



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105338997 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 17

(21) 申请号 201480021368. 4
 (22) 申请日 2014. 03. 14
 (30) 优先权数据
 61/790423 2013. 03. 15 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2015. 10. 15
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2014/029035 2014. 03. 14
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02014/144567 EN 2014. 09. 18
 (71) 申请人 圣诺菲·帕斯图尔公司
 地址 美国宾夕法尼亚州
 (72) 发明人 S. 豪泽
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 72001
 代理人 初明明 彭昶

(51) Int. Cl.
 A61K 39/08(2006. 01)
 A61K 47/00(2006. 01)

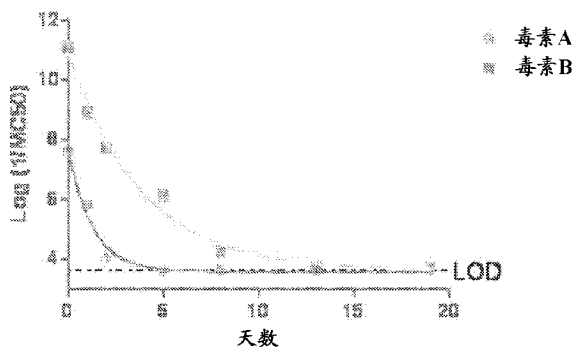
权利要求书2页 说明书18页 附图2页

(54) 发明名称

类毒素、组合物和相关的方法

(57) 摘要

本公开一般性涉及毒素灭活领域。更具体地，本公开涉及梭菌毒素，使这些毒素灭活的方法和包含类毒素（例如，通过这些方法生产）的组合物（例如，疫苗）。提供了生产艰难梭菌类毒素的方法，所述方法包括用甲醛使艰难梭菌毒素灭活。通过这些方法制备的类毒素在高温（例如，37°C）下稳定，并且保持非细胞毒性的，具有最小残余的甲醛。



1. 一种生产艰难梭菌类毒素的方法,所述方法包括通过用约0.15%-0.5%甲醛(w/v)在约17-32°C下培养约2-约21天,使经纯化的艰难梭菌毒素A或经纯化的艰难梭菌毒素B灭活。

2. 权利要求1的方法,其中毒素A用约0.2%甲醛在约25°C下培养约2天,以生产类毒素A。

3. 权利要求1或2的方法,其中毒素B用约0.4%甲醛在约25°C下培养约13天,以生产类毒素B。

4. 一种组合物,所述组合物包含通过权利要求1或2的方法制备的类毒素A,和/或通过权利要求1或3的方法制备的类毒素B。

5. 一种用于制备包含经纯化的艰难梭菌类毒素A和经纯化的艰难梭菌类毒素B的免疫原性组合物的方法,所述方法通过使经纯化的艰难梭菌类毒素A和经纯化的艰难梭菌类毒素B与包含残余量的甲醛的组合物组合。

6. 权利要求5的方法,其中所述经纯化的艰难梭菌类毒素A和经纯化的艰难梭菌类毒素B在37°C下稳定达最多约6周。

7. 权利要求5或6的方法,其中所述甲醛的残余量为约0.001%-0.025%(w/v)。

8. 一种组合物,所述组合物使用权利要求5-7中任一项的方法制备。

9. 一种用于制备包含经纯化的艰难梭菌类毒素A和经纯化的艰难梭菌类毒素B的免疫原性组合物的方法,所述方法包括:

通过用约0.15%-0.5%甲醛(w/v)在约17-32°C下培养约2-约21天,使经纯化的艰难梭菌毒素A和经纯化的艰难梭菌毒素B灭活;和,

使经纯化的艰难梭菌类毒素A和经纯化的艰难梭菌类毒素B与包含残余量的甲醛的组合物组合。

10. 权利要求9的方法,其中所述经纯化的艰难梭菌类毒素A和经纯化的艰难梭菌类毒素B在37°C下稳定达最多约6周。

11. 权利要求9或10的方法,其中所述甲醛的残余量为约0.001%、0.004%、0.008%或0.016%(w/v)。

12. 权利要求1-3、5-7或9-13中任一项的方法,其中将所述类毒素A和/或类毒素B保持在pH 7.5的20 mM柠檬酸盐、8%蔗糖和0.016%甲醛的组合物中。

13. 权利要求1-3、5-7或9-13中任一项的方法,其中将包含类毒素A和/或类毒素B的组合物冻干。

14. 一种组合物,所述组合物使用权利要求9-13中任一项的方法制备。

15. 权利要求1-3、5-7或9-13中任一项的方法,所述方法还包括提供包含毒素A和毒素B的艰难梭菌培养物和自所述培养物纯化毒素A和毒素B。

16. 艰难梭菌类毒素A,其根据权利要求1、2、5-7或9-13中任一项的方法生产。

17. 艰难梭菌类毒素B,其根据权利要求1、3、5-7或9-13中任一项的方法生产。

18. 一种包含艰难梭菌类毒素A和艰难梭菌类毒素B的疫苗组合物,其中所述艰难梭菌类毒素A根据权利要求1、2、5-7或9-13中任一项的方法生产,所述类毒素B根据权利要求1、3、5-7或9-13中任一项的方法生产。

19. 权利要求18的疫苗组合物,其中所述疫苗组合物包含约0.001%-0.020%甲醛。

20. 权利要求 19 的疫苗组合物,其中所述疫苗组合物包含约 0.004% 甲醛。
21. 权利要求 19 的疫苗组合物,其中所述疫苗组合物包含 0.008% 甲醛。
22. 权利要求 19 的疫苗组合物,其中所述疫苗组合物包含约 0.016% 甲醛。
23. 权利要求 18-22 中任一项的疫苗组合物,其中所述类毒素 A 和所述类毒素 B 以 A:B 比率为 5:1-1:5 存在于组合物中。
24. 权利要求 23 的疫苗组合物,其中所述类毒素 A 和所述类毒素 B 以 A:B 比率为 3:1 或 3:2 存在于组合物中。
25. 权利要求 18-24 中任一项的疫苗组合物,其中将所述疫苗组合物冷冻干燥、喷雾干燥或泡沫干燥。
26. 权利要求 18-24 中任一项的疫苗组合物,其中所述疫苗组合物为液体形式。
27. 权利要求 18-25 中任一项的疫苗组合物,所述组合物还包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。
28. 权利要求 4、8、14 或 18-26 中任一项的组合物,所述组合物包含柠檬酸盐、磷酸盐、甘氨酸、碳酸盐或碳酸氢盐缓冲液或 pH- 受控的含水溶液。
29. 权利要求 28 的组合物,所述组合物还包含糖或糖醇。
30. 权利要求 29 的组合物,所述组合物包含蔗糖和柠檬酸盐。
31. 一种用于将艰难梭菌毒素 A 转化为类毒素 (类毒素 A) 的方法,所述方法通过将毒素 A 用约 0.21% (w/v) 甲醛在约 25°C 下培养约 6-13 天。
32. 权利要求 31 的方法,其中所述培养达约 6 天。
33. 权利要求 31 或 32 的方法,其中所述培养在 0.21% (w/v) 甲醛 / pH 7 的 100 mM PO_4 中发生。
34. 一种用于将艰难梭菌毒素 B 转化为类毒素 (类毒素 B) 的方法,所述方法通过将毒素 B 用约 0.42% (w/v) 甲醛在约 25°C 下培养约 13- 约 20 天。
35. 权利要求 34 的方法,其中所述培养达约 13 天。
36. 权利要求 34 或 35 的方法,其中所述培养在 0.42% (w/v) 甲醛 / pH 7 的 100 mM PO_4 中发生。

类毒素、组合物和相关的方法

[0001] 相关的申请

本申请要求 2013 年 3 月 15 日提交的美国专利序列号 61/790, 423 的优先权, 其通过全文引用而结合到本文中。

技术领域

[0002] 本公开一般性涉及毒素灭活领域。更具体地, 本公开涉及梭菌毒素、使这些毒素灭活的方法和包含所得到的类毒素的组合物 (例如, 疫苗)。

背景技术

[0003] 细菌毒素可使用本领域技术人员公知的化学剂 (例如, 像甲醛、戊二醛或 β -丙醇酸内酯) 灭活。灭活的毒素 (也称为类毒素) 在一些情况下可回复或恢复细胞毒性。

[0004] 一种艰难梭菌疫苗为福尔马林-灭活的疫苗, 其含有自艰难梭菌菌株 ATCC 43255 的厌氧培养物纯化的类毒素 A 和 B。毒素可分别纯化, 灭活 (类毒素化), 并且以靶向类毒素 A: 类毒素 B 比率 (例如, 3:2) 混合。毒素 A 和 B 的福尔马林-介导的类毒素化在限定和控制药物产品的许多产品特性和品质特征中起到重要的作用, 并且最重要的是通过预防细胞毒性, 保证疫苗的安全性。

[0005] 已公布使用甲醛使艰难梭菌毒素 A 和 B 灭活的方法。例如, 美国专利 6, 669, 520 描述了使用 4.25% mg/ml 甲醛在 4°C 下培养 18 天的部分纯化的艰难梭菌毒素 A 和 B 的混合物。所得到的类毒素混合物用于制备含有和不含甲醛的制剂。在不存在残余的福尔马林的情况下, 在较高温度 (28-37°C) 下发生部分回复为毒性形式, 其中类毒素经过数天至数周恢复可检测的生物活性。尽管残余的甲醛可用于防止回复, 但限制在疫苗中存在的量是需要的 (例如, 以满足一些监管机构的要求设定)。本领域需要在高温 (例如, 37°C) 下保持稳定并且含有最少残余的甲醛的类毒素, 尤其是满足各种药物监管机构的要求设定。本文描述的方法提供在高温下稳定并且仅含有残余的福尔马林的类毒素。本公开提供这样的方法及其附加的优点。

[0006] 附图简述

图 1 为细胞毒性测定的结果的图示表示。使用来自根据所描述的方法 (实施例 2) 经历灭活的每一种毒素 A 和毒素 B 的一个批次的样品, 使用 IMR90 细胞进行细胞毒性测定。在第 0 天取样品, 接着加入甲醛以使毒素灭活, 并且若干天后, 评定材料的细胞毒性。y-轴鉴定在毒性材料存在下 50% 的细胞变圆 (与它们正常的有条纹的形态相反) 时的最低浓度 (MC50)。使用虚线鉴定测定的检测值的下限 (LOD)。

