



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105085349 B

(45)授权公告日 2018.02.09

(21)申请号 201510412419.2

C07K 16/12(2006.01)

(22)申请日 2009.07.21

C08B 37/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61K 47/62(2017.01)

申请公布号 CN 105085349 A

A61K 39/385(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

(43)申请公布日 2015.11.25

(30)优先权数据

61/135,493 2008.07.21 US

61/208,155 2009.02.20 US

(62)分案原申请数据

200980136515.1 2009.07.21

(73)专利权人 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 N·尼凡蒂埃夫

Y·茨韦特科夫 M·格宁

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 杨春刚 黄革生

(51)Int.Cl.

C07C 327/32(2006.01)

C07D 207/46(2006.01)

C07H 15/04(2006.01)

C07H 1/00(2006.01)

(56)对比文件

CA 2475736 A1,2006.01.23,

US 2004005632 A1,2004.01.08,

Sandra Jacques等.Chemoenzymatic synthesis of GM3 and GM2 gangliosides containing a truncated ceramide functionalized for glycoconjugate synthesis and solid phase applications.《Organic & Biomolecular Chemistry》.2005,第4卷第142-154页.

Andreas Sundgren 等.Varied presentation of the Thomsen-Friedenreich disaccharide tumor-associated carbohydrate antigen on gold nanoparticles.《Carbohydrate Research》.2008,第1594-1604页.

审查员 林子婷

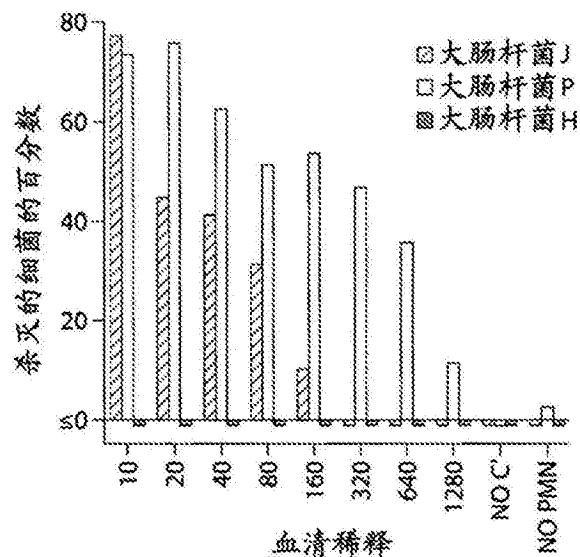
权利要求书3页 说明书32页 附图21页

(54)发明名称

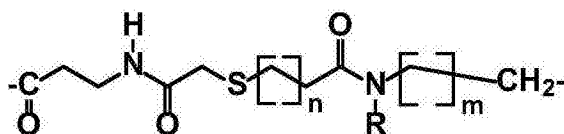
与合成的 β -1,6 葡糖胺寡糖相关的方法和组合物

(57)摘要

本发明涉及与合成的 β -1,6葡糖胺寡糖相关的方法和组合物,尤其涉及与载体缀合的合成的寡- β -(1 $\rightarrow$ 6)-2-氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷的组合物,以及其制备方法和用途。



1. 包含寡糖-载体缀合物的组合物,其中所述的缀合物包含通过连接体与载体缀合的寡糖,所述的连接体为



式 VIIIa

其中

n大于1;

m是选自1至10的数字;

R是H;

其中CH₂-与寡糖O-连接并且-C=O-与载体N-连接,

所述的载体是破伤风类毒素,且

所述的寡糖是β-1-6连接的葡糖胺。

2. 权利要求1的组合物,其中所述的寡糖-载体缀合物具有1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1或100:1的寡糖与载体的比例。

3. 权利要求1的组合物,其中所述的寡糖-载体缀合物具有至少20:1的寡糖与载体的比例。

4. 权利要求2的组合物,其中所述寡糖为2-20个单体长。

5. 权利要求3的组合物,其中所述寡糖为2-20个单体长。

6. 权利要求2的组合物,其中所述寡糖为5个单体长。

7. 权利要求3的组合物,其中所述寡糖为5个单体长。

8. 权利要求6的组合物,其中所述的寡糖是0-40%乙酰化的。

9. 权利要求7的组合物,其中所述的寡糖是0-40%乙酰化的。

10. 权利要求6的组合物,其中所述的寡糖是0%乙酰化的。

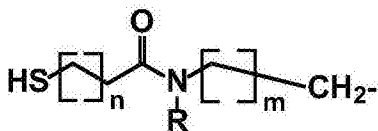
11. 权利要求7的组合物,其中所述的寡糖是0%乙酰化的。

12. 权利要求11的组合物,其还包含可药用载体。

13. 权利要求11的组合物,其还包含佐剂。

14. 权利要求11的组合物,其还包含抗菌剂。

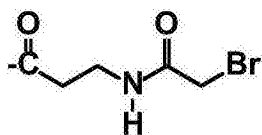
15. 合成寡糖-载体缀合物的方法,该方法包括使与式IXa的连接体缀合的寡糖



式 IXa

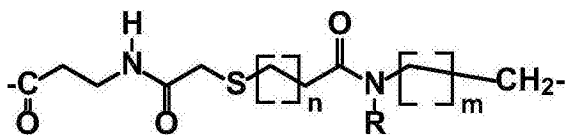
其中n大于1;m是选自1至10的数字;且R是H;

与载体反应,所述载体具有与式X化合物反应后而修饰的氨基



式 X

得到通过具有式VIIIa的结构连接体与载体缀合的寡糖



式 VIIIa

其中 n 大于1; m 选自1至10的数字; R 是H;所述的寡糖是 β -1-6连接的葡糖胺,且所述的载体是破伤风类毒素,

其中 $-CH_2-$ 与寡糖O-连接并且 $-C=O-$ 与载体N-连接。

16. 权利要求15的方法,其中所述的寡糖-载体缀合物具有1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1或100:1的寡糖与载体的比例。

17. 权利要求15的方法,其中所述的寡糖-载体缀合物具有至少20:1的寡糖与载体的比例。

18. 权利要求16的方法,其中所述寡糖为2-20个单体长。

19. 权利要求17的方法,其中所述寡糖为2-20个单体长。

20. 权利要求16的方法,其中所述寡糖为5个单体长。

21. 权利要求17的方法,其中所述寡糖为5个单体长。

22. 权利要求20的方法,其中所述的寡糖是0-40%乙酰化的。

23. 权利要求21的方法,其中所述的寡糖是0-40%乙酰化的。

24. 权利要求20的方法,其中所述的寡糖是0%乙酰化的。

25. 权利要求21的方法,其中所述的寡糖是0%乙酰化的。

26. 权利要求1-14任一项权利要求的寡糖-载体缀合物或通过权利要求15-25任一项的方法合成的寡糖-载体缀合物在制备用于在受试者中治疗或预防由制造PNAG的感染性或病原性微生物所引起的感染的药物中的用途。

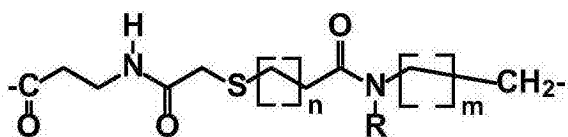
27. 权利要求26的用途,其中所述的感染性或病原性微生物是细菌种类。

28. 权利要求26的用途,其中所述的寡糖-载体缀合物与佐剂一起使用。

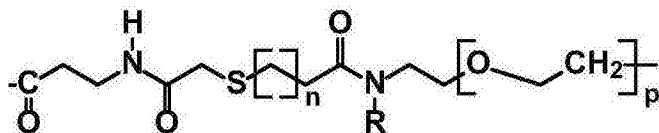
29. 权利要求26或28的用途,其中所述的受试者是人。

30. 权利要求26或28的用途,其中所述的受试者是兔。

31. 寡糖-载体缀合物在制备用于在受试者中治疗或预防由制造PNAG的感染性或病原性微生物所引起的感染的药物中的用途,其中所述的寡糖-载体缀合物包含通过连接体与载体缀合的寡糖,所述的连接体为



式 VIIIa 或



式 VIIIb

其中：

n大于1；

m是选自1至10的数字；

p是选自1至20的数字；

R是H或烷基；

其中CH₂-与寡糖O-连接并且-C=O-与载体N-连接；

所述的载体选自蛋白质和肽；且

所述的寡糖是β-1-6连接的葡糖胺。

32. 权利要求31的用途，其中所述的感染性或病原性微生物是细菌种类。

33. 权利要求31的用途，其中载体是肽。

34. 权利要求31的用途，其中载体是蛋白质。

35. 权利要求31的用途，其中载体是破伤风类毒素。

36. 权利要求31的用途，其中所述的寡糖-载体缀合物具有1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1或100:1的寡糖与载体的比例。

37. 权利要求31的用途，其中所述寡糖为2-20个单体长。

38. 权利要求31的用途，其中所述寡糖为5-11个单体长。

39. 权利要求31的用途，其中所述寡糖为5、7、9或11个单体长。

40. 权利要求31的用途，其中所述的寡糖是0-40%乙酰化的。

41. 权利要求31-40中任意一项的用途，其中所述的寡糖-载体缀合物与佐剂一起使用。

42. 权利要求31-40中任意一项的用途，其中所述的受试者是人。

43. 权利要求31-40中任意一项的用途，其中所述的受试者是兔。

与合成的 β -1,6 葡糖胺寡糖相关的方法和组合物

[0001] 本申请为2009年7月21日提交的、发明名称为“与合成的 β -1,6葡糖胺寡糖相关的方法和组合物”的PCT申请PCT/US2009/004206的分案申请,所述PCT申请进入中国国家阶段的日期为2011年3月18日,申请号为200980136515.1。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求分别于2008年7月21日和2009年2月20日提交的美国临时申请61/135493和61/208155的优先权,两者的全部内容均在此引入作为参考。

[0004] 政府支持

[0005] 本发明得到了美国国立卫生研究所R01AI046706的部分支持。美国政府在本发明中拥有权利。

发明领域

[0006] 本发明涉及与合成的寡- β -(1 $\rightarrow$ 6)-2-氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷相关的组合物和方法,其中所述的寡- β -(1 $\rightarrow$ 6)-2-氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷在本文中为寡- β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-葡糖胺或寡葡糖胺互换使用。

[0007] 发明背景

[0008] 葡萄球菌(Staphylococci)是正常栖息并寄居在人类皮肤与粘膜上的革兰氏阳性细菌。如果在手术或其它创伤过程中皮肤或粘膜受损,葡萄球菌就有机会进入内部组织,引起感染发生。如果葡萄球菌局部增殖或者进入淋巴或血液系统,可能造成严重感染并发症,例如与葡萄球菌型菌血症有关的并发症。这些并发症包括感染性休克、心内膜炎、关节炎、骨髓炎、肺炎以及各种器官的脓肿。

[0009] 葡萄球菌包括产生游离凝固酶的凝固酶阳性有机体和不产生游离凝固酶的凝固酶阴性有机体。金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)是最常见的凝固酶阳性葡萄球菌。金黄色葡萄球菌通常造成局部感染,或者是血管外部位或者是血管内部位,最终都可能导致菌血症。金黄色葡萄球菌还是急性骨髓炎的主要原因,并导致葡萄球菌性肺炎感染。此外,金黄色葡萄球菌是造成大约1-9%细菌性脑膜炎病例和10-15%脑脓肿的原因。

[0010] 凝固酶阴性葡萄球菌已有至少31个已知的种类,其包括表皮葡萄球菌(S.epidermidis)、腐生性葡萄球菌(S.saprophyticus)、人葡萄球菌(S.hominis)、沃氏葡萄球菌(S.warneri)、溶血性葡萄球菌(S.haemolyticus)、腐生葡萄球菌(S.saprophyticus)、科氏葡萄球菌(S.cohnii)、木糖葡萄球菌(S.xylosus)、模仿葡萄球菌(S.simulans)和头葡萄球菌(S.capitis)。表皮葡萄球菌是与静脉内进入装置有关的最经常的致感染物,也是原发性医院菌血症最常见的分离物。表皮葡萄球菌还与人工瓣膜心内膜炎有关。

[0011] 葡萄球菌还是动物细菌感染的通常来源。例如,葡萄球菌性乳腺炎是反刍动物例如牛、绵羊和山羊的常见问题。此疾病通常使用抗生素治疗以减少感染,但是此治疗过程花费昂贵,并且仍会造成乳液产量的损失。迄今为止所鉴定的最有效的疫苗是皮下给药的活的完整金黄色葡萄球菌疫苗。然而,给药活疫苗具有感染的风险。基于此原因,许多研究者

试图制备灭活的金黄色葡萄球菌疫苗,和/或分离可以诱导针对金黄色葡萄球菌免疫的荚膜多糖或者细胞壁成分。

[0012] 有时在疫苗中使用载体化合物以提高针对抗原的免疫反应。例如,某些疫苗中的载体可用于刺激对抗原性部分(moiety)响应的T细胞辅助。天然存在的抗原性部分或天然存在的物质的片段有时更不顺从且更不易操作和/或缀合至其他部分例如载体化合物,这会降低此类疫苗的治疗效果。

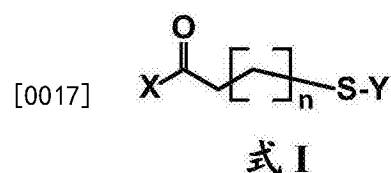
发明内容

[0013] 本发明提供了用于产生抗原性组合物诸如但不限于疫苗的新方法和化合物。特别是,本发明提供了用于修饰寡糖抗原的新方法。这些方法包括寡糖的受控合成,所述寡糖(a)包含预定顺序的单糖单体且(b)与载体化合物缀合。所得到的缀合物(conjugate)更能够刺激(通过诱导或增强)针对目标微生物多糖抗原的免疫反应。如本文所描述的那样,此类免疫反应可用于治疗和/或预防各种感染,包括但不限于葡萄球菌感染。

[0014] 本发明的各方面涉及特殊的连接体(linker)(或连接因子或间隔基或连接剂,这些术语在本文中可互换使用),以及他们在合成缀合物中的应用。特别感兴趣的是寡糖和各种载体化合物的缀合物。这些寡糖包括寡- β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-葡糖胺(本文称为:连接的葡糖胺),其包含通过 β -(1 $\rightarrow$ 6)连接彼此相连的葡糖胺单体。构成该连接的葡糖胺的各单体中的一个或多个可以是N-乙酰化的。因此,单体可以是D-葡糖胺或N-乙酰-D-葡糖胺单体,并且该连接的葡糖胺可以包含确定顺序的一种或两种类型的这些单体(或单糖,在本文中该术语可互换使用)。本发明的寡葡糖胺还在其“还原”末端包含间隔基,所述间隔基具有含硫醇的基团。该间隔基用于将该寡葡糖胺与载体相连。载体可以包含氨基酸(诸如肽或蛋白质),尽管他们并不限于此。

[0015] 因此,在一方面,本发明提供了以下实施方案:

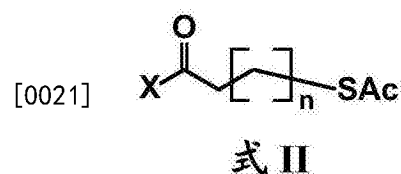
[0016] 1. 式I的化合物



[0018] 其中X是任意的原子或基团,Y是硫保护基,并且n大于1。

[0019] 2. 实施方案1的化合物,其中Y是酰基。

[0020] 3. 实施方案1或2的化合物,其中Y是乙酰基,并且所述化合物具有式II的结构

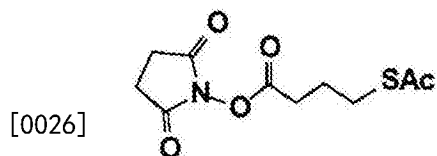


[0022] 其中Ac是乙酰基。

[0023] 4. 实施方案1的化合物,其中所述化合物是式I的活化的酯。

[0024] 5. 实施方案1的化合物,其中所述化合物是式I的活化的酯的氰基、叠氮基或卤素衍生物。

[0025] 6. 实施方案4的化合物, 其中所述化合物具有式III的结构

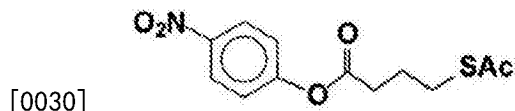


式 III

[0027] (4-乙酰基硫烷基丁酸N-羟基琥珀酰亚氨基酯)

[0028] 其中Ac是乙酰基。

[0029] 7. 实施方案4的化合物, 其中所述化合物具有式IV的结构:



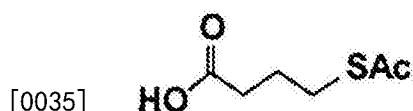
式 IV

[0031] (4-乙酰基硫烷基丁酸N-硝基苯基酯)

[0032] 其中Ac是乙酰基。

[0033] 8. 合成4-乙酰基硫烷基丁酸N-羟基琥珀酰亚氨基酯(式III)的方法, 该方法包括

[0034] 使4-乙酰基硫烷基丁酸(式V)



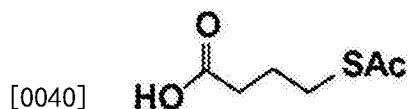
式 V

[0036] 其中Ac是乙酰基,

[0037] 与三氟乙酸N-羟基琥珀酰亚氨基酯(CF₃COOSu)反应, 得到4-乙酰基硫烷基丁酸N-羟基琥珀酰亚氨基酯(式III)。

[0038] 9. 合成4-乙酰基硫烷基丁酸N-硝基苯基酯(IV)的方法, 该方法包括

[0039] 使4-乙酰基硫烷基丁酸(式V)



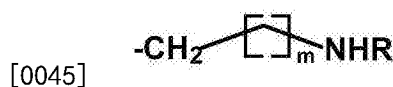
式 V

[0041] 其中Ac是乙酰基,

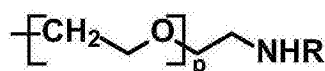
[0042] 与三氟乙酸N-硝基苯基酯(CF₃COOpNp)反应, 得到4-乙酰基硫烷基丁酸N-硝基苯基酯(式IV)。

[0043] 10. 合成与载体缀合的寡糖的方法, 该方法包括

[0044] 使寡糖首先与具有式Va或Vb结构的化合物反应

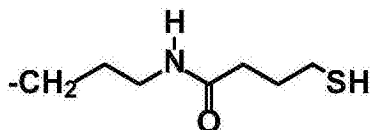


式 Va



式 Vb

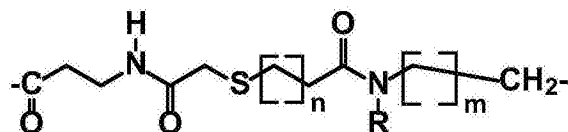
- [0046] 其中m是选自1至10的数字,p是选自1至20的数字,并且R是H或烷基,
 [0047] 其次与式I、II、III或IV的化合物反应,和
 [0048] 随后与载体反应,
 [0049] 其中所述的寡糖是 β -1-6连接的葡糖胺。
 [0050] 11.组合物,该组合物包含
 [0051] 载有O-连接的连接体的寡糖,其中所述的连接体包含



[0052]

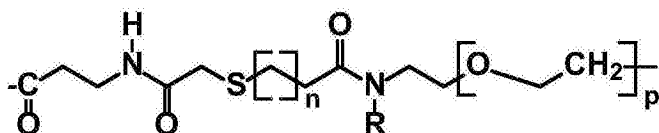
式 VI.

- [0053] 12.实施方案11的组合物,其中所述的寡糖是 β -1-6连接的葡糖胺。
 [0054] 13.实施方案10或11的组合物,其中所述寡糖为2-20个单体长。
 [0055] 14.实施方案10或11的组合物,其中所述寡糖为5-11个单体长。
 [0056] 15.实施方案10或11的组合物,其中所述寡糖为7、9或11个单体长。
 [0057] 16.实施方案15的组合物,其中所述的寡糖是100%乙酰化的。
 [0058] 17.实施方案15的组合物,其中所述的多糖是少于50%乙酰化的。
 [0059] 18.包含寡糖-载体缀合物的组合物,其中所述的缀合物包含通过连接体与载体缀合的寡糖,所述的连接体为



式 VIIIa 或

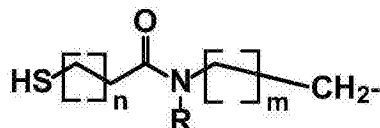
[0060]



式 VIIIb

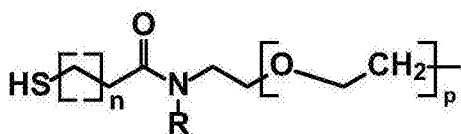
- [0061] 其中所述的连接体与寡糖O-连接并且与载体N-连接。
 [0062] 19.实施方案18的组合物,其中所述的载体是肽。
 [0063] 20.实施方案18的组合物,其中所述的载体是蛋白质。
 [0064] 21.实施方案18的组合物,其中所述的载体是破伤风类毒素。
 [0065] 22.实施方案18的组合物,其中所述的寡糖是 β -1-6连接的葡糖胺。
 [0066] 23.实施方案18的组合物,其中所述的组合物具有1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1或100:1的寡糖与载体的比例。
 [0067] 24.实施方案22的组合物,其中所述寡糖为2-20个单体长。
 [0068] 25.实施方案22的组合物,其中所述寡糖为5-11个单体长。

- [0069] 26. 实施方案22的组合物, 其中所述寡糖为7、9或11个单体长。
- [0070] 27. 实施方案22的组合物, 其中所述的寡糖是0-40%乙酰化的。
- [0071] 28. 实施方案18的组合物, 其还包含可药用载体。
- [0072] 29. 实施方案18的组合物, 其还包含佐剂。
- [0073] 30. 实施方案18的组合物, 其还包含抗菌剂。
- [0074] 31. 合成寡糖-载体缀合物的方法, 该方法包括使与式IXa或IXb的连接体缀合的寡糖



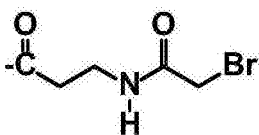
式 IXa

[0075]



式 IXb

- [0076] 与载体反应, 所述载体具有与式X化合物反应后而修饰的氨基

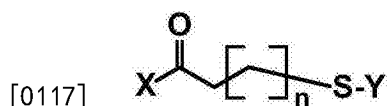


[0077]

式 X

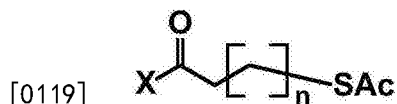
- [0078] 得到通过具有式VIIIa或VIIIb的结构连接体与载体化合物缀合的寡糖。
- [0079] 32. 实施方案31的方法, 其中所述的寡糖-载体缀合物具有1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1或100:1的寡糖与载体的比例。
- [0080] 33. 实施方案31的方法, 其中所述的载体是肽。
- [0081] 34. 实施方案31的方法, 其中所述的载体是蛋白质。
- [0082] 35. 实施方案31的方法, 其中所述的载体是破伤风类毒素。
- [0083] 36. 实施方案31的方法, 其中所述的寡糖是β-1-6连接的葡糖胺。
- [0084] 37. 实施方案31的方法, 其中所述寡糖为2-20个单体长。
- [0085] 38. 实施方案31的方法, 其中所述寡糖为5-11个单体长。
- [0086] 39. 实施方案31的方法, 其中所述寡糖为7、9或11个单体长。
- [0087] 40. 实施方案36的方法, 其中所述的寡糖是0-40%乙酰化的。
- [0088] 41. 在受试者中刺激免疫反应的方法, 该方法包括
- [0089] 给有需要的受试者施用在受试者中有效刺激免疫反应的量的实施方案18-27任一项实施方案的寡糖-载体缀合物或通过实施方案31-40任一项的方法合成的寡糖-载体缀合物。

