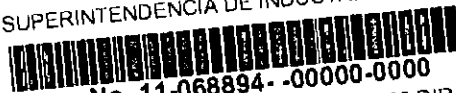


SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-068894-00000-0000

Fecha: 2011-06-02 16:50:11
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Evs: 378 FASENACIONALI
Folios: 34



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES



11-688894

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE VACUNAS.

SOLICITANTE: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

DIRECCION: Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein. Alemania.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 02 de Junio de 2011

P2011/000059

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE &

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



No. 11-068894- -00000-0000

Fecha: 2011-06-02 16:50:11
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 34

PETITORIO - FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2011/000059

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: BOEHRINGER INGELHEIM
VETMEDICA GMBH.

Dirección: Binger Strasse 173, 55216
Ingelheim am Rhein.

Nacionalidad o Domicilio: Alemana

Lugar de Constitución: Alemania

Teléfono: _____ **Fax:** _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Diagonal 34 No. 5-28 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: Jessica, REINEKE.

Dirección: CD Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein,
Alemania.

Nacionalidad o Domicilio: Alemana

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/066109 Fecha Diciembre 01, 2009

Publicación Internacional No. WO 2010/063693 Fecha June 10, 2010

6

Título (54) PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS.

Clasificación Internacional (51) A61K 39/08; C07K 14/33.

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

Diciembre 03, 2008

(31) Número de Solicitud

08170591.5

9

Comprobante de pago No.

11-

Fecha Junio de 2011

10

ANEXOS

2

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver expediente No. 11-024.243☒

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.G

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

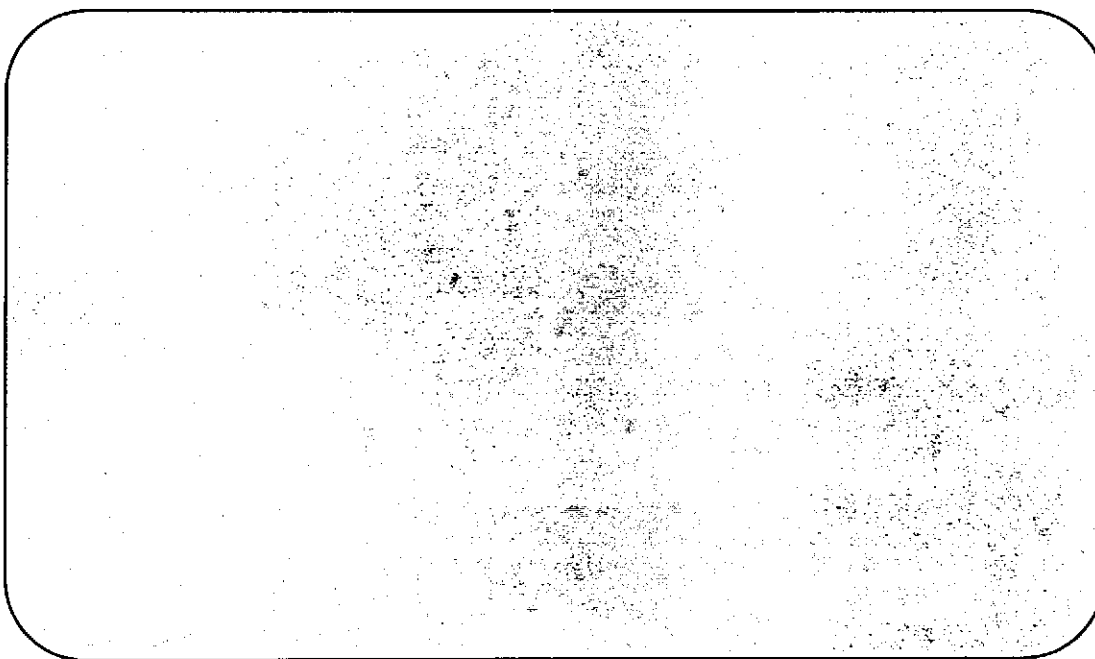
☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTEFIRMA: *Carlos R. Olarte*C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

3

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0053303

Bogotá D.C., Junio 02 de 2011 - 16:27:42

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	444455550	02/06/2011	2.992.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

=====

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-068894- -00000-0000

Fecha: 2011-06-02 16:50:11
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 34

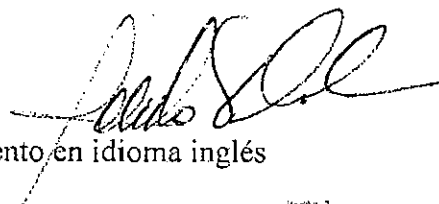
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 2 de 2011 - 16:27:43

Este documento público es una traducción al español de un documento en idioma inglés presentado ante mí.

ROBERTO M. OLARTE GARCÍA
Traductor e Intérprete Oficial
Ministerio de Justicia
Licencia 0041/1996


ROBERTO M. OLARTE GARCÍA
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0041
Minijusticia 1996

ESTADO DE MISSOURI
Oficina del Secretario de Estado

Solicitado para uso en COLOMBIA
No para ser usado en los Estados Unidos de América.
El propósito de la Apostilla es el de certificar la autenticidad de la rúbrica del funcionario quien firma el documento, el cargo del funcionario quien firma el documento, y, donde fuese adecuado, la certificación del sello.

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

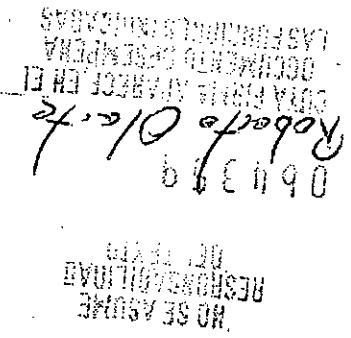
1. País: Estados Unidos de América

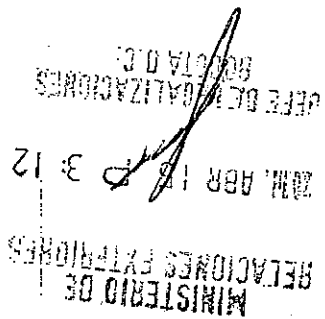
Este documento público
2. ha sido firmado por JUANITA M. NOBLE
3. actuando en calidad de Notario Público, Estado de Missouri
4. lleva el sello de JUANITA M. NOBLE - NOTARIO PÚBLICO -
ESTADO DE MISSOURI

CERTIFICA

5. en Jefferson City, Missouri
6. este 24 de febrero de 2011
7. Por Robin Carnahan, Secretario de Estado, Estado de Missouri
8. No. 232026
9. (SELLO OFICIAL: SELLO DEL SECRETARIO DE ESTADO - MISSOURI)

10. Firma:
(firma: ilegible)





5

ESTADO DE MISSOURI
Oficina del Secretario de Estado

Solicitado para uso en COLOMBIA

No para ser usado en los Estados Unidos de América.

El propósito de la Apostilla es el de certificar la autenticidad de la rúbrica del funcionario quien firma el documento, el cargo del funcionario quien firma el documento, y, donde fuese adecuado, la certificación del sello.

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

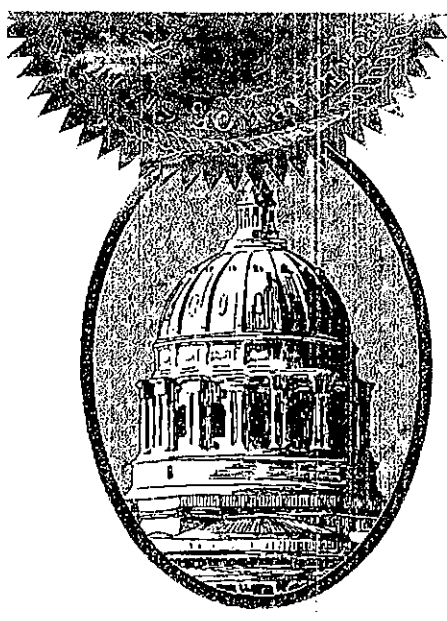
Este documento público

2. ha sido firmado por JUANITA M. NOBLE
3. actuando en calidad de Notario Público, Estado de Missouri
4. lleva el sello de JUANITA M. NOBLE - NOTARIO PÚBLICO -
ESTADO DE MISSOURI

CERTIFICA

5. en Jefferson City, Missouri
6. este 3 de marzo de 2011
7. Por Robin Carnahan, Secretario de Estado, Estado de Missouri
8. No. 232205
9. (SELLO OFICIAL: SELLO DEL SECRETARIO DE ESTADO - MISSOURI)
10. Firma:
(firma: ilegible)


ROBERTO M. OLARTE
Traductor y Notario Público
Licenciado No. 0651
Enero de 1998



STATE OF MISSOURI
Office of
Secretary of State

Requested for use in COLOMBIA
Not for use within the United States of America.
The purpose of the Apostille is to certify the authenticity of the signature of the official signing the document, the capacity in which the official signing the document has acted, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1. Country: United States of America
- This public document
- 2. has been signed by JUANITA M. NOBLE
- 3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC - STATE OF MISSOURI
- 4. bears the seal/stamp of JUANITA M. NOBLE - NOTARY PUBLIC - STATE OF MISSOURI

Certified

- 5. at Jefferson City, Missouri
- 6. the 24th day of FEBRUARY, 2011
- 7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri
- 8. No. 232026
- 9. Seal/Stamp
- 10. Signature:



Robin Carnahan
Secretary of State

OLARTE MOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Power of Attorney

The undersigned,

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

domiciled in

2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506-2002 United States of America

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or Juan Guillermo Moure** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right, also to file Unfair competition actions and request injunctions in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications, collect refunds, desist, settle, conciliate or negotiate. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

El suscrito,

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

domiciliado en

2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506-2002 United States of America

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o Juan Guillermo Moure** poder amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual y también para presentar acciones de competencia desleal y pedir medidas cautelares a nombre de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir, transigir, y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

R. Michel J.

Assistant Secretary

Date/Fecha:

2/14/2011

City/Country/Ciudad,País:

USA

Diagonal 34 No. 5 - 28 Bogotá D.C., Colombia.

Tel: + 57 (1) 601-7700 Fax: + 57 (1) 601-7799 e-mail: office@olartemoure.com

OLARTEMOURE
OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

State of Missouri)
County of Buchanan)

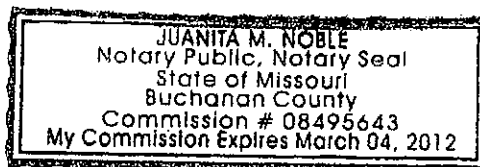
On this 14th day of Feb in the year 2011 before me, Juanita M. Noble^{Asst.} a Notary Public in and for said state, personally appeared R. Michael Herrman, Secretary and General Counsel for Beohringer Ingelheim Vetmedica, Inc., known to me to be the person whose name is subscribed to the within instrument on behalf of said corporation and acknowledged to me that he executed the same for the purposes therein stated.

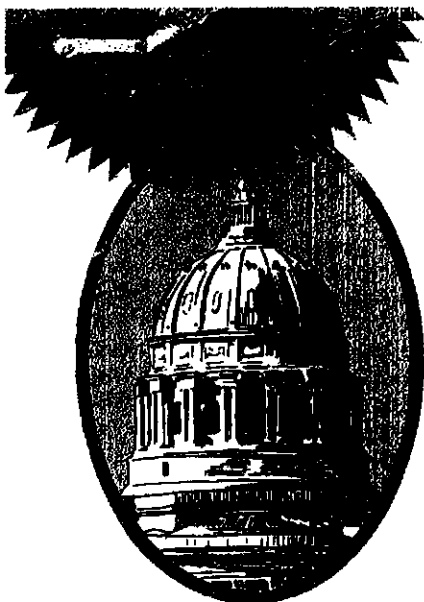
In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Juanita M. Noble
Notary Public

My Commission Expires: 3/4/12

(seal)





STATE OF MISSOURI

Office of Secretary of State

Requested for use in COLOMBIA

Not for use within the United States of America.