[0007] 图 2 为使艰难梭菌毒素 A 和毒素 B 灭活的一种示例性方法的示图。

[0008] 图 3 为来自免疫研究的结果的图示表示。在仓鼠攻击模式 (使用 5 组, 其中每组 9 只仓鼠) 进行的研究 (在实施例 2 中描述) 中, 根据所描述的方法制备类毒素 A 和类毒素 B, 合并, 并且配制作作为冻干的组合物。在接种前将组合物重构, 并且加入佐剂。对一组仓鼠给予安慰剂。制备人剂量 (HD) 的组合物 (100 μ g/剂量) 的四种不同的稀释物, 其它四组

仓鼠各用一种稀释物。给予的组合物（即，安慰剂或 HD 稀释物）在 X- 轴上鉴定。测定在给予致死攻击剂量的艰难梭菌之后每一组的 % 存活率（Y- 轴），如图所示。

[0009] 公开内容简述

本公开提供用于制备在高温下稳定并且仅含有最少福尔马林（例如，残余的甲醛）的类毒素的方法和试剂。示例性方法产生在高温（例如，37°C）下稳定并且含有低量（例如，残余量）的甲醛的类毒素组合物，尤其通过用约任意 0.15%–约 0.5% 甲醛（w/v）（例如，约任意 0.2%–0.8%，例如对于类毒素 A 约 0.2%（例如，0.21%）和 / 或对于类毒素 B 约 0.4%（例如，0.42%）在适当的温度（例如，约任意 17–32°C（例如，约 25°C））下培养适量的时间（例如，约 2–约 30 天），使经纯化的毒素 A 和经纯化的毒素 B 灭活（例如，使得各个毒素灭活成为相应的类毒素）。类毒素可随后组合，以生产仅含有残余量的甲醛（例如，约任意 0.0001%–0.025%，例如 0.004%、0.008% 或 0.016%（w/v））的含有类毒素的免疫组合物和 / 或疫苗。类毒素免疫组合物可为冻干的形式，比起自其重构的组合物（例如，约任意 0.001%、0.004% 或 0.008% 甲醛（w/v）），其可含有例如较高浓度的甲醛（例如，约 0.016% 甲醛（w/v））用于给予宿主。本公开提供用于生产类毒素的方法和包含这样的类毒素的组合物，包括免疫组合物和 / 或疫苗，以及其中间体（例如，包含单独的类毒素 A 或类毒素 B 的组合物）。在本公开中提供其它实施方案，如本领域普通技术人员显而易见的。

[0010] 详述

本公开提供用于制备梭菌类毒素的方法、通过这些方法制备的梭菌类毒素和包含这些类毒素的组合物。本文特别感兴趣的是艰难梭菌毒素 A 和 / 或 B 和 / 或其衍生物（例如遗传上解毒的版本、截短的形式、片段等）。就本公开的目的而言，毒素 A 和 / 或毒素 B 可包括使用本领域的标准技术可鉴定为毒素 A 和 / 或毒素 B 的任何艰难梭菌毒素。示例性技术可包括，例如，免疫测定例如 ELISA、斑点印迹或体内测定。可用于进行这样的鉴定的试剂可包括，例如，抗毒素 A 兔多克隆抗血清（例如，Abeam[®]产品编号 ab35021 或 Abeam[®]产品编号 ab93318）或抗毒素 A 小鼠单克隆抗体（例如，Abeam[®]产品编号 ab19953（mAb PCG4）或 ab82285（mAb B618M）任一种）、抗毒素 B 兔多克隆抗血清（例如，Abeam[®]产品编号 ab83066）或抗毒素 B 小鼠单克隆抗体（例如，Abeam[®]产品编号 ab77583（mAb B428M）、ab130855（mAb B423M）或 ab130858（mAb B424M）任一种）（均可得自 Abeam[®]（Cambridge, MA））。

[0011] 本公开提供用于制备梭菌类毒素的方法、通过这些方法制备的梭菌类毒素和包含这些类毒素的组合物。本文特别感兴趣的是艰难梭菌毒素 A 和 / 或 B 和 / 或其衍生物（例如遗传上解毒的版本、截短的形式、片段等）。就本公开的目的而言，毒素 A 和 / 或毒素 B 可包括使用本领域的标准技术可鉴定为毒素 A 和 / 或毒素 B 的任何艰难梭菌毒素。示例性技术可包括，例如，免疫测定例如 ELISA、斑点印迹或体内测定。可用于进行这样的鉴定的试剂可包括，例如，抗毒素 A 兔多克隆抗血清（例如，Abeam[®]产品编号 ab35021 或 Abeam[®]产品编号 ab93318）或抗毒素 A 小鼠单克隆抗体（例如，Abeam[®]产品编号 ab19953（mAb PCG4）或 ab82285（mAb B618M）任一种）、抗毒素 B 兔多克隆抗血清（例如，Abeam[®]产品编号 ab83066）或抗毒素 B 小鼠单克隆抗体（例如，Abeam[®]产品编号 ab77583（mAb B428M）、ab130855（mAb B423M）或 ab130858（mAb B424M）任一种）（均可得自 Abeam[®]（Cambridge, MA））。

[0012] 本文提供了用于生产在高温（例如，37°C）下稳定并且含有低量的甲醛的艰难梭菌类毒素组合物的方法，所述方法通过一个或多个以下步骤：1) 提供包含毒素 A 和毒素 B

的艰难梭菌培养物；2) 自所述培养物纯化毒素 A 和毒素 B，以提供每一种毒素的单独的组合物；3) 通过用约任意 0.15%–约 0.5% 甲醛 (w/v) (例如，对于类毒素 A 约任意 0.2%–0.8%，例如约 0.2% (例如，0.21%) 和 / 或对于类毒素 B 约 0.4% (例如，约 0.42%)) 在适当的温度 (例如，约任意 17–32°C (例如，约 25°C)) 下培养适量的时间 (例如，约 2–约 21 天) (例如，使得各个毒素灭活为相应的类毒素)，使经纯化的毒素 A 和经纯化的毒素 B 灭活，以分别产生类毒素 A 和类毒素 B 组合物；和，4) 合并类毒素，以产生仅含有残余量的甲醛 (例如，约任意 0.0001%–0.025%，例如约任意 0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.01%、0.016%、0.02% 或 0.025% (w/v) (优选约 0.004% 或 0.008%)) 的类毒素免疫组合物和 / 或疫苗。虽然包含在组合物中的甲醛的量通常关于组合物的百分数 (重量 / 体积 (“w/v”)) 提及，但基于某些因素 (例如蛋白质浓度) 来调节化学计量学可能是重要的。例如，本文预期的甲醛的合适的浓度为在各个毒素 A 和 / 或毒素 B 多肽内提供分子间交联，并且还未实质彼此交联多肽 (例如，未产生分子间交联) 的浓度。如在实施例部分中显示的，包含 0.5 mg/ml 毒素 A 的组合物可仅需要 0.21% (w/v) 甲醛。然而，包含较高浓度的毒素 A 的组合物可需要较高或较低浓度的甲醛以产生所需的分子内交联 (例如，类毒素化)，并且还未产生实质量的分子间交联。相同的原则可适用于毒素 B 的类毒素化。具体组合物的合适的条件可通过本领域普通技术人员使用本文描述的或本领域可得到的技术来确定。例如，具体量的甲醛对于组合物中的具体毒素的类毒素化是否有效可使用在实施例部分中描述的细胞毒性测定、阴离子交换色谱法、尺寸排阻色谱法、胺含量分析、抗原性和免疫原性测定中的任一种或多种来确定。还应理解的是，虽然本文使用甲醛，但其它类似的作用剂可因此替代，如本领域普通技术人员可确定的。例如，在一些实施方案中，甲醛可被戊二醛替代。此外，还应理解的是，虽然本文使用在磷酸盐缓冲液中类毒素化，但其它类似的作用剂可因此替代，如本领域普通技术人员可确定的。例如，在一些实施方案中，使用含有甘氨酸和 / 或赖氨酸的缓冲液。虽然可需要不同的浓度来进行这样的替代，但用于这样的替代的合适的条件可使用本文描述的技术 (例如，在实施例部分中描述的细胞毒性测定、阴离子交换色谱法、尺寸排阻色谱法、胺含量分析、抗原性和免疫原性测定中的任一种或多种) 来确定。

[0013] 在某些实施方案中，毒素 A 可与适量的甲醛 (例如，约 0.2% 甲醛) 混合适量的时间 (例如，约任意 1–60 分钟，例如 10 分钟) 以产生类毒素 A，随后在适当的温度 (例如，约 25°C) 下培养适量的时间 (例如，约 2–21 天，例如任意约 6–12 天 (例如，约 6 天))。在一些优选的实施方案中，如在本文的实施例中显示的，通过将毒素 A 在包含约 0.21% (w/v) 甲醛的制剂中在约 25°C 下培养约 6–约 12 天，毒素 A 可转化为类毒素 A。在某些实施方案中，毒素 B 可与适量的甲醛 (例如，约 0.42%) 混合适量的时间 (例如，约任意 1–60 分钟，例如 10 分钟)，随后在适当的温度 (例如，约 25°C) 下培养适量的时间 (例如，约 2–30 天，例如任意约 13–12 天 (例如，约 21 天))，以产生类毒素 B。在一些优选的实施方案中，如在本文的实施例中显示的，通过将毒素 B 在包含约 0.42% (w/v) 甲醛的制剂中在约 25°C 下培养混合约 13–约 20 天，毒素 B 可转化为类毒素 B。可由 37% 甲醛的储液在包含毒素 A 或毒素 B 的溶液中引入 (例如，无菌地) 甲醛至期望量，接着培养一定的时间段 (例如，5–10 分钟) 并且储存适当的温度和时间 (例如，2–8°C，多天)。在某些实施方案中，经纯化的毒素 A 和经纯化的毒素 B 可组合，随后与适量的甲醛 (例如，约 0.42%) 混合适量的时间 (例如，约任意