- [0090] 42.实施方案41的方法,其中所述的受试者是人。
- [0091] 43.实施方案41的方法,其中所述的受试者是非人类。
- [0092] 44.实施方案41、42或43的方法,其还包括从所述受试者中分离抗体或形成抗体的细胞。
- [0093] 45.实施方案41、42、43或44的方法,其还包括向所述受试者施用佐剂。
- [0094] 46.实施方案41-44或45的方法,其还包括向所述受试者施用抗菌剂。
- [0095] 47.在受试者中治疗或预防感染的方法,该方法包括
- [0096] 向患有感染或有发展为感染的风险的受试者施用诱导免疫反应有效量的实施方案18-27任一项实施方案的寡糖-载体缀合物或通过实施方案31-40任一项的方法合成的寡糖-载体缀合物,
- [0097] 其中所述的感染由制造PNAG的细菌种类所引起。
- [0098] 48.实施方案47的方法,其中所述的感染是葡萄球菌感染。
- [0099] 49.实施方案47的方法,其中所述的葡萄球菌感染是金黄色葡萄球菌感染。
- [0100] 50.实施方案47的方法,其中所述的葡萄球菌感染是表皮葡萄球菌感染。
- [0101] 51.实施方案47-49或50的方法,其中所述的受试者有暴露于葡萄球菌的风险。
- [0102] 52.实施方案47-49或50的方法,其中所述的受试者已暴露于葡萄球菌。
- [0103] 53.实施方案47-51或52的方法,其中所述的感染是大肠杆菌感染、鼠疫杆菌感染、小肠结肠炎耶尔森菌感染、假结核性耶尔森氏菌感染、伴放线菌聚集菌感染、大叶性肺炎放线杆菌感染、百日咳博德特氏菌感染、副百日咳博德特氏菌感染、支气管败血性博德特氏菌感染、不动杆菌属感染、伯克霍尔德氏菌属感染、嗜麦芽糖寡养单胞菌感染、志贺氏菌属感染或克雷伯氏菌属感染。
- [0104] 54.实施方案47-52或53的方法,其中所述的寡糖-载体缀合物与佐剂一起施用。
- [0105] 55.生产抗体的方法,该方法包括
- [0106] 给受试者施用对于产生对PNAG特异的抗体有效量的实施方案18-27任一项实施方案的寡糖-载体缀合物或通过实施方案31-40任一项的方法合成的寡糖-载体缀合物,以及
- [0107] 从该受试者分离抗体。
- [0108] 56.生产单克隆抗体的方法,该方法包括
- [0109] 给受试者施用对于产生对PNAG特异的抗体有效量的实施方案18-27任一项实施方案的寡糖-载体缀合物或通过实施方案31-40任一项的方法合成的寡糖-载体缀合物,
- [0110] 从所述受试者收获产抗体细胞,
- [0111] 使来自所述受试者的产抗体细胞与骨髓瘤细胞融合,以及
- [0112] 收获产自融合亚克隆的抗体。
- [0113] 57.实施方案55的方法,其中所述的抗体是多克隆抗体。
- [0114] 58.实施方案55或56的方法,其中所述的受试者是兔。
- [0115] 59.实施方案55或56的方法,其中所述的受试者是人。
- [0116] 在一个方面,本发明提供了式I的化合物



式 I

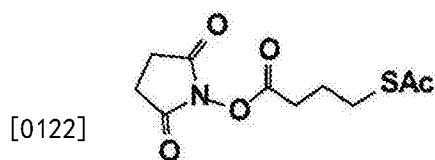
[0118] 其中X是任意的原子或基团,Y是硫保护基(blocking group),并且n大于1。在一个实施方案中,Y是酰基。在另一实施方案中,Y是乙酰基,并且所述化合物具有式II的结构



式 II

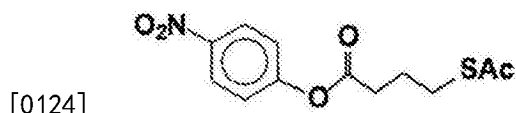
[0120] 其中Ac是乙酰基。

[0121] 在另一实施方案中,所述化合物是式I的活化的酯。在另一实施方案中,所述化合物是式I的活化的酯的氰基、叠氮基或卤素(haloid)衍生物。在另一实施方案中,所述化合物具有式III的结构



式 III

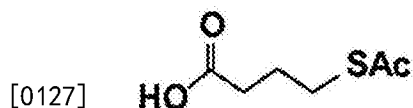
[0123] 其中Ac是乙酰基,并且所述化合物称为4-乙酰基硫烷基丁酸N-羟基琥珀酰亚氨基酯。在另一实施方案中,所述化合物具有式IV的结构:



式 IV

[0125] 其中Ac是乙酰基,并且所述化合物称为4-乙酰基硫烷基丁酸N-硝基苯基酯。

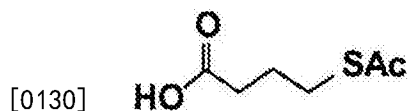
[0126] 在另一方面,本发明提供了合成4-乙酰基硫烷基丁酸N-羟基琥珀酰亚氨基酯(式III)的方法,该方法包括使4-乙酰基硫烷基丁酸(式V)



式 V

[0128] 与三氟乙酸N-羟基琥珀酰亚氨基酯(CF₃COOSu)反应,得到4-乙酰基硫烷基丁酸N-羟基琥珀酰亚氨基酯(式III)。

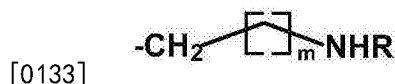
[0129] 在另一方面,本发明提供了合成4-乙酰基硫烷基丁酸N-硝基苯基酯(IV)的方法,该方法包括使4-乙酰基硫烷基丁酸(式V)



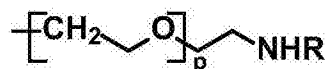
式 V

[0131] 与三氟乙酸N-硝基苯基酯(CF₃COOpNp)反应,得到4-乙酰基硫烷基丁酸N-硝基苯基酯(式IV)

[0132] 另一方面,本发明提供了合成与载体缀合的寡糖的方法,该方法包括使寡糖(a)首先与具有式Va或Vb结构的化合物反应



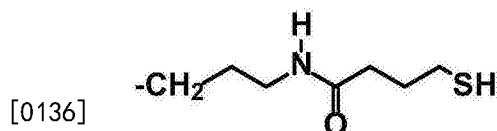
式 Va



式 Vb

[0134] 其中m是选自1至10的数字,p是选自1至20的数字,并且R是H或烷基,(b)其次与式I、II、III或IV的化合物反应,和(c)随后与载体反应,其中所述的寡糖是β-1-6连接的葡糖胺。

[0135] 在另一方面,本发明提供了包含载有O-连接的连接体的寡糖的组合物,其中该连接体包含

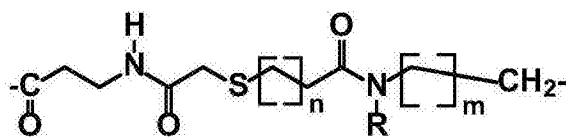


式 VI.

[0137] 在一个实施方案中,所述寡糖是β-1-6连接的葡糖胺。在另一实施方案中,所述寡糖的长度为2-20个单体。在另一实施方案中,所述寡糖的长度为5-11个单体。在另一实施方案中,所述寡糖的长度为7、9或11个单体。

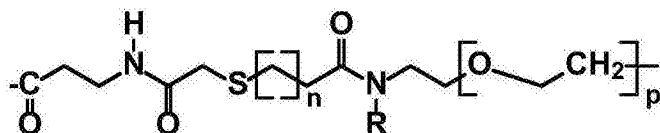
[0138] 在一实施方案中,所述寡糖为0%乙酰化的或100%乙酰化的。在另一实施方案中,所述寡糖为0-40%乙酰化的。

[0139] 在另一方面,本发明提供了包含寡糖-载体缀合物的组合物,其中所述的缀合物包含通过连接体与载体缀合的寡糖,所述的连接体为



式 VIIIa

[0140]

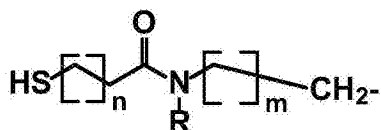


式 VIIIb

[0141] 其中该连接体与寡糖O-连接并且与载体N-连接。

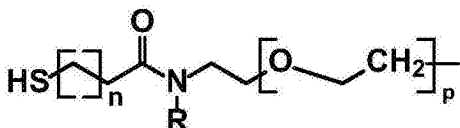
[0142] 在另一方面,本发明提供了合成寡糖-载体缀合物的方法,该方法包括使与式IXa

或IXb的连接体缀合的寡糖



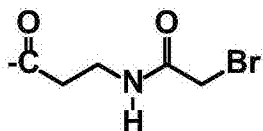
式 IXa

[0143]



式 IXb

[0144] 与载体反应,所述载体具有与式X化合物反应后而修饰的氨基



[0145]

式 X

[0146] 得到通过具有式VIIIa或VIIIb的结构连接体与载体化合物缀合的寡糖。

[0147] 在一个实施方案中,所述载体是肽。在另一实施方案中,所述载体是蛋白质。载体的实例是破伤风类毒素。

[0148] 在一个实施方案中,所述的寡糖是β-1-6连接的葡糖胺。

[0149] 在一个实施方案中,所述组合物具有1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1或100:1的寡糖与载体的比例。

[0150] 在一些实施方案中,所述寡糖具有2-20个单体的长度、5-11个单体的长度,或5、7、9或11个单体的长度。

[0151] 在一个实施方案中,所述寡糖为100%乙酰化的。在另一实施方案中,所述寡糖为0%乙酰化的。在另一实施方案中,所述寡糖为0-40%乙酰化的。

[0152] 在一些实施方案中,所述组合物还包含可药用载体、佐剂和/或抗菌剂。

[0153] 在另一方面,本发明提供了在受试者中刺激免疫反应的方法,该方法包括向有需要的受试者施用在受试者中有效刺激免疫反应的量的上述寡糖-载体缀合物或通过上述方法合成的寡糖-载体缀合物。

[0154] 在一个实施方案中,所述受试者是人。在另一实施方案中,所述受试者是非人类。

[0155] 在另一实施方案中,该方法还包括从受试者中分离抗体或抗体形成细胞。

[0156] 在另一实施方案中,该方法还包括给受试者施用佐剂。在另一实施方案中,该方法还包括给受试者施用抗菌剂。

[0157] 在另外一方面,本发明提供了在受试者中治疗或预防感染的方法,该方法包括对患有感染或有发展为感染的风险的受试者施用对于诱导免疫反应有效量的上述寡糖-载体缀合物或通过上述方法合成的寡糖-载体缀合物,其中所述的感染由制造或能够制造PNAG

的细菌种类所引起。

[0158] 在一个实施方案中,所述感染是葡萄球菌感染。在相关的实施方案中,所述葡萄球菌感染是金黄色葡萄球菌感染。在另一相关的实施方案中,所述葡萄球菌感染是表皮葡萄球菌感染。在另一实施方案中,所述受试者有暴露于葡萄球菌的风险。在另一实施方案中,所述受试者已暴露于葡萄球菌。

[0159] 在其它实施方案中,所述感染是大肠杆菌 (*E.coli*) 感染、鼠疫杆菌 (*Y.pestis*) 感染、小肠结肠炎耶尔森菌 (*Y.enterocolitica*) 感染、假结核性耶尔森氏菌 (*Y.pseudotuberculosis*) 感染、伴放线菌聚集菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) 感染、大叶性肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) 感染、百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 感染、副百日咳博德特氏菌 (*B.parapertussi*) 感染、支气管败血性博德特氏菌 (*B.bronchiseptica*) 感染、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 感染、伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*) 感染诸如新洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cenocepacia*)、嗜麦芽糖寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 感染、志贺氏菌属 (*Shigella*) 感染或克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 感染诸如肺炎克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)。

[0160] 在一些实施方案中,将寡糖-载体缀合物与佐剂和/或抗菌剂一起施用。

[0161] 在另一方面,本发明提供了生产抗体的方法,该方法包括给受试者施用对于产生对天然PNAG特异的抗体而言有效量的上述寡糖-载体缀合物或通过上述方法合成的寡糖-载体缀合物,并从该受试者分离抗体。

[0162] 在另一方面,本发明提供了生产单克隆抗体的方法,该方法包括给受试者施用对于产生对天然PNAG特异的抗体而言有效量的上述寡糖-载体缀合物或通过上述方法合成的寡糖-载体缀合物,从该受试者收获产抗体细胞,使来自受试者的产抗体细胞与骨髓瘤细胞融合,并且收获产自融合亚克隆的抗体。

[0163] 在一个实施方案中,所述抗体是多克隆抗体。在一个实施方案中,所述受试者是兔。在另一实施方案中,所述受试者是人。

[0164] 应当理解,前述构思和以下更详细讨论的其他构思的所有组合(前提是此类构思不是彼此矛盾的)都认为是本文公开的具有创造性的主题的一部分。特别是,在本公开文本的末尾显现的所要求保护的技术方案的所有组合都认为是本文公开的具有创造性的主题的一部分。还应当理解,本文明确使用的术语(其也可能出现在通过引用而并入的任何公开中)应当符合与本文公开的特定构思最一致的含义。

附图说明

[0165] 图1A和B是显示了针对未乙酰化的九-葡糖胺 (9G1cNH₂) 产生的抗血清与来自金黄色葡萄球菌的PNAG (A) 或dPNAG (B) 的结合的图。

[0166] 图2A和B是显示了针对完全乙酰化的九-葡糖胺 (9G1cNAc) 产生的抗血清与来自金黄色葡萄球菌的PNAG或dPNAG的结合的图。

[0167] 图3A和B是显示了针对缀合的9G1cNAc或9G1cNH₂产生的抗血清与11G1cNAc或11G1cNH₂的结合的图。

[0168] 图4是显示了应用在两只兔子中产生的抗血清杀灭金黄色葡萄球菌 菌株MN8细菌

的图,其中一只兔子接受了9G1cNH₂-TT缀合物并且第二只接受了9G1cNAc-TT缀合物,在最后一次注射疫苗后2周获得抗血清。

[0169] 图5是显示了应用在两只兔子中产生的抗血清杀灭金黄色葡萄球菌菌株MN8细菌的图,其中一只兔子接受了9G1cNH₂-TT缀合物并且第二只接受了9G1cNAc-TT缀合物,在最后一次注射疫苗后4周获得抗血清;并且为了比较,还显示了通过针对由与破伤风类毒素(TT)缀合的~100kDa的dPNAG分子组成的且进一步标记(051)的缀合物疫苗产生的抗血清对相同细菌的杀灭。

[0170] 图6-8是比较通过抗缀合至TT的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺(9G1cNH₂) (9G1cNH₂-TT)的兔抗血清(血液1)对金黄色葡萄球菌菌株的杀灭(图6和8,LAC(NT,USA300);图7,SF8300(NT,USA300))的图。为了比较,通过针对由与破伤风类毒素(TT)缀合的~100kDa的dPNAG分子组成的且进一步标记(051)的缀合物疫苗产生的抗血清对相同细菌进行杀灭。

[0171] 图9-16是比较通过抗缀合至TT的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺的兔抗血清(标记为“血液2”)对金黄色葡萄球菌菌株(图9,MN8(荚膜多糖(CP)8);图10,LAC(不标准型(NT),USA300));图11,SF8300(NT,USA300));图12,Newman(CP5);图13,PS80;图14,Reynolds(CP5);图15,Reynolds(不标准型);图16,Reynolds(CP8))的杀灭的图。作为比较,通过针对由与破伤风类毒素(TT)缀合的~100kDa的dPNAG分子组成的且进一步标记(051)的缀合物疫苗产生的抗血清对相同细菌进行杀灭。

[0172] 图16A是显示了通过最后免疫后6周获得的抗9G1cNH₂-TT兔抗血清杀灭两种PNAG-阳性(大肠杆菌J和大肠杆菌P)但不杀灭PNAG-阴性(大肠杆菌H)大肠杆菌菌株的图。

[0173] 图17、18和19是显示了使用针对与TT缀合的9-单体未乙酰化寡葡糖胺产生的抗血清(9G1cNH₂-TT,血液2)免疫并在用 2×10^4 (图18)、 2×10^5 (图19)或 2×10^6 (图20)CFU金黄色葡萄球菌菌株LAC感染之前24小时施用至小鼠后,与预防金黄色葡萄球菌皮肤脓肿感染相关的体内研究结果 的图。

[0174] 图20是图17-19的结果概述。

[0175] 图21、22和23是显示了使用针对9-单体未乙酰化寡葡糖胺产生的抗血清进行免疫并在用 1×10^6 CFU金黄色葡萄球菌MN8(图21)、 4×10^6 CFU金黄色葡萄球菌Newman(图22)、以及 4×10^6 CFU金黄色葡萄球菌Newman Δ ica和 1.5×10^6 CFU金黄色葡萄球菌MN8 Δ ica(图23)感染之前24小时施用至小鼠后,与预防金黄色葡萄球菌脓肿感染相关的体内研究结果的图。

[0176] 发明详述

[0177] 本发明广泛地涉及寡糖缀合物的合成和用途。本发明提供了从头合成方法和在其中用于产生新组合物的组合物。这些合成途径有利于寡糖或多糖的修饰,然而,采用天然存在的多糖抗原时所述修饰是不可行的。

[0178] 本发明尤其提供了制备具有确定顺序单体的寡- β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-葡糖胺寡糖或多糖的方法,将该寡糖或多糖与连接体缀合(连接体随后与载体化合物缀合)的方法,用于制备寡糖-载体缀合或多糖-载体缀合物的方法,以及所述各种化合物的组合物。本发明还涉及各种新的连接体,其出人意料地比在这些制备方法中之前已知的连接体更有用。得到的寡糖-载体缀合物可用于在人类和非人类受试者中体内刺激免疫反应,包括产生抗寡糖自身

及相应的天然存在的PNAG和dPNAG抗原的抗体。

[0179] PNAG和dPNAG抗原在公开的PCT申请WO 2004/043405中更详细地描述。简而言之，PNAG是指聚N-乙酰葡萄糖胺，其为由各种细菌物种产生的表面多糖，所述细菌物种包括但不限于葡萄球菌，诸如金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌。PNAG以高乙酰化和低乙酰化形式天然地存在。PNAG的“高乙酰化”形式是具有超过50%乙酸酯取代的PNAG。PNAG的低乙酰化形式(在本文中称为dPNAG)可具有0-40%的乙酰化。(参见式VII，其中R¹表示乙酰基的位置，如果存在的话)。天然的PNAG是具有不同乙酰化程度的PNAG形式的混合物。天然的PNAG可能包含dPNAG以及更高乙酰化形式的PNAG。PNAG或dPNAG可能包含数百或数千或更多的葡萄糖胺单元(或单体)。

[0180] 本发明的寡糖意图模拟PNAG或dPNAG的区域。因此，当在体内使用时，该寡糖-载体缀合物诱导针对寡糖的与PNAG和/或dPNAG类似或相同的区域的免疫反应，并且因此此类免疫反应可用于靶向制造或能够制造PNAG和/或dPNAG的细菌种类。

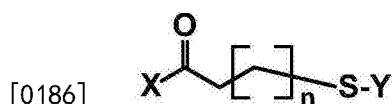
[0181] 在本发明的一些方面，所述寡糖仅包含D-葡萄糖胺，或仅包含N-乙酰-D-葡萄糖胺单元，或包含预定比例和顺序的这两种类型的单体。在某些实施方案中，所述比例和顺序意图模拟在天然PNAG中发现的比例和顺序。根据本发明对寡糖进行操作以使其在其末端(例如，其还原末端)包含具有硫醇基团的间隔基(或连接体，这两个术语在本文中可互换使用)。

[0182] 适于与一种或多种载体缀合的包含胺基团的寡糖诸如连接的葡萄糖胺寡糖(或寡葡萄糖胺，这两个术语在本文中可互换使用)的制备已在本领域中被证明是具有挑战性的。部分原因是连接的葡萄糖胺的立体特异性合成需要在糖基供体中使用参与的但暂时的酰基N-保护基团(称为“参与”基团)，以便于在单体间形成所需的 β -糖苷键。N-邻苯二甲酰、N-三氯乙酰羰基和一些其他基团适于作为参与基团。然而，一些其他参与基团不太合适，包括在本发明所考虑的一些寡糖中存在的N-乙酰基参与基团。例如，N-乙酰化的糖基供体反应性低，并且仅给出中等的糖基化产品产率。此外，由于噁唑啉中间体的形成、N-乙酰基的迁移以及其他不期望的化学反应，在糖基供体中存在N-乙酰基使糖基化反应复杂化。

[0183] 对于连接的葡萄糖胺，它们的结构以及更尤其是它们含有的氨基数目使得需要在氨基总体释放之前引入连接体。移除上述临时N-保护基团以制备游离的寡糖是在碱性条件下进行的。用于移除N-邻苯二甲酰参与基团的最有效试剂是在煮沸乙醇中的水合肼。这一试剂还有效地移除O-酰基保护基团，包括在目标寡糖中可能含有的乙酰基和苯甲酰基。

[0184] 已用于将含氨基配体与蛋白质相连的可商购连接体是S-乙酰基巯基乙酸五氟苯基酯(在实施例中显示的化学结构8)和3-乙酰基硫烷基-丙酸N-羧基琥珀酰亚氨基酯(在实施例中显示的化学结构12)。这些连接剂可用于将硫醇部分引入至寡糖；然而，如在实施例中更详细地描述的那样，两者在移除邻苯二甲酰基团的条件下均不稳定。实施例5显示了基于巯基乙酸的连接体进行氧化重排，实施例6显示了3-巯基丙酸的衍生物给出副产物的复杂混合物。两种转化均导致了必需的硫醇官能的损失。

[0185] 因此，本发明部分地基于一类连接体的发现和使用，所述连接体有效地并且比之前已知的连接体更好地将寡糖(包括其含胺形式)与诸如蛋白质的载体缀合。这类连接体定义为式I的 ω -乙酰基硫烷基碳酸衍生物(其中n>1)。

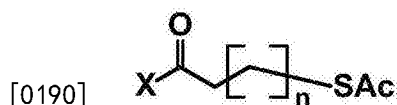


式 I

[0187] 这类连接体在连接至寡糖期间提供有效的N-酰化。该连接体可以是式I的活化的酯或其氰基、叠氮基或卤素衍生物。其可以是式I的另外的衍生物,条件是此类衍生物有效地作为酰化剂并且因此适于连接至本发明的寡糖。Y代表硫原子的临时保护基团,其是本领域公知的并且包括酰基和乙酰基。Y基团的移除释放出SH基团,所述SH基团对于将寡糖与载体相连而言是需要的。X代表为式I化合物提供所需的酰化能力的任意离去基团。

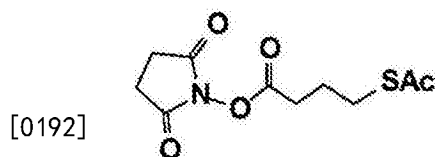
[0188] 应当理解,本发明提供的任意连接体类别均可用于将寡糖与载体化合物缀合。

[0189] 作为实例,一种连接体类别可包含式II的结构(其中 $n > 1$):



式 II

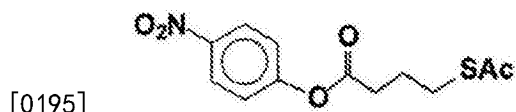
[0191] 作为另一实例,另一连接体类别可以包含N-羟基琥珀酰亚胺衍生物。此类连接体的实例,如实施例1和3所述,为4-乙酰基硫烷基丁酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(流程1的化合物2,实施例1和3)。该连接体具有如下式III的结构:



式 III

[0193] 该连接体在诸如寡糖和多糖的碳水化合物的全脱保护条件下是稳定的。

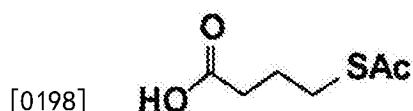
[0194] 活化的酯的另一实例是4-乙酰基硫烷基丁酸N-硝基苯基酯(化合物3,实施例2和3)。该化合物具有如下式IV的结构:



式 IV

[0196] (4-乙酰基硫烷基丁酸N-硝基苯基酯)。

[0197] 本发明提供了合成4-乙酰基硫烷基丁酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(式III)的方法。该方法包括使4-乙酰基硫烷基丁酸(式V)

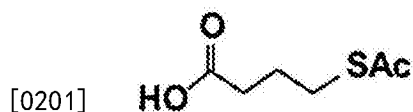


式 V

[0199] 与三氟乙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(CF_3COOSu)反应,得到4-乙酰基硫烷基丁酸N-

羟基琥珀酰亚氨基酯(式III)。

[0200] 本发明还提供了合成4-乙酰基硫烷基丁酸N-硝基苯基酯(式IV)的方法。该方法包括使4-乙酰基硫烷基丁酸(式V)

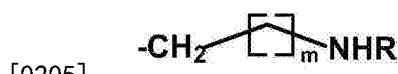


式 V

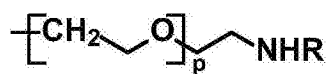
[0202] 与三氟乙酸N-硝基苯基酯(CF₃COOpNp)反应,得到4-乙酰基硫烷基丁酸N-硝基苯基酯(式IV)

[0203] 这些合成方法在实施例中得以更详细地描述。

[0204] 本发明还提供了包含寡糖的组合物,所述寡糖包含在寡糖的“还原末端”与葡糖胺单元的O1-原子缀合的连接体。该O1-缀合的连接体用于通过和式I化合物反应而与含SH的连接体连接。该O1-缀合的连接体具有式Va(见下)的结构,其具有氨基烷基基团,并且其中m在1至10之间变化,R可以是H或简单烷基(例如,甲基或乙基)。或者,O1-缀合的连接体可具有式Vb(见下)的结构,其中p可在1至20之间变化,并且R与式Va中的相同。

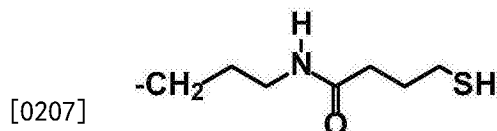


式 Va



式 Vb

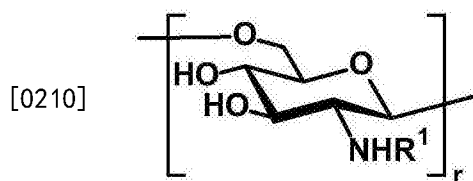
[0206] 因此,本发明的寡糖缀合物可通过使式Va或Vb化合物与式I化合物偶联而合成。临时S-保护基团的转化和随后的移除(实施例8)或相应中间体二硫化物的还原(实施例7)产生了用于将寡糖与载体化合物缀合的最终连接基团。在实施例7和8中描述的此类最终的连接基团具有式VI的结构



式 VI.

