

COMPOSICIONES RELACIONADAS CON UNA TOXINA DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE MUTANTE Y SUS MÉTODOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud provisional de la patente estadounidense 61/478,474, presentada el 22 de abril de 2011, y la Solicitud provisional de la patente estadounidense 61/478,899, presentada el 25 de abril de 2011. Los contenidos completos de las solicitudes mencionadas anteriormente se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

CAMPO

La presente invención se refiere a composiciones referidas a toxinas de *Clostridium difficile* mutante y sus métodos.

ANTECEDENTES

Clostridium difficile (*C. difficile*) es una bacteria anaeróbica grampositiva que se asocia con enfermedad gastrointestinal en los seres humanos. La colonización de un *C. difficile* se produce usualmente en el colon si la flora intestinal natural está disminuida por el tratamiento con antibióticos. Una infección puede llevar a una diarrea asociada con antibiótico y algunas veces a colitis pseudomembranosa a través de la secreción de las toxinas glicosilantes, toxina A y toxina B (308 y 270 kDa, respectivamente), que son los factores de virulencia primarios del *C. difficile*.

La toxina A y toxina B están codificadas dentro del locus de patogenicidad de 19 kb (PaLoc) por los genes *tcdA* y *tcdB*, respectivamente. Las cepas no patogénicas del *C. difficile* tiene este locus reemplazado con una secuencia del par de bases 115 alternativa.

La toxina A y toxina B son citotoxinas potentes. Estas proteínas son glucosiltransferasas homólogas que inactivan GTPasas pequeñas de la familia Rho/Rac/Ras. La alteración resultante de la señalización causa una pérdida de uniones célula-célula, desregulación del citoesqueleto de actina, y/o apoptosis, que producen diarrea secretora profunda que se asocia con las infecciones con *Clostridium difficile* (CDI).

En la última década, las cantidades y gravedad de los brotes de *C. difficile* en los hospitales, hogares de ancianos y otros servicios de atención de largo plazo aumentaron drásticamente. Los factores clave en esta escala incluyen la aparición de cepas patogénicas hipervirulentas, aumento de uso de antibióticos, mejores métodos

de detección y aumento de la exposición a las esporas transmitidas en el aire en los servicios de atención de la salud.

Metronidazol y vancomicina representan el estándar de atención aceptado actualmente para el tratamiento antibiótico de la enfermedad asociada con *C. difficile* (CDAD). Sin embargo, aproximadamente 20% de los pacientes que reciben tal tratamiento experimentan una recurrencia de la infección después de un primer episodio de CDI, y hasta aproximadamente 50% de los pacientes que sufren de recurrencias adicionales. El tratamiento de las recurrencias representa un desafío muy importante, y la mayor parte de las recurrencias usualmente se produce dentro de un mes del episodio precedente.

Por consiguiente, se necesitan composiciones inmunogénicas y/o terapéuticas y los métodos de estas dirigidos al *C. difficile*.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

Estos y otros objetivos son provistos por la invención en la presente.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye una toxina A de *C. difficile* mutante. La toxina A de *C. difficile* mutante incluye un dominio de glucosiltransferasa que tiene al menos una mutación y un dominio de cisteína proteasa que tiene al menos una mutación, con respecto a la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje A. En una forma de realización, al menos un aminoácido de la toxina A de *C. difficile* mutante está entrecruzado químicamente.

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, y donde el polipéptido incluye al menos una cadena lateral de aminoácidos modificada químicamente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS).

En una forma de realización, al menos un aminoácido de la toxina de *C. difficile* mutante está entrecruzado químicamente.

En una forma de realización, el al menos un aminoácido aminoácido está entrecruzado químicamente por formaldehído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinate, o una combinación de EDC y NHS.

En una forma de realización, la composición inmunogénica es reconocida por un anticuerpo neutralizante anti-toxina correspondiente o fragmento de unión de este.

En una forma de realización, la composición inmunogénica exhibe disminución de la citotoxicidad, con respecto a la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye una toxina A de *C. difficile* mutante, que incluye un dominio de glucosiltransferasa que tiene la SEQ ID NO: 29, que tiene una sustitución de aminoácidos de las posiciones 285 y 287, y un dominio de cisteína proteasa que tiene la SEQ ID NO: 32, que tiene una sustitución de aminoácidos de la posición 158, con respecto a la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje A, donde al menos un aminoácido de la toxina A de *C. difficile* mutante está entrecruzado químicamente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye una toxina A de *C. difficile* mutante, que incluye la SEQ ID NO: 4, donde al menos un aminoácido de la toxina A de *C. difficile* mutante está entrecruzado químicamente.

En aún otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye una toxina de *C. difficile* mutante B. La toxina de *C. difficile* mutante B incluye un dominio de glucosiltransferasa que tiene al menos una mutación y un dominio de cisteína proteasa que tiene al menos una mutación, con respecto a la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje B.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, y donde el polipéptido incluye una cadena lateral de aminoácidos modificada químicamente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS).

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye una toxina de *C. difficile* mutante B, que incluye un dominio de glucosiltransferasa que tiene la SEQ ID NO: 31, que tiene una sustitución de aminoácidos de las posiciones 286 y 288, y un dominio de cisteína proteasa que tiene la SEQ ID NO: 33, que tiene una sustitución de aminoácidos de la posición 155, con respecto a la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje B, donde al menos un aminoácido de la toxina de *C. difficile* mutante B está entrecruzado químicamente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye una toxina de *C. difficile* mutante B, que incluye la SEQ ID NO: 6, donde al menos un aminoácido de la toxina de *C. difficile* mutante B está entrecruzado químicamente.

En un aspectos adicionales, la invención se refiere a una célula

recombinante o su progenie, que incluye un polinucleótido que codifica cualquiera de las toxinas de *C. difficile* mutantes precedentes, donde la célula carece de un polinucleótido endógeno que codifica una toxina.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este específico para una composición inmunogénica que incluye una toxina de *C. difficile* mutante.

En un aspecto, la invención se refiere a un método de tratar una infección con *C. difficile* en un mamífero.

En una forma de realización, los métodos de tratar o los métodos de inducir una respuesta inmune en un mamífero que lo necesita.

En una forma de realización, los métodos de tratar o los métodos de inducir una respuesta inmune incluyen un mamífero que ha tenido una infección recurrente con *C. difficile*.

En una forma de realización, los métodos de tratar o los métodos de inducir una respuesta inmune incluye la administración parenteral de la composición.

En una forma de realización, los métodos de tratar o los métodos de inducir una respuesta inmune incluyen una composición inmunogénica que también incluye un adyuvante.

En una forma de realización, el adyuvante incluye gel de hidróxido de aluminio y un oligonucleótido de Cpg. En otra forma de realización, el adyuvante incluye ISCOMATRIX.

En una forma de realización, el polipéptido aislado incluye al menos una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido o al menos una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido está modificada químicamente por glicina.

En una forma de realización, el polipéptido aislado incluye al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido; y al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido.

En una forma de realización, el polipéptido aislado incluye un resto de beta-alanina ligado a una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido.

En una forma de realización, el polipéptido aislado incluye un resto de glicina ligada a una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido o a una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido.

En una forma de realización, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, y donde una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido está ligado a un resto de beta-alanina.

En una forma de realización, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, y donde una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido está ligado a un resto de beta-alanina.

En una forma de realización, el polipéptido aislado incluye una cadena lateral de un segundo residuo de lisina del polipéptido está ligado a una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico o a una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico.

En una forma de realización, el polipéptido aislado incluye una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico o una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido está ligada a un resto de glicina.

En una forma de realización, el polipéptido aislado tiene una EC₅₀ de al menos aproximadamente 100 µg/ml.

En una forma de realización, el polipéptido incluye al menos uno cualquiera de: a) al menos un resto de beta-alanina ligado a una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido; b) al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico; y c) al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico.

En una forma de realización, el polipéptido aislado tiene una EC₅₀ de al menos aproximadamente 100 µg/ml.

En una forma de realización, la composición inmunogénica incluye una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico o una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, está ligado a un resto de glicina.

En una forma de realización, la composición inmunogénica incluye una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico o una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, está ligado a un resto de glicina.

En una forma de realización, el polipéptido aislado tiene una EC₅₀ de al menos

aproximadamente 100 µg/ml.

En un aspecto, la composición inmunogénica incluye un polipéptido aislado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 84 y un polipéptido aislado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 86, donde cada polipéptido incluye a) al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido; b) al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido; c) un resto de beta-alanina ligada a una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido; y d) un resto de glicina ligada a una cadena lateral de al menos un residuo de ácido aspártico del polipéptido o a una cadena lateral de al menos un residuo de ácido glutámico del polipéptido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Alineamiento de secuencia de la toxina de *C. difficile* tipo salvaje A de las cepas 630, VPI10463, R20291, CD196, y toxina A mutante que tiene la SEQ ID NO: 4, usando el alineamiento CLUSTALW, parámetros predeterminados.

Figura 2: Alineamiento de secuencia de la toxina de *C. difficile* tipo salvaje B de las cepas 630, VPI10463, R20291, CD196, y toxina B mutante que tiene la SEQ ID NO: 6, usando el alineamiento CLUSTALW, parámetros predeterminados.

Figura 3: Gráfico que muestra identificación de cepas de *C. difficile* negativas para la toxina tipo salvaje. Los medios de cultivo de 13 cepas de *C. difficile* se analizaron por ELISA para la toxina A. Como se ilustra, siete cepas expresaron la toxina A y 6 cepas no (cepas 1351, 3232, 7322, 5036, 4811 y VPI 11186).

Figura 4 A y B: Resultados de SDS-PAGE que ilustran que la triple mutante A (SEQ ID NO: 4), doble mutante B (SEQ ID NO: 5), y triple mutante B (SEQ ID NO: 6) no glucosilan las Rac1 o RhoA GTPasas en un ensayo de glucosilación *in vitro* con UDP-¹⁴C-glucosa; mientras que 10 µg a 1 ng de la toxina B tipo salvaje glucosila Rac1.

Figura 5: Transferencia Western que indica anulación de la actividad de cisteína proteasa en las toxinas A y B mutantes (SEQ ID NOS: 4 y 6, respectivamente), en comparación con la observación de fragmentos escindidos de toxinas A y B de tipo salvaje (SEQ ID NOS: 1 y 2, respectivamente). Ver Ejemplo 13.

Figura 6: Gráficos que muestran que las triples toxinas A y B mutantes (SEQ ID NOS: 4 y 6, respectivamente) exhiben citotoxicidad residual cuando se analizan a altas concentraciones (por ejemplo, aproximadamente 100 µg/ml) en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* en las células IMR-90.

Figura 7: Gráfico que muestra que los valores de EC₅₀ son similares para la triple toxina B mutante (SEQ ID NO: 6) y hepta toxina B mutante (SEQ ID NO: 8).

Figura 8: Gráfico que representa resultados de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* en que los niveles de ATP (RLUs) se grafican contra concentraciones crecientes de la triple mutante TcdA (SEQ ID NO: 4)(panel superior) y triple mutante TcdB (SEQ ID NO: 6)(panel inferior). La citotoxicidad residual de las toxinas A y B mutantes se puede anular completamente con anticuerpos neutralizantes específicos para toxina A mutante (panel superior-pAb A y mAbs A3-25 + A60-22) y toxina B mutante (panel inferior-pAb B).

Figura 9: Imágenes de morfología celular de IMR-90 a 72 horas pos tratamiento. El panel A muestra célula control tratados simulados. El panel B muestra la morfología celular después del tratamiento con la mutante TcdB inactivada con formalina (SEQ ID NO: 6). El panel C muestra la morfología celular después del tratamiento con mutante TcdB inactivado de EDC (SEQ ID NO: 6). El panel D muestra la morfología celular después del tratamiento con toxina B tipo salvaje (SEQ ID NO: 2). El panel E muestra la morfología celular después del tratamiento con triple mutante TcdB (SEQ ID NO: 6). Se observaron resultados similares para los tratamientos con TcdA.

Figura 10: Gráfico que muestra títulos de anticuerpo neutralizante como se describe en el Ejemplo 25 (estudio muCdiff2010-06).

Figura 11: Gráfico que muestra títulos de anticuerpo neutralizante como se describe en el Ejemplo 26 (estudio muCdiff2010-07).

Figura 12: Gráfico que muestra las respuestas de anticuerpo neutralizante contra las toxinas A y B en hámsteres después de cuatro inmunizaciones como se describe en el Ejemplo 27 (estudio hamC. *difficile*2010-02)

Figura 13: Gráfico que muestra las respuestas de anticuerpo neutralizante en hámsteres después de la vacunación con toxinas mutantes genéticas inactivadas químicamente y Lista Biológica de toxoides, como se describe en el Ejemplo 27 (estudio hamC. *difficile*2010-02).

Figura 14: Curvas de supervivencia para tres grupos de hámsteres inmunizados en comparación con los controles no inmunizados, como se describe en el Ejemplo 28 (estudio hamC. *difficile*2010-02, continuación).

Figura 15: Gráfico que muestra la respuesta de anticuerpo neutralizante relativa contra diferentes formulaciones de toxinas mutantes de C. *difficile* en hámsteres (estudio hamC. *difficile*2010-03), como se describe en el Ejemplo 29.

Figura 16A-B: Gráficos que muestran respuesta de anticuerpo neutralizante relativa fuerte contra toxinas A y B mutantes genéticas químicamente modificadas (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) en cynomolgus macaques, como se describe en el Ejemplo 30.

Figura 17: Secuencias de aminoácidos de regiones variables de las cadenas liviana (VL) y pesada (HL) de A3-25 mAb IgE. Péptido señal – destacado; CDR – itálica y subrayado; Región constante – negrita y subrayado (secuencia completa no mostrada).

Figura 18: Gráfico que muestra titulación de los anticuerpos monoclonales de la toxina A individual en el ensayo de neutralización de toxina usando niveles de ATP (cuantificados por unidades luz relativas- RLU) como un indicador de viabilidad celular. En comparación con la toxina ($4 \times EC_{50}$) control, los mAb A80-29, A65-33, A60-22 y A3-25 tuvieron efectos neutralizantes crecientes sobre la toxina A con la concentración pero no para el nivel del control de anti-toxina A positivo de conejo. Los mAbs A50-10, A56-33, y A58-46 no neutralizaron la toxina A. La célula solo control fue $1 - 1,5 \times 10^6$ RLUs.

Figura 19: Mapeo de 8 grupos de epitopes de los mAbs de la toxina B por BiaCore

Figura 20A-C: Actividades neutralizantes sinérgicas de combinaciones de mAb de toxina A: la adición de diferentes diluciones de anticuerpos neutralizantes A60-22, A65-33, y A80-29 a las concentraciones crecientes de mAb A3-25 aumentaron sinérgicamente la neutralización de la toxina A independientemente de la dilución. Las RLU de la toxina A solo ($4 \times EC_{50}$) control se ilustra ($< 0,3 \times 10^6$) y los controles solo células fueron $2 - 2,5 \times 10^6$ RLU descriptos en los gráficos mostrados en la Figura 20B y Figura 20C.

Figura 21: Actividades neutralizantes sinérgicas de los mAb de la toxina B: la neutralización de la toxina B por los mAbs 8-26, B60-2 y B59-3 se ilustra en la Figura 21A. La neutralización de la toxina B aumenta sinérgicamente después de la combinación de B8-26 con las diluciones de B59-3 (Figura 21B)

Figura 22: Transferencia Western que muestra que la expresión de Rac1 GTPasa se reduce en los extractos de toxina B mutante genética (SEQ ID NO: 6) de 24 a 96 horas, pero no los extractos tratados con la toxina B tipo salvaje (SEQ ID NO: 2). La transferencia también muestra que Rac1 se glucosila en los extractos tratados con toxina B, pero no en los extractos tratados con la toxina B mutante.

Figura 23A-K: Gráfico que representa los resultados de las pruebas de

citotoxicidad *in vitro* en que los niveles de ATP (RLU) se grafican contra las concentraciones crecientes de medio de cultivo de *C. difficile* y la mezcla de suero de hámster (■); toxina bruta (recolección de cultivo) de la cepa respectiva y la mezcla de suero de hámster (●); toxina purificada (toxina comercial obtenida de la Lista de productos biológicos) y la mezcla de suero de hámster (▲); toxina bruta (▼), control; y toxina purificada (◆), control. Las toxinas de las cepas respectivas se añadieron a las células en valores de 4xEC₅₀. La Figura 23 muestra que una composición inmunogénica que incluye la mutante TcdA (SEQ ID NO: 4) y mutante TcdB (SEQ ID NO: 6), donde las toxinas mutantes se inactivaron con EDC, de acuerdo con, por ejemplo, Ejemplo 29, Tabla 15, que se describe en la presente, indujo los anticuerpos neutralizantes que exhibieron actividad neutralizante contra las toxinas de al menos las siguientes 16 diferentes cepas CDC de *C. difficile*, en comparación con la respectivo control solo toxina: 2007886 (Figura 23A); 2006017 (Figura 23B); 2007070 (Figura 23C); 2007302 (Figura 23D); 2007838 (Figura 23E); 2007886 (Figura 23F); 2009292 (Figura 23G); 2004013 (Figura 23H); 2009141 (Figura 23I); 2005022 (Figura 23J); 2006376 (Figura 23K).

Figura 24: Ilustración de un ejemplo de inactivación de EDC/NHS de las toxinas de *C. difficile* mutantes, que producen al menos tres posibles tipos de modificaciones: entrecruzamientos, aductos de glicina, y aductos de beta-alanina. El panel A ilustra el entrecruzamiento. Los residuos carboxílicos de las toxinas triple mutantes se activan por la adición de EDC y NHS. Los ésteres activados reaccionan con aminas primarias para formar enlaces amida estables, lo que produce entrecruzamientos intra- e intermoleculares. El panel B ilustra la formación de aductos de glicina. Después de la inactivación, los ésteres activados residuales se inactivan por la adición de glicina para formar enlaces amida estables. El panel C ilustra la formación de aductos de beta-alanina. Tres moles de NHS pueden reaccionar con un mol de EDC para formar beta-alanina activada. Esta luego reacciona con las aminas primarias para formar enlaces amida estables.

Figura 25: Ilustración de un ejemplo de inactivación de EDC/NHS de las toxinas de *C. difficile* mutantes, que producen al menos uno de los siguientes tipos de modificaciones: (A) entrecruzamientos, (B) aductos de glicina, y (C) aductos de beta-alanina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 expone la secuencia de aminoácidos para la toxina A de *C. difficile* 630 tipo salvaje (TcdA).

SEQ ID NO: 2 expone la secuencia de aminoácidos para la toxina B de *C. difficile* 630 tipo salvaje (TcdB).

SEQ ID NO: 3 expone la secuencia de aminoácidos para una TcdA mutante que tiene una mutación de las posiciones 285 y 287, en comparación con SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 4 expone la secuencia de aminoácidos para una TcdA mutante que tiene una mutación de las posiciones 285, 287, y 700, en comparación con SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 5 expone la secuencia de aminoácidos para una TcdB mutante que tiene una mutación de las posiciones 286 y 288, en comparación con SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 6 expone la secuencia de aminoácidos para una TcdB mutante que tiene una mutación de las posiciones 286, 288, y 698, en comparación con SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 7 expone la secuencia de aminoácidos para una TcdA mutante que tiene una mutación de las posiciones 269, 272, 285, 287, 460, 462, y 700, en comparación con SEQ ID NO: 1

SEQ ID NO: 8 expone la secuencia de aminoácidos para una TcdB mutante que tiene una mutación de las posiciones 270, 273, 286, 288, 461, 463, y 698, en comparación con SEQ ID NO: 2

SEQ ID NO: 9 expone una secuencia de ADN que codifica una toxina A de *C. difficile* 630 (TcdA) tipo salvaje.

SEQ ID NO: 10 expone una secuencia de ADN que codifica una toxina B de *C. difficile* 630 (TcdB) tipo salvaje.

SEQ ID NO: 11 expone una secuencia de ADN que codifica SEQ ID NO: 3

SEQ ID NO: 12 expone una secuencia de ADN que codifica SEQ ID NO: 4

SEQ ID NO: 13 expone una secuencia de ADN que codifica SEQ ID NO: 5

SEQ ID NO: 14 expone una secuencia de ADN que codifica SEQ ID NO: 6

SEQ ID NO: 15 expone la secuencia de aminoácidos para *C. difficile* R20291 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 16 expone una secuencia de ADN que codifica SEQ ID NO: 15.

SEQ ID NO: 17 expone la secuencia de aminoácidos para *C. difficile* CD196 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 18 expone una secuencia de ADN que codifica SEQ ID NO: 17.

SEQ ID NO: 19 expone la secuencia de aminoácidos *C. difficile* VPI10463 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 20 expone una secuencia de ADN que codifica SEQ ID NO: 19.

SEQ ID NO: 21 expone la secuencia de aminoácidos *C. difficile* R20291 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 22 expone una secuencia de ADN que codifica SEQ ID NO: 21.

SEQ ID NO: 23 expone la secuencia de aminoácidos *C. difficile* CD196 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 24 expone una secuencia de ADN que codifica SEQ ID NO: 23.

SEQ ID NO: 25 expone la secuencia de aminoácidos *C. difficile* VPI10463 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 26 expone una secuencia de ADN que codifica SEQ ID NO: 25.

SEQ ID NO: 27 expone una secuencia de ADN de un locus de patogenicidad de *C. difficile* VPI10463 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 28 expone la secuencia de aminoácidos para los residuos 101 a 293 de la SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 29 expone la secuencia de aminoácidos para los residuos 1 a 542 de la SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 30 expone la secuencia de aminoácidos para los residuos 101 a 293 de la SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 31 expone la secuencia de aminoácidos para los residuos 1 a 543 de la SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 32 expone la secuencia de aminoácidos para los residuos 543 a 809 de la SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 33 expone la secuencia de aminoácidos para los residuos 544 a 767 de la SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 34 expone la secuencia de aminoácidos para una mutante TcdA, donde los residuos 101, 269, 272, 285, 287, 460, 462, 541, 542, 543, 589, 655, y 700 pueden ser cualquier aminoácido.

SEQ ID NO: 35 expone la secuencia de aminoácidos para una mutante TcdB, donde 102, 270, 273, 286, 288, 384, 461, 463, 520, 543, 544, 587, 600, 653, 698, y 751 pueden ser cualquier aminoácido.

SEQ ID NO: 36 expone la secuencia de aminoácidos para la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante del TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

SEQ ID NO: 37 expone la secuencia de aminoácidos para la cadena liviana pesada de un anticuerpo neutralizante de TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

SEQ ID NO: 38 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR1 de la cadena liviana variable del anticuerpo neutralizante de TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

SEQ ID NO: 39 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR2 de la cadena liviana variable del anticuerpo neutralizante del TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

SEQ ID NO: 40 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR3 de la cadena liviana variable del anticuerpo neutralizante del TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

SEQ ID NO: 41 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR1 de la cadena pesada variable del anticuerpo neutralizante de TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

SEQ ID NO: 42 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR2 de la cadena pesada variable del anticuerpo neutralizante del TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

SEQ ID NO: 43 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR3 de la cadena pesada variable del anticuerpo neutralizante del TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

SEQ ID NO: 44 expone una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 45 expone una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 46 expone una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 47 expone una secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 48 expone la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido inmunoestimulador ODN CpG 24555.

SEQ ID NO: 49 expone la secuencia de aminoácidos para la cadena liviana pesada de un anticuerpo neutralizante del TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

SEQ ID NO: 50 expone la secuencia de aminoácidos para el péptido señal de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

SEQ ID NO: 51 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR1 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

SEQ ID NO: 52 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR2 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

SEQ ID NO: 53 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR3 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

SEQ ID NO: 54 expone la secuencia de aminoácidos para la región constante de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

SEQ ID NO: 55 expone la secuencia de aminoácidos para la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

SEQ ID NO: 56 expone la secuencia de aminoácidos para el péptido señal de la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

SEQ ID NO: 57 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR1 de la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

SEQ ID NO: 58 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR2 de la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

SEQ ID NO: 59 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR3 de la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

SEQ ID NO: 60 expone la secuencia de aminoácidos para la cadena liviana pesada de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

SEQ ID NO: 61 expone la secuencia de aminoácidos para el péptido señal de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

SEQ ID NO: 62 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR1 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

SEQ ID NO: 63 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR2 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

SEQ ID NO: 64 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR3 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

SEQ ID NO: 65 expone la secuencia de aminoácidos para la región constante de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

SEQ ID NO: 66 expone la secuencia de aminoácidos para la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

SEQ ID NO: 67 expone la secuencia de aminoácidos para el péptido señal de la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

SEQ ID NO: 68 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR1 de la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

SEQ ID NO: 69 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR2 de la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

SEQ ID NO: 70 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR3 de la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

SEQ ID NO: 71 expone la secuencia de aminoácidos para la cadena liviana pesada de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

SEQ ID NO: 72 expone la secuencia de aminoácidos para el péptido señal de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

SEQ ID NO: 73 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR1 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

SEQ ID NO: 74 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR2 de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

SEQ ID NO: 75 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR3 de la cadena

pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

SEQ ID NO: 76 expone la secuencia de aminoácidos para la región constante de la cadena pesada variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

SEQ ID NO: 77 expone la secuencia de aminoácidos para la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

SEQ ID NO: 78 expone la secuencia de aminoácidos para el péptido señal de la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

SEQ ID NO: 79 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR1 de la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

SEQ ID NO: 80 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR2 de la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

SEQ ID NO: 81 expone la secuencia de aminoácidos para la CDR3 de la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

SEQ ID NO: 82 expone la secuencia de aminoácidos para un mutante TcdB, donde un residuo de las posiciones 102, 270, 273, 286, 288, 384, 461, 463, 520, 543, 544, 587, 600, 653, 698, y 751 puede ser cualquier aminoácido.

SEQ ID NO: 83 expone la secuencia de aminoácidos para una TcdA mutante que tiene una mutación de las posiciones 269, 272, 285, 287, 460, 462, y 700, en comparación con SEQ ID NO: 1, donde la metionina de la posición 1 está ausente.

SEQ ID NO: 84 expone la secuencia de aminoácidos para una toxina A de *C. difficile* mutante que tiene una mutación de las posiciones 285, 287, y 700, en comparación con SEQ ID NO: 1, donde la metionina de la posición 1 está ausente.

SEQ ID NO: 85 expone la secuencia de aminoácidos para una toxina de *C. difficile* mutante B que tiene una mutación de las posiciones 270, 273, 286, 288, 461, 463, y 698, en comparación con SEQ ID NO: 2, donde la metionina de la posición 1 está ausente.

SEQ ID NO: 86 expone la secuencia de aminoácidos para una toxina de *C. difficile* mutante B que tiene una mutación de las posiciones 286, 288, y 698, en comparación con SEQ ID NO: 2, donde la metionina de la posición 1 está ausente.

SEQ ID NO: 87 expone la secuencia de aminoácidos para *TcdA* de *C. difficile* 2004013 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 88 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA *C. difficile* 2004111 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 89 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA de C. difficile 2004118 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 90 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA de C. difficile 2004205 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 91 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA de C. difficile 2004206. tipo salvaje

SEQ ID NO: 92 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2005022 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 93 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2005088 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 94 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2005283 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 95 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2005325 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 96 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2005359 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 97 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2006017 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 98 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2007070 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 99 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2007217 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 100 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2007302 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 101 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2007816 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 102 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2007838 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 103 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2007858 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 104 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2007886 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 105 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2008222 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 106 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2009078

tipo salvaje.

SEQ ID NO: 107 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2009087
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 108 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2009141
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 109 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 2009292
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 110 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2004013
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 111 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2004111
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 112 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2004118
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 113 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2004205
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 114 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2004206
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 115 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2005022
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 116 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2005088
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 117 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2005283
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 118 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2005325
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 119 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2005359
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 120 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2006017
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 121 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2006376
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 122 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2007070
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 123 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2007217
tipo salvaje.

SEQ ID NO: 124 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2007302 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 125 expone la secuencia de aminoácidos para C. difficile 2007816 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 126 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2007838 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 127 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2007858 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 128 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2007886 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 129 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2008222 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 130 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2009078 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 131 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2009087 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 132 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2009141 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 133 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 2009292 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 134 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 014 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 135 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 015 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 136 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 020 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 137 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 023 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 138 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 027 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 139 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 029 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 140 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 046 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 141 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 014 tipo

salvaje.

SEQ ID NO: 142 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 015 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 143 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 020 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 144 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 023 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 145 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 027 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 146 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 029 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 147 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 046 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 148 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 001 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 149 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 002 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 150 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 003 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 151 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 004 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 152 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 070 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 153 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 075 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 154 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 077 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 155 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 081 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 156 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 117 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 157 expone la secuencia de aminoácidos para TcdA C. difficile 131 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 158 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB C. difficile 001 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 159 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB *C. difficile* 002 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 160 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB *C. difficile* 003 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 161 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB *C. difficile* 004 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 162 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB *C. difficile* 070 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 163 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB *C. difficile* 075 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 164 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB *C. difficile* 077 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 165 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB *C. difficile* 081 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 166 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB *C. difficile* 117 tipo salvaje.

SEQ ID NO: 167 expone la secuencia de aminoácidos para TcdB *C. difficile* 131 tipo salvaje.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los inventores descubrieron de modo sorprendente, entre otras cosas, una toxina A y toxina B de *C. difficile* mutante, y los métodos de estas. Las mutantes se caracterizan, en parte, por ser inmunogénica y exhibir citotoxicidad reducida en comparación con una forma de tipo salvaje de la toxina respectiva. La presente invención también se refiere a porciones inmunogénicas de estas, equivalentes biológicos de estos y polinucleótidos aislados que incluyen las secuencias de ácidos nucleicos que codifican alguna de las precedentes.

Las composiciones inmunogénicas descritas en la presente demuestran de modo inesperado la capacidad de inducir nuevos anticuerpos neutralizantes contra las toxinas de *C. difficile* y pueden tener la capacidad de conferir protección activa y/o pasiva frente a la exposición a *C. difficile*. Los nuevos anticuerpos se dirigen contra varios epítopes de la toxina A y toxina B. Los inventores también descubrieron que una combinación de al menos dos de los anticuerpos monoclonales neutralizantes pueden exhibir un efecto inesperadamente sinérgico en la respectiva neutralización *in vitro* de

la toxina A y toxina B.

Las composiciones de la invención descritas en la presente, se pueden usar para tratar, prevenir, disminuir el riesgo de, disminuir las apariciones de, disminuir la gravedad de, y/o retrasar el comienzo de una infección con *C. difficile*, enfermedad asociada con *C. difficile* (CDAD), síndrome, afección, síntoma, y/o complicación de esta en un mamífero, en comparación con un mamífero al que no se administró la composición.

Además, los inventores descubrieron una célula de *C. difficile* esporogénica recombinante que puede expresar en forma estable la toxina A y toxina B mutante de *C. difficile*, y nuevos métodos para producirlas.

Composiciones inmunogénicas

En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye una toxina de *C. difficile* mutante. La toxina de *C. difficile* mutante incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una mutación en un dominio de glucosiltransferasa y al menos una mutación en un dominio de cisteína proteasa, con respecto a la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje.

El término “tipo salvaje” como se usa en la presente, se refiere a la forma hallada en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos tipo salvaje es una secuencia presente en un organismo que se puede aislar de una fuente de la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por manipulación humana. La presente invención también se refiere a los polinucleótidos aislados que incluyen las secuencias de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las precedentes. Además, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de las composiciones precedentes para tratar, prevenir, disminuir el riesgo de, disminuir la gravedad de, disminuir las apariciones de, y/o retrasar el comienzo de una infección con *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma de *C. difficile* y/o sus complicaciones en un mamífero, en comparación con un mamífero al que no se administra la composición, así como métodos para preparar dichas composiciones.

Como se usa en la presente, una “composición inmunogénica” o “inmunógeno” se refiere a una composición que induce una respuesta inmune en un mamífero al que se administra la composición.

Una “respuesta inmune” se refiere al desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpo) y/o a celular (mediada por células T específicas del antígeno o sus productos de secreción) beneficiosa dirigida a una toxina de *C. difficile* en un paciente receptor. La respuesta inmune puede ser humoral, celular, o ambos.

La respuesta inmune puede ser una respuesta activa inducida por la administración de una composición inmunogénica, un inmunógeno. De modo alternativo, la respuesta inmune puede ser una respuesta pasiva inducida por la administración de anticuerpo o células T activadas.

La presencia de una respuesta inmune humoral (mediada por anticuerpo) se puede determinar, por ejemplo, por ensayos basados en células conocidos en la técnica, tal como un ensayo de anticuerpo neutralizante, ELISA, etc.

Una respuesta inmune celular normalmente es inducida por la presentación de epitopes polipeptídicos en asociación con moléculas de MHC Clase I o Clase II para activar células auxiliares T específicas del antígeno CD4 + y/o células T citotóxicas CD8+. La respuesta también puede involucrar la activación de monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células microgliales, eosinófilos u otros componentes de la inmunidad innata. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar por ensayos de proliferación (células CD4+ T) o ensayos CTL (linfocitos T citotóxicos) conocidos en la técnica.

En una forma de realización, una composición inmunogénica es una composición de vacuna. Como se usa en la presente, una "composición de vacuna" es una composición que induce una respuesta inmune en un mamífero al que se administra la composición. La composición de vacuna puede proteger el mamífero inmunizado frente a la posterior exposición con un agente inmunizante o un agente de reacción cruzada inmunológica. La protección puede ser completa o parcial con respecto a la reducción de los síntomas o la infección en comparación con un mamífero no vacunado en las mismas condiciones.

Las composiciones inmunogénicas descritas en la presente con reactividad cruzada, la que se refiere a la una característica de poder inducir una respuesta inmune efectiva (por ejemplo, respuesta inmune humoral) contra una toxina producida por otra cepa de *C. difficile* que es diferente de la cepa de que se deriva de la composición. Por ejemplo, las composiciones inmunogénicas (por ejemplo, derivadas de *C. difficile* 630) que se describen en la presente pueden inducir anticuerpos con reactividad cruzada que se unen a las toxinas producidas por múltiples cepas de *C. difficile* (por ejemplo, toxinas producidas por *C. difficile* R20291 y VPI10463). Ver, por ejemplo, Ejemplo 37. La reactividad cruzada es indicativa de la potencial protección cruzada del inmunógeno bacteriano, y viceversa.

El término "protección cruzado" como se usa en la presente se refiere a la capacidad de la respuesta inmune inducida por una composición inmunogénica para

prevenir o atenuar la infección por una cepa bacteriana diferente o especies del mismo género. Por ejemplo, una composición inmunogénica (por ejemplo, derivada de *C. difficile* 630) que se describe en la presente puede inducir una respuesta inmune efectiva en un mamífero para atenuar una infección con *C. difficile* y/o atenuar una enfermedad con *C. difficile* causada por una cepa diferente de 630 (por ejemplo, *C. difficile* R20291) en el mamífero.

Los ejemplos de mamíferos en que la composición inmunogénica o inmunógeno induce una respuesta inmune incluye cualquier mamífero, tal como, por ejemplo, ratones, hámsteres, primates, y seres humanos. En una forma de realización preferida, la composición inmunogénica o inmunógeno induce una respuesta inmune en un ser humano al que se administra la composición.

Como se describió anteriormente, la toxina A (TcdA) y toxina B (TcdB) son glucosiltransferasas homólogas que inactivan GTPasas pequeñas de la familia Rho/Rac/Ras. La acción de TcdA y TcdB sobre las células blanco de mamífero depende de un mecanismo multietapa de endocitosis mediada por receptor, translocación de membrana, procesamiento autoproteolítico, y monoglucosilación de GTPasas. Muchas de estas actividades funcionales se han asignado a regiones diferenciadas dentro de la secuencia primaria de las toxinas, y las toxinas se han visualizado para mostrar que estas moléculas son de estructura similar.

El gen tipo salvaje para TcdA tiene aproximadamente 8130 nucleótidos que codifica una proteína que tiene un peso molecular deducida de aproximadamente 308-kDa, que tiene aproximadamente 2710 aminoácidos. Como se usa en la presente, una TcdA de *C. difficile* tipo salvaje incluye una TcdA de *C. difficile* de cualquier cepa de *C. difficile* tipo salvaje. Una TcdA de *C. difficile* tipo salvaje puede incluir una secuencia de aminoácidos de TcdA de *C. difficile* tipo salvaje que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, con preferencia aproximadamente 98%, con más preferencia aproximadamente 99% o con máxima preferencia aproximadamente 100% de identidad con la SEQ ID NO: 1 (longitud completa) cuando se alinean óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de brecha predeterminadas.

En una forma de realización preferida, la TcdA de *C. difficile* tipo salvaje incluye una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, que describe la secuencia de aminoácidos tipo salvaje para TcdA de la cepa de *C. difficile* 630 (también con el Número de acceso a GenBank YP_001087137,1 y/o CAJ67494,1). La cepa de *C. difficile* 630 es conocida en la técnica por ser una cepa PCR-ribotipo 012.

La SEQ ID NO: 9 describe el gen tipo salvaje para la TcdA de la cepa de *C. difficile* 630, que también se describe en el número de acceso a GenBank NC_009089,1.

Otro ejemplo de una TcdA de *C. difficile* tipo salvaje incluye una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15, que describe la secuencia de aminoácidos tipo salvaje para TcdA de la cepa de *C. difficile* R20291 (que también se describe en el número de acceso a GenBank YP_003217088,1). La cepa de *C. difficile* R20291 es conocida en la técnica por ser una cepa hipervirulenta y una cepa PCR-ribotipo 027. La secuencia de aminoácidos para TcdA de la cepa de *C. difficile* R20291 tiene aproximadamente 98% de identidad con la SEQ ID NO:1. La SEQ ID NO: 16 describe el gen tipo salvaje para la TcdA de cepa de *C. difficile* R20291, que también se describe en el número de acceso a GenBank NC_013316,1.

Un ejemplo adicional de una TcdA de *C. difficile* tipo salvaje incluye una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 17, que describe la secuencia de aminoácidos tipo salvaje para TcdA de la cepa de *C. difficile* CD196 (que también se describe en el número de acceso a GenBank CBA61156,1). CD196 es una cepa de un brote canadiense reciente, y es conocida en la técnica como una cepa PCR-ribotipo 027. La secuencia de aminoácidos para TcdA de la cepa de *C. difficile* CD196 tiene aproximadamente 98% de identidad con la SEQ ID NO: 1, y tiene aproximadamente 100% de identidad con TcdA de la cepa de *C. difficile* R20291. SEQ ID NO: 18 describe el gen tipo salvaje para la TcdA de cepa de *C. difficile* CD196, que también se describe en el número de acceso a GenBank FN538970,1.

Otro ejemplos de una secuencia de aminoácidos para una TcdA de *C. difficile* tipo salvaje incluyen la SEQ ID NO: 19, que describe la secuencia de aminoácidos tipo salvaje para TcdA de la cepa de *C. difficile* VPI10463 (que también se describe en el número de acceso a GenBank CAA63564,1). La secuencia de aminoácidos para TcdA de la cepa de *C. difficile* VPI10463 tiene aproximadamente 100% (99,8%) de identidad con la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 20 describe el gen tipo salvaje para la TcdA de cepa de *C. difficile* VPI10463, que también se describe en el número de acceso a GenBank X92982,1.

Los ejemplos adicionales de una TcdA de *C. difficile* tipo salvaje incluyen TcdA de las cepas de *C. difficile* tipo salvaje que se pueden obtener de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, GA). Los inventores descubrieron que la secuencia de aminoácidos de la TcdA de las cepas de *C. difficile* tipo salvaje que se pueden obtener de los CDC incluyen al menos aproximadamente 99,3% a 100% de identidad con, cuando se alinean óptimamente, a los residuos de aminoácidos 1 a 821

de la SEQ ID NO: 1 (TcdA de *C. difficile* 630). Ver Tabla 1.

Los inventores también descubrieron que la secuencia de aminoácidos de TcdA de las cepas de *C. difficile* tipo salvaje pueden incluir al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, a aproximadamente 100% de identidad con, cuando se alinean óptimamente (por ejemplo, cuando se alinean óptimamente las secuencias de longitud completa) a la SEQ ID NO: 1.

Tabla 1: Cepas de *C. difficile* tipo salvaje obtenidas de los CDC y el por ciento de identidad de los residuos de aminoácidos 1-821 de TcdA de la respectiva cepa de *C. difficile* tipo salvaje a los residuos de aminoácidos 1-821 de la SEQ ID NO: 1, cuando se alinean óptimamente.

Tabla 1: Cepas de <i>C. difficile</i> tipo salvaje de CDC	
Cepa <i>C. difficile</i> ID	% de identidad de aminoácidos aproximada a los residuos 1-821 de la SEQ ID NO: 1
2004111	100
2004118	99,6
2004205	100
2004206	100
2005325	99,3
2005359	99,6
2006017	100
2007070	100
2007302	100
2007816	99,3
2007838	99,6
2007886	99,6
2008222	100
2009078	100
2009087	100
2009141	100
2009292	99,6

Por consiguiente, en una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de TcdA de *C. difficile* tipo salvaje incluye una secuencia de al menos aproximadamente 500, 600, 700, o 800 residuos contiguos, que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, con preferencia aproximadamente 98%, con más preferencia aproximadamente 99%, o con máxima preferencia aproximadamente 100% de identidad con una secuencia de igual longitud entre los residuos 1 a 900 de la SEQ ID NO: 1 cuando se alinean óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de brecha predeterminadas. Los ejemplos incluyen las cepas descritas anteriormente (por ejemplo, R20291, CD196, etc) y las listadas

en la Tabla 1.

En otra forma de realización, la secuencia de aminoácidos de TcdA de *C. difficile* tipo salvaje incluye una secuencia que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, con preferencia aproximadamente 97%, con preferencia aproximadamente 98%, con más preferencia aproximadamente 99% o con máxima preferencia aproximadamente 100% de identidad con alguna de las secuencias seleccionadas de las SEQ ID NOs: 87-109 cuando se alinean óptimamente. Ver Tabla 1-a.

Tabla 1-a: Cepas de <i>C. difficile</i> tipo salvaje	
ID de cepa de <i>C. difficile</i>	Toxina A, SEQ ID NO:
2004013	SEQ ID NO: 87
2004111	SEQ ID NO: 88
2004118	SEQ ID NO: 89
2004205	SEQ ID NO: 90
2004206	SEQ ID NO: 91
2005022	SEQ ID NO: 92
2005088	SEQ ID NO: 93
2005283	SEQ ID NO: 94
2005325	SEQ ID NO: 95
2005359	SEQ ID NO: 96
2006017	SEQ ID NO: 97
2006376	N/A
2007070	SEQ ID NO: 98
2007217	SEQ ID NO: 99
2007302	SEQ ID NO: 100
2007816	SEQ ID NO: 101
2007838	SEQ ID NO: 102
2007858	SEQ ID NO: 103
2007886	SEQ ID NO: 104
2008222	SEQ ID NO: 105
2009078	SEQ ID NO: 106
2009087	SEQ ID NO: 107
2009141	SEQ ID NO: 108
2009292	SEQ ID NO: 109
001	SEQ ID NO: 148
002	SEQ ID NO: 149
003	SEQ ID NO: 150
012 (004)	SEQ ID NO: 151
014	SEQ ID NO: 134
015	SEQ ID NO: 135
017	
020	SEQ ID NO: 136
023	SEQ ID NO: 137
027	SEQ ID NO: 138
029	SEQ ID NO: 139
046	SEQ ID NO: 140

Tabla 1-a: Cepas de <i>C. difficile</i> tipo salvaje	
ID de cepa de <i>C. difficile</i>	Toxina A, SEQ ID NO:
053	
059	
070	SEQ ID NO: 152
075	SEQ ID NO: 153
077	SEQ ID NO: 154
078	
081	SEQ ID NO: 155
087	
095	
106	
117	SEQ ID NO: 156
126	
131	SEQ ID NO: 157

El gen tipo salvaje para TcdB tiene aproximadamente 7098 nucleótidos que codifican una proteína un peso molecular deducido de aproximadamente 270 kDa, que tiene aproximadamente 2366 aminoácidos. Como se usa en la presente, una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje incluye una TcdB de *C. difficile* de cualquier cepa de *C. difficile* tipo salvaje. Una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje puede incluir una secuencia de aminoácidos tipo salvaje que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, con preferencia aproximadamente 98%, con más preferencia aproximadamente 99% o con máxima preferencia aproximadamente 100% de identidad con la SEQ ID NO: 2 cuando se alinean óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de brecha predeterminadas. En una forma de realización preferida, la TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje incluye una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, que describe la secuencia de aminoácidos tipo salvaje para TcdB de la cepa de *C. difficile* 630 (que también se describe en el número de acceso a GenBank YP_001087135,1 y/o CAJ67492). La SEQ ID NO: 10 describe el gen tipo salvaje para la TcdB de la cepa de *C. difficile* 630, que también se describe en el número de acceso a GenBank NC_009089,1.

Otro ejemplo de una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje incluye una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21, que describe la secuencia de aminoácidos tipo salvaje para TcdB de la cepa de *C. difficile* R20291 (que también se describe en el número de acceso a GenBank YP_003217086.1 y/o CBE02479.1). La secuencia de aminoácidos para TcdB de la cepa de *C. difficile* R20291 tiene aproximadamente 92% de identidad con la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 22 describe el gen tipo salvaje para la TcdB de la cepa de *C. difficile* R20291, que también se describe en el número de acceso a GenBank NC_013316,1.

Un ejemplo adicional de una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje incluye una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23, que describe la secuencia de aminoácidos tipo salvaje para TcdB de la cepa de *C. difficile* CD196 (que también se describe en el número de acceso a GenBank YP_003213639,1 y/o CBA61153.1). La SEQ ID NO: 24 describe el gen tipo salvaje para la TcdB de la cepa de *C. difficile* CD196, que también se describe en el número de acceso a GenBank NC_013315.1. La secuencia de aminoácidos para TcdB de la cepa de *C. difficile* CD196 tiene aproximadamente 92% de identidad con la SEQ ID NO: 2.

Otros ejemplos de una secuencia de aminoácidos para una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje incluyen la SEQ ID NO: 25, que describe la secuencia de aminoácidos tipo salvaje para TcdB de la cepa de *C. difficile* VPI10463 (que también se describe en el número de acceso a GenBank P18177 y/o CAA37298). La secuencia de aminoácidos para TcdB de la cepa de *C. difficile* VPI10463 tiene 100% de identidad con la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 26 describe el gen tipo salvaje para la TcdB de la cepa de *C. difficile* VPI10463, que también se describe en el número de acceso a GenBank X53138.1.

Ejemplos adicionales de una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje incluyen la TcdB de las cepas de *C. difficile* tipo salvaje que se pueden obtener de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, GA). Los inventores descubrieron que la secuencia de aminoácidos de TcdB las cepas de *C. difficile* tipo salvaje que se pueden obtener de los CDC incluyen al menos aproximadamente 96% a 100% de identidad con, cuando se alinean óptimamente, a los residuos de aminoácido 1 a 821 de la SEQ ID NO: 2 (TcdB de *C. difficile* 630). Ver Tabla 2.

Tabla 2: Cepas de *C. difficile* tipo salvaje obtenidos de los CDC y el % de identidad de los residuos de aminoácidos 1-821 de TcdB de la respectiva cepa de *C. difficile* tipo salvaje a los residuos de aminoácidos 1-821 de la SEQ ID NO: 2, cuando se alinean óptimamente.

Tabla 2: Cepas de <i>C. difficile</i> tipo salvaje de CDC	
ID de cepa de <i>C. difficile</i>	% de identidad de aminoácido aproximada a los residuos 1-821 de la SEQ ID NO: 2
2004013	96,0
2004111	100
2004118	96,0
2004206	100
2005022	100
2005325	96,7
2007302	100

2007816	96,7
2008222	100
2009078	100
2009087	100
2009141	100

Por consiguiente, en una forma de realización, una Secuencia de aminoácidos de TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje incluye una secuencia de al menos aproximadamente 500, 600, 700, o 800 residuos contiguos, que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, con preferencia aproximadamente 97%, con preferencia aproximadamente 98%, con más preferencia aproximadamente 99% o con máxima preferencia aproximadamente 100% de identidad con una secuencia de igual longitud entre los residuos 1 a 900 de la SEQ ID NO: 2 cuando se alinean óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de brecha predeterminadas. Los ejemplos incluyen las cepas descriptas anteriormente (por ejemplo, R20291, CD196, etc.) y los listados en la Tabla 2.

