



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101896197 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 23

(21) 申请号 200880115518. 2

(22) 申请日 2008. 09. 11

(30) 优先权数据

60/971, 411 2007. 09. 11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CA2008/001593 2008. 09. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02009/033268 EN 2009. 03. 19

(73) 专利权人 圭尔夫大学

地址 加拿大安大略

(72) 发明人 M·A·蒙蒂罗 J·加内沙皮莱

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 张晓威

(56) 对比文件

CN 1518456 A, 2004. 08. 04, 说明书全文.

王思一. 艰难梭菌荚膜的研究. 《微生物学通报》. 1988, (第4期), 26-28页.

范子文等. 艰难梭菌荚膜致病作用的初步研究. 《中国微生态学杂志》. 1993, 第5卷(第4期), 18-21页.

范子文等. 艰难梭菌荚膜多糖单糖组成的气相色谱分析. 《微生物学通报》. 1994, 第21卷(第4期), 224-227页.

J. Ganeshapillai 等. Clostridium difficile Cell-Surface Polysaccharides: Towards a Carbohydrate-Based Vaccine. 《Abstracts of The General Meeting of American Society for Microbiology》. 2007, 第107卷第232页第三栏第7-13行.

审查员 冯娟

(51) Int. Cl.

A61K 39/08 (2006. 01)

A61P 1/12 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

C08B 37/00 (2006. 01)

C08L 5/00 (2006. 01)

C12P 19/04 (2006. 01)

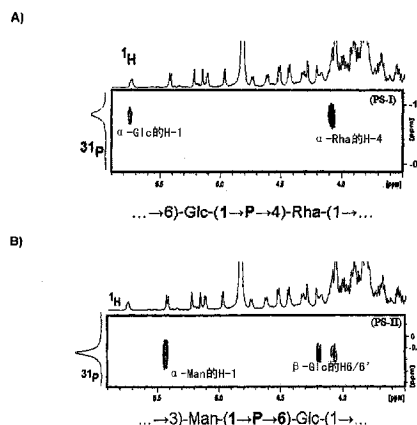
权利要求书3页 说明书19页 附图8页

(54) 发明名称

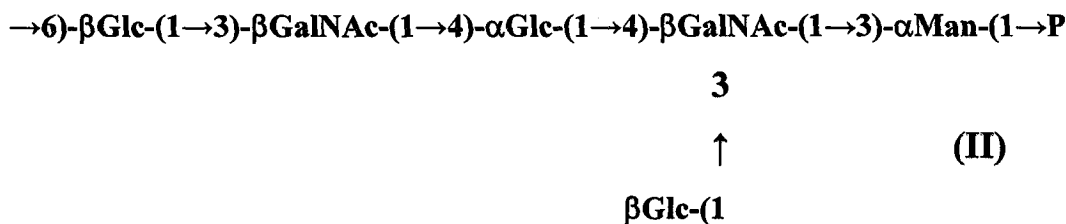
来自艰难梭菌的新型多糖免疫原

(57) 摘要

本申请涉及艰难梭菌 (Clostridium difficile) 细胞表面多糖、包含艰难梭菌细胞表面多糖的组合物, 并且本申请包括它们的药盒、方法和用途。

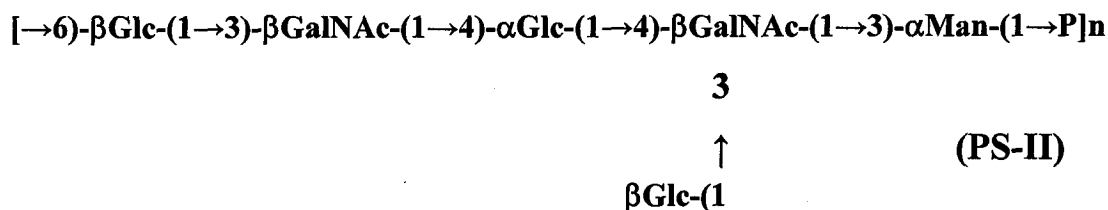


1. 分离的免疫原性艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 细胞表面多糖,其包含式 (II) 的重复的六糖单位:



其中, Glc 是葡萄糖, GalNAc 是 N-乙酰半乳糖胺, P 是糖基磷酸酯, 且 Man 是甘露糖。

2. 权利要求 1 的细胞表面多糖, 其中所述多糖是式 (PS-II) 的化合物:



其中,n 是 1-1000 的整数,Glc 是葡萄糖,GalNAc 是 N- 乙酰半乳糖胺,P 是糖基磷酸酯,且 Man 是甘露糖。

3. 权利要求 1 的细胞表面多糖,其中所述葡萄糖、N- 乙酰半乳糖胺和甘露糖以吡喃糖构象存在。

4. 权利要求 2 的细胞表面多糖,其中所述葡萄糖、N- 乙酰半乳糖胺和甘露糖以吡喃糖构象存在。

5. 权利要求 2 的细胞表面多糖, 其中 n 是 1-100 的整数。

6. 权利要求 2 的细胞表面多糖, 其中 n 是 2-100 的整数。

7. 权利要求 2 的细胞表面多糖, 其中 n 是 25-100 的整数。

8. 权利要求 1-7 中任意一项的细胞表面多糖,其中所述多糖在其共价化学结构中包含甘油、糖醇磷酸酯、葡萄糖和 N- 乙酰葡萄糖胺。

9. 权利要求 1-7 中任意一项的细胞表面多糖,其中所述多糖与载体分子缀合。

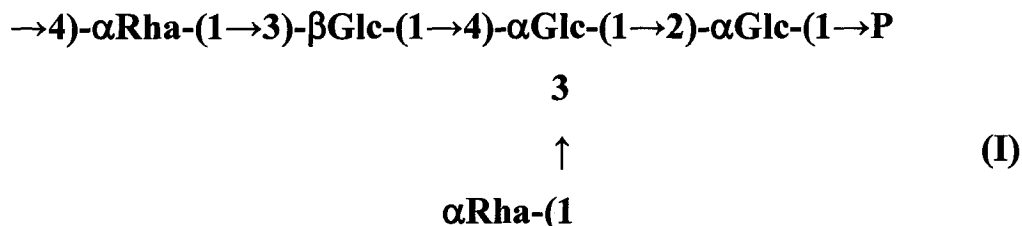
10. 权利要求 9 的细胞表面多糖,其中所述载体分子是 BSA、CRM₁₉₇、MIEP、白喉类毒素、破伤风类毒素或得自博德特菌属的蛋白质。

11. 权利要求 1-7 中任意一项的细胞表面多糖,其如下获得:使艰难梭菌细菌在适当的培养基中生长,分离细菌细胞与所述培养基,通过在使细胞表面多糖从细胞表面物质断裂的条件下进行弱酸处理来提取所述多糖,并且纯化提取的细胞表面多糖。

12. 细胞表面多糖混合物,其包含:

(a) 权利要求 1-7 中任意一项定义的多糖, 和

(b) 包含式 (I) 的重复的五糖单位的细胞表面多糖：



30. 权利要求 1-11 中任意一项的细胞表面多糖或权利要求 12-18 中任意一项的细胞表面多糖混合物用于制备治疗或预防个体的艰难梭菌相关的腹泻的药物的用途。

31. 权利要求 19-22 中任意一项的免疫原性组合物用于制备诱导个体的抗艰难梭菌免疫应答的药物的用途。

32. 权利要求 19-22 中任意一项的免疫原性组合物用于制备治疗或预防个体的艰难梭菌感染的药物的用途。

33. 权利要求 19-22 中任意一项的免疫原性组合物用于制备治疗或预防个体的艰难梭菌相关的腹泻的药物的用途。

34. 权利要求 23-26 中任意一项的疫苗组合物用于制备诱导个体的抗艰难梭菌免疫应答的药物的用途。

35. 权利要求 23-26 中任意一项的疫苗组合物用于制备治疗或预防个体的艰难梭菌感染的药物的用途。

36. 权利要求 23-26 中任意一项的疫苗组合物用于制备治疗或预防个体的艰难梭菌相关的腹泻的药物的用途。

37. 权利要求 28-36 中任意一项的用途,其中所述个体是猪、马、牛或人类。

来自艰难梭菌的新型多糖免疫原

[0001] 本申请涉及新型免疫原性细胞表面多糖及其方法和用途。

[0002] 发明背景

[0003] 艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 是一种革兰氏阳性细菌, 已知它是肠道疾病的病因。它是抗生素相关性腹泻和假膜性结肠炎的主要病因 (Knoop, F. C. ;Owens, M. ; Crocker, I. C. ;Clin. Microbiol. Rev. 6, 1993, 251-265)。与艰难梭菌相关的暴发流行的频率和严重性近年来有所增加 (Pepin, J. ;Valiquette, L. ;Alary, M. E. ;Villemure, P. ; Pelletier, A. ;Forget, K. ;Pepin, K. ;Chouinard, D. ;JAMC. 171, 2004, 466-472)。大多数被摄入的有生长力的艰难梭菌细胞都被胃中存在的酸性环境杀死。然而, 孢子能幸免于死, 并且在暴露于胆汁酸后, 可以在小肠中萌发。由于药物治疗诸如抗生素的使用和化学疗法而造成的肠道中正常微生物细胞水平的降低可使艰难梭菌繁殖。

[0004] 在人类中, 艰难梭菌相关的腹泻 (CDAD) 是医院相关性腹泻和抗菌剂相关性腹泻最常见的诊断病因。传统上, 老年患者和已接受住院治疗、胃肠道外科手术或接触抗生素的患者罹患 CDAD 的风险较高。在美国, 估计的艰难梭菌相关的疾病的病例数量每年超过 250, 000 (Wikkins TD 和 LyerlyDM, 2003, J. Clin Hosp Infect. 48 :81), 全部的附加卫生保健费用接近每年十亿美元 (Kyne L 等人, 2002, Clin Infect Dis 34 :346-353)。

[0005] 在过去五年中, 已经观察到 CDAD 发病率出乎意料地增加。这还涉及较高比率的严重 CDAD、治疗失败和死亡。在年轻患者和无传统风险因素的患者中, 更频繁地鉴定出重症患者。大部分这种变化与称为核糖核酸型 (ribotype) 027 (也称为北美去氧核糖核酸型 (pulsotype) 1 (NAP1) 和 BI) 的暴发克隆的世界性传播有关。艰难梭菌的预防基于患者隔离、改进卫生设施、改进感染控制和抗菌剂限制, 所有这些都涉及高的医疗保健费用。此外, 抗生素的预防性使用已经用于预防感染; 然而, 这导致疾病的发病率增加。由于对甲硝唑 (主要的第一线治疗药物) 的反应正在变得不可预知, 艰难梭菌感染的治疗也成问题。万古霉素 (替代的选择) 很昂贵并且它的使用引起有关出现抗万古霉素肠球菌和其它抗万古霉素生物体的忧虑。

[0006] CDAD 在许多动物物种诸如马和猪中也是重要的问题。它还可以成为其它物种的病因。有一个担忧是, 艰难梭菌可以从动物传播到人, 因为从动物分离出的艰难梭菌的类型经常与在人中发现的类型相同, 包括暴发菌株核糖核酸型 027。根据在零售肉样品中发现艰难梭菌, 这种担忧已经加剧。

[0007] 报导的 CDAD 在增加的发病率、其再发率及其对发病率和死亡率的影响, 以及有关治疗和为限制其传播而进行的适当的隔离操作的费用, 使得对有效的 CDAD 预防方法的需要变得清晰。

[0008] 一个称为核糖核酸型 027 或 NAP1 的具体菌株, 已经成为国际上散发和流行病的重要病因。已经报导了具有高发病率、高死亡率、治疗反应性差、高复发率的严重暴发流行。该菌株产生 3 种主要毒素: 毒素 A、毒素 B 和 CDT (二元毒素)。它还缺失号称的毒素调节基因, 该缺失似乎至少在体外增加了毒素的产生 (Just, I. ;Selzer, J. ;Wilm, M. ;von Eichel-Streiber, C. ;Mann, M. ;Aktories, K. ;Nature. 375, 1995, 500-5033)。人们发现, 该

[0034]

3

[0035]

↑

(PS-II)

[0036]

β Glc-(1

[0037] 其中, n 是 1-1000 的整数, Glc 是葡萄糖, GalNAc 是 N- 乙酰半乳糖胺, P 是糖基磷酸酯, 且 Man 是甘露糖或其免疫原性片段。