[0208] 所述寡糖可包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90或100个单糖单体。在一些重要的实施方案中,所述寡糖包含5个或更多个单体,包括5、7、9或11个单体。在一些实施方案中,所述寡糖包含2-20个单体,或3-20个单体,或4-20个单体,或5-20个单体。

[0209] 在一些重要的实施方案中,单体是葡糖胺并且寡糖是连接的葡糖胺。葡糖胺单体(存在于连接的葡糖胺时)的结构如下:

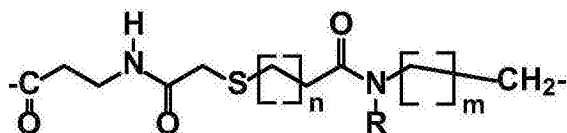


[0211] 式 VII

[0212] 其中在葡糖胺单元具有“游离”氨基的情况下 R^1 是H,或在N-乙酰化葡糖胺单元的情况下 R^1 是乙酰基(COCH_3)。这些单元通过 β -(1 $\rightarrow$ 6)-连接来连接在一起。可以连接任意数量的葡糖胺单元,包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、50或更多个至100个单元(乙酰基取代的或未取代的)。

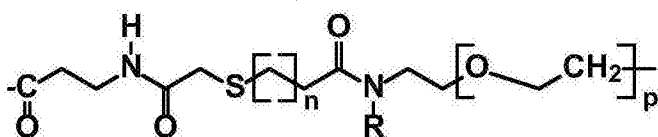
[0213] 式VII化合物中的N-乙酰化程度可以是不同的。其可为0-50%N-乙酰化(即,0-50%的 R^1 为乙酰基),包括0-40%N-乙酰化。在一些实施方案中, β -(1 $\rightarrow$ 6)连接的葡糖胺少于50%、少于40%、少于30%、少于20%、少于10%或少于5%被N-乙酰化。在一些重要的实施方案中,可根据合成方法来得知寡糖内的N-乙酰化的水平和乙酰基的位置。也就是说,可从有序排列的具有或缺乏N-乙酰基的葡糖胺单元合成寡糖。实施例提供了制备具有规定且有序的乙酰基取代的寡糖的方法。此外,可参考Gening等Carbohydrate Research (碳水化合物研究) 2007342:567-575,Gening等Russian J Bioorganic Chem 200632(4):389-399,Yang和Du Carbohydrate Research 2003338:495-502,Yang等Carbohydrate Research 2003338:1313-1318,以及Fridman等Organic Letters (有机化学快报) 20024(2):281-283。

[0214] 本发明还提供了包含寡糖-载体缀合物的组合物,所述缀合物包含通过式VIIIa或VIIIb的连接体与载体化合物缀合的寡糖。



式 VIIIa

[0215]

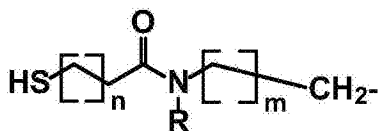


式 VIIIb

[0216] 其中该连接体与寡糖O-连接,且与载体化合物N-连接。

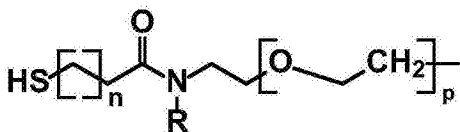
[0217] 本发明还提供了合成寡糖-载体缀合物的方法,该方法如下进行:

[0218] 使包含SH-结束的连接体的寡糖缀合物,其中所述连接体例如具有式IXa或IXb的结构



式 IXa

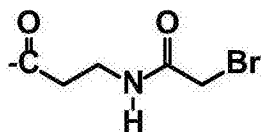
[0219]



式 IXb

[0220] (在来自实施例7和8的化合物的情况中)

[0221] 与载体化合物反应,其中所述载体化合物的末端氨基通过连接式X化合物而被修饰



[0222]

式 X

[0223] 得到通过具有式VIIIa或VIIIb结构的连接体与载体化合物缀合的寡糖。

[0224] 在一些实施方案中,式VIIIa或VIIIb的连接体通过其末端CH₂-基团与在寡糖“还原端”的葡糖胺单元的O1-原子连接。此类连接被认为是O-连接,并且该寡糖被称为与连接体O-连接。

[0225] 在一些实施方案中,式VIIIa或VIIIb的连接体经由末端CO基团与载体化合物的氨基通过酰胺键连接。此类连接被认为是N-连接,并且该载体被称为与连接体N-连接。

[0226] 如上文和实施例8及9所述,制备含氨基的载体和具SH-结束的连接体的寡葡糖胺的缀合物可使用试剂SBAP。然而,本发明也考虑使用适于连接含氨基的载体和SH-结束的寡糖的其他试剂(尤其是由G.Hermanson“Bioconjugate Techniques (生物缀合技术)”,第二版,Academic Press,2008 所描述的那些)。

[0227] 载体化合物

[0228] 如文中所述“载体化合物”(或载体,该术语在本文中可互换使用)是通过使用本发明的连接体与寡糖缀合的化合物。一般来讲,载体化合物是增强针对寡糖配体的免疫反应的化合物。

[0229] 载体化合物包括但不限于蛋白质、肽、多糖、核酸、或者其它聚合物、脂类、和小的低聚物分子,尤其是树枝状聚合物。在一些实施方案中,载体化合物可以是天然存在的或可衍生自天然存在的实体。蛋白质包括,例如,血浆蛋白,诸如血清白蛋白、免疫球蛋白、载脂蛋白和转铁蛋白;细菌多肽诸如破伤风类毒素(TT)、TRPLE、β-半乳糖苷酶,多肽例如疱疹gD蛋白、变应原、白喉类毒素、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,以及病毒蛋白,包括轮状病毒VP、呼吸合胞体病毒f和g蛋白。适用于本发明的载体包括能安全施用至哺乳动物并任选为免疫学有效的载体蛋白的任何蛋白。因此,在一些实施方案中,载体化合物本身可以是免疫原性的。实例包括在疫苗中使用或用作疫苗的化合物,其中所述疫苗针对例如但不限于本文所列出的那些细菌种类。

[0230] 特别适用于免疫的载体化合物包括蛋白质,诸如钥孔虫戚血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或者大豆胰蛋白酶抑制剂。可以类似地使用在待免疫动物种类中致免疫的任何其它化合物。

[0231] 如实施例所示,在本发明的寡糖-载体缀合物中的寡糖与载体的比例可以变化。例如,寡糖-载体缀合物可以具有至少1:1、至少2:1、至少3:1、至少4:1、至少5:1、至少6:1、至少7:1、至少8:1、至少9:1、或至少10:1的寡糖对载体的比例。在其他实施方案中,该比例可以是至少20:1、至少30:1、至少40:1、至少50:1、至少60:1、至少70:1、至少80:1、至少90:1,

或更高,例如达100:1或700:1,这取决于用于连接寡糖配体的载体化合物的能力。作为实例,具有至少3:1的寡糖对载体比例的缀合物是含有与单个载体化合物连接的至少3个寡糖的缀合物。

[0232] 用途

[0233] 本发明的组合物具有许多体外和体内用途。例如,本发明的组合物可用于产生抗体反应,例如作为疫苗,所述疫苗用于主动免疫人或动物以预防制造或能够制造天然PNAG的细菌种类包括但不限于葡萄球菌的感染;用作免疫人或动物的疫苗,其用于产生能够施用至其他人或动物以预防或治疗制造或能够制造天然PNAG的细菌种类感染的抗-dPNAG抗体,所述细菌包括但不限于葡萄球菌;用作筛选生物剂的抗原,所述生物剂例如能够预防制造或能够制造天然PNAG的细菌种类(包括但不限于葡萄球菌)感染的单克隆抗体、参与制备抗体的基因文库、或肽模拟物;用作制造或能够制造天然PNAG的细菌种类包括但不限于葡萄球菌的感染的诊断试剂;以及用作确定人或动物就他们对制造或能够制造天然PNAG的细菌种类(包括但不限于葡萄球菌)感染的易感性而言的免疫状态的诊断试剂。

[0234] 治疗和预防感染

[0235] 本发明提供了在受试者中治疗或预防制造或能够制造天然PNAG的细菌种类(包括但不限于葡萄球菌)感染的方法,该方法包括给患有此类感染或有发展为此类感染的风险的受试者施用诱导免疫反应有效量的本发明的寡糖-载体缀合物。

[0236] 本发明的另一方面提供了评估本发明的缀合物保护受试者不受制造或能够制造天然PNAG的细菌种类(包括但不限于葡萄球菌)感染的能力的方法。该方法包括:给受试者施用有效量的缀合物,其中该缀合物诱导主动免疫;将受试者暴露于制造或能够制造天然PNAG的细菌种类;以及测试该细菌种类在受试者中的存在。

[0237] 所述受试者可以是处于暴露于所述细菌种类的风险之个的受试者,或是已暴露于所述细菌种类的受试者。缀合物可与其他物质一起在组合物中施用,所述其它物质例如但不限于一种或多种佐剂、和/或一种或多种抗菌剂。

[0238] 所述感染可以是葡萄球菌感染。葡萄球菌感染可以是金黄色葡萄球菌感染、表皮葡萄球菌感染,但不限于此。所述感染可以是大肠杆菌感染、鼠疫杆菌感染、小肠结肠炎耶尔森菌感染、假结核性耶尔森氏菌感染、伴放线菌聚集菌感染、大叶性肺炎放线杆菌感染、百日咳博德特氏菌感染、副百日咳博德特氏菌感染、支气管败血性博德特氏菌感染、不动杆菌属感染包括不动杆菌属复合有机体(*Acinetibacter complex organisms*)感染、伯克霍尔德氏菌属感染包括伯克霍尔德氏菌属复合有机体感染、嗜麦芽糖寡养单胞菌感染、志贺氏菌属(不同种(*species*))感染、以及克雷伯氏菌属(不同种)感染。

[0239] 根据本发明产生的抗体也可用于预防或治疗感染性或病原性微生物的感染,其中所述微生物制造与通过针对所述寡糖-载体缀合物免疫反应而诱导的抗体发生反应的分子。

[0240] 本文使用的“诱导免疫反应(例如,抗体反应)有效量”是这样的量,其足以(i)例如通过诱导受试者中的抗体的产生、诱导记忆细胞的产生以及可能的细胞毒性淋巴细胞反应等来帮助受试者产生其自有的免疫保护,和/或(ii)预防暴露于感染性或病原性微生物的受试者发生感染,其中所述的微生物制造或能够制造PNAG,包括但不限于葡萄球菌。

[0241] 在一些优选的实施方案中,用于刺激免疫反应的疫苗的有效量是能够诱导产生与

至少两种葡萄球菌种类(例如,金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌)发生交叉反应的抗体的疫苗的量。

[0242] 本领域普通技术人员可通过本领域已知的常规方法评估一种量是否足以诱导主动免疫。例如,可通过应用缀合物或它们相应的寡糖筛选小鼠或其他受试者中的抗体来评估特定缀合物在哺乳动物中产生抗体的能力。

[0243] 本文所使用的受试者包括人或非人类受试者。非人类受试者包括但不限于伴侣动物,诸如狗、猫、雪貂、鸟等;农业动物,诸如奶牛、猪、山羊、绵羊、马、鸡等;动物园动物,诸如长颈鹿、狮、虎、象、熊等,实验动物诸如小鼠、大鼠、兔等等。受试者可以是60岁以上的人。受试者可以是健康的受试者。

[0244] 待根据本发明治疗的受试者包括住院患者,其由于暴露于医院环境中的细菌下而有发展葡萄球菌感染的风险。发展金黄色葡萄球菌感染的特别高危人群包括例如透析的肾病患者、以及进行高危外科手术的个体。发展表皮葡萄球菌感染的高危人群还包括例如具有内在医药装置诸如静脉内管线(lines)(例如,中心管线)或假体(例如,髌或膝盖置换假体)的患者,因为临床分离菌通常高度地附着在塑料表面。在一些实施方案中,受试者是已接受了医药装置植入的受试者,在另一实施方案中,受试者是尚未接受医疗装置植入但可能计划接受医疗装置植入的受试者。处于发展表皮葡萄球菌感染的受试者还包括例如早产婴儿以及进行化疗的患者。待根据本发明治疗的其他受试者包括由于暴露于医院或社区环境中的细菌而生病和有发展微生物感染风险的住院患者或社区个体,其中所述的微生物制造或能够制造PNAG。

[0245] 免疫反应诱导和抗体产生

[0246] 本发明还提供了用于在受试者中刺激免疫反应的方法,该方法包括给有需要的受试者施用在该受试者中有效刺激免疫反应的量的本发明的寡糖-载体缀合物。免疫反应可以是抗原特异性免疫反应。其可以是细胞和/或体液免疫反应。例如,免疫反应可以导致抗体和/或产抗体细胞的产生。

[0247] 本文所使用的“被动免疫”包括施用抗体给受试者,其中所述抗体产生于不同的受试者(包括相同或不同种类的受试者),从而该抗体附着至细菌的表面并且导致该细菌被吞噬。

[0248] 可将应用本发明缀合物产生的抗体施用至有发展感染的风险的任意受试者,其中所述的感染是由制造PNAG的物种或制造与诱导被动免疫的抗体反应的另一分子的物种所致,并且在一些实施方案中,可能特别适于不能诱导主动免疫的受试者。由于用抗原接种在高危免疫受损受试者中是不十分有效的,这些受试者将受益于用针对本发明的寡糖-载体缀合物产生的抗体制备物进行治疗,从而预防或治疗感染例如由金黄色葡萄球菌所引起的那些。不能诱导免疫反应反应的受试者是免疫受损受试者(例如,进行化疗的患者、AIDS患者等),或尚未发育免疫系统的受试者(例如,早产婴儿)。

[0249] 因此,本发明提供了制备抗体的方法,其包括给受试者施用对于产生对诸如葡萄球菌的生物体表达的PNAG分子特异的抗体而言有效量的本发明的寡糖-载体缀合物,并且从该受试者分离抗体。该抗体可以是多克隆抗体。该抗体还可进一步被修饰。

[0250] 本发明还提供了用于生产单克隆抗体的方法,其包括给受试者施用对于产生对PNAG分子特异的抗体而言有效量的本发明的寡糖-载体缀合物,从来自该受试者的含有产

抗体细胞的任何组织(诸如脾或血液)收集产抗体细胞,使来自受试者的产抗体细胞与骨髓瘤细胞融合,和收集产自融合亚克隆的抗体。

[0251] 本发明涉及到对本发明的寡- β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-葡萄糖胺特异的各種抗体的产生。这些包括嵌合抗体,诸如人源化抗体和抗体片段,以及完整的单克隆和多克隆抗体。本文所使用的“人源化单克隆抗体”是含有至少人类恒定区域和来自非人物种的抗原结合结构域(诸如,1、2、3、4、5或6个CDR,或者1或2个可变区,或Fab或F(ab)₂片段)的人类单克隆抗体或者其功能活性片段。例如,在保留原始抗体抗原表位(epitopic)的特异性的同时,通过使用人类抗体的相似区域替换非人类哺乳动物抗体的非CDR区域,可以构建人源化单克隆抗体。例如,非人类CDR和任选的一些框架区域可以与人类FR和/或Fc/pFc'区域共价连接,以得到功能性抗体。欧洲专利申请0239400提供了制备和使用人源化单克隆抗体的实例教导,其中至少鼠(或者其它非人哺乳动物)抗体的CDR部分包含在人源化抗体中,将此专利的全部内容在此并入本文作为参考。现有一些可以从特定鼠抗体区域商业性合成人源化抗体的美国机构,例如蛋白设计实验室(Mountain View California),Abgenix,和Medarex。

[0252] 分离形式的或在药物制剂中的完整人源化单克隆抗体特别适合本发明的一些方面。由于它们不在人体中引起针对抗体自身的免疫反应,人源化抗体在临床中特别有用。在一优选具体实施方案中,将鼠CDR嫁接到人类抗体的框架区域中,用于制备“人源化抗体”。参见,例如L.Riechmann等人,《自然》(Nature) 332,323 (1988);M.S.Neuberger等人,《自然》(Nature) 314,268 (1985)以及EPA 0239400 (1987年9月30日公开)。

[0253] 可以采用本领域任何已知的方法制备人类单克隆抗体,诸如Borrebaeck等人的美国专利5,567,610、Ostberg的美国专利565,354、Baker等人的美国专利5,571,893、Kozber, J. Immunol. 133:3001 (1984)、Brodeur等人的《单克隆抗体制备技术和应用》(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications)第51-63页(Marcel Dekker, Inc, 纽约,1987年)和Boerner等人, J. Immunol., 147:86-95 (1991)公开的那些方法。

[0254] 除了制备人类单克隆抗体的常规方法外,还可以通过免疫能够产生人类抗体的转基因动物来制备此类抗体(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Lonberg的美国专利5,569,825)。

[0255] 也可通过从人类血液或者其它组织收集产生抗体的淋巴细胞,从而获得人类抗体。可对这些淋巴细胞进行处理,以产生在实验室中适当的培养条件下自我生长的细胞。就产生抗本发明缀合物的抗体,对细胞培养物进行筛选,然后克隆。克隆培养物可以用于产生人类单克隆抗体,或者可克隆编码抗体重链和轻链可变部分的遗传成分,然后插入核酸载体,用于产生不同类型的抗体。

[0256] 本发明还涵盖了抗体片段。公知的功能活性抗体片段包括但不限于抗体的F(ab')₂、Fab、Fv和Fd片段。与完整抗体相比,缺少完整抗体Fc片段的这些片段更加迅速地从循环中清除,并且可能更少发生非特异性组织结合(Wahl等人, J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983))。例如,可根据Ladner等人的美国专利4,946,778公开的方法构建单链抗体。此类单链抗体包含通过灵活连接部分连接的重链与轻链的可变区域。还报道了获得单结构域抗体(“Fd”)的方法,所述单结构域抗体含有分离的可变重链单结构域(参见,例如, Ward等人, Nature 341:644-646 (1989),其公开了一种用其靶表位具有充足的亲和力从而以分离形

式与其结合来鉴定抗体重链可变区域(V_H 单结构域抗体)的筛选方法)。基于已知的抗体重链和轻链可变区域序列制备重组Fv片段的方法在本领域众所周知并已经公开于例如Moore等人的美国专利4,462,334中。描述了抗体片段的使用和产生的其它参考文献包括,例如Fab片段(Tijssen,《酶免疫测定的实践和理论》(Practice and Theory of Enzyme Immunoassays)(Elsevier, Amsterdam, 1985))、Fv片段(Hochman等人, Biochemistry 12: 1130 (1973); Sharon等人, Biochemistry 15:1591 (1976); Ehrilch等人, 美国专利4,355,023), 和抗体分子部分(Audilore-Hargreaves, 美国专利4,470,925)。因此,在不破坏抗体特异性的条件下,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。

[0257] 组合物和药物制剂

[0258] 本发明组合物包含例如本发明的寡糖-载体缀合物,其可与可药用赋形剂一起配制。本文使用的“可药用赋形剂”意指一种或多种相容的固体或液体的填充剂、稀释剂或包封物质,其适于施用至人或动物。在本发明中,术语“赋形剂”表示有机或无机成分,其为天然的或合成的,其与活性成分组合以利于施用。药物组合物的成分还能够以不产生实质上损害期望药物效力的相互作用的方式与缀合物、以及彼此混合。

[0259] 因此,本发明的组合物可作为药物制剂。其可在体内应用,但其应用不限于此。当体内应用时,其可用于人或非人类受试者,用于治疗、预防或研究目的。作为实例,该组合物可用于在非人类受试者诸如小鼠、兔和其他的动物宿主中产生抗体和/或产抗体细胞。

[0260] 本发明因此提供了包含任何前述寡糖-载体缀合物的药物制剂,其可用作疫苗。这些制剂可包含有效刺激免疫反应(诸如抗原特异性免疫反应)的量的缀合物。这些制剂可包含其他组分或成分,诸如但不限于佐剂或抗菌剂。此类制剂可常规地含有可药用浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容性载体、佐剂以及任选的其他治疗成分。

[0261] 配制疫苗的适当载体介质包括磷酸钠缓冲盐溶液(pH7.4)或混悬在pH6的磷酸钠缓冲盐溶液中的0.125M磷酸铝凝胶、以及其它常规介质。通常,疫苗含有约5至约100 μ g抗原、优选约10-50 μ g抗原,以在温血哺乳动物中引发有效水平的抗体。

[0262] 佐剂是引入至抗原中或与抗原一起施用(同时或以其他方式)的任何物质,其能够加强受试者对抗原的免疫反应。佐剂包括但不限于铝化合物,例如凝胶、氢氧化铝和磷酸铝,弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂(例如,其中抗原被引入在稳定的石蜡油包水乳剂的水相中)。可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(*Mycobacterium tuberculosis*))、磷酸钙、左旋咪唑、异丙肌苷、多聚阴离子(例如,聚A:U)、蘑菇多糖、百日咳毒素、脂质A、皂甙、QS-21和肽例如胞壁酰二肽,以及免疫刺激寡核苷酸,诸如CpG寡核苷酸。稀土盐,例如镧和铈,也可以用做佐剂。佐剂的量取决于受试者和所用的特定抗原,并且可由本领域技术人员不需要过度实验即可很容易地确定。

[0263] 抗菌剂是杀死细菌(例如通过溶胞作用)或阻止细菌分裂的物质。在治疗细菌感染中应用抗生素是常规的。抗菌剂包括: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、阿洛西林(avlocillin)、美洛西林、哌拉西林、氮草西林、头孢氨苄、头孢拉定、头孢羟氨苄(cefadroxil)、头孢克洛、头孢唑林、头孢呋辛酯、头孢孟多、头孢尼西、头孢西丁、头孢噻肟、头孢唑肟、头孢甲肟(cefmenoxine)、头孢曲松、拉氧

头孢、头孢替坦、头孢哌酮、头孢他啶 (ceftazidime)、亚胺培南、克拉维酸盐、特美汀、舒巴坦、新霉素、红霉素、甲硝唑、氯霉素、克林霉素、林可霉素、万古霉素、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑、氨基糖苷类、喹诺酮类、四环素类和利福平 (参见Goodman和Gilman《治疗学的药理学基础》(Pharmacological Basics of Therapeutics)第8版,1993年,McGraw Hill Inc)。

[0264] 缀合物可与其他部分包括但不限于可检测标记诸如显像剂、荧光团、酶等共价或非共价连接。

[0265] 通常,适合胃肠外施用的组合物包括可与接受者血液等渗的无菌水制剂。在可接受赋形剂和溶剂中,可以使用的是水、林格溶液以及等渗的氯化钠溶液。此外,无菌的不挥发性油通常可以用做溶剂或者混悬介质。为此目的,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油一酯、甘油二酯。此外,脂肪酸诸如油酸可以应用于可注射的制剂。适合皮下施用、肌肉内施用、腹膜内施用、静脉内施用等的载体配方可以参见《雷明顿药理学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),Mack Publishing Company,Easton,PA。

