剂是细胞毒性剂。

103. 一种方法,包括:

从浓缩的微生物细胞体制品中用乙醇沉淀多糖粗制品;

用溶菌酶和溶葡萄球菌酶共同消化粗制多糖,随后依次用核酸酶和蛋白酶 K 消化,形成消化的多糖制品;

对所述消化的多糖制品进行尺寸分离;

分离乙酰化的多糖组分;以及

将乙酰化的多糖组分去乙酰化,产生具有低于 50%的乙酸盐取代的 PNAG 多糖,其中微生物细胞体制品来自非 *-ica/pga* 的 PNAG 阳性的微生物。

104. 一种方法,包括:

从微生物培养物制备不纯的多糖;

将不纯的多糖与酸或碱温育,产生半纯的多糖制品;

中和所述制品;

将中和的制品在氢氟酸中温育;

从制品中分离乙酰化的多糖;以及

将乙酰化的多糖去乙酰化,产生具有低于 50%的乙酸盐取代的 PNAG 多糖,其中所述微生物培养物是非 *-ica/pga* 的 PNAG 阳性的微生物培养物。

105. 一种方法,包括:

从微生物培养物制备不纯的多糖;

将不纯的多糖与酸或碱温育,产生半纯的多糖制品;

中和所述制品;

将中和的制品在氢氟酸中温育;以及

从所述制品分离具有低于 50%的乙酸盐取代的 PNAG 多糖,

其中所述微生物培养物是非 *-ica/pga* 的 PNAG 阳性的微生物培养物。

106. 权利要求 103-105 任一项的方法,还包括将载体缀合到所述分离的多糖上。

107. 权利要求 106 的方法,其中所述载体是肽载体。

108. 权利要求 103 或 104 的方法,其中所述乙酰化的多糖通过化学方法去乙酰化。

109. 权利要求 108 的方法,其中所述乙酰化的多糖与碱溶液温育进行去乙酰化。

110. 权利要求 103 或 104 的方法,其中所述乙酰化的多糖经酶促去乙酰化。

111. 一种生产抗体的方法,包括:

向个体施用有效量的分离自非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的病原体的 PNAG 多糖和佐剂以产生抗体,以及

从个体中分离抗体。

112. 权利要求 111 的方法,其中所述抗体是多克隆抗体。

113. 一种生产单克隆抗体的方法,包括:

向个体施用有效量的分离自非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的病原体的 PNAG 多糖和佐剂以产生抗体,

从个体中收集脾细胞，  
将来自个体的脾细胞与骨髓瘤细胞融合，和  
收集从融合的亚克隆中产生的抗体。

114. 权利要求 111-113 任一项的方法，其中 PNAG 多糖是低于 50% 乙酰化的。

115. 权利要求 111-114 任一项的方法，还包括分离抗体。

116. 权利要求 111-115 任一项的方法，其中所述个体是兔子。

117. 权利要求 111-116 任一项的方法，其中所述个体是人。

118. 检测非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体的方法，包括：

使疑似含有非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体的样品与 PNAG 特异性抗体或抗体片段接触，以及

检测所述抗体或抗体片段与样品的结合，

其中所述抗体或抗体片段的结合表明样品中存在所述非 ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体。

119. 权利要求 118 的方法，其中所述样品是葡萄球菌阴性的。

120. 权利要求 118 或 119 的方法，其中所述样品是来自个体的生物样品。

121. 权利要求 120 的方法，其中所述生物样品是尿、血、脓、皮肤、唾液、关节液、淋巴液或乳。

122. 权利要求 118-121 任一项的方法，其中抗体或抗体片段与可检测的标记缀合。

## 多糖组合物及使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2012 年 5 月 30 日提交的美国临时申请 61/653389 和 2013 年 5 月 26 日提交的美国临时申请 61/827661 的优先权,这些临时申请除权利要求外的内容引入本文作为参考。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明部分地得到 NIH(NIAID) 基金号 R01AI046706 的支持。美国政府享有本发明的某些权利。

### 发明领域

[0005] 本发明涉及某种多糖抗原和抗体组合物在检测、预防和 / 或治疗特定病原体引起的感染中的用途。

[0006] 发明背景

[0007] 开发针对不论是细菌、病毒、真菌或天然寄生虫导致的各种感染的免疫疗法是高度优先的。许多当前的免疫疗法通过种属特异性抗原靶向于特定的微生物物种。靶向于多种微生物并对其有效的免疫疗法较为少见。

[0008] 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*) 在其表面表达聚-N-乙酰基葡糖胺 (PNAG) 多糖抗原。PNAG 由这些细菌体内的 *ica* 基因座的基因产物体内合成。类似的,大肠杆菌和其他革兰氏阴性菌含有称为 *pga* 位点的同源性基因座,其同样编码可用于合成 PNAG 的蛋白质的合成。因此,含有完整 *ica* 或 *pga* 位点的细菌能产生 PNAG。之前发现,该抗原的去乙酰化形式在刺激抗原特异性的免疫应答方面特别有效,其部分特征在于诱导调理素抗体。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明部分地基于预料不到的和令人惊讶的发现,多糖聚-N-乙酰基葡糖胺 (PNAG) 由多种以前不知道或未提示能表达该多糖的病原体表达。本发明因此提供了包含该多糖或其特异性抗体的组合物,其用于预防和 / 或治疗由这些特定病原体引起的感染,并且任选地用于治疗 and / 或预防可由所述感染导致的疾病或障碍。

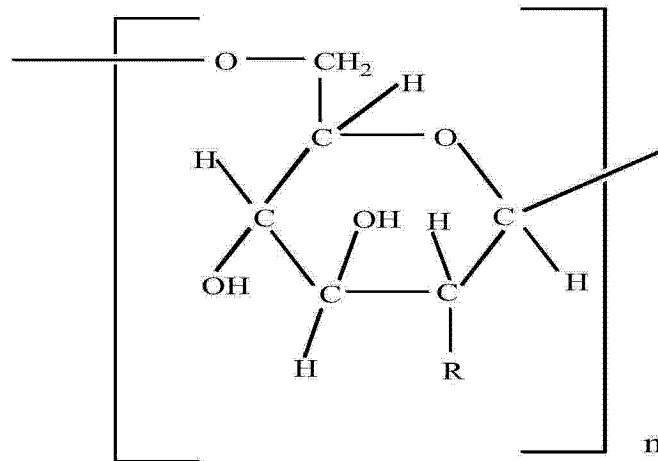
[0011] 令人惊讶的,根据本发明,发现表达 PNAG 的病原体包括许多种类和类型。这些种类和特定的病原体如下:(a) 革兰氏阳性球菌:肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 的疫苗和非疫苗株, A 组链球菌属例如酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、B 组链球菌例如无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 和 C 组链球菌例如停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*) 和粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*);(b) 革兰氏阳性杆菌:单核细胞增生利斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、难辨梭菌 (*Clostridium difficile*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 和耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatis*);(c) 革兰氏阴性球菌和球杆菌:脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseria meningitidis*)、淋病奈瑟球菌 (*N. gonorrhoeae*)、非典型流感嗜血杆菌 (*Non-typable Hemophilus influenzae*)、杜氏嗜血菌 (*Hemophilus ducreyi*)、幽门

螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 和空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*) ;(d) 革兰氏阴性杆菌:脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*)、多形拟杆菌 (*B. thetaiotamicron*)、*B. vulgatis*、啮齿类柠檬酸杆菌 (*Citrobacter rodentium*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、伤寒杆菌 (*Salmonella enterica* serovar typhi) 和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica* serovar typhimurium) ;(e) 真菌:白色念珠菌(酵母)、白色念珠菌(菌丝)、黄曲霉菌、镰刀菌属物种例如腐皮镰刀菌 (*Fusarium solani*) 和新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) ;以及 (f) 寄生虫:伯氏疟原虫 (*Plasmodium bergeri*) 和恶性疟原虫 (*P. falciparum*) (包括孢子);和阴道毛滴虫 (*T. vaginalis*)。这些病原体的 PNAG 表达是尤其令人惊讶的,因为它们均没有可鉴定的与葡萄球菌 *ica* 位点或大肠杆菌 *pga* 位点相关的基因座,所述基因座编码参与 PNAG 以及某些细菌中相关的多糖合成的蛋白。因此,这些病原体在本文中被称为非 *ica/pga* 的病原体,以表明其不含有可鉴别的 *ica* 或 *pga* 基因座。

[0012] 本发明还提供了用于检测任何前述病原体的方法,例如使用对 PNAG 特异性的抗体。

[0013] 因此,本发明一方面提供了一种方法,包括向具有或有风险发生非 *ica/pga* 但 PNAG 阳性的病原体感染的个体施用能诱导针对病原体的免疫应答的有效量的具有下式的分离多糖

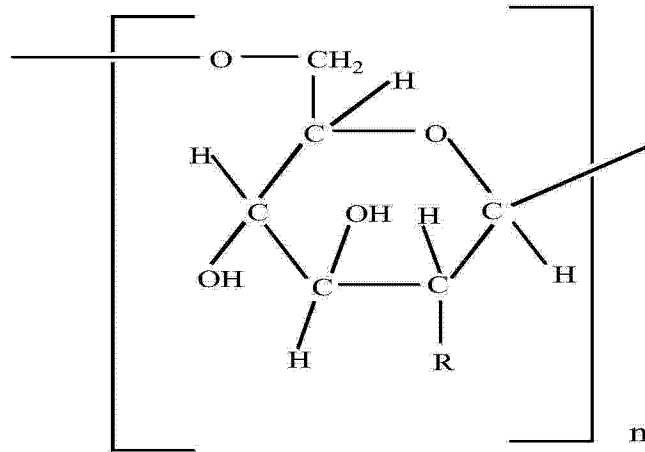
[0014]



[0015] 其中  $n$  至少是 5,  $R$  选自  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$  和  $-\text{NH}_2$ , 条件是低于 50% 的  $R$  基团是  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 。

[0016] 另一方面,本发明提供了一种方法,包括向具有或有风险发生非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的病原体感染的个体施用能诱导针对病原体的免疫应答的有效量的与载体缀合的分离多糖,其中所述多糖具有下式结构

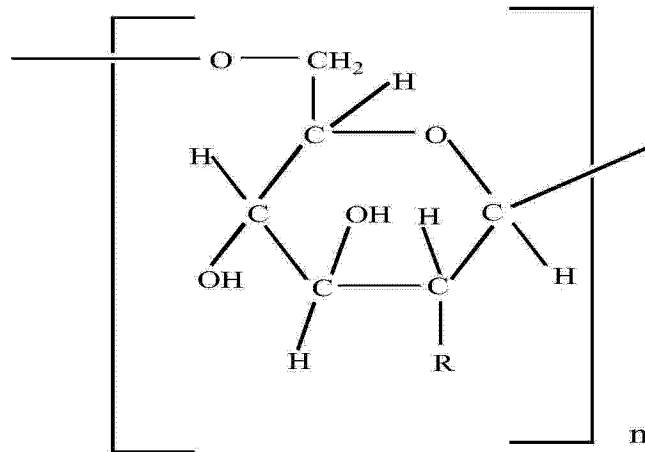
[0017]



[0018] 其中  $n$  是 5 或更多,  $R$  选自基团  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$  和  $-\text{NH}_2$ , 条件是低于 50% 的  $R$  基团是  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 。

[0019] 另一方面本发明提供了包含下式的分离多糖的药物组合物

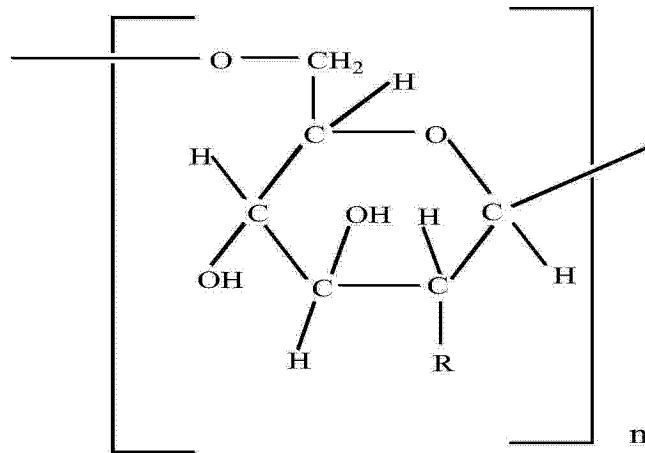
[0020]



[0021] 其中  $n$  至少是 5,  $R$  选自基团  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$  和  $-\text{NH}_2$ , 条件是低于 50% 的  $R$  基团是  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ , 用于预防或治疗个体中非 *ica/pgA* 的 PNAG 阳性病原体的感染。

[0022] 另一方面, 本发明提供了包含与载体缀合的分离多糖的药物组合物, 其中所述多糖具有下式结构

[0023]



[0024] 其中 n 是 5 或更多, R 选自基团  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$  和  $-\text{NH}_2$ , 条件是低于 50% 的 R 基团是  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ , 用于预防或治疗个体中非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性病原体的感染。

[0025] 在某些实施方案中, 分离的多糖与载体通过接头缀合。在某些实施方案中, 所述载体是肽载体。每个多糖可缀合至一个或多个载体。载体可以是多糖。在某些实施方案中, 所述载体多糖不是 N-乙酰基 ( $\beta$ )1-6 葡糖胺。

[0026] 在某些实施方案中, 等于或小于 45%、等于或小于 40%、等于或小于 35%、等于或小于 30%、等于或小于 25%、等于或小于 20%、等于或小于 15%、等于或低于 10%、等于或低于 5%、等于或低于 1% 的 R 基团是  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 。在某些实施方案中, R 基团是  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 。

[0027] 在有些实施方案中, n 至少是 9, 至少是 10, 至少是 20, 至少是 50, 至少是 100, 至少 100, 至少 200, 至少 300, 至少 400 或至少 500。

[0028] 在某些实施方案中, 分离的多糖的分子量为 100–500kDa。在某些实施方案中, 分离的多糖分子量为至少 900 道尔顿、至少 2000 道尔顿、至少 2500 道尔顿、至少 5000 道尔顿、至少 7500 道尔顿、至少 10000 道尔顿、至少 25000 道尔顿、至少 50000 道尔顿、至少 75000 道尔顿、至少 100000 道尔顿、至少 125000 道尔顿、至少 150000 道尔顿、至少 200000 道尔顿、至少 250000 道尔顿、至少 300000 道尔顿、至少 350000 道尔顿、至少 400000 道尔顿、至少 450000 道尔顿或至少 500000 道尔顿。

[0029] 在某些实施方案中, 分离的多糖与佐剂一起施用或配制, 或与佐剂联合使用。

[0030] 在某些实施方案中, 分离的多糖经全身性施用或配制用于全身施用。在某些实施方案中, 分离的多糖经局部施用或配制用于局部施用。

[0031] 在某些实施方案中, 分离的多糖以组合物形式提供, 其还包括可药用的载体。

[0032] 另一方面, 本发明提供了一种方法, 包括向具有或有风险感染非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的病原体的个体施用有效量的 PNAG 特异性抗体或 PNAG 特异性抗体片段。

[0033] 另一方面, 本发明提供了一种药物组合物, 其包含 PNAG 特异性的抗体或 PNAG 特异性的抗体片段, 用于预防或治疗个体的非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的病原体的感染。

[0034] 在某些实施方案中, 所述非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的病原体是非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性球菌。在某些实施方案中, 所述非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性球菌是肺炎链球菌、A 组链球菌、B 组链球菌、C 组链球菌或肠球菌。

[0035] 在某些实施方案中, 所述非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的病原体是非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性杆菌, 在某些实施方案中, 所述非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性杆菌是利斯特菌属、难辨梭菌、枯草芽孢杆菌、结核分枝杆菌或耻垢分枝杆菌。

[0036] 在某些实施方案中, 所述非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的病原体是非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性球菌或球杆菌。在某些实施方案中, 所述非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性球菌或球杆菌是脑膜炎奈瑟球菌、淋病奈瑟球菌、非典型流感嗜血杆菌、螺杆菌属物种或弯曲杆菌属物种。

[0037] 在某些实施方案中, 所述非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的病原体是非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性杆菌。在某些实施方案中, 所述非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性杆菌是脆弱拟杆菌、多形拟杆菌、*B. vulgatis*、啮齿类柠檬酸杆菌、霍乱弧菌、伤寒杆菌或鼠伤寒沙门氏菌。在一些实施方案中, 所述非 *ica/pga* 的 PNAG 阳性的病原体是非 *ica/pga* 的 PNAG

阳性的真菌。在某些实施方案中,非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的真菌是白色念珠菌(酵母)、白色念珠菌(菌丝)、曲霉属、镰刀菌属或隐球菌属。

[0038] 在某些实施方案中,所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体是非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的寄生虫。在某些实施方案中,所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的寄生虫是伯氏疟原虫或恶性疟原虫。

[0039] 在某些实施方案中,所述非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体是阴道毛滴虫。

[0040] 在某些实施方案中,所述个体是人。在某些实施方案中,所述个体是灵长类、马、牛、猪、山羊、绵羊、狗或猫。

[0041] 在某些实施方案中,所述个体感染了非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体。在某些实施方案中,所述个体具有感染非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体的风险。

[0042] 在某些实施方案中,抗体或抗体片段全身性施用或经配制用于全身性施用。在某些实施方案中,抗体或抗体片段局部施用或配制用于局部施用。

[0043] 另一方面,本发明提供了一种方法,包括从浓缩的微生物细胞体制品中用乙醇沉淀多糖粗制品;用溶菌酶和溶葡萄球菌酶共消化粗制多糖,随后依次用核酸酶和蛋白酶 K 消化,形成消化的多糖制品;对所述消化的多糖制品进行尺寸分离;分离乙酰化的多糖组分;以及将乙酰化的多糖组分去乙酰化,产生具有低于 50% 的乙酸盐取代的 PNAG 多糖,其中微生物细胞体制品来自非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的微生物。在某些实施方案中,多糖制品使用柱进行尺寸分离。在某些实施方案中,所述方法产生的 PNAG 多糖具有低于 40% 的乙酸盐取代。

[0044] 另一方面,本发明提供了一种方法,包括从微生物培养物制备不纯的多糖;将不纯的多糖与酸或碱温育,产生半纯的多糖制品;中和所述制品;将中和的制品在氢氟酸中温育;从制品中分离乙酰化的多糖;以及将乙酰化的多糖去乙酰化,产生具有低于 50% 的乙酸盐取代的 PNAG 多糖,其中所述微生物培养物是非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的微生物培养物。在某些实施方案中,该方法产生了具有低于 40% 的乙酸盐取代的 PNAG 多糖。

[0045] 另一方面,本发明提供了一种方法,包括从微生物培养物制备不纯的多糖;将不纯的多糖与酸或碱温育,产生半纯的多糖制品;中和所述制品;将中和的制品在氢氟酸中温育;以及从所述制品分离具有低于 50% 的乙酸盐取代的 PNAG 多糖,其中所述微生物培养物是非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的微生物培养物。在某些实施方案中,分离了具有低于 40% 的乙酸盐取代的 PNAG 多糖。

