



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104797597 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201380056321. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 11. 01

C07K 16/12(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12P 21/08(2006. 01)

201208082-6 2012. 11. 01 SG

G01N 33/53(2006. 01)

A61K 39/02(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 39/085(2006. 01)

2015. 04. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/SG2013/000473 2013. 11. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/070117 EN 2014. 05. 08

(83) 生物保藏信息

PTA-13256 2012. 09. 25

(71) 申请人 新加坡科技研究局

地址 新加坡新加坡市

(72) 发明人 王跃 徐晓莉

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

权利要求书5页 说明书23页

序列表4页

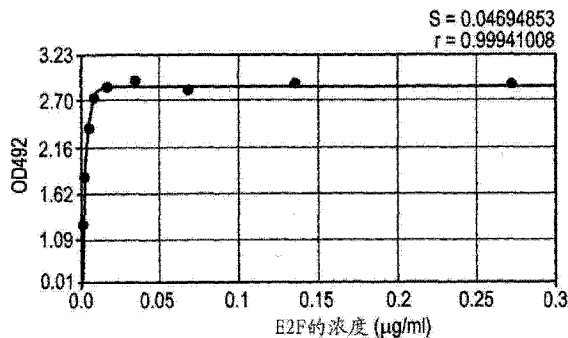
PCT/RO/134表1页 附图2页

(54) 发明名称

针对胞壁肽的单克隆抗体

(57) 摘要

公开了分离的抗体或其抗原结合片段。所述抗体能够结合胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐。所述胞壁肽包含胞壁酸和选自丙氨酸、异谷酰胺、谷氨酸及其盐的氨基酸。还公开了产生所述抗体的方法、包含所述抗体的组合物、利用所述抗体进行治疗的方法、所述抗体的用途、检测胞壁肽的方法、检测胞壁肽的测定、抗细菌剂、杂交瘤和试剂盒。



1. 分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段能够结合胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐,所述胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐包含胞壁酸和氨基酸,所述氨基酸选自丙氨酸、异谷酰胺、谷氨酸及以上的盐。

2. 如权利要求 1 所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述胞壁酸包含 N-乙酰基。

3. 如权利要求 1 所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述胞壁酸不包含 N-乙酰基。

4. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述丙氨酸是 L-丙氨酸或其盐。

5. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述异谷酰胺是 D-异谷酰胺或其盐。

6. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述谷氨酸是 D-谷氨酸或其盐。

7. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述氨基酸包含 L-丙氨酸或其盐,以及 D-异谷酰胺或其盐。

8. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述氨基酸包含 L-丙氨酸或其盐,以及 D-谷氨酸或其盐。

9. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐选自 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺、胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-谷氨酸和胞壁酰-L-丙氨酰-D-谷氨酸。

10. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐是肽聚糖或其片段的一部分。

11. 如权利要求 1 至 10 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含由 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列编码的重链。

12. 如权利要求 1 至 11 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含由 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列编码的轻链。

13. 如权利要求 1 至 12 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含由 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列编码的重链和由 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列编码的轻链。

14. 如权利要求 1 至 13 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其变体。

15. 如权利要求 14 所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述变体包含与 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%同一性的氨基酸序列。

16. 如权利要求 1 至 15 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或其变体。

17. 如权利要求 16 所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述变体包含与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%同一性的氨基酸序列。

18. 如权利要求 1 至 17 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变结构域和轻链可变结构域,所述重链可变结构域包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其变体,所述轻链可变结构域包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或其变体。

19. 如权利要求 1 至 18 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段是单克隆的。

20. 如权利要求 19 所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体属于 IgG1 亚型。

21. 如权利要求 19 或 20 所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体选自人源化抗体和嵌合抗体。

22. 如权利要求 1 至 21 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、sFV 和 scFv。

23. 如权利要求 1 至 22 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段能以选自以下的 Kd 值结合所述胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐: 小于约 1nM、小于约 900pM、小于约 800pM、小于约 700pM、小于约 600pM、小于约 500pM、小于约 400pM、小于约 300pM、小于约 200pM、小于约 100pM、小于约 90pM、小于约 80pM、小于约 70pM、小于约 60pM、小于约 50pM、小于约 40pM、小于约 30pM、小于约 20pM 和小于约 10pM。

24. 分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含含有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其变体的重链可变结构域。

25. 分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含含有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或其变体的轻链可变结构域。

26. 分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含含有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其变体的重链可变结构域,和含有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或其变体的轻链可变结构域。

27. 分离的核酸分子,其包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。

28. 载体,其包含权利要求 27 所述的分离的核酸分子。

29. 宿主细胞,其包含权利要求 27 所述的核酸分子或权利要求 28 所述的载体。

30. 分离的细胞系,其产生权利要求 1-26 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

31. 产生权利要求 1-26 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括以下步骤:在合适的条件下培养权利要求 29 所述的宿主细胞或权利要求 30 所述的分离的细胞系,并回收所述抗体或其抗原结合片段。

32. 产生权利要求 1-26 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括以下步骤:将权利要求 1-10 中任一项所述的胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐接种入非人动物,并分离从所述非人动物产生的抗体或其抗原结合片段。

33. 如权利要求 32 所述方法,其中所述胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐选自 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺、胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-谷氨酸和胞壁酰-L-丙氨酰-D-谷氨酸。

34. 组合物,其包含权利要求 1-26 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段以及药学可接受载体。

35. 如权利要求 34 所述的组合物,其还包含一种或多种治疗剂。

36. 疫苗,其包含权利要求 1-10 中任一项所述的胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐。

37. 免疫缀合物,其包含与以下共价连接的权利要求 1-26 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段:

细胞毒素剂,选自抗菌剂、化疗剂、药物部分、抗生素、放射性同位素、溶核酶、溶菌酶、蛋白酶和脂肪酶;或

捕获标记物;或

检测标记物,选自荧光素、若丹明、丹磺酰、丽丝胺、青色素、藻红蛋白、德克萨斯红和放射性核素检测标记物。

38. 预防性或治疗性地治疗选自以下的自身免疫性疾病或炎性疾病的方法,其包括给予个体权利要求 1-26 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,权利要求 34 或 35 所述的组合物,或权利要求 37 所述的免疫缀合物:

败血症、败血性休克、克罗恩病、风湿性关节炎、哮喘、过敏症、特应性病症、多发性硬化、百日咳、淋病、炎性肠病和抗生素相关的病症。

39. 预防性或治疗性地治疗细菌感染的方法,其包括给予个体权利要求 1-26 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,权利要求 34 或 35 所述的组合物,或权利要求 37 所述的免疫缀合物。

40. 如权利要求 39 所述的方法,其中所述细菌感染选自革兰氏阳性细菌感染和革兰氏阴性细菌感染。

41. 如权利要求 40 所述的方法,其中所述革兰氏阳性细菌感染是金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 感染。

42. 如权利要求 41 所述的方法,其中所述革兰氏阴性细菌感染是大肠杆菌感染。

43. 权利要求 1-26 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,权利要求 34 或 35 所述的组合物,或权利要求 37 所述的免疫缀合物,其用于预防性或治疗性地治疗选自以下的自身免疫性疾病或炎性疾病:败血症、败血性休克、克罗恩病、风湿性关节炎、哮喘、过敏症、特应性病症、多发性硬化、百日咳、淋病、炎性肠病和抗生素相关的病症。

44. 权利要求 1-26 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,权利要求 34 或 35 所述的组合物,或权利要求 37 所述的免疫缀合物,其用于预防性或治疗性地治疗细菌感染。

45. 如权利要求 44 所述的分离的抗体或其抗原结合片段、组合物或免疫缀合物,其中所述细菌感染选自革兰氏阳性细菌感染和革兰氏阴性细菌感染。

46. 如权利要求 45 所述的分离的抗体或其抗原结合片段、组合物或免疫缀合物,其中所述革兰氏阳性细菌感染是金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 感染。

47. 如权利要求 45 所述的分离的抗体或其抗原结合片段、组合物或免疫缀合物,其中所述革兰氏阴性细菌感染是大肠杆菌感染。

48. 权利要求 1-26 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,权利要求 34 或 35 所述的组合物,或权利要求 37 所述的免疫缀合物在制备用于预防性或治疗性地治疗选自以下的自身免疫性疾病或炎性疾病的药物中的用途:

败血症、败血性休克、克罗恩病、风湿性关节炎、哮喘、过敏症、特应性病症、多发性硬

化、百日咳、淋病、炎性肠病和抗生素相关的病症。

49. 权利要求 1-26 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 权利要求 34 或 35 所述的组合物, 或权利要求 37 所述的免疫缀合物在制备用于预防性或治疗性地治疗细菌感染感染的药物中的用途。

50. 如权利要求 49 所述的用途, 其中所述细菌感染选自革兰氏阳性细菌感染和革兰氏阴性细菌感染。

51. 如权利要求 50 所述的用途, 其中所述革兰氏阳性细菌感染是金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 感染。

52. 如权利要求 50 所述的用途, 其中所述革兰氏阴性细菌感染是大肠杆菌感染。

53. 检测样品中是否存在权利要求 1-10 中任一项所述的胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐的方法, 所述方法包括将所述样品与权利要求 1-26 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 权利要求 34 或 35 所述的组合物, 或权利要求 37 所述的免疫缀合物接触; 并分析所述样品以确定是否存在所述胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐与权利要求 1-26 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段的结合产物。

54. 如权利要求 53 所述的方法, 其还包括定量所述结合产物的水平。

55. 如权利要求 53 或 54 所述的方法, 其中所述样品是选自以下的生物样品: 唾液、全血、血液 (例如血清和血浆)、淋巴和囊积液、痰、粪便、眼泪、粘液、腹水、囊积液、尿液、乳头分泌物、乳头吸液、细胞、组织 (例如活检和尸检样品)、采集用于组织学目的的组织冷冻切片、档案样品、外植体、以及来自患者组织的原代细胞培养物和 / 或转化的细胞培养物。

56. 如权利要求 55 所述的方法, 其还包括将来自个体的生物样品中所述结合产物的水平与对照样品中所述结合产物的水平相比较, 其中相对于所述对照样品中所述结合产物的水平, 所述生物样品中所述结合产物的水平更高, 表明所述个体患有或倾向于患有选自自身免疫性疾病或炎性疾病以及细菌感染的病况。

57. 如权利要求 53 或 54 所述的方法, 其中所述样品选自食品、饮品、生物产品 (例如, 抗毒素、细菌和病毒疫苗、血液产品和激素提取物)、实验室设备或医疗设备、以及实验室试剂或医疗试剂。

58. 如权利要求 57 所述的方法, 其还包括将所述样品中所述结合产物的水平与对照中所述结合产物的水平相比较, 其中相对于所述对照中所述结合产物的水平, 所述样品中所述结合产物的水平更高, 表明所述样品被细菌污染。

59. 检测权利要求 1 至 10 中任一项所述的胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐的测定方法, 其包括将样品暴露于权利要求 1-26 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 权利要求 34 或 35 所述的组合物, 或权利要求 37 所述的免疫缀合物; 并确定所述抗体或其抗原结合片段、所述组合物或所述免疫缀合物与所述样品的结合程度。

60. 用于权利要求 53 至 58 中任一项所述的方法、或权利要求 59 所述的测定方法中的试剂盒, 其包含权利要求 1-26 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 权利要求 34 或 35 所述的组合物, 或权利要求 37 所述的免疫缀合物; 以及用于确定是否存在胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐与权利要求 1-26 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段的结合产物的一种或多种试剂。

61. 抗细菌剂, 其包含权利要求 1-26 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,

权利要求 34 或 35 所述的组合物,或权利要求 37 所述的免疫缀合物。

62. 杂交瘤,其在美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA, USA),以登录号编号 PTA-13256 保藏为 Wy-Hyb-2E7。

63. 包含由杂交瘤产生的抗体的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列的抗体,所述杂交瘤在美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA, USA),以登录号编号 PTA-13256 保藏为 Wy-Hyb-2E7。

针对胞壁肽的单克隆抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2012 年 11 月 1 日提交的新加坡专利申请第 201208082-6 号的优先权权益,其内容通过引用整体并入本文用于所有目的。

发明领域

[0003] 本发明通常涉及免疫学和传染病领域。具体而言,本发明涉及抗体。

[0004] 发明背景

[0005] 细菌感染无论是在医学领域还是在商业的非医学领域都是不受欢迎的。为了有效消除不想要的细菌生长,研究人员已经研究了细菌的基本构件,诸如细菌的细胞壁。细菌细胞壁的一种主要成分是肽聚糖,其亚单元被称为胞壁肽。由胞壁肽亚单元形成的肽聚糖在细胞生长和分裂过程中经历细胞壁重建所需的组装和拆卸循环。胞壁肽在拆卸过程中产生,并在细胞生长和分裂过程中再循环以构建新的肽聚糖。因此,胞壁肽在多种细菌的增殖过程中不断地释放。当细菌细胞被噬菌体、抗体和宿主吞噬细胞裂解时,也产生并释放胞壁肽。

[0006] 多种胞壁肽是有效的信号传导分子,并且已被证明能强烈地影响人类宿主中的多个生理过程。与胞壁肽相关的生物活性包括佐剂性、Somnogenicity、致热原性和对纤毛上皮细胞的毒性。胞壁肽还与一系列人类疾病相关,诸如败血症、克罗恩病、风湿性关节炎、哮喘、过敏症、特应性病症、多发性硬化、百日咳和淋病。在胞壁酸残基和肽中不同氨基酸残基上携带不同侧链的不同类型的胞壁肽具有不同的活性。

