



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 122019017005-3 B1



(22) Data do Depósito: 20/04/2012

(45) Data de Concessão: 29/03/2022

(54) Título: COMPOSIÇÕES QUE SE RELACIONAM A UMA TOXINA DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE MUTANTE

(51) Int.Cl.: C07K 14/33; A61K 39/08; C07K 16/12.

(30) Prioridade Unionista: 22/04/2011 US 61/478,474; 25/04/2011 US 61/478,899.

(73) Titular(es): WYETH LLC.

(72) Inventor(es): MANINDER K. SIDHU; ANNALIESA SYBIL ANDERSON; ROBERT G.K. DONALD; KATHRIN UTE JANSEN; NARENDER K. KALYAN; TERRI L. MININNI; JUSTIN KEITH MORAN; MARK E. RUPPEN; MICHAEL JAMES FLINT.

(86) Pedido PCT: PCT IB2012051999 de 20/04/2012

(87) Publicação PCT: WO 2012/143902 de 26/10/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 15/08/2019

(62) Pedido Original do Dividido: BR112013027229-5 - 20/04/2012

(57) Resumo: Em um aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui uma toxina A de Clostridium difficile mutante e/ou uma toxina B de Clostridium difficile mutante. Cada toxina mutante inclui um domínio de glucosiltransferase que possui pelo menos uma mutação e um domínio de cisteína protease que possui pelo menos uma mutação, em relação à toxina de C. difficile do tipo selvagem correspondente. As toxinas mutantes podem incluir ainda pelo menos um aminoácido que é quimicamente reticulado. Em outro aspecto, a invenção refere-se a anticorpos ou fragmentos de ligação dos mesmos que se ligam às ditas composições imunogênicas. Em aspectos adicionais, a invenção refere-se a sequências de nucleotídeos isoladas que codificam qualquer um do que foi descrito anteriormente e métodos de uso de qualquer uma das composições anteriores.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÕES QUE SE RELACIONAM A UMA TOXINA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* MUTANTE**".

Dividido do BR112013027229-5, depositado em 20.04.2012.

Referência cruzada a pedidos de patentes relacionados

[001] O presente pedido de patente reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório U.S. 61/478.474, depositado em 22 de abril de 2011 e do Pedido de Patente Provisório U.S. 61/478.899, depositado em 25 de abril de 2011. Os conteúdos inteiros dos pedidos de patentes mencionados anteriormente são incorporados aqui como referência em suas totalidades.

Campo

[002] A presente invenção é direcionada a composições que estão relacionadas a toxinas de *Clostridium difficile* mutante e métodos para as mesmas.

Fundamento

[003] *Clostridium difficile* (*C. difficile*) é uma bactéria anaeróbica Gram-positiva que está associada à doença gastrointestinal em humanos. A colonização de *C. difficile* geralmente ocorre no cólon se a flora intestinal natural for diminuída por tratamento com antibióticos. Uma infecção pode levar à diarreia associada a antibiótico e algumas vezes à colite pseudomembranosa através da secreção das toxinas glucosilantes, toxina A e toxina B (308 e 270 kDa, respectivamente), que são os fatores de virulência primários de *C. difficile*.

[004] A toxina A e a toxina B são codificadas dentro do locus de patogenicidade de 19 kb (PaLoc) pelos genes *tcdA* e *tcdB*, respectivamente. Cepas não patogênicas de *C. difficile* têm este locus substituído por uma sequência de 115 pares de bases alternativa.

[005] Tanto a toxina A quanto a toxina B são citotoxinas potentes.

Estas proteínas são glucosiltransferases homólogas que inativam pequenas GTPases da família Rho/Rac/Ras. A interrupção resultante na sinalização causa uma perda de junções de célula-célula, desregulação do citoesqueleto de actina e/ou apoptose, resultando na diarreia secretora profunda que é associada às infecções causadas por *Clostridium difficile* (CDI).

[006] Na última década, os números e a gravidade de surtos de *C. difficile* causados em hospitais, casas de repouso e outras unidades de cuidado em longo prazo aumentaram drasticamente. Os fatores chave neste aumento de escala incluem a emergência de cepas patogênicas hipervirulentas, o uso aumentado de antibióticos, os métodos aprimorados de detecção e a maior exposição a esporos carregados pelo ar idades de cuidado da saúde.

[007] Metronidazole e vancomicina representam o padrão atualmente aceito de cuidado para o tratamento com antibióticos de doença associada a *C. difficile* (CDAD). Entretanto, aproximadamente 20% dos pacientes que recebem tal tratamento sofrem uma recorrência de infecção após um primeiro episódio de CDI e até aproximadamente 50% de tais pacientes sofrem de recorrências adicionais. O tratamento de recorrências representa um desafio muito significativo e a maioria das recorrências geralmente ocorrem dentro de um mês do episódio anterior.

[008] Consequentemente, há uma necessidade de composições imunogênicas e/ou terapêuticas e métodos para as mesmas direcionados para *C. difficile*.

Sumário da invenção

[009] Estes e outros objetivos são fornecidos pela invenção apresentada aqui.

[0010] Em um aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui uma toxina A de *C. difficile* mutante. A toxina A

de *C. difficile* mutante inclui um domínio glucosiltransferase que possui pelo menos uma mutação e um domínio de cisteína protease que possui pelo menos uma mutação, em relação à toxina A de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Em uma modalidade, pelo menos um aminoácido da toxina A de *C. difficile* mutante é quimicamente reticulado.

[0011] Em um aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado que inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e em que o polipeptídeo inclui pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-Hidroxissuccinimida (NHS).

[0012] Em uma modalidade, pelo menos um aminoácido da toxina de *C. difficile* mutante é quimicamente reticulado.

[0013] Em uma modalidade, o pelo menos um aminoácido é quimicamente reticulado por formaldeído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxissuccinato ou uma combinação de EDC e NHS.

[0014] Em uma modalidade, a composição imunogênica é reconhecida por um respectivo anticorpo neutralizador anti-toxina ou um fragmento de ligação do mesmo.

[0015] Em uma modalidade, a composição imunogênica exibe menor citotoxicidade, em relação à toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[0016] Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui uma toxina A de *C. difficile* mutante, que inclui um domínio de glucosiltransferase que possui a SEQ ID NO: 29, que possui uma substituição de aminoácido nas posições 285 e 287 e um domínio de cisteína protease que possui a SEQ ID NO: 32, que possui

uma substituição de aminoácido na posição 158, em relação à toxina A de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente, em que pelo menos um aminoácido da toxina A de *C. difficile* mutante é quimicamente reticulado.

[0017] Em um aspecto adicional, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui uma toxina A de *C. difficile* mutante, que inclui a SEQ ID NO: 4, em que pelo menos um aminoácido da toxina A de *C. difficile* mutante é quimicamente reticulado.

[0018] Ainda em outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 4, a SEQ ID NO: 5, a SEQ ID NO: 6, a SEQ ID NO: 7 ou a SEQ ID NO: 8.

[0019] Em um aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui uma toxina B de *C. difficile* mutante. A toxina B de *C. difficile* mutante inclui um domínio de glucosiltransferase que possui pelo menos uma mutação e um domínio de cisteína protease que possui pelo menos uma mutação, em relação à toxina B de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[0020] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado que inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e em que o polipeptídeo inclui uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) (EDC) e N-Hidroxissuccinimida (NHS).

[0021] Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui uma toxina B de *C. difficile* mutante, que inclui um domínio de glucosiltransferase que possui a SEQ ID NO: 31, que possui uma substituição de aminoácido nas posições 286 e 288 e um domínio de cisteína protease que possui a SEQ ID NO: 33, que possui

uma substituição de aminoácido na posição 155, em relação à toxina B de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente, em que pelo menos um aminoácido da toxina B de *C. difficile* mutante é quimicamente reticulado.

[0022] Em um aspecto adicional, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui uma toxina B de *C. difficile* mutante, que inclui a SEQ ID NO: 6, em que pelo menos um aminoácido da toxina B de *C. difficile* mutante é quimicamente reticulado.

[0023] Em um aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui uma toxina A de *C. difficile* mutante, que inclui a SEQ ID NO: 4 e uma toxina B de *C. difficile* mutante, que inclui a SEQ ID NO: 6, em que pelo menos um aminoácido de cada uma das toxinas de *C. difficile* mutantes é quimicamente reticulado.

[0024] Em aspectos adicionais, a invenção refere-se a uma célula recombinante ou uma progênie da mesma, que inclui um polinucleotídeo que codifica qualquer uma das toxinas de *C. difficile* mutantes anteriores, em que a célula não possui um polinucleotídeo endógeno que codifica uma toxina.

[0025] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo ou um fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo específico a uma composição imunogênica que inclui uma toxina de *C. difficile* mutante.

[0026] Em um aspecto, a invenção refere-se a um método de tratamento de uma infecção causada por *C. difficile* em um mamífero. O método inclui a administração ao mamífero de uma composição imunogênica que inclui uma toxina A de *C. difficile* mutante, que inclui a SEQ ID NO: 4 e uma toxina B de *C. difficile* mutante, que inclui a SEQ ID NO: 6, em que pelo menos um aminoácido de cada uma das toxinas de *C. difficile* mutantes é reticulado por formaldeído.

[0027] Em outro aspecto, o método de tratamento de uma infecção

causada por *C. difficile* em um mamífero inclui a administração ao mamífero de uma composição imunogênica que inclui uma toxina A de *C. difficile* mutante, que inclui a SEQ ID NO: 4 e uma toxina B de *C. difficile* mutante, que inclui a SEQ ID NO: 6, em que pelo menos um aminoácido de cada uma das toxinas de *C. difficile* mutantes é reticulado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e/ou N-Hidroxissuccinimida (NHS).

[0028] Em um aspecto, a invenção refere-se a um método de indução de uma resposta imunológica para uma infecção causada por *C. difficile* em um mamífero. O método inclui a administração ao mamífero de uma composição imunogênica que inclui uma toxina A de *C. difficile* mutante, que inclui a SEQ ID NO: 4 e uma toxina B de *C. difficile* mutante, que inclui a SEQ ID NO: 6, em que pelo menos um aminoácido de cada uma das toxinas de *C. difficile* mutantes é reticulado por formaldeído.

[0029] Em outro aspecto, o método de indução de uma resposta imunológica para uma infecção causada por *C. difficile* em um mamífero inclui a administração ao mamífero de uma composição imunogênica que inclui uma toxina A de *C. difficile* mutante, que inclui a SEQ ID NO: 4 e uma toxina B de *C. difficile* mutante, que inclui a SEQ ID NO: 6, em que pelo menos um aminoácido de cada uma das toxinas de *C. difficile* mutantes é reticulado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e/ou N-Hidroxissuccinimida (NHS).

[0030] Em uma modalidade, os métodos de tratamento ou os métodos de indução de uma resposta imunológica ocorrem em um mamífero que necessita dos mesmos.

[0031] Em uma modalidade, os métodos de tratamento ou os métodos de indução de uma resposta imunológica inclui um mamífero que teve uma infecção causada por *C. difficile* recorrente.

[0032] Em uma modalidade, os métodos de tratamento ou os

métodos de indução de uma resposta imunológica incluem a administração de forma parenteral da composição.

[0033] Em uma modalidade, os métodos de tratamento ou os métodos de indução de uma resposta imunológica incluem uma composição imunogênica que inclui ainda um adjuvante.

[0034] Em uma modalidade, o adjuvante inclui gel de hidróxido de alumínio e um oligonucleotídeo CpG. Em outra modalidade, o adjuvante inclui ISCOMATRIX.

[0035] Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui pelo menos uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo ou pelo menos uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo é quimicamente modificada por glicina.

[0036] Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo; e pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo.

[0037] Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui um grupamento de beta-alanina ligado a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídeo.

[0038] Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui um grupamento de glicina ligado a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo ou a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo.

[0039] Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e em que uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídeo está ligada a um grupamento de beta-alanina.

[0040] Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e em que uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídeo está ligada a um grupamento de beta-alanina.

[0041] Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui uma cadeia lateral de um segundo resíduo de lisina do polipeptídeo está ligada a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico ou a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico.

[0042] Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico ou uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo está ligada a um grupamento de glicina.

[0043] Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado possui uma EC₅₀ de pelo menos aproximadamente 100 µg/mL.

[0044] Em um aspecto, a composição imunogênica inclui um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e em que os polipeptídeos possuem pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) (EDC) e N-Hidroxissuccinimida (NHS).

[0045] Em uma modalidade, o polipeptídeo inclui pelo menos um de qualquer um de: a) a) pelo menos um grupamento de beta-alanina ligado a uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo; b) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de ácido

aspártico; e c) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico.

[0046] Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado possui uma EC₅₀ de pelo menos aproximadamente 100 µg/mL.

[0047] Em um aspecto, a composição imunogênica inclui um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e a) em que uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina da SEQ ID NO: 4 está ligada a um grupamento de beta-alanina e b) em que uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina da SEQ ID NO: 6 está ligada a um grupamento de beta-alanina.

[0048] Em uma modalidade, a composição imunogênica inclui uma cadeia lateral de um segundo resíduo de lisina da SEQ ID NO: 4 que está ligada a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico ou a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico e em que um segundo resíduo de lisina de SEQ ID NO: 6 está ligado a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico ou a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico.

[0049] Em uma modalidade, a composição imunogênica inclui uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico ou uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente, está ligada a um grupamento de glicina.

[0050] Em uma modalidade, a composição imunogênica inclui uma

cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico ou uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente, está ligada a um grupamento de glicina.

[0051] Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado possui uma EC_{50} de pelo menos aproximadamente 100 µg/mL.

[0052] Em um aspecto, a composição imunogênica inclui um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 84 e um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 86, em que cada polipeptídeo inclui a) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo; b) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo; c) um grupamento de beta-alanina ligado a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídeo; e d) um grupamento de glicina ligado a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo ou a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo.

Breve descrição dos desenhos

[0053] Figura 1: Alinhamento de sequências da toxina A de *C. difficile* do tipo selvagem das cepas 630, VPI10463, R20291, CD196 e toxina A mutante que possui a SEQ ID NO: 4, utilizando alinhamento de CLUSTALW, parâmetros pré-estabelecidos.

[0054] Figura 2: Alinhamento de sequências da toxina B de *C. difficile* do tipo selvagem das cepas 630, VPI10463, R20291, CD196 e da toxina B mutante que possui a SEQ ID NO: 6, utilizando alinhamento de CLUSTALW, parâmetros pré-estabelecidos.

[0055] Figura 3: Gráfico mostrando a identificação de cepas de *C. difficile* negativas para toxina do tipo selvagem. Os meios de cultura de 13 cepas de *C. difficile* foram testados por ELISA em relação à toxina A. Como ilustrado, sete cepas expressavam a toxina A e 6 cepas não (cepas 1351, 3232, 7322, 5036, 4811 e VPI 11186).

[0056] Figura 4 A e B: Resultados de SDS-PAGE ilustrando que triplo mutante a (SEQ ID NO: 4), duplo mutante B (SEQ ID NO: 5) e triplo mutante B (SEQ ID NO: 6) não glicosilam Rac1 ou RhoA GTPases em ensaios de glicosilação *in vitro* com UDP-¹⁴C-glicose; enquanto que 10 µg até 1 ng da toxina B do tipo selvagem glicosila Rac1.

[0057] Figura 5: Western blot indicando a anulação da atividade de cisteína protease em toxinas A e B mutantes (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente), quando comparada com a observação de fragmentos clivados de toxinas A e B do tipo selvagem (SEQ ID NOs: 1 e 2, respectivamente). Ver o Exemplo 13.

[0058] Figura 6: Gráficos mostrando que toxinas A e B triplo mutantes (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) exibem citotoxicidade residual quando testadas em altas concentrações (por exemplo, aproximadamente 100 µg/mL) através do ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células IMR-90.

[0059] Figura 7: Gráfico que mostra que os valores de EC₅₀ são similares para a toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6) e a toxina B hepta mutante (SEQ ID NO: 8).

[0060] Figura 8: Gráfico que representa os resultados dos testes de citotoxicidade *in vitro* em que os níveis de ATP (RLUs) são representados graficamente contra concentrações crescentes do triplo mutante TcdA (SEQ ID NO: 4)(painel superior) e triplo mutante TcdB (SEQ ID NO: 6)(painel inferior). A citotoxicidade residual das toxinas A e B mutantes pode ser completamente anulada com anticorpos

neutralizadores específicos para a toxina A mutante (painel superior-pAb A e mAbs A3-25 + A60-22) e para a toxina B mutante (painel inferior-pAb B).

[0061] Figura 9: Imagens da morfologia de células IMR-90 em 72 horas pós-tratamento. O painel A mostra células de controle com tratamento simulado. O painel B mostra a morfologia das células após o tratamento com mutante TcdB inativado com formalina (SEQ ID NO: 6). O painel C mostra a morfologia das células após o tratamento com mutante TcdB inativado com EDC (SEQ ID NO: 6). O painel D mostra a morfologia das células após o tratamento com a toxina B do tipo selvagem (SEQ ID NO: 2). O painel E mostra a morfologia das células após o tratamento com o triplo mutante TcdB (SEQ ID NO: 6). Resultados similares foram observados para tratamentos com TcdA.

[0062] Figura 10: Gráfico que mostra os títulos de anticorpos neutralizadores como descrito no Exemplo 25 (estudo muCdiff2010-06).

[0063] Figura 11: Gráfico que mostra os títulos de anticorpos neutralizadores como descrito no Exemplo 26 (estudo muCdiff2010-07).

[0064] Figura 12: Gráfico que mostra respostas de anticorpos neutralizadores contra as toxinas A e B em hamsters após quatro imunizações como descrito no Exemplo 27 (estudo hamC. *difficile*2010-02)

[0065] Figura 13: Gráfico que mostra respostas de anticorpos neutralizadores em hamsters após a vacinação com toxinas mutantes genéticas inativadas quimicamente e toxoides da List Biologicals, como descrito no Exemplo 27 (estudo hamC. *difficile*2010-02).

[0066] Figura 14: Curvas de sobrevivência para três grupos imunizados de hamsters quando comparados com os controles não imunizados, descrito no Exemplo 28 (estudo hamC. *difficile*2010-02,

continuação).

[0067] Figura 15: Gráfico que mostra a resposta de anticorpo neutralizador relativa contra formulações diferentes de toxinas mutantes de *C. difficile* em hamsters (estudo ham*C. difficile*2010-03), como descrito no Exemplo 29.

[0068] Figura 16A-B: Gráficos que mostram a resposta de anticorpo neutralizador relativa forte contra toxinas A e B mutantes genéticas inativadas quimicamente (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) em macacos cinomolgos, como descrito no Exemplo 30.

[0069] Figura 17: Sequências de aminoácidos de regiões variáveis de cadeias leve (VL) e pesada (HL) de A3-25 mAb IgE. Peptídeo sinal – destacado; CDRs – em itálico e sublinhadas; Região constante – em negrito e sublinhada (sequência completa não mostrada).

[0070] Figura 18: Gráfico que mostra a titulação de anticorpos monoclonais para a toxina A individuais no ensaio de neutralização de toxina utilizando níveis de ATP (quantificados por unidades de luz relativas - RLU) como um indicador da viabilidade celular. Em comparação com o controle de toxina ($4 \times EC_{50}$), os mAbs A80-29, A65-33, A60-22 e A3-25 tinham efeitos neutralizadores crescentes sobre a toxina A com concentração, mas não até o nível do controle anti-toxina A de coelho positivo. Os mAbs A50-10, A56-33 e A58-46 não neutralizaram a toxina A. O único controle da célula era $1 - 1,5 \times 10^6$ RLUs.

[0071] Figura 19: Mapeamento de 8 grupos de epítomos dos mAbs da toxina B através de BiaCore

[0072] Figura 20A-C: Atividades neutralizadores sinérgicas de combinações de mAbs para a toxina A: A adição de diluições diferentes de anticorpos neutralizadores A60-22, A65-33 e A80-29 a concentrações crescentes de A3-25 mAb aumentou de forma sinérgica

a neutralização da toxina A independentemente da diluição. As RLUs do único controle da toxina A ($4 \times EC_{50}$) são ilustradas ($<0,3 \times 10^6$) e os únicos controles de células eram $2-2,5 \times 10^6$ RLUs como representado nos gráficos mostrados na Figura 20B e na Figura 20C.

[0073] Figura 21: Atividades de neutralização sinérgica dos mAbs para a toxina B: A neutralização da toxina B pelos mAbs 8-26, B60-2 e B59-3 é ilustrada na Figura 21A. A neutralização da toxina B é sinérgicamente aumentada após a combinação de B8-26 com diluições de B59-3 (Figura 21B)

[0074] Figura 22: Western blot mostrando que a expressão de Rac1 GTPase é induzida em extratos da toxina B mutante genética (SEQ ID NO: 6) de 24 até 96 horas, mas não nos extratos tratados com a toxina B do tipo selvagem (SEQ ID NO: 2). O blot também mostra que Rac1 é glicosilado nos extratos tratados com a toxina B, mas não nos extratos tratados com a toxina B mutante genética.

[0075] Figura 23A-K: Gráfico que representa os resultados provenientes dos testes de citotoxicidade *in vitro* em que os níveis de ATP (RLUs) são representados graficamente contra concentrações crescentes de meios de cultura de *C. difficile* e o conjunto de soro de hamster (■); toxina bruta (coleta de cultura) proveniente da respectiva cepa e do conjunto de soro de hamster (●); toxina purificada (toxina comercial obtida da List Biologicals) e o conjunto de soro de hamster (▲); toxina bruta (▼), controle; e toxina purificada (◆), controle. As toxinas das respectivas cepas foram adicionadas às células nos valores de $4 \times EC_{50}$. A Figura 23 mostra que uma composição imunogênica que inclui mutante TcdA (SEQ ID NO: 4) e mutante TcdB (SEQ ID NO: 6), em que as toxinas mutantes foram inativadas com EDC, de acordo com, por exemplo, o Exemplo 29, Tabela 15, descrito aqui, induzia anticorpos neutralizadores que exibiam atividade de neutralização contra toxinas de pelo menos as 16 cepas CDC

diferentes a seguir de *C. difficile*, em comparação com o respectivo único controle de 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).

[0076] Figura 24: Ilustração de um exemplo de inativação com EDC/NHS de toxinas de *C. difficile* mutantes, resultando em pelo menos três tipos possíveis de modificações: reticulações, adutos de glicina e adutos de beta-alanina. O painel A ilustra a reticulação. Os resíduos carboxílicos de toxinas triplo mutantes são ativados através da adição de EDC e NHS. Os ésteres ativados reagem com aminas primárias para formar ligações de amida estáveis, resultando em reticulações intra e intermoleculares. O painel B ilustra a formação de adutos de glicina. Após a inativação, os ésteres ativados residuais são extinguidos através da adição de glicina para formar ligações amida estáveis. O painel C ilustra a formação de adutos de beta-alanina. Três moles de NHS podem reagir com um mol de EDC para formar beta-alanina ativada. Isto então reage com aminas primárias para formar ligações amida estáveis.

[0077] Figura 25: Ilustração de um exemplo de inativação com EDC/NHS de toxinas de *C. difficile* mutantes, resultando em pelo menos um dos tipos a seguir de modificações: (A) reticulações, (B) adutos de glicina e (C) adutos de beta-alanina.

Breve descrição das sequências

[0078] SEQ ID NO: 1 apresenta a sequência de aminoácidos para a toxina A do tipo selvagem de *C. difficile* 630 (TcdA).

[0079] SEQ ID NO: 2 apresenta a sequência de aminoácidos para a toxina B do tipo selvagem de *C. difficile* 630 (TcdB).

[0080] SEQ ID NO: 3 apresenta a sequência de aminoácidos para uma TcdA mutante que possui uma mutação nas posições 285 e 287,

quando comparada com a SEQ ID NO: 1.

[0081] SEQ ID NO: 4 apresenta a sequência de aminoácidos para uma TcdA mutante que possui uma mutação nas posições 285, 287 e 700, quando comparada com a SEQ ID NO: 1.

[0082] SEQ ID NO: 5 apresenta a sequência de aminoácidos para uma TcdB mutante que possui uma mutação nas posições 286 e 288, quando comparada com a SEQ ID NO: 2.

[0083] SEQ ID NO: 6 apresenta a sequência de aminoácidos para uma TcdB mutante que possui uma mutação nas posições 286, 288 e 698, quando comparada com a SEQ ID NO: 2.

[0084] SEQ ID NO: 7 apresenta a sequência de aminoácidos para uma TcdA mutante que possui uma mutação nas posições 269, 272, 285, 287, 460, 462 e 700, quando comparada com a SEQ ID NO: 1

[0085] SEQ ID NO: 8 apresenta a sequência de aminoácidos para uma TcdB mutante que possui uma mutação nas posições 270, 273, 286, 288, 461, 463 e 698, quando comparada com a SEQ ID NO: 2

[0086] SEQ ID NO: 9 apresenta uma sequência de DNA que codifica uma toxina A do tipo selvagem de *C. difficile* 630 (TcdA).

[0087] SEQ ID NO: 10 apresenta uma sequência de DNA que codifica uma toxina B do tipo selvagem de *C. difficile* 630 (TcdB).

[0088] SEQ ID NO: 11 apresenta uma sequência de DNA que codifica a SEQ ID NO: 3

[0089] SEQ ID NO: 12 apresenta uma sequência de DNA que codifica a SEQ ID NO: 4

[0090] SEQ ID NO: 13 apresenta uma sequência de DNA que codifica a SEQ ID NO: 5

[0091] SEQ ID NO: 14 apresenta uma sequência de DNA que codifica a SEQ ID NO: 6

[0092] SEQ ID NO: 15 apresenta a sequência de aminoácidos para TcdA do tipo selvagem de *C. difficile* R20291.

- [0093] SEQ ID NO: 16 apresenta uma sequência de DNA que codifica a SEQ ID NO: 15.
- [0094] SEQ ID NO: 17 apresenta a sequência de aminoácidos para TcdA do tipo selvagem de *C. difficile* CD196.
- [0095] SEQ ID NO: 18 apresenta uma sequência de DNA que codifica a SEQ ID NO: 17.
- [0096] SEQ ID NO: 19 apresenta a sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* VPI10463 do tipo selvagem.
- [0097] SEQ ID NO: 20 apresenta uma sequência de DNA que codifica a SEQ ID NO: 19.
- [0098] SEQ ID NO: 21 apresenta a sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* R20291 do tipo selvagem.
- [0099] SEQ ID NO: 22 apresenta uma sequência de DNA que codifica a SEQ ID NO: 21.
- [00100] SEQ ID NO: 23 apresenta a sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* CD196 do tipo selvagem.
- [00101] SEQ ID NO: 24 apresenta uma sequência de DNA que codifica a SEQ ID NO: 23.
- [00102] SEQ ID NO: 25 apresenta a sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* VPI10463 do tipo selvagem.
- [00103] SEQ ID NO: 26 apresenta uma sequência de DNA que codifica a SEQ ID NO: 25.
- [00104] SEQ ID NO: 27 apresenta a DNA sequence de um locus de patogenicidade de *C. difficile* VPI10463 do tipo selvagem.
- [00105] SEQ ID NO: 28 apresenta a sequência de aminoácidos para os resíduos 101 até 293 da SEQ ID NO: 1.
- [00106] SEQ ID NO: 29 apresenta a sequência de aminoácidos para os resíduos 1 até 542 da SEQ ID NO: 1.
- [00107] SEQ ID NO: 30 apresenta a sequência de aminoácidos para os resíduos 101 até 293 da SEQ ID NO: 2.

[00108] SEQ ID NO: 31 apresenta a sequência de aminoácidos para os resíduos 1 até 543 da SEQ ID NO: 2.

[00109] SEQ ID NO: 32 apresenta a sequência de aminoácidos para os resíduos 543 até 809 da SEQ ID NO: 1.

[00110] SEQ ID NO: 33 apresenta a sequência de aminoácidos para os resíduos 544 até 767 da SEQ ID NO: 2.

[00111] SEQ ID NO: 34 apresenta a sequência de aminoácidos para uma TcdA mutante, em que os resíduos 101, 269, 272, 285, 287, 460, 462, 541, 542, 543, 589, 655 e 700 podem ser qualquer aminoácido.

[00112] SEQ ID NO: 35 apresenta a sequência de aminoácidos para uma TcdB mutante, em que 102, 270, 273, 286, 288, 384, 461, 463, 520, 543, 544, 587, 600, 653, 698 e 751 podem ser qualquer aminoácido.

[00113] SEQ ID NO: 36 apresenta uma sequência de aminoácidos para a cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

[00114] SEQ ID NO: 37 apresenta uma sequência de aminoácidos para a cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

[00115] SEQ ID NO: 38 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR1 da cadeia leve variável do anticorpo neutralizador de TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

[00116] SEQ ID NO: 39 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR2 da cadeia leve variável do anticorpo neutralizador de TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

[00117] SEQ ID NO: 40 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR3 da cadeia leve variável do anticorpo neutralizador de TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

[00118] SEQ ID NO: 41 apresenta uma sequência de aminoácidos

para CDR1 da cadeia pesada variável do anticorpo neutralizador de TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

[00119] SEQ ID NO: 42 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR2 da cadeia pesada variável do anticorpo neutralizador de TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

[00120] SEQ ID NO: 43 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR3 da cadeia pesada variável do anticorpo neutralizador de TcdA de *C. difficile* (A3-25 mAb).

[00121] SEQ ID NO: 44 apresenta uma sequência de DNA que codifica a SEQ ID NO: 3.

[00122] SEQ ID NO: 45 apresenta uma sequência de DNA que codifica a SEQ ID NO: 4.

[00123] SEQ ID NO: 46 apresenta uma sequência de DNA que codifica a SEQ ID NO: 5.

[00124] SEQ ID NO: 47 apresenta uma sequência de DNA que codifica a SEQ ID NO: 6.

[00125] SEQ ID NO: 48 apresenta a sequência de nucleotídeos do oligonucleotídeo imunoestimulador ODN CpG 24555.

[00126] SEQ ID NO: 49 apresenta uma sequência de aminoácidos para a cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

[00127] SEQ ID NO: 50 apresenta uma sequência de aminoácidos para o peptídeo sinal da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

[00128] SEQ ID NO: 51 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR1 da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

[00129] SEQ ID NO: 52 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR2 da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

[00130] SEQ ID NO: 53 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR3 da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

[00131] SEQ ID NO: 54 apresenta uma sequência de aminoácidos para a região constante da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

[00132] SEQ ID NO: 55 apresenta uma sequência de aminoácidos para a cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

[00133] SEQ ID NO: 56 apresenta uma sequência de aminoácidos para o peptídeo sinal da cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

[00134] SEQ ID NO: 57 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR1 da cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

[00135] SEQ ID NO: 58 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR2 da cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

[00136] SEQ ID NO: 59 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR3 da cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb).

[00137] SEQ ID NO: 60 apresenta uma sequência de aminoácidos para a cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

[00138] SEQ ID NO: 61 apresenta uma sequência de aminoácidos para o peptídeo sinal da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

[00139] SEQ ID NO: 62 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR1 da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

[00140] SEQ ID NO: 63 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR2 da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

[00141] SEQ ID NO: 64 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR3 da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

[00142] SEQ ID NO: 65 apresenta uma sequência de aminoácidos para a região constante da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

[00143] SEQ ID NO: 66 apresenta uma sequência de aminoácidos para a cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

[00144] SEQ ID NO: 67 apresenta uma sequência de aminoácidos para o peptídeo sinal da cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

[00145] SEQ ID NO: 68 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR1 da cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

[00146] SEQ ID NO: 69 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR2 da cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

[00147] SEQ ID NO: 70 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR3 da cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb).

[00148] SEQ ID NO: 71 apresenta uma sequência de aminoácidos para a cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

[00149] SEQ ID NO: 72 apresenta uma sequência de aminoácidos para o peptídeo sinal da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

[00150] SEQ ID NO: 73 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR1 da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

[00151] SEQ ID NO: 74 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR2 da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

[00152] SEQ ID NO: 75 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR3 da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

[00153] SEQ ID NO: 76 apresenta uma sequência de aminoácidos para a região constante da cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

[00154] SEQ ID NO: 77 apresenta uma sequência de aminoácidos para a cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

[00155] SEQ ID NO: 78 apresenta uma sequência de aminoácidos para o peptídeo sinal da cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

[00156] SEQ ID NO: 79 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR1 da cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

[00157] SEQ ID NO: 80 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR2 da cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

[00158] SEQ ID NO: 81 apresenta uma sequência de aminoácidos para CDR3 da cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb).

[00159] SEQ ID NO: 82 apresenta uma sequência de aminoácidos para uma TcdB mutante, em que um resíduo nas posições 102, 270, 273, 286, 288, 384, 461, 463, 520, 543, 544, 587, 600, 653, 698 e 751

pode ser qualquer aminoácido.

[00160] SEQ ID NO: 83 apresenta uma sequência de aminoácidos para uma TcdA mutante que possui uma mutação nas posições 269, 272, 285, 287, 460, 462 e 700, quando comparada com a SEQ ID NO: 1, em que a metionina na posição 1 está ausente.

[00161] SEQ ID NO: 84 apresenta uma sequência de aminoácidos para uma toxina A de *C. difficile* mutante que possui uma mutação nas posições 285, 287 e 700, quando comparada com a SEQ ID NO: 1, em que a metionina na posição 1 está ausente.

[00162] SEQ ID NO: 85 apresenta uma sequência de aminoácidos para uma toxina B de *C. difficile* mutante que possui uma mutação nas posições 270, 273, 286, 288, 461, 463 e 698, quando comparada com a SEQ ID NO: 2, em que a metionina na posição 1 está ausente.

[00163] SEQ ID NO: 86 apresenta uma sequência de aminoácidos para uma toxina B de *C. difficile* mutante que possui uma mutação nas posições 286, 288 e 698, quando comparada com a SEQ ID NO: 2, em que a metionina na posição 1 está ausente.

[00164] SEQ ID NO: 87 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2004013 do tipo selvagem.

[00165] SEQ ID NO: 88 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2004111 do tipo selvagem.

[00166] SEQ ID NO: 89 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2004118 do tipo selvagem.

[00167] SEQ ID NO: 90 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2004205 do tipo selvagem.

[00168] SEQ ID NO: 91 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2004206 do tipo selvagem.

[00169] SEQ ID NO: 92 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2005022 do tipo selvagem.

[00170] SEQ ID NO: 93 apresenta uma sequência de aminoácidos

para TcdA de *C. difficile* 2005088 do tipo selvagem.

[00171] SEQ ID NO: 94 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2005283 do tipo selvagem.

[00172] SEQ ID NO: 95 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2005325 do tipo selvagem.

[00173] SEQ ID NO: 96 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2005359 do tipo selvagem.

[00174] SEQ ID NO: 97 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2006017 do tipo selvagem.

[00175] SEQ ID NO: 98 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2007070 do tipo selvagem.

[00176] SEQ ID NO: 99 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2007217 do tipo selvagem.

[00177] SEQ ID NO: 100 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2007302 do tipo selvagem.

[00178] SEQ ID NO: 101 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2007816 do tipo selvagem.

[00179] SEQ ID NO: 102 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2007838 do tipo selvagem.

[00180] SEQ ID NO: 103 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2007858 do tipo selvagem.

[00181] SEQ ID NO: 104 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2007886 do tipo selvagem.

[00182] SEQ ID NO: 105 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2008222 do tipo selvagem.

[00183] SEQ ID NO: 106 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2009078 do tipo selvagem.

[00184] SEQ ID NO: 107 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2009087 do tipo selvagem.

[00185] SEQ ID NO: 108 apresenta uma sequência de aminoácidos

para TcdA de *C. difficile* 2009141 do tipo selvagem.

[00186] SEQ ID NO: 109 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 2009292 do tipo selvagem.

[00187] SEQ ID NO: 110 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2004013 do tipo selvagem.

[00188] SEQ ID NO: 111 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2004111 do tipo selvagem.

[00189] SEQ ID NO: 112 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2004118 do tipo selvagem.

[00190] SEQ ID NO: 113 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2004205 do tipo selvagem.

[00191] SEQ ID NO: 114 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2004206 do tipo selvagem.

[00192] SEQ ID NO: 115 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2005022 do tipo selvagem.

[00193] SEQ ID NO: 116 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2005088 do tipo selvagem.

[00194] SEQ ID NO: 117 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2005283 do tipo selvagem.

[00195] SEQ ID NO: 118 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2005325 do tipo selvagem.

[00196] SEQ ID NO: 119 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2005359 do tipo selvagem.

[00197] SEQ ID NO: 120 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2006017 do tipo selvagem.

[00198] SEQ ID NO: 121 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2006376 do tipo selvagem.

[00199] SEQ ID NO: 122 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2007070 do tipo selvagem.

[00200] SEQ ID NO: 123 apresenta uma sequência de aminoácidos

para TcdB de *C. difficile* 2007217 do tipo selvagem.

[00201] SEQ ID NO: 124 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2007302 do tipo selvagem.

[00202] SEQ ID NO: 125 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2007816 do tipo selvagem.

[00203] SEQ ID NO: 126 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2007838 do tipo selvagem.

[00204] SEQ ID NO: 127 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2007858 do tipo selvagem.

[00205] SEQ ID NO: 128 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2007886 do tipo selvagem.

[00206] SEQ ID NO: 129 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2008222 do tipo selvagem.

[00207] SEQ ID NO: 130 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2009078 do tipo selvagem.

[00208] SEQ ID NO: 131 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2009087 do tipo selvagem.

[00209] SEQ ID NO: 132 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2009141 do tipo selvagem.

[00210] SEQ ID NO: 133 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 2009292 do tipo selvagem.

[00211] SEQ ID NO: 134 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 014 do tipo selvagem.

[00212] SEQ ID NO: 135 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 015 do tipo selvagem.

[00213] SEQ ID NO: 136 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 020 do tipo selvagem.

[00214] SEQ ID NO: 137 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 023 do tipo selvagem.

[00215] SEQ ID NO: 138 apresenta uma sequência de aminoácidos

para TcdA de *C. difficile* 027 do tipo selvagem.

[00216] SEQ ID NO: 139 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 029 do tipo selvagem.

[00217] SEQ ID NO: 140 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 046 do tipo selvagem.

[00218] SEQ ID NO: 141 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 014 do tipo selvagem.

[00219] SEQ ID NO: 142 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 015 do tipo selvagem.

[00220] SEQ ID NO: 143 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 020 do tipo selvagem.

[00221] SEQ ID NO: 144 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 023 do tipo selvagem.

[00222] SEQ ID NO: 145 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 027 do tipo selvagem.

[00223] SEQ ID NO: 146 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 029 do tipo selvagem.

[00224] SEQ ID NO: 147 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de *C. difficile* 046 do tipo selvagem.

[00225] SEQ ID NO: 148 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 001 do tipo selvagem.

[00226] SEQ ID NO: 149 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 002 do tipo selvagem.

[00227] SEQ ID NO: 150 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 003 do tipo selvagem.

[00228] SEQ ID NO: 151 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 004 do tipo selvagem.

[00229] SEQ ID NO: 152 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de *C. difficile* 070 do tipo selvagem.

[00230] SEQ ID NO: 153 apresenta uma sequência de aminoácidos

para TcdA de C. difficile 075 do tipo selvagem.

[00231] SEQ ID NO: 154 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de C. difficile 077 do tipo selvagem.

[00232] SEQ ID NO: 155 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de C. difficile 081 do tipo selvagem.

[00233] SEQ ID NO: 156 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de C. difficile 117 do tipo selvagem.

[00234] SEQ ID NO: 157 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de C. difficile 131 do tipo selvagem.

[00235] SEQ ID NO: 158 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 001 do tipo selvagem.

[00236] SEQ ID NO: 159 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 002 do tipo selvagem.

[00237] SEQ ID NO: 160 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 003 do tipo selvagem.

[00238] SEQ ID NO: 161 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 004 do tipo selvagem.

[00239] SEQ ID NO: 162 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 070 do tipo selvagem.

[00240] SEQ ID NO: 163 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 075 do tipo selvagem.

[00241] SEQ ID NO: 164 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 077 do tipo selvagem.

[00242] SEQ ID NO: 165 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 081 do tipo selvagem.

[00243] SEQ ID NO: 166 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 117 do tipo selvagem.

[00244] SEQ ID NO: 167 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 131 do tipo selvagem.

[00245] SEQ ID NO: 168 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de C. difficile 053 do tipo selvagem.

[00246] SEQ ID NO: 169 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de C. difficile 078 do tipo selvagem.

[00247] SEQ ID NO: 170 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de C. difficile 087 do tipo selvagem.

[00248] SEQ ID NO: 171 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de C. difficile 095 do tipo selvagem.

[00249] SEQ ID NO: 172 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdA de C. difficile 126 do tipo selvagem.

[00250] SEQ ID NO: 173 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 053 do tipo selvagem.

[00251] SEQ ID NO: 174 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 078 do tipo selvagem.

[00252] SEQ ID NO: 175 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 087 do tipo selvagem.

[00253] SEQ ID NO: 176 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 095 do tipo selvagem.

[00254] SEQ ID NO: 177 apresenta uma sequência de aminoácidos para TcdB de C. difficile 126 do tipo selvagem.

Descrição detalhada

[00255] Os inventores descobriram de forma surpreendente, entre outras coisas, uma toxina A e uma e toxina B de C. difficile mutantes e métodos para as mesmas. Os mutantes são caracterizados, em parte, por serem imunogênicos e exibirem citotoxicidade reduzida comparada com uma forma do tipo selvagem da respectiva toxina. A presente invenção refere-se ainda a porções imunogênicas das mesmas, equivalentes biológicos das mesmas e polinucleotídeos isolados que incluem sequências de ácido nucléico que codificam qualquer uma das anteriores.

[00256] As composições imunogênicas descritas aqui demonstraram inesperadamente a capacidade de ativar novos anticorpos neutralizadores contra toxinas de *C. difficile* e estas podem ter a capacidade de conferir proteção ativa e/ou passiva contra um desafio por *C. difficile*. Os novos anticorpos são direcionados contra vários epítomos da toxina A e da toxina B. Os inventores descobriram ainda que uma combinação de pelo menos dois dos anticorpos monoclonais neutralizadores pode exibir um efeito sinérgico inesperado em relação à neutralização *in vitro* da toxina A e da toxina B.

[00257] As composições da invenção descritas aqui podem ser utilizadas para tratar, prevenir, diminuir o risco de, diminuir as ocorrências de, diminuir a gravidade de e/ou retardar o início de uma infecção causada por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile* (CDAD), síndrome, estado de saúde, sintoma e/ou complicação dos mesmos em um mamífero, quando comparado com um mamífero ao qual a composição não foi administrada.

[00258] Além disso, os inventores descobriram uma célula de *C. difficile* asporogênica recombinante que pode expressar estavelmente a toxina A e a toxina B de *C. difficile* mutante e novos métodos para a produção da mesma.

Composições Imunogênicas

[00259] Em um aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui uma toxina de *C. difficile* mutante. A toxina de *C. difficile* mutante inclui uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos uma mutação em um domínio de glucosiltransferase e pelo menos uma mutação em um domínio de cisteína protease, em relação à toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[00260] O termo "do tipo selvagem", como utilizado aqui, refere-se à forma encontrada na natureza. Por exemplo, um polipeptídeo ou uma

polissequência de nucleotídeos do tipo selvagem é uma sequência presente em um organismo que pode ser isolada partindo de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificada pela manipulação humana. A presente invenção refere-se ainda a polinucleotídeos isolados que incluem sequências de ácido nucléico que codificam qualquer um dos anteriores. Em adição, a presente invenção refere-se ao uso de qualquer uma das composições anteriores para tratar, prevenir, diminuir o risco de, diminuir a gravidade de, diminuir ocorrências de e/ou retardar o início de uma infecção causada por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, estado de saúde, sintoma e/ou complicação dos mesmos em um mamífero, quando comparado a um mamífero ao qual a composição não é administrada, bem como métodos para a preparação das ditas composições.

[00261] Como utilizado aqui, uma "composição imunogênica" ou "agente imunogênico" refere-se a uma composição que ativa uma resposta imunológica em um mamífero ao qual a composição é administrada.

[00262] Uma "resposta imunológica" refere-se ao desenvolvimento de uma resposta humoral (mediada por anticorpo) e/ou celular (mediada por células T específicas ao antígeno e seus produtos de secreção) benéfica direcionada contra uma toxina de *C. difficile* em um paciente receptor. A resposta imunológica pode ser humoral, celular ou ambas.

[00263] A resposta imunológica pode ser uma resposta induzida através da administração de uma composição imunogênica, um agente imunogênico. Alternativamente, a resposta imunológica pode ser uma resposta passiva induzida pela administração de anticorpo ou células T iniciadas.

[00264] A presença de uma resposta imunológica humoral

(mediada por anticorpo) pode ser determinada, por exemplo, por ensaios à base de células conhecidos na arte, tal como um ensaio de anticorpo neutralizador, ELISA etc.

[00265] Uma resposta imunológica celular é tipicamente ativada através da apresentação de epítopos de polipeptídeo em associação com moléculas de MHC de Classe I ou de Classe II para ativar células helper T CD4+ e/ou células T citotóxicas CD8+ específicas ao antígeno. A resposta pode ainda envolver a ativação de monócitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrócitos, células da microglia, eosinófilos ou outros componentes da imunidade inata. A presença de uma resposta imunológica mediada por células pode ser determinada através de ensaios de proliferação (células T CD4+) ou ensaios de CTL (linfócito T citotóxico) conhecidos na arte.

[00266] Em uma modalidade, uma composição imunogênica é uma composição para vacina. Como utilizado aqui, uma "composição para vacina" é uma composição que ativa uma resposta imunológica em um mamífero ao qual a composição é administrada. A composição para vacina pode proteger o mamífero imunizado contra o desafio subsequente por um agente imunizante ou um agente de reação cruzada de forma imunológica. A proteção pode ser completa ou parcial em relação à redução nos sintomas ou na infecção quando comparada a um mamífero não vacinado sob as mesmas condições.

[00267] As composições imunogênicas descritas aqui reagem de forma cruzada, o que se refere aqui ao fato de possuir uma característica de ser capaz de ativar uma resposta imunológica eficiente (por exemplo, resposta imunológica humoral) contra uma toxina produzida por outra cepa de *C. difficile* que é diferente da cepa da qual a composição é derivada. Por exemplo, as composições imunogênicas (por exemplo, derivadas de *C. difficile* 630) descritas aqui podem ativar anticorpos com reação cruzada que podem se ligar

às toxinas produzidas por várias cepas de *C. difficile* (por exemplo, toxinas produzidas por *C. difficile* R20291 e VPI10463). Ver, por exemplo, o Exemplo 37. A reatividade cruzada é indicativa do potencial de proteção cruzada do agente imunogênico bacteriano e vice versa.

[00268] O termo "protetor cruzado" como utilizado aqui se refere à capacidade da resposta imunológica induzida por uma composição imunogênica de prevenir ou atenuar a infecção por uma cepa bacteriana diferencial ou espécies do mesmo gênero. Por exemplo, uma composição imunogênica (por exemplo, derivada de *C. difficile* 630) descrita aqui pode induzir uma resposta imunológica eficiente em um mamífero para atenuar uma infecção causada por *C. difficile* e/ou para atenuar uma doença de *C. difficile* causada por uma cepa sem ser a 630 (por exemplo, *C. difficile* R20291) no mamífero.

[00269] Os exemplos de mamíferos em que a composição imunogênica ou o agente imunogênico ativa uma resposta imunológica incluem quaisquer mamíferos, tais como, por exemplo, camundongos, hamsters, primatas e humanos. Em uma modalidade preferida, a composição imunogênica ou o agente imunogênico ativa uma resposta imunológica em um humano ao qual a composição é administrada.

[00270] Como descrito anteriormente, a toxina A (TcdA) e a toxina B (TcdB) são glucosiltransferases homólogas que inativam pequenas GTPases da família Rho/Rac/Ras. A ação de TcdA e TcdB nas células alvos de mamíferos depende de um mecanismo de várias etapas de endocitose mediada por receptor, translocação de membrana, processamento autoproteolítico e monoglicosilação de GTPases. Muitas destas atividades funcionais foram atribuídas a regiões distintas dentro da sequência primária das toxinas e foram obtidas imagens das toxinas para mostrar que estas moléculas são similares em relação a sua estrutura.

[00271] O gene do tipo selvagem para TcdA possui aproximadamente 8130 nucleotídeos que codificam uma proteína que possui um peso molecular deduzido de aproximadamente 308-kDa, que possui aproximadamente 2710 aminoácidos. Como utilizado aqui, uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma TcdA de *C. difficile* de qualquer cepa de *C. difficile* do tipo selvagem. Uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem pode incluir uma sequência de aminoácidos de TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem que possui pelo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente aproximadamente 98%, mais preferencialmente aproximadamente 99% ou mais preferencialmente aproximadamente 100% de identidade em relação à SEQ ID NO: 1 (comprimento completo) quando alinhadas de maneira ótima, tal como através dos programas GAP ou BESTFIT utilizando os pesos de espaços pré-estabelecidos.

[00272] Em uma modalidade preferida, a TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 1, que descreve a sequência de aminoácidos do tipo selvagem para TcdA from *C. difficile* cepa 630 (também divulgada no número de acesso do GenBank YP_001087137.1 e/ou CAJ67494.1). A cepa 630 de *C. difficile* é conhecida na arte como sendo uma cepa de PCR-ribotipo 012. A SEQ ID NO: 9 descreve o gene do tipo selvagem para TcdA da cepa 630 de *C. difficile*, que é também divulgado no número de acesso do GenBank NC_009089.1.

[00273] Outro exemplo de uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 15, que descreve a sequência de aminoácidos do tipo selvagem para TcdA da cepa R20291 de *C. difficile* (também divulgada no número de acesso do GenBank YP_003217088.1). A cepa R20291 de *C. difficile* é conhecida na arte como sendo uma cepa hipervirulenta e uma cepa

de PCR-ribotipo 027. A sequência de aminoácidos para TcdA da cepa R20291 de *C. difficile* possui aproximadamente 98% de identidade em relação à SEQ ID NO:1. A SEQ ID NO: 16 descreve o gene do tipo selvagem para TcdA da cepa R20291 de *C. difficile*, que é também divulgado no número de acesso do GenBank NC_013316.1.

[00274] Um exemplo adicional de uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 17, que descreve a sequência de aminoácidos do tipo selvagem para TcdA da cepa CD196 de *C. difficile* (também divulgada no número de acesso do GenBank CBA61156.1). A CD196 é uma cepa de um surto recente no Canadá e é conhecida na arte como uma cepa PCR-ribotipo 027. A sequência de aminoácidos para TcdA da cepa CD196 de *C. difficile* possui aproximadamente 98% de identidade em relação à SEQ ID NO: 1 e possui aproximadamente 100% de identidade com a TcdA da cepa R20291 de *C. difficile*. A SEQ ID NO: 18 descreve o gene do tipo selvagem para TcdA da cepa CD196 de *C. difficile*, que é também divulgado no número de acesso do GenBank FN538970.1.

[00275] Exemplos adicionais de uma sequência de aminoácidos para uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem incluem a SEQ ID NO: 19, que descreve a sequência de aminoácidos do tipo selvagem para TcdA da cepa VPI10463 de *C. difficile* (também divulgada no número de acesso do GenBank CAA63564.1). A sequência de aminoácidos para TcdA da cepa VPI10463 de *C. difficile* possui aproximadamente 100% (99,8%) de identidade em relação à SEQ ID NO: 1. A SEQ ID NO: 20 descreve o gene do tipo selvagem para TcdA da cepa VPI10463 de *C. difficile*, que é também divulgada no número de acesso do GenBank X92982.1.

[00276] Exemplos adicionais de uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem incluem TcdA de cepas de *C. difficile* do tipo selvagem que

podem ser obtidas no Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, GA). Os inventores descobriram que a sequência de aminoácidos de TcdA de cepas de *C. difficile* do tipo selvagem que podem ser obtidas do CDC incluem pelo menos aproximadamente 99,3% até 100% de identidade, quando alinhadas de forma ótima, em relação aos resíduos de aminoácidos 1 até 821 da SEQ ID NO: 1 (TcdA de *C. difficile* 630). Ver a Tabela 1.

[00277] Os inventores também descobriram que a sequência de aminoácidos de TcdA de cepas de *C. difficile* do tipo selvagem pode incluir pelo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, até aproximadamente 100% de identidade, quando alinhadas de forma ótima (por exemplo, quando sequências de comprimento completo são alinhadas de forma ótima) em relação à SEQ ID NO: 1.

Tabela 1: Cepas de *C. difficile* do tipo selvagem obtidas no CDC e a porcentagem de identidade de resíduos de aminoácidos 1-821 de TcdA da respectiva cepa de *C. difficile* do tipo selvagem em relação aos resíduos de aminoácidos 1-821 da SEQ ID NO: 1, quando alinhados de forma ótima.

Tabela 1: Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem do CDC	
ID da Cepa de <i>C. difficile</i>	% Aproximada de Identidade de Aminoácidos em Relação aos Resíduos 1-821 da SEQ ID NO: 1
2004111	100
2004118	99,6
2004205	100
2004206	100
2005325	99,3
2005359	99,6
2006017	100
2007070	100

Tabela 1: Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem do CDC	
ID da Cepa de <i>C. difficile</i>	% Aproximada de Identidade de Aminoácidos em Relação aos Resíduos 1-821 da SEQ ID NO: 1
2007302	100
2007816	99,3
2007838	99,6
2007886	99,6
2008222	100
2009078	100
2009087	100
2009141	100
2009292	99,6

[00278] Consequentemente, em uma modalidade, a sequência de aminoácidos da TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de pelo menos aproximadamente 500, 600, 700 ou 800 resíduos contíguos, que possui pelo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente aproximadamente 98%, mais preferencialmente aproximadamente 99% ou mais preferencialmente aproximadamente 100% de identidade em relação a uma sequência de comprimento igual entre os resíduos 1 até 900 da SEQ ID NO: 1 quando alinhadas de forma ótima, tal como através dos programas GAP ou BESTFIT utilizando pesos de espaços pré-estabelecidos. Os exemplos incluem cepas descritas anteriormente (por exemplo, R20291, CD196 etc) e aquelas listadas na Tabela 1.

[00279] Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos da TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência que possui pelo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, preferencialmente aproximadamente 97%, preferencialmente aproximadamente 98%, mais preferencialmente aproximadamente

99% ou mais preferencialmente aproximadamente 100% de identidade em relação a qualquer sequência selecionada das SEQ ID NOs: 87-109 quando alinhadas de forma ótima. Ver a Tabela 1-a.

Tabela 1-a: Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem	
ID da 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

Tabela 1-a: Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem	
ID da Cepa de <i>C. difficile</i>	Toxina A, SEQ ID NO:
001	SEQ ID NO: 148
002	SEQ ID NO: 149
003	SEQ ID NO: 150
012 (004)	SEQ ID NO: 151
014	SEQ ID NO: 134
015	SEQ ID NO: 135
017	
020	SEQ ID NO: 136
023	SEQ ID NO: 137
027	SEQ ID NO: 138
029	SEQ ID NO: 139
046	SEQ ID NO: 140
053	SEQ ID NO: 168
059	
070	SEQ ID NO: 152
075	SEQ ID NO: 153
077	SEQ ID NO: 154
078	SEQ ID NO: 169
081	SEQ ID NO: 155
087	SEQ ID NO: 170
095	SEQ ID NO: 171
106	
117	SEQ ID NO: 156
126	SEQ ID NO: 172
131	SEQ ID NO: 157

[00280] O gene do tipo selvagem para TcdB possui aproximadamente 7098 nucleotídeos que codificam uma proteína com um peso molecular deduzido de aproximadamente 270 kDa, que

possui aproximadamente 2366 aminoácidos. Como utilizado aqui, uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma TcdB de *C. difficile* de qualquer cepa de *C. difficile* do tipo selvagem. Uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem pode incluir uma sequência de aminoácidos do tipo selvagem que possui pelo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente aproximadamente 98%, mais preferencialmente aproximadamente 99% ou mais preferencialmente aproximadamente 100% de identidade em relação à SEQ ID NO: 2 quando alinhadas de forma ótima, tal como através dos programas GAP ou BESTFIT utilizando pesos de espaços pré-estabelecidos. Em uma modalidade preferida, a TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2, que descreve a sequência de aminoácidos do tipo selvagem para TcdB da cepa 630 de *C. difficile* (também divulgada no número de acesso do GenBank YP_001087135.1 e/ou CAJ67492). A SEQ ID NO: 10 descreve o gene do tipo selvagem para TcdB da cepa 630 de *C. difficile*, que é também divulgado no número de acesso do GenBank NC_009089.1.

[00281] Outro exemplo de uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 21, que descreve a sequência de aminoácidos do tipo selvagem para TcdB da cepa 20291 de *C. difficile* (também divulgada no número de acesso do GenBank YP_003217086.1 e/ou CBE02479.1). A sequência de aminoácidos para TcdB da cepa 20291 de *C. difficile* possui aproximadamente 92% de identidade em relação à SEQ ID NO: 2. A SEQ ID NO: 22 descreve o gene do tipo selvagem para TcdB da cepa 20291 de *C. difficile*, que é também divulgado no número de acesso do GenBank NC_013316.1.

[00282] Um exemplo adicional de uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ

ID NO: 23, que descreve a sequência de aminoácidos do tipo selvagem para TcdB da cepa CD196 de *C. difficile* (também divulgada no número de acesso do GenBank YP_003213639.1 e/ou CBA61153.1). A SEQ ID NO: 24 descreve o gene do tipo selvagem para TcdB da cepa CD196 de *C. difficile*, que é também divulgado no número de acesso do GenBank NC_013315.1. A sequência de aminoácidos para TcdB da cepa CD196 de *C. difficile* possui aproximadamente 92% de identidade em relação à SEQ ID NO: 2.

[00283] Exemplos adicionais de uma sequência de aminoácidos para uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem incluem a SEQ ID NO: 25, que descreve a sequência de aminoácidos do tipo selvagem para TcdB da cepa VPI10463 de *C. difficile* (também divulgada no número de acesso do GenBank P18177 e/ou CAA37298). A sequência de aminoácidos para TcdB da cepa VPI10463 de *C. difficile* possui 100% de identidade em relação à SEQ ID NO: 2. A SEQ ID NO: 26 descreve o gene do tipo selvagem para TcdB da cepa VPI10463 de *C. difficile*, que é também divulgado no número de acesso do GenBank X53138.1.

[00284] Exemplos adicionais de uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem incluem TcdB das cepas de *C. difficile* do tipo selvagem que podem ser obtidas no Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, GA). Os inventores descobriram que a sequência de aminoácidos de TcdB de cepas de *C. difficile* do tipo selvagem que podem ser obtidas no CDC incluem pelo menos aproximadamente 96% até 100% de identidade, quando alinhadas de forma ótima, aos resíduos de aminoácidos 1 até 821 da SEQ ID NO: 2 (TcdB de *C. difficile* 630). Ver a Tabela 2.

Tabela 2: Cepas de *C. difficile* do tipo selvagem obtidas no CDC e a % de identidade de resíduos de aminoácidos 1-821 de TcdB da respectiva cepa de *C. difficile* do tipo selvagem em relação aos resíduos de aminoácidos 1-821 da SEQ ID NO: 2, quando alinhados

de forma ótima.

Tabela 2: Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem do CDC	
ID da Cepa de <i>C. difficile</i>	% Aproximada da Identidade de Aminoácidos em Relação aos Resíduos 1-821 da 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

[00285] Consequentemente, em uma modalidade, uma sequência de aminoácidos de TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência de pelo menos aproximadamente 500, 600, 700 ou 800 resíduos contíguos, que possui pelo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, preferencialmente aproximadamente 97%, preferencialmente aproximadamente 98%, mais preferencialmente aproximadamente 99% ou mais preferencialmente aproximadamente 100% de identidade em relação a uma sequência de comprimento igual entre os resíduos 1 até 900 da SEQ ID NO: 2 quando alinhadas de forma ótima, tal como através dos programas GAP ou BESTFIT utilizando pesos de espaços pré-estabelecidos. Os exemplos incluem as cepas descritas anteriormente (por exemplo, R20291, CD196 etc) e aquelas listadas na Tabela 2.

[00286] Em outra modalidade, uma TcdB de *C. difficile* do tipo

selvagem sequência de aminoácidos inclui uma sequência que possui pelo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, preferencialmente aproximadamente 97%, preferencialmente aproximadamente 98%, mais preferencialmente aproximadamente 99% ou mais preferencialmente aproximadamente 100% de identidade em relação a qualquer sequência selecionada das SEQ ID NOs: 110-133 quando alinhadas de forma ótima. Ver a Tabela 2-a.

Tabela 2-a Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem	
ID da 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
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

Tabela 2-a Cepas de <i>C. difficile</i> do tipo selvagem	
ID da Cepa de <i>C. difficile</i>	Toxina B, SEQ ID NO:
2009141	SEQ ID NO: 132
2009292	SEQ ID NO: 133
001	SEQ ID NO: 158
002	SEQ ID NO: 159
003	SEQ ID NO: 160
012 (004)	SEQ ID NO: 161
014	SEQ ID NO: 141
015	SEQ ID NO: 142
017	
020	SEQ ID NO: 143
023	SEQ ID NO: 144
027	SEQ ID NO: 145
029	SEQ ID NO: 146
046	SEQ ID NO: 147
053	SEQ ID NO: 173
059	
070	SEQ ID NO: 162
075	SEQ ID NO: 163
077	SEQ ID NO: 164
078	SEQ ID NO: 174
081	SEQ ID NO: 165
087	SEQ ID NO: 175
095	SEQ ID NO: 176
106	
117	SEQ ID NO: 166
126	SEQ ID NO: 177
131	SEQ ID NO: 167

[00287] Os genes para as toxinas A e B (*tcdA* e *tcdB*) fazem parte de um locus genético de 19,6 kb (o locus de patogenicidade, PaLoc) que inclui 3 quadros abertos de leitura pequenos adicionais (ORFs),

tcdD, *tcdE* e *tcdC* e podem ser considerados úteis para virulência. O PaLoc é conhecido por ser estável e conservado nas cepas toxigênicas. Está presente no mesmo sítio de integração cromossômica em todas as cepas toxigênicas que foram analisadas até agora. Nas cepas não toxigênicas, o locus de patogenicidade (PaLoc) não está presente. Consequentemente, uma característica das cepas de *C. difficile* do tipo selvagem descritas aqui é a presença de um locus de patogenicidade. Outra característica preferida das cepas de *C. difficile* do tipo selvagem descritas aqui é a produção de tanto TcdA quanto TcdB.

[00288] Em uma modalidade, a cepa de *C. difficile* do tipo selvagem é uma cepa que possui um locus de patogenicidade que é pelo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente aproximadamente 98%, mais preferencialmente aproximadamente 99% ou mais preferencialmente aproximadamente 100% idêntico aquele de *C. difficile* 630 ou VPI10463. A sequência total do locus de patogenicidade de *C. difficile* VPI10463, está registrada no banco de dados EMBL com o número de acesso de sequência X92982, também mostrada na SEQ ID NO: 26. As cepas em que o PaLoc é idêntico aquele da cepa de referência VPI10463 são referidas como toxinotipo 0. As cepas de toxinotipos I-VII, IX, XII-XV e XVIII-XXIV produzem tanto TcdA quanto TcdB apesar de variações em seus genes de toxina.

[00289] No terminal N das toxinas, fica localizado o domínio de glucosiltransferase. A atividade de glucosiltransferase das toxinas está associada com a função citotóxica das toxinas. Sem ficar ligado a um mecanismo ou uma teoria, acredita-se que a atividade de glucosiltransferase em ambas as toxinas catalize a monoglicosilação de proteínas de ligação a GTP pequenas na superfamília Rho/Rac/Ras. Após a glicosilação destas proteínas de ligação a GTP,

a fisiologia celular é modificada dramaticamente, resultando em uma perda de integridade estrutural e na interrupção de vias de sinalização essenciais de células hospedeiras infectadas pelas toxinas. O motivo Asp-Xaa-Asp (DXD), que está envolvido com a ligação de manganês, uridina difosfato (UDP) e glicose, é uma característica típica para o domínio de glucosiltransferase. Sem ficar ligado a um mecanismo ou uma teoria, acredita-se que os resíduos críticos para a atividade catalítica, tal como o motivo DXD, não variam entre uma TcdB de uma cepa "histórica" conhecida, tal como 630 e uma TcdB de uma cepa hipervirulenta, tal como R20291. O motivo DXD fica localizado nos resíduos 285 até 287 de uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1 e nos resíduos 286 até 288 de uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2.

[00290] Algoritmos de alinhamento globais (por exemplo, programas de análise de sequências) são conhecidos na arte e podem ser utilizados para alinhar de forma ótima duas ou mais sequências de aminoácidos de toxinas para determinar se a toxina inclui um motivo de assinatura particular (por exemplo, DXD no domínio de glucosiltransferase, DHC no domínio de cisteína protease descrito a seguir etc.). A(s) sequência(s) alinhada(s) de forma ótima é(são) comparada(s) com uma respectiva sequência de referência (por exemplo, SEQ ID NO:1 para TcdA ou SEQ ID NO: 2 para TcdB) para determinar a existência do motivo de assinatura. "Alinhamento ótimo" refere-se a um alinhamento que fornece o escore de porcentagem de identidade mais alto. Tal alinhamento pode ser realizado utilizando programas de análise de sequências conhecidos. Em uma modalidade, um alinhamento com CLUSTAL (tal como CLUSTALW) sob parâmetros pré-estabelecidos é utilizado para identificar toxinas do tipo selvagem adequadas através da comparação da sequência de

busca contra a sequência de referência. A numeração relativa dos resíduos de aminoácidos conservados se baseia na numeração dos resíduos da sequência de aminoácidos de referência para considerar pequenas inserções ou deleções (por exemplo, cinco aminoácidos menos) dentro da sequência alinhada.

[00291] Como utilizado aqui, o termo "de acordo com a numeração de" refere-se à numeração dos resíduos de uma sequência de referência quando o certo aminoácido ou a polissequência de nucleotídeos é comparada com a sequência de referência. Em outras palavras, o número ou a posição do resíduo de certo polímero é denominado em relação à sequência de referência ao invés de através da posição numérica real do resíduo dentro do certo aminoácido ou polissequência de nucleotídeos.

[00292] Por exemplo, certa sequência de aminoácidos, tal como aquela de uma cepa de *C. difficile* do tipo selvagem hipervirulente, pode ser alinhada com uma sequência de referência (por exemplo, tal como aquela de uma cepa histórica de *C. difficile* do tipo selvagem, por exemplo, 630) através da introdução de espaços, se necessário, para otimizar as combinações de resíduos entre as duas sequências. Nestes casos, embora os espaços estejam presentes, a numeração do resíduo no certo aminoácido ou polissequência de nucleotídeos é feita em relação à sequência de referência com a qual está sendo alinhada. Como utilizado aqui, uma "sequência de referência" refere-se a uma sequência definida utilizada como uma base para uma comparação de sequências.

[00293] A não ser que seja citado o contrário, todas as referências contidas aqui às posições de aminoácidos de uma TcdA referem-se à numeração da SEQ ID NO: 1. A não ser que seja citado o contrário, todas as referências contidas aqui às posições de aminoácidos de uma TcdB referem-se à numeração da SEQ ID NO: 2.

[00294] O domínio de glucosiltransferase de TcdA, como utilizado aqui, pode começar nos exemplos de resíduo 1, 101 ou 102 e pode terminar nos exemplos de resíduo 542, 516 ou 293 de uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem, por exemplo, SEQ ID NO: 1. Qualquer posição de resíduo mínima pode ser combinada com uma posição de resíduo máxima entre os resíduos 1 e 542 de TcdA para definir uma sequência para o domínio de glucosiltransferase contanto que a região do motivo DXD seja incluída. Por exemplo, em uma modalidade, o domínio de glucosiltransferase de TcdA inclui a SEQ ID NO: 27, que é idêntica aos resíduos 101-293 da SEQ ID NO: 1 e inclui a região do motivo DXD. Em outra modalidade, o domínio de glucosiltransferase de TcdA inclui a SEQ ID NO: 28, que é idêntica aos resíduos 1-542 da SEQ ID NO: 1.

[00295] O domínio de glucosiltransferase de TcdB, como utilizado aqui, pode começar nos exemplos de resíduo 1, 101 ou 102 e pode terminar nos exemplos de resíduo 543, 516 ou 293 de uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem, por exemplo, SEQ ID NO: 2. Qualquer posição de resíduo mínima pode ser combinada com uma posição de resíduo máxima entre os resíduos 1 e 543 de TcdB para definir uma sequência para o domínio de glucosiltransferase contanto que a região do motivo DXD seja incluída. Por exemplo, em uma modalidade, o domínio de glucosiltransferase de TcdB inclui a SEQ ID NO: 29, que é idêntica aos resíduos 101-293 da SEQ ID NO: 2 e inclui a região do motivo DXD. Em outra modalidade, o domínio de glucosiltransferase de TcdB inclui a SEQ ID NO: 30, que é idêntica aos resíduos 1-543 da SEQ ID NO: 2.

[00296] Sem ficar ligado a uma teoria ou um mecanismo, acredita-se que o terminal N de TcdA e/ou TcdB seja clivado através de um processo autoproteolítico para o domínio de glucosiltransferase que será translocado e liberado dentro do citosol da célula hospedeira,

onde pode interagir com as GTPases Rac/Ras/Rho. Foi mostrado que a TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem é clivada entre L542 e S543. Foi mostrado que a TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem é clivada entre L543 e G544.

[00297] O domínio de cisteína protease está associado com a atividade proteolítica autocatalítica da toxina. O domínio de cisteína protease fica localizado a jusante do domínio da glucosiltransferase e pode ser **CARACTERIZADO** pela tríade catalítica aspartato, histidina e cisteína (*DHC*), por exemplo, D589, H655 e C700 de uma TcdA do tipo selvagem e D587, H653 e C698 de uma TcdB do tipo selvagem. Sem ficar ligado a um mecanismo ou uma teoria, acredita-se que a tríade catalítica é conservada entre a toxina de uma cepa "histórica", tal como 630 e uma TcdB de uma cepa hipervirulenta, tal como R20291.

[00298] O domínio de cisteína protease de TcdA, como utilizado aqui, pode começar no exemplo de resíduo 543 e pode terminar nos exemplos de resíduo 809 769, 768 ou 767 de uma TcdA do tipo selvagem, por exemplo, SEQ ID NO: 1. Qualquer posição de resíduo mínima pode ser combinada com uma posição de resíduo máxima entre 543 e 809 de uma TcdA do tipo selvagem para definir uma sequência para o domínio de cisteína protease contanto que a região do motivo de tríade DHC catalítica seja incluída. Por exemplo, em uma modalidade, o domínio de cisteína protease de TcdA inclui a SEQ ID NO: 32, que possui a região do motivo DHC localizada nos resíduos 47, 113 e 158 da SEQ ID NO: 32, que correspondem respectivamente a D589, H655 e C700 de uma TcdA do tipo selvagem de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1. A SEQ ID NO: 32 é idêntica aos resíduos 543 até 809 da SEQ ID NO: 1, TcdA.

