



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103619871 B

(45)授权公告日 2016.12.14

(21)申请号 201280030656.7

(22)申请日 2012.04.20

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103619871 A

(43)申请公布日 2014.03.05

(30)优先权数据

61/478,474 2011.04.22 US

61/478,899 2011.04.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.12.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2012/051999 2012.04.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/143902 EN 2012.10.26

(73)专利权人 惠氏有限责任公司

地址 美国新泽西

(72)发明人 M·K·希胡 A·S·安德森

R·G·K·唐纳德 K·U·扬森

N·K·卡利安 T·L·米宁尼

J·K·莫兰 M·E·鲁彭

M·J·弗林特

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王健

(51)Int.Cl.

C07K 14/33(2006.01)

A61K 39/08(2006.01)

C07K 16/12(2006.01)

(56)对比文件

CN 101500581 A, 2009.08.05,

CN 101870978 A, 2010.10.27,

WO 2010094970 A1, 2010.08.26,

审查员 李煦颖

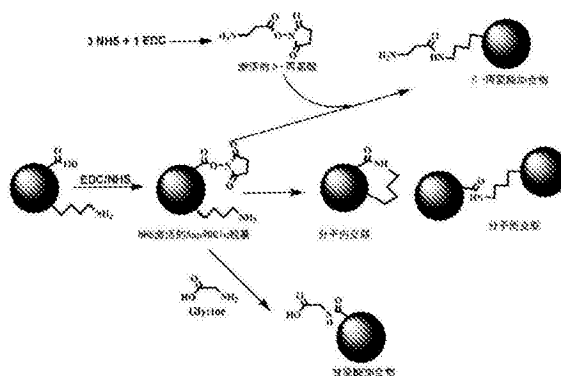
权利要求书3页 说明书121页 附图45页

(54)发明名称

涉及突变体难辨梭菌毒素的组合物及其方法

(57)摘要

在一方面,本发明涉及免疫原性组合物,其包含突变体难辨梭菌毒素A和/或突变体难辨梭菌毒素B。相对于相应的野生型难辨梭菌毒素,每种突变体毒素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。所述突变体毒素还可包含至少一个经化学交联的氨基酸。在另一方面,本发明涉及结合所述免疫原性组合物的抗体或其结合片段。在另外的方面,本发明涉及编码任意前述物质的分离的核苷酸序列,以及使用任意前述组合物的方法。



1. 分离的多肽, 其由突变体难辨梭菌(*C. difficile*)毒素A的氨基酸序列组成, 所述突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列与SEQ ID NO:1相比在位置285、287和700处具有突变D285A、D287A和C700A, 其中位置1处的甲硫氨酸缺失。

2. 权利要求1的分离的多肽, 其由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列组成, 其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在。

3. 权利要求1的分离的多肽, 其中所述多肽的至少一个赖氨酸残基的侧链连接至 β -丙氨酸部分。

4. 权利要求1的分离的多肽, 其中所述多肽的第二赖氨酸残基的侧链连接至天冬氨酸残基的侧链和/或连接至谷氨酸残基的侧链。

5. 权利要求1的分离的多肽, 其中所述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连接至甘氨酸部分。

6. 权利要求1的分离的多肽, 其中通过体外细胞毒性测定, 所述分离的多肽具有至少约100 μ g/ml的EC₅₀值。

7. 权利要求1的分离的多肽, 其中通过体外细胞毒性测定, 所述分离的多肽具有至少约1000 μ g/ml的EC₅₀值。

8. 免疫原性组合物, 其包含由突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列组成的第一个分离的多肽, 所述突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列与SEQ ID NO:1相比在位置285、287和700处具有突变D285A、D287A和C700A, 其中位置1处的甲硫氨酸缺失。

9. 权利要求8的免疫原性组合物, 其中所述分离的多肽的至少一个氨基酸是化学交联的。

10. 权利要求8或9的免疫原性组合物, 其中相对于相应的野生型难辨梭菌毒素A, 所述组合物展现出降低的细胞毒性。

11. 权利要求8的免疫原性组合物, 其还包含具有缺失了第1位甲硫氨酸的SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的第二个分离的多肽。

12. 权利要求11的免疫原性组合物, 其中所述第二个分离的多肽由SEQ ID NO:6组成。

13. 权利要求12的免疫原性组合物, 其中位置1处的甲硫氨酸残基任选缺失。

14. 权利要求11的免疫原性组合物, 所述第一个分离的多肽由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列组成, 其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在, 并且所述第二个分离的多肽由SEQ ID NO:6所示氨基酸序列组成。

15. 权利要求8或11的免疫原性组合物, 其中所述多肽的至少一个赖氨酸残基的侧链连接至 β -丙氨酸部分。

16. 权利要求8的免疫原性组合物, 其中所述第一个分离的多肽的第二赖氨酸残基的侧链连接至天冬氨酸残基的侧链和/或连接至谷氨酸残基的侧链。

17. 权利要求8的免疫原性组合物, 其中所述第一个分离的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连接至甘氨酸部分。

18. 权利要求11的免疫原性组合物, 其中所述第二个分离的多肽的第二赖氨酸残基的侧链连接至天冬氨酸残基的侧链和/或连接至谷氨酸残基的侧链。

19. 权利要求11的免疫原性组合物, 其中所述第二个分离的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连接至甘氨酸部分。

20. 权利要求8或11的免疫原性组合物,其中通过体外细胞毒性测定,所述分离的多肽具有至少约100 μ g/ml的EC₅₀值。

21. 权利要求8或11的免疫原性组合物,其中通过体外细胞毒性测定,所述分离的多肽具有至少约1000 μ g/ml的EC₅₀值。

22. 权利要求8的免疫原性组合物,其中所述组合物还包含佐剂。

23. 权利要求22的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含铝。

24. 权利要求22的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含氢氧化铝凝胶和CpG寡核苷酸。

25. 权利要求22的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含 ISCOMATRIX®。

26. 权利要求8的免疫原性组合物,其中所述多肽包含所述多肽的赖氨酸残基侧链和所述多肽的天冬氨酸残基侧链之间的至少一个交联;和所述多肽的赖氨酸残基侧链和所述多肽的谷氨酸残基侧链之间的至少一个交联。

27. 权利要求11的免疫原性组合物,其中所述第二个分离的多肽包含所述第二个分离的多肽的赖氨酸残基侧链和所述第二个分离的多肽的天冬氨酸残基侧链之间的至少一个交联;和所述第二个分离的多肽的赖氨酸残基侧链和所述第二个分离的多肽的谷氨酸残基侧链之间的至少一个交联。

28. 权利要求8的免疫原性组合物,其还包含缓冲剂。

29. 权利要求8的免疫原性组合物,其还包含稳定剂。

30. 权利要求8的免疫原性组合物,其还包含表面活性剂。

31. 权利要求8的免疫原性组合物,其还包含 polysorbate 80。

32. 权利要求8的免疫原性组合物,其中所述组合物是冻干的。

33. 权利要求8的免疫原性组合物,其中所述组合物不包含甲醛。

34. 包含由突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列组成的分离的多肽的免疫原性组合物和包含缺失了第1位甲硫氨酸的SEQ ID NO:6的免疫原性组合物,其中所述分离的多肽和缺失了第1位甲硫氨酸的SEQ ID NO:6每个都有至少一个氨基酸是化学交联的,所述突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列与SEQ ID NO:1相比在位置285、287和700处具有突变D285A、D287A和C700A,其中位置1处的甲硫氨酸缺失。

35. 权利要求34的免疫原性组合物,其中所述至少一个氨基酸是通过甲醛交联的。

36. 权利要求34的免疫原性组合物,其中所述至少一个氨基酸是通过1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺交联的。

37. 权利要求34或36的免疫原性组合物,其中所述至少一个氨基酸是通过N-羟基琥珀酰亚胺交联的。

38. 免疫原性组合物,其包含由突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列组成的分离的多肽和由缺失了第1位甲硫氨酸的SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的分离的多肽,所述突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列与SEQ ID NO:1相比在位置285、287和700处具有突变D285A、D287A和C700A,其中位置1处的甲硫氨酸缺失,其中每个多肽包含:

- a) 所述多肽的天冬氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联;
- b) 所述多肽的谷氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联;
- c) 连接至所述多肽的至少一个赖氨酸残基侧链的 β -丙氨酸部分;和
- d) 连接至所述多肽的至少一个天冬氨酸残基侧链或所述多肽的至少一个谷氨酸残基

侧链的甘氨酸部分。

39. 重组细胞或其后代, 包含编码突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列的核酸序列, 所述突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列与SEQ ID NO:1相比在位置285、287和700处具有突变D285A、D287A和C700A, 其中位置1处的甲硫氨酸缺失。

40. 权利要求39的重组细胞, 其中所述细胞衍生自难辨梭菌细胞。

41. 权利要求39的重组细胞, 其中所述细胞缺乏编码毒素的内源多核苷酸。

42. 权利要求40的重组细胞, 其中所述细胞缺乏编码毒素的内源多核苷酸。

43. 权利要求40-42任一项的细胞, 其中所述细胞衍生自选自下列的难辨梭菌细胞: 难辨梭菌1351、难辨梭菌3232、难辨梭菌7322、难辨梭菌5036、难辨梭菌4811、和难辨梭菌VPI 11186。

44. 权利要求43的细胞, 其中所述细胞是难辨梭菌VPI 11186细胞。

45. 权利要求43的细胞, 其中所述难辨梭菌细胞的孢子形成基因是失活的。

46. 权利要求44的细胞, 其中所述难辨梭菌细胞的孢子形成基因是失活的。

47. 权利要求45或46的细胞, 其中所述孢子形成基因包括spo0A基因或spoIIE基因。

48. 包含由突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列组成的分离的多肽的免疫原性组合物和包含缺失了第1位甲硫氨酸的SEQ ID NO:6的免疫原性组合物在制备用于在哺乳动物中治疗难辨梭菌感染的药物中的应用, 所述突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列与SEQ ID NO:1相比在位置285、287和700处具有突变D285A、D287A和C700A, 其中位置1处的甲硫氨酸缺失, 其中所述突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列和缺失了第1位甲硫氨酸的SEQ ID NO:6每个都有至少一个氨基酸通过1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺交联。

49. 包含由突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列组成的分离的多肽的免疫原性组合物和包含缺失了第1位甲硫氨酸的SEQ ID NO:6的免疫原性组合物在制备用于在哺乳动物中诱导对难辨梭菌的免疫应答的药物中的应用, 所述突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列与SEQ ID NO:1相比在位置285、287和700处具有突变D285A、D287A和C700A, 其中位置1处的甲硫氨酸缺失, 其中所述突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列和缺失了第1位甲硫氨酸的SEQ ID NO:6每个都有至少一个氨基酸通过1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺交联。

50. 权利要求48或49的应用, 其中所述哺乳动物是对其有需要的哺乳动物。

51. 权利要求48或49的应用, 其中所述哺乳动物患有复发的难辨梭菌感染。

52. 权利要求48或49的应用, 其中肠胃外施用所述组合物。

53. 权利要求48或49的应用, 其中所述组合物还包含佐剂。

54. 权利要求53的应用, 其中所述佐剂包含铝。

55. 权利要求53的应用, 其中所述佐剂包含氢氧化铝凝胶和CpG寡核苷酸。

56. 权利要求53的应用, 其中所述佐剂包含ISCOMATRIX®。

涉及突变体难辨梭菌毒素的组合物及其方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2011年4月22日提交的U.S.Provisional Patent Application 61/478,474、和2011年4月25日提交的U.S.Provisional Patent Application 61/478,899的优先权。上述申请的全部内容以其整体援引加入本文。

发明领域

[0003] 本发明针对的是涉及突变体难辨梭菌(*Clostridium difficile*)毒素的组合物及其方法。

[0004] 发明背景

[0005] 难辨梭菌(*C.difficile*)是革兰氏阳性的厌氧菌,其与人类胃肠道疾病相关。如果天然肠菌群由于用抗体治疗而减少,则难辨梭菌的建群通常在结肠中发生。通过葡萄糖基化毒素,毒素A和毒素B(分别为308和270kDa,其是难辨梭菌的主要毒力因子)的分泌,感染可导致抗生素相关性腹泻以及有时导致假膜性结肠炎。

[0006] 毒素A和毒素B分别是由基因tcdA和tcdB在19kb的致病性基因座(PaLoc)内所编码的。难辨梭菌的非致病性菌株中此基因座被另外的115碱基对的序列所置换。

[0007] 毒素A和毒素B均为强力细胞毒素。这些蛋白是使Rho/Rac/Ras家族的小GTPase失活的同源葡萄糖基转移酶。所导致的信号传导中断会引起细胞-细胞连接、肌动蛋白细胞骨架失调、和/或凋亡的丧失,导致与难辨梭菌感染(CDI)相关的深层分泌性腹泻(profound secretory diarrhea)。

[0008] 在最近十年,在医院、疗养院、和其它长期护理机构中难辨梭菌爆发的次数和严重性大幅增加。此增加的主要因素包括高毒性致病菌株的出现、抗生素使用的增加、检测方法的改善、和健康护理机构中对空气散播孢子暴露的增加。

[0009] 甲硝唑和万古霉素是目前接受的用于难辨梭菌相关疾病(CDAD)抗生素治疗的护理标准。然而,大约20%接受此种治疗的患者在第一期CDI之后经历感染的复发,以及达到大约50%的那些患者患有另外的复发。复发的治疗是非常重要的挑战,大部分的复发通常在前期一个月之内发生。

[0010] 因此,需要涉及难辨梭菌的免疫原性和/或治疗性组合物以及其方法。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明在本文中提供了这些以及其它的目标。

[0013] 在一方面,本发明涉及免疫原性组合物,其包括突变体难辨梭菌毒素A。相对于相应的野生型难辨梭菌毒素A,所述突变体难辨梭菌毒素A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。在一个实施方案中,所述突变体难辨梭菌毒素A的至少一个氨基酸是经化学交联的。

[0014] 在一方面,本发明涉及包括SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的分离的多肽,其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在,并且其中所述多肽包括至少一个经1-乙基-3-(3-二甲基氨基)碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)化学修饰的氨基酸侧链。

[0015] 在一个实施方案中,所述突变体难辨梭菌毒素的至少一个氨基酸是经化学交联的。

[0016] 在一个实施方案中,所述至少一个氨基酸氨基酸是经如下化学交联的:甲醛,1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺(EDC),N-羟基琥珀酸酯/盐,或者EDC和NHS的组合。

[0017] 在一个实施方案中,所述免疫原性组合物由各自的抗毒素中和抗体或其结合片段所识别

[0018] 在一个实施方案中,相对于相应的野生型难辨梭菌毒素,所述免疫原性组合物展现降低的细胞毒性。

[0019] 在另一方面,本发明涉及免疫原性组合物,其包括突变体难辨梭菌毒素A,所述突变体难辨梭菌毒素A包括具有SEQ ID NO:29的葡萄糖基转移酶结构域,其在位置285和287具有氨基酸取代(相对于相应的野生型难辨梭菌毒素A),以及具有SEQ ID NO:32的半胱氨酸蛋白酶结构域,其在位置158具有氨基酸取代(相对于相应的野生型难辨梭菌毒素A),其中所述突变体难辨梭菌毒素A的至少一个氨基酸是经化学交联的。

[0020] 在另外的方面,本发明涉及包括突变体难辨梭菌毒素A的免疫原性组合物,所述突变体难辨梭菌毒素A包括SEQ ID NO:4,其中所述突变体难辨梭菌毒素A的至少一个氨基酸是经化学交联的。

[0021] 在另一方面,本发明涉及免疫原性组合物,其包括SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,或SEQ ID NO:8。

[0022] 在一方面,本发明涉及包括突变体难辨梭菌毒素B的免疫原性组合物。相对于相应的野生型难辨梭菌毒素B,所述突变体难辨梭菌毒素B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。

[0023] 在另一方面,本发明涉及包括SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的分离的多肽,其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在,并且其中所述多肽包括至少一个经1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)化学修饰的氨基酸侧链。

[0024] 在另一方面,本发明涉及包括突变体难辨梭菌毒素B的免疫原性组合物,所述突变体难辨梭菌毒素B包括具有SEQ ID NO:31的葡萄糖基转移酶结构域,其在位置286和288具有氨基酸取代(相对于相应的野生型难辨梭菌毒素B),和具有SEQ ID NO:33的半胱氨酸蛋白酶结构域,其在位置155具有氨基酸取代(相对于相应的野生型难辨梭菌毒素B),其中所述突变体难辨梭菌毒素B的至少一个氨基酸是经化学交联的。

[0025] 在另外的方面,本发明涉及包括突变体难辨梭菌毒素B的免疫原性组合物,所述突变体难辨梭菌毒素B包括SEQ ID NO:6,其中所述突变体难辨梭菌毒素B的至少一个氨基酸是经化学交联的。

[0026] 在一方面,本发明涉及包括突变体难辨梭菌毒素A和突变体难辨梭菌毒素B的免疫原性组合物,所述突变体难辨梭菌毒素A包括SEQ ID NO:4,所述突变体难辨梭菌毒素B包括SEQ ID NO:6,其中每个所述突变体难辨梭菌毒素的至少一个氨基酸是经化学交联的。

[0027] 在另外的方面,本发明涉及包括多核苷酸的重组细胞或其后代,所述多核苷酸编码任意前述突变体难辨梭菌毒素,其中所述细胞缺乏编码毒素的内源多核苷酸。

[0028] 在另一方面,本发明涉及抗体或其抗体结合片段,其特异于包括突变体难辨梭菌毒素的免疫原性组合物。

[0029] 在一方面,本发明涉及在哺乳动物中治疗难辨梭菌感染的方法。所述方法包括向哺乳动物施用免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包括突变体难辨梭菌毒素A和突变体难辨梭菌毒素B,所述突变体难辨梭菌毒素A包括SEQ ID NO:4,所述突变体难辨梭菌毒素B包括SEQ ID NO:6,其中每个所述突变体难辨梭菌毒素的至少一个氨基酸是经甲醛交联的。

[0030] 在一方面,本发明涉及在哺乳动物中治疗难辨梭菌感染的方法。所述方法包括向哺乳动物施用免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包括突变体难辨梭菌毒素A和突变体难辨梭菌毒素B,所述突变体难辨梭菌毒素A包括SEQ ID NO:4,所述突变体难辨梭菌毒素B包括SEQ ID NO:6,其中每个所述突变体难辨梭菌毒素的至少一个氨基酸是经1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和/或N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)交联的。

[0031] 在一方面,本发明涉及在哺乳动物中诱导对难辨梭菌感染免疫应答的方法。所述方法包括向哺乳动物施用免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包括突变体难辨梭菌毒素A和突变体难辨梭菌毒素B,所述突变体难辨梭菌毒素A包括SEQ ID NO:4,所述突变体难辨梭菌毒素B包括SEQ ID NO:6,其中每个所述突变体难辨梭菌毒素的至少一个氨基酸是经甲醛交联的。

[0032] 在一方面,本发明涉及在哺乳动物中诱导对难辨梭菌感染免疫应答的方法。所述方法包括向哺乳动物施用免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包括突变体难辨梭菌毒素A和突变体难辨梭菌毒素B,所述突变体难辨梭菌毒素A包括SEQ ID NO:4,所述突变体难辨梭菌毒素B包括SEQ ID NO:6,其中每个所述突变体难辨梭菌毒素的至少一个氨基酸是经1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和/或N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)交联的。

[0033] 在一个实施方案中,治疗的方法或者诱导免疫应答的方法是在有需要的哺乳动物中。

[0034] 在一个实施方案中,治疗的方法或者诱导免疫应答的方法包括已患有复发的难辨梭菌感染的哺乳动物。

[0035] 在一个实施方案中,治疗的方法或者诱导免疫应答的方法包括胃肠外施用组合物。

[0036] 在一个实施方案中,治疗的方法或者诱导免疫应答的方法包括还含有佐剂的免疫原性组合物。

[0037] 在一个实施方案中,所述佐剂包括氢氧化铝凝胶和CpG寡核苷酸。在另一实施方案中,所述佐剂包括ISCOMATRIX。

[0038] 在一个实施方案中,所述分离的多肽包括经甘氨酸化学交联的所述多肽的至少一个天冬氨酸残基侧链或所述多肽的至少一个谷氨酸残基侧链。

[0039] 在一个实施方案中,所述分离的多肽包括所述多肽的天冬氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联;和所述多肽的谷氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。

[0040] 在一个实施方案中,所述分离的多肽包括连接至所述多肽的至少一个赖氨酸残基侧链的β-丙氨酸部分。

[0041] 在一个实施方案中,所述分离的多肽包括连接至所述多肽的天冬氨酸残基侧链或者连接至所述多肽的谷氨酸残基侧链的甘氨酸部分。

[0042] 在一个实施方案中,所述分离的多肽包括SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,其中位

置1处的甲硫氨酸残基任选不存在,并且其中所述多肽的至少一个赖氨酸残基侧链连接β-丙氨酸部分。

[0043] 在一个实施方案中,所述分离的多肽包括SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在,并且其中所述多肽的至少一个赖氨酸残基侧链连接β-丙氨酸部分。

[0044] 在一个实施方案中,所述分离的多肽包括连接至天冬氨酸残基侧链或连接至谷氨酸残基侧链的第二个赖氨酸残基的侧链。

[0045] 在一个实施方案中,所述分离的多肽包括连接甘氨酸部分的所述多肽的天冬氨酸残基侧链或者谷氨酸残基侧链。

[0046] 在一个实施方案中,所述分离的多肽具有至少约100μg/ml的EC₅₀。

[0047] 在一方面,所述免疫原性组合物包括具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的分离的多肽(其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在),和具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的分离的多肽(其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在),并且其中所述多肽具有至少一个经1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)化学修饰的氨基酸侧链。

[0048] 在一个实施方案中,所述多肽包括如下中任意的至少一个:a)a)连接至所述多肽赖氨酸侧链的至少一个β-丙氨酸部分;b)天冬氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联;和c)谷氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。

[0049] 在一个实施方案中,所述分离的多肽具有至少约100μg/ml的EC₅₀。

[0050] 在一方面,所述免疫原性组合物包括具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的分离的多肽(其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在),和具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的分离的多肽(其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在),并且a)其中SEQ ID NO:4的至少一个赖氨酸残基侧链连接β-丙氨酸部分,以及b)其中SEQ ID NO:6的至少一个赖氨酸残基侧链连接β-丙氨酸部分。

[0051] 在一个实施方案中,所述免疫原性组合物包括SEQ ID NO:4的第二个赖氨酸残基侧链连接天冬氨酸残基侧链或连接谷氨酸残基侧链,并且其中SEQ ID NO:6的第二个赖氨酸残基连接天冬氨酸残基侧链或连接谷氨酸残基侧链。

[0052] 在一个实施方案中,所述免疫原性组合物包括连接甘氨酸部分的具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列(其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在)的多肽的天冬氨酸残基侧链或谷氨酸残基侧链。

[0053] 在一个实施方案中,所述免疫原性组合物包括连接甘氨酸部分的具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列(其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在)的多肽的天冬氨酸残基侧链或谷氨酸残基侧链。

[0054] 在一个实施方案中,所述分离的多肽具有至少约100μg/ml的EC₅₀。

[0055] 在一方面,所述免疫原性组合物包括:具有SEQ ID NO:84所述氨基酸序列的分离的多肽和具有SEQ ID NO:86所述氨基酸序列的分离的多肽,其中每个多肽包括:a)所述多肽的天冬氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联;b)所述多肽的谷氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联;c)连接至所述多肽的

至少一个赖氨酸残基侧链的 β -丙氨酸部分;和d)连接至所述多肽的至少一个天冬氨酸残基侧链或所述多肽的至少一个谷氨酸残基侧链的甘氨酸部分。

[0056] 附图简述

[0057] 图1:来自菌株630、VPI10463、R20291、CD196的野生型难辨梭菌毒素A和具有SEQ ID NO:4的突变体毒素A的序列比对,其中使用CLUSTALW比对,默认参数。

[0058] 图2:来自菌株630、VPI10463、R20291、CD196的野生型难辨梭菌毒素A和具有SEQ ID NO:6的突变体毒素B的序列比对,其中使用CLUSTALW比对,默认参数。

[0059] 图3:显示对野生型毒素阴性的难辨梭菌菌株进行鉴别的图。对于毒素A,通过ELISA测试了13种难辨梭菌菌株的培养基。如其中所示,7种菌株表达了毒素A而6种菌株未表达(菌株1351,3232,7322,5036,4811和VPI11186)。

[0060] 图4A和B:SDS-PAGE结果,说明了三重突变体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),在使用UDP-14C-葡萄糖的体外葡萄糖基化测定中并不将Rac1或RhoA GTPase葡萄糖基化;而10 μ g至1ng的野生型毒素B却葡萄糖基化Rac1。

[0061] 图5:Western印迹,表明了与野生型毒素A和B(分别为SEQ ID NO:1和2)的剪切片段相比,突变体毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)中半胱氨酸蛋白酶活性的消除。参见实施例13。

[0062] 图6:显示通过在IMR-90中进行体外细胞毒性测试,三重突变体毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)在高浓度(例如约100 μ g/ml)测试时展现残余细胞毒性的图。

[0063] 图7:显示三重突变体毒素B(SEQ ID NO:6)和七重突变体毒素B(SEQ ID NO:8)的EC₅₀值类似的图。

[0064] 图8:代表体外细胞毒性测试中结果的图,其中将ATP水平(RLU)针对三重突变体TcdA(SEQ ID NO:4)(上部分)和三重突变体TcdB(SEQ ID NO:6)(下部分)升高的浓度作图。突变体毒素A和B的残余细胞毒性能用特异于突变体毒素A(上部分-pAb A和mAb A3-25+A60-22)和特异于突变体毒素B(下部分-pAb B)的中和抗体完全消除。

[0065] 图9:处理后72小时的IMR-90细胞形态图。A部分显示了模拟处理的对照细胞。B部分显示了用经福尔马林失活的突变体TcdB(SEQ ID NO:6)处理之后的细胞形态。C部分显示了用经EDC失活的突变体TcdB(SEQ ID NO:6)处理之后的细胞形态。D部分显示了用野生型毒素B(SEQ ID NO:2)处理之后的细胞形态。E部分显示了用三重突变体TcdB(SEQ ID NO:6)处理之后的细胞形态。在TcdA处理中观测到类似结果。

[0066] 图10:显示实施例25中所述中和抗体滴度的图(研究muCdiff2010-06)。

[0067] 图11:显示实施例26中所述中和抗体滴度的图(研究muCdiff2010-07)。

[0068] 图12:显示了4次免疫后仓鼠中针对毒素A和B的中和抗体应答的图,如实施例27所述(研究ham难辨梭菌2010-02)。

[0069] 图13:显示了用化学失活的遗传突变体毒素和List Biological类毒素接种后仓鼠中的中和抗体应答的图,如实施例27中所述(研究ham难辨梭菌2010-02)。

[0070] 图14:三个免疫组的仓鼠与未免疫对照相比的存活曲线,如实施例28所述(研究ham难辨梭菌2010-02,续)。

[0071] 图15:显示仓鼠中针对难辨梭菌突变体毒素不同配制物的相对中和抗体应答的图(研究ham难辨梭菌2010-03),如实施例29所述。

[0072] 图16A-B:显示食蟹猴中针对化学失活的遗传突变体毒素A和B(分别为SEQ ID NO: 4和6)的强的相对中和抗体应答的图,如实施例30所述。

[0073] 图17:A3-25mAb IgE的轻链(VL)和重链(HL)可变区的氨基酸序列。信号肽-突出显示;CDR-斜体并加下划线;恒定区-粗体并加下划线(未显示完整序列)。

[0074] 图18:显示毒素中和测定中个别毒素A单克隆抗体的滴定的图,其中使用ATP水平(由相对光单位-RLU来定量)作为细胞生存力的指标。与毒素对照($4 \times EC_{50}$)相比,mAb A80-29、A65-33、A60-22和A3-25对毒素A具有随浓度提高的中和作用(但对阳性兔抗毒素A对照的水平却不这样)。mAbA50-10、A56-33和A58-46未中和毒素A。只有细胞的对照是 $1-1.5 \times 10^6$ RLU。

[0075] 图19:通过BiaCore对毒素B mAb的8个表位的组作图。

[0076] 图20A-C:毒素A mAb的组合的协同中和活性:将中和抗体A60-22,A65-33,和A80-29的不同稀释液加至浓度增加的A3-25mAb会协同提高毒素A的中和(无论是何稀释)。示出了仅有毒素A($4 \times EC_{50}$)的对照的RLU($<0.3 \times 10^6$),而仅有细胞的对照是 $2-2.5 \times 10^6$ RLU,如图20B和图20C中所示。

[0077] 图21:毒素B mAb的组合的协同中和活性:毒素B由mAb8-26、B60-2和B59-3的中和在图21A中示出。毒素B的中和在将B8-26与B59-3的稀释液组合后会协同提高(图21B)。

[0078] 图22:Western印迹,显示了Rac1GTPase的表达在遗传突变体毒素B(SEQ ID NO:6)提取物中自24至96小时降低,但在野生型毒素B(SEQ ID NO:2)处理的提取物中却并不如此。该印迹还显示了,Rac1在毒素B-处理的提取物中是葡萄糖基化的,但是在遗传突变体毒素B处理的提取物中却不是。

[0079] 图23A-K:代表体外细胞毒性测试结果的图,其中将ATP水平(RLU)针对如下作图:浓度提高的难辨梭菌培养基和仓鼠血清库(■);来自各菌株和仓鼠血清库的粗制毒素(培养收获物)(●);纯化的毒素(得自List Biologicals的市售毒素)和仓鼠血清库(▲);粗制毒素(▼),对照;和纯化的毒素(◆),对照。将来自各菌株的毒素以 $4 \times EC_{50}$ 值加至细胞。图23显示了,包括突变体TcdA(SEQ ID NO:4)和突变体TcdB(SEQ ID NO:6)的免疫原性组合物(其中突变体毒素由EDC失活,例如,根据本文所述的实施例29,表15)诱导了中和抗体,所述中和抗体对来自至少如下16种不同CDC菌株的难辨梭菌的毒素展现出中和活性(与各自仅有毒素的对照相比):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)。

[0080] 图24:说明了突变体难辨梭菌毒素的示例性EDC/NHS失活,导致了至少三种可能类型的修饰:交联、甘氨酸加合物、和β-丙氨酸加合物。A部分说明了交联。三重突变体毒素的羧酸残基通过加成EDC和NHS而激活。激活的酯与伯胺反应以形成稳定的酰胺键,导致了分子内和分子间的交联。B部分说明了甘氨酸加合物的形成。失活之后,通过加成甘氨酸形成稳定的酰胺键而使残余的激活酯猝灭。C部分说明了β-丙氨酸加合物的形成。3摩尔的NHS能够与1摩尔的EDC反应以形成激活的β-丙氨酸。这继而与伯胺反应形成稳定的酰胺键。

[0081] 图25:说明了示例性的突变体难辨梭菌毒素EDC/NHS失活,导致至少一种如下类型的修饰:(A)交联,(B)甘氨酸加合物,和(C)β-丙氨酸加合物。

[0082] 序列简述

- [0083] SEQ ID NO:1示出了野生型难辨梭菌630毒素A(TcdA)的氨基酸序列。
- [0084] SEQ ID NO:2示出了野生型难辨梭菌630毒素B(TcdB)的氨基酸序列。
- [0085] SEQ ID NO:3示出了与SEQ ID NO:1相比在位置285和287具有突变的突变体TcdA的氨基酸序列。
- [0086] SEQ ID NO:4示出了与SEQ ID NO:1相比在位置285,287和700具有突变的突变体TcdA的氨基酸序列。
- [0087] SEQ ID NO:5示出了与SEQ ID NO:2相比在位置286和288具有突变的突变体TcdB的氨基酸序列。
- [0088] SEQ ID NO:6示出了与SEQ ID NO:2相比在位置286,288和698具有突变的突变体TcdB的氨基酸序列。
- [0089] SEQ ID NO:7示出了与SEQ ID NO:1相比在位置269,272,285,287,460,462和700具有突变的突变体TcdA的氨基酸序列。
- [0090] SEQ ID NO:8示出了与SEQ ID NO:2相比在位置270,273,286,288,461,463和698具有突变的突变体TcdB的氨基酸序列。
- [0091] SEQ ID NO:9示出了编码野生型难辨梭菌630毒素A(TcdA)的DNA序列。
- [0092] SEQ ID NO:10示出了编码野生型难辨梭菌630毒素B(TcdB)的DNA序列。
- [0093] SEQ ID NO:11示出了编码SEQ ID NO:3的DNA序列。
- [0094] SEQ ID NO:12示出了编码SEQ ID NO:4的DNA序列。
- [0095] SEQ ID NO:13示出了编码SEQ ID NO:5的DNA序列。
- [0096] SEQ ID NO:14示出了编码SEQ ID NO:6的DNA序列。
- [0097] SEQ ID NO:15示出了野生型难辨梭菌R20291TcdA的氨基酸序列。
- [0098] SEQ ID NO:16示出了编码SEQ ID NO:15的DNA序列。
- [0099] SEQ ID NO:17示出了野生型难辨梭菌CD196TcdA的氨基酸序列。
- [0100] SEQ ID NO:18示出了编码SEQ ID NO:17的DNA序列。
- [0101] SEQ ID NO:19示出了野生型难辨梭菌VPI10463TcdA的氨基酸序列。
- [0102] SEQ ID NO:20示出了编码SEQ ID NO:19的DNA序列。
- [0103] SEQ ID NO:21示出了野生型难辨梭菌R20291TcdB的氨基酸序列。
- [0104] SEQ ID NO:22示出了编码SEQ ID NO:21的DNA序列。
- [0105] SEQ ID NO:23示出了野生型难辨梭菌CD196TcdB的氨基酸序列。
- [0106] SEQ ID NO:24示出了编码SEQ ID NO:23的DNA序列。
- [0107] SEQ ID NO:25示出了野生型难辨梭菌VPI10463TcdB的氨基酸序列。
- [0108] SEQ ID NO:26示出了编码SEQ ID NO:25的DNA序列。
- [0109] SEQ ID NO:27示出了野生型难辨梭菌VPI10463的致病性基因座的DNA序列。
- [0110] SEQ ID NO:28示出了SEQ ID NO:1的残基101-293的氨基酸序列。
- [0111] SEQ ID NO:29示出了SEQ ID NO:1的残基1-542的氨基酸序列。
- [0112] SEQ ID NO:30示出了SEQ ID NO:2的残基101-293的氨基酸序列。
- [0113] SEQ ID NO:31示出了SEQ ID NO:2的残基1-543的氨基酸序列。
- [0114] SEQ ID NO:32示出了SEQ ID NO:1的残基543-809的氨基酸序列。
- [0115] SEQ ID NO:33示出了SEQ ID NO:2的残基544-767的氨基酸序列。

- [0116] SEQ ID NO:34示出了突变体TcdA的氨基酸序列,其中残基101,269,272,285,287,460,462,541,542,543,589,655,和700可为任意氨基酸。
- [0117] SEQ ID NO:35示出了突变体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。
- [0118] SEQ ID NO:36示出了难辨梭菌TcdA(A3-25mAb)的中和抗体的可变轻链的氨基酸序列。
- [0119] SEQ ID NO:37示出了难辨梭菌TcdA(A3-25mAb)的中和抗体的可变重链的氨基酸序列。
- [0120] SEQ ID NO:38示出了难辨梭菌TcdA(A3-25mAb)的中和抗体的可变轻链的CDR1的氨基酸序列。
- [0121] SEQ ID NO:39示出了难辨梭菌TcdA(A3-25mAb)的中和抗体的可变轻链的CDR2的氨基酸序列。
- [0122] SEQ ID NO:40示出了难辨梭菌TcdA(A3-25mAb)的中和抗体的可变轻链的CDR3的氨基酸序列。
- [0123] SEQ ID NO:41示出了难辨梭菌TcdA(A3-25mAb)的中和抗体的可变重链的CDR1的氨基酸序列。
- [0124] SEQ ID NO:42示出了难辨梭菌TcdA(A3-25mAb)的中和抗体的可变重链的CDR2的氨基酸序列。
- [0125] SEQ ID NO:43示出了难辨梭菌TcdA(A3-25mAb)的中和抗体的可变重链的CDR3的氨基酸序列。
- [0126] SEQ ID NO:44示出了编码SEQ ID NO:3的DNA序列。
- [0127] SEQ ID NO:45示出了编码SEQ ID NO:4的DNA序列。
- [0128] SEQ ID NO:46示出了编码SEQ ID NO:5的DNA序列。
- [0129] SEQ ID NO:47示出了编码SEQ ID NO:6的DNA序列。
- [0130] SEQ ID NO:48示出了免疫刺激性寡核苷酸ODN CpG24555的核苷酸序列。
- [0131] SEQ ID NO:49示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)的可变重链的氨基酸序列。
- [0132] SEQ ID NO:50示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变重链的信号肽的氨基酸序列。
- [0133] SEQ ID NO:51示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变重链的CDR1的氨基酸序列。
- [0134] SEQ ID NO:52示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变重链的CDR2的氨基酸序列。
- [0135] SEQ ID NO:53示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变重链的CDR3的氨基酸序列。
- [0136] SEQ ID NO:54示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变重链的恒定区的氨基酸序列。
- [0137] SEQ ID NO:55示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变轻链的氨基酸序列。
- [0138] SEQ ID NO:56示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变轻链的信号肽的氨基酸序列。

基酸序列。

[0139] SEQ ID NO:57示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变轻链的CDR1的氨基酸序列。

[0140] SEQ ID NO:58示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变轻链的CDR2的氨基酸序列。

[0141] SEQ ID NO:59示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B8-26mAb)可变轻链的CDR3的氨基酸序列。

[0142] SEQ ID NO:60示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变重链的氨基酸序列。

[0143] SEQ ID NO:61示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变重链的信号肽的氨基酸序列。

[0144] SEQ ID NO:62示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变重链的CDR1的氨基酸序列。

[0145] SEQ ID NO:63示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变重链的CDR2的氨基酸序列。

[0146] SEQ ID NO:64示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变重链的CDR3的氨基酸序列。

[0147] SEQ ID NO:65示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变重链的恒定区的氨基酸序列。

[0148] SEQ ID NO:66示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变轻链的氨基酸序列。

[0149] SEQ ID NO:67示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变轻链的信号肽的氨基酸序列。

[0150] SEQ ID NO:68示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变轻链的CDR1的氨基酸序列。

[0151] SEQ ID NO:69示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变轻链的CDR2的氨基酸序列。

[0152] SEQ ID NO:70示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B59-3mAb)可变轻链的CDR3的氨基酸序列。

[0153] SEQ ID NO:71示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变重链的氨基酸序列。

[0154] SEQ ID NO:72示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变重链的信号肽的氨基酸序列。

[0155] SEQ ID NO:73示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变重链的CDR1的氨基酸序列。

[0156] SEQ ID NO:74示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变重链的CDR2的氨基酸序列。

[0157] SEQ ID NO:75示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变重链的CDR3的氨基酸序列。

[0158] SEQ ID NO:76示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变重链的恒定区的氨基酸序列。

[0159] SEQ ID NO:77示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变轻链的氨基酸序列。

- [0160] SEQ ID NO:78示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变轻链的信号肽的氨基酸序列。
- [0161] SEQ ID NO:79示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变轻链的CDR1的氨基酸序列。
- [0162] SEQ ID NO:80示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变轻链的CDR2的氨基酸序列。
- [0163] SEQ ID NO:81示出了难辨梭菌TcdB中和抗体(B9-30mAb)可变轻链的CDR3的氨基酸序列。
- [0164] SEQ ID NO:82示出了突变体TcdB的氨基酸序列,其中位置102,270,273,286,288,384,461,463,520,543,544,587,600,653,698和751处的残基可以是任意氨基酸。
- [0165] SEQ ID NO:83示出了与SEQ ID NO:1相比,在位置269,272,285,287,460,462和700处具有突变的突变体TcdA的氨基酸序列,其中位置1处的甲硫氨酸缺失。
- [0166] SEQ ID NO:84示出了与SEQ ID NO:1相比,在位置285,287和700处具有突变的突变体难辨梭菌毒素A的氨基酸序列,其中位置1处的甲硫氨酸缺失。
- [0167] SEQ ID NO:85示出了与SEQ ID NO:2相比,在位置270,273,286,288,461,463和698处具有突变的突变体难辨梭菌毒素B的氨基酸序列,其中位置1处的甲硫氨酸缺失。
- [0168] SEQ ID NO:86示出了与SEQ ID NO:2相比,在位置286,288和698处具有突变的突变体难辨梭菌毒素B的氨基酸序列,其中位置1处的甲硫氨酸缺失。
- [0169] SEQ ID NO:87示出了野生型难辨梭菌2004013TcdA的氨基酸序列。
- [0170] SEQ ID NO:88示出了野生型难辨梭菌2004111TcdA的氨基酸序列。
- [0171] SEQ ID NO:89示出了野生型难辨梭菌2004118TcdA的氨基酸序列。
- [0172] SEQ ID NO:90示出了野生型难辨梭菌2004205TcdA的氨基酸序列。
- [0173] SEQ ID NO:91示出了野生型难辨梭菌2004206TcdA的氨基酸序列。
- [0174] SEQ ID NO:92示出了野生型难辨梭菌2005022TcdA的氨基酸序列。
- [0175] SEQ ID NO:93示出了野生型难辨梭菌2005088TcdA的氨基酸序列。
- [0176] SEQ ID NO:94示出了野生型难辨梭菌2005283TcdA的氨基酸序列。
- [0177] SEQ ID NO:95示出了野生型难辨梭菌2005325TcdA的氨基酸序列。
- [0178] SEQ ID NO:96示出了野生型难辨梭菌2005359TcdA的氨基酸序列。
- [0179] SEQ ID NO:97示出了野生型难辨梭菌2006017TcdA的氨基酸序列。
- [0180] SEQ ID NO:98示出了野生型难辨梭菌2007070TcdA的氨基酸序列。
- [0181] SEQ ID NO:99示出了野生型难辨梭菌2007217TcdA的氨基酸序列。
- [0182] SEQ ID NO:100示出了野生型难辨梭菌2007302TcdA的氨基酸序列。
- [0183] SEQ ID NO:101示出了野生型难辨梭菌2007816TcdA的氨基酸序列。
- [0184] SEQ ID NO:102示出了野生型难辨梭菌2007838TcdA的氨基酸序列。
- [0185] SEQ ID NO:103示出了野生型难辨梭菌2007858TcdA的氨基酸序列。
- [0186] SEQ ID NO:104示出了野生型难辨梭菌2007886TcdA的氨基酸序列。
- [0187] SEQ ID NO:105示出了野生型难辨梭菌2008222TcdA的氨基酸序列。
- [0188] SEQ ID NO:106示出了野生型难辨梭菌2009078TcdA的氨基酸序列。
- [0189] SEQ ID NO:107示出了野生型难辨梭菌2009087TcdA的氨基酸序列。

- [0190] SEQ ID NO:108示出了野生型难辨梭菌2009141TcdA的氨基酸序列。
- [0191] SEQ ID NO:109示出了野生型难辨梭菌2009292TcdA的氨基酸序列。
- [0192] SEQ ID NO:110示出了野生型难辨梭菌2004013TcdB的氨基酸序列。
- [0193] SEQ ID NO:111示出了野生型难辨梭菌2004111TcdB的氨基酸序列。
- [0194] SEQ ID NO:112示出了野生型难辨梭菌2004118TcdB的氨基酸序列。
- [0195] SEQ ID NO:113示出了野生型难辨梭菌2004205TcdB的氨基酸序列。
- [0196] SEQ ID NO:114示出了野生型难辨梭菌2004206TcdB的氨基酸序列。
- [0197] SEQ ID NO:115示出了野生型难辨梭菌2005022TcdB的氨基酸序列。
- [0198] SEQ ID NO:116示出了野生型难辨梭菌2005088TcdB的氨基酸序列。
- [0199] SEQ ID NO:117示出了野生型难辨梭菌2005283TcdB的氨基酸序列。
- [0200] SEQ ID NO:118示出了野生型难辨梭菌2005325TcdB的氨基酸序列。
- [0201] SEQ ID NO:119示出了野生型难辨梭菌2005359TcdB的氨基酸序列。
- [0202] SEQ ID NO:120示出了野生型难辨梭菌2006017TcdB的氨基酸序列。
- [0203] SEQ ID NO:121示出了野生型难辨梭菌2006376TcdB的氨基酸序列。
- [0204] SEQ ID NO:122示出了野生型难辨梭菌2007070TcdB的氨基酸序列。
- [0205] SEQ ID NO:123示出了野生型难辨梭菌2007217TcdB的氨基酸序列。
- [0206] SEQ ID NO:124示出了野生型难辨梭菌2007302TcdB的氨基酸序列。
- [0207] SEQ ID NO:125示出了野生型难辨梭菌2007816TcdB的氨基酸序列。
- [0208] SEQ ID NO:126示出了野生型难辨梭菌2007838TcdB的氨基酸序列。
- [0209] SEQ ID NO:127示出了野生型难辨梭菌2007858TcdB的氨基酸序列。
- [0210] SEQ ID NO:128示出了野生型难辨梭菌2007886TcdB的氨基酸序列。
- [0211] SEQ ID NO:129示出了野生型难辨梭菌2008222TcdB的氨基酸序列。
- [0212] SEQ ID NO:130示出了野生型难辨梭菌2009078TcdB的氨基酸序列。
- [0213] SEQ ID NO:131示出了野生型难辨梭菌2009087TcdB的氨基酸序列。
- [0214] SEQ ID NO:132示出了野生型难辨梭菌2009141TcdB的氨基酸序列。
- [0215] SEQ ID NO:133示出了野生型难辨梭菌2009292TcdB的氨基酸序列。
- [0216] SEQ ID NO:134示出了野生型难辨梭菌014TcdA的氨基酸序列。
- [0217] SEQ ID NO:135示出了野生型难辨梭菌015TcdA的氨基酸序列。
- [0218] SEQ ID NO:136示出了野生型难辨梭菌020TcdA的氨基酸序列。
- [0219] SEQ ID NO:137示出了野生型难辨梭菌023TcdA的氨基酸序列。
- [0220] SEQ ID NO:138示出了野生型难辨梭菌027TcdA的氨基酸序列。
- [0221] SEQ ID NO:139示出了野生型难辨梭菌029TcdA的氨基酸序列。
- [0222] SEQ ID NO:140示出了野生型难辨梭菌046TcdA的氨基酸序列。
- [0223] SEQ ID NO:141示出了野生型难辨梭菌014TcdB的氨基酸序列。
- [0224] SEQ ID NO:142示出了野生型难辨梭菌015TcdB的氨基酸序列。
- [0225] SEQ ID NO:143示出了野生型难辨梭菌020TcdB的氨基酸序列。
- [0226] SEQ ID NO:144示出了野生型难辨梭菌023TcdB的氨基酸序列。
- [0227] SEQ ID NO:145示出了野生型难辨梭菌027TcdB的氨基酸序列。
- [0228] SEQ ID NO:146示出了野生型难辨梭菌029TcdB的氨基酸序列。

[0229] SEQ ID NO:147示出了野生型难辨梭菌046TcdB的氨基酸序列。
[0230] SEQ ID NO:148示出了野生型难辨梭菌001TcdA的氨基酸序列。
[0231] SEQ ID NO:149示出了野生型难辨梭菌002TcdA的氨基酸序列。
[0232] SEQ ID NO:150示出了野生型难辨梭菌003TcdA的氨基酸序列。
[0233] SEQ ID NO:151示出了野生型难辨梭菌004TcdA的氨基酸序列。
[0234] SEQ ID NO:152示出了野生型难辨梭菌070TcdA的氨基酸序列。
[0235] SEQ ID NO:153示出了野生型难辨梭菌075TcdA的氨基酸序列。
[0236] SEQ ID NO:154示出了野生型难辨梭菌077TcdA的氨基酸序列。
[0237] SEQ ID NO:155示出了野生型难辨梭菌081TcdA的氨基酸序列。
[0238] SEQ ID NO:156示出了野生型难辨梭菌117TcdA的氨基酸序列。
[0239] SEQ ID NO:157示出了野生型难辨梭菌131TcdA的氨基酸序列。
[0240] SEQ ID NO:158示出了野生型难辨梭菌001TcdB的氨基酸序列。
[0241] SEQ ID NO:159示出了野生型难辨梭菌002TcdB的氨基酸序列。
[0242] SEQ ID NO:160示出了野生型难辨梭菌003TcdB的氨基酸序列。
[0243] SEQ ID NO:161示出了野生型难辨梭菌004TcdB的氨基酸序列。
[0244] SEQ ID NO:162示出了野生型难辨梭菌070TcdB的氨基酸序列。
[0245] SEQ ID NO:163示出了野生型难辨梭菌075TcdB的氨基酸序列。
[0246] SEQ ID NO:164示出了野生型难辨梭菌077TcdB的氨基酸序列。
[0247] SEQ ID NO:165示出了野生型难辨梭菌081TcdB的氨基酸序列。
[0248] SEQ ID NO:166示出了野生型难辨梭菌117TcdB的氨基酸序列。
[0249] SEQ ID NO:167示出了野生型难辨梭菌131TcdB的氨基酸序列。
[0250] SEQ ID NO:168示出了野生型难辨梭菌053TcdA的氨基酸序列。
[0251] SEQ ID NO:169示出了野生型难辨梭菌078TcdA的氨基酸序列。
[0252] SEQ ID NO:170示出了野生型难辨梭菌087TcdA的氨基酸序列。
[0253] SEQ ID NO:171示出了野生型难辨梭菌095TcdA的氨基酸序列。
[0254] SEQ ID NO:172示出了野生型难辨梭菌126TcdA的氨基酸序列。
[0255] SEQ ID NO:173示出了野生型难辨梭菌053TcdB的氨基酸序列。
[0256] SEQ ID NO:174示出了野生型难辨梭菌078TcdB的氨基酸序列。
[0257] SEQ ID NO:175示出了野生型难辨梭菌087TcdB的氨基酸序列。
[0258] SEQ ID NO:176示出了野生型难辨梭菌095TcdB的氨基酸序列。
[0259] SEQ ID NO:177示出了野生型难辨梭菌126TcdB的氨基酸序列。

[0260] 发明详述

[0261] 本发明人令人吃惊地发现了(与其它事项一起)突变体难辨梭菌毒素A和毒素B,以及其方法。所述突变体部分特征在于,其是免疫原性的并且与各自的毒素野生型的形式相比展现出降低的细胞毒性。本发明还涉及其免疫原性部分、其生物学等价物、和包含编码任何前述物质的核酸序列的分离的多核苷酸。

[0262] 本文所述的免疫原性组合物出乎意料的证实了引发针对难辨梭菌毒素的新型中和抗体的能力,并且其可具有赋予针对难辨梭菌攻击的主动和/或被动防护的能力。所述新型的抗体针对毒素A和毒素B的各种表位。本发明人还发现至少两种中和性单克隆抗体的组

合能够在毒素A和毒素B各自的体外中和中展现出出乎意料的协同效应。

[0263] 与未施用本文所述的本发明组合物的哺乳动物相比,所述组合物可用于对哺乳动物中的难辨梭菌感染、难辨梭菌相关疾病(CDAD)、综合征、病况、症状、和/或其并发症进行治疗、预防、降低其风险、降低其发生、降低其严重性、和/或延迟其发病。

[0264] 另外,本发明人发现了能够稳定表达突变体难辨梭菌毒素A和毒素B的重组的不产孢子难辨梭菌细胞,以及用于产生其的方法。

[0265] 免疫原性组合物

[0266] 在一方面,本发明涉及免疫原性组合物,其包括突变体难辨梭菌毒素。所述突变体难辨梭菌毒素包括氨基酸序列,其相对于相应的野生型难辨梭菌毒素具有葡萄糖基转移酶结构域中的至少一个突变以及半胱氨酸蛋白酶结构域中的至少一个突变。

[0267] 本文所用的术语“野生型”指的是自然界中发现的形式。例如,野生型多肽或多核苷酸序列是存在于生物体中的序列,该生物体可以分离自自然界中的来源并且未被人为操作有意地修饰。本发明还涉及分离的多核苷酸,其包含编码任何上述多肽的核酸序列。另外,本发明涉及任何上述组合物在治疗、预防哺乳动物的难辨梭菌感染、难辨梭菌相关疾病、综合征、疾病状况、症状和/或并发症,与未给药所述组合物的哺乳动物相比降低其风险,降低其严重性,减少其发病率和/或延缓其发生的用途,以及用于制备所述组合物的方法。

[0268] 本文所用的“免疫原性组合物”或“免疫原”指在给药组合物的哺乳动物中引起免疫应答的组合物。

[0269] “免疫应答”指在受体患者中发展针对难辨梭菌毒素的有益的体液(抗体介导的)和/或细胞(抗原特异性T细胞或其分泌产物)应答。免疫应答可以是体液的、细胞的或者这两者。

[0270] 免疫应答可以是给药免疫原性组合物、免疫原诱导的主动应答。或者,免疫应答可以是给药抗体或致敏T细胞诱导的被动应答。

[0271] 体液(抗体介导的)免疫应答的存在可以通过例如本领域已知的基于细胞的测定如中和抗体测定、ELISA等来确定。

[0272] 细胞免疫应答通常由与I类或II类MHC分子相关的多肽表位的呈递引起以激活抗原特异性CD4⁺T辅助细胞和/或CD8⁺细胞毒性T细胞。应答还可以涉及单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、嗜碱粒细胞、树状细胞、星形细胞、小胶质细胞、嗜酸粒细胞或自然免疫的其他组分的活化。细胞介导的免疫应答的存在可以通过本领域已知的增殖测定(CD4⁺T细胞)或CTL(细胞毒性T淋巴细胞)来确定。

[0273] 在一个实施方案中,免疫原性组合物为疫苗组合物。本文所用的“疫苗组合物”是引起给药所述组合物的哺乳动物的免疫应答的组合物。疫苗组合物可以保护被免疫的哺乳动物对抗免疫性物质或免疫交叉反应性物质随后的攻击。与相同条件下的未免疫的哺乳动物相比,对于症状或感染的减少,保护可以是完全或部分的。

[0274] 本文所述的免疫原性组合物是交叉反应性的,这表示具有能够引起针对与组合物所来源的菌株不同的另一难辨梭菌菌株产生的毒素的有效免疫应答(例如,体液免疫应答)。例如,本文所述的免疫原性组合物(例如,源自难辨梭菌630)可以引起能够结合难辨梭菌的多种菌株产生的毒素(例如,难辨梭菌R20291和VPI10463产生的毒素)的交叉反应性抗

体。参见,例如实施例37。交叉反应性指示细菌免疫原的交叉保护潜力,并且反之亦然。

[0275] 本文所用的术语“交叉保护”指免疫原性组合物诱导的免疫应答预防或减弱不同细菌菌株或相同属的物种引起的感染的能力。例如,本文所述的免疫原性组合物(例如,源自难辨梭菌630)可以在哺乳动物中诱导有效的免疫应答以减弱哺乳动物中除了630以外的菌株(例如,难辨梭菌R20291)引起的难辨梭菌感染和/或减弱哺乳动物中除了630以外的菌株(例如,难辨梭菌R20291)引起的难辨梭菌疾病。

[0276] 免疫原性组合物或免疫原引起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。在优选的实施方案中,免疫原性组合物或免疫原在给药所述组合物的人中引起免疫应答。

[0277] 如上文所述,毒素A(TcdA)和毒素B(TcdB)是同源葡萄糖基转移酶,其失活Rho/Rac/Ras家族的小GTP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作用、膜易位、自体蛋白水解加工和GTP酶的单糖基化的多步机制。许多这些功能活性已经归因于毒素的一级序列中的分离区域,并且已经进行了毒素的成像以显示这些分子在结构上是相似的。

[0278] TcdA的野生型基因具有约8130个核苷酸,其编码具有约2710氨基酸的约308-kDa的减少分子量的蛋白。如本文所用,野生型难辨梭菌TcdA包括来自任何野生型难辨梭菌菌株的难辨梭菌TcdA。野生型难辨梭菌TcdA可以包括这样的野生型难辨梭菌TcdA氨基酸序列,当最优比对时,例如通过使用预定间隙重(gap weight)的程序GAP或BESTFIT时,其与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%或者最优选约100%的相同性。

[0279] 在优选的实施方案中,野生型难辨梭菌TcdA包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,其描述来自难辨梭菌菌株630的TcdA的野生型氨基酸序列(也公开为GenBank登录号YP_001087137.1和/或CAJ67494.1)。难辨梭菌菌株630在本领域中已知为PCR-核糖核酸型012菌株。SEQ ID NO:9描述来自难辨梭菌菌株630的TcdA的野生型基因,其也公开为GenBank登录号NC_009089.1。

[0280] 野生型难辨梭菌TcdA的另一实例包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,其描述来自难辨梭菌菌株R20291的TcdA的野生型氨基酸序列(也公开为GenBank登录号YP_003217088.1)。难辨梭菌菌株R20291在本领域中已知为高毒性菌株和PCR-核糖核酸型027菌株。来自难辨梭菌菌株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描述来自难辨梭菌菌株R20291的野生型基因,其也公开为GenBank登录号NC_013316.1。

[0281] 野生型难辨梭菌TcdA的另一实例包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,其描述来自难辨梭菌菌株CD196的TcdA的野生型氨基酸序列(也公开为GenBank登录号CBA61156.1)。CD196是来自最近的加拿大爆发的菌株,并且在本领域中已知为PCR-核糖核酸型027菌株。来自难辨梭菌菌株CD196的TcdA的氨基酸序列与SEQ ID NO:1具有约98%的相同性,并且与来自难辨梭菌菌株R20291的TcdA具有约100%的相同性。SEQ ID NO:18描述来自难辨梭菌菌株CD196的TcdA的野生型基因,其也公开为GenBank登录号FN538970.1。

[0282] 野生型难辨梭菌TcdA的氨基酸序列的另外的实例包括SEQ ID NO:19,其描述来自难辨梭菌菌株VPI10463的TcdA的野生型氨基酸序列(也公开为GenBank登录号

CAA63564.1)。来自难辨梭菌菌株VPI10463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描述来自难辨梭菌菌株VPI10463的TcdA的野生型基因,其也公开为GenBank登录号X92982.1。

[0283] 野生型难辨梭菌TcdA的另外实例包括来自野生型难辨梭菌菌株的TcdA,其可获得自疾病控制与预防中心(CDC,Atlanta,GA)。本发明人发现,当最优比对时,来自可获得自CDC的野生型难辨梭菌菌株的TcdA的氨基酸序列与SEQ ID NO:1(来自难辨梭菌630的TcdA)的氨基酸残基1-821具有至少约99.3%-100%的相同性。参见表1。

[0284] 本发明人还发现,当最优比对时(例如,最优比对全长序列时),来自野生型难辨梭菌菌株的TcdA的氨基酸序列可以包含与SEQ ID NO:1至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%的相同性。

[0285] 表1:获得自CDC的野生型难辨梭菌菌株以及最优比对时来自各种野生型难辨梭菌菌株的TcdA的氨基酸残基1-821与SEQ ID NO:1的氨基酸残基1-821的百分比相同性

[0286]

表 1: CDC 的野生型难辨梭菌菌株	
难辨梭菌菌株 ID	与 SEQ ID NO: 1 的残基 1-821 的大约%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

[0287]

2009087	100
2009141	100
2009292	99.6

[0288] 因此,在一个实施方案中,野生型难辨梭菌TcdA氨基酸序列包含至少约500、600、700或800个连续残基的序列,当最优比对时,例如通过使用预定间隙重的程序GAP或BESTFIT时,其与SEQ ID NO:1的残基1-900之间相同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%或者最优选约100%的相同性。实例包括上文所述的菌株(例如R20291、CD196等)以及表1中所列的那些菌株。

[0289] 在另一实施方案中,野生型难辨梭菌TcdA氨基酸序列包含当最优比对时与选自SEQ ID NO:87-109的任何序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、优选约97%、优选约98%、更优选约99%或者最优选约100%的相同性的序列。参见表1-a。