[0007] 胞壁肽通过结合特异性的肽聚糖识别蛋白 (PGRPs) 而影响人类生理机能。人具有四种 PGRPs 和两种细胞内肽聚糖传感元件 ---Nod1 和 Nod2,所述 PGRPs 能够直接结合革兰氏阳性和革兰氏阴性肽聚糖,所述 Nod1 和 Nod2 属于模式识别受体大家族,其识别保守的微生物相关的或病原体相关的分子模式。Nod2 识别胞壁酰二肽 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-谷氨酰胺,而 Nod1 识别肽中的 D- γ -谷氨酰基-mDAP 基序。Nod1 和 Nod2 通过激活转录因子 NF- κ B 触发并调节宿主免疫应答,所述 NF- κ B 依次开启促炎性细胞因子和趋化因子的产生以及其它防御基因的表达。Nod1、Nod2 和 NF- κ B 还参与多种人类疾病。

[0008] 人微生物群含有 10 至 100 万亿种非致病性的细菌细胞,它们不断地产生和分泌大量的胞壁肽。这些分子的一部分能够在宿主的稳态中和多种病理生理条件下通过多种机制进入宿主循环系统。除了很多与上文所述的人类疾病已确立的联系外,强有力的证据正在快速累积,即由共生细菌所释放的胞壁肽在主要的人类系统如免疫系统、胃肠屏障和脑的发育、维持以及调节中起到关键作用。因此,人体内胞壁肽的水平和类型被认为对人类健康以及疾病倾向和病理生理至关重要。

[0009] 考虑到胞壁肽在人类健康和疾病中十分重要,检测、定量、中和或隔离这些分子的技术预期在疾病预测、诊断和治疗中具有广泛应用。这样的技术还可以用于检测医疗设备、试剂、生物产品、食品和饮品的细菌污染。

[0010] 针对胞壁肽的单克隆抗体是本领域内已知的。一种这样的抗体 mAb2-4,属于

IgG2a 同种型, 已被详细表征。然而, 到目前为止, 已知 mAb2-4 仅用于组织的免疫染色, 以检测主要在炎症组织和巨噬细胞中肽聚糖的存在。还不了解该抗体能否用于通过诸如酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的测定检测溶液中的肽聚糖或胞壁肽。此外, 发现 mAb2-4 对胞壁肽具有非常低的亲和力。使用 mAb2-4 的抑制测定表明, mAb2-4 通过 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺结合肽聚糖的 50% 抑制仅在浓度大于 1mg/ml 时发生。此外, 抗原决定簇的结构分析表明, mAb2-4 抗体识别与二肽连接的 N-乙酰胞壁酸。由于很多种细菌在胞壁酸残基中没有 N-乙酰基, mAb2-4 似乎是在识别细菌种类中具有较窄特异性的抗体。

[0011] 另一种常用的针对肽聚糖的小鼠单克隆抗体是 mAb2E9, 其通过用健康人排泄物分离的部分纯化的肽聚糖-多糖复合物免疫小鼠来产生。发现该抗体对 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺的亲和力甚至低于 mAb2-4, 并且抗原决定簇尚未被确定。mAb2E9 已用于组织的免疫染色中但是从没有用于 ELISA 中。

[0012] 还描述了通过用分离自变异链球菌 (*Streptococcus mutans*) 的肽聚糖免疫小鼠而产生的其它单克隆抗体。尽管这些抗体能够识别从多种细菌 (包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌) 制备而来的肽聚糖, 但已知这些抗体的结合是非特异性的, 因为它们不能被 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺抑制, 并且抗原决定簇是未知的。

[0013] 鉴于目前可用的小鼠单克隆抗体亲和力较低, 缺乏确定的抗原决定簇, 以及特异性较窄, 需要提供能够识别胞壁肽的备选抗体。

[0014] 发明概述

[0015] 在第一方面, 提供了能结合胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐的分离的抗体或其抗原结合片段, 所述胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐包含胞壁酸和选自丙氨酸、异谷酰胺、谷氨酸及其盐的氨基酸。

[0016] 在第二方面, 提供了分离的抗体或其抗原结合片段, 其包含含有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其变体的重链可变结构域。

[0017] 在第三方面, 提供了分离的抗体或其抗原结合片段, 其包含含有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或其变体的轻链可变结构域。

[0018] 在第四方面, 提供了分离的抗体或其抗原结合片段, 其包含含有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其变体的重链可变结构域, 和含有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或其变体的轻链可变结构域。

[0019] 在第五方面, 提供了分离的核酸分子, 其包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。

[0020] 在第六方面, 提供了包含第五方面所述的分离的核酸分子的载体。

[0021] 在第七方面, 提供了宿主细胞, 其包含第五方面所述的核酸分子或第六方面所述的载体。

[0022] 在第八方面, 提供了分离的细胞系, 其产生本文所述的抗体或其抗原结合片段。

[0023] 在第九方面, 提供了产生本文所述的抗体或其抗原结合片段的方法, 所述方法包括包括以下步骤: 在合适的条件下培养第七方面所述的宿主细胞或第八方面所述的分离的细胞系, 并回收所述抗体或其抗原结合片段。

[0024] 在第十方面, 提供了产生本文所述的抗体或其抗原结合片段的方法, 包括以下步骤: 将本文所述的胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐接种入非人动物, 并分离从其产生的抗体或其抗原结合片段。

[0025] 在第十一方面,提供了组合物,其包含本文所述的抗体或其抗原结合片段以及药学可接受载体。

[0026] 在第十二方面,提供了包含本文所述的胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐的疫苗。

[0027] 在第十三方面,提供了免疫缀合物,其包含与以下共价连接的本文所述的抗体或其抗原结合片段:细胞毒素剂,选自抗细菌剂、化疗剂、药物部分、抗生素、放射性同位素、溶核酶、溶菌酶、蛋白酶和脂肪酶;或捕获标记物;或检测标记物,选自荧光素、若丹明、丹磺酰、丽丝胺、青色素、藻红蛋白、德克萨斯红和放射性核素检测标记物。

[0028] 在第十四方面,提供了预防性或治疗性治疗自身免疫性疾病或炎性疾病的方法,包括给予个体本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物,所述自身免疫性疾病或炎性疾病选自败血症、败血性休克、克罗恩病、风湿性关节炎、哮喘、过敏症、特应性病症、多发性硬化、百日咳、淋病、炎性肠病和抗生素相关的病症。

[0029] 在第十五方面,提供了预防性或治疗性治疗细菌感染的方法,包括给予个体本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物。

[0030] 在第十六方面,提供了本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物,其用于预防性或治疗性治疗选自以下的自身免疫性疾病或炎性疾病:败血症、败血性休克、克罗恩病、风湿性关节炎、哮喘、过敏症、特应性病症、多发性硬化、百日咳、淋病、炎性肠病和抗生素相关的病症。

[0031] 在第十七方面,提供了本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物,其用于预防性或治疗性治疗细菌感染。

[0032] 在第十八方面,提供了本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物在制备用于预防性或治疗性治疗选自以下的自身免疫性疾病或炎性疾病的药物中的用途:败血症、败血性休克、克罗恩病、风湿性关节炎、哮喘、过敏症、特应性病症、多发性硬化、百日咳、淋病、炎性肠病和抗生素相关的病症。

[0033] 在第十九方面,提供了本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物在制备用于预防性或治疗性治疗细菌感染的药物中的用途。

[0034] 在第二十方面,提供了检测样品中是否存在本文所述的胞壁肽或其衍生物或其类似物或其盐的方法,所述方法包括将所述样品与本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物接触,并分析所述样品以确定是否存在胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐和本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段的结合产物。

[0035] 在第二十一方面,提供了检测本文所述的胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐的测定,包括将样品暴露于本文所述的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物,并确定所述抗体或其抗原结合片段,所述组合物或所述免疫缀合物与所述样品的结合程度。

[0036] 在第二十二方面,提供了用于第二十方面所述的方法或第二十一方面所述的测定

方法中的试剂盒,其包含本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物,以及用于确定是否存在胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐与本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段的结合产物的一种或多种试剂。

[0037] 在第二十三方面,提供了抗菌剂,其包含本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物。

[0038] 在第二十四方面,提供了杂交瘤,其在美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA, USA),以登录号编号 PTA-13256 保藏为 Wy-Hyb-2E7。

[0039] 在第二十五方面,提供了包含由杂交瘤产生的抗体的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列的抗体,所述杂交瘤在美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA, USA),以登录号编号 PTA-13256 保藏为 Wy-Hyb-2E7。

附图说明

[0040] 当结合非限制性实例和附图考虑时,参照详细描述将更好地理解本发明,其中:

[0041] 图 1 显示了本文所述的抗体的一个实例(其是单克隆抗体 2E7)的 Kd 值的确定。为了确定 2E7 对 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-谷氨酰胺的 Kd,将 96 孔板的孔底用 MDP-OVA 包被。将 2E7 的 2 倍连续稀释物添加至孔中孵育。洗涤去除未结合的 Ab 之后,添加与辣根过氧化物酶(HSP)偶联的抗小鼠 IgG Ab。孵育之后,通过洗涤去除未结合的第二 Ab,并添加 HSP 的显色底物。反应之后,利用微量滴定板酶标仪在 492nm 处测量每孔中的颜色强度。使用 CurveExpert Basic 程序(<http://www.curveexpert.net>),通过将 2E7 浓度和 OD₄₉₂ 值拟合至威布尔模型方程(Weibull Model equation) $y = a - b \cdot \exp(-C \cdot x^d)$ 来生成结合曲线。r: 相关系数;s: 标准误差。系数数据:a = 2.8768241, b = 2.8055033, c = 212.44541, 和 d = 0.8659833。Y₅₀ = 1.45, X = 0.00131 μg/ml。Kd = 0.0131/[150x10⁹] = 8.7pM(IgG MW = 150)。

[0042] 图 2(A) 显示了标准曲线,其通过使用 CurveExpert Basic 将 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷酰胺浓度和 OD₄₉₂ 值拟合至变形幂函数拟合方程(Shifted Power Fit equation) $y = a \cdot (x-b)^c$ 而产生。标准曲线用于确定样品中的肽聚糖浓度。(B) 所示的图显示了金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌在存在或不存在阿莫西林的液体 LB 培养基中的生长。两种细菌均生长至 OD₆₀₀ = 1.5。每种培养物被分成两份,一份用 40 μg/ml 阿莫西林(Amx)处理,另一份不处理。在指定的时间收集等份,并通过竞争性 ELISA 测定上清液中 MP 的量。(C) 显示了用 2E7 孵育后,金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的荧光显微镜图像。金黄色葡萄球菌和大肠杆菌活细胞首先用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤 3 次,然后用 2E7 孵育。在通过 PBS 洗涤去除未结合的抗体之后,将细胞与 FITC 标记的抗小鼠 IgG Ab 孵育,之后进行荧光显微镜检查。图 2 证实了 2E7(其是本公开抗体的一个实例)识别天然肽聚糖。

[0043] 图 3(A) 显示了在给予小鼠阿莫西林的研究上的 ELISA 结果的柱状图。以 12-h 的间隔将阿莫西林经口给予 50 只小鼠,并且每 4h 处死三只小鼠以收集血液,用于通过 ELISA 的肽聚糖定量。(B) 显示了来自接受多次静脉注射沃格孟汀(Augmentin)的人患者的血液样品上的 ELISA 结果的柱状图。采集系列血液样品。采血和静脉注射的时间如图所示。图 3 证实了阿莫西林导致小鼠和人体中 MP 血液水平的显著增加。

[0044] 图 4 显示了健康捐献者中 PG 亚单元的检测和定量。从 7 名通常健康的捐献者中采集血液,并通过竞争性 ELISA,使用 E2F 来测定血清中的肽聚糖水平。捐献者的性别和年龄如图所示。

[0045] 发明的详细描述

[0046] 胞壁肽是尚不知存在于任何其它生物体中的细菌肽聚糖。因此,本公开的发明人设想,针对多种形式的胞壁肽的抗体将是有利的。因此,本发明提供了能够结合胞壁肽的分离的抗体。因此,在第一方面,提供了能够结合胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0047] 本文所用的术语“抗体”指免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的片段或以上的衍生物,其具有在通常的生理条件下以显著时间段的半衰期如至少约 30 分钟、至少约 45 分钟、至少约 1 小时、至少约 2 小时、至少约 4 小时、至少约 8 小时、至少约 12 小时、约 24 小时或更久、约 48 小时或更久、约 3、4、5、6、7 天或更多天等,或任何其它相关的功能限定的时间(例如足以诱导、促进、增强和/或调节与抗体抗原结合相关的生理反应的时间,和/或抗体足以启动效应物活性或结合样品中的抗原如溶液、细胞或组织中的抗原的时间),特异性结合抗原的能力。

[0048] 本文所用的“分离的抗体”指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(例如,特异性结合胞壁肽的分离的抗体基本上不含特异性结合胞壁肽之外的抗原的抗体)。但是,特异性结合胞壁肽的表位、同种型或变体的分离的抗体可以与其它相关的抗原例如来自其它细菌类别的抗原(诸如胞壁肽类同系物)具有交叉反应性。而且,分离的抗体可以基本上不含其它细胞物质和/或化学物质。