1-60 分钟,例如 10 分钟),随后在适当的温度(例如,约 25°C)下培养适量的时间(例如,约 2-30 天,例如任意约 13-21 天(例如,约 21 天),以生产类毒素 A 和 B。类毒素可包含在合适的缓冲液(例如,约任意 20-150 mM 磷酸盐(例如,100 mM),pH 7.0)中。类毒素 A 和类毒素 B 组合物可随后在合适的缓冲液中组合(例如,通过在适当的缓冲液例如 20 mM 柠檬酸盐(pH 7.5)、5%-8% 蔗糖(例如,8%)中渗滤),以生产类毒素 A/B 免疫组合物和/或疫苗(例如,本文中可统称为“组合物”)。这样的组合物还可使用标准技术采用冻干的形式制备。因此,在一些实施方案中,类毒素免疫组合物可为冻干的形式,比起由其重构的组合物(例如,药物产物),其可含有例如较高浓度的甲醛。例如,冻干的组合物可包含约 0.016% 甲醛(w/v),但是在为给予宿主而重构后,组合物(例如,药物产物)可包含少于 0.016% 甲醛(w/v)(例如,约任意 0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.01(w/v))。在一些实施方案中,随后,类毒素 A/B 免疫组合物和/或疫苗(例如,“药物产物”)可包含约任意 0.0001%-0.025% 甲醛(w/v)(例如,约任意 0.001%、0.002%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.01%、0.016%、0.02% 或 0.025% (w/v))(例如,“残余的甲醛”)。已发现在药物产物中包括残余的甲醛尤其有益,因为当组合物保持在较高温度(例如,超过 4°C,例如室温或例如 37°C)达一定的时间段(例如,约 6 周)时,其可分别降低和/或防止类毒素 A 和/或类毒素 B 回复为毒素 A 或毒素 B。注意到,在一些情况下,可提高甲醛的量,以降低毒素灭活时间。最终的组合物(例如,免疫组合物、疫苗)包括仅残余量的甲醛。如在实施例中显示的,这些过程意外地提供具有有利的生物化学和功能性质的含有免疫学类毒素 A/B 的组合物。

[0014] 在某些实施方案中,在本文描述的方法的任何点,调节可干涉其中的甲醛的功能性的某些缓冲液组分的量可能是有益的。例如,TRIS 具有胺基团,其可与蛋白质有效竞争甲醛介导的改性,从而降低在反应混合物中的有效甲醛浓度。因此,保持在其中毒素和/或类毒素以低水平产生的组合物中 TRIS 的量可能是有益的。例如,在毒素制备物中残余的 TRIS 值可降低至更合适的水平(例如,低于约 1-约 5 $\mu\text{g/ml}$ (例如,1 $\mu\text{g/ml}$ (例如,低于检测的限度)或 5 $\mu\text{g/ml}$)。如在实施例中显示的,通过在 25mM Tris 中渗滤经纯化的毒素 A 和/或经纯化的毒素 B(例如,以除去 MgCl_2),随后在磷酸盐缓冲液(例如,100 mM PO_4 , pH 7)中渗滤,使用例如切线流动过滤(例如,使用平的材料 Millipore PES50K)(例如,与空心纤维或其它类型的膜相对),在毒素制备物中残余的 TRIS 值可意外地降低至更合适的水平(例如,低于 1 $\mu\text{g/ml}$)。在一些实施方案中,所得到的较低浓度的 TRIS 可允许一次至多次有效调节实现类毒素化过程所需的甲醛的量。其它实施方案可涉及,例如,使用不含胺基团的缓冲液(例如, MEM、乙酸盐、柠檬酸盐)和/或 pH-受控的含水溶液(例如,可向其中加入酸或碱的盐水或水)。

[0015] 因此,在一些优选的实施方案中,在类毒素化反应中,Tris 可用另一种缓冲液(例如磷酸盐缓冲液)代替。例如,如在实施例中描述的,澄清的艰难梭菌培养物滤液可在 Tris 缓冲液(例如,50 mM Tris/NaCl/0.2mM EDTA/1 mM DTT, pH 7.5)中被加工(例如,浓缩和渗滤,例如通过切线流动过滤)。可随后将所得到的溶液过滤(例如,使用膜过滤器),将硫酸铵浓度调节至约适当的量(例如,至约 0.4M),随后可实施进一步过滤(例如,使用膜过滤器)。含有艰难梭菌毒素 A 和毒素 B 的该含水溶液可随后经历疏水相互作用色谱法,将毒素结合至可用 Tris 缓冲液洗涤的尺寸排阻(例如,琼脂糖凝胶)柱。艰难梭菌毒素可随

后用含有 DTT 和 IPA 的 Tris 缓冲液洗脱, 汇合, 并且使用 WFI 调节至约 9mS 或更少的传导率。这些艰难梭菌毒素 (在汇合的洗脱液中) 可随后进一步通过涉及与 Tris 缓冲液平衡的另一种方法 (例如阴离子交换色谱法) 纯化。毒素 A 可随后用低盐 Tris 缓冲液洗脱, 而毒素 B 用高盐 Tris 缓冲液洗脱。含有经纯化的毒素 A 或经纯化的毒素 B 的溶液可各自随后浓缩, 并且在磷酸盐缓冲液 (例如 100 mM PO₄, pH 7) 中渗滤 (其中残余的 TRIS 值优选低于约 1- 约 5 μg/ml)。已发现较低浓度的磷酸盐 (例如, 20 mM) 可能不适合, 并且可导致提高的多聚化 (如果可能, 应最小化)。因此, 优选的合适的磷酸盐缓冲液可包括任何浓度的磷酸盐, 从超过约 20 mM 至最多约 200 mM, 例如, 约任意 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 或 200 mM。如在本文的实施例中显示的, 随后, 通过使毒素 A 与包含约 0.21% (w/v) 甲醛的制剂在 100 mM PO₄ (pH 7) 中在约 25°C 下混合约 6 天, 毒素 A 可转化为类毒素 A。而在一些优选的实施方案中, 如在本文的实施例中显示的, 通过使毒素 B 与包含约 0.41% (w/v) 甲醛的制剂在 100 mM PO₄ (pH 7) 中在约 25°C 下混合约 13 天, 毒素 B 可转化为类毒素 B。还预期其它合适的缓冲液, 如本领域普通技术人员理解的。

[0016] 通过测定具体的条件以确定组合物的特性是否可接受, 本领域普通技术人员可确定具体的条件 (例如, 缓冲液 (或其组分)、时间、温度) 是否适用于制备和 / 或保持类毒素 A 和 / 或类毒素 B 组合物。例如, 可使用细胞毒性测定 (例如, 使用 IMR-90 细胞系 (参见, 例如, 实施例) 或 Vero 细胞)、阴离子交换高效液相色谱法 (AEX-HPLC)、尺寸排阻高效液相色谱法 (SEC-HPLC)、酶-连接的免疫吸附剂测定 (ELISA)、使用在 280nm 下的吸光度测量的浓度、回复分析 (参见, 例如, 实施例) 和 / 或体内效力测定 (例如, 仓鼠效力测定, 如在实施例中描述的) 测试组合物。在有利的条件下制备的组合物可通常呈现以下的任何一种或多种: 对于在细胞毒性测定中监测的细胞, 很少至没有细胞毒性; AEX-HPLC 和 / 或 SEC-HPLC 色谱图显示很少至没有 (或相对于另一个条件, 在一个条件下至少较少, 优选较少) 多聚化类毒素; ELISA/A280 值更接近 1 (例如, 与可通常呈现 ELISA/A280 值远离 1 的在不利的条件下制备的组合物相比); 在测试阶段期间很少至没有从类毒素回复至毒素; 和 / 或在体内测定期间的免疫原性 (例如, 在仓鼠效力测定中, Log₁₀ 滴度为 4.8 或更高)。其它方法也可用于进行这些测定, 如由本领域普通技术人员确定。

[0017] 本文描述的方法适用于来自实际上艰难梭菌的任何菌株的毒素。艰难梭菌的优选的菌株为产生毒素 A 和 / 或 B 的菌株, 并且包括例如但不限于毒素类型 0 (例如, VPI10463/ATCC43255, 630)、III (例如, 027/NAP/B1)、V (例如, 078) 和 VIII (例如, 017) 的菌株。所述方法还适用于使用重组体方法产生的艰难梭菌毒素。毒素 (例如, 毒素 A 和 / 或毒素 B) 可使用本领域已知的方法 (例如, 美国专利 6, 669, 520) 由艰难梭菌的培养物滤液纯化。由艰难梭菌的培养物滤液纯化毒素的示例性方法在本文的实施例中描述。优选毒素的纯度为约任意 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 或更多。毒素可共同或单独灭活。例如, 经纯化的毒素可以期望的毒素 A: 毒素 B 比率 (例如, 3:1, 3:2, 5:1, 1:5) 混合, 随后灭活或可分别灭活。优选毒素分别灭活, 以生产类毒素。本文使用的术语 "类毒素" 用于描述通过化学处理已部分或完全灭活的毒素。如果比起未经处理的毒素, 其具有较少的毒性 (例如, 100%, 99%, 95%, 90%, 80%, 75%, 60%, 55%, 50%, 25% 或 10% 或更少的毒性), 则认为毒素被灭活, 例如, 通过体外细胞毒性测定或通过体内测定来测量。如本文公开的, 使用甲醛处理将毒素灭活。其

它可能的化学手段包括例如戊二醛、过氧化物、 β -丙醇酸内酯或氧处理。

[0018] 灭活可通过用防止类毒素回复为毒素的量的甲醛培养毒素来进行。通过在包含经纯化的毒素 A 或毒素 B 的缓冲液中包括合适量的甲醛,可防止回复。可调节在缓冲液中甲醛的量以保持适当浓度的甲醛,以防止回复。为此,残余浓度的甲醛可包括在缓冲液(和/或药物组合物)中。甲醛的残余浓度为防止回复和/或呈现给予本文描述的组合物的人低副作用风险的浓度。例如,在其它范围中,残余的甲醛浓度可在约任意 0.0001%-0.025% 甲醛(w/v)(例如,约任意 0.004%、0.008%、0.016% 或约 0.01%)、约 0.001%-约 0.020% (w/v)、约 0.004%-约 0.020% (w/v)(例如,约 0.016% \pm 0.04%) 或约 0.004%-0.010% (w/v)(例如,约 0.008%) 范围。通过体外测定例如像通过本文描述的体外测定(参见,例如,在实施例中的细胞毒性测定),当在 37°C 下储存后没有观察到可检测的细胞毒性时,通常发现防止回复。“实质”防止回复通常意味着通过在实施例描述的体外测定,在 37°C 下储存后,10% 或更少的类毒素回复为毒素。合适的体外细胞毒性测定可为基于细胞的荧光测定,使用例如 Vero 细胞。使用 IMR90 细胞(例如,ATCC[®] Accession No. CCL-186)可实施另一种合适的体外细胞毒性测定。可测定测试材料(例如,类毒素)的毒性作为与它们正常的有条纹的形态相比 50% 的细胞变圆时的最小浓度(例如,MC-50)。如在本文的实施例中描述的,通过体外测定,包含通过本文描述的方法制备的类毒素和 0.008% 或更少的甲醛的疫苗组合物在 37°C 下储存后未显示可检测的细胞毒性。物理化学分析(例如,阴离子交换色谱法)也可用于确定回复,但是体外细胞毒性测定可能更加提供信息。还可通过仓鼠体内效力测定来测量类毒素的效力,其测量 log₁₀ 抗毒素 A 或抗毒素 B IgG 滴度的平均值。