En otra forma de realización, la secuencia de aminoácidos de TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje incluye una secuencia que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, con preferencia aproximadamente 97%, con preferencia aproximadamente 98%, con más preferencia aproximadamente 99% o con máxima preferencia aproximadamente 100% de identidad con cualquier secuencia seleccionada de las SEQ ID NOS: 110-133 cuando se alinean óptimamente. Ver Tabla 2-a.

Tabla 2-a Cepas de <i>C. difficile</i> tipo salvaje	
ID de cepa de <i>C. difficile</i>	Toxina B, SEQ ID NO:
2004013	SEQ ID NO: 110
2004111	SEQ ID NO: 111
2004118	SEQ ID NO: 112
2004205	SEQ ID NO: 113
2004206	SEQ ID NO: 114
2005022	SEQ ID NO: 115
2005088	SEQ ID NO: 116
2005283	SEQ ID NO: 117
2005325	SEQ ID NO: 118
2005359	SEQ ID NO: 119
2006017	SEQ ID NO: 120
2006376	SEQ ID NO: 121
2007070	SEQ ID NO: 122
2007217	SEQ ID NO: 123
2007302	SEQ ID NO: 124
2007816	SEQ ID NO: 125

Tabla 2-a Cepas de <i>C. difficile</i> tipo salvaje	
ID de cepa de <i>C. difficile</i>	Toxina B, SEQ ID NO:
2007838	SEQ ID NO: 126
2007858	SEQ ID NO: 127
2007886	SEQ ID NO: 128
2008222	SEQ ID NO: 129
2009078	SEQ ID NO: 130
2009087	SEQ ID NO: 131
2009141	SEQ ID NO: 132
2009292	SEQ ID NO: 133
001	SEQ ID NO: 158
002	SEQ ID NO: 159
003	SEQ ID NO: 160
012 (004)	SEQ ID NO: 161
014	SEQ ID NO: 141
015	SEQ ID NO: 142
017	
020	SEQ ID NO: 143
023	SEQ ID NO: 144
027	SEQ ID NO: 145
029	SEQ ID NO: 146
046	SEQ ID NO: 147
053	
059	
070	SEQ ID NO: 162
075	SEQ ID NO: 163
077	SEQ ID NO: 164
078	
081	SEQ ID NO: 165
087	
095	
106	
117	SEQ ID NO: 166
126	
131	SEQ ID NO: 167

Los genes para las toxinas A y B (*tcdA* y *tcdB*) son parte de un locus genético de 19,6-kb (el locus de patogenicidad, PaLoc) que incluye 3 pequeños marcos de lectura abiertos (ORF) adicionales, *tcdD*, *tcdE*, y *tcdC*, y se pueden considerar útiles para determinar la virulencia. El PaLoc es conocido por ser estable y conservado en las cepas toxigénicas. Está presente en el mismo sitio de integración cromosómico en todas las cepas toxigénicas que se han analizado hasta la fecha. En cepas no toxigénicas, el locus de patogenicidad (PaLoc) no está presente. Por consiguiente, una característica de las cepas de *C. difficile* tipo salvaje que se describen en la presente es la presencia de un locus de patogenicidad. Otra característica preferida de las cepas de *C. difficile* tipo salvaje que se describen en la presente es la producción de

TcdA y TcdB.

En una forma de realización, la cepa de *C. difficile* tipo salvaje es una cepa que tiene un locus de patogenicidad que es al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, con preferencia aproximadamente 98%, con más preferencia aproximadamente 99% o con máxima preferencia aproximadamente 100% idéntico al *C. difficile* 630 o VPI10463. La secuencia del locus de patogenicidad total del *C. difficile* VPI10463, se registra en la base de datos EMBL con el número de acceso de secuencia X92982, también mostrada en la SEQ ID NO: 26. Las cepas en que el PaLoc es idéntico al de la cepa de referencia VPI10463 se denominan como toxinotipo 0. Las cepas de toxinotipos I-VII, IX, XII-XV, y XVIII-XXIV producen TcdA y TcdB a pesar de las variaciones en sus genes de toxina.

En el extremo N-terminal de las toxinas, se ubica el dominio de glucosiltransferasa. La actividad de glucosiltransferasa de las toxinas se asocia con la función citotóxica de las toxinas. Sin estar ligado por mecanismo o teoría, se considera que la actividad de glucosiltransferasa en ambas toxinas cataliza la monoglucosilación de proteínas de unión a GTP pequeñas en la superfamilia de Rho/Rac/Ras. Después de la glucosilación de estas proteínas de unión de GTP, la fisiología celular se modifica drásticamente, lo que produce una pérdida de integridad estructural y alteración de las vías de señalización esencial de las células huésped infectadas por las toxinas. El motivo Asp-Xaa-Asp (DXD), que está involucrado con la unión de manganeso, uridina difosfato (UDP), y la glucosa, es una característica típica para el dominio de glucosiltransferasa. Sin estar ligado por mecanismo o teoría, se considera que los residuos críticos para la actividad catalítica, tales como el motivo DXD, no varía entre una TcdB de una cepa “histórica” conocida, tal como 630, y una TcdB de una cepa hipervirulenta, tal como R20291. El motivo DXD se ubica en los residuos 285 a 287 de una TcdA de *C. difficile* tipo salvaje, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1, y en los residuos 286 a 288 de una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2.

Los algoritmos de alineamiento global (por ejemplo, programas de análisis de secuencia) son conocidos en la técnica y se pueden usar para alinear óptimamente dos o más secuencias de aminoácidos de la toxina para determinar si la toxina incluye un motivo distintivo particular (por ejemplo, DXD en el dominio de glucosiltransferasa, DHC en el dominio de cisteína proteasa que se describe a continuación, etc.). Las secuencias alineadas óptimamente(s) se comparan con una secuencia de referencia respectiva (por ejemplo, SEQ ID NO:1 para la TcdA o SEQ ID NO: 2 para TcdB) para

determinar la existencia del motivo distintivo. “Alineamiento óptimo” se refiere a un alineamiento que da la puntuación de por ciento de identidad más alto. Tal alineamiento se puede realizar usando programas de análisis de secuencia conocidos. En una forma de realización, un alineamiento CLUSTAL (tales como CLUSTALW) con parámetros predeterminados se usa para identificar toxinas tipo salvaje adecuadas por la comparación de la secuencia incógnita contra la secuencia de referencia. La numeración relativa de los residuos de aminoácidos conservados se basa en la numeración de residuos de la secuencia de aminoácidos de referencia para tomar en cuenta las inserciones o supresiones pequeñas (por ejemplo, cinco aminoácidos o menos) dentro de la secuencia alineada.

Como se usa en la presente, el término “de acuerdo con la numeración de” se refiere a la numeración de los residuos de una secuencia de referencia cuando la secuencia de aminoácidos o polinucleótidos dada se compara con la secuencia de referencia. En otras palabras, el número o posición del residuo de un polímero dado se denomina con respecto a la secuencia de referencia más que por la posición numérica real de los residuos dentro de la secuencia de aminoácidos o polinucleótidos dada.

Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos dada, tal como la de una cepa hipervirulenta de *C. difficile* tipo salvaje, se puede alinear a una secuencia de referencia (por ejemplo, tal como la de una cepa histórica de *C. difficile* tipo salvaje, por ejemplo, 630) por la introducción de brechas, si es necesario, para optimizar las coincidencias de residuos entre las dos secuencias. En estos casos, aunque estén presentes las brechas, la numeración del residuo en la secuencia de aminoácidos o polinucleótidos dada se realiza con respecto a la secuencia de referencia a la que se ha alineado. Como se usa en la presente, una “secuencia de referencia” se refiere a una secuencia definida usada como una base para la comparación de secuencia.

A menos que se indique de otro modo, todas las referencias de la presente a las posiciones de aminoácidos de una TcdA se refieren a la numeración de la SEQ ID NO: 1. A menos que se indique de otro modo, todas las referencias de la presente a las posiciones de aminoácidos de una TcdB se refieren a la numeración de la SEQ ID NO: 2.

El dominio de glucosiltransferasa de TcdA, como se usa en la presente, puede comenzar en un residuo ejemplificativo 1, 101, o 102, y puede terminar en un residuo ejemplificativo 542, 516, o 293 de una TcdA de *C. difficile* tipo salvaje, por ejemplo, SEQ ID NO: 1. Cualquier posición de residuo mínima se puede combinar con una posición de residuo máxima entre los residuos 1 y 542 de TcdA para definir una

secuencia para el dominio de glucosiltransferasa siempre que se incluya la región del motivo DXD. Por ejemplo, en una forma de realización, el dominio de glucosiltransferasa de TcdA incluye la SEQ ID NO: 27, que es idéntico a los residuos 101-293 de la SEQ ID NO: 1, e incluye la región del motivo DXD. En otra forma de realización, el dominio de glucosiltransferasa de TcdA incluye la SEQ ID NO: 28, que es idéntico a residuos 1-542 de la SEQ ID NO: 1.

El dominio de glucosiltransferasa de TcdB, como se usa en la presente, puede comenzar en un residuo ejemplificativo 1, 101, o 102, y puede terminar en un residuo ejemplificativo 543, 516, o 293 de una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje, por ejemplo, SEQ ID NO: 2. Cualquier posición de residuo mínima se puede combinar con una posición de residuo máxima entre residuos 1 y 543 de TcdB para definir una secuencia para el dominio de glucosiltransferasa siempre que se incluya la región del motivo DXD. Por ejemplo, en una forma de realización, el dominio de glucosiltransferasa del TcdB incluye la SEQ ID NO: 29, que es idéntico a residuos 101-293 de la SEQ ID NO: 2, e incluye la región del motivo DXD. En otra forma de realización, el dominio de glucosiltransferasa de TcdB incluye la SEQ ID NO: 30, que es idéntico a residuos 1-543 de la SEQ ID NO: 2.

Sin esta ligado por teoría o mecanismo, se considera que el extremo N-terminal TcdA y/o TcdB es escinde por un proceso autoproteolítico para el dominio de glucosiltransferasa que transloca y libera en el citosol de la célula huésped, donde interactúa con Rac/Ras/Rho GTPasas. Se ha mostrado que la TcdA de *C. difficile* tipo salvaje se escinde entre L542 y S543. Se ha demostrado que la TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje se escinde entre L543 y G544.

El dominio de cisteína proteasa se asocia con la actividad proteolítica autocatalítica de la toxina. El dominio de cisteína proteasa se ubica corriente abajo del dominio de glucosiltransferasa y se puede caracterizar por la triada catalítica aspartato, histidina, y cisteína (*DHC*), por ejemplo, D589, H655, y C700 de una TdcA tipo salvaje, y D587, H653, y C698 de una TdcB tipo salvaje. Sin estar ligado por mecanismo o teoría, se considera que la triada catalítica están conservada entre una toxina de una cepa "histórica", tal como 630, y una TcdB de una cepa hipervirulenta, tales como R20291.

El dominio de cisteína proteasa de la TcdA, como se usa en la presente, puede comenzar en un residuo ejemplificativo 543, y puede terminar en un residuo ejemplificativo 809 769, 768, o 767 de una TdcA tipo salvaje, por ejemplo, SEQ ID NO: 1. Cualquier posición de residuo mínima se puede combinar con una posición de

residuo máxima entre 543 y 809 de una TdcA tipo salvaje para definir una secuencia para el dominio de cisteína proteasa siempre que se incluya la región del motivo de DHC de la triada catalítica. Por ejemplo, en una forma de realización, el dominio de cisteína proteasa de la TcdA incluye la SEQ ID NO: 32, que tiene la región del motivo de DHC ubicada en los residuos 47, 113, y 158 de la SEQ ID NO: 32, que corresponde respectivamente a D589, H655, y C700 de una TdcA tipo salvaje de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 32 es idéntica a los residuos 543 a 809 de la SEQ ID NO: 1, TcdA.

El dominio de cisteína proteasa de la TcdB, como se usa en la presente, puede comenzar en un residuo ejemplificativo 544, y puede terminar en un residuo ejemplificativo 801, 767, 755, o 700 de una TdcB tipo salvaje, por ejemplo, SEQ ID NO: 2. Cualquier posición de residuo mínima se puede combinar con una posición de residuo máxima entre 544 y 801 de una TdcB tipo salvaje para definir una secuencia para el dominio de cisteína proteasa siempre que se incluya la región del motivo de DHC de la triada catalítica. Por ejemplo, en una forma de realización, el dominio de cisteína proteasa de la TcdB incluye la SEQ ID NO: 33, que incluye la región del motivo de DHC ubicada en los residuos 44, 110, y 115 de la SEQ ID NO: 33, que corresponde respectivamente a D587, H653, y C698 de una TdcB tipo salvaje de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 33 es idéntica a residuos 544 a 767 de la SEQ ID NO: 2, TcdB. En otra forma de realización, el dominio de cisteína proteasa de la TcdB incluye residuos 544-801 de la SEQ ID NO: 2, TcdB.

En la presente invención, la composición inmunogénica incluye una toxina de *C. difficile* mutante. El término “mutante,” como se usa en la presente, se refiere a una molécula que exhibe una estructura o secuencia que difiere de la correspondiente estructura o secuencia tipo salvaje, por ejemplo, por tener entrecruzamientos en comparación con la correspondiente estructura tipo salvaje y/o por tener al menos una mutación, en comparación con la correspondiente secuencia tipo salvaje cuando se alinean óptimamente, tales como por los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de brecha predeterminadas. El término “mutante” como se usa en la presente también incluye una molécula que exhibe una propiedad funcional (por ejemplo, actividad de glucosiltransferasa anulada y/o de cisteína proteasa anulada) que difiere de la correspondiente molécula tipo salvaje.

Una toxina de *C. difficile* de cualquiera de las cepas tipo salvaje cepas descriptas antes se puede usar como una fuente de la cual se produce una toxina de *C. difficile* mutante. Con preferencia, *C. difficile* 630 es la fuente de la cual se produce

una toxina de *C. difficile* mutante.

La mutación puede involucrar una sustitución, supresión, truncamiento o modificación del residuo de aminoácido tipo salvaje normalmente localizado en esta posición. Con preferencia, la mutación es una sustitución no conservadora de aminoácidos. La presente invención también contempla polinucleótidos aislados que incluyen las secuencias de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las toxinas mutantes que se describen en la presente.

Una sustitución “no conservadora” de aminoácidos, como se usa en la presente, se refiere a un intercambio de un aminoácido de una clase para un aminoácido de otra clase, de acuerdo con la siguiente Tabla 3:

Tabla 3: Clases de aminoácido	
Clase	Aminoácido
No polar:	Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Met (M), Phe (F), Trp (W)
Polar no cargado:	Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
Ácido:	Asp (D), Glu (E)
Básico:	Lys (K), Arg (R), His (H)

Los ejemplos de una sustitución no conservadora de aminoácidos incluyen una sustitución donde un residuo de ácido aspártico (Asp, D) se reemplaza con un residuo de alanina (Ala, A). Otros ejemplos incluyen el reemplazo de un residuo de ácido aspártico (Asp, D) con un residuo de asparagina (Asn, N); reemplazo con un residuo de arginina (Arg, R), ácido glutámico (Glu, E), lisina (Lys, K), y/o histidina (His, H) con un residuo de alanina (Ala, A).

Una sustitución conservadora se refiere a un intercambio entre los aminoácidos de la misma clase, por ejemplo, de acuerdo con la Tabla 3.

Las toxinas mutantes de la invención se pueden preparar por técnicas conocidas en la técnica para preparar mutaciones, tales como, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis usando un mutágeno (por ejemplo, luz UV), etc. Con preferencia, se usa mutagénesis dirigida al sitio. De modo alternativo, una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia objetiva se puede sintetizar directamente. Tales métodos de síntesis química son conocidos en la técnica.

En la presente invención, la toxina de *C. difficile* mutante incluye al menos una mutación en un dominio de glucosiltransferasa, con respecto a la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje. En una forma de realización, el dominio de glucosiltransferasa incluye al menos dos mutaciones. Con preferencia, la mutación disminuye o anula la actividad de enzima glucosiltransferasa de la toxina, en comparación con la actividad de la enzima glucosiltransferasa de la correspondiente

toxina de *C. difficile* tipo salvaje.

Los ejemplos de residuos de aminoácidos en un dominio de glucosiltransferasa de TcdA que pueden experimentar una mutación incluyen al menos uno de los siguientes, o cualquier combinación de estos: W101, D269, R272, D285, D287, E460, R462, S541, y L542, en comparación con a TcdA de *C. difficile* tipo salvaje, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1.

Los ejemplos de mutaciones en un dominio de glucosiltransferasa de TcdA incluyen al menos uno de los siguientes, o cualquier combinación de estos: W101A, D269A, R272A, D285A, D287A, E460A, R462A, S541A, y L542G, en comparación con a TcdA de *C. difficile* tipo salvaje. En una forma de realización preferida, el dominio de glucosiltransferasa de TcdA incluye una mutación L542G, en comparación con una TcdA de *C. difficile* tipo salvaje. En otra forma de realización preferida, el dominio de glucosiltransferasa de la TcdA incluye una mutación D285A y una D287A, en comparación con a TcdA de *C. difficile* tipo salvaje.

Los ejemplos de residuos de aminoácidos en un dominio de glucosiltransferasa de la TcdB que puede experimentar una mutación incluyen al menos uno de los siguientes, o cualquier combinación de estos: W102, D270, R273, D286, D288, N384, D461, K463, W520, y L543, en comparación con a toxina de *C. difficile* tipo salvaje B, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2.

Los ejemplos de mutaciones en un dominio de glucosiltransferasa de TcdB incluyen al menos uno de los siguientes, o cualquier combinación de estos: W102A, D270A, D270N, R273A, D286A, D288A, N384A, D461A, D461R, K463A, K463E, W520A, y L543A, en comparación con una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje. En una forma de realización preferida, el dominio de glucosiltransferasa de la TcdB incluye a L543A, en comparación con una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje. En otra forma de realización preferida, el dominio de glucosiltransferasa de la TcdB incluye una Mutación D286A y una D288A, en comparación con una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje.

Alguna de las mutaciones que se describieron anteriormente en la presente se puede combinar con una mutación en un dominio de cisteína proteasa. En la presente invención, la toxina de *C. difficile* mutante incluye al menos una mutación en un dominio de cisteína proteasa, con respecto a la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje. Con preferencia, la mutación disminuye o anula la actividad de cisteína proteasa de la toxina, en comparación con la actividad de cisteína proteasa de la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje.

Los ejemplos de residuos de aminoácidos en un dominio de cisteína proteasa de la TcdA que pueden experimentar una mutación incluyen al menos uno de los siguientes, o cualquier combinación de estos: S543, D589, H655, y C700, en comparación con a TcdA de *C. difficile* tipo salvaje, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1. Los ejemplos de mutaciones en un dominio de glucosiltransferasa de la TcdA incluyen al menos uno de los siguientes, o cualquier combinación de estos: S543A, D589A, D589N, H655A, C700A, en comparación con a TcdA de *C. difficile* tipo salvaje. En una forma de realización preferida, el dominio de cisteína proteasa de la TcdA incluye una mutación C700A, en comparación con a TcdA de *C. difficile* tipo salvaje.

Los ejemplos de residuos de aminoácidos en un dominio de cisteína proteasa de la TcdB que pueden experimentar una mutación incluyen al menos uno de los siguientes, o cualquier combinación de estos: G544, D587, H653, y C698, en comparación con a TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2. Los ejemplos de mutaciones en un dominio de glucosiltransferasa de la TcdB incluyen al menos uno de los siguientes, o cualquier combinación de estos: G544A, D587A, D587N, H653A, C698A, en comparación con una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje. En una forma de realización preferida, el dominio de cisteína proteasa de TcdB incluye una mutación C698A, en comparación con una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje. Los residuos de aminoácidos adicionales en un dominio de cisteína proteasa de la TcdB que pueden experimentar una mutación incluyen: K600 y/o R751, en comparación con una TdcB tipo salvaje. Los ejemplos de mutaciones incluyen K600E y/o R751E.

Por consiguiente, la toxina de *C. difficile* mutante de la invención incluye un dominio de glucosiltransferasa que tiene una mutación y un dominio de cisteína proteasa que tiene una mutación, con respecto a la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje.

Un ejemplo de TcdA de *C. difficile* mutante incluye un dominio de glucosiltransferasa que incluye la SEQ ID NO: 29 que tiene una sustitución de aminoácidos de las posiciones 285 y 287, y un dominio de cisteína proteasa que comprende la SEQ ID NO: 32 que tiene una sustitución de aminoácidos de la posición 158, con respecto a la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje A. Por ejemplo, tal TcdA de *C. difficile* mutante incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, donde la metionina inicial opcionalmente no está presente. En otra forma de realización, la toxina A de *C. difficile* mutante de la invención incluye la

secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 84.

Otros ejemplos de una toxina A de *C. difficile* mutante incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7, que tiene una mutación D269A, R272A, D285A, D287A, E460A, R462A, y C700A, en comparación con la SEQ ID NO: 1, donde la metionina inicial opcionalmente no está presente. En otra forma de realización, la toxina A de *C. difficile* mutante de la invención incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 83.

Otro ejemplo de TcdA mutante incluye la SEQ ID NO: 34, donde el residuo de las posiciones 101, 269, 272, 285, 287, 460, 462, 541, 542, 543, 589, 655, y 700 puede ser cualquier aminoácido.

En algunas formas de realización, la toxina de *C. difficile* mutante exhibe procesamiento autoproteolítico disminuido o anulado en comparación con la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje. Por ejemplo, una TcdA de *C. difficile* mutante puede incluir una mutación en uno de los siguientes residuos, o cualquier combinación de estos: S541, L542 y/o S543, en comparación con la correspondiente TcdA de *C. difficile* tipo salvaje. Con preferencia, la TcdA de *C. difficile* mutante incluye al menos una de las siguientes mutaciones, o cualquier combinación de estos: S541A, L542G, y S543A, en comparación con la correspondiente TcdA de *C. difficile* tipo salvaje.

Otro ejemplo de TcdA de *C. difficile* mutante incluye una mutación S541A, L542, S543 y C700, en comparación con la correspondiente TcdA de *C. difficile* tipo salvaje.

Un ejemplo de toxina de *C. difficile* mutante B incluye un dominio de glucosiltransferasa que comprende la SEQ ID NO: 31 que tiene una sustitución de aminoácidos de las posiciones 286 y 288, y un dominio de cisteína proteasa que comprende la SEQ ID NO: 33 que tiene una sustitución de aminoácidos de la posición 155, con respecto a la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje B. Por ejemplo, tal mutante TcdB de *C. difficile* incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, donde la metionina inicial opcionalmente no está presente. En otra forma de realización, la toxina A de *C. difficile* mutante de la invención incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 86.

Otros ejemplos de una mutante TcdB de *C. difficile* incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8, que tiene una mutación D270A, R273A, D286A, D288A, D461A, K463A, y C698A, en comparación con la SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 8 donde la metionina inicial opcionalmente no está presente. En otra forma de

realización, la toxina A de *C. difficile* mutante de la invención incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 85.

Otro ejemplo de mutante TcdB incluye la SEQ ID NO: 35, donde el residuo de las posiciones 101, 269, 272, 285, 287, 460, 462, 541, 542, 543, 589, 655, y 700 puede ser cualquier aminoácido.

A modo de otro ejemplo, una mutante TcdB de *C. difficile* puede incluir una mutación de las posiciones 543 y/o 544, en comparación con la correspondiente TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje. Con preferencia, la TcdB de *C. difficile* mutante incluye una mutación L543 y/o G544, en comparación con la correspondiente TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje. Con más preferencia, la TcdB de *C. difficile* mutante incluye una mutación L543G y/o G544A, en comparación con la correspondiente TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje.

Otro ejemplo de mutante TcdB de *C. difficile* incluye una mutación L543G, G544A y C698 en comparación con la correspondiente TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje.

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene una mutación en cualquier posición del residuo de aminoácido 1 a 1500 de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2, para definir un ejemplo de toxina de *C. difficile* mutante B. Por ejemplo, en una forma de realización, el polipéptido aislado incluye una mutación entre los residuos de aminoácidos 830 y 990 de la SEQ ID NO: 2. Los ejemplos de posiciones para las mutaciones incluyen las posiciones 970 y 976 de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2. Con preferencia, la mutación entre los residuos 830 y 990 es una sustitución. En una forma de realización, la mutación es una sustitución no conservadora donde un residuo de aminoácido Asp (D) y/o Glu (E) se reemplazan con un residuo de aminoácido que no está neutralizado después de la acidificación, tales como, por ejemplo, lisina (K), arginina (R), e histidina (H). Los ejemplos de mutaciones incluyen: E970K, E970R, E970H, E976K, E976R, E976H de la SEQ ID NO: 2, para definir una toxina de *C. difficile* mutante B.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene una mutación en cualquier posición del residuo de aminoácido 1 a 1500 de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1, para definir un ejemplo de toxina A de *C. difficile* mutante. Por ejemplo, en una forma de realización, el polipéptido aislado incluye una mutación entre los residuos de aminoácidos 832 y 992 de la SEQ ID NO: 1. Los ejemplos de posiciones para las mutaciones incluyen las posiciones 972 y 978 de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1. Con preferencia, la mutación entre los

residuos 832 y 992 es una sustitución. En una forma de realización, la mutación es una sustitución no conservadora donde un residuo de aminoácido Asp (D) y/o Glu (E) se reemplazan con un residuo de aminoácido que no está neutralizado después de la acidificación, tales como, por ejemplo, lisina (K), arginina (R), e histidina (H). Los ejemplos de mutaciones incluyen: D972K, D972R, D972H, D978K, D978R, D978H de la SEQ ID NO: 1, para definir una toxina A de *C. difficile* mutante.

Los polipéptidos de la invención pueden incluir un residuo de metionina inicial, en algunos casos como resultado de un proceso mediado por la célula huésped. De acuerdo con, por ejemplo, la célula huésped usada en un procedimiento de producción recombinante y/o condiciones de fermentación o cultivo de la célula huésped, se sabe en la técnica que la metionina N-terminal codificada por el codón de iniciación de traducción se puede eliminar de un polipéptido después de la traducción en las células o la metionina N-terminal puede permanecer presente en el polipéptido aislado.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, donde la metionina inicial (de la posición 1) opcionalmente no está presente. En una forma de realización, la metionina inicial de la SEQ ID NO: 4 está ausente. En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 84, que es idéntico a SEQ ID NO: 4, excepto por la ausencia de la metionina inicial.

En otro aspecto, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, donde la metionina inicial (de la posición 1) opcionalmente no está presente. En una forma de realización, la metionina inicial de la SEQ ID NO: 6 está ausente. En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 86, que es idéntico a SEQ ID NO: 6, excepto por la ausencia de la metionina inicial.

En un aspecto adicional, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7, donde la metionina inicial (de la posición 1) opcionalmente no está presente. En una forma de realización, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 83, que es idéntico a SEQ ID NO: 7, excepto por la ausencia de la metionina inicial. En aún otro aspecto, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8, donde la metionina inicial (de la posición 1) opcionalmente no está presente. En una forma de realización, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 85, que es idéntico a

SEQ ID NO: 8, excepto por la ausencia de la metionina inicial.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 4, donde la metionina inicial (de la posición 1) opcionalmente no está presente. En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6, donde la metionina inicial (de la posición 1) opcionalmente no está presente. En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 7, donde la metionina inicial (de la posición 1) opcionalmente no está presente. En aún otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 8, donde la metionina inicial (de la posición 1) opcionalmente no está presente.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 83. En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 84. En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 85. En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 86.

Además de generar una respuesta inmune en un mamífero, las composiciones inmunogénicas que se describen en la presente también tienen citotoxicidad reducida en comparación con la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje. Con preferencia, las composiciones inmunogénicas son seguras y tienen mínima (por ejemplo, aproximadamente una reducción de 6-8 log₁₀) a ninguna citotoxicidad, con respecto a la citotoxicidad de una respectiva toxina tipo salvaje, para administración en mamíferos.

Como se usa en la presente, el término citotoxicidad es un término conocido en la técnica y se refiere a la muerte celular apoptótica y/o un estado en que una o más funciones bioquímicas o biológicas usuales de una célula están comprometidas de modo aberrante, en comparación con una célula idéntica en condiciones idénticas pero en ausencia del agente citotóxico. La toxicidad se puede cuantificar, por ejemplo, en las células o en mamíferos como la cantidad de agente necesaria para inducir 50% de muerte celular (es decir, EC₅₀ o ED₅₀, respectivamente) o por métodos conocidos en la técnica.

Los ensayos para indicar citotoxicidad son conocidos en la técnica, tales como ensayos de redondeado celular (ver, por ejemplo, Kuehne et al. *Nature*. 2010 Oct 7;467(7316):711-3). La acción de TcdA y TcdB causa que las células se redondeen (por ejemplo, pierden morfología) y mueran, tal fenómeno es visible por microscopía óptica. Ver, por ejemplo, Figura 9.

Los ejemplos de ensayo de citotoxicidad adicionales conocidos en la técnica incluyen ensayo de glucosilación relacionado con los ensayos de fósforo para visualización de imágenes de Ras marcado con [^{14}C]glucosa (descritos en Busch et al., J Biol Chem. 1998 Jul 31;273(31):19566-72), y con preferencia el ensayo de citotoxicidad in vitro descrito en los siguientes Ejemplos donde la EC_{50} puede referirse a una concentración de una composición inmunogénica que exhibe al menos aproximadamente 50% del efecto citopatogénico (CPE) en una célula, con preferencia una célula de fibroblastos diploide humana (por ejemplo, célula IMR90 (ATCC CCL-186TM), en comparación con una célula idéntica en condiciones idénticas en ausencia de la toxina. El ensayo de citotoxicidad in vitro también se puede usar para evaluar la concentración de una composición que inhibe al menos aproximadamente 50% de un efecto citopatogénico inducido por C. difficile tipo salvaje (CPE) en una célula, con preferencia una célula de fibroblastos diploide humana (por ejemplo, célula IMR90 (ATCC CCL-186TM), en comparación con una célula idéntica en condiciones idénticas en ausencia de la toxina. Los ejemplos de ensayos de citotoxicidad adicionales incluyen los descritos en Doern et al., J Clin Microbiol. 1992 Aug;30(8):2042-6. La citotoxicidad también se puede determinar por la medición de los niveles de ATP en células tratadas con toxina. Por ejemplo, se puede usar un sustrato basado en luciferasa tal como CELLTITERGLO® (Promega), que emite luminiscencia medida como una unidad luminosa relativa (RLU). En tal ensayo, la viabilidad celular puede ser directamente proporcional a la cantidad de ATP en las células o los valores de RLU.

En una forma de realización, la citotoxicidad de la composición inmunogénica se reduce en al menos aproximadamente 1000, 2000, 3000, 4000, 5000-, 6000-, 7000-, 8000-, 9000-, 10000-, 11000-, 12000-, 13000 veces, 14000 veces, 15000 veces, o más, en comparación con la correspondiente toxina de C. difficile tipo salvaje. Ver, por ejemplo, Tabla 20.

En otra forma de realización, la citotoxicidad de la composición inmunogénica se reduce en al menos aproximadamente 2-log_{10} , con más preferencia en aproximadamente 3-log_{10} , y con máxima preferencia en aproximadamente 4-log_{10} o más, con respecto a la correspondiente toxina tipo salvaje en condiciones idénticas. Por ejemplo, una TcdB de C. difficile mutante puede tener un valor de EC_{50} de aproximadamente 10^{-9} g/ml medido en un ensayo de efecto citopático estándar (CPE), en comparación con un ejemplo de TcdB de C. difficile de tipo salvaje que puede tener un valor de EC_{50} de al menos aproximadamente 10^{-12} g/ml. Ver, por ejemplo, Tablas

7A, 7B, 8A y 8B en la siguiente sección de Ejemplos.

En otra forma de realización más, la citotoxicidad de la toxina de *C. difficile* mutante tiene una EC_{50} de al menos aproximadamente 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 600 µg/ml, 700 µg/ml, 800 µg/ml, 900 µg/ml, 1000 µg/ml o mayor, medida por ejemplo, por un ensayo de citotoxicidad in vitro, tal como uno que se describe en la presente. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, las composiciones inmunogénicas y toxinas mutantes son biológicamente seguras para la administración a los mamíferos.

Sin estar ligado por mecanismo o teoría, se esperó que una TcdA que tiene una mutación D285 y D287, en comparación con una TdcA tipo salvaje, y una TcdB que tiene una mutación D286 y a D288 en comparación con una TdcB tipo salvaje, sea deficientes en cuanto a la actividad de glicosiltransferasa y en consecuencia deficientes en la inducción de un efecto citopático. Además, se esperó que una toxina que tiene una mutación en el motivo DHC sea deficiente para el procesamiento autoacatalítico, y en consecuencia sin ningún efecto citotóxico.

Sin embargo, los inventores descubrieron de modo sorprendente, entre otras cosas, que el ejemplo de TcdA mutante que tiene la SEQ ID NO: 4 y el ejemplo de mutante TcdB que tiene la SEQ ID NO: 6 inesperadamente exhibieron citotoxicidad (aunque significativamente reducida respecto de las toxinas de *C. difficile* 630 tipo salvaje) a pesar de exhibir actividad de glucosiltransferasa disfuncional y actividad de cisteína proteasa disfuncional. Sin estar ligado por mecanismo o teoría, se consideran que las toxinas mutantes producen citotoxicidad a través de un mecanismo nuevo. No obstante, el ejemplo de TcdA mutante que tiene la SEQ ID NO: 4 y el ejemplo de la TcdB mutante que tiene la SEQ ID NO: 6 fueron sorprendentemente inmunogénicas. Ver Ejemplos siguientes.

Si bien el entrecruzamiento químico de una toxina tipo salvaje tiene potencial para fracasar en la inactivación de la toxina, los inventores también descubrieron que el entrecruzamiento químico de al menos un aminoácido de una toxina mutante también redujo la citotoxicidad de la toxina mutante, con respecto a una toxina mutante idéntica que carece de entrecruzamientos químicos, y con respecto a la correspondiente a la toxina tipo salvaje. Con preferencia, la toxina mutante se purifica antes del contacto con el agente de entrecruzamiento químico.

Además, a pesar del potencial de los agentes de entrecruzamiento químico de alterar los epitopes útiles, los inventores descubrieron de modo sorprendente que una toxina modificada genéticamente de *C. difficile* mutante que tiene al menos un

aminoácido entrecruzado químicamente produjo composiciones inmunogénicas que indujeron múltiples anticuerpos neutralizantes o fragmentos de unión de estos. Por consiguiente, los epitopes asociados con las moléculas de anticuerpo neutralizante fueron inesperadamente retenidos después del entrecruzamiento químico.

El entrecruzamiento (también denominado como “inactivación química” o “inactivación” en la presente) es un proceso de unión química de dos o más moléculas por un enlace covalente. Los términos “reactivos de entrecruzamiento,” “agentes de entrecruzamiento” y “entrecruzadores” se refieren a moléculas que son capaces de reaccionar con y/o fijar químicamente a grupos funcionales específicos (aminas primarias, sulfhidrilos, carboxilos, carbonilos, etc) en péptidos, polipéptidos, y/o proteínas. En una forma de realización, la molécula puede contener dos o más extremos reactivos que son capaces de reaccionar con y/o fijar químicamente a grupos funcionales específicos (aminas primarias, sulfhidrilos, carboxilos, carbonilos, etc.) en péptidos, polipéptidos, y/o proteínas. Con preferencia, el agente de entrecruzamiento químico es soluble en agua. En otra forma de realización preferida, el agente de entrecruzamiento químico es un agente de entrecruzamiento heterobifuncional. En otra forma de realización, el agente de entrecruzamiento químico no es un agente de entrecruzamiento bifuncional. Los agentes de entrecruzamiento químico son conocidos en la técnica.

En una forma de realización preferida, el agente de entrecruzamiento es un agente de entrecruzamiento de longitud cero. Un agente de entrecruzamiento de “longitud cero” se refiere a un agente de entrecruzamiento que mediará o producirá un entrecruzamiento directo entre los grupos funcionales de dos moléculas. Por ejemplo, en el entrecruzamiento de dos polipéptidos, un agente de entrecruzamiento de longitud cero producirá la formación de un puente, o un entrecruzamiento entre un grupo carboxilo de una cadena lateral de aminoácidos de un polipéptido, y un grupo amino de otro polipéptido, sin integrar la materia intrínseca. Los agentes de entrecruzamiento de longitud cero pueden catalizar, por ejemplo, la formación de uniones éster entre restos hidroxilo y carboxilo y/o la formación de enlaces amida entre los restos carboxilo y amino primario.

Los ejemplos de agentes de entrecruzamiento químico adecuados incluyen formaldehído; formalina; acetaldehído; propionaldehído; carbodiimidas hidrosolubles ($RN=C=NR'$), que incluyen 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)-Carbodiimida (EDC), clorhidrato de 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)-Carbodiimida, meto-p-toluensulfonato de 1-Ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida (CMC), N,N'-diciclohexilcarbodiimida

(DCC), y N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), y sus derivados; y N-hidroxisuccinimida (NHS); fenilgloxal; y/o UDP-dialdehído.

Con preferencia, el agente de entrecruzamiento es EDC. Cuando un polipéptido de la toxina de *C. difficile* mutante está modificado químicamente por EDC (por ejemplo por el contacto del polipéptido con EDC), en una forma de realización, el polipéptido incluye **(a)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido. En una forma de realización, el polipéptido incluye **(b)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido. En una forma de realización, el polipéptido incluye **(c)** al menos un entrecruzamiento entre el grupo carboxilo del extremo C-terminal del polipéptido y el grupo amino del extremo N-terminal del polipéptido. En una forma de realización, el polipéptido incluye **(d)** al menos un entrecruzamiento entre el grupo carboxilo en el extremo C-terminal del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido. En una forma de realización, el polipéptido incluye **(e)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina de un segundo polipéptido aislado. En una forma de realización, el polipéptido incluye **(f)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina de un segundo polipéptido aislado. En una forma de realización, el polipéptido incluye **(g)** al menos un entrecruzamiento entre el grupo carboxilo en el extremo C-terminal del polipéptido y el grupo amino del extremo N-terminal a segundo polipéptido aislado. En una forma de realización, el polipéptido incluye **(h)** al menos un entrecruzamiento entre el grupo carboxilo en el extremo C-terminal del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina de un segundo polipéptido aislado. Ver, por ejemplo, Figura 24 y Figura 25.

El “segundo polipéptido aislado” se refiere a cualquier polipéptido aislado que está presente durante la reacción con EDC. En una forma de realización, el segundo polipéptido aislado es una polipéptido de la toxina de *C. difficile* mutante que tiene una secuencia idéntica al primer polipéptido aislado. En otra forma de realización, el segundo polipéptido aislado es un polipéptido de la toxina de *C. difficile* mutante que tiene una secuencia diferente del primer polipéptido aislado.

En una forma de realización, el polipéptido incluye al menos dos modificaciones seleccionadas de las modificaciones (a)-(d). En un ejemplo de forma de realización, el

polipéptido incluye **(a)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido y **(b)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido. En una forma de realización adicional, el polipéptido incluye al menos tres modificaciones seleccionadas de las modificaciones (a)-(d). En otra forma de realización adicional, el polipéptido incluye las modificaciones (a), (b), (c), y (d).

Cuando más de un polipéptido mutante está presente durante la modificación química con el EDC, en una forma de realización, la composición resultante incluye al menos una de cualquiera de las modificaciones (a)-(h). En una forma de realización, la composición incluye al menos dos modificaciones seleccionadas de las modificaciones (a)-(h). En una forma de realización adicional, la composición incluye al menos tres modificaciones seleccionadas de las modificaciones (a)-(h). En otra forma de realización adicional, la composición incluye al menos cuatro modificaciones seleccionadas de las modificaciones (a)-(h). En otra forma de realización, la composición incluye al menos una de cada una las modificaciones (a)-(h).

En un ejemplo de forma de realización, la composición resultante incluye **(a)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido; y **(b)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido. En una forma de realización, la composición también incluye **(c)** al menos un entrecruzamiento entre el grupo carboxilo del extremo C-terminal del polipéptido y el grupo amino del extremo N-terminal del polipéptido; y **(d)** al menos un entrecruzamiento entre el grupo carboxilo en el extremo C-terminal del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido.

En otro ejemplo de forma de realización, la composición resultante incluye **(e)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina de un segundo polipéptido aislado; **(f)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina de un segundo polipéptido aislado; **(g)** al menos un entrecruzamiento entre el grupo carboxilo en el extremo C-terminal del polipéptido y el grupo amino del extremo N-terminal al segundo polipéptido aislado; y **(h)** al menos un entrecruzamiento entre el grupo carboxilo en el extremo C-terminal del polipéptido y una cadena lateral de un

residuo de lisina de un segundo polipéptido aislado.

En un ejemplo de forma de realización adicional, la composición resultante incluye **(a)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido; **(b)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido; **(e)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina de un segundo polipéptido aislado; y **(f)** al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina de un segundo polipéptido aislado.

En una forma de realización preferida, el agente de entrecruzamiento químico incluye formaldehído, con más preferencia, un agente que incluye formaldehído en ausencia de lisina. Se puede usar glicina u otro compuesto apropiado con una amina primaria como el inactivador de las reacciones de entrecruzamiento. Por consiguiente, en otra forma de realización preferida, el agente químico incluye formaldehído y uso de glicina.

En otra forma de realización preferida más, el agente de entrecruzamiento químico incluye EDC y NHS. Tal como es conocido en la técnica, se puede incluir NHS en los protocolos de acoplamiento de EDC. Sin embargo, los inventores descubrieron de modo sorprendente que NHS puede facilitar la posterior disminución de citotoxicidad de la toxina de *C. difficile* mutante, en comparación con la correspondiente toxina tipo salvaje, en comparación con una toxina mutada genéticamente, y en comparación con una toxina mutada genéticamente que se ha entrecruzado químicamente con EDC. Ver, por ejemplo, Ejemplo 22. Por consiguiente, sin estar ligado por mecanismo o teoría, una polipéptido mutante de la toxina que tiene un resto de beta-alanina ligado a una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido (por ejemplo, resultante de una reacción del polipéptido mutante de la toxina, EDC, y NHS) puede facilitar la posterior disminución de la citotoxicidad de la toxina mutante, en comparación con, por ejemplo, una toxina de *C. difficile* (tipo salvaje o mutante) donde un resto de beta-alanina está ausente.

El uso de EDC y/o NHS también puede incluir el uso de glicina u otro compuesto apropiado con una amina primaria como el inactivador. Cualquier compuesto que tiene una amina primaria se puede usar como un inactivador, tal como, por ejemplo metil éster de glicina y alanina. En una forma de realización preferida, el

compuesto inactivador es una amina primaria hidrofílica no polimérica. Los ejemplos de una amina primaria hidrofílica no polimérica incluyen, por ejemplo, amino azúcares, amino alcoholes, y amino polioles. Los ejemplos específicos de una amina primaria hidrofílica no polimérica incluyen glicina, etanolamina, glucamina, polietilenglicol funcionalizado con amina, y oligómeros de etilenglicol funcionalizado con amina.

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido de la toxina de *C. difficile* mutante que tiene al menos una cadena lateral de aminoácidos modificada químicamente por EDC y una amina primaria hidrofílica no polimérica, con preferencia glicina. Los aductos de glicina resultantes (por ejemplo, de una reacción de toxinas triple mutantes tratadas con EDC, NHS, e inactivadas con glicina) pueden facilitar la disminución de citotoxicidad de las toxinas A mutantes en comparación con la correspondiente toxina tipo salvaje.

En una forma de realización, cuando un polipéptido de la toxina de *C. difficile* mutante se modifica químicamente por EDC y glicina, el polipéptido incluye al menos una modificación cuando el polipéptido está modificado por EDC (por ejemplo, al menos una de cualquiera de las modificaciones (a)-(h) descritas antes), y al menos una de las siguientes modificaciones ejemplificativas: **(i)** un resto de glicina ligado al grupo carboxilo en el extremo C-terminal del polipéptido; **(j)** un resto de glicina ligado a una cadena lateral de al menos un residuo de ácido aspártico del polipéptido; y **(k)** un resto de glicina ligado a una cadena lateral de al menos un residuo de ácido glutámico del polipéptido. Ver, por ejemplo, Figura 24 y Figura 25.

En una forma de realización, al menos un aminoácido de la TcdA de *C. difficile* mutante está entrecruzado químicamente y/o al menos un aminoácido de la TcdB de *C. difficile* mutante está entrecruzado químicamente. En otra forma de realización, al menos un aminoácido de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, y/o SEQ ID NO: 8 está entrecruzado químicamente. Por ejemplo, el al menos un aminoácido puede estar entrecruzado químicamente con un agente que incluye una carbodiimida, tal como EDC. Las carbodiimidias pueden formar un enlace covalente entre carboxilo libre (por ejemplo, de las cadenas laterales de ácido aspártico y/o ácido glutámico) y grupos amino (por ejemplo, en la cadena lateral de los residuos de lisina) para formar enlaces amida estables.

A modo de otro ejemplo, el al menos un aminoácido se puede entrecruzar químicamente con un agente que incluye NHS. Los agentes de entrecruzamiento activado de NHS pueden reaccionar con las aminas primarias (por ejemplo, en el extremo N-terminal cada cadena de polipéptido y/o en la cadena lateral de los residuos

de lisina) para producir un enlace amida.

En otra forma de realización, el al menos un aminoácido puede estar entrecruzado químicamente con un agente que incluye EDC y NHS. Por ejemplo, en una forma de realización, la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, donde el polipéptido incluye al menos una cadena lateral de aminoácidos modificada químicamente por EDC y NHS. En otra forma de realización, la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, donde el polipéptido incluye al menos una cadena lateral de aminoácidos modificada químicamente por EDC y NHS. En otra forma de realización más, la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8. El polipéptido se modifica por el contacto del polipéptido con EDC y NHS. Ver, por ejemplo, Figura 24 y Figura 25.

Cuando un polipéptido de la toxina de *C. difficile* mutante está modificado químicamente por (por ejemplo, por el contacto) EDC y NHS, en una forma de realización, el polipéptido incluye al menos una modificación cuando el polipéptido está modificado por EDC (por ejemplo, al menos una de cualquiera de las modificaciones (a)-(h) descritas anteriormente), y **(l)** un resto de beta-alanina ligado a una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido.

En otro aspecto, la invención se refiere un polipéptido de la toxina de *C. difficile* mutante donde el polipéptido incluye al menos una cadena lateral de aminoácidos modificada químicamente por EDC, NHS, y una amina primaria hidrofílica no polimérica, con preferencia glicina. En una forma de realización, el polipéptido incluye al menos una modificación cuando el polipéptido está modificado por EDC (por ejemplo, al menos una de cualquiera de las modificaciones (a)-(h) descritas anteriormente), al menos una modificación cuando el polipéptido está modificado por glicina (por ejemplo, al menos una de cualquiera de las modificaciones (i)-(k) descritas anteriormente), y **(l)** un resto de beta-alanina ligado a una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido. Ver, por ejemplo, Figura 24 y Figura 25.

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido de la toxina de *C. difficile* mutante, donde una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido está ligado a un resto de beta-alanina. En una forma de realización, una

cadena lateral de un segundo residuo de lisina del polipéptido está ligada a una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico y/o a una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico. El “segundo” residuo de lisina del polipéptido incluye un residuo de lisina del polipéptido que no está ligado a un resto de beta-alanina. La cadena lateral de un ácido aspártico y/o la cadena lateral de un ácido glutámico al que está ligado el segundo residuo de lisina pueden ser el del polipéptido para formar un entrecruzamiento intra-molecular, o el de un segundo polipéptido para formar un entrecruzamiento inter-molecular. En otra forma de realización, una cadena lateral de al menos un residuo de ácido aspártico y/o una cadena lateral de al menos un residuo de ácido glutámico del polipéptido está ligada a un resto de glicina. El residuo de ácido aspártico y/o el residuo de ácido glutámico que está ligado a un resto de glicina tampoco están ligados a un residuo de lisina.

A modo de otro ejemplo más de un polipéptido entrecruzado químicamente de la toxina de *C. difficile* mutante, el al menos un aminoácido puede estar entrecruzado químicamente por un agente que incluye formaldehído. El formaldehído puede reaccionar con el grupo amino de un residuo de aminoácido N-terminal y las cadenas laterales de arginina, cisteína, histidina, y lisina. El formaldehído y glicina pueden formar un aducto de la base de Schiff, que puede unirse a los grupos amino N-terminal primarios, residuos de arginina, y tirosina, y en menor grado residuos de asparagina, glutamina, histidina, y triptofano.