[0049] 在一实施方案中,抗原是胞壁肽。胞壁肽是细菌肽聚糖的标志,所述细菌肽聚糖由通过有规律间隔的短肽桥交联的长糖链的平行阵列形成。因此,本文所用的术语“胞壁肽”指含有至少一个与肽连接的胞壁酰残基的肽聚糖片段或亚单元。在一实施方案中,胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐是肽聚糖或其片段的一部分。因此,在一实施方案中,胞壁肽可以包含胞壁酸和氨基酸。

[0050] 肽聚糖的聚糖链由通过 β -1,4-糖苷键连接的交替的 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸残基组成。胞壁酸具有在碳 3 上的乳酰侧链,聚糖链通过该乳酰侧链共价连接于肽。不同细菌中的胞壁酸残基可以具有在不同碳原子上的不同侧链。例如,很多种类具有在碳 2 上的 N-乙酰基,而一些种类则没有。一些种类具有 1-6-酞连接。因此,在一实施方案中,本公开的胞壁酸可以包含 N-乙酰基。在另一实施方案中,胞壁酸不包含 N-乙酰基。

[0051] 本公开的胞壁肽中的氨基酸可以包括但不限于细菌肽聚糖中所见的任何氨基酸。在一实施方案中,本公开的胞壁肽中的氨基酸可以包括蛋白氨基酸和/或非蛋白氨基酸。在一实施方案中,蛋白氨基酸可以包括但不限于精氨酸、组氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;非蛋白氨基酸可以包括但不限于高丝氨酸、羊毛硫氨酸、鸟氨酸、异谷氨酰胺、二氨基丁酸、 α -氨基-n-丁酸、戊氨酸、缬氨酸、正亮氨酸、别异亮氨酸、t-亮氨酸、 α -氨基-n-庚酸、哌啶酸、 α , β -二氨基丙酸、 α , γ -二氨基丁酸、别苏氨酸、高半胱氨酸、 β -丙氨酸、 β -氨基-n-丁酸、 β -氨基异丁酸、 γ -氨基丁酸、 α -氨基异丁酸、异缬氨酸、肌氨酸、N-乙基甘氨酸、N-异丙基甘氨酸、N-甲基丙氨酸、

N-乙基丙氨酸、N-甲基β-丙氨酸、N-乙基β-丙氨酸、异丝氨酸、α-羟基-γ-氨基丁酸和内消旋二氨基庚二酸(mesodiaminopimelic acid)。在一实施方案中,本公开的胞壁肽中的氨基酸可以包括但不限于丙氨酸、异谷酰胺、谷氨酸、二氨基丁酸、内消旋二氨基庚二酸、甘氨酸、高丝氨酸、羊毛硫氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、丝氨酸以及以上的盐。在一实施方案中,本公开的胞壁肽中的氨基酸可以包括但不限于丙氨酸、异谷酰胺、谷氨酸以及以上的盐。

[0052] 在一实施方案中,任何氨基酸都可以提供为L-氨基酸或D-氨基酸。本文所用的“L-氨基酸”和“D-氨基酸”指可以在每种氨基酸中产生的两种同分异构物。“L-氨基酸”指细胞中所产生的、并入蛋白中的氨基酸同分异构物。“D-氨基酸”指本文所述氨基酸的同分异构修饰物。在一实施方案中,本公开的胞壁肽中的氨基酸可以以L-D、L-D-L-D、L-D-L-D-L-D、L-D-L-D-L-D-L-D、L-D-L-D-L-D-L-D-L-D或L-D-L-D-L-D-L-D-L-D-L-D氨基酸形式提供。

[0053] 在一实施方案中,胞壁肽可以包含两个氨基酸或由两个氨基酸组成,并且可以称为“胞壁酰二肽”。因此,胞壁酰二肽包含胞壁酸和二肽。本文所用的术语“二肽”指由彼此共价连接的两个氨基酸组成的一段氨基酸。本文所用的共价连接至胞壁酸的一段氨基酸可以称为肽桥。当胞壁肽是胞壁酰二肽时,氨基酸可以包括L-丙氨酸或其盐以及D-异谷酰胺或其盐,或者由L-丙氨酸或其盐以及D-异谷酰胺或其盐组成。在另一实施方案中,氨基酸可以包括L-丙氨酸或其盐以及D-谷氨酸或其盐,或者由L-丙氨酸或其盐以及D-谷氨酸或其盐组成。

[0054] 在另一实施方案中,胞壁肽可以包含三个氨基酸或由三个氨基酸组成,并且可以称为“胞壁酰三肽”。在胞壁酰三肽的一个实施方案中,氨基酸可以包括L-丙氨酸或其盐、D-异谷酰胺或D-谷氨酸或其盐以及L-赖氨酸或内消旋二氨基庚二酸或其盐,或者由L-丙氨酸或其盐、D-异谷酰胺或D-谷氨酸或其盐以及L-赖氨酸或内消旋二氨基庚二酸或其盐组成。

[0055] 在另一实施方案中,胞壁肽可以包含四个氨基酸或由四个氨基酸组成,并且可以称为“胞壁酰四肽”。在一实施方案中,胞壁肽的肽链的第一个氨基酸可以是L-丙氨酸。序列中的第二个可以是D-氨基酸,例如D-异谷酰胺或D-谷氨酸。第三个氨基酸可以连接至第二个氨基酸的γ-羧基基团而非蛋白中所见的常规的α-羧基基团。因此,第三个氨基酸可以是L-二氨基酸如L-赖氨酸或内消旋二氨基庚二酸(mDAP)。第四个氨基酸可以是D-丙氨酸。因此,本公开的胞壁肽的肽链可以是L-D-L-D序列,与蛋白的都是L-氨基酸的序列不同。

[0056] 在另一实施方案中,胞壁肽可以包含5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个氨基酸,或者由5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个氨基酸组成。如本领域内所已知的,胞壁肽可以包含线性肽或分支链,或由线性肽或分支链组成。例如,来自平行的肽聚糖链的四肽可以共价地连接在一条肽的末端D-丙氨酸和另一条肽的mDAP之间,其将肽的长度延伸至7个且具有一个氨基酸(D-alanine)的分支。在一些实施方案中,可以提供连接D-丙氨酸和mDAP的5-甘氨酸接头,其将肽的长度延伸至11个且具有D-丙氨酸分支。

[0057] 有利的是,本公开的抗体能够结合作为整体的胞壁肽,例如,本公开的抗体能够结合作为一组的胞壁酸、氨基酸或二肽。此外,与胞壁酸的N-乙酰基是重要的抗原决定簇的公知常识相比,本公开的抗体可以结合具有或不具有N-乙酰基的胞壁肽。在一实施方案

中,本公开的抗体可以结合胞壁肽,而不结合其任何亚组分如丙氨酸、谷氨酸、异谷氨酸、胞壁酸或 N-乙酰胞壁酸。不希望受理论的限制,设想本公开的抗体仅结合胞壁肽而不结合其亚组分的能力提供了对胞壁肽和肽聚糖具有高特异性的抗体。因此,在一实施方案中,本公开的抗体能够结合胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐,其包括但不限于 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺、胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-谷氨酸、胞壁酰-L-丙氨酰-D-谷氨酸等。

[0058] 本公开的抗体的一个实例包括 E27, 其包含以下核苷酸序列编码的重链:ATGCTGG TGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCCATGAAACTCTCCTGTATAGTCTCGGGATTTACTTTTCAGT TATTATTGGATGTCTTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGTTTGAGTGGGTGCTGAAATCAGATTGAAATCTGA GAATTATGCAACAAATTATACGGAGTCTGTGAAAGGGAAGTTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTCGTCTCT ACCTGCAAAATGAACAGCTTAGGAGCTGAGGACACTGGAATTTACTGTCTAACTGGTTATGCCTGGTTTGGCTTAT TGGGGCCAAGGGACTCTAGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATC TGCTGCCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCT GGA ACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGC TCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAA G (SEQ ID NO:1)。

[0059] 在一实施方案中,分离的抗体或抗原结合片段可以包含以下核苷酸序列编码的轻链,或者由以下核苷酸序列编码的轻链组成:GACGTCCAGATGATCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTAT CTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACTGAAAAT CAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTACTGCGTGCAACATACACATTTTCCCACGTTCCGAGGGGGGA CCAAGCTGGAATAAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCT GGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAG TGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCC TCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCC ATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO:2)。

[0060] 在一实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段可以包含 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列编码的重链和 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列编码的轻链,或者由 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列编码的重链和 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列编码的轻链组成。

[0061] 在一实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段可以包含重链可变结构域或者由重链可变结构域组成,所述重链可变结构域包含如下所示的氨基酸序列或其变体:MLVESG GGLVQPGGSMKLSKIVSGFTFSYYWMSWRQSPKGFVVAEIRLKSNEYATNYTESVKGKFTISRDDSKSRLYLQMN NSLGAEDTGIYYCLTGYAWFAYWGQGLVTVSAAKTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTGLCLVKGYFPEPVTVTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTK (SEQ ID NO:3)。变体可以包含与 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一性的氨基酸序列,同时仍然保留至少大部分 (至少约 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或更高) 的亲本抗体的亲和力 / 亲合力和 / 或特异性 / 选择性,并且在某些情况下,这样的抗体相比亲本抗体可以更大的亲和力和 / 或特异性和 / 或选择性被结合。

[0062] 在一实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段可以包含轻链可变结构域或由轻

链可变结构域组成,所述轻链可变结构域包含如下所示的氨基酸序列或其变体:DVQMIQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQHTHFPTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSSTPIVKSFNRNEC(SEQ ID NO:4)。变体可以包含与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一性的氨基酸序列,同时仍然保留至少大部分(至少约 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或更高)的亲本抗体的亲和力/亲合力和/或特异性/选择性,并且在某些情况下,这样的抗体相比亲本抗体可以更大的亲和力、选择性和/或特异性被结合。

[0063] 在一实施方案中,本文所述分离的抗体或其抗原结合片段可以包含重链可变结构域和轻链可变结构域,或者由重链可变结构域和轻链可变结构域组成,所述重链可变结构域包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其变体,所述轻链可变结构域包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或其变体。变体可以包含与 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一性的氨基酸序列,同时仍然保留至少大部分(至少约 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或更高)的亲本抗体的亲和力/亲合力和/或特异性/选择性,并且在某些情况下,这样的抗体相比亲本抗体可以更大的亲和力、选择性和/或特异性被结合。

[0064] 本文所用的“序列同一性”指两段或更多段多肽序列,或两段或更多段多核苷酸序列,即参照序列和待与该参照序列进行比较的给定序列之间的关系。序列同一性通过以下确定:在给定序列与参照序列进行最佳比对之后,将这些序列相比较以产生最高程度的序列相似性,如通过一系列这样的序列之间的匹配所确定的。在进行这样的比对之后,逐个位置地确定序列同一性,例如如果在特定的位置处核苷酸或氨基酸残基是相同的,则序列在该位置处是“相同的”。然后,将这样的位置身份的总数除以参照序列中的核苷酸或残基总数以产生序列同一性%。序列同一性可以容易地通过已知的方法来计算。确定序列同一性的方法被编在确定给定序列之间的序列同一性的公众可用的计算机程序中。此类程序的实例包括但不限于 BLASTP、BLASTN 和 FASTA。BLASTX 程序可从 NCBI 和其它来源公开获得。这些程序利用缺省空位权重最佳地比对序列,以便在给定序列和参照序列之间产生最高水平的序列同一性。

[0065] 术语抗体还包括多克隆抗体、单克隆抗体(mAbs)、抗体样多肽如嵌合抗体和人源化抗体、以及保留特异性结合抗原的能力的抗体片段(抗原结合片段)。因此,在一实施方案中,本公开的分离的抗体或其抗原结合片段可以选自人源化抗体和嵌合抗体。

[0066] 本文所用的术语“单克隆抗体”指单分子组成的抗体分子制剂。单克隆抗体组成对具体表位展现出单一的结合特异性和亲和力。单克隆抗体可以通过杂交瘤产生,所述杂交瘤包括与永生化细胞融合的来自转基因非人动物如转基因小鼠的 B 细胞,该 B 细胞具有包含重链转基因和轻链转基因的基因组,其编码本公开的抗体。因此,在一实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段可以是单克隆抗体。

[0067] 本公开的抗体可以具有任何同种型。因此,在一实施方案中,分离的抗体可以是同种型 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE 或 IgM。在另一实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段可以是单克隆抗体并且可以是亚型 IgG1。

[0068] 本公开的抗体还可以包括保留特异性结合抗原能力的抗体片段。已经证明,抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段来执行。术语“抗体”涵盖的结合片段的实例包括(i) Fab' 或 Fab 片段——一种由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 结构域组成的单价片段,或单价抗体;(ii) $F(ab')_2$ 片段——包含在铰链区通过二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段;(iii) 基本上由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的 Fd 片段;(iv) 基本上由抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的 Fv 片段;(v) dAb 片段,其基本上由 V_H 结构域组成,并且也被称为结构域抗体;(vi) 骆驼或纳米抗体以及 (vii) 分离的互补决定区 (CDR)。因此,在一实施方案中,抗原结合片段可以选自 Fab、Fab'、 $(Fab')_2$ 、Fv、sFV 和 scFv。