[0046] 在某些实施方案中,所述方法还包括将载体缀合到所述分离的多糖上。在某些实施方案中,所述载体是肽载体。

[0047] 在某些实施方案中,所述乙酰化的多糖通过化学方法去乙酰化。

[0048] 在某些实施方案中,所述乙酰化的多糖与碱溶液温育进行去乙酰化。在某些实施方案中,所述乙酰化的多糖经酶促去乙酰化。

[0049] 另一方面,本发明提供了一种生产抗体的方法,包括向个体施用有效量的分离自非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体的 PNAG 多糖和佐剂以产生抗体,并从个体中分离抗体。在某些实施方案中,所述抗体是多克隆抗体。

[0050] 另一方面,本发明提供了一种生产单克隆抗体的方法,包括向个体施用有效量的分离自非 ica/pgal 的 PNAG 阳性的病原体的 PNAG 多糖和佐剂以产生抗体,从个体中收集脾

细胞,将来自个体的脾细胞与骨髓瘤细胞融合,并收集从融合亚克隆中产生的抗体。

[0051] 在某些实施方案中,所述方法还包括分离抗体。

[0052] 在某些实施方案中,PNAG 多糖是低于 50%乙酰化的。

[0053] 在某些实施方案中,所述个体是兔子。在某些实施方案中,所述个体是人。

[0054] 另一方面,本发明提供了一种检测非-ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体的方法,包括使疑似含有非-ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体的样品与 PNAG 特异性抗体或抗体片段接触,检测所述抗体或抗体片段与样品的结合,其中所述抗体或抗体片段的结合表明样品中存在所述非-ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体。

[0055] 在某些实施方案中,所述样品是葡萄球菌阴性的。

[0056] 在某些实施方案中,所述样品是来自个体的生物样品。在某些实施方案中,所述生物样品是尿、血、脓、皮肤、唾液、关节液、淋巴液或乳。在某些实施方案中,所述样品来源于可植入或植入的医疗器械的拭子,或一小块医疗设备,或病人护理设备的表面。

[0057] 在某些实施方案中,所述抗体或抗体片段是人源化抗体或嵌合抗体或其片段。在某些实施方案中,所述抗体是人抗体。在某些实施方案中,所述抗体或抗体片段是 F598(ATCC PTA-5931) 抗体或其片段。在某些实施方案中,所述抗体或抗体片段是 F628(ATCC PTA-5932) 抗体或其片段。在某些实施方案中,所述抗体或抗体片段是 F630(ATCC PTA-5933) 抗体或其片段。针对 PNAG 的多克隆抗血清也可用于某些情况下。

[0058] 在某些实施方案中,所述抗体或抗体片段与试剂缀合。

[0059] 在某些实施方案中,所述试剂是细胞毒性剂,例如抗生素或放射性同位素。在某些实施方案中,所述试剂是可检测的标记。在某些实施方案中,所述可检测的标记是放射性标记、酶、生物素分子、抗生物素蛋白或荧光染料。

[0060] 本发明的各个限定能够包括本发明的多种实施方案,因此,预期在本发明的每一方面可包括涉及任一个要素或要素组合的本发明的各个限定。

[0061] 附图简述

[0062] 图 1. 感染后 4 小时开始的腹膜内(ip)和局部给予 PNAG 抗体 MAb F598 的效果。该图显示了最低接种量的 48 小时实验数据。实验详情:接种为  $1 \times 10^5$ /眼;在感染后 4 和 24 小时 ip 注射 200  $\mu$ g MAb;感染后 24 和 32 小时局部应用 20  $\mu$ g MAb。数据点代表了每只小鼠的数值;横线表示组的平均分。P 值:Mann Whitney U 检验。

[0063] 图 2. 感染后 4 小时开始的 ip 和局部给予 PNAG 抗体 MAb F598 的效果。该图显示了低接种量的 48 小时实验数据。实验详情:接种为  $2 \times 10^5$ /眼;在感染后 4 小时 ip 注射 500  $\mu$ g MAb;感染后 24 和 32 小时局部应用 50  $\mu$ g MAb。数据点代表了每只小鼠的数值;横线表示组的平均分。P 值:Mann Whitney U 检验。

[0064] 图 3. 感染后 4 小时开始的局部施用 PNAG 抗体 MAb F598 的效果。该图显示了中接种量的 32 小时实验数据。实验详情:接种为  $5.1 \times 10^6$ /眼;感染后 4、8、24 小时局部应用 MAb。数据点代表了每只小鼠的数值;横线表示组的平均分。P 值:Mann Whitney U 检验。

[0065] 图 4. 感染后 4 小时开始的局部施用 PNAG 抗体 MAb F598 的效果。该图显示了高接种量的 32 小时实验数据。实验详情:接种为  $5 \times 10^7$ /眼;感染后 4、8、24 小时局部应用 MAb,32 小时后结束实验。数据点代表了每只小鼠的数值;横线表示组的平均分。P 值:Mann Whitney U 检验。

[0066] 图 5. 用肺炎链球菌 D39 激发后的 CBA/N 小鼠生存率 (N = 12/ 组)。

[0067] 图 6. 9G1cNH<sub>2</sub>-TT 缀合物疫苗的抗体针对酿脓链球菌 (A 组链球菌) 引起的致死皮肤感染的保护效力。

[0068] 图 7. 兔抗 9G1cNH<sub>2</sub>-TT 缀合疫苗的抗体对用 B 组脑膜炎菌株 B16B6 激发的 2-3 日龄幼年小鼠脑膜炎 (脑部细菌) 的保护效力。数据点代表了每一小鼠的 log<sub>10</sub>CFU/ 脑; 横线代表组的中间分值。P 值: Mann Whitney U 检验。

[0069] 图 8. 与 PBS (实验 1) 或针对 HIV 的人 IgG1Mab (MAb F105, 实验 2) 相比, 在小鼠中施用针对 PNAG 的人 IgG1Mab 后结肠炎评分的下降。数据点代表了每一小鼠的评分, 横线代表组中间分值。P 值: Mann Whitney U 检验。

[0070] 图 9. 四个参数的个体评分比较, 用于确定用针对 PNAG 的 MAb F598 或对照的针对 HIV 的人 IgG1Mab (F105) 治疗的 TRUC 小鼠的总体组织学评分。

[0071] 图 10. 兔抗 9G1cNH<sub>2</sub>-TT 缀合疫苗的抗体对单核细胞增生利斯特菌的保护效力。

[0072] 图 11. 兔抗 dPNAG-TT 抗体介导的 4 种肺炎链球菌株系的调理素杀伤。杀伤以正常兔血清作为对照比较。

[0073] 图 12. 针对 PNAG20 的人 IgG1Mab F598 介导的 4 种肺炎链球菌株系的调理素杀伤。杀伤以铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 特异性的 MAb F429 藻酸盐作为对照比较。

[0074] 图 13. 兔抗 9G1cNH<sub>2</sub>-TT 抗体介导的 3 种粪肠球菌株系的调理素杀伤。杀伤以正常兔血清作为对照比较。

[0075] 图 14. 针对 PNAG 的 MAb F598 对 A 组链球菌的调理素杀伤。杀伤以铜绿假单胞菌特异性的 MAb F429 藻酸盐作为对照比较。

[0076] 图 15. 针对 PNAG 的 MAb F598 对白色念珠菌的调理素杀伤。杀伤以铜绿假单胞菌特异性的 MAb F429 藻酸盐作为对照比较。

[0077] 图 16. 脑膜炎奈瑟球菌血清群 B 株系的杀菌作用。

[0078] 图 17. 淋病奈瑟球菌的杀菌作用。

[0079] 图 18. 脑膜炎奈瑟球菌杀菌的抑制。

[0080] 图 19. 淋病奈瑟球菌杀菌的抑制。

[0081] 发明详述

[0082] 本发明部分地涉及关于 PNAG 在众多细菌和非细菌病原体上表达的令人意外的发现。所述发现至少基于两个理由是意料不到的。首先, 本发明发现的表达 PNAG 的病原体均没有 *ica* 或 *pga* 基因座。 *ica* 和 *pga* 基因座各自编码与多糖合成、包括 PNAG 合成有关的 4 个蛋白。在本发明之前认为, 病原体必须具有 *ica* 或 *pga* 基因座以合成 PNAG。 *ica* 基因座存在于金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌中, 其在本发明之前已知能表达 PNAG, 而 *pga* 基因座在某些革兰氏阴性生物中存在。这些新发现的 PNAG 阳性病原体是如何在缺乏这些基因座的情况下合成 PNAG 是不清楚的。本发明的发现显示 PNAG 可在缺乏所述基因座及其编码的蛋白的情况下合成。其次, 被发现能表达 PNAG 的病原体种类众多, 包括细菌和非细菌病原体。在本发明之前, 并没有显示不表达可识别的 *ica*/*pga* 基因座的病原体能合成 PNAG, 同样未显示非细菌的病原体能表达 PNAG。

[0083] 这些众多的细菌和非细菌病原体表达 PNAG 的发现提供了预防、治疗和 / 或诊断由所述病原体引起的感染的新的途径。因此, 本发明尤其涉及从新的 PNAG 阳性病原体中分离

和 / 或衍生 PNAG 和 dPNAG, 以及它们在刺激免疫应答 (包括产生对 PNAG 特异性的抗体所需要的免疫应答)、检测 PNAG 和表达 PNAG 的病原体, 以及预防和治疗表达 PNAG 的病原体引起的感染中的用途。所述表达 PNAG 的病原体包括但不限于本文所述的非 -ica/pga 的表达 PNAG 的病原体。

[0084] 非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体

[0085] 本文新发现的表达 PNAG 的病原体称为非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体, 以表明其不含有与已知能表达 PNAG 的病原体例如金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌或大肠杆菌的四基因 ica/pga 基因座具有任何显著相似度的基于 DNA 的基因座。ica 或 pga 基因座编码四种蛋白 (2-糖基转移酶、N-去乙酰化酶以及用于输出合成的多糖的蛋白)。某些非 -ica/pga 的 PNAG 病原体不包括在单个基因座内编码这四个蛋白的基因。

[0086] 示范性的 ica 基因座的核苷酸序列 (来自金黄色葡萄球菌) 已在 GenBank 提交, 登记号为 AF086783。根据本发明, 认为是“非 -ica”的病原体不具有可识别的 ica 基因座。例如, 所述病原体在染色体 DNA 的相同的相邻延伸区中不含有与 AF086783 的 ica 基因座的完整 4-基因核苷酸序列具有至少 25% 同一性的核苷酸序列。非 -ica 的 PNAG 阳性的病原体排除了葡萄球菌属。

[0087] 示范性的 pga 基因座的核苷酸序列 (来自大肠杆菌 K12 亚株 MG1655) 已在 Genbank 提交, 基因座内的 4 个基因登记号分别为 AAC74106.1、AAC74107.1、AAC74108.1 和 AAC74109.1。根据本发明, 认为是“非 -pga”的病原体不具有可识别的 pga 基因座。例如, 所述病原体在染色体 DNA 的相同的相邻延伸区中不含有与 AAC74106.1、AAC74107.1、AAC74108.1 和 AAC74109.1 的四条核苷酸序列具有至少 25% 同一性的核苷酸序列。非 -pga 的 PNAG 阳性的病原体排除了大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、百日咳博德特菌、副百日咳菌 (*B. parapertussis*)、*B. bronchoseptica*、新洋葱伯克霍尔德杆菌 (*Burkholderia cenocepacia*)、洋葱伯克霍尔德菌 (*B. dolosa*)、大叶性肺炎放线杆菌、伴放线放线杆菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、鲍氏不动杆菌和志贺菌属的某些菌株。

[0088] 所述非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体包括革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌、真菌和寄生虫。更具体而言, 所述非 -ica/pga 的 PNAG 阳性细菌包括革兰氏阳性球菌、革兰氏阳性杆菌、革兰氏阴性球菌或球杆菌, 以及革兰氏阴性杆菌。非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性球菌包括肺炎链球菌、A 组链球菌 (酿脓链球菌)、B 组链球菌 (无乳链球菌)、C 组链球菌 (停乳链球菌) 和肠球菌属 (粪肠球菌和屎肠球菌)。所述非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阳性杆菌包括单核细胞增生利斯特菌、难辨梭菌、枯草芽孢杆菌、结核分枝杆菌和耻垢分枝杆菌。非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性球菌或球杆菌包括脑膜炎奈瑟球菌、淋病奈瑟球菌、非典型流感嗜血杆菌、杜氏嗜血菌、幽门螺杆菌和空肠弯曲杆菌。非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的革兰氏阴性杆菌包括脆弱拟杆菌、多形拟杆菌、*B. vulgatis*、啮齿类柠檬酸杆菌、霍乱弧菌、伤寒杆菌或鼠伤寒沙门氏菌。

[0089] 非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的真菌包括白色念珠菌 (酵母)、白色念珠菌 (菌丝)、曲霉属、镰刀菌属或隐球菌属物种。非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的寄生虫包括伯氏疟原虫或恶性疟原虫。

[0090] 非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体可以是阴道毛滴虫。

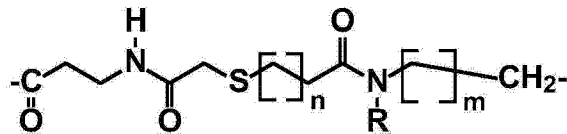


[0099] 本发明涉及高乙酰化和低乙酰化形式的 PNAG 在各种应用中的用途。作为非限制性的实例,高乙酰化的 PNAG 可用于制备抗体,用于诊断或其他非治疗目的。

[0100] 本发明涉及天然形式(高或低乙酰化)和合成形式(即完全从头合成的)的 PNAG 的用途。应理解,所述合成形式可通过已知数量和顺序的  $\beta$  1-6 彼此连接的葡糖胺和 N-乙酰基葡糖胺单元合成。某些情况下,合成形式可少至 4 个单体。

[0101] 已公开的美国专利申请号 US-2011-0150880 描述了合成的寡糖、其合成及其与载体的缀合。该参考文献的具体和全部的教导被引入本文作为参考。在某些实施方案中,合成的寡糖可用于和载体缀合。一个实例是寡糖-载体缀合物,其包含通过如下接头与载体缀合的寡糖

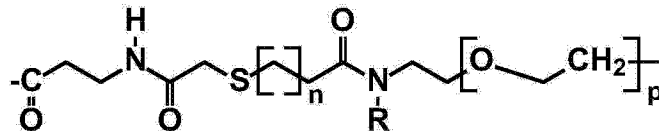
[0102]



式 I

[0103] 或

[0104]

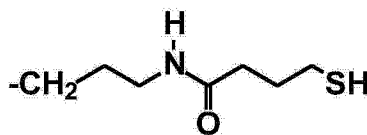


式 II

[0105] 其中 n 大于 1, m 是选自 1-10 的数字, p 是选自 1-20 的数字, R 是 H 或烷基,其中所述接头与寡糖 O- 连接,与载体 N- 连接。在某些实施方案下,“n”可以是 2-10、2-5 或 2、3 或 4。

[0106] 另一个实例是带 O- 连接接头的寡糖,其中所述接头包括:

[0107]



式 III,

[0108] 其中所述寡糖是聚葡糖胺。例如,所述聚葡糖胺可以是 2-20 个单体长、5-11 个单体长的  $\beta$  -1-6 连接的葡糖胺。

[0109] PNAG 和 dPNAG 的尺寸可以变化,由特定的用途决定。通常 PNAG 和 dPNAG 的分子量范围为约 900 道尔顿 (Da) 至 750 千道尔顿 (kDa)。在某些方面,PNAG 或 dPNAG 的分子量低于 2kDa。在某些实施方案中,PNAG 或 dPNAG 的分子量为至少约 2200 道尔顿,或至少约 2500 道尔顿,或至少约 3000 道尔顿。在某些实施方案中,PNAG 或 dPNAG 可以是至少 9、至少 10 个单体单元长,或至少 12 个单体单元长,或至少 15 个单体单元长。在其他方面,PNAG 或 dPNAG 分子量至少为 100kDa,任选其范围为 100-500kDa。

[0110] 如本文中进一步详细的讨论,PNAG 和 dPNAG,包括低分子量版本的 PNAG 和 dPNAG,可以与载体例如载体蛋白缀合。当与载体缀合时,PNAG 和 dPNAG 可以小到 2-3 个单元单体,但优选至少 4-6 个单元单元长。多糖通常介于 800Da 到 1,000kDa。该尺寸的 PNAG 或 dPNAG 形式可根据本文所述方法从头合成。当不含载体化合物使用时,PNAG 或 dPNAG 可为约 100kDa 或更大。

[0111] PNAG 的制备

[0112] 本发明涉及天然和合成形式的 dPNAG 和 PNAG 的用途,包括从本文所述非-ica/pgal 的表达 PNAG 的病原体分离或衍生的 dPNAG 和 PNAG。本文所用的天然的 PNAG 或 dPNAG 是指存在于天然来源中的且任选可从其中分离或衍生的那些。

[0113] PNAG 和 dPNAG 抗原可以以分离形式提供和 / 或使用。分离的多糖,例如分离的 dPNAG,是从其正常存在或合成的环境中取出并至少部分分离的那些。在某些情况下,分离的多糖能从其他化合物中充分分离,以进行结构和功能鉴定。例如,分离的多糖可进行“测序”以确定其化学组成。

[0114] dPNAG 可分离自天然 PNAG,或其可通过使用本文所述的去乙酰化方法从更高度乙酰化的天然 PNAG 衍生。体外合成的 dPNAG 可从其合成反应混合物中分离,由此将其与反应底物、酶、辅因子、催化剂或反应副产物分离。

[0115] PNAG 和 dPNAG 可由任何携带 ica 基因座的微生物(包括细菌)菌株制备。携带 ica 的菌株包括天然表达 ica 基因座的菌株,例如但不限于表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌。具体的菌株包括表皮葡萄球菌 RP62A(ATCC 号 35984)、表皮葡萄球菌 RP12(ATCC 号 35983)、表皮葡萄球菌 M187、金黄色葡萄球菌 RN4220(pCN27) 和金黄色葡萄球菌 MN8 粘液。携带 ica 的菌株还包括那些用 ica 基因座内的基因转化的(例如肉葡萄球菌 TM300(pCN27))。

[0116] 天然的 PNAG 可由多种方法制备,包括从微生物培养物(包括细胞和无细胞培养物上清)中提取粗制天然 PNAG 制品,使富含高分子量天然 PNAG 的物质从粗制 PNAG 制品中分离,使用溶剂例如甲醇、乙醇、丙酮或任何其他本领域技术人员已知能引起多糖从水溶液中沉淀的有机溶剂来沉淀含有富含高分子量 PNAG 物质的不纯 PNAG。提取粗制天然 PNAG 制品和分离、沉淀不纯的天然 PNAG 制品的步骤可使用现有技术中已知的方法进行,如已公开的美国申请号 US-2005-0118198-A1 中所述。

[0117] 不纯的 PNAG 物质随后经纯化和去乙酰化产生 dPNAG。去乙酰化可通过化学法或酶法进行。在某些情况下,化学法去乙酰化可包括将不纯的 PNAG 与碱或酸温育,产生半纯的 PNAG 制品,中和所述制品,并进一步处理该中和的制品以产生 dPNAG。