[0038] 在另一个实施方案中, 所述细胞表面多糖是式 PS-III 的化合物, 所述化合物在其共价化学结构中包含甘油 (Gro)、糖醇磷酸酯 (P)、葡萄糖 (Glc)、N- 乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc)。

[0039] 本申请的另一个方面是艰难梭菌细胞表面多糖混合物, 其包含一种或多种艰难梭菌细胞表面多糖。

[0040] 本申请的另一个方面是免疫原性组合物, 其包含一种或多种艰难梭菌细胞表面多糖。

[0041] 本申请的再一个方面是疫苗组合物, 其包含一种或多种艰难梭菌细胞表面多糖。

[0042] 本申请的另一个方面是药盒, 其包含本文中公开的细胞表面多糖、或本文中公开的细胞表面多糖混合物、或本文中公开的免疫原性组合物、或本文中公开的疫苗组合物, 以及使用说明。

[0043] 本申请的另一个方面是诱导个体的抗艰难梭菌免疫应答的方法, 其通过向有此需要的个体给药有效量的本文中公开的细胞表面多糖或本文中公开的免疫原性组合物或本文中公开的疫苗组合物中的一种或多种来进行。

[0044] 本申请的再一个方面是治疗或预防个体的艰难梭菌感染的方法, 其通过向有此需要的个体给药有效量的本文中公开的细胞表面多糖或本文中公开的免疫原性组合物或本文中公开的疫苗组合物中的一种或多种来进行。

[0045] 本申请的另外一个方面是治疗或预防个体的艰难梭菌相关的腹泻的方法, 其通过向有此需要的个体给药有效量的本文中公开的细胞表面多糖或本文中公开的免疫原性组合物或本文中公开的疫苗组合物中的一种或多种来进行。

[0046] 本申请还公开了本文中公开的细胞表面多糖或本文中公开的细胞表面多糖混合物或本文中公开的免疫原性组合物或本文中公开的疫苗组合物诱导个体的抗艰难梭菌免疫应答、治疗或预防个体的艰难梭菌感染、和 / 或治疗或预防个体的艰难梭菌相关的腹泻的用途。

[0047] 本申请的再一个方面包括本文中公开的细胞表面多糖或本文中公开的细胞表面多糖混合物或本文中公开的免疫原性组合物或本文中公开的疫苗组合物用于制备诱导个体的抗艰难梭菌免疫应答、治疗或预防个体的艰难梭菌感染、和 / 或治疗或预防个体的艰难梭菌相关的腹泻的药物的用途。

[0048] 由以下的详细描述, 本申请的其它特征和优点会变得清晰。然而, 应该理解, 指示本发明的优选的实施方案的详细描述和具体实施例仅仅是通过举例说明的方式给出的, 因为, 由该详细描述, 在本发明的精神和范围内的各种改变和修改对于本领域的技术人员会变得明显。

[0049] 附图简述

[0050] 现在, 联系附图来说明本发明, 附图中:

[0051] 图1是艰难梭菌多糖PS-II的单糖连接类型分析(GC-MS分析图),其显示了PS-II中存在的糖连接类型。

[0052] 图2是(A)PS-I和(B)PS-II的¹H-NMR谱。

[0053] 图3是(A)艰难梭菌PS-I的¹H-¹H NOESY谱,其显示指示单糖单位的序列的NOE间连接性,和(B)显示PS-I重复糖嵌段的化学结构,说明由(A)中所示的¹H-¹H NOESY谱的数据得到的键和序列。

[0054] 图4显示:(A)¹H-³¹P-HMBC谱,其显示多糖PS-I中,糖基磷酸酯与2-连接的Glc的位置编号1的连接和磷酸糖酯与4-连接的Rha的位置编号4的连接;(B)¹H-³¹P-HMBC谱,其显示多糖PS-II中,糖基磷酸酯与3-连接的Man的位置编号1的连接和磷酸糖酯与6-连接的Glc的位置编号6的连接。

[0055] 图5是艰难梭菌多糖PS-II的脱去磷酸的重复的糖的MALDI-TOF质谱。

[0056] 图6显示重复的细胞表面多糖(A)PS-I和(B)PS-II的共价化学结构。

[0057] 图7显示艰难梭菌多糖PS-III的单糖组成分析(GC-MS图)。

[0058] 图8显示来自接种了艰难梭菌细胞表面多糖PS-I和PS-II的混合物的五只猪的斑点印迹血清学分析。

[0059] 发明详述

[0060] I. 定义

[0061] 如本文中使用的,术语“艰难梭菌”包括所有艰难梭菌的菌株,包括例如核糖核酸型027(也称为NAP1和BI)、核糖核酸型W(也称为NAP2)、MOH 900和MOH 718。

[0062] 如本文中使用的,术语“分离的”指当从生长的艰难梭菌菌株制备时,艰难梭菌细胞表面多糖基本上不含细菌细胞物质或提取溶剂。

[0063] 如本文中使用的,术语“艰难梭菌细胞表面多糖”包括从艰难梭菌的菌株分离的那些,也包括合成地制备的具有与本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖相同的结构和/或组成的多糖。“合成地制备的”包括例如由诸如重组DNA技术、基因敲除小鼠和/或化学合成之类的技术制备的细胞表面多糖。

[0064] 如本文中使用的,术语“共价化学结构”指其中所有基团都通过共价键连接的化合物的化学式。

[0065] 如本文中使用的,术语“其片段”指本文中公开的细胞表面多糖的保留了抗艰难梭菌的免疫原性活性的任意部分。所述片段可以包含一个或多个处于所述多糖的共价化学结构内的单糖(糖)或糖磷酸酯。所述片段是否保留免疫原性活性可以使用本领域已知的技术来确定。

[0066] 如本文中使用的,术语“免疫原性”指引起免疫应答的能力。

[0067] 如本文中使用的,术语“疫苗”指可预防艰难梭菌感染、治疗艰难梭菌感染和/或减少艰难梭菌的散发的组合物。

[0068] 术语“治疗有效量”、“有效量”或“足量”指当向所述个体(包括哺乳动物,例如人)给药时,足以达到所期望的结果的量,例如,实现引起个体的免疫应答的量。治疗的有效量可以根据诸如动物的病状、年龄、性别、体重之类的因素而变化。可以调节剂量或治疗方案,以便提供最佳的治疗反应。

[0069] 而且,以治疗有效量进行的个体的“治疗”方案可以由单次给药组成,或者替代地

包含一系列的施药。治疗期的长度取决于多种因素,诸如疾病的严重程度、患者的年龄、所述多糖的浓度和活性、或它们的组合。人们还会认识到,可以在具体的治疗或预防方案进行过程中增加或减少用于治疗或预防的化合物的有效剂量。通过本领域中已知的标准诊断测定,可以引起剂量的改变,并且剂量的改变变得明显。可以在接触细菌之前、之中或之后给药本公开的化合物。

[0070] 如本文中使用的,术语“体内生物相容形式”指其中疗效比任意毒性作用都重要的被给药的物质的形式。

[0071] 如本文中使用的,术语“引起免疫应答”或“诱导免疫应答”指启动、触发、造成、增强、促进或提高例如体液或细胞介导性质的免疫系统的任意应答。免疫应答的启动或增强可以使用本领域的技术人员已知的测定法来评估,所述测定法包括但不限于抗体测定法(例如 ELISA 测定法)、抗原特异性细胞毒性测定法和细胞因子的产生(例如 ELISPOT 测定法)。

[0072] 如本文中使用的,术语“个体”指动物界的任意成员,优选哺乳动物。在一个实施方案中,所述哺乳动物是狗、猫、仓鼠、小鼠、大鼠、猪、马、牛或人类。在另一个实施方案中,所述哺乳动物是猪、马、牛或人类。

[0073] 如本文中使用的、也是本领域充分理解的,“治疗”是用于获得有利的或期望的结果包括临床结果的方法。有利的或期望的临床结果可以包括但不限于:一种或多种症状或病症的减轻或改善、病变范围的减小、病状的稳定(即不恶化)、防止疾病的传播、延迟或减慢疾病进展、病状的改善或缓和、缓解(无论是部分的或是全部的),无论是可检测的或是不可检测的。“治疗”也可以指与如果不接受治疗所预期的相比延长存活。

[0074] “缓和”疾病或病症指病症或疾病状态的程度和/或不希望的临床表现减少,和/或进展的时间过程与不治疗所述病症相比减慢或延长。

[0075] 例如,短语“治疗或预防艰难梭菌感染”包括抑制艰难梭菌感染、预防艰难梭菌感染、减小艰难梭菌感染的严重性、抑制艰难梭菌定植、减少艰难梭菌的散发、防止艰难梭菌定植或改善与艰难梭菌感染相关的体征和症状,而且,短语“治疗或预防艰难梭菌相关的腹泻”包括抑制艰难梭菌相关的腹泻、预防艰难梭菌相关的腹泻、减小艰难梭菌相关的腹泻的严重性或改善与罹患艰难梭菌相关的腹泻有关的体征和症状。本申请还包括治疗或预防与艰难梭菌感染有关的任意疾病。

[0076] 在理解本申请的范围时,如本文中使用的,术语“包含”及其衍生词旨在是开放式的术语,该术语指定陈述的特征、元素、组分、基团、整数和/或步骤的存在,但是不排除其它未陈述的特征、元素、组分、基团、整数和/或步骤的存在。以上所述还应用于具有类似意义的词,诸如术语“包括”、“具有”和它们的衍生词。最后,如本文中使用的,程度术语诸如“基本上”、“约”和“近似”指被修饰的术语的合理量的偏差,以便最终的结果没有被显著地改变。这些程度术语应该解释为包括被修饰的术语的至少 $\pm 5\%$ 的偏差,如果这种偏差不否定它所修饰的词的意义的話。

[0077] II. 本申请的化合物和组合物

[0078] 如上所述,本申请描述了艰难梭菌细胞表面多糖的共价化学结构的分离和鉴定。这些新型多糖暴露在艰难梭菌的细胞表面上,而且可以用于免疫原性组合物、糖类系疫苗制剂和/或用作诊断标记。

[0079] 因此,本申请包括分离的免疫原性艰难梭菌细胞表面多糖。本申请还包括艰难梭菌细胞表面多糖混合物,其包含一种或多种艰难梭菌细胞表面多糖。

[0080] 本申请还包括免疫原性组合物,其包含一种或多种艰难梭菌细胞表面多糖。

[0081] 本申请还包括疫苗组合物,其包含一种或多种艰难梭菌细胞表面多糖。

[0082] 本申请描述了三种不同的细胞表面艰难梭菌细胞表面多糖的分离和鉴定。它们在本申请中被指定为 PS-I、PS-II 和 PS-III。

[0083] 使用化学分析和分析技术,诸如气相色谱法 (GC)、核磁共振 (NMR) 和质谱法 (MS),已经确定,PS-I 是通过磷酸二酯键连接的重复的五糖单位的聚合物,PS-II 是也通过磷酸二酯键连接的重复的六糖单位的聚合物。在一些制剂中,多糖 PS-II 可以包含额外的葡萄糖。具体地,发现 PS-I 是由糖基磷酸酯、鼠李糖和葡萄糖组成的支链的五糖基磷酸酯重复单位,发现 PS-II 是由葡萄糖、甘露糖、N-乙酰半乳糖胺和糖基磷酸酯组成的支链的六糖基磷酸酯重复单位,测定出 PS-III 由甘油、糖醇磷酸酯、葡萄糖和 N-乙酰葡萄糖胺组成。

[0084] 在实施方案中,所述细胞表面多糖从艰难梭菌细菌菌株分离获得,例如使艰难梭菌细菌在适当的培养基中生长,分离细菌细胞与所述培养基,通过在使细胞表面多糖从细胞表面物质断裂的条件下进行弱酸处理来提取所述多糖,并且纯化提取的细胞表面多糖。在进一步的实施方案中,所述弱酸是 0.1% -5% 的乙酸,适当地是 2% 的乙酸。在进一步的实施方案中,通过离心、尺寸排阻色谱和 / 或阴离子交换色谱来纯化或分离所述细胞表面多糖。

[0085] 在一个实施方案中,所述细胞表面多糖包含式 I 的重复的五糖单位:

[0086] $\rightarrow 4)-\alpha \text{ Rha}-(1 \rightarrow 3)-\beta \text{ Glc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow 2)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow \text{P}$

[0087]

3

[0088]

↑

(I)

[0089]

$\alpha \text{ Rha}-(1$

[0090] 其中,Rha 是鼠李糖,P 是糖基磷酸酯,且 Glc 是葡萄糖或其免疫原性片段。

[0091] 在另一个实施方案中,所述细胞表面多糖是式 PS-I 的化合物:

[0092] $[\rightarrow 4)-\alpha \text{ Rha}-(1 \rightarrow 3)-\beta \text{ Glc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow 2)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow \text{P})_n$

[0093]

3

[0094]

↑

(PS-I)

[0095]

$\alpha \text{ Rha}-(1$

[0096] 其中,n 是 1-1000 的整数,Rha 是鼠李糖,P 是糖基磷酸酯,且 Glc 是葡萄糖或其免疫原性片段。

[0097] 在一个实施方案中,PS-I 中的单糖鼠李糖和葡萄糖以吡喃糖构象存在。

[0098] 在另一个实施方案中,PS-I 中的 n 是 1-100、2-100、10-100 或 25-100 的整数。

[0099] 在另一个实施方案中,所述细胞表面多糖 (PS-I) 包含糖基磷酸酯、鼠李糖和葡萄糖。

[0100] 在另一个实施方案中,所述细胞表面多糖包含式 II 的重复的六糖单位:

[0101] $\rightarrow 6)-\beta \text{ Glc}-(1 \rightarrow 3)-\beta \text{ GalNAc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow 4)-\beta \text{ GalNAc}-(1 \rightarrow 3)-\alpha \text{ Man}-(1 \rightarrow \text{P}$

[0102]

3

[0103]

↑

(II)

[0104]

 β Glc-(1

[0105] 其中, Glc 是葡萄糖, GalNAc 是 N- 乙酰半乳糖胺, P 是糖基磷酸酯, 且 Man 是甘露糖或其免疫原性片段。

[0106] 在另一个实施方案中, 所述细胞表面多糖是式 PS-II 的化合物:

[0107] $[\rightarrow 6)-\beta \text{ Glc}-(1 \rightarrow 3)-\beta \text{ GalNAc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow 4)-\beta \text{ GalNAc}-(1 \rightarrow 3)-\alpha \text{ Man}-(1 \rightarrow \text{P})_n$

[0108]

3

[0109]

↑

(PS-II)

[0110]

 β Glc-(1

[0111] 其中, n 是 1-1000 的整数, Glc 是葡萄糖, GalNAc 是 N- 乙酰半乳糖胺, P 是糖基磷酸酯, 且 Man 是甘露糖或其免疫原性片段。

[0112] 在一个实施方案中, PS-II 中的单糖葡萄糖、N- 乙酰半乳糖胺和甘露糖以吡喃糖构象存在。

[0113] 在另一个实施方案中, PS-II 中的 n 是 1-100、2-100、10-100 或 25-100 的整数。

[0114] 在另一个实施方案中, 所述细胞表面多糖 (PS-II) 在其共价化学结构中包含葡萄糖、甘露糖、N- 乙酰半乳糖胺和糖基磷酸酯。

[0115] 在另一个实施方案中, 细胞表面多糖 (PS-III) 的共价化学结构包含甘油、糖醇磷酸酯、葡萄糖和 N- 乙酰葡萄糖胺。

[0116] 在另一个实施方案中, 细胞表面多糖 (PS-III) 的共价化学结构由甘油、糖醇磷酸酯、葡萄糖和 N- 乙酰葡萄糖胺组成。

[0117] 本申请的另一个方面是细胞表面多糖混合物, 其包含以下中的至少两种: a) 本文中公开的细胞表面多糖 PS-I; 或 b) 本文中公开的细胞表面多糖 PS-II; 或 c) 本文中公开的细胞表面多糖 PS-III; 其中所述细胞表面多糖混合物包含任意组合的、a)、b) 或 c) 中的细胞表面多糖中的至少两种。

[0118] 在一个实施方案中, 所述细胞表面多糖混合物包含: a) 本文中公开的细胞表面多糖 PS-I 和 b) 本文中公开的细胞表面多糖 PS-II。

[0119] 在另一个实施方案中, 本申请公开免疫原性组合物, 其包含一种或多种艰难梭菌细胞表面多糖、和药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或它们的混合物。

[0120] 在一个实施方案中, 所述免疫原性组合物含有包含式 I 的重复的五糖单位的细胞表面多糖:

[0121] $[\rightarrow 4)-\alpha \text{ Rha}-(1 \rightarrow 3)-\beta \text{ Glc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow 2)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow \text{P})_n$

[0122]

3

[0123]

↑

(I)

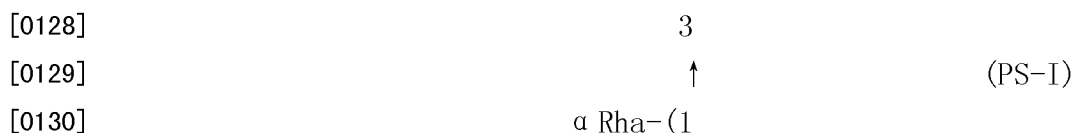
[0124]

 $\alpha \text{ Rha}-(1$

[0125] 其中, Rha 是鼠李糖, P 是糖基磷酸酯, 且 Glc 是葡萄糖或其免疫原性片段。

[0126] 在另一个实施方案中, 所述免疫原性组合物包含式 PS-I 的细胞表面多糖:

[0127] $[\rightarrow 4)-\alpha \text{ Rha}-(1 \rightarrow 3)-\beta \text{ Glc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow 2)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow \text{P})_n$



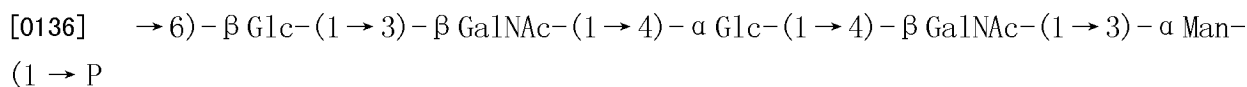
[0131] 其中, n 是 1-1000 的整数, Rha 是鼠李糖, P 是糖基磷酸酯, 且 Glc 是葡萄糖或其免疫原性片段。

[0132] 在一个实施方案中, PS-I 中的单糖鼠李糖和葡萄糖以吡喃糖构象存在。

[0133] 在另一个实施方案中, PS-I 中的 n 是 1-100、2-100、10-100 或 25-100 的整数。

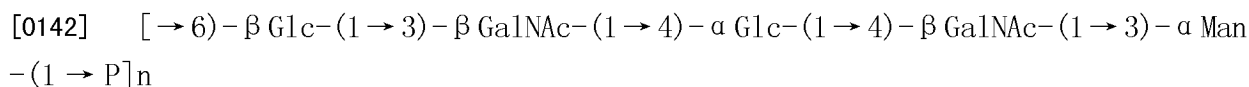
[0134] 在另一个实施方案中, 所述免疫原性组合物包含细胞表面多糖 (PS-I), 该细胞表面多糖在其共价化学结构中包含糖基磷酸酯、鼠李糖和葡萄糖。

[0135] 在另一个实施方案中, 所述免疫原性组合物含有包含式 (II) 的重复的六糖单位的细胞表面多糖:



[0140] 其中, Glc 是葡萄糖, GalNAc 是 N-乙酰半乳糖胺, P 是糖基磷酸酯, 且 Man 是甘露糖或其免疫原性片段。

[0141] 在另一个实施方案中, 所述免疫原性组合物包含式 PS-II 的细胞表面多糖:



[0146] 其中, n 是 1-1000 的整数, Glc 是葡萄糖, GalNAc 是 N-乙酰半乳糖胺, P 是糖基磷酸酯, 且 Man 是甘露糖或其免疫原性片段。

[0147] 在一个实施方案中, PS-II 中的单糖葡萄糖、N-乙酰半乳糖胺和甘露糖以吡喃糖构象存在。

[0148] 在另一个实施方案中, PS-II 中的 n 是 1-100、2-100、10-100 或 25-100 的整数。

[0149] 在另一个实施方案中, 所述免疫原性组合物包含细胞表面多糖 (PS-II), 该细胞表面多糖在其共价化学结构中包含葡萄糖、甘露糖、N-乙酰半乳糖胺和糖基磷酸酯。

[0150] 在另一个实施方案中, 所述免疫原性组合物包含细胞表面多糖 (PS-III), 该细胞表面多糖在其共价化学结构中包含甘油、糖醇磷酸酯、葡萄糖和 N-乙酰葡萄糖胺。

[0151] 在另一个实施方案中, 所述免疫原性组合物包含细胞表面多糖 (PS-III), 该细胞表面多糖由其共价化学结构中的甘油、糖醇磷酸酯、葡萄糖和 N-乙酰葡萄糖胺组成。

[0152] 本申请的另一个方面是免疫原性组合物, 其包含以下中的至少两种的混合物: a) 本文中公开的包含细胞表面多糖 PS-I 的免疫原性组合物; 或 b) 本文中公开的包含细胞表面多糖 PS-II 的免疫原性组合物; 或 c) 本文中公开的包含细胞表面多糖 PS-III 的免疫原性组合物; 其中所述免疫原性组合物混合物包含任意组合的、a)、b) 或 c) 中的免疫原性组

合物中的至少两种。

[0153] 本申请的另一个方面是免疫原性组合物,其包含细胞表面多糖混合物,所述混合物包含以下中的至少两种:a)本文中公开的细胞表面多糖 PS-I ;或 b) 本文中公开的细胞表面多糖 PS-II ;或 c) 本文中公开的细胞表面多糖 PS-III ;其中所述免疫原性组合物包含任意组合的、a)、b) 或 c) 中的细胞表面多糖中的至少两种。

[0154] 在本申请的一个实施方案中,免疫原性组合物包含细胞表面多糖混合物,所述混合物包含:a) 本文中公开的细胞表面多糖 PS-I 和 b) 本文中公开的细胞表面多糖 PS-II。

[0155] 在另一个实施方案中,本申请公开疫苗组合物,其包含一种或多种艰难梭菌细胞表面多糖、和药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或它们的混合物。

[0156] 在一个实施方案中,所述疫苗组合物含有包含式 I 的重复的五糖单位的细胞表面多糖:

[0157] $[\rightarrow 4)-\alpha \text{ Rha}-(1 \rightarrow 3)-\beta \text{ Glc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow 2)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow P$

[0158]

3

[0159]

↑

(I)

[0160]

$\alpha \text{ Rha}-(1$

[0161] 其中,Rha 是鼠李糖,P 是糖基磷酸酯,且 Glc 是葡萄糖或其免疫原性片段。

[0162] 在另一个实施方案中,所述疫苗组合物包含式 PS-I 的细胞表面多糖:

[0163] $[\rightarrow 4)-\alpha \text{ Rha}-(1 \rightarrow 3)-\beta \text{ Glc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow 2)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow P]_n$

[0164]

3

[0165]

↑

(PS-I)

[0166]

$\alpha \text{ Rha}-(1$

[0167] 其中,n 是 1-1000 的整数,Rha 是鼠李糖,P 是糖基磷酸酯,且 Glc 是葡萄糖或其免疫原性片段。

[0168] 在一个实施方案中,PS-I 中的单糖鼠李糖和葡萄糖以吡喃糖构象存在。

[0169] 在另一个实施方案中,PS-I 中的 n 是 1-100、2-100、10-100 或 25-100 的整数。

[0170] 在另一个实施方案中,所述疫苗组合物包含细胞表面多糖 (PS-I),该细胞表面多糖在其共价化学结构中包含糖基磷酸酯、鼠李糖和葡萄糖。

[0171] 在另一个实施方案中,所述疫苗组合物含有包含式 II 的重复的六糖单位的细胞表面多糖:

[0172] $\rightarrow 6)-\beta \text{ Glc}-(1 \rightarrow 3)-\beta \text{ GalNAc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow 4)-\beta \text{ GalNAc}-(1 \rightarrow 3)-\alpha \text{ Man}-(1 \rightarrow P$

[0173]

3

[0174]

↑

(II)

[0175]