[0069] 有利的是,抗体或抗原结合片段可以以明显低于本领域已知值的 Kd 值结合胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐。本文所用的术语“Kd”(M) 指特定抗体抗原相互作用的解离平衡常数。在一实施方案中,Kd 可以选自小于约 1nM、小于约 900pM、小于约 800pM、小于约 700pM、小于约 600pM、小于约 500pM、小于约 400pM、小于约 300pM、小于约 200pM、小于约 100pM、小于约 90pM、小于约 80pM、小于约 70pM、小于约 60pM、小于约 50pM、小于约 40pM、小于约 30pM、小于约 20pM 和小于约 10pM。例如,2E7mAb——本公开抗体的一个实例,已被证实具有皮摩尔的亲和力。这与本领域内已知的其它单克隆抗体(即 mAb2-4) 形成对比,其中利用 mAb2-4 的抑制测定显示,mAb2-4 通过 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺结合肽聚糖的 50% 抑制仅在浓度大于 1mg/ml 时发生。因此,本公开的抗体有利的是,与其它已知的单克隆抗体相比,具有更高的结合亲和力。

[0070] 在第二方面,提供了包含重链可变结构域或由重链可变结构域组成的分离的抗体或其抗原结合片段,所述重链可变结构域包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其变体。变体可以包含与 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一性的氨基酸序列,同时仍然保留至少大部分(至少约 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或更高)的亲本抗体的亲和力/亲合力和/或特异性/选择性,并且在某些情况下,这样的抗体相比亲本抗体可以更大的亲和力、选择性和/或特异性被结合。

[0071] 在第三方面,提供了包含轻链可变结构域或由轻链可变结构域组成的分离的抗体或其抗原结合片段,所述轻链可变结构域包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或其变体。变体可以包含与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一性的氨基酸序列,同时仍然保留至少大部分(至少约 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或更高)的亲本抗体的亲和力/亲合力和/或特异性/选择性,并且在某些情况下,这样的抗体相比亲本抗体可以更大的亲和力、选择性和/或特异性被结合。

[0072] 在第四方面,提供了包含重链可变结构域和轻链可变结构域,或者由重链可变结构域和轻链可变结构域组成的分离的抗体或其抗原结合片段,所述重链可变结构域包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其变体,所述轻链可变结构域包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或其变体。变体可以包含与 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一性的氨基酸序列,同时仍然保留至少大部分(至少约 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或更高)的亲本抗体的亲和力/亲合力和/或特异性/选择性,并且

在某些情况下,这样的抗体相比亲本抗体可以更大的亲和力、选择性和 / 或特异性被结合。

[0073] 还公开了编码本公开的抗体的重链和轻链的核酸分子如 DNA 序列。因此,在第五方面,提供了分离的核酸分子,其可以包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2,或者由 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 组成。

[0074] 在第六方面,提供了包含第五方面所述的分离的核酸分子的载体。本文所用的术语“载体”可以与编码本公开的抗体的“表达载体”或“一组表达载体”可交换地使用。抗体的重链和轻链可以由相同的载体或不同的载体编码。这样的表达载体可以用于重组产生本公开的抗体。在一实施方案中,表达载体可以包含编码一种或多种氨基酸序列的核苷酸序列,所述氨基酸序列包括但不限于 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4。在本公开背景下的表达载体可以是任何合适的载体,包括染色体、非染色体和合成的核酸载体(包含一套合适的表达控制元件的核酸序列)。这样的载体的实例包括 SV40 的衍生物、细菌质粒、噬菌体 DNA、杆状病毒、酵母质粒、来源于质粒和噬菌体 DNA 的组合的载体、以及病毒核酸(RNA 或 DNA)载体。

[0075] 在第七方面,提供了包含第五方面所述的核酸分子或第六方面所述的载体的宿主细胞。本文所用的术语“宿主细胞”(或“重组宿主细胞”)指在其中已引入表达载体,例如编码本文所述的抗体的表达载体的细胞。重组宿主细胞可以包括但不限于转染瘤,诸如 CHO(中国仓鼠卵巢)细胞、HEK293(人胚肾 293 细胞系)细胞、NS0(鼠骨髓瘤细胞系)细胞、Per. C6(人胚胎视网膜细胞系)细胞和 BHK(幼仓鼠肾)细胞,以及淋巴细胞。

[0076] 在第八方面,提供了产生本文所述的抗体或其抗原结合片段的分离的细胞系。在一实施方案中,分离的细胞系是永生细胞系如杂交瘤。

[0077] 在第九方面,提供了产生本文所述的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括以下步骤:在合适的条件下培养第七方面所述的宿主细胞或第八方面所述的分离的细胞系,并回收抗体或其抗原结合片段。

[0078] 在第十方面,提供了产生本文所述的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括以下步骤:将本文所述的胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐接种入非人动物,并分离从其产生的抗体或抗原结合片段。在一实施方案中,胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐可以包括但不限于 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺、胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-谷氨酸、胞壁酰-L-丙氨酰-D-谷氨酸等。非人动物可以包括小鼠、兔、豚鼠、大鼠、猴和其它合适的动物。在一实施方案中,抗体可以通过在转基因非人动物中生成抗体来产生。术语“转基因非人动物”指这样的非人动物:其具有包含一种或多种人重链和 / 或轻链转基因或转染色体(整合或未整合入动物的天然基因组 DNA)的基因组,并且能够充分地表达本公开的抗体。例如,转基因小鼠可以具有轻链转基因以及重链转基因或重链转染色体,使得该小鼠当用本文所述的胞壁肽和 / 或表达胞壁肽的细胞免疫时产生本文所述的抗胞壁肽抗体。

[0079] 由于具有增加的特异性和亲和力,本公开的抗体可以用作检测、定量和中和生物样品中的胞壁肽的研究工具。此外,最近的将胞壁肽与不同的人类疾病联系起来的科学进展,以及在微生物群和人类疾病领域内快速扩大的研究活动正在产生对此类抗体的高需求。因此,在第十一方面,提供了包含本文所述的抗体或其抗原结合片段以及药学可接受载体的组合物。在一实施方案中,所述组合物还可以包含一种或多种治疗剂。在一实施方案

中,所述治疗剂可以包括但不限于抗微生物剂或抗生素诸如抗细菌剂、抗病毒剂和抗真菌剂;抗肿瘤剂诸如化疗剂;放射性同位素;药物部分;溶核酶;溶菌酶;蛋白酶;脂肪酶和免疫抑制剂。在一实施方案中,治疗剂可以单独给予或与本公开的抗体一起给予。

[0080] 在第十二方面,提供了包含本文所述的胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐的疫苗。

[0081] 本公开的抗体还可以用作‘弹头’以将其它抗细菌剂特异地递送至细菌细胞,从而导致病原体的靶向杀伤。例如,在第十三方面,提供了包含本文所述的抗体或其抗原结合片段的免疫缀合物。所述免疫缀合物可以共价地连接至:细胞毒素剂,包括但不限于抗细菌剂、化疗剂、药物部分、抗生素、放射性同位素、溶核酶、溶菌酶、蛋白酶和脂肪酶;或捕获标记物;或检测标记物,包括但不限于荧光素、若丹明、丹磺酰、丽丝胺、青色素、藻红蛋白、德克萨斯红和放射性核素检测标记物。

[0082] 由于本公开的抗体与胞壁肽的结合阻断了胞壁肽的生物活性(例如促炎性反应的激活),本公开的抗体可以被开发成用于预防或治疗相关疾病的治疗剂。因此,在第十四方面,提供了预防性或治疗性治疗选自以下的自身免疫性疾病或炎性疾病的方法:败血症、败血性休克、克罗恩病、风湿性关节炎、哮喘、过敏症、特应性病症、多发性硬化、百日咳、淋病、炎性肠病和抗生素相关的病症。所述方法可以包括给予个体本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物。

[0083] 有利的是,由于本文所述的抗体结合肽聚糖中共有的结构基序(其是细菌中通用的成分),设想本文所述的抗体可用于开发广谱的抗细菌剂。不希望受理论的束缚,本公开的抗体可以结合细菌细胞的表面,并以三种方式作用于免疫力:细菌细胞的抗体包被阻止病原体进入或破坏宿主细胞,通过巨噬细胞和其它免疫细胞刺激病原体的去除,以及通过刺激其它免疫应答如补体通路来触发病原体的破坏。多种常规的抗生素已变得无用,因为病原体已通过多种机制包括药物靶标的突变改变发展出抗性。肽聚糖的核心结构,即本公开的抗体的靶标,经过数十亿年的进化都不曾改变,并且预期不会变得发展出对所述抗体的抗性。因此,在第十五方面,提供了预防性或治疗性治疗细菌感染的方法。所述方法可以包括给予个体本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物。

[0084] 在第十六方面,提供了本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物,其用于预防性或治疗性治疗选自以下的自身免疫性疾病或炎性疾病:败血症、败血性休克、克罗恩病、风湿性关节炎、哮喘、过敏症、特应性病症、多发性硬化、百日咳、淋病、炎性肠病和抗生素相关的病症。

[0085] 在第十七方面,提供了本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物,其用于预防性或治疗性治疗细菌感染。

[0086] 在第十八方面,提供了本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物在制备用于预防性或治疗性治疗选自以下的自身免疫性疾病或炎性疾病的药物中的用途:败血症、败血性休克、克罗恩病、风湿性关节炎、哮喘、过敏症、特应性病症、多发性硬化、百日咳、淋病、炎性肠病和抗生素相关的病症。

[0087] 在第十九方面,提供了本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物在制备用于预防性或治疗性治疗细菌感染的

药物中的用途。

[0088] 本文公开的细菌感染可以包括由任何细菌引起的任何感染。在一实施方案中, 细菌感染可以包括但不限于革兰氏阳性细菌感染和革兰氏阴性细菌感染。例如, 细菌可以来自包括但不限于以下的属: 醋菌属 (*Acetobacter*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、放线菌属 (*Actinomyces*)、土壤杆菌属 (*Agrobacterium* spp.)、根瘤菌属 (*Azorhizobium*)、固氮菌属 (*Azotobacter*)、红孢子虫属 (*Anaplasma* spp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* spp.)、拟杆菌属 (*Bacteroides* spp.)、巴尔通氏体属 (*Bartonella* spp.)、博代氏杆菌属 (*Bordetella* spp.)、疏螺旋体属 (*Borrelia*)、布鲁氏菌属 (*Brucella* spp.)、伯克氏菌属 (*Burkholderia* spp.)、鞘杆菌属 (*Calymmatobacterium*)、弯曲菌属 (*Campylobacter*)、衣原体属 (*Chlamydia* spp.)、嗜衣体属 (*Chlamydomphila* spp.)、梭菌属 (*Clostridium* spp.)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium* spp.)、柯克斯氏体属 (*Coxiella*)、埃立克体属 (*Ehrlichia*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、肠球菌属 (*Enterococcus* spp.)、埃希氏杆菌属 (*Escherichia*)、弗朗西斯氏菌属 (*Francisella*)、梭菌属 (*Fusobacterium*)、加德纳菌属 (*Gardnerella*)、嗜血杆菌属 (*Haemophilus* spp.)、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、克雷白氏杆菌属 (*Klebsiella*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus* spp.)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、军团菌属 (*Legionella*)、李斯特菌属 (*Listeria*)、*Methanobacterium* *extroquens*、多形细杆菌属 (*Microbacterium* *multiforme*)、藤黄微球菌属 (*Micrococcus* *luteus*)、卡他莫拉菌 (*Moraxella* *catarrhalis*)、分支杆菌属 (*Mycobacterium* spp.)、支原体属 (*Mycoplasma* spp.)、奈瑟氏菌属 (*Neisseria* spp.)、巴氏杆菌属 (*Pasteurella* spp.)、消化链球菌属 (*Peptostreptococcus*)、卟啉单胞菌属 (*Porphyromonas*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、立克次体属 (*Rickettsia* spp.)、罗沙利马体属 (*Rochalimaea* spp.)、罗氏菌属 (*Rothia*)、沙门氏菌属 (*Salmonella* spp.)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* spp.)、寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas*)、链球菌属 (*Streptococcus* spp.)、密螺旋体属 (*Treponema* spp.)、弧菌属 (*Vibrio* spp.)、沃尔巴克氏体属 (*Wolbachia*) 和耶尔森菌属 (*Yersinia* spp)。在一个实例中, 细菌感染可以由包括但不限于以下的细菌引起: 橙黄弗拉托菌 (*Acetobacter* *aurantius*)、鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter* *baumannii*)、衣氏放线菌 (*Actinomyces* *Israelii*)、放射形土壤杆菌 (*Agrobacterium* *radiobacter*)、根瘤农杆菌 (*Agrobacterium* *tumefaciens*)、甘蓝固氮根瘤菌 (*Azorhizobium* *caulinodans*)、茎瘤固氮根瘤菌 (*Azotobacter* *vinelandii*)、嗜吞噬细胞无形体 (*Anaplasma* *phagocytophilum*)、边缘无形体 (*Anaplasma* *marginale*)、炭疽杆菌 (*Bacillus* *anthracis*)、短芽孢杆菌 (*Bacillus* *brevis*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus* *cereus*)、梭形气芽孢杆菌 (*Bacillus* *fusiformis*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus* *licheniformis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus* *megaterium*)、蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus* *mycoides*)、嗜热脂肪杆菌 (*Bacillus* *stearothermophilus*)、枯草杆菌 (*Bacillus* *subtilis*)、脆弱类杆菌 (*Bacteroides* *fragilis*)、龈拟杆菌 (*Bacteroides* *gingivalis*)、*Bacteroides* *melaminogenicus* (*Prevotella* *melaminogenica*)、汉氏巴尔通氏体 (*Bartonella* *henselae*)、五日热巴尔通氏体 (*Bartonella* *Quintana*)、支气管败血性包特氏菌 (*Bordetella* *bronchiseptica*)、百日咳包特氏菌 (*Bordetella* *pertussis*)、布氏疏螺旋体 (*Borrelia* *burgdorferi*)、流产布鲁氏菌 (*Brucella*