Se dice que un agente de entrecruzamiento químico reduce la citotoxicidad de una toxina su la toxina tratada tiene menos toxicidad (por ejemplo, aproximadamente 100%, 99%, 95%, 90%, 80%, 75%, 60%, 50%, 25%, o 10% menos toxicidad) que la toxina no tratada en condiciones idénticas, medida, por ejemplo, por un ensayo de citotoxicidad in vitro, o por toxicidad animal.

Con preferencia, el agente de entrecruzamiento químico reduce la citotoxicidad de la toxina de *C. difficile* mutante en al menos aproximadamente una reducción de 2- $\log_{10}$, con más preferencia aproximadamente una reducción de 3- $\log_{10}$, y con máxima preferencia aproximadamente una reducción de 4- $\log_{10}$ o más, con respecto a la toxina mutante en condiciones idénticas pero en ausencia del agente de entrecruzamiento químico. En comparación con la toxina tipo salvaje, el agente de entrecruzamiento químico con preferencia reduce la citotoxicidad de la toxina B mutante y al menos aproximadamente una reducción de 5- $\log_{10}$, aproximadamente una reducción de 6- $\log_{10}$, aproximadamente una reducción de 7- $\log_{10}$, aproximadamente una reducción de 8- $\log_{10}$, o más.

En otra forma de realización preferida, la toxina de *C. difficile* mutante inactivada químicamente exhibe un valor de EC_{50} mayor de o al menos aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, 700 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$, 900 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ o mayor medido, por ejemplo, por un ensayo de citotoxicidad in vitro, tal como en el que se describe en la presente.

Las condiciones de reacción para poner en contacto la toxina mutante con el agente de entrecruzamiento químico están dentro del alcance de la habilidad de los expertos en la técnica, y las condiciones pueden variar de acuerdo con el agente usado. Sin embargo, los inventores descubrieron de modo sorprendente las condiciones de reacción óptimas para poner en contacto un polipéptido de la toxina de *C. difficile* mutante con un agente de entrecruzamiento químico, mientras que retiene los epitopes funcionales y disminuye la citotoxicidad de la toxina mutante, en comparación con la correspondiente toxina tipo salvaje.

Con preferencia, las condiciones de reacción se seleccionan para poner en contacto una toxina mutante con el agente de entrecruzamiento, donde la toxina mutante tiene una concentración mínima de aproximadamente 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0 mg/ml a una máxima de aproximadamente 3,0, 2,5, 2,0, 1,5, o 1,25 mg/ml. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un rango de concentraciones adecuadas de una toxina mutante para la reacción. Con máxima preferencia, la toxina mutante tiene una concentración de aproximadamente 1,0 – 1,25 mg/ml para la reacción.

En una forma de realización, el agente usado en la reacción tiene una concentración mínima de aproximadamente 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, o 50 mM, y una concentración máxima de aproximadamente 100 mM, 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, o 50 mM. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un rango de concentraciones adecuadas del agente químico para la reacción.

En una forma de realización preferida donde el agente incluye formaldehído, la concentración usada es con preferencia cualquier concentración entre aproximadamente 2 mM a 80 mM, con máxima preferencia aproximadamente 40 mM. En otra forma de realización preferida donde el agente incluye EDC, la concentración usada es con preferencia cualquier concentración entre aproximadamente 1,3 mM a aproximadamente 13 mM, con más preferencia aproximadamente 2 mM a 3 mM, con máxima preferencia aproximadamente 2,6 mM.

Los ejemplos de tiempos de reacción en los que la toxina mutante se pone en

contacto con el agente de entrecruzamiento químico incluyen un mínimo de aproximadamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 36, 48, o 60 horas, y un máximo de aproximadamente 14 días, 12 días, 10 días, 7 días, 5 días, 3 días, 2 días, 1 día, o 12 horas. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un rango de tiempos de reacción adecuados.

En una forma de realización preferida, la etapa de poner en contacto la toxina mutante con el agente de entrecruzamiento químico se produce durante un período de tiempo que es suficiente para reducir la citotoxicidad de la toxina de *C. difficile* mutante a un valor de EC_{50} de al menos aproximadamente 1000 $\mu\text{g/ml}$ en una célula humana adecuada, por ejemplo, células IMR-90, en un ensayo de citotoxicidad in vitro estándar, en comparación con una toxina mutante idéntica en ausencia del agente de entrecruzamiento. Con más preferencia, la etapa de reacción se realiza durante un tiempo que es al menos dos veces de duración y con máxima preferencia al menos tres veces de duración o más, que el período de tiempo suficiente para reducir la citotoxicidad de la toxina mutante a un valor de EC_{50} de al menos aproximadamente 1000 $\mu\text{g/ml}$ en una célula humana adecuada. En una forma de realización, el tiempo de reacción no excede aproximadamente 168 horas (o 7 días).

Por ejemplo, en una forma de realización donde el agente incluye formaldehído, la toxina mutante con preferencia se pone en contacto con el agente durante aproximadamente 12 horas, que se ha mostrado que es un ejemplo de período de tiempo suficiente para reducir la citotoxicidad de la toxina de *C. difficile* mutante a un valor de EC_{50} de al menos aproximadamente 1000 $\mu\text{g/ml}$ en una célula humana adecuada, por ejemplo, células IMR-90, en un ensayo de citotoxicidad estándar in vitro, en comparación con una toxina mutante idéntica en ausencia del agente de entrecruzamiento. En una forma de realización más preferida, la reacción se lleva a cabo durante aproximadamente 48 horas, que es al menos aproximadamente tres veces tan largo como un período de tiempo suficiente para la reacción. En tal forma de realización, el tiempo de reacción con preferencia no es mayor que aproximadamente 72 horas.

En otra forma de realización donde el agente incluye EDC, la toxina mutante con preferencia se pone en contacto con el agente durante aproximadamente 0,5 horas, con más preferencia al menos aproximadamente 1 hora, o con máxima preferencia aproximadamente 2 horas. En tal forma de realización, el tiempo de reacción con preferencia es no mayor de aproximadamente 6 horas.

Los ejemplos de pH en que la toxina mutante se pone en contacto con el

agente de entrecruzamiento químico incluye un mínimo de aproximadamente pH 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, o 7,5, y un máximo de aproximadamente pH 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, o 6,5. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un rango de pH adecuado. Con preferencia, la reacción ocurre a pH 6,5 a 7,5, con preferencia a pH 7,0.

Los ejemplos de temperaturas a las que la toxina mutante se pone en contacto con el agente de entrecruzamiento químico incluyen un mínimo de aproximadamente 2°C, 4°C, 10°C, 20°C, 25°C, o 37°C, y una temperatura máxima de aproximadamente 40°C, 37°C, 30°C, 27°C, 25°C, o 20°C. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un rango de temperatura de reacción adecuada. Con preferencia, la reacción ocurre a aproximadamente 20°C a 30°C, con máxima preferencia a aproximadamente 25°C.

Las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente pueden incluir una toxina de *C. difficile* mutante (A o B). Por consiguiente, las composiciones inmunogénicas pueden ocupar viales separados (por ejemplo, un vial separado para una composición que incluye la toxina A de *C. difficile* mutante y un vial separado para una composición que incluyen la toxina de *C. difficile* mutante B) en la preparación o el kit. Las composiciones inmunogénicas pueden estar destinadas al uso simultáneo, secuencial o separado.

En otra forma de realización, las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente pueden incluir las toxinas de *C. difficile* mutantes (A y B). Cualquier combinación de la toxina A de *C. difficile* mutante y toxina de *C. difficile* mutante B descritas se pueden combinar para una composición inmunogénica. Por consiguiente, las composiciones inmunogénicas se pueden combinar en un vial único (por ejemplo, un vial único que contiene una composición que incluye TcdA de *C. difficile* mutante y una composición que incluye TcdB de *C. difficile* mutante). Con preferencia, las composiciones inmunogénicas incluyen una TcdA de *C. difficile* mutante y una TcdB de *C. difficile* mutante.

En otra forma de realización, la composición inmunogénica incluye una toxina A de *C. difficile* mutante, que incluye la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7, y una toxina de *C. difficile* mutante B, que comprende la SEQ ID NO: 8, donde al menos un aminoácido de cada de las toxinas de *C. difficile* mutantes está entrecruzado químicamente.

En otra forma de realización, la composición inmunogénica incluye cualquier secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 84, y SEQ ID NO: 83, y

cualquier secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 86, y SEQ ID NO: 85. En otra forma de realización, la composición inmunogénica incluye la SEQ ID NO: 84 y una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 86. En otra forma de realización, la composición inmunogénica incluye la SEQ ID NO: 83 y una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 85. En otra forma de realización, la composición inmunogénica incluye la SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 86, y SEQ ID NO: 85.

Se considera que cualquiera de las composiciones de la invención, por ejemplo, las composiciones inmunogénicas que incluyen una toxina A mutante y/o toxina B mutante, se pueden combinar en diferentes relaciones o cantidades para el efecto terapéutico. Por ejemplo, la TcdA de *C. difficile* mutante y TcdB de *C. difficile* mutante pueden estar presentes en una composición inmunogénica en una relación en el rango de 0,1:10 a 10:0,1, A:B. En otra forma de realización, por ejemplo, la TcdB de *C. difficile* mutante y TcdA de *C. difficile* mutante pueden estar presentes en una composición inmunogénica en una relación en el rango de 0,1:10 a 10:0,1, B:A. En una forma de realización preferida, la relación es tal que la composición incluye una cantidad total mayor de una mutante TcdB que una cantidad total de la TcdA mutante.

En un aspecto, una composición inmunogénica es capaz de unirse a un anticuerpo neutralizante o fragmento de unión de este. Con preferencia, el anticuerpo neutralizante o fragmento de unión de este es uno que se describe en la presente más adelante. En un ejemplo de forma de realización, una composición inmunogénica es capaz de unirse a un anticuerpo anti-toxina A o fragmento de unión de este, donde el anticuerpo anti-toxina A o fragmento de unión de este incluye una cadena liviana variable que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y una cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37. Por ejemplo, la composición inmunogénica puede incluir una TcdA de *C. difficile* mutante, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 7. A modo de otro ejemplo, la composición inmunogénica puede incluir las SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 83.

En otro ejemplo de forma de realización, una composición inmunogénica es capaz de unirse a un anticuerpo anti-toxina B o fragmento de unión de este, donde el anticuerpo anti-toxina B o fragmento de unión de este incluye una cadena liviana variable de B8-26 y una cadena pesada variable de B8-26. Por ejemplo, la composición inmunogénica puede incluir una TcdB de *C. difficile* mutante, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 8. A modo de otro ejemplo, la composición inmunogénica puede incluir SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 85.

Célula recombinante

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula recombinante o su progenie. En una forma de realización, la célula o su progenie incluye un polinucleótido que codifica una TcdA de *C. difficile* mutante y/o una TcdB de *C. difficile* mutante.

En otra forma de realización, la célula recombinante o su progenie incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, con preferencia aproximadamente 98%, con más preferencia aproximadamente 99% o con máxima preferencia aproximadamente 100% de identidad con algunas de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8, cuando se alinean óptimamente, tales como por los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de brecha predeterminadas.

En otra forma de realización, la célula recombinante o su progenie incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, con preferencia aproximadamente 98%, con más preferencia aproximadamente 99% o con máxima preferencia aproximadamente 100% de identidad con algunas de las SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 83, o SEQ ID NO: 85, cuando se alinean óptimamente, tales como por los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de brecha predeterminadas.

En una forma de realización adicional, la célula recombinante o su progenie incluye secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, con preferencia aproximadamente 98%, con más preferencia aproximadamente 99% o con máxima preferencia aproximadamente 100% de identidad con algunas de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, o SEQ ID NO: 47, cuando se alinean óptimamente, tales como por los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de brecha predeterminadas.

La célula recombinante puede derivar de cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, un procariota o eucariota. Con preferencia, la célula recombinante deriva de cualquier célula es adecuada para expresar secuencias de ácidos nucleicos heterólogas mayores que aproximadamente 5000, 6000, con preferencia aproximadamente 7000, y con más preferencia aproximadamente 8000 nucleótidos o más. La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gramnegativa o grampositiva. En ejemplos de formas de

realización, la célula huésped procariótica carece de un polinucleótido endógeno que codifica una toxina y/o espora.

Las bacterias gramnegativas incluyen, pero sin limitación, *Campilobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, y *Ureaplasma*. Por ejemplo, la célula recombinante puede derivar de una célula de *Pseudomonas fluorescens*, como se describe en la publicación de la solicitud de Patente US 2010013762, párrafos [0201]-[0230], que se incorpora en la presente por referencia.

Las bacterias grampositivas incluyen, pero sin limitación, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Streptomyces*. Con preferencia, la célula deriva de una célula de *C. difficile*.

Los inventores identificaron cepas de *C. difficile* de tipo salvaje que carecen de un polinucleótido endógeno que codifica una toxina de *C. difficile*. Las cepas que carecen de los genes endógenos de la toxina A y B incluyen las siguientes cepas, que están disponibles a través de la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA): *C. difficile* 1351 (ATCC 43593™), *C. difficile* 3232 (ATCC BAA-1801™), *C. difficile* 7322 (ATCC 43601™), *C. difficile* 5036 (ATCC 43603™), *C. difficile* 4811 (ATCC 43602™), y *C. difficile* VPI 11186 (ATCC 700057™).

Por consiguiente, en una forma de realización, la célula de *C. difficile* recombinante deriva de una cepa que se describe en la presente. Con preferencia, la célula de *C. difficile* recombinante o su progenie deriva del grupo que consiste en *C. difficile* 1351, *C. difficile* 5036, y *C. difficile* VPI 11186. Con más preferencia, la célula de *C. difficile* recombinante o su progenie deriva de una célula de *C. difficile* VPI 11186.

En una forma de realización preferida, el gen de esporulación de la célula de *C. difficile* recombinante o su progenie está inactivado. Las esporas pueden ser infectivas, altamente resistentes y facilitar la persistencia del *C. difficile* en ambientes aeróbicos fuera del huésped. Las esporas también pueden contribuir a la supervivencia del *C. difficile* dentro del huésped durante la terapia antimicrobiana. Por consiguiente, una célula de *C. difficile* que carece de un gen de esporulación es útil para producir una composición inmunogénica segura para la administración a los mamíferos. Además, el uso de tales células facilita la seguridad durante la fabricación, por ejemplo, seguridad para proteger la instalación, productos futuros y personal.

Los ejemplos de los genes de esporulación para la inactivación dirigida

incluyen, entre otros *spo0A*, *spolIE*, σ^E , σ^G , y σ^K . Con preferencia, el gen *spo0A* está inactivado.

Los métodos de inactivar un gen de esporulación de *C. difficile* son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un gen de esporulación se puede inactivar por la inserción dirigida de un marcador seleccionable, tal como, un marcador de resistencia a antibióticos. Ver, por ejemplo, Heap et al., *J Microbiol Methods*. 2010 Jan;80(1):49-55; Heap et al., *J. Microbiol. Methods*, 2007 Sept; 70(3):452-464; y Underwood et al., *J Bacteriol*. 2009 Dec;191(23):7296-305. Ver también, por ejemplo, Minton et al., WO2007/148091, titulado, "DNA Molecules and Methods," incorporada en la presente por referencia en su totalidad en las páginas 33-66, o la correspondiente publicación US 20110124109 A1, párrafos [00137]-[0227].

Método de producir una toxina de *C. difficile* mutante

En un aspecto, la invención se refiere a un método de producir una toxina de *C. difficile* mutante. En una forma de realización, el método incluye cultivar cualquier célula recombinante o su progenie descrita anteriormente, en condiciones adecuadas para expresar un polipéptido.

En otra forma de realización, el método incluye cultivar una célula recombinante o su progenie en condiciones adecuadas para expresar un polinucleótido que codifica una toxina de *C. difficile* mutante, donde la célula incluye el polinucleótido que codifica la toxina de *C. difficile* mutante, y donde la mutante incluye un dominio de glucosiltransferasa que tiene al menos una mutación y un dominio de cisteína proteasa que tiene al menos una mutación, con respecto a la correspondiente toxina de *Clostridium difficile* de tipo salvaje. En una forma de realización, la célula carece de un polinucleótido endógeno que codifica una toxina.

En una forma de realización adicional, el método incluye cultivar una célula de *C. difficile* recombinante o su progenie en condiciones adecuadas para expresar un polinucleótido que codifica una toxina de *C. difficile* mutante, donde la célula incluye el polinucleótido que codifica la toxina de *C. difficile* mutante y la célula carece de un polinucleótido endógeno que codifica una toxina de *C. difficile*.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de producir una toxina de *C. difficile* mutante. El método incluye las etapas de: (a) poner en contacto una célula de *C. difficile* con una célula de *Escherichia coli* recombinante, donde la célula de *C. difficile* carece de un polinucleótido endógeno que codifica una toxina de *C. difficile* y la célula de *E. coli* incluye un polinucleótido que codifica una toxina de *C. difficile* mutante; (b) cultivar la célula de *C. difficile* y la célula de *E. coli* en condiciones

adecuadas para la transferencia del polinucleótido desde la célula de *E. coli* a la célula de *C. difficile*; (c) seleccionar la célula de *C. difficile* que comprende el polinucleótido que codifica la toxina de *C. difficile* mutante; (d) cultivar la célula de *C. difficile* de la etapa (c) en condiciones adecuadas para expresar el polinucleótido; y (e) aislar la toxina de *C. difficile* mutante.

En el método de la invención, la célula de *E. coli* recombinante incluye un polinucleótido heterólogo que codifica la toxina de *C. difficile* mutante, que se describe en la presente. El polinucleótido puede ser ADN o ARN. En un ejemplo de la forma de realización, el polinucleótido que codifica la toxina de *C. difficile* mutante está optimizado por codón por el uso del codón de *E. coli*. Los métodos para optimizar por codón un polinucleótido son conocidos en la técnica.

En una forma de realización, el polinucleótido incluye una secuencia de ácidos nucleicos que es menos de aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a un polinucleótido que codifica una TcdA de *C. difficile* mutante, que se describió anteriormente. Un ejemplo de polinucleótido que codifica una toxina A de *C. difficile* mutante incluye las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 44, y SEQ ID NO: 45.

En otra forma de realización, el polinucleótido incluye una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a un polinucleótido que codifica una TcdB de *C. difficile* mutante, como se describió anteriormente. Un ejemplo de polinucleótido que codifica una toxina de *C. difficile* mutante B incluye la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 46, y SEQ ID NO: 47. En otra forma de realización, el polinucleótido codifica la SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, o SEQ ID NO: 86.

En una forma de realización, la célula de *E. coli* que incluye el polinucleótido heterólogo es una célula de *E. coli* que aloja en forma estable el polinucleótido heterólogo, que codifica la toxina de *C. difficile* mutante. Los ejemplos de células de *E. coli* incluyen una célula seleccionada del grupo que consiste en células competentes de *E. coli* MAX Efficiency® Stbl2™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), One Shot® Stbl3™ Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA), células competentes de *E. coli* ElectroMAX™ Stbl4™ (Invitrogen), y *E. coli* CA434. En una forma de realización preferida, la célula huésped de clonación de *E. coli* no es DH5α. Con más preferencia, la célula huésped de clonación de *E. coli* es una célula competente de *E. coli* MAX

Efficiency® Stbl2™.

El método de la invención además incluye una etapa de cultivar la célula de *C. difficile* y la célula de *E. coli* en condiciones adecuadas para la transferencia del polinucleótido desde la célula de *E. coli* a la célula de *C. difficile*, lo que produce una célula de *C. difficile* recombinante. En una forma de realización preferida, las condiciones de cultivo son adecuadas para la transferencia del polinucleótido desde la célula de *E. coli* (la célula dadora) en la célula de *C. difficile* (la célula receptora), y que produce una herencia genéticamente estable.

Con máxima preferencia, las condiciones de cultivo son adecuadas para la conjugación bacteriana, que son conocidas en la técnica. La “conjugación” se refiere a un proceso particular de transferencia de un polinucleótido en que se produce la transferencia unidireccional de un polinucleótido (por ejemplo, de un plásmido bacteriano) desde una célula bacteriana (es decir, la “dadora”) a otra (es decir, la “receptora”). El proceso de conjugación involucra el contacto célula dadora a célula receptora. Con preferencia, la célula de *E. coli* dadora es una célula *E. coli* CA434.

Los ejemplos de condiciones (conjugación) adecuadas para la transferencia del polinucleótido de la célula de *E. coli* a la célula de *C. difficile* incluyen cultivos líquidos de crecimiento de *C. difficile* en caldo de infusión de corazón y cerebro (BHI; Oxoide) o caldo anaeróbico Schaedlers (SAB; Oxoid). En otra forma de realización, los cultivos de *C. difficile* sólidos se pueden cultivar en agar sangre fresco (FBA) o agar BHI. Con preferencia, el *C. difficile* se cultiva a 37°C en un ambiente anaeróbico (por ejemplo, 80% de N₂, 10% de CO₂, y 10% de H₂ [vol/vol]). En una forma de realización, la condición adecuada incluye cultivar la *E. coli* en forma aeróbica en caldo de Luria-Bertani (LB) o en caldo LB a 37°C. Para la transferencia de conjugación al *C. difficile*, un ejemplo de condición adecuada incluye cultivar *E. coli* en forma anaeróbica en FBA. Los antibióticos se pueden incluir los medios líquidos y sólidos como es conocido en la técnica. Los ejemplos de tales antibióticos incluyen cicloserina (250 µg/ml), cefoxitina (8 µg/ml), cloramfenicol (12,5 µg/ml), tiamfenicol (15 µg/ml), y eritromicina (5 µg/ml).

El método de la invención incluye adicionalmente una etapa de seleccionar la célula de *C. difficile* recombinante resultante que incluye el polinucleótido que codifica la toxina de *C. difficile* mutante. En un ejemplo de forma de realización, la célula de *C. difficile* recombinante es receptora del polinucleótido que codifica la toxina de *C. difficile* mutante de la célula de *E. coli* recombinante por medio de conjugación.

El método de la invención incluye una etapa de cultivar la célula recombinante o su progenie en condiciones adecuadas para expresar el polinucleótido que codifica

la toxina de *C. difficile* mutante, lo que origina la producción de una toxina de *C. difficile* mutante. Las condiciones adecuadas para que una célula recombinante exprese el polinucleótido incluyen las condiciones de cultivo adecuadas para cultivar una célula de *C. difficile*, que son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las condiciones adecuadas pueden incluir cultivar los transformantes de *C. difficile* en caldo de infusión de corazón y cerebro (BHI; Oxoid) o caldo anaeróbico de Schaedlers (SAB; Oxoid). En otra forma de realización, los cultivos sólidos de *C. difficile* se pueden cultivar en agar FBA o BHI. Con preferencia, el *C. difficile* se cultiva a 37°C en un ambiente anaeróbico (por ejemplo, 80% de N₂, 10% de CO₂, y 10% de H₂ [vol/vol]).

En una forma de realización, el método de la invención incluye una etapa de aislar la toxina de *C. difficile* mutante resultante. Los métodos de aislar una proteína de *C. difficile* son conocidos en la técnica.

En otra forma de realización, el método incluye una etapa de purificar la toxina de *C. difficile* mutante resultante. Los métodos de purificar un polipéptido, tal como cromatografía, son conocidos en la técnica.

En un ejemplo de forma de realización, el método también incluye una etapa de poner en contacto la toxina de *Clostridium* mutante aislada con un agente de entrecruzamiento químico descrito anteriormente. Con preferencia, el agente incluye formaldehído, etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, o una combinación de EDC y NHS. Los ejemplos de condiciones de reacción se describieron anteriormente y la siguiente sección de Ejemplos.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye una toxina de *C. difficile* mutante que se describe en la presente, producida por cualquier método, con preferencia por alguno de los métodos descritos antes.

Anticuerpos

De modo sorprendente, las composiciones inmunogénicas de la invención descritas anteriormente indujeron nuevos anticuerpos *in vivo*, lo que sugiere que las composiciones inmunogénicas incluyen una estructura nativa conservada (por ejemplo, un epítopo antigénico preservado) de la respectiva toxina *C. difficile* tipo salvaje y que las composiciones inmunogénicas incluyen un epítopo. Los anticuerpos producidos contra una toxina de una cepa de *C. difficile* pueden ser capaces de unirse a una correspondiente toxina producida por otra cepa de *C. difficile*. Es decir, los anticuerpos y fragmentos de unión a estos pueden tener “reactividad cruzada” que se refiere a la capacidad de reaccionar con sitios antigénicos similares en las toxinas producidas de múltiples cepas de *C. difficile*. La reactividad cruzada también incluye la

capacidad de un anticuerpo para reaccionar con o unirse a un antígeno que no estimuló su producción, es decir, la reacción entre un antígeno y un anticuerpo que se generó contra un antígeno diferente pero similar.

En un aspecto, los inventores descubrieron de modo sorprendente anticuerpos monoclonales que tienen un efecto neutralizante sobre las toxinas de *C. difficile*, y los métodos de producir los mismos. Los anticuerpos de la invención pueden neutralizar la citotoxicidad de la toxina de *C. difficile* *in vitro*, inhibir la unión de la toxina de *C. difficile* a las células de mamífero, y/o puede neutralizar la enterotoxicidad de la toxina de *C. difficile* *in vivo*. La presente invención también se refiere a los polinucleótidos aislados que incluyen secuencias de ácidos nucleicos que codifica alguna de las anteriores. Además, la presente invención se refiere al uso de las composiciones precedentes para tratar, prevenir, disminuir el riesgo de, disminuir la gravedad de, disminuir las apariciones de, y/o retrasar el comienzo de una infección con enfermedad. síndrome, afección, síntoma asociado a *C. difficile*, y/o complicación de estos en un mamífero, en comparación con un mamífero al que no se administra la composición, así como los métodos para preparar dichas composiciones.

Los inventores también descubrieron que una combinación de al menos dos de los anticuerpos monoclonales neutralizantes puede exhibir un inesperado efecto sinérgico en la respectiva neutralización de TcdA o TcdB. Los anticuerpos anti-toxina o fragmentos de unión de estos pueden ser útiles en la inhibición de una infección con *C. difficile*.

Un “anticuerpo” es una proteína que incluye al menos una o dos regiones variables de cadena pesada (H) (abreviadas en la presente como VH), y al menos una o dos regiones variables de cadena liviana (L) (abreviada en la presente como VL). Las regiones VH y VL también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas “regiones determinantes de complementariedad” (“CDR”), intercaladas con las regiones que están más conservadas, denominadas “regiones estructurales” (FR). La extensión de la región estructural y las CDR ha sido definida con precisión (ver, Kabat, E. A., et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publicación No. 91-3242, 1991, y Chothia, C. et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987). El término “anticuerpo” incluye inmunoglobulinas intactas de los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como sus subtipos), donde las cadenas livianas de la inmunoglobulina pueden ser de los tipos kappa o lambda.

Las moléculas de anticuerpo pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un

anticuerpo IgG1 o IgG4). Los anticuerpos pueden ser de diversos isotipos, que incluyen IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD, o IgE. En una forma de realización preferida, el anticuerpo es un isotipo IgG, por ejemplo, IgG1. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo IgE.

En otra forma de realización, la molécula de anticuerpo incluye un “fragmento de unión al antígeno” o “fragmento de unión” como se usa en la presente, que se refiere a una porción de un anticuerpo que se une específicamente a una toxina de *C. difficile* (por ejemplo, toxina A). El fragmento de unión es, por ejemplo, una molécula en que una o más cadenas de inmunoglobulina no es de longitud completa, pero que se une específicamente a una toxina.

Los ejemplos de porciones de unión abarcadas dentro del término “fragmento de unión” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento de Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de una rama simple de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989), que consiste en un dominio VHn; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR) que tiene estructura suficiente para unir específicamente, por ejemplo, una porción de unión del antígeno de una región variable.

Un fragmento de unión de una región variable de la cadena liviana y un fragmento de unión de una región variable de la cadena pesada, por ejemplo, los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se pueden unir, usando métodos recombinantes, con un ligador sintético que les permite formarse como una cadena de proteína simple en que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); ver por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena simple también están comprendidos dentro del término “fragmento de unión” de un anticuerpo. Estas porciones del anticuerpo se obtienen usando técnicas conocidas en la materia y las porciones se seleccionan por utilidad de la misma manera que en los anticuerpos intactos.

Como se usa en la presente, un anticuerpo que se “se une específicamente” a o es “específico” para un polipéptido particular o un epítopo de un polipéptido particular es un anticuerpo que se une a este polipéptido particular o epítopo de un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítopo de polipéptido.

Por ejemplo, cuando se refiere a una biomolécula (por ejemplo, proteína, ácido nucleico, anticuerpo, etc.) que “se une específicamente” a un blanco, la biomolécula se une a su molécula blanco y no se une a una cantidad significativa a otras moléculas en una población heterogénea de moléculas que incluyen el blanco, medido en las condiciones designadas (por ejemplo, condiciones de inmunoensayo en el caso de un anticuerpo). La reacción de unión entre el anticuerpo y su blanco es determinante de la presencia del blanco en la población heterogénea de moléculas. Por ejemplo, “unión específica” o “se une específicamente” se refiere a la capacidad de un anticuerpo o fragmento de unión de este para unirse a una toxina de *C. difficile* tipo salvaje y/o mutante con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno no específico.

En un ejemplo de forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico se puede producir por técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia. Por ejemplo, un gene que codifica la región constante de Fc de una molécula de anticuerpo monoclonal murino (u otra especie) se puede digerir con enzimas de restricción para eliminar la región que codifica la Fc murina, y se sustituye la porción equivalente de un gen que codifica una región constante Fc humana. Un anticuerpo quimérico también se puede crear por técnicas de ADN recombinante donde el ADN que codifica las regiones variables murinas se puede ligar al ADN que codifica las regiones constantes humanas.

En otro ejemplo de forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este se humaniza por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una vez que se obtienen los anticuerpos murinos, una CDR del anticuerpo se puede reemplazar con al menos una porción de una CDR humana. Los anticuerpos humanizados también se pueden generar por el reemplazo de secuencias de la región variable Fv murina que no están directamente involucradas en la unión del antígeno con secuencias equivalentes de las regiones variables Fv humanas. Los métodos generales para generar anticuerpos humanizados son conocidos en la técnica.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales dirigidos a TcdA de *C. difficile* o TcdB de *C. difficile* también se pueden producir por técnicas estándares, tales como una técnica de hibridoma (ver, por ejemplo, Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495-497). En breves palabras, una línea celular inmortal se fusiona a un linfocito de un mamífero inmunizado con TcdA de *C. difficile*, TcdB de *C. difficile*, o una toxina de *C. difficile* mutante que se describen en la presente, y los sobrenadantes del cultivo de las células de hibridoma resultantes se analizan para identificar un hibridoma productor

de un anticuerpo monoclonal que se une a TcdA de *C. difficile* o TcdB de *C. difficile*. Normalmente, la línea de células inmortalizadas se deriva de la misma especie que los linfocitos. Las células del hibridoma productoras de un anticuerpo monoclonal de la invención se detectan por el análisis de los sobrenadantes del cultivo del hibridoma para los anticuerpos que unen TcdA de *C. difficile* o TcdB de *C. difficile* usando un ensayo, tal como ELISA. Los hibridomas humanos se pueden preparar de una manera similar.

A modo de una alternativa para producir anticuerpos por inmunización y selección, los anticuerpos de la invención también se pueden identificar por el análisis de una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante con una TcdA de *C. difficile*, TcdB de *C. difficile*, o a toxina de *C. difficile* mutante que se describen en la presente. La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser, por ejemplo, una biblioteca de scFv o una biblioteca de Fab. Además, los anticuerpos de la invención que se describen en la presente se pueden usar en estudios de unión competitiva para identificar anticuerpos anti-TcdA o anti-TcdB adicionales y fragmentos de unión de estos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-TcdA o anti-TcdB adicionales y fragmentos de unión de estos se pueden identificar por la selección de una biblioteca de anticuerpos humanos y la identificación de moléculas dentro de la biblioteca que compite con los anticuerpos de la invención que se describen en la presente en un ensayo de unión competitiva.

Además, los anticuerpos abarcados por la presente invención incluyen anticuerpos recombinantes que se pueden generar por el uso de métodos de despliegue en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de despliegue en fago, se pueden usar fagos para desplegar dominios de unión del antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpos (por ejemplo, humano o murino). El fago que expresa un dominio de unión al antígeno que se une a un inmunógeno descrito en la presente (por ejemplo, una toxina de *C. difficile* mutante) se puede seleccionar o identificar con el antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado.

También dentro del alcance de la invención están los anticuerpos y fragmentos de unión de estos en que se han sustituido, suprimido o añadido los aminoácidos específicos. En particular, los anticuerpos preferidos tienen sustituciones de aminoácidos en la región estructural, tal como para mejorar la unión al antígeno. Por ejemplo, un número pequeño, seleccionado de residuos estructurales aceptores de la cadena de inmunoglobulina se pueden reemplazar con los correspondientes aminoácidos dadores. Las localizaciones preferidas de las sustituciones incluyen

residuos de aminoácidos adyacentes a la CDR, o que son capaces de interactuar con una CDR. Los criterios para seleccionar los aminoácidos del dador se describen en la Patente U.S. No. 5.585.089 (por ejemplo, columnas 12-16). La estructura aceptora puede ser una secuencia estructural o secuencia de consenso del anticuerpo humano maduro.

Como se usa en la presente, un "anticuerpo neutralizante o fragmento de unión de este" se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión de este respectivo que se une a un patógeno (por ejemplo, una TcdA de *C. difficile* o TcdB) y reduce la infectividad y/o una actividad del patógeno (por ejemplo, reduce la citotoxicidad) en un mamífero y/o en cultivo celular, en comparación con el patógeno en condiciones idénticas en ausencia del anticuerpo neutralizante o fragmento de unión de este. En una forma de realización, el anticuerpo neutralizante o fragmento de unión de este es capaz de neutralizar al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, o más de una actividad biológica del patógeno, en comparación con la actividad biológica del patógeno en condiciones idénticas en ausencia de el anticuerpo neutralizante o fragmento de unión de este.

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo anti-toxina o fragmento de unión de este" se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión de este que se une a la respectiva toxina de *C. difficile* (por ejemplo, una toxina de *C. difficile* A o toxina B). Por ejemplo, un anticuerpo anti-toxina A o fragmento de unión de este se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión de este que se une a TcdA.

Los anticuerpos o fragmentos de unión de estos que se describen en la presente se pueden originar en cualquier mamífero, tipo salvaje y/o transgénico, que incluye, por ejemplo, ratones, seres humanos, conejos y cabras.

Cuando una composición inmunogénica descrita anteriormente es una que se ha administrado previamente a una población, tales como para vacunación, la respuesta del anticuerpo generada en los sujetos se puede usar para neutralizar toxinas de la misma cepa y de una cepa que no estimuló la producción del anticuerpo. Ver, por ejemplo, Ejemplo 37, que muestra estudios relacionados con la reactividad cruzada, generados por la composición inmunogénica, entre la cepa 630 y las toxinas de varias cepas de *C. difficile* tipo salvaje.

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión de este específico para la TcdA de *C. difficile*. Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a TcdA incluyen A65-33; A60-22; A80-29 y/o, con preferencia, A3-25.

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión de

este específico para una TcdA de cualquier cepa de *C. difficile* tipo salvaje, tal como las descritas anteriormente, por ejemplo, para la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión de este específico para una composición inmunogénica descrita anteriormente. Por ejemplo, en una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este es específico para una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7. En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este es específico para una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7, donde al menos un aminoácido de la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7 está entrecruzado por formaldehído, EDC, NHS, o una combinación de EDC y NHS. En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este es específico para una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 83.

Los anticuerpos o fragmentos de unión de estos que tienen regiones variables de cadena pesada y cadena liviana que tienen al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, con preferencia aproximadamente 98%, con más preferencia aproximadamente 99% o con máxima preferencia aproximadamente 100% de identidad con las regiones variables de cadena pesada y cadena liviana de A65-33; A60-22; A80-29 y/o, con preferencia, A3-25 también se puede unir a TcdA.

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de A3-25 como se expone en la SEQ ID NO: 37.

En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este incluye una región variable de la cadena liviana que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de A3-25 que se expone en la SEQ ID NO: 36.

En un aspecto adicional más, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada

expuesta en la SEQ ID NO: 37, y a región variable de la cadena liviana que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana expuesta en la SEQ ID NO: 36.

En otra forma de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión de estos que tienen regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadenas pesadas variables y/o cadenas livianas variables de A65-33; A60-22; A80-29 y/o, con preferencia, A3-25 también se puede unir a TcdA. Las CDR de la región variable de la cadena pesada de A3-25 se muestran en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4: Secuencias de aminoácidos de CDR de la cadena pesada variable				
Clon	Cadena	CDR	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
A3-25	Pesada	CDR1	GFTFTNYWMN	41
		CDR2	EIRLKSHNYATHFAESVKG	42
		CDR3	DYYGNPAFVY	43

Las CDR de la región variable de la cadena liviana de A3-25 se muestran en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5: Cadena liviana variable CDR Secuencias de aminoácidos				
Clon	Cadena	CDR	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
A3-25	Liviana	CDR1	RSSQSLIHSNGNTILH	38
		CDR2	KVSNRFS	39
		CDR3	SQTTYFPYT	40

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este incluye las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (CDR) como se muestra en las SEQ ID NOs: 41 (CDR H1), 42 (CDR H2) y 43 (CDR H3), y/o las secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena liviana como se muestra en las SEQ ID NOs: 38 (CDR L1), 39 (CDR L2) y 40 (CDR L3).

En un ejemplo de forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este específico para la toxina de *C. difficile* A se une específicamente a un epítopo dentro de la región N-terminal de TcdA por ejemplo, un epítopo entre los aminoácidos 1-1256 de una TcdA, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1.

En una forma de realización preferida, el anticuerpo o fragmento de unión de este específico para la toxina de *C. difficile* A se une específicamente a un epítopo dentro de la región C-terminal de la toxina A, por ejemplo, un epítopo entre los aminoácidos 1832 a 2710 de una TcdA, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID

NO: 1. Los ejemplos incluyen A3-25; A65-33; A60-22; A80-29.

En otra forma de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión de este específico para la toxina de *C. difficile* A se une específicamente a un epítopo dentro de la región de “translocación” de la toxina de *C. difficile* A, por ejemplo, un epítopo que con preferencia incluyen los residuos 956-1128 de una TcdA, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1, tales como un epítopo entre aminoácidos 659-1832 de una TcdA, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión de este específico para TcdB de *C. difficile*. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión de este puede ser específico para una TcdB de cualquier cepa de *C. difficile* de tipo salvaje, tal como los descritos anteriormente, por ejemplo, a la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión de este específico para una composición inmunogénica descrita anteriormente. Por ejemplo, en una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este es específico para una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8.

En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este es específico para una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8, donde al menos un aminoácido de la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 está entrecruzado por formaldehído, EDC, NHS, o una combinación de EDC y NHS. En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este es específico para una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 85.

Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la TcdB incluyen anticuerpos producidos por los clones B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6; y/o, con preferencia, B8-26 que se describen en la presente.

Los anticuerpos o fragmentos de unión de estos que también se pueden unir a TcdB incluyen los que tienen regiones de cadena pesada variable y cadena liviana variable que son al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, con preferencia aproximadamente 98%, con más preferencia aproximadamente 99% o con máxima preferencia aproximadamente 100% de identidad con las regiones variables de la cadena pesada y liviana de B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6, con preferencia B8-26, B59-3, y/o B9-30.

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%

idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de A3-25 que se expone en la SEQ ID NO: 49.

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de A3-25 que se expone en la SEQ ID NO: 60.

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de A3-25 que se expone en la SEQ ID NO: 71.

En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este incluye una región variable de la cadena liviana que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de A3-25 que se expone en la SEQ ID NO: 55.

En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este incluye una región variable de la cadena liviana que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de A3-25 que se expone en la SEQ ID NO: 66.

En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este incluye una región variable de la cadena liviana que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de A3-25 que se expone en la SEQ ID NO: 77.

La secuencia de aminoácidos para la cadena liviana pesada de un anticuerpo neutralizante de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb) se expone en la SEQ ID NO: 49. Ver Tabla 25-a.

Tabla 25-a: Secuencias de aminoácidos de la cadena pesada variable			
Clon	Región	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
B8-26	Péptido señal	MGWSCILFLVATATGVHS	50
	Cadena pesada variable	QVQLQQPGAELVKPGA PVKLSCAS GYSFTSYWMN WVKQRPGRGLEWIG RIDPSNSEIYYNQKF KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSL TSEDSAVYYCAS GHYGSIFAY WGQGTTTLTVSS	49
	CDR1	GYSFTSYWMN	51
	CDR2	RIDPSNSEIYYNQKF	52
	CDR3	GHYGSIFAY	53
	Región constante (IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK	54

La secuencia de aminoácidos para la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de la TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb) se expone en la SEQ ID NO: 55. Ver Tabla 25-b.

Tabla 25-b: Secuencias de aminoácidos de la cadena liviana (κ) variable			
Clon	Región	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
B8-26	Péptido señal	MRFQVQVLGLLLLWISGAQCD	56
	Cadena liviana variable	VQITQSPSILAASPGETITINC RASKSISKILA WYQEKPGKTNKLLLY SGSTLQS GIPS RFSGSRSGTDFTLISSLEPEDSAMYYC QQHNEYPLT FGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEEFQ	55
	CDR1	RASKSISKILA	57
	CDR2	SGSTLQS	58
	CDR3	QQHNEYPLT	59

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este incluye las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada como se muestra en las SEQ ID NOs: 51 (CDR H1), 52 (CDR H2) y 53 (CDR H3), y/o las secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena liviana como se muestra en las SEQ ID NOs: 57 (CDR L1), 58 (CDR L2) y 59 (CDR L3).

La secuencia de aminoácidos para la cadena liviana pesada de un anticuerpo neutralizante de la TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb) se expone en la SEQ ID NO: 60. Ver Tabla 26-a.

Tabla 26-a: Secuencias de aminoácidos de la cadena pesada variable			
Clon	Región	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
B59-3	Péptido señal	MGWSYIILFLVATATDVHS	61

	Cadena pesada variable	QVQLQQPGAELVKPGASVKLS CKAS WVKQRPGQGLEWIG VINPSNGRSTYSEKF KTTATVTVDKSSSTAYMQL SILTSEDSAVYYCAR AYYSTSYAMDY WGQGTSTVTVSS	60
	CDR1	GYTFTSYWMH	62
	CDR2	VINPSNGRSTYSEKF	63
	CDR3	AYYSTSYAMDY	64
	Región constante (IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK	65

La secuencia de aminoácidos para la cadena liviana variable de un anticuerpo neutralizante de la TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb) se expone en la SEQ ID NO: 66. Ver Tabla 26-b.

Tabla 26-b: Secuencias de aminoácidos de la cadena liviana variable (κ)			
Clon	Región	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
B59-3	Péptido señal	MKLPVRLLVLMFWIPASSSD	67
	Cadena liviana variable	VLMTQSPLSLPVSLGDQASIS C RSSQNIVHSNGNTILE WILQKPGQSPKLLIY KVSNRFS GVPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHFPFT FGTGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEEFQ	66
	CDR1	RSSQNIVHSNGNTILE	68
	CDR2	KVSNRFS	69
	CDR3	FQGSHFPFT	70

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este incluye las secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena pesada como se muestra en las SEQ ID NOs: 62 (CDR H1), 63 (CDR H2) y 64 (CDR H3), y/o las secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena liviana como se muestra en las SEQ ID NOs: 68 (CDR L1), 69 (CDR L2) y 70 (CDR L3).

La secuencia de aminoácidos para la cadena liviana pesada de un anticuerpo neutralizante de la TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb) se expone en la SEQ ID NO: 71. Ver Tabla 27-a.

Tabla 27-a: Secuencias de aminoácidos de la cadena pesada variable			
Clon	Región	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
B9-30	Péptido señal	MGWSCILFLVATATGVHS	72

	Cadena pesada variable	QVQLQQPGAIEVVKPGAPVKLS CKAS GYPFTNYWMN WVKQRPGRGLEWIG RIDPSNSEIYYNQKF KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYY CAS GHYGSIFAY WGQGTTLTVSS	71
	CDR1	GYPFTNYWMN	73
	CDR2	RIDPSNSEIYYNQKF	74
	CDR3	GHYGSIFAY	75
	Región constante (IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK	76

La secuencia de aminoácidos para la cadena liviana variable de a anticuerpo neutralizante de la TcdB de C. difficile (B9-30 mAb) se expone en la SEQ ID NO: 77. Ver Tabla 27-b.

Tabla 27-b: Variable Liviana (κ) Cadena Secuencias de aminoácidos			
Clon	Región	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
B9-30	Péptido señal	MRFQVQVLGLLLLWISGAQCD	78
	Cadena liviana variable	VQITQSPSILAASPGETITINC RASKSISKILA WYQEKPGKTNKLLIY SGSTLQS GIPS RFSGSRSGTDFTLISSLEPEDSAMYYC QQHNEYPLT FGAGTKLELKRADAAPTIVSIFPPSSEEFQ	77
	CDR1	RASKSISKILA	79
	CDR2	SGSTLQS	80
	CDR3	QQHNEYPLT	81

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este incluye las secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena pesada como se muestra en las SEQ ID NOs: 73 (CDR H1), 74 (CDR H2) y 75 (CDR H3), y/o las secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena liviana como se muestra en las SEQ ID NOs: 79 (CDR L1), 80 (CDR L2) y 81 (CDR L3).

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión de este específico para una TcdB de C. difficile tipo salvaje de cualquier cepa de C. difficile, tales como los descritos anteriormente, por ejemplo, a la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión de este específico para una composición inmunogénica descrita anteriormente. Por ejemplo, en una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este es específico para una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8. En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este es específico para una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8,

donde al menos un aminoácido de la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 está entrecruzado por formaldehído, EDC, NHS, o una combinación de EDC y NHS.

Los anticuerpos o fragmentos de unión de estos que tiene a cadena pesada variable y región variable de la cadena livianas que son al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, con preferencia aproximadamente 98%, con más preferencia aproximadamente 99% o con máxima preferencia aproximadamente 100% de identidad con la regiones de cadena pesada y liviana variables de B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6; y/o, con preferencia, B8-26 también se puede unir a TcdB.

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de B8-26 (SEQ ID NO: 49).

En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este incluye una región variable de la cadena liviana que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de B8-26 (SEQ ID NO: 55).

En un aspecto adicional más, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de B8-26 (SEQ ID NO: 49), y a región variable de la cadena liviana que incluye una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de B8-26 (SEQ ID NO: 55).

En otra forma de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión de estos que tienen las CDR de las cadenas pesadas variables y/o cadenas livianas variables de B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6; y/o, con preferencia, B8-26 también se puede unir a la TcdB.

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este incluye las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (CDR) de B8-26, y/o las secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena liviana de B8-26.

En una forma de realización preferida, el anticuerpo o fragmento de unión de este específico para la toxina de *C. difficile* B se une específicamente a un epítopo dentro de la región N-terminal de la toxina B, por ejemplo, un epítopo entre los aminoácidos 1-1256 de una TcdB, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2. Los ejemplos incluyen B2-31; B5-40; B8-26; B70-2; B6-30; y B9-30.

En un ejemplo de forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión de este específico para la toxina de *C. difficile* B se une específicamente a un epítopo dentro de la región C-terminal de toxina B, por ejemplo, un epítopo entre los aminoácidos 1832 a 2710 de una TcdB, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2.

En otra forma de realización más, el anticuerpo o fragmento de unión de este específico para la toxina de *C. difficile* B se une específicamente a un epítopo dentro de la región de “translocación” de la toxina de *C. difficile* B, por ejemplo, un epítopo que con preferencia incluye residuos 956-1128 de una TcdB, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2, tales como un epítopo entre los aminoácidos 659-1832 de una TcdB. Los ejemplos incluyen B59-3; B60-2; y B56-6.

Combinaciones de anticuerpos

El anticuerpo anti-toxina o fragmento de unión de este se puede administrar en combinación con otros anticuerpos anti-toxina de *C. difficile* (por ejemplo, otros anticuerpos monoclonales, gamma-globulina policlonal) o un fragmento de unión de este. Las combinaciones que se pueden usar incluyen un anticuerpo anti-toxina A o fragmento de unión de este y un anticuerpo anti-toxina B o fragmento de unión de este.

