

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/70
A61K 47/48

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99805510.7

[43] 公开日 2001 年 6 月 6 日

[11] 公开号 CN 1298306A

[22] 申请日 1999.5.27 [21] 申请号 99805510.7
[30] 优先权
[32] 1998.5.28 [33] US [31] 09/085,032
[86] 国际申请 PCT/CA99/00484 1999.5.27
[87] 国际公布 WO99/61031 英 1999.12.2
[85] 进入国家阶段日期 2000.10.26
[71] 申请人 辛索尔布生物技术有限公司
地址 加拿大艾伯塔
[72] 发明人 G·D·阿姆斯特朗
L·D·希尔兹

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所
代理人 樊卫民

权利要求书 4 页 说明书 22 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 艰难梭菌毒素 B 相关疾病的治疗
[57] 摘要

本发明涉及使用结合艰难梭菌毒素 B 的寡糖组合物
预防和/或治疗抗生素相关 性腹泻,包括艰难梭菌相关
腹泻(CDAD)、假膜性结膜炎(PMC)和其 它的与艰难梭
菌感染有关的疾病。更特别的,本发明涉及与这些疾病
相关的艰 难梭菌毒素 B 的中和。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种从怀疑含有艰难梭菌毒素 B 的样品中结合和去除该毒素 B 的方法，其中方法包括：

a) 在其中所述毒素 B 被吸附到所述支持物的条件下，将所述样品与通过非肽基相容性连接臂共价连接到惰性支持物上的至少一种结合毒素 B 的寡糖序列接触，其中所述寡糖序列结合毒素 B；以及

b) 从样品中分离含有吸附的毒素 B 之支持物。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述寡糖序列含有 2 到 10 个糖单位。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述寡糖序列含有 2 到 4 个糖单位。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述寡糖序列选自基团 α Glc (1-2) β Gal、 α Glc (1-4) β Glc、 β Glc (1-4) β Glc、 α Glc (1-6) α Glc (1-6) α Glc、 α Glc (1-6) α Glc、和 β GlcNAc (1-4) β GlcNAc。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述连接臂选自基团- $(\text{CH}_2)_8\text{C}(\text{O})$ -和- $\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-$ ，其中 m 是从约 2 到约 10 的整数。

6. 一种在受试者中治疗或预防 CDAD、PMC、腹泻或其它由艰难梭菌毒素 B 介导的疾病的方法，其中方法包括向需要这样的治疗或预防之受试者施用有效量的组合物，组合物中包含通过非肽基相容性连接臂共价连接到药学可接受的惰性支持物的至少一种结合毒素 B 的寡糖序列，其中所述寡糖序列结合毒素 B，其中所述组合物能够被从胃肠道排除。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述寡糖序列含有 2 到 10 个糖单位。

8. 权利要求 6 的方法，其中所述寡糖序列含有 2 到 4 个糖单位。

9. 权利要求 6 的方法，其中所述寡糖序列选自基团 α Glc (1-2) β Gal、 α Glc (1-4) β Glc、 β Glc (1-4) β Glc、 α Glc (1-6) α Glc (1-6) α Glc、 α Glc (1-6) α Glc、和 β GlcNAc (1-4) β GlcNAc。

10. 权利要求 6 的方法，其中所述连接臂选自基团- $(\text{CH}_2)_8\text{C}(\text{O})$ -和- $\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-$ ，其中 m 是从约 2 到约 10 的整数。

11. 一种用于治疗或预防 CDAD 以及由艰难梭菌毒素 B 引起的相关疾病的药物组合物，其中组合物包含

a) 通过非肽基相容性连接臂共价连接到药学可接受的惰性支持物上的至少一种寡糖序列, 其中所述寡糖序列结合毒素 B; 以及

b) 药学可接受的载体, 其中所述组合物能够被从胃肠道中排除。

12. 权利要求 11 的方法, 其中所述寡糖序列含有 2 到 10 个糖单位。

13. 权利要求 11 的方法, 其中所述寡糖序列含有 2 到 4 个糖单位。

14. 权利要求 11 中的方法, 其中所述寡糖序列选自基团 α Glc (1-2) β Gal、 α Glc (1-4) β Glc、 β Glc (1-4) β Glc、 α Glc (1-6) α Glc (1-6) α Glc、 α Glc (1-6) α Glc、和 β GlcNAc (1-4) β GlcNAc。

15. 权利要求 11 的方法, 其中所述连接臂选自基团- $(\text{CH}_2)_8\text{C}(\text{O})$ -和- $\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-$, 其中 m 是从约 2 到约 10 的整数。

16. 一种从怀疑含有艰难梭菌毒素 A 和 B 的样品中结合并去除艰难梭菌毒素 A 和 B 的方法, 其中方法包括

a) 在其中所述毒素被吸附到所述支持物的条件下, 将所述样品与通过非肽基相容性连接臂共价连接到惰性支持物上的至少一种结合毒素 A 的寡糖序列和至少一种结合毒素 B 的寡糖序列接触, 其中所述寡糖序列结合毒素; 以及

b) 从样品中分离含有吸附的毒素的支持物。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所述寡糖序列含有 2 到 10 个糖单位。

18. 权利要求 16 的方法, 其中所述寡糖序列含有 2 到 4 个糖单位。

19. 权利要求 16 的方法, 其中所述寡糖序列选自基团 α Glc (1-2) β Gal、 α Glc (1-4) β Glc、 β Glc (1-4) β Glc、 α Glc (1-6) α Glc (1-6) α Glc、 α Glc (1-6) α Glc、 β GlcNAc (1-4) β GlcNAc、和 α Gal (1-3) β Gal (1-4) β Glc。

20. 权利要求 16 的方法, 其中所述连接臂选自基团- $(\text{CH}_2)_8\text{C}(\text{O})$ -和- $\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-$, 其中 m 是从约 2 到约 10 的整数。

21. 权利要求 16 的方法, 其中所述寡糖序列既可结合毒素 A 又可结合毒素 B。

22. 权利要求 16 的方法, 其中至少使用两个寡糖序列, 至少其中之一可结合毒素 A 且至少其中之一可结合毒素 B。

23. 一种治疗或预防受试者中 CDAD、PMC、腹泻或由艰难梭菌毒素 A 和 B 介导的其它疾病的方法，其中方法包括向需要这样的治疗或预防的受试者施用有效量的组合物，组合物包含通过非肽基相容性连接臂共价连接到药学可接受的惰性支持物上的至少一种结合毒素 A 的寡糖序列和至少一种结合毒素 B 的寡糖序列，其中所述寡糖序列结合毒素 A 和 B，其中所述组合物能够被从胃肠道排除。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述寡糖序列含有 2 到 10 个糖单位。

25. 权利要求 23 的方法，其中所述寡糖序列含有 2 到 4 个糖单位。

26. 权利要求 23 的方法，其中所述寡糖序列选自基团 α Glc (1-2) β Gal、 α Glc (1-4) β Glc、 β Glc (1-4) β Glc、 α Glc (1-6) α Glc (1-6) α Glc、 α Glc (1-6) α Glc、 β GlcNAc (1-4) β GlcNAc、和 α Gal (1-3) β Gal (1-4) β Glc。

27. 权利要求 23 中的方法，其中所述连接臂选自基团 $-(CH_2)_8C(O)-$ 和 $-NH-(CH_2)_m-NHC(O)NH-$ ，其中 m 是从约 2 到约 10 的整数。

28. 权利要求 23 的方法，其中所述寡糖序列既可结合毒素 A 又可结合毒素 B。

29. 权利要求 23 的方法，其中至少使用两个寡糖序列，至少其中之一可结合毒素 A 且至少其中之一可结合毒素 B。

30. 一种用于治疗或预防 CDAD 以及与艰难梭菌毒素 A 和 B 引发的相关疾病的药物组合物，其中组合物包含

a) 通过非肽基相容性连接臂共价连接到药学可接受的惰性支持物上的至少一种寡糖序列，其中所述寡糖序列既可结合毒素 A 又可结合毒素 B；以及

b) 药学可接受的载体，其中所述组合物能够被从胃肠道中排除。

31. 权利要求 30 的方法，其中所述寡糖序列含有 2 到 10 个糖单位。

32. 权利要求 30 的方法，其中所述寡糖序列含有 2 到 4 个糖单位。

33. 权利要求 30 的组合物，其中所述寡糖序列选自基团 α Glc (1-2) β Gal、 α Glc (1-4) β Glc、 β Glc (1-4) β Glc、 α Glc (1-6) α Glc

