



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105308066 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201480021573. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 14

*C07K 14/33*(2006. 01)

(30) 优先权数据

*A61K 39/02*(2006. 01)

61/793376 2013. 03. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/029070 2014. 03. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/144594 EN 2014. 09. 18

(71) 申请人 圣诺菲·帕斯图尔公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 M. 谢 M. 索伊卡

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 赵胜宝 石克虎

权利要求书2页 说明书16页 附图2页

(54) 发明名称

类毒素、组合物和相关的方法

(57) 摘要

公开了生产经纯化的梭菌毒素的方法,包括切向流过滤、疏水相互作用层析法和阴离子交换层析法。这些方法提供纯度为约 90% 或更大的艰难梭菌毒素的良好收率。还公开了高度纯化的梭菌毒素、类毒素(例如,通过使毒素灭活而制备,如本文公开的)和包含这些毒素和/或类毒素的组合物。还公开了使用经纯化的毒素和/或类毒素的方法,例如,以引出对梭状芽胞杆菌(例如,艰难梭菌)的免疫响应。

1. 一种用于生产经纯化的艰难梭菌 (*C. difficile*) 毒素的方法, 所述方法包括:
  - a) 将包含艰难梭菌毒素的不纯的含水溶液施用于疏水相互作用载体, 以将艰难梭菌毒素结合至所述载体;
  - b) 从所述疏水相互作用载体洗脱结合的艰难梭菌毒素;
  - c) 将来自步骤 (b) 的经洗脱的艰难梭菌毒素施用于选自以下的阴离子 - 交换载体:
    - (i) 具有季胺官能团的聚甲基丙烯酸酯树脂; 和
    - (ii) 具有季胺官能团的聚醚砜膜, 以将艰难梭菌毒素结合至所述载体; 和,
  - d) 从所述阴离子 - 交换载体洗脱结合的艰难梭菌毒素。
2. 权利要求 1 的方法, 所述方法还包括在步骤 (a) 之前, 使包含艰难梭菌毒素的不纯的含水溶液经历切向流过滤。
3. 权利要求 1 或 2 的方法, 所述方法还包括在步骤 (d) 之后回收经纯化的艰难梭菌毒素。
4. 权利要求 1-3 中任一项的方法, 其中所述毒素为艰难梭菌毒素 A。
5. 权利要求 1-3 中任一项的方法, 其中所述毒素为艰难梭菌毒素 B。
6. 权利要求 1-5 中任一项的方法, 其中所述疏水相互作用载体为具有连接的丁基 S 基团的基质或具有连接的丙基的基质。
8. 权利要求 6 的方法, 其中所述疏水相互作用载体为具有连接的丙基的基质, 并且在硫酸铵存在下, 将不纯的含水溶液施用于疏水相互作用载体。
9. 权利要求 8 的方法, 其中在约 0.8- 约 1.0M 硫酸铵存在下, 将所述不纯的含水溶液施用于疏水相互作用载体。
10. 权利要求 1-5、8 或 9 中任一项的方法, 其中步骤 (b) 在不存在有机溶剂下实施。
11. 权利要求 6 的方法, 其中所述疏水相互作用载体为具有连接的丁基 S 基团的琼脂糖凝胶树脂。
12. 权利要求 6 或 11 的方法, 其中在步骤 (a) 和 (b) 之后, 在不纯的含水溶液中回收约 70% 的毒素 A 和 / 或约 90% 的毒素 B。
13. 权利要求 6、11 或 12 中任一项的方法, 其中步骤 (b) 在不存在有机溶剂下实施。
14. 权利要求 1 的方法, 其中所述包含艰难梭菌毒素的含水溶液包含艰难梭菌毒素 A 和艰难梭菌毒素 B, 并且在步骤 (c) 中, 艰难梭菌毒素 A 和艰难梭菌毒素 B 从所述阴离子 - 交换载体单个洗脱。
15. 权利要求 1-14 中任一项的方法, 其中所述阴离子交换载体为基于非多糖的材料。
16. 权利要求 15 中任一项的方法, 其中所述阴离子交换载体为具有结合的季胺官能团的聚甲基丙烯酸酯树脂。
17. 权利要求 16 中任一项的方法, 其中所述阴离子交换载体包含强阴离子交换剂, 部分  $-O-R-N^+(CH_3)_3$ , 其中 R 为聚合物; 和 / 或, 阴离子交换载体为 Tosoh Super Q 650M。
18. 权利要求 14-17 中任一项的方法, 其中毒素 A 使用低盐缓冲液洗脱。
19. 权利要求 19 的方法, 其中毒素 A 低盐缓冲液包含 2- 约 32mM  $MgCl_2$  或约 125- 约 160mM NaCl。
20. 权利要求 14-17 中任一项的方法, 其中毒素 B 使用高盐缓冲液洗脱。
21. 权利要求 20 的方法, 其中所述高盐缓冲液包含约 120- 约 150mM  $MgCl_2$  或约 450- 约

550mM NaCl。

22. 权利要求 1-21 中任一项的方法,其中所述艰难梭菌毒素的不纯的含水溶液通过以下方法得到:在生长培养基中生长艰难梭菌的细胞,以提供含有艰难梭菌毒素和生长的细胞的培养物肉汤,和将培养物肉汤与生长的细胞分离,以提供艰难梭菌毒素的不纯的含水溶液。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述生长培养基包含山梨糖醇。

24. 一种经纯化的艰难梭菌毒素,其根据权利要求 1-12 中任一项的方法得到,其中所述经纯化的艰难梭菌毒素的纯度为约 90%或更大。

25. 权利要求 24 的经纯化的艰难梭菌毒素,其中所述毒素的纯度为约 94%或更大。

26. 权利要求 25 的经纯化的艰难梭菌毒素,其中所述毒素的纯度为约 98%或更大。

27. 权利要求 26 的经纯化的艰难梭菌毒素 A,其纯度为约 99%或更大。

28. 权利要求 24 的经纯化的艰难梭菌毒素,其中所述毒素为艰难梭菌毒素 A。

29. 权利要求 24 的经纯化的艰难梭菌毒素,其中所述毒素为艰难梭菌毒素 B。

30. 一种经纯化的艰难梭菌毒素,其根据权利要求 1-23 中任一项的方法得到,其中所述经纯化的艰难梭菌毒素基本上不含溶剂。

31. 一种经纯化的艰难梭菌毒素,其根据权利要求 1-23 中任一项得到,其中所述经纯化的艰难梭菌毒素不具有可检测的醇脱氢酶。

32. 权利要求 1-23 中任一项的方法,所述方法还包括用化学剂使回收的经纯化的艰难梭菌毒素灭活,以提供艰难梭菌类毒素。

33. 权利要求 32 的方法,其中所述回收的经纯化的艰难梭菌毒素用甲醛灭活,以提供艰难梭菌类毒素。

34. 一种艰难梭菌类毒素,其根据权利要求 32 或 33 的方法得到。

35. 权利要求 34 的艰难梭菌类毒素,其中所述类毒素为类毒素 A 或类毒素 B。

36. 一种组合物,所述组合物包含权利要求 34 或 35 的艰难梭菌类毒素。

37. 一种组合物,所述组合物包含权利要求 34 或 35 的艰难梭菌类毒素和药学上可接受的赋形剂。

38. 权利要求 36 或 37 的组合物,其中所述艰难梭菌类毒素为类毒素 A 或类毒素 B。

39. 权利要求 36 或 37 的组合物,所述组合物包含 3 : 2 重量比的艰难梭菌类毒素 A 和艰难梭菌 B。

40. 一种在受试者中引出免疫响应的方法,所述方法包括给予受试者权利要求 36-39 中任一项的组合物。

41. 一种预防或治疗受试者症状艰难梭菌感染的方法,所述方法包括给予受试者权利要求 36-39 中任一项的组合物。

42. 权利要求 41 的方法,其中所述受试者不具有症状艰难梭菌感染的症状,但是处于发展症状艰难梭菌感染的风险。

43. 权利要求 41 的方法,其中所述受试者具有症状艰难梭菌感染。

## 类毒素、组合物和相关的方法

### [0001] 相关的申请

本申请要求 2013 年 3 月 15 日提交的美国专利序号 61/793,376 的优先权,其通过引用而全文结合到本申请中。

### [0002] 本公开的领域

本公开一般性涉及蛋白质纯化领域。更具体地,本公开涉及经纯化的梭菌毒素、类毒素、包含经纯化的毒素或类毒素的组合物和制备经纯化的毒素和类毒素的方法。

### [0003] 本公开的背景

由培养物滤液制备的梭菌毒素需要广泛的纯化,以分离存在于滤液中的各种细胞组分(例如,细胞 DNA、细胞蛋白质、培养基组分),以适用于体内应用。的确,已开发多种纯化技术用于该目的。然而,根据这些技术制备的毒素可能仍含有明显量的过程中杂质。已进行各种努力以从培养物滤液纯化艰难梭菌 (*C. difficile*) 毒素 A 和毒素 B。