abortus)、马尔他布鲁氏菌 (*Brucella melitensis*)、猪布鲁氏菌 (*Brucella suis*)、鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia mallei*)、类鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*)、新洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cenocepacia*)、肉芽肿鞘杆菌 (*Calymmatobacterium granulomatis*)、大肠弯曲杆菌 (*Campylobacter coli*)、胚胎弯曲杆菌 (*Campylobacter fetus*)、空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*)、幽门弯曲菌 (*Campylobacter pylori*)、砂眼立克次氏体 (*Chlamydia trachomatis*)、嗜衣原体属 (例如肺炎嗜衣原体 (*C. pneumoniae*))、鸚鵡热嗜衣原体 (*Chlamydophila psittaci*)、肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*)、难辨梭菌 (*Clostridium difficile*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、白喉棒杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、*Corynebacterium fusiforme*、伯纳特氏立克次氏体 (*Coxiella burnetii*)、恰菲埃里希氏体 (*Ehrlichia chaffeensis*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、鸟肠球菌 (*Enterococcus avium*)、耐久肠球菌 (*Enterococcus durans*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、尿肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、鹌鸡肠球菌 (*Enterococcus gallinarum*)、*Enterococcus maloratus*、大肠杆菌、土拉热弗朗西丝氏菌 (*Francisella tularensis*)、核粒梭菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、阴道加德纳氏菌 (*Gardnerella vaginalis*)、杜克莱氏嗜血菌 (*Haemophilus ducreyi*)、流感杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、副流感杆菌 (*Haemophilus parainfluenzae*)、百日咳嗜血杆菌 (*Haemophilus pertussis*)、阴道嗜血杆菌 (*Haemophilus vaginalis*)、胃螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)、侵肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、*Methanobacterium extroquens*、多形微杆菌 (*Microbacterium multiforme*)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*)、鸟结核分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*)、牛结核分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*)、*Mycobacterium diphtheriae*、胞内分枝杆菌 (*Mycobacterium intracellulare*)、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、鼠麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium lepraemurium*)、草分枝杆菌 (*Mycobacterium phlei*)、包皮垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、发酵枝原体 (*Mycoplasma fermentans*)、生殖道枝原体 (*Mycoplasma genitalium*)、人型枝原体 (*Mycoplasma hominis*)、穿透枝原体 (*Mycoplasma penetrans*)、肺炎枝原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、出血败血性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*)、土拉巴斯德氏菌 (*Pasteurella tularensis*)、消化链球菌属 (*Peptostreptococcus*)、牙龈红棕色单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、放射根瘤菌 (*Rhizobium radiobacter*)、普氏立克次氏体 (*Rickettsia prowazekii*)、*Rickettsia psittaci*、五日热立克次氏体 (*Rickettsia quintana*)、立克次氏立克次氏体 (*Rickettsia rickettsii*)、沙眼立克次体 (*Rickettsia trachomae*)、亨氏罗卡利马氏体菌 (*Rochalimaea henselae*)、五日热罗卡利马氏体菌 (*Rochalimaea quintana*)、龋齿罗氏菌 (*Rothia dentocariosa*)、肠炎沙门菌 (*Salmonella enteritidis*)、伤寒沙门

氏菌 (*Salmonella typhi*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、痢疾埃伯泽氏菌 (*Shigella dysenteriae*)、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、嗜麦芽糖寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、*Streptococcus. avium*、牛链球菌 (*Streptococcus bovis*)、大鼠链球菌 (*Streptococcus cricetus*)、*Streptococcus faecium*、粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*)、野生链球菌 (*Streptococcus ferus*)、鸡链球菌 (*Streptococcus gallinarum*)、乳酸链球菌 (*Streptococcus lactis*)、温和链球菌 (*Streptococcus mitior*)、缓症链球菌 (*Streptococcus mitis*)、变异链球菌、口腔链球菌 (*Streptococcus oralis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、鼠链球菌 (*Streptococcus rattus*)、唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*)、血链球菌 (*Streptococcus sanguis*)、远缘链球菌 (*Streptococcus sobrinus*)、梅毒密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)、霍乱杆菌 (*Vibrio cholerae*)、逗号弧菌 (*Vibrio comma*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*)、沃尔巴克氏体属 (*Wolbachia*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*)、鼠疫巴斯德氏菌 (*Yersinia pestis*) 和假结核巴斯德氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)。在一实施方案中,革兰氏阴性细菌感染可以是大肠杆菌感染。在另一实施方案中,革兰氏阳性细菌感染可以是金黄色葡萄球菌感染。

[0089] 本文所述的组合物,取决于是否需要局部或全身治疗可以以多种方式给予。给予可以是局部的、经肺的(例如通过吸入或吹入粉剂或气雾剂,包括通过喷雾器;气管内的、鼻内的、表皮的和经皮的),或全身的如经口的和/或肠胃外的。肠胃外给予包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注;或颅内例如鞘内或心室内给予。在一个实例中,给予的途径可以选自全身给予、经口给予、静脉内给予和肠胃外给予。

[0090] 用于经口给予的组合物和制剂包括粉剂或颗粒剂、在水性或非水性介质中的悬浮液或溶液、胶囊剂、扁囊剂(sachet)或片剂。增稠剂、芳香剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可能是可取的。

[0091] 用于肠胃外、鞘内或心室内给予的组合物和制剂可以包括无菌水溶液,其还可以含有缓冲剂、稀释剂和其它合适的添加剂,诸如但不限于渗透促进剂、载体化合物和其它药学可接受的载体或赋形剂。

[0092] 本文所述的组合物包括但不限于溶液、乳剂和含脂质体的制剂。这些组合物可以从多种成分产生,所述成分包括但不限于预制液体、自乳化固体和自乳化半固体。

[0093] 本文所述的制剂,其可以方便地以单位剂量形式提供,可以根据制药产业公知的常规技术来制备。此类技术包括将活性成分与药物载体或赋形剂结合的步骤。通常,所述制剂通过以下来制备:将活性成分与液体载体或细碎的固体载体或二者均匀且紧密地结合,然后(如果必要)使产物成型。

[0094] 本文所述的组合物可以被配制成多种可能的剂型中的任何一种,包括但不限于片剂、胶囊剂、液体糖浆剂、软凝胶、栓剂和灌肠剂。本文所述的组合物还可以被配制成水性介质、非水性介质或混合介质中的悬浮液。水性悬浮液还可以含有增加悬浮液的粘性的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。悬浮液还可以含有稳定剂。

[0095] 在一实施方案中,药物组合物可以被配制成为泡沫。药物泡沫包括诸如但不限于以下的制剂:乳剂、微乳剂、膏剂、凝胶剂和脂质体。尽管性质基本相似,但是这些制剂在终产物的成分和稠度上不同。

[0096] 本文所述的组合物还可以含有药物组合物中常规存在的其它辅助成分。因此,例如,组合物可以含有另外的、兼容的药物活性物质诸如例如止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或者可以含有用于物理性配制本发明组合物的不同剂型的其它物质诸如染料、芳香剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。然而,若添加时,此类物质不应当过度干扰本公开组合物的成分的生物活性。制剂可以被灭菌,并且若需要的话,与以下不会与制剂的抗体发生有害相互作用的助剂混合:例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲液、着色剂、芳香剂和/或芳香物质等。

[0097] 可以以治疗有效量提供本文所用的组合物。本文所用的术语“治疗有效量”在其含义内包括本文所述的化合物的足够的但非毒性的提供期望的治疗作用的量。所需的精确量在个体间不同,取决于诸如所治疗的物种、个体的年龄和一般状况、所治疗的病况的严重程度、所给予的具体药剂、给予的方式等因素。因此,不可能指定精确的“有效量”。然而,对于任何给定病例,合适的“有效量”可以由本领域技术人员仅使用常规的实验来确定。

[0098] 给药取决于待治疗的疾病状态的严重程度和反应性,治疗过程持续数天至数月,或者直至治愈或实现疾病状态的减轻。最佳的给药方案可以从患者体内的药物积累的测量结果计算得到。主治医师能够容易地确定最佳剂量、给药方法和重复频率。最佳剂量可以随组合物的相对功效而不同,并且通常可以基于所见的在体外或体内动物模型中有效的 EC_{50} s 或基于本文所述的实施例来估算。通常,剂量为 $0.01 \mu\text{g}$ 至 $100\text{g}/\text{kg}$ 体重,并且可以每天、每周、每月或每年给予一次或多次。治疗医师可以基于所测量的药物在体液或组织中的停留时间和浓度估算给药的重复频率。在成功治疗之后,使个体进行维持治疗以预防疾病状态复发可能是可取的,其中以范围为 $0.01 \mu\text{g}$ - $100\text{g}/\text{kg}$ 体重,每天一次或多次至每2年一次的维持剂量给予组合物。

[0099] 在一个实例中,可以以下量给予化合物:约 $0.01 \mu\text{g}$ 、 $0.05 \mu\text{g}$ 、 $0.1 \mu\text{g}$ 、 $0.5 \mu\text{g}$ 、 $1 \mu\text{g}$ 、 $5 \mu\text{g}$ 、 $10 \mu\text{g}$ 、 $20 \mu\text{g}$ 、 $30 \mu\text{g}$ 、 $40 \mu\text{g}$ 、 $50 \mu\text{g}$ 、 $60 \mu\text{g}$ 、 $70 \mu\text{g}$ 、 $80 \mu\text{g}$ 、 $90 \mu\text{g}$ 、 $100 \mu\text{g}$ 、 $110 \mu\text{g}$ 、 $120 \mu\text{g}$ 、 $130 \mu\text{g}$ 、 $140 \mu\text{g}$ 、 $150 \mu\text{g}$ 、 $160 \mu\text{g}$ 、 $170 \mu\text{g}$ 、 $180 \mu\text{g}$ 、 $190 \mu\text{g}$ 、 $200 \mu\text{g}$ 、 $210 \mu\text{g}$ 、 $220 \mu\text{g}$ 、 $230 \mu\text{g}$ 、 $240 \mu\text{g}$ 、 $250 \mu\text{g}$ 、 $260 \mu\text{g}$ 、 $270 \mu\text{g}$ 、 $280 \mu\text{g}$ 、 $290 \mu\text{g}$ 、 $500 \mu\text{g}$ 、 1mg 、 1.5mg 、 2mg 、 2.5mg 、 3mg 、 3.5mg 、 4mg 、 5mg 、 10mg 、 15mg 、 20mg 、 25mg 、 30mg 、 35mg 、 40mg 、 45mg 、 50mg 、 75mg 、 100mg 、 125mg 、 150mg 、 175mg 、 200mg 、 225mg 、 $250\text{mg}/\text{kg}$ 个体体重的任何一个至约 $0.01 \mu\text{g}$ 、 $0.05 \mu\text{g}$ 、 $0.1 \mu\text{g}$ 、 $0.5 \mu\text{g}$ 、 $1 \mu\text{g}$ 、 $5 \mu\text{g}$ 、 $10 \mu\text{g}$ 、 $20 \mu\text{g}$ 、 $30 \mu\text{g}$ 、 $40 \mu\text{g}$ 、 $50 \mu\text{g}$ 、 $60 \mu\text{g}$ 、 $70 \mu\text{g}$ 、 $80 \mu\text{g}$ 、 $90 \mu\text{g}$ 、 $100 \mu\text{g}$ 、 $110 \mu\text{g}$ 、 $120 \mu\text{g}$ 、 $130 \mu\text{g}$ 、 $140 \mu\text{g}$ 、 $150 \mu\text{g}$ 、 $160 \mu\text{g}$ 、 $170 \mu\text{g}$ 、 $180 \mu\text{g}$ 、 $190 \mu\text{g}$ 、 $200 \mu\text{g}$ 、 $210 \mu\text{g}$ 、 $220 \mu\text{g}$ 、 $230 \mu\text{g}$ 、 $240 \mu\text{g}$ 、 $250 \mu\text{g}$ 、 $260 \mu\text{g}$ 、 $270 \mu\text{g}$ 、 $280 \mu\text{g}$ 、 $290 \mu\text{g}$ 、 $500 \mu\text{g}$ 、 1mg 、 1.5mg 、 2mg 、 2.5mg 、 3mg 、 3.5mg 、 4mg 、 5mg 、 10mg 、 15mg 、 20mg 、 25mg 、 30mg 、 35mg 、 40mg 、 45mg 、 50mg 、 75mg 、 100mg 、 125mg 、 150mg 、 175mg 、 200mg 、 225mg 、 250mg 、 $300\text{mg}/\text{kg}$ 个体体重的任何一个。

[0100] 在一个实例中,所给予的化合物的浓度为约 1 至约 $100\text{mg}/\text{Kg}$ 个体体重、约 5 至约 $100\text{mg}/\text{Kg}$ 个体体重、约 10 至约 $100\text{mg}/\text{Kg}$ 个体体重、约 20 至约 $100\text{mg}/\text{Kg}$ 个体体重、约 30 至约 $100\text{mg}/\text{Kg}$ 个体体重、约 1 至约 $50\text{mg}/\text{Kg}$ 个体体重、约 5 至约 $50\text{mg}/\text{Kg}$ 个体体重以及约 10

