



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108135167 B

(45) 授权公告日 2021.07.09

(21) 申请号 201680060914.4

(22) 申请日 2016.08.19

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108135167 A

(43) 申请公布日 2018.06.08

(30) 优先权数据  
62/207,360 2015.08.19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.04.18

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2016/047787 2016.08.19

(87) PCT国际申请的公布数据  
WO2017/031431 EN 2017.02.23

(73) 专利权人 哈佛学院院长及董事  
地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 吴成焕 D·埃尔图克-哈斯德米尔  
D·L·卡斯派尔

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

代理人 唐宏

(51) Int.Cl.  
A61K 31/715 (2006.01)  
A61P 37/06 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2013009945 A1, 2013.01.17  
US 2010221269 A1, 2010.09.02  
WO 2013009945 A1, 2013.01.17  
US 2010221269 A1, 2010.09.02  
WO 03077863 A2, 2003.09.25  
US 2014243285 A1, 2014.08.28  
US 2004185057 A1, 2004.09.23  
PANTOSTI A 等. Immunochemical  
Characterization of Two Surface  
Polysaccharides of Bacteroides fragilis.  
《INFECTION AND IMMUNITY》.1991, 第59卷 (第6  
期),

审查员 李杨军

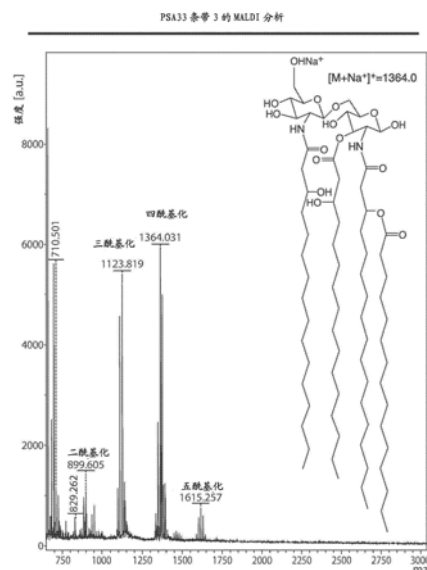
权利要求书2页 说明书24页 附图18页

### (54) 发明名称

脂化PSA组合物和方法

### (57) 摘要

本发明提供脂化PSA的各种分离和合成形式以及脂化PSA的糖脂组分的分离或合成形式, 及其组合物、制备方法, 包括分离此类形式的方法及其使用方法。



1. 一种从脆弱拟杆菌 (*B. fragilis*) 中分离脂化多糖A (PSA) 的非水解方法, 其中所述非水解方法是缺乏酸水解步骤的方法, 其中所述方法包括:

使用苯酚和水的混合物将来自脆弱拟杆菌的荚膜复合物提取到水相中,

使用乙醇从水相中沉淀多糖级分, 和

通过尺寸排阻从多糖级分分离脂化PSA。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中通过尺寸排阻分离包括使用包含去污剂或胆汁盐的色谱柱。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其中所述色谱柱包含脱氧胆酸盐。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法, 其中所述方法在低于9的pH下进行。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法, 还包括透析分离的脂化PSA。

6. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法, 其中提取在60-75℃发生。

7. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法, 其中提取在68℃发生。

8. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法, 其中所述方法在脱氧胆酸钠的存在下进行。

9. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法, 其中脆弱拟杆菌是相对于PSB过表达PSA的脆弱拟杆菌的突变形式。

10. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法, 其中脆弱拟杆菌是野生型脆弱拟杆菌。

11. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法, 其中按未缀合的糖脂的重量相对于脂化PSA的重量计, 未缀合的糖脂为0.5重量%或更少。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述分离的脂化PSA不含未缀合的糖脂。

13. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法, 其中所述方法进一步包括将所述分离的脂化PSA配制成药物组合物的步骤。

14. 一种组合物, 其包含通过权利要求1-13中任一项所述的方法产生的分离的脂化多糖A, 其中按未缀合的糖脂的重量相对于脂化PSA的重量计, 所述组合物包含0.5重量%或更少的未缀合的糖脂。

15. 根据权利要求14所述的组合物, 其中所述分离的脂化多糖A不含未缀合的糖脂。

16. 根据权利要求14或15所述的组合物, 其中所述组合物被配制用于胃肠外施用至受试者。

17. 权利要求14-16中任一项所述的组合物在制备用于治疗患有炎症相关病况或处于发展炎症相关病况的风险的受试者的药物组合物中的用途。

18. 根据权利要求17所述的用途, 其中所述病况是自身免疫性疾病。

19. 根据权利要求18所述的用途, 其中所述自身免疫性疾病为多发性硬化症、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、类风湿性关节炎或I型糖尿病。

20. 根据权利要求17所述的用途, 其中所述病况是哮喘。

21. 根据权利要求17所述的用途, 其中所述病况是手术后粘连。

22. 根据权利要求21所述的用途, 其中所述药物组合物在手术之前、期间和/或之后施用。

23. 根据权利要求17所述的用途, 其中所述病况是脓肿。

24. 根据权利要求23所述的用途, 其中所述药物组合物与抗生素组合施用至所述受试者。

25. 根据权利要求17所述的用途,其中所述病况是肥胖症。

26. 根据权利要求17-25中任一项所述的用途,其中所述药物组合物胃肠外施用至所述受试者。

## 脂化PSA组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e) 要求2015年8月19日提交的标题为“LIPIDATED PSA COMPOSITIONS AND METHODS”的美国临时申请系列号62/207,360的优先权,该申请的全部内容通过引用并入本文。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及脂化荚膜多糖A (PSA)、糖脂、组合物、其合成、分离和/或纯化方法及其使用方法。

[0004] 发明背景

[0005] 据报道,脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 的多糖A (PSA) 是具有治疗和预防活性的免疫调节剂。美国专利5,679,654和5,700,787;Tzianabos AO等人(2000) J Biol Chem 275:6733-40。最近发现PSA具有脂质部分。假设脂质部分将多糖锚定在脆弱拟杆菌外膜中。最近还发现,该“脂化PSA”比现有技术中提供的非脂化PSA(本文称为“PSA”)形式更有效。然而,脂质部分的性质迄今尚未确定,其与PSA的关联性质也没有确定。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明部分基于使用某些分离方法对被发现与PSA缀合的脂质部分的鉴定和表征。本公开内容提供了与这种脂质部分缀合的PSA(在本文中称为“脂化PSA”)的完整结构鉴定和表征。本发明部分地基于新的分离方法和认识到这样的方法获得比迄今可能获得的更高的脂化PSA产率。重要的是,大多数现有技术的PSA分离方法完全不产生脂化形式的PSA。这可能部分归因于在分离过程后期使用相对严格的酸水解步骤,其从脂化PSA释放脂质部分,从而导致非脂化PSA。

[0008] 因此,本公开内容在一些方面中提供了确定的化学结构的分离的脂化PSA以及包含分离的脂化PSA的组合物。这种组合物可以通过其中所含的分离的脂化PSA的纯度和/或浓度来进一步限定。还发现分离的脂化PSA自组装成胶束形式。重要的是,脂化PSA在体内不采用这种构象,因此这种胶束形式是非天然存在的。更重要的是,已经发现这样的胶束非常稳定并且因此难以破坏。这导致了这样的发现:某些破坏性试剂(例如去污剂和胆汁盐)和具有有助于形成这种稳定胶束的纯度或浓度的分离的脂化PSA(如本文所提供的)的组合使用使得胶束较不稳定并使更多的脂化PSA在体内可用。

[0009] 还提供了合成形式的脂化PSA及其组合物,其包含一种或多种PSA聚合物(每种聚合物包含PSA的一个或多个重复四糖单元),和脂化PSA的一种或多种脂质或糖脂组分。PSA和脂质或糖脂组分可以直接或间接地彼此缀合。这种缀合可以是共价或非共价缀合。作为实例,本发明提供了包含非缀合形式的PSA和脂质或糖脂组分以及基底如纳米颗粒的组合物。脂化多糖的这些合成形式可以包含在自然界中不存在的比例的PSA组分(包括四糖单元)和脂质或糖脂组分。

[0010] 本发明进一步提供了分离脂化PSA的方法,制备脂化PSA的上述合成形式的方法以及本文提供的分离和合成形式的脂化PSA的体外和体内用途。

[0011] 因此,一方面,本发明提供了包含与糖脂共价缀合的多糖A (PSA) 的分离的脂化多糖A (PSA),其中所述糖脂为二酰化、三酰化、四酰化或五酰化的。在一些实施方案中,糖脂是四酰化或五酰化的。

[0012] 另一方面,本发明提供了分离的脂化多糖A (PSA),其包含与糖脂共价缀合的多糖A (PSA),所述糖脂包含长度为14-17个碳的一个或多个酰基链。

[0013] 在多个实施方案中,糖脂包含被一个或多个酰基链取代的二糖。在多个实施方案中,糖脂包含二葡萄糖胺。

[0014] 另一方面,本发明提供了分离的脂化多糖A (PSA),其包含与长度为14-17个碳的一个或多个酰基链共价缀合的多糖A (PSA)。

[0015] 在多个实施方案中,一个或多个酰基链的长度为15-17个碳。

[0016] 在多个实施方案中,分离的脂化多糖A (PSA) 基本上不含在脆弱拟杆菌荚膜中发现的其他组分。在多个实施方案中,分离的脂化多糖A (PSA) 基本上不含LPS。在多个实施方案中,分离的脂化多糖A (PSA) 基本上不含未缀合的糖脂。在多个实施方案中,分离的脂化多糖A (PSA) 不含非脂化PSA。在多个实施方案中,分离的脂化多糖A (PSA) 为纯化形式。在不同的实施方案中,脂化多糖A (PSA) 从相对于多糖B (PSB) 过表达PSA的脆弱拟杆菌细胞中分离。

[0017] 在多个实施方案中,分离的脂化多糖A (PSA) 以不含脆弱拟杆菌膜的形式提供,因此不作为脆弱拟杆菌细胞或作为脆弱拟杆菌OMV提供。在多个实施方案中,分离的脂化多糖A (PSA) (包括合成的非天然存在形式的脂化多糖A (PSA)) 可以以脂质体或胶束形式提供,并且此类脂质体或胶束形式可以是非天然存在的(例如它可能缺乏天然存在的组分,和/或它可能还包含非天然存在的组分,例如非天然存在的脂质、表面活性剂、稳定剂等)。

[0018] 在多个实施方案中,分离的脂化多糖A (PSA) 为胶束形式。

[0019] 在多个实施方案中,分离的脂化多糖A (PSA) 为冻干形式。冻干形式的脂化PSA特别适用于长期储存,范围为几天、几周、几个月或甚至几年。

[0020] 在多个实施方案中,分离的脂化多糖A (PSA) 适合于施用至人。

[0021] 另一方面,本发明提供任何前述脂化多糖A (PSA),其中PSA组分包含少于100,少于90,少于80,少于70,少于60或少于50个重复四糖单元。

[0022] 另一方面,本发明提供任何前述脂化多糖A (PSA),其中PSA组分包含1-10个重复四糖单元。

[0023] 另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含任何前述脂化多糖A (PSA),以及少于0.5% (w/w) 的游离糖脂。

[0024] 另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含前述脂化多糖A (PSA) 中的任何一种和药学上可接受的载体。

[0025] 在多个实施方案中,组合物包含少于1%或少于0.5%的游离糖脂(w/w)。在多个实施方案中,组合物还包含去污剂或胆汁盐。在多个实施方案中,去污剂或胆汁盐以药学可接受的水平存在。在多个实施方案中,去污剂或胆汁盐以等于或少于1%、0.5%或0.1%的量存在。

[0026] 在多个实施方案中,组合物为冻干形式。

[0027] 在多个实施方案中,分离的脂化多糖A (PSA) 作为胶束或脂质体提供。

[0028] 另一方面,本发明提供了包含任何前述脂化多糖A (PSA) 和去污剂或胆汁盐的药物

组合物。

[0029] 另一方面,本发明提供了包含胶束或脂质体中的任何前述脂化多糖(PSA)的组合物。

[0030] 另一方面,本发明提供了包含含有1至50个四糖单元的多糖A(PSA)和糖脂的组合物,其中PSA与糖脂共价缀合。

[0031] 另一方面,本发明提供一种组合物,其包含含有1至50个四糖单元的多糖,每个四糖单元具有式I的结构,和包含一个或多个长度为14-17个碳的酰基链的糖脂,其中多糖与糖脂共价缀合。

[0032] 在多个实施方案中,多糖包含1-40个四糖单元或1-20个四糖单元。在多个实施方案中,多糖包含1-10个四糖单元或1-5个四糖单元。

[0033] 在多个实施方案中,组合物被配制用于胃肠外或肠内或口服施用至受试者。在多个实施方案中,组合物被配制用于亲脂性递送,包括例如在脂质体中或在基于油的递送系统中。本文提供的各种组合物可以配制成胶囊或其他分散剂型,包括用于口服或肠内施用的剂型。

[0034] 另一方面,本发明提供了分离的糖脂,其包含与2-5个酰基链共价缀合的二葡萄糖胺,每个酰基的长度各自独立地为14-17个碳。糖脂可以是本文提供的任何糖脂或其组合。

[0035] 在多个实施方案中,二葡萄糖胺与2-5或2-4个酰基链共价缀合。在多个实施方案中,二葡萄糖胺与4或5个酰基链共价缀合。在不同的实施方案中,酰基链的长度为15-17个碳。以下列举与糖脂相关的其他实施方案。

[0036] 另一方面,本发明提供了一种组合物,其在基底中或基底上包含多糖A(PSA)和糖脂,其中PSA不与糖脂共价缀合。

[0037] 另一方面,本发明提供了一种组合物,其包含含有一个或多个四糖单元的多糖,每个四糖单元具有式I的结构,以及包含含有一个或多个长度为14-17个碳的酰基链的糖脂,其中多糖和糖脂以彼此不缀合的方式提供在基底中或基底上。

[0038] 在多个实施方案中,基底是纳米颗粒。

[0039] 在多个实施方案中,PSA和糖脂以10:1至小于1:1的分子量比存在。

[0040] 另一方面,本发明提供了包含多糖A(PSA)和糖脂的组合物,所述多糖A(PSA)和糖脂通过非酮苷键彼此共价缀合。

[0041] 另一方面,本发明提供了一种组合物,其包含含有一个或多个四糖单元的多糖,每个四糖单元具有式I的结构,并且包含含有一个或多个长度为14-17个碳的酰基链的糖脂,其中多糖通过非酮苷键与糖脂共价缀合。

[0042] 在多个实施方案中,非酮苷键是酯键、酰胺键或醚键。

[0043] 在多个实施方案中,糖脂包含二糖。在多个实施方案中,二糖是二葡萄糖胺。

[0044] 在不同的实施方案中,糖脂包含2-5个酰基链。在不同的实施方案中,糖脂包含4或5个酰基链。

[0045] 在不同的实施方案中,一个或多个酰基链中的至少一个是未修饰的。在多个实施方案中,一个或多个酰基链中的至少一个被修饰。在多个实施方案中,一个或多个酰基链中的至少一个未被修饰,并且一个或多个酰基链中的至少一个被修饰。在多个实施方案中,一个或多个酰基链中的至少一个用羟基修饰。

[0046] 在多个实施方案中,一个或多个酰基链中的至少一个是C16:0-OH。在多个实施方案中,一个或多个酰基链中的至少一个是C17:0-OH。在多个实施方案中,一个或多个酰基链中的至少一个是C14:0。在多个实施方案中,一个或多个酰基链中的至少一个是C15:0。

[0047] 在多个实施方案中,一个或多个酰基链中的至少一个是在二糖上N-取代的。在多个实施方案中,一个或多个酰基链中的至少一个是在二糖上O-取代的。在多个实施方案中,一个或多个酰基链中的至少一个是在二糖上N-取代的,并且一个或多个酰基链中的至少一个是在二糖上O-取代的。

[0048] 在多个实施方案中,多糖具有约150千道尔顿的分子量。在不同的实施方案中,多糖包含1-10个四糖单元。

[0049] 在不同的实施方案中,糖脂具有式II的结构。在不同的实施方案中,糖脂具有式III的结构。

[0050] 在多个实施方案中,多糖和糖脂存在于基底中或基底上。在多个实施方案中,基底是膜、基质或颗粒。在不同的实施方案中,基底是可生物降解的。在多个实施方案中,基底是纳米颗粒。

[0051] 在多个实施方案中,组合物还包含药学上可接受的载体。在多个实施方案中,组合物是药物组合物。在多个实施方案中,组合物被配制用于胃肠外、肠内或口服施用。在不同的实施方案中,组合物有效治疗自身免疫性疾病。在多个实施方案中,组合物基本上不含在脆弱拟杆菌荚膜中发现的其他组分并且适合施用至人。

[0052] 另一方面,本发明提供了基本上由脂化PSA组成的胶束。在多个实施方案中,脂化PSA是分离的脂化PSA。

[0053] 另一方面,本发明提供一种组合物,其包含基本上由脂化PSA和去污剂或胆汁盐组成的胶束。

[0054] 在多个实施方案中,去污剂或胆汁盐以药学上可接受量存在。

[0055] 在多个实施方案中,组合物是药物组合物。

[0056] 另一方面,本发明提供了用于从脆弱拟杆菌分离脂化多糖A (PSA) 的非水解方法,包括使用苯酚和水的混合物从脆弱拟杆菌提取荚膜复合物到水相中,使用乙醇从水相沉淀多糖级分,和通过尺寸排阻从多糖级分离脂化PSA。

[0057] 在多个实施方案中,通过尺寸排阻分离包括使用包含去污剂或胆汁盐的色谱柱。在多个实施方案中,色谱柱包含脱氧胆酸盐。在不同的实施方案中,该方法在脱氧胆酸钠的存在下进行。

[0058] 在多个实施方案中,该方法在低于约9的pH下进行。

[0059] 在多个实施方案中,该方法还包括透析分离的脂化PSA。

[0060] 在多个实施方案中,提取在60-75°C发生。在多个实施方案中,提取在约68°C发生。

[0061] 在多个实施方案中,脆弱拟杆菌是相对于PSB过表达PSA的脆弱拟杆菌的突变形式。

[0062] 在多个实施方案中,分离的脂化PSA基本上不含未缀合的糖脂。

[0063] 另一方面,本发明提供了包含通过任何前述方法产生的分离的脂化多糖A的组合物。

[0064] 在多个实施方案中,组合物被配制用于胃肠外、肠内或口服施用至受试者。

[0065] 另一方面,本发明提供了一种方法,其包括向患有炎症相关病况或处于发展炎症相关病况的风险的受试者施用有效量的任何前述脂化PSA或任何前述组合物。

[0066] 在多个实施方案中,所述病况是自身免疫性疾病。在多个实施方案中,自身免疫性疾病是多发性硬化症、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎,类风湿性关节炎或I型糖尿病。在多个实施方案中,病况是哮喘。

[0067] 在多个实施方案中,该病况是手术后粘连。在多个实施方案中,组合物在手术之前、期间和/或之后施用。在多个实施方案中,该病况是脓肿。在多个实施方案中,将抗生素施用至受试者。在多个实施方案中,该病况是肥胖症。