[0118] 酶促去乙酰化通常包括将不纯的 PNAG 与酶温育,例如消化生物材料的细菌酶类,包括细胞壁分解剂,如溶菌酶、溶葡萄球菌酶和蛋白酶 K,以及核酸酶,例如降解 DNA 和 RNA 的 DNase 和 RNase。随后添加溶剂,使 PNAG 从溶液中沉淀出来,收集沉淀物,将 PNAG 再次溶解于碱例如 NaOH,或酸例如 HCl 中,随后中和。如果温育步骤使用了酸,则中和可用碱完成,或者如果温育步骤使用了碱,则中和用酸完成。中和物质的不溶性组分随后例如用氢氟酸温育处理,产生纯的天然 PNAG 抗原,或再次溶解于 pH<4.0 的缓冲液中,随后进行分子筛和 / 或离子交换色谱处理。

[0119] 另一种分离方法包括通过将培养物与强碱或酸温育,从微生物(包括细菌)培养物中提取粗制 PNAG 混悬液的步骤。优选地,所述培养物在强碱或酸中搅拌至少 2 小时,更

优选至少 5、10、15、18 或 24 小时。所述强碱或酸可以是任何类型的强碱或酸，但优选至少 1M 的 NaOH 或 HCl 的强度。在某些实施方案中，所述强碱或酸是 5M 的 NaOH 或 5M 的 HCl。所述酸或碱溶液随后进行离心，收集细胞体。在某些实施方案中，提取的步骤重复若干次。所得的酸或碱溶液中和至约 pH7，随后透析产生不溶性的不纯的 PNAG。

[0120] dPNAG 也可从头合成。从头合成 dPNAG 的方法描述于已公开的美国专利申请号 US-2005-0118198-A1 和 US-2011-0150880-A1 中。

[0121] 某些方法可从原料中衍生 dPNAG，所述原料例如但不限于多聚葡萄糖（即葡聚糖）、多聚葡萄糖胺例如壳多糖或壳聚糖、多聚葡萄糖胺糖醛酸以及多聚半乳糖胺糖醛酸也可用于产生本发明的 dPNAG 抗原。

[0122] PNAG 和 dPNAG 制品可以有多种纯度。本文中，纯的 PNAG 或 dPNAG 制品是超过 92% 无污染的 PNAG 或 dPNAG 制品。这些污染物包括半乳糖、磷酸盐、磷壁酸等。在某些实施方案中，PNAG 和 dPNAG 组合物至少是 93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 无污染物或 100% 无污染物的。在某些实施方案中，dPNAG 组合物不含高度乙酰化的 PNAG。

[0123] PNAG 或 dPNAG 组合物的纯度水平可通过本领域已知的方法评价。例如，所述纯度可通过化学分析法、气相色谱和核磁共振来验证材料的结构方面。

[0124] 载体

[0125] PNAG 和 dPNAG，不论是从头合成的或者衍生自天然来源的，均可以缀合或未缀合的形式使用。当为缀合形式时，PNAG 或 dPNAG 可与载体（或载体化合物，所述术语在本文中可互换使用）直接或通过接头缀合。所述缀合可在多糖的任何位置进行，包括在其末端之一或两个末端。

[0126] 本文所述“载体”是指通过直接连接或者使用接头连接到多糖的化合物，所述载体可以是具有免疫活性（免疫原性）或其可以是惰性的。当用于体内时，应当理解载体是能安全施用于个体的。

[0127] 载体包括但不限于蛋白质、或者肽、多糖、核酸、或者其它聚合物、脂类、和小分子。载体蛋白包括例如血浆蛋白，例如血清白蛋白、免疫球蛋白、载脂蛋白、转铁蛋白；细菌多肽，例如 TRIPLE、 $\beta$ -半乳糖苷酶，多肽，例如疱疹 gD 蛋白、变应原、白喉和破伤风类毒素、沙门氏菌鞭毛蛋白、嗜血杆菌菌毛蛋白、嗜血杆菌 15kDa、28-30kDa 和 40kDa 膜蛋白、大肠杆菌、热标记肠毒素 1tb、霍乱毒素，和病毒蛋白，其中包括轮状病毒 VP、呼吸道合胞病毒 f 和 g 蛋白。

[0128] 可特别用于免疫的载体蛋白包括钥孔虫凝血素、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、或者大豆胰蛋白酶抑制剂。可以使用在被免疫的个体中有免疫原性的任何其它化合物作为载体。

[0129] 将多糖与蛋白缀合的许多方法在本领域中众所周知。通常，应该激活多糖，或者使其易于缀合（即，至少使多糖一部分能够与蛋白或者其它分子共价结合）。许多此类方法在本领域众所周知。可参考已公开的美国专利申请 US-2005-0118198-A1 和 US-2011-0150880-A1 和美国专利号 4356170、4663160、4619828、4808700、4711779。

[0130] 所述载体可通过接头或者间隔基团与 PNAG 或 dPNAG 缀合。可以采用本领域公知的任何方式将多糖与接头或者间隔基团缀合，包括例如利用多糖的游离还原末端与间隔基团或者接头生成共价键。共价键的生成可通过将 PNAG 或 dPNAG 的游离还原末端转换成游离

1-氨基葡萄糖苷,随后通过乙酰化作用与间隔基团共价连接(Lundquist 等人,期刊《糖化学》1991 年第 10 期第 377 页)。或者,使用 N-羟基琥珀酰亚胺活性酯作为间隔基团上的活性基团,将 PNAG 或 dPNAG 共价连接到间隔基团上(Kochetkow,《糖研究》1986 年第 146 期 C1 页)。还可以使用碘和氢氧化钾将 PNAG 或 dPNAG 的游离还原末端转化为内酯(Isebell 等人,《糖化学的方法》,Academic Press,纽约(1962 年))。通过间隔基团或者接头上的伯氨基基团,内酯可以共价连接到间隔基团上。还可以利用还原胺化作用,将 PNAG 或 dPNAG 的游离还原末端共价连接到接头或者间隔基团上。

#### [0131] 抗体

[0132] 本发明包括结合 PNAG 和 / 或 dPNAG 的抗体。所述抗体可以是单克隆或多克隆抗体。结合 dPNAG 的抗体也可结合高度乙酰化形式的 PNAG。抗体可以使用 dPNAG 或 PNAG,或合成的由高于 3 个葡萄糖胺或 N-乙酰基葡萄糖胺的单糖单元组成的寡糖制备,任选与载体缀合和 / 或与佐剂结合使用。抗体可使用来自非-ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体或携带 ica 或携带 pga 的病原体的 PNAG 或 dPNAG 制备。

[0133] 多克隆抗体通常通过多次皮下或腹膜内注射抗原和佐剂在动物中产生。PNAG 或 dPNAG 或缀合的合成寡糖的多克隆抗体通常通过注射单独的缀合或未缀合形式的 PNAG 或 dPNAG 或缀合形式的合成的寡糖,或其与载体的组合而产生。制备所述多克隆抗体的方法描述于公开的美国专利申请 US-2005-0118198-A1 中。

[0134] 简言之,缀合或未缀合形式的 PNAG 或 dPNAG,或缀合形式的寡糖与诸如弗氏不完全佐剂的佐剂组合(例如,1-3 体积的弗氏佐剂中含有 100  $\mu$ g 缀合物,用于兔子或小鼠),在多个位点进行皮内注射。约 1 个月后,动物用 1/5 到 1/10 初始量的抗原或抗原缀合物与佐剂通过在多个位点皮下注射进行激发。一至二周后给动物放血,测定血清中抗体的存在。动物可以被重复激发,直到抗体滴度平稳。动物可用单独的 PNAG 或 dPNAG 或合成的寡糖缀合物,PNAG 或 dPNAG 缀合物或合成的寡糖缀合物,或 PNAG 或 dPNAG 与不同载体的缀合物,或合成的寡糖缀合物激发,含或不含佐剂。在某些实施方案中,激发剂可包括 PNAG 而非 dPNAG,或其可以含有 dPNAG 和 PNAG 的混合物。

[0135] 除了提供多克隆抗体的来源,免疫的动物还可用于产生 PNAG 特异性和 dPNAG 特异性的单克隆抗体。本文中,术语“单克隆抗体”是指免疫球蛋白的同种(即单个克隆)群体,其结合某一抗原同样的表位。单克隆抗体具有同样的 Ig 基因重排,因此具有相同的结合特异性。当使用 dPNAG 或合成的寡糖缀合物产生抗体时,所述表位可以以高度乙酰化的 PNAG 和 dPNAG 存在,这样针对 dPNAG 的抗体也可结合 PNAG。

[0136] 制备单克隆抗体的方法是本领域已知的。单克隆抗体可通过多种方法制备。在一种方法中,分离自免疫动物的脾细胞经与杂交瘤细胞融合或通过 EB 病毒转化进行永生,随后筛选并鉴定表达所需抗体的克隆。其他方法包括分离重排的 Ig 基因序列,并克隆至永生细胞系中。所述方法还详述于公开的美国专利申请 US-2005-0118198-A1 和 US-2011-0150880-A1 中,并且所述教导引入本文作为参考。

[0137] 对 PNAG 特异性的抗体可不限于鼠、人或嵌合抗体,例如但不限于人源化抗体。

[0138] 人单克隆抗体可通过本领域已知的任何方法制备,包括美国专利号 5567610、5565354、5571893, Kozber, J. Immunol. 133:3001(1984), Brodeur, 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p. 51-63(Marcel Dekker, Inc, new

York, 1987) 和 Boerner 等, *J. Immunol.*, 147:86-95 (1991) 中公开的那些。人抗体可通过从血液或其他产生针对相关抗原(例如 dPNAG 或 PNAG)的抗体的人其他组织收集产生抗体的淋巴细胞而获得。这些淋巴细胞可经处理产生能在实验室适当培养条件下自我生长的细胞。细胞培养物可经筛选用于产生针对相关抗原的抗体,随后克隆。克隆的培养物可用于产生 dPNAG 或 PNAG 的人单克隆抗体,或编码所述抗体重链和轻链可变区的遗传片段可被克隆并插入核酸载体中,用于产生不同类型抗体。除了用于制备人单克隆抗体的常规方法以外,所述抗体也可通过免疫能产生人抗体的转基因动物获得(例如 Jakobovits 等, *PNAS USA*, 90:2551 (1993), Jakobovits 等, *Nature*, 362:255-258 (1993), Bruggermann 等, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993) 和授予 Lonberg 的美国专利 5569825)。

[0139] 本文中,“人源化的单克隆抗体”是含有至少人类恒定区域和来自非人类动物的抗原结合区域,例如一个、两个或三个 CDR 的单克隆抗体或者其功能活性片段。人源化抗体具有特殊的临床应用,其特异性识别相关抗原,但不会激发人体针对抗体本身的免疫应答。例如,鼠 CDR 可被移植到人抗体的框架区中以制备人源化的抗体。参见 L. Riechmann 等人, *Nature* 332, 323 (1988); M. S. Neuberger 等人, *Nature* 314, 268 (1985) 和 EPA 0239400。或者,人源化的单克隆抗体可通过用人抗体的类似区域替换非人抗体的非 CDR 区域构建,同时保留原始抗体的表位特异性。例如,非人 CDR 和任选的某些框架区域可通过共价结合到人 FR 和 / 或 Fc/pFc' 区域产生功能抗体。在美国,已经有从特异性鼠抗体区域合成人源化抗体的商业机构,例如 Protein Design Labs (Mountain View California), Abgenix 和 Medarex。同样可参考欧洲专利申请 0239400。

[0140] 本发明也包括结合抗原的抗体片段。本领域已知,只有抗体分子的一个小部分(即互补位)涉及抗体与抗原表位的结合(通常参见,Clark, WR (1986)《现代免疫学实验基础》Wiley&Sons, Inc, 纽约;Roitt, I (1991 年)《核心免疫学》第 7 版,Blackwell Scientific Publications, Oxford)。例如,抗体的 pFc' 和 Fc 区域是补体级联的效应子,但并不涉及抗原结合。pFc' 区域被酶促断裂的抗体或者制备的缺少 pFc' 区域的抗体被命名为 F(ab')<sub>2</sub> 片段,保留了完整抗体的两个抗原结合位点。由于其具有两个抗原结合位点,分离的 F(ab')<sub>2</sub> 片段被称为二价单克隆片段。相似的是,Fc 区域被酶促断裂的抗体或者制备的缺少 Fc 区域的抗体被命名为 Fab 片段,保留了完整抗体分子的一个抗原结合位点。更进一步的是, Fab 片段是由共价连接的抗体轻链和命名为 Fd(重链可变区域)的一部分抗体重链构成的。Fd 片段是抗体特异性的主要决定因子(在未改变抗体特异性条件下,单个的 Fd 片段可与多达 10 条不同的轻链结合),并且单独的 Fd 片段保留着结合抗原表位的能力。

[0141] 术语 Fab、Fc、pFc'、F(ab')<sub>2</sub> 和 Fv 还具有标准的免疫学含义 [Klein,《免疫学》(John Wiley, 纽约, 1982 年); Clark, WR (1986)《现代免疫学实验基础》(Wiley&Sons, Inc, 纽约); Roitt, I (1991)《核心免疫学》第 7 版 (Blackwell Scientific Publication, Oxford)]。众所周知的功能活性抗体片段包括但不限于抗体的 F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fv 和 Fd 片段。与完整抗体相比,缺少完整抗体 Fc 片段的这些片段很显然在循环中更加迅速,可更少发生非特异性组织结合 (Wahl 等人, 期刊《Nucl Med》1983 年第 24 期第 316-325 页)。例如,根据 Ladner 等人的美国专利 4946778 公开的方法,构建单链抗体。此单链抗体包括通过柔性接头连接的重链与轻链的可变区。还报道了获得单一区域抗体 (“Fd”) 的方法(参见例如, Ward 等人,《自然》1989 年第 341 期第 644-646 页),其含有分离的可变重链单一结构域;并且公开了一

种利用与目标抗原表位结合的足够亲和力来鉴别抗体重链可变区 ( $V_H$  单结构域抗体) 的筛选方法。基于公知的抗体重链和轻链可变区序列, 制备重组 Fv 片段的方法在本领域众所周知并已经公开, 例如 Moore 等人的美国专利 4462334。公开了使用并产生抗体片段的其它参考文献包括例如 Fab 片段 (Tijssen, 《酶免疫测定的实施与理论》(Elsevier, Amsterdam, 1985)), Fv 片段 (Hochman 等人, 《生物化学》1973 年第 12 期第 1130 页; Sharon 等人, 《生物化学》1976 年第 15 期第 1591 页; Ehrlich 等人, 美国专利 4355023), 和抗体分子的部分 (Audilore-Hargreaves, 美国专利 4470925)。因此, 在不破坏抗体对于 dPNAG 抗原表位的特异性的条件下, 本领域技术人员可以从完整抗体的各个部分构建抗体片段。可以理解, 由抗 dPNAG 抗体识别的抗原表位也可以存在于高度乙酰化的 PNAG 上。

#### [0142] 用途

[0143] 本发明的多糖、合成寡糖和抗体可用于多种不同的应用, 包括体外、原位和体内的应用。多糖和合成寡糖可用于在体内免疫个体, 以预防或治疗由非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体导致的感染。多糖和合成寡糖也可用于开发 PNAG 或 dPNAG 特异性抗体, 其可用于在体内免疫个体, 以预防或治疗由非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体导致的感染。

[0144] 来自于非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体的 PNAG 和 / 或 dPNAG 可用于筛选结合伙伴, 例如抗体。抗体也可用于检测表达 PNAG 的病原体, 包括检测 (即诊断) 个体的感染。本发明因此还提供了用于产生结合 PNAG 和 dPNAG 的抗体的方法。

[0145] 来自于非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体的 PNAG 和 / 或 dPNAG 可用于在具有或处于发生由任一表达 PNAG 的病原体 (包括携带和未携带 ica 基因座的) 引起的感染的风险的个体中诱导免疫应答。应当理解, “来自于非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体的 PNAG 和 / 或 dPNAG” 表示使用本文所述方法从非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体产生的多糖。免疫应答诱导可预防或部分或完全治疗所述感染。部分治疗所述感染可包括减轻症状的严重性或频率, 和 / 或部分减少患者体内的病原体载量。当患者正被施用或将要被施用一种或多种其他治疗剂时, 部分治疗可以是有效的。通过向个体施用诱导免疫应答例如针对 PNAG 或 dPNAG (或表达 PNAG 的病原体) 的抗体反应的有效量的任何 PNAG 或 dPNAG 或其组合物完成免疫应答诱导。

[0146] 本文中, 个体为温血哺乳动物, 包括例如人、灵长类、马、牛、猪、山羊、绵羊、狗或猫。在某些实施方案中, 个体是非啮齿类个体。非啮齿类个体是前文所定义的任何个体, 但特别排除了啮齿类动物, 例如小鼠、大鼠和兔子。在某些实施方案中, 优选的个体是人。

[0147] 所述个体可以是具有或处于发生由表达 PNAG 的病原体 (无论携带或未携带 ica 基因座的) 引起的感染的风险。处于发生由表达 PNAG 的病原体引起的感染的风险的个体可能正处于暴露于所述病原体的风险中。如本文所述, 大量的非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体对一类或多类抗生素具有耐药性。因此, 由于其不能通过使用抗生素消灭, 个体可能将暴露在所述病原体下。具有感染风险的人群包括, 例如新生儿个体、免疫妥协个体 (例如正接受化疗的个体)、使用免疫抑制剂的个体 (包括移植)、透析个体、经高风险手术的个体以及具有体内医疗器械例如静脉导管 (例如中枢导管) 或假肢 (例如髌或膝关节置换假体) 的个体。

[0148] 与蛋白质载体缀合的 PNAG 或 dPNAG 和合成的寡糖可以诱导免疫应答的有效量施用至个体。所述有效量可以是足以帮助个体产生本身的免疫保护的量, 例如诱导对 PNAG 和

/ 或 dPNAG 特异性的抗体的生成, 诱导记忆细胞的生成, 以及可能的细胞毒的淋巴细胞反应等。所述免疫应答可随后预防暴露在所述病原体下的个体的由表达 PNAG 的病原体导致的感染。本领域技术人员能通过本领域已知的方法判定 PNAG 或 dPNAG 或合成的寡糖缀合物疫苗的量是否足以诱导主动免疫。例如, PNAG 或 dPNAG 或合成的寡糖缀合物疫苗在哺乳动物中产生 PNAG 特异性抗体的能力可通过使用 PNAG 抗原在小鼠或其他个体中筛选产生的抗体进行。诱导免疫应答的 PNAG 或 dPNAG 的量范围可以为约 1 至 100  $\mu\text{g}$ , 但这不是限制性的。

[0149] 对 PNAG 和 / 或 dPNAG 特异性的抗体或抗体片段可用于诱导个体的被动免疫, 例如, 在具有暴露在表达 PNAG 的病原体 (包括非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体) 下风险的个体中预防全身性感染。诱导对感染的被动免疫的方法包括向个体施用有效量的对 PNAG 和 / 或 dPNAG 或合成寡糖特异性的抗体, 以诱导对 PNAG 或表达 PNAG 的病原体 (包括非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体) 的免疫应答。

[0150] 抗体或抗体片段可施用给任何具有发生非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体导致的感染风险的个体, 在某些实施方案中可特别适用于不能诱导对 PNAG 和 / 或 dPNAG 的主动免疫的个体。PNAG 或 dPNAG 或合成的寡糖缀合物疫苗可能不能完全有效的预防或消除某些个体的感染, 因此这些个体可受益于使用对 PNAG 和 / 或 dPNAG 特异性的抗体的治疗。不能诱导免疫应答的个体包括免疫妥协的个体 (例如, 正接受化疗的个体、具有 AIDS 的个体等), 或未发育免疫系统的个体 (例如早产的婴儿)。