[0266] 本发明的制剂可以以有效量施用。如上文所述,有效量在某些情况下是能够单独或者与附加剂量一起诱导主动免疫或被动免疫的量,其取决于受试者。据信,取决于施用方式,1毫微克/千克至100毫克/千克的剂量是有效的。认为优选的范围是500毫微克/千克至500微克/千克,最优选的范围是1微克至100微克/千克。绝对量取决于各种因素,包括:施用是在尚未受细菌感染的高危受试者中进行还是已经受感染的受试者中进行;并行的疗法;剂量次数;和个体患者的参数,包括年龄、身体状况、大小和体重。这些是本领域普通技术人员公知的因素,并且可以通过常规实验确定。通常优选使用最大剂量,即根据合理的医学判断的最高的安全剂量。

[0267] 本发明组合物的多剂量被考虑在内。通常,免疫方案包括施用高剂量抗原,经过几周后,接着施用较低剂量的抗原。还可以施用附加剂量。如果需要,被动免疫的给药方案完全不同,其需更频繁施用。可以使用增强抗细菌感染的免疫反应和/或随后保护免受感染的任何给药方案。本领域普通技术人员可以通过常规实验确定递送多剂量特定缀合物所需的时间间隔。

[0268] 可利用多种施用途径。当然,所选的具体方式取决于所选的特定缀合物、被治疗的具体疾患以及治疗效果所需的剂量。一般而言,可以采用医学可接受的任何施用方式,即产生有效水平的免疫反应且不会造成临床不可接受副作用的任何方式,来实施本发明方法。优选的施用方式是胃肠外途径。术语“胃肠外”包括皮下注射、静脉内注射、肌肉内注射、腹膜内注射和胸骨内注射,或者输注技术。其它途径包括但不限于口腔、鼻、皮肤、舌下以及局部途径。

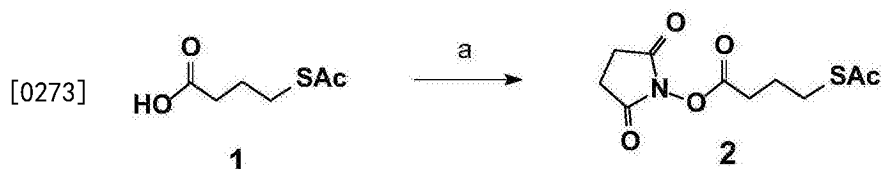
具体实施方式

[0269] 以下的实施例用于阐释的目的,而不意欲限制本发明的范围。

[0270] 实施例

[0271] 通过以下非限制性实施例进一步阐述本发明的各方面。这些实施例尤其阐明了如何制备寡- β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-葡糖胺寡糖,以及如何将该寡糖与诸如蛋白质载体的载体缀合。此类缀合物尤其可用作疫苗。

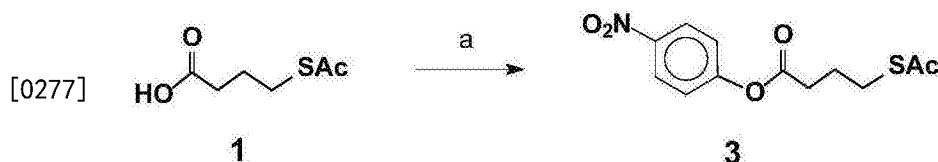
[0272] 实施例1.4-乙酰基硫烷基丁酸N-羧基琥珀酰亚氨基酯2的合成



[0274] 流程1.连接剂2的合成。a:CF₃COOSu,吡啶

[0275] 向酸1 (Hogg, J. Heather; Ollmann, Ian R.; Wetterholm, Anders; Andberg, Martina Blomster; Haeggstroem, Jesper; 等人, Chem. Europ. J.; EN; 4; 9; 1998; 1698-1713) (237mg, 1.46mmol) 和三氟乙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯 (431mg, 2.02mmol) 的二氯甲烷 (4mL) 溶液中加入吡啶 (355μL, 4.4mmol), 并且在室温下搅拌所得到的溶液2h。用二氯甲烷 (50mL) 稀释混合物, 用冰冷的1M HCl和水洗涤, 并浓缩。将残留物进行硅胶柱层析 (甲苯-乙酸乙酯9:1), 得到活化的酯2 (359mg, 95%), 其为无色浆状物。¹H NMR数据 (300MHz, CDCl₃): δ2.00 (m, 2H, β-CH₂), 2.33 (s, 3H, CH₃COS), 2.68 (t, 2H, J 7.4Hz, γ-CH₂), 2.81 (s, 4H, 琥珀酰亚胺的2CH₂), 2.96 (t, 2H, J 7.1Hz, α-CH₂)。 ¹³C NMR数据 (62.9MHz, CDCl₃): δ24.7 (β-CH₂), 25.6 (琥珀酰亚胺的CH₂), 27.9 (γ-CH₂), 29.7 (α-CH₂), 30.7 (CH₃COS), 168.0 (CO-ON), 169.2 (琥珀酰亚胺的CO), 195.4 (CH₃COS)。

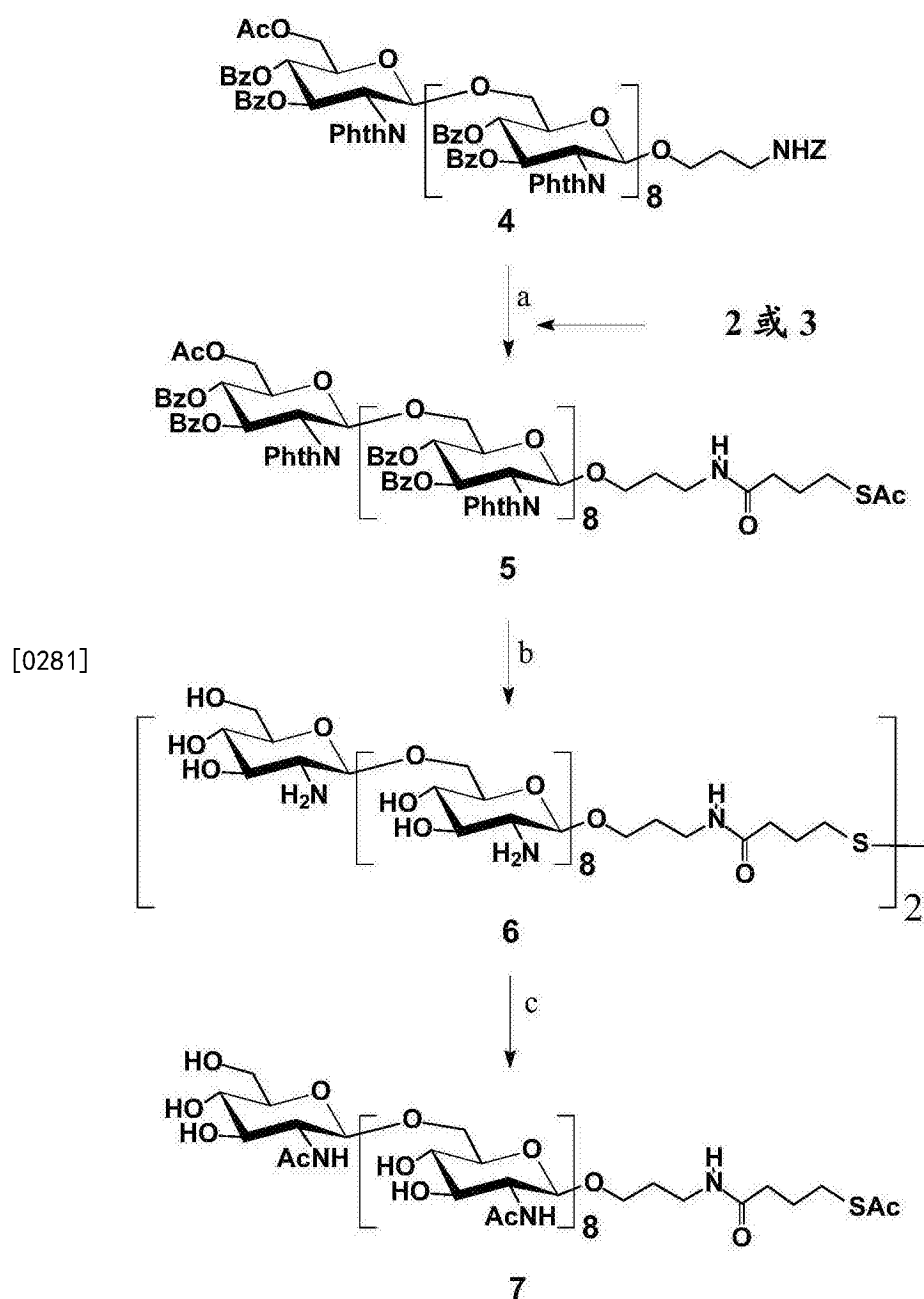
[0276] 实施例2.4-乙酰基硫烷基丁酸4-硝基苯基酯3的合成



[0278] 流程2.连接剂3的合成。a:CF₃COOpNp, Et₃N。

[0279] 向酸1 (233mg, 1.44mmol) (Hogg, J. Heather; Ollmann, Ian R.; Wetterholm, Anders; Andberg, Martina Blomster; Haeggstroem, Jesper; 等人; Chem. Europ. J.; EN; 4; 9; 1998; 1698-1713) 和三氟乙酸4-硝基苯基酯 (470mg, 2mmol) 的二氯甲烷溶液中加入三乙胺 (400μL, 2.88mmol), 并在室温下搅拌该溶液2h。如对2所描述的那样后处理混合物, 并且通过硅胶柱层析 (甲苯-乙酸乙酯92:8) 分离活化的酯3 (385mg, 94%)。 ¹H NMR数据 (300MHz, CDCl₃): δ2.03 (m, 2H, β-CH₂), 2.36 (s, 3H, CH₃COS), 2.68 (t, 2H, J 7.2Hz, γ-CH₂), 3.01 (t, 2H, J 7.1Hz, α-CH₂), 7.28, 8.26 (2d, 4H, 芳香族)。 ¹³C NMR数据 (62.9MHz, CDCl₃): δ24.7 (β-CH₂), 28.0 (γ-CH₂), 30.7 (CH₃COS), 32.7 (α-CH₂), 122.5, 125.2, 145.3, 155.3 (芳香族C), 170.4 (COO), 195.5 (CH₃COS)。

[0280] 实施例3.应用连接剂2或3合成配体6和7



[0282] 流程3. 配体的合成。a: 1) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, MeOH/THF 2) 2或3, Et_3N , CH_2Cl_2 ; b: $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH , Δ ; c: DTT , NaHCO_3 , Ac_2O , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 。

[0283] 将九糖4 (M.L.Gening, Y.E.Tsvetkov, G.B.Pier, N.E.Nifantiev, 《相应于金黄色葡萄球菌表面多糖片段的寡- $\beta(1\rightarrow6)$ -葡糖胺的合成》(Synthesis of oligo- $\beta(1\rightarrow6)$ -glucosamines corresponding to the fragments of the surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus*) Carbohydr. Res. 342 (2007), 567-575) (110mg, 0.023mmol) 溶解于 MeOH (3ml)、 THF (6ml) 和1M HCl (0.2ml) 的混合物中, 并加入 $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (110mg)。在氢气气氛下将得到的混合物搅拌1h。滤除催化剂并蒸发溶剂。将残留物溶解于 CH_2Cl_2 (2ml) 和 DMF (1ml) 的混合物中, 然后加入连接剂2 (12mg, 0.046mmol, 在1ml CH_2Cl_2 中的溶液) 和 Et_3N (100 μl)。30分钟后, 用甲苯稀释该混合物, 浓缩, 进行硅胶柱层析(甲苯/ Me_2CO , 4:1), 得到作为无色泡沫状物的5 (98mg, 98%)。通过在被保护的碳水化合物配体的NMR谱中存在连接体特

征性信号来证实引入了连接体。 ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) : δ 1.88 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$) , 2.21 (t, 2H, J 7.2Hz, $\gamma\text{-CH}_2$) , 2.31 (s, 3H, CH_3COS) , 2.88 (t, 2H, J 7.1Hz, $\alpha\text{-CH}_2$) . ^{13}C NMR数据 (125MHZ, CDCl_3) : δ 25.7 ($\beta\text{-CH}_2$) , 28.5 ($\alpha\text{-CH}_2$) , 30.6 (CH_3COS) , 35.1 ($\gamma\text{-CH}_2$) .

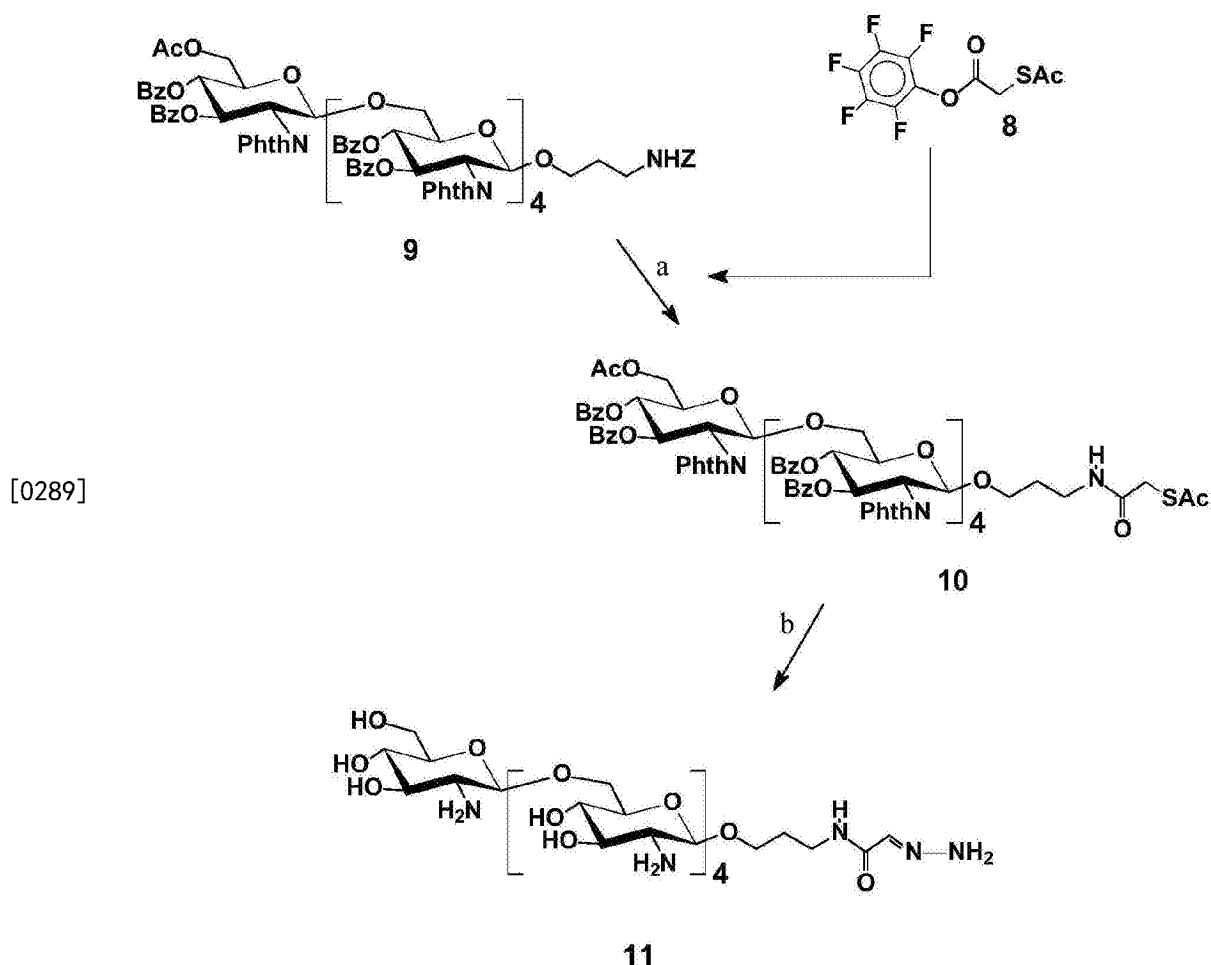
[0284] 在回流条件下将被保护的九糖5 (95mg, 0.02mmol) 、EtOH (5ml) 和 $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.5ml) 的混合物搅拌1h, 然后浓缩, 并在0.1M AcOH水溶液中进行凝胶渗透层析 (TSK gel Toyopearl HW 40S, 2.5x 40cm) , 得到九糖6 (28mg, 86%) 。凝胶层析后直接可得到SH-衍生物, 如通过质谱分析所检测的那样, 但是在溶液中贮存后其转化为相应的二硫化物, 这通过 ^{13}C NMR实验所证实。 ^1H NMR (500MHz, D_2O) : δ 1.95 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$) , 2.32 (t, 2H, J 7.2Hz, $\gamma\text{-CH}_2\text{SH}$) , 2.71 (t, 2H, J 7.1Hz, $\alpha\text{-CH}_2$) . ^{13}C NMR数据 (125MHZ, D_2O) : δ 29.7 ($\beta\text{-CH}_2$) , 35.8 ($\gamma\text{-CH}_2\text{SH}$) , 38.5 ($\alpha\text{-CH}_2$) , 42.1 ($\gamma\text{-CH}_2\text{SS}$) . 质谱: $\text{C}_{61}\text{H}_{114}\text{N}_{10}\text{O}_{38}\text{S}$ 计算值为543.234 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 实验值543.243 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$.

[0285] 将九糖6 (15mg) 溶解于水/MeOH (2ml, 1:1v/v) 混合物中, 加入二硫苏糖醇 (15mg) 和 NaHCO_3 (20mg) 。将得到的混合物搅拌5分钟, 然后加入乙酸酐 (100 μl) , 并且在溶剂蒸发前继续搅拌30分钟。通过在0.1M AcOH水溶液中的凝胶渗透层析 (TSK gel Toyopearl HW 40S, 2.5x 40cm) 纯化产物, 得到乙酰化产物7 (15mg, 95%) 。 ^1H NMR (500MHz, D_2O) : δ 1.75 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$) , 2.11 (t, 2H, J 7.2Hz, $\gamma\text{-CH}_2$) , 2.43 (s, 3H, CH_3COS) , 2.75 (t, 2H, J 7.1Hz, $\alpha\text{-CH}_2$) . ^{13}C NMR数据 (125MHZ, D_2O) : δ 25.7 ($\beta\text{-CH}_2$) , 28.5 ($\alpha\text{-CH}_2$) , 30.6 (CH_3COS) , 35.1 ($\gamma\text{-CH}_2$) . 质谱: $\text{C}_{81}\text{H}_{134}\text{N}_{10}\text{O}_{48}\text{S}$ 的计算值1024.418 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 实验值1024.427 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

[0286] 实施例4. 应用连接剂3合成被保护的配体5

[0287] 将九糖4 (60mg, 0.013mmol) 溶解于MeOH (1.5ml) 、THF (3ml) 和1M HCl (0.1ml) 的混合物中, 加入Pd (OH) $_2$ /C (60mg) 。在氢气气氛下搅拌所得到的混合物1h。滤除催化剂并蒸发溶剂。将残留物溶解于 CH_2Cl_2 (2ml) 和DMF (1ml) 的混合物中, 然后加入连接剂3 (20mg, 0.07mmol, 在1ml CH_2Cl_2 中的溶液) 和 Et_3N (50 μl) 。20h后, 用甲苯稀释混合物, 浓缩, 并进行硅胶柱层析 (甲苯/ Me_2CO , 4:1) , 得到5 (37mg, 68%) , 为无色泡沫状物。

[0288] 实施例5. 连接剂8用于制备进一步与蛋白质缀合的配体的适用性研究

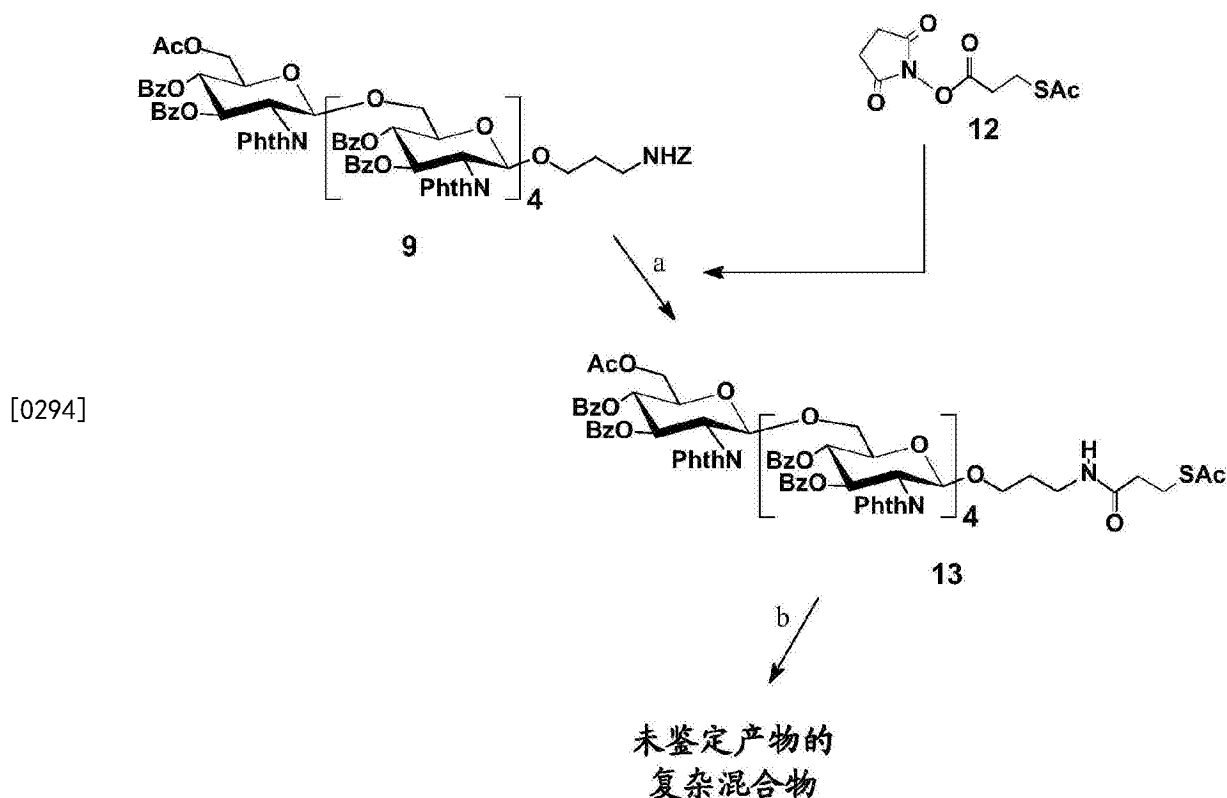


[0290] 流程4. 配体的合成。a: 1) H_2 , Pd(OH) $_2$ /C, MeOH/THF 2) 8, Et $_3$ N, CH $_2$ Cl $_2$; b: N $_2$ H $_4$ · H $_2$ O, EtOH, Δ 。

[0291] 将五糖9 (150mg, 0.026mmol) (M.L.Gening, Y.E.Tsvetkov, G.B.Pier, N.E.Nifantiev, 《相应于金黄色葡萄球菌表面多糖片段的寡- β (1 $\rightarrow$ 6)-葡糖胺的合成》(Synthesis of oligo- β (1 $\rightarrow$ 6)-glucosamines corresponding to the fragments of the surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus*) Carbohydr. Res. 342 (2007), 567-575) 溶解于MeOH (1.5ml)、THF (3ml) 和1M HCl (0.1ml) 的混合物中, 并加入Pd(OH) $_2$ /C (150mg)。在氢气气氛下搅拌得到的混合物1h。滤除催化剂并蒸发溶剂。将残留物溶解于CH $_2$ Cl $_2$ (2ml) 和DMF (1ml) 的混合物中, 然后加入连接剂8 (30mg, 0.1mmol, 在0.1ml CH $_2$ Cl $_2$ 中的溶液) 和Et $_3$ N (50 μ l)。1h后, 用甲苯稀释该混合物, 浓缩, 进行硅胶柱层析(甲苯/Me $_2$ CO, 4:1) 得到作为无色泡沫状物的10 (132mg, 89%)。 1H NMR数据 (500MHz, CDCl $_3$): δ 2.38 (s, 3H, CH $_3$ COS), 3.53 (s, 2H, CH $_2$ S); ^{13}C NMR数据 (125MHZ, CDCl $_3$): δ 30.2 (CH $_3$ COS), 32.9 (CH $_2$ S)。