[0004] 在一种工艺中,通过超滤、离子交换层析法和乙酸沉淀纯化培养物滤液。通过该工艺,毒素 B 可仅被部分纯化,如通过当通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分析时不能区分毒素与若干污染蛋白质而证明的。[Rothman, S. W., 等人, Curr. Microbiol. 1981, 6:221-224 ;Sullivan, N. M., 等人, Infect. Immun., 1982, 35:1032-1040]。该工艺后来的修改涉及通过疏水相互作用层析法和离子交换层析法从艰难梭菌的渗析的滤液纯化毒素 (Rothman S. W., Infect. Immun., 1984, 第 324-331 页)。然而,该工艺也不能提供毒素 A 和毒素 B 二者高度纯化的形式。

[0005] 使用渗滤、硫酸铵沉淀和凝胶层析法 (S-300 Sephacryl 尺寸排阻柱) 从艰难梭菌培养物滤液共同纯化毒素 A 和 B 的方法在美国专利号 6,969,520 中描述。通过该方法制备的毒素的纯度为 50%-60% (或更少,例如,44%) 并且包括多种杂质(例如,约 35 kDa 杂质,艰难梭菌 3-羟基丁基 (butryl) Co A 脱氢酶,45-47 kDa 杂质(艰难梭菌谷氨酸脱氢酶)和 60-70 kDa 蛋白质 (groEL 的同系物或蛋白质的细菌 hsp60 家族))。

[0006] 目前可得的方法不适用于大规模生产。因此,本领域需要制备经纯化的毒素的备选方法。本公开提供用于以大规模提供经纯化的艰难梭菌毒素的方法。

### [0007] 本公开简述

本公开提供用于制备高度纯化的毒素和类毒素的方法。通过使用本文描述的方法,以纯化的形式并且以足够的收率得到艰难梭菌毒素和类毒素。在一些实施方案中,通过疏水相互作用层析法和阴离子交换层析法组合,任选在某些赋形剂存在下,通过由不纯的含水溶液纯化毒素,本公开提供用于生产艰难梭菌毒素的方法。在某些实施方案中,所述方法可包括使用基于非多糖的载体的阴离子交换层析法。在一些实施方案中,所述方法还可包括使用具有连接的苯基、丁基或丙基的疏水相互作用载体的疏水相互作用层析法。在一些实施方案中,不纯的含水溶液可经历超滤和 / 或渗滤步骤(例如,通过切向流过滤)。本文描述的方法以约  $\geq 90\%$  (例如,约 90%,约 94%,约 95-97%,约 98%,约 99% 或更大)(例如,“基本上不含杂质”)的纯度水平提供毒素。经纯化的毒素可使用化学剂或本领域普通技术人员可得的其它方法(例如像,但不限于,甲醛、戊二醛或  $\beta$ -丙醇酸内酯 (priopiolactone))

灭活（例如，以产生“类毒素”）。还提供高度纯化的毒素和类毒素和包含这样的毒素或类毒素的组合物。这样的高度纯化的组分（和相关的组合物）可用于保护受试者免于症状艰难梭菌感染（例如，作为免疫组合物和/或疫苗）和/或治疗患有症状艰难梭菌感染的受试者（例如，作为免疫组合物和/或疫苗）。示例性方法、毒素、类毒素、其组合物及用途因此可包括但不限于在实施例中描述的那些。由本公开，其它实施方案对于本领域普通技术人员来说显而易见。

[0008] 附图简述

图 1. 示例性毒素纯化工艺。

[0009] 图 2. 类毒素的免疫原性。

[0010] 详细描述

本公开提供用于制备高度纯化的毒素和类毒素的方法。本文特别感兴趣的是艰难梭菌毒素 A 和/或 B 和/或其衍生物（例如遗传解毒的译本、截短的形式、片段等）。就本公开的目的而言，毒素 A 和/或毒素 B 可包括使用本领域的标准技术可鉴定为毒素 A 和/或毒素 B 的任何艰难梭菌毒素。示例性技术可包括，例如，免疫测定，例如 ELISA、斑点印迹或体内测定。可用于进行这样的鉴定的试剂可包括，例如，抗毒素 A 兔子多克隆抗血清（例如，Abcam®产品编号 ab35021 或 Abcam®产品编号 ab93318）或抗毒素 A 小鼠单克隆抗体（例如，任意 Abcam®产品编号 ab19953 (mAb PCG4) 或 ab82285 (mAb B618M))、抗毒素 B 兔子多克隆抗血清（例如，Abcam®产品编号 ab83066）或抗毒素 B 小鼠单克隆抗体（例如，任意 Abcam®产品编号 ab77583 (mAb B428M)、ab130855 (mAb B423M) 或 ab130858 (mAb B424M))（均可得自 Abcam®(Cambridge, MA)）。

[0011] 本文提供了从分析到生产规模可按比例放大的方法。在一些实施方案中，所述方法提供纯度水平为约 90% 或更大（例如，约 90%，约 95-97%，约 98%，约 99% 或更大）的毒素。在一些实施方案中，包含这样的纯度水平的毒素和/或类毒素的组合物可认为“基本上不含杂质”。还提供了用于使经纯化的毒素灭活为类毒素的方法。还提供了使用这样的毒素和类毒素的方法。本文提供了这些方法、毒素、类毒素、组合物及其使用方法。

[0012] 本文描述的方法通常涉及由艰难梭菌毒素的不纯的含水溶液纯化艰难梭菌毒素。所述方法适用于来自艰难梭菌的实际上任何菌株的毒素。艰难梭菌的优选的菌株为产生毒素 A 和/或 B 的菌株，并且可为例如毒素类型 (toxino type) 0（例如，VPI10463/ATCC43255, 630）、III（例如，027/NAP/B1）、V（例如，078）和 VIII（例如，017）的菌株。

[0013] 通常，艰难梭菌在受控的条件下在发酵罐中生长，直至达到细胞的期望浓度，通过 OD 测量来测定。收获发酵罐肉汤，通过过滤（例如，使用膜过滤器）除去大多数细胞和细胞碎片杂质而净化。过滤可使用过滤器例如深度过滤器（例如，高效深度过滤器，例如，像，Pa11 Stax）来实施。过滤的肉汤可随后通过微过滤而灭菌，优选使用约 0.2 μm 孔尺寸的膜过滤器。所得到的肉汤滤液通常包括艰难梭菌毒素（例如，毒素 A 和/或毒素 B）和其它杂质，代表艰难梭菌毒素的不纯的含水溶液。为了纯化（或基本上纯化）艰难梭菌毒素，提供了包括多个阶段（例如，步骤）的方法。

[0014] 在一些实施方案中，第一阶段可包括浓缩、超滤和/或渗滤含有艰难梭菌毒素的肉汤。浓缩、超滤和渗滤可通过切向流过滤 (TFF)（例如，交叉流过滤）来实施。浓缩可通常通过在具有合适的截止阈值（例如，约 100 kDa-约 400 kDa）的膜上超滤而进行。TFF 为

本领域技术人员公知的,并且用于其执行的设备和协议由多个制造商市售可得,包括但不限于Pall Corporation (Port Washington, New York ;www.pall.com) 和EMD Millipore (Billerica, MA ;www.millipore.com)。这些方法可使用任意若干宽泛可得的系统来执行,例如包含平的片材膜或空心纤维膜的那些。示例性膜可包括,例如,Millipore 的 Spectrum 膜和Biomax 膜。在大规模生产中,可使用对毒素能防止过度剪切力的平的片材系统(例如,具有敞开的流动通道)。切向超滤可使用平的片材形式并且具有适当的截止阈值(例如,50-100 kDa 中的约任何一个)的膜进行。

[0015] 滤液(例如,如上所述生产)可在合适的缓冲液中渗滤,例如,像,pH 为约 7.0- 约 8.0 (例如,pH 7.5) 的 Tris 缓冲液(例如,25mM-50 mM 中的约任何一种),任选包括盐(例如,25 mM-50 mM NaCl)、EDTA (例如,0.2 mM)。缓冲液还可包括二硫苏糖醇(DTT),但是这可能不总是需要的和/或建议的。在一些优选的实施方案中,随后,特别排除 DTT,由于其可能对过程结果具有负面影响。渗滤的产物可随后使用适当的系统(例如,包含 0.8  $\mu\text{m}$  膜和 0.2  $\mu\text{m}$  膜的过滤器胶囊(例如,Sartorius、Pall EKV 或 Millipore 过滤器))过滤一次或多次。

[0016] 渗滤液可随后经历疏水相互作用层析法(HIC),以除去亲水和稍微疏水杂质。HIC 的原理为本领域公知的。简要地,并且不束缚于任何具体的作用机理,HIC 基于在蛋白质上的疏水基团和在可适用的固体载体上的疏水配体之间的相互作用。通过加入易溶盐(例如,像,但不限于硫酸铵、硫酸钠),可促进将在蛋白质上的疏水基团吸附至在载体上的疏水配体。通过用低盐浓度的缓冲液逐步或梯度洗脱,可实现结合的溶质的脱附。通过多种因素,可影响使蛋白质结合于疏水载体,包括:(i) 配体的类型,特别是其疏水性(例如,醚、苯基、丁基或丙基);(ii) 固体载体的配体密度;(iii) 基质的骨架材料;(iv) 蛋白质的疏水性质;和,(v) 所用的盐的类型。较少疏水的柱通常需要较高的盐浓度用于结合。为了促进疏水相互作用,可将硫酸铵加入到渗滤液溶液中(例如,至适当的最终的浓度(例如,约 0.4-1.2M 中任意一种或约 0.4- 约 0.9M,例如约 0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、或 1.2M 中的任意一种))。溶液可在疏水相互作用载体(例如,树脂或膜)例如琼脂糖凝胶(Sepharose)(具有例如,连接的苯基、丁基、醚或丙基配体,优选丁基、醚或丙基)上进行层析。在某些最优选的实施方案中,载体可包括丁基配体(例如,丁基 S 琼脂糖凝胶)。使用这样的色谱载体可提供从载体洗脱毒素,而不使用溶剂(例如,异丙醇(IPA)),并且不加入 DTT(参见,例如,实施例)。如在实施例中显示的,使用丁基琼脂糖凝胶(例如,丁基 S HIC 琼脂糖凝胶)的 HIC 可提供提高的毒素回收率和不使用溶剂(例如,IPA)来洗脱毒素 A 和 B。