[0290]

表 1-a: 野生型难辨梭菌菌株	
难辨梭菌菌株 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

[0291]

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	
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

[0292]

087	SEQ ID NO: 170
095	SEQ ID NO: 171
106	
117	SEQ ID NO: 156
126	SEQ ID NO: 172
131	SEQ ID NO: 157

[0293] TcdB的野生型基因具有约7098个核苷酸,其编码具有约2366个氨基酸的约270kDa的减少分子量的蛋白。如本文所用,野生型难辨梭菌TcdB包含来自任何野生型难辨梭菌菌株的难辨梭菌TcdB。野生型难辨梭菌TcdB可以包含当最优比对时,例如通过使用预定间隙重的程序GAP或BESTFIT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%或者最优选约100%的相同性的序列。在优选的实施方案中,野生型难辨梭菌TcdB包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,其描述来自难辨梭菌菌株630的TcdB的野生型氨基酸序列(也公开为GenBank登录号YP_001087135.1和/或CAJ67492)。SEQ ID NO:10描述来自难辨梭菌菌株630的TcdB的野生型基因,其也公开为GenBank登录号NC_009089.1。

[0294] 野生型难辨梭菌TcdB的另一实例包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,其描述来自难辨梭菌菌株R20291的TcdB的野生型氨基酸序列(也公开为GenBank登录号YP_003217086.1和/或CBE02479.1)。来自难辨梭菌菌株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描述来自难辨梭菌菌株R20291的TcdB的野生型基因,其也公开为GenBank登录号NC_013316.1。

[0295] 野生型难辨梭菌TcdB的另一实例包含SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列,其描述来自难辨梭菌菌株CD196的TcdB的野生型氨基酸序列(也公开为GenBank登录号YP_003213639.1和/或CBA61153.1)。SEQ ID NO:24描述来自难辨梭菌菌株CD196的TcdB的野生型基因,其也公开为GenBank登录号NC_013315.1。来自难辨梭菌菌株CD196的TcdB的氨基酸序列与SEQ ID NO:2具有约92%的相同性。

[0296] 野生型难辨梭菌TcdB的氨基酸序列的其他实例包含SEQ ID NO:25,其描述来自难辨梭菌菌株VPI10463的TcdB的野生型氨基酸序列(也公开为GenBank登录号P18177和/或CAA37298)。来自难辨梭菌菌株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描述来自难辨梭菌菌株VPI10463的TcdB的野生型基因,其也公开为GenBank登录号X53138.1。

[0297] 野生型难辨梭菌TcdB的其他实例包括来自野生型难辨梭菌菌株的TcdB,其可获得自疾病控制与预防中心(CDC,Atlanta,GA)。本发明人发现,当最优比对时,来自可获得自CDC的野生型难辨梭菌菌株的TcdB的氨基酸序列与SEQ ID NO:2(来自难辨梭菌630的TcdB)的氨基酸残基1-821具有至少约96%-100%的相同性。参见表2。

[0298] 表2:获得自CDC的野生型难辨梭菌菌株以及最优比对时来自各种野生型难辨梭菌菌株的TcdB的氨基酸残基1-821与SEQ ID NO:2的氨基酸残基1-821的百分比相同性

[0299]

表 2: 来自 CDC 的野生型难辨梭菌菌株	
难辨梭菌菌株 ID	与 SEQ ID NO: 2 的残基 1-821 的大约%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

[0300] 因此,在一个实施方案中,野生型难辨梭菌TcdB氨基酸序列包含至少约500、600、700或800个连续残基的序列,当最优比对时,例如通过使用预定间隙重的程序GAP或BESTFIT时,其与SEQ ID NO:2的残基1-900之间相同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%或者最优选约100%的相同性。实例包括上文所述的菌株(例如R20291、CD196等)以及表2中所列的那些菌株。

[0301] 在另一实施方案中,野生型难辨梭菌TcdB氨基酸序列包含当最优比对时与选自SEQ ID NO:110-133的任何序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、优选约97%、优选约98%、更优选约99%或者最优选约100%的相同性的序列。参见表2-a。

[0302]

表 2-a 野生型难辨梭菌菌株	
难辨梭菌菌株 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

[0303]

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	
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
059	
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	
117	SEQ ID NO: 166
126	SEQ ID NO: 177

[0304]

131

SEQ ID NO: 167

[0305] 毒素A和B(tcdA和tcdB)的基因是19.6-kb基因座的一部分(致病性基因座, PaLoc),其包含3个额外的小开放阅读框(ORF)tcdD、tcdE和tcdC,并且可以视为对毒性是有用的。PaLoc已知为在产毒菌种中是稳定且保守的。其存在于目前分析的所有产毒菌株中相同的染色体整合位点。在非产毒菌株中不存在致病性基因座(PaLoc)。因此,本文所述的野生型难辨梭菌菌株的特征在于存在致病性基因座。本文所述的野生型难辨梭菌菌株的另一优选特征在于产生TcdA和TcdB。

[0306] 在一个实施方案中,野生型难辨梭菌菌株是具有致病性基因座的菌株,该致病性基因座与难辨梭菌630或VPI10463的致病性基因座至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约98%、更优选约99%或者最优选约100%相同。难辨梭菌VPI10463的总致病性基因座序列在EMBL数据库注册为序列登录号X92982,还示于SEQ ID NO:26。PaLoc与参考菌株VPI10463相同的菌株优选称为毒素型0。毒素型I-VII、IX、XII-XV和XVIII-XXIV的菌株产生TcdA和TcdB,无论它们的毒素基因的变异。

[0307] 葡萄糖基转移酶结构域位于毒素的N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。不被任何机制或理论所束缚,认为两种毒素中的葡萄糖基转移酶活性催化Rho/Rac/Ras超家族中小GTP-结合蛋白的单糖基化。这些GTP结合蛋白的糖基化后,细胞生理被明显修饰,使得毒素感染的宿主细胞丧失结构完整性和重要信号转导途径的破坏。与锰、.尿苷二磷酸(UDP)和葡萄糖结合有关的Asp-Xaa-Asp(DXD)基序是葡萄糖基转移酶结构域的典型特征。不被机制和理论束缚,认为对催化活性重要的残基如DXD基序在来自已知的“历史”菌株如630的TcdB和来自高毒性菌株如R20291的TcdB直接不改变。DXD基序位于野生型难辨梭菌TcdA的残基285-287(根据SEQ ID NO:1的编号)和野生型难辨梭菌TcdB的残基286-288(根据SEQ ID NO:2的编号)。

[0308] 整体比对算法(例如序列分析程序)为本领域已知,并且可以用于最优比对两个或多个氨基酸毒素序列以确定毒素是否包含特定的标识序列(例如,下文所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)。将最优比对的序列与各自的参考序列(例如,TcdA的SEQ ID NO:1或TcdB的SEQ ID NO:2)以确定标识基序的存在。“最优比对”指给出最高百分比相同性分数的比对。这样的比对可以利用已知的序列分析程序进行。在一个实施方案中,使用预定参数的CLUSTAL比对(如CLUSTALW)通过比较查询序列与参考序列来鉴定合适的野生型毒素。保守氨基酸残基的相对编号基于参考氨基酸序列的残基编号以表示比对的序列中的小插入或缺失(例如,5个氨基酸或更少)。

[0309] 本文所用的术语“根据...的编号”指给定氨基酸或多核苷酸序列与参考序列比较时的参考序列的残基的编号。换言之,给定聚合物的数目或残基位置相对于参考序列而不是给定氨基酸或多核苷酸序列中残基的实际数值位置指定。

[0310] 例如,给定氨基酸序列例如高毒性野生型难辨梭菌菌株的给定氨基酸序列可以在必要时通过引入间隙与参考序列(例如,历史野生型难辨梭菌菌株如630的序列)进行比对以优化两个序列之间的匹配。在这些情况下,虽然存在间隙,但是相对于进行比对的参考序列指定给定氨基酸或多核苷酸中的残基编号。本文所用的“参考序列”指用作序列比较的基础的限定序列。

[0311] 除非另外指明,本文中所有的TcdA的氨基酸位置指SEQ ID NO:1的编号。除非另外指明,本文中所有的TcdB的氨基酸位置指SEQ ID NO:2的编号。

[0312] 本文所用的TcdA的葡萄糖基转移酶结构域可以在野生型难辨梭菌TcdA如SEQ ID NO:1的示例性残基1、101或102开始,并且可以在示例性残基542、516或293结束。TcdA的残基1和542之间任何最小残基位置可以与最大残基位置组合以限定葡萄糖基转移酶结构域的序列,只要包含DXD基序区域。例如,在一个实施方案中,TcdA的葡萄糖基转移酶结构域包含SEQ ID NO:27,其与SEQ ID NO:1的残基101-293相同,并且其包含DXD基序区域。在另一实施方案中,TcdA的葡萄糖基转移酶结构域包含SEQ ID NO:28,其与SEQ ID NO:1的残基1-542相同。

[0313] 本文所用的TcdB的葡萄糖基转移酶结构域可以在野生型难辨梭菌TcdB如SEQ ID NO:2的示例性残基1、101或102开始,并且可以在示例性残基542、516或293结束。TcdB的残基1和543之间任何最小残基位置可以与最大残基位置组合以限定葡萄糖基转移酶结构域的序列,只要包含DXD基序区域。例如,在一个实施方案中,TcdB的葡萄糖基转移酶结构域包含SEQ ID NO:29,其与SEQ ID NO:2的残基101-293相同,并且其包含DXD基序区域。在另一实施方案中,TcdB的葡萄糖基转移酶结构域包含SEQ ID NO:30,其与SEQ ID NO:1的残基1-543相同。

[0314] 不被理论或机制所束缚,认为TcdA和/或TcdB的N端被自体蛋白水解过程切割以使得葡萄糖基转移酶结构域易位并释放至宿主细胞胞质中,其中其可以与Rac/Ras/Rho GTP酶相互作用。野生型难辨梭菌TcdA据证实在L542和S543之间被切割。野生型难辨梭菌TcdB据证实在L543和G544之间被切割。

[0315] 半胱氨酸蛋白酶结构域与毒素的自体催化蛋白水解活性相关。半胱氨酸蛋白酶结构域位于葡萄糖基转移酶结构域的下流,并且特征在于催化性三元组天冬氨酸、组氨酸和半胱氨酸(DHC),例如野生型TcdA的D589、H655和C700以及野生型TcdB的D587、H653和C698。不被机制或理论束缚,认为催化性三元组在来自“历史”菌株如630的毒素与来自高毒性菌株如R20291的TcdB之间是保守的。

[0316] 本文所用的TcdA的半胱氨酸蛋白酶结构域可以在野生型TcdA如SEQ ID NO:1的示例性残基543开始,并且可以在示例性残基809、769、768或767结束。野生型TcdA的残基543和809之间任何最小残基位置可以与最大残基位置组合以限定半胱氨酸蛋白酶结构域的序列,只要包含催化性三元组DHC基序区域。例如,在一个实施方案中,TcdA的半胱氨酸蛋白酶结构域包含SEQ ID NO:32,其具有位于SEQ ID NO:32的残基47、113和158处的DHC基序区域,其分别对应于根据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的残基543-809相同。

[0317] 本文所用的TcdB的半胱氨酸蛋白酶结构域可以在野生型TcdB如SEQ ID NO:2的示例性残基544开始,并且可以在示例性残基801、767、755或700结束。野生型TcdB的残基544和801之间任何最小残基位置可以与最大残基位置组合以限定半胱氨酸蛋白酶结构域的序列,只要包含催化性三元组DHC基序区域。例如,在一个实施方案中,TcdB的半胱氨酸蛋白酶结构域包含SEQ ID NO:33,其包含位于SEQ ID NO:33的残基44、110和115处的DHC基序区域,其分别对应于根据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,TcdB的残基544-767相同。在另一实施方案中,TcdB的半胱氨酸蛋白酶结构

域包含SEQ ID NO:2,TcdB的残基544-801。

[0318] 在本申请中,免疫原性组合物包含突变体难辨梭菌毒素。本文所用的术语“突变体”指表现出与相应的野生型结构或序列不同的结构或序列的分子,例如通过具有与对应野生型结构相比的交联和/或通过具有当最优比对时例如通过使用预定间隙重的程序GAP或BESTFIT时,与相应的野生型序列相比具有至少一个突变。本文所用的术语“突变体”还包含表现出与相应的野生型分子不同的功能性质(例如,丧失的葡萄糖基转移酶和/或丧失的半胱氨酸蛋白酶活性)的分子。

[0319] 来自任何上述野生型菌株的难辨梭菌毒素可以用作产生突变体难辨梭菌毒素的来源。优选地,难辨梭菌630是产生突变体难辨梭菌毒素的来源。

[0320] 突变可以包括取代、缺失、截短或通常位于该位置的野生型氨基酸残基的修饰。优选地,突变是非保守性氨基酸取代。本发明还涵盖分离的多核苷酸,其包含编码本文所述的任何突变体毒素的核酸序列。

[0321] 本文所用的“非保守性”氨基酸取代指根据下表3的从一类氨基酸变为另一类氨基酸。

[0322]

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

[0323] 非保守性氨基酸取代的实例包括其中天冬氨酸残基(Asp,D)被丙氨酸残基(Ala,A)代替的取代。其他实例包括用天冬酰胺残基(Asn,N)代替天冬氨酸残基(Asp,D),用丙氨酸残基(Ala,A)代替精氨酸(Arg,R)、谷氨酸(Glu,E)、赖氨酸(Lys,K)和/或组氨酸(His,H)残基。

[0324] 保守性取代指例如根据表3的相同类之间的氨基酸交换。

[0325] 本发明的突变体毒素可以通过本领域已知的用于制备突变的技术制备,例如定点诱变、使用诱变剂(例如,UV光)的诱变等。优选地使用定点诱变。或者,可以直接合成具有目标序列的核酸分子。这样的化学合成方法是本领域中已知的。

[0326] 在本发明中,突变体难辨梭菌毒素包含相对于相应的野生型难辨梭菌毒素的葡萄糖基转移酶结构域中的至少1个突变。在一个实施方案中,葡萄糖基转移酶结构域包含至少2个突变。优选地,与相应的野生型难辨梭菌毒素的葡萄糖基转移酶活性相比,突变降低或消除毒素的葡萄糖基转移酶活性。

[0327] 可以进行突变的TcdA的葡萄糖基转移酶结构域中的示例性氨基酸残基包含以下

中的至少一个或其任意组合(与野生型难辨梭菌TcdA相比,根据SEQ ID NO:1的编号):W101、D269、R272、D285、D287、E460、R462、S541和L542。

[0328] TcdA的葡萄糖基转移酶结构域中的示例性突变包含以下中的至少一个或其任意组合(与野生型难辨梭菌TcdA相比):W101A、D269A、R272A、D285A、D287A、E460A、R462A、S541A和L542G。在另一优选的实施方案中,TcdA的葡萄糖基转移酶结构域包含(与野生型难辨梭菌TcdA相比)D285A和D287A突变。

[0329] 可以进行突变的TcdB的葡萄糖基转移酶结构域中的示例性氨基酸残基包含以下中的至少一个或其任意组合(与野生型难辨梭菌TcdB相比,根据SEQ ID NO:2的编号):W102、D270、R273、D286、D288、N384、D461、K463、W520和L543。

[0330] TcdB的葡萄糖基转移酶结构域中的示例性突变以下中的至少一个或其任意组合(与野生型难辨梭菌TcdB相比):W102A、D270A、D270N、R273A、D286A、D288A、N384A、D461A、D461R、K463A、K463E、W520A和L543A。在优选的实施方案中,TcdB的葡萄糖基转移酶结构域包含(与野生型难辨梭菌TcdB相比)L543A。在另一优选的实施方案中,TcdB的葡萄糖基转移酶结构域包含(与野生型难辨梭菌TcdB相比)D286A和D288A突变。

[0331] 上文所述的任何突变可以与半胱氨酸蛋白酶结构域中的突变组合。在本发明中,突变体难辨梭菌毒素包含相对于相应的野生型难辨梭菌毒素的半胱氨酸蛋白酶结构域中的至少1个突变。优选地,与相应的野生型难辨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。

[0332] 可以进行突变的TcdA的半胱氨酸蛋白酶结构域中的示例性氨基酸残基包含以下中的至少一个或其任意组合(与野生型难辨梭菌TcdA相比,根据SEQ ID NO:1的编号):S543、D589、H655和C700。TcdA的葡萄糖基转移酶结构域中的示例性突变包含以下中的至少一个或其任意组合(与野生型难辨梭菌TcdA相比):S543A、D589A、D589N、H655A、C700A。在优选的实施方案中,TcdA的半胱氨酸蛋白酶结构域包含(与野生型难辨梭菌TcdA相比)C700A突变。

[0333] 可以进行突变的TcdB的半胱氨酸蛋白酶结构域中的示例性氨基酸残基包含以下中的至少一个或其任意组合(与野生型难辨梭菌TcdB相比,根据SEQ ID NO:2的编号):G544、D587、H653和C698。在优选的实施方案中,TcdB的半胱氨酸蛋白酶结构域包含(与野生型难辨梭菌TcdB相比)C698A突变。可以进行突变的TcdB的半胱氨酸蛋白酶结构域中的其他氨基酸残基包含(与野生型TcdB相比)K600和/或R751。示例性突变包含K600E和/或R751E。

[0334] 因此,本发明的突变体难辨梭菌毒素具有相对于相应的野生型难辨梭菌毒素的突变的葡萄糖基转移酶结构域和具有相对于相应的野生型难辨梭菌毒素的突变的半胱氨酸蛋白酶结构域。

[0335] 示例性突变体难辨梭菌TcdA包含葡萄糖基转移酶结构域,其包含SEQ ID NO:29,其具有相对于相应的野生型难辨梭菌毒素A的位置285和287处的氨基酸取代;并且包含半胱氨酸蛋白酶结构域,其包含SEQ ID NO:32,其具有相对于相应的野生型难辨梭菌毒素A的位置158处的氨基酸取代。例如,这样的突变体难辨梭菌TcdA包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,其中起始的甲硫氨酸任选地不存在。在另一实施方案中,突变体难辨梭菌毒素A包含SEQ ID NO:84所示的氨基酸序列。

[0336] 突变体难辨梭菌毒素A的其他实例包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,其具有与

SEQ ID NO:1的D269A、R272A、D285A、D287A、E460A、R462A和C700A突变,其中起始的甲硫氨酸任选地不存在。在另一实施方案中,突变体难辨梭菌毒素A包含SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列。

[0337] 另一示例性突变体TcdA包含SEQ ID NO:34,其中位置101、269、272、285、287、460、462、541、542、543、589、655和700处的残基可以是任意氨基酸。

[0338] 在一些实施方案中,突变体难辨梭菌毒素表现出与相应的野生型难辨梭菌毒素相比降低或消除的自体蛋白水解加工。例如,突变体难辨梭菌TcdA可以包含以下残基之一或其任意组合处的突变(与相应的野生型难辨梭菌TcdA相比):S541、L542和/或S543。优选地,突变体难辨梭菌TcdA包含以下突变中的至少一种或其任意组合(与相应的野生型难辨梭菌TcdA相比):S541A、L542G和S543A。

[0339] 另一示例性突变体难辨梭菌TcdA包含(与相应的野生型难辨梭菌TcdA相比)S541A、L542、S543和C700突变。

[0340] 示例性突变体难辨梭菌毒素B包含葡萄糖基转移酶结构域,其包含SEQ ID NO:31,其具有相对于相应的野生型难辨梭菌毒素B的位置286和288处的氨基酸取代,并且包含半胱氨酸蛋白酶结构域,其包含SEQ ID NO:33,其具有相对于相应的野生型难辨梭菌毒素B的位置155处的氨基酸取代。例如,这样的突变体难辨梭菌TcdB包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,其中起始的甲硫氨酸任选地不存在。在另一实施方案中,突变体突变体难辨梭菌毒素A包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列。

[0341] 突变体难辨梭菌TcdB的其他实例包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,其具有相对于SEQ ID NO:2的D270A、R273A、D286A、D288A、D461A、K463A和C698A突变,其中起始的甲硫氨酸任选地不存在。在另一实施方案中,突变体突变体难辨梭菌毒素A包含SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列。

[0342] 另一示例性突变体TcdB包含SEQ ID NO:35,其中位置101、269、272、285、287、460、462、541、542、543、589、655和700处的残基可以是任意氨基酸。

[0343] 作为另一实例,突变体难辨梭菌TcdB可以包含与相应的野生型难辨梭菌TcdB相比的位置543和/或544处的突变。优选地,突变体难辨梭菌TcdB包含(与相应的野生型难辨梭菌TcdB相比)L543和/或G544突变。更优选地,突变体难辨梭菌TcdB包含(与相应的野生型难辨梭菌TcdB相比)L543G和/或G544A突变。

[0344] 另一示例性突变体难辨梭菌TcdB包含(与相应的野生型难辨梭菌TcdB相比)L543G、G544A和C698突变。

[0345] 在一方面,本发明涉及分离的多肽,其具有根据SEQ ID NO:2编号的氨基酸残基1-1500的任何位置处的突变,以限定示例性突变体难辨梭菌毒素B。例如,在一个实施方案中,分离的多肽包含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含根据SEQ ID NO:2编号的位置970和976。优选地,残基830和990之间的突变是取代。在一个实施方案中,突变是非保守性取代,其中Asp(D)和/或Glu(E)氨基酸残基被酸化时不被中和氨基酸残基如赖氨酸(K)、精氨酸(R)和组氨酸(H)代替。示例性突变包括SEQ ID NO:2的E970K、E970R、E970H、E976K、E976R、E976H以限定突变体难辨梭菌毒素B。

[0346] 在另一方面,本发明涉及分离的多肽,其具有根据SEQ ID NO:1编号的氨基酸残基1-1500的任何位置处的突变,以限定示例性突变体难辨梭菌毒素A。例如,在一个实施方案

中,分离的多肽包含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含根据SEQ ID NO:1编号的位置972和978。优选地,残基832和992之间的突变是取代。在一个实施方案中,突变是非保守性取代,其中Asp(D)和/或Glu(E)氨基酸残基被酸化时不被中和氨基酸残基如赖氨酸(K)、精氨酸(R)和组氨酸(H)代替。示例性突变包括SEQ ID NO:1的D972K、D972R、D972H、D978K、D978R、D978H以限定突变体难辨梭菌毒素A。

[0347] 本发明的多肽可以包含起始的甲硫氨酸残基,在一些情况下是由于宿主细胞介导的过程。取决于例如重组生产方法和/或宿主细胞的发酵或生长条件,本领域中已知翻译起始密码子编码的N-端甲硫氨酸可以于细胞中在翻译后从多肽除去,或者N-端甲硫氨酸可以保留在分离的多肽中。

[0348] 因此,在一方面,本发明涉及发明涉及包括SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的分离的多肽,其中起始的甲硫氨酸(位于位置1)任选地不存在。在一个实施方案中,SEQ ID NO:4的起始的甲硫氨酸是不存在的。在一方面,本发明涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:84所示的氨基酸序列,其与SEQ ID NO:4相同,但是不存在起始的甲硫氨酸。

[0349] 在另一方面,分离的多肽包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,其中起始的甲硫氨酸(位于位置1)任选地不存在。在一个实施方案中,SEQ ID NO:6的起始的甲硫氨酸是不存在的。在一方面,本发明涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列,其与SEQ ID NO:6相同,但是不存在起始的甲硫氨酸。

[0350] 在另外的方面,分离的多肽包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,其中起始的甲硫氨酸(位于位置1)任选地不存在。在一个实施方案中,本发明涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列,其与SEQ ID NO:7相同,但是不存在起始的甲硫氨酸。在另一方面,分离的多肽包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,其中起始的甲硫氨酸(位于位置1)任选地不存在。在一个实施方案中,分离的多肽包含SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列,其与SEQ ID NO:8相同,但是不存在起始的甲硫氨酸。

[0351] 在一方面,本发明涉及免疫原性组合物,其包含SEQ ID NO:4,其中起始的甲硫氨酸(位于位置1)任选地不存在。在另一方面,本发明涉及免疫原性组合物,其包含SEQ ID NO:6,其中起始的甲硫氨酸(位于位置1)任选地不存在。在另外的方面,本发明涉及免疫原性组合物,其包含SEQ ID NO:7,其中起始的甲硫氨酸(位于位置1)任选地不存在。在另一方面,本发明涉及免疫原性组合物,其包含SEQ ID NO:8,其中起始的甲硫氨酸(位于位置1)任选地不存在。

[0352] 在另一方面,本发明涉及包含SEQ ID NO:83的免疫原性组合物。在一方面,本发明涉及包含SEQ ID NO:84的免疫原性组合物。在一方面,本发明涉及包含SEQ ID NO:85的免疫原性组合物。在另一方面,本发明涉及包含SEQ ID NO:86的免疫原性组合物。

[0353] 除了在哺乳动物中产生免疫应答,本文所述的免疫原性组合物与相应的野生型难辨梭菌毒素相比具有减少的细胞毒性。优选地,与各自的野生型毒素相比,免疫原性组合物对哺乳动物中的给药是安全的,并且具有最小(例如,约6-8log₁₀减少)的细胞毒性至没有细胞毒性。

[0354] 本文所用的术语细胞毒性为本领域中理解的术语,并且指凋亡细胞死亡和/或与相同但没有细胞毒性剂的条件下的相同细胞相比,其中细胞的一种或多种通常生化或生物学异常地受损的状态。毒性可以被量化,例如在细胞或哺乳动物中诱导50%细胞死亡所需的

物质的量(即分别的EC₅₀或ED₅₀),或者通过本领域已知的其他方法量化。

[0355] 指示细胞毒性的测定是本领域已知的,例如细胞变圆测定(参见,例如Kuehne et al. Nature. 2010 Oct 7; 467(7316): 711-3)。TcdA和TcdB的作用使得细胞变圆(例如,丧失形态)并死亡,并且这样的现象可以通过光学显微术观察。参见,例如图9。

[0356] 本领域中已知的其他示例性细胞毒性测定包括与用[¹⁴C]葡萄糖标记的Ras磷屏成像测定相关的糖基化测定(如Busch et al., J Biol Chem. 1998 Jul 31; 273(31): 19566-72所述)以及优选下文的实施例中所描述的细胞毒性测定,其中EC₅₀可以指与不存在毒素的相同条件下的相同细胞相比在优选人二倍体成纤维细胞(例如,IMR90细胞(ATCC CCL-186™)的细胞中表现出至少约50%的细胞致病效果(CPE)的免疫原性组合物的浓度。体外细胞毒性测定还可以用于评价与不存在毒素的相同条件下的相同细胞相比在优选人二倍体成纤维细胞(例如,IMR90细胞(ATCC CCL-186™)的细胞中抑制至少约50%的野生型难辨梭菌毒素诱导的细胞致病效果(CPE)的组合物的浓度。其他示例性细胞毒性测定包括Doern et al., J Clin Microbiol. 1992 Aug; 30(8): 2042-6所述的那些细胞毒性测定。细胞毒性还可以通过测量用毒素处理的细胞中的ATP水平来确定。例如,可以使用基于萤光素酶底物如CELLTITERGLO® (Promega),其发射作为相对光单位(RLU)测量的萤光。在这样的测定中,细胞生存力可以与细胞中ATP的量或RLU值成正比。

[0357] 在一个实施方案中,与相应的野生型难辨梭菌毒素相比,免疫原性组合物的细胞毒性被降低至少约1000、2000、3000、4000、5000-、6000-、7000-、8000-、9000-、10000-、11000-、12000-、13000-fold、14000-倍、15000-倍或更多。参见,例如表20。

[0358] 在另一实施方案中,免疫原性组合物的细胞毒性与相同条件下的相应野生型毒素相比被降低至少约2-log₁₀、更优选约3-log₁₀并且最优选约4-log₁₀或更多。例如,如标准细胞致病效果(CPE)所测量的,与EC₅₀值为至少约10⁻¹²g/ml的示例性野生型难辨梭菌TcdB相比,突变体难辨梭菌TcdB的EC₅₀可以为约10⁻⁹g/ml。参见,例如下文的实施例部分的表7A、7B、8A和8B。

[0359] 在另一实施方案中,如通过例如本文所述的体外细胞毒性测定所测量的,突变体难辨梭菌毒素的细胞毒性的EC₅₀为至少约50μg/ml、100μg/ml、200μg/ml、300μg/ml、400μg/ml、500μg/ml、600μg/ml、700μg/ml、800μg/ml、900μg/ml、1000μg/ml或更大。因此,在优选的实施方案中,免疫原性组合物和突变体毒素对于给药哺乳动物是生物学上安全的。

[0360] 不被机制或理论束缚,与野生型TcdA相比具有D285和D287突变的TcdA和与野生型TcdB相比具有D286和D288突变的TcdB预期在糖基转移酶活性中是缺陷的,因此在诱导细胞致病效果上是缺陷的。另外,在DHC基序中具有突变的毒素预期在自体催化加工中是缺陷的,因此不具有任何细胞毒性效果。

[0361] 然而,本发明人出人意料地发现,具有SEQ ID NO: 4的示例性突变体TcdA和具有SEQ ID NO: 6的示例性突变体TcdB意想不到地表现出细胞毒性(虽然比野生型难辨梭菌630毒素明显降低),虽然表现出功能失常的葡萄糖基转移酶活性和功能失常的半胱氨酸蛋白酶活性。不被机制或理论束缚,认为突变体毒素通过新机制产生细胞毒性。然而,具有SEQ ID NO: 4的示例性突变体TcdA和具有SEQ ID NO: 6的示例性突变体TcdB出人意料的是免疫原性的。参见下文的实施例。

[0362] 虽然野生型毒素的化学交联可能无法失活毒素,但是本发明人进一步发现,与缺

少化学交联的相同突变体毒素相比以及与相应的野生型毒素相比,化学交联突变体毒素的至少一个氨基酸进一步降低突变体毒素的细胞毒性。优选地,在与化学交联剂接触之前将突变体毒素纯化。

[0363] 而且,虽然化学交联剂可能改变有用的表位,但是本发明人出人意料地发现,具有至少一个化学交联的氨基酸的遗传修饰的突变体难辨梭菌毒素获得引起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在化学交联后出人意料地保留。

[0364] 交联(本文中也称为“化学失活”或“失活”)是通过共价键化学连接两个或更多个分子的方法。术语“交联试剂”、“交联剂”和“交联物质”指能够与肽、多肽和/蛋白上的特定官能团(伯胺、巯基、羧基、羰基等)反应和/或化学连接至肽、多肽和/蛋白上的特定官能团(伯胺、巯基、羧基、羰基等)的分子。在一个实施方案中,所述分子可以包含能够与肽、多肽和/蛋白上的特定官能团(伯胺、巯基、羧基、羰基等)反应和/或化学连接至肽、多肽和/蛋白上的特定官能团(伯胺、巯基、羧基、羰基等)的两个或更多个反应末端。优选地,化学交联剂是水溶性的。在另一优选的实施方案中,化学交联剂是异型双官能交联物质。在另一实施方案中,化学交联剂不是双官能交联物质。化学交联剂是本领域中已知的。

[0365] 在优选的实施方案中,交联剂是0长度交联剂。“0长度”指介导或产生两个分子的官能团之间的直接交联的交联剂。例如,在两个多肽的交联中,0长度交联物质会导致形成一个多肽的氨基酸侧链的羧基与另一个多肽氨基之间形成桥或交联,而不引入外源性物质。0长度交联剂可以催化例如形成羟基和羧基部分之间形成酯键和/或羧基与伯氨基部分之间形成酰胺键。

[0366] 示例性适宜的的化学交联剂包括甲醛;福尔马林;乙醛;丙醛;水可溶性碳二亚胺($RN=C=NR'$),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、3-(2-吗啉基-(4-乙基)碳二亚胺N-甲-对甲苯磺酸1-环己基酯(CMC)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)和N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)及其衍生物;以及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS);苯甲酰甲醛;和/或UDP-二醛。

[0367] 优选地,交联剂是EDC。当突变体难辨梭菌毒素多肽经EDC化学修饰时(例如,通过将多肽与EDC接触),在一个实施方案中,所述多肽包括(a)所述多肽的天冬氨酸残基侧链和所述多肽的谷氨酸残基侧链之间的至少一个交联。在一个实施方案中,所述多肽包括(b)所述多肽的谷氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。在一个实施方案中,所述多肽包括(c)所述多肽C端的羧基和所述多肽的N端的氨基之间的至少一个交联。在一个实施方案中,所述多肽包括(d)所述多肽C端的羧基和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。在一个实施方案中,所述多肽包括(e)所述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。在一个实施方案中,所述多肽包括(f)所述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。在一个实施方案中,所述多肽包括(g)所述多肽C端的羧基和第二分离的多肽N端的氨基之间的至少一个交联。在一个实施方案中,所述多肽包括(h)所述多肽C端的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。

[0368] “第二分离的多肽”指在与EDC反应期间存在的任何分离的多肽。在一个实施方案中,第二分离的多肽是突变体难辨梭菌毒素多肽,其具有与第一分离的多肽相同的序列。在

另一实施方案中,第二分离的多肽是突变体难辨梭菌毒素多肽,其具有与第一分离的多肽不同的序列。

[0369] 在一个实施方案中,所述多肽包括至少2个选自(a)-(d)修饰的修饰。在示例性实施方案中,所述多肽包括(a)所述多肽的天冬氨酸残基侧链和所述多肽的谷氨酸残基侧链之间的至少一个交联;以及(b)所述多肽的谷氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。在另外的实施方案中,所述多肽包括至少3个选自(a)-(d)修饰的修饰。在另外的实施方案中,所述多肽包括(a)、(b)、(c)和(d)修饰。

[0370] 当通过EDC的化学修饰期间存在多于1个突变体多肽时,在一个实施方案中,所得的组合物包含任何(a)-(h)修饰中的至少一个。在一个实施方案中,所述组合物包含至少2个选自(a)-(h)修饰的修饰。在另外的实施方案中,所述组合物包含至少3个选自(a)-(h)修饰的修饰。在另外的实施方案中,所述组合物包含至少4个选自(a)-(h)修饰的修饰。在另一实施方案中,所述组合物包含每个(a)-(h)修饰中的至少一个。

[0371] 在示例性实施方案中,所得的组合物包含(a)所述多肽的天冬氨酸残基侧链和所述多肽的谷氨酸残基侧链之间的至少一个交联;以及(b)所述多肽的谷氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。在一个实施方案中,所述组合物还包含(c)所述多肽C端的羧基和所述多肽的N端的氨基之间的至少一个交联;以及(d)所述多肽C端的羧基和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。

[0372] 在另外的示例性实施方案中,所得组合物包含(e)所述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)所述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)所述多肽C端的羧基和第二分离的多肽N端的氨基之间的至少一个交联;和(h)所述多肽C端的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。

[0373] 在另外的示例性实施方案中,所得的组合物包含(a)所述多肽的天冬氨酸残基侧链和所述多肽的谷氨酸残基侧链之间的至少一个交联;(b)所述多肽的谷氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联;(c)所述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(d)所述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。

[0374] 在优选的实施方案中,化学交联剂包括甲醛,更优选地,在不存在赖氨酸的情况下,包含甲醛的试剂。具有伯胺的甘氨酸和其他合适的化合物可以用作交联反应中的猝灭剂。因此,在另一优选的实施方案中,化学试剂包括甲醛,并且使用甘氨酸。

[0375] 在另外的优选实施方案中,化学交联剂包括EDC和NHS。如本领域中已知的,NHS可以包括在EDC偶联方法中。然而,本发明人令人惊讶地发现,与相应的野生型毒素相比,与遗传突变的毒素相比以及与通过EDC化学交联的遗传突变的毒素相比,NHS可以促进进一步降低突变体难辨梭菌毒素的细胞毒性。参见,例如实施例22。因此,不被机制或理论束缚,与例如其中不存在 β -丙氨酸部分的难辨梭菌毒素(野生型或突变体)相比,具有连接至多肽的至少一个赖氨酸残基侧链的 β -丙氨酸部分的突变体毒素多肽(例如得自突变体毒素多肽、EDC和NHS的反应)的突变体毒素多肽可以促进进一步降低突变体毒素的细胞毒性。

[0376] 使用EDC和/或NHS还可以包括使用甘氨酸或具有伯胺的其他合适化合物作为猝灭剂。任何具有伯胺的化合物可以用作猝灭剂,例如甘氨酸甲酯和丙氨酸。在优选的实施方案

中,猝灭剂化合物是非聚合性亲水伯胺。非聚合性亲水伯胺的实例包括例如氨基糖、氨基醇和氨基多元醇。非聚合性亲水伯胺的具体实例包括甘氨酸、乙醇胺、葡糖胺、胺官能化聚乙二醇和胺官能化乙二醇寡聚物。

[0377] 在一方面,本发明涉及突变体难辨梭菌毒素多肽,其具有至少一个被EDC以及非聚合性亲水伯胺优选甘氨酸化学修饰的氨基酸侧链。与相应的野生型毒素相比,所得的甘氨酸加合物(例如,来自用EDC、NHS处理并用甘氨酸猝灭的三重突变体毒素)可以促进降低突变体毒素的细胞毒性。

[0378] 在一个实施方案中,当突变体难辨梭菌毒素多肽被EDC和甘氨酸化学修饰时,所述多肽包含至少一个所述多肽被EDC修饰时修饰(例如任何上述(a)-(h)修饰中的至少一个)以及以下示例性修饰中的至少一个:(i)连接至所述多肽C端的羧基部分的甘氨酸部分;(j)连接至所述多肽的至少一个天冬氨酸残基侧链的甘氨酸部分;和(k)连接至所述多肽的至少一个谷氨酸残基侧链的甘氨酸部分。参见,例如图24和25。

[0379] 在一个实施方案中,突变体难辨梭菌TcdA的至少一个氨基酸是化学交联的和/或突变体难辨梭菌TcdB的至少一个氨基酸是化学交联的。在另一实施方案中,SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8的至少一个氨基酸是化学交联的。例如,至少一个氨基酸可以通过包括碳二亚胺如EDC的试剂化学交联。碳二亚胺可以在游离羧基(例如,来自天冬氨酸和/或谷氨酸的侧链)和氨基(例如,赖氨酸残基的侧链中)形成共价键以形成稳定的酰胺键。

[0380] 作为另一实例,至少一个氨基酸可以通过包括NHS的试剂化学交联。NHS酯活化交联物质可以与伯胺反应(例如,每条多肽链的N端处和/或赖氨酸残基的侧链中)以产生酰胺键。

[0381] 在另一实施方案中,至少一个氨基酸可以通过包括EDC和NHS的试剂化学交联。例如,在一个实施方案中,本发明涉及具有具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的分离的多肽,其中位置1的甲硫氨酸残基任选地不存在,其中所述多肽包含至少一个被EDC和NHS化学修饰的氨基酸侧链。在另一实施方案中,本发明涉及具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的分离的多肽,其中位置1的甲硫氨酸残基任选地不存在,其中所述多肽包含至少一个被EDC和NHS化学修饰的氨基酸侧链。在另一实施方案中,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或SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的分离的多肽。所述多肽通过使所述多肽与EDC和NHS接触来修饰。参见,例如图24和25。

[0382] 当突变体难辨梭菌毒素多肽被EDC和NHS化学修饰(例如,通过接触)时,在一个实施方案中,所述多肽包含至少一个所述多肽被EDC修饰时修饰(例如,任何上述(a)-(h)修饰中的至少一个)以及(1)连接至所述多肽的至少一个赖氨酸残基侧链的β-丙氨酸部分。

[0383] 在另一方面,本发明涉及突变体难辨梭菌毒素多肽,其中所述多肽包含至少一个被EDC、NHS和非聚合性亲水伯胺优选甘氨酸化学修饰的氨基酸侧链。在一个实施方案中,所述多肽包含至少一个所述多肽被EDC修饰时的修饰(例如,任何上述(a)-(h)修饰中的至少一个)、至少一个所述多肽被甘氨酸修饰时的修饰(例如,任何上述(i)-(k)修饰中的至少一个)以及(1)连接至所述多肽的至少一个赖氨酸残基侧链的β-丙氨酸部分。参见,例如图24和25。

[0384] 在一方面,本发明涉及突变体难辨梭菌毒素多肽,其中所述多肽的至少一个赖氨酸

酸残基的侧链连接至 β -丙氨酸部分。在一个实施方案中,所述多肽的第二赖氨酸残基的侧链连接至天冬氨酸残基的侧链和/或连接至谷氨酸残基的侧链。多肽的“第二”赖氨酸残基包括所述多肽未连接至 β -丙氨酸部分的赖氨酸残基。第二赖氨酸残基所连接的天冬氨酸的侧链和/或谷氨酸的侧链可以是所述多肽的天冬氨酸的侧链和/或谷氨酸的侧链以形成分子内交联,或者可以是第二多肽的天冬氨酸的侧链和/或谷氨酸的侧链以形成分子间交联。在另一实施方案中,所述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连接至甘氨酸部分。连接至甘氨酸部分的天冬氨酸残基和/或谷氨酸残基不连接至赖氨酸残基。

[0385] 作为化学交联的突变体难辨梭菌毒素多肽另一实例,至少一个氨基酸可以被包括甲醛的试剂化学交联。甲醛可以与N-端氨基酸残基以及精氨酸、半胱氨酸、组氨酸和赖氨酸的侧链反应。甲醛和甘氨酸可以形成席夫碱加合物,其可以连接至N端伯氨基、精氨酸和酪氨酸残基以及较少程度地连接至天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸和色氨酸残基。

[0386] 化学交联剂据认为降低毒素的细胞毒性,例如通过体外细胞毒性测定或通过动物毒性测量的,如果处理的毒素比未处理的毒素在相同条件下具有较低的毒性(例如,约少100%、99%、95%、90%、80%、75%、60%、50%、25%或10%的毒性)。

[0387] 优选地,相对于相同条件但不存在化学交联剂的突变体毒素,化学交联剂降低突变体难辨梭菌毒素的细胞毒性至少约 $2-\log_{10}$ 、更优选约 $3-\log_{10}$ 并且最优选约 $4-\log_{10}$ 或更多。与野生型毒素相比,化学交联剂优选地降低突变体毒素的细胞毒性至少约 $5-\log_{10}$ 、约 $6-\log_{10}$ 、约 $7-\log_{10}$ 、约 $8-\log_{10}$ 或更多。

[0388] 在另一优选的实施方案中,例如通过体外细胞毒性测定如本文所述的那些测量的,化学失活的突变体难辨梭菌毒素表现出大于或至少约 $50\mu\text{g/ml}$ 、 $100\mu\text{g/ml}$ 、 $200\mu\text{g/ml}$ 、 $300\mu\text{g/ml}$ 、 $400\mu\text{g/ml}$ 、 $500\mu\text{g/ml}$ 、 $600\mu\text{g/ml}$ 、 $700\mu\text{g/ml}$ 、 $800\mu\text{g/ml}$ 、 $900\mu\text{g/ml}$ 、 $1000\mu\text{g/ml}$ 或更大的 EC_{50} 值。

[0389] 使突变体毒素与化学交联剂接触的反应条件在本领域技术人员的经验范围内,并且该条件可以根据所用的试剂而变化。然而,本发明人令人惊讶地发现使突变体难辨梭菌毒素多肽与化学交联剂接触同时维持功能表位并与相应的野生型毒素相比降低突变体毒素的细胞毒性的最优反应条件。

[0390] 优选地,选择使突变体毒素与交联剂接触的条件,其中所述突变体毒素的最小浓度为约 0.5 、 0.75 、 1.0 、 1.25 、 1.5 、 1.75 、 2.0mg/ml 至最大浓度为约 3.0 、 2.5 、 2.0 、 1.5 或 1.25mg/ml 。任何最小值可以与任何最大值组合以限定突变体毒素的适宜反应浓度范围。最优选地,突变体毒素的反应浓度为约 1.0 – 1.25mg/ml 。

[0391] 在一个实施方案中,反应中所用的试剂的最小浓度为约 1mM 、 2mM 、 3mM 、 4mM 、 5mM 、 10mM 、 15mM 、 20mM 、 30mM 、 40mM 或 50mM ,并且最大浓度为约 100mM 、 90mM 、 80mM 、 70mM 、 60mM 或 50mM 。任何最小值可以与任何最大值组合以限定反应的化学试剂的适宜浓度范围。

[0392] 在试剂包括甲醛的优选实施方案中,所用的浓度优选为约 2mM – 80mM 的任何浓度,最优选约 40mM 。在试剂包括EDC的另一优选实施方案中,所用的浓度优选为约 1.3mM –约 13mM 的任何浓度,更优选约 2mM to 3mM ,最优选约 2.6mM 。

[0393] 使突变体毒素与化学交联剂接触的示例性反应时间包括最小约 0.5 、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 12 、 24 、 36 、 48 或 60 小时,并且最大约 14 天、 12 天、 10 天、 7 天、 5 天、 3 天、 2 天、 1 天或 12 小时。任

何最小值可以与任何最大值组合以限定反应时间的适宜范围。

[0394] 在优选的实施方案中,使突变体毒素与化学交联剂接触的步骤进行的时间足以使突变体难辨梭菌毒素的细胞毒性在标准体外细胞毒性测定中与不存在交联剂的相同突变体毒素相比降低至诸如IMR-90细胞的适宜人细胞中的EC₅₀值为至少约1000μg/ml。更优选地,反应步骤进行的时间是足以使突变体毒素的细胞毒性降低至适宜人细胞中的EC₅₀值为至少约1000μg/ml的时间至少2倍并且最优选至少3倍或更长。在一个实施方案中,反应时间不超过约168小时(或7天)。

[0395] 例如,在试剂包括甲醛的一个实施方案中,优选地使突变体毒素与试剂接触约12小时,据证实这为示例性时间段,其足以使突变体难辨梭菌毒素的细胞毒性在标准体外细胞毒性测定中与不存在交联剂的相同突变体毒素相比降低至诸如IMR-90细胞的适宜人细胞中的EC₅₀值为至少约1000μg/ml。在更优选的实施方案中,反应进行约48小时,这是足够的反应时间段的至少约3倍。在这样的实施方案中,反应时间优选不超过约72小时。

[0396] 在试剂包括EDC的另一实施方案中,优选使突变体毒素与试剂接触约0.5小时,更优选至少约1小时,或者最优选约2小时。在这样的实施方案中,反应时间优选不超过约6小时。

[0397] 使突变体毒素与化学交联剂接触的示例性pH包括最小约pH5.5、6.0、6.5、7.0或7.5,并且最大约pH8.5、8.0、7.5、7.0或6.5。任何最小值可以与任何最大值组合以限定pH的适宜范围。优选地,反应在pH6.5-7.5下进行,优选pH7.0。

[0398] 使突变体毒素与化学交联剂接触的示例性温度包括最小约2℃、4℃、10℃、20℃、25℃或37℃,并且最大温度为约40℃、37℃、30℃、27℃、25℃或20℃。任何最小值可以与任何最大值组合以限定反应温度的适宜范围。优选地,反应在约20℃-30℃下进行,最优选25℃。

[0399] 上述免疫原性组合物可以包含一种突变体难辨梭菌毒素(A或B)。因此,免疫原性组合物可以在制剂或试剂盒中在分离小瓶(例如包含突变体难辨梭菌毒素A的组合物和包含突变体难辨梭菌毒素B的组合物)的分离小瓶)。免疫原性组合物可以同时、顺序或分别使用。

[0400] 在另一实施方案中,上述免疫原性组合物可以包含两种突变体难辨梭菌毒素(A和B)。所述的突变体难辨梭菌毒素A和突变体难辨梭菌毒素B的任何组合可以组合为免疫原性组合物。因此,免疫原性组合物可以组合在单个小瓶中(例如,包含含有突变体难辨梭菌TcdA的组合物和包含突变体难辨梭菌TcdB的组合物)的单个小瓶)。优选地,免疫原性组合物包含突变体难辨梭菌TcdA和突变体难辨梭菌TcdB。

[0401] 例如,在一个实施方案中,免疫原性组合物包含SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6,其中SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的每一个的至少一个氨基酸是化学交联的。在另一实施方案中,免疫原性组合物包含突变体难辨梭菌毒素A,其包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7,并且包含突变体难辨梭菌毒素B,其包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8,其中每个所述突变体难辨梭菌毒素的至少一个氨基酸是化学交联的。

[0402] 在另一实施方案中,所述免疫原性组合物包含选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:83的任何序列以及选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:85的任何序列。在另一实施方案中,免疫原性组合物包含SEQ ID NO:84以及包含SEQ ID NO:86的免疫

原性组合物。在另一实施方案中,免疫原性组合物包含SEQ ID NO:83以及包含SEQ ID NO:85的免疫原性组合物。在另一实施方案中,免疫原性组合物包含SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:85。

[0403] 应当理解,任何本发明的组合物,例如包含突变体毒素A和/或突变体毒素B的免疫原性组合物可以用于治疗效果的不同比例或量组合。例如,突变体难辨梭菌TcdA和突变体难辨梭菌TcdB可以0.1:10-10:0.1,A:B范围内的比例存在于免疫原性组合物中。在另一实施方案中,例如突变体难辨梭菌TcdB和突变体难辨梭菌TcdA可以0.1:10-10:0.1,B:A的范围内的比例存在于免疫原性组合物中。在一个优选实施方案中,比例使得组合物包含比突变体TcdA的总量更大的突变体TcdB的总量。

[0404] 在一方面,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是下文所述的中和抗体或其结合片段。在一个示例性的实施方案中,免疫原性组合物能够结合抗毒素A抗体或其抗原结合片段,其中所述抗毒素A抗体或其结合片段包含具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的可变轻链以及具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的可变重链。例如,免疫原性组合物可以包含突变体难辨梭菌TcdA、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7。作为另一实例,免疫原性组合物可以包含SEQ ID NO:84或SEQ ID NO:83。

[0405] 在另外的示例性实施方案中,免疫原性组合物能够结合抗毒素B抗体或其抗原结合片段,其中所述抗毒素B抗体或其结合片段包含B8-26的可变轻链和B8-26的可变重链。例如,免疫原性组合物可以包含突变体难辨梭菌TcdB、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8。作为另一实例,免疫原性组合物可以包含SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:85。

[0406] 重组细胞

[0407] 在另一方面,本发明涉及重组细胞或其后代。在一个实施方案中,所述细胞或其后代包含编码突变体难辨梭菌TcdA和/或突变体难辨梭菌TcdB的多核苷酸。

[0408] 在另一实施方案中,所述重组细胞或其后代包含核酸序列,当最优比对时,例如通过使用预定间隙重的程序GAP或BESTFIT时,其编码的多肽与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8中的任一个具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约98%、更优选约99%或者最优选约100%的相同性。

[0409] 在另一实施方案中,所述重组细胞或其后代包含核酸序列,当最优比对时,例如通过使用预定间隙重的程序GAP或BESTFIT时,其编码的多肽与SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:85中的任一个具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约98%、更优选约99%或者最优选约100%的相同性。

[0410] 在另外的实施方案中,所述重组细胞或其后代包含核酸序列,,当最优比对时,例如通过使用预定间隙重的程序GAP或BESTFIT时,其与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47中的任一个具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%优选约98%、更优选约99%或者最优选约100%的相同性。

[0411] 重组细胞可以源自可用于重组生产本发明的多肽的任何细胞。例如,原核细胞或真核细胞。优选地,重组细胞源自适合表达大于约5000、6000、优选约7000、并且更优选约8000个核苷酸或更长的异源核酸序列的任何细胞。原核宿主细胞可以是任何革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌。在示例性实施方案中,原核宿主细胞缺少编码毒素和/或孢子的内源多核

苷酸。

[0412] 革兰氏阴性菌包括但不限于弯曲杆菌(*Campylobacter*)、大肠杆菌(*E.coli*)、黄杆菌(*Flavobacterium*)、梭杆菌(*Fusobacterium*)、螺杆菌(*Helicobacter*)、泥杆菌(*Ilyobacter*)、奈瑟氏菌(*Neisseria*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、沙门氏菌(*Salmonella*)和脲原体(*Ureaplasma*)。例如,重组细胞可以源自荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)细胞,如美国专利申请公开2010013762的[0201]-[0230]段所述,该公开援引加入本文。

[0413] 革兰氏阳性菌包括但不限于芽胞杆菌(*Bacillus*)、梭菌(*Clostridium*)、肠球菌(*Enterococcus*)、土芽孢杆菌(*Geobacillus*)、乳杆菌(*Lactobacillus*)、乳球菌(*Lactococcus*)、海洋芽孢杆菌(*Oceanobacillus*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)、链球菌(*Streptococcus*)和链霉菌(*Streptomyces*)。优选地,细胞源自难辨梭菌细胞。

[0414] 本发明人鉴定的野生型难辨梭菌的菌株缺乏编码难辨梭菌毒素的内源多核苷酸。缺乏内源毒素A和B基因的菌株包括以下可获得自美国典型培养物保藏中心(ATCC)的菌株:难辨梭菌1351(ATCC43593TM)、难辨梭菌3232(ATCC BAA-1801TM)、难辨梭菌7322(ATCC43601TM)、难辨梭菌5036(ATCC43603TM)、难辨梭菌4811(ATCC43602TM)和难辨梭菌VPI11186(ATCC700057TM)。

[0415] 因此,在一个实施方案中,重组难辨梭菌细胞源自本文所述的菌株。优选地,重组难辨梭菌细胞或其后代源自选自以下的菌株:难辨梭菌1351、难辨梭菌5036和难辨梭菌VPI11186。更优选地,重组难辨梭菌细胞或其后代源自难辨梭菌VPI11186细胞。

[0416] 在优选的实施方案中,重组难辨梭菌细胞或其后代的孢子形成基因是失活的。孢子可以是感染性、高度抗性的,并且促进难辨梭菌在宿主外的有氧环境中的维持。孢子还可以促进抗微生物治疗期间难辨梭菌在宿主中的存活。因此,缺少孢子形成基因的难辨梭菌细胞可用于生产向哺乳动物给药的安全免疫原性组合物。另外,使用这样的细胞促进制备期间的安全性,例如保护设备、未来产品及员工的安全。

[0417] 用于靶向失活的孢子形成基因的实例包括spo0A、spoIIIE、 σ^E 、 σ^G 和 σ^K 。优选地,spo0A基因是失活的。

[0418] 用于失活难辨梭菌孢子形成基因的方法是本领域已知的。例如,孢子形成基因可以通过靶向插入选择性标记物如抗生素抗性标记物来失活。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。还参见,例如Minton et al., W02007/148091, 题为“DNA Molecules and Methods,”, 其第33-66页整体援引加入本文,或者相应的美国公开US20110124109A1, [00137]-[0227]段。

[0419] 产生突变体难辨梭菌毒素的方法

[0420] 在一方面,本发明涉及产生突变体难辨梭菌毒素的方法。在一个实施方案中,所述方法包括在适宜的条件下培养任何上文所述的重组细胞或其后代,以表达多肽。

[0421] 在另一实施方案中,所述方法包括在适宜的条件下培养重组细胞或其后代,以表达编码突变体难辨梭菌毒素的多核苷酸,其中所述细胞包含编码突变体难辨梭菌毒素的多核苷酸,并且其中所述突变体包含(相对于相应的野生型难辨梭菌毒素)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。在一个实施方案

中,所述细胞缺乏编码毒素的内源多核苷酸。

[0422] 在另外的实施方案中,所述方法包括在适宜的条件下培养重组难辨梭菌细胞或其后代,以表达编码突变体难辨梭菌毒素的多核苷酸,其中所述细胞包含编码突变体难辨梭菌毒素的多核苷酸且所述细胞缺乏编码毒素的内源多核苷酸。

[0423] 在另一方面,本发明涉及产生突变体难辨梭菌毒素的方法。所述方法包括如下步骤:(a)将难辨梭菌细胞与重组大肠杆菌细胞接触,其中所述难辨梭菌细胞缺乏编码难辨梭菌毒素的内源多核苷酸并且大肠杆菌细胞包括编码突变体难辨梭菌毒素的多核苷酸;(b)在适宜的条件下培养所述难辨梭菌细胞和所述大肠杆菌细胞用以将所述多核苷酸从所述大肠杆菌细胞转移至所述难辨梭菌细胞;(c)选择包含编码突变体难辨梭菌毒素的多核苷酸的难辨梭菌细胞;(d)在适宜的条件下培养步骤(c)的难辨梭菌细胞以表达所述多核苷酸;和(e)分离突变体难辨梭菌毒素。

[0424] 在本发明的方法中,重组大肠杆菌细胞包括编码本文所述突变体难辨梭菌毒素的异源多核苷酸。所述多核苷酸可以是DNA或RNA。在一个示例性的实施方案中,编码突变体难辨梭菌毒素的多核苷酸进行了对于大肠杆菌密码子选择的密码子优化。对多核苷酸进行密码子优化的方法是本领域熟知的。

[0425] 在一个实施方案中,所述多核苷酸包括核酸序列,其与编码本文所述突变体难辨梭菌TcdA的多核苷酸至少约60%,65%,70%,75%,80%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%相同。编码突变体难辨梭菌毒素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。

[0426] 在另一实施方案中,所述多核苷酸包括核酸序列,其与编码本文所述突变体难辨梭菌TcdB的多核苷酸至少约60%,65%,70%,75%,80%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%相同。编码突变体难辨梭菌毒素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。在另一实施方案中,所述多核苷酸编码SEQ ID NO:83,SEQ ID NO:84,SEQ ID NO:85,或SEQ ID NO:86。

[0427] 在一个实施方案中,包含异源多核苷酸的大肠杆菌细胞是稳定容纳(host)编码突变体难辨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如下的细胞:MAX Efficiency[®] Stb12[™]大肠杆菌感受态细胞(Invitrogen, Carlsbad, CA), One Shot[®] Stb13[™]化学感受态大肠杆菌(Invitrogen, Carlsbad, CA), ElectroMAX[™] Stb14[™]大肠杆菌感受态细胞(Invitrogen), 和大肠杆菌CA434。在优选的实施方案中,大肠杆菌克隆宿主细胞不是DH5 α 。更优选地,大肠杆菌克隆宿主细胞是MAX Efficiency[®] Stb12[™]大肠杆菌感受态细胞。

[0428] 本发明的方法还包括这样的步骤:在适宜的条件下培养所述难辨梭菌细胞和所述大肠杆菌细胞用以将多核苷酸从所述大肠杆菌细胞转移至所述难辨梭菌细胞,导致了重组难辨梭菌细胞。在优选的实施方案中,培养条件是适宜于将多核苷酸从大肠杆菌细胞(供体细胞)转移至难辨梭菌细胞(受体细胞)内并导致遗传稳定的继承的条件。

[0429] 最优选地,培养条件适宜于细菌接合,其是本领域已知的。“接合”是指转移多核苷酸的特定过程,其中发生多核苷酸(例如,细菌质粒)从一个细菌细胞(即“供体”)到另一个(即“受体”)的单向转移。所述接合过程涉及供体细胞-对-受体细胞的接触。优选地,供体大

肠杆菌细胞是大肠杆菌CA434细胞。

[0430] 将多核苷酸从大肠杆菌细胞向难辨梭菌细胞转移的示例性适宜(接合)条件包括,使难辨梭菌液体培养物在脑心浸萃培养液(BHI;Oxoid)或Schaedlers厌氧培养液(SAB;Oxoid)中生长。在另一实施方案中,可以使固态难辨梭菌培养物在新鲜血琼脂(FBA)或BHI琼脂上生长。优选地,难辨梭菌于37℃在厌氧环境中生长(例如,80%N₂,10%CO₂,和10%H₂[vol/vol])。在一个实施方案中,所述适宜条件包括使大肠杆菌在Luria-Bertani(LB)培养液中或在LB琼脂上于37℃需氧生长。对于接合性转移至难辨梭菌,示例性适宜条件包括使大肠杆菌在FBA上厌氧生长。如本领域所知,液态或固态培养基中可以包括抗生素。此类抗生素的实例包括环丝氨酸(250μg/ml),头孢西丁(8μg/ml),氯霉素(12.5μg/ml),甲砒霉素(15μg/ml)和红霉素(5μg/ml)。