[0151] 抗体或抗体片段以有效量施用至个体, 诱导对 PNAG 或表达 PNAG 的病原体例如非 -ica/pga 的 PNAG 阳性的病原体的免疫应答。本文中, 有效量的诱导免疫应答的抗体或抗体片段是足以 (i) 预防暴露于所述病原体的个体发生感染; (ii) 抑制感染的进展, 即, 妨碍或减缓其进展; 和 / 或 (iii) 减轻感染, 即消除感染个体体内的微生物的抗体或其片段的量。微生物包括细菌、病毒、真菌、寄生虫等。

[0152] 使用那些本领域技术人员已知的方法, 可以确定抗体或抗体片段的用量是否是体外调理素作用分析中的有效量, 其预示着抗体调理作用的程度。调理微生物例如细菌的抗体是加入到微生物样品中时引起微生物被吞噬的抗体。调理素作用分析可以是比色测定法、化学发光测定法、荧光测定法或放射标记摄取测定法、细胞介导的细胞毒性分析或测定物质调理能力的其他分析方法。

[0153] 药物组合物和制剂

[0154] 通常, 当体内施用时, 本发明的多糖、抗体和抗体片段以可药用的组合物形式施用。所述组合物可包括可药用的载体、盐、缓冲剂、防腐剂、佐剂和任选的其他预防或治疗成分。可药用的载体表示一种或多种相容的固体或液体填充剂、稀释剂或包囊物质, 其适合人体或其他动物给药。可药用载体中的术语: “载体” 表示与多糖、抗体或抗体片段混合有利于应用 (包括给药) 的天然或者合成的有机成分或者无机成分。药物组合物的成分应当能与多糖、抗体或抗体片段混合, 以致各成分之间不存在实质削弱所需药用效果的相互作用。

[0155] 可药用的盐包括但不限于由下列酸制备的盐: 盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、对甲苯磺酸、酒石酸、柠檬酸、甲烷磺酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸、萘-2-磺酸、苯磺酸。另外, 可药用的盐可以制备成碱金属或者碱土金属盐, 例如羧酸基团的钠盐、钾盐或钙盐。

[0156] 适当的缓冲剂包括乙酸和盐(1-2%重量/体积);柠檬酸和盐(1-3%重量/体积);硼酸和盐(0.5-2.5%重量/体积);磷酸与盐(0.8-2%重量/体积)。适合的防腐剂包括苯扎氯铵(0.003-0.03%重量/体积)、氯丁醇(0.3-0.9%重量/体积)、对羟基苯甲酸酯类(0.01-0.25%重量/体积)和硫柳汞(0.004-0.02%重量/体积)。

[0157] 适于肠胃外给药的组合物通常包括所述多糖、抗体或抗体片段的无菌水制剂,其与接受者的血液是等渗的。可接受的溶媒和溶剂包括水、林格溶液和等渗的氯化钠溶液。此外,通常无菌的不挥发性油可以用做溶剂或者悬浮介质。为了此目的,可以使用任何温和的不挥发性油,其中包括合成的甘油单酯、甘油二酯。此外,脂肪酸例如油酸,可应用于可注射的制剂。适合皮下给药、肌肉给药、腹膜内给药、静脉内给药等方式的载体配方可以参见《雷明顿药物学》(Mack Publishing Company, Easton, PA)。

[0158] 所述多糖、寡糖、抗体和抗体片段以有效量给药。多糖或寡糖的剂量范围为1-100  $\mu\text{g}$  可以是有效的,这取决于施用的方式。抗体或抗体片段剂量范围为0.1-100mg/kg 和0.1-20mg/kg,取决于施用的方式。绝对用量取决于各种因素,其中包括,给药是实施在尚未受细菌感染的高危个体还是已经受感染的个体,共同治疗,用药次数和个体病人的参数,其中包括年龄、身体状况、身高和体重。这些是本领域普通技术人员公知的因素,可以通过不超出常规的实验获得。通常优选的是,根据合理的医学判断,所用的最大剂量是最高安全剂量。

[0159] 可以考虑所述多糖、抗体和/或抗体片段的多种给药方式。通常,免疫方案涉及将高剂量的抗原给药,经过几周后,接着将低剂量的抗原给药。还可以施用进一步的剂量。如果需要,被动免疫的给药方案完全不同于高频率的给药方案。可以使用增强抗细菌感染的免疫响应和/或随后保护免受感染的任何给药方案。通过不超出常规的实验,本领域普通技术人员可以确定递送多次剂量的具体抗原所需的给药间隔。疫苗可以在1到6个月内施用,任选以相同的时间间隔给药。对于抗体和抗体片段,给药间隔通常在14-180天。

[0160] 可以采用各种给药途径。所选的具体方式取决于例如待治疗的具体症状、有效治疗所需的剂量。一般地讲,实施本发明方法可以采用医学可接受的任何给药方式,也就是,在未造成临床不可接受副作用的条件下产生有效水平的免疫应答的任何方式。优选的给药方式是胃肠外途径。术语“胃肠外”包括皮下注射、静脉内注射、肌肉注射、腹膜内注射、或者输注技术。其它途径包括但不限于口腔、鼻、皮肤、舌下、和局部途径。

[0161] 其它递送系统可以包括限时释放系统、缓释递送系统、或者持续释放递送系统。这样的系统可以避免本发明多糖的重复给药,增加了个体与医生的便利。许多类型的释放递送系统是可行的,对于本领域普通技术人员众所周知。它们包括基于聚合物的系统,例如聚乳酸和聚乙醇酸、聚酞和聚己内酯;脂类的非聚合物系统,其中包括固醇,例如胆固醇、胆固醇酯,和脂肪酸,或者中性脂肪,例如甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯;水凝胶释放系统;硅橡胶系统;基于肽的系统;使用常规粘合剂和赋形剂的蜡包衣压缩片剂,部分融合的植入片等。特定实例包括但不限于:(a) 基质中含有某种形式多糖的侵蚀系统,参见美国专利4452775(Kent);4667014(Nestor 等人);4748034 和 5239660(Leonard);(b) 活性化合物以可控速率透过聚合物的扩散系统,参见美国专利3832253(Higuchi 等人)和3854480(Zaffaroni)。此外,可以使用基于泵的硬件递送系统,其中一些系统适合植入。

[0162] 第二药物

[0163] dPNAG 和 / 或 PNAG- 特异性抗体可与其他药物联合递送。其他药物的性质可依赖于 dPNAG 或 PNAG 特异性抗体是否施用。

[0164] 例如,当施用以诱导主动免疫和 / 或产生抗体时, dPNAG 可与佐剂联合。本文中,术语佐剂是指与抗原(例如 dPNAG)联合施用(包括在同一时间、同一制剂中等)以加强抗原特异性免疫应答的物质。佐剂包括但不限于铝化合物,例如凝胶、氢氧化铝和磷酸铝以及弗氏完全或不完全佐剂(其中 dPNAG 抗原整合到石蜡油乳浊液中稳定水的水相中)。可以采用不同类型的油例如鲨烯油或者花生油替换石蜡油。具有佐剂特性的其它材料包括 BCG(减毒的结核分支杆菌)、磷酸钙、左旋咪唑、异丙肌苷、聚阴离子(例如,多聚 A:U)、蘑菇多糖、白喉毒素、脂质 A、皂苷、QS-21 和肽,例如胞壁酰二肽。稀土盐,例如镧和铈,也可以用作佐剂。佐剂的用量取决于个体和所用的具体 dPNAG 抗原(例如,乙酸盐取代水平),并且不需要过度实验就可以由本领域技术人员很容易地确定。

[0165] 所述药物可以是抗微生物剂,例如抗菌剂、抗病毒药、抗寄生虫药、抗真菌药等。

[0166] 所述药物可以是抗菌药物(例如抗生素)、另一种细菌抗原或另一种抗菌的抗体或其混合物或组合。抗生素在治疗细菌感染的用途是常规的。抗原诱导主动免疫和抗体诱导被动免疫的用途也是常规的。在该实施方案中,常规的给药溶媒(例如片剂、植入片、可注射溶液等)可以含有本发明活性剂和抗生素和 / 或其他抗原和 / 或其他抗体。此外,抗生素和 / 或其他抗原和 / 或其他抗体可以分别用药。抗生素可以与 dPNAG 或抗 dPNAG 抗体缀合。

[0167] 抗菌的抗生素是众所周知的,包括但不限于:青霉素 G、青霉素 V、氨苄西林、阿莫西林、巴氨西林、环青霉素、依匹西林、海他西林、匹氨西林、甲氧西林、萘夫西林、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、氟氯西林、羧苄西林、替卡西林、avlocillin、美洛西林、哌拉西林、氮卓西林、头孢西林、头孢霉定、头孢羟氨苄、头孢克洛、头孢唑林、头孢呋肟酯、头孢孟多、头孢尼西、头孢西丁、头孢噻肟、头孢唑肟、头孢甲肟、头孢曲松、拉氧头孢、头孢替坦、头孢哌酮、头孢他啶、亚胺培南、棒酸钾、特美汀、舒巴坦、新霉素、红霉素、甲硝唑、氯霉素、克林霉素、林克霉素、万古霉素、甲氧苄啶 - 磺胺甲恶唑、氨基糖苷类、喹诺酮类、四环素类和利福平(参见《古德曼和吉尔曼治疗学药理学基础》第 8 版,1993 年,McGraw Hill Inc)。

[0168] 多糖抗原(除 PNAG 和 dPNAG 外)和多糖特异性抗体(除 PNAG 特异性抗体外)是本领域已知的。实例包括伤寒沙门氏菌荚膜 Vi 抗原(Szu, S. C., X. Li, A. L. Stone 和 J. B. Robbins,《Vi 荚膜多糖结构与免疫特性之间的关系》,《感染与免疫》1991 年第 59 期第 4555-4561 页);大肠杆菌 K5 荚膜(Vann, W, MA Schmidt, B Jann 和 K Jann,《泌尿道感染性大肠杆菌的荚膜多糖(K5 抗原)结构,010 :K5 :H4,与脱硫肝素相似的聚合物》,《欧洲生物化学杂志》1981 年第 116 期第 359-364 页);金黄色葡萄球菌类型 5 的荚膜(Foumier JM K Hannon, M Moreau, WW Karakawa 和 WF Vann,《从金黄色葡萄球菌分离类型 5 的荚膜多糖》,Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (巴黎),1987 年第 138 期第 561-567 页);苜蓿根瘤菌外多糖 II(Glazebrook J 和 GC Walker,《通过苜蓿根瘤菌,一种新型外多糖能够功能性替代苜蓿生节瘤中卡尔科弗卢尔结合的外多糖》,《细胞》1989 年第 65 期第 661-672 页);B 组葡萄球菌类型 III(Wessels MR, V. Pozsgay, DL Kasper 和 HJ Jennings,《B 组类型 III 葡萄球菌荚膜多糖低聚糖重复单元的结构与免疫化学》,《生物化学杂志》1987 年第 262 期第 8262-8267 页);绿脓假单胞菌 Fisher70- 特异侧链(Knirel, YA, NA Paramonov, EV Vinogradov, AS

Shashkow, BA NK Kochetkov, ES Stanislavsky 和 EV Kholodkova,《绿脓假单胞菌的体细胞抗原,绿脓假单胞菌 03(Lanyi)、025(Wokatsch) 和 Fisher 免疫类型 3 和 7 脂多糖的 O-特异多糖链的结构》,《欧洲生物化学杂志》1987 年第 167 期第 549 页);宋内氏痢疾杆菌的氧-特异侧链(Kenne. L, B Lindberg 和 K Petersson,《宋内氏痢疾杆菌相 I 脂多糖氧特异侧链的结构研究》,《糖类研究》1980 年第 78 期第 119-126 页);肺炎链球菌类型 I 荚膜(Lindberg, B, Lindqvist, B, Lonngren J, Powell DA,《肺炎链球菌类型 I 荚膜多糖的结构研究》,《糖类研究》1980 年第 78 期第 111-117 页);和肺炎链球菌组抗原(Jennings HJ, C. Lugowski 和 NM Young,《肺炎链球菌类型 I 复合多糖碳物质的结构》,《生物化学》1980 年第 19 期第 4712-4719 页)。其他非多肽抗原和非多糖特异性抗体是本领域技术人员已知的,可与本发明的组合物联合使用。

#### [0169] 检测和诊断分析

[0170] dPNAG 和合成寡糖抗原及其抗体也可用于确定个体或者样品免疫状态的诊断测定,或者可以作为免疫分析的试剂。例如,抗体可以用于检测表面具有 PNAG 的微生物例如细菌样品的存在。如果微生物存在于样品,那么抗体还可以用于治疗感染的个体。抗体还可以用于筛选存在 PNAG 抗原的微生物,并且可以从复杂的混合物中分离 dPNAG 或 PNAG 抗原以及含有 dPNAG 或 PNAG 抗原的微生物。

[0171] 通过标记 dPNAG 或抗体和 / 或将 dPNAG 或抗体固定在不溶性的基质上,可实现上述测定或者本领域公知的任何其它测定。使用 dPNAG 和 / 或其抗体的分析与诊断方法使用了至少一种下列试剂:标记的分析物类似物、固定的分析物类似物、标记的结合配偶体、固定的结合配偶体、立体缀合物。所用的标记可以是任何不干扰分析物与其结合配偶体结合的可测的功能性标记。在免疫测定中使用的多种标记众所周知。例如,可以直接检测的化合物,如荧光色素、化学发光标记、放射性标记,以及通过反应或者衍生作用例如通过酶作用可以测得的化合物。这样类型标记的实例包括  $^{32}\text{P}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$  和  $^{131}\text{I}$  放射同位素,荧光基团例如稀土螯合物或者荧光素及其衍生物,罗丹明及其衍生物,丹酰,伞形酮,萤光素酶、例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利 4737456),萤光素, 2,3-dihydrophthalavinedione,辣根过氧化酶(HRP),碱性磷酸酶, $\beta$ -半乳糖苷酶,葡糖淀粉酶,溶菌酶,糖基氧化酶例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。杂环氧化酶,例如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,与利用过氧化氢氧化染料前体的酶例如 HRP、乳过氧化物酶或微过氧化物酶偶联,生物素卵白素、自旋标记、噬菌体标记、和稳定的自由基。

[0172] 通过本领域技术人员公知的方法,所述标记可以与 dPNAG 或抗 dPNAG 抗体缀合。例如,美国专利 3940475 和 3645090 举例说明了荧光基团和酶与抗体的结合。本发明能采用的通常重复使用的抗原与抗体的其它测定法包括竞争测定法和夹心测定法。

[0173] 下列实施例旨在举例说明,并非对本发明的范围加以限制。

## 实施例

[0174] 实施例 1: 多种微生物物种的细菌表面多糖聚-N-乙酰基葡糖胺(PNAG)的表达

[0175] 抗体直接结合:生物体在多种培养基中生长以促进 PNAG 产生,温度范围为  $20^{\circ}\text{C}$  至  $37^{\circ}\text{C}$ , 24-72 小时,大气氧条件 ( $21\% \text{O}_2$ )、 $5\% \text{CO}_2$  或在缺氧情况下。来自平板的细胞直接在 PBS(磷酸盐缓冲液)中悬浮,而来自培养液中的细胞经洗涤后再悬浮于 PBS 中。

[0176] 将样品置于载玻片上,用甲醇固定 1 分钟。样品随后用与 Alexafluor 488 (AF488) (1:313 稀释的 1.63mg/ml 储存液,最终浓度 5.2ug/ml) 直接缀合的 Mab F429 (阴性对照,对铜绿假单胞菌藻酸盐抗原特异性的人 IgG1) 温育,或用与 AF488 (1:833 稀释的 4.35mg/ml 储存液,最终浓度 5.2ug/ml) 直接缀合的 MAb F598 (对 PNAG 特异性的人 IgG1) 在含有 0.5% BSA 的 PBS 中温育过夜,4℃,含 4uM Syto 83。样品用 PBS 洗涤,装上 1.5 盖玻片,用于共焦分析。

[0177] MAb F598 结合 PNAG 的特异性:生物体在多种培养基中生长以促进 PNAG 产生,温度范围为 20℃至 37℃,24-72 小时,大气氧条件 (21% O<sub>2</sub>)、5% CO<sub>2</sub>或在缺氧情况下。来自平板的细菌细胞直接在 TBS (tris 缓冲盐溶液 pH 6.5) 中悬浮,而来自培养液中的细胞经洗涤后再悬浮于 TBS 中。

[0178] 通常,样品用壳多糖酶、Dispersin B 或高碘酸盐处理,随后暴露于 MAb F598。在 pH6.5 的 TBS 中的样品与 (a) 50 μg/ml 壳多糖酶 (阴性对照)、(b) Dispersin B (消化 PNAG) 在 37℃温育 24 小时,或 (c) 与 0.4M 高碘酸盐在 37℃温育 2 小时。PNAG 被高碘酸盐裂解,Dispersin B 消化,未受壳多糖酶影响。细胞随后与针对 PNAG 的人 IgG 单克隆抗体 (Mab) 或针对非相关抗原即铜绿假单胞菌藻酸盐的 IgG1 单克隆抗体 (MAb F429) (阴性对照,对铜绿假单胞菌藻酸盐抗原特异性的人 IgG1) 反应。非相关抗原的抗体不应当结合 PNAG。

[0179] 具体而言,洗涤样品,取 10 μl 试样风干在载玻片上,随后用甲醇固定 1 分钟。MAb F429 (阴性对照) 直接与 AF488 缀合 (1:313 稀释的 1.63mg/ml 储存液,最终浓度 5.2ug/ml), MAb F598 (抗 -PNAG, 批次 2) 与 AF488 (1:833 稀释的 4.35mg/ml 储存液,最终浓度 5.2ug/ml) 直接缀合,其在含有 0.5% BSA 的 PBS 中温育过夜,4℃,含 4uM Syto 83 (染红 DNA)。样品用 PBS 洗涤,载玻片上装上 1.5 盖玻片,用于共焦分析。

[0180] 表 1

[0181]

微生物	MAb F598	MAb F598 +壳多糖酶	MAb F598 + Dispersin	MAb F598 + 高碘酸盐	阴性对照
金黄色葡萄球菌(阳性对照)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
肺炎链球菌(菌株 D39)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
肺炎链球菌(菌株 ATCC8)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
酿脓链球菌(菌株 950771)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
无乳链球菌(菌株 M781)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
粪肠球菌(菌株 V583)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	ND	阴性(深色)
单核细胞增生利斯特菌	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
难辨梭菌	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
脆弱拟杆菌(菌株 9343)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	ND	阴性(深色)
结核分枝杆菌(菌株 H37RV)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
耻垢分枝杆菌	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
脑膜炎奈瑟菌(菌株 B16B6)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
淋病奈瑟球菌(菌株 179008)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
流感嗜血菌(非典型)(菌株 140)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)

[0182]