[0017] 在柱平衡后,溶液可直接负载于柱上。载荷缓冲液可用于允许毒素与所用的柱载体材料结合。合适的载荷缓冲液可包含,例如,合适的缓冲组分例如,像,合适浓度(例如,约 15mM-50 mM 中任意一种,例如约 15、20、25、30、35、40、45 或 50 mM 中任意一种,优选约 25 mM) 的 Tris,典型的 pH 为约 7.0- 约 8.0 (优选,pH 8.0),具有适量的盐(例如,0.8M-1.0M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,例如约 0.8、0.9 或 1.0M 中任意一种,优选约 0.9M)。许多其它盐也可为合适的,例如像,通常用于 HIC 的那些,例如硫酸钠和/或 NaCl (例如,25 mM-50 mM NaCl,例如约 25、30、35、40、45 或 50 mM 中任意一种 NaCl),如本领域普通技术人员理解的。还可包括其它组分,例如 EDTA (例如,约 0.2 mM)。DTT 可能包括在内或者也可能不包括在内(例如,

由于其可影响毒素自动解蛋白活性)。如以上提及的,优选排除 DTT (因此,过程优选在不包括和 / 或不存在 DTT 下进行)。

[0018] 柱载荷可通常接着使用包含合适的缓冲组分的适当的缓冲液的洗涤步骤,例如,像,合适浓度的 Tris (例如,约 15 mM-约 50 mM Tris (例如约 15、20、25、30、35、40、45 或 50 mM 中任意一种,优选约 25 mM Tris);0.8M-1.0M 硫酸铵 (优选 0.9M)), pH 约 7.5-8.0, (例如,约 pH 7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 或 8.0 中任意一种)),以洗去杂质。结合的毒素可随后使用合适的缓冲液 (例如,10-40mM Tris (例如约 10、15、20、25、30、35 或 40 mM 中任意一种 Tris,优选约 25 mM Tris),pH 7.5-8.0 (例如,约 pH 7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 或 8.0 中任意一种))洗脱在一种或多种级分中。使用适当的稀释剂 (例如,像,注射用水 (WFI)),洗脱的毒素级分的传导率 (离子强度)可随后降低至适当的水平 (例如,6-8 mS/cm (传导率单位)或更少,例如,像,约 6、6.5、7.0、7.5 或 8.0 mS/cm 中任意一种)。

[0019] 艰难梭菌毒素 (在洗脱液中)可随后通过阴离子交换层析法 (AEX) 进一步纯化。AEX 的原理为本领域公知的。不束缚于任何具体的作用机理,该方法通常依赖于待分离的溶质 / 分子之间的电荷 - 电荷相互作用和在所用的阴离子交换载体材料 (例如,树脂、膜) 上的电荷。因为在生理 pH 范围下毒素带负电荷,因此载体可含有固定的带正电荷的离子交换基团 / 部分。带正电荷的部分通常为季氨基或二乙基氨基乙烷 (DEAE) 基团。因此,洗脱的含水溶液可允许与在允许毒素与载体结合的条件下具有带正电荷的离子交换基团的阴离子交换载体 (例如,树脂、膜) 接触。虽然 AEX 可使用基于多糖的载体 (例如,像,DEAE- 琼脂糖凝胶树脂、GE (Q、DEAE、DEAP) 琼脂糖凝胶树脂,和 / 或 Sartobind 膜) 实施,发现基于非多糖的载体 (例如,合成的聚合物和无机材料) 改善毒素纯度和收率。可使用的合适的示例性膜包括由例如使用交联的聚合物化学改性的微孔聚醚砜 (PES) 制备的那些,以生产具有带正电荷的离子交换基团的季胺表面 (例如像, Pall 或 Natrix 的膜)。例如,适合使用的示例性树脂包括连接季胺官能团的基于甲基丙烯酸酯的树脂 (例如像, Tosoh Super Q 树脂 (Toso Biosciences)、Bio-Rad Q 树脂 (Bio-Rad))。如在实施例显示的,与常规的技术相比,这样的色谱载体 (树脂、膜) 可提供醇脱氢酶 (ADH) 杂质与毒素有效和 / 或改善的分离。

[0020] AEX 色谱载体可用适当的缓冲液 (例如,25 mM Tris,0 mM  $MgCl_2$ ) 平衡。柱平衡后,包含毒素的溶液可直接负载于柱上。通常使用传导率和 / 或 pH 允许毒素结合于柱载体的载荷缓冲液。毒素 A 和毒素 B 可使用具有适当的盐浓度的适当的缓冲液 (例如,提高离子强度的) 单个洗脱。例如,与毒素 B 相比,毒素 A 可用较低盐浓度的缓冲液洗脱。在一些实施方案中,毒素 A 可用包含一种或多种钠和 / 或镁盐的低盐缓冲液洗脱,例如,像,约 2- 约 32 mM  $MgCl_2$ , 优选约 27 mM  $MgCl_2$ , 或约 125- 约 160 mM, 或约 140 mM (例如,141 mM) NaCl。毒素 B 可用包含一种或多种钠和 / 或镁盐的高盐缓冲液洗脱,例如,像,约 120- 约 150 mM, 或约 122- 约 148 mM  $MgCl_2$ , 优选约 135 mM  $MgCl_2$ , 或约 450- 约 550 mM, 或约 500 mM (例如,488 mM) NaCl。杂质可通常以高盐和低盐缓冲液之间的盐浓度 (例如,65-79 mM  $MgCl_2$ , 通常约 72 mM  $MgCl_2$ ) 洗脱。许多不同的组分可适用于缓冲 (例如,稳定 pH), 例如,像,适量的 (例如,约 25- 约 50 mM) Tris。还可使用其它缓冲液和盐,如本领域普通技术人员理解的。在一些实施方案中,当毒素浓度高和 / 或当毒素的含水溶液包括某些杂质 (例如,ADH, hsp60) 时,优选使用  $MgCl_2$  从 AEX 载体洗脱。如在以下实施例显示的,当艰难梭菌使用补

充山梨糖醇的培养基培养时,可遇到这样的情况。

[0021] 层析法通常在含水缓冲液系统存在下进行,以避免蛋白质变性。例如,任何常规的缓冲液(例如 Tris、Tricine、磷酸盐(PBS)、甘氨酸、MES、MOPS、HEPES、双-三-丙烷-HCl 或其它缓冲液)可适用于 AEX。带正电荷的缓冲离子应在阴离子交换剂上使用,以避免相互作用或结合于官能团。在一些实施方案中,例如,可使用具有  $\text{Cl}^-$  作为反荷离子的 Tris (pKa 8.2)。

[0022] 优选,可将经纯化的(或基本上纯化的)毒素 A 和/或经纯化的(或基本上纯化的)毒素 B 浓缩,并且在适当的储存缓冲液(例如,柠檬酸盐、磷酸盐、甘氨酸、碳酸盐、碳酸氢盐缓冲液)中渗滤。使用柠檬酸盐缓冲液已观察到降低的毒素降解,其因此可为优选的(参见,例如,实施例)。

[0023] 最终的经纯化的毒素通常为至少约 80%、85%、90%、95%、97.5%、98%、99% 或 100% 中任意一种纯化的,如使用标准技术(例如,毛细管凝胶电泳和/或 SDS/PAGE 测定)测量。如在实施例中显示的,可使用本文描述的方法,以生产纯化至约 99% 的毒素 A 和纯化至约 98% 的毒素 B。

[0024] 本文描述的方法还提供增强的可量测性、过程控制、产品纯度和产品稳定性。为了提高规模,例如,可使用提高尺寸的柱,并且可因此调节流速。

[0025] 所述方法导致艰难梭菌毒素良好的收率,具有有限的杂质和充分的效力/细胞毒性。例如,已发现通过本文描述的方法(例如,使用疏水相互作用层析法和/或使用基于非多糖的载体的阴离子交换层析法)纯化从培养物滤液除去大量的污染物(例如,生物分子,包括 DNA、脂质和蛋白质)。应注意,AEX 可在疏水相互作用层析法(HIC)之前或之后进行。例如,HIC 可在 AEX 之前实施,或者 AEX 可在 HIC 之前实施。AEX 还可由使用者按需重复,以进一步改善纯度水平。