(1-6) α Glc、 α Glc (1-6) α Glc、 β GlcNAc (1-4) β GlcNAc、和 α Gal (1-3) β Gal (1-4) β Glc。

34. 权利要求 30 的组合物，其中所述连接臂选自基团- $(\text{CH}_2)_8\text{C}(\text{O})$ -和- $\text{NH}-(\text{CH}_2)_m\text{-NHC}(\text{O})\text{NH-}$ ，其中 m 是从约 2 到约 10 的整数。

35. 权利要求 30 的组合物，其中所述寡糖序列既可结合毒素 A 又可结合毒素 B。

36. 权利要求 30 的组合物，其中至少使用两个寡糖序列，至少其中之一可结合毒素 A 且至少其中之一可结合毒素 B。

说明书

艰难梭菌毒素 B 相关疾病的治疗

发明背景

本发明涉及抗生素相关性腹泻，包括艰难梭菌（*Clostridium difficile*）相关腹泻（CDAD）和假膜性结肠炎（PMC）以及其它与艰难梭菌感染相关的疾病的治疗。更特别地，本发明涉及一种与 CDAD、PMC 和其它由艰难梭菌引起的疾病相关的细胞毒素艰难梭菌毒素 B 的中和。

参考文献

下列参考文献以在申请中的相关部分中括号内的编号被本申请引用。

1. Bartlett, J.G.等人, “由产生毒素的梭状芽孢杆菌引起的抗生素相关性假膜性结肠炎” 新英格兰医学杂志 (N.Engl.J.Med), 298:531-534(1978)。

2. Lyster, D.M., “艰难梭菌疾病的流行病学”, 临床微生物新闻 (Clin. Microbiol. News) 15:49-53(1993)。

3. Cozart, H.C., 等人, “相对于非艾滋病对照的艾滋病病人中的艰难梭菌腹泻。治疗的方法与对治疗的临床反应”, 临床胃肠病学杂志 (J.Clin. Gastroenterol.), 16:192-4(1993)。

4. Barbut, F.等人, “从艾滋病或人类免疫缺陷病毒阴性病人中分离的艰难梭菌菌株的肠毒素产生、细胞毒素产生、血清群以及抗微生物敏感性的比较”, 临床微生物学杂志 (J.Clin.Microbiol.), 31:740-2(1993)。

5. Krivan, H.C., “艰难梭菌肠毒素的细胞表面结合位点: 含有 α Gal(1-3) β Gal(1-4) β GlcNAc 序列的复合糖的证据”, 感染免疫学 (Infect.Immun.), 53:573-81(1986)。

6. Clark, G.F 等人, “艰难梭菌毒素 A 与具有 α Gal(1-3) β Gal(1-4) β GlcNAc 序列末端的兔红细胞糖脂结合”, 生物化学生物物理学文献

(Arch. Biochem. Biophys.), 257:217-29(1987)。

7. Tucker, K.d.等人, 感染免疫学, 59:73-8(1991)。

8. Krivan, H.C.等人., “通过固定化牛甲状腺球蛋白上的亲和层析纯化艰难梭菌毒素 A”, 感染免疫学, 55:1873-7(1987)。

9. Kamiya, S.等人, : “通过固定化牛甲状腺球蛋白上的亲和层析得到的艰难梭菌毒素 A 的纯度分析”, FEMS Microbiol. Lett., 56:331-6(1988)。

10. Armstrong, G.D.等人, “志贺样毒素结合到化学合成的寡糖序列的研究”, 传染病杂志 (J. Infect.Dis.), 164:1160-7(1991)。

11. Von Eichel-Streiber, C.等人, “艰难梭菌携带与链球菌的糖基转移酶的糖类结合区同源的 C-末端重复结构”, 基因 (Gene), 96:107-13(1990)。

12. Lemieux, R.U.等人, “与血型 Lewis A 有关的合成抗原的特性”, 美国化学协会杂志 (J. Am.Chem. Soc.), 97:4076-83(1975)。

13. Sullivan, N.M.等人, “艰难梭菌毒素 A 和 B 的纯化与表征”, 感染免疫学, 35:1032-40(1983)。

14. Finegold, S.M.等人, “针对艰难梭菌以及它的毒素的治疗。治疗的并发症” Rolfe, R.D.等人., (编) 艰难梭菌: 在肠道疾病中的作用 学院出版社, 公司, 圣地亚哥, CA 341-57(1988)。

15. Bartlett, J.G.等人, “口服万古霉素治疗后抗生素相关性假膜性结肠炎的症状的复发”, 胃肠病学 (Gastroenterology), 78:431-4(1989)。

16. Tedesco, F.J., “假膜性结肠炎: 发病与治疗”, 北美临床医药 (Med.Clin. North Am.), 66:655-64(1982)。

17. Keighley, M.R.B., “抗生素相关性假膜性结肠炎: 发病与治疗”, 药物 (Drugs), 20:449-56(1980)。

18. Bartlett, J.D., “抗生素相关性假膜性结肠炎的治疗”, 传染病综述 (Rev. Infect. Dis.), 6, 增刊 (Suppl.) 1:1-55(1984)。

19. Onderdonk, A.B.等人, “氯林可霉素和氯林可霉素代谢物在抗生素相关性结肠炎的仓鼠模型中的类似的比较结果”, 抗微生物化学

杂志 (J.Antimicrob. Chem.), 8:383-93(1981)。

20. Triadfilopoulos, G.等人, “艰难梭菌毒素 a 和 b 对兔回肠的不同作用”, 胃肠病学, 93:273-9(1987)。

21. Lemieux, R.U.等人, “糖苷-醚-酯化合物”, 美国专利 No. 4, 137, 401, 1979 年 1 月授权。

22. Lemieux, R.U.等人, “人工寡糖抗原决定簇”, 美国专利 No. 4, 238, 473, 1980 年 12 月 9 日授权。

23. Lemieux, R.U.等人, “由烯糖合成 2-氨基-2-脱氧葡萄糖和 2-氨基-2-脱氧糖苷”, 美国专利 No. 4, 362, 720, 1982 年 12 月 7 日授权。

24. Cox, D.等人 “4-O α -D-吡喃半乳糖基-D-吡喃型半乳糖的新合成”, 糖类研究 (Carbohy. Res.), 62:245-252(1978)。

25. Dahmen, J.等人, “血型 P 抗原的三糖部分 [α -D-Gal-(1-4)- β -D-Gal(1-4)- β -D-Glc] 的间隔臂、脂质和乙基糖苷的合成: 新糖蛋白的制备”, 糖类研究, 127:15-25(1984)。

26. Garegg, P. J.等人, “8-甲氧羰基辛基-1-基 O- α -D-吡喃半乳糖基-(1-3)-O- β -D-吡喃半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖的合成”, 糖类研究, 136:207-213(1985)。

27. Garegg, P.J.等人, “用于研究抑制肾盂肾炎源的有菌毛大肠杆菌与泌尿器上皮细胞表面结合的甲基 4-O- α -D-吡喃半乳糖基- β -D-吡喃半乳糖苷的 6-和 6' 脱氧衍生物的合成”, 糖类研究, 137:270-275(1985)。

28. Jacquinet, J.C.等人, “血型物质的合成, 部分 11. 三糖 O- α -D-吡喃半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-吡喃半乳糖基-1 $\rightarrow$ 4)-2-乙酸氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖的合成。” J.C.S. Perkin, 1:326-330(1981)。

29. Koike, K., 等人, “Globotriaosyl-E 和 Z-神经酰胺以及 Isoglobotriaosyl-E-神经酰胺的全合成,” 糖类研究, 163:189-208(1987)。

30. Schaubach, R.等人, “肿瘤相关抗原合成: Gal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal- β -(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc 抗原决定簇的合成。一种新陈代谢过程中特异的决定簇?” Liebig's Ann. Chem., 607-614(1991)。

31. Ratcliffe, R.M.等人, “唾液酸糖苷、抗原、免疫吸附剂和它们的制备方法”, 美国专利 No.5, 079, 353, 1992 年 1 月 7 日授权。

32. Okamoto, K.等人 “唾液酸的糖苷化”, 四面体 (Tetrahedron), 47:5835-5857(1990)。

33. Abbas, S.A.等人, “肿瘤相关的寡糖 I: 唾液 (酸) 基 Lewis 抗原决定簇的合成”, 唾液酸, 日本德国研讨会会刊, 柏林 (Sialic Acid .Proc. Japan-German Symp. Berlin), 22-23(1988)。