杜氏嗜血菌	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
幽门螺杆菌(菌株 88-3857)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
空肠弯曲杆菌	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
啮齿类柠檬酸杆菌	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	ND	阴性(深色)
白色念珠菌(酵母)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
白色念珠菌(菌丝)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
黄曲霉菌	阳性(绿色)	ND	ND	ND	阴性(深色)
镰刀菌属	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
新型隐球菌	阳性(绿色)	ND	ND	ND	阴性(深色)
伯氏疟原虫(菌株 ANKA)-在感染的小 鼠血液中	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
恶性疟原虫(菌株塞 内加尔2)-在感染的 血液中	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
伤寒杆菌(菌株 TY2)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)
鼠伤寒沙门氏菌(菌 株LT2)	阳性(绿色)	阳性(绿色)	阴性(深色)	阴性(深色)	阴性(深色)

[0183] ND = 未完成。

[0184] 此外,在患有肺炎链球菌中耳炎的儿童以及两名非典型流感嗜血菌中耳炎儿童中获取的中耳渗出液(MEF)样本中的感染细菌上检测到壳多糖酶抗性的、dispersin B-敏感的PNAG。同样的感染菌也用肺炎链球菌或流感嗜血菌特异性抗体染色。一名结核分枝杆菌感染患者的肺组织中也检测到PNAG。在用肺炎链球菌血清群19A感染的毛丝鼠鼻咽液中,可容易的观察到带有血清群19A荚膜的壳多糖酶抗性的、dispersin B-敏感的PNAG抗原的共区域化。在用啮齿类柠檬酸杆菌感染的小鼠胃肠道内,可在与上皮细胞结合的微生物周围检测到PNAG。在白色念珠菌感染的角膜炎小鼠的眼组织中,在真菌细胞的DNA阳性的部分检测到PNAG。

[0185] 此外,共焦显微镜分析显示,与MAb F598反应但不与MAb F429反应的细菌株系包括霍乱弧菌2R1和霍乱弧菌0395。

[0186] 与 PNAG 的多克隆兔抗体反应但不与正常的兔血清反应的细菌菌株包括多形拟杆菌和 *Bacteroides vulgatis*。

[0187] 实施例 2 : 胃肠道中的啮齿类柠檬酸杆菌

[0188] 样品和与 AF488 (1:313 稀释的 1.63mg/ml 储存液, 最终浓度 5.2ug/ml) 直接缀合的 MAb F429 (阴性对照, 对铜绿假单胞菌藻酸盐抗原特异性的人 IgG1) 或与 AF488 (1:833 稀释的 4.35mg/ml 储存液, 最终浓度 5.2ug/ml) 直接缀合的 MAb F598 (对 PNAG 特异性的人 IgG1) 在含有 0.5% BSA 的 PBS 中反应过夜, 4°C, 含 4uM Syto 83 (用于细胞核染色)。样品用 PBS 洗涤, 装上 1.5 盖玻片, 用于共焦分析。

[0189] 使用 F598 抗体的结果显示, 感染小鼠的胃肠道中的啮齿类柠檬酸杆菌菌落中存在 PNAG。MAb F429 未对菌落染色, 进一步验证了 F598MAb 染色的特异性 (数据未显示)。

[0190] 实施例 3 : 耳和鼻灌洗液中的肺炎链球菌

[0191] 该实施例证实了患中耳炎的毛丝鼠的耳鼻灌洗液中荚膜 19A 型肺炎链球菌上 PNAG 的共表达。

[0192] 将样品与 50  $\mu$ g/ml Dispersin B 或壳多糖酶在 TBS 中温育过夜, 随后用 1:50 的 F598 (1mg/ml) 或 F429 (1mg/ml) 和兔抗肺炎链球菌 19A 荚膜多糖 (1:100) 在 BSA/PBS 中在 4°C 标记过夜, 随后在室温下用 1:200 的与 AF488 缀合的山羊抗人 IgG 和山羊抗兔 AF568 温育 1 小时。

[0193] 结果显示, 中耳炎毛丝鼠的鼻咽灌洗液中的肺炎链球菌细胞周围存在 PNAG。用壳多糖酶和 Dispersin B 处理, 随后暴露在对照 MAb F429 中的样品呈阴性。用 Dispersin B 处理, 随后暴露于 MAb F598 的样品呈阴性, 而用壳多糖酶处理随后暴露在 MAb F598 中的样品呈阳性, 证明中耳炎毛丝鼠的鼻咽灌洗液中存在 PNAG。染色图案与兔抗 SPn 19A 染色重叠 (数据未显示)。

[0194] 类似的, 壳多糖酶处理后, 使用 PNAG 特异性 MAb F598 染色, 在感染肺炎链球菌 19A 的中耳炎毛丝鼠的耳灌洗液和鼻腔中也检测到 PNAG, 但使用对照 MAb F429 未检测到。染色图案与兔抗 SPn 19A 染色重叠 (数据未显示)。

[0195] 实施例 4 : 中耳炎儿童的人耳灌洗液中的肺炎链球菌或非典型流感嗜血杆菌

[0196] 耳液样品与 100  $\mu$ g/ml DNaseI 在 37°C 孵育过夜, 随后在 37°C 用 50  $\mu$ g/ml 壳多糖酶或 Dispersin B 在 TBS 中温育 24 小时。洗涤样品, 取 10  $\mu$ l 试样风干在载玻片上, 热固定, 用 50  $\mu$ g/ml F598 (AP01) 或 F429 (1mg/ml) 和小鼠抗肺炎链球菌磷脂酰胆碱 (1:100) 或豚鼠抗流感嗜血杆菌 (热杀灭全细胞, 1:100) 在含有 0.5% BSA (PBS/BSA) 的 PBS 中在 4°C 下标记过夜。样品用 PBS 洗涤, 用 1:250 的与 AF488 缀合的抗人 IgG、1:200 的山羊抗鼠 IgG 或与 AF568 缀合的山羊抗豚鼠 IgG 在室温下温育 1 小时。清洗并安装载玻片。

[0197] 结果证实, 具有肺炎链球菌感染 (中耳炎) 的人耳液中存在 PNAG。暴露于壳多糖酶和 MAb F429, 或暴露于 Dispersin B 和 MAb F598 的样品呈阴性, 而暴露于壳多糖酶和 MAb F598 的样品呈阳性。染色图案与抗肺炎链球菌磷脂酰胆碱的小鼠抗体染色有重叠 (数据未显示)。

[0198] 实施例 5 : 血中的伯氏疟原虫和恶性疟原虫

[0199] 疟疾感染的小鼠 (伯氏疟原虫 NK-65 感染的 BALB/CJ, 感染后 18 天) 的未染色新鲜血涂片进行共聚焦显微镜检查。涂片用免疫组化笔分成壳多糖酶、Dispersin B 和高碘酸盐

处理三个孔。加热固定载玻片,用 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  壳多糖酶或 Dispersin B 在 TBS 中 37 $^{\circ}\text{C}$  处理 24 小时,或用 0.4M 高碘酸盐在 37 $^{\circ}\text{C}$  处理 2 小时。载玻片用 PBS 洗涤,与直接缀合 AF488 (绿色) 的 MAb F598 (1.3mg/ml 储存液;1:250 稀释,等价于每 600  $\mu\text{l}$  中 2.4  $\mu\text{l}$ ;最终浓度 5.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  或每 600  $\mu\text{l}$  中 3.12  $\mu\text{g}$ ;每孔加入 200  $\mu\text{l}$ ) 温育。还加入 4  $\mu\text{M}$  Syto 83 (DNA 染料-红色) 的 PBS 溶液,含有 0.5% BSA (BSA/PBS);二者均在室温下温育 4 小时。载玻片用 PBS 洗涤,用 1.5  $\mu\text{m}$  盖玻片覆盖,用于共焦显微镜观察。

[0200] 结果显示,脑型疟疾死亡的小鼠血液中存在 PNAG。用 Dispersin B 或高碘酸盐处理并用 MAb F598 染色的样品呈阴性,而用壳多糖酶处理并用 MAb F598 染色的样品呈阳性 (数据未显示)。

[0201] 使用类似的方法分析感染恶性疟原虫的人血中 PNAG 的表达。用对照 MAb F429 染色的样品和用 Dispersin B 或高碘酸盐处理后用 MAb F598 染色的样品呈阴性 (数据未显示)。用壳多糖酶处理的样品或未处理的样品、随后用 F598 染色则呈阳性 (数据未显示)。F598 的染色图案与红细胞内 DNA 鉴定重叠,表明疟原虫的存在,因为人红细胞不含有细胞核或 DNA (数据未显示)。

[0202] 实施例 6: 肺中的洋葱伯克霍尔德菌 (*B. dolosa*)

[0203] 使用类似于前述实施例中的方法,对来自死于洋葱伯克霍尔德菌肺炎和败血症的囊性纤维化患者的肺组织进行切片,分析 PNAG 表达。使用 TO-PRO-3 染色肺细胞核。用抗洋葱伯克霍尔德菌小鼠血清随后用 AF568 驴抗小鼠 IgG 显影。PNAG 使用针对 9G1cNH<sub>2</sub>-TT PNAG 糖形的兔抗血清、随后用 AF488 山羊抗兔 IgG 显影。阴性对照是正常兔血清用 TO-PRO-3 染色。PNAG 表达与洋葱伯克霍尔德菌细胞染色重叠 (数据未显示)。

[0204] 实施例 7: 眼中的白色念珠菌

[0205] 根据厂商说明书,将石蜡包埋的白色念珠菌感染小鼠眼组织切片用 EzDewax 脱石蜡,室温下将载玻片在水中水合 2 小时,随后用 0.5% BSA/PBS 处理 2 小时。样品进一步用与 AF488 (1:313 稀释的 1.63mg/ml 储存液,最终浓度 5.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 直接缀合的 MAb F429 (阴性对照),或与 AF488 (1:833 稀释的 4.35mg/ml 储存液,最终浓度 5.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 直接缀合的 PNAG 的 MAb F598 在含有 0.5% BSA 的 PBS 中温育过夜,4 $^{\circ}\text{C}$ ,含 4 $\mu\text{M}$  Syto 83。样品用 PBS 洗涤,装配 1.5  $\mu\text{m}$  盖玻片用于共焦分析。

[0206] 结果显示,使用 MAb F598 的核出现共焦染色,MAb F429 则没有,证实了白色念珠菌的体内 PNAG 表达 (数据未显示)。

[0207] 实施例 8: 白色念珠菌角膜炎的小鼠模型中 MAb F598 对微生物 PNAG 的效果。

[0208] 抓破麻醉的雄性 C57B1/6 小鼠角膜 (3X1mm),随后接种约  $10^5$ - $10^7$  CFU/眼的白色念珠菌 SC5314 (5  $\mu\text{l}$  体积),诱导角膜炎。感染后 4 小时通过 IP 注射和/或局部施用 PNAG-特异性 MAb (F598) 或对照人 IgG1MAb (F429),并在感染后 24 和 32 小时再次施用抗体。在感染后 24 和 32 小时检查小鼠,如果在该时间点,对照显示无法康复的角膜损伤,将动物安乐死,测定 CFU/眼。如果在 36 小时对照受损眼损伤不超过 3+,继续感染直至 48 小时,随后安乐死小鼠,由不具备小鼠治疗知识的观察者确定 CFU/眼和角膜病变评分。角膜病变评分如下:

[0209] 评分 4: 角膜穿孔

[0210] 评分 3: 前段覆盖密集不透明物

[0211] 评分 2: 瞳孔覆盖密集不透明物

[0212] 评分 1: 瞳孔部分覆盖弱不透明物

[0213] 评分 0: 与未感染的对侧眼相同。

[0214] 与用对照 MAb F429 处理的小鼠相比,通过 IP 注射和 / 或局部施用 Mab F598 治疗的白色念珠菌感染小鼠眼部细菌水平显著下降,角膜病变下降。这些数据显示于图 1-4。

[0215] PNAG 的抗体在白色念珠菌角膜炎模型中具有治疗效果,表明 PNAG 的体内表达,并可能通过疫苗和 PNAG 的免疫疗法预防或治疗真菌感染。

[0216] 实施例 9 :9G1cNH<sub>2</sub>-TT 缀合疫苗的多克隆抗体对肺炎链球菌引起的致死性肺炎的保护效果

[0217] 肺炎链球菌菌株 D39 在胰蛋白酶解酪蛋白大豆液体培养基 (TSB) 中生长过夜, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>。培养物用 Todd-Hewitt 培养基 +1% 葡萄糖稀释至 OD<sub>650nm</sub> = 0.1, 在 37°C 生长直到 OD = 0.45 (约 2.5 小时)。CBA/N 小鼠在异氟醚麻醉条件下眼眶后 (RO) 注射 37.5 μl 热灭活的正常山羊血清或针对稀释至 50 μl PBS 的抗 9G1cNH<sub>2</sub>-TT 缀合物疫苗的山羊抗血清。小鼠被注射 24 小时后,将细菌制品稀释至 OD<sub>650nm</sub> = 0.45 (对于该试验,将 83 μl 稀释到 917 μl PBS 中,获得 3x10<sup>7</sup>CFU/ml。小鼠用氯胺酮 / 赛拉嗪麻醉 (每只小鼠 250 μl),经鼻滴注 2x 10 μl 剂量的细菌。监测小鼠 7 天。这些结果显示于图 5。

[0218] 此外,在 FVB 小鼠中经鼻感染血清群 9V DSM 11865 菌株 4 小时后给予 mAb F598,发现与抗生素头孢噻肟 (在感染后 1 小时和 4 小时给药) 在降低小鼠肺中细菌载荷方面一样有效。

[0219] 实施例 10 :9G1cNH<sub>2</sub>-TT 缀合疫苗的多克隆抗体对于酿脓链球菌 (A 组链球菌) 引起的致死性皮肤感染的保护效果

[0220] 小鼠为 CD1 (ICR) 6- 周龄雌性小鼠。组 1 (8 只) 对应于注射正常兔血清 (NRS) 的小鼠,组 2 (8 只) 对应注射 9G1cNH<sub>2</sub>-TT 的小鼠。细菌为 A 组链球菌 (GAS) 菌株 950771,处于 10<sup>7</sup>CFU/ml 的对数期。抗体为多克隆兔抗 -9G1cNH<sub>2</sub>-TT,用量为 200 μl / 小鼠 / 剂, NRS 用量为 200 μl / 小鼠 / 剂。

[0221] 在第 0 天,将存储的 GAS 细菌细胞在血琼脂平板 (BAP) 上划线,在 37°C 孵育过夜,接种到 1 试管的含 1% 葡萄糖的 Todd-Hewitt 酵母提取物培养基 (THY+G),在 37°C 静态培养。小鼠在感染前 24 小时 IP 注射。第一天,小鼠在感染前 4 小时二次 IP 免疫。为制备感染接种物,使用 10ml THY+G 和细菌悬液 OD<sub>600nm</sub> = 0.05,置于 37°C 直到 OD<sub>600nm</sub> = 0.15。将其稀释,在 BAP 上铺板测定 CFU:将 10 μl 10<sup>-5</sup>和 10<sup>-6</sup>稀释液平铺在 BAP 上 (每个稀释度 2 块板)。为制备感染接种物,将 10ml THY+G 培养物转移到 15ml 锥形管中,将管在 2000rpm 离心 20 分钟,获得菌细胞团块。弃去上清,将团块悬浮在 1ml THY+G 培养基中后转移至微量离心机中,在 8000rpm 离心 2 分钟。弃去上清,将菌细胞团块混悬于 500 μl 注射用水中,随后转移至 1ml 27 号注射器,放置在冰上。制备 1:4 稀释的 50mg/ml 戊巴比妥和注射用水 [最终浓度 10 μg/ml], IP 注射 (每只 0.3ml 麻醉溶液)。右肋刮毛并用乙醇擦拭,随后每只小鼠皮下注射 0.1ml 细菌悬液 (即 5x10<sup>5</sup>CFU / 小鼠)。为证实实际的接种量,稀释细菌悬液并铺板计数。注射的细菌悬液浓度为 1.7x10<sup>6</sup>CFU/ml,表明每只小鼠注射了 1.7x10<sup>5</sup>CFU。观察小鼠,对垂死小鼠实施安乐死。结果显示于图 6。

[0222] 实施例 11 :针对 9G1cNH<sub>2</sub>-TT 缀合疫苗的兔抗体对于用 B 组脑膜炎奈瑟球菌激发

的 2-3 日龄幼鼠脑膜炎（脑中细菌）的保护作用

[0223] 小鼠为 2-3 日龄的 CD-1 新生小鼠。脑膜炎奈瑟球菌在血琼脂板上生长过夜，将细菌细胞刮入 PBS，调节在 600nm 的 OD 值，给予不同的激发剂量。在感染前 24 小时注射 NRS (50  $\mu$ l IP (NRS 来自 Accurate)) 或兔抗 9G1cNH<sub>2</sub>-TT 缀合疫苗的血清 (50  $\mu$ l IP (兔 4. 2, 血 4-3/4-4))。小鼠在 24 小时后用 50  $\mu$ l 血清群 B 脑膜炎奈瑟球菌菌株 B16B6 按如下稀释度 IP 激发： $5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^6$  或  $5 \times 10^8$ 。24 小时后杀死小鼠，取脑，匀浆并平铺在巧克力琼脂平板上进行细菌计数，结果如图 7 中所示。

[0224] 实施例 12：施用全长人 IgG1MAb F598 对易感传染性结肠炎的小鼠的保护效果

[0225] TRUC 小鼠缺乏后天和先天免疫系统 (Garrett 等人, Cell 2007131(1):33-45; Garrett 等, Cell Host Microbe, 20108(3):292-300)。这些小鼠在 8 周龄的时候会自发出现传染性结肠炎。新生的 TRUC 小鼠在其出生第一周时便 IP 给予 50  $\mu$ g MAb F598 或 PBS 或 MAb F598 或对照的人 IgG1MAb，每周三次，直到第 8 周处死。取出小鼠肠道，根据文献处理评价结肠炎 (Garrett 等, Cell 2007131(1):33-45; Garrett 等, Cell Host Microbe, 20108(3):292-300)。比较施用 MAb F598 或对照 IgG1MAb 的小鼠组的总体的结肠炎病理学评分，结果示于图 8 和 9。

[0226] 在其他实验中，第 7 天开始的每周 mAb F598 给药显著的减少了在 8 周龄时总体的组织病理学损伤（由一名病理学家盲法测定）。

[0227] 当 WT 新生儿由 TRUC 母鼠交叉喂养时，其在 8 周形成自发的结肠炎，但程度较 TRUC 后代为轻。为评价 mAb F598 对于未受免疫系统功能损伤的 WT 小鼠结肠炎的治疗效果，由 TRUC 母鼠喂养的 WT 小鼠在 4 周龄时开始治疗，每两周注射 mAb F598 或对照的人 IgG1MAb F105，在 8 周时测定结肠病理学。与对照组相比，mAb F598 显著减少了接受治疗的小鼠的总体病理学评分，单核细胞浸润和反应性增生显著下降，但损伤方面并不显著，因为大多数对照的损伤评分为 0（数据未显示）。

[0228] 实施例 13：兔抗 9G1cNH<sub>2</sub>-TT 缀合疫苗的抗体对单核细胞增生利斯特菌菌株 10403S 的保护效果

[0229] 2-3 日龄新生 CD1 小鼠进行 IP 免疫 24 小时后给予 50  $\mu$ l NRS (n = 15) 或兔抗 9G1cNH<sub>2</sub>-TT 缀合疫苗免疫血清 (n = 15)。小鼠通过 IP 用单核细胞增生利斯特菌激发 ( $10^8$  CFU, 50  $\mu$ l)。在 24 小时内监测生存情况，通过卡方和 Yates 校正分析总体生存率，P. 001。结果示于图 10。