The purpose of the Apostille is to certify the authenticity of the signature of the official signing the document, the capacity in which the official signing the document has acted, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by JUANITA M NOBLE

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC - STATE OF MISSOURI

4. bears the seal/stamp of JUANITA M NOBLE - NOTARY PUBLIC - STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri

6. the 3RD day of MARCH, 2011

7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri

8. No. 232205

9. Seal/Stamp

10. Signature:



Robin Carnahan
Secretary of State

Notarial Certification

On this date,

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Secretary

of **BOEHRINGER INGELHEIM
VETMEDICA, INC.**

3. That **BOEHRINGER INGELHEIM
VETMEDICA, INC.**,

having its principal place of business located in
**2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506-
2002 United State of America**

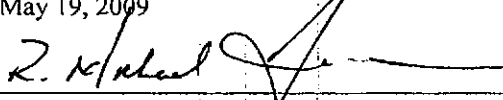
is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. Unanimous
Written Consent of Directors dated November 8,
2007

Bylaws of Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.
May 19, 2009



R. Michael Herrman
Assistant Secretary

Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

mayor de edad y domiciliado

suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de

3. Que

con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscibir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas
en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del)
siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

CLARTE MOURE
CLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

State of Missouri)
)
County of Buchanan)

Assistant

On this 1st day of March, in the year 2011 before me, Juanita M. Noble, a Notary Public in and for said state, personally appeared R. Michael Herrman, ^{Assistant} Secretary and General Counsel for Beohringer Ingelheim Vetmedica, Inc., known to me to be the person whose name is subscribed to the within instrument on behalf of said corporation and acknowledged to me that he executed the same for the purposes therein stated.

In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Juanita M. Noble
Notary Public

My Commission Expires: 3/4/12

JUANITA M. NOBLE
Notary Public, Notary Seal
State of Missouri
Buchanan County
Commission # 08495643
My Commission Expires March 04, 2012

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardised wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

In relation to international application no. PCT/EP2009066109,

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

(i) Jessica REINEKE, Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany, a citizen of Germany is the inventor for the subject matter for which protection is sought by way of this application.

(ii) BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL VETMEDICA GMBH is entitled as employer of the inventor Jessica REINEKE

- (51) International Patent Classification:
A61K 39/08 (2006.01) C07K 14/33 (2006.01)
(21) International Application Number:
PCT/EP2009/066109
(22) International Filing Date:
1 December 2009 (01.12.2009)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data:
08170591.5 3 December 2008 (03.12.2008) EP
(71) Applicant (for all designated States except US):
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
[DE/DE]; Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein
(DE).
(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): REINEKE, Jessica
[DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, CD Patents,
Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein (DE).
(74) Agents: HAMMANN, Heinz et al.; c/o Boehringer Ingel-
heim GmbH, Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein
(DE).
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,

CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments (Rule 48.2(h))

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCTION OF VACCINES

(57) Abstract: The invention relates to a process for the production of a vaccine against bacterial pathogens which produce an AB toxin, like Clostridium, comprising (a) culturing the pathogen under conditions where the AB toxin is produced, and harvesting the culture (b) cleaving the AB toxin enzymatically in vitro, preferably using inositol hexaphosphate as a co-factor, and (c) combining the composition of step (b) with a pharmaceutically acceptable carrier.

PROCESS FOR PRODUCTION OF VACCINES

TECHNICAL FIELD

- 5 The invention relates to a process of production of vaccines, and vaccines produced accordingly.

BACKGROUND INFORMATION

- 10 *Clostridium difficile*, a spore-forming, gram-negative bacterium, is responsible for 60% of the cases of antibiotics-associated diarrhoea and for almost 100% of the patients affected by pseudomembranous colitis. The mechanism responsible for the outbreak of the disease is not yet fully understood. It might be related to both host and strain factors, since not all patients infected with *C. difficile* develop the disease. Clinical symptoms of
15 infected patients can range from being asymptomatic to life-threatening toxic megacolon.

- C. difficile*, like many other pathogens causing disease in animals, including humans, produces toxins. A toxin is a poisonous substance produced by living cells or organisms that is active at very low concentrations. Toxins can be small molecules, peptides, or
20 proteins and are capable of causing disease on contact or absorption with body tissues by interacting with biological macromolecules such as enzymes or cellular receptors. *C. difficile* produces two toxins, Toxin A (TcdA) and Toxin B (TcdB) which are causative for antibiotic-associated diarrhoea or pseudomembranous colitis. They are very large (308 kDa and 269 kDa) bacterial proteins, which are part of the family of the so-called large
25 clostridial cytotoxins (LCT's) together with TcsH and TcsL of *C. sordellii* and Tcna of *C. novyi*. All these toxins display a high degree of sequence homology, a similar domain structure and harbour a glycosyltransferase moiety. TcdA and TcdB are single-chained proteins characterized by a tripartite functional organization. Their C-terminal domain is required for binding to the plasma membrane of the target cell, the hydrophobic middle
30 part is a putative translocation domain and the N-terminal catalytic domain of the proteins carries the glycosyltransferase site. The uptake process into the cytosol of the target cell has not yet been fully characterized. However, it is generally accepted that the toxins are endocytosed after binding to cell surface receptors. After acidification of the endosomes, only the N-terminal domain of the toxin translocates into the cytosol. This translocation

process is supposedly mediated by pore formation, since TcdA forms pores in artificial membranes at low pH. Activation of the toxin requires proteolytic cleavage between the amino acids Leu543 and Gly544, which liberates a small fragment of 63 kDa that harbours the N-terminal catalytic domain into the cytosol. The larger, 207 kDa C-terminal part of TcdB, remains in the membrane fraction. The N-terminal 63 kDa fragment displays full cytotoxic activity. Once liberated, the N-terminal glycosyltransferase domain can move freely in the cytosol to inactivate its target proteins, GTPases of the Rho/Rac family. These proteins are involved in many cellular functions, e.g. organization of the actin cytoskeleton, control of transcription, cell polarity and proliferation. Since Rho GTPases play an important role in many functions of the immune system, including pathogen defense responses, cytokine expression and signalling of immune cells, they constitute optimal targets for bacterial toxins.

It has recently been shown that activation of *C. difficile* toxins occurs by autocatalytic cleavage (Reineke et al., Nature 2007, 446:415-419). Furthermore, the role of inositol hexaphosphate (Ins6P, IP6, CAS number [83-86-3]) as a potent activator and co-factor of such autocatalytic cleavage of toxin B was elucidated (Reineke et al., supra). This highly charged molecule appears to fulfil several functions and might be involved in the stabilization of the conformation of the toxin. It is now known that toxin activation through autocatalytic cleavage occurs also with similar toxins of other organisms, including the LCT's toxin A (TcdA) und B (TcdB) of *Clostridium difficile*, the lethal (TcsL) and the hemorrhagic toxin (TcsH) of *Clostridium sordellii*, and the α -Toxin (Tcn α) of *Clostridium novyi*, the RTX toxins of *Vibrio cholerae* (VcRTX), *V. vulnificus* (VvRtx), *V. splendidus* (VsRtx), *Xenorhabdus nematophila* (XnRtx), *X. bovienii* (XbRtx), *Yersinia pseudotuberculosis* (YpRtx), *Y. mollaretti* (YmMfp2) and *Bordetella pertussis* (FhaL1-4) (Sheahan KL et al. EMBO J 2007, 26(10):2552-2561.) *Listonella anguillarum*, *Photorhabdus luminescens*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* (Lupardus PJ et al. SCIENCE 2008, 322(5899):265-268) . All these toxins can be classified as "AB toxins" as outlined below.

30

International patent application WO2008014733 discloses a method of treatment of *Clostridium* infection wherein an inhibitor or activator (IP6) of the autocatalytic activity is administered to a patient.

Several publications disclose *C. difficile* vaccines. Vaccines wherein TcdA and TcdB are inactivated by the chemical agent formalin are disclosed in Sougioultzis S. L. et al., Gastroenterology (2005), 128:764-770; Kotloff, Infect. Immun. 2001; WO9920304, and Ghose et al, Infect. Immun. (2007), 75(6), 2826-2832. Vaccines comprising recombinantly expressed polypeptides representing the C-terminal ligand domain of TcdA or TcdB are disclosed in WO9859053, WO0061761, WO0061762, WO9702836, Pavliakova et al, Infect Immun (2000), 68(4), 2161-2166; Ward et al, Infect Immun (1999), 67(10), 5124-5132; and Lyerly et al., Current Microbiol 21: 29-32). WO2007146139 discloses a codon-optimised DNA-molecule encoding the receptor binding domain of TcdA and TcdB and is use as a DNA vaccine. WO2004041857 discloses non-toxic mutants of TcdB and its use for vaccination. Genth, H. et al., Infect. Immun. (2000), 68: 1094-1101 discloses a method to generate enzymatically deficient *Clostridium difficile* toxin B as an antigen for immunization.

Vaccines are typically manufactured by making a preparation comprising antigenic components of such pathogens and admixing them with a pharmaceutically acceptable carrier. To achieve an effective immune response and for economic reasons it is desirable to use preparations obtained from bacterial cultures with only few processing or fractionation steps. In the case of toxin producing organisms, the problem is that the toxins included in such preparations would prevent administration thereof unless they are inactivated. Therefore, the prior art approaches have suggested to make vaccines against bacterial pathogens producing AB toxins like *C. difficile* by chemical inactivation of the toxins, recombinant expression of the non-toxic domain of the toxins (the C-terminal receptor binding or "B" domain), or producing non-toxic mutants of the toxins. However, all these measures lead to a loss of antigenic epitopes of the pathogenic organism which may affect the effectivity of the vaccine, and/or are costly.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

30

The present invention relates to a process for the production of a vaccine against bacterial pathogens which produce an AB toxin, comprising

- (a) Culturing the pathogen under conditions where the AB toxin is produced, and harvesting the culture;

- (b) Cleaving the AB toxin enzymatically *in vitro*; and
- (c) Combining the composition of step (b) with a pharmaceutically acceptable carrier.

5 In a preferred aspect, the enzymatic cleavage is autocatalytic. In a preferred aspect, inositol phosphate, preferably inositol hexaphosphate is used as a co-factor of the enzymatic cleavage.

10 In a further preferred aspect, the invention relates to a process as described, wherein the cells are separated from the culture medium after the harvest, and the AB toxin in the culture medium is cleaved.

The process of the invention can be used for the production of vaccines against pathogens of the genus *Clostridium*, preferably *C. difficile*, *C. sordellii*, *C. botulinum*, *C.*
15 *perfringens*, *C. tetani*, or *C. novyi*, or of the genus *Vibrio*, preferably *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, or *V. splendidus*, or *V. anguillarum* or of the genus *Xenorhabdus*, preferably *X. nematophila*, *X. bovienii*, or of the genus *Yersinia*, preferably *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, or *Y. mollaretti*, or of the genus *Bordetella*, preferably *B. pertussis*, *B. parapertussis*, or *B. bronchiseptica*, or of the genus
20 *Actinobacillus*, preferably *A. pleuropneumoniae*, or *A. suis* and *E. coli*.

An adjuvant may be added to the vaccine composition.

25 In a further aspect, the present invention relates to a vaccine produced with the process as described.

Another aspect of the invention is related to the use of a vaccine produced according to the process as disclosed, for the vaccination of animals, including humans, against infection of bacterial pathogens producing AB toxins.

30

Another aspect of the invention relates to a method of vaccination of animals, including humans, against infection of bacterial pathogens producing AB toxins, comprising administering an effective amount of a vaccine produced according to the process of the invention to an animal, including a human.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5 The present invention relates to an improved process of production of vaccines against bacterial pathogens which produce toxins of the AB type (AB toxins). The present invention provides for an elegant method of inactivation of AB toxins by an autocatalytic enzymatic process *in vitro* taking advantage of the intrinsic proteolytic activity of such toxins. To this end, the composition containing the toxins is adjusted to conditions under
10 which such enzymatic cleavage can occur. In particular, the addition of a necessary co-factor such as inositol phosphate can induce proteolytic inactivation of the AB toxin. By this proteolytic cleavage, the toxic A domain is separated from the transporter domain B and loses its ability to enter the cytosol of cells where it needs to be to exert its toxic effects. In effect, the resulting composition is not toxic any more, or much less toxic than
15 the single chain AB toxin, when applied to living organisms. On the other hand, this kind of inactivation preserves the natural conformation and the antigenic epitopes of the proteins which is important for the effectivity of the vaccine.