[0068] 在多个实施方案中,组合物胃肠外或肠内施用至受试者。

[0069] 应该理解,各种前述方面和实施方案重叠。预期的是上述实施方案同样适用于上述各个方面。

[0070] 应该认识到,以下更详细讨论的前述概念和其它概念的所有组合(假设这些概念不相互不一致)被认为是本文公开的发明主题的一部分。特别地,出现在本公开内容结尾处的要求保护的主题的所有组合被认为是本文公开的发明主题的一部分。还应该理解,本文中明确采用的术语也可以出现在通过引用并入的任何公开内容中,并且应该赋予与本文公开的特定概念最一致的含义。

[0071] 附图简述

[0072] 应该理解的是,附图不一定按比例绘制,而是将重点放在一般性举例说明本文所讨论的各种概念上。

[0073] 图1A提供了从脂化PSA释放的四酰化(底部)和五酰化(顶部)糖脂的代表性质谱(MS)光谱。

[0074] 图1B提供了脆弱拟杆菌PSA糖脂锚定物的LC-MS/MS特征谱,其显示具有不同数目的酰基链的单磷酸化和非磷酸化糖脂种类。具有相同数目酰基链的种类在此类酰基链的总链长度和/或性质(组成)方面仍可能彼此不同。在一些情况下,在具有相同数目的酰基链的种类组中已经鉴定了~30种总糖脂种类。

[0075] 图2A提供了从脂化PSA释放的五酰化糖脂(从顶部,小图1和2)和四酰化糖脂(从顶部,小图3和4)的MS光谱的比较。小图1和3中的材料是在分离过程中使用温和水解步骤较早获得的。之后在分离过程中使用更严格的水解步骤获得了小图2和4中的材料。在小图1和3中可检测到脂质部分,但在小图2和4中不可检测到,证实了较苛刻和较晚时间的酸水解步骤对脂质部分的有害作用。

[0076] 图2B提供了从脆弱拟杆菌分离的结构的MS/MS分配。已经确定 $m/z=1674.2$ 的种类是用饱和或单羟基化的C15-C17脂肪酸五酰化和单磷酸化的。

[0077] 图3是从脂化PSA释放的脂质部分的MALDI-MS光谱,其显示二酰化、三酰化、四酰化和五酰化脂质部分的峰。右边的结构是来自脂化PSA的四酰化糖脂的例子。该结构包含在碳C1和C4(最右侧取代的葡糖胺(或还原糖)上的碳)和碳C3'和C4'(最左侧取代的葡糖胺(或非还原糖)上的碳)上的羟基。本公开内容包括其包含磷酸基团(例如- $OP(O_3)H$ )代替C1或C4'位置处的羟基(-OH)的变体。

[0078] 图4是显示与PSA结合的脂质部分的定量分析的柱状图。显示了六种不同的脂质部分,每种具有不同的MS位置。显示了具有约1350-1378范围内的 $m/z$ 的四酰化脂质部分和具

有约1604-1634范围内的m/z的五酰化脂质部分。对于每个脂质部分,显示两条柱:第一条对应于使用较苛刻和较晚的酸水解步骤产生的材料(PSA 23),第二条对应于使用较温和以及较早的酸水解步骤产生的材料(PSA 24)。该图显示当使用较温和以及较早的酸水解步骤时,脂质部分被保留。它还显示了不同部分的相对比例,其中m/z 1378部分是最普遍的四酰化形式并且m/z 1618部分是最普遍的五酰化形式。

[0079] 图5是列出来源于脂化PSA的糖脂分子种类及其提出的酰基链组成的表格。该表列出了5种不同的五酰化种类,5种不同的四酰化种类,4种不同的三酰化种类和2种不同的二酰化种类。每个分组中的突出种类(例如1632,1618和1604)代表了最丰富的种类。在五酰化种类中,1632和1618种类最为普遍,其次是1604种类,其次是1646和1590种类。在四酰化种类中,1378和1364种类最为普遍,其次是1350种类,其次是1392种类和1336种类。在三酰化种类中,1123和1109种类是最普遍的,其次是1095种类,其次是1081种类。在二酰化种类中,899和885种类普遍性大致相同。在所有种类中,各组的丰度如下(从大到小):四酰化,五酰化,三酰化和二酰化。从脂化PSA水解的这些糖脂的典型比例大约是二酰化:三酰化:四酰化:五酰化=痕量:0.5:3:2。图中列出的种类通常在使用本文提供的方法分离的脂化PSA的制备物中观察到。这些方法优选不包括酸水解步骤,从而相对于现有技术方法导致更大比例的完全脂化PSA被分离。这些方法在一些情况下还包括脱氧胆酸钠或其它胆汁盐。

[0080] 图6A提供了来自脂化PSA的糖脂的代表性结构。具有约1341.1分子量的代表性四酰化二葡萄糖胺显示在左侧(在本文中称为式II),并且右侧显示了分子量约为1595.3的代表性五酰化二葡萄糖胺(在本文称为式III)。左侧的四酰化结构包含在C1,C4,C3'和C4'位置的羟基。右侧的五酰化结构包含在C1,C4和C4'位置的羟基。本文还提供了这些化合物的单磷酸化变体,其包含磷酸基团代替C1或C4'位置上的羟基。

[0081] 图6B提供了五酰化的单磷酸化糖脂种类。磷酸化存在于C1位。

[0082] 图7是显示IL-10诱导测定结果的柱状图。使用较温和较早的酸水解步骤制备的材料被鉴定为PSA24。使用较苛刻和较晚的酸水解步骤制备的材料被鉴定为PSA 23。CCP表示来自野生型脆弱拟杆菌NCTC 9373的荚膜多糖复合物。

[0083] 图8是显示脾DC+T细胞共培养物中IL-10诱导测定结果的柱状图。该图使用被认为比现有技术制剂更完全脂化的分离形式的脂化PSA,预期是与现有技术方法相比更高纯度的脂化PSA。这种制剂在本文中被称作“完全脂化PSA”,因为它明显不含游离(或释放)的糖脂成分。该图显示分离的完全脂化的PSA制剂(称为PSA批次34)在不存在脱氧胆酸盐的情况下聚集,并且这种聚集导致较少的IL-10诱导活性。加入少量分散聚集体或使其不太稳定的脱氧胆酸盐导致批次34刺激T细胞产生IL-10的能力显著增加。使用通过温和酸处理制备的PSA批次28未实现这一观察结果。这表明使用本文提供的方法分离的完全脂化PSA采用与使用现有技术方法分离的脂化PSA不同的构象。

[0084] 图9提供了使用PBS柱(顶部)和脱氧胆酸柱(底部)的完全脂化PSA批次40的色谱洗脱曲线。当使用用脱氧胆酸盐平衡的柱子时,通过折射率监测组分的分子大小表明批次40的尺寸大大减小。这是由于分离的、完全脂化PSA形成的胶束的破坏。

[0085] 图10是硫酸锌/咪唑染色的SDS PAGE凝胶的照片。与通过温和酸处理制备的PSA(PSA批次28)相比,分离的完全脂化PSA制剂(PSA批次34)显示少得多的游离脂质。

[0086] 图11是显示PBS和PSA批次40处理的小鼠的EAE累计评分的柱状图。PBS小鼠,n=8;

PSA小鼠,  $n=7$ 。PSA处理:隔天口服灌胃(75微克剂量),从第2天开始。

[0087] 图12提供了从使用非水解方法制备的脂化PSA制剂(PSA批次40)获得的许多五-、四-和三-酰化糖脂的MS光谱。

[0088] 图13提供了从使用非水解方法制备的脂化PSA制剂(PSA批次40)获得的许多五酰化糖脂的MS光谱。这些不同的糖脂种类在酰基链长度上彼此不同。

[0089] 图14提供了列出从使用非水解方法制备的脂化PSA制剂(PSA批次40)获得的各种糖脂种类的表格。该表显示了脂化PSA的糖脂成分的复杂性。这种复杂性是由链长和羟基化的不同所引起的。

[0090] 图15提供了从使用非水解方法制备的脂化PSA制剂(PSA批次40)获得的糖脂种类的代表性结构。本文还提供了所示化合物的单磷酸化变体,其包含磷酸基团代替C1或C4'位置上的羟基。

[0091] 图16提供了使用非水解方法制备的脂化PSA制剂(PSA批次40)获得的糖脂种类的洗脱谱和结构。所示化合物的单磷酸化变体也在本文中提供,其包含磷酸基团代替C1或C4'位置上的羟基。

[0092] 发明详述

[0093] 本文提供了脂化PSA的脂质部分的结构鉴定和表征。根据本发明已经发现,这些脂质部分是由被一个或多个酰基链取代的二葡萄糖胺组成的糖脂。在天然存在的形式中,糖脂通过酮苷键与其相邻的四糖单元缀合,所述酮苷键是酸性不稳定键,其易于酸水解。已显示脂化PSA比其非脂化对应物PSA更具免疫效力。例如,如在实施例中所证明的,脂化PSA比非脂化PSA能够更好地诱导IL-10产生(并且因此能够更好地与Treg细胞相互作用)。

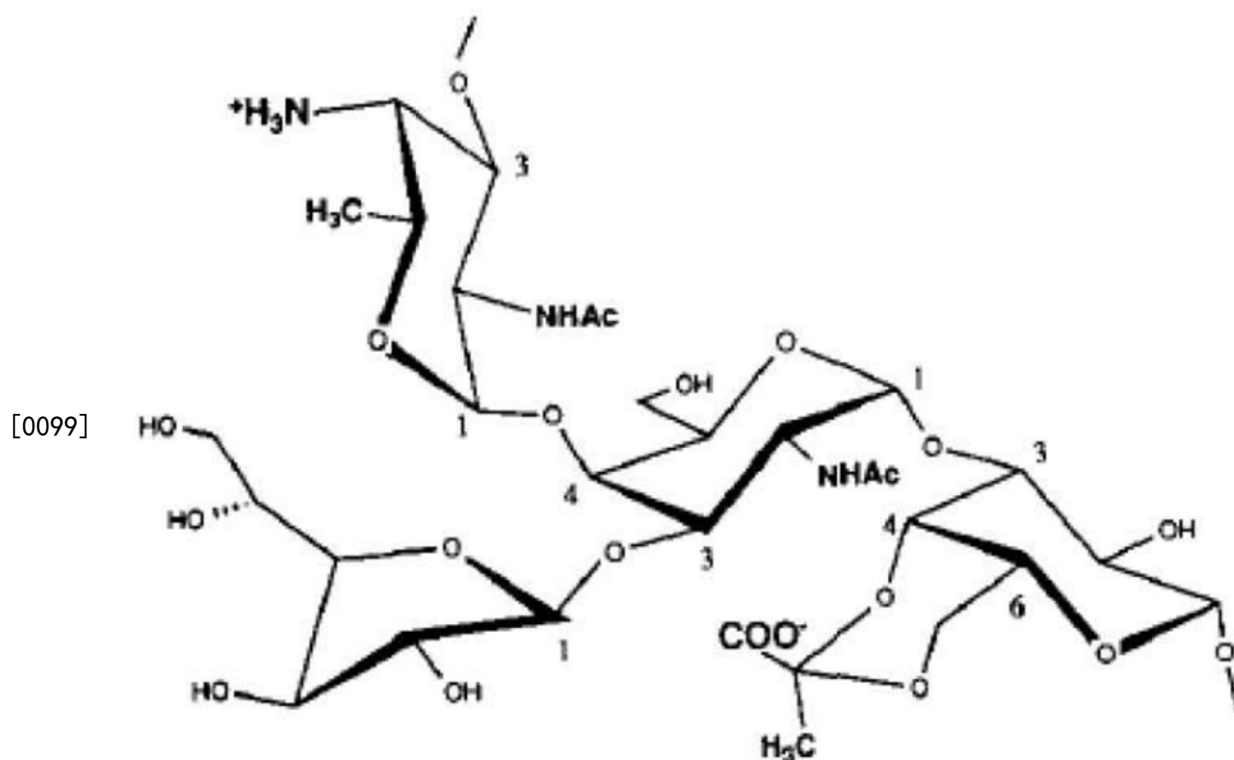
[0094] 脂化PSA

[0095] 本发明部分涉及脂化PSA的脂质部分的表征和脂化PSA的新识别的糖脂结构和脂质复杂性以及该糖脂结构与PSA缀合的性质。现已发现脂化PSA在其多糖组分还原末端含糖脂部分。该糖脂包含被一个和通常多于一个酰基链取代的二糖。

[0096] 多糖组分

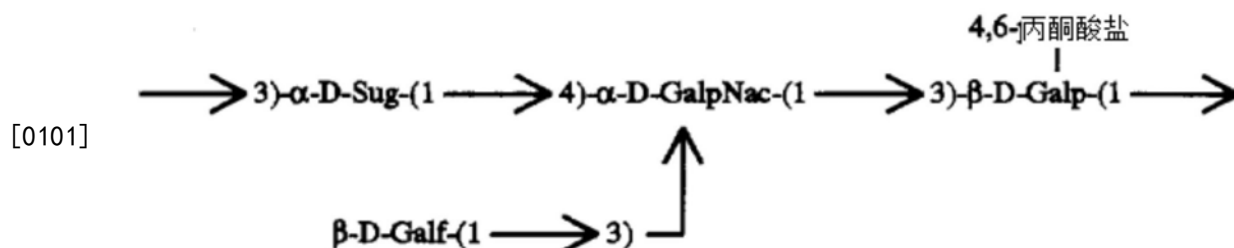
[0097] 本文称为PSA的脂化PSA的多糖组分包含如下所示的四糖重复单元。它具有由其游离胺基上的正电荷和其游离羧基上的负电荷(每个重复四糖单元)赋予的两性离子行为。已报道其天然存在状态包含超过60个四糖重复单元(例如直至并在一些情况下包括平均约100或约200或约300个重复单元),并且其平均分子大小为约150kD(范围从约75kD到240kD)。

[0098] PSA的重复四糖单元具有如下结构:



(式 I)。

[0100] 四糖重复单元也可以如下表达：



[0102] 本发明考虑了合成形式的脂化PSA,其包含较少的四糖单元(例如1-60,1-50,1-40,1-30,1-20,1-10,1-9,1-8,1-7,1-6个或1-5个四糖单元或其间的任何数量的单元,如本文明确列举的,例如包括但不限于1,2,3,4,5,6,7,8,9和10个单元)。这种较短的变体可以通过解聚天然存在的脂化PSA或解聚从脂化PSA得到的PSA来获得。如可以使用例如本领域已知的化学手段(例如使用活性氧种类或活性氮种类,例如但不限于一氧化氮,如Duan和Kasper, Glycobiology, 2011, 21 (4) : 401-409中所述)、机械手段和/或酶促手段使PSA解聚。

[0103] 本发明进一步涵盖包含多于300个(包括但不限于350,400,500,600,700,800,900或1000个单元或更多)重复四糖单元的合成形式的脂化PSA。

[0104] 如本文所述,多糖组分可以与糖脂共价缀合,或者在某些合成形式中,其可以不与糖脂缀合。如果共价缀合,则其可以通过酮苷键(ketosidic bond)或其他酸不稳定键或通过例如酯键、酰胺键或醚键的键缀合以形成非天然存在的脂化PSA。

[0105] 糖脂组分

[0106] 糖脂组分包含被一个或多个酰基链取代的二葡萄糖胺。在图3和6中提供了在糖脂环境中的示例性二葡萄糖胺。根据本发明现在认识到,二葡萄糖胺通过酮苷键与多糖组分缀合,所

述酮苷键是酸不稳定的,并且因此对现有技术方法的严格水解步骤敏感。

[0107] 在一些情况下,二葡萄糖胺可以被磷酸化或不被磷酸化。在一些情况下,二葡萄糖胺是单磷酸化的。磷酸化可发生在二葡萄糖胺的C1位(还原性末端)或C4'位。

[0108] 在一些情况下,二糖可以通过例如酯或酰胺键与一个或多个酰基链(包括2、3、4、5或更多个酰基链)缀合,并且因此可以分别被称为“O”取代的(例如酰化的)或“N”取代的(例如酰化的)。因此,每种脂化PSA分子包含1、2、3、4、5或更多个酰基链。因此,二糖、糖脂组分和最终的脂化PSA分子在本文中可分别称为二酰化、三酰化、四酰化或五酰化形式。

[0109] 在某些情况下,分离的脂化PSA的酰基链长度可以在14至17个碳的范围内。认为这些种类代表大于95%的天然存在的总脂化PSA。酰基链可以是未修饰的或它们可以被修饰。如果修饰,酰基链可以被羟基修饰。因此,在一些情况下,脂化PSA可以包含一个或多个酰基链,其特征为C14:0, C14:0-OH, C15:0, C15:0-OH, C16:0, C16:0-OH, C17:0和C17:0-OH。

[0110] 图1、4和12-16说明脂化PSA的单一制剂可以产生许多不同的酰化糖脂。例如,如图1A所示,质谱(MS)光谱中的每个峰表示不同种类的糖脂,其中种类的酰基链组成不同。该图说明了四酰化和五酰化糖脂两者的情况。图4显示了不同的四酰化(显示为m/z 1350, 1364和1378)和五酰化(显示为m/z 1604, 1618和1634)糖脂种类的绝对量。因此,从脆弱拟杆菌分离的脂化PSA的批量制剂将产生脂化PSA分子的非均质混合物,潜在地包括但不限于多种二酰化种类和/或多种三酰化种类和/或多种四酰化种类和/或多种五酰化种类。

[0111] 图5提供了糖脂类种类及其酰基链组成的列表。例如,该表提供了包含以下酰基链组合的五酰化种类:

[0112] (1) 一条C16:0-OH链,三条C17:0-OH链和一条C15:0链,

[0113] (2) 两条C16:0-OH链,两条C17:0-OH链和一条C15:0链,

[0114] (3) 三条C16:0-OH链,一条C17:0-OH链和一条C15:0链,

[0115] (4) 四条C16:0-OH链和一条C15:0链,以及

[0116] (5) 四条C16:0-OH链和一条C14:0链。

[0117] 该表类似地提供了四酰化、三酰化和二酰化酰基链的多种种类。

[0118] 因此,应该理解,本发明的脂化PSA形式(无论是从脆弱拟杆菌分离的还是合成的,以及无论是缀合还是非缀合形式)可以包含但不限于酰基链的任何前述组合:

[0119] (1) 仅C16:0-OH酰基链,

[0120] (2) 仅C17:0-OH酰基链,

[0121] (3) 仅C16:0-OH和C17:0-OH链,

[0122] (4) 仅C16:0-OH和C17:0-OH和C15:0链,

[0123] (5) C16:0-OH和C17:0-OH和C14:0链。

[0124] 每种链的数量可能有所不同,可能包括但不限于以下选项

[0125] (1) 0-4个C16:0-OH链,

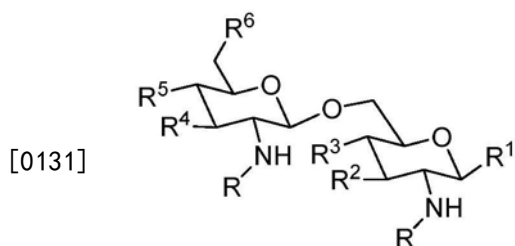
[0126] (2) 0-4个C17:0-OH链,

[0127] (3) 0或1个C14:0链,和

[0128] (4) 0或1个C15:0链。

[0129] 在使用非水解法(PSA批次40)获得的另一种脂化PSA制剂中,相似的多样性是明显的,如图12-16所示。

[0130] 因此本公开内容提供了各自具有以下结构的化合物：



式 I

[0132] 其中：

[0133]  $R^1$ 和 $R^5$ 各自独立地包含或为-OH或磷酸根如 $-OPO_3H^-$ ；

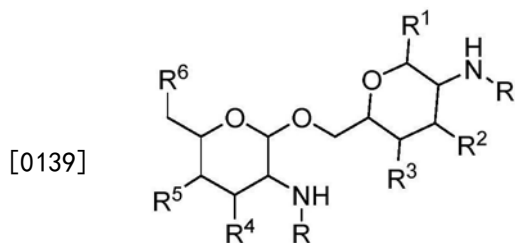
[0134]  $R^2$ ,  $R^3$ 和 $R^4$ 各自独立地包含或为-OH或-OR；

[0135]  $R^6$ 是-OH或-OR<sup>7</sup>；

[0136] R的每个实例独立地为氢或任选取代的酰基链；和

[0137]  $R^7$ 是或包含多糖。

[0138] 因此本公开内容提供了具有以下结构的化合物：



式 II

[0140] 其中：

[0141]  $R^1$ 和 $R^5$ 各自独立地包含或为-OH或磷酸根如 $-OPO_3H^-$ ；

[0142]  $R^2$ ,  $R^3$ 和 $R^4$ 各自独立地包含或为-OH或-OR；

[0143]  $R^6$ 是-OH或-OR<sup>7</sup>；

[0144] R的每个实例独立地为氢或任选取代的酰基链；和

[0145]  $R^7$ 是或包含多糖。

[0146] 在一些实施方案中，磷酸根是 $-OPO_3H^-$ 。在一些实施方案中，磷酸根是 $-OPO_3H_2^-$ 。

[0147] 在一些实施方案中，酰基链选自本文提供的任何酰基链，包括直链和支链酰基链。

[0148] 在一些实施方案中，如本文所述，多糖是PSA或者是包含1个或更多个PSA的四糖重复单元的多糖。

[0149] 在一些实施方案中， $R_3$ 是OH。

[0150] 在一些实施方案中， $R_1$ 或 $R_5$ 是或包含磷酸根(即，仅一个是或包含磷酸根)。

[0151] 上述实例不应被认为是限制性的，而是本发明考虑了用于脂化PSA组合物中的各种组合以及前述的组合。

[0152] 本发明提供了具有已知的并且因此任选地预定义的糖脂含量和组成以及已知的且因此任选地预定义的多糖与糖脂比例的已定义的脂化PSA混合物。因此，本发明的脂化PSA及其组合物可以根据任何这些结构特征来表征，从而进一步将这些组合物与现有技术

的组合物区分开来。例如,基于本文提供的教导,本发明提供了包含脂化PSA种类的组合物,其仅仅或主要(例如,大于50%,或至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%或至少95%)是二酰化或三酰化或四酰化或五酰化的或其一些组合,包括但不限于四-和五-酰化。这种化学上确定的组合物迄今为止没有被设想或实现。

[0153] 本发明进一步提供了从脂化PSA及其组合物获得的分离的糖脂用于体内和体外应用。预期任何前述糖脂和前述脂质的任何组合用于此类应用。

[0154] 分离的形式

[0155] 如本文所述,根据本发明已经发现,分离方法可显著影响分离的脂化PSA的丰度,影响产率和纯度。例如,已经发现,与包括酸水解步骤的方法(即使酸分解步骤早于分离过程发生)相比,排除酸水解步骤的分离方法产生更完整的完全脂化PSA种类。换言之,当使用酸水解步骤从脆弱拟杆菌中收获脂化的PSA时,在该过程中,一部分最初脂化的PSA将变为脱脂的。这例如可以通过将制剂在用硫酸锌/咪唑染色反染色的16.5%Tris-Tricine SDS-PAGE凝胶上进行电泳来看到,例如如图10所示,其比较了使用温和酸水解分离的脂化PSA(批次28)和未经酸水解步骤分离的脂化PSA(批次34)。该染色方案允许人们在同一凝胶系统中观察脂化PSA的多糖和脂质部分。已经发现现有技术的脂化PSA制剂含有比本发明的脂化PSA制剂更程度的释放的糖脂。

[0156] 因此,本文提供的制剂可以通过其释放或游离糖脂的含量来表征。这样的含量可以少于5%,少于4%,少于3%,少于2%,少于1%,少于0.5%,少于0.1%,少于0.05%,少于0.001%,少于0.0005%,少于0.0001%(释放的糖脂相对于脂化PSA,w/w)。在一些情况下,如例如使用本文所述的凝胶电泳方法测定的,组合物或制剂具有检测不到的释放或游离的糖脂水平。在这些情况下,可以认为脂化PSA不含或基本上不含释放的糖脂。脂化PSA也可以被认为是纯的(即,它不含或基本上不含释放的糖脂和任何其它天然存在的污染物)。纯度可以是至少70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%,99.1%,99.2%,99.3%,99.4%,99.5%,99.6%,99.7%,99.8%或99.9%或更高。

[0157] 因此,本发明提供了包含分离的脂化PSA的组合物,包括包含迄今尚未达到的纯度和/或浓度的分离的脂化PSA的组合物。还提供了包含或基本由特定种类的脂化PSA或脂化PSA种类的特定子集组成的组合物。这些种类可以表征并因此与其他种类区分开来,并且就其糖脂组分而言可以与批量分离的脂化PSA区分开。糖脂组分可以通过它们具有的酰基链的数量、位置和类型来表征。例如,它们可以包含相对于天然比例增加量的二酰化、三酰化、四酰化或主要五酰化形式的脂化PSA。这些增加的量可能会超过特定种类的天然存在的呈现度,因此这些数量会因具体种类而异。例如,组合物可以包含至少5%,10%,15%,20%或更多的二酰化脂化PSA,或者其可以包含至少70%,75%,80%,85%,90%,95%或更多的四酰化和/或五酰化脂化PSA。

[0158] 组合物可以通过它们的纯度来定义,例如关于它们的糖脂组分,或关于它们的污染物含量如非脂化PSA。组合物可以通过它们的脂化PSA的浓度或通过它们的PSA组分和/或糖脂组分的浓度,或通过它们的PSA与糖脂组分的比例来定义。

[0159] 合成形式

[0160] 本发明进一步提供了另外的合成的、非天然存在的脂化PSA的种类。在一些情况下,这些非天然存在的种类被表征为具有比在分离形式的脂化PSA中观察到的更低的四糖/

糖脂比例(或更低的PSA/糖脂比例,其中PSA是包含一个或多个重复四糖单元的聚合物)。这种比例可以是摩尔比或分子量比。本发明进一步提供了包含以非天然存在的缀合形式获得或衍生自脂化PSA的多糖(PSA)或四糖和糖脂和/或脂质组分的其它组合物。例如,多糖和糖脂组分可以通过非天然存在的键相互缀合。该键可以是非酮苷键,并且可以是酯或酰胺或醚,而没有限制。在其他组合物中,诸如多糖和糖脂组分的组分可以是未缀合的。在其他组合物中,多糖(或四糖)和糖脂(或脂质)组分(无论是缀合的还是非缀合的)存在于基底或递送载体中或其上。

[0161] 所有这些不同形式的脂化PSA,包括例如从脆弱拟杆菌细胞中分离的那些,合成制备并且具有不同于分离形式的多糖/糖脂比例的那些,作为非缀合多糖和糖脂组分提供的那些,等等,均被认为是活性剂。涉及和提及“脂化PSA”的各个方面和实施方案同样适用于这些不同的形式,并且不意味着仅适用于分离形式或共价缀合形式,除非另有说明或明显不同。

[0162] 脂化PSA组合物

[0163] 本发明进一步提供了包含分离的脂化PSA的组合物。如本文所用,就脂化PSA而言,术语“分离的”意指脂化PSA由脆弱拟杆菌制备或获得,并且与其天然环境(例如,脆弱拟杆菌细胞,脆弱拟杆菌细胞的组分和/或脆弱拟杆菌细胞荚膜复合物的组分,例如但不限于PSB)物理分离。

[0164] 在一些实施方案中,组合物基本上不含天然存在的污染物,例如核酸(例如DNA和RNA),蛋白质和脆弱拟杆菌和/或脆弱拟杆菌荚膜的其他组分。如本文所用,“基本上不含”意味着这些污染物按重量计约为或少于5%,少于1%,少于0.5%或少于0.1%(或更少)(污染物的重量相对于脂化PSA形式的重量)。在某些情况下,这些污染物可能无法检测到。

[0165] 各种组合物可以含有或不含有LPS。LPS可以以约0.5%(LPS相对于脂化的PSA组分,w/w)的量存在。

[0166] 一些组合物可以包含至少约95%,96%,97%,98%,99%或更多(w/w)的脂化PSA和少于5%,少于4%,少于3%,少于2%,少于1%,少于0.5%或更少的游离释放糖脂。在一些实施方案中,游离的释放的糖脂是不可检测到的。

[0167] 因此,包含脂化PSA的某些组合物(无论是分离的还是合成的形式)可以包含或不包含包括LPS和/或游离的释放糖脂的其他组分。在一些实施方案中,存在于这样的组合物中的LPS的量为约0.5%(w/w)或更少。在一些实施方案中,释放或游离糖脂相对于脂化PSA的量为约0.5%(w/w)或更低。在各种其他实施方案中,存在于这样的组合物中的非脂化PSA的量为约10%(w/w)或更少,包括5%或更少,或1%或更少。在一些实施方案中,组合物基本上不含非脂化PSA。

[0168] 这些各种组分和污染物(包括脂化PSA,释放的(未缀合的)糖脂和/或LPS)的存在和量可以使用如本文所述的凝胶系统来确定。

[0169] 脂化PSA的一些组合物可以包含至少约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,99%或更多的多糖组分(非脂化PSA)(多糖的重量相对于多糖和糖脂总重量)。脂化PSA的一些组合物可包含约50%,45%,40%,35%,30%,25%,20%,15%,10%,5%,1%或更少的糖脂组分(糖脂重量相对于多糖和糖脂的总重量)。一些脂化PSA的组合物可包含约99%多糖组分(非脂化PSA)和约0.5%糖脂组分。脂化PSA的一些组合物可包含约

80%多糖组分(非脂化PSA)和约20%糖脂组分。这些可能是脂化PSA的分离或合成形式。因此,它们可以是其中多糖和糖脂组分彼此缀合的形式,或者它们可以是这些组分彼此不缀合的形式。缀合可以是直接或间接缀合,并且另外它可以是共价或非共价缀合。应该理解的是,多糖和糖脂组分是脂化PSA组分(即,由一种或多种式I的四糖单元和本文所述的糖脂形成并包含与一个或多个酰基链缀合的二糖的聚合物)。

[0170] 举例来说,在一种情况下,组合物可以包含具有6个四糖单元和一个四酰化糖脂单元的合成形式的脂化PSA(参见例如图6A中的式II)。该组合物可包含约20%糖脂和80%多糖(w/w,如上所定义)。合成组合物可以通过它们的糖脂和多糖组分、量和比例来定义,无论这些组分是彼此缀合的还是非缀合的。本领域普通技术人员可以预期其他组合物和组合,并且将容易地理解其他组合物和组合。

[0171] 应该理解,本发明的组合物通常包含多种脂化PSA分子,并且在一些情况下,多种脂化PSA分子可以表现出脂化程度或性质的变化。本发明预期组合物具有特定比例的脂化PSA的特定种类和/或脂化PSA的特定子集。比例可以是w/w比例(例如,特定种类的重量相对于组合物中所有脂化PSA的重量)。这样的比例可以是大约或大于5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%或更多的确定种类或种类子集。例如,特定种类可以是包含式II的糖脂的脂化PSA或包含式III的糖脂的脂化PSA或包含图5中列出的任何一种酰基链组合的脂化PSA。脂化PSA种类的特定子集可以是包含四酰化糖脂的脂化PSA,或包含五酰化糖脂的脂化PSA或包含四酰化或五酰化糖脂的脂化PSA。各种子集都是可以预期的,并且基于本公开内容将是明显的。

[0172] 本发明提供了用于体外和体内的组合物。在体外,组合物可以用作分析工具或测定标准。在体内,组合物可使用或用于实验模型如人类疾病的动物模型或用于人或其他需要免疫调节的对象。当在体内使用时,组合物是药学上可接受的,意指它们适合施用至受试者。它们可能或可能不会在这些受试者中预防或治疗地使用。

[0173] 脂化PSA形式可以作为独立的活性剂使用,或者它们可以与一种或多种其他活性剂组合使用。试剂的组合使用可以是添加剂或可以是超添加剂(例如协同)。脂化PSA形式可以与其他活性剂一起或与其分开配制。脂化PSA形式可以经由与其他活性剂相同或不同的途径施用。如果不一起配制,则脂化PSA形式和其他活性剂可以以相同或基本相同的施用方案施用(包括基本上同时施用,尽管未配制在一起),或者可以根据不同的方案施用。脂化PSA形式可以急性和/或慢性给药。

[0174] 分离和合成方法

[0175] 本发明进一步提供从脆弱拟杆菌中分离和纯化脂化PSA的方法以及制备本文所述的各种合成形式的脂化PSA的方法。

[0176] 最近认识到,用于分离和纯化PSA的现有技术方法从多糖除去脂质部分,从而以前仅产生用于PSA的多糖结构。参见公开的PCT申请W02013/009945。然而,脂质部分的性质及其与PSA的特定连接在本发明之前是未知的。

[0177] 分离方法

[0178] 根据本发明,发现脂化PSA可以在不存在水解步骤的情况下分离。因此,本文提供了用于从脆弱拟杆菌菌株中分离脂化PSA的非水解方法(即缺乏水解步骤如酸水解步骤的方法)。先前没有认识到脂化PSA可以在不经过水解步骤的情况下从脆弱拟杆菌菌株中分离

出来。

[0179] 还发现脂化PSA可以在胆汁盐例如脱氧胆酸盐的存在下分离。以前认为去污剂或胆汁盐如脱氧胆酸钠的存在对分离过程是不利的,导致脂化PSA的产率较低。出乎意料的是,本文提供的不含水解步骤且任选地使用去污剂(例如脱氧胆酸盐)的各种方法提供了脂化PSA的合适产率,并且在一些情况下提供了更高产率的脂化PSA。从分离过程中完全排除酸水解步骤可防止糖脂从PSA上水解下来,从而导致相对于非脂化PSA的更大比例的脂化PSA。这通过在这样的制剂中减少和在大多数情况下以不可检测的量存在的释放的(未缀合的)糖脂来证明。可以使用本文所述的任何分析技术观察释放的糖脂,包括凝胶电泳或质谱。

[0180] 在一些情况下,此类方法涉及使用本文所述的分离方法分离脂化PSA,并纯化分离的脂化PSA以达到迄今未实现的纯度和/或浓度水平。如本文所证明的,这种纯度和/或浓度水平可以通过下述而明显:脂化PSA(例如作为胶束)的聚集程度,以及任选的解聚剂如脱氧胆酸盐增加这些组合物的生物学活性的作用。

[0181] 由于认为脂化PSA比非脂化PSA更具生物活性,本文提供的分离方法产生脂化PSA,其具有比以前所述的制剂更高的单位重量活性。例如,这种活性可以是IL-10诱导活性。

[0182] 该方法提供了从脆弱拟杆菌中分离和纯化脂化PSA的一般和具体方法。应该理解的是,这些方法可以在任何脆弱拟杆菌菌株上进行,只要它产生脂化PSA。这种菌株包括天然存在的菌株或非天然存在的菌株。非天然存在的菌株的一个例子是脆弱拟杆菌菌株9343的delta44突变体。该突变菌株仅表达PSA,而不是在野生型菌株如9343中发现的PSA和PSB。

[0183] 分离方法通常涉及在厌氧条件下生长脆弱拟杆菌(野生型或突变株),从脆弱拟杆菌中提取多糖荚膜复合物,分离多糖级分,并从该级分中纯化脂化PSA。提取步骤可以使用苯酚/水萃取来完成,其任选可以在升高的温度(例如约60-80℃)下进行。然后将含有荚膜多糖的水相相对于水进行透析,随后可将其部分冻干以减少总体积。然后通常用核酸酶例如DNA酶和RNA酶以及蛋白酶例如链霉菌蛋白酶处理所得溶液以进一步纯化多糖级分。然后乙醇沉淀多糖级分,收集沉淀物,洗涤并进行尺寸排阻技术以进一步将脂化PSA与其他多糖(包括例如LPS)分离。典型的尺寸排阻技术是柱色谱法。合适的色谱柱是S-400尺寸排阻色谱柱。如实施例所述,使用含有脱氧胆酸钠形式的生物去污剂的色谱柱分离脂化PSA。鉴定并合并包含脂化PSA的柱级分,并且如果需要,可以将合并的混合物进一步透析和冻干。此外,重构后,混合物可以进一步透析、乙醇沉淀和/或冻干以备储存或延迟使用。整个分离期间的pH优选为9或更小(例如,约4至约9或更小),并且在大多数步骤中保持在中性范围。

[0184] 前述方法可以在没有酸水解步骤的情况下进行。然而,应当理解,可以使用包括酸水解步骤和/或尺寸排阻步骤而不使用如脱氧胆酸钠的去污剂的方法来收获脂化PSA及其种类和种类子集。

[0185] 如果使用酸水解步骤,则优选温和水解(例如,在约4的pH,或在4-5的范围内的pH),并且其优选结合在纯化过程中的早期步骤(例如在第一次乙醇沉淀后)。如果使用酸水解,可以使用稀酸(例如1-2%乙酸)在高温下进行酸水解。高温可以在80-100℃、85-95℃的范围内,并且在一些情况下可以是约90℃。处理可持续1小时、2小时、3小时或更长时间。在一些情况下,使用2%乙酸在90℃进行酸处理3小时。

[0186] 前述方法可以在色谱柱和/或洗脱液中使用去污剂或胆汁盐例如脱氧胆酸盐(例

如脱氧胆酸钠)进行。脱氧胆酸钠可以以少于5%，少于4%，少于3%，少于2%或大约1%或更小的强度存在。然而，应该理解，可以使用包括尺寸排阻步骤的方法收获脂化PSA，所述步骤不使用诸如脱氧胆酸盐的去污剂。

[0187] 因此，示例性分离方法包括使用苯酚和水的混合物任选地在高温下将来自脆弱拟杆菌的荚膜复合物萃取到水相中，任选地，在DNA和/或RNA和/或蛋白质消化之后使用乙醇使水相中的多糖级分沉淀，并且通过尺寸排阻（例如含有脱氧胆酸钠的色谱柱）从其他多糖中分离脂化PSA。