$\beta \text{ Glc}-(1$

[0176] 其中,Glc 是葡萄糖,GalNAc 是 N-乙酰半乳糖胺,P 是糖基磷酸酯,且 Man 是甘露糖或其免疫原性片段。

[0177] 在另一个实施方案中,所述疫苗组合物包含式 PS-II 的细胞表面多糖:

[0178] $[\rightarrow 6)-\beta \text{ Glc}-(1 \rightarrow 3)-\beta \text{ GalNAc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow 4)-\beta \text{ GalNAc}-(1 \rightarrow 3)-\alpha \text{ Man}$

-(1 → P]_n

[0179]

3

[0180]

↑

(PS-II)

[0181]

β Glc-(1

[0182] 其中, n 是 1-1000 的整数, Glc 是葡萄糖, GalNAc 是 N- 乙酰半乳糖胺, P 是糖基磷酸酯, 且 Man 是甘露糖或其免疫原性片段。

[0183] 在一个实施方案中, PS-II 中的单糖葡萄糖、N- 乙酰半乳糖胺和甘露糖以吡喃糖构象存在。

[0184] 在另一个实施方案中, PS-II 中的 n 是 1-100、2-100、10-100 或 25-100 的整数。

[0185] 在另一个实施方案中, 所述疫苗组合物包含细胞表面多糖 (PS-II), 该细胞表面多糖在其共价化学结构中包含葡萄糖、甘露糖、N- 乙酰半乳糖胺和糖基磷酸酯。

[0186] 在另一个实施方案中, 所述疫苗组合物包含细胞表面多糖 (PS-III), 该细胞表面多糖在其共价化学结构中包含甘油、糖醇磷酸酯、葡萄糖和 N- 乙酰葡萄糖胺。

[0187] 在另一个实施方案中, 所述疫苗组合物包含细胞表面多糖 (PS-III), 该细胞表面多糖由其共价化学结构中的甘油、糖醇磷酸酯、葡萄糖和 N- 乙酰葡萄糖胺组成。

[0188] 本申请的另一个方面是疫苗组合物, 其包含以下中的至少两种的混合物: a) 本文中公开的包含细胞表面多糖 PS-I 的疫苗组合物; 或 b) 本文中公开的包含细胞表面多糖 PS-II 的疫苗组合物; 或 c) 本文中公开的包含细胞表面多糖 PS-III 的疫苗组合物; 其中所述疫苗组合物混合物包含任意组合的、a)、b) 或 c) 中的疫苗组合物中的至少两种。

[0189] 本申请的另一个方面是疫苗组合物, 其包含细胞表面多糖混合物, 所述混合物包含以下中的至少两种: a) 本文中公开的细胞表面多糖 PS-I; 或 b) 本文中公开的细胞表面多糖 PS-II; 或 c) 本文中公开的细胞表面多糖 PS-III; 其中所述疫苗组合物包含任意组合的、a)、b) 或 c) 中的细胞表面多糖中的至少两种。

[0190] 在本申请的一个实施方案中, 疫苗组合物包含细胞表面多糖的混合物, 所述混合物包含: a) 本文中公开的细胞表面多糖 PS-I 和 b) 本文中公开的细胞表面多糖 PS-II。

[0191] 已知糖缀合物疫苗增强糖类的免疫原性。因此, 通过使艰难梭菌细胞表面多糖与载体分子偶联, 可以使糖类系疫苗的免疫原性应答最大化。

[0192] 因此, 在本申请的另一个实施方案中, 包括与载体分子缀合的、本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种。

[0193] 在另一个实施方案中, 包含式 I 的重复的五糖单位的细胞表面多糖与载体分子缀合。在另一个实施方案中, 所述细胞表面多糖 PS-I 与载体分子缀合。在另一个实施方案中, 包含式 II 的重复的六糖单位的细胞表面多糖与载体分子缀合。在另一个实施方案中, 所述细胞表面多糖 PS-II 与载体分子缀合。在另一个实施方案中, 所述细胞表面多糖 PS-III 与载体分子缀合。

[0194] 本申请的另一个实施方案是免疫原性组合物, 其包含与载体分子缀合的、本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种。

[0195] 本申请的进一步的实施方案是疫苗组合物, 其包含与载体分子缀合的、本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种。

[0196] 在一个实施方案中,所述载体分子是蛋白质。在另一个实施方案中,所述载体分子是牛血清白蛋白(BSA)。在另一个实施方案中,所述载体分子是可交叉反应的物质例如 CRM₁₉₇。CRM₁₉₇是无毒性形式的白喉毒素,它已经被成功地用于肺炎球菌结合疫苗(Anderson, P. W., 1983, Infect. Immun. 39:233-238)。在另一个实施方案中,所述载体分子是 MIEP(主要的免疫增强蛋白)。MIEP 可以得自 B 型脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)和其它 B 型脑膜炎球菌的外膜复合物(Merck)。在另一个实施方案中,所述载体分子是白喉类毒素。在进一步的实施方案中,所述载体分子是破伤风类毒素。在另一个实施方案中,所述载体分子是源自博德特菌属(*Bordetella*)的蛋白质。

[0197] 可以使用已知的方法使所述载体分子与所述细胞表面多糖连接。例如,通过所述糖上可用的羟基或羧基和所述蛋白质上的羧基或胺基之间的酯键或酰胺键。

[0198] 以前已经报导了其它载体分子和它们的连接方法(见例如美国专利 4,673,574,其内容通过引用结合与此)。

[0199] 无论免疫剂(即本申请中公开的艰难梭菌细胞表面多糖、或包含所述艰难梭菌细胞表面多糖的免疫原性组合物、或包含所述艰难梭菌细胞表面多糖的疫苗组合物)的给药形式如何,与免疫刺激组分诸如佐剂联合免疫(co-immunize)都可以明显地改善免疫原性。佐剂增强免疫原的免疫原性,但是它们本身不一定是免疫原性的。佐剂可以通过使免疫原局部地保留在给药部位附近以产生贮库效应(depot effect)来发挥作用,所述贮库效应有利于缓慢地持续地将免疫原释放至免疫系统的细胞。佐剂还可以将免疫系统细胞吸引至免疫原贮库并刺激这些细胞引发免疫应答。因此,本申请的实施方案包括组合物,包括例如还包含佐剂的免疫原性组合物、疫苗组合物或药物组合物。

[0200] 本申请的另一个方面是免疫原性组合物,其包含本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种和免疫刺激组分诸如佐剂。

[0201] 本申请的另一个方面是疫苗组合物,其包含本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种和免疫刺激组分诸如佐剂。

[0202] 佐剂被用于促进宿主对例如疫苗的免疫应答已经有许多年。内源性佐剂(Intrinsic adjuvant)(诸如脂多糖)通常是用作疫苗的、灭活的或毒性减弱的细菌的组分。外源性佐剂(extrinsic adjuvant)是免疫调制剂,它们通常非共价地与抗原连接,并被配制以增强宿主的免疫应答。因此,已经鉴定了增强对肠胃外递送的抗原的免疫应答的佐剂。然而,这些佐剂中的某些是有毒的并且可造成不期望的副作用,这使得它们不适合用于人类和许多动物。的确,仅仅氢氧化铝和磷酸铝(一般共同称为明矾)常规地作为佐剂用于人和兽医疫苗。明矾在增强对白喉破伤风类毒素的抗体应答中的效力已充分确定。

[0203] 很多种外源性佐剂能刺激有效的对免疫原的免疫应答。这些包括与膜蛋白质抗原复合的皂苷(免疫刺激复合物)、pluronic 聚合物与矿物油、灭活的分枝杆菌与矿物油、弗氏完全佐剂、细菌产物诸如胞壁酰二肽(MDP)和脂多糖(LPS)、以及脂质 A 和脂质体。

[0204] 在本申请的一个方面,可用于本文所述的任意实施方案的佐剂如下。用于肠胃外免疫的佐剂包括铝化合物(诸如氢氧化铝、磷酸铝和羟基磷酸铝)。根据标准规程,可以用所述铝化合物使抗原沉淀,或者使抗原吸附到所述铝化合物上。其它佐剂诸如 RIBI(ImmunoChem, Hamilton, MT)也可以用于肠胃外给药。

[0205] 用于粘膜免疫的佐剂包括细菌毒素(例如霍乱毒素(CT))、大肠杆菌(*E. coli*)不

耐热毒素 (LT)、艰难梭菌毒素 A 和百日咳毒素 (PT)、或者它们的组合、亚单位、类毒素或突变体。例如,可以使用天然霍乱毒素亚单位 B (CTB) 的精制制剂。任何这些毒素的片段、同系物、衍生物和融合物 (fusion) 也是适合的,条件是它们保留佐剂活性。优选地,使用毒性减小的突变体。适合的突变体已有描述 (例如在 WO 95/17211 (Arg-7-Lys CT 突变体)、WO96/6627 (Arg-192-Gly LT 突变体) 和 WO 95/34323 (Arg-9-Lys 和 Glu-129-GlyPT 突变体) 中)。可以用于本文中公开的方法和组合物的其它 LT 突变体包括例如 Ser-63-Lys、Ala-69-Gly、Glu-110-Asp 和 Glu-112-Asp 突变体。其它佐剂 (诸如各种来源 (例如大肠杆菌、明尼苏达沙门菌 (*Salmonellaminnesota*)、鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*) 或弗氏志贺菌 (*Shigella flexneri*)) 的细菌单磷酸脂质 A (MPLA)、皂苷、聚乳酸聚乙醇酸共聚物 (polylactide glycolide, PLGA) 微球体) 也可以用于粘膜给药。

[0206] 用于粘膜和肠胃外免疫的佐剂包括聚磷腈 (例如 WO 95/2415)、DC- 胆固醇 (3b-(N-(N', N' - 二甲基氨基甲烷)- 氨基甲酰) 胆固醇 (例如美国专利 5, 283, 185 和 WO 96/14831) 和 QS-21 (例如 WO 88/9336)。

[0207] 通过本领域的技术人员已知的任意常规途径,用组合物包括例如包含本申请中公开的艰难梭菌细胞表面多糖的免疫原性组合物、疫苗组合物或药物组合物可以使个体免疫。这可以包括例如通过粘膜 (例如眼睛、鼻内、口腔、胃、肺、肠、直肠、阴道或泌尿道) 表面、通过肠胃外 (例如皮下、皮内、肌内、静脉内或腹膜内) 途径或经结节 (intranodally) 进行免疫。优选的途径取决于免疫原的选择,本领域的技术人员对此很清楚。可以单剂量完成给药或间隔地重复给药。适当的剂量取决于各种参数,诸如免疫原本身 (即多肽对核酸 (更具体地,免疫原的类型)、给药途径和将被接种的动物的情况 (体重、年龄等),这些参数是技术人员都理解的。

[0208] 本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖或免疫原性组合物或疫苗组合物可以通过本领域已知的用于制备可以向个体给药的药学上可接受的组合物的方法来制备,如此,有效量的活性物质与药学上可接受的媒介物 (vehicle) 在混合物中结合。例如在 Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 20 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA, 2000) 中描述了合适的媒介物。在此基础上,所述组合物包括但不限于与一种或多种药学上可接受的媒介物或稀释剂结合并且被包含在具有合适的 pH 并且与生理溶液等渗的缓冲溶液中的物质的溶液剂。

[0209] 药物组合物包括但不限于冻干粉或者水性或非水性的无菌可注射溶液剂或混悬剂,它们还可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质,所述溶质使得所述组合物基本上与预定接受者的组织或血液相容。可以存在于这样的组合物中的其它组分包括例如水、表面活性剂 (诸如吐温)、醇类、多元醇、甘油和植物油。可以由无菌粉剂、颗粒剂、片剂或者浓缩溶液剂或混悬剂来制备临时的注射溶液剂或混悬剂。所述药物组合物可以例如但非限制地作为冻干粉来提供,所述冻干粉在向患者给药之前用无菌水或盐水重新溶解 (reconstituted)。

[0210] 组合物,包括例如本申请的免疫原性组合物、疫苗组合物或药物组合物,可以包含药学上可接受的载体。合适的药学上可接受的载体包括基本上化学惰性的和无毒的、不会妨碍所述药物组合物的生物活性的效力的组合物。合适的药物载体的例子包括但不限于水、盐水溶液、甘油溶液、乙醇、N-(1(2,3- 二油氧基) 丙基) N,N,N- 三甲基氯化铵 (DOTMA)、