In the context of the present invention, the term "AB toxin" is used for a single-chain
20 bacterial toxin which, like the LCT's, comprises a catalytic domain (the A domain) and a receptor binding/translocation domain (the B domain or transporter domain), and wherein the activation of the catalytic domain *in vivo* occurs by autocatalytic cleavage releasing the catalytic domain into the cytosol. AB toxins are for example the LCT's including toxin A (TcdA) and B (TcdB) of *Clostridium difficile*, the lethal (TcsL) and the hemorrhagic toxin
25 (TcsH) of *Clostridium sordellii*, and the α -Toxin (Tcna) of *Clostridium novyi*. Furthermore, AB toxins include the RTX toxins of *Vibrio cholerae* (VcRTX), *V. vulnificus* (VvRtx), *V. splendidus* (VsRtx), *Xenorhabdus nematophila* (XnRtx), *X. bovienii* (XbRtx), *Yersinia pseudotuberculosis* (YpRtx), *Y. mollaretti* (YmMfp2), *Y. enterocolitica* (YST), *Listonella anguillarum* (VaRtx) and *Bordetella pertussis* (FhaL1-4).

30

Accordingly, the process of the invention may be applied to manufacture vaccines against infection by the bacterial pathogens producing AB toxins, as those bacteria listed above. A vaccine is a pharmaceutical preparation which is used to improve immunity to a particular disease in animal, including humans. Vaccines can be prophylactic (e.g. to prevent or

ameliorate the effects of a future infection by any natural or "wild" pathogen), or therapeutic, i.e. applied in a situation where the host is already infected by the pathogen, with or without clinical symptoms of disease. Vaccines may contain killed micro organisms, modified live (attenuated) micro organisms, antigenic subunit preparations of micro organisms (e.g. fractions or recombinantly expressed polypeptides), or, as preferred
5 in the context of the present invention, toxoids, i.e. inactivated toxic compounds in cases where these primarily cause the illness. The vaccine may contain an adjuvant, an agent that can stimulate the immune system and increase the response to a vaccine, without having any specific antigenic effect in itself. Examples of commonly used adjuvants are
10 alum (hydrated aluminium potassium sulfate), aluminium phosphate, aluminium hydroxide, squalene, or oil-based adjuvants. A preferred adjuvant is the commercially available Carbopol® 934P (Carbomer 934P; Noveon, Inc. , Pedricktown, NJ, USA) which may be present in the amount of about 2 ml/l. Carbopol is an acrylic acid polymer which is cross-linked with polyallylsucrose.

15 The first step of the process is culturing the pathogen under conditions where the AB toxin is produced. Bacterial cell culture is well-established in the art. Standard methods for the different species are known and suitable samples of the microorganisms are available from public collections. Listed microorganisms are cultivated according to their special
20 requirements. Clostridia are cultivated under anaerobic atmosphere whereas Yersinia, Xenorhabdus, Bordetella and Vibrio can be cultivated aerobically. Yersinia are psychrotolerant, these organisms are usually cultivated at 28°C. Each organism needs its special medium composition for growth which is readily known in the art.

25 The AB toxin is normally released into the culture medium in the late stationary phase of the culture. After the harvest, it is often advantageous to separate the cells from the culture medium, as the AB toxins are present in the medium in sufficient concentration. This can be done by centrifugation. When the cells are separated by centrifugation, they are discarded and the supernatant is further processed. The toxins in the medium are
30 then deactivated by enzymatic cleavage taking advantage of their autocatalytic properties. To achieve cleavage, the conditions have to be adjusted properly to allow for the enzymatic activity. Most importantly, a co-factor has to be added which promotes the enzymatic activity. Inositol phosphate, in particular inositol hexaphosphate, may be used as a co-factor at a concentration range of 1 µmol/l to 10 mmol/l, more preferably 10-100

μmol/l, but other analogues or derivatives such as 1,3,4- or 3,4,6-triphosphate, 1,2,3,4-, 1,3,4,5-, 3,4,5,6, or 1,4,5,6-tetraphosphate, or 1,2,3,4,5-, 1,2,3,5,6-, 1,3,4,5,6-, 2,3,4,5,6-pentaphosphate work as well, but may require higher concentrations. The pH should be in the range of 6,5-8,5, and the pH of the culture medium is normally already within that
5 range. Otherwise, a buffer may be added or exchanged e.g. by dialysis or ultrafiltration, e.g. Tris HCl at pH 8.5. A suitable temperature range is 20 – 40°C. The cleavage will normally be completed within 1 to 24 hours and should be tested with an assay like those disclosed in the examples, to avoid residual toxicity.

10 The toxin species may be purified from the harvest and/or culture medium prior to inactivation. If the pathogen produces more than one toxin species, these toxin species may be isolated from each other before inactivation. For example, *C. difficile* produces the two toxins Toxin A (TcdA) and Toxin B (TcdB), as outlined above. These two proteins may be separated as exemplified in Example 4 herein before inactivation, and then used in
15 vaccine preparation either individually, or in combination. Toxoid A and/or Toxoid B of *C. difficile*, i.e. Toxin A and/or Toxin B inactivated according to the present invention, are preferred antigens for vaccinations. The toxoids may be further purified after autocatalytic cleavage, with enrichment of the larger, C-terminal cleavage fragments (e.g. consisting of amino acids 543-2710 of the holotoxin A, or amino acids 544-2666 or 545-2666 of the
20 holotoxin B). The purified toxoids of the invention may further be combined with inactivated AB toxins of other pathogens in vaccine preparations.

The resulting preparation is then brought into its final formulation for use as a vaccine as deemed appropriate. For example, it may be used as is, with the aqueous environment as
25 is being the pharmaceutically acceptable carrier. The environment may also be changed, for example by dilution, dialysis, ultrafiltration or further purification steps like affinity chromatography. The antigen preparation may be freeze-dried for storage, for reconstitution with water before use. If appropriate, adjuvants may be added. Adjuvants that can be considered are for example water in oil-, oil in water-, multiphasic- or non-
30 mineral oil- emulsions, aluminium based adjuvants, polymeric adjuvants like Carbopol®, squalene, liposome, microparticles, immunostimulatory complexes and Toll-like receptor cascade activating adjuvants. The vaccine will be administered by subcutan, interdermal, intramuscular, intravenous or intraperitoneal injection. The frequency of injection and dosage depends on the target species. Susceptible species are humans, dogs, cats,

rabbits, pigs, cattle, fish, rodents and horses. The vaccination is a prophylactic treatment and protection of progeny can be achieved by vaccination of the mother. The time of vaccination starts after disappearance of maternal antibodies and may require booster vaccinations after 4 weeks and at later time points.

5

Thus, in a further aspect, the present invention relates to a vaccine against *Clostridium*-induced diarrhoea, comprising toxoid A and/or toxoid B of *Clostridium difficile*, wherein said toxoid A and/or toxoid B has been generated from Toxin A and/or Toxin B by autocatalytic cleavage, optionally together with a pharmaceutically acceptable carrier. In some embodiments, Toxoid A consists of amino acids 543-2710 of the sequences as deposited in public databases (EMBL, NCBI) under the accession Nos. YP_001087137, ZP_05349827, or YP_003213641. In further embodiments, Toxoid B consists of amino acids 544-2666 or 545-2666 of the sequences as deposited in public databases (EMBL, NCBI) under the accession Nos. of YP_001087135, ZP_05349824, ZP_05328744, YP_003217086, or YP_003213639. The vaccine may further comprise an adjuvant.

15

EXAMPLES

20

Example 1: Manufacture of a *Clostridium difficile* vaccine

Clostridium difficile samples may be obtained from public collections, for example the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, under accession No. ATCC 9689, ATCC 43255. It is grown in a fermenter in BHI medium (brain heart infusion broth, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany; see American Pharmaceutical Association. 1950. The national formulary, 9th ed., APA, Washington, D.C.) under anaerobic conditions at 37°C for 3-4 days. The two large cytotoxins TcdA and TcdB are released in the late stationary phase. At this point in time, the culture is harvested and the bacteria are sedimented by centrifugation at 8000 x g for 10 minutes. The supernatant is used as is, or toxins may be enriched by gel permeation chromatography (e.g. on S300 Sephacryl), affinity chromatography, anion exchange chromatography and/or ultrafiltration. The reducing agent dithiotreitol is then added at a final concentration of 1-50 mmol/l to the supernatant or toxin-enriched preparation, followed by addition of the

25

30

chelate forming agent ethylene diamine tetraacetate at a final concentration of 10-100 mmol/l. Inositol hexaphosphate (IP6) is then added at a final concentration between 1 μ mol/l and 10 mmol/l, for example 10 μ mol/l or 100 μ mol/l, and the composition is incubated at 37°C for a period of 2 to 24 hours in a suitable buffer like Tris-HCL at a pH of 6,5-8,5. Completeness of the cleavage may be tested by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and protein staining.

The resulting preparation is then brought into its final formulation for use as a vaccine as deemed appropriate. For example, it may be used as is, with the aqueous environment as is being the pharmaceutically acceptable carrier. The environment may also be changed, for example by dilution, dialysis ultrafiltration or further purification steps like affinity chromatography. If appropriate adjuvants may be added. Adjuvants that can be considered are for example water in oil-, oil in water-, multiphasic- or non-mineral oil-emulsions, aluminium based adjuvants, polymeric adjuvants like Carbopol, squalene, liposome, microparticles, immunostimulatory complexes and Toll-like receptor cascade activating adjuvants. The vaccine will be administered by subcutan, interdermal, intramuscular, intravenous or intraperitoneal injection. The frequency of injection and dosage depends on the target species. Susceptible species are humans, dogs, cats, rabbits, pigs, cattle and horses. The vaccination is a prophylactic treatment and protection of progeny can also be achieved by vaccination of the mother. The time of vaccination starts after disappearance of maternal antibodies and may require booster vaccinations after 4 weeks and at later time points.

Example 2: Activity assay

CHO cells (chinese hamster ovary, e.g. DSM ACC110, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) are seeded into 96 or 24 well microtiter plates (100 μ l per well) in e.g. Ham's F10 medium with e.g. 5 % FCS (fetal calf serum) and incubated at 37°C overnight in a humid atmosphere until they reach confluence. They are washed with Ringer's solution without bivalent ions like Magnesium or Calcium, then the wells are filled with 100 μ l (96 well plate) or 400 μ l (24 well plate) Ringer's solution without Mg and Ca. Then, 100 or 400 μ l, respectively, of the vaccine preparation of example 1, and respective dilution series (10^{-1} to 10^{-8}) are pipetted into the

5 wells, with double values for each sample. BHI medium which was treated the same way as the vaccine preparation serves as a negative control. As a positive control, untreated *C. difficile* supernatant is used. The plates are incubated at 37°C in a humid atmosphere for 3 to 24 hours, then the cells are inspected with a microscope.

5

Cells treated with the vaccine preparation should show no morphological changes, as those of the negative control. Cells treated with untreated culture supernatant will show a cytopathic effect which is primarily characterized by getting a round shape and developing an "astrocyte-like" morphology. If the vaccine-treated cells show a cytopathic effect similar
10 to the positive control, the enzymatic cleavage was not complete and has to be repeated.

Example 3: Vaccination of animals

15 Syrian gold hamsters may be used as a standardized animal model for *C. difficile* infections. Animals of 60 to 100 g weight are used in the experiment. The animals receive different concentrations (1-100 µg) of vaccine preparation by intraperitoneal or subcutaneous injection. The vaccine either contains no adjuvant, or Complete Freund adjuvant (1:1 with vaccine preparation) or Ribi (monophosphoryl lipid A and trehalose
20 dicorynomycolate emulsion) as adjuvant. BHI medium treated the same way as the vaccine is used as a negative control. 2 weeks after the last vaccination, the animals receive 10-100 mg/kg clindamycin intraperitoneally or orogastrically. 24 hours later, they are inoculated through a gastric feeding tube or ball end cannula with at least 10⁴ viable *C. difficile* germs per animal, or 100 c.f.u. (colony forming units), respectively. Protective
25 efficacy of the vaccine is determined through clinical monitoring of diarrhoea or mortality rate.

Example 4: *Clostridium difficile* vaccination of animals

30

In these studies, AB-toxins of *Clostridium difficile* were inactivated by use of their intrinsic autocatalytic cleavage function and used as vaccines in animals.