[0188] 一旦分离，由脆弱拟杆菌制备的脂化PSA形式可以被进一步修饰。例如，多糖组分可以被解聚以产生具有比天然发现的更少的四糖单元的另一种非天然存在的形式。这可以通过机械、化学或酶学手段完成。如Duan和Kasper, *Glycobiology*, 2011, 21 (4) : 401-409中所述，化学解聚的例子涉及活性氧种类或活性氮种类，例如但不限于一氧化氮。糖苷酶可用于酶促解聚。机械解聚可能涉及剪切。例如，PSA聚合物可以缩短25%，50%，75%或更多，由此产生与天然存在的脂化PSA在结构上不同的脂化PSA。这种修饰可产生具有约50、40、30、20或约1-10个四糖单元长度的PSA或脂化PSA。

[0189] 使用例如液相色谱法、离子色谱法或其他基于尺寸的或基于离子的分离技术，可以根据多糖长度解聚并分级分离PSA的脂化和非脂化形式。

[0190] 脂化PSA的分离形式可以单独配制，在这种情况下它们形成紧密的胶束状结构。值得注意的是，脂化PSA在体内存在时不会形成这样的胶束样结构。仅在以相对纯的形式分离脂化PSA时才观察到（并因此成为可能的）这种改变的结构。此外，这些胶束状结构如此稳定以至于可能需要去污剂或其他解聚剂来破坏它们或使它们不太稳定，从而使其中包含的脂化PSA可接近。

[0191] 在这些各种非天然存在的形式中，酰基链位于胶束状结构的外部，因此可被靶细胞及其受体接近。这样的细胞包括抗原呈递细胞，并且这样的受体包括TLR例如TLR2。参见Wang等人 *J. Exp. Med* 203 (13) : 2853-63 和 Round等人 *Science* 2011, 332 (6032) : 974-7。

[0192] 分离的脂化PSA还可以基于糖脂的性质进行分级分离，使得所得组合物包含非天然存在比例的二酰化、三酰化、四酰化和五酰化PSA。

[0193] 因此，本公开内容考虑了与天然存在的脂化PSA相比具有更少四糖单元的脂化PSA的另外的非天然存在种类。

[0194] 其他方法

[0195] 本发明的合成脂化PSA形式可以使用天然存在形式的或合成产生形式的多糖和糖脂组分制备。天然存在的形式可以通过慎重水解（例如酸处理）脂化PSA从而切割多糖和糖脂之间的酮苷键来制备。多糖和糖脂组分可以彼此分离，并由此使用液相色谱法、离子色谱法，凝胶电泳或其他基于尺寸的或基于电荷的分离技术分离。

[0196] 多糖可以通过机械、化学和/或酶促方式进一步修饰。如果需要，这可以用来减少多糖组分的长度。多糖（PSA）可以使用例如本领域已知的和本文描述的机械和/或酶学手段解聚。

[0197] 类似地，本发明考虑根据它们的酰化程度将从脂化PSA获得的天然存在的糖脂分级分离，然后将特定子集与多糖组分重组。例如，可以分离五酰化或四酰化糖脂子集并与多糖组分重组。最终产物可以包含糖脂和多糖之间的天然存在的键，或者它们可以包含非天

然存在的键,例如酯、酰胺、醚或其组合。多糖和糖脂也可以通过双功能连接分子缀合,例如但不限于2-(Boc-氨基)乙基溴。可以使用其他接头分子,并且其是本领域已知的。

[0198] 或者,脂化PSA的组分可以被合成然后组合。例如,可以合成糖脂然后与分离自脆弱拟杆菌的多糖组分一起使用。例如,可以使用Imoto等人(Tet.Lett.1984,25:25,2667-2670)中所述的技术合成糖脂。这些技术可用于产生合成脂化PSA的缀合和非缀合形式。应该理解,为了简洁,如本文所用,术语“脂化PSA”包括合成形式,其包含一起提供但以非缀合形式(例如,在基底中或在基底上,如下所述)提供的多糖和糖脂组分。

[0199] 可以提供合成的脂化PSA形式,包括在基底中和/或在基底上。基底可以是固体或半固体,并且可以采取各种形状或形式中的任何一种。基底可以是生物可降解的,并且其本身可以由天然存在的和/或非天然存在的组分组成,例如但不限于天然存在的和/或非天然存在的聚合物。合适基底的一个例子是颗粒。颗粒可以是微粒(平均直径在1-999微米范围内)或纳米颗粒(平均直径在1-900纳米范围内)。颗粒可以是多孔颗粒或者它可以是无孔颗粒。生产这种在其中或其上具有活性剂的颗粒的方法是本领域已知的。因此,本发明考虑使用任何此类方法和任何此类颗粒来制备本文所考虑的脂化PSA的某些组合物。

[0200] 在一些情况下,糖脂或PSA组分缀合到颗粒的表面。

[0201] 在一些情况下,糖脂和PSA组分以脂质体或脂质体样结构提供。糖脂组分可以在外部,并且多糖组分可以在脂质体内部。脂质体可以仅包含来自脂化PSA的糖脂和PSA组分,或者其可以包含其他组分,例如但不限于其他脂质。据信面向外部的脂质组分与抗原呈递细胞上的TLR2相互作用,从而促进脂质体进入这种细胞和PSA组分的细胞内释放。

[0202] 天然或非天然存在的脂化PSA的脂质体或胶束形式通常在表面包含糖脂组分并且可用于与细胞和特定受体(如TLR2)相互作用。

[0203] 可以配制脂化PSA以靶向特定的细胞类型,以获得更高的治疗功效。例如,如果脂化PSA(无论是分离的还是合成的)都是在基底如纳米颗粒的背景下提供的,则基底可以进一步包含增加基底与免疫细胞(如抗原呈递细胞(APC),包括树突状细胞和B细胞)的归巢或结合的部分。

[0204] 非天然存在形式的脂化PSA的实例包括包含糖脂和多糖组分之间的非天然存在的键的那些,具有比天然存在形式的脂化PSA更短或更长的PSA聚合物的那些,以低于或高于其天然存在的比例存在的那些,或具有这些特征的某些组合或全部这些特征的那些。

[0205] 脂化PSA的分析和表征方法

[0206] 本发明提供了检测脂化PSA存在的方法,并且在一些情况下定量样品或组合物中脂化PSA的量。

[0207] 结构表征

[0208] 分离的级分的纯度可以通过质子NMR和/或SDS PAGE凝胶进行评估。质子NMR谱可以使用600MHz NMR产生。可以类似的方式测试其他组合物的脂化PSA的存在。

[0209] 这些方法也可用于表征脂化PSA的糖脂组分。例如,如图1和2所示,脂化PSA的四酰化和五酰化糖脂可以使用质谱彼此区分。类似地,MADLI-TOF-TOF可用于从脂化PSA检测和区分二酰化、三酰化、四酰化和五酰化糖脂。因此,这些方法可用于测试特定糖脂的存在。

[0210] 还可以使用酸处理时间过程来鉴定脂化PSA的存在,由此可以使用用硫酸锌/咪唑染色反向染色的16.5%Tris-Tricine SDS-PAGE凝胶来显现释放的(未缀合的)脂质部分。

该染色方案允许人们在同一凝胶系统中观察脂化PSA的多糖和脂质部分。作为一个例子,待测脂化PSA含量的样品可以用2%乙酸在90℃处理不同的时间,然后用NaOH中和并透析。然后将100微克所得产物在16.5%Tris-Tricine SDS-PAGE凝胶上运行并如上所述进行反向染色。随着水解时间的增加,伴随有约5kD的一条或多条脂质条带出现的脂化PSA条带(60kD以上的主条带,其代表脂化和非脂化形式的PSA)的强度降低证明存在脂化PSA。随着时间的增加,约6和8kD的LPS条带的强度也降低。

[0211] 这种方法也可用于测试脂化PSA制剂中是否存在游离的释放的糖脂。图10说明了用弱酸水解制备的制剂(PSA批次28)和根本不用酸水解步骤制备的制剂(PSA批次34)的SDS PAGE凝胶分析结果。使用非水解方法分离的批次34不含游离的释放的糖脂,而使用温和水解分离的批次28具有游离的释放的糖脂。应该理解,游离的释放的糖脂是指未与多糖PSA缀合的糖脂,并且这种糖脂可以被互换地称为是游离的、释放的或者未缀合的。

[0212] 功能表征

[0213] 已显示脂化PSA比其非脂化对应物(即非脂化PSA)更有效。脂化PSA的免疫学活性可以在体外和体内测定。体外试验的一个例子是在脾树突细胞(DC)和T细胞共培养物中诱导IL-10产生。该测定可以如下进行:(1)使用小鼠抗CD11c微珠(Miltenyi Biotec cat# 130-052-001)分离脾DC;(2)使用小鼠T细胞CD4子集柱试剂盒(R&D systems cat#MCD4C-1000)分离CD4<sup>+</sup>T细胞;(3)将 $2 \times 10^4$ 个CD11c<sup>+</sup>DC和 $10^5$ 个CD4<sup>+</sup>T细胞混合并加入1μg/ml抗CD3(BD Pharmingen目录号553057);(4)然后用100μg/ml脂化PSA刺激培养物并将细胞孵育5天;和(5)收获上清液并通过ELISA分析IL-10的存在。

[0214] 图7表明,使用该共培养体系,使用较温和较早的酸水解步骤制备的脂化PSA(显示为PSA 24)的效力是使用较苛刻且较晚的酸水解步骤制备的材料(显示为PSA 23)的效力的约3倍。

[0215] 图8显示了没有酸水解步骤下制备的脂化PSA(显示为PSA34,每对条带的第二条)在该相同测定中的活性。在加入脱氧胆酸盐(DOC)后,该制剂的IL-10诱导活性增加约2倍。使用较温和的酸水解步骤制备的脂化PSA(显示为PSA28,每对条带的第一条)未观察到类似的增加。添加脱氧胆酸盐后活性的增加表明脂化PSA紧密聚集并且这种聚集形式不太稳定,因此在脱氧胆酸盐存在下脂化PSA更易接近。

[0216] 多发性硬化症(EAE)的动物模型可用于在体内研究脂化PSA的免疫学活性。在该模型中,在EAE诱导前6天开始每三天用脂化PSA(大约75-100μg/小鼠)或对照(盐水,PBS)处理小鼠。用在200μl完全弗氏佐剂(Sigma)中的250μg MOG<sub>33-55</sub>(Peptides International)皮下攻击小鼠。在攻击后第0天和第2天,小鼠接受腹腔内注射250ng百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)毒素(List Biological Laboratories)。以确定的0-5等级对疾病进行评分,其中5分为晚期神经系统疾病。监测小鼠并每天对疾病进展评分。

[0217] 使用方法

[0218] 还提供了在体外和体内使用各种形式的脂化PSA的方法。各种形式的脂化PSA比先前描述的非脂化形式的PSA更有效。本文提供的各种形式可以用作免疫调节剂,特别是鉴于其增强的IL-10诱导活性和Treg成熟活性。预期这些形式用于体外和体内应用。体外用途包括用作分析工具(例如,作为脆弱拟杆菌存在的标记)和作为测定标准或对照(例如作为脂化PSA的阳性标记或在体外测定中的比较物,例如IL-10诱导测定)。体内用途包括用于动物

模型,并且还临床上用于治疗或预防炎性病症,例如但不限于自身免疫病症(例如多发性硬化症和炎性肠病)。

[0219] 本发明进一步考虑脂化PSA的单独的多糖和糖脂组分的用途。例如,糖脂组分可以用作单一药剂。作为另一个例子,多糖和糖脂组分可以以非缀合形式一起使用。

[0220] 体内用途包括但不限于涉及人类受试者的那些。例如,体内用途包括将脂化PSA分子及其组合物给予非人受试者以调节免疫应答,例如作为阳性对照或比较物。

[0221] 还考虑通过给予此类受试者本文所述的脂化PSA来调节受试者的免疫应答的方法。受试者可能是患有或可能发展异常免疫应答的受试者。通常,异常免疫应答是增强的免疫应答,并且脂化PSA起到下调免疫应答的作用。增强的免疫应答通常与炎症状况相关,例如但不限于自身免疫疾病。

[0222] 因此,包含例如分离或合成形式的脂化PSA、缀合或未缀合形式的脂化PSA、或脂化PSA的糖脂组分(作为单一药剂或与除PSA以外的多糖组合)的本发明组合物可以用于调节(并典型地下调)患有或有风险发展自身免疫疾病的受试者的免疫应答。如本领域普通技术人员将理解的,患有自身免疫疾病的受试者通常经历与自身免疫疾病相关的一个或多个“事件”或复发。例如,患有炎症性肠病的受试者可能经历疾病的暂时的分离的攻击,其特征在于症状的存在或症状的严重程度增加。本发明预期所述组合物可以用于这样的受试者中以降低疾病的未来复发的可能性或降低与所述疾病相关的症状的严重程度(例如疼痛,发烧,不适,疲劳等)。因此,组合物可以在这种复发之前施用,并且可以以这种方式长期施用,任选地以常规频率施用。实例包括每天一次,每2、3、4、5或6天一次或每周一次等。本发明还预期组合物可在复发过程中施用至受试者以降低症状的严重程度或缩短再次发生的时间。

[0223] 因此,作为实例,本发明提供了一种方法,其包括向处于炎症相关病症复发风险的受试者施用有效量的本文提供的任何形式的脂化PSA,例如但不限于分离的或合成形式的脂化PSA和/或缀合或非缀合形式的脂化PSA,或有效量的作为单一药剂或与除PSA以外的药剂组合的脂化PSA的糖脂组分。该方法可以减少病症复发的可能性或者可以降低未来复发的频率。该方法可以降低与该病症相关的症状的严重程度,无论这种症状是以第一次表现、复发还是长期存在。

[0224] 自身免疫性疾病在本领域中是已知的。自身免疫性疾病的实例包括但不限于多发性硬化症,包括克罗恩病和溃疡性结肠炎的炎症性肠病,类风湿性关节炎,牛皮癣,I型糖尿病,葡萄膜炎,腹腔疾病(Celiac disease),恶性贫血,斯罗伊恩综合征(Srojen's syndrome),桥本氏甲状腺炎,格雷夫斯病,系统性红斑狼疮,急性播散性脑脊髓炎,艾迪生病,强直性脊柱炎,抗磷脂抗体综合征,格林巴利综合征,特发性血小板减少性紫癜,古德帕斯丘氏综合征,重症肌无力,天疱疮,巨细胞动脉炎,再生障碍性贫血,自身免疫性肝炎,Kawaski病,混合性结缔组织疾病,Ord甲状腺炎,多发性关节炎,原发性胆管硬化症,莱特尔氏综合征,Takaysu动脉炎,白癜风,温抗体型自身免疫性溶血性贫血(warm autoimmune hemolytic anemia),韦格纳肉芽肿病,查加斯病,慢性阻塞性肺病和结节病。

[0225] 在重要的实施方案中,自身免疫性疾病是多发性硬化症。在其他重要的实施方案中,自身免疫性疾病是炎症性肠病,包括但不限于溃疡性结肠炎和克罗恩氏病。在其他实施方案中,自身免疫性疾病可以是类风湿性关节炎或I型糖尿病。

[0226] 在一些情况下,本发明的组合物可以基于已知的遗传或家族性倾向对尚未表现出

自身免疫性疾病(包括其症状)但处于发展这样的疾病风险中的受试者施用。这样的受试者可能有一个或多个患有该疾病的家庭成员。

[0227] 在一些情况下,将本发明的组合物施用至患有移植物抗宿主病或有发生移植物抗宿主病风险的受试者。可以在器官或组织(包括血液或血液制品)移植入受试者之前、期间和/或之后施用。

[0228] 在其他情况下,组合物可以施用至患有炎症相关病症或具有发展炎症相关病症风险的受试者。

[0229] 作为例子,组合物可以施用至患有哮喘的受试者。如本领域中将理解的,具有哮喘的受试者通常经历哮喘发作或以呼吸障碍为特征的事件。本发明预期本文所述的组合物可以对哮喘受试者进行急性给药(例如,单次大剂量)或长期给药(例如重复,较小剂量)。因此,在一些情况下,组合物可以在哮喘发作之前施用以防止发作发生、减少发作的频率和/或减轻发作的严重程度。在一些情况下,组合物可以在发作期间施用以降低其严重性和/或减少其持续时间。

[0230] 与炎症相关的另一种病症是术后粘连。本发明考虑将本文描述的组合物施用至患有术后粘连或具有发生术后粘连风险的受试者。可以在手术之前、期间和/或手术之后立即或其任何组合(包括但不限于手术之前和期间)施用组合物,以防止这种粘连的发生和/或降低其严重性。可以在手术后重复施用组合物,包括例如每天,每两天,每三天等等,持续手术一周,两周,三周,一个月或几个月。

[0231] 与炎症相关的另一种病症是脓肿,包括但不限于肠内容物渗入腹膜时可能发生的腹腔脓肿。在这些情况下,所治疗的受试者也可以施用抗菌剂如抗生素。

[0232] 因此,作为另一实例,提供了一种方法,其包括向患有脓肿或有罹患脓肿的风险的受试者施用有效量的本文所述的任何脂化PSA形式或脂化PSA的糖脂组分(与多糖组分分离)或其组合物。在一些实施方案中,还向受试者施用抗菌剂如抗生素。在一些实施方案中,脂化PSA在脓肿发展之前和/或在与脓肿相关的症状出现之前施用。在一些实施方案中,脂化PSA或糖脂在检测到或诊断脓肿之后和/或在与脓肿相关的症状出现之后施用。

[0233] 与炎症相关的另一种病症是肥胖症,因此本发明还考虑将本文所述的组合物施用至肥胖的受试者中。这样的受试者通常被定义为具有30或更高的体重指数(BMI)。在一些情况下,组合物可以施用至BMI大于20或大于25的受试者。所述组合物旨在防止此类受试者进一步体重增加和/或诱导体重减轻。

[0234] 受试者旨在包括将受益于施用本发明的组合物或可以施用本发明的组合物的任何受试者。在重要的实施方案中,受试者是人类受试者。受试者也可以是伴侣动物如狗或猫,农业牲畜如马,牛,猪,绵羊等,实验动物如小鼠,大鼠,兔子,猴子等,或动物如保持动物园中或以其它方式被圈养的那些动物。

[0235] 有多种施用途径可供选择。当然,所选择的具体模式将取决于所治疗的具体病症,所治疗的病症的严重程度以及治疗效果所需的剂量。一般而言,本发明的方法可以使用医学可接受的任何给药模式来实施,这意味着任何产生有效水平的活性化合物而不引起临床上不可接受的副作用的方式。这种给药方式包括口服,直肠,局部,鼻腔,吸入(例如吸入器或雾化)或胃肠外途径。术语“胃肠外”包括皮下,静脉内,肌内,腹膜内或输注。

[0236] 制剂

[0237] 当施用时,将本发明的活性剂配制成药学上可接受的组合物或制剂。这样的组合物或制剂可以常规地含有药学上可接受的载体,盐浓度,缓冲剂,防腐剂,其他免疫调节剂和任选的其他治疗剂。如本文所用并且在下文中更充分描述的术语“药学上可接受的载体”是指适用于施用至人类或其他动物的一种或多种相容的固体或液体填充剂、稀释剂或胶囊化物质。术语“载体”表示天然或合成的有机或无机组分,与活性剂结合以促进施用、长期储存、稳定性等。本发明的活性剂可以与药物组合物的其他组分以不存在会显著损害所需药物功效的相互作用的方式混合。

[0238] 药物组合物可以以单位剂型存在并且可以通过药学领域已知的任何方法制备。所有方法都包括使活性剂与构成一种或多种辅助组分的载体结合的步骤。通常,通过使活性剂与液体载体、细碎的固体载体或两者均匀且紧密地结合,然后如果需要,使产物成形来制备组合物。适合于口服给药的组合物可以作为离散单位存在,例如胶囊、片剂、锭剂,各自含有预定量的活性剂。其他组合物包括在含水液体或非水性液体中的混悬剂,如糖浆剂、酏剂或乳剂。

[0239] 活性剂可以以本身(纯)或以药学上可接受的盐的形式施用。药学上可接受的盐可用于体内应用以及体外应用。非药学上可接受的盐可以用于制备其药学上可接受的盐,并且不排除在本发明的范围之外。药学上可接受的盐包括但不限于由以下酸制备的那些:盐酸,氢溴酸,硫酸,硝酸,磷酸,马来酸,乙酸,水杨酸,对甲苯磺酸,酒石酸,柠檬酸,甲磺酸,甲酸,丙二酸,琥珀酸,萘-2-磺酸和苯磺酸。而且,药学上可接受的盐可以制备为碱金属盐或碱土金属盐,例如羧酸基团的钠盐、钾盐或钙盐。

[0240] 合适的缓冲剂包括:乙酸和盐(1-2%w/v);柠檬酸和盐(1-3%w/v);硼酸和盐(0.5-2.5%w/v);以及磷酸和盐(0.8-2%w/v)。合适的防腐剂包括苯扎氯铵(0.003-0.03%w/v);三氯叔丁醇(0.3-0.9%w/v);对羟基苯甲酸酯(0.01-0.25%w/v)和硫柳汞(0.004-0.02%w/v)。

[0241] 适合胃肠外给药的组合物便利地包含活性剂的无菌含水制剂,其可以与接受者的血液等渗。其中可以使用的可接受的载体和溶剂为水,林格溶液和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的不挥发油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以使用任何温和的不挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。另外,脂肪酸如油酸可用于制备注射剂。适用于皮下、肌肉、腹膜内、静脉内等给药的载体制剂可见于Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa.