[0019] 在一些实施方案中,可由 37% 甲醛的溶液将适量的甲醛加入到毒素中。在加入甲醛之前,毒素优选在合适的缓冲液溶液(例如,100 mM 磷酸钠缓冲液,pH 7.0)中。其中的毒素浓度可为,例如,约 0.1-约 5 mg/mL(例如,0.5 mg/mL)。为了开始灭活过程,毒素可开始时与合适浓度的甲醛(例如,约 0.1%-约 0.6%)混合合适的时间段(例如,10 分钟)。例如,经纯化的毒素 A (0.5 mg/ml 经纯化的毒素 A 在 100 mM 磷酸钠(pH 7.0)中)可在约 0.2% 甲醛中混合约 10 分钟。而经纯化的毒素 B(例如,0.5 mg/ml 经纯化的毒素 B 在 100 mM 磷酸钠(pH 7.0)中)可在约 0.4% 甲醛中混合约 10 分钟。可随后过滤(例如,使用 0.2 μ m 膜过滤器)这样的混合物,以除去通过在 280 nm 下的吸光度可影响蛋白质浓度的小的蛋白质聚集物(例如,允许以预期的类毒素 A: 类毒素 B 比率精确配制药物组合物)。通过将混合物培养约 1-约 21 天(例如,约 2 天、约 6 天或约 13 天),可随后继续灭活。例如,毒素 A 混合物可在合适的温度(例如,约 25°C)下在 13 天或更少(例如,约 2 天、约 6 天或约 13 天)内培养。毒素 B 混合物可在合适的温度(例如,约 25°C)下培养 21 天或更少(例如,约 2 天,约 6 天或约 13 天)。采用这种方式,可提供类毒素 A 和/或类毒素 B 的制备物。这样的制备物通常包含至少约任意 90%、95%、99% 或 100% 类毒素(例如,灭活的毒素)。

[0020] 虽然这些类毒素制备物可与缓冲液直接混合,优选,将制备物浓缩,并且在适当的缓冲液溶液中渗滤。优选,使用切线流动过滤进行浓缩和渗滤,以使蛋白质剪切最小化,同时确保除去甲醛和在缓冲液中交换。缓冲液优选包括至少一种或多种提高类毒素的稳定性和/或延迟或降低类毒素的聚集的药学上可接受的赋形剂。适合使用的赋形剂包括例如但不限于糖(例如,蔗糖、海藻糖)或糖醇(例如,山梨糖醇)和盐(氯化钠、氯化钾、氯化镁、乙酸镁)或它们的组合。此外,合适的赋形剂可为在例如,美国专利公布 2011/045025(序

列号 12/667, 864) 中描述的那些中的任一种。在灭活后, 可将灭活的毒素 (即, 类毒素) 的溶液浓缩和 / 或超滤和 / 或渗滤, 并且在适当的缓冲液 (例如但不限于, 约 5- 约 100 mM (例如, 约任意 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 mM 柠檬酸盐、磷酸盐、甘氨酸、碳酸盐、碳酸氢盐等缓冲液) 中在 pH 8.0 或更少 (例如, 6.5-7.7, 例如约任意 6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 或 8.0) (例如, 20 mM 柠檬酸盐、pH 7.5) 下储存, 该缓冲液防止或实质上防止类毒素回复为细胞毒素形式 (例如, 回复为毒素)。一种示例性缓冲液可为例如含有适量的甲醛 (例如, 0.016% (w/v)) 的 20 mM 柠檬酸盐 (pH 7.5)、5%-8% 蔗糖。其它缓冲液等也可为合适的, 如本领域普通技术人员理解的。

[0021] 可配制类毒素用作药物组合物 (例如, 免疫原性和 / 或疫苗组合物)。例如, 通过在药学上可接受的稀释剂 (例如, 生理盐水) 中悬浮类毒素或通过使类毒素与药学上可接受的载体缔合, 可制备包含艰难梭菌类毒素的组合物用于给予。这样的药物制剂可包括一种或多种本领域已知的赋形剂 (例如, 稀释剂、增稠剂、缓冲液、防腐剂、佐剂、洗涤剂 and / 或免疫刺激剂)。合适的赋形剂与类毒素和与佐剂 (在加入佐剂的组合物中) 相容, 其实例为本领域普通技术人员已知和可得的。组合物可为液体形式或冻干的 (按照标准方法) 或泡沫干燥的 (如例如在美国专利公布 2009/110699 中描述的)。一种示例性冻干的疫苗组合物可包含例如类毒素 A 和 B、20 mM 柠檬酸盐、8% 蔗糖、0.016% 甲醛, pH 7.5。

[0022] 为了制备用于给予的疫苗, 干燥的组合物可与含水溶液 (例如, 注射用水或合适的稀释剂或缓冲液溶液) 重构。在某些实施例中, 稀释剂包括本文描述的甲醛。稀释剂可包括佐剂 (例如, 氢氧化铝), 含有或不含甲醛。一种示例性稀释剂可为 NaCl 和氢氧化铝的含水溶液。这样的稀释剂可用于重构干燥的组合物。药物组合物可包含约 10-150 $\mu\text{g/mL}$ (例如, 任意约 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 或 150 $\mu\text{g/mL}$) 剂量的类毒素。通常, 用于注射的剂量的体积为 0.5 mL 或 1.0 mL。可提高或降低剂量, 以调节待在受试者中诱导的免疫反应。类毒素可在存在或不存在佐剂下给予, 其量可由本领域技术人员确定。使用的佐剂包括铝化合物, 例如氢氧化铝、磷酸铝和羟基磷酸铝。

[0023] 免疫学和 / 或疫苗组合物可通过经皮 (例如, 肌内、静脉内、腹膜内或皮下)、透皮、粘膜路线给予具有有症状艰难梭菌感染或处于发展有症状艰难梭菌感染风险的受试者, 其量和方案由本领域技术人员确定。这些受试者群体包括, 例如, 已接受广谱抗生素的受试者, 例如住院的年老的患者、疗养院居民、慢性病患者、癌症患者、AIDS 患者、重症监护病房中的患者和接受透析治疗的患者。疫苗可给予 1 次、2 次、3 次、4 次或更多次。当给予多个剂量时, 剂量可彼此分隔例如, 一周、一个月或几个月。因此, 通过给予受试者药物组合物, 本公开还提供引发针对毒素、类毒素和 / 或艰难梭菌的免疫反应的方法。这可通过给予受试者本文描述的组合物 (例如, 免疫原性组合物和 / 或疫苗) 来实现, 以实现使类毒素暴露于受试者的免疫系统。因此, 免疫原性组合物和 / 或疫苗可用于预防和 / 或治疗有症状的艰难梭菌感染。

[0024] 组合物可包括在试剂盒 (例如, 疫苗试剂盒) 中。例如, 试剂盒可包含含有干燥形式的本文描述的组合物的第一容器和含有用于使组合物重构的含水溶液的第二容器。试剂盒可任选包括给予重构的液体形式的组合物的装置 (例如, 皮下注射器、显微针阵列) 和 / 或使用说明。由于已发现本文描述的组合物可具有良好的稳定性, 并且在适度的温度 (例

如,在约 2-8℃)和较高温度(例如,在约 15℃,25℃,37℃或更高)下储存阶段后保持无细胞毒性,因此这样的试剂盒是可能的。在某些实施例中,如以下进一步描述的,在 37℃下储存后,组合物保持无细胞毒性(例如,没有回复的证据)。

[0025] 因此,本公开提供用于生产艰难梭菌类毒素的方法,例如,通过用约 0.15%-0.5% 甲醛(w/v)在约 17-32℃下培养约 2-约 21 天,使经纯化的艰难梭菌毒素 A 和/或经纯化的艰难梭菌毒素 B 灭活。在一些实施方案中,毒素 A 可用约 0.2% 甲醛在约 25℃下培养约 2 天,以生产类毒素 A。在一些实施方案中,毒素 B 用约 0.4% 甲醛在约 25℃下培养约 13 天,以生产类毒素 B。还提供包含通过这样的方法制备的类毒素 A 和/或类毒素 B 的组合物。还提供用于制备包含经纯化的艰难梭菌类毒素 A 和经纯化的艰难梭菌类毒素 B 的免疫原性组合物的方法,所述方法通过使经纯化的艰难梭菌类毒素 A 和经纯化的艰难梭菌类毒素 B 与包含残余量的甲醛(例如,约任意 0.001%-0.025%,例如约任意 0.004%、0.008%或 0.016% (w/v))的组合物组合。在一些实施方案中,所述方法可提供在 37℃下稳定达最多约 6 周的艰难梭菌类毒素 A 和/或经纯化的艰难梭菌类毒素 B 的组合物。因此,在一些实施方案中,本文描述的方法还可包括通过用约 0.15%-0.5% 甲醛(w/v)在约 17-32℃下培养约 2-约 21 天,使经纯化的艰难梭菌毒素 A 或经纯化的艰难梭菌毒素 B 灭活;和,使艰难梭菌类毒素 A 和经纯化的艰难梭菌类毒素 B 与包含残余量的甲醛的组合物组合。通过这样的方法制备的艰难梭菌类毒素 A 和 B 组合物可在 37℃下稳定达最多约 6 周。在这样的组合物中甲醛的残余量可为约任意 0.001%-0.025%、0.004%、0.008%或 0.016% (w/v)。组合物还可包含约 20 mM 柠檬酸盐(pH 7.5)、4%-8% 蔗糖和 0.016% 甲醛。在一些实施方案中,可将组合物冻干。这些方法还可包括提供包含毒素 A 和毒素 B 的艰难梭菌培养物和由所述培养物纯化毒素 A 和毒素 B。还提供根据这些方法生产的艰难梭菌类毒素 A 或 B。在一些实施方案中,这样的组合物为疫苗(例如,针对有症状艰难梭菌感染提供保护、预防和/或治疗反应的组合物)。组合物(例如,疫苗组合物)可包含 A:B 比率为 5:1-1:5(例如,3:1 或 3:2)的类毒素 A 和类毒素 B。在一些实施方案中,组合物可为冻干、冷冻干燥、喷雾干燥或泡沫干燥的,或为液体形式。这样的组合物可包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。组合物可包含缓冲液,例如,柠檬酸盐、磷酸盐、甘氨酸、碳酸盐或碳酸氢盐缓冲液或 pH-受控的含水溶液,和/或一种或多种糖(例如,蔗糖、海藻糖)和/或糖醇(山梨糖醇)。其它实施方案对于本领域普通技术人员来说显而易见。