[0431] 本发明的方法还包括选择包括编码突变体难辨梭菌毒素的多核苷酸的所得的重组难辨梭菌细胞的步骤。在示例性实施方案中,所述重组难辨梭菌细胞是经接合来自重组大肠杆菌细胞的编码突变体难辨梭菌毒素的多核苷酸的受体。

[0432] 本发明的方法包括在适宜表达编码突变体难辨梭菌毒素的多核苷酸的条件培养重组细胞或其后代的步骤,其导致产生突变体难辨梭菌毒素。重组细胞表达多核苷酸的适宜条件包括适宜难辨梭菌细胞生长的培养条件,其是本领域已知的。例如,适宜的条件可包括在脑心浸萃培养液(BHI;Oxoid)或Schaedlers厌氧培养液(SAB;Oxoid)中培养难辨梭菌转化体。在另一实施方案中,固态难辨梭菌培养物可以在FBA或BHI琼脂上生长。优选地,难辨梭菌于37℃在厌氧环境生长(例如,80%N₂,10%CO₂,和10%H₂[vol/vol])。

[0433] 在一个实施方案中,本发明的方法包括分离所得的突变体难辨梭菌毒素的步骤。从难辨梭菌分离蛋白的方法是本领域已知的。

[0434] 在另一实施方案中,所述方法包括纯化所得的突变体难辨梭菌毒素的步骤。纯化多肽的方法,如层析,是本领域已知的。

[0435] 在示例性实施方案中,所述方法还包括将分离的突变体难辨梭菌毒素与上文所述的化学交联剂接触的步骤。优选地,所述交联剂包括甲醛,乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺,或者EDC和NHS的组合。示例性的反应条件在上文中以及在下文实施例部分有描述。

[0436] 在另一方面,本发明涉及免疫原性组合物,其包括由任何方法产生的本文所述的突变体难辨梭菌毒素,优选是通过上文所述的方法产生的。

[0437] 抗体

[0438] 令人吃惊地,上述本发明的免疫原性组合物在体内引起新抗体,表明所述免疫原性组合物包含各自野生型难辨梭菌毒素保持的天然结构(例如,保持的抗原表位)并且所述免疫原性组合物包含表位。针对难辨梭菌的一个菌株的毒素产生的抗体可以能够结合难辨梭菌的另一菌株产生的相应的毒素。也就是说,抗体及其结合片段可以是“交叉反应性的”,这表示与多种难辨梭菌菌株产生的毒素上的类似抗原性位点反应的能力。交叉反应性还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的抗原产生的抗体之间的反应。

[0439] 在一方面,本发明人令人惊讶地发现具有对难辨梭菌毒素的中和效果的单克隆抗体及其制备方法。本发明的抗体可以在体外中和难辨梭菌毒素细胞毒性,抑制难辨梭菌毒素对哺乳动物细胞的结合,和/或可以在体内中和难辨梭菌毒素肠毒性。本发明还涉及分离

的多核苷酸,其包含编码任何上述多肽的核苷酸序列。另外,本发明涉及任何上述组合物在治疗、预防哺乳动物的难辨梭菌感染、难辨梭菌相关疾病、综合征、疾病状况、症状和/或并发症,与未给药所述组合物的哺乳动物相比降低其风险,降低其严重性,减少其发病率和/或延缓其发生的用途,以及用于制备所述组合物的方法。

[0440] 本发明人进一步发现,至少两种中和单克隆抗体的组合在各自中和TcdA或TcdB中可以表现出意想不到的协同效应。抗毒素抗体或其结合片段可以用于抑制难辨梭菌感染。

[0441] “抗体”是包含至少一条或两条重(H)链可变区(在本文中简写为VH)以及至少一条或两条轻(L)链可变区(在本文中简写为VL)的蛋白。VH和VL可以进一步细分为超变区,称为“互补决定区”(“CDR”),其与更保守的称为“框架区”(FR)的区域穿插。框架区和CDR的范围已经精确地定义(参见Kabat,E.A.,et al.Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242,1991,and Chothia,C.et al.,J.Mol.Biol.196:901-917,1987)。术语“抗体”包括IgA、IgG、IgE、IgD、IgM类型(以及其亚类)的完整免疫球蛋白,其中所述免疫球蛋白的轻链可以是 κ 或 λ 型。

[0442] 抗体分子可以是全长的(例如,IgG1或IgG4抗体)。抗体可以具有各种同种型,包括IgG(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA1、IgA2、IgD或IgE。在一优选实施方案中,抗体为IgG同种型,例如IgG1。在另一优选的实施方案中,抗体为IgE抗体。

[0443] 在另一实施方案中,抗体分子包括“抗原结合片段”或“结合片段”,如本文所用,其指特异性结合难辨梭菌的毒素(如,毒素A)的抗体的部分。结合片段为例如其中一条或多条免疫球蛋白链不是全长但特异性结合毒素的分子。

[0444] 术语抗体的“结合片段”中所涵盖的结合部分的实例包括(i)a Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')₂片段,包含通过铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)Fd片段,由VH和CH1结构域组成;(iv)Fv片段,由抗体的单臂的VL和VH结构域组成;(v)dAb片段(Ward et al.,Nature341:544-546,1989),其由VH结构域组成;以及(vi)分离的互补决定区(CDR),具有足够的框架以特异性结合例如可变区的抗原结合部分。轻链可变区的结合片段和重链可变区的结合片段如Fv片段的两个结构域VL和VH可以利用重组方法通过使得它们成为单蛋白链的合成接头连接,其中VL和VH配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv),参见例如Bird et al.(1988)Science242:423-426;and Huston et al.(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA85:5879-5883)。这样的单链抗体也涵盖在术语抗体的“结合片段”内。这些抗体部分利用本领域已知的技术获得,并且以完整抗体相同的方式筛选部分的用途。

[0445] 如本文所用,“特异性结合”特定多肽或特定多肽上的表位或者对特定多肽或特定多肽上的表位是“特异性”的抗体是结合该特定多肽或特定多肽上的表位但基本上不结合任何其他多肽或多肽表位的抗体。例如,当指“特异性”结合靶标的生物分子(例如,蛋白、核酸、抗体等)时,如在指定条件下测量(例如,抗体情况下的免疫测定条件)的,所述生物分子在包含靶标的混杂的分子群体中结合其靶分子,并且不以明显的量结合其他分子。抗体与其靶标之间的结合确定混杂的分子群体中靶标的存在。例如,“特异性结合”或“特异性地结合”指抗体或其结合片段结合难辨梭菌的野生型和/或突变体毒素的亲和力是其对非特异性抗原的亲和力的至少两倍。

[0446] 在示例性实施方案中,抗体是嵌合抗体。嵌合抗体可以通过本领域已知的重组DNA技术产生。例如,编码小鼠(或其他物种)单克隆抗体分子的Fc恒定区的基因可以用限制性酶消化以除去编码小鼠Fc的区域,并且取代编码人Fc恒定区的基因的等同部分。嵌合抗体还可以通过重组DNA技术产生,其中编码小鼠可变区的DNA可以连接至编码人恒定区的DNA。

[0447] 在另外的示例性实施方案中,抗体或其结合片段通过本领域已知的方法人源化。例如,一旦获得小鼠抗体,可以用至少一部分人CDR代替所述抗体的CDR。人源化抗体还可以通过用人Fv可变区的等同序列代替未直接涉及抗原结合的小鼠Fv可变区的序列来产生。产生人源化抗体的一般方法是本领域已知的。

[0448] 例如,针对难辨梭菌TcdA或难辨梭菌TcdB的单克隆抗体还可以通过标注技术如杂交瘤技术产生(参见例如,Kohler and Milstein,1975,Nature,256:495-497)。简言之,将永生细胞系与来自用本文所述的难辨梭菌TcdA、难辨梭菌TcdB或突变体难辨梭菌毒素免疫的哺乳动物的淋巴细胞融合,并筛选所得的杂交瘤细胞的培养物上清以鉴定产生结合难辨梭菌TcdA或难辨梭菌TcdB的单克隆抗体的杂交瘤。通常,永生细胞系源自相同的哺乳动物的淋巴细胞。利用诸如ELISA的测定,通过筛选杂交瘤培养物上清的结合难辨梭菌TcdA或难辨梭菌TcdB的抗体来检测产生本发明的单克隆抗体的杂交瘤细胞。人杂交瘤可以类似的方式制备。

[0449] 作为通过免疫和选择产生抗体的替代,本发明的抗体还可以通过用本文所述的难辨梭菌TcdA、难辨梭菌TcdB或突变体难辨梭菌毒素筛选重组组合免疫球蛋白文库来鉴定。重组抗体文库可以是例如scFv文库或Fab文库。而且,本文所述的抗体还可以用于竞争结合研究以鉴定额外的抗TcdA或抗TcdB抗体及其结合片段。例如,额外的抗TcdA或抗TcdB抗体及其结合片段可以通过筛选人抗体文库并在竞争结合测定中鉴定该文库中与本文所述的抗体竞争的分子来鉴定。

[0450] 另外,本发明所涵盖的抗体包括重组抗体,其可以通过利用本领域已知的噬菌体展示方法产生。在噬菌体展示方法中,噬菌体可以用于展示从集合(repertoire)或抗体文库(例如,人或小鼠)表达的抗原结合结构域。表达结合本文所述的免疫原(例如,突变体难辨梭菌毒素)的抗原结合结构域的噬菌体可以用抗原如标记的抗原选择或鉴定。

[0451] 抗体及其结合片段也在本发明范围内,其中特定的氨基酸已被取代、缺失或添加。优选地,优选的抗体具有框架区中的氨基酸取代,以改进对抗原的结合。例如,免疫球蛋白链所选的少量受体框架残基可以由相应的供体氨基酸代替。取代的优选位置包含CDR附近的氨基酸残基,或者其能够与CDR相互作用。从供体选择氨基酸的标准描述于U.S.Pat.No.5,585,089(例如,12-16栏)。受体框架可以是成熟人抗体框架序列或其共有序列。

[0452] 本文所用的“中和抗体或其结合片段”指各自的抗体或其结合片段,其结合病原体(如难辨梭菌TcdA或TcdB)并且与不存在所述中和抗体或其结合片段的相同条件下的病原体相比降低该病原体在哺乳动物和/或细胞培养物中的感染性和/或活性(如降低细胞毒性)。在一个实施方案中,与不存在所述中和抗体或其结合片段的相同条件下的病原体相比,中和抗体或其结合片段能够中和病原体生物学活性的至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多。

[0453] 本文所用的术语“抗毒素抗体或其结合片段”指结合各自的难辨梭菌毒素(例如,难辨梭菌毒素A或毒素B)的抗体或其结合片段。例如,抗毒素A抗体或其结合片段至结合TcdA的抗体或其结合片段。

[0454] 本文所述的抗体或其结合片段可以在任何野生型和/或转基因哺乳动物中产生,包括例如小鼠、人、兔和山羊。

[0455] 当上述免疫原性组合物是事先给药给群体的免疫原性组合物时,例如用于疫苗接种,在个体中产生的抗体应答可以用于中和来自相同菌株以及来自不刺激产生所述抗体的菌株的毒素。参见,例如实施例37,其示出免疫原性组合物在来自630菌株和来自各种野生型难辨梭菌菌株的毒素之间的产生交叉反应性。

[0456] 在一方面,本发明涉及特异于难辨梭菌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/或优选地A3-25。

[0457] 在一方面,本发明涉及特异于来自任何野生型难辨梭菌菌株的TcdA的抗体或其结合片段,例如上文所述的那些,例如特异于SEQ ID NO:1。在另一方面,本发明涉及特异于上文所述免疫原性组合物的抗体或其结合片段。例如,在一个实施方案中,抗体或其结合片段特异于包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7的免疫原性组合物。在另一实施方案中,抗体或其结合片段特异于包含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的至少一个氨基酸被甲醛、EDC、NHS或EDC和NHS的组合交联。在另一实施方案中,抗体或其结合片段特异于包含SEQ ID NO:84或SEQ ID NO:83的免疫原性组合物。

[0458] 具有可变重链和可变轻链区的抗体或其结合片段也可以结合TcdA,所述可变重链和可变轻链区与A65-33、A60-22、A80-29和/或优选A3-25的可变重链区和轻链区具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、优选约98%、更优选约99%或者最优选约100%的相同性。

[0459] 在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含可变重链区,其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:37所示的A3-25的可变重链区氨基酸序列至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0460] 在另一实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含可变轻链区,其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:36所示的A3-25的可变轻链区氨基酸序列至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0461] 在另一方面,抗体或其抗原结合片段包含可变重链区,其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:37所示的可变重链区氨基酸序列至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且包含可变轻链区,其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:36所示的可变轻链区氨基酸序列至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0462] 在另一实施方案中,具有A65-33、A60-22、A80-29和/或优选A3-25的可变重链和/或可变轻链的互补决定区(CDR)抗体或其结合片段可以结合TcdA。A3-25的可变重链区的CDR在下表4中示出。

[0463]

表 4: 可变重链 CDR 氨基酸序列				
克隆	链	CDR	氨基酸序列	SEQ ID NO:
A3-25	重链	CDR1	GFITFTNYWMN	41
		CDR2	EIRLKSHNYATHFAESVKG	42
		CDR3	DYYGNPAFVY	43

[0464] A3-25的可变轻链区的CDR在下表5中示出。

[0465]

表 5: 可变轻链 CDR 氨基酸序列				
克隆	链	CDR	氨基酸序列	SEQ ID NO:
A3-25	轻链	CDR1	RSSQSLIHSNGNTYLH	38

[0466]

		CDR2	KVSNRFS	39
		CDR3	SQTTYFPYT	40

[0467] 在一个实施方案中,抗体或其结合片段包含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/或包含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。

[0468] 在一个示例性的实施方案中,特异于难辨梭菌毒素A的抗体或其结合片段特异性地结合TcdA的N端区域中的表位,例如根据SEQ ID NO:1编号的TcdA的氨基酸1-1256之间的表位。

[0469] 在优选的实施方案中,特异于难辨梭菌毒素A的抗体或其结合片段特异性地结合毒素A的C端区域中的表位,例如根据SEQ ID NO:1编号的TcdA的氨基酸1832-2710之间的表位。实例包括A3-25、A65-33、A60-22、A80-29。

[0470] 在另一实施方案中,特异于难辨梭菌毒素A的抗体或其结合片段特异性地结合难辨梭菌毒素A的“易位”区域中的表位,例如优选包含根据SEQ ID NO:1编号的TcdA的残基956-1128的表位,例如根据SEQ ID NO:1编号的TcdA的氨基酸659-1832之间的表位。

[0471] 在另一方面,本发明涉及特异于难辨梭菌TcdB的抗体或其结合片段。例如,抗体或其结合片段可以特异于来自任何野生型难辨梭菌菌株的TcdB,如上文所述的那些,例如,特异于SEQ ID NO:2。在另一方面,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,在一个实施方案中,抗体或其结合片段特异于包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的免疫原性组合物。

[0472] 在另一实施方案中,抗体或其结合片段特异于包含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的至少一个氨基酸被甲醛、EDC、NHS或EDC和NHS的组合交联。在另一实施方案中,抗体或其结合片段特异于包含SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:85的免疫原性组合物。

[0473] 特异性结合TcdB的单克隆抗体包括通过本文所述的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。

[0474] 还可以结合TcdB的抗体或其结合片段包括这样的抗体或其结合片段,其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%或者最优选约100%的相同性。

[0475] 在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含可变重链区,其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:49所示的A3-25的可变重链区氨基酸序列至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0476] 在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含可变重链区,其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:60所示的A3-25的可变重链区氨基酸序列至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0477] 在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含可变重链区,其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:71所示的A3-25的可变重链区氨基酸序列至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0478] 在另一实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含可变轻链区,其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:55所示的A3-25的可变轻链区氨基酸序列至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0479] 在另一实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含可变轻链区,其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:66所示的A3-25的可变轻链区氨基酸序列至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0480] 在另一实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含可变轻链区,其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:77所示的A3-25的可变轻链区氨基酸序列至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0481] 难辨梭菌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。

[0482]

表 25-a: 可变重链氨基酸序列			
克隆	区	氨基酸序列	SEQ ID NO:
B8-26	信号肽	MGWSCILFLVATATGVHS	50
	可变重链	QVQLQQPGAELVKPGA PVKLSCKAS GYSFTSYWMN WVKQRPGRGLEWIG RIDPSNSEIYYNQKF KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSL TSEDSAVYYCAS GHYGSIFAY WGQGTTTLTVSS	49
	CDR1	GYSFTSYWMN	51
	CDR2	RIDPSNSEIYYNQKF	52
	CDR3	GHYGSIFAY	53
	恒定区 (IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK	54

[0483] 难辨梭菌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。

[0484]

表 25-b: 可变轻链(κ)氨基酸序列			
克隆	区	氨基酸序列	SEQ ID NO:
B8-26	信号肽	MRFQVQVLGLLLLWISGAQCD	56
	可变轻链	VQITQSPSYLAASPGETITINC RASKSISKYLA WYQEKPGKTNKLLLY SGSTLQS GIPS RFSGSRSGTDFTLIISLEPEDSAMYYC QQHNEYPLT FGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEEFQ	55

[0485]

	CDR1	RASKSISKYLA	57
	CDR2	SGSTLQS	58
	CDR3	QQHNEYPLT	59

[0486] 在一个实施方案中,抗体或其结合片段包含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/或包含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。

[0487] 难辨梭菌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。

[0488]

表 26-a: 可变重链氨基酸序列			
克隆	区	氨基酸序列	SEQ ID NO:
B59-3	信号肽	MGWSYIILFLVATATDVHS	61
	可变重链	QVQLQQPGAELVKPGASVKLS CKAS GYTFTSYWMH WVKQRPQGQGLEWIG VINPSNGRSTYSEKF KTTATVTVDKSSSTAYMQL SILTSEDSAVYYCAR AYYSTSYAMDY WGQGTSVTVSS	60
	CDR1	GYTFTSYWMH	62
	CDR2	VINPSNGRSTYSEKF	63
	CDR3	AYYSTSYAMDY	64
	恒定区 (IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK	65

[0489] 难辨梭菌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。

[0490]

表 26-b: 可变轻链(κ)氨基酸序列

[0491]

克隆	区	氨基酸序列	SEQ ID NO:
B59-3	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

[0492] 在一个实施方案中,抗体或其结合片段包含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/或包含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。

[0493] 难辨梭菌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。

[0494]

表 27-a: 可变重链氨基酸序列			
克隆	区	氨基酸序列	SEQ ID NO:
B9-30	信号肽	MGWSCILFLVATATGVHS	72
	可变重链	QVQLQQPGAIEVVKPGAPVKLS CKAS GYPFTNYWMN WVKQRPGRGLEWIG RIDPSNSEIYYNQKF KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDS AVYY CAS GHYGSIFAY WGQGTTLTVSS	71
	CDR1	GYPFTNYWMN	73

[0495]

	CDR2	RIDPSNSEIYYNQKF	74
	CDR3	GHYGSIFAY	75
	恒定区 (IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK	76

[0496] 难辨梭菌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。

[0497]

表 27-b: 可变轻(κ)链氨基酸序列			
克隆	区	氨基酸序列	SEQ ID NO:
B9-30	信号肽	MRFQVQVLGLLLWISGAQCD	78
	可变轻链	VQITQSPSYLAASPGETITINC RASKSISKYLA WYQEKPGKTNKLLIY SGSTLQS GIPS RFSGSRSGTDFTLISSLEPEDSAM YYC QQHNEYPLT FGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSS EEFQ	77
	CDR1	RASKSISKYLA	79
	CDR2	SGSTLQS	80
	CDR3	QQHNEYPLT	81

[0498] 在一个实施方案中,抗体或其结合片段包含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/或包含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。

[0499] 在一方面,本发明涉及抗体或其结合片段,其特异于来自任何难辨梭菌菌株的野生型难辨梭菌TcdB,例如上文所述的那些,例如特异于SEQ ID NO:2。在另一方面,本发明涉及抗体或其结合片段,其特异于上文所述的免疫原性组合物。例如,在一个实施方案中,抗体或其结合片段特异于包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的免疫原性组合物。在另一实施方案中,抗体或其结合片段特异于包含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的至少一个氨基酸被甲醛、EDC、NHS或EDC和NHS的组合交联。

[0500] 具有可变重链和可变轻链区的抗体或其结合片段也可以结合TcdB,所述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%或者最优选约100%的相同性。

[0501] 在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含可变重链区,其包含的氨基酸序列与B8-26的可变重链区氨基酸序列(SEQ ID NO:49)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。

[0502] 在另一实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含可变轻链区,其包含的氨基酸序列与B8-26的可变轻链区氨基酸序列(SEQ ID NO:55)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。

[0503] 在另一方面,抗体或其抗原结合片段包含可变重链区,其包含的氨基酸序列与B8-26的可变重链区氨基酸序列(SEQ ID NO:49)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;并且包含可变轻链区,其包含的氨基酸序列与B8-26的可变轻链区氨基酸序列(SEQ ID NO:55)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。

[0504] 在另一实施方案中,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以结合TcdB。

[0505] 在一个实施方案中,抗体或其结合片段包含B8-26的重链互补决定区(CDR)的氨基酸序列,和/或包含B8-26的轻链CDR的氨基酸序列。

[0506] 在优选的实施方案中,特异于难辨梭菌毒素B的抗体或其结合片段特异性地结合毒素B的N端区域中的表位,例如根据SEQ ID NO:2编号的TcdB的氨基酸1-1256之间的表位。实例包括B2-31、B5-40、B8-26、B70-2、B6-30和B9-30。

[0507] 在示例性实施方案中,特异于难辨梭菌毒素B的抗体或其结合片段特异性地结合毒素B的C端区域中的表位,例如根据SEQ ID NO:2编号的TcdB的氨基酸1832-2710之间的表位。

[0508] 在另一实施方案中,特异于难辨梭菌毒素B的抗体或其结合片段特异性地结合难辨梭菌毒素B的“易位”区域中的表位,例如优选包含根据SEQ ID NO:2编号的TcdB的残基956-1128的表位,例如TcdB的氨基酸659-1832之间的表位。实例包括B59-3、B60-2和B56-6。

[0509] 抗体的组合

[0510] 抗毒素抗体或其结合片段可以与其它抗难辨梭菌毒素抗体组合施用(例如,其它的单克隆抗体,多克隆 γ -球蛋白)或其抗原结合片段。可是用的组合包括抗毒素A抗体或其结合片段以及抗毒素B抗体或其抗原结合片段。

[0511] 在另一实施方案中,组合包括抗毒素A抗体或其结合片段和另一抗毒素A抗体或其抗原结合片段。优选地,组合包括中和性抗毒素A单克隆抗体或其结合片段和另一中和性抗毒素A单克隆抗体或其结合片段。令人吃惊的是,本发明人发现此种组合在毒素A细胞毒性的中和中的协同效应。例如,组合包括至少两种下述中和性抗毒素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抗体和至少一种下述中和性抗毒素A单克隆抗体:A65-33;A60-22;和A80-29。最优选地,组合包括所有四种抗体:A3-25;A65-33;A60-22;和A80-29。

[0512] 在另外的实施方案中,组合包括抗毒素B抗体或其结合片段和另一抗毒素B抗体或

其抗原结合片段。优选地,组合包括中和性抗毒素B单克隆抗体或其结合片段以及另一中和性抗毒素B单克隆抗体或其抗原结合片段。令人吃惊的是,本发明人发现本发明人发现此种组合在毒素B细胞毒性的中和中的协同效应。更优选地,组合包括至少两种下述中和性抗毒素B单克隆抗体的组合:B8-26;B9-30和B59-3。最优选地,组合包括所有三种抗体:B8-26;B9-30和B59-3。

[0513] 在另一实施方案中,组合包括抗毒素B抗体或其结合片段以及另一抗毒素B抗体或其抗原结合片段。如此前所述,本发明人发现,在毒素A和毒素B的各自中和中,至少两种中和性单克隆抗体的组合能够展现出乎意料的协同效应。

[0514] 在另一实施方案中,本发明的物质可以被配制为混合物,或者用本领域已知的技术化学或遗传连接而由此导致具有抗毒素A和抗毒素B二者的结合特性的共价连接的抗体(或共价连接的抗体片段)。可以通过确定物质单独的或者与另一物质的组合的一或多个参数如亲和性、亲和力、或生物学效力来指引组合配制。

[0515] 此类组合治疗在其治疗活性方面优选是添加性的和/或协同性的,例如,在难辨梭菌相关疾病或病况的抑制、预防(例如,复发的预防)、和/或治疗中。施用此类组合治疗可以降低达到期望效果所需要的治疗物质(例如,抗体或抗体片段混合物,或者交联的或遗传融合的双特异性抗体或抗体片段)的剂量。

[0516] 应理解,任何本发明的组合物,例如,抗毒素A和/或抗毒素B抗体或其抗原结合片段,可以以不同的比例或量组合用于治疗效果。例如,抗毒素A和抗毒素B抗体或其各自的结合片段可以0.1:10至10:0.1(A:B)范围的比例存在于组合物中。在另一实施方案中,抗毒素A和抗毒素B抗体或其各自的结合片段可以0.1:10至10:0.1(B:A)范围的比例存在于组合物中。

[0517] 在另一方面,本发明涉及产生针对难辨梭菌TcdA的中和抗体的方法。所述方法包括向哺乳动物施用上文所述的免疫原性组合物,并从所述哺乳动物回收抗体。在优选的实施方案中,所述免疫原性组合物包括具有SEQ ID NO:4的突变体难辨梭菌TcdA,其中所述突变体难辨梭菌TcdA的至少一个氨基酸是经化学交联的,优选经甲或1-乙基-3-(3-二甲基氨基)碳二亚胺交联。可以产生的针对TcdA的示例性中和抗体包括A65-33;A60-22;A80-29和/或A3-25。

[0518] 在另一方面,本发明涉及产生针对难辨梭菌TcdB的中和抗体的方法。所述方法包括向哺乳动物施用上文所述的免疫原性组合物,并从所述哺乳动物回收抗体。在优选的实施方案中,所述免疫原性组合物包括具有SEQ ID NO:6的突变体难辨梭菌TcdB,其中所述突变体难辨梭菌TcdB的至少一个氨基酸是经化学交联的,优选经甲或1-乙基-3-(3-二甲基氨基)碳二亚胺交联。可以产生的针对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。

[0519] 制剂

[0520] 本发明的组合物(如,例如,包括本文所述的突变体难辨梭菌毒素、免疫原性组合物、抗体和/或其抗体结合片段的组合物)可以多种形式。这些形式包括,例如,半固态和固态剂型,栓剂,液态形式如液态溶液(例如,可注射和可灌注溶液),分散液或悬液,脂质体,和/或干燥的形式如例如,冻干粉末形式,冻干形式,喷干形式,和/或泡沫干形式(foam-dried form)。对于栓剂,结合剂和载体包括,例如,聚烯烃二醇(polyalkylene glycol)或

甘油三酯;此类栓剂可以由含有本发明组合物的混合物形成。在示例性实施方案中,所述组合物是适宜于注射前在液体载剂中的溶液或悬液的形式。在另外的示例性实施方案中,所述组合物乳化或包囊在脂质体或微颗粒中,如多乳酸化合物,聚乙醇酸交酯,或共聚物。

[0521] 在优选的实施方案中,所述组合物是冻干的并且在使用前即时重配的。

[0522] 在一方面,本发明涉及包括与药物可接受的载体一起配制的任何本文所述组合物的药物组合物(如例如,包括本文所述的突变体难辨梭菌毒素,免疫原性组合物,抗体和/或其抗体结合片段的组合物)。“药物可接受的载体”包括生理学适宜的任何溶剂、分散介质、稳定剂、稀释剂、和/或缓冲剂。

[0523] 示例性的稳定剂包括碳水化合物,如山梨醇,甘露醇,淀粉,葡聚糖,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,诸如壳聚糖,聚乳酸,聚乙醇酸和共多聚物(如胶乳功能化的SEPHAROSE™琼脂糖,琼脂糖,纤维素等),氨基酸,多聚氨基酸,氨基酸共聚物,和脂质集合体(如油滴或脂质体)。另外,这些载体可以用作免疫刺激物质(即佐剂)。

[0524] 优选地,所述组合物包括海藻糖。海藻糖的优选量(重量%)从最少的大约1%,2%,3%,或4%到最多的大约10%,9%,8%,7%,6%,或5%。任何最少的值可以与任何最大的值组合以定义适宜的范围。在一个实施方案中,所述组合物包括大约3%-6%海藻糖,最优选地,4.5%海藻糖,例如,在每0.5mL的剂量中。

[0525] 适宜的稀释剂的例子包括蒸馏水,盐水,生理磷酸盐缓冲盐水,甘油,醇(如乙醇),林格溶液,右旋糖溶液,汉克斯平衡盐溶液,和/或冻干赋形剂。

[0526] 示例性的缓冲剂包括磷酸盐(如磷酸钙,磷酸钠);醋酸盐(如醋酸钠);琥珀酸盐(如琥珀酸钠);甘氨酸;组氨酸;碳酸盐,Tris(三羟甲氨基甲烷),和/或碳酸氢盐(如碳酸氢铵)缓冲剂。优选地,所述组合物包括Tris缓冲剂。优选的Tris缓冲剂的量包括从最少的大约1mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM,10mM到最多的大约100mM,50mM,20mM,19mM,18mM,17mM,16mM,15mM,14mM,13mM,12mM,或11mM。任何最少的值可以与任何最大的值组合以定义适宜的范围。在一个实施方案中,所述组合物包括大约8mM至12mM的Tris缓冲剂,最优选地,10mM的Tris缓冲剂,例如,在每0.5mL的剂量中。

[0527] 在另一优选的实施方案中,所述组合物包括组氨酸缓冲剂。优选的组氨酸缓冲剂的量包括从最少的大约1mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM,10mM到最多的大约100mM,50mM,20mM,19mM,18mM,17mM,16mM,15mM,14mM,13mM,12mM,或11mM。任何最少的值可以与任何最大的值组合以定义适宜的范围。在一个实施方案中,所述组合物包括大约8mM至12mM的组氨酸缓冲剂,最优选地,10mM的组氨酸缓冲剂,例如,在每0.5mL的剂量中。

[0528] 在另外的优选实施方案中,所述组合物包括磷酸盐缓冲剂。优选的磷酸盐缓冲剂的量包括从最少的大约1mM,5mM,6mM,7mM,8mM,9mM,10mM到最多的大约100mM,50mM,20mM,19mM,18mM,17mM,16mM,15mM,14mM,13mM,12mM,或11mM。任何最少的值可以与任何最大的值组合以定义适宜的范围。在一个实施方案中,所述组合物包括大约8mM至12mM的磷酸盐缓冲剂,最优选地,10mM的磷酸盐缓冲剂,例如,在每0.5mL的剂量中。

[0529] 通常会选择缓冲剂的pH以稳定所选的活性材料,且本领域技术人员可以通过已知的方法来确定所述pH。优选地,缓冲剂的pH会在生理pH的范围内。因此,优选的pH范围是从大约3至大约8;更优选地,从大约6.0至大约8.0;更优选地,从大约6.5至大约7.5;以及最优

选地,在大约7.0至大约7.2。

[0530] 在一些实施方案中,所述药物组合物可包括表面活性剂。任何表面活性剂都适合,无论是两性的,非离子的,阳离子的还是阴离子的。示例性的表面活性剂包括聚氧乙烯山梨坦酯表面活性剂(例如,TWEEN®),如Polysorbate20和/或Polysorbate80;衍生自十二烷基、十六烷基、十八烷基和油醇基醇的聚氧乙烯脂肪醚(已知为Brij表面活性剂),如三甘醇单十二烷基醚(Brij30);Triton X100,或者t-辛基苯基聚乙氧基乙醇;和山梨坦酯(通常称为SPAN),如三油酸山梨坦(Span85)和单月桂山梨坦,以及其组合。优选的表面活性剂包括Polysorbate80(聚氧乙烯山梨坦单油酸酯)。

[0531] Polysorbate80的优选量(重量%)包括,从最少的大约0.001%,0.005%,或0.01%,到最多的大约0.010%,0.015%,0.025%,或1.0%。任何最少的值可以与任何最大的值组合以定义适宜的范围。在一个实施方案中,所述组合物包括大约0.005%–0.015%的Polysorbate80,最优选地,0.01%的Polysorbate80。

[0532] 在示例性实施方案中,所述免疫原性组合物包括海藻糖和Phosphate80。在另外的示例性实施方案中,所述免疫原性组合物包括Tris缓冲剂和Polysorbate80。在另外的示例性实施方案中,所述免疫原性组合物包括组氨酸缓冲剂和Polysorbate80。在另外的示例性实施方案中,所述免疫原性组合物包括磷酸盐缓冲剂和Polysorbate80。

[0533] 在一个示例性的实施方案中,所述免疫原性组合物包括海藻糖,Tris缓冲剂和Polysorbate80。在另外的示例性实施方案中,所述免疫原性组合物包括海藻糖,组氨酸缓冲剂和Polysorbate80。在另外的示例性实施方案中,所述免疫原性组合物包括海藻糖,磷酸盐缓冲剂和Polysorbate80。

[0534] 本文所述组合物还可包括石油、动物、植物或合成来源的成分,例如,花生油,大豆油,和/或矿物油。实例包括二醇如丙二醇或聚乙二醇。

[0535] 在一些实施方案中,所述药物组合物还包括甲醛。例如,在优选的实施方案中,还包括甲醛的药物组合物具有免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物的突变体难辨梭菌毒素已经与包括甲醛的化学交联剂接触。The amount of 甲醛present in所述药物组合物中存在的甲醛的量可以从最少的大约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%,到最多的大约0.020%,0.019%,0.018%,0.017%0.016%,0.015%,0.014%,0.013%,0.012%0.011%或0.010%变化。任何最少的值可以与任何最大的值组合以定义适宜的范围。在一个实施方案中,所述药物组合物包括大约0.010%的甲醛。

[0536] 在另外的一些实施方案中,本文所述药物组合物不包括甲醛。例如,在优选的实施方案中,不包括甲醛的药物组合物具有免疫原性组合物,其中突变体难辨梭菌毒素的至少一个氨基酸经包括EDC的物质化学交联。更优选地,在此类实施方案中,所述突变体难辨梭菌毒素未曾与包括甲醛的化学交联剂接触。作为另一示例性实施方案,冻干形式的药物组合物不包括甲醛。

[0537] 在另一实施方案中,本文所述组合物可包括如下文所述的佐剂。优选的佐剂提升对免疫原的内在免疫应答而不引起所述免疫原中能够影响免疫应答定性形式的构象改变。

[0538] 示例性的佐剂包括3De-0-酰化的单磷酸脂质A(MPL™)(参见GB2220211(GSK));氢氧化铝凝胶如Alhydrogel™(Brenntag Biosector,Denmark);铝盐(如氢氧化铝,磷酸铝,硫

酸铝),其可在存在或不存在免疫刺激剂如MPL或3-DMP的情况下使用,QS-21,多聚体或单体氨基酸如聚谷氨酸或聚赖氨酸。

[0539] 另外的示例性佐剂是免疫刺激性寡核苷酸如CpG寡核苷酸(参见,例如,W01998/040100,W02010/067262),或者皂苷和免疫刺激性寡核苷酸,如CpG寡核苷酸(参见,例如,W000/062800)。在优选的实施方案中,佐剂是CpG寡核苷酸,最优选CpG寡聚脱氧核苷酸(CpG ODN)。优选的CpG ODN是优先激活B细胞的B类。对于本发明,CpG ODN具有氨基酸序列5'T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T*T3'(SEQ ID NO:48)其中*表示硫代磷酸酯键。此序列的CpG ODN已知为CpG24555,其在W02010/067262中有描述。在优选的实施方案中,CpG24555与氢氧化铝盐如铝胶(Alhydrogel)一起使用。

[0540] 另一类示例性佐剂包括皂苷佐剂,如StimulonTM(QS-21,其是三萜甙或皂苷,Aquila,Framingham,Mass.)或者由其生成的颗粒如ISCOM(免疫刺激性复合物)和ISCOMATRIX[®]佐剂。因此,本发明的组合物可以如下形式提供:ISCOM,含CTB的ISCOMS,脂质体或者包囊在化合物中如丙烯酸盐或聚(DL-丙交酯-共-糖苷)以形成适宜于吸附大小的微球。通常,术语“ISCOM”是指糖苷之间形成的免疫原性复合物,如三萜式皂苷(特别是Quil A),以及含有疏水区的抗原。在优选的实施方案中,佐剂是ISCOMATRIX佐剂。

[0541] 其它示例性的佐剂包括RC-529,GM-CSF以及完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)。

[0542] 另一类示例性佐剂是糖脂类似物包括N-糖基酰胺,N-糖基尿素和N-糖基氨基甲酸盐/酯,其中每个都在糖残基中由氨基酸取代。

[0543] 任选地,所述药物组合物包括两种或更多种不同的佐剂。优选的佐剂组合包括,例如含有至少两种如下佐剂的任何佐剂组合:alum,MPL,QS-21,ISCOMATRIX,CpG,和铝胶。示例性的佐剂组合包括CpG和铝胶的组合。

[0544] 或者,在一个实施方案中,所述组合物在无佐剂时施用于哺乳动物。

[0545] 本文所述的组合物可以任何施用途来施用,如例如,用于预防和/或治疗应用的肠胃外,局部,静脉内,粘膜,口服,皮下,动脉内,颅内,硬膜内,腹膜内,鼻内,肌内,皮内,灌注,直肠,和/或经皮途径。在优选的实施方案中,所述组合物的施用途是肠胃外,更优选肌内施用。典型的肌内施用在胳膊或腿部肌肉处进行。

[0546] 本文所述的组合物可以与其它疗法(在难辨梭菌感染的预防和/或治疗方面至少部分有效)组合施用。例如,本发明的组合物可以在如下疗法之前、与其同时、或其之后施用:生物治疗;益生治疗;肛门植入;免疫治疗(如静脉内免疫球蛋白);和/或难辨梭菌相关疾病(CDAD)抗生素治疗的经接受的护理标准,如甲硝唑和/或万古霉素。

[0547] 涉及毒素A和毒素B的本发明组合物可以任何组合施用于哺乳动物。例如,包括突变体难辨梭菌TcdA的免疫原性组合物可以在包括突变体难辨梭菌TcdB的免疫原性组合物之前、与其同时、或其之后施用。反过来,包括突变体难辨梭菌TcdB的免疫原性组合物可以在包括突变体难辨梭菌TcdA的免疫原性组合物之前、与其同时、或其之后施用。

[0548] 在另一实施方案中,包括抗毒素A抗体或其结合片段的免疫原性组合物可以在包括抗毒素B抗体或其结合片段的免疫原性组合物之前、与其同时、或其之后施用。反过来,包括抗毒素B抗体或其结合片段的免疫原性组合物可以在包括抗毒素A抗体或其结合片段的免疫原性组合物之前、与其同时、或其之后施用。

[0549] 在另外的实施方案中,本发明的组合物可以在药物可接受的载体之前、与其同时、或其之后施用。例如,佐剂可以在包括突变体难辨梭菌毒素的组合物之前、与其同时、或其之后施用。因此,本发明的组合物和药物可接受的载体可以包装在同一瓶内或者它们可以包装在不同瓶内并在使用前混合。所述组合物可以配制为单剂量施用和/或多剂量施用。

[0550] 在哺乳动物中防护和/或治疗难辨梭菌感染的方法

[0551] 在一方面,本发明涉及在哺乳动物中诱导针对难辨梭菌毒素的免疫应答的方法。所述方法包括向哺乳动物施用有效量的本文所述组合物。例如,所述方法可以包括施用有效量以在哺乳动物中产生针对各个难辨梭菌毒素的免疫应答。

[0552] 在示例性实施方案中,本发明涉及在哺乳动物中诱导针对难辨梭菌TcdA的免疫应答的方法。所述方法包括向哺乳动物施用有效量的包括突变体难辨梭菌TcdA的免疫原性组合物。在另外的示例性实施方案中,本发明涉及在哺乳动物中诱导针对难辨梭菌TcdB的免疫应答的方法。所述方法包括向哺乳动物施用有效量的包括突变体难辨梭菌TcdB的免疫原性组合物。

[0553] 在另外的实施方案中,所述方法包括向哺乳动物施用有效量的包括突变体难辨梭菌TcdA的免疫原性组合物和有效量的包括突变体难辨梭菌TcdB的免疫原性组合物。在另外的方面,本文所述组合物可用于对哺乳动物中的难辨梭菌感染、难辨梭菌相关疾病(CDAD)、综合征、病况、症状、和/或其并发症进行治疗、预防、降低其风险、降低其发生、降低其严重性、和/或延迟其发病(相较于未施用所述组合物的哺乳动物)。所述方法包括向哺乳动物施用有效量的所述组合物。

[0554] 基于感染的严重性,识别了三种由难辨梭菌感染所引起的临床综合症。最严重的形式是假膜性结肠炎(PMC),其特征在于暴注(profuse diarrhea),腹痛,全身性疾病迹象,以及区别性结肠内窥表象。

[0555] 抗生素相关结肠炎(AAC)也是特征在于暴注,腹部疼痛和压痛,全身性迹象(例如,发烧),和白细胞增多。AAC中的肠损伤不如PMC中严重,PMC中的特征性结肠内窥表象缺失,并且死亡率低。

[0556] 最后,抗生素相关性腹泻(AAD,也称作难辨梭菌相关性腹泻(CDAD)是相对轻度的综合症,特征在于轻度至中度腹泻,缺乏大肠炎症(特征在于例如,腹部疼痛和压痛)以及全身性感染迹象(例如,发烧)。

[0557] 这三种不同的装置通常以逐个增加的频率发生。也就是说,PMC的发生频率通常低于AAC,而AAD通常是最常发生的难辨梭菌疾病的临床表现。

[0558] 难辨梭菌感染的常见并发症是反复或复发疾病,在所有从难辨梭菌疾病恢复的患者中有达20%会发生。复发临床特征在于AAD,AAC,或PMC。复发一次的患者更有可能再次复发。

[0559] 如本文所用,难辨梭菌感染的病况包括,例如,轻度、轻度至中度、中度、和严重的难辨梭菌感染。难辨梭菌感染的病况可根据感染的表现和/或症状严重性而变化。

[0560] 难辨梭菌感染的症状可包括生理学、生化、组织学和/或行为症状,如例如,腹泻;大肠炎;痉挛性大肠炎,发烧,排泄物白细胞增多,和结肠活检上的炎症;假膜性结肠炎;低白蛋白血症;全身性水肿;白细胞增多;败血症;腹痛;无症状带菌;和/或感染发展期间出现的并发症和中间态病理表型,以及其组合等。因此,例如,施用有效量的本文所述组合物可

以例如,对腹泻;腹痛,痉挛,发烧,结肠活检上的炎症,低白蛋白血症,全身性水肿,白细胞增多,败血症,和/或无症状带菌者等进行治疗、预防、降低其风险、降低其发生、降低其严重性、和/或延迟其发病(相较于未施用所述组合物的哺乳动物)。

[0561] 难辨梭菌感染的风险因素可包括,例如,正在或立即要使用抗微生物剂(涵盖任何具有针对厌氧菌的抗菌谱和/或活性的抗微生物物质,包括例如,破坏正常结肠微生物菌群的维生素,例如,克林霉素,头孢菌素,甲硝唑,万古霉素,荧光喹诺酮(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);正在或立即要停用处方甲硝唑或万古霉素;正在或立即要接触健康护理机构(如医院,长期护理机构等)以及护理人员;正在或立即要用质子泵抑制剂、H2拮抗剂、和/或甲氨蝶呤、或其组合进行治疗;正患有胃肠道疾病或具有患病风险,如炎性肠病;曾经、正在或立即要对哺乳动物进行胃肠道手术或胃肠道处理;难辨梭菌感染和/或CDAD曾经或正在反复,例如,患有一次或多次难辨梭菌感染和/或CDAD的患者;以及年龄至少或者超过大约65岁的人。

[0562] 在本文所述的方法中,所述哺乳动物可以是任何哺乳动物,如例如,小鼠,仓鼠,灵长动物,和人。在优选的实施方案中,所述哺乳动物是人。根据本发明,所述人可以包括曾展现出难辨梭菌感染、难辨梭菌相关疾病、综合症、病况、症状、和/或其并发症的个体;正展现难辨梭菌感染、难辨梭菌相关疾病、综合症、病况、症状、和/或其并发症的个体;以及具有难辨梭菌感染、难辨梭菌相关疾病、综合症、病况、症状、和/或其并发症风险的个体。

[0563] 显示出难辨梭菌感染症状的个体的实例包括显示过或正在显示上文所述症状的个体;曾患有或正在患有难辨梭菌感染和/或难辨梭菌相关疾病(CDAD)的个体;以及患有难辨梭菌感染和/或CDAD反复的个体。

[0564] 具有难辨梭菌感染风险的患者的实例包括具有规划的抗微生物应用风险的个体或正在经受规划的抗微生物应用的个体;具有停用处方甲硝唑或万古霉素风险的个体或正在停用处方甲硝唑或万古霉素风险的个体;具有规划接触护理机构(如医院,长期护理机构等)或护理人员风险的个体或正在接触护理机构或护理工作人员的个体;和/或具有规划的用如下药物治疗风险的个体或正在经受如下药物治疗的个体:质子泵抑制剂、H2拮抗剂、和/或甲氨蝶呤、或其组合;曾患有或正在经受胃肠道疾病如炎性肠病的个体;曾经历或正在经受胃肠道手术或胃肠道处理的个体;以及曾经历或正经历难辨梭菌感染和/或CDAD复发的个体,例如,患有一次或多次难辨梭菌感染和/或CDAD的患者;年龄大约65岁或更大的个体。此类有风险的患者目前可显示或不显示难辨梭菌感染的症状。

[0565] 在无症状患者中,预防和/或治疗可以在任何年龄开始(例如,在大约10,20,或30岁)。然而在一个实施方案中,在患者达到大约45,55,65,75,或85岁前并不是必需开始治疗。例如,本文所述组合物可以施用于50-85岁的无症状人。

[0566] 在一个实施方案中,在哺乳动物中对难辨梭菌感染、难辨梭菌相关疾病、综合征、病况、症状、和/或其并发症进行治疗、预防、降低其风险、降低其发生、降低其严重性、和/或延迟其发病的方法包括向有需要的哺乳动物、有难辨梭菌感染风险的哺乳动物和/或疑似患有难辨梭菌感染的哺乳动物施用有效量的本文所述组合物。有效量包括,例如,足以对难辨梭菌感染、难辨梭菌相关疾病、综合征、病况、症状、和/或其并发症进行治疗、预防、降低其风险、降低其发生、降低其严重性、和/或延迟其发病的量(相较于未施用所述组合物的哺乳动物)。施用有效量的本发明的组合物可以,例如,对腹泻;腹痛,痉挛,发烧,结肠活检上

的炎症,低白蛋白血症,全身性水肿,白细胞增多,败血症,和/或无症状带菌者等进行治疗、预防、降低其风险、降低其发生、降低其严重性、和/或延迟其发病(相较于未施用所述组合物的哺乳动物)。在优选的实施方案中,所述方法包括向有需要的哺乳动物、有难辨梭菌感染风险的哺乳动物和/或疑似患有难辨梭菌感染的哺乳动物施用有效量的本文所述的免疫原性组合物。

[0567] 在另外的实施方案中,在哺乳动物中对难辨梭菌感染、难辨梭菌相关疾病、综合征、病况、症状、和/或其并发症进行治疗、预防、降低其风险、降低其发生、降低其严重性、和/或延迟其发病的方法包括向疑似患有或正在经受难辨梭菌感染的哺乳动物施用有效量的本文所述组合物。有效量包括,例如,足以对难辨梭菌感染、难辨梭菌相关疾病、综合征、病况、症状、和/或其并发症进行治疗、预防、降低其风险、降低其发生、降低其严重性、和/或延迟其发病的量(相较于未施用所述组合物的哺乳动物)。

[0568] 施用有效量的所述组合物可以在对象中改善至少一种难辨梭菌感染的迹象或症状,如下文所述的那些。施用有效量的本文所述组合物可以,例如,与未施用所述组合物的哺乳动物相比,降低腹泻的严重性和/或减少其复发;降低腹痛、痉挛、发烧、结肠活检上的炎症、低白蛋白血症、全身性水肿、白细胞增多、败血症、和/或无症状带菌者等的严重性和/或减少其复发。任选地,在治疗之前确定感染症状、迹象和/或风险因素的存在。在优选的实施方案中,所述方法包括向疑似患有或正在经受难辨梭菌感染的哺乳动物施用有效量的本文所述的抗体和/或其结合片段。

[0569] 因此,有效量的组合物是指足以在本发明的方法中实现所期望效果(例如,预防和/或治疗效果)的量。例如,用于施用的免疫原的量可以从每次注射最少的大约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到最多的大约2mg,1mg,500 μ g,200 μ g变化。任何最少的值可以与任何最大的值组合以定义适宜的范围。通常每种免疫原大约10,20,50或100 μ g被用于每次人类注射。

[0570] 施用于对象的本发明组合物的量可以取决于感染的严重性和/或个体的特征,如整体健康、年龄、性别、体重、以及对药物的耐受。其也可以取决于疾病的程度、严重性、和类型。有效量也可以根据因素而变化,如施用途径、靶位点、患者的生理状态、患者的年龄、患者是人还是动物、所施用的其它疗法、以及该处理是预防性的还是治疗性的。本领域技术人员能够根据这些以及其它因素确定适宜的量。

[0571] 有效量可包括用于本文方法中的一个有效剂量或多个有效剂量(如例如,2,3,4个剂量或更多)。有效剂量可能需要经渐增以使安全性和有效性达到最优化。

[0572] 足够实现预防和/或治疗性用途的量和给药频率的组合被定义为预防有效的或治疗有效的方案。在预防性和/或治疗性方案中,通常施用所述组合物多于一个剂量直至达到足够的免疫应答。通常,对免疫应答进行监测并在免疫应答减弱时给予重复的剂量。

[0573] 组合物可以在一段时间以多剂量施用。可以通过针对时间来测定抗体、或激活的T-细胞或B-细胞应答(针对治疗物质(例如,包括突变体难辨梭菌毒素的免疫原性组合物))来对治疗进行监测。如果应答降低,则表明需要进行加强剂量。

实施例

[0574] 实施例1:毒素阴性难辨梭菌菌株的鉴别

[0575] 为鉴别缺乏毒素(A和B)基因和毒素表达的难辨梭菌菌株,测试了13种难辨梭菌菌株。对于毒素A,通过ELISA测试了13种难辨梭菌菌株的培养基。7种菌株表达了毒素A:难辨梭菌14797-2,难辨梭菌630,难辨梭菌BDMS,难辨梭菌W1194,难辨梭菌870,难辨梭菌1253,和难辨梭菌2149。参见图3。

[0576] 6株菌株未表达毒素A并且缺乏整个致病性基因座:难辨梭菌1351(ATCC43593TM),难辨梭菌3232(ATCC BAA-1801TM),难辨梭菌7322(ATCC43601TM),难辨梭菌5036(ATCC43603TM),难辨梭菌4811(4ATCC3602TM),和难辨梭菌VPI11186(ATCC700057TM)。基于通过结合而摄入质粒DNA的有效性而选择了VPI11186。

[0577] 在使用致病性基因座之外引物的多重PCR测定中测试了相同的所述13种菌株(PaLoc;Braun et al.,Gene.1996Nov28;181(1-2):29-38.)。PCR结果表明,来自所述6株毒素A阴性菌株(经ELISA)的DNA并未从PaLoc(tcdA-tcdE)扩增任何基因。出现了PaLoc旁侧序列(cdd3和cdu2)(数据未显示)。

[0578] 实施例2:难辨梭菌VPI11186中孢子形成通路的失活

[0579] 敲除难辨梭菌生产菌株中的孢子形成功能有助于在安全的生产环境中大规模发酵。使用了ClosTron系统以创建不产孢子的难辨梭菌菌株。参见Heap et al.,J Microbiol Methods.2009Jul;78(1):79-85。所述ClosTron系统用以用于定点插入性失活spo0A1梭菌基因的II组内含子而使靶标基因失活。使用此ClosTron技术将毒素阴性菌株VPI11186的孢子形成失活。选择红霉素抗性突变体并通过PCR确认插入性盒的存在(未显示)。确认了两个独立克隆形成孢子能力的丧失。

[0580] 实施例3:毒素A和B基因的遗传修饰以使细胞毒性功能失活

[0581] 设计了基于菌株630 Δ 基因组序列的全长突变体毒素A和B开放阅读框(ORF)以在Blue Heron Biotech进行合成。参见例如,SEQ ID NO:9-14。通过两个等位基因取代而改变了负责细胞毒性的葡萄糖基转移酶活性的活性位点:毒素A为D285A/D287A(参见SEQ ID NO:3),以及毒素B为D286A/D288A(参见SEQ ID NO:5)。在每个天冬氨酸(D)密码子突变两个核苷酸,以创建丙氨酸(A)密码子。参见,例如,SEQ ID NO:9-14。另外,在Blue Heron Biotech按照定制合成构建了一对表达缺乏半胱氨酸残基的突变体毒素的载体。来自突变体毒素A的7个半胱氨酸残基和来自突变体毒素B的9个半胱氨酸残基被替换为丙氨酸。该取代包括了A和B毒素自身催化蛋白酶的催化半胱氨酸。另外,在需要之处引入了沉默突变以去除用于载体构建的限制酶切位点。

[0582] 实施例4:pMTL84121fdx表达载体

[0583] 用于难辨梭菌突变体毒素抗原表达的质粒穿梭载体选自Minton lab开发的pMTL8000-系列调节系统(参见Heap et al.,J Microbiol Methods.2009Jul;78(1):79-85)。所选择的载体pMTL84121fdx含有难辨梭菌质粒pCD6Gram+复制子,catP(氯霉素/甲砒霉素)选择标记,p15a Gram-复制子和tra功能,以及产芽胞梭状芽胞杆菌(*C.sporogenes*)铁氧还蛋白启动子(fdx)和远端多克隆位点(MCS)。经验数据表明,低拷贝数p15a复制子相较于ColE1的选择赋予了大肠杆菌更大的稳定性。选择所述fdx启动子是因为其产生较高的表达(相较于用CAT报道子构建体所测试的其他启动子,例如tcdA,tcdB;或者异源的tetR或xy1R)(数据未显示)。

[0584] 实施例5:将经修饰的毒素ORF克隆至pMTL84121fdx内

[0585] 经标准的分子生物学技术,用pMTL84121fdx载体多克隆NdeI和BglIII位点,将基于菌株630 Δ 基因组序列的全长突变体毒素A和B开放阅读框(ORF)亚克隆。为促进克隆,ORF旁侧具有含起始密码子的近端NdeI位点和紧接终止密码子下游的BglIII位点。

[0586] 实施例6:TcdA的定点诱变以创建三重突变体

[0587] 自身催化蛋白酶结构域的催化半胱氨酸残基在SEQ ID NO:3和5中(即,在每个“双重突变体”中)被取代(即,TcdA的C700A和TcdB的C698A)。对于突变体毒素A的诱变,将来自TcdA D285A/D287A表达质粒的2.48kbNdeI-HindIII片段亚克隆至pUC19(经同样的酶切)中,并在此模板上进行定点诱变。一旦通过DNA序列分析确定了新的等位基因,将修饰的NdeI-HindIII片段再引入到表达载体pMTL84121fdx中以创建“三重突变体”,即,SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6。

[0588] 实施例7:TcdB的定点诱变以创建三重突变体

[0589] 对于突变体毒素B的诱变,将来自突变体毒素B质粒的3.29kbNdeI-EcoNI片段修饰并再引入。由于可用的克隆载体中不存在EcoNI位点,将稍大一些的3.5kb NdeI-EcoRV片段亚克隆至pUC19(用NdeI-SmaI制备)中。诱变之后,将经修饰的内部3.3kb NdeI-EcoNI片段剪掉并用于置换相应的突变体毒素B表达载体pMTL84121fdx判断。由于发现此定向策略的克隆效率很低,所以同时尝试了用于引入C698A等位基因(涉及1.5kbDraIII的置换)的另一策略。两种策略均独立产生所期望的重组体。

[0590] 实施例8:通过定点诱变创建另外的突变体毒素变体

[0591] 构建了至少12种不同的难辨梭菌突变体毒素变体。通过定点诱变(Quickchange® kit)将等位基因取代引入至N-端突变体毒素基因片段中。重组毒素还经改造为参考对照以评估此基于质粒的系统产生蛋白(生物活性定量等价于纯化自野生型难辨梭菌菌株天然毒素)的能力。在此情况中,引入等位基因取代以将原葡萄糖基转移酶取代恢复原样。另外,在Blue Heron Biotech按定制合成构建了一对无半胱氨酸的突变体毒素载体。

[0592] 所述12种毒素变体包括:(1)具有D285A/D287A突变的突变体难辨梭菌毒素A(SEQ ID NO:3);(2)具有D286A/D288A突变的突变体难辨梭菌毒素B(SEQ ID NO:5);(3)具有D285A/D287A C700A突变(SEQ ID NO:4)的突变体难辨梭菌毒素A;(4)具有D286A/D288A C698A突变的突变体难辨梭菌毒素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突变的突变体难辨梭菌毒素A;(8)具有C698A突变的突变体难辨梭菌毒素B;(9)具有C700A C597S,C1169S,C1407S,C1623S,C2023S,和C2236S突变的突变体难辨梭菌毒素A;(10)具有C698A C395S,C595S,C824S,C870S,C1167S,C1625S,C1687S,和C2232S突变的突变体难辨梭菌毒素B;(11)具有D285A,D287A,C700A,D269A,R272A,E460A,和R462A突变的突变体难辨梭菌毒素A(SEQ ID NO:7);和(12)具有D270A,R273A,D286A,D288A,D461A,K463A,和C698A突变的突变体难辨梭菌毒素B(SEQ ID NO:8)。

[0593] 实施例9:转化体的稳定性

[0594] 用通用的DH5大肠杆菌实验室菌株获得经重排的质粒。相反,在于30℃在LB氯霉素(25μg/ml)平板上生长3天之后,用Invitrogen Stb12™大肠杆菌宿主的转化产生了缓慢生长的全长突变体毒素重组体。用相关的Stb13™和Stb14™大肠杆菌菌株获得了更低的克隆效率,尽管发现这些菌系对于保持质粒而言是稳定的。随后将转化体在琼脂中或液体培养

中的氯霉素选择下于30℃传代。也发现LB(Miller's)培养基的使用改善了转化体的回收和生长(相较于基于无动物胰蛋白胨大豆的培养基)。

[0595] 实施例10:用编码野生或遗传突变体毒素基因的pMTL84121fdx转化难辨梭菌

[0596] 基本如Heap et al., Journal of Microbiological Methods, 2009.78(1):p.79-85中所述完成用大肠杆菌接合转移来转化难辨梭菌。编码野生型或突变体毒素基因的pMTL84121fdx来转化大肠杆菌宿主CA434。大肠杆菌宿主CA434是将表达质粒固定至难辨梭菌生产菌株VPI11186spo0A1中的中间体。CA434是大肠杆菌HB101的衍生体。此菌株携有Tra+Mob+R702接合质粒,其赋予了对Km、Tc、Su、Sm/Spe、和Hg(由于Tn1831)的抗性。制备了化学感受态或电感受态CA434细胞,并在Miller's LB CAM平板上于30℃选择表达载体转化体。挑取3天后出现的缓慢生长的菌落,并在3mL LB氯霉素培养中扩增至对数中期(~24h, 225rpm, 定轨摇床, 30℃)。通过低速(5,000g)离心来收集大肠杆菌培养物以避免破坏菌毛,并将细胞沉淀轻柔地用大口径移液管重悬于1mL PBS中。用低速离心浓缩细胞。通过倾倒将大部分PBS去除,将倒干的沉淀转移至无氧箱中并用0.2mL的难辨梭菌培养物重悬,点至BHIS琼脂平板上并使其生长8h或过夜。在突变体毒素A转化体的情况中,过夜接合实现更好的结果。将细胞块刮至0.5mLPBS中并将0.1mL铺板至BHIS选择培养基上,所述培养基补加了15μg/mL甲砒霉素(更强力的氯霉素类似物)和D-环丝氨酸/头孢西丁以杀死大肠杆菌供体细胞。通过重划线至新的BHIS(加上补加物)平板上来纯化16-24h后出现的转化体,并测试随后的培养物对重组毒素或突变体毒素的表达。从表现良好表达的克隆制备了甘油长期保存液(glycerol permanent)和留种储备。也从2mL的培养物制备了质粒的小量制备,其中使用了修改的Qiagen试剂盒步骤(其中用溶菌酶(非必须)预处理细胞)。将所述难辨梭菌小量制备DNA作为模板用于PCR测序以验证克隆完整性。或者,从大肠杆菌Stb12™转化体制备了质粒大量制备DNA并测序。