For toxin production, 1 ml of *C. difficile* (reference strain VPI10463, ATCC 43255) working culture was transferred into a pretreated and sterile dialysis bag containing 200 ml 0.9 % NaCl. The dialysis bag was placed into 1.3 l BHI medium and was incubated for 5 d at 37 °C in an anaerobic chamber. After 5 d the content of the dialysis bag was centrifuged (5000 rpm, 4 °C, 15 min) and fractionated ammonium persulfate precipitation of the supernatant was performed. The first precipitation step (toxin A) was performed by addition of 45 % (NH)₄SO₄ and stirring for 3 h at 4 °C. After this time the solution was centrifuged (5000 rpm, 4 °C and 30 min) and a second precipitation step (toxin B) was conducted by addition of (NH)₄SO₄ to a final content of 70 %. The second fraction was stirred for 3 h at 4 °C and after that again centrifuged (5000 rpm, 4 °C and 30 min). The resulting pellets of the precipitation steps were suspended in 5 ml 50 mM Tris/HCl pH 7.5. The two fractions (toxin A and B) received from (NH)₄SO₄ precipitation were further purified by sucrose density gradient centrifugation. Therefore a sucrose density gradient was prepared by underlying 4.5 ml of the following sucrose solutions in increasing order in an ultracentrifuge tube: 10 %, 18.75 %, 27.50 %, 36.25 % and 45 % sucrose in 50 mM Tris/HCl pH 7.5. The toxin fractions were added on the top and the tube was centrifuged for 3.5 h at 4 °C and 100.000 g. The resulting gradient was collected in 2 ml aliquots. The toxin content of the samples was measured by cytotoxicity assays with CHO-K1 cells. Therefore CHO-K1 cells (ATCC CCL-61) were grown in DMEM/F10-Medium containing 10 % FCS, 0.5 % L-glutamine and 0.5 % penicillin/streptomycin. Monolayers of cells (about 4000 per well) were prepared in 96-well microtiter plates and incubated at 37 °C and 5 % CO₂ for 24 h. After incubation time 10- fold dilutions of toxin containing samples were prepared. After removal of medium from cells, toxin dilutions were added. Cytotoxic effects were examined microscopically after 24 h by an inverted microscope.

25

Following scheme was used to evaluate cytotoxicity:

positive (+): > 90 % rounded cells

negative (-): < 90 % rounded cells

30 The toxin containing fractions of the sucrose density gradient centrifugation were pooled (each for Toxin A and Toxin B) and 1:2 diluted with 50 mM Tris/HCl pH 7.5. The samples (either Toxin A or Toxin B) were loaded on an ion exchange column and a NaCl gradient ranging from 50 mM NaCl in 50 mM Tris/HCl pH 7.5 to 700 mM NaCl in 50 mM Tris/HCl pH 7.5 was conducted (Δ NaCl 5 mM/ml) to elute the toxin. Fractions of 2 ml were

collected. Toxin content of the samples was measured by cytotoxicity assays with CHO-K1 cells. The toxin containing fractions were pooled and concentrated by an ultra centrifugation step for 15 min at 4 °C and 5000 rpm. To the obtained toxin solutions 20 % glycerin was added and samples were stored at -20 °C.

5

Purification steps were also monitored by SDS-PAGE. Proteins were visualized by Coomassie staining. Concentration of the final toxin samples were determined by comparison of the toxin amount in SDS gels with BSA standards. The comparison was conducted by optical adjustment and by computer analysis.

10

Vaccine preparations were prepared by induction of autocatalytic cleavage of toxins by adding DTT and IP₆. Toxin A cleavage was performed in H₂O at a final volume of 50 µl by addition of 3 mM IP₆ and 50 mM DTT. Toxin B cleavage was performed in H₂O at a final volume of 100 µl by addition of 1 mM IP₆ and 150 mM DTT. Autocleavage was performed over night at 37 °C on a rotator.

15

The resulting cleavage products were analyzed by cytotoxicity assay and SDS PAGE analysis. Cytotoxicity assays were performed with CHO-K1 cells and Caco cells as Caco cells showed higher sensitivity against Toxin A. Caco cells were grown in MEM medium containing 10 % FCS and 0.5 % penicillin/streptomycin on 96 microtiter wells incubated at 37 °C and 5 % CO₂ for 48 h. The cytotoxicity assay showed a reduction of cytotoxicity of at least 10³ fold for toxin A and 10⁴ fold for toxin B after 24 h. Cleavage efficiency was visualized with Coomassie stained SDS PAGE analysis.

20

Vaccine doses with respective inactivated toxins (toxoids) were prepared with the Sigma Adjuvant System (oil-in-water emulsion with Monophosphoryl Lipid A and synthetic trehalose dicorynomycolate). Toxoid concentrations were determined by comparison of the toxin amount in SDS gels with BSA standards. The comparison was conducted by optical adjustment and by computer analysis. The adjuvant was reconstituted as described by the manufacturer with PBS and mixed 1:1 with the respective toxoid sample.

30

The classical model organism for *Clostridium difficile* infection is the Syrian hamster. Syrian hamsters react very sensitive to the infection and develop clinical signs and

pathological alterations similar to those in humans. Thus the hamster infection model is a very strict model ending in a 100 % mortality of infected animals.

In the trials Syrian hamsters with a body weight of 60-80g at inclusion were purchased by Charles River, D-97633, Sulzfeld, Germany. The animals were randomized to the respective groups at the arrival at the test facility and were given an adequate acclimatization period of at least 5 days. Animals were vaccinated 3 times in intervals of 2 weeks. 14 days after the last immunization the infection with *Clostridium difficile* was performed. 24 h prior to the oral challenge with *Clostridium difficile*, 2mg Clindamycin was orally administered to each animal. The administration of the antibiotic Clindamycin predisposes the animals to the *C. difficile* infection by disrupting the normal bacterial flora of the gut.

Over a period of 7 days after challenge careful daily clinical examinations were made and clinical findings recorded. At several time points during the study blood samples were taken and sera analyzed for antibodies that inhibit the cytotoxicity of Toxin A and Toxin B on cultured cells. Therefore CHO-K1 cells were seeded at 5000 cells/well in 96 well plates in DMEM/F10-medium containing 10 % FCS, 0,5 % L-glutamine and 0,5 % penicillin/streptomycin and were incubated at 37°C and 5 % CO₂ overnight. Dilutions of hamster sera were prepared in medium and incubated for 1 h at 37 °C with toxin A and B dilutions. The toxins had been diluted to concentrations that cause > 90 % rounding of cells after 3 h and 24 h. Cell rounding was determined microscopically after 3 h and 24 h as described before. Neutralization titer was defined as the reciprocal value of the greatest sera dilution which completely inhibited rounding of cells after 24 h.

The objective of the study was to determine if the repeated subcutaneous immunizations with different doses of a combination of inactivated toxin A and B is biocompatible and if protection against a *C. difficile* infection can be induced. Therefore 12 male Syrian hamsters were used that were randomized to 4 respective groups at the arrival at the test facility. Each group consisted of 3 animals. The groups were vaccinated on different days and increasing doses in order to be able to react to potential toxic effects after vaccination.

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
N (animals)	3	3	3	3
Dose volume	100 µl Sigma Adjuvant System per dose			
1. Immunisation	Toxoid A/B, each 1 µg	Toxoid A/B, each 1 µg	Toxoid A/B, each 1.5 µg	Adjuvant
2. Immunisation	Toxoid A/B, each 2 µg	Toxoid A/B, each 3 µg	Toxoid A/B, each 4 µg	Adjuvant
3. Immunisation	Toxoid A/B, each 4 µg	Toxoid A/B, each 4 µg	Toxoid A/B, each 4 µg	Adjuvant

study outline:

Day of the study	Procedure
-5	Baseline blood samplings, approximately 100 µL serum per animal
0	Administration of Group A and D with the respective test item, subcutaneous, 100 µL and body weight determination
2	Administration of Group B with the respective test item, subcutaneous, 100 µL and body weight determination
4	Administration of Group C with the respective test item, subcutaneous, 100 µL and body weight determination
14	Administration of Group A and D with the respective test item, subcutaneous, 100 µL and body weight determination
16	Administration of Group B with the respective test item, subcutaneous, 100 µL and body weight determination
18	Administration of Group C with the respective test item, subcutaneous, 100 µL and body weight determination
30	Administration of group A - D with the respective test item, subcutaneous, 100 µL and body weight determination
38	Blood sampling, approximately 100 µL serum per animal
43	Treatment with antibiotic (Clindamycin 2 mg/ animal), orally
44	Challenge with <i>Clostridium difficile</i> (1.77×10^8 / animal) orally, 24 hours after treatment with antibiotic; body weight determination
45 - 47	Clinical adspection 5 times per day
48 - 51	Clinical adspection 3 times per day
52	Blood samplings of surviving animals Section of animals— on day 52, in case of death or at day of euthanizing (if animals developed severe signs of suffering).

All animals were without clinical signs after subcutaneous vaccination thus the toxin dose could be increased to up to 4 µg each for toxoid A and B. Also the animals of the control group showed no reactions to the subcutaneous vaccination demonstrating that the Sigma adjuvant system was well tolerated if applied subcutaneously. The determination of the
5 body weight at several days during the study also confirmed the good tolerance of the vaccination. All animals gained weight until challenge. The weight gain of the toxin vaccinated animals was comparable to that of the control group. Also the last measured weight before challenge of toxin vaccinated animals (average: Group 1: 140,3 g; Group 2: 136,3 g; Group 3: 144 g) was in the range of the weight of control animals (average Group
10 4: 141 g).

After the challenge at study day 44 the animals of the control group died within 2-3 days. In comparison the animals vaccinated with the cleaved toxins all survived longer and 2 animals even showed nearly no clinical signs until the end of the study (Group 1 animal
15 No.1; Group 3 animal No.1).

Animal No. 1 from group 1 only developed softish feces at study day 47 but recovered fast and was without clinical findings at the next study day and until end of the study. The other animal that survived until end of study (No. 1 group 3) showed softish feces, slightly
20 wet, soiled perineum and slightly reduced spontaneous activity from study day 47 onwards until study day 50. It was without clinical signs on study day 51.

5

10

15

20

25

Group	Animal No.	Death/Euthanasia at study day
Group 1	1	study end (52)
	2	48
	3	50
Group 2	1	48
	2	48
	3	48
Group 3	1	study end (52)
	2	48
	3	50
Group 4 (control group)	1	46
	2	47
	3	47

30

Based on these results, the immunizations with toxoid A/B have induced immunogenicity and partial protection: All vaccinated animals survived longer than the control animals. While challenge was lethal for all control animals 2/9 vaccinated animals survived until the end of the trial. Furthermore the analysis of hamster sera in the cytotoxicity neutralization assay confirmed the development of an immunological response.

5

10

15

20

25

Group (No. of hamsters)	Animal	Serum cytotoxicity neutralization titer d=-5		Serum cytotoxicity neutralization titer d=38	
		Anti-A	Anti-B	Anti-A	Anti-B
1 (3)	1	0	0	50	≤ 10
	2	0	0	25	10
	3	0	0	50	≤ 10
2 (3)	1	0	0	25	≤ 10
	2	0	0	50	≤ 10
	3	0	0	50	≤ 10
3 (3)	1	0	0	10	10
	2	0	0	50	≤ 10
	3	0	0	50	≤ 10
4 (3)	1-3	0	0	0	0

30

No cytotoxicity neutralizing antibodies against toxin A or B could be detected in the sera prior to vaccination and animals of the control group stayed without neutralizing antibodies until the last blood sampling at study day 38. All vaccinated animals developed neutralizing antibodies against both toxins after the three vaccinations (study day 38) clearly showing the immunogenicity of the inactivated toxin preparation. Also the challenge titer might be too high in this sensitive hamster model and might need further adaptation. Looking at the survival rates of the different vaccine groups, no dose-related effect could be observed. This can correlate to the small differences in toxoid

concentration applied and therefore all vaccinated animals may rather be considered as one vaccine group.

Taken together, the results of this study demonstrate that by autocatalytic cleavage
5 inactivated toxin is well tolerated, can induce an immunological response and partial protection against the infection.