[0026] “经纯化的”毒素通常意味着毒素已例如从培养物滤液分离,并且使用本领域已知的方法纯化至少至一些程度。例如,本文描述纯化毒素的示例性方法。在一些实施方案中,经纯化的毒素的纯度可为约任意 75%,80%,85%,90%,95%,99% 或更多。类似地,“经纯化的”类毒素可为纯度为约任意 75%,80%,85%,90%,95%,99% 或更多的类毒素。

[0027] 当在数值或范围的列表前面时,术语“约”,“大致”等指独立地在列举或范围中的每一个单个值,就好像在列举或范围中的每一个单个值直接前面有该术语。该术语意味着与相同的提及精确、接近或与之类似的值。例如,术语“约”或“大致”可包括指示的值的 +/-10% 的值(例如,“约 30℃”可意味着 27℃-33℃之间的任何值,包括但不限于 30℃)。

[0028] 本文使用的受试者或宿主指个体。受试者可包括驯养的动物,例如猫和狗、家畜(例如,牛、马、猪、绵羊和山羊)、实验室动物(例如,小鼠、兔、大鼠、豚鼠)和鸟类。在一方面,受试者为哺乳动物,例如灵长类动物或人。

[0029] 术语“培养”、“混合”和“储存”(或其同义词和/或衍生物)可互换使用。例如,毒素可使用包含甲醛的溶液培养。这样的培养可任选意味着例如组合物通过运动(例如,使用混合棒等)而主动组合或保持为基本上静止状态。

[0030] 任选的或任选意味着随后描述的事件或情况可能发生或者可能不发生,并且该描述包括事件或情况发生的情况以及事件或情况不发生的情况。例如,短语任选组合物可包含组合意味着组合物可包含不同分子的组合,或者可能不包括该组合,使得该描述包括组合和不存在组合(即,组合的单个成员)二者。

[0031] 范围在本文中可表述为从约一个具体值和/或至约另一个具体值。当表述这样的范围时,另一个方面包括从一个具体值和/或至另一个具体值。类似地,当作为近似值表达值时,通过使用先行词约或大致,应理解的是,具体值形成另一个方面。进一步应理解的是,每一个范围的端点关于另一个端点是有效的,并且独立于另一个端点。范围(例如,90-100%)意味着包括范围本身以及在该范围内的每一个独立的值,就好像每一个值单个列举一样。

[0032] 当术语防止与给定的治疗达给定的条件(例如,防止有症状感染)结合在本文使用时,意味着传达经治疗的受试者根本不会发展在临床上可观察的水平的病况,或者比起缺乏治疗,更缓慢地发展和/或至较少的程度。这些术语不仅局限于其中受试者根本不经历病况的各方面的情况。例如,如果在使受试者暴露于预期产生给定的病况表现的刺激期间给予,并且比起另外预期的导致受试者经历较少和/或更温和的病况的症状,认为治疗已预防病况。通过导致受试者显示仅温和的明显的感染症状,治疗可“防止”有症状感染;这不意味着一定不存在艰难梭菌微生物。

[0033] 类似地,降低在本文中与感染风险与给定的治疗结合使用(例如,降低有症状艰难梭菌感染的风险)时,通常指与在不存在治疗(例如,使用所公开的类毒素给予或接种)下发展感染的对照或基础水平相比,受试者发展感染更缓慢或至较少的程度。降低症状感染的风险可导致受试者显示仅温和的明显的感染症状或延迟的感染症状;这不意味着一定不存在艰难梭菌微生物。

[0034] 在本公开内引用的所有参考文献通过全文引用而结合到本文中。在以下实施例中进一步描述某些实施方案。仅作为实例提供这些实施方,并且不旨在以任何方式限制权利要求的范围。

实施例

[0035] 提供以下实施例仅用于说明的目的,并且不旨在限制本公开的范围。当情况可能建议或使得权宜时,预期形式的变化和等价物的替代。虽然本文已采用具体的术语,但这样的术语预期为描述性含义而不是限制的目的。使用但是未在本公开和这些实施例中明确描述的分子遗传学、蛋白质生物化学和免疫学的方法在科学文献中充分报道并且完全在本领域技术人员的能力范围内。

[0036] 实施例 1

艰难梭菌有效菌种(菌株 VPI10463/ATCC43255)用于接种 pH 6.35-7.45 的包含大豆蛋白胨、酵母提取物、磷酸盐缓冲液和碳酸氢钠的预调制的培养基(SYS 培养基),并且由 4 mL Working Cell Bank (WCB) 小瓶按比例放大至 160 L 培养物。在达到期望的密度和

10-12 小时培养阶段后,整个 160 L 培养物处理用于澄清并且经过 0.2 μm 过滤。收获来自一个或多个生产发酵罐的培养物,经历膜过滤(例如,使用 Meisner 膜过滤器),以除去艰难梭菌细胞和细胞碎片杂质。将所得到的澄清的培养物滤液浓缩,通过切线流动过滤在 50 mM Tris/NaCl/0.2mM EDTA/1 mM DTT(pH 7.5) 中渗滤。所得到的溶液使用膜过滤器过滤,硫酸铵的浓度提高(例如,至约 0.4M),随后实施进一步过滤(例如,使用膜过滤器)。该含水溶液含有艰难梭菌毒素 A 和毒素 B。含水溶液经历疏水相互作用色谱法。艰难梭菌毒素结合于琼脂糖凝胶柱。柱用 Tris 缓冲液洗涤,两种艰难梭菌毒素流分用含有 DTT 和 IPA 的 Tris 缓冲液洗脱。将由 HIC 洗脱的两种毒素流分汇合,使用 WFI 将传导率调节至 9mS 或更少。艰难梭菌毒素(在汇合的洗脱液中)通过阴离子交换色谱法进一步纯化。将洗脱的含水溶液通过阴离子交换柱,使毒素结合于柱。柱用 Tris 缓冲液平衡,毒素 A 用低盐 Tris 缓冲液洗脱,毒素 B 用高盐 Tris 缓冲液洗脱。将经纯化的毒素 A 和经纯化的毒素 B 各自浓缩,并且在 100 mM PO_4 (pH 7) 中渗滤。蛋白质浓度为约 0.5 mg/mL,每一种毒素的纯度为 90% 或更大。

[0037] 将 37% 甲醛溶液无菌地加入到每一种毒素 A 渗滤液和毒素 B 渗滤液中,以得到 0.42% 的最终浓度。将溶液混合,随后在 2-8°C 下储存 18-22 天。灭活后,在制剂缓冲液(20 mM 柠檬酸盐/5% 蔗糖,pH 7.5) 中渗析毒素渗滤液。通过加入 37% 甲醛溶液,按需调节甲醛浓度。类毒素 A 和 B 以 3:2 (A:B) 重量的比率组合,冻干。冻干的产品包含类毒素 A (0.24 mg/mL)、类毒素 B (0.16 mg/mL)、20 mM 柠檬酸钠、5% (w/v) 蔗糖和指示浓度的甲醛。

[0038] 实施回复分析,以观察在 37°C 下经 6 周阶段潜在的回复。使用不同量的残余的甲醛(0%、0.008% 和 0.016% (w/v)) 配制包含类毒素 A 和类毒素 B 的组合物,在 37°C 或 4°C 下储存,并且每周经由细胞毒性测定测试,达 6 周。来自这些研究的数据在表 1 中陈述。在 4°C 下,产品通过回复分析,即使不具有加入的残余的甲醛。然而,在 37°C 下,需要 0.016% 残余的甲醛以通过回复测试。

[0039] 表 1

在 37°C 下储存的药物产物的回复分析

4°C	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天
0%	-	-	-	-	-	-
0.008%	-	-	-	-	-	-
0.016%	-	-	-	-	-	-
37°C	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天
0%	+	+	+	+	+	+
0.008%	-	+	+	-	-	-
0.016%	-	-	-	-	-	-

*=- 未检测到细胞毒性 ;+= 有细胞毒性。

[0040] 实施例 2

实施本文描述的实验,以鉴定提供在 37°C 下稳定的类毒素的类毒素化方法。在无菌一次性袋中艰难梭菌有效菌种(菌株 VPI10463/ATCC43255) 用于接种预调制的培养基(包含大豆蛋白胨、酵母提取物、磷酸盐缓冲液和 D- 山梨糖醇,pH 7.1-7.3),将培养物在 35-39°C 下培养,直至实现靶 OD。在 250 L 无菌一次性培养袋中,30L 菌种 1 培养物用于接种培养基,将培养物在 35-39°C 下培养,直至实现靶 OD。菌种 2 培养物用于接种 1000L 无菌一次性培养袋,将培养物在 35-39°C 下培养,直至实现靶 OD。收获来自一个或多个生产发酵罐的培