[0597] 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)的难辨梭菌表达分析

[0598] 使转化体在2mL培养物(用于常规分析)中或在通气塞烧瓶(用于时间进程实验)中生长。将样品(2mL)剪短离心(10,000rpm, 30s)以浓缩细胞:倒掉上清并浓缩10x(Amicon-ultra30k);将沉淀倒干并冷冻于-80℃。在冰上解冻细胞沉淀,重悬于1mL水解缓冲剂中(Tris-HCl pH7.5;1mM EDTA,15%甘油)并超声破碎(用微尖头(microtip)冲击1x20s)。将水解物于4℃离心并将上清浓缩5-倍。将上清和水解物的样品与样品缓冲剂组合并加热处理(10min, 80℃),随后装载至一式双份3-8%Tris-醋酸SDS-PAGE凝胶上(Invitrogen)。一个凝胶用考马氏亮蓝染色,第二个凝胶用电印迹以用于Western分析。毒素A-特异性和毒素B-特异性兔抗血清(Fitzgerald;Bioscience)被用于检测突变体毒素A和B变体。七重突变体毒素B(SEQ ID NO:8)的表达也经Western印迹杂交获得了确认。

[0599] 实施例12:突变体毒素葡萄糖基转移酶活性的消除

[0600] 遗传双重突变体(DM)毒素A和B(分别为SEQ ID NO:3和5)和三重突变体(TM)毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)在体外葡萄糖化测定(存在UDP-¹⁴C-葡萄糖[30μM], 50mM HEPES, pH7.2, 100mM KCl, 4mM MgCl₂, 2mM MnCl₂, 1mM DTT, 和0.1μg/μL BSA)中并未将¹⁴C-葡萄糖转移至10μg的RhoA, Rac1和Cdc42GTPase。然而,野生型A和B毒素对照(分别具有SEQ ID NO:1和2)每种在10和1ng的低剂量(和更低的剂量-数据未显示)有效地将¹⁴C-葡萄糖转移至

GTPase(图4A和4B),即便在存在100 μ g的突变体毒素的情况下(图4B),这表明与各自的野生型毒素相比至少100,000-倍的降低。对于Cdc42GTPase检测到了类似的结果(数据未显示)。

[0601] 具体而言,在Fig.4B中,将野生型毒素A和毒素B(1ng)或三重突变体毒素A和三重突变体毒素B(100 μ g)与hoA GTPase一起于30 $^{\circ}$ C温育2hr(存在UDP- 14 C-葡萄糖)。如所示,1ng的野生型TcdA和TcdB将 14 C-葡萄糖转移至RhoA,但100 μ g的三重突变体毒素A和三重突变体毒素B未转移。当1ng的野生型TcdA或TcdB被加至各自的100 μ g的三重突变体毒素A或三重突变体毒素B的反应中,检测到了RhoA的葡萄糖化,表明葡萄糖化抑制剂的缺乏。对葡萄糖化活性检测的灵敏新据评估为100 μ g突变体毒素背景中的1ng野生型毒素(1:100,000的比例)。该结果显示,在三重突变体毒素A和三重突变体毒素B的葡萄糖基转移酶活性位点中的突变降低了任何可测量的(与各自的野生型毒素的活性相比低不到100,000-倍的活性)葡萄糖基转移酶活性。也开发了类似的测定来通过葡萄糖化GTPase的TCA沉淀对葡萄糖基转移酶活性进行定性。

[0602] 实施例13:自身催化半胱氨酸蛋白酶活性的消除

[0603] 当半胱氨酸蛋白酶切割位点被突变时,三重遗传突变体A和(TM)(分别为SEQ ID NO:4和6)中的自身催化切割的功能被消除。如图5中所示,在肌醇-6-磷酸盐的存在下将野生型(wt)毒素A和B(分别为SEQ ID NO:3和5)切割。也在肌醇-6-磷酸盐的存在下将双重突变体毒素A和B(分别为SEQ ID NO:3和5)切割(数据未显示),与野生型类似。将毒素A(SEQ ID NO:3)从308kDa切割成245和60kDa的两个片段。将毒素B(SEQ ID NO:5)从270kDa切割成207和63kDa的两个片段。三重遗传突变体A和B(TM)(分别为SEQ ID NO:4和6)分别保持在308和270kDa未受影响,即便存在肌醇-6-磷酸盐。参见图5。因此,遗传修饰将半胱氨酸蛋白酶活性失活n。

[0604] 更具体地,在图5中,将1 μ g的三重突变体A和三重突变体B于室温(21 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C)与野生型TcdA和TcdB(得自List Biologicals)平行温育90分钟。切割反应在20 μ L体积的Tris-HCl,pH7.5,2mM DTT中(存在或不存在肌醇-6-磷酸盐(TcdA10mM及TcdB0.1mM))进行。继而将整个反应体积装载至3-8%SDS/PAGE中;通过银染使蛋白条带可见。如所示,在肌醇-6-磷酸盐的存在下,wt Tcd A和cdB分别被切割成245kD和60kD及207kD和63kD的两个蛋白条带。所述三重突变体毒素A和三重突变体毒素B未被切割,由此确认了三重突变体毒素A中的C700A突变和三重突变体毒素B中的C698A封闭了切割。

[0605] 实施例14:三重突变体毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)的残余细胞毒性

[0606] 通过体外细胞毒性测定(IMR90细胞,人二倍体肺成纤维细胞细胞系)评估了遗传突变体毒素的细胞毒性。这些细胞对毒素A和B皆敏感。作为另外的优选实施方案,来自非洲绿猴(*Cercopithecus aethiops*)的Vero正常肾细胞可用于细胞毒性测定,因为据观察它们对毒素A和B具有合理的敏感性。优选地,HT-29人结直肠腺癌细胞不用于细胞毒性测定,因为它们显示出对所述毒素显著降低的敏感性(相较于Ver和IMR90细胞系)。参见,例如,下表6。

表 6: 细胞系对毒素 A 和 B*的敏感性

[0607]

细胞系	毒素 50 µg/ml	细胞/孔	EC ₅₀ (pg/ml)	
			48 小时	72 小时
Vero (ATCC CCL-81™)	A	10000	1816	244
	B	10000	62	29
IMR90	A	10000	1329	1152

[0608]

(ATCC CCL-186™)	B	10000	14	13
HT-29 (ATCC HTB-38™)	A	10000	>1E6	>1E6
	B	10000	11089	53313
*体外细胞毒性测定通过用基于荧光素酶的底物, CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI) 来测量细胞 ATP				

[0609] 将系列稀释的遗传突变体毒素或wt毒素样品加至96-孔组织培养平板中生长的细胞单层培养中。在37℃温育72h后,通过测量细胞ATP水平来评估平板的代谢活性细胞,所述测量细胞ATP水平是通过加入基于荧光素酶的CellTiterGlo®试剂(Promega, Madison, WI)产生表示为相对光单位(RLU)的荧光。高RLU显示细胞是存活的,低RLU显示细胞无代谢活性并且是快死的。细胞毒性的水平(表示为EC₅₀)被定义为引发50%的RLU降低的wt毒素或遗传突变体毒素的量(相较于细胞培养物对照中的水平)(此测定的细节在下文中描述)。如图6、表7A、和表8A中所示,TcdA和TcdB的EC₅₀值分别为大约0.92ng/mL和0.009ng/mL。三重突变体毒素A和三重突变体毒素B的EC₅₀值分别为大约8600ng/mL和74ng/mL。尽管相对于wt毒素而言细胞毒性有大约10,000-倍的降低,两种遗传突变体毒素均证明了低的残余细胞毒性水平。可以通过中和性抗毒素单克隆抗体来封闭此残余细胞毒性,表明其特异于三重突变体毒素但却不太可能与已知的wt毒素酶(葡萄糖化或自身蛋白水解)的酶活性相关。

[0610] 两种wt毒素均展现有力的体外细胞毒性,小量的毒素就足以引起各种对哺乳动物细胞的作用,如细胞变圆(细胞病变效应或CPE)以及代谢活性的缺乏(通过ATP水平来测量)。因此,开发了两种体外测定(CPE或细胞变圆测定和ATP测定)以验证所述突变体毒素药物物质中无残余细胞毒性保留。结果表示为EC₅₀,其是毒素或突变体毒素引起如下的量:1) 50%的细胞发展处CPE或2) 50%的ATP水平(测量为相对光单位)的降低。

[0611] 在CPE测定中,将药物物质的样品系列稀释并与IMR90细胞温育,观察其潜在的细胞病变效应。所述CPE测定在0(正常细胞)至4(~100%细胞变圆)的范围打分,且分数2(~50%细胞变圆)定义为所测试样品的EC₅₀值。此方法用于在1000µg/mL的浓度测试突变体毒素药物物质,所述1000µg/mL的浓度是此测定中可以测试的无基体干扰的最大可耐受浓度。因此,没有可检测的细胞毒性被报道为EC₅₀>1000µg/mL。

[0612] 所述ATP测定是基于对从ATP产生的荧光信号的量的测量,其与代谢活性细胞的量成比例。此测定中可测试的最大可耐受浓度(无测定干扰)是大约200µg/mL。因此,没有可检测的细胞毒性被报道为EC₅₀>200µg/mL。

[0613] 将不同浓度的突变体毒素A和B平行加入细胞中(有毒素对照)。测定的终点是通过

细胞ATP水平(使用CellTiter-Glo® (Promega))所确定的细胞生存力。荧光的程度与ATP的水平或存活细胞的数目成比例。

[0614] 野生型(wt)毒素A的体外细胞毒性(EC₅₀)是920pg/mL,而毒素B为9pg/mL。突变体毒素A(SEQ ID NO:4)的体外细胞毒性(EC₅₀)是8600ng/mL,而突变体毒素B(SEQ ID NO:6)为74ng/mL。虽然这些值分别代表了9348和8222-倍的降低,在两种突变体毒素中均检测到残余的细胞毒性。

[0615] 换句话说,在IMR-90细胞中的体外细胞毒性测定中,相对于wt毒素A和B(分别为SEQ ID NO:1和2)的细胞毒性,三重突变体毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)的细胞毒性显著降低。如图6中所示,虽然两种三重突变体毒素均展现出相对于wt毒素的细胞毒性的显著降低(10⁴倍),两种三重突变体毒素在较高浓度均观察到残余的细胞毒性。

[0616] 另外,可以通过毒素特异性抗体而将每种三重突变体毒素的残余细胞毒性完全中和(例如,相对于野生型毒素毒性,毒性至少6-8log₁₀的降低)。参见下文实施例16。

[0617] 细胞培养测定对于检测细胞毒性而言比体内动物模型更灵敏。通过当i.p.或i.v.途径递送至小鼠致死攻击模型时,wt TcdA具有~50ng/小鼠的LD₅₀,而wt TcdB更有力而具有~5ng/小鼠的LD₅₀。相反,上文所述基于细胞培养物的体外测定具有100pg/孔(wt TcdA)和2pg/孔(wt TcdB)的EC₅₀值。

[0618] 实施例15:遗传七重突变体毒素B(SEQ ID NO:8)的残余细胞毒性

[0619] 如图7所示,三重突变体毒素B(SEQ ID NO:6)(20.78ng/mL)和七重突变体毒素B(SEQ ID NO:8)(35.9ng/mL)突变体的EC₅₀值类似,表明进一步修饰葡萄糖基转移酶活性位点和GTPase底物结合位点的另外四个突变并未进一步降低遗传突变体毒素的细胞毒性。双重突变体毒素B(SEQ ID NO:5)的EC₅₀值也类似于三重和七重突变体毒素(数据未显示)。此观察表明,突变体毒素的细胞毒性令人吃惊地并不依赖于葡萄糖基转移酶和底物识别机制。

[0620] 实施例16:三重突变体毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)的残余细胞毒性

[0621] 为了进一步评估残余细胞毒性的性质,将突变体毒素(SEQ ID NO:4和6)混合并与之前其各自的中和抗体温育,将混合物加至IMR90细胞单层培养。

[0622] 结果(图8)显示,用特异于突变体毒素A(上图,图8)和突变体毒素B(下图,图8)的中和抗体能够完全消除突变体毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)的残余细胞毒性。将浓度渐增的突变体毒素A(上图)和B(下图)与兔抗毒素单克隆(pAb,1:10稀释)或鼠单克隆抗体(从含3.0mg IgG/mL的母液1:50稀释)一起温育,之后加入至IMR90细胞。在与IMR90细胞于37℃温育处理72hr之后,加入CellTiter-Glo®底物,并在风光光度计中用荧光程序测量相对光单位(RLU)以测量ATP水平。ATP水平越低,则毒性越高。对照包括Tcd和TcdB(4倍于其相应EC₅₀值)。

[0623] 已公开的报道指出毒素的葡萄糖基转移酶或自身催化蛋白酶结构域中的突变导致毒性的完全失活。然而,我们的数据并不与这些公开的报道一致,这可归因于在我们的研究中所测试的是高度纯化的切浓度增加的突变体毒素,而公开的报道中则相反使用粗制培养物水解物;对经突变体毒素-处理的细胞的细胞变圆进行观察的时间点增加(例如,24小时,48小时,72小时,或96小时),而报道中则相反仅在少于12小时内进行观察;在本细胞毒性测定中使用了对毒素展现出显著更高敏感性的细胞系,相对于公开报道的细胞毒性测定

中使用的HT-29人结直肠腺癌细胞;和/或归因于葡萄糖化之外未知的可促成突变体毒素残余毒性的活性或过程。

[0624] 实施例17:遗传突变体毒素细胞毒性的新机制

[0625] 为研究遗传突变体毒素残余细胞毒性的机制,用wt毒素B(SEQ ID NO:2)或遗传突变体毒素B(SEQ ID NO:6)来处理IMR-90细胞,并用处理时间研究了Rac1GTPase的葡萄糖化。从24-96小时收集样品并制备细胞提取物。通过用两种Rac1抗体的Western印迹来区分葡萄糖化的Rac1与未-葡萄糖化的Rac1。一种抗体(23A8)识别两种形式的Rac1,而另一种(102)仅识别未-葡萄糖化的Rac1。如图22中所示,对于毒素B,总Rac1水平未随时间改变,且大部分的Rac1被葡萄糖化。另一方面,用遗传突变体毒素B(SEQ ID NO:6)的处理,则导致显著降低的总Rac1,然而,该Rac1在所有时间点均为未-葡萄糖化的。这显示遗传突变毒素处理对Rac1水平产生负影响,但wt毒素却不会。如图22中所示,在示出的时间点,肌动蛋白的水平在毒素和遗传突变体毒素B处理的细胞中类似,并类似于模拟处理的细胞。这显示了,遗传突变体毒素通过与野生型毒素推动葡萄糖化途径不同的机制来发挥细胞毒性。

[0626] 实施例18:遗传突变体毒素的化学处理

[0627] 虽然经遗传修饰的突变体毒素显示出4-log的细胞毒性活性的降低是优选的,仍考虑了细胞毒性活性的进一步降低(2-4log)。评估了两种化学失活策略。

[0628] 第一种方法使用甲醛和甘氨酸来失活突变体毒素。甲醛失活是通过在甲醛和蛋白上的伯胺之间形成席夫碱(亚胺)而发生的。席夫碱继而能够与许多氨基酸残基(Arg,His,Trp,Tyr,Gln,Asn)反应以形成分子内或分子间交联。此交联固定了蛋白的结构导致其失活。另外,甲醛能够与甘氨酸反应形成席夫碱。该甘氨酸席夫碱继而能够与氨基酸残基反应形成分子间蛋白-甘氨酸交联。甲醛将遗传突变体毒素的细胞毒性活性降低至 t_0 低于可检测限(三重突变体B(SEQ ID NO:6)细胞毒性降低至 $>8\log_{10}$,而三重突变体A(SEQ ID NO:4)为 $>6\log_{10}$)。然而,当甲醛-失活(FI)的三重突变体毒素在25℃温育时,则会随着时间观察到恢复。可以通过加入少量的甲醛(0.01-0.02%)至FI-三重突变体毒素储藏溶液中来防止细胞毒性恢复。参见实施例23。

[0629] 另一种方法使用1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)处理来产生失活的突变体毒素。在此方法中,EDC/NHS与蛋白上的羧基反应以形成激活的酯。该激活的酯继而能与蛋白上的伯胺反应以形成稳定的酰胺键。与用甲醛反应一样,此反应导致了分子内和分子间的交联。用EDC/NHS处理所形成的酰胺键比福尔马林失活所形成的脆弱的亚胺键更稳定的且不可恢复。在激活的酯与多肽上伯胺反应形成的交联之外,甘氨酸和 β -丙氨酸加合物均可形成。不受机制或理论限制,在添加甘氨酸以使未反应的激活酯退火时会产生甘氨酸加合物。甘氨酸的胺与多肽上激活的酯反应以形成稳定的酰胺键。不受机制或理论限制, β -丙氨酸加合物是通过激活的 β -丙氨酸与多肽上的伯胺反应而形成的。此反应导致稳定的酰胺键。激活的 β -丙氨酸由3摩尔的NHS与1摩尔的EDC的反应产生。

[0630] 为实现细胞毒性活性相对于遗传修饰的突变体毒素2-4log的降低(相对于天然毒素6-8log),化学失活的突变体毒素应具有 $\geq 1000\mu\text{g/mL}$ 的 EC_{50} 值。在细胞毒性活性的降低之外,保留通过斑点杂交分析确定的关键表位将会是有利的。目前,鉴定出了许多反应条件,其满足降低细胞毒性和识别表位的条件。制备了若干批次的失活的突变体毒素用于动物研

究,并且来自几个代表性批次的分析数据在表7A和7B、表8A和8B中示出。

[0631]

表 7A: 化学失活的突变体毒素 A 是安全的且具抗原性的					
样品 #	毒素样品 ID	处理	CPE EC ₅₀	毒性的降低	对 mAb 的反应性
			μg/mL	Log 尺度	
1	突变体 TcdA (SEQ ID NO: 4) L44905-160A	福尔马林	>1000	6.4	中/高
2	突变体 TcdA (SEQ ID NO: 4) L44166-166	EDC	>1000	6.4	高
3	突变体 TcdA (SEQ ID NO: 4) L44905-170A	福尔马林	>1000	6.4	低
对照					
4	TcdA wt (得自 List Bio)	无	390 pg/mL	1	高
5	TcdB wt (得自 List Bio)	无	3.90 pg/mL	不适用	无
6	r 突变体 TcdA 遗传 TM L36901-79 (SEQ ID NO: 4)	无	12.5 μg/mL	4.5	高
7	类毒素 A List Bio	福尔马林	未进行	---	低

[0632]

表 7B: 化学失活的突变体毒素 A 是安全的且具抗原性的								
样品 #	毒素样品 ID	处理	与 mAb 的反应性 (斑点杂交, 非变性条件)					
			N- 端 mAb#6	Mid-结构域 mAb # 102	C-端(neut)			
					A80-29	A3-25	A60-22	A65-33
1	突变体 TcdA (SEQ ID NO: 4) L44905-160A	福尔马林	++	++	++++	++	++++	++++
2	突变体 TcdA (SEQ ID NO: 4) L44166-166	EDC	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3	突变体 TcdA (SEQ	福尔马林	+	+	++	++	++	+

[0633]

	ID NO: 4) L44905-170A							
对照								
4	TcdA wt (得自 List Bio)	无	++++	+++	++++	++++	++++	++++
5	TcdB wt (得自 List Bio)	无	—	—	—	—	—	—
6	r 突变体 TcdA 遗传 TM L36901-79 (SEQ ID NO: 4)	无	++++	++++	++++	++++	++++	++++
7	类毒素 A List Bio	福尔马林	—	—	+	—	++	+

[0634] List=List Biologicals; CPE=细胞病变效应测定; EC₅₀=50%的细胞显示细胞毒性的最低浓度; mAb=单克隆抗体; neut=中和; ND=未进行; TM=激活位点和切割突变体(“三重突变体”)

[0635]

表 8A: 化学失活的突变体毒素 B 是安全的且有抗原性的					
样品 #	毒素样品 ID	处理	CPE EC ₅₀	毒性的降低	对 mAb 的反应性
			μg/mL	Log 尺度	
1	突变体 TcdB L44905-182 (SEQ ID NO: 6)	福尔马林	>1000	8.4	中/高
2	突变体 TcdB L34346-38A (SEQ ID NO: 6)	EDC	>1000	8.4	高
3	突变体 TcdB L44905-170B (SEQ ID NO: 6)	福尔马林	>1000	8.4	低
对照					
4	TcdA wt (得自 List Bio)	无	390 pg/mL	不适用	无
5	TcdB wt (得自 List Bio)	无	3.90 pg/mL	1	高
6	r 突变体毒素 B 遗传 TM (SEQ ID NO: 6) L34346-022	无	69 ng/mL	4.2	高
7	类毒素 A List	福尔马林	未进行	---	中

[0636]

表 8B: 化学失活的突变体毒素 B 是安全的且具抗原性的			
样品 #	毒素样品 ID	处理	与 mAb 的反应性 (斑点杂交, 非变性条件)

[0637]

			N-端 aa 1-543		中间-/C-端 aa 544-2366	
			B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
1	突变体 TcdB (SEQ ID NO: 6) L44905-160A	福尔马林	+++	+++	++	++
2	突变体 TcdB (SEQ ID NO: 6) L44166-166	EDC	++++	++++	++++	++++
3	突变体 TcdB (SEQ ID NO: 6) L44905-170A	福尔马林	++	+	+/-	-
对照						
4	TcdA wt (得自 List Bio)	无	—	—	—	—
5	TcdB wt (得自 List Bio)	无	++++	+++	++++	++++
6	r 突变体 TcdB 遗传 TM L34346-022 (SEQ ID NO: 6)	无	++++	++++	++++	++++
7	类毒素 B List	福尔马林	+++	+++	+++	+++

[0638] List=List Biologicals;CPE=细胞病变效应测定;EC₅₀=50%的细胞显示细胞毒性的最低浓度;mAb=单克隆抗体;neut=中和;ND=未进行;TM=激活位点和切割突变体(“三重突变体”)

[0639] 实施例19:纯化

[0640] 在发酵结束时,将发酵罐冷却。通过连续离心和在适宜缓冲剂中重悬来回收细胞浆。通过高压匀浆实现细胞悬液的细胞裂解。对于突变体毒素A,匀浆液呈絮状并对絮状的溶液进行连续离心。过滤此溶液并继而将其转移至后续加工。对于突变体毒素B,通过连续离心使匀浆液澄清,并继而将其转移至后续加工。

[0641] 用两个层析步骤及随后的最终更换缓冲剂来纯化突变体毒素A(SEQ ID NO:4)。将澄清的裂解液装载至疏水相互作用层析(HIC)柱上并用柠檬酸钠梯度洗脱结合的突变体毒素。继而将来自HIC柱的产品收集装载至阳离子交换(CEX)柱上,并用氯化钠梯度洗脱结合的突变体毒素A。通过透析过滤将含纯化的突变体毒素A的CEX收集更换至最终缓冲剂。通过透析过滤将纯化的突变体毒素A更换至最终的药物物质中间体缓冲剂。透析过滤之后,将渗余物通过0.2微米的过滤器过滤,之后化学失活至最终的药物物质。蛋白浓度靶定为1-3mg/mL。

[0642] 用两个层析步骤及随后的最终更换缓冲剂来纯化突变体毒素B(SEQ ID NO:6)。将澄清的裂解液装载至阴离子交换(AEX)柱上,并用氯化钠梯度洗脱结合的突变体毒素。将柠檬酸钠加至来自AEX柱的产物收集并装载至疏水相互作用层析(HIC)柱上。用柠檬酸钠梯度洗脱结合的突变体毒素。通过透析过滤将含纯化的突变体毒素多肽(SEQ ID NO:6)的HIC收集更换至最终缓冲剂。通过透析过滤将纯化的突变体毒素B更换至最终的药物物质中间体缓冲剂。透析过滤之后,将渗余物通过0.2微米的过滤器过滤,之后化学失活至最终的药物物质。蛋白浓度靶定为1-3mg/mL。

[0643] 实施例20:甲醛/甘氨酸失活

[0644] 在纯化后,于25℃用40mM(1.2mg/mL)的甲醛将遗传突变体毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)失活48小时。在pH7.0±0.5于10mM磷酸盐、150mM氯化钠缓冲剂(含有40mM(3mg/mL)甘氨酸)中进行所述失活。失活时间设定为超过三倍的在IMR90细胞中将EC₅₀降低至1000ug/mL所需的时间。48小时后,生物学活性相对于天然毒素降低了7至8log₁₀。在48小时的温育后,通过透析过滤将失活的突变体毒素更换至药物物质缓冲剂。例如,使用100kD再生的醋酸纤维素超滤盒,将失活的毒素浓缩至1-2mg/mL并更换缓冲剂。

[0645] 实施例21:N-(3-二甲基氨丙基)-N'-乙基碳二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)失活

[0646] 纯化后,于25℃对每mg纯化的遗传突变体毒素A和B(分别为大约2.6mM和4.4mM)用0.5mg的EDC和0.5mg的NHS来将所述遗传突变体毒素(SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6)失活2小时。通过加入甘氨酸至终浓度100mM来将该反应失活,并在25℃将反应再另外温育2小时。在pH7.0±0.5于10mM磷酸盐、150mM氯化钠缓冲剂中进行所述失活。失活时间设定为超过三倍的在IMR90细胞中将EC₅₀降低至1000ug/mL所需的时间。2小时后,生物学活性相对于天然毒素降低了7至8log₁₀。在4小时的温育后,通过透析过滤将失活的突变体毒素更换至药物物质缓冲剂。例如,使用100kD再生的醋酸纤维素超滤盒,将失活的毒素浓缩至1-2mg/mL并更换缓冲剂。

[0647] 除非另有说明,是实例部分中所使用的如下术语是指根据本说明书实施例21所述产生的组合物:“经EDC/NHS-处理的三重突变体毒素”;“经EDC-失活的突变体毒素”;“突变体毒素[A/B]药物物质”;“EI-突变体毒素”;“EDC/NHS-三重突变体毒素”。例如,如下术语是同义的:“经EDC/NHS-处理的三重突变体毒素A”;“经EDC-失活的突变体毒素A”;“突变体毒素A药物物质”;“EI-突变体毒素A”;“EDC/NHS-三重突变体毒素A”。作为另一实例,如下术语是同义的:“经EDC/NHS-处理的三重突变体毒素B”;“经EDC-失活的突变体毒素B”;“突变体毒素B药物物质”;“EI-突变体毒素B”;“EDC/NHS-三重突变体毒素B”。

[0648] 所述突变体毒素A药物物质和所述突变体毒素B药物物质均是用分批方式制备的,其包括(1)毒素阴性的难辨梭菌菌株(VPI11186)的发酵,所述菌株含有编码各个遗传三重突变体毒素多肽的质粒,所述发酵是在包含大豆水解产物,酵母提取物HY YESTTM412(Sheffield Bioscience),葡萄糖,和甲磺霉素的培养基中,(2)从无细胞裂解液中纯化遗传突变体毒素(所述“药物物质中间体”)至至少高于95%的纯度,其中使用离子交换和疏水相互作用层析过程,(3)通过用EDC/NHS处理随后用甘氨酸退火/封闭反应来进行化学失活,和(4)更换至最终缓冲剂基体。

[0649] 实施例22:支持失活和配制条件的研究

[0650] 为将遗传突变体毒素的化学失活优化,进行了实验的统计学设计(DOE)。所述DOE中检测的因素包括温度、甲醛/甘氨酸浓度、EDC/NHS浓度和时间(表9和10)。为监测生物学活性的丧失,测定了IMR90细胞中的EC₅₀值。另外,还观察了IMR-90细胞在处理各个时间点的细胞形态。参见图9,显示了处理后72小时时的形态。为确定对蛋白结构的影响,用斑点杂交分析来监测表位识别,其中使用了一组针对毒素不同结构域而产生的单克隆抗体。

[0651]

表 9: 甲醛/肝素 DOE 所测试的参数	
参数	测试的范围
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
Glycine 浓度(mg/ml)	0 至 80

[0652]

表 10: EDC/NHS DOE 所测试的参数	
参数	测试的范围
时间(消失)	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

[0653] 在难辨梭菌突变体毒素的甲醛/甘氨酸失活中,对最终反应条件进行选择从而实现所期望水平的细胞毒性活性降低(7至8log₁₀)同时将表位识别最大化。参见上文实施例20。

[0654] 在难辨梭菌突变体毒素的EDC/NHS失活中,对最终反应条件进行选择从而实现所期望水平的细胞毒性活性降低(7至8log₁₀)同时将表位识别最大化。参见上文实施例21。

[0655] 在另外的实施方案中,通过加入足以将反应退火的丙氨酸而将EDC-NHS反应退火。丙氨酸的使用可导致突变体毒素蛋白上的修饰,所述修饰类似于用甘氨酸使反应退火时的修饰。例如,通过加入丙氨酸退火可在突变体毒素的谷氨酸和/或天冬氨酸残基的侧链上导致丙氨酸部分。在另外的实施方案中,通过加入足以将反应退火的甘氨酸甲基酯而将EDC-NHS反应退火。

[0656] 在最佳条件下产生化学失活的三重突变体难辨梭菌毒素A和毒素B导致了残余细胞毒性进一步降低至不可检测的水平(>1000μg/mL-通过CPE测定测试的最高浓度),同时保留了抗原性(通过其与毒素特异性中和抗体的反应而测量)。表28中所使出的结果证明细胞毒性逐步从wt毒素降低至经EDC/NHS-处理的三重突变体毒素。免疫荧光标记确认了三重突变体毒素(SEQ ID NO:4和6)和突变体毒素药物物质展现出对IMR-90细胞相当的结合,表明细胞毒性的丧失并不是由于对细胞结合的降低(数据未显示)。与突变体毒素A药物物质相比,突变体毒素B药物物质实现了细胞毒性更高倍数的降低,这与所观测到的TcdB比TcdA高~600-倍的效力一致。

[0657] 表28.细胞毒性总结

[0658]

毒素	样品	EC ₅₀	细胞毒性降低的倍数
A	TcdA (SEQ ID NO: 1)	1.6 ng/mL	1
	三重突变体毒素 A(SEQ ID NO: 4)	12.5 µg/mL	7800
	突变体毒素 A 药物物质	>1000 µg/mL	>625,000
B	TcdB (SEQ ID NO: 2)	2.5 pg/mL	1
	三重突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6)	45 ng/mL	18,000
	突变体毒素 B 药物物质	>1000 µg/mL	>400,000,000

[0659] 还评估了经EDC单独修饰的突变体毒素B、或者经EDC和磺基-NHS修饰的突变体毒素B的细胞毒性测定的结果。参见表29。

[0660] 表29

[0661]

样品	细胞毒性 EC ₅₀ , mg.mL ⁻¹ CPE)	评价
TcdB TM (SEQ ID NO: 6), 未修饰的	0.03	
TM TcdB-EDC 1, 无 NHS	<0.97	与 EDC 单独反应
TM TcdB-EDC 2, 无 NHS	<0.97	一式双份制备
TM TcdB-EDC 3, 磺基-NHS (0.5x)	125	与 EDC 和磺基-NHS 反应
TM TcdB-EDC 4, 磺基-NHS (0.5x)	125	一式双份制备
TM TcdB-EDC 3, 磺基-NHS (1.0x)	250	与 EDC 和磺基-NHS 反应
TM TcdB-EDC 4, 磺基-NHS (2.0x)	750	与 EDC 和磺基-NHS 反应

[0662] 条件:三重突变体毒素B(“TM TcdB”)(SEQ ID NO:6)以重量比例修饰,突变体毒素B:EDC:磺基-NHS=1:0.5:0.94。此比例摩尔等价于(对应于更高的磺基-NHS的MW)实施例21中所述的标准EDC/NHS反应。为确定磺基-NHS的作用,磺基-NHS的比例从0.5x变至2x标准比例。在1x PBS pH7.0中于25℃进行一式双份的反应,并通过加入EDC溶液而起始反应。2小时后,通过加入1M的甘氨酸pH7.0(0.1M终浓度)而将反应退火,并再另外温育2小时。使用Vivaspin20装置将经退火的反应出去盐分并将突变体毒素B药物物质(“TM TcdB-EDC”)浓缩,除菌过滤至无菌小瓶中并用于在细胞毒性测定中进行评估。

[0663] 以相同的摩尔比,磺基-NHS将EC₅₀降低至大约250ug/mL(相较于NHS的>1000ug/mL)。即便以两倍的摩尔比,磺基-NHS未表现出在降低细胞毒性方面不与NHS一样有效。参见表30。

[0664] 表30

修饰	参考消化	NHS 对照消	磺基-NHS
	(TcdB EDC 004)	化(TcdB EDC 001)	样品消化
[0665] 甘氨酸加合物 (+57 da)	49	29	35
β -丙氨酸 (+71 da)	24	19	0
交联(-18 da)	7	4	3
脱氢丙氨酸(-34 da)	6	5	4
未修饰	273	195	217

[0666] 为确定修饰的数目和类型,在经EDC/NHS和经EDC/磺基-NHS失活的三重突变体毒素B样品上均进行了肽作图(mapping)。在两份样品中均观测到类似量的甘氨酸加合物,交联和脱氢丙氨酸修饰。然而在磺基-NHS样品中,未观测到 β -丙氨酸。

[0667] 用标准方案将野生型毒素B(SEQ ID NO:2)失活(参见实施例21);毒素B:EDC:NHS1:0.5:0.5,于25℃达2小时,在1x PBS pH7.0中,继而用1M甘氨酸(0.1M终浓度)退火并另外再温育2小时。将样品除去盐分,浓度并用于细胞毒性测定。此样品的The EC₅₀为<244ng/mL。

[0668] 实施例23:恢复研究

[0669] 为确定经甲醛/甘氨酸或经EDC/NHS失活的难辨梭菌突变体毒素是否发生恢复,将失活的突变体毒素样品(1mg/mL)于25℃温育5-6周。每周取等分试样并确定IMR90细胞中的EC₅₀值。一个甲醛/甘氨酸失活的样品不含甲醛,而一个样品含0.01%的甲醛。通过CPE测定来确定EC₅₀。

[0670]

表 11: 来自失活的 TcdA 恢复研究的结果			
温育时间 (天)	EC ₅₀ (IMR90 细胞测定)		
	福尔马林-失活的		EDC/NHS
	无甲醛	0.01% 甲醛	
0	1000 ug/ml	1000 ug/ml	1000 ug/ml

[0671]

7	740 ug/mL	ND	1000 ug/ml
14	493 ug/mL	1000 ug/ml	1000 ug/ml
21	395 ug/mL	ND	1000 ug/ml
28	395 ug/mL	1000 ug/ml	1000 ug/ml
35	326 ug/M	ND	ND

[0672] 于25℃在缺乏残余甲醛使,观测到部分恢复(表11)。在5周之后,细胞毒性活性提高了大约3-倍。虽然细胞毒性活性提高了,但在5周之后相对于天然毒素依然有7log₁₀的降低。通过包含0.010%浓度的福尔马林而完全阻止了恢复。在经EDC/NHS失活的样品中未观测到恢复。在整个6-周的温育中,对于所有的4套的经EDC/NHS-处理的三重突变体毒素A(SEQ ID NO:4)和经EDC/NHS-处理的三重突变体毒素B(SEQ ID NO:6),其EC₅₀值均保持在起始>1000μg/mL水平。相反,经FI-处理的三重突变体毒素A(SEQ ID NO:4)和经FI-处理的三重突变体毒素B(SEQ ID NO:6)的EC₅₀值是不稳定的并降低至不可接受的低EC₅₀值,表明细胞毒性的提高或者失活的恢复。参见表11。

[0673] 在稳定降低细胞毒性至不可检测水平(>1000μg/mL,通过CPE测定测量)之外,由EDC/NHS失活的突变体毒素保留了重要的表位(其是毒素中和mAb的靶标)。参见表31。FI突变体毒素则显示了相同抗原决定簇的丧失。

[0674] 表31.EDC/NHS失活降低了遗传突变体毒素的细胞毒性并保持了重要的抗原决定簇

[0675]

样品	EC ₅₀	相对于 wt 毒素 的细胞毒性降低 (log ₁₀) ^a	最大结合(Rmax) ^b 中和 mAb ^d		
			1 ^c	2	3
三重突变体 A (SEQ ID NO: 4)	12.5 μg/mL	4.5	100	100	100
FI-三重突变体 A	>1000 μg/mL	>6.4	55	59	53
EDC/NHS-三重突 变体 A	>1000 μg/mL	>6.4	90	94	103
三重突变体 B (SEQ ID NO: 6)	69 ng/mL	4.3	100	100	100
FI-三重突变体 B	>1000 μg/mL	8.4	67	67	36
	>1000 μg/mL	8.4	87	78	73

[0676]

EDC/NHS-三重突 变体 B

[0677] a细胞毒性用CPE测定在IMR90细胞上测量

[0678] b用多个中和性mAb(针对各个非重叠毒素表位)经Biacore™分析所确定的值

[0679] c为两个实验的平均值

[0680] d对于前三排,中和性mAb“1,”“2,”“3”分别是指毒素A的mAb A60-22,A80-29,和A65-33。对于后三排,中和性mAb“1,”“2,”“3”分别是指毒素B的mAb B8-26,B59-3,和B-56-15。

[0681] 实施例24:临床前免疫原性研究

[0682] 关键的临床前目标包括在小动物和非人灵长动物(NHP)中测试包含难辨梭菌突变体毒素A和B的组合物。免疫小鼠和仓鼠以确定,其中,难辨梭菌组合物是否能够引发针对突变体毒素A和B的中和抗体。在一系列的免疫小鼠、仓鼠和食蟹猴之后,测试了抗原对血清中和抗体应答的诱导。在一些实施方案中,将遗传和/或化学失活的突变体毒素配制在中性缓冲剂、铝磷酸盐缓冲剂、或含有ISCOMATRIX作为佐剂的缓冲剂中。一般在每次加强或者最后一次给药之后2-4周测试中和抗体的应答。

[0683] 毒素中和测定证明了抗血清中和由难辨梭菌TcdA或TcdB介导的细胞毒性作用的能力,因而可以用于测量样品中存在的抗体的功能性活性。毒素中和测定在人肺成纤维细胞细胞系IMR-90上进行,其对TcdA和TcdB均敏感。简言之,用IMR-90细胞接种96-孔微量滴定平板作为毒素介导的细胞毒性的靶标。分别分析每个测试血清样品中和TcdA和TcdB的能力。将测试抗血清适宜的系列稀释与固定浓度的TcdA或TcdB混合并在加湿的温育器(37℃/5%CO₂)内于37℃温育90分钟,以使毒素的中和发生。为控制质量,所有平板均包括了参考标准和对照,其包含已知滴度的抗毒素抗体。90分钟后,将毒素-抗血清混合物加至IMR-90细胞单层培养,并将平板再另外温育72小时。随后,将CellTiter-Glo®底物加至测定平板以确定代谢活性细胞中存在的三磷酸腺苷(ATP)的水平,并且其被测定为相对光单位(RLU)。高ATP水平表明高细胞生存力,并且水平与样品中存在的抗体对毒素中和的量直接成比例。对于临床前数据,将所述RLU数据针对测试抗血清样品的稀释值进行作图以产生四参数逻辑(4-PL)回归应答拟合曲线。中和滴度表示为展现出细胞毒性50%降低的样品稀释值。

[0684] 实施例25:小鼠免疫原性研究:mu难辨梭菌2010-06

[0685] 此研究的目的是评估两种形式的突变体难辨梭菌毒素B(SEQ ID NO:6)(每个都通过不同方法化学失活)的免疫原性。在此研究中,有或无佐剂的未经处理的突变体毒素B(SEQ ID NO:6)(遗传失活但未化学失活)被用作对照。

[0686] 用10μg的根据表12的免疫原来肌肉内免疫10小鼠的组。

[0687] 表12. 在小鼠中测试化学失活的突变体毒素B(SEQ ID NO:6)

[0688]

组	免疫原	剂量	No.	途径	方案
1	福尔马林-失活的突变体毒素 B ^a , 在 AlPO ₄ ^c 中	10 µg	10	IM	初免 wk 0, 加强 wk 4, 8
2	失活的突变体毒素 B 来自 2 ^b , 在 AlPO ₄ ^c 中	10 µg	10	IM	初免 wk 0, 加强 wk 4, 8
3	遗传失活的突变体毒素 B, 未加佐剂	10 µg	10	IM	初免 wk 0, 加强 wk 4, 8,
4	遗传失活的突变体毒素 B, 在 AlPO ₄ ^c 中	10 µg	10	IM	初免 wk 0, 加强 wk 4, 8,
^a 化学失活 = 经福尔马林/甘氨酸处理, 10°C, 7 天 ^b 化学失活 = 经 EDC/NHS 处理, 30°C, 2 小时 ^c 铝离子浓度 = 0.5 mg/mL					

[0689] 结果:疫苗候选的每次施用之后无不良影响。如图10所示,在用各自的突变体毒素3次给药之后,每组中的小鼠发展出了显著的强抗毒素B中和抗体。

[0690] 基于第12周的低度,看起来在小鼠中EDC-失活的突变体毒素B(组2)和福尔马林-失活的突变体毒素(组1)产生了有力的中和性应答。

[0691] 在缺乏化学失活时,遗传突变体毒素B(SEQ ID NO:6)在两次给药后(组3-4,第8周)产生了中和性应答,其在第三次给药后加强(组3-4,第12周)。

[0692] 实施例26:小鼠免疫原性研究:mu难辨梭菌2010-07:

[0693] 此研究的目的是评估化学失活的难辨梭菌突变体毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)单独或组合的免疫原性。所有组的免疫原用磷酸铝作为佐剂配制。

[0694] 用10µg的根据表13的免疫原来肌肉内免疫5小鼠的组。

[0695] 表13. 在小鼠中测试化学失活的遗传A和B突变体毒素(分别为SEQ ID NO:4和6)

[0696]

组	免疫原	剂量	No.	组	方案
1	福尔马林-失活的 ^a 突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), 在 AlPO_4^c 中	10 μg	5	IM	初免 wk 0, 加强 wk 4, 8, 12
2	EDC-失活的 ^b 突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), 在 AlPO_4^c 中	10 μg	5	IM	初免 wk 0, 加强 wk 4, 8, 12
3	福尔马林-失活的突变体毒素 A(SEQ ID NO: 4)来自 1, 在 AlPO_4^c 中	10 μg	5	IM	初免 wk 0, 加强 wk 4, 8, 12
4	EDC-失活的突变体毒素 A(SEQ ID NO: 4), 在 AlPO_4^c 中	10 μg	5	IM	初免 wk 0, 加强 wk 4, 8, 12
5	福尔马林-失活的突变体毒素 A+B, 在 AlPO_4^c 中	每只 10 μg	5	IM	初免 wk 0, 加强 wk 4, 8, 12
^a 福尔马林-处理 = 福尔马林/甘氨酸处理 2 天, 25°C; 突变体毒素不具有细胞毒性并保留了对所有测试的突变体毒素特异性单克隆抗体的结合 ^b EDC-处理 = 于 30°C EDC/NHS 处理 4hrs; 突变体毒素不具有细胞毒性并保留了对所有测试的突变体毒素特异性单克隆抗体的结合 ^c 铝离子浓度 = 0.5 mg/mL					

[0697] 结果:疫苗候选的每次施用之后无不良影响。如图11所示,在化学失活的遗传突变体毒素2次给药之后,抗毒素A中和抗体(组3-5)被加强至滴度在 $34\log_{10}$ 之间,而抗毒素B中和抗体(组1-2,5)保持了低至不可检测,这与上文所述来自小鼠研究的数据一致(图10)。在第三次给药(第12周滴度)后组1、2和5中抗毒素B中和抗体加强至 $2-3\log_{10}$,并在第四次给药后达到其峰值(第14周滴度)。组3-5中的抗毒素A中和抗体滴度在第三次(第12周滴度)和第四次免疫(第14周滴度)之后轻微增加。

[0698] 实施例27:仓鼠免疫原性研究:ham难辨梭菌2010-02:

[0699] 此研究的目的是在叙利亚金仓鼠模型中评估难辨梭菌三重突变体和化学失活的突变体毒素A和B的免疫原性和保护性潜力。叙利亚金仓鼠模型代表了模拟人CDAD的最佳攻击模型。用于小鼠研究mu难辨梭菌2010-07的相同批次的突变体毒素A和B也用于此研究。作为对照,一组被给予不含铝佐剂的突变体毒素。

[0700] 用10 μg 的根据表14的免疫原来肌肉内免疫5叙利亚金仓鼠的组。

[0701] 表14. 在仓鼠(ham难辨梭菌2010-02)中测试化学失活的突变体毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)

[0702]

组	免疫原	剂量	No.	途径	方案
1	福尔马林-失活的 ^a 突变体毒素 A+B (SEQ ID NO: 4 和 6), 在 AlPO_4 ^c 中	10 μg 每只	5	IM	初免 wk 0, 加强 wk 4, 8, 12
2	福尔马林-失活的突变体毒素 A+B (SEQ ID NO: 4 和 6), 在 PBS 中(无佐剂)	10 μg 每只	5	IM	初免 wk 0, 加强 wk 4, 8, 12
3	EDC-Inactivated ^b 突变体毒素 A+B (SEQ ID NO: 4 和 6), 在 AlPO_4 ^c 中	10 μg 每只	5	IM	初免 wk 0, 加强 wk 4, 8, 12
4	List Biological 类毒素, 在 AlPO_4 ^c 中	10 μg 每只	5	IM	初免 wk 0, 加强 wk 4, 8, 12
^a 福尔马林-处理 = 福尔马林/甘氨酸处理 2 天, 25°C; 突变体毒素不具有细胞毒性并保留了对所有测试的突变体毒素特异性单克隆抗体的结合 ^b EDC-处理 = EDC/NHS 处理 4hr, 30°C; 突变体毒素不具有细胞毒性并保留了对所有测试的突变体毒素特异性单克隆抗体的结合 ^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/100-130g 每只 2. 疫苗接种: IM, 0.05 ml 每只, 根据如上方案。类毒素由 Process Development 提供并在 AlPO_4 稀释剂中由制剂组配制。组 2 作为无佐剂对照组。 3. 采血: 就在每次免疫前, 所有仓鼠将在第 0, 4, 8, 和 12 周采血 4. 血清样品分析: 中和测定					

[0703] 结果: 用突变体毒素免疫之后未观测到不良影响。如图12中所示, 在突变体毒素的单次给药后, 抗毒素A中和性应答在 $2-3\log_{10}$ 之间(福尔马林-失活的突变体毒素(组1-2))和 $3-4\log_{10}$ 之间(EDC-失活的突变体毒素(组3))。第二次给药之后, 抗毒素A抗体在所有三组中加强。第三次给药后, 抗毒素A抗体在所有三组中未表现出提高。在第四次免疫后观测到类似的结果, 其中在不含铝佐剂的福尔马林-失活组(组2)中观测到滴度的提高。

[0704] 在单次给药后, 抗毒素B中和性应答在福尔马林-失活的突变体毒素组(组1-2)中不可检测, 且在EDC-失活的突变体毒素(组3)中仅仅超过 $2\log_{10}$ 。在第二次给药后, 抗毒素B中和抗体滴度在两个福尔马林-失活组(组1-2)中提高至 $3-4\log_{10}$, 而在EDC-失活组(组3)中提高至 $4-5\log_{10}$ 。对于所有三组, 在第三次和/或第四次给药之后均观测到抗毒素B中和抗体滴度的提高, 且所述组在第16周(最后一次给药后)达到峰值滴度。参见图12。

[0705] 在图13中, 将针对化学失活遗传突变体毒素的中和抗体应答水平(图12)与List Biological Laboratories, Inc. (Campbell, California)(本文中也可作“List Bio”或“List Biologicals”)的类毒素(即, 购自List Biological Laboratories类毒素, 通过福尔马林失活所制备的野生型毒素; 用于建立仓鼠攻击模型的对照试剂)所激发的水平比较。

[0706] 如本文所用, 图和表中的“FI”是指毒素的福尔马林/甘氨酸处理, 2天, 25°C, 除非另有说明。如本文所用, 图和表中的“EI”是指EDC/NHS处理4小时, 30°C, 除非另有说明。在图

13中,5只仓鼠动物用各个突变体毒素组合物处理,而11只仓鼠动物用购自List Biological的类毒素处理。

[0707] 图13中的数据显示,在根据表14施用的仓鼠中,由包含EDC失活的突变体毒素的免疫原性组合物两次给药后所诱导的针对毒素A(图13A)和毒素B(图13B)的各中和抗体滴度,比由List Biologicals的类毒素所引发的各个中和抗体滴度高。

[0708] 实施例28:仓鼠免疫原性研究:ham难辨梭菌2010-02(续)

[0709] 为评估突变体毒素的保护性效力,将经免疫的仓鼠,与一个对照组的未经免疫动物一起,首先给予口服给药的克林霉素抗生素(30mg/kg)以破坏正常肠道菌群。5天后,用口服给药的野生型难辨梭菌孢子(630菌株,100cfu/动物)攻击仓鼠。在攻击后11天内每天监测动物中CDAD的迹象,其在仓鼠中已知为湿尾症(wet tail)。利用对许多不同参数评分的临床体系,将确定为患有严重CDAD的动物安乐死。所述参数包括刺激后活动性、脱水、排泄物、温度和体重等,其是本领域已知的。

[0710] 在第11天,终止该研究并将所有动物安乐死。图14显示了三个免疫组(根据表14的组1-3)每个与未免疫对照相比的存活曲线。如其中所示,未免疫动物全都发展出严重的CDAD并且需要在攻击后的1-3天被安乐死(0%存活)。施用了福尔马林-失活突变体毒素的两个组均具有60%的存活曲线,且动物直至3天(组1)或第4天(组2)前都不需要安乐死。施用EDC-失活的突变体毒素的组具有80%的存活曲线,其中1只(5只中的)动物需要在第7天进行安乐死。因此,用难辨梭菌孢子可以保护仓鼠免受致命攻击。

[0711] 实施例29:仓鼠免疫原性研究:ham难辨梭菌2010-03:遗传和化学失活的难辨梭菌突变体毒素的免疫原性

[0712] 此研究的目的是在叙利亚金仓鼠模型中评估无佐剂难辨梭菌三重突变体和化学失活的突变体毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)的免疫原性。与mu难辨梭菌2010-07的小鼠研究中所使用的相同批次的突变体毒素A和B(分别为SEQ ID NO:4和6)也用于此研究。作为对照,一组(组1)被给予磷酸盐缓冲盐水作为安慰剂。

[0713] 用根据表15的免疫原来免疫5或10只叙利亚金仓鼠的组。动物被给予三次给药。另外,每两周向动物给药。

[0714]

表 15: 仓鼠免疫和攻击的实验设计					
组	免疫原	剂量	No.	途径	方案
1	安慰剂(PBS 缓冲剂)	NA	5	NA	
2	突变体毒素 A+B (分别为 SEQ ID NO: 4 和 6); 福尔马林-失活的	10 µg 每只	10	IM	初免 wk 0, 加强 wks 2, 4
3	突变体毒素 A+B (分别为 SEQ ID NO: 4 和 6); EDC-失活的	10 µg 每只	10	IM	初免 wk 0, 加强 wk 2, 4
4	突变体毒素 A+B (分别为 SEQ ID NO: 4 和 6); 遗传	10 µg 每只	10	IM	初免 wk 0, 加强 wk 2, 4

[0715] 结果:参见图15。在安慰剂对照组中未观测到抗毒素A或B抗体。在一次给药后,在

福尔马林-失活组(组2)和遗传突变体毒素组(组4)观测到 $2-3\log_{10}$ 之间的抗毒素A中和抗体,以及在EDC-失活组(组3)观测到 $3-4\log_{10}$ 之间的抗毒素A中和抗体。在用相关突变体毒素第二次免疫后,这些组(2-4)中的每一组都观测到抗毒素A中和抗体的提高(比较图15中第2周和第3周的滴度)。突变体毒素的第三次给药后(在第4周给予),组2-4中的抗毒素A中和抗体滴度与其第4周的滴度相比提高了。

[0716] 抗-毒素B中和抗体在第二次给药后可检测,其中福尔马林-失活组(组2)和EDC-失活组(组3)的抗毒素B中和抗体提高至 $3-4\log_{10}$ 之间,而在遗传三重突变体组(组4)提高至 $2-3\log_{10}$ 之间。在第三次免疫后(第4周),抗毒素B中和抗体滴度在福尔马林-失活的突变体毒素组(组2)和遗传突变体毒素组(组4)加强至 $3-4\log_{10}$ 之间,而在EDC-失活的突变体毒素组(组3)加强至 $4-5\log_{10}$ 之间。

[0717] 对于抗毒素A和抗毒素B中和抗体,在所有疫苗接种组(组2-4)中,峰值滴度在第6周观测到(第3次给药后)。

[0718] 用铝胶/CpG或ISCOMATRIX作为佐剂的免疫原性组合物的评估

[0719] 用包含化学失活的突变体毒素(用铝胶、ISCOMATRIX或铝胶/CpG24555(A1h/CpG)配制)的免疫原性组合物免疫的仓鼠发展出强中和性抗毒素抗血清。据观察,在用突变体毒素(在A1h/CpG或ISCOMATRIX中配制)免疫的组中的峰值抗毒素A和抗毒素B应答,比起仅用铝胶配制的疫苗免疫的组高2-3倍且统计学显著。参见表32,其中显示了50%中和滴度。在第0、2和4周,用 $10\mu\text{g}$ 的每种突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质(用 $100\mu\text{g}$ 的铝胶,或 $200\mu\text{g}$ 的CpG24555+ $100\mu\text{g}$ 的铝胶,或10U的ISCOMATRIX配制)免疫仓鼠($n=10$ 只/组)。在每个时间点收集血清并在毒素中和测定中分析功能性抗毒素活性。表32中给出了几何平均滴度。星(*)表示与铝胶组的滴度比较时的统计学显著性($p<0.05$)。

[0720]

表 32: 仓鼠中有佐剂突变体毒素药物物质的免疫原性						
抗毒素 A		50%中和滴度				
	第 0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 6 周
铝胶 滴度:	10	26	88	7425	6128	15965
A1h/CpG 滴度:	10	103	*688	*34572	*23028	*62203
ISCOMATRIX 滴度:	10	27	*246	*12375	8566	*36244
抗毒素 B						
铝胶 滴度:	10	15	10	218	1964	7703
A1h/CpG 滴度:	10	10	18	*5550	*5212	*59232
ISCOMATRIX 滴度:	10	12	12	*7412	*15311	*92927

[0721] 测试了包含用这些佐剂配制的突变体毒素药物物质的免疫原性组合物的保护性

效力。在第5周将仓鼠免疫并口服给予克林霉素(30mg/kg),并根据上文所述方法进行攻击。包括一组未免疫的仓鼠(n=5)作为对照。在用突变体毒素药物物质(以A1h/CpG或ISCOMATRIX作为佐剂)免疫的仓鼠(100%存活)中观测到与仅用铝胶(70%存活)相比提高的效力。因此,用难辨梭菌孢子可以保护仓鼠免受致命攻击。

[0722] 实施例30:在食蟹猴中接种难辨梭菌

[0723] 此研究的目的是在食蟹猴中测试低和高剂量EDC-失活的及福尔马林-失活的难辨梭菌突变体毒素的免疫原性。所有突变体毒素以 ISCOMATRIX® 作为佐剂配制,有一组除外,其作为无佐剂对照(组5)。

[0724]

表 16: 食蟹猴的免疫					
组	免疫原	数目	剂量	途径	方案
1	FI- 突变体毒素 A+B (ISCOMATRIX)	5	10 µg 每只	IM	初免 wk 0, 加强 wks 2, 4
2	FI- 突变体毒素 A+B (ISCOMATRIX)	5	100 µg 每只	IM	初免 wk 0, 加强 wks 2, 4
3	EI- 突变体毒素 A+B (ISCOMATRIX)	5	10 µg 每只	IM	初免 wk 0, 加强 wks 2, 4
4	EI- 突变体毒素 A+B (ISCOMATRIX)	5	100 µg 每只	IM	初免 wk 0, 加强 wks 2, 4
5	EI- 突变体毒素 A+B (无佐剂)	5	100 µg 每只	IM	初免 wk 0, 加强 wks 2, 4
动物: 25 只食蟹猴 图 16 中的星“*”,是指第 12 周在组中仅具有 4 只 食蟹猴, 组中的一只食蟹猴在第 8 周最终采血 疫苗接种: IM, 0.5mL/剂量, 在滴 0, 2, 和 4 周。如上文所述制备突变体毒素组合物。突变体毒素组合物在 ISCOMATRIX 中配制, 除了第五组在无佐剂的缓冲剂中配制。 采血: 第-2, 0, 2, 3, 4, 6, 8, 和 12 周。在第 8 周将具有最高难辨梭菌滴度的动物安乐死并最终采血。 血清样品分析: 蛋白 ELISA 和中和测定					

[0725] 结果:图16显示在第0,2,3,4,6,8,和12周这些动物中的抗-毒素中和抗体应答。单次给药后(第2周滴度)所有5组的抗毒素A滴度在2-3log₁₀之间。在随后每次对每组的给药之后,这些滴度加强。这些动物中,在第三周和第四周之间,滴度未降低。所有组的峰值在4-5log₁₀之间。在所有时间点,无ISCOMATRIX佐剂的组(组5)具有最低的滴度,表明了ISCOMATRIX加强免疫应答的用处。无佐剂对照组(组5)在第12周达到峰值,用高剂量EDC-失活的突变体毒素免疫的组也是如此(组4);所有其它组在第6周达到峰值,即在最后一次给药后两周。所有组的滴度在第二次给药后加强(第3周时间点)。与抗毒素A应答一样,抗毒素

B应答从第3周至第4周末降低。在第三次给药后(第6周时间点),所有组的抗毒素B中和抗体滴度在 $3-4\log_{10}$ 之间,除了低剂量福尔马林-失活组(组1)和高剂量EDC-失活组(组4),二者均仅具有 $>4\log_{10}$ 的滴度。所有组的峰值滴度在第12周观测到,除了低剂量EDC-失活组(组3),其在第8周具有峰值滴度。所有组具有 $>4\log_{10}$ 的峰值滴度。

[0726] 实施例31:单克隆抗体的产生

[0727] 虽然毒素A和B具有很多结构同源性,但是据发现抗体的中和活性是毒素特异性的。在本发明中,鉴定了若干抗体,其特异于个体毒素,并针对各种表位和功能性结构域,且对天然毒素具有高亲和性和强中和活性。从小鼠分离抗体,所述小鼠经商业可购的福尔马林失活的(FI)-突变体毒素或重组完全-突变体毒素(SEQ ID NO:4和6,通过在其催化位点引入特定突变而致使其无毒性)免疫用于分别产生毒素A和B mAb。抗体的表位作图显示,大部分针对毒素A的mAb(52个中的49个)针对毒素的非催化C端结构域。

