



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104797706 B

(45)授权公告日 2020.05.26

(21)申请号 201380054635.3

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

(22)申请日 2013.10.07

72002

(65)同一申请的已公布的文献号

代理人 左路 林晓红

申请公布号 CN 104797706 A

(51)Int.Cl.

(43)申请公布日 2015.07.22

C12N 1/20(2006.01)

(30)优先权数据

C07K 14/33(2006.01)

61/716,605 2012.10.21 US

(56)对比文件

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

Aiqi Fang 等.Production of

2015.04.20

Clostridium difficile toxin in a medium
totally free of both animal and dairy

(86)PCT国际申请的申请数据

proteins or digests..《PNAS》.2009,第106卷
(第32期),第13225-13229页.

PCT/IB2013/059183 2013.10.07

Aiqi Fang 等.Production of

(87)PCT国际申请的公布数据

Clostridium difficile toxin in a medium
totally free of both animal and dairy

W02014/060898 EN 2014.04.24

proteins or digests..《PNAS》.2009,第106卷
(第32期),第13225-13229页.

(73)专利权人 辉瑞公司

John T. Heap等.The ClosTron:

地址 美国纽约

Mutagenesis in Clostridium refined and
streamlined..《Journal of Microbiological

(72)发明人 K·U·扬森 A·S·安德森

Methods》.2009,第80卷第49-55页.

R·G·K·唐纳德 M·J·弗林特

审查员 刘春杰

N·K·卡利安 J·A·洛特温

权利要求书2页 说明书115页
序列表(电子公布) 附图51页

M·K·希胡 J·K·莫兰

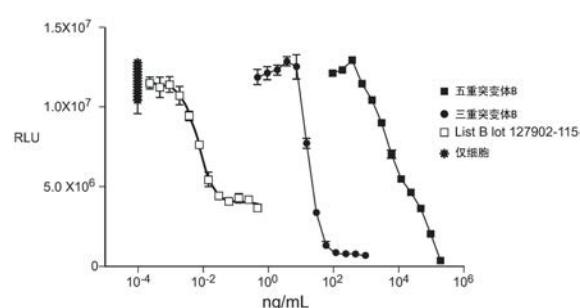
M·E·鲁彭 W·孙

(54)发明名称

涉及突变型艰难梭菌毒素的组合物和方法

(57)摘要

一方面,本发明涉及包含突变型艰难梭菌毒素A和/或突变型艰难梭菌毒素B的免疫原性组合物。突变型毒素可包括相对于对应野生型艰难梭菌毒素具有至少一个突变的葡萄糖基转移酶结构域和具有至少一个突变的半胱氨酸蛋白酶结构域。突变型毒素可包括被化学交联的至少一个氨基酸。另一方面,本发明涉及用于培养艰难梭菌和制备艰难梭菌毒素的方法和组合物。



1. 一种制备如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的多肽的方法,包括在适合条件下在培养基中培养重组艰难梭菌以产生所述多肽,并从所述培养基中分离所述多肽;
其中所述培养基包含大豆水解物、酵母提取物和葡萄糖,
其中所述重组艰难梭菌缺少编码毒素的内源性多核苷酸,
其中所述重组艰难梭菌包括编码所述多肽的多核苷酸,且
其中所述重组艰难梭菌进一步包括生孢梭菌铁氧还蛋白启动子。
2. 权利要求1的方法,其中所述培养基进一步包含聚乙二醇2000。
3. 权利要求1的方法,其中所述培养基进一步包含甲砜氯霉素。
4. 权利要求1的方法,其中所述重组艰难梭菌包括编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸,其中所述重组艰难梭菌进一步包括生孢梭菌铁氧还蛋白启动子。
5. 权利要求1的方法,其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌VPI 11186 ATCC 700057TM。
6. 权利要求1的方法,其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌1351 ATCC 43593TM。
7. 权利要求1的方法,其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌3232 ATCC BAA-1801TM。
8. 权利要求1的方法,其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌7322 ATCC 43601TM。
9. 权利要求1的方法,其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌5036 ATCC 43603TM。
10. 权利要求1的方法,其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌4811 ATCC 43602TM。
11. 一种制备如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的多肽的方法,包括在适合条件下在培养基中培养重组艰难梭菌以产生所述多肽,并从所述培养基中分离所述多肽;
其中所述培养基包含大豆水解物、酵母提取物和葡萄糖,
其中所述重组艰难梭菌缺少编码毒素的内源性多核苷酸,
其中所述重组艰难梭菌包括编码所述多肽的多核苷酸,且
其中所述重组艰难梭菌进一步包括生孢梭菌铁氧还蛋白启动子。
12. 权利要求11的方法,其中所述培养基进一步包含聚乙二醇2000。
13. 权利要求11的方法,其中所述培养基进一步包含甲砜氯霉素。
14. 权利要求11的方法,其中所述重组艰难梭菌包括编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸,其中所述重组艰难梭菌进一步包括生孢梭菌铁氧还蛋白启动子。
15. 权利要求11的方法,其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌VPI 11186 ATCC 700057TM。
16. 权利要求11的方法,其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌1351 ATCC 43593TM。
17. 权利要求11的方法,其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌3232 ATCC BAA-1801TM。
18. 权利要求11的方法,其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌7322 ATCC 43601TM。
19. 权利要求11的方法,其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌5036 ATCC 43603TM。
20. 权利要求11的方法,其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌4811 ATCC 43602TM。
21. 一种制备包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的多肽的方法,包括在适合条件下在培养基中培养重组艰难梭菌以产生所述多肽,并从所述培养基中分离所述多肽;
其中所述培养基包含大豆水解物、酵母提取物和葡萄糖,

其中所述重组艰难梭菌缺少编码毒素的内源性多核苷酸，

其中所述重组艰难梭菌包括编码所述多肽的多核苷酸，且

其中所述重组艰难梭菌进一步包括生孢梭菌铁氧还蛋白启动子。

22. 权利要求21的方法，其中所述培养基进一步包含聚乙二醇2000。

23. 权利要求21的方法，其中所述培养基进一步包含甲砜氯霉素。

24. 权利要求21的方法，其中所述重组艰难梭菌包括编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸，其中所述重组艰难梭菌进一步包括生孢梭菌铁氧还蛋白启动子。

25. 权利要求21的方法，其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌VPI 11186 ATCC 700057TM。

26. 权利要求21的方法，其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌1351 ATCC 43593TM。

27. 权利要求21的方法，其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌3232 ATCC BAA-1801TM。

28. 权利要求21的方法，其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌7322 ATCC 43601TM。

29. 权利要求21的方法，其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌5036 ATCC 43603TM。

30. 权利要求21的方法，其中所述重组艰难梭菌源自重组艰难梭菌4811 ATCC 43602TM。

涉及突变型艰难梭菌毒素的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年10月21日提交的美国临时申请61/716,605的权益，其整体援引加入本申请。

技术领域

[0003] 本申请涉及与突变型艰难梭菌相关的毒素的组合物和方法。

背景技术

[0004] 艰难梭菌 (*C. difficile*) 是与人胃肠道疾病相关的革兰氏阳性厌氧菌。如果天然肠道细菌群落经由抗生素治疗后减少，艰难梭菌的建群通常出现在结肠。通过分泌作为艰难梭菌主要毒力因子的糖基化毒素，毒素A和毒素B(分别为308和270kDa)，感染能导致与抗生素相关的腹泻和有时假膜性结肠炎。

[0005] 毒素A和毒素B分别由基因tcdA和tcdB编码于19kb致病性座位 (PaLoc) 内。艰难梭菌的非致病性菌株的此座位被另一115个碱基对的序列所替代。

[0006] 毒素A和毒素B均为强力细胞毒素。这些蛋白为灭活Rho/Rac/Ras家族小GTP酶的同源性葡萄糖基转移酶。所导致的信号传导的中断引起细胞-细胞连接的缺失、肌动蛋白细胞骨架的失调和/或细胞凋亡，由此导致与艰难梭菌感染 (CDI) 相关的深处的分泌性腹泻 (profound secretory diarrhea)。

[0007] 在近十年，艰难梭菌在医院、疗养院和其它长期护理机构中爆发的数量和严重程度显著增加。这种逐步增长的关键因素包括强毒病原菌的出现、抗生素使用的增加、检测方法的改进和在健康护理机构中更多的暴露于空气传播的孢子。

[0008] 对于与艰难梭菌相关疾病 (CDAD) 的抗生素治疗，甲硝达唑和万古霉素代表目前接受的护理标准。然而，在第一次CDI事件后大约20%接受此治疗的患者经历感染的复发，那些患者中的多至大约50%经受另外的复发。复发的治疗极具挑战，大部分复发通常在前面的事件的一个月内发生。

[0009] 因此，需要涉及艰难梭菌的免疫原性和/或治疗性组合物及其方法。

发明内容

[0010] 本文提供本发明的这些和其它目标。

[0011] 一方面，本发明涉及突变型艰难梭菌毒素A。突变型毒素A包括与野生型毒素A相比在285、287、700、972和978位残基处的突变。在一个实施方式中，突变型毒素A包括SEQ ID NO:183。在一个实施方式中，突变型毒素A比对应的野生型毒素A的细胞毒性更低。在一个实施方式中，突变型细胞毒素A包括经化学修饰的至少一个氨基酸残基。一方面，本发明涉及分离的多肽，其包括SEQ ID NO:183。

[0012] 另一方面，本发明涉及突变型艰难梭菌毒素B。突变型毒素B包括与野生型毒素B相比在286、288、698、970和976位残基处的突变。在一个实施方式中，突变型毒素B包括SEQ ID

NO:184。在一个实施方式中,突变型毒素B比对应的野生型毒素B的细胞毒性更低。在一个实施方式中,突变型细胞毒素A包括经化学修饰的至少一个氨基酸残基。一方面,本发明涉及分离的多肽,其包括SEQ ID NO:184。

[0013] 本发明还涉及用于培养艰难梭菌和制备艰难梭菌毒素的组合物和方法。一方面,本发明涉及包括植物水解物和艰难梭菌细胞的培养基。在一优选实施方式中,水解物为大豆水解物。更优选地,大豆水解物为大豆水解物SE50MK。

[0014] 另一方面,本发明涉及包括氮源和艰难梭菌细胞的培养基。在一个实施方式中,氮源为酵母提取物。优选地,酵母提取物为HY YEST 412 (Kerry Biosciences)。

[0015] 另一方面,本发明涉及包括植物水解物、酵母提取物和艰难梭菌细胞的培养基。在一个实施方式中,培养基不包含碳源。

[0016] 在一优选实施方式中,培养基进一步包括碳源。发明人发现与不含碳源的发酵相比,艰难梭菌在包含至少一种碳源的培养基中的发酵产生高OD₆₀₀值和高毒素生产率。在一个实施方式中,碳源为葡萄糖、甘露醇、果糖和/或甘露糖。

[0017] 在一个实施方式中,艰难梭菌细胞未被遗传修饰。在一个实施方式中,艰难梭菌细胞为重组艰难梭菌细胞。在一个实施方式中,艰难梭菌缺少编码毒素的内源性多核苷酸。在另一个实施方式中,细胞包括组成型启动子。在一优选实施方式中,启动子为生孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*) 铁氧还蛋白 (fdx) 启动子。在另一实施方式中,细胞不包含天然的、调节型染色体启动子。

[0018] 在另一方面,本发明涉及培养艰难梭菌的方法。所述方法包括在培养基中培养艰难梭菌细胞。在一个实施方式中,培养基包含大豆水解物和/或酵母提取物。在一优选实施方式中,培养基进一步包括碳源。优选地,碳源为葡萄糖。

[0019] 在一个实施方式中,培养步骤在厌氧条件下进行。

[0020] 在一个实施方式中,艰难梭菌作为种子培养物生长。在一个实施方式中,种子培养物通过从在培养物中生长的原种培养物 (stock culture) 接种来起始。

[0021] 在一个实施方式中,艰难梭菌作为发酵培养物生长。在一个实施方式中,发酵培养物从在培养基中生长的种子培养物接种。在另一方面,本发明涉及培养艰难梭菌的方法。所述方法包括在单克隆抗体培养基中培养艰难梭菌细胞。

[0022] 一方面,本发明涉及制备艰难梭菌毒素的方法。所述方法包括在培养基中培养艰难梭菌细胞。所述方法进一步包括从所述培养基中分离艰难梭菌毒素。

附图说明

[0023] 图1A-H:使用CLUSTALW比对(缺省参数),来自630、VPI10463、R20291、CD196株的野生型艰难梭菌毒素A和具有SEQ ID NO:4的突变型毒素A的序列比对。

[0024] 图2A-F:使用CLUSTALW比对(缺省参数),来自630、VPI10463、R20291、CD196株的野生型艰难梭菌毒素B和具有SEQ ID NO:6的突变型毒素B的序列比对。

[0025] 图3:图表显示野生型毒素阴性艰难梭菌株的鉴定。对于毒素A,通过ELISA测试13种艰难梭菌株的培养基。如图所示,7种菌株表达毒素A,6种菌株不表达(1351、3232、7322、5036、4811和VPI 11186株)毒素A。

[0026] 图4A和B:SDS-PAGE结果表明,在使用UDP-¹⁴C-葡萄糖的体外糖基化测试中,三重突

变体A(SEQ ID NO:4)、双重突变体B(SEQ ID NO:5)和三重突变体B(SEQ ID NO:6)并不糖基化Rac1或RhoA GTP酶；然而，10 μ g至1ng野生型毒素B糖基化Rac1。

[0027] 图5：免疫印迹表明，相比于对野生型毒素A和B(分别为SEQ ID NO:1和2)的切割片段的观察，突变型毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)中半胱氨酸蛋白酶活性消失。参见实施例13。

[0028] 图6：图表显示，通过IMR-90细胞中体外细胞毒性测试，当在高浓度(如约100 μ g/ml)下测定时，三重突变型毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)显示剩余细胞毒性。

[0029] 图7：图表显示对于三重突变型毒素B(SEQ ID NO:6)和七重突变型毒素B(SEQ ID NO:8)，EC₅₀值类似。

[0030] 图8：图表代表来自体外细胞毒性测试的结果，其中ATP水平(RLU)针对三重突变型TcdA(SEQ ID NO:4)(上幅图)和三重突变型TcdB(SEQ ID NO:6)(下幅图)的浓度增加绘制。通过特异于突变型毒素A(上幅图-pAb A和mAbs A3-25:A60-22)和突变型毒素B(下幅图-pAb B)的中和抗体，突变型毒素A和B的剩余细胞毒性可被完全消除。

[0031] 图9：处理后72小时的IMR-90细胞形态学的图像。图A显示假(mock)处理的对照细胞。图B显示经甲醛灭活的突变型TcdB(SEQ ID NO:6)处理后的细胞形态学。图C显示经EDC灭活的突变型TcdB(SEQ ID NO:6)处理后的细胞形态学。图D是经野生型毒素B(SEQ ID NO:2)处理后的细胞形态学。图E显示经三重突变型TcdB(SEQ ID NO:6)处理后的细胞形态学。对TcdA处理观察到类似结果。

[0032] 图10：图表显示实施例25所述的中和抗体滴度(研究muCdiff2010-06)。

[0033] 图11A-B：图表显示实施例26所述的中和抗体滴度(研究muCdiff2010-07)。

[0034] 图12：图表显示如实施例27所述，在4次免疫后在仓鼠中，中和抗体针对毒素A和B的应答(研究hamC.difficile2010-02)。

[0035] 图13A-B：图表显示如实施例27所述，在经化学灭活的遗传突变型毒素和List Biological类毒素接种后，在仓鼠中中和抗体的应答(研究hamC.difficile2010-02)。

[0036] 图14：如实施例28所述，与非免疫对照相比，三个免疫组的仓鼠的存活曲线(研究hamC.difficile2010-02，续)。

[0037] 图15：图表显示，如实施例29所述，在仓鼠中相关中和抗体针对艰难梭菌突变型毒素不同配方的应答(研究hamC.difficile2010-03)。

[0038] 图16A-B：图表显示，如实施例30所示，在食蟹猴(cynomolgus macaques)中，相关中和抗体针对化学灭活的遗传突变型毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)的应答。

[0039] 图17：A3-25mAb IgE轻链(VL)和重链(HL)可变区的氨基酸序列。信号肽-高亮标记；CDR-斜体和下划线标记；恒定区-粗体和下划线标记(完整序列未示出)。

[0040] 图18：图表显示在使用ATP水平(通过相对光单位-RLU)作为细胞生存力指示物的毒素中和测试中，单个毒素A单克隆抗体的滴度。相比于毒素(4 \times EC₅₀)对照，mAb A80-29、A65-33、A60-22和A3-25对毒素A具有随着浓度增加的中和作用，但是不如阳性兔抗毒素A对照的水平。mAb A50-10、A56-33和A58-46不中和毒素A。仅有细胞的对照为1-1.5 \times 10⁶RLU。

[0041] 图19：通过BiaCore对毒素B mAb的8个表位组作图。

[0042] 图20A-C：毒素A mAb的组合的协同中和活性：加入不同稀释的中和抗体A60-22、A65-33和A80-29至增加浓度的A3-25mAb协同增加对毒素A的中和，这与稀释无关。如图20B

和图20C的图表中所绘,仅有毒素A ($4\times EC_{50}$) 的对照的RLU为 $<0.3\times 10^6$,仅有细胞的对照的RLU为 $2-2.5\times 10^6$ 。

[0043] 图21:毒素B mAb的协同中和活性:如图21A所示的mAb 8-26、B60-2和B59-3对毒素B的中和。在组合B8-26和B59-3的稀释后,毒素B的中和协同地增加(图21B)。

[0044] 图22:免疫印迹显示Rac1GTP酶表达在24至96小时在遗传突变型毒素B (SEQ ID NO:6) 提取物中降低,但在野生型毒素B (SEQ ID NO:2) 处理的提取物中并不降低。免疫印迹还显示Rac1在毒素B处理的提取物中被糖基化,但在遗传突变型毒素B处理的提取物中并未被糖基化。

[0045] 图23A-K:图表代表获自体外细胞毒性测试的结果,其中ATP水平 (RLU) 针对以下物质的浓度增加绘制:艰难梭菌培养基和仓鼠血清库 (■);来自各个菌株的未加工的毒素(培养收集物) 和仓鼠血清库 (●);纯化的毒素(获得自List Biologicals的商品化毒素) 和仓鼠血清库 (▲);未加工的毒素 (▼),对照;和纯化的毒素 (◆),对照。来自各个菌株的毒素以 $4\times EC_{50}$ 值加入至细胞。图23显示包括突变型TcdA (SEQ ID NO:4) 和突变型TcdB (SEQ ID NO:6) 的免疫原性组合物,其中突变型毒素用EDC灭活(根据例如本文所述的实施例29表15),相比于各个仅含毒素的对照:2007886(图23A)、2006017(图23B)、2007070(图23C)、2007302(图23D)、2007838(图23E)、2007886(图23F)、2009292(图23G)、2004013(图23H)、2009141(图23I)、2005022(图23J)、2006376(图23K),其诱导显示针对来自至少以下16种不同艰难梭菌CDC株的毒素的中和活性的中和抗体。

[0046] 图24:突变型艰难梭菌毒素示例性EDC/NHS灭活的图解,得到至少三种可能类型的修饰:交联物、甘氨酸加合物和 β -丙氨酸加合物。图A说明交联。三重突变型毒素的羧基残基通过加入EDC和NHS活化。活化的酯与伯胺反应以形成稳定的酰胺键,得到分子内和分子间交联物。图B说明甘氨酸加合物的形成。在灭活后,剩余活化的酯通过加入甘氨酸终止,以形成稳定的酰胺键。图C说明 β -丙氨酸加合物的形成。三摩尔NHS能与一摩尔EDC反应以形成活化的 β -丙氨酸。其随后与伯胺反应以形成稳定的酰胺键。

[0047] 图25:突变型艰难梭菌毒素示例性EDC/NHS灭活的图解,得到至少以下一种类型的修饰:(A) 交联物、(B) 甘氨酸加合物和(C) β -丙氨酸加合物。

[0048] 图26:图表代表来自体外细胞毒性测试的结果,其中ATP水平 (RLU) (72小时ATP) 针对以下物质的浓度增加绘制:野生型TcdB(商购自List Biologicals (□))、三重突变型TcdB (SEQ ID NO:86) (●)、和五重突变型TcdB (SEQ ID NO:184) (■)。IMR-90细胞 (★) 用作对照。

[0049] 图27:图表显示IMR-90细胞上,五重突变型毒素B (SEQ ID NO:184) 对三重突变型毒素B (SEQ ID NO:86)-介导的细胞毒性的竞争性抑制(72小时ATP测试)。-●-代表五重突变型毒素B (SEQ ID NO:184) ("PM-B");-▲-代表三重突变型(TM),200ng/mL。

[0050] 图28:图表显示灌注发酵后的终OD和三重突变型毒素B滴度 (mg/1) (CDF-5126)。-●-代表OD_{600nm}; -▲-代表灌注流速(发酵器体积/2.0h); -■-代表葡萄糖(g/L); -●-代表毒素B(三重突变型,SEQ ID NO:86)。

[0051] 图29:图表显示来自另一灌注培养的终OD和三重突变型毒素B滴度 (mg/1) (CDF-5127)。-●-代表OD_{600nm}; -▲-代表灌注流速(发酵器体积/2.0h); -■-代表葡萄糖(g/L); -●-代表毒素B(三重突变型,SEQ ID NO:86)。

- [0052] 序列说明
- [0053] SEQ ID NO:1示出了野生型艰难梭菌630毒素A (TcdA) 的氨基酸序列。
- [0054] SEQ ID NO:2示出了野生型艰难梭菌630毒素B (TcdB) 的氨基酸序列。
- [0055] SEQ ID NO:3示出了与SEQ ID NO:1相比,在285和287位具有突变的突变型TcdA的氨基酸序列。
- [0056] SEQ ID NO:4示出了与SEQ ID NO:1相比,在285、287和700位具有突变的突变型TcdA的氨基酸序列。
- [0057] SEQ ID NO:5示出了与SEQ ID NO:2相比,在286和288位具有突变的突变型TcdB的氨基酸序列。
- [0058] SEQ ID NO:6示出了与SEQ ID NO:2相比,在286、288和698位具有突变的突变型TcdB的氨基酸序列。
- [0059] SEQ ID NO:7示出了与SEQ ID NO:1相比,在269、272、285、287、460、462和700位具有突变的突变型TcdA的氨基酸序列。
- [0060] SEQ ID NO:8示出了与SEQ ID NO:2相比,在270、273、286、288、461、463和698位具有突变的突变型TcdB的氨基酸序列。
- [0061] SEQ ID NO:9示出了编码野生型艰难梭菌630毒素A (TcdA) 的DNA序列。
- [0062] SEQ ID NO:10示出了编码野生型艰难梭菌630毒素B (TcdB) 的DNA序列。
- [0063] SEQ ID NO:11示出了编码SEQ ID NO:3的DNA序列。
- [0064] SEQ ID NO:12示出了编码SEQ ID NO:4的DNA序列。
- [0065] SEQ ID NO:13示出了编码SEQ ID NO:5的DNA序列。
- [0066] SEQ ID NO:14示出了编码SEQ ID NO:6的DNA序列。
- [0067] SEQ ID NO:15示出了野生型艰难梭菌R20291TcdA的氨基酸序列。
- [0068] SEQ ID NO:16示出了编码SEQ ID NO:15的DNA序列。
- [0069] SEQ ID NO:17示出了野生型艰难梭菌CD196TcdA的氨基酸序列。
- [0070] SEQ ID NO:18示出了编码SEQ ID NO:17的DNA序列。
- [0071] SEQ ID NO:19示出了野生型艰难梭菌VPI10463TcdA的氨基酸序列。
- [0072] SEQ ID NO:20示出了编码SEQ ID NO:19的DNA序列。
- [0073] SEQ ID NO:21示出了野生型艰难梭菌R20291TcdB的氨基酸序列。
- [0074] SEQ ID NO:22示出了编码SEQ ID NO:21的DNA序列。
- [0075] SEQ ID NO:23示出了野生型艰难梭菌CD196TcdB的氨基酸序列。
- [0076] SEQ ID NO:24示出了编码SEQ ID NO:23的DNA序列。
- [0077] SEQ ID NO:25示出了野生型艰难梭菌VPI10463TcdB的氨基酸序列。
- [0078] SEQ ID NO:26示出了编码SEQ ID NO:25的DNA序列。
- [0079] SEQ ID NO:27示出了野生型艰难梭菌VPI10463的致病性座位的DNA序列。
- [0080] SEQ ID NO:28示出了SEQ ID NO:1的101至293残基的氨基酸序列。
- [0081] SEQ ID NO:29示出了SEQ ID NO:1的1至542残基的氨基酸序列。
- [0082] SEQ ID NO:30示出了SEQ ID NO:2的101至293残基的氨基酸序列。
- [0083] SEQ ID NO:31示出了SEQ ID NO:2的1至543残基的氨基酸序列。
- [0084] SEQ ID NO:32示出了SEQ ID NO:1的543至809残基的氨基酸序列。

- [0085] SEQ ID NO:33示出了SEQ ID NO:2的544至767残基的氨基酸序列。
- [0086] SEQ ID NO:34示出了突变型TcdA的氨基酸序列,其中101、269、272、285、287、460、462、541、542、543、589、655和700残基可为任意氨基酸。
- [0087] SEQ ID NO:35示出了突变型TcdB的氨基酸序列,其中102、270、273、286、288、384、461、463、520、543、544、587、600、653、698和751可为任意氨基酸。
- [0088] SEQ ID NO:36示出了艰难梭菌TcdA中和抗体(A3-25mAb)可变轻链的氨基酸序列。
- [0089] SEQ ID NO:37示出了艰难梭菌TcdA中和抗体(A3-25mAb)可变重链的氨基酸序列。
- [0090] SEQ ID NO:38示出了艰难梭菌TcdA中和抗体(A3-25mAb)可变轻链的CDR1的氨基酸序列。
- [0091] SEQ ID NO:39示出了艰难梭菌TcdA中和抗体(A3-25mAb)可变轻链的CDR2的氨基酸序列。
- [0092] SEQ ID NO:40示出了艰难梭菌TcdA中和抗体(A3-25mAb)可变轻链的CDR3的氨基酸序列。
- [0093] SEQ ID NO:41示出了艰难梭菌TcdA中和抗体(A3-25mAb)可变重链的CDR1的氨基酸序列。
- [0094] SEQ ID NO:42示出了艰难梭菌TcdA中和抗体(A3-25mAb)可变重链的CDR2的氨基酸序列。
- [0095] SEQ ID NO:43示出了艰难梭菌TcdA中和抗体(A3-25mAb)可变重链的CDR3的氨基酸序列。
- [0096] SEQ ID NO:44示出了编码SEQ ID NO:3的DNA序列。
- [0097] SEQ ID NO:45示出了编码SEQ ID NO:4的DNA序列。
- [0098] SEQ ID NO:46示出了编码SEQ ID NO:5的DNA序列。
- [0099] SEQ ID NO:47示出了编码SEQ ID NO:6的DNA序列。
- [0100] SEQ ID NO:48示出免疫刺激寡核苷酸ODN CpG 24555的核苷酸序列。
- [0101] SEQ ID NO:49示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变重链的氨基酸序列。
- [0102] SEQ ID NO:50示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变重链的信号肽的氨基酸序列。
- [0103] SEQ ID NO:51示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变重链的CDR1的氨基酸序列。
- [0104] SEQ ID NO:52示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变重链的CDR2的氨基酸序列。
- [0105] SEQ ID NO:53示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变重链的CDR3的氨基酸序列。
- [0106] SEQ ID NO:54示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变重链的恒定区的氨基酸序列。
- [0107] SEQ ID NO:55示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变轻链的氨基酸序列。
- [0108] SEQ ID NO:56示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变轻链的信号肽的氨基酸序列。
- [0109] SEQ ID NO:57示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变轻链的CDR1的氨基

酸序列。

[0110] SEQ ID NO:58示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变轻链的CDR2的氨基酸序列。

[0111] SEQ ID NO:59示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变轻链的CDR3的氨基酸序列。

[0112] SEQ ID NO:60示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变重链的氨基酸序列。

[0113] SEQ ID NO:61示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变重链的信号肽的氨基酸序列。

[0114] SEQ ID NO:62示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变重链的CDR1的氨基酸序列。

[0115] SEQ ID NO:63示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变重链的CDR2的氨基酸序列。

[0116] SEQ ID NO:64示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变重链的CDR3的氨基酸序列。

[0117] SEQ ID NO:65示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变重链的恒定区的氨基酸序列。

[0118] SEQ ID NO:66示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变轻链的氨基酸序列。

[0119] SEQ ID NO:67示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变轻链的信号肽的氨基酸序列。

[0120] SEQ ID NO:68示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变轻链的CDR1的氨基酸序列。

[0121] SEQ ID NO:69示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变轻链的CDR2的氨基酸序列。

[0122] SEQ ID NO:70示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变轻链的CDR3的氨基酸序列。

[0123] SEQ ID NO:71示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变重链的氨基酸序列。

[0124] SEQ ID NO:72示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变重链的信号肽的氨基酸序列。

[0125] SEQ ID NO:73示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变重链的CDR1的氨基酸序列。

[0126] SEQ ID NO:74示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变重链的CDR2的氨基酸序列。

[0127] SEQ ID NO:75示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变重链的CDR3的氨基酸序列。

[0128] SEQ ID NO:76示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变重链的恒定区的氨基酸序列。

[0129] SEQ ID NO:77示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变轻链的氨基酸序列。

[0130] SEQ ID NO:78示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变轻链的信号肽的氨基酸序列。

- [0131] SEQ ID NO:79示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变轻链的CDR1的氨基酸序列。
- [0132] SEQ ID NO:80示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变轻链的CDR2的氨基酸序列。
- [0133] SEQ ID NO:81示出了艰难梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变轻链的CDR3的氨基酸序列。
- [0134] SEQ ID NO:82示出了突变型TcdB的氨基酸序列,其中102、270、273、286、288、384、461、463、520、543、544、587、600、653、698和751位的残基可为任意氨基酸。
- [0135] SEQ ID NO:83示出了与SEQ ID NO:1相比,在269、272、285、287、460、462和700位具有突变的突变型TcdA的氨基酸序列,其中1位缺少甲硫氨酸。
- [0136] SEQ ID NO:84示出了与SEQ ID NO:1相比,在285、287和700位具有突变的突变型艰难梭菌毒素A的氨基酸序列,其中1位缺少甲硫氨酸。
- [0137] SEQ ID NO:85示出了与SEQ ID NO:2相比,在270、273、286、288、461、463和698位具有突变的突变型艰难梭菌毒素B的氨基酸序列,其中1位缺少甲硫氨酸。
- [0138] SEQ ID NO:86示出了与SEQ ID NO:2相比,在286、288和698位具有突变的突变型艰难梭菌毒素B的氨基酸序列,其中1位缺少甲硫氨酸。
- [0139] SEQ ID NO:87示出了野生型艰难梭菌2004013TcdA的氨基酸序列。
- [0140] SEQ ID NO:88示出了野生型艰难梭菌2004111TcdA的氨基酸序列。
- [0141] SEQ ID NO:89示出了野生型艰难梭菌2004118TcdA的氨基酸序列。
- [0142] SEQ ID NO:90示出了野生型艰难梭菌2004205TcdA的氨基酸序列。
- [0143] SEQ ID NO:91示出了野生型艰难梭菌2004206TcdA的氨基酸序列。
- [0144] SEQ ID NO:92示出了野生型艰难梭菌2005022TcdA的氨基酸序列。
- [0145] SEQ ID NO:93示出了野生型艰难梭菌2005088TcdA的氨基酸序列。
- [0146] SEQ ID NO:94示出了野生型艰难梭菌2005283TcdA的氨基酸序列。
- [0147] SEQ ID NO:95示出了野生型艰难梭菌2005325TcdA的氨基酸序列。
- [0148] SEQ ID NO:96示出了野生型艰难梭菌2005359TcdA的氨基酸序列。
- [0149] SEQ ID NO:97示出了野生型艰难梭菌2006017TcdA的氨基酸序列。
- [0150] SEQ ID NO:98示出了野生型艰难梭菌2007070TcdA的氨基酸序列。
- [0151] SEQ ID NO:99示出了野生型艰难梭菌2007217TcdA的氨基酸序列。
- [0152] SEQ ID NO:100示出了野生型艰难梭菌2007302TcdA的氨基酸序列。
- [0153] SEQ ID NO:101示出了野生型艰难梭菌2007816TcdA的氨基酸序列。
- [0154] SEQ ID NO:102示出了野生型艰难梭菌2007838TcdA的氨基酸序列。
- [0155] SEQ ID NO:103示出了野生型艰难梭菌2007858TcdA的氨基酸序列。
- [0156] SEQ ID NO:104示出了野生型艰难梭菌2007886TcdA的氨基酸序列。
- [0157] SEQ ID NO:105示出了野生型艰难梭菌2008222TcdA的氨基酸序列。
- [0158] SEQ ID NO:106示出了野生型艰难梭菌2009078TcdA的氨基酸序列。
- [0159] SEQ ID NO:107示出了野生型艰难梭菌2009087TcdA的氨基酸序列。
- [0160] SEQ ID NO:108示出了野生型艰难梭菌2009141TcdA的氨基酸序列。
- [0161] SEQ ID NO:109示出了野生型艰难梭菌2009292TcdA的氨基酸序列。

- [0162] SEQ ID NO:110示出了野生型艰难梭菌2004013TcdB的氨基酸序列。
- [0163] SEQ ID NO:111示出了野生型艰难梭菌2004111TcdB的氨基酸序列。
- [0164] SEQ ID NO:112示出了野生型艰难梭菌2004118TcdB的氨基酸序列。
- [0165] SEQ ID NO:113示出了野生型艰难梭菌2004205TcdB的氨基酸序列。
- [0166] SEQ ID NO:114示出了野生型艰难梭菌2004206TcdB的氨基酸序列。
- [0167] SEQ ID NO:115示出了野生型艰难梭菌2005022TcdB的氨基酸序列。
- [0168] SEQ ID NO:116示出了野生型艰难梭菌2005088TcdB的氨基酸序列。
- [0169] SEQ ID NO:117示出了野生型艰难梭菌2005283TcdB的氨基酸序列。
- [0170] SEQ ID NO:118示出了野生型艰难梭菌2005325TcdB的氨基酸序列。
- [0171] SEQ ID NO:119示出了野生型艰难梭菌2005359TcdB的氨基酸序列。
- [0172] SEQ ID NO:120示出了野生型艰难梭菌2006017TcdB的氨基酸序列。
- [0173] SEQ ID NO:121示出了野生型艰难梭菌2006376TcdB的氨基酸序列。
- [0174] SEQ ID NO:122示出了野生型艰难梭菌2007070TcdB的氨基酸序列。
- [0175] SEQ ID NO:123示出了野生型艰难梭菌2007217TcdB的氨基酸序列。
- [0176] SEQ ID NO:124示出了野生型艰难梭菌2007302TcdB的氨基酸序列。
- [0177] SEQ ID NO:125示出了野生型艰难梭菌2007816TcdB的氨基酸序列。
- [0178] SEQ ID NO:126示出了野生型艰难梭菌2007838TcdB的氨基酸序列。
- [0179] SEQ ID NO:127示出了野生型艰难梭菌2007858TcdB的氨基酸序列。
- [0180] SEQ ID NO:128示出了野生型艰难梭菌2007886TcdB的氨基酸序列。
- [0181] SEQ ID NO:129示出了野生型艰难梭菌2008222TcdB的氨基酸序列。
- [0182] SEQ ID NO:130示出了野生型艰难梭菌2009078TcdB的氨基酸序列。
- [0183] SEQ ID NO:131示出了野生型艰难梭菌2009087TcdB的氨基酸序列。
- [0184] SEQ ID NO:132示出了野生型艰难梭菌2009141TcdB的氨基酸序列。
- [0185] SEQ ID NO:133示出了野生型艰难梭菌2009292TcdB的氨基酸序列。
- [0186] SEQ ID NO:134示出了野生型艰难梭菌014TcdA的氨基酸序列。
- [0187] SEQ ID NO:135示出了野生型艰难梭菌015TcdA的氨基酸序列。
- [0188] SEQ ID NO:136示出了野生型艰难梭菌020TcdA的氨基酸序列。
- [0189] SEQ ID NO:137示出了野生型艰难梭菌023TcdA的氨基酸序列。
- [0190] SEQ ID NO:138示出了野生型艰难梭菌027TcdA的氨基酸序列。
- [0191] SEQ ID NO:139示出了野生型艰难梭菌029TcdA的氨基酸序列。
- [0192] SEQ ID NO:140示出了野生型艰难梭菌046TcdA的氨基酸序列。
- [0193] SEQ ID NO:141示出了野生型艰难梭菌014TcdB的氨基酸序列。
- [0194] SEQ ID NO:142示出了野生型艰难梭菌015TcdB的氨基酸序列。
- [0195] SEQ ID NO:143示出了野生型艰难梭菌020TcdB的氨基酸序列。
- [0196] SEQ ID NO:144示出了野生型艰难梭菌023TcdB的氨基酸序列。
- [0197] SEQ ID NO:145示出了野生型艰难梭菌027TcdB的氨基酸序列。
- [0198] SEQ ID NO:146示出了野生型艰难梭菌029TcdB的氨基酸序列。
- [0199] SEQ ID NO:147示出了野生型艰难梭菌046TcdB的氨基酸序列。
- [0200] SEQ ID NO:148示出了野生型艰难梭菌001TcdA的氨基酸序列。

- [0201] SEQ ID NO:149示出了野生型艰难梭菌002TcdA的氨基酸序列。
- [0202] SEQ ID NO:150示出了野生型艰难梭菌003TcdA的氨基酸序列。
- [0203] SEQ ID NO:151示出了野生型艰难梭菌004TcdA的氨基酸序列。
- [0204] SEQ ID NO:152示出了野生型艰难梭菌070TcdA的氨基酸序列。
- [0205] SEQ ID NO:153示出了野生型艰难梭菌075TcdA的氨基酸序列。
- [0206] SEQ ID NO:154示出了野生型艰难梭菌077TcdA的氨基酸序列。
- [0207] SEQ ID NO:155示出了野生型艰难梭菌081TcdA的氨基酸序列。
- [0208] SEQ ID NO:156示出了野生型艰难梭菌117TcdA的氨基酸序列。
- [0209] SEQ ID NO:157示出了野生型艰难梭菌131TcdA的氨基酸序列。
- [0210] SEQ ID NO:158示出了野生型艰难梭菌001TcdB的氨基酸序列。
- [0211] SEQ ID NO:159示出了野生型艰难梭菌002TcdB的氨基酸序列。
- [0212] SEQ ID NO:160示出了野生型艰难梭菌003TcdB的氨基酸序列。
- [0213] SEQ ID NO:161示出了野生型艰难梭菌004TcdB的氨基酸序列。
- [0214] SEQ ID NO:162示出了野生型艰难梭菌070TcdB的氨基酸序列。
- [0215] SEQ ID NO:163示出了野生型艰难梭菌075TcdB的氨基酸序列。
- [0216] SEQ ID NO:164示出了野生型艰难梭菌077TcdB的氨基酸序列。
- [0217] SEQ ID NO:165示出了野生型艰难梭菌081TcdB的氨基酸序列。
- [0218] SEQ ID NO:166示出了野生型艰难梭菌117TcdB的氨基酸序列。
- [0219] SEQ ID NO:167示出了野生型艰难梭菌131TcdB的氨基酸序列。
- [0220] SEQ ID NO:168示出了野生型艰难梭菌053TcdA的氨基酸序列。
- [0221] SEQ ID NO:169示出了野生型艰难梭菌078TcdA的氨基酸序列。
- [0222] SEQ ID NO:170示出了野生型艰难梭菌087TcdA的氨基酸序列。
- [0223] SEQ ID NO:171示出了野生型艰难梭菌095TcdA的氨基酸序列。
- [0224] SEQ ID NO:172示出了野生型艰难梭菌126TcdA的氨基酸序列。
- [0225] SEQ ID NO:173示出了野生型艰难梭菌053TcdB的氨基酸序列。
- [0226] SEQ ID NO:174示出了野生型艰难梭菌078TcdB的氨基酸序列。
- [0227] SEQ ID NO:175示出了野生型艰难梭菌087TcdB的氨基酸序列。
- [0228] SEQ ID NO:176示出了野生型艰难梭菌095TcdB的氨基酸序列。
- [0229] SEQ ID NO:177示出了野生型艰难梭菌126TcdB的氨基酸序列。
- [0230] SEQ ID NO:178示出了野生型艰难梭菌059TcdA的氨基酸序列。
- [0231] SEQ ID NO:179示出了野生型艰难梭菌059TcdB的氨基酸序列。
- [0232] SEQ ID NO:180示出了野生型艰难梭菌106TcdA的氨基酸序列。
- [0233] SEQ ID NO:181示出了野生型艰难梭菌106TcdB的氨基酸序列。
- [0234] SEQ ID NO:182示出了野生型艰难梭菌017TcdB的氨基酸序列。
- [0235] SEQ ID NO:183示出了与SEQ ID NO:1相比，在285、287、700、972和978位具有突变的突变型TcdA的氨基酸序列。
- [0236] SEQ ID NO:184示出了与SEQ ID NO:2相比，在286、288、698、970和976位具有突变的突变型TcdB的氨基酸序列。
- [0237] SEQ ID NO:185至SEQ ID NO:195分别示出了示例性突变型毒素的氨基酸序列。

- [0238] SEQ ID NO:196至SEQ ID NO:212分别示出了示例性突变型毒素A的氨基酸序列。
- [0239] SEQ ID NO:213至SEQ ID NO:222分别示出了示例性突变型毒素B的氨基酸序列。
- [0240] SEQ ID NO:223至SEQ ID NO:236分别示出了示例性突变型毒素A的氨基酸序列。
- [0241] SEQ ID NO:237至SEQ ID NO:243分别示出了示例性突变型毒素B的氨基酸序列。
- [0242] SEQ ID NO:244至SEQ ID NO:245分别示出了示例性突变型毒素A的氨基酸序列。
- [0243] SEQ ID NO:246至SEQ ID NO:249分别示出了示例性突变型毒素B的氨基酸序列。
- [0244] SEQ ID NO:250至SEQ ID NO:253分别示出了示例性突变型毒素A的氨基酸序列。
- [0245] SEQ ID NO:254示出了示例性突变型毒素的氨基酸序列。
- [0246] SEQ ID NO:255至SEQ ID NO:263分别示出了示例性突变型毒素A的氨基酸序列。
- [0247] SEQ ID NO:264至SEQ ID NO:269分别示出了示例性突变型毒素B的氨基酸序列。
- [0248] SEQ ID NO:270至SEQ ID NO:275分别示出了示例性突变型毒素的氨基酸序列。
- [0249] SEQ ID NO:276至SEQ ID NO:323分别示出了示例性突变型毒素A的氨基酸序列。
- [0250] SEQ ID NO:324至SEQ ID NO:373分别示出了示例性突变型毒素B的氨基酸序列。
- [0251] SEQ ID NO:374至SEQ ID NO:421分别示出了示例性突变型毒素A的氨基酸序列。
- [0252] SEQ ID NO:422至SEQ ID NO:471分别示出了示例性突变型毒素B的氨基酸序列。
- [0253] SEQ ID NO:472至SEQ ID NO:519分别示出了示例性突变型毒素A的氨基酸序列。
- [0254] SEQ ID NO:568至SEQ ID NO:615分别示出了示例性突变型毒素B的氨基酸序列。
- [0255] SEQ ID NO:520至SEQ ID NO:567分别示出了示例性突变型毒素A的氨基酸序列。
- [0256] SEQ ID NO:616至SEQ ID NO:663分别示出了示例性突变型毒素B的氨基酸序列。
- [0257] SEQ ID NO:664至SEQ ID NO:711分别示出了示例性突变型毒素A的氨基酸序列。
- [0258] SEQ ID NO:712至SEQ ID NO:761分别示出了示例性突变型毒素B的氨基酸序列。

具体实施方式

[0259] 发明人惊奇地发现了突变型艰难梭菌毒素A和毒素B以及其方法等等。突变体部分地表征为具有免疫原性,且与野生型形式的各个毒素相比显示出降低的细胞毒性。本发明还涉及其免疫原性部分、其生物等价物和包括编码任何前述的核酸序列的分离的多核苷酸。

[0260] 本文所述的免疫原性组合物不可预期地表现出引发针对艰难梭菌毒素的新中和抗体的能力,且它们可以具有赋予针对艰难梭菌攻击主动和/或被动保护的能力。新抗体涉及针对毒素A和毒素B的各种表位。发明人进一步发现至少两种中和单克隆抗体的组合能够显示出对于毒素A和毒素B的体外中和的不可预期的协同效果。

[0261] 本文所述的本发明的组合物可用于在哺乳动物中治疗、预防、降低下述风险,降低下述的出现,降低下述的严重性和/或延迟下述的开始:艰难梭菌感染、与艰难梭菌相关疾病(CDAD)、综合病征、状况、症状和/或其并发症(与未被施用组合物的哺乳动物相比)。

[0262] 而且,发明人发现能够稳定表达突变型艰难梭菌毒素A和毒素B的重组的不产孢子的艰难梭菌细胞,及其新的制备方法。

免疫原性组合物

[0264] 一方面,本发明涉及包含突变型艰难梭菌毒素的免疫原性组合物。突变型艰难梭菌毒素包括相对于对应野生型艰难梭菌毒素,在葡萄糖基转移酶结构域具有至少一个突变

和在半胱氨酸蛋白酶结构域具有至少一个突变的氨基酸序列。

[0265] 本文所用术语“野生型”是指自然界中发现的形式。例如，野生型多肽或多核苷酸序列为生物体中存在的序列，其可以从自然来源分离且未经过人为修饰。本发明还涉及包括编码任何前述的核酸序列的分离的多核苷酸。此外，本发明涉及任何前述组合物在哺乳动物中治疗、预防、降低下述风险，降低下述的严重性，降低下述的出现和/或延迟下述的开始中的用途：艰难梭菌感染、与艰难梭菌相关疾病、综合病征、状况、症状和/或其并发症（与未被施用组合物的哺乳动物相比），以及制备所述组合物的方法。

[0266] 如本文所用，“免疫原性组合物”或“免疫原”是指在被施用此组合物的哺乳动物中引发免疫应答的组合物。

[0267] “免疫应答”是指针对受体患者中艰难梭菌毒素的有益体液（抗体介导的）和/或细胞（抗原特异性T细胞或其分泌产物介导的）应答。免疫应答可为体液应答、细胞应答或二者。

[0268] 免疫应答可为施用免疫原性组合物、免疫原诱导的主动应答。或者，免疫应答可为施用抗体或致敏T细胞诱导的被动应答。

[0269] 体液免疫应答（抗体介导的）的存在可通过例如本领域已知的基于细胞的试验，例如中和抗体试验、ELISA等来确定。

[0270] 细胞免疫应答通过呈递与I类或II类MHC分子相关的多肽表位以活化抗原特异性CD4+T辅助细胞和/或CD8+细胞毒性T细胞来引发。应答也可包括单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、嗜碱细胞、树突细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞、嗜酸性细胞或先天免疫的其它组分的活化。细胞介导的免疫应答的存在可通过本领域已知的增殖试验（CD4+T细胞）或CTL（细胞毒性T淋巴细胞）试验来确定。

[0271] 在一个实施方式中，免疫原性组合物为疫苗组合物。如本文所用，“疫苗组合物”为在被施用此组合物的哺乳动物中引发免疫应答的组合物。疫苗组合物可以保护被免疫的哺乳动物免受由免疫剂或免疫学交叉反应剂导致的随后攻击。对于与相同条件下非接种哺乳动物相比的症状或感染的降低，保护可为完全或部分的。

[0272] 本文所述的免疫原性组合物是交叉反应的，其是指具有以下特征，即针对不同于此组合物来源的菌株的另一种艰难梭菌株产生的毒素能够引发有效免疫应答（如体液免疫应答）。例如，本文所述的免疫原性组合物（如源自艰难梭菌630）可引发能结合多种艰难梭菌株产生的毒素（如艰难梭菌R20291和VPI10463产生的毒素）的交叉反应性抗体。参见例如实施例37。交叉反应性是细菌免疫原交叉保护潜力的体现，反之亦然。

[0273] 本文所用术语“交叉保护的”是指免疫原性组合物诱导免疫应答以预防或减弱不同细菌株或相同属的种感染的能力。例如，本文所述的免疫原性组合物（如源自艰难梭菌630）可诱导哺乳动物中有效免疫应答，以减弱哺乳动物中艰难梭菌感染和/或减弱除630外菌株（如源自艰难梭菌R20291）造成的艰难梭菌疾病。

[0274] 免疫原性组合物或免疫原引发免疫应答的示例性哺乳动物包括任何哺乳动物，例如小鼠、仓鼠、灵长类和人。在优选实施方式中，免疫原性组合物或免疫原在被施用此组合物的人中引发免疫应答。

[0275] 如上所述，毒素A（TcdA）和毒素B（TcdB）为灭活Rho/Rac/Ras家族小GTP酶的同源的葡萄糖基转移酶。TcdA和TcdB对哺乳动物靶细胞的作用取决于受体介导的内吞、膜易位、自

蛋白水解加工 (autoproteolytic processing) 和 GTP 酶单葡萄糖基化的多步机制。许多这些功能活性已被归于毒素一级序列内的不连续区域,且毒素已被描绘以显示这些分子在结构上类似。

[0276] TcdA 的野生型基因具有约 8130 个核苷酸,其编码具有约 308kDa 推定分子量,具有约 2710 个氨基酸的蛋白。如本文所用,野生型艰难梭菌 TcdA 包括来自任何野生型艰难梭菌株的艰难梭菌 TcdA。野生型艰难梭菌 TcdA 可包括当例如通过使用缺省缺口加权的程序 GAP 或 BESTFIT 进行最佳比对时,与 SEQ ID NO:1(全长) 具有至少约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约 98%、更优选约 99% 或最优选约 100% 相同性的野生型艰难梭菌 TcdA 氨基酸序列。

[0277] 在优选实施方式中,野生型艰难梭菌 TcdA 包括 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列,其描述了来自艰难梭菌株 630 的 TcdA 的野生型氨基酸序列(也公开于 GenBank 登录号 YP_001087137.1 和/或 CAJ67494.1)。艰难梭菌株 630 在本领域被称为 PCR-核糖核酸型 012 株。SEQ ID NO:9 描述了来自艰难梭菌株 630 的 TcdA 的野生型基因,其也公开于 GenBank 登录号 NC_009089.1。

[0278] 野生型艰难梭菌 TcdA 的另一实施例包括 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列,其描述了来自艰难梭菌株 R20291 的 TcdA 的野生型氨基酸序列(也公开于 GenBank 登录号 YP_003217088.1)。艰难梭菌株 R20291 在本领域已知是强毒菌株且被称为 PCR-核糖核酸型 027 株。来自艰难梭菌株 R20291 的 TcdA 的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 具有约 98% 的相同性。SEQ ID NO:16 描述了来自艰难梭菌株 R20291 的 TcdA 的野生型基因,其也公开于 GenBank 登录号 NC_013316.1。

[0279] 野生型艰难梭菌 TcdA 的另一实施例包括 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列,其描述了来自艰难梭菌株 CD196 的 TcdA 的野生型氨基酸序列(也公开于 GenBank 登录号 CBA61156.1)。CD196 是来自于最近加拿大疾病爆发的菌株,其在本领域被称为 PCR-核糖核酸型 027 株。来自艰难梭菌株 CD196 的 TcdA 的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 具有约 98% 的相同性,且与来自艰难梭菌株 R20291 的 TcdA 具有约 100% 的相同性。SEQ ID NO:18 描述了来自艰难梭菌株 CD196 的 TcdA 的野生型基因,其也公开于 GenBank 登录号 FN538970.1。

[0280] 野生型艰难梭菌 TcdA 的氨基酸序列的其它实施例包括 SEQ ID NO:19,其描述了来自艰难梭菌株 VPI 10463 的 TcdA 的野生型氨基酸序列(也公开于 GenBank 登录号 CAA63564.1)。来自艰难梭菌株 VPI 10463 的 TcdA 的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 具有约 100% (99.8%) 的相同性。SEQ ID NO:20 描述了来自艰难梭菌株 VPI 10463 的 TcdA 的野生型基因,其也公开于 GenBank 登录号 X92982.1。

[0281] 野生型艰难梭菌 TcdA 的其它实施例包括来自可从疾病预防控制中心 (CDC, Atlanta, GA) 获得的野生型艰难梭菌株的 TcdA。发明人发现,当最佳比对时,可从 CDC 获得的野生型艰难梭菌株的 TcdA 的氨基酸序列包括与 SEQ ID NO:1(来自艰难梭菌 630 的 TcdA) 的 1 至 821 氨基酸残基至少约 99.3% 至 100% 的相同性。参见表 1。

[0282] 发明人还发现,当最佳比对时(例如当最佳比对全长序列时),来自野生型艰难梭菌株的 TcdA 氨基酸序列可包括与 SEQ ID NO:1 至少约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 至约 100% 的相同性。

[0283] 表 1: 获得自 CDC 的野生型艰难梭菌株,且当最佳比对时,来自各个野生型艰难梭菌

株的TcdA的1至821氨基酸残基与SEQ ID NO:1的1至821氨基酸残基的百分比相同性。

[0284]

表 1: 来自 CDC 的野生型艰难梭菌株	
艰难梭菌株 ID	与 SEQ ID NO:1 的 1 至 821 残基的大约的氨基酸相同性%
2004111	100
2004118	99.6
2004205	100
2004206	100
2005325	99.3
2005359	99.6
2006017	100
2007070	100
2007302	100
2007816	99.3
2007838	99.6
2007886	99.6
2008222	100
2009078	100
2009087	100
2009141	100
2009292	99.6

[0285] 因此,在一个实施方式中,野生型艰难梭菌TcdA氨基酸序列包括至少约500、600、700或800连续残基的序列,当例如通过使用缺省缺口加权的程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时,其与SEQ ID NO:1的1至900残基之间相等长度的序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约98%、更优选约99%或最优选约100%的相同性。实施例包括上述的菌株(如R20291,CD196等)和表1所列的那些菌株。

[0286] 在另一实施方式中,野生型艰难梭菌TcdA氨基酸序列包括当最佳比对时,与选自SEQ ID NO:87-109的任意序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、优选约97%、优选约98%、更优选约99%或最优选约100%的相同性的序列。参见表1-a。

表 1-a:野生型艰难梭菌株	
艰难梭菌株 ID	毒素 A, SEQ ID NO:
2004013	SEQ ID NO:87
2004111	SEQ ID NO:88
2004118	SEQ ID NO:89
2004205	SEQ ID NO:90
2004206	SEQ ID NO:91
2005022	SEQ ID NO:92
2005088	SEQ ID NO:93
2005283	SEQ ID NO:94
2005325	SEQ ID NO:95
2005359	SEQ ID NO:96
2006017	SEQ ID NO:97
2006376	N/A
2007070	SEQ ID NO:98
2007217	SEQ ID NO:99
2007302	SEQ ID NO:100
2007816	SEQ ID NO:101
2007838	SEQ ID NO:102
2007858	SEQ ID NO:103
2007886	SEQ ID NO:104
2008222	SEQ ID NO:105
2009078	SEQ ID NO:106
2009087	SEQ ID NO:107
2009141	SEQ ID NO:108
2009292	SEQ ID NO:109
001	SEQ ID NO:148
002	SEQ ID NO:149
003	SEQ ID NO:150
012 (004)	SEQ ID NO:151
014	SEQ ID NO:134
015	SEQ ID NO:135
017	
020	SEQ ID NO:136
023	SEQ ID NO:137
027	SEQ ID NO:138
029	SEQ ID NO:139
046	SEQ ID NO:140
053	SEQ ID NO:168
059	SEQ ID NO:178
070	SEQ ID NO:152
075	SEQ ID NO:153
077	SEQ ID NO:154
078	SEQ ID NO:169
081	SEQ ID NO:155

[0287]

[0288]

087	SEQ ID NO:170
095	SEQ ID NO:171
106	SEQ ID NO:180
117	SEQ ID NO:156
126	SEQ ID NO:172
131	SEQ ID NO:157
SE844	SEQ ID NO:196
12087	SEQ ID NO:197
K14	SEQ ID NO:198
BI6	SEQ ID NO:199
BI17	SEQ ID NO:200
CH6230	SEQ ID NO:201
SE881	SEQ ID NO:202

[0289] TcdB的野生型基因具有约7098个核苷酸,其编码具有约270kDa推定分子量,具有约2366个氨基酸的蛋白。如本文所用,野生型艰难梭菌TcdB包括来自任何野生型艰难梭菌株的艰难梭菌TcdB。野生型艰难梭菌TcdB可包括当例如通过使用缺省缺口加权的程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时,与SEQ ID NO:2具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约98%、更优选约99%或最优选约100%相同性的野生型氨基酸序列。在优选实施方式中,野生型艰难梭菌TcdB包括SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,其描述了来自艰难梭菌株630的TcdB的野生型氨基酸序列(也公开于GenBank登录号YP_001087135.1和/或CAJ67492)。SEQ ID NO:10描述了来自艰难梭菌株630的TcdB的野生型基因,其也公开于GenBank登录号NC_009089.1。

[0290] 野生型艰难梭菌TcdB的另一实施例包括SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,其描述了来自艰难梭菌株R20291的TcdB的野生型氨基酸序列(也公开于GenBank登录号YP_003217086.1和/或CBE02479.1)。来自艰难梭菌株R20291的TcdB的氨基酸序列与SEQ ID NO:2具有约92%的相同性。SEQ ID NO:22描述了来自艰难梭菌株R20291的TcdB的野生型基因,其也公开于GenBank登录号NC_013316.1。

[0291] 野生型艰难梭菌TcdB的另一实施例包括SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列,其描述了来自艰难梭菌株CD196的TcdB的野生型氨基酸序列(也公开于GenBank登录号YP_003213639.1和/或CBA61153.1)。SEQ ID NO:24描述了来自艰难梭菌株CD196的TcdB的野生型基因,其也公开于GenBank登录号NC_013315.1。来自艰难梭菌株CD196的TcdB的氨基酸序列与SEQ ID NO:2具有约92%的相同性。

[0292] 野生型艰难梭菌TcdB的氨基酸序列的其它实施例包括SEQ ID NO:25,其描述了来自艰难梭菌株VPI10463的TcdB的野生型氨基酸序列(也公开于GenBank登录号P18177和/或CAA37298)。来自艰难梭菌株VPI10463的TcdB的氨基酸序列与SEQ ID NO:2具有100%的相同性。SEQ ID NO:26描述了来自艰难梭菌株VPI10463的TcdB的野生型基因,其也公开于GenBank登录号X53138.1。

[0293] 野生型艰难梭菌TcdB的其它实施例包括来自可从疾病预防控制中心(CDC, Atlanta, GA)获得的野生型艰难梭菌株的TcdB。发明人发现,当最佳比对时,可从CDC获得的野生型艰难梭菌株的TcdB的氨基酸序列包括与SEQ ID NO:1(来自艰难梭菌630的TcdB)的1至821氨基酸残基至少约96%至100%的相同性。参见表2。

[0294] 表2:获得自CDC的野生型艰难梭菌株,且当最佳比对时,来自各个野生型艰难梭菌株的TcdB的1至821氨基酸残基与SEQ ID NO:2的1至821氨基酸残基的相同性%。

表 2: 来自 CDC 的野生型艰难梭菌株	
艰难梭菌株 ID	与 SEQ ID NO:2 的 1-821 残基的约氨基酸相同性%
2004013	96.0
2004111	100
2004118	96.0
2004206	100
2005022	100
2005325	96.7
2007302	100
2007816	96.7
2008222	100
2009078	100
2009087	100
2009141	100

[0295]

[0296] 因此,在一个实施方式中,野生型艰难梭菌TcdB氨基酸序列包括至少约500、600、700或800连续残基的序列,当例如通过使用缺省缺口加权的程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时,其与SEQ ID NO:2的1至900残基之间相等长度的序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、优选约97%、优选约98%、更优选约99%或最优选约100%的相同性。实施例包括上述的菌株(如R20291,CD196等)和表2所列的那些菌株。

[0297] 在另一实施方式中,野生型艰难梭菌TcdB氨基酸序列包括当最佳比对时,与选自SEQ ID NO:110-133的任意序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、优选约97%、优选约98%、更优选约99%或最优选约100%的相同性的序列。参见表2-a。

表 2-a 野生型艰难梭菌株	
艰难梭菌株 ID	毒素 B, SEQ ID NO:
2004013	SEQ ID NO:110
2004111	SEQ ID NO:111
2004118	SEQ ID NO:112
2004205	SEQ ID NO:113
2004206	SEQ ID NO:114
2005022	SEQ ID NO:115
2005088	SEQ ID NO:116
2005283	SEQ ID NO:117
2005325	SEQ ID NO:118
2005359	SEQ ID NO:119
2006017	SEQ ID NO:120
2006376	SEQ ID NO:121
2007070	SEQ ID NO:122
2007217	SEQ ID NO:123
2007302	SEQ ID NO:124
2007816	SEQ ID NO:125
2007838	SEQ ID NO:126
2007858	SEQ ID NO:127
2007886	SEQ ID NO:128
2008222	SEQ ID NO:129
2009078	SEQ ID NO:130
2009087	SEQ ID NO:131
2009141	SEQ ID NO:132
2009292	SEQ ID NO:133
001	SEQ ID NO:158
002	SEQ ID NO:159
003	SEQ ID NO:160
012 (004)	SEQ ID NO:161
014	SEQ ID NO:141
015	SEQ ID NO:142
017	SEQ ID NO:182
020	SEQ ID NO:143
023	SEQ ID NO:144
027	SEQ ID NO:145
029	SEQ ID NO:146
046	SEQ ID NO:147
053	SEQ ID NO:173

[0298]

[0299]

059	SEQ ID NO:179
070	SEQ ID NO:162
075	SEQ ID NO:163
077	SEQ ID NO:164
078	SEQ ID NO:174
081	SEQ ID NO:165
087	SEQ ID NO:175
095	SEQ ID NO:176
106	SEQ ID NO:181
117	SEQ ID NO:166
126	SEQ ID NO:177
131	SEQ ID NO:167

[0300] 毒素A和B的基因(tcdA和tcdB)是19.6-kb遗传座位(致病性座位,PaLoc)的部分,所述遗传座位包括3个额外的小开放阅读框(ORFs)、tcdD、tcdE和tcdC,且可被认为对毒力有用。PaLoc已知在产生毒素的菌株中是稳定且保守的。其在目前已分析的全部产生毒素的菌株中位于相同染色体整合位点。在非产生毒素的菌株中,不存在致病性座位(PaLoc)。因此,本文所述的野生型艰难梭菌株的特征为存在致病性座位。本文所述的野生型艰难梭菌株的另一优选特征是同时产生TcdA和TcdB。

[0301] 在一个实施方式中,野生型艰难梭菌株是具有下述致病性座位的菌株,所述致病性座位与艰难梭菌630或VPI10463的致病性座位具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约98%、更优选约99%或最优选约100%的相同性。艰难梭菌VPI10463的总致病性座位序列在EMBL数据库中以序列登录号X92982注册,也显示为SEQ ID NO:26。PaLoc与参比株VPI10463相同的菌株被称为毒素型(toxinotype)0。尽管它们的毒素基因变异,毒素型I-VII、IX、XII-XV和XVIII-XXIV的菌株同时产生TcdA和TcdB。

[0302] 葡萄糖基转移酶结构域位于毒素的N末端。毒素的葡萄糖基转移酶活性与毒素的细胞毒性功能相关。不受机理或理论的束缚,两种毒素中的葡萄糖基转移酶活性被认为可催化Rho/Rac/Ras超家族中小GTP结合蛋白的单葡萄糖基化。在这些GTP结合蛋白葡萄糖基化后,细胞生理学显著改变,导致毒素感染的宿主细胞的结构完整性的丧失和基本信号通路的破坏。参与锰、尿苷二磷酸(UDP)和葡萄糖结合的Asp-Xaa-Asp(DXD)基序是葡萄糖基转移酶结构域的典型特征。不受机理或理论的束缚,对催化活性重要的残基例如DXD基序被认为在来自已知“历史的”菌株如630的TcdB和来自强毒株如R20291的TcdB之间不改变。DXD基序位于野生型艰难梭菌TcdA的285至287残基处(根据SEQ ID NO:1的编号),且位于野生型艰难梭菌TcdB的286至288残基处(根据SEQ ID NO:2的编号)。

[0303] 全局比对算法(如序列分析程序)是本领域已知的,且可用于最佳化两条或多条氨基酸毒素序列的比对以确定是否毒素包括特别特征基序(如本文下述的葡萄糖基转移酶结构域中的DXD、半胱氨酸蛋白酶结构域中的DHC等)。将最佳比对的序列与各个参比序列(如对TcdA为SEQ ID NO:1,或对TcdB为SEQ ID NO:2)比对,以确定特征基序的存在。“最佳比对”是指给出最高百分比相同性评分的比对。这种比对可使用已知的序列分析程序进行。在一个实施方式中,使用CLUSTAL比对(如CLUSTALW)在缺省参数下通过比较查询序列与参比

序列来确定适合的野生型毒素。保守氨基酸残基的相对编号是基于参比氨基酸序列的残基编号,以说明比对序列内的小插入或缺失(如小于5个氨基酸)。

[0304] 如本文所用,术语“根据……的编号”是指当将给定氨基酸或多核苷酸序列与参比序列比较时,参比序列的残基的编号。换句话说,给定聚合物的数目或残基位置相对于参比序列来指定,而并非是给定氨基酸或多核苷酸序列内残基的用数字表示的真实位置。

[0305] 例如,通过引入缺口(如果需要),可将给定氨基酸序列,例如强毒野生型艰难梭菌株的给定氨基酸序列与参比序列(如历史的野生型艰难梭菌株如630的参比序列)比对,以最佳化两条序列之间的残基匹配。在这些情况下,虽然存在缺口,给定氨基酸或多核苷酸中残基的编号参照与其进行比对的参比序列给出。如本文所用,“参比序列”是指用作序列对比基础的所限定的序列。

[0306] 除非另有说明,本文全部所提及的TcdA的氨基酸位置均是指SEQ ID NO:1的编号。除非另有说明,本文全部所提及的TcdB的氨基酸位置均是指SEQ ID NO:2的编号。

[0307] 本文所用的TcdA的葡萄糖基转移酶结构域可开始于野生型艰难梭菌TcdA如SEQ ID NO:1的示例性残基1、101或102,且可终止于示例性残基542、516或293。只要包括DXD基序区域,任何最低残基位置可与TcdA的残基1至542之间的最大残基位置组合,以限定葡萄糖基转移酶结构域的序列。例如,在一个实施方式中,TcdA的葡萄糖基转移酶结构域包括与SEQ ID NO:1的残基101-293相同的SEQ ID NO:27,且其包括DXD基序区域。在另一实施方式中,TcdA的葡萄糖基转移酶结构域包括与SEQ ID NO:1的残基1-542相同的SEQ ID NO:28。