[00299] O domínio de cisteína protease de TcdB, como utilizado aqui, pode começar no exemplo de resíduo 544 e pode terminar nos

exemplos de resíduo 801, 767, 755 ou 700 de uma TcdB do tipo selvagem, por exemplo, SEQ ID NO: 2. Qualquer posição de resíduo mínima pode ser combinada com uma posição de resíduo máxima entre 544 e 801 de uma TcdB do tipo selvagem para definir uma sequência para o domínio de cisteína protease contanto que a região do motivo de tríade DHC catalítica seja incluída. Por exemplo, em uma modalidade, o domínio de cisteína protease de TcdB inclui a SEQ ID NO: 33, que inclui a região do motivo DHC localizada nos resíduos 44, 110 e 115 da SEQ ID NO: 33, que correspondem respectivamente a D587, H653 e C698 de uma TcdB do tipo selvagem de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2. A SEQ ID NO: 33 é idêntico aos resíduos 544 até 767 da SEQ ID NO: 2, TcdB. Em outra modalidade, o domínio de cisteína protease de TcdB inclui os resíduos 544-801 da SEQ ID NO: 2, TcdB.

[00300] Na presente invenção, a composição imunogênica inclui uma toxina de *C. difficile* mutante. O termo "mutante", como utilizado aqui, refere-se a uma molécula que exibe uma estrutura ou uma sequência que difere da estrutura ou da sequência do tipo selvagem correspondente, por exemplo, possuindo reticulações quando comparada com a estrutura do tipo selvagem correspondente e/ou possuindo pelo menos uma mutação, quando comparada com a sequência do tipo selvagem correspondente quando alinhada de forma ótima, tal como através dos programas GAP ou BESTFIT utilizando pesos de espaços pré-estabelecidos. O termo "mutante" como utilizado aqui inclui ainda uma molécula que exibe uma propriedade funcional (por exemplo, glucosiltransferase anulada e/ou atividade de cisteína protease anulada) que difere daquela da molécula do tipo selvagem correspondente.

[00301] Uma toxina de *C. difficile* de qualquer uma das cepas do tipo selvagem descritas anteriormente pode ser utilizada como uma

fonte partindo da qual uma toxina de *C. difficile* mutante é produzida. Preferencialmente, *C. difficile* 630 é a fonte partindo da qual uma toxina de *C. difficile* mutante é produzida.

[00302] A mutação pode envolver uma substituição, uma deleção, um truncamento, ou uma modificação do resíduo de aminoácido do tipo selvagem normalmente localizado em tal posição. Preferencialmente, a mutação é uma substituição de aminoácido não conservativa. A presente invenção também considera polinucleotídeos isolados que incluem sequências de ácido nucléico que codificam as toxinas mutantes descritas aqui.

[00303] Uma substituição de aminoácido "não conservativa", como utilizado aqui, refere-se a uma troca de um aminoácido de uma classe por um aminoácido de outra classe, de acordo com a Tabela 3 a seguir:

Tabela 3: Classes de Aminoácidos	
Classe	Aminoácido
Não polar:	Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Met (M), Phe (F), Trp (W)
Polar não carregado:	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)

[00304] Os exemplos de uma substituição de aminoácido não conservativa incluem uma substituição em que um resíduo de ácido aspártico (Asp, D) é substituído por um resíduo de alanina (Ala, A). Outros exemplos incluem a substituição de um resíduo de ácido aspártico (Asp, D) por um resíduo de asparagina (Asn, N); a substituição de um resíduo de arginina (Arg, R), ácido glutâmico (Glu, E), lisina (Lys, K) e/ou histidina (His, H) por um resíduo de alanina (Ala, A).

[00305] Uma substituição conservativa refere-se a uma troca entre aminoácidos da mesma classe, por exemplo, de acordo com a Tabela 3.

[00306] As toxinas mutantes da invenção podem ser preparadas através de técnicas conhecidas na arte para a preparação de mutações, tais como, por exemplo, mutagênese direcionada ao sítio, mutagênese utilizando um agente mutagênico (por exemplo, luz UV) etc. Preferencialmente, é utilizada a mutagênese direcionada ao sítio. Alternativamente, uma molécula de ácido nucléico que possui uma sequência de objetivo pode ser sintetizada diretamente. Tais métodos de síntese química são conhecidos na arte.

[00307] Na presente invenção, a toxina de *C. difficile* mutante inclui pelo menos uma mutação em um domínio de glucosiltransferase, em relação à toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Em uma modalidade, o domínio de glucosiltransferase inclui pelo menos duas mutações. Preferencialmente, a mutação diminui ou anula a atividade da enzima glucosiltransferase da toxina, quando comparada com a atividade da enzima glucosiltransferase da toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[00308] Os exemplos de resíduos de aminoácidos em um domínio de glucosiltransferase de TcdA que podem sofrer uma mutação incluem pelo menos um dos seguintes ou qualquer combinação dos mesmos: W101, D269, R272, D285, D287, E460, R462, S541 e L542, quando comparada com uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1.

[00309] Os exemplos de mutações em um domínio de glucosiltransferase de TcdA incluem pelo menos uma das seguintes ou qualquer combinação das mesmas: W101A, D269A, R272A, D285A, D287A, E460A, R462A, S541A e L542G, quando comparada com uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem. Em uma modalidade preferida, o

domínio de glucosiltransferase de TcdA inclui uma mutação L542G, quando comparado com uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem. Em outra modalidade preferida, o domínio de glucosiltransferase de TcdA inclui uma mutação D285A e uma D287A, quando comparada com uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem.

[00310] Os exemplos de resíduos de aminoácidos em um domínio de glucosiltransferase de TcdB que podem sofrer uma mutação incluem pelo menos um dos seguintes ou qualquer combinação dos mesmos: W102, D270, R273, D286, D288, N384, D461, K463, W520 e L543, quando comparada com uma toxina B de *C. difficile* do tipo selvagem, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2.

[00311] Os exemplos de mutações em um domínio de glucosiltransferase de TcdB incluem pelo menos uma das seguintes ou qualquer combinação das mesmas: W102A, D270A, D270N, R273A, D286A, D288A, N384A, D461A, D461R, K463A, K463E, W520A e L543A, quando comparada a uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem. Em uma modalidade preferida, o domínio de glucosiltransferase de TcdB inclui uma L543A, quando comparada a uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem. Em outra modalidade preferida, o domínio de glucosiltransferase de TcdB inclui uma mutação D286A e uma D288A, quando comparada a uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem.

[00312] Qualquer uma das mutações descritas aqui anteriormente pode ser combinada com uma mutação em um domínio de cisteína protease. Na presente invenção, a toxina de *C. difficile* mutante inclui pelo menos uma mutação em um domínio de cisteína protease, em relação à toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Preferencialmente, a mutação diminui ou anula a atividade de cisteína protease da toxina, quando comparada com a atividade de cisteína protease da toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[00313] Os exemplos de resíduos de aminoácidos em um domínio de cisteína protease de TcdA que podem sofrer uma mutação incluem pelo menos um dos seguintes ou qualquer combinação dos mesmos: S543, D589, H655 e C700, quando comparada com uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1. Os exemplos de mutações em um domínio de glucosiltransferase de TcdA incluem pelo menos um dos seguintes ou qualquer combinação dos mesmos: S543A, D589A, D589N, H655A, C700A, quando comparada com uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem. Em uma modalidade preferida, o domínio de cisteína protease de TcdA inclui uma mutação C700A, quando comparada com uma TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem.

[00314] Os exemplos de resíduos de aminoácidos em um domínio de cisteína protease de TcdB que podem sofrer uma mutação incluem pelo menos um dos seguintes ou qualquer combinação dos mesmos: G544, D587, H653 e C698, quando comparada a uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2. Os exemplos de mutações em um domínio de glucosiltransferase de TcdB incluem pelo menos uma das seguintes ou qualquer combinação das mesmas: G544A, D587A, D587N, H653A, C698A, quando comparada a uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem. Em uma modalidade preferida, o domínio de cisteína protease de TcdB inclui uma mutação C698A, quando comparada a uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem. Os resíduos de aminoácidos adicionais em um domínio de cisteína protease de TcdB que podem sofrer uma mutação incluem: K600 e/ou R751, quando comparada a uma TcdB do tipo selvagem. Os exemplos de mutações incluem K600E e/ou R751E.

[00315] Consequentemente, a toxina de *C. difficile* mutante da invenção inclui um domínio de glucosiltransferase que possui uma mutação e um domínio de cisteína protease que possui uma mutação,

em relação à toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[00316] Um exemplo de TcdA de *C. difficile* mutante inclui um domínio de glucosiltransferase que inclui a SEQ ID NO: 29 que possui uma substituição de aminoácido nas posições 285 e 287 e um domínio de cisteína protease que compreende a SEQ ID NO: 32 que possui uma substituição de aminoácido na posição 158, em relação à toxina A de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Por exemplo, tal TcdA de *C. difficile* mutante inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, em que a metionina inicial opcionalmente não está presente. Em outra modalidade, a toxina A mutante de *C. difficile* mutante inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 84.

[00317] Os exemplos adicionais de uma toxina A de *C. difficile* mutante incluem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 7, que possui uma mutação D269A, R272A, D285A, D287A, E460A, R462A e C700A, quando comparada com a SEQ ID NO: 1, em que a metionina inicial opcionalmente não está presente. Em outra modalidade, a toxina A mutante de *C. difficile* mutante inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 83.

[00318] Outros exemplos de TcdA mutante incluem a SEQ ID NO: 34, em que o resíduo nas posições 101, 269, 272, 285, 287, 460, 462, 541, 542, 543, 589, 655 e 700 pode ser qualquer aminoácido.

[00319] Em algumas modalidades, a toxina de *C. difficile* mutante exibe processamento autoproteolítico diminuído ou anulado quando comparada com a toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Por exemplo, uma TcdA de *C. difficile* mutante pode incluir uma mutação em um dos resíduos a seguir ou qualquer combinação dos mesmos: S541, L542 e/ou S543, quando comparada com a TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Preferencialmente, a TcdA de *C. difficile* mutante inclui pelo menos

uma das mutações a seguir ou qualquer combinação das mesmas: S541A, L542G e S543A, quando comparada com a TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[00320] Outros exemplos de TcdA de *C. difficile* mutante inclui uma mutação S541A, L542, S543 e C700, quando comparada com a TcdA de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[00321] Um exemplo de toxina B de *C. difficile* mutante inclui um domínio de glucosiltransferase que compreende a SEQ ID NO: 31 que possui uma substituição de aminoácido nas posições 286 e 288 e um domínio de cisteína protease que compreende a SEQ ID NO: 33 que possui uma substituição de aminoácido na posição 155, em relação à toxina B de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Por exemplo, tal TcdB de *C. difficile* mutante inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que a metionina inicial opcionalmente não está presente. Em outra modalidade, a toxina A mutante de *C. difficile* mutante inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 86.

[00322] Os exemplos adicionais de uma TcdB de *C. difficile* mutante incluem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 8, que possui uma mutação D270A, R273A, D286A, D288A, D461A, K463A e C698A, quando comparada com a SEQ ID NO: 2. A SEQ ID NO: 8 em que a metionina inicial opcionalmente não está presente. Em outra modalidade, a toxina A mutante de *C. difficile* mutante inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 85.

[00323] Outros exemplos de TcdB mutante incluem a SEQ ID NO: 35, em que o resíduo nas posições 101, 269, 272, 285, 287, 460, 462, 541, 542, 543, 589, 655 e 700 pode ser qualquer aminoácido.

[00324] Como outro exemplo, uma TcdB de *C. difficile* mutante pode incluir uma mutação nas posições 543 e/ou 544, quando comparada com a TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem

correspondente. Preferencialmente, a TcdB de *C. difficile* mutante inclui uma mutação L543 e/ou G544, quando comparada com a TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Mais preferencialmente, a TcdB de *C. difficile* mutante inclui uma mutação L543G e/ou G544A, quando comparada com a TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[00325] Outros exemplos de TcdB de *C. difficile* mutante incluem uma mutação L543G, G544A e C698, quando comparada com a TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente.

[00326] Em um aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado que possui uma mutação em qualquer posição desde o resíduo de aminoácido 1 até 1500 de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2, para definir um exemplo de toxina B de *C. difficile* mutante. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui uma mutação entre os resíduos de aminoácidos 830 e 990 da SEQ ID NO: 2. Os exemplos de posições para mutações incluem as posições 970 e 976 de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2. Preferencialmente, a mutação entre os resíduos 830 e 990 é uma substituição. Em uma modalidade, a mutação é uma substituição não conservativa em que um resíduo de aminoácido Asp (D) e/ou a Glu (E) é substituído por um resíduo de aminoácido que não é neutralizado após a acidificação, tal como, por exemplo, lisina (K), arginina (R) e histidina (H). Os exemplos de mutações incluem: E970K, E970R, E970H, E976K, E976R, E976H da SEQ ID NO: 2, para definir uma toxina B de *C. difficile* mutante.

[00327] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado que possui uma mutação em qualquer posição desde o resíduo de aminoácido 1 até 1500 de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1, para definir um exemplo de toxina A de *C. difficile* mutante. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo isolado

inclui uma mutação entre os resíduos de aminoácidos 832 e 992 da SEQ ID NO: 1. Os exemplos de posições para mutações incluem as posições 972 e 978 de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1. Preferencialmente, a mutação entre os resíduos 832 e 992 é uma substituição. Em uma modalidade, a mutação é uma substituição não conservativa em que um resíduo de aminoácido Asp (D) e/ou a Glu (E) é substituído por um resíduo de aminoácido que não é neutralizado após a acidificação, tal como, por exemplo, lisina (K), arginina (R) e histidina (H). Os exemplos de mutações incluem: D972K, D972R, D972H, D978K, D978R, D978H da SEQ ID NO: 1, para definir uma toxina A de *C. difficile* mutante.

[00328] Os polipeptídeos da invenção podem incluir um resíduo de metionina inicial, em alguns casos como um resultado de um processo mediado por células hospedeiras. Dependendo, por exemplo, da célula hospedeira utilizada em um procedimento de produção recombinante e/ou na fermentação ou nas condições de crescimento da célula hospedeira, é sabido na arte que a metionina N-terminal codificada pelo códon de início da tradução pode ser removida de um polipeptídeo após a tradução nas células ou a metionina N-terminal pode permanecer presente no polipeptídeo isolado.

[00329] Consequentemente, em um aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado que inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, em que a metionina inicial (na posição 1) opcionalmente não está presente. Em uma modalidade, a metionina inicial da SEQ ID NO: 4 está ausente. Em um aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado que inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 84, que é idêntica à SEQ ID NO: 4, menos pela ausência da metionina inicial.

[00330] Em outro aspecto, o polipeptídeo isolado inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que a metionina

inicial (na posição 1) opcionalmente não está presente. Em uma modalidade, a metionina inicial da SEQ ID NO: 6 está ausente. Em um aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado que inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 86, que é idêntica à SEQ ID NO: 6, menos pela ausência da metionina inicial.

[00331] Em um aspecto adicional, o polipeptídeo isolado inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 7, em que a metionina inicial (na posição 1) opcionalmente não está presente. Em uma modalidade, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado que inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 83, que é idêntica à SEQ ID NO: 7, menos pela ausência da metionina inicial. Ainda em outro aspecto, o polipeptídeo isolado inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 8, em que a metionina inicial (na posição 1) opcionalmente não está presente. Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado inclui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 85, que é idêntica à SEQ ID NO: 8, menos pela ausência da metionina inicial.

[00332] Em um aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 4, em que a metionina inicial (na posição 1) opcionalmente não está presente. Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6, em que a metionina inicial (na posição 1) opcionalmente não está presente. Em um aspecto adicional, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 7, em que a metionina inicial (na posição 1) opcionalmente não está presente. Ainda em outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 8, em que a metionina inicial (na posição 1) opcionalmente não está presente.

[00333] Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 83. Em um aspecto, a invenção

refere-se a uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 84. Em um aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 85. Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 86.

[00334] Em adição a gerar uma resposta imunológica em um mamífero, as composições imunogênicas descritas aqui também possuem citotoxicidade reduzida comparadas com a toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Preferencialmente, as composições imunogênicas são seguras e possuem toxicidade mínima (por exemplo, aproximadamente uma redução de 6-8 log₁₀) até nenhuma, em relação à citotoxicidade de uma toxina do tipo selvagem respectiva, para administração em mamíferos.

[00335] Como utilizado aqui, o termo citotoxicidade é um termo entendido na arte e refere-se a uma morte celular apoptótica e/ou um estado em que uma ou mais funções bioquímicas ou biológicas usuais de uma célula estão aberrantemente comprometidas, quando comparada a uma célula idêntica sob condições idênticas, mas na ausência do agente citotóxico. A toxicidade pode ser quantificada, por exemplo, nas células ou nos mamíferos como a quantidade de um agente necessária para induzir 50% de morte celular (isto é, EC₅₀ ou ED₅₀, respectivamente) ou através de outros métodos conhecidos na arte.

[00336] Os ensaios para a indicação da citotoxicidade são conhecidos na arte, tais como ensaios de arredondamento de células (ver, por exemplo, Kuehne e outros *Nature*. 2010 Oct 7;467(7316):711-3). A ação de TcdA e TcdB faz com que as células fiquem arredondadas (por exemplo, percam a morfologia) e morram e tal fenômeno é visível por microscopia em luz visível. Ver, por exemplo, a Figura 9.

[00337] Exemplos adicionais de ensaios de citotoxicidade

conhecidos na arte incluem ensaios de glicosilação em relação a ensaios de obtenção de imagens com fósforo de Ras marcado com [^{14}C]glicose (como descrito em Busch e outros, J Biol Chem. 1998 Jul 31;273(31):19566-72) e preferencialmente o ensaio de citotoxicidade *in vitro* descrito nos Exemplos a seguir em que a EC_{50} pode se referir à concentração de uma composição imunogênica que exibe pelo menos aproximadamente 50% de efeito citopatogênico (CPE) em uma célula, preferencialmente uma célula de fibroblasto diploide humana (por exemplo, célula IMR90 (ATCC CCL-186TM), quando comparada com uma célula idêntica sob condições idênticas na ausência da toxina. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* também pode ser utilizado para avaliar a concentração de uma composição que inibe pelo menos aproximadamente 50% de um efeito citopatogênico (CPE) induzido por uma toxina de *C. difficile* do tipo selvagem em uma célula, preferencialmente uma célula de fibroblasto diploide humana (por exemplo, célula IMR90 (ATCC CCL-186TM), quando comparada com uma célula idêntica sob condições idênticas na ausência de the toxina. Exemplos adicionais de ensaios de citotoxicidade incluem aqueles descritos em Doern e outros, J Clin Microbiol. 1992 Aug;30(8):2042-6. A citotoxicidade também pode ser determinada através da medida dos níveis de ATP nas células tratadas com toxina. Por exemplo, pode ser utilizado um substrato à base de luciferase tal como CELLTITERGLO® (Promega), que emite luminescência medida como uma unidade de luz relativa (RLU). Em tal ensaio, a viabilidade celular pode ser diretamente proporcional à quantidade de ATP nas células ou aos valores de RLU.

[00338] Em uma modalidade, a citotoxicidade de uma composição imunogênica é reduzida em pelo menos aproximadamente 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000 vezes, 14000 vezes, 15000 vezes ou mais, quando comparada

com a toxina de *C. difficile* do tipo selvagem correspondente. Ver, por exemplo, a Tabela 20.

[00339] Em outra modalidade, a citotoxicidade de uma composição imunogênica é reduzida em pelo menos aproximadamente 2-log_{10} , mais preferencialmente em aproximadamente 3-log_{10} e mais preferencialmente em aproximadamente 4-log_{10} ou mais, em relação à toxina do tipo selvagem correspondente sob condições idênticas. Por exemplo, uma TcdB de *C. difficile* mutante pode ter um valor de EC_{50} de aproximadamente 10^{-9} g/mL quando medida em um ensaio de efeito citopático (CPE) padronizado, quando comparada com um exemplo de TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem que pode ter um valor de EC_{50} de pelo menos aproximadamente 10^{-12} g/mL. Ver, por exemplo, as Tabelas 7A, 7B, 8A e 8B na seção de Exemplos a seguir.

[00340] Ainda em outra modalidade, a citotoxicidade da toxina de *C. difficile* mutante possui uma EC_{50} de pelo 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 ou maior, que é medida, por exemplo, por um ensaio de citotoxicidade *in vitro*, tal como um descrito aqui. Consequentemente, em uma modalidade preferida, as composições imunogênicas e as toxinas mutantes são biologicamente seguras para administração a mamíferos.

[00341] Sem ficar ligado a um mecanismo ou uma teoria, uma TcdA que possui uma mutação D285 e D287, quando comparada a uma TcdA do tipo selvagem e uma TcdB que possui uma mutação D286 e a D288, quando comparada a uma TcdB do tipo selvagem, eram esperadas como sendo defeituosas na atividade de glicosiltransferase, e, portanto, defeituosa na indução de um efeito citopático. Em adição, uma toxina que possui uma mutação no motivo DHC era esperada como sendo defeituosa no processamento autocatalítico e, portanto, não ter quaisquer efeitos citotóxicos.

[00342] Entretanto, os inventores descobriram de forma surpreendente, entre outras coisas, que os exemplos de TcdA mutante que possuem a SEQ ID NO: 4 e os exemplos de TcdB mutante que possuem a SEQ ID NO: 6 exibiam de forma inesperada citotoxicidade (embora significativamente reduzida daquelas das toxinas de *C. difficile* 630 do tipo selvagem) apesar de exibirem atividade de glucosiltransferase disfuncional e atividade de cisteína protease disfuncional. Sem ficar ligado a um mecanismo ou uma teoria, acredita-se que as toxinas mutantes efetuam a citotoxicidade através de um novo mecanismo. Todavia, os exemplos de TcdA mutante que possuem a SEQ ID NO: 4 e os exemplos de TcdB mutante que possuem a SEQ ID NO: 6 eram surpreendentemente imunogênicas. Ver os Exemplos a seguir.

[00343] Embora a reticulação química de uma toxina do tipo selvagem ter um potencial em falhar na inativação da toxina, os inventores descobriram ainda que a reticulação quimicamente de pelo menos um aminoácido de uma toxina mutante reduzia adicionalmente a citotoxicidade da toxina mutante, em relação a uma toxina mutante idêntica que não possui reticulações químicas e em relação à toxina do tipo selvagem correspondente. Preferencialmente, a toxina mutante é purificada antes do contado com o agente de reticulação química.

[00344] Além disso, apesar de um potencial de agentes de reticulação química de alterar epítomos úteis, os inventores descobriram de forma surpreendente que uma toxina de *C. difficile* mutante modificada geneticamente que possui pelo menos um aminoácido quimicamente reticulado resultava em composições imunogênicas que ativavam vários anticorpos neutralizadores ou fragmentos de ligação dos mesmos. Consequentemente, os epítomos associados com as moléculas de anticorpo neutralizador eram inesperadamente mantidos após a reticulação química.

[00345] Reticulação (também referida como "inativação química" ou "inativação" aqui) é um processo de ligar quimicamente duas ou mais moléculas através de uma ligação covalente. Os termos "reagentes de reticulação", "agentes de reticulação" e "reticuladores" referem-se a moléculas que são capazes de reagir com e/ou se ligar quimicamente a grupos funcionais específicos (aminas primárias, sulfidrilas, carboxilas, carbonilas etc) on peptídeos, polipeptídeos e/ou proteínas. Em uma modalidade, a molécula pode conter duas ou mais extremidades reativas que são capazes de reagir com e/ou se ligar quimicamente a grupos funcionais específicos (aminas primárias, sulfidrilas, carboxilas, carbonilas etc) sobre peptídeos, polipeptídeos e/ou proteínas. Preferencialmente, o agente de reticulação química é solúvel em água. Em outra modalidade preferida, o agente de reticulação química é um agente de reticulação heterobifuncional. Em outra modalidade, o agente de reticulação química não é um agente de reticulação bifuncional. Os agentes de reticulação química são conhecidos na arte.

[00346] Em uma modalidade preferida, o agente de reticulação é um agente de reticulação de comprimento zero. Um agente de reticulação "de comprimento zero" refere-se a um agente de reticulação que mediará ou produzirá uma ligação cruzada direta entre grupos funcionais de duas moléculas. Por exemplo, na reticulação de dois polipeptídeos, um agente de reticulação de comprimento zro resultará na formação de uma ponte ou uma ligação cruzada entre um grupo carboxila de uma cadeia lateral de aminoácido de um polipeptídeo e um grupo amino de outro polipeptídeo, sem a integração de matéria extrínseca. Os agentes de reticulação de comprimento zero podem catalisar, por exemplo, a formação de ligações éster entre grupamentos hidroxila e carboxila e/ou a formação de ligações amida entre grupamentos carboxila e amino primários.

[00347] Os exemplos de agentes de reticulação química adequados incluem formaldeído; formalina; acetaldeído; propionaldeído; carbodiimidas solúveis em água ($RN=C=NR'$), que incluem 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)-Carbodiimida (EDC), Cloridrato de 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)-Carbodiimida, 1-Ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida meto-p-toluenossulfonato (CMC), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) e derivados dos mesmos; e N-hidroxissuccinimida (NHS); fenilglioxal; e/ou UDP-dialdeído.

[00348] Preferencialmente, o agente de reticulação é EDC. Quando um polipeptídeo de toxina de *C. difficile* mutante for quimicamente modificado por EDC (por exemplo, através do contato do polipeptídeo com EDC), em uma modalidade, o polipeptídeo inclui (a) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo. Em uma modalidade, o polipeptídeo inclui (b) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo. Em uma modalidade, o polipeptídeo inclui (c) pelo menos uma reticulação entre o grupo carboxila no terminal C do polipeptídeo e o grupo amino no terminal N do polipeptídeo. Em uma modalidade, o polipeptídeo inclui (d) pelo menos uma reticulação entre o grupo carboxila no terminal C do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo. Em uma modalidade, o polipeptídeo inclui (e) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um segundo polipeptídeo isolado. Em uma modalidade, o polipeptídeo inclui (f) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um

segundo polipeptídeo isolado. Em uma modalidade, o polipeptídeo inclui (g) pelo menos uma reticulação entre o grupo carboxila no terminal C do polipeptídeo e o grupo amino no terminal N de um segundo polipeptídeo isolado. Em uma modalidade, o polipeptídeo inclui (h) pelo menos uma reticulação entre o grupo carboxila no terminal C do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um segundo polipeptídeo isolado. Ver, por exemplo, a Figura 24 e a Figura 25.

[00349] O "segundo polipeptídeo isolado" refere-se a qualquer polipeptídeo isolado que está presente durante a reação com EDC. Em uma modalidade, o segundo polipeptídeo isolado é um polipeptídeo de toxina de *C. difficile* mutante que possui uma sequência idêntica àquela do primeiro polipeptídeo isolado. Em outra modalidade, o segundo polipeptídeo isolado é um polipeptídeo de toxina de *C. difficile* mutante que possui uma sequência diferente daquela do primeiro polipeptídeo isolado.

[00350] Em uma modalidade, o polipeptídeo inclui pelo menos duas modificações selecionadas das modificações (a)-(d). Em um exemplo de modalidade, o polipeptídeo inclui (a) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo e (b) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo. Em uma modalidade adicional, o polipeptídeo inclui pelo menos três modificações selecionadas das modificações (a)-(d). Ainda em uma modalidade adicional, o polipeptídeo inclui as modificações (a), (b), (c) e (d).

[00351] Quando mais de um polipeptídeo mutante estiver presente durante a modificação química por EDC, em uma modalidade, a composição resultante inclui pelo menos uma de qualquer uma das

modificações (a)-(h). Em uma modalidade, a composição inclui pelo menos duas modificações selecionadas das modificações (a)-(h). Em uma modalidade adicional, a composição inclui pelo menos três modificações selecionadas das modificações (a)-(h). Ainda em uma modalidade adicional, a composição inclui pelo menos quatro modificações selecionadas das modificações (a)-(h). Em outra modalidade, a composição inclui pelo menos uma de cada das modificações (a)-(h).

[00352] Em um exemplo de modalidade, a composição resultante inclui (a) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo; e (b) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo. Em uma modalidade, a composição inclui ainda (c) pelo menos uma reticulação entre o grupo carboxila no terminal C do polipeptídeo e o grupo amino no terminal N do polipeptídeo; e (d) pelo menos uma reticulação entre o grupo carboxila no terminal C do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo.

[00353] Em outros exemplos de modalidade, a composição resultante inclui (e) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um segundo polipeptídeo isolado; (f) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um segundo polipeptídeo isolado; (g) pelo menos uma reticulação entre o grupo carboxila no terminal C do polipeptídeo e o grupo amino no terminal N de um segundo polipeptídeo isolado; e (h) pelo menos uma reticulação entre o grupo carboxila no terminal C do

polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um segundo polipeptídeo isolado.

[00354] Em um exemplo adicional de modalidade, a composição resultante inclui (a) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo; (b) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo; (c) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um segundo polipeptídeo isolado; e (d) pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina de um segundo polipeptídeo isolado.

[00355] Em uma modalidade preferida, o agente de reticulação química inclui formaldeído, mais preferencialmente, um agente que inclui formaldeído na ausência de lisina. Glicina ou outro composto apropriado com uma amina primária pode ser utilizado como o agente de extinção nas reações de reticulação. Consequentemente, em outra modalidade preferida, o agente químico inclui formaldeído e o uso de glicina.

[00356] Ainda em outra modalidade preferida, o agente de reticulação química inclui EDC e NHS. Como é conhecido na arte, NHS pode ser incluído nos protocolos de acoplamento de EDC. Entretanto, os inventores descobriram de forma surpreendente que NHS pode facilitar na diminuição adicional da citotoxicidade da toxina de C. difficile mutante, quando comparada com a toxina do tipo selvagem correspondente, quando comparada com uma toxina mutada geneticamente e quando comparada com uma toxina mutada geneticamente que foi quimicamente reticulada por EDC. Ver, por

exemplo, o Exemplo 22. Consequentemente, sem ficar ligado a um mecanismo ou uma teoria, um polipeptídeo de toxina mutante que possui um grupamento de beta-alanina ligado a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídeo (por exemplo, resultante de uma reação do polipeptídeo de toxina mutante, EDC e NHS) pode facilitar na diminuição adicional da citotoxicidade da toxina mutante, quando comparada, por exemplo, a uma toxina de *C. difficile* (do tipo selvagem ou mutante) em que um grupamento de beta-alanina está ausente.

[00357] O uso de EDC e/ou NHS também pode incluir o uso de glicina ou outro composto apropriado com uma amina primária como o agente de extinção. Qualquer composto que possui uma amina primária pode ser utilizado como um agente de extinção, tal como, por exemplo, glicina metil éster e alanina. Em uma modalidade preferida, o composto de extinção é uma amina primária hidrofílica não polimérica. Os exemplos de uma amina primária hidrofílica não polimérica incluem, por exemplo, amino açúcares, amino alcoóis e amino polióis. Os exemplos específicos de uma amina primária hidrofílica não polimérica incluem glicina, etanolamina, glucamina, polietileno glicol funcionalizado com amina e oligômeros de etileno glicol funcionalizado com amina.

[00358] Em um aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo de toxina de *C. difficile* mutante que possui pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada por EDC e uma amina primária hidrofílica não polimérica, preferencialmente glicina. Os adutos de glicina resultantes (por exemplo, de uma reação de toxinas mutantes triplas tratadas com EDC, NHS e extinguidas com glicina) podem facilitar na diminuição da citotoxicidade das toxinas A mutantes comparadas com a toxina do tipo selvagem correspondente.

[00359] Em uma modalidade, quando um polipeptídeo de toxina de

C. difficile mutante é quimicamente modificado por EDC e glicina, o polipeptídeo inclui pelo menos uma modificação quando o polipeptídeo é modificado por EDC (por exemplo, pelo menos uma de qualquer uma das modificações (a)-(h) descritas anteriormente) e pelo menos um dos exemplos de modificações a seguir: (i) um grupamento de glicina ligado ao grupo carboxila no terminal C do polipeptídeo; (j) um grupamento de glicina ligado a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo; e (k) um grupamento de glicina ligado a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo. Ver, por exemplo, a Figura 24 e a Figura 25.

[00360] Em uma modalidade, pelo menos um aminoácido da TcdA de C. difficile mutante é quimicamente reticulado e/ou pelo menos um aminoácido da TcdB de C. difficile mutante é quimicamente reticulado. Em outra modalidade, pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 4, da SEQ ID NO: 6, da SEQ ID NO: 7 e/ou da SEQ ID NO: 8 é quimicamente reticulado. Por exemplo, o pelo menos um aminoácido pode ser quimicamente reticulado por um agente que inclui uma carbodiimida, tal como EDC. As carbodiimidas podem formar uma ligação covalente entre grupos carboxila (por exemplo, das cadeias laterais de ácido aspártico e/ou ácido glutâmico) e grupo aminos (por exemplo, na cadeia lateral de resíduos de lisina) livres para formar ligações amida estáveis.

[00361] Como outro exemplo, o pelo menos um aminoácido pode ser quimicamente reticulado por um agente que inclui NHS. Os agentes reticuladores ativados por NHS éster podem reagir com as aminas primárias (por exemplo, no terminal N de cada cadeia polipeptídica e/ou na cadeia lateral dos resíduos de lisina) para fornecer uma ligação amida.

[00362] Em outra modalidade, o pelo menos um aminoácido pode

ser quimicamente reticulado por um agente que inclui EDC e NHS. Por exemplo, em uma modalidade, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente, em que o polipeptídeo inclui pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada por EDC e NHS. Em outra modalidade, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente, em que o polipeptídeo inclui pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada por EDC e NHS. Ainda em outra modalidade, a invenção refere-se a um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 84, na SEQ ID NO: 86, na SEQ ID NO: 83, na SEQ ID NO: 85, na SEQ ID NO: 7 ou na SEQ ID NO: 8. O polipeptídeo é modificado através do contato do polipeptídeo com EDC e NHS. Ver, por exemplo, a Figura 24 e a Figura 25.

[00363] Quando um polipeptídeo de toxina de *C. difficile* mutante é quimicamente modificado por (por exemplo, através do contato com) EDC e NHS, em uma modalidade, o polipeptídeo inclui pelo menos uma modificação quando o polipeptídeo é modificado por EDC (por exemplo, pelo menos uma de qualquer uma das modificações (a)-(h) descritas anteriormente) e (i) um grupamento de beta-alanina ligado a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídeo.

[00364] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo de toxina de *C. difficile* mutante em que o polipeptídeo inclui pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada por EDC, NHS e uma amina primária hidrofílica não polimérica, preferencialmente glicina. Em uma modalidade, o polipeptídeo inclui

pelo menos uma modificação quando o polipeptídeo é modificado por EDC (por exemplo, pelo menos uma de qualquer uma das modificações (a)-(h) descritas anteriormente), pelo menos uma modificação quando o polipeptídeo é modificado por glicina (por exemplo, pelo menos uma de qualquer uma das modificações (i)-(k) descritas anteriormente) e (l) um grupamento de beta-alanina ligado a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídeo. Ver, por exemplo, a Figura 24 e a Figura 25.

[00365] Em um aspecto, a invenção refere-se a um polipeptídeo de toxina de *C. difficile* mutante, em que uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídeo está ligada a um grupamento de beta-alanina. Em uma modalidade, uma cadeia lateral de um segundo resíduo de lisina do polipeptídeo está ligada a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico e/ou a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico. O "segundo" resíduo de lisina do polipeptídeo inclui um resíduo de lisina do polipeptídeo que não está ligado a um grupamento de beta-alanina. A cadeia lateral de um ácido aspártico e/ou a cadeia lateral de um ácido glutâmico ao qual o segundo resíduo de lisina está ligado pode ser aquela do polipeptídeo para formar uma reticulação intramolecular ou aquela de um segundo polipeptídeo para formar uma reticulação intermolecular. Em outra modalidade, uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de ácido aspártico e/ou uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo é ligada a um grupamento de glicina. O resíduo de ácido aspártico e/ou o resíduo ácido glutâmico que é ligado a um grupamento de glicina não está também ligado a um resíduo de lisina.

[00366] Ainda como outro exemplo de um polipeptídeo de toxina de *C. difficile* mutante quimicamente reticulado, o pelo menos um aminoácido pode ser quimicamente reticulado por um agente que

inclui formaldeído. O formaldeído pode reagir com o grupo amino de um resíduo de aminoácido N-terminal e as cadeias laterais de arginina, cisteína, histidina e lisina. O formaldeído e a glicina podem formar um aduto de base de Schiff, que pode se ligar a grupos amino N-terminal primários, resíduos de arginina e de tirosina e até um menor grau resíduos de asparagina, glutamina, histidina e triptofano.

[00367] É dito que um agente de reticulação química reduz a citotoxicidade de uma toxina se a toxina tratada tiver menos toxicidade (por exemplo, aproximadamente 100%, 99%, 95%, 90%, 80%, 75%, 60%, 50%, 25% ou 10% menos toxicidade) do que uma toxina não tratada sob condições diferentes, que é medida, por exemplo, através de um ensaio de citotoxicidade *in vitro* ou através da toxicidade a um animal.

[00368] Preferencialmente, o agente de reticulação química reduz a citotoxicidade da toxina de *C. difficile* mutante em pelo menos aproximadamente uma redução de 2-log₁₀, mais preferencialmente aproximadamente uma redução de 3-log₁₀ e mais preferencialmente aproximadamente a 4-log₁₀ ou mais, em relação à toxina mutante sob condições diferentes, mas na ausência do agente de reticulação química. Quando comparado com a toxina do tipo selvagem, o agente de reticulação química preferencialmente reduz citotoxicidade da toxina mutante em pelo menos aproximadamente uma redução de 5-log₁₀, aproximadamente uma redução de 6-log₁₀, aproximadamente uma redução de 7-log₁₀, aproximadamente uma redução de 8-log₁₀ ou mais.

[00369] Em outra modalidade preferida, a toxina de *C. difficile* mutante quimicamente inativada exibe um valor de EC₅₀ maior que ou pelo menos aproximadamente de 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 ou maior, que é medido, por exemplo, através

de um ensaio de citotoxicidade *in vitro*, tal como um descrito aqui.

[00370] As condições de reação para o contato da toxina mutante com o agente de reticulação química estão dentro do âmbito da especialização de um perito na arte e as condições podem variar dependendo do agente utilizado. Entretanto, os inventores descobriram de forma surpreendente condições de reação ótimas para o contato de um polipeptídeo de toxina de *C. difficile* mutante com um agente de reticulação química, enquanto são mantidos os epítomos funcionais e é diminuída a citotoxicidade da toxina mutante, quando comparada à toxina do tipo selvagem correspondente.

[00371] Preferencialmente, as condições de reação são selecionadas para o contato de uma toxina mutante com o agente de reticulação, em que a toxina mutante possui uma concentração mínima de aproximadamente 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0 mg/mL até uma máxima de aproximadamente 3,0, 2,5, 2,0, 1,5 ou 1,25 mg/mL. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma faixa de concentrações adequadas de uma toxina mutante para a reação. Mais preferencialmente, a toxina mutante possui uma concentração de aproximadamente 1,0 – 1,25 mg/mL para a reação.

[00372] Em uma modalidade, o agente utilizado na reação possui uma concentração mínima de aproximadamente 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM ou 50 mM e uma concentração máxima de aproximadamente 100 mM, 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM ou 50 mM. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma faixa de concentrações adequadas do agente químico para a reação.

[00373] Em uma modalidade preferida em que o agente inclui formaldeído, a concentração utilizada é preferencialmente qualquer concentração entre aproximadamente 2 mM até 80 mM, mais

preferencialmente aproximadamente 40 mM. Em outra modalidade preferida em que o agente inclui EDC, a concentração utilizada é preferencialmente qualquer concentração entre aproximadamente 1,3 mM até aproximadamente 13 mM, mais preferencialmente aproximadamente 2 mM até 3 mM, mais preferencialmente aproximadamente 2,6 mM.

[00374] Os exemplos de tempos de reação em que a toxina mutante é colocada em contato com o agente de reticulação química incluem um mínimo de aproximadamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 36, 48 ou 60 horas e um máximo de aproximadamente 14 dias, 12 dias, 10 dias, 7 dias, 5 dias, 3 dias, 2 dias, 1 dia ou 12 horas. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma faixa de tempos de reação adequados.

[00375] Em uma modalidade preferida, a etapa de contato da toxina mutante com o agente de reticulação química ocorre durante um período de tempo que é suficiente para reduzir a citotoxicidade da toxina de *C. difficile* mutante até um valor de EC₅₀ de pelo menos aproximadamente 1000 µg/mL em uma célula humana adequada, por exemplo, células IMR-90, em um ensaio de citotoxicidade *in vitro* padronizado, quando comparada a uma toxina mutante idêntica na ausência do agente de reticulação. Mais preferencialmente, a etapa de reação é realizada durante um período de tempo que é pelo menos duas vezes mais longo e mais preferencialmente pelo menos três vezes mais longo ou mais, que o período de tempo suficiente para reduzir a citotoxicidade da toxina mutante até um valor de EC₅₀ de pelo menos aproximadamente 1000 µg/mL em uma célula humana adequada. Em uma modalidade, o tempo de reação não excede aproximadamente 168 horas (ou 7 dias).

[00376] Por exemplo, em uma modalidade em que o agente inclui formaldeído, a toxina mutante é preferencialmente colocada em

contato com o agente durante aproximadamente 12 horas, que foi mostrado como sendo um exemplo de período de tempo que era suficiente para reduzir a citotoxicidade da toxina de *C. difficile* mutante para um valor de EC_{50} de pelo menos aproximadamente 1000 µg/mL em uma célula humana adequada, por exemplo, células IMR-90, em um ensaio de citotoxicidade *in vitro* padronizado, quando comparada a uma toxina mutante idêntica na ausência do agente de reticulação. Em uma modalidade mais preferida, a reação é realizada durante aproximadamente 48 horas, que é pelo menos aproximadamente três vezes mais longo que um período de tempo suficiente para a reação. Em tal modalidade, o tempo de reação não é preferencialmente maior que aproximadamente 72 horas.

[00377] Em outra modalidade em que o agente inclui EDC, a toxina mutante é preferencialmente colocada em contato com o agente durante aproximadamente 0,5 hora, mais preferencialmente pelo menos aproximadamente 1 hora ou mais preferencialmente aproximadamente 2 horas. Em tal modalidade, o tempo de reação não é preferencialmente maior que aproximadamente 6 horas.

[00378] Os exemplos de pH em que a toxina mutante é colocada em contato com o agente de reticulação química incluem um mínimo de aproximadamente pH 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 ou 7,5 e um máximo de aproximadamente pH 8,5, 8,0, 7,5, 7,0 ou 6,5. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma faixa de pH adequada. Preferencialmente, a reação ocorre em pH 6,5 até 7,5, preferencialmente em pH 7,0.

[00379] Os exemplos de temperaturas em que a toxina mutante é colocada em contato com o agente de reticulação química incluem um mínimo de aproximadamente 2°C, 4°C, 10°C, 20°C, 25°C ou 37°C e uma temperatura máxima de aproximadamente 40°C, 37°C, 30°C, 27°C, 25°C ou 20°C. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com

qualquer valor máximo para definir uma faixa de temperatura de reação adequada. Preferencialmente, a reação ocorre a aproximadamente 20°C até 30°C, mais preferencialmente a aproximadamente 25°C.

[00380] As composições imunogênicas descritas anteriormente podem incluir uma toxina de *C. difficile* mutante (A ou B). Consequentemente, as composições imunogênicas podem ocupar frascos separados (por exemplo, um frasco separado para uma composição que inclui a toxina A de *C. difficile* mutante e um frasco separado para uma composição que inclui a toxina B de *C. difficile* mutante) na preparação ou no kit. As composições imunogênicas podem ser pretendidas para uso simultâneo, sequencial ou separado.

[00381] Em outra modalidade, as composições imunogênicas descritas anteriormente podem incluir ambas as toxinas de *C. difficile* mutantes (A e B). Qualquer combinação de toxina A de *C. difficile* mutante e toxina B de *C. difficile* mutante descrita pode ser combinada para uma composição imunogênica. Consequentemente, as composições imunogênicas podem ser combinadas em um único frasco (por exemplo, um único frasco que contém tanto uma composição que inclui TcdA de *C. difficile* mutante quanto uma composição que inclui TcdB de *C. difficile* mutante). Preferencialmente, as composições imunogênicas incluem uma TcdA de *C. difficile* mutante e uma TcdB de *C. difficile* mutante.

[00382] Por exemplo, em uma modalidade, a composição imunogênica inclui a SEQ ID NO: 4 e a SEQ ID NO: 6, em que pelo menos um aminoácido de cada uma da SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 6 é quimicamente reticulado. Em outra modalidade, a composição imunogênica inclui uma toxina A de *C. difficile* mutante, que inclui a SEQ ID NO: 4 ou a SEQ ID NO: 7 e uma toxina B de *C. difficile* mutante, que compreende a SEQ ID NO: 6 ou a SEQ ID NO: 8, em

que pelo menos um aminoácido de cada uma das toxinas de *C. difficile* mutantes é quimicamente reticulado.

[00383] Em outra modalidade, a composição imunogênica inclui qualquer sequência selecionada da SEQ ID NO: 4, da SEQ ID NO: 84 e da SEQ ID NO: 83 e qualquer sequência selecionada da SEQ ID NO: 6, da SEQ ID NO: 86 e da SEQ ID NO: 85. Em outra modalidade, a composição imunogênica inclui a SEQ ID NO: 84 e uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 86. Em outra modalidade, a composição imunogênica inclui a SEQ ID NO: 83 e uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 85. Em outra modalidade, a composição imunogênica inclui a SEQ ID NO: 84, a SEQ ID NO: 83, a SEQ ID NO: 86 e a SEQ ID NO: 85.

[00384] É entendido que qualquer uma das composições da invenção, por exemplo, composições imunogênicas que incluem uma toxina A mutante e/ou uma toxina B mutante, pode ser combinada em proporções ou quantidades diferentes para efeito terapêutico. Por exemplo, a TcdA de *C. difficile* mutante e a TcdB de *C. difficile* mutante podem estar presentes na composição imunogênica em uma proporção na faixa de 0,1:10 até 10:0,1, A:B. Em outra modalidade, por exemplo, a TcdB de *C. difficile* mutante e a TcdA de *C. difficile* mutante podem estar presentes na composição imunogênica em uma proporção na faixa de 0,1:10 to 10:0,1, B:A. Em uma modalidade preferida, a proporção é tal que a composição inclui uma quantidade total maior de uma TcdB mutante que uma quantidade total de uma TcdA mutante.

[00385] Em um aspecto, uma composição imunogênica é capaz de se ligar a um anticorpo neutralizador ou fragmento de ligação do mesmo. Preferencialmente, o anticorpo neutralizador ou o fragmento de ligação do mesmo é um descrito aqui a seguir. Em um dos exemplos de modalidade, uma composição imunogênica é capaz de

se ligar a um anticorpo anti-toxina A ou um fragmento de ligação do mesmo, em que o anticorpo anti-toxina A ou o fragmento de ligação do mesmo inclui uma cadeia leve variável que possui a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 36 e uma cadeia pesada variável que possui a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 37. Por exemplo, a composição imunogênica pode incluir uma TcdA de *C. difficile* mutante, SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 7. Como outro exemplo, a composição imunogênica pode incluir a SEQ ID NO: 84 ou a SEQ ID NO: 83.

[00386] Em outros exemplos de modalidade, uma composição imunogênica é capaz de se ligar a um anticorpo anti-toxina B ou um fragmento de ligação do mesmo, em que o anticorpo anti-toxina B ou o fragmento de ligação do mesmo inclui uma cadeia leve variável de B8-26 e uma cadeia pesada variável de B8-26. Por exemplo, a composição imunogênica pode incluir uma TcdB de *C. difficile* mutante, SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 8. Como outro exemplo, a composição imunogênica pode incluir a SEQ ID NO: 86 ou a SEQ ID NO: 85.

Célula recombinante

[00387] Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma célula recombinante ou uma progênie da mesma. Em uma modalidade, a célula ou a progênie da mesma inclui um polinucleotídeo que codifica uma TcdA de *C. difficile* mutante e/ou uma TcdB de *C. difficile* mutante.

[00388] Em outra modalidade, a célula recombinante ou a progênie da mesma inclui uma sequência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente aproximadamente 98%, mais preferencialmente aproximadamente 99% ou mais preferencialmente aproximadamente 100% de identidade

em relação a qualquer uma da SEQ ID NO: 4, da SEQ ID NO: 6, da SEQ ID NO: 7 ou da SEQ ID NO: 8, quando alinhadas de forma ótima, tal como através dos programas GAP ou BESTFIT utilizando pesos de espaços pré-estabelecidos.

[00389] Em outra modalidade, a célula recombinante ou a progênie da mesma inclui uma sequência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo que possui pelo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente aproximadamente 98%, mais preferencialmente aproximadamente 99% ou mais preferencialmente aproximadamente 100% de identidade em relação a qualquer uma da SEQ ID NO: 84, da SEQ ID NO: 86, da SEQ ID NO: 83 ou da SEQ ID NO: 85, quando alinhadas de forma ótima, tal como através dos programas GAP ou BESTFIT utilizando pesos de espaços pré-estabelecidos.

[00390] Em uma modalidade adicional, a célula recombinante ou a progênie da mesma inclui uma sequência de ácido nucléico que possui pelo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente aproximadamente 98%, mais preferencialmente aproximadamente 99% ou mais preferencialmente aproximadamente 100% de identidade em relação a qualquer uma da SEQ ID NO: 11, da SEQ ID NO: 12, da SEQ ID NO: 13, da SEQ ID NO: 14, da SEQ ID NO: 44, da SEQ ID NO: 45, da SEQ ID NO: 46 ou da SEQ ID NO: 47, quando alinhadas de forma ótima, tal como através dos programas GAP ou BESTFIT utilizando pesos de espaços pré-estabelecidos.

[00391] A célula recombinante pode ser derivada de qualquer célula útil na produção recombinante de um polipeptídeo da presente invenção, por exemplo, uma procariota ou uma eucariota. Preferencialmente, a célula recombinante é derivada de qualquer célula que seja adequada para a expressão de sequências de ácido

nucléico heterólogos maiores que aproximadamente 5000, 6000, preferencialmente aproximadamente 7000 e mais preferencialmente aproximadamente 8000 nucleotídeos ou mais. A célula hospedeira procariótica pode ser qualquer bactéria gram-negativa ou gram-positiva. Nos exemplos de modalidades, a célula hospedeira procariótica não possui um polinucleotídeo endógeno que codifica uma toxina e/ou um esporo.

[00392] As bactérias Gram-negativas incluem, mas não estão limitadas a, *Campilobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Ureaplasma*. Por exemplo, a célula recombinante pode ser derivada de uma célula de *Pseudomonas fluorescens*, como descrito na Publicação de Pedido de Patente US 2010013762, parágrafos [0201]-[0230], que é incorporada aqui como referência.

[00393] As bactérias Gram-positivas incluem, mas não estão limitadas a, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphilococcus*, *Streptococcus* e *Streptomyces*. Preferencialmente, a célula é derivada de uma célula de *C. difficile*.

[00394] Os inventores identificaram cepas de *C. difficile* de do tipo selvagem que não possuem um polinucleotídeo endógeno que codifica uma toxina de *C. difficile*. As cepas que não possuem genes endógenos das toxinas A e B incluem as cepas a seguir, que estão disponíveis na 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™) e *C. difficile* VPI 11186 (ATCC 700057™).

[00395] Consequentemente, em uma modalidade, a célula de *C. difficile* recombinante é derivada de uma cepa descrita aqui.

Preferencialmente, a célula de *C. difficile* recombinante ou uma progênie da mesma é derivada do grupo que consiste de *C. difficile* 1351, *C. difficile* 5036 e *C. difficile* VPI 11186. Mais preferencialmente, a célula de *C. difficile* recombinante ou uma progênie da mesma é derivada de uma célula de *C. difficile* VPI 11186.

[00396] Em uma modalidade preferida, o gene de esporulação da célula de *C. difficile* recombinante ou de uma progênie da mesma está inativado. Os esporos podem ser infecciosos, altamente resistentes e facilitam a persistência de *C. difficile* em ambientes aeróbicos fora do hospedeiro. Os esporos também podem contribuir para a sobrevivência de *C. difficile* dentro do hospedeiro durante a terapia antimicrobiana. Consequentemente, uma célula de *C. difficile* que não possui um gene de esporulação é útil para produzir uma composição imunogênica segura para administração a mamíferos. Em adição, o uso de tais células facilita a segurança durante a produção, por exemplo, segurança para proteger a unidade, futuros produtos e a equipe.

[00397] Os exemplos de genes de esporulação para inativação direcionada incluem, *inter alia*, *spo0A*, *spolIE*, σ^E , σ^G e σ^K . Preferencialmente, o gene *spo0A* é inativado.

[00398] Os métodos de inativação de um gene de esporulação de *C. difficile* são conhecidos na arte. Por exemplo, um gene de esporulação pode ser inativado através de inserção direcionada de um marcador selecionável, tal como um marcador de resistência a antibiótico. Ver, por exemplo, Heap e outros, *J Microbiol Methods*. 2010 Jan;80(1):49-55; Heap e outros, *J. Microbiol. Methods*, 2007 Sept; 70(3):452-464; e Underwood e outros, *J Bacteriol*. 2009 Dec;191(23):7296-305. Ver também por exemplo, Minton e outros, WO2007/148091, intitulada, "DNA Molecules and Methods", incorporada aqui como referência em sua totalidade partindo das

páginas 33-66 ou a publicação US correspondente US 20110124109 A1, parágrafos [00137]-[0227].

Método de Produção de uma Toxina de *C. difficile* Mutante

[00399] Em um aspecto, a invenção refere-se a um método de produção de uma toxina de *C. difficile* mutante. Em uma modalidade, o método inclui o cultivo de qualquer célula recombinante ou progênie da mesma descrita anteriormente, sob condições adequadas para a expressão de um polipeptídeo.

[00400] Em outra modalidade, o método inclui o cultivo de uma célula recombinante ou uma progênie da mesma sob condições adequadas para a expressão de um polinucleotídeo que codifica uma toxina de *C. difficile* mutante, em que a célula inclui o polinucleotídeo que codifica a toxina de *C. difficile* mutante e em que o mutante inclui um domínio de glucosiltransferase que possui pelo menos uma mutação e um domínio de cisteína protease que possui pelo menos uma mutação, em relação à toxina de *Clostridium difficile* do tipo selvagem correspondente. Em uma modalidade, a célula não possui um polinucleotídeo endógeno que codifica uma toxina.

[00401] Em uma modalidade adicional, o método inclui a cultura de uma célula de *C. difficile* recombinante ou uma progênie da mesma sob condições adequadas para a expressão de um polinucleotídeo que codifica uma toxina de *C. difficile* mutante, em que a célula inclui o polinucleotídeo que codifica a toxina de *C. difficile* mutante e a célula não possui um polinucleotídeo endógeno que codifica uma toxina de *C. difficile*.

[00402] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método de produção de uma toxina de *C. difficile* mutante. O método inclui as etapas de: (a) contato de uma célula de *C. difficile* com uma célula de *Escherichia coli* recombinante, em que a célula de *C. difficile* não possui um polinucleotídeo endógeno que codifica uma toxina de *C.*

difficile e a célula de *E. coli* inclui um polinucleotídeo que codifica uma toxina de *C. difficile* mutante; (b) cultivo da célula de *C. difficile* e da célula de *E. coli* sob condições adequadas para a transferência dos polinucleotídeo da célula de *E. coli* para a célula de *C. difficile*; (c) seleção da célula de *C. difficile* que compreende o polinucleotídeo que codifica a toxina de *C. difficile* mutante; (d) cultivo da célula de *C. difficile* da etapa (c) sob condições adequadas para a expressão do polinucleotídeo; e (e) isolamento da toxina de *C. difficile* mutante.

[00403] No método da invenção, a célula de *E. coli* recombinante inclui um polinucleotídeo heterólogo que codifica a toxina de *C. difficile* mutante, descrito aqui. O polinucleotídeo pode ser DNA ou RNA. Em um dos exemplos de modalidade, o polinucleotídeo que codifica a toxina de *C. difficile* mutante tem o códon otimizado para uso de códons de *E. coli*. Os métodos para a otimização de códons de um polinucleotídeo são conhecidos na arte.

[00404] Em uma modalidade, o polinucleotídeo inclui uma sequência de ácido nucléico que é pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica àquela de um polinucleotídeo que codifica uma TcdA de *C. difficile* mutante, como descrito anteriormente. Um exemplo de polinucleotídeo que codifica uma toxina A de *C. difficile* mutante inclui a SEQ ID NO: 11, a SEQ ID NO: 12, a SEQ ID NO: 44 e a SEQ ID NO: 45.

[00405] Em outra modalidade, o polinucleotídeo inclui uma sequência de ácido nucléico que é pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica àquela de um polinucleotídeo que codifica uma TcdB de *C. difficile* mutante, como descrito anteriormente. Um exemplo de polinucleotídeo que codifica uma toxina B de *C. difficile* mutante inclui a SEQ ID NO: 13, a

SEQ ID NO: 14, a SEQ ID NO: 46 e a SEQ ID NO: 47. Em outra modalidade, o polinucleotídeo codifica a SEQ ID NO: 83, a SEQ ID NO: 84, a SEQ ID NO: 85 ou a SEQ ID NO: 86.

[00406] Em uma modalidade, a célula de *E. coli* que inclui o polinucleotídeo heterólogo é uma célula de *E. coli* que hospeda de forma estável o polinucleotídeo heterólogo, que codifica a toxina de *C. difficile* mutante. Os exemplos de células de *E. coli* incluem uma célula selecionada do grupo que consiste de MAX Efficiency® Stbl2™ *E. coli* Competent Cells (Invitrogen, Carlsbad, CA), One Shot® Stbl3™ Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA), ElectroMAX™ Stbl4™ *E. coli* Competent Cells (Invitrogen e *E. coli* CA434. Em uma modalidade preferida, a célula hospedeira de clonagem de *E. coli* não é DH5α. Mais preferencialmente, a célula hospedeira de clonagem de *E. coli* cloning é uma MAX Efficiency® Stbl2™ *E. coli* Competent Cell.

[00407] O método da invenção inclui ainda uma etapa de cultivo da célula de *C. difficile* cell e da célula de *E. coli* sob condições adequadas para a transferência do polinucleotídeo da célula de *E. coli* para a célula de *C. difficile*, resultando em uma célula de *C. difficile* recombinante. Em uma modalidade preferida, as condições são adequadas para a transferência do polinucleotídeo da célula de *E. coli* (a célula doadora) para dentro da célula de *C. difficile* (a célula receptora) e resultando em uma herança geneticamente estável.

[00408] Mais preferencialmente, as condições são adequadas para conjugação bacteriana, que é conhecida na arte. "Conjugação" refere-se a um processo particular de transferência de um polinucleotídeo em que uma transferência unidirecional de um polinucleotídeo (por exemplo, de um plasmídeo bacteriano) ocorre de uma célula de bactéria (isto é, a "doadora") para outra (isto é, a "receptora"). O processo de conjugação envolve o contato da célula doadora com a célula receptora. Preferencialmente, a célula de *E. coli* doadora é uma

célula de *E. coli* CA434.

[00409] Os exemplos de condições (conjugação) adequados para a transferência do polinucleotídeo de uma célula de *E. coli* para célula de *C. difficile* incluem culturas líquidas de crescimento de *C. difficile* no caldo de infusão de coração e cérebro (BHI; Oxoid) ou caldo de Schaedlers anaeróbico (SAB; Oxoid). Em outra modalidade, culturas sólidas de *C. difficile* podem ser crescidas sobre ágar com sangue fresco (FBA) ou BHI ágar. Preferencialmente, o *C. difficile* é crescido a 37°C em um ambiente anaeróbico (por exemplo, 80% de N₂, 10% de CO₂ e 10% de H₂ [vol/vol]). Em uma modalidade, a condição adequada inclui o crescimento da *E. coli* de forma anaeróbica em caldo Luria-Bertani (LB) ou sobre LB ágar a 37°C. Para a transferência conjugativa para *C. difficile*, um exemplo de condição adequada inclui o crescimento da *E. coli* de forma anaeróbica sobre FBA. Antibióticos podem ser incluídos nos meios líquidos e sólidos como é conhecido na arte. Os exemplos de tais antibióticos incluem ciclosserina (250 µg/mL), cefoxitina (8 µg/mL), cloramfenicol (12,5 µg/mL), tiamfenicol (15 µg/mL) e eritromicina (5 µg/mL).

[00410] O método da invenção inclui adicionalmente uma etapa de seleção da célula de *C. difficile* recombinante resultante que inclui o polinucleotídeo que codifica a toxina de *C. difficile* mutante. Em um exemplo de modalidade, a célula de *C. difficile* recombinante é uma receptora de polinucleotídeo que codifica a toxina de *C. difficile* mutante partindo da célula de *E. coli* recombinante através da conjugação.

[00411] O método da invenção inclui uma etapa de cultura da célula recombinante ou da progênie da mesma sob condições adequadas para a expressão do polinucleotídeo que codifica a toxina de *C. difficile* mutante, resultando na produção de uma toxina de *C. difficile* mutante. As condições adequadas para que uma célula recombinante expresse o polinucleotídeo incluem condições de cultura adequadas para o

crescimento de uma célula de *C. difficile*, que são conhecidas na arte. Por exemplo, as condições adequadas podem incluir o cultivo de transformantes de *C. difficile* no caldo de infusão de cérebro coração (BHI; Oxoid) ou no caldo anaeróbico de Schaedlers (SAB; Oxoid). Em outra modalidade, culturas sólidas de *C. difficile* podem ser crescidas sobre FBA ou BHI ágar. Preferencialmente, o *C. difficile* é crescido a 37°C em um ambiente anaeróbico (por exemplo, 80% de N₂, 10% de CO₂ e 10% de H₂ [vol/vol]).

[00412] Em uma modalidade, o método da invenção inclui uma etapa de isolamento da toxina de *C. difficile* mutante resultante. Os métodos de isolamento de uma proteína de *C. difficile* são conhecidos na arte.

[00413] Em outra modalidade, o método inclui uma etapa de purificação da toxina de *C. difficile* mutante resultante. Os métodos de purificação de um polipeptídeo, tal como cromatografia, são conhecidos na arte.

[00414] Em um exemplo de modalidade, o método inclui ainda uma etapa de contato da toxina de *Clostridium difficile* mutante isolada com um agente de reticulação química descrito anteriormente. Preferencialmente, o agente inclui formaldeído, etil- 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida ou uma combinação de EDC e NHS. Os exemplos de condições de reação são descritos anteriormente e na seção de Exemplos a seguir.

[00415] Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição imunogênica que inclui uma toxina de *C. difficile* mutante descrita aqui, produzida através de qualquer método, preferencialmente através de qualquer um dos métodos descritos anteriormente.

Anticorpos

[00416] De forma surpreendente, as composições imunogênicas da invenção descritas anteriormente ativaram novos anticorpos *in vivo*,

sugerindo que as composições imunogênicas incluem uma estrutura nativa preservada (por exemplo, um epítipo antigênico preservado) da respectiva toxina de *C. difficile* do tipo selvagem e que as composições imunogênicas incluem um epítipo. Os anticorpos produzidos contra a toxina de uma cepa de *C. difficile* podem ser capazes de se ligar a uma toxina correspondente produzida por outra cepa de *C. difficile*. Isto é, os anticorpos e os fragmentos de ligação dos mesmos podem ter "reação cruzada", que se refere à capacidade de reagir com sítios antigênicos similares sobre as toxinas produzidas partindo de várias cepas de *C. difficile*. A reatividade cruzada inclui ainda a capacidade de um anticorpo de reagir com ou se ligar a um antígeno que não estimulou sua produção, isto é, uma reação entre um antígeno e um anticorpo que foi gerado contra um antígeno diferente, mas similar.

[00417] Em um aspecto, os inventores descobriram de forma surpreendente anticorpos monoclonais que possuem um efeito de neutralização sobre as toxinas de *C. difficile* e métodos de produção dos mesmos. Os anticorpos da invenção podem neutralizar a citotoxicidade *in vitro* da toxina de *C. difficile*, inibir a ligação da toxina de *C. difficile* às células de mamífero e/ou podem neutralizar a enterotoxicidade *in vivo* da toxina de *C. difficile*. A presente invenção refere-se ainda a polinucleotídeos isolados que incluem sequências de ácido nucléico que codificam qualquer um dos anteriores. Em adição, a presente invenção refere-se ao uso de qualquer uma das composições anteriores para tratar, prevenir, diminuir o risco de, diminuir a gravidade de, diminuir ocorrências de e/ou retardar o início de uma infecção causada por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, estado de saúde, sintoma e/ou complicação dos mesmos em um mamífero, quando comparado a um mamífero ao qual a composição não é administrada, bem como métodos para a preparação das ditas composições.

[00418] Os inventores descobriram ainda que uma combinação de pelo menos dois dos anticorpos monoclonais neutralizadores pode exibir um efeito sinérgico inesperado em relação à neutralização de TcdA ou TcdB. Os anticorpos anti-toxina ou os fragmentos de ligação dos mesmos podem ser úteis na inibição de uma infecção causada por *C. difficile*.

[00419] Um "anticorpo" é uma proteína que inclui pelo menos uma ou duas regiões variáveis de cadeia pesada (H) (abreviadas aqui como VH) e pelo menos uma ou duas regiões variáveis de cadeia leve (L) (abreviadas aqui como VL). As regiões VH e VL podem ser adicionalmente subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas "regiões de determinação de complementaridade" ("CDR"), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas "regiões estruturais" (FR). A extensão da região estrutural e das CDRs foi precisamente definida (ver, Kabat, E. A. e outros *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publicação No. 91-3242, 1991 e Chothia, C. e outros, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987). O termo "anticorpo" inclui imunoglobulinas intactas dos tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (bem como subtipos dos mesmos), em que as cadeias leves da imunoglobulina podem ser dos tipos kappa ou lambda.

[00420] As moléculas de anticorpo podem ser de comprimento completo (por exemplo, um anticorpo IgG1 ou IgG4). Os anticorpos podem ser de vários isotipos, que incluem: IgG (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD ou IgE. Em uma modalidade preferida, o anticorpo é um isotipo IgG, por exemplo, IgG1. Em outra modalidade preferida, o anticorpo é um anticorpo IgE.

[00421] Em outra modalidade, a molécula de anticorpo inclui um "fragmento de ligação ao antígeno" ou "fragmento de ligação", como

utilizado aqui, que se refere a uma porção de um anticorpo que se liga especificamente a uma toxina de *C. difficile* (por exemplo, toxina A). O fragmento de ligação é, por exemplo, uma molécula em que uma ou mais cadeias de imunoglobulina não são de comprimento completo, mas que se liga especificamente a uma toxina.

[00422] Os exemplos de porções de ligação abrangidos dentro do termo "fragmento de ligação" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste dos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd que consiste dos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv que consiste dos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward e outros, *Nature* 341:544-546, 1989), que consiste de um domínio VH; e (vi) uma região de determinação de complementaridade (CDR) isolada que possui estrutura suficiente para se ligar especificamente, por exemplo, a uma porção de ligação ao antígeno de uma região variável.

[00423] Um fragmento de ligação de uma região variável de cadeia leve e um fragmento de ligação de uma região variável de cadeia pesada, por exemplo, os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, podem ser ligados, utilizando métodos recombinantes, através de um ligante sintético que os possibilita ser produzidos na forma de uma única cadeia de proteína em que as regiões VL e VH se pareiam para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia isolada (scFv); ver, por exemplo, Bird e outros (1988) *Science* 242:423-426; e Huston e outros (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Tais anticorpos de cadeia isolada são também abrangidos dentro do termo "fragmento de ligação" de um anticorpo. Estas porções do anticorpo são obtidas utilizando técnicas conhecidas

na arte e as porções são verificadas em relação à utilidade da mesma maneira que são os anticorpos intactos.

[00424] Como utilizado aqui, um anticorpo que "se liga especificamente" a ou é "específico" para um polipeptídeo particular ou um epítopo sobre um polipeptídeo particular é um anticorpo que se liga a tal polipeptídeo ou epítopo particular sobre um polipeptídeo particular sem se ligar substancialmente a qualquer outro polipeptídeo ou epítopo de polipeptídeo. Por exemplo, quando se faz referência a uma biomolécula (por exemplo, proteína, ácido nucléico, anticorpo etc.) que "se liga especificamente" a um alvo, a biomolécula se liga a sua molécula alvo e não se liga em uma quantidade significativa com outras moléculas em uma população heterogênea de moléculas que incluem o alvo, que é medido sob condições designadas (por exemplo, condições de ensaio imunológico no caso de um anticorpo). A reação de ligação entre o anticorpo e seu alvo é determinante da presença do alvo na população heterogênea de moléculas. Por exemplo, "ligação específica" ou "se liga especificamente" refere-se à capacidade de um anticorpo ou um fragmento de ligação do mesmo de se ligar a uma toxina de *C. difficile* do tipo selvagem e/ou mutante com uma afinidade que é pelo menos duas vezes maior que sua afinidade por um antígeno inespecífico.

[00425] Em um exemplo de modalidade, o anticorpo é um anticorpo quimérico. Um anticorpo quimérico pode ser produzido através de técnicas do DNA recombinante conhecidas na arte. Por exemplo, um gene que codifica a região Fc constante de uma molécula de anticorpo monoclonal murino (ou de outra espécie) pode ser digerido com enzimas de restrição para remover a região que codifica o Fc murino e a porção equivalente de um gene que codifica uma região Fc constante humana é substituída. Um anticorpo quimérico também pode ser criado através de técnicas do DNA recombinante em que o

DNA que codifica regiões variáveis murinas pode ser ligado ao DNA que codifica as regiões constantes humanas.

[00426] Em outros exemplos de modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo é humanizado através de métodos conhecidos na arte. Por exemplo, uma vez que anticorpos murinos são obtidos, uma CDR do anticorpo pode ser substituída por pelo menos uma porção de uma CDR humana. Os anticorpos humanizados também podem ser gerados através da substituição das sequências da região variável de Fv murina que não estão diretamente envolvidas na ligação ao antígeno por sequências equivalentes de regiões variáveis de Fv humanas. Os métodos gerais para a produção de anticorpos humanizados são conhecidos na arte.

[00427] Por exemplo, anticorpos monoclonais direcionados para TcdA de *C. difficile* ou TcdB de *C. difficile* também podem ser produzidos através de técnicas padronizadas, tal como uma técnica de hibridoma (ver, por exemplo, Kohler e Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495-497). Sucintamente, uma linhagem de células imortal é fundida com um linfócito de um mamífero imunizado com TcdA de *C. difficile*, TcdB de *C. difficile* ou uma toxina de *C. difficile* mutante descrita aqui e os sobrenadantes de cultura das células de hibridoma resultantes são verificados para identificar um hibridoma que produz um anticorpo monoclonal que se liga a TcdA de *C. difficile* ou TcdB de *C. difficile*. Tipicamente, a linhagem de células imortal é derivada da mesma espécie de mamífero que os linfócitos. As células de hibridoma produtoras de um anticorpo monoclonal da invenção são detectadas através da verificação dos sobrenadantes de cultura do hibridoma em relação a anticorpos que se ligam a TcdA de *C. difficile* ou a TcdB de *C. difficile* utilizando um ensaio, tal como ELISA. Os hibridomas humanos podem ser preparados de uma maneira similar.