养物,经历深度过滤(例如,使用 Pall Depth 700p/80p/0.2 μ m 0.02msq/L),以除去艰难梭菌细胞和细胞碎片杂质,同时冷却(例如,约 37 $^{\circ}$ C -19 $^{\circ}$ C),以限制蛋白酶活性。将所得到的澄清的培养物滤液浓缩,使用平形材料 Millipore,并且在约 4 $^{\circ}$ C 的温度下(用于降低的蛋白酶活性),通过切线流动过滤在 25 mM Tris/50mM NaCl/0.2mM EDTA (pH 7.5-8.0) 中并且不加入 DTT 来渗滤。所得到的溶液使用膜过滤器过滤,硫酸铵的浓度提高(例如,至约 0.9M),随后实施进一步过滤(例如,使用膜过滤器)。该含水溶液含有艰难梭菌毒素 A 和毒素 B。含水溶液经历疏水相互作用色谱法。艰难梭菌毒素结合于丁基琼脂糖凝胶树脂(例如,GE Butyl S FF 琼脂糖凝胶)。柱用 0.9 mM 硫酸铵 25 mM Tris(pH 8.0) 洗涤,艰难梭菌毒素用 25 mM Tris(pH 8.0) 洗脱,使用 WFI 将传导率调节至 7mS 或更少。艰难梭菌毒素(在洗脱液中)通过阴离子交换色谱法进一步纯化。将洗脱的含水溶液通过阴离子交换柱(例如,Tosoh Q 650 M),使毒素结合于柱。柱用 25 mM Tris(pH 7.5) 平衡,毒素 A 用 27 mM MgCl₂ 在 25mM Tris(pH 8.0) 中洗脱,毒素 B 用 135 mM MgCl₂ 在 25mM Tris(pH 8.0) 中洗脱。将经纯化的毒素 A 和经纯化的毒素 B 各自浓缩,首先在 25mM Tris 中渗滤(例如,以除去 MgCl₂),随后在 100 mM PO₄ (pH 7) 中渗滤。毒素 A 的平均收率为约 0.021 g 纯毒素 /L 发酵(UV280),通过 SDS Page 评价的纯度为平均约 97.2%。毒素 B 的平均收率为约 0.011g 纯毒素 /L 发酵(UV280),通过 SDS Page 评价的纯度为平均约 93.9%。由该过程产生的毒素呈现 90% 或更高的程度,并且还显示降低由先前的工艺步骤留下的基质残余物(例如,三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS))。在来自基本上如在实施例 1 中描述的过程的毒素基质中的残余的 TRIS 值在约 100-800 μ g/ml 变化,其中在来自在该实施例中描述的纯化过程的毒素基质中的残余的 TRIS 值低于 1 μ g/ml (即,低于检测的限度)。关于与甲醛的类毒素化反应,TRIS 具有可与蛋白质有效竞争甲醛介导的改性的胺基团,从而降低在反应混合物中的有效甲醛浓度。因此,数据表明,与通过在实施例 1 中描述的过程制备的类毒素的动力学相比,通过该过程制备的类毒素的类毒素化动力学更快。

[0041] 关于温度和甲醛浓度,对类毒素化过程实施研究,并且分析随着类毒素化培养阶段的变化。目的是比起使用较早的过程(如在实施例 1 中描述的)产生的类毒素,开发提供更好的安全性特性和更好的回复特性的稳健的类毒素化过程,同时保持相同水平的免疫原性。期望得到药物产物的类毒素化条件,其通过在 37 $^{\circ}$ C 下的回复分析,具有最少量的残余的甲醛。在这些实验中,毒素浓度固定在 0.5 mg/ml,所有反应在 100 mM 磷酸钠缓冲液(pH 7.0) 中实施。对于每一种类毒素化反应评价的温度为 4 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C 和 25 $^{\circ}$ C。对于类毒素 A 反应,甲醛浓度在 0.21 % ("0.2%")-0.42% ("0.4%") 之间变化,对于类毒素 B 反应,甲醛浓度在 0.42% ("0.4%")-0.84% ("0.8%") 之间变化。对于每一个反应条件,将毒素浓度调节至 0.5 mg/ml,并且以 100 ml 规模实施。对于每个单独的反应,随后加入百分之三十七(37%) 甲醛,以达到靶向浓度。将反应物温和搅拌 5-10 分钟,并且在靶向温度(在 1 小时培养内实现靶温度)下放置在培养器中。每天监测每个单独的反应,达最多 21 天的时间段。引出样品,通过细胞毒性分析、AEX-HPLC、SEC-HPLC、SDS-PAGE 和 TNBS 测定来分析。以某些时间间隔(取决于类毒素化条件),引出样品,配制和动物研究,实施回复分析和 ELISA 测试。

[0042] 动力学细胞毒性分析

类毒素化反应接着细胞毒性分析,因此每天直接从反应混合物引出样品,并且经历同一天分析。类毒素化过程接着对 IMR90 细胞的细胞毒性,类毒素化的动力学为单相的,毒素

A 平均 5 ± 1 天取出用于细胞毒性中和,而毒素 B 接近 13 ± 2 天取出(对于整个反应,不足 3 倍安全限度)。使用一个批次得到的数据在图 1 中显示。y-轴含有 MC50 值,其反映材料的毒性,并且代表在毒性材料存在下 50% 的细胞变圆而不是它们正常的有条纹的形态时的最小浓度。对于两种毒素,MC 50 值差别达 1000 倍;B 更具细胞毒性,其 MC50 值在低 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围。类毒素的绝对 MC50 值是未知的,由于当在这些实验中以 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的最高浓度测试时不存在细胞毒性。灭活过程的总的时间段为 18-21 天。

[0043] 对于毒素 A 和毒素 B 的类毒素化反应,来自细胞毒性分析的数据在表 2 中显示。其描绘对于甲醛与毒素的每一个单独的反应,显示细胞毒性丧失所需的时间量(以天计)。对于毒素 A 和毒素 B,由对于类毒素化反应的数据,几个通常的趋势是显而易见的。当甲醛浓度提高时,使毒素灭活所需的时间降低。此外,对于反应,当温度提高时,使毒素灭活所需的时间也降低。数据表明,当提高温度或甲醛浓度时,类毒素化的速率加速。由动力学细胞毒性分析鉴定许多潜在的条件,数据表明,通过使细胞毒性的初始丧失外推 3 倍,可实现 3 倍安全限度。例如,使用 0.2% 甲醛,在 25°C 下,毒素 A 在 2 天时解毒,因此,施用适当的安全系数将最低程度涉及继续反应 6 天。基于细胞毒性丧失的接受标准(基于动力学分析),多种类毒素化反应条件满足预期,并且使用其它分析的进一步评价将缩小条件。

[0044] 表 2

动力学研究的细胞毒性结果 *

	第0天	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	第9天
类毒素A, 0.2%, 4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
类毒素A, 0.2%, 15℃	+	+	+	-	-	-	-	-	-
类毒素A, 0.2%, 25℃	+	+	-	-	-	-	-	-	N.D.
类毒素A, 0.4%, 4℃	+	+	+	-	-	-	-	-	-
类毒素A, 0.4%, 15℃	+	-	-	-	-	-	-	-	-
类毒素A, 0.4%, 25℃	+	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
类毒素B, 0.8%, 4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	-
类毒素B, 0.8%, 15℃	+	+	-	-	-	-	-	-	-
类毒素B, 0.8%, 25℃	+	-	-	-	-	-	-	-	-
类毒素B, 0.4%, 4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
类毒素B, 0.4%, 15℃	+	+	+	+	+	-	-	-	-
类毒素B, 0.4%, 25℃	+	+	-	-	-	-	-	-	-

*+ :有细胞毒性 ; - :未检测到细胞毒性 ; N. D. :未测定。

[0045] DoE反应的动力学 AEX-HPLC分析

AEX-HPLC (延伸的梯度方法) 可用作进一步评价不同的类毒素化参数的工具。AEX 特性在缩小合适的类毒素化条件中可为有价值的工具。在 AEX 色谱图中, 对于类毒素 A 和类毒素 B 二者, 观察两个亚群体, 比起毒素, 均具有较长的保留时间。随着反应的进展, 峰群偏移, 表明对毒素的进一步改性。潜在地, 这反映甲醛与在毒素上的胺基团反应, 改变在蛋白质上的电荷特性至较少正电荷, 从而提高与柱树脂 (季铵树脂) 的结合亲和力。随着时间的变化, 温度和甲醛浓度可影响和 " 偏移 " 峰群特性, 指示更多的甲醛蛋白质改性; 对于毒素 A 和毒素 B 类毒素化反应二者, 当提高温度和甲醛浓度时, 观察到更快速偏移至第二峰群。从评价的立场, 更期望在第二峰位置处具有单分散的特性, 以确保更多的蛋白质改性。对于类毒素 A, 0.21% 甲醛在 25℃ 下 > 6 天或 0.42% 甲醛在 15℃ 下 > 6 天的条件得到期望的单分散的第二峰特性。对于类毒素 B, 0.4% 或 0.8% 甲醛在 15℃ 下 > 10 天; 或者 0.4% 甲醛在 25℃ 下 > 5 天的条件导致期望的单分散的第二峰特性。重要的是, 注意到具有最高甲醛浓度和温度的反应随着时间开始产生更多的类毒素群体, 表明更加广泛的蛋白质改性 (特别

是在 0.4% 甲醛, 25°C 下使毒素 A 灭活的情况下)。

[0046] 动力学 SEC-HPLC 分析

SEC 特性在缩小合适的类毒素化条件中可为有价值的工具。色谱图可给出作为甲醛诱导的分子间交联的结果可发生的多聚化程度的洞察。期望对类毒素的多聚化的量最小化, 并且实现与在实施例 1 中产生的产品类似的特性。通过 SEC-MALS 每天监测单个反应, 并且定性分析多聚化的外观。对于类毒素 B 反应分析的所有的条件显示没有多聚化。对于类毒素 A, 观察到过度多聚化, 主要是对于具有最高的甲醛浓度的条件。因此, 关于温度、时间或甲醛浓度, 对于类毒素 B 条件, SEC-MALS 数据没有区别。然而, 数据表明, 对于类毒素 A, 较高温度和甲醛浓度共同可导致多聚化。

[0047] 动力学胺含量 (TNBS) 分析

通过反应以形成基于甲醛的部分, 福尔马林介导的类毒素化导致降低在蛋白质上的游离胺含量 (例如, 赖氨酸的 ϵ -氨基基团)。对较早的材料进行使用三硝基苯磺酸 (TNBS) 测定监测改性程度的尝试, 并且在反应结束时, 改性的程度显示对于类毒素 A 和 B 分别为约 35% 和 65% (剩余的游离胺含量相反)。对于该研究, 还使用 TNBS 测定监测游离胺含量。条件显示, 当温度和时间提高时, % 游离胺含量更快速接近渐近线。因此, 胺改性的程度可最大估计为约 40% (对于毒素 A) 和 75% (对于毒素 B) (剩余的游离胺含量相反)。虽然胺含量与细胞毒性丧失具有很少的关联, 但其可用于跟踪甲醛和毒素反应的程度。对于各个实施例, 在 25°C 下, 胺改性在 6 天 (关于 A) 和约 10 天 (关于 B) 内看起来完成。如果反应在较低温度下实施, 实现相同程度的胺改性所需的时间提高。因此, 数据表明较高温度在较短的时间量下将导致更加完全的反应。