34. Paulsen, “复合寡糖选择性化学合成的进展”, Angew. Chem. Int. Ed. Eng, 21:155-173(1982)。

35. Schmidt, “合成糖苷和寡糖的新方法-有 Koenigs-Knorr 方法的备选方法吗?”, Angew. Chem. Int. Eng, 25:212-235(1988)。

36. Fügedi, P.等人, “硫糖苷作为寡糖合成中糖苷化试剂”, 复合糖杂志 (Glycoconjugate J.), 4:97-108(1987)。

37. Kameyama, A.等人, “唾液 (酸) 基 Lewis X 的全合成”, 糖类研究, 209:c1-c4(1991)。

38. Ekbofgr, G.等人, “用于制备携带已知存在于糖蛋白的免疫决定簇的免疫原的三种二糖的合成”, 糖类研究, 110:55-67(1982)。

39. Dahmén, J, m 等人, “2-溴乙基糖苷: 在间隔臂糖苷合成中的应用”, 糖类研究, 118:292-301(1983)。

40. Rana, S. S.等人, “苯基 2-乙酰氨基-2-脱氧-3-O- α L-吡喃岩藻糖基- β -D-吡喃葡萄糖苷以及相关化合物的合成”, 糖类研究, 91:149-157(1981)。

41. Amvam-Zollo, P.等人, “肺炎链球菌 (Streptococcus pneumoniae) XIV 型多糖: 具有二噁型间隔臂的重复分支四糖的合成”, 糖类研究, 150:199-212(1986)。

42. Paulsen, H., "Synthese von oligosaccharid-determinanten mit amid-spacer vom typ des T-antigens", 糖类研究, 104:195-219(1982)。

43. Chemyak, A. Y.等人, “新型的含有糖类的合成抗原: 具有 0:3 和 0:4 沙门氏菌因子特异性的含有糖类的聚丙烯酰胺共聚体的合

成”， 糖类研究, 128:269-282(1984)。

44. Femandez-Santana, V.等人, “单烯丙基二甘醇糖苷: 一种新型的合成寡糖的间隔基团” 糖类化学杂志 (J.Carbohy.Chem.), 8(3), 531-537(1989)。

45. Lee, R.T.等人, “3-(2-氨基乙基硫) 丙基糖苷的合成”, 糖类研究, 37:193-201(1974)。

46. Riegler, M., Sedivy, R., Pothoulakis, C., Hamilton, G., Zacherl, J., Bischof, G., Cosentini, E., Feil, W., Schiessel, R., LaMont, J.T., Wenzl, E., 临床调查杂志 (J. Clin. Invest.), 95:2004-2011 (1995)。

47. Chang T.W., Gorbach, S.L., Bartlett, J.G., “抑制艰难梭菌毒素与类固醇的结合”, 传染病研究 (J. Infect. Dis.), 142:113(1980)。

48. Lyerly, D.M., Krivan, H.C., Wilkens, T.D., “艰难梭菌: 它的疾病和毒素”, 临床微生物综述 (Clin. Microb. Rev.), 1:1-18(1988)。

49. Wren, B.W., Russell, R.R. and Tabaqchali, S., “通过对艰难梭菌毒素 A、变异链球菌葡聚糖-结合蛋白和合成肽的抗体与抗原的交叉反应和功能抑制”, 感染免疫学 (Infect. Immun.), 59:3151-5(1991)。

50. Wren, B.W., “具有保守的 C-末端重复序列的梭菌和链球菌配体结合蛋白的家族”, 分子微生物学 (Mol. Microbiol.), 5:797-803(1991)。

51. Von Eichel-Streiber, C., Laufenberg-Feldmann, R., Sartingen, S., Schulze, J., Sauerborn, M., “艰难梭菌毒素 A 和 B 比较性序列分析”, 分子普通遗传学 (Mol. Gen. Genet.), 233:260-268(1992)。

52. Smith, D.J., Akita, H., King, W.F., Taubman, M.A., “变异链球菌的新型葡聚糖结合蛋白的纯化和抗原性”, 感染免疫学, 62:2545-2552(1994)。

53. Rolfe, R.D., “艰难梭菌毒素 A 和 B 与幼小的和成年仓鼠的肠刷状缘膜的结合动力学”, 感染免疫学, 59:1223-1230(1991)。

54. Bartlett, J.G., “艰难梭菌: 作为一种肠致病菌作用的记载以

及有关此生物目前状态的认识”，临床传染疾病 (Clin. Infect. Dis.), 18 (增刊 4):S265-272(1994)。

55. Bartlett, J.G., Chang, T.W., Gurwith, M., Gorbach, S.L., Onderdonk, A.B., “由产生毒素的梭菌引发的抗生素相关性假膜性结肠炎”，新英格兰医学杂志, 298:531-534(1978)。

56. Triadafilopoulos, G., Pothoulakis, C., O' Brien, M.J., LaMont, J.T., “艰难梭菌毒素 A 和 B 对于兔回肠的不同作用”，胃肠病学, 93:273-279(1987)。

57. Lyerly, D.M., Saum, K.E., MacDonald, D.K., Wilkins, T.D., “艰难梭菌毒素胃肠内施于动物的结果”，感染免疫学, 47:349-352(1985)。

58. Torres, J., Jennische, E., Lange, D., Lonnroth, I., “艰难梭菌肠毒素在大鼠肠中致泻的能力和形态学的结果”，肠 (Gut), 31:781-785(1990)。

59. Flegel, W.A., Muller, F., Daubener, W., Fischer, H.G., Hadding, U., Northoff, H., “人类单核细胞对艰难梭菌毒素 A 和毒素 B 的细胞因子反应”，感染免疫学, 59:3659-3666(1991)。

60. Heerze, L.D., Kelm, M.A., Talbot, J.A., Armstrong, G.D., “寡糖序列连接到惰性支持物(SYNSORB)上作为对抗生素相关性腹泻和假膜性结肠炎的潜在治疗”，传染病杂志, 169:1291-1296(1994)。

61. Sullivan, N.M., Pellet, S.和 Wilkins, T.D., “艰难梭菌毒素 A 和 B 的纯化和表征”，感染免疫学, 35:1032-1040(1982)。

62. Lima, A.A., Lyerly, D.M., Wilkins, T.D., Innes, D.J., Guerrant, R.L., “艰难梭菌毒素 A 和 B 在体内兔的小肠和大肠中的作用以及对体外培养的细胞的作用”，感染免疫学, 56:582-588(1988)。

63. Donta, S.T., Sullivan, N., Wilkins, T.D., “艰难梭菌毒素对组织培养细胞的不同作用”，临床微生物学杂志 (J. Clin. Microb.), 15:1157-1158(1982)。

64. Fiorentini, C.等人, “艰难梭菌毒素 A 以及它对细胞的作用”, *Toxicon*, 29:543-567(1991).
65. Heerze, 等人, 美国专利 No. 5, 484, 773(1996).
66. Heerze, 等人, 美国专利 No. 5, 635, 606(1996).
67. Hinsgaul, O. 等人, PCT/CA97/00862(1997).
68. Hinsgaul, O. 等人, PCT/CA97/00863(1997).
69. Hinsgaul, O. 等人, PCT/CA97/00864(1997).
70. Hinsgaul, O.等人, PCT/CA97/00851(1997).