[00428] Como uma alternativa da produção de anticorpos por

imunização e seleção, os anticorpos da invenção também podem ser identificados através de verificação de uma biblioteca combinatória de imunoglobulinas recombinantes com uma TcdA de *C. difficile*, uma TcdB de *C. difficile* ou uma toxina de *C. difficile* mutante descrita aqui. A biblioteca de anticorpos recombinantes pode ser uma biblioteca de scFv ou uma biblioteca de Fab, por exemplo. Além disso, os anticorpos da invenção descritos aqui podem ser utilizados em estudos de ligação competitiva para a identificação de anticorpos anti-TcdA ou anti-TcdB adicionais e fragmentos de ligação dos mesmos. Por exemplo, anticorpos anti-TcdA ou anti-TcdB adicionais e fragmentos de ligação dos mesmos podem ser identificados através da verificação de uma biblioteca de anticorpos humanos e da identificação das moléculas dentro da biblioteca que competem com os anticorpos da invenção descritos aqui em um ensaio de ligação competitiva.

[00429] Em adição, os anticorpos abrangidos pela presente invenção incluem anticorpos recombinantes que podem ser gerados através da utilização de métodos de exibição de fagos conhecidos na arte. Nos métodos de exibição de fagos, o fago pode ser utilizado para exibir domínios de ligação ao antígeno expressos partindo de um repertório ou uma biblioteca de anticorpos (por exemplo, humana ou murina). O fago que expressa um domínio de ligação ao antígeno que se liga a um agente imunogênico descrito aqui (por exemplo, uma toxina de *C. difficile* mutante) pode ser selecionado ou identificado com antígeno, por exemplo, utilizando um antígeno marcado.

[00430] Ainda dentro do âmbito da invenção estão anticorpos e fragmentos de ligação dos mesmos em que aminoácidos específicos foram substituídos, deletados ou adicionados. Em particular, os anticorpos preferidos possuem substituições de aminoácidos na região estrutural, de forma a aprimorar a ligação ao antígeno. Por exemplo,

um número pequeno selecionado de resíduos estruturais receptores da cadeia de imunoglobulina pode ser substituído pelos aminoácidos doadores correspondentes. As localizações preferidas das substituições incluem resíduos de aminoácidos adjacentes à CDR ou que são capazes de interagir com uma CDR. Os critérios para a seleção de aminoácidos partindo do doador são descritos na Pat. U.S. No. 5.585.089 (por exemplo, colunas 12-16). A estrutura receptora pode ser uma sequência estrutural de anticorpo humano madura ou uma sequência consenso.

[00431] Como utilizado aqui, um "anticorpo neutralizador ou fragmento de ligação do mesmo" refere-se a um respectivo anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo que se liga a um agente patogênico (por exemplo, uma TcdA ou uma TcdB de *C. difficile*) e reduz a infectividade e/ou uma atividade do agente patogênico (por exemplo, reduz a citotoxicidade) em um mamífero e/ou em cultura de células, quando comparado com o agente patogênico sob condições diferentes na ausência do anticorpo neutralizador ou do fragmento de ligação do mesmo. Em uma modalidade, o anticorpo neutralizador ou o fragmento de ligação do mesmo é capaz de neutralizar pelo menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou mais de uma atividade biológica do agente patogênico, quando comparada com a atividade biológica do agente patogênico sob condições diferentes na ausência do anticorpo neutralizador ou do fragmento de ligação do mesmo.

[00432] Como utilizado aqui, o termo "anticorpo anti-toxina ou fragmento de ligação do mesmo" refere-se a um anticorpo ou um fragmento de ligação do mesmo que se liga à respectiva toxina de *C. difficile* (por exemplo, uma toxina A ou uma toxina B de *C. difficile*). Por exemplo, um anticorpo anti-toxina A ou um fragmento de ligação do mesmo refere-se a um anticorpo ou um fragmento de ligação do

mesmo que se liga à TcdA. Os anticorpos ou os fragmentos de ligação dos mesmos descritos aqui podem ser produzidos em qualquer mamífero, do tipo selvagem e/ou transgênico, que inclui, por exemplo, camundongos, humanos, coelhos e caprinos.

[00433] Quando uma composição imunogênica descrita anteriormente for uma que foi previamente administrada a uma população, tal como para vacinação, a resposta de anticorpo gerada nos indivíduos pode ser utilizada para neutralizar as toxinas da mesma cepa e de uma cepa que não estimulou a produção do anticorpo. Ver, por exemplo, o Exemplo 37, que mostra estudos em relação à reatividade cruzada, gerada pela composição imunogênica, entre a cepa 630 e as toxinas de várias cepas de *C. difficile* do tipo selvagem.

[00434] Em um aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo ou um fragmento de ligação do mesmo específico à TcdA de *C. difficile*. Os anticorpos monoclonais que se ligam especificamente à TcdA incluem A65-33; A60-22; A80-29 e/ou, preferencialmente, A3-25.

[00435] Em um aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo ou um fragmento de ligação do mesmo específico a uma TcdA de qualquer cepa de *C. difficile* do tipo selvagem, tal como as descritas anteriormente, por exemplo, à SEQ ID NO: 1. Em outro aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo ou um fragmento de ligação do mesmo específico para uma composição imunogênica descrita anteriormente. Por exemplo, em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo é específico para uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 4 ou a SEQ ID NO: 7. Em outra modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo é específico para uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 4 ou a SEQ ID NO: 7, em que pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 4 ou da SEQ ID NO: 7 é reticulado por formaldeído, EDC, NHS ou uma combinação de EDC e NHS. Em outra modalidade, o anticorpo

ou o fragmento de ligação do mesmo é específico para uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 84 ou a SEQ ID NO: 83.

[00436] Os anticorpos ou os fragmentos de ligação dos mesmos que possuem uma cadeia pesada variável e regiões de cadeias leves variáveis que possuem pelo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente aproximadamente 98%, mais preferencialmente aproximadamente 99% ou mais preferencialmente aproximadamente 100% de identidade com as regiões de cadeias pesadas e leves variáveis de A65-33; A60-22; A80-29 e/ou, preferencialmente, A3-25 também podem se ligar à TcdA.

[00437] Em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia pesada variável que inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região de cadeia pesada variável de A3-25 como é apresentado na SEQ ID NO: 37.

[00438] Em outra modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia leve variável que inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região de cadeia leve variável de A3-25 como é apresentado na SEQ ID NO: 36.

[00439] Ainda em um aspecto adicional, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia pesada variável que inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região de cadeia pesada variável apresentada na SEQ ID NO: 37 e uma região de cadeia leve variável que inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região de cadeia leve variável apresentada na SEQ ID NO: 36.

[00440] Em outra modalidade, os anticorpos ou os fragmentos de ligação dos mesmos que possuem regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de cadeias pesadas variáveis e/ou cadeias leves variáveis de A65-33; A60-22; A80-29 e/ou, preferencialmente, A3-25 também podem se ligar à TcdA. As CDRs da região de cadeia pesada variável de A3-25 são mostradas na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4: Sequências de Aminoácidos das CDRs de Cadeias Pesadas Variáveis				
Clone	Cadeia	CDR	Sequência de aminoácidos	SEQ ID NO:
A3-25	Pesada	CDR1	GFTFTNYWMN	41
		CDR2	EIRLKSHNYATHFAESVKG	42
		CDR3	DYYGNPAFVY	43

[00441] As CDRs da região de cadeia leve variável de A3-25 são mostradas na Tabela 5, a seguir.

Tabela 5: Sequências de Aminoácidos das CDRs de Cadeias Leves Variáveis				
Clone	Cadeia	CDR	Sequência de aminoácidos	SEQ ID NO:
A3-25	Leve	CDR1	RSSQSLIHSNGNTILH	38
		CDR2	KVSNRFS	39
		CDR3	SQTTYFPYT	40

[00442] Em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação

do mesmo inclui sequências de aminoácidos das regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada como mostrado nas SEQ ID NOs: 41 (CDR H1), 42 (CDR H2) e 43 (CDR H3) e/ou as sequências de aminoácidos das CDRs de cadeia leve como mostrado nas SEQ ID NOs: 38 (CDR L1), 39 (CDR L2) e 40 (CDR L3).

[00443] Em um dos exemplos de modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo específico para uma toxina A de *C. difficile* se liga especificamente a um epítipo dentro da região N-terminal da TcdA, por exemplo, um epítipo entre os aminoácidos 1-1256 de uma TcdA, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1.

[00444] Em uma modalidade preferida, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo específico a uma toxina A de *C. difficile* se liga especificamente a um epítipo dentro da região C-terminal da toxina A, por exemplo, um epítipo entre os aminoácidos 1832 até 2710 de uma TcdA, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1. Os exemplos incluem A3-25; A65-33; A60-22; A80-29.

[00445] Ainda em outra modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo específico a uma toxina A de *C. difficile* se liga especificamente a um epítipo dentro da região de "translocação" da toxina A de *C. difficile*, por exemplo, um epítipo que inclui preferencialmente os resíduos 956-1128 de uma TcdA, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1, tal como um epítipo entre os aminoácidos 659-1832 de uma TcdA, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1.

[00446] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo ou um fragmento de ligação do mesmo específico a uma TcdB de *C. difficile*. Por exemplo, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo pode ser específico a um TcdB from qualquer cepa de *C. difficile* do tipo selvagem, tal como aquelas descritas anteriormente, por exemplo, para a SEQ ID NO: 2. Em outro aspecto, a invenção refere-se a um

anticorpo ou um fragmento de ligação do mesmo específico a uma composição imunogênica descrita anteriormente. Por exemplo, em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo é específico a uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6 ou a SEQ ID NO: 8.

[00447] Em outra modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo é específico a uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6 ou a SEQ ID NO: 8, em que pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 6 ou da SEQ ID NO: 8 é reticulado por formaldeído, EDC, NHS ou uma combinação de EDC e NHS. Em outra modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo é específico a uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 86 ou a SEQ ID NO: 85.

[00448] Os anticorpos monoclonais que se ligam especificamente à TcdB incluem anticorpos produzidos pelos B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6; e/ou, preferencialmente, clones B8-26 descritos aqui.

[00449] Os anticorpos ou os fragmentos de ligação dos mesmos que também podem se ligar à TcdB incluem aqueles que possuem uma cadeia pesada variável e regiões de cadeias leves variáveis que possuem pelo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente aproximadamente 98%, mais preferencialmente aproximadamente 99% ou mais preferencialmente aproximadamente 100% de identidade em relação às regiões de cadeias pesadas e leves variáveis de B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6, preferencialmente B8-26, B59-3 e/ou B9-30.

[00450] Em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia pesada variável que inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região de cadeia pesada variável de A3-25 como é apresentado na SEQ ID NO: 49.

[00451] Em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia pesada variável que inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região de cadeia pesada variável de A3-25 como é apresentado na SEQ ID NO: 60.

[00452] Em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia pesada variável que inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região de cadeia pesada variável de A3-25 como é apresentado na SEQ ID NO: 71.

[00453] Em outra modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia leve variável que inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região de cadeia leve variável de A3-25 como é apresentado na SEQ ID NO: 55.

[00454] Em outra modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia leve variável que inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região de cadeia

leve variável de A3-25 como é apresentado na SEQ ID NO: 66.

[00455] Em outra modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia leve variável que inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região de cadeia leve variável de A3-25 como é apresentado na SEQ ID NO: 77.

[00456] A sequência de aminoácidos para a cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb) é apresentada na SEQ ID NO: 49. Ver a Tabela 25-a.

Tabela 25-a: Sequências de Aminoácidos de Cadeia Pesada Variável			
Clone	Região	Sequência de aminoácidos	SEQ ID NO:
B8-26	Peptídeo sinal	MGWSCILFLVATATGVHS	50
	Cadeia pesada variável	QVQLQQPGAELVKPGA PVKLSCKAS GYSFTSYWMN WVKQRPGRGLEWIG RIDPSNSEIYYNQKF KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSL TSEDSAVYYCAS GHYGSIFAY WGQGTTTLTVSS	49
	CDR1	GYSFTSYWMN	51
	CDR2	RIDPSNSEIYYNQKF	52
	CDR3	GHYGSIFAY	53
	Região constante (IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK	54

[00457] A sequência de aminoácidos para a cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B8-26 mAb) é apresentada na SEQ ID NO: 55. Ver a Tabela 25-b.

Tabela 25-b: Sequências de Aminoácidos de Cadeia Leve Variável (κ)			
Clone	Região	Sequência de aminoácidos	SEQ ID NO:
B8-26	Peptídeo sinal	MRFQVQVLGLLLWISGAQCD	56
	Cadeia leve variável	VQITQSPSILAASPGETITINC RASKSISKILA WYQEKPGKTNKLLLY SGSTLQS GIPS RFSGSRSGTDFTLIISLEPEDS AMYYC QQHNEYPLT FGAGTKLELKRADAAPTVSIFP PSSEEFQ	55
	CDR1	RASKSISKILA	57
	CDR2	SGSTLQS	58
	CDR3	QQHNEYPLT	59

[00458] Em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo inclui sequências de aminoácidos das CDRs de cadeia pesada como mostrado nas SEQ ID NOs: 51 (CDR H1), 52 (CDR H2) e 53 (CDR H3) e/ou as sequências de aminoácidos das CDRs de cadeia leve como mostrado nas SEQ ID NOs: 57 (CDR L1), 58 (CDR L2) e 59 (CDR L3).

[00459] A sequência de aminoácidos para a cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb) é apresentada na SEQ ID NO: 60. Ver a Tabela 26-a.

Tabela 26-a: Sequências de Aminoácidos da Cadeia Pesada Variável			
Clone	Região	Sequência de aminoácidos	SEQ ID NO:
B59-3	Peptídeo sinal	MGWSYIILFLVATATDVHS	61

	Cadeia pesada variável	QVQLQQPGAELVKPGASVKLS CKAS GYTFTSYWMH WVKQRPQGQGLEWIG VINPSNGRSTYSEKF KTTATVTVDKSSSTAYMQL SILTSEDSAVYYCAR AYYSTSYAMDY WGQGTSVTVSS	60
	CDR1	GYTFTSYWMH	62
	CDR2	VINPSNGRSTYSEKF	63
	CDR3	AYYSTSYAMDY	64
	Região constante (IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK	65

[00460] A sequência de aminoácidos para a cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B59-3 mAb) é apresentada na SEQ ID NO: 66. Ver a Tabela 26-b.

Tabela 26-b: Sequências de Aminoácidos da Cadeia Leve Variável (κ)			
Clone	Região	Sequência de aminoácidos	SEQ ID NO:
B59-3	Peptídeo sinal	MKLPVRLLVLMFWIPASSSD	67
	Cadeia leve variável	VLMTQSPLSLPVSLGDQASIS C RSSQNIVHSNGNTILE WILQKPGQSPKLLIY KVSNRFS GVPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDL GVYYC FQGSHFPFT FGTGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEEF Q	66
	CDR1	RSSQNIVHSNGNTILE	68
	CDR2	KVSNRFS	69
	CDR3	FQGSHFPFT	70

[00461] Em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo inclui sequências de aminoácidos das CDRs de cadeia

pesada como mostrado nas SEQ ID NOs: 62 (CDR H1), 63 (CDR H2) e 64 (CDR H3) e/ou as sequências de aminoácidos das CDRs de cadeia leve como mostrado nas SEQ ID NOs: 68 (CDR L1), 69 (CDR L2) e 70 (CDR L3).

[00462] A sequência de aminoácidos para a cadeia pesada variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb) é apresentada na SEQ ID NO: 71. Ver a Tabela 27-a.

Tabela 27-a: Sequências de Aminoácidos da Cadeia Pesada Variável			
Clone	Região	Sequência de aminoácidos	SEQ ID NO:
B9-30	Peptídeo sinal	MGWSCIILFLVATATGVHS	72
	Cadeia pesada variável	QVQLQQPGAEEVKPGAPVKLS CKAS GYPFTNYWMN WVKQRPGRGLEWIG RIDPSNSEIYYNQKF KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSE DSAVYY CAS GHYGSIFAY WGQGTTTLTVSS	71
	CDR1	GYPFTNYWMN	73
	CDR2	RIDPSNSEIYYNQKF	74
	CDR3	GHYGSIFAY	75
	Região constante (IgG1)	AKTTPPSVYPLAPGNSK	76

[00463] A sequência de aminoácidos para a cadeia leve variável de um anticorpo neutralizador de TcdB de *C. difficile* (B9-30 mAb) é apresentada na SEQ ID NO: 77. Ver a Tabela 27-b.

Tabela 27-b: Sequências de aminoácidos da Cadeia Leve Variável (κ)			
Clone	Região	Sequência de aminoácidos	SEQ ID NO:
B9-30	Peptídeo sinal	MRFQVQVLGLLLLWISGAQCD	78
	Cadeia leve variável	VQITQSPSILAASPGETITINC RASKSISKILA WYQEKPGKTNKLLIY SGSTLQS GIPS RFSGSRSGTDFTLISSLEPEDSAMY YC QQHNEYPLT FGAGTKLELKRADAAPTIVSIFPPSSE EFQ	77
	CDR1	RASKSISKILA	79
	CDR2	SGSTLQS	80
	CDR3	QQHNEYPLT	81

[00464] Em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo inclui sequências de aminoácidos das CDRs de cadeia pesada como mostrado nas SEQ ID NOS: 73 (CDR H1), 74 (CDR H2) e 75 (CDR H3) e/ou as sequências de aminoácidos das CDRs de cadeia leve como mostrado nas SEQ ID NOS: 79 (CDR L1), 80 (CDR L2) e 81 (CDR L3).

[00465] Em um aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo ou um fragmento de ligação do mesmo específico a uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem de qualquer cepa de *C. difficile*, tal como aquelas descritas anteriormente, por exemplo, para a SEQ ID NO: 2. Em outro aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo ou um fragmento de ligação do mesmo específico a uma composição imunogênica descrita anteriormente. Por exemplo, em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo é específico para uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6 ou a SEQ ID NO: 8. Em outra modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo é

específico para uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6 ou a SEQ ID NO: 8, em que pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 6 ou da SEQ ID NO: 8 é reticulado por formaldeído, EDC, NHS ou uma combinação de EDC e NHS.

[00466] Os anticorpos ou os fragmentos de ligação dos mesmos que possui uma cadeia pesada variável e regiões de cadeias leves variáveis que são pelo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, preferencialmente aproximadamente 98%, mais preferencialmente aproximadamente 99% ou mais preferencialmente aproximadamente 100% idênticas às regiões de cadeias pesadas e leves variáveis de B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6; e/ou, preferencialmente, B8-26 também podem se ligar à TcdB.

[00467] Em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia pesada variável que inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região de cadeia pesada variável de B8-26 (SEQ ID NO: 49).

[00468] Em outra modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia leve variável que inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região de cadeia leve variável de B8-26 (SEQ ID NO: 55).

[00469] Ainda em um aspecto adicional, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui uma região de cadeia pesada variável que inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos

aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região de cadeia pesada variável de B8-26 (SEQ ID NO: 49) e uma região de cadeia leve variável que inclui uma sequência de aminoácidos pelo menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos da região de cadeia leve variável de B8-26 (SEQ ID NO: 55).

[00470] Em outra modalidade, os anticorpos ou os fragmentos de ligação dos mesmos que possui CDRs de cadeias pesadas variáveis e/ou cadeias leves variáveis de B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6; e/ou, preferencialmente, B8-26 podem também se ligar à TcdB.

[00471] Em uma modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo inclui sequências de aminoácidos das regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada de B8-26 e/ou as sequências de aminoácidos das CDRs de cadeia leve de B8-26.

[00472] Em uma modalidade preferida, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo específico para uma toxina de *C. difficile* B se liga especificamente a um epítopo dentro da região N-terminal da toxina B, por exemplo, um epítopo entre aminoácidos 1-1256 de uma TcdB, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2. Os exemplos incluem B2-31; B5-40; B8-26; B70-2; B6-30; e B9-30.

[00473] Em um exemplo de modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo específico para uma toxina de *C. difficile* B se liga especificamente a um epítopo dentro da região C-terminal da toxina B, por exemplo, um epítopo entre aminoácidos 1832 até 2710 de uma TcdB, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2.

[00474] Ainda em outra modalidade, o anticorpo ou o fragmento de ligação do mesmo específico para uma toxina de *C. difficile* B se liga especificamente a um epítopo dentro da região de "translocação" da toxina B de *C. difficile*, por exemplo, um epítopo que inclui preferencialmente os resíduos 956-1128 de uma TcdB, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2, tal como um epítopo entre os aminoácidos 659-1832 de uma TcdB. Os exemplos incluem B59-3; B60-2; e B56-6.

Combinações de anticorpos

[00475] O anticorpo anti-toxina ou o fragmento de ligação do mesmo pode ser administrado em combinação com outro anticorpos anti-toxina de *C. difficile* (por exemplo, outros anticorpos monoclonais, gamma-globulina policlonal) ou um fragmento de ligação do mesmo. As combinações que podem ser utilizadas incluem um anticorpo anti-toxina A ou um fragmento de ligação do mesmo e um anticorpo anti-toxina B ou um fragmento de ligação do mesmo.

[00476] Em outra modalidade, uma combinação inclui um anticorpo anti-toxina A ou um fragmento de ligação do mesmo e outro anticorpo anti-toxina A ou um fragmento de ligação do mesmo. Preferencialmente, a combinação inclui um anticorpo monoclonal anti-toxina A neutralizador ou um fragmento de ligação do mesmo e outro anticorpo monoclonal anti-toxina A neutralizador ou um fragmento de ligação do mesmo. De forma surpreendente, os inventores descobriram que tal combinação resultava em um efeito sinérgico na neutralização da citotoxicidade da toxina A. Por exemplo, a combinação inclui uma combinação de pelo menos dois dos anticorpos monoclonais anti-toxina A neutralizadores a seguir: A3-25; A65-33; A60-22; e A80-29. Mais preferencialmente, a combinação inclui o anticorpo A3-25 e pelo menos um dos anticorpos monoclonais anti-toxina A neutralizadores a seguir: A65-33; A60-22; e A80-29. Mais

preferencialmente, a combinação inclui todos os quatro anticorpos: A3-25; A65-33; A60-22; e A80-29.

[00477] Em uma modalidade adicional, uma combinação inclui um anticorpo anti-toxina B ou um fragmento de ligação do mesmo e outro anticorpo anti-toxina B ou fragmento de ligação do mesmo. Preferencialmente, a combinação inclui um anticorpo monoclonal anti-toxina B neutralizador ou um fragmento de ligação do mesmo e outro anticorpo monoclonal anti-toxina B neutralizador ou um fragmento de ligação do mesmo. De forma surpreendente, os inventores descobriram que tal combinação resultava em um efeito sinérgico na neutralização da citotoxicidade da toxina B. Mais preferencialmente, a combinação inclui uma combinação de pelo menos dois dos anticorpos monoclonais anti-toxina B neutralizadores a seguir: B8-26; B9-30 e B59-3. Mais preferencialmente, a combinação inclui todos os três anticorpos: B8-26; B9-30 e B59-3.

[00478] Ainda em outra modalidade, uma combinação inclui um anticorpo anti-toxina B ou um fragmento de ligação do mesmo e outro anticorpo anti-toxina B ou um fragmento de ligação do mesmo. Como citado anteriormente, os inventores descobriram que uma combinação de pelo menos dois dos anticorpos monoclonais neutralizadores podem exibir um efeito sinérgico inesperado na respectiva neutralização da toxina A e da toxina B.

[00479] Em outra modalidade, os agentes da invenção podem ser formulados na forma de umamistura ou quimicamente ou geneticamente ligados utilizando técnicas reconhecidas na arte resultando assim em anticorpos ligados covalentemente (ou fragmentos de anticorpo ligados covalentemente), que possuem propriedades de ligação tanto à anti-toxina A quanto à anti-toxina B. A formulação combinada pode ser guiada através da determinação de um ou mais parâmetros tal como a afinidade, a avidéz ou a eficácia

biológica do agente isoladamente ou em combinação com outro agente.

[00480] Tais terapias de combinação são preferencialmente aditivas e/ou sinérgicas em sua atividade terapêutica, por exemplo, na inibição, na prevenção (por exemplo, de reincidência) e/ou no tratamento de doenças ou distúrbios relacionados com *C. difficile*. A administração de tais terapias de combinação pode diminuir a dosagem do agente terapêutico (por exemplo, anticorpo ou mistura de fragmentos de anticorpo ou anticorpo biespecífico ou fragmento de anticorpo reticulado ou geneticamente fundido) necessária para atingir o efeito desejado.

[00481] É entendido que qualquer uma das composições da invenção, por exemplo, um anticorpo anti-toxina A e/ou anti-toxina B ou um fragmento de ligação do mesmo, pode ser combinada em proporções ou quantidades diferentes para o efeito terapêutico. Por exemplo, o anticorpo anti-toxina A e anti-toxina B ou o respectivo fragmento de ligação do mesmo pode estar presente em uma composição em uma proporção na faixa de 0,1:10 até 10:0,1, A:B. Em outra modalidade, o anticorpo anti-toxina A e o anti-toxina B ou o respectivo fragmento de ligação do mesmo pode estar presente em uma composição em uma proporção na faixa de 0,1:10 to 10:0,1, B:A.

[00482] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método de produção de um anticorpo neutralizante contra uma TcdA de *C. difficile*. O método inclui a administração de uma composição imunogênica como descrito anteriormente a um mamífero e a recuperação do anticorpo do mamífero. Em uma modalidade preferida, a composição imunogênica inclui uma TcdA de *C. difficile* mutante que possui a SEQ ID NO: 4, em que pelo menos um aminoácido da TcdA de *C. difficile* mutante é quimicamente reticulado, preferencialmente por formaldeído ou 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. Os

exemplos de anticorpos neutralizadores contra TcdA que podem ser produzidos incluem A65-33; A60-22; A80-29 e/ou A3-25.

[00483] Ainda em outro aspecto, a invenção refere-se a um método de produção de um anticorpo neutralizante contra uma TcdB de *C. difficile*. O método inclui a administração de uma composição imunogênica como descrito anteriormente a um mamífero e a recuperação do anticorpo do mamífero. Em uma modalidade preferida, a composição imunogênica inclui uma TcdB de *C. difficile* mutante que possui a SEQ ID NO: 6, em que pelo menos um aminoácido da TcdB de *C. difficile* mutante é quimicamente reticulado, preferencialmente por formaldeído ou 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. Os exemplos de anticorpos neutralizadores contra TcdB que podem ser produzidos incluem B2-31; B5-40, B70-2; B6-30; B9-30; B59-3; B60-2; B56-6; e/ou B8-26.

Formulações

[00484] As composições da presente invenção (tais como, por exemplo, composições que incluem uma toxina de *C. difficile* mutante, composições imunogênicas, anticorpos e/ou fragmentos de anticorpos de ligação dos mesmos descritos aqui) podem estar em uma variedade de formas. Estas incluem, por exemplo, formas de dosagem semissólidas e sólidas, supositórios, formas líquidas, tais como soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e de infusão), dispersões ou suspensões, lipossomos e/ou forma seca, tal como, por exemplo, forma de pó liofilizado, forma seca por congelamento, forma seca por spray e/ou forma seca de espuma. Para os supositórios, agentes aglutinantes e carreadores incluem, por exemplo, polialquileno glicóis ou triglicerídeos; tais supositórios podem ser formados partindo de misturas que contêm as composições da invenção. Em um exemplo de modalidade, a composição está em uma forma que é adequada para solução em ou suspensão em, veículos líquidos antes da injeção.

Em outros exemplos de modalidade, a composição é emulsificada ou encapsulada em lipossomos ou micropartículas, tal como polilactídeo, poliglicolídeo ou copolímero.

[00485] Em uma modalidade preferida, a composição é liofilizada e reconstituída de forma extemporânea antes do uso.

[00486] Em um aspecto, a presente invenção refere-se a composições farmacêuticas que incluem qualquer uma das composições descritas aqui (tais como, por exemplo, composições que incluem uma toxina de *C. difficile* mutante, composições imunogênicas, anticorpos e/ou fragmentos de anticorpos de ligação dos mesmos descritos aqui), formuladas juntas com um carreador farmacêuticamente aceitável. Os "carreadores farmacêuticamente aceitáveis" incluem quaisquer solventes, meios de dispersão, estabilizantes, diluentes e/ou tampões que são fisiologicamente adequados.

[00487] Os exemplos de estabilizantes incluem carboidratos, tal como sorbitol, manitol, amido, dextrana, sacarose, trealose, lactose e/ou glicose; proteínas inertes, tal como albumina e/ou caseína; e/ou outras macromoléculas metabolizadas lentamente grandes, tais como polissacarídeos tais como quitosana, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos e copolímeros (tais como agarose SEPHAROSE™ funcionalizada com látex, agarose, celulose etc/), aminoácidos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos e agregados lipídicos (tais como gotículas de óleo ou lipossomos). Adicionalmente, estes carreadores podem funcionar como agentes imunoestimulantes (isto é, adjuvantes).

[00488] Preferencialmente, a composição inclui trealose. As quantidades preferidas de trealose (% em peso) incluem desde um mínimo de aproximadamente 1%, 2%, 3% ou 4% até um máximo de aproximadamente 10%, 9%, 8%, 7%, 6% ou 5%. Qualquer valor

mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma faixa adequada. Em uma modalidade, a composição inclui aproximadamente 3% - 6% de trealose, mais preferencialmente, 4,5% de trealose, por exemplo, por dose de 0,5 mL.

[00489] Os exemplos de diluentes adequados incluem água destilada, solução salina, solução salina tamponada com fosfato fisiológica, glicerol, álcool (tal como etanol), solução de Ringer, solução de dextrose, soluções de sais equilibrados de Hanks e/ou um excipiente de liofilização.

[00490] Os exemplos de tampões incluem tampões de fosfato (tais como fosfato de potássio, fosfato de sódio); acetato (tal como acetato de sódio); succinato (tal como succinato de sódio); glicina; histidina; carbonato, Tris (tris(hidroximetil)aminometano) e/ou bicarbonato (tal como bicarbonato de amônio). Preferencialmente, a composição inclui tampão tris. As quantidades preferidas de tampão tris incluem desde um mínimo de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM até um máximo de aproximadamente 100 mM, 50 mM, 20 mM, 19 mM, 18 mM, 17 mM, 16 mM, 15 mM, 14 mM, 13 mM, 12 mM ou 11 mM. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma faixa adequada. Em uma modalidade, a composição inclui aproximadamente 8 mM até 12 mM de tampão tris, mais preferencialmente, 10 mM de tampão tris, por exemplo, por dose de 0,5 mL.

[00491] Em outra modalidade preferida, a composição inclui tampão de histidina. As quantidades preferidas de tampão de histidina incluem desde um mínimo de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM até um máximo de aproximadamente 100 mM, 50 mM, 20 mM, 19 mM, 18 mM, 17 mM, 16 mM, 15 mM, 14 mM, 13 mM, 12 mM ou 11 mM. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma faixa adequada. Em uma

modalidade, a composição inclui aproximadamente 8 mM até 12 mM de tampão de histidina, mais preferencialmente, 10 mM de tampão de histidina, por exemplo, por dose de 0,5 mL.

[00492] Ainda em outra modalidade preferida, a composição inclui tampão fosfato. As quantidades preferidas de tampão fosfato incluem desde um mínimo de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM até um máximo de aproximadamente 100 mM, 50 mM, 20 mM, 19 mM, 18 mM, 17 mM, 16 mM, 15 mM, 14 mM, 13 mM, 12 mM ou 11 mM. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma faixa adequada. Em uma modalidade, a composição inclui aproximadamente 8 mM até 12 mM de tampão fosfato, mais preferencialmente, 10 mM de tampão fosfato, por exemplo, por dose de 0,5 mL.

[00493] O pH do tampão será geralmente escolhido para estabilizar o material ativo de escolha e pode ser determinável pelos peritos na arte através de métodos conhecidos. Preferencialmente, o pH do tampão estará na faixa do pH fisiológico. Assim, faixas de pH preferidas são desde aproximadamente 3 até aproximadamente 8; mais preferencialmente, desde aproximadamente 6,0 até aproximadamente 8,0; ainda mais preferencialmente, desde aproximadamente 6,5 até aproximadamente 7,5; e mais preferencialmente, a aproximadamente 7,0 até aproximadamente 7,2.

[00494] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas podem incluir um tensoativo. Qualquer tensoativo é adequado, seja este anfotérico, não iônico, catiônico ou aniônico. Os exemplos de tensoativos incluem os tensoativos de ésteres de polioxietileno sorbitana (por exemplo, TWEEN®), tais como polissorbato 20 e/ou polissorbato 80; éteres graxos de polioxietileno derivados de lauril, cetil, estearil e oleil alcoóis (conhecidos como tensoativos Brij), tal como trietilenoglicol monolauril éter (Brij 30); Triton X 100 ou t-

octilfenoxipolietoxietanol; e ésteres de sorbitana (comumente conhecidos como os SPANs), tais como trioleato de sorbitana (Span 85) e monolaurato de sorbitana e combinações dos mesmos. Os tensoativos preferidos incluem polissorbato 80 (monooleato de polioxietileno sorbitana).

[00495] As quantidades preferidas de polissorbato 80 (% em peso) incluem desde um mínimo de aproximadamente 0,001%, 0,005% ou 0,01%, até um máximo de aproximadamente 0,010%, 0,015%, 0,025% ou 1,0%. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma faixa adequada. Em uma modalidade, a composição inclui aproximadamente 0,005% - 0,015% de polissorbato 80, mais preferencialmente, 0,01% de polissorbato 80.

[00496] Em um exemplo de modalidade, a composição imunogênica inclui trealose e fosfato 80. Em outros exemplos de modalidade, a composição imunogênica inclui tampão tris e polissorbato 80. Em outros exemplos de modalidade, a composição imunogênica inclui tampão de histidina e polissorbato 80. Ainda em outros exemplos de modalidade, a composição imunogênica inclui tampão fosfato e polissorbato 80.

[00497] Em um dos exemplos de modalidade, a composição imunogênica inclui trealose, tampão tris e polissorbato 80. Em outros exemplos de modalidade, a composição imunogênica inclui trealose, tampão de histidina e polissorbato 80. Ainda em outros exemplos de modalidade, a composição imunogênica inclui trealose, tampão fosfato e polissorbato 80.

[00498] As composições descritas aqui podem incluir ainda componentes de petróleo, origem animal, vegetal ou sintética, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de soja e/ou óleo mineral. Os exemplos incluem glicóis tal como propileno glicol ou polietileno glicol.

[00499] Em algumas modalidades, a composição farmacêutica

inclui ainda formaldeído. Por exemplo, em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica que inclui ainda formaldeído possui uma composição imunogênica, em que a toxina de *C. difficile* mutante da composição imunogênica foi colocada em contato com um agente de reticulação química que inclui formaldeído. A quantidade de formaldeído presente na composição farmacêutica pode variar desde um 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% ou 0,015%, até um máximo de aproximadamente 0,020%, 0,019%, 0,018%, 0,017%, 0,016%, 0,015%, 0,014%, 0,013%, 0,012% 0,011% ou 0,010%. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma faixa adequada. Em uma modalidade, a composição farmacêutica inclui aproximadamente 0,010% de formaldeído.

[00500] Em algumas modalidades alternativas, as composições farmacêuticas descritas aqui não incluem formaldeído. Por exemplo, em uma modalidade preferida, uma composição farmacêutica que não inclui formaldeído possui uma composição imunogênica, em que pelo menos um aminoácido da toxina de *C. difficile* mutante é quimicamente reticulado por um agente que inclui EDC. Mais preferencialmente, em tal modalidade, a toxina de *C. difficile* mutante não foi colocada em contato com um agente de reticulação química que inclui formaldeído. Como outros exemplos de modalidade, uma composição farmacêutica que está em uma forma liofilizada não inclui formaldeído.

[00501] Em outra modalidade, as composições descritas aqui podem incluir um adjuvante, como descrito a seguir. Os adjuvantes preferidos aumentam a resposta imunológica intrínseca para um agente imunogênico sem causar alterações conformacionais no agente imunogênico que possam afetar a forma qualitativa da resposta

imunológica.

[00502] Os exemplos de adjuvantes incluem 3 De-O-acilated monophosphoril lipid A (MPL™) (ver GB 2220211 (GSK)); um gel de hidróxido de alumínio tal como Alhydrogel™ (Brenntag Biosector, Dinamarca); sais de alumínio (tais como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio), que podem ser utilizados com ou sem um agente imunoestimulador tal como MPL ou 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos ou monoméricos tal como ácido poliglutâmico ou polilisina.

[00503] Ainda outros exemplos de adjuvante é um oligonucleotídeo imunoestimulador tal como um oligonucleotídeo CpG (ver, por exemplo, WO 1998/040100, WO2010/067262) ou uma saponina e um oligonucleotídeo imunoestimulador, tal como um oligonucleotídeo CpG (ver, por exemplo, WO 00/062800). Em uma modalidade preferida, o adjuvante é um oligonucleotídeo CpG, mais preferencialmente CpG oligodeoxinucleotídeos (CpG ODN). Os CpG ODN preferidos são da Classe B que preferencialmente ativam células B. Em aspectos da invenção, o CpG ODN possui a sequência de ácido nucléico 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) em que * indica uma ligação de fosforotioato. O CpG ODN desta sequência é conhecido como CpG 24555, que é descrito na WO2010/067262. Em uma modalidade preferida, o CpG 24555 é utilizado junto com um sal de hidróxido de alumínio tal como Alhydrogel.

[00504] Uma classe adicional dos exemplos de adjuvantes incluem adjuvantes de saponina, tal como Stimulon™ (QS-21, que é um glicosídeo de triterpeno ou saponina, Aquila, Framingham, Mass.) ou partículas geradas partindo dos mesmos tais como ISCOMs (complexos de estimulação imunológica) e o adjuvante ISCOMATRIX®. Consequentemente, as composições da presente invenção podem

ser fornecidas na forma de ISCOMs, ISCOMS contendo CTB, lipossomos ou encapsuladas em compostos tais como acrilatos ou poli(DL-lactídeo-co-glicosídeo) para formar microesferas de um tamanho adequado para a adsorção. Tipicamente, o termo "ISCOM" refere-se a complexos imunogênicos formados entre glicosídeos, tais como saponinas triterpenoides (particularmente Quil A) e antígenos que contêm uma região hidrofóbica. Em uma modalidade preferida, o adjuvante é um adjuvante ISCOMATRIX.

[00505] Outros exemplos de adjuvantes incluem RC-529, GM-CSF e Adjuvante Completo de Freund (CFA) e Adjuvante Incompleto de Freund (IFA).

[00506] Ainda outra classe de exemplos de adjuvantes é análogos de glicolípídeo que incluem N-glicosilamidas, N-glicosiluréias e N-glicosilcarbamatos, dos quais cada um é substituído no resíduo de açúcar por um aminoácido.

[00507] Opcionalmente, a composição farmacêutica inclui dois ou mais adjuvantes diferentes. As combinações preferidas de adjuvantes incluem qualquer combinação de adjuvantes que inclui, por exemplo, pelo menos dois dos adjuvantes a seguir: alume, MPL, QS-21, ISCOMATRIX, CpG e Alhydrogel. Um exemplo de combinação de adjuvantes inclui uma combinação de CpG e Alhydrogel.

[00508] Alternativamente, em uma modalidade, a composição é administrada ao mamífero na ausência de um adjuvante.

[00509] As composições descritas aqui podem ser administradas através de qualquer rota de administração, tal como, por exemplo, rotas parenterais, tópicas, intravenosas, mucosais, orais, subcutâneas, intraarteriais, intracraniais, intratecais, intraperitoneais, intranasais, intramusculares, intradermais, por infusão, retais e/ou transdermais para aplicações profiláticas e/ou terapêuticas. Em uma modalidade preferida, a rota de administração de uma composição é parenteral,

mais preferencialmente, administração intramuscular. A administração intramuscular típica é realizada nos músculos do braço ou da perna.

[00510] As composições descritas aqui podem ser administradas em combinação com terapias que são pelo menos parcialmente eficientes na prevenção e/ou no tratamento de infecção causada por *C. difficile*. Por exemplo, uma composição da invenção pode ser administrada antes, concorrentemente com ou após a bioterapia; terapia pró-biótica; implantes de stool; imunoterapia (tal como imunoglobulina intravenosa); e/ou um padrão aceito de cuidado para o tratamento com antibiótico da doença associada a *C. difficile* (CDAD), tal como metronidazol e/ou vancomicina.

[00511] Uma composição da presente invenção em relação à toxina A e à toxina B pode ser administrada ao mamífero em qualquer combinação. Por exemplo, uma composição imunogênica que inclui uma TcdA de *C. difficile* mutante pode ser administrada ao mamífero antes, concorrentemente ou após a administração de uma composição imunogênica que inclui uma TcdB de *C. difficile* mutante. De modo inverso, uma composição imunogênica que inclui uma TcdB de *C. difficile* mutante pode ser administrada ao mamífero antes, concorrentemente com ou após a administração de uma composição imunogênica que inclui uma TcdA de *C. difficile* mutante.

[00512] Em outra modalidade, uma composição que inclui um anticorpo anti-toxina A ou um fragmento de ligação do mesmo pode ser administrada ao mamífero antes, concorrentemente com ou após a administração de uma composição que inclui um anticorpo anti-toxina B ou um fragmento de ligação do mesmo. De modo inverso, uma composição que inclui um anticorpo anti-toxina B ou um fragmento de ligação do mesmo pode ser administrada ao mamífero antes, concorrentemente com ou após a administração de uma composição que inclui um anticorpo anti-toxina A ou um fragmento de ligação do

mesmo.

[00513] Em uma modalidade adicional, uma composição da presente invenção pode ser administrada ao mamífero antes, concorrentemente com ou após a administração de um carreador farmacologicamente aceitável. Por exemplo, um adjuvante pode ser administrado antes, concorrentemente com ou após a administração de uma composição que inclui uma toxina de *C. difficile* mutante. Consequentemente, uma composição da presente invenção e um carreador farmacologicamente aceitável podem ser embalados no mesmo frasco ou podem ser embalados em frascos separados e misturados antes do uso. As composições podem ser formuladas para administração de uma única dose e/ou para administração de várias doses.

[00514] Métodos de Proteção e/ou Tratamento de infecção causada por *C. difficile* em um mamífero

[00515] Em um aspecto, a invenção refere-se a um método de indução de uma resposta imunológica para uma toxina de *C. difficile* em um mamífero. O método inclui a administração de uma quantidade eficiente de uma composição descrita aqui ao mamífero. Por exemplo, o método pode incluir a administração de uma quantidade eficiente para gerar uma resposta imunológica para a respectiva toxina de *C. difficile* no mamífero.

[00516] Em um exemplo de modalidade, a invenção refere-se a um método de indução de uma resposta imunológica para uma TcdA de *C. difficile* em um mamífero. O método inclui a administração de uma quantidade eficiente de uma composição imunogênica que inclui uma TcdA de *C. difficile* mutante ao mamífero. Em outros exemplos de modalidade, a invenção refere-se a um método de indução de uma resposta imunológica para uma TcdB de *C. difficile* em um mamífero. O método inclui a administração de uma quantidade eficiente de uma

composição imunogênica que inclui uma TcdB de *C. difficile* mutante ao mamífero.

[00517] Em uma modalidade adicional, o método inclui a administração de uma quantidade eficiente de uma composição imunogênica que inclui uma TcdA de *C. difficile* mutante e uma quantidade eficiente de uma composição imunogênica que inclui uma TcdB de *C. difficile* mutante ao mamífero. Em aspectos adicionais, as composições descritas aqui podem ser utilizadas para tratar, prevenir, diminuir o risco de, diminuir a gravidade de, diminuir as ocorrências de e/ou retardar o início de uma infecção causada por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, estado de saúde, sintoma e/ou complicação dos mesmos em um mamífero, quando comparado a um mamífero ao qual a composição não é administrada. O método inclui a administração de uma quantidade eficiente de uma composição ao mamífero.

[00518] Três síndromes clínicas causadas pela infecção por *C. difficile* são reconhecidas, com base na gravidade da infecção. A forma mais grave é a colite pseudomembranosa (PMC), que é caracterizada por diarreia profusa, dor abdominal, sinais sistêmicos de doença e uma aparência endoscópica distintiva do cólon.

[00519] A colite associada a antibióticos (AAC) é também caracterizada por diarreia profusa, dor abdominal e sensibilidade, sinais sistêmicos (por exemplo, febre) e leucocitose. Os danos intestinais na AAC são menos graves que na PMC, a aparência endoscópica característica do cólon na PMC está ausente e a mortalidade é baixa.

[00520] Finalmente, a diarreia associada a antibióticos (AAD, que é também conhecida como diarreia associada a *C. difficile* (CDAD) é uma síndrome relativamente branda e é caracterizada por diarreia branda a moderada, não possuindo tanto inflamação do intestino

grosso (que é caracterizada, por exemplo, por dor abdominal e sensibilidade) e sinais sistêmicos de infecção (por exemplo, febre).

[00521] Estas três síndromes distintas tipicamente ocorrem em uma ordem crescente de frequência. Isto é, a PMC tipicamente ocorre menos frequentemente que a AAC e a AAD é tipicamente a apresentação clínica mais frequente de doença causada por *C. difficile*.

[00522] Uma complicação frequente de infecção causada por *C. difficile* é a doença recorrente ou reincidente, que ocorre em até 20% de todos os indivíduos que se recuperaram da doença causada por *C. difficile*. A reincidente pode ser caracterizada clinicamente como AAD, AAC ou PMC. Os pacientes que têm reincidente uma vez têm maior probabilidade de nova reincidente.

[00523] Como utilizado aqui, os estados de saúde de uma infecção causada por *C. difficile* incluem, por exemplo, infecção causada por *C. difficile* branda, branda à moderada, moderada e grave. Um estado de saúde de infecção causada por *C. difficile* pode variar dependendo da presença e/ou da gravidade dos sintomas da infecção.

[00524] Os sintomas de uma infecção causada por *C. difficile* podem incluir sintomas fisiológicos, bioquímicos, histológicos e/ou comportamentais tais como, por exemplo, diarreia; colite; colite com cólicas, febre, leucócitos fecais e inflamação na biópsia do cólon; colite pseudomembranosa; hipoalbuminemia; anasarca; leucocitose; septicemia; dor abdominal; comportamento assintomático; e/ou complicações e fenótipos patológicos intermediários presente durante o desenvolvimento da infecção e combinações dos mesmos etc. Consequentemente, por exemplo, a administração de uma quantidade eficiente das composições descritas aqui pode, por exemplo, tratar, prevenir, diminuir o risco de, diminuir a gravidade de, diminuir as ocorrências de e/ou retardar o início de diarreia; dor abdominal,

cólicas, febre, inflamação na biópsia colônica, hipoalbuminemia, anasarca, leucocitose, septicemia e/ou comportamento assintomático etc., quando comparado a um mamífero ao qual a composição não foi administrada.

[00525] Os fatores de risco de uma infecção causada por *C. difficile* podem incluir, por exemplo, uso presente ou futuro imediato de um antimicrobiano (qualquer agente antimicrobiano com espectro antibacteriano e/ou atividade contra bactérias anaeróbicas são abrangidos, incluindo, por exemplo, antibióticos que causam perturbação da microbiota colônica normal, por exemplo, clindamicina, cefalosporinas, metronidazol, vancomicina, fluoroquinolonas (que incluem levofloxacina, moxifloxacina, gatifloxacina e ciprofloxacina), linezolida etc.); eliminação presente ou futura imediata de metronidazol ou vancomicina prescrita; admissão presente ou futura imediata em uma unidade de cuidado da saúde (tal como um hospital, uma unidade de cuidados crônicos etc.) e trabalhadores de cuidado da saúde; tratamento presente ou futuro imediato com inibidores de bomba de prótons, antagonistas de H₂ e/ou metotrexato ou a combinação dos mesmos; doenças gastrointestinais presentes ou de risco, tal como doença do intestino inflamatório; cirurgia gastrointestinal ou procedimento gastrointestinal passado, presente ou futuro imediato no mamífero; recorrência passada ou presente de uma infecção causada por *C. difficile* e/ou uma CDAD, por exemplo, pacientes que tiveram uma infecção causada por *C. difficile* e/ou uma CDAD uma vez ou mais de uma vez; e humanos idosos com pelo menos aproximadamente 65 e mais velhos.

[00526] Nos métodos descritos aqui, o mamífero pode ser qualquer mamífero, tal como, por exemplo, camundongos, hamsters, primatas e humanos. Em uma modalidade preferida, o mamífero é um humano. De acordo com a presente invenção, o humano pode incluir indivíduos

que exibiram uma infecção causada por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, estado de saúde, sintoma e/ou complicação dos mesmos; indivíduos que estão atualmente exibindo uma infecção causada por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, estado de saúde, sintoma e/ou complicação dos mesmos; e indivíduos que estão em risco de uma infecção causada por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, estado de saúde, sintoma e/ou complicação dos mesmos.

[00527] Os exemplos de indivíduos que exibiram sintomas de infecção causada por *C. difficile* incluem indivíduos que exibiram ou estão exibindo sintomas descritos anteriormente; indivíduos que tiveram ou que possuem uma infecção causada por *C. difficile* e/ou uma doença associada a *C. difficile* (CDAD); e indivíduos que têm uma recorrência de uma infecção causada por *C. difficile* e/ou CDAD.

[00528] Os exemplos de pacientes que estão em risco de uma infecção causada por *C. difficile* incluem indivíduos em risco de ou estão sofrendo atualmente uso de antimicrobianos planejado; indivíduos em risco de ou estão sofrendo atualmente a eliminação de metronidazol ou vancomicina prescrita indivíduos que estão em risco de ou estão sofrendo atualmente uma admissão planejada em uma unidade de cuidado da saúde (tal como um hospital, unidade de cuidados crônicos etc.) e trabalhadores de cuidado da saúde; e/ou indivíduos em risco de ou estão atualmente sofrendo um tratamento planejado com inibidores de bomba de prótons, antagonistas de H₂ e/ou metotrexato ou uma combinação dos mesmos; indivíduos que have tiveram ou estão sofrendo de doenças gastrointestinais, tal como doença do intestino inflamatório; indivíduos que tiveram ou estão sofrendo cirurgia gastrointestinal ou procedimentos gastrointestinais; e indivíduos que tiveram ou possuem uma recorrência de uma infecção causada por *C. difficile* e/ou uma CDAD, por exemplo, pacientes que

tiveram uma infecção causada por *C. difficile* e/ou uma CDAD uma vez ou mais de uma vez; indivíduos que possui aproximadamente 65 anos de idade ou mais velhos. Tais pacientes em risco podem ou não estar atualmente apresentando sintomas de uma infecção causada por *C. difficile*.

[00529] Nos pacientes assintomáticos, a profilaxia e/ou o tratamento pode começar em qualquer idade (por exemplo, em aproximadamente 10, 20 ou 30 anos de idade). Em uma modalidade, entretanto, não é necessário começar o tratamento até que um paciente atinja pelo menos aproximadamente 45, 55, 65, 75 ou 85 anos de idade. Por exemplo, as composições descritas aqui podem ser administradas a um ser humano assintomático que tem 50-85 anos de idade.

[00530] Em uma modalidade, o método de prevenção, diminuição do risco de, diminuição da gravidade de, diminuição das ocorrências de e/ou retardo do início de uma infecção causada por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, estado de saúde, sintoma e/ou complicação dos mesmos em um mamífero inclui a administração de uma quantidade eficiente de uma composição descrita aqui a um mamífero que necessita da mesma, um mamífero em risco de e/ou um mamífero suscetível a uma infecção causada por *C. difficile*. Uma quantidade eficiente inclui, por exemplo, uma quantidade suficiente para prevenir, diminuir o risco de, diminuir a gravidade de, diminuir as ocorrências de e/ou retardar o início de uma infecção causada por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, estado de saúde, sintoma e/ou complicação dos mesmos em um mamífero, quando comparado a um mamífero ao qual a composição não é administrada. A administração de uma quantidade eficiente das composições descritas aqui may, por exemplo, previne, diminui o risco de, diminui a gravidade de, diminui as ocorrências de e/ou retarda o início de

diarreia; dor abdominal, cólicas, febre, inflamação na biópsia colônica, hipoalbuminemia, anasarca, leucocitose, septicemia e/ou comportamento assintomático etc., quando comparado a um mamífero ao qual a composição não foi administrada. Em uma modalidade preferida, o método inclui a administração de uma quantidade eficiente de uma composição imunogênica descrita aqui ao mamífero que necessita da mesma, ao mamífero em risco de e/ou ao mamífero suscetível a uma infecção causada por *C. difficile*.

[00531] Em uma modalidade adicional, o método de tratamento de, diminuição da gravidade de e/ou retardo do início de uma infecção causada por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, estado de saúde, sintoma e/ou complicação dos mesmos em um mamífero inclui a administração de uma quantidade eficiente de uma composição descrita aqui a um mamífero suspeito de ou sofrendo atualmente de uma infecção causada por *C. difficile*. Uma quantidade eficiente inclui, por exemplo, uma quantidade suficiente para tratar, diminuir a gravidade de e/ou retardar o início de uma infecção causada por *C. difficile*, doença associada a *C. difficile*, síndrome, estado de saúde, sintoma e/ou complicação dos mesmos em um mamífero, quando comparado a um mamífero ao qual a composição não é administrada.

[00532] A administração de uma quantidade eficiente de uma composição pode melhorar pelo menos um sinal ou um sintoma de infecção causada por *C. difficile* no indivíduo, tal como é descrito a seguir. A administração de uma quantidade eficiente das composições descritas aqui pode, por exemplo, diminuir a gravidade de e/ou diminuir as ocorrências de diarreia; diminuir a gravidade de e/ou diminuir as ocorrências de dor abdominal, cólicas, febre, inflamação na biópsia colônica, hipoalbuminemia, anasarca, leucocitose, septicemia e/ou comportamento assintomático etc., quando comparado a um

mamífero ao qual a composição não foi administrada. Opcionalmente, a presença de sintomas, sinais e/ou fatores de risco de uma infecção é determinada antes de começar o tratamento. Em uma modalidade preferida, o método inclui a administração de uma quantidade eficiente de um anticorpo e/ou um fragmento de ligação do mesmo descrito aqui ao mamífero suspeito ou sofrendo atualmente de, uma infecção causada por *C. difficile*.

[00533] Consequentemente, uma quantidade eficiente de uma composição refere-se a uma quantidade suficiente para atingir um efeito desejado (por exemplo, efeito profilático e/ou terapêutico) nos métodos da presente invenção. Por exemplo, a quantidade de um agente imunogênico para administração pode variar desde um mínimo de aproximadamente 1 µg, 5 µg, 25 µg, 50 µg, 75 µg, 100 µg, 200 µg, 500 µg ou 1 mg até um máximo de aproximadamente 2 mg, 1 mg, 500 µg, 200 µg por injeção. Qualquer valor mínimo pode ser combinado com qualquer valor máximo para definir uma faixa adequada. Tipicamente aproximadamente 10, 20, 50 ou 100 µg por agente imunogênico são utilizados para cada injeção ao ser humano.

[00534] A quantidade de uma composição da invenção administrada ao indivíduo pode depender do tipo e da gravidade da infecção e/ou das características do indivíduo tais como saúde geral, idade, sexo, peso corporal e tolerância a fármacos. Isto também pode depender do grau, da gravidade e do tipo de doença. Uma quantidade eficiente também pode variar dependendo de fatores, tais como a rota de administração, o sítio alvo, o estado fisiológico do paciente, a idade do paciente, se o paciente é humano ou um animal, outras terapias administradas e se o tratamento é profilático ou terapêutico. O perito na arte será capaz de determinar quantidades apropriadas dependend destes e de outros fatores.

[00535] Uma quantidade eficiente pode incluir uma dose eficiente

ou várias doses eficientes (tais como, por exemplo, 2, 3, 4 doses ou mais) para uso nos métodos apresentados aqui. Pode ser necessário titular as dosagens eficientes para otimizar a segurança e a eficácia.

[00536] A combinação de quantidade e frequência de dose adequada para realizar usos profiláticos e/ou terapêuticos é definida como um regime profilaticamente ou terapêuticamente eficiente. Em um regime profilático e/ou terapêutico, a composição é tipicamente administrada em mais de uma dosagem até que uma resposta imunológica suficiente seja atingida. Tipicamente, a resposta imunológica é monitorada e dosagens repetidas são fornecidas se a resposta imunológica começar a diminuir.

[00537] As composições podem ser administradas em várias dosagens ao longo de um período de tempo. O tratamento pode ser monitorado através da análise do anticorpo ou das respostas das células T ou das células B ativadas para o agente terapêutico (por exemplo, uma composição imunogênica que inclui uma toxina de *C. difficile* mutante) ao longo do tempo. Se a resposta diminuir, é indicada uma dosagem de reforço.

Exemplos

Exemplo 1: Identificação de cepas de *C. difficile* negativas para toxinas { TC "Identification of toxin-negative *C. difficile* strains" \f C \l "3" }

[00538] Para identificar cepas de *C. difficile* que não possuem genes da toxina (A e B) e expressão de toxinas, 13 cepas de *C. difficile* foram testadas. Os meios de cultura de 13 cepas de *C. difficile* foram testados por ELISA em relação à toxina A. Sete cepas expressavam a toxina A: *C. difficile* 14797-2, *C. difficile* 630, *C. difficile* BDMS, *C. difficile* W1194, *C. difficile* 870, *C. difficile* 1253 e *C. difficile* 2149. Ver a Figura 3.

[00539] Seis cepas não expressavam a toxina A e não tinham o locus de patogenicidade inteiro: *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™) e *C. difficile* VPI 11186 (ATCC 700057™). VPI 11186 foi selecionada com base em sua efetividade de captar DNA plasmideal por conjugação.

[00540] As mesmas 13 cepas foram testadas em um ensaio de PCR multiplex utilizando iniciadores fora do locus de patogenicidade (PaLoc; Braun e outros, *Gene*. 1996 Nov 28;181(1-2):29-38.). Os resultados da PCR demonstraram que o DNA das 6 cepas negativas para a toxina A por ELISA não amplificavam quaisquer genes do PaLoc (tcdA-tcdE). As sequências flanqueadoras de PaLoc (*cdd3* e *cdu2*) estavam presentes (dados não mostrados).

Exemplo 2: Inativação da via de esporulação em *C. difficile* VPI 11186

[00541] O nocaute da função de formação de esporos da cepa de produção de *C. difficile* facilita a fermentação em grande escala em um ambiente de fabricação seguro. O sistema ClosTron foi utilizado para criar uma cepa de *C. difficile* asporogênica. Ver Heap e outros, *J Microbiol Methods*. 2009 Jul;78(1):79-85. O sistema ClosTron permite a inativação gênica direcionada com um íntron do grupo II para a inativação de inserção direcionada ao sítio de um gene clostridial *spo0A1*. A produção da cepa menos toxina VPI11186 foi submetida à inativação da esporulação pela tecnologia ClosTron. Mutantes resistentes à eritromicina foram selecionados e a presença do cassete de inserção foi confirmada por PCR (não mostrado). A incapacidade de dois clones independentes de formar esporos foi confirmada.

Exemplo 3: Modificação genética dos genes das toxinas A e B para inativar a função de citotoxicidade

[00542] Os quadros abertos de leitura (ORFs) das toxinas mutantes A e B de comprimento completo baseados nas sequências genômicas da cepa 630Δ foram planejados para a síntese customizada na Blue

Heron Biotech. Ver, por exemplo, as SEQ ID NOs: 9-14. O sítio ativo para a atividade de glucosiltransferase responsável pela toxicidade celular foi alterado por duas substituições alélicas: D285A/D287A (ver a SEQ ID NO: 3) para a toxina A e D286A/D288A (ver a SEQ ID NO: 5) para a toxina B. Dois nucleotídeos foram mutados em cada códon de aspartato (D) para criar o códon para alanina (A). Ver, por exemplo, as SEQ ID NOs: 9-14. Em adição, um par de vetores expressando as toxinas mutantes que não possuem os resíduos de cisteína foi construído após a síntese customizada na Blue Heron Biotech. Sete resíduos de cisteína da toxina A mutante e 9 resíduos de cisteína da toxina B mutante foram substituídos por alanina. As substituições incluem cisteínas catalíticas da proteação autocatalítica das toxinas A e B. Ainda, mutações silenciosas foram introduzidas quando necessário para eliminar sítios de restrição utilizados para a construção dos vetores.

Exemplo 4: Vetor de Expressão pMTL84121fdx

[00543] O vetor bifuncional plasmideal utilizado para a expressão mutante da toxina A de *C. difficile* foi selecionado do sistema modular da série pMTL8000 desenvolvido pelo Minton lab (ver Heap e outros, *J Microbiol Methods*. 2009 Jul;78(1):79-85). O vetor escolhido pMTL84121fdx contém o replicon do plasmídeo pCD6 Gram+ de *C. difficile*, o marcador selecionável *catP* (cloramfenicol/ tiamfenicol), o replicon p15a Gram- e a função *tra* e o promotor da ferredoxina de *C. sporogenes* (*fdx*) e o sítio múltiplo de clonagem distal (MCS). Dados empíricos sugeriram que o replicon p15a com baixo número de cópias conferia maior estabilidade em *E. coli* do que em ColE1 alternativo. O promotor *fdx* foi selecionado uma vez que fornecia maior expressão que outros promotores testados em experimentos com construções repórteres de CAT (por exemplo, *tcdA*, *tcdB*; ou tetR ou xilR heterólogos) (dados não mostrados).

Exemplo 5: Clonagem dos ORFs de toxina modificados no pMTL84121fdx

[00544] Os quadros abertos de leitura (ORFs) das toxinas A e B mutantes de comprimento completo baseados nas sequências genômicas da cepa 630Δ foram subclonados utilizando os sítios de *NdeI* e *BglII* de clonagem múltipla do vetor pMTL84121fdx utilizando técnicas de biologia molecular padronizadas. Para facilitar a clonagem, os ORFs foram flanqueados por um sítio *NdeI* proximal contendo o códon de início e um sítio *BglII* logo a jusante do códon de término.

Exemplo 6: Mutagênese direcionada ao sítio de TcdA para criar um triplo mutante

[00545] O resíduo de cisteína catalítico do domínio de protease autocatalítico foi substituído (isto é, C700A para TcdA e C698A para TcdB) nas SEQ ID NOs: 3 e 5, isto é, em cada um dos "duplos mutantes". Para a mutagênese da toxina A mutante, um fragmento de *NdeI-HindIII* de 2,48 kb do plasmídeo de expressão TcdA D285A/D287A foi subclonado em pUC19 (corte com os mesmos) e a mutagênese direcionada ao sítio foi realizada sobre este molde. Uma vez que os novos alelos foram confirmados através da análise de sequência de DNA, os fragmentos de *NdeI-HindIII* modificados foram reintroduzidos dentro do vetor de expressão pMTL84121fdx para criar os "triplo mutantes", isto é, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 6.

Exemplo 7: Mutagênese direcionada ao sítio de TcdB para criar um triplo mutante

[00546] Para a mutagênese da toxina B mutante, um fragmento de *NdeI-EcoNI* de 3,29 kb do plasmídeo da toxina B mutante foi modificado e reintroduzido. Uma vez que o sítio *EcoNI* não está presente nos vetores de clonagem disponíveis um fragmento ligeiramente maior de 3,5 kb de *NdeI-EcoRV* foi subclonado no pUC19 (preparado com *NdeI-SmaI*). Após a mutagênese, o fragmento de

NdeI-EcoNI de 3,3 kb interno modificado foi cortado e utilizado para substituir o fragmento do vetor pMTL84121*fdx* de expressão da toxina B mutante correspondente. Uma vez que foi observado que a eficiência de clonagem desta estratégia direcional era bastante baixa, uma estratégia alternativa para a introdução do alelo C698A envolvendo a substituição de um *DraIII* de 1,5 kb foi tentada em paralelo. Ambas as estratégias independentemente forneceram os recombinantes desejados.

Exemplo 8: Criação de variantes de toxina mutante adicionais através de mutagênese direcionada ao sítio

[00547] Pelo menos doze variantes de toxina mutante de *C. difficile* diferentes foram construídos. As substituições alélicas foram introduzidas dentro dos fragmentos gênicos da toxina mutante N-terminais através de mutagênese direcionada ao sítio (Quickchange® kit). As toxinas recombinantes também foram engenheiradas como controles de referência para avaliar a capacidade deste sistema à base de plasmídeo de gerar proteína quantitativamente equivalente na atividade biológica em relação às toxinas nativas purificadas das cepas de *C. difficile* do tipo selvagem. Neste caso, substituições alélicas foram introduzidas para reverter as substituições de glucosiltransferase originais. Em adição, um par de vetores de toxina mutante sem cisteína foi construído após a síntese customizada na Blue Heron Biotech.

[00548] Os doze variantes de toxina incluem (1) uma toxina A de *C. difficile* mutante que possui uma mutação D285A/D287A (SEQ ID NO: 3); (2) uma toxina B de *C. difficile* mutante que possui uma mutação D286A/D288A (SEQ ID NO: 5); (3) uma toxina A de *C. difficile* mutante que possui uma mutação D285A/D287A C700A (SEQ ID NO: 4); (4) uma toxina B de *C. difficile* mutante que possui uma mutação D286A/D288A C698A (SEQ ID NO: 6); (5) uma toxina A recombinante

que possui a SEQ ID NO: 1; (6) uma toxina B recombinante que possui a SEQ ID NO: 2; (7) uma toxina A de *C. difficile* mutante que possui uma mutação C700A; (8) uma toxina B de *C. difficile* mutante que possui uma mutação C698A; (9) uma toxina A de *C. difficile* mutante que possui uma mutação C700A C597S, C1169S, C1407S, C1623S, C2023S e C2236S; (10) uma toxina B de *C. difficile* mutante que possui uma mutação C698A C395S, C595S, C824S, C870S, C1167S, C1625S, C1687S e C2232S; (11) uma toxina A de *C. difficile* mutante que possui uma mutação D285A, D287A, C700A, D269A, R272A, E460A e R462A (SEQ ID NO: 7); e (12) uma toxina B de *C. difficile* mutante que possui uma mutação D270A, R273A, D286A, D288A, D461A, K463A e C698A (SEQ ID NO: 8).

Exemplo 9: Estabilidade dos Transformantes

[00549] Os plasmídeos rearranjados foram obtidos com a cepa de laboratório de *E. coli* DH5 α comumente utilizada. Em contraste, as transformações utilizando o hospedeiro Invitrogen Stbl2™ *E. coli* forneceram recombinantes para as toxinas mutantes de comprimento completo com crescimento lento após três dias de crescimento a 30°C sobre placas de LB cloramfenicol (25 μ g/mL). As eficiências de clonagem inferiores foram obtidas com as cepas de *E. coli* relacionadas Stbl3™ e Stbl4™, embora estas linhagens fossem observadas como sendo estáveis para a manutenção dos plasmídeos. Os transformantes foram subsequentemente propagados em ágar ou em cultura líquida sob seleção com cloramfenicol a 30°C. Também foi observado que o uso de meios LB (de Miller) aprimorava a recuperação e o crescimento dos transformantes comparados com os meios à base de triptona-soja isento de produtos animais.

Exemplo 10: Transformação de *C. difficile* com pMTL84121fdx que codifica genes de toxinas do tipo selvagem ou mutantes genéticas

[00550] A transformação de *C. difficile* através da transferência

conjugal de *E. coli* foi realizada essencialmente como descrito em Heap e outros, *Journal de Microbiological Methods*, 2009. 78(1): p. 79-85. O hospedeiro de *E. coli* CA434 foi transformado com pMTL84121 *fdx* que codifica genes de toxinas do tipo selvagem ou variantes mutantes. O hospedeiro de *E. coli* CA434 é o intermediário para mobilizar os plasmídeos de expressão para dentro da cepa de produção de *C. difficile* VPI 11186 spo0A1. CA434 é um derivado de *E. coli* HB101. Esta cepa carrega o plasmídeo conjugativo Tra+ Mob+ R702 que confere resistência a Km, Tc, Su, Sm/Spe e Hg (devido a Tn1831). As células CA434 quimicamente competentes ou eletrocompetentes foram preparadas e os transformantes com vetor de expressão foram selecionados sobre placas de Miller's LB CAM a 30°C. As colônias de crescimento lento que apareciam após 3 dias foram selecionadas e amplificadas em 3 mL de culturas de LB cloramfenicol até a fase mid-log (~24h, 225 rpm, agitador orbital a 30°C). As culturas de *E. coli* foram coletadas por centrifugação à baixa velocidade (5.000g) para evitar o rompimento dos pili e as pelotas de células foram ressuspensas suavemente com uma pipeta de transferência de orifício amplo em 1 mL de PBS. As células foram concentradas por centrifugação à baixa velocidade. Mais do PBS foi removido através da inversão e as pelotas drenadas foram transferidas para dentro da câmara anaeróbica e ressuspensas com 0,2 mL de cultura de *C. difficile*, spotted sobre placas de BHIS ágar e deixadas crescer durante 8 h ou durante a noite. No caso de transformantes da toxina A mutante, melhores resultados foram atingidos com a conjugação durante a noite. As "malhas" de células foram raspadas para dentro de 0,5 mL de PBS e 0,1 mL foi plaqueado sobre meios de seleção BHIS suplementados com 15 µg/mL de tiamfenicol (análogo mais potente de cloramfenicol) e D-ciclosserina / cefoxitina para matar as células doadoras de *E. coli*. Os transformantes que apareceram 16-

24 h depois foram purificados reestriando sobre uma nova placa de BHIS (mais suplementos) e as culturas subsequentes foram testadas em relação à expressão de toxinas recombinantes ou toxinas mutantes. Permanentes em glicerol e estoques de inoculação foram preparados partindo dos clones que exibiam boa expressão. Minipreps plasmideais também foram preparados partindo de culturas de 2 mL utilizando um procedimento modificado do Qiagen kit em que as células foram pré-tratadas com lisozima (não essencial). O DNA da miniprep de *C. difficile* foi utilizado como um molde para o sequenciamento por PCR para verificar a integridade do clone. Alternativamente, uma maxiprep de DNA plasmideal foi preparada partindo dos transformantes *E. coli* Stbl2™ e sequenciada.

Exemplo 11: Análise da expressão de *C. difficile* do triplo mutante das toxinas A e B (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) e do hepta mutante de B (SEQ ID NO: 8)

[00551] Os transformantes foram crescidos em culturas de 2 mL (para análise de rotina) ou em frascos com tampa ventilada (para experimentos de curso de tempo). As amostras (2 mL) foram brevemente centrifugadas (10.000 rpm, 30 s) para concentrar as células: os sobrenadantes foram decantados e concentrados 10x (Amicon-ultra 30k); as pelotas foram drenadas e congeladas a -80°C. As pelotas de células foram descongeladas em gelo, ressuspensas em 1mL de tampão de lise (Tris-HCl pH7,5; 1 mM de EDTA, 15% de glicerol) e submetidas a ultrassom (1x 20s de rompimento com microtip). O lisado foi centrifugado a 4°C e o sobrenadante foi concentrado 5 vezes. As amostras de sobrenadante e lisado foram combinadas com o tampão de amostra e tratados com calor (10 min, 80°C) antes do carregamento sobre géis de SDS-PAGE com Tris-acetato a 3-8% em duplicata (Invitrogen). Um gel foi corado com Coomassie, o segundo foi "electroblotted" para análise de western.