至约 50mg/Kg 个体体重。

[0101] 本文所用的术语“约”，在制剂成分的量或浓度的背景下，通常表示所述值的 $\pm 5\%$ ，更通常表示所述值的 $\pm 4\%$ ，更通常表示所述值的 $\pm 3\%$ ，更通常表示所述值的 $\pm 2\%$ ，甚至更通常表示所述值的 $\pm 1\%$ ，且更通常表示所述值的 $\pm 0.5\%$ 。

[0102] 在一实施方案中，个体可以是动物、哺乳动物、人，包括但不限于归为牛、猪、马、犬、狼、猫、鼠、绵羊、鸟、鱼、山羊、乌鸦、Acrine 或 Delphine 的动物。在一实施方案中，个体可以是人。

[0103] 由于胞壁肽已与多种疾病有关联，人体内异常高水平的这些分子可能预示人有患某些疾病的倾向。本公开的抗体可为人体内胞壁肽水平与疾病之间的关联的建立提供有力的工具。一旦建立起这样的关联，使用本公开抗体的诊断工具可以开发用于相关的疾病。简单地测试样品中的胞壁肽水平可被并入常规的医疗检查，用于评估人患某些疾病的风险。因此，在第二十方面，提供了检测样品中是否存在本文所述的胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐的方法。所述方法可以包括将所述样品与本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段，第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物接触，并分析所述样品以确定是否存在胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐和本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段的结合产物。本文所用的术语“结合产物”指细胞、片段或因子，其包含所述的胞壁肽和 / 或可以包含能够特异性结合本公开的抗体的表位或抗原决定簇。在一实施方案中，所述方法还可以包括将来自个体的生物样品中结合产物的水平与对照样品中结合产物的水平相比较，其中相对于所述对照样品中结合产物的水平，所述生物样品中结合产物的水平更高，表明所述个体患有或倾向于患有包括但不限于自身免疫性疾病或炎性疾病以及细菌感染的病况。在一实施方案中，所述方法还可以包括将样品中结合产物的水平与对照中结合产物的水平相比较，其中相对于所述对照中结合产物的水平，所述样品中结合产物的水平更高，表明所述样品被细菌感染。

[0104] 本文所用的“对照”可以指具有已知水平的结合产物的参照，并且可以是“阴性对照”和 / 或“阳性对照”。“阴性对照”指已知基本上没有任何结合产物的参照，例如蒸馏水。“阳性对照”指已知含有预定水平的结合产物的参照，例如含有已知量的胞壁肽的样品。

[0105] 本文所用的术语“样品”指任何样品，包括生物样品以及非医学相关的样品。这样的样品可以例如包括来源于以下或包含以下的样品：粪便、全血、血清、血浆、眼泪、唾液、鼻液、痰、粘液、耳液、生殖器液、乳头分泌物、乳头吸液、乳腺液、乳汁、初乳、胎盘液、羊水、淋巴液、囊肿液、汗液、滑液、腹水、脑脊液、胆汁、胃液、房水、玻璃体液、胃肠液、分泌液、渗出液、胸膜液、心包液、精液、上呼吸道液、腹膜液、从免疫应答位置收获的液体、从合并的收集位置收获的液体、支气管灌洗液、尿液、活检材料和尸检样品，例如来自所有合适器官（例如，肺、肌肉、脑、肝、胰腺、胃、粘膜表面、毛发或皮肤）的细胞或组织、采集用于组织学目的的组织冷冻切片、档案样品、外植体以及来自患者组织的原代细胞培养物和 / 或转化的细胞培养物。此外，可以使用环境来源的样品，例如水样品、肉或家禽类样品、来自潜在污染来源的样品等。在一实施方案中，样品可以是生物样品，包括但不限于唾液、全血、血液（例如血清和血浆）、淋巴和囊肿液、痰、粪便、眼泪、粘液、腹水、囊肿液、尿液、乳头分泌物、乳头吸液、细胞、组织（例如活检和尸检样品）、采集用于组织学目的的组织冷冻切片、档案样品、外植体以及来自患者组织的原代细胞培养物和 / 或转化的细胞培养物。

[0106] 还设想,商品化试剂盒可以开发用于快速检测医疗设备、试剂和生物产品的细菌污染。因此,在一实施方案中,样品还可以包括但不限于食品、饮品、生物产品(例如,抗毒素、细菌和病毒疫苗、血液产品和激素提取物)、实验室设备或医疗设备、以及实验室试剂或医疗试剂。

[0107] 在第二十一方面,提供了检测本文所述的胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐的测定,包括将样品暴露于本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物,并确定所述抗体或其抗原结合片段,所述组合物或所述免疫缀合物与所述样品的结合程度。在一实施方案中,如通过以下的实验部分所示例的,本公开的测定可以包括但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)、在组织切片上的免疫组织化学、免疫荧光测试、流式细胞术等。

[0108] 在第二十二方面,提供了用于第二十方面所述的方法或第二十一方面所述的测定方法中的试剂盒,其包含本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物,以及用于确定是否存在胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐与本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段的结合产物的一种或多种试剂。

[0109] 适于测量信号的试剂可以包括这样的试剂:其可以并入可检测标记物如荧光团、放射性部分、酶、生物素/亲和素标记物、发色团、化学发光标记物等,或者所述试剂盒可以包含标记用于检测是否存在本文所述的胞壁肽的核酸引物、核酸探针、或者核酸引物和核酸探针的试剂。引物和/或探针、校准物和/或对照可以提供在单独的容器中或者预分配在合适的测定格式中,例如微量滴定板。所述试剂盒还可以包含这样的试剂:其包括但不限于从样品分离肽的试剂、用于阳性或阴性对照的试剂以及用于本文所述的测定的试剂。例如,所述试剂盒可以包含以下实验部分中所用的试剂。

[0110] 所述试剂盒还可以包含说明书,其可以以纸件形式或诸如盘、CD、DVD 等的计算机可读形式提供。所述试剂盒可以任选地包含质量控制试剂如敏度套组、校准物和阳性对照。

[0111] 试剂盒可以任选地包含进行诊断测定或促进质量控制评估所需的其它试剂,例如缓冲液、盐水、酶、酶辅助因子、底物、检测试剂等。试剂盒中还可以包含其它成分,例如用于分离和/或处理试样的缓冲液和溶液(例如,预处理试剂)。试剂盒还可以包含一种或多种其它的对照。试剂盒的一种或多种成分可以被冻干,并且试剂盒还可以包含适于冻干成分复原的试剂。

[0112] 试剂盒的多种成分任选地被提供在合适的容器中。如上文所指出的,一个或多个容器可以为微量滴定板。试剂盒还可以包含用于支持或储存样品的容器(例如用于血液或尿液样品的容器或盒)。若适用,试剂盒还可以任选地含有反应容器、混合容器、或帮助制备试剂或试样的其它成分。试剂盒还可以包含用于辅助获得试样的一个或多个工具,例如注射器、移液管、镊子、量匙等。

[0113] 在第二十三方面,提供了抗细菌剂,其包含本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段,第十一方面所述的组合物或第十三方面所述的免疫缀合物。

[0114] 在第二十四方面,提供了杂交瘤,其在美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA, USA),以登录号编号 PTA-13256 保藏为 Wy-Hyb-2E7。

[0115] 在第二十五方面,提供了包含由杂交瘤产生的抗体的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列的抗体,所述杂交瘤在美国典型培养物保藏中心(ATCC,

Manassas, VA, USA), 以登录号编号 PTA-13256 保藏为 Wy-Hyb-2E7。

[0116] 本文示例性描述的发明可以在不存在本文未具体公开的一个或多个元件、一种或多种限制的情况下适宜地实施。因此, 例如, 术语“包含”、“包括”、“含有”等应当被宽泛且非限制性地解读。此外, 本文所采用的术语和表述被用作描述性术语而非限制, 并且在使用这类术语和表述中并非意图排除所示和所描述的特征的任何等同物或其一部分, 而是应当认识到, 多种修改都可能在本发明请求保护的范围内。因此, 应当理解, 尽管本发明已通过优选实施方案和可选特征进行了具体的公开, 本文公开的在其中体现的本发明的修改和变动可诉诸于本领域技术人员, 并且此类修改和变动也被认为在本发明的范围内。

[0117] 在本文已对本发明进行宽泛且一般性地描述。落入上位公开的较窄的种类和亚组的每一种也形成了本发明的一部分。这包括本发明的一般描述, 条件或不利限制是从属中去除任何主题, 而不管去除的物质是否在本文进行了具体的披露。

[0118] 其它实施方案在以下权利要求和非限制性实施例中。此外, 如果本发明的特征或方面依照马库什组进行描述, 则本领域技术人员将认识到, 本发明进而还依照马库什组的任何单个成员或成员亚组进行描述。

[0119] 实验部分

[0120] 将参照具体的实施例更加详细地描述本发明的非限制性实例, 这些实施例不应当以任何限制本发明范围的方式来解释。

[0121] 材料和方法

[0122] 胞壁肽 (MPs) 是共享共有的结构部分的相关分子。在本公开中, 用识别共有结构的抗原和特异于亚型的另一种抗原产生了两种小鼠单克隆抗体。为了实现这一目的, 以下胞壁肽二肽 (MDPs) 用作抗原: N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺、胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-谷氨酸和胞壁酰-L-丙氨酰-D-谷氨酸。这些 MDPs 是化学合成的或如之前所描述的 (Xu et al., 2008, Bacterial peptidoglycan triggers *Candida albicans* hyphal growth by directly activating the adenylyl cyclase Cyr1p. Cell Host & Microbe 4, 1-12, 其内容通过引用并于此), 从 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺的部分 HCl 水解产物纯化的。

[0123] 为了增强 MDPs 的抗原性, 利用接头分子将这些分子与人血清白蛋白 (HSA) 缀合。首先将 MDPs 的羧酸部分连接至 N-Boc-乙二胺, 然后去除 Boc 保护基, 并将得到的胺用戊二醛连接至 HSA。MDPs 与 HSA 的成功缀合通过质谱法确定。然后, MDP-HSA 缀合物用于免疫 BALB/c 小鼠。通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检查免疫小鼠的血清抗原特异的滴度, 所述酶联免疫吸附测定针对利用如上所述的相同的连接策略缀合至卵白蛋白 (OVA) 的 MDPs。通过以下标准方案进行杂交瘤细胞系的产生、产抗体克隆的筛查、mAbs 的制备和纯化以及 mAb 同种型分型。利用竞争性 ELISA 测试不同 MDPs 和组成部分抑制 mAb 结合 MDP (原来用作免疫抗原) 的能力, 来确定 mAb 的抗原特异性。

[0124] 实施例 1- 针对 MDPs 的 mAb 的表征

[0125] mAb (2E7) 获自 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺免疫的小鼠。抗体同种型分型测试将 2E7 鉴定为 IgG₁, 并且 2E7 对 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺的 Kd 经计算为 8.7 pM (图 1)。通过竞争性 ELISA, 发现 2E7 与缀合至 OVA 的 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺的结合, 被胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨

酰 -D- 谷氨酸和胞壁酰 -L- 丙氨酰 -D- 谷氨酸几乎与 N- 乙酰胞壁酰 -L- 丙氨酰 -D- 异谷酰胺同样有效地,以浓度依赖的方式抑制,这表明 2E7 识别四种 MDPs 中的共有表位。然而,2E7 没有对胞壁酸、N- 乙酰胞壁酸、N- 乙酰葡萄糖胺、丙氨酸、D- 异谷酰胺、谷氨酸、葡萄糖、或蛋白中的 20 种共有氨基酸的任何一种或混合物(处于比其在血液中的正常浓度高 100 倍的浓度)表现出可检测的亲合力。数据表明,2E7 特异性识别在四种 MDPs 中共有的结构背景下唯一形成的表位。特异性识别用于连接 MDP 与 HSA 的戊二醛接头的 IgG₁mAb 也在筛查杂交瘤克隆中获得。该抗体对除了戊二醛之外的任何上述分子均没有表现出可检测的亲合力,这为利用 2E7 的实验提供了极好的阴性对照。

[0126] 实施例 2-2E7 重链和轻链可变区氨基酸序列的确定

[0127] 信使 RNA 从产生 2E7 的杂交瘤克隆制备,然后被用作模板以产生互补 DNA。分别编码重链和轻链可变区的 DNA 片段通过聚合酶链式反应 (PCR),利用特异靶向可变区编码区侧翼的保守序列基序的寡核苷酸引物对(表 1)来扩增(其方法描述于 Kettleborough et al.,1993,Optimisation of primers for cloning libraries of mouse immunoglobulin genes using the polymerase chain reaction.Eur J Immunol 23,206-211 和 Pope et al.,1996,Construction of use of antibody gene repertoires.In Antibody Engineering-A Practical Approach. 由 McCafferty J.Hoogenboom H 和 Chiswell D. 编辑,两者的内容通过引用并于此)。纯化 PCR 产物,拼接入 pJET1. 2/ 平端载体 (Fermentas International Inc, Canada),并转化入大肠杆菌中以获得独立的克隆。从多个克隆分离质粒,并将具有预期大小的插入片段的质粒进行 DNA 序列分析。分析了五个克隆中每一个的重链和轻链,这产生了相同的序列。然后将核苷酸序列翻译成氨基酸序列(表 2)。其作为小鼠抗体重链或轻链可变区的身份通过使用查询 NCBI 非冗余蛋白序列数据库的序列来确定。2E7 重链序列与数十种小鼠抗体在相同的区域内展现出 75-90% 的最高同一性,并且 2E7 轻链序列展现出高达 98% 的同一性。在数据库中没有找到与 2E7 的重链或轻链相同的序列。