[0292] 在回流下搅拌被保护的五糖10 (100mg, 0.017mmol)、EtOH (5ml) 和N $_2$ H $_4$ · H $_2$ O (0.5ml) 的混合物1h, 然后浓缩, 并在0.1M AcOH水溶液中进行凝胶渗透层析(TSK gel Toyopearl HW 40S, 2.5x 40cm), 得到五糖11 (32mg, 93%)。 1H NMR数据 (500MHz, D $_2$ O): δ 7.17 (s, 1H, CH=N); ^{13}C NMR数据 (125MHZ, D $_2$ O): δ 134.6 (C=N-NH $_2$), 167.4 (C(O)-CH=N)。质谱: C $_{35}$ H $_{67}$ N $_8$ O $_{22}$ 计算值951.438[M+H] $^+$, 实验值951.448[M+H] $^+$ 。

[0293] 实施例6. 连接剂12用于制备进一步与蛋白质缀合的配体的适用性研究

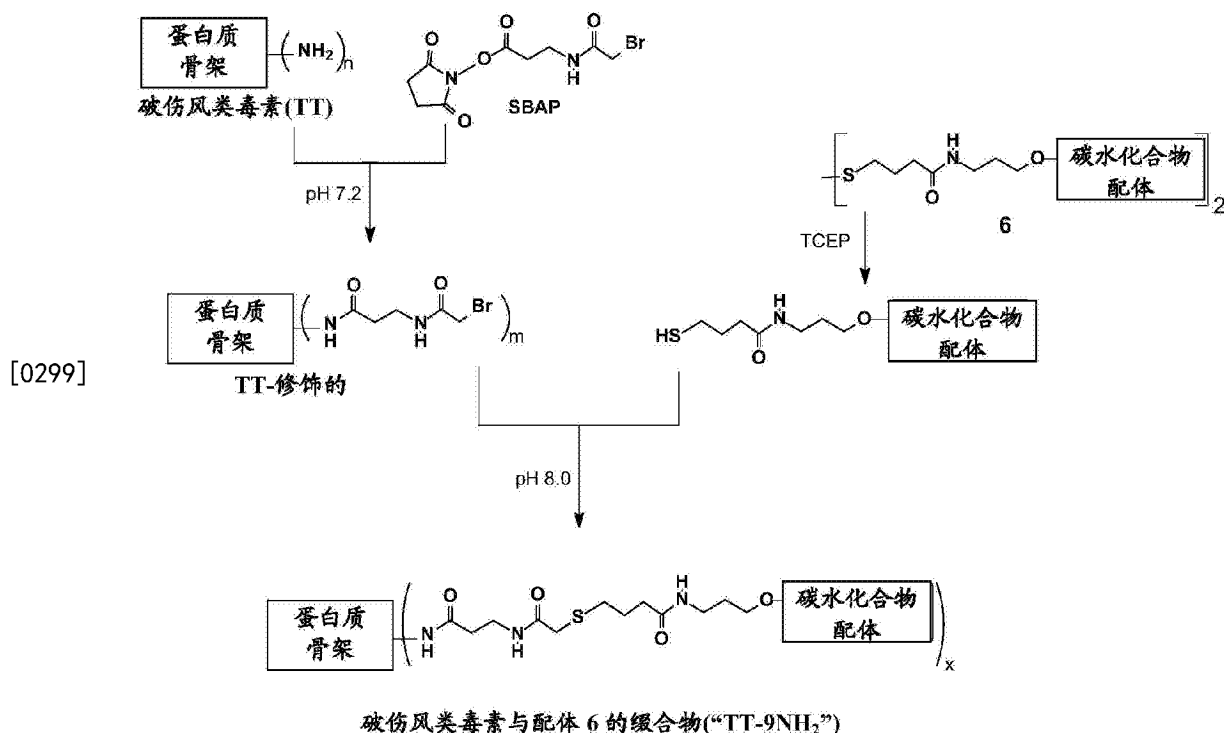


[0295] 流程5.配体的合成.a:1) H_2 , $Pd(OH)_2/C$, MeOH/THF 2) 12, Et_3N , CH_2Cl_2 ; b: $N_2H_4 \cdot H_2O$, EtOH, Δ

[0296] 将五糖9 (100mg, 0.017mmol) (M.L.Gening, Y.E.Tsvetkov, G.B.Pier, N.E.Nifantiev,《相应于金黄色葡萄球菌表面多糖片段的寡- β (1 $\rightarrow$ 6)-葡糖胺的合成》(Synthesis of oligo- β (1 $\rightarrow$ 6)-glucosamines corresponding to the fragments of the surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus*) Carbohydr.Res.342 (2007), 567-575) 溶解于MeOH(1.5ml)、THF(3ml)和1M HCl(0.1ml)的混合物中,并加入 $Pd(OH)_2/C$ (150mg)。在氢气气氛下搅拌得到的混合物1h。滤除催化剂并蒸发溶剂。将残留物溶解于 CH_2Cl_2 (2ml)和DMF(1ml)的混合物中,然后加入连接剂12(15mg, 0.061mmol, 在0.1ml CH_2Cl_2 中的溶液)和 Et_3N (50 μ l)。1h后,用甲苯稀释该混合物,浓缩,进行硅胶柱层析(甲苯/ Me_2CO , 4:1)得到作为无色泡沫状物的13(87mg, 85%)。 1H NMR数据(500MHz, $CDCl_3$): δ 2.33(s, 3H, CH_3COS), 2.52(m, 2H, $COCH_2$), 3.15(t, 2H, J 7.6, CH_2S); ^{13}C NMR数据(125MHZ, $CDCl_3$): δ 25.2(CH_3COS), 29.2($COCH_2$), 35.9(CH_2S)。

[0297] 在回流下搅拌被保护的五糖13(80mg, 0.015mmol)、EtOH(5ml)和 $N_2H_4 \cdot H_2O$ (0.5ml)的混合物1h,然后浓缩,并在0.1M AcOH水溶液中进行凝胶渗透层析(TSK gel Toyopearl HW 40S, 2.5x 40cm),得到未鉴定产物的混合物。

[0298] 实施例7.破伤风类毒素与配体6的缀合物“TT-9NH₂”的制备

破伤风类毒素与配体 6 的缓合物("TT-9NH₂")

[0300] 流程6.与配体6缀合

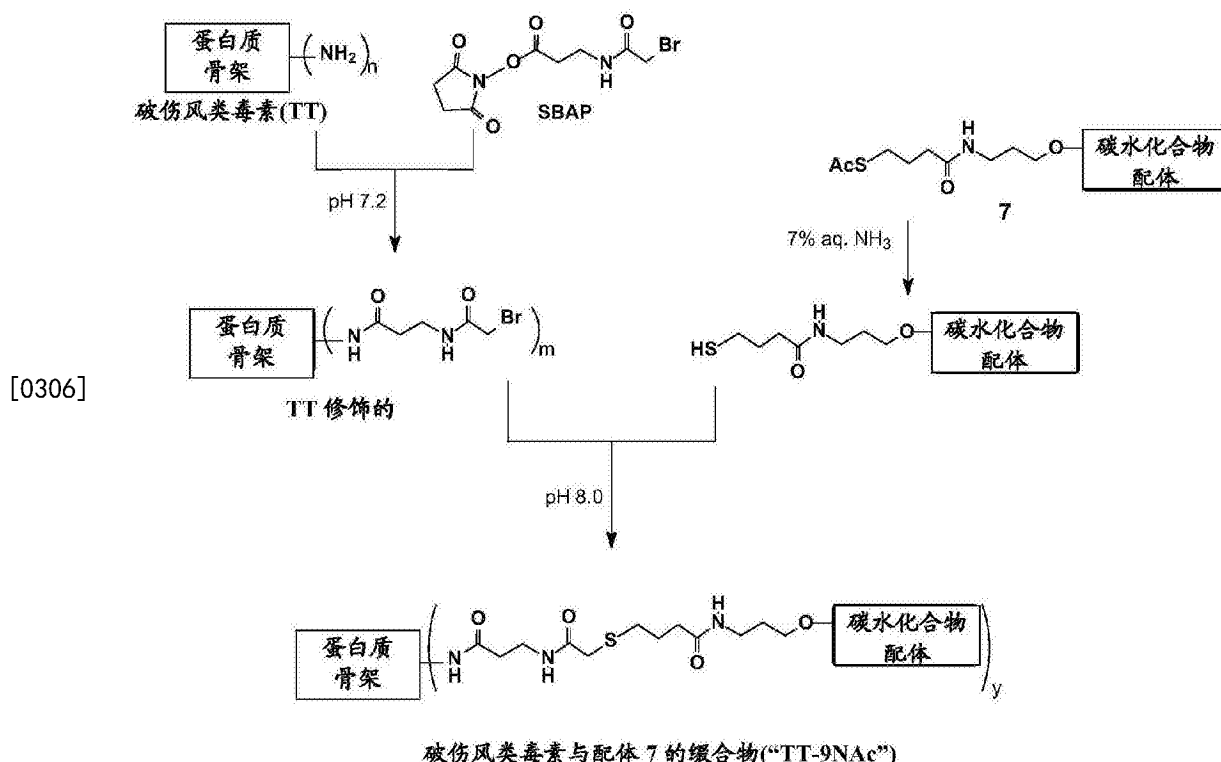
[0301] 步骤1. 蛋白质修饰。用400 μ l pH 7.2缓冲液(0.1M磷酸钠, 0.15M NaCl, 10mM EDTA) 稀释破伤风类毒素(在120 μ l中4mg, 储备溶液), 加入SBAP(2.6mg)的DMSO(80 μ l)溶液, 并在RT下将混合物温育2h。应用PD-10柱在pH 8.0电泳缓冲液(0.1M磷酸钠, 0.15M NaCl, 10mM EDTA)中移除未反应的SBAP, 并将得到的3.5ml经修饰的蛋白质溶液浓缩至400 μ l。

[0302] 步骤2. 二硫化物还原。将固定的TCEP二硫化物还原凝胶(Immobilized TCEP Disulfide Reducing Gel) (200μl在水中的50%浆体) 离心, 移除过量的水, 并加入二硫化物6 (1.5mg, 在100μl pH 8.0缓冲液 (0.1M磷酸钠, 0.15M NaCl, 10mM EDTA) 中)。在室温下在转架上温育45分钟后, 通过离心从凝胶上分离SH-衍生物溶液, 并用相同的pH 8.0缓冲液 (3x 100μl) 洗涤固定的TCEP。

[0303] 步骤3. 缀合。使在步骤2中得到的配体溶液(400 μ l在pH 8.0缓冲液中)立即与经修饰的蛋白质(400 μ l在pH 8.0缓冲液中, 步骤1)混合, 并在室温下搅拌过夜。然后, 通过在Superose 6制备级(prepare-grade)柱上的凝胶过滤将缀合物从未偶联的成分中分离。合并含有TT-9NH₂缀合物的流份, 浓缩, 并储存于-20 $^{\circ}$ C。

[0304] 缀合物的化学分析。应用Smith和Gilkinson(R.L.Smith及E.Gilkinson.1979Analytical Biochem.98:478-480)描述的己糖胺测试法,用化合物6作为标准品,分析缀合物的寡糖含量,以及用Bradford测试法(M.M.Bradford,1976,Analytical Biochem.72:248-254)分析蛋白质。根据这些测定,缀合物TT-9NH₂中每一蛋白质分子含有74个碳水化合物配体(x=74)。

[0305] 实施例8.破伤风类毒素与配体7的缀合物“TT-9NAc”的制备



[0307] 流程7. 与配体7的缀合

[0308] 步骤1. 蛋白质修饰。如上面对缀合物TT-9NH₂所描述的那样用SBAP 修饰TT。

[0309] 步骤2. S-乙酰基脱保护。将九糖7 (2.1mg) 溶解于200μl 7% NH₃水溶液中, 在室温下保持该混合物1小时, 然后冻干。

[0310] 步骤3. 缀合。将冻干的寡糖立即溶解于400μl pH 8.0缓冲液 (0.1M磷酸钠, 0.15M NaCl, 10mM EDTA) 中, 并与400μl 在相同缓冲液中的TT-修饰的溶液混合。在室温下搅拌反应混合物过夜。这之后, 通过在Superose6制备级柱上进行凝胶过滤将缀合物从未偶联的成分中分离。合并含有TT-9NAc缀合物的流份, 浓缩, 并储存于-20℃。

[0311] 缀合物的化学分析。如与缀合物TT-9NH₂ (实施例7) 相同的方式进行分析, 揭示了缀合物TT-9NAc中每蛋白质分子含有71个碳水化合物配体 (y=71)。

[0312] 实施例9. 应用寡糖缀合物产生抗体

[0313] 方法: 用10μg多糖当量的与破伤风类毒素(TT) 缀合的九葡萄糖胺(即, 9个链接的单体) 皮下免疫兔两次, 间隔一周, 用等体积的Specol佐剂免疫。在第三周, 用在盐水中的10μg PS-当量IV将兔免疫3次(即, 在星期一、星期三和星期五)。最后一次免疫后, 使兔休息两周, 并且每两周取血。本文中的数据包含了来自免疫后获得的第一(血液1) 和第二(血液2) 次血清的结果。

[0314] 结果: 图1A和B显示了与由未乙酰化的九-葡萄糖胺(9GlcNH₂) 引诱的抗血清与来自金黄色葡萄球菌的PNAG (A) 或dPNAG (B) 的结合相关的数据。在该试验中使用的dPNAG是约15%乙酰化的。然而, 应当理解, 乙酰化的水平可以是0-40%。该数据展示了该抗血清同等地与PNAG及dPNAG结合。

[0315] 图2A和B显示了涉及针对完全乙酰化的九-葡萄糖胺(9GlcNAc) 产生的抗血清与来自金黄色葡萄球菌的PNAG或dPNAG的结合的数据。该数据展示了该抗血清与高乙酰化PNAG的结合比与dPNAG的结合更好。

[0316] 图3A和B显示了涉及针对TT-缀合的9GlcNAc或9GlcNH₂产生的抗血清与未缀合的11GlcNAc或11GlcNH₂的结合的数据。该数据显示针对乙酰化的9GlcNAc产生的抗血清比针对未乙酰化的9GlcNH₂产生的抗血清更好地与乙酰化的11GlcNAc结合。对于与9GlcNH₂的结合而言则是相反的,因为针对9GlcNH₂-TT缀合物的抗血清在小于6400的血清稀释下是偏出刻度的(off-scale)。

[0317] 图4和5显示了应用来自血液1的抗血清抗金黄色葡萄球菌MN8和两种USA300菌株的结果。图4比较了抗缀合至破伤风类毒素(TT)的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺的兔抗血清(称为“血液1”)对抗金黄色葡萄球菌MN8(CP8)的杀灭。图5比较了抗缀合至TT的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺的兔抗血清(血液1)对抗金黄色葡萄球菌MN8的杀灭。应用抗-dPNAG-TT缀合物抗血清作为比较。图6比较了抗缀合至TT的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺的兔血清(血液1)对抗金黄色葡萄球菌LAC(NT,USA300)的杀灭。图7比较了抗缀合至TT的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺的兔血清(血液1)对抗金黄色葡萄球菌SF8300(NT,USA300)的杀灭。图8比较了抗缀合至TT的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺的兔血清(血液1)对抗金黄色葡萄球菌LAC(NT,USA300)的杀灭。总而言之,证明了针对9GlcNH₂-TT产生的血清有更好的总活性,但是在多数测试中仅比针对9GlcNAc-TT产生的血清略好。

[0318] 图9-16显示了应用血液2血清得到的杀灭数据。对于菌株MN8、SF8300和LAC,应用兔抗dPNAG-TT对照作为比较物。对于Newman(CP5)、PS80(CP8)和同基因株Reynolds CP5、Reynolds不标准型(non-typable)和Reynolds CP8,应用山羊抗dPNAG-TT作为比较物。

[0319] 图9比较了抗缀合至TT的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺的兔血清(血液2)对抗金黄色葡萄球菌MN8(CP8)的杀灭。图10比较了通过抗缀合至TT的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺的兔血清(血液2)对抗金黄色葡萄球菌LAC(NT,USA300)的杀灭。图11比较了通过抗缀合至TT的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺的兔血清(血液2)对抗金黄色葡萄球菌SF8300(NT,USA300)的杀灭。图12比较了通过抗缀合至TT的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺的兔血清(血液2)对抗金黄色葡萄球菌Newman(CP5)的杀灭。图13比较了通过抗缀合至TT的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺的兔血清(血液2)对抗金黄色葡萄球菌PS80的杀灭。图14比较了通过抗缀合至TT的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺的兔血清(血液2)对抗金黄色葡萄球菌Reynolds(CP5)的杀灭。图15比较了通过抗缀合至TT的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺的兔血清(血液2)对抗金黄色葡萄球菌Reynolds(不标准型)的杀灭。图16比较了通过抗缀合至TT的完全乙酰化或未乙酰化9-单体寡葡糖胺的兔血清(血液2)对抗金黄色葡萄球菌Reynolds(CP8)的杀灭。

[0320] 概括而言,应用针对寡糖缀合物产生的抗血清比应用针对dPNAG-TT产生的抗血清实现更高的杀灭程度。用血液2血清对菌株LAC和SF8300的杀灭比血液1血清更好,尽管ELISA结合曲线类似。应用血液2时,与应用针对9GlcNAc所产生的血清的溶胞作用相比,在应用针对9GlcNH₂所产生的抗血清的杀灭中观察到更大的差异。

[0321] 实施例10.兔抗血清与大肠杆菌的调理素杀灭

[0322] 免疫后兔抗血清(如之前所述)中的兔抗体介导调理素杀灭两种之前显示产生PNAG的大肠杆菌菌株,但是不杀灭缺乏编码大肠杆菌中PNAG生物合成酶的pga基因的第三种菌株(图16A)。

[0323] 实施例11. 小鼠皮肤脓肿模型

[0324] 图17、18和19显示了应用小鼠皮肤脓肿模型并用金黄色葡萄球菌菌株LAC (USA300) 攻击的体内研究结果。证实了针对9GlcNH₂产生的抗血清对于抵抗金黄色葡萄球菌LAC (USA300) 皮肤感染有保护效力。组1 (标记为9GlcNH₂-TT) 在感染前24小时腹膜内施用0.2ml 9GlcNH₂-TT抗血清 (血液2)。组2 (标记为NRS) 在感染前24小时施用0.2ml正常兔血清 (NRS)。用在具有microdex珠 (10g/ml) 的100μl皮下注射液 (每个脓肿) 中的2x10⁴CFU (图17)、2x 10⁵CFU (图19) 或2x 10⁶CFU (图20) 感染小鼠。使金黄色葡萄球菌LAC菌株在TSB中生长过夜, 然后洗涤, 并在施用前加入microdex珠。72小时后, 割下每一脓肿, 重悬于1ml TSB中, 匀化, 稀释, 然后将100μl匀浆涂板 (并系列稀释)。检测的低限是10CFU/脓肿。图17、18和19显示了与正常兔血清相比较, 施用9GlcNH₂-TT抗血清的小鼠极大地减少了每脓肿的CFU数。图20概述了图18-20的结果, 显示对于每一剂量的金黄色葡萄球菌, 施用了9GlcNH₂的小鼠更好地被保护免受金黄色葡萄球菌攻击。

[0325] 图21和22显示了应用如前段所描述的相同的小鼠皮肤脓肿模型和方法, 但攻击菌株为两种其它金黄色葡萄球菌菌株MN8和Newman的两个体内研究的结果。用在具有microdex珠 (10g/ml) 的100μl皮下注射液 (每脓肿) 中的1x 10⁶CFU菌株MN8 (图21) 或4x 10⁶CFU菌株Newman (图22) 感染小鼠。图21和22显示了与正常兔血清相比, 在施用了9GlcNH₂-TT抗血清的小鼠中每脓肿的CFU数目得以显著地减少。

[0326] 图23显示了针对9GlcNH₂-TT缀合物疫苗产生的抗血清不能显著地 (P>0.05) 减少金黄色葡萄球菌菌株MN8 Δica和Newman Δica的CFU/脓肿。这两种菌株移除了ica基因座, 并且不能再合成PNAG表面多糖。在缺乏PNAG抗原的情况下, 抗9GlcNH₂寡糖的抗体不能对金黄色葡萄球菌皮肤感染提供任何的保护性免疫。

[0327] 实施例12. 抗大肠杆菌腹膜炎的保护效力

[0328] 在大肠杆菌感染的致死腹膜炎模型中测试了抗9GlcNH₂-TT抗体的保护效力。该抗体保护所有经免疫的小鼠免受由两种PNAG阳性大肠杆菌分离株 (表1, UTI菌株J和P) 引起的感染, 而所有接受了NRS的对照均没有存活。抗9GlcNH₂-TT抗血清的抗体没有提供抗PNAG-阴性大肠杆菌菌株H的任何保护。

[0329] 表1. 抗9GlcNH₂-TT抗体的对抗由大肠杆菌引起的致死腹膜炎的保护效力

	攻击 大肠杆菌菌株	总小鼠中的 存活者数量		P值 (Fisher 精确检验)
		抗-9GlcNH ₂ TT	NRS ^a	
[0330]	J (PNAG ⁺)	8/8	0/8	0.0002
	P (PNAG ⁺)	8/8	0/8	0.0002
	H (PNAG ⁻)	0/8	0/8	1.0
[0331]	^a NRS: 正常兔血清			
[0332]	结果讨论			

[0333] 应用完全未乙酰化的、合成的GlcNH₂-TT缀合物疫苗,根据本发明发现对于在动物中产生高水平调理性(opsonic)和保护性抗体而言不需要醋酸盐,缀合小到5个GlcNH₂-单体大小的分子对于强劲的免疫反应而言即已足够,并且这些抗体容易与高乙酰化的PNAG、低乙酰化的dPNAG和未乙酰化的寡糖结合。因此这些保护性抗体会与天然存在的PNAG结合,而不管其组成,包括其乙酰化水平。

[0334] 本发明还考虑到制备包含多抗原的疫苗,包括本发明的未乙酰化的寡糖。具有还原端连接体(其含有反应性巯基)的GlcNH₂-寡聚物的合成提示可通过将该GlcNH₂-寡糖与作为致病因子和疫苗抗原的微生物蛋白质缀合,从而更有效地制备靶向制造PNAG的微生物的疫苗。例如,鼠疫杆菌(*Y.pestis*)的LcrV蛋白是保护免患鼠疫的靶标(Garmory等,Vaccine 22:947-57 (2004);Overheim等,Infect.Immun.73:5152-9 (2005);Quenee等,Infect.Immun.76:2025-2036 (2008)),但是在中亚流行的鼠疫杆菌菌株中发现了该蛋白的血清学变体(Anisimov等,Clin.Microbiol.Rev.17:434-464 (2004)),使得此类菌株可能会逃避由单LcrV疫苗成分引起的免疫。由于鼠疫杆菌表达PNAG,因此将GlcNH₂-寡聚物与LcrV缀合可能提高鼠疫疫苗的保护覆盖度。该疫苗制造方法是有吸引力的,因为合成形式的dPNAG寡糖可非常便宜地制得,并且非常重要,其将没有任何其他的微生物污染。

[0335] 总之,这些发现表明与载体蛋白质缀合的 β (1→6)-连接的葡糖胺小寡聚物能诱导高效价的调理性抗体,其还可保护抵抗实验性金黄色葡萄球菌皮肤感染和由大肠杆菌引起的致死腹膜炎。

[0336] 等同方式

[0337] 虽然本文中已经描述并举例说明了本发明的数个实施方案,但本领域技术人员将很容易预见到用于实现本文中所述的功能和/或获得本文中所述的结果和/或一个或多个优点的多种其它的手段和/或结构,这些变化和/或修改中的每一种均被认为在本文描述的发明实施方案范围内。更具体来讲,本领域技术人员将容易理解,本文中所述的所有参数、尺寸、材料和结构都旨在是示例性的,实际的参数、尺寸、材料和/或结构将取决于使用本发明教导的具体应用。本领域技术人员仅利用常规实验就知道或者能够确定本文中所述的具体发明实施方案的多种等同方式。因此,应当理解,前述实施方案仅是通过实例方式提出的,在所附权利要求和其等同方案的范围内,可超出具体所描述和所要求保护的内容而实施本发明技术方案。本公开文本的发明实施方案涉及本文中所述的每一种单独的特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法。此外,任何两种或更多种这些特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法的组合(如果这些特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法不彼此矛盾)都包括在本发明的范围内。

[0338] 在还有词典定义、所引入参考文献中的定义和/或所定义术语的普通含义的情况下,所有定义均应以本文中所定义和使用的为准。

[0339] 本文公开的所有参考文献、专利和专利申请均就其所引用的主题引入本文作为参考,在某些情况下其可以包括该文件的所有内容。

[0340] 除非有明确的相反说明,本说明书和权利要求书中所使用的不定冠词“一个”和“一种”均应理解为意为“至少一个(种)”。

[0341] 本说明书和权利要求书中所使用的短语“和/或”应理解为意指如此结合的要素中的“任一个或两者”,即在某些情形中联合存在的和在其它情形中分离地存在的要素。用