[0728] 针对毒素B的单克隆抗体靶向于该蛋白的三个结构域。在总共17个毒素B特异性mAb中,6个特异于N-端(例如,野生型难辨梭菌TcdB的氨基酸1-543,如630),6个特异于C-端(例如,野生型难辨梭菌TcdB的氨基酸1834-2366,如630)以及5个特异于中间的易位结构域(例如,野生型难辨梭菌TcdB的氨基酸799-1833,如630)。使用突变体难辨梭菌毒素(例如,SEQ ID NO:4和6)作为免疫抗原的手段由此提供了与福尔马林失活方法相比关键的优势,以用于呈现大部分(如果不是全部的话)抗原性表位,而是说福尔马林失活方法会不利地影响突变体毒素的抗原结构。

[0729] 实施例32:毒素A的mAb A3-25的表征,其包括具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的可变轻链和具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的可变重链

[0730] 对mAb A3-25有特别的兴趣是因为此抗体不遵从所有定义其免疫球蛋白(Ig)同种型的尝试(使用常用于IgG,IgM和IgA的同种型试剂盒)。通过使用Ig H-链特异性抗血清的Western印迹的进一步分析显示,A3-25是IgE同种型,这在mAb的产生中是罕见的。这通过对分离自A3-25杂交瘤细胞的mRNA进行的核苷酸测序得到了确认。由A3-25的H-和L-链的可变区核苷酸序列所推演出的氨基酸序列在图17中示出。

[0731] 为进一步在难辨梭菌感染和疾病模型中评估A3-25mAb,通过根据已公开的方法将 ϵ H链的可变区分子嫁接至鼠 γ 重链上而将A3-25mAb的Ig同种型变更为鼠IgG1。

[0732] 实施例33:毒素特异性抗体的中和活性和表位作图

[0733] 另外,在鉴定功能性/中和抗体的尝试中,在标准细胞病变作用(CPE)测定中、或者在更严格和定量的测定(基于对ATP作为细胞生存力指标的测量)中评估了所有单克隆抗体中和野生型毒素的能力。

[0734] 在总共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)展现出变化水平的中和活性。进行了BiaCore竞争性结合测定和血凝反应抑制(HI)测定,以对抗体表位作图。结果表明,这些抗体可靶向于毒素A蛋白的不同表位(表17)。为进一步坚定该蛋白上的结合位置,使用已知序列的毒素片段在Western印迹或斑点杂交测定中对抗体进行了个别评估。据发现所有4个中和性均针对毒素的C-端区域。

[0735] 在总共17个毒素B特异性抗体中,据发现9个是中和性的。在该9个中和性mAb中,其中6个针对B毒素的N-端,而其它三个针对B毒素的易位结构域(表18)。基于Biacore竞争性结合测定,可将所述9个中和性单克隆抗体分组为4个表位组,如图19中所示。

[0736] 表17:选择的毒素A的mAb的表征

[0737]

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

[0738] 表18:选择的毒素B的mAb的表征

[0739]

表位组	mAb #	中和活性	结合特异性	Ig 同种型
-----	-------	------	-------	--------

[0740]

(Biacore)				
1	B2-31	+	N-端	IgG1, κ
	B5-40			IgG1, κ
	B8-26			IgG1, κ
	B70-2			IgG1, κ
2	B6-30	+	N-端	IgG1, κ
	B9-30			IgG1, κ
3	B59-3	+	以为结构域	IgG1, κ
	B60-2			IgG1, κ
4	B56-6	+	以为结构域	IgG1, κ
	B58-4	-		IgG1, κ
5	B12-34	-	C-端	IgG1, κ
	B14-23			IgG1, κ
	B80-3			IgG1, κ
6	B66-29	-	C-端	IgG1, κ
7	B84-3	-	C-端	IgG1, κ

[0741] 实施例34:具有显著增强的中和活性的新型毒素A抗体组合的鉴定:

[0742] 在基于ATP的中和测定中分别测试时,4种毒素A的mAb(A3-25,A65-33,A60-22和A80-29)显示了不完整的或部分的毒素A中和活性。所述mAb A3-25是最有力的抗体而其它三种中和性较低且A80-29几乎仅在背景之上(图18)。然而,当A3-25与其它三种mAb的任一种组合时,在所有三种组合中均观测到中和的协同效应,其远远大于单个抗体的中和的总和,如图20A-C中所示。另外,所有三种组合展现出通常在抗毒素A多克隆抗体所观测到的完整中和能力。

[0743] 实施例35:显示出显著增强的中和活性的新型毒素B抗体组合的鉴定:

[0744] 我们也观测了来自不同表位组(由BiaCore分析鉴定)的毒素B的mAb的协同中和。

将毒素B的mAb B8-26(组1最占优势的mAb)与来自组3的多个mAb组合。在毒素B特异性中和测定中评估了所述组合,结果在图21和表19中示出。

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

[0747] 当B8-26与表位组3的mAb组合时观测到协同中和效应(图21B),但与任何其它mAb组合则没有(数据未显示)。

[0748] 实施例36:通过mAb体外筛选安全且有效的突变体毒素组合物:

[0749] 经遗传改造产生的难辨梭菌的遗传突变体毒素A和B(例如,SEQ ID NO:4和6)显示了残余细胞毒性(用体外细胞毒性测定)。虽然我们已经实现了每个突变体毒素难辨梭菌毒素细胞毒性~4log的降低(表20),但仍优选进行突变体毒素的进一步化学失活,如用福尔马林处理。然而,化学失活处理可以很激烈并且可对毒素或突变体毒素的关键抗原性表位产生不利影响。

[0750]

表 20: WT 毒素、三重突变体毒素、和福尔马林-失活的(FI, 来自 List Biological)WT 毒素(List Biological, 商业)的体外细胞毒素的比较			
Tcd	来源/处理	EC ₅₀ ng/mL	细胞毒性降低倍数
TcdA			
毒素 A (SEQ ID NO: 1)	WT	0.92	1
突变体毒素 A (SEQ ID NO: 4)	三重突变体	8600	9348
类毒素 A (FI)	福尔马林处理的, 商业	>20,000	>21,739
TcdB			
毒素 B (SEQ ID NO: 2)	WT	0.009	1
突变体毒素 B (SEQ ID NO: 6)	三重突变体	74	8222
类毒素 B (FI)	福尔马林处理的, 商业	4300	477,778

[0751] 为将生物过程最优化,对三重突变体Tcd A和B(1mg/mL)的化学失活(用福尔马林和EDC/NHS处理)进行了实验的统计学设计(DOE)。为了最优化三重突变体TcdA的福尔马林失活,我们改变了福尔马林/甘氨酸的浓度(20-40mM)、pH(6.5-7.5)、和温度(25-40℃)。对于三重突变体TcdB,我们将福尔马林/甘氨酸浓度从2变至80mM而温度和pH分别为25℃和

7.0。所有福尔马林处理的温育时间都是24小时。对于福尔马林失活,表21和23中的“40/40”代表反应中所使用的福尔马林和甘氨酸的浓度。对于EDC/NHS处理,我们将EDC/NHS的浓度从0.25变至2.5mg/mg的三重突变体TcdA及从0.125变至2.5mg/mg的三重突变体TcdB,并于25°C温育4小时。在反应的结束时,将所有样品在10mM的磷酸盐,pH7.0中去除盐分。纯化之后,通过斑点杂交分析分析经处理的Tcd的残余细胞毒性和表位的mAb识别。目标是鉴定处理条件,所述条件降低细胞毒性至期望水平($EC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$)而不会不利地影响一组中和抗体(++++)或(+++)所识别的表位。所述处理条件(在表21-24中用对号“√”标记)产生了潜在的安全和有效的免疫原性组合物,其保留了对至少4种中和mAb的反应性且展现出细胞毒性6-8log₁₀的降低(相对于各自的野生型毒素细胞毒性)。选择结果在表21-24中示出。来自对三重突变体毒素的不同处理条件的另外的数据磨合来自体外细胞毒性和毒素中和测定的数据在表33和表34中示出。还可参见,例如,上文的实施例20和21,其中提供了突变体毒素优选交联处理条件的进一步细节。

[0752]

表 21: 福尔马林-失活的三重突变体 TcdA(SEQ ID NO: 4)的细胞毒性和中和性 mAb 反应性								
对三重突变体 TcdA 的化学失活反应条件	CPE μg /mL	与 mAb 的反应性 (斑点杂交,非变性条件)						
		N- 端 Mab#6	易位结构域 Mab# 102	C-端(中和)				
				A80-29	A3-25	A60-22	A65-33	
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,三重突变体毒素 A	18.5-25	++++	++++	++++	++++	++++	++++	
FI 类 毒素 A (List Biological)	ND	—	—	++	++	+++	+	

[0753]

表 22: EDC-失活的三重突变体 TcdA(SEQ ID NO: 4)的细胞毒性和中和性 mAb 反应性								
对三重突变体 TcdA 的化学失活反应条件	CPE μg /mL	与 mAb 的反应性 (斑点杂交,非变性条件)						
		N- 端 Mab#6	易位结构域 Mab# 102	C-端(中和)				
				A80-29	A3-25	A60-22	A65-33	
25°C, 0.25mg/mg, 4hr ✓	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++	
25°C, 0.5mg/mg, 4hr ✓	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++	
25°C, 1.25mg/mg, 4hr ✓	>1000	+++	++++	++++	+++	++++	++++	

[0754]

25°C, 2.5mg/mg, 4hr ✓	>1000	+++	++++	++++	+++	++++	+++
无,三重突变体 TcdA	18.5-25	++++	++++	++++	++++	++++	++++
FI 类毒素 A (List Biological)	ND	—	—	++	++	+++	+

[0755]

表 23: 福尔马林-失活的三重突变体 TcdB(SEQ ID NO: 6)的细胞毒性和中和性 mAb 反应性

对三重突变体 TcdB 的化学失活反应条件	CPE (μg/mL)	mAb # (N-端 aa 1 – 543)		mAb # (中间-/C-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,三重突变体 TcdB	0.058	++++	++++	++++	++++
FI 类毒素 B (List Biological)	ND	+++	+++	+++	++

[0756]

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

对三重突变体 TcdB 的化学失活反应条件	CPE (μg/mL)	mAb # (N-端 aa 1 – 543)		mAb # (中间-/C-端 aa 544 – 2366)	
		B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
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,三重突变体 TcdB	0.058	++++	++++	++++	++++
FI 类毒素 B (List Biological)	ND	+++	+++	+++	++

[0757] 表33

[0758]

		细胞测定 (EC50)		与 mAb 的反应性 (斑点杂交,非变性条件)		
样 品 #	突变体毒素 A(SEQ ID NO: 4) 样品 ID	CPE; 24h µg /mL	CPE, 72h µg /mL	N-端 Mab#6	易位 结构 域 Mab#	C-端(中和)

[0759]

					102	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 hr	187.5	155.9	+++	++++	++++	++++	++++	++++
23	L44897-101, 4 hr	375	380.3	+++	++++	++++	++++	++++	++++
24	L44897-101, 6 hr	500	429.6	+++	++++	++++	++++	++++	++++
25	L44897 102, 24 hr	>1000	>1000	++	++++	++++	++++	++++	++++
26	L44897-103, 51 hr	>1000	>1000	+	+++	+++	++++	++++	+++
27	L44897-104, 74 hr	>1000	>1000	—	+++	+++	+++	+++	+++
28	L44897-105, 120 hr	>1000	>1000	—	++	++	+++	+++	++
29	L44980-004	>1000	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
30	反应 #1 第 0 周, 25C	750 ug/mL	ND	ND	++	++	+++	+++	++
31	反应 #1 第 1 周, 25C	375 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
32	反应 #1 第 2 周, 25C	375 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
33	反应 #1 第 3 周, 25C	375 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
34	反应 #1 第 4 周, 25C	250 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
35	反应 #1 第 3 周, 37C	93.8 ug/mL	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++

[0760]

36	反应 #2 第 0 周, 25C	375 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
37	反应 #2 第 1 周, 25C	375 ug/mL	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
38	反应 #2 第 2 周, 25C	750 ug/mL	ND	ND	++	++	++	+++	++
39	反应 #2 第 3 周, 25C	250 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	++++	+++
40	反应 #2 第 4 周, 25C	250 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	++++	+++
41	反应 #2 第 3 周, 37C	187.5 ug/mL	ND	ND	+++	+++	++++	++++	+++
42	TxA Control 第 3 周, 25C	18.8 ug/mL	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
43	TxA Control 第 3 周, 37C	25 ug/mL	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
44	L44897-116-6 29.5 hr	> 2000 ug/mL	ND	ND	++	++	++	+++	++
45	L44897-116-7 57.5 hrs	> 2000 ug/mL	ND	ND	++	++	++	+++	++
46	L44897-116 -8 79.5 hr	> 2000 ug/mL	ND	ND	+	+	+	+++	+
47	L44897-116-9 123.5 hr	> 2000 ug/mL	ND	ND	++	++	++	+++	++
48	L44897-139	>1000	ND	++	++++	++++	++++	++++	++++
49	L44166-204	>1000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++

[0761] 表33中提到的三重突变体毒素A(SEQ ID NO: 4)样品的化学交联反应条件

[0762] 样品1-4用EDC/NHS修饰。条件:30℃,20 mM MES/150 mM NaCl pH6.5。通过加入EDC而起始反应。2小时反应后,在样品A、B和C具加入1M甘氨酸至50mM的甘氨酸终浓度。样品D未加入甘氨酸。反应设定为有不同重量比的突变体毒素A(SEQ ID NO:4):EDC:NHS,如下所示。

1 L44166-157A 1: 0.25: 0.25 w: w: w

2 L44166-157B 1: 1.25: 1.25

[0763]

3 L44166-157C 1: 2.5: 2.5

4 L44166-157D 1: 2.5: 2.5

[0764] 样品5 L44905-160A 80mM HCHO,80mM甘氨酸,80mM NaPO₄pH7,1mg/mL突变体毒素A(SEQ ID NO:4)蛋白,于25℃反应48hr。

[0765] 样品6 L44166-166EDC/NHS修饰的突变体毒素A(SEQ ID NO:4),于25℃20mM MES/

150mM NaCl pH6.5中。突变体毒素A(SEQ ID NO:4):EDC:NHS=1:0.5:0.5。通过加入EDC起始反应。2小时反应之后,将1M甘氨酸加至0.1M甘氨酸终浓度并再进行2小时的温育。在此时间之后,在Sephadex G25上将反应缓冲剂更换为1X PBS。

[0766] 样品7 L44905-170A 80mM HCHO,80mM甘氨酸,80mM NaPO₄pH7,1mg/mL突变体毒素A(SEQ ID NO:4)蛋白,于35℃反应48hr。此福尔马林反应意在产生过量的交联,从而严格减少抗原结合。

[0767] 样品8 L44897-6132mM HCHO/80mM甘氨酸,于25℃反应72hr。

[0768] 样品9 L44897-6380mM HCHO/80mM甘氨酸,于25℃反应72hr。如下反应全具有24hr的反应时间:

[0769] 样品10 L44897-72 管#1 25℃,80mM NaPi pH6.5,20mM HCHO/20mM甘氨酸

[0770] 样品11 L44897-72 管#2 25℃,80mM NaPi pH6.5,40mMHCHO/40mM甘氨酸

[0771] 样品12 L44897-72 管#3 32.5℃,80mM NaPi pH7.0,30mMHCHO/30mM甘氨酸

[0772] 样品13 L44897-72 管#4 32.5℃,80mM NaPi pH7.0,30mMHCHO/30mM甘氨酸

[0773] 样品14 L44897-72 管#5 32.5℃,80mM NaPi pH7.0,30mMHCHO/30mM甘氨酸

[0774] 样品15 L44897-75 管#6 25℃,80mM NaPi pH7.5,20mMHCHO/20mM甘氨酸

[0775] 样品16 L44897-75 管#7 25℃,80mM NaPi pH7.5,40mMHCHO/40mM甘氨酸

[0776] 样品17 L44897-75 管#8 40℃,80mM NaPi pH6.5,20mMHCHO/20mM甘氨酸

[0777] 样品18 L44897-75 管#9 40℃,80mM NaPi pH6.5,40mMHCHO/40mM甘氨酸

[0778] 样品19 L44897-75 管#10 40℃,80mM NaPi pH7.5,20mMHCHO/20mM甘氨酸

[0779] 样品20 L44897-75 管#11 40℃,80mM NaPi pH7.5,40mMHCHO/40mM甘氨酸

[0780] 如下8个样品,在含有78mM HCHO和76mM的甘氨酸的80mM NaPi pH7.0中,于25℃进行所示时间的反应:

[0781] 样品21 L44897-101(预修饰)TxA对照时间零对照样品,未修饰或暴露于HCHO/甘氨酸

[0782] 样品22 L44897-101,2hr

[0783] 样品23 L44897-101,4hr

[0784] 样品24 L44897-101,6hr

[0785] 样品25 L44897102,24hr

[0786] 样品26 L44897-103,51hr

[0787] 样品27 L44897-104,74hr

[0788] 样品28 L44897-105,120hr

[0789] 样品29(L44980-004)是EDC/NHS修饰的突变体毒素A(SEQ ID NO:4)(三重突变体毒素A(SEQ ID NO:4)-EDC)。反应条件是:25℃,缓冲剂是20mM MES/150mM NaCl pH6.6。三重突变体毒素A(SEQ ID NO:4):EDC:NHS=1:0.5:0.5w:w:w。通过加入EDC起始反应。2小时反应之后,加入感受至0.1M终浓度并再于25℃反应2小时。通过在Sephadex G25上去除盐分而终止反应。

[0790] 如下12个样品和2个对照是恢复实验,其中样品在25℃和37℃温育:

[0791] 反应1=25℃,80mM NaPi pH7.0,仅40mM HCHO(无甘氨酸),24小时反应。

[0792] 反应2=25℃,80mM NaPi pH7.0,40mM 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
[0793] 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

[0794] 下面4个样品通过在25°C于80mM NaPi pH7.0,40mM HCHO/40mM甘氨酸中进行所示时间的反应而产生:

44	L44897-116-6 29.5 hr
45	L44897-116-7 57.5 hr
[0795] 46	L44897-116 -8 79.5 hr
47	L44897-116-9 123.5 hr

[0796] 样品48L44897-139于25°C反应48hr,80mM NaPi pH7.0,40mMHCHO/40mM甘氨酸。

[0797] 样品49L44166-204EDC/NHS修饰的突变体毒素A(SEQ ID NO:4)。25C,缓冲剂1x PBS pH7。突变体毒素A(SEQ ID NO:4):EDC:NHS=1:0.5:0.5w:w:w。用EDC/NHS反应2小时,继而将1M甘氨酸加至0.1M终浓度并再反应2小时。在Sephadex G25上将缓冲剂更换至20mM L-组氨酸/100mM NaCl pH6.5。

[0798]

表 34

表 34							
突变体毒素 B 样品 ID	细胞测定(EC50)		与中和 mAb 的反应性(斑点杂交,非变性条件)				对所有 4 种 mAb 的强反应性
	CPE; 24h	ATP, 72h	mAb # (N-端 aa 1 – 543) 8-26 9-30		mAb # (中间-/C-端 aa 544 – 2366) 56-6 59-3		
L44905-86-01 三重突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), 未处理对照	<0.1 µg /mL	<0.1µg/mL	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-02 三重突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, 第 1 天	≥100 µg/mL	2.2µg/mL	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-03 三重突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, 第 1 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	++++	++	+++	√*
L44905-86-04 三重突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, 第 1 天	>100 µg/mL	5.2 µg/mL	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-05 三重突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, 第 1 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	++++	++	+++	√*
L44905-86-06 三重突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, 第 1 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	-	++++	+++	
L44905-86-07 三重突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, 第 1 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	-	++++	+++	
L44905-86-08 三重突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, 第 5 天	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	++++	++++	+++	√

[0799]

L44905-86-09 三重突 变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, 第 5 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	++	++	-	+	
L44905-86-10 三重突 变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, 第 5 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-11 三重突 变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, 第 5 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	++	++++	-	+	
L44905-86-12 三重突 变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, 第 5 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	++++	-	++++	+++	
L44905-86-13 三重突 变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, 第 5 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	++++	-	++++	++++	
L44905-86-14 三重突 变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, 第 7 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-15 三重突 变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, 第 7 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	+++	++++	-	+	
L44905-86-16 三重突 变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, 第 7 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	+++	++++	+++	++++	√
L44905-86-17 三重突 变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, 第 7 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	++	++	-	+	
L44905-86-18 三重突 变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, 第 7 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	++++	-	++++	++++	

[0800]

L44905-86-19 三重突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, 第 7 天	>100 μg/mL	>100 μg/mL	+++	-	++	++	
L34346-30A	>100 μg/mL	>100 μg/mL	++++	++++	++++	++++	√
L34346-30B	>100 μg/mL	>100 μg/mL	+++	++++	++++	++++	√
商业的, FI 类毒素 B (List Biologicals)	ND	ND	++++	++++	++++	++++	√
商业的, 对照毒素 B wt (List Biologicals)	22.5 pg/mL	7.8 pg/mL	+++	++	+++	+++	√
对照, 重组三重突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6)	78 ng/mL	72 ng/ml	+++	++	++++	+++	√

[0801] 表34中提到的突变体毒素B样品的化学交联反应条件

[0802] 将三重突变体毒素B(SEQ ID NO:6)化学交联并根据如下反应条件测试。在涉及三种福尔马林反应变化和两种温育温度的实验中测试L44905-86样品。每天,取6个样品,总共18个样品。列表中的第一个样品是未处理的对照(其使得总共有19个样品)。未经处理的对照包括未处理的三重突变体毒素B多肽(SEQ ID NO:6)。

[0803] 反应1(“Rxn1”)=80mM HCHO,80mM甘氨酸,80mM NaPO₄pH7,1mg/mL三重突变体毒素B(SEQ ID NO:6)蛋白

[0804] 反应2(“Rxn2”)=80mM HCHO,无甘氨酸,80mM NaPO₄pH7,1mg/mL三重突变体毒素B(SEQ ID NO:6)蛋白

[0805] 反应3(“Rxn3”)=80mM HCHO,无甘氨酸,80mM NaPO₄pH7,1mg/mL三重突变体毒素B(SEQ ID NO:6)蛋白+氰基硼氢化加帽。氰基硼氢化加帽涉及将80mM CNBrH₄加至去除盐分的终反应以及在36°C温育24hr。

[0806] 对于样品L34346-30A0.5g EDC和NHS每克的三重突变体毒素B(SEQ ID NO:6),于30°C4小时,在20mM MES,150mM NaCl,pH6.5中。

[0807] 对于样品L34346-30B0.5g EDC和NHS每克的三重突变体毒素B(SEQ ID NO:6),于30°C2小时,随后加入甘氨酸(终浓度g/L)并在20mM MES,150mM NaCl,pH6.5中,于30°C另温育2小时。L34346-30A和L34346-30B的两个反应之间的唯一差异是将甘氨酸加至反应L34346-30B。

[0808] 实施例37:免疫原性组合物诱导的抗体能够中和来自各种难辨梭菌菌株的毒素

[0809] 为评估包含突变体毒素药物物质的免疫原性组合物所诱导的抗体是否能够中和广谱的多样毒素序列,对代表多样核糖核酸型和毒素型的菌株进行测序,以鉴定与突变体毒素药物物质相比各种菌株之间遗传多样性的程度。继而在体外中和测定中用来自免疫仓鼠的血清测试了含有从各种菌株分泌的毒素的培养物上清,以确定所述免疫原性组合物的覆盖性并确定所述免疫原性组合物针对来自流行临床菌株的多样毒素的保护能力。

[0810] HT-29细胞(结肠癌细胞系)和IMR-90细胞均用于测试对CDC菌株表达的毒素的中和。HT-29细胞对TcdA更敏感;纯化的TcdA在此类细胞中的EC₅₀是100pg/mL(相较于TcdB的3.3ng/mL)。另一方面,IMR-90细胞对TcdB更敏感;纯化的TcdB在此类细胞中的EC₅₀范围在9-30pg/mL之间(相较于TcdA的0.92-1.5ng/mL)。通过使用多克隆和单克隆毒素特异性抗体确认了所述测定在这些细胞系中对TcdA和TcdB的特异性。为了测定的归一化,在其各自EC₅₀值的4倍浓度测试了24种CDC分离物的培养过滤物。所述菌株中的三种具有太低的毒素水平以致不能在中和测定中用于测试。

[0811] 代表多样的核糖核酸型/毒素型(涵盖了美国和加拿大超过95%的流行难辨梭菌菌株)的24种菌株得自CDC。这些分离物种有代表核糖核酸型027、001和078的菌株,三种CDAD美国、加拿大和英国流行株。菌株2004013和2004118代表核糖核酸型027;菌株2004111代表核糖核酸型001,以及菌株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菌株之间的遗传多样性程度,将来自这些临床菌株的毒素基因(TcdA和TcdB)进行完全测序。参见表35。用Megalign™程序(DNASTAR® Lasergene®)中的ClustalW将毒素的氨基酸序列进行比对,并分析序列相同性。对于tcdA,基因组比对分析显示,所有的临床分离物和菌株630具有总共大约98-100%的氨基酸序列相同性。tcdA基因的C-端部分稍微更加多样化。对tcdB基因进行了同样的分析,其展示出更高的序列多样性。值得注意的是,菌株2007838/NAP7/126和2007858/NAP1/unk5在N端(79-100%)和C端(88-100%;数据未显示)结构域展示出与630菌株最大的多样性模式。

[0812] 从使用包括突变体TcdA(SEQ ID NO:4)和突变体TcdB(SEQ ID NO:6)的免疫原进行免疫的叙利亚金仓鼠收集了仓鼠血清库(HS),其中根据例如上文的实施例29、表15用EDC将突变体毒素失活,并用磷酸铝配制。表35中的结果显示,在体外中和测定中,至少来自各个培养物上清的毒素B被来自免疫仓鼠的血清所中和。

[0813] 表35. 来自CDC的难辨梭菌菌株的描述以及免疫仓鼠血清中和各种毒素的能力

[0814]

菌株	PFGE 型	核糖核酸型	由仓鼠血清中和
2005088	NAP7	78	中和
2007816	NAP7-related	78	中和
2005325	NAP7	78	中和
2004013	NAP1	27	中和
2007886	NAP1		中和
2008222	NAP4	77	中和
2004206	NAP4	154	中和
2005283	NAP5	Unk3	未测试 ^b
2009141	NAP2		中和
2007838	NAP7	126	中和
2004111	NAP2	1	中和
2007070	NAP10	70	中和
2006017	NAP12	15	中和
2009078	NAP11	106	未测试 ^b
2007217	NAP8	126	中和
2006376	NAP9	17	中和
2007302	NAP11	Unk2	中和
2004118	NAP1	27	中和
2005022	NAP3	53	中和
2009292	NAP1		中和
2004205	NAP6	2	中和
2007858	NAP1	Unk5	中和
2009087	NAP11	106	未测试 ^b
2005359	NAP1-相关		中和

[0815] b毒素水平太低以至不能进行中和测定

[0816] 图23显示了使用来自各种难辨梭菌菌株的毒素制备物在IMR-90上的中和测定的结果。该数据显示仓鼠抗血清中的TcdB中和抗体能够中和来自经测试的所有21种分离物的毒素,包括高毒性菌株和TcdA-阴性、TcdB-阳性菌株。难辨梭菌的至少16种不同菌株得自CDC(Atlanta,GA)(此前有描述),并在难辨梭菌培养基中于适宜的条件(如本领域所知的以及如上文所述的)下培养。对含有分泌的毒素的培养物上清进行了分析,以确定其在IMR-90单层培养上的细胞毒性(EC₅₀),并继而在标准体外中和测定中以4倍的EC₅₀用来自仓鼠的血清的各种稀释进行了测试,其中所述仓鼠经突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质(用磷酸铝配制)免疫。使用上文所述的体外细胞毒性测定,测试了得自每种菌株培养物上清的粗制毒素和纯化的毒素(得自List Biologicals的商业可购毒素)(并非纯化自各个上清)对IMR-90细胞的细胞毒性。

[0817] 在图23A-K中,所述图显示了来自体外细胞毒性测试(此前有描述)的结果,其中将ATP水平(RLU)针对如下的增加的浓度作图:难辨梭菌培养基和仓鼠血清库(■);粗制毒素和仓鼠血清库(■);纯化的毒素和仓鼠血清库(▲);粗制毒素(▼),对照;和纯化的毒素(◆),对照。将来自各个菌株的毒素以4xEC₅₀值加至细胞。

[0818] 如图23A-K,接受了所述免疫原的仓鼠令人吃惊地发展出了展现中和活性的中和抗体,其中所述中和活性是针对至少来自如下16种不同的难辨梭菌CDC菌株的毒素(相较于仅有各毒素的对照):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)。也可参见表35中另外的难辨梭菌菌株,来自其中的毒素经测试并被含有突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质(配制在磷酸铝中)的免疫原性组合物所中和。

[0819] 在另一研究中,在体外中和测定中用来自仓鼠的血清测试了含有各种难辨梭菌菌株(得自CDC和Leeds Hospital,UK)所分泌毒素的培养物上清,所述仓鼠经施用突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质(用铝胶配制)。实验设计参见表36。结果在表37表38中示出。

[0820]

表 36: 实验设计	
测定对照	在使用 HT-29 细胞的测定中: 兔抗血清(抗-毒素 A 多克隆, Fitzgerald Industries, #70-CR65)和参考毒素 A(来自 List Biologicals 的野生型毒素 A) 在使用 IMR-90 细胞的测定中: 兔抗血清(抗-毒素 B 多克隆, Meridian Life Science, #B01246R)和参考毒素 B(来自 List Biologicals 的野生型毒素 B)
样品对照	在使用 HT-29 细胞的测定中: HS 血清 + 参考毒素 A
	在使用 IMR-90 细胞的测定中: HS 血清 + 参考毒素 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 的培养物上清
测试样品	HS + 各难辨梭菌培养物上清
仓鼠抗血清 (HS)的来源	施用了突变体毒素 A 药物物质和突变体毒素 B 药物物质(用铝胶配制)的动物

[0821]

表 37: 免疫原性组合物-诱导的抗体中和来自各种野生型难辨梭菌菌株(来自 CDC)的毒素 A 和毒素 B, 包括高毒性菌株

难辨梭菌菌株	PFGE 型	核糖核酸型	毒素型	其它分型方法	由 HS (IMR-90, 毒素 B)中和	由 HS (HT-29, 毒素 A)中和
2004111	NAP2	1	0	各毒素序列与来自菌株 630 的毒素具有 100% 同源性	中和	中和
2009141	NAP2		0		中和	中和
2006017	NAP12	15	0		中和	中和
2007302	NAP11	Unk2	0		中和	中和
2009087	NAP11	106	0		中和	中和
2005022	NAP3	53	0		中和	中和
2005283	NAP5	Unk3	0		中和	中和
2009078	NAP5	53	0		中和	中和
2004206	NAP4	154	0		中和	中和
2008222	NAP4	77	0		中和	中和
2004205	NAP6	2	0		中和	中和
2007070	NAP10	70	0		中和	中和
2006376	NAP9	17	VIII	txnA-/txnB+	中和	N/A
2007816	NAP7-相关	78	V	提高在 US 和欧洲的流行	中和	中和
2007838	NAP7	126			中和	中和
2005088	NAP7	78			中和	中和
2005325	NAP7	78			中和	中和

[0822]

2007217	NAP8	126			中和	中和
2004013	NAP1	27	III	高毒性 NAP1/027/III	中和	中和
2004118	NAP1	27			中和	中和
2009292	NAP1				中和	中和
2005359	NAP1-相关				中和	中和
2007858	NAP1	Unk5	IX/XXIII	其它	中和	中和
2007886	NAP1		IX/XXIII		中和	中和

[0823]

表 38: 免疫原性组合物-诱导的抗体中和来自各种野生型难辨梭菌菌株(来自欧洲)的毒素 A 和毒素 B, 包括高毒性菌株					
难辨梭菌菌株	PFGE 型	其它分型方法	毒素型	由 HS (IMR-90,毒素 B) 中和	由 HS (HT-29,毒素 A)中和
001	NAP2	毒素型 0 菌株	0	中和	中和
002	NAP6			中和	中和
012 (004)	NAPCR1			中和	中和
014	UK			中和	中和
015	NAP12			中和	中和
020	NAP4			中和	中和
029	UK			中和	中和
046	UK			中和	中和
053	NAP5			中和	中和
059	UK			中和	中和
077	UK			中和	中和
078	UK			中和	中和
081	UK			中和	中和
087	UK			中和	中和
095	UK			中和	中和
106	UK			中和	中和
117	UK			中和	中和
017	NAP9	txnA-/txnB+	VIII	中和	NA
027	NAP1	高毒性	III	中和	中和
075	UK			中和	中和
003	NAP10	其它	I	中和	中和
023	UK		IV	中和	中和
070	UK		XIII	中和	中和
126	UK		UK	中和	中和
131	UK		UK	进行中	中和

野生型难辨梭菌菌株得自 Leeds Hospital, UK。
 “UK”= 未知状况
 NA, 不适用; 菌株不产生毒素 A; 未在毒素 A 中和测定中测试

[0824] 实施例38:EDC/NHS三重突变体毒素的肽作图

[0825] 为了表征EDC/NHS失活的三重突变体毒素,对4套经EDC/NHS-处理的三重突变体毒素A(SEQ ID NO:4)和4套经EDC/NHS-处理的三重突变体B(SEQ ID NO:6)进行了肽作图(peptide mapping)实验。在用胰蛋白酶消化所述突变体毒素之后,将所得的肽片段用反相HPLC分离。用质谱分析被来鉴别失活过程所导致发生的修饰。对于突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质,均有超过95%的理论胰蛋白酶肽被鉴别。鉴别出了交联和甘氨酸加合物(甘氨酸被用作加帽剂)。在突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质中,也均观测到了β-丙氨酸加合物。不受机制或理论限制,所述β-丙氨酸加合物看起来得自三摩尔NHS与一摩尔EDC的反应,其中形成NHS激活的β-丙氨酸。此分子继而可以与赖氨酸基团反应以

形成 β -丙氨酸加合物(+70Da)。在经EDC/NHS-处理的三重突变体毒素B样品中,也观测到了低水平(0.07摩尔/摩尔蛋白)的脱氢丙氨酸(-34Da)。脱氢丙氨酸是半胱氨酸残基脱磺烷基作用的结果。在每种突变体毒素所有4个批次中均观测到同样类型和程度的修饰,表明所述方法产生一致的产品。肽作图(以超过95%的序列覆盖)确认存在修饰。修饰的总结在表39中示出。也可参见图24-25。另外,与不存在化学失活的各个三重突变体毒素A和三重突变体毒素B的大小和电荷异质性相比,所述三重突变体毒素A药物物质和三重突变体毒素B药物物质的大小和电荷异质性提高了。因此,大小排阻层析(SEC)和阴离子交换层析(AEX)谱具有相对宽的峰(数据未显示)。

[0826] 表39. 突变体毒素药物物质中观测到的修饰的总结

[0827]

修饰	修饰残基的#	残基的总#	修饰的程度	摩尔修饰/ 摩尔蛋白
突变体毒素 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
突变体毒素 B 药物物质				
交联	3	390 Asp/Glu	11-63%	0.8

[0828]

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

[0829] 修饰的程度通过用修饰肽的HPLC区域除以天然+修饰肽的HPLC区域来计算。

[0830] 实施例39: 药物产品的产生

[0831] 难辨梭菌免疫原性组合物(药物产品)含有两种活性药物成分(突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质)。示例性的药物产品是冻干制剂,其含有10mM Tris缓冲剂 pH7.4, 4.5%(w/w)的二水海藻糖,和0.01%(w/v)的Polysorbate80,包括突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质的每一种。参见表40。通过用稀释剂或含铝胶稀释剂重悬冻干的疫苗而将所述免疫原性组合物制备为用于注射。安慰剂将包含灭菌的正常盐溶液以用于注射(0.9%氯化钠)。

[0832] 表40

[0833]

成分	选择
制剂剂型	冻干
每 0.5 mL 的抗原剂量	25, 50, 100 μ g 的每种经 EDC/NHS-处理的三重突变体毒素 A(SEQ ID NO: 4)和经 EDC/NHS-处理的三重突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6)
pH	7.4 $\pm$ 0.5
缓冲剂	10 mM Tris
稳定剂/填充剂	4.5%二水海藻糖 (3—6%)
表面活性剂	0.01% Polysorbate 80 (0.005 – 0.015%)
容器封装	2 mL 13 mm 1 型氧化铅玻璃小瓶, Blowback, West - Flurotec

[0834] 缓冲剂制备

[0835] 将注射用水(WFI)加至调配管中。在混合时,加入赋形剂并溶解至溶液中。测量pH。如果有需要,用HCl将pH调节至7.4 $\pm$ 0.1。用WFI将溶液稀释至最终重量,继而用0.22 μ m Millipore Express SHC XL150过滤器过滤。在过滤之前取预过滤减少生物复合量的样品(pre-filtration bioburden reduction sample)。将过滤的缓冲剂取样用于重量摩尔渗透压浓度和pH。

[0836] 制剂制备

[0837] 基于预先计算的量按照如下的操作顺序将解冻的突变体毒素药物物质收集在配制管中:首先将实现0.6mg/mL所需的目标稀释缓冲剂体积的50%加至管中,随后加入突变体毒素A药物物质并以100rpm混合5分钟。继而将突变体毒素B药物物质加至管中并将溶液进一步稀释至0.6mg/mL的稀释点,再以100rpm另混合5分钟。取样并测试总突变体毒素浓度。基于处理中的突变体毒素浓度值,将溶液稀释至100%的体积再以100rpm混合15分钟。对所配制的药物产品取样用于pH和生物负担量预过滤。继而用Millipore Express SHC XL150将所配制的药物产品过滤以用于过夜储存,或者移至输送管用于灭菌过滤。

[0838] 将所配制的部分移至填充区,取样用于生物负担量,继而用两个串联的Millipore Express SHC XL150过滤器灭菌过滤。将所配制的部分以0.73mL的目标体积填充至去热源的玻璃瓶中。将经填充的瓶部分堵塞住再装载至冷冻干燥器中。如表41所示进行冻干循环。在完成循环时,用氮气回填冻干室至0.8atm继而使堵塞完全就位。将该室卸载并用钳口盖(flip-off seal)给瓶加帽。

[0839] 表41. 难辨梭菌药物产品冻干循环设置点

[0840]

步骤	温度(°C)	Ramp(分钟)	浸吸(soak) (分钟)	压力
装载	5°C	N/A	60	-
冷冻 1	-50°C	183	60	-
复性	-10°C	133	180	
冷冻 2	-45°C	117	90	
真空起始	-45°C	-	60	50
首次干燥	-30°C	75	3420	50
二次干燥	30°C	300	600	50
储存	5°C	50	-	50

[0841] 药物产品稳定性数据总结在表42中。该数据表明,药物产品在于2-8°C储存至少3个月或者于25°或40°C储存至少一个月期间是物理和化学稳定的。在两种储存条件下,由大小排阻层析(SEC)检测的杂质水平未变化,直至所测试的最后的时点体外抗原性也未有变化。

[0842] 表42:冻干药物产品的稳定性^a

[0843]

	药物产品制剂 200 µg/mL 突变体毒素 A 药物物质, 200 µg/mL 突变体毒素 B 药物物质, 4.5% 二水海藻糖, 0.01% Polysorbate 80, 10mM Tris 缓冲剂 pH 7.4			
测试	t=0	1 个月@25°C	1 个月@40°C	3 个月@2-8°C
重溶前外观	白色块状基本无可见外来颗粒物质	白色块状基本无可见外来颗粒物质	白色块状基本无可见外来颗粒物质	白色块状基本无可见外来颗粒物质
重溶后外观	澄清无色溶液	澄清无色溶液	澄清无色溶液	澄清无色溶液
pH	7.5	7.6	7.6	7.5
强度, 经 AEX (µg/mL)	- 突变体毒素 A 药物物质 212 - 突变体毒素 B 药物物质 235	- 突变体毒素 A 药物物质 193 - 突变体毒素 B 药物物质 223	- 突变体毒素 A 药物物质 191 - 突变体毒素 B 药物物质 222	- 突变体毒素 A 药物物质 193 - 突变体毒素 B 药物物质 230
杂质, 经 SEC	< 2.5%	2.8%	2.8%	2.9%
表征, 经 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%
水分	0.5	NA	NA	NA

[0844] ^a对于这些测试,用60mM NaCl稀释剂将冻干的DP重溶。

[0845] 实施例40:疫苗稀释剂

[0846] 对于盐水,60mM NaCl被用作稀释剂用于冻干的无佐剂药物产品,以在重溶时确保等渗溶液。

[0847] 铝胶:铝胶“85”2%(Brenntag)是商业可购的优良制造规范(GMP)级的产品,其由氢氧化铝的八面体晶状片层(octahedral crystalline sheet)组成。示例性的铝胶稀释剂制剂在表43中示出。该示例性制剂可与上文所述的药物产品组合使用。

表 43. 铝胶稀释剂的配制原理	
组分	选择
[0848] 制剂剂型	液体悬液
每 0.5 mL 的佐剂剂量	0.5 mg Al
pH	6.5 ± 0.5
[0849] 缓冲剂	10 mM His
盐	60 mM NaCl
容器封装	2 mL 13 mm 1 型氧化铅玻璃小瓶, Blowback, West - Flurotec

[0850] 用铝胶佐剂剂型的研究显示了突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质对1mg Al/mL铝胶(pH6.0至7.5)的100%结合。在所测试的最高蛋白浓度(每个300μg/mL)时观察到两种药物物质的最大结合。

[0851] 也使用冻干的药物产品制剂(含有200μg/mL的每种药物物质和范围在0.25-1.5mg/ml的铝胶)测试了蛋白对铝胶的结合。用含有变化浓度的铝胶的稀释液重溶药物产品,并测量了所结合的每种突变体毒素的百分比。所有经测试浓度的铝胶都证明了对抗原100%的结合。

[0852] 也以目标剂量的突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质(每种200μg/mL)来评估了蛋白对铝胶的结合动力学。结果显示,在整个24-小时的RT时间进程中,100%的突变体毒素药物物质结合至铝胶。

[0853] CpG24555和铝胶:CpG24555是合成的21-聚体寡聚脱氧核苷酸(ODN),其具有序列5-TCG TCG TTTTTC GGT GCT TTT-3(SEQ ID NO:48)。CpG24555和铝胶稀释剂组合的示例性制剂在表44中示出。该示例性制剂可与上文所述的药物产品组合使用。

表 44: CpG/铝胶稀释剂的配制原理	
组分	选择
[0854] 制剂剂型	液体悬液
每 0.5 mL 的佐剂剂量	0.5 mg Al 和 1mg cpG
pH	6.5 ± 0.5
缓冲剂	10 mM His
盐	60 mM NaCl
容器封装	2 mL 13 mm 1 型氧化铅玻璃小瓶, Blowback, West - Flurotec

[0855] **ISCOMATRIX®:** ISCOMATRIX® 佐剂是本领域已知的基于皂苷的佐

剂。所述 ISCOMATRIX®佐剂制剂的示例性制剂在表45中示出。该示例性制剂可与上文所述的药物产品组合使用。

[0856]	表45: ISCOMATRIX®稀释剂的配制原理	
	组分	选择
[0857]	制剂剂型	液体悬液
	每0.5 mL的佐剂剂量	45单位
	pH	6.2 ± 0.5
	缓冲剂	10 mM磷酸盐
	盐	60 mM NaCl
	容器封装	2 mL 13 mm 1型氧化铅玻璃小瓶, Blowback, West - Flurotec

[0858] 实施例41:以铝胶作为佐剂的突变体毒素药物物质组合在NHP模型中的免疫原性以及临床概念验证(Proof of Concept)

[0859] 评估了以铝胶作为佐剂的突变体毒素药物物质组合在NHP模型(具体而言,食蟹猴)中的免疫原性。用每剂量10μg的每种突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质组合(用铝胶配制)以两周的间隔(第0,2,4周)免疫的NHP,发展出了强中和性抗毒素应答。参见表46。在第三次免疫后,抗毒素A和抗毒素B中和性应答均达到了保护性范围,并保持在所述保护范围之内或之上直至至少第33周(所研究的最后时间点)。

[0860] 在第0,2和4周,用10μg的每种突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质(以250μg的铝胶配制)IM免疫食蟹猴(n=8)。在每个时间点收集血清,并在毒素中和测定中分析功能性抗毒素活性。GMT在表46中提供。该表中提供的保护性滴度范围说明了对应于Merck单克隆抗体治疗试验中难辨梭菌感染复发显著降低的中和抗体滴度范围。

[0861]

表 46: 突变体毒素 A 药物物质和突变体毒素 B 药物物质 (以 250 μg 铝胶配制)在食蟹猴中的免疫原性(50%中和滴度)												
抗毒素 A (Merck/Medarex 保护性范围: 对于抗毒素 A, 666- 6,667)												
周:	Wk 0	Wk 1	Wk 2	Wk 3	Wk 4	Wk 5	Wk 6	Wk 8	Wk 12	Wk 25	Wk 29	Wk 33
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, 222- 2,222)												
滴度:	10	10	10	10	20	311	410	446	676	1631	2970	3510

[0862] Merck mAb治疗试验的人保护性抗体滴度与Pfizer's疫苗候选在NHP中诱导的滴度的对应

[0863] 使用Merck/Medarex mAb的二期效力研究(Lowy et al., N Engl J Med. 2010 Jan 21; 362(3):197-205)似乎证明了血清中的中和性抗毒素mAb水平与CDAD复发预防之间的对应。在将毒素特异性mAb施用至人之后,10-100μg/mL范围内的人受体中血清抗体水平表现出针对复发的保护(CDAD复发降低70%)。

[0864] 测试了包含突变体毒素药物物质的免疫原性组合物,以测定该免疫原性组合物是否能够在人中诱导强有力的中和抗体应答,其中是通过将Merck/Medarex 2期研究发表的数据与所述免疫原性组合物在NHP模型中诱导的抗体水平进行比较。这是通过如下方式实现的:利用此前发表的Merck/Medarex mAb的特征,来将得自未展现复发迹象的对象血清中这些mAb的范围(10-100 μ g/mL)换算为50%中和滴度,并将这些滴度(“保护性滴度范围”)与本文所述临床前模型中所观测到的滴度进行比较。如表46中所示,在第三次给药之后,包含突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质的免疫原性组合物(以铝胶作为佐剂)在NHP中产生了达到“保护性范围”的免疫应答,并保持在此范围之内或之上直至第33周。由本发明的难辨梭菌免疫原性组合物在NHP中诱导的毒素中和抗体水平,与所述Merck/Medarex试验对象(表现出针对CDAD复发的保护)中的血清抗体水平相当。

[0865] 实施例42:以ISCOMATRIX或铝胶/CpG24555(A1h/CpG)作为佐剂的突变体毒素药物物质组合物在NHP模型中的免疫原性

[0866] 在NHP中,ISCOMATRIX和A1h/CpG均统计学显著地增强抗毒素A和B的中和滴度(相较于仅用铝胶施用的疫苗)(表47)。用A1h/CpG或ISCOMATRIX施用的疫苗在更早的时间点(第2-4周)激发背景之上的抗毒素应答(相较于仅用铝胶(第4-6周),这可以在针对人类中CDAD复发的保护方面具有重要的作用。相较于铝胶,以A1h/CpG或以ISCOMATRIX作为佐剂的免疫原性组合物更快地产生了达到保护性范围的抗毒素中和滴度(也可参见实施例41),并保持在此范围之内或之上直至第33周。

[0867] 如表47中所示,在第0,2和4周,用10 μ g的每种突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质IM免疫食蟹猴,其中所述药物物质以250 μ g的铝胶配制(n=8)、或以500 μ g的CpG+250 μ g的铝胶配制(n=10)、或以45U的ISCOMATRIX配制(n=10)。在每个时间点收集血清,并在上文所述的毒素中和测定中分析功能性抗毒素活性。GMT在表中列出。星(*)表示在与铝胶组的滴度比较时的统计学显著性(p<0.05)。保护性滴度范围代表了对应于Merck/Medarex mAb治疗试验中难辨梭菌感染复发显著降低的中和抗体滴度范围。

[0868]

表 47: 加佐剂的突变体毒素药物物质在 NHP 中的免疫原性 (50%中和滴度)

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

Week:	Wk 0	Wk 2	Wk 4	Wk 6	Wk 12	Wk 25	Wk 33
铝胶 滴度:	15	129	336	3069	1599	1520	2178
铝胶 + 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 的保护性范围: 对于毒素 B, 222- 2,222)

铝胶 滴度:	10	10	20	410	676	1631	3510
铝胶 + CpG 滴度:	10	13	*136	*2163	*5076	*9057	*27971
ISCOMATRIX 滴度:	10	10	*269	*5325	*9161	*19479	*25119

[0869] 也评估了(在存在ISCOMATRIX或Alh/CpG佐剂时)在NHP中产生的中和性抗毒素抗体滴度所施用的突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质的剂量。在一个研究中,对NHP施用了低剂量的(10 μ g)或高剂量的(100 μ g)每种突变体毒素药物物质(以ISCOMATRIX配制)。免疫后在每个时间点对应答进行比较。如表48中所示,两个处理组中的抗毒素中和滴度均很强。在大多数时间点,低剂量和高剂量组之间的抗毒素A滴度几乎相等,而抗毒素B的滴度则有种在高剂量组更高的趋势。

[0870]

表 48: 在用 10 μ g 或 100 μ g 的每种突变体毒素药物物质和突变体毒素药物物质(与 ISCOMATRIX 施用)免疫后, NHP 中的中和性抗毒素滴度 (50%中和滴度)

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

周	Wk 0	Wk 2	Wk 3	Wk 4	Wk 6	Wk 8	Wk 12
10 μ g 滴度:	11	585	3522	4519	19280	10225	12084
100 μ g	11	400	1212	2512	9944	10283	18337

[0871]

滴度:							
抗毒素 B (Merck/Medarex 保护性范围: 对于毒素 B, 222- 2,222)							
10μg	10	10	112	266	3710	2666	7060
滴度:							
100 μg	10	10	303	469	6016	4743	20683
滴度:							

[0872] 如表48中所示,在第0,2和4周,用10 μ g或100 μ g的每种突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质(以45U的ISCOMATRIX配制)IM免疫食蟹猴(n=5)。在每个时间点收集血清,并在毒素中和测定中分析功能性抗毒素活性。GMT在表中列出。保护性滴度范围代表了对应于Merck/Medarex mAb治疗试验中难辨梭菌感染复发显著降低的中和抗体滴度范围。

[0873] 在增强抗毒素B应答的动力学的尝试中,用如下来免疫NHP:恒定剂量的突变体毒素A药物物质(10 μ g)混有剂量升高的突变体毒素B药物物质(10,50,或100 μ g),其中存在ISCOMATRIX或Alh/CpG佐剂。无论佐剂如何,接受较高剂量突变体毒素B药物物质(50或100 μ g)的组有种诱导更高抗毒素B中和性应答的趋势(相较于10 μ g剂量的突变体毒素B药物)(表50,以*标记表明统计学显著的提高)。在最后的免疫之后,在大多数时间点观测到此趋势。然而,在一些情形中,当突变体毒素B的量增加时,抗毒素A中和性应答显示了统计学显著的降低(在表49中以^标记)。

[0874] 如表49和表50中所示,在第0,2和4周,用不同比例的突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质(以ISCOMATRIX(每剂量45U)或以Alh/CpG/(每剂量250 μ g/500 μ g))IM免疫NHP(10/组),其中使用了10 μ g的突变体毒素A药物物质加上10,50,或100 μ g的突变体毒素B药物物质(在表49和表50中分别命名为:10A:10B,10A:50B和10A:100B。表49显示抗毒素A滴度。表50显示抗毒素B滴度。GMT在表中列出。保护性滴度范围代表了对应于Merck mAb治疗试验中难辨梭菌感染复发显著降低的中和抗体滴度范围。符号^代表中和滴度与10A:10B组相比统计学显著的降低(p<0.05)。星符号*代表中和滴度与10A:10B组相比统计学显著的提高(p<0.05)。

[0875]

表 49: 在用 10 μ g 突变体毒素 A 药物物质组合 10、50 或 100 μ g 突变体毒素 B 药物物质 (使用 ISCOMATRIX 或 Alh/CpG 作为佐剂)免疫后, NHP 中的中和性抗毒素滴度(50%中和滴度)

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

ISCOMATRIX

周:	Wk 0	Wk 2	Wk 4	Wk 6	Wk 12	Wk 25	Wk 33
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: 对于毒素 A, 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

[0876]

表 50: 在用 10 μ g 突变体毒素 A 药物物质组合 10、50 或 100 μ g 突变体毒素 B 药物物质 (使用 ISCOMATRIX 或 Alh/CpG 作为佐剂)免疫后, NHP 中的中和性抗毒素滴度(50%中和滴度)

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

Week:	Wk 0	Wk 2	Wk 4	Wk 6	Wk 12	Wk 25	Wk 33
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

抗毒素 B (Merck/Medarex 保护性范围: 对于毒素 B, 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

[0877] 实施例43: 在食蟹猴中用免疫原性组合五周IM重复给药毒性研究, 其中有4-周恢复期

[0878] 在食蟹猴中使用PF-06425095(包含三重突变体毒素A药物物质和三重突变体毒素

B药物物质的免疫原性组合物,其中组合了佐剂氢氧化铝和CpG24555)进行了五周IM重复给药毒性研究,以评估难辨梭菌三重突变体毒素A药物物质和三重突变体毒素B药物物质组合氢氧化铝和CpG24555佐剂(PF-06425095)的潜在毒性和免疫原性。向食蟹猴(6只/性别/组)IM施用如下作为初免给药:PF-06425095以0.2或0.4mg/剂量三重突变体毒素A药物物质和三重突变体毒素B药物物质(分别低剂量和高剂量免疫原性组合物组),0.5mg铝作为氢氧化铝,和1mg CpG24555以及仅有佐剂组合(氢氧化铝+CpG24555;PF-06376915),随后是3次加强给药(第1,8,22和36天)。另外单独一组动物(6只/性别)接受0.9%等渗盐水(大约7.0的pH)。免疫原性组合物载剂由10mM的Tris缓冲剂(pH7.4)、4.5%的二水海藻糖和0.1%的Polysorbate80组成。佐剂对照载剂由10mM的组氨酸缓冲剂(有60nM的NaCl,pH6.5)组成。总给药体积是每次注射0.5mL。所有给药都施用于左和/或右股四头肌。所选择的动物经历了4-周的无给药观察期,以评估此研究的给药期期间所观察到的任何效果的可逆性。

[0879] 在此研究中没有不利的发现。PF-06425095被良好耐受并且仅产生了局部的炎症反应而无全身毒性的证据。在给药期期间,免疫原性组合物-处理组中发现了如下从预测试的提高(给药依赖性):在第4和38天的纤维蛋白原(23.1%至2.3x)以及第4天(2.1x至27.5x)和第38天(2.3x至101.5x)的C-反应蛋白,和第36和/或38天的球蛋白(11.1%至24.1%);并且与预期的对加佐剂免疫原性组合物施用的炎性应答一致。

[0880] 在第4天注意到的纤维蛋白原和C-反应蛋白的提高在第8天部分恢复,其中仅在高剂量免疫原性组合物组中有纤维蛋白原(25.6%至65.5%)和C-反应蛋白(4.5x和5.6x)的提高。在第1天,第3小时(8.3x至127.2x第1天第0小时的个体值,给药应答)和第36天,第3小时(9.4x至39.5x第36天第0小时的个体值)于低剂量和高剂量免疫原性组合物组中观测到白介素(IL)-6的提高。在其它细胞因子(IL-10、IL-12、干扰素诱导蛋白(IP-10),和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)中未观测到变化。这些急性期蛋白和细胞因子的提高是部分预期的对施用外源抗原的正常生理反应。在恢复期(在恢复期期间未评估细胞因子),这些临床病理参数并无PF06425095-相关或佐剂-相关的变化。另外,在注射部位有局部的变化,其在佐剂对照组以及低剂量和高剂量免疫原性组合物组有类似的发生率和严重性;因而,它们并不与PF-06425095直接相关。在给药期,变化包括轻微至中度的慢性活动性炎症,特征在于由巨噬细胞浸润而引起的肌纤维的分离,其通常含有嗜碱性粒细胞(经解读为含铝佐剂)、淋巴细胞、血浆细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、坏死碎屑、和水肿。在这些慢性活动性炎症的病灶内也存在细胞外的嗜碱性粒细胞。在恢复期结束时,有轻微至中度的慢性炎症和单核细胞浸润,以及轻微的纤维化。这些注射部位的发现代表了对佐剂的局部炎性反应。其它显微可见变化包括在髂(引流)淋巴结处淋巴细胞结构轻微至中度的增加,以及脾生发中心中细胞结构的轻微增加,这些在佐剂对照组以及低剂量和高剂量免疫原性组合物组中于给药期间观测到。在恢复期结束时,这些显微可见发现具有低严重性。这些作用代表了对抗原刺激的免疫应答,以及对佐剂或PF-06425095的药理学应答。在抗-DNA抗体中无测试品相关的增加。

[0881] 有鉴于无不利发现,此研究中的无明显损害作用水平(NOEL)是,高剂量免疫原性组合物组(0.4mg的三重突变体毒素A药物物质和三重突变体毒素B药物物质/剂量作为PF-06425095)以两次0.5mL注射施用4个剂量。实施例44:被动转移至仓鼠的血清阳性NHP血清的效力

[0882] 向5只叙利亚金仓鼠的组施用了口服给药的克林霉素抗生素(30mg/kg)以破坏正常的肠道菌群。5天后,用口服给药的野生型难辨梭菌孢子(630菌株,100cfu/动物)攻击仓鼠,并腹膜内(IP)施用根据表51的NHP血清。不受机制或理论限制,用孢子攻击后的疾病症状通常在攻击后大约30-48小时开始发作。

[0883] 在用突变体毒素A药物物质和突变体毒素B药物物质(10:10,10:50,和10:100的A:B比例,以ISCOMATRIX配制,参见实施例42,表49和表50)三次免疫之后,从展现出最高滴度(抗-毒素A血清和抗毒素B血清)的NHP血清样品汇集施用至仓鼠的NHP血清。从第5、6和8周(免疫在0、2和4周进行)的时间点收集NHP血清,如实施例42所述。结果在下表52-54中示出。符号“+”表示在不包括动物#3无应答者的()中的几何平均(GM)。“*TB”代表最终采血,动物被安乐死的那一天,不是所有动物都在同一天。

[0884]

表 51: 试验设计				
组	施用的组合物	动物 No.	途径	方案
1 “1 剂量”	血清阳性 NHP 血清 (未浓缩的)	5	IP	在第 0 天攻击 在第 0 天给药 在第 0、1、2 天采血, TB 在第 11 天
2 “2 剂量”	血清阳性 NHP 血清 (未浓缩的)	5	IP	在第 0 天攻击 在第 0、1 天给药 在第 0、1、2 天采血, TB 在第 11 天

[0885]

表 52: 在 1 或 2 次 NHP 血清的 IP 给药后,仓鼠血清中抗毒素 A 中和滴度(表示为 RLU 的 50%中和滴度)								
	天	仓鼠 1	仓鼠 2	仓鼠 3	仓鼠 4	仓鼠 5	GM	SE
1 次 给药	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	2877	4008	2617	4917	1872	3081	538
	D2	1983	3009	2750	2902	1117	2214	357
		3239						
	TB*	(d4)	537 (d9)	155 (d11)	977 (d9)	972 (d2)	762	538
2 次 给药	D0	50	50	50	50	50	50	0
							606	
	D1	1154	2819	50	429	1174	(1131) ⁺	475
	D2	4119	4674	1899	545		2113	862
		1236						
	TB*	(d9)	1267 (d8)	1493 (d4)	50 (d11)	1877 (d9)	738	306
输入 NHP 血清= 41976								