以上的、在此处引用的出版物、专利和专利申请书所揭示的事实将以相同程度以它们完整的形式引入作为参考，此处所包括的每一个出版物、专利和专利申请书都是特异和独特的。

发明背景

厌氧生物艰难梭菌是医院和长期的护理机构中，大多数老年病人的抗生素相关性细菌性腹泻和假膜性结肠炎（PMC）的主要致病因素[1, 2]。此生物不能成功地与成年人结肠中的正常微生物菌群竞争，但是当正常的肠道菌群在例如抗生素治疗后改变时，艰难梭菌就有可能在肠道中高数量地寄居。抗生素治疗引起 98% 的与艰难梭菌相关的腹泻（CDAD）病例。但是改变正常肠道菌群的任何易感染的疾病，包括需要广泛的免疫抑制治疗的疾病，也能够导致 CDAD 的发生。例如，最近的证据表明 AIDS 病人是获得 CDAD 的高危易感人群[3, 4]。

艰难梭菌产生似乎对引起 CDAD 起着重要作用的两种外毒素，毒素 A（一种肠毒素）和毒素 B（一种细胞毒素）。长期以来，认为毒素 A 对此种疾病负主要的责任。它发挥作用是通过结合于肠中的上皮细胞，从而导致这些细胞的损坏，引起液体分泌到肠中。毒素 A 对这些防护性上皮细胞的破坏代表着导致腹泻发生的关键步骤。一旦对上皮细胞的破坏发生，潜在的细胞毒素 B 就获得了位于敏感组织之下的入径，引发另外的临床症状[5-10, 13, 19-20, 53-56, 57-59, 61-64]。但是，在最近的

体外研究中[46], 发现毒素 B 在破坏人的结肠上皮细胞方面比毒素 A 更有效, 表明毒素 B 可能在 CDAD 中起着比以前所认为的更为重要的作用。

已发现毒素 A 显示出凝集素样活性, 使得它可以结合到上皮细胞的寡糖受体上。已经鉴定了几种寡糖序列为毒素 A 的潜在受体[60, 66]。毒素 B 的细胞受体还没有测定, 但是有一些毒素 B 结合到红细胞上的指征, 提示糖类受体可能参与毒素 B 的结合[47, 48]。甾类化合物也被认为是毒素 B 的潜在受体[47]。

目前, 对患有 CDAD 或 PMC 的病人的治疗是不用那些令人讨厌的药物, 而开始与液体代替物一起口服抗生素甲硝唑或万古霉素 [3, 14]。万古霉素只是在病人不能忍受或对甲硝唑治疗无效的某些情况下才使用。因为万古霉素的费用较高, 且它的过量使用可能会纵容万古霉素抗性微生物的发展, 所以常规上不使用万古霉素。甲硝唑治疗对大约 80% 患有 CDAD 或 PMC 的病人有效。在大约 20% 的病人中, 在停止抗生素治疗之后, 腹泻复发[15]。在这样的个体中持续发作或复发, 直到正常的肠道菌群重新建立, 并且艰难梭菌的数量降低。这是一个缓慢的过程, 因为在每一次腹泻发生时都服用例如可干扰正常肠道菌群平衡的抗生素, 如甲硝唑。

可从肠道中排除毒素活性的唯一另外一种用于 CDAD 和 PMC 的治疗包括, 与抗生素联合口服使用多克量的阴离子交换树脂, 例如消胆胺和降胆宁。此方法已经用于治疗轻度到中度的患病病人, 以及患有腹泻多次发作的个体[16, 17]。这种治疗的形式只在治疗疾病中获得了中度成功[18]。除了缺乏功效外, 还有与使用离子交换树脂相关的一些其它不利之处。离子交换树脂不能特异地结合毒素 A 或毒素 B。那么, 离子交换树脂还可能结合抗生素, 导致肠中抗生素的亚适量水平。这也可能随着其它的药疗法发生, 病人可能会患有不相关的疾病。离子交换树脂的另一个缺点是与这些化合物口服施用相关的令人不快的、持久的味道。

就诊断的方法而言, 检测样品中艰难梭菌的一个方法是培养样品。此方法的缺点包括获得结果所要求的时间长度, 以及非产毒艰难梭菌菌株 (不产生毒素) 的干扰。其它的方法包括使用特异的抗血清或单克隆抗

体。这些方法是建立在检测临床样品中毒素 A 或毒素 B 的基础之上的。美国专利 4, 863, 852 和 5, 098, 826 描述利用含有毒素 A 的生物受体检测艰难梭菌毒素 A 的方法, 其中包括与支持物相结合的 α Gal(1-3) β Gal(1-4) β GlcNAc、X 和 Y 抗原寡糖序列的试剂。美国专利 5, 635, 606 教导了某种共价连接到生物相容性固体支持物, 例如, Chromosorb P™ 上的合成寡糖序列可用于结合毒素 A。

综上所述, 需要一种对抗生素相关性腹泻的有效治疗。尤其是, 需要一种能够中和艰难梭菌毒素 B 和/或能够既中和艰难梭菌毒素 A 又中和毒素 B 的化合物。将以一种合适的药物制剂非侵入性地施用优选的化合物, 例如口服。

发明概述

本发明提供用于预防和治疗抗生素相关性腹泻、假膜性结肠炎和由艰难梭菌毒素 B 引起的其它疾病的组合物和方法。

一方面, 本发明提供从怀疑含有所述毒素 B 的样品中结合并排除艰难梭菌毒素 B 的方法, 包括用至少一种通过非肽基相容性连接臂共价结合到惰性支持物的结合毒素 B 的寡糖序列, 在毒素 B 可被吸收到支持物的条件下与样品接触; 并且从样品中分离含有所吸收的毒素 B 的支持物。

另一方面, 本发明提供在患有所述疾病或对所述疾病易感的病人中预防或缓解由艰难梭菌毒素 B 介导的一种或多种疾病的方法, 包括给病人施用有效量的组合物, 组合物含有至少一种通过非肽基相容性连接臂共价结合到药学可接受的惰性支持物上的毒素 B 结合寡糖序列, 其中所述寡糖序列可结合毒素 B, 并且其中此组合物能够被从胃肠道中除去。

另一方面, 本发明提供在治疗或预防 CDAD 以及由艰难梭菌毒素 B 所引起的相关疾病中有用的药物组合物, 包括至少一种通过非肽基相容性连接臂共价结合到药学可接受的惰性支持物上的寡糖序列, 其中所述寡糖序列可结合毒素 B, 组合物还包括药学可接受的载体, 其中所述组合物能够被从胃肠道中除去。

另一方面, 本发明提供从怀疑含有所述毒素 A 和 B 的样品中结合并

除去艰难梭菌毒素 A 和 B 的方法，包括用通过非肽基相容性连接臂共价结合到惰性支持物上的至少一种结合毒素 A 的寡糖序列和至少一种结合毒素 B 的寡糖序列，在毒素可被吸收到支持物的条件下与样品接触；并且从样品中分离含有所吸收的毒素的支持物。

另一方面，本发明提供在患有所述疾病或对所述疾病易感的病人中预防或缓解由艰难梭菌毒素 A 和 B 介导的一种或多种疾病的方法，包括给病人施用有效量的组合物，其中组合物含有通过非肽基相容的连接臂共价结合到药学可接受的惰性支持物上的至少一种毒素 A 结合寡糖序列和至少一种毒素 B 结合寡糖序列，其中所述寡糖序列结合毒素 A 和 B，并且其中此组合物能够被从胃肠道中除去。

另一方面，本发明提供在治疗或预防 CDAD 以及由艰难梭菌毒素 A 和 B 所引起的相关疾病中有用的药物组合物，包括至少一种通过非肽基相容的连接臂共价结合到药学可接受的惰性支持物上的寡糖序列，其中所述寡糖序列结合毒素 A 和结合 B，组合物还包括药学可接受的载体，其中所述组合物能够被从胃肠道中除去。

附图简述

图 1A 和 1B 表明依据使用 SYNSORB 5-128 对艰难梭菌毒素 B 活性的时间和浓度依赖性中和作用。

图 2 表明具有通过它们各自的连接物共价结合的镆和异麦芽糖 (isomaltose) 寡糖之 SYNSORB 5174，中和毒素 A 和 B 的活性。

发明详述

A. 定义

此处所使用的以下术语具有以下的含义：

术语“抗生素相关性细菌性腹泻”是指其中抗生素治疗干扰肠中微生物菌群的平衡，使得致病性生物例如艰难梭菌生长过量的疾病。这些生物引起腹泻。抗生素相关性细菌性腹泻包括这样的疾病，例如艰难梭菌相关性腹泻 (CDAD) 和假膜性结肠炎 (PMC)。

术语“生物相容的”是指相对于人的组织或体液来说是化学惰性的。

术语“相容性连接臂”或“连接臂”是指用于将寡糖结构与生物相容性支持物间隔开且具有双功能的基团，其中一个官能团能够结合支持物上相应（reciprocal）的官能团，另一个官能团能够结合寡糖结构的相应官能团部分。在本发明中，相容性连接臂优选的是非肽基间隔臂。寡糖可通过 8-甲氧羰基辛基连接物或通过另一种合适的非肽基连接物，例如，分子式为 $\text{-NH-}(\text{CH}_2)_m\text{-NHC(O)NH-}$ 的脲样连接臂来连接，其中 m 是从约 2 到约 10 的整数。