[0048] 抗原性的分析

酶联免疫吸附测定 (ELISA) 也可用作进一步评价不同的类毒素化参数的工具。产品的 ELISA 特性可用于缩小合适的类毒素化条件。针对由较早的材料产生的抗体, 经由 ELISA 测量产生的类毒素, 并且分析随着类毒素化时间的变化。此处 ELISA 用于检测毒素的量, 并且针对使用在 280 nm 下的吸光度测量的浓度进行比较。在类毒素化反应中随着抗原的进展, ELISA 值可下降, 指示由使用实施例 1 类毒素观察到的反应的变化 (潜在地指示多聚化)。虽然在测定中注意到变化性, 但数据表明, 较高温度和较高甲醛浓度导致较低的 ELISA 反应。例如, 在 25°C 下使用 0.4% 甲醛导致 ELISA 值下降比在 25°C 下使用 0.2% 甲醛更快。同样, 在 25°C 下使用 0.4% 甲醛的条件导致 ELISA 值下降比在 4°C 下使用 0.4% 甲醛更快。作为评价工具, 期望保持 ELISA 反应超过 70%; 鉴定众多条件。

[0049] 免疫原性的分析

通过仓鼠效力测定测量免疫原性可用于评价类毒素化条件。对于类毒素 A 和类毒素 B, 选择不少于 4.8 的平均 Log₁₀ IgG 滴度反应的 IgG 滴度反应。根据那些规格评价由这些研究产生的类毒素, 并且进一步详细检查, 以不具有与获自较早的条件的类毒素显著较低的反应。此外, 由于不能评价所有可能的散布性 (关于时间、温度和甲醛浓度), 基于动力学细胞毒性分析 (3 倍安全限度) 以及本文描述的物理化学特性选择类毒素。配制类毒素作为二价材料 (非冻干), 用于仓鼠效力测定, 并且分析血清的 IgG 反应。所有类毒素化条件不仅通过效力规格 (即, 平均 IgG 滴度反应为 4.8 Log₁₀), 而且与较早的 (实施例 1) 材料具有在统计学上同等的滴度反应 (注意到没有显著的差异)。此外, 使用体外攻击测定测试所

有血清,发现具有中和抗体活性。作为关键的品质特性,数据表明任意这些类毒素化条件可接受。

[0050] 药物产物 (“DP”) 的回复分析

使用在评价下的类毒素化条件制备的类毒素 A 和 B,配制药产物 (包含类毒素 A 和 B 的组合物)。制剂包括 0%、0.004% 和在一些情况下 0.008% (w/v) 残余的甲醛。通过从类毒素 A 或 B 组合物除去所有的 (或基本上所有的) 甲醛,随后用指示量的甲醛示踪澄清的组合物,制备制剂。药物产物经历在 37°C 下进行的回复分析。在表 3 中描绘来自药物产物回复分析的数据。对于细胞毒性测试为阴性的药物产物标注为 (-)。

[0051] 多种药物产物制剂通过回复分析 (即,在 37°C 下储存后,不具有可检测的细胞毒性)。在 37°C 下储存后,两种药物产物 (具有 0.004% 或具有 0.008% 甲醛 (“残余的甲醛”)) 不具有可检测的细胞毒性:(i) 包含类毒素 A (通过 0.2% 甲醛,15°C 培养 13 天而灭活) 和类毒素 B (通过 0.8% 甲醛,15°C 培养 13 天而灭活) 的药物产物 (表 3,测试 13 和 14 的参数);和,(ii) 包含类毒素 A (通过 0.2% 甲醛,25°C 培养 6 天而灭活) 和类毒素 B (通过 0.4% 甲醛,25°C 培养 13 天而灭活) 的药物产物 (表 3,测试 22 和 23 的参数)。在 37°C 下储存后,具有 0.008% 甲醛的若干其它药物产物也不具有可检测的细胞毒性,包括例如,包含类毒素 A (通过 0.4% 甲醛,4°C 培养 13 天而灭活) 和类毒素 B (通过 0.8% 甲醛,4°C 灭活 21 天) 的药物产物和包含类毒素 A (通过 0.4% 甲醛,4°C 灭活 13 天) 和类毒素 B (通过 0.8% 甲醛,4°C 灭活 21 天) 的药物产物。由该分析鉴定的最佳的类毒素化条件为:毒素 A 的类毒素化:0.5mg/ml 毒素 A,0.21 % 甲醛,25°C,在 100mM NaPO₄(pH 7) 中 6 天;和毒素 B 的类毒素化:0.5mg/ml 毒素 B,0.42% 甲醛,25°C,在 100mM NaPO₄(pH 7) 中 13 天 (表 3,测试 22 的参数)。当通过其它物理化学测定测量时,这些条件也具有期望的特性。AEX 显示对于每一种类毒素的均质峰群,SEC MALS 显示最少多聚化,TNBS 显示在给定的时间点实现最大胺改性的每一个反应。此外,保持 ELISA (A280) 反应。

[0052] 表 3

回复分析 (37°C)

测试	类毒素 A	类毒素 B	37°C	第1 周	第2 周	第3 周	第4 周	第5 周	第6 周
			样品						
1	6d.	21d.	DP+0%Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2	0.4% 4°C	0.8% 4°C	DP+0.004%Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3	13d.	21d.	DP+0%Form.	+	+	+	+	+	+
4	0.4% 4°C	0.8% 4°C	DP+0.004%Form.	+	+	-	-	-	-
5	4°C	4°C	DP+0.008%Form.	-	-	-	-	-	-
6	6d.	13d.	DP+0%Form.	+	+	+	+	+	+
7	0.2% 15°C	0.8% 15°C	DP+0.004%Form.	+	+	-	-	-	-
8	6d.	13d.	DP+0%Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
9	0.2% 15°C	0.4% 15°C	DP+0.004%Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
10	6d.	18d.	DP+0%Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	0.2% 15°C	0.4% 15°C	DP+0.004%Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12	13d.	13d.	DP+0%Form.	+	+	+	+	+	+
13	0.2% 15°C	0.8% 15°C	DP+0.004%Form.	-	-	-	-	-	-
14	15°C	15°C	DP+0.008%Form.	-	-	-	-	-	-
15	13d.	13d.	DP+0%Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
16	0.2% 15°C	0.4% 15°C	DP+0.004%Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17	13d.	18d.	DP+0%Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18	0.2% 15°C	0.4% 15°C	DP+0.004%Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
19	6d.	6d.	DP+0%Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20	0.2% 25°C	0.4% 25°C	DP+0.004%Form.	-	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
21	6d.	13d.	DP+0%Form.	-	+	+	+	+	+
22	0.2% 25°C	0.4% 25°C	DP+0.004%Form.	-	-	-	-	-	-
23	25°C	25°C	DP+0.008%Form.	-	-	-	-	-	-
第23周DP									
24	6d.	21d.	DP+0%Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
25	0.4% 4°C	0.8% 4°C	DP+0.004%Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
26	13d.	21d.	DP+0%Form.	+	+	+	+	+	+
27	0.4% 4°C	0.8% 4°C	DP+0.004%Form.	+	+	+	+	-	-
28	4°C	4°C	DP+0.008%Form.	-	-	-	-	-	-

DP= 药物产物 ;Form. = 甲醛 ;+ :有细胞毒性 ; - :未检测到细胞毒性 ;N. D. 未测定

表 1 和 3 指示参数 22 对于由毒素 A 和 B 制备类毒素是最佳的。这些条件为：

制备类毒素A:0.5 mg/ml 毒素 A,0.21 % 甲醛,25°C,在 100 mM NaPO₄ (pH 7) 中 6 天；
和，

制备类毒素B:0.5 mg/ml 毒素 B,0.42% 甲醛,25°C,在 100 mM NaPO₄ (pH 7) 中 13 天。

[0053] 这些程序还包括在 6 天 (类毒素 A) 或 13 天 (类毒素 B) 培养之前,10 分钟混合步骤,接着 0.2 μm 过滤。在测试在 37°C 下的回复之前,将类毒素 A 和类毒素 B 在 20 mM 柠檬酸盐 (pH 7.5)、0.004% 甲醛中渗滤。该程序在图 2 中说明。还注意到,在柠檬酸盐缓冲液中 0.008% 甲醛也通常提供在 37°C 下良好的稳定性。

[0054] 通过意外的免疫数据（在仓鼠中 IgG 反应）进一步证实该数据，显示对于类毒素 A，较长的培养时间导致较低的 ELISA 值，表明提高的甲醛 - 诱导的毒素改性（在第 6 天，ELISA/A280=0.94；在第 12 天 =0.64）。与此相反，对于类毒素 B，较长的培养时间导致较高的 ELISA 值（在第 13 天，ELISA/A280 =0.53；在第 20 天 =0.73）。期望的 ELISA/A280 值为更接近 1.0 的那些。本领域普通技术人员应理解，12 天培养阶段对于毒素 A 的类毒素化可为适当的，而 20 天培养阶段对于毒素 B 的类毒素化可为适当的。然而，即使鉴于该数据，如上所述，对于毒素 B 的类毒素化，认为 13 天培养时间是最佳的。