二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和脂质体。这样的组合物应该包含治疗有效量的所述化合物以及适当量的载体,以便提供用于直接向患者给药的形式。

[0211] 所述组合物可以是药学上可接受的盐的形式,所述盐包括但不限于与游离氨基形成的那些(诸如得自氢氯酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸的那些),和与游离羧基形成的那些(诸如得自氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些)。

[0212] 本申请中公开的组合物可以例如通过肠胃外、静脉内、皮下、肌内、颅内、眶内、眼、心室内、囊内、椎管内、脑池内、腹膜内、鼻内、气雾剂或口腔给药来给药。

[0213] 因此,本申请的另一个实施方案是包含与合适的赋形剂、稀释剂、载体、缓冲剂或稳定剂混合的有效量的本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖的药物组合物。

[0214] 在合适的实施方案中,所述药物组合物适于以体内生物相容的形式向个体给药。

[0215] 本申请的另一个方面是药盒,其包含本文中公开的细胞表面多糖、或本文中公开的细胞表面多糖混合物、或本文中公开的免疫原性组合物、或本文中公开的疫苗组合物、或本文中公开的药物组合物,以及它们的使用说明。

[0216] 所述药盒还可以包括辅助因素(agent)。例如,所述药盒可以包括将本申请的免疫原性组合物注入个体的工具,诸如注射器;储存或运输所述免疫原性组合物的容器;和/或药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂或稳定剂。

[0217] III. 本申请的方法和用途

[0218] 本申请的另一个方面是诱导个体的抗艰难梭菌免疫应答的方法,其通过向所述个体给药有效量的本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种来进行。

[0219] 本申请的再一个方面是治疗或预防个体的艰难梭菌感染的方法,其通过向所述个体给药有效量的本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种来进行。

[0220] 本申请的另一个方面是治疗或预防个体的艰难梭菌相关的腹泻的方法,其通过向所述个体给药有效量的本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种来进行。

[0221] 本申请还公开本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种诱导个体的抗艰难梭菌免疫应答、治疗或预防个体的艰难梭菌感染和治疗或预防个体的艰难梭菌相关的腹泻的用途。

[0222] 本申请的其它方面包括本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种用于制备诱导个体的抗艰难梭菌免疫应答、治疗或预防艰难梭菌感染和治疗或预防艰难梭菌相关的腹泻的药物的用途。

[0223] 本申请的另一个方面是诱导个体的抗艰难梭菌免疫应答的方法,其通过向所述个体给药有效量的本文中公开的免疫原性组合物来进行,其中所述免疫原性组合物包含本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种。

[0224] 本申请的再一个方面是治疗或预防个体的艰难梭菌感染的方法,其通过向所述个体给药有效量的本文中公开的免疫原性组合物来进行,其中所述免疫原性组合物包含本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种。

[0225] 本申请的另一个方面是治疗或预防个体的艰难梭菌相关的腹泻的方法,其通过向所述个体给药有效量的本文中公开的免疫原性组合物来进行,其中所述免疫原性组合物包含本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种。

[0226] 本申请还公开本文中公开的免疫原性组合物诱导个体的抗艰难梭菌免疫应答、治疗或预防个体的艰难梭菌感染和治疗或预防个体的艰难梭菌相关的腹泻的用途,其中所述免疫原性组合物包含本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种。

[0227] 本申请的其它方面包括本文中公开的免疫原性组合物用于制备诱导个体的抗艰难梭菌免疫应答、治疗或预防艰难梭菌感染和治疗或预防艰难梭菌相关的腹泻的药物的用途,其中所述免疫原性组合物包含本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种。

[0228] 本申请的另一个方面是诱导个体的抗艰难梭菌免疫应答的方法,其通过向所述个体给药有效量的本文中公开的疫苗组合物来进行,其中所述疫苗组合物包含本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种。

[0229] 本申请的再一个方面是治疗或预防个体的艰难梭菌感染的方法,其通过向所述个体给药有效量的本文中公开的疫苗组合物来进行,其中所述疫苗组合物包含本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种。

[0230] 本申请的另一个方面是治疗或预防个体的艰难梭菌相关的腹泻的方法,其通过向所述个体给药有效量的本文中公开的疫苗组合物来进行,其中所述疫苗组合物包含本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种。

[0231] 本申请还公开本文中公开的疫苗组合物诱导个体的抗艰难梭菌免疫应答、治疗或预防个体的艰难梭菌感染和治疗或预防个体的艰难梭菌相关的腹泻的用途,其中所述疫苗组合物包含本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种。

[0232] 本申请的其它方面包括本文中公开的疫苗组合物用于制备诱导个体的抗艰难梭菌免疫应答、治疗或预防艰难梭菌感染和治疗或预防艰难梭菌相关的腹泻的药物的用途,其中所述疫苗组合物包含本文中公开的艰难梭菌细胞表面多糖中的一种或多种。

[0233] 本申请的方法和用途可适用于包括例如猪、马、牛或人类的个体。

[0234] 本申请还包括所述艰难梭菌细胞表面多糖作为艰难梭菌感染的诊断标记的方法和用途。例如,由于艰难梭菌核糖核酸型 027 独特地具有 PS-I, 所以其细胞物质中存在该多糖可指示样品中存在该核糖体型。所述样品可以来自人或动物个体或者来自食物或水、或者被怀疑感染艰难梭菌的其它物质。

[0235] 因此,本申请包括检测试样中的艰难梭菌的方法,其包括测定所述样品中存在本文中公开的分离的细胞表面多糖中的一种或多种。本申请还包括本文中公开的分离的细胞表面多糖中的一种或多种检测试样中的艰难梭菌的用途。

[0236] 本文中公开的分离的细胞表面多糖中的一种或多种的存在可以例如通过从所述样品中分离所述多糖并实施化学分析以确定所述多糖中存在的糖的身份 (identity) 来测定。此类化学分析可以包括 (i) 相应的糖醇乙酸酯的 GLC-MS、MS 和 NMR 波谱法中的一种或多种。

[0237] 以上公开概括地描述了本发明。通过参考以下具体的实施例,可以获得更完全的理解。描述这些实施例仅出于说明的目的,无意限制本发明的范围。当情况暗示或呈现便利时,考虑改变形式和用等同物替代。虽然本文中采用了特定的术语,但是,这些术语被寄予描述性意义而无限制的意图。

[0238] 以下非限制性的实施例是对本发明的说明。

[0239] IV. 实施例

[0240] 选择三种艰难梭菌菌株用于研究。已经显示,一个具体的菌株,称为核糖核酸型 027 或北美去氧核糖核酸型 1 (NAP1),是国际上散发病和流行病的重要病因。已经报导了具有高发病率、高死亡率、治疗反应性差、高复发率的严重暴发流行。该菌株产生三种主要毒素:毒素 A、毒素 B 和 CDT (二元毒素)。被研究的其它菌株是艰难梭菌 MOH 900 和艰难梭菌 MOH718,艰难梭菌 MOH 900 仅表达所述三种毒素中的两种(毒素 A 和 B),已发现其在加拿大更加流行;艰难梭菌 MOH 718 是不常见的毒素变异体,其具有编码毒素 B 的基因,但没有编码毒素 A 或 CDT 的基因。

[0241] 艰难梭菌是产芽孢细菌,其通过细胞表面多糖抵抗吞噬作用。鉴于疫苗开发,靶向细胞表面上的该暴露的糖链可能证明是有利的。因此,在尝试开发糖缀合物疫苗中,本申请说明了艰难梭菌细胞表面多糖的分离和表征,以便随后用于例如糖类系疫苗的制备。

[0242] 材料和方法:

[0243] 细菌生长和多糖的分离:该研究使用从罹患艰难梭菌相关的疾病的人得到的核糖核酸型 027 分离株。在所有情况下,于厌氧培养室中、37℃ 下使细胞在 CDMN 肉汤(艰难梭菌拉氧头孢诺氟沙星)中生长 24 小时,然后用磷酸盐缓冲盐水洗涤,通过离心分离并冻干。通过 2% 乙酸处理,选择性地从肽多糖中分裂出多糖,来从细菌细胞表面分离细胞表面多糖。多糖 PS-I 和 PS-II 得自水层,多糖 PS-III 得自团粒物质。而且,通过尺寸排阻色谱和阴离子交换层析实施随后的纯化步骤

[0244] 分析方法:使用 GLC-MS (Sawardeker, J. S. ;Sloneker, J. H. ;Jeanes, A. Anal. Chem. 1965, 37 (12), 1602-1604) 进行糖醇乙酸酯形式的糖组分的测定。用三氟乙酸水解样品,然后用硼氘化钠还原水解产物并用乙酸酐进行乙酰化。然后通过 GLC-MS 分析乙酰化的单糖衍生物。通过 NaOH-DMSO-碘甲烷程序 (Hakomori, S. ;J. Biochem (Tokyo). 1964, 55, 205-208 ;Lindberg, B. ;Methods Enzymol. 1972, 28, 178-195) 进行连接分析并且如上通过 GLC-MS 进行分析。通过 48% HF 处理来实现多糖的去磷酸化 (Kenne, L. ;Lindberg, S. ; Rahman, M. ;Mosihuzzaman, M. Carb Res. 1993, 247, 181-189)。

[0245] 质谱:使用芥子酸作为基质,进行基质辅助激光解吸电离飞行时间-质谱 (MALDI-TOF-MS)。

[0246] NMR 波谱分析:样品与氧化氘交换、冻干,然后溶解在 600 μ L D_2O 中。使用用于 2D 实验的标准脉冲序列于 298K 处记录波谱。

[0247] 猪接种艰难梭菌 CSP 的免疫原性:使用十头来自当地的猪经营渠道的母猪。研究中包括的所有母猪都是健康的,没有全身性疾病的体征,无早先对疫苗或其它肌肉内注射产生不良反应的记录,并且在之前的 30 天内无腹泻记录。这些猪被随机地分成两组(每组 $n = 5$)。在离计划的母猪分娩日期约 30 天时招入母猪。将溶解在无佐剂的盐水中的艰难梭菌细胞表面多糖 PS-I 和 PS-II 的混合物 (400ug/ 接种) 肌内给予组 1 的所有母猪。作为对照,对组 2 的母猪仅注射盐水。所有母猪在第一天接种一次(首次接种),第 8 天再接种一次(第二次接种)。记录接种的部位。在第一天,从眶下窦采集全血 (10ml)。前四个小时内,每小时监测母猪,然后每天两次,记录一般表现、体态、食欲、排尿、排便、体温、脉搏和呼吸频率。评估注射部位的炎症体征(肿胀、触痛)。在第 8 天和第 15 天重复采血。通过斑点印迹分析法,分析来自第 1、8、15 天的血清的免疫球蛋白 M (IgM) 对 PS-I 和 PS-II 的特异性。在斑点印迹试验中,结肠弯曲杆菌 (*Campylobacter coli*) 的全细胞制剂用作阳性对

照,BSA 用作阴性对照。用 HRP- 结合的 IgM(对于 PS-II 的稀释度为 1 : 5000,对于 PS-I/PS-II 的混合物的稀释度为 1 : 100) 在聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上进行斑点印迹分析。

[0248] 结果:

[0249] 使从艰难梭菌核糖核酸型 027 分离的水性多糖制备物接受尺寸排阻色谱。洗脱图显示,较早洗脱的流分 (fraction) 明显不同于较晚洗脱的流分。对一个较早的流分 (PS-I) 实施的单糖组成分析揭示了鼠李糖和葡萄糖残基的存在,然而,对较晚的流分 (PS-II) 实施的相同分析主要显示甘露糖和 N- 乙酰半乳糖胺残基。发现从艰难梭菌 MOH 900 和 MOH 718 分离出的水性多糖制备物仅含有多糖 PS-II。

[0250] 测定出存在于 PS-I 中的主要连接类型是末端 Rha[Rha-(1 →],2- 单取代的 Glc[→ 2)-Glc-(1 →],和 3- 单取代的 Glc[→ 3)-Glc-(1 →] 和 3,4- 二取代的 Glc[→ 3,4)-Glc-(1 →]。还发现 4- 单取代的 Rha[→ 4)-Rha-(1 →] 的痕迹。2-(S)- 和 2-(R)- 丁基手性糖苷的分析揭示 Glc 具有 D 型对映体构型, Rha 具有 L 型对映体构型。