Antissoros específicos para a toxina A e específicos para a toxina B (Fitgerald; Biodesign) foram utilizados para detectar os variantes de toxinas A e B mutantes. A expressão da toxina B hepta mutante (SEQ ID NO: 8) foi também confirmada por hibridização em western blot.

Exemplo 12: Anulação da atividade de glucosiltransferase das toxinas mutantes

[00552] As toxinas A e B duplo mutantes (DM) genéticas (SEQ ID NOs: 3 e 5, respectivamente) e as toxinas A e B triplo mutantes (TM) (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) não transferiam ^{14}C -glicose para 10 μg de RhoA, Rac1 e Cdc42 GTPases em ensaios de glicosilação *in vitro* na presença de UDP- ^{14}C -glicose [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 e 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA. Entretanto, os controles das toxinas A e B do tipo selvagem (que possuem as SEQ ID NOs: 1 e 2, respectivamente) transferiam ^{14}C -glicose para as GTPases eficientemente em uma dose baixa de 10 e 1 ng cada (e menos - dados não mostrados) (Figuras 4A e 4B), mesmo na presença de 100 μg de toxina mutante (Figura 4B) indicando uma redução de pelo menos 100.000 vezes comparadas com as respectivas toxinas do tipo selvagem. Resultados similares foram detectados para Cdc42 GTPase (dados não mostrados).

[00553] Especificamente, na Fig. 4B, a toxina A e a toxina B do tipo selvagem (1 ng) ou a toxina A triplo mutante e a toxina B triplo mutante (100 μg) foram incubadas com RhoA GTPase na presença de UDP- ^{14}C -glicose durante 2 h a 30°C. Como ilustrado, 1 ng de TcdA e TcdB do tipo selvagem transferia ^{14}C -glicose para RhoA, mas 100 μg de toxina A triplo mutante e toxina B triplo mutante não. Quando 1 ng de TcdA ou TcdB do tipo selvagem foi respingado dentro da reação com respectivos 100 μg de toxina A triplo mutante ou toxina B triplo mutante, a glicosilação de RhoA foi detectada, indicando a ausência

de inibidores da glicosilação. A sensibilidade de detecção para a atividade de glicosilação foi estabelecida como sendo de 1 ng da toxina do tipo selvagem em um fundo de 100 µg de toxina mutante (proporção de 1:100.000). Os resultados mostram que as mutações no sítio ativo da glucosiltransferase na toxina A triplo mutante e na toxina B triplo mutante reduzem qualquer atividade de glucosiltransferase mensurável (menos que 100.000 vezes menor atividade comparada com a atividade das respectivas toxinas do tipo selvagem). Um ensaio similar também foi desenvolvido para quantificar a atividade de glucosiltransferase através da precipitação com TCA de GTPases glicosiladas.

Exemplo 13: Anulação da Atividade Auto-catalítica de cisteína protease

[00554] A função da clivagem auto-catalítica foi anulada nos triplos mutantes genéticos de A e B (TM) (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) quando o sítio de clivagem da cisteína protease foi mutado. Como ilustrado na Figura 5, as toxinas A e B do tipo selvagem (*wt*) (SEQ ID NOs: 3 e 5, respectivamente) são clivadas na presença de inositol-6-fosfato. As toxinas A e B duplo mutantes (SEQ ID NOs: 3 e 5, respectivamente) são também clivadas na presença de inositol-6-fosfato (dados não mostrados), similar aquelas do tipo selvagem. A toxina A (SEQ ID NO: 3) é clivada de 308 kDa em 2 fragmentos de 245 e 60 kDa. A toxina B (SEQ ID NO: 5) é clivada de 270 kDa em dois fragmentos de 207 e 63 kDa. Os triplo mutantes A e B genéticos (TM) (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) permanecem inafetados em 308 e 270 kDa respectivamente, mesmo na presença de inositol-6-fosfato. Ver a Figura 5. Portanto, a atividade da cisteína protease foi inativada por modificação genética.

[00555] Mais especificamente, na Figura 5, um µg de triplo mutante A e triplo mutante B foi incubado durante 90 minutos à

temperatura ambiente ($21 \pm 5^\circ\text{C}$) em paralelo com TcdA e TcdB do tipo selvagem da List Biologicals. A reação de clivagem foi realizada em um volume de 20 μL em Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM de DTT na presença ou na ausência de inositol-6-fosfato (10 mM para TcdA e 0,1 mM para Tcd B). O volume de reação inteiro foi então carregado em um SDS/PAGE a 3-8%; as bandas de proteína foram visualizadas por coloração com prata. Como ilustrado, Tcd A e TcdB wt foram clivadas em duas bandas de proteína de 245kD e 60kD e 207kD e 63 kD, respectivamente, na presença de inositol-6-fosfato. A toxina A triplo mutante e a toxina B triplo mutante não foram clivadas, confirmando assim que a mutação C700A na toxina A triplo mutante e a mutação C698A na toxina B triplo mutante bloquearam a clivagem.

Exemplo 14: Citotoxicidade Residual de Toxinas A e B triplo mutantes (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente)

[00556] As toxinas mutantes genéticas foram avaliadas em relação a sua citotoxicidade através de um ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células IMR90, uma linhagem de células de fibroblastos pulmonares diploides humanos. Estas células são sensíveis a ambas as toxinas A e B. Como uma modalidade preferida alternativa, células renais normais Vero de *Cercopithecus aethiops* podem ser utilizadas no ensaio de citotoxicidade uma vez que foi observado que estas possuem sensibilidades razoáveis às toxinas A e B. Preferencialmente, células de adenocarcinoma colorretal humano HT-29 não são utilizadas no ensaio de citotoxicidade porque possuem sensibilidades significativamente reduzidas às toxinas, quando comparadas com as linhagens de células Vero e IMR90. Ver, por exemplo, a Tabela 6 abaixo.

Tabela 6: Sensibilidade das Linhagens de Células às Toxinas A e B*				
Linhagem de células	Toxina 50 µg/mL	Células/poço	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
*O ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> foi realizado através da medida do ATP celular utilizando substrato à base de luciferase, CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI)				

[00557] Amostras de toxina mutante genética ou de toxina do tipo selvagem diluídas em série foram adicionadas a monocamadas de células crescidas em placas de cultura de tecido de 96 poços. Após a incubação a 37°C durante 72 h, as placas foram avaliadas em relação às células metabolicamente ativas através da medida dos níveis de ATP celular pela adição do reagente à base de luciferase VellTiterGlo® (Promega, Madison, WI) gerando luminescência expressa na forma de unidades de luminescência relativas (RLUs). Altas RLUs mostram que as células são viáveis, baixas RLUs mostram que as células não são metabolicamente ativas e estão morrendo. O nível de citotoxicidade, expresso na forma de EC₅₀, é definido como a quantidade de toxina *wt* ou toxina mutante genética que ativa uma redução de 50% nas RLUs comparada com os níveis nos controles de cultura de células (os detalhes deste ensaio são fornecidos a seguir). Como mostrado na Figura 6, nas Tabelas 7A e na Tabela 8A, os valores de EC₅₀ de TcdA e TcdB eram de aproximadamente 0,92 ng/mL e 0,009 ng/mL, respectivamente. Os valores de EC₅₀ da toxina A triplo mutante e da toxina B triplo mutante eram de

aproximadamente 8600 ng/mL e 74 ng/mL, respectivamente. Apesar de uma redução de aproximadamente 10.000 na citotoxicidade em relação às toxinas *wt*, ambas as toxinas mutantes genéticas ainda demonstravam baixos níveis residuais de citotoxicidade. Esta citotoxicidade residual poderia ser bloqueada através de anticorpos monoclonais antitoxina neutralizadores indicando que isto era específico às toxinas triplo mutantes, mas não provavelmente relacionado às atividades enzimáticas conhecidas das toxinas *wt* (glicosilação ou autoproteólise).

[00558] Ambas as toxinas *wt* exibem potente citotoxicidade *in vitro*, como pequenas quantidades das toxinas sendo suficientes para causar vários efeitos sobre as células de mamífero tal como o arredondamento das células (efeito citopático ou CPE) e falta de atividade metabólica (que é medida pelos níveis de ATP). Consequentemente, dois ensaios *in vitro* (um ensaio de CPE ou de arredondamento das células e um ensaio de ATP) foram desenvolvidos para verificar que nenhuma citotoxicidade residual permanece nas substâncias de fármacos de toxina mutante. Os resultados são expressos na forma de EC_{50} , que é a quantidade de toxina ou toxina mutante que faz com que 1) 50% das células desenvolvam CPE ou 2) 50% de redução nos níveis de ATP que são medidos em unidades de luz relativas.

[00559] No ensaio de CPE, a amostra de substância de fármaco é diluída em série e incubada com células IMR90, que são observadas em relação a um efeito citopático potencial. O ensaio de CPE é classificado em uma escala de 0 (células normais) até 4 (~100 % de arredondamento das células) e um escore de 2 (~50% de arredondamento das células) é definido como o valor de EC_{50} da amostra de teste. Este método é utilizado para o teste da substância de fármaco de toxina mutante na concentração de 1000 µg /mL, que é

a concentração máxima tolerável que pode ser testada neste ensaio sem interferência da matriz. Consequentemente, nenhuma citotoxicidade detectável é relatada como $EC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$.

[00560] O ensaio de ATP se baseia na medida da quantidade de sinal de luminescência gerado partindo do ATP, que é proporcional ao número de células metabolicamente ativas. A concentração tolerável máxima que pode ser testada neste ensaio sem interferência no ensaio é de aproximadamente $200 \mu\text{g/mL}$. Portanto, nenhuma citotoxicidade detectável neste ensaio é relatada como $EC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$.

[00561] Diferentes concentrações de toxinas A e B mutantes foram adicionadas às células em paralelo com controles de toxina. Os pontos finais do ensaio eram a viabilidade celular determinada pelos níveis de ATP celular utilizando o CellTiter-Glo® (Promega). O grau de luminescência é proporcional aos níveis de ATP ou ao número de células viáveis.

[00562] A citotoxicidade *in vitro* (EC_{50}) da toxina A do tipo selvagem (wt) era de 920 pg/mL e de 9 pg/mL para a toxina B. A citotoxicidade *in vitro* (EC_{50}) da toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) era de 8600 ng/mL e de 74 ng/mL para a toxina B mutante (SEQ ID NO: 6). Embora estes valores representem reduções de 9348 e 8222 vezes, respectivamente, uma citotoxicidade residual foi detectada em ambas as toxinas mutantes.

[00563] Em outras palavras, a citotoxicidade das toxinas A e B triplo mutantes (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) foi significativamente reduzida no ensaio de citotoxicidade *in vitro* nas células IMR-90 em relação à citotoxicidade das toxinas A e B wt (SEQ ID NOs: 1 e 2, respectivamente). Como ilustrado na Figura 6, embora ambas as toxinas triplo mutantes exibissem redução significativa na citotoxicidade (10^4 vezes) em relação à toxina wt, uma citotoxicidade

residual foi observada a concentrações mais altas de ambas as toxinas triplo mutantes.

[00564] Além disso, a citotoxicidade residual de cada toxina triplo mutante poderia ser completamente neutralizada (por exemplo, pelo menos uma redução de 6-8 $\log_{10}$ na toxicidade, em relação à toxicidade da toxina do tipo selvagem) pelos anticorpos específicos para a toxina. Ver o Exemplo 16, a seguir.

[00565] Ensaio de cultura de células são mais sensíveis para a detecção da citotoxicidade do que modelos com animais *in vivo*. Quando fornecida através de rotas i.p. ou i.v. no modelo de desafio letal em camundongos, a TcdA *wt* possui um LD₅₀ de ~50 ng por camundongo enquanto que a TcdB *wt* é mais potente com um LD₅₀ de ~5 ng por camundongo. Em contraste, os ensaios *in vitro* baseados em culturas de células descritos anteriormente possuem valores de EC₅₀ de 100 pg por poço para TcdA *wt* e 2 pg por poço para TcdB *wt*.

Exemplo 15: Citotoxicidade Residual da Toxina B hepta mutante genética (SEQ ID NO: 8)

[00566] Como ilustrado na Figura 7, os valores de EC₅₀ são similares para a toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6) (20,78 ng/mL) e para a toxina B hepta mutante (SEQ ID NO: 8) (35,9 ng/mL) indicando que as quatro mutações adicionais para modificar adicionalmente o sítio ativo da glucosiltransferase e o sítio de ligação ao substrato da GTPase não reduziram adicionalmente a citotoxicidade das toxinas mutantes genéticas. Os valores de EC₅₀ também eram similares para a toxina B duplo mutante (SEQ ID NO: 5) como eram para toxinas triplo e hepta mutantes (dados não mostrados). Esta observação sugere que o mecanismo para a citotoxicidade das toxinas mutantes é de forma surpreendente independente do mecanismo da glucosiltransferase e de reconhecimento do substrato.

Exemplo 16: Citotoxicidade Residual das Toxinas A e B triplo mutantes (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente)

[00567] Para avaliar adicionalmente a natureza da citotoxicidade residual, as toxinas mutantes (SEQ ID NOs: 4 e 6) foram misturadas e incubadas com seus respectivos anticorpos neutralizadores antes e a mistura foi adicionada à monocamada de células IMR90.

[00568] Os resultados (Figura 8) mostraram que a citotoxicidade residual das toxinas A e B mutantes (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) pode ser completamente anulada com anticorpos neutralizadores específicos para a toxina A mutante (painel superior, Figura 8) e para a toxina B mutante (painel inferior, Figura 8). Concentrações crescentes de toxina A (painel superior) e B mutante (painel inferior) foram incubadas com anticorpos policlonais anti-toxina de coelho (pAb, 1:10 dilution) ou monoclonais murinos (diluição de 1:50 partindo de um estoque contendo 3,0 mg de IgG/mL) antes da adição às células IMR90. Após a incubação do tratamento de 72 h com as células IMR90 a 37°C, o substrato de CellTiter-Glo® foi adicionado e as unidades de luz relativas (RLU) foram medidas em um espectrofotômetro com o programa de luminescência para medir os níveis de ATP. Quanto menor o nível de ATP, maior a toxicidade. Os controles incluíam TcdA e TcdB adicionadas a 4 vezes seus valores de EC₅₀ correspondentes.

[00569] Relatos publicados sugerem que as mutações na glucosiltransferase ou no domínio de protease autocatalítica das toxinas resultem na inativação completa da toxicidade. Entretanto, os dados dos presentes inventores não concordam com estes relatos publicados e isto poderia ser atribuído às concentrações maiores das toxinas mutantes altamente purificadas testadas nos estudos dos presentes inventores ao contrário de lisados de cultura brutos nos relatos publicados; maiores pontos de tempo que que o

arredondamento das células de células tratadas com toxina mutante foram observados (por exemplo, 24 horas, 48 horas, 72 horas ou 96 horas) ao contrário das observações feitas em menos de 12 horas; uso de linhagens de células que exibem sensibilidades significativamente mais altas às toxinas nos presentes ensaios de citotoxicidade em contraste com as células de adenocarcinoma colorretal humano HT-29 nos ensaios de citotoxicidade divulgados nos relatos publicados; e/ou a uma atividade ou a um processo desconhecido, sem ser a glicosilação, que poderia estar controlando a toxicidade residual das toxinas mutantes.

Exemplo 17: Novo Mecanismo de Citotoxicidade de Toxinas mutantes genéticas

[00570] Para investigar o mecanismo de citotoxicidade residual das toxinas mutantes genéticas, as células IMR-90 foram tratadas com toxina B wt (SEQ ID NO: 2) ou toxina B mutante genética (SEQ ID NO: 6) e a glicosilação de Rac1 GTPase foi estudada dentro do tempo de tratamento. As amostras foram coletadas desde 24 até 96 horas e os extratos de células foram preparados. Rac1 glicosilada é distinguida de Rac1 não glicosilada por western blots com dois anticorpos para Rac1. Um anticorpo reconhece ambas as formas de Rac1 (23A8) e o outro (102) reconhece apenas a Rac1 não glicosilada. Como ilustrado na Figura 22, para a toxina B, os níveis totais de Rac1 permaneceram inalterados ao longo do tempo com a maioria da Rac1 sendo glicosilada. O tratamento com a toxina B mutante genética (SEQ ID NO: 6), por outro lado, resultou em uma redução significativa da Rac1 total, entretanto, a Rac1 estava não glicosilada em todos os pontos de tempo. Isto mostra que o nível de Rac1 era negativamente afetado pelo tratamento com a toxina mutante genética, mas não pela toxina wt. Como ilustrado na Figura 22, o nível de actina era similar nas células tratadas com toxina e toxina B mutante genética e similar ao de

células com tratamento simulado nos pontos de tempo indicados. Isto mostrou que as toxinas mutantes genéticas exerciam a citotoxicidade através de um mecanismo que é diferente que a via de glicosilação controlada pela toxina do tipo selvagem.

Exemplo 18: Tratamento químico das toxinas mutantes genéticas

[00571] Embora o fato das toxinas mutantes geneticamente modificadas exibirem uma redução de 4-log na atividade citotóxica ser preferido, uma redução adicional (2 até 4 logs) na atividade citotóxica foi considerada. Duas estratégias de inativação química foram avaliadas.

[00572] O primeiro método utiliza formaldeído e glicina para inativar as toxinas mutantes. A inativação com formaldeído ocorre através da formação de uma base de Schiff (imina) entre o formaldeído e as aminas primárias sobre a proteína. As bases de Schiff podem então reagir com um número de resíduos de aminoácidos (Arg, His, Trp, Tyr, Gln, Asn) para formar reticulações intra- ou intermoleculares. Esta reticulação fixa a estrutura da proteína tornando-a inativa. Em adição, o formaldeído pode reagir com a glicina para formar uma base de Schiff. A base de Schiff glicila pode então reagir com os resíduos de aminoácidos para formar reticulações de proteína-glicina intermoleculares. O formaldeído reduziu a atividade citotóxica das toxinas mutantes genéticas abaixo dos limites detectáveis (redução na citotoxicidade $>8 \log_{10}$ para triplo mutante B (SEQ ID NO: 6) e $>6 \log_{10}$ para triplo mutante A (SEQ ID NO: 4). Entretanto, uma reversão foi observada ao longo do tempo quando as toxinas triplo mutantes inativadas por formaldeído (FI) foram incubadas a 25°C. A reversão citotóxica pode ser prevenida através da adição de uma baixa quantidade de formaldeído (0,01-0,02%) dentro da solução de armazenamento de toxinas triplo mutantes FI. Ver o Exemplo 23.

[00573] Outro método utiliza o tratamento com 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/N-hidroxissuccinimida (NHS) para gerar toxinas mutantes inativadas. Neste método, EDC/NHS reage com os grupos carboxílicos sobre a proteína para formar ésteres ativados. Os ésteres ativados podem então reagir com as aminas primárias sobre a proteína para formar ligações amida estáveis. Como com a reação com formaldeído, esta reação resulta em reticulações intra- e intermoleculares. A ligação amida formada através do tratamento com EDC/NHS é mais estável e irreversível que a ligação imina lábil formada através da inativação com formalina. Em adição às reticulações formadas através da reação de ésteres ativados com as aminas primárias sobre o polipeptídeo, tanto adutos de glicina quanto de beta-alanina podem ser formados. Sem ficar ligado a um mecanismo ou uma teoria, os adutos de glicina são produzidos quando a glicina é adicionada para extinguir ésteres ativados não reagidos. A amina da glicina reage com o éster ativado sobre o polipeptídeo para formar ligações amida estáveis. Sem ficar ligado a um mecanismo ou uma teoria, adutos de beta-alanina são formados através da reação da beta-alanina ativada com as aminas primárias sobre o polipeptídeo. Esta reação resulta em ligações amida estáveis. A beta-alanina ativada é produzida através da reação de três moles de NHS com um mol de EDC.

[00574] Para atingir a redução de 2-4 logs da atividade citotóxica em relação às toxinas mutantes geneticamente modificadas (6-8 logs, em relação às toxinas nativas), as toxinas mutantes quimicamente inativadas devem ter valores de EC_{50} de $\geq 1000 \mu\text{g/mL}$. Em adição à redução na atividade citotóxica, seria vantajoso manter epítomos chaves que são determinados através da análise de dot-blot. Até agora, um número de condições de reação foi identificado que satisfaz os critérios de redução da citotoxicidade e de reconhecimento de epítomos. Várias bateladas de toxinas mutantes inativadas foram

preparadas para estudos com animais e os dados analíticos de algumas bateladas representativas são mostrados nas Tabelas 7A e 7B, nas Tabelas 8A e 8B.

Tabela 7A: A Toxina A Mutante Quimicamente Inativada é Segura e Antigênica					
Amostra #	ID da Amostra de Toxina	Tratamento	CPE EC ₅₀	Redução na toxicidade	Reatividade para mAbs
			µg/mL	Escala de Log	
1	TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) L44905-160A	Formalina	>1000	6,4	Média/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	Baixa
CONTROLES					
4	TcdA wt (da List Bio)	nenhum	390 pg/mL	1	Alta
5	TcdB wt (da List Bio)	nenhum	3,90 pg/mL	Não aplicável	Nenhum
6	rTcdA mutante TM Genética L36901-79 (SEQ ID NO: 4)	nenhum	12,5 µg/mL	4,5	Alta
7	Toxóide A List Bio	Formalina	Não Realizado	---	Baixa

Tabela 7B: A Toxina A Mutante Quimicamente Inativada é Segura e Antigênica								
Amostra #	ID da Amostra de Toxina	Tratamento	Reatividade com mAb (dot blot, condições não desnaturantes)					
			N-terminal mAb#6	Domínio Mid mAb # 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 (da List Bio)	nenhum	++++	+++	++++	++++	++++	++++
5	TcdB wt (da List Bio)	nenhum	—	—	—	—	—	—
6	rTcdA mutante TM Genética L36901-79 (SEQ ID NO: 4)	nenhum	++++	++++	++++	++++	++++	++++
7	Toxóide A List Bio	Formalina	—	—	+	—	++	+

List = List Biologicals; CPE= ensaio de efeito citopático; EC₅₀ = a concentração mais baixa em que 50% das células exibem citotoxicidade; mAbs= anticorpos monoclonais; neut= neutralizante; ND= não realizado; TM= mutante de sítio ativo e clivagem ("triplo

mutante")

Tabela 8A: A Toxina B Mutante Quimicamente Inativada é Segura e Antigênica					
Amostra #	ID da Amostra de Toxina	Tratamento	CPE EC ₅₀	Redução na toxicidade	Reatividades para mAbs
			µg/mL	Escala de Log	
1	TcdB mutante L44905-182 (SEQ ID NO: 6)	Formalina	>1000	8,4	Média/alta
2	TcdB mutante L34346-38A (SEQ ID NO: 6)	EDC	>1000	8,4	Alta
3	TcdB mutante L44905-170B (SEQ ID NO: 6)	Formalina	>1000	8,4	Baixa
CONTROLES					
4	TcdA wt (da List Bio)	nenhum	390 pg/mL	Não aplicável	Nenhum
5	TcdB wt (da List Bio)	nenhum	3,90 pg/mL	1	Alta
6	rToxina B mutante TM Genética (SEQ ID NO: 6) L34346-022	nenhum	69 ng/mL	4,2	Alta
7	Toxóide A List	Formalina	Não Realizado	---	Média

Tabela 8B: A Toxina B Mutante Quimicamente Inativada é Segura e Antigênica						
Amostra #	ID da Amostra de Toxina	Tratamento	Reatividade com mAb (dot blot, condições não desnaturantes)			
			Aa N-terminal 1-543		Aa Mid-/C-terminal 544-2366	
			B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
1	TcdB mutante (SEQ ID NO: 6) L44905-160A	Formalina	+++	+++	++	++
2	TcdB mutante (SEQ ID NO: 6) L44166-166	EDC	++++	++++	++++	++++
3	TcdB mutante (SEQ ID NO: 6) L44905-170A	Formalina	++	+	+/-	-
CONTROLES						
4	TcdA wt (da List Bio)	nenhum	—	—	—	—
5	TcdB wt (da List Bio)	nenhum	++++	+++	++++	++++
6	rTcdB mutante TM Genética L34346-022 (SEQ ID NO: 6)	nenhum	++++	++++	++++	++++
7	Toxóide B List	Formalina	+++	+++	+++	+++

List =List Biologicals; CPE= ensaio de efeito citopático; EC₅₀ = a concentração em que 50% das células exibem citotoxicidade; mAbs= anticorpos monoclonais; neut= neutralizante; ND= não realizado; TM=

mutante de sítio ativo e clivagem ("triplo mutante")

Exemplo 19: Purificação

[00575] No final da fermentação, o fermentador é resfriado. A suspensão de células é recuperada através da centrifugação contínua e ressuspensa no tampão apropriado. A lise da suspensão de células é atingida através da homogeneização em alta pressão. Para a toxina A mutante, o homogenato é floculado e a solução floculada sofre centrifugação contínua. Esta solução é filtrada e então transferida para o processamento a jusante. Para a toxina B mutante, o homogenato é clarificado por centrifugação contínua e então transferido para o processamento a jusante.

[00576] A toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) é purificada utilizando duas etapas cromatográficas seguidas por uma troca de tampão final. O lisado clarificado é carregado sobre uma coluna de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e a toxina mutante ligada é eluída utilizando um gradiente de citrato de sódio. O conjunto de produtos da coluna de HIC é então carregado sobre uma coluna de troca catiônica (CEX) e a toxina A mutante ligada é eluída utilizando um gradiente de cloreto de sódio. O conjunto de CEX contendo a toxina A mutante purificado é trocado dentro do tampão final por diafiltração. A toxina A mutante purificada é trocada no tampão intermediário da substância de fármaco final por diafiltração. Após a diafiltração, o que fica retido é filtrado ao longo de um filtro de 0,2 micron antes da inativação química em uma substância de fármaco final. A concentração de proteína é direcionada para 1-3 mg/mL.

[00577] A toxina B mutante (SEQ ID NO: 6) é purificada utilizando duas etapas cromatográficas seguidas por uma troca de tampão final. O lisado clarificado é carregado sobre uma coluna de troca aniônica (AEX) e a toxina mutante ligada é eluída utilizando um gradiente de cloreto de sódio. O citrato de sódio é adicionado ao conjunto de

produtos proveniente da coluna de AEX e carregado sobre uma coluna de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). A toxina mutante ligada é eluída utilizando um gradiente de citrato de sódio. O conjunto de HIC contendo o polipeptídeo purificado da toxina mutante (SEQ ID NO: 6) é trocado no tampão final por diafiltração. A toxina B mutante purificada é trocada no gradiente intermediário da substância de fármaco final por diafiltração. Após a diafiltração, o que fica retido é filtrado ao longo de um filtro de 0,2 micron antes da inativação química em uma substância de fármaco final. A concentração de proteína é direcionada para 1-3 mg/mL.

Exemplo 20: Inativação com Formaldeído/Glicina

[00578] Após a purificação, as toxinas mutantes genéticas A e B (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) são inativadas durante 48 horas a 25°C utilizando 40 mM (1,2 mg/mL) de formaldeído. A inativação é realizada a pH $7,0 \pm 0,5$ em 10 mM de fosfato, 150 mM de tampão cloreto de sódio contendo 40 mM (3 mg/mL) de glicina. O período de inativação é ajustado para exceder três vezes o período necessário para a redução na EC_{50} nas células IMR90 para mais que 1000 ug/mL. Após 48 horas, a atividade biológica é reduzida 7 até 8 $\log_{10}$ em relação à toxina nativa. Após a incubação de 48 horas, a toxina mutante inativada é trocada no tampão de substância de fármaco final por diafiltração. Por exemplo, utilizando um cassete de ultrafiltração de acetato de celulose regenerado de 100 kD, a toxina inativada é concentrada em 1-2 mg/mL e trocada com tampão.

Exemplo 21: Inativação com N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC)/N-hidroxissuccinimida (NHS)

[00579] Após a purificação, as toxinas mutantes genéticas (SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 6) são inativadas durante 2 horas a 25°C utilizando 0,5 mg de EDC e 0,5 mg de NHS por mg de toxinas A e B mutantes genéticas purificadas (aproximadamente 2,6 mM e 4,4 mM

respectivamente). A reação é extinguida através da adição de glicina a uma concentração final de 100 mM e as reações incubadas durante 2 horas adicionais a 25°C. A inativação é realizada em pH $7,0 \pm 0,5$ em 10 mM de fosfato, 150 mM de tampão cloreto de sódio. O período de inativação é ajustado para exceder três vezes o período necessário para a redução na EC_{50} nas células IMR90 para mais que 1000 ug/mL. Após 2 horas, a atividade biológica é reduzida 7 até 8 $\log_{10}$ em relação à toxina nativa. Após a incubação de 4 horas, a toxina mutante inativada é trocada no tampão de substância de fármaco final por diafiltração. Por exemplo, utilizando um cassete de ultrafiltração de acetato de celulose regenerado de 100 kD, a toxina inativada é concentrada em 1-2 mg/mL e trocada com tampão.

[00580] A não ser que seja citado o contrário, os termos a seguir que são utilizados na seção de Exemplos referem-se a uma composição produzida de acordo com a presente descrição no Exemplo 21: "toxina triplo mutante tratada com EDC/NHS"; "toxina mutante inativada com EDC"; "substância de fármaco de toxina mutante [A/B]"; "toxina mutante EI"; "toxina triplo mutante EDC/NHS". Por exemplo, os termos a seguir são sinônimos: "toxina A triplo mutante tratada com EDC/NHS"; "toxina A mutante inativada com EDC"; "substância de fármaco de toxina A mutante"; "toxina A mutante EI"; "toxina A triplo mutante com EDC/NHS". Como outro exemplo, os termos a seguir são sinônimos: "toxina B triplo mutante tratada com EDC/NHS"; "toxina B mutante inativada com EDC"; "substância de fármaco de toxina B mutante"; "toxina B mutante EI"; "toxina B triplo mutante com EDC/NHS".

[00581] A substância de fármaco de toxina A mutante e a substância de fármaco de toxina B mutante são cada uma produzidas utilizando um processo em batelada, que inclui (1) a fermentação da cepa de *C. difficile* negativa para a toxina (VPI 11186) contendo um

plasmídeo que codifica o respectivo polipeptídeo triplo genético de toxina mutante (em um meio que inclui hidrolisado de soja, extrato de levedura HY YEST™ 412 (Sheffield Bioscience), glicose e tiamfenicol), (2) a purificação da toxina mutante genética (o "intermediário de substância de fármaco") partindo do lisado isento de células utilizando procedimentos cromatográficos de troca iônica e de interação hidrofóbica para pelo menos mais que 95% de pureza, (3) a inativação química através do tratamento com EDC/NHS seguida pela extinção/capeamento com glicina e (4) a troca na matriz de tampão final.

Exemplo 22: Estudos que Sustentam as Condições de Inativação e Formulação

[00582] Para otimizar a inativação química das toxinas mutantes genéticas, um planejamento estatístico do experimento (DOE) foi realizado. Os fatores verificados no DOE incluíam temperatura, concentração de formaldeído/glicina, concentração de EDC/NHS e tempo (Tabela 9 e 10). Para monitorar a perda de atividade biológica, foram determinados os valores de EC₅₀ nas células IMR90. Em adição, foi também observada a morfologia das células das células IMR-90 em vários pontos de tempo após o tratamento. Ver a Figura 9, que mostra a morfologia em 72 horas pós-tratamento. Para determinar o efeito sobre a estrutura da proteína, o reconhecimento de epítomos foi monitorado utilizando a análise de dot-blot utilizando um conjunto de anticorpos monoclonais produzidos contra domínios diferentes da toxina.

Tabela 9: Parâmetros Testados DOE de Formaldeído/Glicina	
Parâmetros	Faixa testada
Tempo (dias)	1 até 14
Temperatura (°C)	4 até 37
Concentração da toxina (mg/mL)	1 até 1,25
Concentração da formaldeído (mM)	2 até 80
Concentração de glicina (mg/mL)	0 até 80

Tabela 10: Parâmetros Tested EDC/NHS DOE	
Parâmetros	Faixa testada
Tempo (horas)	1 até 4
Temperatura (°C)	25 to 35
Concentração da toxina (mg/mL)	1 até 1,25
EDC (mg/mg de toxina)	0,25 até 2,5
NHS (mg/mg de toxina)	0 até 2,5

[00583] Na inativação com formaldeído/glicina de toxinas mutantes de *C. difficile*, foram escolhidas condições de reação finais de forma que o nível de redução na atividade citotóxica (7 até 8 log₁₀) fosse atingido enquanto o reconhecimento do epítipo era maximizado. Ver o Exemplo 20 acima.

[00584] Na inativação com EDC/NHS de toxinas mutantes de *C. difficile*, foram escolhidas condições de reação finais de forma que o nível desejado de redução na atividade citotóxica (7 até 8 log₁₀) fosse atingido enquanto o reconhecimento do epítipo era maximizado. Ver o Exemplo 21 acima.

[00585] Em uma modalidade alternativa, a reação com EDC-NHS foi extinguida através da adição de alanina, que suficientemente extinguiu a reação. O uso de alanina pode resultar em uma modificação na toxina mutante proteína que é similar à modificação quando a reação é extinguida por glicina. Por exemplo, a extinção através da adição de alanina pode resultar em um grupamento de alanina sobre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico e/ou de ácido aspártico da toxina mutante. Em outra modalidade alternativa, a reação com EDC-NHS foi extinguida através da adição de glicina metil éster, que extinguiu suficientemente a reação.

[00586] A produção de toxina A e toxina B de *C. difficile* triplo mutantes quimicamente inativas sob condições otimizadas resultou em uma redução adicional da citotoxicidade residual até um nível

indetectável (>1000 µg/mL - a concentração mais alta testada através do ensaio de CPE), enquanto mantinha a antigenicidade que é medida através de sua reatividade aos anticorpos neutralizadores específicos para a toxina. Os resultados mostrados na Tabela 28 demonstram uma redução em etapas na citotoxicidade da toxina wt até as toxinas triplo mutantes tratadas com EDC/NHS. A marcação com imunofluorescência confirmou que as toxinas triplo mutantes (SEQ ID NO: 4 e 6) e substâncias de fármaco de toxinas mutantes exibiam ligação comparável com as células IMR-90 sugerindo que a perda da citotoxicidade não era devida à ligação reduzida às células (dados não mostrados). Comparada com a substância de fármaco de toxina A mutante, a substância de fármaco de toxina B mutante atingia uma quantidade de redução mais alta na citotoxicidade, que é coerente com a potência ~600 vezes mais alta da TcdB comparada com a TcdA.

Tabela 28. Sumário de Citotoxicidade

Toxin a	Amostra	EC ₅₀	Quantidade de redução na citotoxicidade
A	TcdA (SEQ ID NO: 1)	1.6 ng/mL	1
	Toxina A triplo mutante (SEQ ID NO: 4)	12,5 µg/mL	7800
	Substância de fármaco de toxina A mutante	>1000 µg/mL	>625.000
B	TcdB (SEQ ID NO: 2)	2,5 pg/mL	1
	Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6)	45 ng/mL	18.000
	Substância de fármaco de toxina B mutante	>1000 µg/mL	>400.000.000

[00587] Os resultados do ensaio de citotoxicidade para a toxina B mutante modificada por EDC isoladamente ou por EDC e sulfo-NHS

também foram analisados. Ver a Tabela 29.

Tabela 29

Amostra	Citotoxicidade EC ₅₀ , mg.mL ⁻¹ (CPE)	Comendário
TcdB TM (SEQ ID NO: 6), não modificada	0,03	
TM TcdB-EDC 1, no NHS	<0,97	Reagida com EDC isoladamente
TM TcdB-EDC 2, no NHS	<0,97	Preparação em duplicata
TM TcdB-EDC 3, sulfo- NHS (0,5x)	125	Reagida com EDC e sulfo-NHS
TM TcdB-EDC 4, sulfo- NHS (0,5x)	125	Preparação em duplicata
TM TcdB-EDC 3, sulfo- NHS (1,0x)	250	Reagida com EDC e sulfo-NHS
TM TcdB-EDC 4, sulfo- NHS (2,0x)	750	Reagida com EDC e sulfo-NHS

[00588] Condições: A toxina B triplo mutante ("TM TcdB")(SEQ ID NO: 6) foi modificada nas proporções em peso da toxina B mutante:EDC:sulfo-NHS = 1: 0,5: 0,94. Esta proporção é o equivalente molar (corrigido para o PM mais alto de sulfo-NHS) à reação de EDC/NHS padronizada como descrito no Exemplo 21. Para determinar o efeito de sulfo-NHS, a proporção de sulfo-NHS foi variada desde 0,5x até 2x a proporção padronizada. Reações em duplicata foram realizadas em 1 x PBS pH 7,0 a 25 °C e foram iniciadas através da adição da solução de EDC. Após 2 horas, as reações foram extinguidas através da adição de 1 M de glicina pH 7,0 (concentração final de 0,1 M) e incubadas durante mais 2 horas. As reações

extinguidas foram dessalinizadas e a substância de fármaco de toxina B mutante ("TM TcdB-EDC") foi concentrada utilizando dispositivos Vivaspín 20 e esterilizada por filtração para dentro de frascos esterilizados e submetida à avaliação em um ensaio de citotoxicidade.

[00589] Na mesma proporção molar, sulfo-NHS reduzia a EC_{50} até aproximadamente 250 ug/mL quando comparado com >1000 ug/mL para NHS. Mesmo no dobro da proporção molar, sulfo-NHS não parece ser tão eficiente quanto NHS na diminuição da citotoxicidade. Ver a Tabela 30.

Tabela 30

Modificação	Digestão de referência (TcdB EDC 004)	Digestão de NHS de controle (TcdB EDC 001)	Digestão da Amostra com Sulfo-NHS
aduto de glicina (+57 da)	49	29	35
beta-alanina (+71 da)	24	19	0
reticulações (-18 da)	7	4	3
desidroalanina (-34 da)	6	5	4
Não modificada	273	195	217

[00590] Para determinar o número e o tipo de modificações, foi realizado o mapeamento do peptídeo em amostras de toxina B triplo mutante tanto inativada com EDC/NHS tanto com EDC/sulfo-NHS. Quantidades similares de modificações de adutos de glicina, reticulações e desidroalanina foram observadas em ambas as amostras. Entretanto na amostra com sulfo-NHS, não foi observada beta-alanina.

[00591] A toxina B do tipo selvagem (SEQ ID NO: 2) foi inativada utilizando o protocolo padronizado (ver o Exemplo 21); toxina B:EDC:NHS 1:0,5:0,5, 25°C durante 2 horas em 1 x PBS pH 7,0, então

extinguida com 1 M de glicina (final concentração de 0,1 M) e incubada durante mais 2 horas. A amostra foi dessalinizada, concentrada e submetida ao ensaio de citotoxicidade. A EC₅₀ para estas amostras era <244 ng/mL.

Exemplo 23: Estudos de Reversão

[00592] Para determinar se a reversão ocorre com qualquer uma das toxinas mutantes de *C. difficile* inativadas com formaldeído/glicina ou com EDC/NHS, amostras de toxinas mutantes inativadas (1 mg/mL) foram incubadas a 25°C durante cinco-seis semanas. Alíquotas foram removidas em cada semana e os valores de EC₅₀ nas células IMR90 foram determinados. Uma amostra inativada com formaldeído/glicina não continha formaldeído e uma amostra continha 0,01% de formaldeído. A EC₅₀ foi medida através do ensaio de CPE.

Tabela 11: Resultados do Estudo de Reversão de TcdA Inativada			
Tempo de Incubação (Dias)	EC ₅₀ (ensaio de células IMR90)		
	Inativada com formalina		EDC/NHS
	Nenhum formaldeído	0,01% de formaldeído	
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

[00593] A 25°C na ausência de formaldeído residual, é observada uma reversão parcial (Tabela 11). Após cinco semanas, a atividade citotóxica aumentou aproximadamente 3 vezes. Embora a atividade citotóxica tenha aumentado, após cinco semanas havia ainda uma redução de 7 log₁₀ em relação à toxina nativa. A reversão foi completamente prevenida através da inclusão de formalina a uma concentração de 0,010%. Nenhuma reversão foi observada na

amostra inativada com EDC/NHS. Ao longo de toda a incubação de 6 semanas, os valores de EC_{50} permaneceram no nível inicial de $>1000 \mu\text{g/mL}$ para todos os quatro lotes tanto da toxina A triplo mutante tratada com EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) quanto da toxina B triplo mutante tratada com EDC/NHS (SEQ ID NO: 6). Em contraste, os valores de EC_{50} da toxina A triplo mutante tratada com FI (SEQ ID NO: 4) e da toxina B triplo mutante tratada com FI (SEQ ID NO: 6) não eram estáveis e diminuía até valores de EC_{50} inaceitavelmente baixos, indicando um aumento na citotoxicidade ou reversão da inativação. Ver a Tabela 11.

[00594] Em adição à redução estável da citotoxicidade até um nível não detectável ($>1000 \mu\text{g/mL}$, que é medido através do ensaio de CPE), as toxinas mutantes inativadas utilizando EDC/NHS mantinham epítomos importantes que são alvos dos mAbs neutralizantes da toxina. Ver a Tabela 31. As toxinas mutantes FI exibiam uma perda dos mesmos determinantes antigênicos.

Tabela 31. Inativação com EDC/NHS Reduzia a Citotoxicidade de Toxinas mutantes genéticas e Mantinha Determinantes Antigênicos Importantes

Amostra	EC_{50}	Redução na citotoxicidade em relação à toxina wt ($\log_{10}$) ^a	Ligação max (Rmax) ^b mAb ^d Neut		
			1 ^c	2	3
Triplo mutante A (SEQ ID NO: 4)	12,5 $\mu\text{g/mL}$	4,5	100	100	100
FI- Triplo mutante A	$>1000 \mu\text{g/mL}$	$>6,4$	55	59	53
EDC/NHS- Triplo mutante A	$>1000 \mu\text{g/mL}$	$>6,4$	90	94	103
Triplo mutante B (SEQ ID NO: 6)	69 ng/mL	4,3	100	100	100

Amostra	EC ₅₀	Redução na citotoxicidade em relação à toxina wt (log ₁₀) ^a	Ligação max (Rmax) ^b mAb ^d Neut		
			1 ^c	2	3
FI-Triplo mutante B	>1000 µg/mL	8,4	67	67	36
EDC/NHS-Triplo mutante B	>1000 µg/mL	8,4	87	78	73

a citotoxicidade foi medida utilizando o ensaio de CPE nas células IMR90

b valores determinados através da análise de Biacore™ utilizando vários mAbs neutralizantes direcionados a vários epítomos da toxina não sobrepostos

c valores são médias de dois experimentos

d Para as três primeiras fileiras, os mAb neut "1", "2", "3" referem-se a mAbs A60-22, A80-29 e A65-33 para a toxina A, respectivamente. Para as três últimas fileiras, os mAb neut "1", "2", "3" referem-se a mAbs B8-26, B59-3 e B-56-15 para a toxina B, respectivamente.

Exemplo 24: Estudos de Imunogenicidade de Agentes Pré-Clínicos

[00595] Os objetivos pré-clínicos principais incluem o teste das composições que incluem toxinas mutantes de *C. difficile* A e B em pequenos animais e primatas não humanos (NHP). Camundongos e hamsters foram imunizados para determinar, entre outras coisas, se as composições de *C. difficile* são capazes de ativar anticorpos neutralizadores contra as toxinas A e B mutantes. Os antígenos foram testados em relação à indução de respostas de anticorpo neutralizadores no soro após uma série de imunizações em camundongos, hamsters e macacos cinomolgos. As toxinas mutantes inativadas geneticamente e/ou quimicamente foram formuladas em um tampão neutro, tampão fosfato de alumínio ou tampão contendo ISCOMATRIX como um adjuvante em algumas modalidades. As

respostas de anticorpo neutralizador foram testadas de forma geral aproximadamente duas até quatro semanas após cada dose de reforço ou final.

[00596] O ensaio de neutralização da toxina demonstra a capacidade de um antissoro de neutralizar o efeito citotóxico mediado por TcdA ou TcdB de *C. difficile* e é, portanto, capaz de medir a atividade funcional dos anticorpos que estão presentes em uma amostra. Um ensaio de neutralização da toxina foi realizado em uma linhagem de células de fibroblasto pulmonar humano, IMR-90, que é sensível tanto à TcdA quanto à TcdB. Sucintamente, uma placa de microtitulação de 96 poços foi inoculada com as células IMR-90 servindo como o alvo da citotoxicidade mediada pela toxina. Cada amostra de soro de teste foi analisada separadamente em relação à capacidade de neutralizar TcdA e TcdB. Diluições em série apropriadas de antissoros de teste foram misturadas com concentrações fixas de TcdA ou TcdB e incubadas a 37°C durante 90 minutos em uma incubadora umidificada (37°C /5% de CO₂) para permitir que a neutralização das toxinas ocorra. Para o controle de qualidade, todas as placas incluíam um padrão de referência e controles que incluem anticorpos antitoxina de título conhecido. Após 90 minutos, a mistura de toxina-antissoros foi adicionada à monocamada de células IMR-90 e as placas foram incubadas durante 72 horas adicionais. Subsequentemente, o substrato CellTiter-Glo® foi adicionado à placa de ensaio determinar os níveis de Adenosina Trifosfato (ATP) presentes nas células metabolicamente ativas e foram medidos na forma de Unidades de Luminescência Relativa (RLU). Um grande nível de ATP indica alta viabilidade celular e os níveis são diretamente proporcionais à quantidade de neutralização da toxina pelo anticorpo presentes na amostra. Para os dados pré-clínicos, os dados de RLU foram representados graficamente contra o valor de

diluição da amostra de antissoro de teste para gerar uma curva de ajuste de resposta de regressão Logística de Quatro Parâmetros (4-PL). Os títulos de neutralização foram expressos na forma do valor de diluição da amostra que exibia 50% de redução na citotoxicidade.

Exemplo 25: Estudo de Imunogenicidade em Camundongo: muC. difficile2010-06

[00597] A finalidade deste estudo era avaliar a imunogenicidade de duas formas de toxina B de C. difficile mutante (SEQ ID NO: 6), cada uma quimicamente inativada através de métodos diferentes. Neste estudo, a toxina B mutante não tratada (SEQ ID NO: 6) (geneticamente inativada, mas não quimicamente inativada) foi utilizada como um controle com e sem adjuvante.

[00598] Grupos de 10 camundongos foram imunizados intramuscularmente com 10 µg de um agente imunogênico de acordo com a Tabela 12.

Tabela 12. Teste de toxina B mutante quimicamente inativada (SEQ ID NO: 6) em camundongos

Grupo	Agente imunogênico	Dose	No.	Rota	Programação
1	Toxina B Mutante Inativada com Formalina ^a em AlPO ₄ ^c	10 µg	10	IM	Início semana 0, Reforço semanas 4, 8
2	Forma da Toxina B mutante inativada 2 ^b em AlPO ₄ ^c	10 µg	10	IM	Início semana 0, Reforço semanas 4, 8
3	Toxina B mutante inativada geneticamente sem adjuvante	10 µg	10	IM	Início semana 0, Reforço semanas 4, 8,

Tabela 12. Teste de toxina B mutante quimicamente inativada (SEQ ID NO: 6) em camundongos

Grupo	Agente imunogênico	Dose	No.	Rota	Programação
4	Toxina B mutante Inativada Geneticamente em AlPO_4^c	10 µg	10	IM	Início semana 0, Reforço semanas 4, 8,
^a inativação química = Tratada com formalina/glicina 10°C durante 7 dias ^b inativação química = Tratada com EDC/NHS, 30°C durante 2 horas ^c concentração de íon de alumínio = 0,5 mg/mL					

[00599] Resultados: Não havia eventos adversos nos camundongos após cada administração dos candidatos à vacina. Como ilustrado na Figura 10, os camundongos em cada grupo desenvolveram anticorpos neutralizadores anti-toxina B significativamente robustos após a terceira dose com as respectivas toxinas mutantes.

[00600] Com base nos títulos da semana 12, parece que nos camundongos a toxina B mutante inativada por EDC (Grupo 2) e as toxinas mutantes inativadas com formalina (Grupo 1) geraram respostas neutralizadoras potentes.

[00601] Na ausência de inativação química, a toxina B mutante genética (SEQ ID NO: 6) gerou respostas neutralizadoras após duas doses (Grupos 3-4, semana 8), que receberam reforço após a terceira dose (Grupos 3-4, semana 12).

Exemplo 26: Estudo de imunogenicidade em camundongos: muC. difficile2010-07:

[00602] A finalidade deste estudo era avaliar a imunogenicidade de toxinas A e B mutantes de C. difficile quimicamente inativadas (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente), isoladamente ou em combinação. Os agentes imunogênicos para todos os grupos foram formulados com

fosfato de alumínio como um adjuvante.

[00603] Grupos de 5 camundongos foram imunizados intramuscularmente com 10 µg de um agente imunogênico de acordo com a Tabela 13.

Tabela 13. Teste de Toxinas A e B mutantes Genéticas Inativadas Quimicamente (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) em Camundongos

Grupo	Agente imunogênico	Dose	No.	Grupo	Programação
1	Toxina B Inativada ^a com Formalina (SEQ ID NO: 6) em AlPO_4^c	10 µg	5	IM	Início semana 0, Reforço semanas 4, 8, 12
2	Toxina B mutante Inativada ^b com EDC (SEQ ID NO: 6) em AlPO_4^c	10 µg	5	IM	Início semana 0, Reforço semanas 4, 8, 12
3	Toxina A mutante Inativada com Formalina (SEQ ID NO: 4) forma 1 em AlPO_4^c	10 µg	5	IM	Início semana 0, Reforço semanas 4, 8, 12
4	Toxina A mutante inativada com EDC (SEQ ID NO: 4) em AlPO_4^c	10 µg	5	IM	Início semana 0, Reforço semanas 4, 8, 12
5	Toxinas A+B mutantes Inativadas com Formalina em AlPO_4^c	10 µg cada	5	IM	Início semana 0, Reforço semanas 4, 8, 12

- ^a Tratamento com formalina = tratada com formalina/glicina durante 2 dias a 25°C; a toxina mutante não era citotóxica e mantinha a ligação com todos os anticorpos monoclonais específicos à toxina mutante testados
- ^b Tratamento com EDC = tratada com EDC/NHS durante 4 h a 30°C; a toxina mutante não era citotóxica e mantinha a ligação com todos os anticorpos monoclonais específicos à toxina mutante testados
- ^c concentração de íon de alumínio = 0,5 mg/mL

[00604] Resultados: Não havia eventos adversos nos camundongos após cada administração dos candidatos à vacina. Como ilustrado na Figura 11, após duas doses de toxinas mutantes genéticas inativadas quimicamente, os anticorpos neutralizadores anti-toxina A (Grupos 3-5) foram reforçados até títulos entre 3 e 4log₁₀ enquanto que os anticorpos neutralizadores anti-toxina B (Grupos 1-2, 5) permaneceram baixos até indetectáveis, o que é coerente com os dados proveniente do estudo com camundongos descrito anteriormente (Figura 10). Os anticorpos neutralizadores anti-toxina B reforçaram até 2-3 log₁₀ nos grupos 1, 2 e 5 após a terceira dose (semana 12 titers) e atingiram seu máximo duas semanas após a quarta dose (títulos da semana 14). Os títulos do anticorpo neutralizador anti-toxina A nos grupos 3-5 aumentaram lentamente após a terceira (títulos da semana 12) e a quarta imunizações (títulos da semana 14).

Exemplo 27: Estudo de imunogenicidade em hamsters: hamC. difficile2010-02:

[00605] A finalidade deste estudo estudo era avaliar a imunogenicidade e o potencial protetor de triplo mutante de *C. difficile* e toxinas mutantes A e B quimicamente inativadas no modelo de hamster Sírio dourado. O modelo de hamster Sírio dourado representa o melhor modelo de desafio disponível para simulação de CDAD

humana. As mesmas bateladas das toxinas mutantes A e B utilizadas no estudo em camundongos *muC. difficile*2010-07 foram utilizadas neste estudo. Como um controle, um grupo recebeu toxinas mutantes sem o adjuvante contendo alumínio.

[00606] Grupos de 5 hamsters sírios dourados foram imunizados intramuscularmente com 10 µg de um agente imunogênico de acordo com a Tabela 14.

Tabela 14. Teste das Toxinas mutantes A e B quimicamente inativadas (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) em Hamsters (hamC. *difficile*2010-02)

Grupo	Agente imunogênico	Dose	No.	Rota	Programação
1	Toxinas mutantes A+B Inativadas ^a com Formalina (SEQ ID NOs: 4 e 6) em AlPO ₄ ^c	10 µg cada	5	IM	Início semana 0, Reforço semanas 4, 8, 12
2	Toxinas mutantes A+B Inativadas com Formalina (SEQ ID NOs: 4 e 6) em PBS (sem adjuvante)	10 µg cada	5	IM	Início semana 0, Reforço semanas 4, 8, 12
3	Toxinas mutantes A+B Inativadas ^b com EDC (SEQ ID NOs: 4 e 6) em AlPO ₄ ^c	10 µg cada	5	IM	Início semana 0, Reforço semanas 4, 8, 12
4	Toxóide da List Biological em AlPO ₄ ^c	10 µg cada	5	IM	Início semana 0, Reforço semanas 4, 8, 12

Tabela 14. Teste das Toxinas mutantes A e B quimicamente inativadas (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) em Hamsters (hamC.

*difficile*2010-02)

Grupo	Agente imunogênico	Dose	No.	Rota	Programação
^a Tratamento com formalina = tratadas com formalina/glicina durante 2 dias a 25°C; A toxina mutante não era citotóxica e mantinha a ligação a todos os anticorpos monoclonais específicos à toxina mutante testados ^b Tratamento com EDC = tratadas com EDC/NHS durante 4 h a 30°C; A toxina mutante não era citotóxica e mantinha a ligação a todos os anticorpos monoclonais específicos à toxina mutante testados ^c concentração de íon de alumínio = 0,5 mg/mL 1. Animais: 15 hamsters sírios dourados, do sexo feminino, 6-8 semanas de idade/ 100-130g cada. 2. Vacinação: IM, 0,05 mL cada, de acordo com a programação acima. Os toxóides serão fornecidos por Process Development e serão formulados no diluente AlPO ₄ pelos Grupos de Formulações. O Grupo 2 servirá como um grupo de controle que não recebeu adjuvante. 3. Drenagem do sangue: Todos os hamsters terão seu sangue drenado em semanas 0, 4, 8 e 12, logo antes de cada imunização. 4. Análise de amostra de soro: Ensaio de neutralização					

[00607] Resultados: Não havia eventos adversos observados após a imunização com as toxinas mutantes. Como ilustrado na Figura 12, após uma única dose de toxinas mutantes, as respostas neutralizadoras anti-toxina A ficavam entre 2-3 log₁₀ para as toxinas mutantes inativadas com formalina (Grupos 1-2) e entre 3-4 log₁₀ para toxinas mutantes inativadas com EDC (Grupo 3). Após a segunda dose, os anticorpos anti-toxina A sofreram reforço em todos os três grupos. Os anticorpos anti-toxina A em todos os três grupos não pareciam aumentar após a terceira dose. Um resultado similar foi

observado após a quarta imunização, em que um aumento no título foi observado no grupo inativado com formalina que não continha o adjuvante de alumínio (Grupo 2).

[00608] As respostas neutralizadoras anti-toxina B eram indetectáveis nos grupos de toxinas mutantes inativadas com formalina (Grupos 1-2) e estavam logo acima de $2 \log_{10}$ para as toxinas mutantes inativadas com EDC (Grupo 3) após uma única dose. Após a segunda dose, os títulos do anticorpo neutralizador anti-toxina B nos dois grupos inativados com formalina (Grupos 1-2) aumentaram para $3-4 \log_{10}$ enquanto aqueles no grupo inativado com EDC (Grupo 3) aumentaram para $4-5 \log_{10}$. Para todos os três grupos, foram observados aumentos nos títulos do anticorpo neutralizador anti-toxina B após a terceira e/ou a quarta doses, com todos os grupos atingindo um título máximo na semana 16 (após a última dose). Ver a Figura 12.

[00609] Na Figura 13, o nível das respostas de anticorpo neutralizador contra toxinas mutantes genéticas inativadas quimicamente (Figura 12) foi comparado com aqueles ativados pelos toxóides da List Biological Laboratories, Inc. (Campbell, California) (também referida aqui como "List Bio" ou "List Biologicals") (isto é, os toxóides obtidos na List Biological Laboratories foram preparados através da inativação com formalina das toxinas do tipo selvagem; reagente de controle utilizado para estabelecer o modelo de desafio com hamsters).

[00610] Como utilizado aqui, "FI" nas figuras e nas tabelas refere-se ao tratamento com formalina/glicina das toxinas, 2 dias a 25°C , a não ser que seja citado o contrário. Como utilizado aqui, "EI" nas figuras e nas tabelas refere-se ao tratamento com EDC/NHS durante 4 horas a 30°C , a não ser que seja citado o contrário. Na Figura 13, 5 hamsters foram tratados com a composição da respectiva toxina mutante,

enquanto que 11 hamsters foram tratados com o toxóide obtido na List Biological.

[00611] Os dados na Figura 13 mostram que, nos hamsters administrados de acordo com a Tabela 14, os títulos do respectivo anticorpo neutralizador contra toxina A (Figura 13A) e toxina B (Figura 13B) induzidos por uma composição imunogênica que inclui toxinas mutantes inativadas com EDC após duas doses é mais altos que os títulos do respectivo anticorpo neutralizador ativado pelos toxóides da List Biologicals.

Exemplo 28: Estudo de imunogenicidade em hamsters: *C. difficile* ham2010-02 (continuação)

[00612] Para avaliar a eficácia protetora das toxinas mutantes, hamsters imunizados, junto com um grupo de controle de animais não imunizados, receberam primeiro uma dose oral do antibiótico clindamicina (30 mg/kg) para perturbar a flora intestinal normal. Após cinco dias, os hamsters foram desafiados com uma dose oral de esporos de *C. difficile* do tipo selvagem (630 cepa, 100 ufc por animal). Os animais foram monitorados diariamente durante onze dias após o desafio em relação a sinais de CDAD, que em hamsters é conhecida como cauda molhada. Utilizando um sistema de classificação clínica de um número de parâmetros diferentes, os animais determinados como possuindo CDAD grave foram submetidos à eutanásia. Os parâmetros incluíam atividade após o estímulo, desidratação, excremento, temperatura e peso etc., que são conhecidos na arte.

[00613] No dia 11, o estudo foi terminado e todos os animais sobreviventes foram submetidos à eutanásia. A Figura 14 mostra as curvas de sobrevivência para cada um dos três grupos imunizados (Grupos 1-3, de acordo com a Tabela 14) quando comparados com os controles não imunizados. Como pode ser observado, os animais não

imunizados desenvolveram todos CDAD grave e necessitaram de eutanásia entre os dias 1-3 após o desafio (0% de sobrevivência). Ambos os grupos que receberam administração com toxina mutante inativada com formalina tiveram curvas de sobrevivência de 60%, com os animais não necessitando de eutanásia até o dia 3 (Grupo 1) ou o dia 4 (Grupo 2). O grupo que recebeu administração com toxina mutante inativada com EDC tiveram uma curva de sobrevivência de 80%, com 1 animal (de 5) necessitando de eutanásia no dia 7. Consequentemente, os hamsters foram protegidos do desafio letal com esporos de *C. difficile*.

Exemplo 29: Estudo de imunogenicidade em hamsters: hamC. difficile2010-03: Imunogenicidade de toxinas mutantes inativadas geneticamente e quimicamente de C. difficile

[00614] A finalidade deste estudo estudo era avaliar a imunogenicidade de toxinas triplo mutantes e A e B mutantes de *C. difficile* sem adjuvante quimicamente inativadas (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) no modelo de hamster Sírio dourado. As mesmas bateladas de toxinas mutantes A e B (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente) utilizadas no estudo em camundongo muC. difficile2010-07 foram utilizadas neste estudo. Como um controle, um grupo (Grupo 1) recebeu uma solução salina tamponada com fosfato como placebo.

[00615] Grupos de cinco ou dez hamsters sírios dourados foram imunizados com um agente imunogênico de acordo com a Tabela 15. Os animais receberam três doses. Em adição, os animais receberam doses a cada duas semanas.

Tabela 15: Planejamento Experimental de Imunização e Desafio de Hamsters					
Grupo	Agente imunogênico	Dose	No.	Rota	Programação
1	Placebo (tampão PBS)	NA	5	NA	
2	Toxina A + B mutante (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente); inativada com formalina	10 µg cada	10	IM	Início semana 0, Reforço semanas 2, 4
3	Toxina A + B mutante (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente); inativada com EDC	10 µg cada	10	IM	Início semana 0, Reforço semanas 2, 4
4	Toxina A + B mutante (SEQ ID NOs: 4 e 6, respectivamente); genética	10 µg cada	10	IM	Início semana 0, Reforço semanas 2, 4

[00616] Resultados: Ver a Figura 15. Nenhum anticorpo anti-toxina A ou B foi observado no grupo de controle com placebo. Após uma dose, anticorpos neutralizadores anti-toxina A foram observados entre 2-3 log₁₀ para os grupos de toxina mutante inativada com formalina (Grupo 2) e genética (Grupo 4) e entre 3-4log₁₀ para o grupo com inativada com EDC grupo (Grupo 3). Os anticorpos neutralizadores anti-toxina A aumentaram em cada um destes grupos (2-4) após a segunda imunização com as toxinas mutantes relevantes (comparar os títulos na semana 2 com os da semana 3 na Figura 15). Após a terceira dose de toxinas mutantes (given at semana 4), os títulos de anticorpo neutralizador anti-toxina A nos Grupos 2-4 aumentaram comparados com seus títulos na semana 4.

[00617] Os anticorpos neutralizadores anti-toxina B eram

detectáveis após a segunda dose, em que os anticorpos neutralizadores anti-toxina B inativada com formalina (Grupo 2) e inativada com EDC (Grupo 3) aumentaram até entre 3-4 $\log_{10}$ e até entre 2-3 $\log_{10}$ para o triplo mutante genético (Grupo 4). Após a terceira imunização (semana 4), os títulos de anticorpo anti-toxina B neutralizador sofreram reforço até entre 3-4 $\log_{10}$ para as toxinas mutantes inativadas com formalina (Grupo 2) e para as toxinas mutantes genéticas (Grupo 4) e entre 4-5 $\log_{10}$ para as toxinas mutantes inativadas com EDC (Grupo 3).

[00618] Para ambos os anticorpos neutralizadores anti-toxina A e anti-toxina B, os títulos máximos foram observados na semana 6 (pós-dose 3) para todos os grupos vacinados (Grupos 2-4).

Avaliação de Composições imunogênicas com Adjuvante com Alhidrogel/CpG ou ISCOMATRIX

[00619] Hamsters imunizados com uma composição imunogênica que inclui uma toxina mutante quimicamente inativada formulada com Alhidrogel, ISCOMATRIX ou Alhidrogel/CpG24555 (Alh/CpG) desenvolveram antissoros antitoxina neutralizadores robustos. Foi observado que as respostas máximas antitoxina A e antitoxina B eram 2-3 vezes mais altas e estatisticamente significativas nos grupos imunizados com toxinas mutantes formuladas em Alh/CpG ou ISCOMATRIX quando comparadas com a vacina formulada com Alhidrogel apenas. Ver a Tabela 32 que mostra títulos de neutralização de 50%. Os hamsters (n=10/ grupo) foram imunizados IM em 0, 2 e 4 semanas com 10 μ g de cada substância de fármaco de toxina A mutante e substância de fármaco de toxina B mutante formulada com 100 μ g de Alhidrogel ou 200 μ g de CpG 24555 + 100 μ g de Alhidrogel ou 10 U de ISCOMATRIX. Os soros foram coletados em cada ponto de tempo e analisados no ensaio de neutralização da toxina em relação à atividade antitoxina funcional. Os títulos em média

geométrica são fornecidos na Tabela 32. Asteriscos (*) indicam significância estatística ($p < 0,05$) quando comparados com os títulos no grupo com Alhidrogel.

Tabela 32: Imunogenicidade de Substância de fármaco de toxina mutantes com Adjuvante em Hamsters						
Título de Neutralização de Antitoxina A de 50%						
	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 6
Título de Alhidrogel:	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 Alhidrogel:	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

[00620] A eficácia protetora de uma composição imunogênica que inclui substâncias de fármaco de toxina mutante formuladas com estes adjuvantes foi testada. Os hamsters foram imunizados e receberam clindamicina oral (30 mg/kg) na semana 5 e foram desafiados de acordo com o método descrito anteriormente. Um grupo de hamsters não imunizados (n=5) foi incluído como um controle. A eficácia aumentada foi observada em hamsters imunizados com as substâncias de fármaco de toxina mutante com adição de adjuvante com Alh/CpG ou ISCOMATRIX (100% de sobrevivência) quando

comparada com a de Alhidrogel apenas (70% de sobrevivência). Consequentemente, os hamsters foram protegidos do desafio letal com esporos de *C. difficile*.

Exemplo 30: Vacinação com *Clostridium difficile* em Macacos Cinomolgos

[00621] A finalidade deste estudo estudo era testar a imunogenicidade de doses baixas e altas de toxinas mutantes de *C. difficile* inativadas com EDC e inativadas com formalina em macacos cinomolgos. Todas as toxinas mutantes foram formuladas em ISCOMATRIX® como um adjuvante exceto para um grupo, que serviu como um controle sem adjuvante (Grupo 5).

Tabela 16: Imunização de Macacos Cinomolgos					
Grupo	Agente imunogênico	Número	Dose	Rota	Programação
1	FI-Toxinas mutantes A+B (ISCOMATRIX)	5	10 µg cada	IM	Início semana 0, Reforço semanas 2, 4
2	FI-Toxinas mutantes A+B (ISCOMATRIX)	5	100 µg cada	IM	Início semana 0, Reforço semanas 2, 4
3	EI-Toxinas mutantes A+B (ISCOMATRIX)	5	10 µg cada	IM	Início semana 0, Reforço semanas 2, 4
4	EI-Toxinas mutantes A+B (ISCOMATRIX)	5	100 µg cada	IM	Início semana 0, Reforço semanas 2, 4
5	EI-Toxinas mutantes A+B (no adjuvante)	5	100 µg cada	IM	Início semana 0, Reforço semanas 2, 4

Tabela 16: Imunização de Macacos Cinomolgos					
Grupo	Agente imunogênico	Número	Dose	Rota	Programação
Animais: 25 macacos cinomolgos O asterisco, "*", na Figura 16 refere-se ao fato de possuir apenas 4 macacos no grupo para a semana 12, um macaco no grupo teve se sangue drenado de forma terminal na semana 8 Vacinação: IM, 0,5mL por dose, nas semanas 0, 2 e 4. As composições de toxina mutante foram preparadas como descrito anteriormente. As composições de toxina mutante foram formuladas em ISCOMATRIX, exceto para o Grupo 5 que foi formulada em tampão sem adjuvante. Drenagem do sangue: Semanas -2, 0, 2, 3, 4, 6, 8 e 12. Eutanásia e drenagens do sangue terminais nos animais com títulos mais altos de <i>C. difficile</i> na semana 8. Análise de amostra de soro: ELISA de Proteína e ensaios de Neutralização					

[00622] Resultados: A Figura 16 mostra as respostas do anticorpo neutralizador anti-toxina nestes animais nas semanas 0, 2, 3, 4, 6, 8 e 12. Os títulos anti-toxina A ficavam entre 2-3 log₁₀ para todos os cinco grupos após uma única dose (títulos da semana 2). Estes títulos aumentavam após cada dose subsequente para cada grupo. Nestes animais, não havia queda no título entre as semanas 3 e 4. Para todos os grupos, os títulos máximos ficavam entre 4-5 log₁₀. Em todos os pontos de tempo, o grupo sem adjuvante ISCOMATRIX (Grupo 5) teve os títulos mais baixos, indicando a utilidade de ISCOMATRIX no aumento das respostas imunológicas. O grupo de controle sem adjuvante (Grupo 5) atingiu títulos máximos na semana 12, como fez o grupo imunizado com alta dose de toxinas mutantes inativadas com EDC (Grupo 4); todos os outros grupos atingiram picos máximos na

semana 6, duas semanas após a última dose.

[00623] Os títulos em todos os grupos aumentaram após a segunda dose (ponto de tempo da semana 3). Como com as respostas anti-toxina A, as respostas anti-toxina B não diminuíram da semana 3 até semana 4. Após a terceira dose (ponto de tempo da semana 6), os títulos do anticorpo neutralizador anti-toxina B em todos os grupos ficaram entre 3-4 $\log_{10}$, exceto no grupo inativado com formalina em baixa dose (Grupo 1) e no grupo inativado com EDC em alta dose (Grupo 4), dos quais ambos tiveram títulos de apenas $>4 \log_{10}$. Os títulos máximos foram observados na semana 12 para todos os grupos exceto o grupo inativado com EDC em baixa dose (Grupo 3), que teve picos máximos na semana 8. Todos os grupos tiveram picos máximos $>4 \log_{10}$.

Exemplo 31: Produção de Anticorpos Monoclonais

[00624] Embora as toxinas A e B compartilhem bastante homologia estrutural, foi observado que as atividades neutralizadoras dos anticorpos são específicos para a toxina. Nesta invenção, foram identificados vários anticorpos que são específicos para uma toxina individual e direcionados para vários epítomos e domínios funcionais e possuem alta afinidade e atividade neutralizadora potente em direção às toxinas nativas. Os anticorpos foram isolados de camundongos que foram imunizados com uma (FI)-toxina mutante inativada com formalina disponível comercialmente ou uma holo-toxina mutante recombinante (SEQ ID NOs: 4 e 6) tornada atóxica através da introdução de mutações específicas no sítio catalítico para a produção de mAb para as toxinas A e B, respectivamente. O mapeamento de epítomos dos anticorpos mostrou que a grande maioria do mAb contra a toxina A (49 de 52) era direcionado para o domínio da toxina C terminal não catalítico.

[00625] Os anticorpos monoclonais contra a toxina B foram

direcionados para três domínios da proteína. De um total de 17 mAbs específicos para a toxina B, 6 eram específicos ao terminal N (por exemplo, aminoácidos 1-543 de uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem, tal como 630), 6 para o terminal C (por exemplo, aminoácidos 1834-2366 de uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem, tal como 630) e 5 para o domínio de translocação mid (por exemplo, aminoácidos 799-1833 de uma TcdB de *C. difficile* do tipo selvagem, tal como 630). A abordagem de utilização de toxinas de *C. difficile* mutantes (por exemplo, SEQ ID NO: 4 e 6) como agentes imunizantes oferece assim uma vantagem chave de apresentar mais, se não todos, os epítomos antigênicos quando comparada com o processo de inativação com formalina que tende a afetar de forma adversa a estrutura antigênica da toxina mutante.