[0308] 本文所用的TcdB的葡萄糖基转移酶结构域可开始于野生型艰难梭菌TcdB如SEQ ID NO:2的示例性残基1、101或102,且可终止于示例性残基543、516或293。只要包括DXD基序区域,任何最低残基位置可与TcdB的残基1至543之间的最大残基位置组合,以限定葡萄糖基转移酶结构域的序列。例如,在一个实施方式中,TcdB的葡萄糖基转移酶结构域包括与SEQ ID NO:2的残基101-293相同的SEQ ID NO:29,且其包括DXD基序区域。在另一实施方式中,TcdB的葡萄糖基转移酶结构域包括与SEQ ID NO:2的残基1-543相同的SEQ ID NO:30。

[0309] 不受机理或理论的束缚,TcdA和/或TcdB的N末端被认为通过自蛋白水解加工切割,以使葡萄糖基转移酶结构域被易位且释放进入宿主细胞胞质溶胶(其在此处可与Rac/Ras/Rho GTP酶相互作用)。野生型艰难梭菌TcdA被显示在L542和S543之间被切割。野生型艰难梭菌TcdB被显示在L543和G544之间被切割。

[0310] 半胱氨酸蛋白酶结构域与毒素的自催化的蛋白水解活性有关。半胱氨酸蛋白酶结构域位于葡萄糖基转移酶结构域的下游,且特征为具有催化的三联天冬氨酸、组氨酸和半胱氨酸(DHC),如野生型TcdA的D589、H655和C700和野生型TcdB的D587、H653和C698。不受机理或理论的束缚,催化的三联被认为在来自“历史的”菌株如630的毒素和来自强毒株如R20291的TcdB之间保守。

[0311] 本文所用的TcdA的半胱氨酸蛋白酶结构域可开始于野生型TcdA如SEQ ID NO:1的示例性残基543,且可终止于示例性残基809、769、768或767。只要包括催化的三联DHC基序区域,任何最低残基位置可与野生型TcdA的残基543至809之间的最大残基位置组合,以限定半胱氨酸蛋白酶结构域的序列。例如,在一个实施方式中,TcdA的半胱氨酸蛋白酶结构域包括SEQ ID NO:32,其具有位于SEQ ID NO:32的47、113和158残基处的DHC基序区域(分别对应于根据SEQ ID NO:1编号的野生型TcdA的D589、H655和C700)。SEQ ID NO:32与SEQ ID

NO:1 (TcdA) 的543至809残基相同。

[0312] 本文所用的TcdB的半胱氨酸蛋白酶结构域可开始于野生型TcdB如SEQ ID NO:2的示例性残基544,且可终止于示例性残基801、767、755或700。只要包括催化的三联DHC基序区域,任何最低残基位置可与野生型TcdB的残基544至801之间的最大残基位置组合,以限定半胱氨酸蛋白酶结构域的序列。例如,在一个实施方式中,TcdB的半胱氨酸蛋白酶结构域包括SEQ ID NO:33,其具有位于SEQ ID NO:33的44、110和115残基处的DHC基序区域(分别对应于根据SEQ ID NO:2编号的野生型TcdB的D587、H653和C698)。SEQ ID NO:33与SEQ ID NO:2的544至767残基(TcdB)相同。在另一实施方式中,TcdB的半胱氨酸蛋白酶结构域包括SEQ ID NO:2 (TcdB) 的544至801残基。

[0313] 突变型毒素

[0314] 在本发明中,免疫原性组合物包括突变型艰难梭菌毒素。如本文所用,术语“突变型”是指显示出不同于对应野生型结构或序列的结构或序列的分子,例如当通过如使用缺省缺口加权的程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时,其与对应野生型结构相比具有交联物,和/或其与对应野生型序列相比具有至少一个突变。本文所用术语“突变型”进一步包括显示出不同于对应野生型分子的功能性质(如丧失的葡萄糖基转移酶和/或丧失的半胱氨酸蛋白酶活性)。

[0315] 来自本文上述任何野生型菌株的艰难梭菌毒素可用作制备突变型艰难梭菌毒素的来源。优选地艰难梭菌630是制备突变型艰难梭菌毒素的来源。

[0316] 突变可包括通常位于此位置的野生型氨基酸残基的取代、缺失、截短或修饰。优选地,突变为非保守性氨基酸取代。本发明还涉及包括编码任何本文所述的突变型毒素的核酸序列的分离的多核苷酸。

[0317] 本文所用“非保守的”氨基酸取代是指根据下表3的一类氨基酸替换另一类氨基酸。

表 3: 氨基酸类型	
类型	氨基酸
非极性的:	Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Met (M), Phe (F), Trp (W)
不带电荷的极性的:	Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
酸性的:	Asp (D), Glu (E)
碱性的:	Lys (K), Arg (R), His (H)

[0319] 非保守的氨基酸取代的实施例包括这样的取代,其中天冬氨酸残基(Asp,D)被丙氨酸残基(Ala,A)替代。其它实施例包括用天冬酰胺残基(Asn,N)替代天冬氨酸残基(Asp,D);用丙氨酸残基(Ala,A)替代精氨酸(Arg,R)、谷氨酸(Glu,E)、赖氨酸(Lys,K)和/或组氨酸(His,H)残基。

[0320] 保守的取代是指例如根据表3的相同类型氨基酸之间的替换。

[0321] 本发明突变型毒素的制备可采用本领域已知的用于产生突变的技术,例如点诱导的突变、使用诱变剂的突变(如UV光)等。优选地,使用点诱导的突变。或者,可直接合成具有目标序列的核酸分子。这类化学合成方法是本领域已知的。

[0322] 在本发明中,突变型艰难梭菌毒素包括相对于对应野生型艰难梭菌毒素,在葡萄糖基转移酶结构域中的至少一个突变。在一个实施方式中,葡萄糖基转移酶结构域包括至

少两个突变。优选地,与对应野生型艰难梭菌毒素的葡萄糖基转移酶的酶活性相比,突变降低或消除毒素的葡萄糖基转移酶的酶活性。

[0323] 与根据SEQ ID NO:1的编号的野生型艰难梭菌TcdA相比,经过突变的TcdA的葡萄糖基转移酶结构域中的示例性氨基酸残基包括至少以下一种或其组合:W101、D269、R272、D285、D287、E460、R462、S541和L542。与根据SEQ ID NO:1的编号的野生型艰难梭菌TcdA相比,经过突变的其它示例性氨基酸残基包括E514、S517和W519。

[0324] 与野生型艰难梭菌TcdA相比,TcdA的葡萄糖基转移酶结构域中的示例性突变包括至少以下一种或其组合:W101A、D269A、R272A、D285A、D287A、E460A、R462A、S541A和L542G。在优选实施方式中,与野生型艰难梭菌TcdA相比,TcdA的葡萄糖基转移酶结构域包括L542G突变。在另一优选实施方式中,与野生型艰难梭菌TcdA相比,TcdA的葡萄糖基转移酶结构域包括D285A和D287A突变。

[0325] 与根据SEQ ID NO:2的编号的野生型艰难梭菌毒素B相比,经过突变的TcdB的葡萄糖基转移酶结构域中的示例性氨基酸残基包括至少以下一种或其组合:W102、D270、R273、D286、D288、N384、D461、K463、W520和L543。与根据SEQ ID NO:2的编号的野生型艰难梭菌毒素B相比,经过突变的其它示例性氨基酸残基包括E515、S518和W520。

[0326] 与野生型艰难梭菌TcdB相比,TcdB的葡萄糖基转移酶结构域中的示例性突变包括至少以下一种或其组合:W102A、D270A、D270N、R273A、D286A、D288A、N384A、D461A、D461R、K463A、K463E、W520A和L543A。在优选实施方式中,与野生型艰难梭菌TcdB相比,TcdB的葡萄糖基转移酶结构域包括L543A突变。在另一优选实施方式中,与野生型艰难梭菌TcdB相比,TcdB的葡萄糖基转移酶结构域包括D286A和D288A突变。

[0327] 本文上述任何突变可与半胱氨酸蛋白酶结构域中的突变组合。在本发明中,突变型艰难梭菌毒素包括相对于对应野生型艰难梭菌毒素,在半胱氨酸蛋白酶结构域中的至少一个突变。优选地,与对应野生型艰难梭菌毒素的半胱氨酸蛋白酶活性相比,突变降低或消除毒素的半胱氨酸蛋白酶活性。

[0328] 与根据SEQ ID NO:1的编号的野生型艰难梭菌TcdA相比,经过突变的TcdA的半胱氨酸蛋白酶结构域中的示例性氨基酸残基包括至少以下一种或其组合:S543、D589、H655和C700。与野生型艰难梭菌TcdA相比,TcdA的葡萄糖基转移酶结构域中示例性突变包括至少以下一种或其组合:S543A、D589A、D589N、H655A、C700A。在优选实施方式中,与野生型艰难梭菌TcdA相比,TcdA的半胱氨酸蛋白酶结构域包括C700A突变。

[0329] 与根据SEQ ID NO:2的编号的野生型艰难梭菌TcdB相比,经过突变的TcdB的半胱氨酸蛋白酶结构域中的示例性氨基酸残基包括至少以下一种或其组合:G544、D587、H653和C698。与野生型艰难梭菌TcdB相比,TcdB的葡萄糖基转移酶结构域中示例性突变包括至少以下一种或其组合:G544A、D587A、D587N、H653A、C698A。在优选实施方式中,与野生型艰难梭菌TcdB相比,TcdB的半胱氨酸蛋白酶结构域包括C698A突变。与野生型TcdB相比,经历突变的TcdB的半胱氨酸蛋白酶结构域中的其它氨基酸残基包括K600和/或R751。示例性突变包括K600E和/或R751E。

[0330] 因此,相对于对应的野生型艰难梭菌毒素,本发明的突变型艰难梭菌毒素包括具有突变的葡萄糖基转移酶结构域和具有突变的半胱氨酸蛋白酶结构域。在一个实施方式中,突变型毒素包括葡萄糖基转移酶结构域中的至少一个突变和半胱氨酸蛋白酶结构域中

的至少一个突变。在优选实施方式中，突变型毒素A包括至少D285、D287和C700突变。在优选实施方式中，突变型毒素B包括至少D286、D288和C698突变。突变型毒素可包括本文所述的单独的或组合的任何其它突变。

[0331] 相对于对应的野生型艰难梭菌毒素A，示例性突变型艰难梭菌TcdA包括葡萄糖基转移酶结构域和半胱氨酸蛋白酶结构域，所述葡萄糖基转移酶结构域包括在285和287位具有氨基酸取代的SEQ ID NO:29，所述半胱氨酸蛋白酶结构域包括在158位具有氨基酸取代的SEQ ID NO:32。例如，此突变型艰难梭菌TcdA包括SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列，其中起始的甲硫氨酸可选地不存在。在另一实施方式中，突变型艰难梭菌毒素A包括SEQ ID NO:84所示的氨基酸序列。

[0332] 突变型艰难梭菌毒素A的其它实施例包括SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列，与SEQ ID NO:1相比具有D269A、R272A、D285A、D287A、E460A、R462A和C700A突变，其中起始的甲硫氨酸可选地不存在。在另一实施方式中，突变型艰难梭菌毒素A包括SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列。

[0333] 另一示例性突变型TcdA包括SEQ ID NO:34，其中101、269、272、285、287、460、462、541、542、543、589、655和700位残基可为任意氨基酸。

[0334] 在一些实施方式中，突变型艰难梭菌毒素表现出与对应野生型艰难梭菌毒素相比降低或丧失的自蛋白水解加工。例如，与对应的野生型艰难梭菌TcdA相比，突变型艰难梭菌TcdA可包括以下残基之一处的突变或其任意组合：S541、L542和/或S543。优选地，与对应的野生型艰难梭菌TcdA相比，突变型艰难梭菌TcdA包括至少以下残基之一处的突变或其任意组合：S541A、L542G和S543A。

[0335] 与对应的野生型艰难梭菌TcdA相比，其它示例性突变型艰难梭菌TcdA包括S541A、L542、S543和C700突变。

[0336] 相对于对应的野生型艰难梭菌毒素B，示例性突变型艰难梭菌毒素B包括葡萄糖基转移酶结构域和半胱氨酸蛋白酶结构域，所述葡萄糖基转移酶结构域包括在286和288位具有氨基酸取代的SEQ ID NO:31，所述半胱氨酸蛋白酶结构域包括在155位具有氨基酸取代的SEQ ID NO:33。例如，此突变型艰难梭菌TcdB包括SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列，其中起始的甲硫氨酸可选地不存在。在另一实施方式中，突变型艰难梭菌毒素A包括SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列。

[0337] 突变型艰难梭菌TcdB的其它实施例包括SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列，与SEQ ID NO:2相比具有D270A、R273A、D286A、D288A、D461A、K463A和C698A突变，其中起始的甲硫氨酸可选地不存在。在另一实施方式中，突变型艰难梭菌毒素A包括SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列。

[0338] 另一示例性突变型TcdB包括SEQ ID NO:35，其中101、269、272、285、287、460、462、541、542、543、589、655和700位残基可为任意氨基酸。

[0339] 作为另一实施例，与对应野生型艰难梭菌TcdB相比，突变型艰难梭菌TcdB可包括在543和/或544位的突变。优选地，与对应野生型艰难梭菌TcdB相比，突变型艰难梭菌TcdB包括L543和/或G544突变。更优选地，与对应野生型艰难梭菌TcdB相比，突变型艰难梭菌TcdB包括L543G和/或G544A突变。

[0340] 与对应野生型艰难梭菌TcdB相比，另一示例性突变型艰难梭菌TcdB包括L543G、

G544A和C698突变。

[0341] 一方面,本发明涉及在根据SEQ ID NO:2编号的氨基酸残基1至1500的任何位置处具有突变的分离的多肽,以限定示例性突变型艰难梭菌毒素B。例如,在一个实施方式中,分离的多肽包括SEQ ID NO:2的氨基酸残基830和990之间的突变。突变的示例性位置包括根据SEQ ID NO:2编号的970和976位的突变。优选地,830和990残基之间的突变为取代。在一个实施方式中,突变为非保守的取代,其中Asp(D)和/或Glu(E)氨基酸残基被酸化时不被中和的氨基酸残基如赖氨酸(K)、精氨酸(R)和组氨酸(H)取代。示例性突变包括SEQ ID NO:2的E970K、E970R、E970H、E976K、E976R、E976H,以限定突变型艰难梭菌毒素B。

[0342] 在一个实施方式中,分离的多肽包括以下取代D286A/D288A/C698A/E970K/E976K(SEQ ID NO:184)。E970和E976在来自全部所观察的艰难梭菌株的毒素B中保守(参见表2-a,SEQ ID NO:110-133),除了核糖核酸型078和核糖核酸型126株之外(参见表35和表37)。在核糖核酸型078和核糖核酸型126株的毒素B中,甘氨酸970(G970)替代谷氨酸970。因此,在一个实施方式中,分离的多肽包括G970和E976处的突变,例如G970K和E976K。与对应的野生型毒素相比,上述和本文所述的突变型毒素可显示出降低的细胞毒性。参见实施例8和15。

[0343] 另一方面,本发明涉及在根据SEQ ID NO:1编号的氨基酸残基1至1500的任何位置处具有突变的分离的多肽,以限定示例性突变型艰难梭菌毒素A。例如,在一个实施方式中,分离的多肽包括SEQ ID NO:1的氨基酸残基832和992之间的突变。突变的示例性位置包括根据SEQ ID NO:1编号的972和978位的突变。优选地,832和992残基之间的突变为取代。在一个实施方式中,突变为非保守的取代,其中Asp(D)和/或Glu(E)氨基酸残基被酸化时不被中和的氨基酸残基如赖氨酸(K)、精氨酸(R)和组氨酸(H)取代。示例性突变包括SEQ ID NO:1的D972K、D972R、D972H、D978K、D978R、D978H,以限定突变型艰难梭菌毒素A。

[0344] 在一个实施方式中,分离的多肽包括以下取代D285A/D287A/C700A/D972K/D978K(SEQ ID NO:183)。D972和D978残基在所评估的全部艰难梭菌株的毒素A中保守(参见表1-a,SEQ ID NO:87-109)。与对应的野生型毒素相比,上述和本文所述的突变型毒素可显示出降低的细胞毒性。

[0345] 以下描述了其它的示例性突变型毒素。在一个实施方式中,突变型毒素TcdA包括(i) SEQ ID NO:185; (ii) 与SEQ ID NO:185具有至少90%、92%、93%、95%、98%、99%或100%相同性的SEQ ID NO:185的多肽;或(iii) SEQ ID NO:185的至少250、280或300个氨基酸的片段。在另一实施方式中,突变型毒素TcdB包括(iv) SEQ ID NO:186; (v) 与SEQ ID NO:186具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、98%、99%或100%相同性的SEQ ID NO:186的多肽;或(vi) SEQ ID NO:186的至少250、280或300个氨基酸的片段。

[0346] 在一个实施方式中,突变型毒素TcdA由小于600、675、650、625、600、575、550、525、500、475、450、425、400、375、350、325、300、275、250或225个氨基酸组成。在一个实施方式中,突变型毒素由小于800、775、750、725、700、675、650、625、600、575、550或525个氨基酸组成。在一个实施方式中,突变型毒素包括SEQ ID NO:185的至少200、225、250、270、280、300或310个氨基酸,或与SEQ ID NO:185具有至少80%、85%、90%、92%、95%、98%、99%或100%相同性的多肽的至少200、225、250、270、280、300或310个氨基酸。在一个实施方式中,突变型毒素包括SEQ ID NO:186的至少400、425、450、475、500、525、550、575、600或610个氨

基酸,或与SEQ ID NO:186具有至少80%、85%、90%、92%、95%、98%、99%或100%相同性的多肽的至少400、425、450、475、500、525、550、575、600或610个氨基酸。

[0347] 在一个实施方式中,突变型毒素包括含有A)与B)融合的融合蛋白,其中A):(i) SEQ ID NO:185;(ii)与SEQ ID NO:185具有至少90%、92%、93%、95%、98%、99%或100%相同性的SEQ ID NO:185的多肽;或(iii)SEQ ID NO:185的至少250、280或300个氨基酸的片段;B):(iv)SEQ ID NO:186;(v)与SEQ ID NO:186具有至少80%、85%、90%、92%、93%、95%、98%、99%或100%相同性的SEQ ID NO:186的多肽;或(vi)SEQ ID NO:186的至少250、280或300个氨基酸的片段。在另一实施方式中,SEQ ID NO:185的N末端邻近SEQ ID NO:186的C末端。在另一实施方式中,SEQ ID NO:185的N末端邻近SEQ ID NO:186的N末端。在另一实施方式中,SEQ ID NO:185的C末端邻近SEQ ID NO:186的C末端。突变型毒素的其它实施例包括任一以下氨基酸序列:SEQ ID NO:187、SEQ ID NO:188、SEQ ID NO:189、SEQ ID NO:190、SEQ ID NO:191、SEQ ID NO:192、SEQ ID NO:193、SEQ ID NO:194和SEQ ID NO:195。

[0348] 在另一实施方式中,突变型毒素包括融合和/或杂合多肽,其包括选自以下任何序列的氨基酸序列的任何组合:SEQ ID NO:223、SEQ ID NO:224、SEQ ID NO:225、SEQ ID NO:226、SEQ ID NO:227、SEQ ID NO:228、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:230、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:234、SEQ ID NO:235、SEQ ID NO:236、SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:238、SEQ ID NO:239、SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242和SEQ ID NO:243。例如,在一个实施方式中,突变型毒素包括以下任一所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:254、SEQ ID NO:270、SEQ ID NO:271、SEQ ID NO:272、SEQ ID NO:273、SEQ ID NO:274或SEQ ID NO:275。

[0349] 突变型毒素的另一实施例包括野生型毒素的片段。本文所用“片段”突变型毒素TcdA是指与对应野生型艰难梭菌毒素TcdA序列相比具有更少连续氨基酸总数的肽序列,例如包括少于2710个连续氨基酸总数的序列。片段突变型毒素TcdA可进一步包括本文所述的氨基酸残基的突变。本文所用“片段”突变型毒素TcdB是指与对应野生型艰难梭菌毒素TcdB序列相比具有更少连续氨基酸总数的肽序列,例如包括少于2366个连续氨基酸总数的序列。片段突变型毒素TcdB可进一步包括本文所述的氨基酸残基的突变。此示例性突变型毒素序列包括SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33。在一个实施方式中,突变型毒素TcdA包括如本文所述的野生型突变型毒素A,如SEQ ID NO:1的至少200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900或2000个连续氨基酸。在另一实施方式中,突变型毒素包括本文所述的遗传突变的毒素A的片段。在一个实施方式中,突变型毒素TcdB包括如本文所述的野生型突变型毒素B,如SEQ ID NO:2的至少200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900或2000个连续氨基酸。在另一实施方式中,突变型毒素包括本文所述的遗传突变的毒素B的片段。在一个实施方式中,突变型毒素至多3000、2710、2500、2400、2366、2000、1900、1800、1700、1600、1500、1400、1300、1200、1100、1000、900、800、700、600、500、400或300个连续氨基酸。任何最低值可与任何最大值组合以限定适合的范围。在另一实施方式中,突变型毒素与至少一种其它肽或至少一种其它突变型毒素以产生杂合分子的方式融合。

[0350] 其它示例性片段突变型毒素TcdA包括具有SEQ ID NO:374至SEQ ID NO:421中任

一氨基酸序列的多肽。其它示例性片段突变型毒素TcdA包括具有SEQ ID NO:472至SEQ ID NO:519中任一氨基酸序列的多肽。其它示例性片段突变型毒素TcdB包括具有SEQ ID NO:422至SEQ ID NO:471中任一氨基酸序列的多肽。其它示例性片段突变型毒素TcdB包括具有SEQ ID NO:568至SEQ ID NO:615中任一氨基酸序列的多肽。

[0351] 以下描述了其它的示例性突变型毒素。在一个实施方式中，突变型毒素包括下述TcdA，其包括或仅包括(consists of)在选自以下组的氨基酸残基处的至少3、至少4或至少5个突变：W101、D287、E514、D285、S517、W519和C700(如根据SEQ ID NO:1的编号)。在其它实施方式中，TcdA突变体包括或仅包括选自以下组的至少3、至少4或至少5个突变：W101A、D287A、E514Q、D285A、S517A、W519A和C700A取代和W101缺失。

[0352] 另一示例性突变型毒素TcdA包括氨基酸取代W101、D287A和E514Q(如根据SEQ ID NO:1的编号)。另一实施方式提供了下述TcdA蛋白，其包括或仅包括以下氨基酸取代：W101A、D287A、E514Q和W519A。本发明的另一具体实施方式是下述TcdA蛋白，其包括或仅包括以下氨基酸取代：W101A、D287A、E514Q、W519A和C700A。

[0353] 在另一实施方式中，突变型毒素TcdA包括突变W101A、D287A、E514Q和D285A(如根据SEQ ID NO:1的编号)。在另一实施方式中，突变型毒素TcdA包括突变W101A、D287A、E514Q和S517A。

[0354] 在另一实施方式中，进一步的突变可引入突变型TcdA，如C700A突变。在其它实施方式中，多至2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个进一步的突变可引入本文所述的任何突变型毒素TcdA的实施方式。

[0355] 突变型毒素TcdA的其它实施例包括如SEQ ID NO:203、SEQ ID NO:204、SEQ ID NO:205、SEQ ID NO:206、SEQ ID NO:207、SEQ ID NO:208、SEQ ID NO:209或SEQ ID NO:211所示的氨基酸序列。在另一实施方式中，突变型毒素TcdA包括氨基酸序列SEQ ID NO:210。在另一实施方式中，突变型毒素TcdA包括位于W101、D287、E514、W519和C700的突变；其中W101被除色氨酸外的任何氨基酸取代，D287被除天冬氨酸外的任何氨基酸取代，E514被除谷氨酸外的任何氨基酸取代，W519被除色氨酸外的任何氨基酸取代，且C700被除半胱氨酸外的任何氨基酸取代，如SEQ ID NO:212所示。

[0356] 突变型毒素TcdA的其它实施例包括下述多肽，其具有与原始参比序列(如SEQ ID NO:203、SEQ ID NO:204、SEQ ID NO:205、SEQ ID NO:206、SEQ ID NO:207、SEQ ID NO:208、SEQ ID NO:209、SEQ ID NO:210、SEQ ID NO:211或SEQ ID NO:212或SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:86)为至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%相同性的氨基酸序列。

[0357] 在另一实施方式中，突变型毒素TcdA包括例如相对于SEQ ID NO:203、SEQ ID NO:204、SEQ ID NO:205、SEQ ID NO:206、SEQ ID NO:207、SEQ ID NO:208、SEQ ID NO:209、SEQ ID NO:210、SEQ ID NO:211和SEQ ID NO:212或SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:86，至多12个氨基酸残基、至多11个氨基酸残基、至多10个氨基酸残基、至多9个氨基酸残基、至多8个氨基酸残基、至多7个氨基酸残基、至多6个氨基酸残基、至多5个氨基酸残基、至多4个氨基酸残基、至多3个氨基酸残基、至多2个氨基酸残基或1个氨基酸残基的突变。

[0358] 以下描述了其它的示例性突变型毒素。在一个实施方式中，突变型毒素为突变型

TcdB,其包括在选自以下组的氨基酸残基处的至少3、至少4或至少5个突变:W102、D288、E515、D286、S518、W520和C698(如根据SEQ ID NO:2的编号)。在另一实施方式中,突变型毒素TcdB包括选自以下组的至少3、至少4或至少5个突变:W102A、D288A、E515Q、D286A、S518A、W520A和C698A取代和W102缺失。在一个实施方式中,突变型毒素TcdB包括如SEQ ID NO:213、SEQ ID NO:214、SEQ ID NO:215、SEQ ID NO:216、SEQ ID NO:217、SEQ ID NO:218、SEQ ID NO:219、SEQ ID NO:220或SEQ ID NO:221所示的氨基酸序列。在另一实施方式中,突变型毒素TcdB包括位于W102、D288、E515、W520和C698的突变;其中W102被除色氨酸外的任何氨基酸取代,D288被除天冬氨酸外的任何氨基酸取代,E515被除谷氨酸外的任何氨基酸取代,W520被除色氨酸外的任何氨基酸取代,且C698被除半胱氨酸外的任何氨基酸取代,如SEQ ID NO:222所示。

[0359] 突变型毒素TcdB的其它实施例包括与原始参比序列SEQ ID NO:213、SEQ ID NO:214、SEQ ID NO:215、SEQ ID NO:216、SEQ ID NO:217、SEQ ID NO:218、SEQ ID NO:219、SEQ ID NO:220、SEQ ID NO:221或SEQ ID NO:222具有至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%相同性的氨基酸序列的多肽。

[0360] 在另一实施方式中,突变型毒素TcdB包括例如相对于SEQ ID NO:213、SEQ ID NO:214、SEQ ID NO:215、SEQ ID NO:216、SEQ ID NO:217、SEQ ID NO:218、SEQ ID NO:219、SEQ ID NO:220、SEQ ID NO:221和/或SEQ ID NO:222,至多12个氨基酸残基、至多11个氨基酸残基、至多10个氨基酸残基、至多9个氨基酸残基、至多8个氨基酸残基、至多7个氨基酸残基、至多6个氨基酸残基、至多5个氨基酸残基、至多4个氨基酸残基、至多3个氨基酸残基、至多2个氨基酸残基或1个氨基酸残基的突变。

[0361] 其它示例性突变型毒素TcdA包括具有SEQ ID NO:276至SEQ ID NO:323中任一氨基酸序列的多肽。其它示例性突变型毒素TcdB包括具有SEQ ID NO:324至SEQ ID NO:373中任一氨基酸序列的多肽。

[0362] 以下描述了其它的示例性突变型毒素。在一个实施方式中,突变型毒素TcdA包括下述氨基酸序列:(a)所述氨基酸序列与SEQ ID NO:224或SEQ ID NO:245具有50%或更高相同性(如60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、99.5%、99.8%、99.9%或100%);和/或(b)所述氨基酸序列为SEQ ID NO:224或SEQ ID NO:245的至少“n”个连续氨基酸的片段,其中“n”为7或更高(如8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150、250、300、400、500、540或更高),或所述氨基酸序列为与SEQ ID NO:224或SEQ ID NO:245具有80%或更高相同性且包含SEQ ID NO:224和/或SEQ ID NO:245的表位的多肽的片段。

[0363] 在一个实施方式中,突变型毒素TcdA包括SEQ ID NO:223、SEQ ID NO:224、SEQ ID NO:225、SEQ ID NO:226、SEQ ID NO:227、SEQ ID NO:228、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:230、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:234、SEQ ID NO:235或SEQ ID NO:236所示的氨基酸序列。突变型毒素TcdA的其它示例性实施方式包括以下任一所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251、SEQ ID NO:252、SEQ ID NO:253、SEQ ID NO:254、SEQ ID NO:255、SEQ ID NO:256、SEQ ID NO:257、SEQ ID NO:258、SEQ ID NO:259、SEQ ID NO:260、SEQ ID NO:261、SEQ ID NO:262和/或SEQ ID NO:263。

[0364] 在一个实施方式中,突变型毒素TcdB包括下述氨基酸序列: (a) 与SEQ ID NO:238或SEQ ID NO:247具有80%或更高相同性的氨基酸序列; 和/或 (b) 所述氨基酸序列为SEQ ID NO:238或SEQ ID NO:247的至少7个连续氨基酸的片段,或所述氨基酸序列为与SEQ ID NO:238或SEQ ID NO:247具有80%或更高相同性且包含SEQ ID NO:238或SEQ ID NO:247的表位的多肽的片段。

[0365] 在一个实施方式中,突变型毒素TcdB包括下述氨基酸序列: (a) 所述氨基酸序列与SEQ ID NO:238或SEQ ID NO:247具有50%或更高相同性(如60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、99.5%、99.8%、99.9%或更高); 和/或 (b) 所述氨基酸序列为SEQ ID NO:238或SEQ ID NO:247的至少“n”个连续氨基酸的片段,或所述氨基酸序列为与SEQ ID NO:238或SEQ ID NO:247具有50%或更高相同性的多肽的片段,其中“n”为7或更高(如8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150、250、300、400、500、540或更高)。

[0366] 在一个实施方式中,突变型毒素TcdB包括SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:238、SEQ ID NO:239、SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242或SEQ ID NO:243所示的氨基酸序列。突变型毒素TcdB的其它示例性实施方式包括以下任一所示的氨基酸序列: SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:264、SEQ ID NO:265、SEQ ID NO:266、SEQ ID NO:267、SEQ ID NO:268和/或SEQ ID NO:269。

[0367] 其它示例性突变型毒素TcdA包括具有SEQ ID NO:520至SEQ ID NO:567中任一氨基酸序列的多肽。其它示例性突变型毒素TcdB包括具有SEQ ID NO:616至SEQ ID NO:663中任一氨基酸序列的多肽。

[0368] 以下描述了其它的示例性突变型毒素。在一个实施方式中,突变型毒素TcdA包括具有SEQ ID NO:664至SEQ ID NO:711中任一氨基酸序列的多肽。其它示例性突变型毒素TcdB包括具有SEQ ID NO:712至SEQ ID NO:761中任一氨基酸序列的多肽。

[0369] 在一些情况下由于宿主细胞介导的过程的原因,本发明的多肽可包括起始甲硫氨酸残基。取决于例如重组制备过程中所用的宿主细胞和/或宿主细胞的发酵或生长条件,本领域已知翻译起始密码子编码的N末端甲硫氨酸在细胞内翻译后可从多肽中被去除,或N末端甲硫氨酸可存在于分离的多肽中。

[0370] 因此,一方面,本发明涉及包括SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的分离的多肽,其中起始甲硫氨酸(1位)可选地不存在。在一个实施方式中,SEQ ID NO:4的起始甲硫氨酸不存在。一方面,本发明涉及包括SEQ ID NO:84所示氨基酸序列的分离的多肽,其与SEQ ID NO:4相同但是缺少起始甲硫氨酸。

[0371] 另一方面,分离的多肽包括SEQ ID NO:6所示氨基酸序列,其中起始甲硫氨酸(1位)可选地不存在。在一个实施方式中,SEQ ID NO:6的起始甲硫氨酸不存在。一方面,本发明涉及包括SEQ ID NO:86所示氨基酸序列的分离的多肽,其与SEQ ID NO:6相同但是缺少起始甲硫氨酸。

[0372] 另一方面,分离的多肽包括SEQ ID NO:7所示氨基酸序列,其中起始甲硫氨酸(1位)可选地不存在。在一个实施方式中,本发明涉及包括SEQ ID NO:83所示氨基酸序列的分离的多肽,其与SEQ ID NO:7相同但是缺少起始甲硫氨酸。另一方面,分离的多肽包括SEQ ID NO:8所示氨基酸序列,其中起始甲硫氨酸(1位)可选地不存在。在一个实施方式中,分离

的多肽包括SEQ ID NO:85所示氨基酸序列,其与SEQ ID NO:8相同但是缺少起始甲硫氨酸。
[0373] 一方面,本发明涉及包括SEQ ID NO:4的免疫原性组合物,其中起始甲硫氨酸(1位)可选地不存在。另一方面,本发明涉及包括SEQ ID NO:6的免疫原性组合物,其中起始甲硫氨酸(1位)可选地不存在。另一方面,本发明涉及包括SEQ ID NO:7的免疫原性组合物,其中起始甲硫氨酸(1位)可选地不存在。另一方面,本发明涉及包括SEQ ID NO:8的免疫原性组合物,其中起始甲硫氨酸(1位)可选地不存在。

[0374] 另一方面,本发明涉及包含SEQ ID NO:83的免疫原性组合物。一方面,本发明涉及包含SEQ ID NO:84的免疫原性组合物。一方面,本发明涉及包含SEQ ID NO:85的免疫原性组合物。一方面,本发明涉及包含SEQ ID NO:86的免疫原性组合物。

[0375] 细胞毒性

[0376] 除在哺乳动物中产生免疫应答外,与对应野生型艰难梭菌毒素相比,本文所述的免疫原性组合物还降低细胞毒性。优选地,相对于各野生型毒素,免疫原性组合物对于哺乳动物中施用是安全的且具有最低(如约 $6-8\log_{10}$ 降低)的至无细胞毒性。

[0377] 如本文所用,术语细胞毒性是本领域已知的术语,其是指与在相同条件但缺少细胞毒性剂的相同细胞相比,凋亡细胞死亡和/或细胞的一个或多个常规生物化学或生物学功能异常受损的状态。毒性可例如在细胞或哺乳动物中以诱导50%细胞死亡所需的试剂的量(即分别为EC₅₀或ED₅₀)或通过其它本领域已知方法来定量。

[0378] 指示细胞毒性的测试是本领域已知的,例如细胞圆形化测试(cell rounding assay)(参见例如Kuehne et al.Nature.2010 Oct 7;467 (7316):711-3)。TcdA和TcdB的作用引起细胞变圆(如丧失形态)并死亡,且此现象通过光学显微镜可见。参见例如图9。

[0379] 本领域已知的其它示例性细胞毒性测试包括涉及[¹⁴C]葡萄糖标记的Ras的磷成像的葡萄糖基化测试(描述于Busch et al., J Biol Chem.1998 Jul 13;273 (31):19566-72),且优选下文实施例所述的体外细胞毒性测试,其中EC₅₀可指与在缺少毒素的相同条件下的相同细胞相比,在细胞,优选人二倍体成纤维细胞(如IMR90细胞(ATCC CCL-186TM)中显示出至少约50%细胞病变效果(CPE)的免疫原性组合物的浓度。体外细胞毒性测试也可用于评估与在缺少毒素的相同条件下的相同细胞相比,在细胞,优选人二倍体成纤维细胞(如IMR90细胞(ATCC CCL-186TM)中抑制至少约50%野生型艰难梭菌毒素诱导的细胞病变效果(CPE)的免疫原性组合物的浓度。其它示例性细胞毒性测试包括描述在Doern et al., J Clin Microbiol.1992 Aug;30 (8):2042-6的那些测试。细胞毒性也可通过测定毒素处理的细胞中的ATP水平来确定。例如,可使用基于荧光素酶的底物例如CELLTITERGLO[®](Promega),其发射以相对光单位(RLU)测定的荧光。在此测试中,细胞生存力可正比于细胞中的ATP量或RLU值。

[0380] 在一个实施方式中,与对应野生型艰难梭菌毒素相比,免疫原性组合物的细胞毒性降低至少约1000、2000、3000、4000、5000-、6000-、7000-、8000-、9000-、10000-、11000-、12000-、13000-倍、14000-倍、15000-倍或更多。参见例如表20。

[0381] 在另一实施方式中,相对于相同条件下对应野生型毒素,免疫原性组合物的细胞毒性降低至少约 $2-\log_{10}$ 、更优选约 $3-\log_{10}$ 且最优选约 $4-\log_{10}$ 或更多。例如,相比于可具有至少约 $10^{-12}g/ml$ 的EC₅₀值的示例性野生型艰难梭菌TcdB,突变型艰难梭菌TcdB可具有在标准细胞病变效果测试(CPE)中测定的约 $10^{-9}g/ml$ 的EC₅₀值。参见例如下部分实施例中的表

7A、7B、8A和8B。

[0382] 在另一实施方式中,如通过例如体外细胞毒性测试(如本文所述的测试)中所测定,突变型艰难梭菌毒素的细胞毒性具有至少约50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更高的EC₅₀。因此,在优选实施方式中,免疫原性组合物和突变型毒素对哺乳动物施用是生物学安全的。

[0383] 不受机理或理论的束缚,预期具有D285和D287突变的TcdA(相比于野生型TcdA)和具有D286和D288突变的TcdB(相比于野生型TcdB)在葡萄糖基转移酶活性上有缺陷,因此在诱导细胞病变效果上有缺陷。此外,预期在DHC基序上有突变的毒素在自催化加工上有缺陷,因此没有任何细胞毒性效果。

[0384] 然而,发明人惊奇地发现,特别地,尽管显示出功能失常的葡萄糖基转移酶活性和功能失常的葡萄糖基转移酶活性,具有SEQ ID NO:4的示例性突变型TcdA和具有SEQ ID NO:6的示例性突变型TcdB不可预期地显示出细胞毒性(虽然从野生型艰难梭菌630毒素显著降低)。不受机理或理论的束缚,认为突变型毒素通过新机理产生细胞毒性。然而,具有SEQ ID NO:4的示例性突变型TcdA和具有SEQ ID NO:6的示例性突变型TcdB惊人地具有免疫原性。参见以下实施例。

[0385] 交联

[0386] 虽然野生型毒素的化学交联有可能不能成功灭活毒素,发明人进一步发现相对于缺少化学交联的相同突变型毒素和相对于对应野生型毒素,在突变型毒素的至少一个氨基酸处的化学交联进一步降低突变型毒素的细胞毒性。优选地,在突变型毒素接触化学交联剂前将其纯化。

[0387] 而且,尽管化学交联剂有改变可用表位的潜力,发明人惊奇地发现具有至少一个氨基酸化学交联的遗传修饰的突变型艰难梭菌毒素导致产生多种中和抗体或其结合片段的免疫原性组合物。因此,与中和抗体分子相关的表位不可预期地保持以下化学交联。

[0388] 交联(本文也称为“化学灭活”或“灭活”)是两个或更多个分子通过共价键化学连接的过程。术语“交联试剂”、“交联剂”和“交联物”是指能够与肽、多肽和/或蛋白质上特定官能团(伯胺、sulhydryls、羧基、羰基等)反应和/或化学相连的分子。在一个实施方式中,分子可包含两个或多个反应性末端,其能够与肽、多肽和/或蛋白质上特定官能团(伯胺、sulhydryls、羧基、羰基等)反应和/或化学相连。优选地,化学交联剂是水溶性的。在另一优选实施方式中,化学交联剂是异双功能交联物。在另一实施方式中,化学交联剂不是双功能交联物。化学交联剂是本领域已知的。

[0389] 在优选实施方式中,交联剂是零长度交联物。“零长度”交联物是指在两分子官能团之间介导或产生直接交联的交联剂。例如,在两个多肽的交联中,零长度交联物将导致桥的形成,或导致来自一个肽的氨基酸侧链的羧基和另一多肽的氨基之间的交联,而不并入外部物质。零长度交联剂可以催化例如羟基和羧基部分之间的酯键,和/或羧基和伯胺部分之间的酰胺键的形成。

[0390] 示例性的适合的化学交联剂包括:甲醛;福尔马林;乙醛;丙醛;水溶性碳二亚胺(RN=C=NR'),其包括1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐、1-环己基-3-(2-吗啉基-(4-乙基)碳二亚胺甲-对-甲苯磺酸盐(CMC)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、和N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)和其衍生物;

和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)；苯甲酰甲醛；和/或UDP-二醛。

[0391] 优选地，交联剂为EDC。当突变型艰难梭菌毒素多肽被EDC化学修饰时(如通过将多肽接触EDC)，在一个实施方式中，多肽包括(a)多肽的天冬氨酸残基侧链和多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。在一个实施方式中，多肽包括(b)多肽的谷氨酸残基侧链和多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。在一个实施方式中，多肽包括(c)多肽的C末端羧基和多肽的N末端氨基之间的至少一个交联。在一个实施方式中，多肽包括(d)多肽的C末端羧基和多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。在一个实施方式中，多肽包括(e)多肽的天冬氨酸残基侧链和第二分离的多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。在一个实施方式中，多肽包括(f)多肽的谷氨酸残基侧链和第二分离的多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。在一个实施方式中，多肽包括(g)多肽的C末端羧基和第二分离的多肽的N末端氨基之间的至少一个交联。在一个实施方式中，多肽包括(h)多肽的C末端羧基和第二分离的多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。参见例如图24和图25。

[0392] “第二分离的多肽”是指在与EDC反应期间存在的任何分离的多肽。在一个实施方式中，第二分离的多肽是与第一分离的多肽具有相同序列的突变型艰难梭菌毒素多肽。在另一实施方式中，第二分离的多肽是与第一分离的多肽具有不同序列的突变型艰难梭菌毒素多肽。

[0393] 在一个实施方式中，多肽包括选自(a)-(d)修饰的至少两种修饰。在示例性实施方式中，多肽包括(a)多肽的天冬氨酸残基侧链和多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联，和(b)多肽的谷氨酸残基侧链和多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。在另一实施方式中，多肽包括选自(a)-(d)修饰的至少三种修饰。在其它实施方式中，多肽包括(a)、(b)、(c)和(d)修饰。

[0394] 当通过EDC的化学修饰期间存在大于一个突变型多肽时，在一个实施方式中，所得组合物包括(a)-(h)修饰中的至少一种。在一个实施方式中，组合物包括选自(a)-(h)修饰的至少两种修饰。在另一实施方式中，组合物包括选自(a)-(h)修饰的至少三种修饰。在另一实施方式中，组合物包括选自(a)-(h)修饰的至少四种修饰。在另一实施方式中，组合物包括选自(a)-(h)各个修饰的至少一种修饰。

[0395] 在示例性实施方式中，所得组合物包括(a)多肽的天冬氨酸残基侧链和多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联，和(b)多肽的谷氨酸残基侧链和多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。在一个实施方式中，组合物进一步包括(c)多肽的C末端羧基和多肽的N末端氨基之间的至少一个交联；和(d)多肽的C末端羧基和多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。

[0396] 在另一示例性实施方式中，所得组合物包括(e)多肽的天冬氨酸残基侧链和第二分离的多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联；(f)多肽的谷氨酸残基侧链和第二分离的多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联；(g)多肽的C末端羧基和第二分离的多肽的N末端氨基之间的至少一个交联；和(h)多肽的C末端羧基和第二分离的多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。

[0397] 在另一示例性实施方式中，所得组合物包括(a)多肽的天冬氨酸残基侧链和多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联；(b)多肽的谷氨酸残基侧链和多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联；(e)多肽的天冬氨酸残基侧链和第二分离的多肽的赖氨酸残基

侧链之间的至少一个交联；和(f)多肽的谷氨酸残基侧链和第二分离的多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。

[0398] 在优选实施方式中，化学交联剂包括甲醛，更优选地，缺少赖氨酸时包括甲醛的试剂。甘氨酸或具有伯胺的其它适合化合物在交联反应中可用作猝灭剂。因此，在另一优选实施方式中，化学剂包括甲醛或使用甘氨酸。

[0399] 在另一优选实施方式中，化学交联剂包括EDC和NHS。如本领域已知，NHS可包括在EDC偶联方法中。然而，发明人惊奇地发现与对应野生型毒素相比，与遗传突变的毒素相比，和与已经由EDC化学交联的遗传突变的毒素相比，NHS可有助于突变型艰难梭菌毒素进一步降低细胞毒性。参见如实施例22。因此，不受机理或理论的束缚，与例如不存在 β -丙氨酸部分的艰难梭菌毒素(野生型或突变型)相比，具有与多肽的至少一个赖氨酸残基侧链连接的 β -丙氨酸部分的突变型毒素多肽(由突变型毒素多肽、EDC和NHS反应得到)可有助于突变型毒素进一步降低细胞毒性。

[0400] 使用EDC和/或NHS也可包括使用甘氨酸或具有伯胺的其它适合的化合物作为猝灭剂。具有伯胺的任何化合物可用作猝灭剂，例如甘氨酸甲酯和丙氨酸。在优选实施方式中，猝灭剂化合物为非聚合的亲水性伯胺。非聚合的疏水性伯胺的实施例包括例如氨基糖、氨基醇和氨基多元醇。非聚合的疏水性伯胺的具体实施例包括甘氨酸、乙醇胺、葡糖胺、胺官能化的聚乙二醇和胺官能化的乙二醇寡聚物。

[0401] 一方面，本发明涉及突变型艰难梭菌毒素多肽，其具有经由EDC和非聚合的疏水性伯胺，优选甘氨酸化学修饰的至少一条氨基酸侧链。相比于对应的野生型毒素，所得甘氨酸加合物(如来自EDC、NHS处理且用甘氨酸猝灭的三重突变型毒素的反应)可有助于降低突变型毒素的细胞毒性。

[0402] 在一个实施方式中，当突变型艰难梭菌毒素多肽经由EDC和甘氨酸化学修饰时，多肽包括当多肽经由EDC修饰时的至少一种修饰(如上述(a)-(h)修饰中的至少任一一种)，和至少一种以下示例性修饰：(i)与多肽的C末端羧基连接的甘氨酸部分；(j)与多肽的至少一个天冬氨酸残基侧链连接的甘氨酸部分；和(k)与多肽的至少一个谷氨酸残基侧链连接的甘氨酸部分。参见例如图24和图25。

[0403] 在一个实施方式中，突变型艰难梭菌TcdA的至少一个氨基酸被化学交联，和/或突变型艰难梭菌TcdB的至少一个氨基酸被化学交联。本文所述的任何突变型毒素可被化学交联。在其它实施方式中，SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8的至少一个氨基酸被化学交联。在一个实施方式中，具有SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:761中任一氨基酸序列的多肽的至少一个氨基酸残基被交联。在一个实施方式中，具有SEQ ID NO:183至SEQ ID NO:761中任一氨基酸序列的多肽的至少一个氨基酸残基包括上述修饰，如任一(a)-(k)的修饰，如(a)多肽的天冬氨酸残基侧链和多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。

[0404] 例如，至少一个氨基酸可被包括碳二亚胺如EDC的试剂化学交联。碳二亚胺可在游离羧基(如来自天冬氨酸和/或谷氨酸的侧链)和氨基(如在赖氨酸残基的侧链中)之间形成共价键，以形成稳定的酰胺键。

[0405] 作为另一个实施例，至少一个氨基酸可被包括NHS的试剂化学交联。NHS酯活化的交联物可与伯胺(如在每条多肽链的N末端和/或赖氨酸残基的侧链中)反应以产生酰胺键。

[0406] 在另一个实施方式中,至少一个氨基酸可被包括EDC和NHS的试剂化学交联。例如,在一个实施方式中,本发明涉及具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的分离的多肽,其中1位的甲硫氨酸残基可选地不存在,其中多肽包括经由EDC和NHS化学修饰的至少一条氨基酸侧链。在另一实施方式中,本发明涉及具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的分离的多肽,其中1位的甲硫氨酸残基可选地不存在,其中多肽包括经由EDC和NHS化学修饰的至少一条氨基酸侧链。在另一实施方式中,本发明涉及具有SEQ ID NO:84,SEQ ID NO:86,SEQ ID NO:83,SEQ ID NO:85,SEQ ID NO:7,or SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的分离的多肽。多肽通过使其接触EDC和NHS而被修饰。参见例如图24和图25。

[0407] 当突变型艰难梭菌毒素多肽经由EDC和NHS(如通过接触)被化学修饰时,在一个实施方式中,多肽包括当多肽经由EDC修饰时的至少一种修饰(如上述(a)-(h)修饰中的至少任一种),和(l)与多肽的至少一个赖氨酸残基侧链连接的β-丙氨酸部分。

[0408] 另一方面,本发明涉及突变型艰难梭菌毒素多肽,其中多肽包括经由EDC、NHS和非聚合的疏水性伯胺,优选甘氨酸化学修饰的至少一条氨基酸侧链。在一个实施方式中,多肽包括当多肽被EDC修饰时的至少一种修饰(如上述(a)-(h)修饰中的至少任一种)、当多肽被甘氨酸修饰时的至少一种修饰(如上述(i)-(k)修饰中的至少任一种)、和(l)与多肽的至少一个赖氨酸残基侧链连接的β-丙氨酸部分。参见例如图24和图25。

[0409] 一方面,本发明涉及突变型艰难梭菌毒素多肽,其中多肽的至少一个赖氨酸残基侧链与β-丙氨酸部分连接。在一个实施方式中,多肽的第二赖氨酸残基侧链与天冬氨酸残基的侧链和/或谷氨酸残基的侧链连接。多肽的“第二”赖氨酸残基包括未与β-丙氨酸部分连接的多肽的赖氨酸残基。第二赖氨酸残基连接的天冬氨酸的侧链和/或谷氨酸的侧链可为多肽的侧链用以形成分子内连接,或可为第二多肽的侧链用于形成分子间连接。在另一实施方式中,多肽的至少一个天冬氨酸残基的侧链和/或至少一个谷氨酸残基的侧链与甘氨酸部分连接。与甘氨酸部分连接的天冬氨酸残基和/或谷氨酸残基也不连接赖氨酸残基。

[0410] 另一方面,本发明涉及突变型艰难梭菌毒素,其中野生型艰难梭菌毒素的至少一条氨基酸侧链被化学修饰。在一个实施方式中,野生型艰难梭菌毒素A的至少一条氨基酸侧链和/或野生型艰难梭菌毒素B的至少一条氨基酸侧链被EDC化学修饰。例如,在一个实施方式中,TcdA (SEQ ID NO:1) 和/或Tcdb (SEQ ID NO:2) 被EDC化学修饰。在另一实施方式中,野生型毒素被EDC和NHS化学修饰。在一个实施方式中,野生型毒素包括化学修饰的野生型毒素A,其中野生型毒素A如表1-a中任一所述。在另一实施方式中,野生型毒素包括化学修饰的野生型毒素B,其中野生型毒素B如表2-a中任一所述。

[0411] 作为化学交联的突变型艰难梭菌毒素多肽的另一实施例,至少一个氨基酸可被包括甲醛的试剂化学交联。甲醛可与N末端氨基酸残基以及精氨酸、半胱氨酸、组氨酸和赖氨酸侧链的氨基反应。甲醛和甘氨酸可形成席夫碱(Schiff-base)加合物,其可连接至N末端伯胺基团、精氨酸和酪氨酸残基,和连结至较小程度的天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸和色氨酸残基。

[0412] 如果根据例如通过体外细胞毒性测试或通过动物毒性的测量,经处理的毒素在相同条件下比未经处理的毒素具有更低毒性(如约低于100%、99%、95%、90%、80%、75%、60%、50%、25%或10%的毒性),则称化学交联剂降低毒素的细胞毒性。

[0413] 优选地,相对于在相同条件但缺少化学交联剂下的突变型毒素,化学交联剂降低

突变型艰难梭菌毒素至少约 $2-\log_{10}$ 降低、更优选约 $3-\log_{10}$ 降低且最优选约 $4-\log_{10}$ 或更多。与野生型毒素相比,化学交联剂优选降低突变型毒素的细胞毒性至少约 $5-\log_{10}$ 降低、约 $6-\log_{10}$ 降低、约 $7-\log_{10}$ 降低、约 $8-\log_{10}$ 降低或更多。

[0414] 在另一优选实施方式中,如通过例如体外细胞毒性测试(如本文所述的测试)中所测定,化学灭活的突变型艰难梭菌毒素显示出大于或至少约 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $300\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $600\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $700\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $800\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $900\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更高的EC₅₀值。

[0415] 使突变型毒素与化学交联剂接触的反应条件在本领域技术人员的专业技能内,且条件可根据所用试剂改变。然而,发明人惊奇地发现使突变型艰难梭菌毒素多肽与化学交联剂接触,同时保持功能性表位并降低突变型毒素的细胞毒性(与对应野生型毒素相比)的最佳反应条件。

[0416] 优选地,选择使突变型毒素接触交联剂的反应条件,其中突变型毒素具有约0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、1.75、2.0的最低浓度和约3.0、2.5、2.0、1.5或1.25mg/ml的最高浓度。任何最低值可与任何最高值组合以限定用于反应的突变型毒素的适合浓度范围。最优先地,突变型毒素用于反应的浓度为约1.0-1.25mg/ml。

[0417] 在一个实施方式中,反应中所用试剂具有约1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、10mM、15mM、20mM、30mM、40mM或50mM的最低浓度,和约100mM、90mM、80mM、70mM、60mM或50mM的最高浓度。任何最低值可与任何最高值组合以限定用于反应的化学试剂的适合浓度范围。

[0418] 在试剂包括甲醛的优选实施方式中,所用浓度优选为约2mM至80mM之间的任何浓度,最优先约40mM。在试剂包括EDC的另一优选实施方式中,所用浓度优选为约1.3mM至约13mM,更优选约2mM至3mM之间的任何浓度,最优先约2.6mM。在一个实施方式中,EDC浓度基于总反应体积为至多5g/L、4g/L、3g/L、2.5g/L、2g/L、1.5g/L、1.0g/L、0.5g/L,优选至多1g/L,更优先至多0.5g/L。

[0419] 突变型毒素接触化学交联剂的示例性反应时间包括最低约0.5、1、2、3、4、5、6、12、24、36、48或60小时,和最高约14天、12天、10天、7天、5天、3天、2天、1天或12小时、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1小时。任何最低值可与任何最大值组合以限定适合反应时间的范围。

[0420] 在优选实施方式中,使突变型毒素接触化学交联剂的步骤发生的时长足以将在标准体外细胞毒性测试中适合的人细胞如IMR-90细胞中突变型艰难梭菌毒素的细胞毒性降低至至少约 $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 的EC₅₀值(与缺少交联剂下相同突变型毒素相比)。更优先地,反应步骤进行的时长是足以将适合人细胞中突变型毒素的细胞毒性降低至至少约 $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 的EC₅₀值的时长的至少两倍,且最优先至少三倍或更长。在一个实施方式中,反应时间不超过约168小时(或7天)。

[0421] 例如,在试剂包括甲醛的一个实施方式中,使突变型毒素优选接触试剂12小时,其被表明是足以将在标准体外细胞毒性测试中适合的人细胞如IMR-90细胞中突变型艰难梭菌毒素的细胞毒性降低至至少约 $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 的EC₅₀值(与缺少交联剂下相同突变型毒素相比)的示例性时长。在更优选的实施方式中,反应进行约48小时,其是反应的充分时长的至少约3倍。在此实施方式中,反应时间优选不大于约72小时。

[0422] 在试剂包括EDC的另一实施方式中,突变型毒素优选接触试剂约0.5小时、更优选至少约1小时,或最优先约2小时。在一个实施方式中,突变型毒素接触EDC至多约5小时、优

选至多约3小时、更优选至多约2小时。在此实施方式中，反应时间优选不大于约6小时。

[0423] 突变型毒素接触化学交联剂时的示例性pH包括最低约pH 5.5、6.0、6.5、7.0、或7.5，和最高约pH 8.5、8.0、7.5、7.0或6.5。任何最低值可与任何最大值组合以限定适合pH的范围。优选地，反应在pH 6.5至7.5，优选pH 7.0下发生。

[0424] 突变型毒素接触化学交联剂时的示例性温度包括最低约2°C、4°C、10°C、20°C、25°C或37°C，和最高约40°C、37°C、30°C、27°C、25°C或20°C的温度。任何最低值可与任何最大值组合以限定适合反应温度的范围。优选地，反应在约20°C至30°C，最优选在约25°C下发生。

[0425] 上述免疫原性组合物可包括一种突变型艰难梭菌毒素(A或B)。因此，免疫原性组合物在配制品或试剂盒中可占据单独的瓶(如用于包括突变型艰难梭菌毒素A的组合物的单独的瓶，和用于包括突变型艰难梭菌毒素B的组合物的单独的瓶)。免疫原性组合物可设计为同时、连续或单独使用。

[0426] 在另一实施方式中，上述免疫原性组合物可包括两种突变型艰难梭菌毒素(A和B)。所述突变型艰难梭菌毒素A和突变型艰难梭菌毒素B的任何组合可组合用于免疫原性组合物。因此，免疫原性组合物可在单个瓶中组合(单个瓶同时包括含突变型艰难梭菌TcdA的组合物和含突变型艰难梭菌TcdB的组合物)。优选地，免疫原性组合物包括突变型艰难梭菌TcdA和突变型艰难梭菌TcdB。

[0427] 例如，在一个实施方式中，免疫原性组合物包括SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6，其中SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6各自的至少一个氨基酸被化学交联。在另一实施方式中，免疫原性组合物包括含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7的突变型艰难梭菌毒素A，和含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的突变型艰难梭菌毒素B，其中每个突变型艰难梭菌毒素的至少一个氨基酸被化学交联。

[0428] 在另一实施方式中，免疫原性组合物包括选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:83的任何序列、和选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:85的任何序列。在另一实施方式中、免疫原性组合物包括SEQ ID NO:84和含SEQ ID NO:86的免疫原性组合物。在另一实施方式中、免疫原性组合物包括SEQ ID NO:83和含SEQ ID NO:85的免疫原性组合物。在另一实施方式中、免疫原性组合物包括SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:85。

[0429] 在另一实施方式中，免疫原性组合物包括具有选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:761中任一序列的多肽和选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:761中任一序列的第二多肽。

[0430] 应理解任何本发明的组合物，例如包括突变型毒素A和/或突变型毒素B的免疫原性组合物，为了治疗效果可以不同比例或含量组合。例如，突变型艰难梭菌TcdA和突变型艰难梭菌TcdB可以0.1:10至10:0.1(A:B)范围内的比例存在于免疫原性组合物中。在另一实施方式中，例如突变型艰难梭菌TcdB和突变型艰难梭菌TcdA可以0.1:10至10:0.1(B:A)范围内的比例存在于免疫原性组合物中。在一个优选实施方式中，此比例为使组合物包含比突变型TcdA总量更高的突变型TcdB总量的比例。

[0431] 一方面，免疫原性组合物能够结合中和抗体或其结合片段。优选地，中和抗体或其结合片段为本文下述的那些。在一个示例性实施方式中，免疫原性组合物能够结合抗毒素A抗体或其结合片段，其中抗毒素A抗体或其结合片段包括具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列

的可变轻链和具有SEQ ID N0:37的氨基酸序列的可变重链。例如，免疫原性组合物可包括突变型艰难梭菌TcdA、SEQ ID N0:4或SEQ ID N0:7。作为另一实施例，免疫原性组合物可包括SEQ ID N0:84或SEQ ID N0:83。

[0432] 在另一示例性实施方式中，免疫原性组合物能够结合抗毒素B抗体或其结合片段，其中抗毒素B抗体或其结合片段包括B8-26的可变轻链和B8-26的可变重链。例如，免疫原性组合物可包括突变型艰难梭菌TcdB、SEQ ID N0:6或SEQ ID N0:8。作为另一实施例，免疫原性组合物可包括SEQ ID N0:86或SEQ ID N0:85。

[0433] 重组细胞

[0434] 另一方面，本发明涉及重组细胞或其子代。在一个实施方式中，细胞或其子代包括编码突变型艰难梭菌TcdA和/或突变型艰难梭菌TcdB的多核苷酸。

[0435] 在另一实施方式中，重组细胞或其子代包括编码当例如通过使用缺省缺口加权的程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时，与SEQ ID N0:4、SEQ ID N0:6、SEQ ID N0:7或SEQ ID N0:8中任一具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约98%、更优选约99%或最优选约100%相同性的多肽的核酸序列。在一个实施方式中，重组细胞或其子代包括编码与SEQ ID N0:1至SEQ ID N0:761中任一具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约98%、更优选约99%或最优选约100%相同性的多肽的核酸序列。

[0436] 在另一实施方式中，重组细胞或其子代包括编码当例如通过使用缺省缺口加权的程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时，与SEQ ID N0:84、SEQ ID N0:86、SEQ ID N0:83或SEQ ID N0:85中任一具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约98%、更优选约99%或最优选约100%相同性的多肽的核酸序列。

[0437] 在另一实施方式中，重组细胞或其子代包括编码当例如通过使用缺省缺口加权的程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时，与SEQ ID N0:11、SEQ ID N0:12、SEQ ID N0:13、SEQ ID N0:14、SEQ ID N0:44、SEQ ID N0:45、SEQ ID N0:46或SEQ ID N0:47中任一具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约98%、更优选约99%或最优选约100%相同性的核酸序列。重组细胞可来自于可用于本发明多肽的重组制备中的任何细胞，例如原核生物或真核生物。优选地，重组细胞来源于适合表达大于约5000、6000、优选约7000且更优选约8000核苷酸或更多的异源核酸序列的任何细胞。原核宿主细胞可为任何革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌。在示例性实施方式中，原核宿主细胞缺少编码毒素和/或孢子的内源性多核苷酸。

[0438] 革兰氏阴性菌包括但不限于弯曲杆菌属(Campylobacter)、大肠杆菌(E.coli)、产黄菌属(Flavobacterium)、梭菌属(Fusobacterium)、螺杆菌属(Helicobacter)、泥杆菌属(Ilyobacter)、奈瑟氏菌属(Neisseria)、假单胞菌属(Pseudomonas)、沙门氏菌属(Salmonella)和脲原体(Ureaplasma)。例如，重组细胞可源自如美国专利申请2010013762第[0201]-[0230]段所述的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)细胞，其援引加入本文。

[0439] 革兰氏阳性菌包括但不限于芽孢杆菌属(Bacillus)、梭菌属(Clostridium)、肠球菌属(Enterococcus)、地芽孢杆菌属(Geobacillus)、乳酸菌属(Lactobacillus)、乳球菌属(Lactococcus)、Oceanobacillus、葡萄球菌属(Staphylococcus)、链球菌属(Streptococcus)和链霉菌属(Streptomyces)。优选地，细胞源自艰难梭菌细胞。

[0440] 发明人鉴定到缺乏编码艰难梭菌毒素的内源性多核苷酸的野生型艰难梭菌的菌株。缺乏内源性毒素A和毒素B的菌株包括以下菌株,其可获自美国典型培养物保藏中心(ATCC) (Manassas, VA) :艰难梭菌1351 (ATCC43593TM)、艰难梭菌3232 (ATCC BAA-1801TM)、艰难梭菌7322 (ATCC43601TM)、艰难梭菌5036 (ATCC 43603TM)、艰难梭菌4811 (ATCC 43602TM) 和、艰难梭菌VPI 11186 (ATCC 700057TM)。

[0441] 因此,在一个实施方式中,重组艰难梭菌细胞源自本文所述的菌株。优选地,重组艰难梭菌细胞或其子代源自选自以下的组:艰难梭菌1351、艰难梭菌5036和艰难梭菌VPI 11186。更优选地,重组艰难梭菌细胞或其子代选自艰难梭菌VPI 11186细胞。

[0442] 在优选实施方式中,重组艰难梭菌或其子代的孢子形成基因被灭活。孢子可为有感染性的,高耐性的,且有助于艰难梭菌在宿主外的有氧环境中存留。孢子也有助于抗微生物治疗期间宿主内艰难梭菌的存活。因此,缺乏孢子形成基因的艰难梭菌细胞可用于制备向哺乳动物施用的安全的免疫原性组合物。此外,此类细胞的使用有助于生产期间的安全性,例如保护设备、将来产品和员工的安全性。

[0443] 用于靶向灭活的孢子形成基因的实施例包括特别是spo0A、spoIIIE、σ^E、σ^G和σ^K。优选地,灭活spo0A基因。

[0444] 灭活艰难梭菌孢子形成基因的方法是本领域已知的。例如,孢子形成基因可通过选择性标记如抗生素抗性标记的靶向插入来灭活。参见例如Heap et al., J Microbiol Methods. 2010 Jan; 80 (1) : 49-55; Heap et al., J. Microbiol. Methods, 2007 Sept; 70 (3) : 452-464; 和Underwood et al., J Bacteriol. 2009 Dec; 191 (23) : 7296-305。同样参见例如Minton等,WO2007/148091,标题为“DNA分子和方法”,其33-66页或对应美国申请US 20110124109A1第[00137]-[0227]段援引加入本文。

[0445] 涉及培养艰难梭菌细胞的组合物

[0446] 本发明还涉及用于培养艰难梭菌和制备艰难梭菌毒素的组合物和方法。一方面,本发明涉及包括氮源和艰难梭菌细胞的培养基。

[0447] 适合的培养基氮源包括:HY-SOY (Quest)、AMI-SOY (Quest)、NZ-SOY (Quest)、NZ-SOY BL4 (Quest)、NZ-SOY BL7 (Quest)、SHEFTONE D (Sheffield)、SE50M (DMV)、SE50 (DMV)、SE%) MK (DMV)、SOY PEPTONE (Gibco)、BACTO-SOYTON (Difco)、NUTRISOY 2207 (ADM)、BAKES NUTRISOY (ADM) NUTRISOY FLOUR、大豆粉、BACTO-YEAST EXTRACT (Difco) YEAST EXTRACT (Gibco)、HY-VEST 412酵母提取物 (Quest)、HY-VEST 441酵母提取物 (Quest)、HY-VEST 444酵母提取物 (Quest)、HY-VEST 455酵母提取物 (Quest) BACTO-MALT EXTRACT (Difco)、Corn Steep和PROFLO (Traders)。

[0448] 一方面,本发明涉及包括植物水解物和艰难梭菌细胞的培养基。任何植物水解物均适合。适合的植物水解物的实施例为棉籽水解物、豌豆水解物和大豆水解物。

[0449] 在优选实施方式中,植物水解物为大豆水解物。优选地,大豆水解物为SE50MK (Friesland-Campaigna)。可与在本发明中的大豆产物及其来源的其它实施例包括:Tekniscience:大豆蛋白胨A1、大豆蛋白胨A2、大豆蛋白胨A3、植物蛋白胨E1、植物蛋白胨ET1和小麦蛋白胨E1;Quest:HY-Soy、HY-Soy T、AMI-Soy、NZ-Soy、NZ-Soy BLA和NZ-Soy BL7;DMV:SE50M、SE70M、SE50MK、SE50MK-NK (Friesland-Campaigna)、WGE80BT、WGE80M、CNE50M和SE70BT;Marcor:大豆蛋白胨类型AB、大豆蛋白胨类型AC、大豆蛋白胨类型SL、大豆

蛋白胨类型II和大豆蛋白胨类型F;Oxoid:植物蛋白胨和植物蛋白胨1号;Gibco:大豆蛋白胨;和Difco:Bacsoytone。

[0450] 培养基中植物水解物的浓度范围例如在最低值5、10、20、30、40或50g/L至最高值200、150、100或75g/L之间。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中,培养基中植物水解物的浓度为10-50g/L,最优先约30g/L。本文所述的培养基中植物水解物的浓度可基于培养基的总体积。