“和/或”列出的多个要素应以同样的方式进行解释,即如此结合的要素中的“一个或多个”。不同于通过“和/或”短语所具体指明的要素,其它要素可任选地存在,不论其与具体指明的那些要素相关或不相关。因此,作为非限制性的实例,对于“A和/或B”的引用,当与开放式语言(诸如“包含”)联用时,在一个实施方案中可仅涉及A(任选地包含除B以外的要素);在另一个实施方案中可仅涉及B(任选地包含除A以外的要素);在又一个实施方案中可涉及A和B二者(任选地包含其它要素)等。

[0342] 在本文的说明书和权利要求书中所用的“或”应当理解为具有与如上所定义的“和/或”相同的含义。例如,当在列表中分隔项目时,“或”或者“和/或”应解释为包含的意思,即包含至少一个,但也包含多于一个的一定数目的要素或要素列表,并且可任选地包含其它未列出的项目。仅当术语明确地做出相反指明时(比如“仅...之一”或“...确切的之一”)或者“由...组成”(在权利要求中使用)才指包括多个要素或要素列表中的恰好一个要素。通常,当跟有排他性术语比如“...两者之一”、“...中之一”、“仅...中之一”或“...中确切的之一”时,本文中所用的术语“或”应仅解释为表示排他性的选择(即“一个或另一个但非两者”)。当用于权利要求中时,“基本上由...组成”具有其在专利法领域中所用的普通含义。

[0343] 在本文的说明书和权利要求书中所用的短语“至少一个(种)”,在涉及一个或多个要素的列表时,应当理解为意指从所述要素列表中的任何一个或多个要素中所选出的至少一个要素,但不必包含所述要素列表中具体列出的每个要素的至少一个,也不排除所述要素列表中要素的任意组合。此定义还允许可任选地存在与短语“至少一个”所涉及要素列表中所具体指明要素不相同的要素,无论其与所具体指明的那些要素相关或不相关。因此,作为一个非限制性实例,“A和B中的至少一个”(或等价的“A或 B中的至少一个”或者“A和/或B中的至少一个”)在一个实施方案中可以意指至少一个(任选地包括多于一个)A而没有B存在(任选地包含除B以外的要素);在另一个实施方案中可以意指至少一个(任选地包括多于一个)B而没有A存在(任选地包含除A以外的要素);在又一个实施方案中可以意指至少一个(任选地包括多于一个)A和至少一个(任选地包括多于一个)B(以及任选地包含其它要素)等。

[0344] 应当理解,除非有明确相反说明,在本文中所要求保护的包含多于一个步骤或动作的任何方法中,所述方法的步骤或动作的顺序并不必局限于所述方法的步骤或动作被叙述的顺序。

[0345] 在权利要求书中以及在上述说明书中,所有的过渡性短语如“包含”、“包括”、“带有”、“具有”、“含有”、“涉及”、“容纳”等均应理解为开放式的,即意为包括但不限于。仅过渡性短语“由...组成”和“基本上由...组成”分别是封闭式或半封闭式的过渡性短语,如美国专利局专利审查程序手册(United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures),2111.03节中所述。