[0230] 疟疾的有效疫苗可能需要多种疟原虫抗原，但作为确定 PNAG 是否为多价疫苗的候选疫苗抗原成分的第一步，感染 PNAG 阳性的伯氏疟原虫 ANKA 的 C57BL/6 小鼠用 200  $\mu$ l PNAG 的多克隆抗体或对照生理血清进行 IP 注射治疗，每 3 天注射一次，从感染当天开始，直到感染后 20 天。PNAG 的抗体显著延长了所治疗小鼠的存活期，预防了脑型疟疾的发展。在第 9 天，用正常血清治疗的 8 只小鼠有 5 只死亡，为低水平寄生虫血症，剩余 3 只，在第 30 天死亡，为高水平寄生虫血症。对于用 PNAG 抗体治疗 3 周的小鼠，仅有 1 只，在第 7 天死于脑型疟疾，4 只发生寄生虫血症水平升高并在第 33 天死亡，该日期是最后一次注射抗体后 13 天。1 只直到第 22 天未检测到寄生虫血症，并在第 40 天死亡（末次注射抗体后 20 天）。2 只小鼠几乎未检测到寄生虫血症，在 45 天的试验周期内保持存活。根据最初计划，抗体治疗在 20 天停止。如果进一步增加抗体治疗时间，可能会观察到延长的存活周期。

[0231] 实施例 14 :PNAG 抗体介导了对多种表达 PNAG 的病原体的调理素或杀菌活性

[0232] 肺炎链球菌和粪肠球菌调理素杀菌方案类似于 Skurnik 等人公开的金黄色葡萄球菌方案 (J Clin Invest. 2010, 120(9):3220-33), 除了使用 HL60 细胞替代新鲜人 PMN 作为吞噬细胞来源。HL60 细胞用 0.8% DMF 分化 6 天, 调节至  $1.3 \times 10^6$ /ml。细菌在 37°C 生长过夜 (不振荡)。将肺炎链球菌置于 5% CO<sub>2</sub>, THY+1% 葡萄糖 (THY+G) 中。粪肠球菌在大气条件下生长。试验结束时将细菌菌株铺板在 TSB+ 血琼脂上。补体被目标菌株金黄色葡萄球菌 MN8 吸收, 其在 CSB 中振荡生长过夜。C': Invitrogen 目录号 31203/S 批次号 510908698270 补体血清, 金黄色葡萄球菌 MN8 细胞吸收。兔抗体针对以下两种抗原之一:

[0233] 1. 与破伤风毒素缀合的脱乙酰化 PNAG (dPNAG) (dPNAG-TT): Maira-Litran 等人 Infect Immun. 2005, 73(10):6752-62. 勘误表: Infect Immun. 2005, 73(11):7789; 和

[0234] 2. 与 TT 缀合的合成 9GlcNH<sub>2</sub> 寡糖: Gening 等人, Infect Immun. 2010, 78(2):764-72。

[0235] PNAG 的人 MAb MAb F598 也进行了试验 (Kelly-Quintos 等人, Infect Immun. 2006, 74(5):2742-50)。

[0236] 结果示于图 11-13。

[0237] A 组链球菌调理素杀伤方案如下: 使用 A 组链球菌 (GAS) 菌株 771、188, 使用的 MAb 批号: F598AP1-01 [19mg/ml], 新解冻 x1。MAb F598 的对照: 铜绿假单胞菌藻酸盐的 MAb F429 [1.0mg/ml]。金黄色葡萄球菌 MN8 菌株来自冷冻的储备库, 37°C 接种到含 10ml THB+G 的 50ml 锥形瓶中, 松盖振荡。GAS 771 和 188 在 ON 板的 THY+G 中生长, 37°C OD<sub>650</sub> = 0.05 时接种, 静置培养。金黄色葡萄球菌 MN8Dica 来自冷冻的储备库, 37°C 接种到含 10ml THB+G 的 CSB 溶液的 50ml 锥形瓶中, 松盖振荡。试验结束时, GAS 菌株铺板在含血的 TSA 上。补体被目标金黄色葡萄球菌 MN8  $\Delta$  ica 或 GAS 771 细菌吸收, 其分别在 THB+G 振荡或 THY+G 静态生长过夜。缓冲液: HBSS+0.1% 明胶。C': 补体血清, 来自 Invitrogen 目录号 31203/S 批号 510908698270, 由金黄色葡萄球菌 MN8Dica 或 GAS 771 或 188 吸收。

[0238] 结果示于图 14。

[0239] 白色念珠菌调理素杀伤方案如下: 白色念珠菌在 YPD 培养基 (酵母提取物 / 蛋白胨 / 葡萄糖) 上生长至 OD 1.0, 随后离心沉淀, 再悬浮于 MEM+1% BSA, OD 调节至 0.4 (650nm), 悬液随后 1:10 稀释。MAb F429 从杂交瘤上清用蛋白质 A 纯化, 随后用 pH 6.5 PBS 透析, 储存在 -20°C。缓冲液: MEM+1% BSA。C': 来自兔的补体血清, Sigma 批号 106K6029, 目录号 S7764。补体由白色念珠菌细胞吸收。吞噬细胞从 TRIMA 颈捐献者处获得。

[0240] 结果示于图 15。

[0241] 脑膜炎奈瑟球菌和淋病奈瑟球菌的杀菌方案如下: 正常兔血清 (NRS 取自 -20°C 库, Accurate Chemical, 批号 2008) 和兔抗 9GlcNH<sub>2</sub>-TT 缀合疫苗抗体储存在 -20°C, 使用来自兔 4.3 和 4.4 的血清。血清在 4°C 平衡, 保存在 4°C 直到试验。将脑膜炎奈瑟球菌和淋病奈瑟球菌在 5% CO<sub>2</sub>、巧克力琼脂上生长 24-48 小时, 将细菌混悬在含有 0.5% 葡萄糖、9mM CaCl<sub>2</sub> 和 4.9mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 和 1% (w/v) 牛血清白蛋白的 PBS 中 (Lifeblood Medical, Freehold, NJ) = PBS++, pH 7.4。将细菌混悬液从由巧克力琼脂悬液制备的 OD<sub>650nm</sub> 悬液在 PBS++ 中稀释至  $1.5-2 \times 10^4$  CFU/ml。试验包括将 80  $\mu$ l 血清稀释液和 20  $\mu$ l

奈瑟菌细胞混合,随后将混合物在 37°C 温育 1 小时。将试管置于 37°C,轻微振荡(可能的话采用轨道)。在 Muller-Hinton 培养基中制备 10 μl 1:2 和 10<sup>-1</sup> 的稀释液,随后在巧克力琼脂上铺板。将培养物在 5% CO<sub>2</sub> 和 37°C 温育过夜。第二天计数菌落。结果示于图 16 和 17。

[0242] 在具有或不具有特异性抗原抑制的兔抗 9G1cNH<sub>2</sub>-TT 血清存在下对脑膜炎奈瑟球菌和淋病奈瑟球菌的杀菌试验如下进行:

[0243] 缓冲液:缓冲液 -PBS 含有 0.5% 葡萄糖,9mM CaCl<sub>2</sub> 和 4.9mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 和 1% (w/v) 牛血清白蛋白 (Lifeblood Medical, Freehold, NJ) = PBS++, pH 7.4。

[0244] 使用的菌株和制剂:将菌株再悬浮于含有 0.5% 葡萄糖、9mM CaCl<sub>2</sub> 和 4.9mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 和 1% (w/v) 牛血清白蛋白的 PBS (Lifeblood Medical, Freehold, NJ) = PBS++, pH 7.4。将细菌混悬液从由巧克力琼脂悬液制备的 OD<sub>650</sub>nm 悬液在 PBS++ 中稀释至 1.5-2X 10<sup>4</sup>CFU/ml。

[0245] 抑制抗原:溶解至 PBS++ 中,最终浓度为 200ug/ml。

[0246] 使用的 PNAG 抗原:批号 27。使用来自菌株 2192, Pk 3 (运行 1) 的藻酸盐抗原。

[0247] 使用的抗血清:正常兔血清 (NRS 取自 -20° 库, Accurate Chemical)。兔抗 9G1cNH<sub>2</sub>-TT 缀合疫苗的抗体存储在 -20°C, 使用来自兔 4.3 和 4.4 的血清。

[0248] 试验:混合 40 μl 血清源 (根据直接杀菌试验中需要获得 >80-90% 杀伤的最高稀释度进行稀释,除非在 1:2 血清稀释时最大杀伤下降,此时使用 1:2 最终稀释度的血清)、40 μl 抗原和 20 μl 奈瑟菌细胞 (不含抗原的试管加入 80 μl 适当稀释的抗血清)。将试管置于 37°C, 轻微振荡 (可能的话采用轨道)。将培养物在巧克力琼脂上铺板, 5% CO<sub>2</sub> 和 37°C 温育过夜。第二天计数菌落。

[0249] 结果示于图 18 和 19。

#### [0250] 等同方案

[0251] 认为前述说明足以使本领域技术人员实施本发明。此处提供的具体实施例并不是限制本发明范围,因为实施例仅用于说明本发明的一个方面的单个例证,其他功能等同的实施方案也包括在本发明的范围之内。对于本领域技术人员而言,除了此处描述和显示的内容以外,根据前文描述进行多种对本发明的修饰显而易见,且都落入所附权利要求的范围内。本发明的优点和对象不是必须被本发明的每一实施方案所涵盖。