术语“寡糖”意谓含有 1 到大约 20 个糖部分的糖类。糖类衍生物也可能被用作术语寡糖中所包含的糖类部分[67-69]。

术语“假膜性结膜炎”（PMC），也被称为假膜性小肠结膜炎或肠炎，是指小肠和大肠的粘液膜的炎症，有着粪便中假膜性材料（包括纤维蛋白、粘液的、坏死的上皮细胞和白细胞）的形成和排出。

术语“支持物”是指一种惰性材料，寡糖序列可能通过相容性连接臂结合或固定于其上。当使用是在体内时，支持物将是生物相容性的。

术语“SYNSORB”是指共价偶联到 Chromosorb P™(Manville Corp., Denver, Colorado)[12] 的 8-甲氧羰基辛基寡糖结构，一种衍生的硅石颗粒材料。这里说明的是，SYNSORB 可以使用脲样连接臂而不是 8-甲氧羰基辛基连接物。

术语“毒素 A”是指艰难梭菌的肠毒素，它可引起 CDAD 以及相关疾病。此毒素具有凝集素样活性。

术语“毒素 B”是指艰难梭菌的细胞毒素，它可引起肠道细胞的破坏以及诱导炎性介质的释放。

为本申请的目的，所有引用的糖都使用传统的三字母命名。除非另外说明，假设所有的糖都是 D 型的，除岩藻糖是 L 型的。另外所有的糖都是吡喃型。

B. 药理学

艰难梭菌毒素 A 和毒素 B 中的氨基酸序列与已报道的在链球菌葡聚糖

结合蛋白中负责寡糖结合的序列相似[45-51]。虽然，如上所述，毒素 B 的受体还不清楚，但对这些葡聚糖结合蛋白的寡糖结合特异性就是针对如下所示的连接的重重复葡萄糖单位的 [52]:



寡糖异麦芽三糖 ($\alpha \text{ Glc}(1-6) \alpha \text{ Glc}(1-6) \text{ Glc}$) 是通过采用连接臂附着到 Chromosorb P 上而固定化的，并在毒素 B 中和实验中测试。这些实验的结果在图 1A 和 1B 中图示，其中显示使用固定化异麦芽三糖 SYNSORB ($n=3$) 对艰难梭菌毒素 B 细胞毒活性的中和是时间和浓度依赖性的。浓度中和实验通过将固定化异麦芽三糖 (10、20 或 40 毫克) 与 1 毫升的毒素 B，在室温下温育 2 小时来进行。使用中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞来测定每个样品中毒素活性的量。

结果可用相对于没有与 SYNSORB 一起温育的对照毒素溶液之残余活性百分比来表示。时间依赖性中和实验通过将毒素 B 与 20 毫克固定化的异麦芽三糖 SYNSORB 在室温温育 1、2 和 4 小时来进行。将毒素 B 与 Chromosorb P 的对照解育 (4 小时) 包括在内，以测定支持物的背景结合的程度。结果用相对于没有与 SYNSORB 一起解育的对照毒素溶液的残余活性百分比来表示，表明毒素 B 以时间和浓度依赖的方式与异麦芽三糖 SYNSORB 结合。结果还表明在这些条件下，毒素 B 与支持物缓慢结合，需要长达 4 小时以实现明显的毒素 B 结合。另外，这些资料表明，含有葡萄糖 $\alpha(1-6)$ -连键重复单位的寡糖对于结合毒素 B 是有效的，并可用于艰难梭菌介导的腹泻的治疗。

掺入以葡萄糖或 N-乙酰葡萄糖胺结尾的寡糖之 SYNSORB 也被用于检测毒素 B 的结合，方法是通过测定有或无 SYNSORB 时毒素 B 在 CHO 细胞中的细胞毒活性。这些研究的结果在表 1 中列出，其中*表示使用豚样连接臂的 SYNSORB。

表 1: 毒素 B 中和作用的研究

SYNSORB 编号	常用名	寡糖结构	中和百 分比	0. 5% BSA 存在 下的中和百分比
23	-	β Glc	0	0
38	-	α Glc(1-2) β Gal	78 ± 16	80
3-74*	麦芽糖	α Glc(1-4) β Glc	96 ± 0	80
3-76*	纤维二糖	β Glc(1-4) β Glc	93 ± 5	80
5-128*	异麦芽三糖	α Glc(1-6) α Glc(1-6) α Glc	96 ± 0	80
179A*	异麦芽糖	α Glc(1-6) α Glc	96 ± 9	N.D.
78	壳二糖	β GlcNAc(1-4) β GlcNAc	93 ± 5	80

除 SYNSORB23 外, 所有测试的 SYNSORB 都有效地中和毒素 B 的细胞毒性。比较而言, 毒素 A 不能结合于 SYNSORB 5-128 (异麦芽三糖) 和 179A (异麦芽糖)。没有检测表 1 中的其它 SYNSORB 对毒素 A 的结合。这个观测证实在毒素 A 和毒素 B 的结合特异性方面是有差异的, 尽管在两个毒素之间有一些氨基酸同源性 (60%氨基酸同源)。已经鉴定了结合毒素 A 的寡糖[65-66]。

我们还利用掺入两种不同寡糖配体的 SYNSORB 衍生物。用于 Chromosorb PTM 双重标记所选择的配体是基于以前的研究结果: 其揭示对毒素 A 和毒素 B 不同的寡糖结合特异性。因为寡糖 α Gal(1-3) β Gal(1-4) β Glc(Cd)可结合毒素 A, 而不结合毒素 B, 因此选择它作为毒素 A 的中和成分, 并用 8-甲氧羰基辛基连接臂将它固定到氨基衍生化的 Chromosorb P 上。毒素 B 而不是毒素 A 结合到异麦芽糖(α Glc(1-6)Glc)。利用已经掺入了镉寡糖的氨基衍生的 Chromosorb, 使用如 PCT/CA97/00851[70]中所公开的新近发展的“Instasorb”连接臂技术, 将异麦芽糖固定在支持物上。然后, 用所得 SYNSORB (SYNSORB 5174, 它具有通过其各自的连接物共价结合的寡糖) 来测试毒素 A 和 B 的结合。包括了 SYNSORB 镉和异麦芽糖 (SYNSORB 179A) 用作对照。图 3 中所表示的结果表明 SYNSORB 5174 即中和毒素 A 又中和毒素 B 的活性。结果还说明 SYNSORB 5174 的毒素中和能力与 SYNSORB 镉和 SYNSORB 179A 相当。因此, 包含一种以上寡糖配体的支持物能够用来

既结合毒素 A 又结合毒素 B。

C. 合成

可采用本领域熟知的方法来实现寡糖结构合成的化学方法。这些材料一般使用适当保护的个别单糖组装。

所使用的特殊方法一般是对所要合成的每一个别结构进行调整和最优化。一般地，所有或部分寡糖糖苷的化学合成首先包括在还原糖或单糖的异头碳原子上糖苷键的形成。具体地，天然存在的或化学修饰的糖结构（糖基供体）的合适保护形式在还原单位的异头中心被选择性修饰，以便引入一个离去基团，该离去基团包括卤化物、三氯乙酰亚胺酸根、乙酰基、硫糖苷等。然后，在本领域熟知的催化条件下，将供体与在要建立糖苷键的位置上拥有一个游离羟基的苷元或糖类受体的合适形式反应。

本领域已知许多种苷元部分，并能够以合适的构象与还原单位的异头中心结合。糖类合成领域熟知的相容性保护基团的适当使用，将允许合成的结构之选择性修饰，或其它糖单位或糖嵌段的进一步结合。

糖苷键形成以后，糖苷可用于实现另外的糖单位偶联或在所选部位的化学修饰，或在传统的去保护后，用于酶促合成。一般，天然存在或化学修饰的糖单位与糖苷的化学偶联可通过使用文献[21-37]中已详尽描述的化学方法来实现。

结合或固定化本发明寡糖结构的支持物包括本领域已知的多种生物相容的材料。水溶性生物相容性聚合物例如，水凝胶、羧甲基纤维素、合成聚合物等等都是特别优选的。尤其是，这些支持物可用于肠道递送，尤其是延时递送。有用的支持物是不可吸收的，也就是说，它们可以是可溶的或不可溶的，只要它们不被身体所吸收。