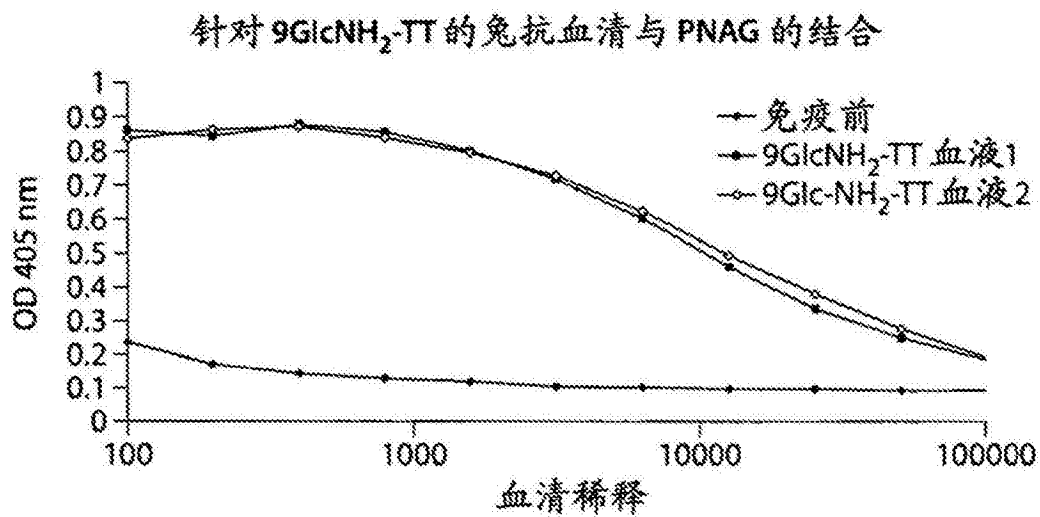


图1A

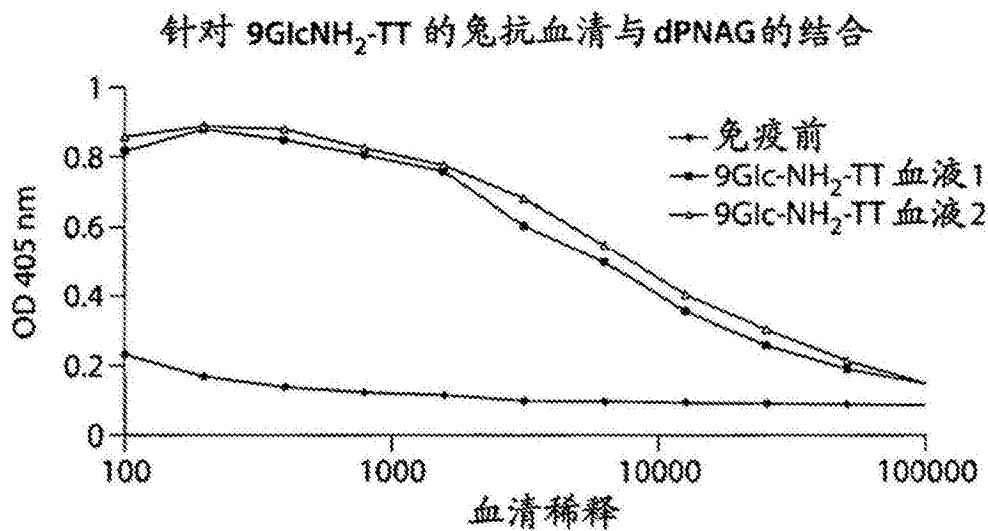


图1B

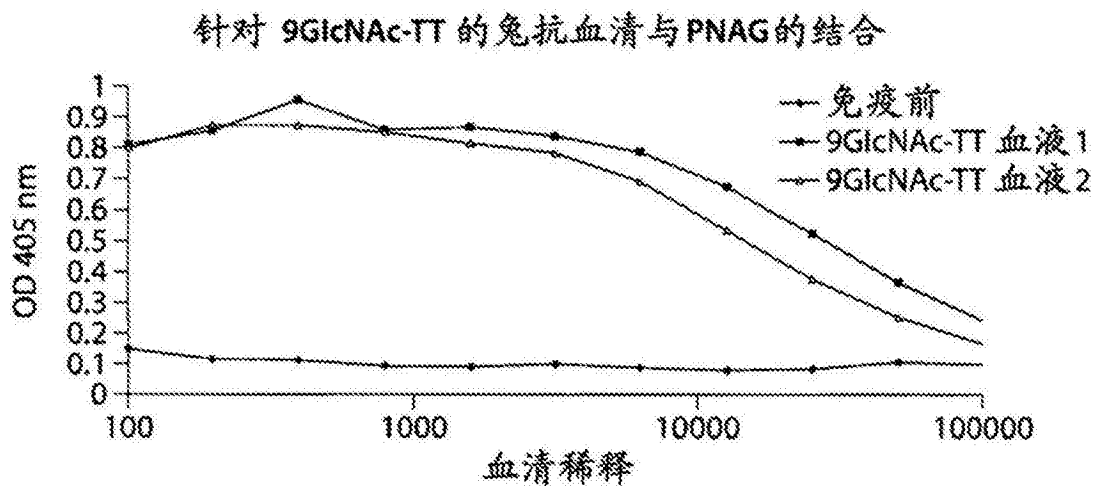


图2A

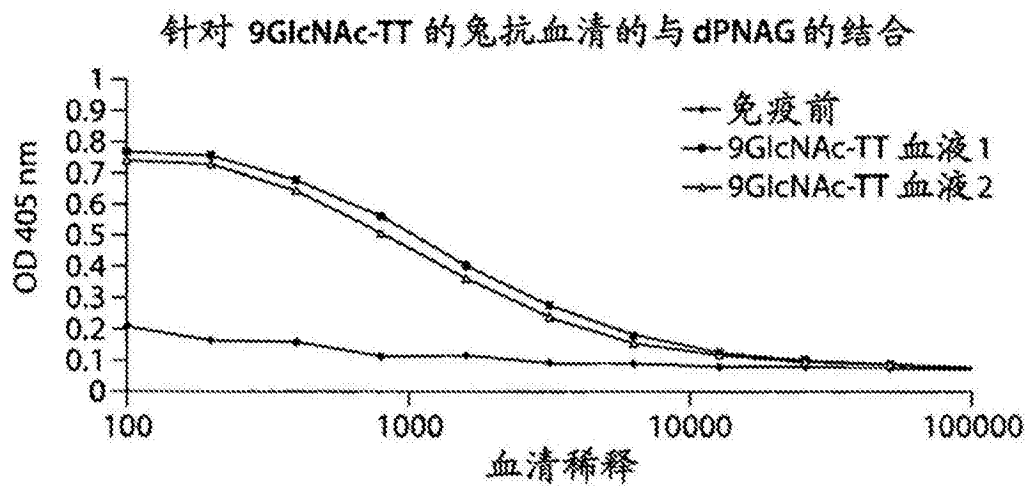


图2B

用 5 微克/ml 的 11GlcNAc 包被的板

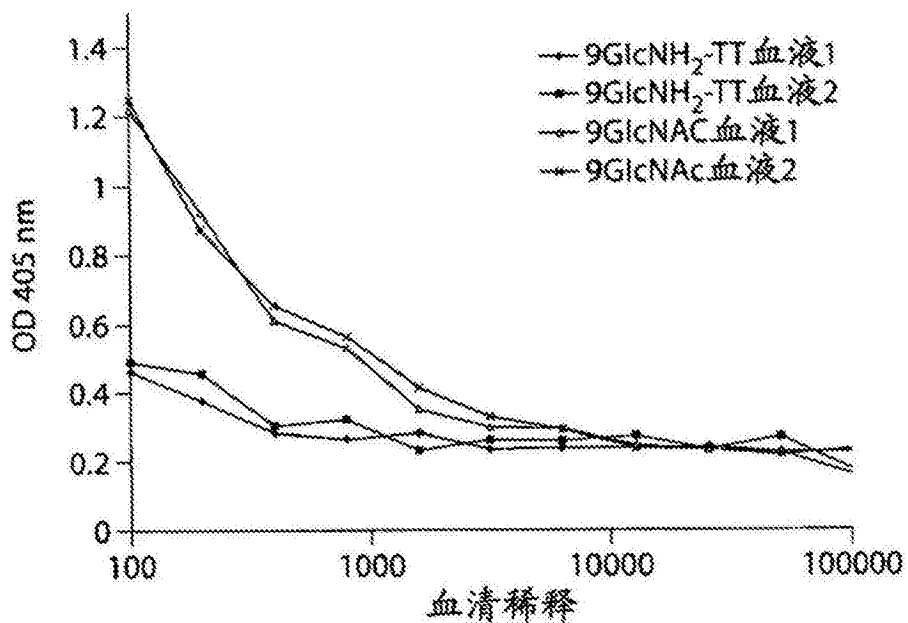


图3A

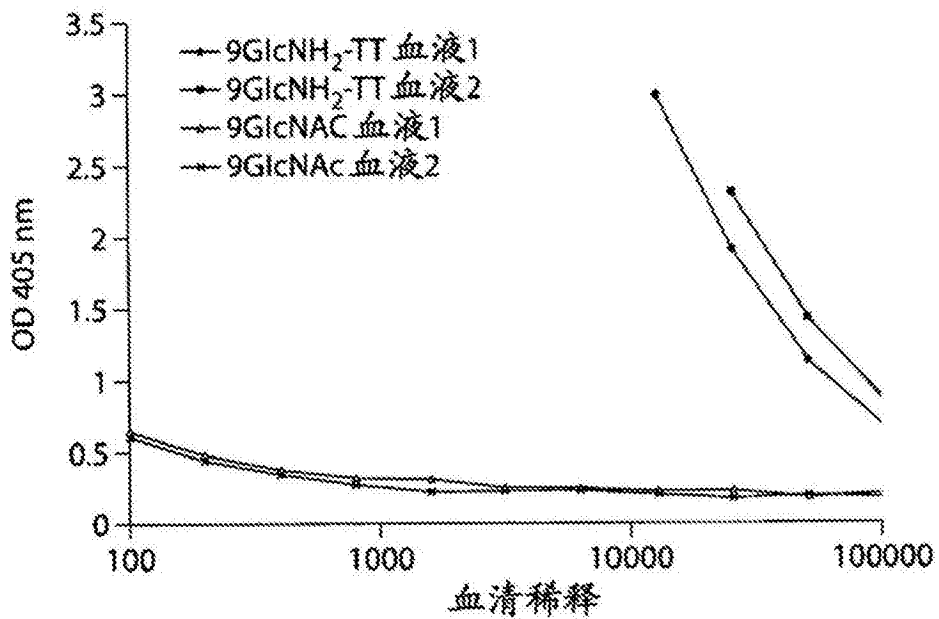
用 5 微克/ml 的 11GlcNH₂ 包被的板

图3B

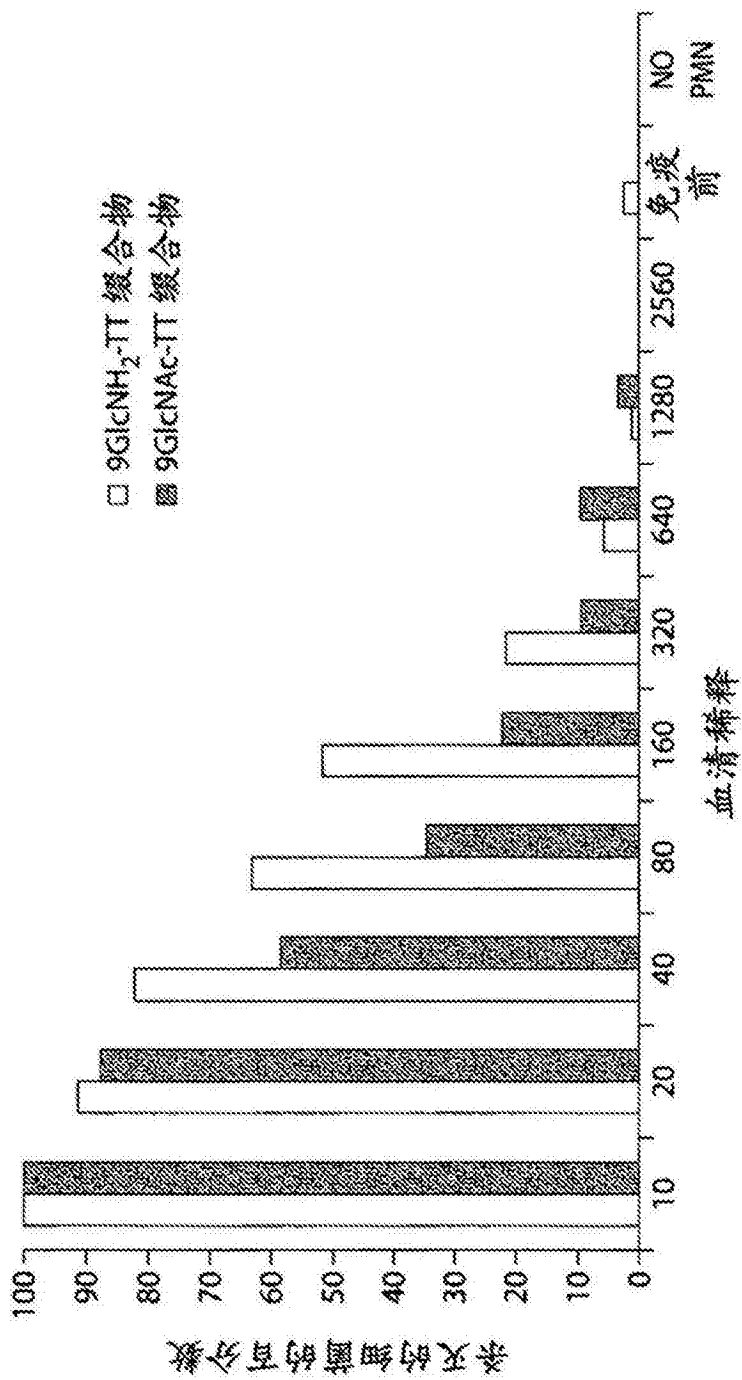


图4

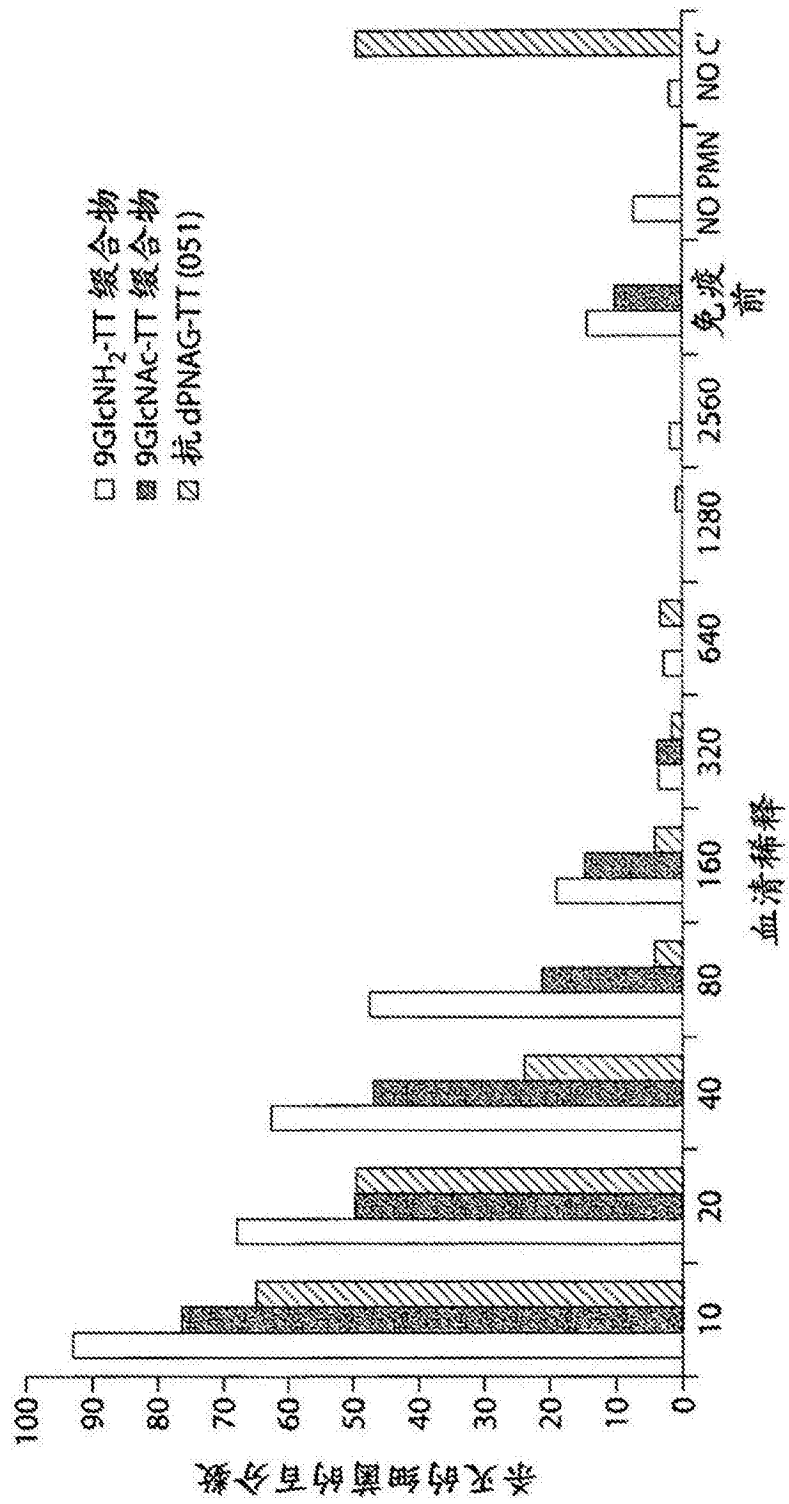


图5

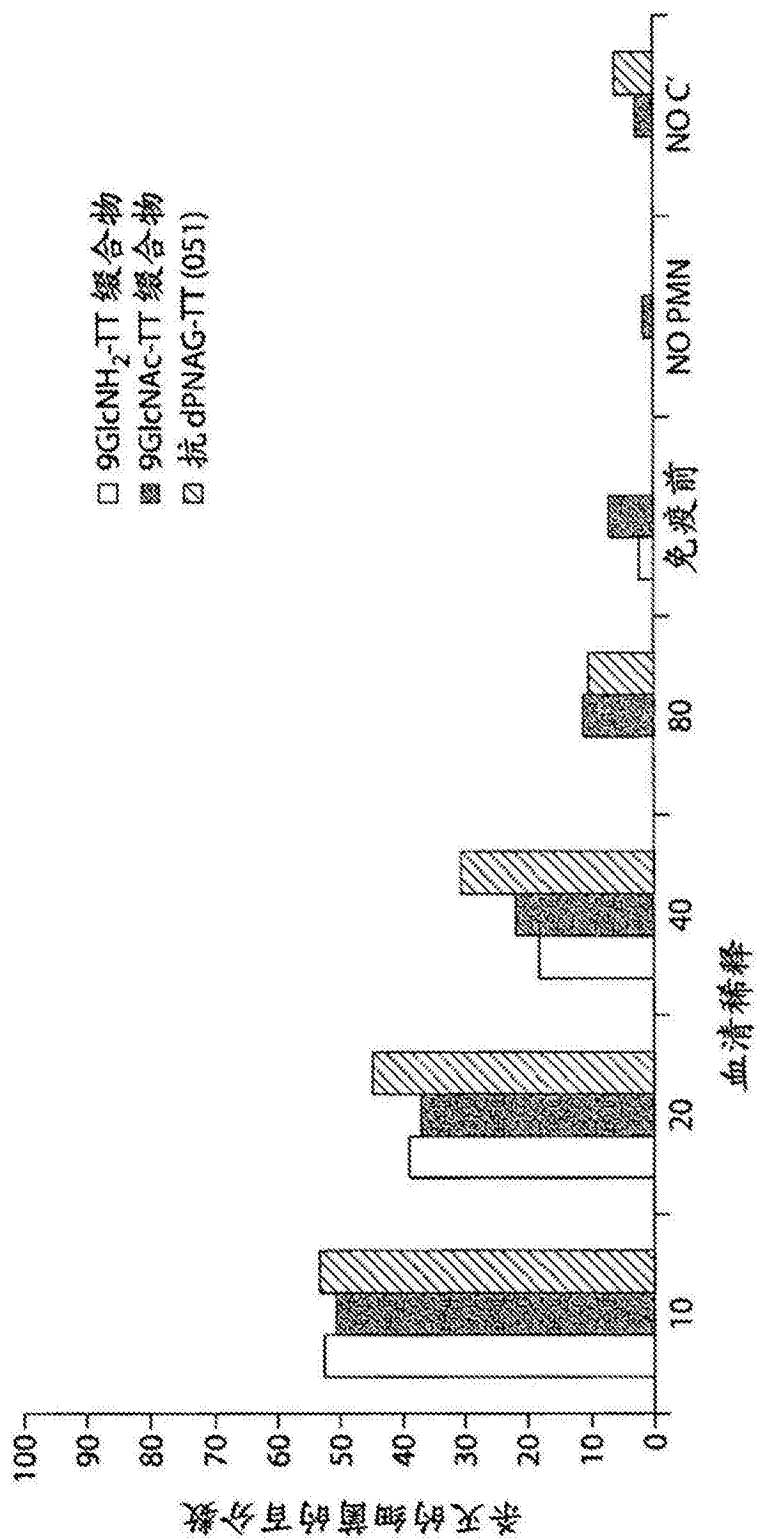


图6

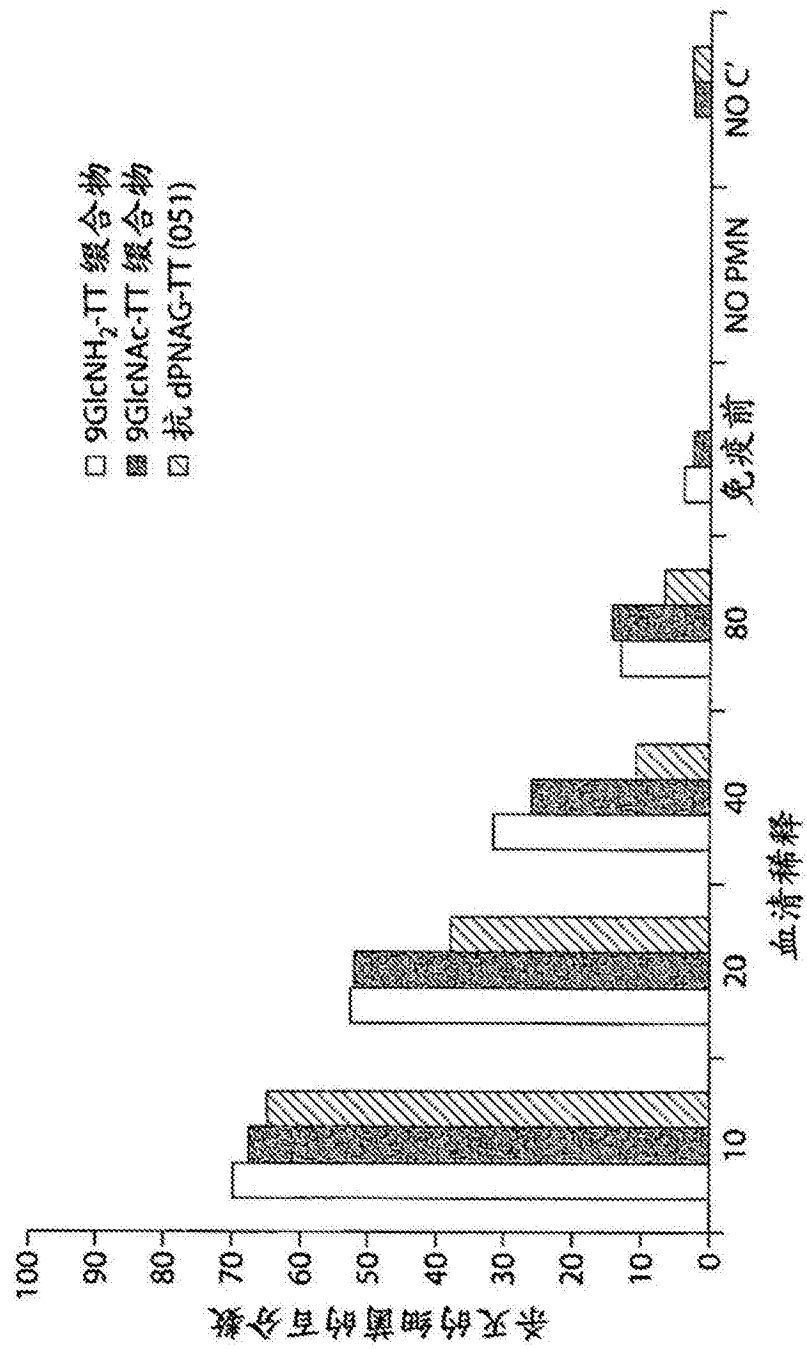


图7

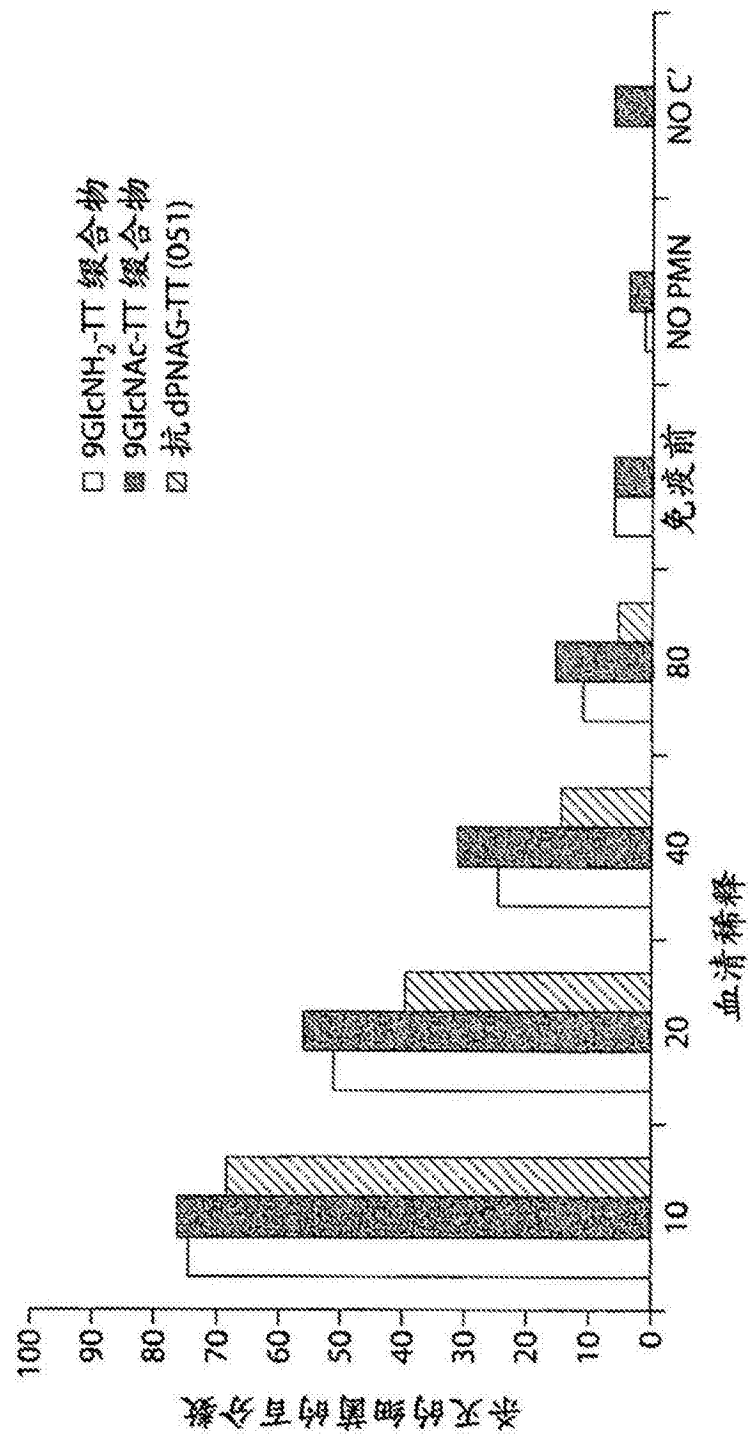


图8

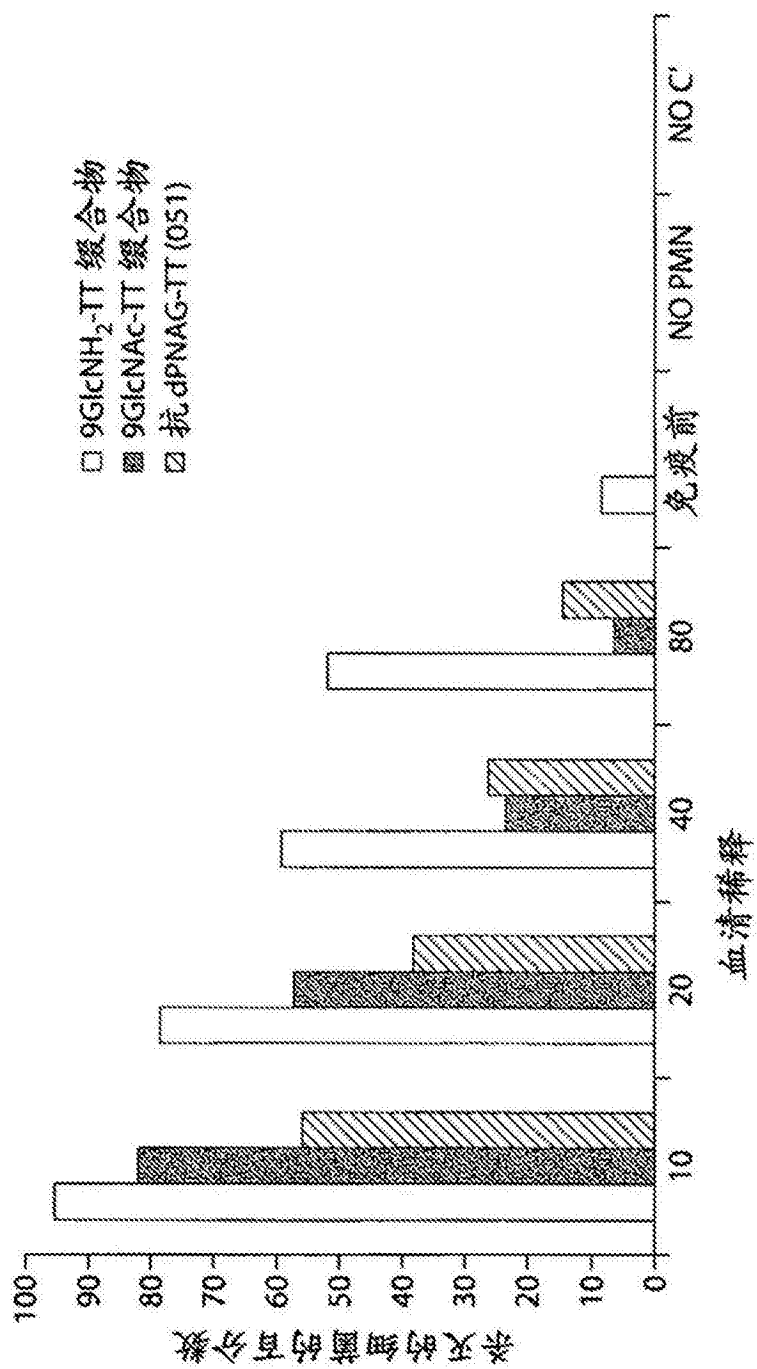


图9

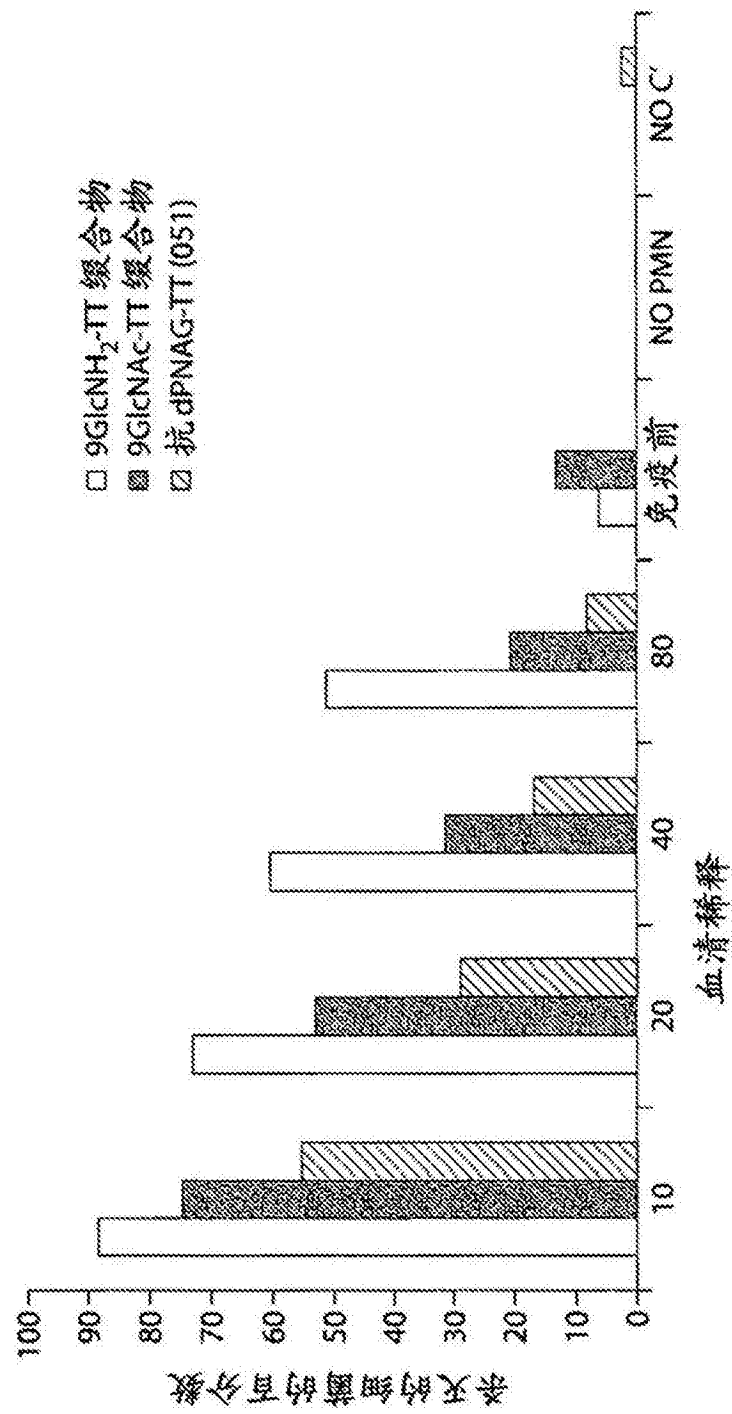


图10