[0026] 使用本领域普通技术人员已知的技术 例如,像,通过使用化学剂(例如,但不限于,甲醛、戊二醛或  $\beta$ -丙醇酸内酯),可将经纯化的毒素灭活(例如,以产生类毒素)。例如,毒素可使用甲醛灭活。经纯化的毒素可以可适用的靶毒素 A: 毒素 B 比率(例如,3:1, 3:2)混合,随后灭活或可单个灭活。例如,为了使毒素灭活,可将约 4 mg/ml 甲醛加入到约 0.5 mg/ml 毒素中。灭活可在适当的温度(例如,约 2-8°C,约 25°C 或更少)和在适当的 pH(例如,约 pH 7.0)下进行适量的时间(例如,约 18-21 天)。灭活的优选的方法(例如,“类毒素化”)包括在 2013 年 3 月 15 日提交的共同待审的美国专利序号 61/790,423 中描述的那些,其通过引用而全文结合到本申请中。

[0027] 所得到的类毒素制剂可在 pH 8.0 或更少(例如,6.5-7.5)的储存缓冲液中储存,该储存缓冲液可防止类毒素回复为毒素(例如,像,但不限于,柠檬酸盐、磷酸盐、甘氨酸、碳酸盐或碳酸氢盐)。缓冲液优选包括至少一种或多种提高类毒素的稳定性和/或延迟或降低类毒素的聚集的药学上可接受的赋形剂。使用的赋形剂包括例如但不限于糖(例如,海藻糖、蔗糖)或糖醇(例如,山梨糖醇)、盐(氯化钠、氯化钾、氯化镁、乙酸镁)、甲醛(0.001-0.02%)或它们的组合。适合使用的其它赋形剂在本领域描述,例如 W02009/035707 (US 2011/045025(A1)),其通过引用而全文结合到本文中。

[0028] 虽然类毒素制剂可与储存缓冲液直接混合,但是还可将制剂浓缩,并且在适当的缓冲液溶液中渗滤。优选,浓缩和渗滤使用切向流过滤进行,以使蛋白质剪切最小化,同时

确保除去甲醛和交换在储存缓冲液中。一种示例性储存缓冲液包含适量的柠檬酸盐（例如 20 mM），适当的 pH（例如，pH 7.5），适量的至少一种糖（例如，4%–8% 蔗糖，例如 5%），和约  $0.016 \pm 0.004\%$  甲醛（w/v）。如果需要，可调节甲醛的浓度，以保持甲醛的目标浓度（例如， $0.016 \pm 0.004\%$  甲醛（w/v）），以防止回复。在一些实施方案中，甲醛可以较低水平例如像， $0.008\%$ （w/v）或  $0.004\%$ （w/v）存在于这样的组合物中。储存的优选的方法包括在 2013 年 3 月 15 日提交的共同待审的美国专利序号 61/790,423 中描述的那些，其通过引用而全文结合到本申请中。

[0029] 还可过滤（例如，使用  $0.2 \mu\text{m}$  膜过滤器）类毒素制剂，以除去通过在 280 nm 下的吸光度可影响蛋白质浓度的小的蛋白质聚集物，以允许以预定的类毒素 A: 类毒素 B 比率配制药物组合物。在储存前，类毒素 A 和类毒素 B 可以预定的类毒素 A: 类毒素 B 比率组合。组合的或单个类毒素的组合物可在例如  $2-8^{\circ}\text{C}$  下储存，为液体或冻干的形式（例如，在该形式中，甲醛可以例如约  $0.016\%$ （w/v）存在）。如果为液体形式，类毒素优选在  $<-60^{\circ}\text{C}$  下储存。

[0030] 可配制类毒素用作药物组合物（例如，免疫原性和 / 或疫苗组合物）。例如，通过在药学上可接受的稀释剂（例如，生理盐水）中悬浮类毒素和 / 或通过使类毒素与药学上可接受的载体缔合，可制备包含艰难梭菌类毒素的组合物用于给予。这样的药物制剂可包括一种或多种赋形剂（例如，稀释剂、增稠剂、缓冲剂、防腐剂、佐剂、洗涤剂 and / 或免疫刺激剂），如本领域普通技术人员已知的和 / 或可得的那些。合适的赋形剂通常与类毒素和佐剂（例如，在加入佐剂的组合物中）相容，其实例为本领域普通技术人员已知和可得的。组合物可为液体形式或冻干的（按照标准方法）或泡沫干燥的（如例如在美国专利公布 2009/110699 中描述的，其通过引用而全文结合到本文中）。如以上提及的，还可将组合物冻干。在一些实施方案中，冻干的组合物可在约  $2^{\circ}\text{C}$  – 约  $8^{\circ}\text{C}$  之间储存。

[0031] 为了制备用于给予的疫苗，干燥的组合物可与含水溶液（例如，像，注射用水或合适的稀释剂或缓冲液溶液）重新组成。在某些实例中，稀释剂可包括本文描述的甲醛。稀释剂可包括佐剂（例如，氢氧化铝），含有或不含甲醛。一种示例性稀释剂可为 NaCl 和氢氧化铝的含水溶液。这样的稀释剂可用于重新组成干燥的组合物。药物组合物可包含约  $10-150 \mu\text{g/mL}$ （例如，约 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140 或  $150 \mu\text{g/mL}$  中任意一种）剂量的类毒素。通常，用于注射的剂量的体积为约 0.5 mL 或 1.0 mL。可按需提高或降低剂量，以在受试者中调节免疫响应（和 / 或如果观察到副作用）。类毒素可在存在或不存在佐剂下给予，其量可由本领域技术人员确定。示例性佐剂可包括例如铝化合物，例如氢氧化铝、磷酸铝和羟基磷酸铝。

[0032] 疫苗组合物可通过经皮（例如，肌内、静脉内、腹膜内或皮下）、透皮和 / 或粘膜途径给予，其量和方案由本领域技术人员确定对于具有或处于发展症状艰难梭菌感染风险的受试者为合适的。这些群体包括，例如，已接受广谱抗生素的受试者，例如就医的年老的患者、疗养院居民、临床上生病的患者、癌症患者、AIDS 患者、加强护理单位的患者和接受透析治疗的患者。疫苗可给予 1 次、2 次、3 次、4 次或更多次。当给予多个剂量时，剂量可彼此分隔例如，1–6 天、一周、两周、三周或一个或多个个月（例如，几个月）中任意一种。因此，通过给予受试者药物组合物，本公开还提供引出对毒素、类毒素和 / 或包含所述的毒素、类毒素的感染的有机体的免疫响应的方法。这可通过给予受试者本文描述的药物组合物（例如，

免疫原性组合物和 / 或疫苗) 以实现使类毒素暴露于受试者的免疫系统来实现。因此, 免疫原性组合物和 / 或疫苗可用于预防和 / 或治疗症状艰难梭菌感染。

[0033] 因此, 通过将包含艰难梭菌毒素的不纯的含水溶液施用于疏水相互作用载体 (例如, HIC), 以将艰难梭菌毒素结合至其上; 从所述疏水相互作用载体洗脱结合的艰难梭菌毒素; 将经洗脱的艰难梭菌毒素施用于选自以下的阴离子 - 交换载体 (例如, AEX): (i) 具有季胺官能团的聚甲基丙烯酸酯树脂; 和 (ii) 具有季胺官能团的聚醚砜膜, 以将艰难梭菌毒素结合至其上; 和, 从所述阴离子 - 交换载体洗脱结合的艰难梭菌毒素, 本公开提供用于生产经纯化的艰难梭菌毒素的方法。在一些实施方案中, 所述方法还包括在 HIC 之前使包含艰难梭菌毒素的不纯的含水溶液经历切向流过滤和 / 或从 AEX 洗脱液回收经纯化的艰难梭菌毒素。毒素通常为艰难梭菌毒素 A 或艰难梭菌毒素 B。在一些实施方案中, 包含艰难梭菌毒素的含水溶液包含艰难梭菌毒素 A 和艰难梭菌毒素 B, 其可从阴离子 - 交换载体单个洗脱。在一些实施方案中, 用于 HIC 的疏水相互作用载体为具有连接的苯基的基质、具有连接的丁基 S 基团的基质 (例如, 琼脂糖凝胶基质) 或具有连接的丙基的基质。在一些实施方案中, 阴离子交换载体可为具有结合的季胺官能团的聚甲基丙烯酸酯树脂, 包含部分  $-O-R-N^+(CH_3)_3$ , 其中 R 为聚合物; 和 / 或, 阴离子交换载体为 Tosoh Super Q 650M。在一些实施方案中, 艰难梭菌毒素的不纯的含水溶液通过以下方法而得到: 在生长培养基中生长艰难梭菌的细胞, 以提供含有艰难梭菌毒素和生长的细胞的培养物肉汤, 并将培养物肉汤与生长的细胞分离, 以提供艰难梭菌毒素的不纯的含水溶液。在一些实施方案中, 艰难梭菌毒素的不纯的含水溶液包含山梨糖醇。还提供了根据任意这些方法得到的经纯化的艰难梭菌毒素 (例如, 纯度为约 90% 或更大 (例如, 约 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 中任意一种))。在一些实施方案中, 所述方法可提供纯化至约 92.8% 的艰难梭菌毒素 A。在一些实施方案中, 所述方法可提供纯化至约 91% 的艰难梭菌毒素 B。在一些实施方案中, 经纯化的艰难梭菌毒素可基本上不含溶剂和 / 或可检测的醇脱氢酶。所述方法还可包括用化学剂 (例如, 甲醛) 使回收的经纯化的艰难梭菌毒素灭活, 以提供艰难梭菌类毒素。本公开还提供根据任意这些方法得到的艰难梭菌类毒素。类毒素 (例如, 类毒素 A 和 / 或类毒素 B) 还可与药学上可接受的赋形剂组合, 以提供药物组合物 (例如, 免疫原性组合物和 / 或疫苗)。在一些实施方案中, 这样的组合物可包含 3:2 重量比的艰难梭菌类毒素 A 和艰难梭菌 B。通过给予受试者任何一种或多种本文提供的组合物, 本公开还提供用于在受试者中引出免疫响应 (例如, 针对艰难梭菌) 的方法。在一些实施方案中, 所述方法包括预防或治疗受试者症状和 / 或非症状艰难梭菌感染。所述方法还可用于治疗不具有但是可处于发展症状艰难梭菌感染风险的受试者。