固体支持物在某些应用中尤其有用。结合本发明寡糖结构的这类支持物可以是片状或颗粒的形式。本领域已知大量的生物相容固体支持物材料。其中的实例是硅石，合成的硅酸盐例如多孔玻璃、生物硅酸盐例如硅藻土，含硅酸盐的矿物，如高岭土，以及合成聚合物例如聚苯乙烯、

聚丙烯, 以及多糖。用于体内使用的优选固体支持物具有从约 10 到 500 微米的颗粒大小。特别优选的颗粒大小是 100 到 200 微米。

寡糖结构共价连接或非共价(被动地)吸附到支持物以便被固定化。共价结合可通过支持物官能团与寡糖结构相容性连接臂之间的反应。出乎意料地发现, 寡糖结构与生物相容的支持物通过相容性连接臂的结合, 产生了一个有效地去除毒素的产物。用于间接结合的连接部分优选是具有合适长度的有机双功能分子(至少一个碳原子), 它仅仅是提供这个寡糖结构离开支持物表面的距离。

本发明的组合物优选由此分子式表示:



其中, 寡糖代表至少一个其基团结合毒素 B 和/或 A 之糖单位的寡糖基团, Y 是氧、硫或氮, R 是至少一个碳原子的苷元连接臂, 支持物如以上所定义的, n 是大于或等于 1 的整数。可使用含有大约 2 到 10 个糖单位的寡糖序列。优选含有 2 到 4 个糖单位的序列。在一些情况中, 不止一个寡糖基团可连接到支持物上, 例如, 一个结合毒素 B 的寡糖基团, 另一个结合毒素 A 的寡糖基团, 以提供结合不止一种毒素部分的组合物。

本领域已知许多苷元连接臂。例如, 已经公开了一个含有对硝基苯基(例如 $-\text{O}_6\text{CH}_4\text{pNO}_2$) 的连接臂[38]。在合成中的适当时间, 硝基基团被还原成一个能够被保护为 N-三氟乙酰氨的氨基。在偶联到支持物之前, 通过去除三氟乙酰氨基团使氨基去保护。

已经公开了含有硫的连接臂[39]。特别地, 连接臂是由 2-溴乙基基团衍生的, 它在与硫亲核体的取代反应中已经显示能产生含有许多末端官能团的连接臂, 例如, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$ 和 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_4\text{-pNH}_2$ 。这些末端官能团使得反应至支持物的互补官能团上, 因此, 形成与支持物的共价连接。这种反应在本领域是熟知的。

已经公开了 6-三氟乙酰氨-己基连接臂 ($-\text{O}-(\text{CH}_2)_6\text{-NHCOCF}_3$) [40], 其中三氟乙酰氨保护基团可以除去, 将用于偶联的伯氨基去掩蔽。

其它的已知连接臂的范例包括 7-甲氧羰基-3, 6, 二噁庚基连接臂[41] ($-\text{OCH}_2\text{-CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$); 2-(4-甲氧羰基丁烷-羧酸氨) 乙基[42]

($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_4\text{CO}_2\text{CH}_3$)；通过与合适单体的自由基共聚合产生共聚体的烯丙基连接臂[43] ($-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)；其它的已知为 ($-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) 的烯丙基连接臂[44]。另外，烯丙基连接臂可在 2-氨基乙基硫醇存在下衍生化，以提供 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 连接臂[45]。也已经公开了其它合适的连接臂[21-23, 25, 26]。用于将寡糖基团共价连接到支持物的具体连键并不关键。

优选地，苷元连接臂是疏水性基团，最优选地，苷元连接臂是选自

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ || \end{array}$$

$-(\text{CH}_2)_6\text{C}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_5\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{O}-$ 和 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-$ 的疏水性基团，其中 m 是从约 2 到约 10 的整数。

我们已经发现共价连接到生物相容性支持物，例如 Chromosorb PTM(SYNSORB)上的合成寡糖序列可以用来结合毒素 B。这些组合物可用于治疗或预防 CDAD、PMC 和其它与艰难梭菌感染相关的疾病。当使用固体支持物时，对于这些组合物，SYNSORB 是特别优选的，因为它无毒并耐受机械和化学降解。

在使用大鼠的研究中（一种广泛接受的临床前模型，因为它们是对人的反应的预测）已经发现 SYNSORB 可不受影响地通过大鼠的胃肠道。发现口服施用后它们可被完全并快速地排除（72 小时排除 99%）。另外，SYNSORB 上高密度的寡糖部分对于结合具有糖类结合亲和力的毒素是非常有用的。例如，认为毒素 A 具有多个寡糖结合位点[11]。

非肽基连接臂优选用作本发明的相容性连接臂。因为糖肽含有数个（一般是不同的）连接到同一蛋白的寡糖，因此不希望使用糖肽。难以大量获得以及需要昂贵的和费力的纯化，使得得到糖肽也是不容易的。同样地，由于口服时在胃肠道中的稳定性不好，也不希望 BSA 或 HAS 偶联物的使用。

含有通过非肽基间隔臂连接到惰性支持物的毒素 B 结合单位之寡糖基团的共价连接，可以从一个待分析的样品中有效结合并除去毒素 B（或者

毒素 A 和毒素 B), 该样品需分析毒素 B(或毒素 A 和 B)存在, 或者可以从患有或对 CDAD、PMC 和其它与艰难梭菌感染相关的疾病易感的病人肠中分析毒素 B(或毒素 A 和 B)。当合成具有这种连接的(以非衍生化形式)相容连接臂的寡糖时, 可以得到能够偶联到多种支持物上的高纯度的组合物。

D. 药物组合物

通过使用包含一种或多种可将毒素 B 结合到支持物上的寡糖结构之药物组合物可以完成本发明的方法。

当用于优选的口服施用时, 这些组合物可通过多种途径配制。它将优选为流体或半固体形式。可以考虑将包括流体药学惰性载体(例如水)的组合物用于口服。其它药学相容性流体或半固体也可使用。这些流体或半固体的使用是本领域的技术人员所熟知的(参见, 例如, Remington's 制药科学, 第 18 版, 1990。)

也优选可与流体或半固体食物(例如肠道营养配方、苹果酱、冰激凌或布丁)混合的组合物。优选诸如没有不受欢迎的味道或后味的 SYNSORB 这样的制剂。也可使用鼻胃管将组合物直接递送到胃中。

也可使用固体组合物, 并可任选地、便利地用于含有药学惰性载体的制剂, 其中惰性载体包括传统的固体载体, 如, 乳糖、淀粉、糊精或硬脂酸镁, 组合物能够方便地以片剂或胶囊的形式出现。(寡糖-Y-R)_n-支持物组合物本身也可在不加入惰性药学载体时使用, 尤其是以胶囊的形式使用。

选择剂量以提供对受影响的个体或易感受试者肠中发现的毒素 B 的中和与消除。有用的剂量是从大约 0.25 到 1.25 微摩尔寡糖/kg 体重/天, 优选约 0.5 到 1.0 微摩尔寡糖/kg 体重/天。使用 SYNSORB 组合物时, 这意味着大约 0.5 到 1.0 克 SYNSORB/kg 体重/天, 其在肠中 SYNSORB 的浓度为大约 20 毫克/毫升。对于具有临床症状的受试者, 预期每天服药 3 到 4 次, 连续一个星期或直到症状缓解。对于易感人群, 显示需要缓释性预防性给药, 如在肠道营养配方中使用。剂量水平和服药日程可根据

所使用的特定寡糖结构和受试者的年龄以及病情等因素加以改变。

如以前所讨论的，优选口服施用，但是也可考虑用于其它给药方式，例如经直肠的制剂。这些制剂的使用可取决于所使用的具体组合物及接受治疗的具体病人。这些制剂可以包含一种油性、水性、乳化的液体载体或含有某种适于给药方式的溶剂。

组合物可以以单位剂量的形式，或以多倍的或亚单位剂量来配制。按照前面提出的预期剂量，口服施用的液体组合物应该优选含有约 1 微摩尔寡糖/毫升。

E. 方法学

我们已经发现某些结合毒素的寡糖序列可以中和艰难梭菌毒素 B。尤其是，已经发现通过非肽基相容性连接臂共价结合到支持物上的合成寡糖可有效地中和毒素 B 或是毒素 A 和 B。这些组合物的实例是中和毒素 B 或者既中和毒素 A 又中和毒素 B 活性的某种 SYNSORB。