En otra forma de realización, una combinación incluye un anticuerpo anti-toxina A o fragmento de unión de este y otro anticuerpo anti-toxina A o fragmento de unión de este. Con preferencia, la combinación incluye un anticuerpo monoclonal neutralizante anti-toxina A o fragmento de unión de este y otro anticuerpo monoclonal neutralizante anti-toxina A o fragmento de unión de este. De modo sorprendente, los inventores descubrieron que tal combinación produjo un efecto sinérgico en la neutralización de la citotoxicidad de la toxina A. Por ejemplo, la combinación incluye una combinación de al menos dos de los siguientes anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-toxina A:

A3-25; A65-33; A60-22; y A80-29. Con más preferencia, la combinación incluye Anticuerpo A3-25 y al menos uno de los siguientes anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-toxina A: A65-33; A60-22; y A80-29. Con máxima preferencia, la combinación incluye los cuatro anticuerpos: A3-25; A65-33; A60-22; y A80-29.

En una forma de realización adicional, una combinación incluye un anticuerpo anti-toxina B o fragmento de unión de este y otro anticuerpo anti-toxina B o fragmento de unión de este. Con preferencia, la combinación incluye un anticuerpo monoclonal neutralizante anti-toxina B o fragmento de unión de este y otro anticuerpo monoclonal neutralizante anti-toxina B o fragmento de unión de este. De modo sorprendente, los inventores descubrieron que tal combinación produjo un efecto sinérgico en la neutralización de citotoxicidad de la toxina B. Con más preferencia, la combinación incluye una combinación de al menos dos de los siguientes anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-toxina B: B8-26; B9-30 y B59-3. Con máxima preferencia, la combinación incluye los tres anticuerpos: B8-26; B9-30 y B59-3.

En otra forma de realización más, una combinación incluye un anticuerpo anti-toxina B o fragmento de unión de este y otro anticuerpo anti-toxina B o fragmento de unión de este. Como se indicó previamente, los inventores descubrieron que una combinación de al menos dos de los anticuerpos monoclonales neutralizantes pueden exhibir un inesperado efecto sinérgico en la respectiva neutralización de la toxina A y toxina B.

En otra forma de realización, los agentes de la invención se pueden formular como una mezcla, o ligada química o genéticamente usando técnicas reconocidas en la técnica de este modo se produce anticuerpos ligados en forma covalente (o fragmentos de anticuerpo ligados covalentemente), que tienen propiedades de unión a anti-toxina A y anti-toxina B. La formulación combinada se puede guiar por una determinación de uno o más parámetros tales como la afinidad, avidéz, o eficacia biológica del agente solo o en combinación con otro agente.

Tales terapias de combinación son con preferencia aditivos y/o sinérgicos en su actividad terapéutica, por ejemplo, en la inhibición, prevención (por ejemplo, de recaída), y/o tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con *C. difficile*. La administración de tales terapias de combinación pueden disminuir la dosis del agente terapéutico (por ejemplo, anticuerpo o mezcla de fragmento de anticuerpo, anticuerpo biespecífico entrecruzado o genéticamente fusionado o fragmento de anticuerpo) necesario para obtener el efecto deseado.

Se entiende que ninguna de las composiciones de la invención, por ejemplo, un

anticuerpo anti-toxina A y/o anti-toxina B o fragmento de unión de este, se puede combinar en diferentes relaciones o cantidades para el efecto terapéutico. Por ejemplo, el anticuerpo anti-toxina A y anti-toxina B o fragmento de unión de este respectivo pueden estar presentes en una composición en una relación en el rango de 0,1:10 a 10:0,1, A:B. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-toxina A y anti-toxina B o fragmento de unión de este respectivo pueden estar presentes en una composición en una relación en el rango de 0,1:10 a 10:0,1, B:A.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de producir un anticuerpo neutralizante contra una TcdA de *C. difficile*. El método incluye administrar una composición inmunogénica como se describió anteriormente a un mamífero, y recuperar el anticuerpo del mamífero. En una forma de realización preferida, la composición inmunogénica incluye una TcdA de *C. difficile* mutante que tiene la SEQ ID NO: 4, donde al menos un aminoácido de la TcdA de *C. difficile* mutante está entrecruzado químicamente, con preferencia por formaldehído o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Los ejemplos de anticuerpos neutralizantes contra la TcdA que se pueden producir incluyen A65-33; A60-22; A80-29 y/o A3-25.

En aún otro aspecto, la invención se refiere a un método de producir un anticuerpo neutralizante contra una TcdB de *C. difficile*. El método incluye administrar una composición inmunogénica como se describió anteriormente a un mamífero, y recuperar el anticuerpo del mamífero. En una forma de realización preferida, la composición inmunogénica incluye a TcdB de *C. difficile* mutante que tiene la SEQ ID NO: 6, donde al menos un aminoácido de la TcdB de *C. difficile* mutante está entrecruzado químicamente, con preferencia por formaldehído o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Los ejemplos de anticuerpos neutralizantes contra la TcdB que pueden producir incluyen B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6; y/o B8-26.

Formulaciones

Las composiciones de la presente invención (tales como, por ejemplo, composiciones que incluye una toxina de *C. difficile* mutante, composiciones inmunogénicas, anticuerpos y/o sus fragmentos de unión del anticuerpo que se describen en la presente) pueden estar en una variedad de formas. Estos incluyen, por ejemplo, formas de dosis semisólidas y sólidas, supositorios, formas líquidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, liposomas, y/o forma seca, tales como, por ejemplo, forma de polvo liofilizado, forma liofilizada, forma secada por aspersion, y/o forma

secada por espuma. Para los supositorios, aglutinantes y portadores incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios se pueden formar a partir de las mezclas que contienen las composiciones de la invención. En un ejemplo de forma de realización, la composición está en una forma que es adecuada para la solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. En otro ejemplo de forma de realización, la composición se emulsiona o encapsula en liposomas o micropartículas, tales como poliláctido, poliglicólido, o copolímero.

En una forma de realización preferida, la composición se liofiliza y reconstituye en forma extemporánea antes de usar.

En un aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen algunas de las composiciones que se describen en la presente (tales como, por ejemplo, composiciones que incluye una toxina de *C. difficile* mutante, composiciones inmunogénicas, anticuerpos y/o sus fragmentos de unión del anticuerpo que se describen en la presente), formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptable. "Portadores farmacéuticamente aceptables" incluyen algunos solventes, medios de dispersión, estabilizantes, diluyentes y/o buffer que son fisiológicamente adecuados.

Los ejemplos de estabilizantes incluyen carbohidratos, tales como sorbitol, manitol, almidón, dextrano, sacarosa, trehalosa, lactosa, y/o glucosa; proteínas inertes, tales como albúmina y/o caseína; y/o otras macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como polisacáridos tales como chitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como agarosa SEPHAROSE™ funcionalizada con látex, agarosa, celulosa, etc.), aminoácidos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, y agregados de lípidos (tales como, microgotas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos portadores pueden actuar como agentes inmunoestimulantes (es decir, adyuvantes).

Con preferencia, la composición incluye trehalosa. Las cantidades preferidas de trehalosa (% en peso) incluyen de un mínimo de aproximadamente 1%, 2%, 3%, o 4% a un máximo de aproximadamente 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, o 5%. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un rango adecuado. En una forma de realización, la composición incluye aproximadamente 3% - 6% de trehalosa, con máxima preferencia, 4,5% de trehalosa por 0,5 ml de dosis.

Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen agua destilada, solución salina, solución salina regulada con fosfato fisiológica, glicerol, alcohol (tales como etanol), soluciones de Ringer, solución de dextrosa, soluciones de sal equilibrada de Hank, y/o

un excipiente de liofilización.

Los ejemplos de buffer incluyen buffer fosfato (tal como fosfato de potasio, fosfato de sodio); acetato (tal como acetato de sodio); succinato (tal como succinato de sodio); glicina; histidina; carbonato, Tris (tris(hidroximetil)aminometano), y/o bicarbonato (tales como bicarbonato de amonio). Con preferencia, la composición incluye buffer tris. Las cantidades preferidas de buffer tris incluyen desde un mínimo de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM a un máximo de aproximadamente 20 mM, 19 mM, 18 mM, 17 mM, 16 mM, 15 mM, 14 mM, 13 mM, 12 mM, o 11 mM. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un rango adecuado. En una forma de realización, la composición incluye aproximadamente buffer tris 8 mM a 12 mM, con máxima preferencia, buffer tris 10 mM por 0,5 ml de dosis.

En otra forma de realización preferida, la composición incluye buffer de histidina. Las cantidades preferidas de buffer de histidina incluyen de un mínimo de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM a un máximo de aproximadamente 20 mM, 19 mM, 18 mM, 17 mM, 16 mM, 15 mM, 14 mM, 13 mM, 12 mM, o 11 mM. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un rango adecuado. En una forma de realización, la composición incluye aproximadamente buffer de histidina 8 mM a 12 mM, con máxima preferencia, buffer de histidina 10 mM por 0,5 ml de dosis.

En otra forma de realización preferida más, la composición incluye buffer de fosfato. Las cantidades preferidas de buffer de fosfato incluye de un mínimo de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM a un máximo de aproximadamente 20 mM, 19 mM, 18 mM, 17 mM, 16 mM, 15 mM, 14 mM, 13 mM, 12 mM, o 11 mM. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un rango adecuado. En una forma de realización, la composición incluye aproximadamente buffer de fosfato 8 mM a 12 mM, con máxima preferencia, buffer de fosfato 10 mM por 0,5 ml de dosis.

El pH del buffer generalmente se elegirá para estabilizar el material activo de elección, y puede ser comprobable por los de la técnica por métodos conocidos. Con preferencia, el pH del buffer estará en el rango del pH fisiológico. En consecuencia, los rangos de pH preferidos son de aproximadamente 3 a aproximadamente 8; con más preferencia, de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0; aún con más preferencia, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5; y con máxima preferencia, a aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,2.

En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas pueden incluir un tensioactivo. Cualquier tensioactivo es adecuado, sea anfotérico, no iónico, catiónico o aniónico. Los ejemplos de tensioactivos incluyen los tensioactivos de ésteres de polioxitilen sorbitano (por ejemplo, TWEEN®), tales como polisorbato 20 y/o polisorbato 80; éteres grasos polioxietileno derivados de alcoholes laurílicos, cetílicos, estearílicos y oleílicos (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter trietilenglicol monolaurílico (Brij 30); Triton X 100, o t-octilfenoxipoliétoxietanol; y ésteres de sorbitano (comúnmente conocidos como los SPAN), tales como trioleato de sorbitano (Span 85) y monolaurato de sorbitano, y sus combinaciones. Los tensioactivos preferidos incluyen polisorbato 80 (monoleato de polioxietilen sorbitano).

Las cantidades preferidas de polisorbato 80 (% en peso) incluyen desde un mínimo de aproximadamente 0,001%, 0,005%, o 0,01%, a un máximo de aproximadamente 0,010%, 0,015%, 0,025%, o 1,0%. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un rango adecuado. En una forma de realización, la composición incluye aproximadamente 0,005% - 0,015% de polisorbato 80, con máxima preferencia, 0,01% de polisorbato 80 por 0,5 ml de dosis.

En un ejemplo de forma de realización, la composición inmunogénica incluye trehalosa y fosfato 80. En otro ejemplo de forma de realización, la composición inmunogénica incluye buffer tris y polisorbato 80. En otro ejemplo de forma de realización, la composición inmunogénica incluye buffer de histidina y polisorbato 80. En aún otro ejemplo de forma de realización, la composición inmunogénica incluye buffer de fosfato y polisorbato 80.

En un ejemplo de forma de realización, la composición inmunogénica incluye trehalosa, buffer tris y polisorbato 80. En otro ejemplo de forma de realización, la composición inmunogénica incluye trehalosa, buffer de histidina y polisorbato 80. En aún otro ejemplo de forma de realización, la composición inmunogénica incluye trehalosa, buffer de fosfato y polisorbato 80.

Las composiciones que se describen en la presente también pueden incluir componentes de aceite, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja y/o aceite mineral. Los ejemplos incluyen glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica también incluye formaldehído. Por ejemplo, en una forma de realización preferida, una composición farmacéutica que también incluye formaldehído tiene una composición inmunogénica, donde la toxina de *C. difficile* mutante de la composición inmunogénica se ha puesto

en contacto con un agente de entrecruzamiento químico que incluye formaldehído. La cantidad de formaldehído presente en la composición farmacéutica puede variar de un mínimo de aproximadamente 0,001%, 0,002%, 0,003%, 0,004%, 0,005%, 0,006%, 0,007%, 0,008%, 0,009%, 0,010%, 0,013%, o 0,015%, a un máximo de aproximadamente 0,020%, 0,019%, 0,018%, 0,017%, 0,016%, 0,015%, 0,014%, 0,013%, 0,012%, 0,011% o 0,010%. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un rango adecuado. En una forma de realización, la composición farmacéutica incluye aproximadamente 0,010% de formaldehído.

En algunas formas de realización alternativas, las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente no incluyen formaldehído. Por ejemplo, en una forma de realización preferida, una composición farmacéutica que no incluye formaldehído tiene una composición inmunogénica, donde al menos un aminoácido de la toxina de *C. difficile* mutante está entrecruzado químicamente con un agente que incluye EDC. Con más preferencia, en tal forma de realización, la toxina de *C. difficile* mutante no se ha puesto en contacto con un agente de entrecruzamiento químico que incluye formaldehído. A modo de otro ejemplo de forma de realización, una composición farmacéutica que está en una forma liofilizada no incluye formaldehído.

En otra forma de realización, las composiciones que se describen en la presente pueden incluir un adyuvante, como se describe a continuación. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta inmune intrínseca a un inmunógeno sin causar cambios conformacionales en el inmunógeno que pueden afectar la forma cualitativa de la respuesta inmune.

Los ejemplos de adyuvantes incluyen monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (MPL™) (ver GB 2220211 (GSK)); un gel de hidróxido de aluminio tales como Alhydrogel™ (Brenntag Biosector, Dinamarca); sales de aluminio (tales como, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio), que se puede usar con o sin un agente inmunoestimulante tal como MPL o 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglutámico o polilisina.

Aún otro ejemplo de adyuvante es un oligonucleótido inmunoestimulante tales como un oligonucleótido de Cpg (ver, por ejemplo, WO 1998/040100, WO2010/067262), o una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulante, tales como un oligonucleótido de Cpg (ver, por ejemplo, WO 00/062800). En una forma de realización preferida, el adyuvante es un oligonucleótido de Cpg, con máxima preferencia un oligodesoxinucleótidos CpG (CpG ODN). Los CpG ODN preferidos son de la Clase B que activan en forma preferencial las células B. En aspectos de la

invención, la CpG ODN tiene la secuencia de ácidos nucleicos 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T*T 3' (SEQ ID NO: 48) donde * indica una ligadura fosforotioato. El CpG ODN de esta secuencia es conocido como CpG 24555, que se describe en WO2010/067262. En una forma de realización preferida, CpG 24555 se usa junto con una sal de hidróxido de aluminio tal como Alhydrogel.

Una clase adicional de adyuvantes ejemplificativos incluyen adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (QS-21, que es un glicósido de triterpeno o saponina, Aquila, Framingham, Mass.) o partículas generadas de estas tales como ISCOMs (complejos inmunoestimulantes) y adyuvante ISCOMATRIX®. Por consiguiente, las composiciones de la presente invención se pueden administrar en la forma de ISCOM, ISCOMs que contienen CTB, liposomas o encapsulados en compuestos tales como acrilatos o poli(DL-láctido-co-glicósido) para formar microesferas de un tamaño adecuado para la adsorción. Normalmente, el término "ISCOM" se refiere a complejos inmunogénicos formados entre glicósidos, tales como saponinas triterpenoides (particularmente Quil A), y antígenos que contienen una región hidrofóbica. En una forma de realización preferida, el adyuvante es un adyuvante ISCOMATRIX.

Otros ejemplos de adyuvantes incluyen RC-529, GM-CSF y adyuvante de Freund completo (CFA) y adyuvante de Freund incompleto (IFA).

Aún otra clase de ejemplos de adyuvantes es análogos de glicolípidos que incluyen N-glicosilamidas, N-glicosilureas y N-glicosilcarbamatos, cada uno de los cuales está sustituido en el residuo azúcar por un aminoácido.

Opcionalmente, la composición farmacéutica incluye dos o más adyuvantes diferentes. Las combinaciones preferidas de adyuvantes incluyen cualquier combinación de adyuvantes que incluyen, por ejemplo, al menos dos de los siguientes adyuvantes: alúmina, MPL, QS-21, ISCOMATRIX, CpG, y Alhydrogel. Un ejemplo de combinación de adyuvantes incluye una combinación de CpG y Alhydrogel.

Alternativamente, en una forma de realización, la composición se administra al mamífero en ausencia de un adyuvante.

Las composiciones que se describen en la presente se pueden administrar por cualquier vía de administración, tales como, por ejemplo, vías parenteral, tópica, intravenosa, mucosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneana, intratecal, intraperitoneal, intranasal, intramuscular, intradérmica, infusión, rectal, y/o transdérmica para aplicaciones profilácticas y/o terapéuticas. En una forma de realización preferida, la vía de administración de la composición es administración parenteral, con más preferencia, intramuscular. La administración intramuscular típica

se realiza en el brazo de músculos de la pierna.

Las composiciones que se describen en la presente se pueden administrar en combinación con terapias que son al menos parcialmente efectivas en la prevención y/o tratamiento de la infección con *C. difficile*. Por ejemplo, una composición de la invención se puede administrar antes, concurrentemente con, o después de la bioterapia; terapia probiótica; implantes fecales, inmunoterapia (tal como inmunoglobulina intravenosa); y/o un estándar de atención aceptado para el tratamiento antibiótico de la enfermedad asociada con *C. difficile* (CDAD), tales como metronidazol y/o vancomicina.

Una composición de la presente invención relacionada con la toxina A y toxina B se puede administrar al mamífero en cualquier combinación. Por ejemplo, una composición inmunogénica que incluye una TcdA de *C. difficile* mutante se puede administrar al mamífero antes, en forma concurrente con o después de la administración de una composición inmunogénica que incluye una TcdB de *C. difficile* mutante. A la inversa, una composición inmunogénica que incluye una TcdB de *C. difficile* mutante se puede administrar al mamífero antes, en forma concurrente con o después de la administración de una composición inmunogénica que incluye a TcdA de *C. difficile* mutante.

En otra forma de realización, una composición que incluye un anticuerpo anti-toxina A o fragmento de unión de este se puede administrar al mamífero antes, en forma concurrente con o después de la administración de a composición que incluye un anticuerpo anti-toxina B o fragmento de unión de este. A la inversa, una composición que incluye un anticuerpo anti-toxina B o fragmento de unión de este se puede administrar al mamífero antes, en forma concurrente con o después de la administración de a composición que incluye un anticuerpo anti-toxina A o fragmento de unión de este.

En una forma de realización adicional, una composición de la presente invención se puede administrar al mamífero antes, en forma concurrente con o después de la administración de a portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un adyuvante se puede administrar antes, en forma concurrente con o después de la administración de a composición que incluye a toxina de *C. difficile* mutante. Por consiguiente, una composición de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable se pueden envasar en el mismo vial o se pueden envasar en viales separados y mezclar antes de usar. Las composiciones se pueden formular para la administración de dosis única y/o administración de dosis múltiple.

Métodos de proteger y/o tratar la infección con *C. difficile* en un mamífero

En un aspecto, la invención se refiere a un método de inducir una respuesta inmune a una toxina de *C. difficile* en un mamífero. El método incluye administrar una cantidad efectiva de una composición que se describen en la presente al mamífero. Por ejemplo, el método puede incluir administrar una cantidad efectiva para generar una respuesta inmune a la respectiva toxina de *C. difficile* en el mamífero.

En un ejemplo de forma de realización, la invención se refiere a un método de inducir una respuesta inmune a una TcdA de *C. difficile* en un mamífero. El método incluye administrar una cantidad efectiva de una composición inmunogénica que incluye una TcdA de *C. difficile* mutante al mamífero. En otro ejemplo de forma de realización, la invención se refiere a un método de inducir una respuesta inmune a una TcdB de *C. difficile* en un mamífero. El método incluye administrar una cantidad efectiva de una composición inmunogénica que incluye a TcdB de *C. difficile* mutante al mamífero.

En una forma de realización adicional, el método incluye administrar una cantidad efectiva de una composición inmunogénica que incluye a TcdA de *C. difficile* mutante y una cantidad efectiva de una composición inmunogénica que incluye una TcdB de *C. difficile* mutante al mamífero. En aspectos adicionales, las composiciones que se describen en la presente se puede usar para tratar, prevenir, disminuir el riesgo de, disminuir la gravedad de, disminuir las apariciones de, y/o retrasar el comienzo de una infección con *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma asociado a *C. difficile*, y/o complicación estos en un mamífero, en comparación con un mamífero al que no se administra la composición. El método incluye administrar una cantidad efectiva de la composición al mamífero.

Se reconocen tres síndromes clínicos causados por la infección con *C. difficile*, sobre la base de la gravedad de la infección. La forma más grave es la colitis pseudomembranosa (PMC), que se caracteriza por diarrea profusa, dolor abdominal, signos sistémicos de enfermedad, y un aspecto endoscópico distintivo del colon.

La colitis asociada con antibiótico (AAC) también se caracteriza por diarrea profusa, dolor abdominal y sensibilidad a la palpación, signos sistémicos (por ejemplo, fiebre), y leucocitosis. La lesión intestinal en la AAC es menos grave que en la PMC, el característico aspecto endoscópico del colon en la PMC está ausente, y la mortalidad es baja.

Finalmente, la diarrea asociada con antibióticos (AAD, que también se conoce como diarrea asociada con *C. difficile* (CDAD) es un síndrome relativamente leve y se

caracteriza por diarrea leve a moderada, carece de inflamación intestinal grande (caracterizada, por ejemplo, por dolor abdominal y sensibilidad a la palpación) y signos sistémicos de la infección (por ejemplo, fiebre).

Estos tres síndromes distintos se producen normalmente en un orden de frecuencia creciente. Es decir, la PMC normalmente ocurre con menos frecuencia que AAC, y AAD es normalmente la presentación clínica más frecuente de la enfermedad de *C. difficile*.

Una complicación frecuente de la infección con *C. difficile* es la enfermedad recurrente o recidivante, que se produce en hasta 20% de los sujetos que se recuperan de la enfermedad de *C. difficile*. La recidiva se puede caracterizar clínicamente como AAD, AAC, o PMC. Los pacientes que recidivan una vez es más probable que recidiven de nuevo.

Como se usa en la presente, las condiciones de una infección con *C. difficile* incluyen, por ejemplo, infección leve, leve a moderada, moderada, y grave con *C. difficile*. Una condición de infección con *C. difficile* puede variar de acuerdo con la presencia y/o gravedad de los síntomas de la infección.

Los síntomas de una infección con *C. difficile* pueden incluir síntomas fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o conductuales tales como, por ejemplo, diarrea; colitis; colitis con calambres, fiebre, leucocitos fecales e inflamación en biopsia colónica, colitis pseudomembranosa; hipoalbuminemia; anasarca; leucocitosis; sepsis; dolor abdominal; transporte asintomático; y/o complicaciones y fenotipos patológicos intermedios presentes durante el desarrollo de la infección, y sus combinaciones, etc. Por consiguiente, por ejemplo, la administración de una cantidad efectiva de las composiciones que se describen en la presente, por ejemplo pueden tratar, prevenir, disminuir el riesgo de, disminuir la gravedad de, disminuir las apariciones de, y/o retrasar el comienzo de la diarrea; dolor abdominal, calambres, fiebre, inflamación en la biopsia colónica, hipoalbuminemia, anasarca, leucocitosis, sepsis y/o transporte asintomático, etc., en comparación con un mamífero al que no se administró la composición.

Los factores de riesgo de una infección con *C. difficile* pueden incluir, por ejemplo, el uso futuro presente o inmediato de un antimicrobiano (está comprendidos cualquier agente antimicrobiano con espectro antibacteriano y/o actividad contra las bacterias anaeróbicas, que incluyen, por ejemplo, antibióticos que causan alteración de la microflora colónica normal, por ejemplo, clindamicina, cefalosporinas, metronidazol, vancomicina, fluoroquinolonas (que incluye levofloxacin, moxifloxacin,

gatifloxacina, y ciprofloxacina), linezolid, etc.); retiro presente o futuro inmediato del metronidazol o vancomicina prescripto; admisión presente o inmediata en un servicio de salud (tal como un hospital, servicio de atención crónica, etc.) y trabajadores de la salud; tratamiento presente o futuro inmediato con inhibidores de la bomba de protones, antagonistas de H₂, y/o metotrexato, o una combinación de estos; presente o riesgo de enfermedades gastrointestinales, tales como enfermedad intestinal inflamatoria; cirugía gastrointestinal o procedimiento gastrointestinal pasado, presente o futuro inmediato en el mamífero; recurrencia pasada o presente de una infección con *C. difficile* y/o a CDAD, por ejemplo, pacientes que presentaron una infección con *C. difficile* y/o a CDAD una vez o más de una vez; y seres humanos de al menos aproximadamente 65 años y mayores.

En los métodos que se describen en la presente, el mamífero puede ser cualquier mamífero, tales como, por ejemplo, ratones, hámsteres, primates, y seres humanos. En una forma de realización preferida, el mamífero es un ser humano. De acuerdo con la presente invención, el ser humano puede incluir individuos que han presentado una infección con *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma asociado a *C. difficile*, y/o complicación de esta; individuos que están exhibiendo actualmente una infección con *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma asociado a *C. difficile*, y/o sus complicaciones; e individuos que tienen riesgo de una infección con *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma asociado a *C. difficile*, y/o sus complicaciones.

Los ejemplos de individuos que muestran síntomas de infección con *C. difficile* incluyen individuos que han mostrado o están mostrando los síntomas descritos anteriormente; individuos que han tenido o están teniendo una infección con *C. difficile* y/o a enfermedad asociada a *C. difficile* (CDAD); e individuos que presentan una recurrencia de una infección con *C. difficile* y/o CDAD.

Los ejemplos de pacientes que están en riesgo de una infección con *C. difficile* incluyen individuos con riesgo o que están sometidos actualmente al uso antimicrobiano planificado; individuos en riesgo de o sometidos actualmente al retiro de metronidazol o vancomicina prescripto; individuos que tienen riesgo de o actualmente sometidos a una admisión planificada a un servicio de salud (tal como un hospital, servicio de atención crónica, etc.) y trabajadores de la salud; y/o individuos en riesgo de o experimentando actualmente un tratamiento planificado con inhibidores de la bomba de protones, antagonistas de H₂, y/o metotrexato, o una combinación de estos; individuos que han tenido o están experimentando enfermedades

gastrointestinales, tales como enfermedad intestinal inflamatoria; individuos que han tenido o están sometidos a cirugía gastrointestinal o procedimiento gastrointestinal; e individuos que han tenido o están teniendo una recurrencia de una infección con *C. difficile* y/o una CDAD, por ejemplo, pacientes que han tenido una infección con *C. difficile* y/o una CDAD una vez o más de una vez; individuos que tienen aproximadamente 65 años o más. Tales pacientes en riesgo pueden estar mostrando o no en el presente síntomas de una infección con *C. difficile*.

En pacientes asintomáticos, la profilaxis y/o tratamiento pueden comenzar a cualquier edad (por ejemplo, a aproximadamente 10, 20, o 30 años). En una forma de realización, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente alcance al menos aproximadamente 45, 55, 65, 75, u 85 años. Por ejemplo, las composiciones que se describen en la presente se pueden administrar a un ser humano asintomático que tiene 50-85 años.

En una forma de realización, el método de prevenir, disminuir el riesgo de, disminuir la gravedad de, disminuir las apariciones de, y/o retrasar el comienzo de una infección con *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma asociado a *C. difficile*, y/o sus complicaciones en un mamífero incluye administrar una cantidad efectiva de una composición descrita en la presente a un mamífero que lo necesita, un mamífero en riesgo de, y/o un mamífero sensible a una infección con *C. difficile*. Una cantidad efectiva incluye, por ejemplo, una cantidad suficiente para prevenir, disminuir el riesgo de, disminuir la gravedad de, disminuir las apariciones de, y/o retrasar el comienzo de una infección con *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma asociado a *C. difficile*, y/o sus complicaciones en un mamífero, en comparación con un mamífero al que no se administra la composición. La administración de una cantidad efectiva de las composiciones que se describen en la presente puede, por ejemplo, prevenir, disminuir el riesgo de, disminuir la gravedad de, disminuir las apariciones de, y/o retrasar el comienzo de diarrea; dolor abdominal, calambres, fiebre, inflamación en la biopsia colónica, hipoalbuminemia, anasarca, leucocitosis, sepsis y/o transporte asintomático, etc., en comparación con un mamífero al que no se administró la composición. En una forma de realización preferida, el método incluye administrar una cantidad efectiva de una composición inmunogénica que se describen en la presente al mamífero que lo necesita, el mamífero en riesgo de, y/o el mamífero sensible a una infección con *C. difficile*.

En una forma de realización adicional, el método de tratar, disminuir la gravedad de, y/o retrasar el comienzo de una infección con *C. difficile*, enfermedad,

síndrome, afección, síntoma asociado a *C. difficile*, y/o sus complicaciones en un mamífero incluye administrar una cantidad efectiva de una composición descrita en la presente a un mamífero sospechado de o que padece actualmente de una infección con *C. difficile*. Una cantidad efectiva incluye, por ejemplo, una cantidad suficiente para tratar, disminuir la gravedad de, y/o retrasar el comienzo de una infección con *C. difficile*, enfermedad, síndrome, afección, síntoma asociado a *C. difficile*, y/o sus complicaciones en un mamífero, en comparación con un mamífero al que no se administra la composición.

La administración de una cantidad efectiva de la composición puede mejorar al menos un signo o síntoma de la infección con *C. difficile* en el sujeto, tal como los que se describen a continuación. La administración de una cantidad efectiva de las composiciones que se describen en la presente, por ejemplo, pueden disminuir la gravedad de y/o disminuir las apariciones de diarrea; disminuir la gravedad de y/o disminuir las apariciones de dolor abdominal, calambres, fiebre, inflamación en la biopsia colónica, hipoalbuminemia, anasarca, leucocitosis, sepsis y/o transporte asintomático, etc., en comparación con un mamífero al que no se administró la composición. Opcionalmente, la presencia de síntomas, signos, y/o factores de riesgo de una infección se determina antes de comenzar el tratamiento. En una forma de realización preferida, el método incluye administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo y/o fragmento de unión de este que se describe en la presente al mamífero sospechado de o que está padeciendo actualmente de, una infección con *C. difficile*.

Por consiguiente, una cantidad efectiva de la composición se refiere a una cantidad suficiente para obtener un efecto deseado (por ejemplo, efecto profiláctico y/o terapéutico) en los métodos de la presente invención. Por ejemplo, la cantidad de un inmunógeno para la administración puede variar de un mínimo de aproximadamente 1 µg, 5 µg, 25 µg, 50 µg, 75 µg, 100 µg, 200 µg, 500 µg, o 1 mg a un máximo de aproximadamente 2 mg, 1 mg, 500 µg, 200 µg por inyección. Cualquier valor mínimo se puede combinar con cualquier valor máximo para definir un rango adecuado. En general se usa aproximadamente 10, 20, 50 o 100 µg por inmunógeno para cada inyección humana.

La cantidad de la composición de la invención administrada al sujeto puede depender del tipo y gravedad de la infección y/o de las características del individuo, tal como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerando a los fármacos. También puede depender del grado, gravedad, y tipo de enfermedad. Una cantidad efectiva también puede variar de acuerdo los factores, tales como vía de administración, sitio

blanco, estado fisiológico del paciente, edad del paciente, si el paciente es ser humano o un animal, otras terapias administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Los profesionales expertos podrán determinar las cantidades apropiadas de acuerdo con estos y otros factores.

Una cantidad efectiva puede incluir una dosis efectiva o dosis efectivas múltiples (tales como, por ejemplo, 2, 3, 4 dosis o más) para usar en los métodos en la presente. Las dosis efectivas pueden necesitar titular para optimizar la seguridad y eficacia.

Una combinación de cantidad y frecuencia dosis adecuadas para obtener usos profilácticos y/o terapéuticos como un régimen efectivo para uso profiláctico o terapéutico. En un régimen profiláctico y/o terapéutico, la composición se administra normalmente en más de una dosis hasta que se ha obtenido una respuesta inmune suficiente. Normalmente, se controla la respuesta inmune y se dan dosis repetidas si la respuesta inmune comienza a declinar.

Las composiciones se pueden administrar en dosis múltiples durante un período de tiempo. El tratamiento se puede controlar por el ensayo del anticuerpo, o respuestas de células T o células B activadas al agente terapéutico (por ejemplo, la composición inmunogénica que incluye una toxina de *C. difficile* mutante) durante el tiempo. Si fracasa la respuesta, se indica una dosis de refuerzo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación de cepas de *C. difficile* con toxina negativa

Para identificar cepas de *C. difficile* que carecen de expresión de los genes de toxina (A y B) y toxina, se analizaron 13 cepas de *C. difficile*. Se analizaron medios de cultivo de 13 cepas de *C. difficile* por ELISA para la toxina A. Siete cepas expresaron toxina A: *C. difficile* 14797-2, *C. difficile* 630, *C. difficile* BDMS, *C. difficile* W1194, *C. difficile* 870, *C. difficile* 1253, y *C. difficile* 2149. Ver Figura 3.

Seis cepas no expresaron la toxina A y carecieron el locus de patogenicidad entero: *C. difficile* 1351 (ATCC 43593™), *C. difficile* 3232 (ATCC BAA-1801™), *C. difficile* 7322 (ATCC 43601™), *C. difficile* 5036 (ATCC 43603™), *C. difficile* 4811 (4 ATCC 3602™), y *C. difficile* VPI 11186 (ATCC 700057™). VPI 11186 se seleccionó sobre la base de su efectividad para captar el ADN del plásmido por la conjugación.

Las mismas 13 cepas se analizaron en un ensayo de PCR multiplex usando cebadores exteriores del locus de patogenicidad (PaLoc; Braun et al., *Gene*. 1996 Nov 28;181(1-2):29-38.). Los resultados de PCR demostraron que el ADN de 6 cepas negativas para toxina A por ELISA no amplificaron ninguno de los genes del PaLoc (tcdA-tcdE). Las secuencias flanqueantes del PaLoc (*cdd3* y *cdu2*) estaban presentes (datos no mostrados).

Ejemplo 2: Inactivación de la vía de esporulación en *C. difficile* VPI 11186

La inactivación de la función de formadora de esporas de la cepa productora de *C. difficile* facilita la fermentación en gran escala en un ambiente de fabricación seguro. El sistema ClosTron se usó para crear una cepa esporogénica de *C. difficile*. Ver Heap et al., *J Microbiol Methods*. 2009 Jul; 78(1):79-85. El sistema ClosTron permite la inactivación del gen dirigido con un intrón del grupo II para la inactivación de inserción dirigido al sitio de un gen clostridial *spo0A1*. La cepa de producción de menos toxina VPI11186 se sometió a la inactivación de la esporulación por la tecnología de ClosTron. Se seleccionaron las mutantes resistentes a eritromicina y la presencia del casete de inserción se confirmó por PCR (no mostrado). Se confirmó la incapacidad de dos clones independientes para formar esporas.

Ejemplo 3: Modificación genética de los genes de toxina A y B para inactivar la función de citotoxicidad

Los marcos de lectura abierta de las toxinas A y B mutantes (ORF) de longitud completa basados en las secuencias genómicas de la cepa 630Δ se diseñaron para la síntesis habitual en Blue Heron Biotech. Ver, por ejemplo, SEQ ID NO: 9-14. El sitio activo para la actividad de glucosiltransferasa responsable para la toxicidad celular se

alteró por dos sustituciones alélicas: D285A/D287A (ver SEQ ID NO: 3) para la toxina A, y D286A/D288A (ver SEQ ID NO: 5) para la toxina B. Dos nucleótidos mutaron en cada codón de aspartato (D) para crear el codón para alanina (A). Ver, por ejemplo, SEQ ID NOs: 9-14. Además, se construyó un par de vectores que expresan toxinas mutantes que carecen de residuos de cisteína siguiendo la síntesis habitual en Blue Heron Biotech. Siete residuos de cisteína de la toxina A mutante y 9 residuos de cisteína de la toxina B mutante se reemplazaron con alanina. Las sustituciones incluyen cisteínas catalíticas de la proteasa autocatalítica de la toxina A y B. Asimismo, se introdujeron mutaciones silentes cuando sea necesario para eliminar los sitios de enzima de restricción usados para la construcción del vector.

Ejemplo 4: Vector de expresión de pMTL84121fdx

El vector de lanzadera del plásmido usado para la expresión del antígeno de la toxina de *C. difficile* mutante se seleccionó del sistema modular de serie pMTL8000 desarrollado por Minton lab (ver Heap et al., *J Microbiol Methods*. 2009 Jul;78(1):79-85). El vector pMTL84121fdx elegido contiene el plásmido de *C. difficile* pCD6 Gram+ replicón, el marcador seleccionable *catP* (cloramfenicol/ tiamfenicol), el p15a Gram-replicón y función *tra*, y el promotor de ferredoxina de *C. sporogenes* (*fdx*) y el sitio de clonación múltiple distal (MCS). Los datos empíricos sugirieron que el replicón p15a de número de copias bajas confirió mayor estabilidad en *E. coli* que la alternativa ColE1. El promotor *fdx* se seleccionó ya que produjo expresión más alta que otros promotores analizados en los experimentos con constructos del indicador CAT (por ejemplo *tcdA*, *tcdB*; o tetR o xilR heterólogos) (datos no mostrados).

Ejemplo 5: Clonación de las ORF de la toxina modificada eno pMTL84121fdx

Los marcos de lectura abiertos (ORF) de la toxina A y B mutante de longitud completa sobre la base de las secuencias genómicas de la cepa 630Δ se subclonaron usando sitios *NdeI* y *BglII* de clonación múltiple del vector pMTL84121fdx usando técnicas de biología molecular estándares. Para facilitar la clonación, los ORF se flanquearon un sitio *NdeI* próximo que contienen el codón de inicio y un sitio *BglII* justo corriente abajo del codón de detención.

Ejemplo 6: Mutagénesis dirigida al sitio de la TcdA para crear una triple mutante

El residuo de cisteína catalítico del dominio de proteasa autocatalítico se sustituyó (es decir, C700A para TcdA y C698A para TcdB) en las SEQ ID NOs: 3 y 5, es decir, en cada una de las “mutantes dobles”. Para la mutagénesis de la toxina A mutante, un fragmento *NdeI-HindIII* de 2,48kb del plásmido de expresión de la TcdA D285A/D287A se subclonó en pUC19 (cortado con el mismo) y se realizó la

mutagénesis dirigida al sitio en este molde. Una vez que se confirmaron los nuevos alelos por el análisis de la secuencia de ADN, los fragmentos de *NdeI-HindIII* modificados se reintrodujeron en el vector de expresión pMTL84121*fdx* para crear las “mutantes triples” es decir, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6.

Ejemplo 7: Mutagénesis dirigida al sitio de la TcdB para crear una triple mutante

Para la mutagénesis de la toxina B mutante, un fragmento *NdeI-EcoNI* de 3,29 kb del plásmido de la toxina B mutante se modificó y se reintrodujo. Como el sitio de *EcoNI* no está presente en vectores de clonación disponibles se subclonó un fragmento *NdeI-EcoRV* de 3,5 kb ligeramente más grande en pUC19 (preparado con *NdeI-SmaI*). Después de la mutagénesis, se escindió el fragmento *NdeI-EcoNI* de 3,3kb interno modificado y se usó para reemplazar el correspondiente fragmento del vector pMTL84121*fdx* de expresión de la toxina B mutante. Debido a que se halló que la eficiencia de la clonación de esta estrategia direccional es relativamente baja, se intentó una estrategia alternativa en paralelo para introducir el alelo C698A que involucra el reemplazo de una *DraIII* de 1,5 kb. Ambas estrategias produjeron de modo independiente los recombinantes deseados.

Ejemplo 8: Creación de variación de toxina mutante adicional por mutagénesis dirigida al sitio

Se construyeron al menos doce variantes de la toxina mutante de *C. difficile*. Las sustituciones alélicas se introdujeron en fragmentos del gen de la toxina mutante N-terminal por mutagénesis dirigida al sitio (Quickchange® kit). Las toxinas recombinantes también se manipularon genéticamente como controles de referencia para evaluar la capacidad de este sistema basado en plásmido para generar proteína de actividad biológica cuantitativamente equivalente a las toxinas nativas purificadas de las cepas de *C. difficile* tipo salvaje. En este caso, las sustituciones alélicas se introdujeron para revertir las sustituciones de la glucosiltransferasa original. Además, se construyó un par de vectores de la toxina mutante sin cisteína siguiendo la síntesis habitual en Blue Heron Biotech.

Las doce variantes de la toxina incluyen (1) una toxina A de *C. difficile* mutante que tiene una mutación de D285A/D287A (SEQ ID NO: 3); (2) una toxina de *C. difficile* mutante B que tiene una mutación de D286A/D288A (SEQ ID NO: 5); (3) una toxina A de *C. difficile* mutante que tiene una mutación de D285A/D287A C700A (SEQ ID NO: 4); (4) una toxina de *C. difficile* mutante B que tiene una mutación de D286A/D288A C698A (SEQ ID NO: 6); (5) una toxina A recombinante que tiene la SEQ ID NO: 1; (6) una toxina B recombinante que tiene la SEQ ID NO: 2; (7) una toxina A de *C. difficile*

mutante que tiene una mutación C700A; (8) una toxina B *C. difficile* mutante que tiene una mutación C698A; (9) una toxina A de *C. difficile* mutante que tiene a C700A C597S, C1169S, C1407S, C1623S, C2023S, y C2236S mutación; (10) a toxina de *C. difficile* mutante B que tiene una mutación C698A C395S, C595S, C824S, C870S, C1167S, C1625S, C1687S, y C2232S; (11) una toxina A de *C. difficile* mutante que tiene una mutación D285A, D287A, C700A, D269A, R272A, E460A, y R462A (SEQ ID NO: 7); y (12) una toxina de *C. difficile* mutante B que tiene una mutación D270A, R273A, D286A, D288A, D461A, K463A, y C698A (SEQ ID NO: 8)

Ejemplo 9: Estabilidad de transformantes

Se obtuvieron plásmidos reordenados con la cepa de laboratorio DH5 α *E. coli* comúnmente usado. En contraste, las transformaciones que usan el huésped Invitrogen Stbl2™ *E. coli* produjo toxinas mutantes recombinantes de longitud completa de crecimiento lento después de tres días de crecimiento a 30°C en placas de LB cloramfenicol (25 μ g/ml). Se obtuvieron eficiencias de clonación más bajas con las cepas de *E. coli* relacionadas Stbl3™ y Stbl4™, si bien se halló que estas líneas son estables para el mantenimiento del plásmido. Los transformantes se propagaron posteriormente en medio de cultivo de agar o líquido bajo selección de cloramfenicol a 30°C. También se halló que el uso del medio LB (de Miller) mejora la recuperación y crecimiento de los transformantes en comparación con el medio basado tritona-soja libre de animal.

Ejemplo 10: Transformación de *C. difficile* con pMTL84121 fdx que codifica genes de toxina mutante tipo salvaje o genética

La transformación de *C. difficile* por la transferencia de conjugación de *E. coli* se realizó esencialmente como se describe en Heap et al., *Journal of Microbiological Methods*, 2009. 78(1): p. 79-85. El huésped de *E. coli* CA434 se transformó con pMTL84121 fdx que codifica genes de toxina mutante de tipo salvaje o variante. El huésped de *E. coli* CA434 es el intermedio para movilizar los plásmidos de expresión en la cepa de producción de *C. difficile* VPI 11186 spo0A1. CA434 es un derivado de *E. coli* HB101. Esta cepa aloja el plásmido de conjugación Tra+ Mob+ R702 que confiere resistencia a Km, Tc, Su, Sm/Spe, y Hg (debido a Tn1831). Se prepararon células CA434 competentes químicamente o electrocompetentes y se seleccionaron los transformantes del vector de expresión en las placas CAM de LB de Millar a 30°C. Se seleccionaron las colonias de crecimiento lento que aparecen 3 días después y se amplificaron 3 ml de cultivos de LB cloramfenicol hasta fase semilog (~24 horas, 225 rpm, agitador orbital a 30°C). Los cultivos de *E. coli* se recolectaron por centrifugación

a velocidad baja (5.000 g) para evitar la ruptura de vellosidades, y los pellet celulares se resuspendieron suavemente con una pipeta de transferencia de perforación amplia en 1 ml de PBS. Las células se concentraron por centrifugación de velocidad baja. La mayor parte del PBS se extrajo por inversión y los pellet drenados se transfirieron a la cámara anaeróbica y se resuspendieron con 0,2 ml de cultivo de *C. difficile*, Se sembraron en placas de agar BHIS y se dejaron crecer durante 8 horas o toda la noche. En el caso de los transformantes de la toxina A mutante, se obtuvieron mejores resultados con la conjugación durante toda la noche. Los parches celulares se rasparon en 0,5 ml de PBS y 0,1 ml se sembraron en medio de selección BHIS suplementado con 15 µg/ml de tiamfenicol (análogo más potente de cloramfenicol) y D-cicloserina / cefoxitina para destruir las células dadoras de *E. coli*. Los transformantes que aparecen 16-24 h más tarde se purificaron por el re-estriado en una nueva placa BHIS (más suplementos) y se analizaron cultivos posteriores para determinar la expresión de las toxinas recombinantes o toxinas mutantes. Se prepararon patrones permanentes y de semilla con glicerol de los clones que muestran buena expresión. Las minipreparaciones del plásmido también se prepararon a partir de 2 ml de cultivos usando un procedimiento del kit de Qiagen modificados en que las células se pretrataron con lisozima (no esencial). El ADN de minipreparación de *C. difficile* se usó como un molde para la secuenciación de PCR para verificar la integridad del clon. De modo alternativo, el ADN de maxipreparación del plásmido se preparó a partir de los transformantes de *E. coli* Stbl2™ y se secuenciaron.

Ejemplo 11: Análisis de la expresión de *C. difficile* de la toxina A y B triple mutante (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) y hepta B mutante (SEQ ID NO: 8)

Los transformantes se cultivaron en 2 ml de cultivos (para el análisis de rutina) o en matraces con tapa de ventilación (para los experimentos de curso de tiempo). Las muestras (2 ml) se centrifugaron brevemente (10.000 rpm, 30 s) para concentrar las células: los sobrenadantes se decantaron y concentraron 10x (Amicon-ultra 30k); los pellet se drenaron y congelaron a -80°C. Los pellet celulares luego se descongelaron en hielo, se resuspendieron en 1 ml de buffer de lisis (Tris-HCl pH 7,5; 1 mM de EDTA, 15% de glicerol) y se sometieron a sonicación (1x 20s estallido con microtip). El lisado se centrifugó a 4°C y el sobrenadante se concentró 5 veces. Las muestras del sobrenadante y el lisado se combinaron con buffer de muestra y se trataron con calor (10 min, 80°C) antes de cargar en 3-8% de geles de SDS-PAGE Tris-acetato por duplicado (Invitrogen). Un gel se tiñó con Coomassie, el segundo se electrotransfirió para el análisis western. Se usaron antisueros de conejos específicos de la Toxina A y

específicos de Toxina B (Fitzgerald; Biodesign) para detectar las variantes de la toxina A y B mutantes. La expresión de la hepta toxina B mutante (SEQ ID NO: 8) también se confirmó por hibridación por transferencia Western.

Ejemplo 12: Anulación de la actividad de glucosiltransferasa de las toxinas mutantes

Las toxinas mutantes dobles genéticas (DM) A y B (SEQ ID NOs: 3 y 5, respectivamente) y las toxinas A y B triple mutantes (TM) (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) no transfirieron ^{14}C -glucosa a 10 μg de RhoA, Rac1 y Cdc42 GTPasas en ensayos de glucosilación *in vitro* en presencia de UDP- ^{14}C -glucosa [30 μM], 50 mM de HEPES, pH 7,2, 100 mM de KCl, 4 mM de MgCl_2 , 2 mM de MnCl_2 , 1 mM de DTT, y 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA. Sin embargo, los controles de toxina A y B tipo salvaje (que tienen la SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente) transfirieron ^{14}C -glucosa a las GTPasas en forma eficiente a una dosis baja de 10 y 1 ng cada una (y los datos más bajos no mostrados) (Figuras 4A y 4B), incluso en presencia de 100 μg de toxina mutante (Figura 4B) lo que indica menos de 100.000 veces de reducción en comparación con las respectivas toxinas tipo salvaje. Se detectaron resultados similares para Cdc42 GTPasa (datos no mostrados).