表 53: 在 1 或 2 次 NHP 血清的 IP 给药后, 仓鼠血清中抗毒素 B 中和滴度 (表示为 RLU 的 50% 中和滴度)

	天	仓鼠 1	仓鼠 2	仓鼠 3	仓鼠 4	仓鼠 5	GM	SE	
[0886]	1 次 给药	D0	50	50	50	50	50	50	0
		D1	1846	4254	1347	5178	406	1859	904
		D2	992	1795	2585	2459	1145	1669	327
			1744	50		265	544		
		TB*	(d4)	(d9)	50 (d11)	(d9)	(d2)	229	317
	2 次 给药	D0	50	50	50	50	50	50	0
								778	
		D1	1189	2229	50	550	3920	(1546)⁺	687
[0887]		D2	2288	2706	1452	287		1268	477
			301	694	682	50	1334		
		TB*	(d9)	(d8)	(d4)	(d11)	(d9)	394	217
输入 NHP 血清= 23633									

表 54: 在 1 或 2 次 NHP 血清的 IP 给药后, 产生针对严重 CDAD 的保护的仓鼠百分比

注射后天数	0	2	4	6	8	10	11
[0888] 1 次给药 NHP 血清	100%	80%	60%	60%	60%	20%	20%
2 次给药 NHP 血清	100%	100%	80%	80%	60%	20%	20%
安慰剂	100%	75%	50%	25%	0%	n/a	n/a

[0889] 在另一研究中, 向叙利亚金仓鼠施用口服给药的克林霉素抗生素 (30mg/kg) 以破坏正常的肠道菌群。5 天后, 用口服给药的野生型难辨梭菌孢子 (630 菌株, 100cfu/动物) 攻击仓鼠, 并根据表 55 腹膜内 (IP) 施用 NHP 血清。不受机制或理论限制, 用孢子攻击后的疾病症状通常在攻击后大约 30-48 小时开始发作。

[0890] 在用突变体毒素 A 药物物质和突变体毒素 B 药物物质 (10:10, 10:50, 和 10:100 的 A:B 比例, 以铝胶和 CpG24555 配制, 参见实施例 42, 表 49 和表 50) 三次免疫之后, 从收集自 NHP 的样品汇集施用至仓鼠的 NHP 血清。从第 5、6、8 和 12 周的时间点收集 NHP 血清, 如实施例 42 所述 (在 0、2 和 4 周免疫 NHP)。结果在下表 56-59 中示出。进一步研究来自仓鼠的血清, 以确定抑制性浓度 (IC₅₀) 值, 其是用上文所述的毒素中和测定来确定的。由本发明的难辨梭菌免疫原性组合物在仓鼠中诱导的毒素-中和抗体水平, 与所述 Merck/Medarex 试验对象 (表现出针对 CDAD 复发的保护) 中的血清抗体水平相当。

[0891]

表 55: 试验设计				
组	施用的组合物	No.	途径	方案
1	血清阳性 NHP 血清	5	IP	攻击 D0 给药 D0, 1, 3, 5, 7

[0892]

2	血清阳性 NHP 血清	5	IP	无攻击 给药 D0, 1, 3, 5, 7,
3	血清阳性 NHP 血清	10	IP	攻击 D0 给药 D0, 1, 3, 5, 7
4	安慰剂	5	IM	攻击 D0

[0893]

表 56: 在 1 或 2 次 NHP 血清的 IP 给药后, 仓鼠血清中的抗毒素 A 中和滴度^a (表示为 RLU 的 50%中和滴度)

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*

输入 NHP 血清汇集= 9680

a, 每个组的滴度表示为几何平均(在第 0 天“攻击”组 n=15, 未“攻击组”n=5)

Merck/Medarex 保护性范围: 对于毒素 A, 666- 6,667

星“*”表示显著差异

[0894]

表 57: 在 1 或 2 次 NHP 血清的 IP 给药后, 仓鼠血清中的抗毒素 B 中和滴度^a (表示为 RLU 的 50%中和滴度)

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*

输入 NHP 血清汇集= 19631

a, 每个组的滴度表示为几何平均(在第 0 天“攻击”组 n=15, 未“攻击组”n=5)

Merck/Medarex 保护性范围: 对于毒素 B, 222- 2,222

星“*”表示显著差异

表 58: 在 NHP 血清的 IP 给药后, 产生针对严重 CDAD 的保护的仓鼠百分比

[0895]

注射后天数	0	2	4	6	8	10	11
-------	---	---	---	---	---	----	----

[0896]

组 1 和 3	100%	73%	53%	53%	47%	33%	33%
安慰剂(组 2)	100%	50%	0%				

[0897]

表 59: 来自毒素特异性 50%中和滴度的 IC ₅₀ 值															
		抗毒素 A 的 IC ₅₀								抗毒素 B 的 IC ₅₀					
		给药后天数								给药后天数					
攻击的	动物 ID	0	1	3	5	7	11	动物 ID	0	1	3	5	7	11	
					死亡							死亡			
	1-1	10	50	338	D4			1-1	10	50	254	D4			
	1-2	10	614	579	777	605	192	1-2	10	720	659	896	475	157	
							死亡								
	1-3	10	710	1035	845	548	D10	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				
				死亡							死亡				
	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	
							死亡							死亡	
	3-4	10	536	493	1102	1314	死亡 D9	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	
			死亡							死亡					
3-7	10	50	D2				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*					
			死亡							死亡					
3-10	10	792	D2				3-10	10	835	D2					
未攻击的	几何平均	11	380	666	864	564	263	几何平均	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	

[0898]	几何平均	12	720	1220	1367	1688	1281	几何平均	10	828	1400	1734	1877	1436
	标准差	3	46	169	199	156	197	标准差	0	38	173	338	332	296

[0899] *=在该日降低

[0900] 实施例45:突变体毒素药物物质的鉴定

[0901] 三重突变体毒素A的一级结构在SEQ ID NO:4中示出。SEQ ID NO:4的位置1处的NH₂-端Met残基源自SEQ ID NO:12的起始密码子,并且在分离的蛋白(例如,参见SEQ ID NO:84)中缺失。因此,在实施例12至实施例45中,“SEQ ID NO:4”是指其中起始甲硫氨酸(位于位置1)缺失的SEQ ID NO:4。纯化的三重突变体毒素A(SEQ ID NO:4)(药物物质中间分子-Lot L44993-132)和经EDC/NHS处理的三重突变体毒素A(SEQ ID NO:4)(“突变体毒素A药物物质”-Lot L44898-012)均展现出以SLISKEELIKLAYSI(SEQ ID NO:4的位置2-16)起始的单一的NH₂-端序列。

[0902] 三重突变体毒素B的一级结构在SEQ ID NO:6中示出。SEQ ID NO:6的位置1处的NH₂-端Met残基源自SEQ ID NO:12的起始密码子,并且在分离的蛋白(例如,参见SEQ ID NO:86)中缺失。因此,在实施例12至实施例45中,“SEQ ID NO:6”是指其中起始甲硫氨酸(位于位置1)缺失的SEQ ID NO:6。纯化的三重突变体毒素B(SEQ ID NO:6)(药物物质中间分子-Lot 010)和经EDC/NHS处理的三重突变体毒素B(SEQ ID NO:6)(“突变体毒素B药物物质”-Lot L44906-153)均展现出以SLVNRKQLEKMANVR(SEQ ID NO:6的位置2-16)起始的单一的NH₂-端序列。

[0903] 使用圆二色(CD)光谱来评估三重突变体A(SEQ ID NO:4)和突变体毒素A药物物质的二级和三级结构。也使用CD光谱来评估三重突变体B(SEQ ID NO:6)和突变体毒素B药物物质的二级和三级结构。也使用CD光谱来评估pH对结构的潜在影响。通过将得自突变体毒素A药物物质的CD数据与得自三重突变体毒素A的数据进行比较来分析EDC处理对三重突变体毒素A的影响。通过将得自突变体毒素B药物物质的CD数据与得自三重突变体毒素B的数据进行比较来分析EDC处理对三重突变体毒素B(SEQ ID NO:6)的影响。

[0904] 在各种pH获得了突变体毒素A药物物质的远-UV CD数据。在pH5.0-7.0记录的光谱指示二级结构中高比例的 α -螺旋,表明蛋白的多肽骨架采取了 α -螺旋占优势的界定清楚的构象。

[0905] 也获得了突变体毒素A药物物质的近-UV CD光谱。260-300nm之间的强负椭圆率表明芳香族侧链处于独特的刚性环境中,即突变体毒素A药物物质具有三级结构。实际上,源自芳香族侧链个体类型的表征性特征可在光谱中区分:~290nm处的肩和~283nm处的最大负峰是由于有序的色氨酸侧链对偏振光的吸收,276nm处的负峰来自酪氨酸侧链,而262和268nm处的小肩表明参与三维接触的苯丙氨酸残基。远-和近-UV结果提供了证据证明突变体毒素A药物物质在生理pH保持完整折叠的结构。在pH5.0-7.0观测到的几乎相同的远-和近-UV CD光谱表明,在此pH范围内未发生可检测的结构变化。在pH3.0和4.0不能收集CD数据,因为蛋白在此类pH点不可溶。在突变体毒素A药物物质与三重突变体毒素A的比较性远-和近-UV CD光谱中,在所有经研究的实验条件下,两种蛋白的光谱基本相同,表明EDC处理对三重突变体毒素A的二级和三级结构没有可检测的影响。此发现与凝胶过滤及分析性超离心结果(其分别显示出在斯托克斯半径和沉降/摩擦系数中均无可检测的变化)一致。

[0906] 突变体毒素A药物物质(以及三重突变体毒素A)含有25个色氨酸残基,其分布遍及一级序列并且可用作方便的内部荧光探针。获得了作为温度的函数的突变体毒素A药物物质在300-400nm之间的荧光发射光谱。在6.8℃,于280nm激发时,突变体毒素A药物物质显示特征性的色氨酸荧光发射光谱。荧光发射最大值在~335nm处观测到,表明色氨酸残基在非极性环境中,是典型的蛋白内部环境而不是极性的水环境。荧光发射光谱结果,与此报告中给出的CD实验结果一起,确认了突变体毒素A药物物质保持完整折叠的结构。

[0907] 外部探针8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)的荧光用于表征,在pH变化时,突变体毒素A药物物质和三重突变体毒素A中可能的构象变化。由结果可知,当突变体毒素A药物物质或三重突变体毒素A在pH7.0用该探针滴定时,ANS荧光密度基本上没有增加,表明在这些条件下蛋白上没有暴露疏水表面。将pH变至2.6则导致ANS荧光量子场随着探针浓度升高而产生剧烈变化,直至荧光量子场达到表观饱和。ANS荧光量子场的此种提高表明,在低pH(2.6)时,突变体毒素A药物物质和三重突变体毒素A均经历了pH-诱导的构象变化暴露了疏水表面。此类构象变化表明,EDC-诱导的三重突变体毒素A的修饰和失活并不限制突变体毒素A药物物质(DS)的构象可塑性。

[0908] 用大小排阻层析在G4000SWXL柱上评估了EDC处理对三重突变体毒素A的流体动力学性质的影响。将突变体毒素A药物物质和三重突变体毒素A注射至G4000SWXL柱(在pH7.0、6.0、和5.0平衡)上。数据表明,使用大小排阻层析未能检测出突变体毒素A药物物质和三重突变体毒素A在斯托克斯半径中有差异。因此,EDC处理并不会剧烈影响三重突变体毒素A的流体动力学性质,由此也相应地不会剧烈影响其整体分子形状。

[0909] 用多角度激光散射(MALLS)技术对三重突变体毒素A和突变体毒素A药物物质进行了进一步的分析。用EDC处理三重突变体毒素A导致产生异质混合物,其由各种多聚体和单体种类组成。此种异质性反应了大量EDC-诱导的分子间和分子内共价键(羧基与蛋白的伯胺之间)的引入。

[0910] 所获得的数据提供了三重突变体毒素A和突变体毒素A药物物质(经EDC处理的三重突变体毒素A)的物理和化学特征,并描述了其一级、二级和三级结构中的关键特征。所产生的数据证明,经EDC处理的三重突变体毒素A导致了其多肽链的共价修饰,但却并未影响蛋白的二级和三级结构。用EDC处理导致分子内和分子间交联。突变体毒素A药物物质(以及三重突变体毒素A)所获得的生物化学和生物物理学参数在表60中给出。

[0911]

表 60: 三重突变体毒素 A (SEQ ID NO: 4) 和突变体毒素 A 药物物质所获得的主要生物化学和生物物理学参数		
参数	三重突变体毒素 A (SEQ ID NO: 4)	突变体毒素 A 药物物质
氨基酸残基的数目	2709	2709
N-端序列	SLISKEELIKLAYSI (SEQ ID NO: 4 的位置 2-16)	SLISKEELIKLAYSI (SEQ ID NO: 4 的位置 2-16)
分子量(得自 AA 序列)	308 kDa	308 kDa
分子量 (得自 SEC-MALLS)	299 kDa	300 kDa 和 718 -1139 kDa
280 nm 处消光系数	1.292 或 1.275 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹	1.292 或 1.275 275 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹
理论 pI	5.57	ND
20 °C 的部分比分子体积	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 (f/f ₀)	1.69	1.69

[0912]

斯托克斯半径/单体	78.4±1.1	77.9
荧光 max (λ _{ex} = 280 nm)	334-335 nm	334-335 nm
近-UV CD 光谱最小值	284 nm 和 278 nm	284 nm 和 278 nm
284 & 278 nm 处的平均 res 椭圆率	-138±7 & -130±7	-138±8 & 131±10
222 nm 处的平均 res 椭圆率	-8989±277	-7950±230
DSC 解折叠跃迁最大值(PBS, pH 7.4)	47.3 °C 和 53.6 °C	47.9±0.2 °C 和 54.1±0.2 °C

[0913] 在各种pH获得了突变体毒素B药物物质的远-UV CD数据。在pH5.0-7.0记录的光谱指示二级结构中高比例的α-螺旋,表明蛋白的多肽骨架采取了α-螺旋占优势的界定清楚的构象。

[0914] 也获得了突变体毒素B药物物质的近-UV CD光谱。260-300nm之间的强负椭圆率表明芳香族侧链处于独特的刚性环境中,即突变体毒素B药物物质具有三级结构。实际上,源自芳香族侧链个体类型的表征性特征可在光谱中区分:~290nm处的肩和~283nm处的最大负峰是由于有序的色氨酸侧链对偏振光的吸收,276nm处的负峰来自酪氨酸侧链,而262和268nm处的小肩表明参与三维接触的苯丙氨酸残基。远-和近-UV结果提供了证据证明突变体毒素B药物物质在生理pH保持完整折叠的结构。在pH5.0-7.0观测到的非常相似的远-和近-UV CD光谱表明,在此pH范围内未发生可检测的结构变化。pH3.0和4.0不能收集CD数据,因为蛋白在此类pH点不可溶。

[0915] 在突变体毒素B药物物质与三重突变体毒素B的比较性远-和近-UVCD光谱中,在pH5.0-7.0之间,两种蛋白的光谱非常相似,表明EDC处理对该蛋白的二级和三级结构没有

可检测的影响。

[0916] 三重突变体毒素B含有16个色氨酸残基,其分布遍及一级序列并且可用作方便的内部荧光探针。获得了作为温度的函数的突变体毒素B药物物质在300–400nm之间的荧光发射光谱。在7℃,于280nm激发时,突变体毒素B药物物质显示特征性的色氨酸荧光发射光谱。荧光发射最大值在~335nm处观测到,表明色氨酸残基在非极性环境中,是典型的蛋白内部环境而不是极性的水环境。此结果,与CD实验(参见上文)的结果一起,确认了突变体毒素B药物物质保持完整折叠的结构。

[0917] 外部探针8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)的荧光用于表征,在pH变化时,突变体毒素B药物物质和三重突变体毒素B中可能的构象变化。由结果可知,当突变体毒素B药物物质或三重突变体毒素B在pH7.0用该探针滴定时,ANS荧光密度基本上没有增加,表明在这些条件下蛋白上没有暴露疏水表面。将pH变至2.6则导致ANS荧光量子场(在存在突变体毒素B药物物质时)随着探针浓度升高而产生剧烈变化,直至荧光量子场达到表观饱和。ANS荧光量子场的此种提高表明,在低pH(2.6)时,突变体毒素B药物物质经历了pH-诱导的构象变化暴露了疏水表面。此类构象变化表明,EDC-诱导的三重突变体毒素B的修饰和失活并不限制突变体毒素B药物物质(DS)的构象可塑性。

[0918] 用大小排阻层析在G4000SWXL柱上评估了EDC处理对三重突变体毒素B的流体动力学性质的影响。将突变体毒素B药物物质和三重突变体毒素B注射至G4000SWXL柱(在pH7.0、6.0、和5.0平衡)上。数据表明,使用大小排阻层析未能检测出突变体毒素B药物物质和三重突变体毒素B在斯托克斯半径中有差异,因此,EDC处理并不会剧烈影响所述蛋白的流体动力学性质,由此也相应地不会剧烈影响其整体分子形状。

[0919] 用多角度激光散射(MALLS)技术对三重突变体毒素B和突变体毒素B药物物质进行了进一步的分析。用EDC处理三重突变体毒素B导致产生更加异质的混合物,其由各种多聚体和单体种类组成。此种异质性反应了大量EDC-诱导的分子间和分子内共价键(羧基与蛋白的伯胺之间)的引入。

[0920] 所获得的数据提供了三重突变体毒素B和突变体毒素B药物物质(经EDC处理的三重突变体毒素B)的物理和化学特征,并描述了其一级、二级和三级结构中的关键特征。所产生的数据证明,经EDC处理的三重突变体毒素B导致了其多肽链的共价修饰,但却并未影响蛋白的二级和三级结构。用EDC处理导致分子内和分子间交联。突变体毒素B药物物质(以及三重突变体毒素B)所获得的主要生物化学和生物物理学参数在表61中给出。

[0921]

表 61: 三重突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6)和突变体毒素 B 药物物质所获得的主要生物化学和生物物理学参数

参数	三重突变体毒素 B(SEQ ID NO: 6)	突变体毒素 B 药物物质
氨基酸残基的数目	2365	2365
N-端序列	SLVNRKQLEKMANVR (SEQ ID NO: 6 的位置 2-16)	SLVNRKQLEKMANVR (SEQ ID NO: 6 的位置 2-16)
分子量(得自 AA)	269.5 kDa	269.5 kDa

[0922]

序列)		
分子量 (得自 SEC-MALLS)	255 kDa 和 ~1,754 kDa	264, 268, 706, 和 2,211 kDa
280 nm 处消光系数	$1.067 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$1.067 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
理论 pI	4.29	ND
20 °C 的部分比分子体积	$0.734 \text{ cm}^3/\text{g}$	$0.734 \text{ cm}^3/\text{g}$
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	$9.1 \pm 0.2 \text{ S}$	9.4 S
摩擦系数比 (f/f_0)	1.58 ± 0.03	1.53
斯托克斯半径/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 解折叠跃迁中间值 T_{m1} 和 T_{m2} (PBS, pH 7.0)	$48.8 \pm 0.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $52.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$	$48.2 \pm 0.3 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $54.3 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$

[0923] 本发明的方面

[0924] 如下条目描述了本发明另外的实施方案:

[0925] C1. 包括 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列的分离的多肽, 其中位置 1 处的甲硫氨酸残基任选不存在, 并且其中所述多肽包括至少一个经 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)化学修饰的氨基酸侧链。

[0926] C2. 包括 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列的分离的多肽, 其中位置 1 处的甲硫氨酸残基任选不存在, 并且其中所述多肽包括经 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)化学修饰的氨基酸侧链。

[0927] C3. 条目 C1 或 C2 的分离的多肽, 其中所述多肽的至少一个天冬氨酸残基侧链或所述多肽的至少一个谷氨酸残基侧链是经甘氨酸化学修饰的。

[0928] C4. 条目 C1-C3 中任一项的分离的多肽, 其中所述多肽包括:

[0929] a) 所述多肽的天冬氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联; 和

[0930] b) 所述多肽的谷氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。

[0931] C5. 条目 C1-C4 中任一项的分离的多肽, 其中所述多肽包括连接至所述多肽的至少一个赖氨酸残基侧链的 β -丙氨酸部分。

[0932] C6. 条目 C4 的分离的多肽, 其中所述多肽包括连接至所述多肽的天冬氨酸残基侧链或连接至所述多肽的谷氨酸残基侧链的甘氨酸部分。

[0933] C7.包括SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的分离的多肽,其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在,并且其中所述多肽的至少一个赖氨酸残基侧链连接 β -丙氨酸部分。

[0934] C8.包括SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的分离的多肽,其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在,并且其中所述多肽的至少一个赖氨酸残基侧链连接 β -丙氨酸部分。

[0935] C9.条目C7或C8的分离的多肽,其中所述多肽的第二个赖氨酸残基的侧链连接至天冬氨酸残基的侧链或连接至谷氨酸残基的侧链。

[0936] C10.条目C7-C9中任一项的分离的多肽,其中所述多肽的天冬氨酸残基侧链或者谷氨酸残基侧链连接甘氨酸部分。

[0937] C11.条目C1-C10任一项的分离的多肽,其中所述多肽具有至少大约100 μ g/ml的EC₅₀。

[0938] C12.免疫原性组合物,其包括具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的分离的多肽,其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在,和具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的分离的多肽,其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在,并且其中所述多肽具有至少一个经1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)化学修饰的氨基酸侧链。

[0939] C13.条目C12的免疫原性组合物,其中所述多肽包含下列任意的至少一个:

[0940] a)连接至所述多肽赖氨酸侧链的至少一个 β -丙氨酸部分;

[0941] b)天冬氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联;和

[0942] c)谷氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联。

[0943] C14.条目C12的免疫原性组合物,其中所述多肽具有至少大约100 μ g/ml的EC₅₀。

[0944] C15.免疫原性组合物,其包含具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的分离的多肽,其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在,和具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的分离的多肽,其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在,并且

[0945] a)其中SEQ ID NO:4的至少一个赖氨酸残基侧链连接 β -丙氨酸部分,和

[0946] b)其中SEQ ID NO:6的至少一个赖氨酸残基侧链连接 β -丙氨酸部分。

[0947] C16.条目C15的免疫原性组合物,其中SEQ ID NO:4的第二个赖氨酸残基侧链连接天冬氨酸残基侧链或连接谷氨酸残基侧链,并且其中SEQ ID NO:6的第二个赖氨酸残基侧链连接天冬氨酸残基侧链或连接谷氨酸残基侧链。

[0948] C17.条目C12-C16中任一项的免疫原性组合物,其中所述多肽的天冬氨酸残基侧链或者谷氨酸残基侧链连接甘氨酸部分,其中所述多肽具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在。

[0949] C18.条目C12-C16中任一项的免疫原性组合物,其中所述多肽的天冬氨酸残基侧链或者谷氨酸残基侧链连接甘氨酸部分,其中所述多肽具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在。

[0950] C19.条目C12-C18中任一项的免疫原性组合物,其中所述多肽具有至少大约100 μ g/ml的EC₅₀。

[0951] C20.免疫原性组合物,其包含具有SEQ ID NO:84所示的氨基酸序列的分离的多肽和具有SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列的分离的多肽,其中每个多肽包括:

[0952] a)所述多肽的天冬氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联;

- [0953] b)所述多肽的谷氨酸残基侧链和所述多肽的赖氨酸残基侧链之间的至少一个交联;
- [0954] c)连接至所述多肽的至少一个赖氨酸残基侧链的 β -丙氨酸部分;和
- [0955] d)连接至所述多肽的至少一个天冬氨酸残基侧链或所述多肽的至少一个谷氨酸残基侧链的甘氨酸部分。
- [0956] C21.免疫原性组合物,其包括突变体难辨梭菌毒素A,相对于相应的野生型难辨梭菌毒素A,所述突变体难辨梭菌毒素A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。
- [0957] C22.条目C21的组合物,其中所述突变是非保守氨基酸取代。
- [0958] C23.条目C22的组合物,其中所述取代包括丙氨酸取代。
- [0959] C24.条目C21-C23任一项的组合物,其中所述野生型难辨梭菌毒素A包括与SEQ ID NO:1具有至少95%相同性的序列。
- [0960] C25.条目C24的组合物,其中所述野生型难辨梭菌毒素A包括与SEQ ID NO:1具有至少98%相同性的序列。
- [0961] C26.条目C25的组合物,其中所述野生型难辨梭菌毒素A包括SEQ ID NO:1。
- [0962] C27.条目C21-C26任一项的组合物,其中所述葡萄糖基转移酶结构域包括至少两个突变。
- [0963] C28.条目C27的组合物,其中根据SEQ ID NO:1的编号,所述至少两个突变存在于氨基酸位置101、269、272、285、287、269、272、460、462、541或542。
- [0964] C29.条目C21-C26任一项的组合物,其中所述葡萄糖基转移酶结构域包括SEQ ID NO:29。
- [0965] C30.条目C29的组合物,其中所述葡萄糖基转移酶结构域包括至少两个非保守突变,所述非保守突变存在于SEQ ID NO:29的氨基酸位置101、269、272、285、287、269、272、460、462、541、或542,或其任意组合。
- [0966] C31.条目C21-C26中任一项的组合物,其中根据SEQ ID NO:1的编号,所述半胱氨酸蛋白酶结构域包括存在于位置700、589、655、543、或其任意组合的突变。
- [0967] C32.条目C21-C26中任一项的组合物,其中所述半胱氨酸蛋白酶结构域包括SEQ ID NO:32。
- [0968] C33.条目C32的组合物,其中所述半胱氨酸蛋白酶结构域包括非保守突变,所述非保守突变存在于SEQ ID NO:32的位置1、47、113、158、或其任意组合。
- [0969] C34.条目C21的组合物,其中所述突变体难辨梭菌毒素A包括SEQ ID NO:4。
- [0970] C35.条目C21的组合物,其中所述突变体难辨梭菌毒素A包括SEQ ID NO:84。
- [0971] C36.条目C21的组合物,其中所述突变体难辨梭菌毒素A包括SEQ ID NO:7。
- [0972] C37.条目C21的组合物,其中所述突变体难辨梭菌毒素A包括SEQ ID NO:83。
- [0973] C38.条目C21-C33中任一项的组合物,其中所述突变体难辨梭菌毒素A的至少一个氨基酸是化学交联的。
- [0974] C39.条目C38的的组合物,其中所述氨基酸是通过甲醛化学交联的。
- [0975] C40.条目C38的组合物,其中所述氨基酸是通过1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺化学交联的。

- [0976] C41. 条目C38或C40的组合物,其中所述氨基酸是通过N-羟基琥珀酰亚胺化学交联的。
- [0977] C42. 条目C21-C41中任一项的组合物,其中所述组合物被抗毒素A中和抗体或其结合片段所识别。
- [0978] C43. 免疫原性组合物,其包括突变体难辨梭菌毒素A,相对于相应的野生型难辨梭菌毒素A,所述突变体难辨梭菌毒素A包括:葡萄糖基转移酶结构域,其包括在位置285和287具有氨基酸取代的SEQ ID NO:29;和半胱氨酸蛋白酶结构域,其包括在位置158具有氨基酸取代的SEQ ID NO:32;其中所述突变体难辨梭菌毒素A的至少一个氨基酸是化学交联的。
- [0979] C44. 免疫原性组合物,其包括SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7,其中SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:7的至少一个氨基酸是化学交联的。
- [0980] C45. 条目C43或C44的组合物,其中所述至少一个氨基酸是通过甲醛交联的。
- [0981] C46. 条目C43或C44的组合物,其中所述至少一个氨基酸是通过1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺交联的。
- [0982] C47. 条目C43, C44, 或C46的组合物,其中所述至少一个氨基酸是通过N-羟基琥珀酰亚胺交联的。
- [0983] C48. 条目C43或C44的组合物,其中所述组合物被抗毒素A中和抗体或其结合片段所识别。
- [0984] C49. 包括SEQ ID NO:4的免疫原性组合物。
- [0985] C50. 包括SEQ ID NO:84的免疫原性组合物。
- [0986] C51. 包括SEQ ID NO:7的免疫原性组合物。
- [0987] C52. 包括SEQ ID NO:83的免疫原性组合物。
- [0988] C53. 条目C49-C52任一项的组合物,其中至少一个氨基酸是化学交联的。
- [0989] C54. 条目C21-C51任一项的组合物,其中相对于相应的野生型难辨梭菌毒素A,所述组合物展现出降低的细胞毒性。
- [0990] C55. 包括SEQ ID NO:84的分离的多肽。
- [0991] C56. 包括SEQ ID NO:86的分离的多肽。
- [0992] C57. 包括SEQ ID NO:83的分离的多肽。
- [0993] C58. 包括SEQ ID NO:85的分离的多肽。
- [0994] C59. 免疫原性组合物,其包括突变体难辨梭菌毒素B,相对于相应的野生型难辨梭菌毒素B,所述突变体难辨梭菌毒素B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。
- [0995] C60. 条目C59的组合物,其中所述突变是非保守氨基酸取代。
- [0996] C61. 条目C60的组合物,其中所述取代包括丙氨酸取代。
- [0997] C62. 条目C59-C61任一项的组合物,其中所述野生型难辨梭菌毒素B包括与SEQ ID NO:2具有至少95%相同性的序列。
- [0998] C63. 条目C62的组合物,其中所述野生型难辨梭菌毒素B包括与SEQ ID NO:2具有至少98%相同性的序列。
- [0999] C64. 条目C63的组合物,其中所述野生型难辨梭菌毒素B包括SEQ ID NO:2。
- [1000] C65. 条目C59-C64任一项的组合物,其中所述葡萄糖基转移酶结构域包括至少两

个突变。

[1001] C66. 条目C65的组合物, 其中根据SEQ ID NO:2的编号, 所述至少两个突变存在于氨基酸位置102、286、288、270、273、384、461、463、520、或543。

[1002] C67. 条目C59-C64任一项的组合物, 其中所述葡萄糖基转移酶结构域包括SEQ ID NO:31。

[1003] C68. 条目C67的组合物, 其中所述葡萄糖基转移酶结构域包括至少两个非保守突变, 所述非保守突变存在于SEQ ID NO:31的氨基酸位置102、286、288、270、273、384、461、463、520、或543。

[1004] C69. 条目C59-C64任一项的组合物, 其中根据SEQ ID NO:2的编号, 所述半胱氨酸蛋白酶结构域包括存在于位置698、653、587、544、或其任意组合的突变。

[1005] C70. 条目C59-C64任一项的组合物, 其中所述半胱氨酸蛋白酶结构域包括SEQ ID NO:33。

[1006] C71. 条目C70的组合物, 其中所述半胱氨酸蛋白酶结构域包括非保守突变, 所述非保守突变存在于SEQ ID NO:33的位置1、44、110、155、或其任意组合。

[1007] C72. 条目C59的组合物, 其中所述突变体难辨梭菌毒素B包括SEQ ID NO:6。

[1008] C73. 条目C59的组合物, 其中所述突变体难辨梭菌毒素B包括SEQ ID NO:86。

[1009] C74. 条目C59的组合物, 其中所述突变体难辨梭菌毒素B包括SEQ ID NO:8。

[1010] C75. 条目C59的组合物, 其中所述突变体难辨梭菌毒素B包括SEQ ID NO:85。

[1011] C76. 条目C59-C71任一项的组合物, 其中所述突变体难辨梭菌毒素B的至少一个氨基酸是化学交联的。

[1012] C77. 条目C76的组合物, 其中所述氨基酸是通过甲醛化学交联的。

[1013] C78. 条目C76的组合物, 其中所述氨基酸是通过1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺化学交联的。

[1014] C79. 条目C76或C78的组合物, 其中所述至少一个氨基酸是通过N-羟基琥珀酰亚胺化学交联的。

[1015] C80. 条目C59-C79任一项的组合物, 其中所述组合物被抗毒素B中和抗体或其结合片段所识别。

[1016] C81. 免疫原性组合物, 其包括突变体难辨梭菌毒素B, 相对于相应的野生型难辨梭菌毒素B, 所述突变体难辨梭菌毒素B包括: 葡萄糖基转移酶结构域, 其包括在位置286和288具有氨基酸取代的SEQ ID NO:31; 和半胱氨酸蛋白酶结构域, 其包括在位置155具有氨基酸取代的SEQ ID NO:33; 其中所述突变体难辨梭菌毒素B的至少一个氨基酸是化学交联的。

[1017] C82. 免疫原性组合物, 其包括SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8, 其中SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的至少一个氨基酸是化学交联的。

[1018] C83. 条目C81或C82的组合物, 其中所述至少一个氨基酸是通过甲醛交联的。

[1019] C84. 条目C81或C82的组合物, 其中所述至少一个氨基酸是通过1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺交联的。

[1020] C85. 条目C81, C82, 或C84的组合物, 其中所述至少一个氨基酸是通过N-羟基琥珀酰亚胺交联的。

[1021] C86. 条目C81或C82的组合物, 其中所述组合物被抗毒素B中和抗体或其结合片段

所识别。

[1022] C87.免疫原性组合物,其包括SEQ ID NO:6。

[1023] C88.免疫原性组合物,其包括SEQ ID NO:86。

[1024] C89.免疫原性组合物,其包括SEQ ID NO:8。

[1025] C90.免疫原性组合物,其包括SEQ ID NO:85。

[1026] C91.条目C59-C89任一项的组合物,其中相对于相应的野生型难辨梭菌毒素B,所述组合物展现出降低的细胞毒性。

[1027] C92.包括SEQ ID NO:4的免疫原性组合物和包括SEQ ID NO:6的免疫原性组合物,其中SEQ ID NO:4和6每个都至少有一个氨基酸是化学交联的。

[1028] C93.包括SEQ ID NO:84的免疫原性组合物和包括SEQ ID NO:86的免疫原性组合物,其中SEQ ID NO:84和86每个都至少有一个氨基酸是化学交联的。

[1029] C94.条目C92或C93的组合物,其中所述至少一个氨基酸是通过甲醛交联的。

[1030] C95.条目C92或C93的组合物,其中所述至少一个氨基酸是通过1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺交联的。

[1031] C96.条目C92,C93,或C95的组合物,其中所述至少一个氨基酸是通过N-羟基琥珀酰亚胺交联的。

[1032] C97.重组细胞或其后代,包括SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、或SEQ ID NO:47。

[1033] C98.重组细胞或其后代,包括编码SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、或SEQ ID NO:8的核酸序列。

[1034] C99.重组细胞或其后代,包括编码SEQ ID NO:84的核酸序列。

[1035] C100.重组细胞或其后代,包括编码SEQ ID NO:86的核酸序列。

[1036] C101.重组细胞或其后代,包括编码SEQ ID NO:83的核酸序列。

[1037] C102.重组细胞或其后代,包括编码SEQ ID NO:85的核酸序列。

[1038] C103.条目C97或C98的重组细胞,其中所述细胞衍生自革兰氏阳性菌细胞。

[1039] C104.条目C97,C98,或C99的重组细胞,其中所述细胞衍生自难辨梭菌细胞。

[1040] C105.条目C97-C104中任一项的重组细胞,其中所述细胞缺乏编码毒素的内源多核苷酸。

[1041] C106.条目C104或C105的细胞,其中所述细胞衍生自选自下列的难辨梭菌细胞:难辨梭菌1351、难辨梭菌3232、难辨梭菌7322、难辨梭菌5036、难辨梭菌4811、和难辨梭菌VPI11186。

[1042] C107.条目C106的细胞,其中所述细胞是难辨梭菌VPI11186细胞。

[1043] C108.条目C106或C107的细胞,其中所述难辨梭菌细胞的孢子形成基因是失活的。

[1044] C109.条目C108的细胞,其中所述孢子形成基因包含spo0A基因或spoIIE基因。

[1045] C110.产生突变体难辨梭菌毒素的方法,包括:

[1046] 在适宜的条件下培养重组细胞或其后代以表达编码突变体难辨梭菌毒素的多核苷酸,其中所述细胞包含所述编码突变体难辨梭菌毒素的多核苷酸,并且其中相对于相应的野生型难辨梭菌毒素,所述突变体包含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。

- [1047] C111. 条目C110的方法, 其中所述细胞缺乏编码毒素的内源多核苷酸。
- [1048] C112. 条目C110的方法, 其中所述重组细胞或其后代包括条目C97-C111中任一项的细胞。
- [1049] C113. 条目C110的方法, 还包括分离突变体难辨梭菌毒素。
- [1050] C114. 条目C113的方法, 还包括将分离的突变体难辨梭菌毒素与甲醛接触。
- [1051] C115. 条目C114的方法, 其中所述接触发生最多14天。
- [1052] C116. 条目C115的方法, 其中所述接触发生最多48小时。
- [1053] C117. 条目C114的方法, 其中所述接触在大约25℃发生。
- [1054] C118. 条目C113的方法, 还包括将分离的突变体难辨梭菌毒素与乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺接触。
- [1055] C119. 条目C118的方法, 其中所述接触发生最多24小时。
- [1056] C120. 条目C120的方法, 其中所述接触发生最多4小时。
- [1057] C121. 条目C118的方法, 其中所述接触在大约25℃发生。
- [1058] C122. 条目C118的方法, 还包括将分离的突变体难辨梭菌毒素与N-羟基琥珀酰亚胺接触。
- [1059] C123. 由条目C110-C122中任一项的方法产生的免疫原性组合物。
- [1060] C124. 产生针对难辨梭菌毒素A的中和抗体的方法, 包括: 向哺乳动物施用免疫原性组合物, 所述免疫原性组合物包含SEQ ID NO:4, 其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在, 其中SEQ ID NO:4的至少一个氨基酸通过甲醛、1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、或1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的组合交联, 并从所述哺乳动物回收抗体。
- [1061] C125. 产生针对难辨梭菌毒素A的中和抗体的方法, 包括: 向哺乳动物施用免疫原性组合物, 所述免疫原性组合物包含SEQ ID NO:84, 其中SEQ ID NO:84的至少一个氨基酸通过甲醛、1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、或1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的组合交联, 并从所述哺乳动物回收抗体。
- [1062] C126. 产生针对难辨梭菌毒素B的中和抗体的方法, 包括: 向哺乳动物施用免疫原性组合物, 所述免疫原性组合物包含SEQ ID NO:6, 其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在, 其中SEQ ID NO:6的至少一个氨基酸通过甲醛、1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、或1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的组合交联, 并从所述哺乳动物回收抗体。
- [1063] C127. 产生针对难辨梭菌毒素A的中和抗体的方法, 包括: 向哺乳动物施用免疫原性组合物, 所述免疫原性组合物包含SEQ ID NO:86, 其中SEQ ID NO:86的至少一个氨基酸通过甲醛、1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、或1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的组合交联, 并从所述哺乳动物回收抗体。
- [1064] C128. 特异于免疫原性组合物的抗体或其抗体结合片段, 所述免疫原性组合物包含SEQ ID NO:4其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在, 或者SEQ ID NO:7其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在。
- [1065] C129. 条目C128的抗体或其抗体结合片段, 其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在的SEQ ID NO:4中的至少一个氨基酸、或者位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在的SEQ ID

NO:7中的至少一个氨基酸通过甲醛、1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、或1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的组合交联。

[1066] C130. 抗体或其抗体结合片段,其包含:SEQ ID NO:41(CDR H1)、SEQ ID NO:42(CDR H2)和SEQ ID NO:43(CDR H3)中所示的重链互补决定区(CDR)的氨基酸序列,和SEQ ID NO:38(CDR L1)、SEQ ID NO:39(CDR L2)和SEQ ID NO:40(CDR L3)中所示的轻链CDR的氨基酸序列。

[1067] C131. 条目C128, C129, 或C130的抗体或其抗体结合片段,其中所述抗体或其抗体结合片段包含:重链,其包含SEQ ID NO:37中所示的氨基酸序列;和轻链,其包含SEQ ID NO:36中所示的氨基酸序列。

[1068] C132. 包含两种或更多种抗体或其抗体结合片段的组合物,其中所述抗体或其抗体结合片段选自条目C128-C131中的任一项的任意抗体或其抗体结合片段。

[1069] C133. 特异于免疫原性组合物的抗体或其抗体结合片段,所述免疫原性组合物包含:其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在的SEQ ID NO:6,或者其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在的SEQ ID NO:8。

[1070] C134. 条目C133的抗体或其抗体结合片段,其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在的SEQ ID NO:6中的至少一个氨基酸、或者位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在的SEQ ID NO:8中的至少一个氨基酸通过甲醛、1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、或1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的组合交联。

[1071] C135. 抗体或其抗体结合片段,其包括:SEQ ID NO:51(CDR H1)、SEQ ID NO:52(CDR H2)和SEQ ID NO:53(CDR H3)中所示的重链互补决定区(CDR)的氨基酸序列,和SEQ ID NO:57(CDR L1)、SEQ ID NO:58(CDR L2)和SEQ ID NO:59(CDR L3)中所示的轻链CDR的氨基酸序列。

[1072] C136. 抗体或其抗体结合片段,其包括:SEQ ID NO:61(CDR H1)、SEQ ID NO:62(CDR H2)和SEQ ID NO:63(CDR H3)中所示的重链互补决定区(CDR)的氨基酸序列,和SEQ ID NO:68(CDR L1)、SEQ ID NO:69(CDR L2)和SEQ ID NO:70(CDR L3)中所示的轻链CDR的氨基酸序列。

[1073] C137. 抗体或其抗体结合片段,其包括:SEQ ID NO:73(CDR H1)、SEQ ID NO:74(CDR H2)和SEQ ID NO:75(CDR H3)中所示的重链互补决定区(CDR)的氨基酸序列,和SEQ ID NO:79(CDR L1)、SEQ ID NO:80(CDR L2)和SEQ ID NO:81(CDR L3)中所示的轻链CDR的氨基酸序列。

[1074] C138. 包括两种或更多种抗体或其抗体结合片段的组合物,其中所述抗体或其抗体结合片段选自条目C133-C137中的任一项。

[1075] C139. 在哺乳动物中治疗难辨梭菌感染的方法,包括:向所述哺乳动物施用包括其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在的SEQ ID NO:4的免疫原性组合物,和包括其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在的SEQ ID NO:6的免疫原性组合物,其中SEQ ID NO:4和6每个都至少有一个氨基酸通过甲醛交联。

[1076] C140. 在哺乳动物中治疗难辨梭菌感染的方法,包括:向所述哺乳动物施用包括其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在的SEQ ID NO:4的免疫原性组合物,和包括其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在的SEQ ID NO:6的免疫原性组合物,其中SEQ ID NO:4和SEQ

ID NO:6每个都至少有一个氨基酸通过1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、或者1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的组合交联。

[1077] C141. 在哺乳动物中治疗难辨梭菌感染的方法, 包括向所述哺乳动物施用: 包括SEQ ID NO:84的免疫原性组合物, 和包括SEQ ID NO:86的免疫原性组合物, 其中SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:86每个都至少有一个氨基酸通过1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺交联。

[1078] C142. 在哺乳动物中诱导对难辨梭菌的免疫应答的方法, 包括向所述哺乳动物施用: 免疫原性组合物, 其包括其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在的SEQ ID NO:4; 和免疫原性组合物, 其包括其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在的SEQ ID NO:6; 其中SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6每个都至少有一个氨基酸通过甲醛交联。

[1079] C143. 在哺乳动物中诱导对难辨梭菌的免疫应答的方法, 包括向所述哺乳动物施用: 免疫原性组合物, 其包括其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在的SEQ ID NO:4; 和免疫原性组合物, 其包括其中位置1处的甲硫氨酸残基任选不存在的SEQ ID NO:6; 其中SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6每个都至少有一个氨基酸通过1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、或者1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的组合交联。

[1080] C144. 在哺乳动物中诱导对难辨梭菌的免疫应答的方法, 包括向所述哺乳动物施用: 包括SEQ ID NO:84的免疫原性组合物, 和包括SEQ ID NO:86的免疫原性组合物, 其中SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:86每个都至少有一个氨基酸通过1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺交联。

[1081] C145. 条目C139-C144任一项的方法, 其中所述哺乳动物是对其有需要的哺乳动物。

[1082] C146. 条目C139-C144任一项的方法, 其中所述哺乳动物患有复发的难辨梭菌感染。

[1083] C147. 条目C139-C144任一项的方法, 其中肠胃外施用所述组合物。

[1084] C148. 条目C139-C144任一项的方法, 其中所述组合物还包括佐剂。

[1085] C149. 条目C148的方法, 其中所述佐剂包括铝。

[1086] C150. 条目C148的方法, 其中所述佐剂包括氢氧化铝凝胶和CpG寡核苷酸。

[1087] C151. 条目C148的方法, 其中所述佐剂包括ISCOMATRIX®。

```

MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYQLKK 50
*****

LNESIDVFMNKYKTSSRNRLSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKTSSRNRLSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKTSSRNRLSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKNSRNRLSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKNSRNRLSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
*****

WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLWYDSEAFVNTLKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLWYDSEAFVNTLKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLWYDSEAFVNTLKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLWYDSEAFVNTLKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLWYDSEAFVNTLKKAIVESSTT 150
*****

EALQLLEEEIIONPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIIONPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIIONPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIIONPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIIONPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
*****

IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
*****

LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFPGGVYLDVDMPLPGIHSDFKTI 300
LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFPGGVYLAVAMPLPGIHSDFKTI 300
LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFPGGVYLDVDMPLPGIHSDFKTI 300
LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFPGGVYLDVDMPLPGIHSDFKTI 300
LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFPGGVYLDVDMPLPGIHSDFKTI 300
*****

SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
PRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
PRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
*****

```

图1A

```

SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSGVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSGVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSGVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSGVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSGVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
*****

QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSATAENSMFLTKIA 450
*****

PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500
PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500
PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500
PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500
PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500
*****

KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYGGSLSSEDNGVDF 550
KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYGGSLSSEDNGVDF 550
KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYGGSLSSEDNGVDF 550
KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYGGSLSSEDNGVDF 550
KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYGGSLSSEDNGVDF 550
*****

NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
*****

SKNPKNSIIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
SKNPKNSIIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
SKNPKNSIIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
SKNPKNSIIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
SKNPKNSIIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
*****

TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDLSNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDLSNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGA 700
TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDLSNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDLSNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDLSNEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
*****

```

图1B

```

NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKN SITIGANQYEV RINS 750
NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKN SITIGANQYEV RINS 750
NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKN SITIGANQYEV RINS 750
NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKN SITIGANQYEV RINS 750
NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKN SITIGANQYEV RINS 750
*****;*****

EGRKELLAHSGKWINKEEA IMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
EGRKELLAHSGKWINKEEA IMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
EGRKELLAHSGKWINKEEA IMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
EGRKELLAHSGKWINKEEA IMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
EGRKELLAHSGKWINKEEA IMSDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
*****

SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNI ESSIGDYIY EKLEPVKNII 850
SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNI ESSIGDYIY EKLEPVKNII 850
SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNI ESSIGDYIY EKLEPVKNII 850
SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNI ESSIGDYIY EKLEPVKNII 850
SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNI ESSIGDYIY EKLEPVKNII 850
*****

HNSIDDLIDEFNLL ENVSDELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
HNSIDDLIDEFNLL ENVSDELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
HNSIDDLIDEFNLL ENVSDELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
HNSIDDLIDEFNLL ENVSDELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
HNSIDDLIDEFNLL ENVSDELYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
*****

RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
*****

QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
*****

NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPTITEGIPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPTITEGIPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPTITEGIPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPTITEGIPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPTITEGIPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
*****

```

图1C

```

LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100
*****

ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSSESKEYGPKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSSESKEYGPKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSSESKEYGPKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSSESKEYGPKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSSESKEYGPKTEDDKILVPID 1150
*****;*****

DLVISEIDFNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
DLVISEIDFNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
DLVISEIDFNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
DLVISEIDFNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPYISSHIP 1200
DLVISEIDFNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPYISSHIP 1200
*****

SLSIYSAIGIETENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLNDGT 1250
SLSIYSAIGIETENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLNDGT 1250
SLSIYSAIGIETENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLNDGT 1250
SLSVYSAIGIKTENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLNNGT 1250
SLSVYSAIGIKTENLDFS KIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLNNGT 1250
***;*****;*****;***

RLLDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKIKLDKDTRNFI 1300
RLLDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKIKLDKDTRNFI 1300
RLLDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNIKIKLDKDTRNFI 1300
KLLDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNTKIKLDKDTRNFI 1300
KLLDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVYEDTNTKIKLDKDTRNFI 1300
;*****

MPTITTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYPISTNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYPISTNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYPISTNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTDEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYPISMNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTDEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYPISMNINLSKDDLWIFNID 1350
*****;*****

NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
*****;***;*****

```

图1D

```

RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
*****

LGLDSKNIAINYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHYKKDSKNILEFYNDST 1500
LGLDSKNIAINYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHYKKDSKNILEFYNDST 1500
LGLDSKNIAINYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHYKKDSKNILEFYNDST 1500
LGLDSKNIAINYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHYKKDSKNILEFYNGST 1500
LGLDSKNIAINYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHYKKDSKNILEFYNGST 1500
*****

LEFNSKDFIAEDINVMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNOV 1550
LEFNSKDFIAEDINVMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNOV 1550
LEFNSKDFIAEDINVMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNOV 1550
LEFNSKDFIAEDINVMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNOV 1550
LEFNSKDFIAEDINVMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNOV 1550
*****

KVNGLYLINESVYSSYLDFVKNSDGHHTSNFMNLFNDNISFWKLFGFENI 1600
KVNGLYLINESVYSSYLDFVKNSDGHHTSNFMNLFNDNISFWKLFGFENI 1600
KVNGLYLINESVYSSYLDFVKNSDGHHTSNFMNLFNDNISFWKLFGFENI 1600
KVNGLYLINESVYSSYLDFVKNSDGHHTSNFMNLFNNISFWKLFGFENI 1600
KVNGLYLINESVYSSYLDFVKNSDGHHTSNFMNLFNNISFWKLFGFENI 1600
*****

NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
*****

RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
*****

INTNYSNEYYPEIIIVLNPNTFHKKNINLDSSSFYEYKWSTEGSDFILVR 1750
INTNYSNEYYPEIIIVLNPNTFHKKNINLDSSSFYEYKWSTEGSDFILVR 1750
INTNYSNEYYPEIIIVLNPNTFHKKNINLDSSSFYEYKWSTEGSDFILVR 1750
INTNYSNEYYPEIIIVLNPNTFHKKNINLDSSSFYEYKWSTEGSDFILVR 1750
INTNYSNEYYPEIIIVLNPNTFHKKNINLDSSSFYEYKWSTEGSDFILVR 1750
*****

```

图1E

```

YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKM SIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800
YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKM SIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800
YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKM SIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800
YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKM SIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800
YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKM SIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800
*****

NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNL 1850
NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNL 1850
NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNL 1850
NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIESNL 1850
NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIESNL 1850
*****

VTGWQTINGKKYYFDINTGAALISYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
VTGWQTINGKKYYFDINTGAALISYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
VTGWQTINGKKYYFDINTGAALTSYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
VTGWQTINGKKYYFDINTGAASTSYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
VTGWQTINGKKYYFDINTGAASTSYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
*****

GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
*****

NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
*****

DTAIAFNGYKTIDGKHFYFSDCVVKIGVFSTSNNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
DTAIAFNGYKTIDGKHFYFSDCVVKIGVFSTSNNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
DTAIAFNGYKTIDGKHFYFSDCVVKIGVFSTSNNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
DTAIAFNGYKTIDGKHFYFSDCVVKIGVFSGSNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
DTAIAFNGYKTIDGKHFYFSDCVVKIGVFSGSNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
*****

GQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
GQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
GQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGLQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
GQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
GQAIVYQSKFLTNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
*****

```

图1F

```

WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTSIASTGYTIINGKY 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTSIASTGYTIINGKY 2150
*****;*****;

FYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKVPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKVPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGK 2200
***** *****. *****;*****

KYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNIAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNIAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNIAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAITGWQTIDGKKYYFNPNNIAIAATHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAITGWQTIDGKKYYFNPNNIAIAATHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
*****;***; *;.***** *****

LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
*****

AIVYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDSKYYFNLNTAVAVTGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKKYYFDNDSKAVTGWQTIDSKYYFNLNTAVAVTGWQ 2350
*****.***** *.****

TIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFY 2400
TIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFY 2400
TIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFY 2400
TIDGKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKRYFNTNTYIASTGYTIINGKHFY 2400
TIDGKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKRYFNTNTYIASTGYTIINGKHFY 2400
****;*****;*****;***** *****

FNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
FNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
FNTDGIMQIGVFKGPNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
FNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
FNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
*****;*****. *****

```

图16

YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIA 2500
 YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIA 2500
 YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIA 2500
 YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTYIA 2500
 YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTYIA 2500
 ***** **

STGYTIISGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
 STGYTIISGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
 STGYTIISGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
 STGYTIISGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
 STGYTIISGKHFFYFNTDGMQIGVFKGPDGFYFAPANTDANNIEGQAIR 2550

YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
 YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
 YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
 YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWATIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
 YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWATIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
 *****;*****.*****

NKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLL 2650
 NKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLL 2650
 NKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLL 2650
 NKNFYFRNGLPQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIDGQAIRYQNRFLHLL 2650
 NKNFYFRNGLPQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIDGQAIRYQNRFLHLL 2650
 *****.*****;*****

GKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
 GKIIYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
 GKIIYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
 GKIIYFGNNSKAVTGWQTINSKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
 GKIIYFGNNSKAVTGWQTINSKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 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

```

MSLVNRKQLEKMANVRFRTQEDEYVAILDALEEEYHNMSSENTVVEKYLKDKDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFRTQEDEYVAILDALEEEYHNMSSENTVVEKYLKDKDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFRTQEDEYVAILDALEEEYHNMSSENTVVEKYLKDKDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFVQEDEYVAILDALEEEYHNMSSENTVVEKYLKDKDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFVQEDEYVAILDALEEEYHNMSSENTVVEKYLKDKDINSLTDIYI 60
*****

DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKD 120
*****

VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLDNPRFDYNKFFRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLDNPRFDYNKFFRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLDNPRFDYNKFFRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLDNPRFDYNKFFRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLDNPRFDYNKFFRKRMEIY 180
*****

DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV 240
DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV 240
DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV 240
DKQKNFINYYKTQREENPDLIIDDIVKIYLSNEYSKDIDELNSYIEESLNKVTENSGNDV 240
DKQKNFINYYKTQREENPDLIIDDIVKIYLSNEYSKDIDELNSYIEESLNKVTENSGNDV 240
*****

RNFEEFKNGESFNLYEQELVERWNLAASDILRISALKEIGMYLDVDMPLPGIQPDLFES 300
RNFEEFKNGESFNLYEQELVERWNLAASDILRISALKEIGMYLDVDMPLPGIQPDLFES 300
RNFEEFKNGESFNLYEQELVERWNLAASDILRISALKEIGMYLAVAMPLPGIQPDLFES 300
RNFEEFKGGESFKLYEQELVERWNLAASDILRISALKEVGGVYLDVDMPLPGIQPDLFES 300
RNFEEFKGGESFKLYEQELVERWNLAASDILRISALKEVGGVYLDVDMPLPGIQPDLFES 300
*****

IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMVTKLEAIMKYKEYIPGYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMVTKLEAIMKYKEYIPGYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
*****

SSLGDMEASPLEVKIAFNKSGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLGDMEASPLEVKIAFNKSGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLGDMEASPLEVKIAFNKSGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLGDMEASPLEVKIAFNKSGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLGDMEASPLEVKIAFNKSGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
*****

DNDFNNTTNTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTINLSGPEAYAAAYQD 480
DNDFNNTTNTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTINLSGPEAYAAAYQD 480
DNDFNNTTNTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTINLSGPEAYAAAYQD 480

```

图2A

DNDFNTTTNAFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTTINLSGPEAYAAAYQD 480
DNDFNTTTNAFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTTINLSGPEAYAAAYQD 480
*****;*****

LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKRNIFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKRNIFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKRNIFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKRNIFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKRNIFE 540
*****;****

GSLGEDDNLDFSQNIVVDKEYLLEKISSLARSSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAAACNLFAK 600
GSLGEDDNLDFSQNIVVDKEYLLEKISSLARSSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAAACNLFAK 600
GSLGEDDNLDFSQNIVVDKEYLLEKISSLARSSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAAACNLFAK 600
GSLGEDDNLDFSQNTVVDKEYLLEKISSLARSSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAAACNLFAK 600
GSLGEDDNLDFSQNTVVDKEYLLEKISSLARSSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAAACNLFAK 600

TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYPNGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYPNGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYPNGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYPNGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYPNGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660

DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLLVK 720
DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLLVK 720
DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLLVK 720
DIFAGLDVDSLSTEIETAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLLVK 720
DIFAGLDVDSLSTEIETAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLLVK 720
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****

DKISELMPISISQDSIIVSANQYEVRIINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
DKISELMPISISQDSIIVSANQYEVRIINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
DKISELMPISISQDSIIVSANQYEVRIINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
DKVSELMPISISQDSIIVSANQYEVRIINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
DKVSELMPISISQDSIIVSANQYEVRIINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
;***

NPKENKITVKSKNLPFELSTLLQEIRNNSNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER 840
NPKENKITVKSKNLPFELSTLLQEIRNNSNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER 840
NPKENKITVKSKNLPFELSTLLQEIRNNSNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER 840
NPKENKIIVKSKNLPFELSTLLQEIRNNSNSSDIELEEKVMLAECEINVISNIDTQVVEGR 840
NPKENKIIVKSKNLPFELSTLLQEIRNNSNSSDIELEEKVMLAECEINVISNIDTQVVEGR 840
***** *****;*****;*****;*****;*****;*****

IEEAKNLTSDSINYIKDEFKLIIESISDALCDLKQQNELEDSHFISFEDISSETDEGFSIRF 900
IEEAKNLTSDSINYIKDEFKLIIESISDALCDLKQQNELEDSHFISFEDISSETDEGFSIRF 900
IEEAKNLTSDSINYIKDEFKLIIESISDALCDLKQQNELEDSHFISFEDISSETDEGFSIRF 900
IEEAKSLTSDSINYIKNEFKLIIESISDALYDLKQQNELEESHFISFEDILETDEGFSIRF 900
IEEAKSLTSDSINYIKNEFKLIIESISDALYDLKQQNELEESHFISFEDILETDEGFSIRF 900
*****;*****;***** *****;***** *****

图2B

```

INKETGESIFVETEKIFSEYANHITTEEISKIKGTIFDVTNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
INKETGESIFVETEKIFSEYANHITTEEISKIKGTIFDVTNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
INKETGESIFVETEKIFSEYANHITTEEISKIKGTIFDVTNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
IDKETGESIFVETEKAFSEYANHITTEEISKIKGTIFDVTNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
IDKETGESIFVETEKAFSEYANHITTEEISKIKGTIFDVTNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
*:*****:*****:*****

AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
*****

LLPTLSEGLPIIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLLREQIEAKIGIMAVNLTTATTAIIT 1080
LLPTLSEGLPIIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLLREQIEAKIGIMAVNLTTATTAIIT 1080
LLPTLSEGLPIIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLLREQIEAKIGIMAVNLTTATTAIIT 1080
LLPTLSEGLPVIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLLREQIEAKIGIMAVNLTAATTAIIT 1080
LLPTLSEGLPVIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLLREQIEAKIGIMAVNLTAATTAIIT 1080
*****:*****:*****

SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDYFKHVSLVETEGVFTLLD 1140
SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDYFKHVSLVETEGVFTLLD 1140
SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDYFKHVSLVETEGVFTLLD 1140
SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDYFHSISLAESEGAFTSLD 1140
SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDYFHSISLAESEGAFTSLD 1140
*****:*****:***:***:*** **

DKIMMPQDDLVISEIDFNNSIVLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
DKIMMPQDDLVISEIDFNNSIVLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
DKIMMPQDDLVISEIDFNNSIVLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
DKIMMPQDDLVISEIDFNNSITLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
DKIMMPQDDLVISEIDFNNSITLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
*****

SIYDVLEVQKEELDLSKDLMLPNAPNRVFAWETGWTPLRLSLNDGKLLDRIRDNYEG 1260
SIYDVLEVQKEELDLSKDLMLPNAPNRVFAWETGWTPLRLSLNDGKLLDRIRDNYEG 1260
SIYDVLEVQKEELDLSKDLMLPNAPNRVFAWETGWTPLRLSLNDGKLLDRIRDNYEG 1260
SIYDVLEVQKEELDLSKDLMLPNAPNRVFAWETGWTPLRLSLNDGKLLDRIRDNYEG 1260
SIYDVLEVQKEELDLSKDLMLPNAPNRVFAWETGWTPLRLSLNDGKLLDRIRDNYEG 1260
*****

EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPIITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPIITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPIITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPVITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPVITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
*****:*****

GTYALSLSQYNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTIESDKIKKGDLEIGILSTLSIEEN 1380
GTYALSLSQYNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTIESDKIKKGDLEIGILSTLSIEEN 1380
GTYALSLSQYNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTIESDKIKKGDLEIGILSTLSIEEN 1380