我们已经测试了通过 8-甲氧羰基辛基 (MCO) 或脲样连接臂结合到 Chromosorb P 上的几种寡糖序列其中和毒素 B (或者既中和毒素 A 又中和毒素 B) 的能力。本发明中有用的结合到支持物上的寡糖序列是那些结合毒素 B 的序列及在一些情况中既结合毒素 A 又结合毒素 B 的序列。

寡糖与毒素 B 的结合亲和力可通过，例如以下实施例 3 中所提出的样品体外测试很容易检测。作为本发明的目的，连接到支持物上的结合毒素 B 的寡糖序列是指那些能够在 CHO 细胞中至少降低 50% 细胞毒性的组合物。

已经发现几种通过相容性连接臂连接到支持物上的不同寡糖序列具有中和毒素 B (在一些情况中，中和毒素 A 和 B) 活性的能力。可以使用这些序列以及其它也可结合毒素 B 的序列治疗或预防 CDAD、PMC 以及其它与艰难梭菌感染相关的疾病。发现完全去除毒素 B 活性的最适时间是 37℃，大约 4 小时，使用浓度为 1 毫升样品中 20 毫克 SYNSORB。因为每克 SYNSORB 中含有大约 0.25 到 1.0 微摩尔寡糖，使用 4 升的肠体积，每天所给的剂量中寡糖的总量范围将从 7.5 到 30 微摩尔。

可通过口服施用含有用相容性连接臂共价结合到支持物上的寡糖序列的组合物（如 SYNSORB）来治疗或预防 CDAD、PMC 以及其它与艰难梭菌感染相关的疾病。例如，已经发现 SYNSORB 可完整地通过大鼠的胃。这就意味着当它们在肠道中结合毒素 B 时是完整的。随后完整的 SYNSORB 和与之结合的毒素 B 的除去将导致毒素 B 从病人中的排除。

通过相容性连接臂共价结合到支持物上的寡糖序列，例如 SYNSORB 可用于治疗患有多次发作腹泻的个体。在初始的腹泻复发后，将用 SYNSORB 治疗病人，以从肠中去除毒素 B 或者毒素 A 和 B。毒素 A 的去除阻止了对肠内层的初始的组织破坏，这将预防或减轻腹泻。毒素 B 的去除阻止了这种毒素对肠和结肠细胞的细胞毒性，这也将预防或减轻腹泻。没有进一步用抗生素治疗的必要，将使得肠中正常肠道微生物菌群重新建立。这类治疗的好处是不影响正常微生物菌群在肠道的重新定居。直到腹泻停止的治疗将允许完全恢复。

除了它可用于患有复发性腹泻的病人中，使用通过相容性连接臂共价结合到支持物上的寡糖序列，例如 SYNSORB 的治疗还可用于治疗所有患有或易于患 CDAD、PMC 以及其它与艰难梭菌感染相关的疾病的个体。在与抗生素治疗相结合使用本发明的寡糖-支持物组合物，将能够更加有效地减轻腹泻，导致更快的康复。

使用任何适当的检测系统可以直接在含有寡糖的支持物表面测定毒素 B 和/或毒素 A。例如，可以使用对毒素特异的放射性的、生物素酰化的、荧光标记的单克隆抗体或多克隆抗体测定结合到支持物上的毒素量。本领域熟知许多与标准的免疫分析技术类似的、用于测定特定结合复合物形成的方法。

实施例

采用以下方法进行以下实施例中的研究。术语和缩写与那些本领域目前所使用的那些是一致的。

1. 毒素纯化

使用稍稍加以修饰的 Sullivan 等人以前所描述的方法[2, 21], 从产生毒素的艰难梭菌菌株 (ATCC 43255、VPI 菌株 10463) 中分离毒素 A 和 B。如通过测定不能使兔红细胞发生血细胞凝集的含毒素溶液, 则毒素 B 级分缺乏毒素 A 的活性。

2. 使用兔红细胞的毒素 A 血细胞凝集分析

用 Tris 缓冲盐水 (TBS, pH7.4) 洗涤新鲜的兔红细胞, 并重新悬浮在浓度 4% (体积/体积) 的 TBS 中。在 U-型微量滴定孔中用 TBS 制备系列的两倍稀释 (50 微升) 的毒素 A 溶液。将等体积 (50 微升) 的兔红细胞加入到每个孔中并将微量滴定板轻轻混匀。毒素 A 血细胞凝集分析在 4℃ 孵育 4 小时。然后通过视觉来评定血细胞凝集效价。所有的分析都按双份进行。

3. 使用中国仓鼠卵巢细胞的毒素 B 分析

在补充有 10% 胎牛血清的 Hams F12 培养基中, 在 37℃、含有 5% CO₂ 的大气中培养中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。将要测试毒素 B 活性的样品以 1: 10 在 Hams 培养基中稀释, 并通过 0.22 μm 针式滤器无菌过滤。将样品在培养基中连续 3 倍稀释, 将 100 微升的每一个稀释液加入到含有融合的单层 CHO 细胞的孔中, 并在 37℃/5%CO₂ 下孵育 24 小时。

每一个样品都分析两次。经过 24 小时孵育后, 通过与不含有毒素 B 的对照孔比较, 记录细胞毒作用。24 小时后, 用 95% 甲醇固定细胞, 并用姬姆萨染料染色。用类似的方式处理中和实验的样品。通过比较经过或未经过 SYNSORB 处理的样品之终点稀释测定中和作用百分比。

4. 毒素 A 和 B 的中和作用分析

将含有纯化的毒素 B 和/或 A (0.5 毫升) 的含或不含 0.5% BSA 之 PBS 溶液添加到 0.5 毫升微量离心管中的 SYNSORB (10 毫克), 在立式圆筒转子上室温孵育 1 小时。孵育后, SYNSORB 被沉淀到管底, 小心移去

上清。在 Tris 缓冲盐水 (TBS) 中制备系列的上清液两倍稀释液，在血细胞凝集或 CHO 细胞分析中的终点效价通过以上所描述的测定。毒素 B 和/或毒素 A 的结合百分比可通过相对于与无 SYNSORB 温育的或者与含有非肽基连接臂的 Chromosorb P 温育的毒素溶液之终点效价而计算得到的。

实施例 1

测定毒素 B 与异麦芽三糖 SYNSORB 结合的条件

通过在 1.5 毫升的微量离心管中，将 20 毫克异麦芽三糖 SYNSORB (5-128) 或 Chromosorb 样品与 1 毫升纯化的毒素 B 溶液在立式圆筒转子上室温孵育 1、2 和 4 小时，测定毒素 B 结合所要求的条件。含有毒素 B 溶液但不含有 SYNSORB 或 Chromosorb 的对照管同时孵育。最大毒素 B 中和作用所需要的异麦芽三糖 SYNSORB 的最适量的测定，通过将固定化的异麦芽三糖 (10、20 或 40 毫克) 与 1 毫升毒素 B 在室温孵育 2 小时来进行。使用 CHO 细胞测定每一个样品中毒素活性的量。孵育后，SYNSORB 被沉淀到管底，小心移去上清液。如上所述，制备上清液的系列 5 倍稀释液并测定细胞毒性终点。每一个实验至少做两个重复。通过与没有加入 SYNSORB 的对照比较，测定存在 SYNSORB 时终点的降低程度。这些实验的结果在图 1A 和 1B 中列出，表明 SYNSORB 5174 对中和毒素 B 活性是有效的。

实施例 2

筛选中和毒素 B 的寡糖

在 1.5 毫升微量离心管中，将含有纯化的毒素 B (1 毫升) 的溶液加入到表 1 中所列出的含有不同寡糖序列的多种 SYNSORB 中，在立式圆筒转子上室温孵育 4 小时。通过比较有或无 SYNSORB 时样品的 CHO 细胞之细胞毒性终点效价来测定每一个样品的中和量。

如表 1 中所示，除 β Glc，所有测试的寡糖都有效地中和毒素 B 细胞毒性。因此，寡糖 α Glc (1-2) β Gal、 α Glc (1-4) β Glc (麦芽糖)、

β Glc (1-4) β Glc (纤维二糖)、 α Glc (1-6) α Glc (1-6) α Glc (异麦芽三糖)、 α Glc (1-6) α Glc (异麦芽糖)、和 β GlcNAc (1-4) β GlcNAc (壳二糖) 结合毒素 B。