[0251] 对 PS-II 实施的单糖组成分析显示 Glc、甘露糖 (Man) 和 N- 乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 的存在,但是在 PS-II 中还检测到少量 Rha。观察到所有单位都具有 D 型对映体构型。对 PS-II 实施的糖连接类型分析显示许多变化地连接的单糖单位。测定出存在于 PS-II 中的主要连接类型是作为主要单位的末端 Glc、4- 单取代的 Glc、3- 单取代的 Man、3- 单取代的 GalNAc 和 3,4- 二取代的 GalNAc。与 4- 单取代的 Glc 残基共同洗脱,在 PS-II 中还检测到痕量 6- 单取代的 Glc 的 m/z 离子特征 (m/z 189)。此外,在 PS-II 的连接类型分析中,还检测到少量的被发现存在于 PS-I 中的连接类型。图 1 显示得自艰难梭菌 MOH 900 的多糖 PS-II 的糖连接类型。

[0252] 通过阴离子交换层析纯化艰难梭菌核糖核酸型 027 的水性制备物也产生两种不同的多糖 (PS-I 和 PS-II)。PS-I 和 PS-II 的 ¹H-NMR 谱图 (图 2A 和 2B) 对 PS-I 显示五个异头物信号 (指定为 A 至 E),对 PS-II 显示六个异头物信号 (指定为 A 至 F)。从艰难梭菌 MOH 900 和 MOH 718 细胞分离的多糖 PS-II 得到与核糖核酸型 027 的 PS-II 相同的 ¹H-NMR 谱图。

[0253] 使用了其它二维 NMR 实验 (同核的 (¹H) 和异核的 (¹H、¹³C 和 ³¹P)) 来确定 PS-I (图 3) 和 PS-II 的序列。2D¹H-¹H COSY、TOCSY 和 ¹H-¹³C HSQC 实验可确定 PS-I 和 PS-II 中存在的各个单位的大多数环质子和碳的归属。通过 ¹H-¹³C HMBC 和 ¹H-¹H NOESY (图 3) 实验能够确定单糖残基的序列,这些实验可确定 PS-I 中的糖基键的归属。对 PS-I 实施的 2D¹H-¹H NOESY (图 3) 揭示末端 α Rha(B) 的 H-1 (δ_H 5.23) 与支链的 3,4- 取代的 α Glc(D) 的 H-3 (δ_H 4.01) 之间的 [α -Rha-(1 → 3)-α -Glc-(1 →] 的 nOE 间连接性、4- 取代的 α Rha(C) 的 H-1 (δ_H 5.17) 和 3- 取代的 β Glc(E) 的 H-3 (δ_H 3.62) 之间的 [→ 4)-α Rha-(1 → 3)-β Glc-(1 →] 的 nOE 间连接性、支链的 3,4- 取代的 α Glc(D) 的 H-1 (δ_H 5.13) 与 2- 取代的 β Glc(A) 的 H-2 (δ_H 3.68) 之间的 [→ 3/4)-α Glc-(1 → 2)-α Glc-(1 →] 的 nOE 间连接性、和 3- 取代的 α Glc(E) 的 H-1 (δ_H 4.53) 和支链的 3,4- 取代的 α Glc(D) 的 H-4 (δ_H 3.86) 之间的 [→ 3)-β Glc-(1 → 4)-α Glc-(1 →] 的 nOE 间连接性 (示意性地显示在图 3 下方)。还通过 2D ¹H-¹H NOESY 实验检测了其它的穿越空间的相互作用 (许多由 nOE 间连接性引起),但是,特别值得注意的是,支链的 3,4- 取代的 α Glc 的异头质子 (D; δ_H 5.13) 和

2-取代的 α -Glc 的异头质子 (A; δ_H 5.75) 之间的 nOe 间相互作用揭示这两个 α -Glc 单位 [$\rightarrow 3/4$) - α -Glc - (1 $\rightarrow$ 2) - α -Glc - (1 $\rightarrow$) 之间的 (1 $\rightarrow$ 2) 糖苷键中的这两个质子是接近的。在 PS-I 中检测到的相关是：

[0254] H-1 (D) / C-2 (A), 对于 [α -Glc - (1 $\rightarrow$ 2) - α -Glc]

[0255] H-1 (D) / C-4 (D), 对于 [β -Glc - (1 $\rightarrow$ 4) - α -Glc]

[0256] H-1 (C) / C-3 (E), 对于 [α -Rha - (1 $\rightarrow$ 3) - β -Glc]

[0257] H-1 (B) / C-3 (D), 对于 [α -Rha - (1 $\rightarrow$ 3) - α -Glc]

[0258] ^1H - ^{31}P HMBC 实验 (图 4) 提供关于序列 ... $\rightarrow$ 2) - α -Glc - (1 $\rightarrow$ P $\rightarrow$ 4) - α -Rha - (1 $\rightarrow$... 的于 -0.78ppm 处的 ^{31}P 信号与 PS-I 的 A(2-取代的 α -Glc) 的 H-1 和 PS-I 的 C(4-取代的 α -Rha) 的 H-4 之间的 ^1H - ^{31}P 相关。

[0259] 得自 GC-MS 分析和 NMR 波谱实验的结果揭示, 艰难梭菌核糖核酸型 027PS-I 由五糖基磷酸酯重复嵌段组成：

[0260]	C	E	D	A
[0261]	... $\rightarrow$ 4) - α -Rha - (1 $\rightarrow$ 3) - β -Glc - (1 $\rightarrow$ 4) - α -Glc - (1 $\rightarrow$ 2) - α -Glc - (1 $\rightarrow$ P ...			
[0262]			3	
[0263]			↑	
[0264]			1	
[0265]			α -Rha	
[0266]			B	

[0267] 对 PS-II 实施的 ^{31}P -NMR 实验揭示, PS-II 还携带磷酸单酯组分 (在较高的 pH 下化学迁移无变化)。PS-II 的 1D ^{31}P -NMR 谱图在 δ_P -1.67ppm 处显示共振。PS-II 的 ^1H NMR (图 2B) 得到六个异头物共振, 这与 PS-II 中存在的连接类型的数量相一致。与 PS-I 的情况一样, 通过 2D NMR 实验能够确定单糖残基的序列, 所述实验揭示以下序列：

[0268] H-1 (C) / C-3 (A), 对于 [β -GalNAc - (1 $\rightarrow$ 3) - α -Man]

[0269] H-1 (B) / C-4 (C), 对于 [α -Glc - (1 $\rightarrow$ 4) - β -GalNAc]

[0270] H-1 (D) / C-4 (B), 对于 [β -GalNAc - (1 $\rightarrow$ 4) - α -Glc]

[0271] H-1 (E) / C-3 (D), 对于 [β -Glc - (1 $\rightarrow$ 3) - β -GalNAc]

[0272] H-1 (F) / C-3 (C), 对于 [β -Glc - (1 $\rightarrow$ 3) - α -GalNAc]

[0273] ^1H - ^{31}P HMBC 实验 (图 4) 显示, 关于序列 ... 3) - α -Man - (1 $\rightarrow$ P $\rightarrow$ 6) - β -Glc - (1 $\rightarrow$... 的于 -1.67ppm 处的 ^{31}P 信号显示与 PS-II 的 A(3-取代的 α -Man) 的 H-1 和 PS-II 的 E(6-取代的 β -Glc) 的 H-6 及 6' 的相关。

[0274] 总起来说, 得自 GC-MS 分析和 NMR 波谱实验的结果揭示, 艰难梭菌核糖核酸型 027PS-II 由六糖基磷酸酯重复嵌段组成：

[0275]	E	D	B	C	A
[0276]	$\rightarrow$ 6) - β -Glc - (1 $\rightarrow$ 3) - β -GalNAc - (1 $\rightarrow$ 4) - α -Glc - (1 $\rightarrow$ 4) - β -GalNAc - (1 $\rightarrow$ 3) - α -Man - (1 $\rightarrow$ P				
[0277]				3	
[0278]				↑	
[0279]				1	

$[0280] \quad \beta \text{ G]c}$

[0281] F

[0282] 使用基质辅助激光解吸电离质谱 (MALDI-MS) 实验鉴定多糖的分子量。得自脱去磷酸的多糖样品的 m/z 片段鉴定了 PS-II 的寡糖单位的分子量是 1054Da (图 5)。这与通过 NMR 和 GC-MS 实验获得的数据相一致。MALDI-MS 数据 (图 5) 也指出这样的事实, 即在某些情况下, PS-II 的寡糖重复嵌段可以包含其它己糖单位。

[0283] 来自艰难梭菌 MOH 900 和 MOH 718 的 PS-II 的分析显示,它们在结构上与艰难梭菌核糖核酸型 027 的 PS-II 相同。

[0284] 得自团粒物质的多糖 PS-III 的化学、GC-MS 和 NMR 分析被观察到由甘油、葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺和糖醇磷酸酯组成（图 7）。

[0285] 斑点印迹血清学分析揭示,5头接种的猪产生对单独的艰难梭菌 PS-II 具有特异性的 IgM 抗体,也产生对 PS-I/PS-II 的混合物具有特异性的 IgM 抗体(图8)。数据显示,IgM 对 PS-I 和 PS-I/PS-II 的特异性随着重复接种而提高,在第8天和第15天观察到强免疫原性,特别是针对 PS-II。未观察到不良反应,证实用这些艰难梭菌 PS-I/PS-II 细胞表面多糖接种的安全性。

[0286] 结果和讨论：

[0287] 化学操作结合分析实验、MS 实验和 NMR 实验确定了 PS-I 和 PS-II 的共价化学结构以及 PS-III 的组成。发现 PS-I (图 6A) 由支链的五糖基磷酸酯重复单位组成, 所述单位由糖基磷酸酯 (P)、鼠李糖 (Rha) 和葡萄糖 (Glc) 组成:

[0288] $[\rightarrow 4)-\alpha \text{ Rha}-(1 \rightarrow 3)-\beta \text{ Glc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow 2)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow \text{P})_n$

[0289] 3

[0290]

[0291] α Rha-(1

[0292] 发现 PS-II 的化学结构 (图 6B) 由支链的六糖基磷酸酯重复单位组成, 所述单位由葡萄糖、甘露糖 (Man) 和 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 和糖基磷酸酯组成:

[0293] $[\rightarrow 6)-\beta \text{ Glc}-(1 \rightarrow 3)-\beta \text{ GalNAc}-(1 \rightarrow 4)-\alpha \text{ Glc}-(1 \rightarrow 4)-\beta \text{ GalNAc}-(1 \rightarrow 3)-\alpha \text{ Man}-(1 \rightarrow 6)]_n$

[0294] 3

[0295]

[0296] β G]c-(1

[0297] 这些发现揭示,所有本文中研究的艰难梭菌菌株都表达艰难梭菌多糖 PS-II。

[0298] 本文中呈现的结构结果提供描述艰难梭菌细胞表面多糖的共价化学结构的首次报道,并且可以成为疫苗制备的基础。

[0299] 这些新的结果提供描述艰难梭菌多糖的具体化学组成的首次报道。本文中,显示艰难梭菌核糖核酸型 027 表达至少两种结构变化的细胞表面多糖 (PS-I 和 PS-II),每一种细胞表面多糖均由具有几种连接类型的各种单糖组成。发现艰难梭菌 MOH 900 和 MOH 718 仅表达一种类型的多糖,已经显示该多糖在结构上类似于核糖核酸型 027 的 PS-II。

[0300] 显示艰难梭菌的细胞表面多糖 PS-I 和 PS-II 在猪体内是免疫原性的 (IgM) (图 8)。PS-II 是高免疫原性的, 而且 PS-I/PS-II 的混合物也是免疫原性的, 但是程度较低。

[0301] 纯化的艰难梭菌细胞表面多糖用作疫苗,并且 / 或者糖基链与载体分子偶联以形成免疫活性的糖缀合物疫苗。然后,合成的疫苗将用于涉及动物模型的免疫学研究。

[0302] IV. 制备缀合物的假想例

[0303] 使用本领域中已知的偶联技术,可以使艰难梭菌细胞表面多糖,包括本申请中公开的 PS-I、II 和 III,与稳定的载体蛋白诸如 CRM₁₉₇ 和 / 或破伤风类毒素偶联,以得到糖缀合物疫苗,来治疗或预防艰难梭菌感染、或者诱导对抗艰难梭菌的免疫应答。