[0451] 另一方面,本发明涉及包括酵母提取物(如氮源)和艰难梭菌细胞的培养基。最优先地,酵母提取物为HY YEST 412(Kerry Biosciences)。

[0452] 培养基中酵母提取物的浓度范围例如在最低值5、10、20、30、40或50g/L至最高值200、150、100或75g/L之间。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中,培养基中酵母提取物的浓度为10-50g/L,最优先约20g/L。本文所述的培养基中酵母提取物的浓度可基于培养基的总体积。

[0453] 发明人发现艰难梭菌的生长可在包括植物水解物而没有酵母提取物的培养基和在包括酵母提取物而没有植物水解物的培养基中得到支持。然而,已观察到得自包括植物水解物和酵母提取物二者的培养基的细胞的培养和/或毒素的产生高于得自包括植物水解物但没有酵母提取物的培养基的产率,且高于得自包括酵母提取物但没有植物水解物的培养基的产率。

[0454] 因此,发明人发现植物水解物和酵母提取物的组合有助于支持最大的艰难梭菌的生长和/或毒素的产生。一方面,本发明涉及包括植物水解物、酵母提取物和艰难梭菌细胞的培养基。植物水解物可为上述本领域已知的任何适合的植物水解物。优先地,水解物为大豆水解物。更优先地,大豆水解物为SE50MK(Friesland-Campaigna)。在优选实施方式中,酵母提取物为HY YEST 412。

[0455] 在一个实施方式中,培养基不包含碳源。发明人观察到包括大豆水解物/酵母提取物但缺乏碳源的培养基实现2-3的OD₆₀₀值和10-15mg/L的毒素产率。

[0456] 然而,惊奇地观察到与缺乏碳源的培养基相比,包括碳源的培养基增加艰难梭菌细胞的培养和毒素的产生。此外,发明人惊奇地发现在存在包括大豆水解物的培养基,在包括碳源的厌氧条件下培养艰难梭菌细胞并不显著抑制突变型毒素的产生。因此,在优选实施方式中,培养基进一步包括碳源。更优先地,在一个实施方式中,培养基包括碳源,其中培养基进一步包括重组艰难梭菌细胞。甚至更优先地,重组艰难梭菌细胞包括组成型启动子。在一优选实施方式中,启动子为生孢梭菌铁氧还蛋白(fdx)启动子。在另一优选实施方式中,重组艰难梭菌细胞不包括受调节的染色体启动子(可被如葡萄糖阻遏负调节)。在最优先实施方式中,艰难梭菌细胞为上述重组细胞或其子代。任何碳源可被用在培养基中。适合的碳源包括葡萄糖、右旋糖、甘露醇、果糖和/或甘露糖。优先地,培养基中的碳源是葡萄糖。在优选实施方式中,培养基不包括阿拉伯糖、木糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、甘油、鼠李糖和/或半乳糖。

[0457] 培养基中碳源(如葡萄糖、甘露醇、果糖和/或甘露糖)的浓度范围可在例如最低值1、5、10、15、20、30、40、50或60g/L至最高值150、100、90、80、75、70、50、40或30g/L之间。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中,培养基中碳源的浓度为5-70g/L。在一个实施方式中,培养基中碳源的浓度为约10g/L。在另一实施方式中,培养

基中碳源的浓度为大于10g/L。在另一实施方式中,培养基中碳源(如葡萄糖)的浓度为45-75g/L、优选55-65g/L、更优选55-65g/L。在另一实施方式中,培养基中碳源的浓度为约60g/L。本文所述的培养基中碳源的浓度可基于培养基的总体积。

[0458] 在一个实施方式中,培养基进一步包括氯霉素衍生物。示例性的氯霉素衍生物包括甲砜氯霉素、氟苯尼考、氯霉素琥珀酸盐(酯)和氟胺酰醇(fluoramphenicol)。优选地,培养基包括甲砜氯霉素。不受机理或理论的束缚,认为与缺少氯霉素衍生物的培养基相比,氯霉素衍生物有助于防止发酵期间质粒损失并增加细胞和/或毒素的产生。

[0459] 培养基中氯霉素衍生物的浓度范围可在例如最低值5、10、15、20或30mg/L至最高值100、75、50或40mg/L之间。在另一实施方式中,培养基中氯霉素衍生物的浓度范围可在例如最低值0.5g/L、1g/L、1.5g/L、2g/L、2.5g/L、3g/L、3.5g/L、4g/L、4.5g/L或5g/L至最高值10g/L、9.5g/L、9g/L、8.5g/L、8g/L、7.5g/L、7g/L、6.5g/L、6g/L、5.5g/L、5g/L之间。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中,培养基中氯霉素衍生物的浓度为5-20mg/L,优选约15mg/L。在另一优选实施方式中,培养基中氯霉素衍生物的浓度为1g/L-10g/L,优选1g/L-5g/L,最优选约3g/L。本文所述的培养基中氯霉素衍生物的浓度可基于培养基的总体积。

[0460] 在一个实施方式中,培养基进一步包括细胞保护剂,如聚乙二醇、聚乙烯醇或普兰尼克(pluronic)多元醇。在一个实施方式中,培养基包括聚乙二醇,例如聚乙二醇2000(PPG 2000)。

[0461] 培养基中细胞保护剂例如聚乙二醇浓度的范围可为例如最低值0.01、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.80、0.85、0.90、0.95或1ml/L至最高值2、1、0.90、0.80、0.70、0.60、0.50、0.40、0.30、0.20ml/L。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中,培养基中细胞保护剂如聚乙二醇的浓度为0.01ml/L至0.50,最优选约0.25ml/L。本文所述的培养基中细胞保护剂的浓度可基于培养基的总体积。

[0462] 在优选实施方式中,培养基包括植物水解物、酵母提取物和碳源,其中植物水解物为大豆水解物,其中酵母提取物为HY YEST 412(Kerry Biosciences),且其中碳源为葡萄糖、甘露醇、果糖和/或甘露糖。在最优选实施方式中,培养基包括大豆水解物SE50MK、HY YEST 412酵母提取物、葡萄糖和甲砜氯霉素,pH 7。

[0463] 在一个优选实施方式中,培养基包括30g/L大豆水解物SE50MK、20g/LHY YEST 412酵母提取物、10g/L葡萄糖和15mg/L甲砜氯霉素,pH 7。在一个优选实施方式中,培养基包括约30g/L大豆水解物SE50MK、约20g/LHY YEST 412酵母提取物、约10g/L葡萄糖和约15mg/L甲砜氯霉素,pH 7。培养基可进一步包括约0.25ml/L PPG 2000。在另一实施方式中,培养基可进一步包括右旋糖。

[0464] 在另一优选实施方式中,培养基包括30g/L大豆水解物SE50MK、20g/LHY YEST 412酵母提取物、60g/L葡萄糖和15mg/L甲砜氯霉素,pH 7。在另一优选实施方式中,培养基包括约30g/L大豆水解物SE50MK、约20g/LHY YEST 412酵母提取物、约60g/L葡萄糖和约15mg/L甲砜氯霉素,pH 7。培养基可进一步包括约0.25ml/L PPG 2000。在另一实施方式中,培养基可进一步包括右旋糖。

[0465] 在一个实施方式中,培养基进一步包括聚乙二醇2000(PPG 2000)。培养基可包括

约0.05mL PPG 2000至约1ml PPG 2000/L培养基,优选地,培养基包括约0.25mL PPG 2000/L培养基。

[0466] 本文所述的培养基可适用于培养任何艰难梭菌细胞。在一个实施方式中,细胞未被遗传修饰。在另一实施方式中,细胞被遗传修饰,例如上述重组细胞或其子代。在一个实施方式中,艰难梭菌缺少编码毒素的内源性多核苷酸。在优选实施方式中,艰难梭菌细胞源自VPI 11186。

[0467] 在另一个实施方式中,细胞包括组成型启动子。在一优选实施方式中,启动子为生孢梭菌铁氧还蛋白(fdx)启动子。在另一优选实施方式中,细胞不包括受调节的染色体启动子(可被如葡萄糖阻遏负调节)。在最优选实施方式中,艰难梭菌细胞为上述重组细胞或其子代。

[0468] 发明人还发现单克隆抗体培养基支持艰难梭菌的生长。因此,一方面,本发明涉及包括单克隆抗体培养基的培养基。在一个实施方式中,培养基为SFM4MAbTM培养基(Thermo Scientific)。显示培养基产生约10的OD₆₀₀值,且毒素产率为约40mg/L。

[0469] 在一个实施方式中,培养基的pH范围可为例如最低值6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9或7.0至最高值8.0、7.9、7.8、7.7、7.6、7.5、7.4、7.3、7.2或7.1。任何最低值可与任何最大值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中,培养基的pH为6.0至8.0,更优选6.5至7.5。最优选地,pH为7.0。

[0470] 适合的pH滴定剂是本领域已知的,包括例如NH₄OH、Na₂CO₃和NaOH。优选地,pH滴定剂是NaOH。

[0471] 培养基可包括含磷酸盐成分,例如Na₂HPO₄、KH₂PO₄。然而,在优选实施方式中,培养基不包括含磷酸盐成分。

[0472] 涉及培养艰难梭菌细胞的方法

[0473] 在另一方面,本发明涉及培养艰难梭菌的方法。所述方法包括在上述培养基中培养艰难梭菌细胞。

[0474] 在一个实施方式中,根据本发明方法的艰难梭菌的生长在至少两个时期进行:种子生长和发酵。种子培养物通过从原种培养物如工作细胞银行(working cell bank)接种来首先生长。种子或用于接种第二种子培养物或用于接种相对大的发酵培养物。如本领域所理解,所用种子培养物的数量可取决于例如发酵步骤的大小和体积。

[0475] 因此,一方面,本发明涉及培养艰难梭菌的方法。所述方法包括在有助于细胞生长的条件下在第一培养基中培养艰难梭菌细胞;在所述第一培养后,向第二培养基中接种全部或部分所述第一培养基;在有助于细胞生长的条件下培养所述接种的第二培养基。所述方法可进一步包括从所述第二培养基中分离艰难梭菌毒素。在一个实施方式中,艰难梭菌在被称为种子培养物的第一培养基中生长。在一个实施方式中,种子培养物包括上述的培养基和来自在培养基中生长的原种培养物的接种。

[0476] 通常进行种子生长期(或多个生长期)以扩大来自所储存培养物的微生物的数量,使得其可被用作用于发酵期的接种物。也可进行种子生长期以允许所储存培养物中相对休眠的微生物恢复活力并生长为活跃生长的培养物。

[0477] 如果减少活跃生长的培养物(如种子培养物),而非如果减少所储存培养物,用于接种发酵培养物的存活细胞的体积和数量可被更准确地控制。

[0478] 此外,多于一个(如两个或三个)种子生长期可被用于扩大用于接种发酵培养基的艰难梭菌的数量。或者,如果需要,发酵期艰难梭菌的生长可通过直接接种所储存培养物直接进行。

[0479] 第一培养基包括上述培养基。例如,在一个实施方式中,第一培养基包括植物水解物和艰难梭菌细胞。优选地,植物水解物为大豆水解物,最优先大豆水解物SE50MK。在另一实施方式中,第一培养基包括酵母提取物和艰难梭菌细胞。优选地,酵母提取物为HY YEST 412。在另一实施方式中,第一培养基包括植物水解物和酵母提取物。在另一实施方式中,第一培养基进一步包括碳源。优选地,碳源为葡萄糖。在一个实施方式中,当包括碳源时,培养基包括重组艰难梭菌细胞,其中重组细胞包括组成型启动子。在另一实施方式中,第一培养基进一步包括氯霉素衍生物。优选地,培养基包括甲砜氯霉素。

[0480] 第一培养基(如种子培养基)中植物水解物的浓度范围例如在最低值5、10、20、30、40或50g/L至最高值200、150、100或75g/L之间。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中,培养基中植物水解物的浓度为10–50g/L,最优先约30g/L。本文所述的培养基中植物水解物的浓度可基于培养基的总体积。

[0481] 第一培养基(如种子培养基)中酵母提取物的浓度范围例如在最低值5、10、20、30、40或50g/L至最高值200、150、100或75g/L之间。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中,培养基中酵母提取物的浓度为10–50g/L,最优先约20g/L。本文所述的培养基中酵母提取物的浓度可基于培养基的总体积。

[0482] 第一培养基(如种子培养基)中碳源的浓度范围例如在最低值1、5、10、15或20g/L至最高值100、75、50、40或30g/L之间。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中,培养基中碳源的浓度为5–20g/L,最优先约10g/L。

[0483] 在一个实施方式中,培养基进一步包括选自以下的氯霉素衍生物:甲砜氯霉素、氟苯尼考、氯霉素琥珀酸盐(酯)和氟胺酰醇。优选地,培养基包括甲砜氯霉素。第一培养基(如种子培养基)中氯霉素衍生物的浓度范围例如在最低值5、10、15、20或30mg/L至最高值100、75、50或40mg/L之间。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中,培养基中氯霉素衍生物的浓度为5–20mg/L,最优先约15mg/L。

[0484] 在一个实施方式中,第一培养基的pH范围可为例如最低值6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9或7.0至最高值8.0、7.9、7.8、7.7、7.6、7.5、7.4、7.3、7.2或7.1。任何最低值可与任何最大值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中,第一培养基的pH为6.0至8.0,更优先6.5至7.5。最优先地,pH为7.0。

[0485] 在优选实施方式中,第一培养基包括大豆水解物、酵母提取物HY YEST412、葡萄糖、甲砜氯霉素,pH 7。更优先地,培养基包括30g/L大豆水解物SE50MK、20g/L酵母提取物HY YEST 412、10g/L葡萄糖、15mg/L甲砜氯霉素,pH 7。

[0486] 为了起始发酵期,包含艰难梭菌的部分或全部种子培养物可用于接种发酵培养基。用于接种发酵培养基的种子培养物的适合浓度可由本领域技术人员确定,且可为例如0.1–10%的范围。作为具体实施例,可使用0.5、1、5、5.5、6、6.25、6.5、7、8、9、10%的浓度。

[0487] 发酵可用于在大规模厌氧环境中产生大量细胞。在一个实施方式中,艰难梭菌作为发酵培养物生长。在一个实施方式中,发酵培养物从在培养基中生长的种子培养物接种。

[0488] 第二培养基包括上述培养基。例如,在一个实施方式中,第二培养基包括植物水解

物和艰难梭菌细胞。优选地，植物水解物为大豆水解物，最优先大豆水解物SE50MK。在另一实施方式中，第二培养基包括酵母提取物和艰难梭菌细胞。优选地，酵母提取物为HY YEST 412。在另一实施方式中，第二培养基包括植物水解物和酵母提取物。在另一实施方式中，第二培养基进一步包括碳源。优选地，碳源为葡萄糖。在一个实施方式中，当包括碳源时，培养基包括重组艰难梭菌细胞，其中重组细胞包括组成型启动子。在另一实施方式中，第二培养基进一步包括氯霉素衍生物。优选地，培养基包括甲砜氯霉素。

[0489] 第二培养基中植物水解物的浓度范围例如可在最低值5、10、20、30、40或50g/L至最高值200、150、100或75g/L之间。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中，培养基中植物水解物的浓度为10–50g/L，最优先约30g/L。本文所述的培养基中植物水解物的浓度可基于培养基的总体积。

[0490] 第二培养基中酵母提取物的浓度范围例如可在最低值5、10、20、30、40、40或50g/L至最高值200、150、100或75g/L之间。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中，培养基中酵母提取物的浓度为10–50g/L，最优先约20g/L。

[0491] 第二培养基中碳源的浓度范围例如可在最低值10、20、30、40、50或60g/L至最高值150、100、90、80或70之间。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中，培养基中碳源的浓度为50–70g/L，最优先约60g/L。在一个实施方式中，第二培养基中碳源的浓度大于第一培养基中碳源的浓度。本文所述培养基中碳源的浓度可基于培养基的总体积。

[0492] 在一个实施方式中，培养基进一步包括选自以下的氯霉素衍生物：甲砜氯霉素、氟苯尼考、氯霉素琥珀酸盐(酯)和氟胺酰醇。优选地，培养基包括甲砜氯霉素。第二培养基中氯霉素衍生物的浓度范围可在例如最低值5、10、15、20或30mg/L至最高值100、75、50或40mg/L之间。在另一实施方式中，培养基中氯霉素衍生物的浓度范围可在例如最低值0.5g/L、1g/L、1.5g/L、2g/L、2.5g/L、3g/L、3.5g/L、4g/L、4.5g/L或5g/L至最高值10g/L、9.5g/L、9g/L、8.5g/L、8g/L、7.5g/L、7g/L、6.5g/L、6g/L、5.5g/L、5g/L之间。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中，培养基中氯霉素衍生物的浓度为5–20mg/L，优先约15mg/L。在另一优选实施方式中，培养基中氯霉素衍生物的浓度为1g/L–10g/L，优先1g/L–5g/L，最优先约3g/L。本文所述的培养基中氯霉素衍生物的浓度可基于培养基的总体积。

[0493] 在一个实施方式中，培养基进一步包括细胞保护剂，如聚乙二醇、聚乙烯醇或普兰尼克多元醇。在一个实施方式中，培养基包括聚乙二醇，例如聚乙二醇2000 (PPG 2000)。

[0494] 培养基中细胞保护剂例如聚乙二醇浓度的范围可为例如最低值0.01、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.80、0.85、0.90、0.95或1ml/L至最高值2、1、0.90、0.80、0.70、0.60、0.50、0.40、0.30、0.20ml/L。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中，培养基中细胞保护剂如聚乙二醇的浓度为0.01ml/L至0.050，最优先约0.25ml/L。本文所述的培养基中细胞保护剂的浓度可基于培养基的总体积。

[0495] 在一个实施方式中，第二培养基的pH范围可为例如最低值6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9或7.0至最高值8.0、7.9、7.8、7.7、7.6、7.5、7.4、7.3、7.2或7.1。任何最低值可与任何最大值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中，第二培养基的pH为6.0

至8.0,更优选6.5至7.5。最优选地,pH为7.0。

[0496] 在优选实施方式中,第二培养基包括大豆水解物、酵母提取物HY YEST412、葡萄糖、甲砜氯霉素,pH 7。更优选地,培养基包括30g/L大豆水解物SE50MK、20g/L酵母提取物HY YEST 412、60g/L葡萄糖、15mg/L甲砜氯霉素,pH 7。

[0497] 在一个实施方式中,培养在厌氧条件下进行。在一个实施方式中,本发明方法的培养步骤(种子和发酵)在厌氧条件下进行,虽然对于这些时期之一也可使用有氧条件。

[0498] 细菌如艰难梭菌厌氧培养的方法是本领域已知的,且可利用例如氮气或氮和氢气的混合物。气体可在发酵期间鼓泡经过培养基(如起泡),或通过培养室中液体上的区域(如室顶部空间)。

[0499] 艰难梭菌细胞的培养可在厌氧室中在约30±1℃、31±1℃、32±1℃、33±1℃、34±1℃、35±1℃、36±1℃、37±1℃、38±1℃或39±1℃,优选约37±1℃下进行。培养可进行的时间范围从例如最低值1、2、3、4、7、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时至最高值9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、48小时或36小时或24小时。任何最低值可与任何最大值组合以限定适合的范围。在优选实施方式中,细胞的培养发生11至48小时,最优选约24小时。在另一实施方式中,细胞的培养发生5至25小时,10至20小时,优选约15小时。生长可通过测定培养基的光密度(O.D.)来监测。

[0500] 在一个实施方式中,方法进一步包括从所述培养基中分离艰难梭菌毒素。艰难梭菌可使用已知蛋白纯化方法从培养物中分离和/或纯化。纯化的毒素可随后例如通过化学灭活处理来灭活。

[0501] 在另一方面,本发明涉及培养艰难梭菌的方法。所述方法包括在单克隆抗体培养基中培养艰难梭菌细胞。

[0502] 另一方面,本发明涉及制备艰难梭菌毒素的方法。所述方法包括在允许产生毒素的条件下在上述培养基中培养艰难梭菌细菌。所述方法进一步包括从所述培养基中分离艰难梭菌毒素。

[0503] 在一个实施方式中,方法包括在有助于艰难梭菌生长的条件下在第一培养基中培养艰难梭菌细胞;在所述培养后,向第二培养基中接种全部或部分所述第一培养基;在有助于艰难梭菌生长和毒素产生的条件下培养所述接种的第二培养基;和从所述第二培养基中分离艰难梭菌毒素。在一个实施方式中,包含艰难梭菌的第一或第二培养基的培养在厌氧条件下进行。

[0504] 在一个实施方式中,艰难梭菌细胞在连续培养系统中培养。在另一实施方式中,本发明涉及在灌注培养中培养艰难梭菌的方法。发明人惊奇地发现表达突变型毒素的重组艰难梭菌细胞可成功在厌氧连续培养中和厌氧灌注培养中培养。连续系统和/或灌注系统的优点为可连续加入新制培养基。此外,生产中的毒素副产物可在生产期间被去除且同时保持系统中的细胞活力。

[0505] 连续培养体系可包括向细胞提供新制培养基,且同时从生物反应器中去除废培养基和细胞。连续培养可包括灌注培养,其中液体流出物包含基本不含细胞或包含比生物反应器中明显更低细胞浓度的培养基。在灌注培养中,细胞可通过例如过滤、超滤、离心或沉淀保留。

[0506] 在一个实施方式中,去除并过滤废培养基,这防止细胞从生物反应器中被去除。过

滤器可为交叉流动过滤器和/或切向流过滤器。在一个实施方式中，所述过滤系统包括中空纤维过滤器。在另一实施方式中，通过离心步骤防止细胞被从生物反应器中去除。在另一实施方式中，通过超滤步骤防止细胞被从生物反应器中去除。在另一实施方式中，经由沉淀系统防止细胞被从生物反应器中去除。在另一实施方式中，所述过滤系统包括平板过滤片(flat-sheet cassette)。

[0507] 在另一实施方式中，灌注系统包括将保留细胞但不保留所期望产物的中空纤维过滤器。细胞被再循环回到生物反应器，且包含所期望产物的废培养基通过所期望分子量截留过滤器(cut-off filter)。过滤器将保留所期望产物。未被过滤器保留的废产物可被处理或再循环。

[0508] 制备突变型艰难梭菌毒素的方法

[0509] 一方面，本发明制备突变型艰难梭菌毒素的方法。在一个实施方式中，发明包括在适合表达多肽的条件下培养上述任何重组细胞或其子代。所述方法进一步包括从培养基中分离毒素的步骤。

[0510] 在另一实施方式中，方法包括在适合表达编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸的条件下培养重组细胞或其子代，其中所述细胞包括编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸，其中相对于对应的野生型艰难梭菌毒素，所述突变体包括具有至少一个突变的葡萄糖基转移酶结构域和具有至少一个突变的半胱氨酸蛋白酶结构域。在一个实施方式中，细胞缺少编码毒素的内源性多核苷酸。

[0511] 在另一实施方式中，方法包括在适合表达编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸的条件下培养重组艰难梭菌细胞或其子代，其中所述细胞包括编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸，且所述细胞缺少编码艰难梭菌毒素的内源性多核苷酸。

[0512] 另一方面，本发明制备突变型艰难梭菌毒素的方法。所述方法包括以下步骤：(a)使艰难梭菌细胞接触重组大肠杆菌细胞，其中艰难梭菌细胞缺乏编码艰难梭菌毒素的内源性多核苷酸，且大肠杆菌细胞包括编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸；(b)在适合将所述多核苷酸从大肠杆菌细胞转移至艰难梭菌细胞的条件下培养艰难梭菌细胞和大肠杆菌细胞；(c)选择包含编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸的艰难梭菌细胞；(d)在适合表达多核苷酸的条件下培养步骤(c)的艰难梭菌细胞；和(e)分离突变型艰难梭菌毒素。

[0513] 在本发明方法中，重组大肠杆菌细胞包括编码本文所述的突变型艰难梭菌毒素的异源多核苷酸。多核苷酸可为DNA或RNA。在一个示例性实施方式中，为了大肠杆菌密码子利用，编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸经密码子优化。用于密码子优化多核苷酸的方法是本领域已知的。

[0514] 在一个实施方式中，多核苷酸包含与上述编码突变型艰难梭菌TcdA的多核苷酸具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的核酸序列。在一个实施方式中，多核苷酸包含与编码具有选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:761中任一序列的多肽的多核苷酸具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的核酸序列。编码突变型艰难梭菌毒素A的示例性多核苷酸包括SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45。

[0515] 在另一实施方式中,多核苷酸包含与上述编码突变型艰难梭菌TcdB的多核苷酸具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的核酸序列。编码突变型艰难梭菌毒素B的示例性多核苷酸包括SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:47。在另一实施方式中,多核苷酸编码SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:86。

[0516] 在一个实施方式中,包含异源多核苷酸的大肠杆菌细胞为稳定寄宿编码突变型艰难梭菌毒素的异源多核苷酸的大肠杆菌细胞。示例性大肠杆菌细胞包括选自以下组的细胞:MAXEfficiency[®] Stb12TM大肠杆菌感受态细胞(Invitrogen, Carlsbad, CA)、OneShot[®] Stb13TM化学地感受态大肠杆菌(Invitrogen, Carlsbad, CA)、ElectroMAXTM Stb14TM大肠杆菌感受态细胞(Invitrogen)和大肠杆菌CA434。在优选实施方式中,大肠杆菌克隆宿主细胞不为DH5 α 。更优选地,大肠杆菌克隆宿主细胞为MAX Efficiency[®] Stb12TM大肠杆菌感受态细胞。

[0517] 本发明方法进一步包括在适合将多核苷酸从大肠杆菌细胞转移至艰难梭菌细胞的条件下培养艰难梭菌细胞和大肠杆菌细胞,产生重组艰难梭菌细胞的步骤。在优选实施方式中,培养条件适合于将多核苷酸从大肠杆菌细胞(供体细胞)转移至艰难梭菌细胞(受体细胞),并产生遗传稳定的遗传特征。

[0518] 更优选地,培养条件适合于细菌接合,这是本领域已知的。“接合”是指将转移多核苷酸的特定过程,其中多核苷酸(即来自细菌质粒)发生从一个细菌细胞(即“供体”)至另一细菌细胞(即“受体”的单向转移。结合过程涉及供体细胞与受体细胞接触。优选地,供体大肠杆菌细胞为大肠杆菌CA434细胞。

[0519] 用于多核苷酸从大肠杆菌细胞转移至艰难梭菌细胞的示例性适合(接合)条件包括使艰难梭菌的液体培养物在脑心浸液肉汤(BHI;Oxoid)或Schaedlers厌氧肉汤(SAB;Oxoid)中生长。在另一实施方式中,固体艰难梭菌培养物可在新制血琼脂(FBA)或BHI琼脂上生长。优选地,艰难梭菌在37℃厌氧环境(如80%N₂、10%CO₂和10%H₂[vol/vol])中生长。在一个实施方式中,适合的条件包括使大肠杆菌在37℃下Luria-Bertani(LB)肉汤或LB琼脂上有氧生长。对于接合转移至艰难梭菌,示例性适合条件包括使大肠杆菌在FBA上厌氧生长。抗生素可包含在本领域已知的液体和固体培养基中。此类抗生素的实施例包括环丝氨酸(250 μ g/ml)、头孢西丁(8 μ g/ml)、氯霉素(12.5 μ g/ml)、甲砜氯霉素(15 μ g/ml)和红霉素(5 μ g/ml)。

[0520] 本发明的方法额外包括选择包含编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸的所得重组艰难梭菌细胞的步骤。在示例性实施方式中,重组艰难梭菌细胞为经由接合来自重组大肠杆菌细胞的编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸的受体。

[0521] 本发明的方法包括在适合表达编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸的条件下培养重组细胞或其子代,导致产生突变型艰难梭菌毒素的步骤。适用于重组细胞表达多核苷酸的条件包括适用于生长艰难梭菌细胞的培养条件,这是本领域已知的。例如,适合的条件可包括在脑心浸液肉汤(BHI;Oxoid)或Schaedlers厌氧肉汤(SAB;Oxoid)中培养艰难梭菌转化体。在另一实施方式中,固体艰难梭菌培养物可在FBA或BHI琼脂上生长。优选地,艰难

梭菌在37°C厌氧环境(如80%N₂、10%CO₂和10%H₂[vol/vol])中生长。

[0522] 在一个实施方式中,本发明的方法包括分离所得突变型艰难梭菌毒素的步骤。从艰难梭菌中分离蛋白的方法是本领域已知的。

[0523] 在另一实施方式中,本发明的方法包括纯化所得突变型艰难梭菌毒素的步骤。纯化多肽的方法,例如色谱法是本领域已知的。

[0524] 在示例性实施方式中,方法进一步包括使分离的突变型艰难梭菌毒素接触上述化学交联剂的步骤。优选地,试剂包括甲醛、乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺或EDC和NHS的组合。示例性反应条件如上和如下部分实施例中所述。

[0525] 另一方面,本发明涉及包括通过任何方法制备,优选通过上述方法制备的本文所述突变型艰难梭菌毒素的免疫原性组合物。

[0526] 抗体

[0527] 令人惊奇地,上述本发明的免疫原性组合物在体内引发新抗体,这提示免疫原性组合物包括各野生型艰难梭菌毒素的保守的天然结构(如保守抗原性表位),且免疫原性组合物包括表位。针对艰难梭菌菌株之一的毒素产生的抗体能够结合另一艰难梭菌菌株产生的对应毒素。也就是说,抗体和其结合片段可为“交叉反应的”,其是指与从多种艰难梭菌菌株产生的毒素上的类似抗原性位点反应的能力。交叉反应性也包括抗体与不刺激其产生的抗原反应或结合的能力,即抗原和针对不同但类似抗原产生的抗体之间的反应。

[0528] 一方面,发明人惊奇地发现对艰难梭菌毒素具有中和作用的单克隆抗体及其制备方法。本发明的抗体可以中和艰难梭菌毒素的体外细胞毒性,抑制艰难梭菌毒素与哺乳动物细胞的结合,和/或可以中和艰难梭菌毒素的体内肠毒性。本发明还涉及包括编码任何前述的核酸序列的分离的多核苷酸。此外,本发明涉及任何前述组合物在哺乳动物中治疗、预防、降低下述风险,降低下述的严重性,降低下述的出现和/或延迟下述的开始中的用途:艰难梭菌感染、与艰难梭菌相关疾病、综合病征、状况、症状和/或其并发症(与未被施用组合物的哺乳动物相比),以及制备所述组合物的方法。

[0529] 发明人进一步发现至少两种中和单克隆抗体的组合对TcdA或TcdB的各自中和可显示出预想不到的协同作用。抗毒素抗体或其结合片段可用于抑制艰难梭菌感染。

[0530] “抗体”为包括至少一种或两种重链(H)可变区(缩写为VH)和至少一种或两种轻链(L)可变区(缩写为VL)的蛋白质。VH和VL区可进一步细分为被称为“互补决定区”(“CDR”)的超变区,互补决定区间插有更保守的,被称为“框架区”(FR)的区域。框架区和CDR的范围已被明确定义(参见,Kabat,E.A.等.Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242,1991,和Chothia,C.等,J.Mol.Biol.196:901-917,1987)。术语“抗体”包括IgA、IgG、IgE、IgD、IgM型(及其亚型)的完整免疫球蛋白,其中免疫球蛋白的轻链可为κ或λ型。

[0531] 抗体分子可为全长的(如IgG1或IgG4抗体)。抗体可为各种同种型,包括:IgG(如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA1、IgA2、IgD或IgE。在一个优选实施方式中,抗体为IgG同种型,如IgG1。在另一优选实施方式中,抗体为IgE抗体。

[0532] 在另一实施方式中,抗体分子包括本文所用的“抗原结合片段”或“结合片段”,其是指特异性结合艰难梭菌的毒素(如毒素A)的抗体的一部分。结合片段为例如其中一条或

更多条免疫球蛋白链不为全长,但特异性结合毒素的分子。

[0533] 术语抗体的“结合片段”所涵盖的结合部分的实施例包括(i) Fab片段,其是由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,其为包括在铰链区由二硫键连接的两Fab片段的二价片段;(iii) Fd片段,其是由VH和CH1结构域组成;(iv) Fv片段,其是由抗体的单臂的VL和VH结构域组成;(v) dAb片段(Ward et al., Nature 341:544-546, 1989),其是由VH结构域组成;和(vi) 分离的互补决定区(CDR),其具有足以特异性结合如可变区的抗原结合部分的构架。

[0534] 轻链可变区的结合片段和重链可变区的结合片段,如Fv片段、VL和VH的两个结构域可使用重组方法,通过使它们成为单个蛋白链(其中VL和VH区配对形成单价分子)的合成连接物来连接(称为单链Fv(scFv);参见如Bird等(1988) Science 242:423-426;和Huston等(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。此类单链抗体也涵盖在术语抗体的“结合片段”内。这些抗体部分使用本领域已知的技术获得,且筛选所述部分从而以与完整抗体相同的方式使用。

[0535] 如本文所用,对特定多肽或特定多肽上的表位“特异性结合”或具有“特异的”的抗体是指下述抗体,其结合特定多肽或特定多肽上的表位,而基本不结合任何其它多肽或多肽表位。例如,当称生物分子(如蛋白质、核酸、抗体等)“特异性结合”标靶时,如在指定条件下所测定(如在抗体情况下免疫测试条件),此生物分子结合其标靶分子,且不以显著量结合包括标靶的异质分子群中的其它分子。抗体和其标靶之间的结合反应确定异质分子群中靶的存在。例如,“特异结合”或“特异性结合”是指抗体或其结合片段结合艰难梭菌的野生型和/或突变型毒素的能力,此亲和力是其对非特异性抗原的亲和力的至少两倍。

[0536] 在示例性实施方式中,抗体为嵌合抗体。嵌合抗体可通过本领域已知的重组DNA技术制备。例如,编码鼠(或其它物种)单克隆分子的Fc恒定区的基因可通过限制性酶消化以去除编码鼠Fc的区域,并替换编码人Fc恒定区的基因的等价部分。嵌合抗体也可通过重组DNA技术产生,其中编码鼠可变区的DNA可与编码人恒定区的DNA连接。

[0537] 在另一示例性实施方式中,抗体或其结合片段通过本领域已知方法人源化。例如当获得鼠抗体时,抗体的CDR可替换为人CDR的至少一部分。人源化抗体也可通过将不直接参与抗原结合的鼠Fv可变区的序列替换为来自人Fv可变区的等价序列来产生。用于产生人源化抗体的常规方法是本领域已知的。

[0538] 例如,针对艰难梭菌TcdA或艰难梭菌TcdB的单克隆抗体也可通过标准技术产生,例如杂交瘤技术(参见如Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256:495-497)。简言之,永生细胞系与来自本文所述的艰难梭菌TcdA、艰难梭菌TcdB或突变型艰难梭菌毒素免疫的哺乳动物的淋巴细胞融合,且筛选所得杂交瘤细胞的培养物上清液以鉴定产生结合艰难梭菌TcdA或艰难梭菌TcdB的单克隆抗体的杂交瘤。典型地,永生细胞系源自与淋巴细胞相同的哺乳动物物种。产生本发明单克隆抗体的杂交瘤细胞使用诸如ELISA的测试,通过筛选用于结合艰难梭菌TcdA或艰难梭菌TcdB的抗体的杂交瘤培养物上清液来检测。人杂交瘤可以类似方式制备。

[0539] 作为通过免疫和选择制备抗体的另一种方法,本发明的抗体也可通过使用本文所述的艰难梭菌TcdA、艰难梭菌TcdB或突变型艰难梭菌毒素筛选重组的组合免疫球蛋白库来鉴定。重组抗体库可为例如scFv库或Fab库。而且,本文所述的本发明的抗体可用在竞争性

结合研究中以鉴定其它抗TcdA或抗TcdB抗体及其结合片段。例如,其它抗TcdA或抗TcdB抗体及其结合片段可通过筛选人抗体库和鉴定此库内在竞争性结合测试中与本文所述的本发明的抗体竞争的分子来鉴定。

[0540] 此外,本发明涵盖的抗体包括可通过使用本领域已知的噬菌体展示方法产生的重组抗体。在噬菌体展示方法中,可使用噬菌体来展示从储库(repertoire)或抗体库(如人或鼠)表达的抗原结合结构域。表达结合本文所述免疫原(如突变型艰难梭菌毒素)的抗原结合结构域的噬菌体可通过抗原,如使用标记的抗原来选择或鉴定。

[0541] 其中具体氨基酸已被取代、缺失或添加的抗体和其结合片段也包含在本发明的范围内。特别地,优选的抗体在框架区具有氨基酸取代,如以改进与抗原的结合。例如,免疫球蛋白链的所选的少量受体框架残基可被对应的供体氨基酸所取代。取代的优选位置包括与CDR相邻的氨基酸残基,或能够与CDR相互作用的氨基酸残基。从供体选择氨基酸的标准描述在美国专利5,585,089(如12-16栏)。受体框架可为成熟人抗体框架序列或共有序列。

[0542] 如本文所用,“中和抗体或其结合片段”是指下述各抗体或其结合片段,其结合哺乳动物和/或细胞培养物中的病原体(如艰难梭菌TcdA或TcdB),且与在缺乏中和抗体或其结合片段的相同条件下的病原体相比,降低病原体感染性和/或活性(如降低细胞毒性)。在一个实施方式中,与在缺乏中和抗体或其结合片段的相同条件下的病原体的生物活性相比,中和抗体或其结合片段能够中和病原体的生物活性的至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更高。

[0543] 如本文所用,术语“抗毒素抗体或其结合片段”是指结合各艰难梭菌毒素(如艰难梭菌毒素A或毒素B)的抗体或其结合片段。例如,抗毒素A抗体或其结合片段是指结合TcdA的抗体或其结合片段。

[0544] 本文所述的抗体或其结合片段可在任何野生型和/或转基因的哺乳动物,包括例如小鼠、人、兔和羊中产生。

[0545] 当上述免疫原性组合物是之前已被施用给群体用于如接种的免疫原性组合物时,对象中产生的抗体应答可用于中和来自相同菌株和来自不刺激抗体产生的菌株中的毒素。参见例如实施例37,其显示涉及来自630菌株和各种野生型艰难梭菌株的毒素之间的,由免疫原性组合物产生的交叉反应性的研究。

[0546] 一方面,本发明涉及特异于艰难梭菌TcdA的抗体或其结合片段。特异性结合TcdA的单克隆抗体包括A65-33、A60-22、A80-29和/或优选A3-25。

[0547] 一方面,本发明涉及特异于来自任何野生型艰难梭菌株(如上述那些菌株)的TcdA,如特异于SEQ ID NO:1的抗体或其结合片段。另一方面,本发明涉及特异于上述免疫原性组合物的抗体或其结合片段。例如,在一个实施方式中,抗体或其结合片段特异于包括SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7的免疫原性组合物。在另一实施方式中,抗体或其结合片段特异于包括SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7的免疫原性组合物,其中SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7的至少一个氨基酸通过甲醛、EDC、NHS或EDC和NHS的组合交联。在另一实施方式中,抗体或其结合片段特异于包括SEQ ID NO:84或SEQ ID NO:83的免疫原性组合物。

[0548] 下述抗体或其结合片段也可以结合TcdA,所述抗体或其结合片段具有的可变重链和可变轻链区与A65-33、A60-22、A80-29和/或优选A3-25的可变重链和可变轻链区具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约98%、更优选约99%或最优选约

100% 相同性。

[0549] 在一个实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括下述可变重链区,所述可变重链区包括与SEQ ID NO:37所示的A3-25的可变重链区氨基酸序列具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列。

[0550] 在一个实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括下述可变轻链区,所述可变轻链区包括与SEQ ID NO:36所示的A3-25的可变轻链区氨基酸序列具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列。

[0551] 在另一方面,抗体或其结合片段包括下述可变重链区和可变轻链区,所述可变重链区包括与SEQ ID NO:37所示的可变重链区氨基酸序列具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列,所述可变轻链区包括与SEQ ID NO:36所示的可变轻链区氨基酸序列具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列。

[0552] 在另一实施方式中,具有A65-33、A60-22、A80-29和/或优选A3-25的可变重链和可变轻链的互补决定区(CDR)的抗体或其结合片段也可结合TcdA。A3-25的可变重链区的CDR如下表4所示。

表 4: 可变重链 CDR 的氨基酸序列					
	克隆	链	CDR	氨基酸序列	SEQ ID NO:
[0553]	A3-25	重链	CDR1	GFTFTNYWMN	41
[0554]			CDR2	EIRLKSHNYATHFAESVKG	42
			CDR3	DYYGNPAFVY	43

[0555] A3-25的可变轻链区的CDR如下表5所示

表 5: 可变轻链 CDR 的氨基酸序列					
	克隆	链	CDR	氨基酸序列	SEQ ID NO:
[0556]	A3-25	轻链	CDR1	RSSQSLIHSNGNTYLH	38
			CDR2	KVSNRFS	39
			CDR3	SQTTYFPYT	40

[0557] 在一个实施方式中,抗体或其结合片段包括SEQ ID NO:41(CDR H1)、42(CDR H2)和43(CDR H3)所示的重链互补决定区(CDR)的氨基酸序列,和/或SEQ ID NO:38(CDR L1)、39(CDR L2)和40(CDR L3)所示的轻链CDR的氨基酸序列。

[0558] 在一个示例性实施方式中,特异于艰难梭菌毒素A的抗体或其结合片段特异性结合TcdA的N末端区域内的表位,如根据SEQ ID NO:1编号的TcdA的1-1256氨基酸之间的表位。

[0559] 在优选实施方式中,特异于艰难梭菌毒素A的抗体或其结合片段特异性结合毒素A的C末端区域内的表位,如根据SEQ ID NO:1编号的TcdA的1832至2710氨基酸之间的表位。实施例包括A3-25、A65-33、A60-22、A80-29。

[0560] 在另一实施方式中,特异于艰难梭菌毒素A的抗体或其结合片段特异性结合艰难

梭菌毒素A的“易位”区内的表位，例如优选包括如根据SEQ ID NO:1编号的TcdA的956-1128残基的表位，如TcdA的659-1832氨基酸之间的表位。

[0561] 另一方面，本发明涉及特异于艰难梭菌TcdB的抗体或其结合片段。例如，抗体或其结合片段可特异于来自任何野生型艰难梭菌株(如上述那些菌株)的TcdB，如特异于SEQ ID NO:2。另一方面，本发明涉及特异于上述免疫原性组合物的抗体或其结合片段。例如，在一个实施方式中，抗体或其结合片段特异于包括SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的免疫原性组合物。

[0562] 在另一实施方式中，抗体或其结合片段特异于包括SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的免疫原性组合物，其中SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的至少一个氨基酸通过甲醛、EDC、NHS或EDC和NHS的组合交联。在另一实施方式中，抗体或其结合片段特异于包括SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:85的免疫原性组合物。

[0563] 特异性结合TcdB的单克隆抗体包括本文所述B2-31、B5-40、B70-2、B6-30、B9-30、B59-3、B60-2、B56-6和/或优选B8-26克隆产生的抗体。

[0564] 也可以结合TcdB的抗体或其结合片段包括下述那些，所述抗体或其结合片段具有的可变重链和可变轻链区与B2-31、B5-40、B70-2、B6-30、B9-30、B59-3、B60-2、B56-6、优选B8-26、B59-3和/或B9-30的可变重链和可变轻链区具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约98%、更优选约99%或最优选约100%相同性。

[0565] 在一个实施方式中，抗体或其抗原结合片段包括下述可变重链区，所述可变重链区包括与SEQ ID NO:49所示的A3-25的可变重链区氨基酸序列具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列。

[0566] 在一个实施方式中，抗体或其抗原结合片段包括下述可变重链区，所述可变重链区包括与SEQ ID NO:60所示的A3-25的可变重链区氨基酸序列具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列。

[0567] 在一个实施方式中，抗体或其抗原结合片段包括下述可变重链区，所述可变重链区包括与SEQ ID NO:71所示的A3-25的可变重链区氨基酸序列具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列。

[0568] 在一个实施方式中，抗体或其抗原结合片段包括下述可变轻链区，所述可变轻链区包括与SEQ ID NO:55所示的A3-25的可变轻链区氨基酸序列具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列。

[0569] 在一个实施方式中，抗体或其抗原结合片段包括下述可变轻链区，所述可变轻链区包括与SEQ ID NO:66所示的A3-25的可变轻链区氨基酸序列具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列。

[0570] 在一个实施方式中，抗体或其抗原结合片段包括下述可变轻链区，所述可变轻链区包括与SEQ ID NO:77所示的A3-25的可变轻链区氨基酸序列具有至少约60%、65%、

70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列。

[0571] 艰难梭菌TcdB的中和抗体(B8-26mAb)的可变重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:49所示。参见表25-a。

表 25-a: 可变重链的氨基酸序列			
克隆	区域	氨基酸序列	SEQ ID NO:
[0572]	B8-26	信号肽	MGWSCIILFLVATATGVHS
		可变重链	QVQLQQPGAEVLVCPGA PVKLSCKAS GYSFTSYWMN WVKQRPGRGRGLEWIG RIDPSNSEIYYNQKF KDKATLTVDKSSTAYIQLSSL TSEDSAVYYCAS GHYGSIFAY WGQGTTLTVSS
		CDR1	GYSFTSYWMN
		CDR2	RIDPSNSEIYYNQKF
		CDR3	GHYGSIFAY
		恒定区(IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK
			50
			49
			51

[0573] 艰难梭菌TcdB的中和抗体(B8-26mAb)的可变轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:55所示。参见表25-b。

表 25-b: 可变轻链(κ)的氨基酸序列			
克隆	区域	氨基酸序列	SEQ ID NO:
[0574]	B8-26	信号肽	MRFQVQVLGLLLLWISGAQCD
		可变轻链	VQITQSPSYLAASPGETITINC RASKSISKYLA WYQEKGKTNKL SGSTLQS GIPS RFSGSRSGTDFTLISSLEPEDSAMYYC QQHNEYPLT FGAGTKLELKRAAADAPTWSIFPPSSEEFQ
		CDR1	RASKSISKYLA
		CDR2	SGSTLQS
		CDR3	QQHNEYPLT
			56
			55
			57
			58

[0575] 在一个实施方式中,抗体或其结合片段包括SEQ ID NO:51(CDR H1)、52(CDR H2)和53(CDR H3)所示的重链CDR的氨基酸序列,和/或SEQ ID NO:57(CDR L1)、58(CDR L2)和59(CDR L3)所示的轻链CDR的氨基酸序列。

[0576] 艰难梭菌TcdB的中和抗体(B59-3mAb)的可变重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:60所示。参见表26-a。

表 26-a: 可变重链的氨基酸序列			
克隆	区域	氨基酸序列	SEQ ID NO:
[0577]	信号肽	MGWSYIILFLVATATDVHS	61
	可变重链	QVQLQQPGAEVVKPGAPVKLS CKAS GYPFTNYWMN WVKQRPGRGLIWIG RIDPSNSEIYYNQKF KDKATLTVDKSSTAYIQLSSLTSEDSAVYY CAS GHYGSIFAY WGQGTTLVSS	60
	CDR1	GYTFTSYWMH	62
	CDR2	VINPSNGRSTYSEKF	63
	CDR3	AYYSTSYYAMDY	64
	恒定区(IgG1)	AKTPPSVYPLAPGNSK	65

[0578] 艰难梭菌TcdB的中和抗体(B59-3mAb)的可变轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:66所示。参见表26-b。

表 26-b: 可变轻链(κ)的氨基酸序列			
克隆	区域	氨基酸序列	SEQ ID NO:
[0579]	信号肽	MKLPVRLLVLMFWIPASSSD	67
	可变轻链	VLMTQSPLSLPVSLGDQASIS C RSSQNIVHSNGNTYLE WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFS GVPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHFPFT FGTGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEEFQ	66
	CDR1	RSSQNIVHSNGNTYLE	68
	CDR2	KVSNRFS	69
	CDR3	FQGSHFPFT	70

[0580] 在一个实施方式中,抗体或其结合片段包括SEQ ID NO:62(CDR H1)、63(CDR H2)和64(CDR H3)所示的重链CDR的氨基酸序列,和/或SEQ ID NO:68(CDR L1)、69(CDR L2)和70(CDR L3)所示的轻链CDR的氨基酸序列。

[0581] 艰难梭菌TcdB的中和抗体(B9-30mAb)的可变重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:71所示。参见表27-a。

表 27-a: 可变重链的氨基酸序列			
克隆	区域	氨基酸序列	SEQ ID NO:
[0582]	信号肽	MGWSCIILFLVATATGVHS	72
	可变重链	QVQLQQPGAEVVKPGAPVKLS CKAS GYPFTNYWMN WVKQRPGRGLIWIG RIDPSNSEIYYNQKF KDKATLTVDKSSTAYIQLSSLTSEDSAVYY CAS GHYGSIFAY WGQGTTLVSS	71
	CDR1	GYPFTNYWMN	73
	CDR2	RIDPSNSEIYYNQKF	74
	CDR3	GHYGSIFAY	75
	恒定区(IgG1)	AKTPPSVYPLAPGNSK	76

[0583] 艰难梭菌TcdB的中和抗体(B9-30mAb)的可变轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:77所示。参见表27-b。

表 27-b: 可变轻链(κ)的氨基酸序列			
克隆	区域	氨基酸序列	SEQ ID NO:
B9-30	信号肽	MRFQVQVLGLLLLWISGAQCD	78
	可变轻链	VQITQSPSYLAASPGETITINC RASKSISKYLA WYQEKGKTNKLLIY SGSTLQS GIPS RFSGSRSGTDFTLISSLEPEDSAMYYC QQHNEYPLT FGAGTKLELKADAAPTVSIFPPSSEEFQ	77
	CDR1	RASKSISKYLA	79
	CDR2	SGSTLQS	80
	CDR3	QQHNEYPLT	81

[0584] [0585] 在一个实施方式中,抗体或其结合片段包括SEQ ID NO:73(CDR H1)、74(CDR H2)和75(CDR H3)所示的重链CDR的氨基酸序列,和/或SEQ ID NO:79(CDR L1)、80(CDR L2)和81(CDR L3)所示的轻链CDR的氨基酸序列。

[0586] 一方面,本发明涉及特异于来自任何艰难梭菌株(如上述那些菌株)的野生型艰难梭菌TcdB,如特异于SEQ ID NO:2的抗体或其结合片段。另一方面,本发明涉及特异于上述免疫原性组合物的抗体或其结合片段。例如,在一个实施方式中,抗体或其结合片段特异于包括SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的免疫原性组合物。在另一实施方式中,抗体或其结合片段特异于包括SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的免疫原性组合物,其中SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的至少一个氨基酸通过甲醛、EDC、NHS或EDC和NHS的组合交联。

[0587] 下述抗体或其结合片段也可以结合TcdB,所述抗体或其结合片段具有的可变重链和可变轻链区与B2-31、B5-40、B70-2、B6-30、B9-30、B59-3、B60-2、B56-6、和/或优选B8-26的可变重链和可变轻链区具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约98%、更优选约99%或最优选约100%相同性。

[0588] 在一个实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括下述可变重链区,所述可变重链区包括与B8-26的可变重链区氨基酸序列(SEQ ID NO:49)具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列。

[0589] 在另一实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括下述可变轻链区,所述可变轻链区包括与B8-26的可变轻链区氨基酸序列(SEQ ID NO:55)具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列。

[0590] 在另一方面,抗体或其结合片段包括下述可变重链区和可变轻链区,所述可变重链区包括与B8-26的可变重链区氨基酸序列(SEQ ID NO:49)具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列,所述可变轻链区包括与B8-26的可变轻链区氨基酸序列(SEQ ID NO:55)具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的氨基酸序列。

列。

[0591] 在另一实施方式中,具有B2-31、B5-40、B70-2、B6-30、B9-30、B59-3、B60-2、B56-6和/或优选B8-26的可变重链和/或可变轻链的CDR的抗体或其结合片段也可结合TcdB。

[0592] 在一个实施方式中,抗体或其结合片段包括B8-26的重链互补决定区(CDR)的氨基酸序列和/或B8-26的轻链CDR的氨基酸序列。

[0593] 在优选实施方式中,特异于艰难梭菌毒素B的抗体或其结合片段特异性结合毒素B的N末端区域内的表位,如根据SEQ ID NO:2编号的TcdB的1-1256氨基酸之间的表位。实施例包括B2-31、B5-40、B8-26、B70-2、B6-30和B9-30。

[0594] 在示例性实施方式中,特异于艰难梭菌毒素B的抗体或其结合片段特异性结合TcdB的C末端区域内的表位,如根据SEQ ID NO:2编号的TcdB的1832至2710氨基酸之间的表位。

[0595] 在另一实施方式中,特异于艰难梭菌毒素B的抗体或其结合片段特异性结合艰难梭菌毒素B的“易位”区内的表位,例如优选包括如根据SEQ ID NO:2编号的TcdB的956-1128残基的表位,如TcdB的659-1832氨基酸之间的表位。实施例包括B59-3、B60-2和B56-6。

[0596] 抗体的组合

[0597] 抗毒素抗体或其结合片段可与其它抗艰难梭菌毒素抗体(如其它单克隆抗体、多克隆 γ 球蛋白)或其结合片段组合施用。可使用的组合包括抗毒素A抗体或其结合片段和抗毒素B抗体或其结合片段。

[0598] 在另一实施方式中,组合包括抗毒素A抗体或其结合片段和另一种抗毒素A抗体或其结合片段。优选地,组合包括中和抗毒素A单克隆抗体或其结合片段和另一种中和抗毒素A单克隆抗体或其结合片段。惊奇地,发明人发现此组合导致中和毒素A细胞毒性的协同效果。例如,组合包括至少两种以下中和抗毒素A单克隆抗体的组合:A3-25、A65-33、A60-22和A80-29。更优选地,组合包括A3-25抗体和至少一种以下中和抗毒素A单克隆抗体:A65-33、A60-22和A80-29。最优选地,组合包括全部四种抗体:A3-25、A65-33、A60-22和A80-29。

[0599] 在另一实施方式中,组合包括抗毒素B抗体或其结合片段和另一种抗毒素B抗体或其结合片段。优选地,组合包括中和抗毒素B单克隆抗体或其结合片段和另一种中和抗毒素B单克隆抗体或其结合片段。惊奇地,发明人发现此组合导致中和毒素B细胞毒性的协同效果。更优选地,组合包括至少两种以下中和抗毒素B单克隆抗体的组合:B8-26、B9-30和B59-3。最优选地,组合包括全部三种抗体:B8-26、B9-30和B59-3。

[0600] 在另一实施方式中,组合包括抗毒素B抗体或其结合片段和另一种抗毒素B抗体或其结合片段。如前所述,发明人发现至少两种中和单克隆抗体的组合对毒素A和毒素B的各自中和可显示出预想不到的协同作用。

[0601] 在另一实施方式中,本发明的试剂可配制为混合物,或可使用本领域已知的技术进行化学或遗传学地交联以得到共价连接的抗体(或共价连接的抗体片段),其具有同时抗毒素A和抗毒素B的结合性质。组合配制可通过确定单独试剂或其与另一种试剂组合的诸如亲和力、亲合力或生物效力等参数中的一种或多种来指导。

[0602] 此组合治疗在它们的治疗活性上,例如在艰难梭菌相关疾病或病症的抑制、预防(如复发的预防)和/或治疗上,是优选加成和/或协同的。施用此组合治疗可降低实现所期望效果所需的治疗剂(如抗体或抗体片段混合物,或与双特异性抗体或抗体片段交联或遗

传融合)的剂量。

[0603] 应理解任何本发明的组合物,例如抗毒素A和/或抗毒素B抗体或其结合片段为了治疗效果可以不同比例或含量组合。例如,抗毒素A和抗毒素B抗体或其各个结合片段可以0.1:10至10:0.1(A:B)范围的比例存在于组合物中。在另一实施方式中,抗毒素A和抗毒素B抗体或其各个结合片段可以0.1:10至10:0.1(B:A)范围的比例存在于组合物中。

[0604] 另一方面,本发明制备抗艰难梭菌TcdA的中和抗体的方法。方法包括将上述免疫原性组合物施用至哺乳动物,和从哺乳动物回收抗体。在优选实施方式中,免疫原性组合物包括具有SEQ ID NO:4的突变型艰难梭菌TcdA,其中突变型艰难梭菌TcdA的至少一个氨基酸被化学交联,优选通过甲醛或1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺被化学交联。可制备的抗TcdA的示例性中和抗体包括A65-33、A60-22、A80-29和/或A3-25。

[0605] 另一方面,本发明制备抗艰难梭菌TcdB的中和抗体的方法。方法包括将上述免疫原性组合物施用至哺乳动物,和从哺乳动物回收抗体。在优选实施方式中,免疫原性组合物包括具有SEQ ID NO:6的突变型艰难梭菌TcdB,其中突变型艰难梭菌TcdB的至少一个氨基酸被化学交联,优选通过甲醛或1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺被化学交联。可制备的抗TcdB的示例性中和抗体包括B2-31、B5-40、B70-2、B6-30、B9-30、B59-3、B60-2、B56-6和/或B8-26。

[0606] 配方

[0607] 本发明的组合物(如本文所述的包括突变型艰难梭菌毒素、免疫原性组合物、抗体和/或其抗体结合片段的组合物)可为各种形式。这些形式包括例如半固体和固体剂型、栓剂、液体形式例如液体溶液(如可注射和可输注的溶液)、分散剂或混悬剂、脂质体、和/或干燥形式,如冻干粉形式、冻干形式、喷雾干燥形式和/或泡沫干燥形式。对于栓剂,粘结剂和载体包括例如聚(亚烷基)二醇或甘油三酯;此栓剂可从包含本发明组合物的混合物形成。在示例性实施方式中,组合物为适用于注射前的液体载体中溶液或混悬液的形式。在另一示例性实施方式中,组合物被乳化或封装在脂质体或微粒如聚交酯、聚乙交酯或共聚物中。

[0608] 在优选实施方式中,组合物被冻干且在使用前即时重构。

[0609] 一方面,本发明涉及药物组合物,其包含与药用载体一起配制的本文所述任一组合物(如本文所述的包括突变型艰难梭菌毒素、免疫原性组合物、抗体和/或其抗体结合片段的组合物)。“药用载体”包括生理学适用的溶剂、分散介质、稳定剂、稀释剂和缓冲液。

[0610] 示例性稳定剂包括碳水化合物如山梨醇、甘露醇、淀粉、右旋糖苷、蔗糖、海藻糖、乳糖和/或葡萄糖;惰性蛋白质如白蛋白和/或酪蛋白;和/或其它大的、缓慢代谢的大分子如多糖如壳聚糖、聚乳酸、聚乙醇酸和共聚物(如胶乳官能化的SEPHAROSETM琼脂糖、琼脂糖、纤维素等)、氨基酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和脂质聚集体(如油滴或脂质体)。此外,这些载体可起到免疫刺激剂(即佐剂)的功能。

[0611] 优选地,组合物包括海藻糖。海藻糖的优选含量(wt %)包括最低约1%、2%、3%或4%至最高约10%、9%、8%、7%、6%或5%。任何最低值可与任何最大值组合以限定适合的范围。在一个实施方式中,组合物包括约3%-6%海藻糖,最优选4.5%海藻糖,例如每0.5mL剂量。

[0612] 适合的稀释剂的实施例包括蒸馏水、盐水、生理学的磷酸盐缓冲盐水、甘油、醇(如乙醇)、Ringer溶液、右旋糖溶液、Hank平衡盐溶液和/或冻干赋形剂。

[0613] 示例性缓冲液包括磷酸盐(如磷酸钾、磷酸钠)；乙酸盐(如乙酸钠)；琥珀酸盐(如琥珀酸钠)；甘氨酸；组氨酸；碳酸盐、Tris(三(羟甲基)氨基甲烷)和/或碳酸氢盐(如碳酸氢铵)缓冲液。优选地，组合物包括Tris缓冲液。Tris缓冲液的优选含量包括最低约1mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM至最高约100mM、50mM、20mM、19mM、18mM、17mM、16mM、15mM、14mM、13mM、12mM或11mM。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合范围。在一个实施方式中，组合物包括约8mM至12mM Tris缓冲液，最优选10mM Tris缓冲液，例如每0.5mL剂量。

[0614] 在另一优选实施方式中，组合物包括组氨酸缓冲液。组氨酸缓冲液的优选含量包括最低约1mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM至最高约100mM、50mM、20mM、19mM、18mM、17mM、16mM、15mM、14mM、13mM、12mM或11mM。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合范围。在一个实施方式中，组合物包括约8mM至12mM组氨酸缓冲液，最优选10mM组氨酸缓冲液，例如每0.5mL剂量。

[0615] 在另一优选实施方式中，组合物包括磷酸盐缓冲液。磷酸盐缓冲液的优选含量包括最低约1mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM至最高约100mM、50mM、20mM、19mM、18mM、17mM、16mM、15mM、14mM、13mM、12mM或11mM。任何最低值可与任何最高值组合以限定适合范围。在一个实施方式中，组合物包括约8mM至12mM磷酸盐缓冲液，最优选10mM磷酸盐缓冲液，例如每0.5mL剂量。

[0616] 通常选择缓冲液的pH以稳定所选的活性材料，且缓冲液的pH通过本领域已知方法是可确定的。优选地，缓冲液的pH为生理pH范围。因此，优选pH范围为约3至约8；更优选地为约6.0至约8.0；更优选地为约6.5至约7.5；且最优选地为约7.0至约7.2。

[0617] 在一些实施方式中，药物组合物可包括表面活性剂。任何表面活性剂是适合的，无论其是两性的、非离子型的、阳离子型的或阴离子型的。示例性表面活性剂包括聚氧化乙烯山梨聚糖酯表面活性剂(如TWEEN®)，如聚山梨醇酯20和/或聚山梨醇酯80；源自月桂醇、鲸蜡醇、硬脂醇和油醇的聚氧化乙烯脂肪醚(称为Brij表面活性剂)，如三乙二醇单月桂醚(Brij 30)；Triton X 100、或叔-辛基苯氧基聚乙氧基乙醇；和山梨聚糖酯(通常称为SPAN)，如山梨聚糖三油酸酯(Span 85)和山梨聚糖单月桂酸酯及其组合。优选的表面活性剂包括聚山梨酸酯80(聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯)。

[0618] 聚山梨醇酯80的优选含量(wt%)包括最低约0.001%、0.005%或0.01%至最高约0.010%、0.015%、0.025%或1.0%。任何最低值可与任何最大值组合以限定适合的范围。在一个实施方式中，组合物包括约0.005%-0.015%聚山梨醇酯80，最优选0.01%聚山梨醇酯80。

[0619] 在示例性实施方式中，免疫原性组合物包括海藻糖和磷酸盐80。在另一示例性实施方式中，免疫原性组合物包括Tris缓冲液和聚山梨醇酯80。在另一示例性实施方式中，免疫原性组合物包括组氨酸缓冲液和聚山梨醇酯80。在另一示例性实施方式中，免疫原性组合物包括磷酸盐缓冲液和聚山梨醇酯80。

[0620] 在一个示例性实施方式中，免疫原性组合物包括海藻糖、Tris缓冲液和聚山梨醇酯80。在另一示例性实施方式中，免疫原性组合物包括海藻糖、组氨酸缓冲液和聚山梨醇酯80。在另一示例性实施方式中，免疫原性组合物包括海藻糖、磷酸盐缓冲液和聚山梨醇酯80。

[0621] 本文所述的组合物可进一步包括石油、动物、植物或合成源的组分，例如花生油、

豆油和/或矿物油。实施例包括二醇如丙二醇或聚乙二醇。

[0622] 在一些实施方式中,药物组合物进一步包括甲醛。例如,在优选实施方式中,进一步包括甲醛的药物组合物具有免疫原性组合物,其中免疫原性组合物的突变型艰难梭菌毒素已与包括甲醛的化学交联剂接触。药物组合物中存在的甲醛的量可从最低约0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.010%、0.013%或0.015%变化至最高约0.020%、0.019%、0.018%、0.017%、0.016%、0.015%、0.014%、0.013%、0.012%、0.011%或0.010%。任何最低值可与任何最大值组合以限定适合的范围。在一个实施方式中,药物组合物包括约0.010%甲醛。

[0623] 在一些可选实施方式中,本文所述的药物组合物不包括甲醛。例如,在优选实施方式中,不包括甲醛的药物组合物具有免疫原性组合物,其中突变型艰难梭菌毒素的至少一个氨基酸被包括EDC的试剂化学交联。更优选地,在此实施方式中,突变型艰难梭菌毒素未与包括甲醛的化学交联剂接触。作为另一示例性实施方式,冻干形式的药物组合物不包括甲醛。

[0624] 在另一实施方式中,本文所述组合物可包括下述佐剂。优选的佐剂增强对免疫原的固有免疫应答,而不引起可影响免疫应答性质类型的免疫原的构象变化。

[0625] 示例性佐剂包括3脱-0-酰化的单磷酰基脂A (MPLTM) (参见GB2220211 (GSK)) ;氢氧化铝凝胶如AlhydrogelTM (Brenntag Biosector, Denmark) ;铝盐(如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝),其可与免疫刺激剂如MPL或3-DMP、QS-21、聚合的或单体氨基酸如聚谷氨酸或聚赖氨酸一起使用或不起使用。

[0626] 另一示例性佐剂为免疫刺激寡核苷酸,如CpG寡核苷酸(参见如W01998/040100、W02010/067262),或皂昔和免疫刺激寡核苷酸,如CpG寡核苷酸(参见如W0 00/062800)。在优选实施方式中,佐剂为CpG寡核苷酸,最优选CpG寡脱氧核苷酸(CpG ODN)。优选的CpG ODN优先激活B细胞的B类。在本发明的各方面中,CpG ODN具有核酸序列5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*T*G*C*T*T*T 3' (SEQ ID NO:48),其中*是指硫代磷酸酯键。此序列的CpG ODN被称为CpG 24555,描述于W02010/067262。在优选实施方式中,CpG 24555与氢氧化铝盐如Alhydrogel一起使用。

[0627] 另一类示例性佐剂包括皂昔佐剂,如StimulonTM(QS-21,其为三萜糖昔或皂昔,Aquila, Framingham, Mass.)或由其产生的颗粒如ISCOM(免疫刺激复合物)和ISCOMATRIX[®]佐剂。因此,本发明的组合物可以ISCOM、包含CTB的ISCOM、脂质体的形式递送,或封装在诸如丙烯酸酯或聚(DL-丙交酯-共聚-糖昔)的化合物中,以形成尺寸适于吸附的微球。通常,术语“ISCOM”是指在糖昔如三萜系化合物皂昔(特别为Quill A)和包含疏水区的抗原之间形成的免疫原性复合物。在优选实施方式中,佐剂为ISCOMATRIX佐剂。

[0628] 其它示例性佐剂包括RC-529、GM-CSF以及完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)。

[0629] 另一类示例性佐剂为糖脂类似物,包括N-糖基酰胺、N-糖基脲和N-糖基氨基甲酸酯,上述每个在糖残基中被氨基酸取代。

[0630] 可选地,药物组合物包括两种或更多种不同佐剂。佐剂的优选组合包括含例如至少两种以下佐剂的任意佐剂组合:明矾、MPL、QS-21、ISCOMATRIX、CpG和Alhydrogel。佐剂的示例性组合包括CpG和Alhydrogel的组合。