Específicamente, en la Fig. 4B, la toxina A y B tipo salvaje (1 ng) o triple toxina A mutante y triple toxina B mutante (100 μg) se incubaron con RhoA GTPasa en presencia de UDP- ^{14}C -glucosa durante 2 horas a 30°C. Como se ilustra, 1 ng de TdcA y TcdB tipo salvaje transfirieron ^{14}C -glucosa a RhoA pero 100 μg de toxina A triple mutante y toxina B triple mutante no. Cuando 1 ng de TdcA o TcdB tipo salvaje se adicionó en la reacción con respectivos 100 μg de toxina A triple mutante o toxina B triple mutante, se detectó la glucosilación de RhoA, lo que indica la carencia de inhibidores de la glucosilación. La sensibilidad de detección para la actividad de glucosilación se estableció que es 1 ng de toxina tipo salvaje en un umbral de 100 μg toxina mutante (relación de 1:100,000). Los resultados muestran que las mutaciones en el sitio activo de la glucosiltransferasa en la toxina A triple mutante y toxina B triple mutante redujeron cualquier actividad de glucosiltransferasa medible (actividad menor de 100.000 veces más baja en comparación con la actividad de las toxinas tipo salvaje respectivas). Un ensayo similar también se desarrolló para cuantificar la glucosiltransferasa por precipitación con TCA de las GTPasas glucosiladas.

Ejemplo 13: Anulación de actividad autocatalítica de la cisteína proteasa

La función de la escisión auto-catalítica se anuló en las mutantes A y B genéticas triple (TM) (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) cuando se mutó el sitio de

escisión de la cisteína proteasa. Como se ilustra en la Figura 5, las toxinas A y B tipo salvaje (*wt*) (SEQ ID NOs: 3 y 5, respectivamente) se escinden en presencia de inositol-6-fosfato. Las toxinas A y B mutantes doble (SEQ ID NOs: 3 y 5, respectivamente) también se escinden en presencia de inositol-6-fosfato (datos no mostrados), similares a las de tipo salvaje. La toxina A (SEQ ID NO: 3) se escinde de 308 kDa en 2 fragments de 245 y 60 kDa. La toxina B (SEQ ID NO: 5) se escinde de 270 kDa en dos fragmentos de 207 y 63 kDa. Las mutantes A y B genéticas triple (TM) (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) permanecen sin afectar a 308 y 270 kDa respectivamente, aun en la presencia de inositol-6-fosfato. Ver Figura 5. En consecuencia, la actividad de cisteína proteasa se inactivó por modificación genética.

Más específicamente, en la figura 5, un μg de la triple mutante A y triple mutante B se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente ($21 \pm 5^\circ\text{C}$) en paralelo con TcA y TcdB tipo salvaje de la Lista de productos biológicos. La reacción de escisión se realizó en 20 μL de volumen en Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM DTT en presencia o ausencia de inositol-6-fosfato (10 mM para TcdA y 0,1 mM para Tcd B). El volumen de reacción completo luego se cargó en un SDS/PAGE 3-8%; las bandas de proteína se visualizaron por tinción con plata. Como se ilustra, TdcA y TcdB *wt* se escindieron en dos bandas de proteína de 245 kD y 60 kD y 207kD y 63 kD, respectivamente, en la presencia de inositol-6-fosfato. La toxina A triple mutante y toxina B triple mutante no se escindieron, en consecuencia se confirma la mutación C700A en la toxina A triple mutante y la mutación C698A en toxina B triple mutante bloqueó la escisión.

Ejemplo 14: Citotoxicidad residual de las toxinas A y B triple mutantes (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente)

Las toxinas mutantes genéticas se evaluaron en cuanto a su citotoxicidad por un ensayo de citotoxicidad *in vitro* en las células IMR90, una línea celular de fibroblastos de pulmón diplomes humanos. Estas células son sensibles a la toxina A y B. A modo de forma de realización preferida alternativa, las células renales normales Vero de *Cercopithecus aethiops* se pueden usar en el ensayo de citotoxicidad ya que se observó que tenían sensibilidades razonables para la toxina A y B. Con preferencia, las células de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29 no se usan en el ensayo de citotoxicidad porque han mostrado sensibilidades disminuidas a las toxinas, en comparación con las líneas celulares Vero e IMR90. Ver, por ejemplo, la siguiente Tabla 6.

Tabla 6: Sensibilidades de la línea celular a las toxinas A y B*				
Línea celular	Toxina 50 µg/ml	Células/pocillo	EC ₅₀ (pg/ml)	
			48 horas	72 horas
Vero (ATCC CCL-81™)	A	10000	1816	244
	B	10000	62	29
IMR90 (ATCC CCL-186™)	A	10000	1329	1152
	B	10000	14	13
HT-29 (ATCC HTB-38™)	A	10000	>1E6	>1E6
	B	10000	11089	53313
*El ensayo de citotoxicidad in vitro se realizó por la medición de ATP celular usando sustrato basado en luciferasa, CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI)				

Las muestras de toxina mutante genética o toxina *wt* diluidas en forma seriada se añadieron a las monocapas celulares cultivadas en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Después de la incubación a 37°C durante 72 horas, las placas se evaluaron para determinar células metabólicamente activas por la medición de niveles de ATP celular por la adición de reactivo CellTiterGlo® basado en luciferasa (Promega, Madison, WI) que generan luminiscencia expresada como unidades de luminiscencia relativas (RLU). Las RLU altas muestran que las células son viables, las RLU bajas muestra que las células no son metabólicamente activas y se mueren. El nivel de citotoxicidad, expresado como EC₅₀, se define como la cantidad de toxina *wt* o toxina mutante genética que induce un 50% de reducción en las RLU en comparación con los niveles en los controles del cultivo celular (los detalles de este ensayo se proporcionan a continuación). Como se muestra en las Figuras 6, Tablas 7A, y Tabla 8A, los valores de EC₅₀ de TcdA y TcdB fueron aproximadamente 0,92 ng/ml y 0,009 ng/ml, respectivamente. Los valores de EC₅₀ de la toxina A triple mutante y toxina B triple mutante fueron aproximadamente 8600 ng/ml y 74 ng/ml, respectivamente. A pesar de una reducción aproximada de 10.000 veces de la citotoxicidad con respecto a las toxinas *wt*, ambas toxinas mutantes genéticas todavía demostraban bajos niveles residuales de citotoxicidad. Esta citotoxicidad residual se puede bloquear con anticuerpos monoclonales antitoxina neutralizantes lo que indica que era específica para las triple toxinas mutantes pero probablemente no relacionadas con las actividades enzimáticas conocidas de las toxinas *wt* (glucosilación o autoproteólisis).

Ambas toxinas *wt* exhiben citotoxicidad in vitro potente, pequeñas cantidades de las toxinas son suficientes para causar varios efectos sobre las células mamíferas tales como redondeado celular (efecto citopático o CPE) y carencia de actividad metabólica (medida por los niveles de ATP). En consecuencia, se han desarrollado dos ensayos *in vitro* (un ensayo CPE o redondeado celular y un ensayo de ATP) para

verificar que no queda citotoxicidad residual las los principios activos de la toxina mutante. Los resultados se expresan como EC_{50} , que es la cantidad de toxina o toxina mutante que causa 1) 50% de las células desarrollen CPE o 2) 50% de reducción de los niveles de ATP medidos en unidades luminosas relativas.

En el ensayo de CPE, una muestra de principio activo se diluye en forma seriada y se incuba con células IMR90, que se observan para determinar un potencial efecto citopático. El ensayo CPE se califica en una escala de 0 (células normales) a 4 (~100% de redondeado celular) y una puntuación de 2 (~50% de redondeado celular) se define como un valor de EC_{50} de la muestra de ensayo. Este método se usa para analizar el principio activo de la toxina mutante a la concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que es la concentración tolerable máxima que se puede analizar en este ensayo sin interferencia de la matriz. En consecuencia, se informa citotoxicidad no detectable como $EC_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$.

El ensayo de ATP se basa en la medición de la cantidad de señal de luminiscencia generada del ATP, que es proporcional al número de células metabólicamente activas. La concentración tolerable máxima que se puede analizar en este ensayo sin interferencia del ensayo es aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En consecuencia se informa citotoxicidad no detectable en este ensayó como $EC_{50} > 200 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Diferentes concentraciones de toxina A y B mutantes se añadieron a las células en paralelo con los controles de toxina. Los criterios de valoración del ensayo fueron viabilidad celular determinada por niveles de ATP celular usando el CellTiter-Glo® (Promega). El grado de luminiscencia es proporcional a los niveles de ATP o número de células viables.

La citotoxicidad in vitro (EC_{50}) de la toxina A tipo salvaje (wt) fue 920 pg/ml y 9 pg/ml para la toxina B. La citotoxicidad in vitro (EC_{50}) de la toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) fue 8600 ng/ml y 74 ng/ml para la toxina B mutante (SEQ ID NO: 6). Si bien estos valores representan reducciones de 9348 y 8222 veces, respectivamente, se detectó citotoxicidad residual en ambas toxinas mutantes.

En otras palabras, la citotoxicidad de las toxinas A y B triple mutantes (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) se redujo significativamente en el ensayo de citotoxicidad in vitro en las células IMR-90 respecto de la citotoxicidad de las toxinas A y B wt (SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente). Como se ilustra en la Figura 6, si bien las toxinas mutantes triple exhibieron significativa reducción de la citotoxicidad (10^4 veces) con respecto a la toxina wt, se observó citotoxicidad residual en

concentraciones más altas de ambas triple toxinas mutantes.

Además, la citotoxicidad residual de cada toxina mutante triple se puede neutralizar completamente (por ejemplo, al menos una reducción de 6-8 log₁₀ de la toxicidad, con respecto a la toxicidad de la toxina tipo salvaje) por los anticuerpos específicos de toxina. Ver Ejemplo 16, a continuación.

Los ensayos de cultivo celular son más sensibles para la detección de citotoxicidad que los modelos animales *in vivo*. Cuando se administran por vías i.p. o i.v en el modelo de exposición letal de ratón, la TcdA wt tiene una LD₅₀ de ~50 ng por ratón mientras que la TcdB wt es más potente con una LD₅₀ de ~5 ng por ratón. En contraste, el cultivo celular basado en los ensayos *in vitro* descritos antes tienen valores de EC₅₀ de 100 pg por pocillo para TcdA wt y 2 pg por pocillo para TcdB wt.

Ejemplo 15: Citotoxicidad residual de la Toxina B hepta mutante genética (SEQ ID NO: 8)

Como se ilustra en la Figura 7, los valores de EC₅₀ son similares para la toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6) (20,78 ng/ml) y toxina B hepta mutante (SEQ ID NO: 8) (35,9 ng/ml) que indican que las cuatro mutaciones adicionales para modificar adicionalmente el sitio activo de glucosiltransferasa y el sitio de unión del sustrato de GTPasa no redujeron adicionalmente la citotoxicidad de la toxinas mutantes genéticas. Los valores de EC₅₀ también fueron similares para la toxina B doble mutante (SEQ ID NO: 5) como para las toxinas triple y hepta mutantes (datos no mostrados). Esta observación sugiere que el mecanismo de la citotoxicidad de las toxinas mutantes es de modo sorprendente independiente del mecanismo de reconocimiento de la glucosiltransferasa y el sustrato.

Ejemplo 16: Citotoxicidad residual de las toxinas A y B triple mutantes (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente)

Para evaluar adicionalmente la naturaleza de la citotoxicidad residual, las toxinas mutantes (SEQ ID NOs: 4 y 6) se mezclaron e incubaron con sus respectivos anticuerpos neutralizantes antes y la mezcla se añadió a la monocapa celular IMR90.

Los resultados (Figura 8) mostraron que la citotoxicidad residual de la toxinas A y B mutantes (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) se puede anular por completo con anticuerpos neutralizantes específicos para toxina A mutante (panel superior, Figura 8) y toxina B mutante (panel inferior, Figura 8). Concentraciones crecientes de toxina A mutante (panel superior) y B (panel inferior) se incubaron con anticuerpos policlona anti-toxina de conejo (pAb, dilución 1:10) o anticuerpos monoclonales murinos (1:50 de dilución un patrón que contiene 3,0 mg de IgG/ml) antes de añadir a las células IMR90.

Después de 72 horas de incubación del tratamiento con las células IMR90 a 37°C, se añadió sustrato CellTiter-Glo® y se midieron unidades luminosas relativas (RLU) en un espectrofotómetro con el programa de luminiscencia para medir niveles de ATP. A menor nivel de ATP, mayor toxicidad. Los controles incluyeron TcdA y TcdB añadidos a razón de 4 veces sus correspondientes valores de EC₅₀.

Los informes publicados sugieren que las mutaciones en el dominio de glucosiltransferasa o proteasa autocatalítica de las toxinas producen inactivación completa de la toxicidad. Sin embargo, nuestros datos no concuerdan con estos informes publicados y esto se puede atribuir a las concentraciones aumentadas de las toxinas mutantes altamente purificadas analizadas en nuestros estudios en oposición a los lisados de cultivo bruto de los informes publicados; se observaron puntos de tiempo aumentados en los se observó redondeado celular de las células tratadas con toxina mutante (por ejemplo, 24 horas, 48 horas, 72 horas, o 96 horas) en oposición a las observaciones realizadas en menos de 12 horas; el uso de líneas celulares que exhiben sensibilidades significativamente más altas en los ensayos de citotoxicidad presentes en contraste con las células de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29 en los ensayos de citotoxicidad descritos en los informes publicados; y/o a una actividad o proceso desconocido, diferente de la glicosilación, que pueden conducir la toxicidad residual de las toxinas mutantes.

Ejemplo 17: Nuevo mecanismo de citotoxicidad de las toxinas mutantes genéticas

Para investigar el mecanismo de citotoxicidad residual de las toxinas mutantes genéticas, las células IMR-90 se trataron con toxina B wt (SEQ ID NO: 2) o toxina B mutante genética (SEQ ID NO: 6), y se estudió la glucosilación de la Rac1 GTPasa con el tiempo de tratamiento. Las muestras se recolectaron de 24 a 96 horas y se prepararon extractos celulares. La Rac1 glucosilada se distingue de la Rac1 no glucosilada por transferencias Western con dos anticuerpos para Rac1. Un anticuerpo reconoce ambas formas de Rac1 (23A8) y el otro (102) solo reconoce Rac1 no glucosilada. Como se ilustra en Figura 22, para la toxina B, los niveles de Rac1 totales permanecieron sin cambios con el tiempo con la mayor parte de la Rac1 que está glucosilada. El tratamiento con la toxina B mutante genética (SEQ ID NO: 6), a la inversa, produjo una reducción significativa de la Rac1 total, sin embargo Rac1 no fue glucosilada en todos los puntos de tiempo. Esto muestra que el nivel de Rac1 fue afectado negativamente por el tratamiento con la toxina mutante genética, pero no la toxina wt. Como se ilustra en Figura 22, el nivel de actina fue similar en las células

tratadas con toxina y toxina B mutante genética y similar a las células tratadas simuladas en los puntos de tiempo indicados. Esto mostró que las toxinas mutantes genéticas ejercieron la citotoxicidad por un mecanismo que es diferente de la vía de glucosilación conducida por la toxina tipo salvaje.

Ejemplo 18: Tratamiento químico de las toxinas mutantes genéticas

Si bien se prefieren las toxinas mutantes modificadas genéticamente que muestran una reducción 4-log en la actividad citotóxica, se consideró la reducción adicional (2 a 4 log) de la actividad citotóxica. Se ha evaluado dos estrategias de inactivación química.

El primer método usa formaldehído y glicina para inactivar las toxinas mutantes. La inactivación con formaldehído ocurre por la formación de una base de Schiff (imina) entre formaldehído y las aminas primarias de la proteína. Las bases de Schiff luego pueden reaccionar con numerosos residuos de aminoácidos (Arg, His, Trp, Tyr, Gln, Asn) para formar entrecruzamientos intra- o intermoleculares. Este entrecruzamiento fija la estructura de la proteína volviéndola inactiva. Además, el formaldehído puede reaccionar con glicina para formar una base de Schiff. La base de Schiff de glicilo luego puede reaccionar con los residuos de aminoácidos para formar entrecruzamientos intermoleculares proteína-glicina. El formaldehído redujo la actividad citotóxica de las toxinas mutantes genéticas por debajo de los límites detectables (reducción de la citotoxicidad $>8 \log_{10}$ para toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6) y $>6 \log_{10}$ para la toxina A triple mutante (SEQ ID NO: 4). Sin embargo, se observó la inversión con el tiempo cuando las toxinas triple mutantes tratadas con formaldehído (FI) se incubaron a 25°C. La inversión citotóxica se puede evitar por la adición de una cantidad baja de formaldehído (0,01-0,02%) en solución de conservación de las toxinas triple mutantes-FI. Ver Ejemplo 23.

Otro método usa el tratamiento con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)/N-hidroxisuccinimida (NHS) para generar toxinas mutantes inactivadas. En este método, EDC/NHS reacciona con los grupos carboxílicos de la proteína para formar ésteres activados. Los ésteres activados luego pueden reaccionar con las amina primarias de la proteína para formar enlaces amida estables. Como en la reacción de formaldehído, esta reacción produce entrecruzamientos intra- o intermoleculares. El enlace amida formado por el tratamiento con EDC/NHS es más estable y no reversible que el enlace imina lábil formado por la inactivación con formalina. Además de entrecruzamientos formados por la reacción de ésteres activados con las aminas primarias del polipéptido, se pueden formar aductos de glicina y beta-alanina. Sin estar

ligado por mecanismo o teoría, los aductos de glicina se producen cuando se añade glicina para inactivar los ésteres activados sin reaccionar. La amina de la glicina reacciona con el éster activado del polipéptido para formar enlaces amida estables. Sin estar ligado por mecanismo o teoría, los aductos de beta-alanina se forman por la reacción de beta-alanina activada con las aminas primarias del polipéptido. Esta reacción produce enlaces amida estables. La beta-alanina activada se produce por la reacción de tres moles de NHS con un mol de EDC.

Para obtener la reducción de 2-4 log de la actividad citotóxica con respecto a las toxinas mutantes modificadas genéticamente (6-8 log, con respecto a las toxinas nativas), las toxinas mutantes inactivadas químicamente deben tener valores de EC_{50} de ≥ 1000 $\mu\text{g/ml}$. Además de la reducción de la actividad citotóxica, puede ser ventajoso retener los epitopes clave determinados por el análisis de transferencia de mancha. Hasta la fecha, se han identificado numerosas condiciones de reacción que cumplen tanto los criterios de reducción de citotoxicidad como de reconocimiento del epitope. Se han preparado varios lotes de toxinas mutantes inactivadas para los estudios de animales y los datos analíticos de algunos lotes representativos se muestran en las Tablas 7A y 7B, Tabla 8A y 8B.

Tabla 7A: La Toxina A mutante inactivada químicamente es segura y antigénica					
Muestra #	Muestra de toxina ID	Tratamiento	CPE EC_{50}	Reducción de la toxicidad	Reactividades para mAbs
			$\mu\text{g/ml}$	Escala log	
1	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44905-160A	Formalina	>1000	6,4	Media/alta
2	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44166-166	EDC	>1000	6,4	Alta
3	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44905-170A	Formalina	>1000	6,4	Baja
CONTROLES					
4	TcdA wt (de la lista de prod biol))	ninguno	390 $\mu\text{g/ml}$	1	Alta
5	TcdB wt (de la lista de prod biol))	ninguno	3,90 $\mu\text{g/ml}$	No aplicable	Ninguno
6	TcdA rMutante TM Genética L36901-79 (SEQ ID NO: 4)	ninguno	12,5 $\mu\text{g/ml}$	4,5	Alta
7	Toxoide A Lista proa Biol	Formalina	No realizado	---	Baja

Tabla 7B: la toxina A mutante inactivada químicamente es segura y antigénica								
Muestra #	Muestra de toxina ID	Tratamiento	Reactividad con mAb (transferencia de mancha, condiciones no desnaturalizantes)					
			N-terminal mAb#6	MAB dominio medio # 102	C-terminal (neut)			
					A80-29	A3-25	A60-22	A65-33
1	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44905-160A	Formalina	++	++	++++	++	++++	++++
2	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44166-166	EDC	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44905-170A	Formalina	+	+	++	++	++	+
CONTROLES								
4	TcdA wt (de la lista de prod biol))	ninguno	++++	+++	++++	++++	++++	++++
5	TcdB wt (de la lista de prod biol))	ninguno	—	—	—	—	—	—
6	TcdA rmutante genética TML36901-79 (SEQ ID NO: 4)	ninguno	++++	++++	++++	++++	++++	++++
7	Toxoide A lista de prod biol	Formalina	—	—	+	—	++	+

Lista =Lista de productos biológicos; CPE= ensayo del efecto citopático; EC₅₀ = la concentración mínima donde 50% de las células muestran citotoxicidad; mAbs= anticuerpos monoclonales; neut= neutralizantes; ND= no realizado; TM= mutante de sitio activo y escisión (“triple mutante”)

Tabla 8A: La toxina B mutante inactivada químicamente es segura y antigénica					
Muestra #	Muestra de toxina ID	Tratamiento	CPE EC ₅₀	Reducción de la toxicidad	Reactividades para los mAb
			µg/ml	Escala log	
1	Mutante TcdB L44905-182 (SEQ ID NO: 6)	Formalina	>1000	8,4	Medio/alta
2	Mutante TcdB L34346-38A (SEQ ID NO: 6)	EDC	>1000	8,4	Alta
3	Mutante TcdB L44905-170B (SEQ ID NO: 6)	Formalina	>1000	8,4	Baja
CONTROLES					
4	TcdA wt (de la lista de prod biol))	ninguno	390 pg/ml	No aplicable	Ninguno
5	TcdB wt (de la lista de prod biol))	ninguno	3,90 pg/ml	1	Alta
6	Toxina B rmutante TM Genética (SEQ ID NO: 6) L34346-022	ninguno	69 ng/ml	4,2	Alta
7	Toxoide A List	Formalina	No realizado	---	Medio

Tabla 8B: La toxina B mutante inactivada químicamente es segura y antigénica						
Muestra #	Muestra de toxina ID	Tratamiento	Reactividad con mAb (transferencia de mancha, condiciones no desnaturalizantes)			
			N-terminal aa 1-543		Medio-/C-terminal aa 544-2366	
			B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
1	Mutante TcdB (SEQ ID NO: 6) L44905-160A	Formalina	+++	+++	++	++
2	Mutante TcdB (SEQ ID NO: 6) L44166-166	EDC	++++	++++	++++	++++
3	Mutante TcdB (SEQ ID NO: 6) L44905-170A	Formalina	++	+	+/-	-
CONTROLES						
4	TcdA wt (de la lista de prod biol))	ninguno	—	—	—	—
5	TcdB wt (de la lista de prod biol))	ninguno	++++	+++	++++	++++
6	TcdB rMutante TM Genética L34346-022 (SEQ ID NO: 6)	ninguno	++++	++++	++++	++++
7	Toxoide B Lista	Formalina	+++	+++	+++	+++

Lista =Lista de productos biológicos; CPE= ensayo de efecto citopático; EC₅₀ = la concentración donde 50% de las células muestran citotoxicidad; mAbs= anticuerpos monoclonales; neut= neutralizantes; ND= no realizado; TM= mutante de sitio activo y escisión (“triple mutante”)

Ejemplo 19: Purificación

Al final de la fermentación, el fermentador se enfría. La suspensión celular se recupera por centrifugación continua y se resuspende en el buffer apropiado. La lisis de la suspensión celular se obtiene por la homogenización de alta presión. Para la toxina A mutante, el homogenizado flocula y la solución floculada se somete a centrifugación continua. Esta solución se filtra y luego se transfiere para el procesamiento posterior. Para la toxina B mutante, el homogenizado se clarifica por centrifugación continua, y luego se transfiere para el procesamiento posterior.

La toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) se purifica usando dos etapas cromatográficas seguidas por un intercambio de buffer final. El lisado clarificado se carga sobre una columna de interacción hidrofóbica (HIC) y la toxina mutante unida se eluye usando un gradiente de citrato de sodio. La mezcla de producto de la columna HIC luego se carga en una columna de intercambio catiónico (CEX) y la toxina A mutante unida se eluye usando un gradiente de cloruro de sodio. La mezcla CEX que contiene toxina A mutante purificada se intercambia en el buffer final por y diafiltración. La toxina A mutante purificada se intercambia con el buffer intermedio del principio activo final por diafiltración. Después de la diafiltración, el retenido se filtra a través de un filtro de 0,2 micrones antes de inactivar químicamente un principio activo final. La concentración de proteína se dirige a 1-3 mg/ml.

La toxina B mutante (SEQ ID NO: 6) se purifica usando dos etapas cromatográficas seguidas por un intercambio de buffer final. El lisado clarificado se carga en una columna de intercambio aniónico (AEX), y la toxina mutante unida se eluye usando un gradiente de cloruro de sodio. Se añade citrato de sodio a la mezcla de producto de la columna AEX y se carga en una columna de interacción hidrofóbica (HIC). La toxina mutante unida se eluye usando un gradiente de citrato de sodio. La mezcla HIC que contiene el polipéptido de la toxina mutante purificada (SEQ ID NO: 6) se intercambia en el buffer final por diafiltración. La toxina B mutante purificada se intercambia con el buffer intermedio del principio activo final por diafiltración. Después de la diafiltración, el retenido se filtra a través de un filtro de 0,2 micrones antes de inactivar químicamente un principio activo final. La concentración de proteína se dirige a 1-3 mg/ml.

Ejemplo 20: Inactivación con formaldehído/glicina

Después de la purificación, las toxinas A y B mutantes genéticas (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) se inactivan durante 48 horas a 25°C usando 40 mM (1,2 mg/ml) de formaldehído. La inactivación se lleva a cabo a pH $7,0 \pm 0,5$ en 10 mM de fosfato, 150 mM de buffer de cloruro de sodio que contiene 40 mM (3 mg/ml) de glicina. El período de inactivación se ajusta para exceder tres veces el período necesario para la reducción de la EC_{50} en las células IMR90 a más de 1000 ug/ml. Después de 48 horas, la actividad biológica se reduce 7 a 8 $\log_{10}$ con respecto a la toxina nativa. Después de 48 horas de incubación, la toxina mutante inactivada se intercambia en el buffer de principio activo final por diafiltración. Por ejemplo, usando un casete de ultrafiltración de acetato de celulosa regenerada de 100 kD, la toxina inactivada se concentra a 1-2 mg/ml y se intercambia con el buffer.

Ejemplo 21: Inactivación de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC)/N-hidroxisuccinimida (NHS)

Después de la purificación, las toxinas mutantes genéticas (SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6) se inactivan durante 2 horas a 25°C usando 0,5 mg de EDC y 0,5 mg de NHS por mg de toxinas A y B mutantes genéticas purificadas (aproximadamente 2,6 mM y 4,4 mM respectivamente). La reacción se inactiva con la adición de glicina a una concentración final de 100 mM y las reacciones se incuban durante 2 horas adicionales a 25°C. La inactivación se lleva a cabo a pH $7,0 \pm 0,5$ en 10 mM de fosfato, 150 mM de buffer de cloruro de sodio. El período de inactivación se ajusta para exceder tres veces el período necesario para la reducción de la EC_{50} en las células IMR90 a más de 1000 ug/ml. Después de 2 horas, la actividad biológica se

reduce 7 a 8 log₁₀ con respecto a la toxina nativa. Después de 4 horas de incubación, la toxina mutante inactivada se intercambia en el buffer de principio activo final por diafiltración. Por ejemplo, usando un casete de ultrafiltración de acetato de celulosa regenerada de 100 kD, la toxina inactivada se concentra a 1-2 mg/ml y se intercambia con el buffer.

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos usados en la sección de Ejemplos se refieren a una composición producida de acuerdo con la presente descripción del Ejemplo 21: “toxina triple mutante tratada con EDC/NHS”; “toxina mutante inactivada con EDC”; “principio activo [A/B] de la toxina mutante”; “toxina mutante EI”; “toxina triple mutante EDC/NHS.” Por ejemplo, los siguientes términos son sinónimos: “toxina A triple mutante tratada con EDC/NHS”; “toxina A mutante inactivada con EDC”; “principio activo de la toxina A mutante”; “toxina A mutante EI”; “toxina triple mutante EDC/NHS.” A modo de otro ejemplo, los siguientes términos son sinónimos: “Toxina B triple mutante tratada con EDC/NHS”; “Toxina B mutante inactivada con EDC”; “principio activo de la toxina B mutante”; “toxina B mutante EI”; “toxina B triple mutante EDC/NHS.”

El principio activo de la toxina A mutante y la principio activo de la toxina B mutante se fabrican usando un proceso discontinuo, que incluye (1) fermentación de la cepa de *C. difficile* negativa para toxina (VPI 11186) que contiene un plásmido que codifica el respectivo polipéptido de la toxina triple mutante genética (en un medio que incluye hidrolizado de soja, extracto de levaduras HY YEST™ 412 (Sheffield Bioscience), glucosa, y tiamfenicol), (2) purificación de la toxina mutante genética (el “intermediario del principio activo”) del lisado libre de células usando procedimientos cromatográficos de intercambio iónico e interacción hidrofóbica a al menos más de 95% de pureza, (3) inactivación química por tratamiento con EDC/NHS seguido por inactivación/finalización con glicina, y (4) intercambio en la matriz del buffer final.

Ejemplo 22: Estudios que avalan las condiciones de inactivación y formulación

Para optimizar la inactivación química de las toxinas mutantes genéticas, se realizó un diseño estadístico del experimento (DOE). Los factores examinados en el DOE incluyeron temperatura, concentración de formaldehído/glicina, concentración de EDC/NHS y tiempo (Tabla 9 y 10). Para controlar la pérdida de actividad biológica, se determinaron los valores de EC₅₀ de las células IMR90. Además, la morfología celular de las células IMR-90 también se observaron varios puntos de tiempo pos-tratamiento. Ver Figura 9, que muestra la morfología a 72 horas pos-tratamiento. Para determinar el efecto sobre la estructura de la proteína, se controló el reconocimiento usando

análisis de transferencia de mancha mediante un panel de anticuerpos monoclonales originados contra diferentes dominios de la toxina.

Tabla 9: Parámetros analizados Formaldehído/Glicina DOE	
Parámetros	Rango analizado
Tiempo (días)	1 a 14
Temperatura (°C)	4 a 37
Toxina concentración (mg/ml)	1 a 1,25
Formaldehído concentración (mM)	2 a 80
Glicina concentración (mg/ml)	0 a 80

Tabla 10: Parámetros analizados EDC/NHS DOE	
Parámetros	Rango analizado
Tiempo (horas)	1 a 4
Temperatura (°C)	25 a 35
Toxina concentración (mg/ml)	1 a 1,25
EDC (mg/mg toxina)	0,25 a 2,5
NHS (mg/mg toxina)	0 a 2,5

En la inactivación con formaldehído/glicina de las toxinas mutantes de *C. difficile*, se eligieron las condiciones de reacción finales de modo de que se obtuvo el nivel de reducción deseado de la actividad citotóxica (7 a 8 log₁₀) mientras que se maximiza el reconocimiento del epítipo. Ver Ejemplo 20 anterior.

En la inactivación con EDC/NHS de las toxinas mutantes de *C. difficile*, se eligieron las condiciones de reacción finales de modo de que se obtuvo el nivel de reducción deseado de la actividad citotóxica (7 a 8 log₁₀) mientras que se maximiza el reconocimiento del epítipo. Ver Ejemplo 21 anterior.

En una forma de realización alternativa, la reacción de EDC-NHS se inactivó por la adición de alanina, que inactivó suficientemente la reacción. El uso de alanina puede producir una modificación de la toxina mutante proteína que es similar a la modificación cuando la reacción es inactivada por la glicina. Por ejemplo, la inactivación por la adición de alanina puede producir un resto de alanina en una cadena lateral de un ácido glutámico y/o residuo de ácido aspártico de la toxina mutante. En otra forma de realización alternativa, la reacción de EDC-NHS se inactivó por la adición de metil éster de glicina, que inactivó suficientemente la reacción.

La producción de toxina A y toxina B triple mutante de *C. difficile* inactivada químicamente en condiciones optimizadas produjo en una reducción adicional de citotoxicidad residual a un nivel no detectable (>1000 µg/ml – la concentración más alta analizada por medio del ensayo CPE), a la vez que retienen la antigenicidad medido por su reactividad a los anticuerpos neutralizantes específicos de antígeno.

Los resultados mostrados en la Tabla 28 demuestran una reducción gradual en la citotoxicidad de la toxina wt a través de las toxinas triple mutantes tratadas con EDC/NHS. La marcación con inmunofluorescencia confirmó que las toxinas triple mutantes (SEQ ID NO: 4 y 6) y los principios activo de la toxina mutante exhibieron unión comparable a las células IMR-90 lo que sugiere que la pérdida de citotoxicidad no se debió a la reducción de la unión a las células (datos no mostrados. El comparación con el principio activo de la toxina A mutante, el principio activo de la toxina B mutante obtuvo una reducción de la citotoxicidad mayor, que es compatible con la potencias ~600 veces más alta observada de la TcdB en comparación con TcdA.

Tabla 28. Síntesis de citotoxicidad

Toxina	Muestra	EC ₅₀	Veces de reducción de la citotoxicidad
A	TcdA (SEQ ID NO: 1)	1,6 ng/ml	1
	Toxina A triple mutante (SEQ ID NO: 4)	12,5 µg/ml	7800
	Principio activo de la toxina A mutante	>1000 µg/ml	>625,000
B	TcdB (SEQ ID NO: 2)	2,5 pg/ml	1
	Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6)	45 ng/ml	18,000
	Principio activo de la toxina B mutante	>1000 µg/ml	>400,000,000

Los resultados del ensayo de citotoxicidad para la toxina B mutante modificado por EDC solo, o por EDC y sulfo-NHS también se evaluaron. Ver Tabla 29.

Tabla 29

Muestra	Citotoxicidad EC ₅₀ , mg.ml ⁻¹ (CPE)	Comentario
TcdB TM (SEQ ID NO: 6), no modificada	0,03	
TM TcdB-EDC 1, no NHS	<0,97	Reaccionó con EDC solo
TM TcdB-EDC 2, no NHS	<0,97	Preparación duplicada
TM TcdB-EDC 3, sulfo-NHS (0,5x)	125	Reaccionó con EDC y sulfo-NHS
TM TcdB-EDC 4, sulfo-NHS (0,5x)	125	Preparación duplicada
TM TcdB-EDC 3, sulfo-NHS (1,0x)	250	Reaccionó con EDC y sulfo-NHS
TM TcdB-EDC 4, sulfo-NHS (2,0x)	750	Reaccionó con EDC y sulfo-NHS

Condiciones: La toxina B triple mutante ("TM TcdB")(SEQ ID NO: 6) se modificó en las relaciones de peso de toxina B mutante:EDC:sulfo-NHS = 1: 0,5: 0,94. Esta relación es el equivalente molar (corregido para MW más alta de sulfo-NHS) a la reacción de EDC/NHS estándar descrita en el Ejemplo 21. Para determinar el efecto de sulfo-NHS, la relación de sulfo-NHS varió de 0,5x a 2x la relación estándar. Las reacciones duplicadas se realizaron en 1 x PBS pH 7,0 a 25 °C, y se iniciaron por la adición de solución de EDC. Después de 2 horas, las reacciones se inactivaron por la adición de glicina 1 M pH 7,0 (0,1 M concentración final) y se incubaron durante 2 horas adicionales. Las reacciones inactivadas se desalinizaron y el principio activo de la toxina B mutante ("TM TcdB-EDC") se concentró usando dispositivos Vivaspin 20, y se filtraron en forma estéril en viales estériles y se remitieron para la evaluación en un ensayo de citotoxicidad.

En la misma relación molar, sulfo-NHS redujo la EC₅₀ a aproximadamente 250 ug/ml en comparación con >1000 ug/ml para NHS. Aun a dos veces la relación molar, sulfo-NHS no parecer ser tan efectivo como NHS para disminuir la citotoxicidad. Ver Tabla 30.

Tabla 30

Modificación	Digesto de referencia (TcdB EDC 004)	Digesto control de NHS (TcdB EDC 001)	Digesto de muestra con Sulfo-NHS
aducto de glicina (+57 da)	49	29	35
beta-alanina (+71 da)	24	19	0
entrecruzamientos (-18 da)	7	4	3
dehidroalanina (-34 da)	6	5	4
No modificada	273	195	217

Para determinar el número y tipo de modificaciones, se realizó el mapeo peptídico en muestras de toxinas B triple mutante inactivadas con EDC/NHS y EDC/sulfo-NHS. Se observaron cantidades similares de aductos de glicina, entrecruzamientos y modificaciones de dehidroalanina en ambas muestras. Sin embargo en la muestra de sulfo-NHS muestra, no se observó beta-alanina.

La toxina B tipo salvaje (SEQ ID NO: 2) se inactivó usando el protocolo estándar (ver Ejemplo 21); toxina B:EDC:NHS 1:0,5:0,5, 25°C durante 2 horas in 1 x PBS pH 7,0, luego se inactivó con glicina 1 M (0,1 M de concentración final) y se incubó durante 2 horas adicionales. La muestra se desalinizó, concentró y remitió para

el ensayo de citotoxicidad. La EC₅₀ para estas muestras fue <244 ng/ml.

Ejemplo 23: Estudios de inversión

Para determinar si la inversión se produce con las toxinas mutantes de C. difficile inactivadas de formaldehído/glicina o EDC/NHS, muestras de toxinas mutantes inactivadas (1 mg/ml) se incubaron a 25°C durante cinco-seis semanas. Se extrajeron alícuotas cada semana y se determinaron los valores de EC₅₀ en las células IMR90. Una muestra inactivada de formaldehído/glicina no contenía formaldehído y una muestra contenía 0,01% de formaldehído. La EC₅₀ se midió con el ensayo CPE.

Tabla 11: Resultados del estudio de inversión de TcdA inactivada			
Tiempo de incubación (Días)	EC ₅₀ (ensayo de células IMR90)		
	Inactivado de formalina		EDC/NHS
	Sin formaldehído	0,01% de formaldehído	
0	1000 ug/ml	1000 ug/ml	1000 ug/ml
7	740 ug/ml	ND	1000 ug/ml
14	493 ug/ml	1000 ug/ml	1000 ug/ml
21	395 ug/ml	ND	1000 ug/ml
28	395 ug/ml	1000 ug/ml	1000 ug/ml
35	326 ug/M	ND	ND

A 25°C en ausencia de formaldehído residual, se observa inversión parcial (Tabla 11). Después de cinco semanas, la actividad citotóxica aumentó aproximadamente 3 veces. Si bien la actividad citotóxica aumentó, después de cinco semanas hubo aún una reducción de 7 log₁₀ con respecto a la toxina nativa. La inversión se evitó por completo por la inclusión de formalina a una concentración de 0,010%. No se observó inversión en la muestra inactivada por EDC/NHS. A lo largo de 6 semanas de incubación, los valores de EC₅₀ quedaron en el nivel inicial de >1000 µg/ml para los cuatro lotes de toxina A triple mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) y toxina B triple mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 6). En contraste, los valores de EC₅₀ de la toxina A triple mutante tratada con FI (SEQ ID NO: 4) y toxina B triple mutante tratada con Fi (SEQ ID NO: 6) no fueron estables y declinaron a valores de EC₅₀ inaceptablemente bajos, lo que indica un aumento de la citotoxicidad o inversión de la inactivación. Ver Tabla 11.

Además de reducir en forma estable la citotoxicidad a un nivel no detectable (>1000 µg/ml, medido por el ensayo CPE), las toxinas mutantes inactivadas usando EDC/NHS retuvieron epítopes importantes que son blancos de los Amb neutralizantes de toxina. Ver Tabla 31. Las toxinas mutantes FI mostraron una pérdida de los mismos determinantes antigénicos.

Tabla 31. La inactivación por EDC/NHS redujo la citotoxicidad de las toxinas mutantes genéticas y mantuvieron determinantes antigénicos importantes

Muestra	EC ₅₀	Reducción de la citotoxicidad con respecto a la toxina wt (log ₁₀) ^a	Unión máxima de (Rmax) ^b Neut mAb ^d		
			1 ^c	2	3
Triple mutante A (SEQ ID NO: 4)	12,5 µg/ml	4,5	100	100	100
FI- Triple mutante A	>1000 µg/ml	>6,4	55	59	53
EDC/NHS- Triple mutante A	>1000 µg/ml	>6,4	90	94	103
Triple mutante B (SEQ ID NO: 6)	69 ng/ml	4,3	100	100	100
FI-Triple mutante B	>1000 µg/ml	8,4	67	67	36
EDC/NHS-Triple mutante B	>1000 µg/ml	8,4	87	78	73

a la citotoxicidad se midió usando el ensayo CPE en las células IMR90

b valores determinados por análisis Biacore™ usando mAbs neutralizantes múltiples dirigidos a varios epitopes de toxina no superpuestos

c los valores son promedios de dos experimentos

d Para las primeras tres hileras, el mAb neut “1”, “2”, “3” se refieren a los mAb A60-22, A80-29, y A65-33 para la toxina A, respectivamente. Para las tres hileras inferiores, el mAb neut “1”, “2” y “3” se refieren a los mAb B8-26, B59-3, y B-56-15 para la toxina B, respectivamente.

Ejemplo 24: Estudios de inmunogenicidad preclínica

Los objetivos preclínicos clave incluyen analizar las composiciones que incluyen toxinas A y B mutantes de *C. difficile* en animales pequeños y primates no humanos (NHP). Los ratones y hámsteres se inmunizaron para determinar, entre otras cosas, si las composiciones de *C. difficile* son capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra las toxinas A y B mutantes. Los antígenos se analizaron para determinar la inducción de respuestas de los anticuerpos de neutralización séricos después de una serie de inmunizaciones en ratones, hámsteres, y cynomolgus macaques. Las toxinas mutantes genéticas y/o inactivadas genéticamente se formularon en buffer neutro, buffer de fosfato de aluminio, o buffer que contiene ISCOMATRIX como un adyuvante en algunas formas de realización. Las respuestas de anticuerpo neutralizante se analizaron en general aproximadamente dos a cuatro

semanas después de cada refuerzo o la dosis final.

El ensayo de neutralización de toxina demuestra la capacidad de un antisuero para neutralizar el efecto citotóxico mediado por TcdA o TcdB de *C. difficile* y en consecuencia es capaz de medir la actividad funcional de los anticuerpos que están presentes en una muestra. Se realizó un ensayo de neutralización de la toxina en una línea celular de fibroblastos pulmonares humanos, IMR-90, que es sensible a TcdA y TcdB. En breves palabras, una placa de microtitulación de 96 pocillos se sembró en las células IMR-90 que sirve como el blanco de citotoxicidad mediada por toxina. Cada muestra de suero de ensayo se analizó por separado para determinar la capacidad de neutralizar la TcdA y TcdB. Las diluciones seriadas de los antisueros de ensayo se mezclaron con concentraciones fijas de TcdA o TcdB e incuban a 37°C durante 90 minutos en un incubador humidificado (37°C /5% de CO₂) para permitir que ocurra la neutralización de las toxinas. Para control de calidad, todas las placas incluyeron un estándar de referencia y controles que incluyen anticuerpos antitoxina de título conocido. Después de 90 minutos, la mezcla de toxina-antisuero se añadió a la monocapa de células de IMR-90 y las placas se incubaron durante unas 72 horas adicionales. Posteriormente, el sustrato CellTiter-Glo® se añadió a la placa de ensayo para determinar los niveles de trifosfato de adenosina (ATP) presentes en células metabólicamente activas y se midió como unidades de luminiscencia relativa (RLU). Un gran nivel de ATP indica alta viabilidad celular, y los niveles son directamente proporcionales a la cantidad de neutralización de la toxina por el anticuerpo presente en la muestra. Para los datos preclínicos, los datos de RLU se graficaron contra el valor de dilución de la muestra de antisuero de ensayo para generar una curva de ajuste de regresión logística de cuatro parámetros (4-PL). Los títulos de neutralización se expresaron como el valor de la dilución de la muestra que exhibió el 50% de reducción de la citotoxicidad.

Ejemplo 25: Estudio de inmunogenicidad del ratón: muC. *difficile*2010-06

El fin de este estudio fue evaluar la inmunogenicidad de dos formas de la toxina B de *C. difficile* mutante (SEQ ID NO: 6), cada uno inactivado químicamente por métodos diferentes. En este estudio, la toxina B mutante no tratada (SEQ ID NO: 6) (genéticamente inactivada pero no inactivada químicamente) se usó como un control, con y sin adyuvante.

Los grupos de 10 ratones se inmunizaron por vía intramuscular con 10 µg de un inmunógeno de acuerdo con la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis de toxina B mutante inactivada químicamente (SEQ ID NO: 6) en ratones

Grupo	Inmunógeno	Dosis	No.	Vía	Esquema
1	Toxina B mutante inactivada con formalina ^a en AlPO ₄ ^c	10 µg	10	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 4, 8
2	Forma de Toxina B mutante inactivada 2 ^b en AlPO ₄ ^c	10 µg	10	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 4, 8
3	Toxina B mutante inactivada genética sin adyuvante	10 µg	10	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 4, 8,
4	Toxina B mutante inactivada genética en AlPO ₄ ^c	10 µg	10	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 4, 8,
^a inactivación química = Tratados con formalina/glicina 10°C durante 7 días ^b inactivación química = Tratados con EDC/NHS, 30°C durante 2 horas ^c concentración de ion aluminio= 0,5 mg/ml					

Resultados: No hubo eventos adversos en los ratones después de cada administración de los candidatos vacuna. Como se ilustra en Figura 10, los ratones en cada grupo desarrollaron anticuerpos neutralizantes anti-toxina B robustos significativas después de la tercera dosis con las respectivas toxinas mutantes.

Sobre la base de los títulos de la semana 12, parece que en los ratones la toxina B mutante inactivada con EDC (Grupo 2) y las toxinas mutantes inactivadas por la formalina (Grupo 1) generó respuestas neutralizantes potentes.

En ausencia de inactivación química, la toxina B mutante genética (SEQ ID NO: 6) generó respuestas neutralizantes después de dos dosis (Grupos 3-4, semana 8), que se reforzaron después de la tercera dosis (Grupos 3-4, semana 12).

Ejemplo 26: Estudio de inmunogenicidad de ratones: muC. difficile2010-07:

El fin de este estudio fue para evaluar la inmunogenicidad de toxinas de A y B mutantes de C. difficile inactivadas químicamente (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente), solos o en combinación. Los inmunógenos para todos los grupos se formularon con fosfato de aluminio fosfato como adyuvante.

Los grupos de 5 ratones se inmunizaron por vía intramuscular con 10 µg de un inmunógeno de acuerdo con la Tabla 13.

Tabla 13. Análisis de las toxinas A y B genéticas mutantes inactivadas químicamente (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) en ratones

Grupo	Inmunógeno	Dosis	No.	Grupo	Esquema
1	Toxina B mutante inactivada con formalina ^a (SEQ ID NO: 6) en AlPO_4^c	10 μg	5	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 4, 8, 12
2	Toxina B mutante inactivada EDC ^b (SEQ ID NO: 6) en AlPO_4^c	10 μg	5	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 4, 8, 12
3	Toxina A mutante inactivada con formalina ^a (SEQ ID NO: 4) forma 1 en AlPO_4^c	10 μg	5	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 4, 8, 12
4	Toxina A mutante inactivada con EDC (SEQ ID NO: 4) en AlPO_4^c	10 μg	5	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 4, 8, 12
5	Toxinas mutantes A+B inactivadas en formalina AlPO_4^c	10 μg cada uno	5	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 4, 8, 12
^a Tratamiento con formalina= tratado con formalina/glicina durante 2 días a 25°C; la toxina mutante no era citotóxica y retuvo la unión de todos los anticuerpos monoclonales específicos de la toxina mutante analizados ^b Tratamiento con EDC = Tratados con EDC/NHS durante 4 horas a 30°C; la toxina mutante no era citotóxica y estuvo la unión de todos los anticuerpos monoclonales específicos de la toxina mutante analizados ^c concentración de ion aluminio = 0,5 mg/ml					

Resultados: No hubo eventos adversos en los ratones después de cada administración de las vacunas candidatas. Como se ilustra en Figura 11, después de dos dosis de toxinas mutantes genéticas inactivadas químicamente, los anticuerpos anti-toxina A neutralizantes (Grupos 3-5) se reforzaron a títulos entre 3 y 4log₁₀ mientras que los anticuerpos anti-toxina B neutralizantes (Grupos 1-2, 5) permanecieron bajos a no detectables, lo que es compatible con los datos del estudio de ratones descrito antes (Figura 10). Los anticuerpos anti-toxina B neutralizantes reforzados a 2-3 log₁₀ en los grupos 1, 2, y 5 después de la tercera dosis (títulos de la semana 12) y alcanzaron su pico dos semanas después de la cuarta dosis (títulos de la semana 14). Los títulos de anticuerpo neutralizante de anti-toxina A en los grupos 3-5 aumentaron levemente después de la tercera (títulos de la semana 12) y cuarta inmunizaciones (títulos de la semana 14).