```

图2C

137

```

PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKIFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVG 1860
PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKIFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVG 1860
PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKIFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVG 1860
PSYYVEGLLNYDLGLISLYNEKIFYINNFGMMVSGLVYINDSLYYFKPPIKNLITGFTTIG 1860
PSYYVEGLLNYDLGLISLYNEKIFYINNFGMMVSGLVYINDSLYYFKPPIKNLITGFTTIG 1860
****;***;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;***
DDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG 1920
DDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG 1920
DDKYYFNPINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG 1920
DDKYYFNPINGGAASVGETIIDGKNYYFSQNGVLQTVGFSTEDGFKYFAPADTLDENLEG 1920
DDKYYFNPINGGAASVGETIIDGKNYYFSQNGVLQTVGFSTEDGFKYFAPADTLDENLEG 1920
***** *****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****
EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN 1980
EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN 1980
EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN 1980
EAIDFTGKLTIDENVYFCDNYRAAIEWQTLDEVEYFSTDTGRAFKGLNQIGDDKIFYFN 1980
EAIDFTGKLTIDENVYFCDNYRAAIEWQTLDEVEYFSTDTGRAFKGLNQIGDDKIFYFN 1980
***** *****;***;***;***;***;***;***;***;***;*****;***;***
SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFA 2040
SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFA 2040
SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFA 2040
SDGIMQKGFVNINDKTFYFDDSGVMKSGYTEIDGKYFFYFAENGEMQIGVFNTADGFKYFA 2040
SDGIMQKGFVNINDKTFYFDDSGVMKSGYTEIDGKYFFYFAENGEMQIGVFNTADGFKYFA 2040
***;*****;***;..***** *****;*****;***** *****
HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKIIYYFDDSFATVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKIIYYFDDSFATVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKIIYYFDDSFATVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
HHDEDLGNEEGEALSYSYSGILNFNKIIYYFDDSFATVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
HHDEDLGNEEGEALSYSYSGILNFNKIIYYFDDSFATVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
**;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****
LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIG 2160
LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIG 2160
LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIG 2160
ISIINDGKYYFNDDSGIMQIGFVTINNEVFYFSDSGIVESGMQNIDDNYFYIDENGLVQIG 2160
ISIINDGKYYFNDDSGIMQIGFVTINNEVFYFSDSGIVESGMQNIDDNYFYIDENGLVQIG 2160
*;****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;***
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
*****

```

图2E

```

KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGI MRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGI MRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGI MRTGLISFENNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
KYYFDPETKKAYKGINVIDDIKYYFDENGIMRTGLITFEDNHYYFNEDGIMQYGYLNIED 2280
KYYFDPETKKAYKGINVIDDIKYYFDENGIMRTGLITFEDNHYYFNEDGIMQYGYLNIED 2280
****:***** ****:*****:*****:****:****:*****:****:****:*****

```

```

KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYYFTDEYI 2340
KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYYFTDEYI 2340
KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYYFTDEYI 2340
KTFYFSEDGIMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYYFTDEYI 2340
KTFYFSEDGIMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYYFTDEYI 2340
* ***,****:*****

```

```

AATGSVIIDGEEYYFDPDPAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 2, 630)
AATGSVIIDGEEYYFDPDPAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 25, VPI10463)
AATGSVIIDGEEYYFDPDPAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 6)
AATGSVIIDGEEYYFDPDPAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 21, R20291)
AATGSVIIDGEEYYFDPDPAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 23, CD196)
*****

```

图2F

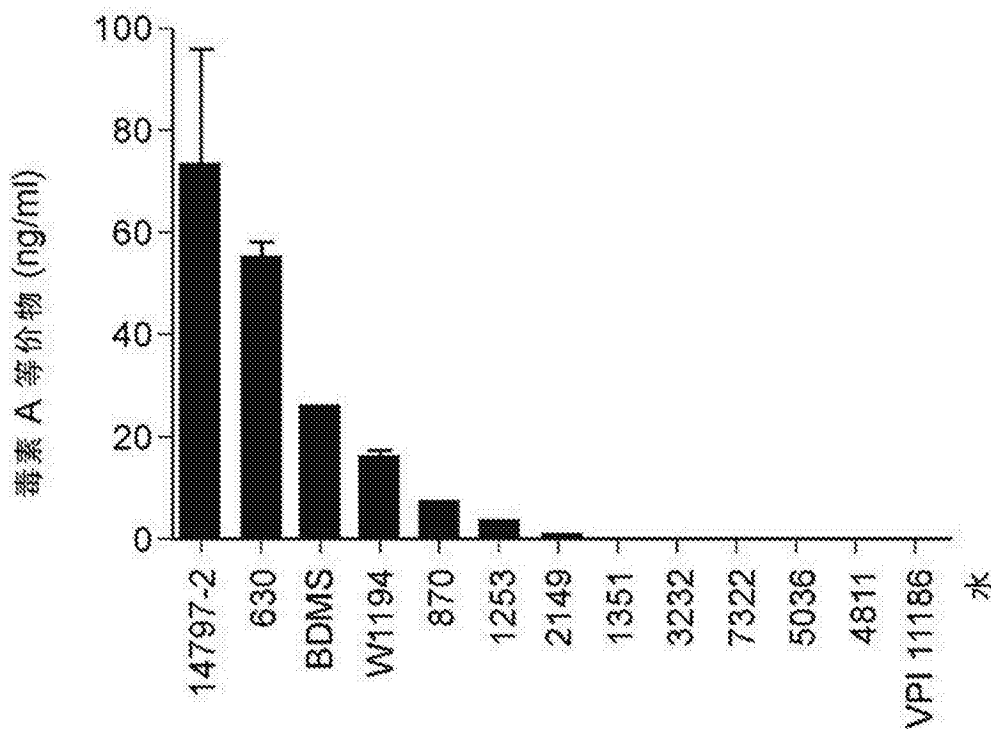


图3

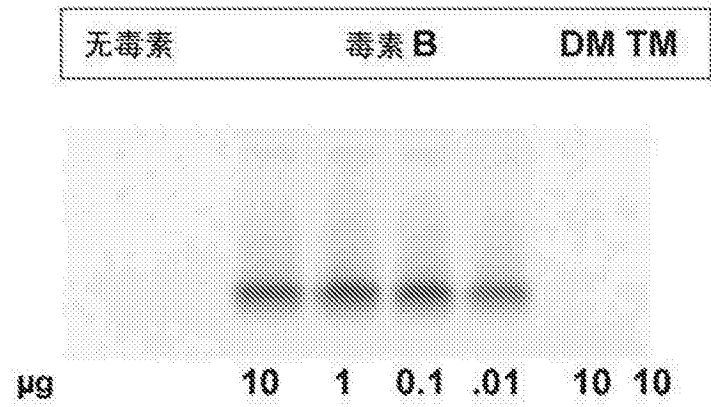


图4A

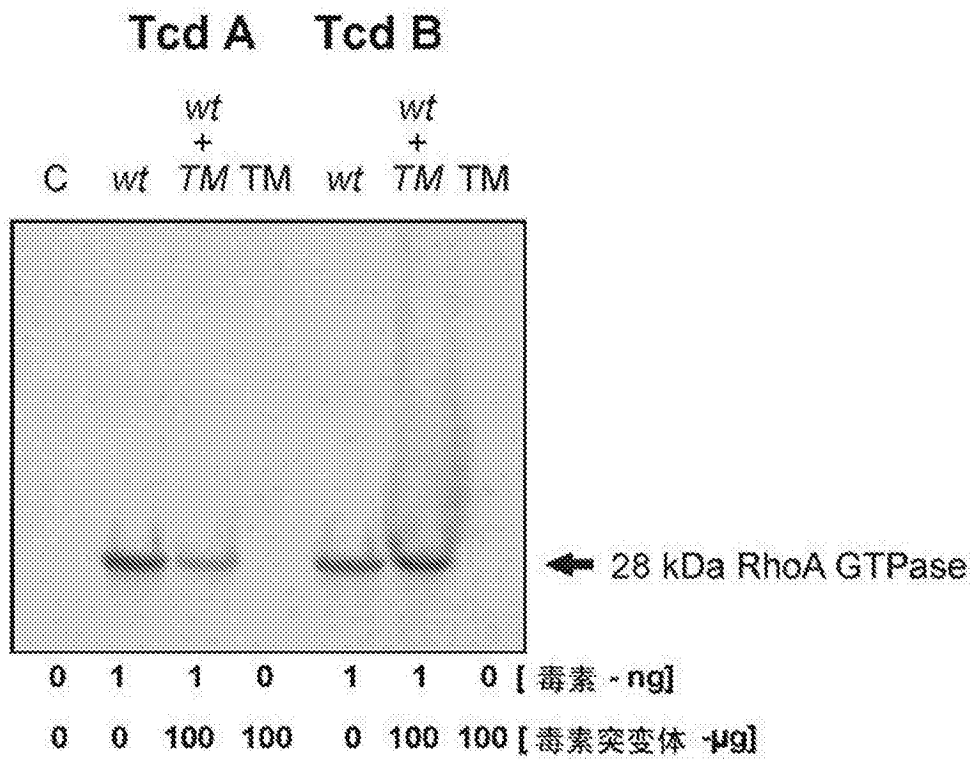


图4B

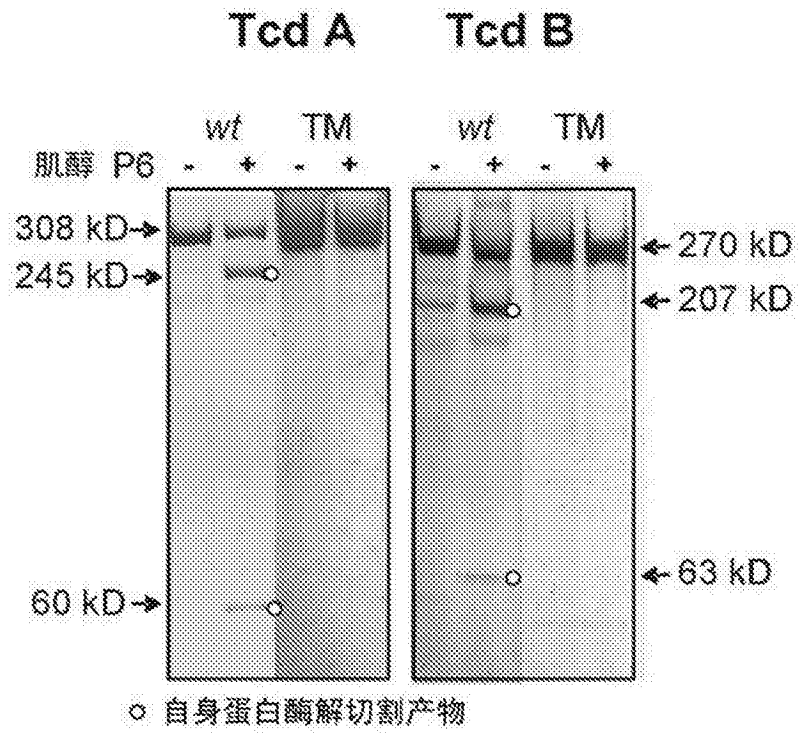


图5

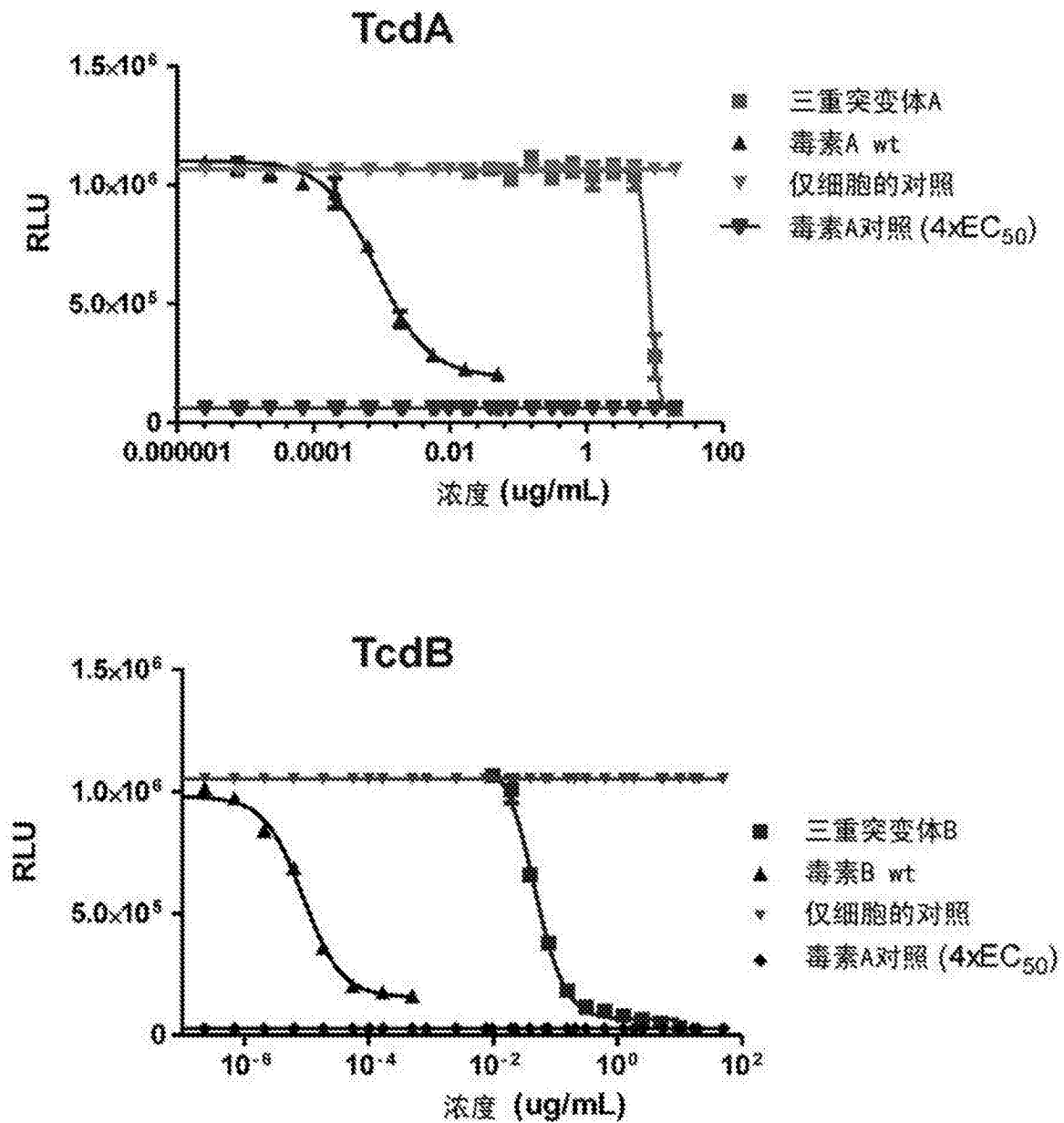
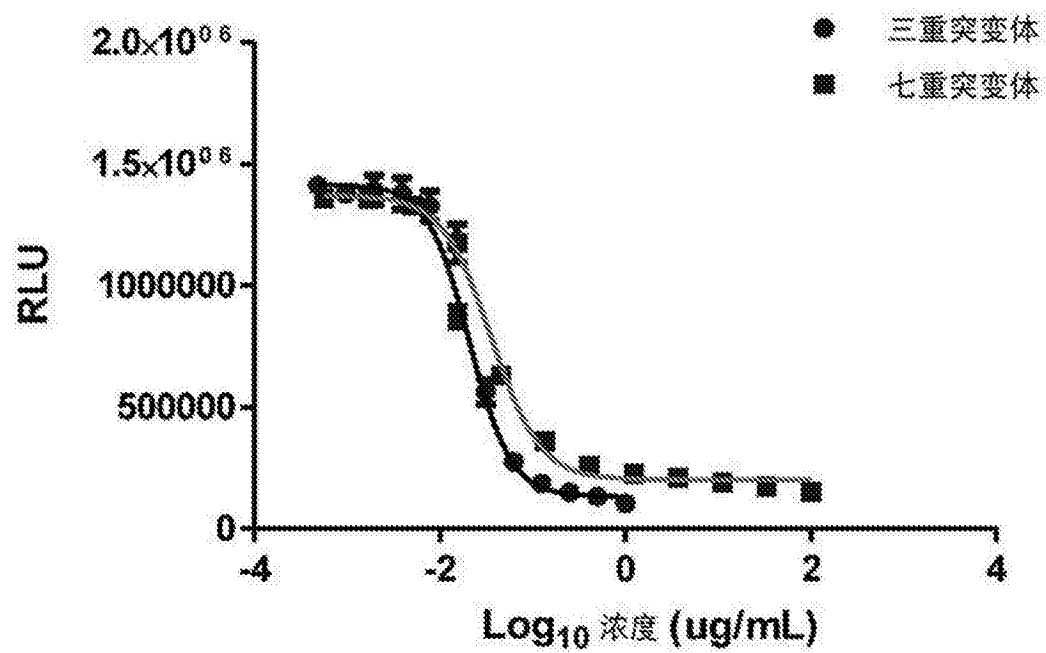


图6



	三重突变体	七重突变体
EC ₅₀	0.02078	0.03590

图7

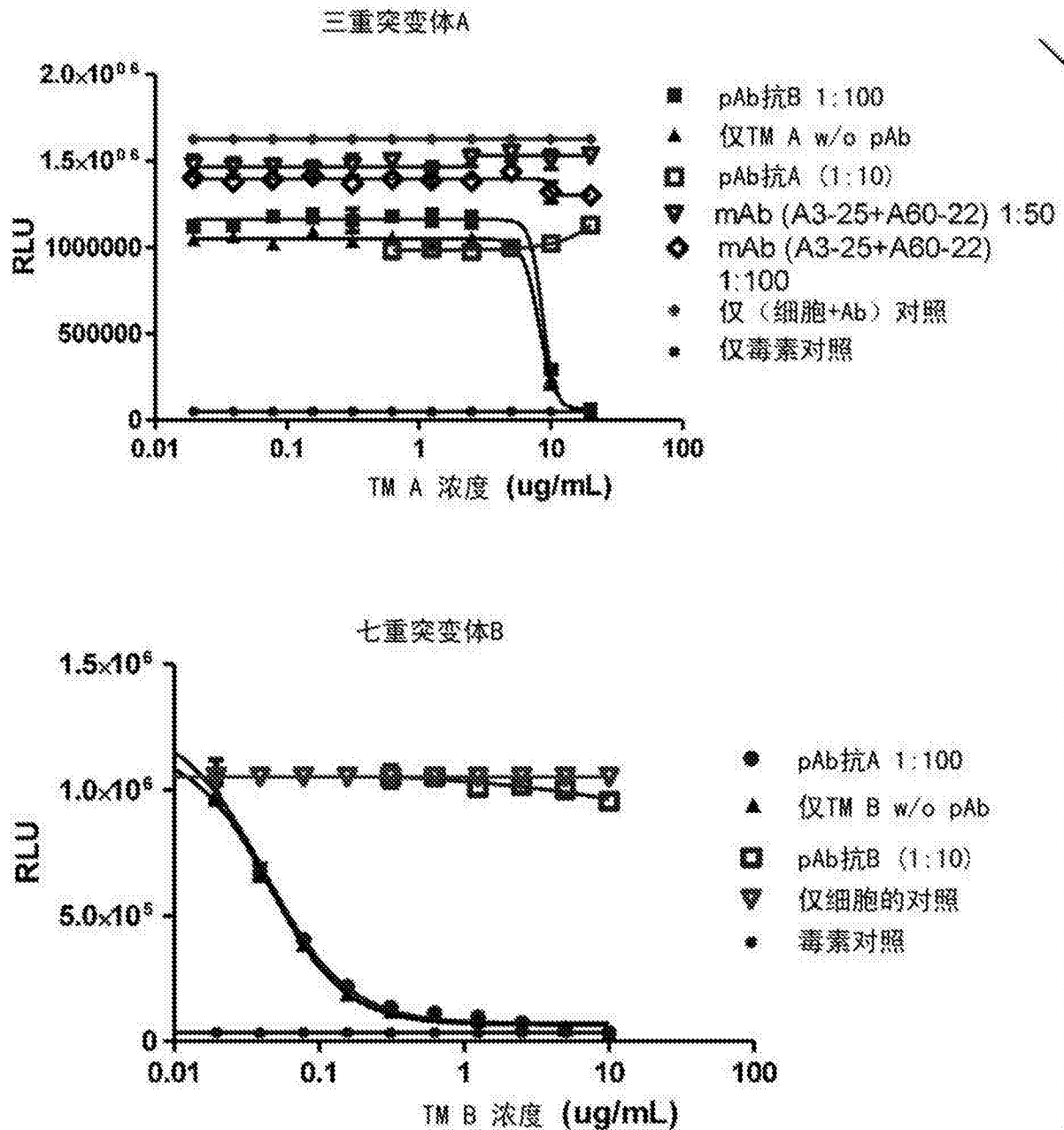


图8

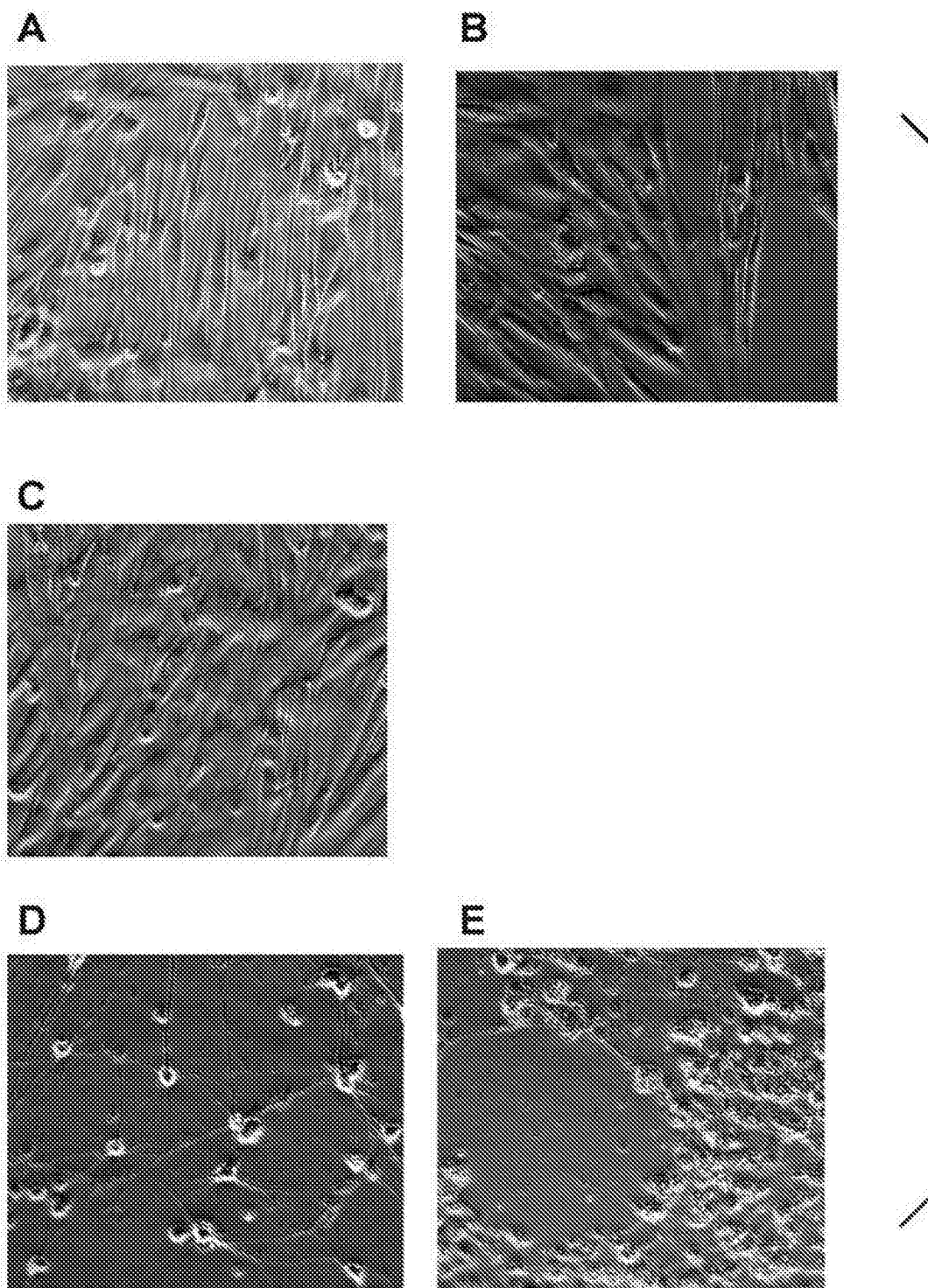


图9

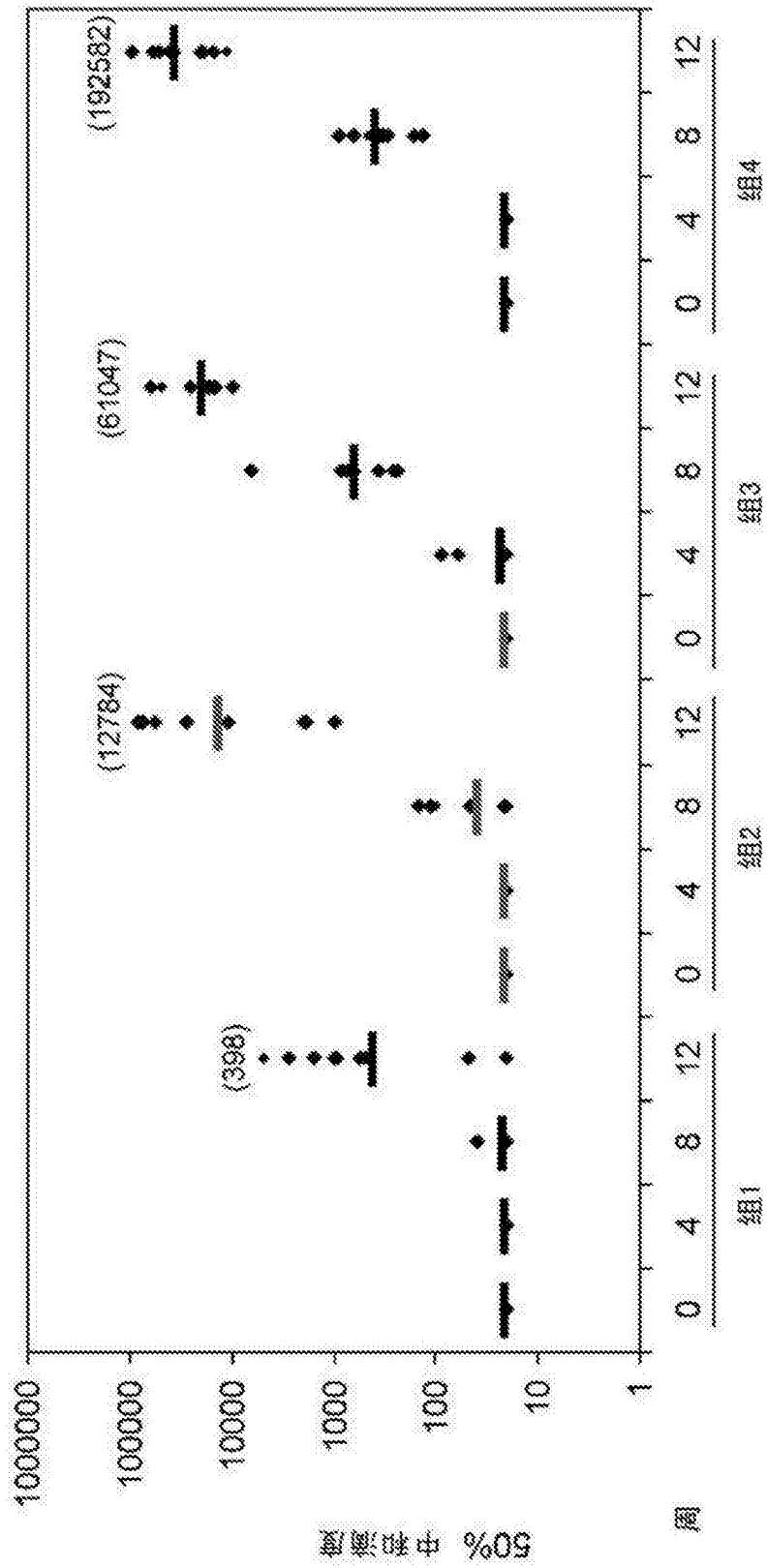


图10

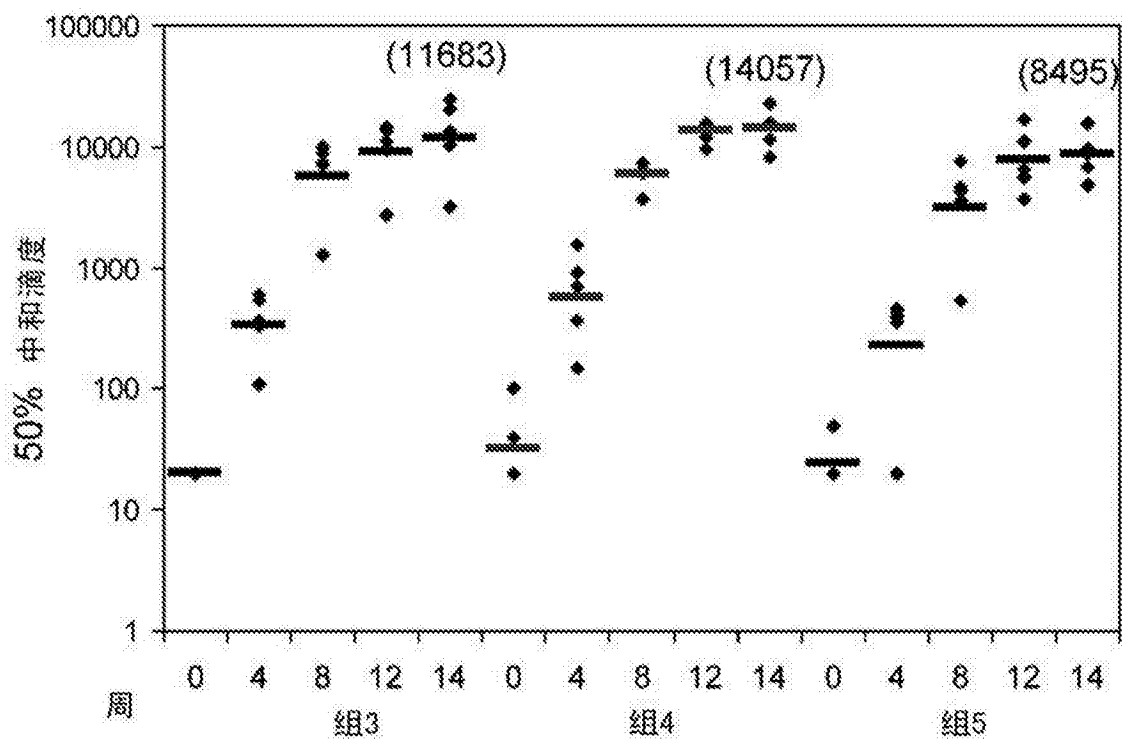


图11A

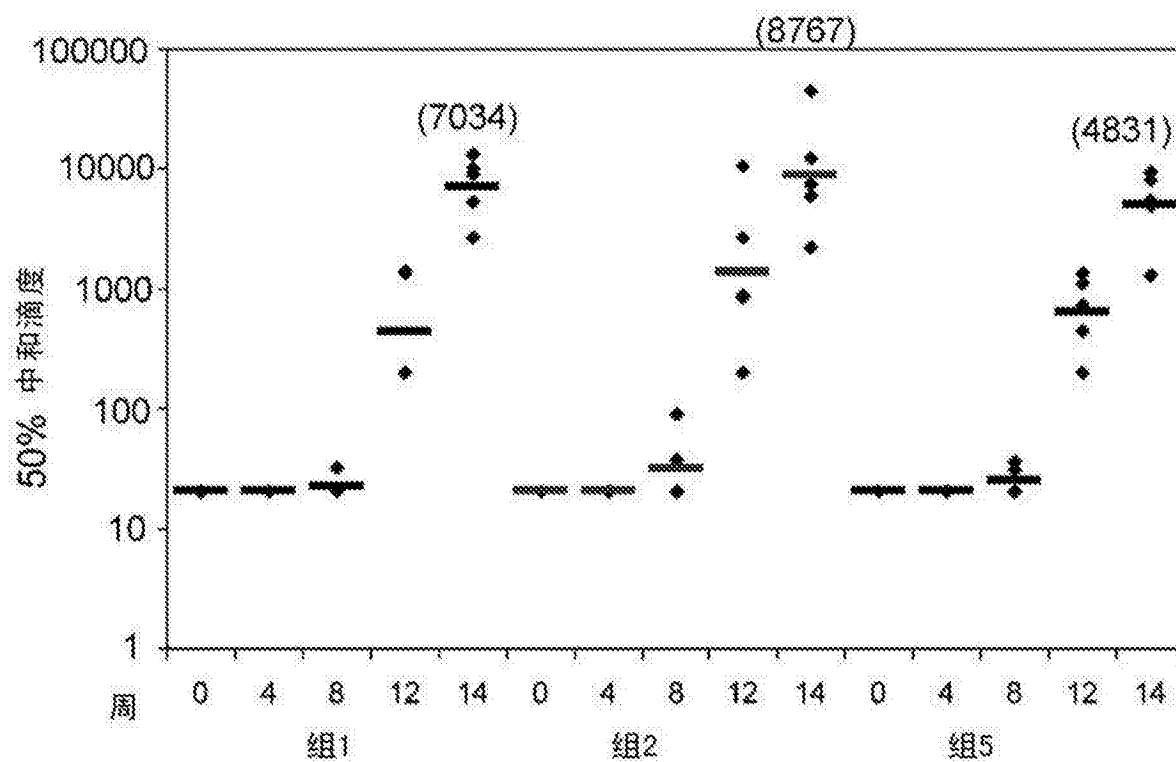


图11B

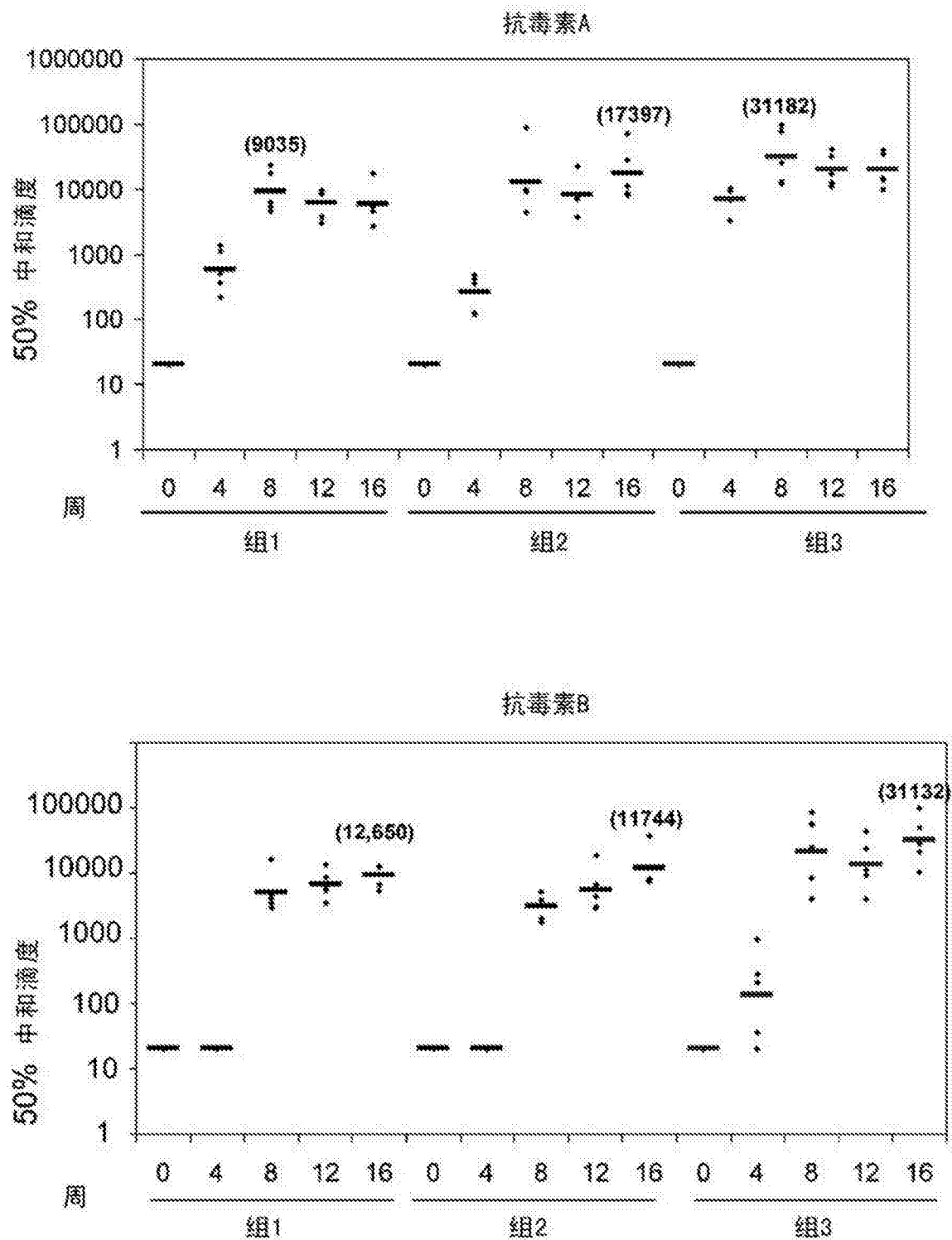


图12

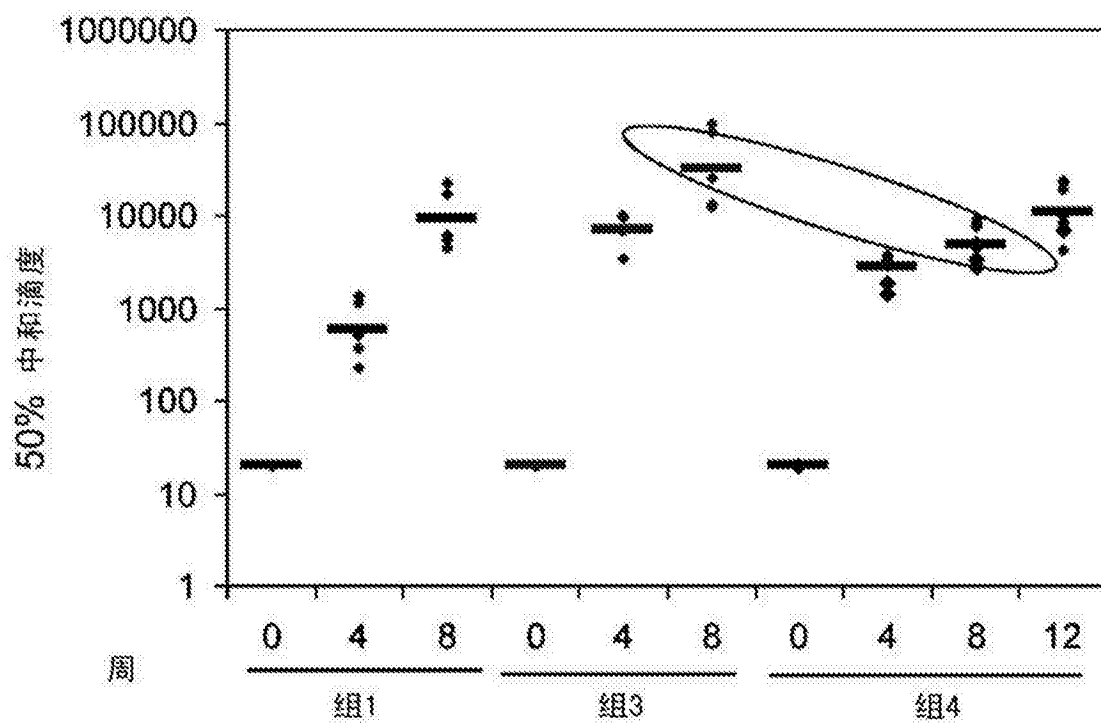


图13A

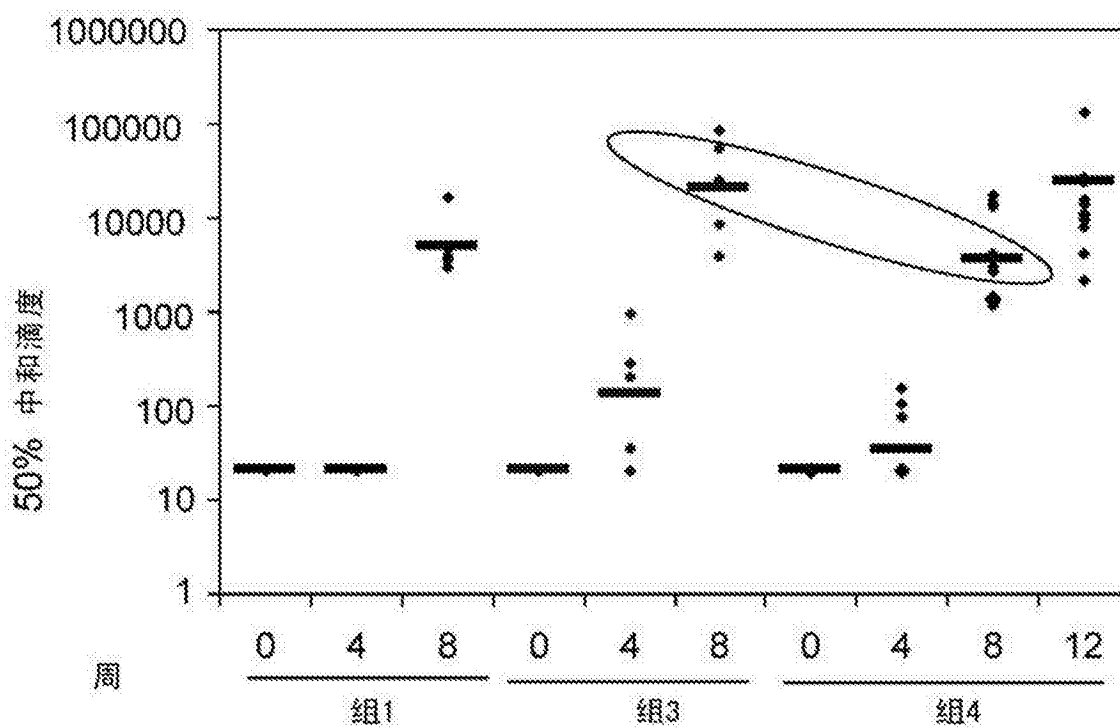


图13B

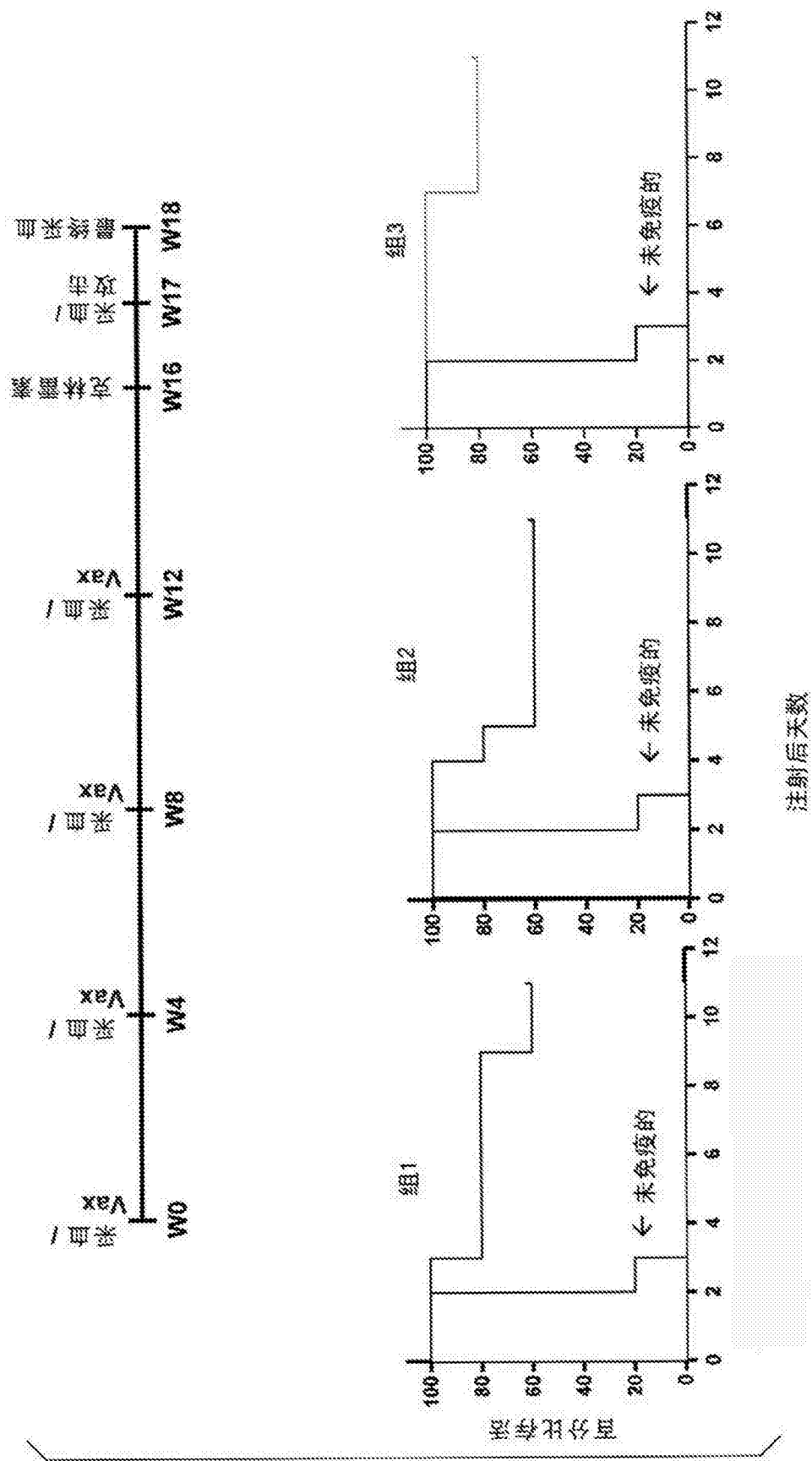


图14

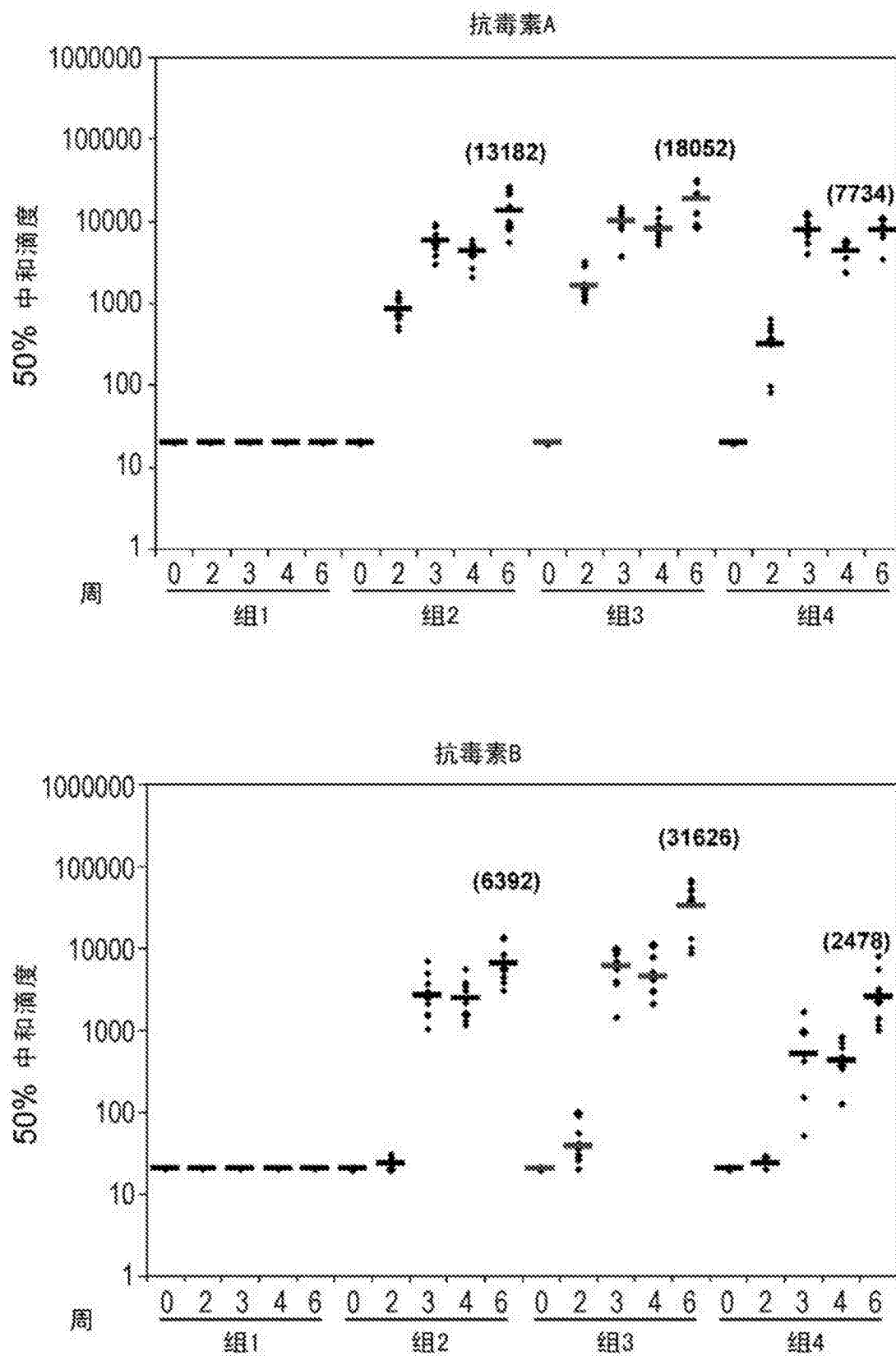


图15

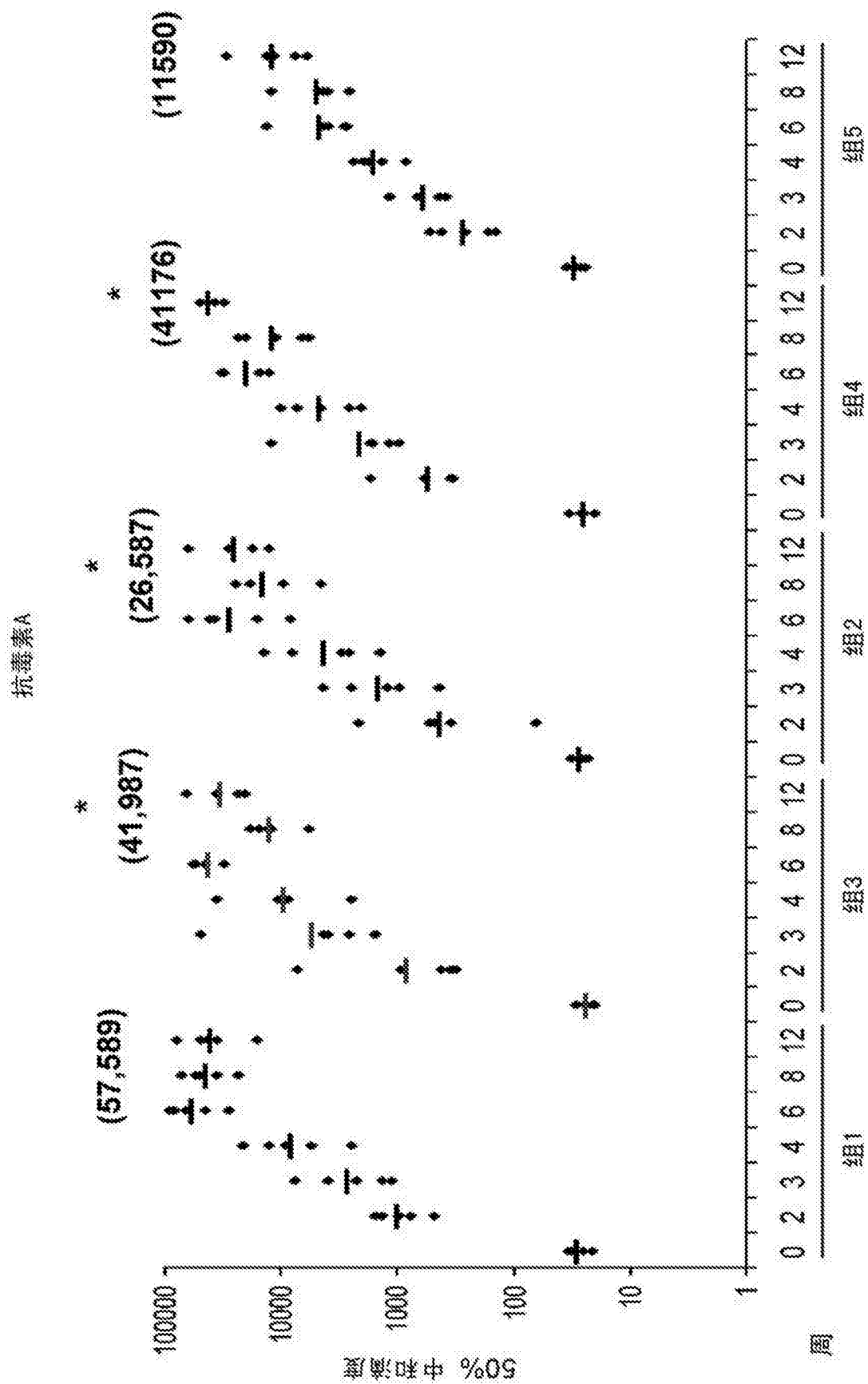


图16A

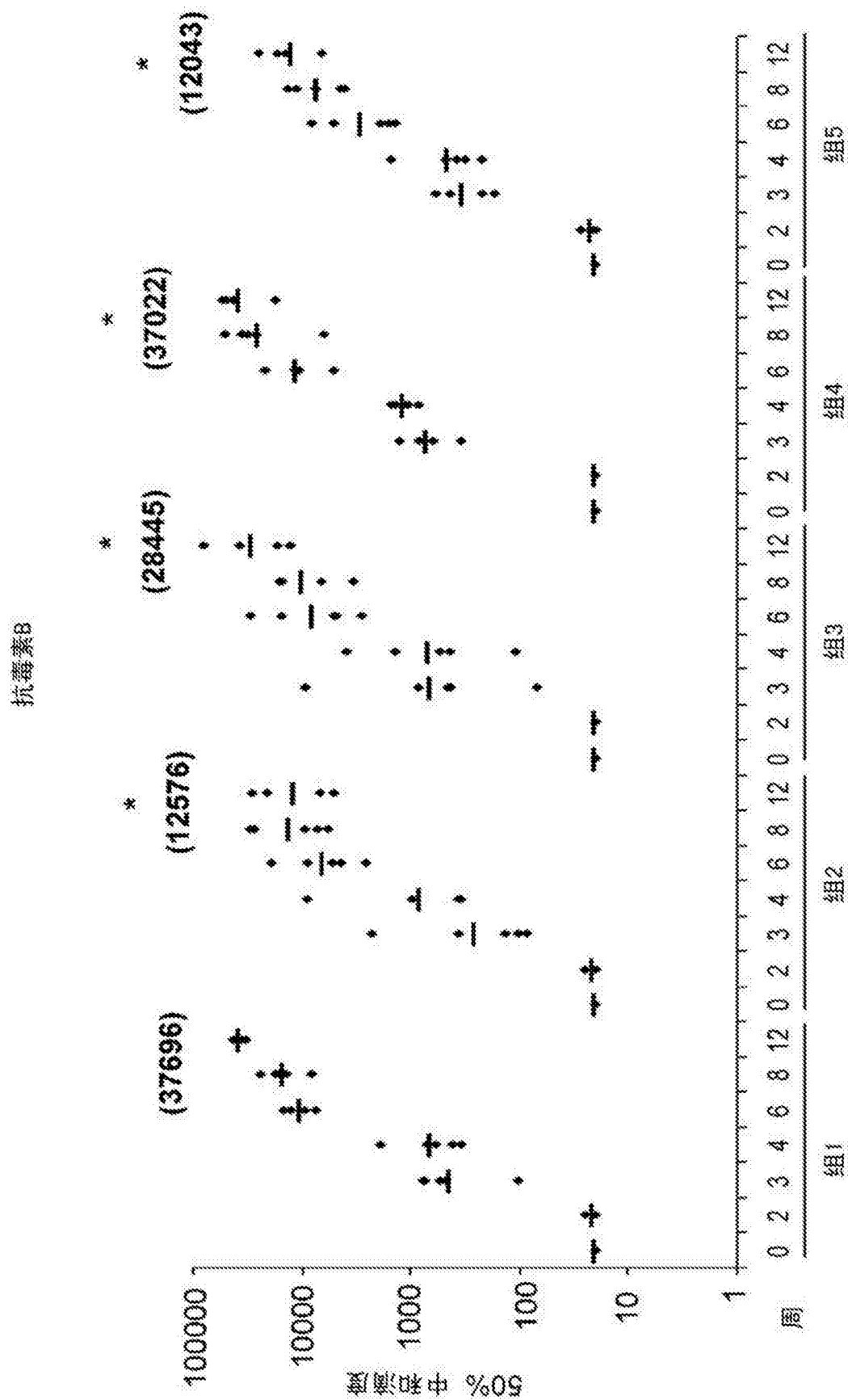


图16B

可变轻链 (m μ K)

MKLPVRLLVLMFWIPGSSSDVVMTHHTPLSLPVSLGDQASMSCRS
SQSLIHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLISKVSNRFSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTTYFPYTFGGGTREIKRAD
AAPTVSIFPPSS (SEQ ID NO: 36)

可变重链 (mIgE)

MYLGLNCVFIVFLLKGVQSEVNLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS
GFTFTNYWMNWRQSPEKGLEWIAEIRLKSHNYATHFAESVKG
RFTISRDDSKSAVSLQMTNLTPEDTGIFYCTWDYYGNPAFVYWG
QGTLVTVSAASIRNPQLYPLKPKGTASMTLGCLVKDYFPGPVT
VTWYSDSLNMSTVN (SEQ ID NO: 37)