Exemplo 32: Caracterização do mAb da toxina A, A3-25, que inclui uma cadeia leve variável que possui a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 36 e uma cadeia pesada variável que possui a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 37.

[00626] O mAb A3-25 era de interesse particular uma vez que este anticorpo desafia todas as tentativas de definir sua isotipagem de imunoglobulina (Ig) utilizando os kits de isotipagem comumente disponíveis para IgG, IgM e IgA. Uma análise adicional através de western blot utilizando antissoros específicos para a cadeia H da Ig mostrou que o A3-25 é do isotipo IgE, um evento raro na produção de mAb. Isto foi adicionalmente confirmado através do sequenciamento de nucleotídeos do mRNA isolado de células de hibridoma de A3-25. As sequências de aminoácidos deduzidas das sequências de nucleotídeos das regiões variáveis de cadeia H e L do A3-25 são mostradas na Figura 17.

[00627] Com a finalidade de avaliar adicionalmente o mAb A3-25 no modelo com animal para a infecção e a doença causadas por *C*

difficile, seu isotipo Ig foi alterado para IgG1 murino através de enxerto molecular da região variável da cadeia ϵ H na cadeia pesada γ murina de acordo com os métodos publicados.

Exemplo 33: Capacidade de Neutralização e Mapeamento de Epítopo de Anticorpos Específicos para a Toxina

[00628] Ainda, em um esforço para identificar anticorpos funcionais/neutralizadores, todos os anticorpos monoclonais foram avaliados em relação à capacidade de neutralizar toxinas do tipo selvagem em um ensaio de efeito citopático (CPE) padronizado ou em um ensaio mais estrigente e quantitativo baseado na medida de ATP como indicador da viabilidade celular.

[00629] De um total de 52 anticorpos específicos para a toxina A, quatro mAb (A3-25, A65-33, A60-22 e A80-29 (Tabela 17 e Figura 18) exibiam níveis variados de atividade de neutralização. Um ensaio de ligação competitiva BiaCore e ensaios de inibição de hemaglutinação (HI) foram realizados para mapear os epítomos dos anticorpos. Os resultados indicavam que estes anticorpos podem ser direcionados para epítomos diferentes da proteína da toxina A (Tabela 17). Para identificar adicionalmente a localização dos sítios de ligação sobre a proteína, os anticorpos foram individualmente avaliados em ensaio de western blot ou dot blot utilizando fragmentos da toxina de sequências conhecidas. Foi observado que todos os 4 mAbs neutralizadores era direcionados para a região C terminal da toxina.

[00630] De um total de 17 anticorpos específicos para a toxina B, foi observado que 9 eram neutralizadores. Dos nove mAbs neutralizadores, seis destes eram direcionados para o terminal N e os outros três para o domínio de translocação da B toxina (Tabela 18). Com base no ensaio de ligação competitiva Biacore, os nove anticorpos monoclonais neutralizadores podem ser agrupados em quatro grupos de epítomos como mostrado na Figura 19.

TABELA 17: Características de mAbs para a Toxina A Selecionados

Grupo do epítopo (Biacore)	# do mAb	Atividade de neutralização	Inibição da hemaglutinação	Especificidade de ligação	Isotipo de 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	-	-	Em progresso	IgG1, κ
	A50-10	-	-	C-terminal	IgG1, κ
	A56-33	-	-	Em progresso	IgG1, κ
ND	A1	-	-	N-terminal	IgG1, κ

TABELA 18: Características de mAbs para a Toxina B Selecionados

Grupo do epítopo (Biacore)	# do mAb	Atividade de neutralização	Especificidade de ligação	Isotipo de 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	+	Domínio de translocação	IgG1, κ
	B60-2			IgG1, κ
4	B56-6	+	Domínio de translocação	IgG1, κ
	B58-4	-		IgG1, κ

TABELA 18: Características de mAbs para a Toxina B Selecionados

Grupo do epítopo (Biacore)	# do mAb	Atividade de neutralização	Especificidade de ligação	Isotipo de Ig
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

Exemplo 34: Identificação de Novas Combinações de Anticorpos para a Toxina A com Atividade de Neutralização Significativamente Aumentada:

[00631] Os quatro mAbs para a toxina A (A3-25, A65-33, A60-22 e A80-29) exibiam neutralização incompleta ou parcial da toxina A quando testados individualmente no ensaio de neutralização baseado no ATP. O mAb A3-25 era o anticorpo mais potente e os outros três eram menos neutralizantes com o A80-29 mal acima do fundo (Figura 18). Entretanto, quando o A3-25 foi combinado com qualquer um dos outros três mAbs, um efeito sinérgico na neutralização foi observado em todas as três combinações que era bem maior que a soma total da neutralização de anticorpos individuais como mostrado na Figura 20A-C. Em adição, todas as três combinações exibiam capacidade de neutralização completa normalmente observada com os anticorpos policlonais anti-toxina A.

Exemplo 35: Identificação de Novas Combinações de Anticorpos para a Toxina B Exibindo Atividade de Neutralização Significativamente Aumentada:

[00632] Foi também observada a neutralização sinérgica com os mAbs para a Toxina B partindo de grupos diferentes do epítomos identificados através da análise BiaCore. O mAb para a Toxina B B8-

26, o mAb mais dominante do grupo 1, foi combinado com vários mAbs do grupo 3. As combinações foram avaliadas em um ensaio de neutralização específico para a toxina B e os resultados são mostrados na Figura 21 e na Tabela 19.

Tabela 19: Neutralização de Toxina B com mAbs		
mAb	Título de Neut CPE ATP	
B8-26 isoladamente	20,480	5.000
B59-3 isoladamente	320	120
B60-2 isoladamente	320	80
B8-26 + B59-3	655,360	~60.000
B8-26 + B60-2	327,680	nd
nd, não Realizado		

[00633] O efeito sinérgico da neutralização foi observado quando B8-26 foi combinado com um grupo de mAbs para o epítipo 3 (Figura 21B), mas não qualquer outro mAb (dados não mostrados).

[00634] Exemplo 36: Verificação *In vitro* através de mAb em relação a Composições de Toxina Mutante Seguras e Eficazes:

[00635] As toxinas mutantes genéticas A e B de *C. difficile* (por exemplo, SEQ ID NOs: 4 e 6) geradas através da engenharia genética exibiam citotoxicidade residual utilizando um ensaio de citotoxicidade *in vitro*. Embora tenha sido atingido uma redução de ~4 log na citotoxicidade para cada toxina mutante de *C. difficile* (Tabela 20), uma inativação química adicional das toxinas mutantes, tal como o tratamento com formalina era preferida. Entretanto, os tratamentos de inativação química podem ser adverso e pode afetar de forma adversa epítopos antigênicos importantes destas toxinas ou toxinas mutantes.

Tabela 20: Uma Comparação da Citotoxicidade *In Vitro* da Toxina WT, Toxina triplo mutante e toxinas WT inativadas com formalina (FI, da List Biological) (List Biological, comercial)

Tcd	Origem/tratamento	EC ₅₀ ng/mL	Quantidade de Redução na Citotoxicidade
TcdA			
Toxina A (SEQ ID NO: 1)	WT	0,92	1
Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4)	Triplo mutante	8600	9348
Toxóide A (FI)	Tratada com formalina, comercial	>20.000	>21.739
TcdB			
Toxina B (SEQ ID NO: 2)	WT	0,009	1
Toxina B mutante (SEQ ID NO: 6)	Triplo mutante	74	8222
Toxóide B (FI)	Tratada com formalina, comercial	4300	477.778

[00636] Para a otimização do bioprocesso, um planejamento estatístico do experimento (DOE) foi realizado para a inativação química das Tcd A e B triplo mutantes (1 mg/mL) utilizando tratamento com formalina e EDC/NHS. Para otimizar a inativação com formalina da TcdA triplo mutante, foram variados as concentrações de formalina/glicina (20-40 mM), o pH (6,5-7,5) e a temperatura (25-40°C). Para TcdB triplo mutante, foi variada a concentração de formalina/glicina de 2 até 80 mM e a temperatura e o pH eram de 25 °C e 7,0 respectivamente. O tempo de incubação para todos os tratamentos com formalina era de 24 horas. Para a

inativação com formalina, "40/40" nas Tabelas 21 e 23 representa a concentração de formalina e glicina utilizada na reação. Para o tratamento com EDC/NHS, foram variadas as concentrações de EDC/NHS de 0,25 até 2,5 mg/mg de TcdA triplo mutante e de 0,125 até 2,5 mg/mg de TcdB triplo mutante e incubadas durante quatro horas a 25 °C. No final das reações, todas as amostras foram dessalinizadas em 10 mM de fosfato, pH 7,0. Após a purificação, as Tcds tratadas foram analisadas em relação à citotoxicidade residual e o reconhecimento pelo mAb de epítomos através da análise de dot-blot. A meta era identificar as condições de tratamento que reduzem a citotoxicidade até o nível desejado ($EC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) sem ter impacto negativo sobre os epítomos reconhecidos por um conjunto de mAbs neutralizadores (++++ ou +++). As condições de tratamento (marcadas com um sinal de conferido "✓" nas Tabelas 21-24) forneceram composições imunogênicas potencialmente seguras e eficazes que mantinham a reatividade para pelo menos quatro mAbs neutralizadores enquanto exibiam uma redução de 6-8 $\log_{10}$ na citotoxicidade, em relação à citotoxicidade da respectiva toxina do tipo selvagem. Resultados selecionados são ilustrados nas Tabelas 21 até 24. Os dados adicionais de condições de tratamento variáveis sobre as toxinas triplo mutantes e os dados do ensaio de citotoxicidade *in vitro* e de neutralização da toxinas são mostrados na Tabela 33 e na Tabela 34. Ver também, por exemplo, os Exemplos 20 e 21 acima, que fornecem detalhes adicionais em relação às condições de tratamento de reticulação preferidas das toxinas mutantes.

Tabela 21: Citotoxicidade e Reatividade de mAb Neutralizador da TcdA triplo mutante inativada com formalina (SEQ ID NO: 4)							
Condições de reação de inativação química sobre TcdA triplo mutante	CPE μg /mL	Reatividade com mAb (dot blot, condições não desnaturantes)					
		N-terminal Mab#6	Domínio de translocação 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, 40/40mM	>1000	++	++	++++	++++	++++	+++
Nenhuma, Toxina A triplo mutante	18,5-25	++++	++++	++++	++++	++++	+++ +
FI Toxóide A (List Biological)	ND	—	—	++	++	+++	+

Tabela 22: Citotoxicidade e Reatividade de mAb Neutralizador da TcdA triplo mutante inativada com EDC (SEQ ID NO: 4)							
		Reatividade com mAb (dot blot, condições não desnaturantes)					
Condições de reação de inativação química sobre TcdA triplo mutante	CPE μg /mL	N-terminal Mab#6	Domínio de translocação Mab#102	C-terminal (neut)			
				A80-29	A3-25	A60-22	A65-33
25°C, 0,25mg/mg, 4 h ✓	>100 0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, 0,5mg/mg, 4 h ✓	>100 0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25°C, 1,25mg/mg, 4 h ✓	>100 0	+++	++++	++++	+++	++++	++++
25°C, 2,5mg/mg, 4 h ✓	>100 0	+++	++++	++++	+++	++++	+++
Nenhuma, TcdA triplo mutante	18,5-25	++++	++++	++++	++++	++++	++++
FI Toxóide A (List Biological)	ND	—	—	++	++	+++	+

Tabela 23: Citotoxicidade e Reatividade de mAb Neutralizador da TcdB triplo mutante inativada com formalina (SEQ ID NO: 6)					
Condições de reação de inativação química sobre TcdB triplo mutante	CPE (µg /mL)	# do mAb (Aa N-terminal 1 – 543)		# do mAb (aa Mid-/C-terminal 544 – 2366)	
		B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
25°C, pH 7,0, 80/80mM, 24 h ✓	>1000	++++	++++	++++	+++
25°C, pH 7,0, 40/40mM, 24 h ✓	>1000	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 7,0, 10/10mM, 24 h	15.6	++++	++++	++++	++++
25°C, pH 7,0, 2/2mM, 24 h	<0,98	++++	++++	++++	++++
Nenhuma, TcdB triplo mutante	0,058	++++	++++	++++	++++
FI Toxóide B (List Biological)	ND	+++	+++	+++	++

Tabela 24: Citotoxicidade e Reatividade de mAb Neutralizador da TcdB triplo mutante inativada com EDC (SEQ ID NO: 6)					
Condições de reação de inativação química sobre TcdB triplo mutante	CPE (µg /mL)	# do mAb (Aa N-terminal 1 – 543) 8-26 9-30		# do mAb (aa Mid-/C-terminal 544 – 2366) 56-6 59-3	
		B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
25°C, 0,125mg/mg, 4 h	3,9	++++	++++	++++	++++
25°C, 0,25mg/mg, 4 h	250	++++	++++	++++	++++

Tabela 24: Citotoxicidade e Reatividade de mAb Neutralizador da TcdB triplo mutante inativada com EDC (SEQ ID NO: 6)					
Condições de reação de inativação química sobre TcdB triplo mutante	CPE (µg /mL)	# do mAb (Aa N-terminal 1 – 543) 8-26 9-30		# do mAb (aa Mid-/C-terminal 544 – 2366) 56-6 59-3	
		B8-26	B9-30	B56-6	B59-3
25°C, 0,5mg/mL, 4 h ✓	>1000	++++	++++	++++	++++
25°C, 1,25mg/mg, 4 h ✓	>1000	++++	+++	+++	+++
25°C, 2,5mg/mg, 4 h ✓	>1000	++++	+++	+++	+++
Nenhuma, TcdB triplo mutante	0,058	++++	++++	++++	++++
FI Toxóide B (List Biological)	ND	+++	+++	+++	++

Tabela 33

		Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb (dot blot, condições não desnaturantes)					
Amostra #	Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) Amostra ID	CPE; 24h µg /mL	CPE, 72h µg /mL	N-terminal Mab#6	Domínio de transloc ação Mab# 102	C-terminal (neut)			
						80-29	3-25	60-22	65-33
1	L44166-157A	>1000	>1000	++++	++++	++++	+++	++++	++++
2	L44166-157B	>1000	>1000	+++	++++	++++	+++	++++	++++

		Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb (dot blot, condições não desnaturantes)					
Amostra #	Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) Amostra ID	CPE; 24h µg /mL	CPE, 72h µg /mL	N- termin al Mab#6	Domínio de transloc ação Mab# 102	C-terminal (neut)			
						80- 29	3-25	60- 22	65- 33
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	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++

		Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb (dot blot, condições não desnaturantes)					
Amostra #	Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) Amostra ID	CPE; 24h µg /mL	CPE, 72h µg /mL	N- termin al Mab#6	Domínio de transloc ação Mab# 102	C-terminal (neut)			
						80- 29	3-25	60- 22	65- 33
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- modificaçã o) Controle de TxA	23,4	<7.8	++++	++++	++++	++++	++++	++++
22	L44897- 101, 2 h	187,5	155,9	+++	++++	++++	++++	++++	++++
23	L44897- 101, 4 h	375	380.3	+++	++++	++++	++++	++++	++++

		Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb (dot blot, condições não desnaturantes)					
Amostra #	Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) Amostra ID	CPE; 24h µg /mL	CPE, 72h µg /mL	N- termin al Mab#6	Domínio de transloc ação Mab# 102	C-terminal (neut)			
						80- 29	3-25	60- 22	65- 33
24	L44897- 101, 6 h	500	429.6	+++	++++	++++	++++	++++	++++
25	L44897 102, 24 h	>1000	>1000	++	++++	++++	++++	++++	++++
26	L44897- 103, 51 h	>1000	>1000	+	+++	+++	++++	++++	+++
27	L44897- 104, 74 h	>1000	>1000	—	+++	+++	+++	+++	+++
28	L44897- 105, 120 h	>1000	>1000	—	++	++	+++	+++	++
29	L44980- 004	>1000	>1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++
30	Reação #1 Semana 0, 25C	750 ug/mL	ND	ND	++	++	+++	+++	++
31	Reação #1 Semana 1, 25C	375 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
32	Reação #1 Semana 2, 25C	375 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++

		Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb (dot blot, condições não desnaturantes)					
Amostra #	Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) Amostra ID	CPE; 24h µg /mL	CPE, 72h µg /mL	N- termin al Mab#6	Domínio de transloc ação Mab# 102	C-terminal (neut)			
						80- 29	3-25	60- 22	65- 33
33	Reação #1 Semana 3, 25C	375 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
34	Reação #1 Semana 4, 25C	250 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
35	Reação #1 Semana 3, 37C	93,8 ug/mL	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
36	Reação #2 Semana 0, 25C	375 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++
37	Reação #2 Semana 1, 25C	375 ug/mL	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
38	Reação #2 Semana 2, 25C	750 ug/mL	ND	ND	++	++	++	+++	++
39	Reação #2 Semana 3, 25C	250 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	++++	+++

		Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb (dot blot, condições não desnaturantes)					
Amostra #	Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) Amostra ID	CPE; 24h µg /mL	CPE, 72h µg /mL	N- termin al Mab#6	Domínio de transloc ação Mab# 102	C-terminal (neut)			
						80- 29	3-25	60- 22	65- 33
40	Reação #2 Semana 4, 25C	250 ug/mL	ND	ND	+++	+++	+++	++++	+++
41	Reação #2 Semana 3, 37C	187,5 ug/mL	ND	ND	+++	+++	++++	++++	+++
42	Controle de TxA Semana 3, 25C	18,8 ug/mL	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
43	Controle de TxA Semana 3, 37C	25 ug/mL	ND	ND	++++	++++	++++	++++	++++
44	L44897- 116-6 29,5 hs	> 2000 ug/mL	ND	ND	++	++	++	+++	++
45	L44897- 116-7 57,5 hs	> 2000 ug/mL	ND	ND	++	++	++	+++	++

		Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb (dot blot, condições não desnaturantes)					
Amostra #	Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) Amostra ID	CPE; 24h µg /mL	CPE, 72h µg /mL	N- termin al Mab#6	Domínio de transloc ação Mab# 102	C-terminal (neut)			
						80- 29	3-25	60- 22	65- 33
46	L44897- 116 -8 79,5 hs	> 2000 ug/mL	ND	ND	+	+	+	+++	+
47	L44897- 116-9 123,5 hs	> 2000 ug/mL	ND	ND	++	++	++	+++	++
48	L44897- 139	>1000	ND	++	++++	++++	++++	++++	++++
49	L44166- 204	>1000	ND	++++	++++	++++	++++	++++	++++

[00637] Condições de reação de reticulação química para as amostras de toxina A triplo mutante (SEQ ID NO: 4) referidas na Tabela 33

[00638] As amostras 1-4 foram modificadas com EDC/NHS. Condições: 30°C, 20 mM de MES/150 mM de NaCl pH 6,5. As reações foram iniciadas através da adição de EDC. Após 2 horas de reação, as amostras A, B e C tiveram 1 M de glicina adicionado a uma concentração final de glicina de 50 mM. A amostra D não tinha glicina adicionada. As reações foram montadas com proporções em peso diferentes de Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4):EDC:NHS como indicado a seguir.

[00639] 1 L44166-157A 1: 0,25: 0,25 p: p: p

- [00640] 2 L44166-157B 1: 1,25: 1,25
- [00641] 3 L44166-157C 1: 2,5: 2,5
- [00642] 4 L44166-157D 1: 2,5: 2,5
- [00643] Amostra 5 L44905-160A 80 mM de HCHO, 80 mM de glicina, 80 mM de NaPO₄ pH 7, 1 mg/mL de Proteína da Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4), 48 h de reação a 25 °C.
- [00644] Amostra 6 L44166-166 modificação com EDC/NHS de Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4) a 25 °C em 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. Reação iniciada através da adição de EDC. Após 2 horas de reação, 1 M glicina adicionado até uma concentração final de glicina de 0,1 M e incubação durante 2 horas adicionais. Após este tempo, o tampão de reação foi trocado por 1 X PBS em Sephadex G25.
- [00645] Amostra 7 L44905-170A 80 mM de HCHO, 80 mM de glicina, 80 mM de NaPO₄ pH 7, 1 mg/mL de Proteína da Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4), 48 h de reação a 35 C. Esta reação com formalina foi direcionada na produção de reticulação excessiva de forma que a ligação ao antígeno fosse gravemente diminuída.
- [00646] Amostra 8 L44897-61 32 mM de HCHO/80 mM de glicina, 72 h de reação a 25 °C.
- [00647] Amostra 9 L44897-63 80 mM de HCHO/80 mM de glicina, 72 h de reação a 25 °C.
- [00648] As reações a seguir tinham todas um tempo de reação de 24 h.
- [00649] Amostra 10 L44897-72 Tubo#1 25°C, 80 mM de NaPi pH 6,5, 20 mM de HCHO/20 mM de glicina
- [00650] Amostra 11 L44897-72 Tubo#2 25 °C, 80 mM de NaPi pH 6,5, 40 mM de HCHO/40 mM de glicina
- [00651] Amostra 12 L44897-72 Tubo#3 32,5 °C, 80 mM de NaPi pH 7,0, 30 mM de HCHO/30 mM de glicina

- [00652] Amostra 13 L44897-72 Tubo#4 32,5 °C, 80 mM de NaPi pH 7,0, 30 mM de HCHO/30 mM de glicina
- [00653] Amostra 14 L44897-72 Tubo#5 32,5 °C, 80 mM de NaPi pH 7,0, 30 mM de HCHO/30 mM de glicina
- [00654] Amostra 15 L44897-75 Tubo#6 25 °C, 80 mM de NaPi pH 7,5, 20 mM de HCHO/20 mM de glicina
- [00655] Amostra 16 L44897-75 Tubo#7 25 °C, 80 mM de NaPi pH 7,5, 40 mM de HCHO/40 mM de glicina
- [00656] Amostra 17 L44897-75 Tubo#8 40 °C, 80 mM de NaPi pH 6,5, 20 mM de HCHO/20 mM de glicina
- [00657] Amostra 18 L44897-75 Tubo#9 40 °C, 80 mM de NaPi pH 6,5, 40 mM de HCHO/40 mM de glicina
- [00658] Amostra 19 L44897-75 Tubo#10 40 °C, 80 mM de NaPi pH 7,5, 20 mM de HCHO/20 mM de glicina
- [00659] Amostra 20 L44897-75 Tubo#11 40 °C, 80 mM de NaPi pH 7,5, 40 mM de HCHO/40 mM de glicina
- [00660] As 8 amostras a seguir foram reagidas a 25 °C durante os tempos indicados em 80 mM de NaPi pH 7,0 contendo 78 mM de HCHO e 76 mM de glicina
- [00661] Amostra 21 L44897-101 (pre-modificação) Controle de TxA amostra de controle de tempo zero, não modificada ou exposta a HCHO/glicina
- [00662] Amostra 22 L44897-101, 2 h
- [00663] Amostra 23 L44897-101, 4 h
- [00664] Amostra 24 L44897-101, 6 h
- [00665] Amostra 25 L44897 102, 24 h
- [00666] Amostra 26 L44897-103, 51 h
- [00667] Amostra 27 L44897-104, 74 h
- [00668] Amostra 28 L44897-105, 120 h
- [00669] A amostra 29 (L44980-004) era Toxina A mutante

modificada com EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) (toxina A triplo mutante (SEQ ID NO: 4)-EDC). As condições de reação são: 25 °C, o tampão era 20 mM de MES/150 mM de NaCl pH 6,6. Toxina A triplo mutante (SEQ ID NO: 4):EDC:NHS = 1:0,5:0,5 p:p:p. Reação iniciada através da adição de EDC. Após 2 horas de reação, glicina adicionada até uma concentração final de 0,1 M e reagida durante 2 horas adicionais a 25 C. Reação terminada através da dessalinização em Sephadex G25.

[00670] As 12 amostras e os 2 controles a seguir eram experimentos de inversão em que as amostras foram incubadas a 25°C e 37 °C.

[00671] Reação 1 = 25 °C, 80 mM de NaPi pH 7,0, 40 mM de HCHO apenas (sem glicina), 24 horas de reação.

[00672] Reação 2 = 25 °C, 80 mM de NaPi pH 7,0, 40 mM de HCHO/40 mM de glicina, 24 horas de reação

[00673]	Amostra	Reação

[00674]	30	Reação #1 Semana 0, 25°C

[00675]	31	Reação #1 Semana 1, 25°C

[00676]	32	Reação #1 Semana 2, 25°C

[00677]	33	Reação #1 Semana 3, 25°C

[00678]	34	Reação #1 Semana 4, 25°C

[00679]	35	Reação #1 Semana 3, 37°C

[00680]	36	Reação #2 Semana 0, 25°C

[00681]	37	Reação #2 Semana 1, 25°C

[00682]	38	Reação #2 Semana 2, 25°C

[00683]	39	Reação #2 Semana 3, 25°C

[00684]	40	Reação #2 Semana 4, 25°C

[00685]	41	Reação #2 Semana 3, 37°C

[00686]	42	Controle de TxA Semana 3, 25°C

[00687] 43 Controle de TxA Semana 3, 37°C

[00688] As 4 amostras a seguir foram geradas através da reação durante os tempos indicados a 25 °C em 80 mM de NaPi pH 7,0, 40 mM de HCHO/40 mM de glicina

[00689] 44 L44897-116-6 29,5 h

[00690] 45 L44897-116-7 57,5 h

[00691] 46 L44897-116 -8 79,5 h

[00692] 47 L44897-116-9 123,5 h

[00693] Amostra 48 L44897-139 48 h de reação a 25 °C, 80 mM de NaPi pH 7,0, 40 mM de HCHO/ 40 mM de glicina.

[00694] Amostra 49 L44166-204 modificação com EDC/NHS de Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4). 25 C, tampão 1 x PBS pH7,0. Toxina A mutante (SEQ ID NO: 4):EDC:NHS = 1:0,5:0,5 p:p:p. 2 horas de reação com EDC/NHS, então 1 M de glicina adicionado até uma concentração final de 0,1 M e 2 horas adicionais de reação. Tampão trocado em Sephadex G25 por 20 mM de L-histidina/100 mM de NaCl pH 6,5.

Tabela 34							
ID da Amostra de Toxina B mutante	Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb neut (dot blot, condições não desnaturantes)				Fortes reatividades para todos os 4 mAbs
	CPE; 24h	ATP, 72h	# do mAb (Aa N-terminal 1 – 543) 8-26 9-30		# do mAb (aa Mid-/C-terminal 544 – 2366) 56-6 59-3		
L44905-86-01 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Controle não tratado	<0,1 µg /mL	<0,1µg/ mL	++++	++++	++++	++++	√

Tabela 34							
	Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb neut (dot blot, condições não desnaturantes)				Fortes reativida des para todos os 4 mAbs
ID da Amostra de Toxina B mutante	CPE; 24h	ATP, 72h	# do mAb (Aa N- terminal 1 – 543) 8-26 9-30	# do mAb (aa Mid-/C-terminal 544 – 2366) 56-6 59-3			
L44905-86-02 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, dia1	≥100 µg/mL	2,2µg/ mL	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-03 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, dia1	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	++++	++	+++	√*
L44905-86-04 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, dia1	>100 µg/mL	5,2 µg/mL	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-05 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, dia1	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	++++	++	+++	√*

Tabela 34							
ID da Amostra de Toxina B mutante	Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb neut (dot blot, condições não desnaturantes)				Fortes reatividades para todos os 4 mAbs
	CPE; 24h	ATP, 72h	# do mAb (Aa N-terminal 1 – 543) 8-26 9-30		# do mAb (aa Mid-/C-terminal 544 – 2366) 56-6 59-3		
L44905-86-06 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, dia1	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	-	++++	+++	
L44905-86-07 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, dia1	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	-	++++	+++	
L44905-86-08 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, dia5	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	++++	++++	+++	√
L44905-86-09 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, dia5	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++	++	-	+	

Tabela 34							
ID da Amostra de Toxina B mutante	Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb neut (dot blot, condições não desnaturantes)				Fortes reatividades para todos os 4 mAbs
	CPE; 24h	ATP, 72h	# do mAb (Aa N-terminal 1 – 543) 8-26 9-30		# do mAb (aa Mid-/C-terminal 544 – 2366) 56-6 59-3		
L44905-86-10 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, dia5	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-11 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, dia5	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++	++++	-	+	
L44905-86-12 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, dia5	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	-	++++	+++	
L44905-86-13 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, dia5	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	-	++++	++++	

Tabela 34							
ID da Amostra de Toxina B mutante	Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb neut (dot blot, condições não desnaturantes)				Fortes reatividades para todos os 4 mAbs
	CPE; 24h	ATP, 72h	# do mAb (Aa N-terminal 1 – 543) 8-26 9-30		# do mAb (aa Mid-/C-terminal 544 – 2366) 56-6 59-3		
L44905-86-14 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 10°C, dia7	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	++++	++++	++++	√
L44905-86-15 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn1, 25°C, dia7	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	++++	-	+	
L44905-86-16 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 10°C, dia7	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	++++	+++	++++	√
L44905-86-17 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn2, 25°C, dia7	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++	++	-	+	

Tabela 34							
ID da Amostra de Toxina B mutante	Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb neut (dot blot, condições não desnaturantes)				Fortes reatividades para todos os 4 mAbs
	CPE; 24h	ATP, 72h	# do mAb (Aa N-terminal 1 – 543) 8-26 9-30		# do mAb (aa Mid-/C-terminal 544 – 2366) 56-6 59-3		
L44905-86-18 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 10°C, dia7	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	-	++++	++++	
L44905-86-19 Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), Rxn3, 25°C, dia7	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	-	++	++	
L34346-30A	>100 µg/mL	>100 µg/mL	++++	++++	++++	++++	√
L34346-30B	>100 µg/mL	>100 µg/mL	+++	++++	++++	++++	√
Comercial, FI Toxóide B (List Biologicals)	ND	ND	++++	++++	++++	++++	√
Comercial, Pt de Toxina B de controle (List Biologicals)	22,5 pg/mL	7,8 pg/mL	+++	++	+++	+++	√

Tabela 34							
	Ensaio de Cito (EC50)		Reatividade com mAb neut (dot blot, condições não desnaturantes)				Fortes reativida
ID da Amostra de Toxina B mutante	CPE; 24h	ATP, 72h	# do mAb (Aa N- terminal 1 – 543) 8-26 9-30	# do mAb (aa Mid-/C-terminal 544 – 2366) 56-6 59-3			des para todos os 4 mAbs
Controle, toxina B triplo mutante recombinante (SEQ ID NO: 6)	78 ng/mL	72 ng/mL	+++	++	++++	+++	√

[00695] Condições de reação de reticulação química para as amostras de toxina B mutante referidas na Tabela 34

[00696] A toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6) foi quimicamente reticulada e testada de acordo com as condições de reação a seguir. As amostras de L44905-86 foram testadas em um experimento envolvendo três variações de reação de formalina e duas temperaturas de incubação. Cada dia, 6 amostras foram coletadas para um total de 18 amostras. A primeira amostra na lista é o controle não tratado (o que torna 19 amostras no total). O controle não tratado incluía um polipeptídeo de toxina B triplo mutante não tratada (SEQ ID NO: 6).

[00697] Reação1 ("Rxn1") = 80 mM de HCHO, 80 mM de glicina, 80 mM de NaPO₄ pH 7, 1mg/mL de Proteína da Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6)

[00698] Reação2 ("Rxn2") = 80 mM de HCHO, Sem glicina, 80 mM de NaPO₄ pH 7, 1mg/mL de Proteína da Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6)

[00699] Reação3 ("Rxn3") = 80 mM de HCHO, Sem glicina, 80 mM de NaPO₄ pH 7, 1mg/mL de Proteína da Toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6) + capeamento com Cianoborohidreto. O Capeamento com Cianoborohidreto envolvia 80 mM de CNBrH₄ adicionados à reação

final dessalinizada e incubados 24 h a 36°C.

[00700] Para a Amostra L34346-30A 0,5 g de EDC e NHS por grama de toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), 4 horas a 30°C, em 20 mM de MES, 150 mM de NaCl, pH 6,5.

[00701] Para a Amostra L34346-30B 0,5 g de EDC e NHS por grama de toxina B triplo mutante (SEQ ID NO: 6), 2 horas a 30°C seguidas pela adição de glicina (concentração final de g/L) e incubada durante mais 2 horas a 30°C, em 20 mM de MES, 150 mM de NaCl, pH 6,5. A única diferença entre as duas reações para L34346-30A e para L34346-30B é a adição glicina à reação L34346-30B.

Exemplo 37: Anticorpos Induzidos por Composições Imunogênicas são Capazes de Neutralizar Toxinas de Várias Cepas de C. difficile

[00702] Para avaliar se os anticorpos induzidos pelas composições imunogênicas que incluem a substância de fármaco de toxina mutantes podem neutralizar um amplo espectro de sequências de toxinas diversas, cepas representativas de diversos ribotipos e toxinotipos foram sequenciadas para identificar a extensão da diversidade genética entre as várias cepas comparadas com as substâncias de fármaco de toxina mutante. Sobrenadantes de cultura contendo toxinas secretadas de várias cepas foram então testados em um ensaio de neutralização *in vitro* utilizando soros de hamsters imunizados para determinar a cobertura da composição imunogênica e para determinar a capacidade da composição imunogênica de proteger contra diversas toxinas de cepas clínicas circulantes.

[00703] Tanto as células HT-29 (linhagem de células de carcinoma de cólon) quanto as células IMR-90 foram utilizadas para testar a neutralização de toxinas expressas partindo de cepas do CDC. As células HT-29 são mais sensíveis à TcdA; a EC₅₀ da TcdA purificada nestas células é de 100 pg/mL quando comparada com 3,3 ng/mL para a TcdB. Por outro lado, as células IMR-90 são mais sensíveis à

TcdB; a EC₅₀ da TcdB purificada nestas células varia entre 9-30 pg/mL quando comparada a 0,92-1,5 ng/mL para a TcdA. A especificidade do ensaio tanto para TcdA quanto para TcdB nestas linhagens de células foi confirmada através da utilização de anticorpos específicos para a toxina tanto policlonais quanto monoclonais. Para a normalização do ensaio, filtrados de cultura dos 24 isolados do CDC foram testados em uma concentração quatro vezes seu respectivo valor de EC₅₀. Três das cepas tinham níveis de toxina que eram muito baixos para testar no ensaio de neutralização.

[00704] Vinte e quatro cepas representando ribotipos/ toxinotipos diversos cobrindo mais que 95% das cepas de *C. difficile* circulantes nos EUA e no Canadá foram obtidas do CDC. Entre estes isolados estavam cepas representando os ribotipos 027, 001 e 078, três cepas epidêmicas do CDAD nos Estados Unidos da América, Canadá e Reino Unido. As cepas 2004013 e 2004118 representavam o ribotipo 027; a cepa 2004111 representava o ribotipo 001 e as cepas 2005088, 2005325 e 2007816 representavam o ribotipo 078. Para identificar a extensão da diversidade genética entre os isolados clínicos causadores de doença e a 630 cepa, os genes de toxina (*tcdA* e *tcdB*) destas cepas clínicas foram completamente sequenciados. Ver a Tabela 35. As sequências de aminoácidos das toxinas foram alinhadas utilizando ClustalP no programa Megalign™ (DNASTAR® Lasergene®) e analisadas em relação à identidade de sequência. Para *tcdA*, a análise de alinhamento genômico mostrou que todos os isolados clínicos e a cepa 630 compartilhavam de forma global aproximadamente 98-100% de identidade de sequências de aminoácidos. A porção C-terminal do gene *tcdA* era ligeiramente mais divergente. A mesma análise foi realizada para o gene *tcdB* que exibia maior divergência de sequência. Notavelmente, as cepas 2007838/NAP7/126 e 2007858/NAP1/unk5 exibiam os padrões mais

divergentes da 630 cepa nos domínios N terminal (79-100%) e C terminal (88-100%; dados não mostrados).

[00705] Um conjunto de soro de hamster (HS) foi coletado dos hamsters sírios dourados que imunizados com um agente imunogênico que inclui TcdA mutante (SEQ ID NO: 4) e TcdB mutante (SEQ ID NO: 6), em que as toxinas mutantes foram inativadas com EDC, de acordo, por exemplo, com o Exemplo 29, Tabela 15, descritos anteriormente e formuladas com fosfato de alumínio. Os resultados na Tabela 35 mostram que pelo menos a toxina B dos respectivos sobrenadantes de cultura foi neutralizada, em um ensaio de neutralização *in vitro*, pelos soros dos hamsters imunizados.

Tabela 35. Descrição de cepas de *C. difficile* do CDC e Capacidade dos Soros de Hamsters Imunes de Neutralizar Várias Toxinas

Cepa	Tipo de PFGE	Ribotipo	Neutralizada pelos Soros de Hamster
2005088	NAP7	78	sim
2007816	Relacionado a NAP7	78	sim
2005325	NAP7	78	sim
2004013	NAP1	27	sim
2007886	NAP1		sim
2008222	NAP4	77	sim
2004206	NAP4	154	sim
2005283	NAP5	Unk3	Não testado ^b
2009141	NAP2		sim
2007838	NAP7	126	sim
2004111	NAP2	1	sim
2007070	NAP10	70	sim
2006017	NAP12	15	sim
2009078	NAP11	106	Não testado ^b
2007217	NAP8	126	sim

Cepa	Tipo de PFGE	Ribotipo	Neutralizada pelos Soros de Hamster
2006376	NAP9	17	sim
2007302	NAP11	Unk2	sim
2004118	NAP1	27	sim
2005022	NAP3	53	sim
2009292	NAP1		sim
2004205	NAP6	2	sim
2007858	NAP1	Unk5	sim
2009087	NAP11	106	Não testado ^b
2005359	Relacionado a NAP1		sim

b Os níveis de toxina eram muito baixos para realizar o ensaio de neutralização.

[00706] A Figura 23 representa os resultados do ensaio de neutralização utilizando preparações de toxina de várias cepas de *C. difficile* sobre células IMR-90. Os dados mostram que os anticorpos neutralizadores de TcdB nos antissoros de hamster eram capazes de neutralizar toxinas de todos os 21 isolados testados, que incluem cepas hipervirulentas e uma cepa negativa para TcdA, cepa positiva para TcdB. Pelo menos 16 cepas de *C. difficile* diferentes foram obtidas no CDC (Atlanta, GA)(descrito anteriormente) e foram cultivadas em meios de cultura de *C. difficile* sob condições adequadas que são conhecidas na arte e como são descritas anteriormente. Os sobrenadantes de cultura contendo as toxinas secretadas foram analisados para determinar sua citotoxicidade (EC₅₀) sobre monocamadas de IMR-90 e subsequentemente testados em um ensaio de neutralização *in vitro* padronizado a 4 vezes a EC₅₀ utilizando várias diluições de soros de hamsters imunizados com a substância de fármaco de toxina A mutante e a substância de fármaco de toxina B mutante, formuladas com fosfato de alumínio. A toxina

bruta obtida partindo dos sobrenadantes de cultura de de cada cepa e a toxina purificada (toxina comercial obtida na List Biologicals)(não purificada dos respectivos sobrenadantes) foram testadas em relação à citotoxicidade para as células IMR-90 utilizando o ensaio de citotoxicidade *in vitro* descrito anteriormente.

[00707] Nas Figuras 23A-K, os gráficos mostram os resultados dos testes de citotoxicidade *in vitro* (descritos anteriormente) em que os níveis de ATP (RLUs) são representados graficamente contra concentrações crescentes de: meios de cultura de *C. difficile* e o conjunto de soro de hamster (■); toxina bruta e o conjunto de soro de hamster (●); toxina purificada e o conjunto de soro de hamster (▲); toxina bruta (▼), controle; e toxina purificada (◆), controle. As toxinas provenientes das respectivas cepas foram adicionadas às células a 4x os valores de EC₅₀.

[00708] Como mostrado nas Figuras 23A-K, os hamsters que receberam o agente imunogênico descrito desenvolveram de forma surpreendente anticorpos neutralizadores que exibiam atividade de neutralização contra toxinas de pelo menos as 16 cepas de *C. difficile* do CDC diferentes a seguir, em comparação com o único controle da respectiva 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 também a Tabela 35 para cepas de *C. difficile* adicionais das quais as toxinas foram testadas e foram neutralizadas por uma composição imunogênica que inclui uma substância de fármaco de toxina A mutante e uma substância de fármaco de toxina B mutante, formuladas em fosfato de alumínio.

[00709] Em outro estudo, sobrenadantes de cultura contendo toxinas secretadas de várias cepas de *C. difficile* (obtidas no CDC e no

Leeds Hospital, UK) foram testados no ensaio de neutralização *in vitro* utilizando soros de hamsters que receberam a administração da substância de fármaco de toxina A mutante e da substância de fármaco de toxina B mutante, formuladas com Alhidrogel. Ver a Tabela 36 para o planejamento experimental. Os resultados são mostrados na Tabela 37 e na Tabela 38.

Tabela 36: Planejamento experimental	
Controle do Ensaio	No ensaio utilizando células HT-29: Antissoro de coelho (Anti-Toxina A policlonal da Fitzgerald Industries, #70-CR65) e Toxina A de Referência (toxina A do tipo selvagem da List Biologicals) No ensaio utilizando células IMR-90: Antissoro de coelho (Anti-Toxina B policlonal da Meridian Life Science, #B01246R) e Toxina B de Referência (toxina B do tipo selvagem da List Biologicals)
Controles da Amostra	No ensaio utilizando células HT-29: soro h + Toxina A de Referência
	No ensaio utilizando células IMR-90: soro h + Toxina B de Referência
	Soro HS+630 pt toxina
	Soro HS+ Meios de cultura de linhagens de células IMR-90 ou HT-29
	Soro HS+ sobrenadante de cultura de VPI11186
Amostra de Teste	HS + respectivo sobrenadante de cultura de <i>C. difficile</i>
Origem do Antissoro de Hamster (HS)	Animais administrados com substância de fármaco de toxina A mutante e substância de fármaco de toxina B mutante formuladas com Alhidrogel

Tabela 37: Anticodpos induzidos pela Composição imunogênica Neutralizavam a Toxina A e a Toxina B de Várias Cepas de C. difficile do tipo selvagem do CDC, que incluem Cepas Hipervirulentas						
Cepa Cdiff	Tipo de PFGE	Riboti po	Toxi notip o	Outro Método de Tipagem	Neutralizad o por h (IMR-90, Toxina B)	Neutralizad o por h (HT-29, Toxina A)
200411 1	NAP2	1	0	A sequência da respectiva toxina possui 100% de homologia em relação à toxina da Cepa 630	Sim	Sim
200914 1	NAP2		0		Sim	Sim
200601 7	NAP12	15	0		Sim	Sim
200730 2	NAP11	Unk2	0		Sim	Sim
200908 7	NAP11	106	0		Sim	Sim
200502 2	NAP3	53	0		Sim	Sim
200528 3	NAP5	Unk3	0		Sim	Sim
200907 8	NAP5	53	0		Sim	Sim
200420 6	NAP4	154	0		Sim	Sim
200822 2	NAP4	77	0		Sim	Sim
200420 5	NAP6	2	0		Sim	Sim

Tabela 37: Anticodpos induzidos pela Composição imunogênica Neutralizavam a Toxina A e a Toxina B de Várias Cepas de C. difficile do tipo selvagem do CDC, que incluem Cepas Hipervirulentas						
Cepa Cdiff	Tipo de PFGE	Riboti po	Toxi notip o	Outro Método de Tipagem	Neutralizad o por h (IMR-90, Toxina B)	Neutralizad o por h (HT-29, Toxina A)
200707 0	NAP10	70	0		Sim	Sim
200637 6	NAP9	17	VIII	txnA-/txnB+	Sim	N/A
200781 6	Relaciona do a NAP7	78	V	Prevalência crescente nos EUA e na Europa	Sim	Sim
200783 8	NAP7	126			Sim	Sim
200508 8	NAP7	78			Sim	Sim
200532 5	NAP7	78			Sim	Sim
200721 7	NAP8	126			Sim	Sim
200401 3	NAP1	27	III	Hipervirulent a NAP1/027/III	Sim	Sim
200411 8	NAP1	27			Sim	Sim
200929 2	NAP1				Sim	Sim

Tabela 37: Anticodpos induzidos pela Composição imunogênica Neutralizavam a Toxina A e a Toxina B de Várias Cepas de C. difficile do tipo selvagem do CDC, que incluem Cepas Hipervirulentas						
Cepa Cdiff	Tipo de PFGE	Ribotipo	Toxinotipo	Outro Método de Tipagem	Neutralizado por h (IMR-90, Toxina B)	Neutralizado por h (HT-29, Toxina A)
2005359	Relacionado a NAP1				Sim	Sim
2007858	NAP1	Unk5	IX/X XIII	Outro	Sim	Sim
2007886	NAP1		IX/X XIII		Sim	Sim

Tabela 38: Anticodpos induzidos pela Composição imunogênica Neutralizavam a Toxina A e a Toxina B de Várias Cepas de C. difficile do tipo selvagem da Europa, que incluem Cepas Hipervirulentas					
Cepa Cdiff	Tipo de PFGE	Outro Método de Tipagem	Toxinotipo	Neutralizado por h (IMR-90, Toxina B)	Neutralizado por h (HT-29, Toxina A)
001	NAP2	Cepas do Toxinotipo 0	0	Sim	Sim
002	NAP6			Sim	Sim
012 (004)	NAPCR1			Sim	Sim
014	UK			Sim	Sim
015	NAP12			Sim	Sim
020	NAP4			Sim	Sim

029	UK			Sim	Sim
046	UK			Sim	Sim
053	NAP5			Sim	Sim
059	UK			Sim	Sim
077	UK			Sim	Sim
078	UK			Sim	Sim
081	UK			Sim	Sim
087	UK			Sim	Sim
095	UK			Sim	Sim
106	UK			Sim	Sim
117	UK			Sim	Sim
017	NAP9	txnA-/txnB+	VIII	Sim	NA
027	NAP1	Hipervirulenta	III	Sim	Sim
075	UK			Sim	Sim
003	NAP10	Outro	I	Sim	Sim
023	UK		IV	Sim	Sim
070	UK		XIII	Sim	Sim
126	UK		UK	Sim	Sim
131	UK		UK	Em progresso	Sim

Cepas de *C. difficile* do tipo selvagem obtidas no Leeds Hospital, Reino Unido.

"UK" = status desconhecido

NA, não aplicável; a cepa não produz a toxina A; não foi testado no ensaio de neutralização da Toxina A

Exemplo 38: Mapeamento do Peptídeo de toxinas triplo mutantes com EDC/NHS

[00710] Para caracterizar as toxinas triplo mutantes inativadas com EDC/NHS, experimentos de mapeamento de peptídeo foram

realizados sobre quatro lotes de toxina A triplo mutante tratada com EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) e quatro lotes de triplo mutante B tratada com EDC/NHS (SEQ ID NO: 6). Após a digestão das toxinas mutantes com tripsina, os fragmentos peptídicos resultantes foram separados utilizando HPLC em fase inversa. A análise de espectro de massa foi utilizada para identificar modificações que ocorrem como um resultado do processo de inativação. Para tanto a substância de fármaco de toxina A mutante quanto a substância de fármaco de toxina B mutante, mais de 95% dos peptídeos trípticos teóricos foram identificados. As reticulações e os adutos de glicina (a glicina foi utilizada como o agente de capeamento) foram identificados. Tanto na substância de fármaco de toxina A mutante quanto na substância de fármaco de toxina B mutante, adutos de beta-alanina também foram observados. Sem ficar ligado a um mecanismo ou uma teoria, os adutos de beta-alanina parecem resultar da reação de três moles de NHS com um mol de EDC que forma beta-alanina ativada por NHS. Esta molécula pode então reagir com os grupos de lisina para formar adutos de beta-alanina (+70 Da). Nas amostras de toxina B triplo mutante tratadas com EDC/NHS, baixos níveis (0,07 mol/mol de proteína) de desidroalanina (-34 Da) também foram observados. A desidroalanina é um resultado da dessulfonação de um resíduo de cisteína. O mesmo tipo e grau de modificação foi observado em quatro bateladas de cada toxina mutante, indicando que o processo produz um produto coerente. O mapeamento do peptídeo (em mais de 95% de cobertura de sequência) confirma que as modificações estão presentes. Um resumo das modificações é mostrado na Tabela 39. Ver também as Figuras 24-25. Em adição, a heterogeneidade do tamanho e da carga da substância de fármaco da toxina A triplo mutante e da substância de fármaco da toxina B triplo mutante aumentou, quando comparada com a heterogeneidade do tamanho e da carga das respectivas toxina

A triplo mutante e toxina B triplo mutante na ausência de inativação química. Como um resultado, os perfis de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) e de cromatografia de troca aniônica (AEX) tinham picos relativamente amplos (dados não mostrados).

Tabela 39. Sumário de Modificações Observadas na Substância de fármaco de toxina mutantes

Modificação	# de Resíduos Modificados	# Total de Resíduos	Grau de Modificação	Moles modificados / mol de proteína
Substância de fármaco de toxina A mutante				
Reticulação	2	313 Asp/Glu	16-40%	0,6
Grupamento de glicina	8	313 Asp/Glu	10-53%	2,2
Grupamento de beta alanina	19	233 Lys	10-60%	4,7
Substância de fármaco de toxina B mutante				
Reticulação	3	390 Asp/Glu	11-63%	0,8
Grupamento de glicina	23	390 Asp/Glu	10-31%	3,9
Grupamento de beta alanina	10	156 Lys	12-42%	2,6
desidroalanina	2	8 Cys	1,0-3,5%	,07

O grau de modificação é calculado através da divisão da área de HPLC do peptídeo modificado pela área de HPLC do peptídeo nativo + modificado.

Exemplo 39: Produção do Produto de Fármaco

[00711] A composição imunogênica de *C. difficile* (produto de fármaco) contém dois ingrediente farmacêuticos ativos (substância de fármaco de toxina A mutante e substância de fármaco de toxina B mutante):□. Um exemplo de produto de fármaco é uma formulação liofilizada contendo 10 mM de Tampão tris pH 7,4, 4,5% (p/p) trealose dihidratada e 0,01% (p/v) de polissorbato 80, que inclui cada uma da substância de fármaco de toxina A mutante e da substância de fármaco de toxina B mutante. Ver a Tabela 40. A composição imunogênica é preparada para injeção através da ressuspensão da vacina liofilizada com diluente ou com diluente contendo Alhidrogel. A pílula de placebo inclui uma solução salina normal esterilizada para injeção (cloreto de sódio a 0,9%).

Tabela 40

Componente	Selecionado
Forma de dosagem da formulação	Liofilizada
Dose de antígeno por 0,5 mL	25, 50, 100 µg de cada toxina A triplo mutante tratada com EDC/NHS (SEQ ID NO: 4) e toxina B triplo mutante tratada com EDC/NHS (SEQ ID NO: 6)
pH	7,4 ± 0,5
Tampão	10 mM de Tris
Estabilizante/Agente de massa	4,5% de Trealose dihidratada (3 – 6%)
Tensoativo	0,01% de Polissorbato 80 (0,005 – 0,015%)
Container closures	2 mL 13 mm Tipo 1 flint Frasco de vido, Blowback, Pest - Flurotec

Preparação do tampão

[00712] Água para injeção (PFI) é adicionada a um recipiente de composto. Durante a mistura, os excipientes são adicionados e dissolvidos até estarem em solução. O pH é medido. Se requerido o pH é ajustado em $7,4 \pm 0,1$ com HCl. A solução é diluída até o peso final com PFI e então filtrada utilizando um filtro de 0,22 µm Millipore Express SHC XL150. Uma redução da biocarga pré-filtração é realizada antes da filtração. São retiradas amostras do tampão filtrado para osmolaridade e pH.

Preparação da formulação

[00713] As substâncias de fármaco de toxina mutante descongeladas são agrupadas no recipiente de formulação baseado nas quantidades pré-calculadas na ordem a seguir de operação: 50% do volume do tampão de diluição alvo para atingir 0,6 mg/mL são adicionados primeiro ao recipiente, seguidos pela adição de substância de fármaco de toxina A mutante e misturados durante 5 minutos a 100 rpm. A substância de fármaco de toxina B mutante é então adicionada ao recipiente e a solução é adicionalmente diluída até o ponto de diluição de 0,6 mg/mL e então misturada durante mais 5 minutos a 100 rpm. Uma amostra é removida e testada em relação à concentração total de toxina mutante. A solução é diluída até 100 por cento do volume com base no valor da concentração da toxina mutante no processo e então misturada durante 15 minutos a 100 rpm. São tiradas amostras do produto de fármaco formulado para pH e biocarga pré-filtração. O produto de fármaco formulado é então filtrado utilizando um Millipore Express SHC XL150 durante um armazenamento durante a noite ou levada até a linha de preenchimento para esterilização por filtração.

[00714] A massa formulada é levada até a área de preenchimento, são retiradas amostras para a biocarga e então esterilizada por

filtração com dois filtros Millipore Express SHC XL150 em série. A massa formulada é preenchida dentro de frascos de vidro despirogenados até um volume de preenchimento alvo de 0,73 mL. Os frascos preenchidos são parcialmente tampados e então carregados no secador por congelamento. O ciclo de liofilização é executado como mostrado na Tabela 41. No final do ciclo, a câmara de liofilização é preenchida novamente com nitrogênio até 0,8 atm e então as tampas são completamente ajustadas. A câmara é descarregada e os frascos são tampados utilizando selos "flip-off".

Tabela 41. Pontos de Ajuste dos Ciclos de Liofilização do Produto de Fármaco de *C. difficile*

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (minutos)	Saturação (minutos)	Pressão
Carregamento	5°C	N/A	60	-
Congelamento 1	-50°C	183	60	-
Anelamento	-10°C	133	180	
Congelamento 2	-45°C	117	90	
Início do Vácuo	-45°C	-	60	50
Secagem Primária	-30°C	75	3420	50
Secagem Secundária	30°C	300	600	50
Armazenamento	5°C	50	-	50

[00715] Os dados de estabilidade do produto de fármaco são resumidos na Tabela 42. Os dados sugerem que o produto de fármaco é fisicamente e quimicamente estável durante o armazenamento a 2-8°C durante pelo menos 3 meses ou pelo menos 1 mês a 25° ou 40°C. Sob ambas as condições, o nível de impurezas detectado por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) não foi alterado, nem havia alterações na antigenicidade *in vitro* ao longo dos últimos pontos de tempo testados.

Tabela 42: Estabilidade do Produto de Fármaco Liofilizado ^a

	Formulação do Produto de fármaco 200 µg/mL de substância de fármaco de toxina A mutante, 200 µg/mL de substância de fármaco de toxina B mutante, 4,5% de Trealose dihidratada, 0,01% de Polissorbato 80, 10 mM de Tampão tris pH 7,4			
Test	t=0	1 Mês@25°C	1 Mês@40°C	3 meses @2-8°C
Aparência antes da Reconstituição.	Torta branca essencialme nte livre de matéria particulada estranha visível	Torta branca essencialme nte livre de matéria particulada estranha visível	Torta branca essencialme nte livre de matéria particulada estranha visível	Torta branca essencialme nte livre de matéria particulada estranha visível
Aparência após Reconstituição.	Solução incolor translúcida	Solução incolor translúcida	Solução incolor translúcida	Solução incolor translúcida
pH	7,5	7,6	7,6	7,5
Concentração por AEX (µg/mL)	substância de fármaco de toxina A mutante 212 substância de fármaco de toxina B mutante 235	Substância de fármaco de toxina A mutante 193 substância de fármaco de toxina B mutante 223	Substância de fármaco de toxina A mutante 191 Substância de fármaco de toxina B mutante 222	Substância de fármaco de toxina A mutante 193 substância de fármaco de toxina B mutante 230

Impuraza por SEC	< 2,5%	2,8%	2,8%	2,9%
Caracterizaçã o por SEC	HMMS: 29,6% Monômero: 68,0%	HMMS: 30,2% Monômero: 67,1%	HMMS: 30,2% Monômero: 67,1%	HMMS: 28,5% Monômero: 68.7%
Umidade	0,5	NA	NA	NA

um DP Liofilizado é reconstituído com 60 mM de diluente de NaCl para estes testes.

Exemplo 40: Diluentes de vacina

[00716] Para soro fisiológico, é usado NaCl 60 mM como um diluente para o produto fármaco liofilizado sem qualquer adjuvante para garantir a reconstituição de uma solução isotônica.

[00717] Alhydrogel: Alhydrogel "85" 2% (Brenntag) é um produto de grau Boa Prática de Fabricação ("Good Manufacturing Practice" (GMP)) comercialmente disponível composto de folhas cristalinas octaédricas de hidróxido de alumínio. Um exemplo de formulação diluente para Alhydrogel é apresentado na Tabela 43. Os exemplos de formulação podem ser usados em combinação o produto fármaco descrito anteriormente.

Tabela 43. Formulação Racional para Diluente de Alhydrogel	
Componente	Selecionado
Forma de dosagem para Formulação	Suspensão Líquida
Dose de adjuvante por 0,5 mL	0,5 mg Al
pH	6,5 ± 0,5
Tampão	His 10 mM
Sal	NaCl 60 mM
Fechamentos de Recipiente	2 mL de Pequeno Frasco Flint 13 mm Tipo 1, Blowback, West - Flurotec

[00718] Estudos com o adjuvante Alhydrogel apresentam 100% de

ligação de substância de fármaco mutante da toxina A e de substância de fármaco mutante da toxina B a 1 mg de Al/mL de Alhydrogel de pH 6,0 até 7,5A . A ligação máxima de ambas as substâncias de fármaco foi observada na mais alta concentração de proteína testada (300 µg/mL cada).

[00719] A ligação das proteínas a Alhydrogel também foi testada com a formulação de produto fármaco liofilizado que contém 200 µg/mL de cada substância fármaco e Alhydrogel na faixa de 0,25 até 1,5 mg/mL. O produto fármaco foi reconstituído com diluentes que contenham as concentrações variáveis de Alhydrogel e a percentagem de cada mutante de toxina B foi medido. Todas as concentrações de Alhydrogel testadas demonstraram 100% de ligação dos antígenos.

[00720] A cinética de ligação das proteínas a Alhydrogel na dose alvo de substância de fármaco mutante da toxina A e na substância de fármaco mutante da toxina B (200 µg/mL cada) também foram avaliadas. Os resultados demonstram que 100% das substâncias de fármaco mutantes da toxina estavam ligadas a Alhydrogel durante o período de tempo à temperatura ambiente de 24 horas.

[00721] CpG 24555 e Alhydrogel: CpG 24555 é um 21-mer oligodeoxinucleotídeo (ODN) 21-mero sintético que possui uma sequência 5-TCG TCG TTTTTC GGT GCT TTT-3 (SEQ ID NO: 48). Um exemplo de formulação para a combinação de CpG 24555 e de diluentes Alhydrogel é apresentado na Tabela 44. Os exemplos de formulação podem ser usados em combinação com o produto fármaco descrito anteriormente.

Tabela 44: Formulação Racional para Diluente de CpG/Alhydrogel	
Componente	Selecionado
Forma de dosagem para Formulação	Suspensão Líquida
Dose de adjuvante por 0,5 mL	0,5 mg Al e 1mg cpG

pH	6,5 ± 0,5
Tampão	His 10 mM
Sal	NaCl 60 mM
Fechamentos de Recipiente	2 mL de Pequeno Frasco Flint 13 mm Tipo 1, Blowback, West - Flurotec

[00722] ISCOMATRIX®: O adjuvante ISCOMATRIX® é adjuvante à base de saponina conhecido na arte. Um exemplo de formulação para a formulação de adjuvante ISCOMATRIX® é apresentado na Tabela 45. Os exemplos de formulação podem ser usados em combinação com o produto fármaco descrito anteriormente.

Tabela 45: Formulação Racional para Diluente de ISCOMATRIX®	
Componente	Selecionado
Forma de dosagem para Formulação	Forma de dosagem para Formulação
Dose de adjuvante por 0,5 mL	45 unidades
pH	6.2 ± 0,5
Tampão	Fosfato 10 mM
Sal	NaCl 60 mM
Fechamentos de Recipiente	2 mL de Pequeno Frasco Flint 13 mm Tipo 1, Blowback, West - Flurotec

Exemplo 41: Imunogenicidade do agente de Toxina substância de fármaco mutante Composições com Adjuvante com Alhydrogel em Modelo NHP e Prova Pré Clínica de Conceito

[00723] A imunogenicidade de composições do agente de substância de fármaco mutante da toxina A e da substância de fármaco mutante da toxina B com adjuvante com Alhydrogel em NHPs foi avaliada, especificamente em macacos Cinomolgo. Os NHPs imunizados a intervalos de duas semanas (semanas 0, 2, 4) com 10

µg de composições de cada substância de fármaco mutante da toxina A e de substância de fármaco mutante da toxina B (formuladas com Alhydrogel) por dose, desenvolveram respostas robustas de neutralização de antitoxina. Ver a Tabela 46. Ambas as respostas de neutralização de antitoxina A e antitoxina B atingiram uma faixa protetora depois da terceira imunização e permaneceram dentro ou acima da faixa protetora pelo menos através da semana 33 (último ponto do tempo estudado).

[00724] Macacos Cinomolgo (n=8) foram imunizados IM a 0, 2 e 4 semanas com 10 µg de cada substância de fármaco mutante da toxina A e de substância de fármaco mutante da toxina B formulados em 250 µg de Alhydrogel. Os soros foram coletados em cada ponto do tempo e analisados no ensaio de neutralização da toxina para atividade funcional da antitoxina. São fornecidos GMTs na Tabela 46. A faixa protetora de título fornecida na tabela apresenta a faixa do título de anticorpo neutralizador que se refere a uma redução significativa na recorrência de infecção com *C. difficile* no teste de terapia de anticorpo monoclonal na Merck.

Tabela 46: Imunogenicidade do agente de Substância de fármaco mutante da toxina A e Substância de fármaco mutante da toxina B (Formulados em 250 µg de Alhydrogel) em Macacos Cinomolgo (50% de Título de Neutralização) Antitoxina A (faixa protetora da Merck/Medarex: 666- 6,667 para a antitoxina A)												
Semana:	Sem 0	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 5	Sem 6	Sem 8	Sem 12	Sem 25	Sem 29	Sem 33
Título:	15	19	129	382	336	2469	3069	2171	1599	1520	1545	2178
Antitoxina B (Merck/Medarex faixa protetora: 222- 2,222 para a antitoxina B)												
Título:	10	10	10	10	20	311	410	446	676	1631	2970	3510

[00725] Correlação de Títulos de Anticorpo Humano Protetor do Teste de Terapia da Merck mAb para Títulos Induzidos por Candidato a Vacina da Pfizer em NHPs

[00726] O estudo de eficiência da Fase 2 com mAbs da Merck/Medarex (Lowy e outros, *N Engl J serum Med.* 2010 Jan 21;362(3):197-205) pareceu demonstrar uma correlação entre o nível de mAbs de neutralização da antitoxina no soro e a prevenção de recorrência de CDAD. Depois da administração dos mAbsv específicos à toxina humana, os níveis de anticorpo no receptores de soro humano na faixa de 10 a 100 µg/mL parecem proteger contra recorrências (70% de redução na recorrência de CDAD).

[00727] As composições imunogênicas que incluem as substâncias de fármacos mutantes da toxina foram testados para calibrar se as composições imunogênicas são capazes de indução de respostas neutralizadoras de um anticorpo potencialmente eficaz em humanos por comparação dos dados publicados pelo estudo da Merck/Medarex Fase 2 aos níveis de anticorpo induzidos pelas composições imunogênicas no modelo NHP. Isto foi realizado por utilização de característica publicadas anteriormente dos mAbs da Merck/Medarex para converter a faixa destes mAbs no soro obtido por sujeitos que não apresentaram sinal de recorrências (10-100 µg/mL) em títulos com 50% de neutralização e comparando estes títulos ("faixa protetora de título") aos títulos observados nos modelos pré clínicos aqui descritos. Como apresentado na Tabela 46, as composições imunogênicas que incluem a substância de fármaco mutante da toxina A e a substância de fármaco mutante da toxina B com adjuvante com Alhydrogel geraram respostas imunológicas nos NHPs que atingia a "faixa protetora" depois da terceira dose e permaneceram dentro ou acima desta faixa através da semana 33. O nível de anticorpos neutralizadores de toxina induzidos em NHPs pela composição

imunogênica de *C. difficile* da invenção é comparável aos níveis de anticorpo de soro nos experimento de Merck/Medarex os sujeitos que pareceram estar protegidos de recorrências de CDAD.

Exemplo 42: Imunogenicidade das Composições de Substância de Fármaco de Toxina Mutante com Adição de Adjuvante ISCOMATRIX ou Alhydrogel/CpG 24555 (Alh/CpG) no Modelo de NHP

[00728] Em NHPs, tanto ISCOMATRIX como Alh/CpG melhoraram estatisticamente de modo significativo os títulos de neutralização das antitoxinas A e B quando comparadas à vacina administrada apenas com Alhydrogel (Tabela 47). As respostas à antitoxina acima da base foram provocadas em pontos de tempo anteriores por vacina administrada com Alh/CpG ou ISCOMATRIX (semana 2-4) em comparação a Alhydrogel apenas (semanas 4-6), que podem apresentar um efeito importante sobre a proteção contra recorrência de CDAD em humanos. Comparada com Alhydrogel, a composição imunogênica com adjuvante Alh/CpG ou com os títulos de neutralização de antitoxina gerados com ISCOMATRIX que atingiram a faixa protetora (ver também o Exemplo 41) mais rapidamente e que permaneceram dentro ou acima desta faixa até a semana 33.

[00729] Como apresentado na Tabela 47, macacos Cinomolgo foram imunizados IM nas semanas 0, 2 e 4 com 10¹⁰g cada de substância de fármaco mutante da toxina A e substância de fármaco mutante da toxina B formuladas em 250μg de Alhydrogel (n=8) ou 500 μg de CpG + 250 μg de Alhydrogel (n=10) ou 45 U de ISCOMATRIX (n=10). Os soros foram coletados em cada ponto do tempo e analisados no ensaio de neutralização de toxina descrito anteriormente para atividade de antitoxina funcional. Os GMTs estão relacionados nas tabelas. Os asteriscos (*) indicam significado estatístico (p<0,05) quando comparados aos títulos no grupo do Alhydrogel. A faixa de título protetor representa a faixa de título anticorpo neutralizador que

se refere a uma redução significativa na recorrência da infecção por *C. difficile* de acordo com o experimento de terapia com Merck/Medarex mAb.

Tabela 47: Imunogenicidade do agente de substância de fármaco mutante com Adjuvante de Toxina em NHPs (Título de Neutralização a 50%)							
Antitoxina A (faixa protetora de Merck/Medarex: 666- 6,667 para antitoxina A)							
Semana:	Sem 0	Sem 2	Sem 4	Sem 6	Sem 12	Sem 25	Sem 33
Alhydrogel Título:	15	129	336	3069	1599	1520	2178
Alhydrogel + CpG Título:	17	*1004	*2162	*15989	*7179	*5049	*7023
ISCOMATRIX Título:	25	*1283	*3835	*19511	*12904	*6992	*7971
Antitoxina B (faixa protetora de Merck/Medarex: 222- 2,222 para antitoxina B)							
Alhydrogel Título:	10	10	20	410	676	1631	3510
Alhydrogel + CpG Título:	10	13	*136	*2163	*5076	*9057	*27971
ISCOMATRIX Título:	10	10	*269	*5325	*9161	*19479	*25119

[00730] A dose de substância de fármaco mutante da toxina A e da substância de fármaco mutante da toxina B administrada, na presença de ISCOMATRIX ou de adjuvantes Alh/CpG, na neutralização de títulos de anticorpo de antitoxina gerados em NHPs também foi avaliada. Em um estudo, NHPs foram administrados a uma dose baixa

(10µg) ou alta (100µg) de cada substância de fármaco mutante de toxina formulada em ISCOMATRIX. As respostas foram comparadas em cada ponto do tempo depois da imunização. Como apresentado na Tabela 48, os títulos de neutralização antitoxina eram robustos em ambos os grupos de tratamento. Os títulos de antitoxina A eram quase equivalentes a mais pontos do tempo entre os grupos de baixa dose e de alta dose, enquanto havia uma tendência para que os títulos de antitoxina B fossem mais altos no grupo de alta dose.

Tabela 48: Títulos de Neutralização de Antitoxina em NHPs Depois da Imunização com 10µg ou 100µg de cada substância de fármaco mutante de Toxina e substância de fármaco mutante de Toxina administrada com ISCOMATRIX (Título de Neutralização de 50%) Antitoxina A (faixa protetora de Merck/Medarex: 666- 6,667 para antitoxina A)							
Semana	Sem 0	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 6	Sem 8	Sem 12
10µg Título:	11	585	3522	4519	19280	10225	12084
100 µg Título:	11	400	1212	2512	9944	10283	18337
Antitoxina B (faixa protetora de Merck/Medarex: 222- 2,222 para antitoxina B)							
10µg Título:	10	10	112	266	3710	2666	7060
100 µg Título:	10	10	303	469	6016	4743	20683

[00731] Como apresentado na Tabela 48, macacos Cinomolgo (n=5) foram imunizados IM nas semanas 0, 2 e 4 com 10 µg ou 100 µg cada de substância de fármaco mutante da toxina A e substância de fármaco mutante da toxina B formuladas com 45U de ISCOMATRIX. Os soros foram coletados em cada ponto do tempo e

analisados no ensaio de neutralização de toxina para atividade funcional antitoxina. GMTs estão relacionados na tabela. A faixa de título protetor representa a faixa de título anticorpo neutralizador que se refere à redução significativa na recorrência da infecção por *C. difficile* no experimento de terapia com Merck/Medarex mAb.

[00732] Em um esforço para melhorar a cinética de respostas de antitoxina B, os NHPs foram imunizados com uma dose constante de substância de fármaco mutante da toxina A (10 µg) que foi misturada com uma dose crescente de substância de fármaco mutante da toxina B (10, 50 ou 100 µg) na presença de ISCOMATRIX ou de adjuvantes Alh/CpG. Sem levar em conta o adjuvante, há uma tendência de que os grupos que receberam doses mais altas de substância de fármaco mutante da toxina B (50 ou 100 µg) induzirem maiores respostas de neutralização da antitoxina B em comparação com 10 µg de dose do fármaco mutante de toxina B (Tabela 50, marcada por * para indicar aumentos estatisticamente significativos). Esta tendência foi observada em mais pontos do tempo depois da imunização final. Entretanto, em alguns casos, as respostas de neutralização da antitoxina A apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa (marcada por ^ na Tabela 49) quando quantidade de mutante da toxina B foi aumentada.