[0242] 在一些实施方案中,脂化PSA或糖脂组分与去污剂(例如但不限于吐温或胆汁盐,例如但不限于脱氧胆酸盐(例如脱氧胆酸钠))一起配制以限制或防止脂化PSA聚集。这种去污剂或胆汁盐可以以低浓度使用,以使其仍然是药学上可接受的。例如,它可以以大约为或少于0.0001%、0.0005%、0.001%、0.002%、0.005%、0.01%、0.02%、0.05%、0.07%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%或更多的量存在。图8提供了包含约0.0025%脱氧胆酸盐和未经酸水解产生的分离的脂化PSA的组合物。

[0243] 可以使用如本文所述的质谱或凝胶电泳(例如,在后一种情况下,释放的脂质被清楚地鉴定为更快的迁移带)来测定脂化PSA向糖脂和多糖组分的降解。这在图10中示出。

[0244] 如上所述的药物制剂以有效量施用。对于治疗应用,其通常足以达到医学上期望

的结果的量。通常,治疗有效量是延迟所治疗的特定病症的发作、抑制进展或完全停止(包括降低病症复发的可能性、频率和/或严重程度)所需的量。作为实例,有效量可以是用于减轻、减缓或延迟所治疗或预防的病症的症状(例如疼痛,发热等)发作的量。有效量取决于给药方式、待治疗的特定病况和预期结果。它还将取决于病症的阶段、病情的严重程度、被治疗的受试者的年龄和身体状况、并行治疗(如果有的话)的性质、治疗的持续时间、具体的施用途径和医学从业者的知识和专业内的类似因素。对于预防性应用,其是足以延缓所预防的特定病症的发作、抑制进展或完全停止的量,并且可以通过预防症状发作所需的量来测量。

[0245] 通常,本发明的活性剂的剂量可以为约0.01mg/kg/日至1000mg/kg/日,优选约0.1mg/kg至200mg/kg,最优选约0.2mg/kg至约20mg/kg,每天一次或多次剂量给药,持续一天或多天。预计1-500mg/kg范围内的剂量,优选1-100mg/kg范围内的剂量,甚至更优选1-50mg/kg范围内的剂量将是合适的。本领域普通技术人员根据确定药剂最佳剂量水平的标准实践可以确定优选量。根据所用的合理的医学判断,通常优选最大剂量是最高安全剂量。

[0246] 在一些情况下,人受试者的总日剂量范围可以为约50-100微克脂化PSA或与多糖组分分离的糖脂组分。

[0247] 该药物制剂可以单独施用或与一种或多种其他活性剂联合施用。

[0248] 该药物制剂可以与适用于自身免疫性疾病(如多发性硬化症,克罗恩病,溃疡性结肠炎,哮喘,类风湿性关节炎等)的活性剂联合使用或施用。

[0249] 这种药剂的一个例子包括抗炎剂。例子包括类固醇和皮质类固醇如可的松;非甾类抗炎药,如阿司匹林,双水杨酯,塞来昔布,双氯芬酸,依托度酸,布洛芬,吲哚美辛,酮洛芬,酮咯酸,萘丁美酮,萘普生,奥沙普秦,吡罗昔康,舒林酸和托美丁;氨基水杨酸盐,如柳氮磺吡啶和5-氨基水杨酸盐,包括美沙拉嗪,巴柳氮和奥沙拉秦;硫唑嘌呤;巯基嘌呤;环孢素; $\beta$ 干扰素;醋酸格拉替雷;富马酸二甲酯;芬戈莫德;米托蒽醌;缓解疾病的抗风湿药(DMARD),如甲氨蝶呤,来氟米特,羟氯喹和柳氮磺胺吡啶。

[0250] 这种药剂的另一个例子包括抗体或抗体片段。例子包括TNF $\alpha$ 抑制剂,例如英利昔单抗(Remicade),阿达木单抗(Humira)和戈利木单抗(Simponi);那他珠单抗(Tysabri),维多珠单抗(Entyvio);优特克单抗(Stelara);阿巴西普(Orencia);阿纳金拉(Kineret);赛妥珠单抗(Cimzia),依那西普(Enbrel),利妥昔单抗(Rituxan),托珠单抗(Actemra)和托法替尼(Xeljanz)。

[0251] 本发明考虑,本文所述的各种形式的脂化PSA或脂化PSA的分离的糖脂组分与标准治疗(例如上述那些)的组合使用将允许较低剂量的标准治疗用于相同或更好的治疗效应,和/或将导致与这种标准治疗相关的副作用的发生率和/或严重程度降低。

[0252] 在一个实施方案中,所述药物制剂与一种或多种抗菌剂一起施用,所述抗菌剂包括选自以下的抗生素:青霉素G,青霉素V,氨苄青霉素,阿莫西林,巴氨西林,环青霉素,依匹西林,海他西林,匹氨西林,甲氧西林,萘夫西林,苯唑西林,氯唑西林,双氯西林,氟氯西林,羧苄西林,替卡西林,阿洛西林(avlocillin),美洛西林,哌拉西林,氮萘西林,头孢氨苄,头孢拉定,头孢羟氨苄(cefadroxil),头孢克洛,头孢唑林,头孢呋辛酯,头孢孟多,头孢尼西,头孢西丁,头孢噻肟,头孢唑肟,头孢甲肟(cefmenoxime),头孢曲松,拉氧头孢,头孢替坦,头孢哌酮,头孢他啶,亚胺培南,克拉维酸,特美汀,舒巴坦,新霉素,红霉素,甲硝唑,氯

霉素,克林霉素,林可霉素,万古霉素,甲氧苄啶-磺胺甲噁唑复方,氨基糖苷类,喹诺酮类,四环素类和利福平。

[0253] 包括以下实施例是为了举例说明的目的,而不是为了限制本发明的范围。

## 实施例

[0254] 实施例1. 脂化PSA的分离

[0255] 简言之,脆弱拟杆菌在厌氧条件下生长。用热酚/水萃取分离来自脆弱拟杆菌的荚膜复合物。经DNA酶、RNA酶和链霉蛋白酶处理后,用乙醇沉淀多糖级分。将沉淀物进行尺寸排阻色谱法以将脂化PSA与其他多糖组分分离。分析并合并感兴趣的级分,然后透析并冻干。通过核磁共振光谱和质谱评估脂化PSA的纯度。

[0256] 下文更详细地提供了脂化PSA的分离和纯化过程。

[0257] 脆弱拟杆菌delta44突变菌株是通过菌株9343实验获得的,并且在进一步表征时发现它相对于PSB过表达PSA。将Delta44铺板在血琼脂平板上并在37℃下过夜生长。将来自大量定殖的平板的擦拭物继代培养到500ml蛋白胨酵母肉汤起子培养物中。将起子培养物接种到相同培养基的16升培养物中,并用5M NaOH将pH滴定至中性。将厌氧气体混合物鼓泡到密封的培养物中。

[0258] 在维持在pH7的过夜培养后,通过革兰氏染色和继代培养检查细菌。通过以8,000xg离心20分钟收集生物体。细菌沉淀用盐水洗涤两次,产生约1升细菌沉淀。

[0259] 将细菌沉淀悬浮在68℃熔化的结晶苯酚中,使苯酚的最终浓度为约37%v/v(产生苯酚/水制剂),并在68℃下混合30分钟,然后在4℃下搅拌48小时。将酚/水制剂等分到玻璃瓶中,然后以1500rpm离心。收集上层水层。用等体积的乙醚萃取收集的水相中所含的任何残留苯酚。然后用分液漏斗除去醚相,蒸发水相中的任何残留的醚,从苯酚/水制备物中得到最终的水相。

[0260] 将水相相对于水进行透析,在4℃下5天内进行多次换液,随后冻干直至其几乎干燥(剩余约5ml水)。将具有镁、钙和叠氮化钠的0.05M Tris的溶液(总体积61ml)加入到冻干产品中,使总体积达到约66ml。

[0261] 向溶解的产物中加入10ml含DNA酶(0.07mg/ml)和RNA酶(0.33mg/ml)的Tris缓冲液。整个悬浮液通过0.45微米过滤器过滤,滤液在37℃搅拌。通过以相似的浓度向混合物中加入新鲜的酶重复DNA酶/RNA酶处理,并搅拌2小时。

[0262] 然后将混合物与25mg链霉蛋白酶在10ml Tris/镁/钙溶液中组合,并将混合物在37℃下搅拌24小时。重复这一步骤。

[0263] 在4℃下向混合物中加入5倍体积的乙醇来沉淀多糖级分。然后将溶液以12,000xg离心30分钟以沉淀多糖级分。除去上清液并将沉淀重新悬浮于392ml 1型H<sub>2</sub>O中。

[0264] 然后将溶解的级分在4℃下相对于16升1型H<sub>2</sub>O(两次换液)进行透析。通过冻干将体积减少至约50毫升。

[0265] 将20ml等分试样在悬浮于PBS和1%脱氧胆酸钠中的5×200cm S400柱上色谱分离,并收集级分。通过在琼脂中的双扩散法测试级分,其中抗体与脂化PSA和非脂化PSA反应以确定脂化PSA在何处洗脱。测试等分试样在280nm处的UV吸收,并且确定含脂化PSA的级分不具有UV吸收性材料。

[0266] 然后将含有脂化PSA的级分合并、浓缩并在具有10,000mw截止膜的Minitan浓缩器(Millipore)上针对1型H<sub>2</sub>O透析,直至100ml的电导率少于50 $\mu$ S。然后将脂化PSA冻干。

[0267] 多糖和糖脂纯度和结构通过质子核磁共振光谱在600MHz光谱仪和质谱上测定。对于MALDI-TOF-TOF和LC-MS分析,将脂化PSA样品重悬于2%乙酸中至10 $\mu$ g/ $\mu$ L,并在90℃加热90分钟。对于MALDI-TOF-TOF分析,将样品以1:1与1%基质(CHCA或DHB)溶液混合并直接加载至不锈钢MALDI板。对于LC-MS分析,样品进行或不进行液-液萃取(氯仿-水)步骤,然后干燥并重悬于50:50异丙醇:乙腈中并注射。

[0268] 等同物

[0269] 虽然已在本文中描述和说明了几个本发明的实施方案,但本领域技术人员将容易想到多种用于执行本文中描述的功能和/或获得本文中描述的结果和/或本文中描述的一个或多个有利方面的其它手段和/或结构,并且每一个这样的变化和/或修改被认为是在本文所述的本发明实施方案的范围之内。更一般地,本领域技术人员将容易理解,本文所述的所有参数、尺寸、材料和配置旨在是示例性的,并且实际的参数、尺寸、材料和/或配置将取决于本发明的教导所用于的具体应用。本领域技术人员将认识到,或能够仅使用常规实验来确定本文所述的具体的本发明的实施方案的许多等同物。因此,可以理解的是,前述实施方案仅作为示例的方式提出,并且在所附权利要求及其等同物的范围之内,本发明的实施方案可以以不同于所具体描述和要求的其它方式实施。本公开内容的发明的实施方案涉及本文所述的每一个个体特征、体系、制品、材料、试剂盒和/或方法。另外,两个或更多个这样的特征、体系、制品、材料、试剂盒和/或方法的任意组合包括在公开的本发明范围内,只要这样的特征、体系、制品、材料、试剂盒和/或方法不相互矛盾。

[0270] 如本文中定义和使用的所有定义应当被理解为优先于词典中的定义,通过引用并入的文献中的定义,和/或所定义的术语的普通含义。

[0271] 本文所公开的所有参考文献、专利和专利申请关于引用其所各自针对主题而通过引用并入,这在某些情况下可以包括文件的全部内容。

[0272] 不定冠词“一个/一种(a)”和“一个/一种(an)”,如本文中在说明书和权利要求中所用,除非明确指出相反,否则应被理解为意指“至少一个/一种”。

[0273] 如在本文中在说明书和权利要求中所用,短语“和/或”应当被理解为意指所连接的元素的“任一个或两者”,即元素在一些情况下结合地存在以及在其它情况下分离地存在。利用“和/或”列出的多个元素应当以相同的方式来解释,即所连接的元素的“一个或多个”。除通过“和/或”从句明确确定的元素外,还可任选地存在其它元素,无论与明确确定的那些元素相关还是无关。因此,作为非限定性实例,对“A和/或B”的提及,当与开放性措辞诸如“包含/包括”结合使用时,在一个实施方案中可仅指A(任选地包括除B外的元素);在另一个实施方案中可仅指B(任选地包括除A外的元素);在另一个实施方案中,可指A和B(任选地包括其它元素);依此类推。

[0274] 如本文中在说明书和权利要求中所用,“或”应当被理解为具有与如上定义的“和/或”相同的含义。例如,当在列表中分开各项时,“或”或“和/或”应当被理解为是包含性的,即包含许多个元素或一系列元素中的至少一个,但也包括多于一个,以及任选地,包括另外未列出的项。只有明确地指明相反的术语,例如“……中的仅一个”或“……中的恰好一个”或当用于权利要求中时的“由……组成”将指包含多个元素或一系列元素中的正好一个元素。一

般地,如本文中所用的术语“或”应当仅在冠有排他性的术语诸如“任一”、“……之一”、“……中的仅一个”或“……中的恰好一个”时被解释为表示排他性选择(即“一个或另一个但非两个”)。“基本上由……组成”,当用于权利要求中时,应当具有其在专利法领域中使用的普通含义。

[0275] 如本文中在说明书和权利要求中所用,关于一列一个或多个元素的短语“至少一个”应当被理解为意指选自一列元素中的任何一个或多个元素的至少一个元素,但不一定包括元素列表内明确列出的每一个元素的至少一个并且不排除元素列表中的元素的任何组合。该定义还允许可任选地存在除短语“至少一个”所指的元素列表内明确确定的元素外的元素,无论与那些明确确定的元素相关还是不相关。因此,作为非限定性实例,“A和B的至少一个”(或,等同地,“A或B的至少一个”或,等同地“A和/或B的至少一个”)可在一个实施方案中指至少一个(任选地包括不止一个)A而无B存在(且任选地包括除B外的元素);在另一个实施方案中指至少一个(任选地包括不止一个)B而无A存在(且任选地包括除A外的元素);在另一个实施方案中指至少一个(任选地包括不止一个)A和至少一个(任选地包括不止一个)B(且任选地包括其它元素);依此类推。

[0276] 还应当理解,除非明确地指明与之相反,否则在包括不止一个步骤或行为的本文请求保护的任何方法中,所述方法的步骤或行为的顺序不必须地限定于其中叙述所述方法的步骤或行为的顺序。

[0277] 在权利要求中,以及在上述说明书中,所有过渡短语诸如“包含”、“包括”、“携带”、“具有”、“含有”、“涉及”、“持有”、“组成(composed of)”等被理解为开放性的,即意指包括但不限于。只有过渡短语“由……组成”和“基本上由……组成”应当分别是封闭性的或半封闭性的过渡短语,如美国专利局专利审查程序手册第2111.03节中所示的。