WHAT WE CLAIM

1. Process for the production of a vaccine against bacterial pathogens which produce an AB toxin, comprising
 - (a) Culturing the pathogen under conditions where the AB toxin is produced, and harvesting the culture;
 - (b) Cleaving the AB toxin enzymatically *in vitro*; and
 - (c) Combining the composition of step (b) with a pharmaceutically acceptable carrier.
2. Process of claim 1, wherein inositol phosphate, preferably inositol hexaphosphate is used as a co-factor of the enzymatic cleavage.
3. Process of claim 1 or 2, wherein the cells are separated from the culture medium after the harvest, and the AB toxin in the culture medium is cleaved.
4. Process of any one of claims 1 to 3, wherein the AB toxin is purified from the harvest before cleaving, preferably from the culture medium.
5. Process of claims 1 to 4 wherein the pathogen is of the genus *Clostridium*, preferably *C. difficile*, *C. sordellii*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani*, or *C. novyi*, or of the genus *Vibrio*, preferably *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. splendidus* or *V. anguillarum*, or of the genus *Xenorhabdus*, preferably *X. nematophila*, *X. bovienii*, or of the genus *Yersinia*, preferably *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, or *Y. mollaretti*, or of the genus *Bordetella*, preferably *B. pertussis*, *B. parapertussis*, or *B. bronchiseptica* or of the genus *Actinobacillus*, preferably *A. pleuropneumoniae*, or *A. suis* and *E. coli*.
6. Process of claim 5, wherein the pathogen is *Clostridium difficile*, and Toxin A is purified from Toxin B before cleaving.
7. Process of claims 1 to 6 wherein an adjuvant is added to the composition.
8. Vaccine produced with the process according to claims 1 to 7.

9. The vaccine of claim 8 comprising Toxoid A and/or Toxoid B of *Clostridium difficile*.
10. Vaccine against *Clostridium*-induced diarrhoea, comprising Toxoid A and/or
5 Toxoid B of *Clostridium difficile*, wherein said Toxoid A and/or Toxoid B has been
generated from Toxin A and/or Toxin B by autocatalytic cleavage, optionally
together with a pharmaceutically acceptable carrier.
11. Use of a vaccine produced according to any one of the foregoing claims for the
10 vaccination of animals, including humans, against infection of pathogens
producing AB toxins.
12. Method of vaccination of animals, including humans, against infection of
pathogens producing AB toxins, comprising administering an effective amount of a
15 vaccine produced according to any one of claims 1 to 7 to an animal, including a
human.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/066109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/08 C07K14/33

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	REINEKE JESSICA ET AL: "Autocatalytic cleavage of Clostridium difficile toxin B" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 446, no. 7134, 22 March 2007 (2007-03-22), pages 415-419, XP002453402 ISSN: 0028-0836	1-6
Y	page 417, right-hand column - page 418, left-hand column, paragraph 4	7
X	WO 2004/041857 A2 (BALLARD JIMMY D [US]; SPYRES LEA M [US]) 21 May 2004 (2004-05-21)	8-12
Y	paragraph [0015]; claims 1-12	7
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 March 2010

Date of mailing of the international search report

01/04/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gruber, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/066109

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/146139 A2 (CORNELL RES FOUNDATION INC [US]; GARDINER DAVID F [US]) 21 December 2007 (2007-12-21) figures 19,20; examples 2,4,6,8 -----	1-12
A	US 2004/115215 A1 (WILLIAMS JAMES A [US]) 17 June 2004 (2004-06-17) claims 10-13 -----	1-12
A	WO 2008/014733 A1 (UNIV MAINZ JOHANNES GUTENBERG [DE]; VON EICHEL-STREIBER CHRISTOPH [DE]) 7 February 2008 (2008-02-07) claim 2 -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/066109

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004041857 A2	21-05-2004	AU 2003299527 A1	07-06-2004
WO 2007146139 A2	21-12-2007	CN 101500581 A	05-08-2009
US 2004115215 A1	17-06-2004	US 2005238665 A1	27-10-2005
		US 2007269861 A1	22-11-2007
		US 2004253673 A1	16-12-2004
		US 2004142455 A1	22-07-2004
		US 2004219637 A1	04-11-2004
WO 2008014733 A1	07-02-2008	AU 2007280861 A1	07-02-2008
		CA 2659684 A1	07-02-2008
		EP 2054044 A1	06-05-2009
		JP 2009545536 T	24-12-2009
		US 2009311258 A1	17-12-2009

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS

CAMPO TÉCNICO

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para la producción de vacunas, y a las vacunas así producidas.

INFORMACIÓN DE ANTECEDENTES

- 10 *Clostridium difficile*, una bacteria gram-negativa formadora de esporas, es responsable del 60% de los casos de diarrea asociada a antibióticos y de casi el 100% de los pacientes afectados por colitis pseudomembranosa. Todavía no se comprende completamente el mecanismo responsable del comienzo de la enfermedad. Podría estar relacionado con factores tanto del hospedador como de la cepa, ya que no todos los
- 15 pacientes infectados con *C. difficile* desarrollan la enfermedad. Los síntomas clínicos de los pacientes infectados pueden oscilar desde permanecer asintomáticos hasta un megacolon tóxico potencialmente mortal.

- C. difficile*, como otros muchos patógenos que provocan enfermedades en los animales, que incluyen los seres humanos, produce toxinas. Una toxina es una sustancia
- 20 venenosa producida por células u organismos vivos que es activa a concentraciones muy bajas. Las toxinas pueden ser moléculas pequeñas, péptidos o proteínas, y son capaces de provocar enfermedades tras el contacto o la absorción en tejidos corporales mediante la interacción con macromoléculas biológicas tales como enzimas o receptores celulares. *C. difficile* produce dos toxinas, la Toxina A (TcdA) y la Toxina B (TcdB), que son los
- 25 agentes causales de la diarrea asociada a antibióticos o de la colitis pseudomembranosa. Son proteínas bacterianas muy grandes (308 kDa y 269 kDa), que son parte de la familia de las denominadas citotoxinas grandes de clostridium (LCTs) junto con TcsH y TcsL de *C. sordellii* y Tcna de *C. novyi*. Todas estas toxinas exhiben un grado elevado de homología de secuencias, una estructura similar de dominios y albergan un resto de
- 30 glicosiltransferasa. TcdA y TcdB son proteínas de cadena simple caracterizadas por una organización funcional tripartita. Su dominio C-terminal es necesario para la unión a la membrana plasmática de la célula objetivo, la parte media hidrófoba es un dominio de translocación putativo y el dominio catalítico N-terminal de las proteínas porta el sitio de glicosiltransferasa. Todavía no se ha caracterizado completamente el proceso de

absorción hacia el citosol de la célula objetivo. Sin embargo, se acepta en general que las toxinas son endocitadas tras la unión a los receptores de la superficie celular. Tras la acidificación de los endosomas, solamente el dominio N-terminal de la toxina se transloca hacia el citosol. Este proceso de translocación está mediado supuestamente mediante la formación de poros, ya que TcdA forma poros en membranas artificiales a pH bajo. La activación de la toxina requiere una escisión proteolítica entre los aminoácidos Leu543 y Gly544, que libera un fragmento pequeño de 63 kDa que alberga el dominio catalítico N-terminal en el citosol. La parte mayor C-terminal de TcdB, de 207 kDa, permanece en la fracción de la membrana. El fragmento N-terminal de 63 kDa exhibe una actividad citotóxica completa. Una vez liberado, el dominio N-terminal de glicosiltransferasa puede moverse libremente en el citosol para inactivar sus proteínas objetivo, las GTPasas de la familia Rho/Rac. Estas proteínas están implicadas en muchas funciones celulares, p.ej., la organización del citoesqueleto de actina, el control de la transcripción, la polaridad y la proliferación celular. Debido a que las GTPasas Rho desempeñan un papel importante en muchas funciones del sistema inmunitario, que incluyen las respuestas defensivas contra patógenos, la expresión de citocinas y la señalización de las células inmunitarias, constituyen objetivos óptimos para las toxinas bacterianas.

Se ha demostrado recientemente que la activación de las toxinas de *C. difficile* se da mediante una escisión autocatalítica (Reineke et al., Nature 2007, 446:415-419). Además, se dilucidó el papel del hexafosfato de inositol (Ins6P, IP6, número CAS [83-86-3]) como potente activador y cofactor de tal escisión autocatalítica de la toxina B (Reineke et al., anteriormente mencionado). Esta molécula sumamente cargada parece desempeñar varias funciones, y podría estar implicada en la estilización de la conformación de la toxina. Ahora se sabe que la activación de toxinas por medio de la escisión autocatalítica se da también con toxinas similares de otros organismos, que incluyen las LCTs toxina A (TcdA) y B (TcdB) de *Clostridium difficile*, la toxina letal (TcsL) y hemorrágica (TcsH) de *Clostridium sordellii*, y la α -Toxina (Tcn α) de *Clostridium novyi*, las toxinas RTX de *Vibrio cholerae* (VcRTX), *V. vulnificus* (VvRtx), *V. splendidus* (VsRtx), *Xenorhabdus nematophila* (XnRtx), *X. bovienii* (XbRtx), *Yersinia pseudotuberculosis* (YpRtx), *Y. mollaretti* (YmMfp2) y *Bordetella pertussis* (FhaL1-4) (Sheahan KL et al. EMBO J 2007, 26(10):2552-2561), *Listonella anguillarum*, *Photorhabdus luminescens*, *Aeromonas hydrophila* y *Yersinia enterocolitica* (Lupardus PJ et al. SCIENCE 2008, 322(5899):265-268). Todas estas toxinas se pueden clasificar como "toxinas AB", tal como se resume más adelante.

La solicitud de patente internacional WO2008014733 describe un método de tratamiento de la infección por *Clostridium* en el que se administra un inhibidor o activador (IP6) de la actividad autocatalítica a un paciente.

Varias publicaciones describen vacunas contra *C. difficile*. Se describen vacunas en las que se inactivan TcdA y TcdB mediante el agente químico formalina en Sougioultzis S. L. et al., Gastroenterology (2005), 128:764-770; Kotloff, Infect. Immun. 2001; documento WO9920304, y Ghose et al, Infect. Immun. (2007), 75(6), 2826-2832. Se describen vacunas que comprenden polipéptidos expresados de manera recombinante que representan el dominio del ligando C-terminal de TcdA o TcdB en los documentos WO9859053, WO0061761, WO0061762, WO9702836, Pavliakova et al, Infect Immun (2000), 68(4), 2161-2166; Ward et al, Infect Immun (1999), 67(10), 5124-5132; y Lyerly et al., Current Microbiol 21: 29-32). El documento WO2007146139 describe una molécula de ADN con codones optimizados que codifica el dominio de unión al receptor de TcdA y TcdB y que se usa como una vacuna de ADN. El documento WO2004041857 describe mutantes atóxicos de TcdB y su uso para la vacunación. Genth, H. et al., Infect. Immun. (2000), 68: 1094-1101 describe un método para generar toxina B enzimáticamente deficiente de *Clostridium difficile* como antígeno para la inmunización.

Las vacunas se fabrican en general produciendo una preparación que comprende componentes antigénicos de tales patógenos y mezclándolos con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para alcanzar una respuesta inmunitaria eficaz y por razones económicas, es deseable usar preparaciones obtenidas a partir de cultivos bacterianos solamente con unas cuantas etapas de procesamiento o fraccionamiento. En el caso de los organismos productores de toxinas, el problema es que las toxinas incluidas en tales preparaciones impedirían su administración a menos que se inactivasen. Por lo tanto, las aproximaciones del estado de la técnica han propuesto producir vacunas contra los patógenos bacterianos que producen toxinas AB como *C. difficile* mediante la inactivación química de las toxinas, la expresión recombinante del dominio atóxico de las toxinas (el dominio de unión al receptor C-terminal o dominio "B"), o mediante la producción de mutantes atóxicos de las toxinas. Sin embargo, todas estas medidas conducen a una pérdida de epitopos antigénicos del organismo patógeno que puede afectar a la eficacia de la vacuna, y/o son costosas.

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de una vacuna contra patógenos bacterianos que producen la toxina AB, que comprende

- (a) cultivar el patógeno en condiciones en las que se produce la toxina AB, y recoger el cultivo;
- 5 (b) escindir la toxina AB enzimáticamente *in vitro*; y
- (c) combinar la composición de la etapa (b) con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto preferido, la escisión enzimática es autocatalítica. En un aspecto preferido, se usa fosfato de inositol, preferiblemente hexafosfato de inositol, como
10 cofactor de la escisión enzimática.

En un aspecto preferido adicional, la invención se refiere a un procedimiento como se ha descrito, en el que las células se separan del medio de cultivo tras la recogida, y se escinde la toxina AB del medio de cultivo.