[0034] 虽然本文已描述优选的实施方案, 但是应理解的是, 各种变化和修改考虑进行, 并且对于本领域技术人员来讲很容易是显而易见的。

[0035] 当在数值或范围的列举前面时, 术语 “约”, “大致” 等指独立地在列举或范围中的每一个单个值, 就好像在列举或范围中的每一个单个值直接前面有该术语。此类术语意味着它们提及的值是精确的, 与该值接近或类似。例如, “约” 或 “大致” 可指示在指示的值的 10% 内的值 (例如, “约 30%” 可包括 27%–33% 之间的任何值)。

[0036] 本文使用的受试者或宿主指个体。受试者可包括驯养的动物, 例如猫和狗、家畜 (例如, 牛、马、猪、绵羊和山羊)、实验室动物 (例如, 小鼠、兔子、大鼠、豚鼠) 和鸟类。在一

方面,受试者为哺乳动物,例如灵长类动物或人。

[0037] 任选的或任选意味着随后描述的事件或情况可能发生或者可能不发生,并且该描述包括事件或情况发生的情况以及事件或情况不发生的情况。例如,短语任选组合物可包含组合意味着组合物可包含不同分子的组合,或者可能不包括组合,使得该描述包括组合和不存在组合(即,组合的单个成员)二者。

[0038] 范围在本文中可表述为从约一个具体值和/或至约另一个具体值。当表述这样的范围时,另一个方面包括从一个具体值和/或至另一个具体值。类似地,当作为近似值表达值时,通过使用先行词约或大致,应理解的是,具体值形成另一个方面。进一步应理解的是,每一个范围的端点关于另一个端点是有意义的,并且独立于另一个端点。范围(例如,90-100%)意味着包括范围本身以及在该范围内的每一个独立的值,就好像每一个值单个列举一样。

[0039] 当术语防止、防止和防止在本文中给与定的治疗持续给与定的条件(例如,防止感染)结合使用时,意味着传达经治疗的受试者根本不会发展在临床上可观察的水平病症,或者比起他/她缺乏治疗,更缓慢地发展和/或至较少的程度。这些术语不仅局限于其中受试者根本不经历病症的各方面的情况。例如,如果在使受试者暴露于预期产生给与定的病症表现的刺激期间给予,并且比起另外预期的导致受试者经历较少和/或更轻微的病症的症状,就会说治疗已经防止了病症。通过导致受试者显示仅轻微的明显的感染症状,治疗可“防止”症状感染;这并不暗示一定不存在通过感染微生物的任何细胞的渗透。

[0040] 类似地,降低、降低和降低在本文中给与使用给与定的治疗的感染风险(例如,降低症状艰难梭菌感染的风险)结合使用,通常指与在不存在治疗(例如,使用所公开的毒素或类毒素给予或接种)下发展症状感染的对照或基础水平相比,受试者发展症状感染更缓慢或至较少的程度。降低症状感染的风险可导致受试者显示仅轻微的明显的感染症状或延迟的感染症状;这并不暗示一定不存在通过感染微生物的任何细胞的渗透。

[0041] 还必须注意,除非上下文明确指示另外的情况,否则在本公开和所附权利要求书中使用的单数形式“一个”、“一”和“该”包括复数对象。

[0042] 在本公开内引用的所有参考文献通过引用而全文结合到本文中。在以下实施例中进一步描述某些实施方案。这些实施方案仅作为实施例提供,不旨在以任何方式限制权利要求的范围。

## 实施例

[0043] 提供以下实施例仅用于说明的目的,不旨在限制本公开的范围。当情况可能建议或使得权宜时,考虑形式的变化和等同方案的替代。虽然本文已采用具体的术语,但是这样的术语预期为描述性含义,而不是用于限制的目的。使用但是未在本公开和这些实施例中明确描述的分子遗传学、蛋白质生物化学和免疫学的方法在科学文献中充分报道并且完全在本领域技术人员的能力范围内。

### [0044] 实施例 1

该实施例描述了用于制造经纯化的艰难梭菌毒素和类毒素的方法。艰难梭菌工作菌种(菌株 VPI10463/ATCC43255)用于接种 pH 6.35-7.45 的包含大豆蛋白胨、酵母提取物、磷酸盐缓冲液和碳酸氢钠的事先调理的培养基(SYS 培养基),并且由 4 mL 工作细胞库(Working

Cell Bank) (WCB) 小瓶按比例放大至 160 L 培养物。在达到期望的密度和 10-12 小时孵育阶段后,处理整个 160 L 培养物,用于净化和 0.2  $\mu\text{m}$  过滤。收获来自一个或多个生产发酵罐的培养物,经历膜过滤(例如,使用 Meisner 膜过滤器),以除去艰难梭菌细胞和细胞碎片杂质。将所得到的净化的培养物滤液浓缩,在具有 NaCl、EDTA 和 DTT 的 Tris 缓冲液中,通过切向流过滤来渗滤。所得到的溶液使用膜过滤器过滤,硫酸铵的浓度提高(例如,至约 0.4M),随后实施进一步过滤(例如,使用膜过滤器)。该含水溶液含有艰难梭菌毒素 A 和毒素 B。含水溶液经历疏水相互作用层析法。

[0045] 艰难梭菌毒素结合于苯基 FF 琼脂糖凝胶柱(GE 苯基 FF 琼脂糖凝胶)。柱用 0.2 mM 硫酸铵在 Tris 缓冲液中洗涤,两种艰难梭菌毒素级分用 Tris 缓冲液和 IPA 洗脱。将由 HIC 洗脱的两种毒素级分汇集,使用 WFI 将传导率调节至 9mS 或更少。艰难梭菌毒素(在汇集的洗脱液中)通过阴离子交换层析法进一步纯化。将洗脱的含水溶液通过阴离子交换柱(例如,DEAE FF 琼脂糖凝胶),使毒素结合于柱。柱用 Tris 缓冲液(50 mM Tris/50mM NaCl pH 7.5)平衡,毒素 A 用低盐 Tris 缓冲液(141 mM NaCl/50mM Tris, pH 7.5)洗脱,毒素 B 用高盐 Tris 缓冲液(488 mM NaCl/50mM Tris, pH 7.5)洗脱。将经纯化的毒素 A 和经纯化的毒素 B 各自浓缩,并且在 100 mM  $\text{PO}_4$  (pH 7) 中渗滤。在环境温度(即,约 37°C -26°C)下各自实施各步骤(例如,净化、TFF、HIC、AEX)。毒素 A 的平均收率为约 0.0075 g 纯毒素/L 发酵液,通过 SDS Page 评价的纯度为平均约 92.8%。毒素 B 的平均收率为约 0.0035 g 纯毒素/L 发酵液,通过 SDS Page 评价的纯度为平均约 91%。蛋白质的浓度使用吸光度单位通过在 280 nm 下的 UV 吸光度来测定。

#### [0046] 毒素的灭活

通过用甲醛处理,使毒素 A 和 B 灭活。将 37% 甲醛溶液无菌地加入到毒素 A 渗滤液和毒素 B 渗滤液的每一种中,以得到 0.42% 的最终浓度。将溶液混合,随后在 2-8°C 下储存 18-22 天。灭活后,将毒素渗滤液在配制缓冲液中渗析。

#### [0047] 实施例 2

实施本文描述的实验以改善纯化方法的可靠测性、收率和纯度。在无菌一次性袋中艰难梭菌工作菌种(菌株 VPI10463/ATCC43255)用于接种事先调制的培养基(包含大豆蛋白胨、酵母提取物、磷酸盐缓冲液和 D- 山梨糖醇, pH 7.1-7.3),将培养物在 35-39°C 下孵育,直至实现靶 OD。应注意,发现在事先调制的培养基中包括山梨糖醇显著提高收率。在 250 L 无菌一次性培养物袋中,30L 菌种 1 培养物用于接种培养基,将培养物在 35-39°C 下孵育,直至实现靶 OD。菌种 2 培养物用于接种 1000L 无菌一次性培养物袋,将培养物在 35-39°C 下孵育,直至实现靶 OD。收获来自一个或多个生产发酵罐的培养物,经历深度过滤(例如,使用 Pall Stax 深度过滤器),以除去艰难梭菌细胞和细胞碎片杂质,同时冷却(例如,约 37°C -19°C),以限制蛋白酶活性。将所得到的净化的培养物滤液浓缩,使用平的贮备 Millipore(优选按比例放大),并且在约 4°C -10°C 的温度下(用于降低的蛋白酶活性),在 25 mM Tris/50mM NaCl/0.2mM EDTA (pH 7.5-8.0) (无 DTT) 中,通过切向流过滤来渗滤。所得到的溶液使用膜过滤器过滤,硫酸铵的浓度提高(例如,至约 0.4M),随后实施进一步过滤(例如,使用膜过滤器)。该含水溶液含有艰难梭菌毒素 A 和毒素 B。比起由基本上如在实施例 1 中描述的发醇工艺得到的毒素收率,该发醇工艺(利用具有山梨糖醇的培养基)收率为 2-3 倍(即,比起大致 5-9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  毒素 A 和 10-15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  毒素 B,为 2-3 倍)。培