[0304] 虽然已经参考目前被认为是优选的实例说明了本发明,但是,应该理解,本发明不限于这些公开的实例。相反,本发明旨在覆盖包括在所附的权利要求书的精神和范围内的各种修改和等同安排。

[0305] 所有出版物、专利和专利申请都以其全部援引加入本文中,其程度如同每一个单独的出版物、专利和专利申请具体地和单独地被指出以其全部援引加入。

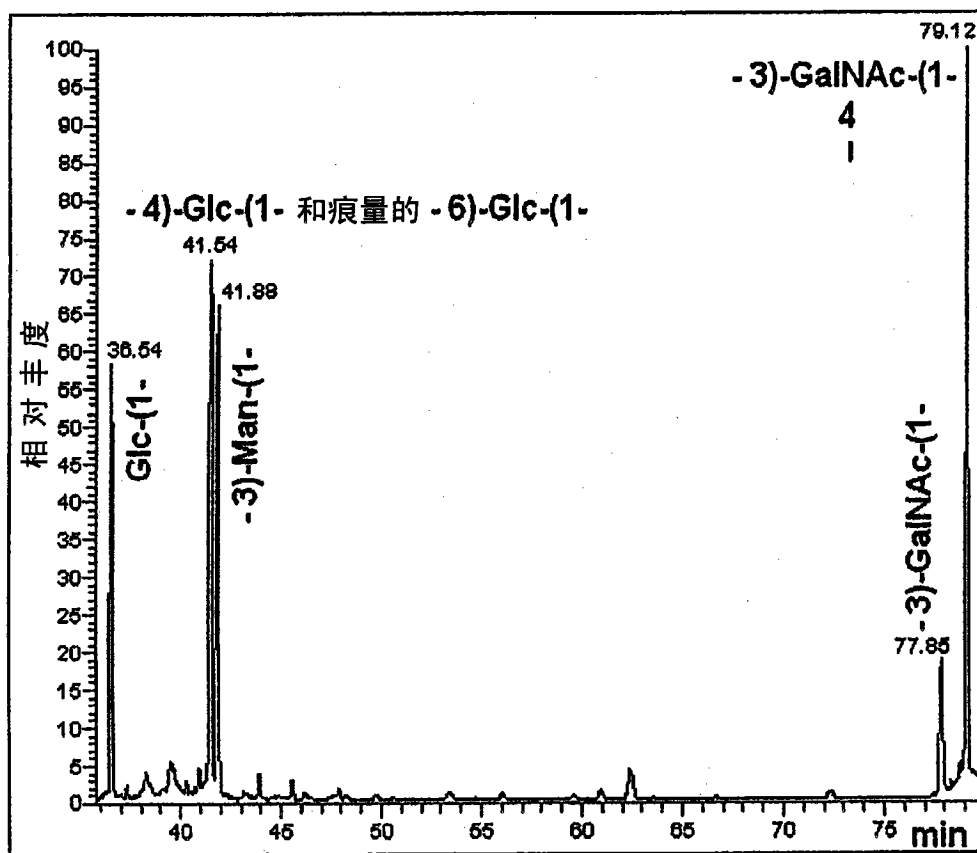
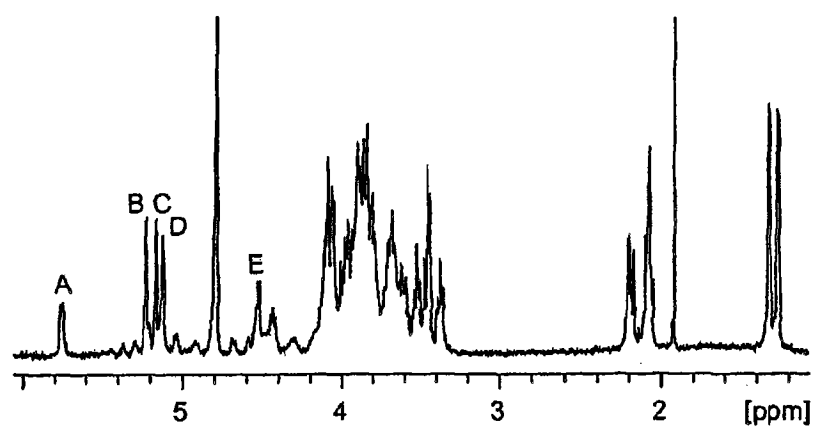


图 1

A)



B)

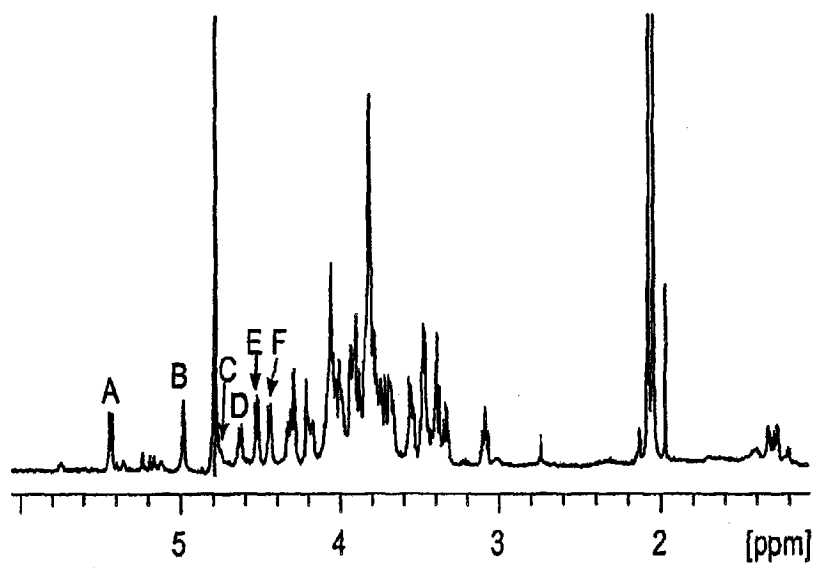
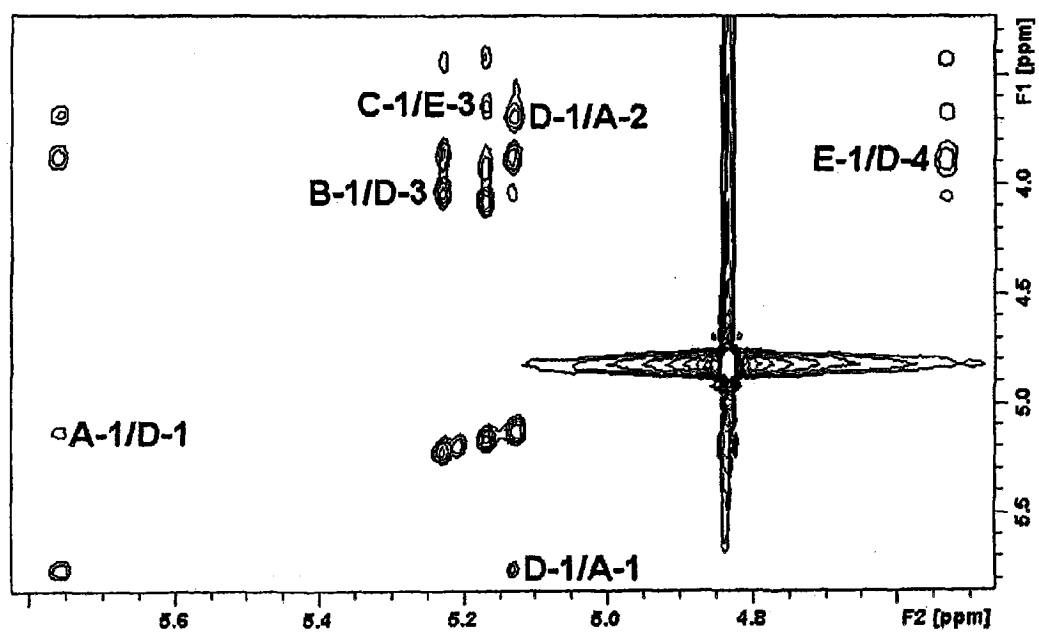


图 2

A)



B)

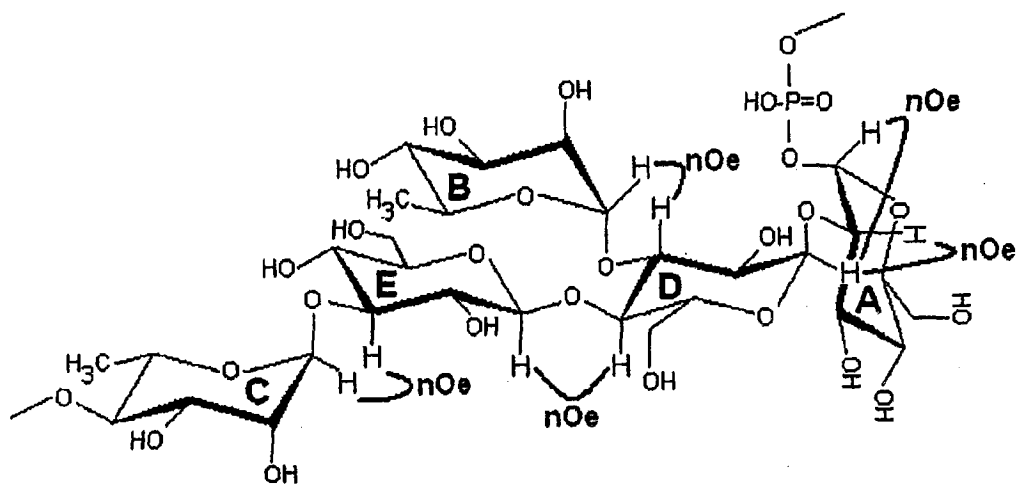
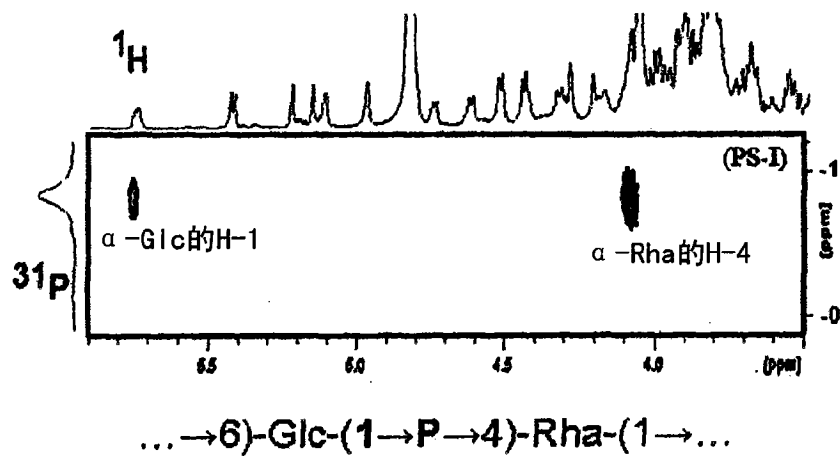


图 3

A)



B)