Ejemplo 27: Estudio de inmunogenicidad del hámster: hamC. *difficile*2010-02:

El fin de este estudio fue evaluar la inmunogenicidad y potencial protector de toxinas A y B triple mutante de *C. difficile* inactivadas químicamente en el modelo de hámster dorado Sirio. El modelo de hámster dorado Sirio representa el mejor modelo de exposición disponible para simular la CDAD humana. Se usaron los mismos lotes de toxinas A y B mutantes utilizadas en el estudio de ratón muC. *difficile*2010-07 en este estudio. Como un control, un grupo administró toxinas mutantes sin adyuvante que contiene aluminio.

Los grupos de 5 hámsteres dorados sirios se inmunizaron por vía intramuscular con 10 µg de un inmunógeno de acuerdo con la Tabla 14.

Tabla 14. Análisis de toxinas A y B mutantes inactivada químicamente (SEQ ID NOS: 4 y 6, respectivamente) en hámsteres (hamC. *difficile*2010-02)

Grupo	Inmunógeno	Dosis	No.	Vía	Esquema
1	Toxinas mutantes A+B inactivada con formalina ^a (SEQ ID NOS: 4 y 6) en AIPO ₄ ^c	10 µg cada uno	5	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 4, 8, 12
2	Toxinas mutantes A+B inactivadas con formalina (SEQ ID NOS: 4 y 6) en PBS (no adyuvante)	10 µg cada uno	5	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 4, 8, 12
3	Toxinas mutantes A+B inactivada con EDC ^b (SEQ ID NOS: 4 y 6) en AIPO ₄ ^c	10 µg cada uno	5	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 4, 8, 12
4	Lista de prod biológicos de toxoide en AIPO ₄ ^c	10 µg cada uno	5	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 4, 8, 12
^a Tratamiento con formalina = tratados con formalina/glicina durante 2 días a 25°C; La toxina mutante no era citotóxica y retuvo la unión a todos los anticuerpos monoclonales específicos de la toxina mutante ^b Tratamiento con EDC = tratado con EDC/NHS durante 4 horas a 30°C; la toxina mutante no era citotóxica y retuvo la unión a todos los anticuerpos monoclonales específicos de la toxina mutante ^c concentración de ion aluminio = 0,5 mg/ml 1. Animales: 15 Hámsteres dorados sirios, hembra, 6-8 semanas/ 100-130 g cada uno. 2. Vacunación: IM, 0,05 ml cada uno, de acuerdo con el anterior esquema. Los toxoides serán provistos por el desarrollo del proceso y se formularán en diluyente AIPO ₄ por el grupo de formulaciones. El Grupo 2 servirá como un grupo control sin adyuvante. 3. Sangrado: Todos los hámsteres se sangrarán en las semanas 0, 4, 8, y 12, justo antes de cada inmunización. 4. Análisis de muestra de suero: Ensayo de neutralización					

Resultados: No se observaron eventos adversos después de la inmunización con las toxinas mutantes. Como se ilustra en Figura 12, después de una dosis única de

toxinas mutantes, las respuestas neutralizantes anti-toxina A estuvieron entre 2-3 $\log_{10}$ para las toxinas mutantes inactivadas con formalina (Grupos 1-2) y entre 3-4 $\log_{10}$ para las toxinas mutantes inactivadas con EDC (Grupo 3). Después de la segunda dosis, se administró refuerzo de los anticuerpos anti-toxina A en los tres grupos. Los anticuerpos anti-toxina A de los tres grupos no parecieron aumentar después de la tercera dosis. Se observó un resultado similar después de la cuarta inmunización, donde se observó un aumento del título en el grupo inactivado con formalina que no contenía el aluminio adyuvante (Grupo 2).

Las respuestas neutralizantes anti-toxina B fueron no detectables en los grupos de toxinas mutantes inactivadas con formalina (Grupos 1-2) y estaban solo por encima 2 $\log_{10}$ para las toxinas mutantes inactivadas con EDC (Grupo 3) después de una dosis única. Después de la segunda dosis, los títulos de anticuerpo neutralizante anti-toxina B en los grupos de dosis inactivados con formalina (Grupos 1-2) aumentaron a 3-4 $\log_{10}$ mientras en el grupo inactivado con EDC (Grupo 3) aumentaron a 4-5 $\log_{10}$. Para los tres grupos, se observaron aumentos en los títulos de anticuerpo neutralizante anti-toxina B después de la tercera y/o cuarta dosis, todos los grupos que alcanzan un título de pico en la semana 16 (después de la última dosis). Ver Figura 12.

En la Figura 13, el nivel de las respuestas de anticuerpo neutralizante contra las toxinas mutantes genéticas inactivadas químicamente (Figura 12) se comparó con los inducidos por la List Biological Laboratories, Inc. (Campbell, California) (también denominado en la presente como “lista de prod biol” o “Lista de productos biológicos”) toxoides (es decir, se prepararon por la inactivación de formalina de toxinas tipo salvaje; reactivo control usado para establecer el modelo de exposición del hámster).

Como se usa en la presente, “FI” en las figuras y tablas se refieren al tratamiento de formalina/glicina de las toxinas, 2 días a 25°C, a menos que se indique lo contrario. Como se usa en la presente, “EI” en figuras y tablas se refiere al tratamiento con EDC/NHS durante 4 horas a 30°C, a menos que se indique lo contrario. En la Figura 13, 5 animales hámster se trataron con la respectiva composición de la toxina mutante, mientras que 11 animales hámster se trataron con el toxoide comercializado de la lista de productos biológicos.

Los datos de la Figura 13 muestran que, en hámsteres administrados de acuerdo con la Tabla 14, los títulos de anticuerpo neutralizante respectivos contra la toxina A (Figura 13A) y toxina B (Figura 13B) inducidos por la composición inmunogénica que incluye las toxinas mutantes inactivada con EDC después de dosis es más alta que los respectivos títulos del anticuerpo neutralizante inducidos por los

toxoides de la Lista de productos biológicos.

Ejemplo 28: Estudio de inmunogenicidad de hámster: *C. difficile* ham2010-02 (continuación)

Para evaluar la eficacia protectora de las toxinas mutantes, a los hámsteres inmunizados, junto con un grupo control de los animales no inmunizados, se administraron primero una dosis oral de antibiótico clindamicina (30 mg/kg) para alterar la flora intestinal normal. Después de cinco días, los hámsteres se expusieron con una dosis oral de las esporas de *C. difficile* tipo salvaje (cepa 630, 100 cfu por animal). Los animales se controlaron diariamente durante once días pos-exposición para los signos de la CDAD, que en los hámsteres se conoce como cola húmeda. Usando un sistema de puntuación clínica de numerosos parámetros diferentes, se sacrificaron los animales que se determinó que tenían severa CDAD. Los parámetros incluyeron actividad después de la estimulación, deshidratación, excremento, temperatura, y peso, etc., que son conocidos en la técnica.

En el día 11, el estudio se terminó y se sacrificaron todos los animales supervivientes. La Figura 14 muestra las curvas de supervivencia para cada uno de los tres grupos inmunizados (Grupos 1-3, de acuerdo con la Tabla 14) en comparación con los controles no inmunizados. Como se puede observar, los animales no inmunizados desarrollaron CDAD severa y requirieron eutanasia entre los días 1-3 pos exposición (0% de supervivencia). Ambos grupos tratados con toxina mutante inactivada con formalina presentaron, curvas de supervivencia 60% con animales que no requieren eutanasia hasta el día 3 (Grupo 1) o día 4 (Grupo 2). El grupo tratado con toxina mutante inactivada con EDC presentó una curva de supervivencia 80%, con 1 (fuera de 5) animal que requiere eutanasia en el día 7. Por consiguiente, los hámsteres se protegieron de la exposición letal con las esporas de *C. difficile*.

Ejemplo 29: Estudio de inmunogenicidad de hámster: ham*C. difficile*2010-03: Inmunogenicidad de toxinas mutantes de *C. difficile* genéticas y químicamente inactivadas

El fin de este estudio fue evaluar la inmunogenicidad de las toxinas A y B triple mutantes de *C. difficile* inactivada químicamente sin adyuvantes (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) en el modelo de hámster dorado sirio. Los mismos lotes de las toxinas A y B mutantes (SEQ ID NOs: 4 y 6, respectivamente) usados en el estudio mu*C. difficile*2010-07 de ratón se usaron en este estudio. Como control, a un grupo (Grupo 1) se administró una solución salina regulada con fosfato.

Grupos de cinco o diez hámsteres dorados sirios se inmunizaron con un

inmunógeno de acuerdo con la Tabla 15. A los animales se administraron tres dosis. Además, los animales se dosificaron cada dos semanas.

Tabla 15: Diseño experimental de inmunización y exposición de hámsteres					
Grupo	Inmunógeno	Dosis	No.	Vía	Esquema
1	Placebo (buffer de PBS)	NA	5	NA	
2	Toxina A mutante+B (SEQ ID NOS: 4 y 6, respectivamente); inactivada con formalina	10 µg cada uno	10	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 2, 4
3	Toxina A mutante+B (SEQ ID NOS: 4 y 6, respectivamente); inactivada con EDC	10 µg cada uno	10	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 2, 4
4	Toxina A mutante+B (SEQ ID NOS: 4 y 6, respectivamente); genética	10 µg cada uno	10	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 2, 4

Resultados: Ver Figura 15. No se observaron anticuerpos anti-toxina A o B en el grupo control placebo. Después de una dosis, los anticuerpos anti-toxina A neutralizantes se observaron entre 2-3 log₁₀ para los grupos toxina mutante inactivada con formalina (Grupo 2) y genética (Grupo 4) y entre 3-4log₁₀ para el grupo inactivado con EDC (Grupo 3). Los anticuerpos anti-toxina A neutralizantes aumentaron en cada uno de estos grupos (2-4) después de la segunda inmunización con las toxinas mutantes relevantes (comparar títulos en la semana 2 a semana 3 en la Figura 15). Después de la tercera dosis de las toxinas mutantes (dadas en la semana 4), los títulos de anticuerpos neutralizantes de anti-toxina A en los Grupos 2-4 aumentaron en comparación con sus títulos de la semana 4.

Los anticuerpos anti-toxina B neutralizantes fueron detectables después de la segunda dosis, donde los anticuerpos anti-toxina B neutralizantes inactivada con formalina (Grupo 2) e inactivada con EDC (Grupo 3) aumentaron entre 3-4 log₁₀ y a entre 2-3 log₁₀ para la triple mutante genética (Grupo 4). Después de la tercera inmunización (semana 4), los títulos de anticuerpo neutralizante anti-toxina B aumentaron a entre 3-4 log₁₀ para las toxinas mutantes inactivadas con formalina (Grupo 2) y toxinas mutantes genéticas (Grupo 4) y entre 4-5 log₁₀ para las toxinas mutantes inactivadas con EDC (Grupo 3).

Para los anticuerpos anti-toxina A y anti-toxina B neutralizantes, se observaron títulos del pico en la semana 6 (pos-dosis 3) para los grupos vacunados (Grupos 2-4).

Evaluación de las composiciones inmunogénicas con adyuvante Alhydrogel/CpG o ISCOMATRIX

Los hámsteres inmunizados con una composición inmunogénica que incluye una toxina mutante inactivada químicamente formulada con Alhydrogel, ISCOMATRIX, o Alhydrogel/CpG24555 (Alh/CpG) desarrollaron antisueros antitoxina neutralizantes robustos. Se observó que las respuestas pico antitoxina A y antitoxina B fueron 2-3 veces más altas y estadísticamente significativos en grupos inmunizados con toxinas mutantes formuladas en Alh/CpG o ISCOMATRIX cuando se comparan con la vacuna formulada con Alhydrogel solo. Ver Tabla 32 que muestra 50% de títulos de neutralización. Los hámsteres (n=10/grupo) se inmunizaron IM a 0, 2, y 4 semanas con 10 µg cada principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante formulado con 100 µg de Alhydrogel, o 200 µg de CpG 24555 + 100 µg de Alhydrogel, o 10 U de ISCOMATRIX. Los sueros se recolectaron en cada punto de tiempo y se analizaron en el ensayo de neutralización de la toxina para la actividad de antitoxina funcional. Las medias geométricas de los títulos se proporcionan en la Tabla 32. Los asteriscos (*) indican significación estadística ($p < 0,05$) cuando se compararon con los títulos en el grupo Alhydrogel.

Tabla 32: Inmunogenicidad del principios activos de la toxina mutante con adyuvante en los hámsteres						
Antitoxina A						
	50% de título de neutralización					
	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 6
Título de Alhydrogel:	10	26	88	7425	6128	15965
Título de Alh/CpG:	10	103	*688	*34572	*23028	*62203
Título de ISCOMATRIX:	10	27	*246	*12375	8566	*36244
Antitoxina B						
Título de Alhydrogel:	10	15	10	218	1964	7703
Título de Alh/CpG:	10	10	18	*5550	*5212	*59232
Título de ISCOMATRIX:	10	12	12	*7412	*15311	*92927

Se analizó la eficacia protectora de la composición inmunogénica que incluye los principios activos de la toxina mutante formulados con estos adyuvantes. Los hámsteres se inmunizaron y se administró clindamicina oral (30 mg/kg) en la semana 5 y se expusieron de acuerdo con el método descrito antes. Un grupo de hámsteres no inmunizados (n=5) se incluyó como control. Se observó aumento de eficacia en los hámsteres inmunizados los principios activos de la toxina mutante con adyuvante Alh/CpG o ISCOMATRIX (100% de supervivencia) en comparación con Alhydrogel solo (70% de supervivencia). Por consiguiente, los hámsteres se protegieron de la

exposición letal con esporas *C. difficile*.

Ejemplo 30: Vacunación con *Clostridium difficile* en *Cynomolgus* Macaques

El fin de este estudio para analizar la inmunogenicidad de dosis bajas y altas de Toxinas mutantes inactivadas con EDC e inactivadas con formalina de *C. difficile* en *cynomolgus* macaques. Todas las toxinas mutantes se formularon en ISCOMATRIX® como un adyuvante excepto para un grupo, que actuó como el control sin adyuvante (Grupo 5).

Tabla 16: Inmunización de <i>Cynomolgus</i> Macaques					
Grupo	Inmunógeno	Número	Dosis	Vía	Esquema
1	FI-Toxinas mutantes A+B (ISCOMATRIX)	5	10 µg cada uno	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 2, 4
2	FI-Toxinas mutantes A+B (ISCOMATRIX)	5	100 µg cada uno	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 2, 4
3	EI-Toxinas mutantes A+B (ISCOMATRIX)	5	10 µg cada uno	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 2, 4
4	EI-Toxinas mutantes A+B (ISCOMATRIX)	5	100 µg cada uno	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 2, 4
5	EI-Toxinas mutantes A+B (no adyuvante)	5	100 µg cada uno	IM	Semana de activación 0, Semanas de refuerzo 2, 4
Animales: 25 <i>cynomolgus</i> macaques El asterisco, “*”, de la figura 16 se refiere al que tiene solo 4 cynos en el grupo para semana 12, un cyno en el grupo se sangró en forma terminal en la semana 8 Vacunación: IM, 0,5 mL por dosis, en las semanas 0, 2, y 4. Se prepararon composiciones de toxina mutante como se describió anteriormente. Las composiciones de toxina mutante se formularon en ISCOMATRIX, excepto el Grupo 5 que se formuló en el buffer sin adyuvante. Sangrado: Semanas -2, 0, 2, 3, 4, 6, 8, y 12. Eutanasia y sangrados terminales en los animales con títulos más altos de <i>C. difficile</i> en la semana 8. Análisis de la muestra de suero: Ensayos ELISA de proteína y de neutralización					

Resultados: La Figura 16 muestra las respuestas de anticuerpo neutralizante anti-toxina en estos animales en las semanas 0, 2, 3, 4, 6, 8, y 12. Los títulos anti-toxina A estuvieron entre 2-3 log₁₀ para los cinco grupos después de una dosis única (títulos de la semana 2). Estos títulos aumentaron después de cada dosis posterior para cada grupo. En estos animales, no hubo caída del título entre las semanas 3 y 4. En todos los grupos, los títulos pico estaban entre 4-5 log₁₀. En todos los puntos de tiempo, el

grupo sin adyuvante ISCOMATRIX (Grupo 5) presentó los títulos más bajos, lo que indica la utilidad de ISCOMATRIX para reforzar las respuestas inmunes. El grupo control sin adyuvante (Grupo 5) alcanzó títulos pico en la semana 12, como lo hizo el grupo inmunizado con las dosis altas de las toxinas mutantes inactivadas con EDC (Grupo 4); los otros grupos alcanzaron títulos pico en la semana 6, dos semanas después de la última dosis. Los títulos en todos los grupos aumentaron después de la segunda dosis (punto de tiempo semana 3). Al igual que con las respuestas anti-toxina A, las respuestas anti-toxina B no disminuyeron de la semana 3 a la semana 4. Después de la tercera dosis (punto de tiempo semana 6), los títulos del anticuerpo neutralizante anti-toxina B en todos los grupos estuvieron entre 3-4 log₁₀, excepto en el grupo inactivado con formalina a baja dosis (Grupo 1) y el grupo inactivado con EDC a dosis alta (Grupo 4), los cuales tenían títulos exactamente >4 log₁₀. Los títulos pico se observaron en la semana 12 para todos los grupos excepto el grupo inactivado con EDC a baja dosis (Grupo 3), que tenía títulos pico en la semana 8. Todos los grupos tenían títulos pico >4 log₁₀.

Ejemplo 31: Producción de anticuerpos monoclonales

Si bien las toxinas A y B comparten mucha homología estructural, se halló que las actividades neutralizantes de los anticuerpos son específicas de la toxina. En esta invención, se identificaron varios anticuerpos que son específicos para la toxina individual y se dirigieron a varios epitopes y dominios funcionales, y tienen alta afinidad y potente actividad neutralizante hacia las toxinas nativas. Los anticuerpos se aislaron de ratones que fueron inmunizados con una toxina mutante inactivada con formalina (FI) disponible en el comercio o toxina holomutante recombinante (SEQ ID NOs: 4 y 6) convertida en no tóxica por la introducción de mutaciones específicas en su sitio catalítico para producir la toxina A y B mAb, respectivamente. El mapeo de epitope de los anticuerpos mostró que la vasta mayoría del mAb contra la toxina A (49 de 52) se dirigió al dominio C-terminal no catalítico de la toxina.

Los anticuerpos monoclonales contra la toxina B se dirigieron a tres dominios de la proteína. De un total de 17 anticuerpos específicos de la toxina B, 6 fueron específicos para el extremo N-terminal (por ejemplo, aminoácidos 1-543 de una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje, tales como 630), 6 para el extremo C-terminal (por ejemplo, aminoácidos 1834-2366 de una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje, tales como 630) y 5 para un dominio de mitad de translocación (por ejemplo, aminoácidos 799-1833 de una TcdB de *C. difficile* de tipo salvaje, tales como 630). El método de usar las toxinas de *C. difficile* mutante (por ejemplo, SEQ ID NO: 4 y 6) como

antígenos inmunizantes en consecuencia ofrece una ventaja clave de presentación de la mayor parte, si no todos, los epitopes antigénicos en comparación con el proceso de inactivación de formalina inactivación que tienden a afectar adversamente la estructura antigénica de la toxina mutante.

Ejemplo 32: Caracterización del mAb de la toxina A, A3-25, que incluye una cadena liviana variable que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y una cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37.

El mAb A3-25 fue de interés particular ya que este anticuerpo desafió todos los intentos para definir su isotipificación de inmunoglobulina (Ig) usando los kit de isotipificación comúnmente disponibles para IgG, IgM y IgA. El análisis posterior por transferencia Western mediante antiseros específicos de la cadena H de Ig mostró que el A3-25 es del isotipo IgE, un evento raro de la producción de mAb. Esto se confirmó adicionalmente por la secuenciación de nucleótidos del ARNm aislado de las células del hibridoma A3-25. Las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de la cadena H- y L de A3-25 se muestran en la Figura 17.

A fin de evaluar adicionalmente el mAb A3-25 en el modelo, animal para la infección y enfermedad con *C. difficile*, su isotipo Ig cambió a IgG1 murino por injerto molecular de la región variable de la cadena ϵ H sobre la cadena murina y pesada de acuerdo con los métodos publicados.

Ejemplo 33: Capacidad de neutralización y mapeo epitópico de los anticuerpos específicos de toxina

Además, en un esfuerzo por identificar anticuerpos funcionales/neutralizantes, se evaluaron todos los anticuerpos monoclonales en cuanto a la capacidad de neutralizar las toxinas tipo salvaje en un ensayo de efecto citopático (CPE) estándar o en un ensayo más estricto y cuantitativo basado en la medición del ATP como un indicador de la viabilidad celular.

Del total de 52 anticuerpos específicos de la toxina A, cuatro mAb (A3-25, A65-33, A60-22 y A80-29 (Tabla 17 y Figura 18) exhibieron variados niveles de actividad neutralizante. Se realizaron los ensayos de unión competitiva BiaCore e inhibición de la hemaglutinación (HI) para mapear los epitopes del anticuerpo. Los resultados indicaron que estos anticuerpos se pueden dirigir a diferentes epitopes de la proteína de la toxina A (Tabla 17). Para identificar adicionalmente la ubicación de sitios de unión en la proteína, los anticuerpos se evaluaron en forma individual en ensayos de

transferencia Western o transferencia de mancha usando fragmentos de toxina de secuencias conocidas. Se halló que los 4 mAb neutralizantes se dirigen a la región del extremo C-terminal de la toxina.

A partir de un total de 17 anticuerpos específicos de la toxina B, se halló que 9 son neutralizantes. De los nueve mAb neutralizantes, seis de ellos se dirigieron al extremo N-terminal y los otros tres al dominio de translocación de la toxina B (Tabla 18). Sobre la base del ensayo de unión competitivo Biacore, los nueve anticuerpos monoclonales neutralizantes se pueden agrupar en cuatro grupos de epitopes como se muestra en las Figura 19.

TABLA 17: Características de mAb Toxina A seleccionada

Grupo de epitope (Biacore)	mAb #	Actividad neutralizante	Inhibición de hemaglutinación	Especificidad de unión	Isotipo Ig
1	A3-25	+	-	C-terminal	IgE, κ
2	A65-33	+	-	C-terminal	IgG2a, κ
3	A80-29	+	+	C-terminal	IgG1, κ
ND	A60-22	+	+	C-terminal	IgG1, κ
4	A64-6	-	-	En progreso	IgG1, κ
	A50-10	-	-	C-terminal	IgG1, κ
	A56-33	-	-	En progreso	IgG1, κ
ND	A1	-	-	N-terminal	IgG1, κ

TABLA 18: Características de mAb Toxina B seleccionada

Grupo de epitope (Biacore)	mAb #	Actividad neutralizante	Especificidad de unión	Isotipo Ig
1	B2-31	+	N-terminal	IgG1, κ
	B5-40			IgG1, κ
	B8-26			IgG1, κ
	B70-2			IgG1, κ
2	B6-30	+	N-terminal	IgG1, κ
	B9-30			IgG1, κ
3	B59-3	+	Dominio de translocación	IgG1, κ
	B60-2			IgG1, κ
4	B56-6	+	Dominio de translocación	IgG1, κ
	B58-4	-		IgG1, κ
5	B12-34	-	C-terminal	IgG1, κ
	B14-23			IgG1, κ
	B80-3			IgG1, κ
6	B66-29	-	C-terminal	IgG1, κ
7	B84-3	-	C-terminal	IgG1, κ

Ejemplo 34: Identificación de nuevas combinaciones de anticuerpos de toxina A con actividad neutralizante significativamente aumentada:

Los cuatros mAb de toxina A (A3-25, A65-33, A60-22 y A80-29) mostraron

neutralización de la toxina A incompleta o parcial cuando se analizaron individualmente en el ensayo de neutralización basado en ATP. El mAb A3-25 fue el anticuerpo más potente y los otros tres fueron menos neutralizantes, el A80-29 apenas por encima del umbral (Figura 18). Sin embargo, cuando A3-25 se combinó con uno de los tres mAbs, se observó un efecto sinérgico en la neutralización en las tres combinaciones que fue mucho más que la suma total de neutralización de los anticuerpos individuales como se muestra en las Figura 20A-C. Además, las tres combinaciones exhibieron capacidad de neutralización completa normalmente observada con los anticuerpos policlonales anti-toxina A.

Ejemplo 35: Identificación de nuevas combinaciones de anticuerpos de toxina B que muestran actividad neutralizante significativamente aumentada:

Los autores también observaron neutralización sinérgica con los mAb de toxina B de los diferentes grupos de epitopes identificados por el análisis BiaCore. El mAb de la toxina B B8-26, el mAb más dominante del grupo 1, se combinó con múltiples mAb del grupo 3. Las combinaciones se evaluaron en un ensayo de neutralización específico de la toxina B y los resultados se muestran en la Figura 21 y Tabla 19.

Tabla 19: Neutralización de la toxina B con mAb		
mAb	Título neut	
	CPE	ATP
B8-26 solo	20,480	5,000
B59-3 solo	320	120
B60-2 solo	320	80
B8-26 + B59-3	655,360	~60,000
B8-26 + B60-2	327,680	nd
nd, no realizado		

El efecto neutralizante sinérgico se observó cuando B8-26 se combinó con un mAb de grupo 3 (Figura 21B), pero no ningún otro mAb (datos no mostrados).

Ejemplo 36: Detección *in vitro* por mAb para composiciones de toxina mutante seguras y eficaces:

Las toxinas A y B mutantes genéticas de *C difficile* (por ejemplo, SEQ ID NO: 4 y 6) generadas por medio de ingeniería genética mostraron citotoxicidad residual usando un ensayo de citotoxicidad *in vitro*. Si bien los autores han obtenido una reducción de ~4 log de la citotoxicidad para cada toxina mutante de *C. difficile* (Tabla 20), se prefirió la posterior inactivación química de las toxinas mutantes, tales como con el tratamiento con formalina. Sin embargo, los tratamientos por inactivación química pueden ser duros y pueden afectar adversamente los epitopes antigénicos

clave de estas toxinas o toxinas mutantes.

Tabla 20: Una comparación de citotoxicidad in vitro de toxina wt, toxina triple mutante, y toxina wt inactivada con formalina (FI, de la lista de productos biológicos) (lista de productos biológicos, comercial)			
Tcd	Fuente/tratamiento	EC ₅₀ ng/ml	Veces de reducción de la citotoxicidad
TcdA			
Toxina A (SEQ ID NO: 1)	WT	0,92	1
Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4)	Triple mutante	8600	9348
Toxoide A (FI)	Tratada con formalina, comercial	>20,000	>21,739
TcdB			
Toxina B (SEQ ID NO: 2)	WT	0,009	1
Toxina B mutante (SEQ ID NO: 6)	Triple mutante	74	8222
Toxoide B (FI)	Tratada con formalina, comercial	4300	477,778

Para la optimización del bioproceso, se realizó un diseño estadístico del experimento (DOE) para la inactivación química de las Tcd A y B triple mutantes (1 mg/ml) usando el tratamiento con formalina y EDC/NHS. Para optimizar la inactivación con formalina de la TcdA triple mutante, los autores variaron las concentraciones de formalina/glicina (20-40 mM), pH (6,5-7,5), y temperatura (25-40°C). Para la TcdB triple mutante, los autores variaron las concentraciones formalina/glicina de 2 a 80 mM y la temperatura y pH fueron 25 °C y 7,0 respectivamente. El tiempo de incubación para todos los tratamientos con formalina fue 24 horas. Para la inactivación con formalina, “40/40” de las Tablas 21 y 23 representa la concentración de formalina y glicina usada en la reacción. Para el tratamiento con EDC/NHS, los autores variaron las concentraciones de EDC/NHS de 0,25 a 2,5 mg/mg de TcdA triple mutante y de 0,125 a 2,5 mg/mg de TcdB triple mutante y se incubaron cuatro horas a 25 °C. Al final de las reacciones, todas las muestras se desalinizaron en 10 mM de fosfato, pH 7,0. Después de la purificación, las Tcds tratadas se analizaron para determinar la citotoxicidad residual y el reconocimiento de mAb de los epitopes por el análisis de transferencia de mancha. El objetivo fue identificar las condiciones del tratamiento que reducen la citotoxicidad en el nivel deseado (EC₅₀ > 1000 µg/ml) sin impactar negativamente epitopes reconocidos por un panel de mAb neutralizantes (++++ o +++). Las condiciones del tratamiento (marcado con una marca de revisión “✓” en las Tablas 21-24) produjeron composiciones inmunogénicas potencialmente seguras y eficaces que retuvieron la

reactividad retenida en al menos cuatro mAb neutralizantes a la vez que exhiben una reducción de 6-8 log₁₀ de la citotoxicidad, con respecto a la respectiva citotoxicidad de la toxina tipo salvaje. Los resultados seleccionados se ilustran en las Tablas 21 a 24. Los datos adicionales de variadas condiciones del tratamiento sobre las toxinas triple mutantes y los datos de citotoxicidad in vitro y los ensayos de neutralización de la toxina se muestran en las Tabla 33 y Tabla 34. Ver también, por ejemplo, los Ejemplos 20 y 21 anteriores, que proporcionan detalles adicionales con respecto a las condiciones del tratamiento de entrecruzamiento de las toxinas mutantes.

Tabla 21: Citotoxicidad y reactividad del mAb neutralizante de la TcdA triple mutante inactivada con formalina (SEQ ID NO: 4)							
Condiciones de reacción de la inactivación química sobre TcdA triple mutante	CPE μ g /ml	Reactividad con mAb (transferencia de mancha, condiciones no desnaturizantes)					
		N-terminal Mab#6	Dominio de translocación Mab#102	C-terminal (neut)			
				A80-29	A3-25	A60-22	A65-33
25°C, pH 6,5, 20/20mM	250	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 6,5, 40/40mM ✓	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 7,5, 40/40mM ✓	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
40°C, pH 6,5, 40/40mM	>1000	++	+++	++++	++++	++++	++++
40°C, pH 7,5, 40/40 mM	>1000	++	++	++++	++++	++++	+++
Ninguno, Toxina A triple mutante	18,5-25	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Toxoide A FI (lista de productos biológicos)	ND	—	—	++	++	+++	+

Tabla 22: Citotoxicidad y reactividad de mAb neutralizante de TcdA triple mutante inactivada con EDC (SEQ ID NO: 4)							
Condiciones de reacción de la inactivación química en TcdA triple mutante	CPE μ g /ml	Reactividad con mAb (transferencia de mancha, condiciones no desnaturizantes)					
		N-terminal Mab#6	Dominio de translocación Mab#102	C-terminal (neut)			
				A80-29	A3-25	A60-22	A65-33
25°C, 0,25 mg/mg, 4 horas ✓	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, 0,5 mg/mg, 4 horas ✓	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, 1,25 mg/mg, 4 horas ✓	>1000	+++	++++	++++	+++	++++	++++
25°C, 2,5 mg/mg, 4 horas ✓	>1000	+++	++++	++++	+++	++++	+++
Ninguno, TcdA triple mutante	18,5-25	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Toxoide FI A (lista de productos biológicos)	ND	—	—	++	++	+++	+

Tabla 23: Citotoxicidad y reactividad de mAb neutralizante de Inactivada con formalina TcdB triple mutante (SEQ ID NO: 6)					
Condiciones de reacción de la inactivación química sobre TcdB triple mutante	CPE (µg /ml)	mAb # (N-terminal aa 1 – 543)		mAb # (mitad/C-terminal aa 544 – 2366)	
		B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
25°C, pH 7,0, 80/80 mM, 24 horas ✓	>1000	++++	++++	++++	+++
25°C, pH 7,0, 40/40 mM, 24 horas ✓	>1000	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 7,0, 10/10 mM, 24 horas	15,6	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 7,0, 2/2 mM, 24 horas	<0,98	++++	++++	++++	++++
Ninguno, TcdB triple mutante	0,058	++++	++++	++++	++++
Toxoide B FI (lista de productos biológicos)	ND	+++	+++	+++	++

Tabla 24: Citotoxicidad y reactividad de mAb neutralizante de TcdB triple mutante inactivada con EDC (SEQ ID NO: 6)					
Condiciones de reacción de la inactivación química sobre TcdB triple mutante	CPE (µg /ml)	mAb # (N-terminal aa 1 – 543)		mAb # (mitad/C-terminal aa 544 – 2366)	
		8-26	9-30	56-6	59-3
		B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
25°C, 0,125 mg/mg, 4 horas	3,9	++++	++++	++++	++++
25°C, 0,25 mg/mg, 4 horas	250	++++	++++	++++	++++
25°C, 0,5 mg/ml, 4 horas ✓	>1000	++++	++++	++++	++++
25°C, 1,25 mg/mg, 4 horas ✓	>1000	++++	+++	+++	+++
25°C, 2,5 mg/mg, 4 horas ✓	>1000	++++	+++	+++	+++
Ninguno, TcdB triple mutante	0,058	++++	++++	++++	++++
Toxoide B FI (lista de productos biológicos)	ND	+++	+++	+++	++

Tabla 33

		Ensayo cyto (EC50)		Reactividad con mAb (transferencia de mancha, condiciones no desnaturalizantes)					
Muestra #	Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) Muestra ID	CPE; 24h µg /ml	CPE; 72h µg /ml	N-terminal Mab#6	Dominio de translocación Mab# 102	C-terminal (neut)			
						80-29	3-25	60-22	65-33
1	L44166-157A	>1000	>1000	++++	++++	++++	+++	++++	++++
2	L44166-157B	>1000	>1000	+++	++++	++++	+++	++++	++++
3	L44166-157C	>1000	>1000	+++	+++	++++	+++	++++	++++
4	L44166-157D	>1000	>1000	+++	+++	++++	+++	++++	++++
5	L44905-160A	>1000	>1000	++	++	++++	++	++++	++++
6	L44166-166	>1000	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
7	L44905-170A	ND	>1000	+	+	++	++	++	+
8	L44897-61	>1000	ND	+++	++	++++	++++	++++	++++
9	L44897-63	>1000	ND	++++	+++	++++	+++	++++	++++
10	L44897-72 Tubo#1	250	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
11	L44897-72 Tubo#2	>1000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
12	L44897-72 Tubo#3	>1000	ND	+++	+++	++++	++++	++++	++++

13	L44897-72 Tubo#4	>1000	ND	+++	++++	++++	++++	++++	++++
14	L44897-72 Tubo#5	>1000	ND	+++	++++	++++	++++	++++	++++
15	L44897-75 Tubo#6	>1000	ND	+++	++++	++++	++++	++++	++++
16	L44897-75 Tubo#7	>1000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
17	L44897-75 Tubo#8	>1000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
18	L44897-75 Tubo#9	>1000	ND	++	+++	++++	++++	++++	++++
19	L44897-75 Tubo#10	>1000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++
20	L44897-75 Tubo#11	>1000	ND	++	++	++++	++++	++++	+++
21	L44897-101 (pre- modificación) TxA control	23,4	<7,8	++++	++++	++++	++++	++++	++++
22	L44897-101, 2 horas	187,5	155,9	+++	++++	++++	++++	++++	++++
23	L44897-101, 4 horas	375	380,3	+++	++++	++++	++++	++++	++++
24	L44897-101, 6 horas	500	429,6	+++	++++	++++	++++	++++	++++
25	L44897-102, 24 horas	>1000	>1000	++	++++	++++	++++	++++	++++
26	L44897-103, 51 horas	>1000	>1000	+	+++	+++	++++	++++	+++
27	L44897-104, 74 horas	>1000	>1000	—	+++	+++	+++	+++	+++
28	L44897-105, 120 horas	>1000	>1000	—	++	++	+++	+++	++
29	L44980-004	>1000	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
30	Reacción #1 Semana 0, 25C	750 ug/ml	ND	ND	++	++	+++	+++	++
31	Reacción #1 Semana 1, 25C	375 ug/ml	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
32	Reacción #1 Semana 2, 25C	375 ug/ml	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
33	Reacción #1 Semana 3, 25C	375 ug/ml	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
34	Reacción #1 Semana 4, 25C	250 ug/ml	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
35	Reacción #1 Semana 3, 37C	93,8 ug/ml	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
36	Reacción #2 Semana 0, 25C	375 ug/ml	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
37	Reacción #2 Semana 1, 25C	375 ug/ml	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
38	Reacción #2 Semana 2, 25C	750 ug/ml	ND	ND	++	++	++	+++	++

39	Reacción #2 Semana 3, 25C	250 ug/ml	ND	ND	+++	+++	+++	++++	+++
40	Reacción #2 Semana 4, 25C	250 ug/ml	ND	ND	+++	+++	+++	++++	+++
41	Reacción #2 Semana 3, 37C	187,5 ug/ml	ND	ND	+++	+++	++++	++++	+++
42	TxA Control Semana 3, 25C	18,8 ug/ml	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
43	TxA Control Semana 3, 37C	25 ug/ml	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
44	L44897-116-6 29,5 horas	> 2000 ug/ml	ND	ND	++	++	++	+++	++
45	L44897-116-7 57,5 horas	> 2000 ug/ml	ND	ND	++	++	++	+++	++
46	L44897-116 - 8 79,5 horas	> 2000 ug/ml	ND	ND	+	+	+	+++	+
47	L44897-116-9 123,5 horas	> 2000 ug/ml	ND	ND	++	++	++	+++	++
48	L44897-139	>1000	ND	++	++++	++++	++++	++++	++++
49	L44166-204	>1000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Condiciones de reacción del entrecruzamiento químico para las muestras de toxina A triple mutante (SEQ ID NO: 4) con referencia a la Tabla 33

Las muestras 1-4 se modificaron con EDC/NHS. Condiciones: 30°C, 20 mM de MES/150 mM de NaCl pH 6,5. Las reacciones se iniciaron por la adición de EDC. Después de 2 horas de reacción, las muestras A, B, y C presentaron glicina 1 M adicionada a 50 mM de concentración final de glicina. La Muestra D no tenía glicina añadida. Las reacciones se ajustaron con diferentes relaciones de peso de Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4):EDC:NHS como se indica a continuación.

- 1 L44166-157A 1: 0,25: 0,25 w: w
- 2 L44166-157B 1: 1,25: 1,25
- 3 L44166-157C 1: 2,5: 2,5
- 4 L44166-157D 1: 2,5: 2,5

Muestra 5 L44905-160A 80 mM de HCHO, 80 mM de glicina, 80 mM de NaPO₄ pH 7, 1 mg/ml de proteína de Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4), 48 horas de reacción a 25 °C.

Muestra 6 L44166-166 Modificación EDC/NHS de la toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) a 25 °C en 20 mM de MES/150 mM de NaCl pH 6,5. Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4):EDC:NHS = 1:0,5:0,5. La reacción se inició por la adición de EDC. Después de

2 horas de reacción, se añadió 1 M de glicina a una concentración final de glicina 0,1 M y 2 horas adicionales de incubación. Después de este momento, el buffer de reacción intercambió en 1 X PBS sobre Sephadex G25.

Muestra 7 L44905-170A 80 mM de HCHO, 80 mM de glicina, 80 mM de NaPO₄ pH 7, 1 mg/ml de proteína de toxina A mutante (SEQ ID NO: 4), 48 horas de reacción a 35°C. Esta reacción de formalina se dirigió a producir excesivo entrecruzamiento de modo de poder disminuir severamente la unión del antígeno.

Muestra 8 L44897-61 32 mM de HCHO/80 mM de glicina, 72 horas de reacción a 25 °C.

Muestra 9 L44897-63 80 mM de HCHO/80 mM de glicina, 72 horas de reacción a 25 °C.

Las siguientes reacciones presentaron 24 horas de tiempo de reacción.

Muestra 10 L44897-72 Tubo#1 25°C, 80 mM de NaPi pH 6,5, 20 mM de HCHO/20 mM de glicina

Muestra 11 L44897-72 Tubo#2 25 °C, 80 mM de NaPi pH 6,5, 40 mM de HCHO/40 mM de glicina

Muestra 12 L44897-72 Tubo#3 32,5 °C, 80 mM de NaPi pH 7,0, 30 mM de HCHO/30 mM de glicina

Muestra 13 L44897-72 Tubo#4 32,5 °C, 80 mM de NaPi pH 7,0, 30 mM de HCHO/30 mM de glicina

Muestra 14 L44897-72 Tubo#5 32,5 °C, 80 mM de NaPi pH 7,0, 30 mM de HCHO/30 mM de glicina

Muestra 15 L44897-75 Tubo#6 25 °C, 80 mM de NaPi pH 7,5, 20 mM de HCHO/20 mM de glicina

Muestra 16 L44897-75 Tubo#7 25 °C, 80 mM de NaPi pH 7,5, 40 mM de HCHO/40 mM de glicina

Muestra 17 L44897-75 Tubo#8 40 °C, 80 mM de NaPi pH 6,5, 20 mM de HCHO/20 mM de glicina

Muestra 18 L44897-75 Tubo#9 40 °C, 80 mM de NaPi pH 6,5, 40 mM de HCHO/40 mM de glicina

Muestra 19 L44897-75 Tubo#10 40 °C, 80 mM de NaPi pH 7,5, 20 mM de HCHO/20 mM de glicina

Muestra 20 L44897-75 Tubo#11 40 °C, 80 mM de NaPi pH 7,5, 40 mM de HCHO/40 mM de glicina

Las siguientes 8 muestras reaccionaron a 25 °C para los tiempos indicados en

80 mM de NaPi pH 7,0 que contiene 78 mM de HCHO y 76 mM de glicina

Muestra 21 L44897-101 (pre-modificación) TxA muestra control cero tiempo control, no modificado o expuesto a HCHO/glicina

Muestra 22 L44897-101, 2 horas

Muestra 23 L44897-101, 4 horas

Muestra 24 L44897-101, 6 horas

Muestra 25 L44897 102, 24 horas

Muestra 26 L44897-103, 51 horas

Muestra 27 L44897-104, 74 horas

Muestra 28 L44897-105, 120 horas

Muestra 29 (L44980-004) fue toxina A mutante modificada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) (toxina A triple mutante (SEQ ID NO: 4)-EDC). Las condiciones de reacción son: 25 °C, el buffer fue 20 mM de MES/150 mM de NaCl pH 6,6. La toxina A triple mutante (SEQ ID NO: 4):EDC:NHS = 1:0,5:0,5 w:w:w. La reacción se inició por la adición de EDC. Después de 2 horas de reacción, se añadió glicina a una concentración final de 0,1 M y reaccionó posteriormente 2 horas a 25 C. La reacción terminó por la desalinización en Sephadex G25.

Las siguiente 12 muestras y 2 controles fueron experimentos de inversión donde las muestras se incubaron a 25°C y 37 °C.

Reacción 1 = 25 °C, 80 mM de NaPi pH 7,0, 40 mM de HCHO solo (sin glicina), 24 horas de reacción.

Reacción 2 = 25 °C, 80 mM de NaPi pH 7,0, 40 mM de HCHO/40 mM de glicina, 24 horas de reacción

Muestra	Reacción
30	Reacción #1 Semana 0, 25°C
31	Reacción #1 Semana 1, 25°C
32	Reacción #1 Semana 2, 25°C
33	Reacción #1 Semana 3, 25°C
34	Reacción #1 Semana 4, 25°C
35	Reacción #1 Semana 3, 37°C
36	Reacción #2 Semana 0, 25°C
37	Reacción #2 Semana 1, 25°C
38	Reacción #2 Semana 2, 25°C
39	Reacción #2 Semana 3, 25°C
40	Reacción #2 Semana 4, 25°C

- 41 Reacción #2 Semana 3, 37°C
 42 Control TxA Semana 3, 25°C
 43 Control TxA Semana 3, 37°C

Las próximas 4 muestras se generaron por la reacción durante los tiempos indicados a 25 °C en 80 mM de NaPi pH 7,0, 40 mM de HCHO/40 mM de glicina

- 44 L44897-116-6 29,5 horas
 45 L44897-116-7 57,5 horas
 46 L44897-116 -8 79,5 horas
 47 L44897-116-9 123,5 horas

Muestra 48 L44897-139 48 horas de reacción a 25 °C, 80 mM de NaPi pH 7,0, 40 mM de HCHO/ 40 mM de glicina.

Muestra 49 L44166-204 Modificación por EDC/NHS de la toxina A mutante (SEQ ID NO: 4). 25 C, buffer 1 x PBS pH 7,0. Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4):EDC:NHS = 1:0,5:0,5 w:w:w. 2 horas de reacción con EDC/NHS, luego 1 M de glicina añadida a una concentración final 0,1 M y posteriormente 2 horas de reacción. El buffer se intercambi6 en Sephadex G25 en 20 mM de L-histidina/100 mM de NaCl pH 6,5.

Tabla 34							
Muestra ID de toxina B mutante	Ensayo cyto (EC50)		Reactividad con mAb neut (transferencia de mancha, condiciones no desnaturizantes)				Fueres reactividades a los 4 mAb
	CPE; 24h	ATP, 72h	mAb # (N-terminal aa 1 – 543) 8-26 9-30	mAb # (mid-/C-terminal aa 544 – 2366) 56-6 59-3			
L44905-86-01 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Control no tratado	<0,1 µg /ml	<0,1µg/ml	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-02 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, día 1	≥100 µg/ml	2,2µg/ml	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-03 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, día 1	>100 µg/ml	>100 µg/ml	+++	++++	++	+++	√*

L44905-86-04 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, día 1	>100 µg/ml	5,2 µg/ml	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-05 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, día 1	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	++++	++	+++	√*
L44905-86-06 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, día 1	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	-	++++	+++	
L44905-86-07 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, día 1	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	-	++++	+++	
L44905-86-08 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, día 5	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	++++	++++	+++	√
L44905-86-09 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, día 5	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++	++	-	+	
L44905-86-10 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, día 5	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-11 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, día 5	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++	++++	-	+	
L44905-86-12 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, día 5	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	-	++++	+++	
L44905-86-13 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, día 5	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	-	++++	++++	

L44905-86-14 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, día 7	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-15 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, día 7	>100 µg/ml	>100 µg/ml	+++	++++	-	+	
L44905-86-16 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, día 7	>100 µg/ml	>100 µg/ml	+++	++++	+++	++++	√
L44905-86-17 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, día 7	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++	++	-	+	
L44905-86-18 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, día 7	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	-	++++	++++	
L44905-86-19 Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, día 7	>100 µg/ml	>100 µg/ml	+++	-	++	++	
L34346-30A	>100 µg/ml	>100 µg/ml	++++	++++	++++	++++	√
L34346-30B	>100 µg/ml	>100 µg/ml	+++	++++	++++	++++	√
Comercial, Toxoide B FI (Lista de productos biológicos)	ND	ND	++++	++++	++++	++++	√
Comercial, Control Toxina B wt (Lista de productos biológicos)	22,5 pg/ ml	7,8 pg/ml	+++	++	+++	+++	√
Control, toxina B triple mutante recombinante (SEQ ID NO: 6)	78 ng/ml	72 ng/ml	+++	++	++++	+++	√

Condiciones de reacción de entrecruzamiento químico para la muestras de toxina B mutante mencionadas en la Tabla 34

La toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6) se entrecruzó químicamente y se analizó de acuerdo con las siguientes condiciones de reacción. Las muestras L44905-86 se analizaron en un experimento que involucra tres variaciones de la reacción de formalina y dos temperaturas de incubación. Cada día, se tomaron 6 muestras para un total de 18 muestras. La primera muestra en la lista es el control no tratado (que hace 19 muestras totales). El control no tratado incluyó un polipéptido de la toxina triple mutante no tratado (SEQ ID NO: 6).