实施例 3

使用异麦芽糖和异麦芽三糖 SYNSORB 的毒素 A 中和分析

在 0.5 毫升微量离心管中, 将含有纯化的毒素 A (1 毫升) 的溶液加入到异麦芽糖或异麦芽三糖的 SYNSORB (10 或 20 毫克) 中, 在立式圆筒转子上 4℃ 或室温孵育 1 小时。孵育后, SYNSORB 被沉淀到管底, 小心移去上清液。在 Tris 缓冲盐水 (TBS) 中制备上清液的系列两倍稀释物并如上所述测定血细胞凝集终点。通过与没有加入 SYNSORB 的对照比较, 测定存在任何一种 SYNSORB 时终点的降低程度。我们没有测定到任何毒素 A 与异麦芽糖或异麦芽三糖 SYNSORB 的结合, 表明毒素 A 具有区别于毒素 B 的结合特异性。

实施例 4

毒素 A 与毒素 B 的中和

使用“双重标记”SYNSORB, 即含有镉寡糖 (α Gal (1-3) β Gal (1-4) β Glc) 和异麦芽糖的 SYNSORB, 通过它们各自的连接物而结合 ($n=2$) 的 SYNSORB 5174, 可进行艰难梭菌毒素 A 血细胞凝集和毒素 B 细胞毒活性的中和实验。通过将 20 毫克/毫升的 SYNSORB 5174、179A (异麦芽糖) 或镉 (Cd) 室温下与毒素 A 孵育 1 小时, 或者与毒素 B 室温下孵育 4 小时来进行中和实验。使用 CHO 细胞或兔红细胞测定每一个样品中毒素活性的量。结果用相对于不与 SYNSORB 孵育的对照毒素溶液之残余活性百分比表示。

图 2 中所表示的结果表明, SYNSORB 5174 既中和毒素 A 又中和毒素 B 的活性。结果还表明 SYNSORB 5174 的毒素中和能力与 SYNSORB 镉和 SYNSORB 179A 相当。因此, 含有一种以上寡糖配体的支持物可用于既结合毒素 A 和又结合毒素 B。

说明书附图

用异麦芽三糖SYNSORB对毒素B之时间依赖性中和

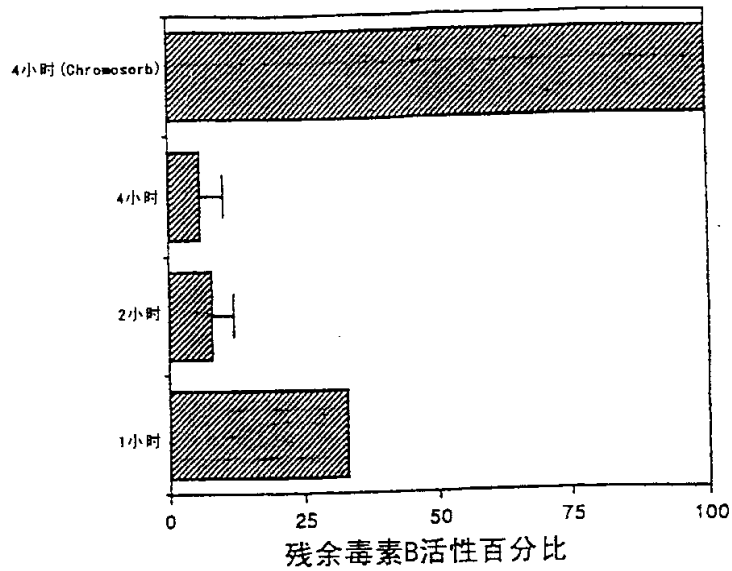


图1(a)

C. 用异麦芽三糖SYNSORB对艰难核菌毒素B的中和作用

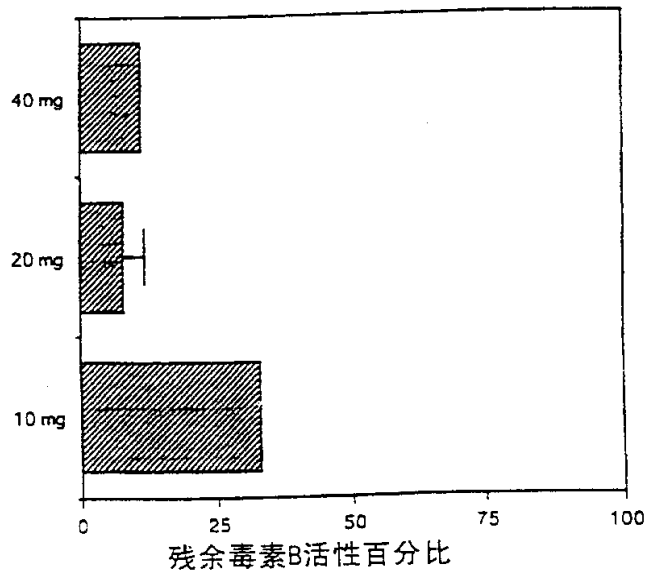


图1(b)

图1

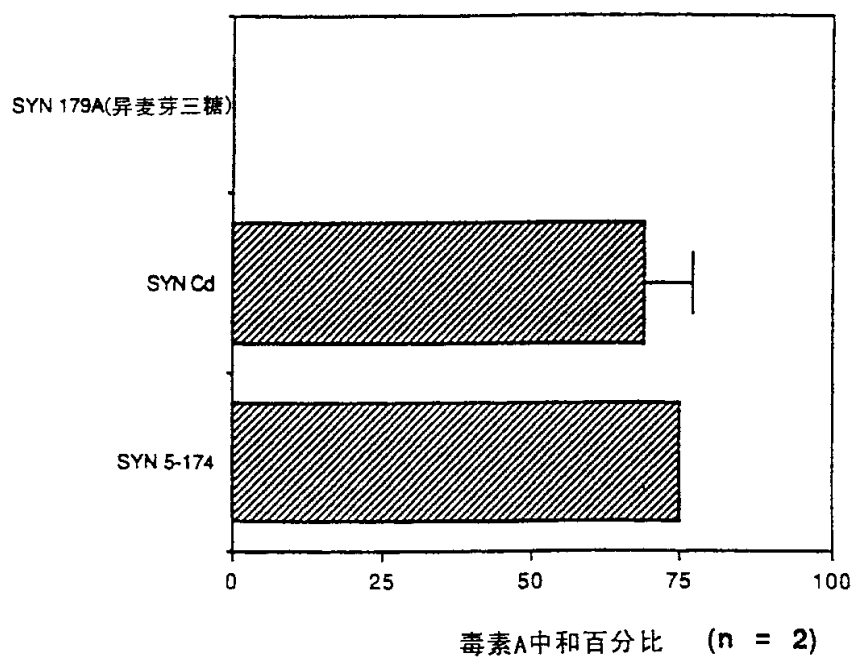
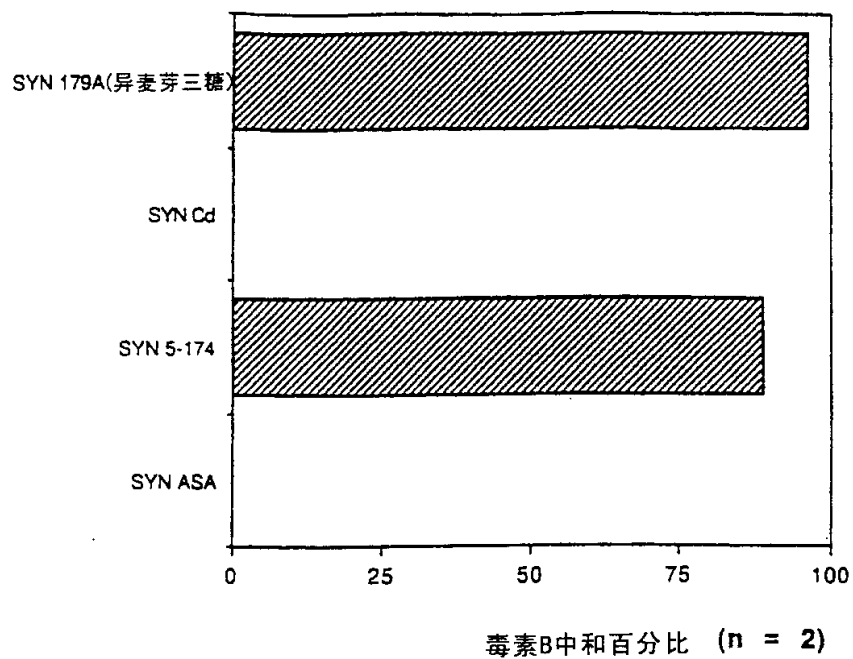


图2