[00733] Como apresentado na Tabela 49 e na Tabela 50, os NHPs (10 por grupo) foram imunizados IM nas semanas 0, 2 e 4 com diferentes proporções de substância de fármaco mutante da toxina A e substância de fármaco mutante da toxina B (10µg de substância de fármaco mutante da toxina A mais 10, 50 ou 100 µg de substância de fármaco mutante da toxina B ; designadas 10A:10B, 10A:50B e 10A:100B, respectivamente, na Tabela 49 e na Tabela 50), formuladas com ISCOMATRIX (45U por dose) ou com Alh/CpG/ (250 µg / 500 µg por dose). A Tabela 49 apresenta títulos de Antitoxina A. A Tabela 50

apresenta títulos de Antitoxina B. Os GMTs estão relacionados nas tabelas. A faixa de título protetor representa a faixa de título do anticorpo neutralizador que se refere a uma redução significativa na recorrência da infecção com *C. difficile* no experimento com a terapia com Merck mAb. O símbolo ^, representa uma diminuição estatisticamente significativa nos títulos de neutralização ($p < 0,05$) comparados com o grupo 10A: 10B. O símbolo asterisco, *, representa aumento estatisticamente significativo nos títulos de neutralização ($p < 0,05$) comparados com o grupo 10A: 10B.

Tabela 49: Títulos de Neutralização de Antitoxina em NHPs Depois da Imunização com 10µg de Substância de fármaco mutante da toxina A Combinados com 10, 50 ou 100 µg de Substância de fármaco mutante da toxina B utilizando ISCOMATRIX ou Alh/CpG como Adjuvantes (Título de Neutralização de 50%) Antitoxina A (faixa protetora de Merck/Medarex: 666- 6,667 para a antitoxina A)							
ISCOMATRIX							
Semana:	Sem 0	Sem 2	Sem 4	Sem 6	Sem 12	Sem 25	Sem 33
10A:10B Título:	25	1283	3835	19511	12904	6992	7971
10A:50B Título:	29	906	2917	16126	^7756	^4208	5965
10A:100B Título:	20	982	2310	^5034	^5469	^4007	3780
Antitoxina A (faixa protetora de Merck/Medarex: 666- 6,667 para a antitoxina A) Alh/CpG							
10A:10B Título:	17	1004	2162	15989	7179	5049	7023
10A:50B Título:	20	460	1728	16600	6693	6173	8074
10A:100B Título:	27	^415	1595	13601	6465	5039	6153

Tabela 50: Títulos de Neutralização de Antitoxina em NHPs Depois da Imunização com 10µg de Substância de fármaco mutante da toxina A Combinados com 10, 50 ou 100 µg de Substância de fármaco mutante da toxina B utilizando ISCOMATRIX ou Alh/CpG como as Adjuvantes (Título de Neutralização de 50%)

Antitoxina B (faixa protetora de Merck/Medarex: 222- 2,222 para a antitoxina B)

Semana:	Sem 0	Sem 2	Sem 4	Sem 6	Sem 12	Sem 25	Sem 33
ISCOMATRIX	10	10	269	5325	9161	19479	25119
Título:							
Título:	13	*20	*604	4861	10801	20186	*57565
Título:	10	*23	*862	*10658	10639	*33725	*56073
Antitoxina B (faixa protetora de Merck/Medarex: 222- 2,222 para a antitoxina B)							
Alh/CpG	10	13	136	2163	5076	9057	27971
Título:							
Título:	10	15	*450	*5542	*9843	15112	50316
Título:	11	17	*775	*13533	*11708	*17487	26600

Exemplo 43: Estudo de Toxicidade de Dose de Repetição IM durante Cinco Semanas com uma composição imunogênica em Macacos Cinomolgos, com um Período de Recuperação de 4 Semanas

[00734] O estudo de toxicidade de dose de repetição IM durante 5 semanas com PF-06425095 (uma composição imunogênica que inclui substância fármaco mutante com toxina tripla A e substância fármaco mutante com toxina tripla B em uma combinação com adjuvantes hidróxido de alumínio e CpG 24555) em Macacos Cinomolgos foi conduzido para avaliar a toxicidade potencial e a imunogenicidade do agente substância fármaco mutante com toxina tripla A e substância fármaco mutante com toxina tripla B de *C. difficile* em uma combinação com os adjuvantes hidróxido de alumínio e CpG 24555

(PF-06425095). PF-06425095 a 0,2 ou 0,4 mg/dose de substância fármaco mutante com toxina tripla A e substância fármaco mutante com toxina tripla B (grupos de composição imunogênica de baixa e de alta dose, respectivamente), 0,5 mg de alumínio como hidróxido de alumínio e 1 mg de CpG 24555 e a combinação de adjuvante sozinho (hidróxido de alumínio + CpG 24555; PF-06376915) foram administrados IM a macacos Cinomolgos (6/sexo/grupo) como uma dose principal seguida por 3 doses de reforço (Dias 1, 8, 22 e 36). Um grupo separado de animais (6/sexo) recebeu soro fisiológico isotônico 0,9% a um pH aproximado de 7,0. O veículo da composição imunogênica era composto de Tampão tris 10 mM a pH 7,4, 4,5% de trealose dihidratada e 0,1% de polissorbato 80. O veículo controle de adjuvante era composto de tampão de histidina 10 mM com 60 NaCl mM a pH 6,5. O volume total da dose era de 0,5 mL por injeção. Todas as doses foram administradas no músculo quadríceps esquerdo e/ou direito. Os animais selecionados foram submetidos a um período de observação de 4 semanas livres de dose para avaliar reversibilidade de quaisquer efeitos observados durante a fase de dosagem do estudo.

[00735] Não houve descobertas adversas neste estudo. PF-06425095 foi bem tolerado e produziu apenas uma reação inflamatória local sem prova de toxicidade sistêmica. Durante a fase de dosagem, os aumentos dose dependentes desde o pré-teste em fibrinogênio (23,1% até 2,3x) nos Dias 4 e 38 e proteína C-reativa nos Dias 4 (2,1x até 27,5x) e 38 (2,3x até 101,5x) e globulina (11,1% até 24,1%) no Dia 36 e/ou 38, foram observados em grupos tratados com composição imunogênica e eram coerentes com a resposta inflamatória esperada para a administração de um composição imunogênica com adjuvante.

[00736] Os aumentos em fibrinogênio e em proteína C-reativa

notados no Dia 4 foram recuperados parcialmente pelo Dia 8 com aumentos em fibrinogênio (25,6% até 65,5%) e proteína C-reativa (4,5x e 5,6x) no grupo de composição imunogênica de alta dose apenas. Os aumentos em interleucina (IL)-6 foram observados nos grupos da composição imunogênica de baixa e alta dose no Dia 1, Hora 3 (8,3x até 127,2x valores individuais Dia 1, Hora 0, sensível à dose) e Dia 36, Hora 3 (9,4x até 39,5x valores individuais Dia 36, Hora 0). Não houve mudanças observadas nas outras citocinas (IL-10, IL-12, Proteína Interferon Induzível (IP-10) e Fator de Necrose de Tumor α (TNF- α)). Os aumentos nestas proteínas em fase aguda e na citocina eram parte da resposta fisiológica normal esperada à administração de antígeno estranho. Não houve alterações relacionadas a PF 06425095 ou alterações relacionadas a adjuvantes nestes parâmetros de patologia clínica na fase de recuperação (as citocinas não foram avaliadas durante a fase de recuperação). Em adição, foram localizadas mudanças nos pontos de injeção, que eram de incidência e gravidade similares no grupo de controle de adjuvante e nos grupos de composição imunogênica de baixa e de alta dose; portanto, estes não estavam diretamente relacionados a PF-06425095. Durante a fase de dosagem, as mudanças incluíram inflamação crônica ativa mínima a moderada que foi caracterizada por separação de fibras musculares por infiltrados de macrófagos, que frequentemente continham material basófilo granular (interpretado como adjuvante que contém alumínio), linfócitos, células de plasma, neutrófilos, eosinófilos, resíduos necróticos e edema. O material basófilo granular também estava presente extracelularmente dentro destes focos de inflamação crônica ativa. No final da fase de recuperação, houve inflamação crônica mínima a moderada e infiltrado de célula mononuclear e fibrose mínimas. Estas descobertas de sítios de injeção representam uma resposta inflamatória local para o adjuvante. Outras mudanças

microscópicas incluíram celularidade linfoide mínima a moderada no nódulo linfático do ílio (drenagem) e maior celularidade mínima em centros germinais no baço que foram observados durante a fase de dosagem no grupo de controle de adjuvante e os grupos de composição imunogênica de baixa e de alta dose. No final da fase de recuperação, estas descobertas microscópicas eram de menor gravidade. Estes efeitos representam uma resposta imunológica ao estímulo antigênico e eram uma resposta farmacológica ao adjuvante ou PF-06425095. Não houve aumento relacionado ao artigo do teste em anticorpos anti-DNA.

[00737] Baseado na ausência de descobertas adversas, o nível de efeito adverso observado (NOAEL) neste estudo é o grupo de composição imunogênica de alta dose (0,4 mg de substância fármaco mutante com toxina tripla A e substância fármaco mutante com toxina tripla B como PF-06425095) administradas como duas injeções de 0,5 mL para quatro doses.

Exemplo 44: Eficiência de Soros NHP Soropositivos Transferidos Passivamente para Hamsters

[00738] A grupos de 5 hamsters sírios dourados foi administrada uma dose oral de antibiótico clindamicina (30 mg/kg) para romper a flora intestinal normal. Depois de cinco dias, os hamsters foram testados com uma dose oral de esporos de *C. difficile* do tipo selvagem (630 cepa, 100 ufc por animal) e administrados intraperitonealmente (IP) com soros de NHP de acordo com a Tabela 51. Sem ficar ligado a um mecanismo ou uma teoria, os sintomas da doença depois do teste com os esporos tipicamente se manifestam iniciando aproximadamente 30-48 horas depois do teste.

[00739] Os soros de NHP que foram administrados aos hamsters forem reunidos das amostras de soro de NHP exibindo o título mais alto (soros de anti-toxina A e soros de anti-toxina B) depois de três

imunizações com substância de fármaco mutante com toxina A e substância de fármaco mutante com toxina B (proporções de 10:10, de 10:50 e de 10:100 de A:B), formuladas com ISCOMATRIX (ver o Exemplo 42, Tabela 49 e Tabela 50). Os soros de NHP foram coletados dos pontos de tempo nas semanas 5, 6 e 8 (as imunizações ocorreram nas semanas 0, 2 e 4), como descrito no Exemplo 42. Os resultados são apresentados nas Tabelas 52-54 a seguir. O símbolo "+" indica uma média Geométrica (GM) em () que não inclui o animal #3, que não é sensível. "*TB" representa hemorragia terminal, no dia em que o animal foi submetido à eutanásia, que não é o mesmo para todos os animais.

Tabela 51: Projeto Experimental				
Grupo	Composição administrada	Nº. de animais	Via	Horário
1 "1 dose"	Soros de NHP soropositivos (não concentrado)	5	IP	Teste Dia 0 Dose dia 0 Sangrados nos dias 0, 1, 2, TB no dia11
2 "2 doses"	Soros de NHP soropositivo (não concentrado)	5	IP	Teste Dia 0 Dose dias 0, 1 Sangrados nos dias 0, 1, 2, TB no dia11

Tabela 52: Título de Neutralização Anti-toxina A em Soros de Hamster depois de 1 ou 2 doses IP de Soros NHP (50% Título de Neutralização em RLU)								
	Dia	Hamster 1	Hamster 2	Hamster 3	Hamster 4	Hamster 5	GM	SE
1	D0	50	50	50	50	50	50	0

dose	D1	2877	4008	2617	4917	1872	3081	53 8
	D2	1983	3009	2750	2902	1117	2214	35 7
	TB *	3239 (d4)	537 (d9)	155 (d11)	977 (d9)	972 (d2)	762	53 8
2 dose	D0	50	50	50	50	50	50	0
	D1	1154	2819	50	429	1174	606 (1131) +	47 5
	D2	4119	4674	1899	545		2113	86 2
	TB *	1236 (d9)	1267 (d8)	1493 (d4)	50 (d11)	1877 (d9)	738	30 6
Soros NHP de entrada = 41976								

Tabela 53: Título de Neutralização Anti-toxina B em Soros de Hamster depois de 1 ou 2 doses IP de Soros NHP (50% Título de Neutralização em RLU)

	Dia	Hamster 1	Hamster 2	Hamster 3	Hamster 4	Hamster 5	GM	SE
1 dose	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	D0	50	50	50	50	50	50	0

dose	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
Soros NHP de entrada = 23633								

Tabela 54: Percentagem de hamsters protegidos contra CDAD grave depois de 1 ou 2 doses de IP de soros NHP							
Dias pós-infecção	0	2	4	6	8	10	11
1 dose de Soros NHP	100%	80%	60%	60%	60%	20%	20%
2 dose de Soros NHP	100%	100%	80%	80%	60%	20%	20%
Placebo	100%	75%	50%	25%	0%	n/a	n/a

[00740] Em outros estudo, a grupos de hamsters sírios dourados foi administrada uma dose oral de antibiótico clindamicina (30 mg/kg) para romper a flora intestinal normal. Depois de cinco dias, os hamsters foram testados com uma dose oral de esporos de *C. difficile* do tipo selvagem (630 cepa, 100 ufc por animal) e administrados intraperitonealmente (IP) com soros de NHP de acordo com a Tabela 55. Sem ficar ligado a um mecanismo ou uma teoria, os sintomas da doença depois do teste com os esporos tipicamente se manifestam iniciando aproximadamente 30-48 horas depois do teste.

[00741] Os soros de NHP que foram administrados aos hamsters forem reunidos das amostras de soro de NHP exibindo o título mais alto (soros de anti-toxina A e soros de anti-toxina B) depois de três imunizações com substância de fármaco mutante com toxina A e substância de fármaco mutante com toxina B (proporções de 10:10, de

10:50 e de 10:100 de A:B), formuladas com Alhydrogel e CpG 24555 (ver o Exemplo 42, Tabela 49 e Tabela 50). Os soros de NHP foram coletados dos pontos de tempo nas semanas 5, 6, 8 e 12 como descrito no Exemplo 42 (os NHPs foram imunizados nas semanas 0, 2 e 4. Os resultados são apresentados nas Tabelas 56-59 a seguir. Os soros provenientes dos hamsters foram ainda investigados para determinar os valores da concentração de inibição (IC_{50}), que foram determinados utilizando o ensaio de neutralização da toxina descrito anteriormente. O nível de anticorpos neutralizadores para toxina induzido pela composição imunogênica de *C. difficile* da invenção é comparável aos níveis de anticorpo do soro nos sujeitos do experimento Merck/Medarex que pareceram estar protegidos contra recorrências de CDAD.

Tabela 55: Projeto Experimental				
Grupo	Composição Administrada	Nº.	Via	Horário
1	Soros de NHP soropositivo	5	IP	Teste D0 Dose D0, 1, 3, 5, 7
2	Soros de NHP soropositivo	5	IP	sem teste Dose D0, 1, 3, 5, 7,
3	Soros de NHP soropositivo	10	IP	Teste D0 Dose D0, 1, 3, 5, 7
4	Placebo	5	IM	Teste D0

Tabela 56: Títulos de Neutralização Anti-toxina A ^a em Soros de Hamster depois de 1 ou 2 doses IP de Soros NHP (Título de Neutralização de 50% em RLU)			
Dia	Testados (Grupos 1 e 3)	Não Testados (Grupo 2)	Valor de 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*

União de soros NHP de entrada = 9680

a, títulos expressos como meios geométricos para cada grupo (n=15 no dia 0 para o grupo "testado", n=5 para o grupo "não testado")

faixa protetora de Merck/Medarex: 666- 6,667 para a antitoxina A

O asterisco "*" indica uma diferença significativa.

Tabela 57: Títulos de Neutralização Anti-toxina B ^a em Soros de Hamster depois de 1 ou 2 doses IP de Soros NHP (Título de Neutralização de 50% em RLU)			
Dia	Testados (Grupos 1 e 3)	Não Testados (Grupo 2)	Valor de 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*
União de soros NHP de entrada = 9680 a, títulos expressos como meios geométricos para cada grupo (n=15 no dia 0 para o grupo "testado", n=5 para o grupo "não testado") faixa protetora de Merck/Medarex: 666- 6,667 para a antitoxina A O asterisco "*" indica uma diferença significativa.			

Tabela 58: Percentagem de hamsters protegidos contra CDAD grave depois de dose IP de soros NHP							
Dias depois da infecção	0	2	4	6	8	10	11
Grupos 1 e 3	100%	73%	53%	53%	47%	33%	33%
Placebo (Grupo 2)	100%	50%	0%				

Tabela 59: Valores de IC ₅₀ provenientes de Títulos de Neutralização de Toxina-específicos 50%														
		IC ₅₀ de Anti Toxina A							IC ₅₀ de Anti Toxina B					
		Dia de Pós Dose							Dia de Pós Dose					
Testa do	Anima l ID	0	1	3	5	7	11	Anima l ID	0	1	3	5	7	11
	1-1	10	50	338	morreu u D4			1-1	10	50	254	morreu u D4		
	1-2	10	614	579	777	605	192	1-2	10	720	659	896	475	157
	1-3	10	710	1035	845	548	Morre u 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	Morre u D2				3-1	10	598	Morre u D2			
	3-2	10	331	Morre u D2				3-2	10	290	Morre u D2			
	3-3	10	660	1273	849	692	640	3-3	10	717	1623	870	791	574
	3-4	10	536	493	1102	1314	Morre u D9	3-4	10	618	598	977	1478	Morre u 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	Morre u D2				3-7	10	50	Morre u 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	Morre u D2				3-10	10	835	Morre u D2			
	Média Geom étrica	11	380	666	864	564	263	Média Geom étrica	10	465	765	941	611	194
Não Testa do	Desvi o Padrã o	1	78	86	41	163	88	Desvi o Padrã o	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
	Média Geom étrica	12	720	1220	1367	1688	1281	Média Geom étrica	10	828	1400	1734	1877	1436
	Desvi o Padrã o	3	46	169	199	156	197	Erro padrã o	0	38	173	338	332	296

*= morreu naquele dia

Exemplo 45: Caracterização de substância de fármaco de Toxinas
mutantes

[00742] A estrutura principal da toxina A triplo mutante é apresentada na SEQ ID NO: 4. O resíduo NH₂-terminal Met na posição 1 da SEQ ID NO: 4 é originado do códon de iniciação da SEQ ID NO: 12 e está ausente na proteína isolada (por exemplo, ver a SEQ ID NO: 84). Consequentemente, no Exemplo 12 até o Exemplo 45, "SEQ ID NO: 4" refere-se a SEQ ID NO: 4 em que a metionina inicial (na posição 1) está ausente. Tanto a toxina A triplo mutante purificada (SEQ ID NO: 4) (Drug Substance Intermediate - Lot L44993-132) como a toxina A triplo mutante purificada EDC/NHS (SEQ ID NO: 4)("substância de fármaco mutante de toxina A" - Lote L44898-012) apresentaram uma única sequência NH₂-terminal partindo de SLISKEELIKLAYSI (posições 2-16 da SEQ ID NO: 4).

[00743] A estrutura principal da toxina B triplo mutante é apresentada na SEQ ID NO: 6. O resíduo Met NH₂-terminal na posição 1 da SEQ ID NO: 6 que se origina no códon de iniciação e está ausente na proteína isolada (por exemplo, ver a SEQ ID NO: 86). Consequentemente, no Exemplo 12 até o Exemplo 45, a "SEQ ID NO: 6" refere-se à SEQ ID NO: 6 em que a metionina inicial (na posição 1) está ausente. Tanto a toxina B triplo mutante purificada (SEQ ID NO: 6) (Drug Substance Intermediate - Lote 010) como a toxina B mutante triple tratada com EDC/NHS (SEQ ID NO: 6)("substância de fármaco mutante da toxina B " - Lote L44906-153) apresentaram uma única sequência NH₂-terminal partindo de SLVNRKQLEKMANVR (posições 2-16 da SEQ ID NO: 6).

[00744] Foi usado espectroscopia de dicroísmo circular (CD) para avaliar a estrutura secundária e terciária de triplo mutante A (SEQ ID NO: 4) e substância de fármaco mutante da toxina A. Também foi usada espectroscopia CD para avaliar a estrutura secundária e terciária de triplo mutante da toxina B (SEQ ID NO: 6) e a substância de fármaco mutante da toxina B. Também foi usada espectroscopia

CD para avaliar os efeitos potenciais de pH na estrutura. O efeito de tratamento EDC sobre a toxina A triplo mutante foi analisado por comparação dos dados de CD obtidos para a substância de fármaco mutante da toxina A com os dados obtidos para o mutante triplo da toxina A. Os efeitos de tratamento EDC sobre o mutante triplo da toxina B (SEQ ID NO: 6) foram analisados por comparação dos dados de CD obtidos para a substância de fármaco mutante da toxina B com os dados obtidos para o mutante triplo da toxina B.

[00745] Os dados da substância de fármaco mutante da toxina A de UV CD remoto foram obtidos a vários pH. Os espectros registrados a pH 5,0-7,0 são indicadores de alta proporção de hélices α na estrutura secundária, sugerindo que a cadeia principal do polipeptídeo da proteína adota conformação bem definida dominada pelas hélices α .

[00746] Também foram obtidos os espectros de UV CD próximos de substância de fármaco mutante de toxina A. A forte elipticidade negativa entre 260 e 300 nm é uma indicação de que as cadeias laterais aromáticas estão no único ambiente rígido, isto é, a substância de fármaco mutante da toxina A possui estrutura terciária. De fato, os aspectos característicos que surgem dos tipos individuais de cadeias laterais aromáticas podem ser distinguidos dentro do espectro: shoulder a ~290 nm e maior pico negativo a ~283 nm são devidos à absorbância da luz polarizada por cadeias laterais de triptofano ordenadas, pico negativo a 276 nm é desde as cadeias laterais de tirosina e shoulders menores a 262 e 268 nm são indicadores dos resíduos de fenilalanina que participam em contatos terciários. Os resultados de UV remoto e próximo fornecem provas de que a substância de fármaco mutante da toxina A mantém a estrutura compactamente dobrada no pH fisiológico. São observados espectros de UV CD quase idênticos a pH 5,0 - 7,0 indicando que não estão ocorrendo variações estruturais detectáveis dentro desta faixa de pH.

Os dados de CD não podiam ser coletados a pH 3,0 e 4,0, pois a proteína era insolúvel nestes pontos de pH. Na comparação dos espectros de UV CD remoto e próximo da substância de fármaco mutante da toxina A com aqueles da toxina A triplo mutante, os espectros de ambas as proteínas são essencialmente idênticos sob todas as condições experimentais estudadas, indicando que o tratamento EDC não apresentou efeitos detectáveis sobre a estrutura secundária e terciária do mutante triplo da toxina A. esta descoberta está de acordo com os resultados de filtração em gel e de ultracentrifugação analítica, que não apresentam variações detectáveis em raios de Stokes e nos coeficientes de sedimentação/ de atrito, respectivamente.

[00747] A substância de fármaco mutante da toxina A (bem como do mutante triplo da toxina A) contém 25 resíduos de triptofano que estão difundidos em toda a sequência principal e pode servir como sondas de fluorescência intrínseca conveniente. Foram obtidos espectros de emissão de fluorescência da substância de fármaco mutante de toxina A entre 300 e 400 nm como uma função da temperatura. A 6,8°C a substância de fármaco mutante da toxina A apresenta um espectro de emissão de fluorescência característico por excitação a 280 nm. O máximo de emissão de fluorescência é observado a ~335 nm, indicando que os resíduos de triptofano estão em ambiente não polar, típico de interiores de proteína em vez de ambientes aquosos polares. Os resultados dos espectros de emissão de fluorescência, juntamente com os resultados dos experimentos de CD apresentados neste relatório, confirmam que a substância de fármaco mutante da toxina A mantém estrutura dobrada compacta.

[00748] A fluorescência da sonda de ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfônico (ANS) foi usada para caracterizar possíveis variações de conformação na substância de fármaco mutante da toxina A e no

mutante triplo da toxina A por variações no pH. Como pode ser observado pelos resultados, não há essencialmente aumento na intensidade da fluorescência de ANS quando a substância de fármaco mutante da toxina A ou o mutante triplo da toxina A são titulados com a sonda a pH 7,0, sugerindo que nenhuma superfície hidrófoba está exposta sobre as proteínas sob estas condições. O desvio do pH até 2,6 leva a um aumento drástico no rendimento de quantum de fluorescência de ANS por aumento da concentração da sonda, até que o rendimento de quantum de fluorescência atinge saturação aparente. Este aumento no rendimento de quantum de fluorescência de ANS indica que a baixo pH (2,6), tanto a substância de fármaco mutante da toxina A como o mutante triplo da toxina A sofrem variação de conformação induzida por pH que expõe superfícies hidrófobas. Tais mudanças de conformação indicam que a modificação e a inativação de mutante triplo da toxina A induzidas por EDC não restringiram a plasticidade de conformação da substância de fármaco mutante da toxina A (DS).

[00749] O efeito de tratamento com EDC sobre as propriedades hidrodinâmicas do mutante triplo da toxina A foi avaliado utilizando cromatografia com exclusão de tamanho em uma coluna G4000 SWXL. A substância de fármaco mutante da toxina A e o mutante triplo da toxina A foram injetados na coluna G4000 SWXL equilibrada a pH 7,0, 6,0 e 5,0. Os dados indicam que não podem ser detectadas diferenças no raio de Stoke da substância de fármaco mutante da toxina A e o mutante triplo da toxina A pode ser detectado utilizando cromatografia por exclusão de tamanho. Portanto, o tratamento EDC não afetou drasticamente as propriedades hidrodinâmicas e, correspondentemente, o formato molecular global do mutante triplo da toxina A.

[00750] Foi realizada uma análise adicional do mutante triplo da

toxina A e da substância de fármaco mutante da toxina A utilizando técnica de difusão leve de laser multi-ângulo (MALLS). O tratamento de mutante triplo da toxina A com EDC resultou na geração de mistura heterogênea composta de várias espécies multiméricas e monoméricas. Tal heterogeneidade reflete a introdução de um grande número de ligações intramoleculares covalentes induzidas por EDC e entre carboxilas e aminas primárias da proteína.

[00751] Os dados obtidos fornecem características físicas e químicas de mutante triplo da toxina A e a substância de fármaco mutante da toxina A (mutante triplo da toxina A tratado com EDC) e descrevem os aspectos fundamentais de suas estruturas primária, secundária e terciária. Os dados gerados demonstram que o tratamento de mutante triplo da toxina A com EDC resultou em modificação covalente de sua cadeia de polipeptídeo porém não afetou as estruturas secundária e terciária da proteína. O tratamento com EDC leva à reticulação intra- e intermolecular. Os parâmetros bioquímicos e biofísicos obtidos para a substância de fármaco mutante da toxina A (bem como mutante triplo da toxina A) são apresentados na Tabela 60.

Tabela 60: Parâmetros Bioquímicos E Biofísicos Principais Obtidos para mutante Triplo da Toxina A (SEQ ID NO: 4) e Substância de fármaco mutante da toxina A		
Parâmetro	Mutante triplo da toxina A (SEQ ID NO: 4)	Substância de fármaco mutante da toxina A
Número de resíduos de aminoácidos	2709	2709
Sequência N-terminal	SLISKEELIKLAYSI (posições 2-16 da SEQ ID NO: 4)	SLISKEELIKLAYSI (posições 2-16 da SEQ ID NO: 4)

Tabela 60: Parâmetros Bioquímicos E Biofísicos Principais Obtidos para mutante Triplo da Toxina A (SEQ ID NO: 4) e Substância de fármaco mutante da toxina A		
Parâmetro	Mutante triplo da toxina A (SEQ ID NO: 4)	Substância de fármaco mutante da toxina A
Massa molar (da sequência AA)	308 kDa	308 kDa
Massa molar (da SEC-MALLS)	299 kDa	300 kDa e 718 -1139 kDa
Coeficiente de extinção a 280 nm	1.292 ou 1.275 (mg/mL) ⁻¹ cm ⁻¹	1.292 ou 1.275 275 (mg/mL) ⁻¹ cm ⁻¹
pI Teórico	5,57	ND
Volume molar parcial específico a 20 °C	0,735 cm ³ /g	0,735 cm ³ /g
Volume anidro/monômero	3,8x10 ⁻¹⁹ cm ³	3,8x10 ⁻¹⁹ cm ³
Coeficiente de sedimentação / monômero	9,2S	9,2S
Proporção do coeficiente de atrito (f/f ₀)	1,69	1,69
Raio de Stokes radius /monômero	78,4±1,1	77,9
Fluorescência max (λ _{ex} = 280 nm)	334-335 nm	334-335 nm
Mínimo de espectro de -UV CD próximo	284 nm e 278 nm	284 nm e 278 nm

Tabela 60: Parâmetros Bioquímicos E Biofísicos Principais Obtidos para mutante Triplo da Toxina A (SEQ ID NO: 4) e Substância de fármaco mutante da toxina A		
Parâmetro	Mutante triplo da toxina A (SEQ ID NO: 4)	Substância de fármaco mutante da toxina A
Elipticidade res média a 284 & 278 nm	-138±7 & -130±7	-138±8 & 131±10
Elipticidade res média a 222 nm	-8989±277	-7950±230
Máximos de transições de desdobramento de DSC (PBS, pH 7,4)	47,3 °C e 53,6 °C	47,9±0,2 °C e 54,1±0,2 °C

[00752] Os dados UV CD remoto da substância de fármaco mutante da Toxina B foram obtidos a vários pHs. Os espectros gravados a pH 5,0-7,0 são indicadores de alta proporção de hélices α na estrutura secundária, sugerindo que a cadeia principal do polipeptídeo da proteína adota uma conformação bem definida dominada pelas hélices α .

[00753] Também foram obtidos espectros UV CD próximo de substância de fármaco mutante da toxina B. A elipticidade negativa forte entre 260 e 300 nm é uma indicação de que as laterais da cadeia aromática estão no ambiente rígido único, isto é, a substância de fármaco mutante da toxina B possui estrutura terciária. De fato, os aspectos característicos que surgem de tipos individuais de laterais da cadeia aromática podem ser distinguidos dentro do espectro: shoulder a ~290 nm e maior pico negativo a ~283 nm são devidos à absorbância da luz polarizada pelas cadeias laterais ordenadas de triptofano, o pico negativo a 276 nm é proveniente das cadeias laterais de tirosina e shoulders menores a 262 e 268 nm são uma indicação

dos resíduos de fenilalanina que participa em contatos terciários. Espectros de UV CD remoto e próximo fornecem provas de que a substância de fármaco mutante da toxina B mantém a estrutura compactamente dobrada no pH fisiológico. Espectros muito similares de UV CD remotos e próximos observados a pH 5,0 - 7,0 indicam que não estão ocorrendo mudanças estruturais secundárias ou terciárias detectáveis dentro desta faixa de pH. Os dados de CD não podiam ser coletados a pH 3,0 e 4,0, pois a proteína era insolúvel nestes pontos de pH.

[00754] Na comparação dos espectros UV CD remoto e próximos da substância de fármaco mutante da toxina B com aqueles do mutante triplo da toxina B, os espectros de ambas as proteínas são muito similares entre o pH 5,0 e 7,0, indicando que o tratamento EDC não possuía efeitos detectáveis sobre a estrutura secundária e terciária da proteína.

[00755] O mutante triplo da toxina B contém 16 resíduos de triptofano que estão espalhados na sequência primária e pode servir como sondas de fluorescência intrínseca convenientes. Foram obtidos espectros de emissão de fluorescência da substância de fármaco mutante da toxina B entre 300 e 400 nm como uma função da temperatura. A 7°C a substância de fármaco mutante da toxina B apresenta espectro característico de emissão de fluorescência de triptofano por excitação a 280 nm. O máximo de emissão de fluorescência é observado a ~335 nm, indicando que os resíduos de triptofano estão em ambiente não polar, típico de interiores de proteína em vez de ambientes polares aquosos. Este resultado, juntamente com os resultados dos experimentos CD (ver acima), confirmam que a substância de fármaco mutante da toxina B mantém a estrutura dobrada compacta.

[00756] A fluorescência da sonda extrínseca ácido 8-anilino-1-

naftalenol sulfônico (ANS) foi usada para caracterizar possíveis mudanças de conformação na substância de fármaco mutante da toxina B e no mutante triplo da toxina B por variações no pH. Como pode ser observado pelos resultados, não há essencialmente aumento na intensidade da fluorescência de ANS quando a substância de fármaco mutante da toxina B ou o mutante triplo da toxina B são titulados com a sonda a pH 7,0, sugerindo que superfícies hidrofóbicas não estão expostas sobre as proteínas sob estas condições. O desvio do pH para 2,6 leva a um aumento drástico no rendimento de quantum de fluorescência de ANS por aumento na concentração da sonda na presença de substância de fármaco mutante da toxina B, até que o rendimento de quantum de fluorescência atinge saturação evidente. Este aumento no rendimento de quantum de fluorescência ANS indica que a um baixo pH (2,6), a substância de fármaco mutante da toxina B sofre variação de conformação induzida por pH que expõe superfícies hidrofóbicas. Tais variações de conformação indicam que a modificação e a inativação do mutante triplo da toxina B induzidas por EDC não restringiram a plasticidade da conformação da substância de fármaco mutante (DS) da toxina B.

[00757] O efeito de tratamento com EDC sobre as propriedades hidrodinâmicas do mutante triplo da toxina B foi avaliado utilizando cromatografia com exclusão de tamanho em uma coluna G4000 SWXL. A substância de fármaco mutante da toxina B e o mutante triplo da toxina B foram injetados sobre a coluna G4000 SWXL equilibrada a pH 7,0, 6,0, 5,0. Os dados indicam que não podem ser detectadas diferenças no raio de Stoke da substância de fármaco mutante da toxina B e do mutante triplo da toxina B utilizando cromatografia com exclusão de tamanho, portanto o tratamento com EDC não afetou drasticamente as propriedades hidrodinâmicas e, correspondentemente o formato molecular global da proteína.

[00758] Foi realizada análise adicional de mutante triplo da toxina B e da substância de fármaco mutante da toxina B utilizando técnica de difusão de raio laser em multi-ângulo (MALLS). O tratamento de mutante triplo da toxina B com EDC resultou na geração de uma mistura mais heterogênea que é composta de várias espécies multiméricas e monoméricas. Tal heterogeneidade reflete a introdução de um grande número de ligações covalentes inter- e intramoleculares induzidas por EDC entre carboxilas e aminas primárias da proteína.

[00759] Os dados obtidos fornecem características físicas e químicas do mutante triplo da toxina B e da substância de fármaco mutante da toxina B (o mutante triplo da toxina B tratado com EDC) e descrevem os aspectos fundamentais de sua estrutura primária, secundária e terciária. Os dados gerados demonstram que o tratamento do mutante triplo da toxina B com EDC resultou na modificação covalente de sua cadeia de polipeptídeo porém não afetou as estruturas secundária e terciária da proteína. O tratamento com EDC leva à reticulação intra- e intermolecular. Os principais parâmetros bioquímicos e biofísicos obtidos para a substância de fármaco mutante da toxina B obtida (bem como o mutante triplo da toxina B) são apresentados na Tabela 61.

Tabela 61: Parâmetros Bioquímicos e Biofísicos Principais Obtidos para Mutante Triplo da Toxina B (SEQ ID NO: 6) e Substância de fármaco mutante da toxina B		
Parâmetro	Mutante triplo da toxina B (SEQ ID NO: 6)	Substância de fármaco mutante da toxina B
Número de resíduos de aminoácidos	2365	2365
Sequência N-terminal	SLVNRKQLEKMANVR (posições 2-16 da SEQ ID NO: 6)	SLVNRKQLEKMANVR (posições 2-16 da SEQ ID NO: 6)

Tabela 61: Parâmetros Bioquímicos e Biofísicos Principais Obtidos para Mutante Triplo da Toxina B (SEQ ID NO: 6) e Substância de fármaco mutante da toxina B		
Parâmetro	Mutante triplo da toxina B (SEQ ID NO: 6)	Substância de fármaco mutante da toxina B
Massa molar (da sequência AA)	269,5 kDa	269,5 kDa
Massa molar (de SEC-MALLS)	255 kDa e ~1,754 kDa	264, 268, 706 e 2,211 kDa
Coeficiente de extinção a 280 nm	1,067 (mg/mL) ⁻¹ cm ⁻¹	1,067 (mg/mL) ⁻¹ cm ⁻¹
pI Teórico	4,29	ND
Volume molar parcial específico a 20°C	0,734 cm ³ /g	0,734 cm ³ /g
Volume anidro /monômero	3,3x10 ⁻¹⁹ cm ³	3,3x10 ⁻¹⁹ cm ³
Coeficiente de sedimentação /monômero	9,1±0,2S	9,4S
Proporção de coeficiente de atrito (f/f ₀)	1,58±0,03	1,53
Proporção de Stokes /monômero	76,2	76,2
Fluorescência max (λ _{ex} = 280 nm)	335 nm	335 nm
Faixas negativas de UV CD próximo	290, 283, 276, 268, 262 nm	290, 283, 276, 268, 262 nm

Tabela 61: Parâmetros Bioquímicos e Biofísicos Principais Obtidos para Mutante Triplo da Toxina B (SEQ ID NO: 6) e Substância de fármaco mutante da toxina B		
Parâmetro	Mutante triplo da toxina B (SEQ ID NO: 6)	Substância de fármaco mutante da toxina B
Faixas negativas de UV CD remoto	208 e 222 nm	208 e 222 nm
Pontos médios de transição de desdobramento de DSC T_{m1} e T_{m2} (PBS, pH 7,0)	48,8±0,0 °C e 52,0±0,1 °C	48,2±0,3 °C e 54,3±0,2 °C

Aspectos da Invenção

[00760] As cláusulas a seguir descrevem modalidades adicionais da invenção:

[00761] C1. Um polipeptídeo isolado que inclui uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e em que o polipeptídeo inclui pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) (EDC) e N-Hidroxissuccinimida (NHS).

[00762] C2. Um polipeptídeo isolado que inclui uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e em que o polipeptídeo inclui uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) (EDC) e N-Hidroxissuccinimida (NHS).

[00763] C3. O polipeptídeo isolado de acordo com a cláusula C1 ou C2, em que pelo menos uma cadeia lateral de um resíduo de ácido

aspártico do polipeptídeo ou pelo menos uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo é quimicamente modificada por glicina.

[00764] C4. O polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das cláusulas C1-C3, em que o polipeptídeo inclui:

[00765] pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo; e

[00766] pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo.

[00767] C5. O polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das cláusulas C1-C4, em que o polipeptídeo inclui um grupamento de beta-alanina ligado a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídeo.

[00768] C6. O polipeptídeo isolado de acordo com a cláusula C4, em que o polipeptídeo inclui um grupamento de glicina ligado a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo ou to uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo.

[00769] C7. Um polipeptídeo isolado que inclui uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e em que uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídeo está ligada a um grupamento de beta-alanina.

[00770] C8. Um polipeptídeo isolado que inclui uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e em que uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídeo está ligada a um grupamento de beta-alanina.

[00771] C9. O polipeptídeo isolado de acordo com a cláusula C7 ou C8, em que uma cadeia lateral de um segundo resíduo de lisina do polipeptídeo está ligada a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico ou to uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico.

[00772] C10, O polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das cláusulas C7-C9, em que uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico ou uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo está ligada a um grupamento de glicina.

[00773] C11. O polipeptídeo isolado as in qualquer de cláusula C1-C10, em que o polipeptídeo possui uma EC50 de pelo menos aproximadamente 100 µg/mL.

[00774] C12. Uma composição imunogênica que inclui um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e em que os polipeptídeos possuem pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) (EDC) e N-Hidroxissuccinimida (NHS).

[00775] C13. A composição imunogênica de acordo com cláusula C12, em que o polipeptídeo inclui pelo menos um de qualquer um de:

[00776] pelo menos um grupamento de beta-alanina ligado a uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo;

[00777] pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico; e

[00778] pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo

de ácido glutâmico.

[00779] C14. A composição imunogênica de acordo com cláusula C12, em que os polipeptídeos possuem um EC50 de pelo menos aproximadamente 100 µg/mL.

[00780] C15. Uma composição imunogênica que inclui um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e

[00781] em que uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina da SEQ ID NO: 4 é ligado a um grupamento de beta-alanina e

[00782] em que uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina da SEQ ID NO: 6 é ligado a um grupamento de beta-alanina.

[00783] C16. A composição imunogênica de acordo com cláusula C15, em que uma cadeia lateral de um segundo resíduo de lisina da SEQ ID NO: 4 é ligado a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico ou to uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico e em que um segundo resíduo de lisina da SEQ ID NO: 6 é ligado a uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico ou to uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico.

[00784] C17. A composição imunogênica de acordo com qualquer de cláusula C12-C16, em que uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico ou uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente, é ligado a um grupamento de glicina.

[00785] C18. A composição imunogênica de acordo com qualquer

de cláusula C12-C16, em que uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico ou uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente, é ligado a um grupamento de glicina.

[00786] C19. A composição imunogênica de acordo com qualquer de cláusula C12-C18, em que o polipeptídeo possui uma EC50 de pelo menos aproximadamente 100 µg/mL.

[00787] C20, Uma composição imunogênica que inclui um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 84 e um polipeptídeo isolado que possui a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 86, em que cada polipeptídeo inclui

[00788] pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo;

[00789] pelo menos uma reticulação entre uma cadeia lateral de um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do polipeptídeo;

[00790] um grupamento de beta-alanina ligado a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de lisina do polipeptídeo; e

[00791] um grupamento de glicina ligado a uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de ácido aspártico do polipeptídeo ou to uma cadeia lateral de pelo menos um resíduo de ácido glutâmico do polipeptídeo.

[00792] C21. Uma composição imunogênica que inclui uma toxina A de *Clostridium difficile* mutante, que inclui um domínio de glucosiltransferase que possui pelo menos uma mutação e um domínio de cisteína protease que possui pelo menos uma mutação, em relação

à toxina A de *Clostridium difficile* do tipo selvagem correspondente.

[00793] C22. A composição de acordo com a cláusula C21, em que a mutação é uma substituição de aminoácido não conservativa.

[00794] C23. A composição de acordo com a cláusula C22, em que a substituição inclui uma substituição de alanina.

[00795] C24. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C21-C23, em que a toxina A de *Clostridium difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência que possui pelo menos 95% de identidade em relação à SEQ ID NO: 1.

[00796] C25. A composição de acordo com a cláusula C24, em que a toxina A de *Clostridium difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência que possui pelo menos 98% de identidade em relação à SEQ ID NO: 1.

[00797] C26. A composição de acordo com a cláusula C25, em que a toxina A de *Clostridium difficile* do tipo selvagem inclui a SEQ ID NO: 1.

[00798] C27. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C21-C26, em que o domínio de glucosiltransferase inclui pelo menos duas mutações.

[00799] C28. A composição de acordo com a cláusula C27, em que as pelo menos duas mutações estão presentes nas posições da aminoácido 101, 269, 272, 285, 287, 269, 272, 460, 462, 541 ou 542, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1.

[00800] C29. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C21-C26, em que o domínio de glucosiltransferase inclui a SEQ ID NO: 29.

[00801] C30. A composição de acordo com a cláusula C29, em que o domínio de glucosiltransferase inclui pelo menos duas mutações não conservativas presentes nas posições de aminoácido 101, 269, 272, 285, 287, 269, 272, 460, 462, 541 ou 542 ou qualquer

combinação das mesmas, da SEQ ID NO: 29.

[00802] C31. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C21-C26, em que o domínio de cisteína protease inclui uma mutação presente nas posições 700, 589, 655, 543 ou quaisquer combinações das mesmas, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 1.

[00803] C32. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C21-C26, em que o domínio de cisteína protease inclui a SEQ ID NO: 32.

[00804] C33. A composição de acordo com a cláusula C32, em que o domínio de cisteína protease inclui uma mutação não conservativa presente nas posições 1, 47, 113, 158 ou quaisquer combinações das mesmas, da SEQ ID NO: 32.

[00805] C34. A composição de acordo com a cláusula 21, em que a toxina A de *Clostridium difficile* mutante inclui a SEQ ID NO: 4.

[00806] C35. A composição de acordo com a cláusula 21, em que a toxina A de *Clostridium difficile* mutante inclui a SEQ ID NO: 84.

[00807] C36. A composição de acordo com a cláusula 21, em que a toxina A de *Clostridium difficile* mutante inclui a SEQ ID NO: 7.

[00808] C37. A composição de acordo com a cláusula 21, em que a toxina A de *Clostridium difficile* mutante inclui a SEQ ID NO: 83.

[00809] C38. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C21-C33, em que pelo menos um aminoácido de a toxina A de *Clostridium difficile* mutante é quimicamente reticulado.

[00810] C39. A composição de acordo com a cláusula C38, em que o aminoácido é quimicamente reticulado por formaldeído.

[00811] C40, A composição de acordo com a cláusula C38, em que o aminoácido é quimicamente reticulado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.

[00812] C41. A composição de acordo com a cláusula C38 ou

C40, em que o aminoácido é quimicamente reticulado por N-hidroxissuccinimida.

[00813] C42. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C21-C41, em que a composição é reconhecida por um anticorpo anti-toxina A neutralizador ou um fragmento de ligação do mesmo.

[00814] C43. Uma composição imunogênica que inclui uma toxina A de *Clostridium difficile* mutante, que inclui um domínio de glucosiltransferase que inclui a SEQ ID NO: 29 que possui uma substituição de aminoácido nas posições 285 e 287 e um domínio de cisteína protease que inclui a SEQ ID NO: 32 que possui uma substituição de aminoácido na posição 158, em relação à toxina A de *Clostridium difficile* do tipo selvagem correspondente, em que pelo menos um aminoácido de a toxina A de *Clostridium difficile* mutante é quimicamente reticulado.

[00815] C44. Uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 7, em que pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 7 é quimicamente reticulado.

[00816] C45. A composição de acordo com a cláusula C43 ou C44, em que o pelo menos um aminoácido é reticulado por formaldeído.

[00817] C46. A composição de acordo com a cláusula C43 ou C44, em que o pelo menos um aminoácido é reticulado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.

[00818] C47. A composição de acordo com a cláusula C43, C44 ou C46, em que o pelo menos um aminoácido é reticulado por N-hidroxissuccinimida.

[00819] C48. A composição de acordo com a cláusula C43 ou C44, em que a composição é reconhecida por um anticorpo anti-toxina A neutralizador ou um fragmento de ligação do mesmo.

- [00820] C49. Uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 4.
- [00821] C50. Uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 84.
- [00822] C51. Uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 7.
- [00823] C52. Uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 83.
- [00824] C53. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C49-C52, em que pelo menos um aminoácido é quimicamente reticulado.
- [00825] C54. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C21-C51, em que a composição exibe menor citotoxicidade, em relação à toxina A de *Clostridium difficile* do tipo selvagem correspondente.
- [00826] C55. Um polipeptídeo isolado que inclui a SEQ ID NO: 84.
- [00827] C56. Um polipeptídeo isolado que inclui a SEQ ID NO: 86.
- [00828] C57. Um polipeptídeo isolado que inclui a SEQ ID NO: 83.
- [00829] C58. Um polipeptídeo isolado que inclui a SEQ ID NO: 85.
- [00830] C59. Uma composição imunogênica que inclui uma toxina B de *Clostridium difficile* mutante, que inclui um domínio de glucosiltransferase que possui pelo menos uma mutação e um domínio de cisteína protease que possui pelo menos uma mutação, em relação à toxina B de *Clostridium difficile* do tipo selvagem correspondente.
- [00831] C60. A composição de acordo com a cláusula C59, em que a mutação é uma substituição de aminoácido não conservativa.

[00832] C61. A composição de acordo com a cláusula C60, em que a substituição inclui uma substituição de alanina.

[00833] C62. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C59-C61, em que a toxina B de *Clostridium difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência que possui pelo menos 95% de identidade em relação à SEQ ID NO: 2.

[00834] C63. A composição de acordo com a cláusula C62, em que a toxina B de *Clostridium difficile* do tipo selvagem inclui uma sequência que possui pelo menos 98% de identidade em relação à SEQ ID NO: 2.

[00835] C64. A composição de acordo com a cláusula C63, em que a toxina B de *Clostridium difficile* do tipo selvagem inclui a SEQ ID NO: 2.

[00836] C65. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C59-C64, em que o domínio de glucosiltransferase inclui pelo menos duas mutações.

[00837] C66. A composição de acordo com a cláusula C65, em que as pelo menos duas mutações estão presentes nas posições do aminoácido 102, 286, 288, 270, 273, 384, 461, 463, 520 ou 543, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2.

[00838] C67. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C59-C64, em que o domínio de glucosiltransferase inclui a SEQ ID NO: 31.

[00839] C68. A composição de acordo com a cláusula C67, em que o domínio de glucosiltransferase inclui pelo menos duas mutações não conservativas presentes nas posições de aminoácido 102, 286, 288, 270, 273, 384, 461, 463, 520 ou 543 da SEQ ID NO: 31.

[00840] C69. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C59-C64, em que o domínio de cisteína protease inclui uma mutação presente nas posições 698, 653, 587, 544 ou quaisquer

combinações das mesmas, de acordo com a numeração da SEQ ID NO: 2.

[00841] C70. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C59-C64, em que o domínio de cisteína protease inclui a SEQ ID NO: 33.

[00842] C71. A composição de acordo com a cláusula C70, em que o domínio de cisteína protease inclui uma mutação não conservativa presente nas posições 1, 44, 110, 155 ou quaisquer combinações das mesmas, da SEQ ID NO: 33.

[00843] C72. A composição de acordo com a cláusula C59, em que a toxina B de *Clostridium difficile* mutante inclui a SEQ ID NO: 6.

[00844] C73. A composição de acordo com a cláusula C59, em que a toxina B de *Clostridium difficile* mutante inclui a SEQ ID NO: 86.

[00845] C74. A composição de acordo com a cláusula C59, em que a toxina B de *Clostridium difficile* mutante inclui a SEQ ID NO: 8.

[00846] C75. A composição de acordo com a cláusula C59, em que a toxina B de *Clostridium difficile* mutante inclui a SEQ ID NO: 85.

[00847] C76. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C59-C71, em que pelo menos um aminoácido de a toxina B de *Clostridium difficile* mutante é quimicamente reticulado.

[00848] C77. A composição de acordo com a cláusula C76, em que o aminoácido é quimicamente reticulado por formaldeído.

[00849] C78. A composição de acordo com a cláusula C76, em que o aminoácido é quimicamente reticulado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.

[00850] C79. A composição de acordo com a cláusula C76 ou C78, em que o pelo menos um aminoácido é reticulado por N-hidroxissuccinimida.

[00851] C80. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C59-C79, em que a composição é reconhecida por um

anticorpo anti-toxina B neutralizador ou fragmento de ligação do mesmo.

[00852] C81. Uma composição imunogênica que inclui uma toxina B de *Clostridium difficile* mutante, que inclui um domínio de glucosiltransferase que inclui a SEQ ID NO: 31 que possui uma substituição de aminoácido nas posições 286 e 288 e um domínio de cisteína protease que inclui a SEQ ID NO: 33 que possui uma substituição de aminoácido na posição 155, em relação à toxina B de *Clostridium difficile* do tipo selvagem correspondente, em que pelo menos um aminoácido de a toxina B de *Clostridium difficile* mutante é quimicamente reticulado.

[00853] C82. Uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO:8, em que pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO:8 é quimicamente reticulado.

[00854] C83. A composição de acordo com a cláusula C81 ou C82, em que o pelo menos um aminoácido é reticulado por formaldeído.

[00855] C84. A composição de acordo com a cláusula C81 ou C82, em que o pelo menos um aminoácido é reticulado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.

[00856] C85. A composição de acordo com a cláusula C81, C82 ou C84, em que o pelo menos um aminoácido é reticulado por N-hidroxissuccinimida.

[00857] C86. A composição de acordo com a cláusula C81 ou C82, em que a composição é reconhecida por um anticorpo anti-toxina B neutralizador ou fragmento de ligação do mesmo.

[00858] C87. Uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6.

[00859] C88. Uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 86.

- [00860] C89. Uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 8.
- [00861] C90. Uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 85.
- [00862] C91. A composição de acordo com qualquer uma das cláusulas C59-C89, em que a composição exibe menor citotoxicidade, em relação à toxina B de *Clostridium difficile* do tipo selvagem correspondente.
- [00863] C92. Uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 4 e uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6, em que pelo menos um aminoácido de cada uma das SEQ ID NOs: 4 e 6 é quimicamente reticulado.
- [00864] C93. Uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 84 e uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 86, em que pelo menos um aminoácido de cada uma das SEQ ID NOs: 84 e 86 é quimicamente reticulado.
- [00865] C94. A composição de acordo com a cláusula C92 ou C93, em que o pelo menos um aminoácido é reticulado por formaldeído.
- [00866] C95. A composição de acordo com a cláusula C92 ou C93, em que o pelo menos um aminoácido é reticulado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.
- [00867] C96. A composição de acordo com a cláusula C92, C93 ou C95, em que o pelo menos um aminoácido é reticulado por N-hidroxissuccinimida.
- [00868] C97. Uma célula recombinante ou uma progênie da mesma, que inclui a 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 ou SEQ ID NO: 47.
- [00869] C98. Uma célula recombinante ou uma progênie da

mesma, que inclui a sequência de ácido nucléico que codifica SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 8.

[00870] C99. Uma célula recombinante ou uma progênie da mesma, que inclui a sequência de ácido nucléico que codifica SEQ ID NO: 84.

[00871] C100. Uma célula recombinante ou uma progênie da mesma, que inclui a sequência de ácido nucléico que codifica SEQ ID NO: 86.

[00872] C101. Uma célula recombinante ou uma progênie da mesma, que inclui a sequência de ácido nucléico que codifica SEQ ID NO: 83.

[00873] C102. Uma célula recombinante ou uma progênie da mesma, que inclui a sequência de ácido nucléico que codifica SEQ ID NO: 85.

[00874] C103. A célula recombinante da cláusula C97 ou C98, em que dita célula é derivada de uma célula de bactéria Gram-positiva.

[00875] C104. A célula recombinante da cláusula C97, C98 ou C99, em que a célula é derivada de uma célula de *Clostridium difficile*.

[00876] C105. A célula recombinante de qualquer uma das cláusulas C97- C104, em que a célula não possui um polinucleotídeo endógeno que codifica a toxina.

[00877] C106. A célula de acordo com qualquer uma da cláusula C104 ou C105 em que a célula é derivada de uma célula de *Clostridium difficile* selecionada do grupo que consiste de *Clostridium difficile* 1351, *Clostridium difficile* 3232, *Clostridium difficile* 7322, *Clostridium difficile* 5036, *Clostridium difficile* 4811 e *Clostridium difficile* VPI 11186.

[00878] C107. A célula de acordo com a cláusula C106, em que a célula é uma célula de *Clostridium difficile* VPI 11186.

[00879] C108. A célula de acordo com a cláusula C106 ou C107,

em que um gene de esporulação da célula de *Clostridium difficile* está inativado.

[00880] C109. A célula de acordo com a cláusula C108, em que o gene de esporulação inclui um gene *spo0A* ou um gene *spoII*E.

[00881] C110. Um método de produção de uma toxina de *Clostridium difficile* mutante, que inclui

[00882] o cultivo de uma célula recombinante ou uma progênie da mesma sob condições adequadas para a expressão de um polinucleotídeo que codifica uma toxina de *Clostridium difficile* mutante, em que a célula inclui o polinucleotídeo que codifica a toxina de *Clostridium difficile* mutante e em que o mutante inclui um domínio de glucosiltransferase que possui pelo menos uma mutação e um domínio de cisteína protease que possui pelo menos uma mutação, em relação à toxina de *Clostridium difficile* do tipo selvagem correspondente.

[00883] C111. O método de acordo com a cláusula C110, em que a célula não possui um polinucleotídeo endógeno que codifica a toxina.

[00884] C112. O método de acordo com a cláusula C110, em que a célula recombinante ou a progênie da mesma inclui uma célula de acordo com qualquer uma das cláusulas C97-C111.

[00885] C113. O método de acordo com a cláusula C110, que inclui ainda o isolamento de uma toxina de *Clostridium difficile* mutante.

[00886] C114. O método de acordo com a cláusula C113, que inclui ainda o contato da toxina de *Clostridium difficile* mutante isolada com formaldeído.

[00887] C115. O método de acordo com a cláusula C114, em que o contato ocorre durante no máximo 14 dias.

[00888] C116. O método de acordo com a cláusula C115, em que

o contato ocorre durante no máximo 48 horas.

[00889] C117. O método de acordo com a cláusula C114, em que o contato ocorre a aproximadamente 25°C.

[00890] C118. O método de acordo com a cláusula C113, que inclui ainda o contato da toxina de *Clostridium difficile* mutante isolada com etil- 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.

[00891] C119. O método de acordo com a cláusula C118, em que o contato ocorre durante no máximo 24 horas.

[00892] C120. O método de acordo com a cláusula C120, em que o contato ocorre durante no máximo 4 horas.

[00893] C121. O método de acordo com a cláusula C118, em que o contato ocorre a aproximadamente 25°C.

[00894] C122. O método de acordo com a cláusula C118, que inclui ainda o contato da toxina de *Clostridium difficile* mutante isolada com N-hidroxissuccinimida.

[00895] C123. Uma composição imunogênica produzida através do método de acordo com qualquer uma das cláusulas C110- C122.

[00896] C124. Um método de produção de um anticorpo neutralizante contra uma toxina A de *Clostridium difficile*, que inclui a administração de uma composição imunogênica a um mamífero, a dita composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 4, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente, em que pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 4 é reticulado por formaldeído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, N-hidroxissuccinimida ou uma combinação de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxissuccinimida e a recuperação do anticorpo do mamífero.

[00897] C125. Um método de produção de um anticorpo neutralizante contra uma toxina A de *Clostridium difficile*, que inclui a administração de uma composição imunogênica a um mamífero, a dita

composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 84, em que pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 84 é reticulado por formaldeído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, N-hidroxissuccinimida ou uma combinação de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxissuccinimida e a recuperação do anticorpo do mamífero.

[00898] C126. Um método de produção de um anticorpo neutralizante contra a Clostridium difficile toxina B, que inclui a administração de uma composição imunogênica to um mamífero, a dita composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 6, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente, em que pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 6 é reticulado por formaldeído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, N-hidroxissuccinimida ou uma combinação de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxissuccinimida e a recuperação do anticorpo do mamífero.

[00899] C127. Um método de produção de um anticorpo neutralizante contra uma toxina A de Clostridium difficile, que inclui a administração de uma composição imunogênica to um mamífero, a dita composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 86, em que pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 86 é reticulado por formaldeído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, N-hidroxissuccinimida ou uma combinação de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxissuccinimida e a recuperação do anticorpo do mamífero.

[00900] C128. Um anticorpo ou um fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo específico a uma composição imunogênica, a dita composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 4 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente ou SEQ ID NO: 7 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente,.

[00901] C129. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao anticorpo

do mesmo de acordo com cláusula C128, em que pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 4 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente ou SEQ ID NO: 7 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente, é reticulado por formaldeído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, N-hidroxissuccinimida ou uma combinação de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxissuccinimida.

[00902] C130, Um anticorpo ou um fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo que inclui as sequências de aminoácidos das regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada apresentadas na SEQ ID NO: 41 (CDR H1), na SEQ ID NO: 42 (CDR H2) e na SEQ ID NO: 43 (CDR H3) e as sequências de aminoácidos das CDRs de cadeia leve que são mostradas na SEQ ID NO: 38 (CDR L1), na SEQ ID NO: 39 (CDR L2) e na SEQ ID NO: 40 (CDR L3).

[00903] C131. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo de acordo com cláusula C128, C129 ou C130, em que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo inclui uma pesada cadeia, que inclui a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 37 e uma leve cadeia, que inclui a sequência de aminoácidos shown in SEQ ID NO: 36.

[00904] C132. Uma composição que inclui a combinação de dois ou mais anticorpos ou fragmentos de anticorpos de ligação dos mesmos selecionados de qualquer um de acordo com qualquer uma das cláusulas C128-C131.

[00905] C133. Um anticorpo ou um fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo específico a uma composição imunogênica, a dita composição imunogênica incluindo a SEQ ID NO: 6 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente ou SEQ ID NO: 8 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente

não está presente.

[00906] C134. O anticorpo ou o fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo de acordo com cláusula C133, em que pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO: 6 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente ou SEQ ID NO: 8 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente, é reticulado por formaldeído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, N-hidroxissuccinimida ou uma combinação de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxissuccinimida.

[00907] C135. Um anticorpo ou um fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo que inclui as sequências de aminoácidos das regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada apresentadas na SEQ ID NO: 51 (CDR H1), na SEQ ID NO: 52 (CDR H2) e na SEQ ID NO: 53 (CDR H3) e as sequências de aminoácidos das CDRs de cadeia leve que são mostradas na SEQ ID NO: 57 (CDR L1), na SEQ ID NO: 58 (CDR L2) e na SEQ ID NO: 59 (CDR L3).

[00908] C136. Um anticorpo ou um fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo que inclui as sequências de aminoácidos das regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada apresentadas na SEQ ID NO: 61 (CDR H1), na SEQ ID NO: 62 (CDR H2) e na SEQ ID NO: 63 (CDR H3) e as sequências de aminoácidos das CDRs de cadeia leve que são mostradas na SEQ ID NO: 68 (CDR L1), na SEQ ID NO: 69 (CDR L2) e na SEQ ID NO: 70 (CDR L3).

[00909] C137. Um anticorpo ou um fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo que inclui as sequências de aminoácidos das regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada apresentadas na SEQ ID NO: 73 (CDR H1), na SEQ ID NO: 74 (CDR H2) e na SEQ ID NO: 75 (CDR H3) e as sequências de

aminoácidos das CDRs de cadeia leve que são mostradas na SEQ ID NO: 79 (CDR L1), na SEQ ID NO: 80 (CDR L2) e na SEQ ID NO: 81 (CDR L3).

[00910] C138. Uma composição que inclui a combinação de dois ou mais anticorpos ou fragmentos de anticorpos de ligação dos mesmos selecionados de qualquer uma das cláusulas C133-C137.

[00911] C139. Um método de tratamento de uma infecção causada por *Clostridium difficile* em um mamífero, que inclui a administração ao mamífero de uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 4 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente, em que pelo menos um aminoácido de cada uma das SEQ ID NOs: 4 e 6 é reticulado por formaldeído.

[00912] C140. Um método de tratamento de uma infecção causada por *Clostridium difficile* em um mamífero, que inclui a administração ao mamífero de uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 4 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente, em que pelo menos um aminoácido de cada uma da SEQ ID NO: 4 e da SEQ ID NO: 6 é reticulado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, N-hidroxissuccinimida ou uma combinação de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxissuccinimida.

[00913] C141. Um método de tratamento de uma infecção causada por *Clostridium difficile* em um mamífero, que inclui a administração ao mamífero de uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 84 e uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 86, em que pelo menos um aminoácido de cada uma da SEQ ID NO: 84 e da

SEQ ID NO: 86 é reticulado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxissuccinimida.

[00914] C142. Um método de indução de uma resposta imunológica para *Clostridium difficile* em um mamífero, que inclui a administração ao mamífero de uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 4 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente, em que pelo menos um aminoácido de cada uma da SEQ ID NO: 4 e da SEQ ID NO: 6 é reticulado por formaldeído.

[00915] C143. Um método de indução de uma resposta imunológica para *Clostridium difficile* em um mamífero, que inclui a administração ao mamífero de uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 4 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente e uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 6 em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente, em que pelo menos um aminoácido de cada uma da SEQ ID NO: 4 e da SEQ ID NO: 6 é reticulado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, N-hidroxissuccinimida ou uma combinação de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxissuccinimida.

[00916] C144. Um método de indução de uma resposta imunológica para *Clostridium difficile* em um mamífero, que inclui a administração ao mamífero de uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 84 e uma composição imunogênica que inclui a SEQ ID NO: 86, em que pelo menos um aminoácido de cada uma da SEQ ID NO: 84 e da SEQ ID NO: 86 é reticulado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxissuccinimida.

[00917] C145. O método de acordo com qualquer uma das

cláusulas C139-C144, em que o mamífero é um mamífero que necessita do mesmo.

[00918] C146. O método de acordo com qualquer uma das cláusulas C139-C144, em que o mamífero possui uma infecção causada por *Clostridium difficile* recorrente.

[00919] C147. O método de acordo com qualquer uma das cláusulas C139-C144, em que a composição é administrada de forma parenteral.

[00920] C148. O método de acordo com qualquer uma das cláusulas C139-C144, em que a composição inclui ainda um adjuvante.

[00921] C149. O método de acordo com a cláusula C148, em que o adjuvante inclui alumínio.

[00922] C150. O método de acordo com a cláusula C148, em que o adjuvante inclui gel de hidróxido de alumínio e um oligonucleotídeo CpG.

[00923] C151. O método de acordo com a cláusula C148, em que o adjuvante inclui ISCOMATRIX®.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende polissorbato 80, um primeiro polipeptídeo compreendendo a SEQ ID NO: 4, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente; e um segundo polipeptídeo compreendendo a SEQ ID NO: 6, em que o resíduo de metionina na posição 1 opcionalmente não está presente; em que o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreendem ainda um motivo beta-alanina reticulado a uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do respectivo polipeptídeo, e em que o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreendem ainda um motivo de glicina reticulado a uma cadeia lateral de um segundo resíduo de lisina do respectivo polipeptídeo.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que cada polipeptídeo tem um EC₅₀ de pelo menos cerca de 1000 µg/ml, conforme medido por um ensaio de citotoxicidade *in vitro*.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é liofilizada.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é imunogênica.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que não inclui formaldeído.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um adjuvante.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende ainda alumínio.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende ainda QS-21.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizada pelo fato de que não inclui um adjuvante.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende ainda tampão Tris.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende ainda di-hidrato de trealose.

12. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que inclui ainda cloreto de sódio.

13. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que inclui ainda água.

14. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende cerca de 100 µg do primeiro polipeptídeo.

15. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende cerca de 100 µg do segundo polipeptídeo.

16. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo estão presentes em uma proporção de 1:1 em peso.

FIG. 1A

```

MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
MSLISKEELIKLAYSIRPRENEYKTILTNLDEYNKLTNNNNENKYLQLKK 50
*****

LNESIDVFMNKYKTSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKTSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKTSSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKNSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
LNESIDVFMNKYKNSRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFV 100
*****

WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLWYDSEAFVNTLTKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLWYDSEAFVNTLTKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLWYDSEAFVNTLTKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLWYDSEAFVNTLTKKAIVESSTT 150
WIGGEVSDIALEYIKQWADINAEYNIKLWYDSEAFVNTLTKKAIVESSTT 150
*****

EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
EALQLLEEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYDRQKRFINYYKSQINKPTVPT 200
*****

IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
IDDIKSHLVSEYNRDETVLESYRTNSLRKINSNHGIDIRANSLFTEQEL 250
*****

LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDLFKTI 300
LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDLFKTI 300
LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDLFKTI 300
LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDLFKTI 300
LNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLLALKNFGGVYLDVDMPLPGIHSDLFKTI 300
*****

SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
PRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
PRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKKYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIE 350
*****

```

FIG. 1B

```

SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
SKSEKSEIFSKLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIE 400
*****

QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSNSATAENSMFLTKIA 450
QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSNSATAENSMFLTKIA 450
QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSNSATAENSMFLTKIA 450
QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSNSATAENSMFLTKIA 450
QVKNRYQFLNQHLNPAIESDNNFTDTTKIFHDSLFSNSATAENSMFLTKIA 450
*****

PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500
PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500
PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500
PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500
PYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDFINLQENTIEKTLKASDLIEF 500
*****

KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGSLSEDNGVDF 550
KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGSLSEDNGVDF 550
KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGSLSEDNGVDF 550
KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGSLSEDNGVDF 550
KFPENNLSQLTEQEINSLWSFDQASAKYQFEKYVRDYTGGSLSEDNGVDF 550
*****

NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
NKNTALDKNYLLNNKIPSNNVEEAGSKNYVHYIIQLQGDDISYEATCNLF 600
*****

SKNPKNSIIIQRMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
SKNPKNSIIIQRMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
SKNPKNSIIIQRMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
SKNPKNSIIIQRMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
SKNPKNSIIIQRMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKV 650
*****

TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGA 700
TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
TFIGHGKDEFNTSEFARLSVDSLSEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLLGC 700
*****

```

FIG. 1C

NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSITIGANQYEVRLNS 750
 NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSITIGANQYEVRLNS 750
 NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKNSITIGANQYEVRLNS 750
 NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKDSITIGANQYEVRLNS 750
 NMFSYDFNVEETYPGKLLLSIMDKITSTLPDVNKDSITIGANQYEVRLNS 750
 *****;

EGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
 EGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
 EGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
 EGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800
 EGRKELLAHSGKWINKEEAIMSDDLSSKEYIFFDSIDNKLKAKSKNIPGLA 800

SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850
 SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850
 SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850
 SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850
 SISEDIKTLLLDASVSPDTKFILNNLKLNISSIGDYIYYEKLEPVKNII 850

HNSIDDLIDEFNLLENVSDLEYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
 HNSIDDLIDEFNLLENVSDLEYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
 HNSIDDLIDEFNLLENVSDLEYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
 HNSIDDLIDEFNLLENVSDLEYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900
 HNSIDDLIDEFNLLENVSDLEYELKKLNNLDEKYLISFEDISKNNSTYSV 900

RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
 RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
 RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
 RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950
 RFINKSNGESVYVETEKEIFSKYSEHITKEISTIKNSIITDVNGNLLDNI 950

QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
 QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
 QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
 QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000
 QLDHTSQVNTLNAAFFIQSLIDYSSNKDVLNDLSTSVKVQLYAQLFSTGL 1000

NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPITITEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
 NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPITITEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
 NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPITITEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
 NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPITITEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050
 NTIYDSIQLVNLISNAVNDTINVLPITITEGPIVSTILDGINLGAAIKEL 1050

FIG. 1D

```

LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100
LDEHDPLLKKELEAKVGVLA INMSLSIAATVASIVGIGAEVTIFLLPIAG 1100
*****

ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSESKKYGPLKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSESKKYGPLKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSESKKYGPLKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSESKKYGPLKTEDDKILVPID 1150
ISAGIPSLVNNELILHDKATSVVNYFNHLSESKKYGPLKTEDDKILVPID 1150
*****:*****

DLVISEIDFNNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
DLVISEIDFNNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
DLVISEIDFNNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPSISSHIP 1200
DLVISEIDFNNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPYISSHIP 1200
DLVISEIDFNNNSIKLGT CNILAMEGGSGHTVTGNIDHFFSSPYISSHIP 1200
*****

SLSIYSAIGIETENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENDGT 1250
SLSIYSAIGIETENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENDGT 1250
SLSIYSAIGIETENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENDGT 1250
SLSVYSAIGIKTENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENNGT 1250
SLSVYSAIGIKTENLDFSKKIMMLPNAPSRVFWWETGAVPGLRSLENNGT 1250
***:*****:*****:***

RL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVEYEDTNIKIKLDKDRNFI 1300
RL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVEYEDTNIKIKLDKDRNFI 1300
RL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVEYEDTNIKIKLDKDRNFI 1300
KL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVEYEDTNTKIKLDKDRNFI 1300
KL LDSIRDLYPGKFYWRFYAFFDYAITTLKPVEYEDTNTKIKLDKDRNFI 1300
:*****

MPTITTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISTNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISTNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTNEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISTNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTDEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISMNINLSKDDLWIFNID 1350
MPTITTDEIRNKLSYSFDGAGGTYSLLLSSYP ISMNINLSKDDLWIFNID 1350
*****:*****

NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
NEVREISIENGTIKKGKLIKDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
NEVREISIENGTIKKGKLI EDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
NEVREISIENGTIKKGKLI EDVLSKIDINKNKLIIGNQTIDFSGDIDNKD 1400
*****:***:*****

```

FIG. 1E

RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
 RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNIEKINT 1450
 RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNTIEKINT 1450
 RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNTIEKINT 1450
 RYIFLTCELDDKISLIIEINLVAKSYSLLLSGDKNYLISNLSNTIEKINT 1450

LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHYKKDSKNILEFYNDST 1500
 LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHYKKDSKNILEFYNDST 1500
 LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHYKKDSKNILEFYNDST 1500
 LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHYKKDSKNILEFYNGST 1500
 LGLDSKNIAYNYTDESNNKYFGAISKTSQKSIHYKKDSKNILEFYNGST 1500
 *****.

LEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
 LEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
 LEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
 LEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550
 LEFNSKDFIAEDINVFMKDDINTITGKYVDNNTDKSIDFSISLVSKNQV 1550

KVNGLYLNESVYSSYLDFVKNSDGHHTSNFMNLFLDNISFWKLFGFENI 1600
 KVNGLYLNESVYSSYLDFVKNSDGHHTSNFMNLFLDNISFWKLFGFENI 1600
 KVNGLYLNESVYSSYLDFVKNSDGHHTSNFMNLFLDNISFWKLFGFENI 1600
 KVNGLYLNESVYSSYLDFVKNSDGHHTSNFMNLFLNNISFWKLFGFENI 1600
 KVNGLYLNESVYSSYLDFVKNSDGHHTSNFMNLFLNNISFWKLFGFENI 1600
 *****;

NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
 NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
 NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
 NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650
 NFVIDKYFTLVGKTNLGYVEFICDNNKNIDIYFGEWKTSSSKSTIFSGNG 1650

RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
 RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
 RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
 RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700
 RNVVVEPIYNPDTGEDISTSLDFSIEPLYGIDRYINKVLIAPDLYTSLIN 1700

INTNYYISNEYYPEIIVLNPNTFHKKVNINLDSSSFYKWKSTEGSDFILVR 1750
 INTNYYISNEYYPEIIVLNPNTFHKKVNINLDSSSFYKWKSTEGSDFILVR 1750
 INTNYYISNEYYPEIIVLNPNTFHKKVNINLDSSSFYKWKSTEGSDFILVR 1750
 INTNYYISNEYYPEIIVLNPNTFHKKVNINLDSSSFYKWKSTEGSDFILVR 1750
 INTNYYISNEYYPEIIVLNPNTFHKKVNINLDSSSFYKWKSTEGSDFILVR 1750

FIG. 1F

YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800
 YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800
 YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800
 YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800
 YLEESNKKILQKIRIKGILSNTQSFNKMSIDFKDIKKLSLGYIMSNFKSF 1800

NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNL 1850
 NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNL 1850
 NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIEFNL 1850
 NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIESNL 1850
 NSENELDRDHLGFKIIDNKTYYYDEDSKLVKGLININNSLFYFDPIESNL 1850
 ***** **

VTGWQTINGKKYYFDINTGAALISYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
 VTGWQTINGKKYYFDINTGAALISYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
 VTGWQTINGKKYYFDINTGAALTSYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
 VTGWQTINGKKYYFDINTGAASTSYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
 VTGWQTINGKKYYFDINTGAASTSYKIINGKHFYFNNDGVMQLGVFKGPD 1900
 ***** : *****

GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
 GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
 GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
 GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
 GFEYFAPANTQNNNIEGQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDNDSKAVTGWRIIN 1950
 ***** :

NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
 NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
 NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
 NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000
 NEKYYFNPNNIAAAGLQVIDNNKYYFNPDTAIISKGWQTVNGSRYYFDT 2000

DTAIAFNGYKTIDGKHFYFSDSCVVKIGVFSTSNNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
 DTAIAFNGYKTIDGKHFYFSDSCVVKIGVFSTSNNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
 DTAIAFNGYKTIDGKHFYFSDSCVVKIGVFSTSNNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
 DTAIAFNGYKTIDGKHFYFSDSCVVKIGVFSGSNGFEYFAPANTYNNNIE 2050
 DTAIAFNGYKTIDGKHFYFSDSCVVKIGVFSGSNGFEYFAPANTYNNNIE 2050

GQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
 GQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
 GQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDNNSKAVTGLQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
 GQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100
 GQAIVYQSKFLTLNGKKYYFDNNSKAVTGWQTIDSKKYYFNTNTAEAAATG 2100

FIG. 1G

```

WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTAIASTGYTIINGKH 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTSIASTGYTIINGKY 2150
WQTIDGKKYYFNTNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTSIASTGYTIINGKY 2150
*****:*****:

FYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNEFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKVPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGK 2200
FYFNTDGIMQIGVFKVPNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGK 2200
***** *****. *****:*****

KYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNIAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNIAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAVTGWRIINNKKYYFNPNNIAIAIHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAITGWQTIDGKKYYFNPNNIAIAATHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
KYYFGSDSKAITGWQTIDGKKYYFNPNNIAIAATHLCTINNDKYYFSYDGI 2250
*****:***: *. ***** *****

LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
LQNGYITIERNNFYFDANNESKMVTGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQ 2300
*****

AIVYQNKFLTNGKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKYYFDNDSKAVTGWQTIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKYYFDNDSKAVTGWQTIDSKYYFNLNTAVAVTGWQ 2350
AIVYQNKFLTNGKYYFDNDSKAVTGWQTIDSKYYFNLNTAVAVTGWQ 2350
*****.***** *.****

TIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFY 2400
TIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFY 2400
TIDGKKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKKYYFNTNTFIASTGYTSINGKHFY 2400
TIDGKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKRYFNTNTYIASTGYTIINGKHFY 2400
TIDGKYYFNLNTAEAAATGWQTIDGKRYFNTNTYIASTGYTIINGKHFY 2400
****:*****:*****:***** *****

FNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
FNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
FNTDGIMQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
FNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
FNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTHNNNIEGQAILYQNKFLTNGKKY 2450
*****:*****. *****

```

FIG. 1H

YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIA 2500
 YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIA 2500
 YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTSIA 2500
 YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTYIA 2500
 YFGSDSKAVTGLRTIDGKKYYFNTNTAVAVTGWQTINGKKYYFNTNTYIA 2500
 ***** **

STGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
 STGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
 STGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
 STGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIR 2550
 STGYTIISGKHFFYFNTDGIMQIGVFKGPDGFEYFAPANTDANNIEGQAIR 2550

YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
 YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
 YQNRFLYLHDNIYYFGNNSKAATGWVTIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
 YQNRFLYLHDNIYYFGNDSKAATGWATIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
 YQNRFLYLHDNIYYFGNDSKAATGWATIDGNRYFEPNTAMGANGYKTID 2600
 *****:*****.

NKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLL 2650
 NKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLL 2650
 NKNFYFRNGLPQIGVFKGSNGFEYFAPANTDANNIEGQAIRYQNRFLHLL 2650
 NKNFYFRNGLPQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIDGQAIRYQNRFLHLL 2650
 NKNFYFRNGLPQIGVFKGPNNGFEYFAPANTDANNIDGQAIRYQNRFLHLL 2650
 *****:*****.

GKIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
 GKIIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
 GKIIYYFGNNSKAVTGWQTINGKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
 GKIIYYFGNNSKAVTGWQTINSKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
 GKIIYYFGNNSKAVTGWQTINSKVYYFMPDTAMAAAGGLFEIDGVIYFFGV 2700
 *****.

DGVKAPGIYG 2710 (SEQ ID NO: 1, 630)
 DGVKAPGIYG 2710 (SEQ ID NO: 4)
 DGVKAPGIYG 2710 (SEQ ID NO: 19, VPI10463)
 DGVKAPGIYG 2710 (SEQ ID NO: 15, R20291)
 DGVKAPGIYG 2710 (SEQ ID NO: 17, CD196)

Fig. 2A

```

MSLVNRKQLEKMANVRFRTQDEDEYVAILDALEEEYHNMSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFRTQDEDEYVAILDALEEEYHNMSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFRTQDEDEYVAILDALEEEYHNMSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFVQDEDEYVAILDALEEEYHNMSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
MSLVNRKQLEKMANVRFVQDEDEYVAILDALEEEYHNMSENTVVEKYLKLDINSLTDIYI 60
*****.*****

DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFWIGGQINDTAINYINQWKD 120
DTYKKSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFWIGGQINDTAINYINQWKD 120
*****

VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLDPRFDYNKFFRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLDPRFDYNKFFRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLDPRFDYNKFFRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTIVESATNDTLESFRENLDPRFDYNKFYRKRMEIY 180
VNSDYNVNVFYDSNAFLINTLKKTIVESATNDTLESFRENLDPRFDYNKFYRKRMEIY 180
*****.*****

DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV 240
DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV 240
DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV 240
DKQKNFINYYKTQREENPDLIIDDIVKIYLSNEYSKDIDELNSYIEESLNKVTENSGNDV 240
DKQKNFINYYKTQREENPDLIIDDIVKIYLSNEYSKDIDELNSYIEESLNKVTENSGNDV 240
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

RNFEFFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGGMYLDVDMPLPGIQPDLFES 300
RNFEFFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGGMYLDVDMPLPGIQPDLFES 300
RNFEFFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEIGGMYLAVAMPLPGIQPDLFES 300
RNFEFFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEVGGVYLDVDMPLPGIQPDLFES 300
RNFEFFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRISALKEVGGVYLDVDMPLPGIQPDLFES 300
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPGYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
IEKPSSVTVDWFEMTKLEAIMKYKEYIPGYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF 360
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

SSLGDMEASPLEVKIAFNNSKGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLGDMEASPLEVKIAFNNSKGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLGDMEASPLEVKIAFNNSKGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLGDMEASPLEVKIAFNNSKGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
SSLGDMEASPLEVKIAFNNSKGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE 420
*****

DNDFNNTTNTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTINLSGPEAYAAAYQD 480
DNDFNNTTNTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTINLSGPEAYAAAYQD 480
DNDFNNTTNTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTINLSGPEAYAAAYQD 480

```

FIG. 2B

```

DNDFN TTTNAFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTTINLSGPEAYAAAYQD 480
DNDFN TTTNAFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFFPDVKTTINLSGPEAYAAAYQD 480
*****:*****

LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKRNYFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKRNYFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKRNYFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKKNYFE 540
LLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKKNYFE 540
*****:****

GSLGEDDNLD FSQNIVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAACNLFAK 600
GSLGEDDNLD FSQNIVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAACNLFAK 600
GSLGEDDNLD FSQNIVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAACNLFAK 600
GSLGEDDNLD FSQNTVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAACNLFAK 600
GSLGEDDNLD FSQNTVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKISYEAACNLFAK 600
*****

TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYPG DGEIQEIDKYKIPSIIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYPG DGEIQEIDKYKIPSIIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYPG DGEIQEIDKYKIPSIIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYPG DGEIQEIDKYKIPSIIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660
TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYPG DGEIQEIDKYKIPSIIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNT 660
*****

DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLLKVK 720
DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSINVEETYPGKLLLKVK 720
DIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGANMFSYSINVEETYPGKLLLKVK 720
DIFAGLDVDSLSTEIETAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSVNVEETYPGKLLLRVK 720
DIFAGLDVDSLSTEIETAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFSYSVNVEETYPGKLLLRVK 720
*****:*****:*****.*****:*****:****

DKISELMPSISQDSIIVSANQYEV RINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
DKISELMPSISQDSIIVSANQYEV RINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
DKISELMPSISQDSIIVSANQYEV RINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
DKVSELMPSISQDSIIVSANQYEV RINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
DKVSELMPSISQDSIIVSANQYEV RINSEGRRELLDHSGEWINKEESI IKDISKEYISF 780
**.:*****

NPKENKITVKSKNLPELSTLLQEIRNNSN SSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER 840
NPKENKITVKSKNLPELSTLLQEIRNNSN SSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER 840
NPKENKITVKSKNLPELSTLLQEIRNNSN SSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEER 840
NPKENKIIVKSKNLPELSTLLQEIRNNSN SSDIELEEKVMLAECEINVISNIDTQVVEGR 840
NPKENKIIVKSKNLPELSTLLQEIRNNSN SSDIELEEKVMLAECEINVISNIDTQVVEGR 840
***** *****:*****:*****:****

IEEAKNLTS DSIYIKDEFK LIESISDALCDLKQQNELED SHFISFED ISETDEGFSIRF 900
IEEAKNLTS DSIYIKDEFK LIESISDALCDLKQQNELED SHFISFED ISETDEGFSIRF 900
IEEAKNLTS DSIYIKDEFK LIESISDALCDLKQQNELED SHFISFED ISETDEGFSIRF 900
IEEAKSLTS DSIYIKNEFK LIESISDALYDLKQQNELEESH FIFEDILETDEGFSIRF 900
IEEAKSLTS DSIYIKNEFK LIESISDALYDLKQQNELEESH FIFEDILETDEGFSIRF 900
*****.*****:***** *****:***** *****

```

FIG. 2C

```

INKETGESIFVETEKTI FSEYANHIT E EISKIKGTIFDTVNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
INKETGESIFVETEKTI FSEYANHIT E EISKIKGTIFDTVNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
INKETGESIFVETEKTI FSEYANHIT E EISKIKGTIFDTVNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
IDKETGESIFVETEKAI FSEYANHIT E EISKIKGTIFDTVNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
IDKETGESIFVETEKAI FSEYANHIT E EISKIKGTIFDTVNGKLVKKVNLDTTHEVNTLN 960
*:*****:*****:*****

AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
AAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETID 1020
*****

LLPTLSEGLPIIATI IDGVSLGAAIKELSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTTATTAIIT 1080
LLPTLSEGLPIIATI IDGVSLGAAIKELSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTTATTAIIT 1080
LLPTLSEGLPIIATI IDGVSLGAAIKELSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTTATTAIIT 1080
LLPTLSEGLPVIATI IDGVSLGAAIKELSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTAATTAIIT 1080
LLPTLSEGLPVIATI IDGVSLGAAIKELSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTAATTAIIT 1080
*****:*****:*****

SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDYFKHVSLVETEGVFTLLD 1140
SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDYFKHVSLVETEGVFTLLD 1140
SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDYFKHVSLVETEGVFTLLD 1140
SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELILRDKATKVVDYFSHISLAESEGAFTSLD 1140
SSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELILRDKATKVVDYFSHISLAESEGAFTSLD 1140
*****:*****.*:*.**:*.** **

DKIMMPQDDLVI SEIDFNNSIVLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
DKIMMPQDDLVI SEIDFNNSIVLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
DKIMMPQDDLVI SEIDFNNSIVLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
DKIMMPQDDLVI SEIDFNNSITLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
DKIMMPQDDLVI SEIDFNNSITLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHL 1200
*****.*****

SIYDVLEVQKEELDLSKDL MVLPNAPNRVFAWETGWT PGLRSLNDG TKLLDRIRDNYEG 1260
SIYDVLEVQKEELDLSKDL MVLPNAPNRVFAWETGWT PGLRSLNDG TKLLDRIRDNYEG 1260
SIYDVLEVQKEELDLSKDL MVLPNAPNRVFAWETGWT PGLRSLNDG TKLLDRIRDNYEG 1260
SIYDVLEVQKEELDLSKDL MVLPNAPNRVFAWETGWT PGLRSLNDG TKLLDRIRDNYEG 1260
SIYDVLEVQKEELDLSKDL MVLPNAPNRVFAWETGWT PGLRSLNDG TKLLDRIRDNYEG 1260
*****

EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPIITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPIITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPIITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPVITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
EFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPVITTEYIREKLSYSFYGSG 1320
*****:*****

GTYALSLSQYNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTIESDKIKKGD LIEGILSTLSIEEN 1380
GTYALSLSQYNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTIESDKIKKGD LIEGILSTLSIEEN 1380
GTYALSLSQYNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTIESDKIKKGD LIEGILSTLSIEEN 1380

```


FIG. 2D

GTYALSLSQYNMNIENIENENDTWVIDVDNVVRDVTIESDKIKKGDLIENILSKLSIEDN 1380
 GTYALSLSQYNMNIENIENENDTWVIDVDNVVRDVTIESDKIKKGDLIENILSKLSIEDN 1380
 *****.*.***.*.*.*:*****.***.*.*.*:

 KIIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIIIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS 1440
 KIIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIIIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS 1440
 KIIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIIIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS 1440
 KIILDNHEINFSGTLNGGNGFVSLTFSILEGINAVIEVDLLSKSYKVLISGELKTLMANS 1440
 KIILDNHEINFSGTLNGGNGFVSLTFSILEGINAVIEVDLLSKSYKVLISGELKTLMANS 1440
 ****:.*.*****:*.*****:*****:***** ** **

 NHIQQKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEKENGFIINGSTKEGLFVSELDPVVLISKVYMD 1500
 NHIQQKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEKENGFIINGSTKEGLFVSELDPVVLISKVYMD 1500
 NHIQQKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEKENGFIINGSTKEGLFVSELDPVVLISKVYMD 1500
 NSVQQKIDYIGLNSELQKNIPYSFMDDKGKENGFIINCSTKEGLFVSELSDVVLISKVYMD 1500
 NSVQQKIDYIGLNSELQKNIPYSFMDDKGKENGFIINCSTKEGLFVSELSDVVLISKVYMD 1500
 *:*****:*****:*.***** *****.*****:

 DSKPSFGYYSNNLKDVKVITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLQDEKTIKLSNVHLDDES 1560
 DSKPSFGYYSNNLKDVKVITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLQDEKTIKLSNVHLDDES 1560
 DSKPSFGYYSNNLKDVKVITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLQDEKTIKLSNVHLDDES 1560
 NSKPLFGYCSNDLKDVKVITKDDVILTGYYLKDDIKISLSFTIQDENTIKLNGVYLDEN 1560
 NSKPLFGYCSNDLKDVKVITKDDVILTGYYLKDDIKISLSFTIQDENTIKLNGVYLDEN 1560
 :*** ** *:*****:* *****:***:*****.*:***.

 GVAEILKFMNRKGNNTNTSDSLMSFLESMNIXSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ 1620
 GVAEILKFMNRKGNNTNTSDSLMSFLESMNIXSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ 1620
 GVAEILKFMNRKGNNTNTSDSLMSFLESMNIXSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQ 1620
 GVAEILKFMNKKGSTNTSDSLMSFLESMNIXSIFINSLOSNITKLILDNTNFIIISGTTSIGQ 1620
 GVAEILKFMNKKGSTNTSDSLMSFLESMNIXSIFINSLOSNITKLILDNTNFIIISGTTSIGQ 1620
 *****.*.*****:*****:***** *:*:*****:

 FEFICDENDNIQPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
 FEFICDENDNIQPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
 FEFICDENDNIQPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
 FEFICDKDNNIQPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
 FEFICDKDNNIQPYFIKNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKY 1680
 *****.:*:*****:*****:*****:*****:

 LYGIDSCVNKVVISPNITDEINITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY 1740
 LYGIDSCVNKVVISPNITDEINITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY 1740
 LYGIDSCVNKVVISPNITDEINITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRY 1740
 LYGIDSCVNKVVISPNITDEINITPIYEANNTYPEVIVLDNTNYISEKINININDLSIRY 1740
 LYGIDSCVNKVVISPNITDEINITPIYEANNTYPEVIVLDNTNYISEKINININDLSIRY 1740
 *****:*****:*.*****:***.*.*.*:*****:

 VWSNDGNDFILMSTSEENKVSQVKIRFVNFKDKTLANKLSFNFSKQDVPVSEIILSFT 1800
 VWSNDGNDFILMSTSEENKVSQVKIRFVNFKDKTLANKLSFNFSKQDVPVSEIILSFT 1800
 VWSNDGNDFILMSTSEENKVSQVKIRFVNFKDKTLANKLSFNFSKQDVPVSEIILSFT 1800
 VWSNDGSDFILMSTDEENKVSQVKIRFTNVFKGNTISDKISFNFSKQDVSINKVISTFT 1800
 VWSNDGSDFILMSTDEENKVSQVKIRFTNVFKGNTISDKISFNFSKQDVSINKVISTFT 1800
 *****.*.*****.*****.*.*.*.:*:*****.:*:*:

FIG. 2E

```

PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVG 1860
PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVG 1860
PSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFGMMVSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVG 1860
PSYYVEGLLNYDLGLISLYNEKFYINNFGMMVSGLVYINDSLYYFKPPIKNLITGFTTIG 1860
PSYYVEGLLNYDLGLISLYNEKFYINNFGMMVSGLVYINDSLYYFKPPIKNLITGFTTIG 1860
**** :*:.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
DDKYYFNPIINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG 1920
DDKYYFNPIINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG 1920
DDKYYFNPIINGGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVGFSTEDGFKYFAPANTLDENLEG 1920
DDKYYFNPDNGGAASVGETIIDGKNYYFSQNGVLQTVGFSTEDGFKYFAPADTLDENLEG 1920
DDKYYFNPDNGGAASVGETIIDGKNYYFSQNGVLQTVGFSTEDGFKYFAPADTLDENLEG 1920
***** *****:*****.******.*.*****:*****
EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN 1980
EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN 1980
EAIDFTGKLIIDENIYYFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYYFN 1980
EAIDFTGKLTIDENVYYFGDNYRAAIEWQTLDDVYYFSTDTGRAFKGLNQIGDDKIFYFN 1980
EAIDFTGKLTIDENVYYFGDNYRAAIEWQTLDDVYYFSTDTGRAFKGLNQIGDDKIFYFN 1980
***** *****:***.*****.*:***:*.*:.*:***.*:***:***** *:***
SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFA 2040
SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFA 2040
SDGVMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFA 2040
SDGIMQKGFVNINDKTFYFDDSGVMKSGYTEIDGKYFYFAENGEMQIGVFNTADGFKYFA 2040
SDGIMQKGFVNINDKTFYFDDSGVMKSGYTEIDGKYFYFAENGEMQIGVFNTADGFKYFA 2040
***.******.***:*.****** *****:***** *****
HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKIIYYFDDSFYAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKIIYYFDDSFYAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
HHNEDLGNEEGEEISYSGILNFNKIIYYFDDSFYAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
HHDEDLGNEEGEALSYSYSGILNFNKIIYYFDDSFYAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
HHDEDLGNEEGEALSYSYSGILNFNKIIYYFDDSFYAVVGWKDLEDGSKYYFDEDTAEAYIG 2100
**.****** :*****
LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIG 2160
LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIG 2160
LSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVFYFSDSGIIESGVQNIDDNYFYIDDNGIVQIG 2160
ISIINDGKYYFNDSGIMQIGFVTINNEVFYFSDSGIVESGMQNIDDNYFYIDENGLVQIG 2160
ISIINDGKYYFNDSGIMQIGFVTINNEVFYFSDSGIVESGMQNIDDNYFYIDENGLVQIG 2160
*:****:*****.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
VFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYGQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETGWIYDMENESD 2220
*****

```

Fig 2F

```
KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
KYYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKGIMRTGLISFENNNYYFNENGEMQFGYINIED 2280
KYYFDPETKKAYKGINVIDDIKYYFDENGIMRTGLITFEDNHYYFNEDGIMQYGYLNIED 2280
KYYFDPETKKAYKGINVIDDIKYYFDENGIMRTGLITFEDNHYYFNEDGIMQYGYLNIED 2280
****:***** ****:*****:*****:***:***:*****:* **:**:****
```

```
KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYI 2340
KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYI 2340
KMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYI 2340
KTFYFSEDGIMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYI 2340
KTFYFSEDGIMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYYFTDEYI 2340
* ***.***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
```

```
AATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 2, 630)
AATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 25, VPI10463)
AATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 6)
AATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 21, R20291)
AATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE 2366 (SEQ ID NO: 23, CD196)
*****
```

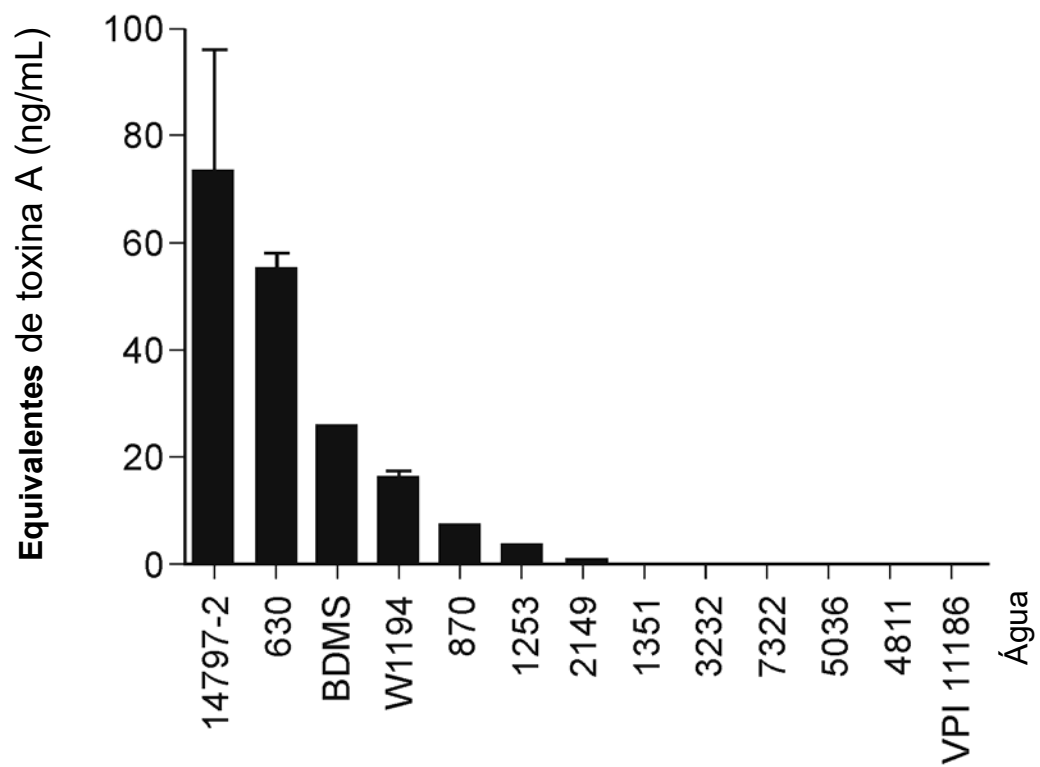
FIG. 3

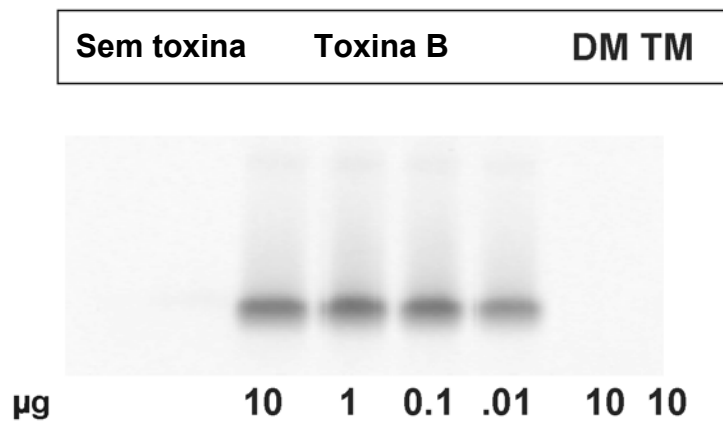
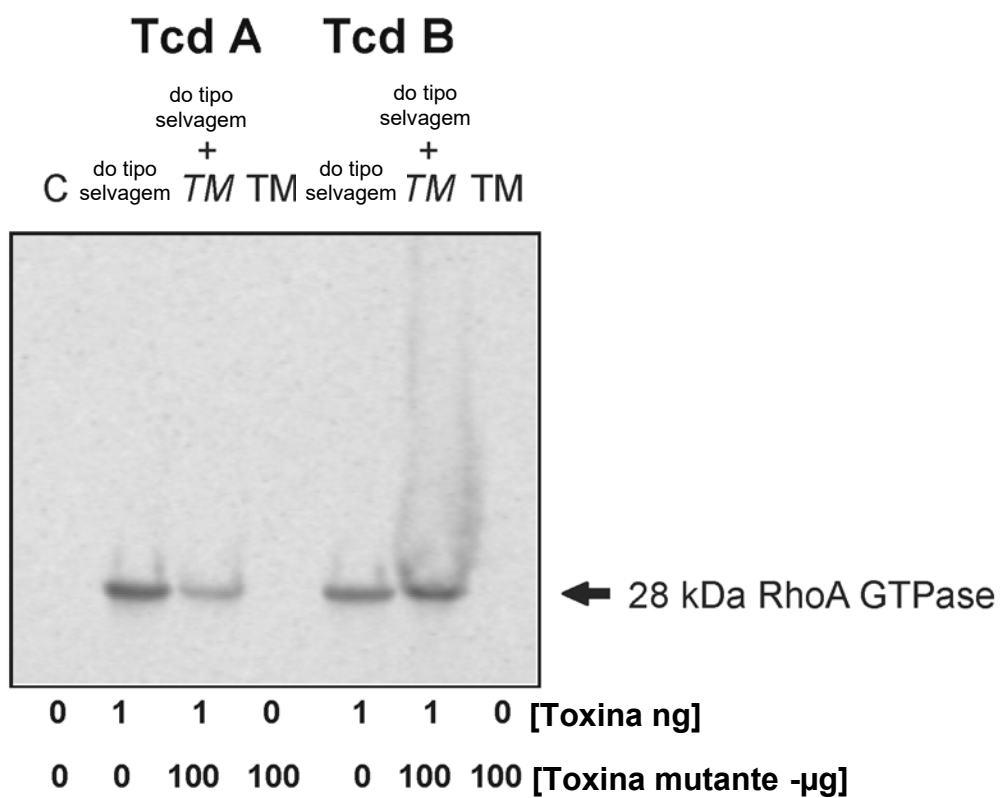
FIG. 4A**FIG. 4B**

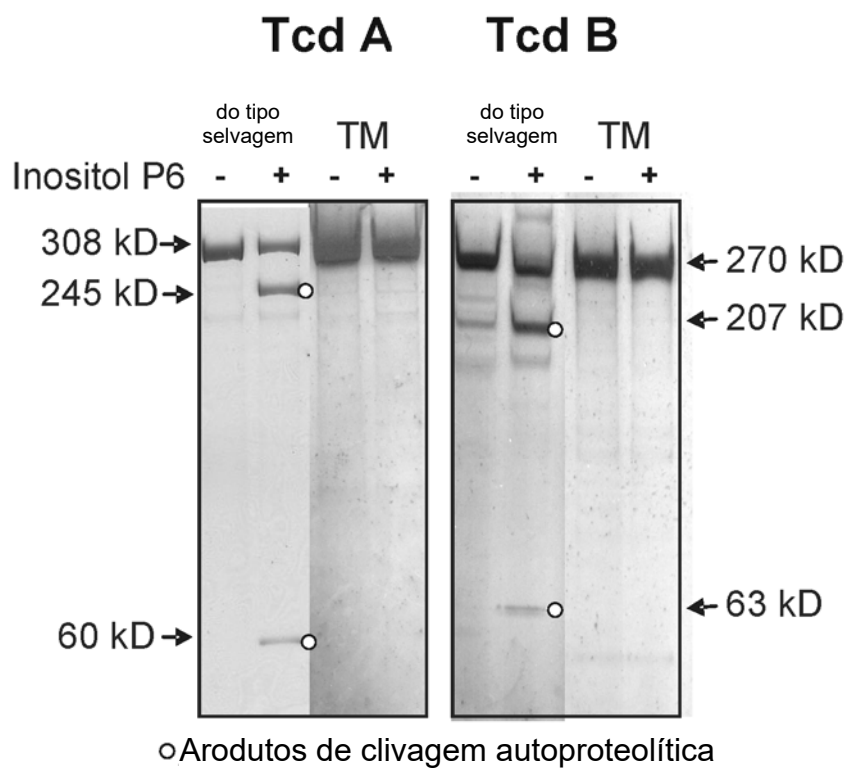
FIG. 5

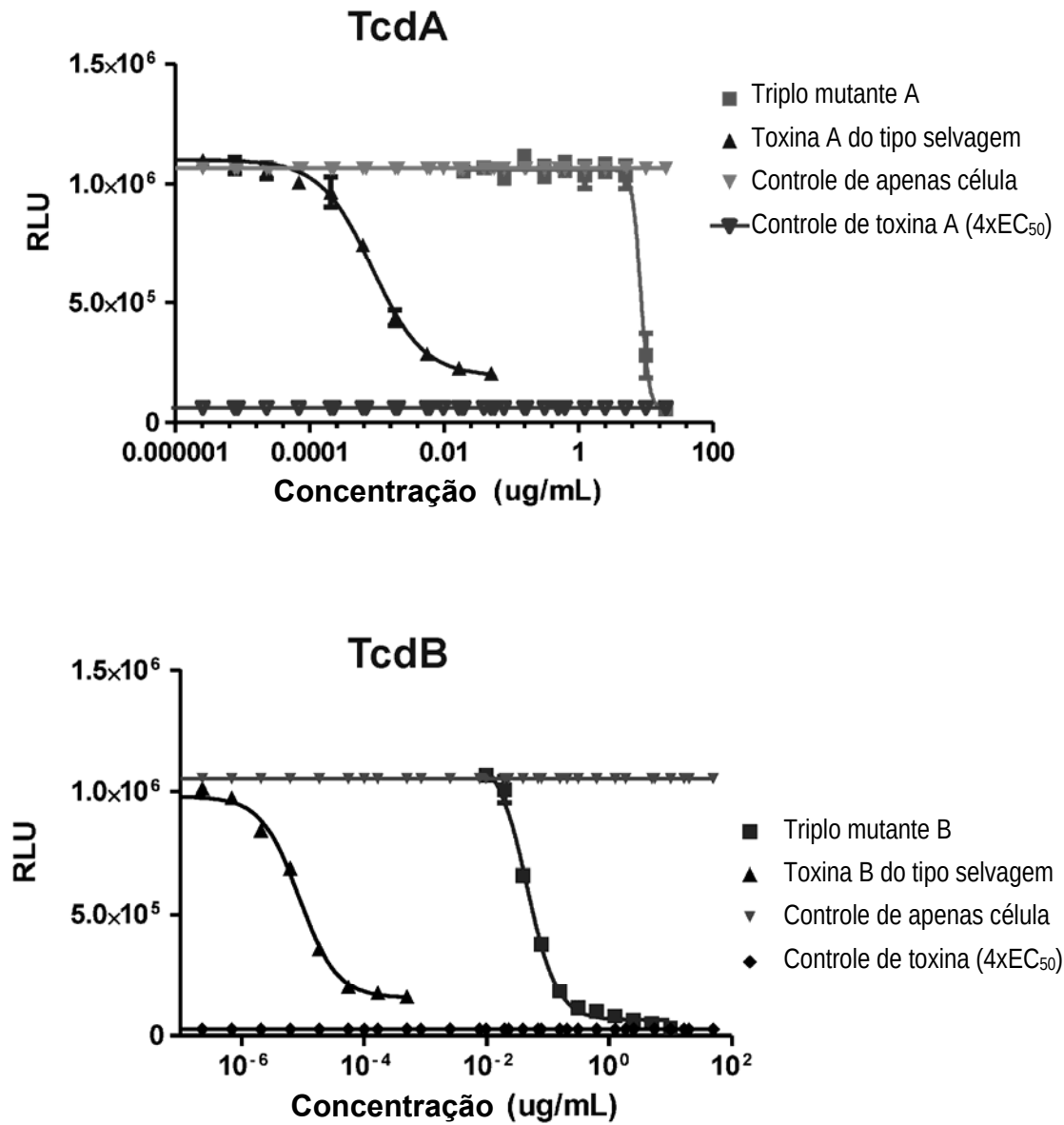
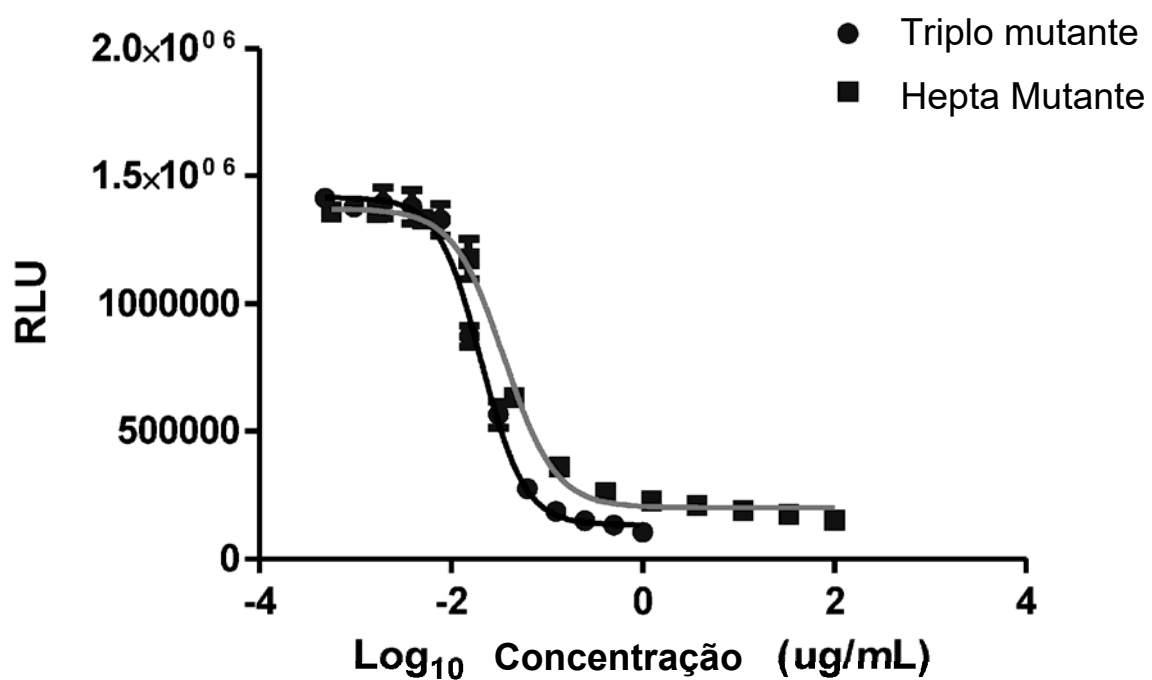
FIG. 6

FIG. 7

	Triplo mutante	Hepta Mutante
EC₅₀	0.02078	0.03590

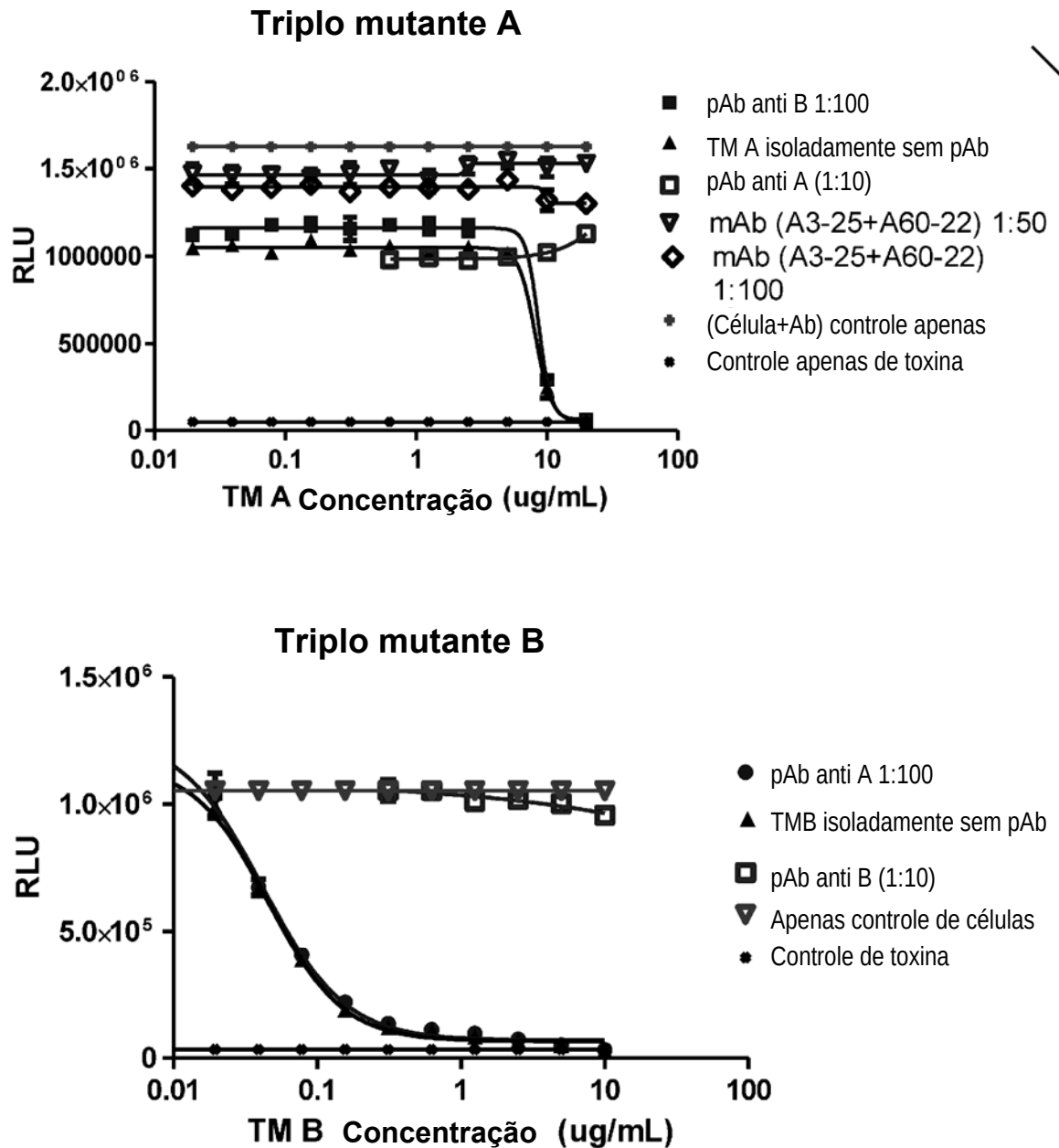
FIG. 8

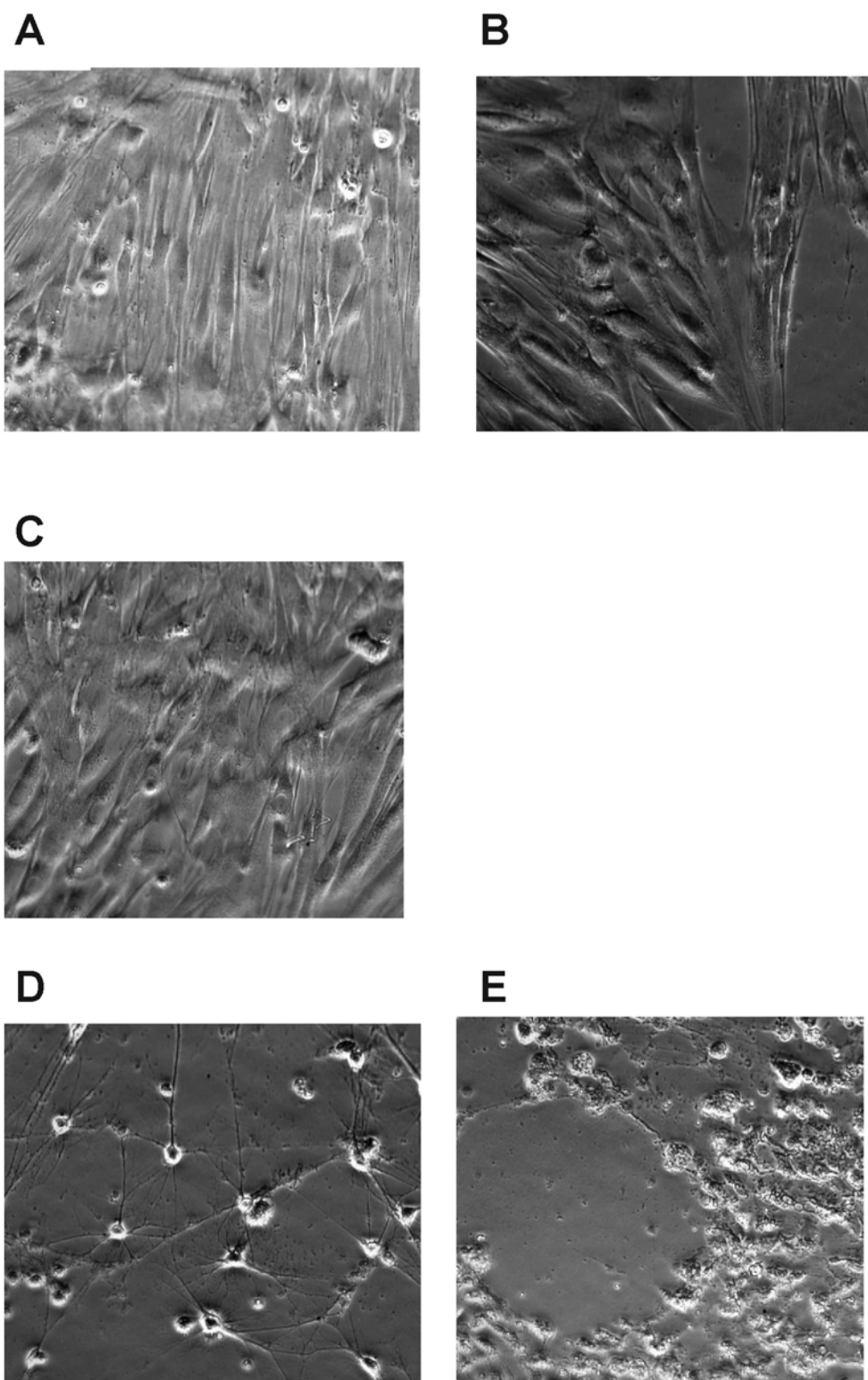
FIG. 9

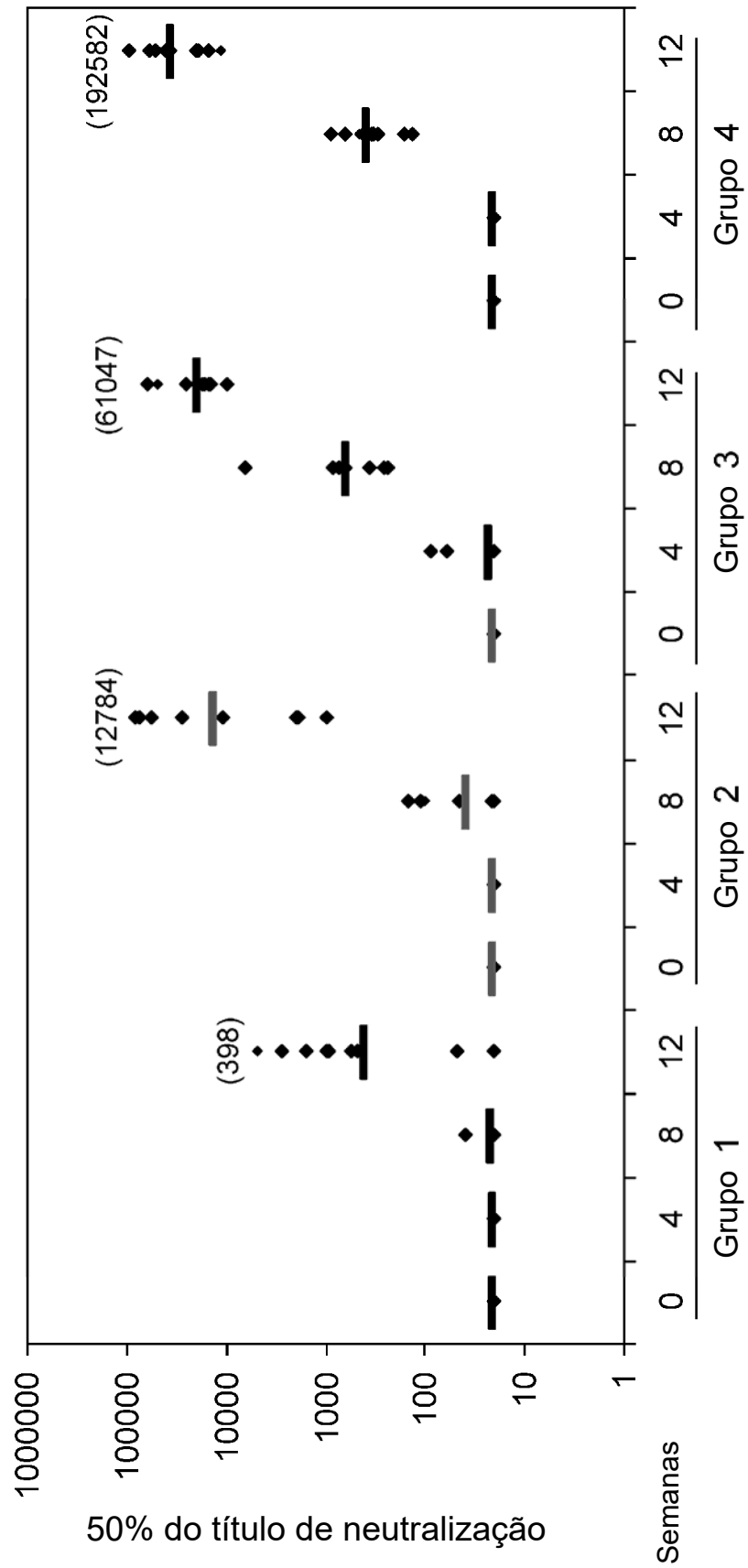
FIG. 10

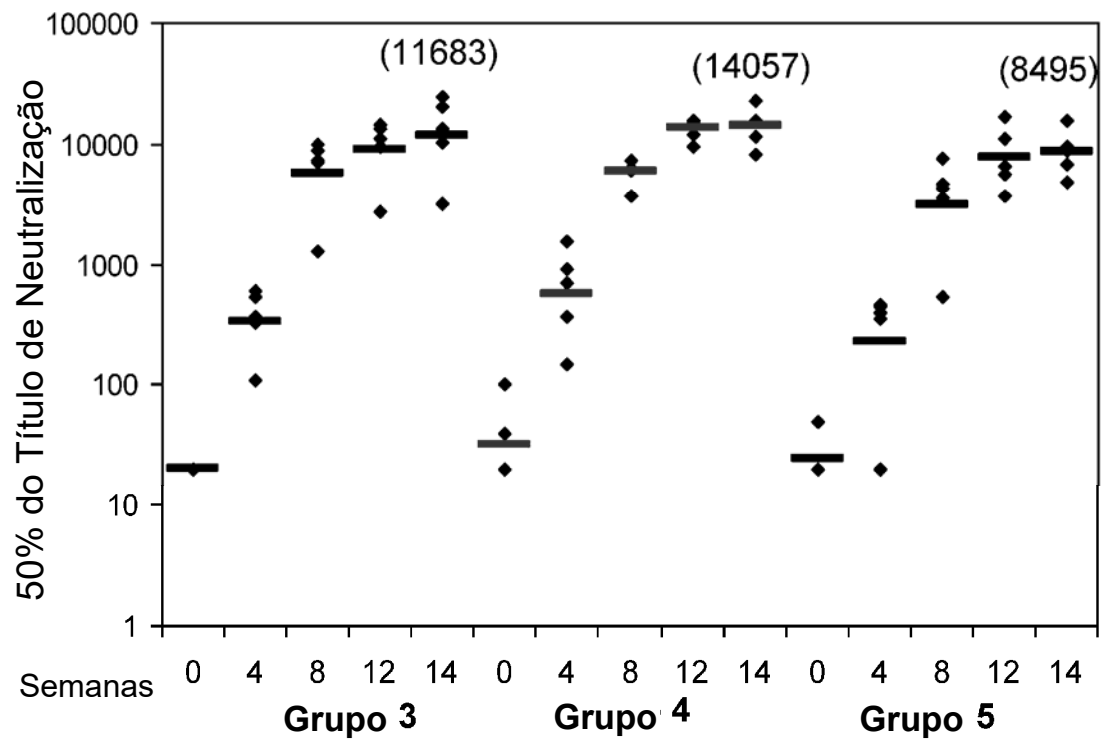
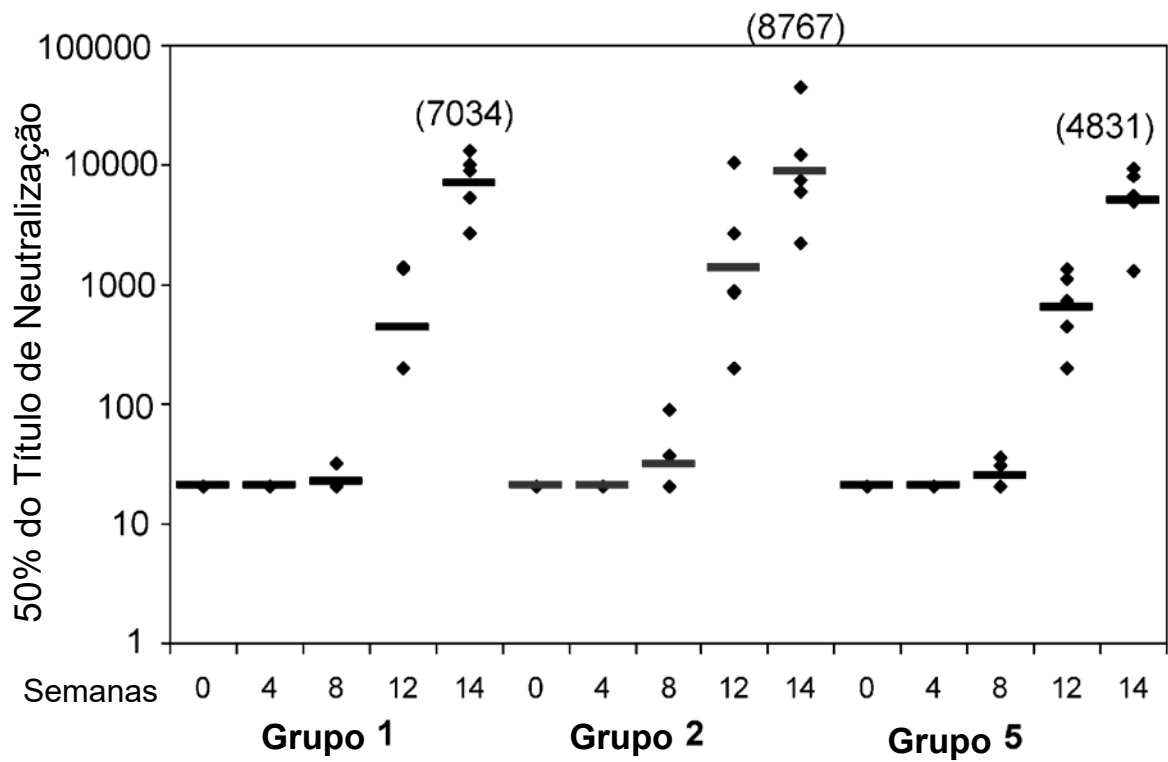
FIG. 11A**FIG. 11B**

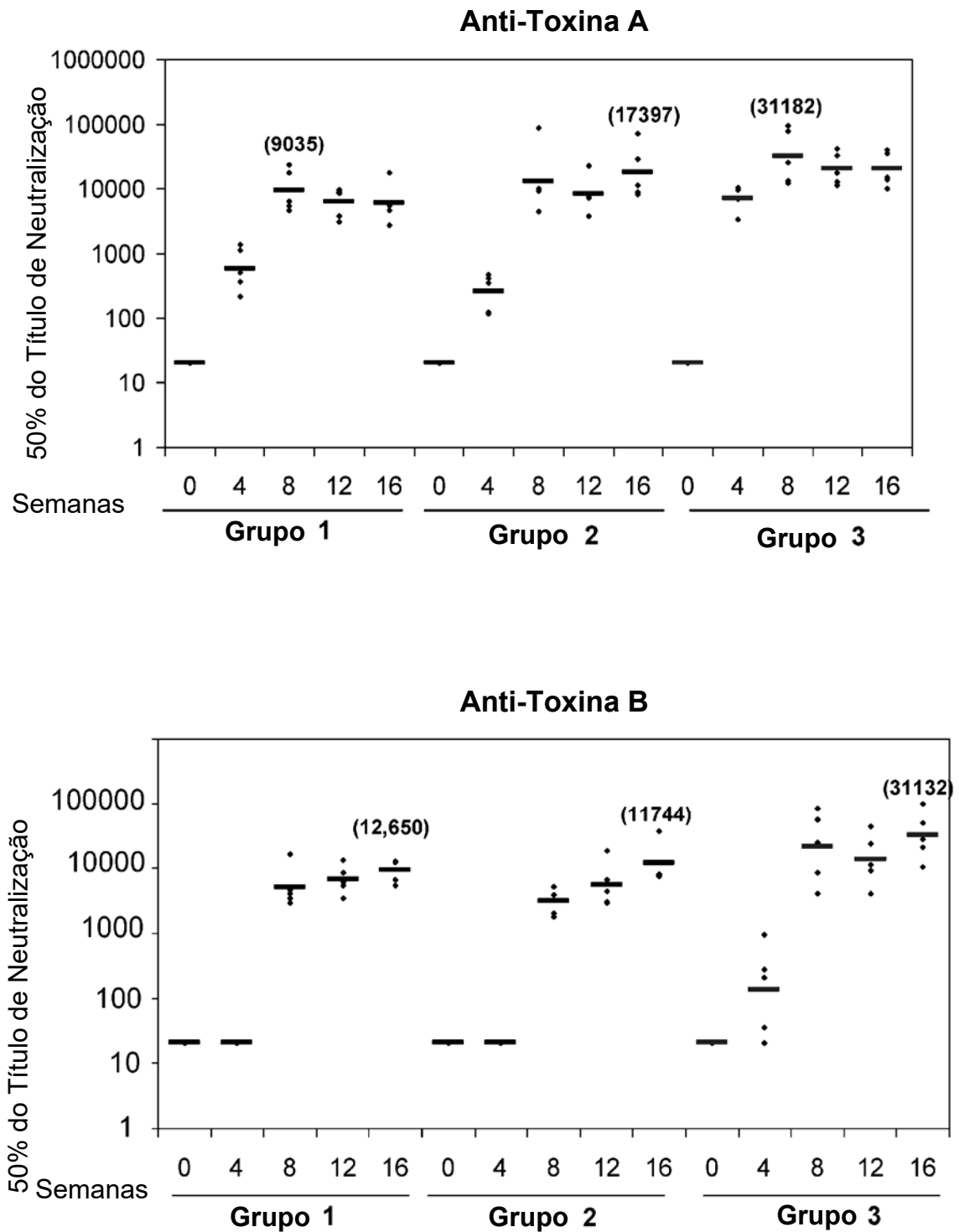
FIG. 12

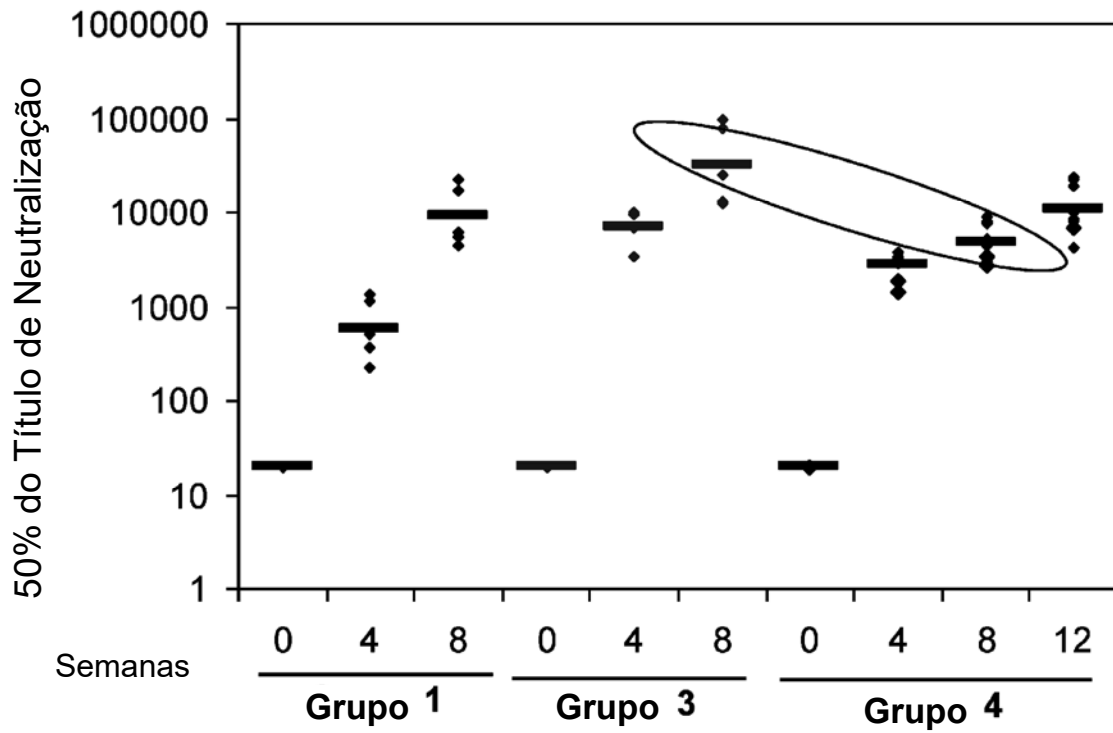
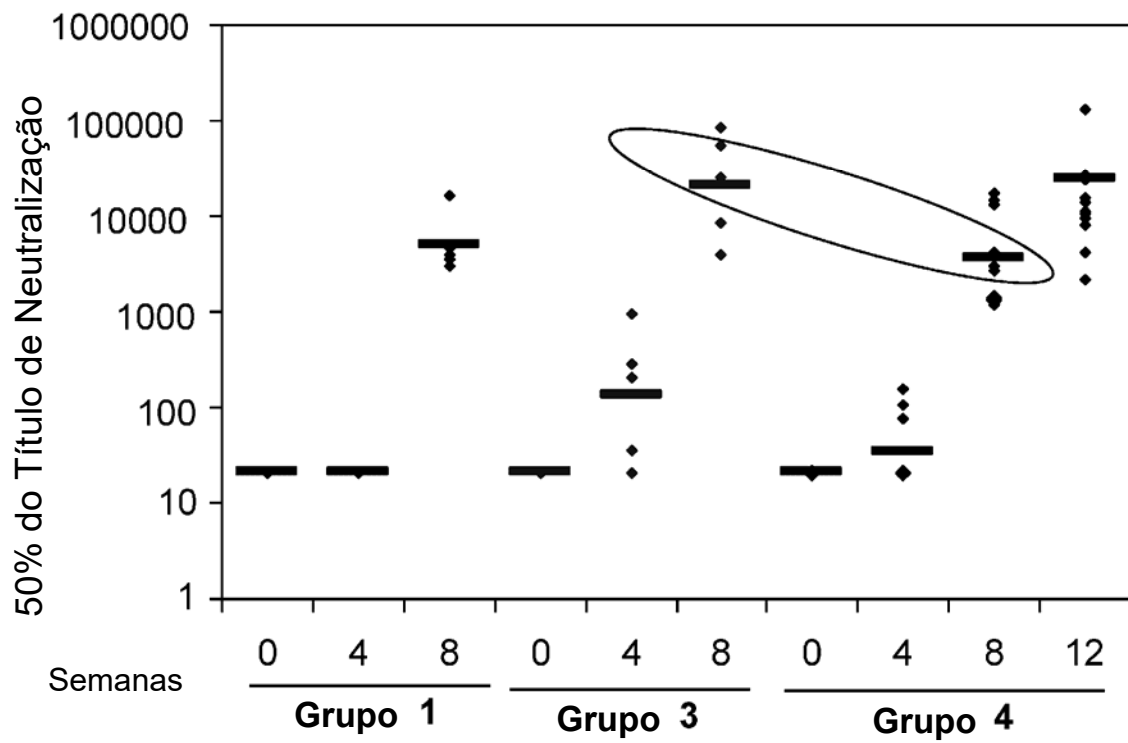
FIG. 13A**FIG. 13B**

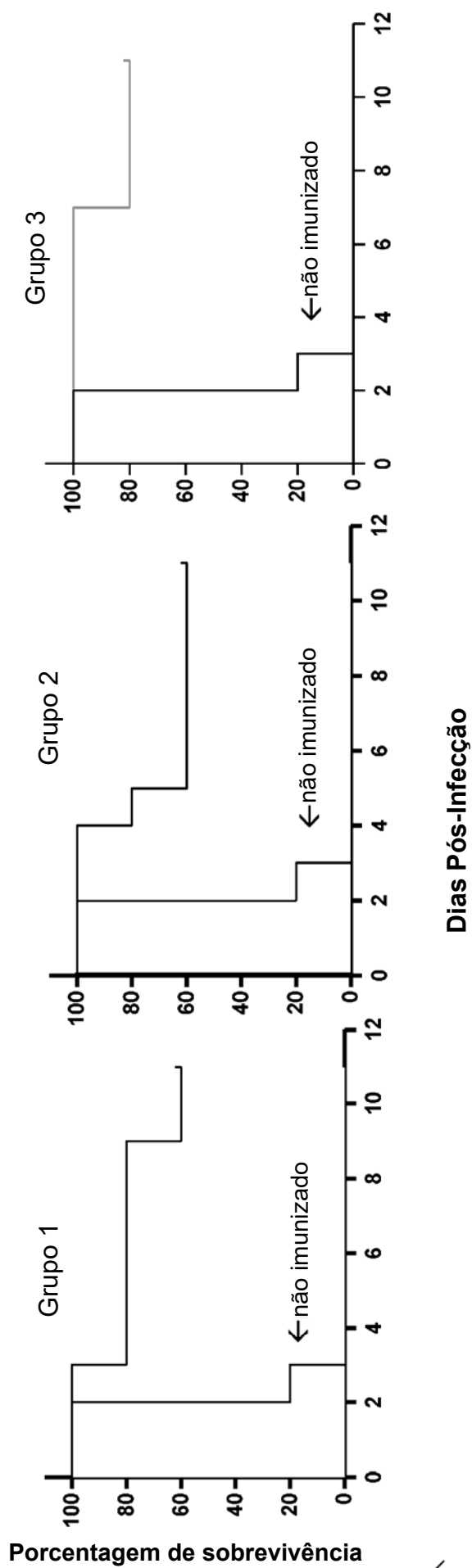
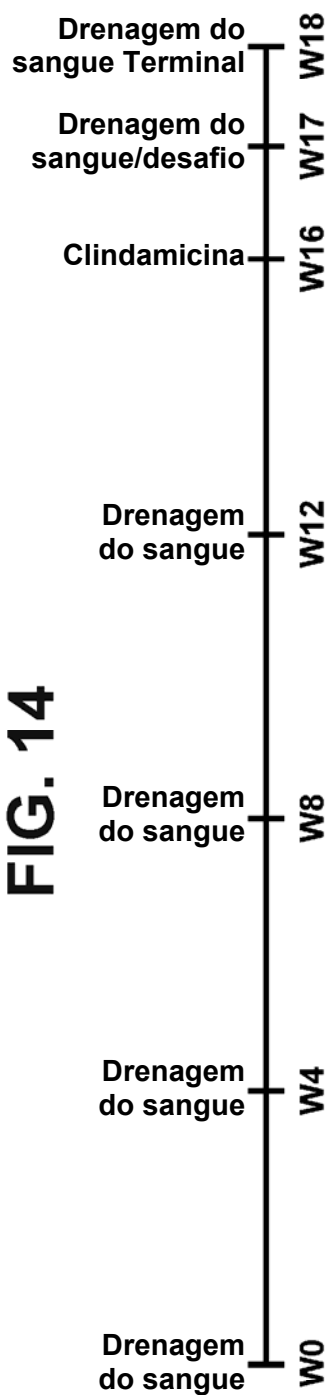
FIG. 14