El procedimiento de la invención se puede usar para la producción de vacunas
15 contra patógenos del género *Clostridium*, preferiblemente *C. difficile*, *C. sordellii*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani*, o *C. novyi*, o del género *Vibrio*, preferiblemente *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, o *V. splendidus*, o *V. anguillarum* o del género *Xenorhabdus*, preferiblemente *X. nematophila*, *X. bovienii*, o del género *Yersinia*, preferiblemente *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, o *Y. mollaretti*, o del
20 género *Bordetella*, preferiblemente *B. pertussis*, *B. parapertussis*, o *B. bronchiseptica*, o del género *Actinobacillus*, preferiblemente *A. pleuropneumoniae*, o *A. suis* y *E. coli*.

Se puede añadir un adyuvante a la composición de vacuna.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una vacuna producida con el procedimiento descrito.

25 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una vacuna producida según el procedimiento descrito para la vacunación de animales, que incluyen seres humanos, contra la infección por patógenos bacterianos que producen toxinas AB.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de vacunación de animales, que incluyen seres humanos, contra la infección por patógenos bacterianos que producen
30 toxinas AB, comprende la administración de una cantidad eficaz de una vacuna producida según el procedimiento de la invención a un animal, que incluye un ser humano.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para la producción de vacunas contra patógenos bacterianos que producen toxinas del tipo AB (toxinas AB). La presente invención proporciona un método elegante de inactivación de las toxinas AB mediante un proceso enzimático autocatalítico *in vitro* que aprovecha la actividad proteolítica intrínseca de tales toxinas. Con este propósito, la composición que contiene las toxinas se ajusta a condiciones bajo las cuales puede ocurrir tal escisión enzimática. En particular, la adición de un cofactor necesario tal como fosfato de inositol puede inducir la inactivación proteolítica de la toxina AB. Mediante esta escisión proteolítica, el dominio A tóxico se separa del dominio transportador B y pierde la capacidad de entrar en el citosol de las células, donde tiene que estar para ejercer su efecto tóxico. De hecho, la composición resultante ya no es tóxica, o es mucho menos tóxica que la toxina AB de cadena simple, cuando se aplica a organismos vivos. Por otra parte, este tipo de inactivación conserva la conformación natural y los epítomos antigénicos de las proteínas, lo cual es importante para la eficacia de la vacuna.

En el contexto de la presente invención, la expresión "toxina AB" se usa para una toxina bacteriana de cadena simple que, como las LCTs, comprende un dominio catalítico (el dominio A) y un dominio de unión al receptor/translocación (el dominio B o dominio transportador), y en la que la activación del dominio catalítico *in vivo* se da mediante una escisión autocatalítica que libera el dominio catalítico en el citosol. Las toxinas AB son, por ejemplo, las LCTs que incluyen la toxina A (TcdA) y B (TcdB) de *Clostridium difficile*, la toxina letal (TcsL) y la toxina hemorrágica (TcsH) de *Clostridium sordellii*, y la α -Toxina (Tcn α) de *Clostridium novyi*. Además, las toxinas AB incluyen las toxinas RTX de *Vibrio cholerae* (VcRTX), *V. vulnificus* (VvRtx), *V. splendidus* (VsRtx), *Xenorhabdus nematophila* (XnRtx), *X. bovienii* (XbRtx), *Yersinia pseudotuberculosis* (YpRtx), *Y. mollaretti* (YmMfp2), *Y. enterocolitica* (YST), *Listonella anguillarum* (VaRtx) y *Bordetella pertussis* (FhaL1-4).

Por lo tanto, el procedimiento de la invención se puede aplicar a la fabricación de vacunas contra la infección por los patógenos bacterianos que producen toxinas AB, tales como las bacterias enumeradas anteriormente. Una vacuna es una preparación farmacéutica que se usa para mejorar la inmunidad hacia una enfermedad particular en un animal, que incluye los seres humanos. Las vacunas pueden ser profilácticas (p.ej., para prevenir o mejorar los efectos de una infección futura por cualquier patógeno natural o "silvestre"), o terapéuticas, es decir, aplicadas en una situación en la que el hospedador ya está infectado por el patógeno, con o sin síntomas clínicos de enfermedad. Las vacunas pueden contener microorganismos muertos, microorganismos vivos modificados

(atenuados), preparaciones de subunidades antigénicas de microorganismos (p.ej., fracciones o polipéptidos expresados de manera recombinante), o, como se prefiere en el contexto de la presente invención, toxoides, es decir, compuestos tóxicos inactivados en los casos en los que éstos provocan de manera primaria la enfermedad. La vacuna
5 puede contener un adyuvante, un agente que puede estimular el sistema inmunitario e incrementar la respuesta hacia una vacuna, sin que tenga ningún efecto antigénico específico por sí mismo. Los ejemplos de adyuvantes usados habitualmente son alumbre (sulfato de potasio y aluminio hidratado), fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, esqualeno, o adyuvantes basados en aceites. Un adyuvante preferido es Carbopol® 934P
10 comercialmente disponible (Carbomer 934P; Noveno, Inc., Pedricktown, NJ, EE.UU.) que puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 2 ml/l. Carbopol es un polímero de ácido acrílico que está reticulado con polialilsacarosa.

La primera etapa del procedimiento es cultivar el patógeno en condiciones en las que se produce la toxina AB. El cultivo de células bacterianas está bien establecido en la
15 técnica. Se conocen los métodos estándar para las diferentes especies, y hay disponibles muestras adecuadas de los microorganismos en las colecciones públicas. Los microorganismos enumerados se cultivan según sus necesidades especiales. Los Clostridia se cultivan en una atmósfera anaeróbica, mientras Yersinia, Xenorhabdus, Bordetella y Vibrio se pueden cultivar de forma aeróbica. Las Yersinia son
20 psicrotolerantes, y estos organismos se cultivan normalmente a 28°C. Cada organismo necesita su composición de medio especial para el cultivo, lo cual se conoce perfectamente en la técnica.

La toxina AB se libera normalmente en el medio de cultivo en la fase estacionaria tardía del cultivo. Tras la recogida, a menudo es ventajoso separar las células del medio
25 de cultivo, ya que las toxinas AB están presentes en el medio en una concentración suficiente. Esto se puede realizar mediante centrifugación. Cuando las células se separan mediante centrifugación, se desechan y el sobrenadante se procesa posteriormente. Las toxinas del medio se desactivan después mediante escisión enzimática aprovechando sus propiedades autocatalíticas. Para llevar a cabo la escisión, se tienen que ajustar de
30 manera apropiada las condiciones para posibilitar la actividad enzimática. Aún más importante, se tiene que añadir un cofactor que estimule la actividad enzimática. Se puede usar fosfato de inositol, en particular hexafosfato de inositol, como cofactor en un intervalo de concentraciones de 1 µmol/l a 10 mmol/l, más preferiblemente 10-100 µmol/l, pero también funcionan otros análogos o derivados tales como 1,3,4- o 3,4,6-trifosfato,

1,2,3,4-, 1,3,4,5-, 3,4,5,6, o 1,4,5,6-tetrafosfato, o 1,2,3,4,5-, 1,2,3,5,6-, 1,3,4,5,6-, 2,3,4,5,6-pentafosfato, pero pueden ser necesarias concentraciones superiores. El pH debería estar en el intervalo de (6,5-8,5), y el pH del medio de cultivo normalmente ya está dentro de ese intervalo. Por otra parte, se puede añadir un tampón o intercambiarlo, p.ej., mediante diálisis o ultrafiltración, p.ej. Tris HCl a pH 8,5. Un intervalo adecuado de temperaturas es 20 – 40°C. La escisión se completará normalmente en 1 a 24 horas, y se debería analizar con un ensayo como los descritos en los ejemplos para evitar una toxicidad residual.

La especie de toxina se puede purificar del medio de recogida y/o cultivo antes de la inactivación. Si el patógeno produce más de una especie de toxina, estas especies de toxina se pueden aislar una de otra antes de la inactivación. Por ejemplo, *C. difficile* produce las dos toxinas, la Toxina A (TcdA) y la Toxina B (TcdB), según se ha esbozado antes. Estas dos proteínas pueden ser separadas según se ejemplifica en el Ejemplo 4 de esta memoria antes de la inactivación y luego utilizarse en la preparación de la vacuna, ya sea individualmente o en combinación. El Toxoide A y/o el Toxoide B de *C. difficile*, es decir, la Toxina A y/o Toxina B inactivadas de acuerdo con la presente invención, son antígenos preferidos para las vacunaciones. Los toxoides se pueden purificar adicionalmente después de la escisión autocatalítica, con enriquecimiento de los fragmentos de la escisión C-terminales, mayores (p. ej., que consisten en los aminoácidos 543-2710 de la holotoxina A, o los aminoácidos 544-2666 ó 545-2666 de la holotoxina B). Los toxoides purificados de la invención se pueden combinar adicionalmente con toxinas AB inactivadas de otros patógenos en preparaciones de vacuna.

La preparación resultante se lleva después a su formulación final para el uso como una vacuna como se considere oportuno. Por ejemplo, se puede usar tal como está, con el medio acuoso tal como está para que sea el vehículo farmacéuticamente aceptable. También se puede cambiar el medio, por ejemplo mediante dilución, diálisis, ultrafiltración o etapas de purificación adicionales como cromatografía de afinidad. La preparación de antígeno se puede liofilizar para el almacenamiento, para la reconstitución con agua antes del uso. Si es adecuado, se pueden añadir adyuvantes. Los adyuvantes que se pueden considerar son, por ejemplo, emulsiones agua en aceite, aceite en agua, multifásicas o de aceite no mineral, adyuvantes basados en aluminio, adyuvantes poliméricos como Carbopol®, escualeno, liposomas, micropartículas, complejos inmunoestimulantes y adyuvantes activantes de la cascada de receptores similares a Toll.

La vacuna se administrará mediante inyección subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. La frecuencia de la inyección y la dosis dependen de la especie seleccionada como objetivo. Las especies susceptibles son los seres humanos, perros, gatos, conejos, cerdos, ganado, peces, roedores y caballos. La vacunación es un tratamiento profiláctico, y se puede conseguir la protección de la progenie mediante la vacunación de la madre. El tiempo de vacunación comienza tras la desaparición de los anticuerpos maternos, y se pueden necesitar vacunaciones de refuerzo después de 4 semanas y en momentos posteriores.

Así, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una vacuna contra diarrea inducida por *Clostridium*, que comprende el toxoide A y/o el toxoide B de *Clostridium difficile*, en donde dicho toxoide A y/o toxoide B han sido generados a partir de la Toxina A y/o la Toxina B mediante escisión autocatalítica, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el Toxoide A consiste en los aminoácidos 543-2710 de las secuencias tal como han sido depositadas en bases de datos públicas (EMBL, NCBI) bajo los n°s de acceso YP_001087137, ZP_05349827 o YP_003213641. En realizaciones adicionales el Toxoide B consiste en los aminoácidos 544-2666 ó 545-2666 de las secuencias tal como han sido depositadas en bases de datos públicas (EMBL, NCBI) bajo los n°s de acceso YP_001087137, ZP_05349827 o YP_003213641. En realizaciones adicionales el Toxoide B consiste en los aminoácidos 544-2666 ó 545-2666 de las secuencias tal como han sido depositadas en bases de datos públicas (EMBL, NCBI) bajo los n°s de acceso YP_001087135, ZP_05349824, ZP_05328744, YP_003217086 o YP_003213639. La vacuna puede comprender, además, un adyuvante.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Fabricación de una vacuna contra *Clostridium difficile*

Se pueden obtener muestras de *Clostridium difficile* de las colecciones públicas, por ejemplo de la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, EE.UU., bajo los n°s de acceso ATCC 9689, ATCC 43255. Se cultiva en un fermentador en medio BHI (caldo de infusión de cerebro-corazón, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania; véase American Pharmaceutical Association. 1950. The national formulary, 9ª ed., APA, Washington, D.C.) en condiciones anaeróbicas a 37°C durante 3-4 días. Las dos citotoksi-

nas grandes TcdA y TcdB se liberan en la fase estacionaria tardía. En este momento, se recoge el cultivo y las bacterias se sedimentan mediante centrifugación a 8000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se usa tal como está, o se pueden enriquecer las toxinas mediante cromatografía de filtración en gel (p.ej., con S300 Sephacryl), cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico y/o ultrafiltración. Después se añade el agente reductor ditioneitol a una concentración final de 1-50 mmol/l al sobrenadante o a la preparación enriquecida en toxina, seguido de la adición del agente formador de quelatos etilendiamintetraacetato a una concentración final de 10-100 mmol/l. Después se añade hexafosfato de inositol (IP6) a una concentración final entre 1 µmol/l y 10 mmol/l, por ejemplo 10 µmol/l o 100 µmol/l, y la composición se incuba a 37°C durante un período de 2 a 24 horas en un tampón adecuado tal como Tris-HCL a un pH de 6,5-8,5. La finalización de la escisión se puede analizar mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) y tinción de proteínas.