[0631] 或者,在一个实施方式中,将组合物在缺乏佐剂的情况下施用至哺乳动物。

[0632] 本文所述的组合物可以任何途径施用以用于预防和/或治疗应用,例如经肠胃外、局部、静脉内、粘膜、口腔、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、鼻内、肌肉内、皮内、灌输、直肠和/或透皮途径。在优选实施方式中,组合物的施用途径为经肠胃外,更优选经肌肉内施用。典型的经肌肉内施用在手臂或腿肌肉中进行。

[0633] 本文所述的组合物可与至少部分有效预防和/或治疗艰难梭菌感染的疗法组合施用。例如,本发明的组合物可在生物疗法、益生菌治疗、stool implant、免疫疗法(如静脉内免疫球蛋白)、和/或用于艰难梭菌相关疾病(CDAD)的抗生素治疗如甲硝咗唑和/或万古霉素的认可的护理标准之前、同时或之后施用。

[0634] 涉及毒素A和毒素B的本发明的组合物可以任何组合施用至哺乳动物。例如,包括突变型艰难梭菌TcdA的免疫原性组合物可在施用包括突变型艰难梭菌TcdB的免疫原性组合物之前、同时或之后施用至哺乳动物。相反,包括突变型艰难梭菌TcdB的免疫原性组合物可在施用包括突变型艰难梭菌TcdA的免疫原性组合物之前、同时或之后施用至哺乳动物。

[0635] 在另一实施方式中,包括抗毒素A抗体或其结合片段的组合物可在施用包括抗毒素B抗体或其结合片段的组合物之前、同时或之后施用至哺乳动物。相反,包括抗毒素B抗体或其结合片段的组合物可在施用包括抗毒素A抗体或其结合片段的组合物之前、同时或之后施用至哺乳动物。

[0636] 在其它实施方式中,本发明的组合物可在施用药用载体之前、同时或之后施用至哺乳动物。例如,佐剂可在施用包括突变型艰难梭菌毒素的组合物之前、同时或之后施用。因此,本发明的组合物和药用载体可包装在同一瓶中,或它们可包装在单独瓶中并在用前混合。组合物可配制用于单剂施用和/或多剂施用。

[0637] 保护和/或预防哺乳动物中艰难梭菌感染的方法

[0638] 一方面,本发明涉及诱导哺乳动物中对艰难梭菌毒素的免疫应答的方法。方法包括向哺乳动物施用有效量的本文所述的组合物。例如,方法可包括施用在哺乳动物对各艰难梭菌毒素产生免疫应答的有效量。

[0639] 在示例性实施方式中,本发明涉及诱导哺乳动物中对艰难梭菌TcdA的免疫应答的方法。方法包括向哺乳动物施用有效量的包括突变型艰难梭菌TcdA的免疫原性组合物。在其它示例性实施方式中,本发明涉及诱导哺乳动物中对艰难梭菌TcdB的免疫应答的方法。方法包括向哺乳动物施用有效量的包括突变型艰难梭菌TcdB的免疫原性组合物。

[0640] 在其它实施方式中,方法包括向哺乳动物施用有效量的包括突变型艰难梭菌TcdA的免疫原性组合物和有效量的包括突变型艰难梭菌TcdB的免疫原性组合物。在其它方面,本文所述的组合物可用于在哺乳动物中治疗、预防、降低下述风险、降低下述的严重性、降低下述的出现和/或延迟下述的开始:艰难梭菌感染、与艰难梭菌相关疾病、综合病征、状况、症状和/或其并发症(与未被施用组合物的哺乳动物相比)。方法包括向哺乳动物施用有效量的组合物。

[0641] 基于感染的严重性,认识到艰难梭菌感染所引起的三种临床综合病征。最严重形式为假膜性结肠炎(PMC),其特征为严重腹泻、腹部疼痛、疾病的全身病征和结肠的独特内窥镜表现。

[0642] 抗生素相关的结肠炎(AAC)也具有严重腹泻、腹部疼痛和压痛、全身病征(如发热)

和白细胞增多的特征。AAC的肠损伤不如PMC的肠损伤严重,PMC中结肠的特有内窥镜表现缺乏,且死亡率低。

[0643] 最后,抗生素相关的腹泻(AAD,也被称为与艰难梭菌相关的腹泻(CDAD))是相对轻度的综合病征,且特征为轻度至中度腹泻、缺乏大的肠炎症(特征为如腹部疼痛和压痛)和感染的全身病征(如发热)。

[0644] 这三种独特综合病征通常以增加的频率的顺序出现。也就是说,PMC通常出现的频率少于AAC,且AAD通常是艰难梭菌疾病最常见的临床表现。

[0645] 艰难梭菌感染的常见并发症为反复的或复发的疾病,其占从艰难梭菌疾病康复的全部对象的多至20%。复发的临床特征可为AAD、AAC或PMC。复发一次的患者可能再次复发。

[0646] 如本文所用,艰难梭菌感染的状况包括例如轻度的、轻度至中度的、中度的和严重的艰难梭菌感染。艰难梭菌感染的状况可根据感染症状的存在和/或严重性变化。

[0647] 艰难梭菌感染的症状可包括生理、生物化学、组织学和/或行为的症状,例如腹泻;结肠炎;结肠炎,伴有惊厥、发热、大便中有白细胞和结肠活组织检查炎症;假膜性结肠炎;血白蛋白减少;全身水肿;白细胞增多;败血症;腹部疼痛;无症状携带;和/或在感染发展期间存在的并发症和中间的病理表型,及它们的组合等。因此,与未被施用组合物的哺乳动物相比,例如施用有效量的本文所述的组合物可例如治疗、预防、降低下述风险、降低下述的严重性、降低下述的出现和/或延迟下述的开始:腹泻;腹部疼痛、惊厥、发热、结肠活组织检查炎症、血白蛋白减少、全身水肿、白细胞增多、败血症和/或无症状携带等。

[0648] 艰难梭菌感染的风险因素包括例如目前或不久将来使用抗微生物药(涵盖具有针对厌氧细菌的抗菌谱和/或活性的任何抗微生物药,包括例如引起破坏正常结肠微生物群的抗生素,如氯林可霉素、头孢菌素、甲硝哒唑、万古霉素、氟喹诺酮(包括左氧氟沙星、莫西沙星、加替沙星和环丙沙星),利奈唑胺等);目前或不久将来停用的处方甲硝哒唑或万古霉素;目前或不久将来允许进入卫生保健机构(如医院、慢性护理机构等)和卫生保健工作者;目前或不久将来使用质子泵抑制剂、H2拮抗药和/或氨甲蝶呤,或其组合治疗;胃肠道疾病如炎性肠病的存在或风险;过去、目前或不久将来在哺乳动物上的胃肠道手术或胃肠道过程;过去或目前复发的艰难梭菌感染和/或CDAD,如已患有一次或多于一次的艰难梭菌感染和/或CDAD的患者;和年龄至少约65或更年老的人。

[0649] 在本文所述方法中,哺乳动物可为任何哺乳动物,例如小鼠、仓鼠、灵长类和人。在优选实施方式中,哺乳动物为人。根据本发明,人可包括已经表现出艰难梭菌感染、与艰难梭菌相关疾病、综合病征、状况、症状和/或其并发症的个体;目前正表现出艰难梭菌感染、与艰难梭菌相关疾病、综合病征、状况、症状和/或其并发症的个体;和具有艰难梭菌感染、与艰难梭菌相关疾病、综合病征、状况、症状和/或其并发症的风险的个体。

[0650] 已经显示出艰难梭菌感染的症状的个体的实施例包括已经显示出或正在显示出上述症状的个体;已经患有或正在患有艰难梭菌感染和/或与艰难梭菌相关的疾病(CDAD)的个体;和具有复发的艰难梭菌感染和/或CDAD的个体。

[0651] 具有艰难梭菌感染风险的患者的实施例包括具有计划抗微生物剂药使用风险或正在经历计划抗微生物剂药使用的个体;具有处方甲硝哒唑或万古霉素停用的风险或正在经历处方甲硝哒唑或万古霉素停用的个体;具有计划允许进入卫生保健机构(如医院、慢性护理机构等)的风险或正在经历计划允许进入卫生保健机构(如医院、慢性护理机构等)的

个体和卫生保健工作者；和/或具有计划使用质子泵抑制剂、H2拮抗药和/或氨甲蝶呤，或其组合治疗的风险或正在经历计划使用质子泵抑制剂、H2拮抗药和/或氨甲蝶呤，或其组合治疗的个体；已经患有或正在经历胃肠道疾病，如炎性肠病的个体；已经患有或正在经历胃肠道手术或胃肠道过程的个体；和已经患有或正在经历艰难梭菌感染和/或CDAD复发的个体，如已患有一次或多于一次的艰难梭菌感染和/或CDAD的患者；和年龄至少约65或更年老的人。此具有风险的患者可目前显示出或不显示出艰难梭菌感染的症状。

[0652] 在无症状患者中，预防和/或治疗可在任何年龄开始（如在约10、20或30岁）。在一个实施方式中，然而，不必需开始治疗，直到患者达到至少约45、55、65、75或85岁。例如，本文所述的组合物可施用至50-85岁年龄的无症状人中。

[0653] 在一个实施方式中，对艰难梭菌感染、与艰难梭菌相关疾病、综合病征、状况、症状和/或其并发症进行预防、降低风险、降低严重性、降低出现和/或延迟开始的方法包括向需要其的哺乳动物，具有艰难梭菌感染风险的哺乳动物和/或易受艰难梭菌感染的哺乳动物施用有效量的本文所述的组合物。有效量包括例如与未被施用组合物的哺乳动物相比，足以在哺乳动物中预防、降低下述风险、降低下述的严重性、降低下述的出现和/或延迟下述的开始：艰难梭菌感染、与艰难梭菌相关疾病、综合病征、状况、症状和/或其并发症的量。与未被施用组合物的哺乳动物相比，有效量的本文所述的组合物的施用可例如预防、降低下述风险、降低下述的严重性、降低下述的出现和/或延迟下述的开始：腹泻；腹部疼痛、惊厥、发热、结肠活组织检查炎症、血白蛋白减少、全身水肿、白细胞增多、败血症和/或无症状携带等。在优选实施方式中，方法包括将有效量的本文所述的免疫原性组合物施用至需要其的哺乳动物，具有艰难梭菌感染风险的哺乳动物和/或易受艰难梭菌感染的哺乳动物。

[0654] 在其它实施方式中，对艰难梭菌感染、与艰难梭菌相关疾病、综合病征、状况、症状和/或其并发症进行治疗、降低严重性和/或延迟开始的方法包括向疑似患有或正在患有艰难梭菌感染的哺乳动物施用有效量的本文所述的组合物。有效量包括例如与未被施用组合物的哺乳动物相比，足以在哺乳动物中治疗、降低下述的严重性和/或延迟下述的开始：艰难梭菌感染、与艰难梭菌相关疾病、综合病征、状况、症状和/或其并发症的量。

[0655] 施用有效量的组合物可改进对象中艰难梭菌感染的至少一种征候或症状，如下述的那些。与未被施用组合物的哺乳动物相比，施用有效量的本文所述的组合物可例如降低腹泻的严重性和/或降低腹泻的出现；降低下述的严重性和/或降低下述的出现：腹部疼痛、惊厥、发热、结肠活组织检查炎症、血白蛋白减少、全身水肿、白细胞增多、败血症和/或无症状携带等。可选地，在治疗开始前确定感染症状、征候和/或风险因素的存在。在优选实施方式中，方法包括将有效量的本文所述的抗体和/或其结合片段施用至疑似患有或正患有艰难梭菌感染的哺乳动物。

[0656] 因此，有效量的组合物是指足以在本发明方法中实现所需效果（如预防和/或治疗效果）的量。例如，用于施用的免疫原的量可从每次注射最低量约1 μ g、5 μ g、25 μ g、50 μ g、75 μ g、100 μ g、200 μ g、500 μ g或1mg变化至最高量约2mg、1mg、500 μ g、200 μ g。任何最低值可与任何最大值组合以限定适合的范围。每个人注射通常用约10、20、50或100 μ g/免疫原。

[0657] 施用至对象的本发明的组合物的量可依赖于感染的类型和严重性和/或个体的特征，如一般健康、年龄、性别、体重和药物耐受程度。其也可依赖于疾病的程度、严重性和类型。有效量也可依据诸如下述因素变化，如施用途径、靶位点、患者的生理状态、患者的年

龄、是否患者为人或动物、其它施用的治疗,和是否治疗为预防性的或治疗性的。本领域技术人员将能够依据这些和其它因素确定适合的量。

[0658] 有效量可包括本发明方法中用的一次有效剂量或多次有效剂量(如2、3、4剂量或更多)。有效剂量可需要滴定以优化安全性和功效。

[0659] 适合实现预防和/或治疗应用的给药含量和频率的组合被称为预防或治疗有效方案。在预防或治疗方案中,组合物通常以大于1剂量施用,直至实现充分的免疫应答。通常,监测免疫应答,且如果免疫应答开始变弱,给予重复剂量。

[0660] 组合物可在一段时间内以多剂量施用。治疗可通过在一段时间内测试抗体或测试活化的T细胞或B细胞对治疗剂(如包括突变型艰难梭菌毒素的免疫原性组合物)的应答来监测。如果应答降低,提示加强剂量。

[0661] 实施例

[0662] 实施例1:毒素阴性艰难梭菌株的鉴定

[0663] 为了鉴定缺乏毒素(A和B)基因和毒素表达的艰难梭菌株,测试13株艰难梭菌株。13株艰难梭菌株的培养基通过ELISA测试毒素A。7株表达毒素A:艰难梭菌14797-2、艰难梭菌630、艰难梭菌BDMS、艰难梭菌W1194、艰难梭菌870、艰难梭菌1253和艰难梭菌2149。参见图3。

[0664] 6株不表达毒素A且缺乏整个致病性座位:艰难梭菌1351(ATCC43593TM)、艰难梭菌3232(ATCC BAA-1801TM)、艰难梭菌7322(ATCC43601TM)、艰难梭菌5036(ATCC 43603TM)、艰难梭菌4811(4ATCC 3602TM)和艰难梭菌VPI 11186(ATCC 700057TM)。基于VPI 11186有效性选择其以通过接合吸收质粒DNA。

[0665] 相同13株在使用致病性座位外的引物的多重PCR测试中测试(PaLoc; Braun et al., Gene. 1996 Nov 28; 181 (1-2): 29-38.)。PCR结果表明来自通过ELISA的6个毒素A阴性株的DNA未从PaLoc(tcdA-tcdE)中扩增出任何基因。存在PaLoc旁侧序列(cdd3和cdu2)(数据未显示)。

[0666] 实施例2:艰难梭菌VPI 11186中孢子形成途径的灭活

[0667] 艰难梭菌产生株的孢子形成功能的敲除有助于在安全生产环境中大规模发酵。ClosTron系统用于产生无孢子形成的艰难梭菌株。参见Heap et al., J Microbiol Methods. 2009 Jul; 78 (1): 79-85。对于spo0A1梭菌基因的定点插入失活,ClosTron系统允许通过II类内含子的靶基因灭活。毒素负产生株VPI11186通过ClosTron技术经历孢子形成灭活。选择红霉素抗性突变体,且插入盒的存在通过PCR确认(未示出)。确认两个独立克隆无法形成孢子。

[0668] 实施例3:毒素A和B基因的遗传修饰以灭活细胞毒性功能

[0669] 设计基于菌株630Δ基因组序列的全长突变型毒素A和B开放阅读框(ORF),委托Blue Heron Biotech合成。参见如SEQ ID NO:9-14。负责细胞毒性的葡萄糖基转移酶活性的活性位点被两个等位基因取代所改变:对于毒素A为D285A/D287A(参见SEQ ID NO:3),对于毒素B为D286A/D288A(参见SEQ ID NO:5)。两个核苷酸在各天冬氨酸(D)密码子被突变以产生丙氨酸(A)的密码子。参见如SEQ ID NO:9-14。此外,构建表达缺少半胱氨酸残基的突变型毒素的一对载体,随后委托Blue Heron Biotech合成。来自突变型毒素A的7个半胱氨酸残基和来自突变型毒素B的9个半胱氨酸残基被丙氨酸取代。取代包括A和B毒素自催化蛋

白酶的催化的半胱氨酸。此外，在需要除去用于载体构建的限制酶位点时引入沉默突变。

[0670] 实施例4:pMTL84121fdx表达载体

[0671] 从Minton lab开发的pMTL8000系列模数系统选择用于艰难梭菌突变型毒素抗原表达的质粒穿梭载体(参见Heap et al., J Microbiol Methods. 2009 Jul; 78 (1) :79-85)。所选载体pMTL84121fdx包含艰难梭菌质粒Gram+复制子、catP(氯霉素/甲砜氯霉素)选择性标记、p15a Gram-复制子和tra功能，和生孢梭菌铁氧还蛋白启动子(fdX)和末端多克隆位点(MCS)。经验数据提示低拷贝数的p15a复制子在大肠杆菌中比在可选择的ColE1中提供更高稳定性。选择fdX启动子是因为其比在使用CAT报告子构建体的实验中测试的其它启动子产生更高表达(如tcdA、tcdB；或异源tetR或xy1R)(数据未显示)。

[0672] 实施例5:修饰的毒素ORF克隆进入pMTL84121fdx

[0673] 基于毒株630Δ基因组序列的全长突变型毒素A和B的开放阅读框(ORF)使用标准分子生物学技术，使用pMTL84121fdx载体多克隆NdeI和BgIII位点亚克隆。为了有助于克隆，将ORF旁侧有包含起始密码子的近端NdeI位点和在终止密码子紧接下游的BgIII位点。

[0674] 实施例6:TcdA的定点诱变以产生三重突变体

[0675] SEQ ID NO:3和5中(即在每个“双重突变体”中)，自催化蛋白酶结构域的催化的半胱氨酸残基被取代(即对于TcdA为C700A且对于TcdB为C698A)。对于突变型毒素A的诱变，来自TcdA D285A/D287A表达质粒的2.48kb NdeI-HindIII片段被亚克隆进入pUC19(进行相同的切割)，且在此模板上进行定点诱变。一旦新等位基因通过DNA序列分析确认，将修饰的NdeI-HindIII片段再引入表达盒pMTL84121fdx以产生“三重突变体”，即SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6。

[0676] 实施例7:TcdB的定点诱变以产生三重突变体

[0677] 对于突变型毒素B的诱变，修饰并再引入来自突变型毒素B质粒的3.29kb NdeI-EcoNI片段。由于EcoNI位点不存在于可获得的克隆载体中，将较大的3.5kb NdeI-EcoRV片段亚克隆进入pUC19(使用NdeI-SmaI制备)。在诱变后，将修饰的内部3.3kb NdeI-EcoNI片段切割并用于替换对应的突变型毒素B表达载体pMTL84121fdx片段。由于发现此定向策略的克隆效率很低，同时并行尝试另一种涉及1.5kb DraIII替换的引入C698A等位基因的策略。两种策略独立产生所期望的重组体。

[0678] 实施例8:通过定点诱变产生另外的突变型毒素变体

[0679] 构建至少12种不同的艰难梭菌突变型毒素变体。等位基因取代通过定点诱变(Quickchange®试剂盒)引入N末端突变型毒素基因片段。重组毒素也被构建为参比对照，以评价此基于质粒的系统产生在生物活性上定量等价于从野生型艰难梭菌株纯化的天然毒素的蛋白质的能力。在此情况下，引入等位基因取代以回复最初的葡萄糖基转移酶取代。此外，构建一对无半胱氨酸(cysteineless)的突变型毒素载体，委托Blue Heron Biotech合成。

[0680] 12个毒素变体包括：(1)具有D285A/D287A突变的突变型艰难梭菌毒素A(SEQ ID NO:3)；(2)具有D286A/D288A突变的突变型艰难梭菌毒素B(SEQ ID NO:5)；(3)具有D285A/D287A C700A突变的突变型艰难梭菌毒素A(SEQ ID NO:4)；(4)具有D286A/D288A C698A突变的突变型艰难梭菌毒素B(SEQ ID NO:6)；(5)具有SEQ ID NO:1的重组毒素A；(6)具有SEQ ID NO:2的重组毒素B；(7)具有C700A突变的突变型艰难梭菌毒素A；(8)具有C698A突变的突

变形艰难梭菌毒素B; (9) 具有C700A、C597S、C1169S、C1407S、C1623S、C2023S和C2236S突变的突变型艰难梭菌毒素A; (10) 具有C698A、C395S、C595S、C824S、C870S、C1167S、C1625S、C1687S和C2232S突变的突变型艰难梭菌毒素B; (11) 具有D285A、D287A、C700A、D269A、R272A、E460A和R462A突变的突变型艰难梭菌毒素A (SEQ ID NO:7); 和 (12) 具有D270A、R273A、D286A、D288A、D461A、K463A和C698A突变的突变型艰难梭菌毒素B (SEQ ID NO:8)。

[0681] 五重突变型毒素也通过定点诱变和使用与上述相同的材料和方法(即实施例1-7)构建。对于毒素B, 五重突变体包括以下取代D286A/D288AC698A/E970K/E976K (SEQ ID NO: 184)。五重突变型毒素B在上述VPI11186spo0A-阴性细胞中表达。进行使用特异于毒素B的N末端表位的mAb#B8-26 (SEQ ID NO:49) 的蛋白印迹, 以确认五重突变型毒素B的表达。在从左数第2、3和4条泳道中, 分别将50ng、30ng和10ng纯化的三重突变体B (SEQ ID NO:86) 用作参比蛋白。在从左数第5和6条泳道中, 评估分别为1:100稀释和1:1000稀释的五重突变型毒素B细胞裂解浓缩物。五重突变型毒素B浓缩物中估计的蛋白量为约1000ug/mL。如印迹所示, 五重突变型毒素B(浓缩的)显示出约270kD的预期大小的蛋白带。

[0682] 实施例9:转化体的稳定性

[0683] 重排的质粒通过常用的DH5大肠杆菌实验室株获得。相反, 在LB氯霉素(25 μ g/ml)平板上, 30°C下生长三天后, 使用Invitrogen Stbl2TM大肠杆菌宿主的转化产生低生长的全长的突变型毒素重组体。使用相关的Stbl3TM和Stbl4TM大肠杆菌株获得较低的克隆效率, 尽管发现这些细胞系对质粒维持是稳定的。转化体随后在琼脂或液体培养基中, 在30°C氯霉素选择下扩增。与基于不含动物的蛋白胨-大豆培养基相比, 也发现使用LB (Miller) 培养基改进转化体的回收和生长。

[0684] 实施例10:用编码野生型或遗传型突变型毒素基因的pMTL84121fdx转化艰难梭菌

[0685] 通过大肠杆菌接合转移来转化艰难梭菌基本如Heap等, Journal of Microbiological Methods, 2009.78 (1): p.79-85所述来进行。使用编码野生型或变体突变型毒素基因的pMTL84121fdx转化大肠杆菌宿主CA434。大肠杆菌宿主CA434是将表达质粒移动至艰难梭菌产生株VPI 11186spo0A1的中间媒介。CA434是大肠杆菌HB101的衍生物。此菌株隐含有提供对Km、Tc、Su、Sm/Spe和Hg (由于Tn1831) 抗性的Tra+Mob+R702接合质粒。制备化学感受态或电感受态CA434细胞, 并在30°C下Miller的LB CAM平板上选择表达载体转化体。挑选在3天后出现的缓慢生长克隆, 并将其在3mL LB氯霉素培养基中扩增直至中间对数期 (~24h, 225rpm, 轨道式摇床, 30°C)。大肠杆菌培养物通过低速(5,000g)离心来收集以避免破坏菌毛, 且细胞团块通过大口径移液管在1mL PBS中轻轻重悬。细胞通过低速离心来浓缩。大部分PBS通过倒置来去除, 沥干的团块被转移进入厌氧培养室并用0.2mL艰难梭菌培养物重悬, 点样在BHIS琼脂平板上并保持生长8h或过夜。在突变型毒素A转化体的情况下, 过夜接合实现更好的结果。细胞碎片被刮入0.5mL PBS中, 并将0.1mL置于补加有为杀死大肠杆菌供体细胞的15 μ g/mL甲砜氯霉素(氯霉素的更强效类似物) 和D-环丝氨酸/头孢西丁的BHIS选择培养基上。16-24h后出现的转化体通过再划线被纯化到新的BHIS (加添加物) 平板上, 且测试随后培养物的重组毒素或突变型毒素的表达。从显示良好表达的克隆制备甘油长久物和种子原液。小提质粒可使用修改的Qiagen试剂盒过程(其中细胞用溶菌酶预处理(非必需))从2mL培养物制备。艰难梭菌的小提DNA被用作PCR测序的模板以确认克隆完整性。或者, 从大肠杆菌Stbl2TM转化体制备质粒大提DNA并测序。

[0686] 实施例11:毒素A和B三重突变体(分别为SEQ ID NO:4和6)和七重B突变体(SEQ ID NO:8)的艰难梭菌表达分析

[0687] 转化体在2mL培养基(用于常规分析)或加塞烧瓶(用于时间段实验)中生长将样品(2mL)轻轻离心(10,000rpm,30s)以浓缩细胞;将上清液弃去并浓缩10x(Amicon-ultra 30k);将团块沥干并在-80°C下冷冻。将细胞团块在冰上解冻,在1mL裂解缓冲液(Tris-HCl pH7.5;1mM EDTA,15%甘油)中重悬浮,并超声处理(1x 20s以微量加样头短促处理)。将裂解物在4°C离心,并将上清液浓缩5倍。在上样至两块3-8%Tris-乙酸盐SDS-PAGE胶(Invitrogen)之前,将上清液和裂解物的样品与样品缓冲液合并且热处理(10min,80°C)。一块胶用Coomassie染色,另一块进行用于western分析的电印迹。使用毒素A特异性和毒素B特异性兔抗血清(Fitgerald;Biodesign)来检测突变型毒素A和B变体。七重突变型毒素B(SEQ ID NO:8)的表达也通过免疫印迹杂交来确认。

[0688] 实施例12:突变型毒素的葡萄糖基转移酶活性的去除

[0689] 在UDP-¹⁴C-葡萄糖[30μM]、50mM HEPES, pH 7.2、100mM KC1、4mM MgCl₂、2mM MnCl₂、1mM DTT和0.1μg/μL BSA存在的体外葡萄糖基化测试中,遗传双重突变型(DM)毒素A和B(分别为SEQ ID NO:3和5)以及三重突变型(TM)毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)未将¹⁴C-葡萄糖转移至10μg的RhoA、Rac1和Cdc42GTP酶。然而,在各为10和1ng低剂量下(和更低剂量,数据未显示)(图4A和4B),甚至在存在100μg突变型毒素(图4B)下(表明相比于各野生型毒素低至少100,000倍),野生型毒素A和B对照(分别具有SEQ ID NO:1和2)有效地转移¹⁴C-葡萄糖至GTP酶。对Cdc42GTP酶也检测到类似结果(数据未显示)。

[0690] 具体地,在图4B中,在存在UDP-¹⁴C-葡萄糖下,野生型毒素A和毒素B(1ng)或三重突变型毒素A和三重突变型毒素B(100μg)用RhoA GTP酶孵育2小时,30°C。如所示,1ng野生型TcdA和TcdB转移¹⁴C-葡萄糖至RhoA,但是100μg三重突变型毒素A和三重突变型毒素B并不转移。当将1ng野生型TcdA或TcdB掺入到具有各100μg三重突变型毒素A或三重突变型毒素B的反应中,检测到RhoA的葡萄糖基化,这表明缺乏葡萄糖基化抑制剂。葡萄糖基化活性的检测灵敏度建立为1ng野生型毒素,以100μg突变型毒素(1:100,000比例)为背景。结果显示在三重突变型毒素A和三重突变型毒素B中的葡萄糖基转移酶活性位点中的突变降低任何可测量的(相比于各野生型毒素的活性低于100,000倍的更低活性)葡萄糖基转移酶活性。也开发类似试验通过葡萄糖基化的GTP酶的TCA沉淀来量化葡萄糖基转移酶活性。

[0691] 实施例13:自催化的半胱氨酸蛋白酶活性的去除

[0692] 当半胱氨酸蛋白酶切割位点被突变时,自催化裂解的功能在三重遗传突变体A和B(TM)(分别为SEQ ID NO:4和6)中被去除。如图5所示,野生型(wt)毒素A和B(分别为SEQ ID NO:3和5)在肌醇-6-磷酸盐存在下被切割。类似于野生型,双重突变型毒素A和B(分别为SEQ ID NO:3和5)在肌醇-6-磷酸盐存在下也被切割(数据未显示)。毒素A(SEQ ID NO:3)被从308kDa切割为245和60kDa的2个片段。毒素B(SEQ ID NO:5)被从270kDa切割为207和63kDa的2个片段。即使在肌醇-6-磷酸盐存在下,三重遗传突变体A和B(TM)(分别为SEQ ID NO:4和6)在分别为308和270kDa下保持不受影响。参见图5。因此,半胱氨酸蛋白酶活性通过遗传修饰被灭活。

[0693] 更具体地,在图5,与来自List Biologicals的野生型TcdA和TcdB并行,将1μg三重突变型A和三重突变型B孵育90分钟,室温(21±5°C)。在存在或缺乏肌醇-6-磷酸盐(对于

TcdA为10mM且对于Tcd B为0.1mM)下,切割反应在20μL体积Tris-HCl, pH 7.5, 2mM DTT中进行。随后将整个反应体积上样至3-8% SDS/PAGE;蛋白条带通过银染色可见。如所示,在存在肌醇-6-磷酸盐下,wt Tcd A和TcdB被分别切割为245kD和60kD以及207kD和63kD两条蛋白条带。三重突变型毒素A和三重突变型毒素B不被切割,因此确认三重突变型毒素A中的C700A突变和三重突变型毒素B中的C698A突变阻碍切割。

[0694] 实施例14:三重突变型毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)的剩余细胞毒性

[0695] 通过IMR90细胞(人二倍体肺成纤维细胞系)的体外细胞毒性测试,评估遗传的突变型毒素的细胞毒性。这些细胞对毒素A和B均敏感。作为另一优选实施方式,来自非洲绿猴(*Cercopithecus aethiops*)的非洲绿猴正常肾细胞可用在细胞毒性测试中,原因是它们被观察到对毒素A和B具有合理的敏感性。优选地,HT-29人结肠直肠腺癌细胞不被用在细胞毒性测试中,原因是它们与非洲绿猴肾细胞和IMR90细胞系相比对毒素显示出显著降低的敏感性。参见例如图6。

细胞系	毒素 50 μg/ml	细胞/孔	EC ₅₀ (pg/ml)	
			48 小时	72 小时
非洲绿猴肾细胞 (ATCC CCL-81 TM)	A	10000	1816	244
	B	10000	62	29
IMR90 (ATCC CCL-186TM)	A	10000	1329	1152
	B	10000	14	13
HT-29 (ATCC HTB-38 TM)	A	10000	>1E6	>1E6
	B	10000	11089	53313

*体外细胞毒性测试使用基于荧光素酶的底物
(CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI))通过测定细胞 ATP 来进行。

[0696] [0697] 将梯度稀释的遗传的突变型毒素或wt毒素样品加入至在96孔组织培养板上生长的细胞单层。在37℃孵育72h后,通过加入产生荧光(以相对荧光单位(RLU)表示)的基于荧光素酶的CellTiterGlo®试剂((Promega, Madison, WI))测定细胞ATP活性,以此评估板的代谢活性细胞。高RLU显示细胞具有活力,低RLU显示细胞无代谢活性且正在死亡。细胞毒性的水平(表示为EC₅₀)被定义为与细胞培养物对照中的水平相比,引起RLU 50%降低的wt毒素或遗传的突变型毒素的量(此试验的细节在下文提供)。如图6、表7A和表8A所示,TcdA和TcdB的EC₅₀值分别为约0.92ng/mL和0.009ng/mL。三重突变型毒素A和三重突变型毒素B的EC₅₀值分别为约8600ng/mL和74ng/mL。尽管相对于wt毒素的细胞毒性降低约10,000倍,两种遗传的突变型毒素均仍显示出低细胞毒性剩余水平。此剩余细胞毒性可通过中和抗毒素单克隆抗体被阻止,说明其特异于三重突变型毒素,但不可能涉及wt毒素的已知酶活性(葡萄糖基化或自体溶解)。

[0698] 两种wt毒素均显示出强体外细胞毒性,相同量的毒素足以在哺乳动物细胞引起各种作用,如细胞变圆(细胞病变效应或CPE)和缺乏代谢活性(通过ATP水平测定)。因此,已开发出两种体外试验(CPE或细胞圆形化测试和ATP试验)来确认在突变型毒素药物物质中未存留有剩余细胞毒性。结果表示为EC₅₀,其是引起以下的毒素或突变型毒素的量:1) 50%的细胞发展出CPE,或2) ATP水平降低50%,以相对光单位测定。

[0699] 在CPE试验中,将药物物质样品梯度稀释并与用于观察可能的细胞病变效应的IMR90细胞一起孵育。CPE试验以0(正常细胞)至4(~100%细胞变圆)等级评分,且将2的评分定义为测试样品的EC₅₀值。此方法用于测定1000μg/mL浓度(其为可在此试验中测定而无基体干扰的最大可容忍浓度)下的突变型毒素药物物质。因此,未检测到的细胞毒性被报导为EC₅₀>1000μg/ml。

[0700] ATP试验基于从ATP产生的荧光信号量的测定,其与代谢活性细胞的数量成比例。此试验中可被测定而无试验干扰的最大可容忍浓度为约200μg/mL。因此,此试验中未检测到的细胞毒性被报导为EC₅₀>200μg/mL。

[0701] 与毒素对照并行,将不同浓度的突变型毒素A和B加入至细胞。试验的终点为使用CellTiter-Glo® (Promega),通过细胞ATP水平确定的细胞活力。荧光的程度与ATP水平或活力细胞数量成比例。

[0702] 野生型(wt)毒素A的体外细胞毒性(EC₅₀)为920pg/mL,对于毒素B为9pg/mL。突变型毒素A(SEQ ID N0:4)的体外细胞毒性(EC₅₀)为8600ng/mL,对于突变型毒素B(SEQ ID N0:6)为74ng/mL。虽然这些值分别代表9348和8222倍的降低,在两种突变型毒素均检测到剩余细胞毒性。

[0703] 换句话说,相对于wt毒素A和B(分别为SEQ ID N0:1和2)的细胞毒性,三重突变型毒素A和B(分别为SEQ ID N0:4和6)的细胞毒性在IMR-90细胞的体外细胞毒性试验中显著降低。如图6所示,虽然两种三重突变型毒素相对于wt毒素显示出显著降低的细胞毒性(10⁴倍),但对更高浓度的两种三重突变型毒素均观察到剩余细胞毒性。

[0704] 而且,各三重突变型毒素的剩余细胞毒性可被毒素特异性抗体完全中和(如相对于野生型毒素毒性,至少6-8log₁₀毒性降低)。参见以下实施例16。

[0705] 对于细胞毒性检测,细胞培养试验比体外动物模型更灵敏。当通过i.p.或i.v途径在鼠致死攻击模型中施用时,wt TcdA具有每只鼠~50ng的LD₅₀,而wt TcdB更有效(每只鼠~5ng的LD₅₀)。相反,基于上述体外测试的细胞培养对于wt TcdA具有每孔100pg的EC₅₀值,对于wt TcdB具有每孔2pg的EC₅₀值。

[0706] 实施例15:遗传的七重突变型毒素B(SEQ ID N0:8)的剩余细胞毒性,和五重突变型毒素B(SEQ ID N0:184)的细胞毒性

[0707] 如图7所示,三重突变型毒素B突变体(SEQ ID N0:6)(20.78ng/mL)和七重突变型毒素B突变体(SEQ ID N0:8)(35.9ng/mL)的EC₅₀值类似,表明进一步修饰葡萄糖基转移酶活性位点和GTP酶底物结合位点的四个额外的修饰不进一步降低遗传的突变型毒素的细胞毒性。双重突变型毒素B(SEQ ID N0:5)的EC₅₀值与三重和七重突变型毒素的EC₅₀值也类似(数据未显示)。此观察提示突变型毒素的细胞毒性的机理惊人地独立于葡萄糖基转移酶和底物识别机理。

[0708] 五重突变型毒素B(SEQ ID N0:184)的细胞毒性通过上述IMR90细胞中的体外ATP细胞毒性测试评估。参见如实施例14。如图26所示,与商购自List Biologicals的野生型毒素B(如SEQ ID N0:2)相比,以及与三重突变型毒素B(SEQ ID N0:86)相比,五重突变型毒素B的细胞毒性显著降低。“仅细胞”对照是指IMR-90细胞。参见下表62,其显示各EC₅₀值。

[0709] 表62

样品	EC ₅₀	EC ₅₀ 的降低倍数
----	------------------	------------------------

五重突变型B(裂解物浓缩物)	11.5 μ g/mL	1,642,857
三重突变型B(纯化的)	18.9ng/mL	2700
List毒素B lot127902-115	7.0pg/mL	1

[0711] 而且,评估五重突变型毒素B(“PM-B”) (SEQ ID NO:184)的细胞毒性的竞争性抑制,其由三重突变型毒素B (SEQ ID NO:86) 在IMR-90细胞上所介导。参见图27。为了制备样品,将全部孔的三重突变型毒素B (TM B) (SEQ ID NO:86) 保持为200ng/mL (10x EC₅₀) 恒定浓度。将从5 μ g/mL起始的2倍梯度稀释的五重突变型毒素B加入包含三重突变型毒素B的孔中。将样品随后转移至包含IMR-90细胞的96孔板,并孵育72小时。如上所述,如在实施例14中,ATP试验完成。如图27所示,五重突变型毒素B竞争性抑制三重突变型毒素B的细胞毒性。

[0712] 实施例16:三重突变型毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)的剩余细胞毒性

[0713] 为了进一步评估剩余细胞毒性的性质,先将突变型毒素 (SEQ ID NO:4和6) 与其各自的中和抗体混合并孵育,且将混合物加入至IMR90细胞单层。

[0714] 结果(图8)显示突变型毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)的剩余细胞毒性可被特异于突变型毒素A(上图,图8) 和突变型毒素B(下图,图8) 的中和抗体完全去除。在加入至IMR90细胞前,将更高浓度的突变型毒素A(上图) 和B(下图) 用兔抗毒素多克隆(pAb, 1:10稀释)或鼠单克隆抗体(1:50稀释,来自包含3.0mg IgG/mL的原液)孵育。在37°C下通过IMR90细胞进行72-hr处理孵育后,加入CellTiter-Glo®底物,并在具有荧光程序的分光光度计中测定相对光单位(RLU),以测定ATP水平。ATP水平越低,毒性越高。对照包括以4倍其对应EC₅₀值加入的TcdA和TcdB。

[0715] 公开的报导提示毒素的葡萄糖基转移酶或自催化蛋白酶结构域中的突变导致毒性的完全灭活。然而,我们的数据不同意这些公开的报导,这可归因于:与公开报导中的粗培养裂解物相反,在我们研究中测试的更高浓度的高度纯化的突变型毒素;与在小于12小时进行的观察相反,观察到突变型毒素处理的细胞的细胞变圆的增加的时间点(如24小时、48小时、72小时或96小时);与公开报导中公开的细胞毒性试验中的HT-29人结肠直肠腺癌细胞相反,本细胞毒性试验中使用对毒素显示出显著更高敏感性的细胞系;和/或可推进突变型毒素的剩余毒性的未知活性或过程(除葡萄糖基化)。

[0716] 实施例17:遗传的突变型毒素的细胞毒性的新机理

[0717] 为了研究遗传的突变型毒素的剩余细胞毒性的机理,用wt毒素B (SEQ ID NO:2) 或遗传的突变型毒素B (SEQ ID NO:6) 处理IMR-90细胞,且随处理时间研究Rac1GTP酶的葡萄糖基化。样品从24至96小时收集,并制备细胞提取物。通过使用两种针对Rac1的抗体的免疫印迹区分葡萄糖基化的Rac1和未葡萄糖基化的Rac1。一种抗体识别Rac1 (23A8) 的两种形式,另一种(102)仅识别未葡萄糖基化的Rac1。如图22所示,对于毒素B,总Rac1水平在一段时间内保持不变,其中大部分Rac1被另一方面,用遗传的突变型毒素B (SEQ ID NO:6) 处理导致总Rac1的显著降低,然而Rac1在全部时间点均为未葡萄糖基化的。这显示Rac1水平受到遗传的突变型毒素处理的负面影响,而不受wt毒素的负面影响。如图22所示,在所指定时间点,肌动蛋白的水平在毒素和遗传的突变型毒素B处理的细胞中类似,且类似于假处理的细胞。这显示遗传的突变型毒素通过不同于野生型毒素驱动的葡萄糖基化途径的机理发挥细胞毒性。

[0718] 实施例18:遗传的突变型毒素的化学处理

[0719] 虽然优选显示出4-log降低的细胞毒性活性的遗传修饰的突变型毒素，考虑细胞毒性活性进一步降低(2至4logs)。已评估两个化学灭活策略。

[0720] 第一个方法使用甲醛和甘氨酸灭活突变型毒素。甲醛灭活通过在甲醛和蛋白质上的伯胺之间形成Schiff碱(亚胺)来发生。Schiff碱可随后与大量氨基酸残基(Arg、His、Trp、Tyr、Gln、Asn)反应以形成分子内或分子间交联。此交联固定蛋白质的结构，使其无活性。此外，甲醛可与甘氨酸反应以形成Schiff碱。甘氨酰Schiff碱可随后与氨基酸残基残影以形成分子间蛋白质-甘氨酸交联。甲醛将遗传的突变型毒素的细胞毒性活性降低至低于可检测限度(对于三重突变型B(SEQ ID NO:6)，细胞毒性降低 $>8\log_{10}$ ，对于三重突变型A(SEQ ID NO:4)，细胞毒性降低 $>6\log_{10}$)。然而，当甲醛灭活的(FI)三重突变型毒素在25°C孵育时，在一段时间内观察到回复。细胞毒性回复可通过将少量甲醛(0.01–0.02%)加入至FI-三重突变型毒素储备液中来防止。参见实施例23。

[0721] 另一方法使用1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)处理以产生灭活的突变型毒素。在此方法中，EDC/NHS与蛋白质上的羧基反应以形成活化的酯。活化的酯可随后与蛋白质上的伯胺反应以形成稳定的酰胺键。随着与甲醛反应，此反应导致分子内和分子间交联。相比于甲醛灭活形成的不稳定的亚胺键，EDC/NHS处理形成的酰胺键更稳定且是不可逆的。除了活化的酯与多肽上伯胺反应形成的交联外，甘氨酸和β-丙氨酸加合物均可形成。不受机理或理论的束缚，当加入甘氨酸以淬灭未反应的活化的酯时，产生甘氨酸加合物。甘氨酸的胺与多肽上活化的酯反应以形成稳定的酰胺键。不受机理或理论的束缚，β-丙氨酸加合物通过活化的β-丙氨酸与多肽上的伯胺反应形成。此反应导致稳定的酰胺键。活化的β-丙氨酸通过三摩尔NHS与一摩尔EDC反应产生。

[0722] 为了实现相对于遗传突变的突变型毒素(6–8log，相对于天然毒素)的细胞毒性活性的2–4log降低，化学灭活的突变型毒素应具有 $\geq 1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 的EC₅₀值。除了细胞活性降低外，这将有利于保持通过点印迹分析确定的关键表位。至今，已鉴定到满足降低细胞毒性和表位识别标准的大量反应条件。已制备若干批次的灭活的突变型毒素以用于动物研究，且来自少数代表性批次的分析数据显示在表7A和7B，表8A和8B中。

表 7A：化学灭活的突变型毒素 A 是安全的且具有抗原性					
样品 #	毒素样品 ID	处理	CPE EC ₅₀	毒性降低	对 mAb 反应性
			$\mu\text{g}/\text{mL}$	Log 比例	
1	突变型 TcdA (SEQ ID NO:4) L44905-160A	甲醛	>1000	6.4	中/高
2	突变型 TcdA (SEQ ID NO:4) L44166-166	EDC	>1000	6.4	高
3	突变型 TcdA (SEQ ID NO:4) L44905-170A	甲醛	>1000	6.4	低
对照					
4	TcdA wt (来自 List Bio)	无	390 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1	高
5	TcdB wt (来自 List Bio)	无	3.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$	不适用	无
6	重组突变型(rMutant)TcdA TM 遗传的 L36901-79 (SEQ ID NO:4)	无	12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4.5	高
7	类毒素 A List Bio	甲醛	未进行	---	低

[0723]

[0724]

表 7B: 化学灭活的突变型毒素 A 是安全的且具有抗原性								
样品#	毒素样品 ID	处理	与 mAb 的反应性 (点印迹, 非变性条件)					
			N- 末端 mAb#6	中间结构 域 mAb # 102	C-末端(neut)			
					A80-29	A3-25	A60-22	A65-33
1	突变型 TcdA (SEQ ID NO:4) L44905-160A	甲醛	++	++	++++	++	++++	++++
2	突变型 TcdA (SEQ ID NO:4) L44166-166	EDC	++++	++++	++++	++++	++++	++++

[0725]

3	突变型 TcdA (SEQ ID NO:4) L44905-170A	甲醛	+	+	++	++	++	+
对照								
4	TcdA wt (来自 List Bio)	无	++++	+++	++++	++++	++++	++++
5	TcdB wt (来自 List Bio)	无	—	—	—	—	—	—
6	重组突变型 TcdA TM 遗传的 L36901-79 (SEQ ID NO:4)	无	++++	++++	++++	++++	++++	++++
7	类毒素 A List Bio	甲醛	—	—	+	—	++	+

[0726] List=List Biologicals; CPE=细胞病变效应; EC₅₀=50% 细胞显示出细胞毒性的最低浓度; mAbs=单克隆抗体; neut=中和; ND=未进行; TM=活性位点和切割突变体 (“三重突变型”)

[0727]

样品#	毒素样品 ID	处理	CPE	毒性降低	对 mAb 反应性
			EC ₅₀ μg/mL		
1	突变型 TcdB L44905-182 (SEQ ID NO:6)	甲醛	>1000	8.4	中/高
2	突变型 TcdB L34346-38A (SEQ ID NO:6)	EDC	>1000	8.4	高
3	突变型 TcdB L44905-170B (SEQ ID NO:6)	甲醛	>1000	8.4	低
对照					
4	TcdA wt (来自 List Bio)	无	390 pg/mL	不适用	无
5	TcdB wt (来自 List Bio)	无	3.90 pg/mL	1	高
6	重组突变型毒素 B TM 遗传的(SEQ ID NO:6) L34346-022	无	69 ng/mL	4.2	高
7	类毒素 A List	甲醛	未进行	---	中

表 8B: 化学灭活的突变型毒素 B 是安全的且具有抗原性						
样品 #	毒素样品 ID	处理	与 mAb 的反应性 (点印迹, 非变性条件)			
			N- 末 端 aa 1-543		中 间 -/C- 末 端 aa 544-2366	
			B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
[0728]	1 突变型 TcdB (SEQ ID NO:6) L44905-160A	甲醛	+++	+++	++	++
	2 突变型 TcdB (SEQ ID NO:6) L44166-166	EDC	++++	++++	++++	++++
	3 突变型 TcdB (SEQ ID NO:6) L44905-170A	甲醛	++	+	+/-	-
	对照					
	4 TcdA wt (来自 List Bio)	无	—	—	—	—
	5 TcdB wt (来自 List Bio)	无	++++	+++	++++	++++
[0729]	6 重组突变型 TcdB TM 遗传的 L34346-022 (SEQ ID NO:6)	无	++++	++++	++++	++++
	7 类毒素 B List	甲醛	+++	+++	+++	+++

[0730] List=List Biologicals; CPE=细胞病变效应; EC₅₀=50% 细胞显示出细胞毒性的最低浓度; mAbs=单克隆抗体; neut=中和; ND=未进行; TM=活性位点和切割突变体(“三重突变型”)

[0731] 实施例19:发酵和纯化

[0732] 发酵从上述包括fdx启动子的冷冻来源的重组艰难梭菌起始。冷冻原液为制成OD₆₀₀=2.0的细胞悬液和20%甘油。将初始培养物与0.2mL培养物原液一起接种到500mL SHYG10培养基(30g/L大豆水解物SE50MK、20g/L酵母提取物HY YEST 412、10g/L葡萄糖、15mg/L甲砜氯霉素,pH7)。培养基包含在500mL敞口的瓶中。接种在常规生物安全厨中进行,瓶用氮气吹洗,将瓶随后在常规孵育器中37℃下静态孵育(关闭开口)~16-18小时。

[0733] 将包含8L SHYG60培养基(30g/L大豆水解物SE50MK、20g/L酵母提取物HY YEST 412、60g/L葡萄糖、15mg/L甲砜氯霉素,pH7)的10L生物反应器用于发酵期。将接种物瓶的500mL内容物接种至在37℃,400rpm(1.47m/s),0.1vvm氮气喷射下操作的发酵器中。pH通过自动加入5N NaOH控制在7.0。发酵通常进行~24小时以达到峰值效力。发酵期间的生长通过OD₆₀₀读数监测。将用于突变型毒素定量所取的样品在~5000xg旋转,并将所得团块在-70℃冷冻。将细胞团块随后解冻并重悬在由20mM Tris、3mM NaCl、0.5mM EDTA(pH 6.5)组成的缓冲液中,并以40振幅超声20秒。将所得细胞裂解物在5,000xg旋转10分钟。将上清液与上样缓冲液和还原剂混合,并在3.8%Tris-乙酸盐PAGE胶上跑胶50-55分钟,对比可信的毒素标准品。将胶过夜染色,随后脱色并在扫描密度计上定量。通常,80-120mg/L毒素值所观察到OD₆₀₀值为~10-12。

[0734] 下表为突变型毒素A的发酵数据的实施例。

表 63

[0735]

用去的发酵时间(小时)	OD ₆₀₀	毒素产率(mg/L)
1	0.32	
3	1.16	
5	3.55	33
7	5.56	53
9	7.11	63

[0736]

11	8.64	81
24	11.14	123

[0737] 突变型毒素B的发酵数据的实施例如下表所示。

表 64

[0738]

用去的发酵时间(hrs)	OD ₆₀₀	毒素产率(mg/L)
1	0.73	
3	1.18	
5	4.54	30
7	5.93	40
9	7.05	48
11	8.44	62
24	10.03	94

[0739] 用于培养重组艰难梭菌细胞和/或制备突变型毒素的组合物和方法的改变已测试且在本发明的范围内。例如,虽然SE50MK (和多种SE50MK-NK, 均来自Friesland-Campaigna) 是氮源的优选选择, 来自其它生产商的多种其它大豆水解物被确定在此过程中很好起作用。在缺乏酵母提取物下包括大豆水解物的培养基提供30-40%的预期产率。

[0740] 来自其它生产商的酵母提取物也显示支持相等的产率。在缺乏大豆水解物下包括酵母提取物的培养基提供60-70%的预期产率。

[0741] 在缺乏碳源下, 使用基于大豆水解物/酵母提取物的培养基产生约2-30D₆₀₀和约10-15mg/L毒素。虽然葡萄糖为培养的优选碳源, 但是甘露醇也获得相等的结果。与缺乏碳源的培养基相比, 瓶中碳源的筛选指示艰难梭菌也可利用果糖和甘露糖, 其也将预期支持高OD/产率。以下碳源不显示支持最佳生长: 阿拉伯糖、木糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、甘油、鼠李糖和半乳糖。

[0742] 此外, 将发酵时间延长至48小时 (需要加入更多葡萄糖) 不显示实质改进产率。

[0743] 而且, 在pH 6.5和7.5下发酵得到在80-120mg/L预期范围的产率。在更极端pH (pH 6.0or 8.0) 下发酵将得到预期OD₆₀₀值, 但降低的毒素的产率 (40-60mg/L)。

[0744] 在缺乏甲砜氯霉素下使用培养基发酵导致对编码突变型毒素B的质粒损失如约10-20%的质粒, 和对编码突变型毒素A的质粒损失如约30-40%的质粒。因此, 在缺乏氯霉素衍生物下使用培养基发酵是可行的。

[0745] 进行发酵的另一种模式也被测试且也在本发明范围内。例如, 发酵可在400rpm或更低下进行, 且可使用氮覆盖, 两种技术均被尝试并成功使用。

[0746] 而且, 单克隆抗体培养基SFM4MAb被测试且显示引起约100D₆₀₀的细胞和约40mg/L

的突变型毒素。

[0747] 最后,与缺乏包含磷酸盐成分的培养基相比,将包含磷酸盐的成分加入至发酵显示出降低毒素的产生。

[0748] 在发酵结束,将发酵器冷却。细胞浆液通过连续离心回收,并重悬于适合的缓冲液中。细胞悬液的裂解通过高压匀浆来完成。对于突变型毒素A,均质物被凝聚,且凝聚的溶液经历连续离心。此溶液被过滤并随后转移用于下游操作。对于突变型毒素B,将均质物通过连续离心来澄清,并随后转移用于下游操作。

[0749] 突变型毒素A (SEQ ID N0:4) 通过使用两个色谱步骤,随后通过最终缓冲液交换来纯化。将澄清的裂解物上样至疏水相互作用色谱 (HIC) 柱上,且结合的突变型毒素使用柠檬酸钠梯度来洗脱。来自HIC柱的产物库随后被上样至阳离子交换 (CEX) 柱上,且结合的突变型毒素A使用氯化钠梯度来洗脱。包含纯化的突变型毒素A的CEX库通过渗滤被交换进入终缓冲液。纯化的突变型毒素A通过渗滤被交换进入终药物物质中间产物缓冲液。在渗滤后,在对终药物物质化学灭活前渗余物通过0.2微米过滤器过滤。蛋白质浓度被定标为1-3mg/mL。

[0750] 突变型毒素B (SEQ ID N0:6) 通过使用两个色谱步骤,随后通过最终缓冲液交换来纯化。将澄清的裂解物上样至阴离子交换 (AEX) 柱上,且结合的突变型毒素使用氯化钠梯度来洗脱。将柠檬酸钠加入之来自AEX柱的产物库中,并上样至疏水相互作用色谱 (HIC) 柱。结合的突变型毒素使用柠檬酸钠梯度洗脱。包含纯化的突变型毒素多肽 (SEQ ID N0:6) 的HIC库通过渗滤被交换进入终缓冲液。纯化的突变型毒素B通过渗滤被交换进入终药物物质中间产物缓冲液。在渗滤后,在对终药物物质化学灭活前渗余物通过0.2微米过滤器过滤。蛋白质浓度被定标为1-3mg/mL。

[0751] 实施例20:甲醛/甘氨酸灭活

[0752] 纯化后,遗传的突变型毒素A和B(分别为SEQ ID N0:4和6) 使用40mM (1.2mg/ml) 甲醛在25°C下灭活48小时。灭活在pH 7.0±0.5,10mM磷酸盐,150mM氯化钠缓冲液(包含40mM (3mg/ml) 甘氨酸) 中进行。灭活时长被设定为超过用于将IMR90细胞的EC₅₀降低至大于1000ug/mL所需的时长的三倍。在48小时后,将生物活性降低至相对于天然毒素7至8log₁₀。在48小时孵育后,将灭活的突变型毒素通过渗滤交换进入终药物物质缓冲液。例如,使用100kD再生的乙酸纤维素超滤盒,将灭活的毒素浓缩至1-2mg/mL并用缓冲液交换。

[0753] 实施例21:N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺 (EDC) /N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 灭活

[0754] 在纯化后,使用0.5mg EDC和0.5mg NHS/每mg的纯化的遗传的突变型毒素A和B(分别为约2.6mM和4.4mM),将遗传的突变型毒素 (SEQ ID N0:4和SEQ ID N0:6) 在25°C灭活2小时。反应通过加入甘氨酸至100mM终浓度来淬灭,且将反应在25°C孵育额外2小时。灭活在pH 7.0±0.5,10mM磷酸盐,150mM氯化钠缓冲液中进行。灭活时长被设定为超过用于将IMR90细胞的EC₅₀降低至大于1000ug/mL所需的时长的三倍。在2小时后,将生物活性降低至相对于天然毒素7至8log₁₀。在4小时孵育后,将灭活的突变型毒素通过渗滤交换进入终药物物质缓冲液。例如,使用100kD再生的乙酸纤维素超滤盒,将灭活的毒素浓缩至1-2mg/mL并用缓冲液交换。

[0755] 除非另有说明,以下实施例部分中所用的术语是指根据实施例21中描述制备的组

合物：“EDC/NHS-处理的三重突变型毒素”；“EDC灭活的突变型毒素”；“突变型毒素[A/B]药物物质”；“EI-突变型毒素”；“EDC/NHS-三重突变型毒素”。例如，以下术语为同义词：“EDC/NHS处理的三重突变型毒素A”；“EDC灭活的突变型毒素A”；“突变型毒素A药物物质”；“EI-突变型毒素A”；“EDC/NHS-三重突变型毒素A”。作为另一实施例，以下术语为同义词：“EDC/NHS处理的三重突变型毒素B”；“EDC灭活的突变型毒素B”；“突变型毒素B药物物质”；“EI-突变型毒素B”；“EDC/NHS-三重突变型毒素B”。

[0756] 突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质各自使用批量方法制备，其包括：(1)包含编码各遗传的三重突变型毒素多肽的质粒的毒素阴性的艰难梭菌株(VPI 11186)的发酵(在包含大豆水解物、酵母提取物HYEST™ 412(Sheffield Bioscience)、葡萄糖和甲砜氯霉素的培养基中)；(2)使用离子交换和疏水相互作用色谱法从无细胞裂解物中将遗传的突变型毒素(“药物物质中间产物”)纯化至至少大于95%纯度；(3)通过EDC/NHS处理，随后用甘氨酸淬灭/加帽来化学灭活；和(4)交换进入终缓冲液基体。

[0757] 实施例22：灭活和配方支持条件的研究

[0758] 为了最佳化遗传的突变型毒素的化学灭活，进行实验的统计学设计(DOE)。在DOE中检查的因素包括温度、甲醛/甘油浓度、EDC/NHS浓度和时间(表9和10)。为了监测生物活性的损失，确定IMR90细胞中的EC₅₀值。此外，也观察各时间点后处理的IMR-90细胞的细胞形态学。参见图9，显示72小时后处理的形态学。为了确定对蛋白质结构的影响，使用针对毒素不同结构域制备的一组单克隆抗体，使用点印迹分析监测表位识别。

表 9: 甲醛/甘油 DOE 的参数测试	
参数	测试范围
时间(天)	1 至 14
温度(°C)	4 至 37
毒素浓度(mg/ml)	1 至 1.25
甲醛浓度(mM)	2 至 80
甘氨酸浓度(mg/ml)	0 至 80

表 10: EDC/NHS DOE 的参数测试	
参数	测试范围
时间(小时)	1 至 4
温度(°C)	25 至 35
毒素浓度(mg/ml)	1 至 1.25
EDC (mg/mg 毒素)	0.25 至 2.5
NHS (mg/mg 毒素)	0 至 2.5

[0761] 在艰难梭菌突变型毒素的甲醛/甘氨酸灭活中，选择终反应条件，使得实现所期望的细胞毒性活性降低水平(7至81log₁₀)，同时最大化表位识别。参见上面的实施例20。

[0762] 在艰难梭菌突变型毒素的EDC/NHS灭活中，选择终反应条件，使得实现所期望的细胞毒性活性降低水平(7至81log₁₀)，同时最大化表位识别。参见上面的实施例21。

[0763] 在另一实施方式中，EDC-NHS反应通过加入足以淬灭反应的丙氨酸淬灭。使用丙氨酸可导致突变型毒素蛋白质上的修饰，此修饰与当反应被甘氨酸淬灭时的修饰类似。例如，通过加入丙氨酸的淬灭可导致突变型毒素的谷氨酸和/或天冬氨酸残基的侧链上的丙氨酸

部分。在另一实施方式中,EDC-NHS反应通过加入足以淬灭反应的甘氨酸甲酯淬灭。

[0764] 在最佳条件下化学无活性的三重突变型艰难梭菌毒素A和毒素B的制备导致将剩余细胞毒性进一步降低至不可检测的水平(>1000 μ g/mL-经由CPE试验测定的最高浓度),同时保持抗原性(通过它们与毒素特异性中和抗体的反应性测定)。表28显示的结果表明细胞毒性从wt毒素向EDC/NHS处理的三重突变型毒素的逐步降低。免疫荧光标记确认三重突变型毒素(SEQ ID NO:4和6)和突变型毒素药物物质显示对IMR-90细胞可比的结合,提示细胞毒性损失并非因对细胞的结合降低(数据未显示)。与突变型毒素A药物物质相比,突变型毒素B药物物质实现更高倍的细胞毒性降低,这与所观察到的TcdB相比TcdA高~600倍的效力一致。

[0765] 表28. 细胞毒性总结

毒素	样品	EC ₅₀	细胞毒性的降低倍数
A	TcdA (SEQ ID NO:1)	1.6 ng/mL	1
	三重突变型毒素 A (SEQ ID NO:4)	12.5 μ g/mL	7800
	突变型毒素 A 药物物质	>1000 μ g/mL	>625,000
B	TcdB (SEQ ID NO:2)	2.5 pg/mL	1
	三重突变型毒素 B (SEQ ID NO:6)	45 ng/mL	18,000
	突变型毒素 B 药物物质	>1000 μ g/mL	>400,000,000

[0766] [0767] 也评估了仅EDC修饰的,或EDC和碘基-NHS修饰的突变型毒素B的细胞毒性试验结果。参见表29。

[0768] 表29

样品	细胞毒性 EC ₅₀ , mg·mL ⁻¹ (CPE)	评述
TcdB TM (SEQ ID NO:6), 未修饰的	0.03	
TM TcdB-EDC 1, 无 NHS	<0.97	与单独 EDC 反应
TM TcdB-EDC 2, 无 NHS	<0.97	重复制备
TM TcdB-EDC 3, 碘基-NHS (0.5x)	125	与 EDC 和碘基-NHS 反应
TM TcdB-EDC 4, 碘基-NHS (0.5x)	125	重复制备
TM TcdB-EDC 3, 碘基-NHS (1.0x)	250	与 EDC 和碘基-NHS 反应
TM TcdB-EDC 4, 碘基-NHS (2.0x)	750	与 EDC 和碘基-NHS 反应

[0769] [0770] 条件:三重突变型毒素B(“TM TcdB”)(SEQ ID NO:6)以突变型毒素B:EDC:碘基-NHS=1:0.5:0.94的重量比修饰。此比率与实施例21所述的标准EDC/NHS反应是摩尔等价的(对碘基-NHS的更高MW校准)。为了确定碘基-NHS的影响,碘基-NHS比率从0.5x变化至2x标准比率。同样的反应在25°C,1x PBS pH 7.0下进行,并通过加入EDC溶液起始。在2小时后,反应通过加入1M甘氨酸pH 7.0(0.1M终浓度)淬灭,并孵育另外2小时。淬灭的反应被脱盐,且突变型毒素B药物物质(“TM TcdB-EDC”)使用Vivaspin 20设备浓缩,无菌过滤至无菌瓶中并提交用于细胞毒性试验的评估。

[0771] 在相同摩尔比率下,与对于NHS为>1000 μ g/mL相比,碘基-NHS将EC₅₀降低至约250 μ g/mL。即使在两倍摩尔比率下,碘基-NHS并未显示出如NHS般有效降低细胞毒性。参见表30。

[0772] 表30

修饰	参比消化(TcdB EDC 004)	NHS 对照消化 (TcdB EDC 001)	碘基-NHS 样 品消化	
[0773]	甘氨酸加合物(+57 da) β -丙氨酸(+71 da) 交联物(-18 da) 脱氢丙氨酸(-34 da) 未修饰的	49 24 7 6 273	29 19 4 5 195	35 0 3 4 217

[0774] 为了确定修饰的数量和类型,对EDC/NHS和EDC/碘基-NHS灭活的三重突变型毒素B样品进行肽作图。在两种样品中均观察到类似的甘氨酸加合物、交联和脱氢丙氨酸修饰的量。然而,在碘基-NHS样品中,未观察到 β -丙氨酸。

[0775] 野生型毒素B(SEQ ID NO:2)使用标准方法灭活(参见实施例21);毒素B:EDC:NHS 1:0.5:0.5,25°C,2小时,1x PBS pH 7.0,随后用1M甘氨酸(0.1M终浓度)淬灭,并孵育另外2小时。将样品脱盐、浓缩并进行细胞毒性试验、此样品的EC₅₀为<244ng/mL。

[0776] 实施例23:回复研究

[0777] 为了确定是否甲醛/甘油或EDC/NHS灭活的艰难梭菌突变型毒素发生回复,将灭活的突变型毒素的样品(1mg/mL)在25°C下灭活5-6周。每周移除等分部分,并测定IMR90细胞的EC₅₀值。一份甲醛/甘油灭活的样品不含甲醛,一份样品包含0.01%甲醛。EC₅₀通过CPE试验测定。

表 11: 来自灭活的 TcdA 回复研究的结果					
孵育时间 (天)	EC ₅₀ (IMR90 细胞试验)			EDC/NHS	
	甲醛灭活的		无甲醛		
	无甲醛	0.01%甲醛			
0	1000 ug/ml	1000 ug/ml	1000 ug/ml	1000 ug/ml	
7	740 ug/mL	ND	1000 ug/ml	1000 ug/ml	
14	493 ug/mL	1000 ug/ml	1000 ug/ml	1000 ug/ml	
21	395 ug/mL	ND	1000 ug/ml	1000 ug/ml	
28	395 ug/mL	1000 ug/ml	1000 ug/ml	1000 ug/ml	
35	326 ug/M	ND	ND	ND	

[0779] 在25°C缺少剩余甲醛下,观察部分回复(表11)。5周后,细胞毒性活性增加约3倍。虽然细胞毒性活性增加,5周后相对于天然毒素仍为7log₁₀降低。回复通过包含0.010%浓度的甲醛被完全防止。在EDC/NHS灭活的样品中未观察到回复。在6周孵育期间,对于全部4批次的EDC/NHS处理的三重突变型毒素A(SEQ ID NO:4)和EDC/NHS处理的三重突变型毒素B(SEQ ID NO:6)二者,EC₅₀值保持在>1000 μ g/mL的起始水平。相反,FI-处理的三重突变型毒素A(SEQ ID NO:4)和FI-处理的三重突变型毒素B(SEQ ID NO:6)的EC₅₀值不稳定且降低至不可接受的低EC₅₀值,提示细胞毒性的增加或灭活的回复。参见表11。

[0780] 除了稳定降低细胞毒性至不可检测水平(>1000 μ g/mL,通过CPE试验测定)外,使用EDC/NHS灭活的突变型毒素保持作为毒素中和mAb的靶标的重要表位。参见表31。FI突变型毒素显示相同抗原决定簇的损失。

[0781] 表31. EDC/NHS灭活降低遗传的突变型毒素的细胞毒性且保持重要抗原决定簇

样品	EC ₅₀	相对于 wt 毒素的细 胞 毒 性 的 降 低 (log ₁₀) ^a	最大结合(Rmax) ^b Neut mAb ^d		
			1 ^c	2	3
[0782]	三重突变型 A (SEQ ID NO:4)	12.5 µg/mL	4.5	100	100
	FI-三重突变型 A	>1000 µg/mL	>6.4	55	59
	EDC/NHS-三重突变型 A	>1000 µg/mL	>6.4	90	94
	三重突变型 B (SEQ ID NO:6)	69 ng/mL	4.3	100	100
	FI-三重突变型 B	>1000 µg/mL	8.4	67	67
	EDC/NHS-三重突变型 B	>1000 µg/mL	8.4	87	78