养物滤液使用基本上如在实施例 1 中描述的工艺纯化（如在以上段落 [0044] 中）。在毒素 A 和 B 中多种杂质是明显的，包括在毒素 A 中的醇脱氢酶 (ADH)。通过 SDS-PAGE 分析，在毒素 B 中三种杂质是明显的，包括在约 210 kDa、85 kDa 和 60 kDa 的带，其可代表 HSP60 和降解产物。该工艺尝试多次。通过 SDS-PAGE 评价毒素纯度，在约 73.5-88.7% 范围。通过测量通过 SDS-PAGE 凝胶可见的主要的带来计算的毒素 A 和毒素 B 的纯度在表 1 中描述，并且在约 73.5-88.7% 范围。毒素 A 的主要的杂质为 ADH（通过 SDS-PAGE 作为在约 100 kDa 下的带可见），并且多种杂质在毒素 B 中明显。在 HIC 步骤中得到的回收率 <50%。

[0048] 表 1

批次 #	% 主要带
毒素 A 批次 1A	76.9
毒素 A 批次 2A	80.3
毒素 A 批次 3A	73.5
毒素 A 批次 4A	78.5
毒素 B 批次 1B	86.7
毒素 B 批次 2B	79.9
毒素 B 批次 3B	88.7
毒素 B 批次 4B	84.9

对以下描述的纯化工艺进行变化，以部分解决由发酵工艺改进得到的提高的杂质载荷：(i) 在 HIC 步骤中，使用 Tris/2mM EDTA 和 7% IPA 实现洗脱；和 (ii) 使用 DEAP 实现 AEX。

#### [0049] 毒素降解

已观察到毒素降解，特别是在毒素 B 中，并且可为关于纯度的问题。在毒素 B 中，典型的杂质带在 200kDa、85kDa 和 60kDa 下观察到，其相应于在 DTT 存在下由于自动蛋白水解得到的由其它报道的带。为了评价蛋白酶的存在，在过程中，将来自一个批次的样品在 -80℃、4℃ 和 25℃ 下孵育若干天。在净化的肉汤中注意到少量带型变化，并且 HIC 之前的样品在约 200kDa 和 85kDa 下显示带，在 25℃ 和 4℃ 样品中呈现，但是在 -80℃ 样品中未显示。在室温下孵育 4 天后，毒素 B 的 TFF2 之后的样品完全降解，表明是外源性蛋白酶。使用 TFF2 之后的材料的研究表明使用 PO<sub>4</sub> 作为渗滤缓冲液可影响降解。在不同的 pH 水平 (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 和 8.0) 下，来自一个批次的 TFF2 之后的材料在 20mM PO<sub>4</sub> 缓冲液中渗析。另外的样品在 20mM 柠檬酸盐 (pH 7.5) 中渗析。在渗析后，在 PO<sub>4</sub> 缓冲液的 pH 下，在约 200kDa 和 85kDa 下观察到新的带。意外地，20mM 柠檬酸盐不显示该结果，因此，表明柠檬酸盐缓冲液可为有用的渗滤缓冲液。

#### [0050] 改进的纯化工艺

如以上提及的，修改纯化工艺，以改善收率和纯度。筛选不同的 HIC 树脂。通过深度过滤后净化的培养物滤液通过切向流过滤和膜过滤处理，使用若干 HIC 载体（例如，苯基低疏水性、苯基高疏水性（苯基琼脂糖凝胶树脂、（苯基琼脂糖凝胶快速流动））、丁基琼脂糖凝胶、丁基 S 琼脂糖凝胶、Sartobind Nano 苯基和 Fractogel 丙基 (EMD Biosciences) 中的一种，通过 HIC 纯化。在这些研究中使用任意 HIC 树脂或膜未实现 ADH 的分离。与苯基高亚（控制）相比，丁基 S 导致能力多约 2 倍，和显著更好的毒素回收率（约 90%，相对苯基的 50%），基于 SDS-PAGE 数据。新的工艺的其它益处包括不需要异丙醇，并且在洗脱后产品可收集一个单一峰。

[0051] 在一个研究中, HIC 之前的材料在 Fractogel 丙基柱 (EMD Biosciences) 上运行。与苯基琼脂糖凝胶树脂相比, Fractogel 丙基为包括惰性载体 (甲基丙烯酸酯) 的较弱的疏水树脂, 比起琼脂糖凝胶, 其具有较高的压缩性 (例如, 并且可限制蛋白质的二次结合)。使用较弱的疏水树脂 (像丙基和丁基) 在含水洗脱之后消除使用溶剂的需要, 以完全汽提产品的树脂。评价各种载荷条件和线性梯度洗脱。与使用苯基琼脂糖凝胶的 HIC 相比, 提供显著更好的毒素回收率以及从毒素分离杂质的一些改善。结果指示 (i) Fractogel 丙基树脂可替代苯基树脂; (ii) 1.2M 硫酸铵浓度的载荷条件足以使毒素结合于丙基树脂; (iii) 不需要溶剂来完成洗脱过程, 就像当前对于苯基树脂所见到的; 和 (iv) 使用丙基树脂, 毒素 A 和 B 的分辨可为可能的, 与二者通过 AEX 层析法共洗脱为分离的后者相反。

[0052] 在另一个研究中, 使用丁基 S 琼脂糖凝胶 (GE Healthcare Hitrap 丁基 -S) 实施 HIC。HIC 之前的材料使用 1 倍体积的 2.5M 硫酸铵、50 mM Tris (pH 7.5) 稀释, 按照制造商用说明在柱上运行, 并且使用线性梯度以共洗脱毒素。通过 SDS-PAGE, 将来自丁基 -S 琼脂糖凝胶层析法运行的 HIC 之后的产品与来自苯基琼脂糖凝胶层析法运行的 HIC 之后的产品相比较。使用丁基 -S 琼脂糖凝胶的 HIC 层析法具有显著较低水平的分子量杂质。比起使用苯基琼脂糖凝胶纯化的材料, 来自丁基 -S HIC 的洗脱的毒素含有较低比率的杂质。与使用苯基琼脂糖凝胶的 HIC 和使用 Fractogel 丙基的 HIC 相比, 通过丁基 -S HIC 提供毒素与杂质显著更好的分离。在比较 HIC/ 苯基琼脂糖凝胶和 HIC/ 丁基 S 的一个研究中, 使用 HIC/ 苯基琼脂糖凝胶仅得到毒素 A 有 10% 回收率, 而使用相同的净化的培养物滤液原料, HIC/ 丁基 S 提供几乎 70% 回收率 (对于毒素 A) 和几乎 90% 回收率 (对于毒素 B)。因此, 与更加疏水的苯基琼脂糖凝胶树脂相比, 较少疏水树脂 (例如, 丁基琼脂糖凝胶树脂, 例如, 像, GE 丁基 S FF 琼脂糖凝胶) 在 HIC 步骤提供显著改善的回收率, 并且还允许不使用溶剂 (例如, IPA) 洗脱毒素。

[0053] 还评价多种阴离子 - 交换载体。使用若干 AEX 柱中的一种纯化通过 HIC/ 苯基琼脂糖凝胶或 HIC/ 丁基 S 琼脂糖凝胶纯化后的培养物滤液。使用 10 柱体积的梯度洗脱。筛选结果在表 2 中描述。在每一个测试的 pH 下, 当使用 DEAP 柱实施 AEX 时, ADH 杂质与毒素 A 共洗脱, 并且使用具有 0.5M 精氨酸的洗脱缓冲液。使用 DEAP 柱和 1M 乙酸盐洗脱缓冲液显示 ADH 杂质与毒素 A 很少至没有分离。使用 Tosoh DEAE 柱的 AEX 层析法也显示 ADH 杂质与毒素 A 很少至没有分离。在 Tosoh Q 上纯化丁基 S 琼脂糖凝胶洗脱的材料运行导致非常纯的材料, 其中毒素 A 纯度为 94% 或更大。使用来自 2000L 发酵批次的肉汤滤液并且使用具有丁基 S 琼脂糖凝胶的 HIC 和使用 Tosoh Q 的 AEX 纯化的多个运行提供平均纯度为 99% 的毒素 A 和平均纯度为 98% 的毒素 B。关于毒素 B, 使用丁基 S 琼脂糖凝胶 (与苯基琼脂糖凝胶相比) 的 HIC 和使用 Tosoh Q (与 DEAP 相比) 的 AEX 改善纯度和收率。除去 DTT 并且在第二切向流过滤步骤中用柠檬酸盐缓冲液代替磷酸盐缓冲液 (虽然, 出于其它原因, 通常优选磷酸盐缓冲液), 进一步改善毒素 B 降解和纯度。因此, 使用基于非多糖的载体 (例如像, 基于甲基丙烯酸酯的树脂、基于聚醚砜的膜), 看到一种杂质 (醇脱氢酶 (ADH)) 与毒素 A 良好分离。还观察到毒素 B 与其它杂质 (例如 HSP-60 和其它蛋白质) 良好分离。与 DEAE- 琼脂糖凝胶树脂相比, 这些基于非多糖的载体提高毒素纯度和收率, 如在表 2 中显示的。