[0055] 规模分析

使用鉴定的最佳的类毒素化条件，以较大规模（1/10 开始规模（200L 发酵））产生类毒素；也就是，使用以下条件使毒素 A 和毒素 B 灭活：A 的类毒素化：0.5 mg/mL 毒素 A，0.21%（w/v）甲醛，25°C，在 100 mM NaPO₄（pH 7）中 6 天；和，B 的类毒素化：0.5 mg/mL 毒素 B，0.42%（w/v）甲醛，25°C，在 100 mM NaPO₄（pH 7）中 13 天。使用在反应期间在各种时间段取出的类毒素样品，评价类毒素化反应的动力学。与以小规模产生的类毒素相比，该类毒素具有相同的动力学细胞毒性特性，在反应的第 2 天观察到细胞毒性丧失。此外，类毒素具有与以小规模产生的类毒素类似的 AEX 特性和类似的胺改性（通过 TNBS 测定测量）。还通过仓鼠效力测定来评价由 1/10 规模类毒素化反应产生的类毒素的免疫原性。与以小规模产生的类毒素一样，类毒素得到平均 IgG 滴度反应为 4.8 Log 或更高，并且提供与根据在实施例 1 中描述的过程制备的类毒素在统计学上同等的滴度反应。对由 1/10 规模类毒素得到的药物产物进行回复分析，并且与以小规模由相同的类毒素化条件得到的药物产物相比较。以 1/10 规模由类毒素得到的药物产物具有与以小规模得到的那些相同的回复特性，并且通过回复，即使在 0.004% 甲醛下。使用以较大规模（例如，使用 1000L 和 2000L 发酵培养物）产生的类毒素得到类似的结果。来自这些研究的数据显示类毒素化方法是可放大的。以大规模产生的类毒素具有与以小规模产生的那些相同的动力学细胞毒性特性、仓鼠效力和回复特性。关于再现性，毒素 A 和毒素 B 的类毒素化过程再现多于 6 次，并且分析显示批次间特性类似。

[0056] 免疫研究

实质上根据上述方法（例如，表 3 中的参数 22）制备经纯化的艰难梭菌类毒素 A 和艰难梭菌类毒素 B，并且配制作成疫苗组合物。类毒素 A 和 B 以 3:2 重量的比率组合，用包含蔗糖（4.0%-6.0% w/v）和甲醛（0.012%-0.020% w/v）的柠檬酸盐缓冲液配制，冻干。每一种组合物用以下描述的稀释剂重构，在作为疫苗使用前，加入氢氧化铝作为佐剂。叙利亚金色仓鼠提供艰难梭菌疫苗开发的严格的模式。在用单次腹膜内（IP）给予的克林霉素抗生素预处理之后，并且在接受胃内（IG）接种产生毒素的艰难梭菌生物体后，仓鼠快速发展暴发性腹泻和出血性盲肠炎，并且在 2-4 天内死亡（例如，未接种）。疫苗用稀释剂（包含 0.57% 氯化钠和 800 μg/mL 铝）重构。重构的疫苗含有 100 μg/剂量类毒素、0.008% 甲醛和 400 μg/剂量铝。使用不同剂量的艰难梭菌疫苗（人剂量（100 μg/剂量）（HD）的 4 种稀释物或注射安慰剂（AIOH），仓鼠（9 只仓鼠/组）接种三次肌肉免疫（在第 0 天、第 14 天和第 27 天）。在第 41 天，仓鼠用化学形式为克林霉素 -2- 磷酸盐的抗生素以 10mg/kg 通过 IP 途径预处理。在第 42 天，在用抗生素 28 小时预处理后，使用由艰难梭菌 ATCC43255 菌株得到的致死剂量的孢子制备物，通过 IG 途径攻击仓鼠。通过测量与艰难梭菌感染关联

的症状初现的动力学和致命性,评定保护效力。结果证明以剂量-依赖性方式,疫苗保护仓鼠免于使用艰难梭菌产生毒素的细菌的致死攻击,通过接种剂量 HD/20 诱导 100% 保护(在 100 μ g/mL A10H 存在下,5 μ g 类毒素 A+B) (图 3)。保护免疫的动物免于死亡和疾病(重量减轻和腹泻)。该研究的结果代表若干体内研究。因此,通过本文描述的方法制备的类毒素提供针对艰难梭菌疾病(有症状艰难梭菌感染)的保护性免疫。

[0057] 虽然根据优选的实施方案已描述某些实施方案,应理解的是,本领域技术人员可以想到变化和修改。因此,预期所附权利要求涵盖在以下权利要求范围内的所有这样的等同变化。

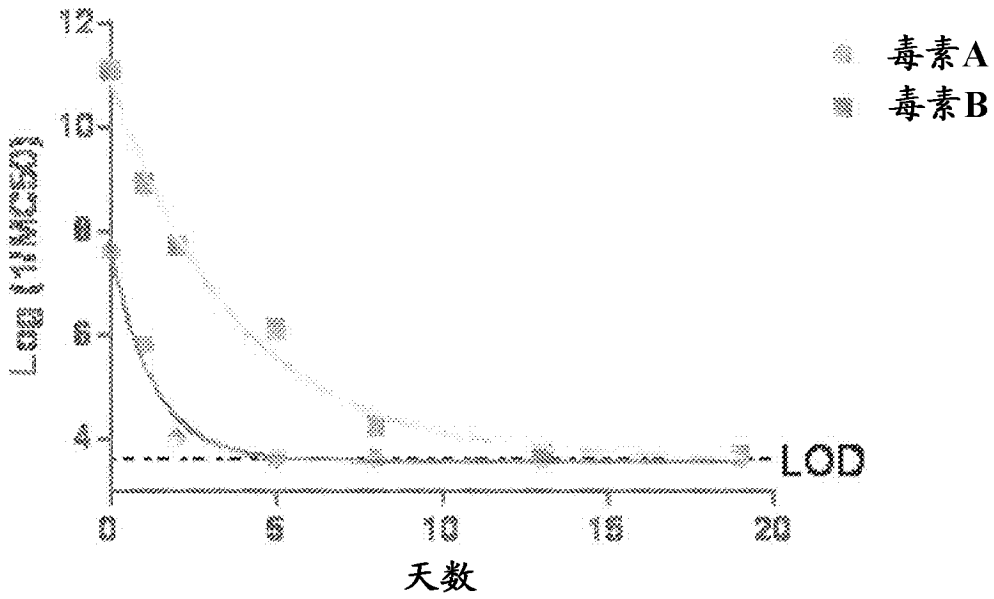


图 1

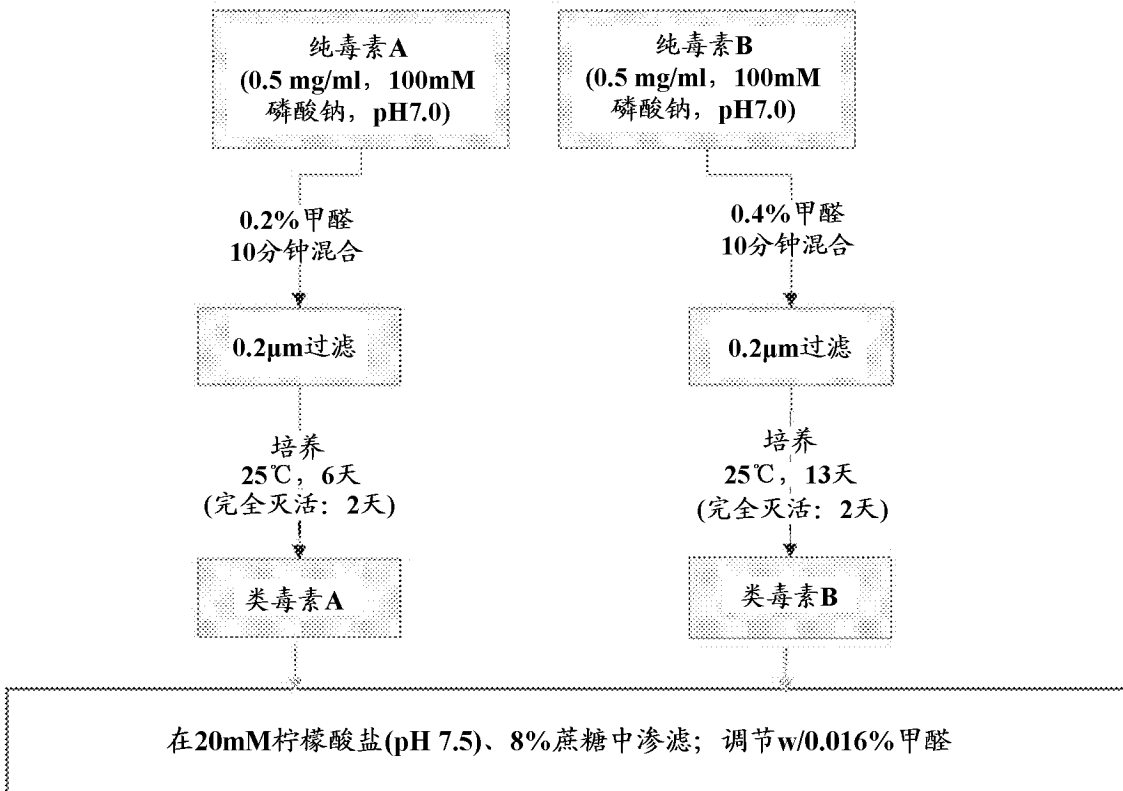


图 2

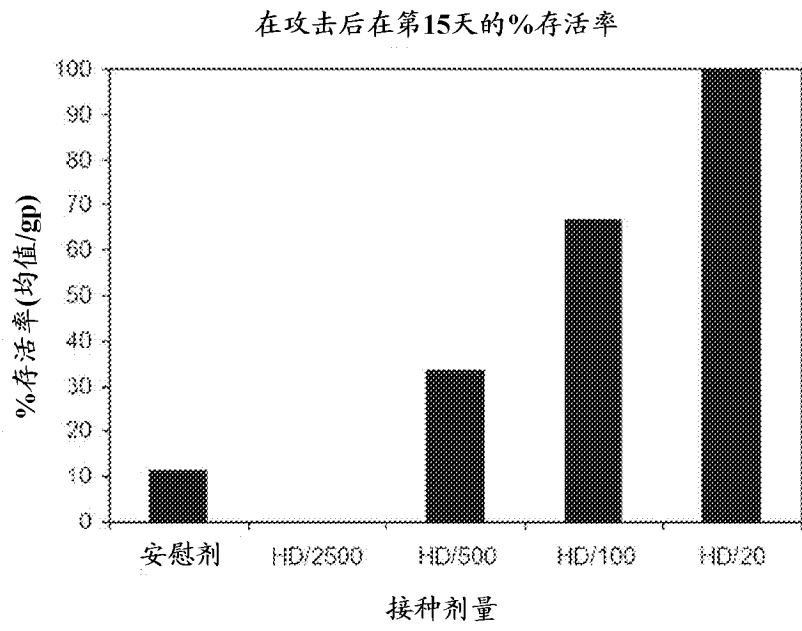


图 3