[0783] a细胞毒性使用CPE试验在IMR90细胞上测定。

[0784] b使用针对各种非重叠毒素表位的多重中和mAb通过BiacoreTM分析测定的值。

[0785] c值为两个实验的平均值。

[0786] d对于前三行,neut mAb“1”、“2”和“3”分别是指对毒素A的mAbs A60-22、A80-29和A65-33。对于后三行,neut mAb“1”、“2”和“3”分别是指对毒素B的mAbs B8-26、B59-3和B-56-15。

[0787] 实施例24:临床前的免疫原性研究

[0788] 关键临床前目标包括在小动物和非人灵长类(NHP)中测试包含艰难梭菌突变型毒素A和B的组合物。免疫小鼠和仓鼠以确定尤其是是否艰难梭菌组合物能够引发针对突变型毒素A和B的中和抗体。测试用于在小鼠、仓鼠和食蟹猴中一系列免疫后诱导血清中和抗体应答的抗原。在一些实施方式中,遗传的和/或化学灭活的突变型毒素在中性缓冲液、磷酸铝缓冲液或包含ISCOMATRIX作为佐剂的缓冲液中配制。中和抗体应答在各加强或最后剂量后通过测试约2-4周。

[0789] 毒素中和试验表明抗血清中和艰难梭菌TcdA或TcdB介导的细胞毒性效果的能力,且由此能够测定样品中存在的抗体的功能性活性。毒性中和试验在对TcdA和TcdB均敏感的人肺成纤维细胞系IMR-90上进行。简言之,在96孔微滴定板上接种作为毒素介导的细胞毒性标靶的IMR-90细胞。单独分析各测试血清样品中和TcdA和TcdB的能力。将测试抗血清的适合的梯度稀释与固定浓度的TcdA或TcdB混合,并在增湿孵育器(37°C/5%CO₂)中在37°C孵育90分钟,以发生毒素的中和。对于质量控制,全部板包括参比对照和包含已知滴度的抗毒素抗体的对照。在90分钟后,将毒素-抗血清混合物加入至IMR-90细胞单层,并将板孵育另外72小时。随后,将CellTiter-Glo[®]底物加入至试验板,以确定在代谢活性细胞中存在并以相对荧光单位(RLU)表示的三磷酸腺苷(ATP)浓度。高ATP水平表明高细胞活力,且水平正比于被样品中存在的抗体中和的毒素的量。对于临床前数据,将RLU数据针对测试抗血清样品的稀释值作图,以产生四参数逻辑(4-PL)回归响应拟合曲线。中和滴度表示为显示出50%细胞毒性降低的样品的稀释值。

[0790] 实施例25:鼠免疫原性研究:muC.difficile2010-06

[0791] 此研究的目的是评价分别通过不同方法化学灭活的两种形式的突变型艰难梭菌毒素B(SEQ ID NO:6)的免疫原性。在此研究中,将未处理的突变型毒素B(SEQ ID NO:6)(遗

传灭活但未被化学灭活)用作对照,其包含和不含佐剂。

[0792] 根据表12,10只小鼠的组通过10 μg 免疫原进行肌肉内免疫。

[0793] 表12. 小鼠中测试化学灭活的突变型毒素B(SEQ ID NO:6)

组	免疫原	剂量	数量	途径	日程
[0794]	1 甲醛灭活的突变型毒素 B ^a , AlPO ₄ ^c	10 μg	10	IM	初免 0 周 加强 4, 8 周
	2 灭活的突变型毒素 B 型 2 ^b , AlPO ₄ ^c	10 μg	10	IM	初免 0 周 加强 4, 8 周
	3 遗传灭活的突变型毒素 B, 未佐剂化	10 μg	10	IM	初免 0 周 加强 4, 8 周
	4 遗传灭活的突变型毒素 B, AlPO ₄ ^c	10 μg	10	IM	初免 0 周 加强 4, 8 周

^a 化学灭活 = 甲醛/甘氨酸处理的, 10°C, 7 天
^b 化学灭活 = EDC/NHS 处理的, 30°C, 2 小时
^c 氯离子浓度 = 0.5 mg/mL

[0795] 结果:在接种各免疫候选物后的小鼠中无不利事件。如图10所示,各组中的小鼠在第三剂的各突变型毒素后出现显著强的抗毒素B中和抗体。

[0796] 基于12周滴定,似乎在小鼠中EDC灭活的突变型毒素B(组2)和甲醛灭活的突变型毒素(组1)产生强中和应答。

[0797] 在缺乏化学灭活的情况下,遗传的突变型毒素B(SEQ ID NO:6)在两剂后(组3-4,8周)产生中和应答,其在第三剂后加强(组3-4,12周)。

[0798] 实施例26:鼠免疫原性研究:muC.difficile2010-07:

[0799] 此研究的目的是评价化学灭活的艰难梭菌突变型毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)(单独或二者的组合)的免疫原性。全部组的免疫原使用磷酸铝作为佐剂配制。

[0800] 根据表13,5只小鼠的组通过10 μg 免疫原进行肌肉内免疫。

[0801] 表13. 小鼠中测试化学灭活的遗传A和B突变型毒素(分别为SEQ ID NO:4和6)

组	免疫原	剂量	数量	组	日程
[0802]	甲醛灭活的 ^a 突变型毒素B (SEQ ID NO: 6), AlPO ₄ ^c	10 μg	5	IM	初免0周, 加强4、8、12周
	EDC灭活的 ^b 突变型毒素B (SEQ ID NO: 6), AlPO ₄ ^c	10 μg	5	IM	初免0周, 加强4、8、12周
	甲醛灭活的突变型毒素A (SEQ ID NO: 4)型1, AlPO ₄ ^c	10 μg	5	IM	初免0周, 加强4、8、12周
	EDC灭活的突变型毒素A (SEQ ID NO: 4), AlPO ₄ ^c	10 μg	5	IM	初免0周, 加强4、8、12周
	甲醛灭活的突变型毒素 A+B, AlPO ₄ ^c	各10 μg	5	IM	初免0周, 加强4、8、12周

^a 甲醛处理 = 甲醛/甘氨酸在25°C处理2天；突变型毒素无细胞毒性且保持结合全部测试的突变型毒素特异性单克隆抗体

^b EDC处理 = EDC/NHS在30°C处理4小时；突变型毒素无细胞毒性且保持结合全部测试的突变型毒素特异性单克隆抗体

^c 铝离子浓度 = 0.5 mg/mL

[0803] 结果：在接种各免疫候选物后的小鼠中无不利事件。如图11所示，在2剂化学灭活的遗传的突变型毒素后，抗毒素A中和抗体(组3-5)被加强至3和4log₁₀间的滴度，而抗毒素B中和抗体(组1-2,5)保持低至不可检测，这与来自上述鼠研究的数据一致(图10)。抗毒素B中和抗体在第三剂(12周滴度)后的组1、2和5中加强至2-3log₁₀，并在第四剂(14周滴度)后两周达到其峰值。在第三(12周滴度)和第四免疫(14周滴度)后，抗毒素A中和抗体滴度在组3-5中轻微增加。

[0804] 实施例27：仓鼠免疫原性研究：hamC.difficile2010-02：

[0805] 此研究的目的是评价叙利亚金仓鼠模型中艰难梭菌三重突变体以及化学灭活的突变型毒素A和B的免疫原性和保护潜力。叙利亚金仓鼠模型代表用于模拟人CDAD的最佳可用攻击模型。鼠研究muC.difficile2010-07中所用的相同批次的突变型毒素A和B用在此研究中。作为对照，一个组给予突变型毒素而无包含铝的佐剂。

[0806] 根据表14,5只叙利亚金仓鼠的组通过10μg免疫原进行肌肉内免疫。

[0807] 表14. 仓鼠中测试化学灭活的突变型毒素A和B(分别为SEQ ID NO: 4和6)(hamC.difficile2010-02)

组	免疫原	剂量	数量	途径	日程
1	甲醛灭活的 ^a 突变型毒素 A+B (SEQ ID NO: 4 和 6), AlPO ₄ ^c	各 10 µg	5	IM	初免 0 周, 加强 4、8、12 周
2	甲醛灭活的突变型毒素 A+B (SEQ ID NO: 4 和 6), PBS (无佐剂)	各 10 µg	5	IM	初免 0 周, 加强 4、8、12 周
3	EDC 灭活的 ^b 突变型毒素 A+B (SEQ ID NO: 4 和 6), AlPO ₄ ^c	各 10 µg	5	IM	初免 0 周, 加强 4、8、12 周
4	List Biological 的类毒素, AlPO ₄ ^c	各 10 µg	5	IM	初免 0 周, 加强 4、8、12 周

[0808]

^a 甲醛处理 = 甲醛/甘氨酸在 25°C 处理 2 天; 突变型毒素无细胞毒性且保持结合全部测试的突变型毒素特异性单克隆抗体

^b EDC 处理 = EDC/NHS 在 30°C 处理 4 小时; 突变型毒素无细胞毒性且保持结合全部测试的突变型毒素特异性单克隆抗体

^c 铝离子浓度 = 0.5 mg/mL

1. 动物: 15 只叙利亚金仓鼠, 雌性, 6-8 周龄/各 100-130g。
2. 接种: IM, 各 0.05 ml, 根据上述日程。类毒素将通过 Process Development 提供且将通过配方组在 AlPO₄ 稀释液中配制。组 2 将用作非佐剂化的对照组。
3. 放血: 全部仓鼠在各自免疫前的 0、4、8 和 12 周时放血。
4. 血清样品分析: 中和测试

[0809] 结果: 在突变型毒素免疫后未观察到不利事件。如图12所示, 在单剂突变型毒素后, 对于甲醛灭活的突变型毒素(组1-2), 抗毒素A中和应答为2-3log₁₀, 且对于EDC灭活的突变型毒素(组3), 抗毒素A中和应答为3-4log₁₀。在第二剂后, 抗毒素A抗体在全部三个组中加强。在全部三个组中抗毒素A抗体在第三剂后不显示出增加。在第四免疫后观察到类似结果, 其中滴度增加在不含铝佐剂的甲醛灭活的组中观察到(组2)。

[0810] 抗毒素B中和应答在甲醛灭活的突变型毒素组中为不可检测的(组1-2), 且在单剂后对EDC灭活的突变型毒素刚刚超过21log₁₀(组3)。在第二剂量后, 抗毒素B中和抗体滴度在两个甲醛灭活的组中增加至3-4log₁₀(组1-2), 同时抗毒素B中和抗体滴度在EDC灭活的组中增加至4-5log₁₀(组3)。对于全部三个组, 抗毒素B中和抗体滴度的增加在第三和/或第四剂后观察到, 其中全部组在16周(末剂后)达到峰值。参见图12。

[0811] 在图13中, 针对化学灭活的遗传的突变型毒素的中和抗体应答的水平与List Biological Laboratories, Inc. (Campbell, California) (本文也称为“List Bio”或“List Biologicals”)类毒素(即, 购自List Biological Laboratories的类毒素通过野生型毒素的甲醛灭活来制备; 对照试剂被用于建立仓鼠攻击模型)引发的那些水平相比。

[0812] 如本文所用, 除非另有说明, 图和表中的“FI”是指毒素的甲醛/甘氨酸处理, 2天, 25°C。如本文所用, 除非另有说明, 图和表中的“EI”是指EDC/NHS处理, 4小时, 30°C。在图13中, 5只仓鼠动物用各个突变型毒素组合物处理, 而11只仓鼠动物用购自List Biological 的类毒素处理。

[0813] 图13的数据显示在根据表14施用的仓鼠中, 在两剂后由包含EDC灭活的突变型毒素的免疫原性组合物诱导的针对毒素A(图13A)和毒素B(图13B)的各中和抗体滴度高于List Biologicals类毒素引发的各中和抗体滴度。

[0814] 实施例28: 仓鼠免疫原性研究:C.difficile ham2010-02(续)

[0815] 为了评价突变型毒素的保护功效, 免疫的仓鼠连同非免疫动物的一个对照组被首

先给予口服剂量的氯林可霉素抗生素(30mg/kg)以破坏正常肠道菌群。在5天后,仓鼠用口服剂量的野生型艰难梭菌孢子(630株,100cfu/动物)攻击。每天监测11天后攻击出现CDAD征兆(在仓鼠中被称为湿尾)的动物。使用对大量不同参数临床评分的系统,将被确定具有严重CDAD的动物安乐死。参数包括刺激后的活性、脱水、排泄物、温度和重量等,这些是本领域已知的。

[0816] 在11天,研究终止,将全部存活动物安乐死。图14显示与非免疫对照相比,对各三个免疫组(组1-3,根据表14)的存活曲线。可以看出,非免疫动物在攻击后1-3天全部发展为严重CDAD并需要安乐死(0%存活率)。施用甲醛灭活的突变型毒素的两个组具有60%存活曲线,其中动物不需要安乐死直至3天(组1)或4天(组2)。施用EDC灭活的突变型毒素的组具有80%存活曲线,其中1只(5只中)动物在7天需要安乐死。因此,仓鼠被保护免受艰难梭菌孢子的致死攻击。

[0817] 实施例29:仓鼠免疫原性研究:hamC.difficile2010-03:遗传和化学灭活的艰难梭菌突变型毒素的免疫原性

[0818] 此研究的目的是评价叙利亚金仓鼠模型中未佐剂化的艰难梭菌三重突变体以及化学灭活的突变型毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)的免疫原性。鼠研究muC.difficile2010-07中所用的相同批次的突变型毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)用在此研究中。作为对照,一组(组1)给予磷酸盐缓冲的盐水作为安慰剂。

[0819] 5或10只叙利亚金仓鼠的组用表15的免疫原免疫。动物被给予三剂。此外,动物每两周给药。

表 15: 仓鼠免疫和攻击的实验设计

组	免疫原	剂量	数量	途径	日程
1	安慰剂(PBS 缓冲液)	NA	5	NA	
2	突变型毒素 A+B (分别为 SEQ ID NO: 4 和 6); 甲醛灭活的	各 10 µg	10	IM	初免 0 周, 加强 2、4 周
3	突变型毒素 A+B (分别为 SEQ ID NO: 4 和 6); EDC 灭活的	各 10	10	IM	初免 0 周, 加强 2、4 周
4	突变型毒素 A+B (分别为 SEQ ID NO: 4 和 6); 遗传的	各 10	10	IM	初免 0 周, 加强 2、4 周

[0820] [0821] 结果:参见图15。在安慰剂对照组中未观察到抗毒素A或B抗体。在1剂后,对于甲醛灭活的(组2)和遗传的突变型毒素(组4)的组,观察到抗毒素A中和抗体为2-31log₁₀,且对EDC灭活的组(组3),观察到抗毒素A中和抗体为3-41log₁₀。抗毒素A中和抗体在相关突变型毒素第二次免疫后在各个这些组(2-4)中增加(与图15中2-3周的滴度相比)。在第三剂突变型毒素(4周给予)后,2-4组中抗毒素A中和抗体滴度相比于其4周的滴度增加。

[0822] 抗毒素B中和抗体在第二剂后为可检测的,其中对于遗传的三重突变体(组4),甲醛灭活的(组2)和EDC灭活的(组3)抗毒素B中和抗体增加至3-41log₁₀和2-31log₁₀。在第三次免疫(4周)后,对于甲醛灭活的突变型毒素(组2)和遗传的突变型毒素(组4),抗毒素B中和抗体滴度加强至3-41log₁₀,且对于EDC灭活的突变型毒素(组3),抗毒素B中和抗体滴度加强至4-51log₁₀。

[0823] 对于抗毒素A和抗毒素B中和抗体二者,全部免疫组(组2-4)在6周(3剂后)观察到峰值滴度。

[0824] Alhydrogel/CpG或ISCOMATRIX佐剂化的免疫原性组合物的评估

[0825] 用包含与Alhydrogel、ISCOMATRIX或Alhydrogel/CpG24555 (Alh/CpG) 配制的化学灭活的突变型毒素的免疫原性组合物免疫的仓鼠显示出强中和抗毒素抗血清。观察到当与单独用Alhydrogel配制的疫苗相比，在用Alh/CpG或ISCOMATRIX配制的突变型毒素免疫的组中峰值抗毒素A和抗毒素B应答是2-3倍并在统计学上显著。参见显示50%中和滴度的表32。仓鼠 (n=10/组) 在0、2和4周各用10μg突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质(用100μg Alhydrogel、或200μg CpG 24555+100μg Alhydrogel、或10U ISCOMATRIX配制)进行IM免疫。血清在各个时间点收集并在用于功能性抗毒素活性的毒素中和试验中分析。表32提供几何平均滴度。星号 (*) 表示当与Alhydrogel组中的滴度比较统计学显著 ($p < 0.05$)。

表 32: 仓鼠中佐剂化的突变型毒素药物物质的免疫原性						
50%中和滴度						
	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周
Alhydrogel 滴度:	10	26	88	7425	6128	15965
Alh/CpG 滴度:	10	103	*688	*34572	*23028	*62203
ISCOMATRIX 滴度:	10	27	*246	*12375	8566	*36244
抗毒素 B						
Alhydrogel 滴度:	10	15	10	218	1964	7703
Alh/CpG 滴度:	10	10	18	*5550	*5212	*59232
ISCOMATRIX 滴度:	10	12	12	*7412	*15311	*92927

[0826] [0827] 测试包含用这些佐剂配制的突变型毒素药物物质的免疫原性组合物的保护效力。根据上述方法,对仓鼠免疫并在5周口服给予氯林可霉素 (30mg/kg) 并攻击。包括一组未免疫的仓鼠 (n=5) 作为对照。与单独的Alhydrogel相比 (70% 存活率), 用Alh/CpG或ISCOMATRIX佐剂化的突变型毒素药物物质免疫的仓鼠中观察到增加的效力 (100% 存活率)。因此,仓鼠被保护免受艰难梭菌孢子的致死攻击。

[0828] 实施例30:在食蟹猴中接种艰难梭菌

[0829] 此研究的目的是测试食蟹猴中低剂量和高剂量的EDC灭活的和甲醛灭活的艰难梭菌突变型毒素的免疫原性。全部突变型毒素在作为佐剂的ISCOMATRIX®中配制,除了作为非佐剂化对照的一组(组)。

表 16: 食蟹猴的免疫					
组	免疫原	数量	剂量	途径	日程
1	FI-突变型毒素 A+B (ISCOMATRIX)	5	各 10 μg	IM	初免 0 周, 加强 2、4 周
2	FI-突变型毒素 A+B (ISCOMATRIX)	5	各 100 μg	IM	初免 0 周, 加强 2、4 周
3	EI-突变型毒素 A+B (ISCOMATRIX)	5	各 10 μg	IM	初免 0 周, 加强 2、4 周
4	EI-突变型毒素 A+B (ISCOMATRIX)	5	各 100 μg	IM	初免 0 周, 加强 2、4 周
5	EI-突变型毒素 A+B	5	各 100 μg	IM	初免 0 周,

[0831]

(无佐剂)				加强 2、4 周
动物: 25 只食蟹猴 星号“*”在图 16 中是指在 12 周组中仅具有 4 只食蟹猴, 在 8 周终止放血组具有 1 只食蟹猴 接种: IM, 0.5mL 每剂量, 0、2 和 4 周。突变型毒素组合物如上述制备。突变型毒素组合物在 ISCOMATRIX 中配制, 除了组 5 在没有佐剂的缓冲液中配制。 放血: 周 - 2、0、2、3、4、6、8 和 12 周。对在 8 周具有最高艰难梭菌滴度的动物安乐死和末期放血。 血清样品分析: 蛋白质 ELISA 和中和测试				

[0832] 结果: 图16显示在0、2、3、4、6、8和12周这些动物中的抗毒素中和抗体应答。在单剂后(2周滴度)全部5组抗毒素A滴度为 $2-3\log_{10}$ 。对于各组, 这些滴度在随后各剂后加强。在这些动物中, 3和4周期间滴度未降低。对于全部组, 峰值滴度为 $4-5\log_{10}$ 。在全部时间点, 无ISCOMATRIX佐剂的组(组5)具有最低滴度, 说明使用ISCOMATRIX加强免疫应答。无佐剂对照组(组5)在12周达到峰值滴度, 用高剂量的EDC灭活的突变型毒素免疫的组(组4)也一样; 全部其余组在6周(末剂后2周)达到峰值滴度。全部组中的滴度在第二剂(3周时间点)后加强。如同抗毒素A应答一样, 抗毒素B应答从3周至4周不增加。在第三剂(6周时间点)后, 全部组中抗毒素B中和抗体滴度为 $3-4\log_{10}$, 其中不包括低剂量甲醛灭活的组(组1)和高剂量EDC灭活的组(组4), 二者具有的滴度仅 $>4\log_{10}$ 。对于全部组在12周观察到峰值滴度, 其中不包括低剂量EDC灭活的组(组3), 其在8周具有峰值滴度。全部组具有峰值滴度 $>4\log_{10}$ 。

[0833] 实施例31: 单克隆抗体的产生

[0834] 虽然毒素A和B共有大量结构相似性, 但发现抗体的中和活性为毒素特异的。在此发明中, 鉴定到若干抗体, 其对各个毒素具有特异性, 且针对各个表位和功能结构域, 且对天然毒素具有高亲和力和强中和活性。抗体从用商购甲醛灭活的(FI)-突变型毒素或重组holo-突变型毒素(SEQ ID N0s:4和6)免疫的小鼠中分离, 其中重组holo-突变型毒素通过在分别其产生毒素A和B mAb的催化位点上引入具体突变变为无毒的。抗体的表位作图显示针对毒素A的大量mAb(52中49个)针对毒素的非催化的C末端结构域。

[0835] 针对毒素B的单克隆靶向蛋白质的三个结构域。在共计17种毒素B特异性mAb中, 6种特异于N末端(如野生型艰难梭菌(如630)TcdB的氨基酸1-543), 6种特异于C末端(如野生型艰难梭菌(如630)TcdB的氨基酸1834-2366), 且5种特异于中间易位结构域(如野生型艰难梭菌(如630)TcdB的氨基酸799-1833)。与倾向于不利影响突变型毒素的抗原结构的甲醛灭活方法相比, 使用突变型艰难梭菌毒素(如SEQ ID N0:4和6)作为免疫抗原的方法因此提供了呈递大部分(如果不是全部)的抗原表位的关键优点。

[0836] 实施例32: 毒素A mAb(A3-25)的表征, 其包括具有SEQ ID N0:36的氨基酸序列的可变轻链和具有SEQ ID N0:37的氨基酸序列的可变重链

[0837] mAb A3-25是特别令人感兴趣的, 这是因为此抗体否定了使用用于IgG、IgM和IgA的商购同种型试剂盒来判断其免疫球蛋白(Ig)同种型的全部尝试。使用Ig H-链特异性抗血清的免疫印迹的进一步分析显示A3-25为IgE同种型, 这在mAb制备中是很少见的事件。这通过对分离自A3-25杂交瘤细胞的mRNA的核苷酸测序进一步确认。从A3-25的H-和L-链可变区的核苷酸序列推断出的氨基酸序列显示在图17中。

[0838] 为了进一步评估在艰难梭菌感染和疾病的动物模型中的A3-25mAb, 其Ig同种型根据公开的方法通过将εH链的可变区分子嫁接到鼠γ重链上变为鼠IgG1。

[0839] 实施例33:毒素特异性抗体的中和能力和表位作图

[0840] 而且,为了鉴定功能性/中和抗体,基于作为细胞活力指示物的ATP的测定,评价全部单克隆在标准细胞病变效果(CPE)试验或更严格和定量试验中中和野生型毒素的能力。

[0841] 在共计52个毒素A特异性抗体中,4个mAb(A3-25、A65-33、A60-22和A80-29(表17和图18)显示出不同水平的中和活性。进行BiaCore竞争性结合试验和血球凝集抑制(HI)试验以对抗原表位作图。结果表明这些抗体可靶向毒素A蛋白质的不同表位(表17)。为了进一步鉴定蛋白质上结合位点的位置,抗体在使用已知序列的毒素片段进行免疫印迹或点印迹试验中单独评价。发现全部4种中和mAb针对毒素的C末端区域。

[0842] 从共计17种毒素B特异性抗体中,发现9种为中和的。在9种中和mAb中,其中6种针对B毒素的N末端,另外3种针对B毒素的易位结构域(表18)。基于Biacore竞争性结合试验,9种中和单克隆抗体分为4个表位组,如图19所示。

[0843] 表17:所选毒素A mAb的特征

表位组(Biacore)	mAb #	中和活性	血球凝集抑制	结合特异性	Ig 同种型
1	A3-25	+	-	C 末端	IgE, κ
2	A65-33	+	-	C 末端	IgG2a, κ
3	A80-29	+	+	C 末端	IgG1, κ
ND	A60-22	+	+	C 末端	IgG1, κ
4	A64-6	-	-	进行中	IgG1, κ
	A50-10	-	-	C 末端	IgG1, κ
	A56-33	-	-	进行中	IgG1, κ
ND	A1	-	-	N 末端	IgG1, κ

[0845] 表18:所选毒素B mAb的特征

表位组(Biacore)	mAb #	中和活性	结合特异性	Ig 同种型
1	B2-31	+	N 末端	IgG1, κ
	B5-40			IgG1, κ
	B8-26			IgG1, κ
	B70-2			IgG1, κ
2	B6-30	+	N 末端	IgG1, κ
	B9-30			IgG1, κ
3	B59-3	+	易位结构域	IgG1, κ
	B60-2			IgG1, κ
4	B56-6	+	易位结构域	IgG1, κ
	B58-4			IgG1, κ
5	B12-34	-	C 末端	IgG1, κ
	B14-23			IgG1, κ
	B80-3			IgG1, κ
6	B66-29	-	C 末端	IgG1, κ
7	B84-3	-	C 末端	IgG1, κ

[0847] 实施例34:具有显著增强中和活性的新毒素A抗体组合的鉴定:

[0848] 当在基于ATP的中和试验中单独测试时,4种毒素A mAb(A3-25、A65-33、A60-22和

A80-29) 显示不完全或部分中和毒素A。mAb A3-25为最强力抗体,且其余3种中和性较弱,A80-29仅高于背景(图18)。然而,当A3-25与其余3种mAb中的任一种组合时,在全部三种组合中观察到协同中和作用,其远高于图20A-C中所示各个抗体的中和的总和。此外,全部三种组合显示出通常使用抗毒素A多克隆抗体观察到的完全中和能力。

[0849] 实施例35:具有显著增强中和活性的新毒素B抗体组合的鉴定:

[0850] 我们也观察到使用来自BiaCore分析鉴定的不同表位组的毒素B mAb的协同中和。毒素B mAb B8-26(组1的最显著的mAb)与来自组3的多种mAb组合。这些组合在毒素B特异的中和试验中评价,且结果显示在图21和表19中。

表 19: mAb 对毒素 B 的中和		
mAb	中和滴度	
	CPE	ATP
单独 B8-26	20,480	5,000
单独 B59-3	320	120
单独 B60-2	320	80
B8-26 + B59-3	655,360	~60,000
B8-26 + B60-2	327,680	nd
Nd, 未进行		

[0851] [0852] 当B8-26与表位组3mAb(图21B),但无任何其它mAb(数据未显示)组合时,观察到协同的中和效果。

[0853] 实施例36:通过mAb对安全且有效的突变型毒素组合物的体外筛选:

[0854] 使用体外细胞毒性试验,经由遗传工程产生的艰难梭菌的遗传的突变型毒素A和B(如SEQ ID NO:4和6)显示剩余细胞毒性。虽然我们已经实现了对于各突变型毒素艰难梭菌毒素的细胞毒性的~4log降低,优选突变型毒素的进一步化学灭活,如通过甲醛处理。然而,化学灭活处理可能是严酷的,且可不利地影响这些毒素或突变型毒素的关键抗原性表位。

表 20: WT 毒素、三重突变型毒素和甲醛灭活的(FI, 来自 List Biological) WT 毒素(List Biological, 商购)的体外细胞毒性的比较			
Tcd	来源/处理	EC ₅₀ ng/mL	细胞毒性的降低倍数
TcdA			
毒素 A (SEQ ID NO: 1)	WT	0.92	1
突变型毒素 A (SEQ ID NO: 4)	三重突变型	8600	9348
类毒素 A (FI)	甲醛处理的, 商购	>20,000	>21,739
TcdB			
毒素 B (SEQ ID NO: 2)	WT	0.009	1
突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6)	三重突变型	74	8222
类毒素 B (FI)	甲醛处理的, 商购	4300	477,778

[0855] [0856] 对于生物过程优化,进行实验的统计学设计(DOE)以用于使用甲醛和EDC/NHS处理进行的三重突变型TcdA和B(1mg/mL)的化学灭活。为了优化三重突变型TcdA的甲醛灭活,我们改变了甲醛/甘氨酸(20-40mM)的浓度、pH(6.5-7.5)和温度(25-40°C)。对于三重突变型

TcdB, 我们将甲醛/甘氨酸浓度从2变为80mM, 将温度和pH分别变为25°C和7.0。对于全部甲醛处理的孵育时间均为24小时。对于甲醛灭活, 表21和23的“40/40”表示反应中所用的甲醛和甘氨酸的浓度。对于EDC/NHS处理, 我们将三重突变型TcdA用的EDC/NHS浓度从0.25变为2.5mg/mg, 将三重突变型TcdB用的EDC/NHS浓度从0.125变为2.5mg/mg, 并在25°C孵育4小时。在反应结束时, 全部样品在10mM磷酸盐, pH 7.0中脱盐。纯化后, 对处理的Tcd进行剩余细胞毒性和表位的mAb识别(通过点印迹分析)的分析。目的是鉴定下述处理条件, 此条件将细胞毒性降低至所期望水平($EC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$), 而不负影响被中和mAb组识别的表位(+++或+++)。处理条件(表21-24中用对勾“√”标记)产生可能安全且有效的免疫原性组合物, 其对至少4种中和mAb保持反应性, 同时相对于各野生型毒素细胞毒性显示出细胞毒性的 $6-8 \log_{10}$ 降低。选择的结果在表21-24中说明。来自对三重突变型毒素的不同处理条件的其它数据和来自体外细胞毒性和毒素中和试验的数据显示在表33和表34中。也参见例如上述实施例20和21, 其提供了关于突变型毒素的优选交联处理条件的进一步细节。

表 21: 甲醛灭活的三重突变型 TcdA (SEQ ID NO: 4) 的细胞毒性和中和 mAb 反应性

三重突变型 TcdA 上的化学灭活 反应条件	CPE μg /mL	与 mAb 的反应性(点印迹, 非变性条件)					
		N 末 端	易 位 结 构 域	C 末端 (neut)			
				Mab#6	Mab# 102	A80-29	A3-25
25°C, pH 6.5, 20/20mM	250	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 6.5, 40/40mM √	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 7.5, 40/40mM √	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
40°C, pH 6.5, 40/40mM	>1000	++	++	++++	++++	++++	++++
40°C, pH 7.5, 40/40mM	>1000	++	++	++++	++++	++++	+++
无, 三重突变型毒素 A	18.5-25	++++	++++	++++	++++	++++	++++
FI 类毒素 A (List Biological)	ND	—	—	++	++	+++	+

表 22: EDC 灭活的三重突变型 TcdA (SEQ ID NO: 4) 的细胞毒性和中和 mAb 反应性

三重突变型 TcdA 上的化学灭活 反应条件	CPE μg /mL	与 mAb 的反应性(点印迹, 非变性条件)					
		N 末 端	易 位 结 构 域	C 末端 (neut)			
				Mab#6	Mab# 102	A80-29	A3-25
25°C, 0.25mg/mg, 4hr √	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, 0.5mg/mg, 4hr √	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, 1.25mg/mg, 4hr √	>1000	++	++	++++	+++	++++	++++
25°C, 2.5mg/mg, 4hr √	>1000	++	++	++++	+++	++++	+++
无, 三重突变型 TcdA	18.5-25	++++	++++	++++	++++	++++	++++
FI 类毒素 A (List Biological)	ND	—	—	++	++	+++	+

[0857]

[0858]

表 23：甲醛灭活的三重突变型 TcdB (SEQ ID NO: 6) 的细胞毒性和中和 mAb 反应性

三重突变型 TcdB 上的化学灭活反应条件	CPE (μg /mL)	mAb # (N 末端 aa 1 – 543)		mAb # (中间-/C 末端 aa 544 – 2366)	
		B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
25°C, pH 7.0, 80/80mM, 24hr ✓	>1000	++++	++++	++++	+++
25°C, pH 7.0, 40/40mM, 24hr ✓	>1000	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 7.0, 10/10mM, 24hr	15.6	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 7.0, 2/2mM, 24hr	<0.98	++++	++++	++++	++++
无, 三重突变型 TcdB	0.058	++++	++++	++++	++++
FI 类毒素 B (List Biological)	ND	++	++	++	++

表 24：EDC 灭活的三重突变型 TcdB (SEQ ID NO: 6) 的细胞毒性和中和 mAb 反应性

三重突变型 TcdB 上的化学灭活反应条件	CPE (μg /mL)	mAb # (N 末端 aa 1 – 543)		mAb # (mid-/C 末端 aa 544 – 2366)	
		8-26	9-30	56-6	59-3
25°C, 0.125mg/mg, 4hr	3.9	++++	++++	++++	++++
25°C, 0.25mg/mg, 4hr	250	++++	++++	++++	++++
25°C, 0.5mg/mL, 4hr ✓	>1000	++++	++++	++++	++++
25°C, 1.25mg/mg, 4hr ✓	>1000	++++	++	++	++
25°C, 2.5mg/mg, 4hr ✓	>1000	++++	++	++	++
无, 三重突变型 TcdB	0.058	++++	++++	++++	++++
FI 类毒素 B (List Biological)	ND	++	++	++	++

[0861] 表33

[0862]

		细胞毒性测试 (EC50)		与 mAb 的反应性(点印迹, 非变性条件)					
样 品 #	突变型毒素 A (SEQ ID NO: 4)样 品 ID	CPE; 24h μ g /mL	CPE, 72h μ g /mL	N 末端 Mab#6 102	易位结 构域 Mab#	C 末端 (neut)			
						80-29	3-25	60-22	65-33
1	L44166-157A	>1000	>1000	++++	++++	++++	+++	++++	++++
2	L44166-157B	>1000	>1000	+++	++++	++++	+++	++++	++++
3	L44166-157C	>1000	>1000	+++	+++	++++	+++	++++	++++
4	L44166-157D	>1000	>1000	+++	+++	++++	+++	++++	++++
5	L44905-160A	>1000	>1000	++	++	++++	++	++++	++++
6	L44166-166	>1000	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
7	L44905-170A	ND	>1000	+	+	++	++	++	+
8	L44897-61	>1000	ND	+++	++	++++	++++	++++	++++
9	L44897-63	>1000	ND	++++	+++	++++	+++	++++	++++
10	L44897-72 管#1	250	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
11	L44897-72 管#2	>1000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
12	L44897-72 管#3	>1000	ND	+++	+++	++++	++++	++++	++++
13	L44897-72 管#4	>1000	ND	+++	++++	++++	++++	++++	++++
14	L44897-72 管#5	>1000	ND	+++	++++	++++	++++	++++	++++
15	L44897-75 管#6	>1000	ND	+++	++++	++++	++++	++++	++++
16	L44897-75 管#7	>1000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
17	L44897-75 管#8	>1000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
18	L44897-75 管#9	>1000	ND	++	+++	++++	++++	++++	++++
19	L44897-75 管#10	>1000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
20	L44897-75 管#11	>1000	ND	++	++	++++	++++	++++	+++
21	L44897-101 (预修 饰) TxA 对照	23.4	<7.8	++++	++++	++++	++++	++++	++++
22	L44897-101, 2 小时	187.5	155.9	+++	++++	++++	++++	++++	++++
23	L44897-101, 4 小时	375	380.3	+++	++++	++++	++++	++++	++++
24	L44897-101, 6 小时	500	429.6	+++	++++	++++	++++	++++	++++
25	L44897 102, 24 小 时	>1000	>1000	++	++++	++++	++++	++++	++++
26	L44897-103, 51 小 时	>1000	>1000	+	+++	+++	++++	++++	+++
27	L44897-104, 74 小 时	>1000	>1000	—	+++	+++	+++	+++	+++
28	L44897-105, 120 小 时	>1000	>1000	—	++	++	+++	+++	++
29	L44980-004	>1000	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
30	反应#10 周, 25C	750 μ g/mL	ND	ND	++	++	+++	+++	++

[0863]	31	反应#1 1周, 25C	375 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
	32	反应#1 2周, 25C	375 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
	33	反应#1 3周, 25C	375 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
	34	反应#1 4周, 25C	250 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
	35	反应#1 3周, 37C	93.8 ug/mL	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
	36	反应#2 0周, 25C	375 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
	37	反应#2 1周, 25C	375 ug/mL	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
	38	反应#2 2周, 25C	750 ug/mL	ND	ND	++	++	++	+++	++
	39	反应#2 3周, 25C	250 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	++++	+++
	40	反应#2 4周, 25C	250 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	++++	+++
	41	反应#2 3周, 37C	187.5 ug/mL	ND	ND	+++	+++	++++	++++	+++
	42	TxA 对照 3周, 25C	18.8 ug/mL	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
	43	TxA 对照 3周, 37C	25 ug/mL	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
	44	L44897-116-6 29.5 小时	> 2000 ug/mL	ND	ND	++	++	++	+++	++
	45	L44897-116-7 57.5 小时	> 2000 ug/mL	ND	ND	++	++	++	+++	++
	46	L44897-116 -8 79.5 小时	> 2000 ug/mL	ND	ND	+	+	+	+++	+
	47	L44897-116-9 123.5 小时	> 2000 ug/mL	ND	ND	++	++	++	+++	++
	48	L44897-139	>1000	ND	++	++++	++++	++++	++++	++++
	49	L44166-204	>1000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++

[0864] 用于表33所列三重突变型毒素A (SEQ ID NO:4) 的样品的化学交联反应条件

[0865] 样品1-4用EDC/NHS修饰。条件:30℃, 20mM MES/150mM NaCl pH6.5。反应通过加入EDC起始。2小时反应后, 样品A、B和C具有1M甘氨酸, 加入至50mM甘氨酸终浓度。样品D未加入甘氨酸。反应用下述不同重量比的突变型毒素A (SEQ ID NO:4) :EDC:NHS建立。

[0866] 1 L44166-157A 1:0.25:0.25w:w:w

[0867] 2 L44166-157B 1:1.25:1.25

[0868] 3 L44166-157C 1:2.5:2.5

[0869] 4 L44166-157D 1:2.5:2.5

[0870] 样品5 L44905-160A 80mM HCHO, 80mM甘氨酸, 80mM NaPO4pH7, 1mg/mL突变型毒素A (SEQ ID NO:4) 蛋白质, 48小时反应, 25℃。

[0871] 样品6 L44166-166突变型毒素A (SEQ ID NO:4) 的EDC/NHS修饰,25℃,20mM MES/150mM NaCl pH 6.5。突变型毒素A (SEQ ID NO:4) :EDC:NHS=1:0.5:0.5。反应通过加入EDC起始。2小时反应后,加入1M甘氨酸至0.1M甘氨酸终浓度,并进一步孵育2小时。此后,反应缓冲液在Sephadex G25上交换进入1X PBS。

[0872] 样品7 L44905-170A 80mM HCHO,80mM甘氨酸,80mM NaPO₄pH7,1mg/mL突变型毒素A (SEQ ID NO:4) 蛋白质,48小时反应,35C。此甲醛反应用于产生过量交联,使得抗原结合严重降低。

[0873] 样品8 L44897-61 32mM HCHO/80mM甘氨酸,72小时反应,25℃。

[0874] 样品9 L44897-63 80mM HCHO/80mM甘氨酸,72小时反应,25℃。

[0875] 以下反应全部具有24小时反应时间:

[0876] 样品10 L44897-72管#1 25℃,80mM NaPi pH 6.5,20mM HCHO/20mM甘氨酸

[0877] 样品11 L44897-72管#2 25℃,80mM NaPi pH 6.5,40mM HCHO/40mM甘氨酸

[0878] 样品12 L44897-72管#3 32.5℃,80mM NaPi pH 7.0,30mMHCHO/30mM甘氨酸

[0879] 样品13 L44897-72管#4 32.5℃,80mM NaPi pH 7.0,30mMHCHO/30mM甘氨酸

[0880] 样品14 L44897-72管#5 32.5℃,80mM NaPi pH 7.0,30mMHCHO/30mM甘氨酸

[0881] 样品15 L44897-75管#6 25℃,80mM NaPi pH 7.5,20mM HCHO/20mM甘氨酸

[0882] 样品16 L44897-75管#7 25℃,80mM NaPi pH 7.5,40mM HCHO/40mM甘氨酸

[0883] 样品17 L44897-75管#8 40℃,80mM NaPi pH 6.5,20mM HCHO/20mM甘氨酸

[0884] 样品18 L44897-75管#9 40℃,80mM NaPi pH 6.5,40mM HCHO/40mM甘氨酸

[0885] 样品19 L44897-75管#10 40℃,80mM NaPi pH 7.5,20mM HCHO/20mM甘氨酸

[0886] 样品20 L44897-75管#11 40℃,80mM NaPi pH 7.5,40mM HCHO/40mM甘氨酸

[0887] 以下8个样品在25℃反应所列时间,80mM NaPi pH 7.0,包含78mMHCHO和76mM甘氨酸

[0888] 样品21 L44897-101(预修饰)Tx A对照0时间对照样品,未修饰或暴露于HCHO/甘氨酸

[0889] 样品22 L44897-101,2hr

[0890] 样品23 L44897-101,4小时

[0891] 样品24 L44897-101,6小时

[0892] 样品25 L44897 102,24小时

[0893] 样品26 L44897-103,51小时

[0894] 样品27 L44897-104,74小时

[0895] 样品28 L44897-105,120小时

[0896] 样品29 (L44980-004) 为EDC/NHS修饰的突变型毒素A (SEQ ID NO:4) (三重突变型毒素A (SEQ ID NO:4)-EDC)。反应条件为:25℃,缓冲液为20mM MES/150mM NaCl pH 6.6。三重突变型毒素A (SEQ ID NO:4) :EDC:NHS=1:0.5:0.5w:w:w。反应通过加入EDC起始。2小时反应后,加入甘氨酸至0.1M终浓度,并在25C进一步反应2小时。反应通过在Sephadex G25上脱盐终止。

[0897] 以下12个样品和2个对照为回归实验,其中样品在25℃和37℃孵育。

[0898] 反应1=25℃,80mM NaPi pH 7.0,仅40mM HCHO(无甘氨酸),24小时反应。

[0899] 反应2=25℃,80mM NaPi pH 7.0,40mM HCHO/40mM甘氨酸,24小时反应。

样品	反应
30	反应#1 0 周, 25°C
31	反应#1 1 周, 25°C
32	反应#1 2 周, 25°C
33	反应#1 3 周, 25°C
34	反应#1 4 周, 25°C
35	反应#1 3 周, 37°C
[0900]	36 反应#2 0 周, 25°C
	37 反应#2 1 周, 25°C
	38 反应#2 2 周, 25°C
	39 反应#2 3 周, 25°C
	40 反应#2 4 周, 25°C
	41 反应#2 3 周, 37°C
	42 TxA 对照 3 周, 25°C
	43 TxA 对照 3 周, 37°C
[0901]	以下4个样品通过在25°C反应所列时间产生, 80mM NaPi pH 7.0, 40mM HCHO/40mM甘氨酸
[0902]	44 L44897-116-6 29.5小时
[0903]	45 L44897-116-7 57.5小时
[0904]	46 L44897-116-8 79.5小时
[0905]	47 L44897-116-9 123.5小时
[0906]	样品48 L44897-139 48小时反应, 25°C, 80mM NaPi pH 7.0, 40mM HCHO/40mM甘氨酸。
[0907]	样品49 L44166-204突变型毒素A (SEQ ID NO:4) 的EDC/NHS修饰, 25°C, 缓冲液1x PBS pH7.0。突变型毒素A (SEQ ID NO:4) :EDC:NHS=1:0.5:0.5w:w:w。使用EDC/NHS进行2小时反应, 随后加入1M甘氨酸至0.1M甘氨酸终浓度, 并进一步孵育2小时。缓冲液在Sephadex G25上交换进入20mM L-组氨酸/100mM NaCl pH 6.5。

表 34

突变型毒素 B 样品编号	细胞毒性测试(EC50)		与 neut mAb 的反应性(点印迹, 非变性条件)				对全部 4 种 mAb 的强反应性	
	CPE; 24h	ATP, 72h	mAb # (N 末端 aa 1 – 543) 8-26 9-30	mAb # (中间 -C 末端 aa 544 – 2366) 56-6 59-3				
[0908]	L44905-86-01 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), 未处理的对照	<0.1 μg /mL	<0.1μg/mL	++++	++++	++++	++++	√
	L44905-86-02 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, 1 天	≥100 μg/mL	2.2μg/mL	++++	++++	++++	++++	√
	L44905-86-03 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, 1 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	+++	++++	++	+++	√*
	L44905-86-04 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, 1 天	>100 μg/mL	5.2 μg/mL	++++	++++	++++	++++	√
	L44905-86-05 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, 1 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	++++	++++	++	+++	√*
	L44905-86-06 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, 1 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	++++	-	++++	+++	
	L44905-86-07 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, 1 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	++++	-	++++	+++	
	L44905-86-08 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, 5 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	++++	++++	++++	+++	√
	L44905-86-09 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, 5 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	++	++	-	+	

[0909]	L44905-86-10 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, 5 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	++++	++++	++++	√
	L44905-86-11 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, 5 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++	++++	-	+	
	L44905-86-12 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, 5 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	-	++++	+++	
	L44905-86-13 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, 5 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	-	++++	++++	
	L44905-86-14 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, 7 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	++++	++++	++++	√
	L44905-86-15 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, 7 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	++++	-	+	
	L44905-86-16 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, 7 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	++++	+++	++++	√
	L44905-86-17 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, 7 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++	++	-	+	
	L44905-86-18 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, 7 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	-	++++	++++	
	L44905-86-19 三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, 7 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	-	++	++	
	L34346-30A	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	++++	++++	++++	√
	L34346-30B	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	++++	++++	++++	√
	商购, FI 类毒素 B (List Biologicals)	ND	ND	++++	++++	++++	++++	√
	商购, 对照毒素 B wt (List Biologicals)	22.5 pg/ mL	7.8 pg/ mL	+++	++	+++	+++	√

[0910]

对照, 重组三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6)	78 ng/mL	72 ng/ml	+++	++	++++	+++	+++	√
--------------------------------	----------	----------	-----	----	------	-----	-----	---

- [0911] 用于表34中所列突变型毒素B的样品的化学交联反应条件
- [0912] 根据以下反应条件对三重突变型毒素B(SEQ ID NO:6)进行化学交联并测试。在涉及三种甲醛反应变化和两种孵育温度的实验中测试L44905-86样品。每天,从总计18个样品中取6个样品。列表中的第一样品为未处理的对照(其使得共计19个样品)。未处理的对照包括未处理的三重突变型毒素B多肽(SEQ ID NO:6)。
- [0913] 反应1("Rxn1")=80mM HCHO,80mM甘氨酸,80mM NaPO₄pH 7,1mg/mL三重突变型毒素B(SEQ ID NO:6)蛋白质。
- [0914] 反应2("Rxn2")=80mM HCHO,无甘氨酸,80mM NaPO₄pH 7,1mg/mL三重突变型毒素B(SEQ ID NO:6)蛋白质。
- [0915] 反应3("Rxn3")=80mM HCHO,无甘氨酸,80mM NaPO₄pH 7,1mg/mL三重突变型毒素B(SEQ ID NO:6)蛋白质+氰基硼氢化物作图。氰基硼氢化物作图包括将80mM CNBrH₄加入至脱盐的终反应并在36°C孵育24小时。
- [0916] 对于样品L34346-30A 0.5g EDC和NHS/每克三重突变型毒素B(SEQ ID NO:6),4小时,30°C,20mM MES,150mM NaCl,pH 6.5。
- [0917] 对于样品L34346-30B 0.5g EDC和NHS/每克三重突变型毒素B(SEQ ID NO:6),2小时,30°C,随后加入甘氨酸(g/L终浓度)并在30°C孵育另外2小时,20mM MES,150mM NaCl,pH 6.5。L34346-30A和L34346-30B两个反应间的唯一差异为将甘氨酸加入至L34346-30B。
- [0918] 实施例37:免疫原性组合物诱导的抗体能够中和来自各种艰难梭菌株的毒素
- [0919] 为了评价是否包括突变型毒素药物物质的免疫原性组合物诱导的抗体可中和广谱的不同毒素序列,对代表不同核糖核酸型和毒素型的菌株测序,以鉴定与突变型毒素药物物质相比不同株间遗传多样性的程度。包含来自各种株分泌的毒素的培养物上清液随后在使用来自免疫仓鼠的血清的体外中和试验中测试,以确定免疫原性组合物的覆盖范围,并确定免疫原性组合物保护免受来自流行临床株的不同毒素的能力。
- [0920] HT-29细胞(结肠癌细胞系)和IMR-90细胞均被用于测试从CDC株表达的毒素的中和。HT-29细胞对TcdA更敏感;与对于TcdB的3.3ng/mL相比,这些细胞中纯化的TcdA的EC₅₀为100pg/mL。另一方面,IMR-90细胞对TcdB更敏感;与对于TcdA的0.92-1.5ng/mL相比,这些细胞中纯化的TcdB的EC₅₀为9-30pg/mL。对这些细胞系中TcdA和TcdB二者的试验特异性通过使用多克隆和单克隆毒素特异的抗体来确认。为了试验标准化,24个CDC分离物的培养滤液在为4倍于它们各自EC₅₀值的浓度下测试。3个毒株具有的毒素水平对于在中和试验中测试而言太低。
- [0921] 从CDC获得代表覆盖美国和加拿大超过95%的艰难梭菌流行株的不同核糖核酸型/毒素型的24个菌株。这些分离物之中有代表核糖核酸型027、001和078的菌株,其为美国、加拿大和英国的CDAD的三种流行病株。菌株2004013和2004118代表核糖核酸型027;菌株2004111代表核糖核酸型001,且菌株2005088、2005325和2007816代表核糖核酸型078。为了鉴定引起疾病的临床分离物和630株之间的遗传多样性的程度,对来自这些临床株的毒素基因(tcdA和tcdB)完全测序。参见表35。毒素的氨基酸序列在MegalignTM程序(DNASTAR[®] Lasergene[®])中使用ClustalW比对并分析其序列相同性。对于tcdA,基因组比对分析显示全部临床分离物和株630具有全部约98-100%的氨基酸序列相同性。tcdA基因的C末端部分略有更高差异。对显示更高序列差异的tcdB基因进行相同分析。值得注

意,菌株2007838/NAP7/126和2007858/NAP1/unk5与630株在N末端(79–100%)和C末端结构域(88–100%;数据未显示)显示出最大差异模式。

[0922] 仓鼠血清库(HS)收集自被包含突变型TcdA(SEQ ID N0:4)和突变型TcdB(SEQ ID N0:6)的免疫原免疫的叙利亚金仓鼠,其中突变型毒素根据例如上述实施例29,表15用EDC灭活并用磷酸铝配制。表35的结果显示至少来自各个培养物上清液的毒素B在体外中和试验中被来自免疫仓鼠的血清中和。

[0923] 表35.来自CDC的艰难梭菌株的描述和免疫仓鼠血清以中和各种毒素的能力

菌株	PFGE 类型	核糖核酸型	被仓鼠血清中和
2005088	NAP7	78	是
2007816	NAP7-相关的	78	是
2005325	NAP7	78	是

菌株	PFGE 类型	核糖核酸型	被仓鼠血清中和
2004013	NAP1	27	是
2007886	NAP1		是
2008222	NAP4	77	是
2004206	NAP4	154	是
2005283	NAP5	Unk3	未测试 ^b
2009141	NAP2		是
2007838	NAP7	126	是
2004111	NAP2	1	是
2007070	NAP10	70	是
2006017	NAP12	15	是
2009078	NAP11	106	未测试 ^b
2007217	NAP8	126	是
2006376	NAP9	17	是
2007302	NAP11	Unk2	是
2004118	NAP1	27	是
2005022	NAP3	53	是
2009292	NAP1		是
2004205	NAP6	2	是
2007858	NAP1	Unk5	是
2009087	NAP11	106	未测试 ^b
2005359	NAP1-相关的		是

[0926] b毒素水平太低而无法进行中和试验。

[0927] 图23描述了使用来自各自艰难梭菌株的毒素制备物在IMR-90细胞上进行的中和试验结果。数据显示仓鼠抗血清中的TcdB中和抗体能够中和来自全部测试的21个分离物(包括强毒株和TcdA阴性、TcdB阳性毒株)的毒素。艰难梭菌的至少16个不同菌株获得自CDC(Atlanta, GA)(前述),且在本领域已知且上述的适合条件下在艰难梭菌培养基中培养。分

析包含分泌的毒素的培养上清液以确定它们在IMR-90单层上的细胞毒性(EC₅₀)，并随后使用来自突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质(磷酸铝配制)免疫的仓鼠的血清的各种稀释，在标准体外中和试验中以4倍EC₅₀测试。使用上述体外细胞毒性试验，测定获得自各菌株的培养上清液的未加工的毒素和纯化的毒素(获得自List Biologicals的商购毒素)(并非从各上清液纯化)对IMR-90细胞的细胞毒性。

[0928] 在图23A-K中，图表代表获自体外细胞毒性测试的结果(前述)，其中ATP水平(RLU)针对以下物质的浓度增加绘制：艰难梭菌培养基和仓鼠血清库(■)；未加工的毒素和仓鼠血清库(●)；纯化的毒素和仓鼠血清库(▲)；未加工的毒素(▼)，对照；和纯化的毒素(◆)，对照。来自各个菌株的毒素以4xEC₅₀值加入至细胞。

[0929] 如图23A-K所示，相比于各仅有毒素的对照，接受所述免疫原的仓鼠令人惊奇地出现显示出针对来自至少以下16种不同艰难梭菌CDC株的毒素的中和活性的中和抗体：2007886(图23A)；2006017(图23B)；2007070(图23C)；2007302(图23D)；2007838(图23E)；2007886(图23F)；2009292(图23G)；2004013(图23H)；2009141(图23I)；2005022(图23J)；2006376(图23K)。也参见对于其它艰难梭菌株的表35，来自这些其它艰难梭菌株的毒素被测试，且被包含突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质(在磷酸铝中配制)的免疫原性组合物中和。

[0930] 在另一研究中，在使用来自施用有突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质(用Alhydrogel配制)的仓鼠的血清的体外中和试验中，测试包含来自各种艰难梭菌株(从CDC和Leeds Hospital, UK获得)的分泌的毒素的培养上清液。参见用于实验设计的表36。结果显示在表37和表38中。

[0931]

表 36：实验设计

测试对照	在使用 HT-29 细胞的测试中：兔抗血清(抗毒素 A 多克隆 Fitzgerald Industries, #70-CR65)和参照毒素 A(野生型毒素 A, 来自 List Biologicals) 在使用 IMR-90 细胞的测试中：兔抗血清(抗毒素 B 多克隆 Meridian Life Science, #B01246R)和参照毒素 B(野生型毒素 B, 来自 List Biologicals)
样品 对照	在使用 HT-29 细胞的测试中：HS 血清 + 参照毒素 A 在使用 IMR-90 细胞的测试中：HS 血清 + 参照毒素 B
	HS 血清+630 wt 毒素
	HS 血清+ IMR-90 或 HT-29 细胞系的培养基
	HS 血清+ VPI11186 的培养上清液
测试样品	HS + 各艰难梭菌的培养上清液
仓鼠抗血清的来源(HS)	向动物施用配制有 Alhydrogel 的突变型毒素 A 药物物质和突变型毒素 B 药物物质

表 37：免疫原性组合物诱导的抗体中和来自 CDC 的各种野生型艰难梭菌株(包括强毒株)的毒素 A 和毒素 B

[0932]

艰难梭菌株	PFGE 类型	核糖核酸型	毒素类型	其它归类方法	被 HS 中和 (IMR-90, 毒素 B)	被 HS 中和 (HT-29, 毒素 A)
2004111	NAP2	1	0	各个毒素序列与菌株	是	是
2009141	NAP2		0	630 的毒素具有 100%	是	是

[0933]

2006017	NAP12	15	0	同源性 在美国和欧洲流行程度增加	是	是
2007302	NAP11	Unk2	0		是	是
2009087	NAP11	106	0		是	是
2005022	NAP3	53	0		是	是
2005283	NAP5	Unk3	0		是	是
2009078	NAP5	53	0		是	是
2004206	NAP4	154	0		是	是
2008222	NAP4	77	0		是	是
2004205	NAP6	2	0		是	是
2007070	NAP10	70	0		是	是
2006376	NAP9	17	VIII	txnA-/txnB+ 在美国和欧洲流行程度增加	是	N/A
2007816	NAP7-related	78	V		是	是
2007838	NAP7	126			是	是
2005088	NAP7	78			是	是
2005325	NAP7	78			是	是
2007217	NAP8	126			是	是
2004013	NAP1	27	III NAP1/027/III	强毒 NAP1/027/III	是	是
2004118	NAP1	27			是	是
2009292	NAP1				是	是
2005359	NAP1 相关的				是	是
2007858	NAP1	Unk5	IX/XXIII	其它	是	是
2007886	NAP1		IX/XXIII		是	是

表 38：免疫原性组合物诱导的抗体中和来自欧洲的各种野生型艰难梭菌株

(包括强毒株)的毒素 A 和毒素 B

[0934]

艰难梭菌株	PFGE 类型	其它归类方法	毒素类型	被 HS 中和(IMR-90, 毒素 B)	被 HS 中和(HT-29, 毒素 A)
001	NAP2	毒素类型 0 菌株	0	是	是
002	NAP6			是	是
012 (004)	NAPCR1			是	是
014	UK			是	是
015	NAP12			是	是
020	NAP4			是	是
029	UK			是	是
046	UK			是	是
053	NAP5			是	是
059	UK			是	是
077	UK			是	是
078	UK			是	是
081	UK			是	是
087	UK			是	是

[0935]

095	UK			是	是
106	UK			是	是
117	UK			是	是
017	NAP9	txnA-/txnB+	VIII	是	NA
027	NAP1	强毒	III	是	是
075	UK			是	是
003	NAP10	其它	I	是	是
023	UK		IV	是	是
070	UK		XIII	是	是
126	UK		UK	是	是
131	UK		UK	进行中	是

野生型艰难梭菌株获得自 Leeds Hospital, UK.