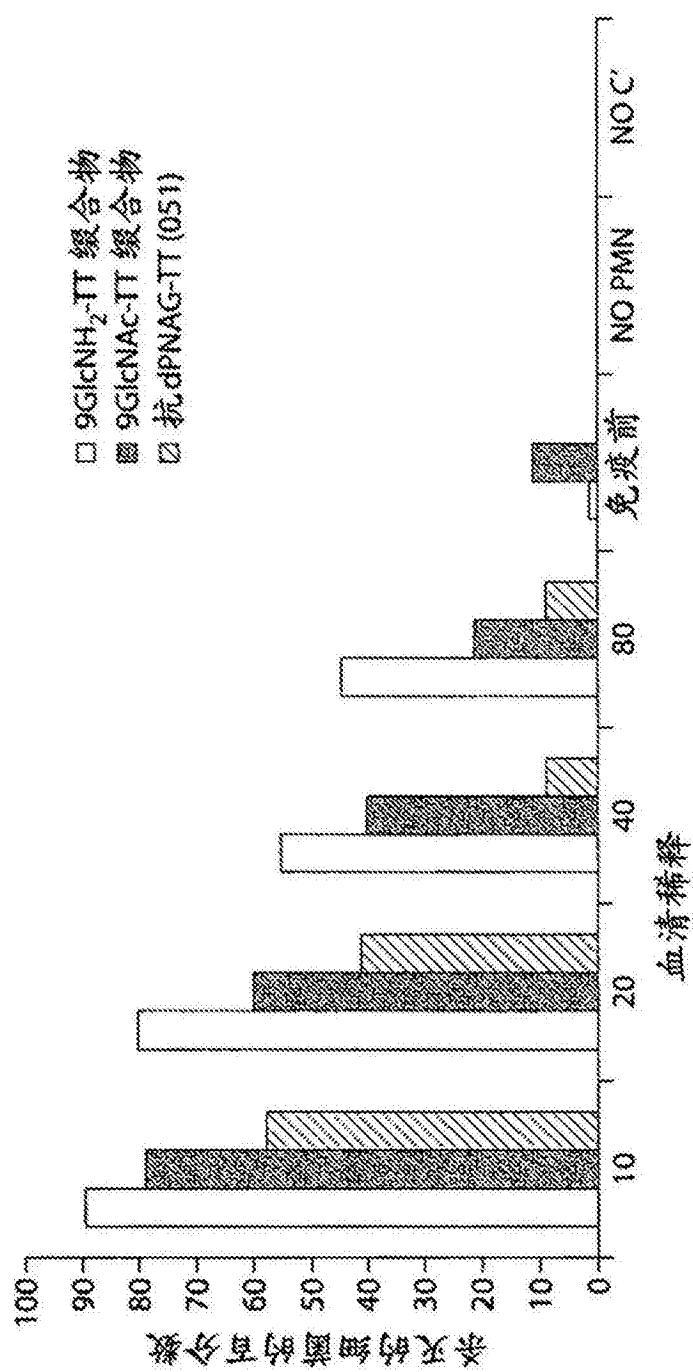


图11

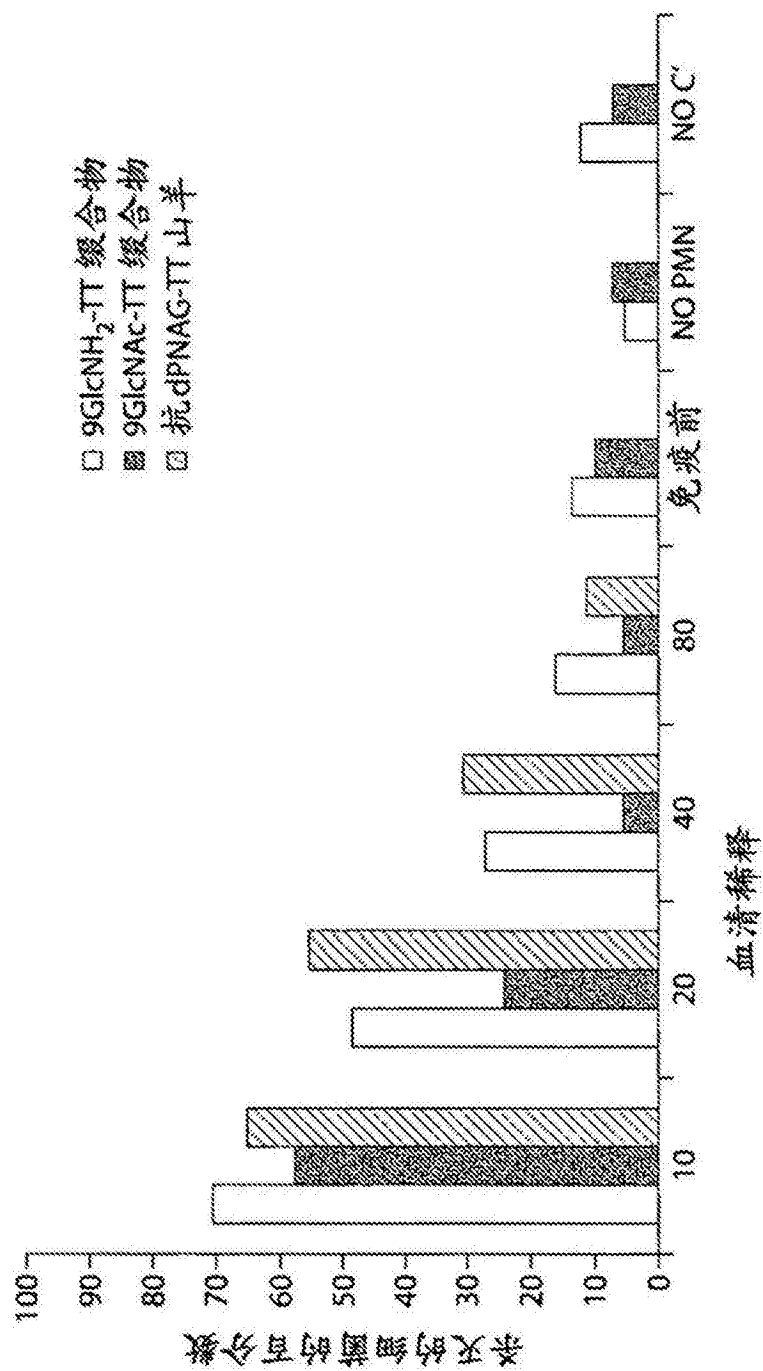


图12

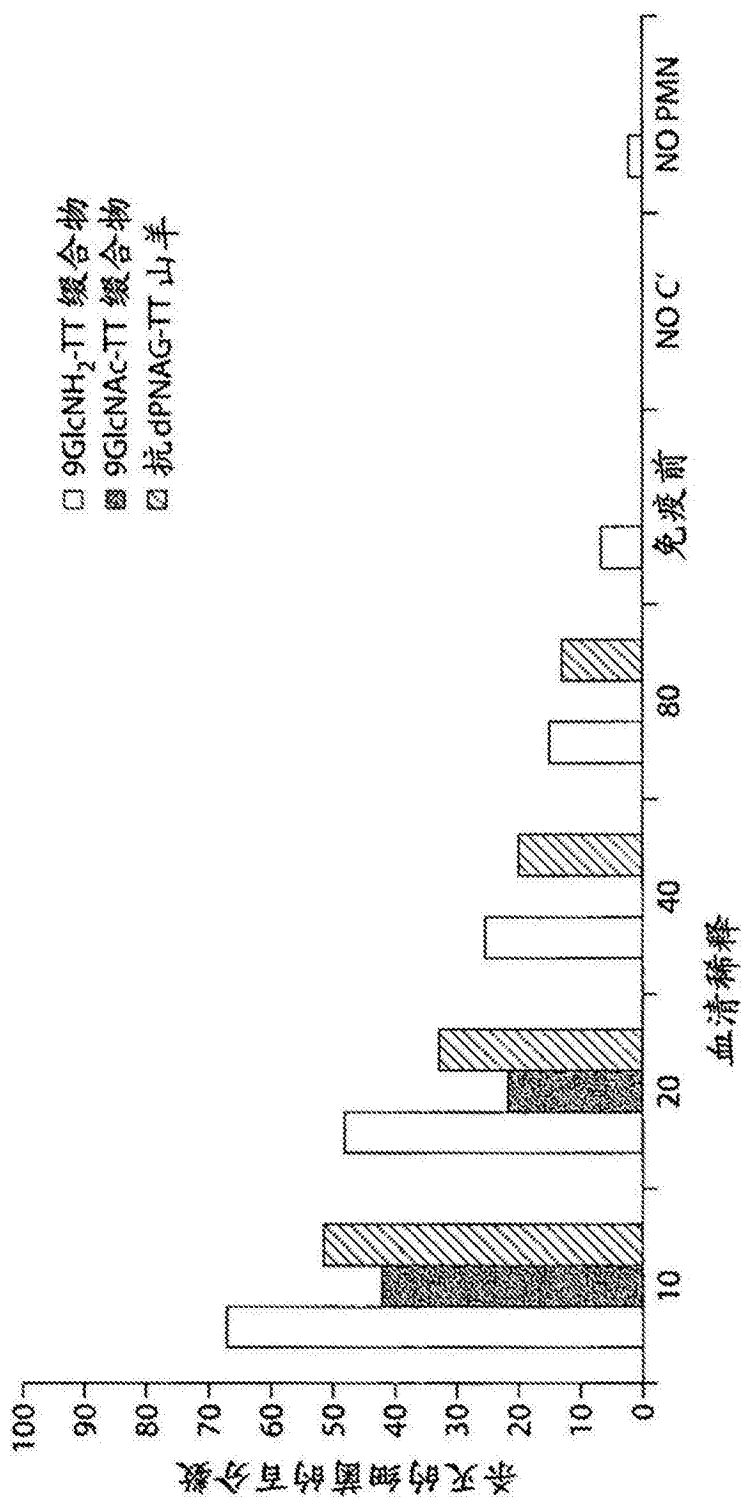


图13

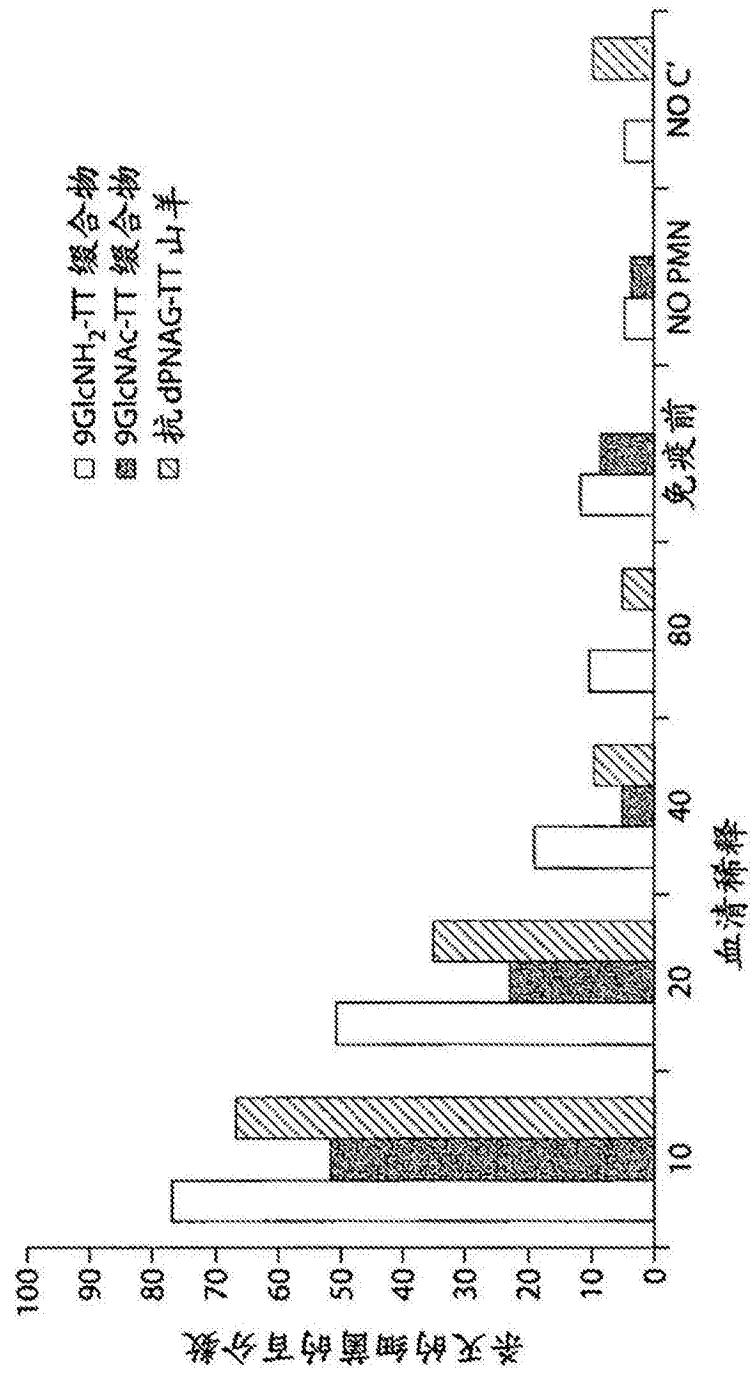


图14

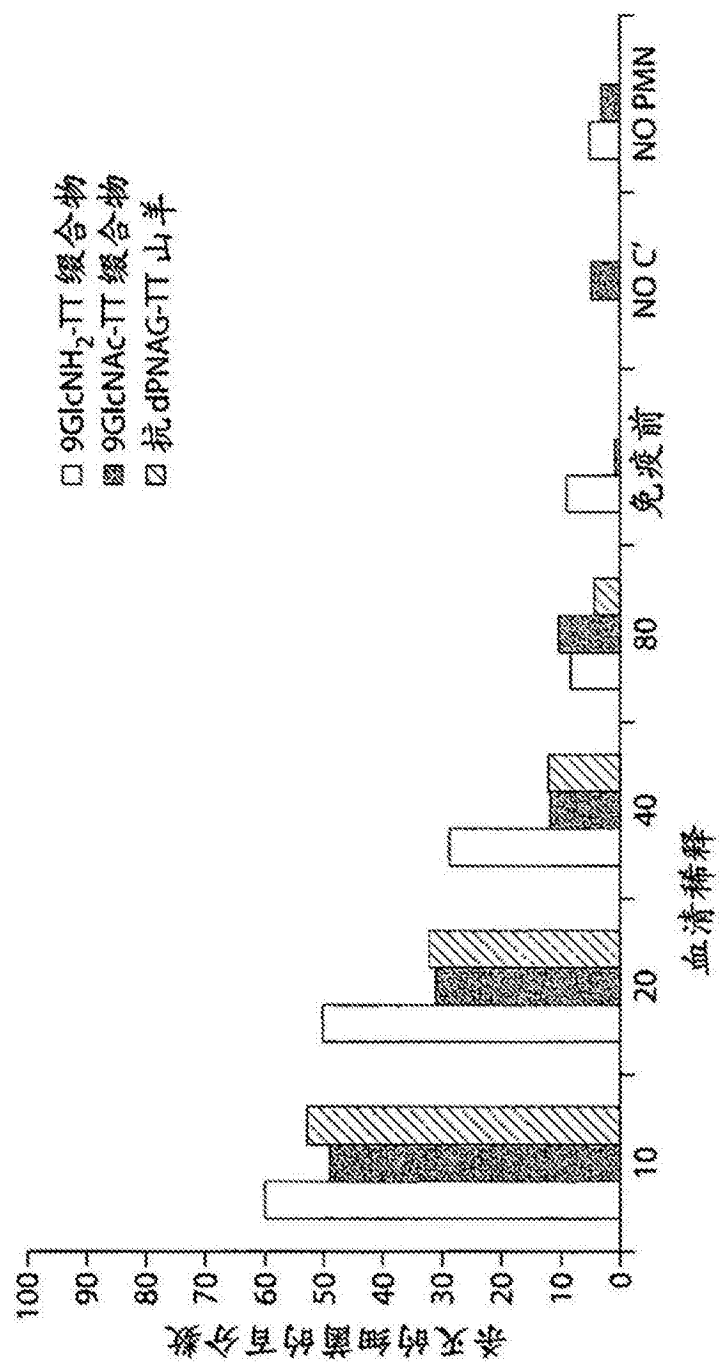


图15

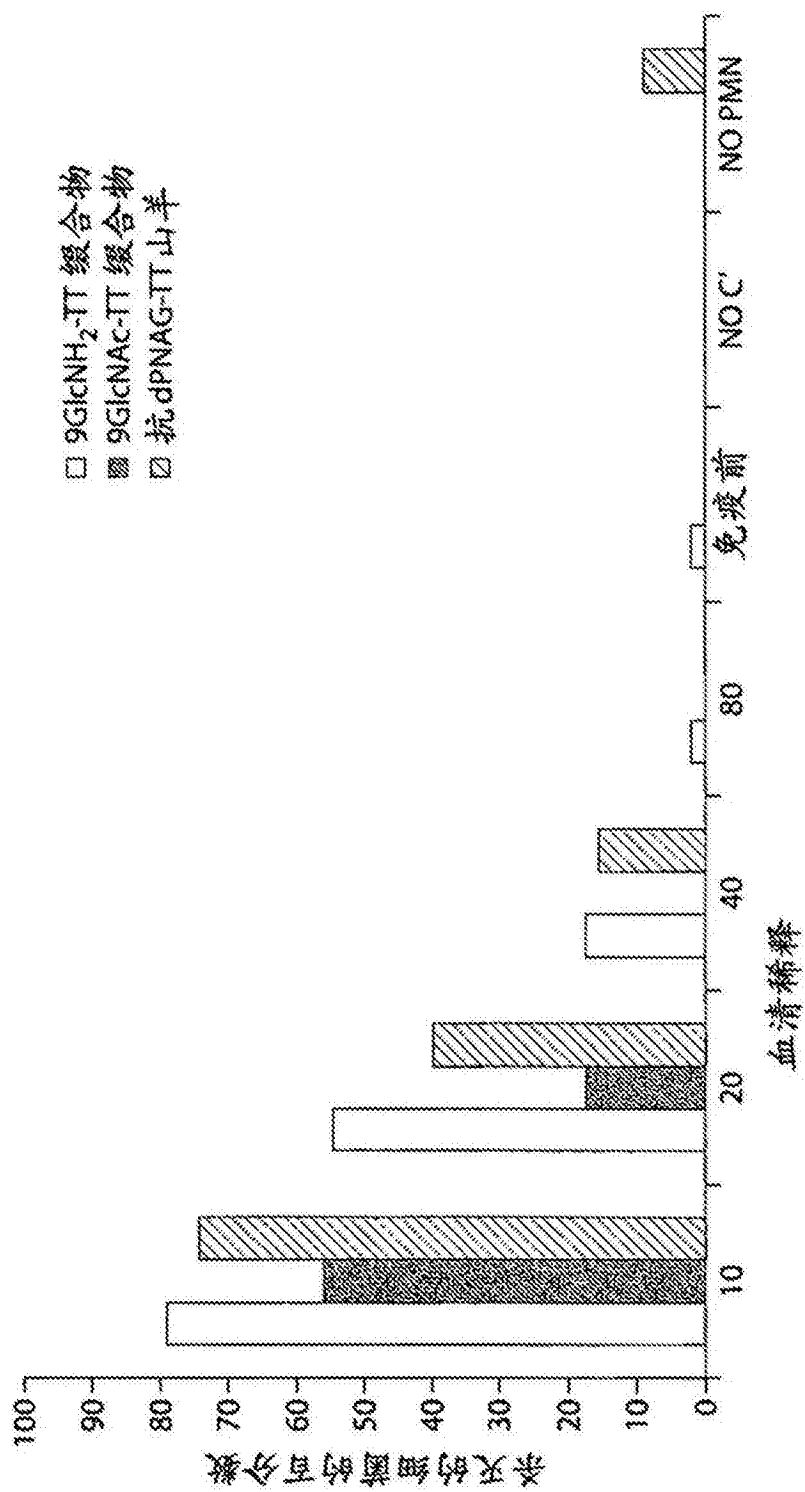


图16

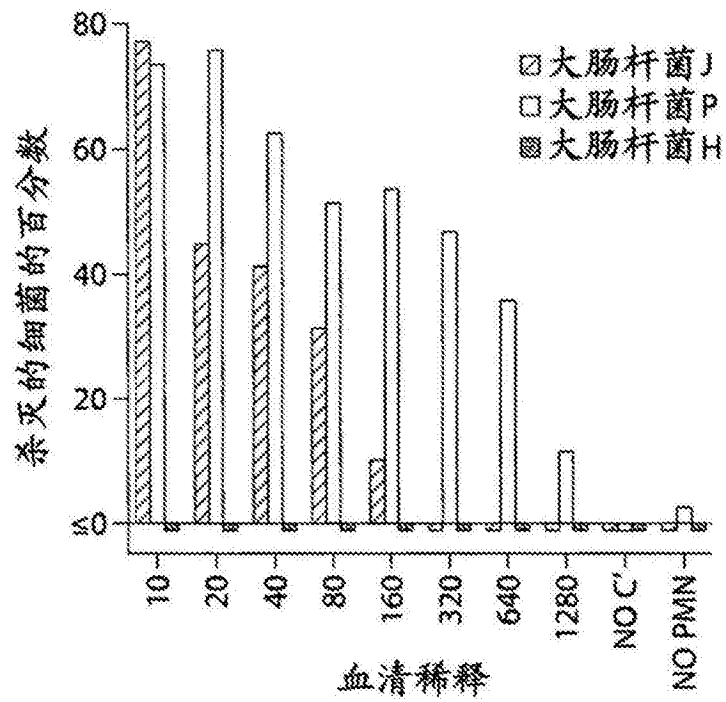


图16A

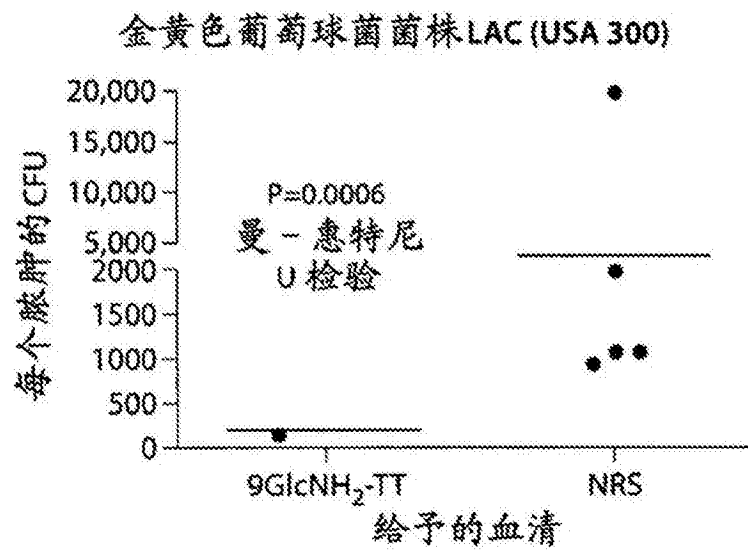


图17

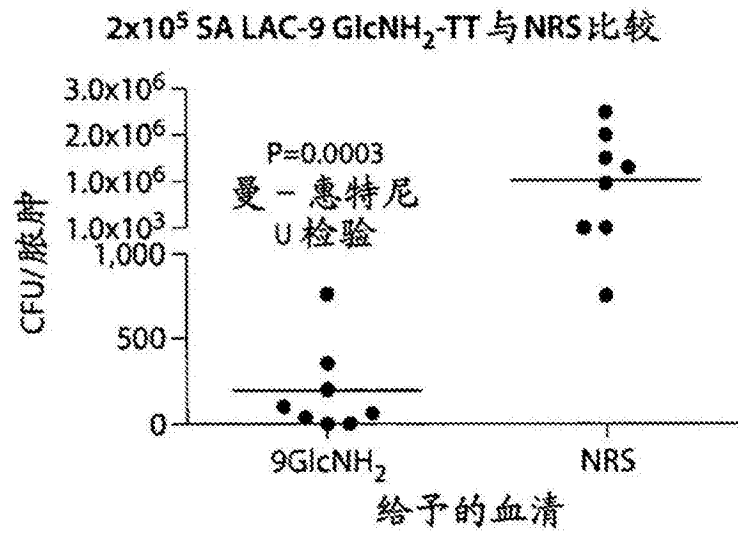


图18

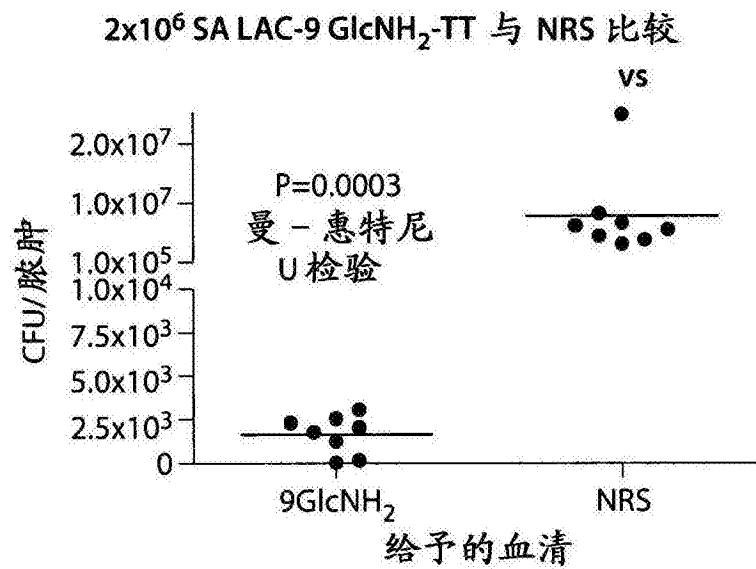


图19

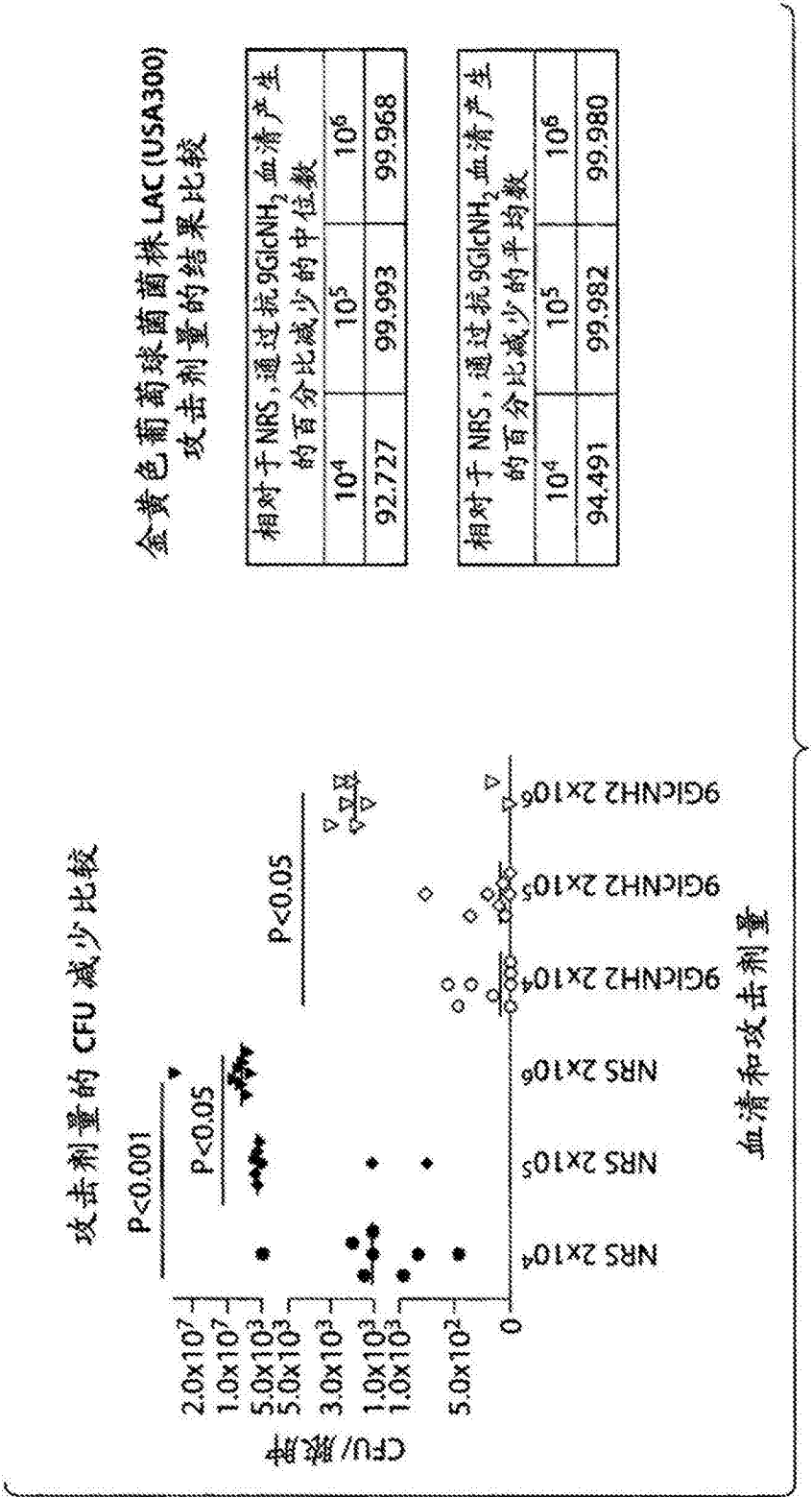


图 20

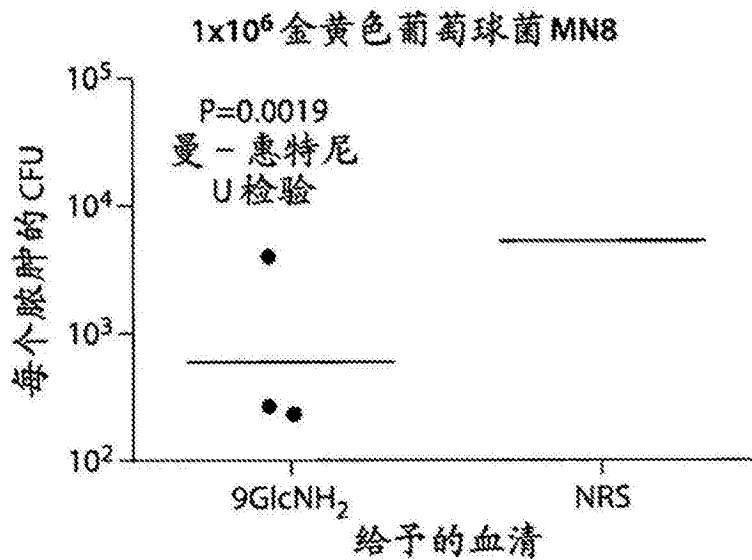


图21

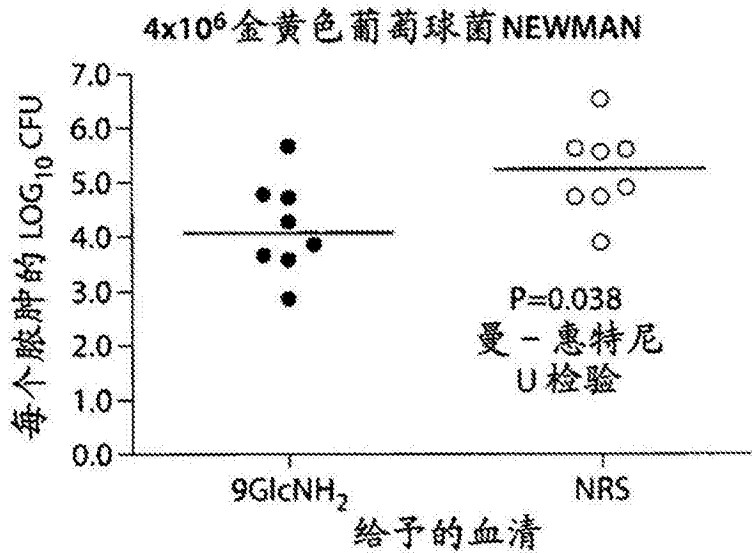


图22

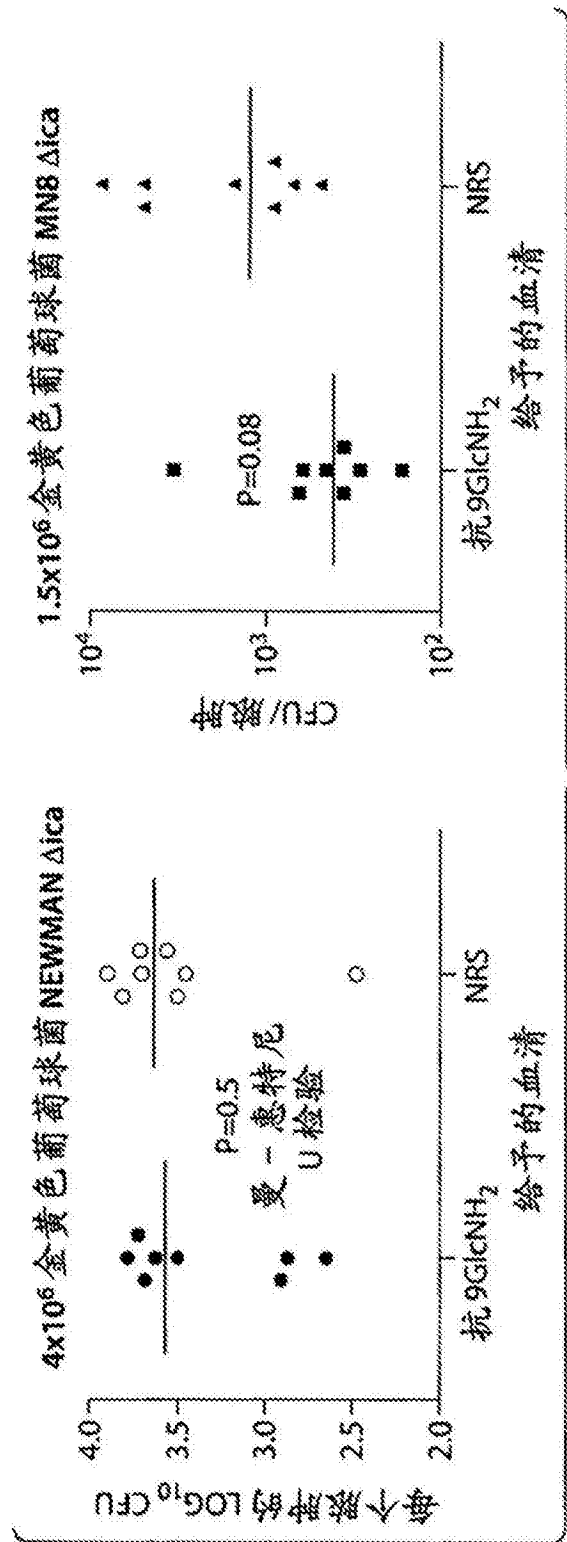


图23