La preparación resultante se lleva después a su formulación final para el uso como una vacuna como se considere oportuno. Por ejemplo, se puede usar tal como está, con el medio acuoso tal como está para que sea el vehículo farmacéuticamente aceptable. También se puede cambiar el medio, por ejemplo mediante dilución, diálisis, ultrafiltración o etapas de purificación adicionales como cromatografía de afinidad. Si es adecuado, se pueden añadir adyuvantes. Los adyuvantes que se pueden considerar son, por ejemplo, emulsiones agua en aceite, aceite en agua, multifásicas o de aceite no mineral, adyuvantes basados en aluminio, adyuvantes poliméricos como Carbopol, escualeno, liposomas, micropartículas, complejos inmunoestimulantes y adyuvantes activantes de la cascada de receptores similares a Toll. La vacuna se administrará mediante inyección subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. La frecuencia de la inyección y la dosis dependen de la especie seleccionada como objetivo. Las especies susceptibles son los seres humanos, perros, gatos, conejos, cerdos, ganado y caballos. La vacunación es un tratamiento profiláctico, y también se puede conseguir la protección de la progenie mediante la vacunación de la madre. El tiempo de vacunación comienza tras la desaparición de los anticuerpos maternos, y se pueden necesitar vacunaciones de refuerzo después de 4 semanas y en momentos posteriores.

Ejemplo 2: Ensayo de actividad

Se siembran células CHO (ovario de hámster chino, p.ej. DSM ACC110, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania) en placas de microtitulación de 96 ó 24 pocillos (100 µl por pocillo), p. ej. en medio Ham-F10 con p. ej. FCS (suero bovino fetal) al 5 %, y se incuban a 37°C durante la noche en una atmósfera húmeda hasta que alcanzan la confluencia. Se lavan con solución de Ringer sin iones bivalentes como magnesio o calcio, y después los pocillos se rellenan con 100 µl (placa de 96 pocillos) o 400 µl (placa de 24 pocillos) de solución de Ringer sin Mg y Ca. Después, se pipetea 100 ó 400 µl, respectivamente, de la preparación de vacuna del ejemplo 1, y se pipetea las series de diluciones respectivas (10^{-1} a 10^{-8}) en los pocillos, con valores dobles para cada muestra. El medio BHI que se trató de la misma manera que la preparación de vacuna sirve como control negativo. Como control positivo se usa el sobrenadante de *C. difficile* sin tratar. Las placas se incuban a 37°C en una atmósfera húmeda durante 3 a 24 horas, y después se examinan las células con un microscopio.

Las células tratadas con la preparación de vacuna no deberían mostrar cambios morfológicos, al igual que las del control negativo. Las células tratadas con sobrenadante de cultivo sin tratar mostrarán un efecto citopático que se caracteriza principalmente por tomar una forma redondeada y desarrollar una morfología "similar a los astrocitos". Si las células tratadas con la vacuna muestran un efecto citopático similar al control positivo, la escisión enzimática fue incompleta y se tiene que repetir.

20

Ejemplo 3: Vacunación de animales

Se pueden usar hámsteres dorados sirios como modelo animal estandarizado para las infecciones por *C. difficile*. Se usan animales con un peso de 60 a 100 g en el experimento. Los animales reciben concentraciones diferentes (1-100 µg) de la preparación de vacuna mediante inyección intraperitoneal o subcutánea. La vacuna no contiene adyuvante, o contiene adyuvante completo de Freund (1:1 con la preparación de vacuna) o Ribi (emulsión de monofosforil lípido A y dicorinomicolato de trehalosa) como adyuvante. El medio BHI tratado de la misma manera que la vacuna se usa como control negativo. 2 semanas después de la última vacunación, los animales reciben 10-100 mg/kg de clindamicina de forma intraperitoneal u orogástrica. 24 horas más tarde se les inoculan a través de un tubo de alimentación gástrico o cánula con extremo esférico con al menos 10^4 gérmenes de *C. difficile* viables por animal, o 100 u.f.c. (unidades

30

formadoras de colonias), respectivamente. La eficacia protectora de la vacuna se determina por medio de la monitorización clínica de la diarrea o la tasa de mortalidad.

Ejemplo 4: Vacunación de animales contra *Clostridium difficile*

5

En estos estudios, se inactivaron toxinas AB de *Clostridium difficile* mediante el uso de su función de escisión autocatalítica intrínseca y se usaron como vacunas en animales.

Para la producción de toxinas, se transfirió 1 ml de cultivo activo de *C. difficile* (cepa de referencia VPI10463, ATCC 43255) a una bolsa de diálisis pretratada y estéril que contenía 200 ml de NaCl al 0,9 %. La bolsa de diálisis se colocó en 1,3 l de medio BHI y se incubó durante 5 d a 37 °C en una cámara anaerobia. Después de 5 d, se centrifugó el contenido de la bolsa de diálisis (5000 rpm, 4 °C, 15 min) y se llevó a cabo la precipitación fraccionada con persulfato de amonio del sobrenadante. La primera etapa de precipitación (toxina A) se llevó a cabo mediante la adición de (NH)₄SO₄ al 45 % y agitación durante 3 h a 4 °C. Después de este tiempo, la disolución se centrifugó (5000 rpm, 4 °C y 30 min) y se llevó a cabo una segunda etapa de precipitación (toxina B) mediante la adición de (NH)₄SO₄ hasta un contenido final del 70 %. La segunda fracción se agitó durante 3 h a 4 °C y después se centrifugó de nuevo (5000 rpm, 4 °C y 30 min). Los sedimentos resultantes de las etapas de precipitación se suspendieron en 5 ml de Tris/HCl 50 mM de pH 7,5. Las dos fracciones (toxinas A y B) recibidas de la precipitación con (NH)₄SO₄ se purificaron adicionalmente mediante una centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. Por lo tanto, se preparó un gradiente de densidad de sacarosa colocando 4,5 ml de las siguientes disoluciones de sacarosa en orden creciente en un tubo de ultracentrífuga: 10 %, 18,75 %, 27,50 %, 36,25 % y 45 % de sacarosa en Tris/HCl 50 mM de pH 7,5. Las fracciones de toxina se añadieron en la parte superior, y el tubo se centrifugó durante 3,5 h a 4 °C y 100.000 g. El gradiente resultante se recogió en alícuotas de 2 ml. El contenido de toxina de las muestras se midió mediante ensayos de citotoxicidad con células CHO-K1. Por lo tanto, se cultivaron células CHO-K1 (ATCC CCL-61) en medio DMEM/F10 que contenía un 10 % de FCS, 0,5 % de L-glutamina y 0,5 % de penicilina/estreptomicina. Se prepararon monocapas de células (alrededor de 4000 por pocillo) en placas de microtitulación de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 h. Tras el tiempo de incubación, se prepararon diluciones 1/10 de las muestras que contenían toxina. Tras la eliminación del medio de las células, se añadieron

las diluciones de toxina. Se examinaron los efectos citotóxicos microscópicamente tras 24 h mediante un microscopio invertido.

Se usó el siguiente esquema para determinar la citotoxicidad:

positivo (+): > 90 % de células redondeadas

5 negativo (-): < 90 % de células redondeadas

Las fracciones que contenían toxina de la centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa se mezclaron (cada una para la Toxina A y la Toxina B) y se diluyeron 1:2 con Tris/HCl 50 mM de pH 7,5. Las muestras (de Toxina A o Toxina B) se cargaron en una columna de intercambio iónico y utilizó un gradiente de NaCl que oscilaba de NaCl 10 50 mM en Tris/HCl 50 mM de pH 7,5 a NaCl 700 mM en Tris/HCl 50 mM de pH 7,5 (Δ NaCl 5 mM/ml) para eluir la toxina. Se recogieron fracciones de 2 ml. El contenido de toxina de las muestras se midió mediante ensayos de citotoxicidad con células CHO-K1. Las fracciones que contenían toxina se mezclaron y se concentraron mediante una etapa de ultracentrifugación durante 15 min a 4 °C y 5000 rpm. A las disoluciones de toxina 15 obtenidas se les añadió un 20 % de glicerina y las muestras se almacenaron a -20 °C.

Las etapas de purificación se monitorizaron también mediante SDS-PAGE. Las proteínas se visualizaron mediante tinción de Coomassie. Se determinó la concentración de las muestras de toxina finales mediante la comparación de la cantidad de toxina en los geles de SDS con patrones de BSA. La comparación se llevó a cabo mediante ajuste 20 óptico y mediante análisis informático.

Las preparaciones de vacuna se prepararon mediante la inducción de la escisión autocatalítica de las toxinas añadiendo DTT e IP₆. La escisión de la Toxina A se llevó a cabo en H₂O a un volumen final de 50 µl mediante la adición de IP₆ 3 mM y DTT 50 mM. La escisión de la Toxina B se llevó a cabo en H₂O a un volumen final de 100 µl mediante 25 la adición de IP₆ 1 mM y DTT 150 mM. La autoescisión se llevó a cabo durante la noche a 37 °C en un aparato rotatorio.

Los productos de escisión resultantes se analizaron mediante un ensayo de citotoxicidad y mediante análisis de SDS PAGE. Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo con células CHO-K1 y células Caco, ya que las células Caco mostraron una 30 sensibilidad superior hacia la Toxina A. Las células Caco se cultivaron en medio MEM que contenía un 10 % de FCS y un 0,5 % de penicilina/estreptomicina en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos incubada a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 48 h. El ensayo de citotoxicidad mostró una reducción de la citotoxicidad de al menos 10³

veces para la toxina A y 10^4 veces para la toxina B tras 24 h. La eficacia de la escisión se visualizó mediante un análisis de SDS PAGE teñido con Coomassie.

Se prepararon dosis de vacunas con las toxinas inactivadas respectivas (toxoides) con el sistema adyuvante de Sigma (emulsión aceite en agua con Monofosforil Lípido A y dicorinomicolato de trehalosa sintético). Las concentraciones de toxoides se determinaron mediante la comparación de la cantidad de toxina en geles de SDS con patrones de BSA. La comparación se llevó a cabo mediante ajuste óptico y mediante análisis informático. El adyuvante se reconstituyó como describió el fabricante con PBS y se mezcló 1:1 con la muestra de toxoide respectiva.

El modelo de organismo clásico para la infección por *Clostridium difficile* es el hámster sirio. Los hámsters sirios reaccionan de manera muy sensible a la infección, y desarrollan signos clínicos y alteraciones patológicas similares a las de los seres humanos. Así, el modelo de infección en hámster es un modelo muy estricto que finaliza con una mortalidad del 100 % de los animales infectados.

En los ensayos, los hámsters sirios con un peso corporal de 60-80 g en el momento de su inclusión se adquirieron de Charles River, D-97633, Sulzfeld, Alemania. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en los grupos respectivos en el momento de la llegada a la instalación de ensayo, y se les proporcionó un período de aclimatación adecuado de al menos 5 días. Los animales se vacunaron 3 veces a intervalos de 2 semanas. 14 días tras la última inmunización, se llevó a cabo la infección con *Clostridium difficile*. 24 h antes de la exposición oral a *Clostridium difficile*, se administraron oralmente 2 mg de Clindamicina a cada animal. La administración del antibiótico Clindamicina predispone a los animales a la infección por *C. difficile* alterando la flora bacteriana normal del intestino.

A lo largo de un periodo de 7 días tras la exposición, se llevaron a cabo exámenes clínicos cuidadosos diariamente y se registraron los hallazgos clínicos. En varios momentos durante el estudio, se tomaron muestras de sangre y los sueros se analizaron en busca de anticuerpos que inhibiesen la citotoxicidad de la Toxina A y la Toxina B en las células cultivadas. Por lo tanto, se sembraron células CHO-K1 a 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio DMEM/F10 que contenía un 10 % de FCS, 0,5 % de L-glutamina y 0,5 % de penicilina/estreptomicina y se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂ durante la noche. Se prepararon diluciones de los sueros de hámster en el medio y se incubaron durante 1 h a 37 °C con diluciones de las toxinas A y B. Las toxinas se habían diluido hasta concentraciones que provocan > 90 % de redondeamiento de las células

tras 3 h y 24 h. El redondeamiento de las células se determinó microscópicamente tras 3 h y 24 h como se describió anteriormente. El título de neutralización se definió como el valor recíproco de la dilución de suero más elevada que inhibió completamente el redondeamiento de las células tras 24 h.