表2

AEX载体	类型	ADH	收率 毒素A/毒素B	纯度 毒素A/毒素B
Tosoh Toyopearl Super Q 650 (Tosoh Bioscience LLC)*	具有连接的季铵官能团的基于甲基丙烯酸酯的树脂, 以在广泛的pH范围内提供正电荷。	良好分离	对于毒素A和B, >70%	来自2000L运行 99%毒素A/ 98%毒素B
Tosoh Toyopearl DEAE-650 (Tosoh Bioscience LLC)* 洗脱缓冲液: MgCl <sub>2</sub> 在Tris中	具有DEAE官能团的基于甲基丙烯酸酯的树脂, 弱阴离子交换剂。	适度分离	对于毒素A和B, >70%	小于99%毒素A/ 98%毒素B
Natrix Q膜 (Natrix Separations Inc.)*	具有季铵官能团的微孔聚醚砜(PES)膜	良好分离	对于毒素A和B, <70%	与tosoh Super Q 类似
Mustang-Q膜 (Pall Corporation)*	具有季铵官能团的微孔聚醚砜(PES)膜	良好分离	对于毒素A和B, >70%	优于tosoh Super Q, 并且 不如natrix那样 非常好
Bio-Rad Macro-Prep High Q (Bio-Rad)*	具有官能团N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> 的基于甲基丙烯酸酯的树脂(甲基丙烯酸酯共聚物珠粒), 强阴离子交换剂。	良好分离	对于毒素A和B, >70%	88%(A)
Sartorius Q膜 (Sartorius)*	具有季和仲胺官能团的基于葡萄糖的	差分离	对于毒素A和B, <70%	比Super Q更低 纯度

	<p>树脂 Sartobind<sup>®</sup> 胶                  具有4mm床高, 和                  具有季胺官能团的                  稳定的增强的纤维素                  的离子交换膜                  强阴离子交换剂</p>			
<p>GE DEAE                  琼脂糖凝胶                  (GE Healthcare)<sup>®</sup></p>	<p>具有季和仲胺官能                  团的基于葡萄糖的                  树脂,                  基质为6%交联的琼                  脂糖和DEAE官能                  团,                  弱阴离子交换剂。</p>	差分离	<p>对于毒素A和B,                  &gt;70%</p>	50-80%
<p>GE DEAP                  (二乙基氨基基丙                  基)                  琼脂糖凝胶                  (ANX Sepharose                  Fast Flow, GE                  Healthcare)                  洗脱缓冲液:                  MgCl<sub>2</sub>, 在 Tris                  中,                  pH 6.5<sup>°</sup></p>	<p>具有季和仲胺官能                  团的基于葡萄糖的                  树脂</p>	杂质差分离	<p>对于毒素A,                  52.3%                  对于毒素B,                  17.7%</p>	50-70%
<p>GE DEAP                  (二乙基氨基基丙                  基)                  琼脂糖凝胶                  (ANX Sepharose                  Fast Flow, GE                  Healthcare)                  洗脱缓冲液:                  MgCl<sub>2</sub>, 在 Tris                  中,                  pH 7.5<sup>°</sup></p>	<p>具有季和仲胺官能                  团的基于葡萄糖的                  树脂</p>	不分离	<p>对于毒素A和B,                  &gt;70%</p>	50-70%
<p>GE DEAP                  (二乙基氨基基丙                  基)</p>	<p>具有季和仲胺官能                  团的基于葡萄糖的</p>	不分离	<p>对于毒素A和B,                  &gt;70%</p>	50-70%

<p>基) 琼脂糖凝胶 (ANX Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) 洗脱缓冲液: MgCl<sub>2</sub> 在 Tris 中, pH 8.5<sup>o</sup></p>	<p>树脂</p>			
<p>GE DEAP (二乙基氨基丙 基) 琼脂糖凝胶 (ANX Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) 洗脱缓冲液: 0.5M 精氨酸 /Tris, pH 7.5<sup>o</sup></p>	<p>具有季和仲胺官能 团的基于葡萄糖的 树脂</p>	<p>不分离</p>	<p>对于毒素A和B, &gt;70%</p>	<p>50-70%</p>
<p>GE DEAP (二乙基氨基丙 基) 琼脂糖凝胶 (ANX Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) 洗脱缓冲液: 1M 乙酸铵/Tris, pH 7.5<sup>o</sup></p>	<p>具有季和仲胺官能 团的基于葡萄糖的 树脂</p>	<p>很少至不分离</p>	<p>对于毒素A和B, &gt;70%</p>	<p>50-70%</p>
<p>GE Q Sepharose Fast Flow(GE Healthcare)<sup>o</sup></p>	<p>具有季和仲胺官能 团的基于葡萄糖的 树脂。 基质为D<sub>6</sub>球形交联 的琼脂糖。具有季 胺基官能团 (-CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 季 铵), 强阴离子交换剂</p>	<p>差分离</p>	<p>对于毒素A和B, 小于70%。</p>	<p>50-70%</p>

Fractogel <sup>®</sup> EMD TMAE (EMD Millipore) <sup>®</sup>	具有季胺官能团的 基于合成的甲基丙 烯酸酯的聚合的树 脂  强阴离子交换剂	良好分离	对于毒素 A, 33.85% 对于毒素 A, 41.34% 对于毒素 B, 13.6%	对于毒素 A, 94.9% ND  ND
---	--	------	--	----------------------------------

[0054] ° 使用苯基琼脂糖凝胶实施的 HIC

\* 使用丁基 S 琼脂糖凝胶实施的 HIC

ND<sup>2</sup>, 由于在样品载荷期间的问题, 未计算收率

使用来自基本上如在本实施例中描述的培养的艰难梭菌的 20L 过滤肉汤, 比较两个纯化程序: (i) 第一个使用丁基 HIC 琼脂糖凝胶用于 HIC 步骤, 使用 Tosoh Q 树脂用于 AEX 步骤; 和, (ii) 第二个使用苯基 HIC 琼脂糖凝胶用于 HIC 步骤, 使用 DEAP 琼脂糖凝胶用于 AEX 步骤。通过 SDS-PAGE 评价纯度。通过第一过程纯化的毒素 A 和 B 的纯度分别 > 97% 和 95%。在 25°C 下储存一周后, 这些毒素显示良好的稳定性, 并且纯度不变。毒素稳定, 甚至在不含柠檬酸盐的缓冲液中。使用第二过程的毒素纯度较少 (例如, 对于毒素 A 为 76%, 对于毒素 B 为 28%)。在 4°C 下储存一周后, 这些毒素的稳定性差。

[0055] HIC 和 AEX 的顺序

交替 HIC 和 AEX 层析法步骤的顺序, 以评价对收率和纯度的影响。净化的收获物首先通过 AEX 层析法 (使用 Tosoh Q 树脂) 纯化, 所得到的毒素 A 和毒素 B 产物通过 HIC 层析法 (使用 Fractogel 丙基树脂) 进一步纯化。使用线性梯度, 由 AEX 柱观察到两个洗脱峰, 具有基线分辨率。通过 SDS-PAGE 分析证实第一洗脱峰相应于毒素 A, 而第二洗脱峰相应于毒素 B。每一个峰的污染物特性显著不同。将来自每一个峰的级分汇集, 以产生毒素 A 和毒素 B 原料, 用于通过 HIC 进一步纯化。对于每一个 HIC 分离, 观察到一个主要的洗脱峰, 当通过 SDS-PAGE 分析时, 峰级分显示主要为毒素 A 或毒素 B。来自该研究的结果显示 (i) 来自净化的收获物的毒素 A 和 B 可分离至基线分辨率, 和 (ii) 单个毒素可进一步纯化, 并且在丙基树脂上精练 (polished)。

[0056] 使用丁基 S 琼脂糖凝胶的 HIC 和使用 Tosoh Q 的 AEX

建立使用丁基 HIC 琼脂糖凝胶用于 HIC 步骤和使用 Tosoh Q 树脂用于 AEX 步骤的纯化工艺 (图 1)。实施多个大规模运行 (160L 或更大)。通过 SDS PAGE 评价的纯度分别平均为约 98% 和 97% (对于毒素 A 和 B)。平均收率分别为 0.024 和 0.12 g 毒素 / L 发酵肉汤 (例如, 含有山梨糖醇) (对于毒素 A 和 B), 比起使用在实施例 1 中描述的过程得到的收率, 其代表 3-5 倍提高。在 1000L 和 2000L 运行中得到类似的收率和纯度结果。因此, 用丁基 S 代替苯基琼脂糖凝胶用于 HIC 和用 Tosoh Q 代替 DEAP 用于 AEX 提供良好的纯度和毒素 A 和毒素 B 的回收率 (部分由于在培养基中包括山梨糖醇)。进行使用丁基 S 用于 HIC 和使用 Tosoh Q 用于 AEX 的随后的研究, 而没有向样品或缓冲液中有任何 DTT 加入, 并且在 AEX 洗脱缓冲液中使用 MgCl<sub>2</sub>, 进一步改善纯度和降低毒素降解。