[0252] 除非另外说明,在本申请中引用的所有参考文献、专利以及专利出版物均在此处完整引入作为参考。



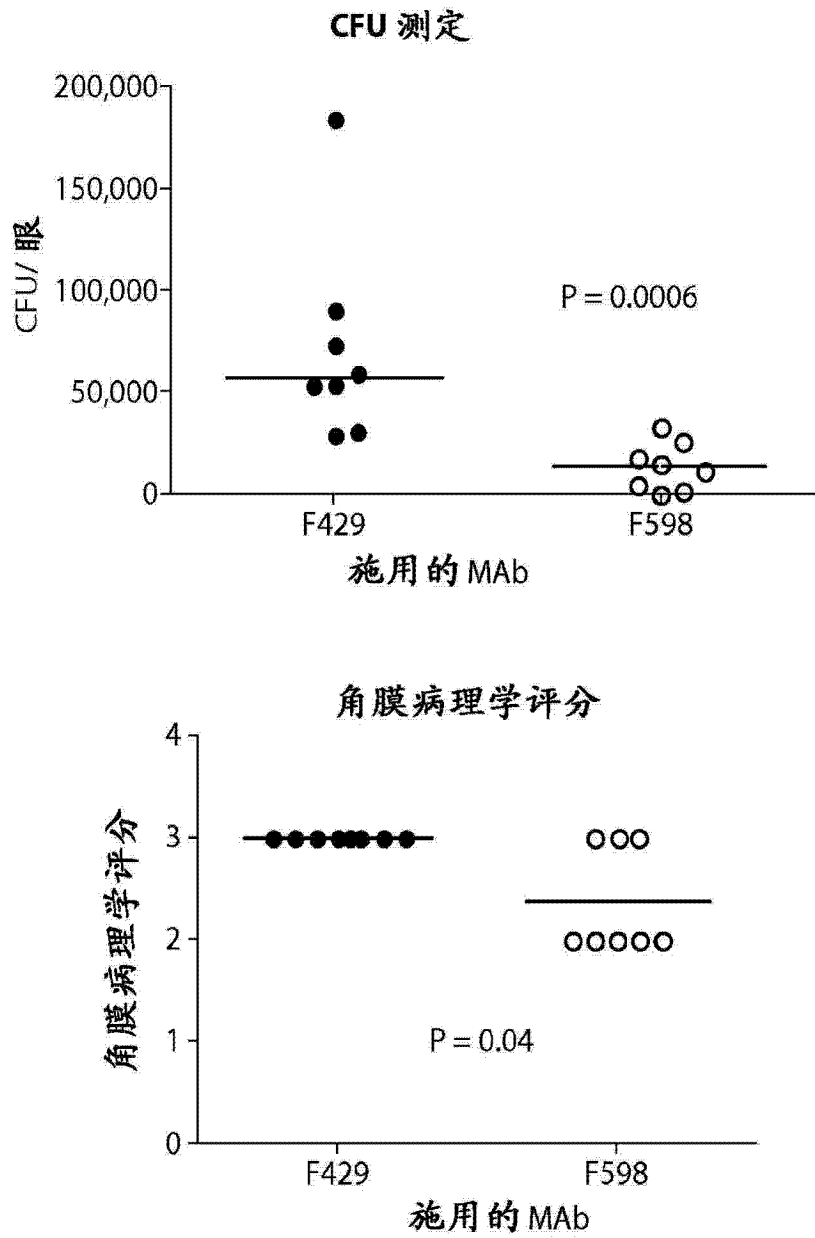


图 2

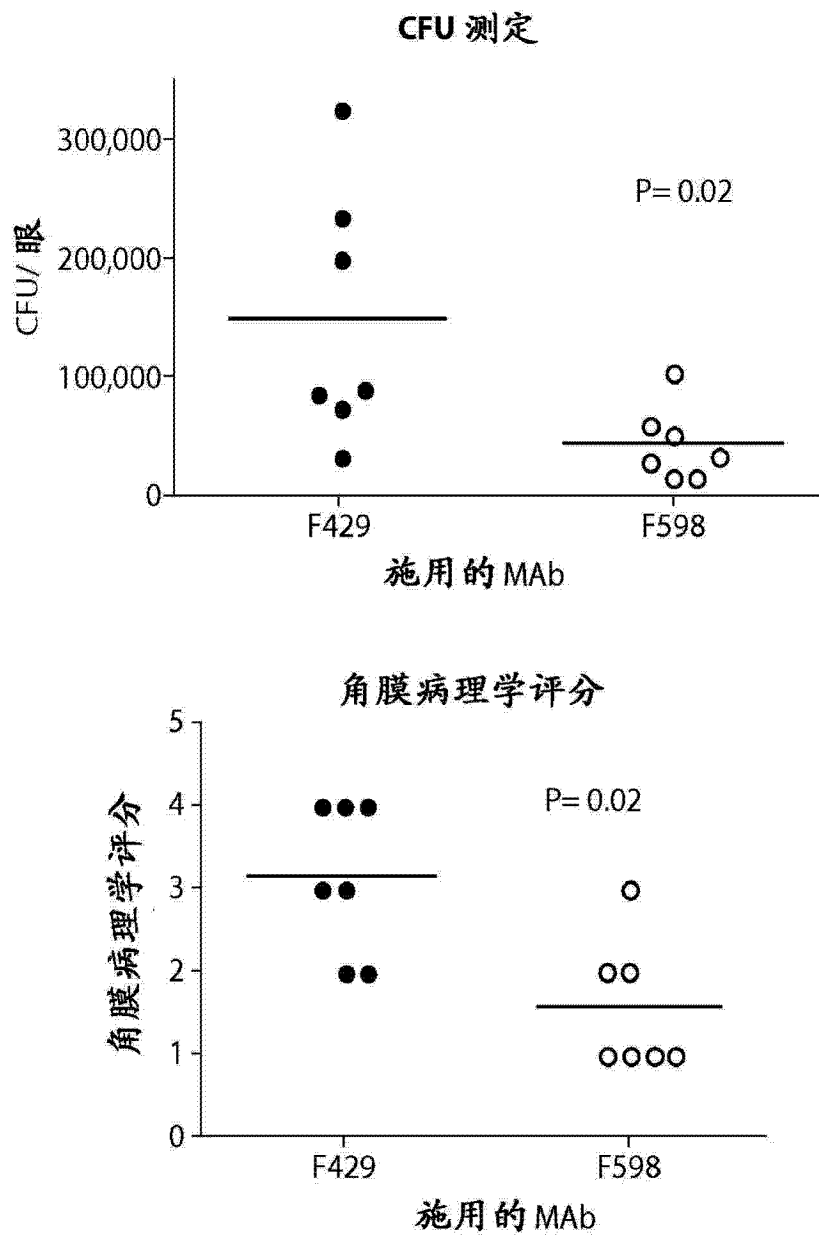


图 3

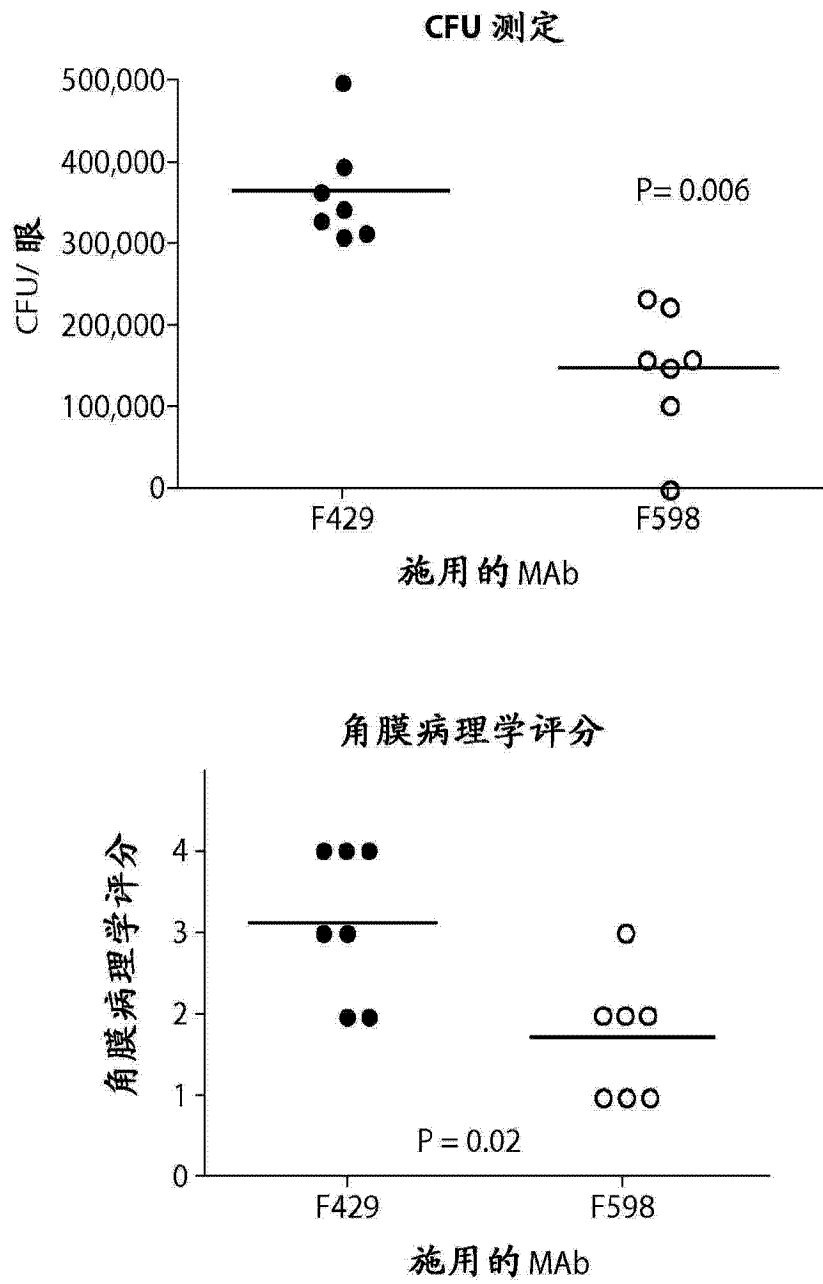


图 4

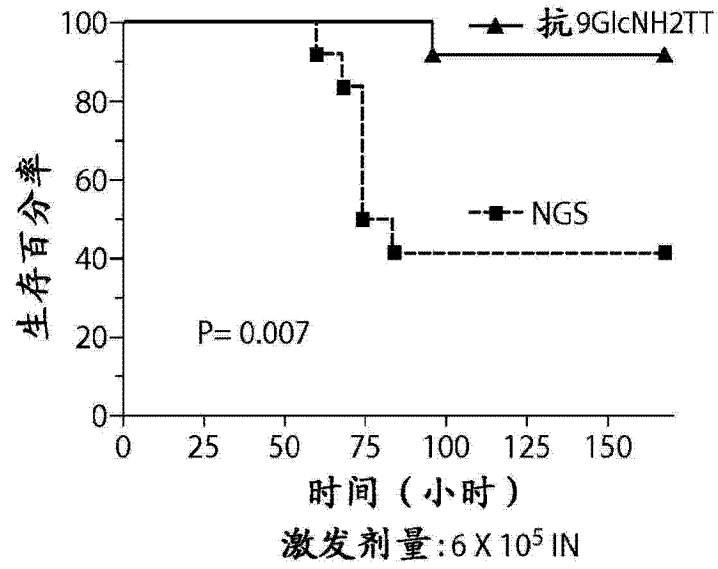


图 5

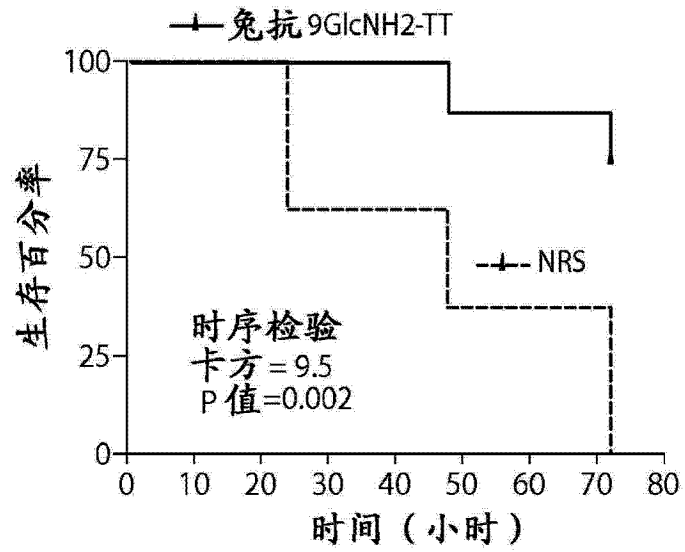


图 6

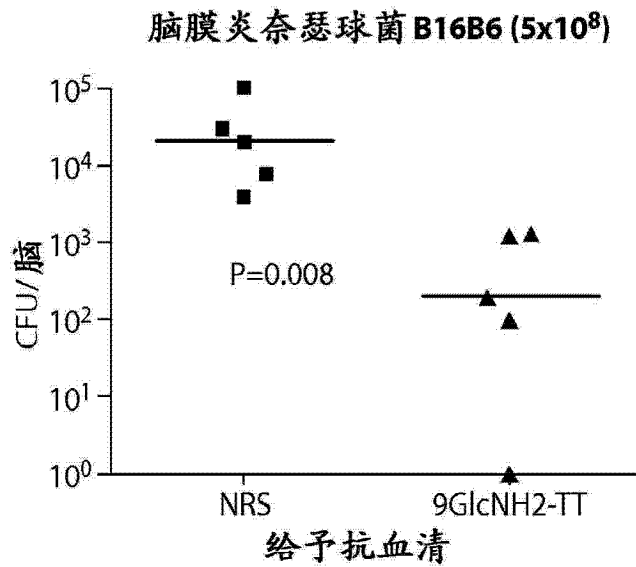
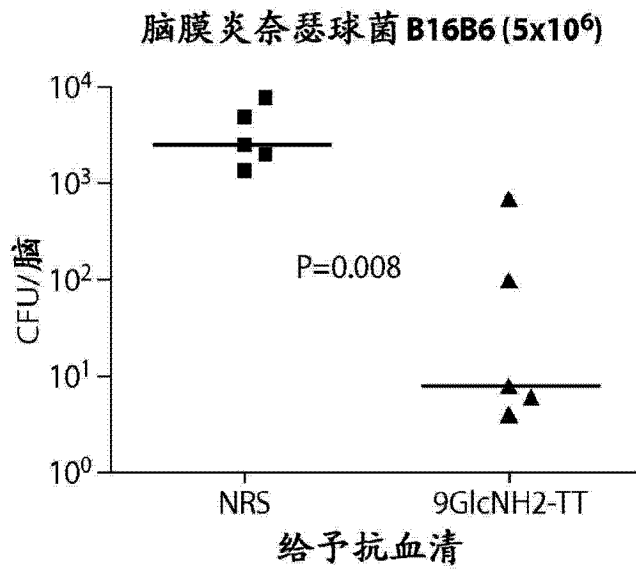
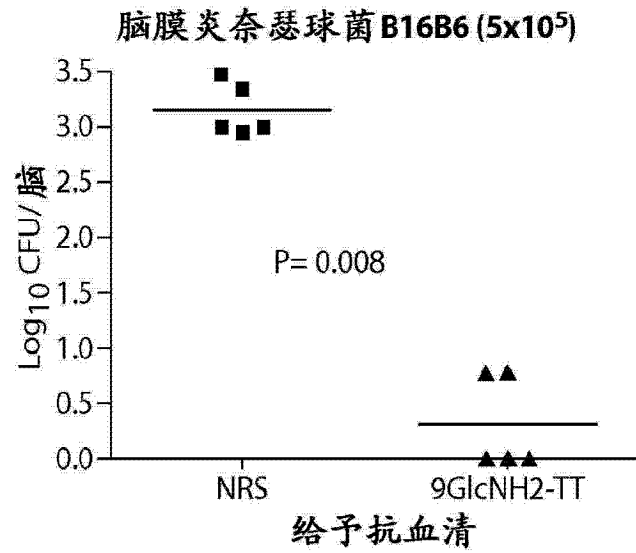


图 7

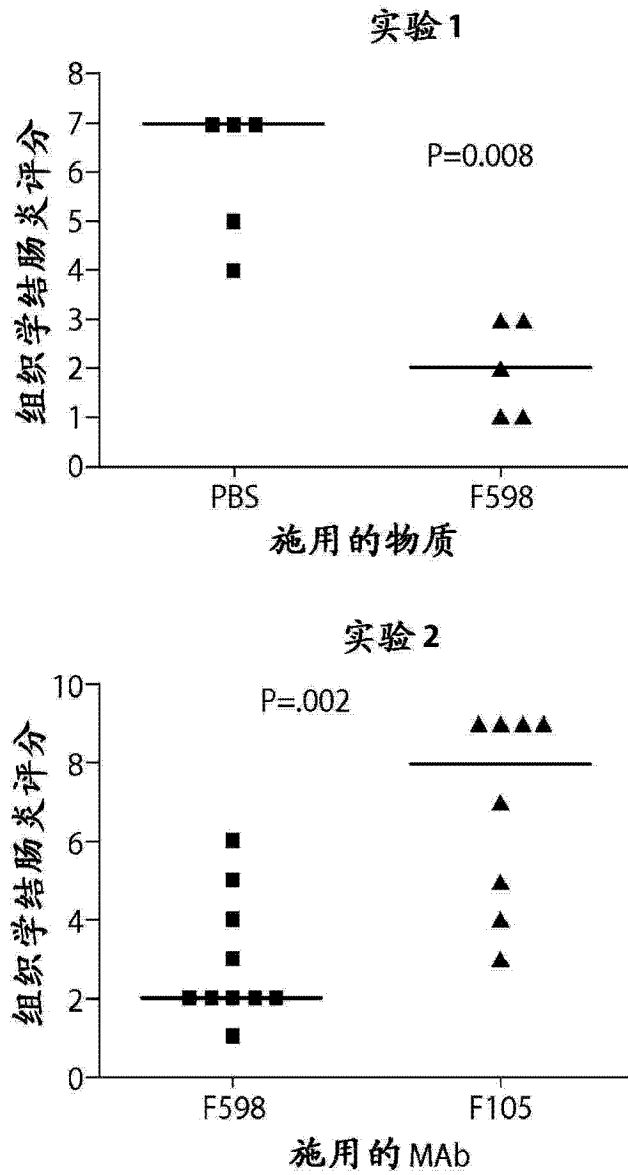
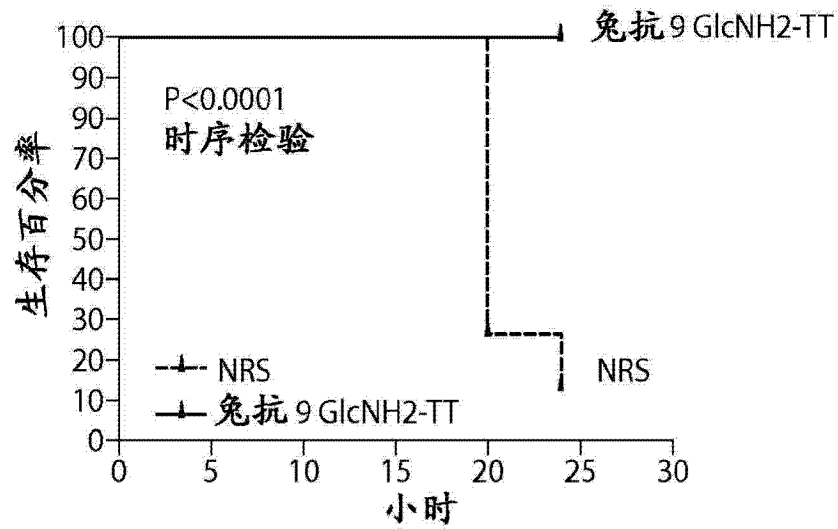


图 8





2-3 日龄的新生 CD-1 小鼠通过 IP 免疫 24 小时，随后用 50  $\mu$ l NRS (n=15) 或针对 9GlcNH<sub>2</sub>-TT 缀合疫苗的兔免疫血清 (n=15) 激发，用单核细胞增生利斯特菌 IP 激发，监测生存 24 小时，总体生存百分率用卡分析，Yates 校正， $P < 0.001$