5 El objetivo del estudio fue determinar si las inmunizaciones subcutáneas repetidas con dosis diferentes de una combinación de toxinas A y B inactivadas es biocompatible, y si se puede inducir protección contra una infección por *C. difficile*. Por lo tanto, se usaron 12 hámsters sirios macho que se habían distribuido aleatoriamente en los 4 grupos respectivos en el momento de la llegada a la instalación de ensayo. Cada grupo consistió
10 en 3 animales. Los grupos se vacunaron en días diferentes y con dosis crecientes para ser capaces de reaccionar a los efectos tóxicos potenciales tras la vacunación.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
N (animales)	3	3	3	3
Volumen de dosis	100 µl de sistema adyuvante de Sigma por dosis			
1. Inmunización	Toxoide A/B, cada uno 1 µg	Toxoide A/B, cada uno 1 µg	Toxoide A/B, cada uno 1,5 µg	Adyuvante
2. Inmunización	Toxoide A/B, cada uno 2 µg	Toxoide A/B, cada uno 3 µg	Toxoide A/B, cada uno 4 µg	Adyuvante
3. Inmunización	Toxoide A/B, cada uno 4 µg	Toxoide A/B, cada uno 4 µg	Toxoide A/B, cada uno 4 µg	Adyuvante

Resumen del estudio:

15

Día del estudio	Procedimiento
-5	Toma de muestras iniciales de sangre, aproximadamente 100 µL de suero por animal
0	Administración al Grupo A y D del artículo de ensayo respectivo, subcutánea, 100 µL y determinación del peso corporal
2	Administración al Grupo B del artículo de ensayo respectivo, subcutánea, 100 µL y determinación del peso corporal

4	Administración al Grupo C del artículo de ensayo respectivo, subcutánea, 100 µL y determinación del peso corporal
14	Administración al Grupo A y D del artículo de ensayo respectivo, subcutánea, 100 µL y determinación del peso corporal
16	Administración al Grupo B del artículo de ensayo respectivo, subcutánea, 100 µL y determinación del peso corporal
18	Administración al Grupo C del artículo de ensayo respectivo, subcutánea, 100 µL y determinación del peso corporal
30	Administración al Grupo A - D del artículo de ensayo respectivo, subcutánea, 100 µL y determinación del peso corporal
38	Toma de muestras de sangre, aproximadamente 100 µL de suero por animal
43	Tratamiento con antibiótico (Clindamicina 2 mg/ animal), de forma oral
44	Exposición a <i>Clostridium difficile</i> (1,77x10 ⁸ / animal) de forma oral, 24 horas tras el tratamiento con el antibiótico; determinación del peso corporal
45 - 47	Inspección clínica 5 veces al día
48 - 51	Inspección clínica 3 veces al día
52	Toma de muestras de sangre de los animales supervivientes Sección de animales- en el día 52, en caso de muerte o en el día del sacrificio (si los animales desarrollaron signos graves de sufrimiento).

Ninguno de los animales tuvo signos clínicos tras la vacunación subcutánea, y así la dosis de toxina se pudo incrementar hasta 4 µg en cada caso para los toxoides A y B. Además, los animales del grupo de control no mostraron reacciones a la vacunación subcutánea, lo que demuestra que el sistema adyuvante de Sigma fue bien tolerado al aplicarlo de forma subcutánea. La determinación del peso corporal en varios días durante el estudio confirmó también la buena tolerancia de la vacunación. Todos los animales aumentaron de peso hasta la exposición. El aumento del peso de los animales vacunados con toxina fue comparable al del grupo de control. Además, el último peso medido antes de la exposición de los animales vacunados con toxina (media: Grupo 1: 140,3 g; Grupo 2: 136,3 g; Grupo 3: 144 g) estuvo en el intervalo del peso de los animales de control (Grupo 4 medio: 141 g).

Tras la exposición en el día de estudio 44, los animales del grupo de control murieron en 2-3 días. En comparación, todos los animales vacunados con las toxinas escindidas sobrevivieron durante más tiempo, y 2 animales prácticamente no mostraron signos clínicos hasta el final del estudio (animal del Grupo 1 N° 1; Animal del Grupo 3 N° 1).

El animal N° 1 del grupo 1 desarrolló solamente heces blandas en el día de estudio 47, pero se recuperó rápidamente y no tuvo hallazgos clínicos en el siguiente día de estudio y hasta el final del estudio. El otro animal que sobrevivió hasta el final del estudio (N° 1 del grupo 3) mostró heces blandas, perineo manchado, ligeramente húmedo, y actividad espontánea ligeramente reducida a partir del día de estudio 47 en adelante hasta el día de estudio 50. No tuvo signos clínicos en el día de estudio 51.

Grupo	Animal N°	Muerte/Sacrificio en el día de estudio
Grupo 1	1	final del estudio (52)
	2	48
	3	50
Grupo 2	1	48
	2	48
	3	48
Grupo 3	1	final del estudio (52)
	2	48
	3	50
Grupo 4 (grupo de control)	1	46
	2	47
	3	47

Basándose en estos resultados, las inmunizaciones con toxoide A/B han inducido inmunogenicidad y protección parcial: Todos los animales vacunados sobrevivieron

durante más tiempo que los animales de control. Aunque la exposición fue letal para todos los animales de control, 2/9 animales vacunados sobrevivieron hasta el final del ensayo. Además, el análisis de los sueros de los hámsters en el ensayo de neutralización de citotoxicidad confirmó el desarrollo de una respuesta inmunológica.

5

Grupo (Nº de hámsters)	Animal	Título de neutralización de la citotoxicidad del suero d=-5		Título de neutralización de la citotoxicidad del suero d=38	
		Anti-A ¹³⁹	Anti-B ¹⁴⁰	Anti-A ¹⁴¹	Anti-B ¹⁴²
1 (3)	1	0	0	50	≤ 10
	2	0	0	25	10
	3	0	0	50	≤ 10
2 (3)	1	0	0	25	≤ 10
	2	0	0	50	≤ 10
	3	0	0	50	≤ 10
3 (3)	1	0	0	10	10
	2	0	0	50	≤ 10
	3	0	0	50	≤ 10
4 (3)	1-3	0	0	0	0

No se pudieron detectar anticuerpos neutralizantes de la citotoxicidad contra la toxina A o B en los sueros antes de la vacunación, y los animales del grupo de control siguieron estando sin anticuerpos neutralizantes hasta la última toma de muestras de sangre en el día de estudio 38. Todos los animales vacunados desarrollaron anticuerpos neutralizantes contra ambas toxinas después de las tres vacunaciones (día de estudio 38), lo que demuestra claramente la inmunogenicidad de la preparación de toxina

10

inactivada. Además, el título de la exposición podría ser demasiado elevado en este modelo de hámster sensible, y podría ser necesaria una adaptación adicional. Observando las tasas de supervivencia de los diferentes grupos vacunados, no se pudo observar un efecto relacionado con la dosis. Esto se puede correlacionar con las
5 pequeñas diferencias en la concentración de toxoide aplicada, y por lo tanto todos los animales vacunados se pueden considerar más bien como un grupo vacunado.

En conjunto, los resultados de este estudio demuestran que mediante la escisión autocatalítica la toxina inactivada se tolera bien, puede inducir una respuesta inmunológica y protección parcial contra la infección.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de una vacuna contra patógenos bacterianos que producen una toxina AB, que comprende
 - (a) cultivar el patógeno en condiciones en las que se produce la toxina AB, y recoger el cultivo;
 - (b) escindir la toxina AB enzimáticamente *in vitro*; y
 - (c) combinar la composición de la etapa (b) con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que se usa fosfato de inositol, preferiblemente hexafosfato de inositol, como cofactor de la escisión enzimática.
3. Procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que las células se separan del medio de cultivo tras la recogida, y se escinde la toxina AB en el medio de cultivo.
4. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la toxina AB se purifica a partir de la recogida antes de la escisión, preferiblemente a partir del medio de cultivo.
5. Procedimiento de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el patógeno es del género *Clostridium*, preferiblemente *C. difficile*, *C. sordellii*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani* o *C. novyi*, o del género *Vibrio*, preferiblemente *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. splendidus* o *V. anguillarum*, o del género *Xenorhabdus*, preferiblemente *X. nematophila*, *X. bovienii*, o del género *Yersinia*, preferiblemente *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, o *Y. mollaretti*, o del género *Bordetella*, preferiblemente *B. pertussis*, *B. parapertussis* o *B. bronchiseptica*, o del género *Actinobacillus*, preferiblemente *A. pleuropneumoniae*, o *A. suis* y *E. coli*.
6. Procedimiento de la reivindicación 5, en el que el patógeno es *Clostridium difficile* y la Toxina A se purifica a partir de la Toxina B antes de la escisión.

7. Procedimiento de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se añade un adyuvante a la composición.
8. Vacuna producida con el procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7.
9. La vacuna de la reivindicación 8, que comprende Toxoide A y/o Toxoide B de *Clostridium difficile*.
10. Vacuna contra la diarrea inducida por *Clostridium*, que comprende Toxoide A y/o Toxoide B de *Clostridium difficile*, en donde dicho Toxoide A y/o Toxoide B han sido generados a partir de Toxina A y/o Toxina B mediante escisión autocatalítica, opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Uso de una vacuna producida según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la vacunación de animales, que incluyen los seres humanos, contra una infección por patógenos que producen toxinas AB.
12. Método de vacunación de animales, que incluyen los seres humanos, contra una infección por patógenos que producen toxinas AB, que comprende administrar una cantidad eficaz de una vacuna producida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 a un animal, que incluye un ser humano.

RESUMEN

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para la producción de una vacuna
contra patógenos bacterianos que producen una toxina AB, como *Clostridium*, que com-
prende (a) cultivar el patógeno en condiciones en las que se produce la toxina AB, y
recoger el cultivo, (b) escindir la toxina AB enzimáticamente *in vitro*, preferiblemente
mediante el uso de hexafosfato de inositol como cofactor, y (c) combinar la composición
10 de la etapa (b) con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P01-2469-PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2009/066109	International filing date (day/month/year) 01/12/2009	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 03/12/2008
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
 b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/066109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/08 C07K14/33

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	REINEKE JESSICA ET AL: "Autocatalytic cleavage of Clostridium difficile toxin B" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 446, no. 7134, 22 March 2007 (2007-03-22), pages 415-419, XP002453402 ISSN: 0028-0836	1-6
Y	page 417, right-hand column - page 418, left-hand column, paragraph 4	7
X	WO 2004/041857 A2 (BALLARD JIMMY D [US]; SPYRES LEA M [US]) 21 May 2004 (2004-05-21)	8-12
Y	paragraph [0015]; claims 1-12	7
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 March 2010

Date of mailing of the international search report

01/04/2010

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gruber, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/066109

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004041857 A2	21-05-2004	AU 2003299527 A1	07-06-2004
WO 2007146139 A2	21-12-2007	CN 101500581 A	05-08-2009
US 2004115215 A1	17-06-2004	US 2005238665 A1	27-10-2005
		US 2007269861 A1	22-11-2007
		US 2004253673 A1	16-12-2004
		US 2004142455 A1	22-07-2004
		US 2004219637 A1	04-11-2004
WO 2008014733 A1	07-02-2008	AU 2007280861 A1	07-02-2008
		CA 2659684 A1	07-02-2008
		EP 2054044 A1	06-05-2009
		JP 2009545536 T	24-12-2009
		US 2009311258 A1	17-12-2009



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-068894-00000-0000

Fecha: 2011-06-02 16:50:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 34

PATENTE DE INVENCION ☐

MODE.

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

REFERENCIA	Radicación No.	11 068894
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/066109
	Fecha inicio fase nacional	03/07/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

1 2 4 2 0

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.



JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

11 AGO. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11

Bogotá D.C.,
2020

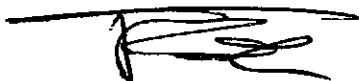
Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

REFERENCIA	Radicación No.	11 068894
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/066109
	Fecha inicio fase nacional	03/07/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	1 2 4 2 1

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.



JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

1.1 AGO. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha .
adpa11