Reacción 1 ("Rxn1") = 80 mM de HCHO, 80 mM de glicina, 80 mM de NaPO₄ pH 7, 1 mg/ml de proteína de toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6)

Reacción2 ("Rxn2") = 80 mM de HCHO, sin glicina, 80 mM de NaPO₄ pH 7, 1 mg/ml de proteína de toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6)

Reacción3 ("Rxn3") = 80 mM de HCHO, sin glicina, 80 mM de NaPO₄ pH 7, 1 mg/ml de proteína de toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6) + terminación de cianoborohidruro. La terminación de cianoborohidruro involucró 80 mM de CNBrH₄ añadidos a la reacción final desalinizada y se incubó 24 horas a 36°C.

Para la Muestra L34346-30A 0,5 g de EDC y NHS por gramo de toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), 4 horas a 30°C, en 20 mM de MES, 150 mM de NaCl, pH 6,5.

Para la Muestra L34346-30B 0,5 g EDC y NHS por gramo de toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6), 2 horas a 30°C seguida por la adición de glicina (concentración final de g/L) y se incubaron otras 2 horas a 30°C, en 20 mM de MES, 150 mM de NaCl, pH 6,5. La única diferencia entre las dos reacciones para L34346-30A y L34346-30B es la adición de glicina a la reacción L34346-30B.

Ejemplo 37: Los anticuerpos inducidos por las composiciones inmunogénicas son capaces de neutralizar las toxinas de varias cepas de *C. difficile*

Para evaluar si los anticuerpos inducidos por las composiciones inmunogénicas que incluyen los principios activos de la toxina mutante neutralizan un amplio espectro de diversas secuencias de toxina, las cepas que representan diversos ribotipos y toxinotipos se secuenciaron para identificar el grado de diversidad genética entre las diversas cepas comparadas con los principios activos de la toxina mutante. Los sobrenadantes del cultivo que contienen toxinas secretadas de las diversas cepas luego se analizaron en un ensayo de neutralización in vitro usando sueros de hámsteres inmunizados para determinar la cobertura de la composición inmunogénica

y para determinar la capacidad de la composición inmunogénica para proteger contra diversas toxinas de las cepas clínicas circulantes.

Las células HT-29 (línea celular del carcinoma de colon) y células IMR-90 se usaron para analizar la neutralización de las toxinas expresas de las cepas CDC. Las células HT-29 son más sensibles para TcdA; la EC₅₀ de la TcdA purificada en estas células es 100 pg/ml en comparación con 3,3 ng/ml para la TcdB. A la inversa las células IMR-90 son más sensibles a la TcdB; la EC₅₀ de la TcdB purificada en estas células varía entre 9-30 pg/ml en comparación con 0,92-1,5 ng/ml para la TcdA. La especificidad del ensayo para TcdA y TcdB en estas líneas celulares se confirmó por el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales específicos de toxina. Para el ensayo de normalización, los filtrados de cultivo de las 24 cepas de CDC se analizaron a una concentración cuatro veces su valor respectivo de EC₅₀. Tres de las cepas presentaron niveles de toxina que fueron demasiado bajos para analizar en el ensayo de neutralización.

Se obtuvieron veinticuatro cepas que representan diversos ribotipos/toxinotipos que cubren más de 95% de las cepas circulantes de *C. difficile* en USA y Canadá de la CDC. Entre estas muestras fueron las cepas que representan ribotipos 027, 001 y 078, tres cepas epidémicas de CDAD en los Estados Unidos, Canadá y UK. Las cepas 2004013 y 2004118 representaron el ribotipo 027; la cepa 2004111 representó el ribotipo 001 y las cepas 2005088, 2005325 y 2007816 representaron el ribotipo 078. Para identificar el grado de diversidad genética entre las cepas clínicas que causan enfermedad y la cepa 630, los genes de la toxina (*tcdA* y *tcdB*) de estas cepas clínicas se secuenciaron por completo. Ver Tabla 35. Las secuencias de aminoácidos de las toxinas se alinearon usando ClustalW en el programa Megalign™ (DNASTAR® Lasergene®) y se analizaron para determinar la identidad de secuencia. Para *tcdA*, el análisis de alineamiento genómico mostró que todas las cepas clínicas y la cepa 630 compartieron aproximadamente 98-100% de identidad de secuencia de aminoácidos global. La porción C-terminal del gen de TcdA fue ligeramente más divergente. Se realizó el mismo análisis para el gen *tcdB* que exhibió mayor divergencia de secuencia. Notablemente, las cepas 2007838/NAP7/126 y 2007858/NAP1/unk5 exhibieron los patrones más divergentes de la cepa 630 en los dominios del extremo N-terminal (79-100%) y el extremo C-terminal (88-100%; datos no mostrados).

Una mezcla de suero de hámster (HS) se recolectó de los hámsteres dorados sirios que se inmunizaron con un inmunógeno que incluye TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) y TcdB mutante (SEQ ID NO: 6), donde las toxinas mutantes se inactivaron con

EDC, de acuerdo con, por ejemplo, el Ejemplo 29, Tabla 15, que se describió anteriormente, y se formuló con fosfato de aluminio. Los resultados de la Tabla 35 muestran que al menos la toxina B de los respectivos sobrenadantes del cultivo se neutralizó, en un ensayo de neutralización in vitro, por los sueros de los hámsteres inmunizados.

Tabla 35. Descripción de cepas de *C. difficile* del CDC y capacidad del suero de hámster inmune para neutralizar varias toxinas

Cepa	PFGE Tipo	Ribotipo	Neutralizado por suero de hámster
2005088	NAP7	78	si
2007816	NAP7-related	78	si
2005325	NAP7	78	si
2004013	NAP1	27	si
2007886	NAP1		si
2008222	NAP4	77	si
2004206	NAP4	154	si
2005283	NAP5	Unk3	No analizado ^b
2009141	NAP2		si
2007838	NAP7	126	si
2004111	NAP2	1	si
2007070	NAP10	70	si
2006017	NAP12	15	si
2009078	NAP11	106	No analizado ^b
2007217	NAP8	126	si
2006376	NAP9	17	si
2007302	NAP11	Unk2	si
2004118	NAP1	27	si
2005022	NAP3	53	si
2009292	NAP1		si
2004205	NAP6	2	si
2007858	NAP1	Unk5	si
2009087	NAP11	106	No analizado ^b
2005359	Relacionado con NAP1		si

b Los niveles de toxina fueron demasiado bajos para realizar el ensayo de neutralización.

La Figura 23 ilustra los resultados del ensayo de neutralización usando preparaciones de toxina de varias cepas de *C. difficile* sobre las células IMR-90. Los datos muestran que los anticuerpos neutralizantes de TcdB en los antisueros de hámster fueron capaces de neutralizar toxinas de las 21 cepas analizadas, que incluyen cepas hipervirulentas y una cepa negativo de TcdA, positivo de TcdB. Se

obtuvieron al menos 16 cepas diferentes de *C. difficile* de los CDC (Atlanta, GA) (previamente descritos) y se cultivaron en medio de cultivo de *C. difficile* en condiciones adecuadas conocidos en la técnica y como se describió anteriormente. Los sobrenadantes del cultivo que contienen las toxinas secretadas se analizaron para determinar su citotoxicidad (EC_{50}) sobre las monocapas de IMR-90 y posteriormente se analizaron en un ensayo de neutralización *in vitro* estándar a 4 veces la EC_{50} usando varias diluciones de sueros de los hámsteres inmunizados con el principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante, y se formularon con fosfato de aluminio. La toxina bruta obtenida de los sobrenadantes del cultivo de cada cepa y toxina purificada (toxina comercial obtenida de la Lista de productos biológicos)(no purificado de los respectivos sobrenadantes) se analizaron para determinar la citotoxicidad para las células IMR-90 usando el ensayo de citotoxicidad *in vitro* descrito anteriormente.

En las Figuras 23A-K, los gráficos muestra los resultados de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* (previamente descritos) en que los niveles de ATP (RLU) se grafican contra concentraciones crecientes de: medio de cultivo de *C. difficile* y la mezcla de suero de hámster (■); toxina bruta y la mezcla de suero de hámster (●); toxina purificada y la mezcla de suero de hámster (▲); toxina bruta (▼), control; y toxina purificada (◆), control. Las toxinas de las cepas respectivas se añadieron a las células con valores de $4 \times EC_{50}$.

Como se muestra en las Figuras 23A-K, los hámsteres que recibieron el inmunógeno descrito desarrollaron de modo sorprendente anticuerpos neutralizantes que exhibieron actividad neutralizante contra las toxinas de al menos las siguientes 16 cepas de CDC diferentes de *C. difficile*, en comparación con el respectivo control de solo toxina: 2007886 (Figura 23A); 2006017 (Figura 23B); 2007070 (Figura 23C); 2007302 (Figura 23D); 2007838 (Figura 23E); 2007886 (Figura 23F); 2009292 (Figura 23G); 2004013 (Figura 23H); 2009141 (Figura 23I); 2005022 (Figura 23J); 2006376 (Figura 23K). Ver también la Tabla 35 para las cepas adicionales de *C. difficile* de las cuales se analizaron las toxinas y se neutralizaron con la composición inmunogénica que incluye un principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante, formulada en fosfato de aluminio.

En otro estudio, los sobrenadantes del cultivo que contienen toxinas secretadas de las diversas cepas de *C. difficile* (obtenidas de los CDC y de Leeds Hospital, UK) se analizaron en el ensayo de neutralización *in vitro* usando sueros de los hámsteres que fueron tratados con principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la

toxina B mutante, formulados con Alhydrogel. Ver Tabla 36 para el diseño experimental. Los resultados se muestran en la Tabla 37 y Tabla 38.

Tabla 36: Diseño experimental		
Control de ensayo	de	En el ensayo usando células HT-29: Anti-suero de conejo (Anti-Toxina A policlonal Fitzgerald Industries, #70-CR65) y Toxina A de referencia (toxina tipo salvaje A de la Lista de productos biológicos) En el ensayo usando células IMR-90: Anti-suero de conejo (Anti-Toxina B policlonal Meridian Life Science, #B01246R) y Toxina B de referencia (toxina B tipo salvaje de la Lista de productos biológicos)
Controles de muestra		En el ensayo usando células HT-29: suero HS + toxina A de referencia
		En el ensayo usando células IMR-90: suero HS + Toxina B de referencia
		suero HS+ toxina wt 630
		suero HS+ Medio de cultivo de IMR-90 o Línea celular HT-29
Muestra de ensayo	de	HS + sobrenadante de cultivo de <i>C. difficile</i>
Fuente de antisuero de hámster (HS)	de	Animales administrados con principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante formulados con Alhydrogel

Tabla 37: Anticuerpos inducidos por la composición inmunogénica neutralizaron la toxina A y toxina B de varias cepas de <i>C. difficile</i> tipo salvaje de los CDC, que incluye las cepas hipervirulentas						
Cepa Cdiff	Tipo PFGE	Ribotipo	Toxinotipo	Otro método de tipificación	Neutralizado por HS (IMR-90, Toxina B)	Neutralizado por HS (HT-29, Toxina A)
2004111	NAP2	1	0	La secuencia de la toxina respectiva tiene 100% de homología con la toxina de la Cepa 630	Si	Si
2009141	NAP2		0		Si	Si
2006017	NAP12	15	0		Si	Si
2007302	NAP11	Unk2	0		Si	Si
2009087	NAP11	106	0		Si	Si
2005022	NAP3	53	0		Si	Si
2005283	NAP5	Unk3	0		Si	Si
2009078	NAP5	53	0		Si	Si
2004206	NAP4	154	0		Si	Si
2008222	NAP4	77	0		Si	Si
2004205	NAP6	2	0		Si	Si
2007070	NAP10	70	0		Si	Si
2006376	NAP9	17	VIII	txnA-/txnB+	Si	N/A
2007816	Relacionada con NAP7	78	V	Aumento de prevalencia de US y Europa	Si	Si
2007838	NAP7	126			Si	Si
2005088	NAP7	78			Si	Si
2005325	NAP7	78			Si	Si
2007217	NAP8	126			Si	Si
2004013	NAP1	27	III	NAP1/027/III hipervirulenta	Si	Si
2004118	NAP1	27			Si	Si
2009292	NAP1				Si	Si
2005359	Relacionada con NAP1				Si	Si

2007858	NAP1	Unk5	IX/XXIII	Otros	Si	Si
2007886	NAP1		IX/XXIII		Si	Si

Tabla 38: Anticuerpos inducidos por la composición inmunogénica neutralizaron la toxina A y toxina B de varias cepas de C. difficile tipo salvaje de Europa, que incluye las cepas hipervirulentas

Cepa Cdiff	PFGE Tipo	Otro método de tipificación	Tipo de toxina	Neutralizado por HS (IMR-90, Toxina B)	Neutralizado por HS (HT-29, Toxina A)
001	NAP2	Cepas de Toxinotipo 0	0	Si	Si
002	NAP6			Si	Si
012 (004)	NAPCR1			Si	Si
014	UK			Si	Si
015	NAP12			Si	Si
020	NAP4			Si	Si
029	UK			Si	Si
046	UK			Si	Si
053	NAP5			Si	Si
059	UK			Si	Si
077	UK			Si	Si
078	UK			Si	Si
081	UK			Si	Si
087	UK			Si	Si
095	UK			Si	Si
106	UK			Si	Si
117	UK			Si	Si
017	NAP9	txnA-/txnB+	VIII	Si	NA
027	NAP1	Hipervirulenta	III	Si	Si
075	UK			Si	Si
003	NAP10	Otros	I	Si	Si
023	UK		IV	Si	Si
070	UK		XIII	Si	Si
126	UK		UK	Si	Si
131	UK		UK	En progreso	Si

Cepas de C. difficile tipo salvaje obtenido de Leeds Hospital, UK.

“UK” = estado desconocido

NA, no aplicable; cepa no produce la toxina A; no se analizó en el ensayo de neutralización de la Toxina A

Ejemplo 38: Mapeo de péptidos de toxinas triple mutantes EDC/NHS

Para caracterizar las toxinas triple mutantes inactivadas por EDC/NHS, se realizaron experimentos de mapeo de péptidos en cuatro lotes de toxina A triple mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) y cuatro lotes de triple mutante B tratada por EDC/NHS (SEQ ID NO: 6). Después de digerir las toxinas mutantes con tripsina, los fragmentos de péptidos resultantes se separaron usando HPLC de fase inversa. Se usó el análisis espectral de masa se usó para identificar modificaciones que se producen como resultado del proceso de inactivación. Para el principio activo de la toxina A mutante y el principio activo de la toxina B mutante, se identificó más de

95% de los péptidos tripticos teóricos. Se identificaron entrecruzamientos y aductos de glicina (se usó glicina como el agente de terminación). Para el principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante, también se observaron aductos de beta-alanina. Sin estar ligado por mecanismo o teoría, los aductos de beta-alanina parecen provenir de la reacción de tres moles de NHS con un mol de EDC que forma beta-alanina activada por NHS. Esta molécula luego puede reaccionar con los grupos lisina para formar aductos de beta-alanina (+70 Da). En las muestras de toxina B triple mutante tratada con EDC/NHS, también se observaron niveles bajos (0,07 moles/mol de proteína) de deshidroalanina (-34 Da). La deshidroalanina es un resultado de la desulfonación de un residuo de cisteína. Se observó el mismo tipo y grado de modificación en los cuatro lotes de cada toxina mutante, lo que indica que el proceso produce un producto compatible. El mapeo peptídico (a más de 95% de cobertura de secuencia) confirma que las modificaciones están presentes. Una síntesis de las modificaciones se muestra en la Tabla 39. Ver también Figuras 24-25. Además, el tamaño y la heterogeneidad de carga del principio activo de la toxina A triple mutante y del principio activo de la toxina B triple mutante aumentaron, en comparación con el tamaño y heterogeneidad de carga de la respectiva toxina A triple mutante y toxina B triple mutante en ausencia de inactivación química. Como resultado, los perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y cromatografía de intercambio aniónico (AEX) presentaron picos relativamente anchos (datos no mostrados).

Tabla 39. Síntesis de modificaciones observadas en los principios activos de la toxina mutante

Modificación	# de residuos modificados	Total # de Residuos	Grado de Modificación	Moles modificados/mol proteína
Principio activo de la toxina A mutante				
Entrecruzamiento	2	313 Asp/Glu	16-40%	0,6
Resto de glicina	8	313 Asp/Glu	10-53%	2,2
Residuo de beta alanina	19	233 Lys	10-60%	4,7
Principio activo de la toxina B mutante				
Entrecruzamiento	3	390 Asp/Glu	11-63%	0,8
Resto de glicina	23	390 Asp/Glu	10-31%	3,9
Residuo de beta alanina	10	156 Lys	12-42%	2,6

Dehidroalanina	2	8 Cys	1,0-3,5%	,07
----------------	---	-------	----------	-----

El grado de modificación se calcula por la división del área de HPLC del péptido modificado por el área de HPLC del péptido nativo+ modificado.

Ejemplo 39: Producción del producto farmacológico

La composición inmunogénica de *C. difficile* (producto farmacológico) contiene dos ingredientes farmacéuticos activos (principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante). Un ejemplo de producto farmacológico es una formulación liofilizado que contiene 10 mM de buffer tris pH 7,4, 4,5% (p/p) de dihidrato de trehalosa, y 0,01% (p/v) de polisorbato 80, que incluye cada principio activo de la toxina A mutante y un principio activo de la toxina B mutante. Ver Tabla 40. La composición inmunogénica se prepara para la inyección por la resuspensión de la vacuna liofilizada con diluyente o con diluyente que contiene Alhydrogel. El placebo incluirá una solución salina normal estéril para la inyección (0,9% de cloruro de sodio).

Tabla 40

Componente	Seleccionado
Forma de dosis de la formulación	Liofilizado
Dosis de antígeno por 0,5 ml	25, 50, 100 µg de cada toxina A triple mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) y Toxina B triple mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 6)
pH	7,4 ± 0,5
Buffer	10 mM Tris
Agente estabilizante/aglomerante	4,5% de dihidrato de trehalosa (3 – 6%)
Tensioactivo	0,01% de Polisorbato 80 (0,005 – 0,015%)
Cierres de recipiente	2 ml 13 mm vial de vidrio flint Tipo 1, Blowback, West - Flurotec

Preparación del buffer

Se añade agua para inyección (WFI) a un recipiente de formación de compuestos. Mientras se mezcla, los excipientes se añaden y se disuelven hasta la solución. Se mide el pH. Si se requiere, el pH se ajusta a 7,4 ± 0,1 con HCl. La solución se diluye al peso final con WFI, luego se filtra usando un filtro Millipore Express SHC XL150 de 0,22 µm. Se toma una muestra de reducción de biocarga de pre-filtración antes de la filtración. El buffer filtrado se muestrea para osmolalidad y pH.

Preparación de la formulación

Los principios activos de la toxina mutante descongelada se mezclan en el

recipiente de formulación sobre la base de las cantidades precalculadas en el siguiente orden de operación: 50% del volumen de buffer de dilución blanco para obtener 0,6 mg/ml se añade al primer recipiente, seguido por la adición del principio activo de la toxina A mutante y se mezcla durante 5 minutos a 100 rpm. El principio activo de la toxina B mutante luego se añade al recipiente y la solución también se diluye en el punto de dilución de 0,6 mg/ml y luego se mezcla durante otros 5 minutos a 100 rpm. Se extrae una muestra y se analiza para determinar la concentración de la toxina mutante total. La solución se diluye a 100 por ciento del volumen sobre la base de la concentración de la toxina mutante en proceso luego se mezcla durante 15 minutos a 100 rpm. El producto farmacológico formulado se muestrea para pH y pre-filtración de la biocarga. El producto farmacológico formulado luego se filtra usando un Millipore Express SHC XL150 para el almacenamiento durante la noche, o se lleva a la línea de cargado para la filtración estéril.

La masa formulada se lleva al área de cargado, se muestrea para biocarga y luego se filtra en forma estéril con dos filtros Millipore Express SHC XL150 en serie. La masa formulada se carga en viales de vidrio despirogenados a un volumen de carga blanco de 0,73 ml. Los viales cargados se tapan parcialmente y luego se cargan en el secador por congelación. El ciclo de liofilización se ejecuta como se muestra en la Tabla 41. A la finalización del ciclo, la cámara de liofilización se rellena con nitrógeno a 0,8 atm y luego las tapas se apoyan completamente. La cámara se descarga y los viales se tapa usando sellos flip-off.

Tabla 41. Puntos de ajuste del ciclo de liofilización del producto farmacológico de *C. difficile*

Etapas	Temperatura (°C)	Aumento (minutos)	Remojo (minutos)	Presión
Carga	5°C	N/A	60	-
Congelación 1	-50°C	183	60	-
Apareamiento	-10°C	133	180	
Congelación 2	-45°C	117	90	
Inicio de vacío	-45°C	-	60	50
Secado primario	-30°C	75	3420	50
Secado secundario	30°C	300	600	50
Almacenamiento	5°C	50	-	50

Los datos de estabilidad del producto farmacológico se sintetizan en la Tabla 42. Los datos sugieren que el producto farmacológico es física y químicamente estable durante el almacenamiento a 2-8°C durante al menos 3 meses o al menos 1 mes a 25° o 40°C. En ambas condiciones de almacenamiento, el nivel de impurezas detectadas por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) no cambió, ni hubo cambios en la

antigenicidad *in vitro* a través de los últimos puntos de tiempo analizados.

Tabla 42: **Estabilidad del producto farmacológico liofilizado^a**

	Formulación del producto farmacológico 200 µg/ml de principio activo de la toxina A mutante, 200 µg/ml de principio activo de la toxina B mutante, 4,5% de Dihidrato de trehalosa, 0,01% de Polisorbato 80, 10 mM de buffer tris pH 7,4			
Ensayo	t=0	1 Mes@25°C	1 Mes@40°C	3 meses @2-8°C
Aspecto antes de la reconstitución.	Torta blanca esencialmente libre de materia particulada extraña visible	Torta blanca esencialmente libre de materia particulada extraña visible	Torta blanca esencialmente libre de materia particulada extraña visible	Torta blanca esencialmente libre de materia particulada extraña visible
Aspecto después de la reconstitución.	Solución incolora transparente	Solución incolora transparente	Solución incolora transparente	Solución incolora transparente
pH	7,5	7,6	7,6	7,5
Concentración por AEX (µg/ml)	- principio activo de la toxina A mutante 212 - principio activo de la toxina B mutante 235	- Principio activo de la toxina A mutante 193 - principio activo de la toxina B mutante 223	- Principio activo de la toxina A mutante 191 - Principio activo de la toxina B mutante 222	- Principio activo de la toxina A mutante 193 - principio activo de la toxina B mutante 230
Impureza por SEC	< 2,5%	2,8%	2,8%	2,9%
Caracterizado por SEC	HMMS: 29,6% Monómero: 68,0%	HMMS: 30,2% Monómero: 67,1%	HMMS: 30,2% Monómero: 67,1%	HMMS: 28,5% Monómero: 68,7%
Humedad	0,5	NA	NA	NA

a DP liofilizada está reconstituida con 60 mM de diluyente de NaCl para estas pruebas.

Ejemplo 40: Diluyentes de la vacuna

Para la solución salina, se usa NaCl 60 mM como un diluyente para el producto farmacológico liofilizado sin ningún adyuvante para asegurar una solución isotónica después de la reconstitución.

Alhydrogel: Alhydrogel “85” 2% (Brenntag) es un producto de grado Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) disponible en el comercio compuesto de hojas cristalinas octahédricas de hidróxido de aluminio. Un ejemplo de formulación de diluyente Alhydrogel se muestra en la Tabla 43. El ejemplo de formulación se puede

usar en combinación con el producto farmacológico descripto anteriormente.

Tabla 43. Fundamento de la formulación para el diluyente Alhydrogel	
Componente	Seleccionado
Forma de dosis de la formulación	Suspensión líquida
Dosis de adyuvante por 0,5 ml	0,5 mg Al
pH	6,5 ± 0,5
Buffer	His 10 mM
Sal	NaCl 60 mM de
Cierres del envase	2 ml 13 mm vial de vidrio flint Tipo 1, Blowback, West - Flurotec

Los estudios con el adyuvante Alhydrogel muestran 100% de unión del principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante a 1 mg de Al/ml Alhydrogel de pH 6,0 a 7,5. Se observó la unión máxima de ambos principios activos en la concentración de proteína más alta analizada (300 µg/ml de cada uno).

La unión de las proteínas al Alhydrogel también se analizó con la formulación del producto farmacológico liofilizado que contiene 200 µg/ml de cada principio activo y Alhydrogel que varía de 0,25 a 1,5 mg/ml. El producto farmacológico se reconstituyó con diluyentes que contienen las concentraciones variadas de Alhydrogel y se midió el por ciento de cada toxina B mutante unida. Todas las concentraciones analizadas de Alhydrogel demostraron 100% de unión de los antígenos.

También se evaluó la cinética de unión de las proteínas al Alhydrogel en la dosis blanco de principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante (200 µg/ml cada una). Los resultados muestran que el 100% de los principios activos de la toxina mutante se unieron a Alhydrogel en todo el período de tiempo RT de 24 horas.

CpG 24555 y Alhydrogel: CpG 24555 es un oligodesoxinucleótido (ODN) 21-mer sintético que tiene una secuencia 5-TCG TCG TTTTTC GGT GCT TTT-3 (SEQ ID NO: 48). Un ejemplo de formulación para una combinación de CpG 24555 y diluyentes de Alhydrogel se muestra en la Tabla 44. El ejemplo de formulación se puede usar en combinación con el producto farmacológico descripto anteriormente.

Tabla 44: Fundamento de la formulación para el diluyente CpG/Alhidrogel	
Componente	Seleccionado
Forma de dosis de la formulación	Suspensión líquida
Dosis de adyuvante por 0,5 ml	0,5 mg Al y 1mg cpG
pH	6,5 ± 0,5
Buffer	His 10 mM
Sal	NaCl 60 mM de
Cierres del envase	2 ml 13 mm vial de vidrio flint Tipo 1, Blowback, West - Flurotec

ISCOMATRIX®: El adyuvante ISCOMATRIX® es un adyuvante basado en saponina conocido en la técnica. Un ejemplo de formulación para la formulación de adyuvante ISCOMATRIX® se muestra en la Tabla 45. El ejemplo de formulación se puede usar en combinación con el producto farmacológico descrito anteriormente.

Tabla 45: Fundamento de la formulación para el diluyente ISCOMATRIX®	
Componente	Seleccionado
Forma de dosis de la formulación	Suspensión líquida
Dosis de adyuvante por 0,5 ml	45 unidades
pH	6,2 ± 0,5
Buffer	His 10 mM
Sal	NaCl 60 mM de
Cierres del envase	2 ml 13 mm vial de vidrio flint Tipo 1, Blowback, West - Flurotec

Ejemplo 41: Inmunogenicidad de las composiciones de principio activo de la toxina mutante con adyuvante de Alhydrogel en el modelo NHP y Prueba de concepto preclínica

Se evaluó la inmunogenicidad de las composiciones de principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante con adyuvante de Alhydrogel en NHP, específicamente cynomolgus macaques. Los NHP inmunizados en intervalos de dos semanas (semanas 0, 2, 4) con 10 µg de cada composición de principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante (formulada con Alhydrogel) por dosis, desarrollaron respuesta antitoxina neutralizantes robustas. Ver Tabla 46. Las respuestas neutralizantes antitoxina A y antitoxina B alcanzaron un rango protector después de la tercera inmunización y permanecieron dentro o por encima del rango protector al menos hasta la semana 33 (último punto de tiempo estudiado).

Los Cynomolgus macaques (n=8) se inmunizaron IM en 0, 2 y 4 semanas con 10 µg cada uno de principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante formulados en 250 µg de Alhydrogel. Los sueros se recolectaron en cada punto de tiempo y se analizaron en el ensayo de neutralización de la toxina para determinar la actividad antitoxina funcional. Las GMT se proporcionan en la Tabla 46. El rango de título protector provisto en la tabla ilustra el rango de título de anticuerpo neutralizante que se correlaciona con la reducción significativa de la recurrencia de la infección con C. difficile en el ensayo de terapia de anticuerpo monoclonal Merck.

Tabla 46: Inmunogenicidad del principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante (formulados en 250 µg de Alhydrogel) en monos Cynomolgus (50% de título neutralizante)

Antitoxina A (rango protector Merck/Medarex: 666- 6,667 para la antitoxina A)

Semana:	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 8	Semana 12	Semana 25	Semana 29	Semana 33
Título :	15	19	129	382	336	2469	3069	2171	1599	1520	1545	2178

Antitoxina B (Rango protector Merck/Medarex: 222- 2,222 para la antitoxina B)

Título :	10	10	10	10	20	311	410	446	676	1631	2970	3510
----------	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	------	------	------

Correlación de títulos de anticuerpo protector humano del ensayo de terapia de mAb de Merck con los títulos inducidos por la vacuna candidata de Pfizer en NHP

El estudio de eficacia de Fase 2 con mAb Merck/Medarex (Lowy et al., *N Engl J Med.* 2010 Jan 21;362(3):197-205) pareció demostrar una correlación entre el nivel de mAb antitoxina neutralizantes en el suero y la prevención de la recurrencia de CDAD. Después de la administración de los mAb específicos de toxina a los seres humanos, los niveles de anticuerpo séricos en los receptores humanos en el rango de 10 a 100 µg/ml parecen proteger contra las recurrencias (70% de reducción en la recurrencia de CDAD).

Las composiciones inmunogénicas que incluyen los principios activos de la toxina mutante se analizaron para medir si las composiciones inmunogénicas son capaces de inducir respuestas de anticuerpo neutralizante potencialmente eficaces en los seres humanos por la comparación de los datos publicados del estudio de Fase 2 Merck/Medarex con los niveles de anticuerpo inducidos por las composiciones inmunogénicas en el modelo NHP. Esto se obtuvo por la utilización de las características previamente publicadas de los mAb Merck/Medarex para convertir el rango de estos mAb en el suero obtenidos de sujetos que no exhibieron signo de recurrencias (10-100 µg/ml) en títulos de 50% de neutralización y comparar estos títulos (“rango de título protector”) en los títulos observados en los modelos preclínicos que se describen en la presente. Como se muestra en la Tabla 46, las composiciones inmunogénicas que incluyen el principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante con adyuvante de Alhydrogel generaron respuestas inmunes en NHP que alcanzaron el “rango protector” después de la tercera dosis y han permanecido dentro o por encima de este rango hasta la semana 33. El nivel de anticuerpos neutralizantes de la toxina inducidos en los NHP por la composición inmunogénica de *C. difficile* de la invención es comparable con los niveles de

anticuerpo sérico en los sujetos del ensayo Merck/Medarex que parecieron estar protegidos de las recurrencias de CDAD.

Ejemplo 42: Inmunogenicidad de las composiciones del, principio activo de la toxina mutante con adyuvante ISCOMATRIX o Alhydrogel/CpG 24555 (Alh/CpG) en el modelo NHP

En los NHP, ISCOMATRIX y Alh/CpG aumentaron en forma estadísticamente significativa los títulos de neutralización de toxina A y B cuando se compararon con la vacuna administrada con Alhydrogel solo (Tabla 47). Las respuestas de antitoxina por encima del umbral se indujeron en puntos de tiempos más tempranos por la vacuna administrada con Alh/CpG o ISCOMATRIX (semana 2-4) en comparación con Alhydrogel solo (semana 4-6), que puede tener un efecto importante en la protección de la recurrencia de CDAD en los seres humanos. En comparación con Alhydrogel, la composición inmunogénica con adyuvante Alh/CpG o con ISCOMATRIX generaron títulos de neutralización antitoxina que alcanzaron el rango protector (ver también Ejemplo 41) más rápidamente y que han permanecido dentro o por encima de este rango hasta la semana 33.

Como se muestra en las Tabla 47, los Cynomolgus macaques se inmunizaron IM en las semanas 0, 2, y 4 con 10 µg de cada principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante formulados en 250 µg de Alhydrogel (n=8), o 500 µg de CpG + 250 µg de Alhydrogel (n=10), o 45 U de ISCOMATRIX (n=10). Los sueros se recolectaron en cada punto de tiempo y se analizaron en el ensayo de neutralización de la toxina descrito anteriormente para actividad antitoxina funcional. Las GMT se listan en las tablas. Los asteriscos (*) indican significancia estadística (p<0,05) cuando se compararon con los títulos del grupo Alhydrogel. El rango de título protector representa el rango de título de anticuerpo neutralizante que correlaciona con la reducción significativa de la recurrencia de la infección con C. difficile de acuerdo con el ensayo de terapia mAb Merck/Medarex.

Tabla 47: Inmunogenicidad de principios activos de la toxina mutante con adyuvante en los NHP (50% de Título de neutralización)							
Antitoxina A (Indican significancia estadística: 666- 6,667 para antitoxina A)							
Semana:	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 12	Semana 25	Semana 33
Título de Alhydrogel	15	129	336	3069	1599	1520	2178
Título de Alhydrogel + CpG:	17	*1004	*2162	*15989	*7179	*5049	*7023

Título de ISCOMATRIX:	25	*1283	*3835	*19511	*12904	*6992	*7971
Antitoxina B (rango protector Merck/Medarex: 222- 2,222 para la antitoxina B)							
Título de Alhydrogel	10	10	20	410	676	1631	3510
Título de Alhydrogel + CpG:	10	13	*136	*2163	*5076	*9057	*27971
Título de ISCOMATRIX:	10	10	*269	*5325	*9161	*19479	*25119

También se evaluó la dosis de principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante administrada, en presencia de adyuvantes ISCOMATRIX o Alh/CpG, sobre los títulos de anticuerpo neutralizante antitoxina generados en los NHP. En un estudio, los NHP se trataron con una dosis baja (10µg) o alta (100 µg) de cada principio activo de la toxina mutante formulado en ISCOMATRIX. Las respuestas se compararon en cada punto de tiempo después de la inmunización. Como se muestra en las Tabla 48, los títulos neutralizantes antitoxina fueron robustos en ambos grupos de tratamiento. Los títulos de antitoxina fueron casi equivalentes en la mayoría de los punto de tiempo entre los grupos de dosis baja y dosis alta, a la vez que hubo una tendencia para los títulos de antitoxina B a ser más altos en el grupo de dosis alta.

Tabla 48: Títulos neutralizantes antitoxina en NHP después de la inmunización con 10 µg o 100 µg de cada principio activo de la toxina mutante y principio activo de la toxina mutante administrados con ISCOMATRIX (50% de título de neutralización)							
Antitoxina A (rango protector Merck/Medarex: 666- 6,667 para la antitoxina A)							
Semana	Semana 0	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 12
Título 10 µg:	11	585	3522	4519	19280	10225	12084
Título 100 µg:	11	400	1212	2512	9944	10283	18337
Antitoxina B (rango protector Merck/Medarex: 222- 2,222 para la antitoxina B)							
Título 10 µg:	10	10	112	266	3710	2666	7060
Título 100 µg:	10	10	303	469	6016	4743	20683

Como se muestra en la Tabla 48, los Cynomolgus macaques (n=5) se inmunizaron IM en las semanas 0, 2, y 4 con 10 µg o 100 µg de cada principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante formulados con 45 U de ISCOMATRIX. Los sueros se recolectaron en cada punto de tiempo y se analizaron en el ensayo de neutralización de la toxina para actividad antitoxina funcional. Las GMT se listan en la tabla. El rango de título protector representa el rango de título de

anticuerpo neutralizante que se correlaciona con la reducción significativa de la recurrencia de la infección con *C. difficile* en el ensayo de terapia mAb Merck/Medarex.

En un esfuerzo para mejorar la cinética de las respuestas de antitoxina B, los NHP se inmunizaron con una dosis constante de principio activo de la toxina A mutante (10 µg) que se mezcló con una dosis creciente de principio activo de la toxina B mutante (10, 50, o 100 µg) en presencia de adyuvantes ISCOMATRIX o Alh/CpG. Independientemente del adyuvante, hubo una tendencia para los grupos que recibieron dosis más altas del principio activo de la toxina B mutante (50 o 100 µg) para inducir respuestas neutralizantes antitoxina B más altas en comparación con la dosis de 10 del principio activo de toxina B mutante (Tabla 50, marcada por * para indicar aumentos estadísticamente significativos). Esta tendencia se observó en la mayoría de los puntos de tiempo después de la inmunización final. Sin embargo, en algunos casos, las respuestas neutralizantes antitoxina A mostraron una disminución estadísticamente significativa (marcado con ^ en la Tabla 49) cuando aumentó la cantidad de toxina B mutante.

Como se muestra en la Tabla 49 y Tabla 50, los NHP (10 por grupo) se inmunizaron IM en las semanas 0, 2, y 4 con diferentes relaciones de principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante (10µg de principio activo de la toxina A mutante más 10, 50, o 100 µg de principio activo de la toxina B mutante; denominado 10A:10B, 10A:50B y 10A:100B, respectivamente, en la Tabla 49 y Tabla 50), formulados con ISCOMATRIX (45 U por dosis) o con Alh/CpG/ (250 µg / 500 µg por dosis). La Tabla 49 muestra títulos de antitoxina. La Tabla 50 muestra títulos de antitoxina B. Las GMT se listan en las tablas. El rango de título protector representa el rango de título de anticuerpo neutralizante que se correlaciona con la reducción significativa de la recurrencia de infección con *C. difficile* en el ensayo de terapia mAb de Merck. El símbolo ^, representas disminución estadísticamente significativa de los títulos neutralizantes ($p<0,05$) en comparación con el grupo 10A: 10B. El símbolo asterisco, *, representa aumento estadísticamente significativo de los títulos neutralizantes ($p<0,05$) en comparación con el grupo 10A: 10B.

Tabla 49: Títulos neutralizantes antitoxina en los NHP después de la inmunización con 10 µg de principio activo de la toxina A mutante combinados con 10, 50, o 100 µg de principio activo de la toxina B mutante usando ISCOMATRIX o Alh/CpG como adyuvantes (50% de título de neutralización)

Antitoxina A (rango protector Merck/Medarex: 666- 6,667 para la antitoxina A)
ISCOMATRIX

Semana:	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 12	Semana 25	Semana 33
Título 10A:10B:	25	1283	3835	19511	12904	6992	7971
Título 10A:50B:	29	906	2917	16126	^7756	^4208	5965
Título 10A:100B:	20	982	2310	^5034	^5469	^4007	3780
Antitoxina A (rango protector Merck/Medarex: 666- 6,667 para la antitoxina A) Alh/CpG							
Título 10A:10B:	17	1004	2162	15989	7179	5049	7023
Título 10A:50B:	20	460	1728	16600	6693	6173	8074
Título 10A:100B:	27	^415	1595	13601	6465	5039	6153

Tabla 50: Títulos neutralizantes antitoxina en NHP después de la inmunización con 10 µg de principio activo de la toxina A mutante combinado con 10, 50, o 100 µg de principio activo de la toxina B mutante usando ISCOMATRIX o Alh/CpG como Adyuvantes (50% Título de neutralización)

Antitoxina B (rango protector Merck/Medarex: 222- 2,222 para la antitoxina B)

Semana:	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 12	Semana 25	Semana 33
Título ISCOMATRIX:	10	10	269	5325	9161	19479	25119
Título:	13	*20	*604	4861	10801	20186	*57565
Título:	10	*23	*862	*10658	10639	*33725	*56073
Antitoxina B (rango protector Merck/Medarex: 222- 2,222 para la antitoxina B)							
Título Alh/CpG:	10	13	136	2163	5076	9057	27971
Título:	10	15	*450	*5542	*9843	15112	50316
Título:	11	17	*775	*13533	*11708	*17487	26600

Ejemplo 43: Estudio de toxicidad IM de dosis repetida de cinco semanas con una composición inmunogénica en Cynomolgus Monkeys, con un período de recuperación de 4 semanas

El estudio de toxicidad IM de dosis repetida de cinco semanas con PF-06425095 (una composición inmunogénica que incluye principio activo de la toxina A triple mutante y principio activo de la toxina B triple mutante en una combinación con adyuvantes hidróxido de aluminio y CpG 24555) en Cynomolgus monkeys se realizó

para evaluar la potencial toxicidad e inmunogenicidad del principio activo de la toxina A triple mutante y principio activo de la toxina B triple mutante de *C. difficile* en una combinación con los adyuvantes hidróxido de aluminio y CpG 24555 (PF-06425095). PF-06425095 a razón de 0,2 o 0,4 mg/dosis de principio activo de la toxina A triple mutante y principio activo de la toxina B triple mutante (grupos de composición inmunogénica de dosis baja y alta, respectivamente), 0,5 mg de aluminio como hidróxido de aluminio, y 1 mg de CpG 24555 y la combinación de adyuvantes solo (hidróxido de aluminio + CpG 24555; PF-06376915) se administraron IM a monos cynomolgus (6/sexo/grupo) como dosis de activación seguida por 3 dosis de refuerzo (Días 1, 8, 22, y 36). Un grupo separado de animales (6/sexo) recibió 0,9% de solución salina isotónica a un pH aproximado de 7,0. El vehículo de la composición inmunogénica estaba compuesto de 10 mM de buffer tris a pH 7,4, 4,5% de dihidrato de trehalosa, y 0,1% de polisorbato 80. El vehículo de adyuvante control estaba compuesto de 10 mM de buffer de histidina con 60 mM de NaCl a pH 6,5. El volumen de dosis total fue 0,5 ml por inyección. Todas las dosis se administraron en el músculo cuádriceps izquierdo y/o derecho. Los animales seleccionados se sometieron a un período de observación libre de dosis de 4 semanas para evaluar la reversibilidad de algunos efectos observados durante la fase de dosificación del estudio.

No hubo hallazgos adversos en este estudio. PF-06425095 fue bien tolerado y produjo solo reacción inflamatoria local sin evidencia de toxicidad sistémica. Durante la fase de dosificación, se observaron aumentos dependientes de la dosis desde la preprueba en fibrinógeno (23,1% a 2,3x) de los Días 4 y 38 y proteína C-reactiva en los Días 4 (2,1x a 27,5x) y 38 (2,3x a 101,5x), y globulina (11,1% a 24,1%) en el Día 36 y/o 38, en los grupos tratados con composición inmunogénica y fueron compatibles con la respuesta inflamatoria esperada a la administración de una composición inmunogénica con adyuvante.

Los aumentos en el fibrinógeno y proteína C-reactiva en el Día 4 se han recuperado parcialmente en el Día 8 con aumentos en el fibrinógeno (25,6% a 65,5%) y proteína C-reactiva (4,5x y 5,6x) solo en el grupo de composición inmunogénica de dosis alta. Se observaron aumentos de la interleuquina (IL)-6 en los grupos de composición inmunogénica de dosis baja y alta en el Día 1, Hora 3 (valores individuales 8,3x a 127,2x Día 1, Hora 0, receptivo a dosis) y Día 36, Hora 3 (valores individuales 9,4x a 39,5x Día 36, Hora 0). NO hubo cambios observados en las otras citoquinas (IL-10, IL-12, proteína inducible por interferón (IP-10), y factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Los aumentos en estas proteínas y citoquinas de fase aguda fueron

parte de la respuesta fisiológica normal esperada a la administración de antígeno extraño. No hubo alteraciones relacionadas con PF 06425095 relacionadas con el adyuvante en estos parámetros de patología clínica en la fase de recuperación (las citoquinas no se evaluaron durante la fase de recuperación). Además, hubo cambios localizados en los sitios de inyección, que fueron de similar incidencia y gravedad en el grupo control de adyuvante y los grupos de composición inmunogénica de dosis baja y alta, en consecuencia, no estuvieron directamente relacionados con la PF-06425095. Durante la fase de dosificación, los cambios incluyeron inflamación activa crónica mínima a moderada que se caracterizó por la separación de fibras musculares por infiltrados de macrófagos, que a menudo contenían material granular basófilo (interpretado como adyuvante que contiene aluminio), linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos, eosinófilos, desechos necróticos, y edema. El material granular basófilo también estaba presente en forma extracelular dentro de estos focos de inflamación activa crónica. Al fin de la fase de recuperación, hubo inflamación mínima a crónica e infiltrado celular mononuclear y fibrosis mínima. Estos hallazgos del sitio de inyección representan una respuesta inflamatoria local para el adyuvante. Otros cambios microscópicos incluyeron celularidad linfocítica aumentada mínima a moderada en el ganglio linfático ilíaco (drenaje) y aumento mínimo de celularidad en los centros germinales del bazo que se observaron durante la fase de dosificación en el grupo control de adyuvante y los grupos de composición inmunogénica de dosis baja y alta. Al final de la fase de recuperación, estos hallazgos microscópicos eran de menor gravedad. Estos efectos representan una respuesta inmunológica a la estimulación antigénica, y fueron una respuesta farmacológica al adyuvante o PF-06425095. No hubo un aumento relacionado con el artículo en los anticuerpos anti-ADN.

Sobre la base de la ausencia de hallazgos adversos, el nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) en este estudio es el grupo de composición inmunogénica de dosis alta (0,4 mg de principio activo de la toxina A triple mutante y principio activo de la toxina B triple mutante/dosis como PF-06425095) administrado como dos inyecciones de 0,5 ml para las cuatro dosis.

Ejemplo 44: Eficacia de sueros de NHP seropositivos transferidos pasivamente a los hámsteres

A los grupos de 5 hámsteres dorados sirios se administró una dosis oral de antibiótico clindamicina (30 mg/kg) para alterar la flora intestinal normal. Después de cinco días, los hámsteres se expusieron a una dosis oral de esporas de *C. difficile* tipo salvaje (cepa 630, 100 cfu por animal), y se les administró por vía intraperitoneal (IP)

suero de NHP de acuerdo con la Tabla 51. Sin estar ligado por mecanismo o teoría, los síntomas de enfermedad después de la exposición con las esporas se manifiestan normalmente a partir de aproximadamente 30-48 horas pos-exposición.

Los sueros de NHP que se administraron a los hámsteres se mezclaron con las muestras de suero de NHP que exhiben un título más alto (suero anti-toxina A y suero anti-toxina B) después de tres inmunizaciones con principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante (relaciones 10:10, 10:50, y 10:100 A:B), formuladas con ISCOMATRIX (ver Ejemplo 42, Tabla 49, y Tabla 50). Los sueros NHP se recolectaron a partir de los puntos de tiempo de las semanas 5, 6, y 8 (inmunizaciones producidas en las semanas 0, 2, y 4), como se describe en el Ejemplo 42. Los resultados se muestran en las siguientes Tablas 52-54. El símbolo “+” indica una media geométrica (GM) en () que no incluye el animal #3, no respondedor. “*TB” representa sangrado terminal, el día en que el animal se sacrificó, que no es el mismo para todos los animal.