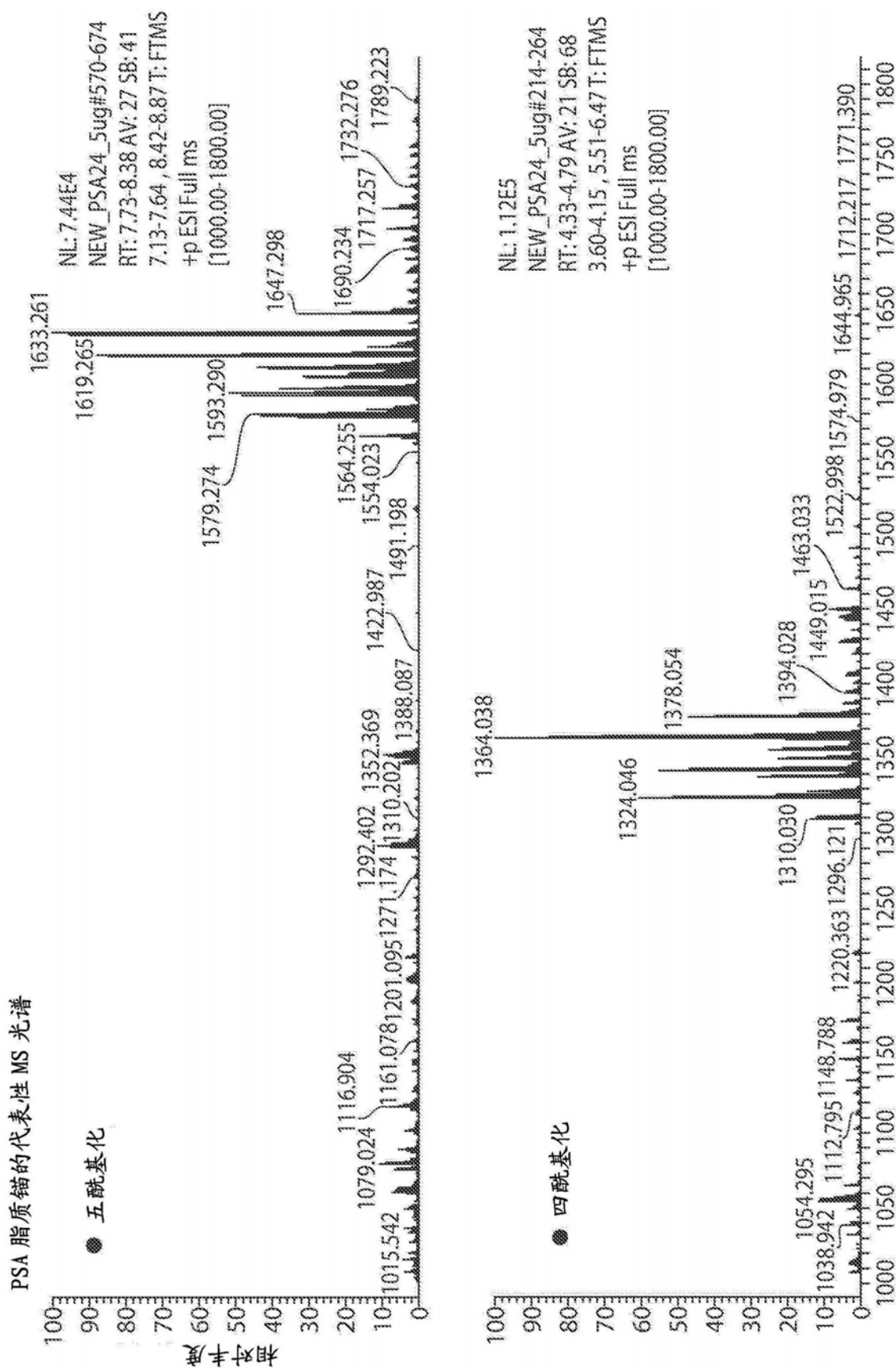


图1A

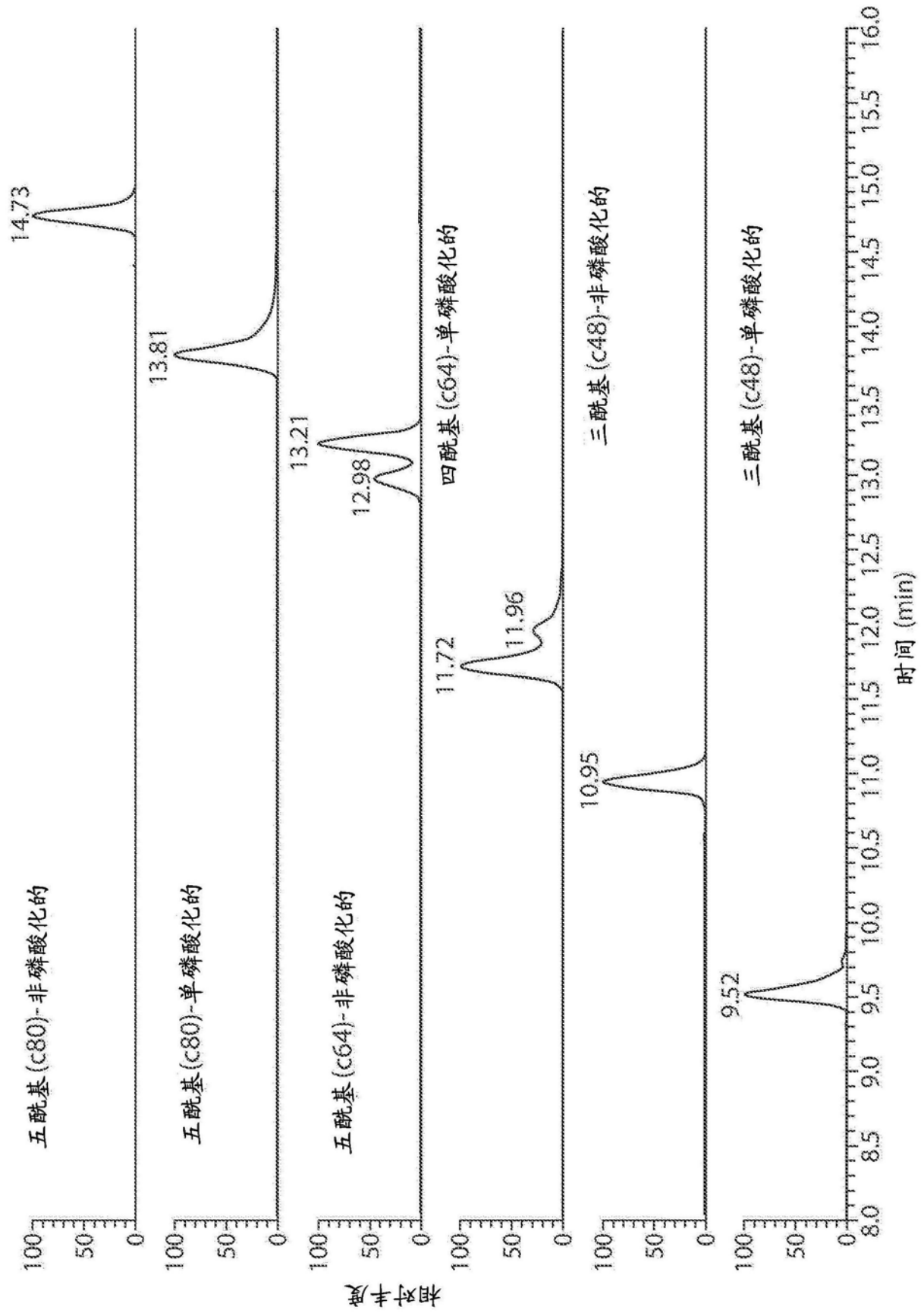


图1B

PSA24 (脂化的) 和 PSA23 (去脂化的) 之间的比较

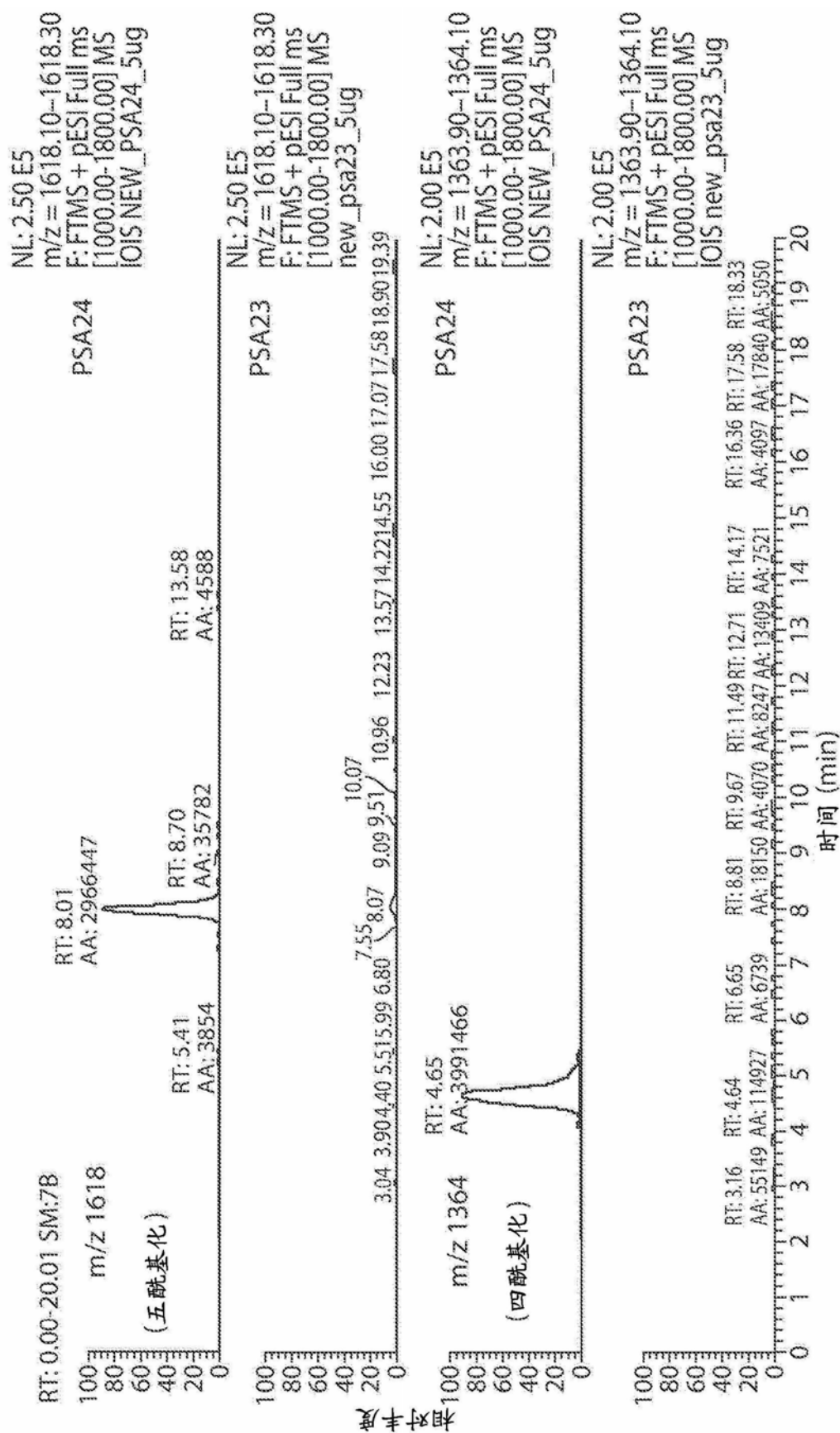


图2A

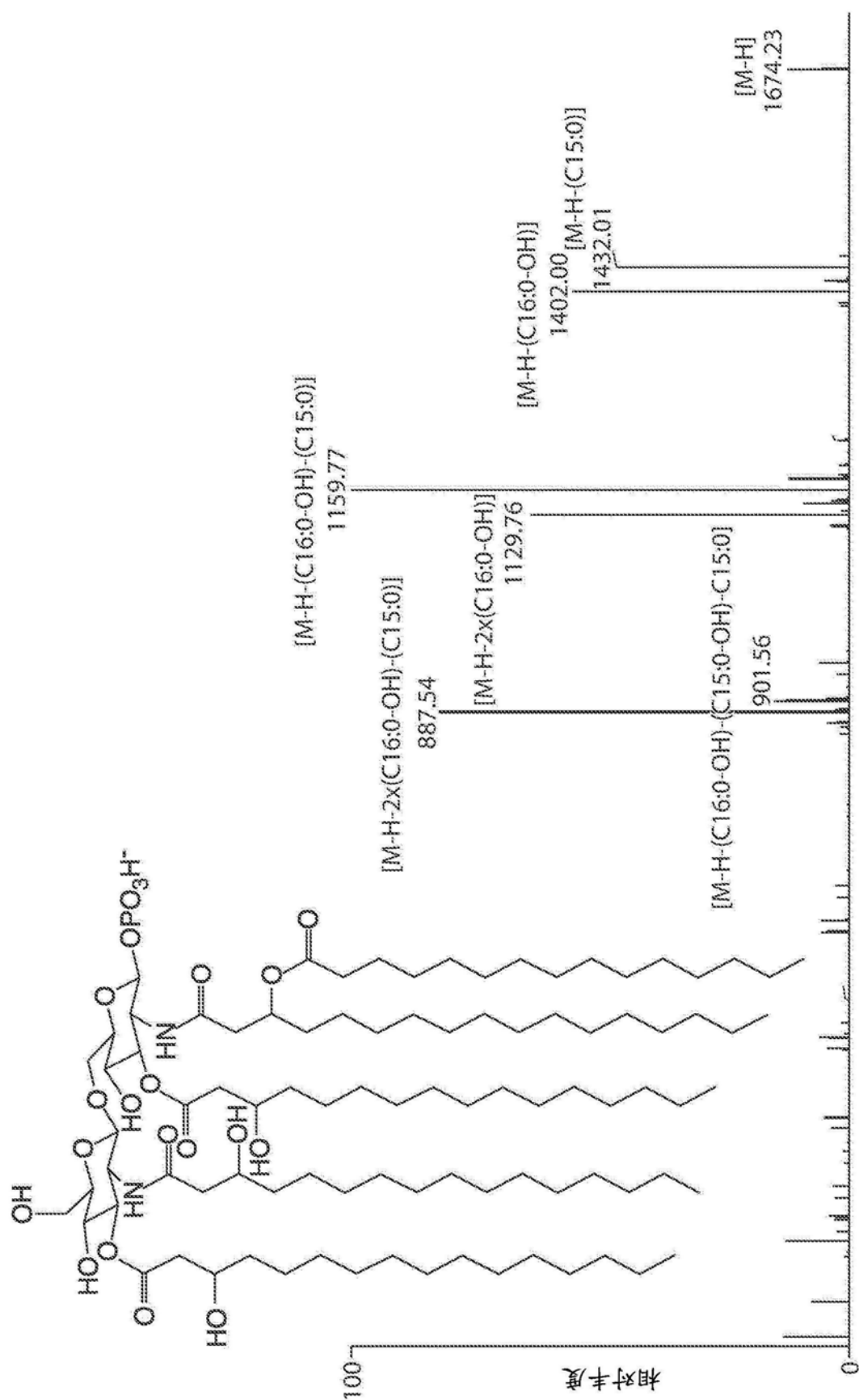


图2B

## PSA33 条带 3 的 MALDI 分析

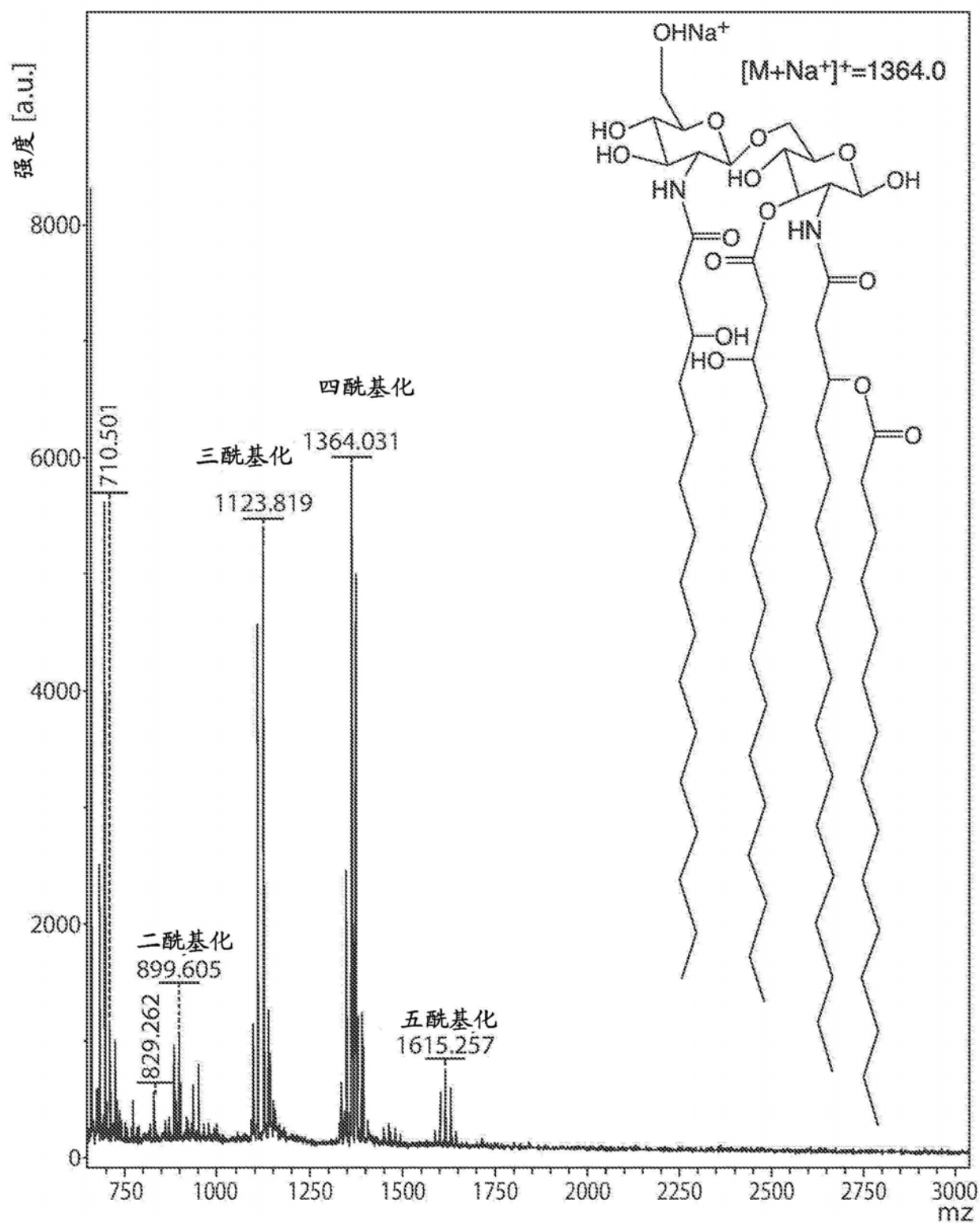


图3

脂质锚物质的定量分析

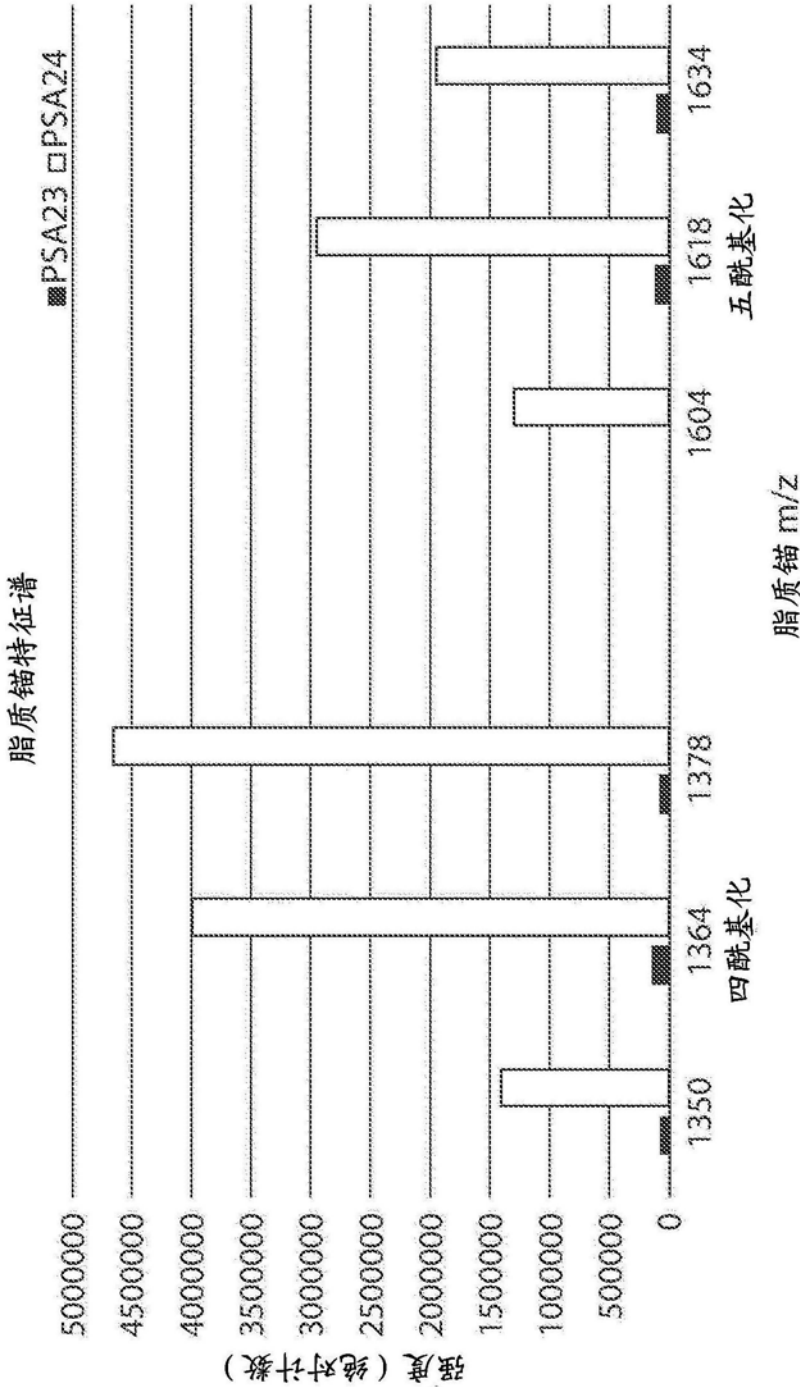
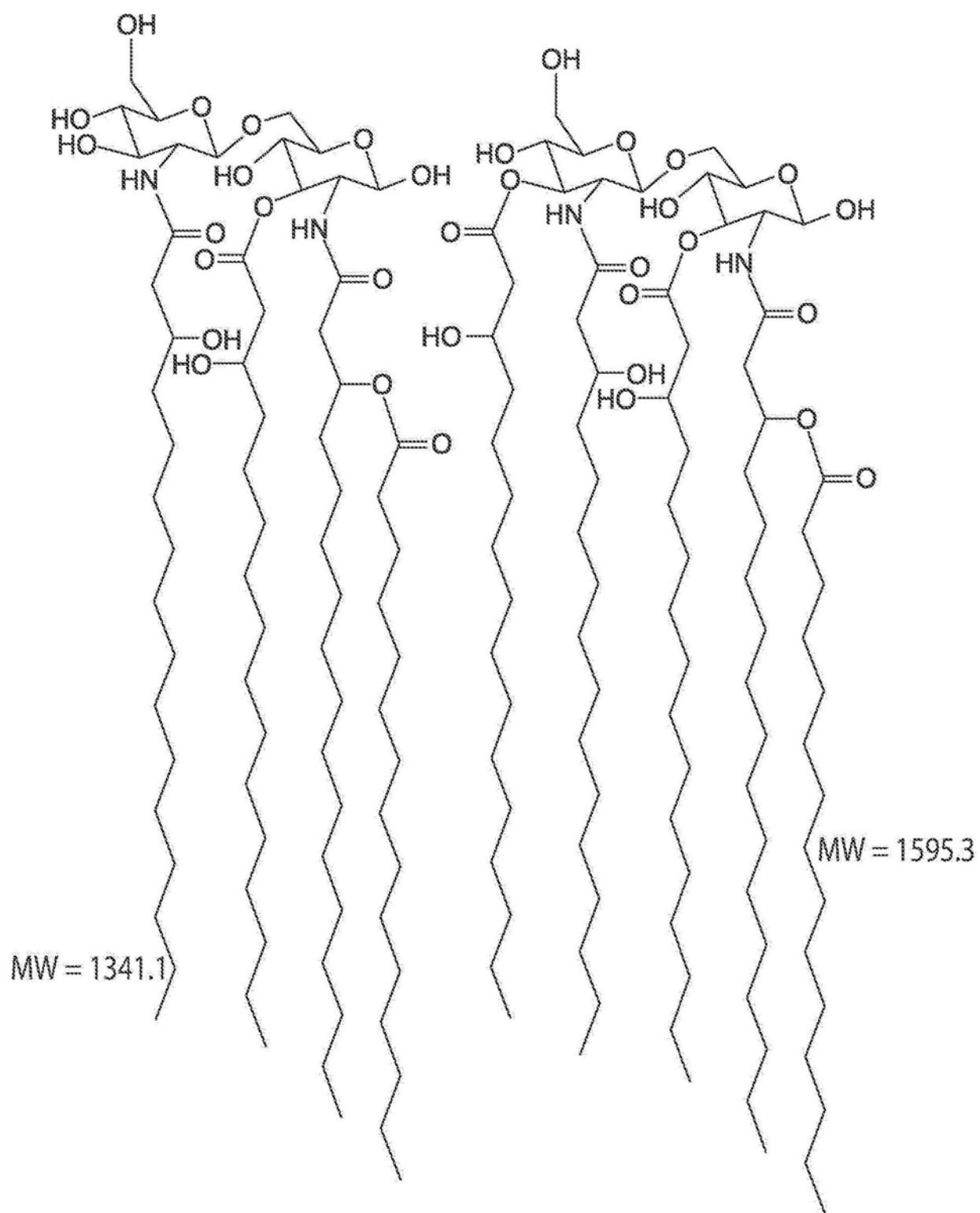


图4

PSA 糖脂的分子种类和提出的酰基链组成

| 酰基的# | [M+Na <sup>+</sup> ] <sup>+</sup> 的 M/Z | 提出的酰基链组成 |          |          |          |       |
|------|-----------------------------------------|----------|----------|----------|----------|-------|
| 五    | 1646                                    | c16:0-OH | c17:0-OH | c17:0-OH | c17:0-OH | c15:0 |
|      | 1632                                    | c16:0-OH | c16:0-OH | c17:0-OH | c17:0-OH | c15:0 |
|      | 1618                                    | c16:0-OH | c16:0-OH | c16:0-OH | c17:0-OH | c15:0 |
|      | 1604                                    | c16:0-OH | c16:0-OH | c16:0-OH | c16:0-OH | c15:0 |
|      | 1590                                    | c16:0-OH | c16:0-OH | c16:0-OH | c16:0-OH | c14:0 |
|      |                                         |          |          |          |          |       |
| 四    | 1392                                    |          | c17:0-OH | c17:0-OH | c17:0-OH | c15:0 |
|      | 1378                                    |          | c16:0-OH | c17:0-OH | c17:0-OH | c15:0 |
|      | 1364                                    |          | c16:0-OH | c16:0-OH | c17:0-OH | c15:0 |
|      | 1350                                    |          | c16:0-OH | c16:0-OH | c16:0-OH | c15:0 |
|      | 1336                                    |          | c16:0-OH | c16:0-OH | c16:0-OH | c14:0 |
|      |                                         |          |          |          |          |       |
| 三    | 1123                                    |          |          | c17:0-OH | c17:0-OH | c15:0 |
|      | 1109                                    |          |          | c16:0-OH | c17:0-OH | c15:0 |
|      | 1095                                    |          |          | c16:0-OH | c16:0-OH | c15:0 |
|      | 1081                                    |          |          | c16:0-OH | c16:0-OH | c14:0 |
| 二    | 899                                     |          |          | c17:0-OH | c17:0-OH |       |
|      | 885                                     |          |          | c16:0-OH | c17:0-OH |       |