[0128] 表 1. 用于 2E7 重链和轻链可变区 DNA 编码序列的 PCR 扩增的寡核苷酸引物

[0129]

重链引物

正向

1. 5'-ATGCTGGTGGAGTCTGGGGGA-3' (SEQ ID NO: 5)

2. 5'-AAGCTGGTGGAAATCTGGAGGA-3' (SEQ ID NO: 6)

[0130]

反向

5'-CTTGGTGCTGCTGGCCGGGTG-3'(SEQ ID NO: 7)

轻链引物

正向

1. 5'-CCGTTTGATTTCAGCTTGGTGCC-3'(SEQ ID NO: 8)

2. 5'-CCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC-3'(SEQ ID NO: 9)

反向

5'-GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA -3'(SEQ ID NO: 10)

[0131] 表 2. 2E7 可变区的核苷酸和氨基酸序列

[0132]

重链(208个氨基酸) (SEQ ID NO: 3):

MLVESGGGLVQPGGSMKLSCI VSGFTFSYYWMSWVRQSPEKGF EW
VAEIRL KSENYATNYTESVKGKFTISRDDSKSRLLYLQMNSLGAEDTGIYY
CLTGYAWFAYWGQGLVTVSAAKTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGC
LVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPS
ETVTCNVAHPASSTK

核苷酸序列(624个核苷酸) (SEQ ID NO: 1):

ATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATC
CATGAAACTCTCCTGTATAGTCTCGGGATTTACTTTCAGTTATTATTGG
ATGTCTTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGTTTGAGTGGGTTGC
TGAAATCAGATTGAAATCTGAGAATTATGCAACAAATTATACGGAGTC
TGTGAAAGGGAAGTTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAGTCGTC
TCTACCTGCAAATGAACAGCTTAGGAGCTGAGGACACTGGAATTTATT
ACTGTCTAACTGGTTATGCCTGGTTTGCTTATTGGGGCCAAGGGACTC
TAGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCAC
TGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATACTCCATGGTGACCCTGGGAT
GCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAAC
TCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAG
TCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCAC

[0133]

CTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCA
GCACCAAG

轻链(177个氨基酸) (SEQ ID NO: 4):

DVQMIQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDL
GVYYCVQHTHFPTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVC
FLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTK
DEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRENC

核苷酸序列(531个核苷酸) (SEQ ID NO: 2):

GACGTCCAGATGATCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTG
TCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATC
AGGAACAGATTTTACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATT
TGGGAGTTTATTACTGCGTGCAACATACATTTTCCCACGTTCCGGAG
GGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTA
TCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCA
GTCGTGTGCTTCTTGAACA ACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAG
TGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTG
GACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACC
CTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTG
TGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCA
ACAGGAATGAGTGT

[0134] 实施例 3- 培养基中和细胞表面上的细菌肽聚糖的 2E7 检测

[0135] 为了证实 2E7 的效用,首先测试抗体检测 MP(其通常存在于细菌培养物中)的能力。已经很好地建立了 β -内酰胺抗生素通过引起细胞累积和分泌 MP 来抑制肽聚糖聚合。将 β -内酰胺抗生素阿莫西林(一种医院中经常使用的药物)添加至培养物,并且能够抑制 2E7 结合 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺的物质的显著增加如所预期的增加了。对于该测试,选择革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌(其具有厚肽聚糖层)和革兰氏阴性大肠杆菌(其具有薄肽聚糖层),并在存在或不存在阿莫西林的情况下培养。培养物生长至 $OD_{600} = 1.5$ 的密度,然后分成两等份。对于一等份,添加阿莫西林至 $40 \mu\text{g/ml}$ 的终浓度,而对于另一等份,不添加药物。允许两种培养物继续生长。以定时的间隔收集培养物等份,并通过离心去除细胞。上清液中 MP 的量通过竞争性 ELISA,利用 2E7 来确定。我们发现,阿莫西林的添加造成能有效抑制 2E7 结合 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺的分子在培

培养基中的急剧增加（图 2A-B）。相比之下，在未处理培养物中仅观察到这类分子的缓慢、逐渐的增加。此外，金黄色葡萄球菌培养物的上清液展现出的抑制比大肠杆菌培养物强~15 倍。作为阴性对照，在其它相同的条件下，没有上清液可辨别地抑制对照抗体与戊二醛的结合。

[0136] 还研究了 2E7 结合细胞壁中的肽聚糖的能力。首先将金黄色葡萄球菌和大肠杆菌细胞与 2E7 孵育，然后用与 FITC 缀合的抗小鼠 IgG Ab 孵育。荧光显微镜检查揭示了金黄色葡萄球菌细胞的强着色和大肠杆菌细胞的弱着色（图 2C），这与其各自的细胞壁中的肽聚糖含量水平一致。用单独的第二 FITC-Ab 孵育仅导致模糊的非特异性着色。此外，用活金黄色葡萄球菌或大肠杆菌孵育 2E7 而非对照抗体，导致显著的细胞聚集（数据未显示），这表明细菌细胞被 2E7 交联。总之，数据表明，本公开的抗体 2E7 特异性识别细菌细胞壁中的肽聚糖和细菌培养物中释放的 MP。

[0137] 实施例 4- 阿莫西林对小鼠和人血液中 MP 水平的影响

[0138] 为了确定 β -内酰胺抗生素处理的小鼠是否将引起血液 MP 水平的急剧增加（其能够因为小鼠微生物群的细菌中肽聚糖合成的抑制而发生），小鼠被以 12h 的间隔喂食阿莫西林 (100mg/kg)，并且每 4h 处死三只小鼠以收集血液，持续三天的时间。血清中的 MP 水平通过竞争性 ELISA，使用本公开抗体的一个实例即 2E7 来测定。如图 3A 所示，未处理小鼠 (0h) 的血清含有等于~1 μ g/ml N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺水平的 MP。引人注意的是，在每次抗生素喂食后 4h 时，观察到血液 MP 水平增加 20-60%，尽管该水平在接下来的几小时内返回基线水平，直到下一次喂食。

[0139] 同时，来自接受了沃格孟汀（阿莫西林+克拉维酸，即一种降低细菌 β -内酰胺酶降解阿莫西林的 β -内酰胺酶抑制剂）多次静脉内给药的 ICU 患者的血液样品依次在 0、7.5h、14h、21h 和 26h 时获得。抗生素处理之前采集的血液样品含有等于~1.2 μ g/ml N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺的量的 MP（图 3B）。如图 3B 所示，在 6.5 和 13.5h 时采集的样品中，MP 水平增加至 1.66 和 2.1 μ g/ml。相比之下，在 17 和 26h 时，MP 水平降低至 1.68 和 1.2 μ g/ml。这些结果表明， β -内酰胺抗生素的使用确实导致血液中 MP 的显著增加。这些结果可能解释了一些抗生素相关疾病如腹泻的原因是因为肠中 MP 诱导的过量炎症。数据还提示，小鼠和人中存在能响应于身体中的 MP 波动将血液 MP 有效恢复至平衡状态水平的调节机制。

[0140] 实施例 5 - 健康人体中血液 MP 的检测和定量

[0141] 假设由于遗传和/或环境因素，个体中的 MP 水平可能不同。由于 MP 具有多种生物活性，并且已与多种疾病关联起来，所以 MP 的血液水平可以用作评价个体患某些疾病的风险的生物标志物。作为第一步，确定通常健康的人体中的 MP 水平。在同一天的上午 10:00，收集来自 7 名自愿捐献者（4 名女性和 3 名男性，年龄为 19 至 52）的血液样品和制备的血清（图 4）。引人注意的是，发现血清 MP 水平在大范围内变化。一份血清 (HD4) 含有几乎检测不到量的 MP，而检测到的最高 MP 浓度为 6.82 μ g/ml (HD5)。其余血清样品中的 MP 水平范围为 1.4 至 4.94 μ g/ml。当两周后再次从 HD4 和 HD5 获得血液样品时，观察到相似的结果。从另一单独的 4 名捐献者的组中，发现第二血清样品含有检测不到水平的 MP。数据表明，血液 MP 水平确实展现出显著的个体差异。顺便地，具有最高血液肽聚糖水平的 2 名捐献者，HD5 和 HD6，尤其是 HD5，具有慢性炎症相关的皮肤问题，并且为了抗炎目的通常需要

接受抗生素一段时间。观察到的高血液 MP 水平与皮肤问题之间的相关性提示,高 MP 水平可能是慢性、低级别炎症的原因或促进了慢性、低级别炎症。

[0142] 由 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷酰胺激发的单克隆抗体是本领域内已知的。一种这样的抗体 mAb2-4(同种型 IgG2a),已被详细地表征,是本领域内已知的。到目前为止,在文献中,mAb2-4 仅用于组织的免疫染色,以检测主要在炎症组织和巨噬细胞中肽聚糖的存在。然而,还没有应用该抗体通过 ELISA 检测溶液中的肽聚糖或 MP 的报道。发现 mAb2-4 对 MP 具有非常低的亲和力。使用 mAb2-4 的抑制测定表明,mAb2-4 通过 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷酰胺结合肽聚糖的 50%抑制仅在浓度大于 1mg/ml 时发生,这明显低于本公开抗体 2E7mAb 的皮摩尔的亲和力。

[0143] 此外,抗原决定簇的结构分析表明,mAb2-4 抗体识别与二肽连接的 N-乙酰胞壁酸,而非单独的 N-乙酰胞壁酸或二肽,并且胞壁酸上的 N-乙酰基是重要的抗原决定簇。因此,N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷酰胺上对于 mAb2-4 的抗原决定簇不同于本公开的抗体(例如 2E7),其识别有或无 N-乙酰基的 MDP。由于许多种细菌在其胞壁酸残基上没有 N-乙酰基,由此断定,mAb2-4 相比 2E7 在识别菌种种类上具有更窄的特异性。

[0144] 另一种相当常用的针对肽聚糖的小鼠单克隆抗体是 mAb2E9。该抗体通过用从健康人排泄物分离的部分纯化的肽聚糖-多糖复合物免疫小鼠来产生。发现该抗体对 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷酰胺的亲和力甚至低于 mAb2-4,并且抗原决定簇尚未被确定。mAb2E9 已用于组织的免疫染色中但是从没有用于 ELISA 中。

[0145] 还描述了通过用分离自变异链球菌的肽聚糖免疫小鼠而产生的其它单克隆抗体。尽管这些抗体能够识别从多种细菌(包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌)制备而来的肽聚糖,但结合不能被 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷酰胺抑制,并且抗原决定簇是未知的。

[0146] 总之,目前可用的针对 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷酰胺或肽聚糖产生的小鼠单克隆抗体,由于亲和力较低,缺乏确定的抗原决定簇,以及特异性较窄,具有受限的应用。这些抗体中没有一种能够用于以大多数研究和临床需求所需要的灵敏度水平检测溶液中的肽聚糖或 MP。

[0147] 如本公开中所示,2E7mAb 能够以皮摩尔的亲和力检测 MP。此外,2E7 识别所有细菌种类中普遍存在的表位。抗原决定簇由来自仅存在于细菌中的多个分子部分和结构特征的结构贡献形成,确保了 2E7 对细菌肽聚糖的高特异性。

[0001]

序列表

- <110> 新加坡科技研究局(A*STAR)
- <120> 针对胞壁肽的单克隆抗体
- <130> 9869SG2229
- <150> SG201208082-6
- <151> 2012-11-01
- <160> 10
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 624
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 重链

<400> 1
atgctggtgg agtctggggg aggcttggtg caacctggag gatccatgaa actctcctgt 60
atagtctcgg gatttacttt cagttattat tggatgtctt gggtcgccca gtcctccagag 120
aaggggtttg agtgggttgc tgaaatcaga ttgaaatctg agaattatgc aacaaattat 180
acggagtctg tgaaagggaa gttcaccatc tcaagagatg attccaaaag tegtctctac 240
ctgcaaatga acagcttagg agctgaggac actggaattt attactgtct aactggttat 300
gcctggtttg ctatttgggg ccaagggact ctagtccctg tctctgcagc caaacgaca 360
ccccatctg tetatccact ggeccctgga tctgctgecc aaactaactc catggtgacc 420
ctgggatgcc tggccaaggg ctatttccct gagccagtga cagtgcactg gaactctgga 480
tccctgtcca gcggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacactctg 540
agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc tggcccagcg agaccgtcac ctgcaacggt 600
gcccaccgg ccagcagcac caag 624

- <210> 2
- <211> 531
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 轻链

<400> 2
gacgtccaga tgatecagtc tccaaagcgc cfaatctatc tgggtgtctaa actggactct 60
ggagtccctg acaggittcac tggcagtgga tcaggaacag attttactact gaaaatcagc 120
agagtggagg ctgaggattt gggagtttat tactgcgtgc aacatacaca ttttccacg 180
ttcggagggg ggaccaagct ggaataaaa cgggctgatg ctgcaccaac tgtatccate 240
ttcccacat ccagtgagca gttaacatct ggaggtgcct cagtcgtgtg etttcttgaac 300
aacttctacc ccaaagacat caatgtcaag tgggaagattg atggcagtga acgacaaaa 360