Tabla 51: Diseño experimental				
Grupo	Composición administrada	No. de animales	Vía	Esquema
1 “1 dosis”	Sueros de NHP seropositivos (no concentrado)	5	IP	Exposición Día 0 Dosis día 0 Sangrado días 0, 1, 2, TB en el día 11
2 “2 dosis”	Sueros de NHP seropositivos (no concentrado)	5	IP	Exposición Día 0 Dosis días 0, 1 Sangrado días 0, 1, 2, TB en el día 11

Tabla 52: Títulos de neutralización de anti-toxina A en sueros de hámster después de 1 o 2 dosis IP de sueros NHP (50% de título de neutralización en RLU)								
	Día	Hámster 1	Hámster 2	Hámster 3	Hámster 4	Hámster 5	GM	SE
1 dosis	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	2877	4008	2617	4917	1872	3081	538
	D2	1983	3009	2750	2902	1117	2214	357
	TB*	3239 (d4)	537 (d9)	155 (d11)	977 (d9)	972 (d2)	762	538
2 dosis	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	1154	2819	50	429	1174	606 (1131)*	475
	D2	4119	4674	1899	545		2113	862
	TB*	1236 (d9)	1267 (d8)	1493 (d4)	50 (d11)	1877 (d9)	738	306
Ingreso de sueros NHP = 41976								

Tabla 53: Títulos de neutralización de anti-toxina B en sueros de hámster después de 1 o 2 dosis IP de sueros NHP (50% De título de neutralización en RLU)								
	Día	Hámster 1	Hámster 2	Hámster 3	Hámster 4	Hámster 5	GM	SE
1 dosis	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	1846	4254	1347	5178	406	1859	904
	D2	992	1795	2585	2459	1145	1669	327
	TB*	1744 (d4)	50 (d9)	50 (d11)	265 (d9)	544 (d2)	229	317
2 dosis	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	1189	2229	50	550	3920	778 (1546)*	687
	D2	2288	2706	1452	287		1268	477
	TB*	301 (d9)	694 (d8)	682 (d4)	50 (d11)	1334 (d9)	394	217
Ingreso de sueros NHP = 23633								

Tabla 54: Porcentaje de hámsteres protegidos de la CDAD severa después de 1 o 2 dosis IP de sueros NHP							
Días pos-infección	0	2	4	6	8	10	11
1 dosis Sueros NHP	100%	80%	60%	60%	60%	20%	20%
2 dosis Sueros NHP	100%	100%	80%	80%	60%	20%	20%
Placebo	100%	75%	50%	25%	0%	n/a	n/a

En otro estudio, los hámsteres dorados sirios se trataron con una dosis oral de antibiótico de clindamicina (30 mg/kg) para alterar la flora intestinal normal. Después de cinco días, los hámsters se expusieron a una dosis oral de esporas de *C. difficile* tipo salvaje (cepa 630, 100 cfu por animal), y se les administró por vía intraperitoneal (IP) suero de NHP de acuerdo con la Tabla 55. Sin estar ligado por mecanismo o teoría, los síntomas de enfermedad después de la exposición con las esporas se manifiestan normalmente a partir de aproximadamente 30-48 horas pos-exposición

Los sueros de NHP que se administraron a los hámsteres se mezclaron con las muestras recolectadas de los NHP después de tres inmunizaciones con principio activo de la toxina A mutante y principio activo de la toxina B mutante (relaciones 10:10, 10:50, y 10:100 A:B), formuladas con Alhydrogel y CpG 24555 (ver Ejemplo 42, Tabla 49, y Tabla 50). Los sueros NHP se recolectaron en los puntos de tiempo de las semanas 5, 6, 8, y 12 como se describe en el Ejemplo 42 (los NHP se inmunizaron en las semanas 0, 2, y 4). Los resultados se muestran en las siguientes Tablas 56-59. Los sueros de los hámsteres se investigaron adicionalmente para determinar el valor de la concentración inhibitoria (IC_{50}), que se determinaron usando el ensayo de neutralización de la toxina descrito anteriormente. El nivel de anticuerpos

neutralizantes de toxina inducido en los hámsteres por la composición inmunogénica de *C. difficile* de la invención es comparable a los niveles de anticuerpo en suero de los sujetos del ensayo Merck/Medarex que parecieron estar protegidos de la recurrencia de CDAD.

Tabla 55: Diseño experimental				
Grupo	Composición administrada	No.	Vía	Esquema
1	Sueros de NHP seropositivos	5	IP	Exposición D0 Dosis D0, 1, 3, 5, 7
2	Sueros de NHP seropositivos	5	IP	no exposición Dosis D0, 1, 3, 5, 7,
3	Sueros de NHP seropositivos	10	IP	Exposición D0 Dosis D0, 1, 3, 5, 7
4	Placebo	5	IM	Exposición D0

Tabla 56: Títulos de neutralización de anti-toxina A ^a en sueros de hámster después de 1 o 2 dosis IP de sueros NHP (50% De título de neutralización en RLU)			
Día	Expuestos (Grupos 1 y 3)	No expuestos (Grupo 2)	Valor p
0	11	12	0,5933
1	380	720	0,034*
3	666	1220	0,0256*
5	864	1367	0,0391*
7	564	1688	0,0411*
11	263	1281	0,001*
Ingreso de mezcla de sueros NHP = 9680 a, títulos expresados como medias geométricas para cada grupo (n=15 del día 0 para el grupo "expuestos", n=5 para el grupo "no expuestos") rango protector Merck/Medarex: 666-6,667 para la antitoxina A El asterisco "*" indica una diferencia significativa			

Tabla 57: Títulos de neutralización de anti-toxina B ^a en sueros de hámster después de 1 o 2 dosis IP de sueros NHP (50% de título de neutralización en RLU)			
Día	Expuestos (Grupos 1 y 3)	No Expuestos (Grupo 2)	Valor p
0	10	10	0,3343
1	465	828	0,0579
3	765	1400	0,0273*
5	941	1734	0,0226*
7	611	1877	0,0498*
11	194	1436	0,0047*
Ingreso de sueros NHP pool = 19631 a, títulos expresados como medias geométricas para cada grupo (n=15 del día 0 para el grupo "expuestos", n=5 para el grupo "no expuestos") Rango protector Merck/Medarex: 222- 2,222 para la antitoxina B El asterisco "*" indica una diferencia significativa.			

Tabla 58: Porcentaje de hámsteres protegidos de CDAD severa después de dosis IP de sueros NHP							
Días pos-infección	0	2	4	6	8	10	11
Grupos 1 y 3	100%	73%	53%	53%	47%	33%	33%
Placebo (Grupo 2)	100%	50%	0%				

Tabla 59: Valores de IC ₅₀ de títulos de neutralización de 50% específicos de toxina															
		IC ₅₀ de Anti Toxina A							IC ₅₀ de Anti Toxina B						
		Día de Pos-dosis							Día de Pos-dosis						
Expuestos	Animal ID	0	1	3	5	7	11	Animal ID	0	1	3	5	7	11	
	1-1	10	50	338	muerto D4			1-1	10	50	254	muerto D4			
	1-2	10	614	579	777	605	192	1-2	10	720	659	896	475	157	
	1-3	10	710	1035	845	548	Muerto D10	1-3	10	867	1017	988	694		
	1-4	10	850	588	942	1116	296	1-4	10	1158	555	1158	1806	250	
	1-5	10	780	895*				1-5	10	910	687*				
	3-1	10	647	Muerto D2				3-1	10	598	Muerto D2				
	3-2	10	331	Muerto D2				3-2	10	290	Muerto D2				
	3-3	10	660	1273	849	692	640	3-3	10	717	1623	870	791	574	
	3-4	10	536	493	1102	1314	Muerto D9	3-4	10	618	598	977	1478	Muerto D9	
	3-5	10	817	807	774	1077	187	3-5	10	772	1260	850	913	243	
	3-6	10	117	649	803	50	186	3-6	10	1038	773	883	50	50	
	3-7	10	50	Muerto D2				3-7	10	50	Muerto D2				
	3-8	10	149	659	650*			3-8	10	121	1010	517*			
	3-9	30	797	1170*				3-9	10	1008	1720*				
3-10	10	792	Muerto D2				3-10	10	835	Muerto D2					
	GeoMean	11	380	666	864	564	263	GeoMean	10	465	765	941	611	194	
No Expuestos	Error estándar	1	78	86	41	163	88	Error estándar	0	94	125	38	224	88	
	2-1	10	697	1634	1597	2219	1709	2-1	10	890	1777	1910	3229	1355	
	2-2	10	779	1207	1322	1755	1327	2-2	10	939	1378	1564	1897	1379	
	2-3	10	581	669	722	1401	1118	2-3	10	828	837	865	1484	1404	
	2-4	26	856	1540	1875	1830	1826	2-4	10	748	1780	2939	1880	2650	
	2-5	10	715	1331	1668	1374	744	2-5	10	752	1475	2064	1364	880	
	Media geom	12	720	1220	1367	1688	1281	Media geom	10	828	1400	1734	1877	1436	
	Error estándar	3	46	169	199	156	197	Error estándar	0	38	173	338	332	296	
*=- murió en este día															

*= murió en este día

Ejemplo 45: Caracterización de principios activos de la toxina mutante

La estructura primaria de la toxina A triple mutante se muestra en la SEQ ID NO: 4. El residuo Met NH₂-terminal de la posición 1 de la SEQ ID NO: 4 se origina del codón de iniciación de la SEQ ID NO: 12 y está ausente en la proteína aislada (por ejemplo, ver SEQ ID NO: 84). Por consiguiente, en el Ejemplo 12 a Ejemplo 45, “SEQ ID NO: 4” se refiere a la SEQ ID NO: 4 donde la metionina inicial (de la posición 1) está ausente. La toxina A triple mutante purificada (SEQ ID NO: 4) (Intermediario del principio activo - Lote L44993-132) y toxina A triple mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 4)(“principio activo de la toxina A mutante” - Lote L44898-012) presentaron una secuencia NH₂-terminal única que comienza en SLISKEELIKLAYSI (posiciones 2-16 de la SEQ ID NO: 4).

La estructura primaria de la toxina B triple mutante se muestra en la SEQ ID NO: 6. El residuo Met NH₂-terminal de la posición 1 de la SEQ ID NO: 6 se origina del

codón de iniciación de la SEQ ID NO: 12 y está ausente en la proteína aislada (por ejemplo, ver SEQ ID NO: 86). Por consiguiente, en el Ejemplo 12 a Ejemplo 45, “SEQ ID NO: 6” se refiere a la SEQ ID NO: 6 donde la metionina inicial (de la posición 1) está ausente. La toxina B triple mutante purificada (SEQ ID NO: 6) (Intermediario del principio activo - Lote 010) y toxina B triple mutante tratada con EDC/NHS (SEQ ID NO: 6)(“principio activo de la toxina B mutante” - Lote L44906-153) presentaron una secuencia NH₂-terminal única que comienza en SLVNRKQLEKMANVR (posiciones 2-16 de la SEQ ID NO: 6).

Se usó espectroscopia por dicroísmo circular (CD) para evaluar la estructura secundaria y terciaria del principio activo de la toxina A triple mutante (SEQ ID NO: 4) y toxina A mutante. La espectroscopía CD también se usó para evaluar la estructura secundaria y terciaria del principio activo de la toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6) y la toxina B mutante. La espectroscopía CD también se usó para evaluar potenciales efectos del pH sobre la estructura. El efecto del tratamiento EDC sobre la toxina A triple mutante se analizó por la comparación de datos de CD obtenidos para el principio activo de la toxina A mutante con los datos obtenidos para la toxina A triple mutante. Los efectos del tratamiento EDC sobre la toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6) se analizaron por la comparación de datos de CD obtenidos para el principio activo de la toxina B mutante con los datos obtenidos para la toxina B triple mutante.

Los datos de CD del UV lejano del principio activo de la toxina A mutante se obtuvieron a varios pH. Los espectros registrados a pH 5,0-7,0 son indicativos de alta proporción de α -hélices en la estructura secundaria, lo que sugiere que el esqueleto polipeptídico de la proteína adopta una conformación bien definida dominada por las α -hélices.

También se obtuvieron espectros de CD de UV cercano del principio activo de la toxina A mutante. La fuerte elipticidad negativa entre 260 y 300 nm es una indicación de que las cadenas laterales aromáticas están en el ambiente rígido único, es decir el principio activo de la toxina A mutante posee estructura terciaria. En efecto, los rasgos característicos que surgen de tipos individual de cadenas laterales aromáticas se pueden distinguir dentro del espectro: el hombro en ~290 nm y el pico negativo más grande a ~283 nm se deben a la absorbancia de la luz polarizada por las cadenas laterales de triptofano ordenadas, el pico negativo a 276 nm es de las cadenas laterales de tirosina, y los hombros menores a 262 y 268 nm son indicativos de los residuos de fenilalanina que participan en los contactos terciarios. Los resultados del UV lejano y cercano proporcionan evidencia de que el principio activo

de la toxina A mutante retiene la estructura plegada compactamente a pH fisiológico. Se observaron espectros de CD de UV lejano y cercano casi idénticos a pH 5,0 - 7,0, indicando que los cambios estructurales no detectables tienen lugar dentro de este rango de pH. Los datos de CD no se pueden recolectar a pH 3,0 y 4,0, ya que la proteína era insoluble a estos puntos de pH. En la comparación de los espectros de CD de UV lejano y cercano del principio activo de la toxina A mutante con los de la toxina A triple mutante, los espectros de ambas proteínas son esencialmente idénticos en todas las condiciones experimentales estudiadas, lo que indica que el tratamiento EDC no tuvo efectos detectables en la estructura secundaria y terciaria de la toxina A triple mutante. Este hallazgo está de acuerdo con los resultados de filtración en gel y ultracentrifugación analítica, que muestran cambios no detectables en los radios de Stokes y coeficientes de sedimentación/friccionales, respectivamente.

El principio activo de la toxina A mutante (así como de la toxina A triple mutante) contiene 25 residuos de triptofano que se extienden a lo largo de la secuencia primaria y pueden actuar como sondas fluorescentes intrínsecas convenientes. Se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia del principio activo de la toxina A mutante entre 300 y 400 nm en función de la temperatura. A 6,8°C el principio activo de la toxina A mutante muestra el espectro de emisión de fluorescencia característico del triptofano después de la excitación a 280 nm. Se observa el máximo de emisión de fluorescencia a ~335 nm, lo que indica que los residuos de triptofano están en un ambiente no polar, típicos de los interiores de la proteína más que de los ambientes polares acuosos. Los resultados del espectro de emisión de fluorescencia, junto con los resultados de los experimentos CD presentados en este informe, confirman que el principio activo de la toxina A mutante retiene la estructura plegada compacta.

La fluorescencia de la sonda extrínseca de ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANS) se usó para caracterizar posibles cambios conformacionales en el principio activo de la toxina A mutante y la toxina A triple mutante después de los cambios en el pH. Como se puede observar a partir de los resultados, no existe esencialmente aumento de la intensidad de fluorescencia ANS cuando el principio activo de la toxina A mutante o toxina A triple mutante se titulan con la sonda a pH 7,0, lo que sugiere que las superficies no hidrofóbicas se exponen a las proteínas en estas condiciones. El cambio de pH a 2,6 lleva a un aumento drástico del rendimiento cuántico de fluorescencia ANS después del aumento de la concentración de la sonda, hasta que el rendimiento cuántico de fluorescencia alcanza la saturación aparente. Este aumento

del rendimiento cuántico de fluorescencia ANS indica que a pH bajo (2,6), el principio activo de la toxina A mutante y toxina A triple mutante experimentan cambio conformacional inducido por pH que expone las superficies hidrofóbicas. Tales cambios conformacionales indican que la modificación e inactivación inducida por EDC de la toxina A triple mutante no restringió la plasticidad de la conformación del principio activo de la toxina A mutante (DS).

El efecto del tratamiento con EDC de las propiedades hidrodinámicas de la toxina A triple mutante se evaluó mediante la cromatografía de exclusión por tamaño en una columna G4000 SWXL. Se inyectaron el principio activo de la toxina A mutante y toxina A triple mutante en la columna G4000 SWXL equilibrada a pH 7,0, 6,0, y 5,0. Los datos indican que no se pueden detectar diferencias en el radio de Store del principio activo de la toxina A mutante y toxina A triple mutante mediante la cromatografía de exclusión por tamaño. En consecuencia, el tratamiento EDC no afectó drásticamente las propiedades hidrodinámicas y en forma correspondiente, la forma molecular global de la toxina A triple mutante.

El análisis adicional del principio activo de la toxina A triple mutante y toxina A mutante se realizó usando la técnica de dispersión de luz láser multiangular (MALLS). El tratamiento de toxina A triple mutante con EDC produjo la generación de una mezcla heterogénea compuesta de varias especies multiméricas y monoméricas. Tal heterogeneidad refleja la introducción de un gran número de enlaces covalentes inter- e intra-moleculares inducidos por EDC entre los carboxilos y aminas primarias de la proteína.

Los datos obtenidos proporcionan características físicas y químicas del principio activo de la toxina A triple mutante y la toxina A mutante (toxina A triple mutante tratada con EDC) y describe los rasgos clave de su estructura primaria, secundaria y terciaria. Los datos generados demuestran que el tratamiento de la toxina A triple mutante con EDC produjo la modificación covalente de su cadena polipeptídica pero no afectó las estructuras secundaria y terciaria de la proteína. El tratamiento con EDC lleva al entrecruzamiento intra- e intermolecular. Los parámetros bioquímicos y biofísicos obtenidos para el principio activo de la toxina A mutante (así como la toxina A triple mutante) se presentan en la Tabla 60.

Tabla 60: Parámetros bioquímicos y biofísicos obtenidos para el principio activo la triple toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) y de la toxina A mutante		
Parámetro	Toxina A triple mutante (SEQ ID NO: 4)	Principio activo de la toxina A mutante
Número de residuos de aminoácidos	2709	2709
Secuencia N-terminal	SLISKEELIKLAYSI (posiciones 2-16 de la SEQ ID NO: 4)	SLISKEELIKLAYSI (posiciones 2-16 de la SEQ ID NO: 4)
Masa molar (de secuencia AA)	308 kDa	308 kDa
Masa molar (de SEC-MALLS)	299 kDa	300 kDa y 718 -1139 kDa
Coeficiente de extinción a 280 nm	1,292 o 1,275 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹	1,292 o 1,275 275 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹
pl teórico	5,57	ND
Volumen molar específico parcial a 20 °C	0,735 cm ³ /g	0,735 cm ³ /g
Volumen anhidro/monómero	3,8x10 ⁻¹⁹ cm ³	3,8x10 ⁻¹⁹ cm ³
Coeficiente de sedimentación/monómero	9,2S	9,2S
Relación de coeficiente friccional (f/f ₀)	1,69	1,69
Radio de Stokes /monómero	78,4±1,1	77,9
Fluorescencia máxima (λ _{ex} = 280 nm)	334-335 nm	334-335 nm
Espectro CD UV cercano mínimo	284 nm y 278 nm	284 nm y 278 nm
Elipticidad res media a 284 & 278 nm	-138±7 & -130±7	-138±8 & 131±10
Elipticidad res media a 222 nm	-8989±277	-7950±230
Máximo de transiciones de no plegamiento DSC (PBS, pH 7,4)	47,3 °C y 53,6 °C	47,9±0,2 °C y 54,1±0,2 °C

Los datos de CD del UV lejano del principio activo de la toxina b mutante se obtuvieron a varios pH. Los espectros registrados a pH 5,0-7,0 son indicativos de alta proporción de α-hélices en la estructura secundaria, lo que sugiere que el esqueleto polipeptídico de la proteína adopta una conformación bien definida dominada por las α-hélices.

También se obtuvieron espectros de CD de UV cercano del principio activo de la toxina B mutante. La fuerte elipticidad negativa entre 260 y 300 nm es una indicación de que las cadenas laterales aromáticas están en el ambiente rígido único, es decir el principio activo de la toxina b mutante posee estructura terciaria. En efecto, los rasgos característicos que surgen de tipos individual de cadenas laterales aromáticas se pueden distinguir dentro del espectro: el hombro en ~290 nm y el pico negativo más grande a ~283 nm se deben a la absorbancia de la luz polarizada por las cadenas laterales de triptofano ordenadas, el pico negativo a 276 nm es de las cadenas laterales de tirosina, y los hombros menores a 262 y 268 nm son indicativos de los residuos de fenilalanina que participan en los contactos terciarios. Los

resultados del UV lejano y cercano proporcionan evidencia de que el principio activo de la toxina B mutante retiene la estructura plegada compactamente a pH fisiológico. Se observaron espectros de CD de UV lejano y cercano muy similares a pH 5,0 - 7,0, indicando que los cambios estructurales no detectables tienen lugar dentro de este rango de pH. Los datos de CD no se pueden recolectar a pH 3,0 y 4,0, ya que la proteína era insoluble a estos puntos de pH.

En la comparación de los espectros de CD de UV lejano y cercano del principio activo de la toxina B mutante con los de la toxina A triple mutante, los espectros de ambas proteínas son muy similares entre pH 5,0 y 7,0, lo que indica que el tratamiento EDC no tuvo efectos detectables en la estructura secundaria y terciaria de la proteína.

La toxina B triple mutante contiene 16 residuos de triptofano residuos que se extienden a lo largo de la secuencia primaria y pueden actuar como sondas fluorescentes intrínsecas convenientes. Se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia del principio activo de la toxina B mutante entre 300 y 400 nm en función de la temperatura. A 7°C el principio activo de la toxina B mutante muestra el espectro de emisión de fluorescencia característico del triptofano después de la excitación a 280 nm. Se observa el máximo de emisión de fluorescencia a ~335 nm, lo que indica que los residuos de triptofano están en un ambiente no polar, típicos de los interiores de la proteína más que de los ambientes polares acuosos. Este resultado, junto con los resultados de los experimentos CD (ver más arriba), confirman que el principio activo de la toxina B mutante retiene la estructura plegada compacta.

La fluorescencia de la sonda extrínseca de ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANS) se usó para caracterizar posibles cambios conformacionales en el principio activo de la toxina B mutante y la toxina B triple mutante después de los cambios en el pH. Como se puede observar a partir de los resultados, no existe esencialmente aumento de la intensidad de fluorescencia ANS cuando el principio activo de la toxina B mutante o toxina B triple mutante se titulan con la sonda a pH 7,0, lo que sugiere que las superficies no hidrofóbicas se exponen a las proteínas en estas condiciones. El cambio de pH a 2,6 lleva a un aumento drástico del rendimiento cuántico de fluorescencia ANS después del aumento de la concentración de la sonda, en presencia del principio activo de la toxina B mutante hasta que el rendimiento cuántico de fluorescencia alcanza la saturación aparente. Este aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia ANS indica que a pH bajo (2,6), el principio activo de la toxina B mutante experimenta cambio conformacional inducido por pH que expone las superficies hidrofóbicas. Tales cambios conformacionales indican que la modificación

e inactivación inducida por EDC de la toxina A triple mutante no restringió la plasticidad de la conformación del principio activo de la toxina B mutante (DS).

El efecto del tratamiento con EDC de las propiedades hidrodinámicas de la toxina B triple mutante se evaluó mediante la cromatografía de exclusión por tamaño en una columna G4000 SWXL. Se inyectaron el principio activo de la toxina B mutante y toxina B triple mutante en la columna G4000 SWXL equilibrada a pH 7,0, 6,0, y 5,0. Los datos indican que no se pueden detectar diferencias en el radio de Store del principio activo de la toxina B mutante y toxina B triple mutante mediante la cromatografía de exclusión por tamaño. En consecuencia, el tratamiento EDC no afectó drásticamente las propiedades hidrodinámicas y en forma correspondiente, la forma molecular global de la proteína.

El análisis adicional del principio activo de la toxina B triple mutante y toxina B mutante se realizó usando la técnica de dispersión de luz láser multiangular (MALLS). El tratamiento de toxina B triple mutante con EDC produjo la generación de una mezcla heterogénea compuesta de varias especies multiméricas y monoméricas. Tal heterogeneidad refleja la introducción de un gran número de enlaces covalentes inter- e intra-moleculares inducidos por EDC entre los carboxilos y aminas primarias de la proteína.

Los datos obtenidos proporcionan características físicas y químicas del principio activo de la toxina B triple mutante y la toxina B mutante (toxina B triple mutante tratada con EDC) y describe los rasgos clave de su estructura primaria, secundaria y terciaria. Los datos generados demuestran que el tratamiento de la toxina B triple mutante con EDC produjo la modificación covalente de su cadena polipeptídica pero no afectó las estructuras secundaria y terciaria de la proteína. El tratamiento con EDC lleva al entrecruzamiento intra- e intermolecular. Los parámetros bioquímicos y biofísico principales obtenidos para el principio activo de la toxina B mutante (así como la toxina B triple mutante) se presentan en la Tabla 61.

Tabla 61: Parámetros bioquímicos y biofísicos obtenidos para el principio activo la triple toxina B mutante (SEQ ID NO: 6) y de la toxina B mutante		
Parámetro	Toxina B triple mutante (SEQ ID NO: 6)	Principio activo de la toxina B mutante
Número de residuos de aminoácidos	2365	2365
Secuencia N-terminal	SLVNRKQLEKMANVR (posiciones 2-16 de la SEQ ID NO: 6)	SLVNRKQLEKMANVR (posiciones 2-16 de la SEQ ID NO: 6)
Masa molar (de secuencia AA)	269,5 kDa	269,5 kDa
Masa molar (de SEC-MALLS)	255 kDa y ~1,754 kDa	264, 268, 706, y 2,211 kDa
Coeficiente de extinción a 280 nm	1,067 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹	1,067 (mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹
pl teórico	4,29	ND
Volumen molar específico parcial a 20 °C	0,734 cm ³ /g	0,734 cm ³ /g
Volumen anhidro/monómero	3,3x10 ⁻¹⁹ cm ³	3,3x10 ⁻¹⁹ cm ³
Coeficiente de sedimentación/monómero	9,1±0,2S	9,4S
Coeficiente de sedimentación/monómero	1,58±0,03	1,53
Relación de coeficiente friccional (f/f ₀)	76,2	76,2
Fluorescencia máxima (λ _{ex} = 280 nm)	335 nm	335 nm
Espectro CD UV cercano mínimo	290, 283, 276, 268, 262 nm	290, 283, 276, 268, 262 nm
Bandas negativas CD UV lejano	208 y 222 nm	208 y 222 nm
Puntos medios de transición de no plegamiento DSC T _{m1} y T _{m2} (PBS, pH 7,0)	48,8±0,0 °C y 52,0±0,1 °C	48,2±0,3 °C y 54,3±0,2 °C

Aspectos de la invención

Las siguientes cláusulas, enumeradas entre paréntesis describen formas de realización adicionales de la invención:

C1. Un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, y donde el polipéptido incluye al menos una cadena lateral de aminoácidos modificada químicamente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS).

C2. Un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, y donde el polipéptido incluye una cadena lateral de aminoácidos modificada químicamente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS).

- C3. El polipéptido aislado de acuerdo con la cláusula C1 o C2, donde al menos una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido o al menos una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido está modificada químicamente por glicina.
- C4. El polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C1-C3, donde el polipéptido incluye:
- a) al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido; y
 - b) al menos un entrecruzamiento entre una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido y una cadena lateral de un residuo de lisina del polipéptido.
- C5. El polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C1-C4, donde el polipéptido incluye un resto de beta-alanina ligado a una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido.
- C6. El polipéptido aislado de acuerdo con la cláusula C4, donde el polipéptido incluye un resto de glicina ligado a una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico del polipéptido o a una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido.
- C7. Un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, y donde una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido está ligado a un resto de beta-alanina.
- C8. Un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, y donde una cadena lateral de al menos un residuo de lisina del polipéptido está ligado a un resto de beta-alanina.
- C9. El polipéptido aislado de acuerdo con la cláusula C7 o C8, donde una cadena lateral de un segundo residuo de lisina del polipéptido está ligado a una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico o a una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico.
- C10. El polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C7-C9, donde una cadena lateral de un residuo de ácido aspártico o una cadena lateral de un residuo de ácido glutámico del polipéptido están ligadas a un resto de glicina.
- C11. El polipéptido aislado en cualquiera de las cláusulas C1-C10, donde el polipéptido tiene una EC50 de al menos aproximadamente 100 µg/ml.
- C12. Una composición inmunogénica que incluye a toxina tipo A de *Clostridium difficile* mutante, que incluye un dominio de glucosiltransferasa que tiene al menos una

mutación y un dominio de cisteína proteasa que tiene al menos una mutación, con respecto a la correspondiente toxina tipo A de *Clostridium difficile* de tipo salvaje.

C13. La composición de acuerdo con la cláusula C12, donde la mutación es una sustitución no conservadora de aminoácidos.

C14. La composición de acuerdo con la cláusula C13, donde la sustitución incluye una sustitución de alanina.

C15. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C12-C14, donde la toxina tipo A de *Clostridium difficile* de tipo salvaje incluye una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1.

C16. La composición de acuerdo con la cláusula C15, donde la toxina tipo A de *Clostridium difficile* de tipo salvaje incluye una secuencia que tiene al menos 98% de identidad con la SEQ ID NO: 1.

C17. La composición de acuerdo con la cláusula C16, donde la toxina tipo A de *Clostridium difficile* de tipo salvaje incluye la SEQ ID NO: 1.

C18. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C12-C17, donde el dominio de glucosiltransferasa incluye al menos dos mutaciones.

C19. La composición de acuerdo con la cláusula C18, donde el al menos dos mutaciones están presentes en las posiciones de aminoácidos 101, 269, 272, 285, 287, 269, 272, 460, 462, 541, o 542, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1.

C20. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C12-C17, donde el dominio de glucosiltransferasa incluye la SEQ ID NO: 29.

C21. La composición de acuerdo con la cláusula C20, donde el dominio de glucosiltransferasa incluye al menos dos mutaciones no conservadoras presentes en las posiciones de aminoácidos 101, 269, 272, 285, 287, 269, 272, 460, 462, 541, o 542, o cualquier combinación de estos, de la SEQ ID NO: 29.

C22. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C12-C17, donde el dominio de cisteína proteasa incluye una mutación presente en las posiciones 700, 589, 655, 543, o cualquiera de las combinaciones de estos, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1.

C23. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C12-C17, donde el dominio de cisteína proteasa incluye la SEQ ID NO: 32.

C24. La composición de acuerdo con la cláusula C23, donde el dominio de cisteína proteasa incluye una mutación no conservadora presente en las posiciones 1, 47, 113, 158, o cualquiera de las combinaciones de estos, de la SEQ ID NO: 32.

- C25. La composición de acuerdo con la cláusula 1, donde la toxina tipo A de *Clostridium difficile* mutante incluye la SEQ ID NO: 4.
- C26. La composición de acuerdo con la cláusula 1, donde la toxina tipo A de *Clostridium difficile* mutante incluye la SEQ ID NO: 84.
- C27. La composición de acuerdo con la cláusula 1, donde la toxina tipo A de *Clostridium difficile* mutante incluye la SEQ ID NO: 7.
- C28. La composición de acuerdo con la cláusula 1, donde la toxina tipo A de *Clostridium difficile* mutante incluye la SEQ ID NO: 83.
- C29. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C12-C24, donde al menos un aminoácido de la toxina tipo A de *Clostridium difficile* mutante está entrecruzado químicamente.
- C30. La composición de acuerdo con la cláusula C29, donde el aminoácido está entrecruzado químicamente por formaldehído.
- C31. La composición de acuerdo con la cláusula C29, donde el aminoácido está entrecruzado químicamente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.
- C32. La composición de acuerdo con la cláusula C29 o C31, donde el aminoácido está entrecruzado químicamente por N-hidroxisuccinimida.
- C33. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C12-C32, donde la composición es reconocida por un anticuerpo neutralizante de anti-toxina A o fragmento de unión de este.
- C34. Una composición inmunogénica que incluye a toxina tipo A de *Clostridium difficile* mutante, que incluye un dominio de glucosiltransferasa que incluye la SEQ ID NO: 29 que tiene una sustitución de aminoácidos de las posiciones 285 y 287, y un dominio de cisteína proteasa que incluye la SEQ ID NO: 32 que tiene una sustitución de aminoácidos de la posición 158, con respecto a la correspondiente toxina tipo A de *Clostridium difficile* de tipo salvaje, donde al menos un aminoácido de la toxina tipo A de *Clostridium difficile* mutante está entrecruzado químicamente.
- C35. Una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7, donde al menos un aminoácido de la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7 está entrecruzado químicamente.
- C36. La composición de acuerdo con la cláusula C34 o C35, donde el al menos un aminoácido está entrecruzado por formaldehído.
- C37. La composición de acuerdo con la cláusula C34 o C35, donde el al menos un aminoácido está entrecruzado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.
- C38. La composición de acuerdo con la cláusula C34, C35 o C37, donde el al menos

un aminoácido está entrecruzado por N-hidroxisuccinimida.

C39. La composición de acuerdo con la cláusula C34 o C35, donde la composición es reconocida por un anticuerpo neutralizante de anti-toxina A o fragmento de unión de este.

C40. Una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 4.

C41. Una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 84.

C42. Una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 7.

C43. Una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 83.

C44. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C40-C43, donde al menos un aminoácido está entrecruzado químicamente.

C45. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C12-C42, donde la composición exhibe disminución de la citotoxicidad, con respecto a la correspondiente toxina tipo A de *Clostridium difficile* de tipo salvaje.

C46. Un polipéptido aislado que incluye la SEQ ID NO: 84.

C47. Un polipéptido aislado que incluye la SEQ ID NO: 86.

C48. Un polipéptido aislado que incluye la SEQ ID NO: 83.

C49. Un polipéptido aislado que incluye la SEQ ID NO: 85.

C50. Una composición inmunogénica que incluye a toxina tipo B de *Clostridium difficile* mutante, que incluye un dominio de glucosiltransferasa que tiene al menos una mutación y un dominio de cisteína proteasa que tiene al menos una mutación, con respecto a la correspondiente toxina tipo B de *Clostridium difficile* de tipo salvaje.

C51. La composición de acuerdo con la cláusula C50, donde la mutación es una sustitución no conservadora de aminoácidos.

C52. La composición de acuerdo con la cláusula C51, donde la sustitución incluye una sustitución de alanina.

C53. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C50-C52, donde la toxina tipo B de *Clostridium difficile* de tipo salvaje incluye una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 2.

C54. La composición de acuerdo con la cláusula C53, donde la toxina tipo B de *Clostridium difficile* de tipo salvaje incluye una secuencia que tiene al menos 98% de identidad con la SEQ ID NO: 2.

C55. La composición de acuerdo con la cláusula C54, donde la toxina tipo B de *Clostridium difficile* de tipo salvaje incluye la SEQ ID NO: 2.

C56. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C50-C55, donde el dominio de glucosiltransferasa incluye al menos dos mutaciones.

- C57. La composición de acuerdo con la cláusula C56, donde el al menos dos mutaciones están presentes en las posiciones de aminoácidos 102, 286, 288, 270, 273, 384, 461, 463, 520, o 543, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2.
- C58. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C50-C55, donde el dominio de glucosiltransferasa incluye la SEQ ID NO: 31.
- C59. La composición de acuerdo con la cláusula C58, donde el dominio de glucosiltransferasa incluye al menos dos mutaciones no conservadoras presentes en las posiciones de aminoácidos 102, 286, 288, 270, 273, 384, 461, 463, 520, o 543 de la SEQ ID NO: 31.
- C60. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C50-C55, donde el dominio de cisteína proteasa incluye una mutación presente en las posiciones 698, 653, 587, 544, o cualquiera de las combinaciones de estos, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 2.
- C61. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C50-C55, donde el dominio de cisteína proteasa incluye la SEQ ID NO: 33.
- C62. La composición de acuerdo con la cláusula C61, donde el dominio de cisteína proteasa incluye una mutación no conservadora presente en las posiciones 1, 44, 110, 155, o cualquiera de las combinaciones de estos, de la SEQ ID NO: 33.
- C63. La composición de acuerdo con la cláusula C50, donde la toxina tipo B de *Clostridium difficile* mutante incluye la SEQ ID NO: 6.
- C64. La composición de acuerdo con la cláusula C50, donde la toxina tipo B de *Clostridium difficile* mutante incluye la SEQ ID NO: 86.
- C65. La composición de acuerdo con la cláusula C50, donde la toxina tipo B de *Clostridium difficile* mutante incluye la SEQ ID NO: 8.
- C66. La composición de acuerdo con la cláusula C50, donde la toxina tipo B de *Clostridium difficile* mutante incluye la SEQ ID NO: 85.
- C67. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C50-C62, donde al menos un aminoácido de la toxina tipo B de *Clostridium difficile* mutante está entrecruzado químicamente.
- C68. La composición de acuerdo con la cláusula C67, donde el aminoácido está entrecruzado químicamente por formaldehído.
- C69. La composición de acuerdo con la cláusula C67, donde el aminoácido está entrecruzado químicamente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.
- C70. La composición de acuerdo con la cláusula C67 o C69, donde el al menos un aminoácido está entrecruzado por N-hidroxisuccinimida.

- C71. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C50-C70, donde la composición es reconocida por un anticuerpo neutralizante anti-toxina B o fragmento de unión de este.
- C72. Una composición inmunogénica que incluye a toxina tipo B de *Clostridium difficile* mutante, que incluye un dominio de glucosiltransferasa que incluye la SEQ ID NO: 31 que tiene una sustitución de aminoácidos de las posiciones 286 y 288, y un dominio de cisteína proteasa que incluye la SEQ ID NO: 33 que tiene una sustitución de aminoácidos de la posición 155, con respecto a la correspondiente toxina tipo B de *Clostridium difficile* de tipo salvaje, donde al menos un aminoácido de la toxina tipo B de *Clostridium difficile* mutante está entrecruzado químicamente.
- C73. Una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO:8, donde al menos un aminoácido de la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO:8 está entrecruzado químicamente.
- C74. La composición de acuerdo con la cláusula C72 o C73, donde el al menos un aminoácido está entrecruzado por formaldehído.
- C75. La composición de acuerdo con la cláusula C72 o C73, donde el al menos un aminoácido está entrecruzado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.
- C76. La composición de acuerdo con la cláusula C72, C73, o C75, donde el al menos un aminoácido está entrecruzado por N-hidroxisuccinimida.
- C77. La composición de acuerdo con la cláusula C72 o C73, donde la composición es reconocida por un anticuerpo neutralizante anti-toxina B o fragmento de unión de este.
- C78. Una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6.
- C79. Una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 86.
- C80. Una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 8.
- C81. Una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 85.
- C82. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C50-C80, donde la composición exhibe disminución de citotoxicidad, con respecto a la correspondiente toxina tipo B de *Clostridium difficile* de tipo salvaje.
- C83. Una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 4 y una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6, donde al menos un aminoácido de cada de la SEQ ID NOs: 4 y 6 está entrecruzado químicamente.
- C84. Una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 84 y una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 86, donde al menos un aminoácido de cada de la SEQ ID NOs: 84 y 86 está entrecruzado químicamente.

- C85. La composición de acuerdo con la cláusula C83 o C84, donde el al menos un aminoácido está entrecruzado por formaldehído.
- C86. La composición de acuerdo con la cláusula C83 o C84, donde el al menos un aminoácido está entrecruzado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.
- C87. La composición de acuerdo con la cláusula C83, C84, o C86, donde el al menos un aminoácido está entrecruzado por N-hidroxisuccinimida.
- C88. Una célula recombinante o su progenie, que incluye la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, o SEQ ID NO: 47.
- C89. Una célula recombinante o su progenie, que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8.
- C90. Una célula recombinante o su progenie, que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la SEQ ID NO: 84.
- C91. Una célula recombinante o su progenie, que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la SEQ ID NO: 86.
- C92. Una célula recombinante o su progenie, que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la SEQ ID NO: 83.
- C93. Una célula recombinante o su progenie, que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la SEQ ID NO: 85.
- C94. La célula recombinante de la cláusula C88 o C89, donde dicha célula deriva de una célula de bacteria grampositiva.
- C95. La célula recombinante de la cláusula C88, C89, o C90, donde la célula deriva de una célula de *Clostridium difficile*.
- C96. La célula recombinante de cualquiera de las cláusulas C88- C95, donde la célula carece de un polinucleótido endógeno que codifica una toxina.
- C97. La célula de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C95, o C96 donde la célula deriva de una célula de *Clostridium difficile* seleccionada del grupo que consiste en *Clostridium difficile* 1351, *Clostridium difficile* 3232, *Clostridium difficile* 7322, *Clostridium difficile* 5036, *Clostridium difficile* 4811, y *Clostridium difficile* VPI 11186.
- C98. La célula de acuerdo con la cláusula C97, donde la célula es una célula de *Clostridium difficile* VPI 11186.
- C99. La célula de acuerdo con la cláusula C97, o C98, donde un gen de esporulación de la célula de *Clostridium difficile* está inactivado.
- C100. La célula de acuerdo con la cláusula C99, donde el gen de esporulación incluye

un gen spo0A o un gen spoIIE.

C101. Un método de producir una toxina de Clostridium mutante, que incluye cultivar una célula recombinante o su progenie en condiciones adecuadas para expresar un polinucleótido que codifica una toxina de Clostridium mutante, donde la célula incluye el polinucleótido que codifica la toxina de Clostridium mutante, y donde la mutante incluye un dominio de glucosiltransferasa que tiene al menos una mutación y un dominio de cisteína proteasa que tiene al menos una mutación, con respecto a la correspondiente toxina de Clostridium difficile de tipo salvaje.

C102. El método de acuerdo con la cláusula C101, donde la célula carece de un polinucleótido endógeno que codifica una toxina.

C103. El método de acuerdo con la cláusula C101, donde la célula recombinante o su progenie incluye una célula de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C86-C102.

C104. El método de acuerdo con la cláusula C101, que también incluye aislar la toxina de Clostridium mutante.

C105. El método de acuerdo con la cláusula C104, que también incluye poner en contacto la toxina de Clostridium mutante aislada con formaldehído.

C106. El método de acuerdo con la cláusula C105, donde el contacto se produce durante a lo sumo 14 días.

C107. El método de acuerdo con la cláusula C106, donde el contacto se produce durante a lo sumo 48 horas.

C108. El método de acuerdo con la cláusula C105, donde el contacto se produce a aproximadamente 25°C.

C109. El método de acuerdo con la cláusula C104, que también incluye poner en contacto la toxina de Clostridium mutante aislada con etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

C110. El método de acuerdo con la cláusula C109, donde el contacto se produce durante a lo sumo 24 horas.

C111. El método de acuerdo con la cláusula C111, donde el contacto se produce durante a lo sumo 4 horas.

C112. El método de acuerdo con la cláusula C109, donde el contacto se produce a aproximadamente 25°C.

C113. El método de acuerdo con la cláusula C109, que también incluye poner en contacto la toxina de Clostridium mutante aislada con N-hidroxisuccinimida.

C114. Una composición inmunogénica producida por el método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C101- C113.

C115. Un método de producir un anticuerpo neutralizante contra una toxina tipo A de *Clostridium difficile*, que incluye administrar una composición inmunogénica a un mamífero, dicha composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 4, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, donde al menos un aminoácido de la SEQ ID NO: 4 está entrecruzado por formaldehído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, N-hidroxisuccinimida, o una combinación de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida, y recuperar el anticuerpo del mamífero.

C116. Un método de producir un anticuerpo neutralizante contra una toxina tipo A de *Clostridium difficile*, que incluye administrar una composición inmunogénica a un mamífero, dicha composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 84, donde al menos un aminoácido de la SEQ ID NO: 84 está entrecruzado por formaldehído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, N-hidroxisuccinimida, o una combinación de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida, y recuperar el anticuerpo del mamífero.

C117. Un método de producir un anticuerpo neutralizante contra una toxina B de *Clostridium difficile*, que incluye administrar una composición inmunogénica a un mamífero, dicha composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, donde al menos un aminoácido de la SEQ ID NO: 6 está entrecruzado por formaldehído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, N-hidroxisuccinimida, o una combinación de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida, y recuperar el anticuerpo del mamífero.

C118. Un método de producir un anticuerpo neutralizante contra una toxina tipo A de *Clostridium difficile*, que incluye administrar una composición inmunogénica a un mamífero, dicha composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 86, donde al menos un aminoácido de la SEQ ID NO: 86 está entrecruzado por formaldehído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, N-hidroxisuccinimida, o una combinación de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida, y recuperar el anticuerpo del mamífero.

C119. Un anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este específico para una composición inmunogénica, dicha composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 4 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, o SEQ ID NO: 7 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente.

C120. El anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este de acuerdo con la cláusula C128, donde al menos un aminoácido de SEQ ID NO: 4 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, o SEQ ID NO: 7 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, está entrecruzado por formaldehído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, N-hidroxisuccinimida, o una combinación de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida.

C121. Un anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este que incluye las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (CDR) expuesta en la SEQ ID NO: 41 (CDR H1), SEQ ID NO: 42 (CDR H2) y SEQ ID NO: 43 (CDR H3), y las secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena liviana como se muestra en las SEQ ID NO: 38 (CDR L1), SEQ ID NO: 39 (CDR L2) y SEQ ID NO: 40 (CDR L3).

C122. El anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este de acuerdo con la cláusula C119, C120, o C121, donde el anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este incluye a pesada cadena, que incluye la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 37, y a cadena liviana, que incluye la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 36.

C123. Una composición que incluye una combinación de dos o más anticuerpos o sus fragmentos de unión del anticuerpo seleccionada de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C119-C122.

C124. Un anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este específico para una composición inmunogénica, dicha composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, o SEQ ID NO: 8 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente.

C125. El anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este de acuerdo con la cláusula C124, donde al menos un aminoácido de la SEQ ID NO: 6 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, o SEQ ID NO: 8 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, está entrecruzado por formaldehído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, N-hidroxisuccinimida, o una combinación de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida.

C126. Un anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este que incluye las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad de

la cadena pesada (CDR) expuesta en la SEQ ID NO: 51 (CDR H1), SEQ ID NO: 52 (CDR H2) y SEQ ID NO: 53 (CDR H3), y las secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena liviana como se muestra en las SEQ ID NO: 57 (CDR L1), SEQ ID NO: 58 (CDR L2) y SEQ ID NO: 59 (CDR L3).

C127. Un anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este que incluye las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (CDR) expuesta en la SEQ ID NO: 61 (CDR H1), SEQ ID NO: 62 (CDR H2) y SEQ ID NO: 63 (CDR H3), y las secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena liviana como se muestra en las SEQ ID NO: 68 (CDR L1), SEQ ID NO: 69 (CDR L2) y SEQ ID NO: 70 (CDR L3).

C128. Un anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este que incluye las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (CDR) expuesta en la SEQ ID NO: 73 (CDR H1), SEQ ID NO: 74 (CDR H2) y SEQ ID NO: 75 (CDR H3), y las secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena liviana como se muestra en las SEQ ID NO: 79 (CDR L1), SEQ ID NO: 80 (CDR L2) y SEQ ID NO: 81 (CDR L3).

C129. Una composición que incluye una combinación de dos o más anticuerpos o sus fragmentos de unión del anticuerpo seleccionados de cualquiera de las cláusulas C124-C128.

C130. Un método de tratar una infección con *Clostridium difficile* en un mamífero, que incluye administrar al mamífero una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 4 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, y una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, donde al menos un aminoácido de cada de la SEQ ID NOs: 4 y 6 está entrecruzado por formaldehído.

C131. Un método de tratar una infección con *Clostridium difficile* en un mamífero, que incluye administrar al mamífero una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 4 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, y una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, donde al menos un aminoácido de cada de la SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 está entrecruzado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, N-hidroxisuccinimida, o una combinación de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida.

C132. Un método de tratar una infección con *Clostridium difficile* en un mamífero, que incluye administrar al mamífero una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID

NO: 84, y una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 86, donde al menos un aminoácido de cada de la SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 86 está entrecruzado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida.

C133. Un método de inducir una respuesta inmune a *Clostridium difficile* en un mamífero, que incluye administrar al mamífero una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 4 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, y una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, donde al menos un aminoácido de cada SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 está entrecruzado por formaldehído.

C134. Un método de inducir una respuesta inmune a *Clostridium difficile* en un mamífero, que incluye administrar al mamífero una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 4 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, y una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 6 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, donde al menos un aminoácido de cada de la SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 está entrecruzado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, N-hidroxisuccinimida, o una combinación de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida.

C135. Un método de inducir una respuesta inmune a *Clostridium difficile* en un mamífero, que incluye administrar al mamífero una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 84, y una composición inmunogénica que incluye la SEQ ID NO: 86, donde al menos un aminoácido de cada de la SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 86 está entrecruzado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida.

C136. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C130-C135, donde el mamífero es un mamífero que lo necesita.

C137. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C130-C135, donde el mamífero tiene una infección recurrente con *Clostridium difficile*.

C138. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C130-C135, donde la composición se administra por vía parenteral.

C139. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas C130-C134, donde la composición también incluye un adyuvante.

C140. El método de acuerdo con la cláusula C139, donde el adyuvante incluye aluminio.

C141. El método de acuerdo con la cláusula C140, donde el adyuvante incluye gel de

hidróxido de aluminio y un oligonucleótido de Cpg.

C142. El método de acuerdo con la cláusula C141, donde el adyuvante incluye ISCOMATRIX®.

RESUMEN

En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye una toxina A de *Clostridium difficile* mutante y/o una toxina B de *Clostridium difficile* mutante. Cada toxina mutante incluye un dominio de glucosiltransferasa que tiene al menos una mutación y un dominio de cisteína proteasa que tiene al menos una mutación, con respecto a la correspondiente toxina de *C. difficile* tipo salvaje. Las toxinas mutantes también pueden incluir al menos un aminoácido que está entrecruzado químicamente. En otro aspecto, la invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de unión a este que se unen a dichas composiciones inmunogénicas. En un aspecto adicional, la invención se refiere a secuencias de nucleótidos aisladas que codifican alguna de los precedentes y los métodos de cualquiera de las composiciones precedentes.