图5



PSA 脂质锚的代表性结构，四酰基化（左）和  
五酰基化（右）的 diGluNs

图6A

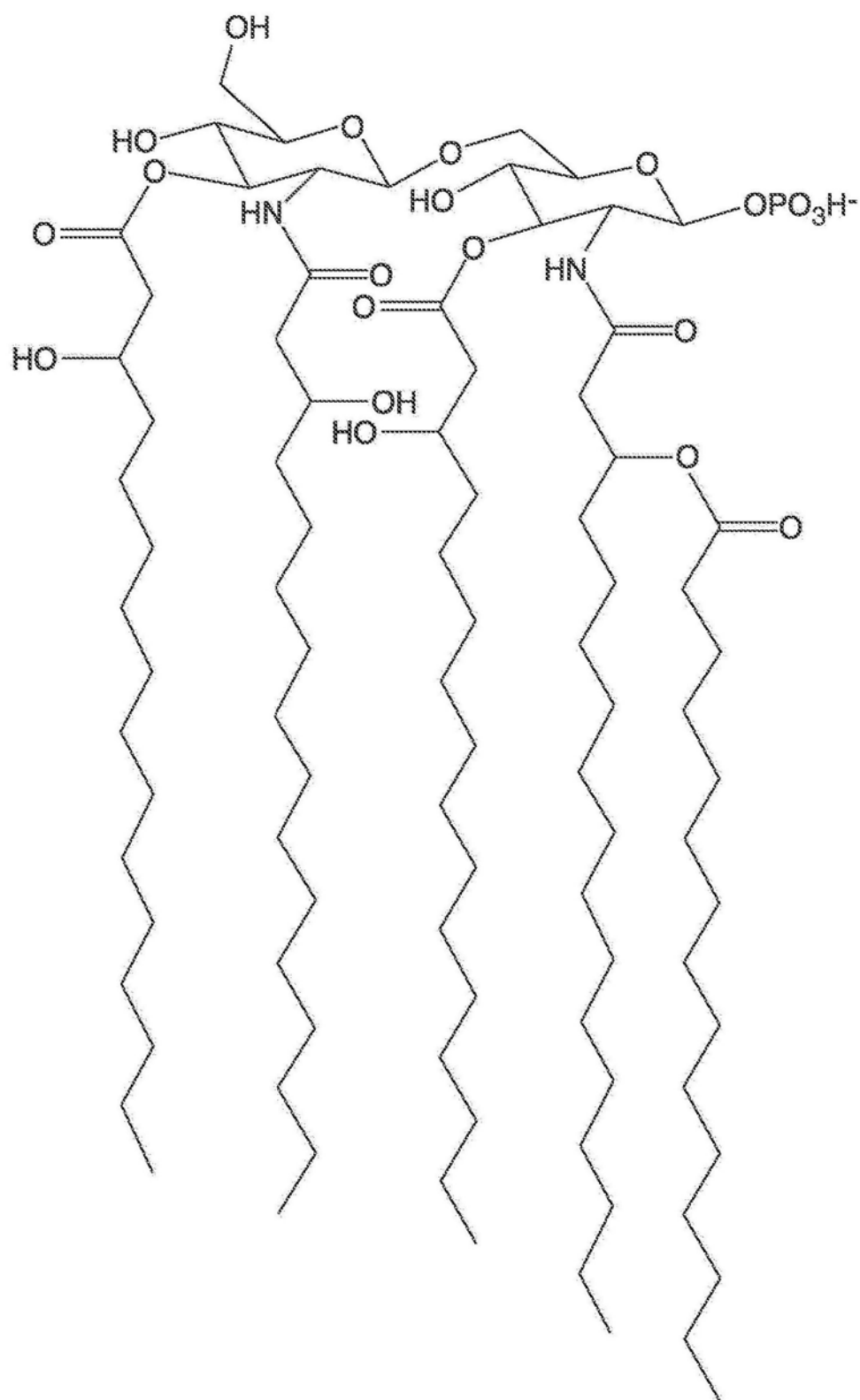


图6B

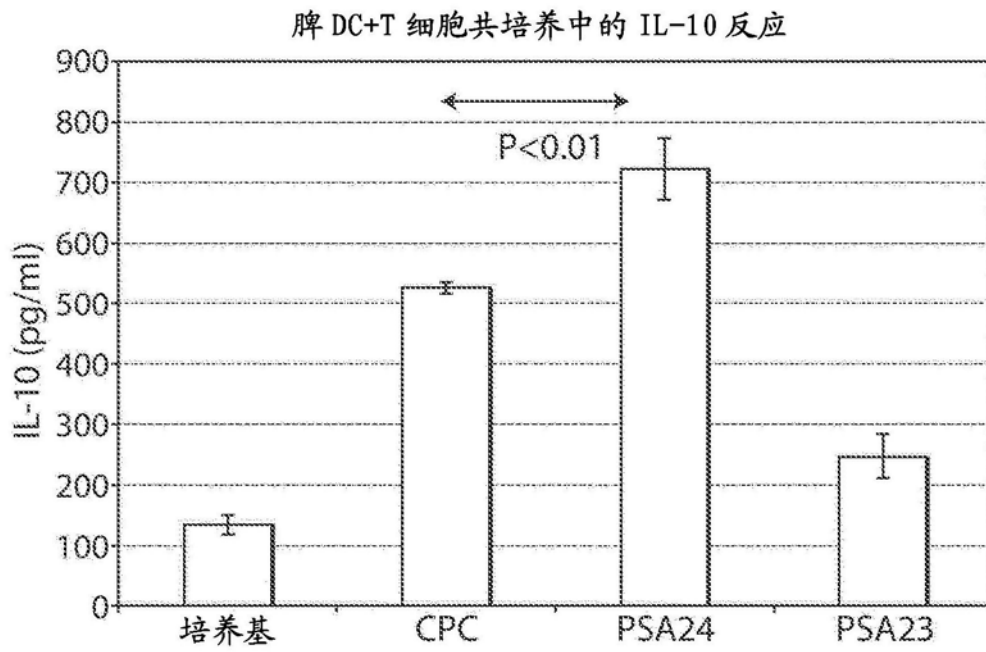


图7

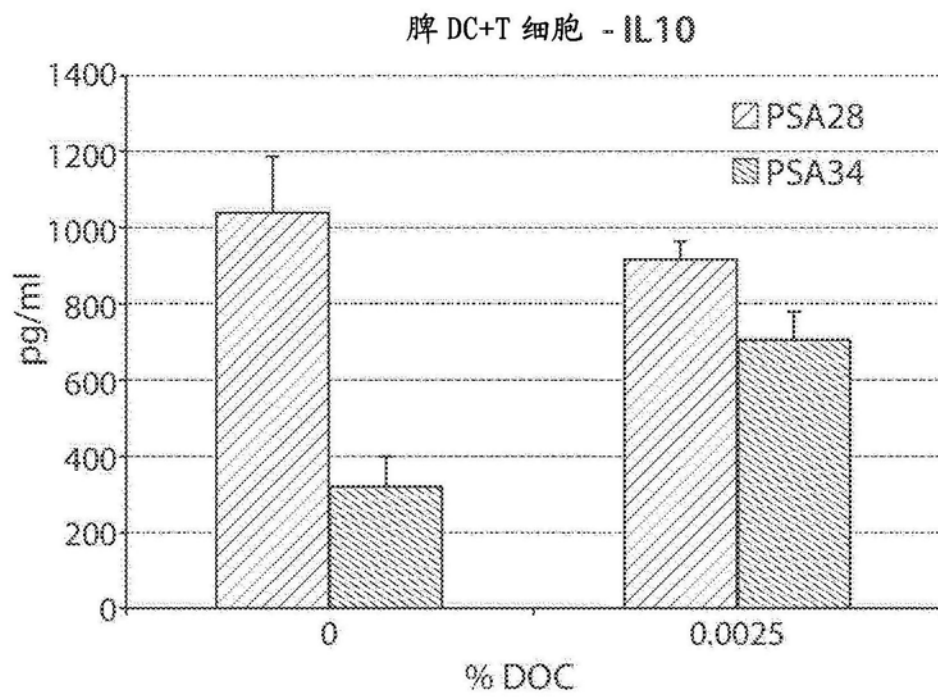


图8

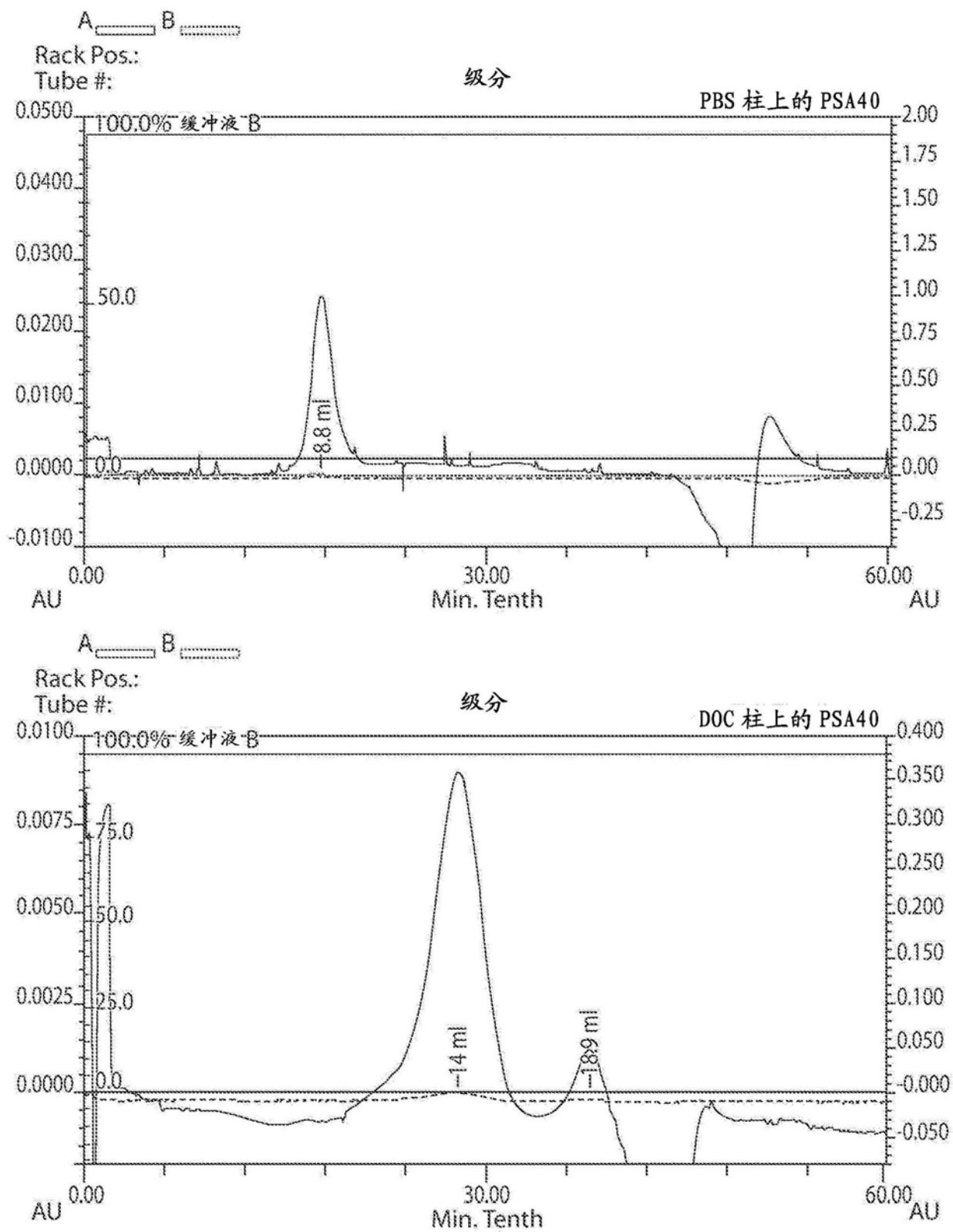


图9

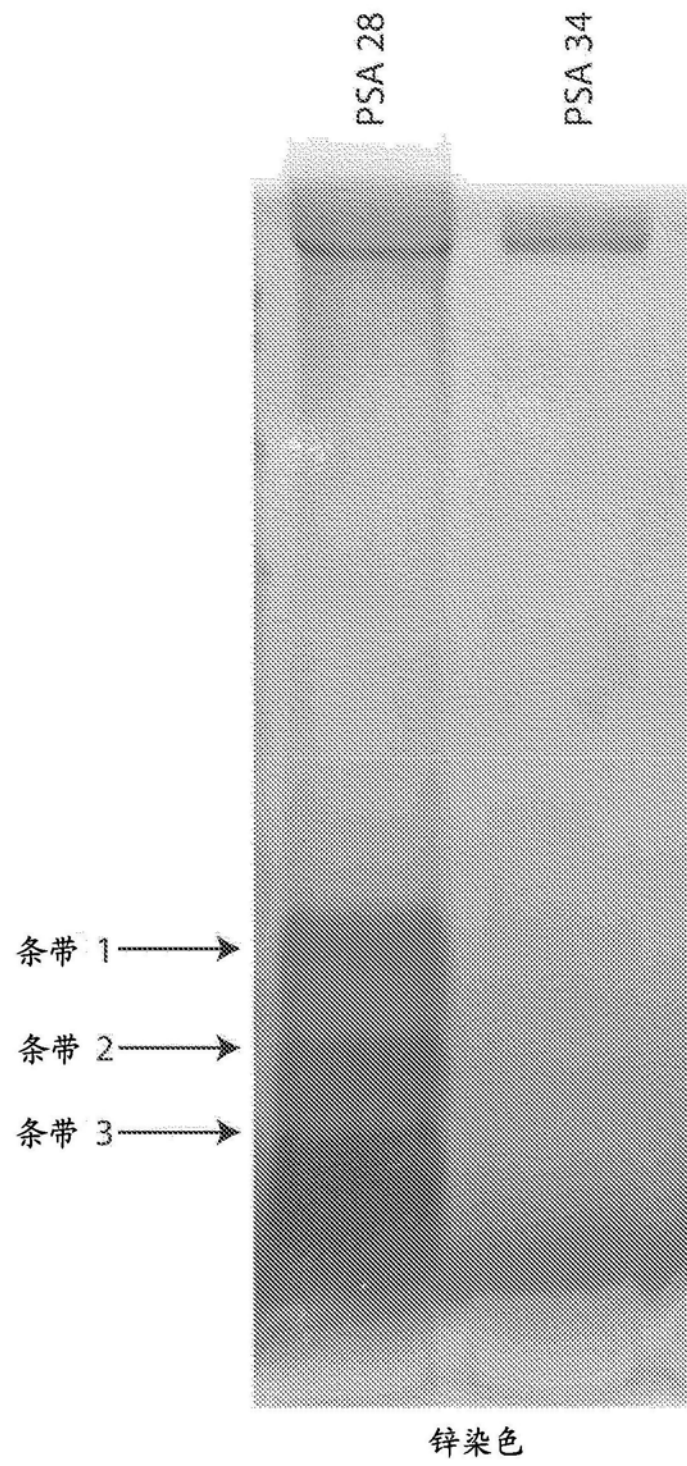