“UK”= 未知状态

NA, 不可行; 菌株不产生; 在毒素 A 中和测试中未测试

[0936] 实施例38:EDC/NHS三重突变型毒素的肽作图

[0937] 为了表征EDC/NHS灭活的三重突变型毒素,肽作图实验在四批次EDC/NHS-处理的三重突变型毒素A (SEQ ID N0:4) 和四批次EDC/NHS-处理的三重突变型B (SEQ ID N0:6) 上进行。在用胰蛋白酶消化突变型毒素后,所得肽片段使用反向HPLC分离。使用质谱分析来鉴定因灭活过程而出现的修饰。对于突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质,鉴定到大于95%的理论的胰蛋白酶的肽。鉴定到交联和甘氨酸加合物(甘氨酸被用作加帽剂)。在突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质中,也观察到β-丙氨酸加合物。不受机理或理论的束缚,β-丙氨酸加合物似乎得自于3摩尔NHS与1摩尔EDC的反应,其形成NHS灭活的β-丙氨酸。此分子能够随后与赖氨酸基团反应以形成β-丙氨酸加合物(+70Da)。在EDC/NHS处理的三重突变型毒素B样品中,也观察到低水平的(0.07摩尔/摩尔蛋白质)脱氢丙氨酸(-

34Da)。脱氢丙氨酸是半胱氨酸残基去磺化的结果。相同类似和程度的修饰在全部4个批次的各个突变型毒素中观察到,说明此方法产生一致的产物。肽作图(大于95%序列覆盖率)确认存在修饰。修饰的总结显示在表39中。参见图24-25。此外,与缺少化学灭活下各三重突变型毒素A和三重突变型毒素B的大小和电荷异质性相比,三重突变型毒素A药物物质和三重突变型毒素B药物物质的大小和电荷异质性增加。作为结果,分子排阻色谱(SEC)和阴离子交换色谱(AEX)图具有相对宽的峰(数据未显示)。

[0938] 表39. 突变型毒素药物物质中观察到的修饰的总结

修饰	修饰残基的#	残基的总#	修饰的程度	摩尔修饰的/摩尔蛋白质
突变型毒素 A 药物物质				
交联	2	313 Asp/Glu	16-40%	0.6
甘氨酸部分	8	313 Asp/Glu	10-53%	2.2
β丙氨酸部分	19	233 Lys	10-60%	4.7
突变型毒素 B 药物物质				
交联	3	390 Asp/Glu	11-63%	0.8
甘氨酸部分	23	390 Asp/Glu	10-31%	3.9
β丙氨酸部分	10	156 Lys	12-42%	2.6
脱氢丙氨酸	2	8 Cys	1.0-3.5%	.07

[0940] 修饰的程度通过将修饰肽的HPLC面积除以天然+修饰的肽的HPLC面积来计算。

[0941] 实施例39:药物产物制备

[0942] 艰难梭菌免疫原性组合物(药物产物)包含两种活性药物成分(突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质)。示例性药物产物为冻干配方,包含10mM Tris缓冲液(pH 7.4)、4.5% (w/w) 海藻糖二水合物和0.01% (w/v) 聚山梨醇酯80,包含各个突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质。参见表40。免疫原性组合物通过用稀释液或包含Alhydrogel的稀释液重悬冻干的疫苗制备注射剂。安慰剂将包括用于注射的无菌生理盐水(0.9%氯化钠)。

[0943] 表40

组分	所选的
配方剂型	冻干的
[0944] 抗原剂量, 每 0.5 mL	25、50、100 μg 各 EDC/NHS 处理的三重突变型毒素 A (SEQ ID NO: 4) 和 EDC/NHS 处理的三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6)
pH	7.4 ± 0.5
缓冲液	10 mM Tris
稳定剂/填充剂	4.5% 海藻糖二水合物 (3 – 6%)
表面活性剂	0.01% 聚山梨醇酯 80 (0.005 – 0.015%)
[0945] 容器盖	2 mL 13 mm 1 型 flint 玻璃瓶, Blowback, West - Flurotec

[0946] 缓冲液制备

[0947] 将注射用水 (WFI) 加入混合器皿。混合时, 加入赋形剂并溶解直至进入溶液。测定 pH。如果需要, 用 HCl 将 pH 调节至 7.4 ± 0.1 。将溶液用 WFI 稀释至终重量, 随后使用 0.22 μm Millipore Express SHC XL150 过滤器过滤。在过滤前取预过滤生物负荷量减少的样品。取样过滤的缓冲液用于重量摩尔渗透压浓度和 pH。

[0948] 配方制剂

[0949] 解冻的突变型毒素药物物质基于预算算量按以下操作顺序在配方器皿中合并 (pooled): 首先向器皿中加入 50% 的目标稀释缓冲液体积至 0.6 mg/mL, 随后加入突变型毒素 A 药物物质, 并在 100 rpm 下混合 5 分钟。突变型毒素 B 药物物质随后加入器皿中, 且将溶液进一步稀释至 0.6 mg/mL 稀释点, 并随后在 100 rpm 下混合另外 5 分钟。去除样品, 并测试总突变型毒素浓度。基于过程中突变型毒素浓度值将溶液稀释至 100 体积 %, 随后在 100 rpm 下混合 15 分钟。取样配制的药物产物用于 pH 和生物负荷量预过滤。配制的药物产物随后使用 Millipore Express SHC XL150 过滤, 过夜储存, 或送至装填线用于无菌过滤。

[0950] 配制的块状物被送至装填区域, 取样用于生物负荷量, 并随后使用两个串接 Millipore Express SHC XL150 过滤器无菌过滤。配制的块状物以 0.73 mL 的目标装填体积被装填入去热原的玻璃瓶中。装填的瓶被部分塞好, 并随后置于冻干器中。冻干循环如表 41 执行。在循环结束, 将冻干室用氮气回填至 0.8 atm, 随后完全塞紧塞子。将室放空, 并将瓶使用 flip-off 密封盖好。

[0951] 表 41. 艰难梭菌药物产物冻干循环设定点

步骤	温度 (°C)	Ramp (分钟)	浸泡 (分钟)	压力
[0952]	上样	5°C	N/A	60
	冷冻 1	-50°C	183	60
	退火	-10°C	133	180
	冷冻 2	-45°C	117	90
[0953]	真空起始	-45°C	-	60
	一次干燥	-30°C	75	3420
	二次干燥	30°C	300	600
	储存	5°C	50	-

[0954] 药物产物稳定性数据总结在表42中。数据提示药物产物在2-8°C储存期间至少3个月是物理和化学稳定的,或在25°C或40°C储存期间至少1个月是物理和化学稳定的。在两种储存条件下,分子排阻色谱(SEC)测定的杂质水平并未改变,在测试的最近时间点内体外抗原性也未改变。

[0955] 表42:冻干药物产物的稳定性^a

	药物产物配方			
	t=0	1 个月, 25°C	1 个月, 40°C	3 个月, 2-8°C
重构前的外观	白色饼, 基本无可见的外源颗粒物质	白色饼, 基本无可见的外源颗粒物质	白色饼, 基本无可见的外源颗粒物质	白色饼, 基本无可见的外源颗粒物质
重构后的外观	清澈无色溶液	清澈无色溶液	清澈无色溶液	清澈无色溶液
pH	7.5	7.6	7.6	7.5
强度, 通过 AEX (μg/mL)	<ul style="list-style-type: none"> • 突变型毒素 A 药物物质 212 • 突变型毒素 B 药物物质 235 	<ul style="list-style-type: none"> • 突变型毒素 A 药物物质 193 • 突变型毒素 B 药物物质 223 	<ul style="list-style-type: none"> • 突变型毒素 A 药物物质 191 • 突变型毒素 B 药物物质 222 	<ul style="list-style-type: none"> • 突变型毒素 A 药物物质 193 • 突变型毒素 B 药物物质 230
杂质, 通过 SEC	< 2.5%	2.8%	2.8%	2.9%
特征, 通过 SEC	HMMS: 29.6% 单体: 68.0%	HMMS: 30.2% 单体: 67.1%	HMMS: 30.2% 单体: 67.1%	HMMS: 28.5% 单体: 68.7%
湿度	0.5	NA	NA	NA

[0957] a冻干的DP用60mM NaCl稀释液重构以用于这些测试。

[0958] 实施例40:疫苗稀释液

[0959] 对于盐水,将60mM NaCl用作无任何佐剂的冻干药物产物的稀释剂,以确保重构时的等渗溶液。

[0960] Alhydrogel:Alhydrogel“85”2% (Brenntag) 购自Good Manufacturing Practice (GMP) 级产品,由氢氧化铝的八面体晶体片组成。示例性Alhydrogel稀释剂配方显示在表

43.示例性配方可与上述药物产物组合使用。

表 43. 用于 Alhydrogel 稀释液的配方比例	
组分	所选的
配方剂型	液体混悬剂
佐剂剂量, 每 0.5 mL	0.5 mg Al
pH	6.5 ± 0.5
缓冲液	10 mM His
盐	60 mM NaCl
容器盖	2 mL 13 mm 1 型 Flint 玻璃瓶, Blowback, West - Flurotec

[0961] [0962] 使用Alhydrogel佐剂的研究显示突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质与1mg Al/mL Alhydrogel (pH 6.0–7.5) 100%的结合。两种药物物质的最大结合在测试的最高蛋白质浓度(各300μg/mL)时可见。

[0963] 蛋白质与Alhydrogel的结合也通过包含200μg/mL各药物物质的冻干药物产物配方和0.25–1.5mg/ml的Alhydrogel来测试。药物产物通过包含不同浓度的Alhydrogel的稀释剂重构，并测定结合的各突变型毒素的百分数。Alhydrogel的全部测试浓度说明100%的抗原结合。

[0964] 也评价了在突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质(各为200μg/mL)的目标剂量下蛋白质与Alhydrogel的结合动力学。结果显示100%的突变型毒素药物物质在24小时RT时间段期间结合Alhydrogel。

[0965] CpG 24555和Alhydrogel:CpG 24555为合成的21–聚体寡聚脱氧核苷酸(ODN)，其具有序列5-TCG TCG TTTTC GGT GCT TTT-3 (SEQ ID NO:48)。用于CpG 24555和Alhydrogel稀释剂组合的示例性配方显示在表44中。示例性配方可与上述药物产物组合使用。

表 44: 用于 CpG/Alhydrogel 稀释液的配方比例	
组分	所选的
配方剂型	液体混悬剂
佐剂剂量, 每 0.5 mL	0.5 mg Al 和 1mg cpG
pH	6.5 ± 0.5
缓冲液	10 mM His
盐	60 mM NaCl
容器盖	2 mL 13 mm 1 型 Flint 玻璃瓶, Blowback, West - Flurotec

[0966] [0967] ISCOMATRIX®: ISCOMATRIX®佐剂为本领域已知的基于皂昔的佐剂。用于ISCOMATRIX®佐剂配方的示例性配方显示在表45中。示例性配方可与上述药物产物组合使用。

[0968]

表45：用于ISCOMATRIX®稀释液的配方比例	
组分	所选的
配方剂型	液体混悬剂
佐剂剂量, 每 0.5 mL	45单位
pH	6.2 ± 0.5
缓冲液	10 mM磷酸盐
盐	60 mM NaCl
容器盖	2 mL 13 mm 1型 Flint玻璃瓶, Blowback, West - Flurotec

[0969] 实施例41：在NHP模型中用Alhydrogel佐剂化的突变型毒素药物物质组合物的免疫原性和设想的预临床验证

[0970] 评价NHP,特别是食蟹猴中Alhydrogel佐剂化的突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质组合物的免疫原性。以2周间隔(0、2、4周)通过每剂10μg的各突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质组合物(用Alhydrogel配制)免疫NHP,NHP发展出强中和抗毒素应答。参见表46。抗毒素A和抗毒素B中和应答在第三次免疫后均达到保护范围,且在至少33周内(研究的最后时间点)保持在保护范围内或高于保护范围。

[0971] 食蟹猴(n=8)在0、2和4周通过各10μg的各突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质(在250μg Alhydrogel中配制)来进行IM免疫。血清在各个时间点收集并在用于功能性抗毒素活性的毒素中和试验中分析。GMT在表46中提供。表中提供的保护滴度范围描述了中和抗体滴度范围,其与Merck单克隆抗体治疗试验中艰难梭菌感染复发的显著降低相关联。

[0972]

表 46：食蟹猴中突变型毒素 A 药物物质和突变型毒素 B 药物物质(在 250 μg Alhydrogel 中配制)的免疫原性(50%中和滴度)

抗毒素 A (Merck/Medarex 保护性范围：对于抗毒素 A 为 666-6,667)

周:	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	8 周	12 周	25 周	29 周	33 周
滴度:	15	19	129	382	336	2469	3069	2171	1599	1520	1545	2178

抗毒素 B (Merck/Medarex 保护性范围：对于抗毒素 B 为 222- 2,222)

滴度:	10	10	10	10	20	311	410	446	676	1631	2970	3510

[0973] NHP中来自Merck mAb治疗试验的人保护性抗体滴度与Pfizer的疫苗候选物诱导的滴度的相关性

[0974] 使用Merck/Medarex mAb(Lowy等,N Engl J Med.2010 Jan 21;362(3):197-205)的2期功效研究似乎说明血清中中和抗毒素mAb水平和预防CDAD复发之间的关联。在给人施用毒素特异性mAb后,人受体中10至100μg/mL范围内的血清抗体水平似乎可保护免受复发(CDAD复发降低70%)。

[0975] 测试包含突变型毒素药物物质的免疫原性组合物,通过比较来自Merck/Medarex 2期研究的公开数据与NHP模型中免疫原性组合物诱导的抗体水平,以评估是否免疫原性组合物能够诱导可能人中有效的中和抗体应答。这可以通过利用Merck/Medarex mAb以前公开的特征来将获得自显示无复发征兆的对象的血清中的这些mAb的范围(10-100μg/mL)转

换为50%中和滴度，并将这些滴度（“保护滴度范围”）与本文所述的临床前模型中观察的滴度比较来实现。如表46所示，包含Alhydrogel佐剂化的突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质的免疫原性组合物在NHP中产生免疫应答，所述免疫应答在第三剂后达到“保护范围”且在33周范围内保持在保护范围内或高于此范围。NHP中由本发明艰难梭菌免疫原性组合物诱导的毒素-中和抗体的水平可匹配看似被保护免受CDAD复发的Merck/Medarex试验对象中的血清抗体水平。

[0976] 实施例42：NHP模型中ISCOMATRIX或Alhydrogel/CpG 24555 (Alh/CpG) 佐剂化的突变型毒素药物物质组合物的免疫原性

[0977] 在NHP中，相比于与单独Alhydrogel施用的疫苗，ISCOMATRIX和Alh/CpG在统计学上显著提高抗毒素A和B中和滴度（表47）。相比于单独Alhydrogel（4-6周），通过与Alh/CpG或ISCOMATRIX施用的疫苗在较早时间点引发高于背景的抗毒素应答，这可能对保护人中CDAD的复发具有重要作用。相比于Alhydrogel，用Alh/CpG或ISCOMATRIX佐剂化的免疫原性组合物产生抗毒素中和滴度，其更快地达到保护范围（也参见实施例41）且在33周范围内保持在此范围内或高于此范围。

[0978] 如表47所示，食蟹猴在0、2和4周通过10 μ g的各突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质（在250 μ g Alhydrogel ($n=8$)，或500 μ g CpG+250 μ g Alhydrogel ($n=10$)，或45U ISCOMATRIX ($n=10$) 中配制）来进行IM免疫。血清在各个时间点收集并在用于功能性抗毒素活性的上述毒素中和试验中分析。GMT列在表中。星号(*)表示当于Alhydrogel组中的滴度相比具有统计学显著性($p<0.05$)。保护滴度范围代表与根据Merck/Medarex mAb治疗试验中艰难梭菌感染复发的显著降低相关联的中和抗体滴度范围。

表 47：NHP 中佐剂化的突变型毒素药物物质的免疫原性(50%中和滴度)
抗毒素 A (Merck/Medarex 保护性范围：对于抗毒素 A 为 666-6,667)

[0979]

周：	0 周	2 周	4 周	6 周	12 周	25 周	33 周
Alhydrogel 滴度	15	129	336	3069	1599	1520	2178
Alhydrogel + CpG 滴度:	17	*1004	*2162	*15989	*7179	*5049	*7023
ISCOMATRIX 滴度:	25	*1283	*3835	*19511	*12904	*6992	*7971
抗毒素 B (Merck/Medarex 保护性范围：对于抗毒素 B 为 222-2,222)							
Alhydrogel 滴度:	10	10	20	410	676	1631	3510
Alhydrogel + CpG 滴度:	10	13	*136	*2163	*5076	*9057	*27971
ISCOMATRIX 滴度:	10	10	*269	*5325	*9161	*19479	*25119

[0980] 也评价了在存在ISCOMATRIX或Alh/CpG佐剂下，中和在NHP中产生的抗毒素抗体滴度的所施用的突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质的剂量。在一个研究中，对NHP施用低(10 μ g)或高(100 μ g)剂量的各突变型毒素药物物质（在ISCOMATRIX中配制）。在免疫后各时间点比较应答。如表48所示，抗毒素中和滴度在两个处理组中均很强。抗毒素A滴度在低剂量和高剂量组之间在大多数时间点几乎相同，而抗毒素B滴度在高剂量组有变得更高的趋势。

表 48：在随后用与 ISCOMATRIX 施用的 10 μg 或 100 μg 各突变型毒素药物物质和突变型毒素药物物质免疫的 NHP 中的中和抗毒素滴度(50%中和滴度)

抗毒素 A (Merck/Medarex 保护性范围：对于抗毒素 A 为 666-6,667)

周	0 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周	12 周
10μg 滴度：	11	585	3522	4519	19280	10225	12084
100μg 滴度：	11	400	1212	2512	9944	10283	18337
抗毒素 B (Merck/Medarex 保护性范围：对于抗毒素 B 为 222-2,222)							
10μg 滴度：	10	10	112	266	3710	2666	7060
100μg 滴度：	10	10	303	469	6016	4743	20683

[0982] 如表48所示,食蟹猴(n=5)在0、2和4周通过10 μg 或100 μg 的各突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质(用45U ISCOMATRIX配制)来进行IM免疫。血清在各个时间点收集并在用于功能性抗毒素活性的毒素中和试验中分析。GMT列在表中。保护滴度范围代表与Merck/Medarex mAb治疗试验中艰难梭菌感染复发的显著降低相关联的中和抗体滴度范围。

[0983] 为了提高抗毒素B应答的动力学,NHP用恒定剂量的突变型毒素A药物物质(10 μg)免疫,所述突变型毒素A药物物质在存在ISCOMATRIX或Alh/CpG佐剂下与更高剂量的突变型毒素B药物物质(10、50或100 μg)混合。与佐剂无关,相比于10 μg 剂量的突变型毒素B药物,接受更高剂量突变型毒素B药物物质(50或100 μg)的组有诱导更高抗毒素B中和应答的趋势(表50,被*所标记表明统计学上显著增加)。此趋势在最终免疫后在大多数时间点观察到。然而,在一些情况下,当增加突变型毒素B的量时,抗毒素A中和应答显示出统计学显著降低(表49中被^所标记)。

[0984] 如表49和表50所示,NHP(每组为10)在0、2和4周通过不同比例的突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质(10 μg 突变型毒素A药物物质加上10、50或100 μg 突变型毒素B药物物质;在表49和表50中分别称为10A:10B、10A:50B和10A:100B)(用ISCOMATRIX(45U每剂)或Alh/CpG/(250 μg /500 μg 每剂)配制)进行IM免疫。表49显示抗毒素A滴度。表50显示抗毒素B滴度。GMT列在表中。保护滴度范围代表与MerckmAb治疗试验中艰难梭菌感染复发的显著降低相关联的中和抗体滴度范围。符号^表示与10A:10B组相比中和滴度的统计学显著降低($p<0.05$)。星号*表示与10A:10B组相比中和滴度的统计学显著增加($p<0.05$)。

表 49：在随后使用 ISCOMATRIX 或 Alh/CpG 作为佐剂，用与 10、50 或 100 μg 突变型毒素 B 药物物质组合的 10 μg 突变型毒素 A 药物物质免疫的 NHP 中的中和抗毒素滴度(50%中和滴度)

抗毒素 A (Merck/Medarex 保护性范围：对于抗毒素 A 为 666- 6,667)

ISCOMATRIX

周:	0 周	2 周	4 周	6 周	12 周	25 周	33 周
10A:10B 滴度：	25	1283	3835	19511	12904	6992	7971
10A:50B 滴度：	29	906	2917	16126	^7756	^4208	5965
10A:100B 滴度：	20	982	2310	^5034	^5469	^4007	3780

抗毒素 A (Merck/Medarex 保护性范围：对于抗毒素 A 为 666- 6,667)

Alh/CpG

10A:10B 滴度：	17	1004	2162	15989	7179	5049	7023
10A:50B 滴度：	20	460	1728	16600	6693	6173	8074
10A:100B 滴度：	27	^415	1595	13601	6465	5039	6153

表 50：在随后使用 ISCOMATRIX 或 Alh/CpG 作为佐剂，用与 10, 50 或 100 µg 突变型毒素 B 药物物质组合的 10 µg 突变型毒素 A 药物物质免疫的 NHP 中的中和抗毒素滴度 (50% 中和滴度)

[0986]

抗毒素 B (Merck/Medarex 保护性范围：对于抗毒素 B 为 222-2,222)							
周：	0 周	2 周	4 周	6 周	12 周	25 周	33 周
ISCOMATRIX 滴度：	10	10	269	5325	9161	19479	25119
滴度：	13	*20	*604	4861	10801	20186	*57565
滴度：	10	*23	*862	*10658	10639	*33725	*56073

[0987]

抗毒素 B (Merck/Medarex 保护性范围：对于抗毒素 B 为 222-2,222)

Alh/CpG 滴度：	10	13	136	2163	5076	9057	27971
滴度：	10	15	*450	*5542	*9843	15112	50316
滴度：	11	17	*775	*13533	*11708	*17487	26600

[0988] 实施例43：食蟹猴中使用免疫原性组合物的5周重复剂量IM毒性研究,4周恢复期

[0989] 在食蟹猴中使用PF-06425095(包含与佐剂氢氧化铝和CpG 24555组合的三重突变型毒素A药物物质和三重突变型毒素B药物物质的免疫原性组合物)进行5周IM重复剂量毒性研究,以评价与佐剂氢氧化铝和CpG 24555(PF-06425095)组合的艰难梭菌三重突变型毒素A药物物质和三重突变型毒素B药物物质的潜在毒性和免疫原性。将PF-06425095(每剂量0.2或0.4mg的三重突变型毒素A药物物质和三重突变型毒素B药物物质(分别为低和高剂量免疫原性组合物组)、0.5mg铝作为氢氧化铝和1mg CpG 24555)以及单独的佐剂组合物(氢氧化铝+CpG 24555;PF-06376915)经由IM施用至食蟹猴(6/性别/组)作为初免剂量,随后3次加强剂量(1、8、22和36天)。单独的动物组(6/性别)接受0.9%等渗压盐水(pH约7.0)。免疫原性组合物介质由10mM Tris缓冲液(pH 7.4)、4.5%海藻糖二水合物和0.1%聚山梨醇酯80组成。佐剂对照介质由含60nM NaCl的10mM组氨酸缓冲液(pH 6.5)组成。总剂量体积为0.5mL/注射剂。将全部剂量施用至左和/或右quadricepsmuscle。所选动物经历4周无剂量观察期,以评价研究给药期所观察到的任何作用的可逆性。

[0990] 此研究中无不利的发现。PF-06425095被很好耐受且仅产生局部炎性反应而无全身毒性的证据。在给药期,在免疫原性组合物处理的组中观察到从预测试起纤维蛋白原在4天和38天(23.1%至2.3x)、和C反应蛋白在第4天(2.1x至27.5x)和第38天(2.3x至101.5x)、以及球蛋白在第36和/或38天(11.1%至24.1%)的剂量依赖性增加,且此剂量依赖性增加与对施用佐剂化的免疫原性组合物的预期的炎性应答一致。

[0991] 第4天观察到的纤维蛋白原和C反应蛋白的增加在第8天部分恢复,其中纤维蛋白原(25.6%至65.5%)和C反应蛋白(4.5x和5.6x)的增加仅在高剂量免疫原性组合物组。在第1天3小时(8.3x至127.2x单个值,第1天,0小时,应答剂量)和第36天3小时(9.4x至39.5x单个值,第36天,0小时),在低和高剂量免疫原性组合物组观察到白介素(IL)-6的增加。其它细胞因子(IL-10、IL-12、干扰素诱导性蛋白(IP-10)和肿瘤坏死因子α(TNF-α)未观察到变化。这些急性期蛋白质和细胞因子的增加是对施用外源抗原的可预期正常生理应答的一部分。在恢复期(细胞因子在恢复期末评价)这些临床病理学参数中无PF 06425095相关的或佐剂相关的改变。此外,在注射位点有局部变化,其在佐剂对照组以及低和高剂量免疫原性组合物组具有类似发生率和严重性;因此它们不与PF-06425095直接相关。在给药期间,

变化包括由巨噬细胞浸润导致的最低至中度慢性-活性炎症(通过分离肌纤维表征),其通常包括嗜碱性颗粒材料(被解释为包含铝的佐剂)、淋巴细胞、浆细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性细胞、坏死的碎屑和水肿。嗜碱性颗粒材料也在这些慢性-活性炎症的病灶内的细胞外存在。在恢复期末,有最低至中度的慢性炎症和单核细胞浸润,以及最低纤维化。这些注射位点的发现代表对佐剂的局部炎性应答。其它微观变化包括在佐剂独照组以及低和高剂量免疫原性组合物组中给药期间观察到的髂骨(引流)淋巴结中最低至中度增加的淋巴细胞性质和在脾中生发中心的最低增加的细胞性质。在恢复期末,这些微观发现严重性较低。这些效果代表对抗原刺激的免疫应答,且其是对佐剂或PF-06425095的药理应答。对抗DNA抗体无测试物相关的增加。

[0992] 基于缺少不利的发现,此研究中未观察到不利影响水平(NOAEL)的是以两个0.5mL注射剂(4剂)施用的高剂量免疫原性组合物组(0.4mg三重突变型毒素A药物物质和三重突变型毒素B药物物质/剂量如PF-06425095)。

[0993] 实施例44:被动转移至仓鼠的血清阳性NHP血清的功效

[0994] 5只叙利亚金仓鼠的组施用口服剂量的氯林可霉素抗生素(30mg/kg)以破坏正常肠道菌群。在5天后,仓鼠用口服剂量的野生型艰难梭菌孢子(630株,100cfu/动物)攻击,并腹膜内施用NHP血清,根据表51。不受机理或理论的束缚,使用孢子攻击后的疾病症状通常开始出现在约攻击后30-48小时。

[0995] 施用至仓鼠的NHP血清从在用突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质(10:10、10:50和10:100A:B比例)(用ISCOMATRIX配制)三次免疫后显示最高滴度(抗毒素A血清和抗毒素B血清)的NHP血清样品合并(参见实施例42、表49和表50)。如实施例42所述,NHP血清从5、6和8周的时间点收集(免疫在0、2和4周发生)。结果显示在下表52-54中。符号“+”表示()中的几何平均值(GM),其不包括动物#3(无应答者)。“*TB”表示末端放血,此天将动物安乐死,其对全部动物不相同。

表 51: 实验设计				
组	施用的组合物	动物数量	途径	日程
[0996]	1 “1 剂量” 血清阳性 NHP 血清 (未浓度哦)	5	IP	攻击, 0 天 给药, 0 天 放血, 0、1、2 天, TB, 第 11 天
	2 “2 剂量” 血清阳性 NHP 血清 (未浓度哦)	5	IP	攻击, 0 天 给药, 0、1 天 放血, 0、1、2 天, TB, 第 11 天

表 52: 在 1 或 2 IP 剂量的 NHP 血清后仓鼠血清中的抗毒素 A 中和滴度(50% 中和滴度, RLU)

[0997]

	天	仓鼠 1	仓鼠 2	仓鼠 3	仓鼠 4	仓鼠 5	GM	SE
1 剂量	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	2877	4008	2617	4917	1872	3081	538
	D2	1983	3009	2750	2902	1117	2214	357
	TB*	3239 (d4)	537 (d9)	155 (d11)	977 (d9)	972 (d2)	762	538

	D0	50	50	50	50	50	50	0
2 剂量	D1	1154	2819	50	429	1174	606	
	D2	4119	4674	1899	545		2113	862
	TB*	1236 (d9)	1267 (d8)	1493 (d4)	50 (d11)	1877 (d9)	738	306

供给 NHP 血清 = 41976

表 53: 在 1 或 2 IP 剂量的 NHP 血清后仓鼠血清中的抗毒素 B 中和滴度(50% 中和滴度, RLU)

[0998]

	天	仓鼠 1	仓鼠 2	仓鼠 3	仓鼠 4	仓鼠 5	GM	SE
1 剂量	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	1846	4254	1347	5178	406	1859	904
	D2	992	1795	2585	2459	1145	1669	327
	TB*	1744 (d4)	(d9)	50 (d11)	(d9)	(d2)	229	317

[0999]

	D0	50	50	50	50	50	50	0
2 剂量	D1	1189	2229	50	550	3920	778	
	D2	2288	2706	1452	287		1268	477
		301	694	682	50	1334		
	TB*	(d9)	(d8)	(d4)	(d11)	(d9)	394	217

供给 NHP 血清 = 23633

表 54: 在 1 或 2 IP 剂量 NHP 血清后被保护免受严重 CDAD 的仓鼠的百分数

[1000]

感染后天数	0	2	4	6	8	10	11
1 剂量 NHP 血清	100%	80%	60%	60%	60%	20%	20%
2 剂量 NHP 血清	100%	100%	80%	80%	60%	20%	20%
安慰剂	100%	75%	50%	25%	0%	n/a	n/a

[1001] 在另一研究中, 叙利亚金仓鼠施用口服剂量的氯林可霉素抗生素 (30mg/kg) 以破坏正常肠道菌群。在 5 天后, 仓鼠用口服剂量的野生型艰难梭菌孢子 (630 株, 100cfu/动物) 攻击, 并腹膜内 (IP) 施用 NHP 血清, 根据表 55。不受机理或理论的束缚, 使用孢子攻击后的疾病症通常开始出现在约攻击后 30-48 小时。

[1002] 施用至仓鼠的NHP血清从在用突变型毒素A药物物质和突变型毒素B药物物质(10:10、10:50和10:100A:B比例)(用Alhydrogel和CpG 24555配制)三次免疫后的NHP收集的样品合并(参见实施例42、表49和表50)。如实施例42所述,NHP血清从5、6、8和12周的时间点收集(NHP在0、2和4周免疫)。结果显示在下表56-59中。进一步研究来自仓鼠的血清以确定抑制浓度(IC_{50})值,其使用上述毒素中和试验来确定。仓鼠中由本发明艰难梭菌免疫原性组合物诱导的毒素中和抗体的水平可匹配看似被保护免受CDAD复发的Merck/Medarex试验对象中的血清抗体水平。

表 55: 实验设计				
组	施用的组合物	数量	途径	日程
[1003]	1 血清阳性 NHP 血清	5	IP	攻击 D0 剂量 D0, 1, 3, 5, 7
	2 血清阳性 NHP 血清	5	IP	未攻击 剂量 D0, 1, 3, 5, 7,
	3 血清阳性 NHP 血清	10	IP	攻击 D0 剂量 D0, 1, 3, 5, 7
	4 安慰剂	5	IM	攻击 D0

表 56: 在 1 或 2 IP 剂量的 NHP 血清后仓鼠血清中的抗毒素 A 中和滴度^a
(50% 中和滴度, RLU)

天	攻击的(组 1 和 3)	未攻击的(组 2)	p 值
0	11	12	0.5933
1	380	720	0.034*
3	666	1220	0.0256*
5	864	1367	0.0391*
7	564	1688	0.0411*
11	263	1281	0.001*

供给 NHP 血清库 = 9680

a: 滴度用各个组的几何平均值表示(对于“攻击”组, n=15, 0 天, 对于“未攻击”组, n=5)

Merck/Medarex 保护性范围: 对于抗毒素 A 为 666-6,667

星号“*”表示显著差异

[1005]

表 57: 在 1 或 2 IP 剂量的 NHP 血清后仓鼠血清中的抗毒素 B 中和滴度^a
(50%中和滴度, RLU)

天	攻击的(组 1 和 3)	未攻击的(组 2)	p 值
0	10	10	0.3343
1	465	828	0.0579
3	765	1400	0.0273*
5	941	1734	0.0226*
7	611	1877	0.0498*
11	194	1436	0.0047*

供给 NHP 血清库 = 19631

a: 滴度用各个组的几何平均值表示(对于“攻击”组, n=15, 0 天, 对于“未攻击”组, n=5)

Merck/Medarex 保护性范围: 对于抗毒素 B 为 222-2,222

星号“*”表示显著差异

[1006]

表 58: 在 IP 剂量 NHP 血清后被保护免受严重 CDAD 的仓鼠的百分数

感染后天数	0	2	4	6	8	10	11
组 1 和 3	100%	73%	53%	53%	47%	33%	33%
安慰剂(组 2)	100%	50%	0%				

[1007]

表 59: 来自毒素特异性 50% 中和滴度的 IC₅₀ 值

		抗毒素 A 的 IC ₅₀						抗毒素 B 的 IC ₅₀					
		给药后的日期						给药后的日期					
攻击的	动物 ID	0	1	3	5	7	11	动物 ID	0	1	3	5	7
		1-1	10	50	338	D4			1-1	10	50	254	D4

[1008]

1-2	10	614	579	777	605	192			1-2	10	720	659	896	475	157
1-3	10	710	1035	845	548	D10	死亡		1-3	10	867	1017	988	694	
1-4	10	850	588	942	1116	296			1-4	10	1158	555	1158	1806	250
1-5	10	780	895*						1-5	10	910	687*			
			死 亡								死 亡				
3-1	10	647	D2						3-1	10	598	D2			
3-2	10	331	D2						3-2	10	290	D2			
3-3	10	660	1273	849	692	640			3-3	10	717	1623	870	791	574
3-4	10	536	493	1102	1314	D9	死亡		3-4	10	618	598	977	1478	D9
3-5	10	817	807	774	1077	187			3-5	10	772	1260	850	913	243
3-6	10	117	649	803	50	186			3-6	10	1038	773	883	50	50
3-7	10	50	D2				死 亡		3-7	10	50	D2			
3-8	10	149	659	650*					3-8	10	121	1010	517*		
3-9	30	797	1170*						3-9	10	1008	1720*			
3-10	10	792	D2				死 亡		3-10	10	835	D2			
几何平均值	11	380	666	864	564	263			几何平 均值	10	465	765	941	611	194
标准差	1	78	86	41	163	88			标准差	0	94	125	38	224	88
2-1	10	697	1634	1597	2219	1709			2-1	10	890	1777	1910	3229	1355
2-2	10	779	1207	1322	1755	1327			2-2	10	939	1378	1564	1897	1379
2-3	10	581	669	722	1401	1118			2-3	10	828	837	865	1484	1404
2-4	26	856	1540	1875	1830	1826			2-4	10	748	1780	2939	1880	2650
2-5	10	715	1331	1668	1374	744			2-5	10	752	1475	2064	1364	880
几何平均值	12	720	1220	1367	1688	1281			几何平 均值	10	828	1400	1734	1877	1436
标准差	3	46	169	199	156	197			标准差	0	38	173	338	332	296

*= 在此天下降

[1009] 实施例45: 突变型毒素药物物质的表征

[1010] 三重突变型毒素A的一级结构如SEQ ID NO:4所示。SEQ ID NO:4的1位的NH₂-末端Met残基开始自SEQ ID NO:12的起始密码子,且在分离蛋白中缺少(例如参见SEQ ID NO:84)。因此,在实施例12至实施例45中,“SEQ ID NO:4”是指起始甲硫氨酸(在1位)缺少的SEQ ID NO:4。纯化的三重突变型毒素A(SEQ ID NO:4)(药物物质中间产物-Lot L44993-132)和EDC/NHS处理的三重突变型毒素A(SEQ ID NO:4)(“突变型毒素A药物物质”-Lot L44898-012)均显示在SLISKEELIKLAYS(SEQ ID NO:4的2-16位)起始的单个NH₂-末端序列。

[1011] 三重突变型毒素B的一级结构如SEQ ID NO:6所示。SEQ ID NO:6的1位的NH₂-末端Met残基开始自起始密码子,且在分离蛋白中缺少(例如参见SEQ ID NO:86)。因此,在实施例12至实施例45中,“SEQ ID NO:6”是指起始甲硫氨酸(在1位)缺少的SEQ ID NO:6。纯化的三重突变型毒素B(SEQ ID NO:6)(药物物质中间产物-Lot 010)和EDC/NHS处理的三重突变型毒素B(SEQ ID NO:6)(“突变型毒素B药物物质”-Lot L44906-153)均显示在SLVNRKQLEKMANVR(SEQ ID NO:6的2-16位)起始的单个NH₂-末端序列。

[1012] 使用圆二色性(CD)光谱评估三重突变体A(SEQ ID NO:4)和突变型毒素A药物物质

的二级和三级结构。也使用CD光谱评估三重突变型毒素B (SEQ ID NO:6) 和突变型毒素B药物物质的二级和三级结构。也使用CD光谱评估pH对结构的可能的影响。通过比较对突变型毒素A药物物质获得的CD数据和对三重突变型毒素A获得的数据分析EDC处理对三重突变型毒素A的影响。通过比较对突变型毒素B药物物质获得的CD数据和对三重突变型毒素B获得的数据分析EDC处理对三重突变型毒素B (SEQ ID NO:6) 的影响。

[1013] 在不同pH获得突变型毒素A药物物质的远-UV CD数据。在pH 5.0-7.0下记录的光谱指示二级结构中具有高比例的 α -螺旋,提示蛋白质的多肽骨架采用被 α -螺旋支配的明确的构象。

[1014] 也获得突变型毒素A药物物质的近-UV CD光谱。260和300nm之间的强负椭圆率指示芳香侧链在独特的刚性环境中,即突变型毒素A药物物质具有三级结构。事实上,源自单个类型芳香侧链的特有特征可在光谱内被区分:~290nm处的突出部分(shoulder)和~283nm处的最大负峰是由于顺序色氨酸侧链的偏振光的吸收,276nm处的负峰来自酪氨酸侧链,且262和268nm处的较小的突出部分指示参与三级接触的苯丙氨酸残基。远和近-UV结果提供了下述证据,即突变型毒素A药物物质在生理学pH保持紧密折叠的结构。在pH 5.0-7.0下观察到的几乎相同的远和近-UV光谱说明没有可检测的结构变化在此pH范围内发生。CD数据不能在pH 3.0和4.0下收集,因为蛋白质在这些pH点下是不可溶的。在突变型毒素A药物物质与三重突变型毒素A的远和近-UV CD广谱的比较中,两种蛋白质在全部研究的实验条件下基本上相同,这表明EDC处理对三重突变型毒素A的二级和三级结构没有可检测的影响。此发现与凝胶过滤和分析的超速离心结果一致,它们分别在Stokes半径和沉淀/摩擦系数中未显示出可检测的变化。

[1015] 突变型毒素A药物物质(以及三重突变型毒素A)包含25个色氨酸残基,其遍布在整个一级结构中且可用作便利的内在的荧光探针。获得作为温度函数的在300和400nm之间的突变型毒素A药物物质的荧光发射光谱。在6.8°C突变型毒素A药物物质显示在280nm下激发的特征色氨酸荧光发射光谱。荧光发射最大在~335nm处观察到,说明色氨酸残基在非极性环境(典型蛋白质内部,而不是极性含水的环境)中。荧光发射光谱结果连同此报导中呈现的CD实验的结果确认突变型毒素A药物物质保持紧密折叠的结构。

[1016] 使用外来探针8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)的荧光表征pH变化下突变型毒素A药物物质和三重突变型毒素A的可能构象变化。从结果可见,当突变型毒素A药物物质或三重突变型毒素A在pH 7.0下使用探针滴定时,ANS荧光强度基本未增加,这提示在这些条件下蛋白上未暴露疏水表面。将pH移至2.6导致探针浓度增加时ANS荧光量子产率的显著增加,直到荧光量子产率达到表观饱和。此ANS荧光量子产率的增加说明在低pH(2.6)下突变型毒素A药物物质和三重突变型毒素A均经历暴露疏水表面的pH诱导的构象变化。此构象变化说明三重突变型毒素A的EDC诱导的修饰和灭活并不限制突变型毒素A药物物质(DS)的构象可塑性。

[1017] 使用分子排阻色谱在G4000SWXL柱上评估EDC处理对三重突变型毒素A的流体动力学性质的影响。将突变型毒素A药物物质和三重突变型毒素A注射入在pH 7.0、6.0和5.0下平衡的G4000SWXL柱。数据表明使用分子排阻色谱在突变型毒素A药物物质和三重突变型毒素A的Stoke's半径中未能检测出差异。因此,EDC处理并不显著影响三重突变型毒素A的流体动力学性质和由此的整体分子形状。

[1018] 三重突变型毒素A和突变型毒素A药物物质的进一步分析使用多角度激光光散射(MALLS)技术进行。使用EDC处理三重突变型毒素A导致产生由不同多聚体和单体物质组成的异质混合物。此异质性反映出蛋白质羧基和伯胺之间大量EDC诱导的分子间和分子内分子共价键的引入。

[1019] 获得的数据提供了三重突变型毒素A和突变型毒素A药物物质(EDC处理的三重突变型毒素A)的物理和化学性质,且描述了其一级、二级和三级结构的关键特征。产生的数据表明用EDC处理三重突变型毒素A导致其多肽链的共价修饰,但不影响蛋白质的二级和三级结构。EDC处理导致分子内和分子间交联。对突变型毒素A药物物质(以及三重突变型毒素A)获得的生物化学和生物物理学参数显示在表60中。

表 60: 对于三重突变型毒素 A (SEQ ID NO: 4) 和突变型毒素 A 药物物质获得的主要生物化学和生物物理学参数		
参数	三重突变型毒素 A (SEQ ID NO: 4)	突变型毒素 A 药物物质
氨基酸残基的数量	2709	2709
N 末端序列	SLISKEELIKLAYS (SEQ ID NO: 4 的位置 2-16)	SLISKEELIKLAYS (SEQ ID NO: 4 的位置 2-16)
Mol 质量(来自 AA 序列)	308 kDa	308 kDa
Mol 质量 (来自 SEC-MALLS)	299 kDa	300 kDa 和 718 -1139 kDa
280 nm 的消光系数	1.292 或 1.275 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹	1.292 或 1.275 275 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹
理论的 pI	5.57	ND
20°C 下部分具体的摩尔体积	0.735 cm ³ /g	0.735 cm ³ /g
无水体积/单体	3.8x10 ⁻¹⁹ cm ³	3.8x10 ⁻¹⁹ cm ³
沉降系数/单体	9.2S	9.2S
摩擦系数比例(f/f ₀)	1.69	1.69
Stokes 半径/单体	78.4±1.1	77.9
荧光 max (λ _{ex} = 280 nm)	334-335 nm	334-335 nm
近-UV CD 光谱最小	284 nm 和 278 nm	284 nm 和 278 nm
284 & 278 nm 处平均 res 椭圆率	-138±7 & -130±7	-138±8 & 131±10
222 nm 处平均 res 椭圆率	-8989±277	-7950±230
DSC 展开转换最大(PBS, pH 7.4)	47.3°C 和 53.6°C	47.9±0.2°C 和 54.1±0.2°C

[1020]

[1021] 在不同pH获得突变型毒素B药物物质的长-UV CD数据。在pH 5.0-7.0下记录的光谱指示二级结构中具有高比例的α-螺旋,提示蛋白质的多肽骨架采用被α-螺旋支配的明确的构象。

[1022] 也获得突变型毒素B药物物质的近-UV CD光谱。260和300nm之间的强负椭圆率指示芳香侧链在独特的刚性环境中,即突变型毒素B药物物质具有三级结构。事实上,源自单个类型芳香侧链的特有特征可在光谱内被区分:~290nm处的突出部分(shoulder)和~283nm处的最大负峰是由于顺序色氨酸侧链的偏振光的吸收,276nm处的负峰来自酪氨酸侧链,且262和268nm处的较小的突出部分指示参与三级接触的苯丙氨酸残基。远和近-UV CD光谱提供了下述证据,即突变型毒素B药物物质在生理学pH保持紧密折叠的结构。在pH 5.0-7.0下观察到的非常类似的远和近-UV CD光谱说明没有可检测的二级或三级结构变化

在此pH范围内发生。CD数据不能在pH 3.0和4.0下收集,因为蛋白质在这些pH点下是不可溶的。

[1023] 在突变型毒素B药物物质与三重突变型毒素B的远和近-UV CD广谱的比较中,两种蛋白质的光谱在pH 5.0和7.0之间非常类似,这表明EDC处理对蛋白质的二级和三级结构没有可检测的影响。

[1024] 三重突变型毒素B包含16个色氨酸残基,其遍布在整个一级结构中且可用作便利的内在的荧光探针。获得作为温度函数的在300和400nm之间的突变型毒素B药物物质的荧光发射光谱。在7°C突变型毒素B药物物质显示在280nm下激发的特征色氨酸荧光发射光谱。荧光发射最大值在~335nm处观察到,说明色氨酸残基在非极性环境中,代表蛋白质内部,而非极性含水的环境。此结果连同CD实验的结果(见上)确认突变型毒素B药物物质保持紧密折叠的结构。

[1025] 使用外来探针8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)的荧光表征pH变化下突变型毒素B药物物质和三重突变型毒素B的可能构象变化。从结果可见,当突变型毒素B药物物质或三重突变型毒素B在pH 7.0下使用探针滴定时,ANS荧光强度基本未增加,这提示在这些条件下蛋白未暴露疏水表面。在突变型毒素B药物物质存在下,将pH移至2.6导致探针浓度增加时ANS荧光量子产率的显著增加,直到荧光量子产率达到表观饱和。ANS荧光量子产率的增加说明在低pH(2.6)下突变型毒素B药物物质经历暴露疏水表面的pH诱导的构象变化。此构象变化说明三重突变型毒素B的EDC诱导的修饰和灭活并不限制突变型毒素B药物物质(DS)的构象可塑性。

[1026] 使用分子排阻色谱在G4000SWXL柱上评估EDC处理对三重突变型毒素B的流体动力学性质的影响。将突变型毒素B药物物质和三重突变型毒素B注射入在pH 7.0、6.0和5.0下平衡的G4000SWXL柱。数据表明使用分子排阻色谱在突变型毒素B药物物质和三重突变型毒素B的Stoke's半径中未能检测出差異,因此EDC处理并不显著影响蛋白质的流体动力学性质和由此的整体分子形状。

[1027] 三重突变型毒素B和突变型毒素B药物物质的进一步分析使用多角度激光光散射(MALLS)技术进行。使用EDC处理三重突变型毒素B导致产生由不同多聚体和单体物质组成的异质混合物。此异质性反映出蛋白质羧基和伯胺之间大量EDC诱导的分子间和分子内分子共价键的引入。

[1028] 获得的数据提供了三重突变型毒素B和突变型毒素B药物物质(EDC处理的三重突变型毒素B)的物理和化学性质,且描述了其一级、二级和三级结构的关键特征。产生的数据表明用EDC处理三重突变型毒素B导致其多肽链的共价修饰,但不影响蛋白质的二级和三级结构。EDC处理导致分子内和分子间交联。对突变型毒素B药物物质(以及三重突变型毒素B)获得的主要生物化学和生物物理学参数显示在表61中。

表 61：对于三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6)和突变型毒素 B 药物物质获得的主要生物化学和生物物理学参数

参数	三重突变型毒素 B (SEQ ID NO: 6)	突变型毒素 B 药物物质
氨基酸残基的数量	2365	2365
N 末端序列	SLVNRKQLEKMANVR (SEQ ID NO: 6 的位置 2-16)	SLVNRKQLEKMANVR (SEQ ID NO: 6 的位置 2-16)
Mol 质量(来自 AA 序列)	269.5 kDa	269.5 kDa
Mol 质量 (来自 SEC-MALLS)	255 kDa 和 ~1,754 kDa	264, 268, 706, 和 2,211 kDa
280 nm 的消光系数	$1.067 (\text{mg/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$	$1.067 (\text{mg/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$
理论的 pI	4.29	ND
[1029] 20°C 下部分具体的摩尔体积	0.734 cm^3/g	0.734 cm^3/g
无水体积/单体	$3.3 \times 10^{-19} \text{cm}^3$	$3.3 \times 10^{-19} \text{cm}^3$
沉降系数/单体	$9.1 \pm 0.2 \text{S}$	9.4S
摩擦系数比例(f/f_0)	1.58 ± 0.03	1.53
Stokes 半径/单体	76.2	76.2
荧光 max ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$)	335 nm	335 nm
近-UV CD 负带	290, 283, 276, 268, 262 nm	290, 283, 276, 268, 262 nm
远-UV CD 负带	208 和 222 nm	208 和 222 nm
DSC 展开转换中点 T_{m1} 和 T_{m2} (PBS, pH 7.0)	$48.8 \pm 0.0^\circ\text{C}$ 和 $52.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$	$48.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 和 $54.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$

[1030] 实施例46:对于类毒素B的灌注发酵(三重突变型)

[1031] 类毒素B(三重突变体)种子培养:在包含400mL培养基的各1L瓶中接种1ml种子,37℃下孵育,静止过夜(~15小时)。终OD₆₀₀应为3.0-4.0。工作体积:3L(2.7L培养基+300mL接种物)。各个发酵器具有1个Rushton叶轮和管状喷射器。初始条件:温度:37℃,N2流:~0.5vvm,喷射。控制器:用5N NaOH将pH控制在7.0。泡沫通过自动加入PPG-2000控制,在灭菌前向发酵器培养基中加入0.25mL/L。

[1032] 艰难梭菌的灌注培养使用一堆2个SARTOCON Slice Cassettes (0.2μm孔径的HYDROSART过滤材料,每cassette 0.1平方米表面积)进行。将3L加入至10L玻璃发酵器的发酵器中。灌注在OD达到目标~4时起始,以2小时为间隔增加速度,如对于实施例1,图28为0.75L/hr、1.5L/hr、2.25L/hr、3L/hr。使用发酵培养基在OD达到目标~4时起始灌注,以2小时为间隔增加速度,如对于实施例2,图29为0.75L/hr、1.5L/hr、3L/hr和6L/hr。在灌注开始信号处,以1.3L/min交叉流的所期望速度开启循环泵。

[1033] 实施例1,图28:获得终OD 50和类毒素B滴度243mg/L。

[1034] 实施例2,图29:获得终OD 59和类毒素B滴度306mg/L。

[1035] 本发明还提供在以下项目中定义的以下实施方式:

[1036] 项目1 包含SEQ ID NO:183的分离的多肽。

[1037] 项目2 包含SEQ ID NO:184的分离的多肽。

[1038] 项目3 包括含SEQ ID NO:183的分离的多肽的免疫原性组合物。

[1039] 项目4 包括含SEQ ID NO:184的分离的多肽的免疫原性组合物。

[1040] 项目5 培养基,包含大豆水解物、酵母提取物和葡萄糖,且其中所述培养基包括源自VPI 11186的艰难梭菌细菌,其中所述细菌缺少编码毒素的内源性多核苷酸,其中所述细菌包括编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸,其中所述细菌进一步包括生孢梭菌铁氧还蛋白(fdx)启动子。

[1041] 项目6 用于培养艰难梭菌的方法,包括在培养基中培养艰难梭菌,其中所述培养基包含大豆水解物、酵母提取物和葡萄糖,且其中所述培养基包括源自VPI 11186的艰难梭菌细菌,其中所述细菌缺少编码毒素的内源性多核苷酸,其中所述细菌包括编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸,其中所述细菌进一步包括生孢梭菌铁氧还蛋白(fdx)启动子。

[1042] 项目7 制备艰难梭菌毒素的方法,包括在适合条件下在培养基中培养艰难梭菌以产生毒素,并从所述培养基中分离毒素;其中所述培养基包含大豆水解物、酵母提取物和葡萄糖,且其中所述培养基包括源自VPI11186的艰难梭菌细菌,其中所述细菌缺少编码毒素的内源性多核苷酸,其中所述细菌包括编码突变型艰难梭菌毒素的多核苷酸,其中所述细菌进一步包括生孢梭菌铁氧还蛋白(fdx)启动子。

MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTIITNLDEYNKLTTNNNENKYLQLKK 50
 MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTIITNLDEYNKLTTNNNENKYLQLKK 50
 MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTIITNLDEYNKLTTNNNENKYLQLKK 50
 MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTIITNLDEYNKLTTNNNENKYLQLKK 50
 MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTIITNLDEYNKLTTNNNENKYLQLKK 50

LNESIDVFMNKYKTSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
 LNESIDVFMNKYKTSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
 LNESIDVFMNKYKTSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
 LNESIDVFMNKYKNSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
 LNESIDVFMNKYKNSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100

WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNKLWYDSEAFLVNTLKKAIIVESSTT 150
 WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNKLWYDSEAFLVNTLKKAIIVESSTT 150
 WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNKLWYDSEAFLVNTLKKAIIVESSTT 150
 WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNKLWYDSEAFLVNTLKKAIIVESSTT 150
 WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNKLWYDSEAFLVNTLKKAIIVESSTT 150

EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
 EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
 EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
 EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
 EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200

IDDIIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
 IDDIIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
 IDDIIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
 IDDIIKSHLVSEYNRDETLLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
 IDDIIKSHLVSEYNRDETLLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250

LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDFLFTI 300
 LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDFLFTI 300
 LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDFLFTI 300
 LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDFLFTI 300

SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
 SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
 SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
 PRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
 PRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350

图1A

SKSEKSEIFSKLENLNVSDEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
 SKSEKSEIFSKLENLNVSDEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
 SKSEKSEIFSKLENLNVSDEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
 SKSEKSEIFSKLENLNVSDEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
 SKSEKSEIFSKLENLNVSDEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400

QVKNRYQFLNQHQLNPAIESDNNFTDTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
 QVKNRYQFLNQHQLNPAIESDNNFTDTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
 QVKNRYQFLNQHQLNPAIESDNNFTDTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
 QVKNRYQFLNQHQLNPAIESDNNFTDTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
 QVKNRYQFLNQHQLNPAIESDNNFTDTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450

PYLQVGFMP EARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500

KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGLSEDNGVDF 550
 KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGLSEDNGVDF 550
 KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGLSEDNGVDF 550
 KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGLSEDNGVDF 550
 KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGLSEDNGVDF 550

NKNTALDKNYLLNNKIPSNVVEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
 NKNTALDKNYLLNNKIPSNVVEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
 NKNTALDKNYLLNNKIPSNVVEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
 NKNTALDKNYLLNNKIPSNVVEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
 NKNTALDKNYLLNNKIPSNVVEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600

SKNPKNSIIIQRMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
 SKNPKNSIIIQRMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
 SKNPKNSIIIQRMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
 SKNPKNSIIIQRMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
 SKNPKNSIIIQRMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650

TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
 TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGA 700
 TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
 TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
 TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700

图1B

NMF SYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSITIGANQYEV RINS 750
 NMF SYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSITIGANQYEV RINS 750
 NMF SYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSITIGANQYEV RINS 750
 NMF SYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKDSITIGANQYEV RINS 750
 NMF SYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKDSITIGANQYEV RINS 750
 *****:*****

EGR KELLAHSGKWINKEEAIMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800

SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850
 SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850
 SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850
 SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850
 SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850

HNS IDDLIDEFNLL ENVSDELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900

RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
 RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
 RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
 RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
 RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950

QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVNLNSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
 QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVNLNSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
 QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVNLNSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
 QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVNLNSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
 QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVNLNSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000

NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPTITEGIPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
 NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPTITEGIPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
 NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPTITEGIPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
 NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPTITEGIPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
 NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPTITEGIPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050

图1C

LDEHDPLLKKELEAKVGVLAINMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100
 LDEHDPLLKKELEAKVGVLAINMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100
 LDEHDPLLKKELEAKVGVLAINMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100
 LDEHDPLLKKELEAKVGVLAINMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100
 LDEHDPLLKKELEAKVGVLAINMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100

 ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSESKKYGPLKTEDDKILVPID 1150
 ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSESKKYGPLKTEDDKILVPID 1150
 ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSESKKYGPLKTEDDKILVPID 1150
 ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSESKYGPLKTEDDKILVPID 1150
 ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSESKYGPLKTEDDKILVPID 1150
 *****:
 DLVISEIDFNNNSIKLGTNCNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
 DLVISEIDFNNNSIKLGTNCNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
 DLVISEIDFNNNSIKLGTNCNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
 DLVISEIDFNNNSIKLGTNCNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPYISSHIP 1200
 DLVISEIDFNNNSIKLGTNCNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPYISSHIP 1200

 SLSIYSAIGIETENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENDGT 1250
 SLSIYSAIGIETENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENDGT 1250
 SLSIYSAIGIETENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENDGT 1250
 SLSVYSAIGIKTENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENNGT 1250
 SLSVYSAIGIKTENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENNGT 1250
 ***:
 RLLDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKIKLKDTRNFI 1300
 RLLDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKIKLKDTRNFI 1300
 RLLDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKIKLKDTRNFI 1300
 KLLDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNKIKLKDTRNFI 1300
 KLLDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNKIKLKDTRNFI 1300
 :*****
 MPTITTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYPISTNINLSKDDLWIFNID 1350
 MPTITTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYPISTNINLSKDDLWIFNID 1350
 MPTITTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYPISTNINLSKDDLWIFNID 1350
 MPTITTDEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYPISMNINLSKDDLWIFNID 1350
 MPTITTDEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYPISMNINLSKDDLWIFNID 1350
 *****:
 NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
 NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
 NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
 NEVREISIENGTIKKGNLIEDVLSKIDINKNLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
 NEVREISIENGTIKKGNLIEDVLSKIDINKNLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
 *****:

图1D

RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSDGKNYLISNLSNIIEKINT 1450
 RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSDGKNYLISNLSNIIEKINT 1450
 RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSDGKNYLISNLSNTIEKINT 1450
 RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSDGKNYLISNLSNTIEKINT 1450
 RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSDGKNYLISNLSNTIEKINT 1450

LGLDSKNIAINYTDESNNKYFGAISKTSQKSIIHYKKDSKNILEFYNDST 1500
 LGLDSKNIAINYTDESNNKYFGAISKTSQKSIIHYKKDSKNILEFYNDST 1500
 LGLDSKNIAINYTDESNNKYFGAISKTSQKSIIHYKKDSKNILEFYNDST 1500
 LGLDSKNIAINYTDESNNKYFGAISKTSQKSIIHYKKDSKNILEFYNGST 1500
 LGLDSKNIAINYTDESNNKYFGAISKTSQKSIIHYKKDSKNILEFYNGST 1500

LEFNSKDFIAEDINVFMKDINTITGKYVVDNNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
 LEFNSKDFIAEDINVFMKDINTITGKYVVDNNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
 LEFNSKDFIAEDINVFMKDINTITGKYVVDNNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
 LEFNSKDFIAEDINVFMKDINTITGKYVVDNNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
 LEFNSKDFIAEDINVFMKDINTITGKYVVDNNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550

KVNGLYLNE SVYSSYLDVKNSDGHHNTSNFMNLFLDNISFWKLFGFENI 1600
 KVNGLYLNESVYSSYLDVKNSDGHHNTSNFMNLFLDNISFWKLFGFENI 1600
 KVNGLYLNESVYSSYLDVKNSDGHHNTSNFMNLFLDNISFWKLFGFENI 1600
 KVNGLYLNESVYSSYLDVKNSDGHHNTSNFMNLFLNNISFWKLFGFENI 1600
 KVNGLYLNESVYSSYLDVKNSDGHHNTSNFMNLFLNNISFWKLFGFENI 1600

NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIFYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
 NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIFYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
 NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIFYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
 NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIFYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
 NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIFYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650

RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSYEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
 RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSYEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
 RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSYEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
 RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSYEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
 RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSYEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700

INTNYYSEYYPEIIVLPNTFHKKVNINLDSSSFYEYKWSTEGSDFILVR 1750
 INTNYYSEYYPEIIVLPNTFHKKVNINLDSSSFYEYKWSTEGSDFILVR 1750
 INTNYYSEYYPEIIVLPNTFHKKVNINLDSSSFYEYKWSTEGSDFILVR 1750
 INTNYYSEYYPEIIVLPNTFHKKVNINLDSSSFYEYKWSTEGSDFILVR 1750
 INTNYYSEYYPEIIVLPNTFHKKVNINLDSSSFYEYKWSTEGSDFILVR 1750

图1E

YLEESNKKILQKIRIKGILSNQSFNKMSIDFKDIKKSLGYIMSNFKSF 1800
 YLEESNKKILQKIRIKGILSNQSFNKMSIDFKDIKKSLGYIMSNFKSF 1800
 YLEESNKKILQKIRIKGILSNQSFNKMSIDFKDIKKSLGYIMSNFKSF 1800
 YLEESNKKILQKIRIKGILSNQSFNKMSIDFKDIKKSLGYIMSNFKSF 1800
 YLEESNKKILQKIRIKGILSNQSFNKMSIDFKDIKKSLGYIMSNFKSF 1800

NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNL 1850
 NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNL 1850
 NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNL 1850
 NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIESNL 1850
 NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIESNL 1850

VTGWQTINGKKYYFDINTGAALISYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
 VTGWQTINGKKYYFDINTGAALISYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
 VTGWQTINGKKYYFDINTGAALTSYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
 VTGWQTINGKKYYFDINTGAASTSYKIINGKHFYFNNNGVMQLGVFKGPD 1900
 VTGWQTINGKKYYFDINTGAASTSYKIINGKHFYFNNNGVMQLGVFKGPD 1900
 *****:*****

GFEYFAPANTQNNNIEQQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDND SKAVTGWIIN 1950
 GFEYFAPANTQNNNIEQQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDND SKAVTGWIIN 1950
 GFEYFAPANTQNNNIEQQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDNN SKAVTGWIIN 1950
 GFEYFAPANTQNNNIEQQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDND SKAVTGWIIN 1950
 GFEYFAPANTQNNNIEQQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDND SKAVTGWIIN 1950
 *****:*****

NEKYYFNPNNAAIAAVGLQVIDDNNKYYFNPDTAIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
 NEKYYFNPNNAAIAAVGLQVIDDNNKYYFNPDTAIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
 NEKYYFNPNNAAIAAVGLQVIDDNNKYYFNPDTAIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
 NEKYYFNPNNAAIAAVGLQVIDDNNKYYFNPDTAIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
 NEKYYFNPNNAAIAAVGLQVIDDNNKYYFNPDTAIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000

DTAIAFNGYKTIDGKHFYFDSDCVVKIGVFSTSNGFEYFAPANTYNNIE 2050
 DTAIAFNGYKTIDGKHFYFDSDCVVKIGVFSTSNGFEYFAPANTYNNIE 2050
 DTAIAFNGYKTIDGKHFYFDSDCVVKIGVFSTSNGFEYFAPANTYNNIE 2050
 DTAIAFNGYKTIDGKHFYFDSDCVVKIGVFSGSNGFEYFAPANTYNNIE 2050
 DTAIAFNGYKTIDGKHFYFDSDCVVKIGVFSGSNGFEYFAPANTYNNIE 2050

GQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDNN SKAVTGWTIDS KYYFNTNTAEATG 2100

图1F

WQTIDGKKYYFNTNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
 WQTIDGKKYYFNTNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
 WQTIDGKKYYFNTNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
 WQTIDGKKYYFNTNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTSIASTGYTIINGKY 2150
 WQTIDGKKYYFNTNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTSIASTGYTIINGKY 2150
 *****:*****:*****:*****:

FYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTLNGK 2200
 FYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTLNGK 2200
 FYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTLNGK 2200
 FYFNTDGIMQIGVFKVPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGK 2200
 FYFNTDGIMQIGVFKVPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGK 2200
 *****.*****:*****:

KYYFGSDSKAVTGWRINNKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
 KYYFGSDSKAVTGWRINNKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
 KYYFGSDSKAVTGWRINNKYYFNPNNAAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
 KYYFGSDSKAITEGWQTIDGKKYYFNPNNAAIAATHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
 KYYFGSDSKAITEGWQTIDGKKYYFNPNNAAIAATHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
 *****:*****:*****:*****:

LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
 LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
 LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
 LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
 LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300

AIVYQNKFLTNGKKYYFDND SKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQ 2350
 AIVYQNKFLTNGKKYYFDND SKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQ 2350
 AIVYQNKFLTNGKKYYFDND SKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAATGWQ 2350
 AIVYQNKFLTNGKKYYFDND SKAVTGWQTIDSCKYYFNLNTAVAVTGWQ 2350
 AIVYQNKFLTNGKKYYFDND SKAVTGWQTIDSCKYYFNLNTAVAVTGWQ 2350
 *****.*****:*****:

TIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYSINGKHFY 2400
 TIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYSINGKHFY 2400
 TIDGKKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYSINGKHFY 2400
 TIDGEKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKRYYFNTNTYIASTGYTIINGKHFY 2400
 TIDGEKYYFNLNTAEAATGWQTIDGKRYYFNTNTYIASTGYTIINGKHFY 2400
 *****:*****:*****:*****:*****:

FNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGKKY 2450
 FNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGKKY 2450
 FNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTLNGKKY 2450
 FNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGKKY 2450
 FNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTLNGKKY 2450
 *****.*****:*****:

图1G

YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTSIA 2500
 YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTSIA 2500
 YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTSIA 2500
 YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTYIA 2500
 YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKYYFNTNTYIA 2500

STGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
 STGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
 STGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
 STGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
 STGYTIISGKHFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550

YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTID 2600
 YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTID 2600
 YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTID 2600
 YQNRFLYLHDNIYYFGNDSKAATGWATIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTID 2600
 YQNRFLYLHDNIYYFGNDSKAATGWATIDGNRYYFEPNTAMGANGYKTID 2600

NKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLL 2650
 NKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLL 2650
 NKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLL 2650
 NKNFYFRNGLPQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIDGQAIRYQNRFLHLL 2650
 NKNFYFRNGLPQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIDGQAIRYQNRFLHLL 2650

GKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKYYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
 GKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKYYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
 GKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKYYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
 GKIYYFGNNSKAVTGWQTINSKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
 GKIYYFGNNSKAVTGWQTINSKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700

DGVKAPGIYG 2710 (SEQ ID NO: 1, 630)
 DGVKAPGIYG 2710 (SEQ ID NO: 4)
 DGVKAPGIYG 2710 (SEQ ID NO: 19, VPI10463)
 DGVKAPGIYG 2710 (SEQ ID NO: 15, R20291)
 DGVKAPGIYG 2710 (SEQ ID NO: 17, CD196)

图1H

MSLVNRQLEKMANVRFRTQEDEYVAILDALEEHNMSENTVVEKYLKLKDINSLTDIYI 60
 MSLVNRQLEKMANVRFRTQEDEYVAILDALEEHNMSENTVVEKYLKLKDINSLTDIYI 60
 MSLVNRQLEKMANVRFRTQEDEYVAILDALEEHNMSENTVVEKYLKLKDINSLTDIYI 60
 MSLVNRQLEKMANVRFRVQEDEYVAILDALEEHNMSENTVVEKYLKLKDINSLTDIYI 60
 MSLVNRQLEKMANVRFRVQEDEYVAILDALEEHNMSENTVVEKYLKLKDINSLTDIYI 60

DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
 DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
 DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
 DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
 DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120

VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLNDPRFDYNKFFRKRMEEIIY 180
 VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLNDPRFDYNKFFRKRMEEIIY 180
 VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLNDPRFDYNKFFRKRMEEIIY 180
 VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTIVESATNDTLESFRENLNDPRFDYNKFYRKRMEEIIY 180
 VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTIVESATNDTLESFRENLNDPRFDYNKFYRKRMEEIIY 180

DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELENLYIEESLNKITQNSGNDV 240
 DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELENLYIEESLNKITQNSGNDV 240
 DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELENLYIEESLNKITQNSGNDV 240
 DKQKNFINYYKTQREENPDLIIDDIVKIYLSNEYSKDIDELNSYIEESLNKTENSGNDV 240
 DKQKNFINYYKTQREENPDLIIDDIVKIYLSNEYSKDIDELNSYIEESLNKTENSGNDV 240

RNFEEFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGGMYLDVDMLPGIQPDLFES 300
 RNFEEFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGGMYLDVDMLPGIQPDLFES 300
 RNFEEFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGGMYLAVAMLPGIQPDLFES 300
 RNFEEFKGGESFKLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEVGGYLDVDMLPGIQPDLFES 300
 RNFEEFKGGESFKLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEVGGYLDVDMLPGIQPDLFES 300

IEKPSSVTDFWEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
 IEKPSSVTDFWEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
 IEKPSSVTDFWEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
 IEKPSSVTDFWEMVKLEAIMKYKEYIPGYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
 IEKPSSVTDFWEMVKLEAIMKYKEYIPGYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360

SSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
 SSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
 SSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
 SSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
 SSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420

DNDFTTTNTFIDSIMAEANADNGRFMELGKYLGVFFFDPVTTINLSGPEAYAAQD 480
 DNDFTTTNTFIDSIMAEANADNGRFMELGKYLGVFFFDPVTTINLSGPEAYAAQD 480
 DNDFTTTNTFIDSIMAEANADNGRFMELGKYLGVFFFDPVTTINLSGPEAYAAQD 480

图2A

INKETGESIFVETEKTIFSEYANHITEEISIKGTIFDTVNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
 INKETGESIFVETEKTIFSEYANHITEEISIKGTIFDTVNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
 INKETGESIFVETEKTIFSEYANHITEEISIKGTIFDTVNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
 IDKETGESIFVETEKAIFSEYANHITEEISIKGTIFDTVNGKLVKKVNLDATHEVNTLN 960
 IDKETGESIFVETEKAIFSEYANHITEEISIKGTIFDTVNGKLVKKVNLDATHEVNTLN 960
 * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
 AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
 AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
 AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
 AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
 * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

LLPTLSEGLPIIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLLRQEIEAKIGIMAVNLTTATTAIIT 1080
 LLPTLSEGLPIIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLLRQEIEAKIGIMAVNLTTATTAIIT 1080
 LLPTLSEGLPIIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLLRQEIEAKIGIMAVNLTTATTAIIT 1080
 LLPTLSEGLPVIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLLRQEIEAKIGIMAVNLTAATTAIIT 1080
 LLPTLSEGLPVIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLLRQEIEAKIGIMAVNLTAATTAIIT 1080
 * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDFKHVSLVETEGVFLLD 1140
 SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDFKHVSLVETEGVFLLD 1140
 SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDFKHVSLVETEGVFLLD 1140
 SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELILRDKATKVVDFSHISLAEGAFTSLD 1140
 SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELILRDKATKVVDFSHISLAEGAFTSLD 1140
 * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

DKIMMPQDDLWISEIDFNNNSIVLGCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
 DKIMMPQDDLWISEIDFNNNSIVLGCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
 DKIMMPQDDLWISEIDFNNNSIVLGCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
 DKIMMPQDDLWISEIDFNNNSITLGCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
 DKIMMPQDDLWISEIDFNNNSITLGCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
 * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

SIYDVLEVQKEELDLSKDLMVLNPAPNRPFAWETGWTPLRSLENDGTKLLDRIRDNYEG 1260
 SIYDVLEVQKEELDLSKDLMVLNPAPNRPFAWETGWTPLRSLENDGTKLLDRIRDNYEG 1260
 SIYDVLEVQKEELDLSKDLMVLNPAPNRPFAWETGWTPLRSLENDGTKLLDRIRDNYEG 1260
 SIYDVLEVQKEELDLSKDLMVLNPAPNRPFAWETGWTPLRSLENDGTKLLDRIRDNYEG 1260
 SIYDVLEVQKEELDLSKDLMVLNPAPNRPFAWETGWTPLRSLENDGTKLLDRIRDNYEG 1260
 * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPIITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
 EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPIITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
 EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPIITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
 EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPVITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
 EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPVITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
 * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

GTYALSLSQYNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTIESSDKIKKGDLIEGILSTLSIEEN 1380
 GTYALSLSQYNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTIESSDKIKKGDLIEGILSTLSIEEN 1380
 GTYALSLSQYNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTIESSDKIKKGDLIEGILSTLSIEEN 1380

图2C

GTYALSLSQYNMNMNIELNENDTWVIDVDNVVRDVIESDKIKKGDLIENILSKLSIEDN 1380

GTYALSLSQYNMNMNIELNENDTWVIDVDNVVRDVIESDKIKKGDLIENILSKLSIEDN 1380

*****:*****.*****.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

KIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTSILEGINAIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS 1440

KIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTSILEGINAIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS 1440

KIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTSILEGINAIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS 1440

KIILDNHEINFSGTLNGGNGFVSLTSILEGINAVIEVDLLSKSYKVLISGELKTLMANS 1440

KIILDNHEINFSGTLNGGNGFVSLTSILEGINAVIEVDLLSKSYKVLISGELKTLMANS 1440

*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

NHIQQKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEKGKFINGSTKEGLFVSELPDVVLISKVYMD 1500

NHIQQKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEKGKFINGSTKEGLFVSELPDVVLISKVYMD 1500

NHIQQKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEKGKFINGSTKEGLFVSELPDVVLISKVYMD 1500

NSVQQKIDYIGLNSELQKNIPYSFMDDKKGKENGFINCSTKEGLFVSELDVVVLISKVYMD 1500

NSVQQKIDYIGLNSELQKNIPYSFMDDKKGKENGFINCSTKEGLFVSELDVVVLISKVYMD 1500

* :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

DSKPSFGYYSNNLKDVKITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTQDEKTIKLNSVHLDES 1560

DSKPSFGYYSNNLKDVKITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTQDEKTIKLNSVHLDES 1560

DSKPSFGYYSNNLKDVKITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTQDEKTIKLNSVHLDES 1560

NSKPLFGYCSNDLKDVKITKDDVIILTGYYLKDDIKISLSFTIQDENTIKLNGVYLDEN 1560

NSKPLFGYCSNDLKDVKITKDDVIILTGYYLKDDIKISLSFTIQDENTIKLNGVYLDEN 1560

:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

GVAEILKFMNRKGNTNTSDSLMSFLESNIKSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ 1620

GVAEILKFMNRKGNTNTSDSLMSFLESNIKSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ 1620

GVAEILKFMNRKGNTNTSDSLMSFLESNIKSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ 1620