图17

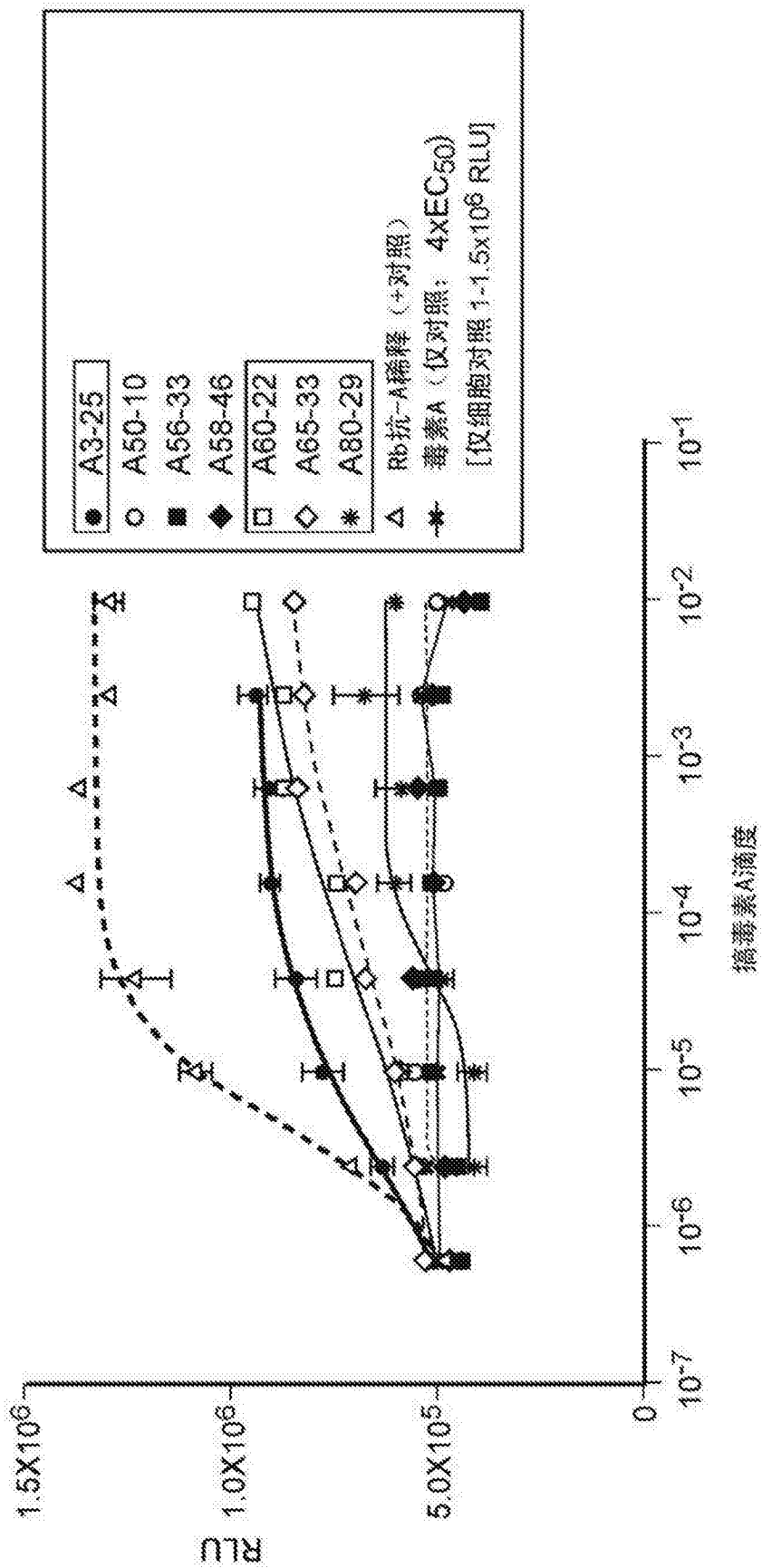


图18

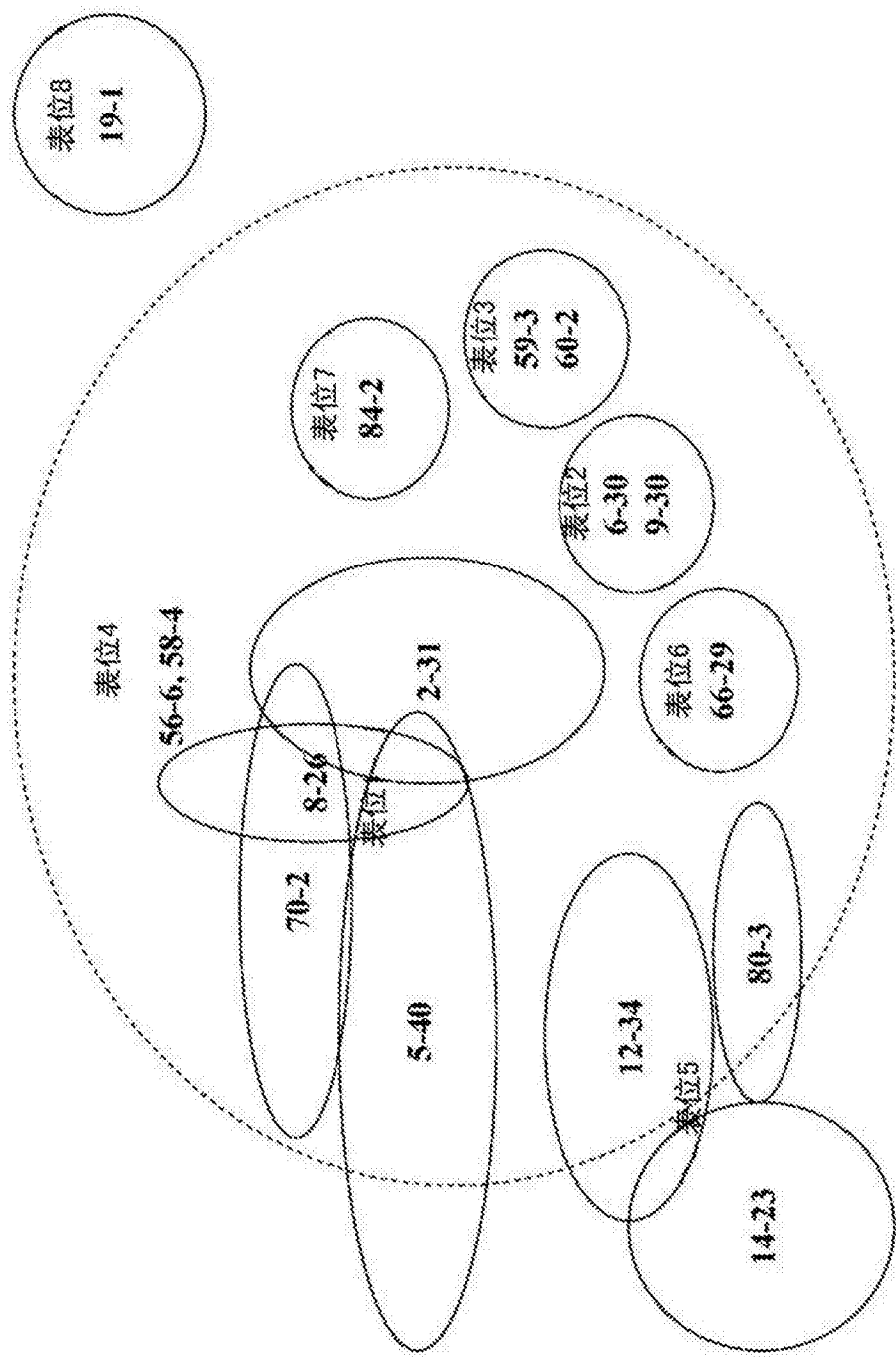


图19

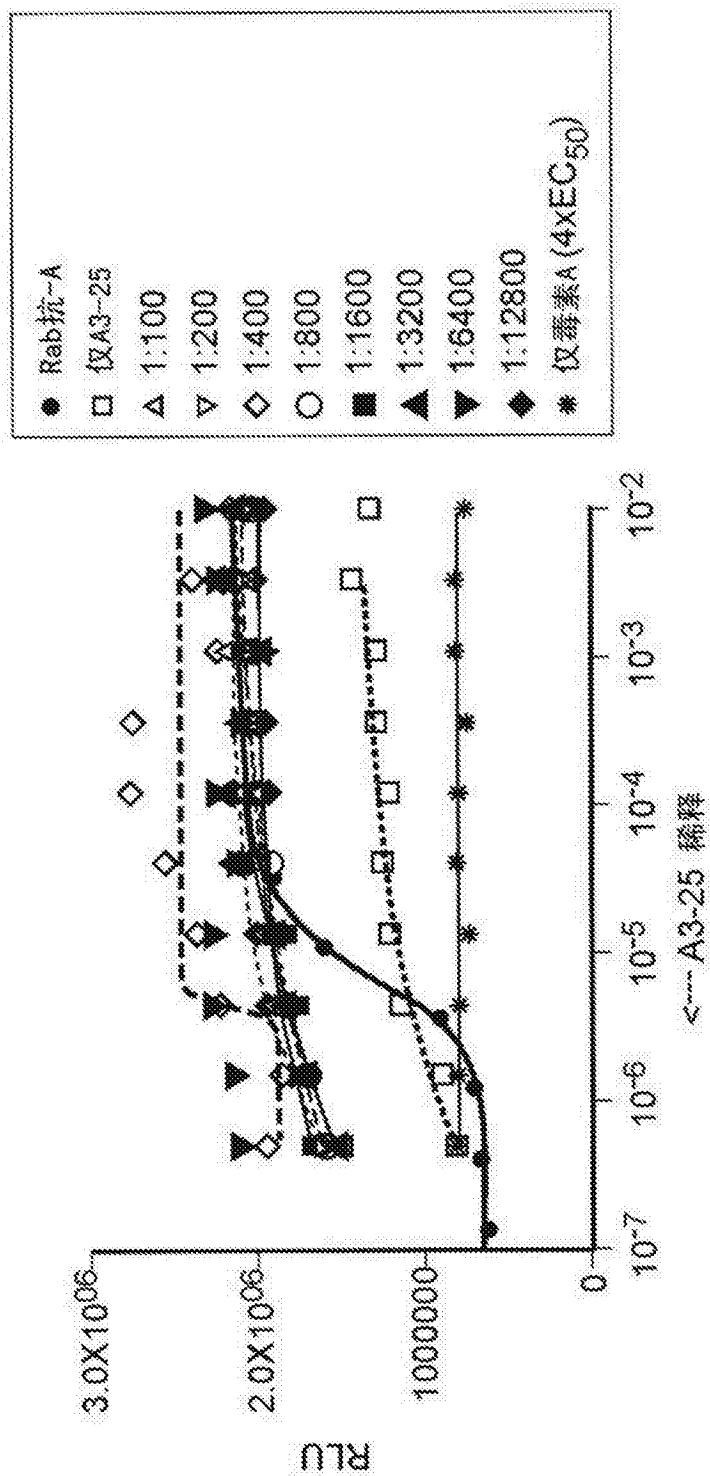


图20A

由mAb A3-25加A65-33稀释中和毒素A

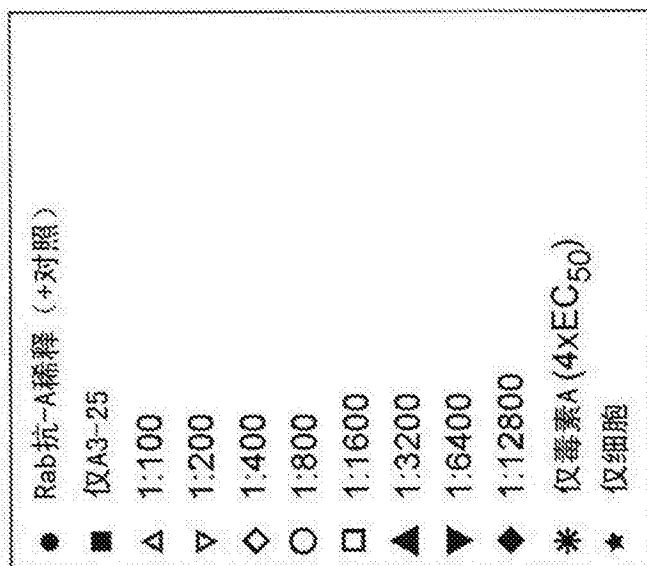
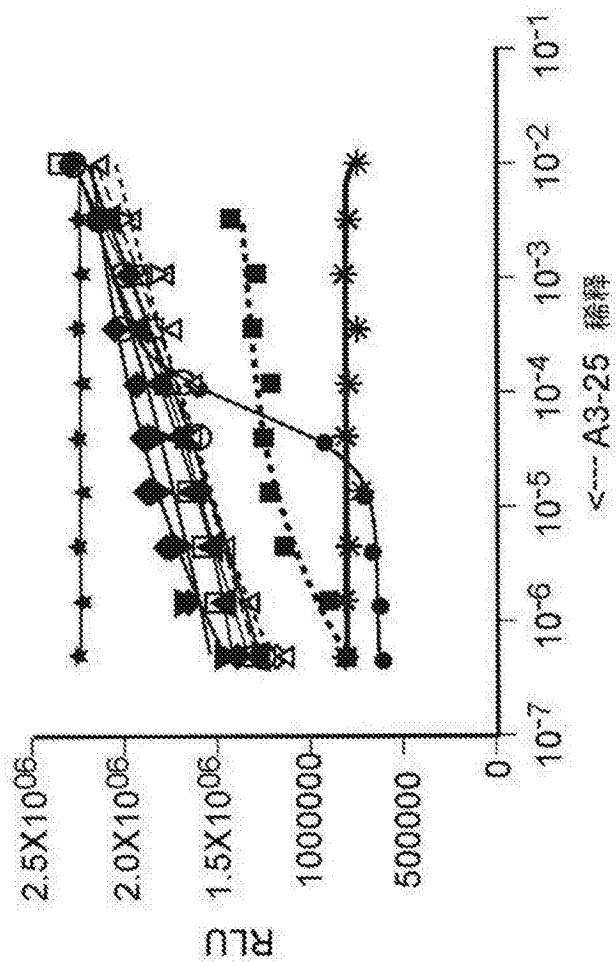


图20B

由mAb A3-25加A30-29稀释中和毒素A

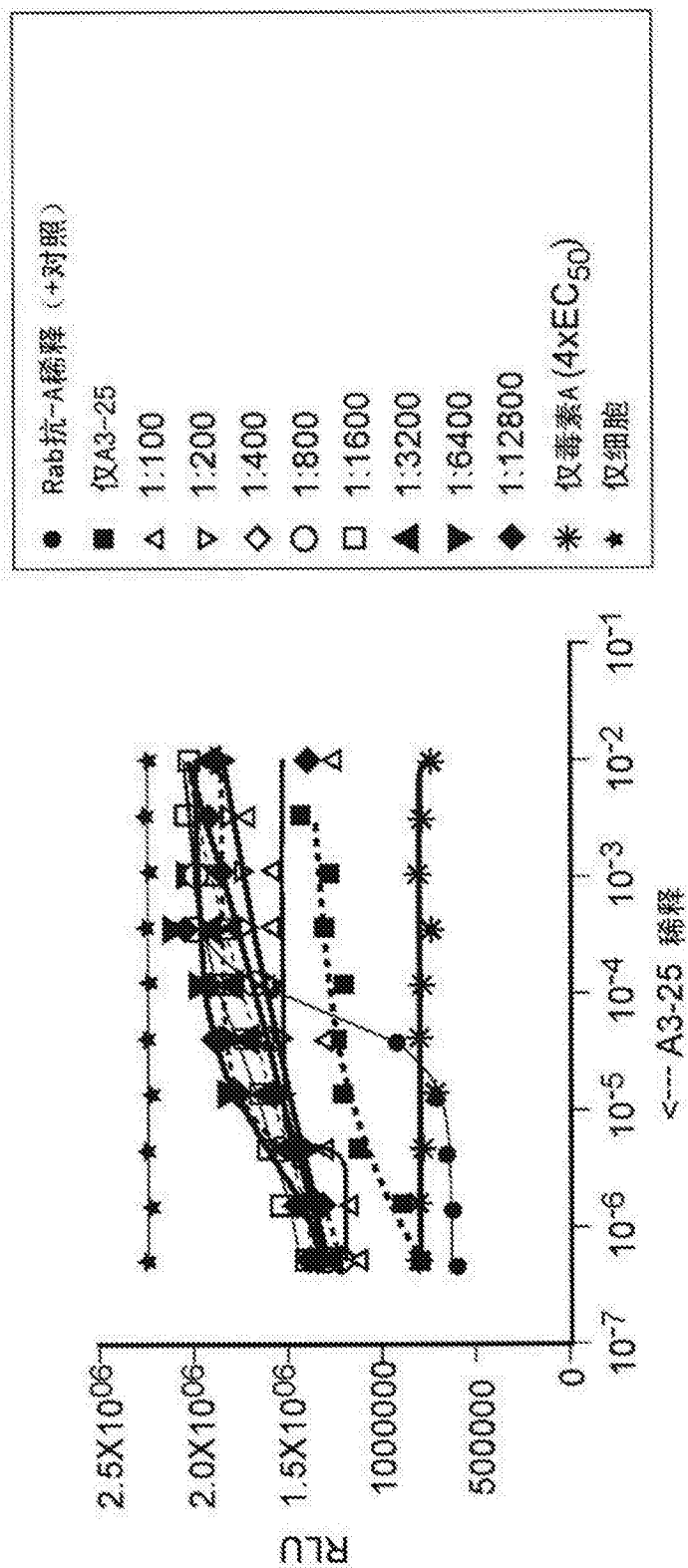


图20C

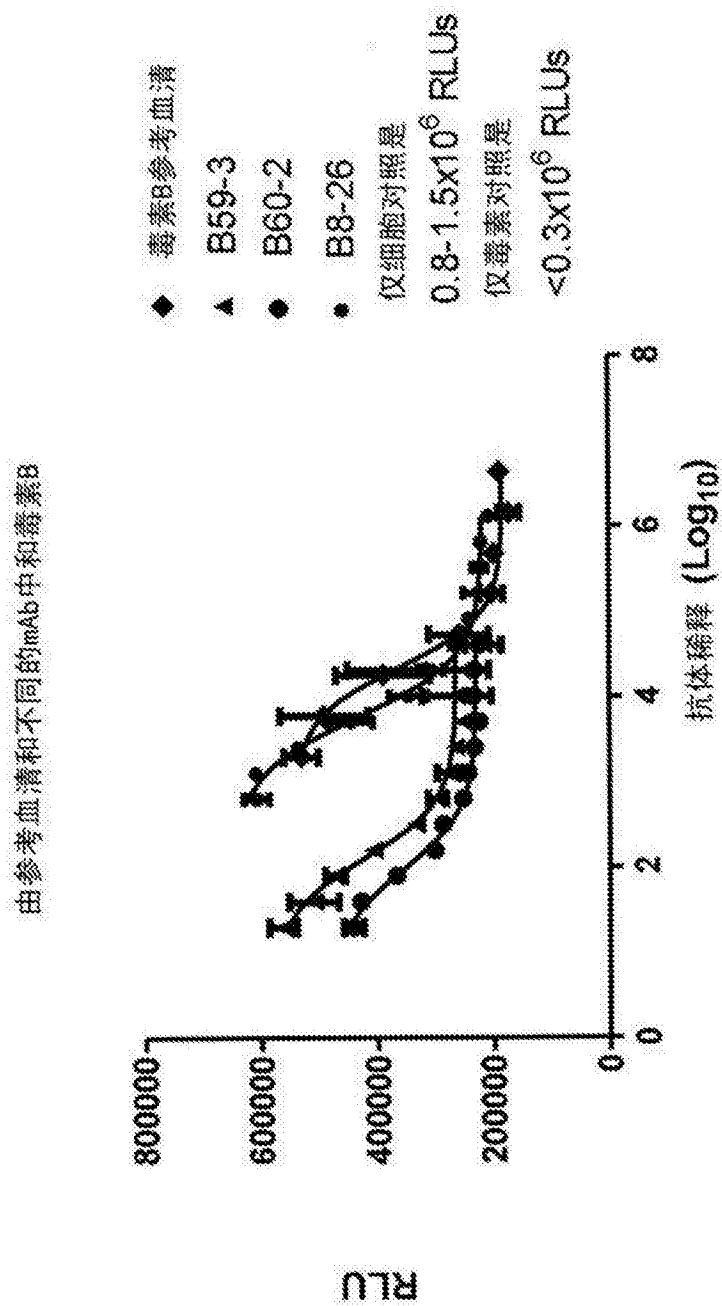


图21A

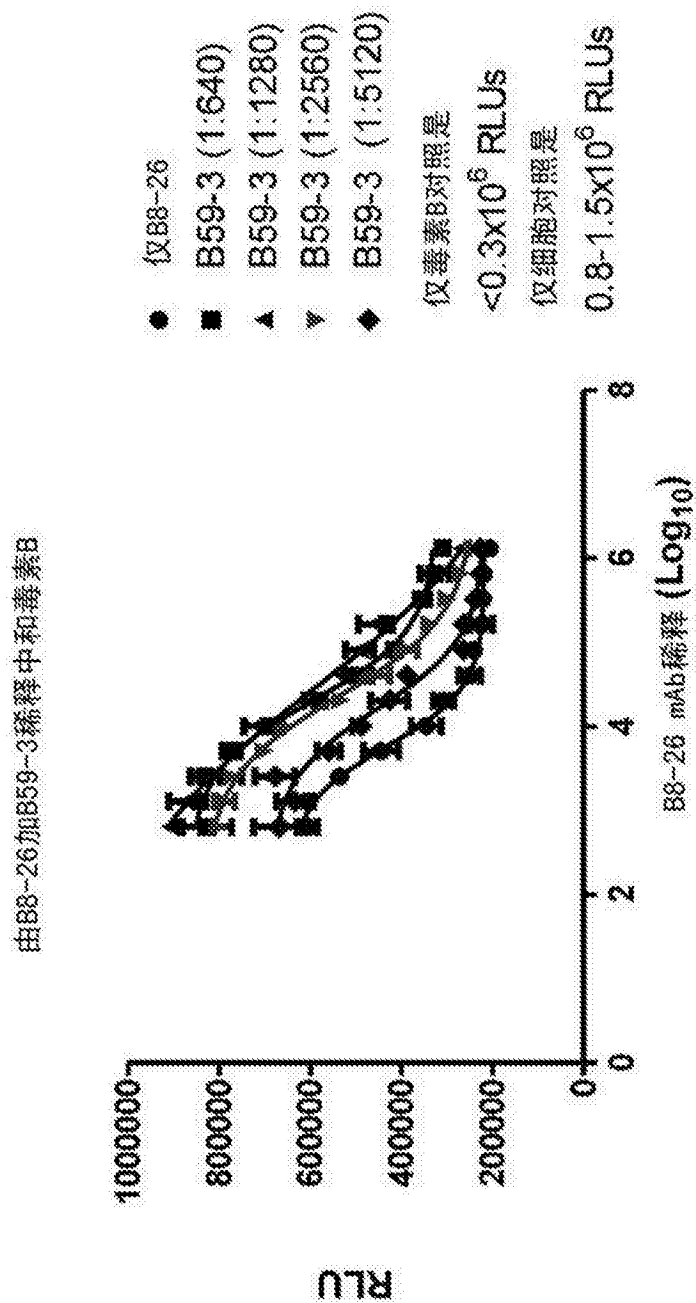


图21B

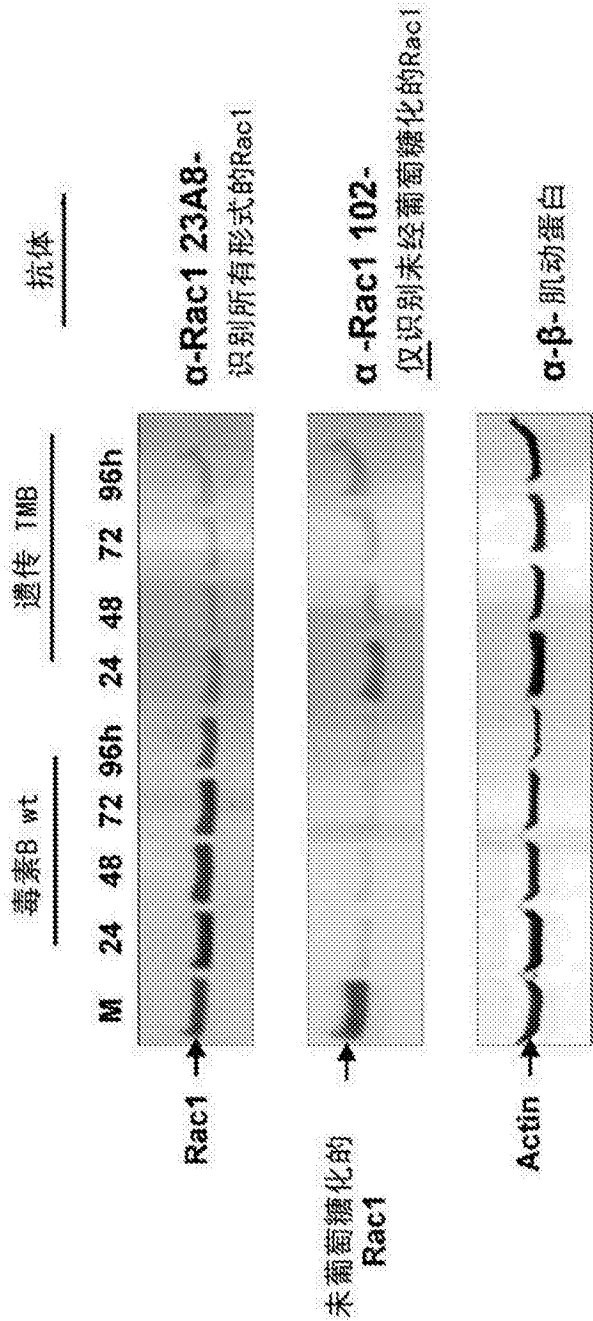


图22

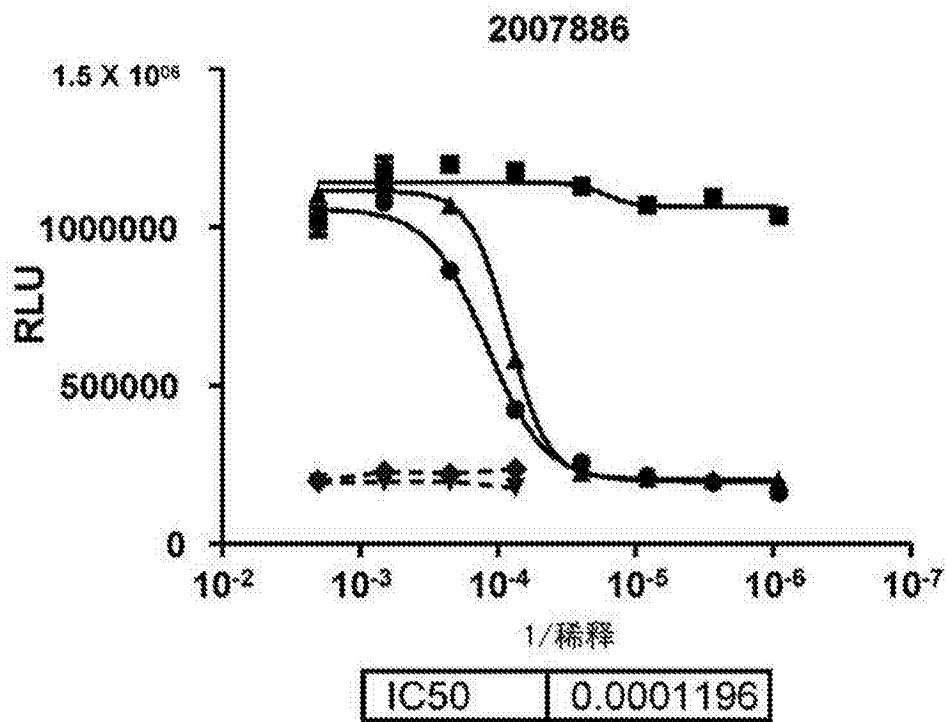


图23A

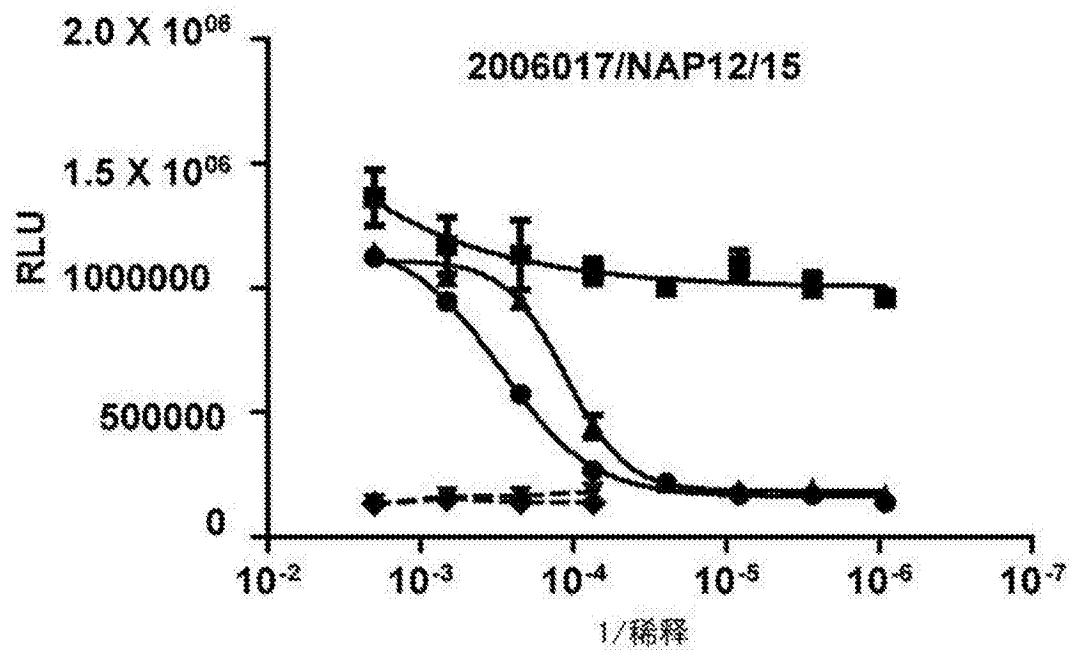


图23B

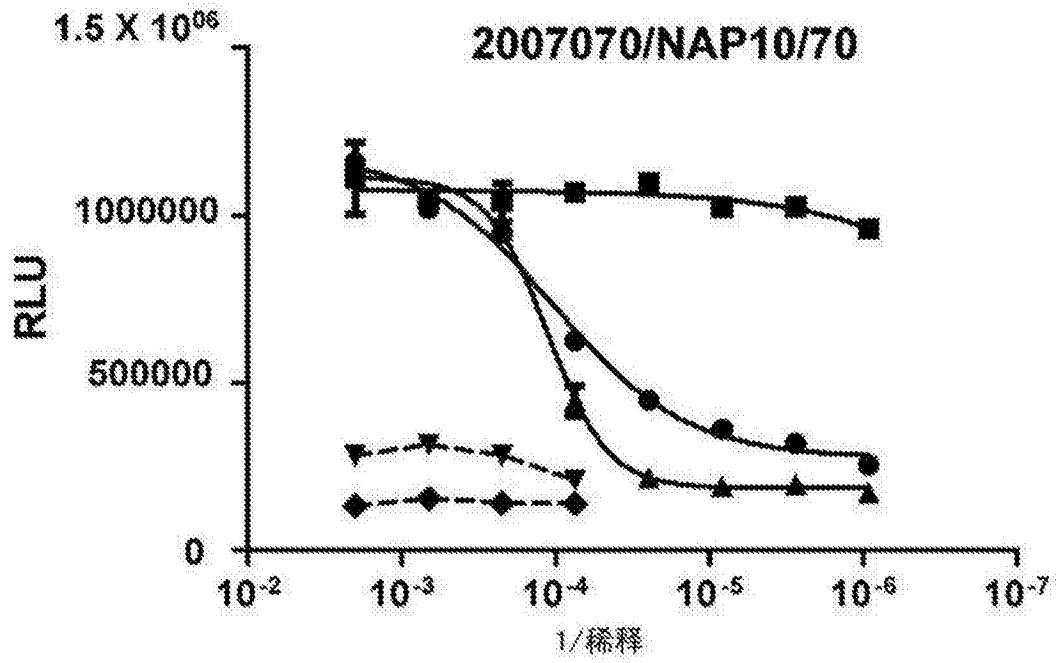


图23C

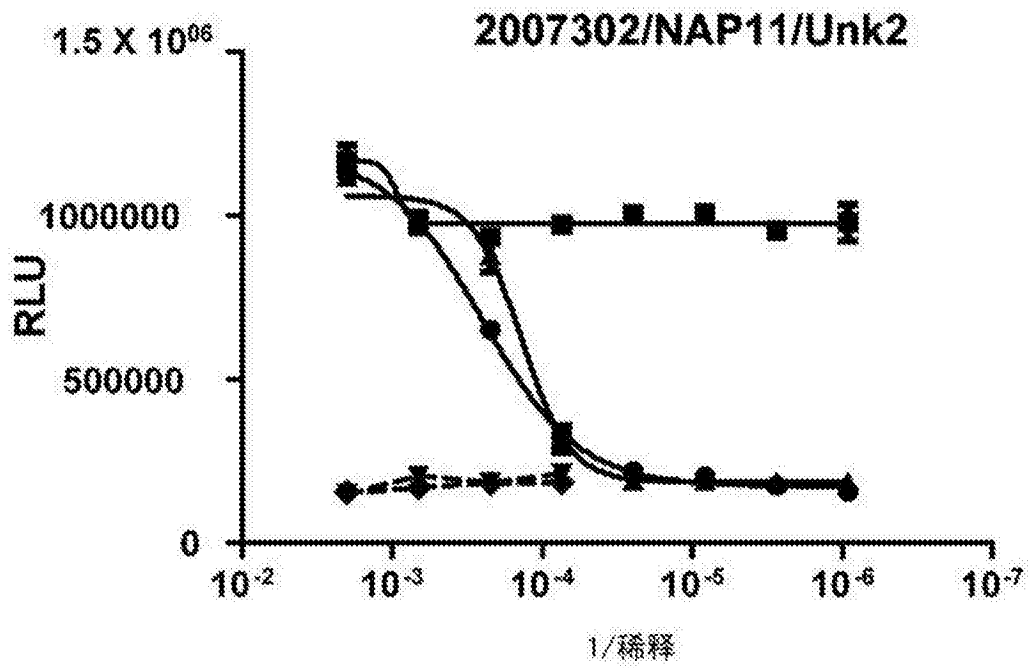


图23D

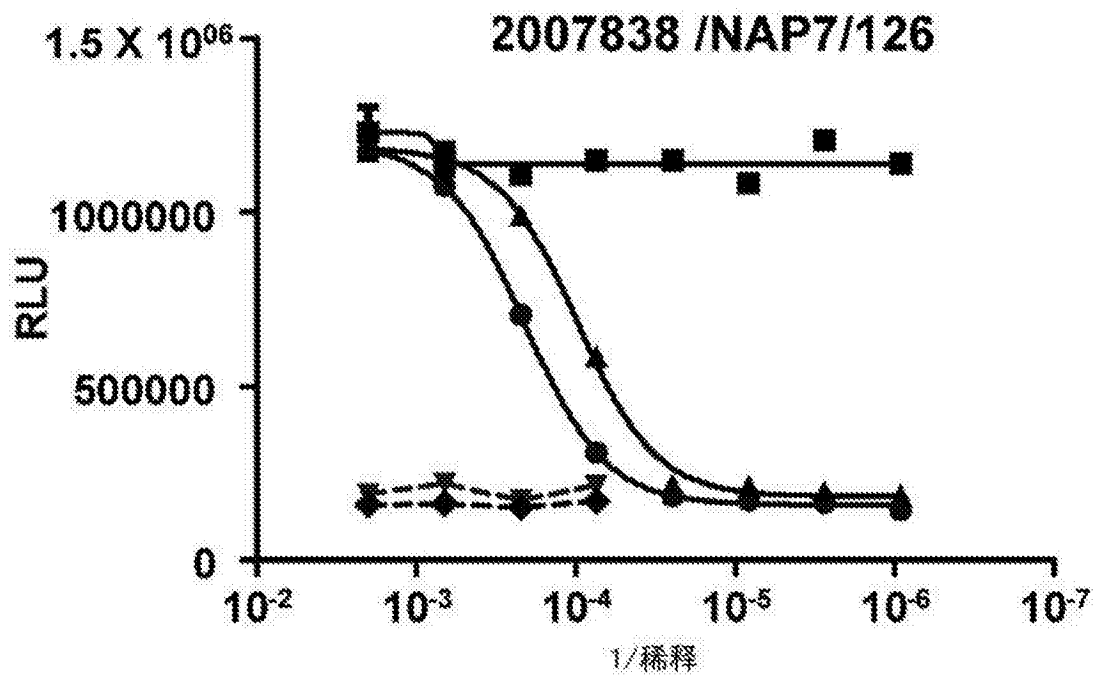


图23E

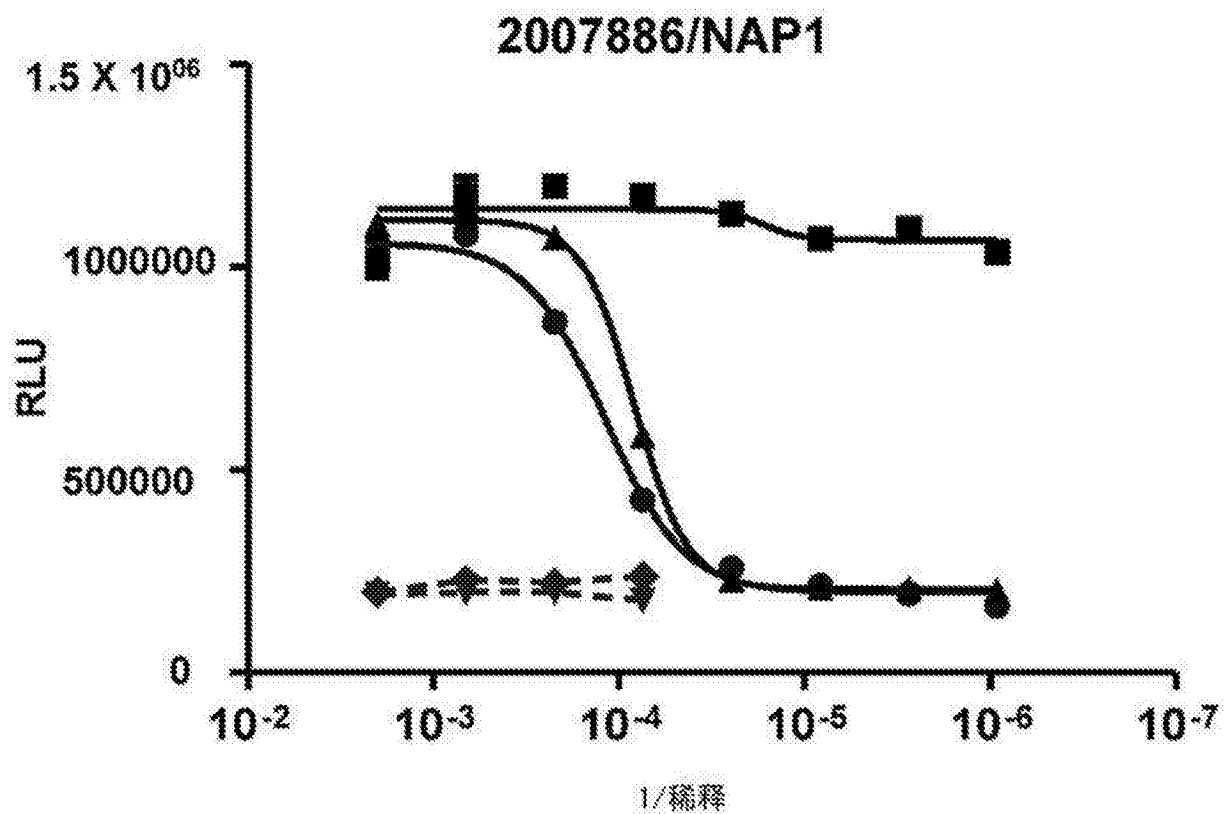


图23F

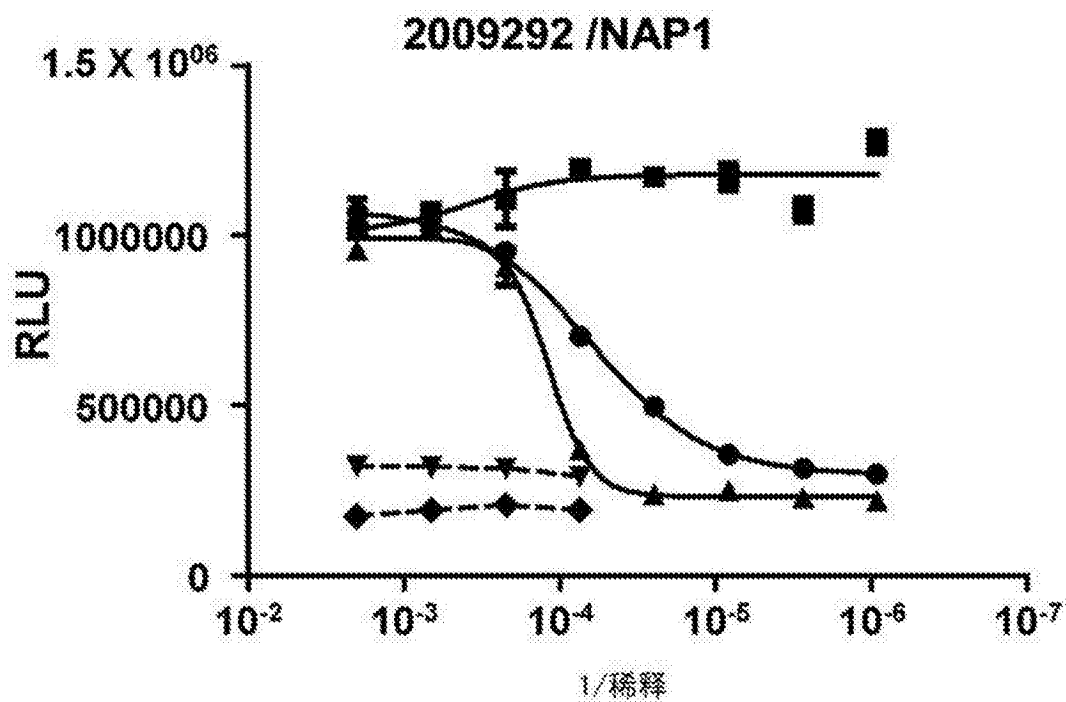


图23G

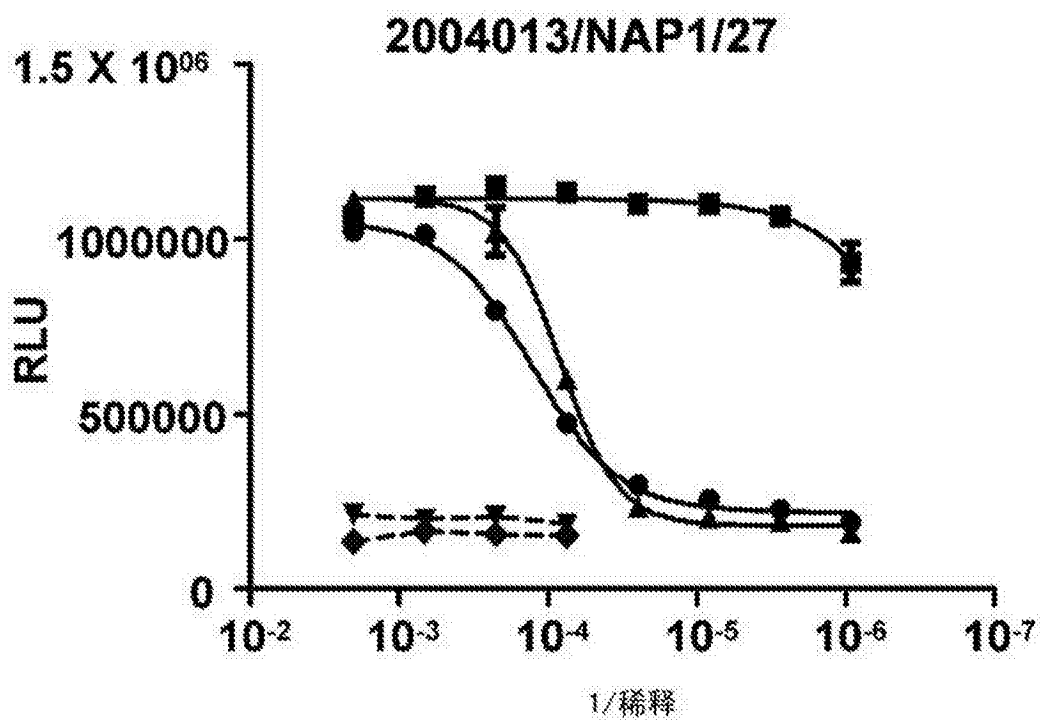


图23H

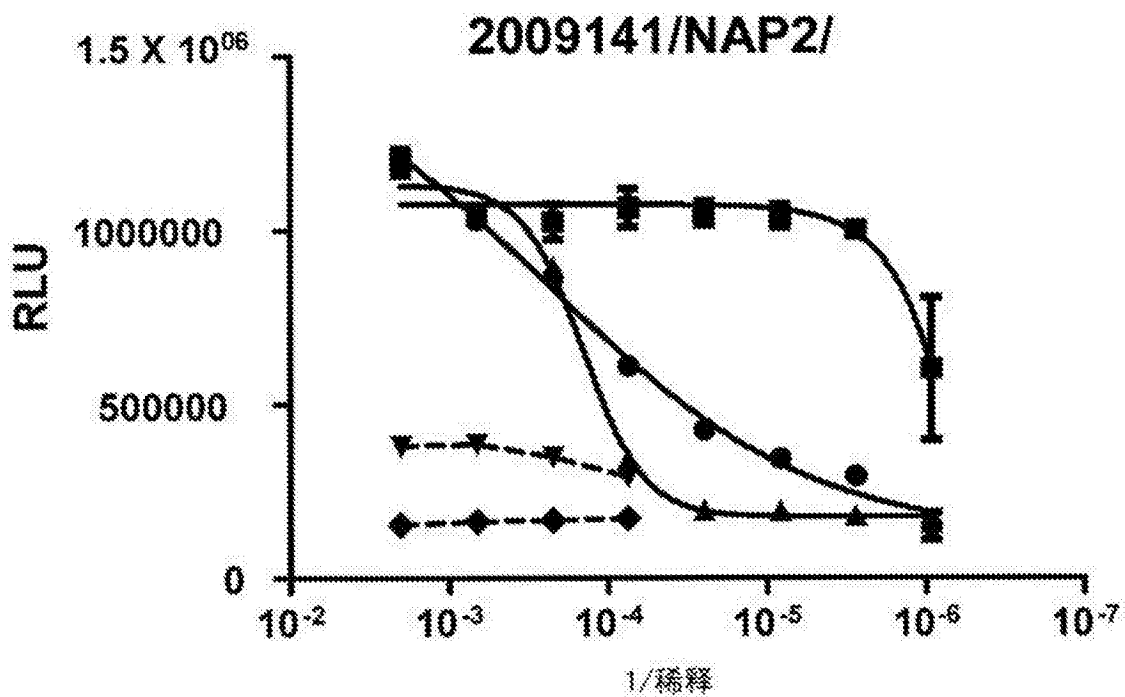


图23I

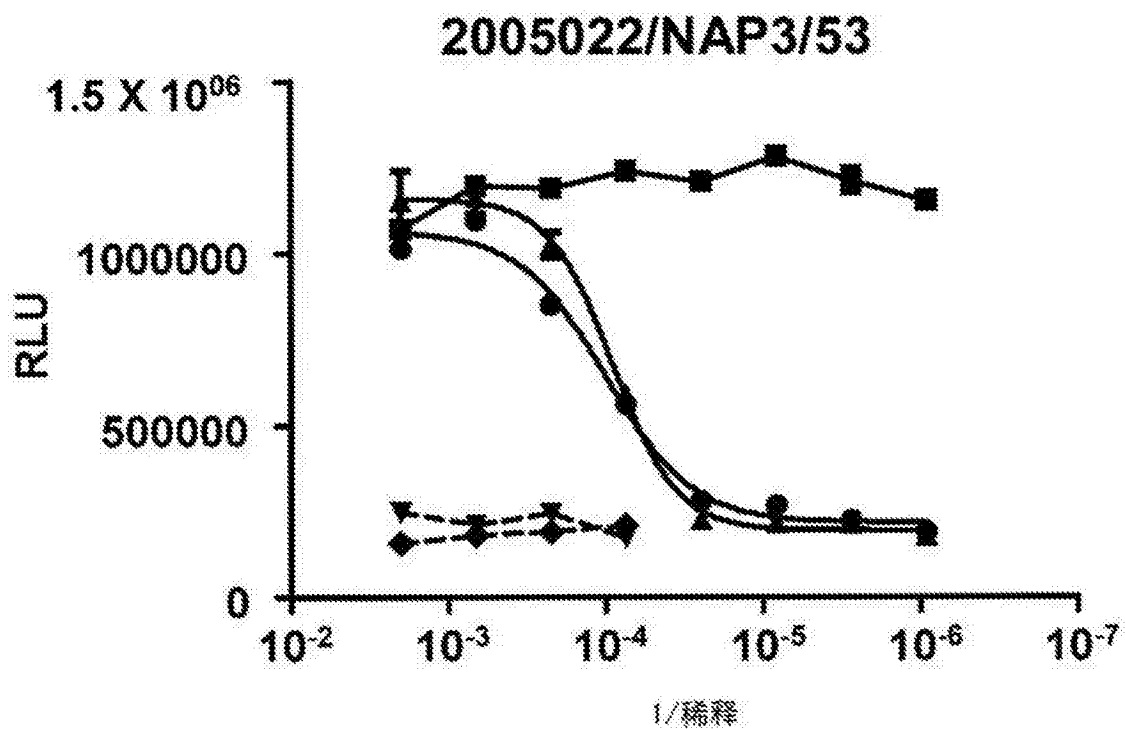


图23J

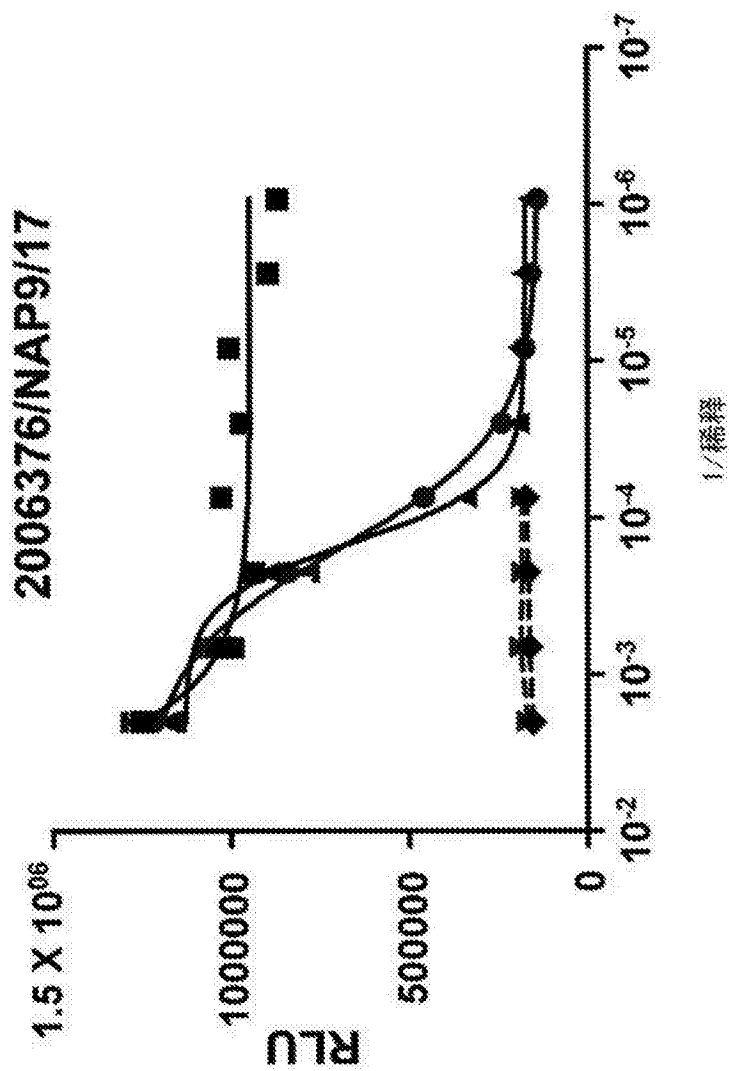


图23K

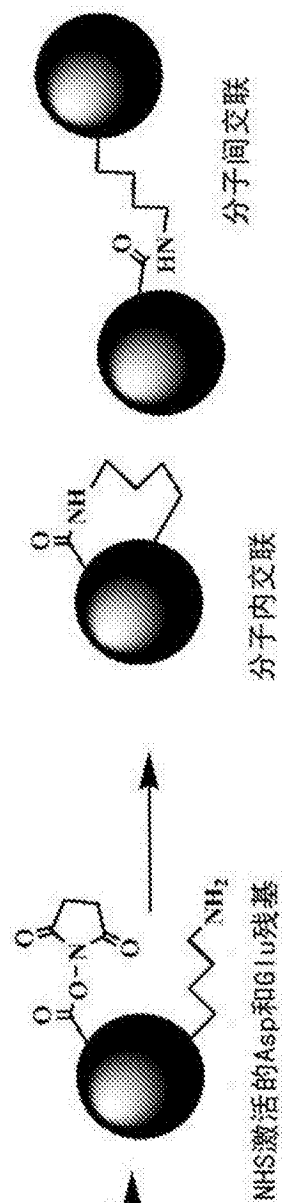


图24A

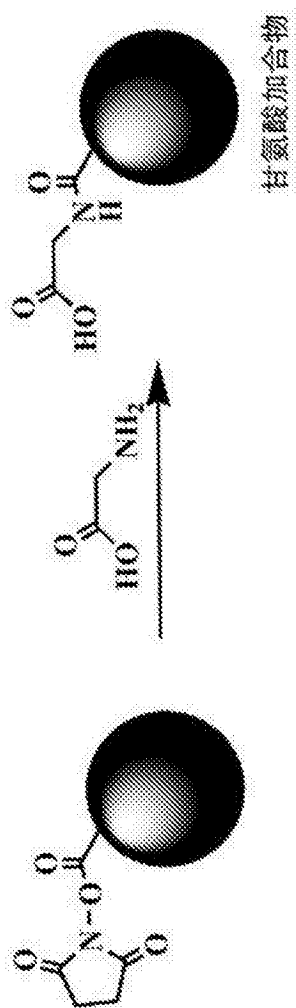


图24B

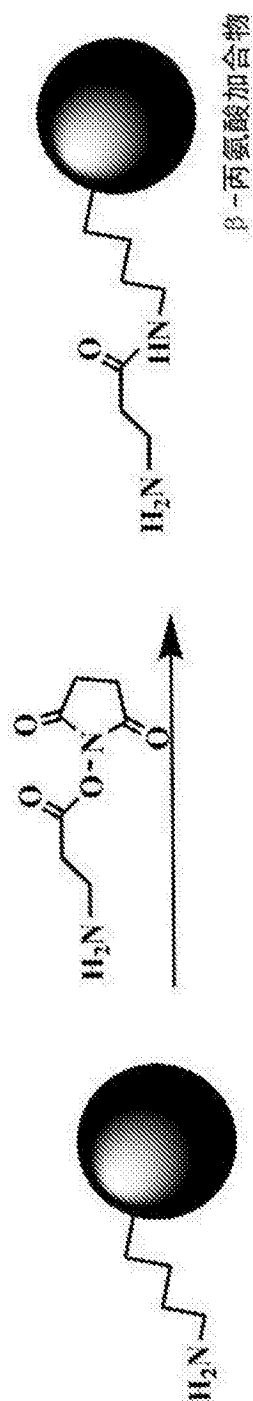


图24C

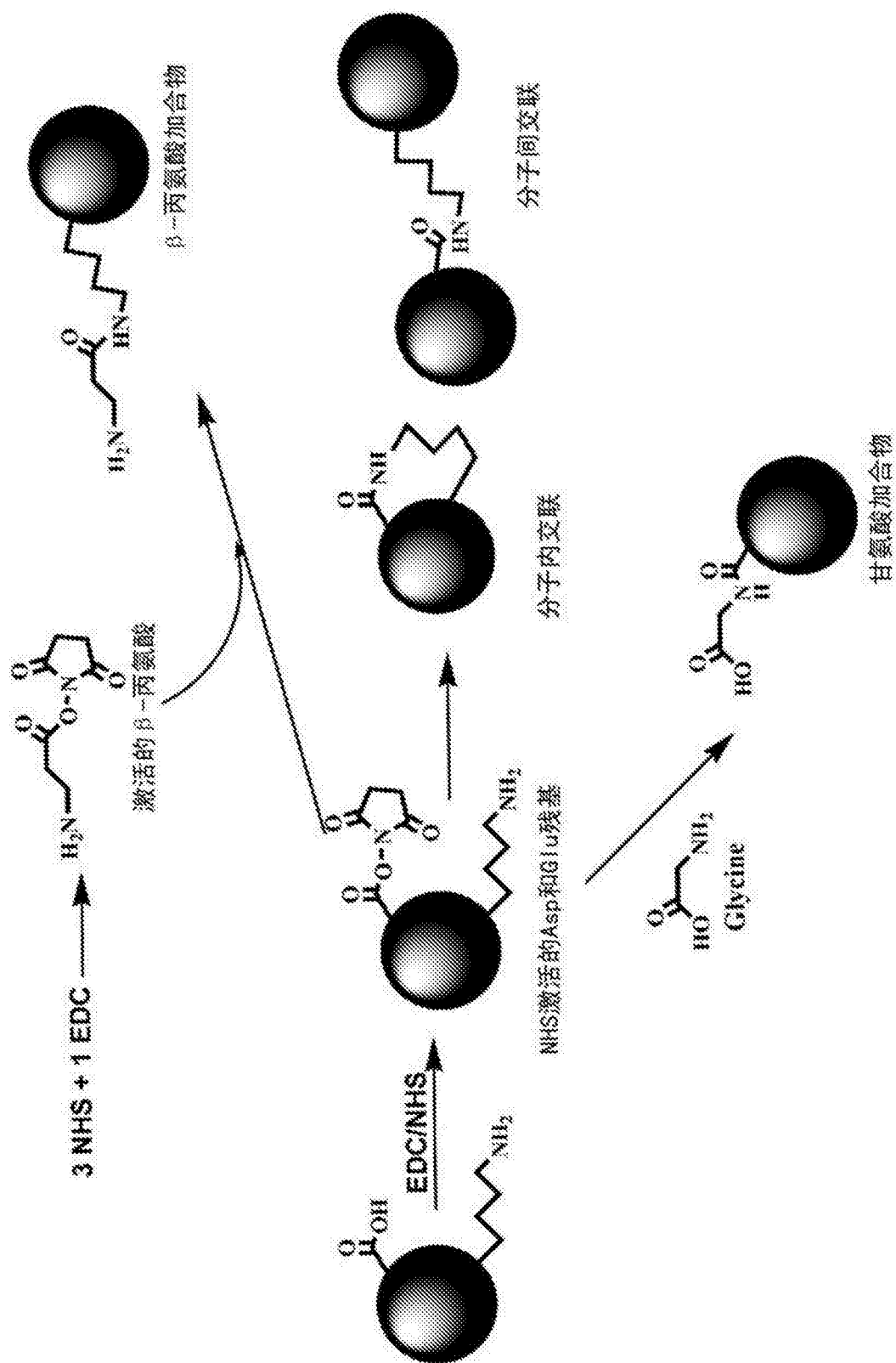


图25