图10

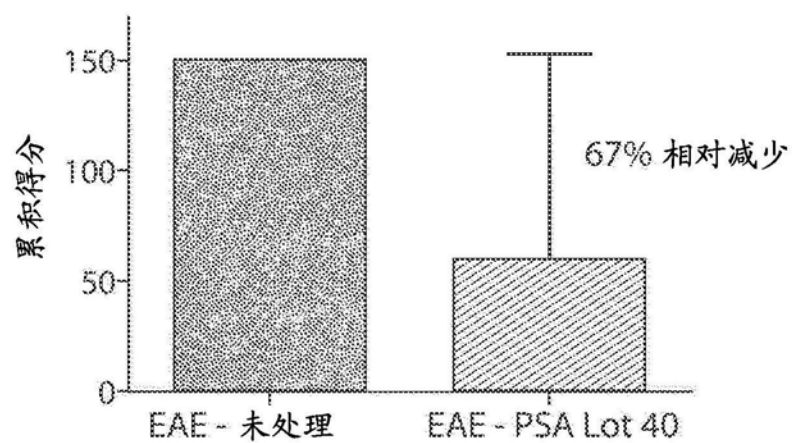


图11

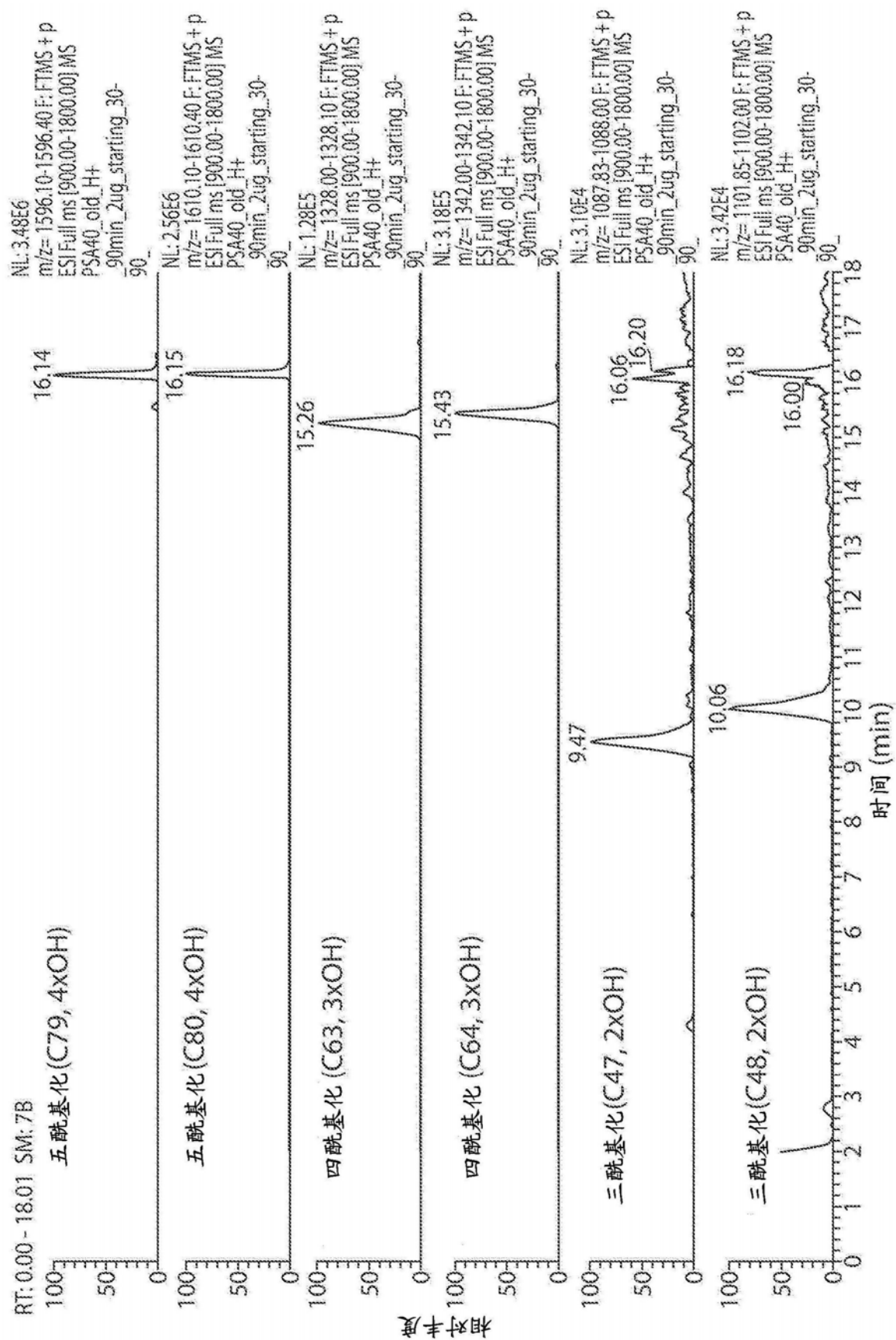


图12

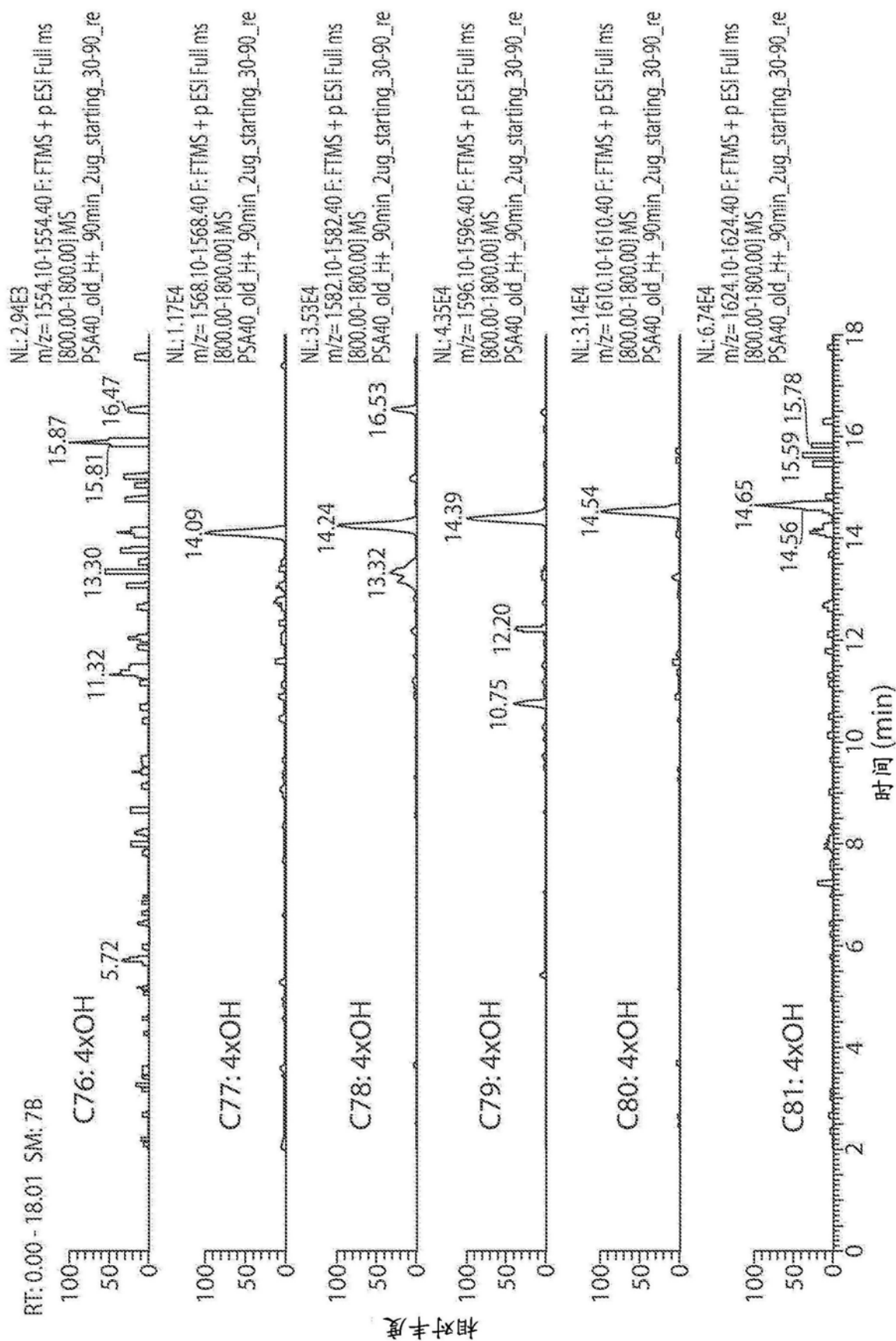


图13



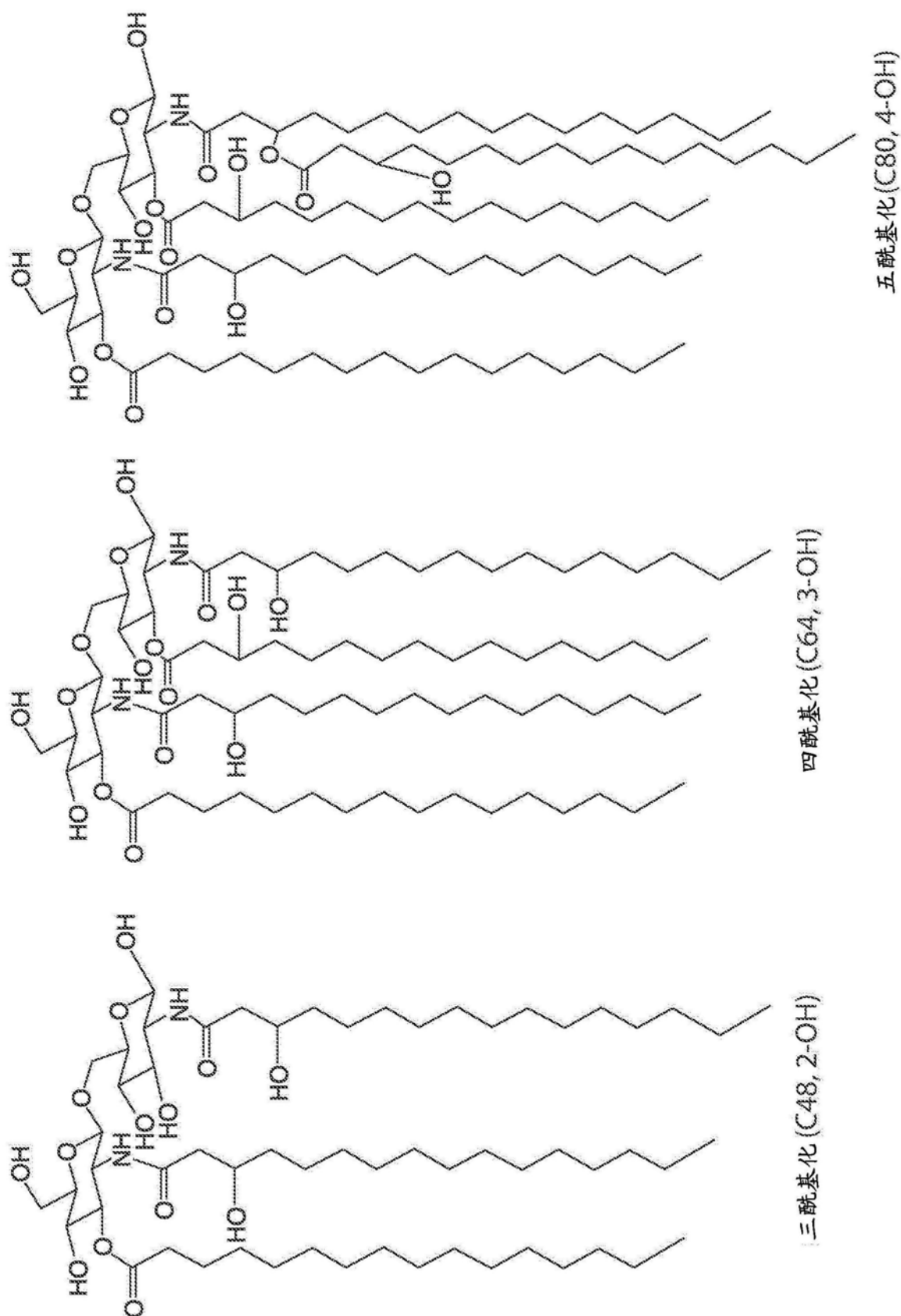


图15

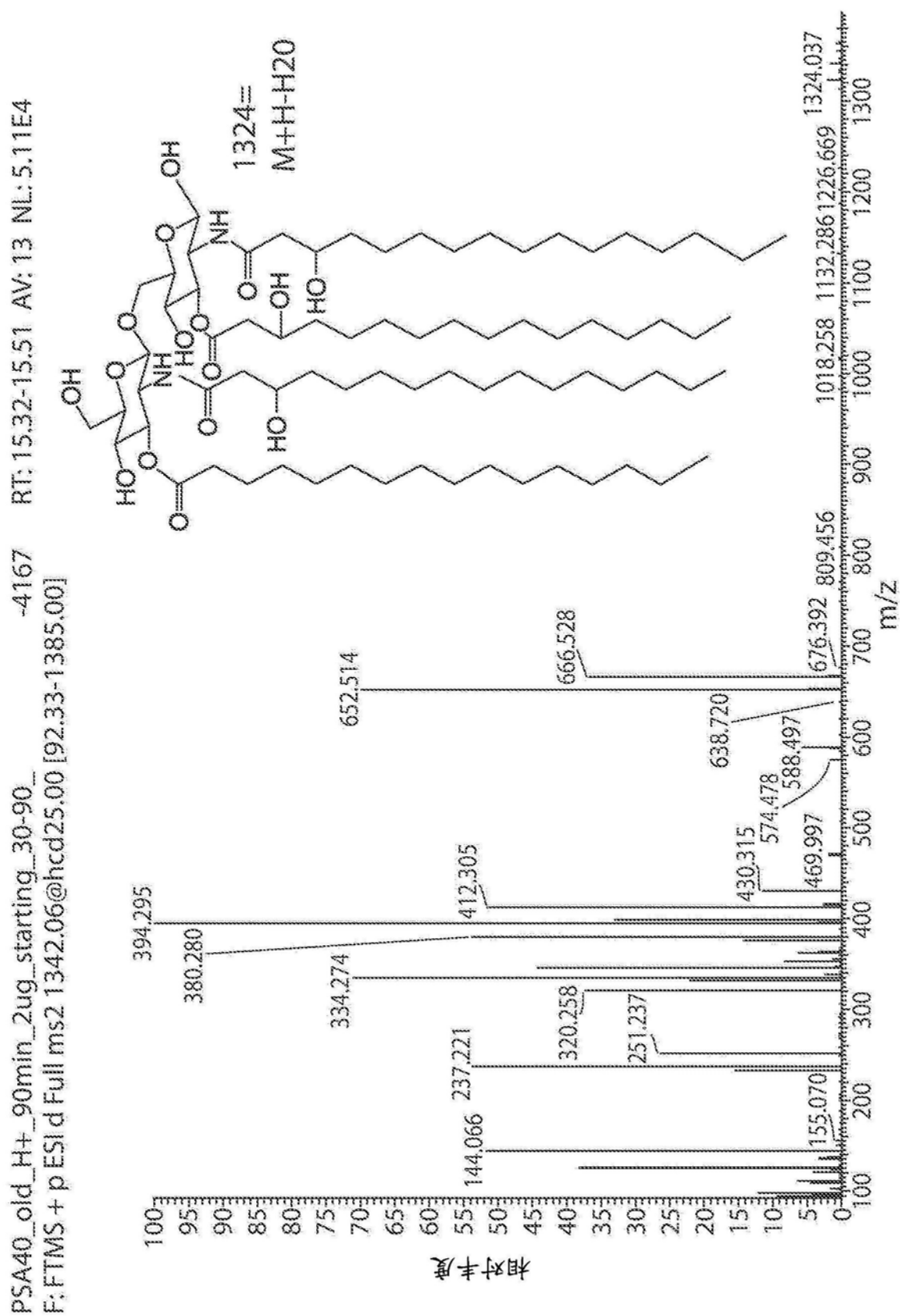


图16