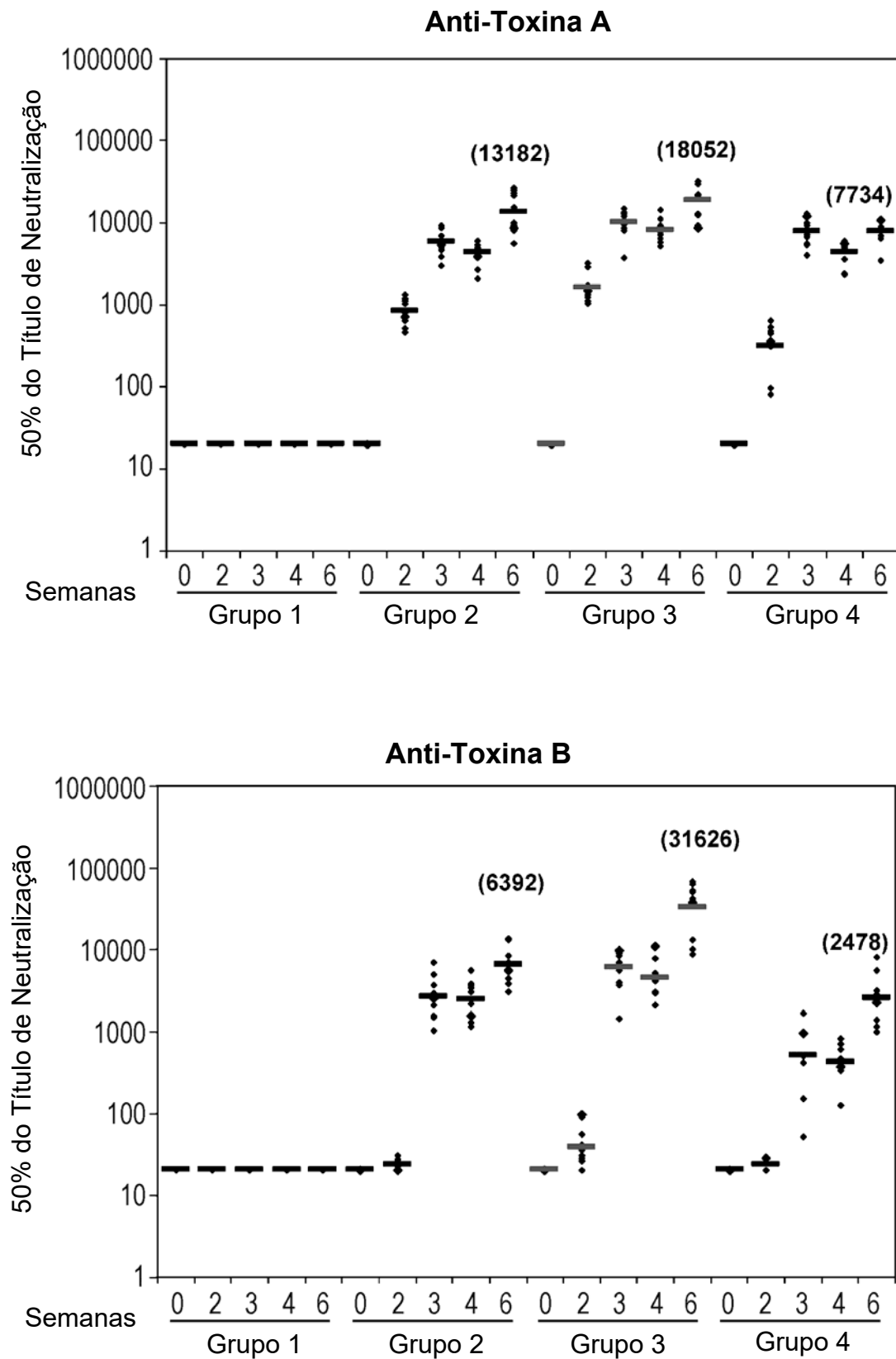
FIG. 15

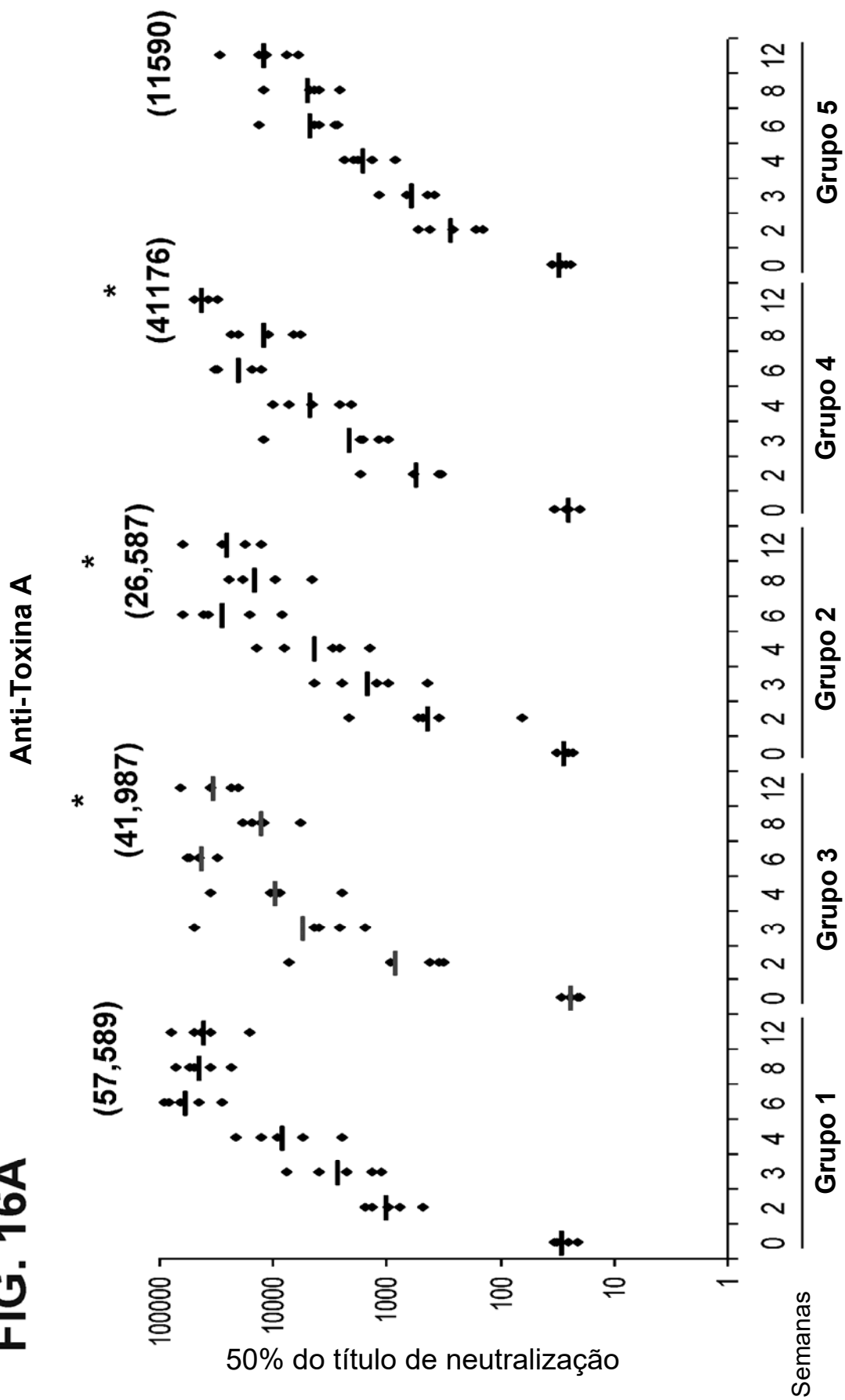
FIG. 16A

FIG. 16B

Anti-Toxina B

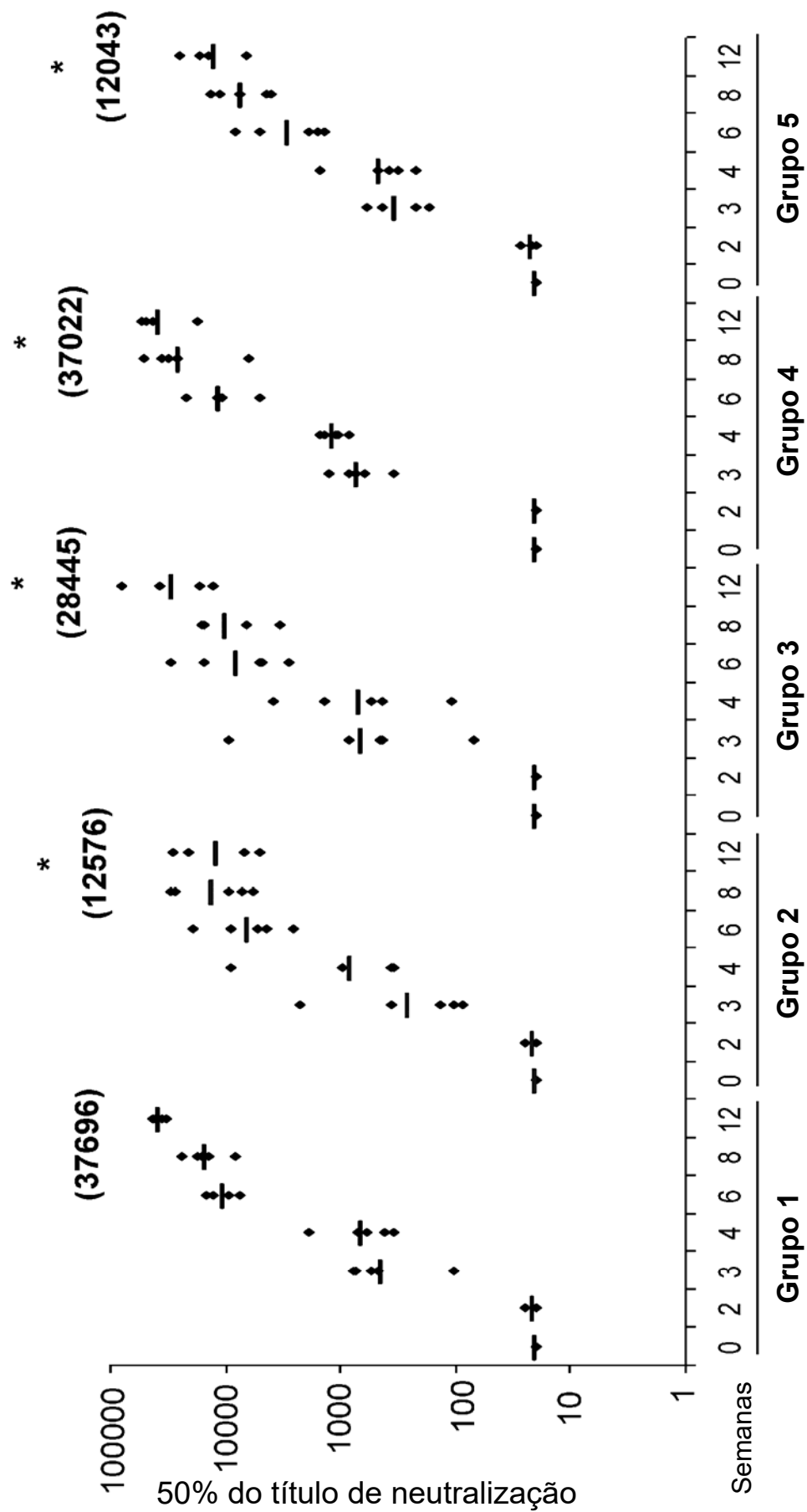


FIG. 17

Cadeia Leve Variável (muK)

MKLPVRLLVLMFWIPGSSSDVVMTHHTPLSLPVSLGDQASMSCRS
SQSLIHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLISKVSNRFSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTTYFPYTFGGGTREIKRAD
AAPTVSIFPPSS (SEQ ID NO: 36)

Cadeia Pesada Variável (mlgE)

MYLGLNCVFIVFLLKGVQSEVNLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS
GFTFTNYWMNWRQSPKEGLEWIAEIRLKSHNYATHFAESVKG
RFTISRDDSKSAVSLQMTNLTPEDTGIFYCTWDYYGNPAFVYWG
QGTTLVTVSAAASIRNPQLYPLKPCCKGTASMTLGCLVKDYFPGPVT
VTWYSDSLNMSTVN (SEQ ID NO: 37)

FIG. 18

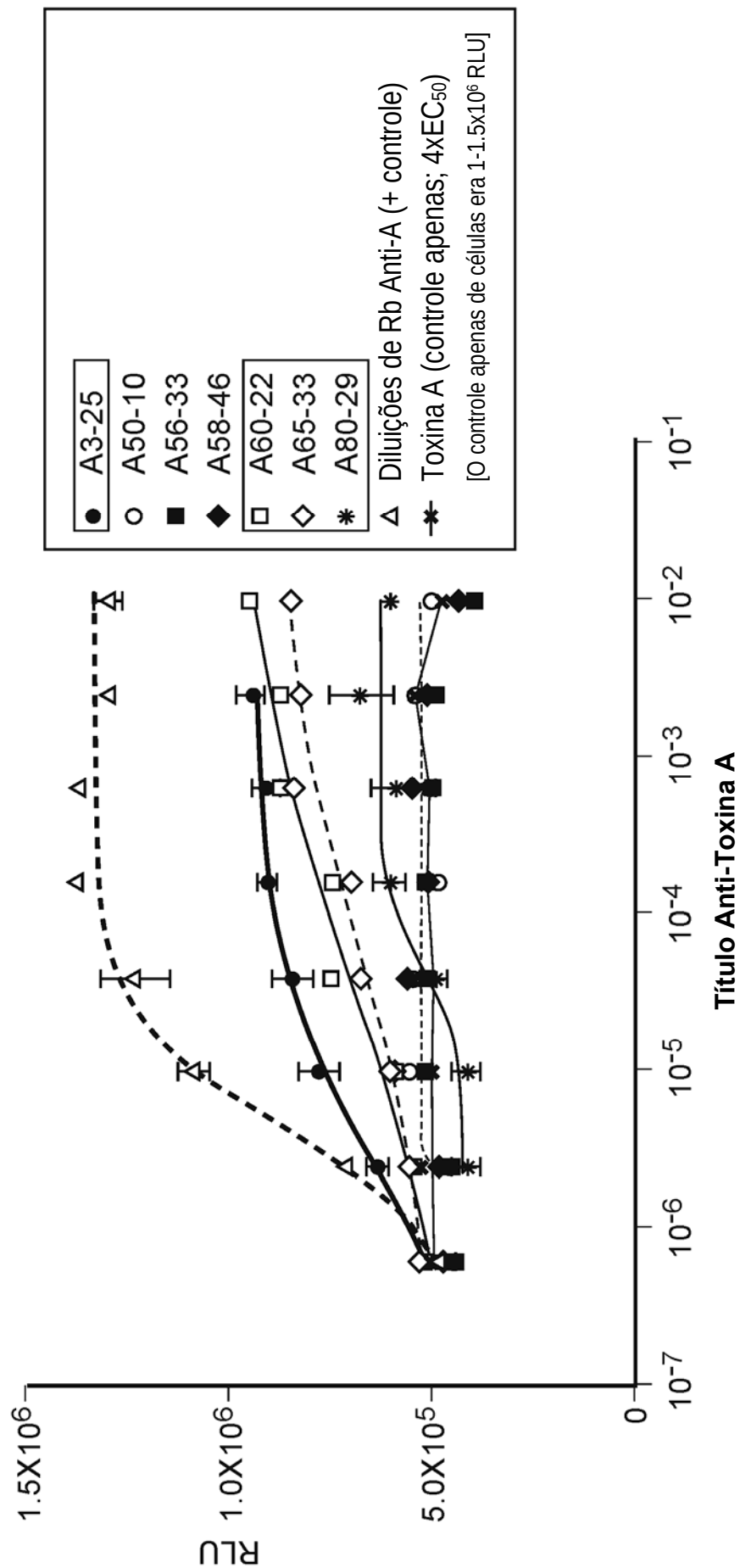


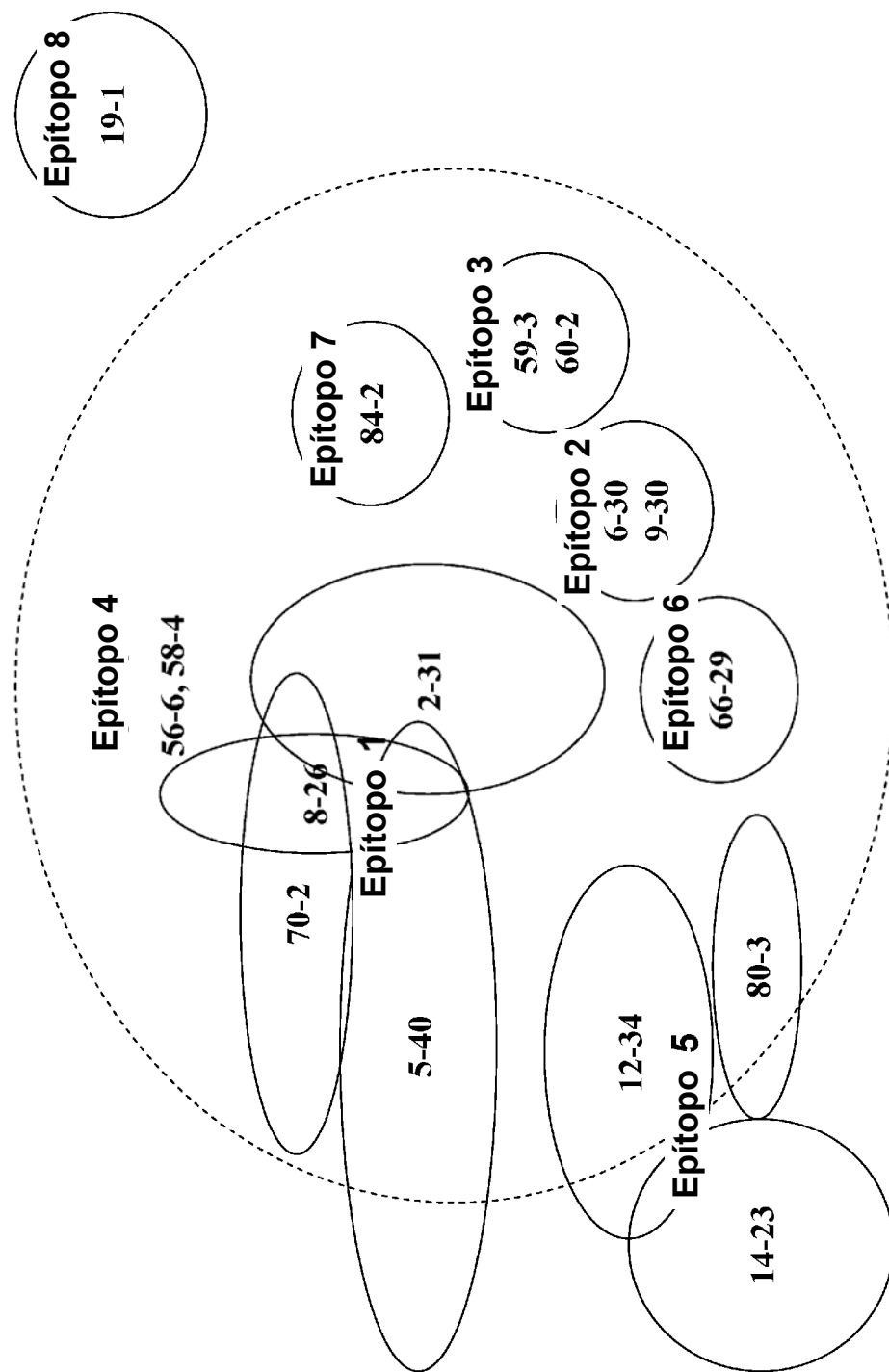
FIG. 19

FIG. 20A

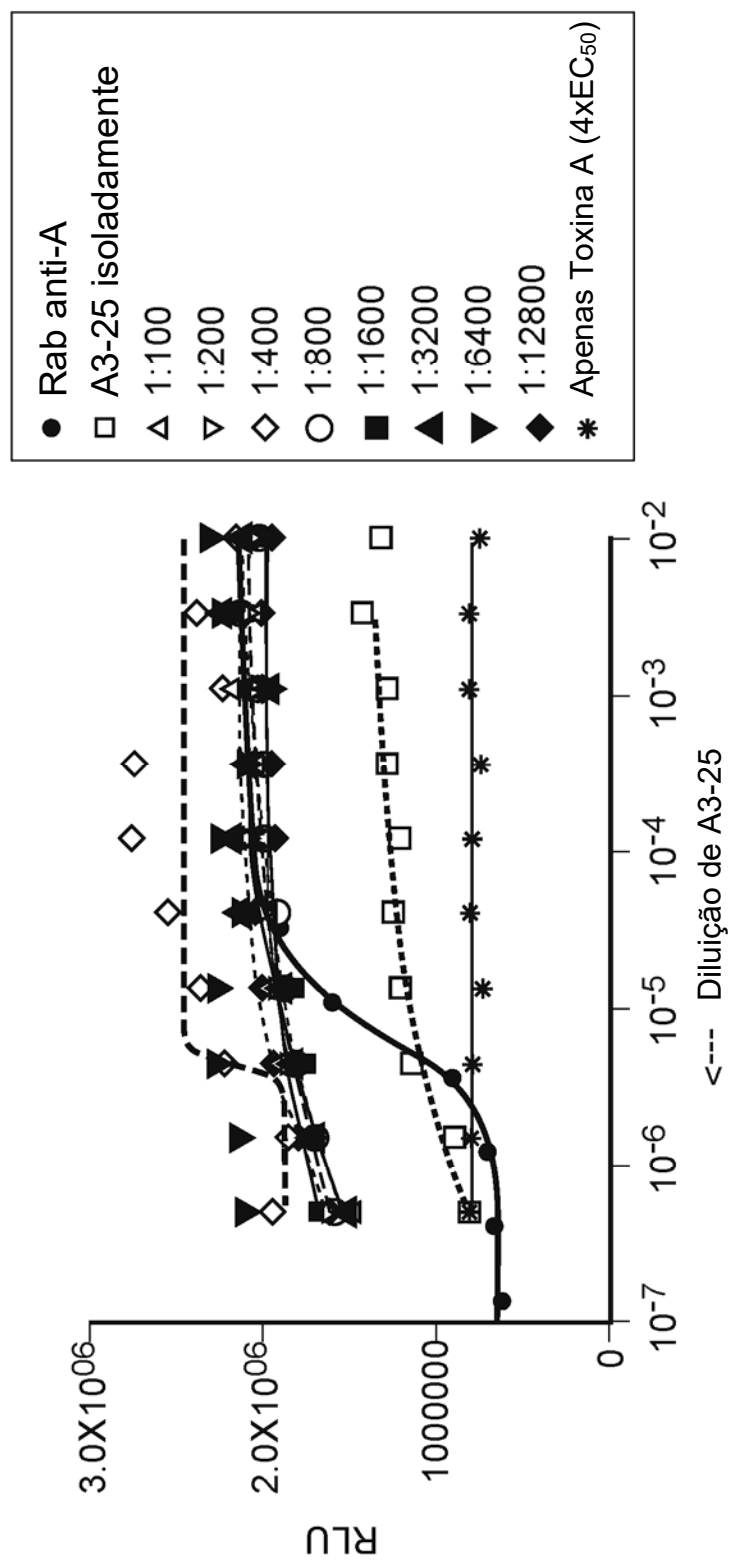


FIG. 20B

Neutralização de toxina A pelo mAb A3-25 mais Diluições de A65-33

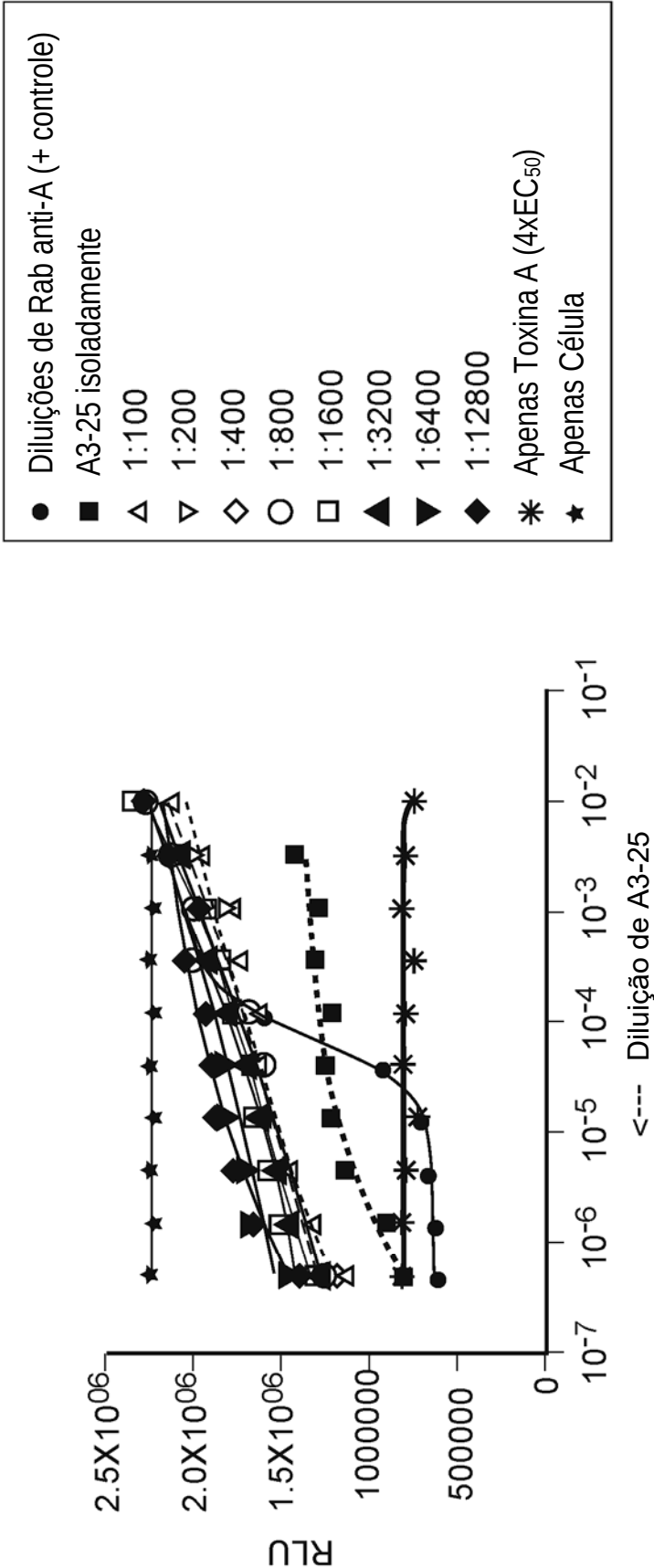


FIG. 20C

Neutralização de toxina A pelo mAb A3-25 mais diluições de A80-29

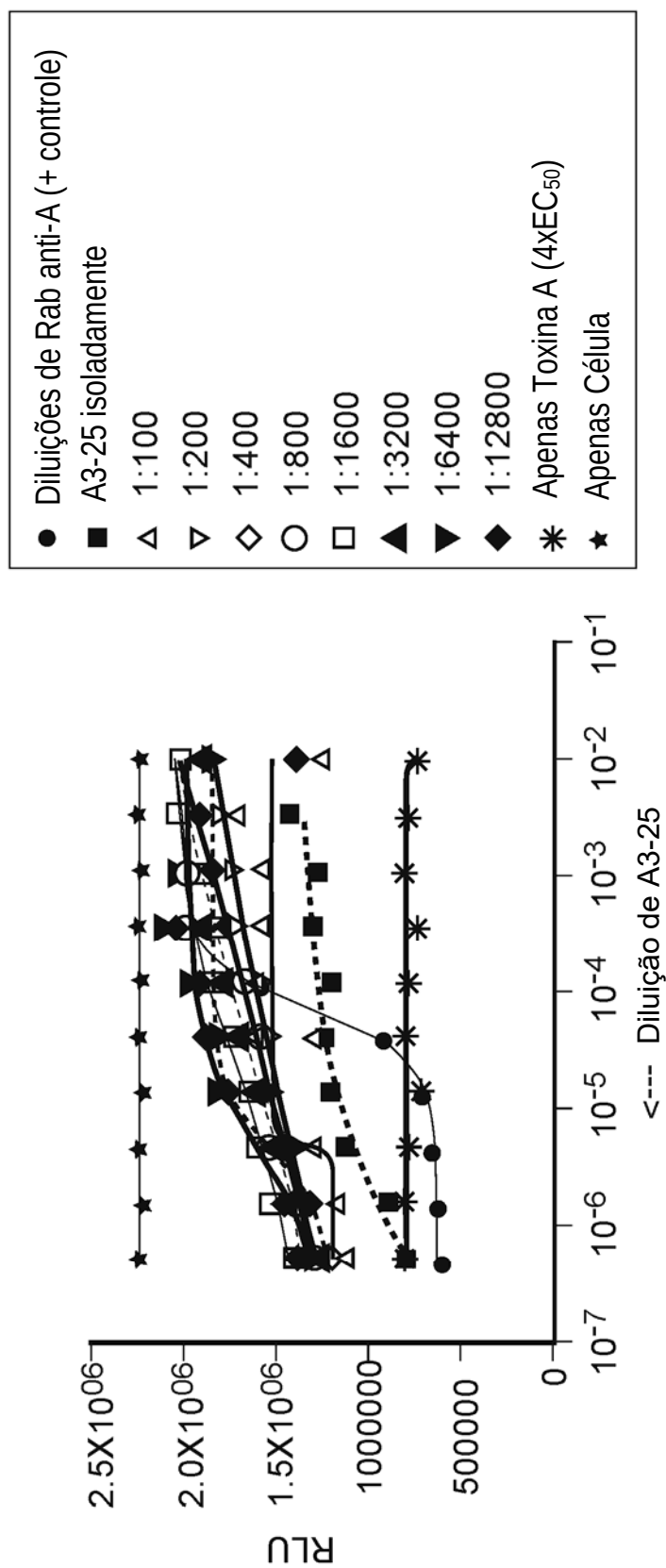


FIG. 21A

Neutralização de toxina B por Soros de Referência e mAbs diferentes

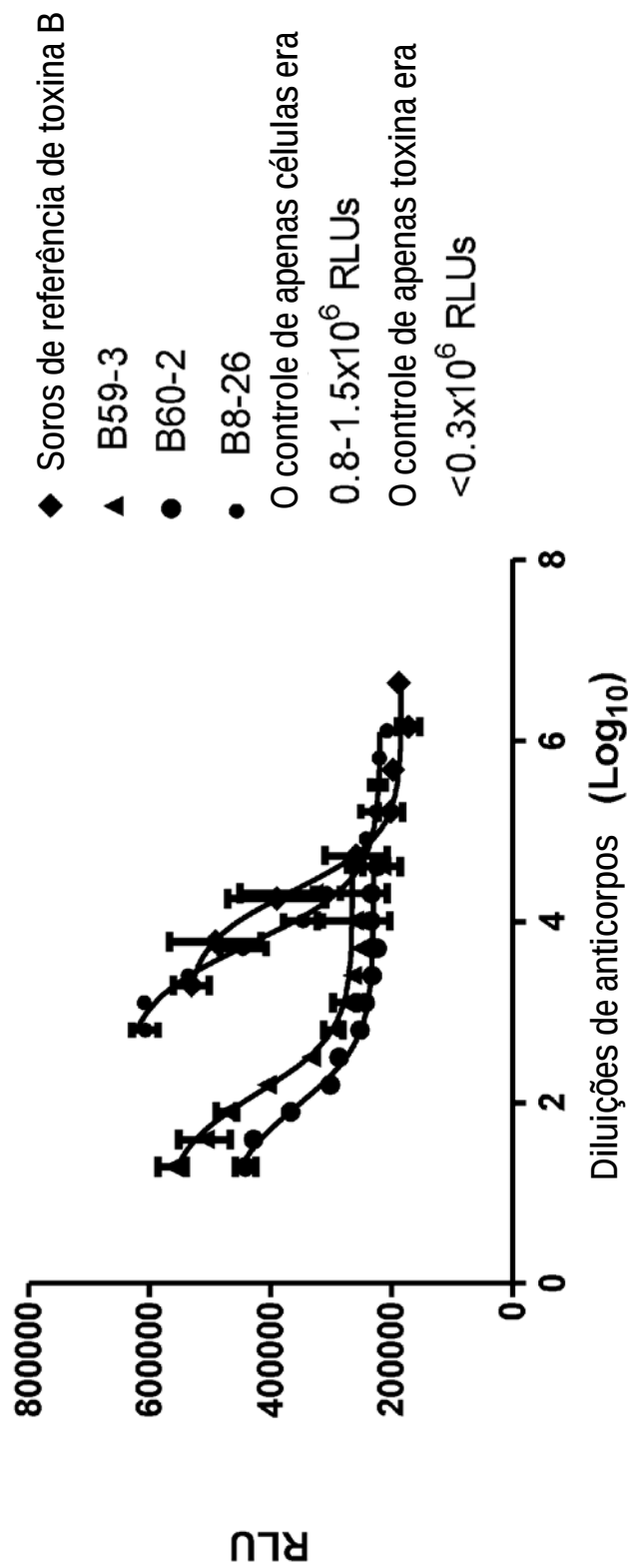


FIG. 21B

Neutralização de toxina B pelo mAb B8-26 mais Diluições de B59-3

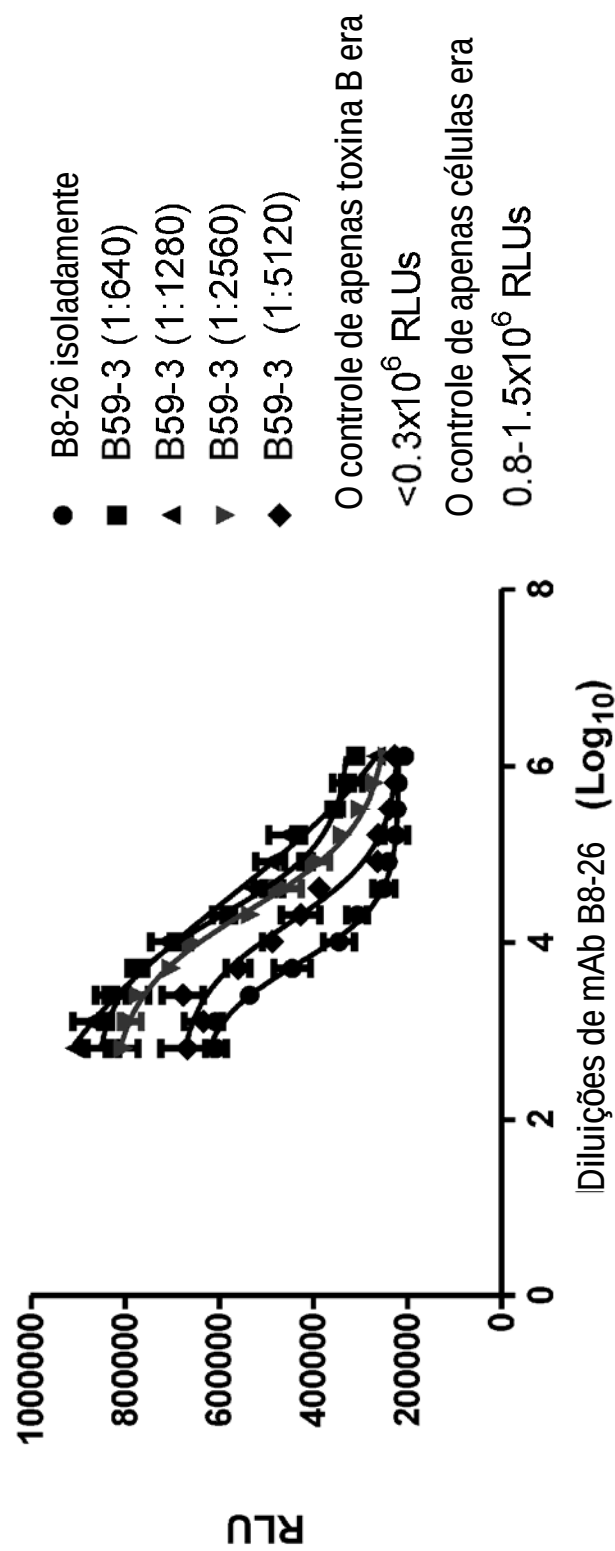


FIG. 22

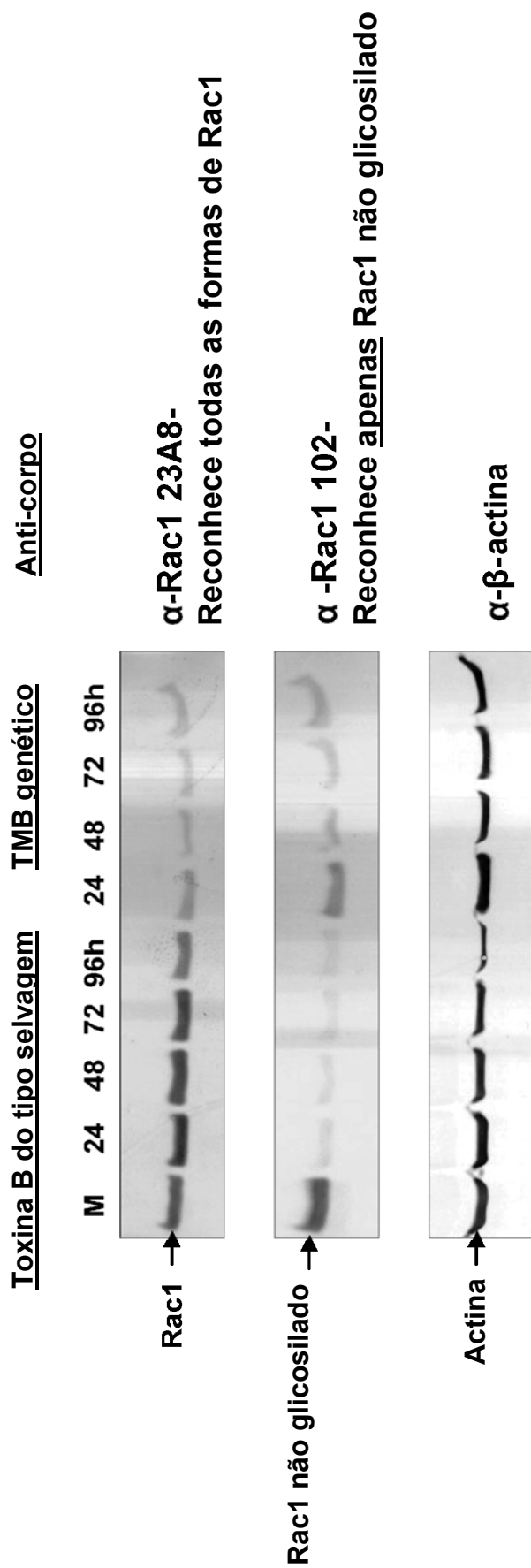


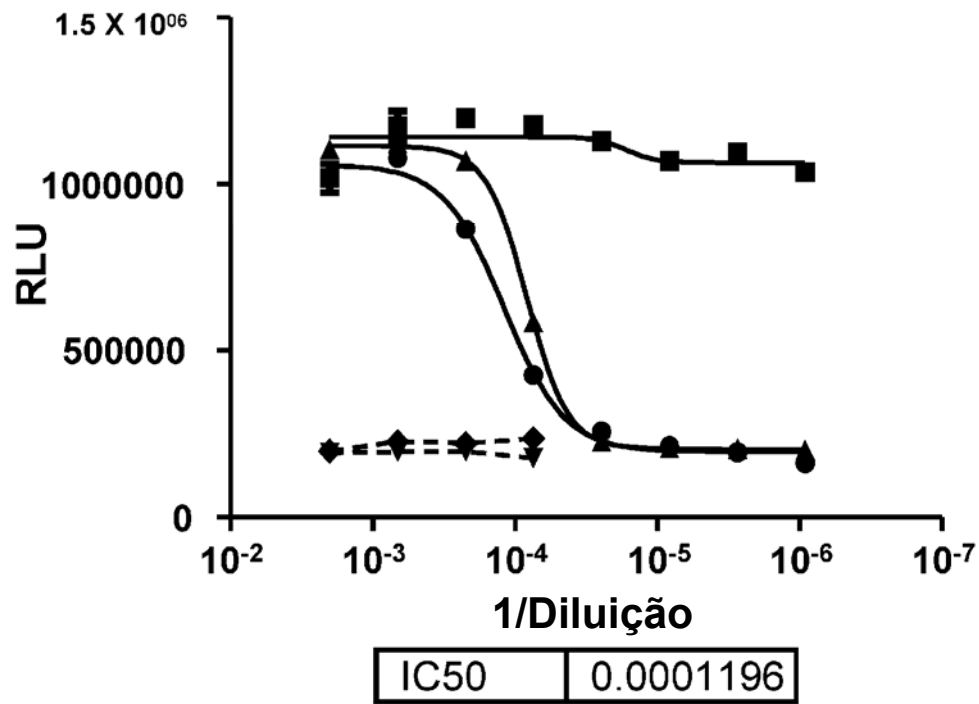
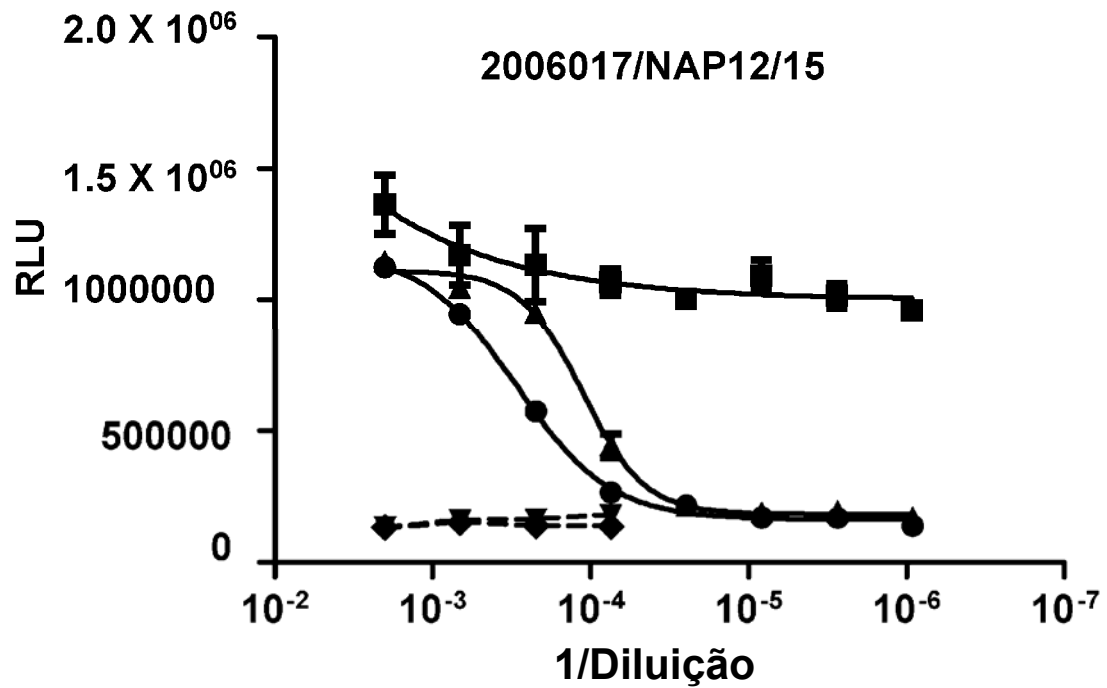
FIG. 23A**2007886****FIG. 23B****2006017/NAP12/15**

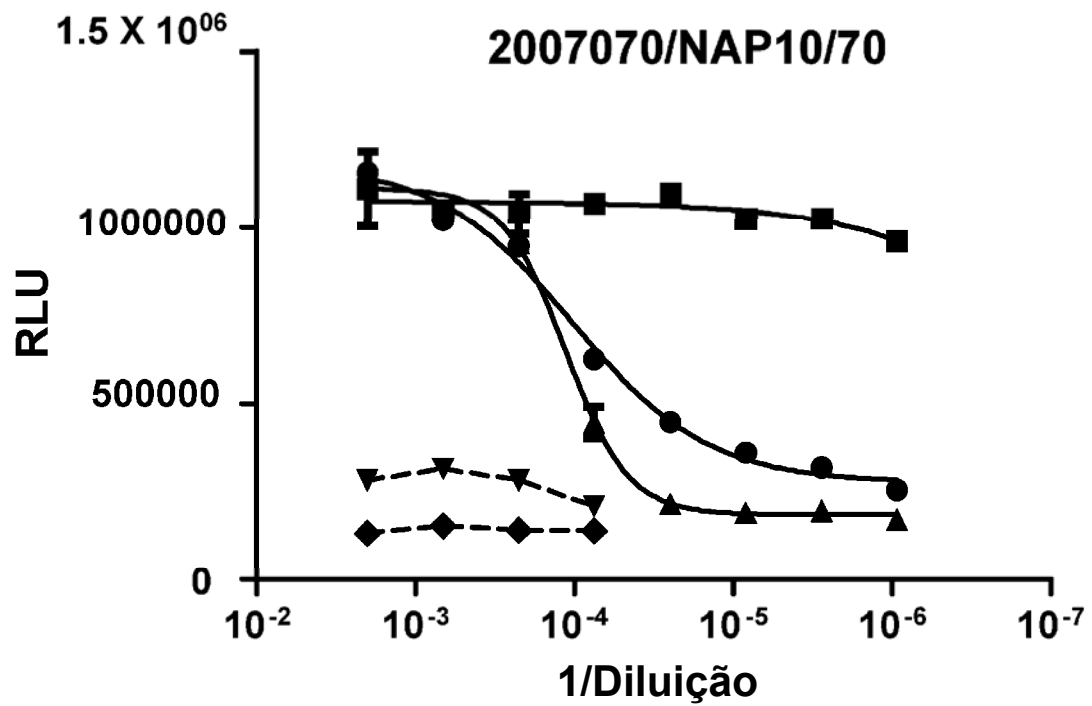
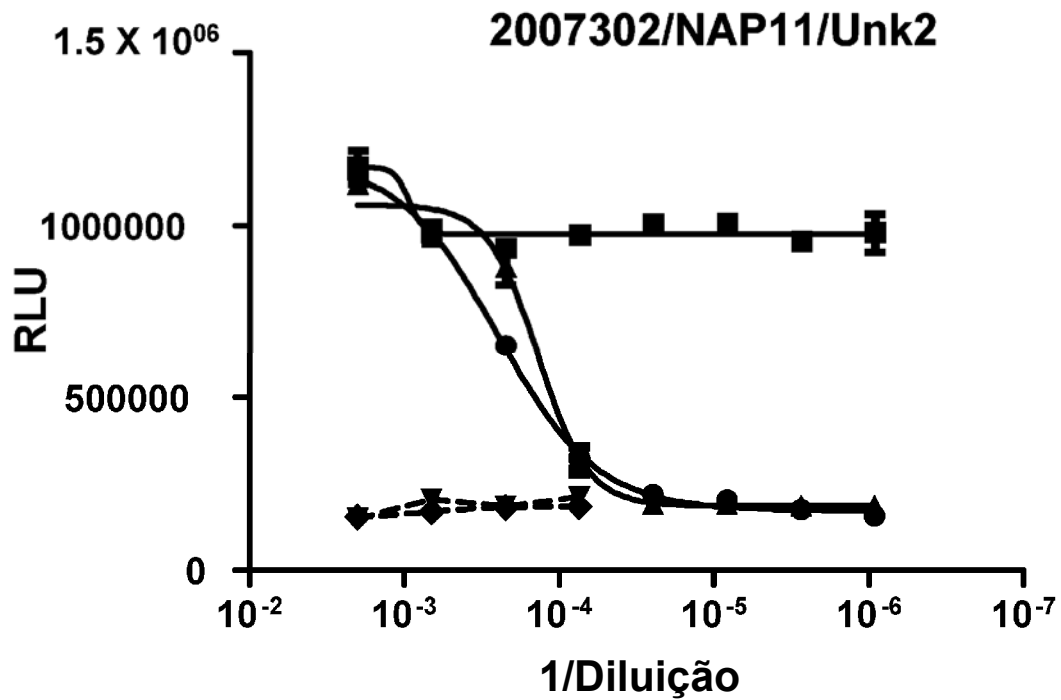
FIG. 23C**FIG. 23D**

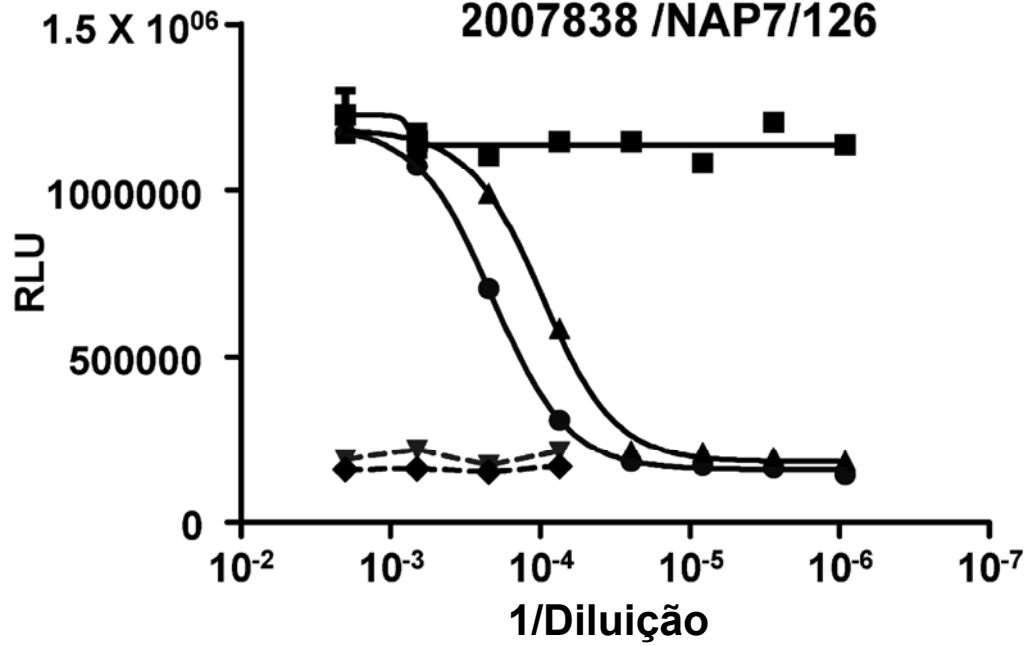
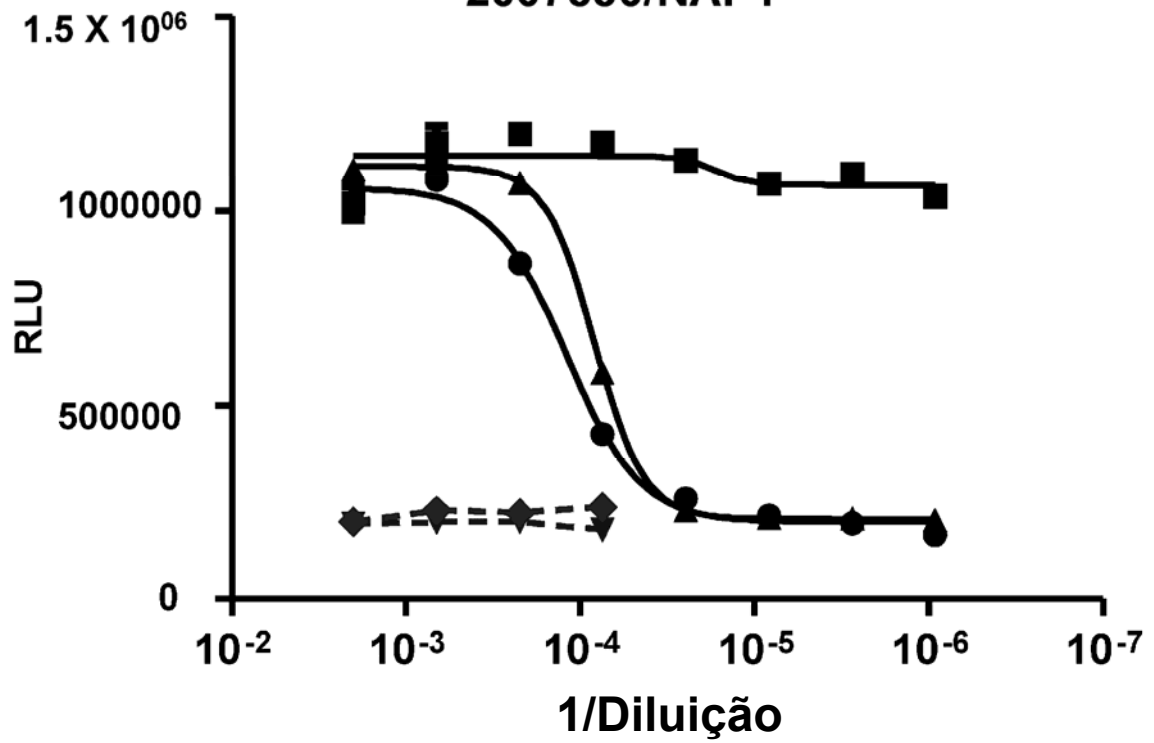
FIG. 23E**2007838 /NAP7/126****FIG. 23F****2007886/NAP1**

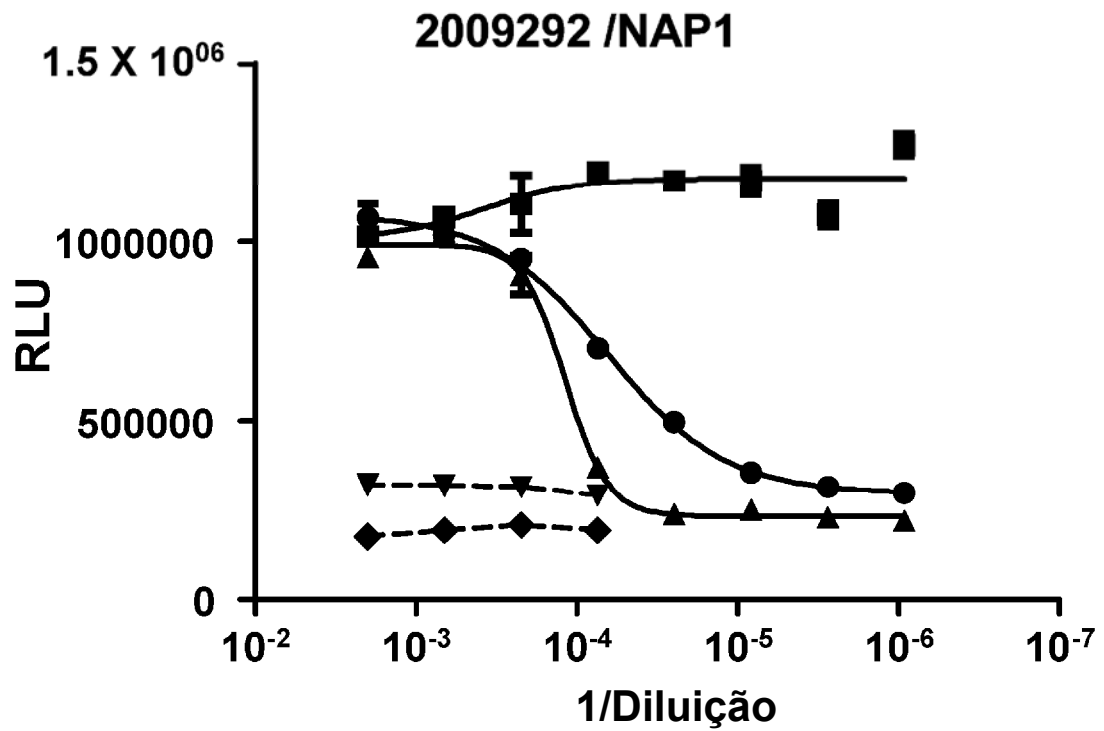
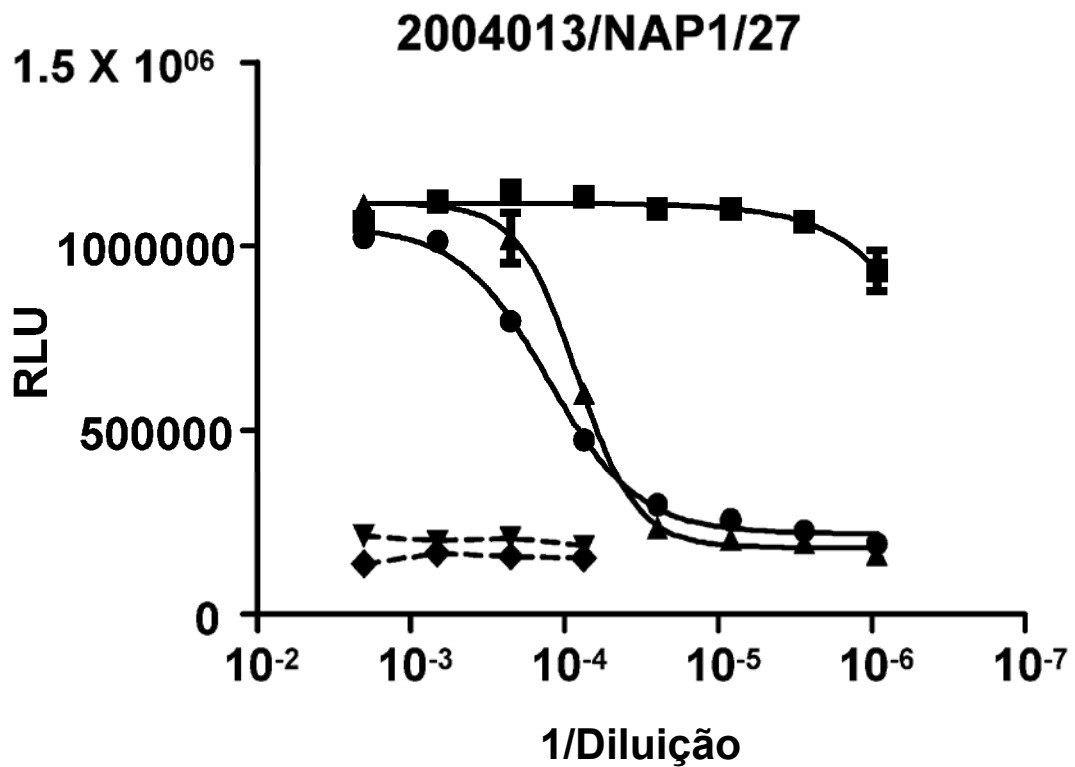
FIG. 23G**FIG. 23H**

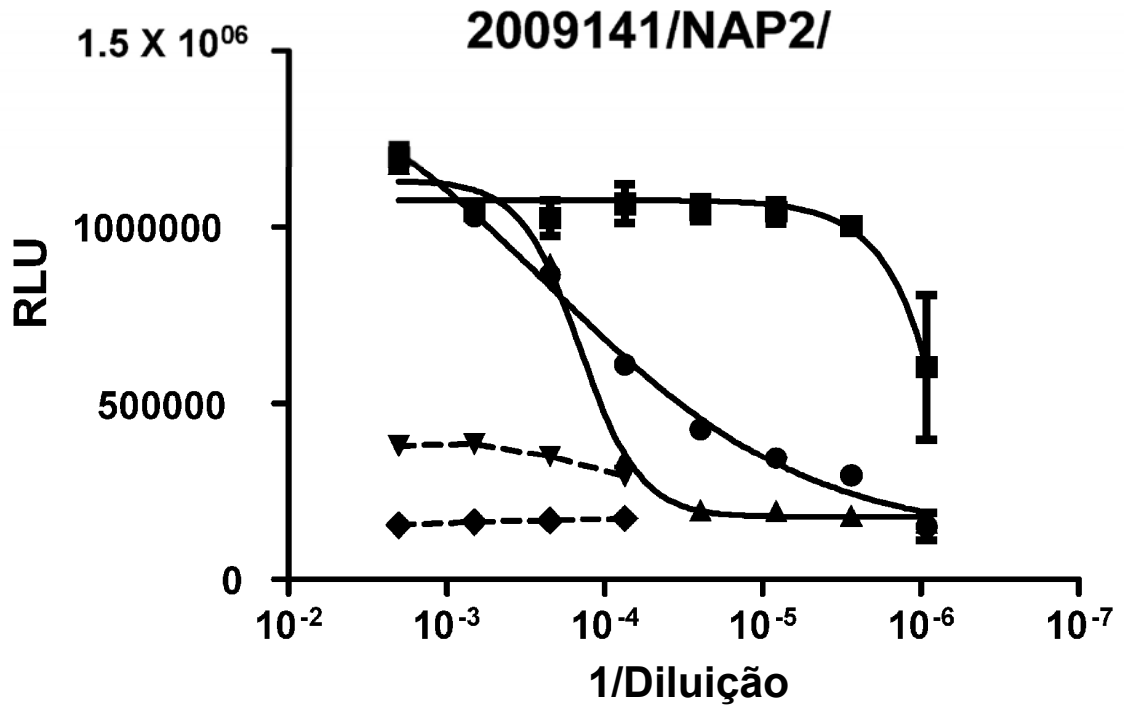
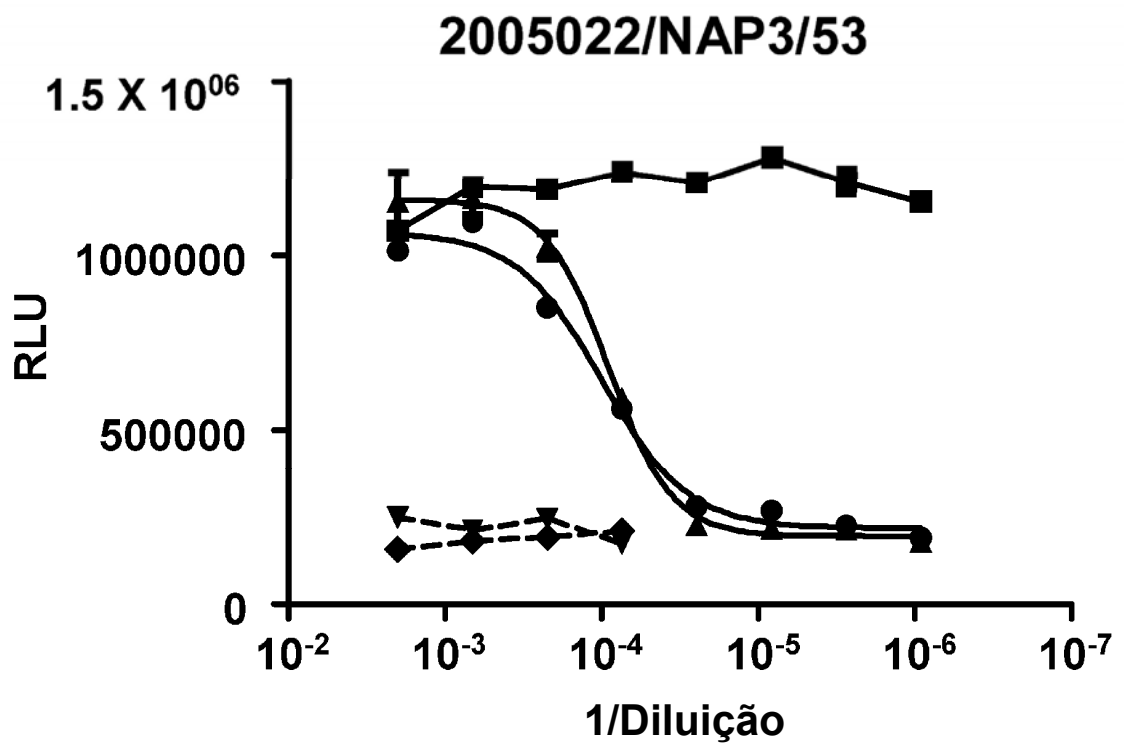
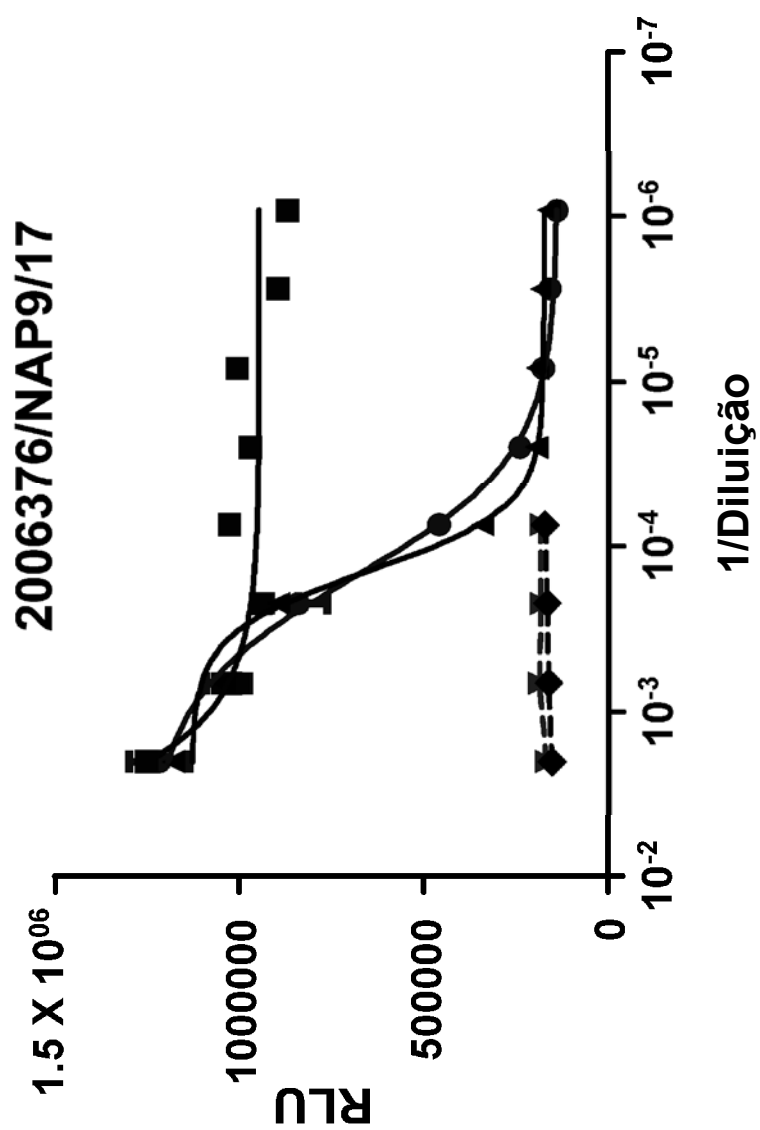
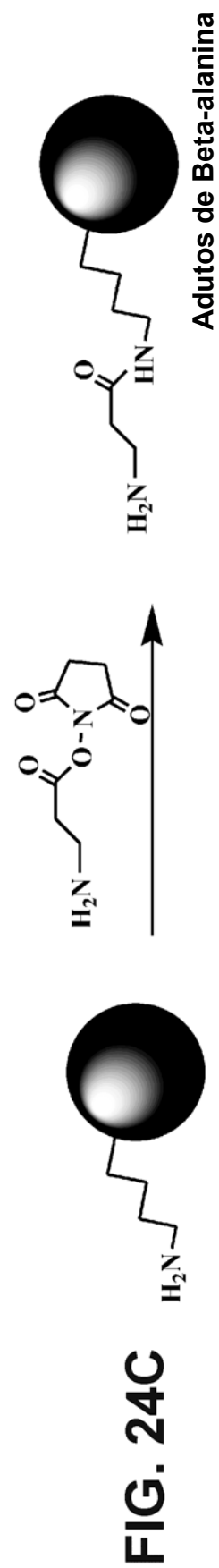
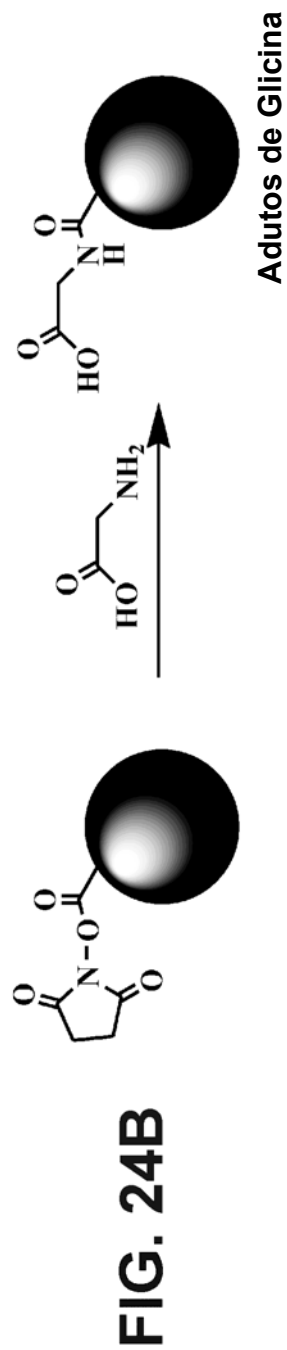
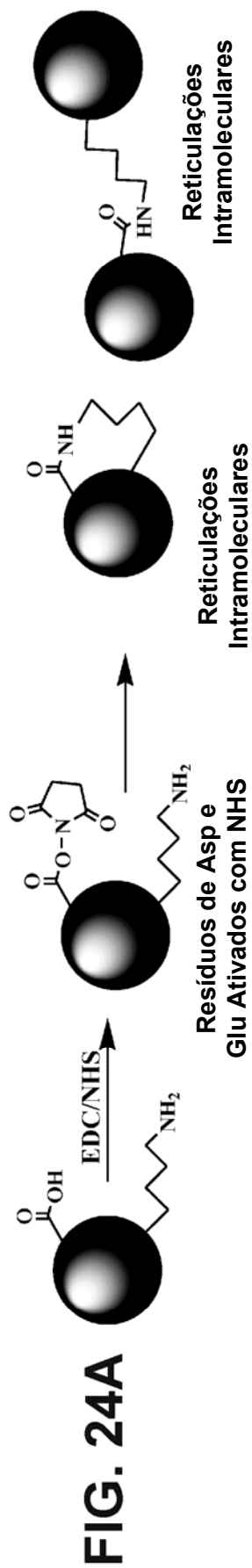
FIG. 23 I**FIG. 23J**

FIG. 23K





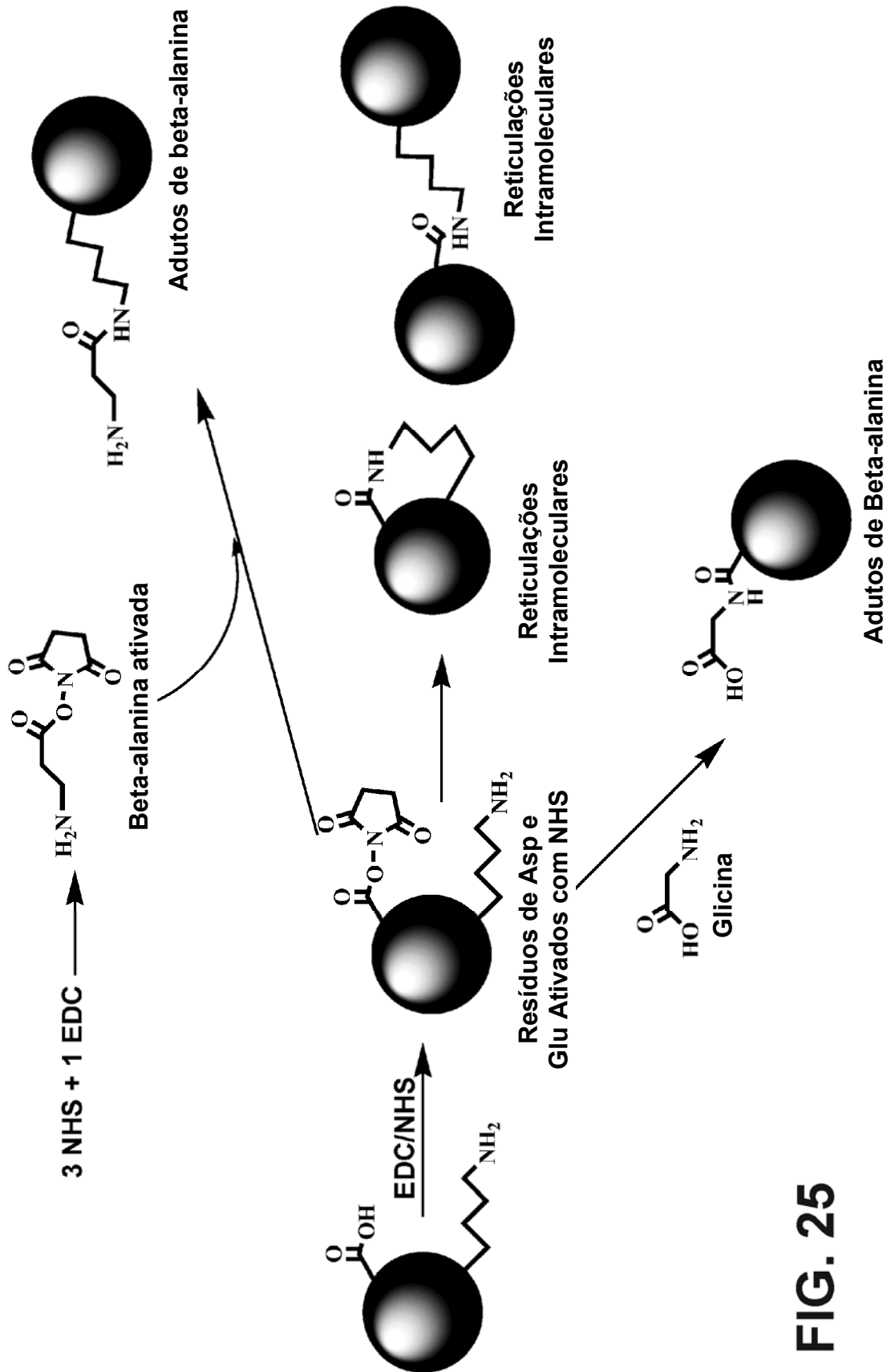


FIG. 25