图 10

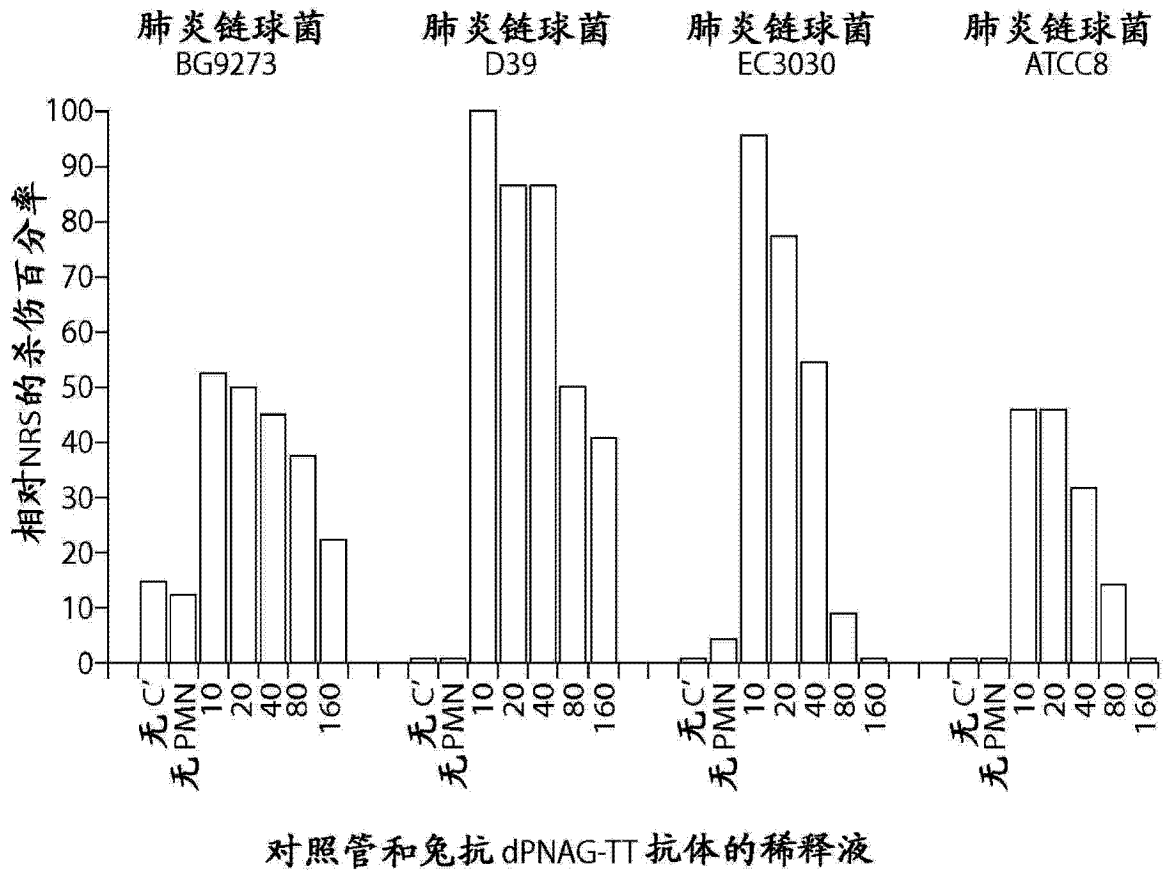


图 11

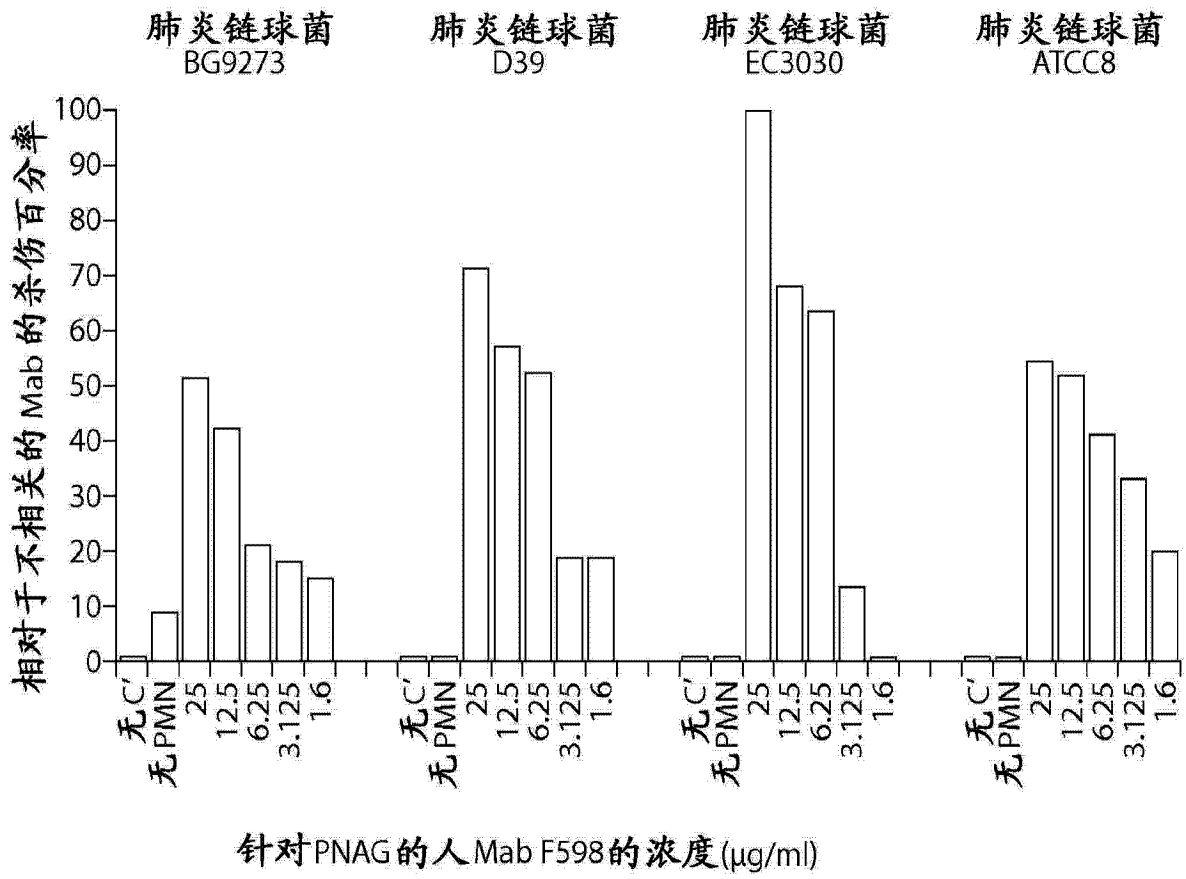


图 12

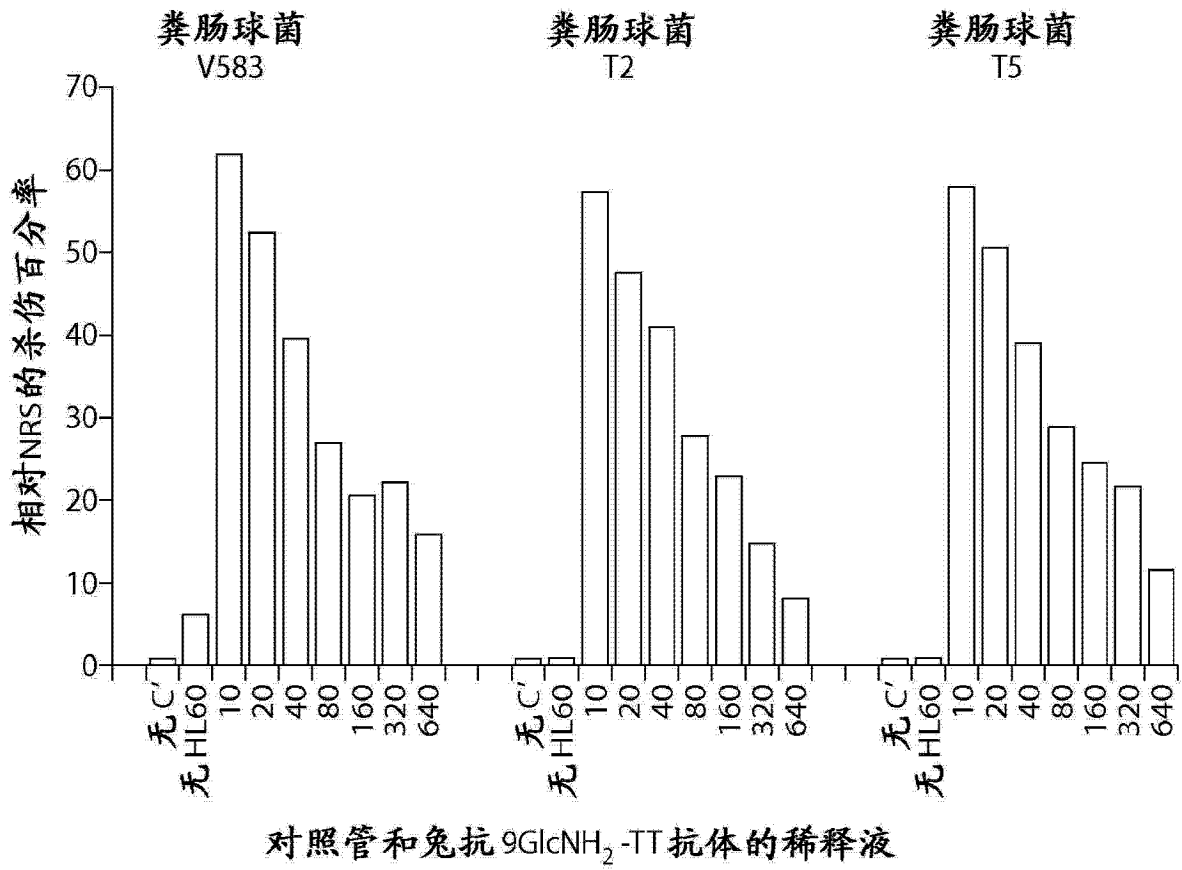


图 13

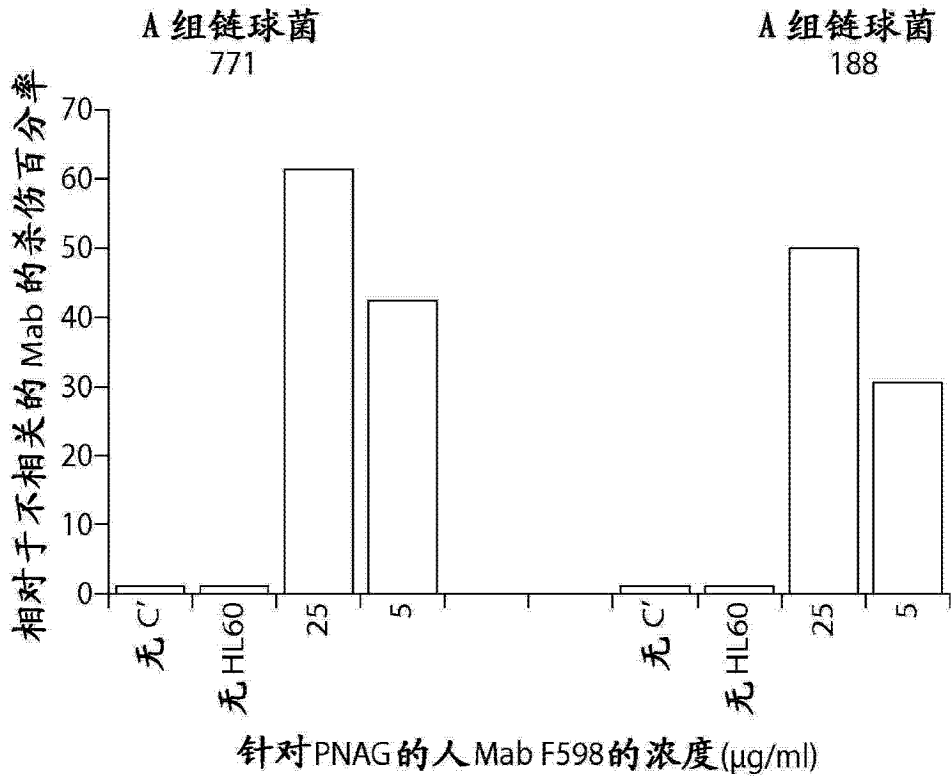


图 14

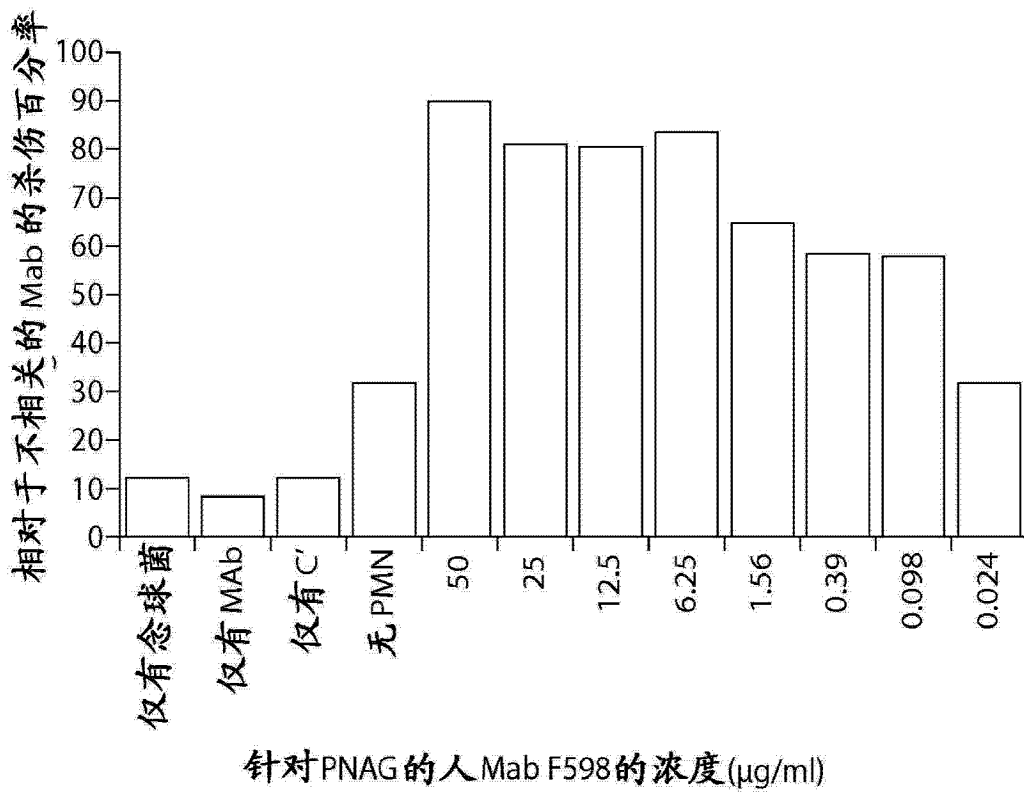


图 15

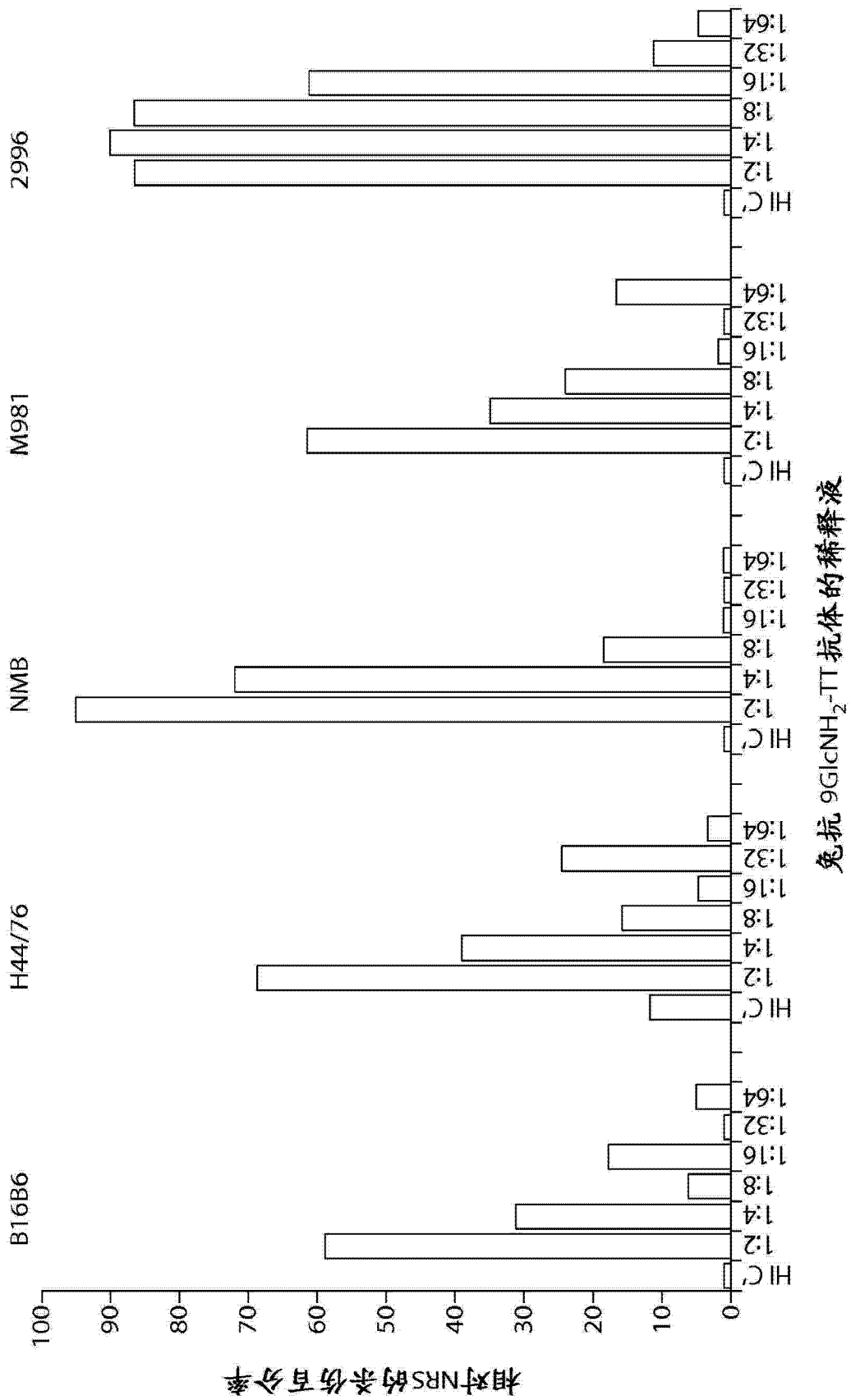


图 16

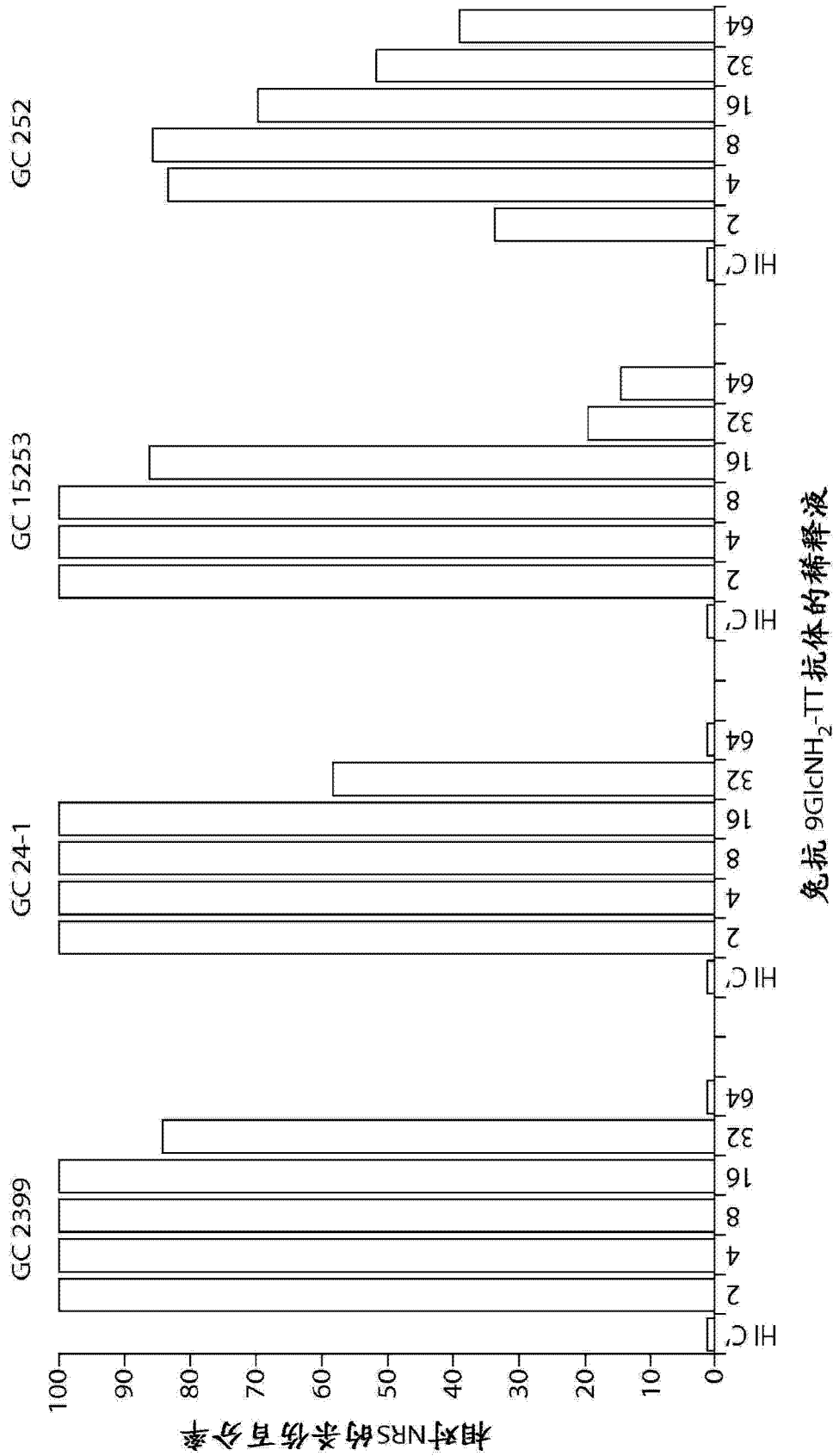


图 17



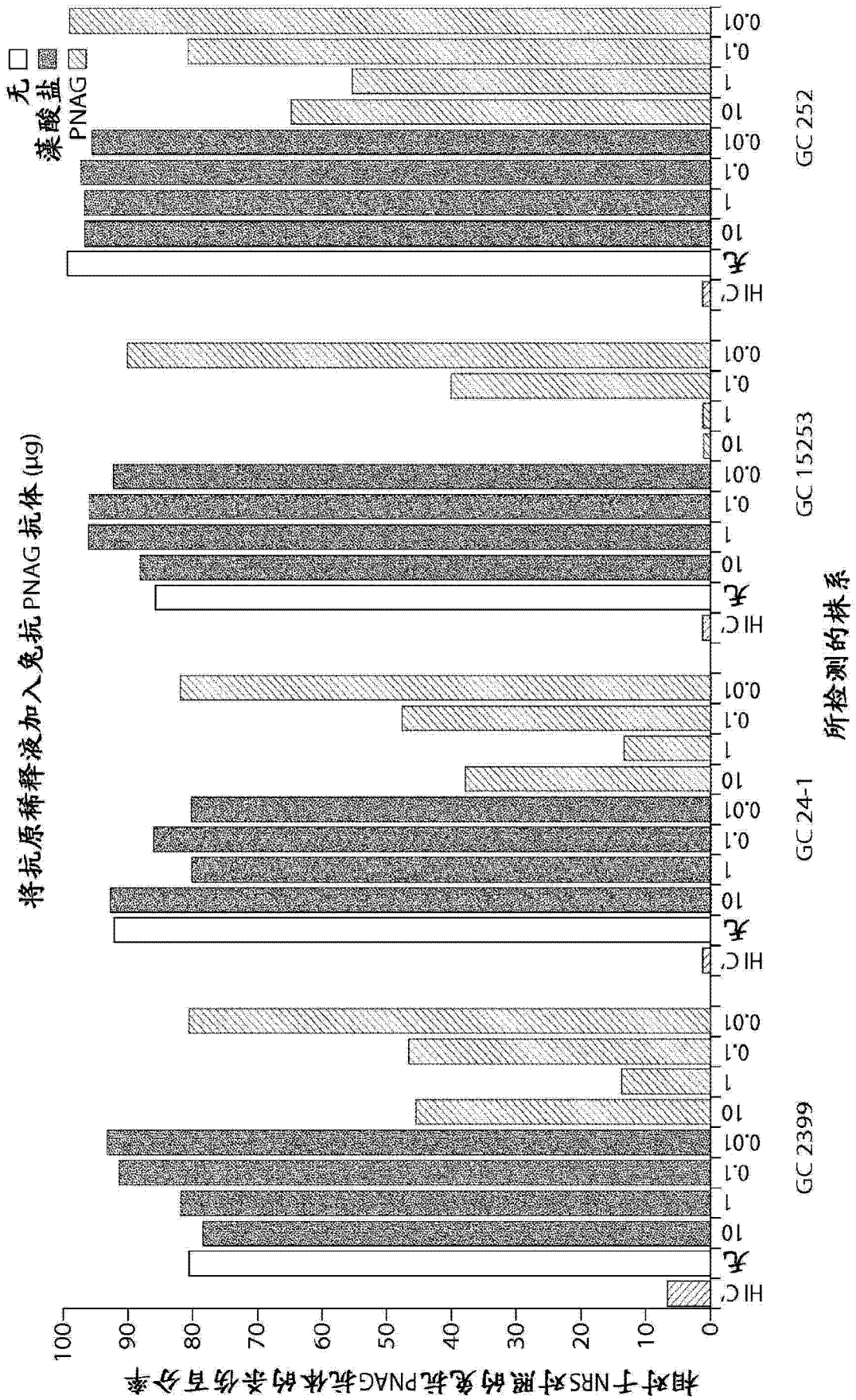


图 19

专利名称(译)	多糖组合物及使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104602696A</a>	公开(公告)日	2015-05-06
申请号	CN201380040356.1	申请日	2013-05-30
[标]申请(专利权)人(译)	布赖汉姆妇女医院		
申请(专利权)人(译)	布赖汉姆妇女医院		
当前申请(专利权)人(译)	布赖汉姆妇女医院		
[标]发明人	GB皮埃尔 C塞维斯 本特利 D斯库尔尼克		
发明人	G·B·皮埃尔 C·塞维斯-本特利 D·斯库尔尼克		
IPC分类号	A61K31/715 A61P31/04 A61P31/10 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K31/715 A61K39/085 A61K47/6415 A61K47/646 A61K2039/505 A61K2039/6031 A61P31/04 A61P31/10 A61P33/00 A61P33/02 A61P33/06 A61P37/04 C07K16/12 C07K16/14 C07K16/20 C07K2317/21 C08B37/0006 G01N33/569 G01N2400/00 A61K39/0002 A61K39/002 A61K39/015 A61K39/0208 A61K39/025 A61K39/04 A61K39/07 A61K39/08 A61K39/092 A61K39/095 A61K39/107 A61K39/385 A61K2039/572 C07K2317/14 C07K2317/31 G01N33/56938 G01N2469/10		
代理人(译)	胡晨曦		
优先权	61/653389 2012-05-30 US 61/827661 2013-05-26 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明部分地涉及聚N-乙酰化葡糖胺(PNAG)的组合物和PNAG特异性抗体在预防和治疗由某些PNAG阳性的病原体导致的感染中的用途，以及在检测(包括诊断)方法中的用途。