GVAEILKFMNKKGSTNTSDSLMSFLESNIKSIFINSLQSNTKLILDTNFIISGTTSIGQ 1620

GVAEILKFMNKKGSTNTSDSLMSFLESNIKSIFINSLQSNTKLILDTNFIISGTTSIGQ 1620

*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

FEFICDENDNIQPYFIKFNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDSDGDISSTVINFSQKY 1680

FEFICDENDNIQPYFIKFNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDSDGDISSTVINFSQKY 1680

FEFICDENDNIQPYFIKFNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDSDGDISSTVINFSQKY 1680

FEFICDKDNNIOPYFIKFNTLETKYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDSDGDISSTVINFSQKY 1680

FEFICDKDNNIOPYFIKFNTLETKYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDSDGDISSTVINFSQKY 1680

*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

LYGIDSCVNKKVVISPNIYTDEINITPVYETNNNTYPEPIVILDANYINEKINVNINDLSIRY 1740

LYGIDSCVNKKVVISPNIYTDEINITPVYETNNNTYPEPIVILDANYINEKINVNINDLSIRY 1740

LYGIDSCVNKKVVISPNIYTDEINITPVYETNNNTYPEPIVILDANYINEKINVNINDLSIRY 1740

LYGIDSCVNKKVVISPNIYTDEINITPIYEANNTYPEPIVILDTNYISEKINININDLSIRY 1740

LYGIDSCVNKKVVISPNIYTDEINITPIYEANNTYPEPIVILDTNYISEKINININDLSIRY 1740

*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

VWSNDGND FILM ST SEEN KV SQVKIRFVNFKD KTLANK LSFNFSDK QDVPVSEI ILSFT 1800

VWSNDGND FILM ST SEEN KV SQVKIRFVNFKD KTLANK LSFNFSDK QDVPVSEI ILSFT 1800

VWSNDGND FILM ST SEEN KV SQVKIRFVNFKD KTLANK LSFNFSDK QDVPVSEI ILSFT 1800

VWSNDGSDFILM ST DEEN KV SQVKIRFTNVFKGNTISDKISFNFS DKQDVSINKVISTFT 1800

VWSNDGSDFILM ST DEEN KV SQVKIRFTNVFKGNTISDKISFNFS DKQDVSINKVISTFT 1800

*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

图2D

PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVG 1860
 PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVG 1860
 PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVG 1860
 PSYYVEGLLNYDLGLISLYNEKFYINNFGMMVSGLVYINDSLYYFKPPIKNLITGFTTIG 1860
 PSYYVEGLLNYDLGLISLYNEKFYINNFGMMVSGLVYINDSLYYFKPPIKNLITGFTTIG 1860
 **** : * : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

DDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG 1920
 DDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG 1920
 DDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTGVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG 1920
 DDKYYFNPDNGGAASVGETIIDGKNYYFSQNGVLQTGVFSTEDGFKYFAPADTLDENLEG 1920
 DDKYYFNPDNGGAASVGETIIDGKNYYFSQNGVLQTGVFSTEDGFKYFAPADTLDENLEG 1920
 ***** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN 1980
 EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN 1980
 EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN 1980
 EAIDFTGKLTIIDENVYYFGDNYRAAIEWQTLDEVYYFSTDTGRAFKGLNQIGDDKFYFN 1980
 EAIDFTGKLTIIDENVYYFGDNYRAAIEWQTLDEVYYFSTDTGRAFKGLNQIGDDKFYFN 1980
 ***** * : *

SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFA 2040
 SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFA 2040
 SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFA 2040
 SDGIMQKGFVNINDKTFYFDDSGVMKSGYTEIDGKYFYFAENGEMQIGVFNTADGFKYFA 2040
 SDGIMQKGFVNINDKTFYFDDSGVMKSGYTEIDGKYFYFAENGEMQIGVFNTADGFKYFA 2040
 *** : *

HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
 HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
 HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
 HHDEDLGNEEGEALSYS GILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
 HHDEDLGNEEGEALSYS GILNFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
 *** : *

LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIESGVQNIDDDNYFYIDDNGIVQIG 2160
 LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIESGVQNIDDDNYFYIDDNGIVQIG 2160
 LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIESGVQNIDDDNYFYIDDNGIVQIG 2160
 ISIINDGKYYFNDSGIMQIGFVTINNEVFYFSDSGIVESGMQNIDDDNYFYIDENGLVQIG 2160
 ISIINDGKYYFNDSGIMQIGFVTINNEVFYFSDSGIVESGMQNIDDDNYFYIDENGLVQIG 2160
 : *

VFDTSRGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
 VFDTSRGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
 VFDTSRGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
 VFDTSRGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
 VFDTSRGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
 ***** * : *

图2E

KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
 KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
 KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
 KYYFDPETKKAYKGINVDDIKYYFDENGIMRTGLITFEDNHYYFNEDGIMQYGYLNIED 2280
 KYYFDPETKKAYKGINVDDIKYYFDENGIMRTGLITFEDNHYYFNEDGIMQYGYLNIED 2280
 **** : ***** : ***** : ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYFTDEYI 2340
 KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYFTDEYI 2340
 KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYFTDEYI 2340
 KTFYFSEDGIMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYFTDEYI 2340
 KTFYFSEDGIMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDEKRYFTDEYI 2340
 * * . * : *****

AATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 2, 630)
 AATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 25, VPI10463)
 AATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 6)
 AATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 21, R20291)
 AATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 23, CD196)

图2F

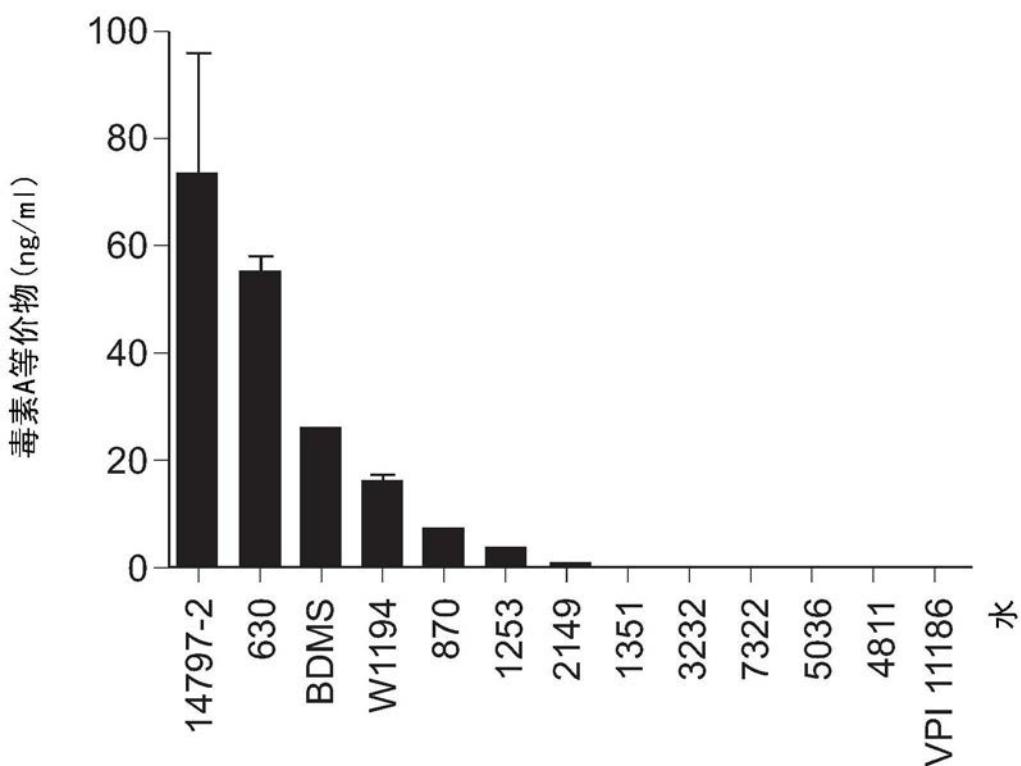


图3

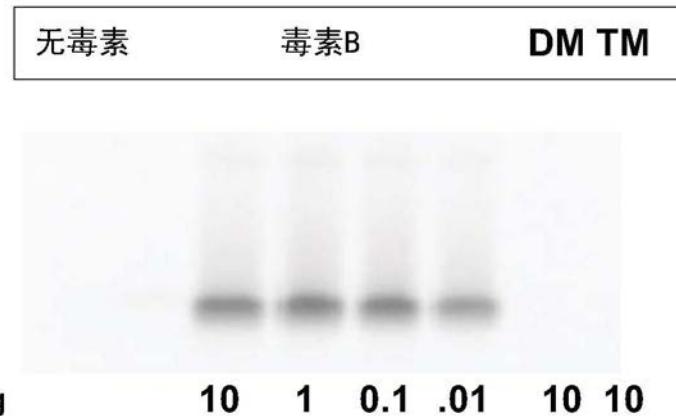


图4A

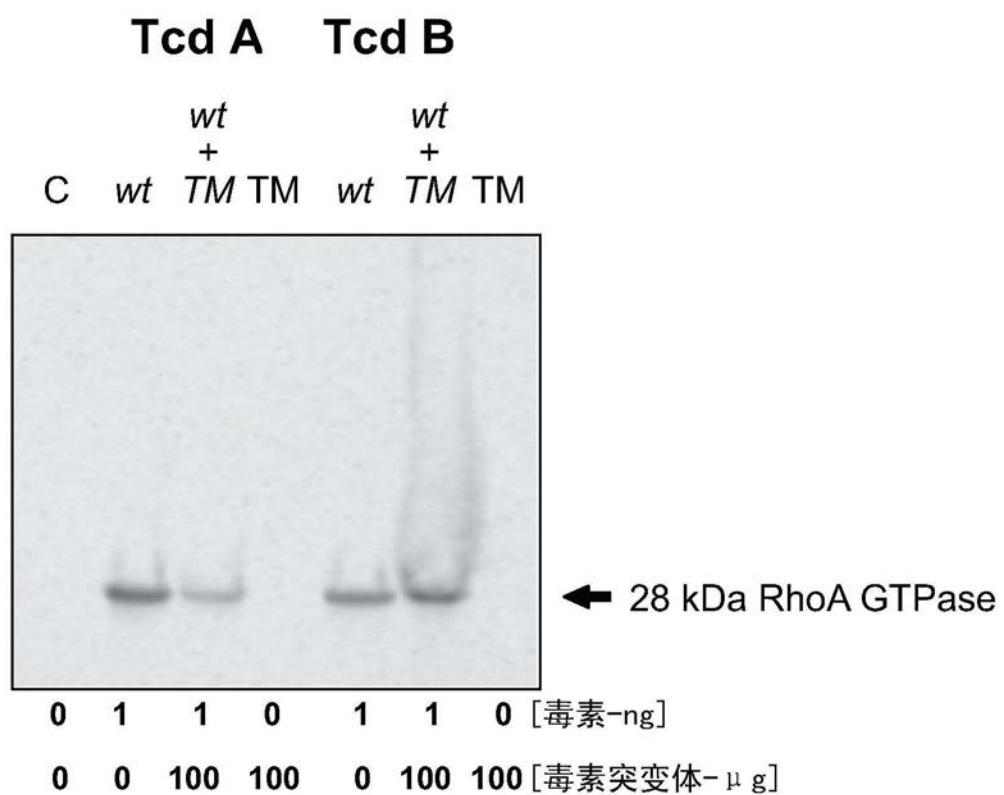


图4B

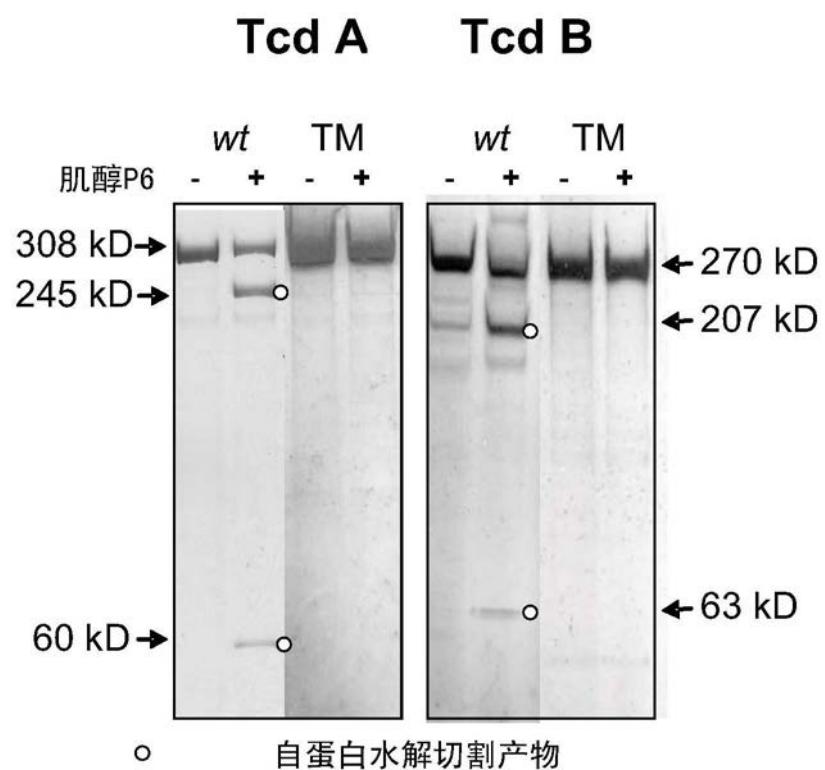


图5

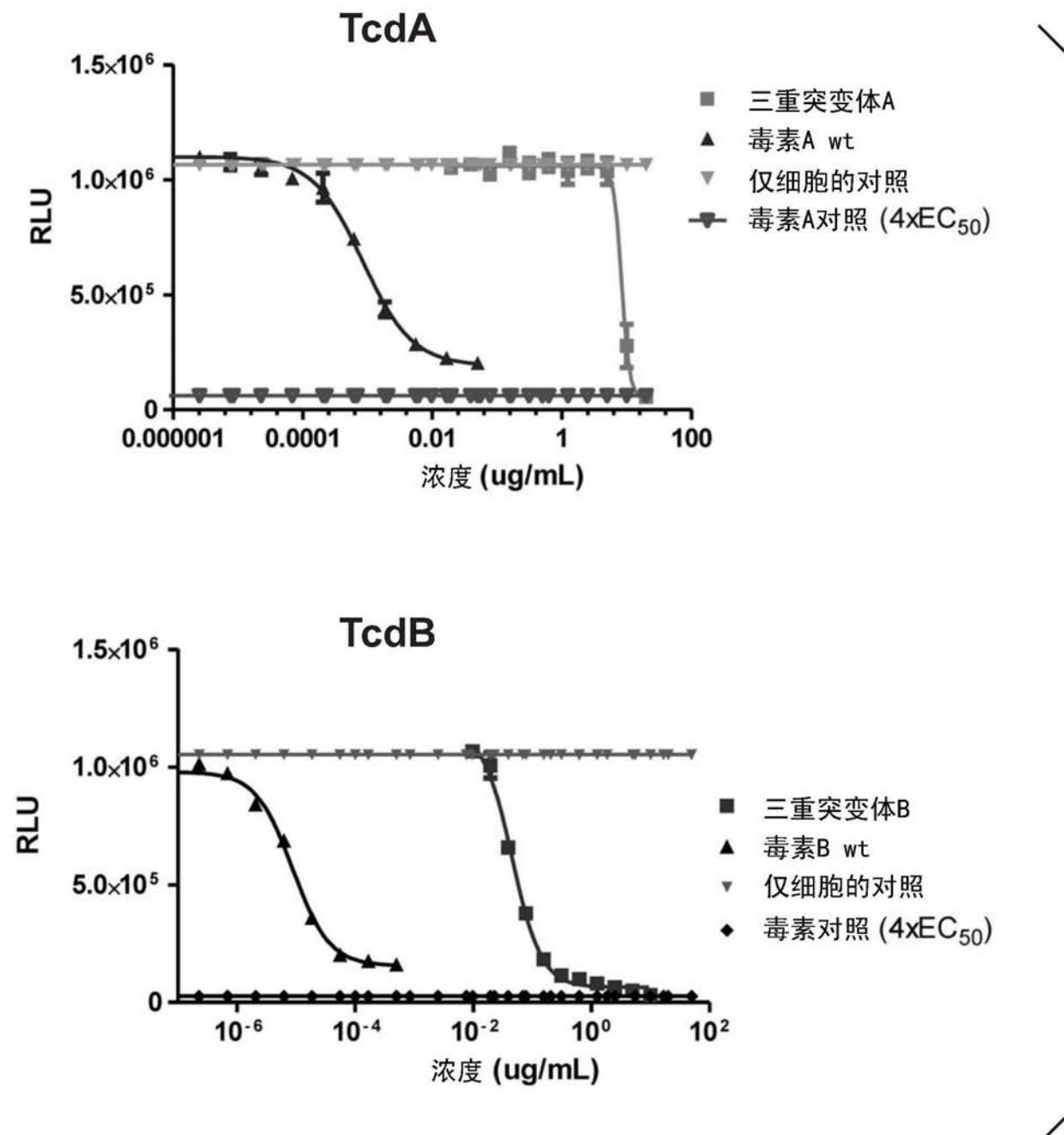
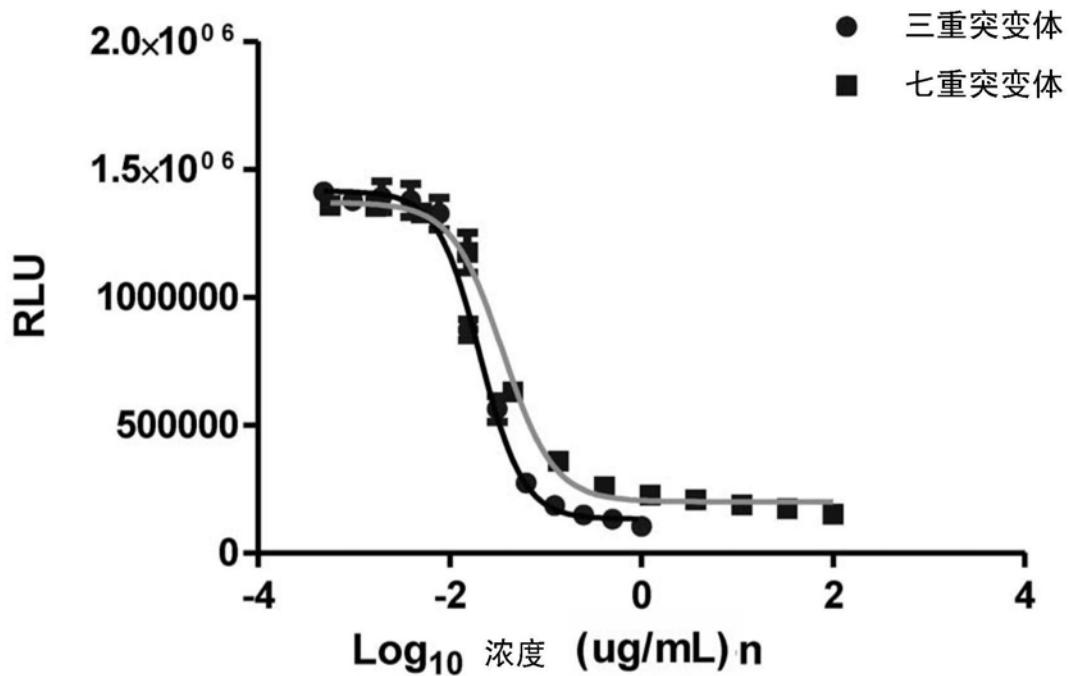


图6



	三重突变体	七重突变体
EC ₅₀	0.02078	0.03590

图7

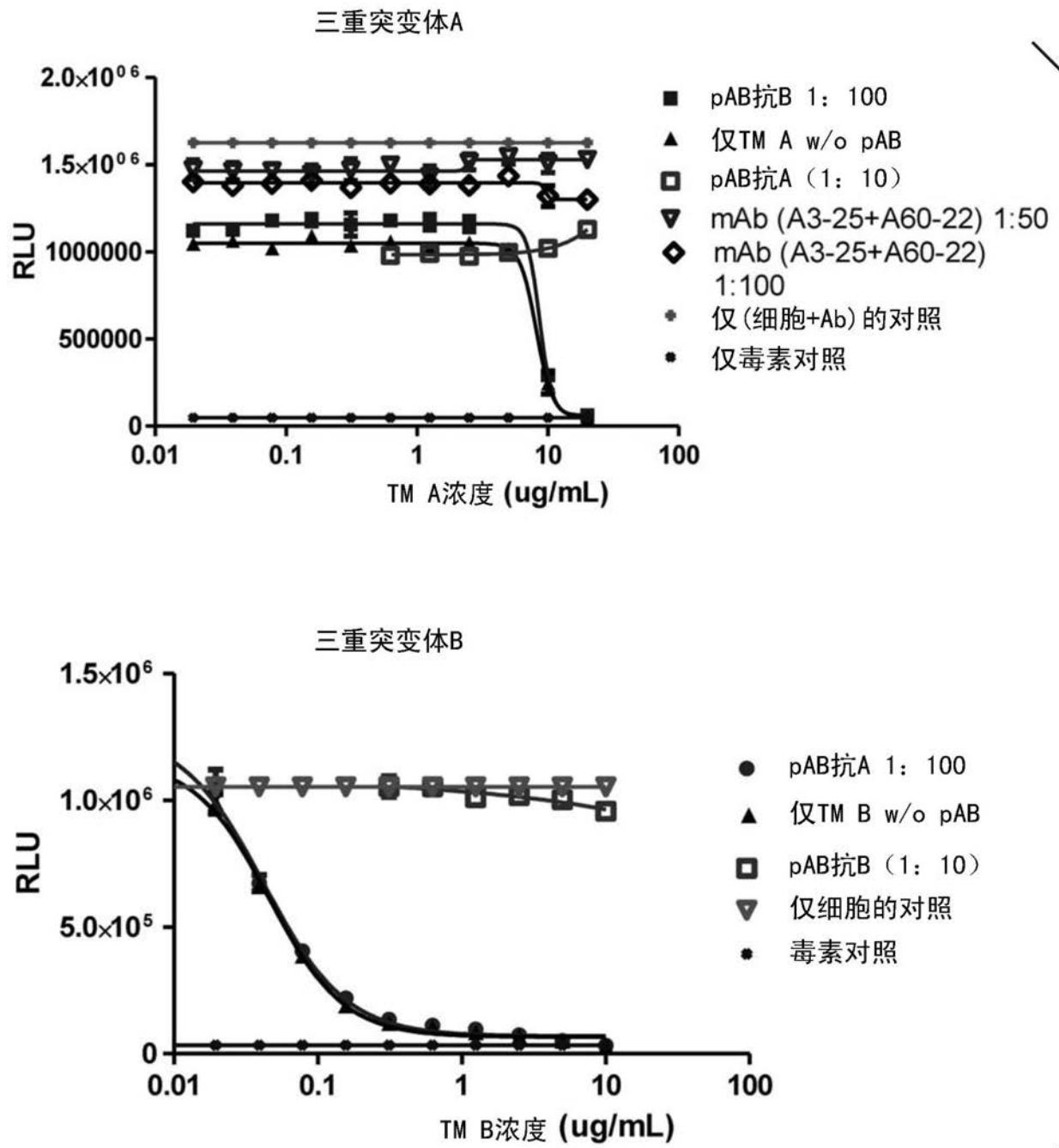


图8

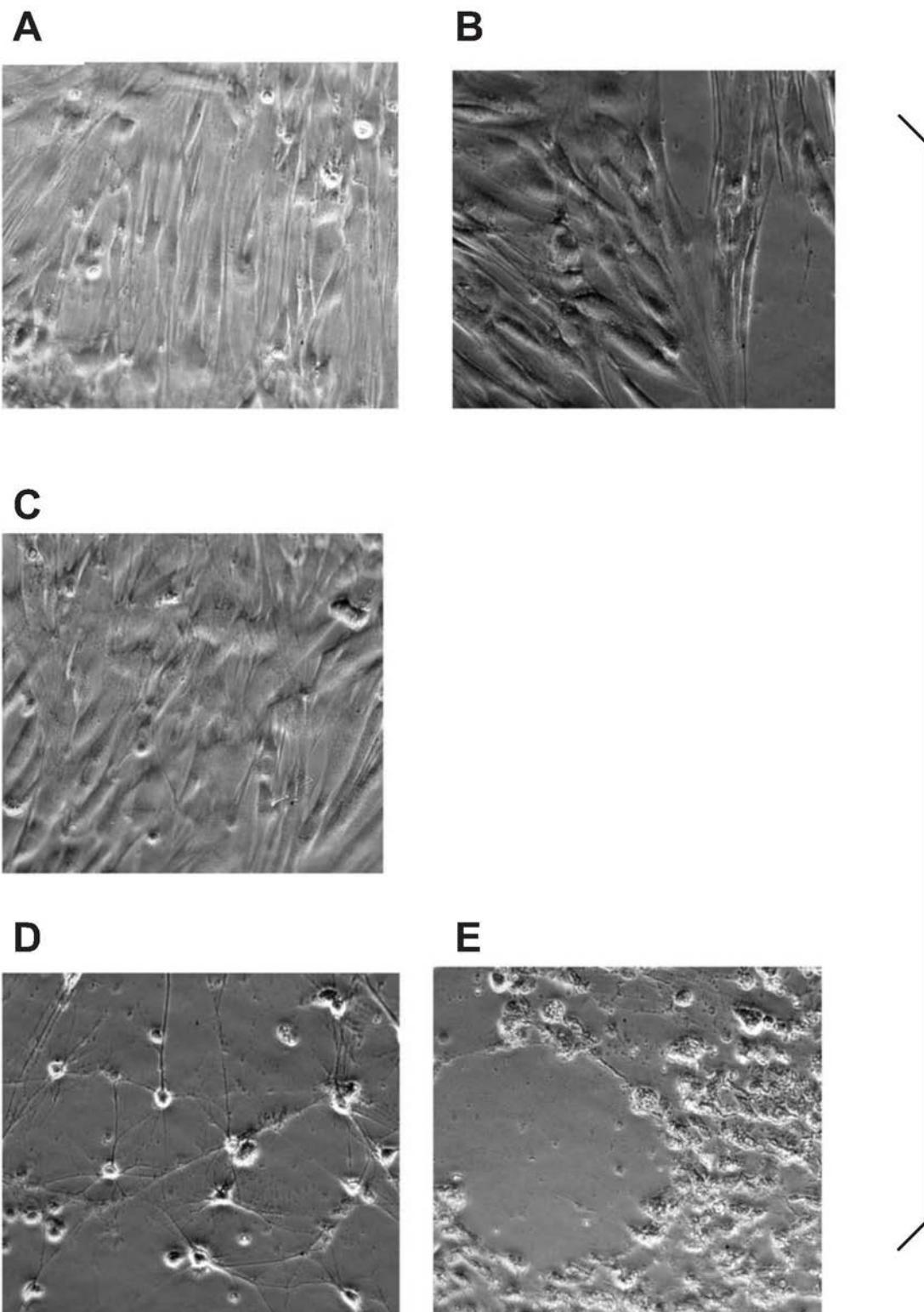


图9

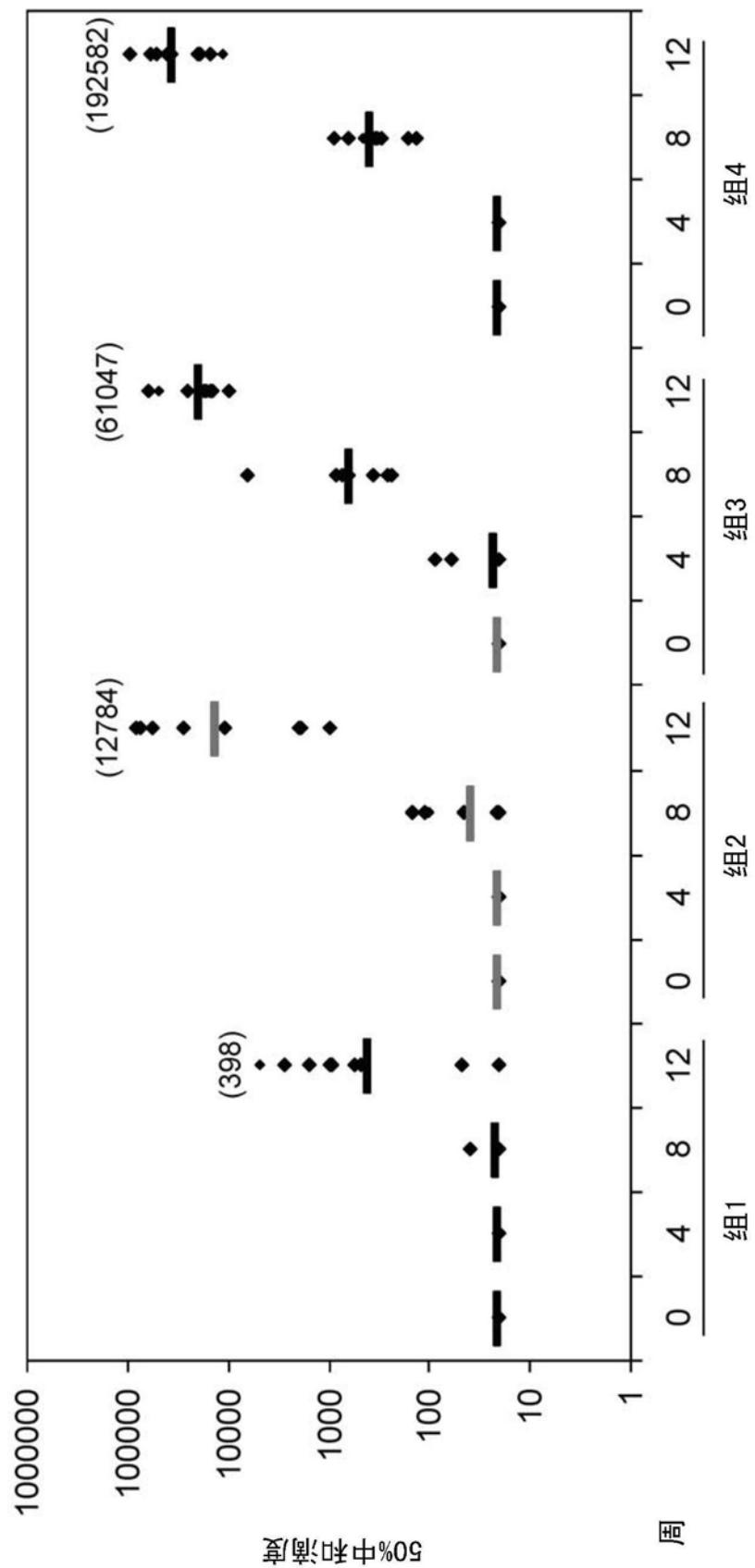


图10

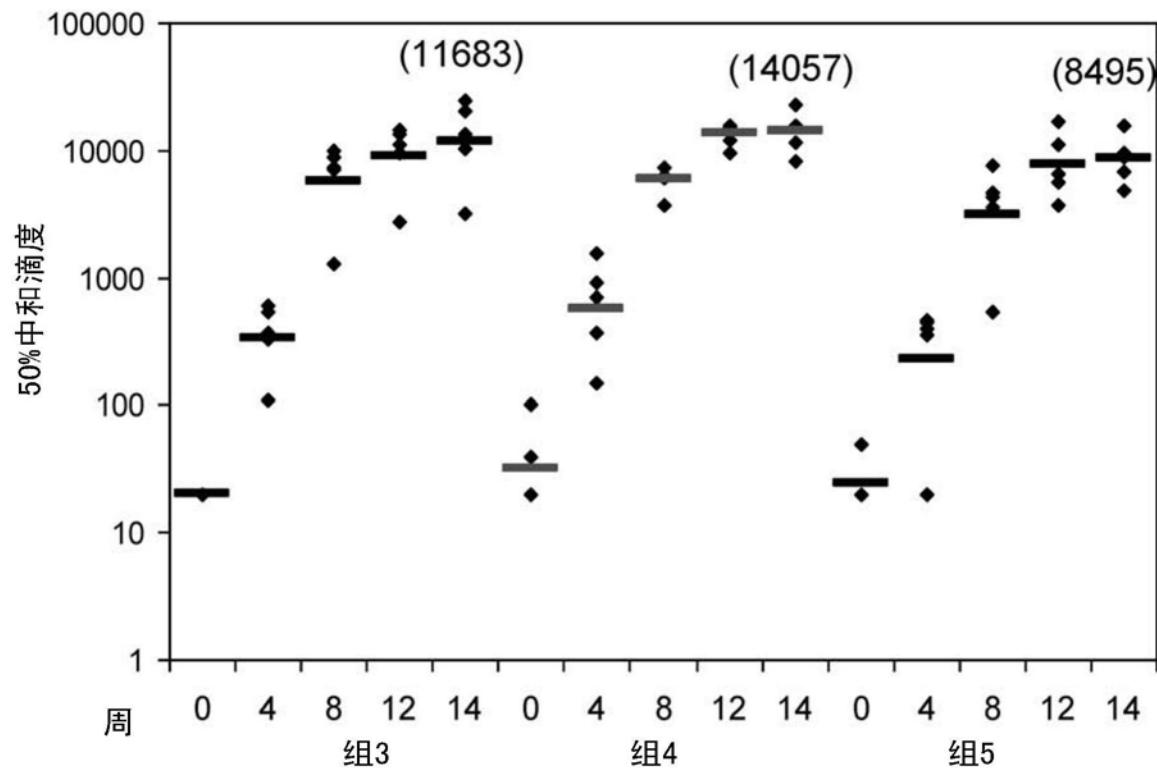


图11A

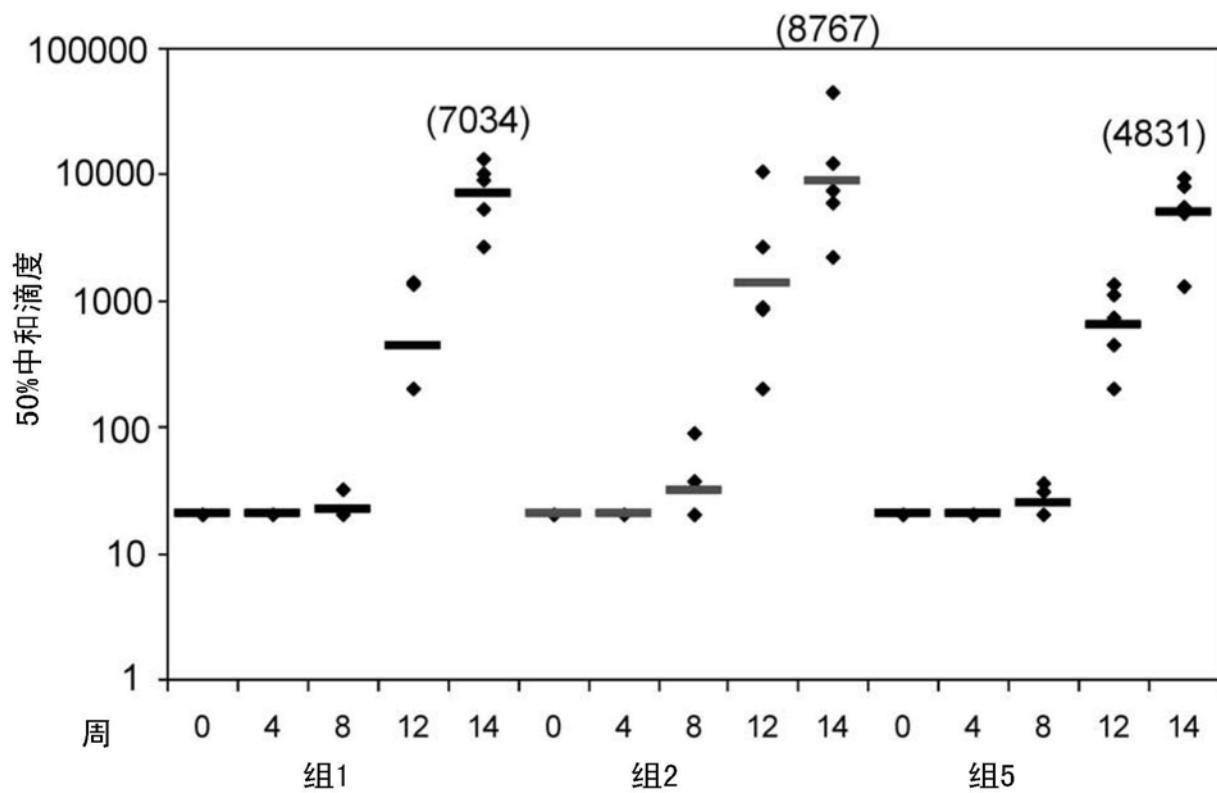


图11B

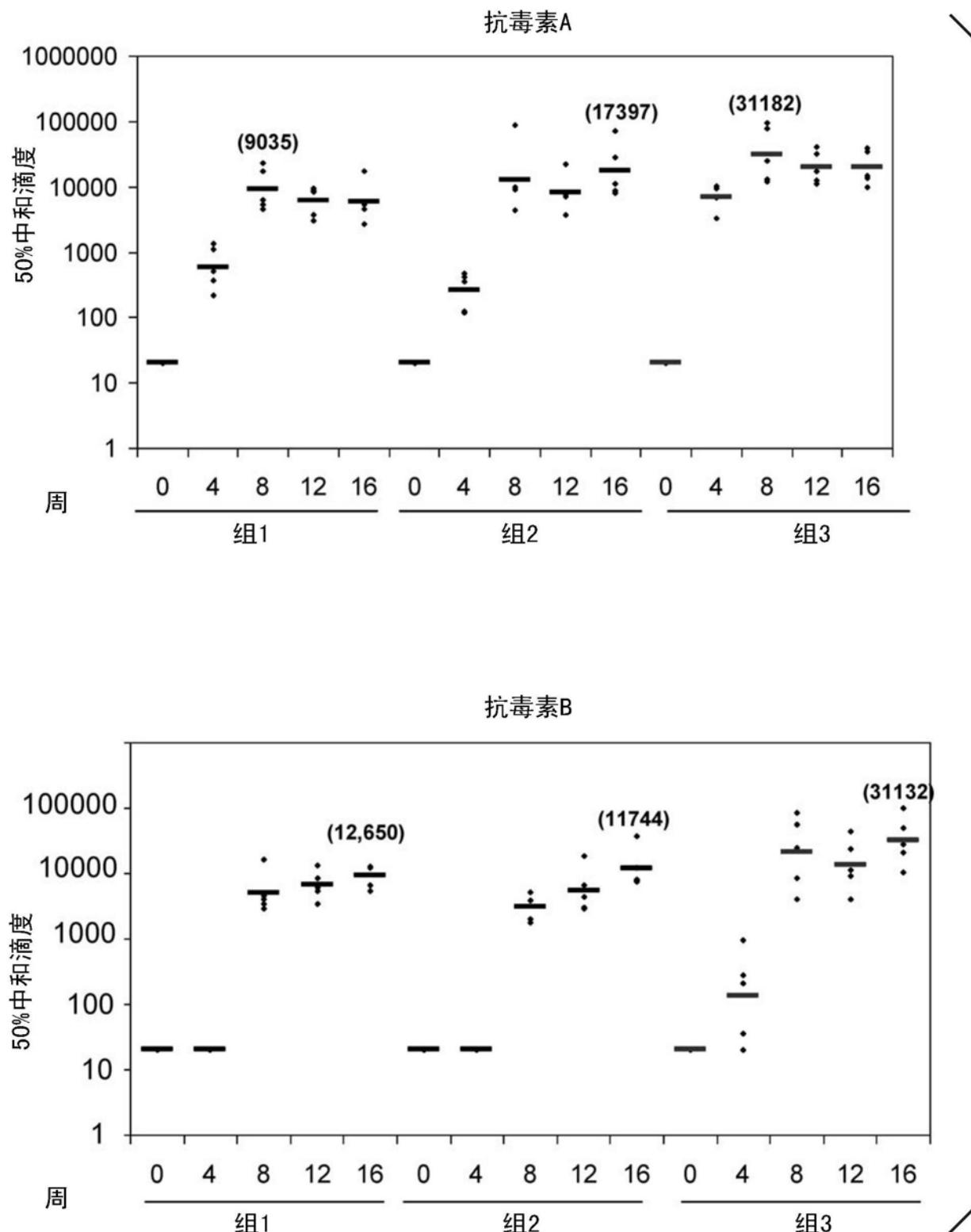


图12

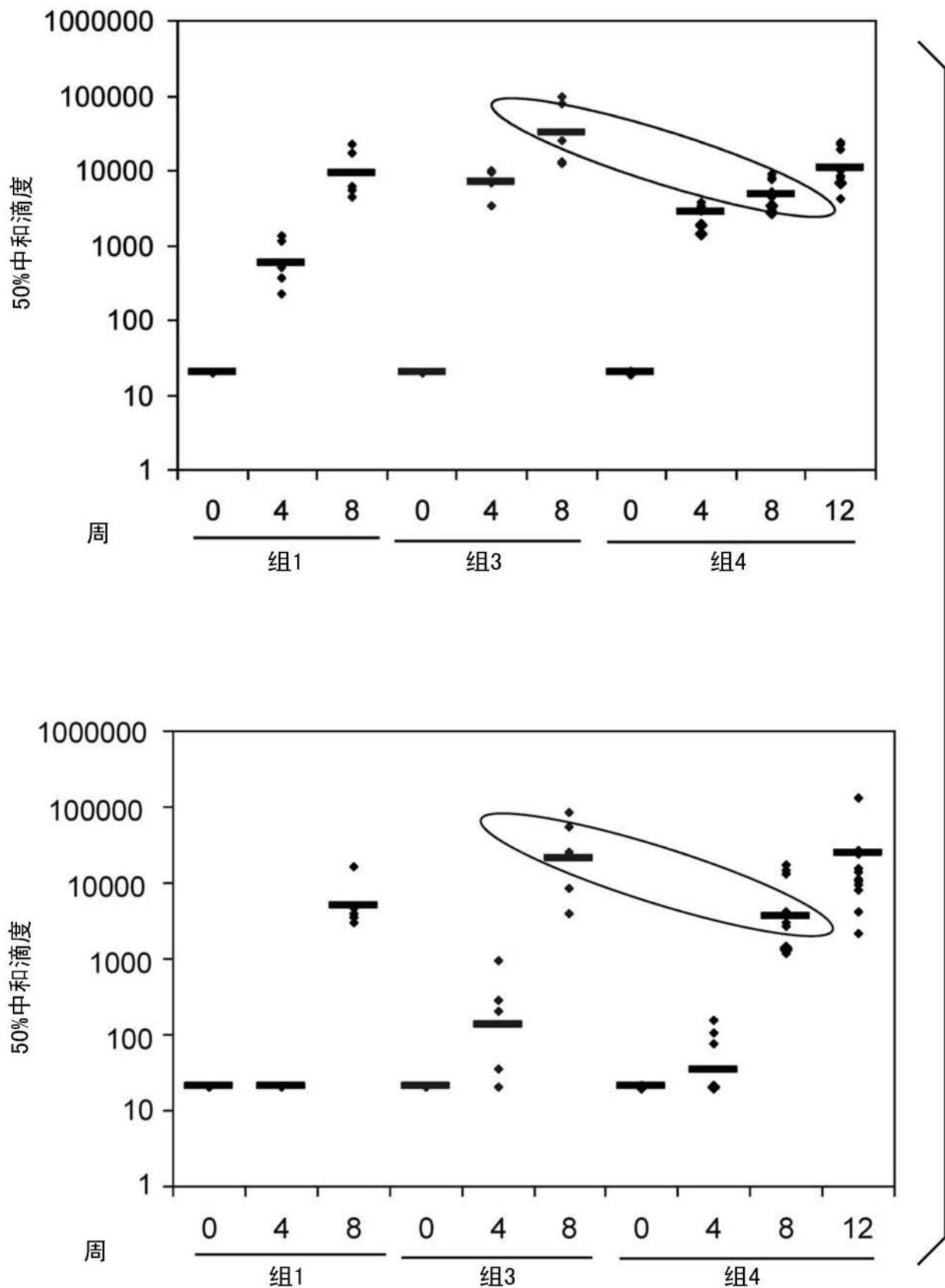


图13

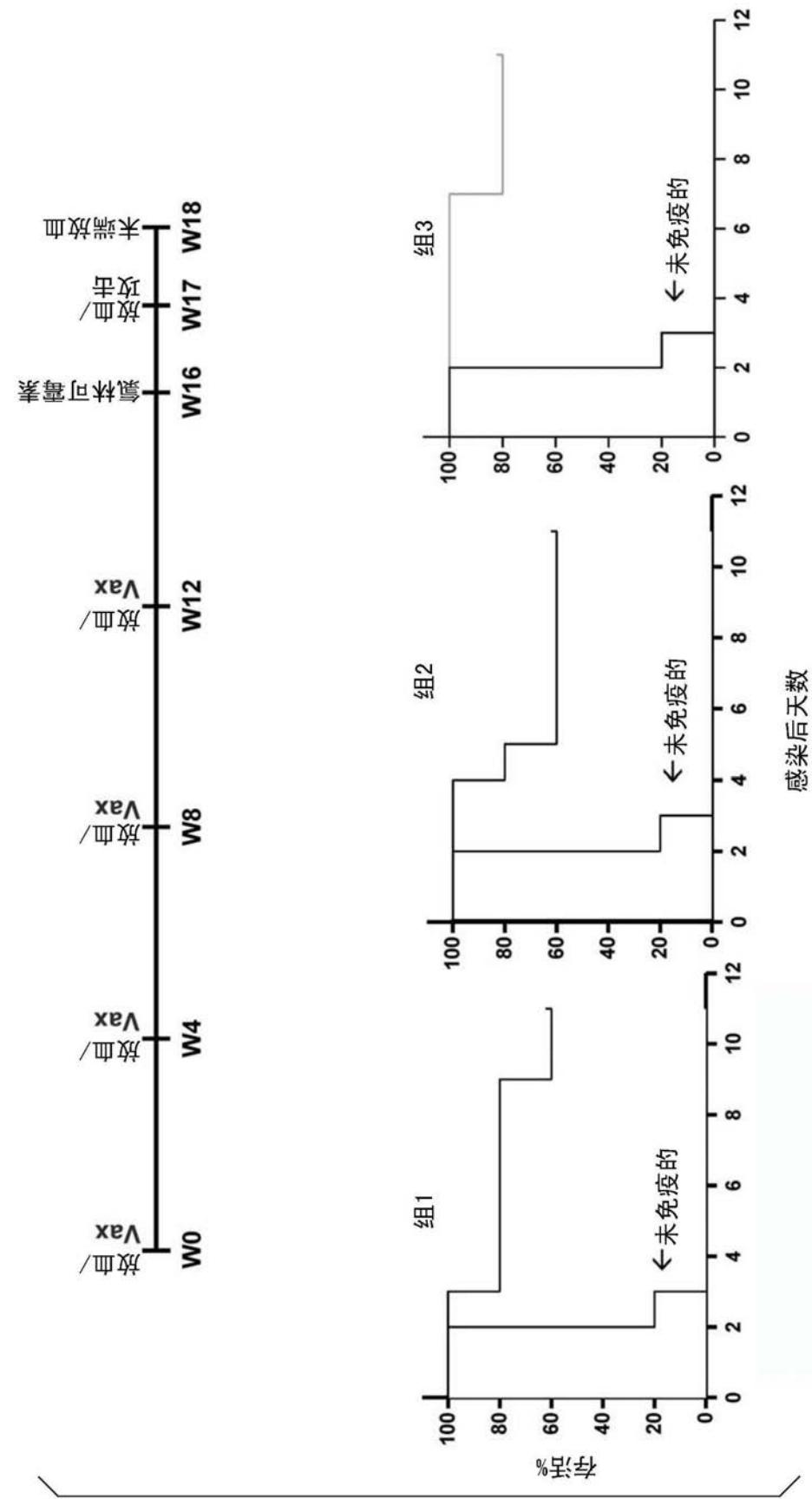


图14

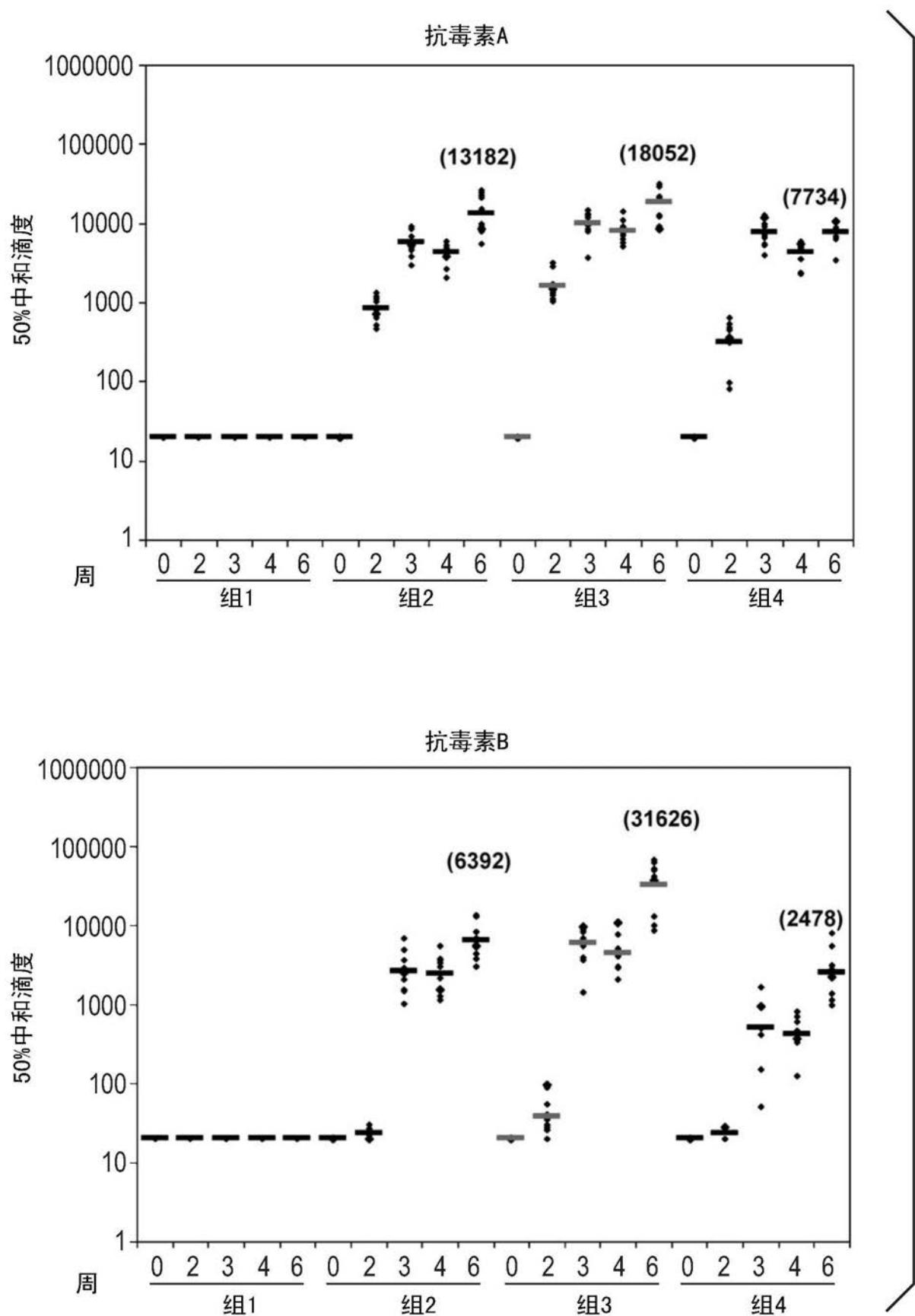


图15

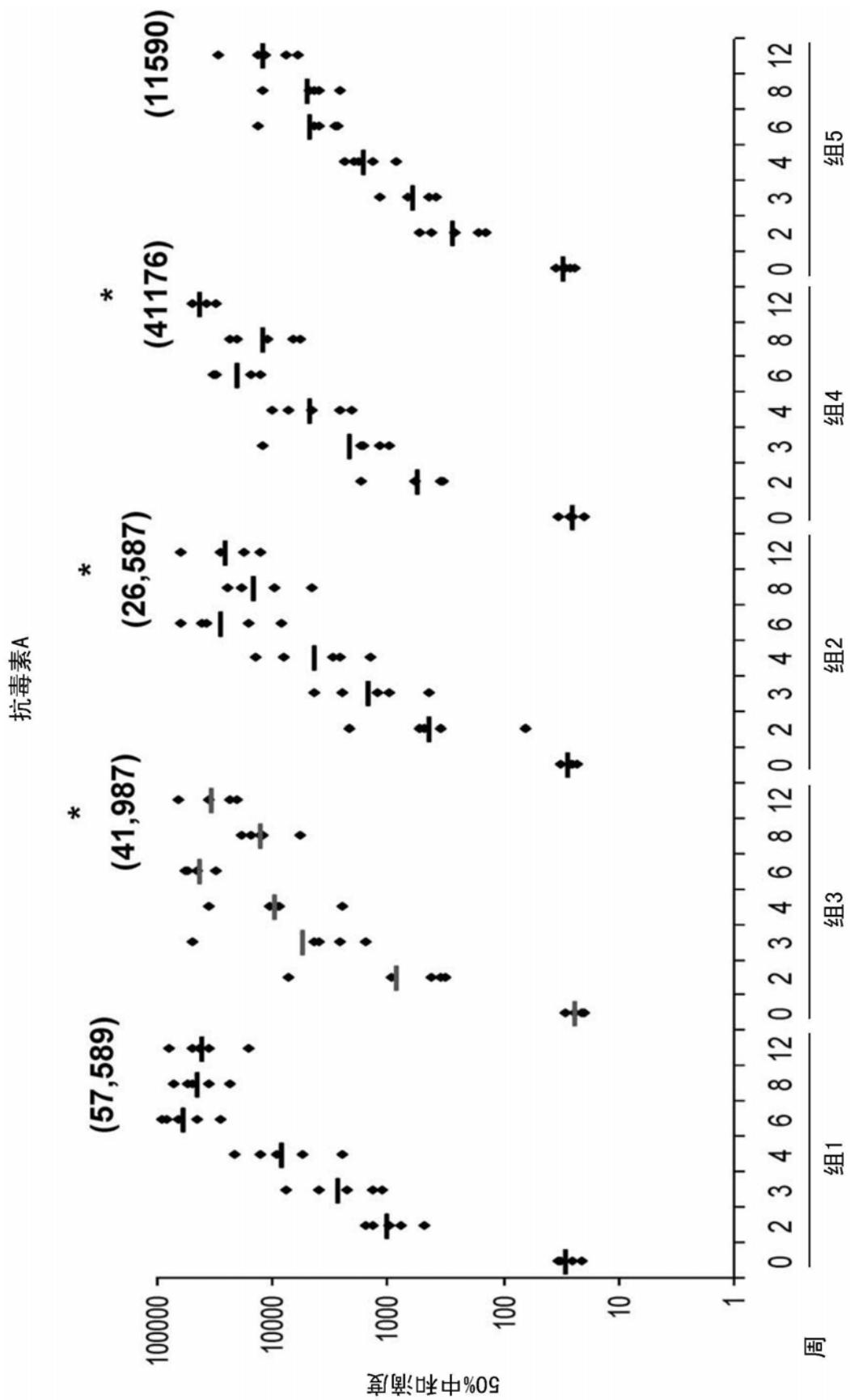


图16A

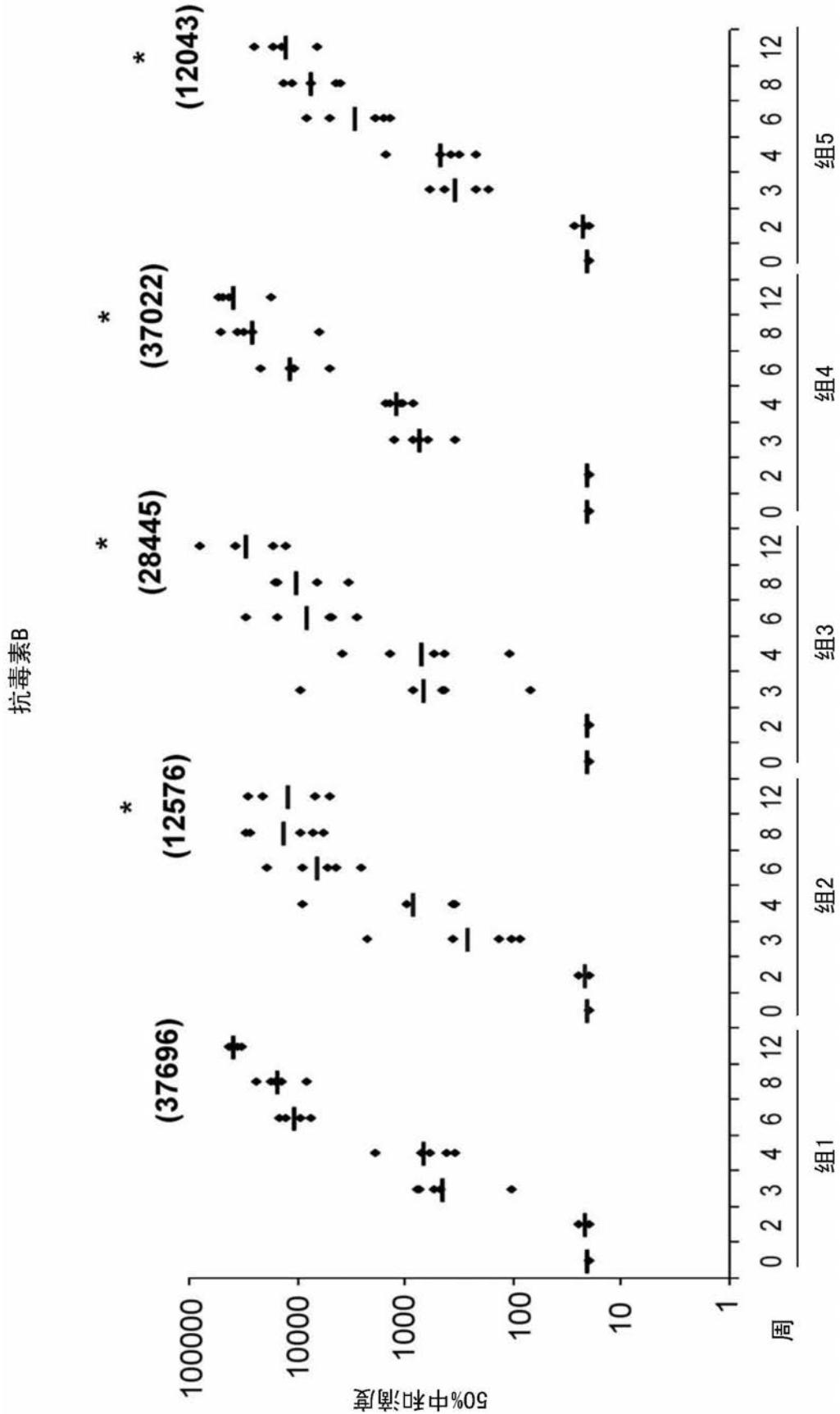


图16B

可变轻链 (muK)

MKLPVRLLVLMFWIPGSSSDVVMTHTPLSLPVSLGDQASMSCRS**
SQSLIHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLISKVSNRFSGVPDRFSG
SGSGTDFTLK**ISRVEAEDLGVYFCSQTTYFPYTFGGGTREIK**RAD****
AAPTVSIFPPSS (SEQ ID NO: 36)**

可变重链 (mIgE)

MYLGLNCVFIVFLLKGVQSEVNLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS**
GFTFTNYWMNWVRQSPEKGLEWIAEIRLKSHNYATHFAESVKG****
RFTISRDDSKSAVSLQMTNLTPEDTGIFYCTWDYYGNPAFVYWG
QGTLVTVSAASIRNPQLYPLKPCKGTASMTLGCLVKDYFPGPVT****
VTWYSDSLNMSTVN (SEQ ID NO: 37)**