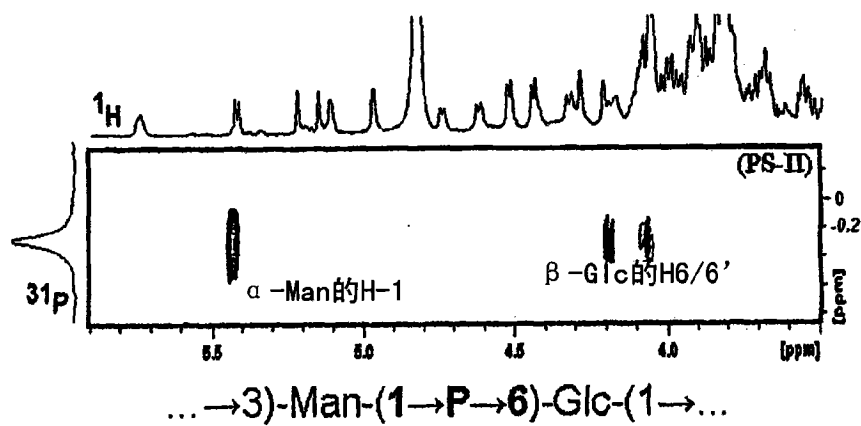


图 4

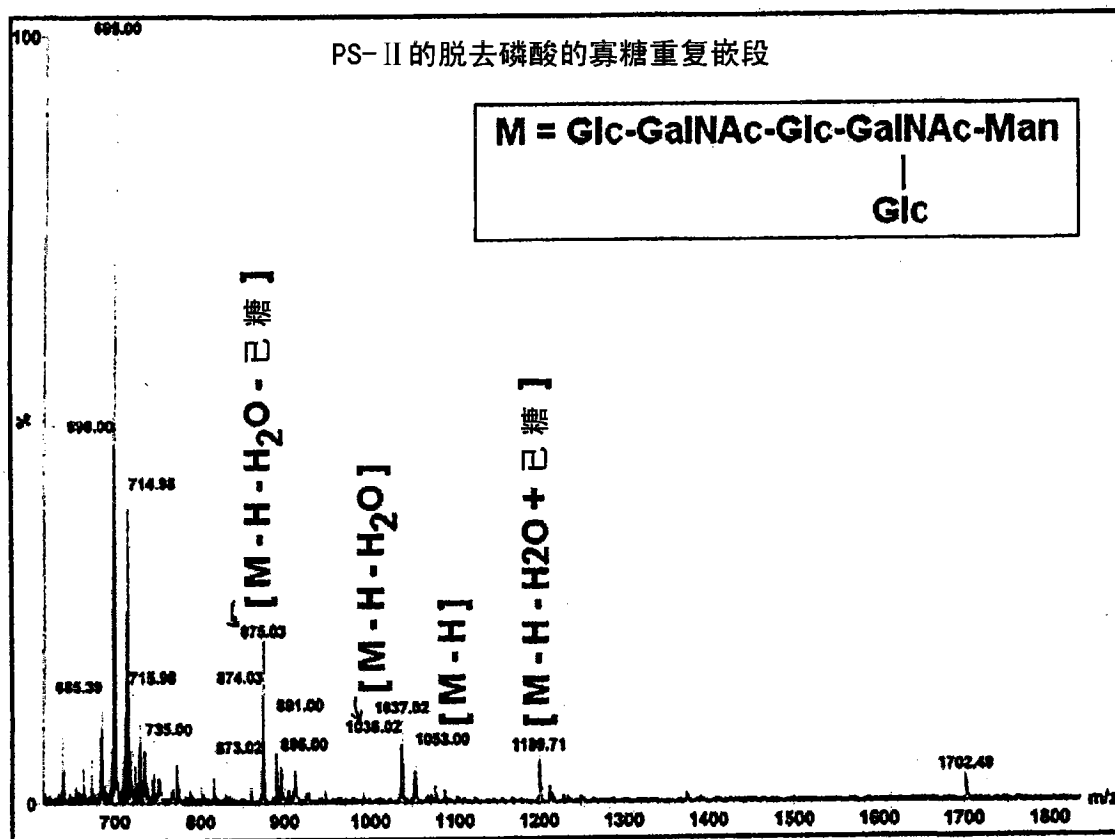


图 5

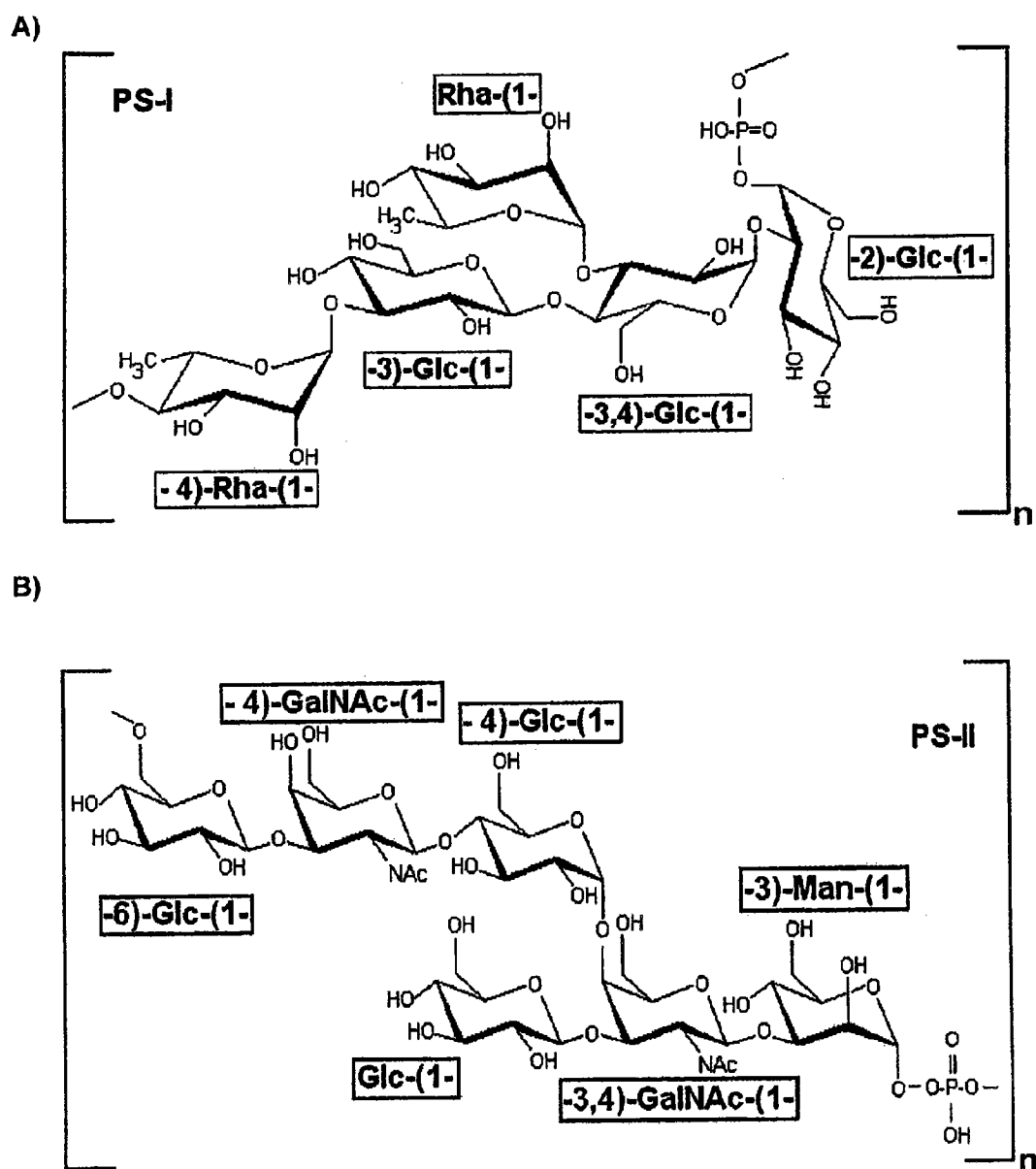


图 6

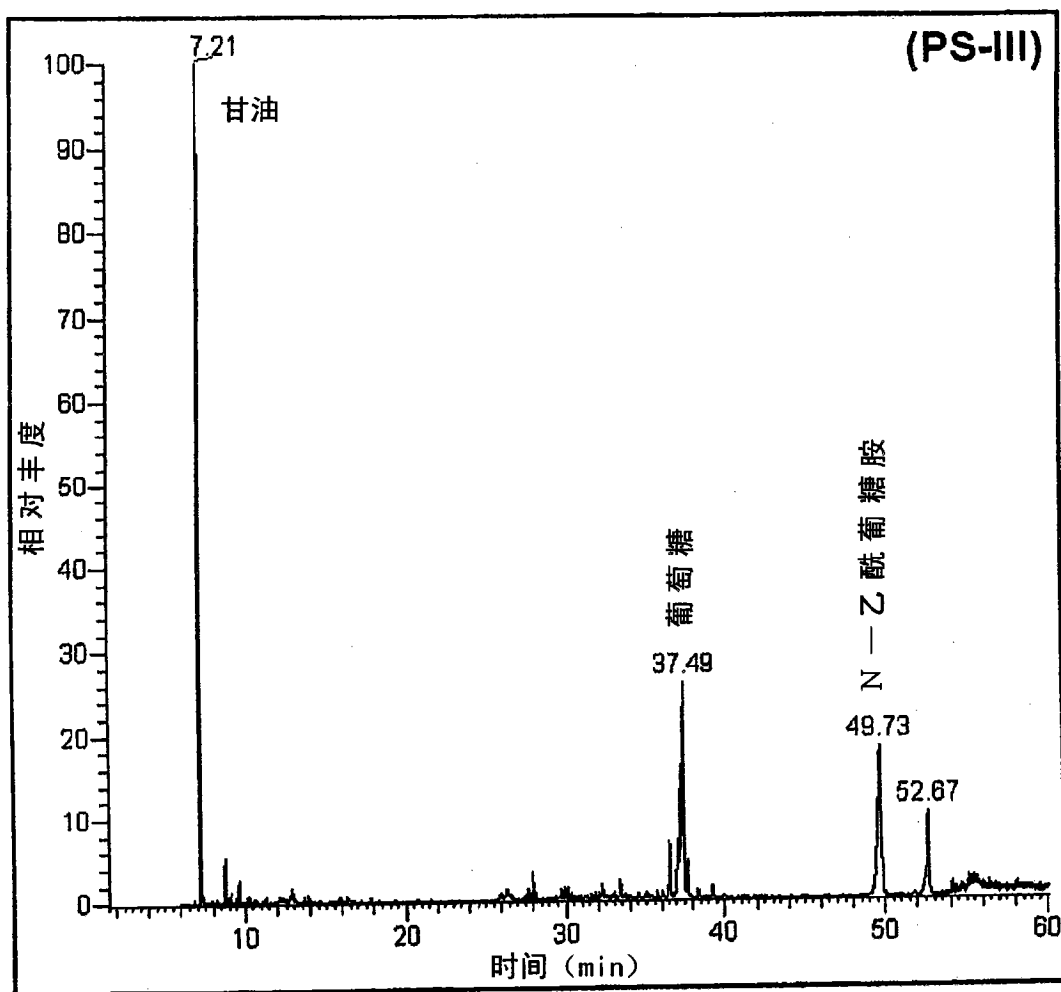


图 7

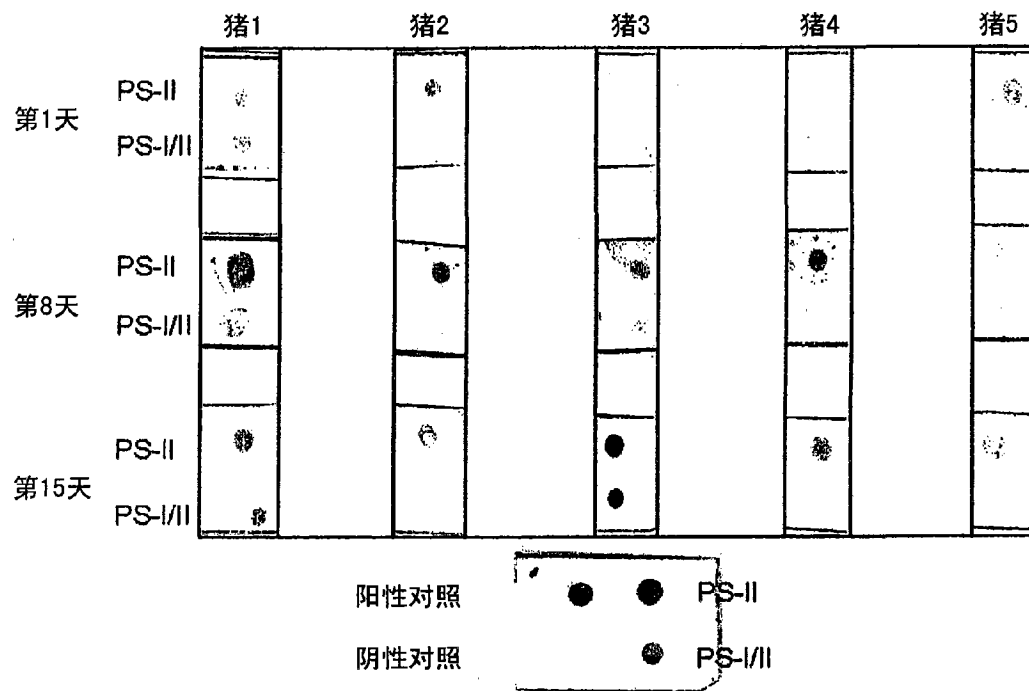


图 8