[0002]

ggcgtcctga acagttggac tgatcaggac agcaaagaca gcacctacag catgagcagc 420
 accctcacgt tgaccaagga cgagtatgaa cgacataaca gctatacttg tgaggccact 480
 cacaagacat caacttcacc cattgtcaag agcttcaaca ggaatgagtg t 531

<210> 3
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重链

<400> 3

Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met
 1 5 10 15

Lys Leu Ser Cys Ile Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr Trp Met
 20 25 30

Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Phe Glu Trp Val Ala Glu
 35 40 45

Ile Arg Leu Lys Ser Glu Asn Tyr Ala Thr Asn Tyr Thr Glu Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Arg Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Gly Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Leu Thr Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp
 165 170 175

Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro
 180 185 190

Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
 195 200 205

[0003]

<210> 4
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 轻链

 <400> 4

 Asp Val Gln Met Ile Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser
 1 5 10 15

 Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly
 20 25 30

 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
 35 40 45

 Val Tyr Tyr Cys Val Gln His Thr His Phe Pro Thr Phe Gly Gly Gly
 50 55 60

 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile
 65 70 75 80

 Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val
 85 90 95

 Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys
 100 105 110

 Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp
 115 120 125

 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 130 135 140

 Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr
 145 150 155 160

 His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu
 165 170 175

 Cys

 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 重链正向引物5' → 3'

 <400> 5

[0004]

atgctggtgg agtctggggg a	21
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 重链正向引物5'→3'	
<400> 6	
aagctggtgg aatctggagg a	21
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 重链反向引物5'→3'	
<400> 7	
cttggtgctg ctggccgggt g	21
<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 轻链正向引物5'→3'	
<400> 8	
ccgtttgatt tccagcttgg tgcc	24
<210> 9	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 轻链正向引物5'→3'	
<400> 9	
ccgtttcagc tccagcttgg tccc	24
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 轻链反向引物5'→3'	
<400> 10	
gacattgagc tcaccagtc tcca	24

[0001]

20150428



关于微生物保藏的说明

申请人或代理人档案号 15C80357CN	国际申请号 PCT/SG2013/000473
-----------------------	-------------------------

关于微生物保藏的说明

(专利合作条约实施细则 13 之 2)

微生物保藏的说明	
A.对说明书第 <u>6</u> 页, 第 <u>3-5</u> 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称美国典型培养物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 美国维吉尼亚州马纳萨斯	
保藏日期 2012-09-25	保藏号 PTA-13256
C.补充说明 (必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
D.本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的)	
E.补充说明 (必要时) 下列说明将随后向国际局提供 (写出说明的类别, 例如: “保藏的编号”)	

由受理局填写
<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
授权官员

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
授权官员

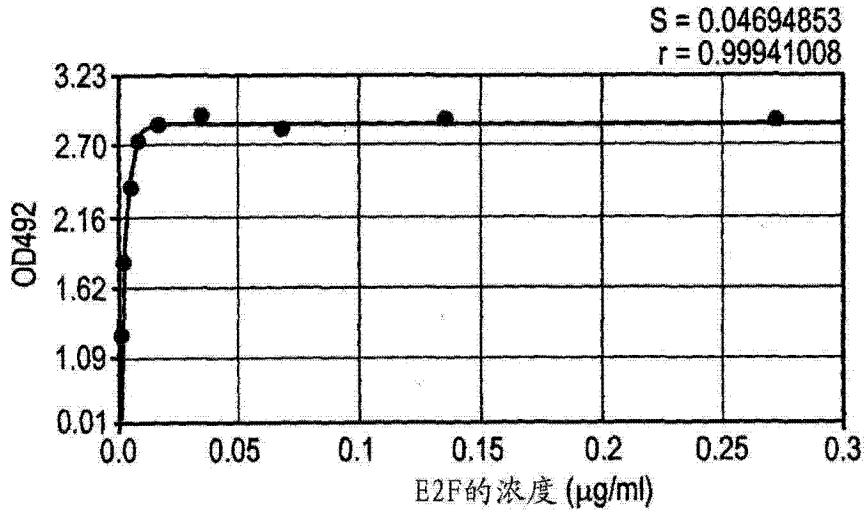


图 1

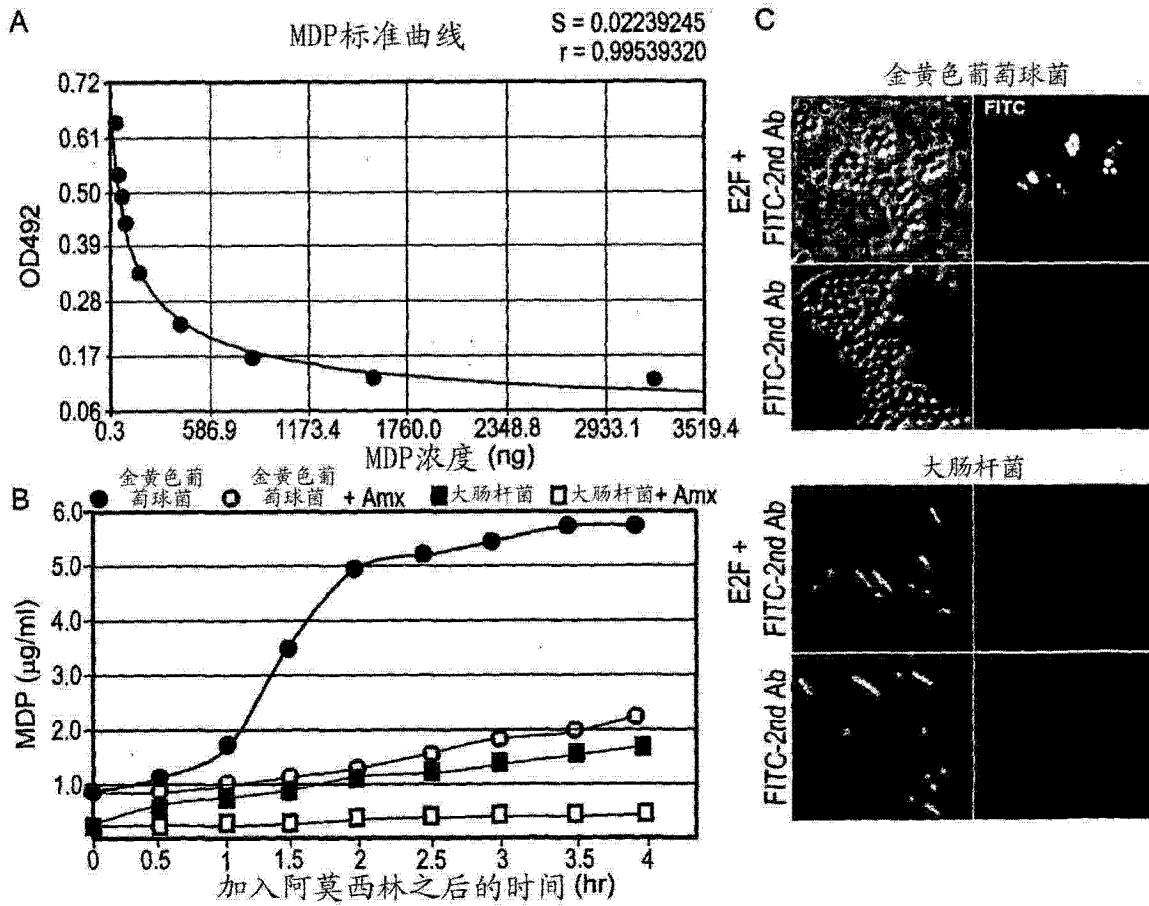


图 2

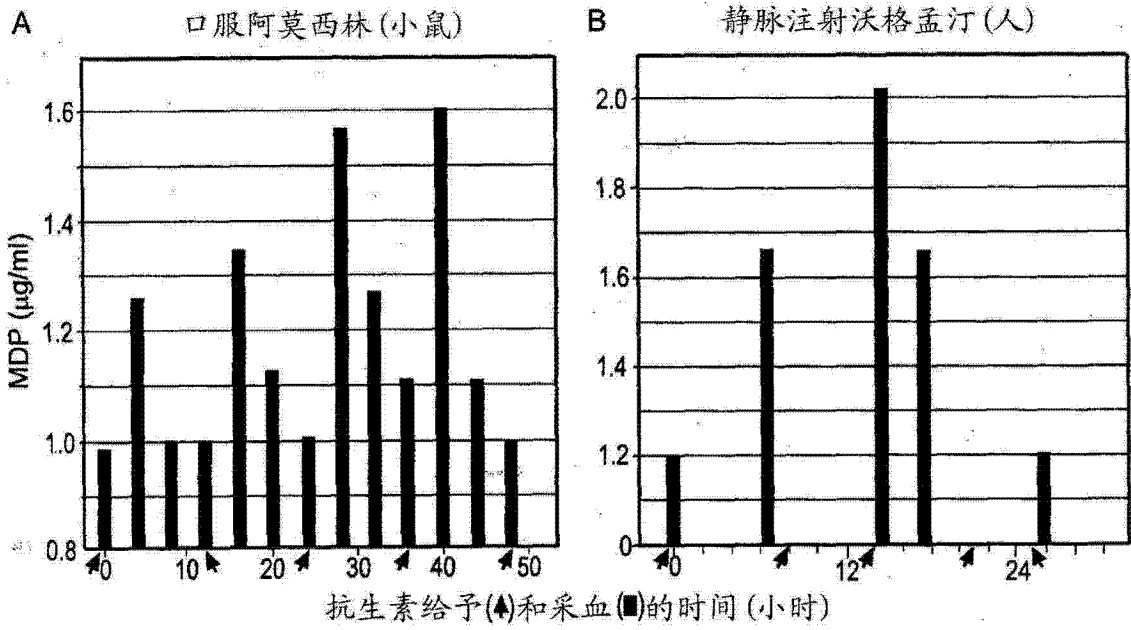


图 3

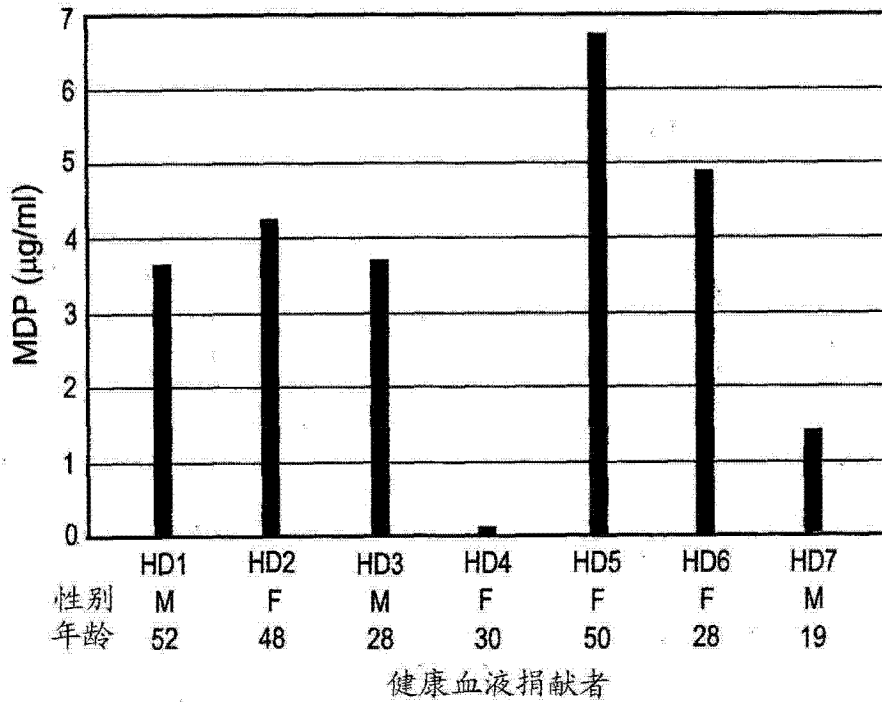


图 4

专利名称(译)	针对胞壁肽的单克隆抗体		
公开(公告)号	CN104797597A	公开(公告)日	2015-07-22
申请号	CN201380056321.7	申请日	2013-11-01
[标]申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
当前申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
[标]发明人	王跃 徐晓莉		
发明人	王跃 徐晓莉		
IPC分类号	C07K16/12 C12P21/08 G01N33/53 A61K39/02 A61K39/085		
CPC分类号	C07K2317/92 G01N33/566 G01N2333/4722 C07K16/12 A61K39/00 A61K2039/6012 C07K16/1232 C07K16/1275 C07K16/44		
代理人(译)	洪欣		
优先权	201208082 2012-11-01 SG		
其他公开文献	CN104797597B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了分离的抗体或其抗原结合片段。所述抗体能够结合胞壁肽或胞壁肽的衍生物或类似物或盐。所述胞壁肽包含胞壁酸和选自丙氨酸、异谷酰胺、谷氨酸及其盐的氨基酸。还公开了产生所述抗体的方法、包含所述抗体的组合物、利用所述抗体进行治疗的方法、所述抗体的用途、检测胞壁肽的方法、检测胞壁肽的测定、抗菌剂、杂交瘤和试剂盒。