图17

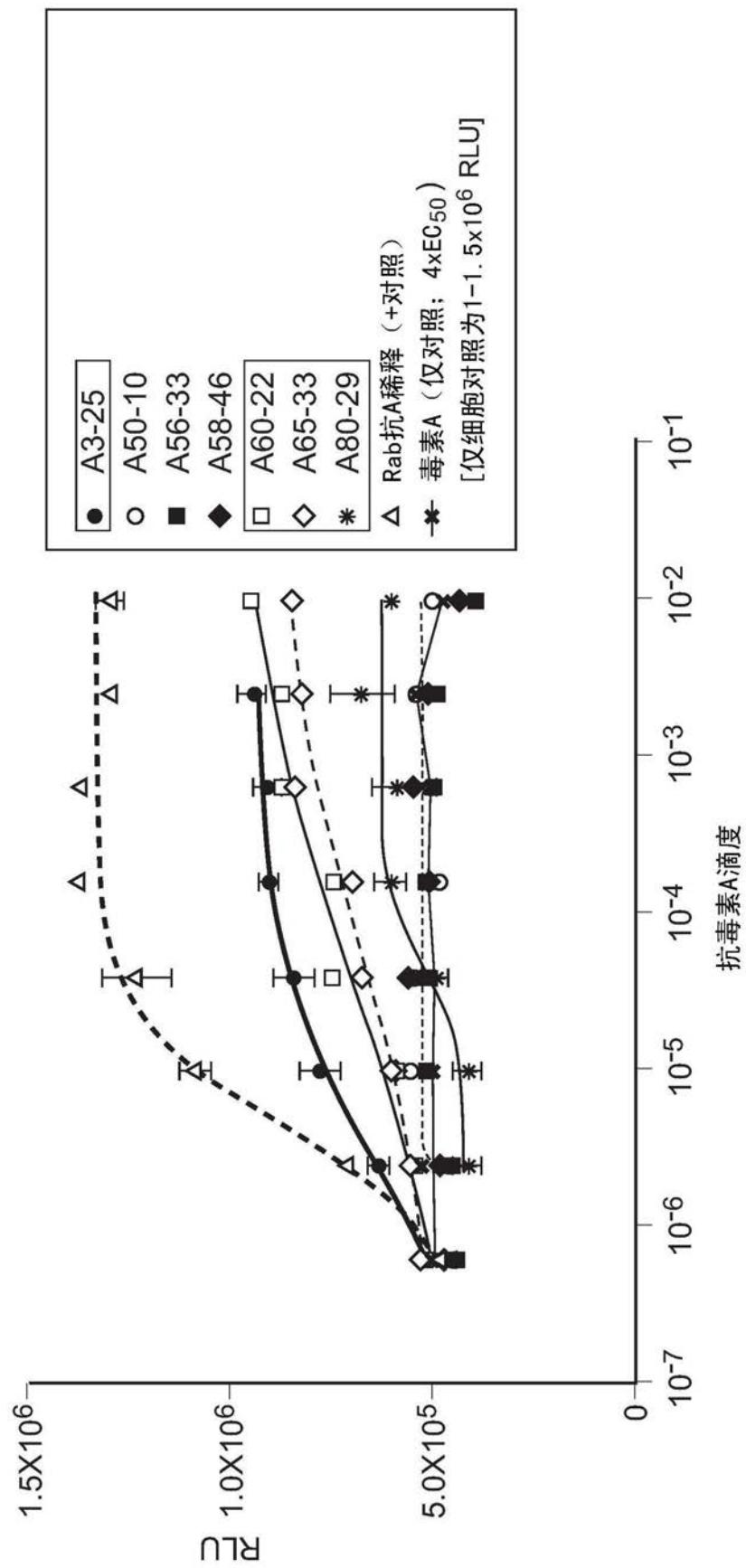


图18

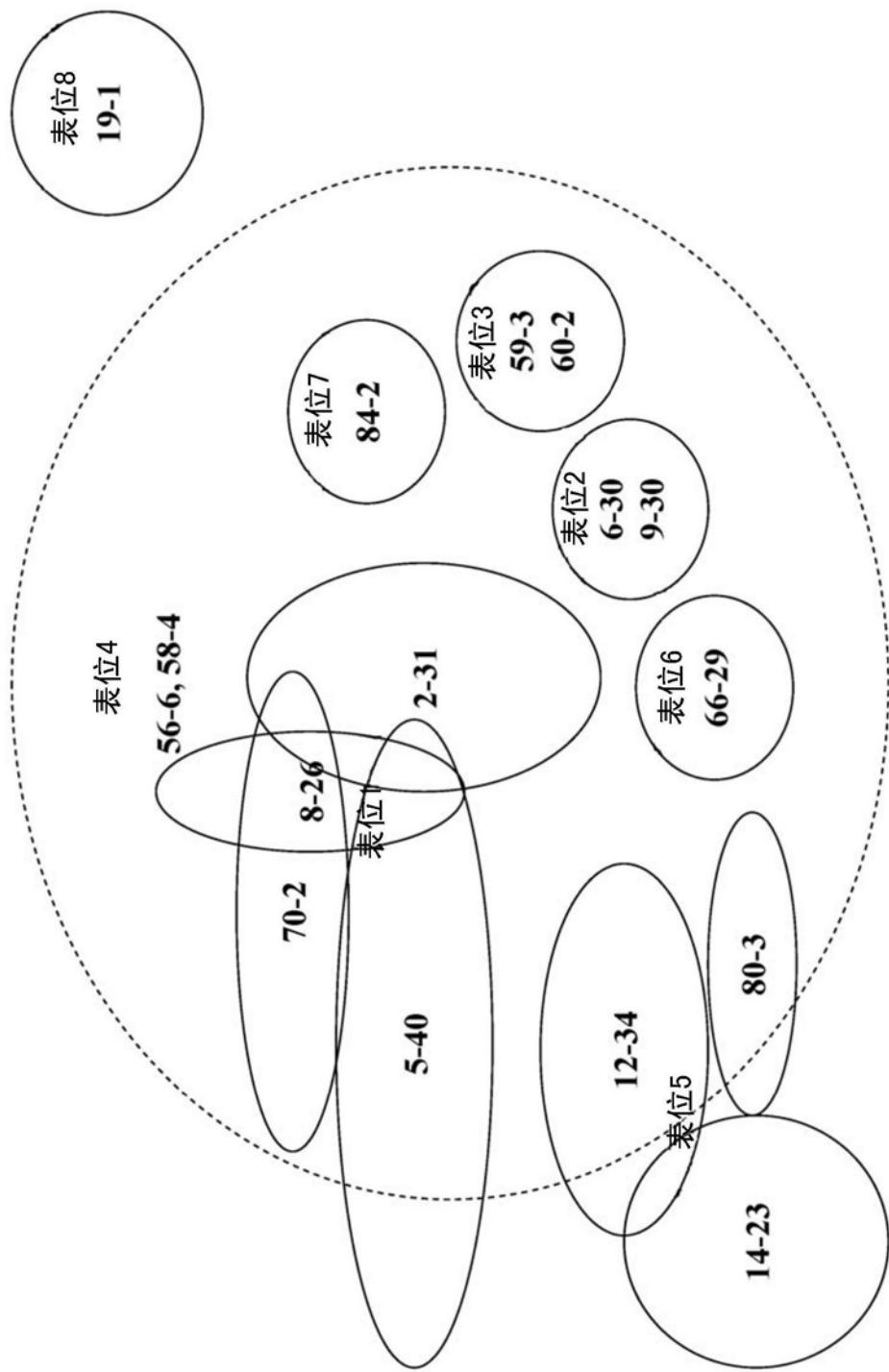


图19

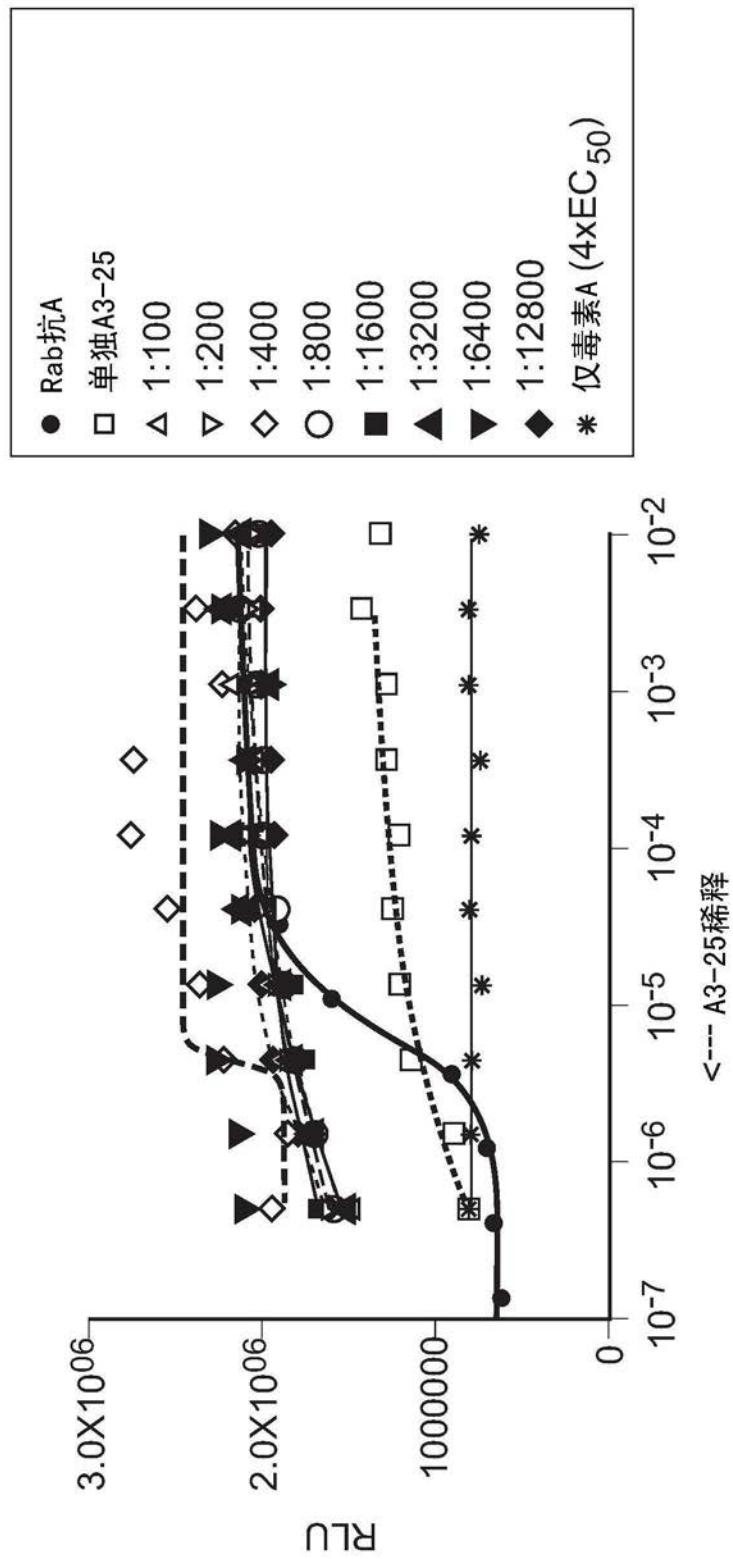


图20A

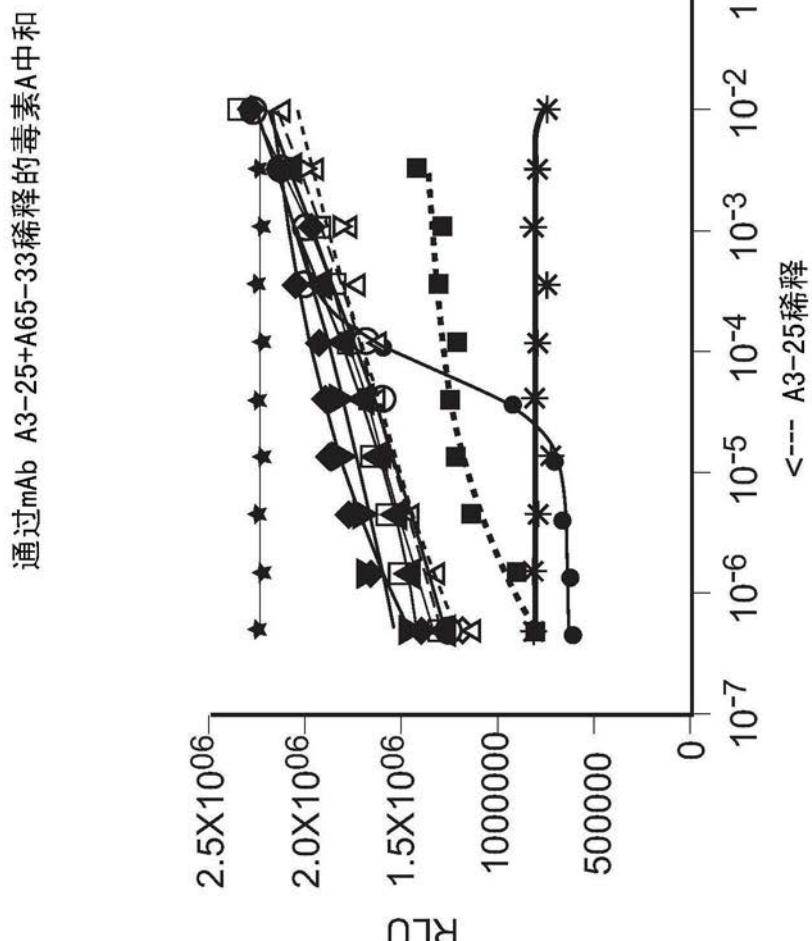


图20B

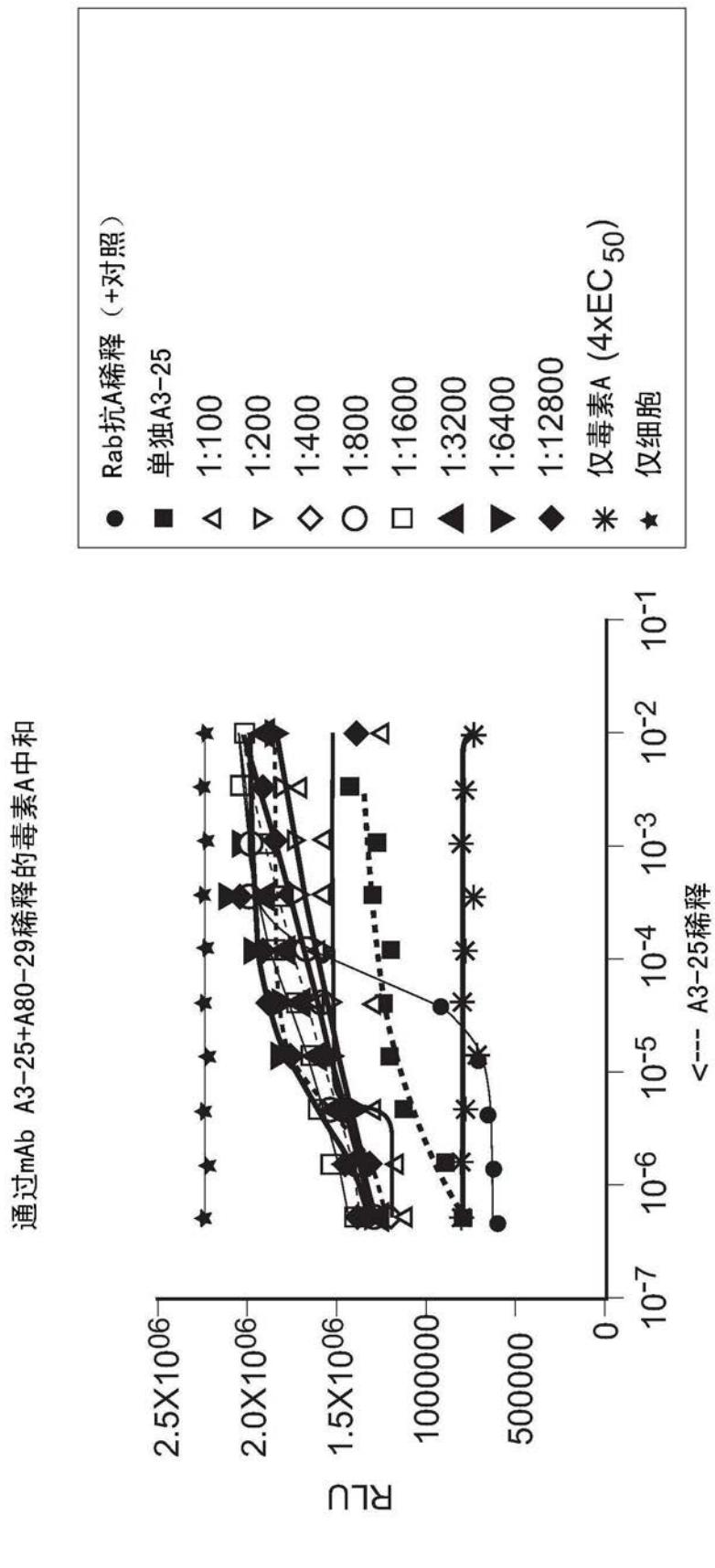


图20C

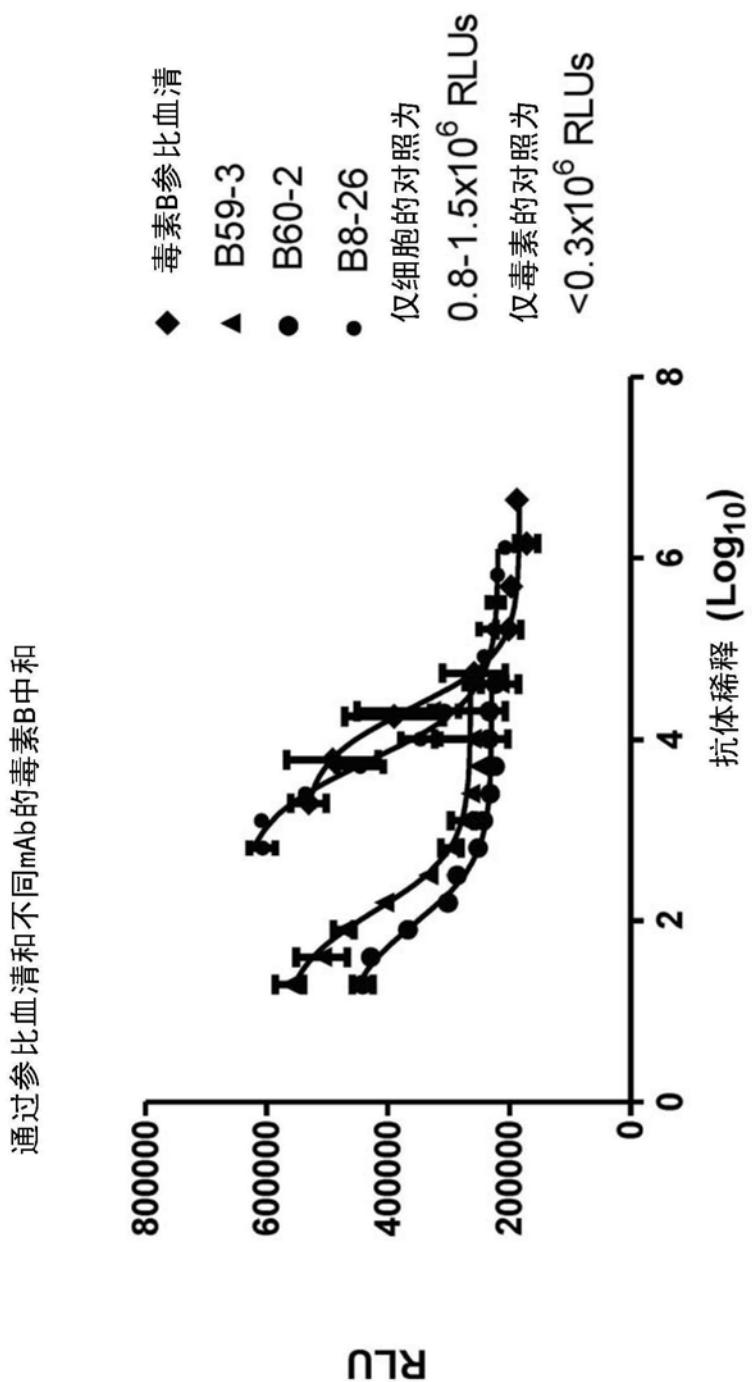


图21A

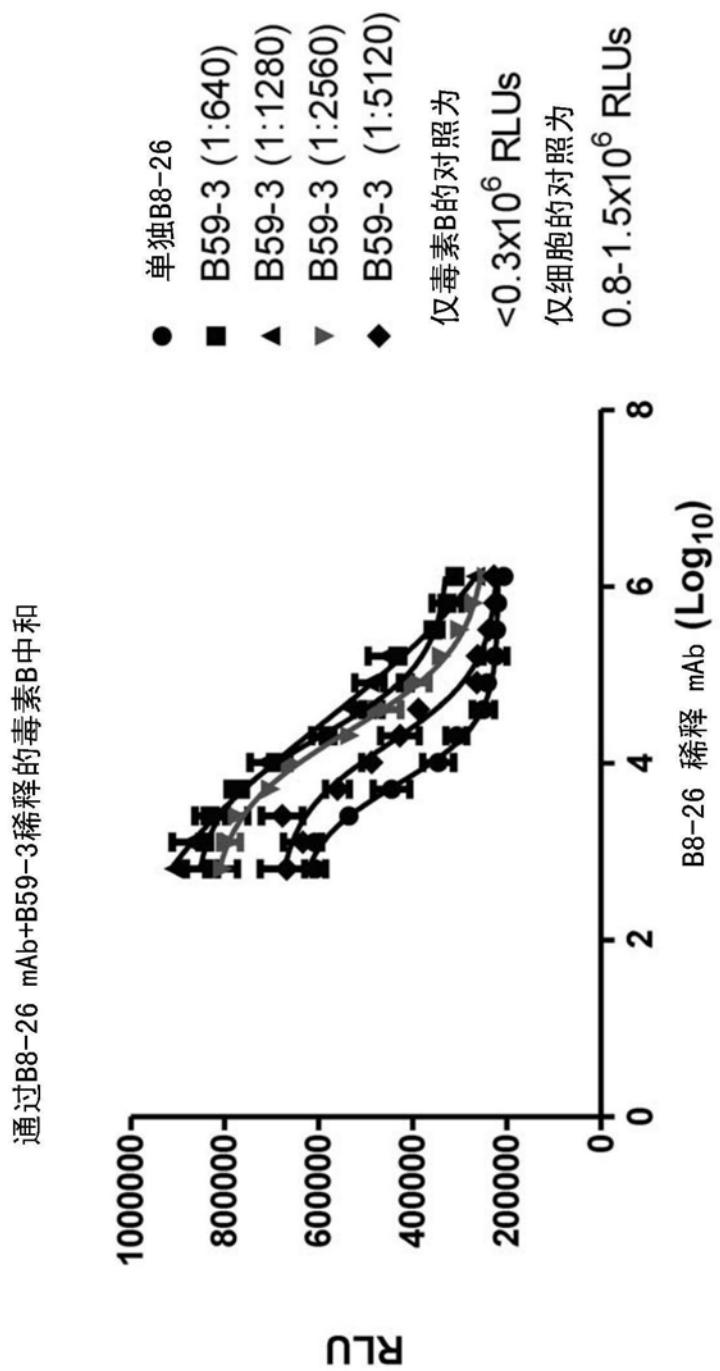


图21B

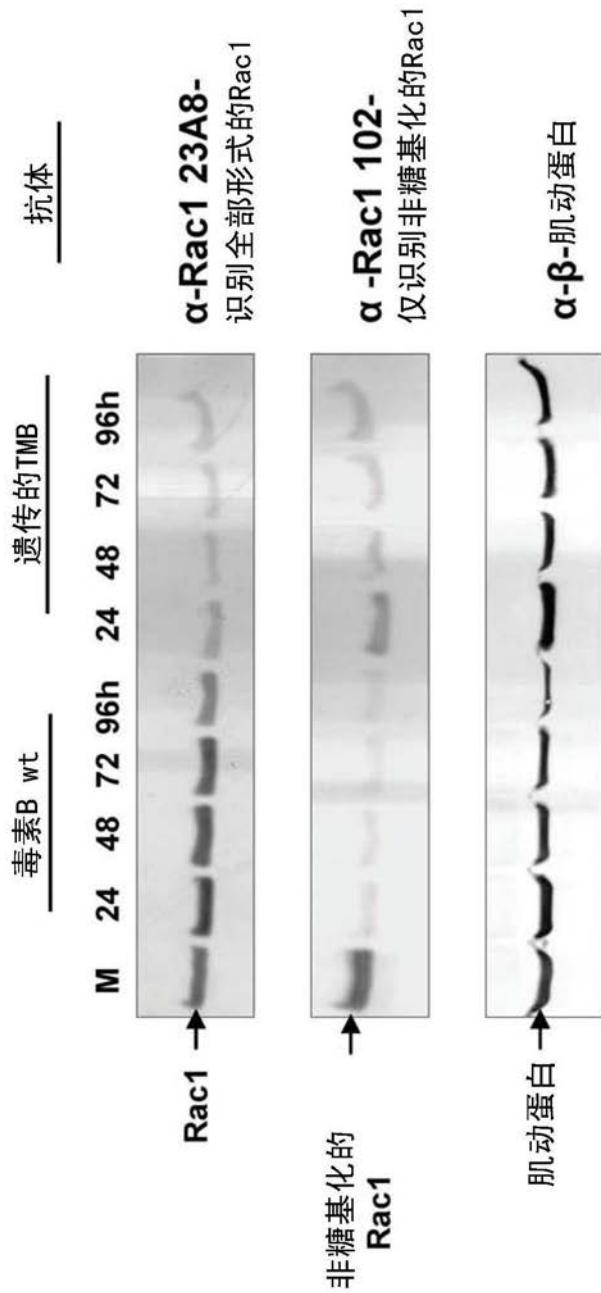


图22

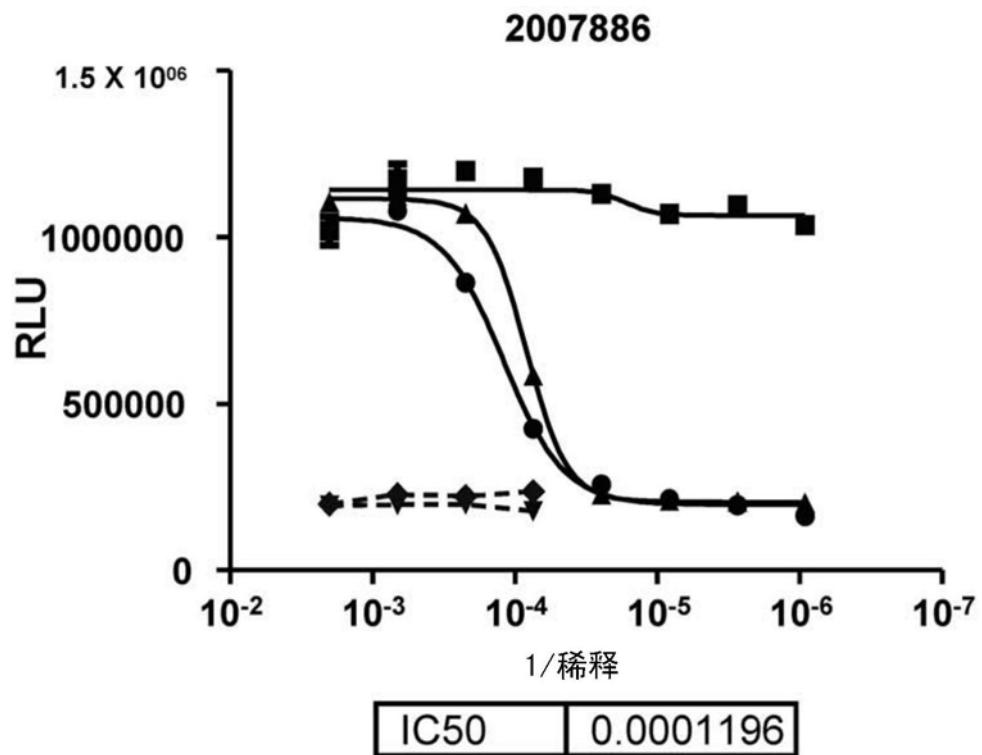


图23A

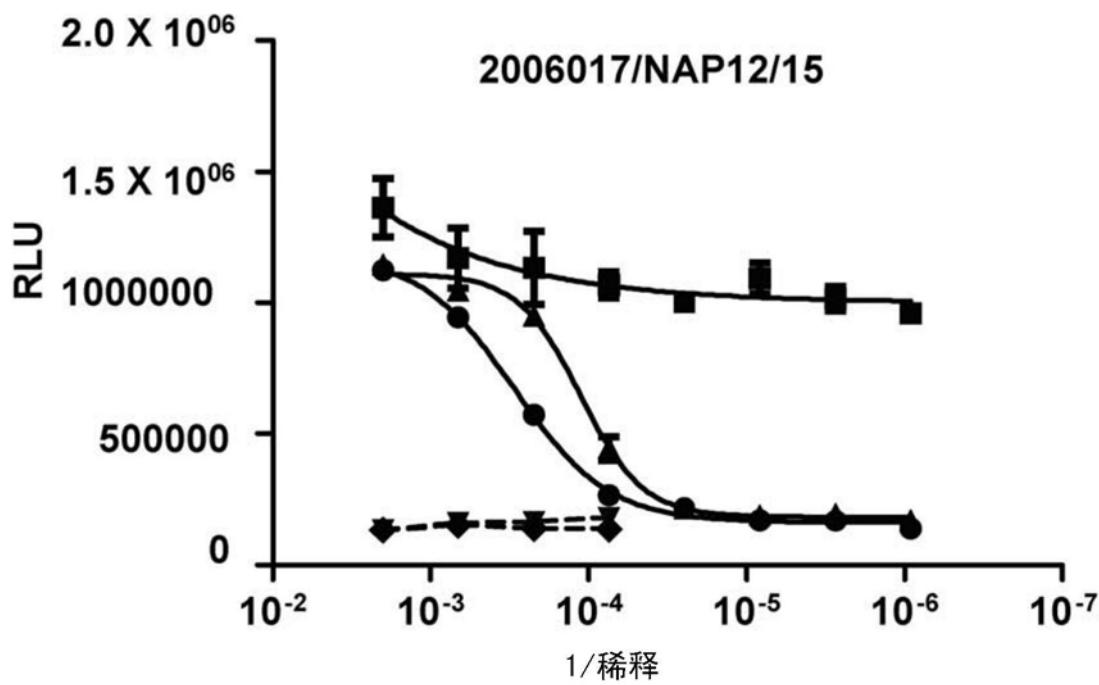


图23B

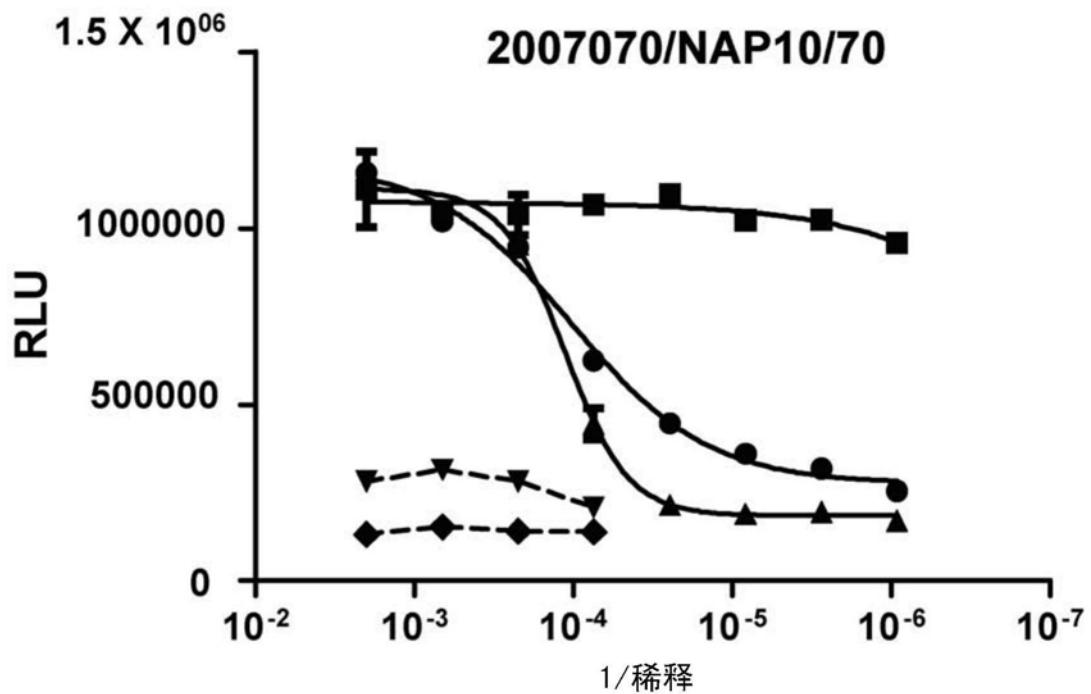


图23C

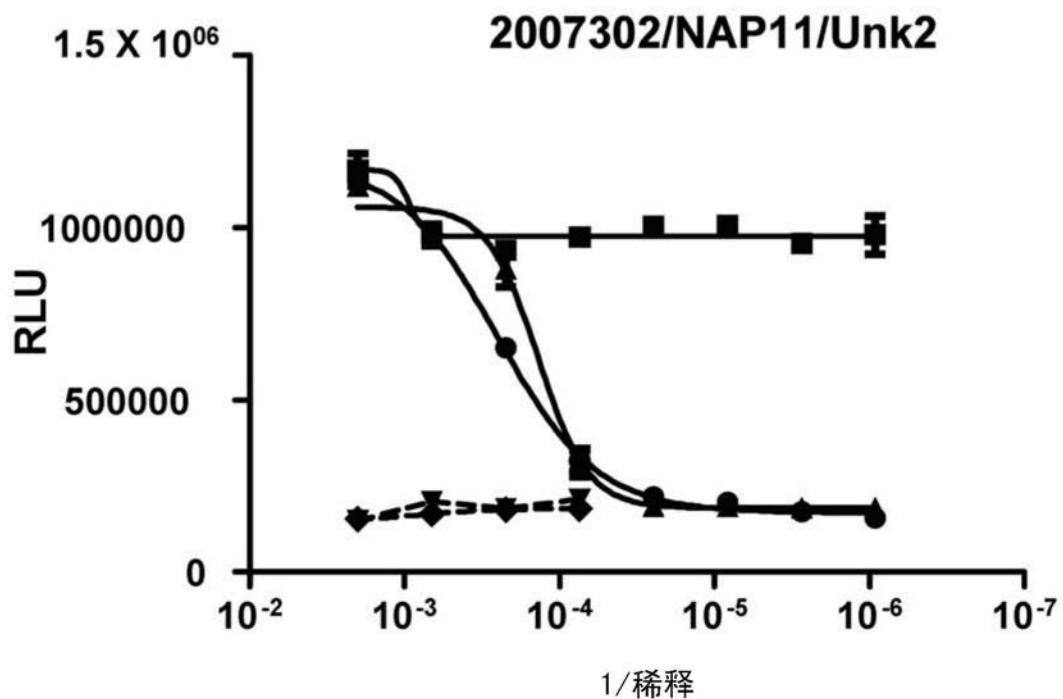


图23D

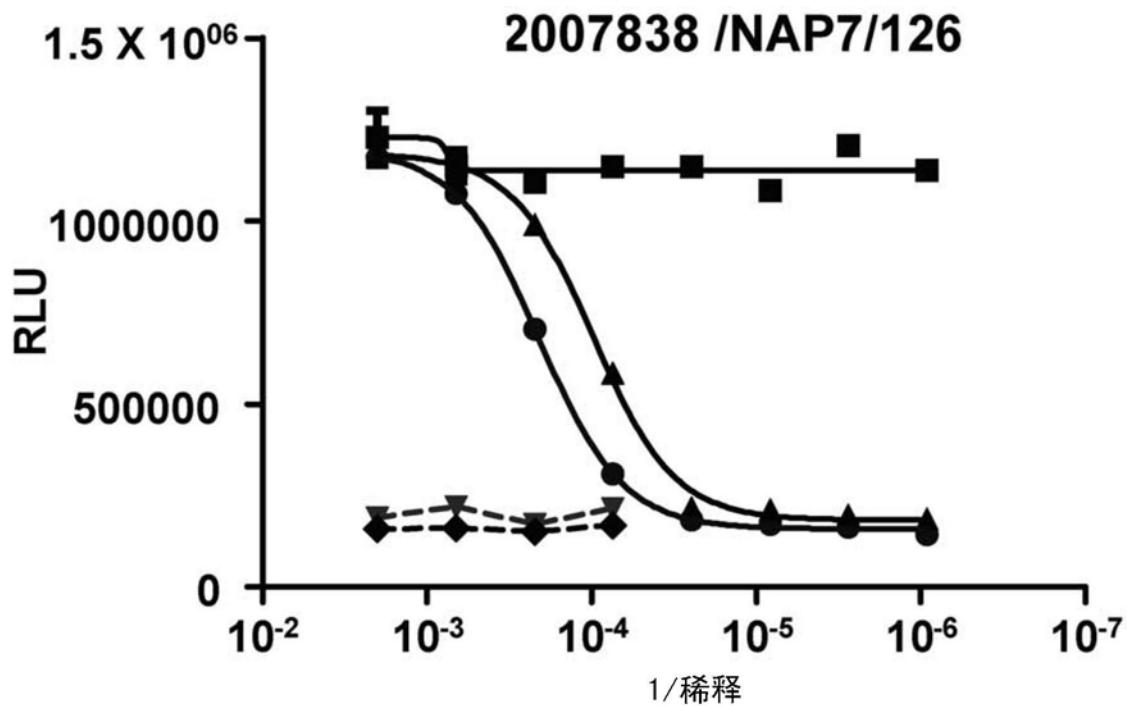


图23E

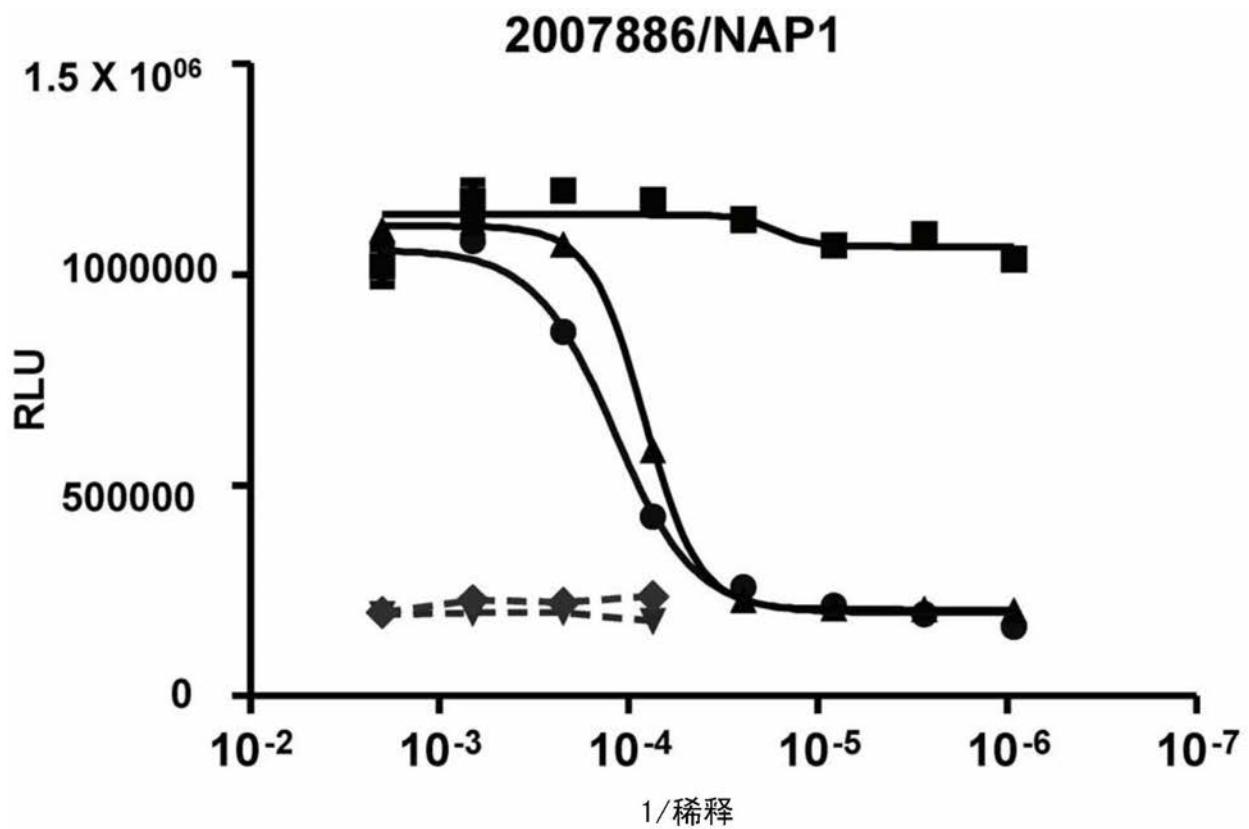


图23F

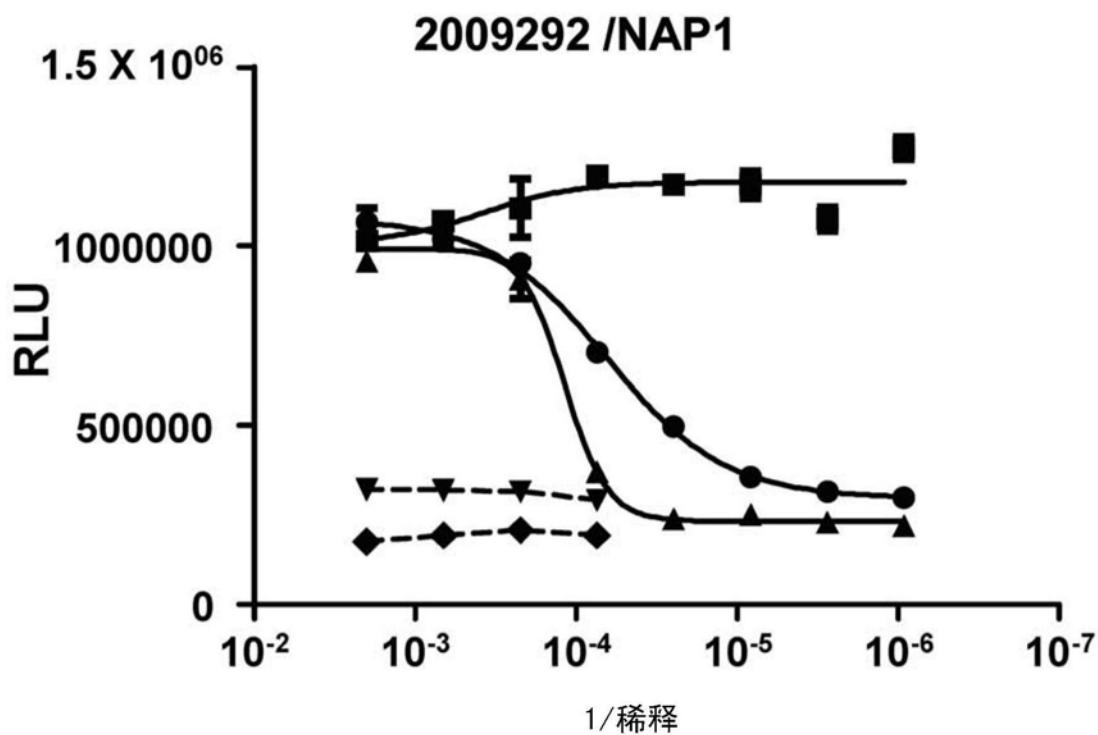


图23G

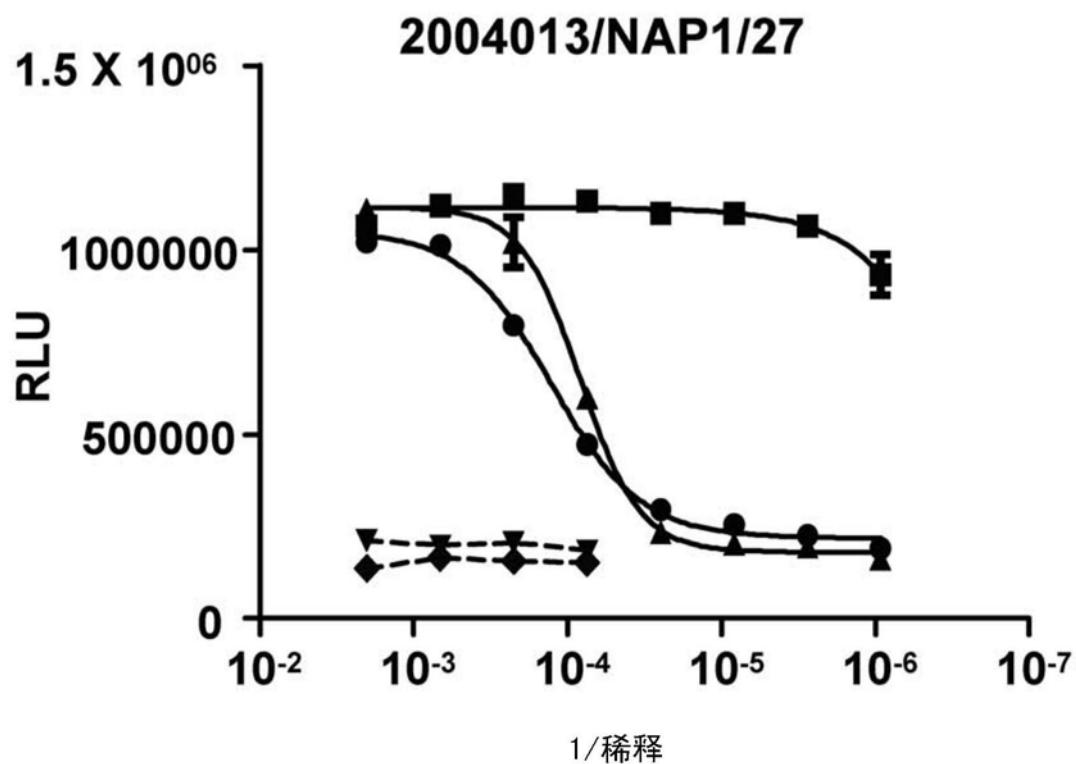


图23H

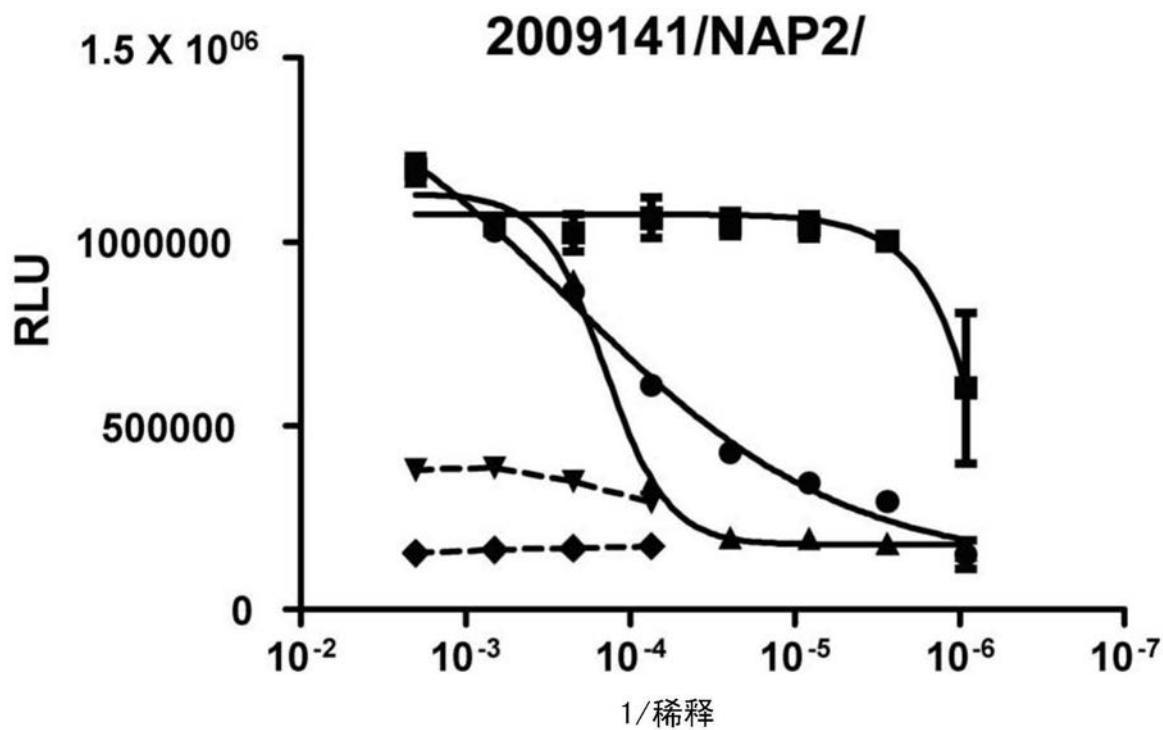


图23I

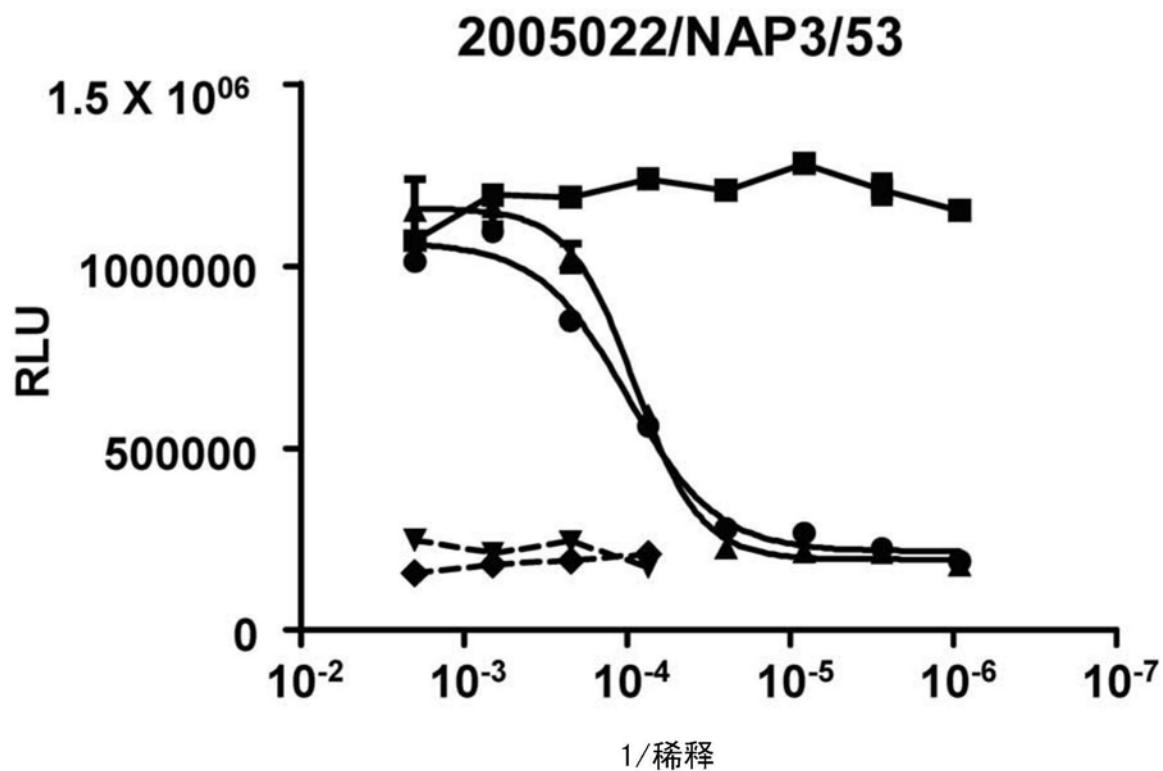


图23J

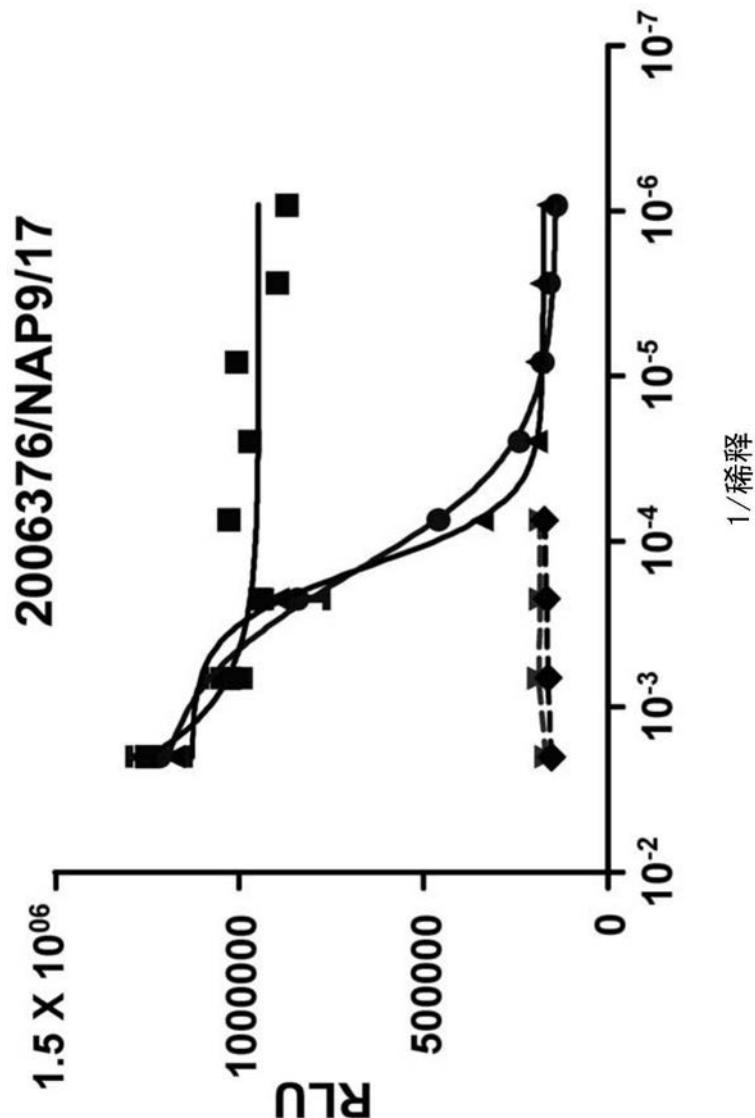


图23K

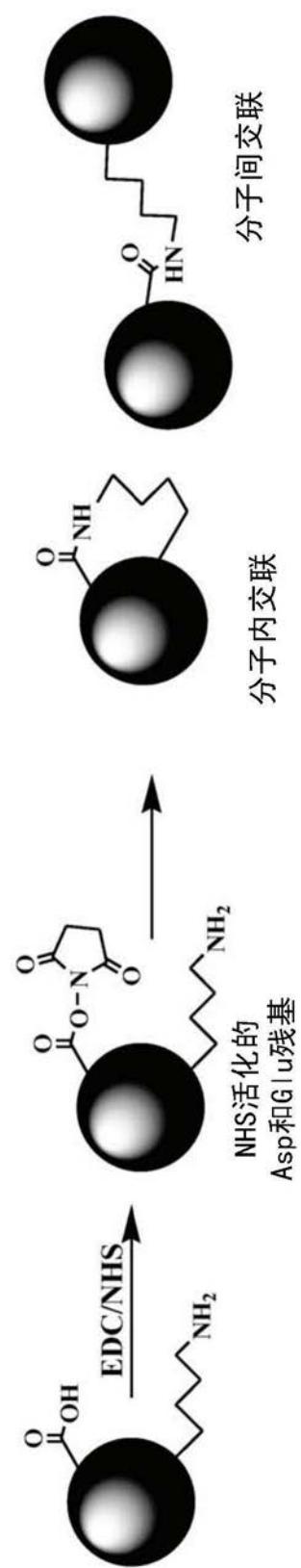


图24A

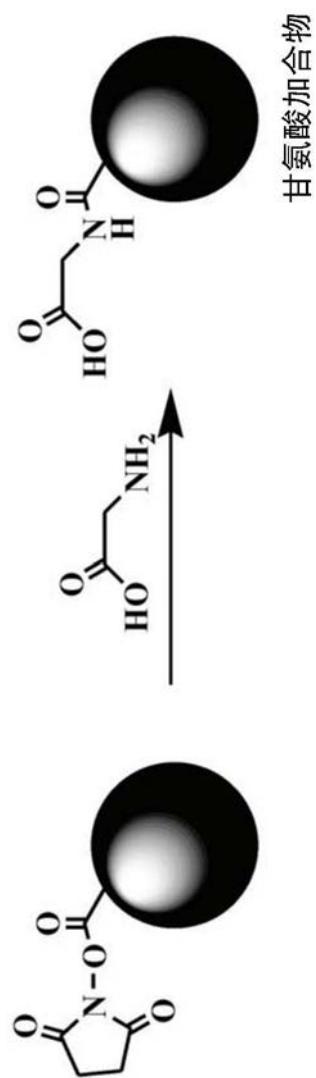


图24B

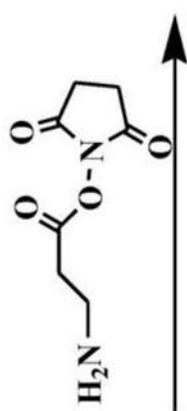
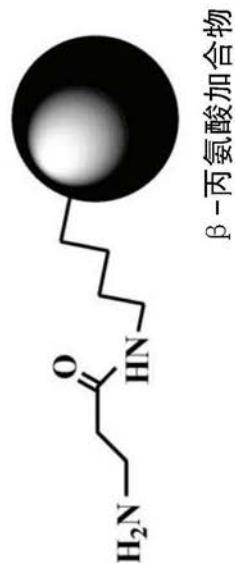


图24C

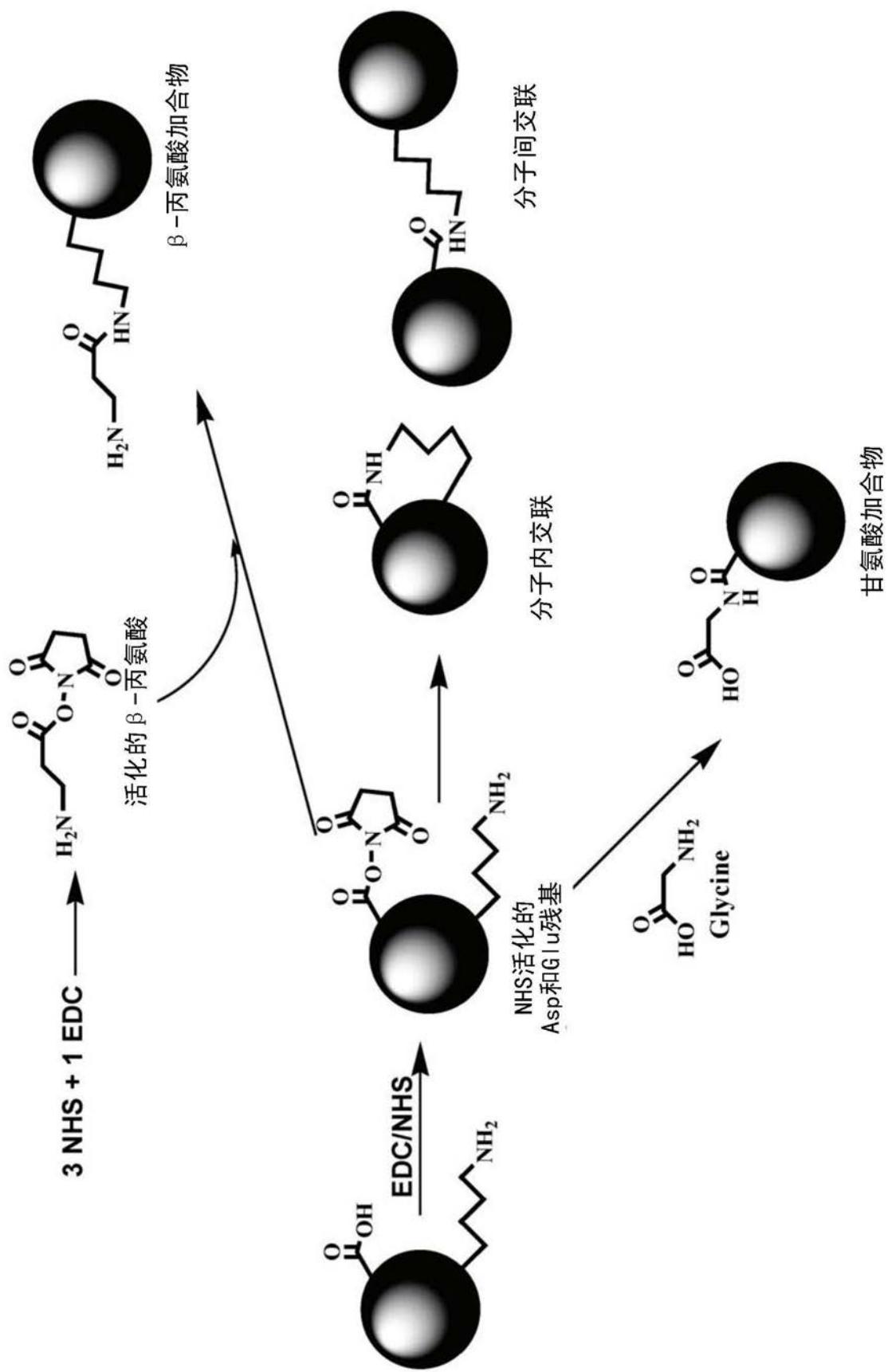


图25

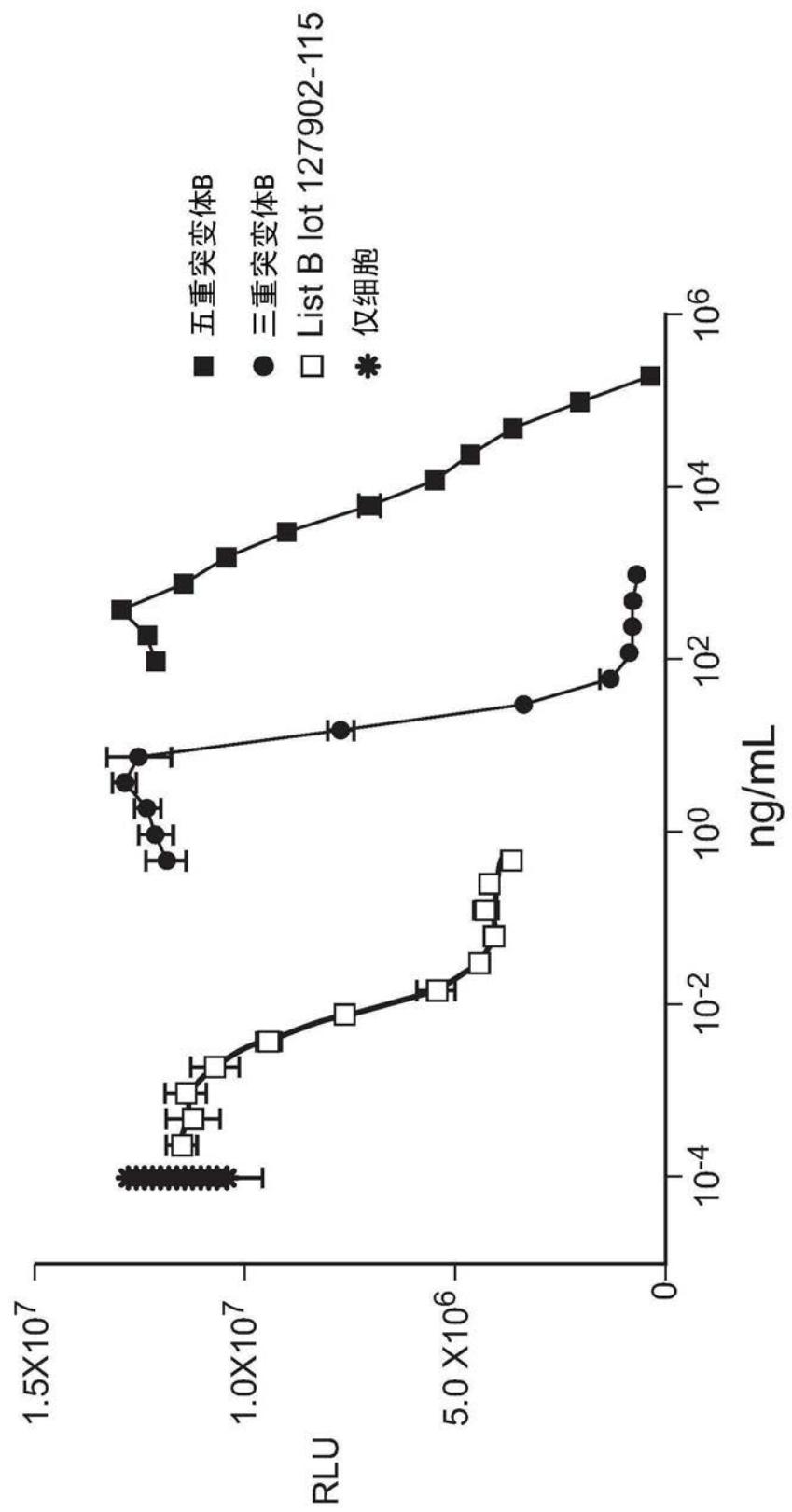


图26

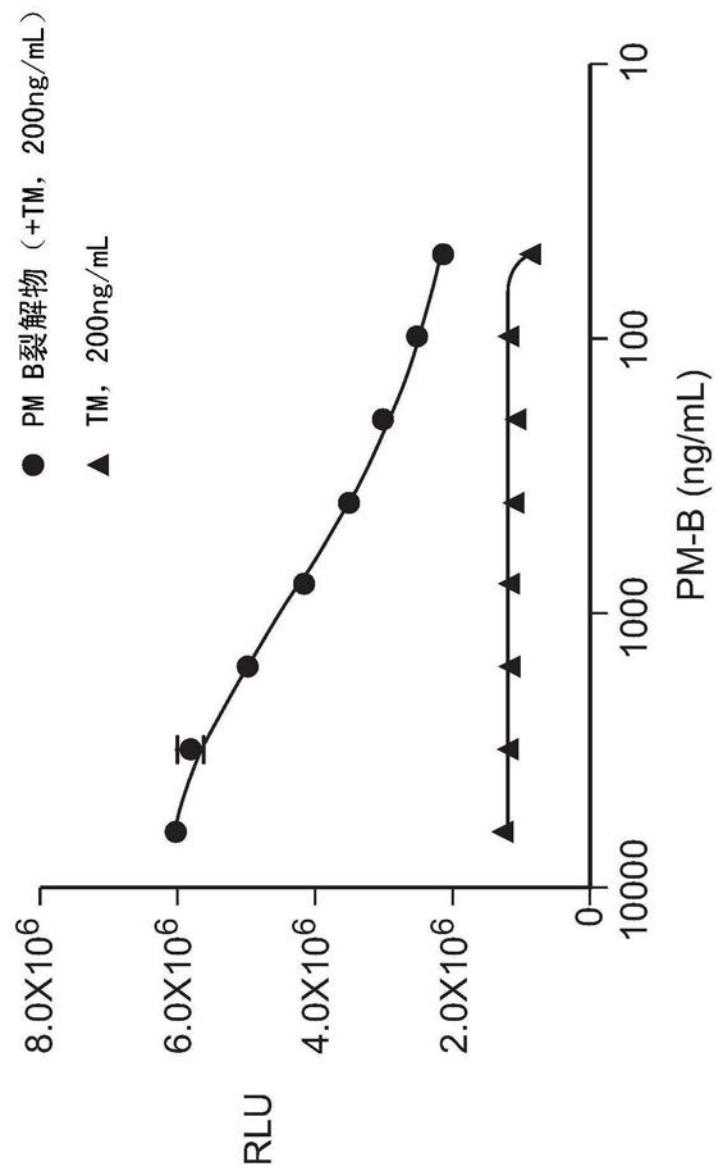


图27

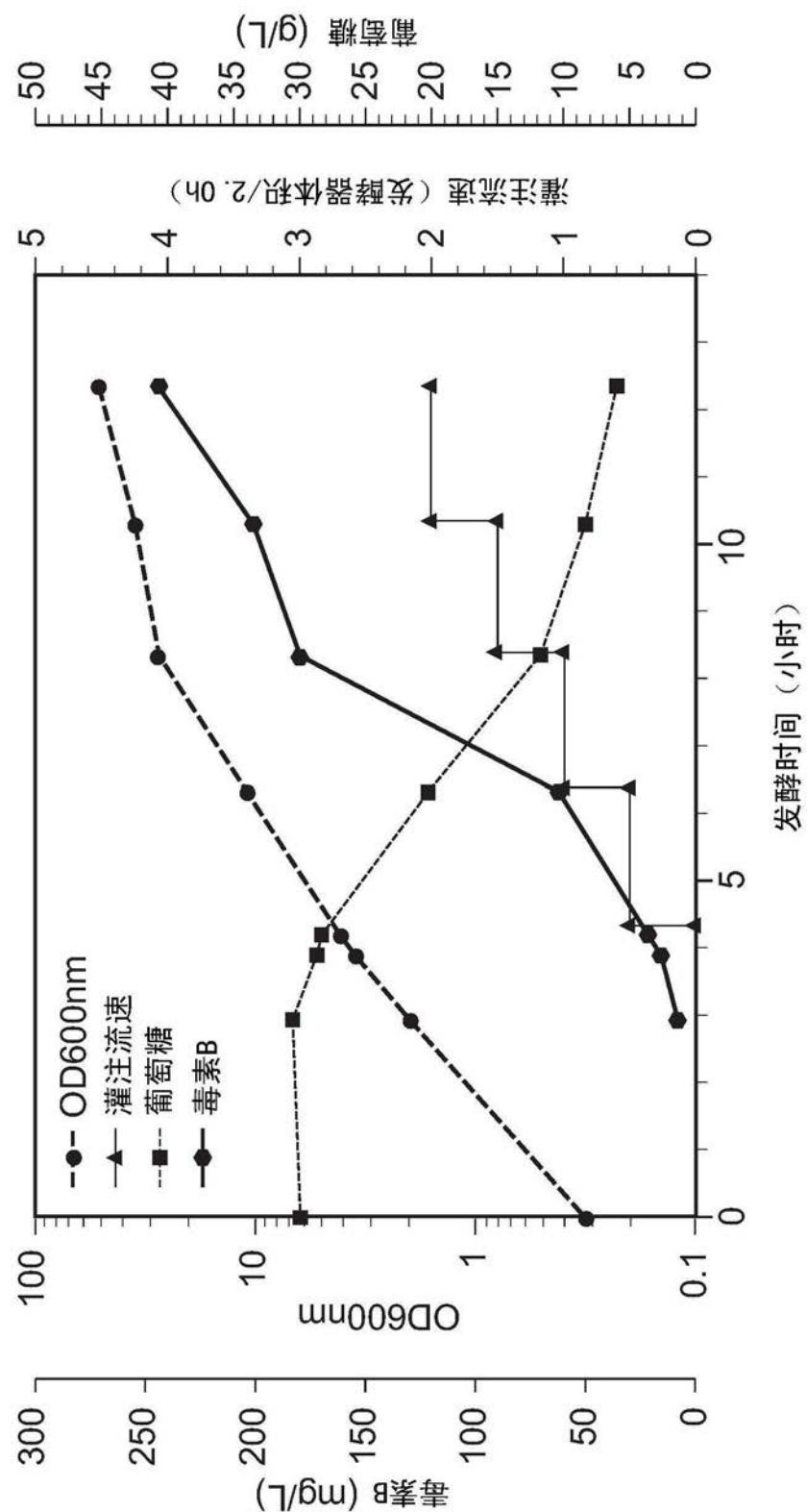


图28

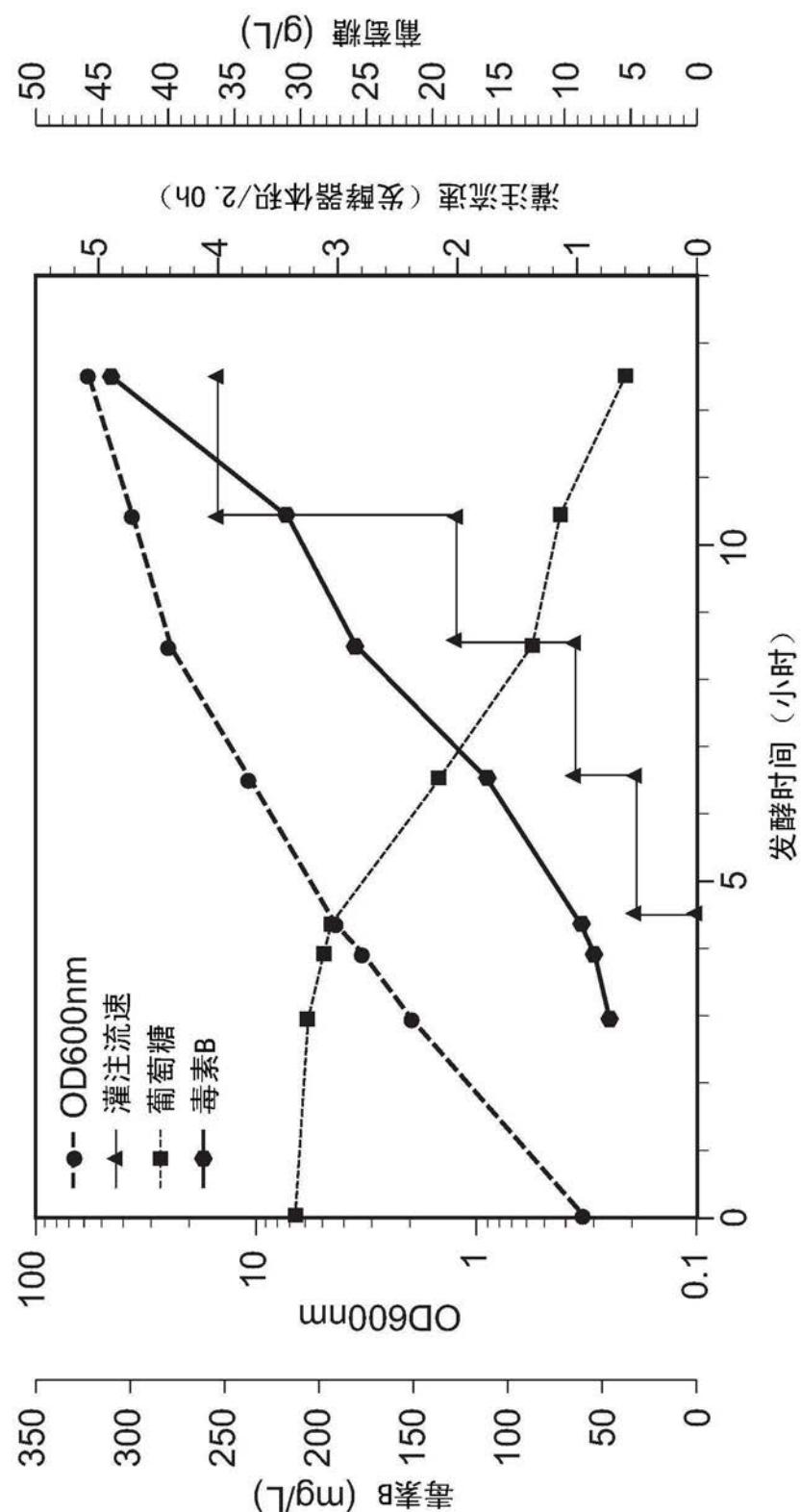


图29