[0057] 毒素的灭活

通过用甲醛处理, 使如上所述纯化的毒素 A 和 B 灭活。将 37% 甲醛溶液无菌地加入到毒素 A 渗滤液和毒素 B 渗滤液的每一种中, 以得到约 0.2%-0.4% 的最终浓度。将溶液混合,

随后在约 25°C 下储存 6-13 天。灭活后,在配制缓冲液中渗析毒素渗滤液,并且如在实施例 3 中描述的进行体内测定。

**[0058] 实施例 3**

基本上根据在实施例 2 中描述的方法制备经纯化的艰难梭菌类毒素 A 和艰难梭菌类毒素 B,并且配制作成疫苗组合物。类毒素 A 和 B 以 3:2 重量的比率组合,用包含蔗糖 (4.0%-8.0% w/v) 和甲醛 (0.012%-0.020% w/v) 的柠檬酸盐缓冲液配制,冻干。每一种组合物用稀释剂重新组成,在作为疫苗使用前,加入氢氧化铝作为佐剂。叙利亚金色仓鼠提供艰难梭菌疫苗开发的严格的模型。在用单一腹膜内 (IP) 剂量的克林霉素抗生素预处理之后,并且在接受胃内 (IG) 接种产生毒素的艰难梭菌有机体后,仓鼠快速发展急性腹泻和出血性盲肠炎,并且在 2-4 天内死亡 (例如,未接种)。重新组成的疫苗含有 100  $\mu$ g/ 剂量类毒素、0.008% 甲醛和 400  $\mu$ g/ 剂量铝。使用不同剂量的艰难梭菌疫苗 (人剂量 (100  $\mu$ g/ 剂量) (HD) 的 4 种稀释物或注射安慰剂 (A10H),仓鼠 (9 只仓鼠 / 组) 通过三次肌肉免疫进行接种 (在第 0 天、第 14 天和第 27 天)。在第 41 天,仓鼠用化学形式的克林霉素 -2- 磷酸酯抗生素以 10mg/kg 通过 IP 途径预处理。在第 42 天,在用抗生素 28 小时预处理后,使用由艰难梭菌 ATCC43255 菌株得到的致死剂量的孢子制剂,通过 IG 途径挑战仓鼠。通过测量与艰难梭菌感染关联的症状初现的动力学和致死率,评定保护效力。结果证明采用剂量 - 依赖性方式疫苗保护仓鼠免于使用艰难梭菌产生毒素的细菌的致死挑战,并且通过接种剂量 HD/20 诱导了 100% 保护 (在 100  $\mu$ g/mL A10H 存在下,5  $\mu$ g 类毒素 A+B) (图 2)。保护免疫的动物免于死亡和疾病 (重量减轻和腹泻)。该研究的结果代表若干体内研究。因此,通过所公开的方法制备的类毒素提供对艰难梭菌疾病的保护性免疫。

**[0059]** 虽然已关于优选的实施方案描述了某些实施方案,但是应理解的是,本领域技术人员会想到各种变化和修改。因此,预期所附权利要求涵盖在以下权利要求范围内的使有这样的等同变化。

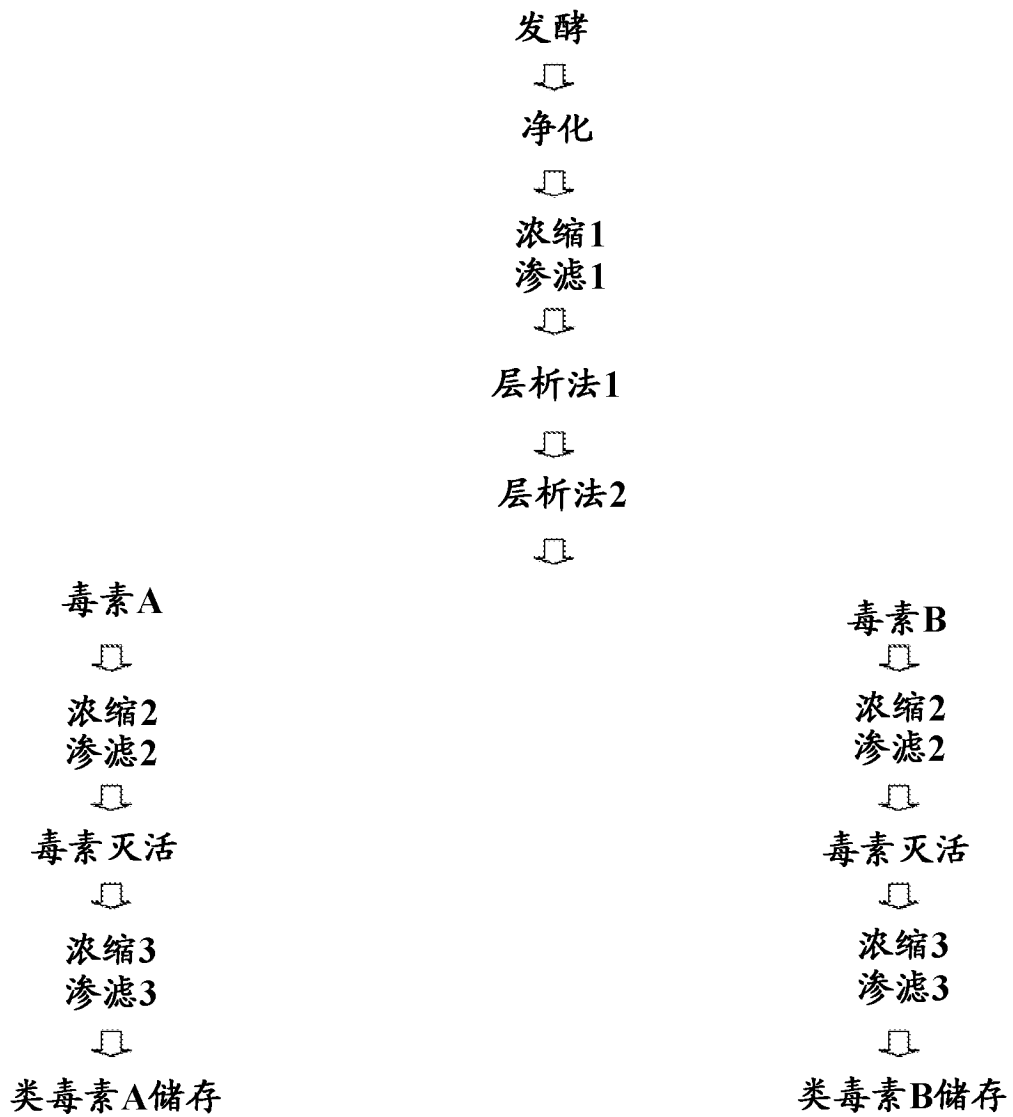


图 1

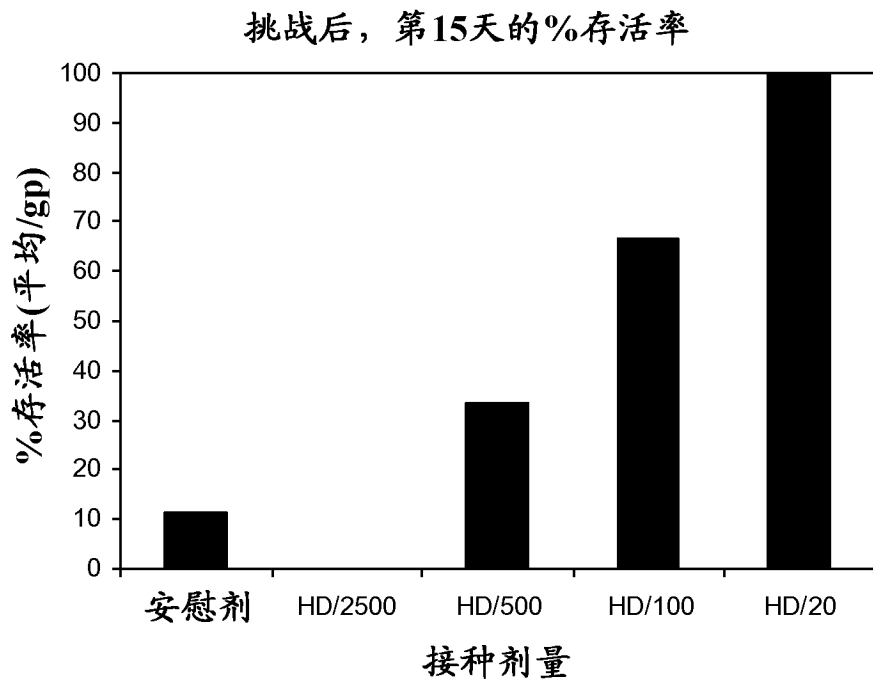


图 2